



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MESSINA

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE, BIOLOGICHE,
FARMACEUTICHE ED AMBIENTALI**

DOTTORATO IN “SCIENZE CHIMICHE”

**Analisi Lipidomiche Mediante Tecniche Cromatografiche
Accoppiate alla Spettrometria di Massa per la
Valutazione dello Stato di Salute dei Pazienti**

PhD Thesis of:
Chiara Buzzanca

Tutor:
Prof. Luigi Mondello

Co-tutor:
Dott. Giuseppe Micalizzi

Coordinator:
Prof.ssa Concetta De Stefano

CICLO XXXVII – A.A. 2023/2024 – SSD CHIM/01

Abstract	1
Capitolo 1: Introduzione alla lipidomica: dalle strutture molecolari alla biosintesi e metabolismo dei lipidi	3
1.1 Introduzione alle scienze omiche	3
1.2 La lipidomica	5
1.3 Classificazione dei lipidi	10
1.3.1 Gli acidi grassi	12
1.3.2 Acilgliceroli	29
1.3.3 Fosfolipidi.....	32
1.3.4 Gli steroli	37
1.3.5 I glicolipidi	43
1.3.6 Glicosfingolipidi	45
1.3.7 Le cere	49
1.4 Biosintesi e metabolismo dei lipidi	50
1.4.1 Biosintesi dei Lipidi	50
1.4.2 Metabolismo dei Lipidi	54
1.5 Implicazioni Cliniche e Prospettive Future	56
Capitolo 2: Lipidi e salute	73
2.1. Dai tempi antichi ad oggi	73
2.2 Raccomandazioni nutrizionali dei lipidi	75
2.3 Raccomandazioni nutrizionali sugli acidi grassi saturi	81
2.4 Raccomandazioni nutrizionali sugli acidi grassi trans	84
2.5 Raccomandazioni nutrizionali sugli acidi grassi monoinsaturi	89
2.6 Raccomandazioni nutrizionali sugli acidi grassi polinsaturi	91
2.7 Carenze nutrizionali dei lipidi e impatto sulla salute umana	93

2.7.1 Ruolo dei lipidi nel sistema immunitario	94
2.7.2 Problemi cutanei associati alla carenza di lipidi	96
2.7.3 Compromissione della funzione cerebrale associata alla carenza dei lipidi	98
2.7.4 Impatti metabolici ed energetici della carenza dei lipidi	100
2.7.5 Carenza dei lipidi e impatto cardiovascolare	105
2.8 Lipidi e obesità: impatto sulla salute	108
2.9 Dieta Mediterranea	116
Capitolo 3: La vitamina D, una molecola chiave per la salute	131
3.1 Introduzione alle vitamine	131
3.2 Storia della vitamina D	132
3.3 Contenuto della vitamina D negli alimenti	135
3.4 Il metabolismo della vitamina D	137
3.5 Le funzioni della vitamina D nell'uomo	139
3.6 Deficit, integrazione e tossicità	142
3.7 Attività dei vari metaboliti	146
3.8 Alcune considerazioni sul ruolo essenziale della vitamina D	148
Capitolo 4: Analisi lipidomica	155
4.1 Trattamenti del campione per l'analisi dei lipidi	156
4.1.1 Metodo di estrazione di Folch	156
4.1.2 Metodo di Bligh e Dyer	157
4.1.4 Metodo MTBE	158
4.1.4 Metodo BUME	159
4.1.5 Preparazione dei derivati esterei degli acidi grassi per l'analisi GC ..	160

4.1.6	Transesterificazione catalizzata da acidi	160
4.1.7	Transesterificazione catalizzata da basi	162
4.1.8	Procedure di derivatizzazione-estrazione diretta	163
4.2	Metodi di separazione per l'analisi dei lipidi	164
4.2.1	Analisi gascromatografica dei lipidi	172
4.2.2	Analisi HPLC dei lipidi	190
Capitolo 5: Spettrometria di massa e lipidomica		209
5.1	Principi fondamentali della spettrometria di massa	209
5.1.1	Sorgenti ioniche nella spettrometria di massa	213
5.1.2	Ionizzazione elettronica in lipidomica	214
5.1.3	Ionizzazione chimica dei composti lipidici	216
5.1.4	Ionizzazione elettrospray (ESI) nell'analisi dei lipidi	216
5.1.5	Ionizzazione/fotoionizzazione chimica a pressione atmosferica per l'analisi dei lipidi	219
5.2	Gli analizzatori in spettrometria MS	222
5.2.1	Spettrometri di massa a quadrupolo	224
5.2.2	Spettrometri di massa a triplo quadrupolo	226
5.2.3	Spettrometri di massa a trappola ionica	228
5.2.4	Spettrometri a tempo di volo (ToF)	230
Capitolo 6: Estrazione di oli dai semi di cactus tramite fluidi supercritici		241
6.1	Introduzione	241
6.2	Materiali e metodi	244
6.2.1	Reagenti	244
6.2.2	Preparazione dei campioni	244

6.2.3 Estrazione dell'olio con fluidi supercritici (SFE).....	244
6.2.4 Estrazione dell'olio tramite tecnica Soxhlet	245
6.2.5 Analisi GC-MS e GC-FID degli acidi grassi	245
6.2.6 Determinazione della composizione dei trigliceridi tramite analisi HPLC-MS	247
6.2.7 Analisi Statistica	248
6.3 Risultati e Discussioni	248
6.3.1 Resa dell'olio dei semi di Opuntia	248
6.3.2 Composizione degli acidi grassi	250
6.3.3 Analisi HPLC/MS dei lipidi intatti	255
6.4 Conclusioni	263
Capitolo 7: Sviluppo di un metodo GC-MS/MS per l'analisi della vitamina D nel siero	269
7.1 Introduzione	269
7.2 Materiali e metodi	273
7.2.1 Standard e reagenti	273
7.2.2 Ottimizzazione delle procedure di sililazione	274
7.2.3 Preparazione del campione per l'analisi GC-QqQ-MS	275
7.2.4 Analisi fast GC-QqQ-MS della vitamina D	276
7.2.5 Calibrazione e validazione del metodo	276
7.3 Risultati e discussione	278
7.3.1 Ottimizzazione della procedura di sililazione	278
7.3.2 GC-QqQ-MS analisi sotto condizioni di ionizzazione elettronica soft...281	
7.3.3 Validazione del metodo.....	288
7.4 Conclusioni	294

Capitolo 8: Determinazione degli acidi grassi a catena corta nel plasma umano	300
8.1 Introduzione	300
8.2 Materiali e metodi	302
8.2.1 Standard e reagenti	302
8.2.2 Estrazione degli SCFAs dal plasma umano	302
8.2.3 Validazione e quantificazione degli SCFAs in plasma umano	303
8.2.4 Analisi GC-MS degli SCFAs	304
8.3 Risultati e discussione	305
8.3.1 Analisi fast GC-MS per la quantificazione degli SCFAs nel plasma umano	305
8.4 Conclusioni	308

Abstract

The study of all lipids in a biological system, known as lipidome, is defined with the term “lipidomics, and it has assumed between the scientists considerable importance and attention in the last decades. Lipid samples from biological matrices are complex mixtures that require the use of appropriate sample treatments and chromatographic techniques for the separation of targeted and untargeted species in order to provide accurate identification and quantification. Lipids in their native form are usually analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC). However, lipid compounds can also be studied in term of fatty acids, previous their conversion in specific derivatives, using gas chromatography techniques (GC). Almost all the techniques of chromatography involve the employment of the mass spectrometry (MS) due to the recent advances in this field and different types of instruments available on the market.

The present PhD. thesis is placed into the lipidomics context, and it has consisted in the development of rapid, greener, and alternative analytical techniques, and improvement of the established methods, for the characterization of complex lipid matrices. In detail, my research consisted in the development of a supercritical fluid extraction (SFE) strategy to produce oil from vegetable seeds such as *Opuntia ficus-indica* seeds. In addition, the research provided the optimization of a *fast* GC tandem mass spectrometry (MS/MS) under milder electron ionization conditions for the monitoring of vitamin D levels in human serum, as alternative procedure to conventional HPLC methods, Finally, a rapid and practicable fast GC-MS technique was developed for the measurement of short-chain fatty acids, including acetic, propionic, and butyric acids, in human plasma.

Pagina lasciata intenzionalmente bianca

Capitolo 1

Introduzione alla lipidomica: dalle strutture molecolari alla biosintesi e metabolismo dei lipidi

1.1 Introduzione alle scienze omiche

Le scienze omiche rappresentano l'insieme delle discipline biomolecolari che si occupano dello studio globale di vari insiemi molecolari all'interno dei sistemi biologici. Queste discipline utilizzano tecnologie avanzate per analizzare in modo sistemico le informazioni biologiche su larga scala, con l'obiettivo di comprendere meglio i processi complessi che stanno alla base dei processi fisiologici e patologici. Le principali scienze omiche includono le seguenti discipline: genomica, trascrittomica, proteomica, e infine metabolomica. La disciplina che studia l'intero patrimonio genetico di un organismo, ovvero il suo genoma, è definita genomica ed ha consentito di mappare e analizzare i genomi di numerosi organismi negli ultimi anni, fornendo informazioni utili sulla struttura, funzione ed evoluzione dei geni. La genomica ha portato quindi a sorprendenti cambiamenti della biologia, aprendo nuove frontiere nel campo della genetica delle malattie, della biotecnologia e della medicina personalizzata [1, 2]. All'interno delle principali scienze omiche vi è la transcriptomica, la disciplina che si occupa dello studio degli RNA messaggeri (mRNA) prodotti dalle cellule di un organismo in un determinato momento, noto come transcriptoma [3]. Questa disciplina ambisce a comprendere i modelli di espressione genica e come questi variano nelle differenti condizioni fisiologiche, sviluppi, e risposte a fattori esterni. La transcriptomica fornisce una visione dettagliata della regolazione genica, consentendo di identificare i meccanismi molecolari alla base delle malattie e delle risposte cellulari agli stimoli. Altra disciplina tra le scienze omiche è rappresentata dalla proteomica che studia

l'insieme completo delle proteine espresse da un organismo, un tessuto, o una cellula in un determinato momento, noto come proteoma. Le proteine svolgono una vasta gamma di funzioni cellulari, incluso il trasporto di molecole, la catalisi di reazioni chimiche, la traduzione del segnale e la regolazione dell'espressione genica. La proteomica ricorre all'utilizzo di tecniche analitiche avanzate come la spettrometria di massa e la cromatografia liquida per identificare e quantificare le proteine, nonché per analizzare le loro modificazioni post-traduzionali e le interazioni [4-14]. Questa disciplina è fondamentale per comprendere la funzionalità delle proteine e il loro ruolo nelle malattie. La metabolomica studia invece i metaboliti, incluse piccole molecole prodotte e utilizzate nelle reazioni metaboliche cellulari. Questi metaboliti comprendono aminoacidi, acidi grassi, zuccheri e nucleotidi. La metabolomica fornisce quindi informazioni dettagliate dello stato metabolico di una cellula o di un organismo, utilizzando tecniche analitiche avanzate come la spettroscopia NMR oppure la spettrometria di massa [5]. L'analisi metabolomica è fondamentale per comprendere il metabolismo e la sua regolazione, nonché per identificare i biomarcatori di malattie e risposte terapeutiche.

Il focus della presente tesi di dottorato è la lipidomica, una delle branche della metabolomica che studia l'insieme dei lipidi presenti in un sistema biologico noto come lipidoma. Questa disciplina è di fondamentale importanza per comprendere il ruolo dei lipidi nei processi fisiologici e patologici, offrendo nuove opportunità per la diagnosi e la prevenzione delle malattie. L'integrazione delle diverse discipline omiche permette una comprensione più completa e olistica dei sistemi biologici. Combinando i dati genomici, transcriptomici, proteomici, metabolomici e lipidomici, la ricerca è in grado di identificare le interazioni tra i vari componenti

molecolari e comprendere come questi contribuiscono alla funzionalità cellulare e allo sviluppo delle malattie [15, 16]. Un tale approccio integrato è fondamentale per lo sviluppo di terapie personalizzate e per la medicina di precisione. Le scienze omiche quindi rappresentano un'importante rivoluzione nella biologia e della medicina, offrendo strumenti potenti per esplorare la complessità dei sistemi biologici.

1.2 La lipidomica

La lipidomica è una branca emergente della metabolomica, come detto in precedenza, che ha lo scopo di studiare l'intero repertorio lipidico (il lipidoma) in un determinato sistema biologico. Essa non si limita solamente allo studio della struttura dei lipidi, ma si concentra anche sulle molecole con cui esse interagiscono, con il fine ultimo di comprenderne il metabolismo e le funzioni biologiche all'interno della cellula. L'interesse dei ricercatori nei confronti dei lipidi ha assunto notevole interesse negli ultimi decenni, da quando è emersa la loro importanza in processi fisiologici vitali nell'uomo, negli animali, nelle piante e nei microrganismi. È ormai infatti dimostrato che le alterazioni del metabolismo lipidico hanno conseguenze disastrose sulla salute dell'intero organismo, in quanto favoriscono l'insorgenza di malattie come l'aterosclerosi, il diabete, l'obesità, la fibrosi cistica, l'infertilità maschile e femminile, e il morbo di Alzheimer [16-20].

Studi scientifici hanno dimostrato come le strutture lipidiche rappresentano una fonte essenziale di energia per organismi sia animali che vegetali [21-22], e risultano responsabili del mantenimento dell'integrità strutturale delle cellule, in quanto componenti principali delle membrane cellulari. Esse sono deputate alla regolazione ed alla segnalazione cellulare, seguono i cambiamenti metabolici

mantenendo la funzionalità il più costante possibile, mediante un continuo adattamento a fattori interni ed esterni. La conoscenza dettagliata dei meccanismi di interazione lipide-lipide e lipide-proteina ha elevato questa classe di molecole da mero bersaglio di enzimi a entità biologiche aventi un ruolo fondamentale nel mantenimento della salute dell'organismo.

La lipidomica, grazie all'identificazione delle diverse migliaia di specie molecolari distribuite nelle cellule e nei tessuti, permette il monitoraggio delle variazioni qualitative e quantitative dell'assetto lipidico, sia in condizioni fisiologiche che patologiche. Tutto questo è stato reso possibile grazie agli avanzamenti tecnologici nel campo della chimica analitica, specie della spettrometria di massa, permettendo la rilevazione anche di minime variazioni all'interno del lipidoma. Tali aspetti sono particolarmente importanti considerata l'enorme complessità di questa classe di composti (una cellula di mammifero può contare da 1.000 a 2.000 specie lipidiche) [23-26]. La sfida analitica consiste quindi nel riuscire a determinare il maggior numero di specie lipidiche strutturalmente diverse tra loro, presenti anche a bassissime concentrazioni, nei sistemi biologici e stabilire eventuali biomarcatori per la cura e la prevenzione di particolari patologie.

I lipidi sono sostanze che si trovano in alimenti di origine animale ma sono presenti anche nel regno vegetale; caratteristica fondamentale dei grassi è quella di essere insolubili in acqua (idrofobici) e per questo si distinguono nettamente dalle proteine e dai carboidrati. Tuttavia, esistono alcuni lipidi, per esempio i fosfolipidi, che presentano una discreta solubilità in acqua. Vista e considerata la notevole quantità di energia immagazzinata nelle loro catene idrocarburiche, e la loro unica capacità di organizzarsi in micelle o in doppi strati in ambiente acquoso, in passato si riteneva che i lipidi avessero solamente due funzioni all'interno dell'organismo:

fungere da riserva energetica e costituire la matrice strutturale delle membrane biologiche. In realtà, queste due importanti funzioni sono solamente due esempi di un'ampia gamma di ruoli fisiologici che includono anche la segnalazione intra ed intercellulare, l'ancoraggio di proteine di membrana e il mantenimento di gradienti elettrochimici [27-29]. Pertanto, i grassi alimentari sono essenziali per lo sviluppo, la crescita e il mantenimento di un buono stato di salute, oltre che contribuire all'appetibilità, al gusto e alla struttura degli alimenti.

La lipidomica rappresenta un'importante risorsa della medicina preventiva, poiché può consentire l'identificazione di biomarcatori lipidici correlati a determinate patologie. Può quindi essere utilizzata nella prevenzione di malattie cardiovascolari, neurodegenerative e metaboliche [30-33]. Ad esempio, alcuni studi di lipidomica hanno identificato numerosi tipi di lipidi bioattivi, come le ceramidi e gli sfingolipidi, che sono strettamente associati al rischio cardiovascolare [31-33]. Le ceramidi sono una classe di lipidi complessi presenti nella membrana cellulare, particolarmente abbondanti nella pelle, fondamentali nel mantenimento dell'integrità della barriera cutanea e nell'idratazione. Infatti, essi contribuiscono a formare una barriera protettiva sulla pelle che impedisce la perdita di liquidi (acqua) e protegge contro le sostanze nocive e gli eventuali patogeni. Con l'età la produzione delle ceramidi si riduce drasticamente, ciò contribuisce alla comparsa di rughe e perdita di elasticità della pelle. Per migliorare i livelli delle ceramidi nella pelle, si possono usare prodotti cosmetici e dermatologici che contengono ceramidi sintetici o derivati da fonti naturali. Inoltre, una dieta equilibrata e ricca di acidi grassi essenziali può supportare la produzione naturale delle ceramidi. Tuttavia, le ceramidi non sono importanti solo per la salute della pelle, hanno anche un ruolo significativo nella biologia cellulare e nella salute cardiovascolare. Per esempio,

studi recenti hanno dimostrato una correlazione tra i livelli delle ceramidi nel sangue e rischio di malattie cardiovascolari. Infatti, alti livelli di ceramidi promuovono l'infiammazione cronica, che rappresenta un fattore di rischio per le malattie cardiovascolari [32-33]. Inoltre, contribuiscono alla formazione di placche aterosclerotiche nelle arterie, un processo noto come aterogenesi che può restringere le arterie e aumentare il rischio di infarto e ictus [32-33]. Alti livelli di ceramidi possono essere inoltre associati a resistenza all'insulina, una condizione che può portare a diabete di tipo 2, noto fattore di rischio per le malattie cardiovascolari. Le ceramidi possono aumentare lo stress ossidativo nelle cellule endoteliali, danneggiando così i vasi sanguigni, contribuendo all'aterogenesi. Studi recenti hanno dimostrato come un dosaggio plasmatico di queste molecole potrebbe contribuire a prevenire incidenti cardiovascolari, considerando queste molecole come biomarcatori potenzialmente preziosi per valutare il rischio di malattie cardiache di un paziente. I fattori tradizionali per valutare questo rischio includono l'età, il sesso, se il paziente fuma o ha il diabete e le misurazioni di laboratorio dei lipidi come il colesterolo LDL. Tuttavia, questi indicatori non segnalano tutti coloro che sono in pericolo. Infatti, circa il 15% delle persone che soffrono di infarto non presenta alcun fattore di rischio standard [31-32]. Per ridurre i livelli delle ceramidi e il rischio cardiovascolare connesso, bisogna adottare diverse strategie, per esempio una dieta ricca di frutta, verdura, cereali integrali e grassi sani come gli acidi grassi omega-3. Praticare attività fisica regolare può migliorare la sensibilità all'insulina e quindi ridurre l'infiammazione, mentre nei casi in cui i livelli di ceramidi sono considerati un fattore di rischio significativo è possibile assumere farmaci. La ricerca continua ad oggi ad esplorare meccanismi attraverso i quali le

ceramidi influenzano la salute cardiovascolare e come queste molecole possono essere considerate target terapeutici per prevenire le malattie cardiovascolari.

Gli sfingolipidi rappresentano un'altra importante classe di lipidi bioattivi che giocano un ruolo chiave nella patogenesi dell'aterosclerosi. Studi di lipidomica hanno rivelato che alterazioni dei profili degli sfingolipidi sono predittive dello sviluppo di placche aterosclerotiche [31]. Quindi l'identificazione di questi biomarcatori può facilitare la diagnosi precoce e la prevenzione dell'aterosclerosi.

Alterazioni del metabolismo lipidico sono state riscontrate anche in differenti patologie neurodegenerative come il morbo di Alzheimer [30] e il morbo di Parkinson [34-35]. Ad esempio, nella malattia di Alzheimer sono state osservate alterazioni significative nei livelli di fosfolipidi e gangliosidi. Dati di letteratura hanno dimostrato come la lipidomica è in grado di determinare specifici profili medici associati a diverse fasi della malattia, suggerendo nuovi biomarcatori per la diagnosi precoce e monitoraggio della malattia. Anche nel morbo di Parkinson, alcuni studi di lipidomica hanno evidenziato cambiamenti nei livelli degli acidi grassi e colesterolo [34-35]. Queste alterazioni possono influenzare la funzione sinaptica e la neuroinfiammazione, offrendo nuovi spunti per strategie preventive e terapeutiche. Ancora, le malattie metaboliche come il diabete di tipo 2 e l'obesità, sono strettamente legate a disfunzioni del metabolismo lipidico. La lipidomica può aiutare a identificare i meccanismi molecolari alla base di queste condizioni e sviluppare interventi preventivi efficaci. Nel diabete di tipo 2, sono stati osservati cambiamenti nei profili degli acidi grassi e dei glicerolipidi. Specifici lipidi possono servire come biomarcatori per la resistenza all'insulina e il rischio di sviluppare il diabete, facilitando la diagnosi precoce e la prevenzione. Anche l'obesità è associata a un cambiamento complesso del lipidoma, con alterazioni dei livelli di

vari lipidi, inclusi i trigliceridi e i fosfolipidi. Questi cambiamenti possono influenzare il metabolismo energetico e la segnalazione infiammatoria, offrendo target per interventi preventivi.

Sulla base delle premesse fin qui descritte, è possibile affermare come la lipidomica rappresenta una frontiera promettente soprattutto nella cura e prevenzione di molteplici patologie. Le sue numerose applicazioni nella diagnosi precoce e nel monitoraggio di patologie cardiovascolari, neurodegenerative e metaboliche offrono nuove opportunità per interventi preventivi mirati e il futuro della medicina preventiva sarà sempre più influenzato da questa disciplina innovativa.

1.3 Classificazione dei lipidi

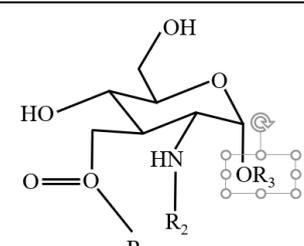
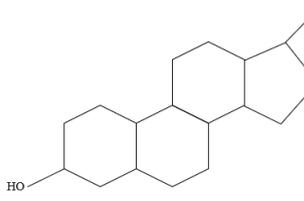
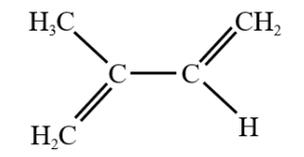
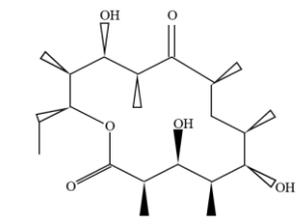
I lipidi, comunemente noti come grassi, sono una classe di composti organici costituiti da catene alifatiche la cui scarsa polarità dei legami si riflette nella caratteristica solubilità in solventi apolari ma non in fase acquosa. I lipidi sono classificati generalmente in otto categorie in base alla loro struttura chimica e alle loro funzioni biologiche come di seguito indicato: acidi grassi, glicerolipidi, glicerofosfolipidi, sfingolipidi, glicolipidi o saccarolipidi, steroidi, isoprenoidi e polichetidi [23, 25, 36-37]. Le formule di struttura generiche o di molecole rappresentative di questi otto tipi di lipidi, assieme alle caratteristiche e alle funzioni principali, sono indicate in Tabella 1.1.

In base alla loro capacità di formare saponi attraverso il processo di saponificazione, le molecole lipidiche vengono anche classificate in lipidi saponificabili (acidi grassi, glicerolipidi, glicerofosfolipidi, sfingolipidi e glicolipidi) e lipidi non saponificabili (steroidi, isoprenoidi e polichetidi). Nei primi

una reazione di idrolisi determina la rottura di un legame estereo per aggiunta di una soluzione alcalina (idrossido di sodio oppure di potassio) e formazione di un alcool e sale metallo-alcalino dell'acido carbossilico, mentre i secondi che non contengono molecole di acidi grassi non sono idrolizzabili [23, 36-38].

Tabella 1.1 Classificazione dei lipidi, strutture, caratteristiche e loro funzioni.

Categoria	Struttura	Caratteristiche	Funzioni
Acidi grassi	R-COOH	Acidi carbossilici con catena laterale R di lunghezza variabile	Costituenti delle principali classi dei lipidi
Glicerolipidi o triacilgliceroli o trigliceridi	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{C} - \text{OCOR}_1 \\ \\ \text{HC} - \text{OCOR}_2 \\ \\ \text{H}_2\text{C} - \text{OCOR}_3 \end{array}$	Triesteri del glicerolo non polari insolubili in acqua	Costituenti dei grassi e oli, fungono da riserva energetica accumulando si negli adipociti, proteggono nei confronti di traumi e variazioni di temperatura
Glicerofosfolipi di o Fosfogliceridi	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{C} - \text{OCOR}_1 \\ \\ \text{HC} - \text{OCOR}_2 \\ \\ \text{H}_2\text{C} - \text{O} - \text{P} \begin{array}{l} \nearrow \text{OH} \\ \searrow \text{OR} \\ \downarrow \text{O} \end{array} \end{array}$	Costituiti da glicerolo-3-fosfato, le cui posizioni C1 e C2 sono esterificate con acidi grassi, sono molecole anfipatiche dotate di code apolari idrofobe e teste polari idrofile	Principali costituenti del doppio strato lipidico delle membrane biologiche, mediano i segnali biochimici comportando si da messaggeri di membrana
Sfingolipidi	$\begin{array}{c} \text{OR}_1 \quad \text{OH} \\ \quad \\ \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{CH} - \text{C}_{12}\text{H}_{27} \\ \quad \\ \text{N} \quad \text{R}_2 \end{array}$	Derivano dalla sfingosina amminoalcol a 18 atomi di carbonio; si suddividono in sfingomieline, cerebrosidi e gangliosidi	Costituenti delle membrane cellulari; fonti per la produzione di lipidi più piccoli

Glicolipidi o saccarolipidi		Al gruppo COO ⁻ dell'acido grasso è direttamente connessa una molecola di uno zucchero	Costituenti delle membrane cellulari
Steroidi		Derivati del ciclopentanoperidofenantrene, costituito da quattro anelli non planari fusi	Costituenti delle membrane plasmatiche; fungono da ormoni e da molecole-segnale; sono i precursori degli acidi biliari
Isoprenoidi o terpenoidi		Costituiti da unità a cinque atomi di carbonio con il medesimo scheletro molecolare dell'isoprene	Fungono da pigmenti, ormoni, vitamine liposolubili, antiossidanti e agenti di difesa
Polichetidi	 6-deossieritronolide B	Sono lattoni macrociclici tensionati costituiti da un numero di atomi di carbonio variabile da 14 a 40 o da sistemi complessi di anelli aromatici	Utilizzati come agenti antimicrobici, antiparassitari e anticancro; alcuni sono delle potenti tossine

Da un punto di vista biologico e quindi in base alle funzioni che essi svolgono all'interno dei sistemi biologici, i lipidi vengono classificati in lipidi di riserva, per esempio i trigliceridi che accumulandosi negli adipociti, forniscono energia chimica, in lipidi strutturali come i fosfolipidi che costituiscono le membrane biologiche, e infine in lipidi regolatori che sono precursori di ormoni e vitamine liposolubili.

1.3.1 Gli acidi grassi

Gli acidi grassi sono acidi carbossilici contenenti un numero variabile di atomi di carbonio, generalmente un numero pari. Essi sono i componenti comuni dei lipidi

complessi, nei quali sono presenti attraverso un legame estereo con alcoli di vario genere, ad esempio glicerolo, sfingosina, e steroli. Chimicamente sono costituiti da una catena alifatica con un gruppo carbossilico ad un'estremità (-COOH), e un gruppo metilico (CH₃) nell'altra estremità. La presenza del gruppo carbossilico all'estremità della catena idrocarburica rende queste molecole anfipatiche; le più diffuse in natura sono le specie a 16 e 18 atomi di carbonio. Gli acidi grassi con catene fino a otto atomi di carbonio sono tutti idrosolubili; dimensioni maggiori della catena idrocarburica rendono invece gli acidi grassi pressoché insolubili in acqua [23, 39-41]. A seconda del grado di insaturazione della catena idrocarburica, gli acidi grassi sono classificati in saturi (SFAs, *saturated fatty acids*) o insaturi (UFAs, *unsaturated fatty acids*). In aggiunta, gli acidi grassi insaturi sono suddivisi in monoinsaturi, generalmente definiti come MUFAs (*monounsaturated fatty acids*) caratterizzati da un solo doppio legame lungo la catena carboniosa, oppure polinsaturi o PUFAs (*polyunsaturated fatty acids*) con almeno due o più doppi legami separati da gruppi metilenici. In Figura 1.1 sono riportati alcuni esempi di strutture chimiche degli acidi grassi saturi, monoinsaturi e polinsaturi appena descritti.

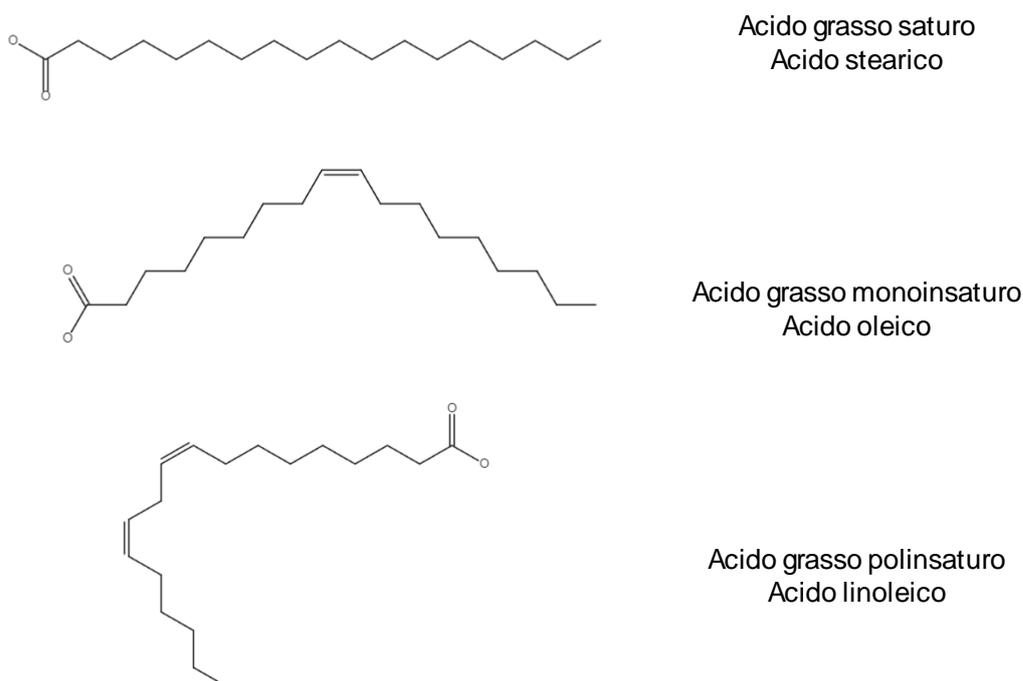


Figure 1.1 Strutture chimiche degli acidi grassi stearico (SFA), oleico (MUFA) e linoleico (PUFA).

La presenza di un doppio legame lungo la catena carboniosa dell'acido grasso genera inoltre una condizione di isomeria *cis-trans* e quindi esistono due varianti per ogni grado di insaturazione come raffigurato in Figura 1.2. Gli isomeri *cis*, più abbondanti nei grassi animali e vegetali, sono caratterizzati da un angolo rigido all'interno della catena idrocarburica che si traduce in un impacchettamento lasso e meno compatto rispetto agli acidi grassi saturi [23, 39-41]. La configurazione di tipo *trans*, si ottiene in genere a seguito di trasformazioni tecnologiche e industriali a carico degli acidi grassi *cis*, per esempio il processo di lavorazione della margarina che prevede una reazione di idrogenazione dei doppi legami con formazione di isomeri *trans*. La configurazione strutturale di tipo *trans* determina un andamento lineare della struttura molecolare dell'acido grasso con conseguente impacchettamento stretto e compatto, tipico dei grassi insaturi naturali. Questa distinzione è fondamentale dal punto di vista nutrizionale perché le forme *cis*

vengono rapidamente metabolizzate, mentre le *trans* subiscono un processo metabolico più lento.

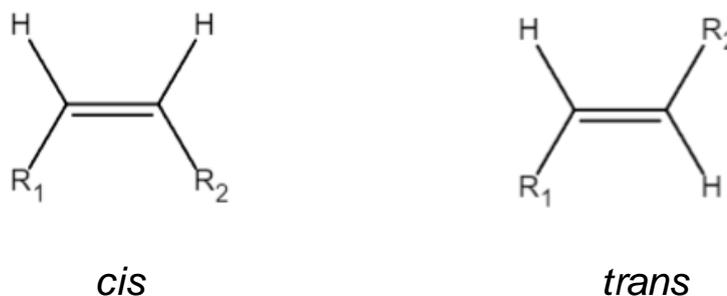


Figura 1.2. Configurazione *cis/trans* di un doppio legame distribuito lungo la catena carboniosa di un doppio legame.

Gli acidi grassi con un numero di atomi di carbonio inferiore a 6 unità sono generalmente classificati con l'acronimo di SCFAs (*short-chain fatty acids*), cioè acidi grassi a catena corta. Quando il numero degli atomi di carbonio dell'acido grasso è compreso tra 6 e 12 unità, il composto è classificato come MCFAs (*medium-chain fatty acids*) oppure acido grasso a catena media; sono classificati come acidi grassi a catena lunga o LCFAs (*long-chain fatty acids*), quei composti con più di 12 atomi di carbonio.

Nel mondo animale prevalgono gli acidi grassi saturi a 16 e 18 atomi di carbonio denominati acido palmitico e acido stearico, rispettivamente. Gli acidi grassi insaturi, invece, si trovano prevalentemente negli oli vegetali e grassi animali provenienti da specie che vivono a basse temperature. Tra questi, il più diffuso è sicuramente l'acido oleico con 18 atomi di carbonio lungo la sua catena carboniosa e un solo doppio legame localizzato in posizione 9 della catena acilica (C18:1 ω 9); tra i PUFAs più diffusi vi sono gli acidi linoleico (C18:2 ω 6) e il linolenico

(C18:3 ω 3) con 18 atomi di carbonio, 2 e 3 doppi legami lungo la catena carboniosa, rispettivamente. A differenza del regno terrestre in cui i lipidi presentano all'interno delle loro strutture acidi grassi con 16 e 18 atomi di carbonio, il regno marino è particolarmente ricco di acidi grassi con 20 e 22 atomi di carbonio come l'acido eicosapentaenoico (C20:5 ω 3) e docosaesanoico (C22:6 ω 3).

La nomenclatura degli acidi grassi prevede l'impiego di due differenti sistemi: IUPAC e sistematica. Mentre la nomenclatura IUPAC utilizza il nome dell'alcano corrispondente (per esempio pentano) e sostituisce il suffisso -ano con la parola -oico (per esempio, acido pentanoico), la nomenclatura sistematica utilizza i nomi comuni degli acidi grassi (per esempio acido valerico). Per indicare l'eventuale presenza di un doppio legame lungo la catena carboniosa dell'acido grasso, è possibile impiegare in maniera indistinta la nomenclatura " Δ " che indica la posizione del doppio legame iniziando a contare il numero degli atomi di carbonio a partire dall'estremità carbossilica (per esempio, acido *cis,cis*- Δ^9,Δ^{12} octadecadienoico), oppure la nomenclatura "*n*- ω " che invece identifica la posizione solo del primo doppio legame lungo la catena carboniosa contando il numero degli atomi di carbonio a partire dalla porzione terminale della molecola (C18:2 ω 6). In Tabella 1.2 è riportata una lista dei più comuni acidi grassi riportati in letteratura e loro rispettive nomenclature IUPAC e sistematiche.

Tabella 1.2. Lista di alcuni acidi grassi e loro nomenclature (IUPAC e sistematica) riportati comunemente in letteratura

NOMENCLATURA IUPAC	NOMENCLATURA SEMPLIFICATA	NOMENCLATURA SISTEMATICA
Acido metanoico	C1:0	Acido formico
Acido etanoico	C2:0	Acido actico
Acido propanoico	C3:0	Acido propinico
Acido butanoico	C4:0	Acido butirrico
Acido pentanoico	C5:0	Acido valerico
Acido esanoico	C6:0	Acido caproico

Acido eptanoico	C:7	Acido enantico
Acido ottanoico	C:8	Acido caprilico
Acido nonanoico	C9:0	Acido pelargonico
Acido decanoico	C10:0	Acido caprico
Acido undecanoico	C11:0	Acido undecilico
Acido dodecanoico	C12:0	Acido laurico
Acido tridecanoico	C13:0	Acido tridecanoico
Acido tetradecanoico	C14:0	Acido miristico
Acido cis-9-tetradecanoico	C14:1n5	Acido miristoleico
Acido pentadecanoico	C15:0	Acido pentadecanoico
Acido cis-10 pentadecanoico	C15:1n5	Acido esadecanoico
Acido esadecanoico	C16:0	Acido palmitico
Acido cis- 9-esadecanoico	C16:1n7	Acido palmitoleico
Acido cis,cis- 5,8-esadecanoico	C16:2n7	Acido 7-palmitoleico; acido ipogeico
Acido eptadecanoico	C17:0	Acido margarico
Acido cis-10-eptadecanoico	C17:1n7	Acido margaroleico
Acido ottadecanoico	C18:0	Acido stearico
Acido cis-9-ottadecanoico	C18:1n9	Acido oleico
Acido cis-11-ottadecanoico	C18:1n7	Acido vaccenico
Acido cis, cis- 9,12- octadecadienoico	C18:2n6	Acido linoleico
Acido cis, cis, cis-3,9,12-ottadecatrienoico	C18:3n6	Acido linoleico
Acido cis, cis, cis- 9,12,15-octadecatrienoico	C18:3n3	Acido linolenico
Acido nonadecanoico	C19:0	Acido nonadecilico
Acido eicosanoico	C20:0	Acido arachidonico
Acido cis-11-eicosanoico	C20:1n9	Acido gondoico
Acido 11,14- eicosadienoico	C20:2n6	Acido eicosadienoico
Acido 8,11,14- eicosatrenoico	C20:3n6	Acido diomo-linolenico
Acido 5,8,11,14- eicosatetraenoico	C20:4n6	Acido arachidonico
Acido cis-11,14,17-eicosatrienoico	C20:3n3	Acido 11-14-17-eicosatrienoico
Acido cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenoico	C20:5n3	Acido eicosapentaenoico (EPA)
Acido eneicosanoico	C21:0	Acido einecosilico
Acido docosanoico	C22:0	Acido beenico
Acido cis-13-docosanoico	C22:1n9	Acido erucico
Acido cis-4,7,10,13,16,19-docosaesaenoico	C22:6n3	Acido docosaesaenoico (DHA)
Acido tricosanoico	C23:0	Acido tricosilico
Acido tetracosanoico	C24:0	Acido lignocerico
Acido cis-15- tetracosanoico	C24:1n9	Acido nervonico

Gli acidi grassi saturi sono una classe di composti organici caratterizzati dall'assenza di doppi legami tra gli atomi di carbonio della loro catena alifatica. Questa saturazione conferisce loro proprietà fisiche e chimiche specifiche che li distinguono dagli acidi grassi insaturi. Acidi grassi saturi hanno la formula generale $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$, dove n varia a seconda della lunghezza della catena carboniosa. La mancanza di doppi legami porta una struttura lineare e flessibile che

facilita l'impacchettamento delle molecole, rendendo questi acidi grassi solidi a temperatura ambiente se la catena è abbastanza lunga. La nomenclatura degli acidi grassi saturi segue le convenzioni IUPAC, alcuni esempi di acidi grassi saturi comuni includono: l'acido butirrico (C4:0) trovato per esempio nel burro, oppure l'acido palmitico (C16:0) presente soprattutto nell'olio di palma e nei grassi animali [42]; l'acido stearico (C18:0) è comune nel burro di cacao e nei grassi animali. Per quanto riguarda le proprietà fisiche e chimiche degli acidi grassi saturi, questi presentano punti di fusione che aumentano con la lunghezza della catena carboniosa, ciò è dovuto alle forze di *Van der Waals* tra le catene lineari; per esempio, l'acido stearico ha un punto di fusione di 69,6 °C, mentre l'acido butirrico fonde a circa -5 °C. Inoltre, gli acidi grassi saturi sono più stabili rispetto agli omologhi acidi grassi insaturi perché non avendo doppi legami, sono meno suscettibili a reazioni di ossidazione. Gli acidi grassi saturi sono presenti in varie fonti alimentari che includono: carne, burro, latte e formaggi mentre le fonti vegetali includono l'olio di cocco e l'olio di palma; la distribuzione degli acidi grassi saturi può variare significativamente tra le diverse fonti alimentari. Gli acidi grassi saturi sono un'importante fonte di energia, sono metabolizzati all'interno dei mitocondri delle cellule tramite la beta ossidazione, producendo acetyl-CoA, che entra nel ciclo dell'acido citrico per produrre ATP. Il consumo eccessivo di acidi grassi saturi è stato associato a un aumento del rischio di malattie cardiovascolari, gli studi hanno infatti dimostrato che elevati livelli di acidi grassi saturi nella dieta possono aumentare i livelli di colesterolo LDL (lipoproteine a bassa densità) nel sangue, uno dei fattori di rischio per l'aterosclerosi. I grassi saturi trovano diverse applicazioni nell'industria alimentare, cosmetica e farmaceutica. Vengono utilizzati nella produzione di margarina, saponi, cosmetici e come intermedi chimici per la sintesi

di altri composti organici. Il loro impatto sulla salute umana richiede una gestione attenta del loro consumo nella dieta. Studi futuri potrebbero approfondire ulteriormente i meccanismi attraverso i quali gli acidi grassi saturi influenzano la salute cardiovascolare e sviluppare strategie per mitigare i loro effetti negativi [7-8, 26, 43].

Gli acidi grassi monoinsaturi, cosiddetti MUFAs, sono contraddistinti dalla presenza di un solo doppio legame lungo la catena carboniosa che conferisce loro particolari proprietà chimiche e fisiche. Infatti, il doppio legame è generalmente presente in natura in configurazione *cis*, il che crea una piega nella molecola riducendo la capacità delle molecole di impilarsi strettamente e abbassando così il punto di fusione rispetto al corrispondente acido grasso saturo. I MUFAs hanno una catena carboniosa che varia in natura solitamente dai 10 ai 22 atomi di carbonio. Tra i più comuni MUFAs, troviamo sicuramente l'acido oleico (C18:1 ω 9) appartenente alla famiglia degli acidi grassi omega-9, ossia la fonte alimentare più ricca è rappresentativa dall'olio d'oliva. L'acido oleico presenta degli effetti benefici a carico del sistema cardiovascolare; infatti, è stato dimostrato il suo coinvolgimento nel mantenimento dei livelli normali del colesterolo nel sangue ed in particolare dei livelli del colesterolo LDL, e di ridurre i valori della pressione arteriosa. L'Autorità europea per la sicurezza alimentare (EFSA), ha infatti autorizzato l'impiego di prodotti a base di acido oleico con l'indicazione del mantenimento nella normalità dei livelli di colesterolo; l'Autorità europea precisa, infatti, che “la sostituzione dei grassi saturi nella dieta con grassi insaturi come l'acido oleico contribuisce al mantenimento dei normali livelli di colesterolo nel sangue” [44]. Anche la frutta secca, ed in particolare le noci e le nocciole, così come i semi di girasole sono buone fonti di MUFA.

Tuttavia, non tutti i MUFAs hanno effetti benefici per la salute. Infatti, esistono in natura alcuni acidi grassi che sono considerati nocivi per la salute dell'uomo, come l'acido erucico, oggetto di preoccupazione a causa dei suoi effetti negativi, specialmente se assunto in alte concentrazioni. Studi sugli animali hanno dimostrato che alti livelli di acido erucico possono causare accumulo di grasso nel muscolo cardiaco portando a cardiomiopatia lipidosica che può compromettere la funzionalità cardiaca [45]. L'acido erucico può inoltre interferire, con il metabolismo lipidico e provocare un aumento dei livelli dei lipidi nel sangue, che a lungo andare causano problemi cardiovascolari [45]. Anche se gli studi sugli animali indicano potenziali rischi, gli effetti diretti sugli esseri umani non sono completamente stati chiariti. Tuttavia, la commissione europea ha fissato un limite massimo di acido erucico negli alimenti per ridurre i potenziali rischi sulla salute: il limite massimo di acido erucico negli oli vegetali e nei grassi è del 5% del totale degli acidi grassi, mentre negli Stati Uniti la FDA limita il contenuto di acido erucico negli oli di colza a un massimo del 2% del totale degli acidi grassi. Anche se l'acido erucico ha applicazioni industriali e si trova in varie fonti alimentari, la preoccupazione per i suoi potenziali effetti negativi sulla salute ha portato a regolamentazioni rigorose per limitarne l'assunzione. La ricerca continua ad oggi a studiare gli effetti a lungo tempo sull'uomo per garantire la sicurezza alimentare. Gli acidi grassi MUFA rappresentano un'importante classe di lipidi con significativi benefici per la salute e numerose applicazioni industriali. La comprensione delle loro proprietà chimiche, fonti alimentari, e ruolo biologico è essenziale per sfruttare appieno il loro potenziale nelle scienze della salute e nelle tecnologie alimentari [44-46].

Gli acidi grassi polinsaturi sono importanti da un punto di vista nutrizionale poiché l'organismo umano non è in grado di sintetizzarli a causa dell'assenza di due enzimi chiave ($\Delta 12$ desaturasi e $\Delta 15$ desaturasi) presenti invece nei vegetali. Pertanto, è necessario assumerli con la dieta e per questa ragione sono anche definiti come acidi grassi essenziali o semplicemente EFAs (*essential fatty acids*). Esempi di acidi grassi essenziali sono l'acido α -linolenico (C18:3 ω 3) e l'acido linoleico (C18:2 ω 6), rispettivamente precursori degli acidi grassi della serie ω -3 e ω -6 come raffigurato in Figura 1.3. L'acido α -linoleico e l'acido linoleico, sono fondamentali per il nostro organismo e la loro carenza provoca modificazioni dello stato di salute e rallentamenti nello sviluppo e crescita. L'acido α -linolenico è il precursore della serie ω -3 che, attraverso una serie di reazioni enzimatiche come l'allungamento e la desaturazione della catena carboniosa porta alla formazione di due importanti ed essenziali acidi grassi come l'acido eicosapentaenoico (EPA, C20:5 ω 3) e acido docosaesanoico (DHA, C22:6 ω 3). Ne sono particolarmente ricchi gli alimenti di origine marina. Alti livelli di EPA e DHA riducono il rischio di malattie cardiovascolari, ipertensione e infarto [47-50]; sono inoltre importanti per lo sviluppo della retina e della crescita fetale e neonatale [51], per questo vengono utilizzati nella formulazione di integratori per le future neomamme durante la gravidanza e l'allattamento.

GLI ACIDI GRASSI ESSENZIALI

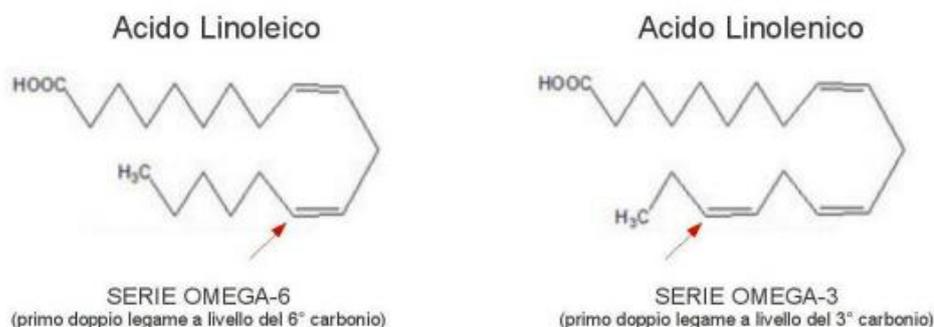


Figura 1.3. Struttura molecolare degli acidi linoleico e α -linolenico, precursori degli acidi grassi della serie ω -6 e ω -3, rispettivamente.

Le più comuni fonti di C18:3 ω 3 sono vegetali a foglia verde (spinaci), legumi, frutta secca, oli vegetali quali l'olio di lino e l'olio di soia. Invece, il capostipite della famiglia ω -6 è l'acido linoleico da cui hanno origine gli acidi γ -linoleico (C18:3 ω 6) e acido arachidonico (C20:4 ω 6), riscontrabili principalmente negli oli vegetali. Sono coinvolti nel processo infiammatorio, nell'immunità e nel funzionamento del sistema nervoso centrale.

I primi derivati degli acidi grassi essenziali furono denominati "prostaglandine" poiché furono rivelati in piccole quantità nel liquido prostatico e nella prostata. Successivamente è stato evidenziato che tutte le cellule contengono gli acidi grassi essenziali e che i tessuti nervosi ne sono particolarmente ricchi. Infatti, oltre il 60% del peso del cervello è costituito da PUFAs, in particolare ω -3 [52]. In tale organo, l'acido grasso prevalente è il DHA e concentrazioni molto elevate si trovano anche nella retina e nelle sinapsi. Il DHA svolge un ruolo centrale per il funzionamento delle sinapsi, per la trasmissione dell'impulso nervoso, della retina, per ricevere gli stimoli visivi; è essenziale al funzionamento dei mitocondri, per produrre ATP,

sostanza chimica energetica vitale prodotta non solo nelle cellule nervose cerebrali. A livello del sistema nervoso centrale, gli acidi grassi essenziali ω -3, conferiscono alle membrane dei neuroni la fluidità necessaria alla progressione dell'impulso nervoso ed inoltre influiscono direttamente sulla produzione e la liberazione di due importanti neurotrasmettitori: la serotonina e la dopamina. Queste sostanze regolano il flusso delle informazioni trasmesse nelle sinapsi tra le cellule nervose per cui, in caso di livelli non adeguati, la trasmissione delle informazioni rallenta vistosamente con evidenti alterazioni psico comportamentali. La carenza alimentare degli ω -3 determina bassi livelli di serotonina che, più facilmente, si associano a stati depressivi o comportamenti violenti, mentre bassi livelli di dopamina si associano più spesso con il morbo di Parkinson o con deficit dell'attenzione (diminuzione della capacità di concentrarsi sui compiti immediati) [53]. Nella comunità scientifica l'interesse nei confronti degli acidi grassi PUFAs ω -3 è cresciuto vertiginosamente negli ultimi anni in virtù della constatazione epidemiologica della bassa incidenza di eventi cardiovascolari in popolazioni che consumano grandi quantità di pesce. [54-56]

Se l'assunzione di acidi grassi ω -6 è maggiore di quella degli ω -3, maggiore sarà la produzione di metaboliti dell'acido linoleico, cioè acido γ -linolenico e acido arachidonico, e minore quella dei metaboliti dell'acido α -linolenico, ossia EPA e DHA. Ciò ha importanti implicazioni pratiche se si considera che i metaboliti derivati da C18:2 ω 6 e C18:3 ω 3 hanno effetti biologici profondamente diversi. L'acido α -linolenico è anche il precursore delle prostaglandine della serie 1, dei trombossani della serie 2 e dei leucotrieni della serie 4 che producono vasocostrizione, broncocostrizione, attivazione dei leucociti polimorfonucleati e aumento della permeabilità vascolare [57]. D'altra parte, L'EPA e il DHA sono i

precursori di prostaglandine della serie 3 e dei leucotrieni della serie 5 che favoriscono la vasodilatazione e riducono la broncocostrizione [49, 58].

Nei paesi occidentali industrializzati il rapporto ω -6: ω -3 è ad oggi pari a 15:1. I motivi di questo rapporto così profondamente sbilanciato sono ascrivibili a una serie di fattori come di seguito descritto: elevato consumo di oli vegetali ricchi in ω -6, basso consumo di pesce, e infine scarso apporto di C18:3 ω 3 nelle carni provenienti da bovini alimentati con mangimi poveri di acidi grassi ω -3. Considerando che l'efficienza della conversione endogena di acido α -linolenico in EPA e DHA è limitata, a livello cardiovascolare si raggiungono maggiori benefici quando EPA e DHA vengono assunti con la dieta o sottoforma di integratori alimentari. Le fonti dietetiche di EPA e DHA sono pesci grassi quali salmone, tonno, sardine, acciughe, sgombri, aringhe. Tuttavia, negli ultimi anni vi è stato un forte incremento nelle vendite di integratori alimentari fortificati con grassi a base di ω -3 sottoforma di trigliceridi, di etil-esteri, o di acidi grassi liberi. Attualmente sono presenti sul mercato svariate formulazioni contenenti 1 g di EPA+DHA, indicate per il trattamento dell'ipertrigliceridemia (trigliceridi plasmatici superiori a 5.65 mmol/L). La Food and Drug Administration (FDA) per la prima volta nel 2002, ha suggerito l'utilizzo di supplementi a base di EPA e DHA, per la prevenzione cardiovascolare secondo i seguenti criteri [46] in assenza di patologia cardiovascolare conclamata: 2 porzioni di pesce a settimana (equivalenti a circa 400-500 mg di EPA e DHA); in presenza di patologia cardiovascolare: 1 g di EPA+DHA al giorno; pazienti con iper-trigliceridemia: 2-4g/die sotto supervisione medica.

Tra le molteplici funzioni degli acidi grassi ω -3 fin qui descritte, è necessario riportare anche la loro funzioni strutturale visto che partecipano attivamente alla

sintesi dei fosfolipidi di membrana e sono presenti anche nelle membrane citoplasmatiche esterne, nelle membrane eritrocitarie, dei mitocondri e dei lisosomi [13]. Inoltre, gli ω -3 partecipano anche alla strutturazione delle varie frazioni lipidiche quali esteri del colesterolo, trigliceridi e fosfolipidi e ne influenzano il loro metabolismo. Il DHA ha soprattutto funzioni strutturali essendo presente nei fosfolipidi dei sinaptosomi cerebrali, nella retina e nei fosfolipidi dei canali di membrana del sodio. Il DHA svolge un ruolo importante nella maturazione cerebrale e nello sviluppo dell'apparato riproduttivo e retinico [59].

Infine, gli ω -3 svolgono anche funzioni di regolazione metabolica nel nostro organismo e influenzano la fluidità e la permeabilità delle membrane svolgendo un ruolo importante nella regolazione degli scambi cellulari. Gli ω -3 sono componenti essenziali di numerosi enzimi (ATPasi, nucleotidasi, lipossidasi), contraggono rapporti con fattori vitaminici (vitamine A, E, B6) e intervengono nella regolazione degli scambi emo-tissutali, del trofismo e della funzione delle pareti vasali. Sono precursori di prostaglandine e leucotrieni ad azione vaso-dilatatrice e antiaggregante piastrinica (LTB₅, PGI₃). Gli effetti ateroprotettivi degli acidi grassi ω -3 sul rischio cardiovascolare sono molteplici, modulano infatti il metabolismo delle lipoproteine ricche in trigliceridi in soggetti ipertrigliceridemicici e normolipidemicici; essi riducono la trigliceridemia post-prandiale e favoriscono la clearance epatica delle lipoproteine ricche in trigliceridi. Regolando la pressione arteriosa, gli acidi grassi ω -3 sembrano esercitare un modesto effetto ipotensivo dose-dipendente che diventa più evidente in pazienti ipertesi. L'effetto ipotensivo è riconducibile alla capacità degli ω -3 di promuovere la sintesi endoteliale di agenti vasodilatanti quali ossido nitrico e prostaciclina [60]. Sono inoltre coinvolti nella modulazione emostatica: l'EPA è il precursore dei prostanoidi ad azione

vasodilatante, anti-aggregante e antinfiammatoria (es PGI₃). Gli acidi grassi ω -3 riducono la produzione di citochine infiammatorie quali TNF- α , IL-6, IL-1 β [61]. Tali effetti, insieme al potenziamento della fibrinolisi, alla riduzione della sintesi di fibrinogeno, del fattore VII rendono ragione dell'azione antitrombotica e antiinfiammatoria degli ω -3 [47]. Gli ω -3 presentano effetti favorevoli sulla stabilità elettrica del miocardio, la proprietà antiaritmica consiste in una lieve iperpolarizzazione delle membrane plasmatiche dei miociti cardiaci; l'iperpolarizzazione determina un aumento della differenza del potenziale diastolico transmembrana e spostamento della soglia di apertura dei canali del sodio verso valori più positivi. È stato dimostrato che gli ω -3 sono capaci di prolungare di circa 3 volte il periodo refrattario della cellula muscolare cardiaca; ne consegue una maggiore resistenza del miocardio alla comparsa delle aritmie letali quali la fibrillazione ventricolare [62]. L'azione di stabilizzazione elettrica sembra essere legata alla capacità degli ω -3 di inibire i canali L del calcio e ridurre così la liberazione del calcio dal reticolo sarcoplasmatico prevenendo i post-potenziamenti aritmogeni [48, 63]. Le proprietà ateroprotettive degli ω -3, EPA e DHA, sono state ampiamente documentate; il costo e la scarsa disponibilità di pesce e di olio di pesce, fonti principali di EPA e DHA, ne limitano il consumo in alcuni paesi nei quali l'apporto con la dieta di questi composti è particolarmente scarso. È necessario quindi identificare fonti alternative di EPA e DHA che siano in grado di fornire quantità sufficienti di EPA e DHA per ottenere la dose giornaliera raccomandata (250-500mg).

Gli acidi grassi a catena corta (SCFA, *short chain fatty acids*) come l'acido acetico, l'acido butirrico e l'acido propionico, rivestono un ruolo cruciale nel mantenimento della salute umana, ed in particolare per il benessere dell'intestino

(microbiota intestinale) svolgendo un ruolo significativo nella prevenzione e nel trattamento dei tumori intestinali [9-12]. Questi composti sono principalmente prodotti dalla fermentazione delle fibre alimentari da parte del microbiota intestinale e possiedono una vasta gamma di effetti benefici, ad esempio, influenzano vari meccanismi cellulari e molecolari che possono ridurre il rischio di sviluppare tumori nel tratto gastrointestinale.

L'acido acetico, ad esempio è il SCFA più abbondante nell'intestino e svolge una funzione importante nella regolazione dell'appetito e nella riduzione dei livelli di glucosio nel sangue [64]. Studi recenti hanno dimostrato che l'acido acetico può contribuire nella gestione del peso corporeo e alla prevenzione del diabete di tipo 2, migliorando la sensibilità all'insulina e modulando le risposte metaboliche a livello sistemico [64].

L'acido propionico svolge un ruolo importante nel metabolismo lipidico e nella modulazione del sistema immunitario. Esso può contribuire alla riduzione dei livelli di colesterolo plasmatico, influenzando la sintesi e l'escrezione degli acidi biliari e modulare la risposta immunitaria riducendo l'infiammazione sistemica. Questi effetti possono contribuire alla riduzione del rischio di malattie cardiovascolari e di altre patologie infiammatorie croniche [65-66]. L'acido propionico ha dimostrato di avere effetti antiproliferativi sulle cellule tumorali del colon, mentre l'acido acetico può contribuire alla regolazione dell'omeostasi cellulare e alla modulazione dell'ambiente infiammatorio nell'intestino.

L'acido butirrico, invece, è essenziale per la salute della mucosa intestinale. Questo SCFA è la principale fonte di energia per le cellule epiteliali del colon e favorisce la proliferazione e la differenziazione di queste cellule, contribuendo al mantenimento dell'integrità della barriera intestinale. Inoltre, l'acido butirrico

possiede proprietà antinfiammatorie e antitumorali, infatti agisce come inibitore dell'istone deacetilasi (HDAC), un gruppo di enzimi che rimuovono gruppi acetile dall'istone, che a sua volta induce la differenziazione influenzando la struttura della cromatina e la trascrizione genica. L'inibizione delle HDAC da parte dell'acido butirrico porta a un'acetilazione aumentata dell'istone che a sua volta induce la differenziazione e l'apoptosi delle cellule tumorali, riducendo la proliferazione cellulare e la progressione del tumore. Inoltre, l'acido butirrico, modula le vie di segnalazione cellulare coinvolte nella crescita e nella sopravvivenza delle cellule tumorali. Può influenzare la via di segnalazione Wnt/ β -catenina, spesso alterata nei tumori del colon, promuovendo la differenziazione delle cellule e inibendo la loro proliferazione. Altre vie di segnalazione, come la via NF- κ B, sono anch'esse modulate dall'acido butirrico, riducendo l'infiammazione cronica che è un fattore di rischio per lo sviluppo del cancro. L'acido butirrico per le sue proprietà immunomodulatrici rappresenta un componente chiave nella modulazione della risposta infiammatoria intestinale.

La produzione di SCFA è strettamente correlata alla composizione del microbiota intestinale e all'assunzione di fibre alimentari [67]. Diete ricche in fibra promuovono la fermentazione batterica che porta alla produzione di SCFA, da qui si evince l'importanza di un'alimentazione equilibrata per la prevenzione dei tumori intestinali. Studi epidemiologici suggeriscono che un elevato consumo di fibre è associato a un rischio ridotto di sviluppare tumori del colon e del retto, sottolineando il ruolo protettivo degli SCFA [9-12]

1.3.2 Acilgliceroli

Generalmente, gli acidi grassi non si trovano in natura allo stato libero, ma prevalentemente sotto forma di esteri del glicerolo, formando così composti lipidici noti come acilgliceroli o acilgliceridi. Questi composti sono insolubili in acqua, ma si dissolvono nei solventi organici. Il glicerolo, essendo un alcol triossidrilico, può essere completamente esterificato (triacilgliceroli o trigliceridi) oppure parzialmente acilato (mono- e diacilgliceroli o mono- e digliceridi) [68]. Il triacilglicerolo, o trigliceride (TAG, *triacylglycerol*), è costituito da una molecola di glicerolo in cui ciascun gruppo ossidrilico è esterificato con un acido grasso. I TAGs contengono quindi tre acidi grassi e, considerando l'elevato numero di acidi grassi presenti in natura, esistono decine di migliaia di combinazioni possibili [69]. Tuttavia, non tutte queste combinazioni sono presenti in natura, poiché esistono solo alcune vie biosintetiche. Nonostante ciò, il numero di specie molecolari di TAG è molto alto. Le proprietà fisiche e chimiche dei TAGs variano in base alla lunghezza della catena carboniosa e al grado di insaturazione dei loro acidi grassi. Il glicerolo può essere esterificato con uno, due o tre acidi grassi differenti. Nel primo caso, il TAG conterrà tre residui acilici identici (ad esempio, la tripalmitina PPP la cui struttura è riportata in Figura 1.4), mentre gli esteri misti coinvolgono due o tre residui acilici diversi (ad esempio, il dipalmito-oleina PPO o il palmi-oleo-linoleina POL). Se i residui acilici nelle posizioni 1 e 3 sono differenti, si forma un centro chirale nella molecola lipidica.

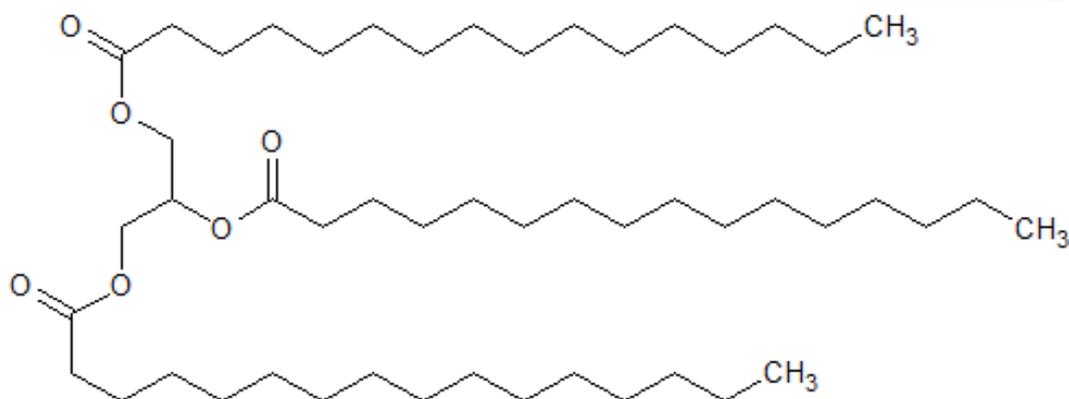


Figura 1.4. Struttura molecolare del trigliceride tripalmitina (PPP).

I trigliceridi svolgono funzioni fondamentali negli organismi viventi, tra cui l'immagazzinamento dell'energia e la sintesi dei lipidi di membrana. Poiché sono altamente ridotti e anidri, i TAGs immagazzinano sei volte più energia rispetto alla stessa quantità di glicogeno idratato [70]. Inoltre, gli oli sotto forma di TAGs contengono più del doppio della densità energetica rispetto a masse equivalenti di carboidrati e proteine [71]. Sebbene i TAGs svolgano un ruolo essenziale nella fisiologia del corpo umano, un accumulo eccessivo di questi composti nel tessuto adiposo può provocare obesità e altre patologie. Ad esempio, un'eccessiva deposizione dei TAG nel muscolo scheletrico è associata alla resistenza all'insulina, nel fegato alla steatoepatite non alcolica, e nel cuore alla cardiomiopatia [72-73]. La biosintesi dei TAGs avviene attraverso due principali vie metaboliche: la via del glicerolo-fosfato, nota anche come via di Kennedy, e la via del monoacilglicerolo [70]. Il sistema enzimatico del glicerolo-fosfato è presente nella maggior parte delle cellule lipidiche di mammiferi e piante. Al contrario, la via del monoacilglicerolo è presente in cellule specifiche come enterociti, epatociti e adipociti. Il sistema enzimatico permette la sintesi dei trigliceridi nell'intestino tenue umano, dove questi composti sono sintetizzati a partire dai grassi alimentari idrolizzati [74-75].

Nell'ultimo step di entrambe le vie biosintetiche, una molecola di acil-CoA e un diacilglicerolo vengono assemblati covalentemente per formare il TAG. Gli oli sotto forma di TAGs sono i composti di riserva energetica più abbondanti negli eucarioti, e il loro metabolismo svolge un ruolo chiave nell'equilibrio energetico cellulare, nell'omeostasi lipidica, nella crescita e nel mantenimento cellulare. Nelle piante, i TAGs svolgono molteplici ruoli, essendo la principale riserva di acidi grassi per la produzione di energia e la sintesi dei carboidrati durante la germinazione dei semi e lo sviluppo precoce delle piantine. Inoltre, sono essenziali per il normale sviluppo e crescita delle piante adulte. Le piante accumulano oli principalmente nei semi e nei frutti [71]. Gli oli vegetali rappresentano importanti fonti di alimenti, mangimi e materie prime industriali per una varietà di applicazioni, tra cui la produzione di biodiesel, che è una miscela di esteri di acidi grassi derivati dai TAGs. Attualmente, il biodiesel viene prodotto da colture oleaginose convenzionali, ma la produzione di combustibile basato su semi oleosi potrebbe soddisfare le esigenze mondiali senza compromettere l'approvvigionamento alimentare globale. È stato dimostrato che gli acidi grassi occupano posizioni specifiche nella molecola del triacilglicerolo [76]. Gli acidi palmitico e stearico [77, 78], e tutti quelli con un numero di atomi di carbonio superiore a 18 sono prevalentemente esterificati nelle posizioni 1 e 3 del glicerolo [79]. Nei grassi animali, la distribuzione degli acidi grassi è fortemente influenzata dalla composizione dell'alimentazione dell'animale. Di conseguenza, i TAG di origine animale mostrano una variabilità maggiore rispetto ai grassi o agli oli di origine vegetale [80].

I diacilgliceroli (DAGs, *diacylglycerols*) e i monoacilgliceroli (MAGs, *monoacylglycerols*) contengono rispettivamente due e una mole di acidi grassi per

mole di glicerolo come raffigurato negli esempi riportati in Figura 1.5. La loro presenza negli oli o nei grassi commestibili di origine animale o vegetale è molto bassa [81]. Tuttavia, i livelli dei DAGs e MAGs possono aumentare a causa dell'azione delle idrolasi durante la conservazione o la lavorazione degli alimenti. L'idrolisi dei TAG avviene tramite vapore ad alta pressione (70 bar) e ad una temperatura elevata (250 °C) [82]. Tuttavia, questo processo presenta svantaggi significativi, tra cui l'elevato consumo energetico, la bassa resa e la scarsa qualità dei prodotti [83]. Un metodo alternativo per la produzione di MAGs e DAGs è l'idrolisi enzimatica dei grassi e degli oli, effettuata a temperature e pressioni moderate. Alcune lipasi sono state utilizzate come biocatalizzatori per la produzione di DAGs e MAGs [84]. Le lipasi più comunemente impiegate nell'idrolisi dei grassi e oli sono enzimi extracellulari microbici, prodotti tramite la fermentazione di lieviti, funghi o batteri [85].

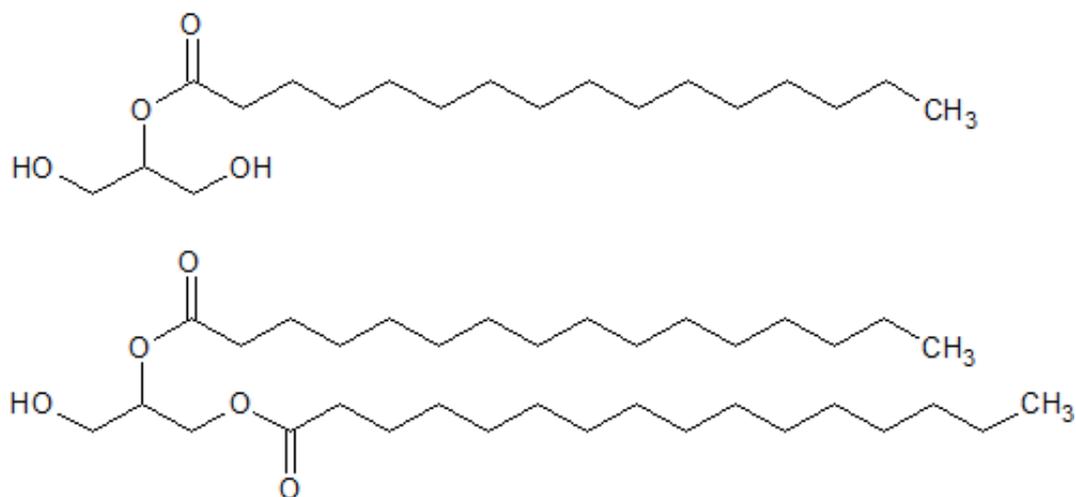


Figura 1.5. Struttura molecolare della monopalmitina (sopra) e della dipalmitina (sotto).

I MAGs e i DAGs sono utilizzati principalmente come emulsionanti nel settore alimentare, farmaceutico e cosmetico [86]. Per quanto riguarda i monogliceridi, il

70% del consumo mondiale totale è destinato alla produzione di emulsionanti alimentari utilizzati in prodotti lattiero-caseari, margarine, prodotti da forno e salse [87]. I digliceridi, presenti come componenti naturali in vari grassi e oli, sono comunemente usati come emulsionanti e stabilizzanti nelle industrie alimentari, cosmetiche e farmaceutiche [88].

1.3.3 Fosfolipidi

I fosfolipidi (PL) sono generalmente costituiti da un gruppo acilico, che rappresenta la porzione lipidica della molecola, e da un residuo di acido fosforico (vedi Figura 1.6). I fosfolipidi si dividono in due ampie sottoclassi a seconda della presenza del glicerolo o della sfingosina. Queste differenze nella struttura di base influenzano la loro reattività. I glicerofosfolipidi (GL), componenti dei tessuti animali e vegetali, rappresentano la prima sottoclasse dei PL e contengono una struttura molecolare di base rappresentata dall'acido fosfatidico e una molecola legata al gruppo fosfato: colina (fosfatidilcolina, PC), glicerolo (fosfatidilglicerolo, PG), serina (fosfatidilserina, PS), etanolamina (fosfatidiletanolamina, PE) o inositolo (fosfatidilinositolo, PI) sono le strutture chimiche che generano la classe dei GL. Un'altra variante dei glicerofosfolipidi comprende i fosfonolipidi, che contengono un legame covalente tra l'atomo di fosforo e il carbonio della base azotata [89]. Questi fosfonolipidi sono sintetizzati dal fitoplancton, che costituisce la base delle catene alimentari degli oceani. La seconda classe dei PL è rappresentata dalle sfingomieline (SM), costituite da una base a catena lunga di sfingosina (trans-D-eritro-1,3-diidrossi-2-amino-4-ottadecene), legata tramite un legame ammidico a un acido grasso e al gruppo fosfocolina. Le SM hanno una struttura simile a quella delle PC, con un gruppo idrofilo (fosfocolina) e due catene idrofobe di idrocarburi.

Questi composti lipidici sono presenti in tracce nelle piante e praticamente assenti nei batteri [90].

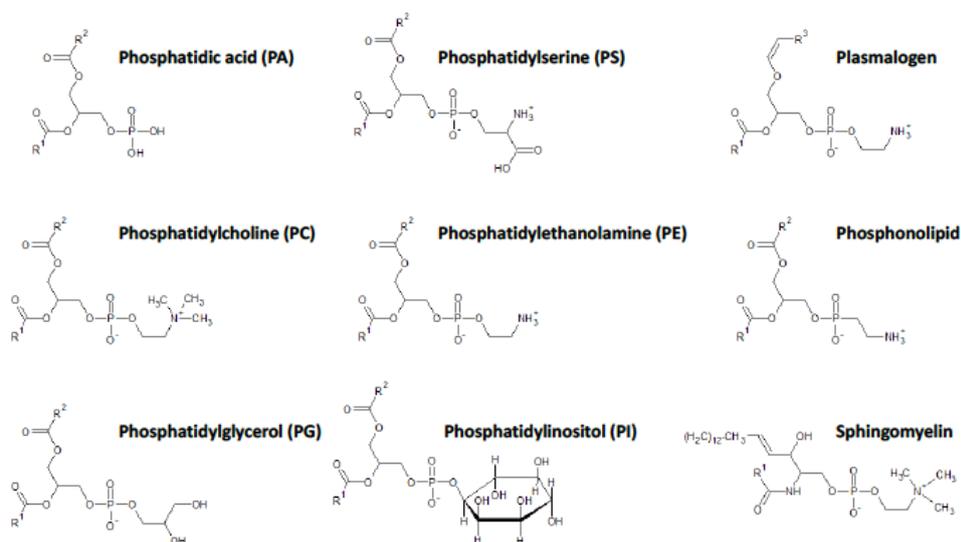


Figura 1.6. Struttura molecolare dei fosfolipidi più comuni.

I fosfolipidi possiedono tipicamente una coda idrofobica, composta da due catene di acidi grassi, e una testa idrofila, in cui si trova il gruppo fosfato. Le catene degli acidi grassi possono variare sia per la lunghezza della catena di carbonio sia per il grado di insaturazione. In generale, una coda contiene un acido grasso insaturo con uno o più doppi legami, mentre l'altra coda presenta un acido grasso saturo. Le differenze nella lunghezza e nel grado di insaturazione degli acidi grassi sono rilevanti poiché influenzano la capacità delle molecole dei fosfolipidi di impacchettarsi tra loro, alterando così la fluidità della membrana [91]. Gli acidi grassi aventi catene carboniose più corte riducono la tendenza delle code idrocarburiche a interagire tra loro, mentre i doppi legami in configurazione *cis* creano pieghe nelle catene idrocarburiche, rendendo più difficile il loro impacchettamento, permettendo così alle membrane di rimanere fluide a

temperature più basse. La classe dei fosfolipidi è definita anfipatica o anfifilica poiché presenta sia caratteri idrofobici sia idrofili. La natura anfipatica di queste molecole causa la loro disposizione a doppio strato in ambiente acquoso. Generalmente, le molecole idrofile o polari sono solubili in acqua perché contengono gruppi carichi o gruppi polari non carichi che possono formare interazioni semplici o legami idrogeno con le molecole d'acqua. Al contrario, i composti idrofobici o non polari sono insolubili in acqua poiché i loro atomi non sono né carichi né polari e quindi non possono interagire con le molecole d'acqua. Se le molecole anfipatiche vengono disperse in acqua, tendono a raggrupparsi, riducendo l'energia libera dell'intero sistema acquoso. Per questi motivi, i composti fosfolipidici si aggregano spontaneamente disponendo le loro code idrofobiche all'interno ed esponendo le loro teste idrofile a contatto con l'acqua. In base a diversi fattori, i fosfolipidi possono assumere due principali disposizioni in ambiente acquoso. Nel primo caso, la proprietà anfipatica induce i fosfolipidi a formare un assemblaggio definito a doppio strato, o a "sandwich" come illustrato in Figura 1.7, in cui le regioni idrofile tendono a orientarsi verso la fase acquosa. Un'altra struttura macromolecolare adottata dai fosfolipidi, compatibile con il loro carattere anfipatico, è la micella sferica, con le code orientate verso l'interno e le teste a contatto con le molecole d'acqua.

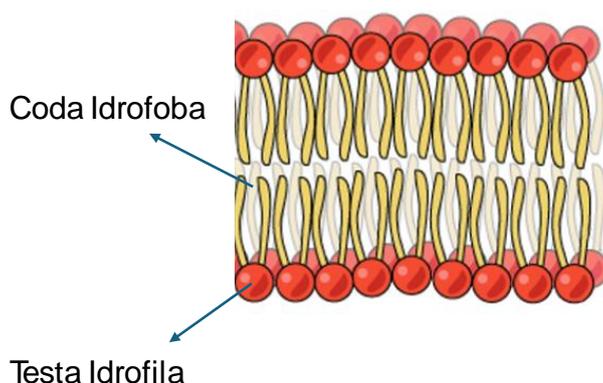


Figura 1.7. Assemblaggio dei fosfolipidi definito a doppio strato o a “sandwich”.

I fosfolipidi rappresentano i lipidi di membrana più abbondanti. In particolare, la fosfatidilcolina (PC), la fosfatidiletanolamina (PE), la fosfatidilserina (PS) e la sfingomieline (SM) sono le quattro principali classi di fosfolipidi predominanti nelle membrane plasmatiche delle cellule dei mammiferi [92]. Insieme, queste quattro classi costituiscono più della metà della massa lipidica della maggior parte delle membrane cellulari [92]. Le fosfatidilcoline sono solitamente i lipidi più abbondanti nelle membrane dei tessuti animali e rappresentano i principali componenti lipidici delle membrane vegetali, sebbene siano raramente presenti nei batteri [81]. Le fosfatidiletanolamine costituiscono la seconda classe dei fosfolipidi più abbondante nei tessuti animali e vegetali, e possono essere la principale classe lipidica nei microrganismi. Altri fosfolipidi, come i fosfatidilinositoli (PI), sono presenti in tracce ma rivestono un'importanza funzionale cruciale, ad esempio nel segnalamento cellulare [81]. Le lisofosfatidilcoline, contenenti solo un acido grasso nella molecola, sono talvolta presenti nei tessuti, ma come componenti minori. I fosfolipidi sono particolarmente abbondanti nella lecitina, una miscela di composti

chimici presente sia nei tessuti animali che negli oli vegetali. Tra tutti gli oli vegetali, l'olio di soia contiene la maggiore quantità di lecitina, che viene separata dall'olio grezzo attraverso il processo di raffinazione [93]. La lecitina grezza è un liquido viscoso che contiene circa il 60-70% dei fosfolipidi [94]. I fosfolipidi presenti nella lecitina sono componenti essenziali delle membrane cellulari e di conseguenza, fondamentali per la crescita, e il corretto funzionamento delle cellule [95]. Nel caso degli organismi marini, le catene di carbonio dei fosfolipidi sono particolarmente ricche di EPA e DHA. Inoltre, è stato riconosciuto che i fosfolipidi contenenti DHA sono lipidi benefici, in grado di promuovere la differenziazione delle cellule tumorali, indotta da agenti differenzianti, sia in cellule tumorali non fissative sia in quelle fissative [96-98].

1.3.4 *Gli steroli*

Gli steroli rappresentano un ampio gruppo di composti lipidici dotati di diverse attività biologiche e proprietà fisiche. Gli steroli naturali presentano solitamente uno scheletro ciclopentano-peridrofenantrenico con una stereochimica specifica. Inoltre, la loro struttura molecolare comprende un numero di atomi di carbonio che varia da 27 a 30, un gruppo ossidrilico legato al carbonio in posizione 3, e una catena laterale di almeno sette atomi di carbonio legata al carbonio in posizione 17 [99]. Gli steroli sono abbondanti nelle cellule eucariotiche, mentre sono rari negli organismi procariotici. In tutti i vertebrati, il colesterolo viene prevalentemente sintetizzato attraverso l'attività biosintetica di alcuni enzimi. Gli organismi invertebrati, invece, non possiedono i sistemi enzimatici necessari per la produzione di steroli e devono quindi assumerli dall'ambiente.

Nelle piante, il sitosterolo e lo stigmasterolo sono i composti sterolici più abbondanti [99], mentre il colesterolo è abbondante nei tessuti dei mammiferi e può essere presente sia come colesterolo libero (Chol) sia come esteri del colesterolo (CE) [100] (Figura 1.8).

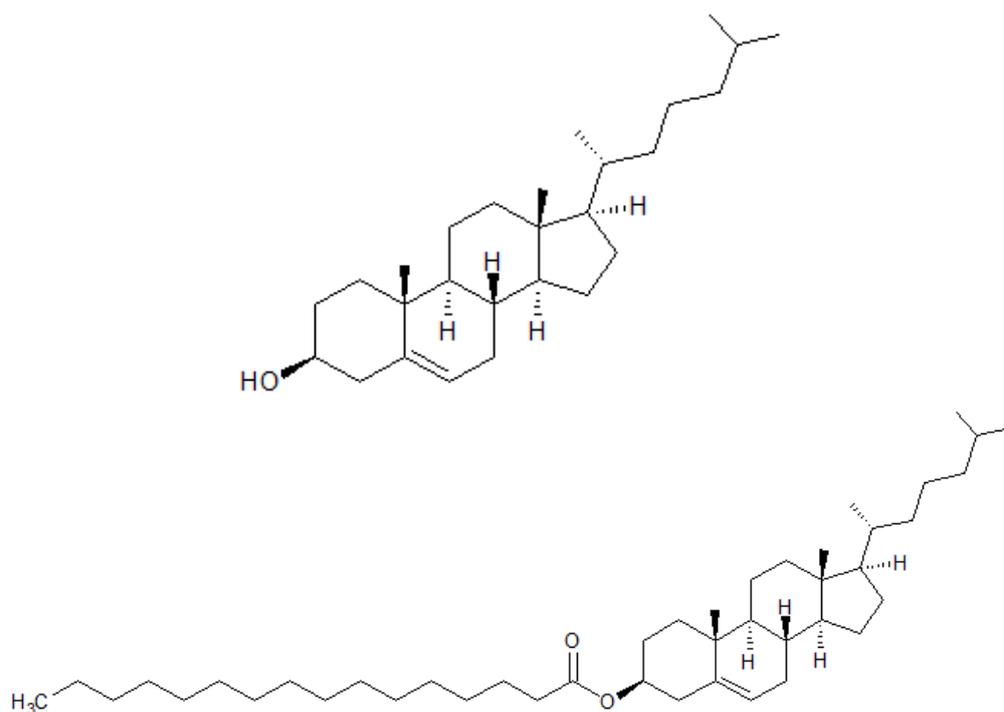


Figura 1.8. Struttura molecolare del colesterolo (sopra) e del colesterolo palmitato (sotto).

Il colesterolo e i suoi esteri vengono trasportati nel sangue tramite lipoproteine, aggregati molecolari che includono proteine e una porzione di fosfolipidi che racchiude un nucleo di lipidi neutri, tra cui colesterolo, esteri del colesterolo e trigliceridi [101]. Le diverse combinazioni dei lipidi e proteine generano diversi trasportatori, classificati in quattro classi principali in base alla loro densità [102]: chilomicroni, lipoproteine a bassissima densità (VLDL), lipoproteine a bassa densità (LDL) e lipoproteine ad alta densità (HDL). I chilomicroni sono le lipoproteine più grandi e meno dense, e contengono una alta proporzione dei TAG

[102]. Le VLDL sono sintetizzate dal fegato e trasportano principalmente i TAG, ma contengono anche quantità inferiori di colesterolo libero ed esterificato. La perdita dei TAG trasforma le VLDL inizialmente in lipoproteine a densità intermedia (IDL) e successivamente in LDL. Queste ultime sono molto ricche in colesterolo e in esteri del colesterolo e sono deputate al trasporto del colesterolo verso i tessuti extraepatici, mentre le HDL sono coinvolte nel processo inverso [103-104]. Il colesterolo svolge funzioni importanti nel corpo umano. Innanzitutto, è un componente essenziale delle membrane cellulari e gioca un ruolo chiave nel mantenimento della fluidità della membrana. Recenti studi hanno evidenziato che il colesterolo occupa regioni specifiche del doppio strato della membrana, principalmente intercalandosi tra due fosfolipidi ed evitando il contatto diretto tra molecole di colesterolo [105]. La presenza di colesterolo aumenta la fluidità della membrana. Pertanto, più bassa è la fluidità, maggiore sarà la quantità di colesterolo richiesta. La riduzione della fluidità si verifica quando il contenuto di acidi grassi saturi supera i valori ottimali nella membrana fosfolipidica. Un contenuto non bilanciato di acidi grassi saturi è generalmente dovuto a un'assunzione di alimenti ricchi di SFA o dall'attivazione del sistema enzimatico FAS. (*fatty acid synthase*)

La regolazione omeostatica della fluidità attiva la biosintesi del colesterolo se il livello degli acidi grassi saturi aumenta. Pertanto, come regola generale, gli SFA hanno un effetto rilevante sui livelli del colesterolo nel sangue umano. È noto, infatti, che la riduzione degli SFA nella dieta abbassa i livelli di colesterolo plasmatico [106]. Le principali fonti di colesterolo (Chol) nell'organismo umano sono due: il colesterolo assunto con la dieta (esogeno) e il colesterolo sintetizzato de novo (endogeno), prodotto nel fegato o nei tessuti extraepatici [107]. Secondo i dati del NHANES (*National Health and Nutrition Examination Survey*), le cinque

principali fonti alimentari di colesterolo nella popolazione americana (2005–2006) sono le uova e i piatti a base di uova, il pollo, il manzo e i piatti a base di manzo, gli hamburger e i formaggi [108]. Per mantenere l'equilibrio del colesterolo, bisogna tenere in considerazione che la sintesi endogena diminuisce con l'aumentare del colesterolo assunto con la dieta [109]. È stato ampiamente dimostrato che il colesterolo alimentare aumenta il rischio di malattie cardiovascolari (CVD, *cardiovascular diseases*), come confermato dalle raccomandazioni del Dietary Guidelines Advisory Committee del 2010, che ha consigliato alla popolazione degli Stati Uniti di non assumere più di 300 mg al giorno di colesterolo [110-111]. Tuttavia, alcuni studi hanno dimostrato un aumento del rischio di CVD con l'assunzione del colesterolo alimentare, mentre altri hanno osservato una diminuzione del rischio o nessuna variazione con un consumo maggiore di colesterolo [112]. Per prevenire l'accumulo di colesterolo, esiste un sistema enzimatico chiamato colesterolo aciltransferasi (ACAT), che utilizza il colesterolo e l'acil-CoA a catena lunga come substrati per produrre esteri del colesterolo (CE) [113]. Il colesterolo viene esterificato nel citoplasma, dove i CE si accumulano e vengono immagazzinati sotto forma di goccioline lipidiche citoplasmatiche. Quando il colesterolo entra nella cellula, la velocità della sua biosintesi si riduce e aumenta la sua esterificazione con gli acidi grassi, mediata dall'enzima ACAT [114].

Il termine fitosteroli si riferisce, invece, ai composti sterolici presenti nelle piante. I fitosteroli sono sostanze naturali presenti nella dieta, principalmente come componenti minori degli oli vegetali [115]. I fitostanoli fanno parte di questo gruppo e si trovano in natura a concentrazioni più basse rispetto alle loro controparti non idrogenate (Figura 1.9). Di conseguenza, l'assunzione alimentare di fitostanoli

è molto inferiore rispetto a quella dei fitosteroli. La fonte naturale più ricca di fitosteroli è rappresentata dagli oli vegetali e dai loro derivati. Anche la frutta a guscio è ricca di fitosteroli, pur essendo consumata in quantità minori, può contribuire significativamente all'apporto totale dei fitosteroli. I prodotti cerealicoli, le verdure, la frutta e le bacche, pur non essendo altrettanto ricchi di fitosteroli, possono comunque rappresentare fonti significative di questi composti grazie al loro consumo elevato [116]. Gli esseri umani non sono in grado di sintetizzare i fitosteroli; pertanto, tutti i fitosteroli presenti nel sangue e nei tessuti umani derivano dalla dieta. Questi composti sono onnipresenti nel mondo vegetale, ma risultano più efficaci quando assunti con la dieta. Recentemente, è aumentata la produzione di alimenti contenenti fitosteroli. Inoltre, per migliorare la solubilità di questi composti negli alimenti contenenti grassi, i fitosteroli o i fitostanoli vengono esterificati con acidi grassi, creando un legame estere [117].

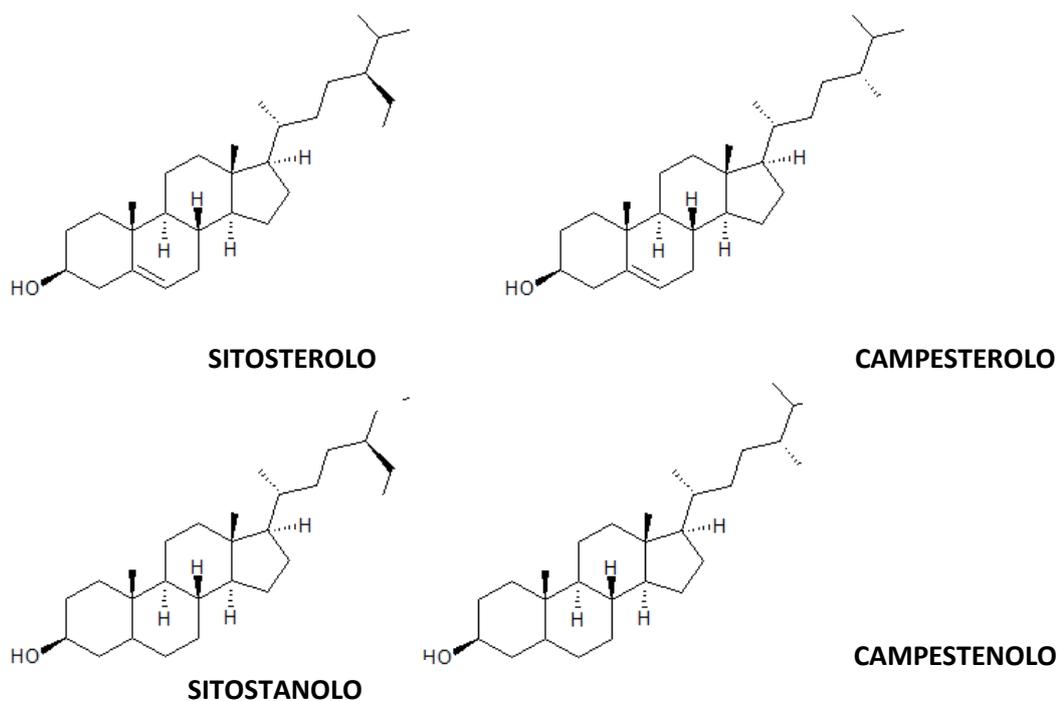


Figura 1.9. Struttura molecolare di alcuni fitosteroli e fitostanoli.

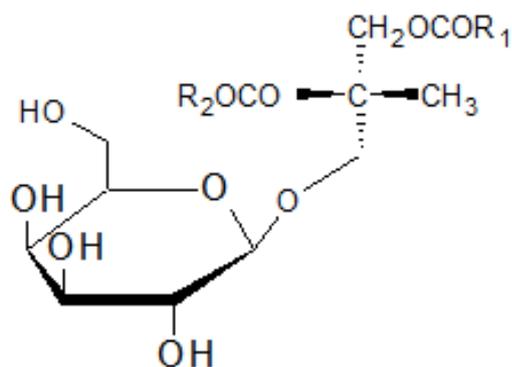
I fitosteroli più comuni nella dieta umana sono il β -sitosterolo e il campesterolo, (Figura 1.10) che rappresentano rispettivamente circa il 65% e il 30% dei fitosteroli presenti negli alimenti di origine vegetale [118]. I fitostanoli più comuni nella dieta umana sono il sitostanolo e il campestanolo, che insieme costituiscono circa il 5% dei fitosteroli alimentari [119]. I fitosteroli hanno la capacità di ridurre i livelli di colesterolo negli esseri umani [120-121]. Infatti, sono stati commercializzati come prodotto farmaceutico con il nome di citellina, utilizzato per il trattamento dei livelli elevati di colesterolo dal 1954 al 1982 [122]. Oggi è ben noto che un'elevata assunzione di steroli o stanoli vegetali può ridurre le concentrazioni di colesterolo totale e LDL nel siero umano, [123-124] diminuendo così il rischio di malattia coronarica [125]. Il consumo di 1,5–1,8 g al giorno di steroli o stanoli vegetali ha dimostrato di ridurre l'assorbimento del colesterolo del 30–40% [126]. In uno studio, è stato osservato che la diminuzione dell'assorbimento del colesterolo è associata a un aumento della sintesi del colesterolo, e un aumento dell'assunzione di fitosteroli è stato correlato a un incremento della sintesi endogena del colesterolo negli esseri umani [127]. Come già menzionato, il colesterolo è un componente importante della membrana cellulare dei mammiferi. La sostituzione del colesterolo con i fitosteroli ha dimostrato di alterare le proprietà fisiche delle membrane cellulari in vitro [128]. In alcuni studi provenienti da modelli animali di ictus emorragico suggeriscono che un'assunzione molto elevata di composti fitosterolici possa sostituire il colesterolo nelle membrane cellulari, aumentando la deformabilità e potenzialmente la fragilità delle cellule [129]. Esistono evidenze scientifiche che supportano il fatto che i fitosteroli e i loro derivati possiedono diverse attività biologiche, che promuovono la salute di animali, esseri umani e microrganismi, con pochi effetti avversi. Pertanto, il consumo regolare di steroli e

stanoli vegetali presenti negli alimenti naturali, non eccedendo i 3 g al giorno, è considerato salutare per l'uomo e per gli animali [117].

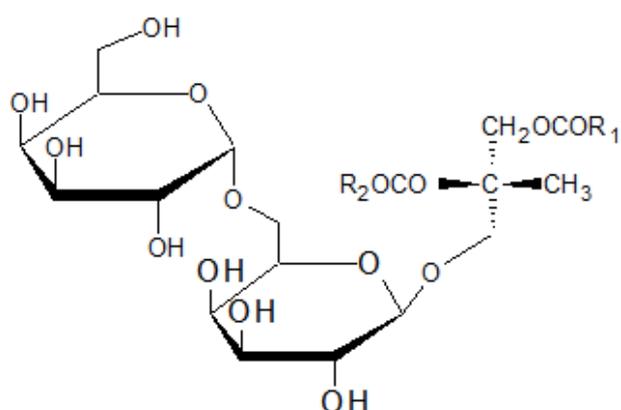
1.3.5 I glicolipidi

I glicolipidi (GLs) sono composti formati da una coda lipidica idrofobica e da uno o più gruppi glucidici idrofilici legati tramite un legame glicosidico. La maggior parte dei glicolipidi è distribuita nelle membrane cellulari di organismi che vanno dai batteri all'uomo. In particolare, circa due terzi dei glicolipidi totali sono componenti delle membrane cellulari, come quelle dell'apparato del Golgi, degli endosomi, dei lisosomi, della membrana nucleare, del reticolo endoplasmatico e dei mitocondri [130]. La funzione principale dei glicolipidi è quella di conferire integrità strutturale alle membrane degli organismi tramite un esteso legame idrogeno tra i gruppi glicosidici delle teste polari [131]. Inoltre, essi svolgono un ruolo importante nelle funzioni cellulari, in particolare nella comunicazione intercellulare. La struttura di base di un glicolipide consiste in un gruppo mono- o oligosaccaridico legato a un gruppo glicerolo o sfingolipide con uno o due acidi grassi. Questi formano le classi dei glicoglicerolipidi e dei glicosfingolipidi, rispettivamente.

Il termine glicoglicerolipide (GGL) si riferisce a glicolipidi contenenti mono-, di- o tri-saccaridi legati glicosidicamente al gruppo ossidrilico di un diacilglicerolo, come il monogalattosildiacylglicerolo (MGDG) e il digalattosildiacylglicerolo (DGDG) [131]. Il 1,2-diacil-sn-3-glicerolo è legato, tramite la posizione sn-3, (Figura 1.10) a un carboidrato, che è solitamente un mono- o disaccaride, meno comunemente un tri- o tetrasaccaride [132].



Digalattosil (MGDG) 1,2-diacil-3-β-D-galattopiranosil-Lglicerolo.



Monogalattosildiacilglicerolo (MGDG) 1,2-diacil-3-β-D-galattopiranosil-Lglicerol.

Figura 1.10. Strutture e nomenclatura dei glicolipidi contenenti un mono-(MGDG) e un disaccaride (DGDG) nella struttura molecolare.

I MGDG e DGDG sono i principali componenti glicolipidici delle varie membrane dei cloroplasti. Queste sostanze lipidiche sono anche i lipidi più abbondanti in tutti i tessuti fotosintetici, inclusi quelli delle piante superiori, delle alghe e di alcuni batteri [133]. Inoltre, i glicoglicerolipidi sono ampiamente presenti nelle alghe marine [134-135]. I glicoglicerolipidi naturali possiedono spesso attività biologiche insolite e talvolta inaspettate, come attività antitumorali, antivirali e antinfiammatorie, che li rendono bersagli molecolari di grande interesse per numerose ricerche [136]. Ad esempio, alcuni autori [137-138] hanno rivelato che gli MGDG e i DGDG isolati da un cianobatterio (*Phormidium tenue*) e da un'alga

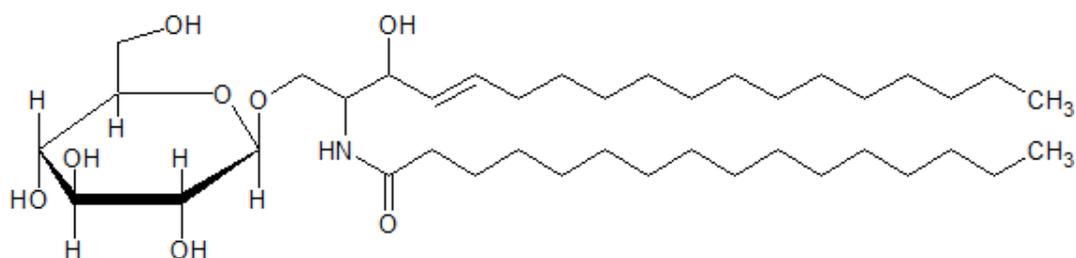
verde d'acqua dolce (*Chlorella vulgaris*) hanno mostrato un effetto inibitorio sulle cellule tumorali. Molti glicoglicerolipidi isolati da piante terrestri sono stati segnalati anche per avere attività antinfiammatorie. Larsen et al. [139] hanno scoperto che i glicoglicerolipidi isolati dal frutto della *Rosa canina* fungevano da agenti antinfiammatori con effetti inibitori sulla chemiotassi dei neutrofilo del sangue periferico umano in vitro. Tuttavia, la scarsa presenza naturale dei glicoglicerolipidi, unita alla difficoltà di isolamento, limita la valutazione della bioattività [136].

1.3.6 Glicosfingolipidi

I glicosfingolipidi (GSLs) sono molecole lipidiche contenenti una molecola ceramidica legata covalentemente ad almeno un residuo monosaccaridico tramite un legame β -glicosidico. Le ceramidi sono ammidi di acidi grassi con basi a catena lunga, di- o tri-idrossilate. Il gruppo acilico delle ceramidi è generalmente un acido grasso saturo o monoinsaturo a catena lunga [131]. Centinaia di diversi carboidrati possono essere legati a decine di molecole ceramidiche diverse, dando origine a una varietà di composti strutturalmente differenti, ciascuno dei quali ha il potenziale per una specifica funzione biologica [140].

Nei vertebrati, i glicosfingolipidi rappresentano la classe più diffusa dei glicolipidi [141]. Essi sono stati suggeriti come modulatori della funzione delle proteine di membrana e sono inoltre coinvolti nella comunicazione cellula-cellula. Sebbene i glicosfingolipidi non siano indispensabili per la vita cellulare, essi sono necessari per lo sviluppo degli organismi multicellulari, e sono quindi molecole chiave nella “sociologia cellulare” [140]. I glicosfingolipidi sono suddivisi in GSLs neutri e GSLs acidi. I GSLs neutri contengono uno o più gruppi glicosilici legati alla

ceramide [131]. I composti monoglicosilceramidici, comunemente chiamati cerebrosidi, sono un esempio di GSLs neutri. Essi contengono una singola porzione glucidica, glucosio o galattosio, legata tramite legame O-estere al gruppo alcolico della ceramide, formando così le due principali specie dei cerebrosidi chiamate glucosilceramidi e galattosilceramidi. In Figura 1.11 sono mostrati due esempi di composti monoglicosilceramidici. Le glucosilceramidi si trovano a bassi livelli nei tessuti animali, come la milza e gli eritrociti, nonché nei tessuti nervosi, in particolare nei neuroni [131].



Palmitoil galattosilceramide

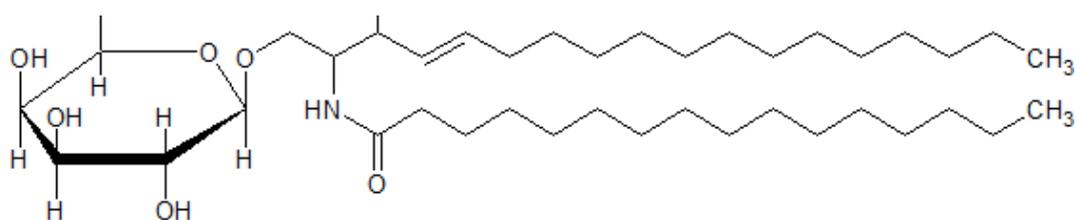


Figura 1.11. Strutture molecolari del palmitoil glucosilceramide (sopra) e palmitoil, galattosilceramide (sotto).

La glucosilceramide è l'unico glicolipide sfingolipidico (GSL) presente nelle piante, nei funghi e negli animali. Al contrario, la galattosilceramide si trova esclusivamente nei funghi e negli animali [142]. I GSL acidi si suddividono in solfoglucosilceramidi e gangliosidi. I solfoglucosilceramidi, talvolta denominati

“solfatidi” o “solfatoglicosfingolipidi,” sono GSL che possiedono un gruppo estere solfato legato alla componente glucidica. Sebbene i solfoglicosfingolipidi siano spesso presenti in quantità minori nei tessuti, la 3'-solfo-galattosilceramide, illustrata nella Figura 1.12, rappresenta uno dei componenti GSL più abbondanti della mielina, costituendo il 4% del totale dei lipidi mielinici [143]. Inoltre, i solfatidi si trovano anche in tessuti coinvolti nel trasporto del sodio, come i reni, le ghiandole del sale e i bronchi [143].

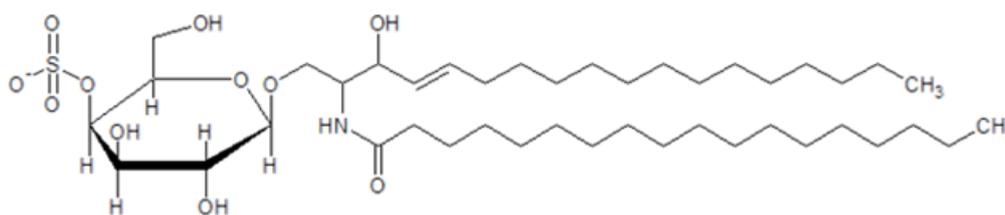


Figura 1.12. Struttura molecolare di 3'-solfo-galattosilceramide (SM4).

La struttura dei solfatidi può variare notevolmente, includendo diverse lunghezze della catena acilica e della porzione ceramidica. I solfatidi più comuni sono composti da ceramidi che possiedono la 4-sfingenina (d18:1) con acidi grassi idrossilati a 22 (C22:0 h), C23:0 h, C24:0 h, e C24:1 h, e con acidi grassi a 24 (C24:0) e C24:1. I solfatidi meno comuni comprendono ceramidi con C18:1 associati a C16:0, C16:0 h, C18:0, C18:0 h, C20:0, C21:0, C22:1, C22:0, C21:0 h, C23:0, C26:1 e C26:0, oltre a fitosfingosina (C18:0) con C20:0 h e C24:0 h. La composizione degli acidi grassi nei solfatidi dipende dai tessuti specifici [144]. Un metabolismo anomalo dei solfatidi può essere associato allo sviluppo di numerose malattie, tra cui il cancro, il diabete e le malattie autoimmuni. Inoltre, molti batteri e alcuni virus utilizzano i solfatidi nei processi di infezione e replicazione [144]. La comprensione delle funzioni biologiche dei solfatidi potrebbe rivelare i meccanismi

sottostanti lo sviluppo di queste patologie e i processi infettivi, aprendo la strada allo sviluppo di farmaci per il trattamento delle malattie associate ai solfatidi [144]. I gangliosidi sono molecole lipidiche costituite da ceramide legata tramite un legame glicosidico a una catena oligosaccaridica contenente unità di esosi e acido sialico. La loro eterogeneità e diversità strutturale nelle catene glucidiche sono caratteristiche distintive di questi lipidi; fino ad oggi, sono stati identificati 188 gangliosidi con diverse strutture glucidiche nei vertebrati [145]. I gangliosidi si trovano diffusamente nei tessuti e nei fluidi corporei, con un'espressione particolarmente abbondante nel sistema nervoso centrale, in particolare nelle cellule gangliari, [146] da cui prendono il nome. Questi lipidi possono rappresentare fino al 6% del peso totale dei lipidi del cervello [131]. Recentemente, i gangliosidi stanno attirando crescente interesse nel campo della biologia delle cellule staminali [145]. Le cellule staminali sono cellule primitive, non specializzate, con un elevato potenziale di proliferazione e capacità di auto-rinnovamento, trasformandosi in altri tipi di cellule nel corpo. Le cellule staminali hanno suscitato notevole interesse negli ultimi anni a causa del loro potenziale biologico e clinico per la medicina rigenerativa [146]. I gangliosidi sono principalmente presenti sulla superficie cellulare, per questo motivo possono essere utilizzati come marcatori specifici di superficie cellulare per l'identificazione o l'isolamento di queste cellule staminali [147-148]. Inoltre, è stato riportato che una sottopopolazione di cellule staminali del cancro cerebrale presenta caratteristiche simili alle cellule staminali, come la capacità di auto-rinnovamento e multipotenza, oltre alla capacità di sostenere la formazione di tumori cerebrali. I gangliosidi possono essere utilizzati non solo come biomarcatori per le cellule staminali tumorali, ma anche come bersagli per il trattamento dei tumori cerebrali [146]. Gli studi sui gangliosidi delle cellule

staminali promettono di essere un campo di ricerca estremamente fertile in futuro [146].

1.3.7 Le cere

Le cere, comunemente denominate esteri cerosi, sono costituite da un acido grasso esterificato con un alcol a lunga catena (Figura 1.13). Gli alcoli presenti nelle cere sono solitamente saturi e monoinsaturi, [81] sebbene le cere provenienti da animali marini contengano spesso elevate quantità di acidi grassi e alcoli insaturi [149-150]. Le cere più abbondanti in natura sono esteri di alcoli primari, ma in alcuni casi, come nei lipidi cuticolari delle cavallette melanopline, gli esteri di alcoli secondari possono rappresentare i componenti principali [151]. Le cere superficiali degli insetti contengono tipicamente catene di alcoli grassi saturi e acidi grassi che variano da 12 a oltre 20 atomi di carbonio [152].

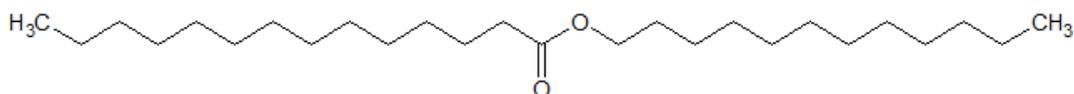


Figura 1.13. struttura molecolare del dodecile tetradecanoato.

Alcuni insetti, come le api, le libellule e le mosche bianche, producono cere contenenti unità di MUFA [152-153], che costituiscono anche i principali componenti della cera d'api, un solido amorfo, generalmente di colore giallo chiaro o ambrato, a seconda della fonte e dal processo di produzione. La cera d'api pura è composta per circa il 70%-80% da esteri a catena lunga, per il 12%-15% da acidi liberi, per il 10%-15% da idrocarburi, e da piccole quantità di dioli ed esteri del colesterolo [154]. Un'altra cera importante è la cera carnauba, conosciuta come la “regina delle cere”, un prodotto vegetale originario del Brasile. Essa è ampiamente

utilizzata nel settore cosmetico e alimentare, nel rivestimento della carta e nella produzione degli inchiostri. La sua composizione comprende cere (84%-85%), acidi liberi (3%-3,5%), resine (4%-6%), alcoli (2%-3%) e idrocarburi (1,5%-3,0%) [154].

Il ruolo biologico delle cere non è ancora stato completamente chiarito. Tuttavia, negli organismi terrestri e marini, le proprietà fisiche degli esteri cerosi possono rivestire un'importanza funzionale significativa. Ad esempio, gli insetti sintetizzano cere con temperature di fusione elevate per garantire una migliore barriera impermeabile. D'altra parte, gli organismi marini producono cere liquide che favoriscono la loro galleggiabilità. Molti artropodi terrestri depositano grandi quantità di cere (e altri lipidi) sulla superficie della loro cuticola per ridurre la perdita d'acqua per evaporazione [152, 155-156].

1.4 Biosintesi e metabolismo dei lipidi

I lipidi rappresentano una vasta e diversificata classe di biomolecole che giocano ruoli essenziali in numerosi processi biologici, tra cui la costituzione delle membrane cellulari, la segnalazione intracellulare, l'immagazzinamento energetico e la modulazione delle risposte infiammatorie. L'importanza dei lipidi è sottolineata dalla complessità delle vie biosintetiche e metaboliche che ne regolano la produzione e la trasformazione.

1.4.1 Biosintesi dei lipidi

La biosintesi dei lipidi è un processo complesso e regolato con precisione, che varia tra i diversi organismi ma che è essenziale per la loro sopravvivenza e funzionalità. Le principali classi dei lipidi sintetizzati dalle cellule comprendono acidi grassi, trigliceridi, fosfolipidi, steroli e glicolipidi [157].

Negli esseri umani, la sintesi de novo degli acidi grassi avviene principalmente nel fegato, nel tessuto adiposo e, in misura minore, nelle ghiandole mammarie durante l'allattamento [158]. Il processo inizia nel citoplasma con la conversione dell'acetil-CoA in malonil-CoA, catalizzata dall'enzima acetil-CoA carbossilasi (ACC). Questa reazione è il passo di regolazione chiave nella sintesi degli acidi grassi, influenzata da fattori nutrizionali e ormonali. Il malonil-CoA viene quindi utilizzato dalla sintasi degli acidi grassi (FAS), un complesso multienzimatico, per l'elongazione della catena carboniosa [159]. Durante questo processo ciclico, il malonil-CoA viene condensato con un gruppo acetilico, seguito da una serie di riduzioni, disidratazioni e ulteriori riduzioni che portano alla formazione di acido palmitico (C16:0), l'acido grasso saturo più comune nei mammiferi [159]. In contrasto, nei batteri, la sintesi degli acidi grassi avviene attraverso un percorso enzimatico simile ma con singoli enzimi che operano in maniera indipendente, piuttosto che come un complesso multienzimatico [160]. Le piante, invece, effettuano la biosintesi degli acidi grassi nei plastidi, organelli derivati dai cloroplasti, con un forte legame tra la produzione di acidi grassi e la fotosintesi. Questo permette alle piante di convertire l'energia solare direttamente in biomassa lipidica, un processo che ha notevole rilevanza per la produzione di biocarburanti [161].

I trigliceridi, la principale forma di riserva energetica negli esseri umani, sono sintetizzati a partire dal glicerolo-3-fosfato, che viene esterificato con acidi grassi attraverso una serie di reazioni catalizzate da aciltransferasi. Questo processo si verifica principalmente nel fegato e nel tessuto adiposo. Il glicerolo-3-fosfato deriva dalla glicolisi o dalla conversione del diidrossiacetone fosfato [158]. Una volta che i trigliceridi sono sintetizzati, vengono immagazzinati nelle cellule adipose sotto

forma di gocce lipidiche. I fosfolipidi, d'altra parte, costituiscono i principali componenti strutturali delle membrane cellulari. Negli esseri umani, la sintesi dei fosfolipidi segue prevalentemente la via Kennedy, nella quale il diacilglicerolo (DAG) viene fosforilato per formare acido fosfatidico, che viene successivamente convertito in fosfatidilcolina (PC) o fosfatidiletanolamina (PE) attraverso reazioni specifiche [158-159]. Questi fosfolipidi sono fondamentali per la formazione delle membrane e per la funzione dei complessi proteici di membrana. Nelle piante, la sintesi dei fosfolipidi è strettamente correlata all'energia fotosintetica, con un predominio del fosfatidilglicerolo, che è essenziale per la funzionalità del fotosistema II [162].

Gli acidi grassi essenziali, come l'acido linoleico e l'acido α -linolenico, non possono essere sintetizzati de novo dagli esseri umani e devono quindi essere assunti con la dieta. Questi acidi grassi sono precursori di una serie di molecole bioattive, tra cui gli eicosanoidi e i docosanoidi, che svolgono ruoli chiave nella regolazione di processi fisiologici come l'infiammazione, la coagulazione del sangue e la pressione arteriosa [61]. Studi recenti hanno approfondito le vie biosintetiche coinvolte nella conversione di questi due acidi grassi in acidi grassi polinsaturi come l'acido arachidonico, l'acido eicosapentaenoico e l'acido docosaesaenoico. Questi processi includono una serie di desaturazioni e allungamenti della catena carboniosa, catalizzati da enzimi specifici come le desaturasi ed elongasi [61] rappresentati in Figure 1.14 e 1.15.

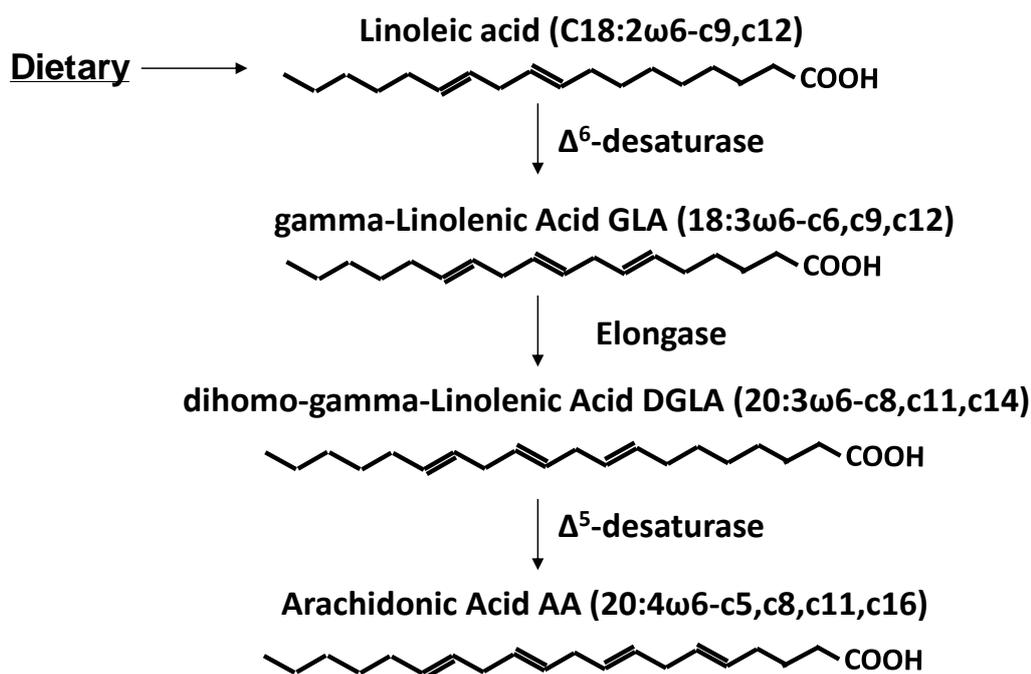


Figura 1.14. Sintesi degli acidi grassi essenziali della serie omega-6.

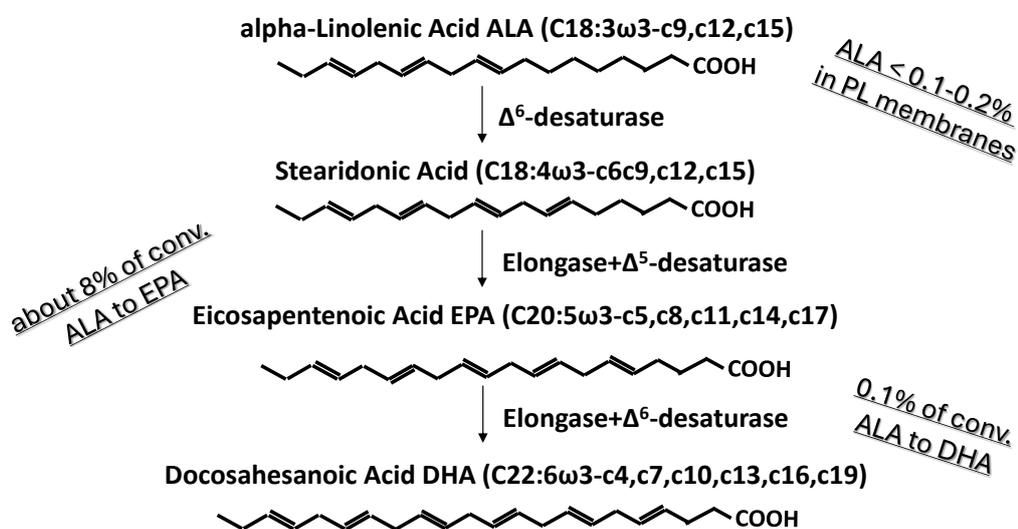


Figura 1.15. Sintesi degli acidi grassi essenziali della serie omega-3.

La regolazione degli enzimi coinvolti nella sintesi dei PUFAs è influenzata da vari fattori, tra cui l'apporto dietetico di acidi grassi, lo stato ormonale e persino la genetica individuale [163]. Ad esempio, è stato dimostrato che la desaturasi delta-

5 e delta-6, enzimi chiave nella conversione dell'acido α -linolenico in EPA e DHA, possono essere modulati dalla presenza di acidi grassi saturi e *trans* nella dieta, così come da ormoni come l'insulina e il glucagone [163]. In altre specie, come i pesci e alcuni organismi marini, la capacità di produrre DHA e EPA è particolarmente efficiente. Questo è uno dei motivi per cui questi organismi sono fonti ricche di PUFAs nella dieta umana. Le microalghe, in particolare, sono state oggetto di studi per il loro potenziale nella produzione sostenibile di PUFA a catena lunga, grazie alla loro capacità di convertire efficacemente l'acido α -linolenico in DHA, rendendole una risorsa preziosa per l'integrazione nutrizionale e per l'industria biotecnologica [164-165]. Nelle piante, la sintesi di acido α -linolenico e acido linoleico avviene nei plastidi attraverso specifiche vie biosintetiche che coinvolgono desaturasi posizionali. Questi enzimi introducono doppi legami specifici nelle catene di acidi grassi, un processo che è fortemente influenzato dalla temperatura e da altre condizioni ambientali. La capacità delle piante di sintetizzare questi acidi grassi è di fondamentale importanza per la loro sopravvivenza, in quanto questi lipidi sono componenti essenziali delle membrane cellulari e partecipano alla regolazione del bilancio idrico e alla protezione contro lo stress ossidativo [166].

1.4.2 Metabolismo dei lipidi

Il metabolismo dei lipidi comprende non solo la loro degradazione per la produzione di energia, ma anche l'interconversione tra diverse forme lipidiche e il loro riciclo all'interno delle cellule. Questi processi sono altamente regolati e variano tra i diversi organismi [158]. Negli esseri umani, la beta-ossidazione è il principale processo catabolico degli acidi grassi e avviene nei mitocondri e nei

perossisomi. Gli acidi grassi vengono attivati nel citoplasma, dove vengono convertiti in acil-CoA. L'acil-CoA viene trasportato nei mitocondri grazie al sistema della carnitina, un processo chiave che regola l'ingresso degli acidi grassi a lunga catena nei mitocondri per la beta-ossidazione [157-158]. Una volta all'interno del mitocondrio, l'acil-CoA subisce cicli di ossidazione, che rimuovono due atomi di carbonio alla volta sotto forma di acetil-CoA. L'acetil-CoA prodotto entra poi nel ciclo dell'acido citrico per la produzione di ATP [157]. Nei batteri, la beta-ossidazione avviene nel citoplasma, e molti batteri, come *Escherichia coli*, possiedono un sistema completo di enzimi beta-ossidativi simili a quelli mitocondriali degli eucarioti [167]. Nelle piante, la beta-ossidazione si verifica nei perossisomi e nei glicossisomi. Quest'ultimo è particolarmente attivo durante la germinazione dei semi, quando le riserve lipidiche vengono convertite in zuccheri per sostenere la crescita del seme [168].

Il metabolismo dei fosfolipidi è cruciale per il mantenimento della fluidità e della funzione delle membrane cellulari [169]. Le fosfolipasi sono gli enzimi chiave che degradano i fosfolipidi, liberando acidi grassi e molecole di segnalazione come l'acido arachidonico [169]. Questo acido grasso è il precursore degli eicosanoidi, una classe di composti bioattivi che includono prostaglandine, trombossani e leucotrieni, tutti coinvolti nella modulazione delle risposte infiammatorie e immunitarie [169]. I glicolipidi, che sono essenziali per la comunicazione cellulare e per la funzione immunitaria, subiscono un metabolismo specifico negli organismi viventi. Negli esseri umani, i glicolipidi vengono degradati principalmente attraverso il percorso lisosomiale. I difetti in questo processo possono portare a malattie da accumulo lisosomiale, come la malattia di Gaucher e la malattia di Tay-Sachs [170]. Nelle piante, i glicolipidi sono particolarmente importanti per la

stabilità delle membrane dei cloroplasti e sono regolati in risposta a condizioni ambientali estreme, come la siccità e le alte temperature [171].

1.5 Implicazioni Cliniche e Prospettive Future

Le alterazioni nella biosintesi e nel metabolismo dei lipidi sono strettamente correlate a una vasta gamma di patologie umane, tra cui obesità, diabete di tipo 2, malattie cardiovascolari e varie forme di cancro [172-173]. La comprensione dettagliata di questi processi è quindi cruciale per lo sviluppo di strategie terapeutiche innovative. Ad esempio, la modulazione della sintesi degli acidi grassi essenziali e dei loro metaboliti attivi offre potenziali vie per il trattamento di malattie infiammatorie e neurodegenerative. L'integrazione di EPA e DHA, sia attraverso la dieta che tramite supplementazione, è stata oggetto di numerosi studi clinici che ne hanno evidenziato i benefici nella prevenzione delle malattie cardiovascolari [47], nel miglioramento delle funzioni cognitive e nella modulazione delle risposte infiammatorie [61, 173]. Inoltre, l'ingegneria genetica di organismi vegetali e microbici per migliorare la produzione dei PUFA rappresenta un'area di ricerca in rapida crescita, con potenziali applicazioni per migliorare la qualità nutrizionale degli alimenti e per la produzione sostenibile di questi nutrienti essenziali [174]. La biosintesi e il metabolismo dei lipidi rappresentano un campo di studio estremamente dinamico, con implicazioni significative per la salute umana e per la biotecnologia. La complessità delle vie biosintetiche e la loro regolazione riflettono l'importanza cruciale dei lipidi per la vita cellulare. Le differenze nei processi lipidici tra gli esseri umani e altri organismi non solo illuminano la diversità biologica, ma offrono anche nuove opportunità per l'innovazione terapeutica e nutrizionale. Il progresso nella comprensione della

sintesi degli acidi grassi essenziali e del loro metabolismo potrebbe portare a nuove strategie per la prevenzione e il trattamento di malattie croniche, migliorando così la qualità della vita e riducendo l'incidenza delle malattie legate ai lipidi.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Lander E.S, Linton L.M, Birren B, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409, 860-921.
- [2] Collins F.S, Green E.D, Guttmacher A.E, Guyer M.S. "A vision for the future of genomic research". *Nature* (2003) , 422(6934),835-847.
- [3] Mortazavi A, Williams B.A, McCue K, Schaeffer L, WoldB. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nature*, 30 May 2008.
- [4] Domon B, Aebersold R. "Mass spectrometry and protein analysis". *Science* 2006, Apr 14, 312(5771):212-7. Doi:10.1126/science.1124619.
- [5] Nicholson J.K, Lindon J.C, Holmes E. "Metabonomic: understanding the metabolic responses of living system to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data". *Xenobiotica* 1999 Nov;29(11):1181-9. doi: 10.1080/004982599238047.
- [6] Han X, Yang K, Gross R. W. "Multi-dimensional mass spectrometry-based shotgun lipidomics and novel strategies for lipidomic analyses". *Mass Spectrom Rev.* 2012 Jan-Feb;31(1):134-78. doi: 10.1002/mas.20342. Epub 2011 Jul 13.
- [7] Hargrove J.L, Greenspan P, Hartle D.K. "Nutritional significance and metabolism of very long chain fatty alcohols and acids form dietary waxes". *Exp Biol Med* (Maywood). 2004 Mar; 229 (3): 215-26.
- [8] Gurr M.I, Harwood J.L, Frayn K.N. "Lipid Biochemistry:an introduction". 5th edition (2002).
- [9] Donohoe D.R, Collins L.B, Wali A, Bigler R, Sun W, Bultman S.J. The Warburgeffect dictates the mechanism of butyrate-mediated histone acetylation and cell proliferation. *Molecular Cell*, 48 (4), 612-626. 2012 Nov 30.doi:10.1016/j.molcel.2012.08.033
- [10] Fung K.Y.C, Cosgrove L, Lockett T, Head R, Tropping D,L. A review of the potential mechanisms for the lowering of colorectal oncogenesis by butyrate. *Br J Nutr.* 2012 Sep;108(5):820-31. Epub 2012 Jun 7. doi: 10.1017/S0007114512001948.
- [11] Sengupta S, Muir J.G, Gibson P.R. "Does butyrate protect from colorectal cancer?". *J Gastroenterol Hepatol.* 2006 Jan;21(1 Pt 2):209-18. doi: 10.1111/j.1440-1746.2006.04213.x.
- [12] Hamer H.M, Jonkers D, Venema K, Vanhoutvin S, Troost F.J, Brummer R.J. "Review article: the role of butyrate on colonic function". *Aliment Pharmacol*

The. 2008 Jan 15;27(2):104-19. doi: 10.1111/j.1365-2036.2007.03562.x. Epub 2007 Oct 25.

[13] Jump D.B. The biochemistry of n-3 polyunsaturated fatty acids. *Biol Chem* 2002 Mar 15;277(11):8755-8. doi: 10.1074/jbc.R100062200. Epub 2001 Dec 17.

[14] Aebersold, R., & Mann, M. "Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function". *Nature*, 14 September 2016. 537(7620), 347-355.

[15] Joyce, A. R., & Palsson, B. "The model organism as a system: integrating 'omics' data sets". *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006 Mar;7(3):198-210. doi: 10.1038/nrm1857.

[16] Karczewski, K. J., & Snyder, M. P." Integrative omics for health and disease".*Rev. Genet, Nat..Maggio 2018;19(5):299-310. doi: 10.1038/nrg.2018.4.*

[17] Fei Yin."Lipid metabolism and Alzheimer's disease: clinical evidence, mechanistic link and therapeutic promise".*FEBS J.* 2023 Mar;290(6):1420-1453. doi: 10.1111/febs.16344.

[18] Samuel, V. T., & Shulman, G. I. "Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links". *Cell.* 2012 Mar 2;148(5):852-71. doi: 10.1016/j.cell.2012.02.017.

[19] Kenneth R. Feingold, MD. "Obesity and Dyslipidemia". *Endotext*

[20] Rubin, B. K. "Mucus structure and properties in cystic fibrosis". *Paediatric Respiratory Rev.* 2007 Mar;8(1):4-7. doi: 10.1016/j.prrv.2007.02.004.

[21] Fahy, E., Subramaniam, S., Murphy, R. C., Nishijima, M., Raetz, C. R., Shimizu, T & Dennis, E. A. "Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids". *J Lipid Res.* 2009 Apr;50 Suppl(Suppl):S9-14. doi: 10.1194/jlr.R800095-JLR200.

[22] Hyun Uk Kim. "Lipid Metabolism in Plants" *Plants (Basel).* 2020 Jul; 9(7): 871.

[23] Iorio, E. L.; Ferreri, C.; *Lipidomica*; estratto da "Trattato Italiano di Medicina di Laboratorio", Vol. IX, "Diagnostica molecolare nella medicina di laboratorio" a cura di Balestrieri, C.; D'Amora, M.; Giordano, A.; Napoli, C.; Pavan, A.; Piccin - Nuova Libreria; Padova, 2009

[24] "Advances in Mass Spectrometry for Lipidomics"; Blanksby, S. J.; Mitchell, T. W.; *Annual Review of Analytical Chemistry*, 3; 433-465 (2010)

[25] *Analytical Methods in Lipidomics and Their Applications*"; Li, M.; Yang, L.; Bai, Y.; Liu, H.; *Analytical Chemistry*, 86; 161-175 (2014).

- [26] Ferreri C and Chatgialloglu C. Membrane lipidomics for personalized health. 1 st ed. United Kingdom: John Wiley & Sons, Ltd; 2015.
- [27] Wymann, M. P., & Schneider, R. "Lipid signalling in disease". *Nat Rev Mol Cell Biol.* Febbraio 2008;9(2):162-76. doi: 10.1038/nrm2335.
- [28] van Meer, G., Voelker, D. R., & Feigenson, G. W. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(2), 112-124.
- [29] K Simons 1, D Toomre. "Lipid rafts and signal transduction". *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2000 Oct;1(1):31-9. doi: 10.1038/35036052.
- [30] Meikle, P. J., & Christopher, M. J. Lipidomics is providing new insight into the metabolic syndrome and its sequelae. *Curr Opin Lipidol.* 2011 Jun;22(3):210-5. doi: 10.1097/MOL.0b013e3283453db.
- [31] Mielke, M. M., & Haughey, N. J. "Could plasma sphingolipids be diagnostic or prognostic biomarkers for Alzheimer's disease?". *Clin Lipidol.* 2012 Oct; 7(5): 525–536.
- [32] Hannun, Y. A., & Obeid, L. M. "Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids". *Nature Reviews Molecular Cell Biology* volume 9, pages139–150 (2008).
- [33] Laaksonen, R., Ekroos, K., Sysi-Aho, M., Hilvo, M., & Minkkinen, P. "Plasma ceramides predict cardiovascular death in patients with stable coronary artery disease and acute coronary syndrome beyond LDL-cholesterol". *Eur Heart J.* 2016 Jul 1;37(25):1967-76. doi: 10.1093/eurheartj/ehw148. Epub 2016 Apr 28.
- [34] Fanning, S., Selkoe, D., & Dettmer, U. (2020). "Parkinson's disease: proteinopathy or lipidopathy?". *NPJ Parkinson's Disease.*2020. 6(1), 1-13.
- [35] Wong, Y. C., & Krainc, D. (2017). "α-synuclein toxicity in neurodegeneration: mechanism and therapeutic strategies". *Nature Medicine*, 23(2), 177-186.
- [36] "Lipidomics: a global approach to lipid analysis in biological systems"; Watson, A. D.; *Journal of Lipid Research*, 47; 2101-2111 (2006).
- [37] A comprehensive classification system for lipids"; Fahy, E.; Subramaniam, S.; Brown, H. A.; Glass, C. K.; Merrill, A. H.; Murphy, R. C.; Raetz, C. R. H.; Russell, D. W.; Seyama, Y.; Shaw, W.; Shimizu, T.; Spener, F.; van Meer, G.; VanNieuwenhze, M. S.; White, S. H.; Witztum, J. L.; Dennis, E. A.; *Journal of Lipid Research*, 46; 839-861 (2005).

- [38] Ma, X.; Yang, J.; "Lipidomics in Cancer Biomarker Discovery" in Omics Technologies in Cancer Biomarker Discovery; Landes Biosciences, 2011; pp. 101-109.
- [39] Gurr., M. I.; James, A. T.; Lipid Biochemistry: An Introduction; Chapman and Hall; 3 rd Edition; London, New York; 1980; pp. 1-39 .
- [40] Voet, D.; Voet, J. G.; Pratt, C. W.; Fondamenti di Biochimica; Zanichelli; Bologna, 2007; pp. 223-236.
- [41] "Fatty Acids: Structures and Properties"; Rustan, A. C.; Drevon, C. A.; Encyclopedia of Life Sciences; John Wiley & Sons; 1-7 (2005).
- [42] Gunstone, Frank D. "The Chemistry of Oils and Fats: Sources, Composition, Properties and Uses." CRC Press, 2004.
- [43] Jakobsson A, Westerberg R, Jacobsson A. Fatty acid elongases in mammals: their regulation and roles in metabolism. Prog Lipid Res. 2006; 45: 237–249.
- [44] Commissione Europea, Autorità Europea per la sicurezza alimentare (EFSA):2016 scientific Opinion on Erucic Acid in Food. EFSA journal.
- [45] Agnieszka Galanty, Marta Grudzińska , Wojciech Paździora , Paweł Paško. Erucic Acid-Both Sides of the Story: A Concise Review on Its Beneficial and Toxic Properties. Molecules 2023 Feb 17;28(4):1924. doi:10.3390/molecules28041924.
- [46] Food and Drug Administration (FDA): 2017 Sec. 184.1555 Rapeseed oil.
- [47] Calder PC. N-3 fatty acids and cardiovascular disease: evidence explained and mechanisms explored. Clin Sci (Lond). 2004; 107:1-11.
- [48] Pepe S, McLennan PL. Dietary fish oil confers direct antiarrhythmic properties on the myocardium of rats. J Nutr. 1996; 126:34-42.
- [49] Calder, Philip C. "Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids, 1851(4), 2015, pp. 469-484.
- [50] Mozaffarian, Dariush, and J. H. Y. Wu. "Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: Effects on risk factors, molecular pathways, and clinical events." Journal of the American College of Cardiology, 58(20), 2011, pp. 2047-2067.
- [51] SanGiovanni, John Paul, and Emily Y. Chew. "The role of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in health and disease of the retina." Progress in Retinal and Eye Research, 24(1), 2005, pp. 87-138.

- [52] Bourre, Jean-Marie. "Effects of nutrients (in food) on the structure and function of the nervous system: update on dietary requirements for brain." Part 1: micronutrients. *Journal of Nutrition, Health & Aging*, 10(5), 2006, pp. 377-385.
- [53] Hibbeln, Joseph R. "Fish consumption and major depression." *The Lancet*, 351(9110), 1998, pp. 1213.
- [54] Dyerberg J, Bang HO, Stoffersen E, Moncada S, Vane JR. Eicosapentaenoic acid and prevention of thrombosis and atherosclerosis?. *Lancet*. 1978; 2:117-119
- [55] Bjerregaard P, Dyerberg J. Mortality from ischaemic heart disease and cerebrovascular disease in Greenland. *Int J Epidemiol*. 1988; 17:514-519
- [56] Daviglius ML, Stamler J, Orenca AJ, Dyer AR, Liu K, Greenland P, Walsh MK, Morris D, Shekelle RB. Fish consumption and 30-year risk of fatal myocardial infarction. *N Eng J Med*. 1997; 336:1046-1053.
- [57] C Galli I, F Marangoni. "Recent advances in the biology of n-6 fatty acids". *Nutrition*. 1997. NovDec;13(1112):97885. doi:10.1016/s08999007(97)00341-9.
- [58] Calder, P. C., & Yaqoob, P. "Omega-3 polyunsaturated fatty acids and human health outcomes." *BioFactors*. 2009 May-Jun;35(3):266-72. doi: 10.1002/biof.42
- [59] Sprecher H. Metabolism of highly unsaturated -3 and n-6 fatty acids. *Biochim Biophys Acta*. 2000; 1486:219-231.
- [60] Howe PR. Dietary fats and hypertension. Focus on fish oil. *Ann NY Acad Sci*. 1997; 827:339-352.
- [61] Calder PC. N-3 polyunsaturated fatty acids and inflammation: from molecular biology to the clinic. *Lipids*. 2003; 90:405-412.
- [62] Marchioli, R., Barzi, F., Bomba, E., Chieffo, C., Di Gregorio, D., Di Mascio, R., & Franzosi, M. G. (2002). "Early protection against sudden death by n-3 polyunsaturated fatty acids after myocardial infarction: Time-course analysis of the results of the GISSI-Prevenzione." *Circulation*, 105(16), 1897-1903.
- [63] Macchia A, Levantesi G, Franzosi MG, Geraci E, Maggioni AP, Marfisi R, Nicolosi GL, Schweiger C, Tavazzi L, Tognoni G, Valagussa F, Marchioli R. GISSI-Prevenzione Investigators. Left ventricular systolic dysfunction, total mortality, and sudden death in patients with myocardial infarction treated with n3 polyunsaturated fatty acids. *Eur J Heart Fail*. 2005; 7:904-909.
- [64] Manuel A. González Hernández, Emanuel E. Johan W.E. Jocken and Ellen E. Blaak. "The Short-Chain Fatty Acid Acetate in Body Weight Control and Insulin Sensitivity". *Nutrients* 2019, 11(8), 1943; <https://doi.org/10.3390/nu11081943>.

- [65] Wong, J. M., de Souza, R., Kendall, C. W., Emam, A., & Jenkins, D. J. “Colonic health: fermentation and short chain fatty acids.” *Journal of Clinical Gastroenterology*. 2006. 40(3), 235-243.
- [66] Hosseini, E., Grootaert, C., Verstraete, W., & Van de Wiele, T. “Propionate as a health-promoting microbial metabolite in the human gut.” *Nutrition Reviews*, 2011, 69(5), 245-258.
- [67] Macfarlane, G. T., & Macfarlane, S. “Bacteria, colonic fermentation, and gastrointestinal health.” *Journal of AOAC International*, (2012). 95(1), 50-60.
- [68] Weete JD (ed.). *Lipid biochemistry of fungi and other organism*. New York NY; Springer US: 1980.
- [69] Kim Ekroos (ed.). *Lipidomics. Technologies and applications*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA, 2012.
- [70] Eric Yen C-L, Stone SJ, Koliwad S, Harris C, Farese Jr RV. Thematic review series: glycerolipids. DGAT enzymes and triacylglycerol biosynthesis. *J Lipid Res*. 2008; 49: 2283–2301.
- [71] Xu C and Shanklin J. Triacylglycerol metabolism, function, and accumulation in plant vegetative tissues. *Annu. Rev. Plant Biol*. 2016; 67: 13.1– 13.28.
- [72] Unger RH. Lipotoxic diseases. *Annu. Rev. Med*. 2002; 53: 319–336.
- [73] Friedman J. Fat in all the wrong places. *Nature*. 2002; 415: 268–269.
- [74] Kayden HJ, Senior JR and Mattson FH. The monoglyceride pathway of fat absorption in man. *J. Clin. Invest*. 1967; 46: 1695–1703.
- [75] Mansbach CM, and Gorelick F. Development and physiological regulation of intestinal lipid absorption. II. Dietary lipid absorption, complex lipid synthesis, and the intracellular packaging and secretion of chylomicrons. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol*. 2007; 293: 645–650.
- [76] Mattson H and Volpenhein RA. The specific distribution acids in the triglycerides of plants of unsaturated fatty. *J Lipid Res*. 1963; 4: 392–396.
- [77] Mattson FH, and Lutton ES. The specific distribution of fatty acids in the glycerides of animal and vegetable fats. *J Biol Chem*. 1950; 233: 868–871.
- [78] Savary P, Flanzly J and Desnuelle P. Emploi de la lipase pancréatique pour l'étude de la structure des corps gras naturels. *Biochim Biophys Acta*. 1957; 24: 414–423.
- [79] Mattson FH and Volpenhein R. The specific distribution of fatty acids in the glycerides of vegetable fats. *J Biol Chem*. 1961; 236: 1891–1894.

- [80] Belitz HD, Grosch W, Schieberle P (eds.). Food chemistry. 4th revised and extended edition. Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2009.
- [81] Christie WW, Han X. Lipid analysis. Isolation, separation, identification and lipidomic analysis. 4th ed. England: Oily Press; 2010.
- [82] Noor IM, Hasan M, Ramachandran KB. Effect of operating variables on the hydrolysis rate of palm oil by lipase. *Process Biochem.* 2003; 39: 13–20.
- [83] Berger M, Schneider MP. Enzymatic esterification of glycerol II. Lipase catalyzed synthesis of regioisomerically pure 1(3)-rac-monoacylglycerols. *J Am Oil Chem Soc.* 1992; 69: 961–965.
- [84] Yang B, Zhao G, Lin H. Hydrolysis of olive oil with immobilized lipase in a tapered column reactor. *Chin J Process Eng.* 2003; 3: 206–211.
- [85] Chew YH, Chua LS, Cheng KK, Sarmidi MR, Abdul AR, Lee CT. Kinetic study on the hydrolysis of palm olein using immobilized lipase. *Biochem Eng J.* 2008; 39: 516–520.
- [86] Devi P, Zhang H, Damstrup ML, Guo Z, Zhang L, Lue BM, Xu X. Enzymatic synthesis of designer lipids. *OCL.* 2008; 15: 189–195.
- [87] Jackson MA, King JW. Lipase-catalyzed glycerolysis of soybean oil in supercritical carbon dioxide. *J Am Oil Chem Soc.* 1997; 74: 103–106.
- [88] Yasunaga K, Glinsmann WH, Seo Y, Katsuragi Y, Kobayashi S, Flickinger B, Kennepohl E, Yasukawa T, Borzelleca JF. Safety aspects regarding the consumption of high-dose dietary diacylglycerol oil in men and women in a doubleblind controlled trial in comparison with consumption of a triacylglycerol control oil. *Food Chem Toxicol.* 2004; 42: 1419–1429.
- [89] Moschidis MC. Phosphonolipids. *Prog Lipid Res.* 1985; 23: 223–246.
- [90] Casimir CA and David B (eds.). Food lipids. Chemistry, nutrition, and biotechnology. 3rd ed. New York NW: CRC Press Taylor and Francis Group; 2008.
- [91] Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K and Walter P. Molecular biology of the cells. 4th ed. New York NW: Garland Science; 2012.
- [92] Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K and Walter P. Molecular biology of the cells. 4th ed. New York NW: Garland Science; 2012.
- [93] Pires LN, Brandão GC, Teixeira LSG. Determination of phospholipids in soybean lecithin samples via the phosphorus monoxide molecule by high-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry. *Food Chem.* 2017; 225: 162–166.

- [94] Rydhag L and Wilton I. The function of phospholipids of soybean lecithin in emulsions. *J Am Oil Chem Soc.* 1981; 58: 830–837.
- [95] Liu L, Waters DLE, Rose TJ, Bao J, King GJ. Phospholipids in rice: Significance in grain quality and health benefits: A review. *Food Chem.* 2013; 139: 1133–1145.
- [96] Tochisawa K, Hosokawa M, Kohno H, Odashima S, Takahashi K. Effect of phospholipids containing docosahexaenoic acid on differentiation and growth of HL-60 human promyelocytic leukemia cells. *J Jpn Oil Chem Soc.* 1997; 46: 383–390.
- [97] Hosokawa M, Sato A, Ishigamori H, Kohno H, Tanaka T, Takahashi K. Synergistic effects of highly unsaturated fatty acid-containing phosphatidylethanolamine on differentiation of human leukemia HL-60 cells by dibutyryl cyclic adenosine monophosphate. *Japanese J Cancer Res.* 2001; 92: 666–672.
- [98] Hossain Z, Konishi M, Hosokawa M, Takahashi K. Effect of polyunsaturated fatty acid-enriched phosphatidylcholine and phosphatidylserine on butyrate-induced growth inhibition, differentiation and apoptosis in Caco-2 cells. *Cell Biochem Function.* 2006; 24: 159–165.
- [99] Casimir CA and David B (eds.). *Food lipids. Chemistry, nutrition, and biotechnology.* 3rd ed. New York NY: CRC Press Taylor and Francis Group; 2008.
- [100] Gerl MJ, Vaz WLC, Domingues N, Klose C, Surma MA, Sampaio JL, Almeida MS, Rodrigues G, Araújo-Gonçalves P, Ferreira J, Borbinha C, Marto JP, Viana-Baptista M, Simons K, Vieira OV. Cholesterol is inefficiently converted to cholesteryl esters in the blood of cardiovascular disease patients. *Sci Rep.* 2018; 8: 1–11.
- [101] Tosi MR, Tugnoli V. Cholesteryl esters in malignancy. *Clin Chim Acta.* 2005; 359: 27–45.
- [102] Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds.). *The metabolic basis of inherited disease.* 6th ed. New York: McGraw-Hill, 1989.
- [103] Tall AR, Costet P, Wang N. Regulation and mechanism of macrophage cholesterol efflux. *J Clin Invest.* 2002; 110: 899–904.
- [104] Toth PP, Davidson MH. Therapeutic interventions targeted at the augmentation of reverse cholesterol transport. *Curr Opin Cardiol.* 2004; 19: 374–379.
- [105] Ferreri C and Chatgililoglu C. *Membrane lipidomics for personalized health.* 1st ed. United Kingdom: John Wiley & Sons, Ltd; 2015.

- [106] Aro A, Jauhiainen M, Partanen R, Salminen I, Mutanen M. Stearic acid, trans fatty acids, and dairy fat: effects on serum and lipoprotein lipids, apolipoproteins, lipoprotein(a), and lipid transfer protein in healthy subjects. *Am J Clin Nutr.* 1997; 65: 1419–1426.
- [107] Soliman GA. Dietary cholesterol and the lack of evidence in cardiovascular disease. *Nutrients.* 2018; 10: 1–14.
- [108] Top Food Sources of Cholesterol among U.S Population, 2005–2006 NHANES. <http://epi.grants.cancer.gov/diet/foodsources/cholesterol/table1.html> (accessed on 10 May 2018).
- [109] Jones PJ. Dietary cholesterol and the risk of cardiovascular disease in patients: A review of the Harvard Egg Study and other data. *Int J Clin Pract.* 2009; 63: 1–8.
- [110] Lichtenstein AH, Appel LJ, Brands M, Carnethon M, Daniels S, Franch HA, Franklin B, Kris-Etherton P, Harris WS, Howard B, Karanja N, Lefevre M, Rudel L, Sacks F, Van Horn L, Winston M, Wylie-Rosett J. Diet and lifestyle recommendations revision 2006: a scientific statement from the American Heart Association Nutrition Committee. *Circulation.* 2006; 114: 82–96.
- [111] USDA and US Department of Health and Human Services. Dietary guidelines for Americans. 7th ed. Washington (DC): US Government Printing Office; 2010.
- [112] Berger S, Raman G, Vishwanathan R, Jacques PF, and Johnson EJ. Dietary cholesterol and cardiovascular disease: a systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr.* 2015; 102: 276–294.
- [113] Chang TY, Chang CCY, Cheng D. Acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase. *Annu Rev Biochem.* 1997; 66: 613– 38.
- [114] Brown MS, Goldstein JL. The cholesteryl ester cycle in macrophage foam cells. *J Biol Chem.* 1980; 255: 9344–9352.
- [115] Blanchfield JR. Phytosterol esters (Plant Sterol and Stanol Esters). Available online: <https://www.ifst.org/resources/informationstatements/> phytosterol-esters-plant-sterol-and-stanol-esters (accessed on 20 Aug 2019).
- [116] Valsta LM, Lemstrom A, Ovaskainen ML, Lampi AM, Toivo J, Korhonen T, Piironen V. Estimation of plant sterol and cholesterol intake in Finland: quality of new values and their effect on intake. *Brit J Nutr.* 2004; 92: 671-8.
- [117] Ogbe RJ, Ochalefu DO, Mafulul SG and Olaniru OB. A review on dietary phytosterols: Their occurrence, metabolism and health benefits. *Asian J Plant Sci Res.* 2015; 5:10-21.

- [118] Weihrauch JL, Gardner JM. Sterol content of foods of plant origin. *J Am Dietet Assoc.* 1978; 73: 39–47.
- [119] Andersson SW, Skinner J, Ellegard L, Welch AA, Bingham S, Mulligan A, Andersson H, Khaw KT. Intake of dietary plant sterols is inversely related to serum cholesterol concentration in men and women in the EPIC Norfolk population: a cross-sectional study. *Eur J Clin Nutr.* 2004; 58: 1378–1385.
- [120] Pollak OJ. Reduction of Blood Cholesterol in Man. *Circulation.* 1953; 7: 702–706.
- [121] Tilvis RS, Miehinen TA. Serum plant sterols and their relation to cholesterol absorption. *Am J Clin Nutr.* 1986; 43: 92–97.
- [122] Jones PJ. Ingestion of phytosterols is not potentially hazardous. *J Nutr.* 2007; 137: 2485–2486.
- [123] Berger A, Jones PJH, Abumweis SS. Plant sterols: factors affecting their efficacy and safety as functional food ingredients. *Lipids Health Dis.* 2004; 3: 1–19.
- [124] Katan MB, Grundy SM, Jones P, Law M, Miettinen T, Paoletti R. Efficacy and safety of plant stanols and sterols in the management of blood cholesterol levels. *Mayo Clin Proc.* 2003; 78: 965–978.
- [125] European Foods Safety Authority, 2006, Available online: <http://www.efsa.europa.eu/en/press/news> (accessed on 20 Aug 2019).
- [126] Normen L, Dutta P, Lia A, Andersson H. Soy sterol esters and betasitostanol ester as inhibitors of cholesterol absorption in human small bowel. *Am J Clin Nutr.* 2000; 71: 908–913.
- [127] Jones PJ, Raeini-Sarjaz M, Ntanos FY, Vanstone CA, Feng JY, Parsons WE. Modulation of plasma lipid levels and cholesterol kinetics by phytosterol versus phytostanol esters. *J Lipid Res.* 2000; 41: 697–705.
- [128] Halling KK, Slotte JP. Membrane properties of plant sterols in phospholipid bilayers as determined by differential scanning calorimetry, resonance energy transfer and detergent-induced solubilization. *Biochim Biophys Acta.* 2004; 1664:161–171.
- [129] Ratnayake WM, Plouffe L, L'Abbe MR, Trick K, Mueller R, Hayward S. Comparative health effects of margarines fortified with plant sterols and stanols on a rat model for hemorrhagic stroke. *Lipids.* 2003; 38: 1237–1347.
- [130] Gillard BK, Thurmon LT, Marcus DM. Variable subcellular localization of glycosphingolipids. *Glycobiology.* 1993; 3: 57–67.

- [131] Malhotra R. Membrane glycolipids: functional heterogeneity: a review. *Biochem Anal Biochem.* 2012; 1: 1–5.
- [132] Belitz HD, Grosch W, Schieberle P (eds.). *Food chemistry*. 4th revised and extended edition. Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2009.
- [133] Christie WW (ed.). *Advances in Lipid Methodology*. 3rd ed. Philadelphia: USA. The Oily Press; 1996.
- [134] Kim Y, Kim E-H, Lee C, Kim, M-H, Rho J-R. Two new monogalactosyl diacylglycerols from brown alga *Sargassum thunbergii*. *Lipids.* 2007; 42: 395–399.
- [135] Son B-W, Cho Y-J, Kim N-K, Choi H-D. New glyceroglycolipids from the brown alga *Sargassum thunbergii*. *Bull Korean Chem Soc.* 1992; 13: 584–584.
- [136] Zhang J, Li C, Yu G and Guan H. Total synthesis and structure-activity relationship of glycolipids from marine organisms. *Mar Drugs.* 2014; 12: 3634–3659.
- [137] Morimoto T, Nagatsu A, Murakami N, Sakakibara J, Tokuda H, Nishino H, Iwashima A. Anti-tumour-promoting glyceroglycolipids from the green alga, *Chlorella vulgaris*. *Phytochemistry.* 1995; 40: 1433–1437.
- [138] Shirahashi H, Murakami N, Watanabe M, Nagatsu A, Sakakibara J, Tokuda H, Nishino H, Iwashima, A. Isolation and identification of anti-tumor-promoting principles from the fresh-water cyanobacterium *Phormidium tenue*. *Chem Pharm Bull.* 1993; 41: 1664–1666.
- [139] Larsen E, Kharazmi A, Christensen LP, Christensen SB. An anti-inflammatory galactolipid from rose hip (*Rosa canina*) that inhibits chemotaxis of human peripheral blood neutrophils in vitro. *J Nat Prod.* 2003; 66: 994–995.
- [140] D'Angelo G, Capasso S, Sticco L and Russo D. Glycosphingolipids: synthesis and functions. *FEBS Journal.* 2013; 280: 6338–6353.
- [141] Merrill AH Jr. Sphingolipid and glycosphingolipid metabolic pathways in the era of sphingolipidomics. *Chem Rev.* 2011; 111: 6387–6422.
- [142] Warnecke D and Heinz E. Recently discovered functions of glucosylceramides in plants and fungi. *Cell. Mol. Life Sci.* 2003; 60: 919–941.
- [143] Ishizuka I. Chemistry and functional distribution of sulfoglycolipids. *Prog Lipid Res.* 1997; 36: 245–319.
- [144] Takahashi T and Suzuki T. Role of sulfatide in normal and pathological cells and tissues. *J Lipid Res.* 2012; 53: 1437–1450.

- [145] Yu RK, Tsai Y-T, Ariga T, and Yanagisawa M. Structures, biosynthesis, and functions of gangliosides - An overview. *J Oleo Sci.* 2011; 60: 537–544.
- [146] Yu RK, Nakatani Y, Yanagisawa M. The role of glycosphingolipid metabolism in the developing brain. *J Lipid Res.* 2009; 50: 440–445.
- [147] Yanagisawa M. Stem Cell Glycolipids. *Neurochem Res.* 2011; 36:1623–1635.
- [148] Yu RK, Suzuki Y, Yanagisawa M. Membrane glycolipids in stem cells. *FEBS Lett.* 2010; 584: 1694–1699.7
- [149] Kattner G, Hagen W, Falk-Petersen S, Sargent JR, Henderson RJ. Antarctic krill *Thysanoessa macrura* fills a major gap in marine lipogenic pathways. *Mar Ecol Progr Ser.* 1996; 134: 295–298.
- [150] Saito H, Murata M. Origin of the monoene fats in the lipid of midwater fishes: relationship between the lipids of myctophids and those of their prey. *Mar Ecol Progr Ser.* 1998; 168: 21–33.
- [151] Blomquist GJ, Soliday CL, Byers BA, Brakke JW, Jackson LL. Cuticular lipids of insects: V. Cuticular wax esters of secondary alcohols from the grasshoppers *Melanoplus packardii* and *Melanoplus sanguinipes*. *Lipids.* 1972; 7: 356–362.
- [152] Samuelson DW, Nelson DR (eds.). *Insect Lipids: Chemistry, Biochemistry and Biology.* Lincoln: University of Nebraska Press; 1993.
- [153] Nelson DR, Freeman TP, Buckner JS. 2000. Waxes and lipids associated with the external waxy structures of nymphs and pupae of the giant whitefly, *Aleurodicus dugesii*. *Comp Biochem Physio B.* 2000; 125: 265–278.
- [154] Casimir CA and David B (eds.). *Food lipids. Chemistry, nutrition, and biotechnology.* 3rd ed. New York NW: CRC Press Taylor and Francis Group; 2008.
- [155] Binnington K, Retnakaran A, (eds.). *The Physiology of the Insect Epidermis.* 240-251. CSIRO, Australia; 1991.
- [156] Gibbs AG. Water-proofing properties of cuticular lipids. *Amer Zool.* 1998; 38: 471–482.
- [157] Berg, J.M., Tymoczko, J.L., & Stryer, L. (2015). *Biochimica.* Zanichelli Editore.
- [158] Lehninger, A.L., Nelson, D.L., & Cox, M.M. (2017). *Principles of Biochemistry.* W.H. Freeman.

- [159] Frayn, K.N. (2013). *Metabolic Regulation: A Human Perspective*. Wiley-Blackwell.
- [160] Rock, C.O., & Jackowski, S. (2002). “Forty Years of Bacterial Fatty Acid Synthesis.” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 292(5), 1155–1166. DOI: 10.1006/bbrc.2002.6741.
- [161] Ohlrogge, J., & Browse, J. (1995). “Lipid Biosynthesis.” *The Plant Cell*, 7(7), 957–970. DOI: 10.1105/tpc.7.7.957.
- [162] Ohlrogge, J.B., & Browse, J. (1995). “Lipid Biosynthesis.” *The Plant Cell*, 7(7), 957–970. DOI: 10.1105/tpc.7.7.957.
- [163] Jump, D.B. “Fatty Acid Regulation of Hepatic Lipid Metabolism”, *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 2011.
- [164] Tocher, D.R. “Omega-3 Fatty Acids and Marine Fish Oils: Benefits and Limitations”, *Journal of Fish Biology*, 2015.
- [165] Harel, M., Lee, S.Y., Alper, H.S. “Biotechnological Advances in Microalgal Production of Omega-3 Fatty Acids”, *Journal of Applied Phycology*, 2016.
- [166] Mei He, Chun-Xue Qin , Xu Wang e Nai-Zheng Ding. “Plant Unsaturated Fatty Acids: Biosynthesis and Regulation”. *Front Plant Sci.* 2020; 11: 390.
- [167] Madigan, M.T., Martinko, J.M., Bender, K.S., et al. “*Brock. Biologia dei microrganismi*”. Pearson, 2014
- [168] Smith, A.M., Zeeman, S.C., Smith, S.M. “Starch Degradation”, *Annual Review of Plant Biology*, 2005.
- [169] Vance, D.E., Vance, J.E. “*Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*”. Elsevier, 2008.
- [170] Kolter, T., Sandhoff, K. “Principles of Lysosomal Membrane Digestion: Glycosphingolipid Catabolism and Disease”, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 2006.
- [171] Taiz, L., Zeiger, E. “*Fisiologia Vegetale*”. Piccin, 2011
- [172] Hotamisligil, G.S. “Inflammation and Metabolic Disorders”, *Nature*, 2006.
- [173] Kang, J.X., Wang, J., Wu, L., et al. “Effects of Omega-3 Fatty Acids on Cancer Progression: Mechanistic Insights”, *International Journal of Molecular Sciences*, 2020

[174] Aabid Manzoor Shah, Wu Yang, Hassan Mohamed, Yingtong Zhang, corresponding author, and Yuanda Song corresponding author. "Microbes: A Hidden Treasure of Polyunsaturated Fatty Acids". *Front Nutr.* 2022; 9: 827837.

Pagina lasciata intenzionalmente bianca

Capitolo 2

Lipidi e salute

2.1 *Dai tempi antichi ad oggi*

Già nel 460 a.C. Ippocrate intuì l'esistenza di una relazione tra alimentazione e stato di salute, sostenne infatti che la causa delle malattie è in generale da individuare in uno squilibrio tra il corpo e l'ambiente esterno comprese le condizioni climatiche, lo stile di vita e soprattutto l'alimentazione. Per i medici ippocratici, la diagnosi e la prognosi di una malattia si basava soprattutto sull'osservazione delle escrezioni corporee (feci, urine, emorragie, catarro, sudore). Se la diagnosi e la prognosi si basavano sulle caratteristiche dei fluidi in uscita, la terapia doveva necessariamente basarsi sulla regolazione delle entrate, cioè sulla dieta. Per i greci, in accordo con l'etimologia della parola greca "*diata*", la dieta riguardava non solo l'alimentazione ma lo stile di vita nella sua globalità, includendo l'esercizio fisico, il riposo la vita sessuale ecc. Ippocrate ha affermato che gli alimenti ed esercizi hanno virtù reciprocamente opposte che contribuiscono insieme al mantenimento di un buono stato di salute. Per loro natura gli esercizi disperdono le energie disponibili, mentre i cibi e le bevande compensano le perdite, Ippocrate pronunciò il celebre aforisma "il cibo sia la tua medicina e la tua medicina sia il cibo". Molti anni più tardi, intorno al 1025 d.C., Avicenna elaborò "*il canone della medicina*", opera che divenne il manuale medico più seguito in Europa [1] fino al 1700 circa, nella quale si afferma che la maggior parte delle malattie consegue ad errori protratti e continui nell'alimentazione. Molti secoli dopo l'*Organizzazione Mondiale della Sanità* (OMS) ha dichiarato che circa 1/3 delle malattie cardiovascolari e dei tumori potrebbero essere evitate attraverso una sana

ed equilibrata alimentazione. Secondo studi recenti solo il 5-10% di tutti i tumori può essere attribuito a fattori genetici, mentre il rimanente 90-95% sarebbe correlato a fattori ambientali e allo stile di vita: fumo di sigaretta, dieta, alcol, esposizione al sole, inquinamento ambientale, infezioni, stress, obesità e sedentarietà [2, 3]. Alcuni studi hanno dimostrato che un'alimentazione scorretta può aumentare il rischio di infarto miocardico, rendendo ragione del 30% del rischio a livello di popolazione [4].

I lipidi, comunemente noti come grassi hanno avuto un ruolo fondamentale nell'alimentazione umana sin dai tempi antichi fino ai giorni nostri. La loro importanza si riflette non solo dal punto di vista nutrizionale, ma anche culturale e sociale, fin dall'antichità, i grassi sono stati una delle principali fonti di energia per l'uomo, cacciatori e raccoglitori si affidavano ai grassi animali e vegetali per soddisfare il loro fabbisogno energetico, soprattutto in periodi di scarsità alimentare. I grassi erano fondamentali per la sopravvivenza durante i periodi di carestia, poiché il corpo umano è in grado di immagazzinare l'energia in eccesso sottoforma di tessuto adiposo. In molte culture antiche, i grassi animali erano considerati preziosi e spesso usati in rituali religiosi o come offerta agli dèi. Il burro, l'olio d'oliva, e altri grassi erano simboli di prosperità e abbondanza. Nell'antica Grecia, l'olio d'oliva era un alimento essenziale, utilizzato non solo in cucina ma anche per la cura del corpo e per scopi medicinali; era considerato un simbolo di civilizzazione e salute. Durante il medioevo, in Europa il lardo e il burro erano tra i grassi più utilizzati, specialmente nelle regioni più fredde dove l'olio d'oliva era meno disponibile, questi grassi erano utilizzati sia per cucinare che per conservare gli alimenti. Successivamente con l'espansione dei commerci durante il Rinascimento e l'età moderna, nuovi tipi di grassi come l'olio di palma e il burro

di cacao entrarono a far parte della dieta Europea [5]. L'industrializzazione ha portato alla produzione sulla larga scala di grassi vegetali e alla creazione di prodotti alternativi come la margarina, alimenti spesso promossi come alternative più economiche e salutari rispetto ai grassi animali [6].

A partire dal XX secolo, i grassi alimentari sono stati oggetto di dibattiti scientifici e nutrizionali, per esempio il ruolo dei grassi saturi e *trans* nella dieta è stato ampiamente studiato portando a cambiamenti nelle linee guida alimentari e alla promozione di grassi insaturi come quelli presenti in noci, pesce e oli vegetali. Oggi c'è una maggiore consapevolezza sull'importanza di bilanciare l'apporto dei grassi nella dieta, riconoscendo il loro ruolo essenziale nella salute del cervello, nella regolazione ormonale e nell'assorbimento delle vitamine liposolubili A, D, E e K [7]. La domanda di alimenti a basso contenuto di grassi, l'adozione di diete a base vegetale e lo sviluppo di alternative ai grassi tradizionali sono testimonianze di come i grassi continuano a evolversi nel contesto alimentare moderno [8].

2.2 Raccomandazioni nutrizionali dei lipidi

In questi ultimi anni, così come tutte le discipline biomediche, anche la nutrizione umana ha assistito ad un aumento vertiginoso della letteratura scientifica del settore. Considerando solo le riviste indicizzate su PubMed, al 2014, il numero dei lavori rispondenti alla parola chiave "nutrition" erano superiori a 300.000, dei quali quasi 140.000 pubblicati dal 2005 al 2014 e più di 19.000 nel corso del solo 2014. Sin dalla fine degli anni '70, la Società Italiana di Nutrizione Umana denominata con l'acronimo SINU si è impegnata a definire per la popolazione italiana i cosiddetti *Livelli di assunzione di riferimento di nutrienti ed energia* (LARN) a partire dal modello del documento americano relativo alle *Recommended*

Dietary Allowances. La IV revisione dei LARN ha coinciso con l'evoluzione del concetto di adeguatezza nutrizionale che è intervenuta, a livello internazionale, nel periodo intercorso dall'ultima pubblicazione dei LARN nel 1996. Questo ha richiesto un lavoro sicuramente più impegnativo che ha portato alla nascita dei nuovi LARN, i quali hanno mantenuto lo stesso acronimo, ma sono cambiati nel loro significato. Infatti, si parla di non più livelli di assunzione raccomandati, ma livelli di assunzione di riferimento dei nutrienti. Dal concetto di raccomandazione (*Recommended Dietary Intake*, RDI) – espresso da un singolo valore tarato sul limite superiore del fabbisogno nel gruppo di popolazione d'interesse, si è passati, infatti, a un sistema articolato di valori di riferimento per la dieta (*Dietary Reference Values*, DRV). Pertanto, i DRV completano il concetto di RDI, introducendo una serie di ulteriori riferimenti utili a una migliore definizione degli apporti dei nutrienti in grado di soddisfare i fabbisogni individuali e di gruppo, e di assicurare l'adeguatezza della dieta. La revisione dei LARN è stata guidata da un gruppo di coordinamento, di otto esperti, individuati nel 2009 dagli allora presidenti della SINU e dell'INRAN (Istituto Nazionale di Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione), oggi conosciuto come CREA (Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria). Definita la metodologia di lavoro e identificati gli esperti per le varie aree scientifiche, come criterio generale, si è considerata l'adeguatezza della dieta sulla base della prevenzione delle manifestazioni cliniche da carenza, mantenimento sia delle riserve del nutriente nell'organismo sia delle funzioni biochimico-fisiologiche; prevenzione nutrizionale delle malattie e relazioni della dieta con morbosità e mortalità.

Per la stesura dei capitoli sui singoli nutrienti si è prevista: una breve introduzione (definizione e terminologia specifica, informazioni chimico-fisiche,

struttura del nutriente, ecc.), descrizione del metabolismo (assorbimento, biodisponibilità, quantità e distribuzione nell'organismo, riserve, ecc.), definizione del ruolo nutrizionale, carenza e tossicità, fonti alimentari, confronto tra criteri, *outcome* e valori indicati nei documenti di riferimento presenti in letteratura, indicazione dei LARN adottati per la popolazione italiana nelle diverse classi d'età e loro variazioni in funzione di gravidanza e allattamento. Questo schema è stato utilizzato di norma per tutti gli argomenti, con un'organizzazione differente per alcuni capitoli. Il gruppo di coordinamento ha stabilito poi le modalità di revisione sistematica della letteratura e i criteri da adottare per valutare la forza dell'evidenza scientifica disponibile. Un altro aspetto preso in esame è stato la definizione delle classi d'età e la scelta dei pesi esemplificativi per la popolazione italiana da utilizzare per la formulazione dei LARN. L'attività è stata condotta tramite gruppi di lavoro su: Energia, Proteine, Lipidi, Carboidrati e Fibra Alimentare, Acqua, Vitamine liposolubili, Vitamine idrosolubili, Minerali macro, Minerali micro, Etanolo, Composti bioattivi presenti negli alimenti con potenziali effetti salutistici e funzionali (es. carotenoidi, polifenoli, ecc.). Altri quattro gruppi "trasversali" hanno prodotto elaborazioni su gravidanza e allattamento, età evolutiva, età geriatrica e attività fisica, un ultimo gruppo sulla definizione delle porzioni standard di riferimento per la dieta italiana. I documenti finali sono stati sottoposti a una *peer review* di revisori esterni e interni ai gruppi di lavoro, e le modifiche proposte sono state discusse e accettate dal gruppo di coordinamento prima di giungere all'approvazione del documento finale.

I LARN rappresentano uno strumento fondamentale per la promozione di un'alimentazione sana e bilanciata. Questi valori di riferimento vengono stabiliti sulla base delle evidenze scientifiche più aggiornate e vengono utilizzati per guidare

le politiche nutrizionali, l'educazione alimentare, e la formulazione di diete per la popolazione italiana. Tra i vari nutrienti considerati, i lipidi occupano un posto centrale, in quanto giocano un ruolo cruciale nella salute umana, sia in termini di prevenzione delle malattie croniche che di mantenimento delle funzioni fisiologiche essenziali. I lipidi non sono solo una fonte concentrata di energia, ma sono anche fondamentali per la struttura delle membrane cellulari, la sintesi di ormoni, la protezione degli organi interni e l'assorbimento delle vitamine liposolubili. Tuttavia, un apporto eccessivo o scorretto dei lipidi può contribuire all'insorgenza di diverse patologie, come malattie cardiovascolari, obesità, diabete e certi tipi di cancro [9]. Le raccomandazioni dei LARN sui lipidi non si limitano a indicare la quantità totale dei grassi da consumare, ma forniscono anche specifiche indicazioni sulla distribuzione ottimale tra i diversi tipi di grassi, come grassi saturi, monoinsaturi, polinsaturi e *trans*. I lipidi dovrebbero costituire tra il 20% e il 35% dell'apporto energetico totale giornaliero per gli adulti sani; questo intervallo permette una flessibilità adeguata a adattare l'apporto lipidico alle esigenze individuali, considerando fattori come l'età, il sesso, il livello di attività fisica e condizioni specifiche come la gravidanza o l'allattamento. È importante notare che, sebbene la quantità totale di lipidi sia rilevante, la qualità dei grassi introdotti con la dieta è altrettanto, se non più, importante. Per i bambini, i LARN raccomandano un apporto lipidico maggiore rispetto agli adulti, soprattutto durante i primi anni di vita (nei primi tre anni di vita, i grassi dovrebbero rappresentare fino al 40% dell'apporto energetico totale giornaliero). Questo è fondamentale per sostenere la crescita rapida e lo sviluppo del sistema nervoso centrale. Man mano che il bambino cresce, l'apporto lipidico dovrebbe gradualmente ridursi, stabilizzandosi intorno al 30-35% nell'età adolescenziale, per poi raggiungere livelli consigliati per gli adulti.

In questi ultimi, mantenere l'apporto lipidico tra il 20% e il 35% dell'apporto energetico totale è fondamentale per garantire un equilibrio energetico e prevenire l'accumulo di grasso corporeo, che è associato a un aumento del rischio di obesità e malattie correlate. All'interno di questo intervallo, la distribuzione tra i vari tipi di grassi è di primaria importanza, ad esempio, una dieta ricca di grassi saturi e *trans* è stata correlata ad un aumento del rischio di malattie mentre una dieta con una predominanza di grassi monoinsaturi e polinsaturi, specialmente gli ω -3 è associata a benefici per la salute cardiovascolare [10]. Con la crescita, il metabolismo lipidico cambia influenzando il modo in cui il corpo utilizza e immagazzina i grassi, gli anziani infatti devono prestare particolare attenzione alla qualità dei grassi nella loro dieta, poiché un eccesso di grassi saturi può contribuire all'insorgenza di malattie cardiovascolari e neurodegenerative. I LARN raccomandano per gli anziani, un apporto lipidico simile a quello degli adulti, ma con un'enfasi maggiore sull'assunzione dei grassi monoinsaturi e polinsaturi, in particolare gli ω -3, per sostenere la salute cognitiva e cardiovascolare.

Durante la gravidanza e l'allattamento i LARN forniscono indicazioni specifiche per l'assunzione di acidi grassi essenziali quali EPA e DHA. Durante la gravidanza, l'assunzione di EPA e DHA è particolarmente importante per lo sviluppo neurologico e visivo del feto. I LARN non forniscono valori specifici per EPA e DHA separatamente, ma raccomandano l'assunzione di almeno 200 mg di DHA al giorno. Questa quantità è generalmente raggiungibile attraverso il consumo regolare di pesce grasso come salmone, sgombro e sardine, o mediante integratori specifici. Durante l'allattamento, le raccomandazioni per il DHA sono simili a quelle della gravidanza. I LARN consigliano un'assunzione di almeno 200 mg di DHA al giorno [11, 12]. Anche in questo caso, è importante ottenere DHA da fonti

alimentari come il pesce o attraverso integratori, se necessario. Questo aiuta a garantire che il latte materno contenga adeguati livelli di DHA, cruciali per lo sviluppo del neonato. In caso di difficoltà a raggiungere queste quantità attraverso la dieta, possono essere utilizzati integratori di olio di pesce o di alghe, previa consultazione con un medico o un nutrizionista. L'integrazione di EPA e DHA durante la gravidanza è oggetto di attenzione per i suoi potenziali benefici sia per la madre sia per il feto. Secondo gli studi recenti, le raccomandazioni generali suggeriscono un'assunzione di almeno 200 mg di DHA al giorno durante la gravidanza [11]. Questo livello è associato a benefici per lo sviluppo neurologico e visivo del feto [12]. Sebbene le linee guida specifiche per EPA non siano sempre definite separatamente, molti integratori di ω -3 contengono sia EPA che DHA. È generalmente consigliabile un equilibrio tra i due acidi grassi, ma l'accento è posto principalmente sul DHA. Il DHA è essenziale per lo sviluppo del cervello e della retina del feto [12]. Durante il terzo trimestre, il feto accumula DHA nel cervello e nella retina, rendendo cruciale un apporto adeguato. Il DHA agisce sulla salute materna, l'integrazione di ω -3 può aiutare a ridurre il rischio di parto prematuro e complicazioni legate alla gravidanza, come la preeclampsia. Alcuni studi suggeriscono che il DHA può avere effetti positivi sull'umore e ridurre il rischio di depressione post-partum [13].

Le fonti principali di EPA e DHA sono pesci grassi, come salmone, sgombro sardine ecc. Se il consumo di pesce è insufficiente, gli integratori di olio di pesce o di alghe possono essere una valida alternativa, gli integratori a base di alghe sono particolarmente utili per le donne vegetariane o vegane. È importante seguire le indicazioni del medico riguardo al dosaggio degli integratori di EPA e DHA, poiché un eccesso di ω -3 può portare a effetti collaterali come sanguinamenti o interferenze

con la coagulazione [14]. Inoltre, è fondamentale scegliere integratori di alta qualità, purificati per eliminare metalli pesanti e altre contaminazioni. Prima di iniziare qualsiasi integrazione, è consigliabile consultare un medico o un nutrizionista per determinare le necessità specifiche e scegliere il prodotto più adatto. In sintesi, l'integrazione di EPA e DHA durante la gravidanza può offrire benefici significativi, soprattutto per lo sviluppo del feto e la salute della madre, ma deve essere gestita con attenzione per evitare eccessi e garantire la massima efficacia e sicurezza [13]. Queste linee guida sono basate su studi che evidenziano i benefici dei grassi ω -3 per la salute materna e infantile, ma è sempre consigliabile discutere con un professionista della salute per personalizzare le raccomandazioni in base alle esigenze individuali. In conclusione, possiamo affermare che la qualità dei grassi assunti è importante quanto la quantità totale, i LARN forniscono indicazioni dettagliate su come distribuire l'apporto lipidico tra i diversi tipi di grassi per ottimizzare lo stato di salute.

2.3 Raccomandazioni nutrizionali sugli acidi grassi saturi

I grassi saturi sono un tipo di acidi grassi caratterizzati dalla mancanza dei doppi legami tra gli atomi di carbonio nella loro catena idrocarburica. Questo significa che tutte le catene di carbonio sono "sature" di atomi di idrogeno, da cui deriva il nome "grassi saturi" [15]. A temperatura ambiente, questi grassi tendono ad essere solidi, una caratteristica che li distingue dai grassi insaturi, che invece sono solitamente liquidi. I grassi saturi sono presenti principalmente in prodotti di origine animale, come carne, burro, formaggi e altri latticini, ma si trovano anche in alcuni oli tropicali, come l'olio di cocco e l'olio di palma [16]. Negli ultimi decenni, i grassi saturi sono stati oggetto di intenso dibattito scientifico a causa dei loro

potenziali effetti sulla salute, in particolare in relazione alle malattie cardiovascolari [7]. La principale fonte di grassi saturi nella dieta umana è rappresentata dai prodotti di origine animale, incluse carni rosse, tagli di manzo e maiale, specialmente nelle parti grasse. Anche i latticini quali burro, formaggio, panna e latte intero sono ricchi di grassi saturi, e tutti i prodotti lattiero-caseari lavorati come il gelato e alcuni tipi di yogurt. Lo strutto e il lardo, utilizzati in alcune tradizioni culinarie sono anch'essi ricchi di grassi saturi [16]. Perfino alcuni oli di origine vegetale, noti come oli tropicali, sono particolarmente ricchi di grassi saturi. Per esempio, l'olio di cocco è composto per circa il 90% da grassi saturi e per queste ragioni è considerato un ingrediente controverso. Anche gli oli di palma e di palmisto sono particolarmente ricchi di acido palmitico, un acido grasso saturo associato ad un aumento del colesterolo LDL. Molti alimenti processati, specialmente quelli che contengono grassi solidi o che sono stati fritti, possono contenere elevate quantità di grassi saturi. In questo caso si parla di prodotti da forno, come biscotti, torte, pasticcini e *croissant* contenenti elevate quantità di burro, margarina o strutto, tutti ingredienti ricchi di acidi grassi saturi. Anche gli snack confezionati come le patatine, i crackers e altri snack spesso utilizzano oli tropicali o grassi idrogenati. L'associazione tra consumo di grassi saturi e il rischio di malattie cardiovascolari è uno dei temi più studiati in ambito nutrizionale [16]. Storicamente, si è ritenuto che un'elevata assunzione di grassi saturi aumentasse i livelli di colesterolo totale e LDL, noto come colesterolo cattivo nel sangue. Alti livelli di LDL sono stati associati a un maggiore rischio di aterosclerosi, una condizione in cui le arterie si induriscono e si restringono a causa dell'accumulo di placche, portando a un aumento del rischio di infarto e ictus [17]. Tuttavia, negli ultimi anni, alcune ricerche hanno messo in discussione l'entità di questo legame, suggerendo che non tutti i grassi saturi

abbiano lo stesso impatto sul colesterolo e che il contesto dietetico generale (ad esempio, la presenza di carboidrati raffinati) possa influenzare gli effetti dei grassi saturi sulla salute [18].

Il consumo eccessivo di grassi saturi è stato anche associato a una maggiore resistenza all'insulina, un fattore di rischio chiave per lo sviluppo del diabete di tipo 2 [19]. La resistenza all'insulina si verifica quando le cellule del corpo non rispondono adeguatamente all'insulina, l'ormone che regola i livelli di glucosio nel sangue. Questo può portare a livelli cronicamente elevati di glucosio nel sangue e nel tempo, allo sviluppo del diabete [19]. Alcuni studi suggeriscono che la sostituzione dei grassi saturi con grassi insaturi, in particolare i grassi polinsaturi, può migliorare la sensibilità all'insulina e ridurre il rischio di diabete tipo 2 [20]. I grassi saturi sono stati implicati in vari processi infiammatori, che giocano un ruolo centrale nello sviluppo di numerose malattie croniche, tra cui il cancro, la malattia di Alzheimer e altre condizioni neurodegenerative [17]. L'infiammazione cronica di basso grado è considerata un fattore di rischio emergente per molte di queste malattie e la dieta può influenzare significativamente il livello di infiammazione sistemica.

I LARN raccomandano che l'apporto di grassi saturi sia limitato a meno del 10% dell'apporto energetico totale giornaliero, questo limite è basato sulla necessità di ridurre il rischio di malattie cardiovascolari e altre patologie croniche associate a un consumo eccessivo di grassi saturi. Le principali organizzazioni sanitarie internazionali, come l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) e l'American Heart Association (AHA), sostengono raccomandazioni simili, suggerendo di mantenere il consumo di grassi saturi al di sotto del 10% delle calorie totali giornaliere e di preferire fonti di grassi insaturi come olive vegetali, noci e pesce.

Uno degli approcci più efficaci per migliorare la qualità della dieta è la sostituzione dei grassi saturi con grassi insaturi, in particolare con grassi monoinsaturi e polinsaturi [20]. Gli oli vegetali come l'olio d'oliva, l'olio di canola e l'olio di girasole sono ricchi di grassi insaturi e possono essere utilizzati come sostituti del burro o del lardo nella cucina quotidiana. Inoltre, il consumo di pesce grasso, noci e semi può contribuire ad aumentare l'apporto di grassi insaturi, che hanno dimostrato di avere effetti benefici sulla salute cardiovascolare e sulla prevenzione del diabete di tipo 2 [21]. In alcuni contesti, i grassi saturi possono essere sostituiti anche con i carboidrati integrali, come cereali integrali, frutta e verdura. Tuttavia, è importante evitare di sostituire i grassi saturi con carboidrati raffinati e zuccheri aggiunti, che possono avere effetti negativi sulla salute, compreso l'aumento del rischio di obesità e malattie cardiovascolari [18].

Il ruolo dei grassi saturi nella dieta umana è complesso e soggetto a un ampio dibattito scientifico; sebbene il consenso generale suggerisca di limitare l'assunzione di grassi saturi per ridurre il rischio di malattie cardiovascolari e altre condizioni croniche, è altrettanto importante considerare la qualità complessiva della dieta. La sostituzione dei grassi saturi con grassi insaturi e carboidrati integrali rappresenta una strategia chiave per migliorare la salute pubblica, supportata da solide evidenze scientifiche. Tuttavia, la ricerca continua ad evolversi e una completa comprensione più dettagliata delle interazioni tra i vari tipi di grassi e altri nutrienti potrebbe portare a raccomandazioni più precise in futuro.

2.4 Raccomandazioni nutrizionali sugli acidi grassi trans

Gli acidi grassi *trans* rappresentano una classe di composti che possono essere presenti naturalmente in alcuni alimenti di origine animale come prodotti lattiero-

caseari e carne derivata dai ruminanti, oppure possono essere generati artificialmente in seguito a processi di idrogenazione degli alimenti. Mentre i grassi *trans* naturali sono presenti in piccole quantità in alcuni prodotti animali, la maggior parte dei grassi *trans* consumati nell'alimentazione moderna proviene da fonti industriali [22]. Questi grassi vengono creati attraverso un processo noto come idrogenazione, un processo di lavorazione che trasforma gli oli vegetali dallo stato liquido a quello solido o semisolido (margarine) a temperatura ambiente [22]. Questo processo è fondamentale nella produzione di margarine, grassi per la cottura, e una vasta gamma di prodotti alimentari trasformati [23]. Tuttavia, questi grassi sono stati associati a diversi effetti negativi sulla salute umana, in particolare per quanto riguarda le malattie cardiovascolari [24].

L'idrogenazione è un processo chimico che consiste nell'addizione di una molecola di idrogeno al doppio legame insaturo dell'acido grasso degli oli vegetali. Durante l'idrogenazione, gli atomi di idrogeno vengono aggiunti ai doppi legami, saturando parzialmente o completamente la catena idrocarburica [25]. Se l'idrogenazione è completa, tutti i doppi legami insaturi vengono convertiti in legami semplici saturi. Tuttavia, quando l'idrogenazione è parziale, alcuni doppi legami possono cambiare da una configurazione *cis* a una configurazione *trans*, molto più stabile da un punto di vista chimico. È in questo caso che si vengono a formare gli acidi grassi *trans* le cui proprietà fisiche, chimiche e biologiche risultano essere differenti dai rispettivi acidi grassi *cis*.

Nell'industria alimentare vengono utilizzati due differenti processi di idrogenazione. La prima viene definita come "idrogenazione completa", in cui tutti i doppi legami presenti negli acidi grassi insaturi vengono trasformati in grassi saturi, questo processo produce grassi solidi, simili ai grassi animali, che sono più

stabili e meno suscettibili all'ossidazione. Nell'idrogenazione parziale, solo una parte dei doppi legami viene saturata, lasciando alcuni doppi legami intatti, tuttavia durante questo processo, molti dei doppi legami rimanenti cambiano configurazione da *cis* a *trans*. Questo produce un grasso semi solido, che ha una consistenza desiderata per molte applicazioni alimentari, ma che contiene una quantità significativa di acidi grassi *trans* [25]. Il processo di idrogenazione fu sviluppato per rispondere a diverse esigenze nell'industria alimentare; gli oli idrogenati sono meno soggetti a irrancidimento poiché i grassi saturi e *trans* sono più stabili rispetto ai rispettivi grassi insaturi [25]. Questo aumenta la durata di conservazione dei prodotti alimentari, riducendo il loro deterioramento e lo spreco alimentare. Inoltre, l'idrogenazione conferisce agli oli vegetali una consistenza più solida, simile al burro o al lardo, che è desiderabile per molte applicazioni culinarie, come la preparazione dei prodotti da forno e margarine [25]. Inoltre, l'idrogenazione è stata utilizzata per creare sostituti dei grassi animali che sono solidi a temperatura ambiente, come la margarina, che può essere spalmata come il burro, ma prodotta da oli vegetali.

Gli acidi grassi *trans* prodotti attraverso l'idrogenazione parziale sono ampiamente riconosciuti come dannosi per la salute cardiovascolare. Numerosi studi hanno dimostrato che l'assunzione degli acidi grassi *trans* aumenta significativamente il livello di colesterolo LDL nel sangue, mentre abbassa il livello di colesterolo HDL; questo squilibrio favorisce la formazione di placche nelle arterie, aumentando il rischio di aterosclerosi, infarto e ictus. Oltre al loro impatto sui livelli di colesterolo, i grassi *trans* sono stati collegati a un aumento dell'infiammazione sistemica, che è un fattore di rischio per molte malattie croniche, tra cui diabete di tipo 2 e alcune forme di cancro. Gli studi hanno anche

suggerito che gli acidi grassi *trans* possono contribuire alla resistenza all'insulina, che predispone allo sviluppo del diabete [23]. A causa dei rischi per la salute associati ai grassi *trans*, molti paesi hanno introdotto regolamentazioni per limitarne il consumo. Ad esempio, l'Unione Europea ha imposto un limite di 2 g di grassi *trans* per 100 g di grassi totali in un alimento. Gli Stati Uniti hanno richiesto la rimozione dei grassi *trans* artificiali dagli alimenti a partire dal 2018, a seguito di una dichiarazione della FDA che li ha considerati non sicuri. I LARN raccomandano di limitare il più possibile l'assunzione di grassi *trans*, che non dovrebbe superare l'1% dell'apporto energetico totale. In risposta a queste regolamentazioni, l'industria alimentare ha sviluppato nuovi metodi per sostituire i grassi *trans* nei prodotti alimentari come l'impiego di oli vegetali non idrogenati oppure di oli tropicali come l'olio di palma, che sono naturalmente solidi a temperatura ambiente ma non contengono grassi *trans*.

L'interesterificazione rappresenta un processo di lavorazione alternativo che consente di modificare le proprietà di un grasso attraverso la riorganizzazione degli acidi grassi all'interno o tra molecole di trigliceridi. Tale processo può avvenire per via chimica oppure enzimatica [26]. L'interesterificazione chimica utilizza un catalizzatore chimico, spesso idrossido di sodio o metossido di sodio, per rompere i legami esterei nei trigliceridi e permettere agli acidi grassi di riarrangiarsi su diverse molecole di glicerolo. Il risultato è un cambiamento nella struttura fisica del grasso, che può portare a una maggiore solidità o a un punto di fusione più elevato, a seconda delle esigenze [26]. Nell'interesterificazione enzimatica, gli enzimi, (spesso lipasi specifiche) vengono utilizzati per facilitare il riarrangiamento degli acidi grassi; questo metodo è più delicato e può essere più selettivo rispetto all'interesterificazione chimica, consentendo una maggiore precisione nel

determinare il profilo del grasso finale [27]. Inoltre, è considerato un metodo più ecologico, poiché evita l'uso di sostanze chimiche nocive [27]. Il risultato dell'interesterificazione è la creazione di grassi che possiedono caratteristiche fisiche simili a quelle ottenute attraverso l'idrogenazione parziale, ma senza la formazione dei grassi *trans*, con punti di fusione specifici utili per prodotti che richiedono una certa consistenza a temperatura ambiente, come le margarine o grassi per pasticceria [26]. Per queste ragioni, il processo di interesterificazione è utilizzato in una vasta gamma di prodotti alimentari, tra cui margarine e creme spalmabili, tutti prodotti alimentari che richiedono una consistenza solida a temperatura ambiente, simile al burro ma senza grassi *trans*. I prodotti da forno come biscotti, torte e altri prodotti da forno traggono vantaggio dall'utilizzo di grassi derivati dell'interesterificazione che conferiscono una buona struttura e una consistenza uniforme. L'interesterificazione può essere utilizzata per ottenere il punto di fusione ideale per il cioccolato e altri prodotti che devono mantenere la loro forma a temperatura ambiente ma fondersi in bocca.

Il processo di interesterificazione, specialmente nella sua forma enzimatica, è più sostenibile e può ridurre non solo i costi per l'acquisto dei reagenti chimici, ma anche per lo smaltimento dei rifiuti chimici [27]. Inoltre, la possibilità di utilizzare enzimi specifici permette una maggiore efficienza del processo, riducendo i costi di produzione a lungo termine. Pertanto, l'interesterificazione rappresenta una soluzione avanzata e versatile per l'industria alimentare, e offre una valida alternativa all'idrogenazione parziale che determina la formazione di acidi grassi *trans* [28]. Tuttavia, come con qualsiasi tecnologia alimentare è essenziale monitorare attentamente gli effetti a lungo termine sulla salute e garantire che i benefici superino eventuali rischi. Con l'evoluzione delle tecnologie e una crescente

attenzione alla salute pubblica, l'interesterificazione potrebbe giocare un ruolo chiave nella futura produzione alimentare sostenibile e sicura. La sfida è dunque bilanciare le esigenze dell'industria alimentare con la necessità di proteggere la salute dei consumatori, continuando a sviluppare alternative più sicure e sostenibili.

2.5 Raccomandazioni nutrizionali sugli acidi grassi monoinsaturi

Per ciò che concerne gli acidi grassi monoinsaturi o comunemente definiti MUFAs, i LARN forniscono indicazioni dettagliate sulla loro assunzione. Innanzitutto, la quota di energia giornaliera derivante dai grassi dovrebbe essere compresa tra il 20% e il 35% dell'apporto energetico totale, e di questo i MUFA dovrebbero contribuire per circa il 10-15% dell'energia totale giornaliera. I LARN sottolineano che l'acido oleico (C18:1 ω 9) è particolarmente benefico per la salute cardiovascolare, aiutando a ridurre il colesterolo LDL senza abbassare il colesterolo HDL. Pertanto, i LARN raccomandano un'ampia inclusione di alimenti ricchi di MUFAs nella dieta, come l'olio d'oliva, considerato un pilastro della dieta mediterranea associata ad una riduzione del rischio di malattie croniche. L'OMS non fornisce un'esatta percentuale specifica per i MUFAs, ma sottolinea l'importanza di ottenere questi grassi da fonti alimentari sane, come l'olio d'oliva e altri oli vegetali non raffinati, piuttosto che da cibi trasformati. L'*American Heart Association* (AHA) raccomanda che i grassi monoinsaturi e polinsaturi insieme costituiscano la maggior parte dei grassi consumati nella dieta, preferibilmente a scapito dei grassi saturi [29]. Specificamente, l'AHA consiglia che i grassi saturi costituiscano meno del 6% delle calorie giornaliere, suggerendo implicitamente che il restante apporto lipidico dovrebbe essere principalmente costituito da MUFA e

PUFA. L'associazione riconosce il valore degli alimenti ricchi di MUFAs nella riduzione del rischio di malattie cardiovascolari [29-30].

Le *Dietary Guidelines for Americans* (DGA) raccomandano di sostituire i grassi saturi con MUFAs e PUFAs come parte di una dieta sana, anche se non specificano una loro percentuale esatta. Inoltre, le DGA incoraggiano l'assunzione di oli vegetali, in particolare l'olio d'oliva, come parte di un'alimentazione equilibrata che favorisca la salute del cuore. Anche l'*European Food Safety Authority* (EFSA) [31] ha pubblicato raccomandazioni che non stabiliscono un intervallo esatto per i MUFAs, ma promuovono l'assunzione di questi grassi come parte di una dieta equilibrata. Anche l'EFSA suggerisce che l'olio d'oliva, ricco di acido oleico, dovrebbe essere una fonte primaria di grassi nella dieta in quanto parte integrante della dieta mediterranea, riconosciuta per i suoi benefici sulla salute cardiovascolare. Le raccomandazioni fornite dai LARN e dalle linee guida internazionali sono in gran parte allineate nell'indicare che gli acidi grassi monoinsaturi sono una componente salutare della dieta. L'accento è posto sull'importanza di sostituire i grassi saturi con i grassi monoinsaturi per migliorare la salute cardiovascolare e ridurre il rischio di malattie croniche [10].

L'olio d'oliva, in particolare è comunemente promosso come una delle migliori fonti di MUFAs, grazie alla sua capacità di abbassare il colesterolo LDL senza influenzare negativamente l'HDL [30]. Un altro aspetto importante è che le linee guida sottolineano l'importanza di ottenere i MUFAs da fonti alimentari integrali minimamente trasformate, come l'olio d'oliva, l'avocado, le noci piuttosto che da alimenti trasformati che possono contenere grassi potenzialmente dannosi [32]. Le raccomandazioni per l'assunzione degli acidi grassi monoinsaturi secondo i LARN e le principali linee guida internazionali convergono sull'importanza di questi grassi

nella promozione della salute, in particolare per la prevenzione delle malattie cardiovascolari. L'inclusione dei MUFAs nella dieta dovrebbe avvenire principalmente attraverso fonti alimentari naturali e sane, con un' enfasi particolare sull'oliva d'oliva, che rappresenta una componente chiave della dieta mediterranea, riconosciuto a livello mondiale per i suoi benefici sulla salute [32].

2.6 Raccomandazioni nutrizionali sugli acidi grassi polinsaturi

Gli acidi grassi polinsaturi, definiti comunemente con il termine PUFAs, sono noti per i loro effetti benefici sulla salute cardiovascolare, cerebrale e infiammatoria [20, 33-34]. Gli ω -6 come l'acido linoleico (C18:2 ω 6), sono importanti per la salute della pelle e per altre funzioni corporee; il loro equilibrio è cruciale per il mantenimento di un buon stato di salute [20, 33-34]. Secondo i LARN, i PUFAs dovrebbero costituire il 6-10% dell'apporto energetico totale giornaliero. Questo intervallo include sia gli acidi grassi della serie ω -3 che ω -6. La raccomandazione si basa su studi che dimostrano che un'assunzione adeguata di PUFA contribuisce a una buona salute cardiovascolare e alla prevenzione delle malattie croniche [34]. I LARN raccomandano di consumare almeno 0,5-1,0 g di acido α -linolenico (C18:3 ω 3) al giorno per ottenere benefici per la salute. Non vi è una raccomandazione specifica per EPA (C20:5 ω 3) e DHA (C22:6 ω 3), ma il LARN suggeriscono che il consumo di pesce ricco di EPA e DHA (almeno due porzioni di pesce grasso alla settimana) possa contribuire ulteriormente alla salute cardiovascolare e cerebrale. L'assunzione di ω -6, principalmente sotto forma di acido linoleico è raccomandata per costituire circa il 5-10% dell'apporto energetico totale. È importante mantenere un equilibrio adeguato tra ω -6 e ω -3 per evitare

effetti pro-infiammatori derivanti da un eccessivo consumo di ω -6 in relazione agli ω -3 [21].

L'OMS raccomanda che i PUFAs rappresentino tra il 6% e il 10% dell'apporto energetico totale giornaliero. Le linee guida dell'OMS enfatizzano l'importanza degli ω -3 nella dieta, suggerendo un'assunzione di almeno 250-500 mg di EPA e DHA al giorno per ridurre il rischio di malattie cardiovascolari. Anche L'*American Heart Association* raccomanda che gli ω -3, in particolare EPA e DHA, siano consumati attraverso pesce grasso o integratori, con una dose di almeno 1,0 g al giorno per le persone con malattie coronariche. L'associazione consiglia di includere almeno due porzioni di pesce grasso alla settimana per ottenere benefici cardiovascolari [32, 35-36]. Le *Dietary Guidelines for Americans* suggeriscono di consumare acidi grassi polinsaturi come parte di una dieta equilibrata, enfatizzando l'importanza degli ω -3 e il bilanciamento con ω -6 [37]. Non viene fornito un valore specifico per gli ω -6, ma si incoraggia un apporto adeguato e bilanciato di PUFA. Infine, l'EFSA raccomanda che i PUFAs costituiscano tra il 6% e il 10% dell'apporto energetico totale. Le linee guida dell'EFSA evidenziano anche l'importanza degli ω -3 e suggeriscono che una dieta equilibrata dovrebbe includere fonti ricche di EPA e DHA.

L'inclusione adeguata dei PUFAs nella dieta è quindi suggerita da tutte le principali organizzazioni mondiali sulla nutrizione umana utili per mantenere non solo la salute cardiovascolare, ma il benessere dell'intero organismo. Gli ω -3 sono noti per ridurre il rischio di malattie cardiache, migliorare la funzione cerebrale e avere effetti antinfiammatori [20, 33-34]. D'altra parte, un eccessivo consumo di ω -6 rispetto agli ω -3 può avere effetti pro-infiammatori, rendendo cruciale un bilanciamento appropriato [37]. Le raccomandazioni sui PUFAs fornite dai LARN

sono in linea con le linee guida internazionali, tutte promuovono l'importanza degli ω -3 e l'equilibrio con gli ω -6. Seguire queste raccomandazioni può contribuire a una dieta sana e alla prevenzione delle malattie croniche. È essenziale che la dieta includa una varietà di fonti di PUFA, con particolare attenzione all'equilibrio tra ω -3 e ω -6 [37].

2.7 Carenze nutrizionali dei lipidi e impatto sulla salute umana

I lipidi sono un gruppo eterogeneo di composti organici che svolgono ruoli cruciali nel corpo umano, non solo come fonte di energia ma anche come componenti strutturali delle membrane cellulari e come precursori di molecole biologiche essenziali [38]. La loro importanza nella dieta e nella salute è indiscutibile, e una loro carenza può portare a una serie di problemi nutrizionali e patologici [37]. I lipidi forniscono una quantità significativa di energia all'organismo umano. Un grammo di grasso fornisce circa 9 calorie, rispetto alle 4 calorie per grammo dei carboidrati e delle proteine. Questa densità energetica è fondamentale per sostenere le attività quotidiane e le funzioni corporee di base. In condizioni di carenza calorica, il corpo utilizza i lipidi immagazzinati come riserva di energia. I lipidi svolgono un ruolo fondamentale nel mantenimento di un sistema immunitario sano [33]. La loro carenza può compromettere significativamente la risposta immunitaria, rendendo l'organismo più vulnerabile a infezioni e malattie [33]. Questo impatto è dovuto a diversi meccanismi attraverso i quali i lipidi influenzano la funzione e l'efficacia del sistema immunitario. Nei sottoparagrafi successivi è fornito un approfondimento dettagliato sui principali aspetti della compromissione del sistema immunitario associata alla carenza di lipidi.

2.7.1 Ruolo dei lipidi nel sistema immunitario.

I lipidi, in particolare i fosfolipidi e i glicolipidi, sono componenti essenziali delle membrane cellulari [39]. Le membrane cellulari delle cellule immunitarie, come linfociti e macrofagi, dipendono dai lipidi per mantenere la loro integrità strutturale e la fluidità necessaria per lo svolgimento delle loro funzioni cellulari [39]. Una carenza dei lipidi può compromettere la fluidità e la funzionalità delle membrane cellulari, riducendo l'efficacia delle cellule immunitarie nel riconoscere e rispondere a patogeni e segnali infiammatori. Gli acidi grassi essenziali, come gli ω -3 e ω -6, sono precursori di eicosanoidi, molecole bioattive che regolano la risposta infiammatoria e immunitaria. Gli eicosanoidi includono prostaglandine, leucotrieni e trombossani, che modulano la funzione immunitaria e la risposta infiammatoria. [40]. La carenza di acidi grassi essenziali porta a una produzione alterata di eicosanoidi, con conseguente disregolazione della risposta infiammatoria e immunitaria. Questo può manifestarsi come una risposta immunitaria inadeguata o esagerata. I linfociti, cruciali per la risposta immunitaria adattativa, richiedono un apporto adeguato di lipidi per la loro proliferazione e funzione, gli acidi grassi essenziali influenzano la produzione di citochine e la capacità dei linfociti di attaccare e distruggere le cellule infette [40]. Una carenza dei lipidi può ridurre la produzione e la funzione dei linfociti T e B, compromettendo la risposta immunitaria specifica e la capacità di combattere infezioni [38]. I macrofagi sono cellule immunitarie responsabili della fagocitosi di patogeni e detriti cellulari. I lipidi sono essenziali per la produzione di membrana e la funzione di fagocitosi dei macrofagi. La carenza dei lipidi può ridurre l'efficacia dei macrofagi nel riconoscere e distruggere i patogeni, aumentando la suscettibilità a infezioni batteriche, virali e fungine [38]. Gli acidi grassi essenziali modulano la risposta

infiammatoria attraverso la produzione di eicosanoidi [41]. Una proporzione inadeguata di ω -3 e ω -6 può portare a una risposta infiammatoria squilibrata, mentre una carenza dei lipidi può causare un'inflammatione cronica a basso grado o una risposta infiammatoria eccessiva, che può contribuire a malattie autoimmuni e infiammatorie croniche come l'artrite reumatoide e il *lupus eritematoso* sistemico. Gli ω -3, come EPA e DHA, hanno effetti antinfiammatori e regolano la produzione di citochine. La loro carenza può ridurre l'inibizione dell'inflammatione e aumentare la risposta infiammatoria. Gli individui con carenza di ω -3 possono avere un aumento del rischio di malattie infiammatorie e autoimmuni; inoltre, possono essere meno capaci di guarire da infezioni e traumi.

Gli ω -6 sono essenziali per la produzione di eicosanoidi pro-infiammatori che sono necessari per risposte immunitarie adeguate; un eccesso o una carenza di ω -6, rispetto agli ω -3, può alterare questo equilibrio [33]. La carenza di ω -6 può compromettere la capacità di generare risposte infiammatorie necessarie per combattere infezioni e gestire lesioni. Per garantire un apporto adeguato dei lipidi essenziali, è necessario includere nella dieta fonti di acidi grassi ω -3 (pesci grassi, semi di lino, noci) e ω -6 (oli vegetali, noci). Inoltre, bisogna limitare l'assunzione dei grassi saturi e *trans*, che possono influenzare negativamente la funzione immunitaria e il profilo lipidico. In caso di sintomi o sospetti di carenza lipidica, monitorare i livelli di acidi grassi attraverso esami clinici. In caso di carenza bisogna considerare l'utilizzo di integratori di ω -3 e ω -6, se necessario, sotto la supervisione di un medico o un nutrizionista. È consigliabile mantenere uno stile di vita sano con attività fisica regolare e un adeguato riposo, che supportano il sistema immunitario e favoriscono l'equilibrio lipidico [29]. I lipidi sono essenziali per la salute del sistema immunitario, influenzando la struttura delle cellule immunitarie, la

produzione di molecole bioattive e la risposta infiammatoria. Per mantenere un sistema immunitario forte e funzionante, è cruciale assicurare un apporto adeguato dei lipidi essenziali e adottare pratiche alimentari e di stile di vita che supportino la salute immunitaria [40-41].

2.7.2 Problemi cutanei associati alla carenza di lipidi

La pelle è uno degli organi più evidenti e vulnerabili agli squilibri nutrizionali, tra cui la carenza dei lipidi [42]. I lipidi svolgono un ruolo fondamentale nella salute cutanea, contribuendo alla sua barriera protettiva, alla sua idratazione e alla sua elasticità. La carenza dei lipidi può manifestarsi attraverso una serie di problemi cutanei, che spaziano da alterazioni superficiali a condizioni più gravi. I lipidi sono cruciali per il mantenimento della barriera cutanea [43]. La pelle è protetta da uno strato di lipidi, noto come “film idrolipidico”, che previene la perdita eccessiva di acqua e protegge contro gli agenti esterni. I principali lipidi coinvolti sono ceramidi, fosfolipidi e i trigliceridi [43]. Quando c'è una carenza dei lipidi, la produzione e la qualità di questi lipidi diminuiscono, compromettendo la capacità della pelle di mantenere l'idratazione e l'integrità strutturale, ciò porta a una perdita di acqua transcutanea e alla secchezza della pelle. La pelle appare squamosa, ruvida e può avere un aspetto opaco, si verificano squame o pellicine che si staccano dalla superficie della pelle, spesso accompagnate da prurito [44]. La carenza dei lipidi può causare un'inflammatione della pelle, nota come dermatite. Senza un'adeguata quantità dei lipidi, la pelle diventa più suscettibile agli irritanti esterni e agli allergeni, contribuendo a condizioni infiammatorie come la dermatite atopica o la dermatite da contatto. La pelle può diventare arrossata, gonfia e calda al tatto, si manifesta con prurito intenso e sensazione di irritazione, che può peggiorare in

risposta a determinati fattori ambientali o alimentari. La carenza dei lipidi altera la funzione barriera della pelle, rendendola più vulnerabile a infezioni e infiammazioni. Gli eczemi e i rash possono svilupparsi a causa dell'interazione tra una pelle compromessa e vari fattori ambientali [43].

L'eczema, si presenta come macchie di pelle infiammata e pruriginosa, spesso accompagnate da vesciche e croste. Esso può essere localizzato o diffuso e può peggiorare senza un'adeguata integrazione lipidica [43]. I rash cutanei possono apparire come macchie rosse, papule o orticaria sulla pelle, spesso accompagnati da prurito e irritazione. Con una carenza dei lipidi, la pelle perde parte della sua capacità di fungere da barriera contro allergeni e irritanti, questo aumenta la sensibilità cutanea e la reattività a sostanze chimiche e ambientali. La pelle può reagire in modo eccessivo a sostanze che normalmente non causerebbero problemi, manifestandosi con arrossamenti, gonfiore e prurito. La pelle diventa più sensibile ai prodotti cosmetici, ai detersivi e ai cambiamenti climatici. Inoltre, i lipidi sono coinvolti nella struttura e nell'elasticità della pelle, contribuendo a mantenere la sua morbidezza e compattezza. La carenza dei lipidi può ridurre la produzione di collagene ed elastina, proteine essenziali per la struttura della pelle [45]. La pelle può apparire meno tonica e più rilassata, con una riduzione della sua capacità di ritornare alla forma originale dopo essere stata tirata. La pelle tende a mostrare rughe e linee sottili precocemente, poiché la perdita dei lipidi influisce negativamente sulla sua capacità di mantenere la struttura e l'elasticità [45]. La carenza dei lipidi ha un impatto diretto e significativo sulla salute della pelle. I lipidi sono essenziali per mantenere la barriera cutanea, regolare l'idratazione e garantire l'integrità strutturale della pelle. Senza un apporto adeguato dei lipidi, la pelle diventa più suscettibile a secchezza, infiammazione, eczemi e altri problemi cutanei

[45]. È fondamentale mantenere una dieta equilibrata e ricca di grassi sani per prevenire e trattare tali condizioni e per preservare una pelle sana e ben nutrita [42].

2.7.3 *Compromissione della funzione cerebrale associata alla carenza dei lipidi*

I lipidi sono fondamentali per la salute del cervello e la funzione cognitiva, la loro carenza può avere impatti significativi sulle funzioni cerebrali, poiché i lipidi sono coinvolti in vari aspetti della neurobiologia, dalla struttura delle membrane neuronali alla produzione di neurotrasmettitori e alla regolazione delle funzioni cerebrali superiori come la memoria e l'umore. Il cervello è composto per circa il 60% da grassi e le membrane neuronali sono ricche di fosfolipidi e colesterolo, questi lipidi sono cruciali per mantenere la fluidità e la stabilità delle membrane cellulari, facilitando la trasmissione degli impulsi nervosi. Una carenza dei lipidi può alterare la composizione e la fluidità delle membrane neuronali, influenzando negativamente la comunicazione tra i neuroni e di conseguenza, le funzioni cognitive e motorie [46]. Gli acidi grassi essenziali, come gli ω -3 e ω -6, sono precursori di molecole che influenzano la sintesi e la funzione dei neurotrasmettitori. Ad esempio, l'acido eicosapentaenoico e l'acido docosaesaenoico sono cruciali per la produzione di dopamina e serotonina. Una carenza dei lipidi può ridurre la produzione dei neurotrasmettitori, contribuendo a disfunzioni cognitive, alterazioni dell'umore e comportamenti anomali [47]. I lipidi, in particolare il DHA, sono essenziali per lo sviluppo cerebrale durante l'infanzia e l'adolescenza, il DHA contribuisce alla formazione delle sinapsi e alla plasticità cerebrale, che è la capacità del cervello di adattarsi e riorganizzarsi [48]. La carenza dei lipidi può compromettere lo sviluppo cerebrale nei bambini e influire sulla plasticità cerebrale negli adulti, con conseguenze sulla capacità di apprendere,

memorizzare e adattarsi a nuove esperienze. La carenza di DHA e altri lipidi essenziali può influenzare negativamente la memoria a breve e lungo termine e le capacità di apprendimento, alcuni studi hanno dimostrato che una dieta povera di ω -3 è associata a una riduzione della memoria e delle capacità cognitive [49]. La mancanza di acidi grassi essenziali può contribuire a problemi di attenzione e concentrazione, rendendo difficile focalizzarsi su compiti complessi e mantenere un'attenzione sostenuta [49]. Gli acidi grassi ω -3 sono noti per il loro ruolo nella regolazione dell'umore e nella prevenzione dei disturbi dell'umore come la depressione e l'ansia, una carenza di questi lipidi può predisporre a disturbi dell'umore e influire sul benessere psicologico. La carenza dei lipidi essenziali può anche essere associata a una maggiore irritabilità e comportamenti aggressivi, poiché i lipidi influenzano la regolazione delle emozioni e delle risposte comportamentali [50]. La carenza di DHA è stata associata a un aumento del rischio di malattie neurodegenerative come l'Alzheimer. Gli acidi grassi essenziali sono fondamentali per la salute delle cellule cerebrali e la protezione contro il danno ossidativo e l'infiammazione. Altre malattie neurodegenerative possono anche essere influenzate dalla carenza di lipidi, poiché i lipidi svolgono un ruolo nella protezione delle cellule nervose e nella regolazione delle risposte infiammatorie nel cervello [51]. Numerosi studi clinici hanno dimostrato che l'integrazione di ω -3 può migliorare le funzioni cognitive e ridurre i sintomi depressivi. Ad esempio, uno studio pubblicato sulla rivista *Journal of Clinical Psychiatry* [52] ha evidenziato che l'assunzione di ω -3 può avere effetti positivi sulla memoria e sull'umore nei pazienti con depressione maggiore. Altri studi hanno trovato che l'integrazione di DHA può migliorare le capacità di apprendimento e memoria negli adulti e nei bambini, suggerendo un ruolo protettivo degli ω -3 contro il declino cognitivo [51].

La carenza di DHA è stata associata a deficit cognitivi e alterazioni dell'umore, studi epidemiologici hanno mostrato che le persone con bassi livelli di DHA sono più inclini a sviluppare problemi di memoria e disturbi dell'umore [51]. La ricerca condotta su diete povere di lipidi essenziali ha rivelato che la restrizione di ω -3 e ω -6 può compromettere la funzionalità cerebrale e accelerare il declino cognitivo [53]. È necessario introdurre con la dieta fonti di acidi grassi essenziali come pesci grassi (salmone, sgombro), semi di lino, noci e oli vegetali per sostenere la salute cerebrale e la funzione cognitiva. Bisogna sempre considerare l'utilizzo di integratori di ω -3 sotto la guida di un professionista della salute per assicurare un adeguato apporto dei lipidi essenziali. Inoltre, è consigliabile monitorare i livelli dei lipidi essenziali attraverso esami clinici per prevenire carenze e ottimizzare la funzione cerebrale. Bisogna mantenere uno stile di vita sano con esercizio regolare e adeguato riposo per supportare la funzione cerebrale e la salute generale. I lipidi sono essenziali per una funzione cerebrale ottimale, influenzando la struttura delle membrane neuronali, la sintesi dei neurotrasmettitori e lo sviluppo cerebrale. La carenza dei lipidi può portare a gravi conseguenze cognitive e comportamentali, tra cui diminuzione della memoria, alterazioni dell'umore e aumento del rischio di malattie neurodegenerative [37]. Assicurare un apporto adeguato dei lipidi essenziali attraverso la dieta e se necessario, l'integrazione è fondamentale per mantenere una funzione cerebrale sana e prevenire problemi associati alla carenza lipidica [49].

2.7.4 *Impatti metabolici ed energetici della carenza dei lipidi*

I lipidi giocano un ruolo chiave nel metabolismo e nella produzione di energia, la loro carenza può avere effetti profondi sul bilancio energetico, sulla salute

metabolica e sulle funzioni fisiologiche generali. I lipidi sono una fonte primaria di energia a lungo termine ed in particolare gli acidi grassi, componenti fondamentali dei trigliceridi, vengono ossidati nei mitocondri per produrre ATP (adenosina trifosfato), la principale molecola energetica delle cellule. Tale processo è particolarmente importante durante periodi di digiuno o esercizio fisico prolungato [54]. Senza un adeguato apporto dei lipidi, l'organismo può avere difficoltà a mantenere adeguati i livelli di energia durante periodi di aumentata necessità energetica, come durante il digiuno o l'attività fisica intensa [54]. Quando i livelli dei carboidrati sono insufficienti, il corpo utilizza i lipidi per produrre corpi chetonici, che vengono utilizzati come fonte di energia alternativa per il cervello e i muscoli. Questo processo è cruciale durante diete a basso contenuto di carboidrati o digiuni prolungati [55]. In assenza dei lipidi adeguati, la produzione dei corpi chetonici può essere compromessa, limitando la capacità del corpo di adattarsi a condizioni di bassa disponibilità dei carboidrati e influenzando negativamente il metabolismo energetico [55]. Una carenza dei lipidi può ridurre la disponibilità di ATP, portando a sintomi di affaticamento e debolezza muscolare, la mancanza di acidi grassi essenziali può compromettere la funzione mitocondriale, che è essenziale per una produzione energetica ottimale. Gli sportivi e le persone fisicamente attive possono sperimentare una riduzione delle prestazioni e della resistenza, poiché i lipidi sono una fonte importante di energia durante attività prolungate e ad alta intensità [56]. Inoltre, la carenza dei lipidi può alterare i segnali di sazietà e il bilancio energetico, portando a un aumento dell'appetito e a un consumo eccessivo di carboidrati; ciò contribuisce a squilibri nel peso corporeo e nella composizione corporea [57].

I lipidi sono precursori di molti ormoni, inclusi gli ormoni steroidei come estrogeni e testosterone, una loro carenza, può influenzare negativamente la produzione ormonale e di conseguenza, il metabolismo energetico e la funzione riproduttiva [58]. La carenza dei lipidi può alterare l'efficienza dell'utilizzo metabolico dei carboidrati. Senza un'adeguata disponibilità dei lipidi, il corpo può fare maggiore affidamento sui carboidrati per la produzione di energia, che può portare a fluttuazioni nei livelli di zucchero nel sangue e alla resistenza all'insulina [56].

In situazioni di carenza lipidica, il corpo può anche iniziare a degradare le proteine per ottenere energia, che può portare alla perdita di massa muscolare e a una riduzione della funzione muscolare e metabolica [59]. I mitocondri, noti come le “centrali energetiche” delle cellule, dipendono dai lipidi per la produzione di ATP, i lipidi sono essenziali per la formazione delle membrane mitocondriali e per la regolazione della catena di trasporto degli elettroni [60]. Una carenza dei lipidi può compromettere la funzione mitocondriale, riducendo la produzione di ATP e influenzando negativamente la capacità cellulare di produrre energia e gestire il metabolismo [60]. I lipidi e i loro metaboliti, come i diacilgliceroli e le ceramidi, giocano un ruolo nella segnalazione metabolica e nell'influenza sulla regolazione della glicemia e dell'omeostasi energetica. La carenza dei lipidi può influenzare la segnalazione lipidica, alterando la regolazione della glicemia e la risposta insulinica, che può portare a disturbi metabolici come il diabete di tipo 2 [61]. Ricerche cliniche hanno dimostrato che la carenza di acidi grassi essenziali è associata a sintomi di affaticamento e riduzione delle prestazioni fisiche, ad esempio, uno studio pubblicato nell' *American Journal of Clinical Nutrition* ha dimostrato che la supplementazione di ω -3 migliora la performance fisica e riduce

l'affaticamento [21]. Alcuni studi hanno indicato che la carenza dei lipidi altera il bilancio energetico e può portare a un aumento dell'appetito e a una maggiore dipendenza dai carboidrati come fonte di energia.

I lipidi sono essenziali per la produzione e la regolazione dell'energia nel corpo umano. La loro carenza può compromettere la produzione di ATP, alterare il bilancio energetico, influenzare la segnalazione metabolica e ridurre la capacità fisica e cognitiva. Per mantenere una funzione energetica ottimale e prevenire problemi metabolici, è importante garantire un apporto adeguato dei lipidi attraverso una dieta equilibrata e, se necessario, ricorrere a integrazioni mirate [6].

I lipidi sono essenziali non solo per la produzione di energia e il mantenimento delle strutture cellulari, ma anche per l'assorbimento delle vitamine liposolubili [7]. Una carenza dei lipidi può compromettere significativamente il processo di assorbimento di queste vitamine, portando a una serie di carenze nutrizionali e conseguenze cliniche. Le vitamine liposolubili, che includono vitamina A, D, E e K, sono solubili nei grassi e richiedono un ambiente lipidico per essere assorbite efficacemente nell'intestino tenue. I lipidi alimentari, insieme ai sali biliari, formano micelle che facilitano il trasporto e l'assorbimento di queste vitamine attraverso la parete intestinale [7]. Le micelle sono piccole strutture lipidiche che solubilizzano le vitamine liposolubili e le rendono disponibili per l'assorbimento. Senza una quantità sufficiente dei lipidi, la formazione di micelle è compromessa, riducendo l'efficienza dell'assorbimento delle vitamine [7]. I lipidi alimentari stimolano la produzione di bile, che contiene sali biliari essenziali per l'emulsione dei grassi e la formazione delle micelle [62]. La vitamina A è fondamentale per la salute della vista, la funzione immunitaria e la pelle, una carenza di lipidi può ridurre l'assorbimento della vitamina A, portando a disturbi visivi come la cecità

notturna e a problemi di pelle come la xerosi. [63] Alcuni studi hanno dimostrato che persone con diete a basso contenuto di grassi possono sviluppare carenze di vitamina A, evidenziando l'importanza dei lipidi nella sua assimilazione. La vitamina D è fondamentale per la regolazione del calcio e la salute delle ossa. La carenza dei lipidi può ridurre l'assorbimento della vitamina D, aumentando il rischio di osteoporosi e rachitismo, secondo alcune evidenze scientifiche la vitamina D viene assorbita più efficacemente in presenza dei lipidi. Studi recenti hanno dimostrato che le diete a basso contenuto di grassi possono influenzare negativamente i livelli di vitamina D nel sangue [64]. La vitamina E agisce come antiossidante, proteggendo le cellule dai danni ossidativi, una carenza, può compromettere l'assorbimento della vitamina E, portando a una ridotta protezione antiossidante e a un aumento del rischio di danni cellulari. La carenza di vitamina E può causare disturbi neurologici e muscolari, alcuni studi hanno mostrato che le diete povere di lipidi sono associate a bassi livelli di vitamina E [70]. La vitamina K è essenziale per la coagulazione del sangue e la salute ossea, una carenza dei lipidi può ridurre l'assorbimento della vitamina K, aumentando il rischio di emorragie e problemi di coagulazione. La vitamina K, essendo liposolubile, richiede un adeguato apporto dei lipidi per essere assorbita, diete a basso contenuto di grassi possono portare a carenze e a disordini della coagulazione [66].

I lipidi, dopo essere stati assorbiti, vengono incorporati in lipoproteine come chilomicroni e VLDL (*Very Low-Density Lipoproteins*), che trasportano le vitamine liposolubili nel sistema circolatorio e nei vari tessuti. La carenza dei lipidi può ridurre la produzione di queste lipoproteine, compromettendo il trasporto delle vitamine liposolubili e contribuendo a carenze nutrizionali. I lipidi formano micelle con le vitamine liposolubili che vengono assorbite attraverso le cellule intestinali

[67]. In assenza dei lipidi, il processo di formazione delle micelle e l'assorbimento delle vitamine sono compromessi, diete a basso contenuto di grassi riducono la capacità dell'intestino di assorbire queste vitamine, portando a deficit nutrizionali. Studi clinici hanno dimostrato che le diete a basso contenuto di grassi possono ridurre significativamente i livelli di vitamine liposolubili nel sangue. Per esempio, uno studio pubblicato recentemente sulla rivista *American Journal of Clinical Nutrition* [68] ha evidenziato che i livelli di vitamina A e D sono diminuiti in individui con assunzione insufficiente di grassi. Ricerche su pazienti con malassorbimento dei grassi hanno dimostrato che una carenza dei lipidi è associata a bassi livelli di vitamina E, dimostrando l'importanza dei lipidi per l'assorbimento di questa vitamina. Studi di ricerca e revisioni sistematiche hanno confermato che la carenza dei lipidi influisce negativamente sull'assorbimento delle vitamine liposolubili, con conseguenze cliniche rilevanti per la salute [69]. La carenza di lipidi può compromettere l'assorbimento delle vitamine liposolubili, con effetti negativi sulla salute generale. La riduzione dell'assorbimento di vitamine A, D, E e K può portare a problemi visivi, ossei, neurologici e di coagulazione. È essenziale garantire un adeguato apporto dei lipidi nella dieta per prevenire carenze vitaminiche e mantenere una buona salute. Le strategie includono il consumo di fonti di grassi sani nella dieta e se necessario, la valutazione e la correzione delle carenze vitaminiche attraverso integrazioni mirate.

2.7.5 Carenza dei lipidi e impatto cardiovascolare.

La carenza dei lipidi può avere un impatto significativo sulla salute cardiovascolare, influenzando vari aspetti della funzione cardiaca e della salute vascolare. I lipidi, in particolare i grassi essenziali come gli acidi grassi ω -3 e ω -6,

giocano ruoli cruciali nella regolazione della pressione arteriosa, nella prevenzione dell'aterosclerosi e nella gestione del rischio cardiovascolare complessivo [35]. Gli acidi grassi essenziali, soprattutto i grassi ω -3 sono cruciali per la salute cardiovascolare perché hanno effetti antinfiammatori e antitrombotici, e riducono il rischio di eventi cardiovascolari come infarti e ictus [33].

I lipidi influenzano la risposta infiammatoria sistemica e la formazione di eicosanoidi, che sono mediatori della infiammazione e della coagulazione. Inoltre, gli acidi grassi polinsaturi sono essenziali per il mantenimento della funzione endoteliale, fondamentale per la regolazione del tono vascolare e della pressione arteriosa [33]. I lipidi aiutano a regolare la pressione arteriosa attraverso la produzione di prostaglandine e altre molecole che influenzano il diametro dei vasi sanguigni. Una carenza dei lipidi può portare a una diminuzione degli acidi grassi essenziali e a uno squilibrio dei lipidi nel sangue, favorendo la formazione di placca aterosclerotica nelle arterie [34]. Alcuni studi hanno dimostrato che le diete a basso contenuto di grassi possono aumentare i livelli di lipoproteine a bassa densità (LDL), associate a un maggiore rischio di aterosclerosi e malattia coronarica [34]. La carenza dei lipidi può aumentare l'infiammazione e lo stress ossidativo, che contribuiscono a danni al miocardio e alla disfunzione cardiaca [70]. La ricerca indica che bassi livelli di acidi grassi ω -3 sono correlati a un aumento del rischio di insufficienza cardiaca e altre malattie cardiovascolari. Gli acidi grassi ω -3 hanno effetti antitrombotici e aiutano a prevenire la formazione di trombi [71]. La loro carenza può compromettere questa protezione, aumentando il rischio di trombosi e ictus. Alcuni studi hanno dimostrato che l'integrazione con ω -3 riduce l'incidenza di eventi trombotici, suggerendo che una carenza di questi acidi grassi può avere effetti negativi sul rischio cardiovascolare [34]. Una dieta povera di lipidi può

influenzare negativamente i livelli di colesterolo HDL “buono” e aumentare i livelli dei trigliceridi, contribuendo a un profilo lipidico sfavorevole. Alcune ricerche scientifiche hanno dimostrato che bassi livelli di grassi nella dieta possono portare a un aumento dei trigliceridi e una riduzione del colesterolo HDL, entrambi fattori di rischio per malattie cardiovascolari [72].

Gli acidi grassi essenziali sono anche precursori di prostaglandine e leucotrieni che regolano la risposta infiammatoria e la funzione vascolare [33-34]. Una carenza dei lipidi può alterare la produzione di questi mediatori. La carenza di acidi grassi essenziali è associata a un aumento della produzione di molecole pro-infiammatorie, che può contribuire alla disfunzione endoteliale e al rischio cardiovascolare. I lipidi sono coinvolti nella regolazione dei recettori delle lipoproteine, che controllano il metabolismo del colesterolo e dei trigliceridi [73]. Una carenza dei lipidi può alterare la funzione di questi recettori. Alterazioni nei recettori delle lipoproteine possono portare a dislipidemia e aumentare il rischio di malattie cardiovascolari [73].

Ricerche scientifiche hanno confermato che una dieta adeguata in lipidi, soprattutto in ω -3, è cruciale per la prevenzione delle malattie cardiovascolari e la gestione dei fattori di rischio correlati [74]. La carenza dei lipidi può avere effetti deleteri sulla salute cardiovascolare, influenzando la formazione della placca aterosclerotica, la funzione cardiaca, la coagulazione e il profilo lipidico. Gli acidi grassi essenziali, in particolare gli ω -3 e ω -6, sono fondamentali per mantenere una salute cardiovascolare ottimale e ridurre il rischio di malattie cardiache. È essenziale garantire un apporto adeguato di lipidi attraverso una dieta equilibrata per prevenire complicazioni cardiovascolari e mantenere una buona salute generale [74].

2.8 *Lipidi e obesità: impatto sulla salute*

Secondo l’OMS, l’obesità è triplicata a livello mondiale dal 1975 ad oggi. Nel 2023, oltre 1,9 miliardi di adulti erano in sovrappeso, di cui più di 650 milioni obesi, questo significa che quasi il 39% della popolazione mondiale adulta è in sovrappeso e circa il 13% è obesa [75]. I tassi di obesità sono particolarmente elevati nei paesi sviluppati, ma anche le nazioni in via di sviluppo stanno sperimentando un aumento significativo, un fenomeno spesso definito “transizione nutrizionale” [75].

L’urbanizzazione, la globalizzazione della catena alimentare e la riduzione dell’attività fisica sono fattori chiave che contribuiscono a questa tendenza. L’obesità infantile è diventata una crisi globale, sempre secondo l’OMS, nel 2020 più di 340 milioni di bambini e adolescenti (dai 5 ai 19 anni) erano in sovrappeso o obesi. Nei bambini sotto i 5 anni, si stima che circa 39 milioni fossero in sovrappeso o obesi nello stesso anno [75]. Questa tendenza è preoccupante poiché i bambini obesi hanno una probabilità significativamente maggiore di diventare adulti obesi, con tutte le complicanze di salute associate. Inoltre, l’obesità infantile è correlata a una serie di problemi di salute, come il diabete di tipo 2, l’ipertensione e problemi psicologici [76]. L’obesità non colpisce tutte le popolazioni in modo uniforme, esistono significative disparità geografiche e socioeconomiche. Nei paesi ad alto reddito, i tassi di obesità sono spesso più alti tra le persone con un livello di istruzione e di reddito più basso. Al contrario, nei paesi a basso e medio reddito, l’obesità è prevalente tra le persone con un reddito più alto, anche se questa tendenza sta cambiando con la crescente accessibilità dei cibi ad alta densità calorica [77]. L’obesità è anche distribuita in modo disomogeneo tra le diverse regioni del mondo, ad esempio, negli Stati Uniti, circa il 42% degli adulti è obeso, un dato tra i più alti a livello globale [77]. In Europa, i tassi di obesità variano

ampiamente, con paesi come la Turchia che riportano tassi di obesità superiori al 30%, mentre nazioni come l'Italia e la Francia presentano tassi inferiori ma comunque in aumento [77].

L'obesità è influenzata non solo da scelte alimentari individuali ma anche da cambiamenti sociali e familiari. Uno degli aspetti più rilevanti degli ultimi decenni è il cambiamento nell'assetto familiare, con particolare riferimento all'emancipazione della donna e al conseguente impatto sulla nutrizione e sullo stile di vita dei bambini. L'emancipazione della donna ha portato a una maggiore partecipazione femminile nel mondo del lavoro e una redistribuzione dei ruoli domestici. Tuttavia, questi cambiamenti hanno anche modificato le dinamiche familiari tradizionali, specialmente per quanto riguarda la preparazione dei pasti e la supervisione dell'alimentazione dei bambini. In molte famiglie moderne, entrambi i genitori lavorano, il che riduce il tempo disponibile per cucinare pasti fatti in casa e per mangiare insieme come una famiglia [78]. Questo fenomeno ha portato a un aumento del consumo di pasti pronti, fast food e cibi altamente trasformati, che sono spesso ricchi di calorie, grassi saturi, zuccheri e sale. Inoltre, i bambini tendono a passare più tempo da soli o con badanti, che potrebbero non essere in grado di controllare adeguatamente la qualità e la quantità del cibo consumato. La mancanza di supervisione durante i pasti può portare a diverse problematiche, come a un consumo eccessivo di cibi ricchi di zuccheri e grassi, spesso influenzati dalla pubblicità e dalla disponibilità di snack poco salutari [78]. Inoltre, l'assenza di un contesto familiare durante i pasti può ridurre l'influenza positiva dei genitori nelle scelte alimentari dei bambini, compromettendo lo sviluppo di abitudini alimentari sane. La mancanza di rituali familiari come il pranzo o la cena insieme può anche avere un impatto negativo sulla socializzazione

e sul benessere psicologico dei bambini. I pasti condivisi sono un momento cruciale per l'interazione sociale, l'educazione alimentare e il rafforzamento dei legami familiari. Senza questi momenti, i bambini possono sentirsi isolati e meno sostenuti nelle loro scelte alimentari [78].

Tutti questi cambiamenti nell'assetto familiare sono stati collegati a un aumento dei tassi di obesità infantile. Studi recenti [79] hanno anche dimostrato che i bambini che consumano pasti senza la supervisione di un adulto hanno una maggiore probabilità di sviluppare abitudini alimentari disordinate, come il consumo eccessivo di snack poco salutari e il mancato rispetto dei pasti regolari. Inoltre, l'assenza di pasti strutturati può portare a una mancanza di regolazione dell'appetito, favorendo l'eccessivo consumo calorico [79]. L'obesità infantile è quindi una condizione preoccupante perché tende a persistere nell'età adulta, con gravi implicazioni per la salute, tra cui un aumentato rischio di malattie cardiovascolari, diabete di tipo 2 e problemi psicologici [76]. Per contrastare l'aumento dell'obesità infantile nel contesto di famiglie moderne con entrambi i genitori lavoratori, è fondamentale adottare alcune strategie. Per esempio, i genitori dovrebbero essere meglio informati sull'importanza di una dieta equilibrata e sull'impatto delle loro scelte alimentari sui loro figli. Programmi di educazione alimentare possono essere introdotti nelle scuole per rafforzare queste conoscenze [75]. Nonostante le sfide del lavoro, è importante cercare di mantenere il più possibile i pasti in famiglia, anche se si tratta di una sola volta al giorno, i pasti in famiglia possono avere un impatto positivo significativo sulla salute alimentare dei bambini. Le scuole e le comunità possono giocare un ruolo cruciale nel fornire accesso a pasti sani durante il giorno, specialmente per quei bambini che potrebbero non avere la supervisione di un genitore durante i pasti. Politiche di welfare che

supportino le famiglie con figli, come il congedo parentale, gli orari di lavoro flessibili e il supporto nella cura dei bambini, possono aiutare a ridurre la pressione sui genitori e a migliorare le abitudini alimentari familiari [75]. L'emancipazione della donna e i cambiamenti nel nucleo familiare hanno avuto numerosi effetti positivi sulla società, ma hanno anche creato nuove sfide, in particolare per quanto riguarda l'alimentazione e la salute dei bambini. La combinazione di minore supervisione durante i pasti e un aumento del consumo di cibi non salutari ha contribuito all'epidemia di obesità infantile [78-79]. Affrontare questo problema richiede un approccio olistico che includa educazione, supporto familiare e politiche pubbliche mirate a promuovere uno stile di vita sano per i bambini. L'obesità rappresenta una delle principali sfide della salute pubblica a livello globale, con una prevalenza in costante aumento [75]. Questa condizione è caratterizzata da un eccessivo accumulo di grasso corporeo che non solo influisce negativamente sull'aspetto fisico, ma anche sulla salute generale dell'individuo.

I lipidi, in particolare i grassi alimentari, giocano un ruolo cruciale nello sviluppo e nella gestione dell'obesità [10]. L'eccessivo consumo di lipidi, associato a stili di vita sedentari, contribuisce significativamente all'aumento di peso e delle complicanze associate. Il surplus calorico derivante da una dieta ricca di grassi, in particolare grassi saturi e *trans*, viene facilmente immagazzinato sotto forma di tessuto adiposo [80]. Questo accumulo di grasso, soprattutto nella regione addominale, è direttamente collegato all'obesità e alle sue complicanze. L'obesità si sviluppa quando c'è uno squilibrio prolungato tra l'apporto calorico e il dispendio energetico, e i lipidi, essendo estremamente densi di energia, sono facilmente immagazzinati nel corpo. Inoltre, i grassi alimentari influenzano la regolazione dell'appetito e del metabolismo attraverso meccanismi ormonali e molecolari

complessi, rendendo più difficile il controllo del peso [80]. Non tutti i lipidi hanno lo stesso effetto sull'obesità; è importante distinguere tra i diversi tipi di grassi in quanto essi influenzano diversamente la salute e il rischio di sviluppare obesità [20]. I grassi saturi sono noti per aumentare i livelli di colesterolo LDL nel sangue, contribuendo non solo all'aumento di peso ma anche all'insorgenza di malattie cardiovascolari [16]. Un'assunzione elevata di grassi saturi è stata ripetutamente associata a un aumento del rischio di obesità e sindrome metabolica [16]. Mentre, gli acidi grassi *trans* sono particolarmente dannosi perché non solo aumentano i livelli di colesterolo LDL, ma riducono anche i livelli di colesterolo HDL, il cosiddetto colesterolo "buono". L'assunzione dei grassi *trans* è fortemente associata all'aumento del rischio di obesità, infiammazione sistemica e malattie cardiovascolari [24]. Per quanto riguarda l'assunzione degli acidi grassi insaturi, sia grassi monoinsaturi che polinsaturi, hanno effetti positivi sulla salute cardiovascolare e sulla regolazione del peso corporeo [14, 29-30]. Gli ω -3, in particolare, hanno proprietà antinfiammatorie e possono aiutare a prevenire l'accumulo di grasso corporeo [33, 40]. Gli acidi grassi ω -3, trovati in pesci grassi come il salmone e le noci, sono stati correlati a una riduzione dell'infiammazione e a miglioramenti nella sensibilità all'insulina, entrambi fattori che possono aiutare a prevenire l'obesità [33, 40]. Tuttavia, un eccesso di ω -6, se non bilanciato da una sufficiente assunzione di ω -3, può promuovere l'infiammazione e l'aumento di peso [37]. Il metabolismo dei lipidi è strettamente collegato allo sviluppo dell'obesità, quando si consumano grandi quantità di grassi saturi, il corpo può diventare meno sensibile all'insulina, l'ormone che regola il glucosio nel sangue. Questa condizione, nota come insulino-resistenza, è un precursore del diabete di tipo 2 ed

è fortemente associata all'accumulo di grasso viscerale, il tipo di grasso più pericoloso [18].

L'obesità rappresenta uno dei principali fattori di rischio per le malattie cardiovascolari, che rappresentano la principale causa di morte a livello globale, l'accumulo di grasso corporeo, soprattutto nella regione viscerale, porta a una serie di cambiamenti metabolici che aumentano il rischio di sviluppare aterosclerosi, una condizione in cui le arterie si induriscono e si restringono a causa dell'accumulo della placca aterosclerotica. Questa placca è costituita da colesterolo, grassi e altre sostanze, e la sua formazione è fortemente influenzata dall'equilibrio dei lipidi nel sangue. L'eccesso di colesterolo LDL, spesso associato a una dieta ricca di grassi saturi e *trans*, contribuisce significativamente alla formazione della placca aterosclerotica [72]. Questo processo può portare a una riduzione del flusso sanguigno al cuore e al cervello, aumentando il rischio di infarto miocardico e ictus. Oltre alla formazione della placca, l'obesità porta a un aumento della pressione sanguigna, un'altra condizione che danneggia le arterie e il cuore [35]. L'ipertensione, combinata con la dislipidemia (livelli anormali dei lipidi nel sangue), è un potente precursore delle malattie cardiovascolari [17]. L'obesità è inoltre strettamente legata alla sindrome metabolica, un insieme di condizioni che includono l'ipertensione, l'iperlipidemia, l'insulino-resistenza e l'obesità addominale. La sindrome metabolica è un importante fattore di rischio per il diabete di tipo 2 e le malattie cardiovascolari, le persone con sindrome metabolica hanno un rischio significativamente aumentato di sviluppare complicanze cardiovascolari gravi [81]. L'accumulo di grasso, in particolare di grasso viscerale, contribuisce all'infiammazione cronica e alla disfunzione endoteliale, che sono entrambi collegati allo sviluppo di malattie cardiovascolari. Inoltre, l'insulino-resistenza

associata all'obesità porta a un aumento dei livelli di glucosio e insulina nel sangue, che nel tempo può evolvere in diabete di tipo 2 [82]. Il diabete è una delle principali complicanze dell'obesità e rappresenta una delle principali cause di morbidità e mortalità a livello globale [82]. L'obesità può avere effetti devastanti sulla salute del fegato, contribuendo allo sviluppo della steatosi epatica non alcolica (NAFLD). Questa condizione è caratterizzata dall'accumulo di grasso nel fegato, che può portare a infiammazione e danno epatico [83]. In una fase avanzata, la NAFLD può evolvere in steatoepatite non alcolica (NASH), una condizione in cui il fegato diventa infiammato e fibrotico, se non trattata, la NASH può portare a cirrosi, insufficienza epatica e persino carcinoma epatocellulare (cancro del fegato). L'assunzione eccessiva dei grassi saturi e *trans* è particolarmente dannosa per la salute epatica, poiché questi grassi favoriscono l'accumulo di trigliceridi nel fegato. Il rischio di steatosi epatica non alcolica (NAFLD) è significativamente elevato nelle persone obese, soprattutto quando l'obesità è associata a sindrome metabolica [83]. Il fegato svolge un ruolo centrale nel metabolismo lipidico e l'accumulo di grasso nel fegato (steatosi) può compromettere le sue funzioni vitali, inclusa la regolazione della glicemia e la produzione di proteine importanti per la coagulazione del sangue. La gestione della salute epatica nelle persone obese richiede un controllo rigoroso dell'assunzione dei grassi e una dieta equilibrata che privilegi grassi insaturi e riduca i grassi saturi e *trans* [29].

L'obesità ha anche un impatto rilevante sulla salute mentale visto che è associata a un maggiore rischio di depressione, ansia e altri disturbi psicologici. La stigmatizzazione sociale, la discriminazione e la bassa autostima sono problemi comuni che possono affliggere le persone con obesità, aggravando il loro benessere psicologico [84]. Dall'altra parte, una condizione psicologica come la depressione

può contribuire all'obesità attraverso meccanismi come l'alimentazione emotiva, la riduzione dell'attività fisica e l'alterazione dei ritmi sonno-veglia [85]. Inoltre, alcuni trattamenti farmacologici per la depressione possono indurre a un aumento di peso, creando un ciclo difficile da interrompere [86]. Un approccio integrato che consideri sia gli aspetti fisici che psicologici dell'obesità è essenziale per una gestione efficace della condizione. Interventi come la terapia cognitivo-comportamentale, combinata con una dieta equilibrata e l'esercizio fisico, possono migliorare significativamente sia la salute mentale che quella fisica. Recenti studi hanno anche esaminato [87] l'impatto dell'obesità sulla funzione cognitiva e sul rischio di sviluppare demenza. L'obesità, in particolare durante la mezza età, è stata correlata a una maggiore probabilità di declino cognitivo in età avanzata e a un rischio aumentato di malattie neurodegenerative come l'Alzheimer [88]. L'infiammazione cronica associata all'obesità, insieme alla resistenza all'insulina e alla dislipidemia, può influenzare negativamente la salute cerebrale. Inoltre, l'obesità è stata associata a una riduzione del volume cerebrale in alcune aree, come l'ippocampo [89], che svolge un ruolo chiave per la memoria e l'apprendimento. La perdita della funzione cognitiva non solo riduce la qualità della vita, ma aumenta anche il carico sociosanitario associato all'obesità.

L'obesità può avere impatti significativi sulla salute riproduttiva sia negli uomini che nelle donne. Nelle donne, l'obesità è associata a irregolarità mestruali, infertilità e un aumento del rischio di complicanze durante la gravidanza, come il diabete gestazionale e la preeclampsia [90]. Negli uomini, l'obesità può ridurre i livelli di testosterone [91], portando a una diminuzione della libido e della qualità dello sperma, contribuendo così all'infertilità. Inoltre, l'obesità durante la gravidanza può

avere effetti a lungo termine sulla salute dei figli, aumentando il rischio di obesità infantile e di sviluppo di sindrome metabolica in età adulta [90].

2.9 *Dieta Mediterranea*

La dieta mediterranea è ampiamente riconosciuta come uno dei modelli alimentari più salutari al mondo. Si basa su un consumo abbondante di frutta, verdura, legumi, cereali integrali, pesce, olio d'oliva e un moderato consumo di vino, soprattutto durante i pasti. Questo modello alimentare è associato a una serie di benefici per la salute, tra cui la riduzione del rischio di malattie cardiovascolari, diabete di tipo 2, obesità e alcune forme di cancro [92]. Negli ultimi anni, la ricerca scientifica ha continuato a rafforzare l'importanza della dieta mediterranea per la salute. Uno dei più rilevanti studi [92] ha dimostrato che una dieta mediterranea arricchita con olio extravergine di oliva o noci riduce significativamente il rischio di eventi cardiovascolari maggiori rispetto a una dieta a basso contenuto di grassi. Questo studio ha confermato che non solo la composizione complessiva della dieta è importante, ma anche la qualità dei grassi consumati. Inoltre, la dieta mediterranea è stata associata a benefici cognitivi; alcuni studi hanno evidenziato che seguire questo modello alimentare può ridurre il rischio di declino cognitivo e di malattie neurodegenerative come l'Alzheimer [93]. Questo è probabilmente dovuto agli effetti antinfiammatori e antiossidanti degli alimenti ricchi di polifenoli [32], come l'olio d'oliva.

Negli ultimi anni, la relazione tra dieta e microbiota intestinale è emersa come un campo di ricerca di grande interesse. Il microbiota intestinale, che è l'insieme dei trilioni di microrganismi che vivono nel tratto gastrointestinale umano, gioca un ruolo fondamentale nella salute generale [94]. Esso influenza una vasta gamma di

processi biologici, inclusi il metabolismo, la modulazione del sistema immunitario, e persino il funzionamento del cervello attraverso l'asse intestino-cervello. La dieta, in particolare, è uno dei principali fattori che influenzano la composizione e la funzione del microbiota intestinale. La dieta mediterranea, ricca di fibre, polifenoli e grassi salutari, è stata associata a una composizione del microbiota intestinale che favorisce la salute, i componenti chiave di questa dieta: frutta, verdura, legumi, cereali integrali, noci, olio d'oliva e un moderato consumo di pesce e vino contribuiscono a creare un ambiente intestinale favorevole per lo sviluppo di una comunità microbica diversificata e benefica [93-94]. Le fibre alimentari, abbondanti nella dieta mediterranea, agiscono come prebiotici, sostanze non digeribili che promuovono la crescita dei batteri benefici nel colon. Questi batteri fermentano le fibre, producendo acidi grassi a catena corta come l'acido acetico, propionico e butirrico che hanno numerosi effetti benefici. Gli SCFAs sono noti per ridurre l'infiammazione intestinale, migliorare la barriera intestinale, e influenzare il metabolismo del glucosio e dei lipidi [95]. I polifenoli, presenti in grandi quantità in alimenti come l'olio d'oliva, le noci, il vino rosso, le erbe aromatiche e molte varietà di frutta e verdura, sono composti bioattivi che modulano il microbiota intestinale. Essi non solo favoriscono la crescita dei batteri benefici, ma inibiscono anche i patogeni intestinali. Inoltre, i polifenoli possiedono proprietà antinfiammatorie e antiossidanti che contribuiscono a mantenere l'equilibrio del microbiota [95]. L'olio extravergine d'oliva, che è una fonte primaria di grassi nella dieta mediterranea, è ricco di acidi grassi monoinsaturi e di composti fenolici che hanno dimostrato [96] effetti positivi sul microbiota intestinale. Alcuni studi hanno evidenziato che il consumo regolare di olio d'oliva può aumentare la biodiversità del microbiota e promuovere specie batteriche associate a una migliore salute

metabolica [96]. Anche il pesce, che fornisce acidi grassi ω -3, ha un impatto positivo sulla composizione del microbiota. Gli ω -3 sono noti per le loro proprietà antinfiammatorie e contribuiscono a modulare la risposta immunitaria intestinale, promuovendo un ambiente intestinale che sostiene la salute generale [96]. Un microbiota equilibrato aiuta a modulare il sistema immunitario, riducendo il rischio di malattie autoimmuni e infiammazioni croniche [96]. La fermentazione delle fibre da parte del microbiota intestinale produce SCFAs, che migliorano la sensibilità all'insulina e regolano il metabolismo lipidico, riducendo il rischio di obesità, diabete di tipo 2 e malattie cardiovascolari [97]. Esiste una crescente evidenza che il microbiota intestinale influenzi il cervello attraverso l'asse intestino-cervello, [97] e una dieta ricca di prebiotici e polifenoli, come la dieta mediterranea, può contribuire a migliorare l'umore e ridurre i sintomi di ansia e depressione [97].

Diversi studi recenti hanno rafforzato l'idea che la dieta mediterranea possa essere utilizzata come strumento terapeutico per modulare il microbiota intestinale e trattare condizioni correlate. Ad esempio, uno studio pubblicato su *Gut* nel 2020 [98] ha mostrato che seguire una dieta mediterranea per un anno può alterare favorevolmente il microbiota intestinale, riducendo i marcatori di infiammazione e migliorando la fragilità nei soggetti anziani [98]. Il futuro della ricerca potrebbe focalizzarsi sull'individualizzazione della dieta mediterranea in base al profilo del microbiota di ogni persona, creando interventi nutrizionali personalizzati che massimizzino i benefici per la salute, tutto ciò contribuisce a spiegare parte degli effetti benefici sulla salute generale della dieta Mediterranea [94].

Un altro elemento fondamentale della dieta mediterranea è l'utilizzo dei prodotti freschi e di stagione, per esempio frutta e verdura, che garantiscono non solo un'alimentazione ricca di nutrienti ma anche un impatto positivo sull'ambiente. La

stagionalità degli alimenti è un principio che promuove la biodiversità, riduce l'uso di pesticidi e fertilizzanti chimici e limita l'impatto del trasporto di cibi fuori stagione, che spesso provengono da lunghe distanze [99]. I prodotti di stagione tendono ad avere un contenuto di nutrienti più elevato e sono meno esposti a trattamenti chimici rispetto a quelli fuori stagione. In Italia, e in particolare in Sicilia, la disponibilità di una vasta gamma di prodotti freschi e di stagione è un vero tesoro. L'Italia, con il suo clima variegato e la sua ricca tradizione agricola, offre una straordinaria varietà di frutta, verdura e altri alimenti che costituiscono la base della dieta mediterranea. La disponibilità di una straordinaria varietà di prodotti locali e stagionali rende questo modello alimentare non solo facilmente accessibile ma anche profondamente radicato nella cultura e nelle tradizioni culinarie del territorio. Il consumo di prodotti locali non solo supporta l'economia agricola regionale, ma permette anche di mantenere viva la tradizione culinaria che caratterizza la dieta mediterranea. In Sicilia, ad esempio, gli agrumi come le arance rosse, i limoni, le mandorle e i fichi d'India sono solo alcune delle eccellenze locali che rendono possibile seguire una dieta mediterranea autentica e ricca di benefici per la salute. Vivere in Italia, ed in Sicilia rappresenta una vera fortuna per chi desidera seguire una dieta mediterranea, la combinazione di un clima favorevole, una tradizione culinaria radicata e la disponibilità di prodotti freschi e di alta qualità rende questa regione una delle migliori al mondo per adottare questo stile di vita alimentare.

La dieta mediterranea si conferma, attraverso numerosi studi scientifici [32, 96, 100] come uno dei regimi alimentari più benefici per la salute umana. Essa rappresenta molto più di un semplice insieme di linee guida nutrizionali: è un vero e proprio stile di vita che integra alimentazione, cultura e sostenibilità ambientale.

Uno degli aspetti più straordinari della dieta mediterranea è la sua capacità di adattarsi alle esigenze nutrizionali delle persone in ogni fase della vita, riducendo il rischio di malattie croniche come quelle cardiovascolari, il diabete di tipo 2, e alcuni tipi di cancro [32]. L'importanza di questo modello alimentare è stata riconosciuta anche dall'UNESCO, che nel 2010 ha inserito la dieta mediterranea nella lista dei patrimoni culturali immateriali dell'umanità [101]. Questo riconoscimento sottolinea non solo i benefici per la salute, ma anche il valore culturale e sociale che la dieta mediterranea rappresenta per le comunità che la seguono. Nonostante i numerosi benefici documentati, la dieta mediterranea è oggi minacciata da cambiamenti socioeconomici e dall'adozione crescente di modelli alimentari meno salutari, tipici delle diete occidentali moderne, caratterizzate da un alto consumo di cibi ultra-processati, zuccheri raffinati e grassi saturi. Questo fenomeno, spesso alimentato dalla globalizzazione e dalla pubblicità aggressiva di prodotti industriali, sta progressivamente erodendo le tradizioni culinarie e i modelli alimentari che hanno fatto della dieta mediterranea un faro di salute e longevità. Di fronte a queste sfide, è fondamentale un impegno collettivo per preservare e promuovere la dieta mediterranea, questo richiede azioni a vari livelli. In primo luogo, è essenziale promuovere una maggiore consapevolezza riguardo ai benefici della dieta mediterranea attraverso programmi educativi nelle scuole, nelle comunità e nei media. L'educazione alimentare dovrebbe incoraggiare le giovani generazioni a riscoprire e apprezzare le tradizioni culinarie locali, insegnando l'importanza dei prodotti di stagione e della cucina casalinga. Le politiche agricole dovrebbero essere orientate a supportare i piccoli produttori locali che sono i custodi della biodiversità e delle tradizioni alimentari mediterranee. Incentivare la produzione e il consumo di prodotti locali e stagionali è cruciale per mantenere viva la dieta

mediterranea e per garantire la sostenibilità ambientale [102]. Le istituzioni culturali e turistiche giocano un ruolo importante nella diffusione della dieta mediterranea, presentandola non solo come un modello alimentare sano ma anche come parte integrante del patrimonio culturale. Iniziative come festival del cibo, mercatini e tour enogastronomici possono contribuire a valorizzare e diffondere le pratiche alimentari mediterranee. Continuare a investire nella ricerca per approfondire la comprensione dei benefici della dieta mediterranea è essenziale. Gli studi scientifici possono fornire ulteriori prove dell'efficacia di questo modello alimentare e contribuire a sviluppare nuove strategie per la sua diffusione su larga scala. La dieta mediterranea non è solo un patrimonio dei paesi del Mediterraneo, ma un modello che può essere adottato e adattato a livello globale, la collaborazione internazionale tra istituzioni, governi e organizzazioni non governative è fondamentale per promuovere la dieta mediterranea come strumento di salute pubblica globale [102].

Adottare e diffondere la dieta mediterranea significa non solo prendersi cura della propria salute, ma anche proteggere un patrimonio culturale che affonda le sue radici nella storia e nelle tradizioni dei popoli del Mediterraneo. In un'epoca in cui la globalizzazione rischia di omologare i gusti e le abitudini alimentari, preservare la dieta mediterranea è un atto di resistenza culturale, di rispetto per la natura e di impegno per il benessere delle future generazioni. Il futuro della salute globale potrebbe dipendere dalla capacità di mantenere viva questa antica saggezza alimentare, adattandola alle esigenze del mondo moderno senza perdere di vista i suoi principi fondamentali.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Farhad B Naini. "Avicenna and the Canon Medicinæ". *J R Soc Med.* 2012 Apr; 105(4): 142. doi: 10.1258/jrsm.2012.12k024.
- [2] IARC Monographs Working Group. "IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans", International Agency for Research on Cancer
- [3] Hoffman, S., & S. Soler. "The Role of Genetic and Environmental Factors in Cancer Etiology", *Journal of Epidemiology and Community Health*, 2010.
- [4] Yoshida, H., Yoshioka, N., Iwata, H., et al. "Fatty Acid Metabolism and Its Implications for Human Health", *International Journal of Molecular Sciences*, 2020.
- [5] Soares, M. J., & Cummings, S. J. Energy metabolism: pathways of energy production. *Nutrients.*2012.4(10), 1526-1532.
- [6] Pettinelli, P., & Videla, L. A. "Up-regulation of PPAR- α and PPAR- γ mRNA expression in the liver of morbidly obese patients: relationship with histological markers of nonalcoholic fatty liver disease.
- [7] Gropper, S. S., Smith, J. L., & Carr, T. P. *Advanced Nutrition and Human Metabolism* (5th ed.). Wadsworth Cengage Learning. 2009.ISBN: 978-0495116578
- [8] Lecerf, J.M., & Defoort, C. "Dietary Fats and Health: A Review of the Evidence", *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 2011.
- [9] Yoshida, H., Yoshioka, N., Iwata, H., et al. "Fatty Acid Metabolism and Its Implications for Human Health", *International Journal of Molecular Sciences*, 2020.
- [10] Astrup, A., Dyerberg, J., Elwood, P., Hermansen, K., Hu, F.B., Jakobsen, M.U. & Willett, W.C. (2011). The role of reducing intakes of saturated fat in the prevention of cardiovascular disease: where does the evidence stand in 2010? *American Journal of Clinical Nutrition*, 93(4), 684-688.
- [11] Koletzko, B., Lien, E., Agostoni, C., Bohles, H., Campoy, C., Cetin, I. & Uauy, R. (2008). The roles of long-chain polyunsaturated fatty acids in pregnancy, lactation and infancy: review of current knowledge and consensus recommendations. *Journal of Perinatal Medicine*, 36(1), 5-14.
- [12] EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (2014). Scientific opinion on the essential composition of infant and follow-on formulae. *EFSA Journal*, 12(7), 3760.

- [13] Emily Oken, Mandy B Belfort. "Fish, fish oil, and pregnancy". JAMA . 2010 Oct 20;304(15):1717-8. doi: 10.1001/jama.2010.1541.
- [14] Wahle, K. W., Caruso, D., Ochoa, J. J., & Quiles, J. L.. Olive oil and modulation of cell signaling in disease prevention. *Lipids*. 2004 Dec;39(12):1223-31. doi: 10.1007/s11745-004-1351-y.
- [15] Gurr., M. I.; James, A. T.; *Lipid Biochemistry: An Introduction*; Chapman and Hall; 3 rd Edition; London, New York; 1980; pp. 1-39.
- [16] Sacks, F. M., Lichtenstein, A. H., Wu, J. H. Y., Appel, L. J., Creager, M. A., Kris-Etherton, P. M., ... & Van Horn, L. V. (2017). Dietary fats and cardiovascular disease: a presidential advisory from the American Heart Association. *Circulation*, 136(3), e1-e23.
- [17] Mensink, R. P. Effects of saturated fatty acids on serum lipids and lipoproteins: a systematic review and regression analysis. World Health Organization. (2016).
- [18] De Souza, R. J., Mente, A., Maroleanu, A., Cozma, A. I., Ha, V., Kishibe, T., & Anand, S. S. Intake of saturated and trans unsaturated fatty acids and risk of all cause mortality, cardiovascular disease, and type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis of observational studies. *BMJ*, 2015 351, h3978.
- [19] Micha, R., Mozaffarian, D. Saturated fat and cardiometabolic risk factors, coronary heart disease, stroke, and diabetes: a fresh look at the evidence. *Lipids*, (2010). 45(10), 893-905.
- [20] Iamamura, F., Micha, R., Wu, J. H., de Oliveira Otto, M. C., Otite, F. O., Abioye, A. I., & Mozaffarian, D. Effects of saturated fat, polyunsaturated fat, monounsaturated fat, and carbohydrate on glucose-insulin homeostasis: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled feeding trials. *PLoS Medicine*, (2016). 13(7), e1002087.
- [21] Simopoulos, A.P. "Ω-3 Fatty Acids in Health and Disease and in Growth and Development", *American Journal of Clinical Nutrition*, 1991.
- [22] Stender, S., Astrup, A., & Dyerberg, J. (2008). Ruminant and industrially produced trans fatty acids: health aspects. *Food & Nutrition Research*, 52(1), 1651-1658.
- [23] Gunstone, F. D. (2004). *The Chemistry of Oils and Fats: Sources, Composition, Properties and Uses*. Blackwell Publishing Ltd.
- [24] Mozaffarian, D., Katan, M. B., Ascherio, A., Stampfer, M. J., & Willett, W. C. (2006). Trans fatty acids and cardiovascular disease. *New England Journal of Medicine*, 354(15), 1601-1613.

[25] Choe, E., & Min, D. B. (2006). Mechanisms and factors for edible oil oxidation. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 5(4), 169-186.

[26] Gunstone, F. D. (2008). *Modifying Lipids for Use in Food*. Woodhead Publishing.

[27] Mariel Farfán, Alfredo Álvarez, Alan Gárate, and Pedro Bouchoncorresponding author. “Comparison of Chemical and Enzymatic Interesterification of Fully Hydrogenated Soybean Oil and Walnut Oil to Produce a Fat Base with Adequate Nutritional and Physical Characteristics” *Food Technol Biotechnol*. 2015 Sep; 53(3): 361–366.

[28] Hans C. Holm, David Cowan. “The evolution of enzymatic interesterification in the oils and fats industry”. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 29 July 2008. Volume 110, Issue 8.

[29] Lichtenstein AH, Appel LJ, Brands M, Carnethon M, Daniels S, Franch HA, 98 Franklin B, Kris-Etherton PM, Harris WS, Howard B, Karanja N, Lefevre M, Rudel LL, Sacks F, Van Horn L, Winston M, Wylie-Rosett J. Diet and Lifestyle recommendations revision 2006. A scientific statement from the American Heart Association Nutrition Committee. *Circ*. 2006; 114:82-96.

[30] Schwingshackl L, Hoffmann G. Monounsaturated fatty acids, olive oil and health status: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Lipids Health Dis*. 2014 Oct 1;13:154.

[31] Food and Drug Administration (FDA): 2017 Sec. 184.1555 Rapeseed oil.

[32] Estruch, R., Ros, E., Salas-Salvadó, J., Covas, M. I., Corella, D., Arós, F. & PREDIMED Study Investigators. Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet. *New England Journal of Medicine*, 2013.368(14), 1279-1290.

[33] Calder PC. N-3 polyunsaturated fatty acids and inflammation: from molecular biology to the clinic. *Lipids*. 2003; 90:405-412.

[34] Calder PC. N-3 fatty acids and cardiovascular disease: evidence explained and mechanisms explored. *Clin Sci (Lond)*. 2004; 107:1-11.

[35] Howe PR. Dietary fats and hypertension. Focus on fish oil. *Ann NY Acad Sci*. 1997; 827:339-352.

[36] Macchia A, Levantesi G, Franzosi MG, Geraci E, Maggioni AP, Marfisi R, Nicolosi GL, Schweiger C, Tavazzi L, Tognoni G, Valagussa F, Marchioli R. GISSI-Prevenzione Investigators. Left ventricular systolic dysfunction, total

mortality, and sudden death in patients with myocardial infarction treated with n3 polyunsaturated fatty acids. *Eur J Heart Fail.* 2005; 7:904-909.

[37] Simopoulos, A. P. The importance of the ratio of ω -6/ ω -3 essential fatty acids. *Biomedicine & Pharmacotherapy.*2002. 56(8), 365-379.

[38] Gómez-Pinilla, F. Brain foods: The effects of nutrients on brain function. *Nature Reviews Neuroscience.*2008. 9(7), 568-578.

[39] A A Spector, M A Yorek. "Membrane lipid composition and cellular function". *J Lipid Res.* 1985 Sep;26(9):1015-35.

[40] J E Kinsella 1, B Lokesh, S Broughton, J Whelan. Dietary polyunsaturated fatty acids and eicosanoids: potential effects on the modulation of inflammatory and immune cells: an overview. *Nutrition* 1990 Jan-Feb;6(1):24-44; discussion 59-62.

[41] Fukao T, Lopaschuk GD, Mitchell GA. Pathways and control of ketone body metabolism: on the fringe of lipid metabolism. *Prostaglandins leukot Essent Fatty Acids* 2004.70:243. doi: 10.1016/j.plefa.2003.11.001.

[42] Nathalie Piccardi & Patricia Manissier. "Nutrition and nutritional supplementation Impact on skin health and beauty". Pages 271-274 | Published online: 01 Sep 2009

[43] Jakob Mutanu Jungersted 1, Lars I Hellgren, Gregor B E Jemec, Tove Agner. "Lipids and skin barrier function--a clinical perspective". *Contact Dermatitis.*2008 May;58(5):255-62.

[44] James Q. Del Rosso, DO, FAOCD and Jacqueline Levin, DO."The Clinical Relevance of Maintaining the Functional Integrity of the Stratum Corneum in both Healthy and Disease-affected Skin". *J Clin Aesthet Dermatol.* 2011 Sep; 4(9): 22–42.

[45] Proksch, E., Brandner, J. M., & Jensen, J. M. (2008). The skin: an indispensable barrier. *Experimental Dermatology*, 17(12) 1063-1072. DOI: 10.1111/j.1600-0625.2008.00786.x

[46] Tracey, T. J., Steyn, F. J., Wolvetang, E. J., Ngo, S. T. "Brain lipids in synaptic function and neurological disease". *Nature Reviews Neuroscience.* (2018).19(5), 278-293. DOI: 10.1038/nrn.2018.12.

[47] Robert K McNamara 1, Susan E Carlson. "Role of ω -3 fatty acids in brain development and function: potential implications for the pathogenesis and prevention of psychopathology". *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2006 Oct-Nov;75(4-5):329-49. doi: 10.1016/j.plefa.2006.07.010. Epub 2006 Sep.

- [48] Andrew J Sinclair 1, Nadia M Attar-Bashi, Duo Li. "What is the role of alpha-linolenic acid for mammals?". *Lipids*. 2002 Dec;37(12):1113-23. doi: 10.1007/s11745-002-1008-x.
- [49] Innis, S. M. (2008). Dietary omega 3 fatty acids and the developing brain. *Brain Research*, 1237, 35-43. DOI: 10.1016/j.brainres.2008.08.078.
- [50] Su, K. P., Matsuoka, Y., & Pae, C. U. "Ω-3 polyunsaturated fatty acids in prevention of mood and anxiety disorders". *Clinical Psychopharmacology and Neuroscience*.2015.13(2), 129-137. DOI: 10.9758/cpn.2015.13.2.129
- [51] Yurko-Mauro, K., McCarthy, D., Rom, D., Nelson, E. B., Ryan, A. S., Blackwell, A., & Salem, N. "Beneficial effects of docosahexaenoic acid (DHA) on cognitive function in age-related cognitive decline". *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, 2010 6(6), 456-464. DOI: 10.1016/j.jalz.2010.01.013.
- [52] Freeman, M. P., Hibbeln, J. R., Wisner, K. L., et al. "Ω-3 fatty acids: evidence basis for treatment and future research in psychiatry". *Journal of Clinical Psychiatry*.2010.67(12), 1954-1967. DOI: 10.4088/JCP.v67n1217.
- [53] Bazinet, R. P., & Layé, S. "Polyunsaturated fatty acids and their metabolites in brain function and disease". *Nature Reviews Neuroscience*.2014.15(12), 771-785. DOI: 10.1038/nrn3820
- [54] Jéquier, E. Pathways to obesity. *International Journal of Obesity*.1998.22(2), S2-S5. DOI: 10.1038/sj.ijo.0800542
- [55] Frayn, K. N. *Metabolic Regulation: A Human Perspective* (3rd ed.). Wiley-Blackwell. 2010
- [56] Hargreaves, M., & Spriet, L. L. Skeletal muscle energy metabolism during exercise. *Nature Metabolism*, 2020 2(9), 817-828.
- [57] Galgani, J. E., Moro, C., & Ravussin, E. Metabolic flexibility and insulin resistance. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 2008.295(5), E1009-E1017.
- [58] Santos, H. O., & Teixeira, F. J. (2020). Saturated fat and testosterone: current evidence on the subject. *Nutrition Reviews*, 78(9), 719-730
- [59] Richard B Kreider 1, Bill Campbell. "Protein for exercise and recovery". *Phys Sportsmed*. 2009 Jun;37(2):13-21. doi: 10.3810/psm.2009.06.1705.
- [60] Schönfeld, P., & Wojtczak, L. Short- and medium-chain fatty acids in energy metabolism: the cellular perspective. *Journal of Lipid Research*.2016.57(6), 943-954.

- [61] Holland, W. L., & Summers, S. A. "Sphingolipids, insulin resistance, and metabolic disease: new insights from in vivo manipulation of sphingolipid metabolism". *Endocrine Reviews*.2008.29(4), 381-402. DOI: 10.1210/er.2007-0025
- [62] Schnyder, S., & Geiser, J. R. "The role of bile acids in the digestion and absorption of fats and fat-soluble vitamins". *Journal of Lipid Research*.2010. 51(10), 2733-2741.
- [63] Peige Song Davies Adeloye, Shuting Li, Dong Zhao, Xinxin Ye, Qing Pan, Yiwen Qiu, Ronghua Zhang, Igor Rudan,, and Global Health Epidemiology Research Group (GHERG). "The prevalence of vitamin A deficiency and its public health significance in children in low- and middle-income countries: A systematic review and modelling analysis".
- [64] Holick, M. F. "Vitamin D deficiency". *New England Journal of Medicine*, 2007 357(3), 266-281.
- [65] C K Chow. "Vitamin E and oxidative stress". *Free Radic Biol Med*. 1991;11(2):215-32.
- [66] Shearer, M. J., & Newman, P."Metabolism and cell biology of vitamin K". *Thrombosis and Haemostasis*, 2008. 100(4), 530-547.
- [67] Gropper, S. S., & Smith, J. L. "Advanced Nutrition and Human Metabolism". Wadsworth Publishing.2012.
- [68] Brinkmann, C. R., & Jensen, G. L. "Impact of dietary fat on vitamin A and D status: Clinical implications". *American Journal of Clinical Nutrition*, 2008.88(4), 1063-1071.
- [69] Patrick Borel, Damien Preveraud, Charles Desmarchelier. "Bioavailability of vitamin E in humans: an update". *Nutrition Reviews*, Volume 71, Issue 6, 1 June 2013, Pages 319–331, <https://doi.org/10.1111/nure.12026>.
- [70] Sacks FM, Svetkey LP, Vollmer WM, et al. "Effects of low-fat diets on lipoprotein cholesterol levels: a meta-analysis." *Jama*.2003.
- [71] Dyerberg J, Bang HO, Stoffersen E, Moncada S, vane JR. Eicosapentaenoic acid and prevention of thrombosis and atherosclerosis?. *Lancet*. 1978; 2:117-119.
- [72] Astrup A, Dyerberg J, Selleck M, et al. "Effects of Dietary Fat on Lipid Profiles: Implications for Cardiovascular Disease". *British Journal of Nutrition*, 2011.

[73] Calder PC. “Essential Fatty Acids and Inflammation: The Role of Ω -3 Fatty Acids in the Regulation of Inflammatory Responses”. *Journal of Clinical Investigation*, 2006.

[74] Kenneth R, Feingold, MD. “The Effect of Diet on Cardiovascular Disease and Lipid and Lipoprotein Levels”. *Endotext* [Internet]. Last Update: March 31, 2024.

[75] World Health Organization (WHO). (2021). Obesity and Overweight. Retrieved from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>.

[76] Lobstein, T., & Jackson-Leach, R. “Estimated burden of paediatric obesity and co-morbidities in Europe. Part 2: Numbers of children with indicators of obesity-related disease”. *Int J Pediatr Obes.*2006;1(1):33-41.

[77] Ng, M., Fleming, T., Robinson, M., et al. (2014). Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet*, 384(9945), 766-781.

[78] Jennifer Jabs 1, Carol M Devine. “Time scarcity and food choices: an overview”. *Appetite* 2006 Sep;47(2):196-204. Epub 2006 May 15.

[79] Patrick, H., & Nicklas, T.A. “A Review of Family and Social Determinants of Children’s Eating Patterns and Diet Quality”. *J Am Coll Nutr.* 2005 Apr;24(2):83-92.

[80] Bray, G. A., & Popkin, B. M. (1998). Dietary fat intake does affect obesity!. *Am J Clin Nutr.* 1998 Dec;68(6):1157-73.

[81] Alberti, Zimmet e Shaw. “A New International Diabetes Federation (IDF) Worldwide Definition of the Metabolic Syndrome: the Rationale and the Results”. January 2006 *Revista Espa de Cardiologia* 58(12):1371-6.

[82] Micha, R., Peñalvo, J.L., Cudhea, F., & Imamura, F. “Association Between Dietary Factors and Mortality From Heart Disease, Stroke, and Type 2 Diabetes In the United States”, *JAMA*, 2017.

[83] Dina G. Tiniakos¹, Miriam B. Vos², and Elizabeth M. Brunt. “Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Pathology and Pathogenesis”. *Annual review of pathology.* Volume 5, 2010.

[84] K M Scott 1, R Bruffaerts, G E Simon, J Alonso, M Angermeyer, G de Girolamo, K Demyttenaere, I Gasquet, J M Haro, E Karam, R C Kessler, D Levinson, M E Medina Mora, M A Oakley Browne, J Ormel, J P Villa, H Uda, M

Von Korff. "Obesity and mental disorders in the general population: results from the world mental health surveys". *Int J Obes (Lond)*. 2008 Jan;32(1):192-200.

[85] Albert J Stunkard 1, Myles S Faith, Kelly C Allison. "Depression and obesity". *Biol Psychiatry*. 2003 Aug 1;54(3):330-7.

[86] Serretti A, Mandelli L. "Antidepressants and body weight: a comprehensive review and meta-analysis". *J Clin Psychiatry*. 2010 Oct;71(10):1259-72.

[87] Emmanuel Quaye, MD, MHS, Andrzej T. Galecki, MD, PhD, Nicholas Tilton, PhD, Rachael Whitney, PhD, Emily M. Briceño, PhD, Mitchell S.V. Elkind, MD, Annette L. Fitzpatrick, PhD, Rebecca et al. "Association of Obesity With Cognitive Decline in Black and White Americans". *Neurology*. 2023 Jan 10; 100(2): e220–e231.

[88] Marcos Vinícius Ferreira Silva, Cristina de Mello Gomide Loures, Luan Carlos Vieira Alves, Leonardo Cruz de Souza, Karina Braga Gomes Borges, Maria das Graças Carvalho. "Alzheimer's disease: risk factors and potentially protective measures". *J Biomed Sci*. 2019 May 9;26(1):33.

[89] Cyrus A Raji 1, April J Ho, Neelroop N Parikshak, James T Becker, Oscar L Lopez, Lewis H Kuller, Xue Hua, Alex D Leow, Arthur W Toga, Paul M Thompson. "Brain structure and obesity". *Hum Brain Mapp*. 2010 Mar;31(3):353-64.

[90] Carmen Paredes, Riccardi C. Hsu, Anna Tong, Jeffery R. Johnson. "Obesity and Pregnancy". *Neoreviews*. 2021 Feb;22(2):e78-e87.

[91] R. Mihalca S Fica, "The impact of obesity on the male reproductive axis". *J Med Life*. 2014 Jun 15; 7(2): 296–300.

[92] Martinez-Gonzalez, M.A., Gea, A., & Ruiz-Canela, M. "The Mediterranean Diet and Cardiovascular Health". *Circ Res*. 2019 Mar;124(5):779-798.

[93] Lourida, I., Soni, M., Thompson-Coon, J., et al. "Mediterranean diet, cognitive function, and dementia: a systematic review". *Epidemiology*. 2013 Jul;24(4):479-89.

[94] De Filippis, F., Pellegrini, N., Vannini, L., et al. "High-level adherence to a Mediterranean diet beneficially impacts the gut microbiota and associated metabolome". *Gut*. 2016 Nov;65(11):1812-

[95] Ana M Valdes 1 2, Jens Walter 3, Eran Segal 4, Tim D Spector BMJ. "Role of the gut microbiota in nutrition and health". *BMJ*. 2018 Jun 13;361:k2179.

- [96] Merra. G, Noce A, Marrone. G, Cintoni. M, Tarsitano. MG, Capacci. A, De Lorenzo A. "Influence of Mediterranean Diet on Human Gut Microbiota". *Nutrients*. 2021 Jan; 13(1): 7.
- [97] Koh, A., De Vadder, F., Kovatcheva-Datchary, P., & Bäckhed, F. "From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites". *Cell*, 2016. 165(6), 1332-1345.
- [98] Mancabelli, L., Milani, C., Lugli, G. A., et al. Exploring the Impact of the Mediterranean Diet on the Gut Microbiota of Healthy Young Adults Over a One-Year Intervention Study. *Gut*, (2020). 69(12), 2080-2091.
- [99] Trichopoulou, A., Martínez-González, M. A., Tong, T. Y., et al. "Definitions and potential health benefits of the Mediterranean diet: Views from experts around the world". *BMC Medicine*, 2020. 18, 133.
- [100] Trichopoulou, A., Martínez-González, M. A., Tong, T. Y., et al. "Definitions and potential health benefits of the Mediterranean diet: Views from experts around the world". *BMC Medicine*, 2020. 18, 133.
- [101] Keys, A., Menotti, A., Karvonen, M. J., et al. "The diet and 15-year death rate in the seven countries study". 1986. *American Journal of Epidemiology*, 124(6), 903-915.
- [102] Dernini, S., & Berry, E. M. "Mediterranean diet: From a healthy diet to a sustainable dietary pattern". *Frontiers in Nutrition*, 2015. 2, 15.

Capitolo 3

La vitamina D, una molecola chiave per la salute.

3.1 Introduzione alle vitamine

Il termine *vitamina* fu introdotto dallo scienziato polacco Casimir Funk nel 1912, derivando dalle parole “vita” e “amine”. “Vita” fa riferimento all’importanza di queste molecole organiche per la salute e il corretto funzionamento dei processi fisiologici, mentre “amine” si riferisce alla loro struttura chimica inizialmente ipotizzata [1]. Successivamente, il biochimico britannico Sir Jack Cecil Drummond suggerì l’uso delle lettere dell’alfabeto per distinguere le diverse vitamine [2]. La scoperta delle vitamine è strettamente collegata all’osservazione degli effetti negativi causati dalla loro carenza nell’alimentazione quotidiana [3]. In passato, molte malattie erano attribuite a infezioni causate da agenti patogeni o dalle tossine da essi prodotte, una teoria conosciuta come *germ theory*. Questa teoria trovò supporto con l’identificazione dei patogeni responsabili di malattie come la malaria, la tubercolosi e il colera. Tuttavia, malattie come lo scorbuto, il beriberi, il rachitismo e la pellagra non potevano essere spiegate attraverso tale teoria. Nel 1906, il biochimico britannico Frederick Gowland Hopkins propose la *vitamine theory*, introducendo il concetto di “fattori dietetici sconosciuti”. Anche altri studiosi, come Nicolai Lunin, avevano precedentemente contribuito a questa teoria attraverso studi su animali, mostrando che i topi non potevano sopravvivere senza l’aggiunta di sostanze indispensabili per la nutrizione, oltre a proteine, grassi, carboidrati, acqua e minerali. Nel 1912, Hopkins dimostrò che i ratti giovani alimentati con una dieta a base di proteine, amido, zucchero di canna, grassi e minerali non crescevano correttamente se non veniva integrato del latte [4]. Un

ulteriore passo avanti si ebbe grazie al medico danese Christiaan Eijkman, che studiò l'origine della malattia beriberi, oggi nota come causata dalla carenza di vitamina B1. Il beriberi, che colpisce il sistema nervoso, fu osservato in prigionieri e soldati a Giava, un'isola tra Sumatra e Bali. Eijkman notò che i polli sviluppavano neuriti periferiche quando la loro dieta passava dal riso integrale al riso raffinato. Egli dedusse che la probabilità di sviluppare la malattia era notevolmente più alta tra i prigionieri che consumavano riso raffinato rispetto a quelli che mangiavano riso non trattato. Funk, basandosi sulle scoperte di Eijkman, riuscì a isolare un fattore antineuritico dal riso raffinato. Per il loro contributo allo studio delle vitamine, Eijkman e Hopkins ricevettero il Premio Nobel per la medicina nel 1929 [2].

Le vitamine sono oggi classificate in 13 gruppi, e ciascun gruppo comprende molecole con strutture chimiche e funzioni biologiche simili. Un criterio distintivo per la loro classificazione è la solubilità; pertanto, le vitamine del complesso B e la vitamina C sono classificate come vitamine idrosolubili, mentre le vitamine A, E, D, K come vitamine liposolubili [5].

3.2 Storia della vitamina D

La vitamina D appartiene alla famiglia degli steroidi e può essere considerata parte di un sistema ormonale che include la vitamina D₃ (coleciferolo) e la vitamina D₂ (ergocalciferolo). La sua scoperta è strettamente legata alle ricerche sulla carenza di vitamina D nell'uomo, in particolare in relazione al rachitismo [6]. Già nel 1645, Glisson e Whistler furono i primi a trattare il rachitismo adottando un approccio scientifico [7]. Con la crescita delle città e l'avanzamento dell'industrializzazione, il rachitismo divenne una patologia sempre più diffusa, ma

le sue cause rimasero incerte fino agli anni '30 del Novecento [6]. Studi come quelli condotti da Eijkman sulla vitamina B1 [2] e da McCollum, [9] Osborne e Mendel sulla vitamina A [8, 10] avevano contribuito a chiarire diverse condizioni patologiche. In questo contesto, Sir Edward Mellanby avanzò l'ipotesi che anche il rachitismo potesse derivare da una carenza vitaminica [11]. Utilizzando cani come modelli sperimentali, Mellanby indusse il rachitismo attraverso una dieta a base di fiocchi d'avena e mantenendoli lontano dalla luce solare. Come trattamento, somministrò olio di fegato di merluzzo, attribuendo inizialmente l'effetto terapeutico alla vitamina A in esso contenuta. Tuttavia, studi successivi di stabilità condotti da McCollum et al. [12] portarono alla conclusione che l'effetto antirachitico fosse dovuto a una diversa sostanza, successivamente denominata vitamina D.

Steenbook e Black riuscirono a dimostrare in modo chiaro che la sintesi della vitamina D è legata all'esposizione ai raggi UV, che agiscono sui lipidi presenti nel cibo e nella pelle [13]. Anche Huldushinsky e Chick [14-15] confermarono l'importanza della luce UV, osservando i suoi effetti nei bambini affetti da rachitismo, mentre Goldblatt e Soames [16] riuscirono a trattare il rachitismo nei ratti utilizzando fegati irradiati con luce UV provenienti da ratti rachitici. Il lavoro di Steenbook e Black fu determinante poiché aprì la strada all'arricchimento di alcuni alimenti con vitamina D, ponendo le basi per la prevenzione e il trattamento del rachitismo [6]. Nel 1931 fu isolata per la prima volta la molecola della vitamina D₂ dall'ergosterolo nel lievito irradiato con luce UV [17]. Successivamente, il 7-deidrocolesterolo fu sintetizzato e convertito in vitamina D₃. Gli studi sul rachitismo dimostrarono che la patologia, caratterizzata da un difetto nella calcificazione di ossa e cartilagini, è legata a livelli inadeguati di calcio e fosforo

nel sangue. Una delle funzioni principali della vitamina D è infatti quella di stimolare l'assorbimento intestinale del calcio [6]. Harrison [18] e De Luca [19-20] evidenziarono nei loro studi la cooperazione tra la vitamina D e il paratormone, che favorisce la mobilizzazione del calcio dalle ossa.

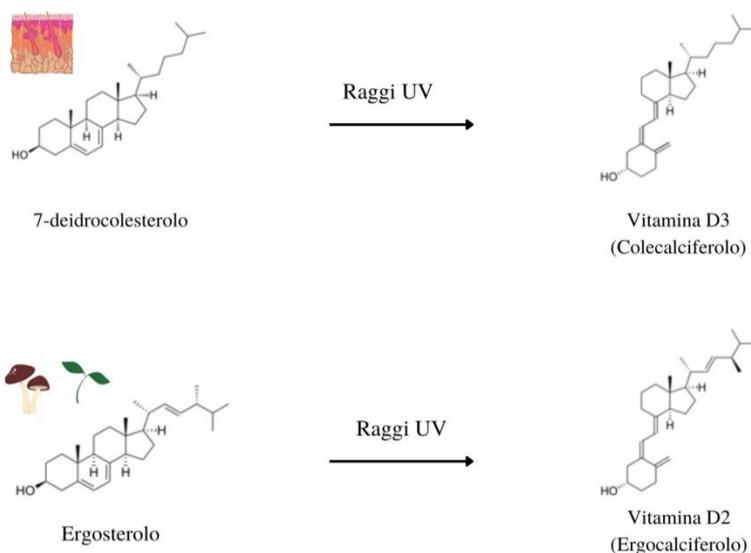


Figura 3.1. Vitamine D₃ e D₂ e i rispettivi precursori.

Grazie a studi effettuati sulla pelle dei maiali [21] e considerando l'alta concentrazione di 7-deidrocolesterolo presente nella cute [22], in particolare nelle ghiandole sebacee e nello strato di Malpighi dell'epidermide, si è giunti alla conclusione che la vitamina D₃ viene sintetizzata nella pelle a seguito dell'esposizione ai raggi UV-B che colpiscono il 7-deidrocolesterolo [23]. Questo processo consiste in una reazione fotochimica in cui, attraverso la rottura del legame 9-10 e una trasposizione sigmatropica 5-7, si forma dapprima la previtamina D₃, che poi isomerizza per diventare vitamina D₃. Tra i sottoprodotti, presenti in minima quantità nella pelle, vi sono il tachisterolo e il lumisterolo. Questa reazione è influenzata da fattori come la quantità di melanina presente nella pelle, l'età, la latitudine, così come dalle creme solari che, seppur lievemente, possono ostacolare

la penetrazione dei raggi UV-B. La vitamina D₂, invece, deriva dalla trasformazione dell'ergosterolo, uno steroide che si trova nei lieviti e nelle piante. Strutturalmente, la vitamina D₂ si differenzia dalla D₃ per la presenza di un doppio legame tra i carboni in posizione 22 e 23 e di un gruppo metilico in posizione 24 [6] (Figura 3.1).

3.3 *Contenuto della vitamina D negli alimenti*

La regolazione complessa del metabolismo e della sintesi della vitamina D, e la moltitudine dei fattori biologici ed ambientali determinano grandi variazioni nei livelli di vitamina D. Uno dei principali fattori influenti è sicuramente l'esposizione ai raggi UVB. L'intensità con cui i raggi colpiscono la pelle è legata a determinate condizioni geografiche come latitudine e altitudine, specifiche condizioni meteorologiche come la presenza di nuvole che possono attenuare l'intensità della radiazione. Le variazioni stagionali possono causare alterazioni nei livelli di vitamina D, oppure in quale momento della giornata ci si espone al sole (mattina presto oppure pomeriggio rispetto a mezzogiorno). Questo vuol dire che non solo la posizione geografica ma anche la stagione deve essere presa in considerazione quando si valutano i livelli di vitamina D.

Altro fattore influente è il colore della pelle. Infatti, la melanina che è un pigmento che si trova nella pelle, assorbe i raggi UVB per proteggere la pelle da un eventuale danneggiamento. Questo si traduce nel fatto che melanina e 7-DHC competono per assorbire i raggi UVB, e conseguentemente si riduce la biodisponibilità dei raggi per la sintesi cutanea della vitamina D₃. Ciò suggerisce che le popolazioni africane o sudamericane, caratterizzate da una colorazione scura della pelle, producono meno vitamina D₃ rispetto a quelle popolazioni con una pelle

chiara considerando lo stesso periodo di esposizione ai raggi UVB. Inoltre, la concentrazione del 7-DHC nell'epidermide è fortemente dipendente dall'età del paziente, diminuendo con l'avanzare dell'età. Questo spiega la bassa produzione di vitamina D₃ nei pazienti anziani rispetto ai giovani adulti sani. In sintesi, esistono una moltitudine di fattori che possono influenzare i livelli di vitamina D, molti dei quali risultano ancora oggi oggetto di studio.

Ciò che risulta abbastanza chiaro è quindi la necessità di integrare tramite l'alimentazione la vitamina D e mantenerne sufficienti i livelli. In generale, se una dieta comprende una buona quantità di pesce, latticini e grassi animali, l'apporto di vitamina D può essere garantito. Nella Tabella 3.1 sono indicati, in ordine decrescente, i quantitativi di vitamina D ($\mu\text{g } 100\text{g}^{-1}$) contenuti negli alimenti più ricchi.

Tabella 3.1. La concentrazione di vitamina D negli alimenti.

Alimenti	Vitamina D
Olio di fegato di merluzzo	210
Salmone e Aringhe	25
Uova	5
Funghi	3
Crusca	3
Burro	0,75
Fegato	0,5

Questi alimenti rappresentano una buona risorsa in termini di supplementazione nel regime alimentare di soggetti con minori possibilità di esposizione al sole o all'aria aperta per limitazioni di natura climatica, di salute o di stile di vita. Nei paesi mediterranei, ad esempio, la quantità di radiazioni ultraviolette assorbita è generalmente considerata sufficiente in relazione al fabbisogno di vitamina D.

Nel 2016, l'EFSA (European Food Safety Authority) ha condotto uno studio sui prodotti dietetici, sull'alimentazione e sulle allergie, per stabilire le quantità di vitamina D3 da assumere in base all'età e alle condizioni di salute temporanee e permanenti. I dosaggi giornalieri devono essere prescritti dal medico dopo accertamento clinico e in particolare in presenza di patologie specifiche come osteoporosi e rachitismo. La prescrizione medica garantisce, inoltre, un'azione di controllo nei casi di eccesso di uso di integratori alimentari o smisurata ingestione di un alimento contenente vitamina D. L'azione preventiva e di controllo a cura del personale medico consente di verificare la quantità di vitamina D attraverso il dosaggio di 25-OH-D nel sangue e interviene nella valutazione dei fattori di rischio legati a specifiche condizioni quali l'obesità, disturbi dell'alimentazione, scarsa esposizione al sole e nelle donne, il periodo di gestazione.

3.4 Il metabolismo della vitamina D

Essendo liposolubile, la vitamina D ha bisogno di trasportatori per circolare nel sangue. Questi includono le proteine plasmatiche come l'albumina, anche se in misura minore, e la *vitamin D binding protein* (VDBP), una globulina che lega la maggior parte della vitamina D e dei suoi metaboliti [24]. La previtamina D₃, a differenza della vitamina D₃, non entra immediatamente in circolo, ma rimane nella pelle in attesa di essere convertita nella sua forma definitiva [6]. A livello dei reni, la proteina megalina consente il trasporto della 25-(OH)-D-VDBP nel tubulo contorto prossimale, dove viene riassorbita e successivamente degradata, rilasciando la 25-(OH)-D nuovamente in circolo [24]. Come illustrato nella Figura 3.2, la vitamina D₃ subisce nel fegato una idrossilazione in posizione 25 grazie all'enzima 25-idrossilasi, situato a livello microsomiale.

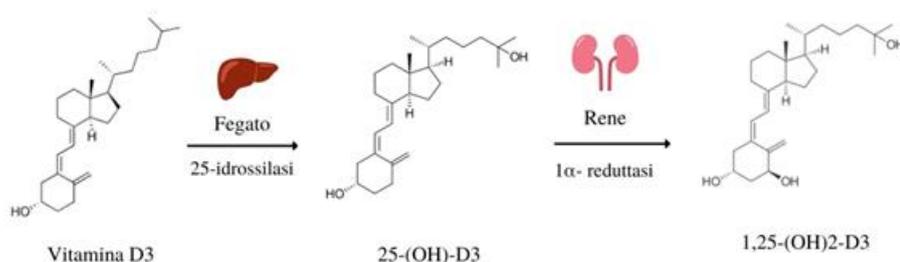


Figura 3.2. Principali vie metaboliche della vitamina D₃.

Questo processo richiede NADPH, ossigeno, una flavoproteina e il citocromo P-450, in particolare il CYP2R1 [6, 27]. La 25-(OH)-D₃, conosciuta anche come calcidiolo, è un metabolita inattivo che viene utilizzato come indicatore per valutare i livelli di vitamina D nel sangue. Nei reni, una ulteriore idrossilazione in posizione 1 α porta alla formazione del calcitriolo (1,25-(OH)₂-D₃) grazie all'enzima 1 α -reduttasi o CYP27B1, la cui attività è regolata dai livelli di calcio, fosforo, PTH e FGF23 (fattore di crescita dei fibroblasti) [24, 27]. Il calcitriolo è la forma biologicamente attiva della vitamina D e svolge le sue funzioni principalmente su ossa e intestino, per cui è considerato un ormone. Questo metabolita è dieci volte più potente della vitamina D₃, sebbene sia presente in concentrazioni molto più basse rispetto alla 25-(OH)-D₃, la forma mono-idrossilata. Inoltre, il calcitriolo ha un'emivita relativamente breve, pari a 2-4 ore nel sangue e leggermente più lunga nei tessuti a causa del suo rapido metabolismo. Tra gli altri enzimi coinvolti nel metabolismo della vitamina D, troviamo la 24-idrossilasi, che converte i metaboliti epatici e renali rispettivamente in 24,25-(OH)-D₃, una forma parzialmente attiva, e in 1,24,25-(OH)₃-D₃. A partire dalla 25-(OH)-D₃ si può anche ottenere la 3-*epi*-25-(OH)-D₃ per azione dell'enzima 25-(OH)-D₃-epimerasi. Sia la vitamina D₂ che la D₃ subiscono gli stessi processi metabolici, ma i metaboliti della vitamina D₂ risultano meno attivi.

La forma biologicamente attiva, 1,25-(OH)₂-D₃, si lega al recettore VDR (*vitamin D receptor*), che appartiene alla famiglia dei recettori nucleari. Il complesso formato da 1,25-(OH)₂-D₃ e VDR interagisce con il recettore RXR dell'acido retinoico, scatenando una serie di effetti. Il VDR agisce come un fattore di trascrizione, regolando l'espressione dei geni che possiedono nel loro promotore il *vitamin D response element* (VDRE) [24, 27].

3.5 *Le funzioni della vitamina D nell'uomo.*

La vitamina D svolge un ruolo fondamentale nell'assorbimento intestinale del calcio. La sua forma attiva, l'1,25-(OH)₂-D₃, si lega ad un recettore nucleare presente sulle cellule intestinali, attivando la trascrizione dei geni responsabili della sintesi delle proteine che trasportano calcio e fosforo, facilitandone l'ingresso negli enterociti. Il calcio esce poi da queste cellule tramite un meccanismo sodio-dipendente. La proteina che trasporta il calcio fu identificata da Wasserman e Taylor [28] ed è prodotta nell'intestino, principalmente a livello citoplasmatico, per prevenire l'eccessivo accumulo del calcio e consentire il suo passaggio attraverso gli enterociti. È stato successivamente dimostrato che questa proteina è dipendente dal calcitriolo, che promuove anche il trasporto del fosfato. Il trasporto del calcio nell'intestino è regolato dal fabbisogno di questo minerale, gestito da un fattore noto come fattore endogeno di *Nicolaysen*, che corrisponde all'1,25-(OH)₂-D₃. Quando vi è una maggiore richiesta di calcio, la vitamina D viene attivata per stimolare l'assorbimento intestinale.

La vitamina D gioca un ruolo cruciale nell'omeostasi del calcio. Quando i livelli del calcio nel sangue scendono, si verifica la secrezione del paratormone (PTH), che a livello renale promuove la sintesi della vitamina D, stimolando il

riassorbimento del calcio nel tubulo distale. In contemporanea, la vitamina D aumenta l'assorbimento intestinale del calcio e, insieme al PTH, favorisce la mobilizzazione del calcio dalle ossa. Quando i livelli ematici del calcio tornano normali, sia il PTH che la vitamina D diminuiscono [6]. Studi radioisotopici [29] hanno dimostrato che la vitamina D è responsabile della mobilizzazione del calcio dalle ossa. Esperimenti su ratti alimentati con diete a basso contenuto di calcio e con carenza di vitamina D [30] hanno mostrato che la somministrazione di vitamina D aumentava i livelli di calcio nel sangue, supportando l'ipotesi che, in assenza di sufficiente apporto di calcio dalla dieta, le ossa rappresentino l'unica fonte disponibile. La mobilizzazione del calcio dalle ossa è mediata dalla vitamina D e dal PTH: il paratormone ha bisogno della vitamina D per stimolare la produzione di proteine di trasporto del calcio.

Patologie come il rachitismo nei bambini e l'osteomalacia negli adulti sono caratterizzate da una mancata mineralizzazione delle fibrille di collagene prodotte dagli osteoblasti, che rende le ossa fragili e predisposte a fratture. La vitamina D non agisce direttamente nella mineralizzazione ossea, ma favorisce l'innalzamento dei livelli del calcio e fosforo nel sangue, superando così i valori di saturazione e stimolando l'assorbimento di questi minerali a livello intestinale. La vitamina D ha anche un ruolo a livello renale, dove favorisce indirettamente il riassorbimento di fosfato, grazie alla sua azione inibitoria sulla secrezione di PTH, che regola l'assorbimento renale del fosfato. Inoltre, insieme al PTH, la vitamina D contribuisce alla conservazione del calcio a livello renale. Tuttavia, sono necessarie ulteriori ricerche su questo processo. Nel tubulo contorto prossimale, la vitamina D inibisce l'enzima 1α -idrossilasi e stimola la $24R$ -idrossilasi. Quando i livelli di calcio sono bassi e viene rilasciato il PTH, l' $1,25-(OH)_2-D_3$ attiva l'enzima 1α -

idrossilasi. La vitamina D esercita numerose altre funzioni: livelli elevati di 1,25-(OH)₂-D₃ sono stati riscontrati nel nucleo di varie cellule, come quelle dell'ipofisi, della ghiandola mammaria, delle isole pancreatiche di Langerhans, nelle cellule endocrine dello stomaco e nella pelle [31-32]. La vitamina D regola anche la secrezione di insulina, riducendola in caso di carenza e aumentandola con un'integrazione esterna. Inoltre, stimola l'accumulo del 7-deidrocolesterolo nella pelle, soprattutto nello strato di Malpighi. Ha un ruolo nel trasporto del calcio nella ghiandola mammaria, nella formazione degli osteoclasti e nella differenziazione delle cellule della leucemia mieloide in macrofagi. Sebbene l'effetto della vitamina D su queste cellule sia stato osservato *in vitro*, non è ancora chiaro se si verifichi nello stesso modo *in vivo*, anche se il recettore della vitamina D è stato identificato in vari tessuti neoplastici [6]. L'1,25-(OH)₂-D svolge inoltre funzioni antinfiammatorie e immunomodulatrici, influenzando lo sviluppo fetale, la crescita infantile e il funzionamento del sistema nervoso centrale e periferico, oltre a regolare il sistema endocrino e cardiovascolare. Ha anche proprietà foto protettive e partecipa alla formazione dell'epidermide [27].

È stata stabilita una possibile relazione tra i livelli ematici di vitamina D e l'infezione da SARS-CoV-2, responsabile della malattia COVID-19. Un'indagine condotta dall'Istituto Superiore di Sanità e dall'Ospedale Sant'Andrea di Roma su 52 pazienti ha evidenziato una correlazione tra carenza di vitamina D e forme più gravi di COVID-19, soprattutto a livello polmonare [33]. Si è osservato che i pazienti con bassi livelli di vitamina D mostravano alterazioni nei marker di infiammazione, danno cellulare e coagulazione. Pertanto, si è ipotizzato che l'integrazione di vitamina D possa ridurre il rischio di contrarre l'infezione e mitigare le manifestazioni più severe. Inoltre, la stagionalità del COVID-19 sembra

riflettere l'andamento della produzione di vitamina D, influenzata dall'esposizione ai raggi UV-B, più scarsa nei paesi con latitudine medio-alta. È stato osservato che in Africa, negli Stati Uniti e in America Latina il virus si è diffuso maggiormente rispetto all'Europa, ipotizzando che ciò sia dovuto a una minore concentrazione di 25-(OH)-D₃, in funzione della pigmentazione cutanea. Una caratteristica del COVID-19 è l'induzione di una tempesta di citochine, mediatori dell'infiammazione, mentre la vitamina D, grazie alle sue proprietà antinfiammatorie, riduce la produzione di citochine pro-infiammatorie come TNF- α e IFN- γ , aumentando al contempo le citochine antinfiammatorie tramite l'azione dei macrofagi. Nei casi più gravi, il sistema immunitario viene colpito, e la vitamina D promuove l'immunità innata, stimolando la produzione di peptidi antimicrobici come le catelicidine e le defensine, che esercitano attività antivirale, oltre che antimicrobica, distruggendo le proteine dell'involucro virale e modulando l'immunità adattativa. Inoltre, la vitamina D, essendo un inibitore della renina, riduce l'accumulo di angiotensina II, diminuendo il rischio di sindrome da stress respiratorio acuto (ARDS), miocarditi e altri problemi cardiaci. È stato anche riscontrato che la vitamina D può contribuire a ridurre le disfunzioni endoteliali associate all'infezione da COVID-19 [34-35].

3.6 Deficit, integrazione e tossicità

Secondo quanto riportato dall'Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA) nella "Scheda vitamina D-cittadino 2019" [36] sono considerati auspicabili valori compresi tra 20 e 40 ng mL⁻¹, mentre si inizia a parlare di carenza per valori di 25-(OH)-D < 20 ng mL⁻¹, per i quali è necessaria un'integrazione. I livelli ottimali, di

deficienza e insufficienza definiti dall'International Osteoporosis Foundation (IOF) sono indicati nella Tabella 3.2 [37].

Tabella 3.2. Linee guida per i livelli di Vitamina D nel sangue.

Livelli soglia della vitamina D nel sangue (IOF)	
Livello ottimale	30-44 ng mL ⁻¹
Insufficienza	20-29 ng mL ⁻¹
Deficienza	10-19 ng mL ⁻¹
Deficienza severa	<10 ng mL ⁻¹

La carenza di vitamina D è diventata un problema globale, con particolare incidenza in alcuni gruppi di popolazione, come donne incinte, persone di colore, soggetti obesi e individui con scarsa esposizione solare [38]. Uno studio condotto a Boston su 40 donne incinte, che assumevano una dose giornaliera di 600 UI di vitamina D, ha riscontrato una deficienza nel 76% delle donne e nell'81% dei neonati [39]. Questo evidenzia che, nonostante l'integrazione durante la gravidanza, i livelli di vitamina D non superavano i 20 ng/ml, aumentando così i rischi di preeclampsia, difficoltà respiratorie e necessità di parto cesareo. Negli Stati Uniti, molti bambini, nonostante l'assunzione di alimenti arricchiti con vitamina D, continuano a mostrare livelli inferiori a 30 ng/ml di 25-(OH)-D₃, probabilmente a causa di una minore esposizione al sole o ridotto consumo di latte, e anche per l'obesità infantile [38].

Nei bambini, una carenza di vitamina D può portare a ritardi nella crescita e all'insorgenza del rachitismo. Negli adulti, possono manifestarsi osteomalacia, osteoporosi, maggiore rischio di fratture, debolezza muscolare e stanchezza cronica. Diversi studi hanno evidenziato che la carenza di vitamina D è correlata a un incremento del 30-50% del rischio di tumori al colon-retto, seno e prostata, con

livelli di 25-(OH)-D₃ inferiori a 50 nmol L⁻¹. La deficienza di vitamina D è stata inoltre associata a malattie come l'ipertensione, schizofrenia, depressione, diabete di tipo I e II, malattie autoimmuni e tubercolosi, dove i macrofagi infettati stimolano la produzione di 1,25-(OH)₂-D, attivano il recettore della vitamina D e aumentano la produzione di catelicidine, potenti agenti antimicrobici e antivirali [40]. Le principali cause della carenza di vitamina D sono la scarsa esposizione ai raggi solari, che attraverso gli UV-B (290-315 nm) convertono il 7-deidrocolesterolo in vitamina D₃. Questa viene poi trasformata in 25-(OH)-D₃ nel fegato e successivamente in 1,25-(OH)₂-D₃ nei reni. La produzione di vitamina D è influenzata da fattori come latitudine, età, momento della giornata, ma anche dal contenuto di melanina della pelle e dall'uso di creme solari, che riducono la quantità di raggi UV-B assorbiti e quindi la produzione di vitamina D [38]. La vitamina D prodotta nella pelle impiega circa 3 giorni per essere completamente rilasciata nel flusso sanguigno, dove può rimanere fino a 7 giorni, raggiungendo il picco di concentrazione tra il settimo e il quattordicesimo giorno dopo l'esposizione al sole. Al contrario, la vitamina D assunta tramite l'alimentazione provoca un picco plasmatico più rapido, raggiungibile entro 10-12 ore dall'assunzione [41]. Fonti alimentari naturali di vitamina D sono limitate e comprendono l'olio di pesce, funghi essiccati e l'olio di fegato di merluzzo. Spesso, gli integratori di vitamina D₃ provengono dall'olio di pesce o dal colesterolo della lana di pecora, mentre la vitamina D₂ è ottenuta dall'irradiazione dei lieviti o dei funghi [38]. Uno studio, aveva ipotizzato che la vitamina D₂ favorisse la degradazione della vitamina D₃, contribuendo così alla sua carenza [42], ma ricerche successive hanno dimostrato che somministrando 1000 UI di vitamina D₂ si ottiene un incremento dei livelli di 25-(OH)-D paragonabile a quello prodotto da 1000 UI di vitamina D₃. La principale

differenza tra le due forme sta nella durata dei loro metaboliti. La 25-(OH)-D₂ ha un'emivita più breve rispetto alla 25-(OH)-D₃, a causa della sua minore affinità con la proteina legante la vitamina D (VDBP). Di conseguenza, i livelli di 25-(OH)-D₂ diminuiscono già dopo 3 giorni, mentre quelli di 25-(OH)-D₃ iniziano a diminuire solo dopo 14 giorni [38]. Uno studio condotto su topi C56BL/6 ha dimostrato che i livelli ematici di 25-(OH)-D erano il doppio nei soggetti trattati con vitamina D₂ rispetto a quelli che avevano ricevuto vitamina D₃, con effetti benefici più pronunciati a livello osseo [43]. Negli Stati Uniti, la vitamina D₂ viene spesso utilizzata per trattare la carenza, mentre in Europa si preferisce l'uso di vitamina D₃. Alcune categorie di persone, come gli obesi (BMI >30), necessitano di dosi maggiori di vitamina D, da 2 a 3 volte superiori rispetto alla media, poiché la vitamina D, essendo liposolubile, viene immagazzinata nel tessuto adiposo, riducendo la quantità disponibile per svolgere le sue funzioni. Anche i pazienti con patologie intestinali infiammatorie, quelli che hanno subito un intervento di bypass gastrico o affetti da malattie che causano malassorbimento, come il morbo di *Crohn* o la celiachia, richiedono un apporto più elevato. La tossicità della vitamina D si manifesta quando viene assunta oralmente in dosi eccessive per periodi prolungati. Tuttavia, una sovraesposizione al sole non provoca intossicazione, poiché l'eccesso di vitamina D prodotto viene distrutto dalla luce solare [38]. I sintomi di tossicità includono ipercalcemia e ipercalciuria, ma possono manifestarsi anche anoressia, nausea, vomito, diarrea, stanchezza, dolori ossei, aritmie cardiache e calcoli renali. Una condizione spesso confusa con la tossicità da vitamina D è l'ipersensibilità alla vitamina D, associata a iperparatiroidismo, sarcoidosi, granulomatosi o alcune forme di cancro [44].

3.7 Attività dei vari metaboliti

La vitamina D₃ viene prodotta nella pelle attraverso una reazione fotochimica attivata dai raggi UV-B e successivamente metabolizzata a 25-(OH)-D₃ per opera della 25-idrossilasi, nota come CYP2R1, presente nel reticolo endoplasmatico degli epatociti. Questo enzima è attivo sia a livello microsomiale che mitocondriale, dove è identificato come CYP27A1. Tuttavia, sembra che il CYP27A1 entri in gioco solo quando i livelli di vitamina D sono elevati. Anche se con un contributo inferiore, la 25-idrossilasi responsabile di questa trasformazione è localizzata anche nell'intestino e nei reni.

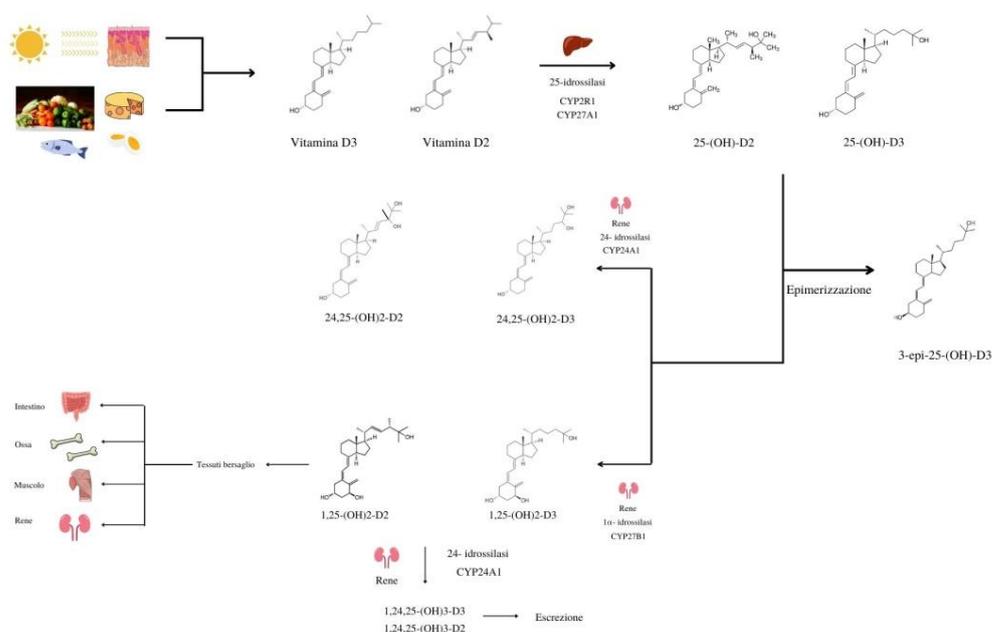


Figura 3.3. Metabolismo della vitamina D.

La forma monoidrossilata della vitamina D è un metabolita inattivo che circola nel sangue in quantità maggiori rispetto alla forma attiva, con un'emivita di circa 2-3 settimane, e rappresenta il biomarcatore utilizzato per misurare i livelli di vitamina D. Per attivarsi, necessita di un'ulteriore trasformazione da parte

dell'enzima 1α -idrossilasi, noto come CYP27B1, situato nei mitocondri delle cellule renali, che converte il metabolita in $1\alpha,25$ -(OH)₂-D, la forma attiva. Questa, presente nel sangue in concentrazioni molto più basse rispetto alla 25-(OH)-D₃ (circa 1000 volte inferiori), ha un'emivita di circa 4 ore. Oltre che nei reni, il CYP27B1 è presente anche nella pelle e nella placenta. Il funzionamento di questo enzima richiede NADPH per ridurre la flavoproteina ferrodossina reduttasi, che successivamente riduce la ferrodossina renale, attivando così il citocromo P450. La $1\alpha,25$ -(OH)₂-D viene metabolizzata molto più rapidamente rispetto alla 25-(OH)-D. Un esperimento su animali nefrectomizzati, incapaci di produrre il metabolita attivo, ha dimostrato che la somministrazione di 25-(OH)-D non causava effetti fisiologici, mentre somministrando $1\alpha,25$ -(OH)₂-D si osservava una risposta. Questo metabolita si lega al recettore VDR, espletando tutte le funzioni caratteristiche della vitamina D. La vitamina D₂, ottenuta dall'ergosterolo irradiato con UV-B, subisce le stesse trasformazioni della vitamina D₃, ma i suoi metaboliti risultano meno affini al legame con la VDBP e meno attivi rispetto a quelli della vitamina D₃ [36].

A partire dalla 25-(OH)-D si può generare la $24R,25$ -(OH)₂-D grazie all'azione dell'enzima CYP24A1. Questo metabolita ha una parziale attività e sembra essere coinvolto nella formazione della cartilagine e nella guarigione delle fratture, legandosi al recettore FAM57B2 invece che al VDR. Nei soggetti con carenza di vitamina D, l'attività della 24-idrossilasi è assente. L'inattivazione della vitamina D₃ avviene tramite la biotrasformazione della $1\alpha,25$ -(OH)₂-D₃ e della 25-(OH)-D₃, grazie al CYP2A1, che produce rispettivamente $1\alpha,24,25$ -(OH)₃-D₃ e $24,25$ -(OH)₂-D₃. Questi metaboliti subiscono un'ossidazione che comporta la scissione del legame tra C23 e C24, formando un acido su C23, il principale prodotto di

eliminazione tramite la bile. Inoltre, sia la 25-(OH)-D₃ che la 1 α ,25-(OH)₂-D₃ sono substrati per una 3-epimerasi, presente nel reticolo endoteliale delle cellule epatiche, ossee e cutanee, che trasforma queste molecole rispettivamente in 3-*epi*-25-(OH)-D₃ e 3-*epi*-1 α ,25-(OH)₂-D₃. Quest'ultimo ha un'affinità per il recettore VDR inferiore del 35-120% rispetto alla sua controparte attiva (Figura 3.4). Altre reazioni a carico della vitamina D sono reazione di solfoconiugazione e glucuronazione che contribuiscono a favorirne l'eliminazione [6, 27].

3.8 *Alcune considerazioni sul ruolo essenziale della vitamina D*

La vitamina D, un tempo conosciuta esclusivamente per il suo ruolo essenziale nel metabolismo del calcio e nella salute dell'apparato scheletrico, ha visto negli ultimi decenni un ampliamento significativo della sua considerazione in ambito scientifico e medico. La scoperta che molti tessuti e organi possiedono recettori per la vitamina D, e che questa vitamina agisce attraverso meccanismi simili a quelli di un ormone, ha spostato la percezione di questa sostanza da semplice "vitamina" a una molecola endocrina di fondamentale importanza per la regolazione di numerosi processi biologici. Il suo riconoscimento come vero e proprio ormone ha aperto nuove prospettive di studio, evidenziando il suo coinvolgimento in una vasta gamma di funzioni sistemiche. Non solo la vitamina D è cruciale per la regolazione del metabolismo del calcio e del fosforo, ma influisce anche sull'omeostasi immunitaria, sul funzionamento del sistema cardiovascolare, sulla salute muscolare e persino sul benessere psicologico. I numerosi studi epidemiologici e clinici condotti negli ultimi anni hanno evidenziato come la carenza di vitamina D sia associata a un aumentato rischio di sviluppare una vasta gamma di malattie, tra cui malattie cardiovascolari, malattie autoimmuni, infezioni e alcune forme di tumori.

Tali evidenze hanno confermato che il suo ruolo va ben oltre la semplice prevenzione delle patologie scheletriche, come il rachitismo nei bambini e l'osteoporosi negli adulti, posizionando la vitamina D come una sostanza chiave per la salute globale dell'individuo. Considerando che i livelli insufficienti di vitamina D sono una condizione diffusa a livello mondiale, è chiaro come la sua integrazione debba essere al centro delle politiche sanitarie globali. Fattori come scarsa esposizione al sole, fattori dietetici e problemi di malassorbimento contribuiscono a rendere la carenza di vitamina D una vera e propria emergenza sanitaria, soprattutto nelle fasce di popolazione più vulnerabili. Questi includono gli anziani, le persone con pelle più scura, che hanno una minore capacità di sintetizzare la vitamina D tramite esposizione solare, e le persone che vivono in aree geografiche ad alta latitudine, dove la luce solare è ridotta per gran parte dell'anno. L'introduzione di programmi di screening e di integrazione alimentare mirati potrebbe rappresentare una soluzione efficace per contrastare la diffusione della carenza di vitamina D, con l'obiettivo di ridurre l'incidenza di patologie correlate. Tuttavia, nonostante la crescente consapevolezza e le numerose raccomandazioni cliniche, è ancora necessario ottimizzare le linee guida per l'integrazione, specialmente per definire con precisione i livelli ottimali di vitamina D, che variano in base a età, genere, stile di vita e stato di salute individuale. Una corretta personalizzazione dell'integrazione è fondamentale per evitare sia il rischio di carenza che quello di ipervitaminosi D, una condizione rara ma potenzialmente pericolosa. La comprensione del ruolo complesso e multifunzionale della vitamina D ha ancora margini di crescita. Uno degli obiettivi principali della ricerca futura sarà quello di chiarire ulteriormente i meccanismi molecolari attraverso cui la vitamina D esercita le sue funzioni in vari tessuti, oltre a identificare eventuali

nuove interazioni con altri sistemi ormonali o molecole biologiche. Tale comprensione più approfondita potrebbe aprire la strada a terapie più mirate ed efficaci per le patologie correlate alla carenza di vitamina D. Inoltre, esistono diverse aree che meritano una maggiore attenzione scientifica, la personalizzazione della terapia con vitamina D: le attuali raccomandazioni di integrazione sono spesso generalizzate e non tengono adeguatamente conto delle differenze individuali. Le future ricerche dovrebbero concentrarsi sulla definizione di dosaggi personalizzati, basati su fattori genetici, condizioni di salute e stile di vita. Ciò permetterebbe di ottimizzare l'efficacia dell'integrazione, minimizzando allo stesso tempo i potenziali rischi legati a un'integrazione inadeguata o eccessiva. Oggi, il dosaggio della vitamina D è basato principalmente sulla misurazione dei livelli sierici di 25(OH)D. Tuttavia, vi è un crescente riconoscimento che questa misura potrebbe non essere completamente rappresentativa dell'effettiva biodisponibilità o dell'attività biologica della vitamina D. Future ricerche potrebbero focalizzarsi su nuovi biomarcatori per valutare più accuratamente lo stato della vitamina D a livello cellulare e tissutale. Un campo emergente di grande interesse è lo studio delle interazioni tra la vitamina D e il microbioma intestinale. Esiste una crescente evidenza che la vitamina D possa influenzare la composizione del microbioma, con implicazioni potenziali per la salute immunitaria e la prevenzione di malattie metaboliche. Capire meglio queste interazioni potrebbe portare a nuove strategie preventive o terapeutiche, che combinano l'integrazione di vitamina D con interventi mirati sul microbioma. La ricerca potrebbe anche concentrarsi sull'ottimizzazione delle formulazioni di vitamina D, esplorando nuove vie di somministrazione, come preparati a rilascio prolungato o integratori più biodisponibili, in grado di garantire un apporto continuo e ottimale di vitamina D,

riducendo così i rischi di oscillazioni nei livelli ematici. In conclusione, la vitamina D ha dimostrato di essere una molecola multifunzionale con un ampio spettro di azioni che influenzano la salute umana in modo profondo e complesso. Mantenere adeguati livelli di vitamina D non è solo fondamentale per prevenire malattie dell'apparato scheletrico, ma è anche cruciale per promuovere una salute ottimale a livello globale, con effetti positivi su molti organi e sistemi corporei. Il crescente corpo di prove scientifiche supporta la necessità di una maggiore consapevolezza pubblica e di politiche sanitarie più incisive per garantire che la popolazione mondiale raggiunga livelli adeguati di questa sostanza. La prevenzione e la correzione delle carenze di vitamina D potrebbero giocare un ruolo cruciale nella riduzione del carico globale di malattie croniche, migliorando così la qualità della vita e riducendo i costi sanitari associati. Alla luce di queste considerazioni, è auspicabile che la comunità scientifica e le istituzioni sanitarie continuino a collaborare per promuovere ulteriori ricerche e interventi mirati, con l'obiettivo di massimizzare i benefici derivanti dall'uso corretto della vitamina D nella pratica clinica e nella prevenzione delle malattie.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Pietrzik, K. & Dierkes, J. History and classical functions of vitamins. *Bibl. Nutr. Dieta* 7–19 (1995) doi:10.1159/000424730.
- [2] Souganidis, E. Nobel laureates in the history of the vitamins. *Ann. Nutr. Metab.* 61, 265–269 (2012).
- [3] Kraemer, K., Semba, R. D., Eggersdorfer, M. & Schaumberg, D. A. Introduction: the diverse and essential biological functions of vitamins. *Ann. Nutr. Metab.* 61, 185–191 (2012).
- [4] Semba, R. D. The discovery of the vitamins. *Int. J. Vitam. Nutr. Res. Int. Z. Vitam.-Ernährungsforschung J. Int. Vitaminol. Nutr.* 82, 310–315 (2012).
- [5] Cappelli, P. & Vannucchi, V. *Chimica degli alimenti: conservazione e trasformazioni.* (Zanichelli, 2005).
- [6] Kumar, R. *Vitamin D: basic and clinical aspects.* (Martinus Nijhoff Publishing, 1984).
- [7] The history of rickets. In: *Rickets, Including Osteomalacia, and Tetany.* (Lea & Febiger, 1929).
- [8] McCollum, E. & Davis, M. The necessity of certain lipids in the diet during growth. *J Biol Chem* 15, 167–175 (1913).
- [9] McCollum, E., Simmonds, N. & Pitz, W. The relation of the unidentified dietary factors, the fat-soluble A and water-soluble B of the diet to the growth-promoting properties of milk. *J Biol Chem* 27, 33–43 (1916).
- [10] Osborne, T. & Mendel, L. The role of vitamins in the diet. *J Biol Chem* 31, 149–163 (1917).
- [11] Mellanby, E. An experimental investigation on rickets. *Lancet* 1, 407–412 (1919).
- [12] McCollum, E., Simmonds, N., Becker, J. & Shipley, P. Studies on experimental rickets. XXI. An experimental demonstration of the existence of a vitamin which promotes calcium deposition. *J Biol Chem* 53, 293–312 (1922).
- [13] Steenbock, H. & Black, A. Fat-soluble vitamins. XVII. The induction of growth-promoting and calcifying properties in a ration by exposure to ultraviolet light. *J Biol Chem* 61, 405–422 (1924).
- [14] Huldshinsky, K. Heilung von rachitis durch künstliche höhensonne. *Deut Med Wochschr* 45, 712–713 (1919).
- [15] Chick, H., Palzell, E. & Hume, E. Studies of rickets in Vienna 1919-1922. *Mediacal Research Council Special Report No. 77*, (1923).
- [16] Goldblatt, H. & Soames, K. Studies on the fat-soluble growth-promoting factor (I) storage (II) synthesis. *Biochem J* 17, 446–453 (1923).

- [17] Askew, F., Bourdillon, R., Bruce, H., Jenkins, R. & Webster, T. The distillation of vitamin D. *Proc Roy Soc B* 107, 76–90 (1931).
- [18] Harrison, H., Harrison, H. & Park, E. Vitamin D and citrate metabolism. Effect of vitamin D in rats fed diets adequate in both calcium and phosphorus. *Am J Physiol* 192, 432–436 (1958).
- [19] Rasmussen, H., DeLuca, H., Arnaud, C., Hawker, C. & von Stedingk, M. The relationship between vitamin D and parathyroid hormone. *J Clin Invest* 42, 1940–1946 (1963).
- [20] Garabedian, M., Tanaka, Y., Holick, M. & DeLuca, H. Response of intestinal calcium transport and bone calcium mobilization to 1,25-dihydroxy-vitamin D₃ in thyroparathyroidectomized rats. *Endocrinology* 94, 1022–1027 (1974).
- [21] Windaus, A. & Bock, F. Über das provitamin aus dem sterin der schweineschwarte. *Z Physiol Chem* 245, 168–170 (1937).
- [22] DeLuca, H., Blunt, J. & Rikkers, H. VII. Biogenesis. In: *The vitamins*. (Sebrell WH Jr, Harris RS, 1971).
- [23] Velluz, L. & Amiard, G. Chimie organique-le precalciferol. *Compt Rend* 228, 692–694 (1949).
- [24] Proietti, A., D'Urso, R., Cardelli, P. & Falaschi, P. Vitamina D: dalle problematiche di dosaggio alle implicazioni cliniche. *Giornale Di Gerontologia LXII*, 142–149 (2014).
- [25] Bills, C. Vitamin D group. In: *The Vitamins*. (Sebrell WH Jr, Harris RS, 1954).
- [26] Brockmann, H. Die isolierung des autirachitischen vitamins aus heilbuttleberöl. *Physiologische Chemie* 245, 96–102 (1937).
- [27] Tuckey, R. C., Cheng, C. Y. S. & Slominski, A. T. The serum vitamin D metabolome: What we know and what is still to discover. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 186, 4–21 (2019).
- [28] Taylor, A. & Wasserman, R. Vitamin D-induced calcium-binding protein: Partial purification, electrophoretic visualization, and tissue distribution. *Arch Biochem Biophys* 119, 536–540 (1967).
- [29] Carlsson, A. Tracer experiments on the effect of vitamin D on the skeletal metabolism of calcium and phosphorus. *Acta Physiol Scand* 26, 212–220 (1952).
- [30] Nicolaysen, R. & Eeg-Larsen, N. The mode of action of vitamin D. In: *Ciba Foundation Symposium on Bone Structure and Metabolism*. (Wolstenholme GWE, O'Connor CM, 1956).
- [31] Stumpf, W., Sar, M., Reid, F., Tanaka, Y. & DeLuca, H. Target cells for 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in intestinal tract, stomach, kidney, skin, pituitary and parathyroid. *Science* 206, 1188–1190 (1979).

- [32] Clark, S., Stumpf, W., Sar, M., DeLuca, H. & Tanaka, Y. Target cells for 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in the pancreas. *Cell Tissue Res* 209, 515–520 (1980).
- [33] ISS (Istituto Superiore di Sanità). COVID-19 e vitamina D, bassi livelli di quest'ultima possono contribuire ad aggravare la prognosi. https://www.iss.it/news/-/asset_publisher/gJ3hFqMQsykM/content/covid-19-e-vitamina-d-bassi-livelli-di-quest-ultima-possono-contribuire-ad-aggravare-la-prognosi#:~:text=La%20carenza%20di%20Vitamina%20D,pubblicato%20sulla%20rivista%20Respiratory%20Research. (2021).
- [34] Mercola, J., Grant, W. B. & Wagner, C. L. Evidence Regarding Vitamin D and Risk of COVID-19 and Its Severity. *Nutrients* 12, E3361 (2020).
- [35] Grant, W. B. et al. Evidence that Vitamin D Supplementation Could Reduce Risk of Influenza and COVID-19 Infections and Deaths. *Nutrients* 12, E988 (2020).
- [36] Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA). SCHEDE VITAMINA D – CITTADINO. 4 (2019).
- [37] International Osteoporosis Foundation. Three steps to unbreakable bones: vitamin D, calcium and exercise. (2011).
- [38] Holick, M. F. The vitamin D deficiency pandemic: Approaches for diagnosis, treatment and prevention. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 18, 153–165 (2017).
- [39] Lee, J. et al. Vitamin D deficiency in a healthy group of mothers and newborn infants. *Clin Pediatr* 46, 42–44 (2007).
- [40] Holick, M. F. & Chen, T. C. Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. *Am. J. Clin. Nutr.* 87, 1080S–6S (2008).
- [41] Fraser, D. R. Vitamin D toxicity related to its physiological and unphysiological supply. *Trends Endocrinol. Metab.* TEM 32, 929–940 (2021).
- [42] Armas, L., Hollis, B. & Heaney, R. Vitamin D₂ is much less effective than vitamin D in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 5387–5391 (2004).
- [43] Chun, R. et al. Differential responses to vitamin D₂ and vitamin D₃ are associated with variations in free 25-hydroxyvitamin D. *Endocrinology* 157, 3420–3430 (2016).
- [44] Alshahrani, F. & Aljohani, N. Vitamin D: deficiency, sufficiency and toxicity. *Nutrients* 5, 3605–3616 (2013).

Capitolo 4

Analisi lipidomica

L'analisi lipidomica è lo studio del profilo chimico del lipidoma e consente di determinare la struttura chimica di ciascun componente lipidico in situazioni fisiologiche e patologiche. Le caratteristiche fondamentali per una strategia analitica di successo sono la selettività e la sensibilità. La prima rappresenta la capacità di determinare univocamente gli analiti d'interesse senza essere influenzata da variabili, per esempio la presenza di agenti interferenti presenti nella matrice, mentre la seconda si riferisce alla capacità di una metodica analitica di apprezzare una variazione di segnale generata da una determinata variazione di quantità di analita. Questo si traduce anche nella capacità di raggiungere bassi livelli di concentrazione in modo da garantire una approfondita e completa caratterizzazione della matrice d'interesse, inclusi quei composti presenti in tracce.

La maggior parte delle tecniche di laboratorio disponibili per l'analisi lipidomica prevedono un preliminare trattamento del campione, per esempio l'estrazione dei lipidi mediante solventi organici, e successive indagini analitiche separative o *shot-gun* dell'estratto per l'identificazione e/o quantificazione mediante l'impiego di idonei metodi di rivelazione [1]. Tuttavia, le tecniche di analisi lipidomica convenzionali prevedono l'utilizzo di metodiche separative quali la cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC), generalmente impiegata per separare e determinare varie classi dei lipidi nella loro forma nativa [2], e la gascromatografia (GC), applicata generalmente per la determinazione degli acidi grassi presenti in ciascuna classe lipidica.

4.1 Trattamenti del campione per l'analisi dei lipidi

L'estrazione dei lipidi da sistemi complessi è generalmente il primo passo per l'analisi lipidomica. Quantità significative di contaminanti non lipidici devono essere rimosse prima che i lipidi siano sottoposti ad analisi strumentale. Pertanto, è necessaria una metodologia di estrazione che sia semplice e riproducibile. Per l'estrazione totale dei lipidi, dove i lipidi vengono estratti in un ampio intervallo di polarità, esistono due procedure standard comunemente utilizzate nei laboratori di analisi; si tratta dei protocolli *Folch* [3] e *Bligh & Dyer* [4]. Entrambe sono procedure di estrazione liquido-liquido (LLE, *liquid-liquid extraction*) che utilizzano cloroformio (CH_2Cl_2) e metanolo ($\text{CH}_3\text{-OH}$) in diverse proporzioni [5]. Tuttavia, di recente sono state messe a punto metodiche di estrazione LLE alternative e compatibili con stazioni preparative robotizzate in modo da rendere automatizzate le procedure di preparazione del campione, in linea con i principi della *White Analytical Chemistry* [6]. Una dettagliata descrizione delle procedure di estrazione LLE impiegate per l'analisi dei lipidi è riportata nei sottoparagrafi che seguono.

4.1.1 Metodo di estrazione di *Folch*

La procedura di estrazione di *Folch* [3] è uno dei metodi più popolari per l'estrazione dei lipidi da campioni biologici. Si avvale del sistema di solventi bifasico costituito da $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{-OH}/\text{H}_2\text{O}$ in un rapporto volumetrico di 8:4:3 (v/v/v). Un campione biologico acquoso come un tessuto biologico, siero o plasma, ecc., viene diluito 1:20 (v/v) con $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{-OH}$ (2:1; v/v). Supponendo che il materiale biologico abbia un peso specifico di 1 g mL^{-1} , 100 mg di tessuto devono essere diluiti con 1,9 mL di $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{-OH}$. Dopo questo passaggio, il campione

viene omogeneizzato a bassa temperatura e se possibile, in brevi periodi di tempo. Per preservare il profilo lipidico di un sistema biologico al momento del campionamento, l'aggiunta di solventi di estrazione che denaturano tutte le proteine e bloccano le attività enzimatiche dei lipidi dovrebbe essere effettuata rapidamente e in modo standardizzato. Nel metodo originale *Folch*, l'estratto grezzo viene filtrato per separare i residui di precipitato non estraibili. Tuttavia, oggi alcuni autori preferiscono non effettuare tale passaggio in modo da evitare eventuali perdite dei lipidi e quindi avere delle basse rese di estrazione. Successivamente, si aggiungono 0,2 equivalente di H₂O rispetto al volume totale di CH₂Cl₂/CH₃-OH alla sospensione per indurre la formazione di un sistema bifasico. La fase superiore composta da H₂O/CH₃-OH viene separata dalla fase inferiore di CH₂Cl₂ in un rapporto di volume di 40:60 (v/v). La fase organica inferiore, contenente i lipidi di interesse, viene raccolta e trasferita in vials per l'analisi strumentale dei lipidi previa diluizione a una concentrazione appropriata. Nonostante il protocollo *Folch* appena descritto resti una delle procedure LLE più utilizzate in letteratura, presenta il problema dell'interfase contenente residui non estraibili. Pertanto, il rischio di contaminare l'estratto lipidico durante il prelievo della fase inferiore è alto.

4.1.2 Metodo di Bligh e Dyer

Il metodo di *Bligh e Dyer* [4] è stato originariamente progettato per l'estrazione e la purificazione dei fosfolipidi dai tessuti muscolari dei pesci e quindi è consigliato per campioni con un elevato contenuto di acqua endogena. La procedura prevede una iniziale estrazione LLE come prevista dal metodo di *Folch*; tuttavia, quantità minori di CHCl₃ vengono utilizzate. Il campione di tessuto omogeneizzato viene quindi miscelato con una soluzione di CH₂Cl₂/CH₃-OH (1:2; v/v). Dopo un

accurato vortex, si aggiunge 1 volume equivalente di CH_2Cl_2 all'omogeneizzato seguito da un ulteriore passaggio di omogeneizzazione. Successivamente, si aggiunge 1 volume di H_2O distillata e la sospensione risultante sarà costituita da una miscela di $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{-OH}/\text{H}_2\text{O}$ con rapporti volumetrici 2:2:1,8. Questa sospensione viene successivamente filtrata attraverso una carta filtrante; il filtrato viene completamente allontanato e lo strato acquoso superiore rimosso. Il metodo ufficiale di *Bligh & Dyer* prevede un ulteriore passaggio di estrazione dello strato acquoso rimosso in precedenza utilizzando solo CH_2Cl_2 per ottenere rese migliori di estrazione, specie per i lipidi non polari come i TAGs. Oggi, il passaggio di filtrazione è spesso omesso nelle applicazioni lipidomiche e la separazione delle fasi è supportata dalla centrifugazione per alcuni minuti.

4.1.3 Metodo MTBE

Nel 2008, Matyash et al. [7] hanno sviluppato un nuovo protocollo per l'estrazione dei lipidi dimostrando che tale protocollo forniva rese di estrazione dei lipidi simili o migliori per la maggior parte delle principali classi dei lipidi rispetto ai metodi convenzionali di *Folch* e *Bligh & Dyer*. Il campione biologico viene miscelato con una soluzione di metil-t-butil etere (MTBE)/ $\text{CH}_3\text{-OH}$ in rapporti volumetrici 10:3 (v/v) e incubato per 1 ora a temperatura ambiente sotto continua agitazione. Successivamente, si aggiungono 0,2 volumi equivalenti di H_2O (rispetto al volume totale di MTBE/ $\text{CH}_3\text{-OH}$), ottenendo il rapporto volumetrico finale di 10:3:2,5 (MTBE/ $\text{CH}_3\text{-OH}/\text{H}_2\text{O}$). Dopo aver omogeneizzato accuratamente i campioni, la sospensione viene centrifugata per 10 minuti a 1000 g e la fase lipidica superiore viene trasferita in una vial. La fase acquosa residua viene ri-estratta con 0,3 volumi equivalenti della fase superiore di MTBE. Gli estratti combinati possono

essere essiccati o utilizzati direttamente per l'analisi strumentale dei lipidi previa diluizione a una concentrazione appropriata. La differenza più significativa tra l'estrazione lipidica con MTBE e i metodi basati sull'impiego di CH-Cl₃/CH₃-OH è l'ordine opposto delle fasi organica e acquosa. La fase lipidica superiore è formata da MTBE e CH₃-OH dovuto alla densità inferiore di entrambi i solventi (MTBE: 0,74 g mL⁻¹ e CH₃-OH: 0,79 g mL⁻¹) rispetto all'H₂O. Di conseguenza, la fase organica viene prelevata senza entrare in contatto con la fase acquosa, quindi i residui non estraibili, che si trovano nella fase inferiore del sistema, risultano totalmente separati dalla frazione lipidica; ciò minimizza il rischio di contaminazione dell'estratto. Grazie alla maggiore polarità dell'MTBE rispetto al CH-Cl₃, il procedimento migliora l'efficienza di estrazione soprattutto dei lipidi polari.

4.1.4 Metodo BUME

Löfgren et al. [59] hanno sviluppato nel 2012 il protocollo di estrazione definito con il termine BUME (butanolo/metanolo), con l'obiettivo di sostituire il CH-Cl₃, ampiamente utilizzato nei metodi di estrazione LLE classici, per l'estrazione e la purificazione delle classi dei lipidi più abbondanti nel plasma. Il metodo BUME è stato implementato con successo e completamente automatizzato nei laboratori per analisi di routine dei lipidi. Il campione biologico viene miscelato con butanolo (C₄H₁₀O)/metanolo (BUME) (3:1; v/v). Successivamente, si aggiungono 1 volume equivalente di una miscela di esano/acetato di etile (3:1) e 1 volume equivalente di acido acetico al 1% alla miscela di reazione. Si effettua un sistema di estrazione bifasico e i composti lipidici vengono recuperati nella fase superiore. Il metodo

BUME ha dimostrato che i recuperi di estrazione per i lipidi analizzati (SLs, GLs, PLs) erano simili o superiori rispetto al metodo di *Folch*.

4.1.5 Preparazione dei derivati esterei degli acidi grassi per l'analisi GC

La tecnica GC ha rivoluzionato lo studio dei lipidi permettendo la determinazione della composizione completa degli acidi grassi di un lipide in un tempo molto breve [9]. A tale scopo, i lipidi vengono convertiti in derivati volatili, solitamente esteri metilici degli acidi grassi o FAMES (*Fatty Acid Methyl Esters*), sebbene altri esteri possano essere preferiti per scopi specifici [10]. La procedura di derivatizzazione più comune è generalmente classificata in procedure catalizzate da agenti derivatizzanti di natura acida o basica.

4.1.6 Transesterificazione catalizzata da acidi

Gli acidi grassi liberi e i lipidi O-acilati sono rispettivamente esterificati o transesterificati riscaldandoli con un eccesso di CH₃-OH anidro in presenza di un catalizzatore acido [2]. Gli alcoli, in presenza di un adeguato catalizzatore acido, possono esterificare gli acidi carbossilici come illustrato in Figura 4.1. Il primo passaggio della procedura di esterificazione è la protonazione dell'acido carbossilico per dare uno ione ossonio, che può subire una reazione di scambio con un alcol per dare uno ione intermedio, che perdendo un protone, forma un estere. Ogni passaggio è reversibile, ma in presenza di un grande eccesso di alcol, il punto di equilibrio della reazione è spostato in modo che l'esterificazione proceda praticamente a completamento.



Figura 4.1 Esterificazione acida degli acidi grassi.

La condizione fondamentale per un'esterificazione completa è l'assenza di acqua. Infatti, l'acqua è un donatore di elettroni più forte che inibisce la formazione dello ione intermedio e blocca il processo di esterificazione. Lo scambio di esteri o la transesterificazione avviene in condizioni simili (Figura 4.2). In questo caso, la protonazione iniziale dell'estere è seguita dall'aggiunta dell'alcol per ottenere uno ione intermedio, che può essere dissociato attraverso lo stato di transizione per dare l'estere. Anche in questo caso, ogni passaggio è reversibile e in presenza di un grande eccesso di alcol, il punto di equilibrio della reazione è spostato verso i prodotti.

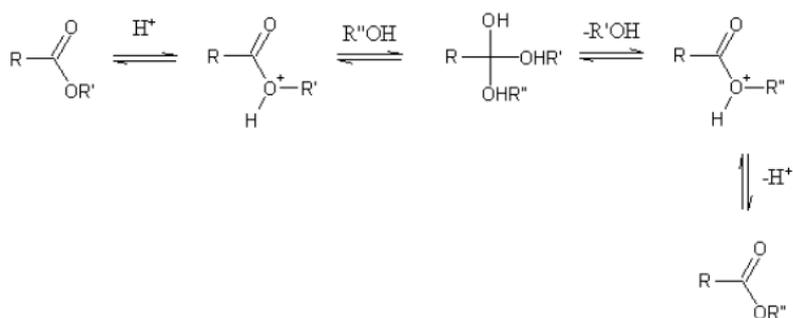


Figura 4.2 Transesterificazione acida dei lipidi

Il reagente più frequentemente utilizzato per la preparazione dei FAMEs è il cloruro di idrogeno anidro (HCl) al 5% in $\text{CH}_3\text{-OH}$ [11]. In una tipica procedura di esterificazione utilizzando cloruro di idrogeno metanolico, il campione lipidico viene dissolto in un eccesso di reagente di almeno 100 volte il suo volume e la soluzione viene mantenuta in riflusso per circa due ore a $50\text{ }^\circ\text{C}$. Al termine della procedura, si aggiunge acqua e i FAME vengono estratti in un solvente appropriato come etere dietilico o esano [10]. Tutti gli acidi grassi vengono esterificati a una velocità approssimativamente equivalente al cloruro di idrogeno metanolico [11], quindi è improbabile che si verifichino perdite differenziali di acidi grassi specifici

durante la fase di esterificazione. D'altra parte, sono necessarie precauzioni particolari per garantire il recupero quantitativo degli esteri a catena corta. Una soluzione di acido solforico concentrato (H_2SO_4) al 1-2% in $\text{CH}_3\text{-OH}$ è utilizzata anche per derivatizzare i composti lipidici. Gli acidi grassi liberi vengono esterificati molto rapidamente riscaldandoli in acido solforico al 10% in $\text{CH}_3\text{-OH}$ fino a raggiungere la temperatura di riflusso [12]; tuttavia, questa procedura non è raccomandata per gli acidi grassi polinsaturi poiché l'acido solforico è un potente agente ossidante. Tempi di riflusso molto lunghi [13-14], concentrazioni eccessive di H_2SO_4 (20%) [15] e alte temperature ($170\text{ }^\circ\text{C}$) [16-17] portano alla formazione di sottoprodotti colorati e alla distruzione dei PUFAs. Con il reagente diluito e condizioni moderate, tuttavia, non ci sono evidenze di effetti collaterali.

Il trifluoruro di boro (BF_3) è un acido di Lewis e in $\text{CH}_3\text{-OH}$ è un potente catalizzatore acido per l'esterificazione degli acidi grassi. Morrison e Smith [18] hanno dimostrato che il reagente può essere utilizzato per la transesterificazione della maggior parte delle classi dei lipidi. L'esterificazione degli acidi grassi liberi viene completata in due minuti con 12-14% di BF_3 in $\text{CH}_3\text{-OH}$ sotto riflusso [19]. Sfortunatamente, il BF_3 presenta gravi inconvenienti quando vengono utilizzate concentrazioni molto elevate (50%). Il tricloruro di boro (BCl_3) in $\text{CH}_3\text{-OH}$ può essere utilizzato in modo simile per preparare esteri metilici, sebbene la reazione sia più lenta rispetto all'uso del BF_3 come catalizzatore.

4.1.7 Transesterificazione catalizzata da basi

Gli esteri, in presenza di una base formano un intermedio anionico (Figura 4.3), che può dissociarsi di nuovo nell'estere originale o formare un nuovo estere. In

presenza di un eccesso di alcol, il punto di equilibrio della reazione è spostato verso il nuovo estere.

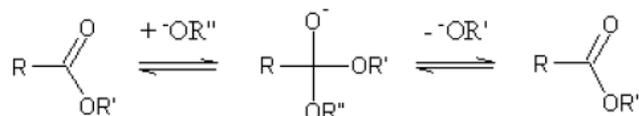


Figura 4.3 Transesterificazione basica dei lipidi

Un acido grasso non esterificato viene convertito in uno ione carbossilato in una soluzione basica, e questo non è soggetto ad attacco nucleofilo da parte degli alcoli. Pertanto, la procedura di esterificazione non può avvenire con un catalizzatore basico. In presenza di acqua, l'intermedio si dissocia irreversibilmente nell'acido libero è necessaria l'assenza di acqua dal sito di reazione. I più utilizzati agenti transesterificanti basici sono il metossido di sodio (MeONa) o il metossido di potassio (MeOK) in CH₃-OH anidro (0,5-2,0 M) [10]. L'idrossido di potassio (KOH) è talvolta utilizzato. In una tipica reazione di transesterificazione, il campione lipidico, se necessario è disciolto in quantità adeguate di toluene o altro solvente, viene fatto reagire con un eccesso di 100 volte di MeONa a una concentrazione di 0,5-2 M a 50 °C. I TAGs vengono completamente transesterificati in 10 minuti e i PL in 5 minuti, sebbene i CE richiedano 60 minuti in queste condizioni [10]. Viene aggiunto un acido diluito per neutralizzare il MeONa e ridurre al minimo il rischio di idrolisi dei FAMES. Gli esteri metilici vengono recuperati tramite estrazione con solvente.

4.1.8 Procedure di derivatizzazione-estrazione diretta

Sono state descritte numerose procedure in cui i tessuti vegetali o animali vengono estratti e derivatizzati simultaneamente [2]. Queste procedure, che non

richiedono l'uso di solventi per l'estrazione LLE dei lipidi, consentono un recupero migliore degli acidi grassi e riducono notevolmente i tempi e la quantità di solvente necessari. Sfortunatamente, non ci sono evidenze che le procedure di derivatizzazione diretta siano adatte per tutti i tipi di campioni lipidici, considerando l'ampia varietà, la diversità e la complessità delle matrici lipidiche. I metodi catalizzati dall'acido potrebbero essere i più adatti poiché sono meno suscettibili alla presenza di piccole quantità di acqua endogena. Tuttavia, esiste il rischio che contaminanti non lipidici che vengano estratti e possano interferire con le successive analisi GC.

4.2 Metodi di separazione per l'analisi dei lipidi

La cromatografia è un metodo fisico di separazione, in cui i componenti di un campione sono distribuiti selettivamente tra due fasi immiscibili; una fase mobile scorre attraverso una fase stazionaria e il processo cromatografico avviene come risultato di ripetuti passaggi di assorbimento e desorbimento durante il movimento degli analiti lungo la fase stazionaria. I primi tentativi di tecniche cromatografiche sono attribuibili al botanico russo Michail Tsweett e risalgono agli inizi del '900; il suo esperimento prevedeva l'utilizzo di una colonna riempita di carbonato di calcio, alla quale poneva dei pigmenti vegetali. Infine, veniva aggiunta una miscela di alcol etilico ed etere di petrolio, la quale, attraversando la colonna, trascinava con sé le varie componenti della sostanza madre. Il semplice esperimento dimostrò come il pigmento vegetale di colore verde, sia composto in realtà da diverse componenti, che raggiungono il fondo della colonna con modalità e tempistiche differenti. D

Durante i suoi studi sulla clorofilla e altri pigmenti vegetali, Tswett osservò che pigmenti colorati di origine vegetale venivano separati in bande individuali quando

iniettati in una colonna di vetro riempita di calcio. Pertanto, Tswett chiamò questa tecnica “cromatografia” (da $\chi\rho\acute{o}\mu\alpha$, colore, e $\gamma\rho\alpha\phi\acute{\eta}$, scrittura) [20]. La cromatografia nasce come tecnica separativa e in seguito si sviluppa come tecnica analitica, capace di separare e quantificare individualmente i diversi componenti presenti in miscele complesse. Un rivelatore, posizionato all’uscita della colonna cromatografica, insieme a dispositivi elettronici ausiliari e di registrazione, genera il cromatogramma, di cui un esempio è mostrato nella Figura 4.4. Un cromatogramma è essenzialmente un diagramma della concentrazione del campione (asse y) rispetto al tempo (asse x). Esso rappresenta le bande dei singoli componenti separati dalla colonna cromatografica e modificati da una varietà di processi fisici in una forma a picco.

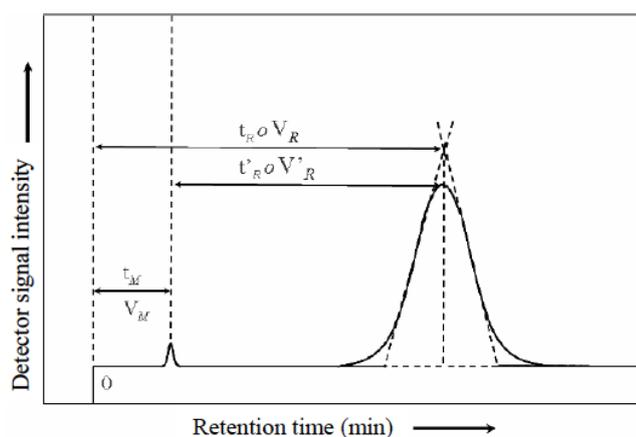


Figura 4.4 Rappresentazione di un cromatogramma.

La posizione di un picco sulla scala temporale del cromatogramma fornisce alcune informazioni qualitative, poiché ogni picco cromatografico rappresenta almeno una molecola chimica, le aree sotto i picchi rappresentano le quantità delle singole sostanze separate nel tempo e nello spazio. La Figura 4.4 mostra un cromatogramma tipico di un singolo componente con un altro picco nella prima

parte del cromatogramma. Il tempo di ritenzione t_R è il tempo trascorso tra l'iniezione e il massimo di un picco cromatografico. Esso è definito come:

$$t_R = t_0(1 + k) \quad \text{Eq. 4.1}$$

dove t_0 è il tempo di ritenzione di un componente della miscela che non ha interazione con la fase stazionaria, e k è il fattore di capacità. Il fattore di capacità è ulteriormente definito come:

$$k = \frac{k V_S}{V_m} \quad \text{Eq. 4.2}$$

dove K è il coefficiente di distribuzione del soluto, V_S è il volume della fase stazionaria e V_m è il volume della fase mobile in una colonna cromatografica. Il coefficiente di distribuzione, relativo alla distribuzione del componente tra la fase stazionaria e quella mobile, può essere calcolato come segue:

$$K_D = \frac{C_S}{C_m} \quad \text{Eq. 4.3}$$

dove C_S e C_m sono le concentrazioni dell'analita nella fase stazionaria e mobile, rispettivamente. Secondo le equazioni 4.1 e 4.2, il tempo di ritenzione degli analiti dipende da diverse variabili come: la natura chimica della fase stazionaria della colonna e la sua temperatura, il rapporto tra i volumi delle fasi nella colonna (V_S/V_m) e il valore di t_{R0} . Nella pratica cromatografica, queste variabili vengono utilizzate per massimizzare la separazione degli analiti e la velocità dell'analisi. Dal tempo di ritenzione di un componente non trattenuto, chiamato tempo morto (t_{R0}), e dalla lunghezza della colonna (L), è possibile calcolare la velocità lineare media (u) della fase mobile:

$$u = \frac{L}{t_{R0}} \quad \text{Eq. 4.4}$$

La portata (F), che può essere facilmente misurata attraverso una colonna con diametro interno d_c , è data da:

$$F = \pi d_c^2 \varepsilon_u u \quad \text{Eq. 4.5}$$

dove ε_u è la frazione della colonna occupata dalla fase mobile tra le particelle e nei pori, il cosiddetto volume di ritenzione (V_R) è il prodotto del tempo di ritenzione e della portata volumetrica:

$$V_R = t_R F \quad \text{Eq. 4.6}$$

Poiché i tempi di ritenzione sono indicativi della natura del soluto, deve essere disponibile un riferimento per il loro confronto. All'interno di un determinato laboratorio chimico, spesso si usano i tempi di ritenzione relativi (valori relativi a un picco cromatografico scelto arbitrariamente):

$$\alpha_{2,1} = \frac{t_{R2}}{t_{R1}} = \frac{V_{R2}}{V_{R1}} = \frac{K_2}{K_1} \quad \text{Eq. 4.7}$$

Questa equazione è anche una conseguenza diretta delle equazioni 4.1 e 4.2. Poiché la ritenzione relativa rappresenta il rapporto dei coefficienti di distribuzione per due soluti diversi, essa è frequentemente utilizzata (per i soluti con strutture chimiche selezionate) come mezzo per valutare la selettività delle interazioni soluto-colonna. Il successo di un metodo di separazione dipende principalmente dal massimizzare le differenze nei tempi di ritenzione dei singoli componenti della miscela. La capacità di un sistema cromatografico di separare due analiti è chiamata selettività. Il fattore di selettività (α) per due componenti è calcolato come:

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0} \quad \text{Eq. 4.8}$$

dove k_1 e k_2 sono i fattori di ritenzione e t_{R1} e t_{R2} sono i tempi di ritenzione dei due componenti. Il fattore di selettività è sempre maggiore di uno. Un'altra variabile del processo di separazione è la larghezza del corrispondente picco cromatografico. Dalla larghezza del picco e dal tempo di ritenzione è possibile valutare la risoluzione (R). Questo parametro rappresenta una misura quantitativa del grado di separazione tra due picchi cromatografici, nominati come 1 e 2, ed è definito come segue:

$$R = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{0.5 (w_2 + w_1)} = \frac{2\Delta t_R}{w_2 + w_1} \quad \text{Eq. 4.9}$$

dove w_1 e w_2 sono le larghezze dei picchi dei due composti alla linea di base. Il grado di separazione tra due picchi cromatografici migliora con un aumento di R . Pertanto, la risoluzione è una misura quantitativa dell'efficacia di un processo di separazione. La Figura 4.5 illustra un caso di bassa risoluzione, in cui due componenti di una miscela non sono completamente separati e la loro risoluzione risulta incompleta. Il caso intermedio della figura rappresenta una situazione di risoluzione moderata, in cui i due componenti sono parzialmente distinti l'uno dall'altro, sebbene la fase stazionaria trattenga il secondo componente più fortemente rispetto al primo. Nel caso di alta risoluzione, si osserva una separazione più efficace dei due componenti, con picchi cromatografici più stretti.

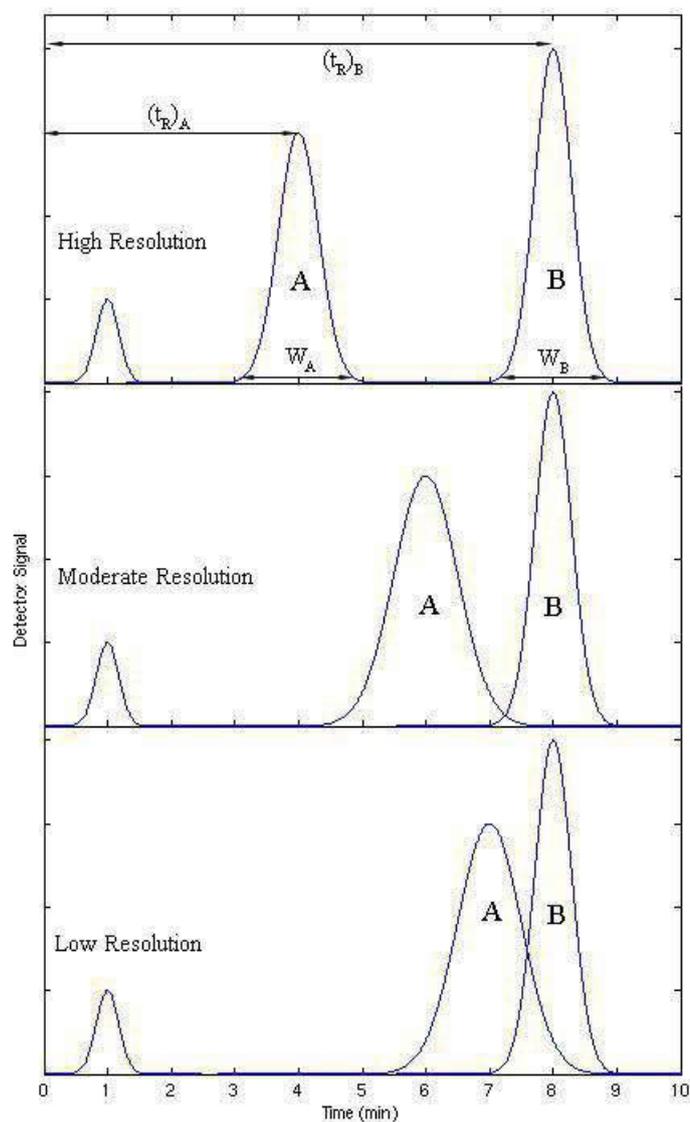


Figure 4.5 Risoluzione tra i picchi cromatografici A e B.

Per una separazione ottimale, è fondamentale ottenere picchi cromatografici simmetrici e limitare l'allargamento delle bande. È inoltre opportuno misurare l'efficienza della colonna, definita dal numero di piatti teorici, N , calcolato come:

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{w} \right)^2 = 5,54 \left(\frac{t_R}{w_{1/2}} \right)^2 = 2\pi \left(\frac{hP t_R}{A} \right)^2 \quad \text{Eq. 4.10}$$

dove $w_{1/2}$ rappresenta la larghezza del picco a metà altezza, hP è l'altezza del picco e A è l'area del picco. L'equazione 4.10 fornisce risultati corretti solo se il picco ha

una forma gaussiana. Per picchi asimmetrici, è possibile calcolare valori approssimativi tramite la seguente:

$$N = 41,7 \frac{(T_R/w_{0,1})}{T+1,25} \quad \text{Eq. 4.11}$$

dove $w_{0,1}$ è la larghezza del picco al 10% dell'altezza del picco e T è il fattore di coda (o asimmetria del picco), definito come:

$$T = \frac{b_{0,1}}{\alpha_{0,1}} \quad \text{Eq. 4.12}$$

I termini $\alpha_{0,1}$ e $b_{0,1}$ sono le sezioni (distanze dalla fronte del picco al massimo e dal massimo alla fine del picco, rispettivamente) della larghezza del picco al 10% dell'altezza del picco. Il numero di piatti teorici dipende dalla lunghezza della colonna (L); maggiore è la lunghezza della colonna, maggiore è il numero dei piatti. Pertanto, è stato introdotto un ulteriore termine che mette in relazione il numero di piatti con la lunghezza della colonna: l'altezza del piatto H (HETP = altezza equivalente a un piatto teorico), che può essere calcolata come segue:

$$H = \frac{L}{N} \quad \text{Eq. 4.12}$$

La larghezza di un picco cromatografico è influenzata da una serie di parametri descritti nell'equazione di *van Deemter*:

$$H = A + \frac{B}{u} Cu \quad \text{Eq. 4.13}$$

in cui A rappresenta i percorsi multipli, B/u la diffusione longitudinale, e Cu è il termine relativo al trasferimento di massa di un soluto nelle fasi stazionaria e mobile. Tutti questi sono fattori sperimentali che contribuiscono all'allargamento di una banda cromatografica. Il termine A o diffusione di Eddy, tiene conto del fatto

che le molecole del soluto, passando attraverso la colonna, seguono percorsi casuali tra le particelle della fase stazionaria, causando un allargamento della banda. Il termine B, o diffusione longitudinale, è correlato al fatto che la concentrazione dell'analita è inferiore ai bordi della banda rispetto alla zona centrale; l'analita diffonde dal centro verso i bordi, causando un ulteriore allargamento della banda. L'effetto di questo fattore diminuisce all'aumentare della velocità della fase mobile. Il termine C, ossia la resistenza al trasferimento di massa, dipende dal fatto che l'analita impiega un certo tempo per equilibrarsi tra la fase stazionaria e quella mobile. Se la velocità della fase mobile è elevata e l'analita ha una forte affinità per la fase stazionaria, l'analita nella fase mobile si sposterà in avanti rispetto a quello nella fase stazionaria, allargando la banda. Maggiore è la velocità della fase mobile, peggiore sarà l'allargamento della banda. La Figura 4.6 rappresenta il grafico dell'altezza di un piatto teorico in funzione della velocità di flusso, la cosiddetta curva di *van Deemter*. La velocità del flusso ottimale e i contributi ai termini A, B/u e Cu sono mostrati nella figura 4.6. Poiché l'altezza del piatto è inversamente proporzionale al numero dei piatti, un valore ridotto indica un picco stretto, che rappresenta la condizione desiderabile. Pertanto, ognuno dei tre termini A, B e C deve essere minimizzato per massimizzare l'efficienza della colonna.

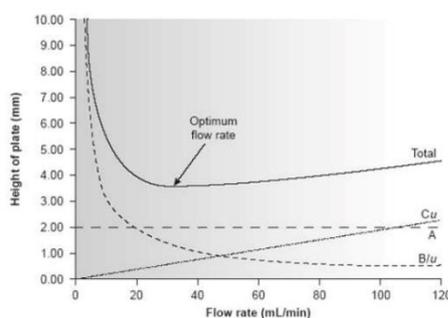


Figura 4.6 Grafico che rappresenta l'altezza del piatto teorico in funzione della velocità della fase mobile (utilizzando l'equazione di van Deemter). L'influenza di A, B/u, e Cu vengono mostrati nel grafico.

4.2.1 Analisi gascromatografica dei lipidi

La gascromatografia è una tecnica analitica ampiamente utilizzata nell'analisi lipidomica, nonostante la complessità del processo di derivatizzazione richiesto prima della separazione cromatografica. Infatti, i metodi GC sono limitati a composti volatili e semi-volatili, pertanto i lipidi con elevato peso molecolare richiedono reazioni di idrolisi e di derivatizzazione. Questi processi possono eliminare gran parte delle informazioni strutturali relative alle specie molecolari dei lipidi. Di conseguenza, quando si utilizza la GC per analizzare diverse categorie di lipidi, sono assolutamente necessarie le derivatizzazioni [21]. La GC è stata ampiamente impiegata per l'analisi quantitativa di miscele complesse, in particolare degli acidi grassi [21]. James e Martin descrissero la prima caratterizzazione degli acidi grassi in campioni biologici nel 1952 [22]. Nel 1953, Crooper et al. [23] descrissero la separazione cromatografica dei FAMES mediante cromatografia in fase gassosa. Dopo questi lavori pionieristici, la caratterizzazione degli acidi grassi tramite esterificazione in FAME e successiva determinazione mediante metodo GC è diventata una delle analisi più diffuse nei laboratori di lipidomica [21].

La GC è una tecnica di separazione ampiamente utilizzata per scopi analitici grazie alla sua alta sensibilità, al suo grande potere risolutivo e al fatto che richiede solo piccole quantità di campione. Grazie a queste caratteristiche, utili per l'analisi di composti organici volatili e semi-volatili, questa tecnica ha trovato largo impiego in tutte le applicazioni di laboratorio e industriali, in vari campi della scienza, inclusa l'analisi lipidica. L'unica grande limitazione della tecnica GC è rappresentata dal fatto che i campioni devono essere volatili a temperature comprese tra la temperatura ambiente (25 °C) e circa 400 °C, temperature comunemente ottenute dagli strumenti GC presenti sul mercato e compatibili con

le colonne cromatografiche utilizzate. Il principio di separazione si basa sull'affinità relativa di un componente con la fase stazionaria (un solido o un liquido), mentre la fase mobile (un gas carrier) fluisce attraverso la colonna separativa. I meccanismi di separazione utilizzati nella GC sono essenzialmente l'adsorbimento e la ripartizione. Il primo meccanismo si ottiene con l'uso di una fase stazionaria solida sulla cui superficie sono presenti siti attivi che possono stabilire una serie di legami deboli come dipolo-dipolo, ponte a idrogeno, forze di *Van der Waals*, dipolo indotto con le diverse molecole della miscela da separare. In questo caso, la tecnica GC è definita cromatografia gas-solido (GSC); se la fase stazionaria è un liquido, le molecole vengono solubilizzate nella fase stazionaria e si dividono tra le due fasi immiscibili. Questo approccio, il più utilizzato, è chiamata cromatografia gas-liquido (GLC). Le parti essenziali del sistema GC sono mostrate nella Figura 4.7.

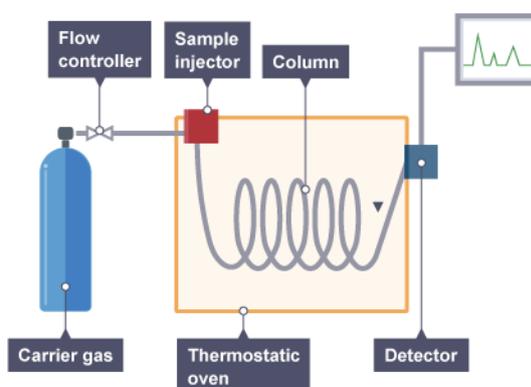


Figura 4.7 Rappresentazione schematica del sistema GC.

I gas carrier comunemente utilizzati nella tecnica GC sono l'elio, l'idrogeno e l'azoto. La scelta del gas carrier dipende solitamente dal rivelatore utilizzato. Generalmente, si preferiscono l'elio e l'idrogeno, con una maggiore preferenza per l'elio dovuto a questioni di sicurezza del laboratorio, nonostante il costo più elevato rispetto all'idrogeno. Il gas carrier non compete con la fase stazionaria essendo un

gas inerte. In ogni caso, il gas carrier deve avere un alto grado di purezza (99,999%) ed essere privo di umidità e idrocarburi che potrebbero danneggiare la fase stazionaria di una colonna e interferire con la risposta del rivelatore. Inoltre, è fortemente consigliato rimuovere tutte le tracce di questi elementi dal gas carrier posizionando trappole contenenti setacci molecolari adatti a rimuovere molecole di ossigeno (disponibili in commercio) tra la bombola del gas e la colonna [2]. La scelta del gas carrier è fondamentale poiché influenza l'efficienza della colonna e di conseguenza, l'intero processo cromatografico. La velocità ottimale del gas carrier diminuisce con la diminuzione della capacità diffusiva del soluto; questo può anche influenzare il tempo di separazione del campione. La diffusività di un soluto influisce sia sull'altezza del piatto sia sulla velocità del gas carrier, come descritto dall'equazione di *Van Deemter*. Come mostrato nella Figura 4.8, l'azoto fornisce il valore più basso di HETP a una velocità ottimale piuttosto bassa, il che comporta tempi di separazione lunghi.

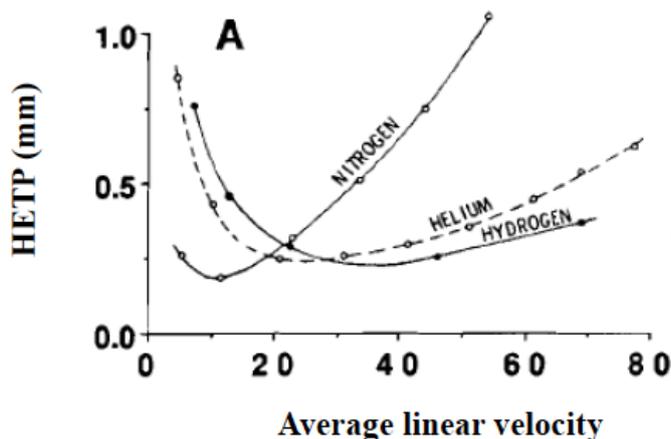


Figura 4.8 Curve di *Van Deemter* per i gas carrier azoto, elio e idrogeno.

Tuttavia, come mostrato in figura 4.8, i parametri ottimali si ottengono per l'idrogeno e l'elio.

Il processo di iniezione del campione è di fondamentale importanza in GC perché non deve alterare la composizione originaria del campione. Idealmente, la degradazione termica o il riarrangiamento del campione dovrebbero essere trascurabili, il picco del solvente non dovrebbe interferire con la rilevazione dei soluti, e i tempi di ritenzione e le aree relative dei picchi dovrebbero essere altamente riproducibili [2]. I sistemi di auto-iniezione sono da preferire quando disponibili. L'iniezione manuale può causare problemi di evaporazione prematura del campione prima che l'ago metallico della siringa sia completamente inserito nei sistemi di iniezione split/splitless, PTV oppure on-column mostrati nella Figura 4.9.

Il sistema di iniezione split/splitless induce una rapida vaporizzazione dei campioni nel gas carrier, che viene diviso in due flussi, uno dei quali è diretto nella colonna cromatografica mentre il secondo è espulso nell'atmosfera tramite una valvola progettata a questo scopo. Il sistema di iniezione è dotato di un setto in silicone che viene perforato quando il campione viene introdotto dall'ago della siringa. Il gas carrier entra nel sistema di iniezione e fluisce verso la camera di vaporizzazione. Questa camera è costituita da un piccolo tubo di vetro o quarzo, detto liner, contenente lana di vetro o materiale suddiviso finemente, e ha lo scopo di mescolare il campione volatilizzato con il gas carrier.

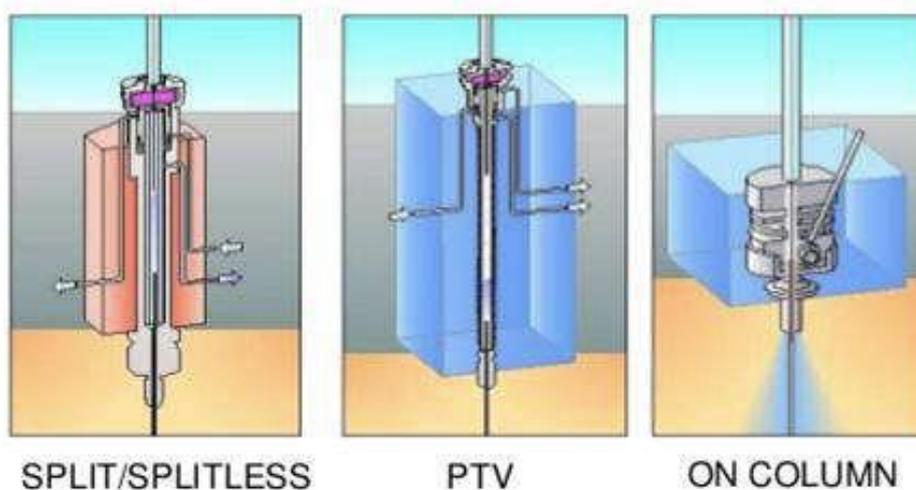


Figura 4.9 Sistemi di iniezione split/splitless, PTV e *on-column* utilizzati in GC.

Prima di entrare nella colonna, questa miscela viene divisa e solo una piccola porzione è autorizzata ad entrare nella colonna per essere analizzata. Il rapporto di split definisce il rapporto tra il flusso che entra nella colonna e il flusso eliminato. I suoi valori sono regolati da una valvola di controllo per ottenere il rapporto di split desiderato, solitamente da circa 1:10 a 1:1000. Poiché il flusso attraverso la colonna è comunemente di circa $1\text{-}2\text{ mL min}^{-1}$, il flusso di gas attraverso l'iniettore è molto elevato ($100\text{-}200\text{ mL min}^{-1}$) e il campione vaporizzato è presente nell'iniettore solo per un istante. Di conseguenza, il campione viene immediatamente introdotto nella colonna come una banda stretta, evitando picchi larghi nel cromatogramma. Lo svantaggio legato all'uso di questo sistema di iniezione è che i componenti più volatili passano nella fase gassosa più rapidamente rispetto ai componenti meno volatili. La conseguenza è che inizialmente nella colonna ci sarà un gas ricco di composti più volatili. In questo caso, il rapporto di split non è lineare e, pertanto, le concentrazioni relative dei vari componenti nel campione iniettato non sono esattamente rappresentate nel gas che entra nella colonna. Per aggirare il problema, l'aumento della temperatura nell'iniettore induce una completa e immediata

evaporazione di tutti i componenti della miscela. Questo è probabilmente il sistema di iniezione più utilizzato per l'analisi degli acidi grassi, poiché è facilmente compatibile con i sistemi di auto-iniezione. Con la dovuta cura, può fornire risultati eccellenti [2]. Nell'iniezione *splitless*, una valvola a solenoide viene attivata bloccando la valvola che controlla il rapporto di split. Così, il campione viene vaporizzato istantaneamente e trasferito completamente nella colonna dal gas carrier. Il principale svantaggio è la possibilità di avere bande iniziali larghe, ma con il beneficio della sensibilità del metodo.

L'iniettore PTV (*Programmed Temperature Vaporization*) consente l'iniezione degli analiti secondo un programma di temperatura determinato. Il campione viene introdotto nell'ingresso, che viene inizialmente raffreddato e successivamente la sua temperatura viene aumentata a un ritmo controllato in modo che tutti i componenti del campione vengano vaporizzati selettivamente. Riscaldando l'iniettore, tutti gli analiti vengono introdotti nella colonna in modalità *splitless*. L'iniettore PTV abbassa i limiti di rilevazione delle tecniche analitiche poiché possono essere iniettati grandi volumi di campione. I sistemi di iniezione di questo tipo sembrano essere i più adatti per l'analisi di lipidi ad alto peso molecolare, come i triacilgliceroli (TAG) [2].

Nell'iniezione *on-column*, il campione e il solvente vengono iniettati direttamente in colonna. Il campione viene concentrato tramite *cold trapping* o *solvent effect* nella testa della colonna; quindi, deve essere iniettato a una temperatura della colonna prossima al punto di ebollizione del solvente. Strutturalmente, questo iniettore è dotato di un'apertura conica che conduce a un canale molto stretto per consentire solo il passaggio dell'ago della siringa. Una valvola regola l'apertura di un portello che permette all'ago di penetrare nella

porzione iniziale della colonna. Qui, arriva un flusso d'aria fredda che consente l'iniezione del campione allo stato liquido e del gas carrier. I sistemi di iniezione *on-column* hanno esteso il campo di applicazione della GC anche a quei campioni che, a causa della loro termolabilità, non potrebbero essere analizzati utilizzando i più comuni sistemi di iniezione a caldo. Con questo metodo, particolare attenzione deve essere posta durante la preparazione dei campioni, per garantire che siano privi di materiali non volatili che potrebbero accumularsi in testa alla colonna.

La colonna cromatografica è il cuore di un sistema GC, all'interno del quale avviene il processo di separazione degli analiti. Le separazioni gascromatografiche delle specie lipidiche vengono eseguite per determinare la lunghezza della catena, il grado di insaturazione e la configurazione geometrica *cis* o *trans* degli acidi grassi. In generale, i tempi di ritenzione dei derivati degli acidi grassi su colonne non polari si basano sulla volatilità e, quindi, la separazione avviene principalmente in funzione della lunghezza della catena carboniosa. I tempi di ritenzione dei derivati degli acidi grassi su colonne polari, invece, sono determinati principalmente dalla polarità e dalla lunghezza della catena. Inizialmente, le prime colonne GC erano impaccate, costituite da tubo realizzato in vetro o metallo riempito con un materiale granulare. Questo materiale era solitamente mantenuto in posizione da piccoli tappi di lana di vetro posti alle estremità della colonna. Durante una corsa GC, la colonna impaccata era collegata allo strumento attraverso una connessione ermetica; il gas carrier fluiva tra le singole particelle, mentre le molecole del campione interagivano con esse. Tipicamente, i diametri interni delle colonne impaccate erano di 1-4 mm, e le lunghezze variavano da 1 a 3 metri, sebbene esistano applicazioni speciali con dimensioni diverse. Il materiale di riempimento granulare poteva essere un materiale adsorbente, se il metodo scelto

era la cromatografia gas-solido (GSC), oppure un supporto solido inerte impregnato con una quantità definita di fase stazionaria liquida nel caso di applicazioni di cromatografia gas-liquido (GLC). In entrambi i casi, era necessario utilizzare materiali di riempimento con particelle uniformemente piccole, poiché le prestazioni della colonna dipendono fortemente dalla dimensione delle particelle. Le performance cromatografiche di diverse colonne impaccate (Silar 10C, Silar 9CP, SP 2340, e OV-275), disponibili a metà degli anni '70, sono state confrontate [24]. Lo sviluppo di queste colonne altamente polari e resistenti alla temperatura ha permesso di separare gli isomeri geometrici degli acidi grassi. Per esempio, una colonna riempita con il 12% di Silar 10C come fase stazionaria era in grado di separare alla linea di base gli isomeri *cis* e *trans* degli esteri metilici dell'acido linoleico [25]. Tutti e otto gli isomeri geometrici dell'acido α -linolenico sono stati anche parzialmente risolti. Sebbene fosse possibile ottenere un numero maggiore di piatti teorici, la necessità di compensare la contropressione impediva il funzionamento di queste colonne a più di 6000 piatti teorici [24].

Le colonne capillari o *wall coated open tubular* (WCOT) sono state introdotte nel 1956 dallo scienziato M. J. E. Golay. Grazie alle altissime efficienze di separazione, le colonne capillari hanno migliorato sostanzialmente le separazioni analitiche. Il vantaggio di queste colonne è l'assenza di materiale di riempimento granulare all'interno della colonna. La fase stazionaria liquida è distribuita uniformemente come un sottile film sulla superficie della parete interna lungo tutta la lunghezza della colonna. A differenza delle colonne impaccate, le colonne capillari sono aperte, generano una resistenza al flusso molto bassa che consente l'uso di colonne di lunghezze notevoli, fino a 200 metri. L'assenza del materiale di riempimento modifica l'equazione di *van Deemter* poiché il termine A è assente.

Pertanto, Golay ha proposto un nuovo termine per gestire il processo di diffusione nella fase gassosa delle colonne capillari. La sua equazione comprendeva due termini C, uno per il trasferimento di massa nella fase stazionaria (C_s , simile all'equazione *di van Deemter*) e uno per il trasferimento di massa nella fase mobile (C_m):

$$H = \frac{B}{u} + (C_s + C_m)u \quad \text{Eq. 4.14}$$

dove B rappresenta la diffusione molecolare e u è la velocità lineare. Come menzionato in precedenza, è auspicabile ridurre il più possibile l'altezza del piatto (H). A questo punto, è chiaro che per diminuire il valore di H, la velocità lineare deve essere aumentata. Infatti, una velocità elevata ridurrà il tempo che un soluto trascorre nella colonna, diminuendo così il tempo disponibile per la diffusione molecolare. La diffusione molecolare può essere espressa come:

$$B = 2D_G \quad \text{Eq. 4.15}$$

dove D_G è il coefficiente di diffusione del soluto nel gas carrier; un basso coefficiente di diffusione può essere ottenuto utilizzando gas con pesi molecolari più elevati, come l'azoto o l'argon. I termini C nell'equazione di Golay si riferiscono al trasferimento di massa del soluto sia nella fase stazionaria sia in quella mobile. Un trasferimento di massa rapido è auspicabile per ridurre l'allargamento della banda. L'importanza relativa dei due termini C nell'equazione di Golay dipende principalmente dallo spessore del film e dal raggio della colonna. Sostanzialmente, per film sottili ($< 0,2 \mu\text{m}$), il termine C è controllato solo dal trasferimento di massa nella fase mobile, mentre per film spessi ($2-5 \mu\text{m}$), è controllato dal trasferimento di massa nella fase stazionaria. Per film intermedi ($0,2-$

2 μm), devono essere considerati entrambi i fattori. Un'altra considerazione può essere fatta sui termini C che sono moltiplicati per la velocità lineare u nell'equazione 4.14. Essi sono minimizzati a velocità basse, dando così più tempo alle molecole per diffondere dentro e fuori la fase liquida e attraverso la colonna nella fase mobile gassosa [26]. Le lunghezze tipiche delle colonne capillari variano da 10 a 100 metri, con diametri interni di 0,2-0,5 mm.

Le colonne capillari polari rivestite con glicole polietilenico o con fasi basate sul cianopropile sono oggi i tipi di colonne più comuni impiegati per la separazione dei FAME [27-31]. Queste colonne consentono la separazione dei FAME che differiscono non solo per il numero di atomi di carbonio, ma anche per il grado di insaturazione, la geometria e la posizione dei doppi legami. Lo svantaggio di queste colonne è che presentano un *bleeding* della colonna più elevato rispetto alle fasi stazionarie non polari, con conseguente disturbo del rumore di fondo relativamente alto che potrebbe compromettere la quantificazione degli analiti, specialmente quelli a bassi livelli di concentrazione. [30] Negli ultimi anni, diversi paesi hanno introdotto nuove normative riguardanti la limitazione o l'etichettatura del contenuto di acidi grassi *trans* negli alimenti e negli integratori alimentari [31]. I metodi GC più recenti per determinare il contenuto di FAMEs in configurazione *trans* descrivono separazioni che richiedono colonne capillari lunghe con fasi stazionarie altamente polari. Esistono metodi ufficiali di GC per determinare i singoli isomeri degli acidi grassi in matrici lipidiche specifiche. Nel 2005, l'American Oil Chemists' Society (AOCS) ha approvato il Metodo Ufficiale Ce 1h-05 per la determinazione di acidi grassi *cis*-, *trans*-, SFA, MUFA e PUFA negli oli e grassi vegetali o di origine animale non ruminante mediante gascromatografia capillare (GLC) [32]. Il Metodo Ufficiale Ce 1h-05 utilizza colonne capillari CP-Sil 88 (100

m x 0,25 mm id, spessore 0,2 µm; Varian Inc., Walnut Creek, CA) o Supelco 2560 (100 m x 0,25 mm id, spessore 0,2 µm; Supelco Inc., Bellefonte, PA). La separazione degli acidi grassi veniva eseguita in condizioni di eluizione isoterma a una temperatura di 180 °C, permettendo la separazione di *cis*- e *trans*-18:1. Tuttavia, il metodo Ce 1h-05 non era adatto per l'analisi di campioni contenenti FAME a catena corta, come i grassi lattieri, o contenenti PUFA a catena lunga. Tuttavia, il metodo offre una separazione superiore degli isomeri posizionali/geometrici degli FAME oleico e linoleico [31]. Nel 2007, l'AOCs ha introdotto la procedura Ce 1j-07 per integrare il metodo Ce 1h-05 nella determinazione degli acidi grassi *cis*-, *trans*-, SFA, MUFA e PUFA nei grassi lattieri e ruminanti mediante GLC capillare [33]. Questo metodo è basato sulla separazione offerta dalle stesse colonne capillari CP-Sil 88 e Supelco 2560, e su un programma di temperatura da 45 a 215 °C. Tale metodo fornisce una separazione dei FAME a catena corta a fronte di una sovrapposizione leggermente maggiore nella separazione di *cis*- e *trans*-18:1 FAME [31].

Recentemente, diverse analisi dei FAME mediante tecnica GC sono state condotte utilizzando colonne capillari rivestite con liquidi ionici (IL) altamente polari [30]. La fase stazionaria polare di una colonna IL è costituita da un catione organico (ad esempio, dialchilimidazolio e fosfonio) e da un anione organico o inorganico [34]. Queste colonne, rispetto a quelle polari comunemente utilizzate, offrono una selettività comparabile o superiore e una minor perdita [30]. Le colonne IL disponibili in commercio sono classificate come SLB-ILxx; con xx (nell'intervallo 59–111), un numero che indica il numero di polarità (PN) come proposto dal Prof. Mondello [35]. La capacità di separare FAME selezionati utilizzando colonne capillari rivestite con una colonna IL altamente polare è stata

dimostrata per la prima volta da Ragonese et al. [36] utilizzando una colonna SLB-IL100 (Merck Life Science, Darmstadt, Germania). Delmonte et al. [37] hanno dimostrato una migliore separazione dei FAME ottenuta con una colonna SLB-IL111 da 100 m (Merck Life Science), in particolare per gli isomeri *cis* e *trans* dei MUFAs e gli isomeri dell'acido linoleico coniugato (CLA), rispetto alla separazione fornita da una colonna SP-2560 [38]. Nel 2012, Del Monte et al. [39] hanno riportato la separazione degli acidi grassi del grasso del latte dopo la loro conversione in FAME utilizzando una colonna capillare SLB-IL111 (Merck Life Science). La colonna, dalla lunghezza di 200 m, ha permesso di risolvere con successo la maggior parte degli acidi grassi contenuti nel grasso del latte in un'unica corsa cromatografica.

Il rivelatore riveste un ruolo estremamente importante nell'intero processo di analisi mediante cromatografia gassosa (GC). Il successo di un metodo analitico è attribuibile in gran parte allo sviluppo di strumenti di rilevazione altamente sensibili e affidabili. Nel rilevare la concentrazione del gas all'uscita della colonna, il rivelatore fornisce informazioni sulla distribuzione dei singoli picchi all'interno di un cromatogramma, nonché sulle loro quantità relative. I rivelatori sono comunemente classificati come universali o selettivi. I rivelatori universali misurano tutti o quasi tutti i componenti di una miscela, sebbene la loro risposta alle stesse quantità di composti diversi non sia spesso simile. I rivelatori selettivi reagiscono solo ai componenti della miscela che possiedono caratteristiche strutturali uniche nelle loro molecole. Le proprietà analitiche più importanti di un rivelatore GC sono la sensibilità, la linearità su un ampio intervallo di concentrazioni, la stabilità a lungo termine e la facilità d'uso. Sebbene la maggior parte delle determinazioni GC venga eseguita con quantità di soluto comprese tra

livelli di μg e ng , alcuni rilevatori selettivi possono raggiungere i livelli di pg , rappresentando alcune delle tecniche di misurazione più sensibili disponibili per il chimico.

Il rilevatore più frequentemente utilizzato nell'analisi dei FAMES mediante GC è il rilevatore a ionizzazione di fiamma (FID) [21]. Il rilevatore FID (Figura 4.10) è ormai utilizzato quasi universalmente, poiché può essere utilizzato con quasi tutti i composti organici e possiede alta sensibilità e stabilità, un basso volume morto e un tempo di risposta rapido, mentre la risposta è lineare su un intervallo molto ampio [2].

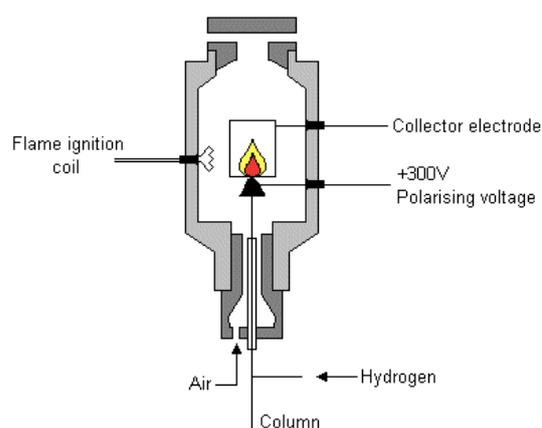
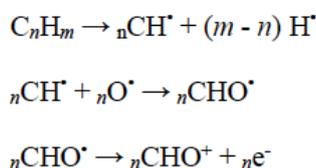


Figura 4.10 Rappresentazione schematica del rivelatore FID.

Il principio del rilevatore si basa sulla generazione di ioni tramite la combustione dei composti organici che eluiscono dalla colonna in una fiamma alimentata da idrogeno e aria. La fiamma è sostenuta sulla punta del getto da un flusso costante di idrogeno puro, mentre l'aria ossidante viene fornita attraverso il diffusore. Alla base del rilevatore, l'effluente della colonna viene introdotto continuamente, mescolato con l'idrogeno e inviato nella fiamma. Le variazioni di conduttività tra gli elettrodi vengono monitorate, amplificate elettronicamente e registrate. Un gas

carrier convenzionale contribuisce poco alla conduttività della fiamma. Quando le molecole di soluto organico entrano nella fiamma, vengono rapidamente ionizzate, aumentando la corrente in accordo con la concentrazione del soluto. Con il rilevatore FID, l'aumento della corrente è lineare con la concentrazione del soluto fino a sei ordini di grandezza. Sebbene il meccanismo di rilevamento non sia ancora stato completamente chiarito, è noto che la risposta agli idrocarburi è proporzionale al numero di atomi di carbonio nella molecola [40]. Le principali fasi che si verificano in un rilevatore FID sono tipicamente reazioni di primo ordine, come il cracking e lo stripping, seguite da ossidazione e chemioionizzazione. La formazione di ioni nella fiamma è principalmente il risultato della chemioionizzazione di radicali CHO energetici, derivante dalla reazione tra radicali CH e O [40]:



Il sistema FID funziona come un contatore di atomi di carbonio; ogni atomo di carbonio nella molecola del soluto contribuisce al segnale (composti con legami C-C e C-H), mentre la presenza di eteroatomi tende a ridurre la risposta. Negli esteri, chetoni o aldeidi, ad esempio, gli atomi di carbonio sono già ossidati nel campione di partenza. Pertanto, in queste molecole, tale frammento non può produrre ioni né generare una risposta nel rilevatore FID. Un atomo di carbonio associato a un eteroatomo fornisce spesso un contributo inferiore rispetto alla norma [41]. Tuttavia, il FID è un rilevatore inadeguato per la determinazione strutturale dei FAMES, soprattutto quando applicato all'analisi di matrici lipidiche complesse.

Infatti, il segnale FID fornisce esclusivamente informazioni sulla risposta strumentale e sul tempo di ritenzione [21]. Per queste ragioni, l'analisi dei FAMEs mediante un gascromatografo accoppiato a un rilevatore FID richiede l'utilizzo di standard di FAMEs per confermare l'identità di ciascun composto; in assenza di standard, possono verificarsi errori di identificazione. In tal caso, è opportuno utilizzare uno spettrometro di massa (MS) per confermare l'identità delle specie incognite. Il principio della tecnica è descritto nel Capitolo 5.

Per identificare un composto all'interno di una matrice complessa, si utilizza spesso il concetto di ritenzione relativa (r) del picco di interesse rispetto a un composto standard, ottenendo così un parametro caratteristico secondo la seguente equazione:

$$r = \frac{t'_{Ri}}{t'_{Rst}} \quad \text{Eq. 4.16}$$

dove t'_{Ri} si riferisce al tempo di ritenzione corretto dell'analita, mentre t'_{Rst} si riferisce al tempo di ritenzione corretto del picco di riferimento. Pertanto, la ritenzione relativa dei soluti che eluiscono dopo lo standard sarà >1 , mentre quella dei composti che eluiscono prima dello standard sarà <1 . Il tempo di ritenzione non è utile per l'identificazione dei picchi, poiché esso è influenzato dalla velocità lineare applicata, dalla temperatura, dal rapporto di fase e dalla lunghezza della colonna. Rispetto al tempo di ritenzione, il fattore di ritenzione è più vantaggioso poiché include il tempo del picco non trattenuto, compensando le variazioni causate da discrepanze nella velocità lineare e da differenze nella lunghezza della colonna. Tuttavia, la ritenzione relativa dipende anche dal rapporto di fase; quindi, se si sceglie un picco di riferimento identico e si applica la stessa temperatura della colonna, i risultati sono comparabili. Per superare questo limite, Kováts introdusse

nel 1958 il sistema degli indici di ritenzione (RI) in cui una serie omologa di paraffine normali veniva utilizzata come picchi di riferimento. In condizioni di GC isotermitiche, come è noto, questa serie omologa eluisce con tempi di ritenzione che aumentano esponenzialmente. In tali condizioni, esiste una relazione semi-logaritmica tra i tempi di ritenzione corretti (t'_{Ri}) delle n -paraffine e il loro numero di atomi di carbonio (C_n), come espresso nell'equazione 3.17 dove a e b sono costanti di proporzionalità:

$$\log t'_R = a C_n + b \quad \text{Eq. 4.17}$$

Ogni analita viene referenziato in base alla sua posizione tra le due n -paraffine che delimitano il suo tempo di ritenzione. Il calcolo dell'indice si basa su un'interpolazione lineare della lunghezza della catena carboniosa delle due paraffine delimitanti. Nella definizione originale, l'indice di ritenzione di una sostanza specifica veniva calcolato utilizzando solo n -paraffine con un numero pari di atomi di carbonio come riferimenti, come rappresentato nella seguente equazione:

$$I_s^{st.ph.}(T) = 100 \left[z + \left(\frac{\log x_s - \log x_z}{\log x_{(z+1)} - \log x_z} \right) \right] \quad \text{Eq. 4.18}$$

dove I è l'indice di ritenzione isotermico alla temperatura T , s è il composto di interesse, *st.ph.* è la fase stazionaria, e x rappresenta il tempo di ritenzione utilizzato per il calcolo, mentre z e $z + 1$ sono n -alcani con rispettivamente z e $z + 1$ atomi di carbonio. Per definizione, l'indice di ritenzione delle n -paraffine è uguale a 100 volte il loro numero di atomi di carbonio per qualsiasi fase stazionaria e a qualsiasi temperatura della colonna; ad esempio, n -C8 ha un indice di 800. Inizialmente, si preferiva l'uso delle n -paraffine con numero pari di atomi di carbonio, ipotizzando

la possibile esistenza di un'oscillazione nelle proprietà cromatografiche dei numeri successivi nella serie completa delle n -paraffine. Successivamente, si è confermato sperimentalmente che tale ipotesi era errata, e Kováts ha ridefinito l'equazione fondamentale proposta in precedenza:

$$I_s^{st.ph.}(T) = 100 \left[z + \left(\frac{\log x_s - \log x_z}{\log x_{(z+1)} - \log x_z} \right) \right] \quad \text{Eq. 4.19}$$

Nell'equazione proposta da Kováts, gli indici di ritenzione si riferiscono a dati ottenuti in condizioni di eluizione isotermica, mentre in condizioni di temperatura programmata, la serie delle n -paraffine eluisce in modo lineare. In questo caso, a ogni picco successivo viene aggiunto un incremento costante al tempo di ritenzione del suo predecessore, anziché un incremento non lineare, come si potrebbe osservare in condizioni isotermiche. L'equazione 4.20 esprime una relazione simile tra i tempi di ritenzione a temperatura programmata delle n -paraffine e il loro numero di atomi di carbonio (Cn):

$$\log t_R^T = a' Cn + b' \quad \text{Eq. 4.20}$$

dove a' e b' sono costanti che dipendono dalla fase stazionaria e dalla natura del gruppo chimico legato alla catena alchilica. Il calcolo dell'indice di ritenzione in condizioni di temperatura programmata si basa sull'equazione 4.21 proposta da *van den Dool e Kratz* [42], che non utilizza la forma logaritmica. Gli indici calcolati con questa equazione sono comunemente denominati indici di ritenzione lineare (LRI, *linear retention index*):

$$I(T) = 100n + \left(100 \frac{t_{R(i)} - t_{R(z)}}{t_{R(z+1)} - t_{R(z)}} \right) \quad \text{Eq. 4.21}$$

dove n rappresenta la differenza nel numero di atomi di carbonio delle due n -paraffine che delimitano il tempo di ritenzione di un soluto. Nella figura 4.11 è riportato un confronto di cromatogrammi relativi all'analisi di una serie omologa di alcani C7-C30 e un campione reale contenente il composto di interesse (i). Gli indici di ritenzione calcolati in condizioni isotermiche e a temperatura programmata presentano valori simili, ma non identici. È importante, per la riproducibilità degli indici di ritenzione, che lo spessore del film della fase stazionaria, la velocità del gas carrier e la programmazione della temperatura siano standardizzati. Infatti, è possibile che i valori di LRI varino in funzione della velocità di temperatura applicata e della temperatura iniziale. Nei database e nelle librerie commerciali, è possibile trovare diversi tipi di LRI. I valori di LRI più utilizzati sono calcolati su fasi stazionarie non polari o semi-polari rispetto a serie omologhe di n -alcani.

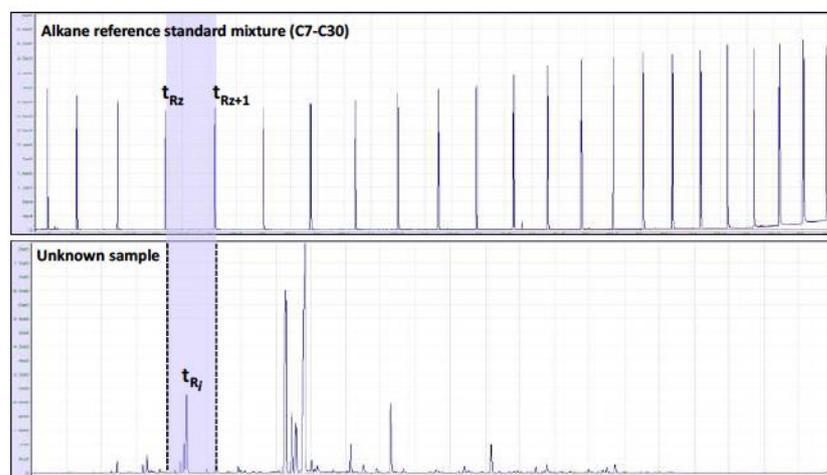


Figura 4.11 Sistema in cui il tempo di ritenzione di un composto (R_i) è correlato alla miscela standard di riferimento di alcani C7-C30.

Grazie alla stabilità di questo tipo di fase stazionaria e alla sua intensa interazione con gli idrocarburi, questa combinazione fornisce i valori di LRI più stabili. Nel campo della lipidomica, vengono applicate colonne altamente polari per una migliore separazione dei FAMES. Sebbene in alcuni database commerciali si

possano trovare valori di LRI calcolati su colonne polari rispetto a *n*-alcani, è ben noto che, a causa della scarsa solubilità degli alcani in questo tipo di fase stazionaria, si può osservare un comportamento fluttuante nei valori di LRI. Considerando questo fatto, invece degli *n*-alcani possono essere utilizzate altre serie omologhe, come i FAMES C4-C24 (Merck Life Science) o gli esteri etilici degli acidi grassi C4-C24 (FAEEs) (Merck Life Science). Nell'analisi lipidomica, la serie omologa dei FAMES C4-C24 è particolarmente utilizzata, risultando in valori di LRI più stabili su colonne polari rispetto all'uso degli *n*-alcani. È importante notare che la stabilità delle fasi stazionarie polari è molto inferiore rispetto alle fasi non polari o semi-polari. Pertanto, con l'invecchiamento della colonna, si possono osservare variazioni significative di ± 10 unità LRI nei valori calcolati nel caso dei FAMES.

4.2.2 Analisi HPLC dei lipidi

La cromatografia liquida (LC) è una tecnica analitica ben nota, utilizzata anche nel campo della lipidomica per la sua buona riproducibilità e l'elevato potere risolutivo. In particolare, l'HPLC ha guadagnato popolarità nell'analisi lipidomica grazie alla sua alta efficienza e selettività [21]. In cromatografia liquida, la separazione si basa sulla distribuzione selettiva degli analiti tra una fase mobile liquida e una fase stazionaria. Pertanto, è possibile analizzare un'ampia gamma di composti con vari pesi molecolari, da centinaia a centinaia di migliaia di Dalton.

Le moderne tecniche LC si sviluppano a partire dalle ricerche scientifiche di Martin e Synge [43], che hanno realizzato che per migliorare le prestazioni del sistema LC era necessario impiegare particelle molto piccole per la fase stazionaria e un'elevata pressione per la fase mobile. Secondo la formulazione di *van Deemter*

(Eq. 4.15), è possibile valutare che esiste un flusso ottimale per il quale sia i termini B che C risultano minimizzati. Questo corrisponde al minimo della curva che traccia H contro la velocità lineare (u) della fase mobile (Figura 4.12).

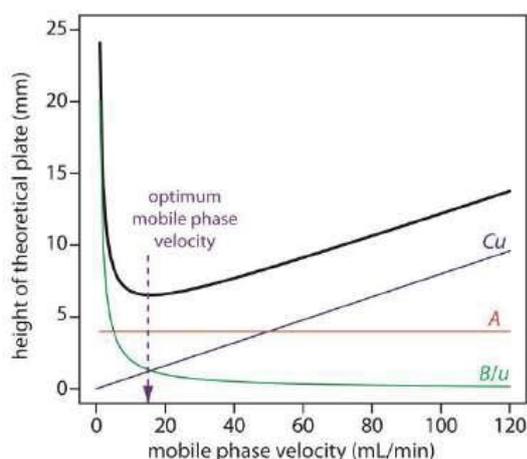


Figura 4.12 Grafico tipico di *Van Deemter*.

Dall'equazione di Van Deemter, risultava chiaro che la riduzione sia del diametro delle particelle (d_p) che dello spessore della fase stazionaria (d_f) avrebbe ridotto H, poiché sia il termine A che C sono legati a questi parametri. Questa teoria è stata prontamente applicata alla LC, portando allo sviluppo di materiali di impaccamento per colonne ad alte prestazioni per LC, sostituendo il materiale poroso convenzionale di 30-200 μm con particelle inferiori ai 10 μm . La nascita della LC moderna è comunemente attribuita a Horvath, che nel 1966 riempì una colonna con un diametro interno (ID) di 1 mm con tali particelle μ -porose [44]. A seconda della lunghezza della colonna, dell'ID e della dimensione delle particelle, la fase mobile veniva spinta nella colonna a diversi tassi di flusso, nell'intervallo di μL - mL min^{-1} , con pressioni relativamente elevate. Di conseguenza, nacque la tecnica HPLC e attualmente ogni applicazione LC può essere considerata un'applicazione HPLC.

L'approccio LC offre una vasta gamma di meccanismi di separazione caratterizzati da diverse selettività. La cromatografia di partizione (PC) è costituita da un sottile film liquido che ricopre un supporto solido e funge da fase stazionaria. La separazione si basa sulla differenza nella distribuzione di equilibrio dei soluti tra la fase stazionaria liquida e la fase mobile. Se la fase stazionaria è legata chimicamente a un supporto, il meccanismo di separazione è definito cromatografia a fase legata (BPC). Storicamente, nelle prime applicazioni venivano utilizzate fasi stazionarie contenenti resine di silice o allumina non modificate, mentre le fasi mobili erano solventi apolari o a bassa polarità. In questa tecnica, la fase stazionaria è più polare della fase mobile e l'esperimento è definito cromatografia a fase normale LC (NP-LC). Nel campo della lipidomica, la NP-LC è un metodo utilizzato per la separazione dei fosfolipidi (PL) in classi [45]. La NP-LC è utilizzata per la separazione preparativa dei PL [46], della ceramide [47], e dell'etil estere degli acidi docosaesaenoico (DHA) e docosapentaenoico (DPA) [48]. Questa tecnica può essere utilizzata anche per la separazione degli enantiomeri dei diacilgliceroli (DAGs) sotto forma di derivati diastereomerici e per la separazione dei lipidi non polari [49]. La fase stazionaria nella NP-LC è spesso impregnata con AgNO₃. Queste fasi sono utilizzate anche per la separazione dei composti lipidici aventi lo stesso numero e configurazione dei doppi legami [21]. L'uso di una fase stazionaria idrofobica può essere considerato l'opposto, o il contrario, della cromatografia liquida normale (NP-LC), da cui il termine cromatografia liquida in fase inversa (RP-LC). La tecnica RP-LC ha guadagnato grande popolarità ed è oggi utilizzata in oltre l'80% delle applicazioni di cromatografia liquida. Infatti, l'uso di solventi acquosi ha permesso l'analisi HPLC dei campioni biologici. Nell'analisi dei lipidi, la RP-LC è stata ampiamente utilizzata per la separazione dei lipidi complessi. I

lipidi più idrofobici, per esempio i TAGs, sono più fortemente trattenuti sulla fase stazionaria e vengono eluiti dalla colonna più tardi rispetto ai lipidi più polari. L'ordine di eluzione nella RP-LC dipende non solo dalla lunghezza della catena di carbonio, ma anche dal grado di insaturazione dei residui acilici dei lipidi analizzati. Il tempo di ritenzione aumenta con il numero dei doppi legami nella catena carboniosa. Nella RP-LC, le lunghezze di catena equivalenti (ECL) caratterizzano l'ordine di eluzione per i composti lipidici. Ad esempio, un composto lipidico costituito da N atomi di carbonio e contenente nella molecola n doppi legami ha un valore di ECL calcolato sulla base della seguente relazione:

$$ECL = n - 2n \quad \text{Eq. 4.22}$$

Ad esempio, i valori ECL di un PL contenente un acido grasso C16:0 e di un PL con un acido grasso C18:1 saranno entrambi 16. Questo significa che con l'aumento dell'ECL, aumenta la forza di ritenzione dell'acido grasso. In generale, il grado di idrofobicità dei composti lipidici è comunemente identificato dal numero di partizione (PN), dato dalla somma del numero totale di carbonio (CN) meno il doppio del numero dei doppi legami (DB) nella catena acilica [38, 50]:

$$PN = CN - 2DB \quad \text{Eq. 4.23}$$

Altra tecnica di separazione comunemente utilizzata nell'analisi dei lipidi è la cromatografia a interazione idrofila (HILIC). L'HILIC è più frequentemente utilizzata per l'analisi dei PL rispetto alla NP-LC. L'HILIC consente l'analisi e la separazione di sostanze altamente idrofile e anfifiliche che sono solitamente scarsamente trattenute sulla fase stazionaria nella RP-LC, mentre sono fortemente trattenute nelle fasi mobili non acquose utilizzate nella NP-LC, o non sono

sufficientemente solubili in esse. Inoltre, l'analisi HILIC rappresenta un'alternativa valida alla NP-LC perché richiede l'uso di fasi mobili compatibili con l'*electrospray ionisation* (ESI)-MS, tecnica di ionizzazione che verrà descritta nel prossimo capitolo. Questo approccio non è consentito con la NP-LC a causa della bassa polarità e della costante dielettrica delle fasi mobili comunemente utilizzate [51].

Le separazioni HPLC effettuate utilizzando fasi stazionarie costituite da un supporto solido con gruppi funzionali anionici (ad es., $-\text{SO}_3^-$) o cationici (ad es., $-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$) covalentemente attaccati è definita cromatografia a scambio ionico (IEC). La separazione IEC si basa su interazioni ioniche (o elettrostatiche) tra analiti ionici e polari, ioni presenti nell'eluente gruppi funzionali ionici fissati al supporto cromatografico. La separazione dei lipidi mediante IEC si basa sui gruppi ionici presenti nella molecola, sebbene anche altri gruppi, come i gruppi ossidrilici, esercitano un'influenza. I composti lipidici vengono separati su diversi materiali a scambio ionico: cellulosa di dietilaminoetile (DEAE), cellulosa di trietilaminoetile (TEAE) o resine a scambio ionico. Il DEAE è il più frequentemente utilizzato per separare le classi di lipidi [52].

La cromatografia a esclusione dimensionale o a permeazione del gel (SEC) utilizza gel porosi come fasi stazionarie e la separazione è dovuta alle differenze nella dimensione dei soluti. I soluti di grandi dimensioni non riescono a penetrare nella fase stazionaria porosa e passano rapidamente attraverso la colonna; i soluti più piccoli entrano nella fase stazionaria porosa, aumentando il tempo trascorso sulla colonna. La tecnica SEC, nota anche come cromatografia per filtrazione su gel, è in grado di separare e rilevare le lipoproteine fornendo una composizione

lipidica dettagliata delle particelle di lipoproteina separate in base alla loro dimensione [53].

Infine, la cromatografia per affinità (AC) rappresenta un meccanismo di separazione alternativo ed è uno degli strumenti più efficienti utilizzati per la purificazione delle biomolecole di interesse, comprese le molecole lipidiche. Si basa su interazioni biologiche altamente specifiche tra due molecole, come le interazioni tra enzima e substrato, recettore e ligando, o anticorpo e antigene. Deutsch et al. hanno utilizzato una fase stazionaria di dodecilamina-agarosio per isolare e raccogliere tutti i principali lipidi neutri e PL dal plasma [54].

L'iniezione del campione nella colonna è una fase importante del processo cromatografico LC. Specialmente nel campo della LC, è necessario introdurre un volume minimo di solvente affinché esso arrivi in colonna come una banda discreta. L'iniettore LC deve consentire il passaggio del campione liquido dalla pressione ambiente alla pressione presente all'ingresso della colonna, possibilmente senza alterare il flusso del solvente. Gli iniettori più utilizzati nella LC sono gli iniettori a valvola, che permettono l'iniezione del campione con notevole ripetibilità e senza significativi cambiamenti del flusso. Nella Figura 4.13 è mostrato lo schema di un iniettore a valvola. Tubi capillari in acciaio montati su un disco metallico, che ruota su un perno, formano un iniettore a valvola tipico. Il campione viene introdotto mediante una siringa in un ciclo di campionamento caratterizzato da un volume specifico. Al termine del processo di carico, la valvola viene ruotata, così il ciclo viene posto in serie con il circuito della fase mobile e il campione viene mescolato nella fase mobile.

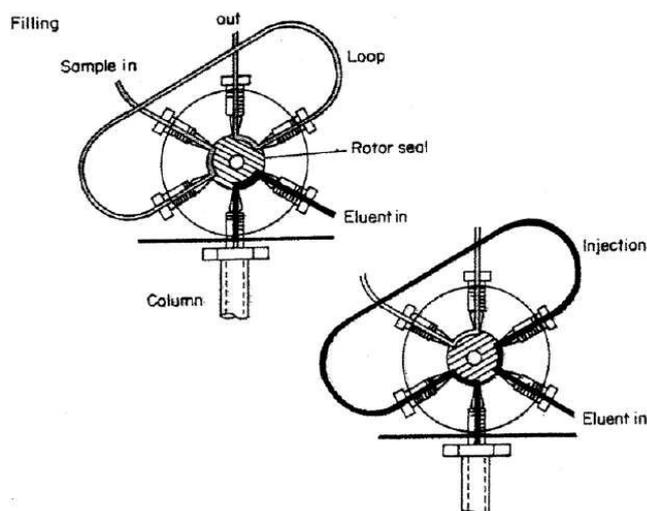


Figura 4.13 Iniettore a valvola in posizioni di riempimento e iniezione.

Le colonne più utilizzate per scopi analitici nella cromatografia liquida sono quelle con un diametro interno di 2-2,1 mm o 4-4,6 mm e una lunghezza compresa tra 10 e 25 cm. Le colonne LC con diametro interno ridotto permettono di rilevare quantità molto basse di campione, ma d'altro canto, presentano una capacità di carico limitata. Colonne più larghe sono generalmente utilizzate per scopi preparativi come riportato in Tabella 4.2.

Tabella 4.2. Classificazione delle colonne LC in base al loro diametro interno.

Tipo di colonna	Diametro Interno (mm)
LC preparativa	> 20
LC semi-preparativa	6-20
LC convenzionale	3-5
LC <i>narrow-bore</i>	2
LC micro	0,5-1
LC capillare	0,1-0,5
Nano LC	0,01-0,1
LC open tubular	0,005-0,05

L'equazione di *Van Deemter* indica che riducendo le dimensioni delle particelle di una colonna LC, si può ottenere una maggiore efficienza della colonna, grazie al

minore contributo della diffusione di Eddy (termine A), del trasferimento di massa della fase mobile (termine C) e dei percorsi di diffusione longitudinale più brevi nei pori della fase stazionaria (termine B). Per ottenere un valore H più basso e quindi un numero di piastre più elevato, è generalmente preferibile utilizzare una fase di riempimento con particelle più piccole piuttosto che allungare la colonna. Infatti, una colonna più lunga aumenta il volume di ritenzione, riducendo così la concentrazione del picco nell'eluato e compromettendo il limite di rilevamento. Le particelle più piccole riducono le dimensioni della banda cromatografica. Il riempimento poroso delle colonne LC è costituito da pori diffusi in gel di silice. Questo tipo di riempimento aumenta la superficie della fase stazionaria. Gli analiti si spostano dalla fase mobile esterna alle particelle verso la fase mobile stagnante all'interno dei pori. Diffondendosi fuori dai pori, le molecole seguono percorsi determinati ed eluiscono lungo la colonna. Il trasferimento di massa tra l'interno e l'esterno delle particelle è la principale causa dell'allargamento della banda nella LC. Ovviamente, l'uso di particelle più piccole può ridurre questa diffusione grazie alla diminuzione dei percorsi degli analiti. Tuttavia, l'efficienza maggiore delle dimensioni delle particelle strette è controbilanciata dalla diminuzione della permeabilità della colonna e quindi da un rapido aumento della contropressione. Come riportato da Giddings nel 1991, esiste una correlazione lineare tra la caduta di pressione (ΔP) e la velocità lineare u nella colonna [55]:

$$\Delta P = \Phi \frac{\eta L u}{d_p^2} \quad \text{Eq. 4.24}$$

dove ϕ , η , L , e d_p sono rispettivamente la resistenza al flusso, la viscosità della fase mobile, la lunghezza della colonna e il diametro delle particelle. È stato calcolato che utilizzando una colonna impaccata di 25 cm con particelle di 5 μm , è necessaria

una pressione di ingresso inferiore a 25 bar per l'analisi LC, mentre diminuendo le dimensioni del diametro delle particelle a $1\ \mu\text{m}$, è richiesta una pressione di ingresso di 2000 bar [1, 56]. Di conseguenza, le pompe, il sistema di iniezione e tutte le connessioni devono essere in grado di operare a pressioni molto elevate, e i rivelatori capaci di acquisire segnali ad elevate velocità. Nasce così la cromatografia liquida ad alta pressione (UPLC o UHPLC), termine coniato da Jorgensen nel 1997 [57] e attualmente utilizzato per indicare separazioni molto rapide con alta efficienza e risoluzione. Il nucleo centrale del sistema UPLC è la colonna impaccata con particelle sub- $2\ \mu\text{m}$. Osservando il grafico di *Van Deemter* per questi tipi di colonne (Figura 4.14), è possibile evidenziare l'appiattimento della curva nella regione di velocità della fase mobile superiore a quella ottimale, il che significa che queste colonne possono operare a flussi elevati senza perdita di efficienza. Nella Figura 4.14 è mostrato lo stesso comportamento per altri riempimenti di colonne, ovvero monolitico e a nucleo fuso. Il primo è costituito da un unico pezzo di materiale poroso, come polimeri organici o silice, caratterizzato da una resistenza al flusso molto limitata rispetto a una colonna con particelle impaccate.

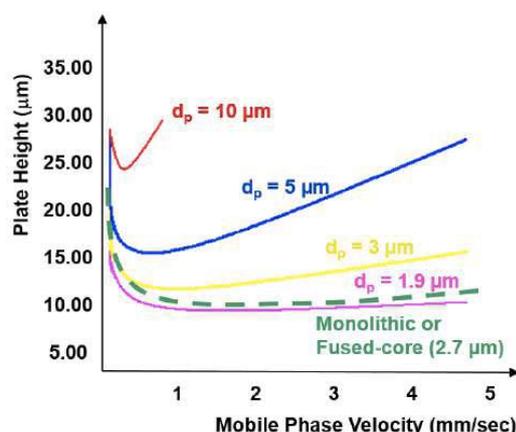


Figura 4.14 Grafico di *Van Deemter* a diversi diametri delle particelle.

Normalmente, il diametro di una particella porosa è di circa 1,5-2 μm (macroporosità) con pori di 10-12 nm (mesoporosità), riducendo così al minimo il percorso di diffusione e i fenomeni di trasferimento di massa. Tuttavia, la presenza di tali mesopori ha reso queste colonne poco efficienti per piccole molecole, mentre sono ancora ampiamente impiegate per l'analisi di macromolecole, come le proteine [58]. Il principale svantaggio della tecnologia monolitica è la limitazione nella lunghezza della colonna. Infatti, una colonna monolitica più lunga di 15 cm non può essere preparata senza problemi, limitando così il numero teorico di piastre per colonna [59-60]. La generazione di un grande numero di piatti teorici richiede una serie di colonne collegate.

Le particelle a nucleo fuso sono state introdotte sul mercato nel 2006 e sono anche conosciute come particelle parzialmente porose o a guscio. In particolare, come mostrato nella Figura 4.15, esse possiedono un nucleo solido in silice di 1,7 μm circondato da un sottile guscio poroso di 0,5 μm , rappresentando l'unico percorso di diffusione in un diametro totale delle particelle di 2,7 μm . Il chiaro vantaggio delle colonne a nucleo fuso rispetto a quelle con particelle sub-2 μm è la minore contropressione, permettendo così di operare tali fasi su strumenti LC convenzionali [61].

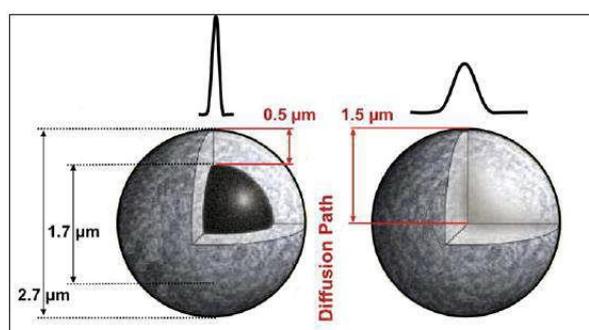


Figura 4.15 Tecnologia a nucleo fuso (a sinistra) e confronto con particelle completamente porose (a destra).

Come mostrato precedentemente nella Figura 4.15, le colonne a nucleo fuso mantengono il loro potere risolutivo anche a elevati flussi. Questo significa che è possibile utilizzare colonne più corte e flussi più elevati per ottenere separazioni ad alta risoluzione in tempi notevolmente rapidi. Il gel di silice è stato ampiamente utilizzato dagli analisti di lipidomica come fase stazionaria adsorbente in innumerevoli applicazioni LC, specialmente per le classi di lipidi separati secondo il numero e la natura dei gruppi funzionali polari (ad es. legami esterici, fosfato, gruppi idrossilici e amminici) nelle molecole dei lipidi. Le proprietà adsorbenti del gel di silice sono dovute ai gruppi silanoli, ovvero gruppi idrossilici legati al silicio, che sono ancorati alla superficie e possono essere liberi o legati all'idrogeno [2]. L'eluizione isocratica con una fase mobile di composizione costante può essere possibile per tipi ristretti di classi di lipidi, ma l'eluizione in gradiente, in cui la polarità della fase mobile viene aumentata a una velocità controllata, offre una maggiore versatilità [2]. Nella cromatografia in fase inversa (RP), esistono molte fasi stazionarie non polari, ma quelle più ampiamente impiegate e più importanti per l'analisi dei lipidi sono quelle costituite da idrocarburi a lunga catena, legati chimicamente alla superficie di silice sferica (con dimensioni delle particelle da 3 a 10 μm). Di queste, la fase più utilizzata è quella costituita da gruppi octadecilsilici [2].

Attualmente esistono in commercio numerosi rivelatori che possono essere accoppiati ad un cromatografo liquido. Come regola generale, non esiste un rivelatore affidabile e facile da usare, sensibile a tutti i materiali e compatibile con tutte le fasi mobili. Per questo motivo, a seconda del tipo di analisi e dei campioni, è opportuno scegliere un rivelatore adeguato. I rivelatori spettrofotometrici che operano nella gamma UV-VIS sono probabilmente i più utilizzati per l'analisi

HPLC di routine. Sono disponibili tre principali tipi di rivelatori UV: il primo tipo contiene filtri che offrono una gamma di lunghezze d'onda fisse, mentre il secondo tipo offre lunghezze d'onda variabili continuamente da 190 a 380 nm con possibile estensione a 600 nm; il terzo e ultimo modello è il rivelatore a serie di diodi (PDA), che offre una gamma di lunghezze d'onda simultaneamente. Solo gli ultimi due sono utili per l'analisi dei lipidi. La migliore risposta è data per i composti contenenti doppi legami coniugati e anelli aromatici, gruppi che si trovano raramente nei composti lipidici. Gli acidi grassi con doppi legami coniugati sono occasionalmente riscontrabili; tuttavia, la rivelazione UV ha permesso l'identificazione di isomeri configurazionali come *cis* e *trans*, *trans*-dieni coniugati, in campioni sottoposti a idroperossidazione chimica o enzimatica. In qualsiasi applicazione lipidica, l'analista preferisce convertire le molecole in derivati lipidici che assorbono fortemente nella gamma UV. Ad esempio, gli acidi grassi sono stati convertiti in esteri aromatici (ad es. fenacile o naftacile) [2], i gruppi zuccherini dei glicolipidi sono stati benzilati e i DAG derivati dai PL sono stati esterificati con acidi aromatici per l'analisi LC [2]. Vi sono alcuni svantaggi nell'uso del rivelatore UV nell'analisi LC dei lipidi. Molti dei solventi che hanno dimostrato una buona efficienza nella separazione dei composti lipidici, come cloroformio, acetone, acetato di etile o toluene, assorbono fortemente tra 200 e 220 nm; quindi, non possono essere utilizzati quando il rivelatore UV è accoppiato al sistema LC. Esano, isopropanolo, acetonitrile, metanolo e acqua sono solventi trasparenti nella regione UV e devono essere utilizzati con un alto grado di purezza, poiché tracce di materiali interferenti, come antiossidanti o plastificanti, potrebbero disturbare l'analisi lipidica. Nonostante queste difficoltà, la rivelazione UV a queste lunghezze

d'onda basse è stata ampiamente utilizzata nell'analisi dei lipidi, e in particolare nella separazione di lipidi semplici e classi di PL [2].

Il rivelatore ELSD (*evaporative light-scattering detector*) può essere considerato universale nella sua applicabilità, anche nel campo della lipidomica. Il solvente che eluisce all'uscita della colonna HPLC viene evaporato in un flusso d'aria o azoto all'interno di una camera di riscaldamento. Il soluto viene nebulizzato e attraversa un fascio di luce sotto forma di minuscole gocce, che vengono riflesse e rifratte. La quantità di luce dispersa viene misurata, e questa è correlata alla quantità di analiti nell'eluente. Condizione fondamentale per l'analisi ELSD-LC è la dimensione uniforme dell'aerosol generato; pertanto, è necessario ottimizzare il flusso del gas nebulizzatore e la temperatura della camera di evaporazione per massimizzare la risposta del rivelatore. Ad esempio, i composti lipidici a basso peso molecolare, come i FAMES, vengono parzialmente evaporati, rendendo impossibile un'analisi quantitativa accurata. I lipidi che presentano fluorescenza naturale sono molto rari e, per questo motivo, i rivelatori di fluorescenza non sono comunemente usati nell'analisi dei lipidi. Tuttavia, i composti lipidici possono essere rilevati con questo tipo di rivelatore mediante la preparazione di derivati idonei. Ad esempio, gli acidi grassi sono stati separati mediante RP-LC dopo derivatizzazione per formare esteri di antrilmetile.

La spettrometria di massa è considerata la tecnologia più importante per la caratterizzazione affidabile e completa dell'intero lipidoma. In particolare, l'ampio uso dell'ionizzazione *elettrospray* (ESI) per l'analisi dei lipidi e il miglioramento degli spettrometri di massa hanno notevolmente aumentato le prestazioni della MS nell'analisi dei lipidi e rivitalizzato gli studi sui lipidi [62]. La tecnica MS sarà trattata in dettaglio nel Capitolo 5.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Colon LA, Cintron JM, Anspach JA, Fermier AM, Swinney KA. Very high pressure HPLC with 1 mm id columns. *Analyst* 2004; 129: 503–504.
- [2] Christie WW, Han X. Lipid analysis. Isolation, separation, identification and lipidomic analysis. 4th ed. England: Oily Press; 2010.
- [3] Folch J, Lees M, S. Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem.* 1957; 226: 497–509.
- [4] Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J Biochem Physiol.* 1959; 37: 911–917.
- [5] Kim Ekroos (ed.). Lipidomics. Technologies and applications. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA, 2012.
- [6] Paweł Mateusz Nowak, Renata Wietecha-Posłuszny, Janusz Pawliszyn. White Analytical Chemistry: An approach to reconcile the principles of Green Analytical Chemistry and functionality. *Trends in Analytical Chemistry*, 2021, 138, 116223.
- [7] Matyash V, Liebisch G, V. Kurzchalia T, Shevchenko A and Schwudke D. Lipid extraction by methyl-tert-butyl ether for high-throughput lipidomics. *J Lipid Res.* 2008; 49: 1137–1146.
- [8] Löfgren L, Ståhlman M, Forsberg G–B, Saarinen S, Nilsson R and I. Hansson G. The BUMe method: a novel automated chloroform-free 96-well total lipid extraction method for blood plasma. *J Lipid Res.* 2012; 53:1690–700.
- [9] Christie WW (ed.). Gas Chromatography and Lipids. Oily Press, Scotland; 1989.
- [10] Christie WW. Preparation of ester derivatives of fatty acids for chromatographic analysis in *Advances in Lipid Methodology*. Oily Press, Dundee; 1993.
- [11] Hartman L. Esterification rates of fatty acids with methanol. *J Am Oil Chem Soc.* 1965; 42: 664–664.
- [12] Rogozinski M. The methanol-sulfuric acid esterification methods. *J Gas Chromatogr.* 1964; 2: 136–137.
- [13] Hansen RP and Smith JF. The occurrence of methyl methoxystearate isomers in the methyl esters prepared from sheep perinephric fat. *Lipids.* 1966; 1: 316–321.
- [14] Kaufmann HP and Mankel G. Anwendung der Gas-Chromatographie auf dem Fettgebiet III: Einfluß der Herstellungsverfahren der Fettsäure-methylester auf das quantitative Ergebnis. *Fette Seifen Anstrichm.* 1963; 65: 179–184.

- [15] Archibald FM and Skipski VP. Determination of fatty acid content and composition in ultramicro lipid samples by gas-liquid chromatography. *J Lipid Res.* 1966; 7: 442–445.
- [16] Hadorn H and Zuercher K. *Mitt. Lebensmittel Unters. Hyg.* 1967; 58: 236–258.
- [17] Peisker KV. A rapid semi-micro method for preparation of methyl esters from triglycerides using chloroform, methanol, sulphuric acid. *J Am Oil Chem Soc.* 1964; 41: 87-89.
- [18] Morrison WR and Smith LM. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride–methanol. *J Lipid Res.* 1964; 5: 600–608.
- [19] Metcalfe LD and Schmitz AA. The rapid preparation of fatty acid esters for gas chromatographic analysis. *Anal Chem.* 1961; 33: 363–364.
- [20] Tswett M. Physikalisch-chemische studien über das chlorophyll. Die absorption. *Ber Dtsch Botan Ges.* 1906; 24: 316–323.
- [21] Jurowski K, Kochan K, Walczak J, Barańska M, Piekoszewski W & Buszewski B. Analytical Techniques in lipidomics: State of the art. *Crit Rev Anal Chem.* 2014; 47: 418–437.
- [22] James A, Martin A. Gas-Liquid Partition Chromatography: The separation and micro-estimation of volatile fatty acids from formic acid to dodecanoic acid. *Biochem J.* 1952; 50: 679–690.
- [23] Cropper FR, Heywood A. Analytical separation of the methyl esters of the C12-C22 fatty acids by vapour-phase chromatography. *Nature.* 1953; 172: 1101–1102.
- [24] Casimir CA and David B (eds.). *Food lipids. Chemistry, nutrition, and biotechnology.* 3rd ed. New York NW: CRC Press Taylor and Francis Group; 2008.
- [25] Heckers H, Ditmar K, Melcher FW, and Kalinowski HO. Silar 10C, Silar 9 CP, Sp2340 and OV-275 in the gas–liquid chromatography of fatty acid methyl esters on packed columns: Chromatographic characteristics and molecular structures. *J Chromatogr.* 1977; 135: 93-107.
- [26] McNair HM & Miller JM (eds.). *Basic Gas Chromatography.* Wiley & Sons, New York.; 1998.
- [27] Mondello L, Tranchida PQ, Dugo P and Dugo G. J. Pharm. Rapid, microscale preparation and very fast gas chromatographic separation of cod liver oil fatty acid methyl esters. *Biomed Anal.* 2006; 41: 1566–1570.

- [28] Saba A, Mazzini F, Raffaelli A, Mattei A and Salvadori P. Identification of 9(E), 11(E)-18:2 Fatty Acid Methyl Ester at trace level in thermal stressed olive oils by GC coupled to acetonitrile CI-MS and CI-MS/MS, a possible marker for adulteration by addition of deodorized olive oil. *J Agric Food Chem.* 2005; 53: 4867–4872.
- [29] Harynuk J, Wynne PM and Marriott PJ. Evaluation of new stationary phases for the separation of Fatty Acid Methyl Esters. *Chromatographia.* 2006; 63: S61–S66.
- [30] Fanali C, Micalizzi G, Dugo P and Mondello L. Ionic liquids as stationary phases for fatty acid analysis by gas chromatography. *Analyst.* 2017; 142: 4601–4612.
- [31] Del Monte P and Fardin-Kia A-R. Review of methods for preparation and gas chromatographic separation of trans and cis reference fatty acids. *J AOAC Int.* 2009; 92: 1310–1326.
- [32] Official Methods and Recommended Practices, AOCS Press, Champaign, IL, Official Method Ce 1h-05.
- [33] Official Methods and Recommended Practices, 2006–2007 Methods Additions and Revisions, AOCS Press, Champaign, IL, Recommended Practice Ce 1j-07.
- [34] Ragonese C, Tranchida PQ, Dugo P, Dugo G, Sidisky LM, Robillard MV and Mondello L. Evaluation of use of a dicationic liquid stationary phase in the fast and conventional gas chromatographic analysis of health-hazardous C18 cis/trans fatty acids. *Anal Chem.* 2009; 81: 5561–5568.
- [35] Ragonese C, Sciarrone D, Tranchida PQ, Dugo P, Dugo G and Mondello L. Evaluation of a medium-polarity ionic liquid stationary phase in the analysis of flavor and fragrance compounds. *Anal Chem.* 2011; 83: 7947–7954.
- [36] Schrimpf-Moss J & Wilkening V. Kodali DR & List GR (eds.), *Trans Fats Alternatives.* AOCS Press, Champaign, IL; 2005.
- [37] Health Canada. *Canada Gazette.* 2003; 137: 154–409.
- [38] Beccaria M, Sullini G, Cacciola F, Donato P, Dugo P, Mondello L. High performance characterization of triacylglycerols in milk and milk-related samples by liquid chromatography and mass spectrometry. *J Chrom A.* 2014; 1360: 172–87.
- [39] Del Monte P, Fardin-Kia A-R, Kramer JKG, Mossoba MM, Sidisky L, Tyburczy C, Rader JJ. Evaluation of highly polar ionic liquid gas chromatographic column for the determination of the fatty acids in milk fat. *J Chroma A.* 2012; 1233: 137–146.

- [40] Kállai M, Veres Z, Balla J. Response of flame ionization detectors to different homologous series. *Chromatographia*. 2001; 54: 511–517.
- [41] Holm T. Aspects of the mechanism of the flame ionization detector. *J Chroma A*. 1999; 842: 221–227.
- [42] Van Den Dool H and Kratz PD. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *J Chrom A*. 1963; 11: 463–471.
- [43] Martin AJP & Synge RLM. A new form of chromatogram employing two liquid phases. *Biochem J*. 1941; 35: 1358–1368.
- [44] Horváth C, Lipsky SR. Use of liquid ion exchange chromatography for the separation of organic compounds. *Nature*. 1966; 211: 748–749.
- [45] Sokol E, Almeida R, Hannibal-Bach HK, Kotowska D, Vogt J, Baumgart J, Kristiansen K, Nitsch R, Knudsen J, Ejsing CS. Profiling of lipid species by normalphase liquid chromatography, nanoelectrospray ionization, and Ion Trap-Orbitrap mass spectrometry. *Anal Biochem*. 2013; 443: 88–96.
- [46] Row KH, Lee JW. Preparative separation of phospholipids from soybean by NP-HPLC. *Korean J Chem Eng*. 1997; 14: 412–415.
- [47] Gildenast T, Lasch J. Isolation of ceramide fractions from human stratum corneum lipid extracts by High-Performance Liquid Chromatography. *Biochim Biophys Acta*. 1997; 1346: 69–74.
- [48] Yamamura R, Shimomura Y. Industrial High-Performance Liquid Chromatography purification of docosahexaenoic acid ethyl ester and docosapentaenoic acid ethyl ester from single-cell oil. *J Am Oil Chem Soc*. 1997;74: 1435–1440.
- [49] Christie WW, Nikolova-Damyanova B, Laakso P, Herslofet B. Stereospecific analysis of triacyl-sn-glycerols via resolution of diastereomeric diacylglycerol derivatives by High-Performance Liquid Chromatography on silica. *J Am Oil Chem Soc*. 1991; 68: 695–701.
- [50] Líska M, Holčápek M. Triacylglycerols profiling in plant oils important in food industry, dietetics and cosmetics using high performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *J Chrom A*. 2008; 1198: 115–130.
- [51] Donato P, Micalizzi G, Oteri M, Rigano F, Sciarrone D, Dugo P, Mondello L. Comprehensive lipid profiling in marine organisms by hyphenated and multidimensional chromatography techniques coupled to mass spectrometry detection. *Anal Bioanal Chem*. 2018; 410: 3297–3313.

- [52] Column chromatography glycolipids. Cyberlipid. Available online: <http://cyberlipid.gerli.com/techniques-of-analysis/analysis-of-complexlipids/glycolipid-analysis/column-chromatography/> (accessed on 26 Aug2019).
- [53] Osei M, Griffin JL and Koulman A. Hyphenating size-exclusion chromatography with electrospray mass spectrometry; using on-line liquid-liquid extraction to study the lipid composition of lipoprotein particles. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2015; 29: 1969–1976.
- [54] Deutsch DG, Fogleman DJ and von Kaulla KN. Isolation of lipids from plasma by affinity chromatography. *Biochem Biophys Res Commun.* 1972; 50:758–764.
- [55] Giddings JC. *Unified separation Science*, Wiley, New York; 1991.
- [56] Anspach JA, Maloney TD, Colon LA. Ultrahigh-pressure liquid chromatography using a 1-mm id column packed with 1.5- μ m porous particles. *J Sep Sci.* 2007; 30: 1207–1213.
- [57] Mac Nair JE, Lewis KC, Jorgenson JW. Ultrahigh-pressure reversed-phase liquid chromatography in packed capillary columns. *Anal Chem.* 1997; 69: 983–989.
- [58] Ali I, Gaitonde VD, Aboul-Enein HY. Monolithic silica stationary phases in Liquid Chromatography. *J Chrom Sci.* 2009; 47: 432–442.
- [59] Ishizuka N, Kobayashi H, Minakuchi H, Nakanishi K, Hirao K, Hosoya K, Ikegami T, Tanaka N. Monolithic silica columns for high-efficiency separations by high-performance liquid chromatography. *J Chrom A.* 2002; 960: 85–96.
- [60] Tanak N, Kobayashi H, Ishizuka N, Minakuchi H, Nakanishi K, Hosoya K, Ikegami T. Monolithic silica columns for high-efficiency chromatographic separations. *J Chrom A.* 2002, 965. 35–49.
- [61] Fekete S, Guillarme D, Dong MW. Superficially porous particles: perspectives, practices and trends. *LCGC N Am.* 2014; 32: 2–12.
- [62] Li L, Han J, Wang Z, Liu J, Wei J, Xiong S and Zhao Z. Mass Spectrometry methodology in lipid analysis. *Int J Mol Sci.* 2014; 15: 10492–10507.

Pagina lasciata intenzionalmente bianca

Capitolo 5

Spettrometria di massa e lipidomica

La spettrometria di massa (MS) è la tecnica analitica che utilizza i rapporti di massa su carica (m/z) per identificare i composti presenti all'interno di un campione incognito. Oggigiorno quasi tutti i lavori di ricerca in campo lipidomico prevedono l'utilizzo di uno spettrometro di massa per identificare il più alto numero possibile di specie lipidiche. La spettrometria di massa è in grado di fornire sia dati qualitativi che quantitativi delle specie in esame; quindi, è in grado anche di determinare eventuali squilibri dei lipidi all'interno dell'organismo umano causati da eventuali stati patologici. Ciò significa che la spettrometria di massa ha trovato applicazioni significative nel campo della diagnostica clinica consentendo di rivelare e monitorare eventuali malattie. Per esempio, la MS può identificare biomarcatori specifici associati a una determinata malattia, è in grado di monitorare i livelli di farmaci nel sangue consentendo di ottimizzare le dosi terapeutiche e prevenire effetti collaterali, può essere impiegata per l'identificazione accurata di agenti patogeni all'interno dei fluidi biologici, fondamentale per una diagnosi tempestiva e trattamento delle infezioni. Considerando la vasta gamma di classi dei lipidi e le loro strutture estremamente complesse, la spettrometria di massa rappresenta l'approccio analitico più affidabile in termini di alta sensibilità, specificità e precisione, per la caratterizzazione completa dell'intero lipidoma.

5.1 *Principi fondamentali della spettrometria di massa*

I pionieri della tecnologia MS possono essere considerati Thomson, Aston e Dempster per le loro ricerche in questo settore. Nel 1897, Joseph John Thomson, un fisico, dimostrò l'esistenza degli elettroni e misurò il loro rapporto m/z [1]. Nel

1919, Aston, un allievo di Thomson, realizzò uno strumento migliorando l'uso dei campi elettrici e magnetici per focalizzare gli ioni su una lastra fotografica utilizzata come rivelatore [2]. Quel dispositivo fu chiamato spettrografo di massa. Successivamente, Dempster costruì uno strumento con un campo magnetico deflettente inclinato a 180° . Per rilevare masse diverse, lo strumento era dotato di un campo magnetico variabile in grado di focalizzarle su un punto del rivelatore [3]. Successivamente, per questo tipo di strumenti che utilizzavano un campo magnetico scansionante, fu coniato il termine spettrometro di massa (MS) [4]. L'analisi allo spettrometro di massa si svolge in tre fasi fondamentali come rappresentato in Figura 5.1. La prima fase è il processo di ionizzazione, che converte molecole o atomi in specie ioniche in fase gassosa. Questo passaggio richiede la rimozione o l'aggiunta di un elettrone o di protoni. L'energia in eccesso trasferita durante un evento di ionizzazione può rompere la molecola in frammenti caratteristici. Il passo successivo riguarda la separazione degli ioni molecolari e l'analisi dei loro frammenti carichi in base ai loro rapporti m/z . La separazione ionica di queste specie avviene tramite campi elettrici e/o magnetici. Nella terza e ultima fase, la corrente ionica dovuta agli ioni separati in base alla loro massa viene misurata, amplificata e mostrata sotto forma di spettrometro di massa.

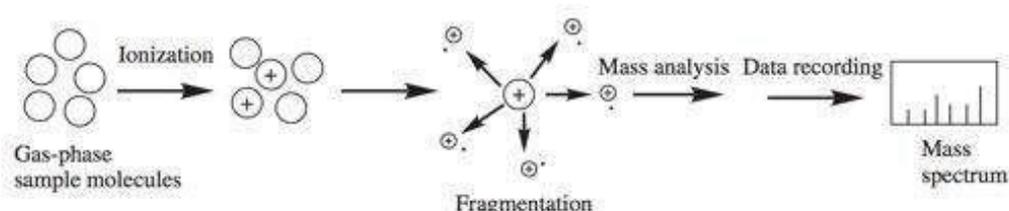


Figura 5.1 Concetto base dell'analisi alla spettrometria di massa.

La formazione e la manipolazione degli ioni devono avvenire in condizioni di alto vuoto, poiché questi sono estremamente reattivi e presentano un'emivita breve. La pressione necessaria per generare e separare gli ioni viene raggiunta tramite un sistema di pompaggio efficiente, che consente di ottenere un vuoto di circa 10^{-3} Torr. Utilizzando una pompa turbomolecolare, il sistema MS può arrivare a un vuoto fino a 10^{-10} Torr. Questa condizione permette agli ioni di muoversi liberamente nello spazio senza collidere o interagire con altre specie. L'alto vuoto evita che le collisioni provochino frammentazioni indesiderate degli ioni molecolari e la formazione di specie diverse attraverso reazioni tra ioni e molecole. Tali processi potrebbero ridurre la sensibilità, aumentare l'ambiguità delle misurazioni e diminuire la risoluzione dell'intero sistema MS.

Lo spettro MS è una rappresentazione bidimensionale in cui l'intensità del segnale è rappresentata sull'asse verticale e il rispettivo rapporto m/z sull'asse orizzontale (Figura 5.2). L'intensità di un frammento riflette direttamente l'abbondanza delle specie ioniche di quel determinato rapporto m/z generate all'interno della sorgente ionica. Il frammento con il rapporto m/z più elevato, noto anche come picco base, viene arbitrariamente assegnato a un'abbondanza relativa del 100%. Lo ione molecolare è indicato come M^+ . Le intensità relative di tutti gli altri picchi sono espresse in percentuale rispetto al picco base. Il rapporto m/z , che rappresenta la proprietà fisica misurata nella spettrometria di massa è un termine adimensionale in cui la massa dello ione, espressa in unità di massa atomica (u), corrispondente a 1/12 della massa dell'isotopo più abbondante del carbonio 12 ($\delta^{12}\text{C}$), sinonimo di dalton (Da), viene divisa per il numero di cariche trasportate.

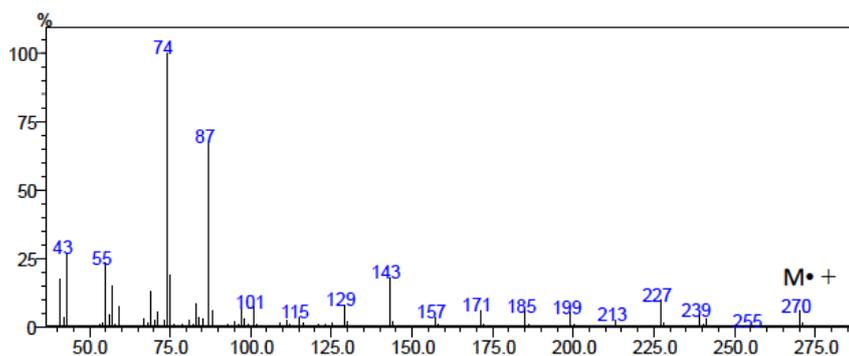


Figura 5.2 Spettro di massa dell'acido palmitico e rappresentazioni del segnale dell'ione molecolare (270 m/z).

Lo spettrometro di massa può essere utilizzato in combinazione con metodi di separazione cromatografica (tecniche ifenate) oppure impiegati in “solitaria” nelle applicazioni *shotgun*. Le tecniche ifenate come la gascromatografia-spettrometria di massa (GC-MS) o cromatografia liquida-spettrometria di massa (HPLC-MS) offrono una selettività elevata e la possibilità di risolvere campioni incogniti più o meno complessi. In questi casi, la tecnica MS funge da rivelatore cromatografico e il suo output deve fornire una serie di spettri di massa, ognuno idealmente corrispondente a un composto eluito. Secondo una recente definizione della IUPAC, il termine corrente ionica totale (TIC, *total ion current*) si riferisce alla somma delle correnti ioniche separate e trasportate dai diversi ioni che contribuiscono a uno spettro MS [5]. Pertanto, il TIC rappresenta un grafico della corrente ionica totale in funzione del tempo di ritenzione ottenuto da una precedente separazione cromatografica con rilevazione MS. Diversamente, il termine EIC o *extracted ion chromatogram* si riferisce a un cromatogramma MS in cui viene estratto un segnale generato da uno specifico valore di m/z selezionato in funzione del tempo di ritenzione [5]. Infine, il cromatogramma del picco di base (BPC) è un cromatogramma ottenuto tracciando i segnali dell'ione del picco di base in funzione del tempo di ritenzione.

5.1.1 Sorgenti ioniche nella spettrometria di massa

Nella sorgente ionica, l'analita viene ionizzato in fase gassosa prima di essere rilevato nel sistema MS. La scelta della sorgente ionica dipende dall'applicazione, dall'energia interna trasferita durante il processo di ionizzazione e dalle proprietà chimico-fisiche del composto che deve essere ionizzato. Alcune tecniche di ionizzazione sono definite con il termine *hard*, e si basano sull'impiego di una elevata energia di ionizzazione tale da provocare una frammentazione intensiva della molecola, spesso con possibile perdita dello ione molecolare diagnostico. All'interno delle tecniche di ionizzazione *hard* rientra la ionizzazione a impatto elettronico (EI, *electron impact*), uno dei processi di ionizzazione più diffusi in GC-MS. Le tecniche di ionizzazione *soft*, al contrario, sono meno distruttive e preservano maggiormente l'intera struttura molecolare, per cui la probabilità che lo ione molecolare sia preservato è elevata. Rientrano tra le tecniche *soft* i metodi di ionizzazione ESI (*electrospray ionization*), MALDI (*matrix assisted laser desorption ionization*), e APCI (*atmospheric pressure chemical ionization*). Tuttavia, è importante sottolineare che sia le sorgenti a impatto elettronico che quelle a ionizzazione chimica sono adatte solo per la ionizzazione in fase gassosa e, quindi, il loro uso è limitato a composti sufficientemente volatili e termicamente stabili. Infatti, quando si tratta di grandi molecole fragili e non volatili, come nel caso dei lipidi, è necessario introdurle nella sorgente ionica dopo un processo di nebulizzazione, utilizzando dispositivi di ionizzazione *elettrospray* o mediante ionizzazione chimica a pressione atmosferica. Una varietà delle tecniche di ionizzazione per la spettrometria di massa è elencata nella Tabella 5.1.

Tabella 5.1. Sorgenti ioniche più comuni nella spettrometria di massa.

Sorgente Ionica	Tipo di ioni	Agente di ionizzazione	Classificazione	Accoppiato a
Impatto elettronico	Ioni molecolari volatili	Elettroni energetici	<i>hard</i>	GC
Ionizzazione chimica	Ioni molecolari volatili	ioni di un reagente	<i>soft</i>	GC
Ionizzazione <i>electrospray</i> (ESI)	Ioni molecolari non volatili	Campo elettrico elevato	<i>soft</i>	LC
Ionizzazione chimica a pressione atmosferica (APCI)	Ioni molecolari non volatili	Reazioni ioniche molecolari in fase gassosa generata da una scarica elettrica effetto-corona	<i>soft</i>	LC, GC
Fotoionizzazione a pressione atmosferica (APPI)	Ioni molecolari non volatili	Reazioni ioniche molecolari in fase gassosa generata da una fotoionizzazione	<i>soft</i>	LC

5.1.2 Ionizzazione elettronica in lipidomica

Dempster introdusse l'impatto elettronico nel 1921 per misurare gli isotopi del litio e del magnesio [6]. La Figura 5.3 illustra una rappresentazione schematica della sorgente EI. Questa consiste in una camera di ionizzazione in cui le molecole dell'analita vengono direttamente introdotte e ionizzate. Un filamento metallico riscaldato, tipicamente realizzato in renio o tungsteno, crea il fascio di elettroni. Gli elettroni ad alta energia prodotti vengono accelerati verso un anodo e collidono con le molecole gassose, provocandone la ionizzazione.

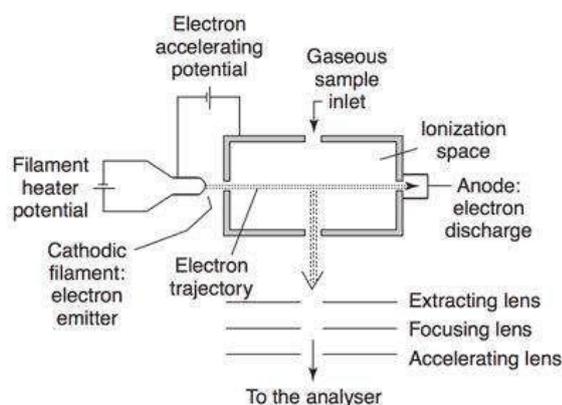


Figura 5.3 Rappresentazione schematica di una sorgente a ionizzazione elettronica.

Ogni elettrone possiede una determinata lunghezza d'onda, se una delle frequenze ha un'energia corrispondente a una transizione nella molecola, può verificarsi un trasferimento di energia che porta a varie eccitazioni elettroniche. Se l'energia è sufficiente, può anche verificarsi l'espulsione di un elettrone. Gli elettroni non “colpiscono” le molecole. Per questo motivo, il precedente termine di “impatto elettronico” è stato correttamente rinominato come “ionizzazione elettronica”. Alla fine di questa interazione, vengono tipicamente formati ioni molecolari radicali positivi. Per gli ioni positivi, l'energia degli elettroni è nella maggior parte dei casi impostata a 70 eV. Tuttavia, durante il processo di ionizzazione, un'energia di 10-20 eV viene trasferita alle molecole. La conseguenza ovvia è che l'energia in eccesso porta a una frammentazione estesa, che può essere vantaggiosa poiché fornisce informazioni strutturali utili per l'interpretazione di analiti sconosciuti. Inoltre, poiché gli spettri di massa EI sono relativamente riproducibili, essi possono essere utilizzati per il riconoscimento delle molecole incognite. Conseguentemente, esistono in commercio delle banche dati di spettrometria di massa in cui sono elencati gli spettri MS di migliaia di molecole utili per un'identificazione rapida e affidabile dei composti. La ionizzazione

elettronica è la tecnica di rilevazione più importante per la maggior parte delle applicazioni GC dei lipidi [7]. È stata utilizzata nella determinazione degli steroli [8], colesterolo [9] e acidi grassi [10], sebbene siano necessarie derivatizzazioni per questi composti non volatili.

5.1.3 Ionizzazione chimica dei composti lipidici

Negli anni '60, la ionizzazione chimica (CI) fu introdotta come una tecnica valida nella spettrometria di massa per le sue caratteristiche [11]. La CI è una tecnica che produce ioni con poca energia in eccesso. Di conseguenza, questa tecnica presenta il vantaggio di generare uno spettro con poche frammentazioni, in cui la specie molecolare o ione molecolare viene preservata. Pertanto, la CI può essere considerata una tecnica complementare all'EI. Il processo di ionizzazione si basa su una reazione chimica tra l'analita e gli ioni di un gas reagente a bassa energia, che viene introdotto nella sorgente ionica in eccesso. Questo eccesso determina una pressione elevata nella sorgente, assicurando che un elettrone, entrando nella sorgente, ionizzi le molecole di gas. Reazioni complesse che coinvolgono il trasferimento di protoni, l'astrazione di idruri, il trasferimento di carica, ecc., produrranno ioni positivi e negativi della sostanza, questi ultimi particolarmente utili per analizzare composti altamente elettronegativi. Il gruppo di Dennis utilizzò il bromuro di pentafluorobenzile per la derivatizzazione degli acidi grassi e successivamente ha utilizzato la ionizzazione chimica negativa (NCI) per rilevare con successo il segnale dello ione molecolare degli acidi grassi [12].

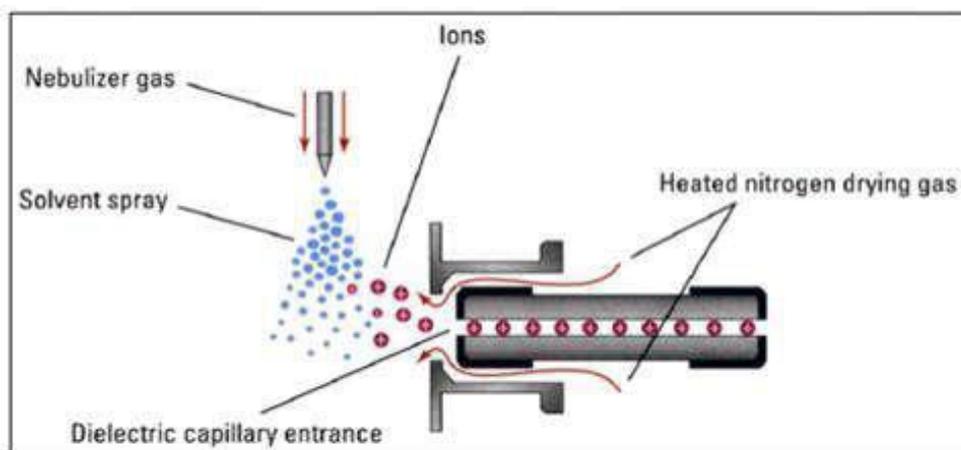
5.1.4 Ionizzazione elettrospray (ESI) nell'analisi dei lipidi

Il problema principale nell'accoppiare un cromatografo liquido ad uno spettrometro di massa risiedeva nell'incompatibilità tra il flusso di solvente della

tecnica HPLC e l'alto vuoto richiesto all'interno dello spettrometro. La necessità di eliminare il solvente della fase mobile all'uscita della colonna LC e ottenere ioni in fase gassosa analizzabili in MS ha portato allo sviluppo dell'interfaccia ESI.

I primi tentativi, come il collegamento tramite nastro mobile, il fascio di particelle (PB) o l'introduzione diretta di liquidi (DLI), presentavano diverse limitazioni, tra cui la portata del flusso e la termolabilità di alcuni composti. I primi due metodi si basavano sulla vaporizzazione selettiva del solvente di eluizione prima che questo entrasse nella sorgente ionica, mentre l'introduzione diretta si basava sulla riduzione del flusso affinché potesse essere direttamente iniettato nella sorgente [13-14]. Oggi, le sorgenti più utilizzate, come ESI, APCI e APPI, possono tollerare portate di circa 1 mL min^{-1} senza necessità di frazionare il flusso, aumentando di conseguenza la sensibilità di rilevazione. L'ESI è il principale metodo di ionizzazione utilizzato nell'analisi dei lipidi [15]. In un sistema ESI, viene applicato un campo elettrico elevato per nebulizzare una soluzione che fuoriesce da un ago di un tubo capillare. Il campo elettrico impartisce una carica alle goccioline, che si accumula man mano che il solvente evapora. Le goccioline aumentano la loro densità di carica fino a raggiungere un livello critico. A questo punto, si innesca un'esplosione *coulombiana*, e le particelle vengono completamente trasformate in ioni in fase gassosa. Infine, gli ioni vengono focalizzati da una lente elettronica e passano attraverso uno *skimmer* nella sorgente ionica. La Figura 5.4 mostra una sorgente ESI. L'ESI produce ioni con singola carica positiva aggiungendo un protone $[M+H]^+$ o un catione come lo ione sodio, $[M+Na]^+$, oppure rimuovendo un protone, $[M-H]^-$. Possono formarsi facilmente anche ioni con cariche multiple, come $[M+2H]^{2+}$. In questo caso, si ottengono spettri MS con numerosi frammenti, che non devono essere confusi con gli spettri

classici che mostrano frammenti molecolari. L'ESI è adatto per analiti termicamente instabili e macromolecole.



La Figura 5.4 rappresentazione schematica della sorgente ESI.

La ionizzazione può essere eseguita sia in modalità positiva che negativa. Per la ionizzazione positiva, è adatto un valore di pH di circa 5, con l'aggiunta di acido formico e acido acetico, talvolta insieme all'acetato di ammonio. Per la ionizzazione negativa, è preferibile un valore di pH di circa 9, con l'aggiunta di ammoniaca, trietilammina e dietilammina, talvolta insieme all'acetato di ammonio. In effetti, è possibile ottenere sia spettri di ioni positivi che negativi, e ciascuno può fornire informazioni strutturali utili per particolari lipidi [7]. Nel 2003, Han e Gross [16] utilizzarono per la prima volta la tecnica *shotgun* in contesto lipidomico, in cui un sistema ESI-MS veniva impiegato per l'analisi diretta dei lipidi. Utilizzando questa tecnologia, scoprirono che le sfingomieline diminuivano nel cervello dei pazienti affetti da Alzheimer, mentre le ceramidi aumentavano [17]. Tuttavia, il fenomeno della conversione reciproca e della soppressione degli ioni tra diversi lipidi può portare a errori sistematici durante la rilevazione di estratti lipidici complessi mediante analisi *shotgun* ESI-MS. Ad esempio, la ionizzazione della

lisofosfatidilcolina (LPC) in ESI potrebbe facilmente causare la perdita del gruppo della colina e diventare acido lisofosfatidico (LPA) artificiale, interferendo così con le successive misurazioni dell'LPA [15]. Pertanto, per bypassare questi problemi, è necessario accoppiare un sistema HPLC con uno spettrometro di massa con ionizzazione ESI, combinando così il potere separativo della cromatografia liquida con il potere identificativo della spettrometria MS. Come riportato da Christie [7], l'ESI è un processo di ionizzazione piuttosto delicato ma sensibile, particolarmente utile per PLs e GLs complessi.

5.1.5 Ionizzazione/fotoionizzazione chimica a pressione atmosferica per l'analisi dei lipidi

Recentemente, la ionizzazione chimica a pressione atmosferica (APCI) e la fotoionizzazione a pressione atmosferica (APPI) sono state sviluppate e applicate per analisi di lipidi intatti. L'APCI si basa sulla ionizzazione chimica mediante reazioni di cattura di elettroni tra ioni e molecole, effettuate nella sorgente ionica operante a pressione atmosferica. Questa tecnica consente di generare ioni tramite scarica comprese tra (3-6 kV) su uno *spray* di solvente. I campioni ionizzati vengono separati dalle molecole di solvente passando attraverso una nube di gas prima di entrare nella regione dell'analizzatore dello spettrometro MS. L'APCI è principalmente applicata a composti con peso molecolare moderato fino a circa 1500 Da e genera generalmente ioni mono-caricati. Anche con l'APCI, la ionizzazione può essere effettuata sia in modalità positiva che negativa. In modalità di ionizzazione positiva, i meccanismi predominanti sono la protonazione, la formazione di intermedi e il trasferimento di carica. In modalità negativa, invece, i meccanismi principali di formazione degli ioni sono la cattura di elettroni e l'adesione di anioni. Quando si utilizzano solventi acquosi, può essere necessario

aggiungere un additivo per garantire una ionizzazione efficiente. Con solventi non acquosi, gli additivi non sono necessari poiché le reazioni avvengono direttamente durante il processo di ionizzazione. Una rappresentazione schematica della sorgente APCI è rappresentata in Figura 5.5.

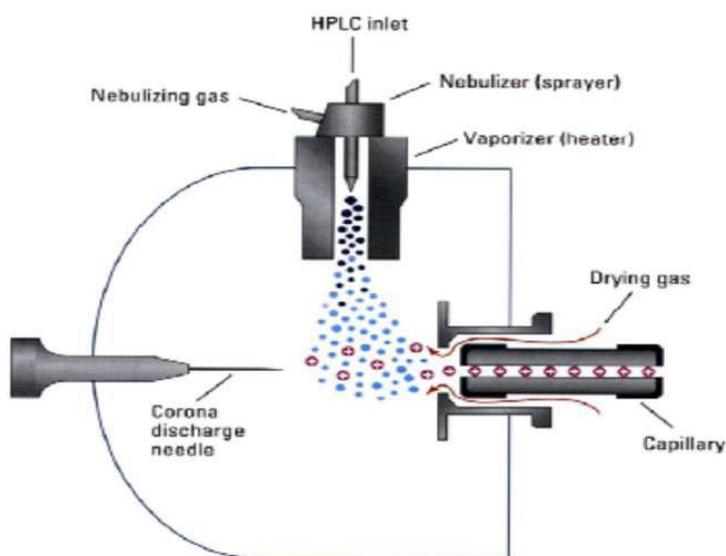


Figura 5.5 Rappresentazione schematica della sorgente APCI.

L'APCI viene solitamente impiegata a tassi di flusso più elevati rispetto all'ESI, specificamente tra 0,2 e 2 mL min⁻¹. L'APCI produce un segnale sensibile alla massa e permette di ottenere limiti di rilevamento molto bassi grazie all'elevata efficienza delle reazioni ioniche-molecolari che avvengono sotto condizioni di pressione atmosferica. In tali condizioni, l'emivita degli ioni è di circa 10 ms, rispetto ai 10 μs ottenuti con la ionizzazione chimica a media pressione. Il meccanismo di ionizzazione nella sorgente APPI è molto simile a quello dell'APCI. La prima utilizza una lampada a scarica che emette fotoni (vedi Figura 5.6), mentre la seconda utilizza un ago per generare una scarica elettrica effetto-corona. Le lampade UV forniscono fotoni con un'energia superiore ai potenziali di ionizzazione degli analiti, ma inferiore a quella dei gas atmosferici e dei solventi

utilizzati. Questo consente di produrre selettivamente ioni dagli analiti senza ionizzare il solvente, riducendo così notevolmente il rumore di fondo.

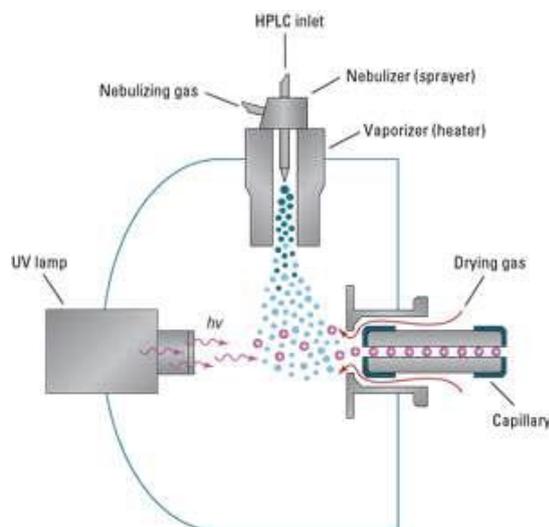


Figura 5.6 Rappresentazione schematica della sorgente APPI.

L'APCI e APPI sono state spesso impiegate in numerose applicazioni per l'analisi dei lipidi non polari, come i trigliceridi (TAG) [7]. Pertanto, quando i lipidi non possono essere analizzati in ESI, specie quelli non polari, possono essere ionizzati in APCI o APPI, si sono rivelati particolarmente adatti a tali analisi [18-19]. Nel 2013, Tian et al. [20] hanno confrontato queste tre tecnologie di ionizzazione per l'analisi del metaboloma plasmatico. L'ESI si è dimostrata molto sensibile nella rilevazione di glicerofosfocholine, glicerofosfoetanolamine, acilcarnitine, acidi biliari, solfati, ecc. L'APCI è utile per l'analisi di alcoli grassi, acidi grassi e acidi linoleici. L'APPI si è dimostrata particolarmente efficace nella rilevazione di steroidi, sfingolipidi, alcuni amminoacidi, nucleosidi e purine nel plasma [20].

5.2 Gli analizzatori in spettrometria MS

Un analizzatore di massa consente di separare le specie in fase gassosa prodotte in base al loro rapporto di m/z . Esistono diversi tipi di analizzatori di massa che utilizzano principi fisici differenti. Possono essere suddivisi in due grandi categorie basate su diverse proprietà. Gli analizzatori a scansione consentono solo agli ioni con un determinato rapporto m/z di passare in un dato momento. Questi includono spettrometri MS a settore magnetico o quadrupolari. Al contrario, gli analizzatori di massa come il tempo di volo (ToF, *time of flight*), la trappola ionica, la risonanza ciclotronica ionica o l'orbitrap, permettono la trasmissione simultanea di tutti gli ioni su un determinato intervallo di masse. Le principali caratteristiche degli analizzatori di massa più comuni, tra cui il singolo quadrupolo (qMS), il triplo quadrupolo (QqQ-MS), la trappola ionica (IT) e il ToF-MS, saranno descritte in questa tesi. La gamma di masse, la velocità di scansione, la trasmissione, la risoluzione e la precisione della massa sono i parametri considerati nella valutazione delle prestazioni di un analizzatore MS. La gamma di masse determina il limite del rapporto m/z che l'analizzatore di massa può misurare. La velocità di scansione rappresenta il tempo necessario per scansionare uno specifico range di masse. La trasmissione è il rapporto tra il numero di ioni che raggiungono il rivelatore e il numero di ioni che entrano nell'analizzatore di massa. Il termine risoluzione di massa, o semplicemente risoluzione (R), si riferisce alla capacità di uno spettrometro di massa di separare due picchi spettrali di massa ravvicinati. La capacità di uno strumento di distinguere tra ioni che differiscono per un piccolo incremento nel loro valore m/z ($\Delta m/z$) è chiamato potere risolutivo:

$$R = \frac{m}{\Delta m} \quad \text{Eq. 5.0}$$

dove Δm è la differenza minima tra due picchi separati che consente di distinguerli, e m è la massa del primo picco. La capacità separativa ovvero quanto lo spettrometro riesce a separare a valle due picchi, dipende dal tipo di analizzatore MS. Ad esempio, la risoluzione nei settori magnetici viene normalmente fornita secondo la definizione a valle al 10%, che definisce Δm come la differenza di massa tra due picchi risolti con una valle al 10% tra di essi. La definizione della valle al 10% è equivalente a quella in cui Δm è definita dalla larghezza del picco al 5% dell'altezza del picco. Il metodo più comunemente utilizzato per misurare la risoluzione nei quadrupoli e nel ToF-MS si basa sulla definizione della "larghezza a metà altezza" (FWHM, *Full Width at Half Maximum*), che prende in considerazione la larghezza di un picco al 50% della sua altezza come misura per Δm (Figura 5.7).

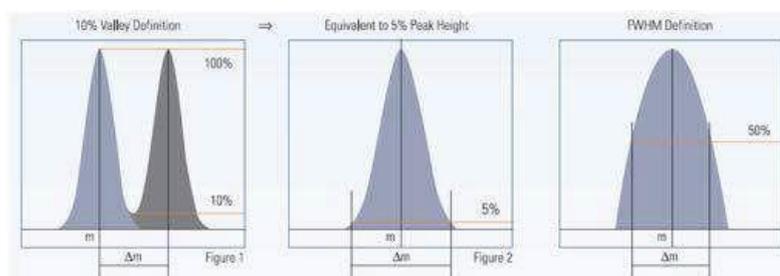


Figura 5.7 Esempi di differenti definizioni di risoluzione

Gli strumenti a bassa risoluzione (LR, *low resolution*) operano con valori di R compresi tra 500 e 2000. L'alta risoluzione (HR, *high resolution*) si riferisce a strumenti di spettrometria di massa con valori di R superiori a 5000. La precisione della massa indica la deviazione della risposta dello strumento tra la massa misurata accuratamente e la massa esatta calcolata. Può essere espressa come precisione di massa assoluta, $\Delta m/z$:

$$\frac{\Delta m}{z} = \frac{m}{z_{exp}} - \frac{m}{z_{cal}} \quad \text{Eq. 5.1}$$

dove m/z_{exp} è la massa misurata e m/z_{cal} è la massa esatta calcolata. La precisione di massa può anche essere indicata come precisione di massa relativa ($\delta m/m$) ed è calcolata come la precisione di massa assoluta divisa per la massa esatta, espressa in parti per milione (ppm):

$$\frac{\delta m}{m} = \frac{(\frac{\delta m}{z})}{(\frac{m}{z})} \times 10^6 \quad \text{Eq. 5.2}$$

Misurazioni precise della massa consentono di determinare la composizione elementare di un analita, confermando così l'identificazione di composti target o supportando l'identificazione di composti sconosciuti. Assumendo una precisione di massa infinita, dovremmo essere in grado di assegnare la formula molecolare di qualsiasi ione semplicemente tramite la sua massa esatta. Tuttavia, nella realtà, esistono delle deviazioni tra la massa accurata e quella esatta di uno ione; quindi, normalmente consideriamo errori dell'ordine di uno o più ppm, a seconda del tipo di strumento e della modalità di operazione.

5.2.1 Spettrometri di massa a quadrupolo

Gli strumenti a singolo quadrupolo (qMS) sono probabilmente gli spettrometri di massa più utilizzati nei laboratori di analisi chimiche. Nel 1953, Paul e Steinweger [21] descrissero per la prima volta il principio dell'analizzatore di massa a singolo quadrupolo. Un quadrupolo è costituito da quattro barre metalliche parallele e perfettamente allineate, come illustrato nella Figura 5.8. La separazione di massa viene realizzata grazie al movimento vibratorio stabile degli ioni all'interno di un campo elettrico oscillante ad alta frequenza, generato

dall'applicazione di potenziali di corrente continua (DC) e radiofrequenza (RF) su questi elettrodi [22-24]. Le barre opposte sono elettricamente connesse in coppia. Le due coppie di barre hanno, in ogni momento, potenziali di uguale magnitudine ma di segno opposto. Gli ioni che entrano nello spazio tra le barre oscillano nelle direzioni x e y. L'ampiezza dell'oscillazione dipende dalla frequenza del potenziale applicato e dalla massa degli ioni. Uno ione positivo viene attratto da una barra negativa, mentre uno ione negativo viene attratto dalla barra con segno opposto. Se il potenziale cambia segno, lo ione cambia direzione senza collidere con la barra.

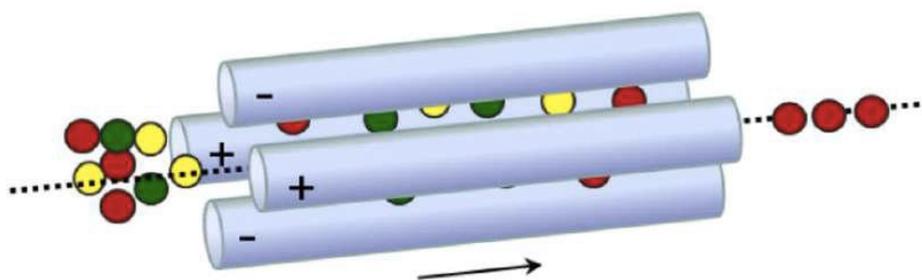


Figura 5.8 Rappresentazione schematica dell'analizzatore di massa a quadrupolo.

I sistemi a quadrupolo operano a risoluzione costante, il che significa che le tensioni DC e RF vengono mantenute costanti. Per una data ampiezza delle tensioni DC e RF, solo gli ioni con un determinato rapporto m/z risonano, seguendo un percorso stabile attraverso il quadrupolo per essere poi rilevati. Gli altri ioni vengono destabilizzati e colpiscono le barre [25]. Gli analizzatori a quadrupolo sono generalmente utilizzati a risoluzione unitaria, il che ne limita l'uso ad applicazioni a bassa risoluzione. La gamma di masse dipende dalle impostazioni delle tensioni DC e RF. Gli intervalli di m/z variano solitamente da 25 a 2000 uma. Com'è comune negli analizzatori a scansione, il quadrupolo rileva un solo ione alla volta, il che comporta che la maggior parte degli ioni prodotti non venga rilevata,

riducendo così la sensibilità. Tuttavia, la sensibilità può essere aumentata scansionando un intervallo ristretto di m/z o operando in modalità di *single ion monitoring* (SIM), cioè, selezionando solo determinati ioni da monitorare. Grazie alla proprietà di scansione degli analizzatori di massa a quadrupolo, questi sono particolarmente adatti per sorgenti di ioni continue, come l'EI (ionizzazione elettronica) e l'ESI (ionizzazione *elettrospray*), ma non sono idonei per metodi di ionizzazione a impulsi.

5.2.2 Spettrometri di massa a triplo quadrupolo

L'obiettivo di qualsiasi analisi di spettrometria di massa è ottenere quante più informazioni possibili sulla struttura dell'analita di interesse. Tuttavia, a volte i sistemi MS non riescono a rilevare correttamente gli analiti, sia perché la tecnica di ionizzazione utilizzata produce relativamente pochi frammenti diagnostici della struttura, soprattutto in esperimenti *soft*, sia perché la frammentazione viene soppressa dalla presenza di altri composti introdotti nella sorgente di ioni, oppure perché i segnali vengono oscurati da altri ioni generati dalla matrice durante il processo di ionizzazione. Per rispondere a queste sfide, è emersa una forte esigenza di sviluppare nuove tecniche in grado di superare questi problemi e fornire informazioni dettagliate sulla struttura molecolare, portando così allo sviluppo della spettrometria di massa tandem. Il termine "spettrometria di massa tandem" (MS/MS), o più semplicemente "tandem MS", si riferisce a un insieme di metodi in cui un determinato ione è sottoposto a ulteriori frammentazioni mediante un gas di collisione o semplicemente CID gas (*collision induced dissociation*) e successivamente rilevato in una seconda dimensione MS [26]. L'elevata selettività

della spettrometria MS/MS offre una capacità avanzata di identificazione, discriminando non solo composti non isobarici, ma anche quelli isobarici. [27]

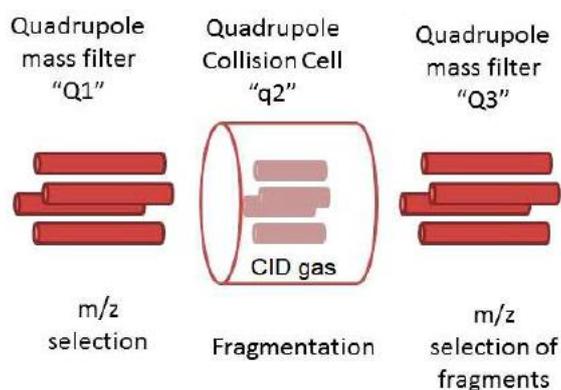


Figura 5.9 Rappresentazione schematica dell'analizzatore di massa a triplo quadrupolo.

Lo spettrometro di massa a triplo quadrupolo è ampiamente utilizzato nell'analisi *targeted* dei lipidi [15]. Uno schema semplice di questo analizzatore ibrido è mostrato nella Figura 5.10. Mentre Q1 e Q3 funzionano come veri e propri quadrupoli, filtrando gli ioni in base alla combinazione dei potenziali RF e DC, q2 funge quasi da trappola ionica, dove viene applicato solo un potenziale RF per bloccare gli ioni. Se sia Q1 che Q3 operano in modalità SIM (Single Ion Monitoring), selezionando rispettivamente uno ione precursore o "genitore" e uno ione prodotto o "figlio", si ottiene la massima selettività e sensibilità nella cosiddetta modalità di SRM (*selected reaction monitoring*) oppure MRM (multiple reaction monitoring). Se è necessario monitorare più componenti caratterizzati da un comportamento di frammentazione simile, si può adottare la modalità NLS (*neutral loss scan*), che consiste nel monitorare la perdita di una molecola neutra, come l'acqua o l'anidride carbonica, durante la frammentazione; solo le transizioni caratterizzate da una differenza specifica tra ione precursore e prodotto risulteranno

in un picco nel cromatogramma. Inoltre, per migliorare l'interpretazione strutturale, è possibile ottenere lo spettro completo di uno ione precursore in modalità PIS (*precursor ion scan*), così come la modalità di scansione dello ione precursore è adatta a confermare l'identificazione di un componente fornendo per un prodotto selezionato il possibile precursore. La Figura 5.10 mostra tutte le modalità operative di uno strumento QqQ-MS [28].

Si ritiene che, insieme allo sviluppo rapido della MS, in particolare con l'evoluzione degli analizzatori di massa e le loro ulteriori applicazioni nell'analisi dei lipidi, verranno identificati e chiariti nuovi lipidi funzionali, che potranno essere utilizzati come biomarcatori e target terapeutici [15].

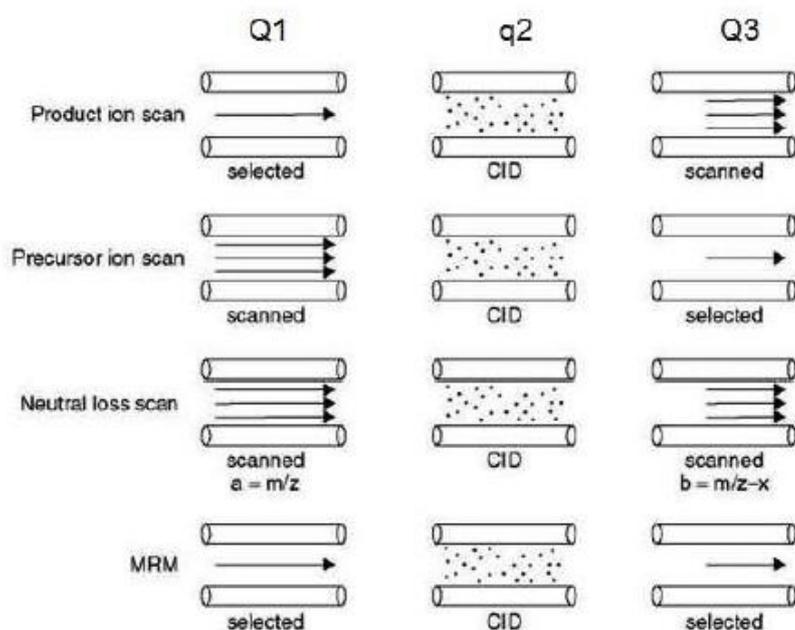


Figura 5.10 Modalità di funzionamento in QqQ-MS.

5.2.3 Spettrometri di massa a trappola ionica

Nel caso della trappola ionica, il principio di funzionamento è diverso rispetto al quadrupolo. Gli ioni sono intrappolati all'interno della trappola e vengono espulsi

in base alla loro massa per ottenere lo spettro MS. Mentre gli ioni si respingono l'un l'altro all'interno della trappola, le loro traiettorie tendono ad espandersi nel tempo. Per evitare la perdita di ioni a causa di questa espansione, è necessario adottare misure per ridurre la traiettoria. Questo viene ottenuto mantenendo all'interno della trappola una pressione di elio o argon, che rimuove l'energia in eccesso dagli ioni tramite collisione. La trappola ionica è composta da due elettrodi iperbolici che fungono da estremità e da un elettrodo ad anello (Figura 5.11). Gli elettrodi all'estremità sono elettricamente connessi e i potenziali DC e RF vengono applicati tra questi e l'elettrodo ad anello [29-30].

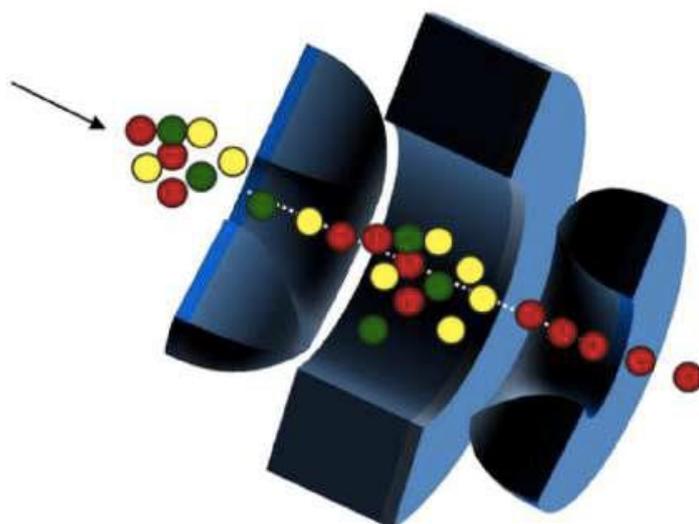


Figura 5.11 Rappresentazione schematica dell'analizzatore di massa a trappola ionica.

Oltre all'esperimento a scansione completa, l'analizzatore a trappola ionica è anche in grado di eseguire esperimenti di spettrometria di massa tandem (MS/MS). È infatti possibile selezionare un particolare ione precursore, che viene poi frammentato e analizzato. Il gas CID, come l'elio o l'argon, forniscono l'energia necessaria per ulteriori frammentazioni.

5.2.4 Spettrometri a tempo di volo (ToF)

Il concetto di analizzatori a tempo di volo o semplicemente ToF-MS è stato descritto per la prima volta da Stephens nel 1946 [31]. Successivamente, nel 1955, Wiley e McLaren pubblicarono il design di uno spettrometro di massa ToF-MS, che divenne poi il primo strumento commerciale [32]. Una rappresentazione schematizzata di uno spettrometro TOF-MS è riportata nella Figura 5.12.

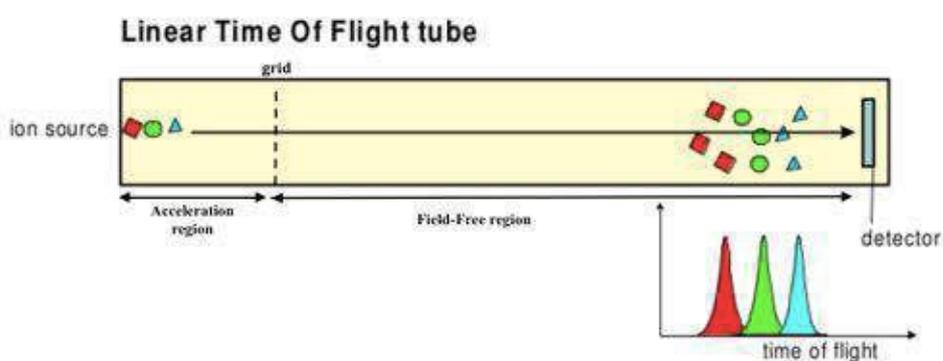


Figura 5.12 Rappresentazione schematica di uno spettrometro di massa ToF lineare.

Gli ioni vengono espulsi dalla sorgente in “pacchetti” mediante l’applicazione di potenziali elettrici su delle lenti di messa a fuoco della sorgente. Successivamente, questi ioni vengono accelerati verso il tubo di volo attraverso una differenza di potenziale applicata tra un elettrodo e la griglia di estrazione. Quando gli ioni lasciano la regione di accelerazione, essi possiedono le stesse cariche e idealmente, le stesse energie cinetiche. Successivamente, entrano in una regione priva di campo elettrico dove vengono separati in base alle loro velocità e raggiungono il rivelatore posizionato all’altra estremità del tubo di volo. A condizione che tutti gli ioni inizino il loro percorso nello stesso momento, o almeno entro un intervallo di tempo molto breve, quelli più leggeri raggiungeranno il rivelatore prima di quelli più pesanti. Un sistema strumentale in cui gli ioni

viaggiano su una linea retta viene definito ToF-MS lineare. La differenza di tempo tra il segnale dell'impulso iniziale e il momento in cui uno ione raggiunge il rivelatore rappresenta il tempo di volo, che può essere espresso mediante l'equazione:

$$t_{TOF} = \frac{L}{v} = L \sqrt{\frac{m}{2qU_a}} \propto \sqrt{\frac{m}{z}} \quad \text{Eq. 5.3}$$

dove L è la lunghezza della regione priva di campo, v è la velocità dell'ione dopo l'accelerazione, m è la massa dell'ione, q è la carica dell'ione, U_a rappresenta la differenza di potenziale elettrico di accelerazione e z lo stato di carica. Questa equazione mostra che, maggiore è la massa di uno ione, più lento sarà il suo arrivo al rivelatore. In linea di principio, la gamma di masse di un analizzatore ToF non ha limiti, il che lo rende particolarmente adatto per l'analisi di molecole di grandi dimensioni, fino a 300 kDa [33]. Un altro vantaggio di questi strumenti è la loro elevata efficienza di trasmissione, che porta a una sensibilità molto alta rispetto agli analizzatori a quadrupolo. Questo è dovuto al fatto che tutte le gamme di masse vengono analizzate simultaneamente, a differenza degli analizzatori a scansione, dove gli ioni vengono trasmessi successivamente su una scala temporale. L'analizzatore ToF-MS è molto veloce e uno spettro su un'ampia gamma di masse può essere ottenuto in un intervallo di tempo dell'ordine dei microsecondi. Poiché la risoluzione di massa è proporzionale al tempo di volo e al percorso di volo, una soluzione per aumentare la risoluzione di questi analizzatori è quella di allungare il tubo di volo. Tuttavia, un tubo di volo eccessivamente lungo può ridurre le prestazioni degli analizzatori ToF-MS a causa della perdita di ioni dovuta alla dispersione dopo collisioni con molecole di gas o alla dispersione angolare del fascio ionico. È anche possibile aumentare il tempo di volo riducendo la tensione

di accelerazione, ma una tensione più bassa riduce la sensibilità. Per migliorare la risoluzione di massa degli strumenti ToF-MS, è stato introdotto il *reflectron* elettrostatico. Proposto per la prima volta da Mamyrin [34], il *reflectron* crea un campo di ritardo che agisce come uno specchio ionico, deviando gli ioni e rimandandoli indietro attraverso il tubo di volo. Il termine analizzatore ToF-MS a *reflectron* (R-ToF) viene utilizzato per differenziarlo dall'analizzatore ToF-MS lineare (L-ToF). Come illustrato nella Figura 5.14, il *reflectron* è posizionato dietro la regione priva di campo, opposto alla sorgente ionica, mentre il rivelatore è collocato sul lato della sorgente dello specchio ionico per catturare l'arrivo degli ioni dopo che sono stati riflessi. Il *reflectron* corregge la dispersione dell'energia cinetica degli ioni che lasciano la sorgente con lo stesso rapporto m/z . Di conseguenza, gli ioni con maggiore energia cinetica e, quindi, maggiore velocità penetreranno più in profondità nel *reflectron* rispetto agli ioni con minore energia cinetica. In tal modo, gli ioni più veloci trascorrono più tempo nel *reflectron*, raggiungendo il rivelatore nello stesso momento degli ioni più lenti. Sebbene il *reflectron* aumenti il percorso di volo senza ampliare le dimensioni dello spettrometro di massa, il vantaggio di un incremento nella risoluzione di massa viene compensato da una riduzione della sensibilità e dalla limitazione della gamma di masse rilevabili.

La scelta di operare con strumenti ToF-MS in modalità lineare o con *reflectron* dipende fortemente dalle specie ioniche da rilevare. Con lo sviluppo della spettrometria MS tandem, nascono gli spettrometri ibridi come il Q-ToF-MS che combina il quadrupolo (e la cella di collisione) con un analizzatore ToF-MS, permettendo un'analisi ad alta risoluzione e alta accuratezza di massa per tutti gli ioni simultaneamente. I sistemi Q-ToF-MS vengono solitamente utilizzati per

l'analisi lipidica untargeted, che rileva molti metaboliti contemporaneamente ed è estremamente utile per individuare i disturbi metabolici [15].

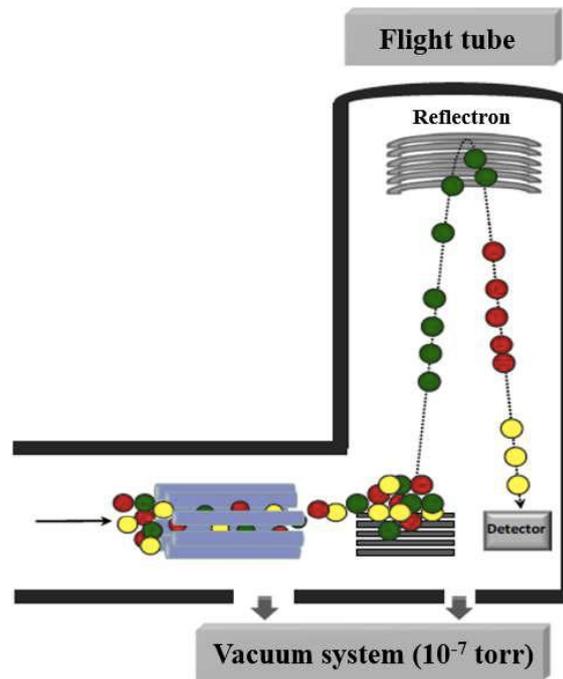


Figura 5.14 Rappresentazione schematica di uno spettrometro di massa a tempo di volo con riflettore (R-ToF).

BIBLIOGRAFIA

- [1] Thomson JJ. Cathode Rays. *Philos Mag.* 1897; 44: 293–316.
- [2] Aston FW. A positive rayspectrograph. *Philos Mag.* 1919; 38: 707–714.
- [3] Dempster AJ. A new Method of Positive Ray Analysis. *Phys Rev.* 1918; 11: 316–325.
- [4] Nier AO. Some reflections on the early days of mass spectrometry at the university of Minnesota. *Int J Mass Spectrom Ion Proc.* 1990; 100: 1–13.
- [5] Murray KK, Boyd RK, Eberlin MN, Langley GJ, Li L, Naito Y, Definitions of terms relating to mass spectrometry (IUPAC Recommendations 2013). *Pure Appl Chem.* 2013; 85: 1515–1609.
- [6] Dempster AJ. Positive ray analysis of lithium and magnesium. *Phys Rev.* 1921; 18: 415–422.
- [7] Christie WW, Han X. *Lipid analysis. Isolation, separation, identification and lipidomic analysis.* 4th ed. England: Oily Press; 2010.
- [8] Ahmida HS, Bertucci P, Franzo L, Massoud R, Cortese C, Lala A, Federica G. Simultaneous determination of plasmatic phytosterols and cholesterol precursors using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) with selective ion monitoring (SIM). *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 2006; 842: 43–47.
- [9] Son HH, Moon JY, Seo HS, Kim HH, Chung BC, Choi MH. Hightemperature GC-MS-based serum cholesterol signatures may reveal sex differences in vasospastic angina. *J Lipid Res.* 2014; 55: 155–162.
- [10] Lin YH, Salem N Jr, Wells EM, Zhou W, Loewke JD, Brown JA, Lands WE, Goldman LR, Hibbeln JR. Automated high-throughput fatty acid analysis of umbilical cord serum and application to an epidemiological study. *Lipids.* 2012; 47: 527–539.
- [11] Munson MSB, Field FH. Chemical ionization mass spectrometry. I. General introduction. *J Am Chem Soc.* 1966; 88: 2621–2630.
- [12] Quehenberger O, Armando AM, Dennis EA. High sensitivity quantitative lipidomics analysis of fatty acids in biological samples by gas chromatographymass spectrometry. *Biochim Biophys Acta.* 2011; 1811: 648–656.
- [13] Arpino PJ, Baldwin MA and McLafferty FW. LC-MS systems providing continuous monitoring with nanogram sensitivity. *Biomed Mass Spectrom.* 1974;1: 80–82.

- [14] Scott RPW, Scott CG, Munroe M and Hess J. Interface for on-line liquid chromatography-mass spectroscopy analysis. *J Chromatogr.* 1974; 99: 395–405. of *Philosophy in Chemical Science* 130
- [15] Li L, Han J, Wang Z, Liu J, Wei J, Xiong S and Zhao Z. Mass Spectrometry methodology in lipid analysis. *Int J Mol Sci.* 2014; 15: 10492–10507.
- [16] Han XL, Gross RW. Global analyses of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples by ESI mass spectrometry: A bridge to lipidomics. *J Lipid Res.* 2003; 44: 1071–1079.
- [17] Han XL, Rozen S, Boyle SH, Hellegers C, Cheng H, Burke JR, Welsh-Bohmer KA, Doraiswamy PM, Kaddurah-Daouk R. Metabolomics in early Alzheimer's disease: Identification of altered plasma sphingolipidome using shotgun lipidomics. *PLoS One.* 2011; 6: 1–13.
- [18] Chen S, Yin P, Zhao X, Xing W, Hu C, Zhou L, Xu, GW. Serum lipid profiling of patients with chronic hepatitis B, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma by ultra-fast LC/IT-TOF MS. *Electrophoresis.* 2013; 34: 2848–2856.
- [19] Gao F, Zhang ZX, Fu XF, Li W, Wang T, Liu HW. Analysis of phospholipids by NACE with on-line ESI-MS. *Electrophoresis.* 2007; 28: 1418–1425.
- [20] Tian H, Bai J, An Z, Chen Y, Zhang R, He J, Bi X, Song Y, Abliz Z. Plasma metabolome analysis by integrated ionization rapid-resolution liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2013; 27: 2071–2080.
- [21] Paul W, Steinwedel H. Notizen: Ein neues Massenspektrometer ohne Magnetfeld. *Z Naturforsch A.* 1953; 8: 448–450.
- [22] Dawson PH. Quadrupole mass analyzers: performance, design, and some recent applications. *Mass Spectrom Rev.* 1986; 5: 1–37.
- [23] Campana JE. Elementary theory of quadrupole mass spectrometry, *Int J Mass Spectrom Ion Proc.* 1980; 33: 101–117.
- [24] Miller PE, Bonner Denton M. The quadrupole mass filter: basic operating concepts. *J Chem Educ.* 1986; 63: 617–622.
- [25] March RE & Hughes RJ. *Quadrupole Storage Mass Spectrometry.* John Wiley and Son: New York; 1989.
- [26] Busch KL, Glish GL, McLuckey SA (eds.). *Mass spectrometry/mass spectrometry: Techniques and applications of tandem mass spectrometry.* Wiley VCH: New York; 1988.

- [27] Holčapek M, Jirasko R, Lída M. Recent developments in liquid chromatography-mass spectrometry and related techniques. *J Chromatogr A*. 2012; 1259: 3–15.
- [28] Farwanah H, Kolter T (eds.). *Lipidomics in Wiley Encyclopedia of Chemical Biology*. John Wiley & Sons, Inc. New York; 2007.
- [29] Gross JH (ed.). *Mass Spectrometry - A textbook*. Springer: Berlin Heidelberg New York; 2004.
- [30] Hoffmann E & Stroobant V (ed.). *Mass Spectrometry: Principles and Applications*, 3rd ed. John Wiley and Son: Chichester; 2007.
- [31] Stephens W. A pulsed mass spectrometer with time dispersion. *Phys Rev*. 1946; 69: 691–691.
- [32] Wiley WC and McLaren JB. Time-of-flight mass spectrometer with improved resolution. *Rev Sci Instrum*. 1955; 16: 1150–1157.
- [33] Moniatte M, van der Goot FJ, Buckley JT, Pattus F, van Dorsselaer A. Characterisation of the heptameric pore-forming complex of the *Aeromonas* toxin aerolysin using MALDI-TOF mass spectrometry. *FEBS Lett*. 1996; 384: 269–272.
- [34] Mamyurin BA, Karataev VI, Schmikk DV and Zagulin VA. The massreflectron, a new nonmagnetic time-of-flight mass spectrometer with high resolution. *Sov Phys JETP*. 1973; 37: 45-48.

Capitolo 6

Estrazione di oli dai semi di cactus tramite fluidi supercritici.

6.1 Introduzione

L'*Opuntia* è un genere di pianta appartenente alla famiglia delle *Cactaceae*, che conta circa 1800 specie. Tra queste, circa 1400 appartengono al genere *Opuntia* e sono diffuse principalmente nei paesi del Mediterraneo, Messico, Europa [1]. Le specie *Opuntia ficus-indica* L. (OFI) e *Opuntia dillenii* (OD) sono le più utilizzate per il consumo umano. Nella medicina tradizionale di molti paesi, queste piante vengono impiegate per il trattamento di diverse patologie e disturbi, tra cui la pertosse e l'infiammazione degli occhi, oltre che come agenti antiulcera e antidiarroidici [2]. La specie, comunemente nota come fico d'India, viene coltivata in molte zone dello Yemen, dove trova impiego come alimento, mangime e in prodotti trasformati come succhi, marmellate e cosmetici, rendendo questa pianta estremamente vantaggiosa anche dal punto di vista economico [3-4]. I frutti del fico d'India contengono circa il 9-10% dei semi [5], che a loro volta contengono tra il 5% e il 16% di olio [3, 6]. Diversi studi hanno analizzato la composizione lipidica in termini di acidi grassi presenti nell'olio dei semi della specie OFI, che risulta particolarmente ricco di acidi grassi insaturi (80-88%), come l'acido linoleico (C18:2 ω 6) (49,3-78,8 %), l'acido oleico (C18:1 ω 9) (12,8-25,3 %), l'acido vaccenico (C18:1 ω 7) (4,3-6,3%) e l'acido α -linolenico (C18:3 ω 3) (0,23-1,1 %). Gli acidi grassi saturi principali sono l'acido palmitico (C16:0) (9,3-14,3%) e l'acido stearico (C18:0) (2,2-4,3%) [7-10]. Il profilo dei trigliceridi dell'olio dei semi di fichi d'India ha evidenziato la presenza di trilinoleina (LLL) e oleildilinoileina (OLL), con percentuali medie rispettivamente del 25,6 % e del 21,5 % [11]. Per

quanto riguarda la specie OD, si tratta di una pianta selvatica che cresce in diverse aree dello Yemen, in particolare nelle regioni di Taiz e Hodeida. I frutti di OD hanno un sapore acidulo e semi di grandi dimensioni (Figura 6.1). Alcuni abitanti dello Yemen preparano succhi freschi o concentrati dai frutti di OD, scartando così una grande quantità di semi. È stato riportato che i semi di OD contengono tra il 6,65 % e il 13,12 % di olio [7-9], ricco di molecole bioattive, tra cui acidi grassi MUFAs e PUFAs. Tuttavia, solo un numero limitato di studi si è occupato di una caratterizzazione chimica esaustiva di questo olio. Ad oggi, l'unico studio che ha fornito un dettagliato profilo della composizione chimica dell'olio di OD è stato condotto su una specie marocchina, utilizzando una procedura di estrazione con solventi convenzionali [8]. D'altro canto, numerosi studi recenti hanno dimostrato che gli oli ottenuti dai semi di *Opuntia ficus-indica* e *Opuntia dillenii* possiedono un elevato valore nutrizionale e molteplici benefici per la salute, tra cui attività antiossidante sia in vivo [10] che in vitro [8], attività antimicrobica [12], effetti antidiabetici [3, 11, 13], riduzione dei lipidi [14], effetti antitumorali in vitro [15], nonché proprietà antinfiammatorie e antiulcerogene [10].

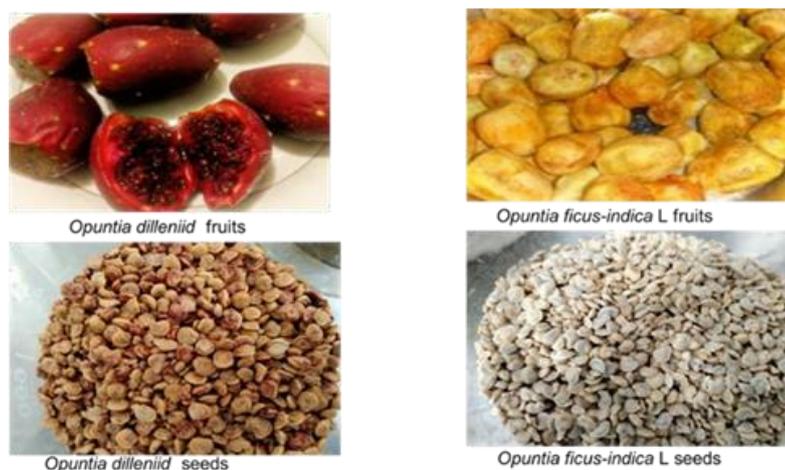


Figura 6.1 Frutti e semi di *Opuntia ficus-indica* L. e *Opuntia dillenii*. Riprodotto con il consenso di MDPI.

Vista la molteplicità dei benefici per la salute associati agli oli dei semi di OFI e OD, un processo di estrazione efficiente è fondamentale per preservarne la qualità. Diversi metodi di estrazione sono stati applicati ai semi di OFI e OD, tra cui macerazione [10], pressatura a freddo [13, 16-17], estrazione assistita da ultrasuoni [18] e *Soxhlet* [19-20]. Tuttavia, tali metodi risultano dispendiosi in termini di tempo, presentano rischi ambientali e possono avere implicazioni negative per la sicurezza degli operatori. Inoltre, possono costituire un pericolo per la salute dei consumatori se i solventi organici non vengono completamente rimossi. Recentemente, l'estrazione con fluidi supercritici (SFE, *supercritical fluid extraction*) si è affermata come un'alternativa valida per l'estrazione di oli dai semi dei frutti e ha attirato una notevole attenzione da parte della comunità scientifica. Il sistema SFE offre numerosi vantaggi quando si utilizza anidride carbonica (CO₂) come solvente di estrazione, in quanto non è tossica, ecocompatibile e non esplosiva [16, 21-22]. Inoltre, l'olio può essere estratto a basse temperature e in assenza di ossigeno [19]. La letteratura disponibile sull'estrazione SFE dei semi di OFI e OD con una dettagliata caratterizzazione lipidica, particolare per quanto riguarda i profili dei trigliceridi e acidi grassi, è piuttosto scarsa.

Nel presente studio, è stato messo a punto un sistema di estrazione SFE per produrre oli dai semi di OFI provenienti dallo Yemen e dall'Italia, così come quelli di OD provenienti dallo Yemen. Gli oli ottenuti con sistema SFE sono stati confrontati con quelli estratti tramite metodo *Soxhlet*. La composizione lipidica degli oli estratti è stata determinata tramite gascromatografia accoppiata a spettrometria di massa e rivelatore FID.

6.2 *Materiali e Metodi*

6.2.1 *Reagenti*

I seguenti standard analitici sono stati acquistati da Merck Life Science (Darmstadt, Germania): trinonanoina (C₉C₉C₉), triundecanoina (C₁₁C₁₁C₁₁), tritridecanoina (C₁₃C₁₃C₁₃), tripentadecanoina (C₁₅C₁₅C₁₅), trieptadecanoina (C₁₇C₁₇C₁₇), trinonadecanoina (C₁₉C₁₉C₁₉), e una miscela standard di FAMEs saturi con numero di atomi di carbonio pari da C₄ a C₂₄ (1000 µg mL⁻¹ ciascuno in esano). Sono stati inoltre impiegati *n*-eptano, metanolo, acido acetico (*reagent grade*), idrossido di potassio (KOH), acetonitrile, metanolo, 2-propanolo (*LC-MS grade*) e *n*-esano (*HPLC grade*).

6.2.2 *Preparazione dei campioni*

In questo studio di ricerca sono state analizzate tre varietà di frutti di *Opuntia*: OFI dallo Yemen, OD dallo Yemen, e infine OFI dall'Italia (Sicilia). I semi sono stati separati dai frutti, asciugati naturalmente a temperatura ambiente, confezionati in sacchetti di plastica e conservati a 4 °C prima delle analisi. I semi essiccati sono stati macinati con un mulino a martelli (Mill-LM3100, Perten Instruments, Svezia). La polvere ottenuta ha mostrato una distribuzione granulometrica con un diametro compreso tra 250 e 100 µm, determinato con un setaccio orbitale (Retsch GmbH, Verder Scientific, Haan, Germania).

6.2.3 *Estrazione dell'olio con fluidi supercritici (SFE)*

L'estrazione con fluidi supercritici è stata effettuata utilizzando un sistema pilota semi-batch (Superfluidi s.r.l., Padova, Italia), come descritto in precedenza [21], con alcune modifiche. Per ciascuna estrazione, il cestello è stato riempito con circa 100 g di semi macinati. I parametri operativi erano i seguenti: pressione di 300 bar,

flusso di CO₂ di 1 L h⁻¹, e temperature di 40 °C e 60 °C. La selezione dei parametri è stata basata su esperienze precedenti di SFE su altri semi [22-23]. La pressione è stata impostata al livello massimo consentito dal sistema. Sono state testate due temperature per valutare il loro effetto sulla resa. Durante ogni estrazione, l'olio veniva raccolto ogni 10 minuti dal separatore mentre la CO₂ veniva rilasciata. Il tempo totale di estrazione è stato di 2 ore e 30 min.

6.2.4 Estrazione dell'olio tramite tecnica Soxhlet

Per l'estrazione *Soxhlet* è stato utilizzato *n*-esano per recuperare gli oli dai semi polverizzati. In ciascun ciclo di estrazione sono stati posti 20 g di semi di OFI o OD macinati in un filtro con l'aggiunta di 150 mL di *n*-esano. L'estrazione è durata 4 ore. Successivamente, il solvente è stato evaporato dall'olio utilizzando un evaporatore rotante (LABOROTA 4000, Heidolph, Schwabach, Germania). La resa dell'olio è stata calcolata in base al peso secco come rapporto tra la quantità di olio estratto e la quantità di semi macinati utilizzati per l'estrazione:

$$\text{Resa \%} = 100 \times \frac{\text{Peso olio estratto}}{\text{Peso iniziale semi}}$$

6.2.5 Analisi GC-MS e GC-FID degli acidi grassi

I lipidi contenuti nell'olio dei semi erano convertiti in derivati FAMES, analizzabili per via gascromatografica mediante una reazione di transesterificazione a freddo, come descritto da Ciriminna et al. [23]. In breve, 50 mg di olio di semi di *Opuntia* sono stati solubilizzati in 1 mL di *n*-eptano e aggiunti di 0,1 mL di una soluzione 2N di idrossido di potassio (KOH) in metanolo. La miscela è stata agitata per 5 min a temperatura ambiente. La fase superiore di eptano, contenente i derivati

FAMEs è stata trasferita in una vial da autocampionatore e analizzata tramite tecniche GC-MS e GC-FID.

Le analisi GC-MS sono state eseguite utilizzando un gascromatografo GC-2010 (Shimadzu, Duisburg, Germania) accoppiato a uno spettrometro di massa a singolo quadrupolo (QP2020, Shimadzu). La separazione degli analiti è stata effettuata utilizzando una colonna capillare SLB-IL60 ($30\text{ m} \times 0.25\text{ mm ID} \times 0.20\text{ }\mu\text{m } d_f$, Merck Life Science) con un programma di temperatura che variava da $50\text{ }^\circ\text{C}$ a $280\text{ }^\circ\text{C}$ a $3\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$. L'elio è stato utilizzato come gas carrier ad una velocità costante di 30 cm s^{-1} e una pressione iniziale di $26,6\text{ kPa}$. Il volume di iniezione, la temperatura dell'iniettore e il rapporto di split erano rispettivamente $0,2\text{ }\mu\text{L}$, $280\text{ }^\circ\text{C}$ e $1:100$. Il rilevatore MS è stato utilizzato in modalità *full scan* (range di massa: $40\text{--}550\text{ } m/z$). Le temperature dell'interfaccia e della sorgente di ioni erano rispettivamente $250\text{ }^\circ\text{C}$ e $220\text{ }^\circ\text{C}$. I dati sono stati raccolti e gestiti con il software GC-MS solution (versione 4.50, Shimadzu). Per l'identificazione dei derivati FAMEs è stato impiegato un database commerciale di spettri MS, LIPIDS ver. 1.0 (Shimadzu). In aggiunta, la libreria di spettri di massa era corredata di indici di ritenzione lineare (LRI) utili per l'identificazione univoca delle specie in esame.

Le analisi GC-FID sono state condotte utilizzando uno gascromatografo GC-2010 (Shimadzu) dotato di un rilevatore a ionizzazione di fiamma (FID). La colonna GC, il programma di temperatura, il gas di trasporto, la velocità lineare e le condizioni di iniezione erano le stesse descritte per l'analisi GC-MS. La pressione iniziale era di $99,4\text{ kPa}$. La temperatura del FID è stata impostata a $280\text{ }^\circ\text{C}$. I flussi dei gas del FID erano: 40 mL min^{-1} per H_2 , 30 mL min^{-1} per il *make-up* gas (N_2) e 400 mL min^{-1} per l'aria. I dati sono stati raccolti e elaborati con il software

LabSolution (versione 5.92, Shimadzu, Duisburg, Germania). Tutti i campioni sono stati analizzati in triplicato.

6.2.6 Determinazione della composizione dei trigliceridi tramite analisi HPLC-MS

Per l'analisi HPLC-MS, sono stati aggiunti 10 mg di C11C11C11 come standard interno (IS) a 20 mg di olio, e la miscela è stata disciolta in 2-propanolo fino a un volume finale di 1 mL. Il cromatografo liquido impiegato consisteva in un sistema Nexera UHPLC collegato a uno spettrometro LCMS-2020 con sorgente APCI (Shimadzu, Duisburg, Germania). Le separazioni sono state eseguite su una colonna Ascentis Express C18 da 10 cm × 2,1 mm con particelle di diametro pari a 2,7 μm (Merck Life Science, Darmstadt, Germania). Le fasi mobili utilizzate erano l'acetonitrile (A) e 2-propanolo (B), e il programma di gradiente lineare era il seguente: 0-52 minuti, 0-70% B, mantenuto per 3 min. La velocità di flusso era di 0,5 mL min⁻¹, la temperatura del forno era impostata a 35 °C e il volume di iniezione era di 5 μL. I parametri MS utilizzati con la sorgente APCI in modalità di ionizzazione positiva (+) erano i seguenti: temperature dell'interfaccia, della linea di desolvatazione e del blocco riscaldato impostate rispettivamente a 450 °C, 250 °C e 300 °C; il flusso del gas nebulizzante e del gas di essiccazione (N₂) era di 1,5 L min⁻¹ e 5 L min⁻¹, rispettivamente; il range di acquisizione MS era tra 250 e 1200 *m/z*. I dati sono stati acquisiti utilizzando il software LabSolution versione 5.95 (Shimadzu, Duisburg, Germania) e elaborati tramite il software ChromLinear. A scopo qualitativo, una miscela di riferimento di TAGs con numero dispari di atomi di carbonio, da C9C9C9 a C19C19C19, è stata iniettata all'inizio e alla fine del lotto analitico per calcolare automaticamente gli LRI per tutti i picchi del campione. Il software ChromLinear ha permesso di abbinare gli LRI calcolati e gli spettri di

massa acquisiti per i singoli TAGs con il database LRI e la libreria spettrale MS, utilizzando una strategia di identificazione rapida a doppio filtro, simile a quella delle analisi GC-MS. A fini quantitativi, le aree dei picchi normalizzate (rapporto tra l'area del picco dell'analita e quella dello standard interno) sono state utilizzate per la quantificazione relativa, considerando una risposta MS piuttosto simile per tutti i TAGs identificati.

6.2.7 Analisi Statistica

Tutti i parametri relativi agli acidi grassi e ai trigliceridi sono stati analizzati statisticamente per rilevare differenze significative ($\alpha = 0,001$) tra i campioni mediante un'ANOVA a una via, utilizzando il software XLSTAT. Quando appropriato, è stato applicato il test post-hoc HSD di Tukey per individuare quali gruppi differivano significativamente tra loro. Il numero di esperimenti indipendenti, i dettagli sulle comparazioni statistiche e i livelli di significatività sono indicati nelle didascalie delle rispettive figure e tabelle.

6.3 Risultati e Discussioni

6.3.1 Resa dell'olio dei semi di *Opuntia*

La resa degli oli estratti dai semi delle tre varietà di OFI e OD dipendeva fortemente dal metodo di estrazione, dalla temperatura applicata durante il processo SFE e dalla varietà dei semi. I risultati hanno mostrato che le rese più alte sono state ottenute tramite l'estrazione *Soxhlet*: $12 \pm 1,35$ % per OFI dallo Yemen, $10 \pm 0,89$ % per OD dallo Yemen e $11,8 \pm 1,34$ % per OFI dalla Sicilia, rispetto al $6,2 \pm 1,27$ % e $8,3 \pm 1,34$ % per OFI dallo Yemen, $5,7 \pm 0,96$ % e $7,4 \pm 1,21$ % per OD dallo Yemen e $6,3 \pm 0,76$ % e $7,7 \pm 1,31$ % per OFI dalla Sicilia tramite estrazione SFE a 40 °C e 60 °C, rispettivamente. Per il metodo SFE, con pressione fissa e temperature

variabili, la resa di estrazione è aumentata da $6,2 \pm 1,27$ % a $8,3 \pm 1,34$ % per OFI dallo Yemen aumentando la temperatura da 40 °C a 60 °C. In particolare, il campione OFI proveniente dallo Yemen ha mostrato la resa più elevata quando estratto sia con *Soxhlet* sia con SFE a 60 °C. Inoltre, per tutti i campioni, la resa è aumentata significativamente con l'aumento della temperatura SFE da 40 °C a 60 °C. La scelta dei parametri del processo per l'SFE si è basata su precedenti esperienze di estrazione con altri semi [21, 24]. Questi risultati erano in linea con altri studi che utilizzavano il sistema SFE a pressione fissa e temperature variabili su semi di *Nigella sativa* [24-25] e di *Swietenia mahagoni* [26]. I dati sull'estrazione con SFE di olio di semi di OFI erano limitati in letteratura [15, 22]. In uno studio sull'olio di OFI tunisino, utilizzando una pressione di 180 bar, una temperatura 40 °C e un tempo di estrazione di 135 minuti con un flusso di CO₂ di 15 mL s⁻¹, è stata riportata una resa del 3,4 % per la varietà spinosa e dell'1,94 % per quella senza spine [22]. Entrambi i risultati erano inferiori rispetto a quelli ottenuti nel presente studio alla stessa temperatura (40 °C). Una possibile spiegazione potrebbe risiedere nella differenza di pressione (180 bar contro 300 bar) o nella variabilità dei campioni. L'estrazione SFE dell'olio dai semi di OD è stata riportata solo da Liu et al. [9]; quest'ultimi hanno dimostrato che sia la temperatura che la pressione influenzavano la resa di estrazione. La resa aumentava fino a raggiungere un valore massimo intorno a 45 °C, per poi diminuire a temperature superiori, mentre aumentava in modo più lineare con l'aumento della pressione. Hanno ottenuto una resa massima del 6,65 %, nonostante l'uso di pressioni più elevate rispetto a quelle del presente studio. Diversi fattori sono stati segnalati come influenti sulla resa dell'olio, tra cui metodi di estrazione, origine geografica, periodo di raccolta dei campioni, maturazione del frutto e tipo di solvente [6, 22].

In questo studio, la resa dell'olio ottenuta con SFE è risultata inferiore rispetto a quella ottenuta con *Soxhlet*, a causa della polarità della CO₂, che è un solvente più adatto per il recupero dei lipidi non polari. D'altra parte, l'esano ha mostrato una maggiore capacità estrattiva, recuperando anche altri lipidi e composti polari oltre ai lipidi non polari. I risultati di questo studio sono coerenti con le precedenti ricerche. In questo contesto, SFE è stato applicato all'OFI da due varietà tunisine, quella spinosa (selvatica) e quella senza spine (coltivata). La resa risultante era significativamente più alta (10,32 % per la selvatica e 8,91 % per la coltivata) per *Soxhlet* rispetto a SFE (3,4 % per la spinosa e 1,94 % per la senza spine) [27]. Un altro studio riportava una resa del 6,5 % per l'estrazione di OFI con SFE [26–30].

6.3.2 Composizione degli acidi grassi

La composizione degli acidi grassi degli oli dei semi di OFI (*Opuntia ficus-indica* dallo Yemen e dalla Sicilia) e di OD (*Opuntia dillenii* dallo Yemen), estratti mediante SFE a 40 °C e 60 °C e mediante *Soxhlet*, è riportata nella Tabella 6.1. Il profilo cromatografico tipico ottenuto tramite GC-MS è rappresentato nella Figura 6.2. È stato riportato un solo cromatogramma poiché non sono state osservate differenze qualitative tra i campioni analizzati. I risultati hanno indicato che gli oli dei semi di *Opuntia* OFI e OD sono caratterizzati da un alto livello di acidi grassi insaturi (circa 83 %). La componente principale è il C18:2 ω 6, che rappresenta oltre il 62% di tutti i campioni. Nel presente studio, il contenuto di C18:1 ω 9 variava da un minimo del 9,88 % in OFI dalla Sicilia estratto tramite SFE a 60°C, fino a un massimo del 13,97% in OFI dallo Yemen estratto con *Soxhlet*, seguito dal campione OFI dallo Yemen estratto con SFE a 60 °C e dal campione proveniente dalla Sicilia estratto con SFE a entrambe le temperature testate. Questi risultati indicano

chiaramente che la composizione degli acidi grassi degli oli dei semi di *Opuntia spp.*, sia di OFI che di OD, non è particolarmente influenzata dal metodo di estrazione, ma piuttosto dalla specie botanica dei semi esaminati.

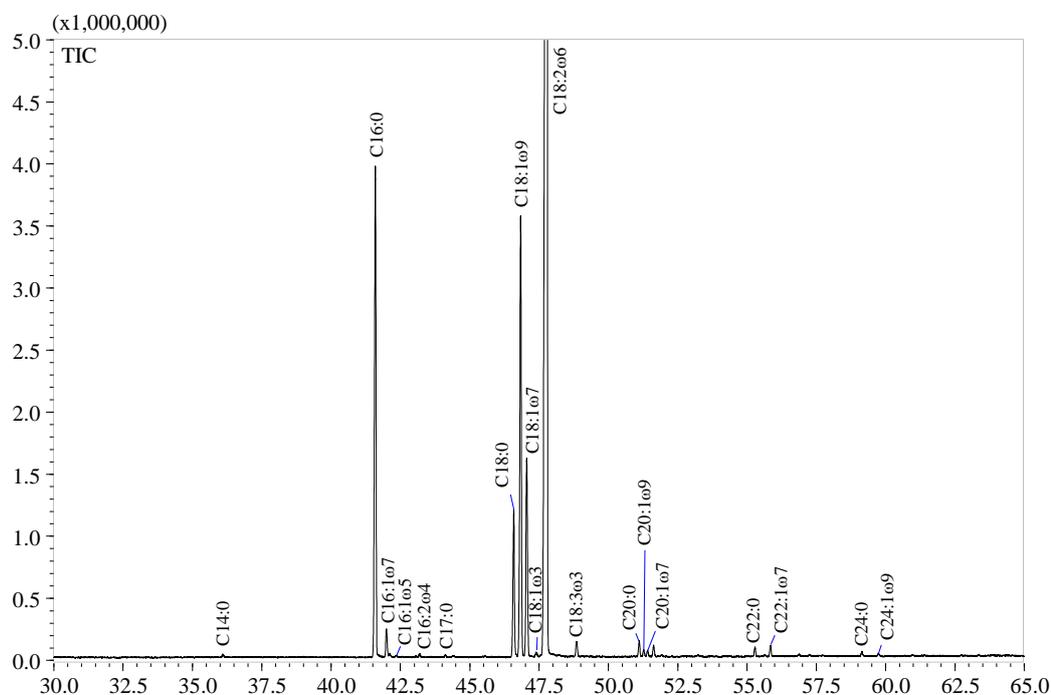


Figura 6.2 Cromatogramma GC-MS degli acidi grassi nell'olio OFI dallo Yemen. Riprodotto con il consenso di MDPI.

Gli acidi grassi saturi principalmente presenti nei tre campioni erano l'acido C16:0, che variava da un minimo dell'11,8 % in OFI dalla Sicilia e OFI dallo Yemen ottenuto con *Soxhlet* e SFE a temperature più basse, rispettivamente, fino a un massimo del 12,5-12,6 % nel campione dalla Sicilia e Yemen (entrambi dai semi di OFI) ottenuti con SFE a 40 °C e 60 °C. Per quanto riguarda gli acidi grassi minori, l'acido C18:3ω3 è stato quantificato in una quantità maggiore negli estratti SFE dei semi provenienti dallo Yemen. Questo evidenzia una buona capacità della CO₂ di estrarre acidi grassi più polari, anche se presenti a livelli inferiori. In generale, il profilo qualitativo e quantitativo degli acidi grassi degli oli di semi di OFI e OD determinato in questo studio è coerente con la letteratura precedente [3, 29-29], che

ha riportato l'acido linoleico come il composto più abbondante in una percentuale variabile tra il 57,54 % e il 66,57 %, seguito dall'acido oleico in un range compreso tra il 15,2 % e il 24,3%, rappresentando così quasi l'80% del totale degli acidi grassi e contribuendo a un rapporto favorevole tra acidi grassi insaturi e saturi (UFA/SFA) superiore a quattro.

Tabella 6.1. Composizione in acidi grassi degli oli dei semi OFI dallo Yemen e dalla Sicilia, e OD dallo Yemen estratti utilizzando i metodi SFE e Soxhlet. I valori quantitativi sono espressi in termini percentuali (Area %).

Acidi grassi	OFI Yemen			OD Yemen			OFI Sicilia		
	SFE 40 °C	SFE 60 °C	Soxhlet	SFE 40 °C	SFE 60 °C	Soxhlet	SFE 40 °C	SFE 60 °C	Soxhlet
C14:0	0.08 ± 0.00 b	0.09 ± 0.00 ab	0.09 ± 0.01 ab	0.09 ± 0.01 a	0.09 ± 0.01 a	0.09 ± 0.01 ab	0.09 ± 0.01 a	0.09 ± 0.01 a	0.09 ± 0.01 ab
C16:0	11.81 ± 0.01 d	12.62 ± 0.10 a	12.35 ± 0.01 b	11.97 ± 0.01 c	12.06 ± 0.01 c	11.76 ± 0.01 d	12.52 ± 0.02 a	12.39 ± 0.02 b	11.86 ± 0.01 d
C16:1 ω 7	0.67 ± 0.01 e	0.74 ± 0.00 a	0.74 ± 0.01 a	0.7 ± 0.01 bcd	0.72 ± 0.01 ab	0.69 ± 0.01 cde	0.71 ± 0.01 abc	0.68 ± 0.01 de	0.7 ± 0.01 bcd
C16:1 ω 5	0.05 ± 0.01 c	0.07 ± 0.01 b	0.08 ± 0.01 ab	0.04 ± 0.01 cd	0.03 ± 0.01 e	0.03 ± 0.01 de	0.08 ± 0.01 ab	0.09 ± 0.01 a	0.04 ± 0.01 cde
C16:2 ω 4	0.08 ± 0.01 c	0.07 ± 0.01 e	0.07 ± 0.01 cde	0.11 ± 0.01 b	0.13 ± 0.01 a	0.13 ± 0.01 a	0.08 ± 0.01 cd	0.07 ± 0.00 de	0.11 ± 0.01 b
C17:0	0.04 ± 0.01 bc	0.04 ± 0.01 c	0.04 ± 0.01 bc	0.05 ± 0.01 abc	0.05 ± 0.01 a	0.05 ± 0.01 a	0.05 ± 0.01 ab	0.04 ± 0.01 c	0.05 ± 0.02 ab
C18:0	3.1 ± 0.01 e	2.69 ± 0.01 h	2.7 ± 0.01 h	3.43 ± 0.01 d	3.88 ± 0.01 b	3.91 ± 0.01 a	2.75 ± 0.01 g	2.92 ± 0.01 f	3.69 ± 0.01 c
C18:1 ω 9	11.7 ± 0.01 d	13.8 ± 0.01 b	13.97 ± 0.01 a	11.22 ± 0.01 e	9.88 ± 0.01 h	10.02 ± 0.01 g	13.65 ± 0.01 c	13.82 ± 0.01 b	10.76 ± 0.01 f
C18:1 ω 7	4.82 ± 0.01 f	5.41 ± 0.01 b	5.49 ± 0.01 a	4.82 ± 0.02 f	4.65 ± 0.01 g	4.83 ± 0.01 f	5.16 ± 0.01 d	5.2 ± 0.01 c	4.97 ± 0.01 e
C18:1 ω 3	0.11 ± 0.01 b	0.16 ± 0.01 a	0.19 ± 0.01 a	0.1 ± 0.01 bc	0.06 ± 0.01 c	0.08 ± 0.01 bc	0.2 ± 0.01 a	0.19 ± 0.02 a	0.1 ± 0.01 bc
C18:2 ω 6	66.09 ± 0.01 b	62.78 ± 0.04 e	62.7 ± 0.03 e	65.79 ± 0.02 c	66.59 ± 0.01 a	66.52 ± 0.02 a	63.12 ± 0.03 d	62.77 ± 0.03 e	65.83 ± 0.02 c
C18:3 ω 3	0.23 ± 0.01 e	0.37 ± 0.01 b	0.28 ± 0.01 d	0.42 ± 0.01 a	0.42 ± 0.01 a	0.34 ± 0.00 c	0.39 ± 0.01 b	0.34 ± 0.01 c	0.32 ± 0.01 c
C20:0	0.33 ± 0.01 d	0.27 ± 0.01 f	0.3 ± 0.01 e	0.34 ± 0.01 c	0.4 ± 0.01 ab	0.41 ± 0.01 a	0.29 ± 0.01 e	0.34 ± 0.02 cd	0.38 ± 0.02 b
C20:1 ω 9	0.16 ± 0.01 b	0.15 ± 0.01 b	0.16 ± 0.01 b	0.16 ± 0.01 b	0.19 ± 0.01 a	0.21 ± 0.01 a	0.14 ± 0.01 b	0.14 ± 0.01 b	0.2 ± 0.01 a
C20:1 ω 7	0.13 ± 0.01 d	0.17 ± 0.01 bc	0.18 ± 0.01 ab	0.14 ± 0.01 cd	0.12 ± 0.01 d	0.13 ± 0.01 d	0.17 ± 0.01 ab	0.19 ± 0.01 a	0.14 ± 0.01 d
C22:0	0.22 ± 0.01 cd	0.16 ± 0.01 g	0.19 ± 0.01 ef	0.2 ± 0.01 de	0.27 ± 0.01 b	0.29 ± 0.01 a	0.18 ± 0.01 f	0.22 ± 0.01 c	0.27 ± 0.01 b
C22:1 ω 7	0.25 ± 0.01 de	0.23 ± 0.01 e	0.27 ± 0.01 c	0.25 ± 0.01 d	0.27 ± 0.01 bc	0.3 ± 0.01 a	0.25 ± 0.01 d	0.29 ± 0.01 ab	0.29 ± 0.02 a
C24:1 ω 9	0.06 ± 0.01 bc	0.07 ± 0.01 ab	0.06 ± 0.01 ab	0.05 ± 0.01 c	0.06 ± 0.01 bc	0.06 ± 0.01 ab	0.06 ± 0.01 bc	0.07 ± 0.02 a	0.06 ± 0.01 ab
SFA	15.67 ± 0.38 f	15.97 ± 0.29 d	15.8 ± 0.22 e	16.15 ± 0.42 c	16.87 ± 0.11 a	16.66 ± 0.21 b	15.99 ± 0.11 d	16.15 ± 0.22 c	12.79 ± 0.11 g

MUFA	17.93 ± 0.97 d	20.74 ± 0.95 b	21.14 ± 0.83 a	17.49 ± 0.64 e	16.00 ± 0.62 h	16.32 ± 0.71 g	20.42 ± 0.82 c	20.67 ± 0.72 b	17.26 ± 0.82 f
PUFA	66.4 ± 0.91 c	63.22 ± 0.94 f	63.06 ± 0.93 g	66.32 ± 0.93 cd	67.13 ± 0.91 a	66.99 ± 0.81 b	63.59 ± 0.83 e	63.18 ± 0.73 f	66.26 ± 0.82 d
PUFA/SFA	4.24 ± 0.02b	3.96 ± 0.02 f	3.99 ± 0.01 e	4.11 ± 0.02 c	3.98 ± 0.01 ef	4.02 ± 0.01 d	3.98 ± 0.01 ef	3.91 ± 0.01 g	5.18 ± 0.04 a

I valori sono presentati come medie ± DS (n = 3). Lettere diverse all'interno di una riga indicano differenze significative, a–h con p <0,01.

libreria spettrale MS creata internamente, ha permesso l'identificazione affidabile di 30 TAGs, molti dei quali identificati per la prima volta negli oli dei semi di *Opuntia spp.* I risultati dell'ANOVA riportati nella Tabella 6.2 mostrano differenze quantitative significative per i digliceridi (DAG) e i TAG contenenti acido linolenico (Ln) ($p < 0,01$), oltre a differenze significative osservate per alcuni TAGs contenenti acido linoleico (L), come trilinoleina (LLL), oleil-dilinoleina (OLL) e dioleil-linoleina (OOL), quest'ultima coeluita parzialmente con gondoil-dilinoleina (GLL). In particolare, i DAG sono stati rilevati in percentuale significativamente più alta nel campione OD estratto mediante SFE a 60 °C, mentre i TAGs contenenti Ln sono stati quantificati a livelli più elevati nel campione siciliano ottenuto tramite SFE a 60 °C. Questi risultati sembrano contrastare con i dati del GC riguardanti la composizione degli acidi grassi, che hanno riportato il contenuto più elevato di Ln nel campione OD estratto con SFE. Tuttavia, l'analisi GC fornisce risultati sulla composizione totale degli acidi grassi, inclusi gli acidi grassi liberi e i monoacilgliceroli, non rilevati tramite il metodo HPLC utilizzato. Si può dunque supporre che sia OD sia OFI della Sicilia contengano una quantità soddisfacente di Ln, estratto in quantità maggiori tramite SFE rispetto a *Soxhlet*, indipendentemente dalla forma nativa in cui era presente nei semi (TAG, acidi grassi liberi o MAG). In generale, il profilo quali-quantitativo dei TAG degli oli dei semi analizzati in questo studio è simile alla composizione precedentemente riportata per l'olio dei semi di OFI proveniente dalla Tunisia ed estratto con *Soxhlet* usando esano, con LLL e OLL come principali componenti, con percentuali medie del 25,6 % e del 21,5 % rispettivamente [30]. Le analisi di questo studio hanno mostrato un contenuto di LLL più elevato, vicino o superiore al 30 % in tutti i campioni, mentre OLL è stato contenuto in percentuali più basse, talvolta inferiori al 20 %. Tale

differenza nella composizione dei TAGs riflette il contenuto inferiore di acido oleico riscontrato nelle analisi GC. D'altra parte, è stato ottenuto un contenuto più elevato di dilinoleil-palmitina (LLP), paragonabile a quello di OLL (17,62-19,01 %). Inoltre, sono stati identificati diversi TAG contenenti Ln, con percentuali attorno allo 0,5 %, insieme ad altri TAGs minori non presenti nel lavoro di Mannoubi et al., [30] che aveva riportato un contenuto notevolmente più elevato di un altro TAG contenente acido oleico, ossia OOL (11,40 % contro il 3,94-6,62 % di questo studio).

Tabella 6.2. Composizione TAG e DAG degli oli dei semi OFI provenienti dallo Yemen e Sicilia e OD dallo Yemen estratti utilizzando SFE e Soxhlet. I valori quantitativi sono espressi in termini %.

Composti	OFI Yemen			YV2			I/S		
	SFE 40 °C	SFE 60 °C	Soxhlet	SFE 40 °C	SFE 60 °C	Soxhlet	SFE 40 °C	SFE 60 °C	Soxhlet
LL	1.44 ± 0.20 c	1.30 ± 0.10 c	1.03 ± 0.47 c	2.99 ± 0.14 b	3.62 ± 0.25 a	2.70 ± 0.20 b	1.03 ± 0.12 c	0.95 ± 0.15 c	2.51 ± 0.12 b
OL+LP	1.18 ± 0.10 c	1.02 ± 0.10 cd	0.89 ± 0.40 cd	1.91 ± 0.16 ab	2.21 ± 0.12 a	1.66 ± 0.07 b	0.74 ± 0.12 d	0.88 ± 0.06 cd	1.60 ± 0.16 b
LnLnLn	0.10 ± 0.02 b	0.14 ± 0.02 b	0.10 ± 0.04 b	0.56 ± 0.24 b	0.27 ± 0.04 b	0.25 ± 0.03 b	0.51 ± 0.08 b	1.23 ± 0.19 a	0.45 ± 0.07 b
LLnLn	0.49 ± 0.07 e	0.51 ± 0.12 de	0.25 ± 0.07 e	1.60 ± 0.32 ab	1.02 ± 0.11 cd	0.60 ± 0.06 de	1.33 ± 0.16 bc	2.07 ± 0.19 a	0.41 ± 0.03 e
LnLnP	0.18 ± 0.03 bcd	0.15 ± 0.02 cd	0.14 ± 0.05 d	0.40 ± 0.34 ab	0.36 ± 0.07 abc	0.44 ± 0.09 a	0.30 ± 0.06 abcd	0.42 ± 0.04 a	0.34 ± 0.08 abc
OLnLn	0.57 ± 0.10 c	0.61 ± 0.04 c	0.62 ± 0.02 c	1.02 ± 0.09 b	0.69 ± 0.04 c	0.60 ± 0.02 c	1.04 ± 0.09 b	1.33 ± 0.04 a	0.56 ± 0.07 c
LLL	34.08 ± 0.41a bcd	31.99 ± 0.68 bcd	31.63 ± 0.98 cd	32.72 ± 1.10 abcd	34.34 ± 0.70 abc	35.24 ± 0.56 a	31.08 ± 0.61 de	29.44 ± 0.92 e	35.00 ± 1.56 abc
LnPPo+OL Ln	0.38 ± 0.07 c	0.28 ± 0.10 c	0.46 ± 0.14b c	0.31 ± 0.01 c	0.49 ± 0.03 cb	0.78 ± 0.07 ab	0.46 ± 0.18 bc	0.88 ± 0.06 a	0.52 ± 0.08 abc
OLL	19.36 ± 0.54 bcd	21.28 ± 0.10 ab	22.10 ± 0.88 a	18.20 ± 0.19 cde	16.57 ± 0.99 e	17.49 ± 0.38 de	21.17 ± 0.15 ab	19.82 ± 0.26 bc	18.47 ± 0.34 cde
LLP	18.80 ± 0.57	18.70 ± 0.23	17.80 ± 1.08	18.25 ± 0.46	18.77 ± 0.08	18.45 ± 1.02	19.01 ± 1.31	18.22 ± 1.11	17.62 ± 0.57
OOL+GLL	5.29 ± 0.20 bc	6.19 ± 0.10 a	6.62 ± 0.32 a	4.63 ± 0.12 cd	3.94 ± 0.17 d	4.19 ± 0.06 d	6.05 ± 0.17 ab	6.05 ± 0.30 ab	4.51 ± 0.29 cd
SLL+OLP	10.18 ± 0.12	9.44 ± 0.20	9.84 ± 0.35	9.46 ± 0.42	9.59 ± 0.60	10.10 ± 0.34	9.35 ± 0.26	9.85 ± 0.74	9.70 ± 0.25
LPP	1.49 ± 0.11	1.67 ± 0.09	1.67 ± 0.19	1.46 ± 0.12	1.37 ± 0.10	1.30 ± 0.12	1.59 ± 0.31	1.75 ± 0.23	1.17 ± 0.14
GOL+C22:1 LL	0.57 ± 0.07	0.57 ± 0.01	0.67 ± 0.089	0.68 ± 0.13	0.49 ± 0.05	0.66 ± 0.11	0.58 ± 0.08	0.71 ± 0.07	0.71 ± 0.17
SOL+OOP	3.45 ± 0.23 ab	3.71 ± 0.11 a	3.61 ± 0.23 a	2.89 ± 0.15 b	2.89 ± 0.23 b	3.06 ± 0.22 ab	3.38 ± 0.27 ab	3.52 ± 0.18 ab	2.91 ± 0.04 b
SLP	1.04 ± 0.08	1.15 ± 0.14	1.14 ± 0.21	1.25 ± 0.15	1.24 ± 0.19	1.11 ± 0.16	1.00 ± 0.07	1.377 ± 0.16	0.97 ± 0.11
C22:1OL+C 24:1LL	0.29 ± 0.02	0.25 ± 0.06	0.21 ± 0.04	0.33 ± 0.03	0.17 ± 0.01	0.25 ± 0.09	0.29 ± 0.13	0.31 ± 0.01	0.17 ± 0.02

C22:1LP	0.13 ± 0.40 ab	0.12 ± 0.01 ab	0.11 ± 0.10 ab	0.06 ± 0.01 b	0.11 ± 0.02 ab	0.17 ± 0.01 a	0.14 ± 0.04 ab	0.15 ± 0.05 ab	0.21 ± 0.02
AOL+BLL	0.60 ± 0.30	0.55 ± 0.16	0.53 ± 0.05	0.63 ± 0.10	0.79 ± 0.23	0.69 ± 0.11	0.60 ± 0.15	0.69 ± 0.19	0.63 ± 0.07
SOO+C20:1 OP+SSL	0.40 ± 0.30	0.37 ± 0.05	0.32 ± 0.045	0.44 ± 0.14	0.40 ± 0.16	0.43 ± 0.09	0.37 ± 0.02	0.39 ± 0.03	0.45 ± 0.13

I valori medi con lettere diverse sono significativamente differenti, da a a-e con $p < 0,01$. Legenda degli acidi grassi: L = acido linoleico C18:2n6; O = acido oleico C18:1n9; P = acido palmitico C16:0; Ln = acido α -linolenico C18:3n3; Po = acido palmitoleico C16:1n7; S = acido stearico C18:0; A = acido arachico C20:0; B = acido beenico C22:0.

6.4 Conclusioni

Sono state applicate le estrazioni SFE e *Soxhlet* per il recupero degli oli dai semi di OFI e OD. L'estrazione *Soxhlet* ha fornito rese di olio superiori rispetto alla SFE. Sono stati analizzati i profili degli acidi grassi. L'acido linoleico è risultato il composto principale, seguito da acido oleico e acido palmitico per entrambi i metodi di estrazione SFE e *Soxhlet*. La SFE ha permesso una migliore estrazione dell'acido α -linolenico rispetto all'estrazione *Soxhlet*. Sono stati identificati per la prima volta 30 TAGs in entrambi gli oli dei semi di OFI e OD. I principali componenti dei TAG erano gli stessi per l'estrazione SFE e *Soxhlet*. LLL era il TAG principale, seguito da OLL e SLL+OLP. I migliori risultati per gli oli estratti da OFI e OD con SFE sono stati ottenuti a 60 °C, che ha fornito una resa di olio maggiore, contenuti di acido linolenico superiori rispetto agli oli estratti a 40 °C. I risultati evidenziano chiaramente che è ancora necessaria un'analisi approfondita per l'ottimizzazione delle condizioni del processo SFE al fine di ottenere oli con una maggiore resa, profilo lipidici ad elevato contenuto di acidi grassi insature. Ciò permetterebbe l'applicazione della SFE come tecnologia di estrazione sostenibile per ottenere oli utili nella formulazione di alimenti funzionali o prodotti nutraceutici.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Guerrero, P.C.; Majure, L.C.; Cornejo-Romero, A.; Hernández-Hernández, T. Phylogenetic Relationships and Evolutionary Trends in the Cactus Family. *J. Hered.* 2019, 110, 4–21.
- [2] Sharma, C.; Rani, S.; Kumar, B.; Kumar, A.; Raj, V.V.; Vihar, V. Plant *Opuntia dillenii*: A Review on Its Traditional Uses; Phytochemical and Pharmacological Properties. *Pharm. Sci.* 2015, 1, 29–43.
- [3] Al-Naqeb, G.; Fiori, L.; Ciolli, M.; Aprea, E. Prickly Pear Seed Oil Extraction; Chemical Characterization and Potential Health Benefits. *Molecules* 2021, 26, 5018.
- [4] Al-Naqeb, G. Effect of prickly pear cactus seeds oil on the blood glucose level of streptozotocin-induced diabetic rats and its molecular mechanisms. *Int. J. Herb. Med.* 2015, 3, 29–34.
- [5] Taoufik, F.; Zine, S.; El Hadek, M.; Idrissi Hassani, L.M.; Gharby, S.; Harhar, H.; Matthäus, B. Oil content and main constituents of cactus seed oils *Opuntia ficus indica* of different origin in Morocco. *Med. J. Nutr. Metab.* 2015, 8, 85–92.
- [6] Karabagias, V.K.; Karabagias, I.K.; Gatzias, I.; Badeka, A.V. Prickly Pear Seed Oil by Shelf-Grown Cactus Fruits: Waste or Maste? *Processes* 2020, 8, 132.
- [7] Loukili, E.A.; Abridach, F.; Bouhrim, M.; Bnouham, M.; Fauconnier, M.L.; Ramdani, M. Chemical Composition and Physicochemical Analysis of *Opuntia dillenii* Extracts Grown in Morocco. *J. Chem.* 2021, 8858929.
- [8] Ghazi, Z.; Ramdani, M.; Fauconnier, M.L.; El Mahi, B.; Cheikh, R. Fatty Acids Sterols and Vitamin E Composition of Seed Oil of *Opuntia Ficus Indica* and *Opuntia Dillenii* from Morocco. *J. Mater. Environ. Sci.* 2013, 4, 967–972.
- [9] Liu, W.; Fu, Y.; Zu, Y.; Tong, M.; Wu, N.; Liu, X.; Zhang, S. Supercritical carbon dioxide extraction of seed oil from *Opuntia dillenii* Haw. and its antioxidant activity. *Food Chem.* 2009, 114, 334–339.
- [10] Bardaa, S.; Turki, M.; Ben Khedir, S.; Mzid, M.; Rebai, T.; Ayadi, F.; Sahnoun, Z. The Effect of Prickly Pear, Pumpkin, and Linseed Oils on Biological Mediators of Acute Inflammation and Oxidative Stress Markers. *Biomed. Res. Int.* 2020, 2020, 5643465.
- [11] Benattia, F.K.; Arrar, Z.; Khabba, Y. Evaluation the Hypo and Antihyperglycemic Activity of Cactus Seeds Extracts (*Opuntia ficus-indica* L.). *PhytoChem. BioSub. J.* 2017, 11.

- [12] Ramírez-Moreno, E.; Cariño-Cortés, R.; Cruz-Cansino, N.D.; Delgado-Olivares, L.; Ariza-Ortega, J.A.; Montañez-Izquierdo, V.Y.; Hernández-Herrero, M.M.; Filardo-Kerstupp, T. Antioxidant and antimicrobial properties of cactus pear (*Opuntia*) seed oils. *J. Food Qual.* 2017, 2017, 3075907
- [13] Bouhrim, M.; Ouassou, H.; Loukili, E.; Ramdani, M.; Mekhfi, H.; Ziyat, A.; Legssyer, A.; Aziz, M.; Bnouham, M. Antidiabetic Effect of *Opuntia Dillenii* Seed Oil on Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 2019, 9, 381–388.
- [14] Ennouri, M.; Fetoui, H.; Bourret, E.; Zeghal, N.; Guermazi, F.; Attia, H. Evaluation of some biological parameters of *Opuntia ficus indica*. 2. Influence of seed supplemented diet on rats. *Bioresour. Technol.* 2006, 97, 2136–2140.
- [15] Becer, E.; Kabaday, H.; Meriçli, F.; Meriçli, A.H.; Kıvançlı, B.; Vatansever, S. Apoptotic Effects of *Opuntia ficus indica* L. Seed Oils on Colon Adenocarcinoma Cell Lines. *Proceedings* 2018, 2, 1566.
- [16] Gaaffar, I.F.; Zainuddin, N.A.M.; Zainal, S. Comparison of Identified Compounds from Extracted *Pelargonium Radula* Leaves by Supercritical Fluid Extraction and Commercial Geranium Essential Oil IOP Conference Series: Materials Science and Engineering. In *Proceedings of the International Conference on Chemical and Material Engineering (ICCME 2020)*, Semarang, Indonesia, 6–7 October 2020; Volume 1053.
- [17] Sodeifian, G.; Ghorbandoost, S.; Sajadian, S.A.; Saadati Ardestani, N. Extraction of oil from *Pistacia khinjuk* using supercritical carbon dioxide: Experimental and modeling. *J. Supercrit. Fluids.* 2016, 110, 265–274.
- [18] Idris, S.A.; Markom, M.; Abd Rahman, N.; Ali, J.M. Prediction of overall yield of *Gynura procumbens* from ethanol-water + supercritical CO₂ extraction using artificial neural network model. *Case Stud. Therm. Eng.* 2022, 5, 100175.
- [19] Bada, J.C.; León-Camacho, M.; Copovi, P.; Alonso, L. Characterization of apple seed oil with denomination of origin from Asturias, Spain. *G Rasas Aceites* 2014, 65, e027.
- [20] Ferrentino, G.; Ndayishimiye, J.; Haman, N.; Scampicchio, M. Functional activity of oils from brewer's spent grain extracted by supercritical carbon dioxide. *Food Bioproc Tech.* 2019, 12, 789–798.
- [21] Ferrentino, G.; Giampiccolo, S.; Morozova, K.; Haman, N.; Spilimbergo, S.; Scampicchio, M. Supercritical fluid extraction of oils from apple seeds: Process optimization; chemical characterization and comparison with a conventional solvent extraction. *IFSET* 2020, 64, 102428.

- [22] Yeddes, N.; Chérif, J.K.; Jrad, A.; Barth, D.; Trabelsi-Ayadi, M. Supercritical SC-CO₂ and Soxhlet n-Hexane Extract of Tunisian *Opuntia ficus indica* Seeds and Fatty Acids Analysis. *J. Lipids*. 2012, 2012, 914693.
- [23] Ciriminna, R.; Bongiorno, D.; Scurria, A.; Danzi, C.; Timpanaro, G.; Delisi, R.; Avellone, G.; Pagliaro, M. Sicilian *Opuntia ficus-indica* Seed Oil: Fatty Acid Composition and Bio-Economical Aspects. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2017, 120, 1870029.
- [24] Al-Naqeep, G.; Ismail, M.; Allaudin, Z. Regulation of low-density lipoprotein receptor and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene expression by thymoquinone-rich fraction and thymoquinone in HepG2 cells. *Lifestyle Genom.* 2009, 2, 163–172.
- [25] Solati, Z.; Baharin, B.S.; Hossein Bagheri, H. Supercritical carbon dioxide (SC-CO₂) extraction of *Nigella sativa* L. oil using full factorial design. *Ind. Crops. Prod.* 2012, 36, 519–523.
- [26] Hartati, H.; Md Salleh, L.; Aziz, A.; Che Yunus, M.A. The Effect of Supercritical Fluid Extraction Parameters on the *Swietenia Mahagoni* Seed Oil Extraction and its Cytotoxic Properties. *J. Teknol.* 2014, 69, 51–53.
- [27] Dugo, L.; Russo, M.; Cacciola, M.; Mandolino, F.; Salafia, F.; Vilmercati, A.; Fanali, C.; Casale, M.; De Gara, L.; Dugo, P.; et al. Determination of the Phenol and Tocopherol Content in Italian High-Quality Extra-Virgin Olive Oils by Using LC-MS and Multivariate Data Analysis. *Food Anal. Methods* 2020, 13, 1027.
- [28] Touil, A.; Chemkhi, S.; Zagrouba, F. Physico-Chemical Characterization of *Opuntia dillenii* Fruit. *Int. J. of Food Eng.* 2010, 6, 5.
- [29] Kolniak-Ostek, J.; Kita, A.; Miedzianka, J.; Andreu-Coll, L.; Legua, P.; Hernandez, F. Characterization of Bioactive Compounds of *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. Seeds from Spanish Cultivars. *Molecules* 2020, 25, 5734.
- [30] El Mannoubi, I.; Barrek, S.; Skanji Casabianca, H.; Zarrouk, H. Characterization of *Opuntia ficus indica* seed oil from Tunisia. *Chem. Nat. Compd.* 2009, 45, 616.

Capitolo 7

Sviluppo di un metodo GC-MS/MS per l'analisi della vitamina D nel siero.

7.1 Introduzione

Negli ultimi anni, la determinazione dei livelli di vitamina D nel siero umano è diventata una pratica comune nei laboratori di diagnostica clinica grazie al ruolo che la vitamina D svolge nel corpo umano come la mineralizzazione ossea e l'assorbimento del calcio e dei fosfati [1]. Alcuni studi clinici suggeriscono che la carenza di vitamina D possa essere una causa possibile di infezioni persistenti e infiammazioni croniche, con conseguenti manifestazioni patologiche come stanchezza cronica, esaurimento e depressione [2–5]. I rapporti clinici indicano una stretta connessione tra vitamina D e malattie neurodegenerative, tra cui l'Alzheimer [6], la sclerosi laterale amiotrofica (SLA) e il Parkinson [7]. Recentemente, studi di ricerca hanno rivelato che l'assunzione di integratori a base di vitamina D potrebbero ridurre il rischio di infezione da SARS-CoV-2 e prevenire la malattia COVID-19 [8, 9]. Alla luce delle molteplici funzioni biologiche svolte dalla vitamina D nell'organismo umano, l'analisi della vitamina D nel siero umano è aumentata esponenzialmente nell'ultimo decennio [10].

La vitamina D comprende una classe di vitamine liposolubili: la vitamina D₃ (coleciferolo, vit-D₃) è principalmente sintetizzata nella pelle dei mammiferi a partire dal precursore 7-deidrossicolesterolo dopo esposizione ai raggi ultravioletti B (UVB) [10], mentre la vitamina D₂ (ergocalciferolo, vit-D₂) è prodotta a partire dall'ergosterolo in piante, funghi e lieviti dopo esposizione agli UVB [1]. Per svolgere le loro attività biologiche nell'organismo umano, vit-D₃ e vit-D₂ devono essere metabolizzate attraverso due processi di ossidazione distinti. Il primo

avviene nel fegato grazie all'enzima 25-idrossilasi e comporta l'ossidazione dell'atomo di carbonio in posizione 25, con la formazione di due forme mono-ossidate della vitamina D, ovvero 25-idrossivitamina D₃ (25-(OH) vit-D₃) e 25-idrossivitamina D₂ (25-(OH) vit-D₂) (struttura chimica illustrata in Figura 7.1). Tra questi, la 25-(OH) vit-D₃ è il metabolita circolante più abbondante [11] con una emivita relativamente lunga nel sangue di circa 21 giorni [12], pertanto il suo valore varia poco in quel range [13-14].

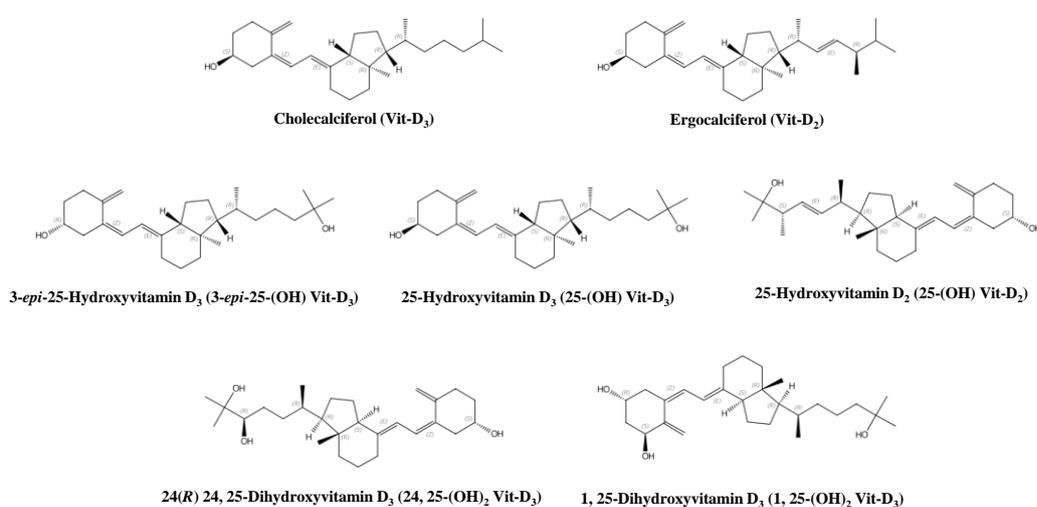


Figura 7.1 Strutture molecolari della vitamina D₃, vitamina D₂ e dei loro metaboliti. Riprodotto con il consenso di Elsevier.

Inoltre, i livelli di 25-(OH) vit-D₂ riportati in letteratura sono generalmente inferiori. Per questo motivo, la 25-(OH) vit-D₃ è utilizzata come biomarcatore per misurare lo stato nutrizionale della vitamina D nei pazienti [11]. De Luca [15] ha riportato una concentrazione di $27,6 \pm 9,2 \text{ ng mL}^{-1}$ per 25-(OH) vit-D₃ nel siero di uomini adulti sani (età 20-40 anni), mentre i livelli di 25-(OH) vit-D₂ erano di $3,9 \pm 3,1 \text{ ng mL}^{-1}$. Il secondo processo di ossidazione avviene nei reni e coinvolge l'azione dell'enzima 1 α -idrossilasi. Questo percorso metabolico introduce un gruppo idrossile (-OH) in posizione C1 del 25-(OH) vit-D₃, portando alla formazione della 1,25-diidrossivitamina D₃ (1,25-(OH)₂ vit-D₃). I suoi livelli sono

1000 volte inferiori a quelli della 25-(OH) vit-D₃ nell'organismo umano [10]. Ad esempio, De Luca [15] ha trovato concentrazioni di 1,25-(OH)₂ vit-D₃ di $34,0 \pm 2,3$ pg mL⁻¹ nel siero di uomini adulti sani (età 20-40 anni). È importante notare che l'emivita ematica della 1,25-(OH)₂ vit-D₃ è estremamente breve, circa 4 ore [10], pertanto la misurazione della vitamina D non include la sua valutazione [12]. Esistono altri percorsi metabolici della vitamina D, con oltre 50 metaboliti diversi riportati in letteratura [16], e quasi tutti utilizzano 25-(OH) vit-D₃ come substrato [15]. Uno dei percorsi metabolici che ha ricevuto grande attenzione è la 24R-idrossilazione, che porta alla formazione della 24(R), 25-diidrossivitamina D₃ (24, 25-(OH)₂ vit-D₃) (vedi Figura 7.1). In condizioni fisiologiche essa circola nel siero a concentrazioni di 1–3 ng mL⁻¹ [17]. Un altro percorso metabolico della vitamina D consiste nell'epimerizzazione C3 della 25-(OH) vit-D₃. Questo percorso genera un gruppo di metaboliti, noti come epimeri della vitamina D, che differiscono dal substrato primario per la configurazione stereochimica del gruppo –OH nella posizione C3 del carbonio. L'epimero C3 del 25-(OH) vit-D₃ (3-*epi*-25-(OH) vit-D₃) (Figura 7.1) è l'epimero circolante più abbondante nel siero umano. Negli adulti, i suoi livelli sono stimati a una concentrazione mediana di 1,72 ng mL⁻¹ (intervallo: 0–9,01 ng mL⁻¹) [18].

Non esistono limiti di riferimento o soglie stabilite dalla comunità scientifica per il livello di vitamina D nei soggetti sani [1]. In effetti, la World Health Organization (WHO) raccomanda livelli sierici di vitamina D > 20 ng mL⁻¹, espressi in termini di 25-(OH) vit-D [19]. Inoltre, la Fondazione Internazionale per l'Osteoporosi (IOF, *International Osteoporosis Foundation*) indica livelli sierici > 30 ng mL⁻¹ per uno stato nutrizionale adeguato [20]. Infine, l'Associazione Medica Mondiale (WMA, *World Medical Association*) definisce il livello normale di vitamina D per gli

individui sani tra 30 e 40 ng mL⁻¹, mentre stabilisce lo stato di carenza e insufficienza rispettivamente a 20 ng mL⁻¹ e 20–30 ng mL⁻¹ [21].

La determinazione dei livelli della vitamina D e dei suoi metaboliti è particolarmente difficile poiché nel siero umano i valori sono estremamente bassi. Numerose tecniche analitiche sono state sviluppate negli anni per il dosaggio della vitamina D, tra cui i saggi immunoenzimatici (ELISA) [22], il *radioimmunoassay* (RIA) [23], i saggi chemiluminescenti [24], la gascromatografia-spettrometria di massa (GC-MS) [25–27], la cromatografia liquida-spettrometria di massa (HPLC-MS) [28] o spettrometria di massa tandem (HPLC-MS/MS) [29-30]. Rispetto ai metodi ELISA, RIA e saggi chemiluminescenti, gli approcci basati sulla cromatografia forniscono misurazioni di più specie di vitamina D in una sola analisi grazie al loro elevato potere risolutivo. L'adeguata specificità di tali tecniche separative consente l'individuazione metabolica delle specie di vitamina D più rilevanti, inclusi metaboliti ed epimeri. I metodi HPLC-MS con ionizzazione chimica a pressione atmosferica (APCI) sono stati sviluppati per la determinazione dei metaboliti della vitamina D nel siero umano. Tuttavia, le interferenze della matrice hanno impedito la quantificazione accurata di alcuni metaboliti della vitamina D [28]. Il metodo HPLC-MS/MS è considerato il “gold standard” comunemente riportato in letteratura per il dosaggio della vitamina D per la sua specificità, sensibilità, accuratezza e ripetibilità [1]. Tra le tecniche GC, la GC-MS è stata ampiamente utilizzata per la separazione e la delucidazione delle strutture molecolari dei composti della vitamina D. Ad esempio, la GC-MS è stata impiegata per confermare l'identità dei metaboliti della vitamina D dopo isolamento tramite HPLC-Prep [31]. Sebbene la tecnica GC-MS sia stata anche utilizzata a fini quantitativi [25–27], non è generalmente la tecnica migliore. In base alle

conoscenze degli autori, esiste un solo riferimento in letteratura riguardo l'uso della GC-MS/MS per la valutazione dei livelli di vitamina D nel siero umano [32]. Questa metodologia ha permesso agli autori di misurare la 25-(OH) vit-D₃, mentre altri metaboliti non sono stati determinati.

Alla luce degli studi finora riportati in letteratura, abbiamo deciso di sviluppare una nuova tecnica analitica GC-MS/MS, rapida ed alternativa a quelle HPLC-MS/MS già esistenti, per l'elucidazione dei composti della vitamina D e dei suoi metaboliti nel siero umano. Particolare attenzione è stata posta all'ottimizzazione delle procedure di preparazione del campione, in particolare nella selezione dell'agente sililante più efficace per la conversione delle specie della vitamina D in derivati trimetilsililici (TMS). Lo spettrometro di massa a triplo quadrupolo (QqQ-MS) è stato utilizzato in modalità di acquisizione *multiple reaction monitoring* (MRM), consentendo di ottenere dati quantitativi altamente sensibili e specifici. Inoltre, sono state applicate condizioni di ionizzazione elettronica (EI) *soft* per i composti target, con l'obiettivo di aumentare l'intensità assoluta dei segnali cromatografici di frammenti diagnostici ad alta massa molecolare, comprendenti lo ione molecolare. L'accuratezza del protocollo ottimizzato è stata poi valutata analizzando un materiale di riferimento standard (SRM) 972a *Vitamin D Metabolites in Frozen Human Serum*, certificato dal *National Institute of Standards and Technology* (NIST) [33]. Infine, sono stati valutati alcuni fattori, come la linearità, i limiti di rilevazione (LoD) e di quantificazione (LoQ).

7.2 *Materiali e metodi*

7.2.1 *Standard e reagenti*

L'accuratezza del metodo analitico sviluppato è stata determinata utilizzando un materiale di riferimento certificato (CRM), ovvero lo standard SRM 972a *Vitamin*

D Metabolites in Frozen Human Serum (Livelli 1-4) (Merck Life Science, Darmstadt, Germania). Tutti i solventi, i reagenti e i materiali standard sono stati acquistati da Merck Life Science. Le soluzioni di vit-D₃ (100 µg mL⁻¹ in etanolo, 97%), vit-D₂ (100 µg mL⁻¹ in etanolo, 98%), 25-(OH) vit-D₃ (100 µg mL⁻¹ in etanolo, 98%), 25-(OH) vit-D₂ (100 µg mL⁻¹ in etanolo, 98%), 3-epi-25-(OH) vit-D₃ (100 µg mL⁻¹ in etanolo, 98%) e 24, 25-(OH)₂ vit-D₃ (100 µg mL⁻¹ in etanolo, 97%) sono state utilizzate per l'ottimizzazione delle transizioni MRM e la costruzione delle curve di calibrazione. Due soluzioni standard con isotopi marcati (Merck Life Science) sono state impiegate come standard interni (ISTD) per scopi quantitativi: soluzioni di vit-D₃ (6,19,19-d₃) (100 µg mL⁻¹ in etanolo) e 25-(OH) vit-D₂ (6,19,19-d₃) (100 µg mL⁻¹ in etanolo). Per ottimizzare la procedura di preparazione del campione, sono stati utilizzati i seguenti agenti di derivatizzazione: *N,O-bis(trimetilsilil)acetamide* (BSA) (per derivatizzazione GC, LiChropur™, ≥ 98,5 %), piridina (anidra, 99,8 %), *N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamide* (BSTFA) con *trimetilclorosilano* (TMCS) (per derivatizzazione GC, contenente 1 % di TMCS, 99 %), *N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamide* (MSTFA) con 1 % di TMCS (per derivatizzazione GC), e reagente TMCS (per derivatizzazione GC, ≥ 99,0 %).

7.2.2 Ottimizzazione delle procedure di sililazione

In questo lavoro di ricerca sono state analizzate diverse procedure di derivatizzazione per valutare la loro efficienza nella conversione delle specie vitaminiche in derivati TMS. Nello specifico, 50 µL di soluzione di 25-(OH) vit-D₂ (100 µg mL⁻¹ in etanolo) sono stati inseriti in una vial in vetro da 1,5 mL; il solvente veniva allontanato utilizzando un evaporatore da banco (Serie EZ 2, Genevac). In

base alle procedure di sililazione descritte in letteratura, sono stati valutati tre differenti protocolli: 100 μL di soluzione BSA/piridina (1:2 v/v) [32], 100 μL di soluzione BSTFA con 10% TMCS (100 μL di reagente TMCS in 1 mL di soluzione BSTFA contenente 1% di TMCS) [25, 34] e 100 μL di soluzione MSTFA con 10% TMCS (100 μL di reagente TMCS in 1 mL di soluzione MSTFA contenente 1% di TMCS) [35]. Tutte le procedure di sililazione sopra descritte comprendevano l'incubazione del campione a 100 °C per 60 min. Successivamente, i derivati TMS della vitamina D erano analizzati tramite analisi GC-QqQ-MS.

7.2.3 Preparazione del campione per l'analisi GC-QqQ-MS

L'estrazione dei composti della vitamina D, inclusi i metaboliti e gli epimeri, dal siero umano è stata eseguita come riportato nel lavoro pubblicato da Yang et al. [32], con alcune modifiche. Nello specifico, 200 μL di siero umano sono stati trasferiti in una provetta da centrifuga da 1,5 mL (Eppendorf). Per quantificare i composti vitaminici target, 10 μL di una soluzione di ISTDs contenente vit-D₃ (6,19,19-d₃) e 25-(OH) vit-D₂ (6,19,19-d₃) (entrambi 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ in etanolo) sono stati aggiunti al campione di siero umano. Successivamente, sono stati aggiunti 200 μL di acetonitrile nella provetta mantenuta a 4 °C per 10 minuti in modo tale da favorire la precipitazione delle proteine. L'estrazione dei metaboliti della vitamina D è stata eseguita aggiungendo 500 μL di *n*-esano alla miscela; il campione è stato agitato con un vortex a 2500 rpm per 5 min e centrifugato a 2500 $\times\text{g}$ per 5 min. La fase organica superiore contenente i composti della vitamina D è stata raccolta e trasferita in una vial in vetro da 1,5 mL. Infine, il solvente di estrazione è stato evaporato tramite l'utilizzo di un evaporatore Serie EZ 2 e derivatizzato con 100

μL di soluzione MSTFA contenente il 10% di TMCS; la miscela di reazione è stata riscaldata per 60 min a 100 °C.

7.2.4 Analisi fast GC-QqQ-MS della vitamina D

L'analisi dei derivati della vitamina D è stata eseguita su un gascromatografo GC2030 NEXIS (Shimadzu, Duisburg, Germania) accoppiato a uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo TQ8050 NX (Shimadzu). Il sistema GC era dotato di un autocampionatore robotizzato, AOC-6000 (Shimadzu), e di un iniettore split/splitless. La separazione dei composti è stata realizzata su una colonna capillare GC SLB-5ms (fase stazionaria 5% difenil/95% dimetil silossano) avente le seguenti dimensioni: 30 m \times 0,25 mm ID \times 0,10 μm d_f (Merck Life Science). Il programma di temperatura era il seguente: da 150 °C (1 min) a 360 °C con un incremento di 20 °C min^{-1} . L'elio è stato utilizzato come gas carrier a una velocità lineare costante di 35 cm s^{-1} e una pressione all'iniettore di 76,7 kPa. Il volume di iniezione era di 2 μL in modalità splitless (tempo di campionamento 1 min). Il sistema QqQ-MS operava in modalità EI (ionizzazione elettronica) con un'energia di ionizzazione di 20 eV e una corrente di emissione di 60 μA . L'argon è stato impiegato come gas di collisione. L'acquisizione dei segnali è stata effettuata in modalità MRM (*event time*: 100 ms; *dwell time*: 33 ms). Le temperature dell'interfaccia e della sorgente ionica erano rispettivamente di 250 °C e 220 °C. La tensione del rilevatore era impostata a 2,0 kV. L'acquisizione e l'elaborazione dei dati sono stati supportati dal software GCMSsolution versione 4.50 (Shimadzu).

7.2.5 Calibrazione e validazione del metodo

La quantificazione dei derivati della vitamina D nel siero umano è stata eseguita utilizzando il metodo delle curve di calibrazione. A tale scopo, alcune miscele

calibranti sono state preparate a diversi livelli di concentrazione ($250,0 \text{ ng mL}^{-1}$, $50,0 \text{ ng mL}^{-1}$, $10,0 \text{ ng mL}^{-1}$, $5,0 \text{ ng mL}^{-1}$, $2,5 \text{ ng mL}^{-1}$, $0,5 \text{ ng mL}^{-1}$ e $0,25 \text{ ng mL}^{-1}$), eseguendo tre repliche per ciascun livello. Tutte le soluzioni sono state addizionate con un volume fisso ($10 \text{ }\mu\text{L}$) di soluzione ISTDs a una concentrazione di $1 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$. Prima dell'analisi GC-QqQ-MS, tutte le miscele di calibrazione sono state soggette a processo di derivatizzazione secondo le condizioni ottimizzate. Le equazioni di regressione lineare sono state costruite considerando il rapporto tra le aree dei picchi in funzione del rapporto di concentrazione. La vit-D₃ (6,19,19-d₃) è stata utilizzata per la quantificazione delle specie vitaminiche vit-D₃ e vit-D₂, mentre 25-(OH) vit-D₂ (6,19,19-d₃) è stata impiegata per la quantificazione della 25-(OH) vit-D₃, 25-(OH) vit-D₂, 3-*epi*-25-(OH) vit-D₃ e 24, 25-(OH)₂ vit-D₃. I parametri LoD (limite di rilevazione) e LoQ (limite di quantificazione) sono stati determinati per ciascun composto analizzando dieci miscele di lavoro alla concentrazione minima rilevabile (vit-D₃: $0,50 \text{ ng mL}^{-1}$; vit-D₂: $0,25 \text{ ng mL}^{-1}$; 25-(OH)-vit-D₃: $0,50 \text{ ng mL}^{-1}$; 25-(OH)-vit-D₂: $0,25 \text{ ng mL}^{-1}$; 3-*epi*-25-(OH)-vit-D₃: $2,50 \text{ ng mL}^{-1}$; 24, 25-(OH)₂-vit-D₃: $2,50 \text{ ng mL}^{-1}$). I valori di LoD e LoQ sono stati calcolati come segue: $\text{LoD} = 3 \times (\text{St. Dev.}/\sqrt{10})$ e $\text{LoQ} = 10 \times (\text{St. Dev.}/\sqrt{10})$, dove St. Dev. rappresenta la deviazione standard delle misurazioni replicate ($n = 10$).

L'accuratezza del metodo è stata valutata mediante l'analisi del materiale di riferimento SRM 972a *Vitamin D Metabolites in Frozen Human Serum* (Livelli 1–4). I valori di concentrazione di riferimento sono riportati nel certificato di analisi [33] con una fiducia approssimativa del 95% (fattore di fiducia $K = 2$). Ogni livello dell'SRM 972a è stato analizzato in triplice copia per migliorare la precisione dei dati. La robustezza del metodo è stata verificata valutando la significatività della differenza tra i valori certificati e quelli misurati utilizzando l'incertezza estesa.

7.3 Risultati e discussione

7.3.1 Ottimizzazione della procedura di sililazione

L'analisi GC della vitamina D e dei suoi metaboliti richiede la derivatizzazione dei gruppi -OH nei loro derivati eteri TMS. Questa reazione di sililazione è fondamentale per convertire le specie di vitamina D in composti più volatili e meno polari. Infatti, la presenza del gruppo funzionale -OH con un idrogeno attivo influisce sul punto di ebollizione e sull'efficienza della separazione in GC. A causa dell'ingombro sterico nei metaboliti della vitamina D, il gruppo più difficile da derivatizzare è l'-OH in posizione 25, mentre il gruppo -OH in posizione 3, senza particolari problemi di ingombro sterico, viene rapidamente convertito in etere TMS. Di conseguenza, è necessario un forte riscaldamento e tempi di reazione prolungati per ottenere una sililazione quantitativa di tutti i gruppi ossidrilici. Tuttavia, queste condizioni potrebbero non essere sufficienti, poiché la completa sililazione dipende anche dalla natura degli agenti derivatizzanti utilizzati. Per massimizzare l'efficienza della sililazione, sono stati valutati diversi reagenti comunemente utilizzati per la formazione di eteri TMS da alcoli, tra cui BSA in combinazione con piridina, BSTFA + TMCS e MSTFA + TMCS.

I cromatogrammi GC-QqQ-MS (acquisizione a scansione) della 25-(OH) vit-D₂ derivatizzata con i tre diversi reagenti sono riportati in Figura 7.2. Come si può vedere, le tracce GC hanno rivelato che BSA+ piridina e BSTFA + TMCS (Fig. 7.2A e 7.2B) non sono adatti a derivatizzare quantitativamente il gruppo -OH in posizione 25 nelle condizioni di reazione utilizzate (sililazione per 60 min a 100 °C). Infatti, in entrambi i casi sono state rilevate le forme mono-sililate (TMS-25-(OH) vit-D₂) e bis-sililate (2-TMS-25-(OH) vit-D₂), confermando che la sililazione della 25-OH non è un processo che avviene facilmente.

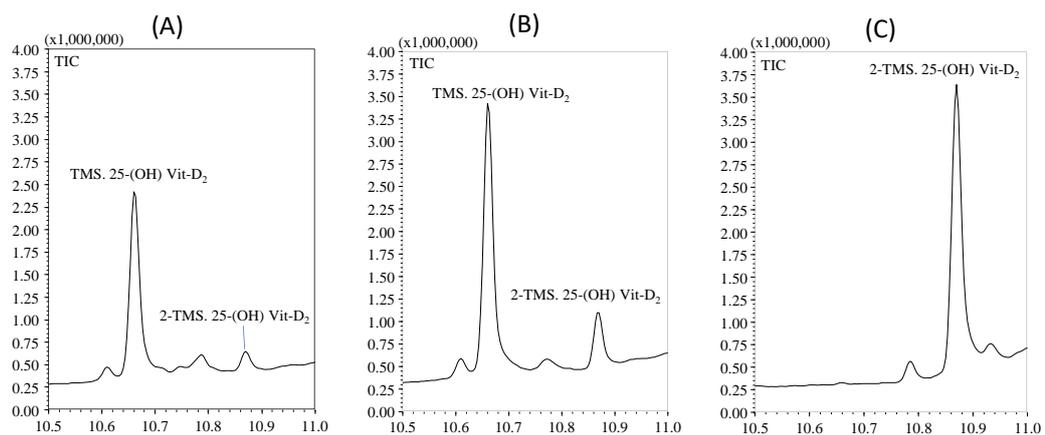


Figura 7.2. Cromatogrammi GC-QqQ-MS (acquisizione in *full scan*) della 25-(OH) vit-D₂ derivatizzata utilizzando i seguenti reagenti di sililazione: BSA + piridina (A), BSTFA + TMCS (B) e MSTFA + TMCS (C). Riprodotto con il consenso di Elsevier.

L'identità dei derivati mono-TMS e bis-TMS della 25-(OH) vit-D₂ è stata confermata dagli spettri MS riportati in Figura 7.3, ottenuti in condizioni EI a 70 eV utilizzando uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo (acquisizione *full scan*). Gli spettri sono stati normalizzati rispetto ai picchi base di 379 *m/z* e 131 *m/z* per le forme mono-TMS e bis-TMS, rispettivamente. I due spettri di massa mostrano diverse differenze, con ioni molecolari che differiscono di 72 amu, corrispondenti al gruppo TMS [-Si-(CH₃)₃]. Inoltre, il derivato bis-TMS è meno stabile, per cui l'intensità (abbondanza relativa) degli ioni a massa più elevata (Figura 7.3, in basso) è significativamente inferiore rispetto a quella del derivato mono-TMS (Figura 7.3, in alto). Spettri MS comparabili sono stati ottenuti anche da Lehner et al. [34].

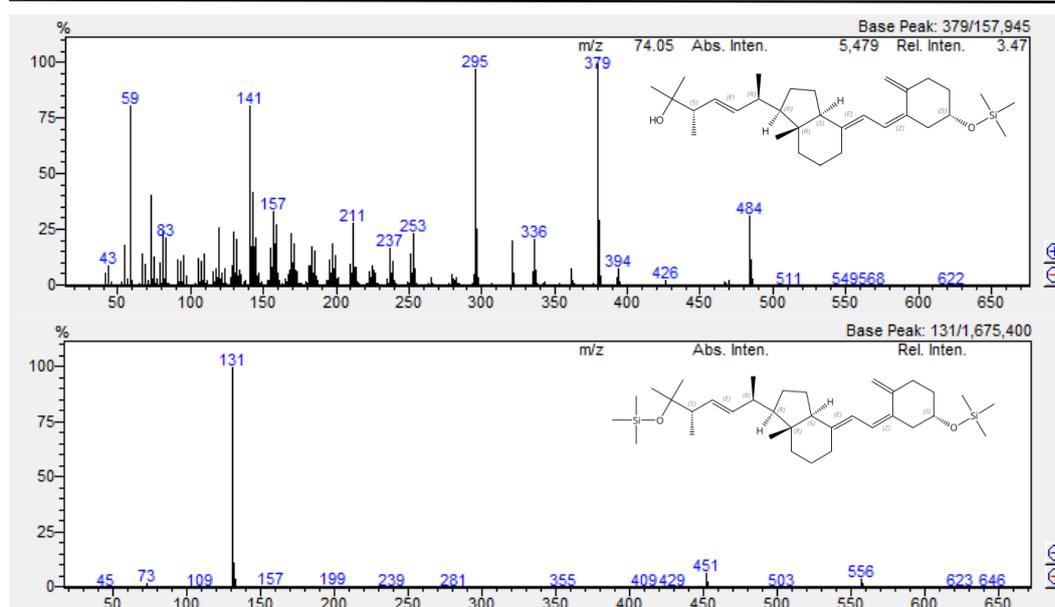


Figura 7.3. Spettri di massa del mono-TMS (in alto) e del bis-TMS (in basso) 25-(OH) vit-D₂. Riprodotto con il consenso di Elsevier.

Al contrario, il cromatogramma GC-QqQ-MS (acquisizione *full scan*) della 25-(OH) vit-D₂ derivatizzata con MSTFA + TMCS (cromatogramma C di Figura 7.2) non ha mostrato tracce della forma mono-TMS, essendo stato rilevato esclusivamente il derivato bis-TMS. Gli stessi risultati sono stati ottenuti anche per altri metaboliti 25-idrossilati, come mostrato nella Figura 7.4. In conclusione, nelle condizioni di reazione selezionate (sililazione per 60 min a 100 °C), MSTFA + TMCS si sono rivelati i reagenti più efficaci per la sililazione dei metaboliti della vitamina D.

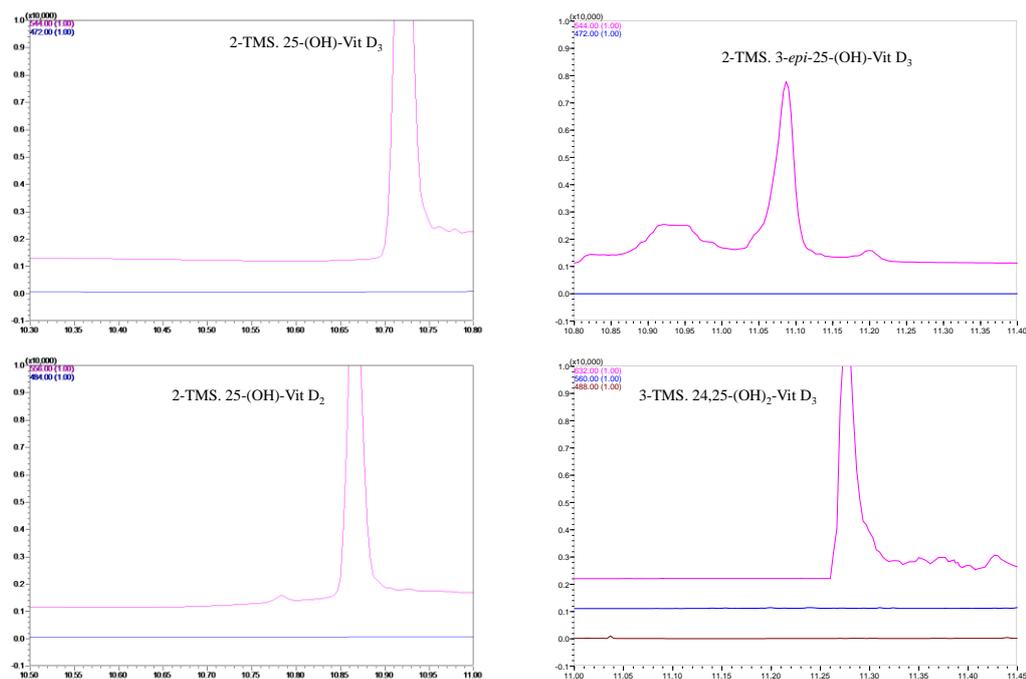


Figura 7.4. Cromatogramma EIC (*enhanced extracted ion chromatogram*) della vitamina 2.TMS 25-(OH)-vit D₃, 2.TMS 25-(OH)-vit D₂, 2.TMS 3-*epi*-25-(OH)-vit D₃ and 3.TMS 24,25-(OH)₂-vit D₃. Le forme bis- e mono-sililate erano rivelate monitorando i loro rispettivi ioni molecolari come di seguito indicato: 544 *m/z* e 472 *m/z* per 2.TMS 25-(OH)-vit D₃; 556 *m/z* e 484 *m/z* for 2.TMS 25-(OH)-vit D₂; 544 *m/z* e 472 *m/z* per 2.TMS 3-*epi*-25-(OH)-vit D₃. Le forme tris-, bis- e mono-sililate della 24,25-(OH)₂-vit D₃ erano analizzate monitorando gli ioni 632, 560 e 488 *m/z*, rispettivamente. Riprodotto con il consenso di Elsevier.

7.3.2 GC-QqQ-MS analisi sotto condizioni di ionizzazione elettronica soft.

È stato sviluppato un metodo *fast* di GC-QqQ-MS per l'analisi dei composti della vitamina D nel siero umano. Inizialmente, è stata prestata particolare attenzione alla scelta della colonna capillare GC, con uno spessore ridotto della fase stazionaria pari a 0,10 μm. Questa scelta è stata dettata dal fatto che i composti target possiedono tutti punti di ebollizione elevati. Pertanto, l'utilizzo di una fase stazionaria più sottile consente una separazione efficiente degli analiti altobollenti. Per quanto riguarda il diametro interno (ID), è stata preferita una colonna con un diametro interno pari a 0,25 mm rispetto a una con diametro di 0,10 mm, poiché permette di iniettare volumi di campione maggiori, condizione essenziale per

l'analisi dei metaboliti della vitamina D presenti a livelli di concentrazioni molto bassi (ng mL^{-1}) nel siero umano. Per aumentare la velocità di analisi, è stato impiegato un programma di temperatura piuttosto accelerato ($20\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$) e una velocità lineare del gas carrier di 35 cm s^{-1} , ottenendo un tempo totale di analisi di 11,5 min.

In questo lavoro di ricerca è stato messo a punto un metodo di ionizzazione elettronica (EI) *soft* in modo da aumentare l'intensità dei segnali dei frammenti diagnostici a più alto peso molecolare. L'energia di ionizzazione è l'energia minima necessaria per ionizzare una molecola neutra. Le energie di ionizzazione tipiche degli analiti organici comuni variano da 5 a 15 eV, e la facilità con cui l'elettrone viene "estratto" dipende dal tipo di analita e, più specificamente, dal tipo di legame [36]. L'efficienza di ionizzazione raggiunge il suo massimo a circa 70 eV per la maggior parte dei composti organici [36-37]. Inoltre, sotto queste condizioni di EI si ottengono spettri di massa altamente ripetibili, motivo per cui le librerie di spettrometria MS contengono principalmente spettri EI acquisiti a 70 eV, utilizzati come riferimento per l'identificazione di composti sconosciuti. Tuttavia, questo tipo di ionizzazione può ridurre l'intensità degli ioni molecolari maggiormente informativi, come il cosiddetto ione molecolare. Per questo motivo, l'uso di energie di ionizzazione più *soft* è stato applicato in vari contesti analitici [37], con l'obiettivo di aumentare l'intensità dell'ione molecolare e/o di altri frammenti diagnostici a massa elevata. Queste condizioni di ionizzazione risultano vantaggiose per analisi mirate più selettive e sensibili, specialmente quando si utilizzano modalità di acquisizione SIM (*selected ion monitoring*) o SRM (*selected reaction monitoring*) [37-38]. Tuttavia, non esistono riferimenti in letteratura sull'uso di condizioni di EI *soft* per la rilevazione dei metaboliti della vitamina D

nel siero umano. In questa ricerca, l'obiettivo è stato l'ottimizzazione di un metodo GC-QqQ-MS in cui i segnali dei metaboliti della vitamina D venissero acquisiti in modalità MRM (multiple reaction monitoring) sotto condizioni di ionizzazione elettronica *soft*.

La prima parte della ricerca si è concentrata sulla valutazione della variabilità degli spettri di massa con diverse energie di ionizzazione. Sono stati condotti esperimenti GC-QqQ-MS (acquisizione *full scan*) utilizzando tre diverse energie di ionizzazione: 70 eV, 40 eV e 20 eV. Durante tutti gli esperimenti, la corrente di emissione è stata mantenuta costante a 60 μA (valore raccomandato per analisi convenzionali). Le tensioni del rilevatore sono state impostate automaticamente dal software durante i processi di *tuning* e variavano tra i diversi esperimenti come segue: 1,09 kV, 1,10 kV e 1,22 kV rispettivamente per le energie EI a 70, 40 e 20 eV. Gli spettri di massa della TMS. vit-D₃ ottenuti con diverse energie di ionizzazione sono mostrati nella Figura 7.5. Tutti gli spettri MS sono stati acquisiti al massimo del picco cromatografico e normalizzati rispetto al picco base. Si è prestata particolare attenzione agli ioni a bassa ($119 m/z$), media (325 e $351 m/z$) e alta massa ($456 m/z$) negli spettri di massa. Le abbondanze relative degli ioni a massa più alta risultavano più intense nello spettro EI a 20 eV (come indicato in Tabella 7.1), mentre si osservava un comportamento opposto per quelli a bassa massa ($119 m/z$). Ad esempio, le abbondanze relative per lo ione molecolare ($456 m/z$) erano del 16,3 %, 16,7 % e 25,5 % (media di 4 misurazioni) rispettivamente per 70, 40 e 20 eV. Al contrario, l'abbondanza relativa dello ione a bassa massa ($119 m/z$) diminuiva notevolmente con condizioni di EI più *soft* (26,5 %, 24,6 % e 8,8 % rispettivamente per 70, 40 e 20 eV).

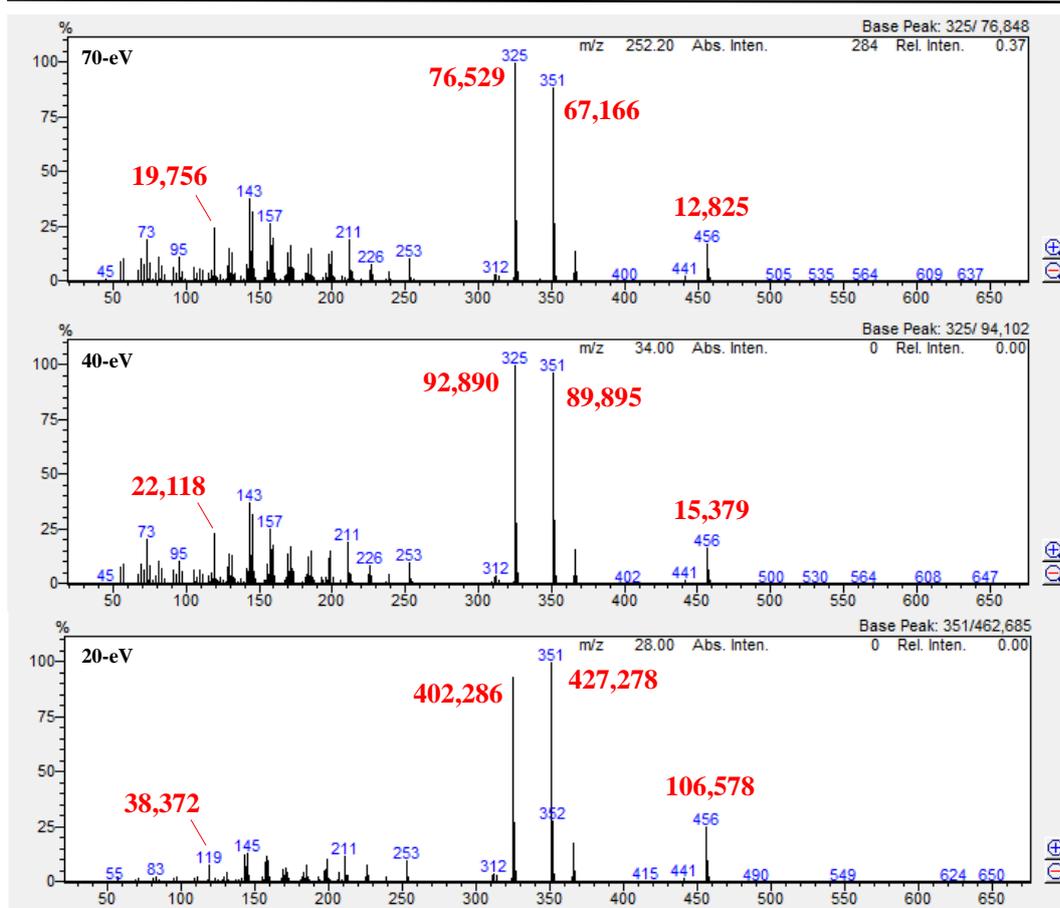


Figura 7.5. Spettri di massa di TMS.vit-D₃ raggiunto in condizioni EI di 70 eV (in alto), 40 eV (al centro) e 20 eV (in basso). I valori in grassetto rappresentano le intensità assolute dei frammenti selezionati (119, 325, 351 e 456 m/z). Riprodotto con il consenso di Elsevier.

I risultati hanno indicato che le applicazioni a 70 e 40 eV erano simili (in alcuni casi, le abbondanze relative dei frammenti rimanevano quasi invariate), mentre gli spettri EI a 70 e 20 eV mostravano differenze sostanziali. Tuttavia, considerando le abbondanze assolute, tutti i frammenti, inclusi quelli a bassa massa, mostravano un aumento di intensità con l'energia a 20 eV. Questo comportamento è attribuibile alle tensioni più elevate del rivelatore registrate sotto condizioni di ionizzazione *soft*. Infatti, la tensione del rivelatore tende ad aumentare con energie di ionizzazione *soft* più basse per compensare la riduzione dell'efficienza di ionizzazione degli analiti [38]. Di conseguenza, è previsto un aumento dell'intensità

degli ioni. In Tabella 7.1 sono elencate le intensità assolute (media \pm deviazione standard di 4 misurazioni) dei frammenti selezionati. Nel caso della TMS vit-D₃, l'intensità dell'ione molecolare è aumentata da 12.825 unità nello spettro EI a 70 eV a 106.578 unità a 20 eV (Figura 7.5), con un incremento di intensità di 8 volte. Una tendenza simile è stata registrata anche per gli ioni a massa media (325 m/z e 351 m/z). Infine, l'intensità assoluta dell'ione a 119 m/z è raddoppiata. Questi risultati preliminari hanno mostrato che il guadagno netto di intensità era determinato dalla tensione del rivelatore (voltage del detector), piuttosto che dalle diverse energie di ionizzazione applicate. Per comprendere appieno il reale contributo della condizione di EI *soft* sull'intensità degli ioni, sono stati condotti ulteriori esperimenti mantenendo una tensione del rivelatore fissa e variando le energie di ionizzazione. La tensione del rivelatore è stata arbitrariamente fissata a 1,22 kV (valore più alto impostato automaticamente dal software per l'applicazione EI a 20 eV) e l'attenzione si è concentrata sulle abbondanze assolute degli ioni a 119, 325, 351 e 456 m/z negli spettri del TMS. vit-D₃. Le intensità (media \pm deviazione standard di 4 misurazioni) sotto condizioni EI a 70, 40 e 20 eV sono riportate in Tabella 7.1. L'intensità dell'ione molecolare aumentava gradualmente con energie di ionizzazione più basse. L'intensità dell'ione a 456 m/z registrata a 20 eV, rispetto a quella a 70 eV, è aumentata di un fattore quasi pari a 2; mentre gli ioni a massa media, come quelli a 325 e 351 m/z , sono rimasti praticamente invariati. Al contrario, l'energia di ionizzazione a 20 eV ha ridotto l'intensità dell'ione a 119 m/z di un fattore pari a 2,7.

Tabella 7.1. Intensità assolute e relative per gli ioni 119 m/z , 325 m/z , 351 m/z e 456 m/z presenti nello spettro MS della TMS-vit-D₃ con energie EI pari a 70 eV, 40 eV e 20 eV. Abbreviazioni: *Variable D.V.*: tensioni variabili del rivelatore; *Fixed D.V.*: tensione fissa del rivelatore. Le intensità sono riportate come media \pm deviazione standard (n = 4).

Ione (m/z)	Intensità Assoluta	Intensità Relativa	Intensità Assoluta	Intensità Relativa	Intensità Assoluta	Intensità Relativa
Variable D.V.	70-eV (1.09 kV)		40-eV (1.10 kV)		20-eV (1.22 kV)	
119	20,358 \pm 971	26.5 \pm 0.6	24,079 \pm 1,549	24.6 \pm 1.3	40,063 \pm 2,391	8.8 \pm 0.3
325	76,910 \pm 2,140	100.0 \pm 0.0	97,883 \pm 3,834	100.0 \pm 0.0	436,196 \pm 47,956	95.2 \pm 1.4
351	71,992 \pm 5,402	93.6 \pm 5.3	93,434 \pm 2,717	95.5 \pm 1.2	457,977 \pm 43,415	100.0 \pm 0.0
456	12,528 \pm 511	16.3 \pm 0.4	16,353 \pm 1,765	16.7 \pm 1.4	117,069 \pm 14,837	25.5 \pm 0.8
Fixed D.V.	70-eV (1.22 kV)		40-eV (1.22 kV)		20-eV (1.22 kV)	
119	106,460 \pm 9,433	26.1 \pm 0.8	112,485 \pm 5,019	22.3 \pm 0.5	40,063 \pm 2,391	8.8 \pm 0.3
325	407,908 \pm 26,801	100.0 \pm 0.0	504,408 \pm 14,612	100.0 \pm 0.0	436,196 \pm 47,956	95.2 \pm 1.4
351	386,171 \pm 26,693	94.7 \pm 1.4	473,332 \pm 15,158	93.8 \pm 1.7	457,977 \pm 43,415	100.0 \pm 0.0
456	66,941 \pm 5,928	16.4 \pm 0.8	84,887 \pm 4,278	16.8 \pm 0.7	117,069 \pm 14,837	25.5 \pm 0.8

Sulla base dei risultati ottenuti per TMS. vit-D₃, l'uso di energie a 20 eV, rispetto a quelle a 70 e 40 eV, ha mostrato un miglioramento dell'intensità degli ioni diagnostici a massa elevata, riducendo al contempo l'abbondanza dei frammenti a massa inferiore. Questa condizione risulta essenziale per ottenere analisi target e selettive dei metaboliti della vitamina D nel siero umano. Spettri EI a 20 eV dei composti della vitamina D, inclusi i metaboliti e gli standard isotopicamente marcati. Dall'analisi strutturale degli spettri EI a 20 eV, sono stati selezionati i frammenti diagnostici a massa più elevata come ioni precursori per ciascun composto della vitamina D. L'argon è stato utilizzato come gas di collisione per favorire la dissociazione degli ioni precursori e la generazione dei loro ioni prodotti. Di conseguenza, le transizioni MRM sono state ottimizzate per ottenere la massima risposta. L'energia di collisione (CE) è stata valutata in un intervallo da 5 a 40 eV, con incrementi di 5 eV. Sono state stabilite tre diverse transizioni MRM, generate da energie di collisione appropriate: la transizione MRM più intensa (transizione *quantifier*) è stata utilizzata per scopi quantitativi, mentre le altre due transizioni sono state impiegate per confermare l'identità del composto target (transizioni *qualifier*). Le impostazioni MRM ottimizzate per i derivati siliati della vitamina D, inclusi gli standard interni marcati isotopicamente, sono riportate nella Tabella 7.2.

Tabella 7.2. Elenco dei composti della vitamina D derivatizzati, inclusi standard interni deuterati e rispettive transizioni MRM ottimizzate (transizione *quantifier* e *qualifier*), insieme alle energie di collisione (eV).

Composti	Transizion e		Transizion e		Transizion e	
	<i>Quantifier</i>	CE	<i>Qualifier 1</i>	CE	<i>Qualifier 2</i>	CE
TMS. vit-D ₃	456 > 325	15	456 > 350	10	456 > 143	30
TMS. vit-D ₂	468 > 363	10	468 > 337	10	468 > 143	30
2-TMS. 25-(OH) vit-D ₃	439 > 143	20	544 > 439	15	544 > 143	15
2-TMS. 25-(OH) vit-D ₂	451 > 131	15	556 > 131	15	556 > 73	30
2-TMS. 3- <i>epi</i> -25-(OH) vit-D ₃	439 > 141	10	544 > 131	15	544 > 439	15
3-TMS. 24R,25-(OH) ₂ vit-D ₃	632 > 131	25	632 > 527	15	632 > 73	30
TMS. vit-D ₃ (6,19,19- <i>d</i> ₃)	459 > 327	15	459 > 352	10	459 > 146	30
2-TMS. 25-(OH) vit-D ₂ (6,19,19- <i>d</i> ₃)	559 > 131	10	559 > 73	35	559 > 452	20

7.3.3 Validazione del metodo

La quantificazione dei composti target nel siero umano è stata eseguita utilizzando il metodo della calibrazione con standard esterno, come descritto nella sezione materiali e metodi. Due standard marcati isotopicamente sono stati aggiunti alle miscele di calibrazione a una concentrazione fissa di 1 µg mL⁻¹. Le equazioni di regressione lineare, i coefficienti di determinazione (R²) e l'intervallo di calibrazione sono riportati in Tabella 7.3. Tutte le curve di calibrazione hanno mostrato una linearità soddisfacente, con valori di R² che variavano da 0,9959 per 2-TMS. 3-*epi*-25(OH) vit-D₃ a 0,9999 per TMS. vit-D₃. I limiti di rilevazione (LoD) e di quantificazione (LoQ) (Tabella 7.3) mostravano valori più bassi (espressi in ng mL⁻¹) per TMS. vit-D₂ (LoD: 0,06 ng mL⁻¹ e LoQ: 0,21 ng mL⁻¹) e 2-TMS. 25-

Capitolo 7. Sviluppo di un metodo GC-MS/MS per l'analisi della vitamina D in siero
(OH) vit-D₂ (LoD: 0,06 ng mL⁻¹ e LoQ: 0,16 ng mL⁻¹). I valori di LoD e LoQ più alti sono stati osservati per 2-TMS. 3-*epi*-25-(OH) vit-D₃ (LoD: 0,73 ng mL⁻¹ e LoQ: 2,43 ng mL⁻¹) e 24R,25-(OH)₂ vit-D₃ (LoD: 0,73 ng mL⁻¹ e LoQ: 2,45 ng mL⁻¹). In generale, i valori di LoD variavano da 0,06 ng mL⁻¹ a 0,73 ng mL⁻¹, mentre i LoQ andavano da 0,16 ng mL⁻¹ a 2,45 ng mL⁻¹.

Tabella 7.3. Equazione di regressione lineare, coefficiente di determinazione (R^2), intervallo di calibrazione espresso in ng mL⁻¹. LoD e LoQ rappresentano il limite di rilevamento e il limite di quantificazione riportati in ng mL⁻¹.

Composti	Linearità			LoD	LoQ
	Equazione di regressione	R ²	Range di calibrazione		
TMS. vit-D ₃	$y = 1.313476x + 0.0395656$	0.9999	50.0 – 0.50	0.12	0.41
TMS. vit-D ₂	$y = 1.198592x + 0.0516603$	0.9991	50.0 – 0.25	0.06	0.21
2-TMS. 25-(OH) vit-D ₃	$y = 2.440075x + 0.0531122$	0.9998	250.0 – 0.50	0.16	0.53
2-TMS. 25-(OH) vit-D ₂	$y = 1.285151x + 0.2680379$	0.9963	50.0 – 0.25	0.06	0.16
2-TMS. 3- <i>epi</i> -25-(OH) vit-D ₃	$y = 1.323764x + 0.2958434$	0.9959	250.0 – 2.50	0.73	2.43
3-TMS. 24R,25-(OH) ₂ vit-D ₃	$y = 0.5253304x - 0.0254484$	0.9989	250.0 – 2.50	0.73	2.45

L'accuratezza è stata valutata analizzando il materiale di riferimento certificato, SRM 972a, composto da quattro livelli (Livelli 1-4) con concentrazioni certificate e di riferimento differenti. Come riportato nel certificato di analisi [33], i livelli 1, 2 e 3 erano un pool di siero umano contenente concentrazioni endogene di metaboliti della vitamina D (senza alcuna modifica al fluido biologico), mentre il livello 4 era fortificato con la vitamina 3-*epi*-25-(OH) vit-D₃. I valori certificati (quelli per i quali il NIST ha la massima fiducia) e i valori di riferimento (valori non certificati che rappresentano la migliore stima dei valori reali) si basano sul consenso dei risultati ottenuti mediante procedure di diluizione isotopica LC-MS [33] e LC-MS/MS [33]. I cromatogrammi GC-QqQ-MS dei 4 livelli del campione SRM 972a sono illustrati nella Figura 7.6.

L'elenco dei metaboliti della vitamina D rilevati è riportato nella Tabella 7.4, insieme ai valori sperimentali e certificati. I risultati di accuratezza, espressi come percentuale di recupero (Rec %), sono riassunti nella Tabella 7.4. Ad eccezione del 25-(OH) vit-D₂ nel siero SRM 972a livello 1 (valore di recupero 392,1 %), tutti i metaboliti della vitamina D sono stati quantificati accuratamente, con valori di recupero che vanno dal 96,2 % per 3-*epi*-25-(OH) vit-D₃ al 150,9 % per 25-(OH) vit-D₂ (Tabella 7.4). Inoltre, i risultati di accuratezza sono stati verificati confrontando le misurazioni sul materiale di riferimento certificato con i valori certificati e valutando la significatività della differenza tra questi valori utilizzando l'incertezza estesa. I risultati delle misurazioni erano in accordo con i valori CRM, e la differenza non era significativa al livello di confidenza del 95% ($k = 2$) per tutti gli analiti indagati, ad eccezione del 25-(OH) vit-D₂ nel siero SRM 972a livello 3 e del 25-(OH) vit-D₃ nel siero SRM 972a livello 4.

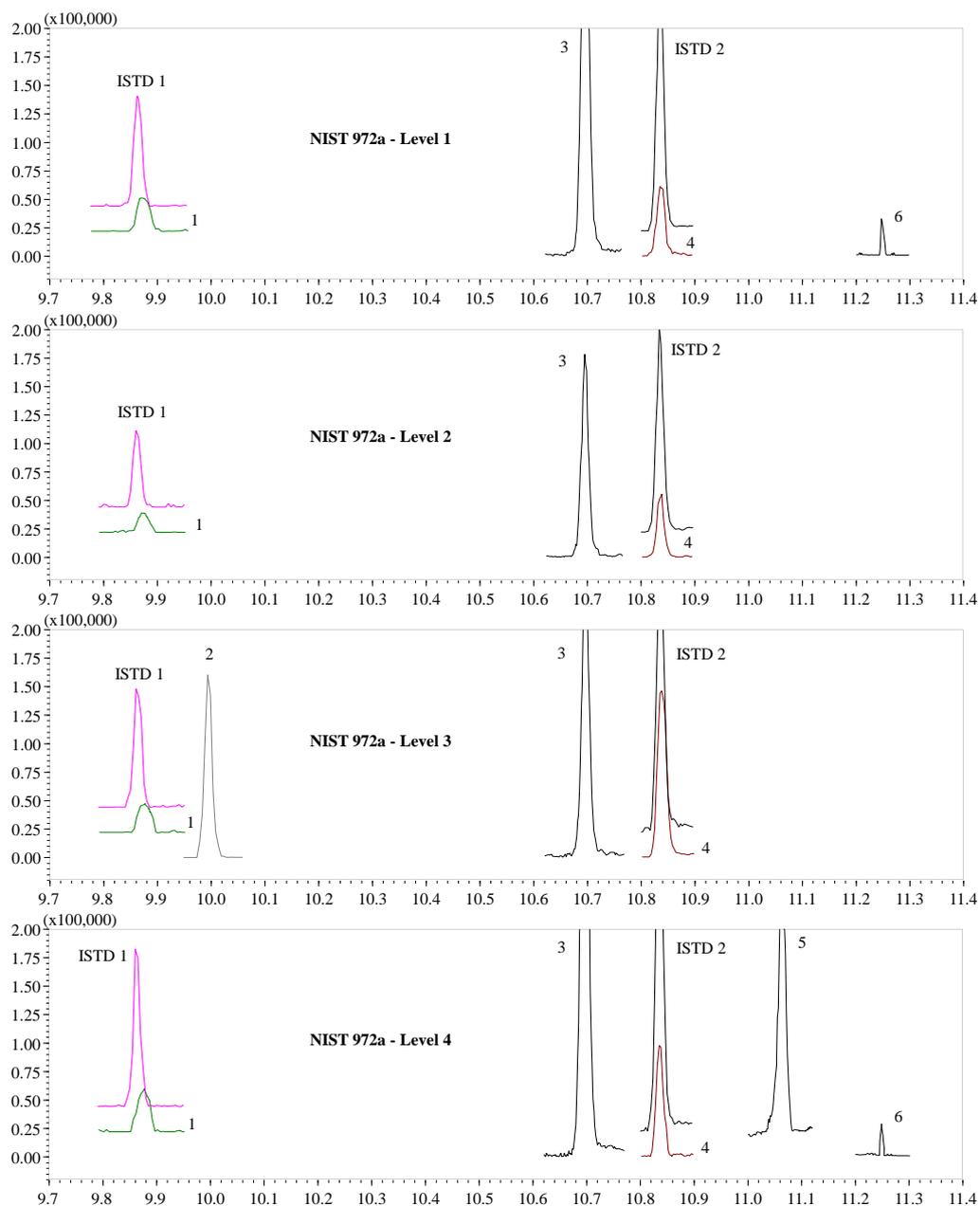


Figura 7.6. Cromatogramma GC-QqQ-MS ottenuto in modalità MRM dei metaboliti della vitamina D nello standard certificato SRM 972a (livelli 1–4). L'assegnazione dei picchi è descritta come segue: (ISTD 1) TMS. vit-D₃ 6,19,19d₃, (1) TMS. vitamina-D₃, (2) TMS. vit-D₂, (3) 2-TMS. 25-(OH) vit-D₃, (ISTD 2) 2-TMS. 25-(OH) vit-D₂ 6,19,19d₃, (4) 2-TMS. 25-(OH) vit-D₂, (5) 2-TMS. 3-*epi*-25-(OH) vit-D₃, (6) 3-TMS. 24R,25-(OH) vit-D₃. Riprodotto con il consenso di Elsevier.

Compound	SRM 972a Level-1			SRM 972a Level-2		
	Exp.	NIST	Rec %	Exp.	NIST	Rec %
TMS. vit-D ₃	14.3 ± 1.3	–	–	12.0 ± 0.5	–	–
TMS. vit-D ₂	< LoQ	–	–	< LoQ	–	–
2-TMS. 25-(OH) vit-D ₃	30.3 ± 1.9	28.8 ± 1.1	105.3	18.4 ± 1.2	18.1 ± 0.40	101.6
2-TMS. 25-(OH) vit-D ₂	2.1 ± 0.3	0.54 ± 0.06 *	392.1	0.9 ± 0.2	0.81 ± 0.06	115.7
2-TMS. 3- <i>epi</i> -25-(OH) vit-D ₃	< LoQ	1.81 ± 0.1	–	< LoQ	1.28 ± 0.09	–
3-TMS. 24R,25-(OH) ₂ vit-D ₃	2.6 ± 0.2	2.66 ± 0.1	99.5	< LoQ	1.41 ± 0.05	–
Compound	SRM 972a Level-3			SRM 972a Level-4		
	Exp.	NIST	Rec %	Exp.	NIST	Rec %
TMS. vit-D ₃	11.9 ± 1.5	–	–	13.7 ± 1.1	–	–
TMS. vit-D ₂	53.0 ± 3.2	–	–	< LoQ	–	–
2-TMS. 25-(OH) vit-D ₃	19.8 ± 0.8	19.8 ± 0.40	99.9	32.9 ± 2.0	29.4 ± 0.9	112.0
2-TMS. 25-(OH) vit-D ₂	14.6 ± 0.7	13.3 ± 0.3	109.6	0.8 ± 0.1	0.55 ± 1.1*	150.9
2-TMS. 3- <i>epi</i> -25-(OH) vit-D ₃	< LoQ	1.17 ± 0.14*	–	25.0 ± 2.5	26 ± 2.2	96.2
3-TMS. 24R,25-(OH) ₂ vit-D ₃	< LoQ	1.62 ± 0.06	–	2.6 ± 0.4	2.64 ± 0.09	98.7

7.4 Conclusioni

Il metodo analitico descritto in questo studio può essere considerato una valida alternativa alle procedure “gold standard” HPLC-MS/MS comunemente riportate in letteratura per l'analisi dei metaboliti della vitamina D. La strategia sviluppata ha previsto l'uso di MSTFA con TMCS per la conversione delle specie vitaminiche in derivati TMS, inclusi i metaboliti 25-(OH) con specifici problemi di ingombro sterico. La ionizzazione dei composti silylati è stata effettuata in condizioni di EI *soft* (energia di 20 eV) che, rispetto alla comune energia di 70 eV, ha permesso di ottenere intensità relative e assolute maggiori per gli ioni diagnostici a massa più elevata, insieme a una ridotta abbondanza dei frammenti a massa più bassa. L'acquisizione dei segnali è stata eseguita in modalità MRM. Il metodo GC-QqQ-MS rapido sviluppato in condizioni di EI *soft* si è dimostrato altamente sensibile e selettivo per l'analisi mirata dei metaboliti della vitamina D nel siero umano.

BIBLIOGRAFIA

- [1] D.A. Volmer, L.R. Mendes, C.S. Stokes, Analysis of vitamin D metabolic markers by mass spectrometry: current techniques, limitations of the “gold standard” method, and anticipated future directions, *Mass Spectrom. Rev.* 34 (2015) 2–23, <https://doi.org/10.1002/mas.21408>.
- [2] A.D. Hořek, Review: Vitamin D3 deficiency results in dysfunctions of immunity with severe fatigue and depression in a variety of diseases, *In vivo.* 28 (2014) 133–145.
- [3] R.D. Gerwin, A review of myofascial pain and fibromyalgia—factors that promote their persistence, *Acupunct Med.* 23 (2005) 121–134, <https://doi.org/10.1136/aim.23.3.121>.
- [4] D.E. McCarty, Resolution of hypersomnia following identification and treatment of vitamin D deficiency, *J. Clin. Sleep Med.* 6 (2010) 605–608, <https://doi.org/10.5664/jcsm.27996>.
- [5] L.M. Shinchuk, M.F. Holick, Vitamin D and rehabilitation: improving functional outcomes, *Nutr. Clin. Pract.* 22 (2007) 297–304, <https://doi.org/10.1177/0115426507022003297>.
- [6] K.V. Lu’o’ng, L.T. Nguyēn, The beneficial role of vitamin D in Alzheimer’s disease, *Am. J. Alzheimer’s Dis. other Dement.* 26 (2011) 511–520, <https://doi.org/10.1177/1533317511429321>.
- [7] A. Gianforcaro, M.J. Hamadeh, Vitamin D as a potential therapy in amyotrophic lateral sclerosis, *CNS Neurosci. Ther.* 20 (2014) 101–111, <https://doi.org/10.1111/cns.12204>.
- [8] W.B. Grant, H. Lahore, S.L. McDonnell, C.A. Baggerly, C.B. French, J.L. Aliano, H. P. Bhattoa, Evidence that Vitamin D Supplementation Could Reduce Risk of Influenza and COVID-19 Infections and Deaths, *Nutrients* 12 (2020) 988, <https://doi.org/10.3390/nu12040988>.
- [9] A.A. Shiravi, M. Saadatkish, Z. Abdollahi, P. Miar, H. Khanahmad, M. Zeinalian, Vitamin D can be effective on the prevention of COVID-19 complications: A narrative review on molecular aspects, *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 92 (2022) 134–146, <https://doi.org/10.1024/0300-9831/a000676>.
- [10] C.J. Farrell, M. Herrmann, Determination of vitamin D and its metabolites, *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 27 (2013) 675–688, <https://doi.org/10.1016/j.beem.2013.06.001>.

- [11] K. Makris, C. Sempos, E. Cavalier, The measurement of vitamin D metabolites: part I-metabolism of vitamin D and the measurement of 25-hydroxyvitamin D, *Hormones* 19 (2020) 81–96, <https://doi.org/10.1007/s42000-019-00169-7>.
- [12] M.F. Holick, Vitamin D status: measurement, interpretation, and clinical application, *Ann. Epidemiol.* 19 (2009) 73–78, <https://doi.org/10.1016/j.annepidem.2007.12.001>.
- [13] G. Jones, Pharmacokinetics of vitamin D toxicity, *Am. J. Clin. Nutr.* 88 (2008), <https://doi.org/10.1093/ajcn/88.2.582S>, 582s-586s.
- [14] Z. Su, S.N. Narla, Y. Zhu, 25-Hydroxyvitamin D: analysis and clinical application, *Clin. Chim. Acta.* 433 (2014) 200–205, <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.03.022>.
- [15] H.F. De Luca, *Vitamin D: Basic and Clinical Aspects*, first ed., Martinus Nijhoff Publishing, Dordrecht, Netherlands, 1984.
- [16] S. Baecher, A. Leinenbach, J.A. Wright, S. Pongratz, U. Kobold, R. Thiele, Simultaneous quantification of four vitamin D metabolites in human serum using high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for vitamin D profiling, *Clin. Biochem* 45 (2012) 1491–1496, <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2012.06.030>.
- [17] R.L. Horst, *Vitamin D: Basic and Clinical Aspects*, first ed., Martinus Nijhoff Publishing, Dordrecht, Netherlands, 1984.
- [18] D. Bailey, K. Veljkovic, M. Yazdanpanah, K. Adeli, Analytical measurement and clinical relevance of vitamin D(3) C3-epimer, *Clin. Biochem.* 46 (2013) 190–196, <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2012.10.037>.
- [19] B. Dawson-Hughes, R.P. Heaney, M.F. Holick, P. Lips, P.J. Meunier, R. Vieth, Estimates of optimal vitamin D status, *Osteoporos. Int.* 16 (2005) 713–716, <https://doi.org/10.1007/s00198.005.1867.7>.
- [20] B. Dawson-Hughes, A. Mithal, J.P. Bonjour, S. Boonen, P. Burckhardt, G.E. Fuleihan, R.G. Josse, P. Lips, J. Morales-Torres, N. Yoshimura, IOF position statement: vitamin D recommendations for older adults, *Osteoporos int.* 21 (2010) 1151–1154, <https://doi.org/10.1007/s00198.010.1285.3>.
- [21] World medical association, WMA statement on vitamin D insufficiency. <https://www.wma.net/policies-post/wma-statement-on-vitamin-d-insufficiency/> (accessed 21 February 2023).

- [22] S.M. Kimball, R. Vieth, A comparison of automated methods for the quantitation of serum 25-hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D, *Clin. Biochem.* 40 (2007) 1305–1310, <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2007.07.015>.
- [23] B.W. Hollis, Comparison of commercially available (125)I-based RIA methods for the determination of circulating 25-hydroxyvitamin D, *Clin. Chem.* 46 (2000) 1657–1661, <https://doi.org/10.1093/clinchem/46.10.1657>.
- [24] P. Glendenning, J.M. Noble, M. Taranto, A.A. Musk, M. McGuinness, P. R. Goldswain, W.D. Fraser, S.D. Vasikaran, Issues of methodology, standardization and metabolite recognition for 25-hydroxyvitamin D when comparing the DiaSorin radioimmunoassay and the Nichols Advantage automated chemiluminescence protein-binding assay in hip fracture cases, *Ann. Clin. Biochem.* 40 (2003) 546–551, <https://doi.org/10.1258/000456303322326470>.
- [25] R.D. Coldwell, C.E. Porteous, D.J. Trafford, H.L. Makin, Gas chromatography-mass spectrometry and the measurement of vitamin D metabolites in human serum or plasma, *Steroids* 49 (1987) 155–196, [https://doi.org/10.1016/0039-128X\(87\)90083-3](https://doi.org/10.1016/0039-128X(87)90083-3).
- [26] R.D. Coldwell, D.J.H. Trafford, H.L.J. Makin, Mass fragmentographic assay for 25-hydroxyvitamin D in plasma without derivatization: Enhanced sensitivity for metabolites of vitamins D2 and D3 after pre-column dehydration, *J. Mass Spectrom.* 30 (1995) 348–356, <https://doi.org/10.1002/jms.1190300218>.
- [27] J.M. Halket, I. Ganschow, B.P. Lisboa, Gas chromatographic-mass spectrometric properties of boronate esters of 24R,25-dihydroxycholecalciferol, *J. Chromatogr. A* 192 (1980) 434–440, [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(80\)80022-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(80)80022-7).
- [28] M. Bedner, K.W. Phinney, Development and comparison of three liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization/mass spectrometry methods for determining vitamin D metabolites in human serum, *J. Chromatogr. A* 1240 (2012) 132–139.
- [29] B.P. Jensen, R. Saraf, J. Ma, S. Berry, C.C. Grant, C.A. Camargo Jr, C.W. Sies, Quantitation of 25-hydroxyvitamin D in dried blood spots by 2D LC-MS/MS without derivatization and correlation with serum in adult and pediatric studies, *Clin. Chim. Acta* 481 (2018) 61–68, <https://doi.org/10.1016/j.cca.2018.02.024>.
- [30] W. Annema, A. Nowak, A. von Eckardstein, L. Saleh, Evaluation of the new restandardized Abbott Architect 25-OH Vitamin D assay in vitamin D-insufficient and vitamin D-supplemented individuals, *J. Clin. Lab. Anal.* 32 (2018) e22328.

- [31] R.M. Gathungu, C.C. Flarakos, G.S. Reddy, P. Vouros, The role of mass spectrometry in the analysis of vitamin D compounds, *Mass Spectrom. Rev.* 32 (2013) 72–86, <https://doi.org/10.1002/mas.21353>.
- [32] M.Y. Yang, C.Y. Huang, T.H.T. Chiu, K.C. Chang, M.N. Lin, L.Y. Chen, A. Hu, Using gas chromatography and mass spectrometry to determine 25-hydroxyvitamin D levels for clinical assessment of vitamin D deficiency, *J Food Drug Anal.* 27 (2019) 494–501, <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2018.12.010>.
- [33] National Institute of Standards & Technology, Certificate of Analysis Standard Reference Material® 972, <https://www-s.nist.gov/srmors/certificates/archives/972.pdf>.
- [34] A. Lehner, M. Johnson, A. Zimmerman, J. Zyskowski, J. Buchweitz, Vitamin D analyses in veterinary feeds by gas chromatography-tandem mass spectrometry, *Eur. J. Mass Spectrom.* 27 (2021) 48–62, <https://doi.org/10.1177/14690667211000>.
- [35] S.C. Moidoveanu, V. David, Chapter 19 - Derivatization Reactions for Analytes with Various Functional Groups, in: S.C. Moidoveanu, V. David (Eds.), *Sample Preparation in Chromatography*, Elsevier Science, Netherlands, 2002, pp. 639–845.
- [36] H. Jürgen, Gross, Chapter 2 - Principles of Ionization and Ion Dissociation, in: J. H. Gross (Ed.), *Mass Spectrometry, A Textbook*, Third Edition, Springer Nature, Switzerland, 2018, pp. 29–84.
- [37] P.Q. Tranchida, I. Aloisi, B. Giocastro, M. Zoccali, L. Mondello, Comprehensive two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry using milder electron ionization conditions: A preliminary evaluation, *J. Chromatogr. A* 1589 (2019) 134–140, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.01.006>.
- [38] A. Glineur, M. Beccaria, G. Purcaro, Exploring 20 eV electron impact ionization in gas chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of estrogenic compounds, *J. Chromatogr. A* 1652 (2021), 462359.

Pagina lasciata intenzionalmente bianca

Capitolo 8

Determinazione degli acidi grassi a catena corta nel plasma umano.

8.1 *Introduzione*

La determinazione quantitativa degli acidi grassi a catena corta (SCFAs) nei fluidi biologici ha suscitato grande interesse negli ultimi anni, grazie alla loro rilevante implicazione come prodotti finali della fermentazione da parte del microbiota intestinale [1]. Tra gli acidi SCFAs più abbondanti nei fluidi biologici si annoverano l'acido acetico, l'acido propionico e l'acido butirrico, la cui concentrazione può essere monitorata per valutare lo stato di salute dei pazienti. La loro abbondanza dipende dalla quantità di microbiota presente nel colon, dalla fonte del substrato e dal tempo di transito intestinale [2, 3].

Le alterazioni delle concentrazioni circolanti di SCFAs riflettono cambiamenti nella diversità e ricchezza del microbiota intestinale, la “disbiosi” è una condizione associata a diverse patologie, tra cui malattie metaboliche, obesità, diabete mellito di tipo 2 (T2DM) e malattie infiammatorie intestinali. In effetti, gli SCFAs regolano la secrezione dell'ormone intestinale anoressizzante e ipoglicemizzante, il peptide-1 simil-glucagone (GLP-1), esercitano effetti genomici inibendo le istone deacetilasi (HDAC), coinvolte nello sviluppo intestinale e nella regolazione del sistema immunitario, modulano le risposte delle cellule immunitarie svolgendo un'azione antinfiammatoria. Inoltre, attivano vie di segnalazione legate al metabolismo energetico e alla protezione cellulare contro lo stress ossidativo e la cancerogenesi [4].

Dal punto di vista analitico, sono stati impiegati diversi approcci per la determinazione degli SCFAs nei fluidi biologici. Focalizzandoci sui pretrattamenti

del campione, quasi tutte le procedure di estrazione prevedono l'uso di acqua acidificata, poiché l'efficienza di estrazione aumenta considerevolmente con la diminuzione del pH dei campioni biologici [5]. L'estrazione degli acidi dai campioni biologici viene generalmente effettuata utilizzando solventi organici [6]. A questo proposito, sono raccomandate specifiche caratteristiche dei solventi di estrazione: volatilità, in modo da favorire una rapida evaporazione durante la fase di iniezione in gascromatografia (GC), e bassa polarità per permettere una rapida separazione dallo strato acquoso [5]. Recentemente, Lotti et al. [1] ha dimostrato che il solvente MTBE, non tossico e non cancerogeno, è in grado di estrarre gli SCFAs da campioni di feci e plasma umano, migliorando la sensibilità e l'accuratezza delle analisi rispetto ad altri solventi organici come acetato di etile, etere dietilico e diclorometano. Inoltre, Yao et al. [7] ha eseguito l'analisi cromatografica degli SCFAs mediante estrazione con MTBE dopo l'acidificazione del plasma/siero. In letteratura è stato anche riportato l'utilizzo della tecnica di estrazione SPME (*solid phase microextraction*) per l'estrazione degli acidi SCFAs da fluidi biologici prima dell'analisi cromatografica [8].

La gascromatografia è la tecnica separativa d'elezione per la determinazione quantitativa degli SCFAs. Alcuni metodi prevedono la conversione degli analiti in composti termicamente più stabili e meno polari attraverso procedure di esterificazione, utilizzando principalmente agenti di silylazione [9] come N,O-bis(trimetilsilil) trifluoroacetamide (BSTFA) [6], N-metil-N-(trimetilsilil)-trifluoroacetamide (MSTFA) [10], N-(tert-butildimetilsilil)-N-metil-trifluoroacetamide (MTBSTFA) [11] o cloroformiato di propile (PCF) [12]. Altri metodi, invece, prevedono la rilevazione dei composti target nella loro forma nativa [1].

Lo scopo della presente ricerca è stata l'ottimizzazione di un metodo analitico rapido e pratico, basato su gascromatografia-spettrometria di massa (GC-MS), per la determinazione quantitativa degli SCFAs, tra cui acido acetico, propionico e butirrico nel plasma umano. Gli analiti di interesse sono stati inizialmente estratti utilizzando acqua acidificata e solvente MTBE, per essere successivamente analizzati tramite *fast* GC-MS. L'acquisizione del segnale è stata eseguita in modalità SIM (*selected ion monitoring*). Inoltre, sono state valutate diverse figure di merito come linearità, limiti di rilevazione (LoD) e di quantificazione (LoQ).

8.2 *Materiali e metodi*

8.2.1 *Standard e reagenti*

Gli standard analitici di acido acetico ($\geq 99,8$ %), acido propionico ($\geq 99,5$ %), acido butirrico ($\geq 99,5$ %) e acido 2-etilbutirrico ($\geq 98,0$ %) sono stati acquistati da Merck Life Science (Darmstadt, Germania) e conservati a -20 °C fino al momento dell'analisi. Acqua (Grado LC-MS, LiChrosolv®), MTBE (HPLC, $\geq 99,8$ %) e acido fosforico (H_3PO_4) (reag. Ph. Eur., ≥ 85 %) sono stati anch'essi acquistati da Merck Life Science.

8.2.2 *Estrazione degli SCFAs dal plasma umano*

I campioni di sangue sono stati raccolti in provette trattate con EDTA da 4 mL, provenienti da due soggetti femminili sani (48 e 58 anni rispettivamente), ricoverati presso l'Unità di Biochimica Clinica dell'Ospedale Policlinico Universitario di Messina e volontariamente reclutati per questo studio, previa firma del consenso informato. I campioni di plasma umano sono stati ottenuti dopo centrifugazione dei campioni di sangue a $2000\times g$ per 5 min e conservati a -80 °C fino all'analisi. L'estrazione degli SCFA dal plasma umano è stata eseguita secondo il protocollo

di Lotti et al. [1], con piccole modifiche. Nello specifico, sono stati aggiunti 10 μL di acqua acidificata (15% H_3PO_4) e 5 μL di soluzione standard interna (ISTD), contenente acido 2-etilbutirrico (1 mg L^{-1} in acqua), a 200 μL di plasma umano in una provetta da 2 mL. Successivamente, 200 μL di solvente MTBE sono stati utilizzati per l'estrazione degli SCFAs. Per facilitare l'estrazione dei componenti target, i campioni sono stati omogeneizzati utilizzando un vortex (2 min) e sonicazione (10 minuti). Infine, il campione è stato centrifugato a 15.000 xg per 10 min in condizioni refrigerate (5° C). La fase organica superiore contenente gli SCFAs è stata raccolta e trasferita in una vial in vetro da 2 mL, dotata di microinserto da 200 μL . Tre estrazioni indipendenti sono state eseguite per ciascun campione di plasma.

8.2.3 Validazione e quantificazione degli SCFAs in plasma umano

La quantificazione degli SCFAs è stata effettuata utilizzando il metodo della curva di calibrazione esterna. Sono state costruite curve di calibrazione separate per acido acetico, propionico e butirrico, utilizzando miscele di lavoro diluite in acqua a diversi livelli di concentrazione (100,0 μM , 50,0 μM , 10,0 μM , 5,0 μM , 1,0 μM , 0,5 μM e 0,1 μM), con tre misure ripetute per ciascun livello. Tutte le miscele di calibrazione sono state inizialmente addizionate con un volume fisso (5 μL) della soluzione ISTD e sottoposte all'estrazione come descritto sopra. Le equazioni di regressione lineare sono state determinate tracciando il rapporto dell'area del picco tra l'analita target e lo standard interno in funzione del loro rapporto di concentrazione. I limiti di rilevazione (LoD) e di quantificazione (LoQ) sono stati determinati come segue: dieci miscele di lavoro sono state preparate per ciascun analita ai livelli più bassi utilizzati per la calibrazione (0,1 μM) e analizzate con il

sistema GC-MS. LoD e LoQ sono stati calcolati utilizzando le seguenti equazioni:

$LoD = 3 \times (\text{dev. std.}/\sqrt{10})$ e $LoQ = 10 \times (\text{dev. std.}/\sqrt{10})$, dove “dev. std.” rappresenta la deviazione standard espressa in unità di concentrazione delle misurazioni replicate ($n = 10$) [13].

8.2.4 Analisi GC-MS degli SCFAs.

Le analisi degli SCFAs nel plasma umano erano effettuate attraverso l'utilizzo di un gascromatografo accoppiato a uno spettrometro di massa GCMS-QP2020 NX system (Shimadzu, Duisburg, Germany). Il sistema era dotato di un autocampionatore AOC-20i (Shimadzu) e un iniettore split/splitless (200 °C). La separazione degli SCFAs è stata effettuata su una colonna capillare GC Nukol, 30 m x 0,25 mm ID 0,25 μm df (Merck Life Science) rivestita con una fase stazionaria a base di poli(etilenglicole) acidificato. Il programma di temperatura era: da 100 °C (3 min) a 210 °C a 30,0 °C min^{-1} . Il gas carrier era l'elio, utilizzato ad una velocità lineare costante di 50 cm s^{-1} (pressione iniziale di ingresso di 133,0 kPa). Il volume di iniezione era 3,0 μL con un rapporto di splittaggio di 1:5. Lo spettrometro MS acquisiva i segnali dei composti target in modalità SIM; tre diversi frammenti per ogni composto erano selezionati all'interno della regione di eluizione del cromatogramma: ione *quantifier* (Q) selezionato per l'analisi quantitativa e due ioni *qualifiers* (q1 e q2) utilizzati per confermare l'identità del composto in esame. Di seguito sono elencati gli ioni selezionati per ciascun composto: acido acetico, 60 m/z (Q), 45 m/z (q1) e 43 m/z (q2); acido propionico, 74 m/z (Q), 73 m/z (q1) e 57 m/z (q2); acido butirrico, 60 m/z (Q), 73 m/z (q1) e 55 m/z (q2); ISTD, 88 m/z (Q), 73 m/z (q1) e 55 m/z (q2). La temperatura della sorgente ionica era 220 °C, mentre

la temperatura dell'interfaccia 220 °C. Il software GCMSsolution (versione 4.50 Shimadzu) è stato utilizzato sia per l'acquisizione che per l'elaborazione dei dati.

8.3 Risultati e discussione

8.3.1 Analisi fast GC-MS per la quantificazione degli SCFAs nel plasma umano

È stato ottimizzato un metodo analitico *fast* GC-MS per la determinazione quantitativa degli acidi grassi a catena corta nel plasma umano. Il trattamento del campione ottimizzato si è dimostrato semplice e facilmente applicabile, poiché non richiede procedure complesse come evaporazione e ridissoluzione, che potrebbero compromettere il recupero degli acidi grassi più volatili. Inoltre, il metodo di preparazione del campione non ha previsto l'impiego di agenti derivatizzanti, riducendo significativamente il costo per analisi e il tempo d'analisi. L'estrazione è stata effettuata aggiungendo un volume minimo di MTBE (200 µL), un solvente non tossico e non cancerogeno, che riduce l'impatto ambientale e i rischi per la salute degli operatori esposti [14]. Inoltre, la fase di MTBE contenente gli SCFAs era localizzata nello strato superiore del sistema bifasico dovuto alla sua densità inferiore rispetto allo strato acquoso. Ciò ha permesso che il prelievo della fase organica risultasse più semplice, evitando il rischio di contaminazione dell'estratto [14].

Per quanto riguarda l'analisi *fast* GC-MS, la separazione degli analiti è stata ottenuta in meno di 7 min, un notevole guadagno in termini di tempo e costo per l'analisi rispetto ai dati riportati in letteratura [1]. La scelta della colonna capillare GC rivestita con gruppi funzionali acidi è stata dettata dal fatto che le forme dei picchi cromatografici erano soddisfacenti per gli acidi carbossilici studiati. Non sono stati rilevati allargamenti di banda, *tailing* o altre anomalie nei cromatogrammi

GC–MS, indicando l'assoluta compatibilità tra la colonna GC e gli analiti da analizzare. Il diametro interno (ID) della colonna era di 0,25 mm, permettendo l'iniezione di volumi maggiori di estratto e migliorando così la sensibilità dell'intero processo analitico.

La Figura 8.1 mostra il cromatogramma GC–MS (in alto) degli SCFAs estratti da un campione di plasma umano che è stato analizzato in questo studio. Nella stessa figura è riportato un cromatogramma GC–MS di un bianco di estrazione (in basso), evidenziando l'assenza di eventuali agenti interferenti dopo i processi di estrazione con solvente. Nella Tabella 8.1 sono elencate le equazioni di regressione lineare, i coefficienti di determinazione (R^2) e gli intervalli di calibrazione per gli acidi acetico, propionico e butirrico esaminati in questo studio di ricerca. I valori di R^2 ottenuti sono stati soddisfacenti, con un valore minimo di 0,9933 per l'acido propionico e un valore massimo di 0,9960 per l'acido acetico. I valori di LoD (limite di rilevazione) (Tabella 8.1) variavano da 0,02 μM (acido butirrico) a 0,03 μM (acido acetico), mentre i LoQ (limite di quantificazione) oscillavano tra 0,06 μM (acido propionico) e 0,10 μM (acido acetico). Valori simili sono stati riportati in letteratura [1, 5].

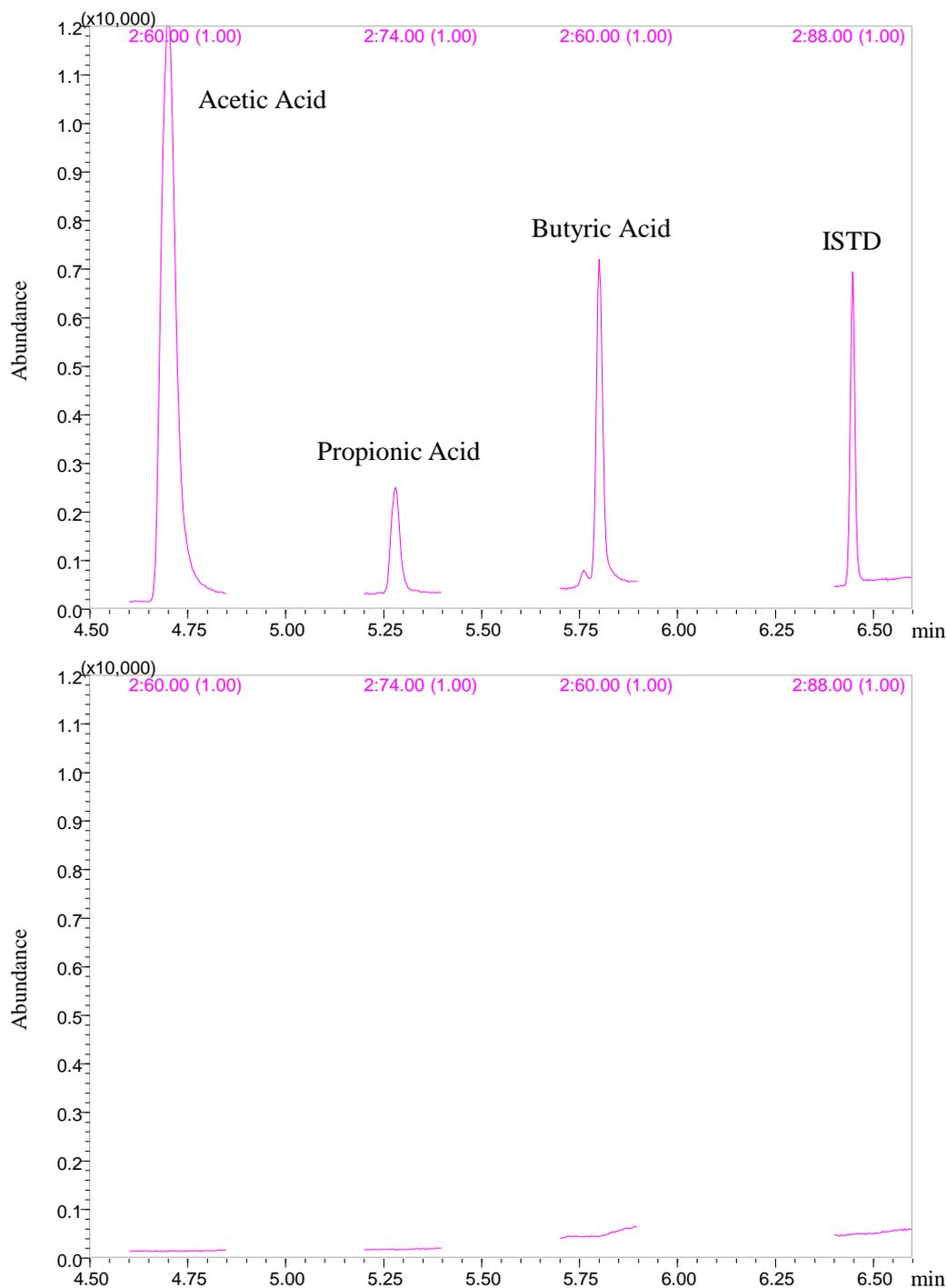


Figura 8.1. Cromatogrammi *fast GC–MS* degli acidi acetico, propionico e butirrico nel plasma umano (in alto) e nel bianco di estrazione con solvente (in basso). I segnali dei picchi cromatografici sono stati ottenuti monitorando gli ioni *quantifier* (Q). Riprodotto con il consenso di Elsevier.

Il metodo analitico descritto si è rivelato una valida alternativa alle procedure convenzionali riportate in letteratura, consentendo la riduzione sia dei tempi di analisi che dei costi grazie all'uso di quantità minime di reagenti chimici.

Tabella 8.1. Equazioni di regressione lineare, valore di R^2 e intervalli di calibrazione espressi in μM . LoD e LoQ sono rispettivamente il limite di rilevamento e il limite di quantificazione, riportati in μM .

SCFAs	Linearità			LoD	LoQ
	Equazione di regressione	R^2	Range di calibrazione		
Acetic acid	$y = 0.069543x + 1.16207$	0.9960	100.0 – 0.10	0.03	0.10
Propionicacid	$y = 0.155211x - 0.100903$	0.9933	10.0 – 0.10	0.02	0.06
Butyric acid	$y = 0.677751x - 0.637558$	0.9934	10.0 – 0.10	0.02	0.07

8.4 Conclusioni

È stato ottimizzato un metodo analitico per il monitoraggio degli acidi acetico, propionico e butirrico nel plasma umano. La procedura di estrazione ha previsto l'uso di volumi minimi di acqua acidificata (10 μL) e di solvente MTBE (200 μL), senza includere procedure laboriose come evaporazione e ridissoluzione degli estratti che potrebbero compromettere il recupero degli acidi volatili. Il metodo di analisi messo a punto ha previsto l'impiego della tecnica *fast* GC-MS. I segnali dei composti di interesse sono stati acquisiti in modalità SIM, consentendo di ottenere dati altamente sensibili e selettivi. Il metodo analitico descritto si è rivelato rapido e pratico per l'analisi degli SCFA nel plasma umano.

BIBLIOGRAFIA

- [1] C. Lotti, J. Rubert, F. Fava, K. Tuohy, F. Mattivi, U. Vrhovsek, Development of a fast and cost-effective gas chromatography-mass spectrometry method for the quantification of short-chain and medium-chain fatty acids in human biofluids, *Anal Bioanal Chem.* 409 (23) (2017) 5555–5567, <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0493-5>.
- [2] Å.M. Henningsson, E.M.G.L. Nyman, I.M.E. Björck, Short-Chain Fatty Acid Content in the Hindgut of Rats Fed Various Composite Foods and Commercial Dietary Fibre Fractions from Similar Sources 82 (4) (2002) 385–393, <https://doi.org/10.1002/jsfa.1049>.
- [3] S. Macfarlane, G.T. Macfarlane, Regulation of short-chain fatty acid production, *Proc Nutr Soc.* 62 (1) (2003) 67–72, <https://doi.org/10.1079/pns2002207>.
- [4] W. Fusco, M.B. Lorenzo, M. Cintoni, S. Porcari, E. Rinninella, F. Kaitsas, E. Lener, M.C. Mele, A. Gasbarrini, M.C. Collado, G. Cammarota, G. Ianiro, Short-chain fatty- acid-producing bacteria: key components of the human gut microbiota, *Nutrients.* 15 (9) (2023), <https://doi.org/10.3390/nu15092211>.
- [5] R. García-Villalba, J.A. Giménez-Bastida, M.T. García-Conesa, F.A. Tomás-Barberán, J. Carlos Espín, M. Larrosa, Alternative method for gas chromatography- mass spectrometry analysis of short-chain fatty acids in faecal samples, *J Sep Sci.* 35 (15) (2012) 1906–1913, <https://doi.org/10.1002/jssc.201101121>.
- [6] S. Zhang, H. Wang, M.-J. Zhu, A sensitive GC/MS detection method for analyzing microbial metabolites short chain fatty acids in fecal and serum samples, *Talanta* 196 (2019) 249–254, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.12.049>.
- [7] L. Yao, E.A. Davidson, M.W. Shaikh, C.B. Forsyth, J.E. Prezzi, C.D. Broeckling, Quantitative analysis of short-chain fatty acids in human plasma and serum by GC–MS, *Anal. Bioanal. Chem.* 414 (15) (2022) 4391–4399, <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03785-8>.
- [8] C. Douny, S. Dufourny, F. Brose, P. Verachtert, P. Rondia, S. Lebrun, M. Marzorati, N. Everaert, V. Delcenserie, M.-L. Scippo, Development of an analytical method to detect short-chain fatty acids by SPME-GC–MS in samples coming from an in vitro gastrointestinal model, *J. Chromatogr. B* 1124 (2019) 188–196, <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.06.013>.
- [9] M. Primec, D. Mičetić-Turk, T. Langerholc, Analysis of short-chain fatty acids in human feces: a scoping review, *Anal Biochem.* 526 (2017) 9–21, <https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.03.007>.

- [10] E. Zarate V. Boyle U. Rupprecht S. Green S.G. Villas-Boas P. Baker F.R. Pinu F.A. Trimethylsilyl (tms), Derivatisation Protocol for Metabolite Profiling by GC-MS Metabolites 7 1 2016 10.3390/metabo7010001.
- [11] G. den Besten, R. Havinga, A. Bleeker, S. Rao, A. Gerding, K. van Eunen, A. K. Groen, D.-J. Reijngoud, B.M. Bakker, The Short-Chain fatty acid uptake fluxes by mice on a guar gum supplemented diet associate with amelioration of major biomarkers of the metabolic syndrome, *PLoS One* 9 (9) (2014) e107392.
- [12] X. Zheng, Y. Qiu, W. Zhong, S. Baxter, M. Su, Q. Li, G. Xie, B.M. Ore, S. Qiao, M. D. Spencer, S.H. Zeisel, Z. Zhou, A. Zhao, W. Jia, A targeted metabolomic protocol for short-chain fatty acids and branched-chain amino acids, *Metabolomics* 9 (4) (2013) 818–827, <https://doi.org/10.1007/s11306-013-0500-6>.
- [13] Eurachem Guide: the fitness for purpose of analytical methods – a laboratory guide to method validation and related topics. 2nd ed., B. Magnusson and U. Örnemark, Editors. 2014.
- [14] V. Matyash, G. Liebisch, T.V. Kurzchalia, A. Shevchenko, D. Schwudke, Lipid extraction by methyl-tert-butyl ether for high-throughput lipidomics, *J Lipid Res.* 49 (5) (2008) 1137–1146, <https://doi.org/10.1194/jlr.D700041-JLR200>.