

# POLITECNICO DI TORINO

Collegio di Ingegneria Chimica e dei Materiali

**Corso di Laurea Magistrale  
in Ingegneria Chimica e dei Processi Sostenibili**

Tesi di Laurea Magistrale

## **Estrazione e caratterizzazione del burro di riso da pula di riso con CO<sub>2</sub> supercritica**



### **Relatori**

Prof.ssa Elena Simone  
Dott.ssa Silvia Fraterrigo Garofalo

### **Candidato**

Marta Fontana

Luglio 2023

## **Abstract**

Il riso è una delle colture più importanti nel mondo poiché è in grado di soddisfare il fabbisogno alimentare di una grande parte della popolazione. Durante la sua lavorazione, vengono generati molti sottoprodotti tra cui la pula di riso, ancora incredibilmente ricca di molti macronutrienti. La pula di riso è molto ricca di sostanze grasse che vengono solitamente estratte con l'ausilio di solventi tossici per l'uomo e per l'ambiente. Uno degli scopi della ricerca è trovare alternative più sostenibili a questo tipo di estrazioni. In questo lavoro di tesi, dopo aver caratterizzato la pula di riso, ottenuta da un'azienda Piemontese, è stata estratta la componente lipidica tramite estrazione in CO<sub>2</sub> supercritica presso un impianto pilota in collaborazione con Exenia (Pinerolo, Piemonte). Una volta ottenuto il burro di riso questo è stato caratterizzato sia dal punto di vista strutturale e chimico in modo da comprendere la sua composizione e i processi di cristallizzazione che lo rendono adatto all'applicazione nell'industria nutraceutica, cosmetica e farmaceutica.

## Ringraziamenti

Volevo ringraziare innanzitutto la Prof.ssa Elena Simone e la Dott.ssa Silvia Fraterrigo Garofolo per avermi guidato durante tutto il percorso di tesi e per la loro gentilezza e disponibilità. Ma anche Cecilia e Giulia che negli incontri in laboratorio si sono sempre mostrate affidabili e alla mano.

Dedico questa tesi ai miei genitori, i quali hanno sempre creduto in me, mi hanno sempre stimata e appoggiata sia nelle scelte di vita che in quelle universitarie. Hanno sempre pensato che avessi delle buone capacità e io sono stata brava a non deluderli. Grazie sia per il sostegno morale che economico.

Grazie a mio fratello, che stimo molto per la sua gentilezza e intelligenza, che con la sua comicità mi ha aiutata a superare i miei momenti di sconforto.

Grazie allo zio Saro, fonte di ispirazione per me, grazie per essere stato presente nel percorso universitario come un padre, per avermi sempre elogiato e per avermi spinto ad ambire sempre al massimo. Grazie anche alla zia Giovanna perché anche lei, come lo zio mi ha sempre sostenuta.

Grazie ad Anto, che per me non è soltanto una cugina, ma anche e soprattutto un' amica. Grazie per essere sempre disponibile e per aiutarmi in qualsiasi momento.

Grazie a Sara, come una sorella per me, unica costante, sempre presente nella mia vita personale e universitaria. Grazie per essermi sempre vicina e per farlo anche in futuro.

A Laura, la mia BBF, senza la quale questo percorso non sarebbe stato fattibile, con la quale ho condiviso ogni materia, ogni lacrima, ma anche ogni gioia, il mio traguardo è anche il tuo.

A Greta, il mio "se avessi" preferito, anche se l'unica cosa che ci riesce bene fare sono i casini, almeno ho la fortuna di farli con te.

A Canni, l'amico più bello, grazie per aver addolcito questi anni di studio e per garantire divertimento assicurato quando siamo insieme.

Ad Enrica e Manfredi, lontani, ma sempre vicini con il cuore.

Grazie a Lorena, che da quando l'ho conosciuta, ha sempre aiutato me e Laura e ci ha guidato nella preparazione delle varie materie.

A Giuseppe, che è stato costretto ad assistere ai miei scleri e alle mie continue ripetizioni ed è sempre stato disponibile ad aiutarmi.

Grazie al mio Ingegnere del cuore, Aldo, che con il suo amore colora ogni giorno la mia vita rendendola luminosa, grazie amore per credere sempre in me.

## Indice

Abstract.....	2
Ringraziamenti .....	3
Lista delle figure.....	6
Lista delle tabelle.....	9
Lista delle abbreviazioni.....	10
1 Introduzione .....	11
1.2 Scopo e struttura della tesi.....	12
2 Stato dell'arte .....	13
2.1 La pula di riso .....	13
2.2 Estrazione con fluido supercritico.....	15
2.3 TAGs .....	17
2.4 Processo di cristallizzazione .....	18
2.4.1 Nucleazione .....	19
2.4.2 Crescita .....	23
2.5 Polimorfismo dei trigliceridi (TAGs).....	25
2.5.1 Aspetti termodinamici della cristallizzazione dei TAGs. ....	27
2.5.2 Aspetti cinetici della cristallizzazione dei TAGs.....	29
2.5.3 Nucleazione dei TAGs .....	30
2.5.4 Crescita dei TAGs .....	31
2.6 Diffrazione a raggi X .....	32
2.7 Calorimetria a scansione differenziale (DSC) .....	34
3 Materiali e Metodi .....	36
3.1 Matrici .....	36
3.1.1 Caratterizzazione della matrice.....	36
3.1.2 Umidità.....	36
3.1.3 Proteine .....	37
3.1.4 Lipidi .....	38
3.1.5 Ceneri .....	40
3.2 Estrazione del burro di riso con CO <sub>2</sub> supercritica .....	41
3.3 Determinazione degli acidi grassi .....	44
3.4 Processo di separazione dell'olio di riso dalla cera di riso .....	45
3.5 Calorimetria Differenziale a Scansione (DSC).....	46
3.6 Diffrazione a raggi X .....	47
4 Risultati.....	48
4.1 Caratterizzazione matrice .....	48
4.2 Estrazione con CO <sub>2</sub> supercritica .....	49

4.3 Caratterizzazione dell'olio di riso e composizione degli acidi grassi .....	51
4.4 Diffrazione a raggi X e DSC .....	53
4.4.1 Olio di riso centrifugato a 40 °C .....	53
4.4.2 DSC del campione olio di riso centrifugato a 40 °C .....	59
4.4.3 Cera di riso centrifugata a 40 °C .....	61
4.4.4 DSC cera di riso centrifugata a 40 °C .....	68
4.4.5 Cera di riso filtrata a 50 °C.....	70
4.4.6 Cera di riso lavata con etanolo .....	73
4.4.7 Olio e cera di riso .....	76
4.4.8 DSC olio e cera di riso .....	80
5 Conclusioni .....	81
Bibliografia .....	82

## Lista delle figure

**Fig. 2.1:** Rappresentazione schematica del riso prima della macinazione con la percentuale di tutti i suoi componenti [2]

**Fig. 2.2:** diagramma di fase della CO<sub>2</sub>. [2]

**Fig 2.3 :** molecola di TAGs, R1, R2 e R3 indicano le catene alchiliche.

**Fig 2.4:** schema riassuntivo dei meccanismi di nucleazione

**Fig. 2.5 :** variazione dell'energia libera in funzione del raggio

**Fig 2.6 :** l'andamento del raggio critico in funzione del sottoraffreddamento

**Fig. 2.7 :** andamento del raggio critico in funzione dell'energia di Gibbs

**Fig2.8 :** Interfaccia soluzione – cristallo [54].

**Fig. 2.9 a:** struttura dei trigliceridi in doppia o tripla catena e **(b)** struttura della sottocella nei tre più comuni polimorfismi dei trigliceridi. [26]

**Fig 2.10 :** relazione tra G e T dei principali polimorfi dei TAGs. [26]

**Fig 2.11:** barriere energetiche da superare per i diversi polimorfi. [26]

**Fig 2.12 :** interazioni tra morfologia e velocità di crescita [26]

**Fig 2.13:** l'intensità delle onde interferenti dipende dalla distanza degli atomi emittenti e dal loro orientamento rispetto alle direzioni di incidenza e di osservazione. Quando le onde arrivano in fase, il rivelatore riceve luminosità e quando le onde arrivano fuori fase, allora il rivelatore riceve oscurità [39]

**Fig. 2.14 :** un esempio del termogramma DSC

**Fig 3.1 :** schema del processo Dumas

**Figura 3.2 :** Schema dell'estrattore Soxhlet, per il significato di lettere e numeri, vedi testo. (figura adattata da: [en.wikipedia.org/wiki/Soxhlet\\_extractor](http://en.wikipedia.org/wiki/Soxhlet_extractor))

**Fig 3.3 :** cestello riempito con pula di riso

**Fig 3.4 :** corpi cilindrici all'interno del cestello

**Fig 3.5 :** Schema dell'impianto situato presso gli stabilimenti di Exenia Group S.R.L. estrazione di fluido supercritico (SFE). Serbatoio, estrattore e separatore gravimetrico sono indicati rispettivamente con T, E e S. [41]

**Fig 3.6 :** preparazione del campione per centrifugazione a 40 °C, riscaldato su piastra

**Fig 3.7 :** reattore da 100mL incamiciato per riscaldare il campione a 50°C.

**Figura 3.8:** Schema di un'apparecchiatura DSC

**Fig 4.1:** pula di riso prima dell'estrazione

**Fig 4.2:** burro di riso dopo estrazione

**Fig 4.3:** pula di riso prima dell'estrazione, al microscopio ottico a luce polarizzata

**Fig 4.4:** burro di riso dopo l'estrazione, al microscopio ottico a luce polarizzata

**Fig 4.5 :** percentuale di acidi grassi saturi e insaturi, presenti nell'olio di riso.

**Fig 4.6 :** Profilo temperatura-tempo, analisi SAXS.

**Fig 4.7:** Modelli di raggi X, regione SAXS del campione olio di riso, durante il riscaldamento

**Fig 4.8:** grafico a dispersione da cui si evince la presenza di una sola fase.

**Fig 4.9 :** Modelli di raggi X, regione SAXS del campione olio di riso, durante il raffreddamento

**Fig 4.10:** grafico a dispersione da cui si evince la presenza di una sola fase

**Fig 4.11:** grafico a dispersione da cui si evince la presenza di una sola fase

**Fig 4.12 :** DSC olio di riso centrifugato a 40°C, raffreddamento.

**Fig. 4.13 :** analisi DSC olio di riso centrifugato a 40°C, riscaldamento

**Fig 4.14 :** profilo temperatura tempo, analisi SAXS

**Fig 4.15 :** Modelli di raggi X, regione SAXS del campione cera di riso, durante il riscaldamento.

**Fig 4.16:** grafico a dispersione da cui si evince la presenza di una sola fase di olio

**Fig 4.17:** grafico a dispersione da cui si evince la presenza di una sola fase di cera.

**Fig 4.18 :** Modelli di raggi X, regione SAXS del campione cera di riso, durante il raffreddamento

**Fig 4.19:** grafico a dispersione che indica la presenza di una sola fase di cera.

**Fig 4.20 :** grafico a dispersione che indica la presenza di una sola fase di olio

**Fig 4.21 :** Modelli di raggi X, regione SAXS del campione cera di riso, durante il secondo riscaldamento

**Fig 4.22 :** analisi DSC cera di riso centrifugata a 40°C, raffreddamento.

**Fig 4.23** : analisi DSC cera di riso centrifugata a 40°C, riscaldamento.

**Fig 4.24**: profilo temperatura tempo analisi SAXS.

**Fig. 4.25** : Modelli di raggi X, regione SAXS del campione cera di riso, durante il riscaldamento

**Fig 4.26** : grafico a dispersione che indica la presenza di una sola fase.

**Fig 4.27** : profilo temperatura tempo , analisi SAXS.

**Fig. 4.28** : Modelli di raggi X, regione SAXS del campione cera di riso, durante il riscaldamento

**Fig. 4.29** : Modelli di raggi X, regione SAXS del campione olio e cera di riso, durante il riscaldamento

**Fig. 4.30** : : Modelli di raggi X, regione SAXS del campione olio e cera di riso, durante il raffreddamento

**Fig. 4.31** : Modelli di raggi X, regione SAXS del campione olio e cera di riso, durante il riscaldamento.

**Fig 4.32** : DSC olio e cera di riso, in funzione del tempo relativo e temperatura.

## **Lista delle tabelle**

**Tabella 4.1** : Caratterizzazione matrice.

**Tabella 4.2** : Caratterizzazione matrice, dati di letteratura

**Tabella 4.3** : Composizione acidi grassi del burro di riso estratto

**Tabella 4.4**: valori di  $q$  e  $d$  della regione SAXS, a 20 °C e 24 °C, durante il riscaldamento

**Tabella 4.5** : valori di  $q$  e di dati SAXS, a 35 °C, durante il riscaldamento

**Tabella 4.6** : valori di  $q$  e di dati SAXS, a 23.47 e 24.47 °C, durante il raffreddamento

**Tabella 4.7** : valori di  $q$  e di dati SAXS, a 16 e 0 °C, durante il raffreddamento

**Tabella 4.8** : valori di  $q$  e  $d$  , dati SAXS, a 20 , 26 e 31 °C, durante il riscaldamento

**Tabella 4.9** : valori di  $q$  e  $d$ , dati SAXS, a 63 e 66 °C, durante il riscaldamento.

**Tabella 4.10** : valori di  $d$  e  $q$ , dati SAXS durante lo step di raffreddamento.

**Tabella 4.11** : valori di  $d$  e  $q$ , dati SAXS durante lo step di raffreddamento.

**Tabella 4.12** : valori di  $d$  e  $q$ , dati SAXS durante lo step di raffreddamento.

**Tabella 4.13** : valori di  $d$  e  $q$  , dati SAXS, 50 °C durante lo step di riscaldamento

**Tabella 4.14** : valore di  $d$  e  $q$  , dati SAXS, 20 °C, durante lo step di riscaldamento

**Tabella 4.15** : valore di  $d$  e  $q$  , dati SAXS 90,70 e 50°C, durante lo step di riscaldamento

**Tabella 4.16** : valore di  $d$  e  $q$  , dati SAXS, 20 °C, durante lo step di riscaldamento.

**Tabella 4.17** : valore di  $d$  e  $q$  , dati SAXS, 24 e 32 °C, durante lo step di riscaldamento

**Tabella 4.18** : valore di  $d$  e  $q$  , dati SAXS, 19 e 24 °C, durante lo step di raffreddamento.

**Tabella 4.19** : valore di  $d$  e  $q$  , dati SAXS, 20 °C 24°C 32 °C e 60 °C, durante lo step di riscaldamento

## **Lista delle abbreviazioni**

DSC Calorimetria a scansione differenziale

TAG triacilgliceroli

XRD Diffrazione di raggi X

SAXS Small-Angle X-Ray Scattering

## 1 Introduzione

Il riso è una delle colture alimentari più importati nel mondo e costituisce il 20 % del fabbisogno energetico mondiale. Quando il riso viene raccolto, l'intero chicco viene sottoposto ad un processo di macinazione e si ottiene il riso bianco, conosciuto e consumato in tutto il mondo. Durante il processo di macinazione vengono generati diversi sottoprodotti: la lolla, la crusca, i germi e il riso spezzato, che vengono tipicamente utilizzati come fonte di alimentazione per gli animali. La crusca è un sottoprodotto molto interessante poiché contiene il 65 % dei nutrienti presenti nell'intero chicco di riso. Uno degli usi più comuni della crusca di riso è l'estrazione dell'olio a partire da essa. L'olio prodotto viene considerato un "olio salutare" grazie alle sue ottime proprietà nutritive. Infatti, esso presenta principalmente proprietà antiossidanti e antinfiammatorie. L'olio di riso viene comunemente estratto utilizzando l'esano, un solvente organico che però è tossico per l'uomo, infiammabile e poco sostenibile. Per questo motivo negli ultimi anni si è cercato un metodo innovativo per attuare un'estrazione "green", che non abbia rischiosi impatti ambientali e che riduca il tempo di processo e il consumo di energia. Uno dei metodi utilizzati è l'estrazione con CO<sub>2</sub> supercritica. Questo gas può essere utilizzato per estrarre prodotti termolabili: non è infiammabile, non è corrosivo, non è tossico, è economico, può essere recuperato e riutilizzato ed è un solvente non polare. In questo lavoro di tesi è stata caratterizzata la matrice di partenza per l'estrazione di composti non polari da pila di riso, e tramite delle analisi chimico-fisiche sono stati ottenuti i valori di umidità, proteine, lipidi e ceneri della crusca. Dopo aver estratto il burro di riso con CO<sub>2</sub> supercritica ed aver valutato l'efficienza del processo, è stato effettuato uno studio sui processi di cristallizzazione del burro di riso. Conoscere il processo di cristallizzazione è molto importante soprattutto ai fini di utilizzare tale prodotto nelle industrie farmaceutiche, cosmetiche e alimentari. Un cristallo è una struttura ordinata composta da unità elementari aventi una disposizione geometrica regolare con il fine di minimizzare il contenuto di energia libera. I trigliceridi (TAGs) contenuti nell'olio di riso possono esistere allo stato solido o a seconda del valore di temperatura e pressione. Il passaggio dallo stato liquido allo stato solido è denominato cristallizzazione. Studiare la cristallizzazione dei TAGs presenti nell'olio di riso, permette di individuare le diverse fasi presenti nel composto. Le molecole dei trigliceridi (TAGs) sono in grado di impacchettarsi in differenti disposizioni cristalline, le quali presentano temperature di fusione diverse. Le molecole degli acidi grassi in genere presentano quattro forme caratteristiche:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\beta'$ , e  $\gamma$ .

## ***1.2 Scopo e struttura della tesi***

In questo lavoro di tesi è stato utilizzato un sottoprodotto del processo di produzione del riso, la pula di riso. Lo scopo della tesi è quello di caratterizzare la matrice di partenza, di studiare il processo di estrazione utilizzando la CO<sub>2</sub> supercritica e di analizzare la cristallizzazione del prodotto estratto. Infatti, una volta ottenuto il burro di riso è stato sono state effettuate analisi strutturali tramite raggi X e termiche (calorimetria a scansione differenziale).

Oltre al capitolo iniziale questa tesi comprende cinque capitoli organizzati come segue:

- Il Capitolo 2 fornisce uno studio critico della letteratura esistente sui principali aspetti che interessano la caratterizzazione della crusca di riso, l'estrazione e il processo di cristallizzazione dei lipidi.
- Il Capitolo 3 fornisce delle informazioni riguardo i materiali e i metodi utilizzati durante il lavoro sperimentale.
- Il Capitolo 4 fornisce una panoramica dei risultati ottenuti.
- Il Capitolo 5 contiene le conclusioni.

## 2 Stato dell'arte

Questo capitolo fornisce una panoramica della letteratura esistente riguardante la composizione e produzione di pula di riso, il processo di estrazione con CO<sub>2</sub> supercritica, i meccanismi di cristallizzazione e il polimorfismo dei lipidi. Inoltre sono fornite le descrizioni dettagliate dei vari metodi sperimentali utilizzati per la stesura di questa tesi.

### 2.1 La pula di riso

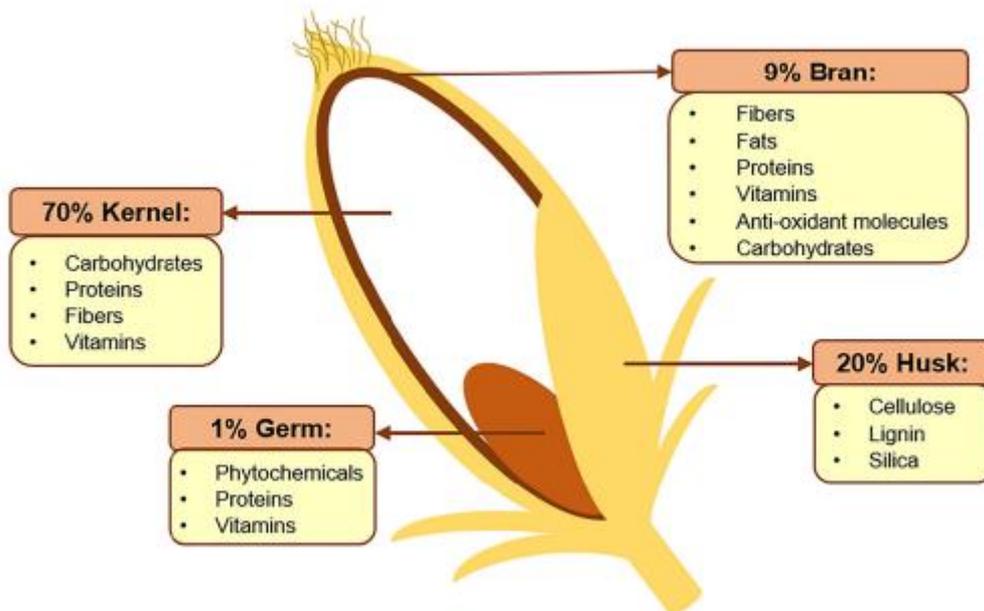
I cereali tra cui il riso, il mais e il grano rappresentano principali alimenti di base del mondo . Il riso, in particolare, contribuisce a circa il 21% dell'apporto energetico pro capite umano globale e al 15% dell'apporto proteico pro capite ed è ricco di proteine, minerali, carboidrati, grassi, vitamine, e amido [1]. Attualmente esistono quasi 22 specie di riso, che sono coltivate principalmente in Asia e in Africa, ma quelle più consumate sono l'*Oryza sativa* e l'*Oryza glaberrima*.

La Cina è il principale produttore e consumatore di riso a livello globale, ed è seguita dall'India e Indonesia.

La grande diffusione del riso in tutto il mondo è dovuta alla capacità di crescita di questa pianta semi-acquatica in una vasta varietà di tipi di suolo e regimi idrici. [2].

Dopo la fase di crescita, il riso entra in una fase di post-produzione. Il raccolto ormai maturo viene prima raccolto (fase di raccolta) e separato dalla paglia, che rappresenta il primo sottoprodotto della produzione del riso. Segue la fase di essiccamento che può essere compiuta in maniera artificiale, naturale, o meccanica. Successivamente il riso viene messo in magazzino, e infine nella fase di macinazione, si ottiene il riso bianco alimentare. In quest'ultimo passaggio si ha la produzione di molti sottoprodotti. Prima di togliere la parte più esterna per ottenere il chicco di riso, l'intero grano viene chiamato "risone". Esso contiene il 9% di pula, il 20 % di lolla, il 70% del chicco di riso o endosperma amidaceo e l'1% del germe. (**Fig. 2.1**). Le porzioni rimosse dal riso sono la lolla, la pula e il germe. La lolla, protegge il chicco durante la crescita, e viene rimossa facilmente (processo di sbucciatura).

Il chicco privato da questo strato viene chiamato riso integrale ed è ricoperto da un secondo strato: la pula. La pula diminuisce la qualità del riso, per questo motivo viene tolta unitamente al germe. La lolla di riso è il sottoprodotto in maggior misura generato da questo processo ed è non commestibile. E' composta principalmente da cellulosa, lignina e silice. La lolla di riso è utilizzata per la produzione di energia, mediante processi termici, come la gassificazione e la combustione [3]. La pula di riso possiede un enorme quantitativo di composti nutritivi come molecole antiossidanti, fibre, grassi, proteine e vitamine. Contiene oltre al resto, il 10-23% di olio che solitamente viene tipicamente estratto con solvente. La pula di riso viene impiegata nell'industria farmaceutica, alimentare, e nutraceutica per le sue proprietà benefiche per la salute [2].



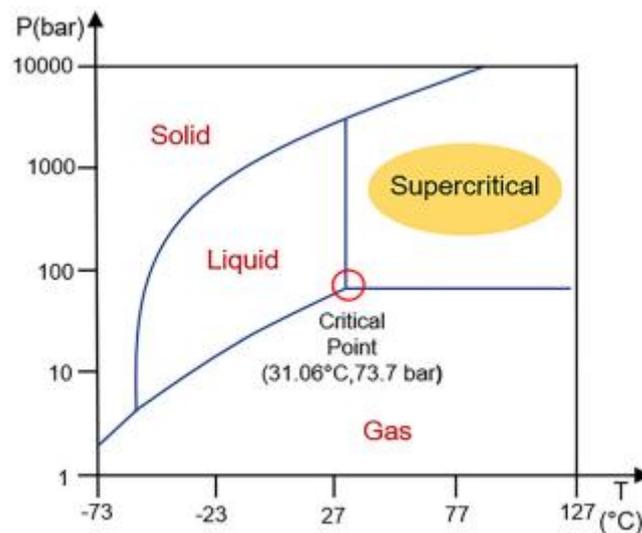
**Fig. 2.1:** Rappresentazione schematica del riso prima della macinazione con la percentuale di tutti i suoi componenti [2]

Le proprietà chimico fisiche e la composizione finale e della pula di riso cambiano a seconda della varietà di riso e alla modalità di molitura utilizzata. Viene considerato un alimento benefico poiché contiene il 60% di tutti i nutrienti dell'intero chicco[4]. Incorpora l'11-17% di proteine, 6-14% di fibre, 12-22% di olio, 8-17% di cenere e il 10-15% di umidità. Sebbene abbia ottime proprietà nutritive, ogni anno parte di questo prodotto viene sprecato e utilizzato come alimento di scarsa qualità per gli animali. Ciò è dovuto al fatto che essa è poiché ha la tendenza a diventare rancida; infatti vi è un enzima che catalizza l'idrolisi dell'olio in glicerolo e acidi grassi liberi [5]. Utilizzare la pula di riso è possibile solamente dopo dei processi di stabilizzazione per disattivare la lipasi. Questo processo può essere fatto con metodi chimici, metodi di tostatura al forno, riscaldamento a umidità trattenuta o cottura per estrusione. Successivamente alla stabilizzazione può essere utilizzata direttamente o può essere soggetta ad altri processi di lavorazione

## 2.2 Estrazione con fluido supercritico

La metodica di recupero dei vari composti ad alto valore aggiunto deve essere scelta al fine di ottimizzare la resa e la purezza dell'estratto. L'estrazione è un'operazione unitaria che interessa la migrazione di un soluto dalla matrice ad un solvente, le cui caratteristiche hanno un ruolo importante in questo processo. L'estrazione del burro di riso viene di norma eseguita con esano, per la sua capacità solubilizzante, il suo basso punto di ebollizione e il suo scarso costo, sebbene sia tossico per l'ambiente [6]. Negli ultimi decenni l'interesse globale per la salvaguardia dell'ambiente è notevolmente aumentato e la comunità scientifica ha affrontato questo serio problema lavorando a nuove possibilità per i processi industriali. Lo studio e la pubblicazione dei dodici principi della chimica "green" e dell'ingegneria "green" sono un atteggiamento responsabile per affrontare questo problema [7]. In questa attività di tesi l'estrazione del burro di riso è stata effettuata con CO<sub>2</sub> supercritica.

Negli ultimi quattro decenni l'interesse per l'estrazione con i fluidi supercritici (SFE) e in modo particolare nell'estrazione di anidride carbonica (scCO<sub>2</sub>) è cresciuta molto. Dopo il primo impiego nel campo della decaffeinizzazione e nella produzione della birra, si è, questo processo green si è diffuso anche nelle industrie alimentari [8]. SFE utilizza fluidi a temperature e pressioni che sono al di sopra dei loro punti critici, viscosità basse, con densità elevate e diffusività tra gas e liquido. Rispetto ai solventi organici, i fluidi supercritici manifestano proprietà di trasporto maggiori e una più grande capacità penetrativa all'interno della matrice, permettendo una estrazione più efficiente [9]. Mediante la manipolazione della temperatura e della pressione è possibile modulare il potere di solubilità e la selettività dei fluidi supercritici. È ugualmente possibile ottenere un prodotto puro e privo di solventi semplicemente diminuendo la densità del fluido e riducendo temperatura e pressione. L'anidride carbonica presenta diverse caratteristiche termodinamiche, che in numerose applicazioni possono costituire dei vantaggi, come una pressione e temperatura critica relativamente bassi (31.06 °C, 73.7bar) (**Fig.2.2**) e viene utilizzata per estrarre lipidi da diverse matrici. Questo gas può essere utilizzato per estrarre prodotti termolabili; non è infiammabile, non è corrosivo, non è tossico, è economico, può essere recuperato e riutilizzato. Inoltre è un solvente non polare.



**Fig. 2.2:** diagramma di fase della CO<sub>2</sub>. [2]

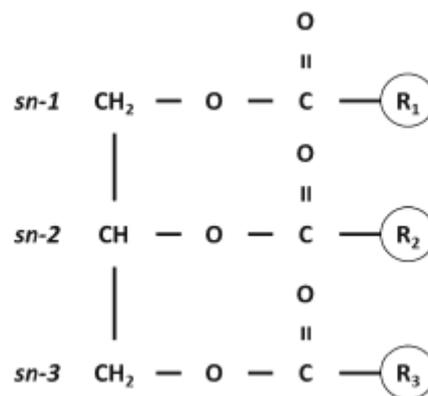
La maggior parte dei lavori trovati in letteratura si basano sull'ottimizzazione del processo di estrazione del burro di riso con  $scCO_2$ , analizzando parametri operativi quali temperatura, pressione, flusso di  $CO_2$ , tempo di estrazione e dimensione della materia prima. Garcia et al. [10] hanno studiato l'influenza della temperatura (da 40° a 70°), della pressione (10, 16,2, 22 e 28 MPa), la dimensione delle frazioni di pula di riso (0,038–0,1, 0,3–0,4, 0,5–0,7 e 0,038–1 mm) e tempo di estrazione (da 30 min a 4 h) sulla resa di estrazione. Il massimo rendimento (71,1 mg/g pula di riso secca) è stato ottenuto a 28 MPa, a temperatura di 70 °C e in un intervallo di 0,038–1 mm. Xu et al. e Al-Okbi et al. [11] hanno estratto l'olio di riso sotto a regime di pressione costante. Xu et al. hanno applicato una pressione di 680 atm e variava la temperatura da 30 °C a 75 °C, con una portata di 250 ml/min per 25 min. La resa percentuale di estrazione di olio di riso variava dal 9 al 13%. Questi lavori hanno confrontato il rendimento con l'estrazione convenzionale con esano e in tutti i casi la percentuale di olio estratto con fluido supercritico era minore.

L'olio estratto con questa metodologia presenta un numero minore di fosfatidi rispetto all'olio estratto mediante metodi tradizionali, verosimilmente a causa dell'insolubilità di questi composti in  $CO_2$  a causa del loro elevato peso molecolare. Oltre al resto, l'estratto con un fluido supercritico contiene meno metalli come Fe o Cu e un'eccellente qualità del colore.

Molti lavori hanno comprovato che la temperatura di estrazione ha un ruolo rilevante rispetto alla pressione sulla resa dell'olio. La densità della  $scCO_2$  infatti, diminuisce all'aumentare della temperatura e temperature elevate possono alterare alcune proprietà fisiche della pula di riso, agevolando la penetrazione del solvente nella matrice. Inoltre, se la pressione è molto al di sopra del punto critico, le temperature elevate possono aumentare la pressione del vapore dell'olio provocando un aumento della solubilità [12]. L'estrazione con  $CO_2$  supercritica può portare ad un'eccellente qualità del colore, un maggior numero di antiossidanti e alla formazione di meno composti indesiderati. Di conseguenza, questo metodo può essere considerato molto prezioso per il recupero di prodotti da materiali di scarto.

## 2.3 TAGs

I lipidi sono rappresentati da acidi grassi e loro derivati, ovvero sostanze funzionalmente e biosinteticamente correlate a questi composti. Gli oli e i grassi commestibili sono nutrienti essenziali nella dieta umana, avendo un ruolo vitale nel fornire acidi grassi essenziali ed energia. Chimicamente, oli e grassi sono miscele multicomponente composte prevalentemente da triacilgliceroli (TAG), che sono esteri di glicerolo e acidi grassi. I TAG sono costituiti da una porzione di glicerolo con ciascun gruppo ossidrilico esterificato in un acido grasso. In natura, sono sintetizzati da sistemi enzimatici, che determinano la creazione di un centro di asimmetria attorno al 2 carbonio dello scheletro del glicerolo, quindi esistono in forme enantiomeriche, con diversi acidi grassi in ogni posizione (sn-1, sn-2 e sn-3), secondo la **Fig. 2.3** Componenti aggiuntivi includono lipidi polari (o minori), come diacilgliceroli (DAG), monoacilgliceroli (MAG), acidi grassi liberi, fosfolipidi, glicolipidi e steroli. Il comportamento fisico dei lipidi dipende dalle caratteristiche della catena alchilica degli acidi grassi: acidi grassi saturi o insaturi, configurazione cis o trans e dimensione della catena. Il punto di fusione aumenta con la lunghezza della catena e diminuisce con l'aumentare dell'insaturazione. Tra gli acidi saturi, gli acidi a catena dispari hanno un punto di fusione inferiore rispetto agli acidi a catena pari adiacenti. La presenza di doppi legami cis abbassa notevolmente il punto di fusione, le catene piegate si impacchettano meno bene. Gli acidi grassi di tipo trans hanno punti di fusione molto più vicini a quelli dei corrispondenti saturi. In particolare, la composizione in trigliceridi determina le proprietà fisiche degli oli e dei grassi, influenzando la struttura, la stabilità, il sapore e le caratteristiche sensoriali e visive degli alimenti. Gli oli sono liquidi a temperatura ambiente e i grassi sono apparentemente solidi, tutti formati da una complessa miscela di TAG



**Fig 2.3** : molecola di TAGs, R1, R2 e R3 indicano le catene alchiliche.

## **2.4 Processo di cristallizzazione**

Un cristallo è composto da unità elementari aventi una disposizione geometrica regolare con il fine di minimizzare il contenuto di energia libera [13]. I lipidi possono esistere allo stato solido o liquido oppure come una miscela di due stati fisici diversi, a seconda del valore di temperatura e pressione [14]. Il passaggio dallo stato liquido allo stato solido è denominato cristallizzazione. Questa operazione può essere utilizzata per preparare dei prodotti finiti o per separare un solido da un liquido.

Durante il processo di cristallizzazione, il sistema viene raffreddato al di sotto della temperatura di fusione. L'entità dell'abbassamento della temperatura è definita come "grado di sottoraffreddamento" ( $\Delta T$ ) (2.1) :

$$\Delta T = T_m - T_{cr} \quad (2.1)$$

dove  $T_m$  e  $T_{cr}$  sono rispettivamente le temperature di fusione e cristallizzazione. Il valore di  $\Delta T$  al quale si osserva l'inizio della cristallizzazione dipende dalla composizione chimica della miscela, ma anche da alcuni parametri di processo utilizzati e dai parametri di processo (velocità di raffreddamento) [17]. Le molecole dei TAGs possono assumere molte conformazioni durante il processo di cristallizzazione, e le barriere energetiche associate alla libertà delle molecole dei trigliceridi, aumentano la difficoltà di ottenere dei nuclei cristallini stabili. [18].

La cristallizzazione avviene secondo due meccanismi consecutivi: nucleazione (generazione di nuovi cristalli) e accrescimento (aumento della massa dei cristalli esistenti).

## 2.4.1 Nucleazione

Il processo di nucleazione avviene quando si ha lo sviluppo di cristalli in liquido sottoraffreddato. In questo caso il processo di nucleazione viene definito primario e può essere omogeneo o eterogeneo. Nel caso invece in cui la nucleazione avviene perché sulla superficie del cristallo si formano embrioni si ha la nucleazione secondaria. I meccanismi sono riassunti nella Fig. 2.4

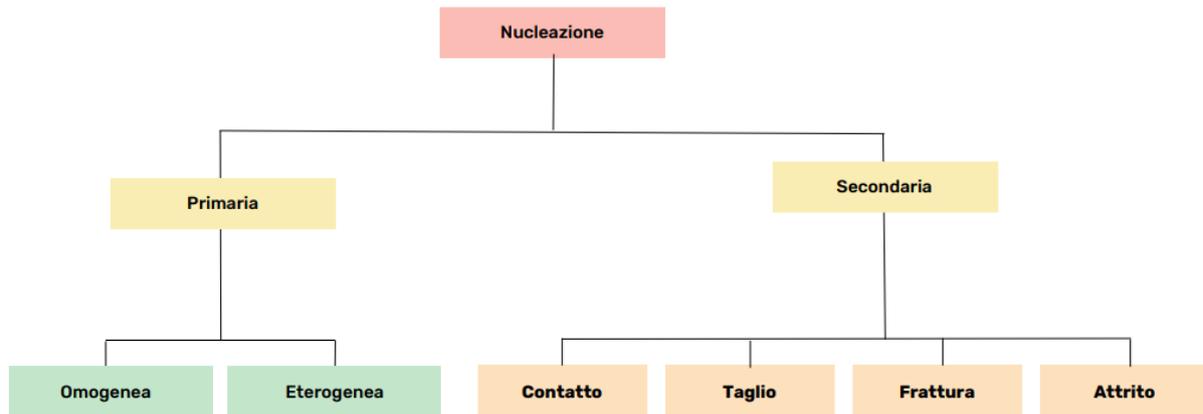


Fig 2.4: schema riassuntivo dei meccanismi di nucleazione

Non è ancora del tutto chiaro il meccanismo della nucleazione primaria. Due sono le teorie più accreditate:

- La teoria della nucleazione classica [19].
- La teoria della nucleazione in due fasi [20].

Secondo la teoria classica, cluster di molecole che raggiungono una dimensione critica possono stabilizzarsi e crescere. Affinché si formi un cluster stabile, si deve considerare il valore dell'energia libera di Gibbs, che sarà dato dalla somma di due contributi ovvero la variazione dell'energia libera per la formazione di una nuova superficie  $\Delta G_s$  e la variazione dell'energia libera necessaria a creare un volume di solido  $\Delta G_v$ . Il primo è un termine positivo ed è l'energia relativa alla formazione di una superficie di separazione fra la soluzione liquida e la particella solida. L'energia libera di volume  $\Delta G_v$  è una grandezza negativa ed è correlata alla differenza di energia libera tra la particella solida e il soluto in soluzione, per unità di volume. È quindi associata alla transizione di fase. È possibile mettere in relazione tali quantità con la tensione interfacciale  $\gamma$  e il raggio del nucleo  $r$ :

$$\Delta G = \Delta G_v + \Delta G_s = \Delta g_v \frac{4}{3} \pi r_c^3 + \Delta g_s 4\pi r_c^2 \quad (2.2)$$

Esiste un valore di raggio critico al di sotto del quale la particella solida si scioglie nuovamente nel liquido. Questo valore di raggio critico viene calcolato eguagliando la derivata della equazione 2.2 a zero. Il valore del raggio critico è definito dall'equazione 2.3.

$$r_c = -\frac{2\gamma}{\Delta g_v} \quad (2.3)$$

La variazione dell'energia libera data dalla somma di  $\Delta G_v$  e  $\Delta G_s$  in funzione del raggio è mostrato in Fig. 2.5.

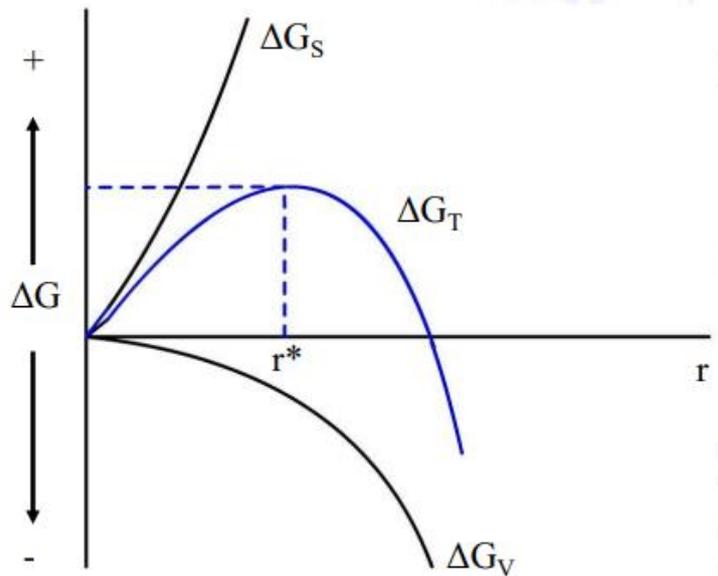


Fig. 2.5 : variazione dell'energia libera in funzione del raggio

Quando il raggio del nucleo ha un valore ad di sopra del raggio critico, l'energia è diminuita dalla crescita nei cristalli, quando invece il raggio del nucleo ha un valore ad di sotto del raggio critico, l'energia è diminuita dal di scioglimento.

Maggiore è il grado di sottoraffreddamento, maggiore è la variazione nell'energia libera di volume  $\Delta G_v$ .  $\Gamma$ , la tensione interfacciale non varia significativamente col sottoraffreddamento. Quando la quantità di sottoraffreddamento  $\Delta T$  aumenta, la dimensione critica del nucleo diminuisce. Il raggio critico è correlato al sottoraffreddamento secondo la relazione 2.4:

$$r^* = \frac{2\gamma T_m}{\Delta H_f \Delta T} \quad (2.4)$$

$r^*$  = raggio critico del nucleo

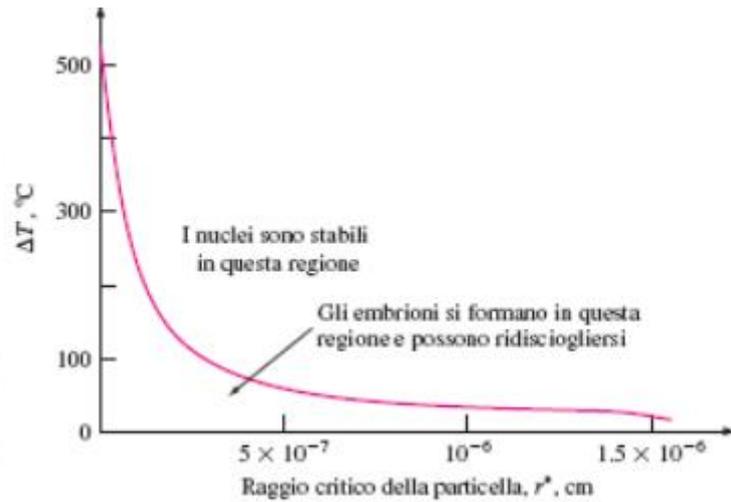
$\gamma$  = energia libera specifica di superficie

$\Delta H_f$  = calore latente di fusione

$\Delta T$  = quantità di sottoraffreddamento

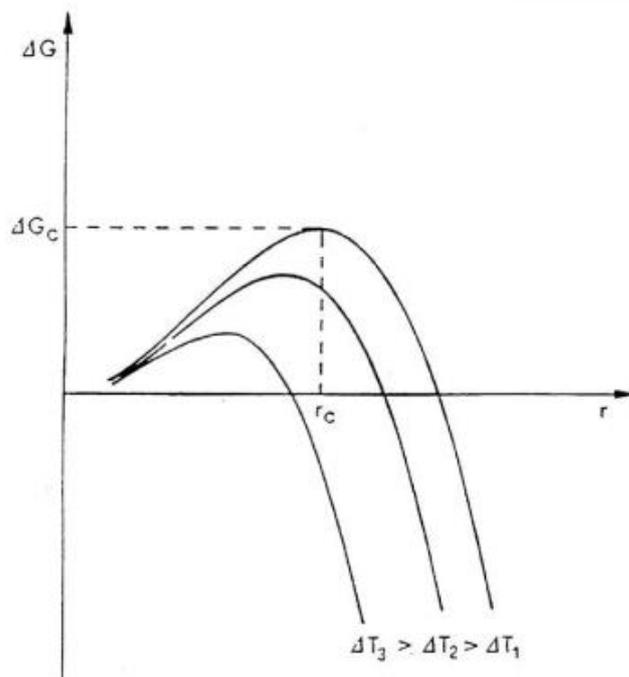
$T_m$  = temperatura media di equilibrio

In Fig. 2.6 è riportato l'andamento del raggio critico in funzione del sottoraffreddamento. All'aumentare del raggio critico della particella, il sottoraffreddamento diminuisce.



**Fig 2.6** : l'andamento del raggio critico in funzione del sottoraffreddamento

In **Fig 2.7** si mostra che a valori crescenti del sottoraffreddamento,  $r_{cr}$  si riduce ( $r_{cr} \propto \Delta T^{-1}$ ) così come  $\Delta G_{cr}$  anche se più rapidamente ( $\Delta G_{cr} \propto \Delta T^{-2}$ )



**Fig. 2.7** : andamento del raggio critico in funzione dell'energia di Gibbs.

La nucleazione omogenea non è molto probabile poiché spesso, soprattutto in sistemi molto grandi si hanno delle impurità, ovvero dei corpi estranei che inducano la nucleazione, riducendo la variazione di energia libera di Gibbs. In questo caso si parla di nucleazione eterogenea. La presenza di impurità riduce l'energia di attivazione correlata alla nucleazione,

rendendo così la formazione di nuclei un processo più termodinamicamente favorevole [22]. La velocità di nucleazione eterogenea può essere scritta come la 2.5.

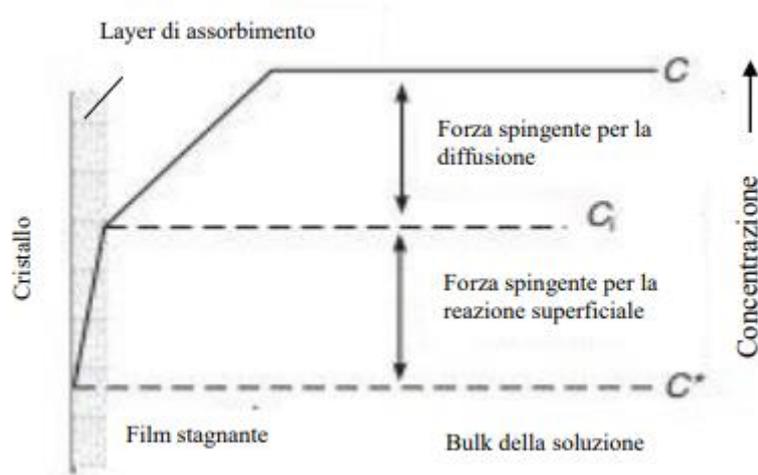
$$B_{et} = A_{et} \exp\left[-\frac{16\pi\gamma^3 v^2 f(\varphi)}{3k^3 T^3 (\ln S)^2}\right] \quad (2.5)$$

dove  $f(\varphi)$  tiene conto della ridotta barriera energetica. La nucleazione eterogenea, in situazioni reali, è il processo predominante, dato che non è possibile assicurare che la soluzione sia priva di impurezze.

La nucleazione secondaria avviene in presenza di altri cristalli nel sistema. Questo tipo di nucleazione può avvenire anche quando il sottoraffreddamento è inferiore rispetto al caso della nucleazione primaria.

## 2.4.2 Crescita

Quando i cluster raggiungono la dimensione critica, ossia una volta formatosi i primi nuclei cristallini, ha inizio l'accrescimento dei cristalli. Il meccanismo di accrescimento può essere descritto da una combinazione di diffusione dal liquido alla superficie del cristallo e di reazione di assorbimento sulla superficie (**Fig.2.8.**)



**Fig2.8** : Interfaccia soluzione – cristallo [54].

I due meccanismi possono essere descritti dalla 2.6 e 2.7 .

$$R_G = k_d(c - c_i) \quad \text{stadio diffusivo (2.6)}$$

$$R_G = k_r(c_i - c^*)^r \quad (\text{stadio della reazione superficiale}) \quad (2.7)$$

dove  $c_i$  e  $c^*$  sono le concentrazioni del soluto nella soluzione all'interfaccia, sulla superficie cristallina ed in condizioni di saturazione,  $k_d$  è la costante diffusiva,  $k_r$  è la costante della reazione superficiale e  $r$  è l'ordine della reazione superficiale.

Uno degli approcci utilizzati per descrivere la crescita dei sistemi contenenti acidi grassi [22] è il modello di Melvin Avrami, il quale ipotizzò che la crescita di una nuova fase inizia con la formazione di piccoli nuclei all'interno della fase liquida. L'equazione che descrive il modello è la 2.8:

$$X = 1 - e^{-kt^n} \quad (2.8)$$

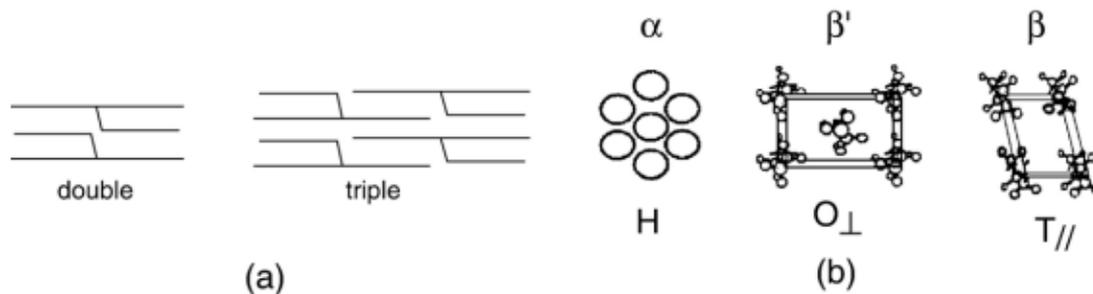
dove  $X$  è la frazione di materia cristallizzata che varia con il tempo  $t$ ,  $k$  è la costante di Avrami e dipende dalla velocità di nucleazione,  $n$  è l'esponente di Avrami, che varia tra 1 e 4, e dipende dal meccanismo di nucleazione e crescita dei cristalli.

Il modello di Avrami non distingue tra nucleazione e crescita dei cristalli, ma considera il fenomeno come un processo globale. La costante di velocità di cristallizzazione ( $k$ ) è la combinazione di nucleazione e crescita dei cristalli e la sua dipendenza dalla temperatura è espressa da un'equazione di tipo Arrhenius).

La dipendenza dei parametri da fattori esterni può giustificare le deviazioni del modello rispetto ai dati sperimentali.

## 2.5 Polimorfismo dei trigliceridi (TAGs)

Le molecole dei trigliceridi (TAGs) sono in grado di impacchettarsi in differenti strutture cristalline, le quali presentano temperature di fusione e proprietà chimico-fisiche diverse. Le molecole degli acidi grassi in genere presentano quattro forme polimorfiche caratteristiche :  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\beta'$ , e  $\gamma$ . I trigliceridi sono molecole risultanti dalla reazione di idrolisi fra tre molecole di acidi grassi ed una di glicerolo. Tali molecole possono impacchettarsi con le catene aciliche in due configurazioni: “ a sedia ”, nella quale la catena acilica nella 2° posizione è accanto alla catena che si trova nella 1° o nella 3° posizione, oppure la configurazione a “diapason” quando la catena acilica nella 2° posizione e le catene nella posizione 1° e 3° si impacchettano tra di loro. Le configurazioni a sedia si possono disporre formando delle strutture a doppia o tripla catena (**Fig. 2.9a**) e questi si impilano fianco a fianco in piani cristallini, a volte con una certa angolazione. Le differenze tra i polimorfi sono più evidenti da una vista dall'alto di questi piani, che mostrano la struttura delle sottocelle (**Fig. 2.9 b**). Le distanze tra le catene forniscono delle informazioni sulle strutture delle sottocelle. Le distanze tra le catene dipendono sia da come queste si impacchettano sia dalla disposizione degli atomi di carbonio nelle catene alifatiche.



**Fig. 2.9 a:** struttura dei trigliceridi in doppia o tripla catena e **(b)** struttura della sottocella nei tre più comuni polimorfismi dei trigliceridi. [26]

La forma  $\alpha$  è caratterizzata da un valore caratteristico di d-spacing di 0.42 nm , le catene creano una struttura esagonale, senza angolo di inclinazione..

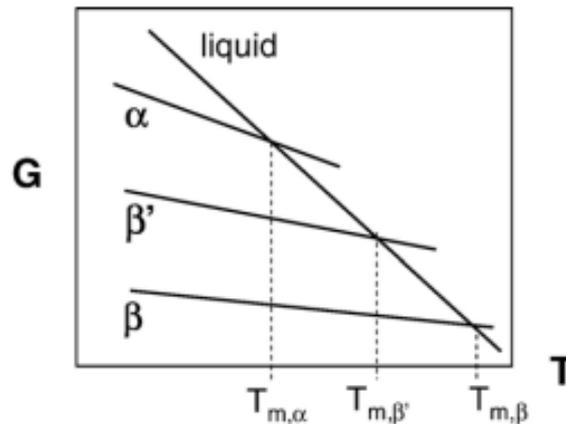
La forma  $\beta'$  è caratterizzata da due valori di d-spacing intorno a 0.37-0.42 nm , la catena si impacchetta in una cella unitaria orto rombica e perpendicolare. Le catene hanno un angolo di inclinazione tra 50 e 70 °.

La forma  $\beta$  è caratterizzata da un d-spacing di 0.46 nm , ma anche 0.36-0.39 nm, che presenta un impacchettamento della struttura in una cella triclinica. In questo caso le catene presentano un angolo di inclinazione di 50-70 °.

I polimorfi  $\beta$  e  $\beta'$  e  $\alpha$  possono avere una struttura di tipo 2L o 3L. La prima si ha in genere quando la natura chimica degli acidi grassi sono uguali o molto simili, la seconda quando le frazioni chimiche presenti sono molto diverse ( ad esempio TAG misto , saturo e insaturo ).

Le trasformazioni tra le varie forme polimorfiche avvengono dalla forma meno stabile alla forma più stabile. I polimorfi presenti nei lipidi possono essere enantiotropici quando la trasformazione è reversibile, invece quando è irreversibile si parla di polimorfo monotropico.

La stabilità relativa delle diverse forme polimorfiche e la forza spingente sono determinati dal valore delle rispettive energie libere di Gibbs (G). Il polimorfo che ha un valore di energia libera più bassa è più stabile. I diagrammi in funzione della temperatura e dell'energia libera di Gibbs sono utilizzati per definire la stabilità termodinamica dei polimorfi (**Fig.2.10**).



**Fig 2.10** : relazione tra G e T dei principali polimorfi dei TAGs. [26]

Il valore di G dipende dall'entalpia (H) dall'entropia (S) e dalla temperatura (T) secondo l'equazione (2.9)

$$G = H - TS \quad (2.9)$$

I valori dell'energia libera di Gibbs sono maggiori per il polimorfo  $\alpha$  perché presenta un imballaggio cristallino meno denso, intermedi per la il polimorfo  $\beta'$  e più piccoli per la forma  $\beta$  perché presenta un impaccamento cristallino più denso. Ogni forma polimorfa ha una sua temperatura di fusione ( $T_m$ ), indicata come l'intersezione di G e T (**Fig.2.10**). Le principali caratteristiche dei tre polimorfi possono essere riassunte come segue :

- La tre forme polimorfiche sono tutte cristallizzabili in seguito allo scioglimento.
- Qualsiasi polimorfo può essere riportato in fase liquida superando la temperatura di fusione.
- Le trasformazioni polimorfiche sono sempre irreversibili.
- Le trasformazioni possono avvenire nello stato solido, oppure si può avere una cristallizzazione delle forme più stabili dopo la fusione delle forme meno stabili.

### 2.5.1 Aspetti termodinamici della cristallizzazione dei TAGs.

La temperatura di fusione e l'entalpia di fusione dei TAG puri sono fondamentali per una descrizione termodinamica degli equilibri di fase solido-liquida nei sistemi contenente acidi grassi multicomponente in quanto possono essere misurate con precisione e possono essere utilizzate per costruire diagrammi di energia libera di base assumendo costante  $\Delta H$  e  $\Delta S$ . La **Fig. 2.10** mostra che ogni polimorfo in un TAG puro ha una propria temperatura di fusione distinta. All'equilibrio  $\Delta G=0$ , la temperatura di fusione può essere scritta come il rapporto tra l'entalpia e l'entropia di fusione, data dalla 2.10 :

$$T_m = \frac{\Delta H_m}{\Delta S_m} \quad (2.10)$$

Quindi una strategia per stimare i punti di fusione consiste nel combinare correlazioni separate per l'entalpia e l'entropia di fusione. Tuttavia, anche l'entalpia e l'entropia sono difficili da stimare correttamente poiché questi dipendono da diversi fattori come l'impacchettamento molecolare nei cristalli (influenzato dalla forma molecolare, dalle dimensioni e dalla simmetria) e da interazioni intermolecolari come il trasferimento di carica e le interazioni dipolo-dipolo nella fase solida [27]. Predire queste interazioni è molto difficile e in letteratura esistono solo delle linee guida per farlo.

Nel caso dei TAG, gli acidi grassi saturi sono molecole relativamente lineari e quindi i TAG contenenti solo acidi grassi saturi possono facilmente allinearsi per formare una struttura compatta. D'altra parte, gli acidi grassi insaturi nei TAG presentano deformazioni nelle loro catene alifatiche in corrispondenza dei doppi legami. L'impaccamento interrotto dei TAG insaturi ostacola la formazione di cristalli e fa sì che i TAG insaturi abbiano una temperatura di fusione inferiore rispetto ai TAG saturi con la stessa lunghezza di catena. Simmetria molecolare[28,29] e struttura del cristallo[27,30] sono considerati i fattori più influenti che regolano le proprietà termiche dei TAG. Le molte diverse strutture molecolari dei TAG, insieme al polimorfismo, fanno sì che la stima della temperatura di fusione dei TAG è più difficile rispetto a quella della maggior parte dei composti organici.[26]

Da molti studi di regressione, Wesdorp [31] ha identificato diversi fattori importanti per una stima corretta dei valori  $T_m$  e  $\Delta H_m$  dei TAG. Questi sono: (1) la lunghezza di ciascuna catena, (2) se la catena ha un numero pari o dispari di atomi di carbonio, (3) se la catena è satura o insatura e (4) la simmetria molecolare. È stato anche scoperto che l'entalpia di fusione della forma  $\beta$  dipende dalla presenza di una catena 2L o 3L. Le correlazioni ottenute per i TAG insaturi nello studio sono risultate meno affidabili a causa dei dati limitati disponibili rispetto a quelli per i TAG saturi.

I TAG con acidi grassi insaturi in posizione sn-2 e acidi saturi nelle altre posizioni sono i componenti principali di una serie di grassi vegetali largamente utilizzati come l'olio di palma e il burro di cacao. Questi saranno considerati qui per illustrare le complessità dei sistemi insaturi. Particolarmente comuni sono quelli contenenti acido oleico nella posizione sn-2. La presenza del doppio legame conferisce un maggiore ingombro sterico rispetto ai TAG completamente saturi, che costringe a formare strutture specifiche per consentire alle porzioni di acidi grassi saturi e insaturi di essere impacchettati nella stessa lamella. [26]

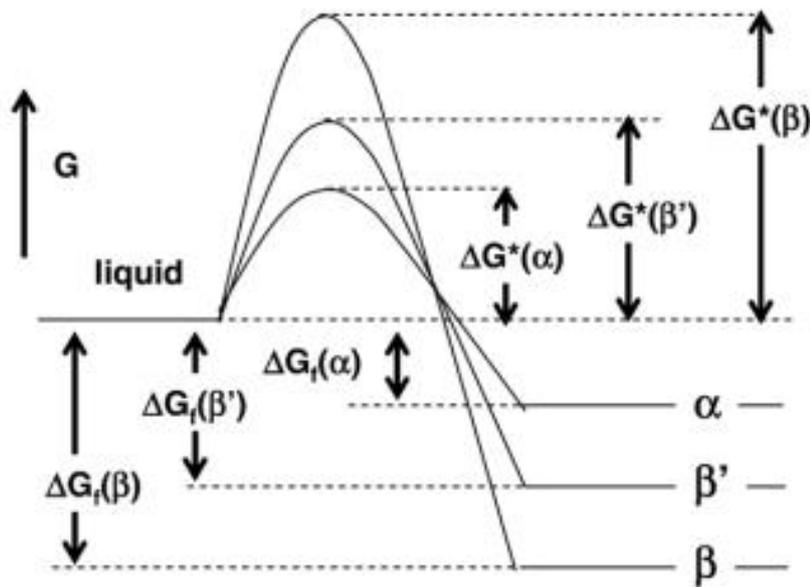
Considerazioni da fare per i sistemi contenenti acidi grassi saturi e insaturi sono:

- Può verificarsi un'altra fase intermedia,  $\gamma$  che ha una struttura 3L . Le catene dell'acido saturo e dell'acido oleico di questa forma sono disordinate, con le catene dell'acido oleico che si impacchettano in una sottocella esagonale (come nella forma  $\alpha$ ) mentre la catena satura mostra un impacchettamento parallelo.
- La forma  $\beta'$  è una struttura 3L o 2L, per cui le parti saturate della catena formano una cella ordinata e perpendicolare, mentre le l'acido oleico rimangono in una cella esagonale disordinata.
- Nel caso della forma  $\beta$ , le lamelle di acido saturo e oleico si impacchettano entrambe in modo ordinato.

### 2.5.2 Aspetti cinetici della cristallizzazione dei TAGs.

La cristallizzazione richiede due eventi distinti: la formazione di nuclei nella fase iniziale e l'accrescimento dei nuclei con conseguente formazione dei cristalli. Nei sistemi contenenti acidi grassi, è stato proposto che un processo di ordinamento delle molecole in lamelle funga da precursore della formazione di una fase solida cristallina [32,33]. Questo processo segue un percorso attraverso stati transitori che richiede il superamento di barriere energetiche, come mostrato in **Fig. 2.11** per diverse forme polimorfiche tipiche dei TAGs [34]. La cinetica complessiva del processo dipende dalla velocità di diffusione delle molecole nelle fasi liquide e solide, dalla disposizione delle molecole e dalla velocità di reazione di legame delle molecole alle superfici dei cristalli. [35,26]

I fattori cinetici sono importanti quanto quelli termodinamici nel determinare quale polimorfo si formerà dal fuso in che quantità e in che composizione.



**Fig 2.11:** barriere energetiche da superare per i diversi polimorfi. [26]

Di solito gli acidi grassi cristallizzano prima nel polimorfo meno stabile, che ha la barriera energetica di nucleazione generalmente più bassa ( $\alpha$ ). Successivamente si trasformano o ricristallizzano in polimorfi più stabili ( $\beta'$  o  $\beta$ ). La cristallizzazione diretta di  $\beta'$  o  $\beta$  tende a verificarsi solo quando non è presente alcun sottoraffreddamento delle forme meno stabili.

### 2.5.3 Nucleazione dei TAGs

Nel polimorfismo monotropico, come nel caso dei TAG, esiste un solo polimorfo solido stabile al di sotto della temperatura di fusione, mentre gli altri sono tutti metastabili. Tuttavia, se più di un polimorfo possiede una forza motrice positiva per la cristallizzazione, la nucleazione e i tassi di crescita sono decisivi nel determinare la forma polimorfica nucleata dalla fase liquida. Empiricamente, questo è descritto dalla regola degli stadi di Ostwald[37], in cui si afferma che la fase termodinamicamente meno stabile si forma sempre per prima e si trasforma in seguito in quella più stabile. Tre fattori principali influenzano la nucleazione dei TAGs:

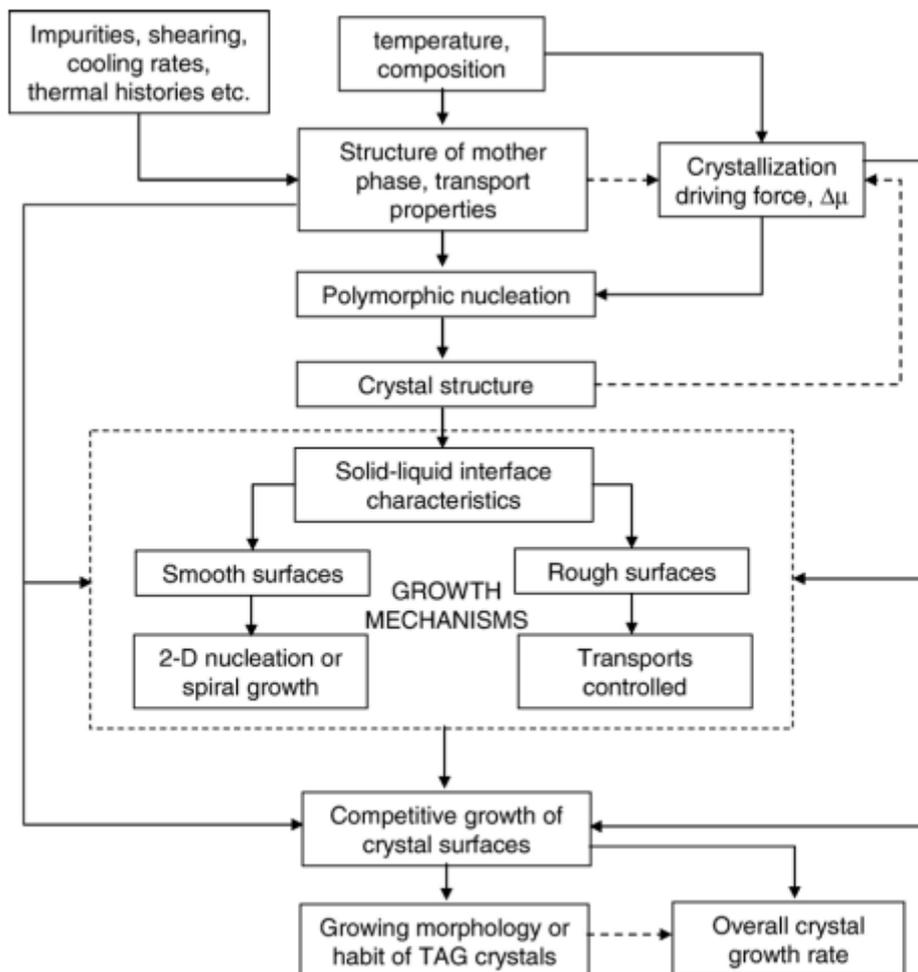
- Sottoraffreddamento  $\Delta T$ , che se aumentato porta a velocità di nucleazione più elevate e alla formazione di polimorfi metastabili
- L'energia libera interfacciale dei cristalli ( $\sigma$ ) che è normalmente minore per le forme meno stabili ( $\alpha < \beta' < \beta$ )
- Le dinamiche di ordinamento da una conformazione casuale di molecole TAG liquide a una conformazione densamente compatta dello stato cristallino[37,38].

$\Delta T$  deve essere positivo affinché si abbia nucleazione. Il termine di energia libera interfacciale è inoltre decisivo per la formazione di una struttura piuttosto che un'altra. I polimorfi che hanno una  $T$  di fusione più bassa hanno valori inferiori di energia libera interfacciale,  $\sigma$  e quindi si formeranno più facilmente. La regola degli stadi di Ostwald si spiega con la competizione tra la nucleazione delle diverse forme polimorfiche; la fase con velocità di nucleazione più alta si formerà preferenzialmente[37]. La regola degli stadi di Ostwald nei TAG, tuttavia, può essere annullata se sono presenti influenze esterne come fluttuazioni di pressione e temperatura locali.

### 2.5.4 Crescita dei TAGs

I fattori che influenzano la crescita dei TAG sono la velocità di attacco delle unità in crescita sulla superficie del cristallo e il trasporto di massa o di calore dalla superficie di crescita. **Fig. 2.12** mostra schematicamente queste relazioni. Nei sistemi lipidici si presume regolarmente che la cinetica di superficie controlli la velocità[36]. La prova principale di ciò è che la velocità di dissoluzione (limitata dal trasferimento di calore e massa, ma non dalla cinetica di reazione superficiale) può avere un ordine di grandezza maggiore della velocità di crescita a parità di forza spingente.

Ci sono anche argomenti meccanicistici secondo cui la cinetica di reazione superficiale è importante in quanto è necessario un gran numero di cambiamenti conformazionali prima che una molecola possa adattarsi correttamente al reticolo cristallino, e questo può causare anche il distacco della molecola stessa dalla superficie del cristallo. Questo ostacolo conformazionale delle molecole TAG provoca velocità di crescita relativamente lente, dell'ordine di 0,01–0,1  $\mu\text{m/s}$ .



**Fig 2.12** : interazioni tra morfologia e velocità di crescita [26]

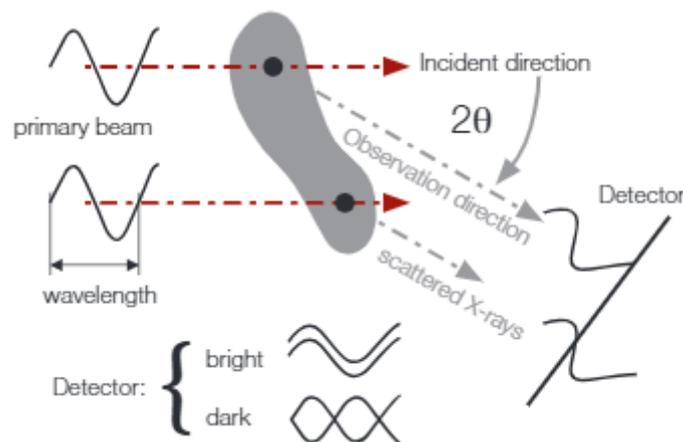
## 2.6 Diffrazione a raggi X

La diffrazione a raggi X è un metodo analitico per determinare la struttura dei sistemi solidi o semi-solidi. Normalmente, i raggi X vengono inviati attraverso il campione (modalità di trasmissione) e ogni particella che si trova all'interno del raggio devierà il raggio in base alla propria struttura. Pertanto, viene misurata la struttura media di tutte le particelle illuminate nel campione.[39]

Il metodo SAXS è accurato, non distruttivo e di solito non richiede preparazione del campione. Le aree di applicazione sono molto ampie e comprendono materiali biologici, polimeri, colloidali, sostanze chimiche, nanocompositi, metalli, minerali, alimenti e prodotti farmaceutici e possono essere trovate nella ricerca e nel controllo qualità

I campioni che possono essere analizzati e i tempi richiesti dagli esperimenti dipendono principalmente dalla strumentazione utilizzata, che può essere classificata in due gruppi principali, (1) gli strumenti di collimazione lineare e (2) gli strumenti di collimazione puntiforme. Le dimensioni delle strutture che possono essere analizzate vanno da 1 a 100 nm in una configurazione tipica, ma possono essere estese su entrambi i lati misurando ad angoli più piccoli (Ultra Small-Angle X-Ray Scattering, USAXS) o più grandi (Wide-Angle X-Ray Scattering, WAXS chiamato anche X-Ray Diffraction, XRD)[39]

Quando i raggi X sono diffratti dagli atomi, ogni atomo emette onde sferiche emanate dalla propria posizione. Poiché le onde luminose che provengono dai processi di diffrazione sono sincronizzate con le onde piane in arrivo, producono schemi di interferenza a seconda della posizione del rivelatore. Le interferenze possono essere costruttive (in fase), distruttive (fuori fase) o intermedie a seconda dell'angolo di osservazione  $2\theta$  (fig. 2.13), dell'orientamento e della distanza  $r$  degli atomi che emettono radiazione tra di loro.



**Fig 2.13:** l'intensità delle onde interferenti dipende dalla distanza degli atomi emittenti e dal loro orientamento rispetto alle direzioni di incidenza e di osservazione. Quando le onde arrivano in fase, il rivelatore riceve luminosità e quando le onde arrivano fuori fase, allora il rivelatore riceve oscurità [39]

Ogni distanza è misurata rispetto alla lunghezza d'onda  $\lambda$  della radiazione incidente. Una figura di interferenza identica viene quindi prodotta ogni volta che il rapporto  $r/\lambda$  è identico.

Per una rappresentazione indipendente dalla lunghezza d'onda, i modelli di scattering sono solitamente presentati come funzioni del valore di  $q$  che è espresso come 2.11 :

$$q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin(\phi) \left[ \frac{1}{\text{nm}} \right] \quad (2.11)$$

La dimensione di  $q$  è uno su lunghezza ed indica “lunghezza del vettore di scattering” e  $\phi$  indica l’angolo di azimuth.

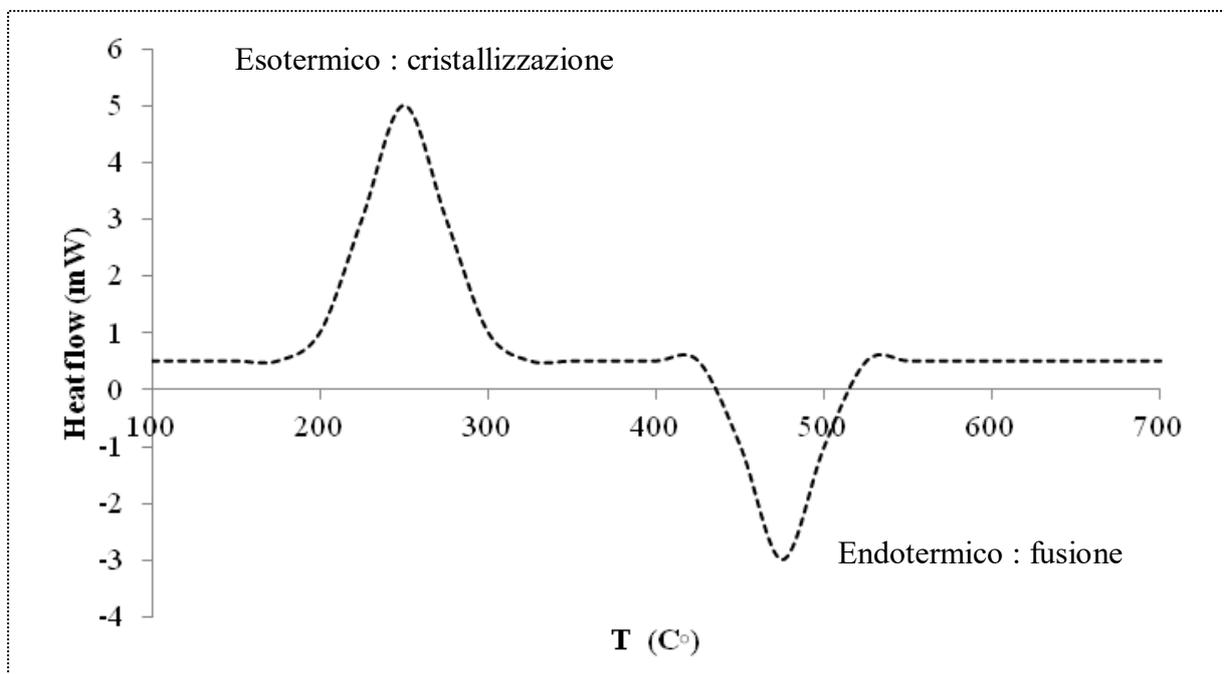
Quando si ha la presenza di campioni con particelle altamente impaccate, le distanze relative dell’una rispetto all’altra assumono lo stesso ordine di grandezza delle distanze fra atomi all’interno della stessa molecola. Lo schema di interferenza conterrà quindi anche contributi di particelle vicine. Questo schema di interferenza viene moltiplicato per il fattore di forma del singolo atomo che viene chiamato “fattore di struttura”. In cristallografia è conosciuto come “fattore di reticolo” perché contiene informazioni sulle posizioni relative degli atomi. Una discesa dell’intensità a piccoli valori di  $q$  è tipica dei potenziali di interazione repulsivi. Un aumento di intensità indica un’interazione attrattiva, che è molto simile all’aggregazione. [39]

Alla fine questa onda può manifestarsi in un picco pronunciato, quando le particelle si allineano in una disposizione altamente ordinata e periodica (cioè cristallina). Viene quindi chiamato picco di Bragg e la posizione del suo massimo ( $q_{\text{peak}}$ ) indica la distanza ( $d_{\text{Bragg}}$ ) tra le particelle allineate utilizzando la legge di Bragg, (equazione 2.12).

$$d_{\text{Bragg}} = \frac{2\pi}{q_{\text{bragg}}} \left[ \frac{1}{\text{nm}} \right] \quad (2.12)$$

## 2.7 Calorimetria a scansione differenziale (DSC)

La calorimetria a scansione differenziale (DSC) è un'analisi termica che consiste nel ricavare informazioni riscaldando o raffreddando il campione in maniera controllata, in particolare si misura il flusso termico tra il campione in esame e uno di riferimento, mentre i due sono vincolati a una temperatura variabile definita da un programma prestabilito. Utilizzare la differenza del flusso di calore è utile in quanto è possibile in questo modo eliminare qualsiasi interferenza indotta da una possibile variazione della temperatura ambientale. Un cambiamento fisico o chimico nel campione viene associato ad un assorbimento o a un'emissione del flusso di calore, necessario a mantenerlo alla temperatura di set point. La differenza del flusso di calore sarà positiva o negativa e quindi esotermica o endotermica, rispettivamente. I dati ottenuti da questa analisi vengono emessi in un grafico simile a quello mostrato in **Figura 2.14**.



**Fig. 2.14** : un esempio del termogramma DSC.

Per ottenere l'entalpia del processo è possibile integrare l'area che si trova sotto il picco di transizione e moltiplicare tale valore per una costante calorimetrica. In questo modo è possibile ottenere il valore dell'entalpia da associare alla variazione chimico-fisica studiata. L'analisi DSC viene utilizzata per determinare diverse proprietà del campione, quali il punto di fusione, il punto di cristallizzazione, le trasformazioni polimorfiche e le transizioni vetrose. Possono essere ottenute anche informazioni che riguardano cambiamenti di calore specifico, ossidazione, degradazione e stabilità termica. Questa tecnica permette anche di analizzare la purezza e la cristallinità del campione. Si può andare incontro ad errori nel caso in cui il campione sia contaminato o sia effettuata una calibrazione sbagliata del campione.



## 3 Materiali e Metodi

### 3.1 Matrici

I campioni di pula di riso macinata con diametro particellare di 500  $\mu\text{m}$ , sono stati forniti da Agrindustria Tecco S.R.L. e immagazzinata  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  fino all'utilizzo.

#### 3.1.1 Caratterizzazione della matrice

#### 3.1.2 Umidità

Questa analisi è stata effettuata rispettando i “Metodi di analisi utilizzati per il controllo chimico degli alimenti” (Rapporti ISTISAN 96/34) previsti dall'Istituto Superiore di Sanità. [40] I crogiolini utilizzati sono stati riempiti con 5 g di pula di riso ed essiccati in una stufa ad aria MEMMERT modello UN 30 prodotta da Vetrotecnica , termostata a  $103\text{ }^{\circ}\text{C}$  per una notte. Questo procedimento serve a valutare il quantitativo di acqua presente nella matrice. La percentuale di umidità è stata calcolata secondo l'equazione 3.1 :

$$\% \text{ Umidità} = \frac{E-m}{E} * 100 \quad (3.1)$$

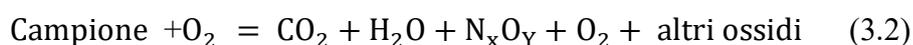
Dove E rappresenta la massa del campione umido in g, ed m la massa del campione secco in g. Le analisi successive sono state effettuate tutte sul campione secco.

### 3.1.3 Proteine

La percentuale di proteine presenti nella matrice è stata valutata con il metodo Dumas. Questo metodo viene ufficialmente riconosciuto dalle organizzazioni internazionali ( AOAC, AACC, ISO, DIN, ASBC, AOCS, OIV ). Il metodo Dumas, noto anche come metodo di combustione, è un metodo primario di determinazione dell'Azoto e delle Proteine che garantisce risultati rapidi, facilità d'uso e sicurezza. Il metodo Dumas prevede tre fasi :

#### 1) Combustione

Dopo aver pesato circa 20 mg di campione , esso viene riscaldato in un forno che raggiunge rapidamente la temperatura di 1000 °C, in presenza di ossigeno puro. Questo produce principalmente acqua, anidride carbonica e azoto sotto forma di diversi ossidi ( $N_yO_x$ )



#### 2) Riduzione e Separazione

Questa miscela di gas passa attraverso una camera di riduzione contenente rame riscaldato a circa 650 °C. Questa fase converte gli ossidi di azoto in azoto elementare e raccoglie l'ossigeno in eccesso. Trappole dedicate rimuovono l'acqua residua e l'anidride carbonica.



#### 3) Detenzione

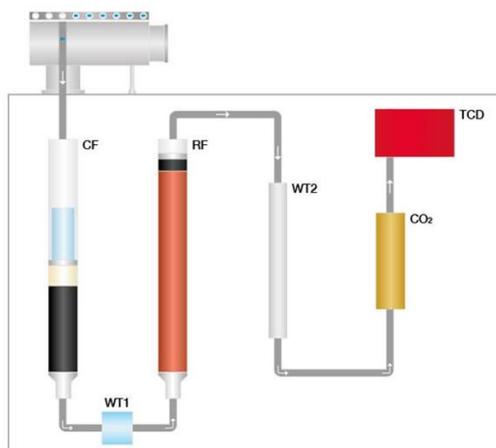
Un rilevatore di conducibilità termica viene utilizzato per quantificare il contenuto di azoto totale. Successivamente con il software DUMAssoft vengono usati dei reagenti per creare delle curve di calibrazione e tradurre in mg di azoto il segnale ricevuto.

Per effettuare il calcolo delle proteine del campione pula di riso , Il campione è stata preparato inserendo, dentro in stagno, 20 mg di pula con 20 mg di tungsteno ( 1:1). L'equazione utilizzata per il calcolo delle proteine è la 3.4 :

$$\% \text{ Proteine} = \% N * 5.34 \quad (3.4)$$

Dove 5.34 è un fattore di correzione che si utilizza per i cereali [40]

Lo strumento utilizzato in questa analisi è un analizzatore elementare MacroCube della Elementar. Lo schema del processo è rappresentato in **Fig 3.1**.



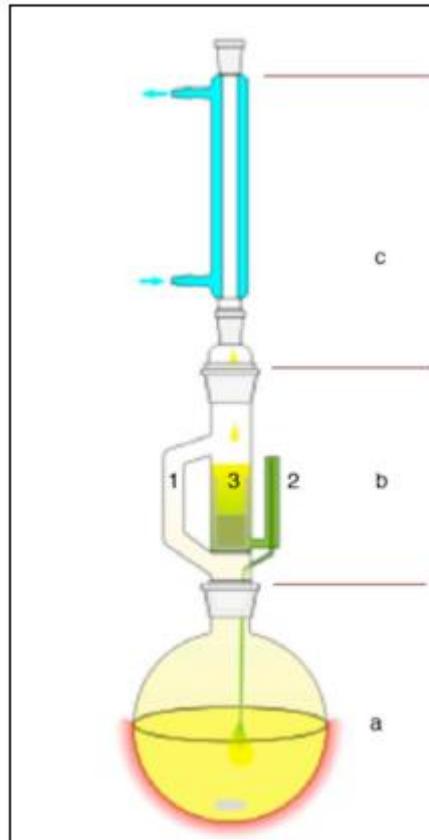
**Fig 3.1** : schema del processo Dumas

### ***3.1.4 Lipidi***

L'operazione per la quantificazione della percentuale dei lipidi è stata condotta rispettando i "Metodi di analisi per il controllo chimico degli alimenti " (Rapporti ISTISAN 96/34). Previsti dall'Istituto Superiore di Sanità. La percentuale di lipidi è stata calcolata utilizzando un estrattore Soxhlet. L'estrattore Soxhlet è costituito essenzialmente da tre parti (come mostrato in **Fig 3.2**) :

- a) il pallone contenente il solvente
- b) l'estrattore vero e proprio
- c) condensatore a riflusso, raffreddato ad acqua.

Il braccio laterale (1) permette il passaggio dei vapori di solvente al condensatore, mentre il sifone (2) permette il periodico svuotamento dell'estrattore. Il materiale solido contenente il composto da estrarre, viene posto in un ditale, spesso di cellulosa porosa (3), che viene inserito nella camera principale dell'estrattore. [45]



**Figura 3.2** : Schema dell'estrattore Soxhlet, per il significato di lettere e numeri, vedi testo.  
(figura adattata da: [en.wikipedia.org/wiki/Soxhlet\\_extractor](http://en.wikipedia.org/wiki/Soxhlet_extractor))

Il funzionamento dell'estrattore è il seguente : il solvente viene riscaldato e i vapori del solvente raggiungono il refrigerante e rifluiscono nel ditale, che lentamente si riempie di solvente caldo. Quando la camera del ditale è quasi piena, questa è automaticamente svuotata dal sifone laterale e il solvente, arricchito del composto da separare, ricade nel pallone. Alla fine le sostanze estratte si concentrano nel pallone di distillazione.

In questo lavoro di tesi il materiale solido, circa 2 g, è stato inserito nella camera di estrazione dentro un filtro a ditale, al quale è stata addizionata un'eguale quantità di solfato di sodio anidro  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , per eliminare eventuali tracce di umidità presenti. I due elementi sono stati mescolati con una bacchetta di vetro e il campione è stato chiuso con un tampone di cotone sgrassato. Il ditale è stato posto nell'estrattore e si sono attese 6-8 ore per l'estrazione con 200 mL di etere di petrolio. A questo punto l'estratto è stato raccolto in un pallone, essiccato e tarato. Il solvente è stato allontanato per distillazione tramite un evaporatore rotante ed il residuo è stato essiccato in stufa. Infine si è lasciato raffreddare in un essiccatore e pesato. La percentuale di sostanze grasse totali è stata valutata attraverso la 3.3 :

$$\% \text{ Lipidi} = \frac{A-B}{c} * 100 \quad (3.3)$$

In cui A corrisponde alla massa in g del pallone contenente la materia grassa estratta, B corrisponde alla massa in g del pallone e C corrisponde alla massa in g del campione analizzato.

### **3.1.5 Ceneri**

Il calcolo del contenuto delle ceneri è stato effettuato anche in questo caso rispettando il “Metodo di analisi per il controllo chimico degli alimenti” (Rapporti ISTISAN 96/34) previsto dall’Istituto Superiore di Sanità. L’incenerimento prevede che il campione venga inserito all’interno di crogioli in ceramica e riscaldato fino alla temperatura di 550 °C, con un avanzamento di 2°C/min, fino alla completa combustione della sostanza organica e il raggiungimento di una massa costante . Le capsule utilizzate vengono poste in una muffola che viene azionato a bassa intensità per limitare la velocità di combustione, poiché questa potrebbe comportare una parziale fuoriuscita del materiale. La durata dell’esperimento va dalle 6 alle 8 ore, per avere una combustione completa. Una volta ottenuti i campioni si lasciano raffreddare fino al raggiungimento della temperatura ambiente e si procede alla pesata. La percentuale delle ceneri viene calcolata secondo l’equazione 3.4 :

$$\% \text{ Ceneri} = \frac{m_r}{m_0} * 100 \quad (3.4)$$

Dove  $m_0$  corrisponde alla massa iniziale del campione ed  $m_r$  alla massa dopo il trattamento

### ***3.2 Estrazione del burro di riso con CO<sub>2</sub> supercritica***

L'estrazione del burro di riso è stata condotta presso un impianto pilota nell'azienda Exenia Group S.r.l a Pinerolo (Italia). La scelta del fluido utilizzato è ricaduta sulla CO<sub>2</sub>, in quanto questa in condizioni supercritiche risulta avere una bassa pressione critica, una bassa temperatura critica, non è tossica, è facile da rimuovere; inoltre il processo non è costoso ed il gas è inerte. L'operazione di estrazione è stata condotta in 3 giorni diversi, poiché ogni ciclo di estrazione aveva la durata di 4 ore. Ogni operazione di estrazione è stata preceduta da un essiccamento della pula di riso, inserita in appositi contenitori, nel forno Nerone della Tecnodom a 70 °C , per rimuovere l'umidità residua, per tutta la notte.

Successivamente è stato caricato un cestello (**Fig 3.3**) di metallo contenente la pula essiccata, sul fondo di esso sono stati riposti dei corpi in acciaio(**Fig 3.4**) per riempire tutto il volume e per fare il modo che la CO<sub>2</sub> non percorresse dei cammini preferenziali, così che questa, trovando degli ostacoli nel percorso sia più propensa ad espandersi in tutto il volume del cestello. Nella parte superiore del cestello è stata inserita una calza in fibra per evitare che la pula, essendo molto fine, si distribuisse lungo le tubazioni durante il processo di estrazione.

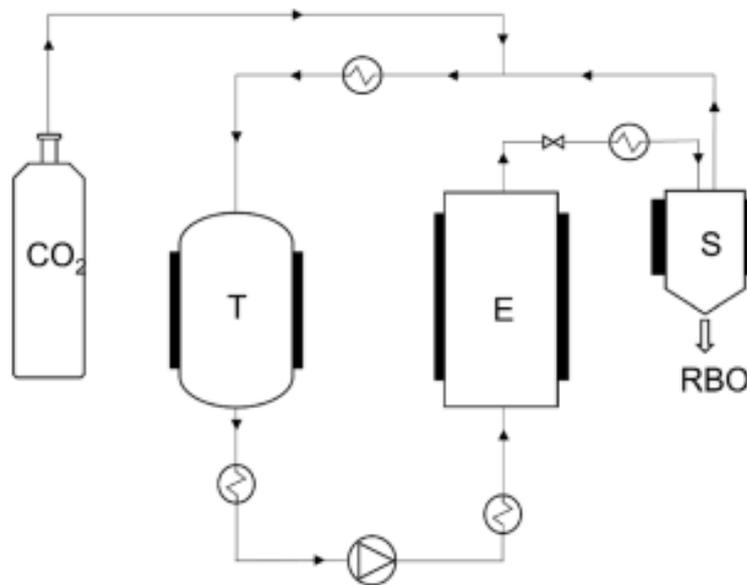


**Fig 3.3** : cestello riempito con pula di riso



**Fig 3.4** : corpi cilindrici all'interno del cestello.

Lo schema dell'impianto utilizzato è riassunto nella **Fig. 3.5** :



**Fig 3.5** : Schema dell'impianto situato presso gli stabilimenti di Exenia Group S.R.L. estrazione di fluido supercritico (SFE). Serbatoio, estrattore e separatore gravimetrico sono indicati rispettivamente con T, E e S. [41]

Nell'impianto utilizzato erano presenti due estrattori, uno da 5 Litri, utilizzato per estrazioni su scala di laboratorio, ed uno da 20 L, utilizzato per lo estrazioni in scala pilota. Per questa tesi è stato utilizzato il reattore da 20 L. Al suo interno è stato calato il cestello riempito precedentemente con la pula di riso, e con il materiale metallico. Durante le 4 ore di processo di estrazione sono stati utilizzati 250 kg di CO<sub>2</sub>. La CO<sub>2</sub> passa attraverso un condensatore così che diventi liquida, segue un tank freddo, in cui la CO<sub>2</sub> vaporizza in maniera parziale.

Successivamente una pompa a membrana che lavora a 350 bar, immette il gas attraverso un evaporatore permettendogli di raggiungere le condizioni supercritiche. In seguito la CO<sub>2</sub> supercritica è immessa nell'estrattore in cui viene avviene il processo. In questo caso la pressione utilizzata è stata di 330 bar e la temperatura dell'estrattore è di 60 °C. A valle dell'estrattore è presente una valvola di laminazione con lo scopo di ridurre la pressione per far sì che la CO<sub>2</sub> ritorni allo stato gassoso. A seguire sono presenti tre separatori, il primo di tipo gravimetrico che lavora a 150 °C, possiede un ugello di separazione tra CO<sub>2</sub> e prodotto, il secondo e il terzo sono un separatori ciclonici, che lavorano a 2/3 °C per raccogliere eventuale acqua o altri solventi. Infine la CO<sub>2</sub> raccolta viene ricircolata e riutilizzata all'interno dell'impianto per diversi cicli di estrazione. L'operazione di estrazione è stata effettuata in tre giorni diversi e ogni giorno sono stati inseriti i seguenti quantitativi di pula di riso :

- 1) 5.01 kg
- 2) 4.02 kg
- 3) 4.00 kg

Tutte le prove successive sono state effettuate sul burro di riso estratto.

### ***3.3 Determinazione degli acidi grassi***

La composizione degli acidi grassi (FA) è stata determinata secondo i metodi standard UNI EN ISO 12966-2:2017 e UNI EN ISO 12966-4:2015 [42,43]. Gli acidi grassi sono stati analizzati sotto forma di esteri metilici (FAME) utilizzando un gascromatografo dotato di un analizzatore di massa (GC-MS). Per preparare gli esteri metilici di FA, circa 100 mg di campione sono stati sciolti in 3 mL di KOH metanolico (0,6 M) (Merck, Germania), in una provetta Falcon e agitati per 10 s sotto un flusso di N<sub>2</sub> per evitare l'ossidazione dei composti. La soluzione è stata riscaldata sotto agitazione (ARGOLab M3-D, Italia) per 10 minuti a 70 °C a bagnomaria. Dopo la completa dissoluzione dell'olio, sono stati aggiunti 3 mL di H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 5% (Merck, Germania), in metanolo (Merck, Germania), e la soluzione è stata riscaldata a 70 °C per altri 5 minuti. Quindi sono stati aggiunti 2 mL di una soluzione satura di NaCl (Merck, Germania) e 2 mL di esano (Merck, Germania), e il falco è stato centrifugato a 4000 rpm per 10 min con una centrifuga SL16R (Thermo Fischer, USA). Il surnatante è stato raccolto, diluito 1:2 e trasferito in una fiala per l'analisi GC-MS [44]. L'analisi FAME è stata condotta utilizzando un gascromatografo (sistema GC Agilent 7890A) dotato di una colonna ZB-FAME (30 m × 0,25 mm ID × 20 µm; Zebron Phenomenex) e un rivelatore di massa quadrupolare (Agilent 5975 C VL MSD). L'elio è stato utilizzato come gas di trasporto con un flusso di 0,4 mL/min, il volume di iniezione era di 1 µl utilizzando la modalità split con un rapporto di splittaggio di 20:1 a 240 °C. La temperatura dell'iniettore è stata mantenuta a 250°C. La colonna è stata inizialmente mantenuta a 100 °C per 2 min e poi la temperatura è stata poi aumentata a 240 °C a 5 °C/min, e mantenuta costante per 8 min [44]. L'analizzatore di massa ha funzionato in modalità di ionizzazione elettronica con un'energia di ionizzazione di 70 eV e in modalità di scansione completa tra 50 e 600 a.m.u.. Le temperature della sorgente e del quadrupolo sono state mantenute rispettivamente a 230 °C e 150 °C. La quantificazione di FAME è stata determinata mediante curve di calibrazione preparate utilizzando una miscela standard di FAME e utilizzando il software ChemStation e il NIST08 Librar.

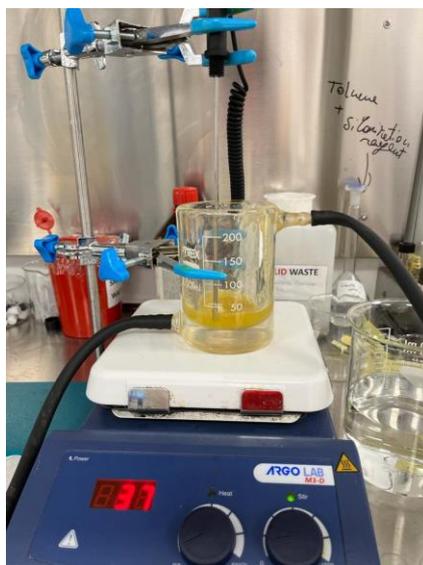
### 3.4 Processo di separazione dell'olio di riso dalla cera di riso

Una volta ottenuto il burro di riso è stata utilizzata una centrifuga Thermo Scientific™ SL 16 Centrifuge Series, commercializzata da Fisher scientific, per separare la fase oleosa dalle cere presenti nell'estratto. Il campione è stato prima riscaldato con una piastra a 40 °C (**Fig 3.6**) e poi inserito in centrifuga alla temperatura di 40 °C, con una velocità di rotazione di 5000 rpm per 20 minuti.



**Fig 3.6** : preparazione del campione per centrifugazione a 40 °C, riscaldato su piastra.

Successivamente le cere, sono state purificate nuovamente, in quanto queste contenevano ulteriori tracce di olio. Per fare questo sono state prima riscaldate per qualche ora a 50 °C, utilizzando un reattore incamiciato da 100 mL (**Fig 3.7**) e successivamente il campione è stato filtrato utilizzando una pompa a vuoto a 360 bar. Infine le cere filtrate sono state lavate con etanolo per rimuovere ulteriormente olio residuo.



**Fig 3.7** : reattore da 100mL incamiciato per riscaldare il campione a 50°C

### 3.5 Calorimetria Differenziale a Scansione (DSC)

La calorimetria differenziale a scansione, nota anche con l'acronimo DSC (dall'inglese Differential Scanning Calorimetry) è una tecnica ampiamente utilizzata per caratterizzare il comportamento termico di materiali alimentari e non. Tramite questa tecnica è possibile analizzare le trasformazioni di fase del burro di riso. Viene stabilito un riscaldamento o un raffreddamento programmato del prodotto e viene misurato il flusso di calore prodotto in seguito a queste transizioni di fase. Se tale valore risulta essere negativo il processo è esotermico e si ha lo sviluppo di calore, mentre se è positivo il processo è endotermico e avviene con assorbimento di calore. La misura differenziale del sistema è legata al comportamento termico proprio del campione in esame. La calorimetria differenziale a scansione misura quindi nel tempo la temperatura, il flusso di calore e, integrando quest'ultimo, l'entalpia delle transizioni. L'apparecchiatura utilizzata è del tipo DSC della Mettler Toledo, utilizza azoto per mantenere inerte l'atmosfera interna alla camera dove sono collocati i due contenitori (Fig 3.8)

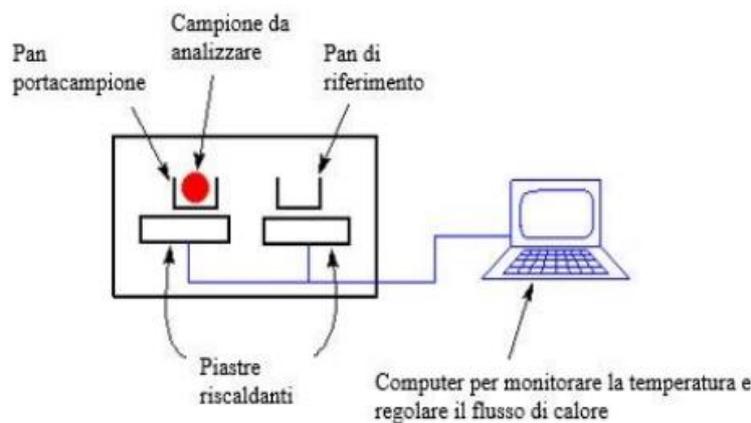


Figura 3.8: Schema di un'apparecchiatura DSC

Ci sono due recipienti, uno contenente il campione da analizzare, mentre l'altro è il recipiente di riferimento, che per le prove sperimentali svolte era vuoto. La quantità di materiale necessario per una prova è molto bassa, in genere sono sufficienti pochi mg di prodotto. Nella camera contenente i due recipienti l'atmosfera è mantenuta inerte tramite l'uso azoto. Sono presenti due riscaldatori ed un sistema di raffreddamento esterno, entrambi atti a mantenere i due contenitori alla stessa temperatura. Il computer controlla che il flusso di calore rimanga costante per tutta la durata dell'esperimento e, soprattutto, che i due recipienti, ognuno con la propria inerzia termica, si scaldino con lo stesso flusso di calore. La quantità di calore in più richiesta è il parametro che viene misurato in un esperimento DSC. I dati prodotti vengono raccolti e inviati ad un elaboratore che mediante un software (TA Universal Analysis) li trasforma per produrre l'output. Il risultato finale è rappresentato da un termogramma, che riporta il flusso di calore in funzione del tempo o della temperatura. Le analisi DSC sono state svolte preriscaldando il campione fino allo scioglimento, il campione è stato poi prelevato tramite una pipetta pasteur e inserito nel crogiolino di alluminio in forma liquida, dove poi si è solidificato. Per la cera di riso sono stati utilizzati 31 mg di prodotto, il quale è stato riscaldato e raffreddato con dei cicli di temperatura che vanno da 0 °C a 90 °C e da 90 °C a 0 °C, con una velocità di riscaldamento e raffreddamento di 2 °C/min, 5 °C/min e 10 °C/min. Mentre per l'olio di riso sono stati utilizzati 21.2 mg di composto e la temperatura è stata variata da 5 °C a 80 °C, sempre con una velocità di 2 °C/min, 5 °C/min e 10 °C/min

### 3.6 Diffrattometria a raggi X

L'analisi SAXS nota anche come "Small-Angle X-ray Scattering" è un metodo standard non distruttivo e altamente versatile per studiare la struttura su scala nanometrica di qualsiasi tipo di materiale, dai nuovi nanosistemi compositi alle macromolecole biologiche. È possibile ottenere parametri come dimensioni medie delle particelle, forme e distribuzioni, porosità e grado di cristallinità dei materiali nonché mappe di densità elettronica con precisione nanometrica. I materiali possono essere solidi, liquidi o addirittura presentare proprietà simili ai gas come ad esempio gli aerosol. Il setup DSC/SAXS presente sulla beamline linea SAXS al Sincrotrone di Trieste (Italia) è stata utilizzata per la misurazione simultanea del DSC, SAXS e WAXS. Un detector Pilatus3 1M (Dectris DH) è stato utilizzato per rilevare il segnale SAXS ( intervallo =  $0.76 < q < 57.5 \text{ \AA}^{-1}$  ) mentre un detector Pilatus 100k è stato utilizzato per la regione del WAXS (intervallo=  $63 < q < 163 \text{ \AA}^{-1}$ ). L'energia del raggio era di 8 keV (1.54 Å di lunghezza d'onda), la calibrazione è stata eseguita con il benato d'argento (d-spacing 58.38 Å) per il SAXS e acido p-bromobenzoico per la regione WAXS. Come portacampione è stato utilizzato un capillare di quarzo di  $1.4 \pm 0.1$  mm di diametro e circa 80 mm di lunghezza, il quale è stato inserito nel setup; come riferimento è stato utilizzato un capillare vuoto della stessa dimensione. I capillari sono stati riempiti con campioni fusi a 50 °C e dopo essere stati posizionati nella configurazione, sono stati portati alla temperatura di 70 °C, successivamente raffreddati a 20 °C e mantenuti a tale temperatura per due ore. Successivamente la temperatura è stata aumentata a 25 °C ad una velocità di 1 °C/min, mantenuta per 15 min e poi riportata a 20 °C per almeno un'altra ora. I diffrattogrammi ottenuti a seguito dell'elaborazione delle immagini 2D sono stati analizzati utilizzando il software Origin 2022.

I valori ottenuti dall'analisi SAXS sono stati elaborati con il software Origin2022. I valori dei picchi,  $q$  (1/nm) sono stati ottenuti con il comando Peak Analyzer e il d-spacing è stato calcolato secondo l'equazione di Bragg (3.5) :

$$d \text{ (nm)} = \frac{2\pi}{q \left(\frac{1}{\text{nm}}\right)} \quad (3.5)$$

## 4 Risultati

### 4.1 Caratterizzazione matrice

In **Tab. 4.1** vengono riportati i risultati relativi alla caratterizzazione della matrice, ottenuti attraverso i metodi descritti al paragrafo 3.1.1. Le analisi vengono condotte in triplicato pertanto di ciascun valore percentuale si ha anche un'idea della deviazione standard.

**Tab. 4.1** Caratterizzazione matrice

	<b>Valore medio</b>	<b>Deviazione standard</b>
<b>Umidità</b>	8.11	0.06
<b>Proteine</b>	13.73	0.28
<b>Lipidi</b>	14.27	1.04
<b>Ceneri</b>	8.36	0.1

I valori ottenuti sono perfettamente in linea con i dati reperiti in letteratura in termini di valore medio , come è possibile notare in **Tab. 4.2**

**Tab. 4.2** Caratterizzazione matrice, dati di letteratura

	<b>Valore medio</b>	<b>Riferimento</b>
<b>Umidità</b>	10-15	Begum et al. (2015) [47]
<b>Proteine</b>	11-17	Begum et al. (2015) [47]
<b>Lipidi</b>	6-14	Begum et al. (2015) [47]
<b>Ceneri</b>	8-17	Begum et al. (2015) [47]

## 4.2 Estrazione con CO<sub>2</sub> supercritica

La Fig 4.1 mostra la pula di riso prima del processo di estrazione, la Fig 4.2 il prodotto ottenuto in seguito all'estrazione effettuata nell'azienda Exenia Group S.R.L. Nelle Fig. 4.3 e 4.4 sono riportati gli stessi campioni visionati al microscopio ottico a luce polarizzata.



Fig 4.1: pula di riso prima dell'estrazione



Fig 4.2: burro di riso dopo estrazione

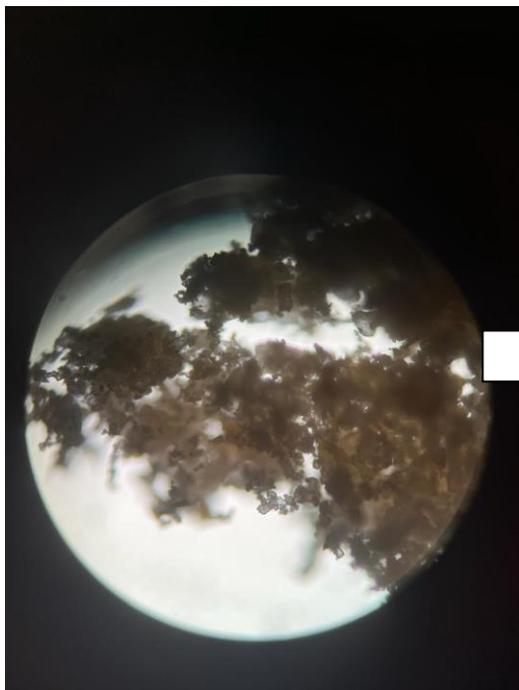


Fig 4.3: pula di riso prima dell'estrazione, al microscopio ottico a luce polarizzata.



Fig 4.4: burro di riso dopo l'estrazione, al microscopio ottico a luce polarizzata.

La resa del processo è stata ottenuta utilizzando l'equazione 4.1 :

$$resa \% = \frac{\text{peso dell'olio estratto con } SCCO_2(g)}{\text{peso dell'olio estratto con il metodo soxhlet } (g)} 100 \quad (4.1)$$

In seguito all'estrazione con CO<sub>2</sub> supercritica sono stati ottenuti 796 g di burro di riso. Con il metodo Soxhlet, utilizzando l'etere di petrolio, è stato ottenuto un quantitativo di lipidi del 15 %. La resa è del 40.7 %.

Dalla letteratura [48] emerge che la resa e il recupero sono influenzati dall'interazione tra pressione e temperatura. In genere a basse pressioni la densità della CO<sub>2</sub> può essere diminuita da un aumento della temperatura e questo porta alla diminuzione della solubilità dell'olio nella CO<sub>2</sub>. Al contrario ad alte pressioni, la diminuzione della densità della CO<sub>2</sub> con un aumento della temperatura può provocare un aumento della pressione di vapore dell'olio.

### 4.3 Caratterizzazione dell'olio di riso e composizione degli acidi grassi

Il burro di riso estratto presenta una percentuale di sostanze grasse del 99%, mentre le altre sostanze sono presenti in un quantitativo trascurabile o addirittura assente. Questi risultati dimostrano che la CO<sub>2</sub> supercritica può estrarre selettivamente le sostanze non polari in queste condizioni di processo. La composizione degli acidi grassi è stata svolta come descritto nel 3.3 di materiali e metodi. I risultati emersi dall'analisi sono riportati nella **tabella 4.3**:

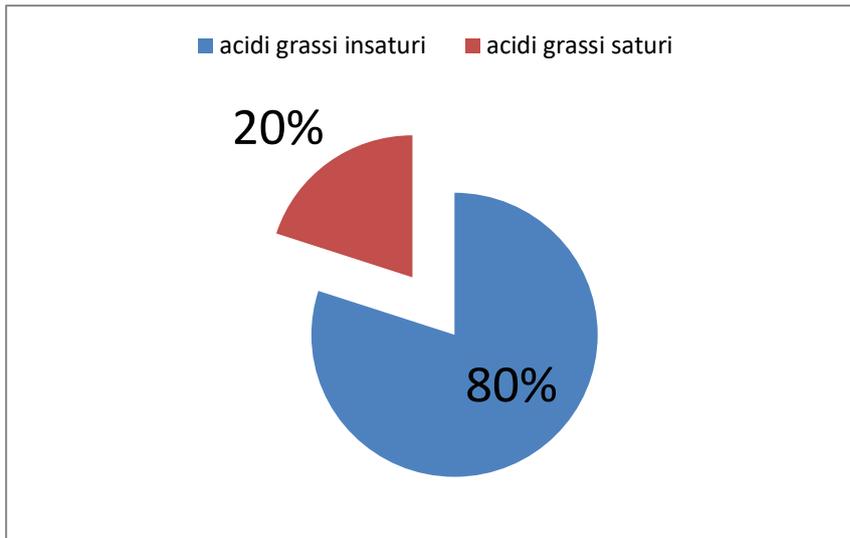
**Tabella 4.3** : Composizione acidi grassi del burro di riso estratto

Acidi grassi	%
C14:0 acido Miristico	0.27±0.01
C16:0 acido Palmitico	15.5±0.5
C16:1 acido Palmitoleico	0.13±0.01
C18:0 acido Stearico	0.13±0.01
C18:1 acido Oleico	42.4±1.7
C18:2 acido Linoleico (omega-6)	35.1±1.4
C18:3 acido $\gamma$ -Lineleico (omega-6)	0.86±0.03
C18:3 acido $\alpha$ -Linoleico (omega-3)	1.0±0.03
C20:1 acido Eicosenoico	0.58±0.02
C22:0 acido Beenico	0.96±0.04
C20:3 acido Eicosatrienoico (omega-6)	0.49±0.01
C24:0 acido Lignocerico	0.97±0.04

Come mostrato nella **Tabella 4.3** il burro di riso estratto è composto dall' 80 % in peso acidi da grassi insaturi, e dal 20% in peso da acidi grassi saturi (vedi **Fig 4.5**) . La percentuale di acidi grassi saturi è responsabile della texture del materiale ottenuto, infatti il prodotto ottenuto è un materiale semisolido quando si trova a temperatura ambiente.

L'acido oleico è l'acido grasso maggiormente presente, infatti corrisponde a circa il 42% dell'intera composizione. L'acido oleico contiene un doppio legame C-C nella catena alifatica ed è uno dei principali acidi grassi monoinsaturi. Il 20% degli acidi grassi saturi presenti nel campione sono omega-3 e omega-6, acidi grassi polinsaturi che si differenziano per la localizzazione del primo doppio legame nella catena alifatica.

Nella serie degli Omega-3, nel campione è presente solo l'acido  $\alpha$ -linolenico , mentre l'acido linoleico, l'acido  $\gamma$ -linolenico e l'acido eicosatrienoico sono i rappresentanti della serie degli Omega-6. Rispetto ad altri, l'olio estratto in questo lavoro presenta una composizione di acidi grassi che si abbina perfettamente alle composizioni trovate in letteratura, dove l'acido oleico è sempre il più abbondante tra il 38,4% e il 42,3% seguito dall'acido linoleico e palmitico. [49].

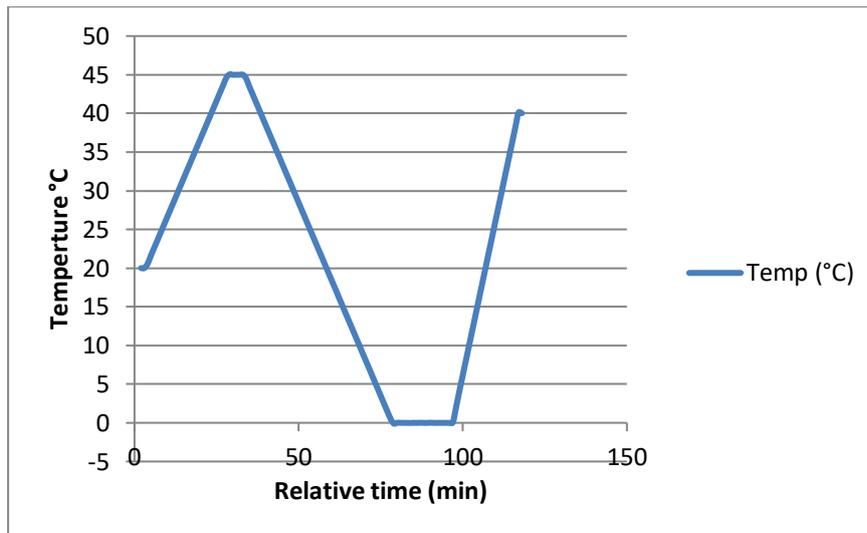


**Fig 4.5** :percentuale di acidi grassi saturi e insaturi, presenti nell'olio di riso.

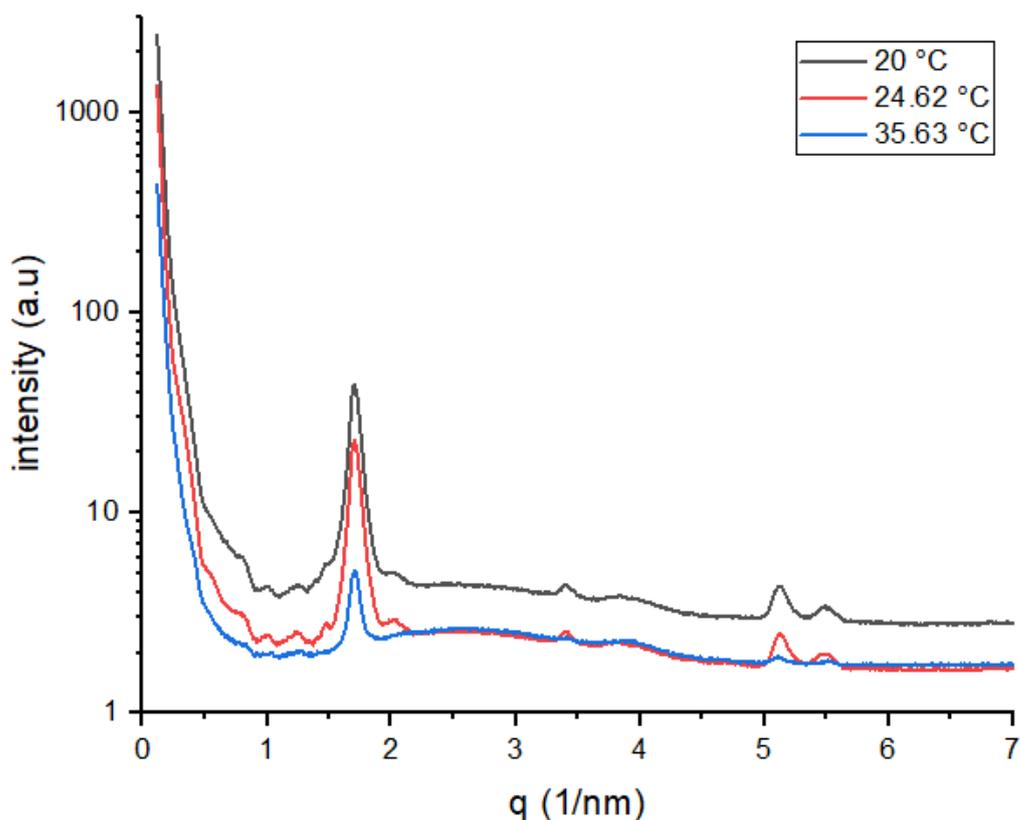
## 4.4 Diffrazione a raggi X e DSC

### 4.4.1 Olio di riso centrifugato a 40 °C

Il campione olio di riso centrifugato è stato ottenuto in seguito alla centrifugazione del burro di riso, a 5000 rpm e a 40 °C (come descritto in materiali e metodi paragrafo 3.4) Successivamente è stato inserito in un capillare e mantenuto a riposo per qualche giorno. L'analisi SAXS è stata svolta con una velocità di 1°C/min come riportato in **Fig 4.6**. Il profilo di temperatura tempo dell'intera analisi SAXS è riportato in **Figura 4.7**.



**Fig 4.6:** Profilo temperatura-tempo, analisi SAXS.



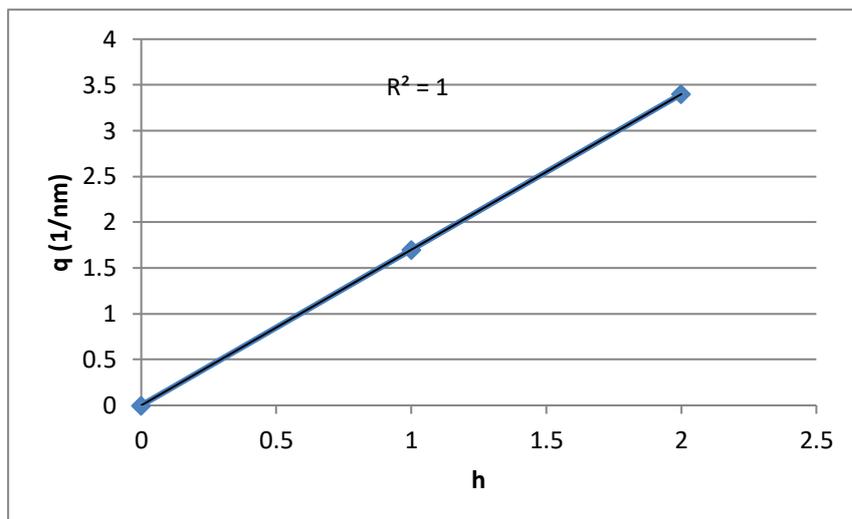
**Fig 4.7:** Modelli di raggi X, regione SAXS del campione olio di riso, durante il riscaldamento.

A 20 °C e a 24 °C i trigliceridi contenuti nell'olio di riso costituiscono 3 fasi diverse come mostrato in **tabella 4.4**, nella quale vengono riportati i valori di q e d calcolati come descritto nel paragrafo 3.5 di materiali e metodi e le varie fasi individuate :

**Tabella 4.4:** valori di q e d della regione SAXS, a 20 °C e 24 °C, durante il riscaldamento :

20 e 24 °C	fase 1 olio	fase 2 olio	fase 3 olio
q [1/nm]	1.7	2.01	5.49
	3.4		
	5.13		
d [nm]	3.69	3.12	1.14
	1.84		
	1.22		

In particolare per accreditare l'ipotesi che i picchi ad un valore di q di 1.7 nm, 3.4,nm e 5.13 nanometri costituiscano una sola fase è possibile fare riferimenti agli indici di Miller, ai valori di q trovati e al valore  $R^2$  (**Fig. 4.8**).



**Fig 4.8** : grafico a dispersione da cui si evince la presenza di una sola fase.

Come detto precedentemente il burro di riso è costituito dall'80% di acidi grassi insaturi e dal 20% di acidi grassi saturi. In particolar modo è presente maggiormente l'acido oleico con un quantitativo del 42.4%. I trigliceridi con acidi grassi insaturi alla posizione sn-2 e acidi grassi saturi nelle altre posizioni (Sat-oleico-sat) sono i principali componenti della maggior parte dei grassi vegetali, ampiamente utilizzati come anche il burro di riso o di cacao. Nel caso dell'acido oleico, la presenza de doppio legame con l'inflessibilità kink, ovvero un piegamento della struttura di circa 30 °C attorno al doppio legame, fornisce un maggiore ingombro sterico rispetto a quella degli acidi grassi saturi, che porta alla formazione di strutture particolari per consentire l'impacchettamento di acidi grassi saturi e insaturi. Le strutture polimorfiche di tutti i trigliceridi sono simili.[26]. In questo caso specifico, il d-spacing ottenuto di 3.7 nm nella seconda fase dei trigliceridi farebbe pensare alla presenza del polimorfo  $\beta'2L$ , in genere strutture con questo polimorfismo presentano un impacchettamento orto rombico e perpendicolare, ovvero le catene adiacenti non sono al passo l'una con l'altra e quindi non si impacchettano in maniera ravvicinata. [ 26].

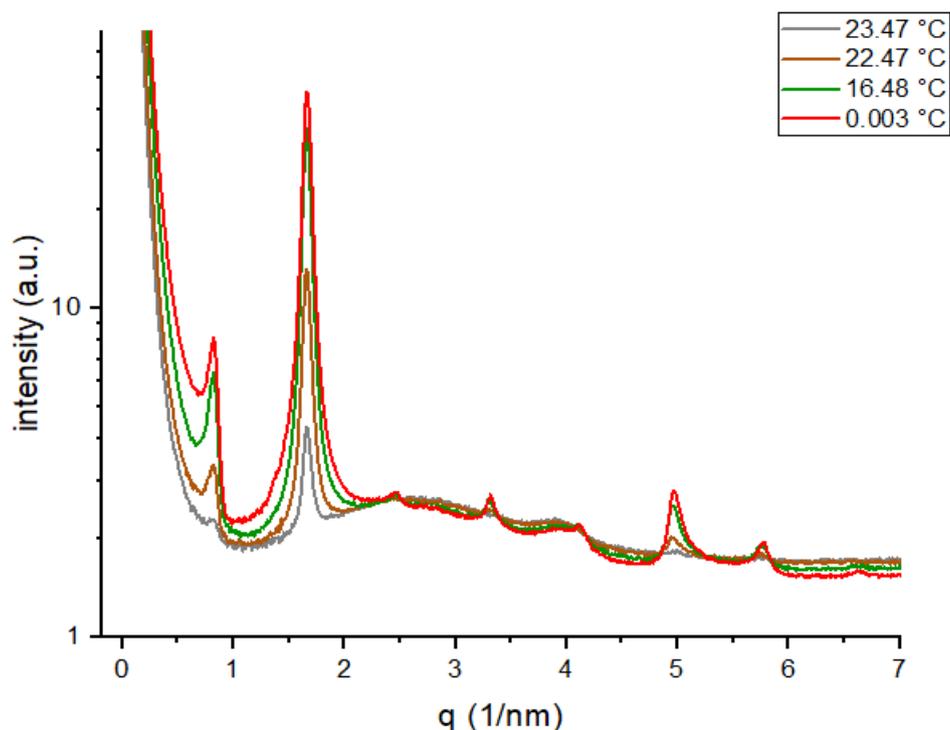
Durante questo step di riscaldamento del campione, quello che si nota è che giunti alla temperatura di 35.63 °C l'unico picco che continua ad essere visibile è quello ad un valore di q di 1.7 1/nm, quindi scaldando il campione si ha la presenza di una sola fase di trigliceridi, come mostrato in **tabella 4.5** a differenza delle temperature più basse.

Il d-spacing di 3.7 nm di tale picco, fa pensare che l'unica fase rimasta dei trigliceridi possa fare riferimento alla presenza del polimorfo  $\beta'2L$ . Superata la temperatura di 35 °C non sono più visibili dei picchi, ciò indica che la temperatura di fusione dei trigliceridi presenti nell'olio di riso è di circa 35 °C.

**Tabella 4.5** : valori di q e di dati SAXS, a 35 °C, durante il riscaldamento

35 °C	Fase 1 olio
q (1/nm)	1.7
d (nm)	3.69

Successivamente, durante lo step di raffreddamento del campione che è avvenuto sempre con una velocità di 1°C/min, sono stati ottenuti i seguenti valori SAXS, mostrati in **Figura 4.9**.

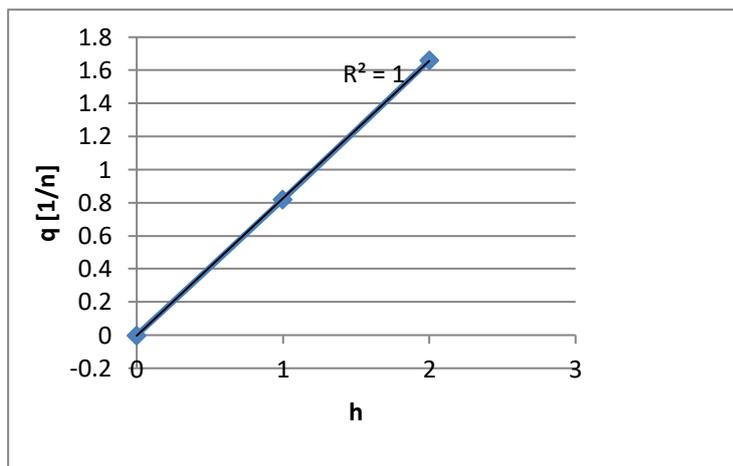


**Fig 4.9** : Modelli di raggi X, regione SAXS del campione olio di riso, durante il raffreddamento.

Alle temperature di 23.47 °C e 24.47 °C sono presenti 2 picchi, a dei valori di  $q$  rispettivamente di 0.82 1/nm e 1.66 1/nm, con dei valori di  $d$  rispettivamente di 7.65 nm e 3.78 nm, come riportato in **tabella 4.6** . Questi due picchi costituiscono una sola fase, come mostrato nella **Figura 4.10** l'elevato valore di  $d$ -spacing ottenuto e la tipologia di picco presente ( il primo più basso e il secondo più alto ) potrebbe riferirsi alla presenza di una forma cristallina di tipo  $\gamma$ , forma instabile, infatti come si può notare si è formata solo in seguito ad un raffreddamento immediato del campione. In genere questa forma cristallina presenta una tripla struttura a catena, infatti le molecole di acido oleico presenti si impacchettano in delle sottocelle esagonali. .[26].

**Tabella 4.6** : valori di  $q$  e di dati SAXS, a 23.47 e 24.47 °C, durante il raffreddamento.

23,47 °C	24,47 °C	Fase 1 olio
$q$ [1/nm]		0.82
		1.66
$d$ [nm]		7.65
		3.78

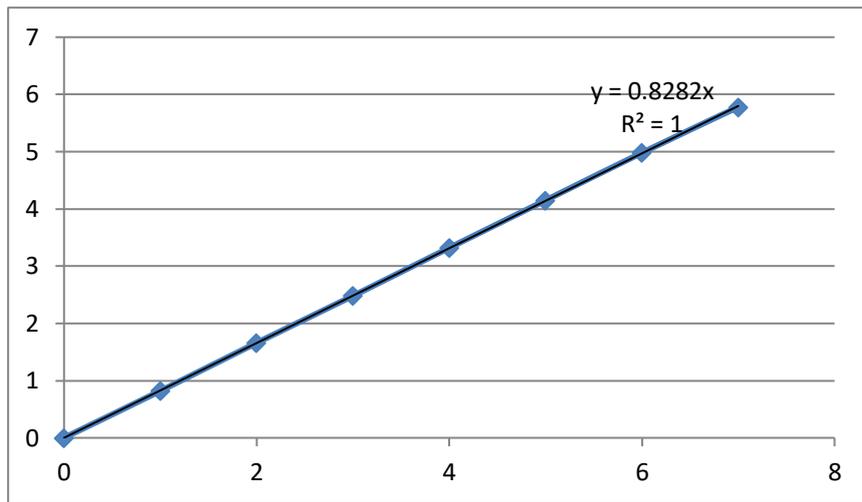


**Fig 4.10:** grafico a dispersione da cui si evince la presenza di una sola fase

Continuando a raffreddare il campione fino alla temperatura di 0 °C , si può notare la presenza di 7 picchi diversi , come mostrato in **Tabella 4.7**, questi costituiscono una sola fase dei trigliceridi dell'olio di riso, come mostrato in **Figura 4.11** .

**Tabella 4.7 :** valori di q e di dati SAXS, a 16 e 0 °C, durante il raffreddamento

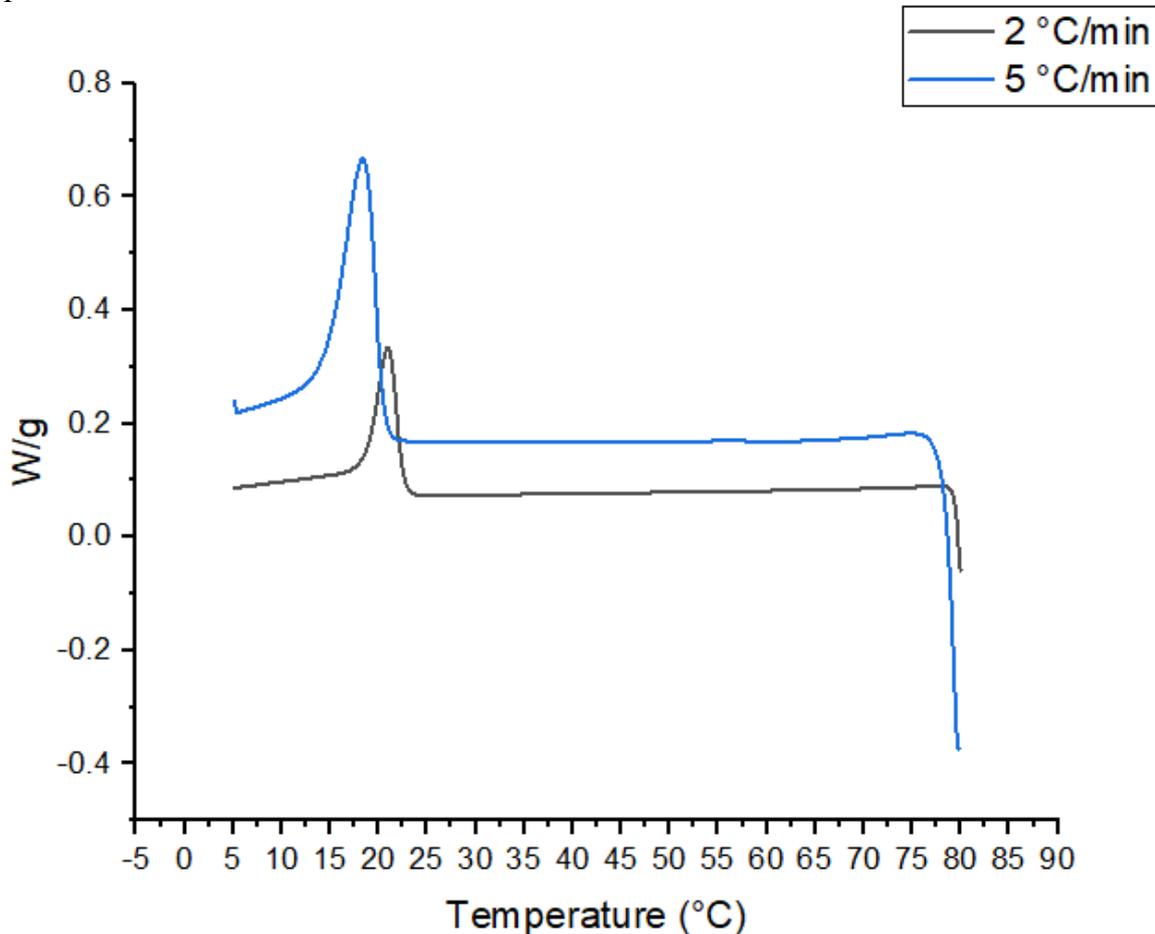
16,48 °C	0°C	fase 1 olio
q [1/nm]		0.82
		1.66
		2.48
		3.32
		4.15
		4.98
		5.78
d [nm]		7.66
		3.78
		1.89
		1.51
		1.26
		1.08



**Fig 4.11:** grafico a dispersione da cui si evince la presenza di una sola fase

#### 4.4.2 DSC del campione olio di riso centrifugato a 40 °C

Per studiare il comportamento termico del campione olio di riso centrifugato a 40 °C è stata effettuata un'analisi termica DSC. Nella **Fig 4.12** sono riportati i due cicli di raffreddamento, rispettivamente a -2°C/min e -5°C/min.

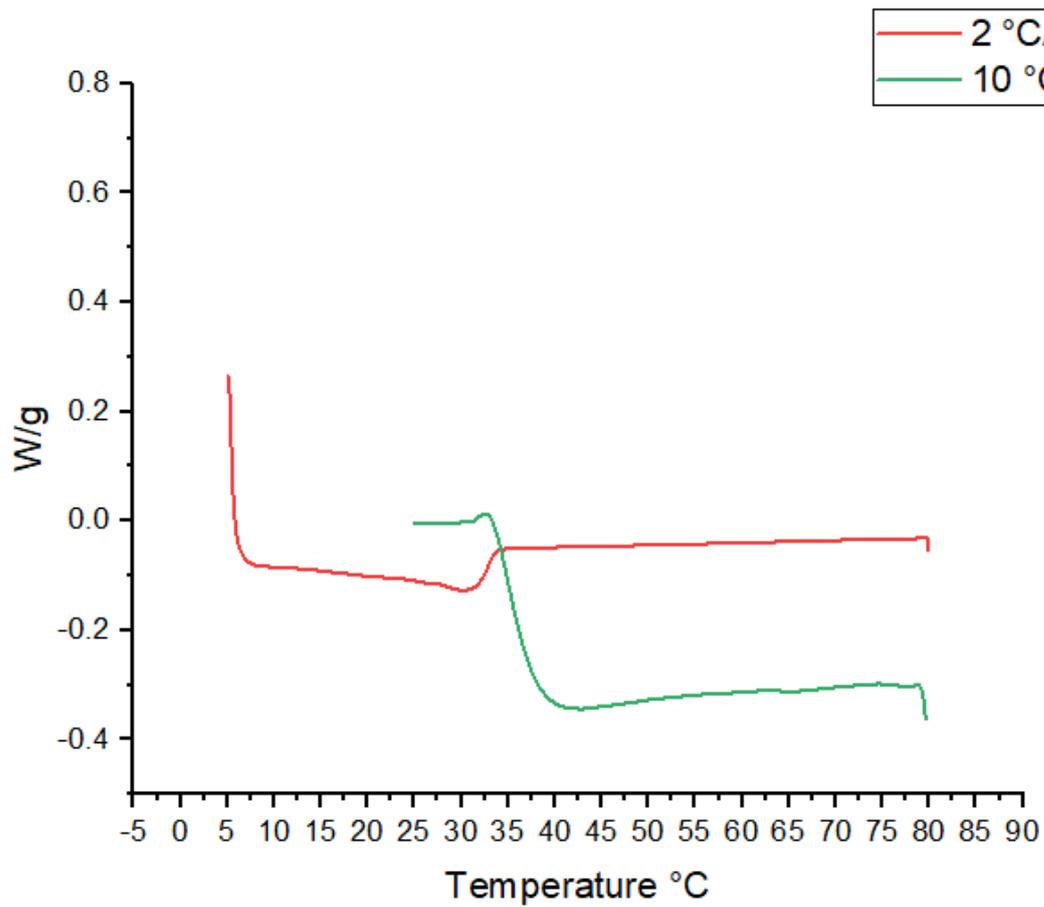


**Fig 4.12** : DSC olio di riso centrifugato a 40°C, raffreddamento.

I picchi rivolti verso l'alto indicano un processo esotermico e la temperatura di cristallizzazione risulta essere pari a 21 °C nel caso di -2°C/min e di 18 °C nel caso di -5°C/min. Il flusso di calore prodotto è minore nel primo caso e maggiore nel riscaldamento più veloce. Entrambe le curve fanno riferimento alla cristallizzazione dei trigliceridi presenti nell'olio, la differenza che quando il raffreddamento è più veloce il picco appare più spostato verso sinistra e il flusso di calore prodotto è più elevato. Quindi velocità di raffreddamento maggiori portano ad una cristallizzazione più rapida e a temperature inferiori. Queste analisi DSC sono in accordo con quanto detto nell'analisi SAXS del campione, durante il raffreddamento, in quel caso però essendo il campione raffreddato con una velocità di un 1°C/min si ottiene una temperatura di cristallizzazione di circa 23 °C.

Nella **Figura 4.13** è riportato il processo di riscaldamento del campione da 5 a 80 °C con un riscaldamento di 2°C/min e da 25 a 80°C con un riscaldamento di 10°C/min. Il picco verso il basso è endotermico e indica la fusione. Nel caso di riscaldamento rapido la  $T_m$  è di circa 35°C temperatura alla quale i trigliceridi presenti nell'olio di riso fondono. Anche in questo caso le analisi DSC sono in accordo con quanto trovato nel SAXS del campione olio di riso, infatti durante il riscaldamento di 1 °C/min è stata ottenuta una Temperatura di fusione di circa 36 °C, inoltre la presenza della fase  $\gamma$  durante la fase di raffreddamento dell'olio di riso è

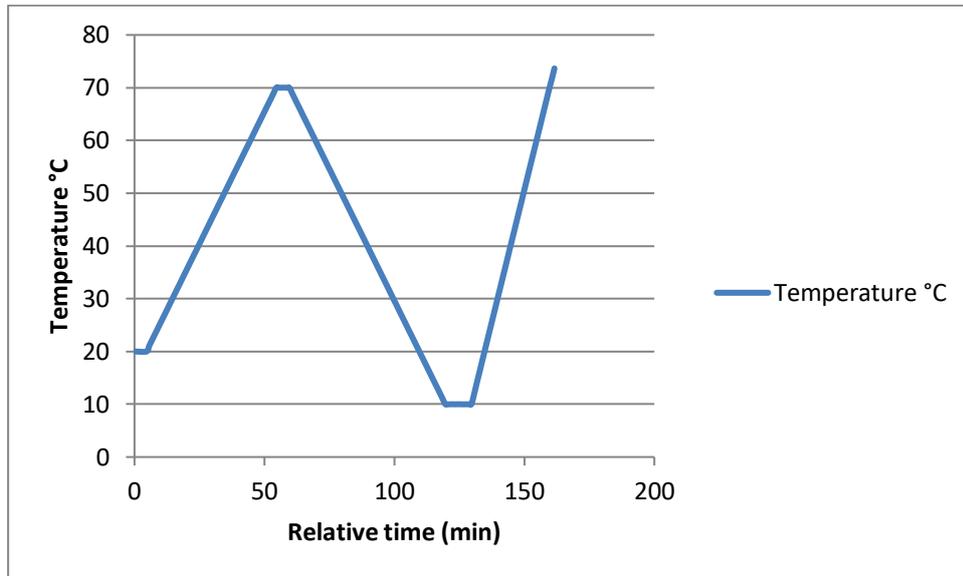
confermata dalla temperatura di fusione trovata nell'analisi termica effettuata, poiché questa è tipica del polimorfo  $\gamma$ . [50]



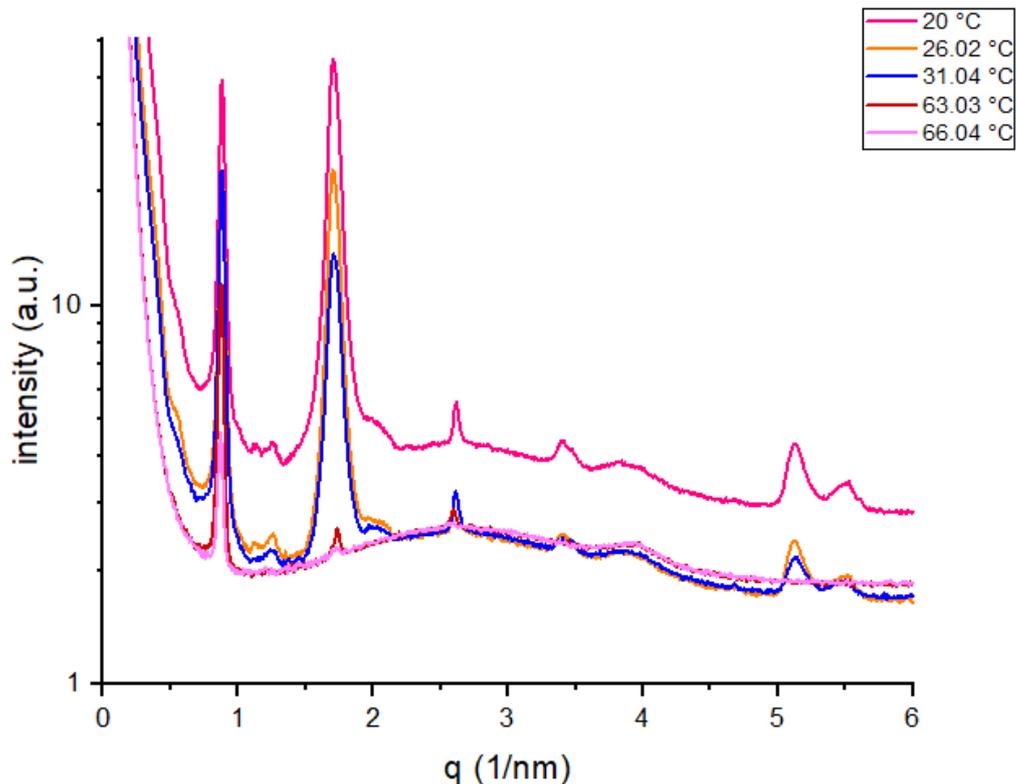
**Fig. 4.13** : analisi DSC olio di riso centrifugato a 40°C, riscaldamento.

### 4.4.3 Cera di riso centrifugata a 40 °C

Il campione cera di riso centrifugata è stato ottenuto in seguito alla centrifugazione del burro di riso, a 5000 rpm e a 40 °C. Successivamente è stato inserito in un capillare e mantenuto a riposo per qualche giorno. Il profilo temperatura tempo dell'analisi SAXS è riportata in **Fig 4.14**. I valori dei dati SAXS durante il primo riscaldamento che è avvenuto con una velocità di 1°C/min sono riportati in **Figura 4.15**



**Fig 4.14** : profilo temperatura tempo, analisi SAXS

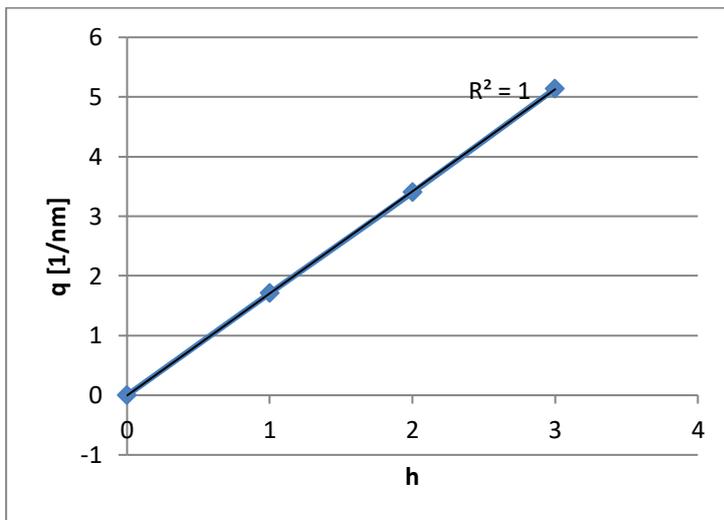


**Fig 4.15** : Modelli di raggi X, regione SAXS del campione cera di riso, durante il riscaldamento.

In seguito alla centrifugazione ci si aspettava di ottenere della cera di riso pura, ovvero senza la presenza di trigliceridi. Dalle analisi SAXS però è emerso che in realtà non si è riusciti a purificare del tutto il campione. Questo indica che la temperatura utilizzata durante la centrifugazione non è stata sufficiente a separare i due composti e probabilmente ci saranno dei trigliceridi che fondono a temperatura più elevata, 40-45 °C. Alla temperatura di 20 °C, 26 °C e 31 °C si ha la presenza di ben 4 fasi diverse come riportato in **Tabella 4.8**, di cui 1 appartiene alle cere e le altre 3 appartengono all'olio di riso. I picchi ad un valore di q di 1.71 1/nm e 3.4 1/nm fanno parte della stessa fase dell'olio (**Fig. 4.16**), così come la presenza del picco a q pari 2.01 1/nm e del picco q pari a 5.5 1/nm costituiscono due fasi diverse, in maniera del tutto analoga al caso di riscaldamento dell'olio di riso centrifugato a 40 °C. La fase 1 appartenente alle cere è stata definita tale poiché questi picchi persistono fino a temperature elevate di circa 66 °C (**Tabella 4.9**), e (**Figura 4.17**) poiché le cere essendo costituite da molecole molto più lunghe rispetto agli acidi grassi dell'olio, hanno una temperatura di fusione molto più elevata. Inoltre i valori del d-spacing ottenuti in questa analisi indicano un arrangiamento cristallino della sottocella di tipo orto rombico ovvero una configurazione  $\beta'$  della cera. Nel SAXS della cera i valori dei picchi ottenuti sono spazati tra di loro e questo è associato alla composizione molecolare e alla morfologia fibrosa della cera di riso. Questo indica una crescita cristallina anisotropica lungo le direzioni perpendicolari e parallele ai piani lamellari. Tale crescita è una conseguenza di forti interazioni di Van Der Waals, tra le lunghe catene idrocarburiche e i gruppi funzionali polari (esteri) presenti nella cera. [51]

**Tabella 4.8** : valori di  $q$  e  $d$ , dati SAXS, a 20 , 26 e 31 °C, durante il riscaldamento.

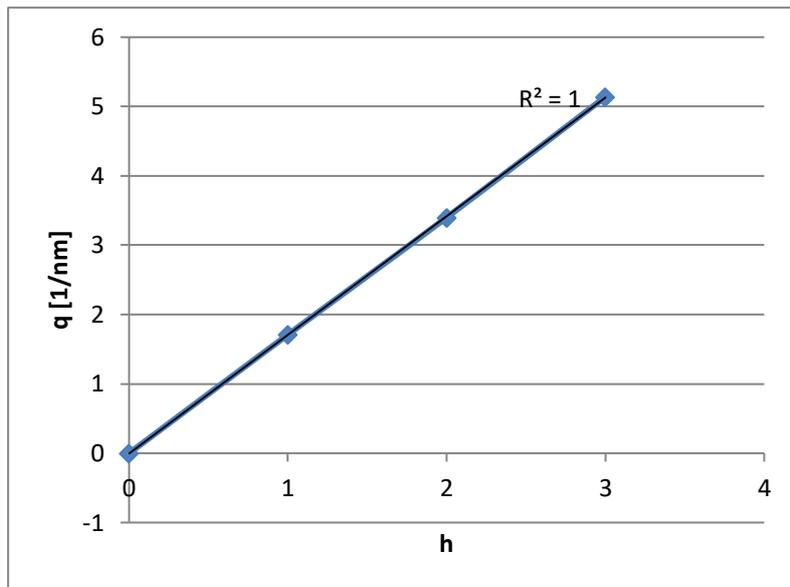
20 °C 26°C 31 °C	fase 1 cera	fase 1 olio	fase 2 olio	fase 3 olio
$q$ [1/nm]	0.88	1.71	2.01	5.5
	1.74	3.4		
	2.61	5.14		
$d$ [nm]	7.14	3.67	3.12	1.14
	3.61	1.85		
	2.4	1.22		



**Fig 4.16**: grafico a dispersione da cui si evince la presenza di una sola fase di olio

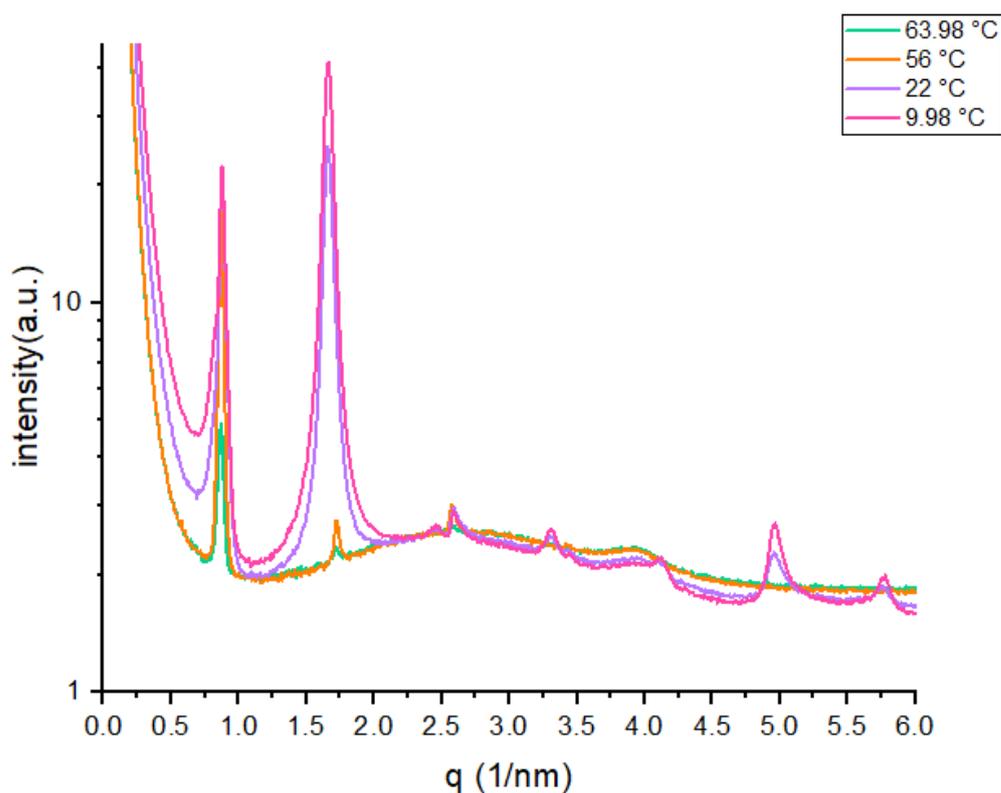
**Tabella 4.9** : valori di  $q$  e  $d$ , dati SAXS, a 63 e 66 °C, durante il riscaldamento.

63 °C 66°C	1 fase cera
$q$ [1/nm]	0.88
	1.74
	2.61
$d$ [nm]	7.13
	3.61
	2.40



**Fig 4.17:** grafico a dispersione da cui si evince la presenza di una sola fase di cera.

Le analisi SAXS del campione cera di riso centrifugata a 40 °C durante lo step di raffreddamento avvenuto ad una velocità di 1°C/min sono riportate nella **Figura 4.18**

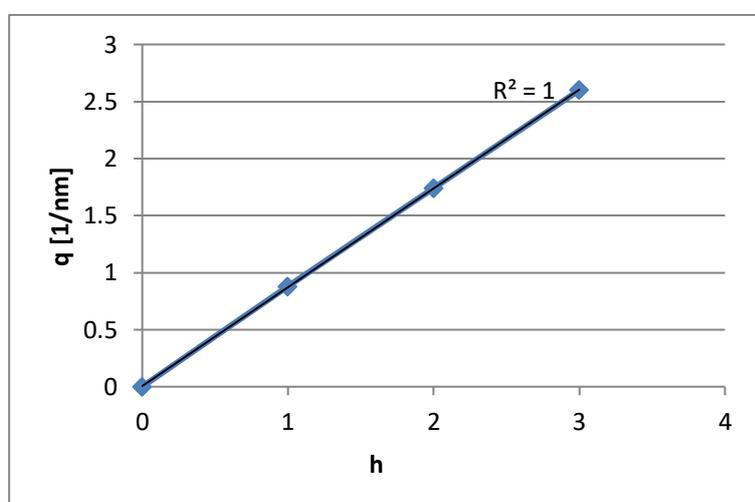


**Fig 4.18** : Modelli di raggi X, regione SAXS del campione cera di riso, durante il raffreddamento.

Ovviamente anche durante lo step di raffreddamento si ha la presenza di cera e olio di riso, in particolare alla temperatura di 63 °C e 56 °C si ha la presenza di una sola fase appartenente alla cera di riso ( data l'elevata temperatura ) come mostrato in **Tabella 4.10** e in **Figura 4.19** che presentano dei valori di q e d analoghi allo step di riscaldamento del campione

**Tabella 4.10** : valori di d e q, dati SAXS durante lo step di raffreddamento.

63 °C 56°C	fase 1 cera
q [1/nm]	0.88
	1.74
	2.61
d [nm]	7.14
	3.61
	2.4

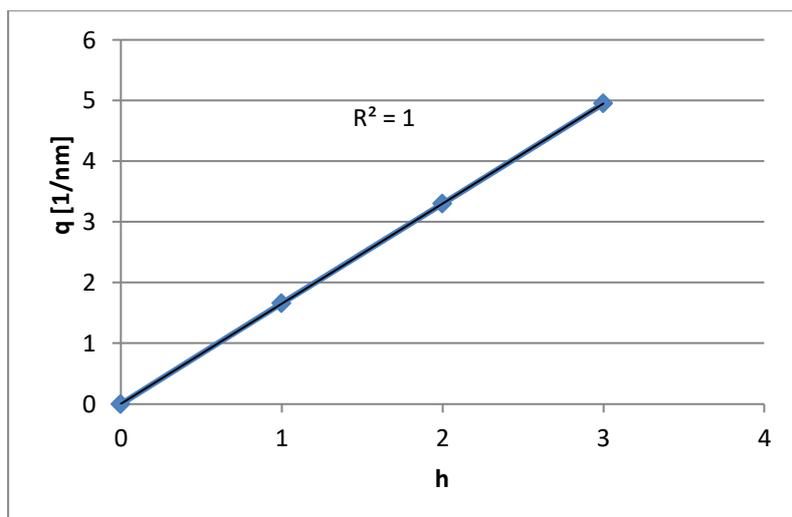


**Fig 4.19**: grafico a dispersione che indica la presenza di una sola fase di cera.

A 22°C però si nota la presenza di diversi picchi, alcuni appartenenti alle cere di riso che creano sempre un'unica fase in maniera analoga al caso precedente, e la formazione di altre due fasi intermedie appartenenti all'olio di riso con dei valori di q e d diversi rispetto al caso in cui avevamo il campione contenente l'olio di riso centrifugato a 40 °C. In particolare la fase 1 dell'olio di riso (**Figura 4.20**) presenta un d-spacing di 3.7 nm che potrebbe riferirsi alla formazione di una forma cristallina del tipo  $\beta'2L$ . I valori di d e q a 22 °C sono riportati in **Tabella 4.11**.

**Tabella 4.11** : valori di d e q, dati SAXS durante lo step di raffreddamento.

22 °C	1 fase cere	1 fase olio	2 fase olio
q [1/nm]	0.88	1.66	5.78
	1.74	3.3	
	2.6	4.95	
q[nm]	7.14	3.79	1.09
	3.61	1.90	
	2.4	1.27	



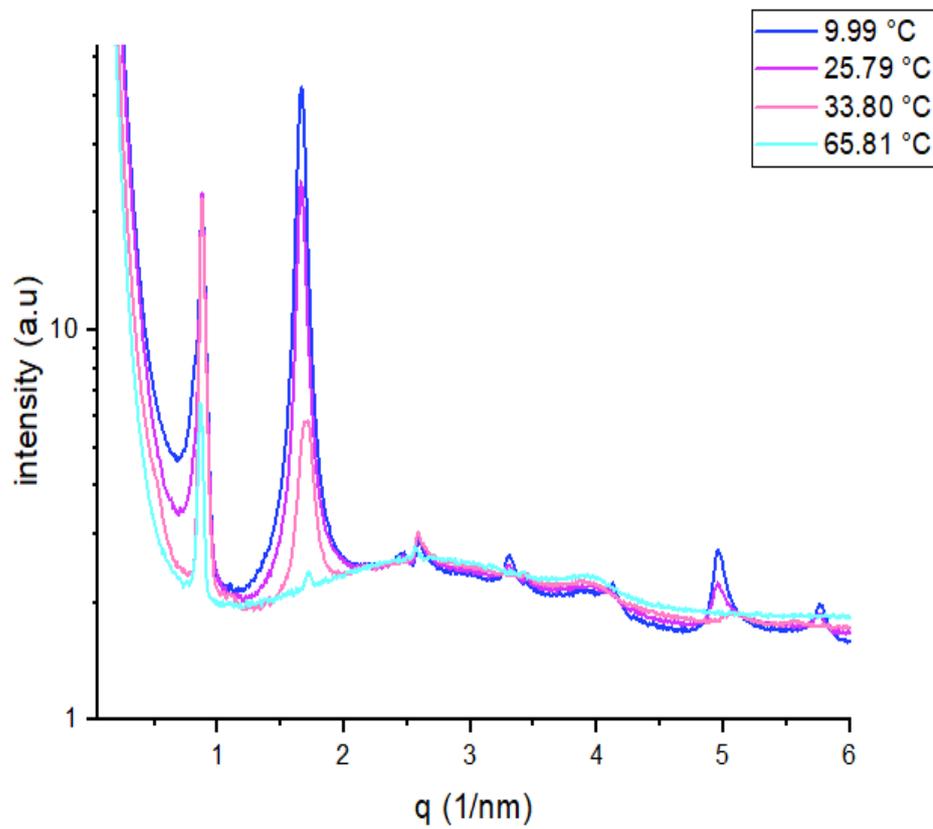
**Fig 4.20** : grafico a dispersione che indica la presenza di una sola fase di olio.

Continuando a raffreddare il campione, giunti alla temperatura di 9 °C (**Tabella 4.12**) la situazione si modifica, in quanto si avrà la formazione di una sola fase appartenente all'olio di riso in maniera del tutto analoga al campione olio di riso centrifugato a 40 °C, infatti si ha la presenza di picchi con il medesimo valore di q (l'elevato valore di d-spacing ottenuto fa pensare sempre ad una forma cristallina di tipo  $\gamma$ , in maniera analoga al raffreddamento del campione contenente solo olio), e ovviamente continua ad essere presente la stessa fase appartenente alle cere.

**Tabella 4.12** : valori di d e q, dati SAXS durante lo step di raffreddamento.

9 °C	1 fase cere	1 fase olio
q [1/nm]	0.88	0.82
	1.7	1.66
	2.6	2.48
		3.3
		4.15
		4.98
		5.78
d [nm]	7.14	7.66
	3.61	3.78
	2.4	1.89
		1.51
		1.26
		1.08

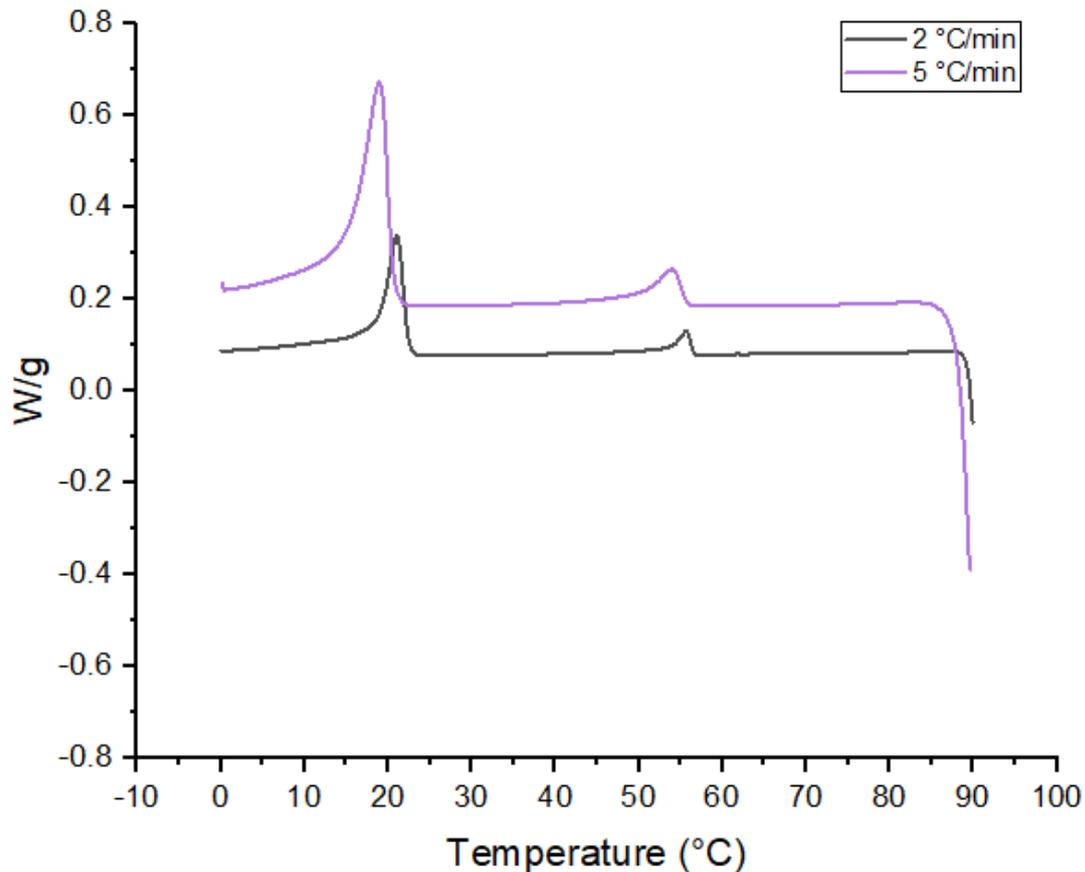
Le analisi SAXS del secondo step di riscaldamento del campione ( $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ) sono riportate in **Figura 4.21**. I valori dei picchi e dei d-spacing ottenuti sono del tutto uguali allo step di raffreddamento.



**Fig 4.21** : Modelli di raggi X, regione SAXS del campione cera di riso, durante il secondo riscaldamento.

#### 4.4.4 DSC cera di riso centrifugata a 40 °C

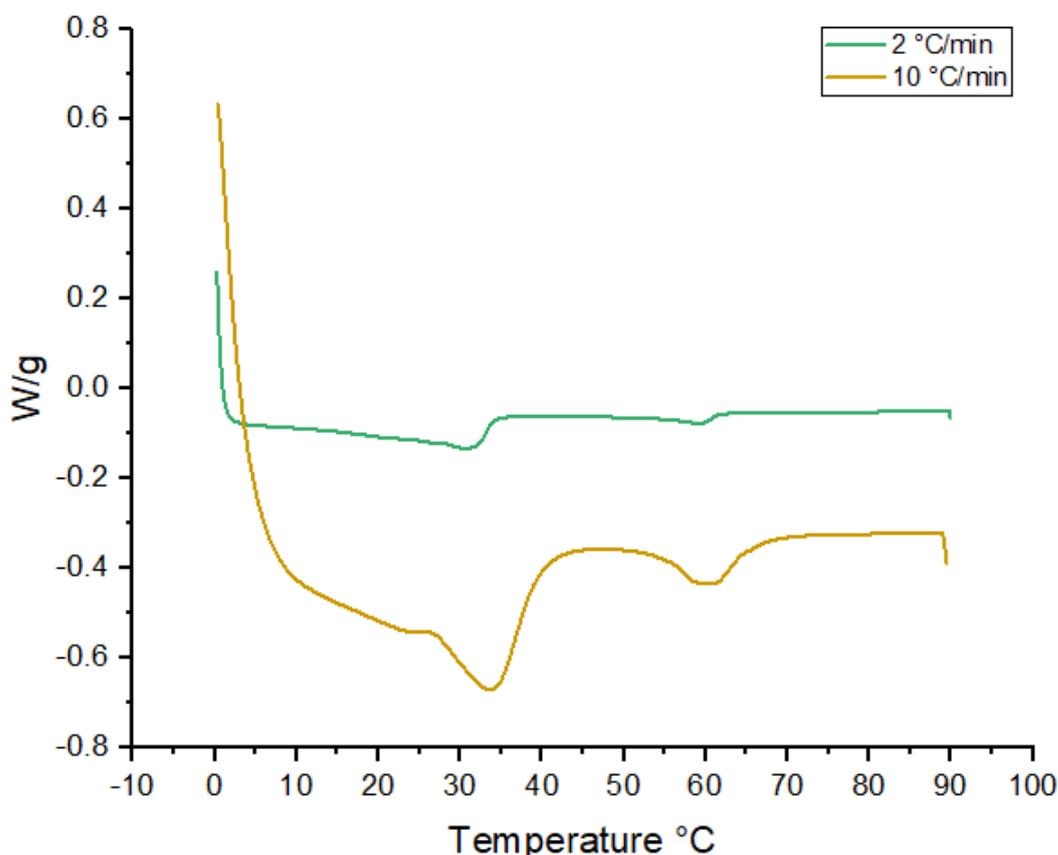
Per comprendere il comportamento termico della cera di riso è stata effettuata l'analisi DSC del campione olio di riso centrifugato a 40 °C. La **Figura 4.22** mostra i due cicli di raffreddamento effettuati sul campione a -2 °C/min e a -5 °C/min. Tuttavia come detto precedentemente per l'analisi SAXS, in seguito a centrifugazione non si è riusciti a separare la cera dall'olio di riso poiché bisogna spingersi a delle temperature più elevate di 40 °C, i quanto ci sono dei trigliceridi che finiscono di sciogliersi a temperature più elevate di 40 °C.



**Fig 4.22** : analisi DSC cera di riso centrifugata a 40°C, raffreddamento.

Nella **Fig 4.22** vediamo i due cicli di raffreddamento rispettivamente a -2 °C/min e -5 °C/min. Il picco rivolto verso l'alto è esotermico ed indica la cristallizzazione delle cere. Si nota dunque che la temperatura di cristallizzazione  $T_c$  è pari a 54 °C nel caso di -5°C/min e di 55.8 °C nel caso di -2 °C/min. Aumentando dunque la velocità di raffreddamento, l'ampiezza del picco appare maggiore, questo indica che l'entalpia sarà maggiore, ovvero che il flusso di calore prodotto sarà maggiore. Quest'analisi termica è in accordo con i dati SAXS del campione cera di riso centrifugata a 40 °C in quanto si nota che in quel caso raffreddando con una velocità di 1°C/min si otteneva una temperatura di cristallizzazione delle cere di 63 °C. I picchi che fanno riferimento alle tracce di olio rimaste nei campioni restano analoghi a quelli ottenuti con la DSC effettuata sul campione olio di riso centrifugato a 40 °C

I cicli di riscaldamento sul campione cera di riso sono stati effettuati con una velocità di 2°C/min e di 10°C/min. Il termogramma ottenuto è riportato in **Figura 4.23**.



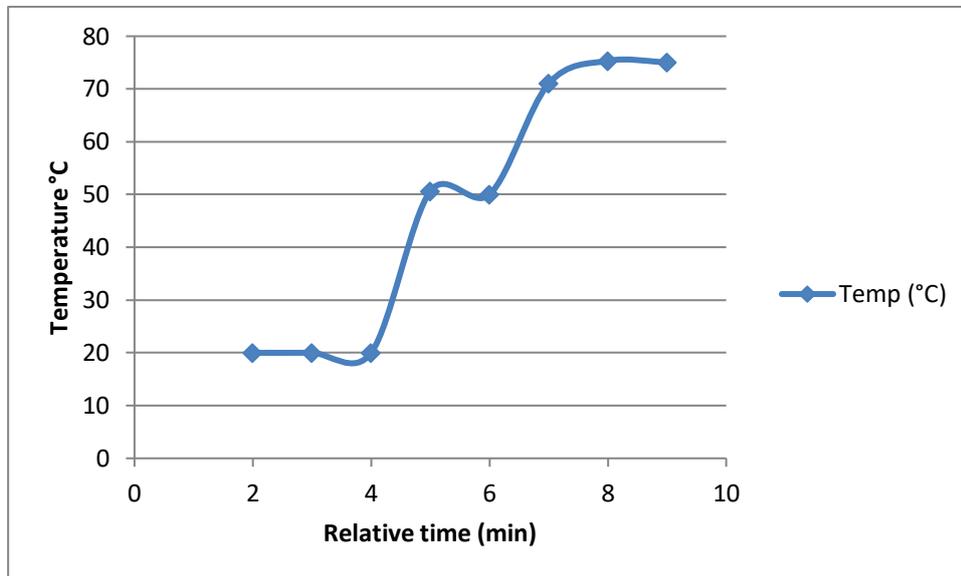
**Fig 4.23** : analisi DSC cera di riso centrifugata a 40°C, riscaldamento.

In questo caso sono stati effettuati due cicli di riscaldamento. Il picco verso il basso è endotermico e rappresenta la fusione. E' stata rilevata un  $T_m$  di circa 60°C per entrambe le velocità. Si nota una leggera differenza con la temperatura di fusione trovata nel SAXS, che era di 68 °C , ma in realtà le misura che ottengo con il DSC sono più precise di quelle ottenute con il SAXS, in cui faccio una misurazione ogni minuti. Anche in questo caso si nota la presenza dei trigliceridi dell'olio, che presentano la stessa temperatura di fusione del campione dell'olio di riso.

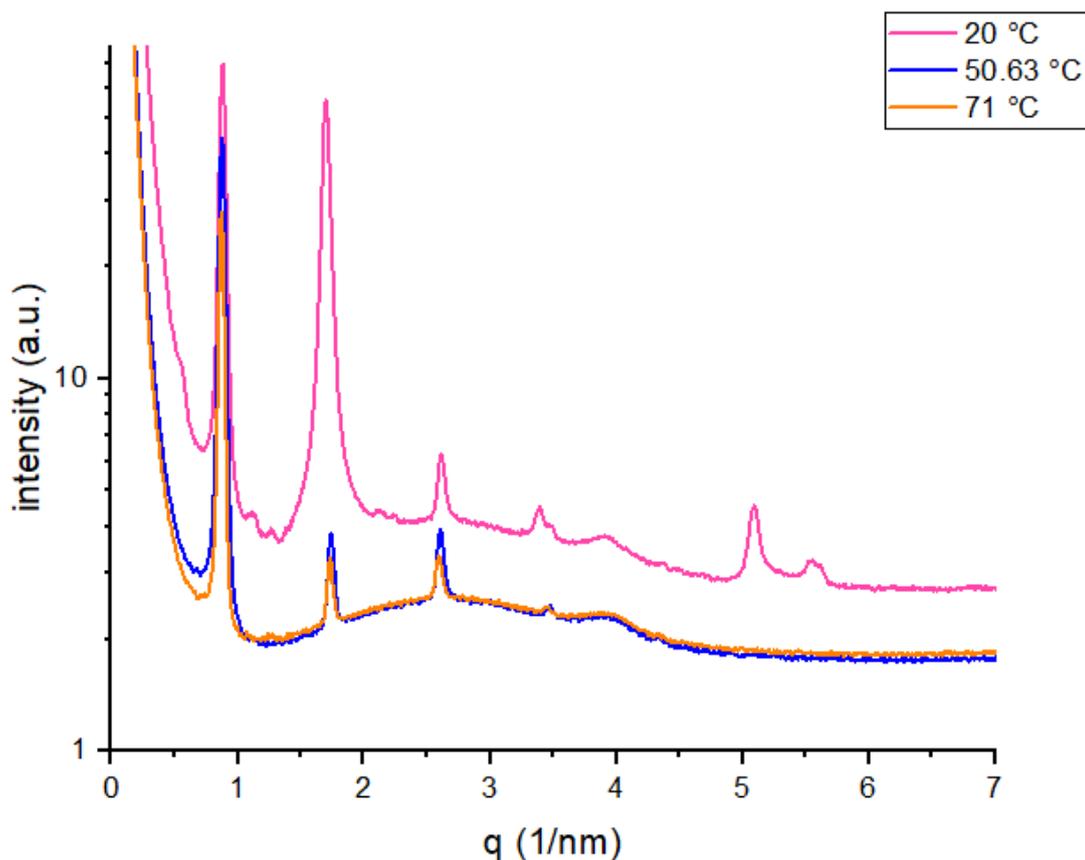
I picchi che fanno riferimento alla cera di riso sono dei picchi singoli, sia per la cristallizzazione che per la fusione, questo è dovuto al fatto che la cera di riso è costituita essenzialmente da un unico gruppo predominante (composizione chimica omogenea ) , di conseguenza i picchi appaiono unici e stretti. [52]

#### 4.4.5 Cera di riso filtrata a 50 °C

Nel tentativo di purificare ulteriormente la cera di riso è stata filtrata a vuoto a 50 °C, ma anche in questo caso non si è raggiunto il risultato sperato, poiché si notano ancora tracce di trigliceridi. In **Figura 4.24** è riportato il profilo temperatura tempo dell'analisi SAXS. Le analisi SAXS del campione sono riportate in **Figura 4.25** durante lo step di riscaldamento.



**Fig 4.24:** profilo temperatura tempo analisi SAXS.

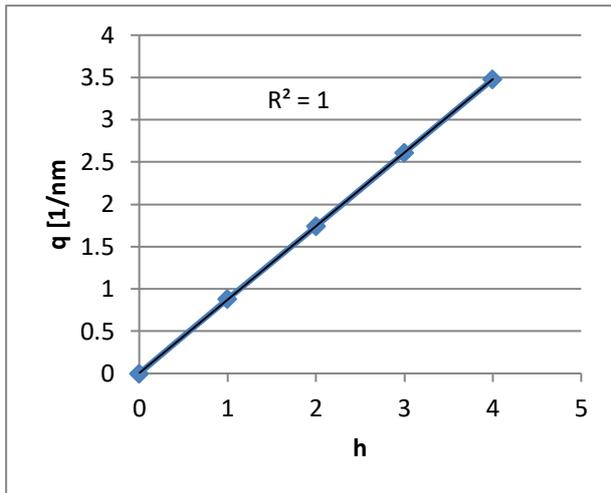


**Fig. 4.25** : Modelli di raggi X, regione SAXS del campione cera di riso, durante il riscaldamento.

A 70 °C e a 50 °C si ha la presenza di una sola fase (**Fig 4.26**) che fa riferimento alle cere (**Tabella 4.13**), dal momento che sono presenti ad elevata temperatura e dal momento che i valori dei picchi che fanno riferimento alle cere sono sempre analoghi a quelli trovati fin ora negli altri campioni.

**Tabella 4.13** : valori di d e q, dati SAXS, 50 °C durante lo step di riscaldamento

50 °C	fase 1 cera
q [1/nm]	0.88
	1.74
	2.61
	3.48
d [nm]	7.14
	3.61
	2.4
	1.80



**Fig 4.26** : grafico a dispersione che indica la presenza di una sola fase.

A 20 °C invece, si ha la presenza dell'unica fase delle cere, e inoltre si notano ben 4 fasi diverse che fanno riferimento ai trigliceridi dell'olio, come mostrato in **Tabella 4.14**.

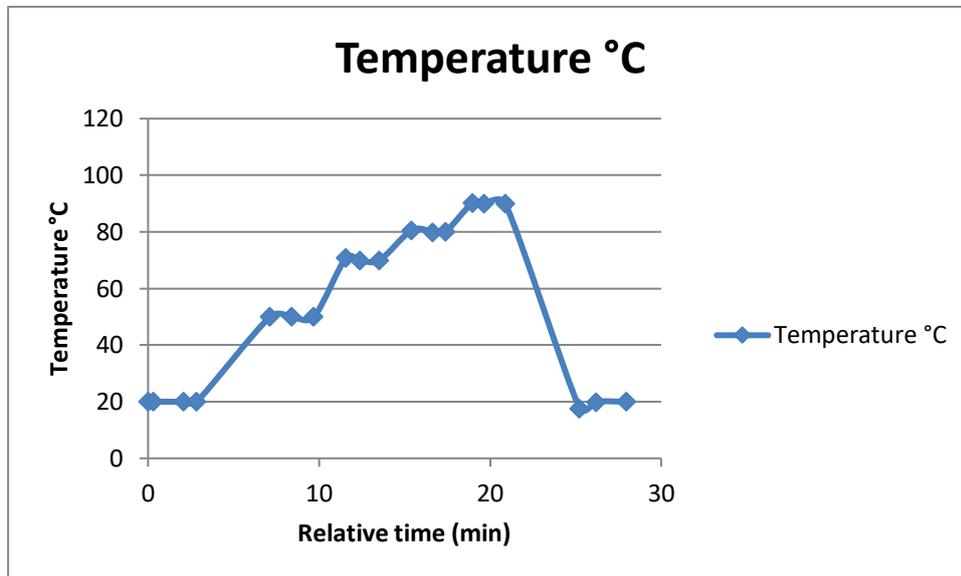
**Tabella 4.14** : valore di d e q , dati SAXS, 20 °C, durante lo step di riscaldamento

20 °C	fase 1 cera	fase 1 olio	fase 2 olio	Fase 3 olio	fase 4 olio
q [1/nm]	0.88	2.15	3.3	5.1	5.59
	1.74				
	2.61				
	3.48				
d [nm]	7.14	2.92	1.90	1.23	1.12
	3.61				
	2.4				

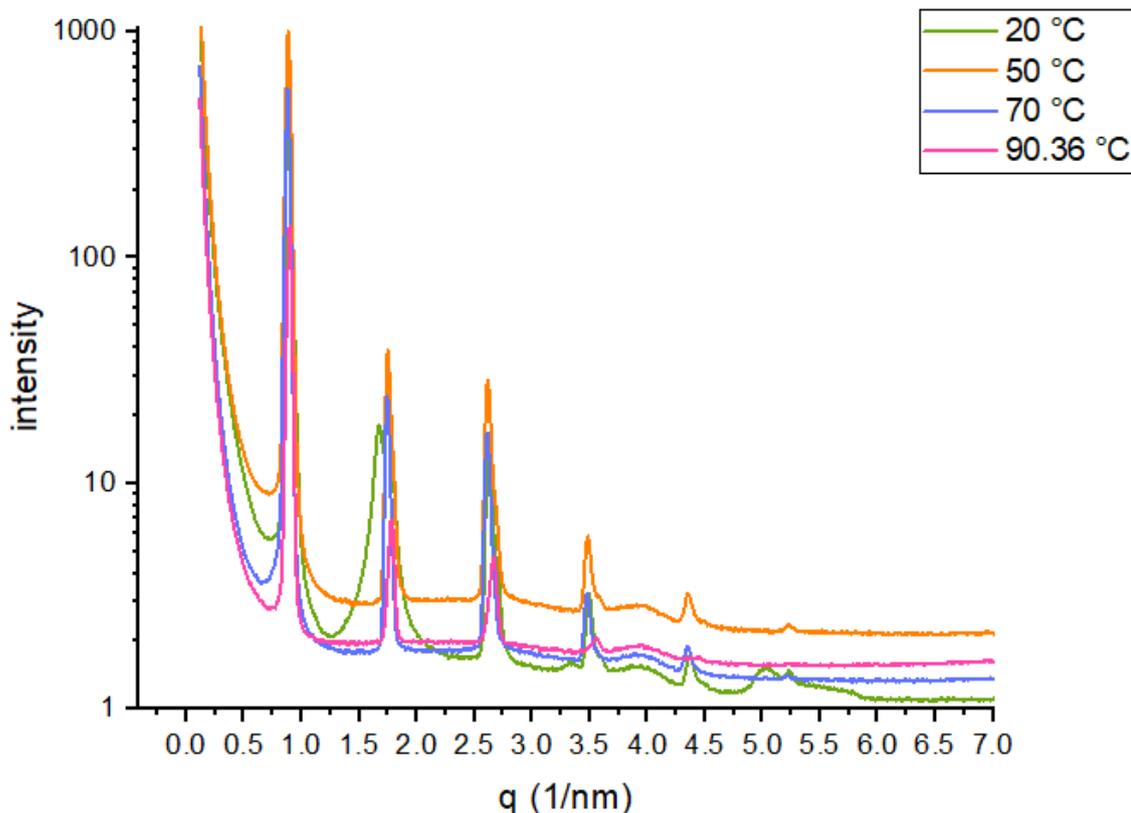
Rispetto al caso in cui la cera di riso è stata solo centrifugata, si nota che i valori dei picchi si sono leggermente modificati e i trigliceridi presenti nel campione hanno assunto un nuovo assetto, creando delle nuove fasi.

#### 4.4.6 Cera di riso lavata con etanolo

Nel tentativo di eliminare le tracce dei trigliceridi dell'olio, la cera è stata lavata con etanolo, anche in questo caso il campione non appare puro. Il profilo temperatura tempo è riportato in **Fig 4.27** . I Dati SAXS dello step di riscaldamento sono riportati in **Figura 4.28**.



**Fig 4.27** : profilo temperatura tempo , analisi SAXS.



**Fig. 4.28** : Modelli di raggi X, regione SAXS del campione cera di riso, durante il riscaldamento.

Alle temperature di 90 °C, 70 °C e 50 °C si ha la presenza di una sola fase appartenente alle cere, in maniera del tutto analoga al caso precedente. I valori di  $q$  e di  $d$  sono riportati in **Tabella 4.15**

**Tabella 4.15** : valore di  $d$  e  $q$ , dati SAXS 90,70 e 50°C, durante lo step di riscaldamento

90, 70 e 50 °C	1 fase cere
$q$ [1/nm]	0.88
	1.75
	2.62
	3.5
$d$ [nm]	7.14
	3.59
	2.40
	1.79

A 20 °C si ha una fase appartenente alla cera e 5 diverse fasi appartenenti ai trigliceridi come mostrato in **Tabella 4.16**. E' interessante notare che il picco ad un valore di  $q$  di circa 1.7 1/nm si è splittato in due, questo fa intendere che nei casi precedenti si avevano due picchi sovrapposti e che appartenevano una alle cere e uno all'olio di riso (infatti in quasi tutti i casi è stato considerato così), è probabile che sia accaduto questo perché la fase della cera ha inglobato con se i trigliceridi dell'olio. Lavando il campione con etanolo e quindi ottenendo

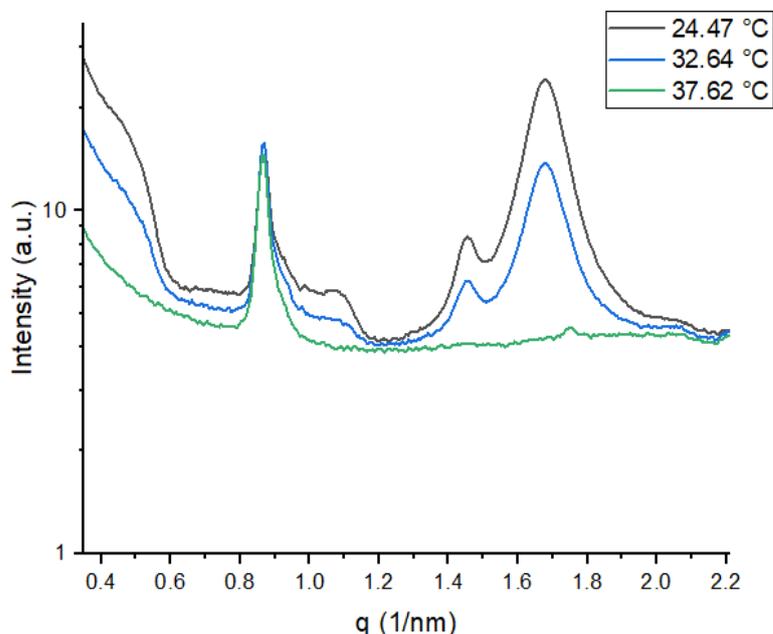
un maggiore grado di purezza, si è verificato questo splittaggio e ciò fa pensare che l'ipotesi fatta nei casi precedenti possa essere corretta.

**Tabella 4.16** : valore di  $d$  e  $q$ , dati SAXS, 20 °C, durante lo step di riscaldamento.

20 °C	1 fase cere	1 fase olio	2 fase olio	3 fase olio	4 fase olio	5 fase olio
$q$ [1/nm]	0.88	1.67	2.7	3.6	4.36	5.24
	1.75	3.34				
	2.62	5.01				
	3.5					
$d$ [nm]	7.14	3.76	2.33	1.75	1.44	1.20
	3.59	1.88				
	2.40	1.25				
	1.79					

#### 4.4.7 Olio e cera di riso

I dati SAXS durante il primo riscaldamento che è avvenuto con una velocità di del campione 1°C/min dell'olio e della cera di riso sono riportati in **Figura 4.29** e i valori di  $q$  e  $d$  in **Tabella 4.17**



**Fig. 4.29** : Modelli di raggi X, regione SAXS del campione olio e cera di riso, durante il riscaldamento.

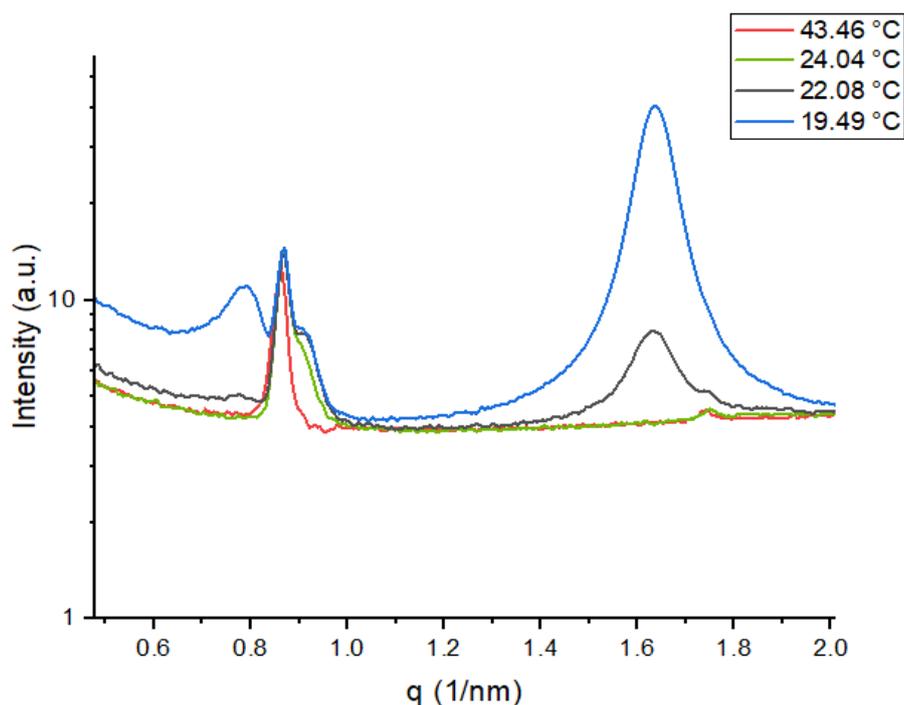
**Tabella 4.17** : valore di  $d$  e  $q$ , dati SAXS, 24 e 32 °C, durante lo step di riscaldamento.

24 e 32 °	fase 1 cera	fase 1 olio	fase 2 olio	fase 3 olio
$q$ [17nm]	0.87	1.08	1.45	1.68
$d$ [nm]	7.22	5.81	4.33	3.74

In questo caso si ha la formazione di 1 sola fase che fa riferimento alla cera di riso, che possiede un valore del picco pari a 0.87, questo valore è uguale al valore ottenuto in tutti i casi precedenti, con la differenza sostanziale che in tutti i casi analizzati precedentemente questo picco non era mai da solo, ma formava un'unica fase con altri picchi. Il fatto che qui si noti solo un picco può essere dovuto al fatto che i trigliceridi dell'olio siano stati inglobati nella cera e quindi la struttura si sia modificata. Il valore del d-spacing della cera di circa 7 nm fa riferimento ad una forma cristallina del tipo  $\beta'3L$ . [53]

La fase 1 dell'olio possiede un d-spacing di 5.81 nm valore che faccia pensare alla presenza di un polimorfo del tipo  $\beta'3L$ , mentre la fase 3 dell'olio ha un valore di d-spacing di 3.7 nm, valore che faccia pensare alla presenza del polimorfo  $\beta'2L$ . La forma cristallina  $\beta'$  ha una stabilità intermedia e un impacchettamento perpendicolare orto rombico, la presenza di una forma metastabile nel campione è indice del fatto che questo campione sia stato a riposo per un tempo relativamente lungo prima di essere stato analizzato.

Successivamente raffreddando il campione ad una velocità di 1°C/min, come mostrato in **Fig. 4.30** considerando la temperatura che va da 19.49 °C a 24 °C si hanno la formazione di due fasi che fanno riferimento ai trigliceridi dell'olio , e di un'unica fase che fa riferimento alla cera del riso, come mostrato in **Tabella 4.18**. Analizzando i valori del d-spacing (7.85 nm) si nota subito che durante il raffreddamento si ha avuto la formazione della forma cristallina di tipo  $\gamma$ , forma instabile, motivo per cui non era presente all'inizio dell'analisi SAXS, ovvero durante il riscaldamento del campione, ma si è formata solo in seguito al raffreddamento veloce. Alla temperatura di 43.46 °C l'unica fase rimasta è quella della cera di riso.



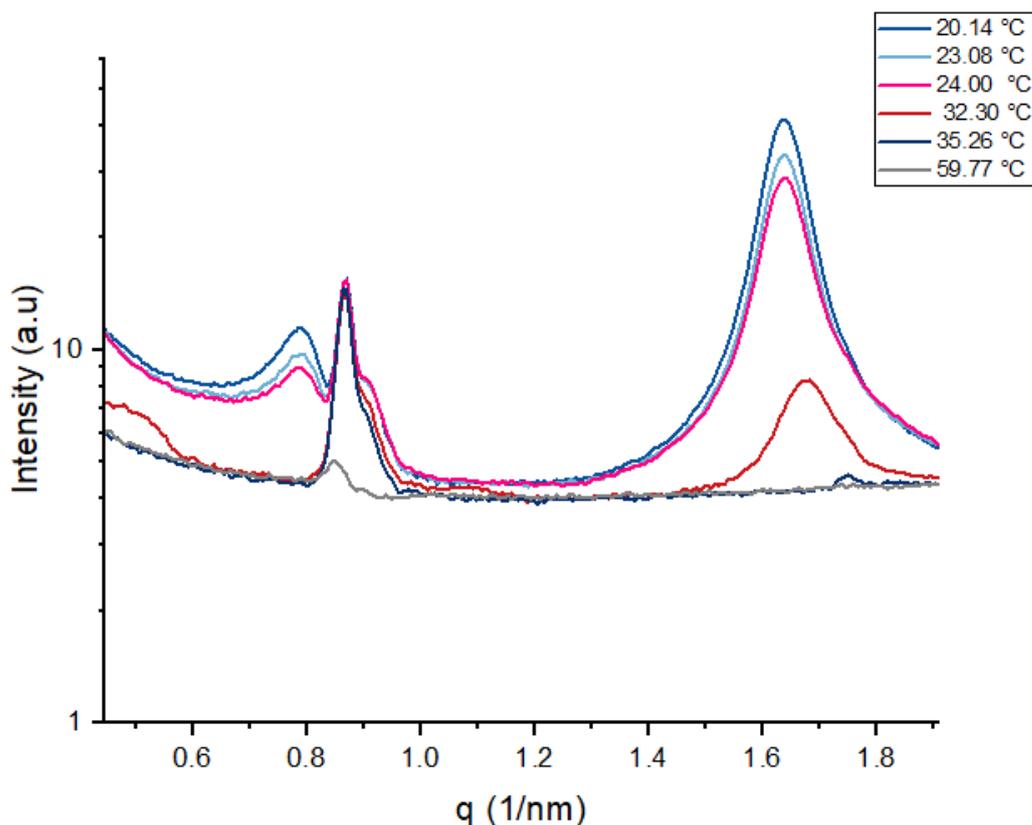
**Fig. 4.30** : : Modelli di raggi X, regione SAXS del campione olio e cera di riso, durante il raffreddamento.

**Tabella 4.18** : valore di d e q , dati SAXS, 19 e 24 °C, durante lo step di raffreddamento.

19 °C 24 °C	fase 1 cera	fase 1 olio	fase 2 olio
q [1/nm]	0.88	0.8	0.91
	1.74	1.64	
d [nm]	7.14	7.85	6.90
	3.61	3.83	

Continuando a riscaldare il campione si ottengono i dati SAXS mostrati in **Fig. 4.31** e i valori di  $d$  e  $q$  mostrati in **Tabella 4.19**

Dati SAXS campione olio e cera di riso, durante il riscaldamento.



**Fig. 4.31** : Modelli di raggi X, regione SAXS del campione olio e cera di riso, durante il riscaldamento.

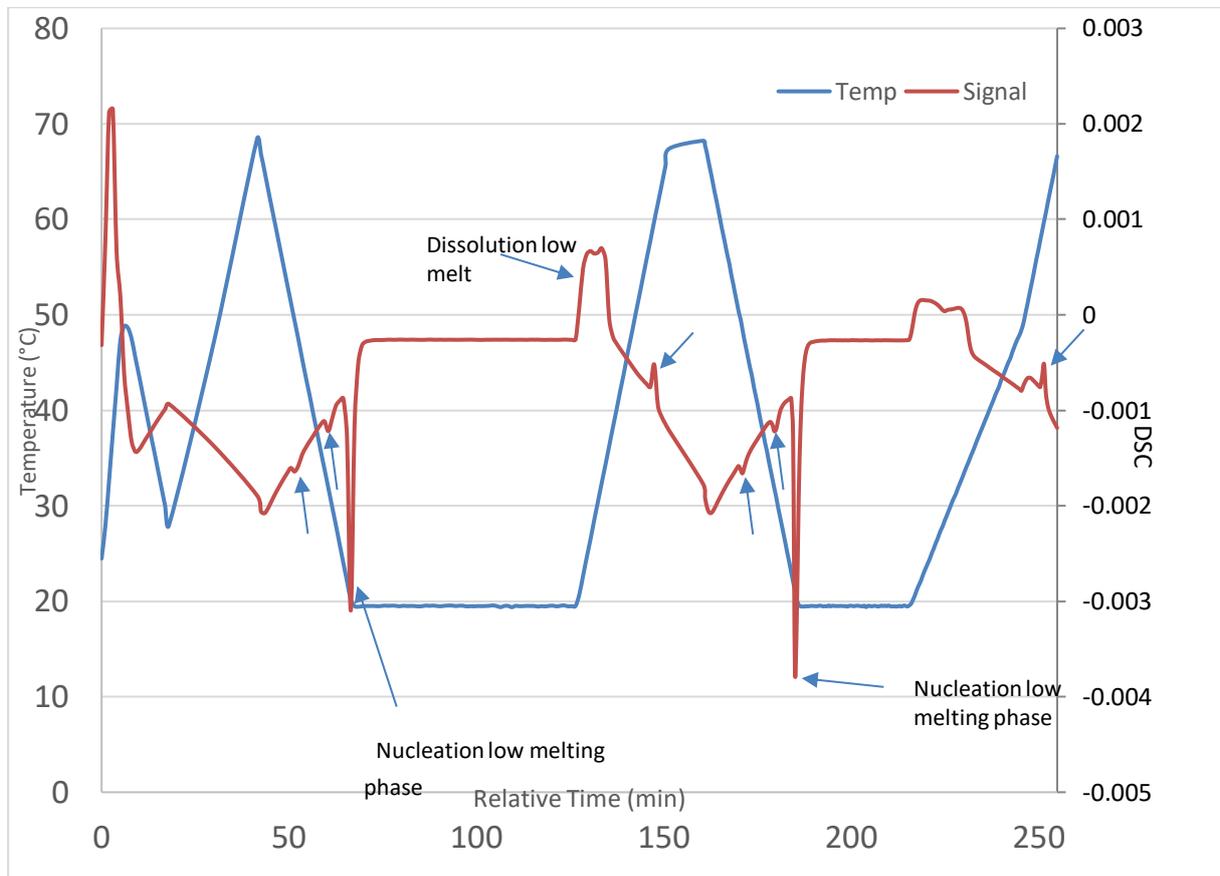
**Tabella 4.19** : valore di  $d$  e  $q$ , dati SAXS, 20 °C 24°C 32 °C e 60 °C, durante lo step di riscaldamento.

20 °C 24 °C	fase 1 cera	fase 1 olio	fase 2 olio
$q$ [1/nm]	0.87	0.78	0.91
		1.64	
$d$ [nm]	7.22	8.05	6.9
		3.83	
32 °C	fase 1 cera	fase 1 olio	fase 2 olio
$q$ [1/nm]	0.87	1.66	0.91
	1.74		
$d$ [nm]	7.22	3.78	6.9
	3.61		
60 °C	fase 1 cera		
$q$ [1/nm]	0.87		
$d$ [nm]	7.22		

Alla temperatura di 20 e 24 °C, la fase 1 dell'olio fa riferimento ancora alla presenza della forma  $\gamma$ , forma che scompare continuando a scaldare in campione, ovvero alla temperatura di 32 °C la forma cristallina  $\gamma$  sarà scomparsa e si ha la presenza di una forma cristallina di tipo  $\beta'2L$ . Mentre per quanto riguarda la cera, questa sarà presente a qualsiasi temperatura in 1 sola fase.

#### 4.4.8 DSC olio e cera di riso

In concomitanza con l'analisi SAXS è possibile analizzare il termogramma di tale campione, mostrato in **Figura 4.32**.



**Fig 4.32** : DSC olio e cera di riso, in funzione del tempo relativo e temperatura.

Da questa analisi termica è possibile fare le seguenti considerazioni :

- La prima nucleazione della fase basso fondente avviene dopo 66 minuti ad una temperatura di 20 °C, questo dato è in accordo con le precedenti analisi DSC effettuate sul campione dell'olio di riso, (paragrafo 4.4.2)
- La fusione della fase basso fondente avviene dopo 133 minuti ad una temperatura di circa 34 °C, la temperatura di fusione è in accordo con i dati SAXS e con le analisi DSC effettuate sul campione dell'olio di riso, (paragrafo 4.4.2)
- La seconda nucleazione della fase basso fondente avviene dopo 185 minuti ad una temperatura di circa 20 °C, anche questo dato è in accordo con le analisi SAXS del campione e con la DSC effettuata sull'olio di riso (paragrafo 4.4.2) .
- Sono infine visibili le due cristallizzazioni della fase appartenente alle cere, la prima che avviene dopo 44 min a 63 °C, la seconda che avviene dopo 164 min a 62 °C, entrambi questi valori sono consistenti con quanto detto al paragrafo 4.4.4.

## 5 Conclusioni

La pula di riso è uno dei sottoprodotti del processo produttivo del riso, possiede delle ottime proprietà nutritive in quanto contiene il 65 % dei macronutrienti presenti all'interno del riso stesso. Negli ultimi anni si è cercato di valorizzare questo sottoprodotto. Lo scopo di questo lavoro di tesi è quello di caratterizzare la matrice di partenza, estrarre il burro di riso utilizzando un processo innovativo ed ecologico, ovvero utilizzando la CO<sub>2</sub> in condizioni supercritiche, e infine studiare il processo di cristallizzazione del burro di riso estratto. In questo lavoro di tesi è stato dimostrato che il burro di riso possiede due fasi distinte, una fase oleosa costituita per l'80% in peso di acidi grassi insaturi e dal 20% di acidi grassi saturi, e una fase costituita da cera che possiede delle molecole molto lunghe. In particolare, tramite le analisi a diffrazione dei raggi X (SAXS) è emerso che la cera è caratterizzata da un d-spacing di 7.4 nm, che potrebbe essere associato alla composizione chimica della cera. Inoltre la struttura della cera è lamellare, infatti diagrammando i valori di q in funzione dell'indice di Miller si ottiene una retta. La cera è caratterizzata da forti interazioni tra le lunghe catene idrocarburiche e i gruppi funzionali polari (esteri) presenti nella cera. Dalle analisi termiche effettuate sulla cera (DSC) è emerso che questa possiede una temperatura di cristallizzazione T<sub>c</sub> di circa 55 °C e che aumentando la velocità di raffreddamento l'ampiezza del picco del termogramma (esotermico) appare maggiore, indicando un maggiore flusso di calore prodotto. La temperatura di fusione della cera di riso invece è risultata essere pari a 60 °C a qualsiasi velocità di riscaldamento. Nelle analisi DSC il picco che si riferisce alla cera è un picco unico, sia per la fusione che per la cristallizzazione, si pensa che questo possa essere associato alla composizione chimica omogenea della cera e alla apparente assenza di forme polimorfiche. Per quanto riguarda l'olio di riso è stato rivelato che questo è composto essenzialmente da trigliceridi (TAGs). Questo è confermato anche dalle analisi a diffrazione di raggi X, che conferma la presenza di fasi lamellari, tipiche dei trigliceridi. Inoltre si è notato che durante il riscaldamento del campione mantenuto per qualche giorno a riposo in un capillare di quarzo si aveva la formazione di diverse fasi solide. In particolare i valori di d-spacing, di 3.7 nm ottenuti in seguito ad analisi SAXS potrebbero riferirsi alla presenza di un polimorfo del tipo  $\beta'2L$ , alla temperatura di 35 °C

E' emerso anche che durante il raffreddamento del campione, si ottengono dei valori di d-spacing molto alti (7nm) rispetto alla lunghezza media delle catene di acidi grassi presenti nel campione. Questo elevato valore ottenuto, così come la configurazione dei picchi ( il primo più basso il secondo più alto) farebbe pensare alla presenza del polimorfo di tipo  $\gamma$  ricchi di acidi grassi insaturi. Questa ipotesi potrebbe essere accreditata poiché la forma  $\gamma$  è una forma instabile e si forma infatti solo dopo raffreddamento immediato. Dalle analisi termiche dell'olio di riso, ottenuto per separazione fisica dalla cera, è emerso che la temperatura di cristallizzazione dell'olio è di circa 20 °C e nel caso di raffreddamento più rapido il flusso di calore prodotto appare maggiore. La temperatura di fusione invece risulta essere di 35 °C, dati in accordo anche con le analisi SAXS, svolte sul campione. Le analisi SAXS e DSC sono state svolte anche su dei campioni contenenti sia la fase oleosa che la cera e i risultati ottenuti sono stati analoghi a quelli effettuati sui campioni separati. Per separare la fase oleosa dalla cera è stata svolta una centrifugazione a 40 °C. E' risultato, però, difficile riuscire a separare i due composti possibilmente a causa della presenza di alcuni trigliceridi che fondono a delle temperature maggiori di quelle utilizzate per effettuare la centrifugazione, per questo motivo è stata anche svolta una prova di filtrazione a 50 °C e sottovuoto, ma si è notata ancora la presenza dei TAGs. La valorizzazione della pula di riso utilizzando processi e solventi ecologici sembrano essere fattibili tecnicamente. Conoscere il processo di cristallizzazione e le caratteristiche strutturali del materiale estratto è inoltre molto importante ai fini di utilizzare tale prodotto nelle industrie farmaceutiche, cosmetiche e alimentari.

## Bibliografia

1. Kumar A, Roy A, Priyadarshinee R, Sengupta B, Malaviya A, Dasguptamandal D, Mandal T (2017) Economic and sustainable management of wastes from rice industry: combating the potential threats. *Environ Sci Pollut Res* 24:26279–26296. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0293-7>
2. Fraterrigo Garofalo, S., Tommasi, T., & Fino, D. (2021). A short review of green extraction technologies for rice bran oil. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 11(2), 569–587. <https://doi.org/10.1007/s13399-020-00846-3>
3. Milling by-products. International Rice Research Institute (IRRI) <http://www.knowledgebank.irri.org/step-by-step-production/postharvest/milling/milling-byproducts-and-their-utilization>.
4. Begum A, Sarma J, Borah P, Moni Bhuyan P, Saikia R, Hussain Ahmed T, Rai L (2015) Microwave (MW) energy in enzyme deactivation: stabilization of rice bran from few widely consumed indigenous rice cultivars (*Oryza sativa* L.) from Eastern Himalayan range. *Curr Nutr Food Sci* 11:240–245. <https://doi.org/10.2174/1573401311666150521233113>.
5. Saunders RM (1985) Rice bran: composition and potential food uses. *Food Rev Int* 1:465–495. <https://doi.org/10.1080/87559128509540780>.
6. Kumar SJ, Prasad SR, Banerjee R, Agarwal DK, Kulkarni KS, Ramesh KV (2017) Green solvents and technologies for oil extraction from oilseed. *Chem Cent J* 11:9. <https://doi.org/10.1186/s13065-017-0238-8>.
7. Tang SY, Bourne RA, Smith RL, Poliakoff M (2008) The 24 principles of green engineering and green chemistry: “Improvements productively”. *Green Chem* 10:268–269. <https://doi.org/10.1039/B719469M>
8. Majid A, Phull AR, Khaskheli AH et al (2019) Applications and opportunities of supercritical fluid extraction in food processing technologies: a review. *Int J Adv Appl Sci* 6:99–103. <https://doi.org/10.21833/ijaas.2019.07.013>
9. Mohamed RS, Mansoori GA (2002) The use of supercritical fluid extraction technology in food processing. *Food Technol Mag* [https://www.academia.edu/34656950/The\\_Use\\_of\\_Supercritical\\_Fluid\\_Extraction\\_Technology\\_in\\_Food\\_Processing](https://www.academia.edu/34656950/The_Use_of_Supercritical_Fluid_Extraction_Technology_in_Food_Processing)
10. Liu SX, Mamidipally PK (2005) Quality comparison of rice bran oil extracted with d-limonene and hexane. *Cereal Chem* 82(2): 209–215. <https://doi.org/10.1094/cc-82-0209>
11. Xu Z, Godber JS (2000) Comparison of supercritical fluid and solvent extraction methods in extracting  $\gamma$ -oryzanol from rice bran. *J Am Oil Chem Soc* 77:547–551. <https://doi.org/10.1007/s11746-000-0087-4>
12. Xu Z, Godber JS (2000) Comparison of supercritical fluid and solvent extraction methods in extracting  $\gamma$ -oryzanol from rice bran. *J Am Oil Chem Soc* 77:547–551. <https://doi.org/10.1007/s11746-000-0087-4>
13. Walstra, P. 2002. *Physical Chemistry of Foods*, CRC Press, Boca Raton.
14. Sato, K., Bayés-García, L., Calvet, T., Cuevas-Diarte, M.À., Ueno, S. 2013. External factors affecting polymorphic crystallization of lipids. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 115, 1224–1238
15. Di Bari, V. 2015. Large deformation and crystallisation properties of process optimised cocoa butter emulsions. Ph. D. Thesis, University of Birmingham

16. Himawan, C., Starov, V. M., Stapley, A. G. F. 2006. Thermodynamic and kinetic aspects of fat crystallization. *Advances in Colloid and Interface Science*, 122, 3-33
17. McClements, D. J. 2005. *Food emulsions: principles, practices, and techniques*. 2th Edition. CRC Press, Boca Raton.
18. McClements, D. J. 2012. Crystals and crystallization in oil-in-water emulsions: Implications for emulsion-based delivery systems. *Advances in Colloid and Interface Science*, 174, 1-30.
19. Mullin, J. W., 2001, *Crystallization*, Fourth edition edn, Butterworth Heinemann.
20. Vekilov, P. G., 2010, "The two-step mechanism of nucleation of crystals in solution", *Nanoscale*, 2, 2346
21. Davey, R.J., Garside, J., 2000, *From molecules to crystallizers: an introduction to crystallization*, Oxford university press
22. Di Bari, V. 2015. Large deformation and crystallisation properties of process optimised cocoa butter emulsions. Ph. D. Thesis, University of Birmingham
23. Threlfall, T. L., Coles, S. J., 2016, "A perspective on the growth-only zone, the secondary nucleation threshold and crystal size distribution in solution crystallization", *CrystEngComm*, 18, 369
24. Hartel, R.W. 2001. *Crystallization in foods*. Springer, New York
25. Taylor, P., Sato, K., Yoshimoto, N., & Arishima, T. (2007). *Journal of Dispersion Science and Technology* *CRYSTALLIZATION PHENOMENA IN FATS AND LIPIDS*. September 2014, 37–41. <https://doi.org/10.1080/01932698908943181>
26. Himawan, C., Starov, V. M., & Stapley, A. G. F. (2006). *Thermodynamic and kinetic aspects of fat crystallization*. 122, 3–33. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2006.06.016>
27. Katritzky AR, Jain R, Lomaka A, Petrukhin R, Maran U, Karelson M. *Cryst Growth Des* 2001;1:261
28. Pinal R. *Org Biomol Chem* 2004;2:2692.
29. Wei J. *Ind Eng Chem Res* 1999;38:5019
30. Chickos JS, Nichols G. *J Chem Eng Data* 2001;46:562
31. Wesdorp LH, *Liquid-Multiple Solid Phase Equilibria in Fats*, PhD dissertation, Delft University of Technology; 1990.
32. Sato K. *Fett-Lipid* 1999;101:467
33. Hartel RW, Kaylegian KE. In: Garti N, Sato K, editors. *Crystallization processes in fats and lipid systems*. New York: Marcel Dekker; 2001. p. 381.
34. Rousset P. In: Narine SS, editor. *Physical properties of lipids*. New York: Marcel Dekker; 2002. p. 1.
35. Hollander FFA, Kaminski D, Duret D, van Enckevort WJP, Meekes H, Bennema P. *Food Res Int* 2002;35:909
36. Walstra P, Kloek W, van Vliet T. In: Sato K, Garti N, editors. *Crystallization processes in fats and lipid systems*. New York: Marcel Dekker; 2001
37. Aquilano D, Sgualdino G. In: Sato K, Garti N, editors. *Crystallization processes in fats and lipid systems*. New York: Marcel Dekker; 2001.
38. Takeuchi M, Ueno S, Sato K. *Food Res Int* 2002;35:919
39. Schnablegger, H., & Singh, Y. (2013). *SAXS Analysis. The SAXS Guide*, 50–90.
40. *Rapp\_ISTISAN\_96\_34\_def.pdf*. (n.d.).
41. Fraterrigo Garofalo, S., Cavallini, N., Destefano, R., Micera, M., Cavagnero, C., Botto, A., Savorani, F., Tommasi, T., & Fino, D. (2023). Optimization of Supercritical

Carbon Dioxide Extraction of Rice Bran Oil and  $\gamma$ -Oryzanol Using Multi-Factorial Design of Experiment. *Waste and Biomass Valorization*, 0123456789.  
<https://doi.org/10.1007/s12649-023-02111-w>

42. UNI EN ISO 12966-2:2017 Animal and vegetable fats and oils - Gas chromatography of fatty acid methyl esters—Part 2: Preparation of methyl esters of fatty acids
43. ISO 12966-4:2015 Animal and vegetable fats and oils—gas chromatography of fatty acid methyl esters—part 4: Determination by capillary gas chromatography
44. Brotas, M.S.C., Carvalho, G.A., Pereira, P.A.P.: Determination, through derivatization and GC-MS analysis, of Omega-3 and Omega-6 fatty acids in fish oil capsules sold in Salvador, Bahia. *J. Braz. Chem. Soc.* 31, 447–455 (2020). <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20190203>
45. Ciamician, G. (2012). *Dipartimento di Chimica "G. Ciamician."* 1, 40126.
46. Limtrakul P, Semmarath W, Mapoung S (2019) Anthocyanins and proanthocyanidins. IntechOpen <https://www.intechopen.com/books/phytochemicals-in-human-health/anthocyanins-andproanthocyanidins-in-natural-pigmented-rice-and-theirbioactivities>.
47. Begum A, Sarma J, Borah P, Moni Bhuyan P, Saikia R, Hussain Ahmed T, Rai L (2015) Microwave (MW) energy in enzyme deactivation: stabilization of rice bran from few widely consumed indigenous rice cultivars (*Oryza sativa* L.) from Eastern Himalayan range. *Curr Nutr Food Sci* 11:240–245. <https://doi.org/10.2174/157340131166615052123311>
48. Karin Tomita <sup>a b</sup>, Siti Machmudah <sup>b c</sup>, Wahyudiono <sup>b</sup>, Ryuichi Fukuzato <sup>d</sup>, Hideki Kanda <sup>b</sup>, Armando T. Quitain <sup>a</sup>, Mitsuru Sasaki <sup>a</sup>, Motonobu Goto (2014) Extraction of rice bran oil by supercritical carbon dioxide and solubility consideration <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2014.02.008>
49. Lai, O., Jacoby, J.J., Leong, W., Lai, W.: Nutritional studies of rice bran oil. In: Cheong, L., Xu, X. (eds) *Rice Bran and Rice Bran Oil Chemistry, Processing and Utilization*, pp 19–54, Elsevier (2019)
50. Sato, K. (2001). *Crystallization behaviour of fats and lipids \* a review.* 56, 2255–2265
51. Blake, A. I., Co, E. D., & Marangoni, A. G. (2014). Structure and physical properties of plant wax crystal networks and their relationship to oil binding capacity. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 91(6), 885–903. <https://doi.org/10.1007/s11746-014-2435-0>
52. Blake, A. I., Co, E. D., & Marangoni, A. G. (2014). Structure and physical properties of plant wax crystal networks and their relationship to oil binding capacity. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 91(6), 885–903. <https://doi.org/10.1007/s11746-014-2435-0>
53. Pandolsook, S., & Kupongsak, S. (2017). Influence of bleached rice bran wax on the physicochemical properties of organogels and water-in-oil emulsions. *Journal of Food Engineering*, 214, 182–192. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.06.030>
54. Jones, A.G., 2002. Crystallization process system. Butterworth-Heinemann, Oxford.