



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

**FACOLTÀ DI SCIENZE MM.FF.NN.  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE  
CORSO DI LAUREA SPECIALISTICA IN CHIMICA**

**Tesi di Laurea**

**Effetti dello stress termico sugli oli alimentari**

**RELATORE: PROF. ALESSANDRO BAGNO**

**CONTRORELATORE: DR. DENIS BADOCCO**

**LAUREANDO: MARCO SALMISTRARO**

**ANNO ACCADEMICO 2008-2009**

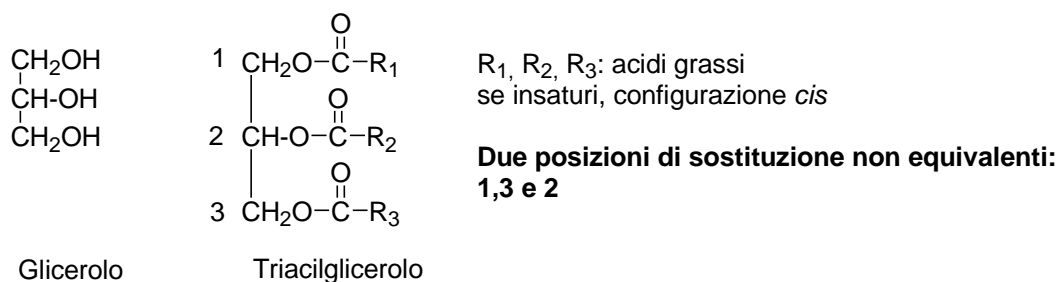
<b>1. Introduzione .....</b>	<b>3</b>
1.1 I lipidi .....	3
1.2 Ossidazione dei lipidi .....	6
1.2.1 Autossidazione dei lipidi .....	6
1.2.2 Ossidazione fotoindotta .....	10
1.2.3 Ossidazione catalizzata da metalli (enzimatica) .....	12
1.2.4 Decomposizione dei perossidi .....	12
1.3 Obiettivo della tesi .....	14
<b>2 Materiali e metodi .....</b>	<b>15</b>
2.1 Reagenti, solventi e strumentazione .....	15
2.1.1 Eliminazione dei perossidi iniziali .....	16
2.2 Trattamento termico .....	17
2.3 Preparazione dei campioni per l'analisi NMR .....	19
2.4 Calcolo del numero medio di doppi legami .....	20
2.5 Standard di pirazina .....	21
2.6 Spettroscopia NMR .....	23
2.6.1 Fondamenti dell'NMR .....	24
2.6.2 Fenomeni di rilassamento .....	27
2.6.3 Il chemical shift .....	28
2.6.4 Il problema del range dinamico .....	29
2.6.5 Sequenze di singolo e doppio spin-eco .....	30
2.6.6 Ottimizzazione dei parametri di acquisizione .....	34
<b>3 Risultati e discussione .....</b>	<b>38</b>
3.1 Prodotti principali di ossidazione .....	38
3.2 Esperimenti su oli non trattati .....	40
3.3 Esperimenti con eliminazione preliminare dei perossidi .....	42
3.4 Esperimenti a bassa temperatura .....	49
3.5 Esperimenti in assenza di ossigeno .....	50
3.6 Esperimenti su oli usati .....	51
3.7 Discussione .....	53
<b>4 Conclusioni .....</b>	<b>54</b>
4.1 Sviluppi futuri .....	54
<b>5 Bibliografia .....</b>	<b>56</b>

# 1. Introduzione

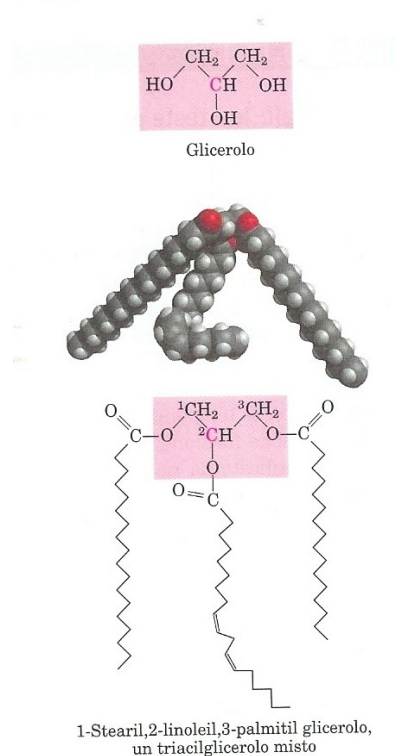
## 1.1 I lipidi

I **lipídi** (detti anche **grassi**) sono molecole organiche, presenti in natura, raggruppate sulla base delle loro proprietà comuni di solubilità: insolubili in acqua (per questo si definiscono idrofobici) e solubili in solventi organici non polari, come l'etere o l'esano. I lipídi hanno una densità significativamente minore di quella dell'acqua. Nonostante la loro somiglianza in termini di solubilità, i lipídi sono molto diversi tra loro per quanto riguarda la struttura chimica, in quanto comprendono esteri e idrocarburi e possono essere aciclici, ciclici o policiclici. A seconda del grado di complessità, i lipídi si suddividono in 3 categorie: lipídi semplici, lipídi complessi e lipídi derivati.

Quelli che ci interessano sono i lipídi semplici, cioè quelli costituiti solo da carbonio, idrogeno e ossigeno, e comprendono triacilgliceroli (detti anche trigliceridi), cere e terpeni. I triacilgliceroli (Figura 1) sono i lipídi più abbondanti di origine naturale, e costituiscono i grassi animali e gli oli vegetali. Essi sono costituiti da tre molecole di acidi grassi legati ai gruppi ossidrilici di una molecola di glicerolo tramite un legame estereo. Quelli che presentano i tre acidi grassi uguali sono chiamati triacilgliceroli semplici e prendono il nome dell'acido grasso costituente. Normalmente i grassi di origine naturale contengono due o più acidi diversi; in questo caso vengono chiamati triacilgliceroli misti (Schema 1).



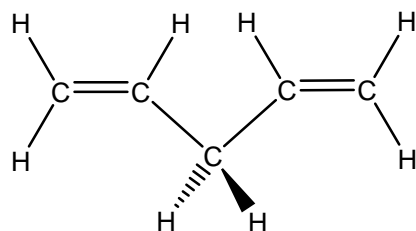
**Schema 1.** Struttura dei triacilgliceroli.



**Figura 1.** Il glicerolo e un triacilglicerolo.

Gli acidi grassi sono acidi carbossilici con una catena idrocarburica lineare composta da 4 a 36 atomi. Sono stati isolati da cellule e tessuti più di 500 tipi di acidi grassi, ma quelli più comunemente presenti nei triacilgliceroli hanno quasi sempre un numero pari di atomi di carbonio (ciò a causa della loro via di biosintesi, che prevede l'aggiunta di frammenti derivanti dall'acido acetico), solitamente compreso tra 12 e 20.

Gli acidi grassi possono essere saturi o insaturi. Nel secondo caso si possono distinguere acidi grassi monoinsaturi (spesso designati come MUFA, Mono-Unsaturated Fatty Acids) e poliinsaturi (PUFA). Negli acidi grassi insaturi solitamente i doppi legami si trovano in posizioni fisse: il primo tra gli atomi C-9 e C-10 ( $\Delta^9$ ) e negli acidi poliinsaturi i successivi si trovano in genere nelle posizioni  $\Delta^{12}$  e  $\Delta^{15}$ . Nella maggior parte degli acidi grassi presenti in natura i doppi legami sono in configurazione *cis* e non sono coniugati tra loro. Vi sono quindi molti atomi di idrogeno in posizioni bis-alliliche (vedi Schema 1) che, come si vedrà, giocano un ruolo chiave nei processi ossidativi.



**Schema 1.** Atomi di idrogeno in posizione bis-allylica nella catena di un acido grasso.

I triacilgliceroli contenenti prevalentemente acidi grassi saturi possono adottare una conformazione estesa di tipo *trans*; quindi allo stato cristallino, si impaccano regolarmente grazie a molte interazioni idrofobiche. Al contrario, la presenza di uno o più doppi legami *cis* (che introducono ripiegamenti nella struttura, vedi fig. 1) tende a produrre aggregati meno stabili. Pertanto, i grassi contenenti elevate quantità di acidi grassi insaturi hanno punto di fusione più bassi rispetto ad acidi grassi saturi con una lunghezza di catena simile.<sup>[1]</sup>

Infatti i lipidi di origine animale (contenuti abbondantemente in burro, strutto e sego e costituiti principalmente da acidi grassi saturi) sono perlopiù solidi a temperatura ambiente. I grassi vegetali, invece, contengono perlopiù acidi grassi insaturi e sono liquidi a temperatura ambiente, e sono detti oli. Gli oli vegetali possono comunque essere idrogenati a grassi saturi e quindi solidi (come nel caso della margarina). Gli acidi grassi più comuni negli oli vegetali sono riportati in Tabella 1.

**Tabella 1.** Alcuni acidi grassi saturi ed insaturi presenti negli oli di tipo vegetale e animale.

Nome	n.C, insat., posizione	Formula	Struttura
Miristico	14:0	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{12}-\text{COOH}$	
Palmitico	16:0	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{14}-\text{COOH}$	
Stearico	18:0	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{16}-\text{COOH}$	
Oleico	18:1 (9)	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$	
Elaidinico	18:1 (9)	Isomero <i>trans</i> dell'acido oleico	
Linoleico	18:2 (9,12)	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_4-(\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2)_2-(\text{CH}_2)_5-\text{COOH}$	
$\alpha$ -Linolenico	18:3 (9,12,15)	$\text{CH}_3-\text{CH}_2-(\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2)_3-(\text{CH}_2)_6-\text{COOH}$	
Erucico	22:1 (13)	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_{10}-\text{COOH}$ Nocivo	

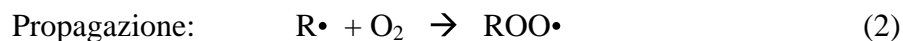
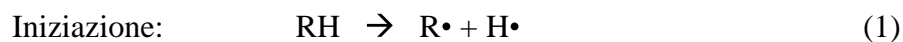
## 1.2 Ossidazione dei lipidi

I grassi vengono spesso utilizzati in preparazioni ad alte temperature (frittura), sia in ambito industriale che domestico. E' noto però che in tali condizioni (temperature di 160-180 °C) possono andare incontro ad un processo di ossidazione da parte dell'ossigeno nel quale si formano molte specie ossidate, tra le quali le primarie sono i perossidi dai quali derivano aldeidi, chetoni e acidi responsabili del caratteristico odore di fritto e, specialmente questi ultimi, dell'odore rancido dei grassi invecchiati.

### 1.2.1 Autossidazione dei lipidi

Il più importante tra i processi coinvolti nel deterioramento ossidativo dei lipidi (irrancidimento) è l'autossidazione degli acidi grassi. Tale processo può avvenire anche a temperatura ambiente e procede con una velocità direttamente proporzionale al grado d'insaturazione (vedremo più avanti il perché); inoltre è accelerato dalle alte temperature, come avviene durante la frittura.

L'autossidazione è una reazione radicalica a catena e può essere divisa in tre processi distinti:

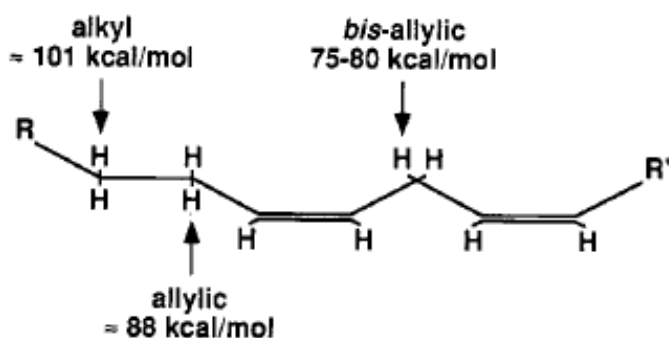


Durante la fase iniziale si forma un radicale  $R\cdot$  per strappo di un atomo di idrogeno dalla catena di un acido grasso ( $R-H$ ) (Reazione 1). Tuttavia, non vi è in letteratura una spiegazione univoca riguardo al meccanismo di iniziazione. Si ipotizza che la rottura omolitica del legame  $R-H$  avvenga per via termica o fotochimica, per estrazione di un atomo d'idrogeno da un iniziatore radicalico<sup>[2]</sup> o per reazione tra un acido grasso e un catalizzatore metallico. Secondo varie fonti di letteratura<sup>[3, 4a, 5]</sup> è possibile che tutte le reazioni di autossidazione siano catalizzate da ioni metallici per la formazione del radicale iniziale.

Una volta formatosi, il radicale  $R\cdot$  reagisce rapidamente con l'ossigeno (che possiede due elettroni spaiati ed è quindi un diradicale in stato di tripletto) per formare il radicale perossilico  $ROO\cdot$  (Reazione 2) che a sua volta reagisce con un acido grasso  $RH$  per dare un idroperossido  $ROOH$  e un altro radicale  $R\cdot$  (Reazione 3): tale passaggio è quello che determina la velocità (rate determining step).

Le reazioni terminano quando due specie radicaliche reagiscono tra loro per formare specie stabili. Tra le varie reazioni di terminazione, solamente la prima (Reazione 4) è significativa a pressione di ossigeno atmosferica. Il processo di terminazione può avvenire anche quando tali specie radicaliche reagiscono con sostanze antiossidanti eventualmente presenti (come tocoferoli e polifenoli, vitamina E).

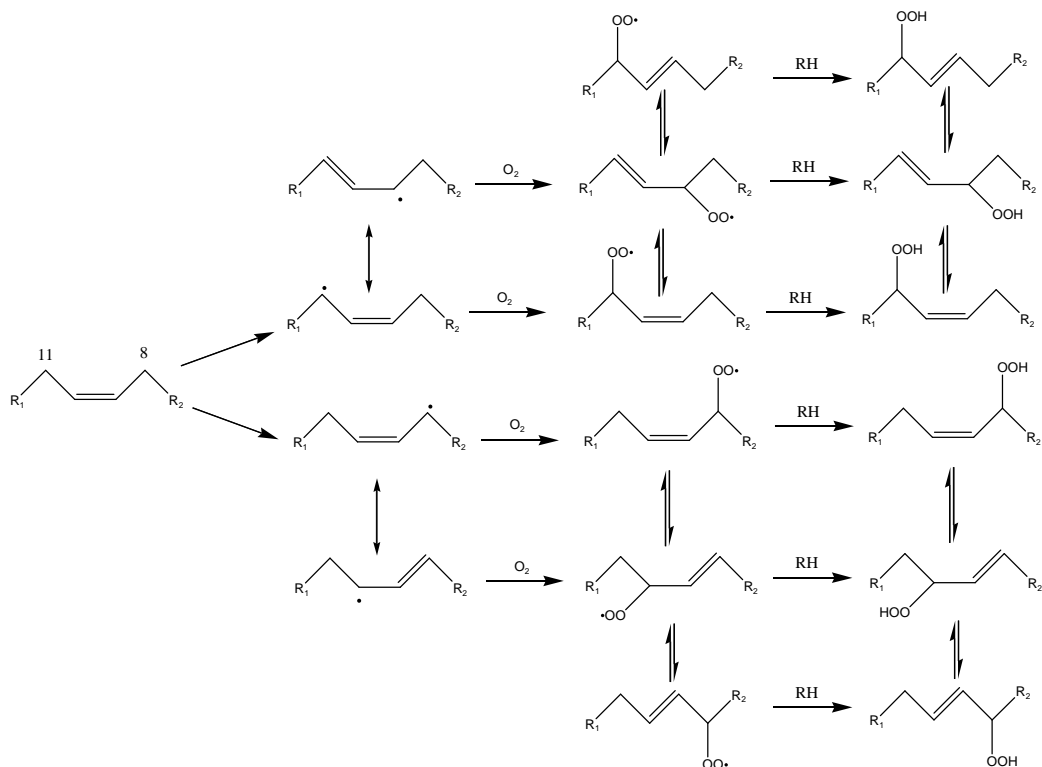
La differente propensione dei vari acidi grassi a formare idroperossidi è da cercare nelle energie di dissociazione (Bond Dissociation Energy, BDE) dei legami  $C-H$  che vengono scissi nelle fasi iniziali delle reazioni di autossidazione; infatti la vicinanza a doppi legami diminuisce tale energia rendendo più facile la rottura di questo legame, come riportato nello Schema 2.



**Schema 2.** Energia di legame per i protoni alchilici, allilici e bis-allilici.<sup>[6]</sup>

Di seguito verranno riportati i meccanismi di formazione dei perossidi per alcuni tipi di acidi grassi, in particolare dell'acido oleico, linoleico e  $\alpha$ -linolenico<sup>[7]</sup>.

L'autossidazione dell'acido oleico porta alla formazione di una miscela di *cis* e *trans* 8-, 9-, 10- e 11- allil idroperossidi. Nelle fasi iniziali si ha l'estrazione di un radicale H• dalla posizione 8 o 11 seguito dall'addizione di ossigeno per formare 4 diversi radicali perossidici: 11-*cis*, 9-*trans*, 8-*cis* e 10-*trans*. Tali radicali possono interconvertirsi tramite un riarrangiamento allilperossidico nei radicali 11-*trans* e 8-*trans*; questi radicali portano a idroperossidi estraendo un idrogeno dall'acido oleico (substrato). La distribuzione relativa dei prodotti è da imputare alla capacità del mezzo di donare atomi di idrogeno; infatti i prodotti cinetici 11-*cis*, 9-*trans*, 8-*cis* e 10-*trans* sono favoriti in presenza di buoni donatori di atomi di idrogeno (schema 3).

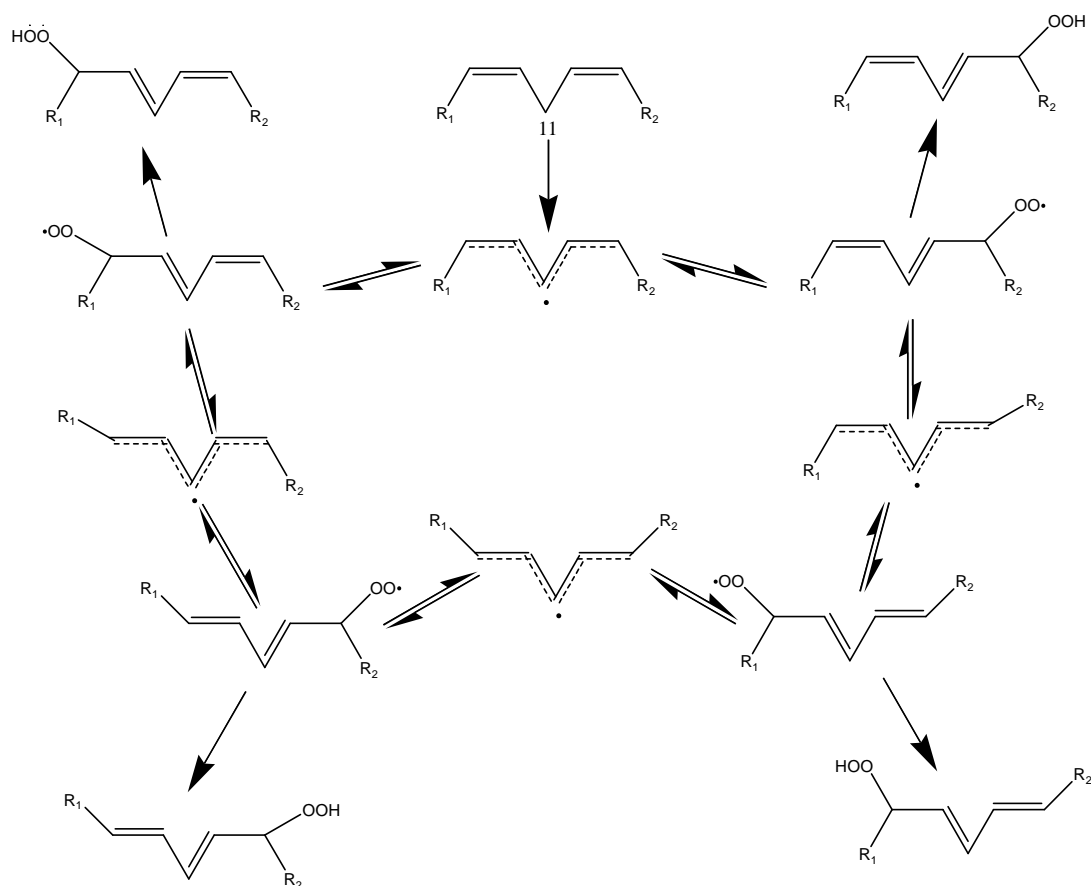


**Schema 3.** Formazione di idroperossidi per autossidazione dell'acido oleico.



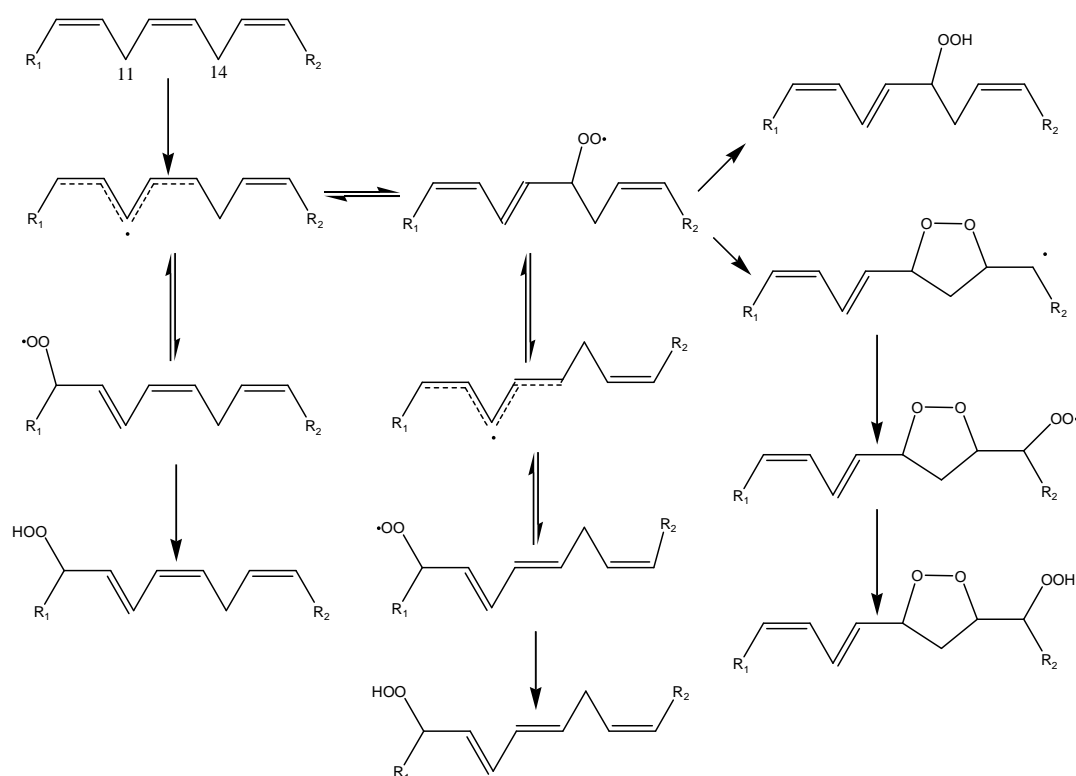
Dall'acido linoleico è possibile ottenere una miscela dei seguenti idroperossiacidi: acido 13-idroperossi-*cis*-9-*trans*-11-ottadecadienoico (13-*cis,trans*), acido 13-idroperossi-*trans*-9-*trans*-11-ottadecadienoico (13-*trans,trans*), acido 9-idroperossi-*trans*-10-*cis*-12-ottadecadienoico (9-*cis,trans*) e acido 9-idroperossi-*trans*-10-*trans*-12-ottadecadienoico (9-*trans,trans*).

Nella fase iniziale si ha l'estrazione di un radicale H• dalla posizione bisallilica (vedi Schema 4) C-11 per formare un radicale pentadienilico che reagisce con l'ossigeno in posizione 9- o 13- *cis,trans* per formare un radicale perossilico. Questi può estrarre un H• dall'acido linoleico (substrato) per formare il relativo idroperossido (prodotto cinetico) oppure può avvenire una rotazione di legame (previa perdita di ossigeno) per formare un nuovo radicale pentadienilico, il quale presenta una geometria *trans, trans*, che porta alla formazione degli idroperossidi 9- e 13-*trans, trans*, i prodotti termodinamici.



**Schema 4.** Formazione di idroperossidi per autoossidazione dell'acido linoleico.

Nell'acido  $\alpha$ -linolenico sono presenti 2 posizioni bisalliliche su C-11 e C-14 (vedi schema 5); ciò porta alla formazione di una miscela di idroperossidi 9-, 12-, 13- e 16- sia *trans,trans* sia *cis,trans*.<sup>[8, 9]</sup> Inoltre si è appurato che gli idroperossidi “esterni” 9- e 16- si formano in quantità 4 volte maggiore rispetto gli idroperossidi “interni” 12- e 13-. Tale differenza è dovuta al fatto che i radicali perossilici 12- e 13- danno una rapida ciclizzazione 1,3 dovuta alla presenza di un doppio legame *cis* in prossimità del gruppo radicalico; ciò permette un'addizione radicalica interna con conseguente formazione di un nuovo radicale.<sup>[7, 10, 11]</sup>



**Schema 5.** Formazione di idroperossidi per autoossidazione dell'acido linolenico.

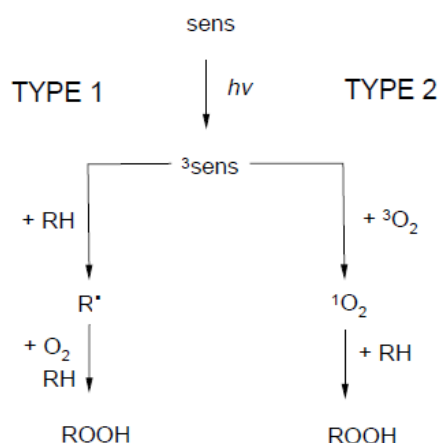
### 1.2.2 Ossidazione fotoindotta

L'esposizione alla luce accelera la formazione di idroperossidi dagli acidi grassi insaturi; ciò può avvenire in due modi: sia per fotossidazione diretta (ossidazione fotochimica) sia per ossidazione fotosensibile degli acidi grassi.<sup>[4b, 12]</sup>

Nella foto-ossidazione diretta si ha la formazione di radicali dall'esposizione alla luce degli acidi grassi, anche se questa reazione è attiva solo quando gli oli vengono esposti direttamente alla luce.

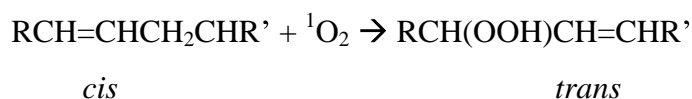


L'ossidazione fotosensibilizzata avviene in presenza di fotosensibilizzatori e luce visibile. Alcuni fotosensibilizzatori che possono trovarsi nei cibi sono la clorofilla, le emoproteine, la riboflavina e i coloranti sintetici.<sup>[4b, 13]</sup> I sensibilizzatori hanno due stati eccitati, il singoletto (<sup>1</sup>sens) ed il tripletto (<sup>3</sup>sens), quest'ultimo presenta un tempo di vita maggiore ed è il responsabile dell'ossidazione fotosensibilizzata. Da fonti di letteratura<sup>[4b, 12, 13, 14]</sup> vengono riportati due tipi di reazione che avvengono dopo l'eccitazione del sensibilizzatore a <sup>3</sup>sens (Figura 2):



**Figura 2.** Ossidazione fotosensibilizzata degli acidi grassi<sup>[13, 14]</sup>

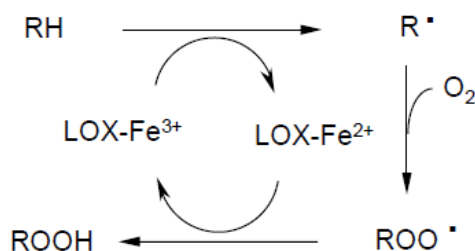
Nel primo esempio il sensibilizzatore reagisce direttamente con l'acido grasso per formare un radicale che reagisce con l'ossigeno per dare i radicali perossilici che si formano anche durante il processo di autossidazione. Nel secondo esempio il sensibilizzatore eccitato reagisce con l'ossigeno atmosferico (<sup>3</sup>O<sub>2</sub>) per formare il più reattivo <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, che a sua volta reagisce con l'acido grasso presente per formare idroperossidi, ma la distribuzione di questi ultimi è differente rispetto al processo di autossidazione.<sup>[15, 16, 17, 18, 19]</sup> L'ossigeno singoletto reagisce col doppio legame degli acidi grassi insaturi in maniera diversa, a dare un meccanismo di addizione concertato "ene", in cui l'ossigeno si inserisce alla fine di entrambi i C del doppio legame che viene spostato in posizione allilica con configurazione *trans*. Gli idroperossidi risultanti hanno un doppio legame *trans* allilico.<sup>[20]</sup>



### 1.2.3 Ossidazione catalizzata da metalli (enzimatica)

La **lipossigenasi** (LOX) è un enzima in grado di produrre idroperossidi coniugati attraverso l'ossidazione di acidi grassi poliinsaturi.<sup>[21]</sup> Perché ciò avvenga il substrato deve presentare un sistema 1,4-*cis,cis*-pentadienilico. Confrontandolo col processo di autossidazione si nota che le reazioni catalizzate da enzimi sono regio- e stereospecifiche riguardo i prodotti di ossidazione a seconda dell'enzima utilizzato.

La molecola di lipossigenasi contiene un atomo di ferro responsabile (nella forma ferrica) della formazione del radicale pentadienilico che reagisce con l'ossigeno per dare un radicale perossilico. A questo punto (per chiudere il ciclo catalitico) l'enzima, nella forma ferrosa, reagisce col radicale perossilico per formarne l'anione e tornare alla forma ferrica (Figura 3)<sup>[22, 23]</sup>



**Figura 3.** Azione della lipossigenasi nella formazione di perossidi dagli acidi grassi.

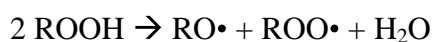
### 1.2.4 Decomposizione dei perossidi

Durante il processo di autossidazione l'elevata temperatura causa la decomposizione a radicali degli idroperossidi formati. Tale decomposizione può essere reversibile se vengono prodotti radicali perossilici (ROO•) mentre è irreversibile se si producono radicali alcossilici (RO•). Normalmente è difficile creare tali specie, giacché la BDE del legame ROO–H è di circa 90 kcal/mol, ma di solo 44 kcal/mol per il legame RO–OH.<sup>[24]</sup>

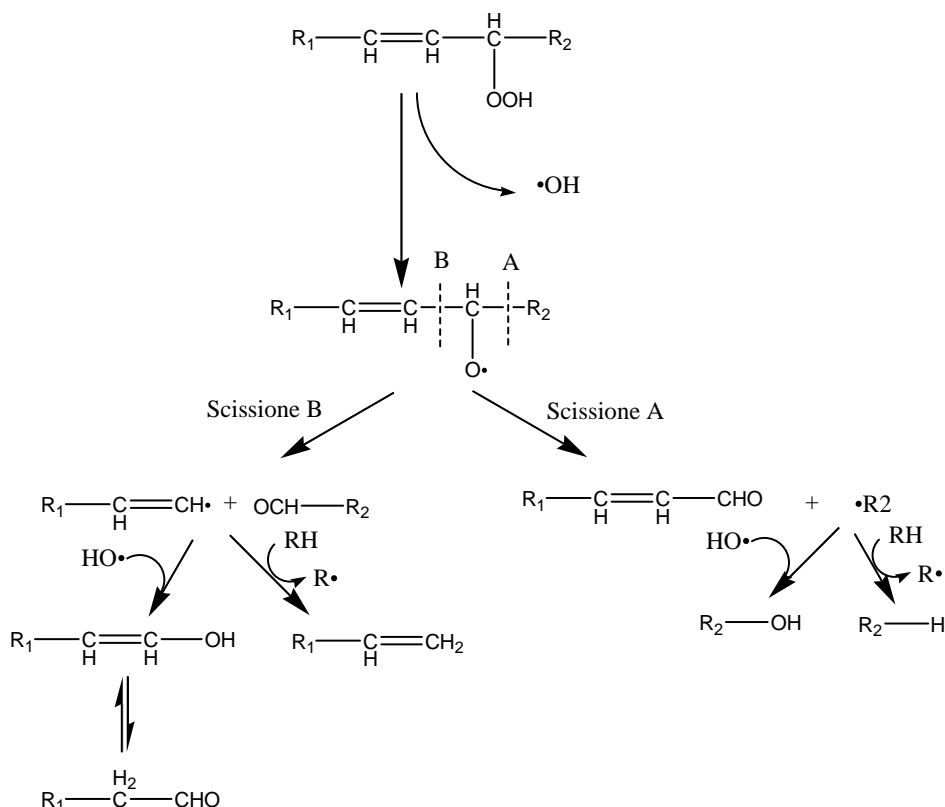
Mentre la formazione di radicali perossilici è un processo unimolecolare



la formazione di radicali alcossilici è un processo bimolecolare.<sup>[3, 25]</sup>



I radicali alcossilici si decompongono a loro volta tramite processi di  $\beta$ -scissione, in cui si formano vari prodotti volatili, responsabili del caratteristico odore di frittura, come mostrato nel seguente schema (Figura 4):



**Figura 4.** Decomposizione dei perossidi a prodotti di ossidazione secondaria.

Gli acidi grassi poliinsaturi (PUFA) risultano essere particolarmente instabili alla temperatura di 180 °C e, degradandosi, originano una gran varietà di composti, come visto in precedenza. Tra i prodotti di decomposizione vanno ricordate in primo luogo le aldeidi, in particolare: *n*-alcanali (1), *trans*-2-alchenali (2), alca-2,4-dienali (3), 4-idrossi-*trans*-2-alchenali (4) e malondialdeide (5) (vedi tabella 2). Ciascuna di queste aldeidi può essere responsabile di effetti tossici quali infiammazioni e processi di invecchiamento, a causa dell'elevata reattività con molecole biologiche (ad es. le ammine<sup>[26]</sup>); in particolare, è stato dimostrato che la malondialdeide è mutagenica e cancerogena.<sup>[27]</sup>

**Tabella 2.** Struttura di alcune aldeidi note come prodotti di ossidazione dei lipidi.

$\text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_4-\text{CHO}$		$\text{R}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CHO}$		$\text{OHC}-\text{CH}_2-\text{CHO}$
1	2	3	4	5

### **1.3 Obiettivo della tesi**

Lo scopo di questa tesi è la rivelazione sperimentale dei prodotti di ossidazione in campioni di oli riscaldati in condizioni simili a quanto avviene durante la comune frittura dei cibi e la registrazione della loro crescita nel tempo mediante spettroscopia NMR. Si cercherà inoltre di razionalizzare i risultati sulla base dei meccanismi conosciuti, così da poter trarre conclusioni, anche pratiche, sulla “bontà” degli oli alimentari per l’utilizzo nella frittura.

## 2 Materiali e metodi

### 2.1 Reagenti, solventi e strumentazione

In questo lavoro di tesi, oltre agli oli alimentari sono stati utilizzati anche i composti riportati in Tabella 3.

**Tabella 3.** Composti chimici utilizzati in questo lavoro di tesi.

<i>Composto</i>	<i>Formula</i>	<i>Fornitore, qualità</i>
Pirazina	$C_4H_4N_2$	Sigma-Aldrich, 99% GC
Cloroformio deuterato	$CDCl_3$	99.8% atom- <i>d</i> Armar Chemicals
DMSO- $d_6$	$(CD_3)_2SO$	Sigma-Aldrich, 99.9% atom- <i>d</i>
Allumina	$Al_2O_3$	Sigma-Aldrich; Ossido di alluminio, attivato, basico Brockman I, standard grade, ca. 150 mesh
n-Esano	$CH_3(CH_2)_4CH_3$	Riedel-de Haën per HPLC

Durante il processo di purificazione dai perossidi è stato utilizzato un Gooch 4 (diametro setto interno 36 mm, diametro pori 10-16  $\mu m$ ).

La strumentazione utilizzata è la seguente: (a) spettrometro NMR Bruker AVANCE DMX 600, operante ad una frequenza  $^1H$  di 600 MHz per le analisi dei campioni di olio sottoposti a trattamento termico; (b) spettrometro UV-Vis Lambda-16 utilizzato sia per eseguire gli spettri della pirazina sia per monitorare la presenza dei perossidi nei campioni di olio (vedi oltre).

Sono stati impiegati diversi tipi di oli alimentari commerciali: strutto, olio di oliva extra vergine (due differenti campioni, di cui uno vecchio di due anni ed uno “nuovo”, cioè appena acquistato in un supermercato), olio di mais, olio di arachidi e olio di vinaccioli (semi d'uva) (Tabella 4). Inoltre sono stati analizzati anche due campioni di olio utilizzati per la frittura nelle sagre, di cui però non è nota la composizione.

**Tabella 4.** Composizione degli oli usati in questo lavoro di tesi.

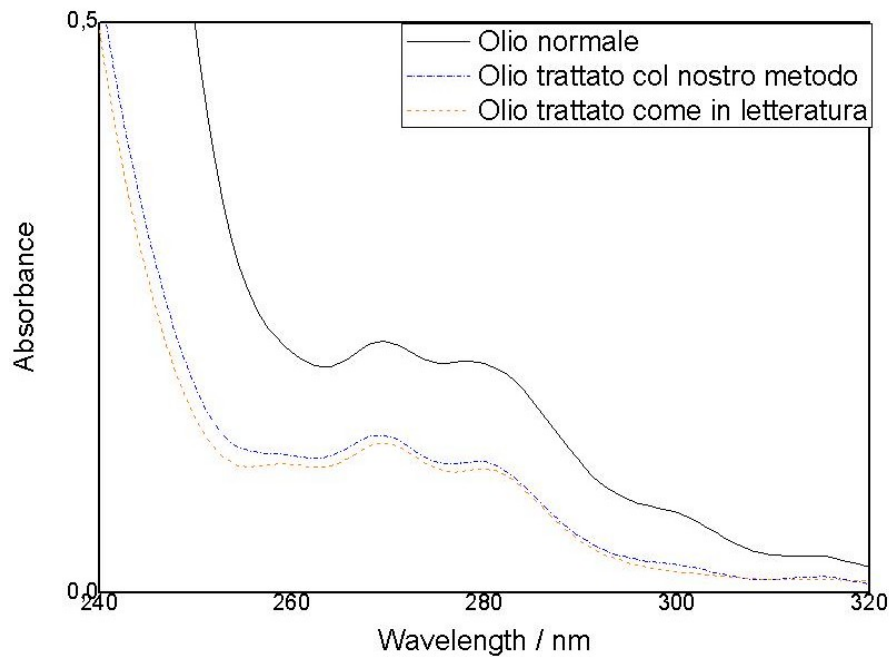
Tipo olio	Grassi saturi	Grassi monoinsaturi	Grassi polinsaturi
Olio d'arachidi	15%	53%	31%
Olio d'oliva	15% (acido palmitico 7-15%, acido stearico 1.5-3.5%)	75%	10%
Strutto	46%	47%	8%
Olio di mais	13%	29%	58%
Olio di vinaccioli	9%	16%	68%

### 2.1.1 Eliminazione dei perossidi iniziali

Vista la presenza iniziale di una quantità variabile di perossidi in molti di questi oli (soprattutto nei campioni di olio invecchiato), si è deciso di utilizzare una tecnica per rimuoverli in modo tale che ogni olio possieda le stesse condizioni iniziali. Per far ciò, in letteratura<sup>[28a]</sup> è riportato il metodo della cromatografia su ossido di allumina, che consiste nel far passare 10 g di olio disciolti in 100 ml di esano attraverso una colonna contenente 30 g di allumina, e successiva evaporazione dell'eluente. Dopo varie prove per ottimizzare tale metodo (eliminando l'eluente e utilizzando una minor quantità di allumina) siamo arrivati ad una procedura che dà risultati analoghi all'utilizzo della colonna in tempi più rapidi, come segue.

Si riempie un Gooch a porosità 4 con circa 3 cm di allumina sulla quale si versano circa 60 ml di olio puro. Utilizzando una beuta codata, il gooch viene leggermente depressurizzato per favorire la percolazione dell'olio, (un vuoto spinto per velocizzare la percolazione rischia di contaminare l'olio con polvere di allumina difficilmente filtrabile). Per monitorare l'andamento delle varie prove si utilizza la spettroscopia UV-Vis<sup>[28a]</sup>: i campioni sono stati preparati pesando esattamente circa 0.25 g di olio trattato e sciogliendoli in 25 ml di esano. Come si nota dagli spettri (Figura 5) il trattamento col nostro metodo permette di ottenere risultati comparabili al metodo di letteratura; inoltre dalle analisi NMR sui campioni a tempo zero è possibile dimostrare l'effettiva rimozione dei perossidi.





**Figura 5.** Spettro UV-Vis dei campioni di olio di oliva prima e dopo il trattamento per eliminare i perossidi.

Tale procedura è stata usata per eliminare i perossidi dall'olio di oliva non invecchiato (contenente inizialmente meno perossidi rispetto all'olio di oliva invecchiato) e poi attuata sull'olio di mais, arachidi e vinaccioli. Questa procedura non è stata applicata allo strutto perchè, essendo questo solido a temperatura ambiente, avremmo dovuto mantenerlo ad una temperatura superiore a 40 °C per tutto il tempo della percolazione.

## 2.2 Trattamento termico

Le prove di stress termico consistono nello scaldare il campione a temperatura costante di 180 °C eseguendo dei prelievi a intervalli regolari (dove non specificato altrimenti).

Per far ciò vengono misurati 40 ml di olio tramite un cilindro graduato e versati in un pallone a tre colli. Nel collo centrale del pallone viene inserito un refrigerante a bolle raffreddato ad acqua per permettere uno scambio d'aria nel pallone ma evitando la dispersione delle sostanze volatili (la maggior parte delle aldeidi formatesi hanno un punto di ebollizione superiore ai 20 °C dell'acqua di raffreddamento), mentre i colli laterali vengono chiusi con dei tappi di vetro, di cui uno fisso e uno mobile per permetterci di prelevare i campioni (vedi Figura 6).



**Figura 6.** Apparecchiatura usata per lo stress termico degli oli.

Lo stress termico vero e proprio avviene immergendo il pallone in un bagno di olio di silicone termostato a 180 °C; per monitorare la temperatura si utilizza un termometro a feedback elettronico collegato ad una piastra riscaldante, ottenendo così un controllo sulla temperatura pari a  $\pm 3$  °C. Per favorire una migliore omogeneità di temperatura nel bagno termostatico si utilizza un'ancoretta magnetica; allo stesso modo, per ottenere un migliore omogeneità del campione di olio, un'ancoretta magnetica è inserita anche nel pallone a tre colli (velocità di rotazione di 350 giri al minuto).

Nella maggior parte degli esperimenti vengono prelevati circa 0.5 ml di olio ogni 20 minuti mediante una pipetta Pasteur per un totale di 9 campioni in 160 minuti, oltre ad un campione di confronto a tempo zero. I campioni d'olio vengono conservati in una fiala di vetro sigillata e raffreddata a 4 °C fino alla preparazione dei campioni per l'analisi NMR.

## 2.3 Preparazione dei campioni per l'analisi NMR

È stata utilizzata la pirazina ( $C_4H_4N_2$ ) come standard esterno per ricavare la concentrazione di aldeidi presenti nei campioni. Infatti la pirazina è un composto stabile che all'NMR presenta un solo segnale non sovrapposto ad altri segnali degli analiti (aldeidi e perossidi). Inoltre è possibile quantificarne la concentrazione in  $CDCl_3$  mediante spettroscopia UV-Vis<sup>[29]</sup> (Figura 8) (si noti tuttavia che in soluzione acquosa la pirazina tende a dimerizzare rendendo impossibile una taratura).

Inizialmente la pirazina è stata usata come standard interno, ma dopo varie prove si è deciso di utilizzarla come standard esterno (essendo una base, è possibile che durante le prove di quantificazione dei prodotti di ossidazione degli oli venga protonata dai perossidi e ciò potrebbe diminuire l'accuratezza dei dati ottenuti). Per far ciò, lo standard viene inserito in un tubo coassiale; con questa procedura, durante la fase di elaborazione dei dati ricavati dagli spettri NMR, è importante ricordare che i segnali relativi ai campioni presenti nel tubo coassiale sono riferiti non alla concentrazione reale ma ad una concentrazione corretta di un fattore 0.108, pari al rapporto tra il volume interno del tubo coassiale e il volume della corona cilindrica esterna.<sup>[30]</sup>

Il tubo coassiale viene ripreparato di volta in volta, in quanto il solvente tende a evaporare nonostante la soluzione venga conservata in frigo; inoltre anche la soluzione standard di pirazina non mantiene una concentrazione costante nel tempo nonostante venga conservata a 4 °C e venga portata a temperatura ambiente solo per prelevare il volume da immettere nel tubo coassiale (100  $\mu$ L), ed ogni mese ne è stata rideterminata la concentrazione.

I campioni per l'analisi NMR vengono preparati prelevando 200  $\mu$ L di olio con una pipetta a spostamento positivo, data l'alta viscosità dell'olio, e sciogliendoli in una miscela composta da 900  $\mu$ L di  $CDCl_3$  e 100  $\mu$ L di DMSO- $d_6$ . La soluzione risultante viene mantenuta in una fiala di vetro sigillata a 4 °C fino all'analisi NMR che viene effettuata entro 24 h.

Per eseguire l'analisi NMR si trasferiscono 500  $\mu$ L della soluzione precedentemente preparata in un tubo NMR da 5 mm; l'apertura del tubo stesso viene poi ricoperta di Teflon, tappata e sigillata con Parafilm per evitare che il cloroformio contenuto nelle soluzioni evapori troppo rapidamente. Subito prima di eseguire le analisi all'NMR i tubi contenenti i campioni vengono agitati con vortex

per circa 30 secondi (questo per garantire una buona omogeneità dei campioni, in quanto è possibile che si abbia separazione delle fasi olio e cloroformio), quindi si inserisce il tubo coassiale contenente lo standard. Per ogni campione vengono registrati due spettri: il primo è un'unica acquisizione dello spettro completo (da 0 a 12 ppm) fatta per ottimizzare il segnale, mentre il secondo è acquisito usando un impulso selettivo per osservare solamente i segnali di interesse compresi entro la banda spettrale che si estende da 7 a 11 ppm.

## 2.4 Calcolo del numero medio di doppi legami

Dagli spettri NMR è possibile calcolare il numero medio di doppi legami per ciascun olio, cosa che permette, in certi casi, di discriminare l'origine botanica (e quindi eventuali sofisticazioni) dell'olio. Il numero medio di doppi legami, a meno di piccole variazioni, è infatti caratteristico di ogni tipo di olio (Tabella 4):

**Tabella 4.** confronto tra numero di iodio (dato di letteratura) e numero medio di doppi legami (dato sperimentale) per gli oli usati in questo lavoro di tesi.

Tipo di olio	numero di iodio <sup>[31]</sup>	n. medio doppi legami
Strutto	63-79	1.99
Oliva	79-88	2.7
Arachidi	88-98	3.0
Mais	111-128	4.1
Vinacciolo (semi d'uva)	130-131 <sup>[32]</sup>	4.80

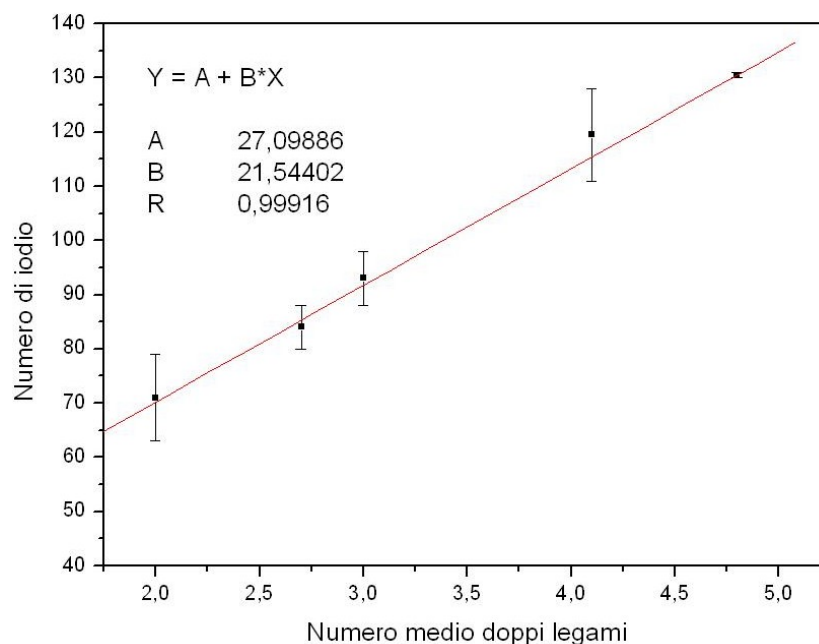
Normalmente tale dato viene ricavato dal numero di iodio (IN)<sup>[28b]</sup> corrispondente ai grammi di iodio reagiti con 100 g di olio. Per determinare l'IN, un eccesso di iodio o iodio monoclورو viene fatto reagire con i doppi legami degli acidi grassi insaturi e successivamente titolato. Diversamente l'utilizzo della spettroscopia NMR, che non necessita di alcuna preparazione preliminare del campione, è vantaggioso per la sua rapidità di esecuzione.

Il segnale dei protoni allilici degli acidi grassi cade a 5.15 ppm, nelle vicinanze del segnale del protone metinico del glicerolo; non è possibile integrare separatamente questi segnali. Normalizzando a 4 il valore dell'integrale dei protoni metilenici del glicerolo, che cadono a 4.05 ppm, il numero medio dei doppi legami è dato dalla seguente formula:

$$N = (A - 1)/2 \quad (1)$$

dove  $A$  è il valore dell'integrale dei segnali dei protoni allilici e del protone metinico del glicerolo.

È possibile fare un confronto tra il numero di iodio ed il numero medio di doppi legami (Figura 7), dimostrando così che la metodica NMR fornisce il dato richiesto con accuratezza paragonabile.



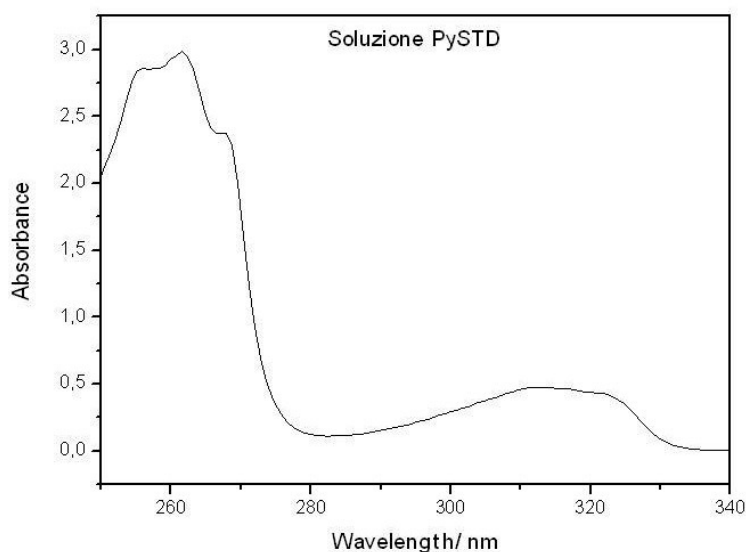
**Figura 7.** confronto tra numero di iodio (dato di letteratura) e numero medio di doppi legami (dati ottenuti in questo lavoro) per gli oli usati in questo lavoro.

## 2.5 Standard di pirazina

Per poter essere certi che la pirazina sia un buono standard bisogna che essa sia quantificabile. Una soluzione di pirazina in  $\text{CDCl}_3$  deve quindi seguire la legge di Lambert-Beer

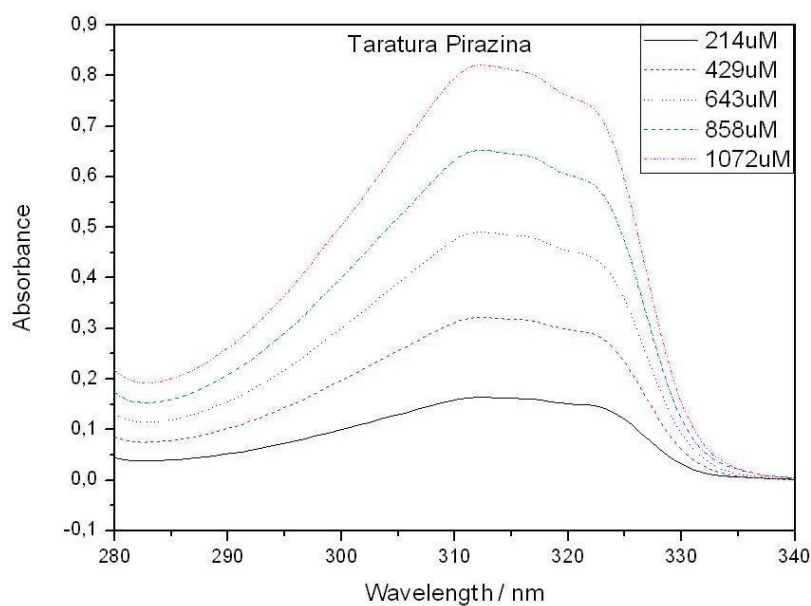
$$A_\lambda = \varepsilon d c \quad (2)$$

dove  $A_\lambda$  è l'assorbanza ad una certa lunghezza d'onda,  $d$  è il cammino ottico (cioè lo spessore della cuvetta),  $c$  la concentrazione della soluzione ed  $\varepsilon$  il coefficiente di estinzione molare alla lunghezza d'onda in esame.



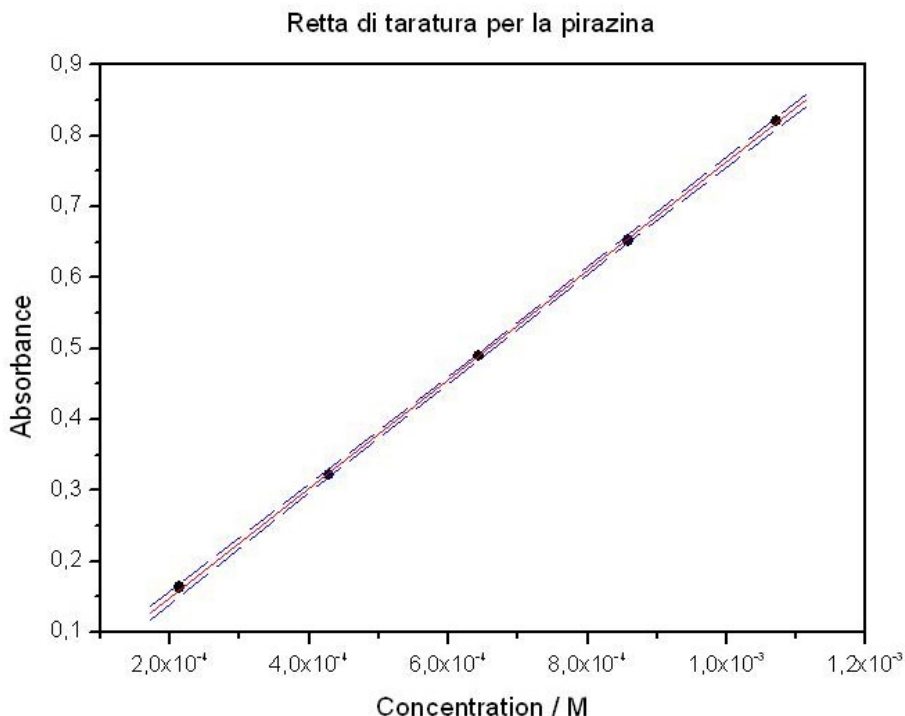
**Figura 8.** Spettro UV-Vis di una soluzione di pirazina in  $\text{CDCl}_3$ .

Non essendo presente in letteratura alcun valore di  $\epsilon$  per la pirazina in  $\text{CDCl}_3$ , è stata costruita una retta di taratura. Per costruire tale retta di taratura è stata preparata una soluzione concentrata di pirazina in  $\text{CDCl}_3$  (PyTAR): si sono pesati 0.0550 g di pirazina e sciolti in 1.83 ml di  $\text{CDCl}_3$ , ottenendo una soluzione in cui  $[\text{Py}] = 3.753 \times 10^{-1} \text{ M}$ . 2  $\mu\text{l}$  di soluzione PyTAR sono stati quindi aggiunti in serie ad una cuvetta riempita con 3.5 ml di  $\text{CDCl}_3$ , ottenendo gli spettri sotto riportati (Figura 9):



**Figura 9.** Spettro UV-Vis di alcune soluzioni a concentrazione nota di pirazina in  $\text{CDCl}_3$ .

Le assorbanze a 312 nm sono quindi state fittate con una retta (Figura 10) ottenendo un valore di  $\epsilon$  pari a  $767 \pm 5$  ( $R^2 = 0.99987$ )  $\text{cm}^{-1}\text{mol}^{-1}$ .



**Figura 10.** Retta di taratura per soluzioni di pirazina in  $\text{CDCl}_3$  con intervallo di confidenza al 95%.

## 2.6 Spettroscopia NMR

La spettroscopia è un insieme di tecniche che permettono di ottenere informazioni sulla struttura di una molecola attraverso l'interazione con una radiazione elettromagnetica che può essere assorbita o emessa. Le tecniche più utilizzate in chimica organica sono la spettroscopia UV, IR e la spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (NMR), maggiormente impiegata in questo lavoro sperimentale.

La spettroscopia NMR misura l'assorbimento di radiazioni elettromagnetiche da parte di un campione e consente di ottenere un'informazione rapida e completa con nessuna o poche manipolazioni chimiche: essa si rivela di straordinaria importanza poiché permette di ottenere una mappa di tutta l'intelaiatura di legami carbonio-idrogeno della molecola.

### 2.6.1 Fondamenti dell’NMR

I nuclei di tutti gli atomi possono essere caratterizzati da un numero quantico di spin nucleare  $I$  che può assumere valore zero, intero o semiintero. Il valore di  $I$  dipende dal numero atomico  $Z$  e dal numero di massa ( $A$ ) dei suoi isotopi. Gli atomi per i quali  $Z$  o  $A$  (o entrambi) sono dispari sono dotati di un momento angolare di spin  $P$  e danno luogo ai fenomeni della risonanza magnetica (ad es.  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ). Invece, alcuni nuclei di interesse in chimica organica ( $^{12}\text{C}$  e  $^{16}\text{O}$ ) hanno  $I = 0$  e non danno quindi il fenomeno della risonanza magnetica nucleare.

I nuclei dotati di  $I \neq 0$  sono possiedono un momento magnetico  $\mu$  dato da

$$\mu = \gamma P = \gamma I h / 2\pi \quad (3)$$

dove  $h$  è la costante di Planck e  $\gamma$  è il rapporto giromagnetico, che è caratteristico per ogni isotopo.

La maggior parte degli elementi chimici presenta almeno un isotopo che possiede  $I \neq 0$ ; uno dei più importanti ai fini pratici è il protone  $^1\text{H}$ , presente nella forma isotopica di idrogeno più abbondante in natura. Per quanto riguarda il carbonio il solo isotopo naturale dotato di spin nucleare è il  $^{13}\text{C}$ , che ha lo svantaggio di essere presente in natura in piccola quantità percentuale (1.1%).

Sia il momento angolare sia il momento magnetico sono quantità vettoriali e come tali hanno un modulo ed una direzione. Normalmente questi vettori sono orientati casualmente, ma quando vengono a trovarsi immersi in un campo magnetico esterno statico  $B_0$  (generalmente rappresentato lungo l’asse  $z$ , componente longitudinale, di un sistema cartesiano in cui il piano  $xy$  viene definito componente trasversale), i momenti magnetici microscopici si allineano parzialmente rispetto al campo magnetico esterno. Associato al numero quantico di spin  $I$ , che rappresenta il *valore assoluto* del momento angolare di spin, esiste un secondo numero quantico  $m$  che specifica l’*orientazione* del momento angolare rispetto all’asse del campo  $B_0$ . Questo numero quantico può assumere  $2I + 1$  valori compresi tra  $+I$  e  $-I$  inclusi con incrementi di 1 unità; ad esempio per il protone i possibili valori di  $m$  sono  $+1/2$  e  $-1/2$ . a questi valori vengono associati le possibili orientazioni rispetto il campo statico: se parallelo al campo viene associato un valore  $m = +1/2$  (stato  $\alpha$ ), mentre se antiparallelo  $m = -1/2$  (stato  $\beta$ ).



L'effetto del campo magnetico è quello di imporre una torsione sul momento magnetico  $\mu$  che inizia a precedere attorno al vettore  $\mathbf{B}_0$  con una frequenza detta *frequenza di Larmor*, proporzionale al campo applicato e caratteristica per ciascun nucleo, poiché dipende anche dal rapporto giromagnetico  $\gamma$ :

$$\omega = -\gamma B_0 \text{ (in rad s}^{-1}\text{)} \quad \nu = -\gamma B_0 / 2\pi \text{ (in Hz)} \quad (4)$$

Come detto in precedenza, il protone possiede due possibili stati di orientazione,  $\alpha$  e  $\beta$ , che corrispondono a livelli energetici diversi: infatti l'orientazione parallela al campo ( $\alpha$ ) si trova a energia leggermente inferiore rispetto l'orientazione antiparallela ( $\beta$ ) e questa differenza di energia può essere ricavata tramite:

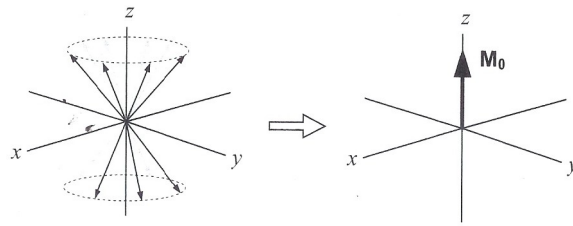
$$\Delta E = h\nu = -h\gamma B_0 / 2\pi \quad (5)$$

$\Delta E$  è relativamente piccolo (nell'ordine delle onde radio). È possibile indurre il passaggio dallo stato ad energia inferiore a quello ad energia maggiore grazie all'assorbimento di un quanto di energia. L'energia viene fornita come radiazione elettromagnetica la cui frequenza deve essere pari alla frequenza di Larmor (condizione di risonanza).

Dato che gli stati  $\alpha$  e  $\beta$  sono a differente energia, in condizioni di equilibrio ci sarà un eccesso di nuclei nello stato  $\alpha$  definiti dalla distribuzione di Boltzmann:

$$N_\alpha / N_\beta = \exp(-\Delta E / k_B T) \quad (6)$$

dove  $N_{\alpha,\beta}$  è la popolazione di ciascuno stato,  $k_B$  la costante di Boltzmann e  $T$  la temperatura assoluta. Questa situazione può essere rappresentata da un insieme di vettori distribuiti casualmente sul cono di precessione e tale che il leggero eccesso di popolazione degli spin  $\alpha$  genera un vettore di magnetizzazione macroscopica  $\mathbf{M}_0$  diretto lungo l'asse  $z$ , mentre lungo le direzioni trasversali la stessa magnetizzazione macroscopica ha una componente mediamente nulla (Figura 11).



**Figura 11.** Comportamento di un nucleo con  $I = \frac{1}{2}$  in un campo magnetico.

Questo porta a semplificare la dinamica di un insieme di spin rappresentandoli semplicemente come un unico vettore  $\mathbf{M}_0$ , in accordo al *modello vettoriale* dell’NMR.

Il requisito essenziale per indurre una transizione tra i livelli energetici, cioè per fare in modo che avvenga la risonanza magnetica nucleare, è l’applicazione di un campo magnetico oscillante alla frequenza di Larmor. Questo campo è dato dalla componente magnetica di una radiofrequenza, denominata  $B_1$ , direzionata perpendicolarmente al campo statico  $B_0$ . Per far ciò si attiva un trasmettitore di radiofrequenza perpendicolarmente al vettore  $\mathbf{M}_0$  lungo l’asse  $x$ , che genera un impulso di durata  $t_p$ . A questo punto il vettore di magnetizzazione ruota verso l’asse  $y$  e l’angolo di rotazione ( $\theta$ ) del vettore (formalmente chiamato *angolo di nutazione* o “*flip angle*”) è proporzionale al valore del campo  $B_1$  applicato e alla sua durata:

$$\theta = (360/2\pi) \gamma B_1 t_p \text{ (in gradi)} \quad (7)$$

tenendo conto delle proiezioni del vettore si nota una progressiva diminuzione della componente  $z$  e un corrispondente aumento della componente  $y$  fino ad arrivare ad una rotazione di  $90^\circ$  in cui tutta la magnetizzazione si trova lungo l’asse trasversale (impulso di  $90^\circ$ , o impulso  $\pi/2$ ); inoltre se prolunghiamo il tempo dell’impulso si avrà che le componenti della magnetizzazione diminuiranno lungo entrambi gli assi fino ad allinearsi lungo  $-z$ , (impulso di  $180^\circ$ ). Quando viene fornito un impulso di  $90^\circ$  le popolazioni degli stati  $\alpha$  e  $\beta$  si equivalgono e non ci sarà magnetizzazione netta lungo l’asse  $z$  mentre sarà presente una magnetizzazione lungo il piano  $xy$  (con *coerenza di fase*), Una volta cessato l’impulso la magnetizzazione tende a ritornare spontaneamente verso lo stato di equilibrio (ossia con  $\mathbf{M}$  allineato lungo l’asse  $z$ ) tramite un processo definito di rilassamento. Prima che ciò avvenga, il vettore magnetizzazione che precede nel piano  $xy$  attorno l’asse  $z$  induce un debole voltaggio

oscillante all'interno di un solenoide che avvolge il campione. Il ritorno verso la condizione di equilibrio genera un segnale NMR transiente detto *free induction decay* (FID). Nei moderni spettrometri NMR i nuclei della specie di interesse vengono eccitati simultaneamente con un unico breve impulso a radiofrequenza (RF)  $B_1$  centrato alla frequenza  $\nu_1$ . Una volta registrato il FID, per passare dal dominio del tempo a quello della frequenza è poi necessaria un'operazione matematica, detta trasformata di Fourier, che permette di ottenere lo spettro convenzionale nel quale l'intensità dei picchi è proporzionale al numero dei protoni risonanti (inclusendo eventuali strutture iperfini dei segnali dovute all'accoppiamento scalare).

## 2.6.2 Fenomeni di rilassamento

Si è detto che, una volta cessato l'impulso di RF, nel sistema si verificano due distinti fenomeni: a) il ritorno di molti spin ad un livello energetico inferiore, con conseguente ripristino della magnetizzazione longitudinale iniziale (rilassamento longitudinale o spin-lattice); b) il decadimento della magnetizzazione trasversale (rilassamento trasversale o rilassamento spin-spin).

Il rilassamento longitudinale è un processo caratterizzato da una costante di tempo  $T_1$  che è una misura del tempo richiesto dagli spin per tornare alle condizioni di equilibrio iniziale grazie alla cessione di energia al microambiente circostante. In termini matematici, il rilassamento longitudinale è descritto da un decadimento di tipo esponenziale la cui costante di velocità,  $1/T_1$ , dipende da numerosi fattori tra cui l'intensità del campo magnetico esterno  $B_0$ , il tipo di solvente (maggiore è la sua viscosità, minore è il  $T_1$ ), la dimensione della molecola (maggiore è la dimensione della molecola, minore è il  $T_1$ ) e, più in generale, la mobilità conformazionale di cui godono i singoli spin all'interno della molecola.

Il rilassamento trasversale è un processo caratterizzato da una costante di tempo  $T_2$  (inferiore o uguale a  $T_1$ ) che è una misura del tempo necessario affinché gli spin perdano coerenza di fase in relazione al reciproco scambio di energia. Questo processo è responsabile del caratteristico decadimento della magnetizzazione trasversale (FID). Il rilassamento trasversale è anch'esso descritto da un decadimento esponenziale la cui costante di velocità,  $1/T_2$ , dipende da fattori simili a quelli già elencati per il rilassamento longitudinale.

A causa della non perfetta omogeneità del campo magnetico esterno, poi, la perdita della coerenza di fase è accelerata rispetto a quanto avverrebbe in presenza di

un campo magnetico perfettamente omogeneo, e ciò porta ad avere un valore della costante di tempo effettiva ( $T_2^*$ ) tale che  $T_2^* < T_2$ .

### 2.6.3 Il chemical shift

Come detto in precedenza, ciascuna specie atomica magneticamente attiva possiede una propria frequenza di precessione (o di Larmor). Se in un composto organico tutti i nuclei simili (ad esempio  $^1\text{H}$ ) risuonassero alla stessa frequenza l'analisi NMR non sarebbe di alcuna utilità (se non per dirci quanti protoni sono presenti).

Nella realtà si hanno variazioni delle frequenze rispetto a quella di Larmor dovute all'intorno chimico dell'atomo preso in esame, dovute alla presenza degli elettroni nell'atomo stesso e in quelli vicini. Il campo magnetico applicato ( $B_0$ ) induce, sull'intorno elettronico di ogni nucleo, un campo magnetico locale opposto. La nube elettronica provoca cioè una modulazione locale del campo applicato, detta **schermatura**. Il campo *effettivo* residuo viene indicato  $B_{\text{eff}} = B_0(1 - \sigma)$  dove  $\sigma$  è la costante di schermo. Rivisitando la formula della frequenza di Larmor:

$$\nu = -\gamma B_0(1 - \sigma)/2\pi \quad (8)$$

Cioè, a seconda dell'intorno chimico di un certo nucleo, la frequenza di risonanza può risultare più bassa di un fattore  $1 - \sigma$ , poiché solitamente il campo magnetico indotto è opposto a quello applicato. La differenza tra le intensità  $B_0$  e  $B_{\text{eff}}$  è molto piccola, nell'ordine dei ppm (parti per milione). Dato che nuclei uguali che occupano posizioni diverse all'interno di un composto avranno intorni chimici differenti (ad esempio i protoni metilenici differiscono da quelli vinilici), questi risuoneranno a frequenze diverse. Notiamo infine che  $\nu$  dipende anche dal campo applicato.

Negli spettri NMR viene quindi riportato sull'asse delle ascisse non la frequenza di risonanza dei nuclei bensì lo spostamento chimico (*chemical shift*) che viene ricavato dalla differenza tra la frequenza di risonanza del nucleo in esame ( $\nu$ ) con quella del nucleo di una molecola campione ( $\nu_0$ ); per gli spettri  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  viene generalmente usato il tetrametilsilano (TMS) come riferimento. Lo spostamento chimico viene espresso in ppm secondo una scala detta dei delta ( $\delta$ ) con  $\delta = [(\nu - \nu_0)/\nu_0] \times 10^6$ . Il picco del TMS cade all'estrema destra dello spettro e

corrisponde al valore zero, così che i valori della scala crescano da destra verso sinistra. Tale sistema di taratura rende i valori di spostamento chimico indipendenti dall'intensità del campo.<sup>[33]</sup>

#### 2.6.4 Il problema del range dinamico

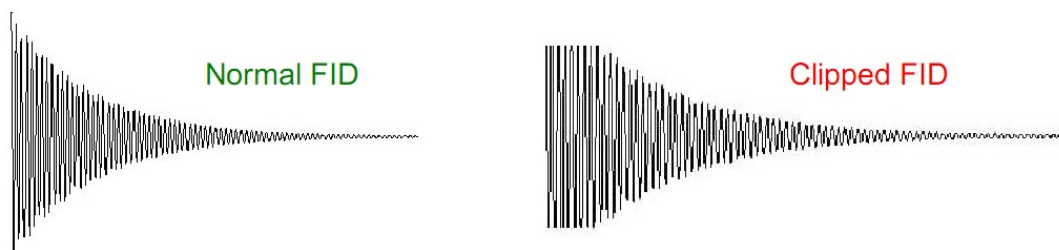
Come verrà mostrato in dettaglio più avanti (par. 3.1), lo spettro  $^1\text{H}$  di un campione di olio dopo stress termico mostra che i segnali di interesse relativi ad aldeidi e perossidi hanno intensità bassissima rispetto ai segnali dell'olio vero e proprio. Questa circostanza (eccetto che in casi estremi in cui il rapporto segnale/rumore è troppo basso) non impedisce l'analisi qualitativa e l'eventuale indagine strutturale; pone invece gravi (e a volte insormontabili) difficoltà se è necessaria un'analisi quantitativa. Il problema si riscontra, in effetti, in tutte le applicazioni NMR in cui deboli segnali ritenuti interessanti (come quelli dei protoni aldeidici) debbano essere rilevati in presenza di segnali molto intensi che provengono, ad esempio, da una matrice biologica (i lipidi nel nostro caso).

Infatti, la capacità di uno spettrometro NMR di registrare i segnali più deboli dipende essenzialmente dal *range dinamico* del convertitore analogico-digitale (ADC): quando la maggior parte di questo range è impiegato per digitalizzare i segnali più intensi, quelli più deboli possono cadere al di sotto del limite di rilevabilità. Tale parametro è legato al numero  $n$  di bit che l'ADC utilizza per campionare il segnale NMR: dati  $n$  bit (un parametro legato all'hardware), il numero intero più grande che l'ADC può memorizzare è pari a

$$\text{Range dinamico} = 2^{n-1} - 1 \quad (9)$$

Gli ADC a 16 bit dei moderni spettrometri NMR possiedono quindi un range dinamico di  $2^{16-1} - 1 = 32767:1$ . Ciò implica che il più debole segnale rilevabile non può essere inferiore a circa 30 parti per milione rispetto al più intenso segnale di input. Anche se questa condizione limite dovesse essere soddisfatta, tuttavia, i segnali più deboli soffrirebbero comunque di una sotto-digitalizzazione e i loro integrali sarebbero poco accurati. (A titolo di esempio si noti che una risoluzione digitale di un solo bit ridurrebbe un segnale qualsiasi ad una serie di rettangoli). Diversamente, amplificare il FID oltre il limite massimo imposto dall'hardware del convertitore analogico-digitale comporterebbe il "*clipping*" (o saturazione) del FID

stesso, con conseguente distorsione del segnale digitalizzato (questa situazione è del tutto analoga a quella di un altoparlante che riceva dall'amplificatore un segnale eccedente la propria potenza nominale) (Figura 12).



**Figura 12.** (a) FID acquisito correttamente; (b) FID acquisito con eccessivo guadagno: i dati acquisiti a tempi brevi sono “tagliati” ad un valore costante che rende i dati inutilizzabili.

A questo punto appare chiaro come la soppressione (o “filtraggio”) dei segnali più intensi permetta di ricalibrare l'intero range dinamico a vantaggio dei segnali più deboli, ottenendo per essi una miglior digitalizzazione, errori di integrazione più piccoli e, in ultima analisi, una loro più accurata quantificazione.

Nel nostro caso, il problema della rivelazione dei deboli segnali dei protoni aldeidici è stato affrontato utilizzando un'eccitazione selettiva assistita da gradienti di campo magnetico (DPFGSE), avendo cura di escludere le risonanze dei protoni lipidici dalla banda spettrale selezionata. Ciò è risultato possibile in quanto i principali segnali lipidici (catene degli acidi grassi saturi e insaturi, glicerolo) cadono in una regione ( $\delta$  0.8-5.5 ppm) ben separata da quella dei segnali di interesse ( $\delta > 9$  ppm).

### 2.6.5 Sequenze di singolo e doppio spin-eco

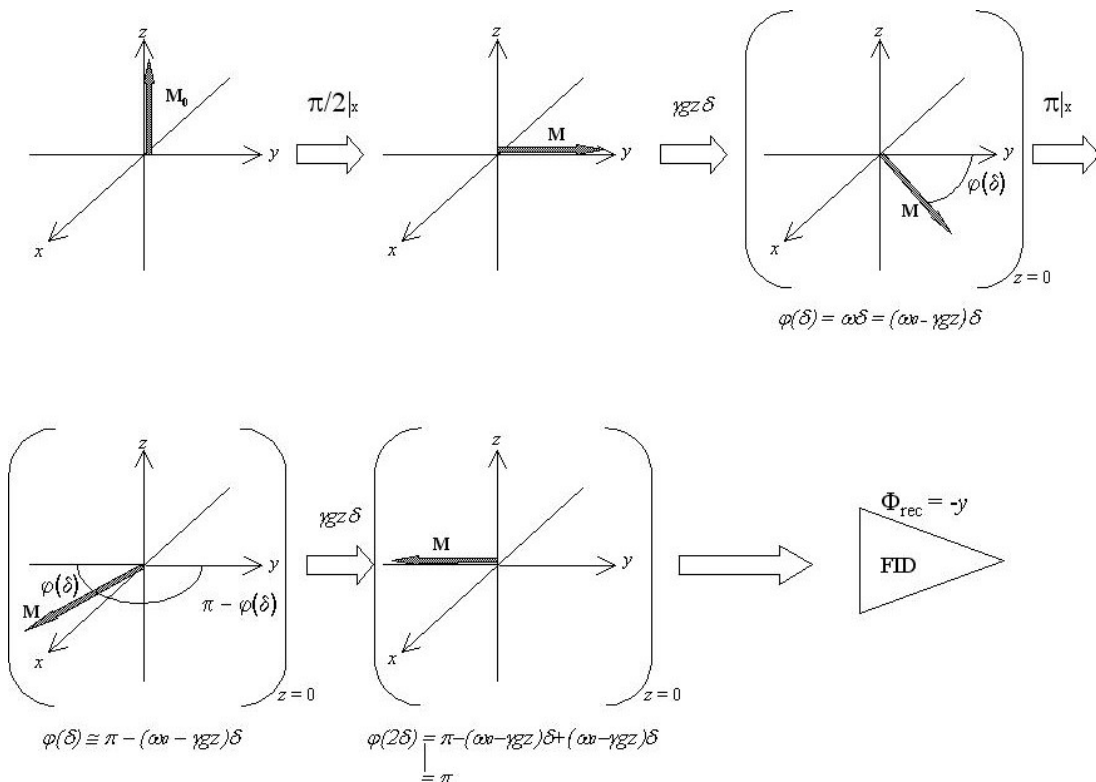
La sequenza “selettiva” citata nella presente tesi utilizza impulsi di radiofrequenza e gradienti di campo magnetico. Lungo l'asse  $z$  viene applicato un gradiente di campo magnetico  $g = \partial B / \partial z$  (per lo strumento NMR Bruker DRX 600 tale gradiente raggiunge un valore massimo di 68 G/cm) che si somma al campo magnetico statico  $B_0$  così da ottenere un campo magnetico totale  $B(z) = B_0 + gz$ . La variazione di campo magnetico con la posizione nel campione porta quindi ad una variazione della frequenza di Larmor che diventerà:

$$\omega(z) = \omega_0 - \gamma gz \quad (10)$$

dove  $\omega_0$  è la frequenza in presenza del solo campo statico  $B_0$ . A questo punto, se viene applicato un gradiente  $g$  per un tempo  $\delta$ , la fase all'interno del campione diventerà:

$$\varphi(z, \delta) = \varphi_0 - \gamma g z \delta \quad (11)$$

A differenza del rilassamento trasversale, il processo di sfasamento indotto dai gradienti di campo magnetico è reversibile e può essere cancellato applicando un gradiente di segno opposto o, in alternativa, un gradiente di ugual segno preceduto da un impulso a RF di  $180^\circ$ . Quest'ultima procedura, detta PFGSE (*pulsed-field gradient spin-echo*) ha il vantaggio di eliminare lo sfasamento  $\varphi_0$  indotto dalla precessione degli spin durante il tempo  $\delta$  oltre che lo sfasamento indotto dai gradienti (vedi Figura 13).



**Figura 13.** Evoluzione della magnetizzazione per un sistema di spin a frequenza singola e privo di accoppiamento scalare durante una sequenza PFGSE.

La sequenza PFGSE inizia con un impulso non selettivo di  $90^\circ$  che porta la magnetizzazione sul piano trasversale; questa magnetizzazione viene quindi defasata da un gradiente  $g$ . Successivamente si applica un impulso di  $180^\circ$  (eventualmente

selettivo, vedi sotto) seguito da un secondo gradiente  $g$  identico al primo. Il risultato complessivo è che la magnetizzazione che ha risentito dell'impulso di  $180^\circ$  viene rifocalizzata alla fine del secondo gradiente.

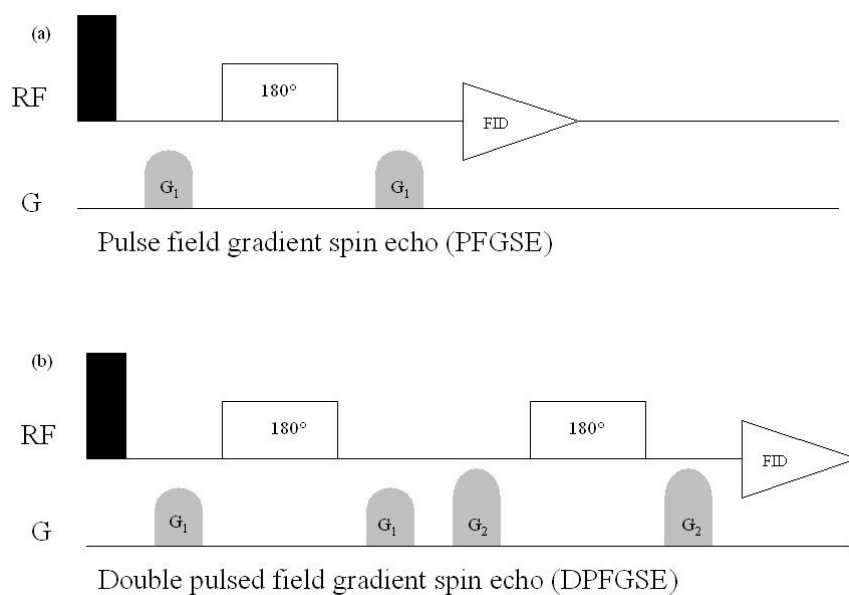
Ora, se l'impulso di  $180^\circ$  fosse selettivo per un ristretto intervallo  $\Delta\nu$  di radiofrequenze, solo la magnetizzazione degli spin che risuonano entro la banda  $\Delta\nu$  verrebbe rifocalizzata alla fine del secondo gradiente, mentre la magnetizzazione degli spin che risuonano fuori dalla banda  $\Delta\nu$  sarebbe ulteriormente defasata dal secondo gradiente. Quantitativamente, il segnale osservato dal ricevitore dopo un impulso a gradiente  $g$  di durata  $\delta$  è

$$S(\delta) = \frac{\sin\left(\frac{1}{2}\gamma g l \delta\right)}{\frac{1}{2}\gamma g l \delta} \quad (12)$$

dove  $l$  è la lunghezza efficace del campione. Per valori sufficientemente grandi del prodotto  $g\delta$  (detto anche *dephasing strength*), quindi, l'intensità del segnale NMR è completamente abbattuta. Da notare che, nella sequenza PFGSE, la magnetizzazione degli spin che risuonano fuori dalla banda  $\Delta\nu$  vede una *dephasing strength* efficace pari a  $2g\delta$ .

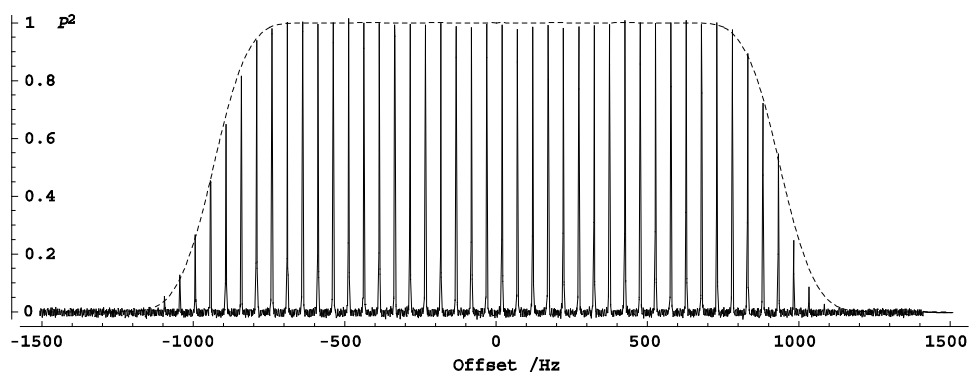
Una possibile difficoltà con le sequenze PFGSE (Figura 14a) è che la direzione lungo la quale la magnetizzazione viene rifasata (ovvero la fase della magnetizzazione osservata) dipende in generale dalle proprietà dell'impulso di  $180^\circ$  ed in modo particolare dall'offset rispetto alla frequenza "centrale" dell'impulso stesso; tale difficoltà viene completamente superata usando due blocchi PFGSE in serie (Figura 15b) per formare un *doppio* PFGSE (DPFGSE). Si dimostra infatti che la fase della magnetizzazione eccitata con un DPFGSE è indipendente dalle proprietà di fase dell'impulso selettivo di  $180^\circ$  (purché i due impulsi a RF siano identici)<sup>[34]</sup>





**Figura 14.** Schemi delle sequenze di impulsi PFGSE e DPFGE. Gli impulsi di  $180^\circ$  tra le coppie di gradienti possono essere resi selettivi per eccitare una ristretta banda spettrale.<sup>[34]</sup>

L'implementazione di questi concetti ha portato alla realizzazione di una sequenza di impulsi che consente una efficace eccitazione selettiva con profilo all'incirca rettangolare, centrata ad un valore arbitrario (Figura 16).<sup>[35]</sup>



**Figura 16.** Profilo di eccitazione utilizzato in questo lavoro. Nell'esempio, la finestra di eccitazione è di 1500 Hz.

Come ulteriore nota tecnica, è importante notare che le sequenze che includono gradienti di campo magnetico possono portare ad un leggero riscaldamento del campione ed quindi è consigliabile effettuare delle pre-scansioni a vuoto (*dummy scans*) quando si registrano gli spettri.

## 2.6.6 Ottimizzazione dei parametri di acquisizione

Negli esperimenti NMR ad impulso, il rapporto segnale/rumore (S/N) è aumentato tramite una media coerente del FID su un certo numero di esperimenti ripetuti. Un singolo impulso di  $90^\circ$  ruota l'intera magnetizzazione del campione nel piano  $xy$  e produce un segnale massimo del FID. Tuttavia, quando l'impulso viene ripetuto, il segnale può essere molto più piccolo se non c'è stato abbastanza tempo per permettere il completo rilassamento longitudinale caratterizzato dal valore di  $T_1$ . Un intervallo di tempo pari a  $5T_1$  dopo un impulso di  $90^\circ$  permette un recupero del 99.3% della magnetizzazione, che è solitamente ritenuto quantitativo ai fini pratici. Nel caso in cui  $T_1 \gg T_2^*$ , un intervallo lungo  $5T_1$  implica che la maggior parte del tempo sperimentale viene speso aspettando piuttosto che acquisendo informazioni, e l'efficienza totale dell'esperimento ne soffre. In questi casi l'efficienza ottimale può essere ottenuta usando angoli di rotazione inferiori a  $90^\circ$  e aspettando tra i vari impulsi un tempo inferiore a  $5T_1$ . Discuteremo brevemente i due approcci adottati per determinare le condizioni ottimali, con l'assunzione usuale che la componente trasversale della magnetizzazione sia nulla prima di applicare l'impulso successivo.

### 1) Ottimizzazione della velocità di ripetizione con angolo di $90^\circ$

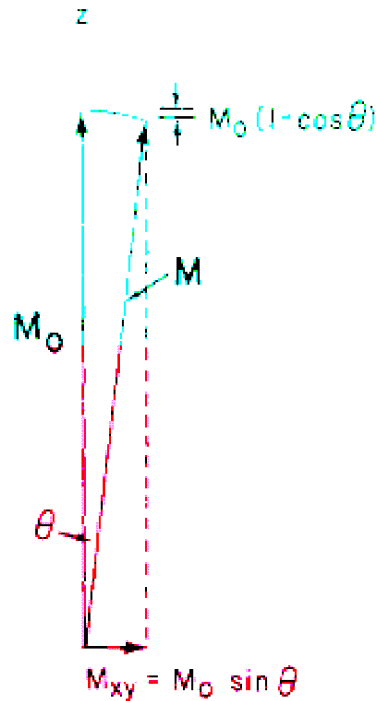
Se il tempo di ripetizione è minore di  $5T_1$ , i segnali dopo il primo FID avranno una magnetizzazione iniziale minore, ma questa riduzione può essere più che compensata aumentando il numero di segnali che possono essere registrati in un tempo dato. Waugh<sup>[36]</sup> ha dimostrato che dopo circa 4 impulsi si raggiunge uno stato stazionario dopo il quale il rapporto segnale/rumore ottenuto durante il tempo di ripetizione  $\tau$  è dato da

$$S / N = \frac{M_0}{\tau^{1/2}} (1 - e^{-\tau/T_1}) \quad (13)$$

Si dimostra facilmente che il rapporto S/N raggiunge il valore massimo quando  $\tau = 1.27T_1$ . In queste condizioni l'ampiezza di ogni FID è solo  $0.72M_0$ , ma a parità di tempo totale dell'esperimento questo metodo permette di ottenere un rapporto S/N che è 1.43 volte quello ottenuto ponendo  $\tau = 5T_1$ .

### 2) Ottimizzazione dell'angolo di *flip*

Se usiamo un angolo inferiore a  $90^\circ$ , il FID risultante sarà ridotto in proporzione a  $\sin\theta$ , dove  $\theta$  è l'angolo di *flip* illustrato nella Figura 17.



**Figura 17.** Nutazione della magnetizzazione  $M$  per un angolo di *flip*  $\theta$ .

Tuttavia, la componente  $z$  della magnetizzazione è ora ridotta a  $M_0 \cos\theta$ , piuttosto che a zero, ed è quindi richiesto un tempo minore per ristabilirla ad un valore prossimo a quello iniziale. Questa situazione è stata analizzata prima da Ernst e Anderson<sup>[37]</sup> e poi da Jones e Sternlicht.<sup>[38]</sup> Anche in questo caso si ottiene uno stato stazionario dopo circa quattro impulsi, e il rapporto S/N è dato da

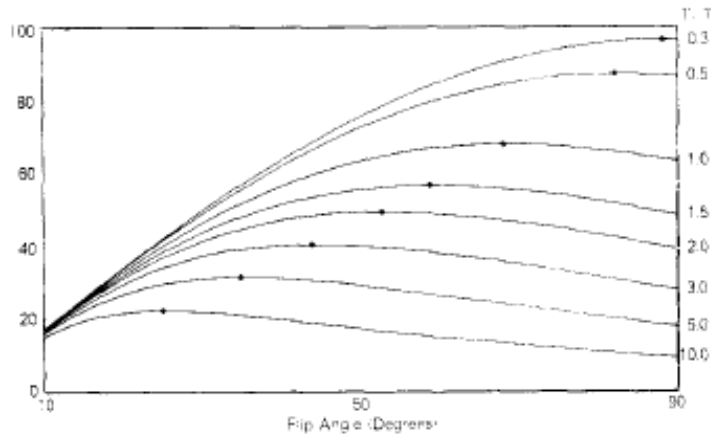
$$S/N = \frac{M_0}{\tau^{1/2}} (1 - e^{-\tau/T_1}) \sin\theta (1 - e^{-\tau/T_1} \cos\theta) \quad (14)$$

dove  $\tau$  è considerato fisso e uguale al tempo di acquisizione  $T$  (solitamente pari a  $3T_2^*$ ). Derivando rispetto a  $\theta$  è facile dimostrare che

$$\cos\theta_{opt} = e^{-T/T_1} \quad (15)$$

Relativamente ad un angolo di rotazione con un tempo di ripetizione pari a  $5T_1$ , gli esperimenti con angoli di rotazione ridotti danno complessivamente un guadagno del rapporto S/N fino a circa 1.58 volte. Questo guadagno massimo teorico esiste quando il tempo di acquisizione è molto minore rispetto a  $T_1$ , ma anche per  $T \approx T_1$  si ha un guadagno di oltre il 50%.

Chiaramente, il maggior difetto in queste procedure per ottimizzare il rapporto S/N è che esse dipendono dalla conoscenza di  $T_1$ . Il problema che si presenta è quindi quello di stabilire quanto sia sensibile il criterio di ottimizzazione (Eq. 15), ovvero: se non si valuta esattamente  $T_1$ , di quanto sarà ridotto il rapporto S/N? Fortunatamente il valore ottimale è situato in una parte piatta del grafico come indicato in Figura 18.<sup>[39]</sup>



**Figura 18.** Grafico del rapporto S/N vs. angolo di *flip* per alcuni valori di  $T_1/T$ , derivati dall'Eq. 14. I punti rappresentano i valori ottimali di  $\theta$  calcolati dall'Eq. 15.

Per ogni valore di  $T_1/T$  il punto nero rappresenta il valore ottimale di  $\theta$  calcolato con l'Eq. 15. Per esempio, se si stimasse erroneamente un valore di  $T_1/T = 1$  (essendo 3 il valore esatto), si eseguirebbe l'esperimento con un angolo di  $68^\circ$  invece del valore corretto di  $44^\circ$ . Tuttavia, la riduzione del rapporto S/N risultante dall'errore di valutazione di  $T_1$  risulterebbe essere solo del 12%.

La Figura 18 illustra anche l'aspetto più critico della riduzione del rapporto S/N risultante dalla presenza di differenti  $T_1$  nel campione. Per esempio, due differenti nuclei con  $T_1/T = 1$  e  $T_1/T = 3$  avranno una differenza di intensità relativa pari ad un fattore 1.46 se misurati alle condizioni ottimali per il maggiore dei  $T_1$  (angolo di rotazione di  $44^\circ$ ). Ad un angolo di rotazione di  $68^\circ$ , che è ottimale per il più corto dei  $T_1$ , la differenza di intensità relative risulta essere di 1.89. Per ottenere un rapporto d'intensità quantitativo tra nuclei a diverso  $T_1$  vengono normalmente usati un angolo di rotazione di  $90^\circ$  e un tempo di ripetizione di almeno  $5T_1$ . Tuttavia, la Figura 18 dimostra che per scopi qualitativi un esperimento ottimizzato sul maggiore dei  $T_1$  solitamente produce una distorsione delle intensità accettabile; nel caso  $T_1$  fosse conosciuto accuratamente, l'Eq. 14 può essere usata per correggere l'effetto delle pulsazioni rapide. Questa situazione si incontra raramente in analisi di

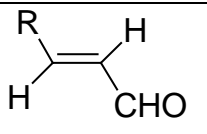
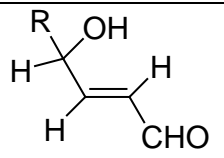
routine o in studi strutturali. Tuttavia, in analisi quantitative di campioni ben definiti in cui devono essere fatte frequentemente (es: applicazioni per il controllo di qualità), determinare i vari  $T_1$  e perciò essere in grado di usare l'ottimizzazione dell'angolo di rotazione, con le correzioni applicate dall'Eq. 14, risulta conveniente.<sup>[39]</sup>

## 3 Risultati e discussione

### 3.1 Prodotti principali di ossidazione

Come visto in precedenza, lo stress termico genera una serie di prodotti di ossidazione primari e secondari; quelli di interesse sono le aldeidi e i perossidi, che possono essere rilevati con la spettroscopia  $^1\text{H}$  NMR. Si possono riconoscere 4 diversi tipi di aldeidi la cui formazione è indicata dalla presenza dei protoni aldeidici ( $-\text{CHO}$ ) evidenziata dai segnali localizzati a:

**Tabella 5.** Chemical shift caratteristici dei protoni aldeidici.

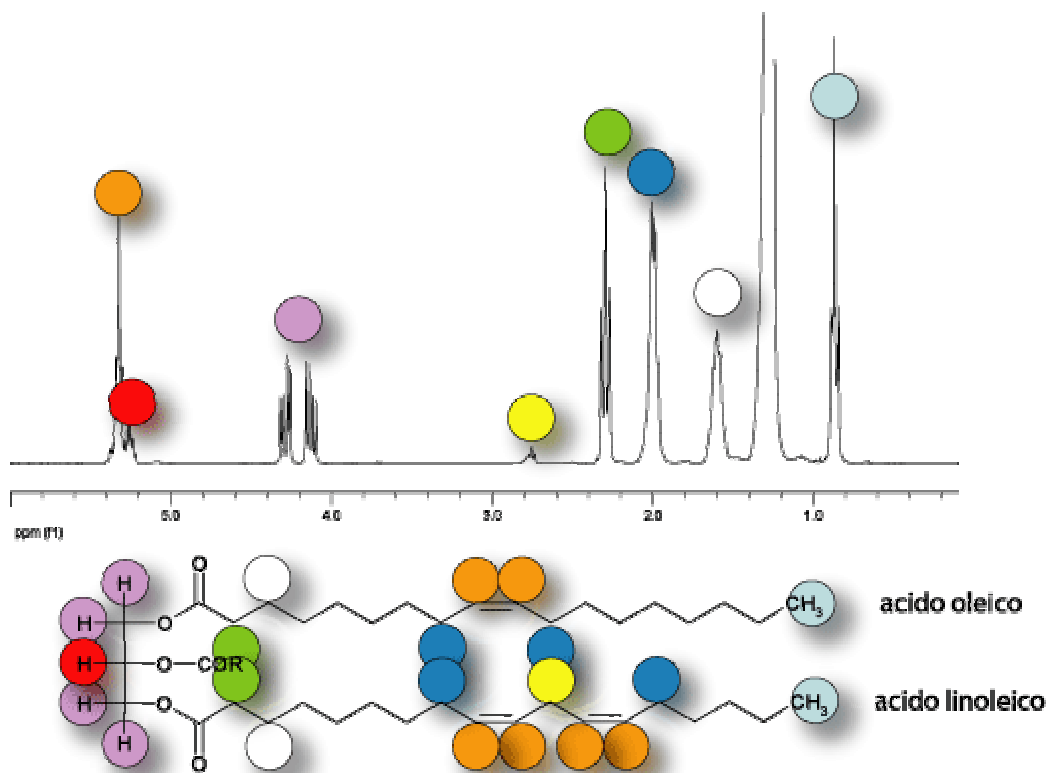
Aldeidi insature		Aldeidi sature	
$\delta = 9.32$ ppm <i>trans</i> -2-alchenali	$\delta = 9.35$ ppm alca-2,4-dienali	$\delta = 9.38$ ppm 4-idrossi- <i>trans</i> -2-alchenali	$\delta = 9.57$ ppm alcanali
	$\text{R}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CHO}$		$\text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_4-\text{CHO}$

Non ci è possibile riportare esattamente i dati dei perossidi in quanto non sono molto stabili e sono presenti in grande varietà (Schema 3, 4, 5); inoltre, tali valori sono fortemente influenzati dal tipo di solvente. Infatti, passando da una soluzione in solo  $\text{CDCl}_3$  ad una di  $\text{CDCl}_3$  e  $\text{DMSO}-d_6$  si può notare uno spostamento dei segnali dei protoni idroperossidici ( $-\text{OOH}$ ) di alcuni ppm. Questo è dovuto alla loro acidità, notevolmente superiore a quella dei corrispondenti alcoli; ad esempio l'alcol ter-butilico  $[(\text{CH}_3)_3\text{C}-\text{OH}]$  presenta un valore di  $\text{pK}_a$  pari a circa 19 mentre il relativo idroperossido  $[(\text{CH}_3)_3\text{C}-\text{OOH}]$  presenta un valore di  $\text{pK}_a$  pari a 13.27.<sup>[40]</sup>

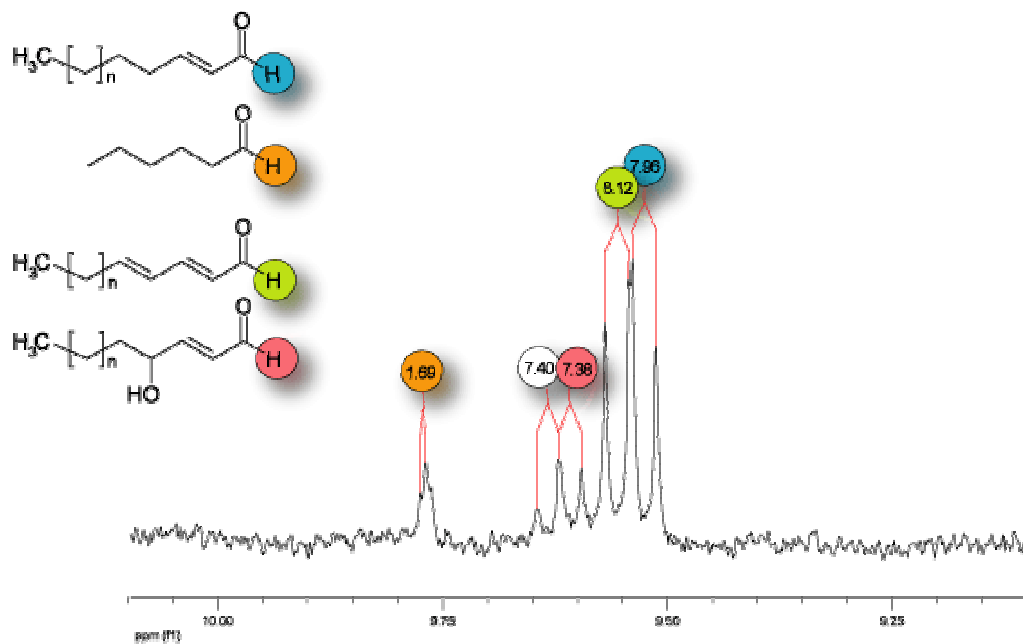
È stato possibile monitorare isolatamente il segnale dei protoni delle aldeidi sature poiché questo è isolato, mentre non è stato possibile fare lo stesso coi vari segnali delle aldeidi sature in quanto i vari segnali si sovrappongono tra loro. I segnali dei protoni idroperossidici vengono monitorati integrando tutti i segnali (che sono tutti singoletti) senza tentare di assegnare i vari tipi di perossidi ai diversi segnali.

Dopo 160 minuti di trattamento termico, la concentrazione media delle specie ossidate nei campioni analizzati è dell'ordine delle millimoli/litro.

Qui di seguito vengono riportate due porzioni dello spettro nelle quali vengono assegnati i vari segnali ai diversi protoni presenti negli acidi grassi (Figura 19) e i segnali delle diverse specie di aldeidi (Figura 20).



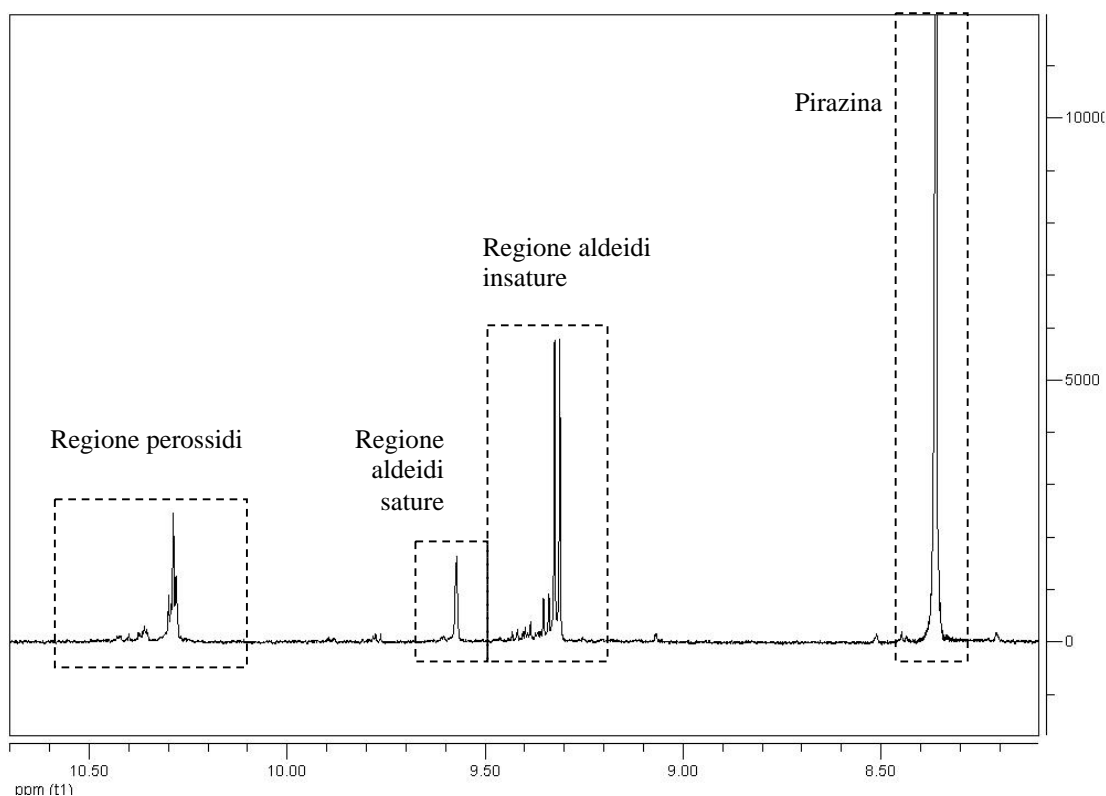
**Figura 19.** Spettro NMR completo dell'olio di oliva.



**Figura 20.** Regione aldeidica dello spettro NMR di un campione di olio di oliva dopo 160 minuti di stress termico a 160 °C. Sono evidenziate le costanti di accoppiamento (in Hz).

### 3.2 Esperimenti su oli non trattati

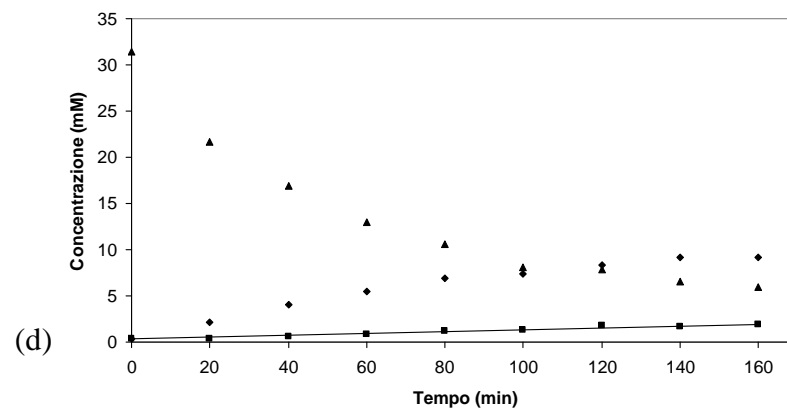
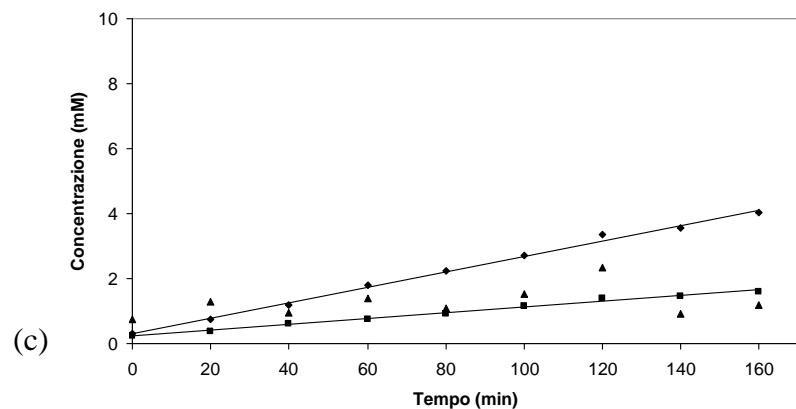
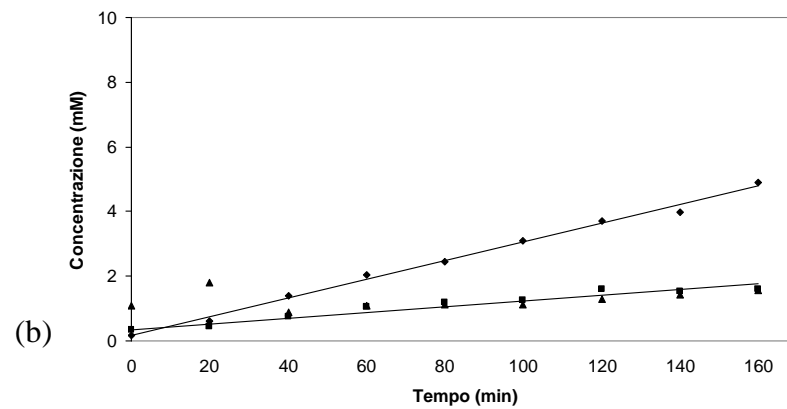
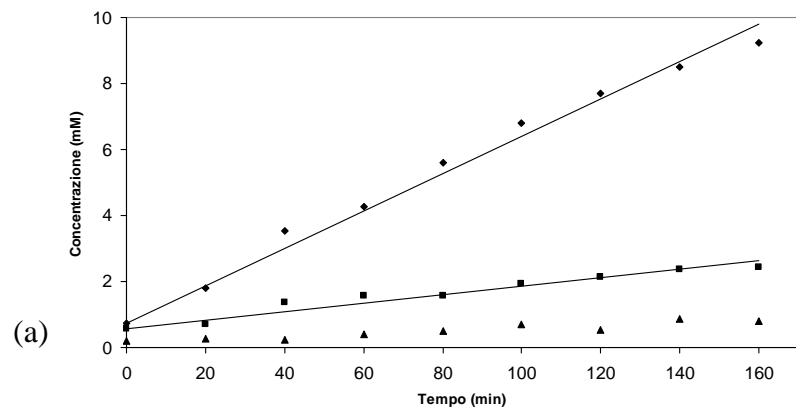
La Figura 21 riporta un tipico spettro NMR selettivo di un olio stressato termicamente a 180 °C per 160 minuti. Si possono notare facilmente le differenti regioni in cui risuonano i segnali di interesse (standard pirazina, aldeidi insature e sature, perossidi).



**Figura 21.** Spettro  $^1\text{H}$  con eccitazione selettiva della regione 7-11 ppm dell'olio di oliva vecchio di due anni, dopo stress termico a 180 °C per 160 minuti.

Di seguito vengono riportati i grafici (Figura 22 a-d) in cui viene descritta la formazione nel tempo dei prodotti di ossidazione che si formano riscaldando vari tipi di oli e grassi (strutto) ad una temperatura di 180 °C; è stata scelta tale temperatura poiché è quella alla quale viene normalmente condotta la frittura. In ascissa viene riportato il tempo di riscaldamento in minuti, mentre in ordinata viene riportata la concentrazione delle specie (in millimoli) riferita al campione di olio non diluito; si è scelto di mantenere fisso il valore massimo di concentrazione per avere un confronto immediato tra i vari campioni di olio (a parte il campione di olio d'oliva invecchiato e non percolato su allumina, in cui la concentrazione iniziale di perossidi è fuori scala).





**Figura 22.** Andamento nel tempo della concentrazione dei prodotti di ossidazione primaria (perossidi) e secondaria (aldeidi) per: a) strutto; b) olio di mais; c) olio di arachidi, d) olio di oliva. Rombi: aldeidi insature (9.20-9.50 ppm); quadrati: aldeidi saturate (9.50-9.65 ppm); triangoli: idroperossidi (10.20-10.60 ppm).

**Tabella 6.** Velocità di formazione dei prodotti di ossidazione secondaria (aldeidi sature ed insature). Tra parentesi è indicato il valore di  $R^2$  per la retta di correlazione.

Olio o grasso	Aldeidi sature (mM/min)	Conc. iniziale (mM)	Aldeidi insature (mM/min)	Conc. iniziale (mM)
Strutto	0.0128 (0.947)	0.58	0.0568 (0.987)	0.72
Olio di mais	0.009 (0.929)	0.33	0.0289 (0.994)	0.17
Olio di arachidi	0.0089 (0.992)	0.23	0.0238 (0.995)	0.31
Olio di oliva	0.01 (0.963)	0.35	Dato non registrato	

Per creare tali grafici è stato monitorato l'andamento sulle seguenti regioni dello spettro: i rombi rappresentano i segnali dei protoni delle aldeidi insature (situati nella regione tra 9.20 e 9.50 ppm), i quadrati rappresentano i segnali dei protoni delle aldeidi sature (un tripletto compreso tra 9.50 e 9.65 ppm), mentre i triangoli rappresentano l'insieme di diversi segnali dei protoni idroperossidici (compresi in una regione tra 10.20 e 10.60 ppm).

In questi grafici si nota un andamento lineare di crescita delle aldeidi (tranne le aldeidi insature nel campione di olio di oliva che arrivano ad un valore costante dopo 140 minuti di riscaldamento); si può notare che le aldeidi sature crescono più lentamente delle aldeidi insature.

L'andamento dei perossidi dipende invece dalla loro quantità iniziale. Infatti, nell'olio di oliva vecchio di due anni (che inizialmente presentava la maggior quantità di perossidi tra tutti i nostri campioni) si nota un decadimento esponenziale, mentre nello strutto, che presenta una minor quantità di perossidi rispetto all'olio di oliva, si nota inizialmente una diminuzione e poi una crescita fino ad arrivare ad una quantità costante; nell'olio di mais si nota un andamento irregolare su valori all'incirca costanti, mentre nell'olio di arachidi (che presentava inizialmente la minor quantità di perossidi) si nota una quantità costante di perossidi.

Si può notare come le velocità di comparsa delle aldeidi siano assai simili tra i vari campioni. Dato che però i perossidi sono i prodotti primari dell'ossidazione, la loro concentrazione iniziale potrebbe influire sulla velocità di formazione delle aldeidi e falsare così il dato finale. Per questo motivo, sono stati effettuati esperimenti anche su campioni di olio preliminarmente trattato in modo da eliminare i perossidi eventualmente contenuti.

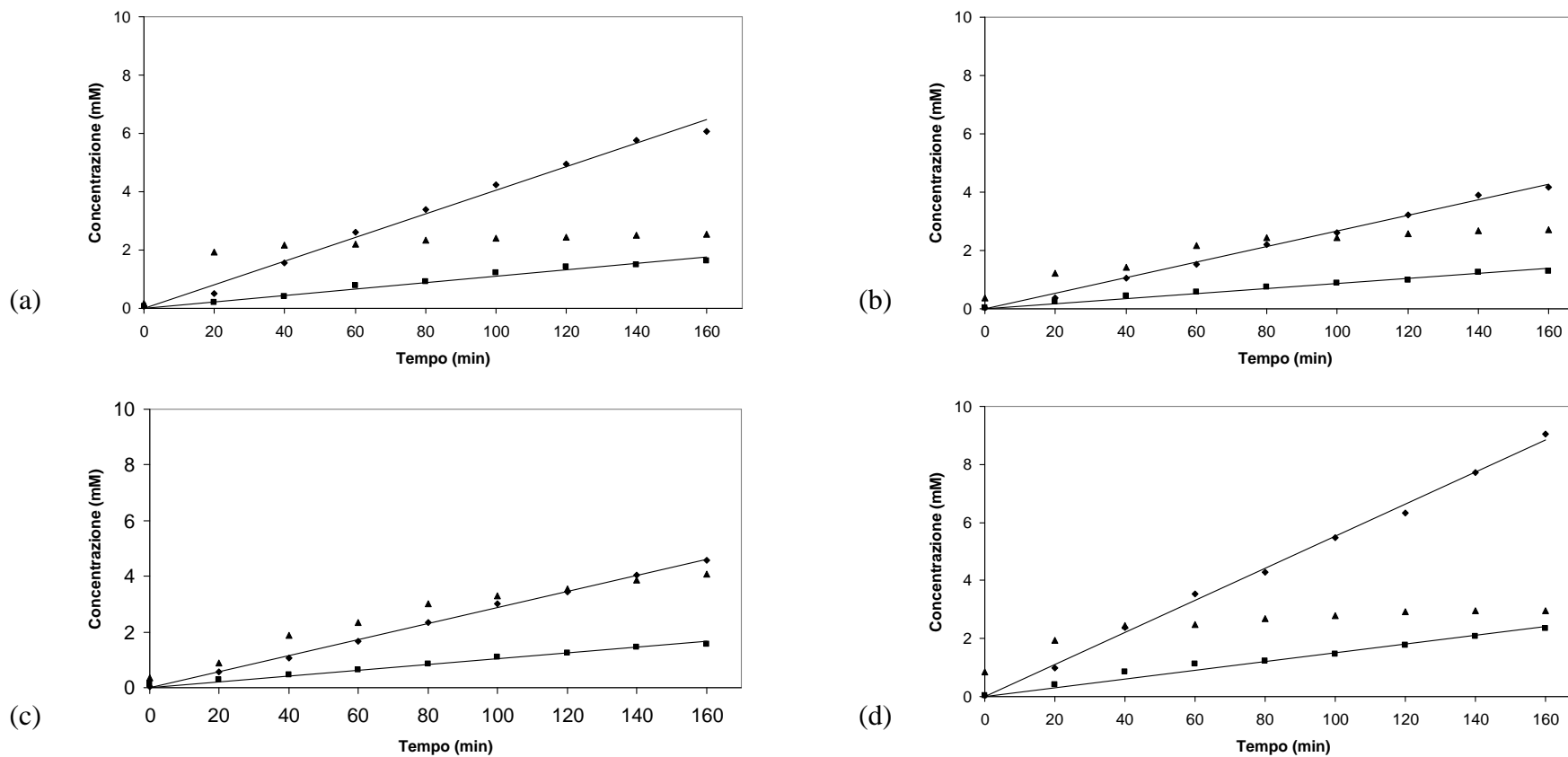
### 3.3 Esperimenti con eliminazione preliminare dei perossidi

Come detto in precedenza, la differente quantità di perossidi iniziali non ci permetteva di fare un confronto accurato tra i vari tipi di oli: sono quindi state

effettuate prove su campioni di olio trattati in modo tale da eliminare i perossidi e fare in modo che abbiano tutte condizioni iniziali simili.

Per far ciò l'olio viene filtrato, in assenza di solvente, su allumina basica (come descritto al paragrafo 2.3.1) e mantenuto ad una temperatura di 4 °C fino alle prove di stress termico. I campioni di olio stressati con questo accorgimento verranno di seguito definiti come "trattati" (Figure 23a-d).



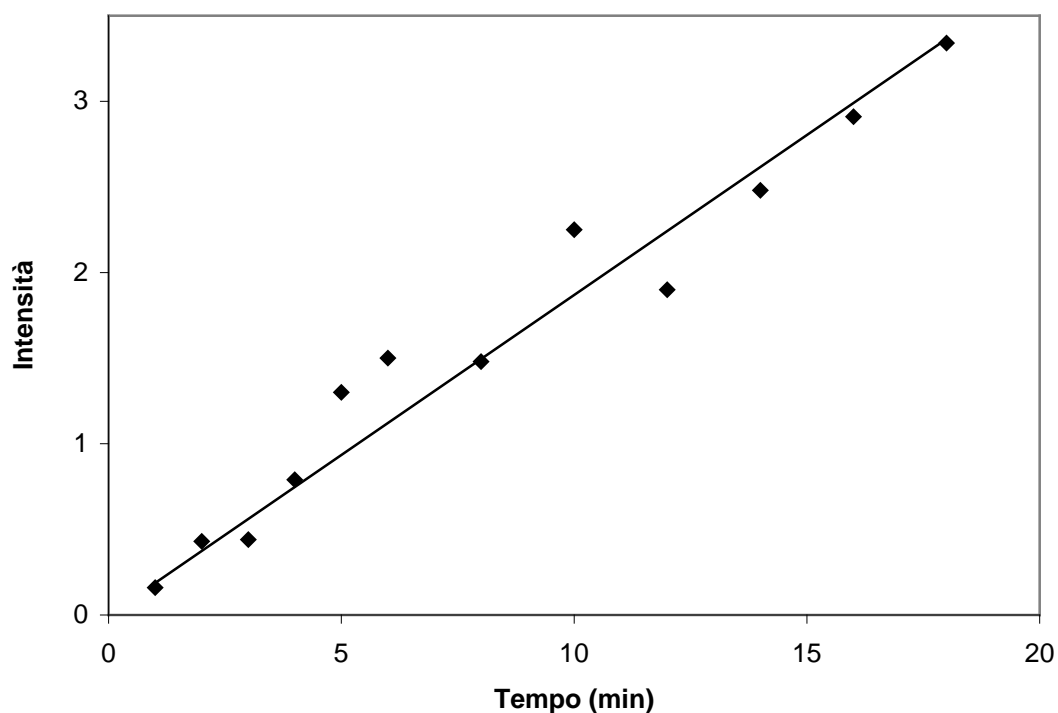


**Figura 23.** Andamento in funzione del tempo della concentrazione dei prodotti di ossidazione primaria (perossidi) e secondaria (nel nostro caso aldeidi) per alcuni tipi di oli vegetali precedentemente trattati per eliminare i perossidi: a) olio di mais; b) olio di arachidi; c) olio di oliva e d) olio di vinaccioli. Rombi: aldeidi insaturi (9.20-9.50 ppm); quadrati: aldeidi saturi (9.50-9.65 ppm); triangoli: idroperossidi (10.20-10.60 ppm).

**Tabella 7.** Velocità di formazione dei prodotti di ossidazione secondaria (aldeidi sature ed insature). Tra parentesi è indicato il valore di  $R^2$  per la retta di correlazione.

Olio	Aldeidi sature (mM/min)	Aldeidi insature (mM/min)
Oliva	0.0103 (0.980)	0.0289 (0.998)
Mais	0.0111 (0.978)	0.0404 (0.990)
Arachidi	0.0086 (0.977)	0.0267 (0.996)
Vinaccioli	0.0151 (0.973)	0.0552 (0.997)

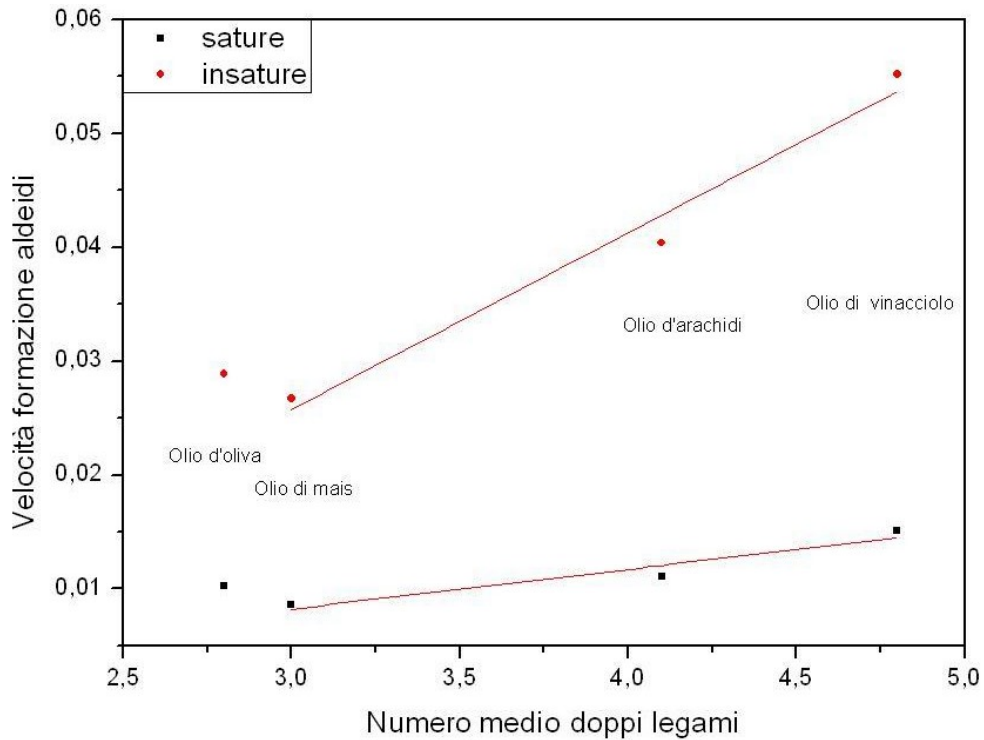
Facendo un confronto coi grafici ottenuti senza il trattamento con allumina si nota che le velocità di crescita delle aldeidi rimangono pressoché invariate. Da questi spettri si può però notare un cambiamento nell'andamento dei perossidi: infatti ora presentano inizialmente una crescita lineare (come mostrato nella Figura 24 riguardante i primi 20 minuti di riscaldamento) per poi stabilizzarsi a valori costanti. Durante questa prova non sono stati ricavati i dati relativi alle aldeidi poiché presenti in concentrazioni troppo basse per una accurata quantificazione.



**Figura 24.** Crescita dei segnali dei protoni idroperossidici nei primi minuti di stress termico.

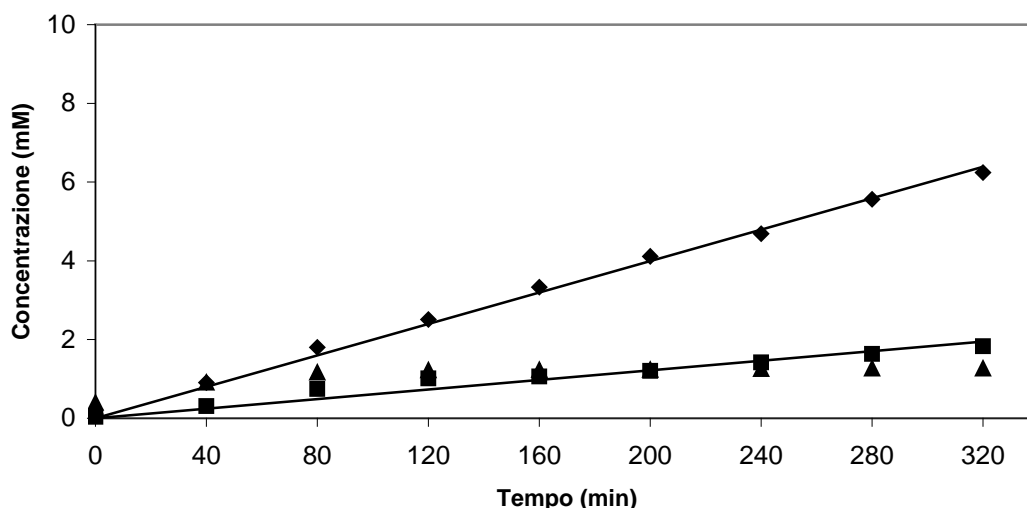
Dai valori delle velocità di formazione è possibile fare un confronto tra queste velocità e il numero medio di doppi legami come si può notare dalla Figura 25; è da notare che gli oli di semi presentano un andamento regolare, mentre il campione di olio d'oliva (ricavato per spremitura dei frutti) non segue bene tale andamento. Questo risultato, che dovrà essere approfondito, potrebbe essere dovuto alla

maggior complessità della matrice dell'olio di oliva, notoriamente caratterizzato da una grande varietà di sostanze presenti. Tra queste possiamo ricordare la clorofilla (che è un fotosensibilizzatore come descritto nel paragrafo 1.2.2) e sostanze antiossidanti naturali presenti (ad esempio i polifenoli e i tocoferoli), la cui azione non è ben nota. Un'altra diversità dell'olio di oliva è che i perossidi non raggiungono un valore stazionario nel tempo della prova.



**Figura 25.** Confronto tra velocità di formazione delle varie specie aldeidiche (● aldeidi insature, ■ aldeidi sature) e numero medio di doppi legami.

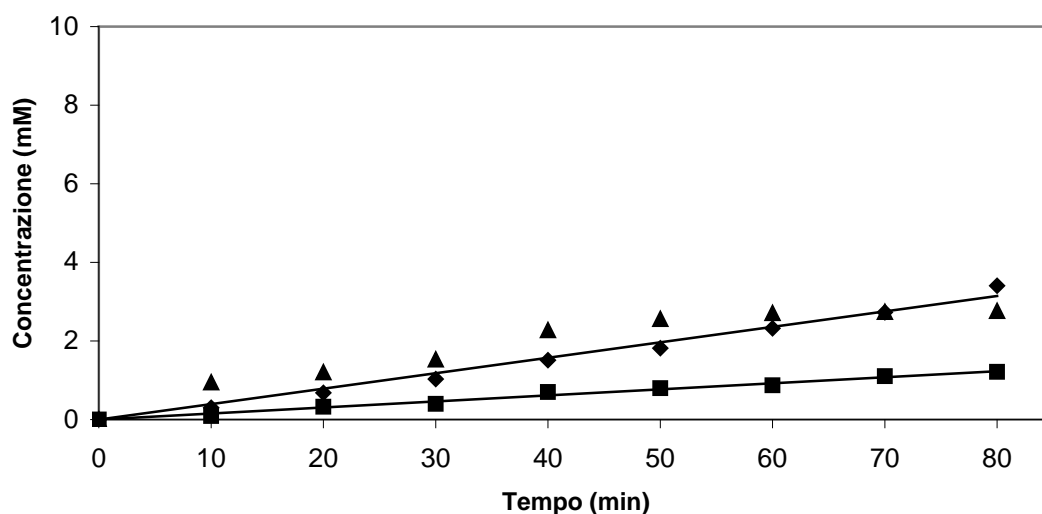
È stato eseguita una prova di riscaldamento sull'olio di arachidi (sempre precedentemente trattato per rimuovere i perossidi iniziali) con tempi di acquisizione del campione di 40 minuti, invece dei soliti 20, sempre per un totale di 9 acquisizioni (tenendo conto anche del campione a tempo zero) per osservare l'andamento delle aldeidi in lunghi periodi (Figura 26).



**Figura 26.** Andamento in funzione del tempo della concentrazione dei prodotti di ossidazione primaria (perossidi) e secondaria (aldeidi) per l'olio di arachidi in un tempo di 320 minuti con prelievi ogni 40 minuti. Rombi: aldeidi insature (9.20-9.50 ppm); quadrati: aldeidi sature (9.50-9.65 ppm); triangoli: idroperossidi (10.20-10.60 ppm).

Da questi dati si nota che le aldeidi mantengono una crescita lineare, in quanto non sono soggette ad alcuna reazione di decomposizione che possa diminuirne la concentrazione.

Oltre a questa prova su tempi lunghi è stata eseguita una prova a tempi brevi (sempre stressando l'olio di arachidi trattato per eliminare i perossidi iniziali) con prelievi ogni 10 minuti per vedere se le aldeidi presentavano inizialmente un periodo di induzione (Figura 27).



**Figura 27.** Andamento in funzione del tempo della concentrazione dei prodotti di ossidazione primaria (perossidi) e secondaria (nel nostro caso aldeidi) per l'olio di arachidi in un tempo di 80 minuti con prelievi ogni 10 minuti. Rombi: aldeidi insature (9.20-9.50 ppm); quadrati: aldeidi sature (9.50-9.65 ppm); triangoli: idroperossidi (10.20-10.60 ppm).



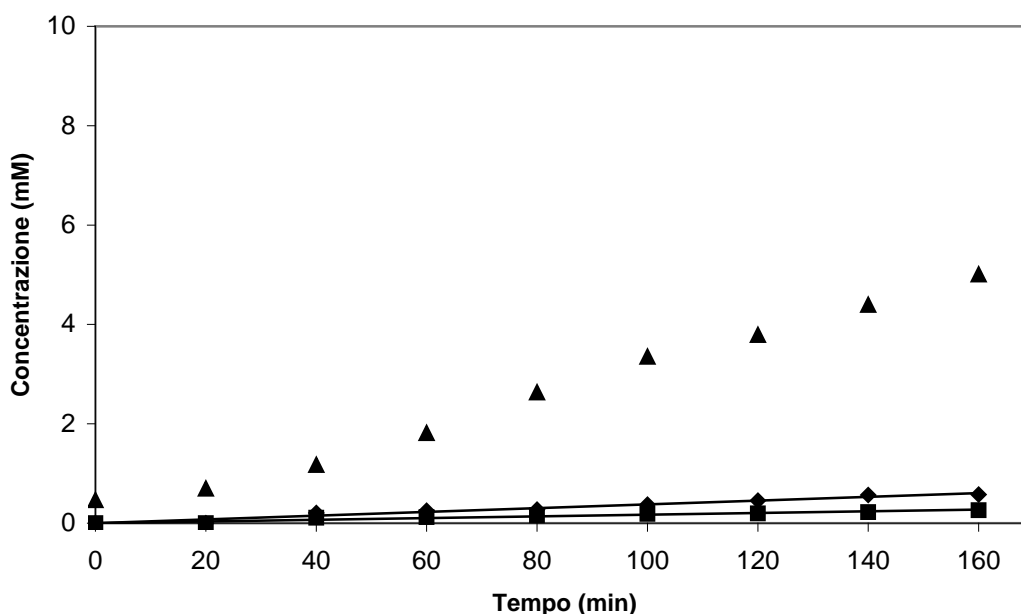
Come si può notare, le aldeidi partono da subito con una crescita lineare (anche se avremmo dovuto prendere campioni ad intervalli minori negli istanti iniziali per avere una maggior accuratezza) e i perossidi raggiungono una concentrazione stabile attorno ai 60 minuti come avviene anche nelle altre prove.

**Tabella 8.** Velocità di formazione dei prodotti di ossidazione secondaria (aldeidi saturi ed insaturi) nell'olio di arachidi. Tra parentesi è indicato il valore di  $R^2$  per la retta di correlazione.

Tipo di prova	Aldeidi saturi (mM/min)	Aldeidi insaturi (mM/min)
Prelievi ogni 10 min	0.0154 (0.986)	0.039 (0.987)
Prelievi ogni 20 min	0.0086 (0.977)	0.027 (0.996)
Prelievi ogni 40 min	0.0061 (0.935)	0.020 (0.996)

### 3.4 Esperimenti a bassa temperatura

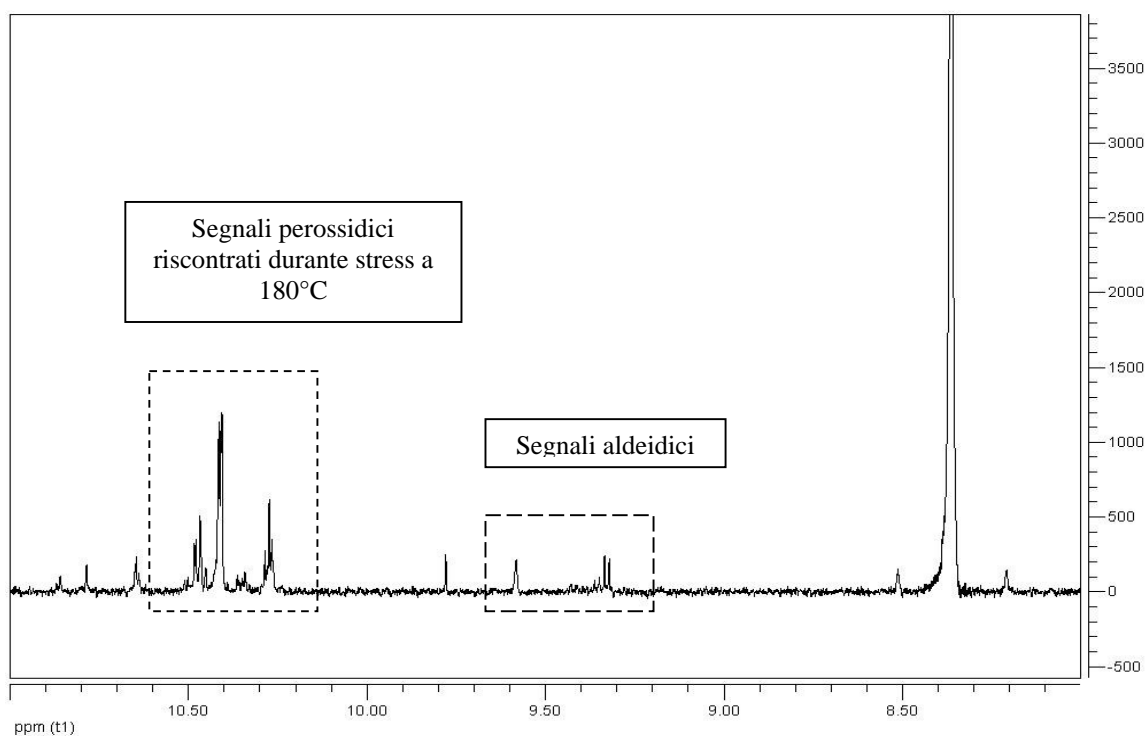
Oltre a queste prove, condotte ad una temperatura di 180 °C, è stata effettuata una prova di stress termico a temperatura inferiore (cioè 115 °C) per vedere come la variazione di temperatura influisce sull'andamento delle specie ossidate<sup>[41]</sup> (Figura 28).



**Figura 28.** andamento in funzione del tempo della concentrazione dei prodotti di ossidazione primaria (perossidi) e secondaria (nel nostro caso aldeidi) per l'olio di arachidi trattato ad una temperatura di 115 °C. Rombi: aldeidi insaturi (9.20-9.50 ppm); quadrati: aldeidi saturi (9.50-9.65 ppm); triangoli: idroperossidi (10.20-10.60 ppm).

Come prevedibile, la diminuzione di temperatura porta ad una drastica riduzione nella velocità di formazione delle aldeidi. Inoltre è possibile notare nello

spettro NMR (Figura 29) molti più segnali di perossidi che cadono a frequenze dove normalmente non si nota alcun segnale; questi segnali, probabilmente, sono dovuti a specie talmente reattive da non raggiungere una concentrazione misurabile ad alte temperature.

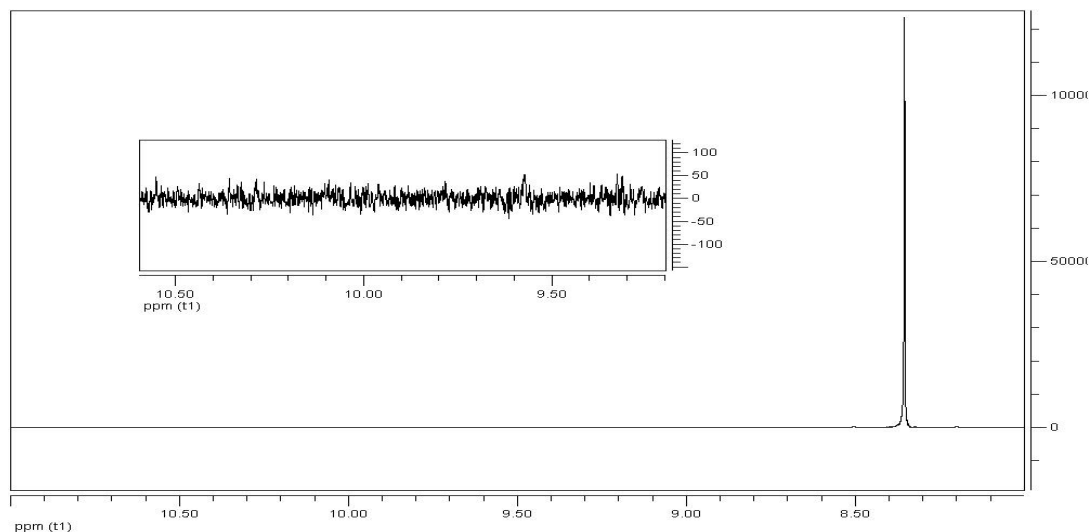


**Figura 29.** Spettro  $^1\text{H}$  NMR selettivo in  $\text{CDCl}_3$  e  $\text{DMSO-d}_6$  di un campione di olio di arachidi riscaldato a  $115\text{ }^\circ\text{C}$  per 160 minuti.

### 3.5 Esperimenti in assenza di ossigeno

Com'è noto, si ritiene che l'ossigeno atmosferico sia necessario per dar luogo alla formazione di perossidi, e quindi di aldeidi. È stata quindi eseguita una prova di stress termico sotto atmosfera di azoto su un campione precedentemente degasato con metodo *freeze-pump-thaw* per eliminare l'ossigeno disciolto. A tale scopo il campione, collegato ad una linea da vuoto, viene inizialmente congelato in un bagno di acetone e ghiaccio secco. Successivamente si applica il vuoto ed infine si scongela il campione immergendolo in un bagno di acqua. L'intero ciclo è quindi ripetuto per tre volte: infine il campione viene pressurizzato sotto azoto e portato alla temperatura di  $180\text{ }^\circ\text{C}$ .

In tutti i campioni prelevati a tempi diversi (lo spettro della figura 30 si riferisce al tempo massimo, ovvero 160 minuti) si notano appena i segnali di perossidi e aldeidi, presenti in concentrazione troppo bassa per una accurata quantificazione.

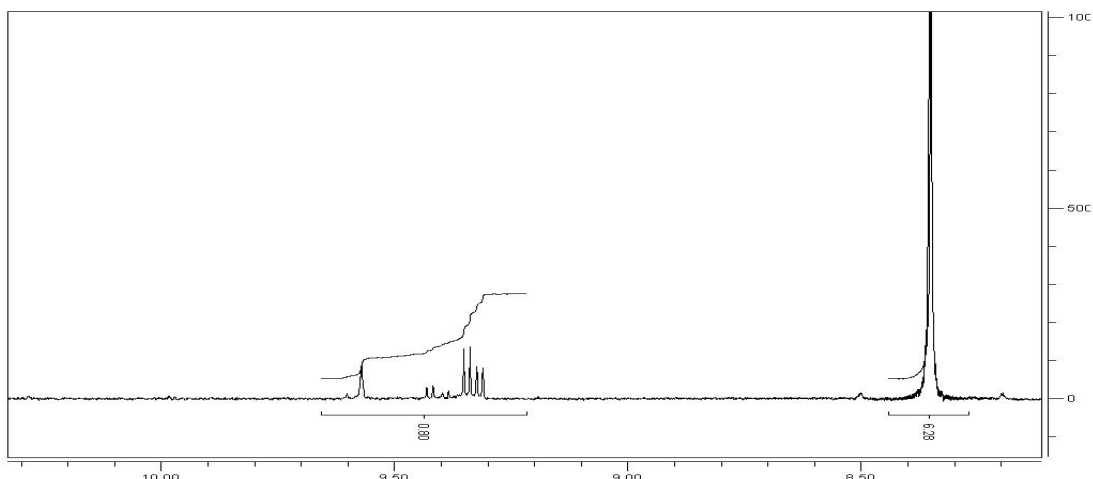


**Figura 30.** Spettro  $^1\text{H-NMR}$  Spettro NMR selettivo in  $\text{CDCl}_3$  e  $\text{DMSO-d}_6$  di un campione di olio di arachidi, precedentemente degasato, scaldato a  $180\text{ }^\circ\text{C}$  per 160 minuti in atmosfera di azoto.

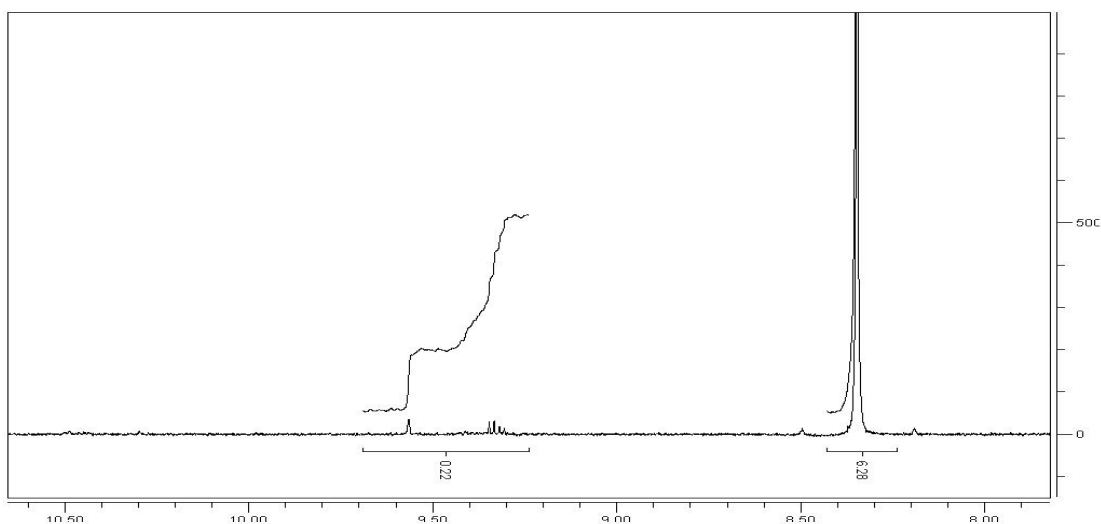
### 3.6 Esperimenti su oli usati

Sono state infine effettuate delle prove di quantificazione delle aldeidi su campioni di olio utilizzati nelle sagre per friggere pesce e patate. Di questi non è nota la natura, né è stato possibile ricostruire accuratamente le effettive condizioni di utilizzo, eccetto che l'olio usato per friggere il pesce è stato mantenuto ad una temperatura di  $160\text{ }^\circ\text{C}$ , mentre quello usato per le patatine tra  $160$  e  $170\text{ }^\circ\text{C}$ . Prima di effettuare le analisi NMR, questi campioni sono stati filtrati per eliminare particelle residue dei cibi fritti.

Dagli spettri NMR, si è notato che sono stati usati due diversi tipi di olio per friggere in quanto il numero medio di doppi legami per il campione usato per la frittura del pesce è pari a 4.2 mentre quello usato per le patatine è pari a 3.3. Da ciò è possibile dedurre che per friggere il pesce sia stato usato probabilmente olio di arachidi, probabilmente miscelato ad altri oli di simili caratteristiche, mentre per le patatine è stata usata probabilmente una miscela di oli contenente olio di mais.



**Figura 31.** Spettro  $^1\text{H-NMR}$  selettivo del campione di olio usato per friggere le patate.



**Figura 32.** Spettro  $^1\text{H-NMR}$  selettivo del campione di olio usato per friggere il pesce.

Dagli spettri NMR è possibile ricavare il valore totale delle aldeidi formatesi durante la frittura. Essendo una misura indicativa non sono state distinte aldeidi sature e insature. Per il campione usato per le patatine si ricava una concentrazione finale di 4.8 mM mentre per il campione usato per il pesce si ottiene un valore pari a 1.3 mM. La bassa quantità di aldeidi presente può essere imputata al fatto che si ha una perdita delle aldeidi volatili dovuta probabilmente alla grande superficie di scambio dell'apparato usato per la frittura. Non sono invece presenti livelli quantificabili di perossidi, probabilmente poiché il lungo periodo di riscaldamento li ha degradati interamente verso i prodotti di ossidazione secondari.

### 3.7 Discussione

Questo lavoro di Tesi è consistito in uno studio qualitativo e quantitativo delle reazioni che avvengono durante i processi di frittura, eseguendo degli esperimenti in condizioni simili a quelle che si trovano in una friggitrice domestica o professionale.

È stata messa a punto una metodologia, riguardante il pre-trattamento dei campioni, le modalità di stress termico, l'analisi via NMR e la determinazione quantitativa con standard esterno, che ora consente una rapida prosecuzione degli esperimenti ad altri ambiti.

Grazie all'utilizzo della spettroscopia  $^1\text{H}$  NMR, abbiamo dimostrato che è possibile determinare il grado di insaturazione (numero medio di doppi legami) degli oli tramite una semplice e rapida misura NMR senza effettuare pre-trattamenti o reazioni sul campione.

Abbiamo quindi mostrato come l'utilizzo di tecniche di eccitazione selettiva a bande consenta di superare i problemi derivanti dalla presenza nello spettro di segnali molto intensi ma non interessanti assieme a quelli di interesse ma molto deboli, mantenendo però la possibilità di quantificarli. È stato quindi possibile ottenere una notevole quantità di informazioni riguardo ai prodotti di ossidazione con una buona risoluzione, riuscendo cioè ad ottenere una accurata quantificazione della concentrazione anche per le specie presenti in bassa quantità (alcune decine di parti per milione). Tramite una scelta opportuna dei parametri di acquisizione è possibile rendere più veloci le misure NMR, rinunciando però in qualche misura all'accuratezza dei dati. Questo aspetto, che sicuramente dovrà essere approfondito, non è però risultato critico per l'applicazione desiderata, perché (a) l'andamento nel tempo dovrebbe essere comunque accurato, e (b) la riproducibilità degli esperimenti risulta ancora bassa e comporta errori maggiori.

La velocità di formazione dei prodotti di ossidazione secondaria è direttamente legata al grado di insaturazione degli acidi grassi presenti nel campione, e la formazione delle aldeidi insature è più veloce rispetto a quella delle aldeidi sature, anche se per il momento non si conosce con certezza se sia favorita la formazione di aldeidi mono-insature rispetto a quelle di-insature.

Si è potuto inoltre notare che il processo di ossidazione avviene anche a temperatura ambiente, ma in questo caso il processo più importante è la formazione di perossidi che si decompongono rapidamente una volta portati ad alte temperature.

Dalle prove eseguite in assenza di ossigeno abbiamo confermato sperimentalmente che il processo di autossidazione, come prevedibile, non ha luogo.

## 4 Conclusioni

La spettroscopia NMR è uno strumento potente e versatile per analizzare i processi ossidativi che avvengono negli oli e grassi alimentari in seguito al trattamento termico alle condizioni ordinarie di frittura, nonché per caratterizzarne alcuni aspetti. È possibile controllare l'andamento nel tempo delle specie derivanti dall'ossidazione primaria e secondaria, potendosi anche distinguere in parte la struttura delle aldeidi formatesi.

Permangono alcuni problemi che non è stato possibile affrontare nell'arco di tempo previsto: soprattutto la scarsa riproducibilità delle misure, forse dovuta ad una disomogenea distribuzione del calore durante gli esperimenti o ad un'inefficiente circolazione di aria (e quindi di ossigeno) all'interno del pallone contenente l'olio riscaldato.

Per questo motivo, al momento, l'unico criterio (molto generale) per stabilire quale tipo di olio sia il più indicato per la frittura rimane quello del minimo numero medio di doppi legami. Quindi, a parte le buone prestazioni dello strutto, come atteso, gli altri oli vegetali non hanno mostrato differenze di comportamento apprezzabili.

### 4.1 Sviluppi futuri

Come si è visto, il lavoro fin qui svolto è stato rivolto per lo più alla messa a punto dei metodi per l'analisi qualitativa e quantitativa dei prodotti di ossidazione. Si possono a questo punto prefigurare diversi sviluppi, che potrebbero riguardare sia altri aspetti metodologici, sia aspetti chimici. Un elenco di possibilità è esposto qui di seguito:

- Migliorare la riproducibilità degli esperimenti, ad es. controllando l'efficacia della propagazione del calore;

- Esperimenti sotto atmosfera controllata di aria sintetica rimuovendo il refrigerante a bolle (in questo lavoro non c'era controllo della quantità di ossigeno presente nel pallone di reazione);
- Controllare l'effetto degli accorgimenti volti a diminuire il tempo di acquisizione degli spettri NMR sull'accuratezza dell'analisi quantitativa;
- Esperimenti con aggiunta di quantità note di antiossidanti naturali (quali il tocoferolo o l'acido ascorbico) o ioni metallici (ad esempio le porfirine) ai campioni destinati allo stress termico;
- Quantificare le aldeidi volatili (ad es. l'acroleina);
- Esplorare più accuratamente le sostanze che si formano durante i primi istanti dello stress termico.

## 5 Bibliografia

1. Nelson, D. L., Cox, M. M.: *I principi di biochimica di Lehninger*, Ed. Zanichelli, Bologna **2002**.
2. Porter, N. A., Caldwell, S. E., Mills, K. A.: *Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids*. *Lipids* **1995**, *30*, 277-290.
3. Labuza, T. P.: *Kinetics of lipid oxidation in foods*. *CRC Crit. Rev. Food Technol.* **1971**, 355-405.
4. Frankel, E. N.: *Lipid Oxidation*. The Oily Press Ltd, Dundee **1998** a) p. 20, b) p. 43.
5. Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C.: *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd ed. Oxford University Press, Oxford. **1999**, 28.
6. Wagner, B. A., Buettner, G. R., Burns, C. P.: *Free radical-mediated lipid peroxidation in cells: oxidizability is a function of cell lipid bis-allylic hydrogen content*. *Biochemistry* **1994**, *33*, 4449-4453.
7. Gardner, H. W.: *Oxygen radical chemistry of polyunsaturated fatty acids*. *Free Rad. Biol. Med.* **1989**, *7*, 65-86.
8. Frankel, E. N., Neff, W. E., Rohwedder, W. K., Khambay, B. P. S., Garwood, R. F., Weedon, B. C. L.: *Analysis of autoxidized fats by gas chromatography-mass spectrometry: III. Methyl linolenate*. *Lipids* **1977**, *12* 1055-1061.
9. Chan, H. W. S., Levett, G.: *Autoxidation of methyl linolenate: Analysis of methyl hydroxylinolenate isomers by high performance liquid chromatography*. *Lipids* **1977**, *12*, 837-840.
10. Chan, H. W. S., Matthew, J. A., Coxon, D. T.: *A hydroperoxy-epidioxide from the autoxidation of a hydroperoxide of methyl linolenate*. *J. C. S., Chem. Commun.* **1980**, 235-236.
11. Coxon, D. T., Price, K. R., Chan, H. W. S.: *Formation, isolation and structure determination of methyl linolenate diperoxides*. *Chem. Phys. Lipids* **1981**, *28*, 365-378.
12. Chan, H. W. S., Coxon, D. T.: *Lipid hydroperoxides*. In: *Autoxidation of Unsaturated Lipids*. H. W.-S. Chan (ed.), Academic Press Inc., London **1987**, 17-50.



13. Bradley, D. G., Min, D. B.: *Singlet oxygen oxidation of foods*. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. **1992**, *31*, 211-236.
14. Foote, C. S.: *Definition of type I and type II photosensitized oxidation*. Photochem Photobiol. **1991**, *54*, 659.
15. Chan, H. W. S.: *Photo-sensitized oxidation of unsaturated fatty acid methyl esters. The identification of different pathways*. J. Am. Oil Chem. Soc. **1977**, *54*, 100-104.
16. Terao, J., Matsushita, S.: *Products formed by photosensitized oxidation of unsaturated fatty acid esters*. J. Am. Oil Chem. Soc. **1977**, *54*, 234-238.
17. Frankel, E. N., Neff, W. E., Bessler, T. R.: *Analysis of autoxidized fats by gas chromatography-mass spectrometry: V. Photosensitized oxidation*. Lipids **1979**, *14*, 961-967.
18. Thomas, M. J., Pryor, W. A.: *Singlet oxygen oxidation of methyl linoleate: Isolation and characterization of the NaBH<sub>4</sub>-reduced products*. Lipids **1980**, *15*, 544-548.
19. Terao, J., Matsushita, S.: *The isomeric compositions of hydroperoxides produced by oxidation of arachidonic acid with singlet oxygen*. Agric. Biol. Chem. **1981**, *45*, 587-593.
20. Gunstone, F. D., Harwood, J. L., Dijkstra, A. J.: *The Lipid Handbook with CD-ROM* (3rd edition). CRC Press, **2007**, 537.
21. Whitaker, J. R.: *Principles of enzymology for the food sciences* (2nd edition). Marcel Dekker, Inc. **1994**, *27*, 579-589.
22. Gardner, H. W.: *Recent investigations into the lipoxygenase pathway of plants*. Biochim. Biophys. Acta **1991**, *1084*, 221-239.
23. Brash, A. R.: *Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate*. J. Biol. Chem. **1999**, *274*, 23679-23682.
24. Gardner, H. W.: *Oxygen radical chemistry of polyunsaturated fatty acids*. Free Rad. Biol. Med. **1989**, *7*, 65-86.
25. Chan, H. W.-S.: *The mechanism of autoxidation*. In: *Autoxidation of Unsaturated Lipids*. Chan, H.W.-S. (ed.), Academic Press Inc., London **1987**, 1-16.

26. Claxon, A. W. D., Hawkes, G. E., Richardson, D. P., Naughton, D. P., Haywood, R. M., Chander, C. L., Atherton, M., Lynch, E. J., Grootveld, M. C.: *Generation of lipid peroxidation products in culinary oil and fats during episodes of thermal stressing: a high field <sup>1</sup>H-NMR study*. FEBS Letters, **1994**, 335, 81.
27. Marnett, L. J.: *Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde*. Mutat. Res. **1999**, 424 (1-2): 83–95.
28. Tateo, F.: *Analisi dei prodotti alimentari*, Chiriotti, Pinerolo **1978**. a) p. 168-174, b) p. 112-113.
29. Halverson, F., Hirt, R. C.: *Near ultraviolet solution spectra of the diazines*. J. Chem. Phys. **1951**, 19, 711.
30. Henderson, T. J.: *Quantitative NMR spectroscopy using coaxial inserts containing a reference standard: purity determination for military nerve agents*. Anal. Chem. **2002**, 74, 191.
31. *Lange's Handbook of Chemistry*, 16th Ed., Mc Graw Hill **2005**, New York.
32. Jamieson, G. S., McKinney, R. S.: *California raisin (grape) seed oil*. J. Am. Oil Chem. Soc. **1935**, 12, 241.
33. Claridge, T. D. W.: *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*, Tetrahedron Organic Chemistry Series **1999**, 19, 16-21.
34. Keeler, J.: *Understanding NMR Spectroscopy*, John Wiley & Sons **2005**, 420-421.
35. Rastrelli, F., Schievano, E., Bagno, A., Mammi S.: *NMR quantification of trace components in complex matrices by band-selective excitation with adiabatic pulses*, inviato per la pubblicazione.
36. Waugh, J. S.: *Sensitivity in Fourier transform NMR spectroscopy of slowly relaxing systems*. J. Mol. Spectrosc. **1970**, 35, 298.
37. Ernst, R. R., Anderson, W. A.: *Application of Fourier Transform Spectroscopy to Magnetic Resonance*. Rev. Sci. Instrum. **1972**, 37, 93.
38. Jones, D. E., Sternlicht, H.: *Fourier transform nuclear magnetic resonance I. Repetitive pulses*. J. Magn. Reson. **1972**, 6, 167.
39. Becker, E. D., Ferretti, A. J., Gambhir, N.: *Selection of optimum parameters for pulse Fourier Transform NMR*. Anal. Chem. **1979**, 51, 1413.
40. Richardson, W. H., Hodge, V. F.: *Acidities of Tertiary Alkyl Hydroperoxide*. J. Org. Chem. **1970**, 35, 4012-4016.

41. Guillen, M. D., Ruiz, A.: *Study by Proton Nuclear Magnetic Resonance of the Thermal Oxidation of Oils Rich in Oleic Acyl Groups*. J. Am. Oil Chem. Soc. **2005**, 82, 349-355.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.  
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.  
This page will not be added after purchasing Win2PDF.