

VIE DI ARRICCHIMENTO DEL LATTE CON ACIDI GRASSI POLINSATURI

Michela MONICI^{1*}, Enrica BANDINI², Gabriele BESIA¹,
Ivana GANDOLFI¹, Costante PINELLI³, Patrizio CAGNASSO¹

INTRODUZIONE

Dagli anni 1970, quando alcune osservazioni epidemiologiche registrarono una riduzione dell'incidenza di eventi cardiovascolari in popolazioni che assumevano con la dieta significative quantità di acidi grassi polinsaturi (PUFA) omega 3 ($\omega 3$) a lunga catena (ac. eicosapentanoico, EPA e ac. docosaesaenoico, DHA) [1-3], l'interesse nei confronti di questi nutrienti è in continua crescita.

Successivamente numerosi studi non solo hanno confermato i loro benefici nella prevenzione delle patologie cardiovascolari [4-8], ma hanno evidenziato altre importanti funzioni biologiche svolte da questi nutrienti, coinvolti in particolare nello sviluppo e nella funzionalità del sistema nervoso centrale dell'embrione e del neonato [9-12], nell'attività antinfiammatoria [13-16] (interferendo con la produzione di numerosi mediatori), nei processi di coagulazione [17, 18] (agendo sull'aggregazione piastrinica come antitrombotici) e nella funzionalità cardiaca, per le loro proprietà antiaritmiche [19-21].

La quantità plasmatica di PUFA $\omega 3$ a lunga catena, nell'uomo sano, dipende:

- dall'apporto con la dieta dell'acido grasso essenziale α -linolenico (C18:3 $\omega 3$), precursore per la sintesi degli $\omega 3$ a lunga catena;
- dall'efficacia della biosintesi, che può essere limitata da alcuni fattori, quali carenze di vitamine e minerali, squilibri ormonali, malattie croniche, digiuno, abuso di alcol e soprattutto età, che influenzano negativamente l'attività degli enzimi implicati nel processo [22, 23];
- dal rapporto degli acidi grassi $\omega 6$: $\omega 3$ assunti con la dieta, ancora oggi troppo spostato verso gli $\omega 6$, rispetto a quello ideale di 5:1 (LARN), in relazione alla maggior diffusione degli acidi grassi $\omega 6$ rispetto a quelli $\omega 3$ negli alimenti comuni e al consumo insufficiente di pesce, ricco in PUFA $\omega 3$ a lunga catena [24, 25]. Questo determina la competizione degli acidi linoleico ($\omega 6$) e α -linolenico ($\omega 3$) per gli stessi enzimi (in particolare per la δ -6-desaturasi), che

* Corrispondenza ed estratti: m.monici@parmalat.net

¹ Ricerca e Sviluppo-Laboratorio Centrale PARMALAT Via S. Vitale 22, 43038 Sala Baganza (PR).

² Assicurazione Qualità PARMALAT Via Milano 1, 43015 Collecchio (PR).

porta a favorire la biosintesi dell'acido arachidonico, (C20:4 ω 6), rispetto a quella di EPA e DHA.

Dato, quindi, l'inadeguato apporto di acidi grassi ω 3 con la dieta, si è andata affermando la tendenza ad introdurli soprattutto sotto forma di integratori [26, 27]. Poiché qualsiasi nutriente viene meglio assimilato se assunto con gli alimenti ed in piccole concentrazioni, l'industria alimentare ha cercato di contribuire a mettere a disposizione di tutti e nelle quantità adeguate gli acidi grassi ω 3 a lunga catena, "arricchendo" alimenti [28, 29] di grande valore intrinseco, di facile assunzione, consumati quotidianamente da larghi strati della popolazione, quali il latte. Tale alimento inoltre, per le sue caratteristiche chimico-fisiche, rappresenta un veicolo ideale.

L'arricchimento in PUFA di un alimento di origine animale può essere ottenuto aggiungendo tali nutrienti direttamente al prodotto, o integrando opportunamente la razione delle lattifere.

Nel primo caso significa sviluppare una tecnologia adeguata per emulsionare stabilmente l'olio di pesce o il grasso vegetale nel latte e, desiderando ottenere un prodotto a lunga conservazione, applicare un trattamento termico UHT delicato, eseguire un accurato studio del sistema di confezionamento e delle condizioni di conservazione. Tutto questo, per evitare modificazioni organolettiche del latte ed impedire un'alterazione dei PUFA, altamente insaturi e sensibili al calore, all'ossigeno e alla luce, rispettivamente durante il processo tecnologico e la conservazione prima del consumo. Occorre inoltre verificare la biodisponibilità di tali nutrienti. Nel secondo caso significa studiare un'alimentazione appropriata per le vacche, valutare la concentrazione di PUFA escreti nel latte nel tempo, monitorare lo stress metabolico dell'animale e verificare l'influenza del rumen sul metabolismo degli acidi grassi [30].

L'attività del rumen produce normalmente una quantità di isomeri trans geometrici variabile: 1,5-6,5 % degli acidi grassi totali. Il 98% circa è costituito dagli isomeri trans dell'acido oleico: l'acido trans-vaccenico -C18:1 t11- (che rappresenta il 30-50% circa) e l'acido elaidico - C18:1 t9-. L'acido trans-vaccenico [31], presente soltanto nei grassi animali, viene in parte convertito in CLA nell'organismo. Gli isomeri geometrici trans dell'acido linoleico rappresentano soltanto 0,4-1% degli acidi grassi totali. Il grasso del latte è inoltre ricco in CLA, isomeri posizionali dell'acido linoleico, di cui l'acido rumenico (C18:2 c9t11) rappresenta il 90% circa [32] (Fig. 1).

Se numerosi studi epidemiologici enfatizzano il coinvolgimento negativo delle forme trans sulla variazione dei livelli di lipoproteine nel plasma e sull'incidenza delle malattie cardiovascolari, i CLA promettono un effetto benefico su diverse funzioni dell'organismo e protettivo per alcune patologie come cancro [33] obesità e diabete [34].

Nel presente lavoro vengono considerati gli aspetti nutrizionali degli studi eseguiti per mettere a punto un latte addizionato di acidi grassi ω 3 a lunga catena, sia attraverso l'aggiunta di olio di pesce che attraverso l'integrazione dell'alimentazio-

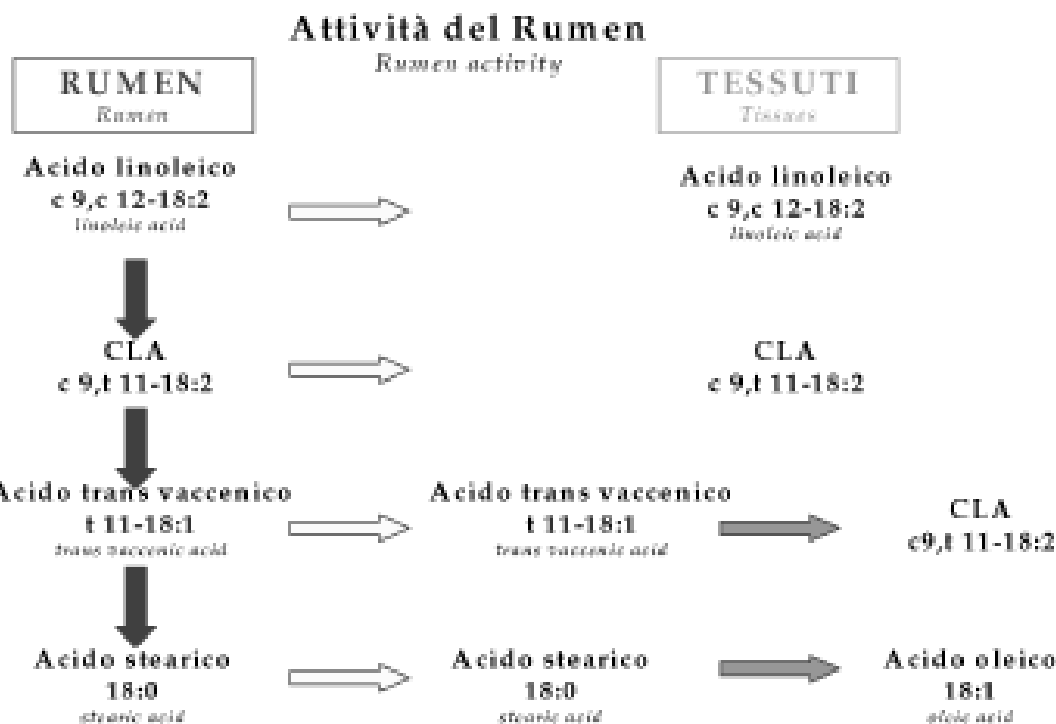


Figura 1 – Formazione di CLA nel rumen e nei tessuti.
Figure 1 – CLA formation in rumen and tissues.

ne delle vacchine. Vengono verificate le concentrazioni di PUFA $\omega 3$ nel latte ottenibili attraverso le due modalità di arricchimento, la biodisponibilità e le variazioni delle quantità di isomeri trans geometrici (in particolare dell'ac.oleico e linoleico) e posizionali (CLA) [35, 36]. Sia gli isomeri trans che i CLA sono naturalmente presenti nel latte in seguito all'attività dei microrganismi del rumen [37, 38].

Sono circa 400 i differenti acidi grassi identificabili nel latte, con catene acido di lunghezza variabile da 4 a 20 atomi di carbonio totali e una gamma di configurazioni steriche altrettanto ampia: arricchire il latte con acidi grassi polinsaturi a lunga catena significa aggiungere ad una composizione già molto complessa, acidi grassi altrettanto complessi e particolarmente delicati. Dal punto di vista delle necessarie verifiche analitiche significa quindi disporre di tecniche che consentono una separazione fine di tutti gli acidi grassi, dal C4 al C22:6 $\omega 3$, degli isomeri posizionali, delle forme trans.

MATERIALI E METODI

- a) *Arricchimento del latte in acidi grassi omega 3 per aggiunta di olio di pesce*
- La creazione del prodotto ha richiesto la selezione di una materia prima (olio di

pesce) di elevata qualità, frutto di speciali processi di estrazione, purificazione e deodorazione. È stata sviluppata inoltre una tecnologia particolare per emulsionare stabilmente l'olio nel latte ed identificato un procedimento esclusivo di trattamento UHT, in grado di ottimizzare l'effetto termico sul latte rendendo omogenea la diffusione del calore e più efficaci gli scambi termici. Sono stati impiegati antiossidanti naturali quali le vitamine E e C, per mantenere inalterata la struttura degli omega 3 e prevenire l'ossidazione dei doppi legami. È stato realizzato un accurato studio del packaging e delle condizioni di conservabilità principalmente attraverso la valutazione della frazione volatile ed è stato condotto uno studio clinico, per valutare la biodisponibilità e l'effetto delle quantità aggiunte.

b) *Arricchimento del latte in acidi grassi omega 3 attraverso l'alimentazione delle vacche* - In collaborazione con un partner specializzato nella gestione ed alimentazione delle vacche da latte, più gruppi di animali, per un totale di circa 2000 lattifere, sono stati alimentati con una dieta "mirata" secondo una formulazione definita, sotto stretto controllo veterinario. Settimanalmente, per 10 settimane, è stato prelevato un campione di latte di massa e analizzato in confronto a quello di un gruppo di vacche alimentate in modo "standard" (unifeed), preso come controllo.

La determinazione quantitativa degli acidi grassi polinsaturi è stata effettuata secondo un metodo gascromatografico messo a punto nel Laboratorio Centrale Parmalat [39]. L'ottimizzazione e affidabilità è stata valutata con uno studio pilota condotto in collaborazione con l'Istituto Lattiero Caseario di Lodi (G Contarini), con le Istituzioni di Industrie Agrarie dell'Università di Bologna (G Lerker), di Udine (L Conte, R Bortolomeazzi) e l'Università Politecnica delle Marche (N Frega). Il metodo è stato proposto al comitato FIL-IDF/ISO per la validazione internazionale ed accettato in seguito all'esito positivo del circuito internazionale (Draft ISO/DIS 23065/IDF 211-2005).

Il metodo prevede l'estrazione del grasso del latte, secondo la norma ISO 14156, l'aggiunta di metil-tricosanoato (C23:0me) come standard interno e la transmetilazione secondo la norma ISO 15884. La determinazione quantitativa degli acidi grassi $\omega 3$ e $\omega 6$ viene eseguita con iniezione in split/splitless su colonna capillare con fase stazionaria in grado di separare in modo soddisfacente i metilesteri degli acidi grassi, quale una polietilen glicol (Omegawax 320 Supelco 30m, 0,32 mm ID, 0,25 μ m film thickness). Le condizioni gascromatografiche ed in particolare la programmata di temperature (da 50°C a 220°C) sono scelte in modo da ottenere una separazione ottimale dei picchi, soprattutto CLA, ac. stearidonico e DPA e DHA. La rivelazione è in FID.

Sono stati quantificati, in mg/100g grasso, i seguenti acidi grassi:

C18:3 $\omega 3$: acido 9,12,15 octadecatrienoico (α linolenic acid: alfa-LNA)

C18:4 $\omega 3$: acido 6,9,12,15 octadecatetraenoico (Stearidononic acid)

C20:5 $\omega 3$: acido 5,8,11,14,17 eicosapentaenoico (EPA)

C22:5 $\omega 3$: acido 7,10,13,16,19 docosapentaenoico (DPA)



C22:6 ω 3 : acido 4,7,10,13,16,19 docosaesaenoico (DHA)

C18:2 ω 6 (ac.linoleico)

C18:2 coniugato: acido 9 cis,11 trans, octadecadienoico (CLA).

L'analisi per la valutazione delle forme trans, espresse come % trans/(cis+trans), è stata eseguita con una colonna altamente polare con fase stazionaria in cianosilicone (Supelco SP 2380 30m x 0,25mm) utilizzando una programmata di temperature in grado di separare le forme isomeriche geometriche trans dell'acido oleico e dell'acido linoleico [40].

RISULTATI

1) *Arricchimento del latte in acidi grassi omega 3 con aggiunta di olio di pesce* – L'aggiunta ha consentito di realizzare un prodotto UHT con un contenuto di acidi grassi ω 3 totali pari a 80 mg/100ml di latte (di cui 60 mg rappresentati da EPA + DHA, 25:35).

Lo studio clinico, condotto in collaborazione con l'Istituto di Scienze Farmacologiche dell'Università di Milano, ha dimostrato che, sostituendo nella dieta quotidiana 1/2 litro di latte con la stessa quantità di un latte addizionato di acidi grassi omega 3, si ottiene un significativo miglioramento del profilo lipidico già dopo tre settimane, con una riduzione dei trigliceridi ed un aumento del colesterolo-HDL [41].

2) *Arricchimento del latte in acidi grassi omega 3 attraverso l'alimentazione delle lattifere* – L'analisi degli acidi grassi ω 3 e ω 6 ha consentito di osservare l'andamento dei valori nel tempo e di verificare che la dieta "integrata" adottata, alla 10^a settimana, determina:

- incremento degli acidi grassi ω 3 totali (+ 65%), arrivando a 1702mg/100g di grasso. Tra la terza e la quinta settimana viene raggiunto un picco (+110% sul controllo), seguito da un calo intorno alla 5^a-7^a e da una successiva crescita a partire dall'ottava;
- mantenimento della concentrazione dell'acido grasso ω 3 α -linolenico, che si stabilizza a livello del controllo, dopo aver raggiunto un massimo intorno alla terza settimana (+ 45% sul controllo);
- incremento costante nel tempo degli acidi grassi ω 3 a lunga catena, EPA+DHA+DPA, raggiungendo 634mg/100g di grasso per EPA+DHA e 341mg/100g di grasso per DPA (Fig. 2).

L'andamento crescente degli omega 3 totali si accompagna ad una variata distribuzione di questi acidi grassi nel tempo come si evince dal confronto tra i due grafici a torta in figura 3: nelle prime settimane l'aumento degli ω 3 totali è correlato principalmente all'incremento di acido linolenico, mentre nelle successive settimane di supplementazione l'aumento totale è dovuto all'incremento dei PUFA a lunga catena.

- mantenimento della concentrazione degli acidi grassi omega 6 (ac. linoleico), che evidenzia un incremento già nelle prime settimane (+ 56%, 2760/100g

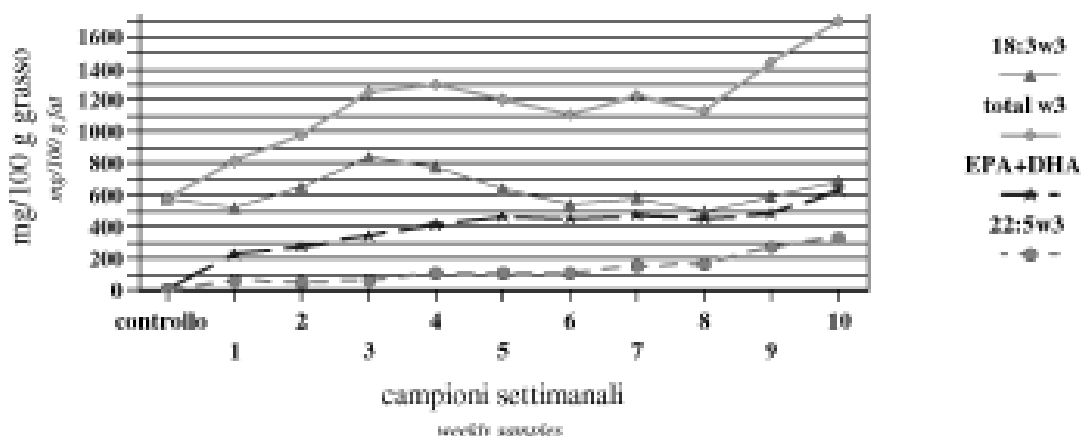


Figura 2 – Andamento del contenuto di acidi grassi omega 3 nei campioni di latte arricchito attraverso alimentazione integrata delle vacche.

Figure 2 – Trend of omega 3 fatty acids content in milk enriched by feeding of cows.

grasso), seguito da un graduale calo che lo porta a stabilizzarsi ad un livello appena superiore al controllo (1765mg/100g grasso);

- incremento dei CLA, che aumentano rapidamente già dalle prime settimane (+ 200%, 1490mg/100 grasso) e si stabilizzano a valori alti (+180%, 1308 mg/100g grasso), sempre rispetto al controllo (Fig. 4).

Un'analisi eseguita a distanza di 18 settimane dall'inizio della sperimentazione conferma che il piano di alimentazione impostato è verosimilmente in grado di mantenere il plateau di concentrazione raggiunto dopo 10 settimane.

- incremento della concentrazione delle forme trans dell'acido oleico e dell'acido linoleico, rispetto a quelle normalmente presenti nel latte (8% per l'acido oleico e 14% per l'acido linoleico). In particolare: le forme "trans" dell'acido oleico tendono a raggiungere un plateau intorno alla quarta settimana di alimentazione mirata e si stabilizzano intorno al 22%, mentre le "trans" dell'acido linoleico tendono a raggiungere un plateau intorno alla sesta settimana e si stabilizzano intorno al 38% (Fig. 5).

Dati confrontabili sono stati ottenuti anche in altre sperimentazioni analoghe (N Frega - Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Università Politecnica delle Marche). In tabella 1 appare come l'arricchimento naturale induce un incremento delle forme trans.

Sono state valutate le concentrazioni dell'acido vaccenico e dell'acido elaidico (isomeri trans dell'acido oleico), data la funzione del vaccenico di substrato per la formazione di CLA nell'organismo.

- Il rapporto vaccenico: elaidico si mantiene pressoché inalterato, pur risultando la loro somma tre volte superiore (circa 90 mg/g grasso) rispetto a quella rilevata nel latte di controllo.

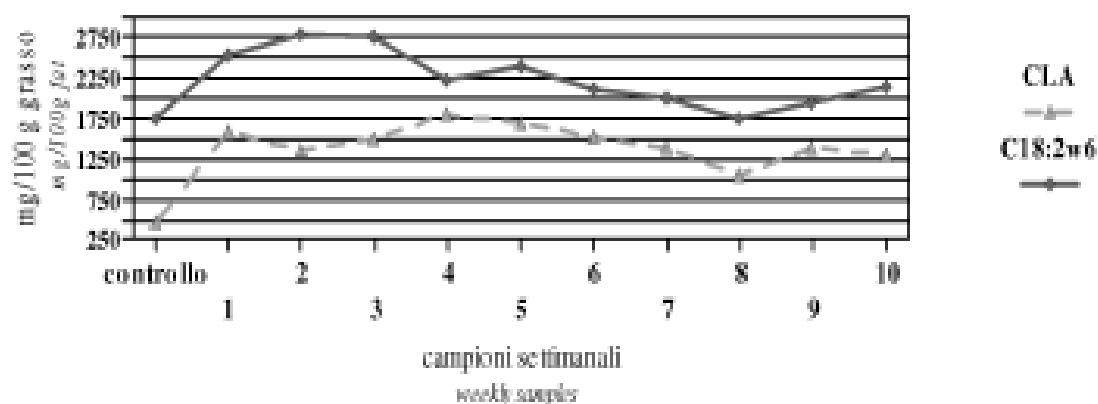


Figura 4 – Andamento del contenuto di acidi grassi omega 6 nei campioni di latte arricchito attraverso alimentazione integrata delle vacche.
 Figure 4 – Trend of omega 6 fatty acids content in milk enriched by feeding of cows.

- un incremento significativo della formazione di isomeri geometrici trans, dovuto all'attività metabolica del rumen, 2-3 volte superiore a quella che si riscontra nel latte di controllo e nel latte arricchito con aggiunta di olio di pesce.
- un aumento significativo di CLA, dovuto all'attività metabolica del rumen, 2-3 volte superiore rispetto alla concentrazione normalmente presente nel latte [42].

L'arricchimento con aggiunta di olio di pesce consente di raggiungere livelli di PUFA a lunga catena con un più alto significato nutrizionale, di poterne garantire la costanza della concentrazione entro un range più ristretto e non determi-

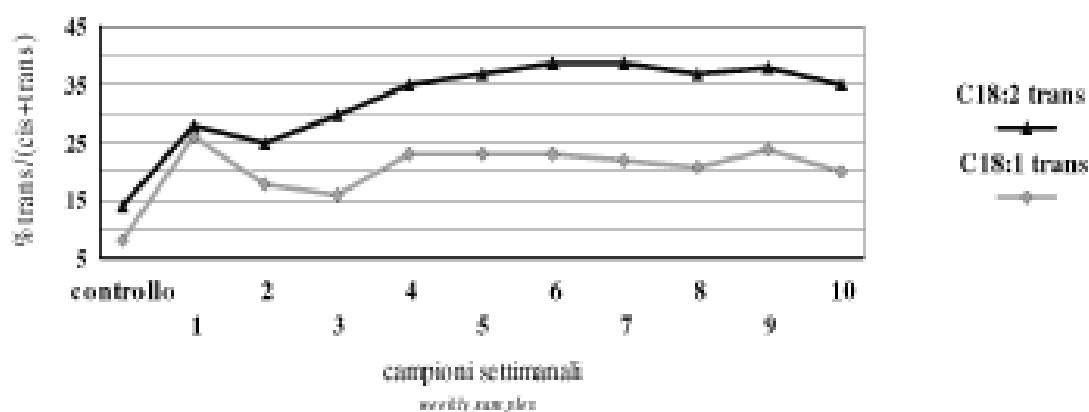


Figura 5 - Analisi dei rapporti isomerici cis/trans nel latte naturalmente arricchito.
 Figure 5 - Analysis of cis/trans ratios in milk enriched by feeding of cows.

Tabella 1 – Confronto dei rapporti isomerici cis/trans tra latte controllo, latte $\omega 3$ con olio di pesce e tre diversi esperimenti di arricchimento tramite alimentazione animale.
 Table 1 – Comparison of cis/trans isomeric forms ratios between control milk, fish oil enriched milk and three different milks enriched by feeding of cows.

	C18:1 % trans/(cis+trans)	C18:2 % trans/(cis+trans)
Latte controllo <i>Control milk</i>	8	14
Latte addizionato di $\omega 3$ (olio di pesce) <i>$\omega 3$ enriched milk (fish oil)</i>	8	16
Latte naturalmente arricchito di $\omega 3$ (alghe) <i>$\omega 3$ feed enriched milk (algae)</i>	25	24
Latte naturalmente arricchito di $\omega 3$ (olio di pesce) <i>$\omega 3$ feed enriched milk (fish oil)</i>	17	27
Latte naturalmente arricchito di $\omega 3$ (dieta mirata – 8 ^{ta} sett.) <i>$\omega 3$ feed enriched milk (specific diet – 8th week)</i>	22	38

na un incremento percentuale di isomeri trans rispetto al latte di controllo. Viene richiesto peraltro un controllo accurato della qualità della materia prima (olio di pesce), soprattutto in termini di microinquinanti, quali PCB e metalli pesanti, data la provenienza, principalmente dai Mari del Nord. La modalità di arricchimento naturale del latte pone invece l'interrogativo sulla possibilità di garantire entro intervalli costanti il livello dei (PUFA) e richiede nel tempo un continuo e rigoroso monitoraggio analitico di tutto il sistema da parte di un laboratorio specializzato. Poiché lo studio sperimentale a dieta integrata ha rivelato una certa variabilità nel tempo, sia del contenuto percentuale di materia grassa del latte (da 3,5% a 4,1%) che degli acidi grassi polinsaturi, la composizione della razione integrata ed il sistema di somministrazione ai diversi gruppi di vacche è stato riconsiderato al fine di ridurre la variabilità della composizione degli acidi grassi nel tempo e lo stress metabolico dell'animale, che influiscono negativamente sul benessere e la produttività delle lattifere.

RIASSUNTO – Le ragioni di arricchimento del latte in acidi grassi polinsaturi della serie $\omega 3$ sono correlabili al rapporto degli acidi grassi $\omega 6:\omega 3$ assunti con la dieta, ancora oggi troppo spostato verso gli $\omega 6$ rispetto a quello ideale di 5:1 (LARN). Le modalità di aggiunta degli acidi grassi omega 3 a lunga catena al latte sono

Tabella 2 – Confronto tra latte di controllo e latti arricchiti con due diverse modalità in mg/100g di grasso.

Table 2 – Comparison between control milk vs two enriched milks obtained in different way as mg/100g fat.

Acidi grassi <i>Fatty acids</i>	Latte controllo <i>Control milk</i>	Latte addizionato di olio di pesce <i>Fish oil enriched milk</i>	Latte naturalmente arricchito <i>Feed enriched milk</i>
EPA + DHA	----	3530	598
DPA	----	294	352
Ac. α -linolenico <i>α-linolenic acid</i>	588	595	667
Omega 3 totali <i>Total omega 3</i>	588	4765	1618
Ac. linoleico <i>Linoleic acid</i>	1765	1790	2143
CLA	471	471	1281
% trans:			
- ac. oleico <i>oleic acid</i>	8	8	20
- ac. linoleico <i>linoleic acid</i>	14	16	36

essenzialmente attraverso l'aggiunta diretta di un grasso ricco di tali nutrienti (olio di pesce) e attraverso l'integrazione mirata della razione alimentare delle vacche da latte. Nel presente studio vengono considerate le differenti problematiche relative alle modalità di arricchimento, viene indicato un metodo analitico dedicato alla valutazione quali-quantitativa del profilo acido e sono focalizzati gli aspetti nutrizionali. L'arricchimento con olio di pesce consente di raggiungere nel latte livelli di PUFA ω 3 a lunga catena, di ottima biodisponibilità, tre volte superiori a quelli raggiunti con l'integrazione della razione alimentare delle vacche, rappresentando un contributo significativo per colmare il gap nutrizionale della dieta. L'utilizzo di olio richiede però un controllo accurato dei microinquinanti. L'arricchimento attraverso la dieta delle lattifere consente di arricchire il

latte in acidi grassi $\omega 3$ e in CLA; determina, per contro, un significativo incremento degli isomeri trans, che raggiungono valori circa 3 volte superiori rispetto a quelli normalmente riscontrati nel latte vaccino. Pone inoltre l'interrogativo del mantenimento delle concentrazioni nel tempo dei PUFA e richiede una valutazione accurata dello stress metabolico dell'animale.

Parole chiave: latte vaccino, acidi grassi polinsaturi (PUFA), omega 3 ($\omega 3$), acidi grassi trans

ABSTRACT – Methods to enrich cow milk with polyunsaturated omega-3 ($\omega 3$) fatty acids. – The aims for which it has been considered advisable to enrich milk with long chain $\omega 3$ PUFA is the actual ratio $\omega 6:\omega 3$ fatty acids of the diet, too shifted towards $\omega 6$ fatty acids, in comparison with LARN indications (5:1). It is possible to enrich cow's milk in long chain polyunsaturated fatty acids (omega 3) through the addition of fat rich in these nutrients (fish oil) and through the integration of the cow's diet. This work reports about some problems connected to the modality of milk enrichment, the analytical method performed to evaluate the quali-quantitative fatty acids composition of milk enriched in long chain omega 3 PUFA fat and examines, especially, the nutritional aspects related to the variation of fatty acids composition. The addition of fish oil to cow's milk allows to achieve concentrations of long chain omega 3 PUFA in milk, that are three times higher than that it has been obtained with the cow's diet integration way. The bioavailability, tested with a clinical study, it has been shown to be good. The fish oil use needs the evaluation of micropollutants presence. The integration of the cow's diet allows to add long chain omega 3 PUFA and to increase the CLA concentration. It causes a significant increase of trans fatty acids concentration too: about 3 times higher than normally found in cow's milk. It points out the question about the control of PUFA's concentration maintaining in time and the evaluation of metabolic stress of the cows.

Keywords: cow's milk, PUFA, Omega 3, CLA, Trans fatty acids

BIBLIOGRAFIA

- 1) Dyeberg J, Bang HO (1978). *Eicosapentaenoic acid and prevention of thrombosis and atherosclerosis?* Lancet, 2, 117-119.
- 2) Brenner R (1989). *Factors influencing fatty acid chain elongation and desaturation* *The Role of Fats in Human Nutrition*, 2nd ed. Vergrossen and Crawford. Academic Press, London, UK.
- 3) Brenner R (1990). *Endocrine control of fatty acid desaturation*. Biochem. Soc. Trans., 34, B4-8.
- 4) Harper CR (2002). *The Fats of life . The role of omega 3 fatty acids in the prevention of cardiovascular disease*. Arch. Intern. Med., 161, 2185-2192.
- 5) Israel DH, Gorlin R (1992). *Fish oils in the prevention of atherosclerosis*. J Am. Coll. Cardiol., 19, 174-185.

- 6) Bigger JT (2001). *Polyunsaturated fatty acids and cardiovascular events. A fish tale.* *Circulation*, 130, 623-625.
- 7) Poli A (2002). *Acidi grassi omega 3 e prevenzione cardiovascolare.* *Trends Med.*, 2(3), 129-136.
- 8) Von Schacky C (2000). *N-3 Fatty acids and prevention of coronary atherosclerosis.* *Am. J. Clin. Nutr.*, 71 (suppl), 224S-227S.
- 9) Connor WE, (2000). *Importance of n-3 fatty acids in health and disease.* *The American Journal of Clinical Nutrition*, 71, 171S-175S.
- 10) British Nutrition Foundation, (Luglio 1999) *Briefing Paper: n-3 Fatty Acids and Health.*
- 11) AHA Science Advisory NJ, Stone MD (1996). *Fish Consumption, Fish Oil, Lipids and Coronary disease.* *Circulation*, 94, 2337-2340.
- 12) GISSI (1999). *Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial.* *The Lancet*, 354, 447-455.
- 13) Endres S, Eisenhut T, Sinha B (1995). *N-3 polyunsaturated fatty acids in the regulation of human cytokine synthesis.* *Biochem. Soc. Trans.*, 23, 277-281.
- 14) Schmidt EB, Pederson JO (1991). *N-3 fatty acids and leucocyte chemotaxis. Effects in hyperlipidemia on dose response studies in healthy men.* *Atheroscler Thromb*, 11, 429-435.
- 15) Zurier RB (1993). *Fatty acids, inflammation and immune responses.* *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, 48(1), 57-62.
- 16) Moser U (2004). *The importance of PUFAs in a balanced nutrition for immune modulation.* *Progr. Nutr.*, 6, 67-71.
- 17) Rogers S, James KS (1987). *Effects of a fish oil supplement on serum lipids, blood pressure, bleeding time, haemostatic and rheological variables: a double blind randomised controlled trial in healthy volunteers.* *Atherosclerosis*, 63, 137-143.
- 18) Haglund O, Metha JL (1994). *Effects of fish oil on some parameters of fibrinolysis and lipoprotein in healthy subjects.* *Am J Cardiol*, 74, 189-192.
- 19) Billman GE, Kang XJ (1999). *Prevention of sudden cardiac death by dietary pure w3 polyunsaturated fatty acids in dogs.* *Circulation*, 99, 2452-2457.
- 20) Leaf A, Kang JX (1996). *Prevention of cardiac sudden death by n-3 fatty acids: a review of the evidence.* *J. Intern. Med.*, 240, 5-12.
- 21) Kang JX, Leaf A (1996). *Antiarrhythmic effects of polyunsaturated fatty acids. Recent studies.* *Circulation*, 94, 1774-1780.
- 22) BNF: *Unsaturated Fatty Acids Nutritional and physiological significance.* pp 35-48. Chapman & Hall, London, UK.
- 23) Griinari JM, Corl BA, Lacy SH, Chouinard PY, Nurmala KVV, Bauman DE (2000) *Conjugated linolenic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by Δ^2 desaturase.* *Journal of Nutrition*, 130, 2285-2291.
- 24) Società Italiana di Nutrizione Umana: LARN (1996) *Revisione*, 63-8.

- 25) Berra B, Bellia G, Montorfano G (2003) *Acidi grassi n-3: nutrienti, alimenti funzionali, farmaci?* Progr. in Nutr., 2, 149-159.
- 26) Lovegrove JA, Brooks CN (1997) *Use of manufactured foods enriched with fish oils as a means of increasing long-chain n-3 PUFA intake.* British Journal of Nutrition, 78, 223-236.
- 27) Simopoulos AP (1998). *Overview of Evolutionary Aspects of omega 3 Fatty Acids in Diet*, World Rev. Nutr. Diet. Basel. Karger, 83, 1-11
- 28) Diplock A, Aggett P, Ashwell M, Bornet F, Fern E, Robertfroid M (1999) *Scientific Consensus of functional foods in Europe: consensus document*, British Journal of Nutrition, 81, 1-27.
- 29) Carnovale E, Sambuy Y, (1999) *Dagli alimenti ai nutrienti*, Fondamenti di Nutrizione Umana, cap.4, 83-126, Il Pensiero Scientifico Editore, Roma
- 30) Tamminga S (2001). *Effects of Feed, Feed Composition and Feed Strategy on Fat Content and Fatty Acid Composition in Milk.* Bulletin of International Dairy Federation, 366, 15-27.
- 31) Banni S, Angioni E, Murra E, Carta G, Melis MP, Bauman D, Dong Y, IP C (2001) *Vaccenic acid feeding increases tissues levels of conjugated linolenic acid and suppresses development of premalignant lesions in rat mammary gland.* Nutr. Cancer, 41,91-97.
- 32) Fritsche J, Steinahart H (1998). *Analysis, occurrence and physiological properties of trans fatty acids with particular emphasis on conjugated linoleic acid isomers - a review.* Fett/Lipid, 100 (6 S), 190-210.
- 33) Parodi PW (1999). *Conjugated Linoleic Acid and other Anticarcinogenic Agents of Bovine Milk Fat.* J Dairy Sci; 82, 1339-1349.
- 34) Ackman RG (2000) *The dicotomy of the trans ethylenic bond in our foods.* Eur. J. Lipid Sci. Technol., 102, 630-632.
- 35) Banni S (2002). *Conjugated linolenic acid and metabolism.* Curr. Opin. Lipidol., 13, 261-266.
- 36) Banni S, Angioni E, Carta G, Casu V (1999). *Influence of dietary conjugated linolenic acid on lipid metabolism in relation to its anti-carcinogenic activity.* Advances in conjugated linolenic acid research, vol.1, pp 307-318. EDS. AOCS. Press, Champaign, IL.
- 37) Soustre Y, Laurent B, Schrezenmeir J, Pfeuffer M, Miller G, Parodi P (2002). *Trans Fatty Acids* Bulletin of International Dairy Federation; 377, 20-31.
- 38) Precht D, Molckentin J (2000). *Trans unsaturated fatty acids in bovine milk fat and dairy products.* Eur. J. Lipid Sci. technol., 102, 635-639.
- 39) Cagnasso P, Bortolomeazzi R, Contarini G, Conte L, Frega N, Gandolfi I, Lercker G (2003). *Determinazione quantitativa degli acidi grassi n-3 addizionati al latte vaccino: risultati preliminari di un test di validazione.* Progr. in Nutr., 2, 200.
- 40) Pokorny J (2000). *Analytical determination of trans unsaturated fatty acid.* Eur. J. Lipid Sci. technol, 102, 650-651.

- 41) Visioli F, Risè P (2000). *Very low intakes of n-3 fatty acids incorporated into bovine milk reduce plasma triacylglycerol and increase HDL- cholesterol concentrations in healthy subjects.* Pharm. Research, *41*(5), 571-576.
- 42) Banni S (2002). *Conjugated linolenic acid and isomers (CLA): good for everything?* Sciences Des Aliments, *22*, 371-380.