

80. Maria E. ALESSANDRINI, Mirella DORETTI, A. SAMPAOLO. — **Raffinazione di olii di oliva contenenti residui di diazinone. - Nota I.**

Riassunto. — Viene riferito su alcune prove preliminari di raffinazione di olii di oliva contenenti residui di diazinone, effettuate allo scopo di stabilire le condizioni per eliminare tali residui.

E' risultato che con il normale processo di raffinazione possono venirne eliminate anche 200 ppm: ciò avverrebbe nella fase di decolorazione, per assorbimento da parte della miscela di terre attive, avente reazione acida, usata allo scopo.

Résumé. — Les auteurs rapportent le résultat d'expériences préliminaires concernant le raffinage de l'huile d'olive contenant des résidus de diazinon et effectuées dans le but d'établir les conditions pour l'élimination de ces résidus.

Il a été constaté que le procédé normal de raffination conduit à éliminer jusqu'à 200 ppm de diazinon: l'élimination du diazinon a lieu au cours de la phase de décoloration par absorption par la terre foulon et le charbon, présentant une réaction acide.

Summary. — Preliminary tests to refine olive oil containing residues of diazinon with the object of eliminating this, are reported. It was found that the normal refining process could eliminate 200 ppm; this occurred during the decolourization phase by absorption on the mixture of fuller's earth and charcoal, having an acid reaction, used for this purpose.

Zusammenfassung. — Es wird über einige einleitende Raffinationsversuche von Diazinonreste enthaltendem Olivenöl berichtet. Zweck der Versuche war die Bestimmung der Bedingungen zur Ausscheidung dieser Reste.

Es wurde festgestellt, dass im Verlauf des normalen Raffinationsprozesses auch 200 ppm ausgeschieden werden können; dies würde während der Entfärbung durch Absorption auf den zum Zweck verwendeten sauren aktiven Erden erfolgen.

Nella presente Nota riferiamo su alcune prove da noi eseguite allo scopo di eliminare residui di diazinone dall'olio di oliva, analogamente a quanto effettuato da uno di noi nei riguardi di residui di parathion e pubblicato con la Nota: « Raffinazione di olii di oliva contenenti residui di parathion » ⁽¹⁾.

vano la completa eliminazione del diazinone, la successiva fase di deodorazione non avrebbe rivestito alcuna importanza ai fini dell'eliminazione dell'insetticida. Tuttavia, abbiamo ritenuto opportuno effettuarla per completare il normale processo di raffinazione e per vedere se i caratteri organolettici e le caratteristiche fisiche e chimiche dell'olio raffinato ed al quale era stato aggiunto prima della raffinazione il diazinone, corrispondevano a quelle dello stesso olio raffinato ma non addizionato di diazinone. I risultati ottenuti nelle varie fasi di raffinazione sono riportati nella tabella n. 1.

TABELLA 1.

Prove eseguite applicando il normale processo di raffinazione a campioni di olio addizionati in laboratorio di quantità di diazinone comprese fra 10 e 200 ppm.

Prova N.	Diazinone contenuto nell'olio			
	Prima del processo di raffinazione ppm	Dopo la fase di neutralizzazione ppm	Dopo la fase di decolorazione ppm	Dopo la fase di deodorazione ppm
1	10	10,0	0	0
2	50	50,5	0	0
3	100	101,0	0	0
4	200	198,0	0	0

Che il diazinone sia stato trattenuto dalle terre decoloranti è stato confermato mediante la sua determinazione in dette terre. Come risulta, infatti, dalla tabella n. 2, il diazinone addizionato inizialmente all'olio è stato ritrovato praticamente tutto nelle terre.

TABELLA 2.

Quantità di diazinone, riferite all'olio, recuperate dalle terre attive impiegate nella fase di decolorazione.

Diazinone contenuto nell'olio prima del processo di raffinazione ppm	Diazinone recuperato dalle terre ppm	Recupero %
100	90	90,0
200	185	92,5

Però, dato che non era da escludersi che, alla temperatura elevata alla quale generalmente si esegue tale fase (90-105°C) e nell'ambiente acido determinato dalle terre, il diazinone, sia pure in parte, potesse

decomporsi in altri composti più o meno tossici, abbiamo condotto altre prove di decolorazione in condizioni di temperatura e di pressione diverse, per cercare di ottenere l'eliminazione dell'insetticida dall'olio e contemporaneamente diminuire le probabilità di decomposizione del diazinone. Infatti A. MARGOT e H. GYSIN (⁴ loc. cit.), hanno studiato la decomposizione del diazinone a caldo ed in presenza di umidità, identificando 12 prodotti di decomposizione. Ma se ciò dovesse avvenire anche nell'olio, sette dei possibili derivati, contenendo la stessa funzione basica del diazinone, dovrebbero essere trattenuti dalle terre acide, mentre altri cinque, che non contengono la funzione basica ma sono prodotti fosforati, tra cui il TEPP (tetraetilpirofosfato), prodotto molto tossico, se presenti nell'olio decolorato, dovrebbero essere rivelati mediante la determinazione del fosforo.

Le diverse condizioni di temperatura e di pressione alle quali è stata effettuata l'aggiunta della miscela di terre decoloranti e carbone, si possono riassumere come segue:

- a) temperatura di 103°C e pressione atmosferica (condizioni generalmente seguite nel processo normale di raffinazione);
- b) temperatura di 70°C e pressione di 1 mm di Hg;
- c) temperatura ambiente e pressione di 1 mm di Hg.

Da tali prove è risultato che in tutti e tre i casi sopracitati il diazinone ed i suoi eventuali prodotti di decomposizione solforati, determinabili secondo il metodo di R. SUTER (^{6, 7} loc. cit.), non sono più presenti nell'olio decolorato.

Inoltre, sull'estratto idroalcolico dell'olio, abbiamo effettuato la ricerca di tracce di prodotti fosforati, col metodo di B. BAZZI e coll. (⁸), da noi opportunamente adattato, e tale ricerca è risultata negativa. La validità del metodo è stata confermata effettuando la determinazione del fosforo su di un campione di olio da noi addizionato di piccole quantità di TEPP.

Ed anche la ricerca di prodotti inibitori della colinesterasi « in vitro » sull'estratto acquoso dell'olio, effettuata con il metodo colorimetrico di COOK (⁹), è risultata negativa.

Abbiamo anche effettuato, sull'olio di partenza addizionato di diazinone, prove di deodorazione senza eseguire precedentemente nè la neutralizzazione, nè la decolorazione, scaldando l'olio a 200°C, alla pressione di 1 mm di Hg per tre ore, e ciò allo scopo di stabilire se, in tali condizioni, l'insetticida veniva eliminato, e ricorrere eventualmente a tale trattamento anzichè all'intero processo di raffinazione.

E' risultato che l'olio così ottenuto contiene prodotti solforati determinabili con lo stesso metodo del diazinone e che pertanto potrebbero essere identificati o con l'insetticida tal quale o con i suoi prodotti di decomposizione. Tutto ciò, in ogni modo, potrà essere chiarito da ulteriori indagini.

Per quanto riguarda i caratteri organolettici e le caratteristiche fisiche e chimiche dell'olio raffinato dopo essere stato precedentemente addizionato di diazinone, essi, com'era del resto da prevedersi, non differiscono da quelli dell'olio raffinato e non addizionato di diazinone. Ciò si può constatare dai dati riportati nella tabella n. 3.

TABELLA 3.

Caratteristiche fisiche e chimiche dell'olio di partenza, prima di essere sottoposto alla raffinazione (campione n. 1), dello stesso olio (non addizionato di diazinone) sottoposto a raffinazione (campione n. 2), e dell'olio (precedentemente addizionato di ca. 200 ppm di diazinone) pure sottoposto a raffinazione (campione n. 3).

Caratteristiche fisiche e chimiche	Campione N. 1	Campione N. 2	Campione N. 3	
			a) con decolorazione a 105°C a press. norm.	b) con decolorazione a 70°C sotto vuoto
Indice di rifraz. a 25°C	1,4681	1,4680	1,4678	1,4680
Num. di Iodio di Hanus	83,60	82,50	81,80	82,50
Grado term. Tor- telli	45,50	42,50	42,50	43,50
Num. di saponifi- cazione	193,10	196,10	191,70	191,70
Num. di acidità in ac. oleico % .	0,56	0,14	0,22	0,14
Luce di Wood .	giallo con rifl. rossi	azzurro	azzurro cielo carico	azzurro cielo carico
Reaz. Villavecchia -Fabris	negativa	negativa	negativa	negativa

Nella parte sperimentale che segue, sono dettagliatamente descritte le modalità seguite nelle varie prove effettuate e, precisamente:

- 1) nel normale processo di raffinazione;
- 2) nelle prove di decolorazione effettuate alle diverse condizioni di temperatura e di pressione;

3) nelle determinazioni del diazinone sulle terre provenienti dalla decolorazione;

4) nelle prove atte a svelare nell'olio raffinato eventuali tracce di prodotti fosforati o di prodotti inibitori della colinesterasi « in vitro ».

PARTE SPERIMENTALE

I° - PROVE DI RAFFINAZIONE.

A - NEUTRALIZZAZIONE.

A quattro porzioni di Kg 2 ciascuna di olio, sono state addizionate quantità variabili di diazinone ed, esattamente, 10, 50, 100 e 200 ppm, quindi sono state scaldate in grossi becker fino a 92-94°C, sotto agitazione meccanica. Raggiunta detta temperatura, è stata addizionata gradualmente una quantità di acqua pari a:

cm³ 5 per g 100 di olio e per grado di acidità (espressa in acido oleico).

Quindi, a mezzo di una buretta, si è fatta sgocciolare, nel tempo di 30' ca., una quantità di idrato sodico a 22° Bé, pari a:

cm³ 0,76 per g 100 di olio e per grado di acidità, più un eccesso pari all'1% dell'olio usato.

Dopo l'aggiunta della soluzione di idrato sodico e interrotta l'agitazione, si è lavato l'olio con una soluzione acquosa di cloruro sodico al 10%, quindi si è posto in stufa a 80°C, per 8 ore. Dopo tale periodo di tempo l'olio è stato sifonato e filtrato su carta.

B - DECOLORAZIONE.

Le prove di decolorazione sono state effettuate sia a pressione atmosferica, sia a pressione ridotta.

a) *Prove eseguite a pressione atmosferica.*

L'olio proveniente dalla neutralizzazione e successiva filtrazione è stato nuovamente scaldato, in un grosso becker, sotto agitazione, fino

a 95-105°C e quindi addizionato, poco alla volta, di una miscela di terre decoloranti così costituita:

— terra attivata « Rumsil » della Ditta Rumianca: 3% dell'olio usato;

— carbone attivo « Norit » della Ditta Ledoga: 0,3% dell'olio usato.

Si è mantenuto l'olio per mezz'ora a tale temperatura, sempre sotto agitazione, e quindi si è filtrato.

b) Prove eseguite a pressione ridotta.

L'olio proveniente dalla neutralizzazione e successiva filtrazione è stato posto in un pallone a tre colli, con giunti a smeriglio, di cui uno è servito per introdurre l'olio, dopo di che è stato chiuso con tappo a smeriglio, l'altro è stato chiuso con tappo recante un termometro ed il terzo è stato collegato con il vuoto. Nell'interno del pallone si è introdotto un agitatore magnetico ed il pallone è stato chiuso in una mantella per riscaldamento elettrico, regolata da apposito reostato.

Come abbiamo già detto, in alcune prove il riscaldamento è stato applicato in maniera tale da mantenere l'olio, per la durata della decolorazione, a 70°C, mentre in altre prove il riscaldamento non è stato applicato e si è effettuata la decolorazione a temperatura ambiente.

L'olio, introdotto nel pallone, è stato anzitutto asciugato mediante applicazione del vuoto (pressione residua 1 mm di Hg), sotto agitazione magnetica, per 15 minuti. Quindi, riportata la pressione a quella atmosferica, si è introdotta nel pallone la miscela delle terre attive, nelle proporzioni già dette. Applicato nuovamente il vuoto, si è protratta la decolorazione per 30 minuti e, secondo i casi, a temperatura ambiente od alla temperatura di 70°C.

Trascorso tale periodo di tempo, si è nuovamente portato l'olio a pressione atmosferica e quindi filtrato.

C - DEODORAZIONE.

La fase di deodorazione è stata condotta sia sull'olio proveniente dalla decolorazione e successiva filtrazione, sia sull'olio di partenza addizionato di diazinone e non sottoposto alle fasi di neutralizzazione e di decolorazione.

Allo scopo, l'olio è stato introdotto in un pallone a tre colli, analogo

a quello già descritto per la decolorazione sotto vuoto. E' stato quindi applicato il vuoto (pressione residua 1 mm di Hg) e, sotto agitazione magnetica, si è scaldato l'olio, mediante mantella elettrica, fino a 200°C. temperatura alla quale è stato mantenuto per tre ore.

Sui campioni di olio prelevati dopo ciascuna delle fasi sopramenzionate è stata eseguita la determinazione del diazinone con il metodo di R. SUTER (⁶, ⁷ loc. cit.).

I risultati ottenuti sono raccolti nella tabella n. 1 (i dati riportati in tabella rappresentano la media di almeno due determinazioni).

II° - DETERMINAZIONE DEL DIAZINONE NELLE TERRE PROVENIENTI DALLA DECOLORAZIONE.

L'imbuto con il filtro contenente le terre, provenienti dalla fase di decolorazione dell'olio, è stato posto sopra ad un imbuto separatore da 1 litro. Il filtro è stato forato con una bacchetta di vetro e le terre sono state trasferite quantitativamente nell'imbuto separatore mediante numerosi lavaggi con esano, fino ad un volume totale di ca. cm³ 500. E' stata quindi addizionata una soluzione di idrato sodico al 2% fino a leggera reazione alcalina, controllata con saggi alla tocca su cartine di indicatore universale. Si è energicamente agitato l'imbuto per 10 minuti e, quando si è avuta la separazione netta delle due fasi, si è passata la fase acquosa in un secondo imbuto separatore ed è stata sottoposta ad una seconda estrazione con cm³ 100 di esano. Le fasi esaniche riunite sono state filtrate su carta ed introdotte in un pallone tarato da 1 litro, portando a volume con esano. Secondo la quantità di diazinone addizionato all'olio di partenza, è stata prelevata un'opportuna aliquota di tale soluzione esanica e su di essa è stata effettuata la determinazione del diazinone con il solito metodo.

Nella tabella n. 2 sono riportati i valori ottenuti in tali determinazioni, ognuno dei quali rappresenta la media di almeno due prove. Come si può osservare da detti dati, il diazinone addizionato inizialmente all'olio è stato ritrovato praticamente tutto nelle terre.

III° - RICERCA DI PRODOTTI FOSFORATI E DI PRODOTTI INIBITORI « IN VITRO » DELLA COLINESTERASI NELL'OLIO RAFFINATO.

Le ricerche sono state eseguite su ciascuno dei campioni di olio raffinato, precedentemente addizionati di quantità diverse di diazinone (10, 50, 100 e 200 ppm).

Si è operato esattamente nel modo seguente:

g 10 dell'olio raffinato sono stati posti in un imbuto separatore da cm^3 250 ed addizionati di cm^3 20 di alcool etilico al 50%. Si è quindi sottoposto l'imbuto separatore ad agitazione per 10 minuti ca. (il che corrisponde a 400 rotazioni), mediante l'agitatore meccanico descritto da B. BAZZI e coll. (⁸ loc. cit.). Dopo aver ottenuto la separazione delle due fasi, si è trasferita quella idroalcolica in un becker da cm^3 150, ripetendo l'estrazione altre due volte, con cm^3 20 di alcool al 50% ogni volta, e raccogliendo gli estratti idroalcolici nello stesso becker. Si è quindi evaporato su bagno-maria, con lieve calore e con l'aiuto di una leggera corrente d'aria, fino a piccolo volume (cm^3 5 ca.), trasferendo poi in un palloncino a pera per microkjeldall da cm^3 50 ed evaporando nuovamente fino a secco. Al residuo sono stati addizionati cm^3 3 di acido perclorico ed il palloncino è stato riscaldato con una microfiamma, fino ad ottenere una soluzione limpida ed incolore. Dopo raffreddamento il liquido è stato filtrato su filtro a fascia bleu ed introdotto in un palloncino tarato da cm^3 25. Sono stati quindi addizionati cm^3 2 di reattivo amidol e cm^3 1 di molibdato ammonico, per ottenere la reazione caratteristica del bleu di molibdeno in presenza di fosforo, secondo quanto descritto da B. BAZZI (⁸ loc. cit.).

Allo scopo di controllare la validità di tale metodo di estrazione e di determinazione di composti fosforati che eventualmente si fossero potuti formare dalla decomposizione del diazinone nell'olio in seguito al processo di raffinazione, e principalmente del TEPP, prodotto fortemente tossico, sono state addizionate quantità note di TEPP ad un campione di olio puro e l'olio è stato sottoposto al processo di estrazione e di determinazione sopra descritto. La quantità di fosforo dosata è risultata praticamente corrispondente a quella del TEPP aggiunta all'olio di partenza.

Per la ricerca di eventuali prodotti inibitori della colinesterasi « in vitro », g 5 di olio raffinato sono stati estratti due volte con cm^3 5 di acqua distillata ogni volta, e su cm^3 1 di estratto acquoso è stata effettuata la ricerca di prodotti inibitori della colinesterasi « in vitro » con il metodo colorimetrico di J. W. COOK (⁹). Come già detto, anche tale ricerca è risultata negativa.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) ALESSANDRINI M. E., PALAZZO F. - Rend. Istituto Sup. Sanità, XX, 113 (1957).
 - (²) ALESSANDRINI M. E., BONIFORTI L., DORETTI M., LANFORTI G. F., RAMELLI G. C., SAMPAOLO A. - Rend. Istituto Sup. Sanità, XX, 1152 (1957).
 - (³) ALESSANDRINI M. E., LANFORTI G. F., RAMELLI G. C., SAMPAOLO A. - Rend. Istituto Sup. Sanità, XXI, 1097 (1958).
 - (⁴) MARGOT A., GYSIN H. - Helvetica Chim. Acta, XL, 1562 (1957).
 - (⁵) METCALF R. L. - Organic Insecticides, 258 (1955). - Interscience Publishers, Inc. N. Y.
 - (⁶) SUTER R., DELLEY R., MEYER R. - Z. An. Chem., 147: 173 (1955).
 - (⁷) DORETTI M.: « Determinazione di residui di diazinone nell'olio di oliva ». - (In corso di stampa).
 - (⁸) BAZZI B., DE PIETRI-TONELLI P., SANTI R.: « Metodi per il microdosaggio chimico e biologico dei residui della N-monometilammide dell'acido 0,0-dimetilditiofosforilacetico nell'olio di oliva ». - Laboratorio Sperimentale Agrario - Soc. Montecatini - Signa (1957).
 - (⁹) COOK J. W. - Journal A.O.A.C., 37: 561 (1954).
-