

G. BRUNO, F. CAPONIO,
C. SUMMO, V.M. PARADISO,
T. GOMES

Il ruolo dei prodotti di idrolisi dei triacilgliceroli sull'evoluzione dei fenomeni ossidativi in oli vegetali

PROGRESS IN NUTRITION
VOL. 13, N. 2, 99-103, 2011

TITLE

The role of triacylglycerol hydrolysis products on evolution of oxidation in vegetable oil

KEY WORDS

Diacylglycerols, monoacylglycerols, free fatty acids, oxidative degradation, purified oil

PAROLE CHIAVE

Diacilgliceroli, monoacilgliceroli, acidi grassi liberi, degradazione ossidativa, olio purificato

Dipartimento di Biologia e Chimica
Agro-Forestale ed Ambientale,
Sezione di Scienze e Tecnologie
Alimentari, Università degli Studi
di Bari Aldo Moro,
Bari, Italy

Indirizzo per la corrispondenza:

Prof. Tommaso Gomes
Tel. +39 080 5442939
Fax +39 080 5443467
E-mail: tommaso.gomes@agr.uniba.it
E-mail: francesco.caponio@agr.uniba.it

Summary

Among the compounds deriving from lipid degradation considerable importance should be given to the products of triacylglycerols hydrolysis, as well as those arising from oxidation. It was shown, in fact, that some of these compounds could have pro-oxidant activity, and therefore affect the shelf-life of foods and their nutritional value, with obvious implications to the consumers' health. The aim of the present research was to evaluate the role of partial acylglycerols and free fatty acids on the evolution of oxidation in vegetable oils. At the purpose, purified diacylglycerols, monoacylglycerols and free fatty acids were added in percent amounts between 0.25% and 3% to vegetable purified oils prepared in laboratory; the mixtures obtained were subjected to Rancimat test. The results showed a different behavior towards the oxidative stability of oils of the different partial acylglycerols considered.

Riassunto

Tra i composti di degradazione dei lipidi, oltre a quelli derivanti dall'ossidazione, notevole importanza assumono i prodotti della degradazione idrolitica. È stato dimostrato, infatti, che alcuni di questi composti possono presentare attività pro-ossidante, e, pertanto, influenzare la shelf-life degli alimenti e il loro valore nutrizionale, con ovvie conseguenze sulla salute umana. Obiettivo del presente lavoro è stato quello di valutare il ruolo degli acilgliceroli parziali e degli acidi grassi liberi sull'evoluzione dei fenomeni ossidativi in oli vegetali. A tal scopo diacilgliceroli, monoacilgliceroli ed acidi grassi liberi preparati in purezza sono stati aggiunti in quantità comprese tra 0,25% e 3% ad un olio di oliva purificato e, le miscele ottenute, sottoposte a Rancimat test. I risultati ottenuti hanno mostrato un differente andamento, nei riguardi della stabilità ossidativa, degli oli dei diversi acilgliceroli parziali considerati.

Introduzione

La qualità degli oli vegetali è intesa come stabilità ossidativa e dun-

que come resistenza all'ossidazione. Durante la produzione e la conservazione i lipidi vanno incontro ad alterazioni di tipo ossi-

dativo ed idrolitico che determinano, sia negli oli alimentari che negli alimenti che li contengono, la perdita di qualità e valore nutrizionale, oltre a sviluppare sgradevoli flavours.

L'ossidazione dei lipidi può procedere attraverso tre differenti modalità: i) reazione a catena non enzimatica mediata da radicali liberi; ii) fotoossidazione non enzimatica e non radicalica; iii) via della lipossigenasi (1).

L'idrolisi enzimatica, invece, è catalizzata dalla lipasi, che rompe i triacilgliceroli in presenza dell'acqua e causa il distacco degli acidi grassi e conseguente formazione di esteri parziali del glicerolo: monoacilgliceroli e diacilgliceroli (2). Numerosi studi sono stati condotti per valutare l'influenza di acidi grassi liberi, monoacilgliceroli e diacilgliceroli sulla stabilità ossidativa degli oli. Tuttavia, le informazioni disponibili appaiono ancora lacunose e, in alcuni casi, contraddittorie (3-9). Le ricerche finora condotte hanno previsto l'utilizzo di standard commerciali.

Obiettivo del presente lavoro è stato, invece, quello di valutare il ruolo delle stesse classi di composti di idrolisi presenti nell'olio sull'evoluzione del fenomeno ossidativo. A tal fine, acidi grassi liberi, monoacilgliceroli e diacilgliceroli sono stati isolati in purezza, partendo da olio d'oliva purificato, e sono stati addizionati in percen-

tuali comprese tra lo 0,25% e il 3% allo stesso olio di oliva purificato, valutando il tempo di induzione mediante metodo Rancimat.

Materiali e metodi

Preparazione dei campioni

Un olio vegetale (olio d'oliva) è stato purificato secondo il metodo di Lee e Min modificato (10). In particolare, circa 250 g di olio sono stati fatti passare attraverso una colonna cromatografica (60 cm x 40 mm), in condizioni di vuoto parziale, impaccata con 75 g di silice, 37,5 g di una miscela di zucchero e celite in rapporto 2:1, 12,6 g di una miscela di carbone e celite in rapporto 2:1, 75 g di silice.

L'olio purificato ottenuto è privo di prodotti di ossidazione e di idrolisi, pigmenti ed antiossidanti. L'efficacia del processo di purificazione è stata accertata mediante la determinazione dell'acidità, del numero di perossidi e dell'analisi High-Performance Size-Exclusion Chromatography (HPSEC) dei composti polari separati dall'olio mediante cromatografia su colonna di gel di silice.

Preparazione degli standard

Gli acidi grassi liberi (AGL) in purezza sono stati preparati mediante reazione di saponificazione

a caldo dell'olio purificato. In particolare, 30 g di olio purificato sono stati saponificati su bagnomaria per 60 minuti in 150 ml di soluzione metanolica di KOH 2N. Successivamente è stata estratta la frazione insaponificabile con etere etilico, mentre la frazione saponificabile è stata titolata con una soluzione di H₂SO₄ sino a pH=3. Infine, gli acidi grassi formati sono stati estratti con etere etilico; quindi la soluzione eterea è stata filtrata su sodio solfato anidro e il solvente allontanato con l'evaporatore rotante.

I diacilgliceroli (DAG) in purezza sono stati ottenuti mediante reazione di saponificazione parziale a temperatura ambiente per 2 minuti partendo da 10 grammi di olio al quale sono stati aggiunti 100 ml di KOH 2N in soluzione metanolica. Trascorso il tempo stabilito di saponificazione a temperatura ambiente, sono stati aggiunti 200 ml di acqua distillata; quindi, dopo aver agitato, sono stati aggiunti 200 ml di etere etilico e si è agitato nuovamente per un minuto. Dopo stratificazione è stata allontanata la fase acquosa e, sulla fase eterea sono stati effettuati dei lavaggi con acqua distillata utilizzando 80 ml per volta, fino a neutralità delle acque di lavaggio. Infine, la soluzione eterea è stata filtrata su sodio solfato anidro, quindi si è allontanato il solvente con l'evaporatore rotante. A questo

punto è stato necessario isolare i DAG, sottoponendo i composti polari (PC), ottenuti mediante cromatografia su colonna di gel di silice (11), ad analisi HPSEC preparativa.

I monoacilgliceroli (MAG) in purezza sono stati ottenuti sottoponendo l'olio purificato a saponificazione parziale a temperatura ambiente per 3 minuti in presenza di una soluzione metanolica di KOH 2N; la reazione è stata poi interrotta con acqua distillata e i MAG estratti con etere etilico.

La purezza dei diversi standard preparati è stata accertata mediante analisi HPSEC.

Rancimat test

Sono state preparate delle soluzioni a diversa concentrazione (0,25%, 0,5%, 1%, 3%) di acidi grassi, monoacilgliceroli e diacilgliceroli in diclorometano (10 mg/ml). Aliquote di ciascuna soluzione sono state aggiunte ad altrettanti campioni di olio purificato e sottoposte, insieme ad un campione controllo, al Rancimat test (12). Il test è stato eseguito ad una temperatura di 85°C e con un flusso di aria di 20 l/h. Tutte le prove sono state eseguite in duplicato.

Analisi HPSEC

Il sistema cromatografico utilizzato è costituito da una pompa series

200 (Perkin-Elmer), un loop da 50 µl, una serie di tre colonne PL-gel (Perkin-Elmer) lunghe 30 cm e diametro interno di 7,5 mm con particelle di 5 µm e diametro dei pori di 500 Å, 500 Å e 100 Å rispettivamente. L'analisi è stata effettuata utilizzando il diclorometano come solvente di eluizione al flusso di 1 ml/min ed un rifrattometro differenziale a deflessione series 200A (Perkin-Elmer) come rivelatore. L'identificazione e la quantificazione dei picchi di interesse è stata effettuata come riportato in precedenti lavori (13, 14).

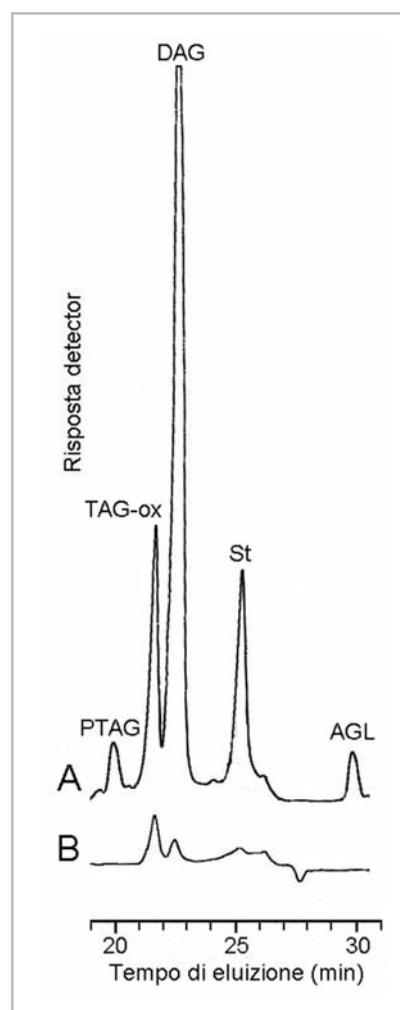
Risultati e discussione

In figura 1 è mostrato il cromatogramma dell'analisi HPSEC dell'olio di oliva di partenza (A) e del corrispondente purificato (B). È possibile osservare che il processo di purificazione utilizzato determinava un abbattimento significativo del contenuto di composti polari rispetto all'olio di partenza.

Inoltre, l'olio purificato aveva un contenuto di acidi grassi liberi e un numero di perossidi pari a zero e valori di dieni e trieni coniugati molto bassi, comparabili a quelli riportati in precedenti lavori (15).

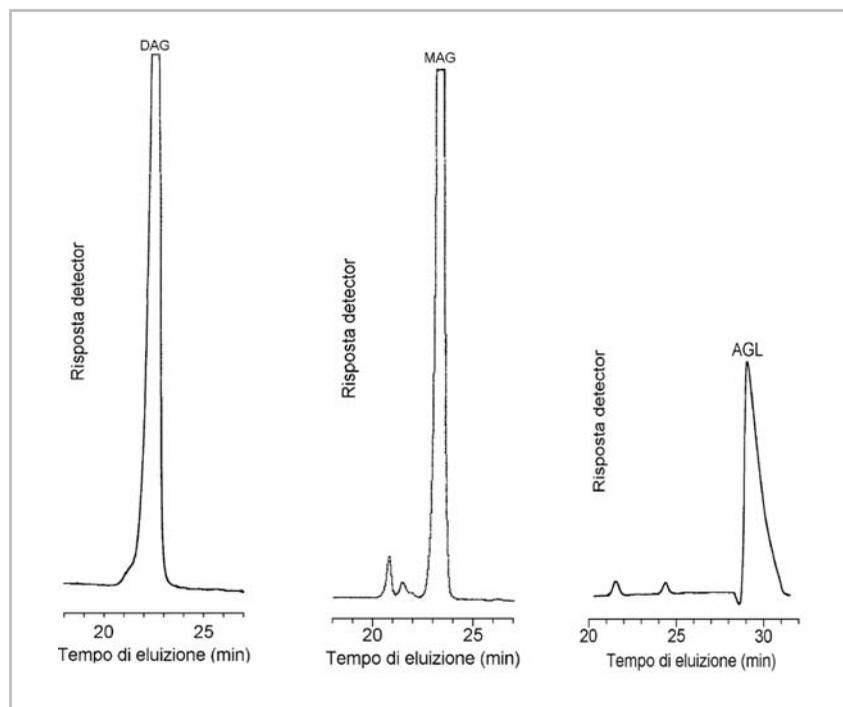
In figura 2 sono mostrati i cromatogrammi dell'analisi HPSEC degli standard di DAG, MAG e AGL preparati in purezza in laboratorio a partire dall'olio di oliva

Figura 1 - Cromatogramma dell'analisi HPSEC dell'olio d'oliva tal quale (A) e del corrispondente purificato (B). PTAG, polimeri dei triacilgliceroli; TAG-ox, triacilgliceroli ossidati; DAG, diacilgliceroli; St, steroli; AGL, acidi grassi liberi



purificato. Gli standard ottenuti presentavano un grado di purezza pari a 99,5%, 98,1% e 98,5% rispettivamente.

Figura 2 - Cromatogramma dell'analisi HPSEC degli standard di diacilgliceroli (DAG), monoacilgliceroli (MAG) e acidi grassi liberi (AGL) preparati in purezza in laboratorio a partire dall'olio di oliva purificato



In figura 3 sono riportati i valori medi del tempo di induzione, valutati con metodo Rancimat, dell'olio purificato addizionato con percentuali diverse (0,25%, 0,50%, 1% e 3%) di DAG, MAG e AGL. I risultati complessivamente ottenuti hanno mostrato una differente influenza, nei riguardi della stabilità ossidativa dell'olio, dei diversi prodotti di idrolisi considerati. In particolare, rispetto all'olio purificato, gli acidi grassi liberi determinavano un decremento del tempo medio di induzione all'aumentare della concentrazione ag-

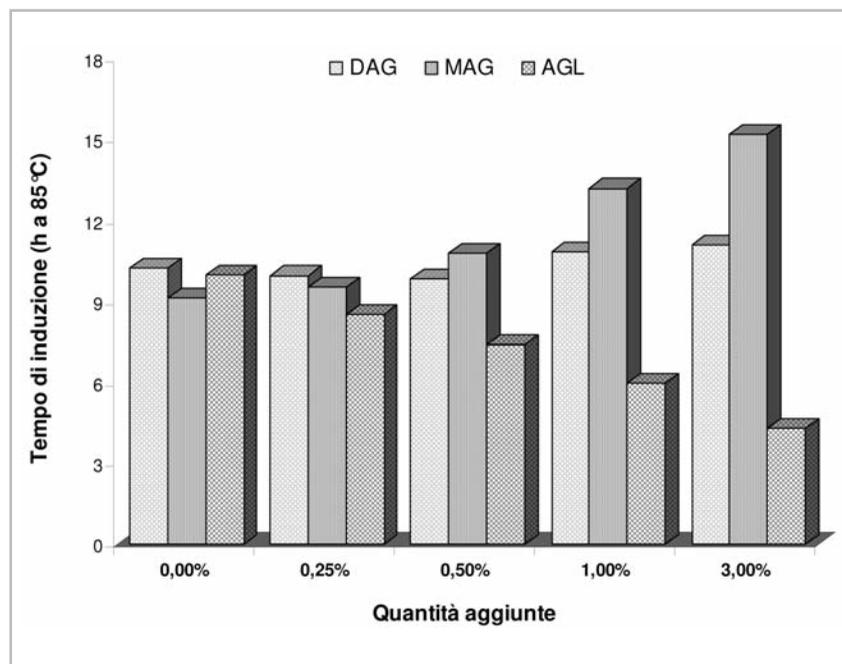
giunta, accelerando la formazione dei composti volatili di ossidazione (acido acetico e acido formico soprattutto) rilevati dal Rancimat test. Ciò in accordo con quanto riscontrato da altri autori (3, 8, 9). In particolare, Miyashita e Takagi attribuiscono questo risultato all'effetto catalitico del gruppo carbossilico sulla decomposizione degli idroperossidi. Frega et al., invece, hanno osservato un comportamento pro-ossidante degli acidi grassi in olio d'oliva vergine filtrato e un opposto comportamento in olio d'oliva vergine non filtrato.

Riguardo ai MAG, la loro aggiunta determinava un incremento del tempo di induzione rispetto al valore ottenuto per l'olio purificato non addizionato di MAG, che risultava tanto più evidente quanto maggiore erano le quantità aggiunte; ciò evidenzia una chiara azione antiossidante di questa classe di composti. Tale risultato appare in contrasto con quanto riportato in bibliografia; infatti, diversi autori (5-7), hanno riscontrato una, se pur lieve, azione pro-ossidante dei MAG. Questo differente risultato si può spiegare col fatto che, a differenza dei lavori presenti in letteratura che adoperavano olio di soia, in questa indagine sperimentale è stato utilizzato olio d'oliva e, quindi, con una composizione acidica differente.

Infine, per quanto concerne i DAG, le prove hanno mostrato un leggero decremento del tempo di induzione con aggiunte fino allo 0,5%, confermando quanto già riscontrato da altri autori (6). L'aggiunta di maggiori quantità di DAG all'olio purificato sembrava determinare, invece, un leggero incremento del tempo di induzione. Complessivamente, quindi, i dati ottenuti per i DAG non hanno mostrato un andamento univoco nei confronti della stabilità ossidativa dell'olio.

In conclusione, i risultati di questa indagine sperimentale hanno mes-

Figura 3 - Valori medi del tempo di induzione dell'olio purificato addizionato con percentuali diverse di standard di diacilgliceroli (DAG), monoacilgliceroli (MAG) e acidi grassi liberi (AGL)



so in evidenza un diverso comportamento nei riguardi dell'evoluzione della degradazione ossidativa dei diversi acilgliceroli parziali. Ulteriori indagini sono necessarie per valutare più approfonditamente l'influenza degli acilgliceroli parziali sull'evoluzione dell'ossidazione di oli vegetali e il loro meccanismo d'azione.

Bibliografia

1. Antolovich M, Prenzler PD, Patsalides E, McDonald S, Robard K. Methods for testing antioxidant activity. *Analist* 2002; 127: 183-98.
2. Conte L. Lipidi. In Cabras P, Martelli A (Eds), *Chimica degli Alimenti*. Piccin, Padova 2004; pp 42-68.
3. Miyashita K, Takagi T. Study on the oxidative rate and prooxidant activity of free fatty acids. *J Am Oil Chem Soc* 1986; 63: 1380-4.
4. Mistry BS, Min DB. Effects of fatty acids on the oxidative stability of soybean oil. *J Food Sci* 198; 52: 380-1.
5. Mistry BS, Min DB. Isolation of sn- α -monolinolein from soybean oil and its

effect on oil oxidative stability. *J Food Sci* 1987; 52: 786-90.

6. Mistry BS, Min DB. Prooxidant effects of monoglycerides and diglycerides in soybean oil. *J Food Sci* 1988; 53: 1896-7.
7. Colakoglu AS. Oxidation kinetics of soybean oil in the presence of monolein, stearic acid and iron. *Food Chem* 2007; 101: 724-8.
8. Paradiso VM, Gomes T, Nasti R, Caponio F, Summo C. Effects of free fatty acids on the oxidative processes in purified olive oil. *Food Res Int* 2010, DOI: 10.1016/j.foodres.2010.04.015.
9. Frega N, Mozzon M, Lerker G. Effects of free fatty acids on oxidative stability of vegetable oil. *J Am Oil Chem Soc* 1999; 76: 325-9.
10. Lee SH, Min DB. Effects, quenching mechanism and kinetics of carotenoids in chlorophyll-sensitized photooxidation of soybean oil. *J Agric Food Chem* 1990; 38: 1630-4.
11. Association of Official Analytical Chemists, *Official methods of analysis of AOAC International*. Horwitz W (Ed). AOAC Press, Arlington, VA 2003.
12. American Oil Chemists' Society, *Official Methods and Recommended Practices of the AOCS*, 4th edn. Firestone D (Ed). AOCS Press, Champaign, IL 1993; method Ch 12b-92.
13. Gomes T, Caponio F. Effort to improve the quantitative determination of oxidation and hydrolysis compound classes in edible vegetable oils. *J Chromatogr A* 1999; 844: 77-86.
14. Gomes T. Oligopolymer: Diglyceride and oxidized triglyceride contents as measure of olive oil quality. *J Am Oil Chem Soc* 1992; 69: 1219-23.
15. Gomes T, Delcuratolo D, Paradiso VM. Pro-oxidant action of polar triglyceride oligopolymers in edible vegetable oils. *Eur Food Res Technol* 2008; 6: 1409-14.