



UNIVERSITÀ  
DI PAVIA

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO**

Direttore Chiar.ma Prof.ssa Simona Collina

**LAUREA MAGISTRALE A CICLO UNICO IN  
CHIMICA E TECNOLOGIA FARMACEUTICHE**

**APPLICAZIONE DELLA TECNICA  
CLOUD POINT EXTRACTION PER L'ANALISI  
QUANTITATIVA DELLA CURCUMINA**

**Relatore:**

Prof.ssa Chiara Milanese

Prof. Yuri Antonio Diaz Fernandez

**Correlatore:**

Vittorio Maceratesi

Tesi di Laurea Magistrale a Ciclo Unico di  
Erika Panaro

Anno Accademico 2024/2025



## Abstract

Il presente studio descrive lo sviluppo e la validazione di un metodo di estrazione al punto di intorbidimento (Cloud Point Extraction, CPE) basato sull'impiego del tensioattivo non ionico Triton X-100. Il lavoro è articolato in due fasi sequenziali: una fase di caratterizzazione fisico-chimica del sistema micellare e una fase applicativa volta al recupero della curcumina.

Nella prima fase, è stato indagato il fenomeno del Cloud Point (CP) del Triton X-100 in soluzione acquosa (1% p/p) attraverso la costruzione di diagrammi di fase. È stata analizzata l'influenza di additivi quali cloruro di sodio (NaCl) e diversi alcoli a concentrazioni crescenti sulla Temperatura di Cloud Point (TCP). L'indagine è stata condotta mediante l'integrazione di due tecniche complementari: il monitoraggio in bagno termostato e la diffusione dinamica della luce (DLS), permettendo di comprendere come la forza ionica e la polarità del mezzo modifichino la stabilità del sistema micellare.

Nella seconda fase, il sistema ottimizzato è stato applicato all'estrazione della curcumina, polifenolo noto per le elevate proprietà antiossidanti ma caratterizzato da una scarsa solubilità acquosa. Previa costruzione di una curva di calibrazione mediante spettrofotometria UV-Vis, il metodo CPE è stato testato su soluzioni standard, a cui è stato aggiunto NaCl per indurre il fenomeno del CP. Dopo aver raggiunto la TCP, le due fasi sono state separate mediante centrifugazione. La concentrazione di curcumina nella fase estratta è stata determinata utilizzando, nuovamente, uno spettrofotometro UV-Vis.

La validazione del protocollo è stata completata attraverso la valutazione dell'accuratezza su un campione titolato e l'analisi della robustezza su una matrice reale complessa (integratore alimentare commerciale). I risultati ottenuti mostrano un'elevata efficienza del metodo, con percentuali di recupero (recovery) stabilmente superiori all'80%, confermando la validità della CPE come tecnica green, rapida ed efficace per la determinazione di composti bioattivi in formulazioni commerciali.



# Indice

<b>1</b>	<b>Introduzione</b>	<b>1</b>
1.1	Green Chemistry e tecniche di estrazione . . . . .	1
1.2	Tensioattivi e chimica micellare . . . . .	2
1.3	Triton X-100 . . . . .	3
1.4	Il fenomeno del Cloud Point (CP) . . . . .	5
1.5	Cloud Point Extraction . . . . .	7
1.6	I Curcuminoidi: composizione e rilevanza analitica . . . . .	9
1.7	La Curcumina: struttura e proprietà chimico-fisiche . . . . .	11
1.8	La Curcumina: profilo farmacologico e potenziale terapeutico . . . . .	12
<b>2</b>	<b>Materiali e Strumenti</b>	<b>16</b>
2.1	Materiali . . . . .	16
2.2	Strumenti . . . . .	16
2.2.1	Bagno a ultrasuoni . . . . .	16
2.2.2	Bagno termostato . . . . .	17
2.2.3	Dynamic Light Scattering . . . . .	18
2.2.4	Spettroscopia infrarossa . . . . .	20
2.2.5	Diffratometro a raggi X . . . . .	21
2.2.6	Centrifuga . . . . .	22
2.2.7	Spettroscopia UV-Vis . . . . .	23
2.2.8	Calorimetria Differenziale a Scansione . . . . .	25
<b>3</b>	<b>Metodologie sperimentali</b>	<b>27</b>
3.1	Caratterizzazione del comportamento di fase del sistema acqua/Triton X-100	27
3.1.1	Preparazione delle soluzioni di TX-100 . . . . .	28
3.1.2	Analisi delle soluzioni mediante bagno termostato . . . . .	29
3.1.3	Analisi delle soluzioni mediante DLS . . . . .	30
3.2	Caratterizzazione chimico-fisica delle polveri di partenza . . . . .	32
3.2.1	Caratterizzazione chimico-fisica dello standard di curcumina . . . . .	33
3.2.2	Caratterizzazione chimico-fisica del campione a titolo noto di curcuminoidi . . . . .	34
3.2.3	Caratterizzazione chimico-fisica dell'integratore alimentare . . . . .	35
3.3	Ottimizzazione del processo di estrazione . . . . .	36
3.3.1	Studio della solubilità dello standard di curcumina . . . . .	36
3.3.2	Determinazione della retta di calibrazione in matrice idroalcolica . . . . .	37
3.3.3	Valutazione dell'effetto matrice nel sistema micellare (TX-100/NaCl) . . . . .	40

3.3.4	Studio dell'influenza della forza ionica sull'efficienza di estrazione della curcumina . . . . .	42
3.3.5	Protocollo operativo ottimizzato . . . . .	47
3.3.6	Applicazione del metodo a campione standard di curcumina . . . . .	48
3.3.7	Applicazione del metodo a campione a titolo noto di curcuminoidi . . . . .	49
3.3.8	Applicazione del metodo a campione reale: integratore alimentare . . . . .	50
<b>4</b>	<b>Risultati e Discussione</b>	<b>52</b>
4.1	Caratterizzazione del comportamento di fase del sistema acqua/Triton X-100 . . . . .	52
4.1.1	Determinazione preliminare della Temperatura di Cloud Point mediante bagno termostato . . . . .	52
4.1.2	Determinazione accurata della Cloud Point Temperature mediante DLS . . . . .	53
4.1.3	Effetto della forza ionica: influenza del NaCl sulla TCP del sistema in assenza di alcol . . . . .	54
4.1.4	Analisi dell'effetto degli alcoli sul comportamento di fase del sistema . . . . .	55
4.1.5	Analisi comparativa dei diagrammi di fase ottenuti . . . . .	59
4.1.6	Analisi comparativa dell'effetto degli alcoli sulla TCP a concentrazione salina costante . . . . .	62
4.1.7	Implicazioni dei risultati di fase per lo sviluppo del protocollo CPE . . . . .	64
4.2	Caratterizzazione chimico-fisica delle polveri di partenza . . . . .	65
4.2.1	Standard di curcumina . . . . .	65
4.2.2	Campione a titolo noto di curcuminoidi . . . . .	68
4.2.3	Integratore alimentare commerciale . . . . .	71
4.2.4	Considerazioni complessive sulla caratterizzazione delle matrici solide . . . . .	76
4.3	Ottimizzazione del metodo CPE per l'estrazione della curcumina . . . . .	76
4.3.1	Studio preliminare della solubilità della curcumina . . . . .	77
4.3.2	Sviluppo del metodo UV-Vis e individuazione del massimo di assorbimento . . . . .	77
4.3.3	Curva di calibrazione in matrice etanolo/acqua 60:40 . . . . .	78
4.3.4	Curva di calibrazione in matrice micellare TX-100/NaCl e valutazione dell'effetto matrice . . . . .	79
4.3.5	Influenza della concentrazione di NaCl sull'efficienza di estrazione . . . . .	80
4.3.6	Selezione delle condizioni operative ottimali . . . . .	85
4.3.7	Applicazione del metodo al campione standard di curcumina . . . . .	86
4.3.8	Applicazione del metodo al campione a titolo noto di curcuminoidi . . . . .	87

4.3.9	Applicazione del metodo a matrice reale: integratore alimentare commerciale . . . . .	88
<b>5</b>	<b>Conclusioni</b>	<b>90</b>
5.1	Caratterizzazione del comportamento di fase . . . . .	90
5.2	Ottimizzazione del protocollo estrattivo . . . . .	90
5.3	Validazione su matrici a complessità crescente . . . . .	91
5.4	Considerazioni conclusive . . . . .	92
<b>6</b>	<b>Prospettive Future</b>	<b>93</b>

## Elenco delle figure

1.1	Formazione delle micelle [7]. . . . .	3
1.2	Struttura molecolare del Triton X-100 [9]. . . . .	4
1.3	Schema del sistema CPE per analiti da matrici complesse [7]. . . . .	8
1.4	Rappresentazione della CPE di ioni metallici [7]. . . . .	9
1.5	Struttura molecolare dei curcuminoidi [20]. . . . .	10
1.6	Struttura molecolare della curcumina [23]. . . . .	11
1.7	Rappresentazione del potenziale terapeutico della curcumina (immagine creata con BioRender). . . . .	15
2.1	a) vial e termometro immersi nel bagno termostato collegato tramite due tubi di gomma al termostato, b) termostato. . . . .	18
2.2	Schema rappresentativo dello strumento (immagine creata con BioRender). . . . .	19
2.3	Strumento Malvern Zetasizer Nano utilizzato per le analisi di DLS. . . . .	20
2.4	Spettrometro Thermo Scientific Nicolet iS20. . . . .	20
2.5	Diffrattometro a raggi X da banco Bruker D6 PHASER utilizzato per la caratterizzazione dei campioni in polvere. . . . .	22
2.6	Centrifuga da banco refrigerata VWR Mega Star 1.6R utilizzata per la ripartizione dei campioni. . . . .	23
2.7	Schema rappresentativo dello strumento (immagine creata con BioRender). . . . .	24
2.8	Spettrometro Agilent Cary 60 UV-Vis utilizzato per le caratterizzazioni ottiche dei campioni. . . . .	25
2.9	Calorimetro differenziale a scansione (DSC) modello Q2000 della TA Instruments. . . . .	26
3.1	Esempio delle soluzioni preparate per l'analisi. I vial contengono miscele a base di TX-100, NaCl e ROH. . . . .	29
3.2	Confronto visivo del fenomeno del cloud point. Si osserva il passaggio dalla fase limpida (vial a destra) alla fase torbida (vial a sinistra), segno dell'avvenuta transizione di fase nel sistema. . . . .	30
3.3	Esempio di grafico che si ottiene da un'analisi al DLS. Profilo termico dello <i>z-average</i> per il sistema TX-100/NaCl/EtOH. L'improvviso incremento dimensionale (da valori inferiori a 100 nm a oltre 2500 nm) evidenzia la formazione di aggregati di grandi dimensioni, fenomeno che identifica sperimentalmente il cloud point. . . . .	32
3.4	Matraccio tarato contenente la soluzione madre di curcumina a concentrazione 0,204 mg/mL. . . . .	38

3.5	Soluzioni standard preparate mediante soluzione madre (matraccio), all'interno di Eppendorf. . . . .	39
3.6	Esempio di spettro UV acquisito dall'analisi della Replica 1. . . . .	40
3.7	Esempio di spettro UV acquisito dall'analisi della Replica 1. . . . .	42
3.8	Becher contenente la soluzione madre di curcumina a concentrazione 4 mg/ml. . . . .	43
3.9	In 6 Falcon sono stati inseriti 14 mL della soluzione da centrifugare. . . .	44
3.10	Dopo aver eseguito la centrifugazione, si ottiene la ripartizione della soluzione: superiormente si ripartisce la fase estrattiva, contenente la curcumina; inferiormente vi è la fase residua. A questo punto è possibile eseguire i prelievi della fase estrattiva, per poter quantificare la curcumina estratta. . . . .	45
3.11	Esempio di spettro UV acquisito dall'analisi della fase estrattiva, di 6 Falcon analizzate, contenenti la stessa soluzione di partenza. . . . .	46
3.12	Esempio di spettro UV acquisito dall'analisi della fase residua acquosa, di 6 Falcon analizzate, contenenti la stessa soluzione di partenza. . . . .	46
3.13	a) integratore alimentare in capsule; b) Falcon contenente 926,34 mg di polvere e 20 mL di etanolo, come si può notare è presente del precipitato.	51
4.1	Andamento della temperatura di Cloud Point (TCP) del sistema TX-100 1% (p/p) in funzione della concentrazione molale di NaCl, in assenza di alcol. I valori di TCP sono stati determinati mediante DLS con incrementi di 0,5°C. . . . .	55
4.2	Andamento della TCP del sistema TX-100 1% (p/p) in funzione della frazione molare di metanolo ( $x_{MeOH}$ ) a tre diverse concentrazioni molali di NaCl (0 m, 1 m e 2 m). I valori di TCP sono stati determinati mediante DLS. . . . .	56
4.3	Andamento della TCP del sistema TX-100 1% (p/p) in funzione della frazione molare di etanolo ( $x_{EtOH}$ ) a tre diverse concentrazioni molali di NaCl (0 m, 1 m e 2 m). I valori di TCP sono stati determinati mediante DLS. . . . .	57
4.4	Andamento della TCP del sistema TX-100 1% (p/p) in funzione della frazione molare di 1-propanolo ( $x_{PrOH}$ ) a tre diverse concentrazioni molali di NaCl (0 m, 1 m e 2 m). I valori di TCP sono stati determinati mediante DLS. . . . .	58

4.5	Andamento della TCP del sistema TX-100 1% (p/p) in funzione della frazione molare di 2-propanolo ( $x_{i-PrOH}$ ) a tre diverse concentrazioni molali di NaCl (0 m, 1 m e 2 m). I valori di TCP sono stati determinati mediante DLS. . . . .	59
4.6	Confronto dell'effetto dei quattro alcoli (EtOH, iPrOH, MeOH, PrOH) sulla TCP del sistema TX-100 1% (p/p) in funzione della frazione molare dell'alcol, in assenza di NaCl (0 m). I valori di TCP sono stati determinati mediante DLS. . . . .	62
4.7	Confronto dell'effetto dei quattro alcoli (EtOH, iPrOH, MeOH, PrOH) sulla TCP del sistema TX-100 1% (p/p) in funzione della frazione molare dell'alcol, in presenza di NaCl 1 m. I valori di TCP sono stati determinati mediante DLS. . . . .	63
4.8	Confronto dell'effetto dei quattro alcoli (EtOH, iPrOH, MeOH, PrOH) sulla TCP del sistema TX-100 1% (p/p) in funzione della frazione molare dell'alcol, in presenza di NaCl 2 m. I valori di TCP sono stati determinati mediante DLS. . . . .	63
4.9	Spettro IR del campione standard di curcumina. . . . .	66
4.10	Termogramma DSC del campione standard di curcumina. . . . .	66
4.11	Diffattogramma a raggi X (XRD) del campione standard di curcumina. . . . .	67
4.12	Spettro IR del campione a titolo noto di curcuminoidi. . . . .	69
4.13	Termogramma DSC del campione a titolo noto di curcuminoidi. . . . .	70
4.14	Diffattogramma a raggi X (XRD) del campione a titolo noto di curcuminoidi. . . . .	71
4.15	Spettro IR del campione integratore alimentare. . . . .	73
4.16	Termogramma DSC del campione integratore alimentare. . . . .	74
4.17	Diffattogramma a raggi X (XRD) del campione di integratore alimentare commerciale. . . . .	75
4.18	Rappresentazione della curva di taratura in matrice idroalcolica. . . . .	79
4.19	Rappresentazione della curva di taratura in matrice acquosa. . . . .	80

## Elenco delle tabelle

1.1	Classificazione dei tensioattivi. . . . .	3
3.1	Parametri strumentali utilizzati per l'acquisizione degli spettri IR di tutti i campioni analizzati (standard di curcumina, campione a titolo noto di curcuminoidi e integratore alimentare). . . . .	32
3.2	Parametri strumentali utilizzati per l'acquisizione del termogramma DSC dello standard di curcumina. . . . .	33
3.3	Parametri strumentali utilizzati per l'acquisizione del diffrattogramma a raggi X (XRD) dello standard di curcumina. . . . .	33
3.4	Parametri strumentali utilizzati per l'acquisizione del termogramma DSC del campione a titolo noto di curcuminoidi. . . . .	34
3.5	Parametri strumentali utilizzati per l'acquisizione del diffrattogramma a raggi X del campione titolato di curcuminoidi. . . . .	35
3.6	Parametri strumentali utilizzati per l'acquisizione del termogramma DSC dell'integratore alimentare. . . . .	36
3.7	Volumi di soluzione madre e di matrice utilizzati per la preparazione degli standard della curva di taratura della curcumina (intervallo di concentrazione 0,001–0,009 M). . . . .	39
3.8	Parametri sperimentali impostati per le analisi UV-Vis. . . . .	40
3.9	Parametri operativi delle prove di estrazione a diverse concentrazioni di NaCl. $V_1$ : volume del primo prelievo della fase estrattiva; $V_2$ : volume del secondo prelievo; $V_{ridisp}$ : volume di ridispersione in etanolo/acqua 60:40; TCP: temperatura di cloud point osservata; Centr.: condizioni di centrifugazione ( $RCF \times g$ , tempo, temperatura). . . . .	45
3.10	Parametri di prelievo e ridispersione per l'applicazione del protocollo ottimizzato al campione a titolo noto di curcuminoidi. . . . .	49
3.11	Parametri di prelievo e ridispersione per l'applicazione del protocollo ottimizzato al campione di integratore alimentare. . . . .	51
4.1	Variazione della temperatura in funzione della concentrazione per diverse miscele di alcoli e NaCl. . . . .	53
4.2	Range di temperatura utilizzati per le analisi DLS delle soluzioni contenenti 1-propanolo a diverse frazioni molari in assenza di NaCl (0 m). (*) Per le soluzioni con $x_{PrOH} \geq 0,03$ , la TCP risulta superiore al limite strumentale (80°C) e non è stato possibile determinarla. . . . .	53
4.3	Range di temperatura utilizzati per le analisi DLS delle soluzioni contenenti 2-propanolo a diverse frazioni molari in presenza di NaCl 2 m. . . . .	54

4.4	Range di temperatura utilizzati per le analisi DLS delle soluzioni contenenti metanolo a diverse frazioni molari in presenza di NaCl 2 m. . . . .	54
4.5	Valori di TCP determinati via DLS in funzione della frazione molare dell'alcol ( $x_{ROH}$ ) e della molalità di NaCl. . . . .	61
4.6	Rese di estrazione della curcumina nella fase micellare a 4,5 m NaCl. Condizioni: TX-100 1% (p/p), $V_1 = 250 \mu\text{L}$ , $V_2 = 200 \mu\text{L}$ , $V_{\text{ridisp}} = 7 \text{ mL}$ .	81
4.7	Rese di estrazione della curcumina nella fase micellare a 4,0 m NaCl. Condizioni: TX-100 1% (p/p), $V_1 = 250 \mu\text{L}$ , $V_2 = 300 \mu\text{L}$ , $V_{\text{ridisp}} = 7 \text{ mL}$ .	82
4.8	Rese di estrazione della curcumina nella fase micellare a 3,5 m NaCl. Condizioni: TX-100 1% (p/p), $V_{\text{prelevato}} = 0,5 \text{ mL}$ , $V_{\text{ridisp}} = 7 \text{ mL}$ . . . . .	83
4.9	Rese di estrazione della curcumina nella fase micellare a 3,0 m NaCl. Condizioni: TX-100 1% (p/p), $V_1 = 500 \mu\text{L}$ , $V_2 = 400 \mu\text{L}$ , $V_{\text{ridisp}} = 7 \text{ mL}$ .	84
4.10	Rese di estrazione della curcumina nella fase micellare a 3,0 m NaCl. Condizioni: TX-100 1% (p/p), $V_{\text{estr}} = 400 \mu\text{L}$ , $V_{\text{ridisp}} = 7 \text{ mL}$ . . . . .	86
4.11	Rese di estrazione e bilancio di massa (recupero totale) sul campione a titolo noto di curcuminoidi in polvere (titolo dichiarato 95%). Condizioni: TX-100 1% (p/p), NaCl 3,0 m. . . . .	87
4.12	Rese di estrazione e bilancio di massa sull'integratore alimentare (titolo teorico in curcuminoidi 85%). Condizioni: TX-100 1% (p/p), NaCl 3,0 m.	88



# 1 Introduzione

Il presente lavoro si propone di analizzare l'efficacia della tecnica di estrazione al punto di intorbidimento (Cloud Point Extraction, CPE) per il recupero della curcumina da matrici acquose, utilizzando il tensioattivo non ionico Triton X-100. La curcumina, composto polifenolico di elevato interesse biologico, grazie alle sue spiccate proprietà antiossidanti e antinfiammatorie, presenta tuttavia una marcata idrofobicità e una scarsa stabilità chimica. La sua suscettibilità a fenomeni di degradazione idrolitica e la sua elevata fotosensibilità ne limitano fortemente la biodisponibilità e la determinazione analitica in fase acquosa. Tali criticità rendono indispensabile lo sviluppo di strategie di pre-concentrazione che siano al contempo efficienti e protettive. In questo scenario, l'impiego del Triton X-100 risulta strategico: la sua capacità di generare sistemi micellari permette di solubilizzare e stabilizzare la curcumina all'interno di un nucleo idrofobico, isolandola e proteggendola dall'ambiente circostante. Inoltre, la sua temperatura di cloud point (TCP), facilmente raggiungibile in condizioni controllate di laboratorio, consente di ottenere un'elevata resa estrattiva con una procedura rapida e a basso impatto ambientale.

Questo lavoro si presenta suddiviso in due parti principali: la prima è dedicata alla caratterizzazione del comportamento di fase del sistema acqua/Triton X-100, con particolare attenzione all'effetto modulante di sali e alcoli sulla TCP; la seconda parte si focalizza sull'applicazione pratica della CPE per l'estrazione e la quantificazione della curcumina, valutando l'efficacia del protocollo sviluppato su campioni standard, su un campione titolato e su una matrice reale complessa rappresentata da un integratore alimentare commerciale.

L'approccio qui presentato non mira solo all'efficacia estrattiva, ma si pone come un'alternativa sostenibile e scalabile, in linea con i principi della Green Analytical Chemistry, per l'analisi di composti bioattivi in formulazioni industriali e farmaceutiche.

## 1.1 Green Chemistry e tecniche di estrazione

L'estrazione liquido-liquido (LLE) rappresenta un pilastro storico della separazione analitica, basandosi sulla ripartizione di un soluto tra due fasi liquide immiscibili. Sebbene sia stata per decenni la tecnica di riferimento sia in ambito industriale che di ricerca, l'allineamento con i moderni protocolli della Green Analytical Chemistry ne ha messo profondamente in discussione l'impiego, a causa dell'elevato consumo di solventi organici volatili, spesso tossici, infiammabili e onerosi da smaltire[1]. In risposta alla necessità di ridurre l'impatto ambientale e i rischi operativi, si è assistito a un cambio di paradigma verso metodologie estrattive che minimizzino l'uso di sostanze nocive [2].

In questo contesto, il Cloud Point Extraction (CPE) si configura come una valida alternati-

va sostenibile. Introdotta per la prima volta in ambito analitico da Watanabe e Tanaka nel 1978, la CPE ha rivoluzionato l'approccio alla separazione sfruttando il comportamento termosensibile dei tensioattivi non ionici al di sopra della loro concentrazione micellare critica (CMC). A differenza della LLE convenzionale, questa tecnica impiega l'acqua come solvente principale, riducendo drasticamente la dipendenza dai solventi organici [3].

Il processo si basa sulla transizione di fase che avviene al raggiungimento della Temperatura di Cloud Point (TCP): a questa temperatura, la soluzione inizialmente limpida diventa torbida e si separa in una fase acquosa e in una fase ricca di tensioattivo (fase micellare) di volume estremamente ridotto. Tale meccanismo non garantisce solo l'efficace estrazione dell'analita, ma ne permette una significativa pre-concentrazione, migliorando sensibilmente la sensibilità analitica complessiva [4].

## 1.2 Tensioattivi e chimica micellare

I tensioattivi sono molecole anfifiliche caratterizzate da una struttura peculiare, composta da un gruppo idrofobico (solitamente una catena idrocarburica) con scarsa affinità per il solvente e da un gruppo idrofilo polare o ionico che presenta, al contrario, una forte interazione con esso. Quando tali molecole vengono disciolte in un solvente polare come l'acqua, la porzione idrofobica tende a distorcere la struttura del solvente, provocando un aumento dell'energia libera del sistema. Per raggiungere uno stato di minima energia e minimizzare il contatto sfavorevole tra le "code" idrofobiche e l'acqua, il sistema risponde attraverso l'orientamento specifico delle molecole all'interfaccia soluzione/aria o mediante la formazione di aggregati organizzati.

L'attività dei tensioattivi deriva dalla loro capacità di adsorbimento alle interfacce, dove riducono la tensione superficiale del sistema. Tuttavia, la presenza del gruppo idrofilo impedisce la completa separazione di fase del tensioattivo, poiché la disidratazione della "testa" polare risulterebbe energeticamente sfavorevole [5]. A seconda della natura chimica di quest'ultimo gruppo, i tensioattivi vengono classificati in quattro categorie principali:

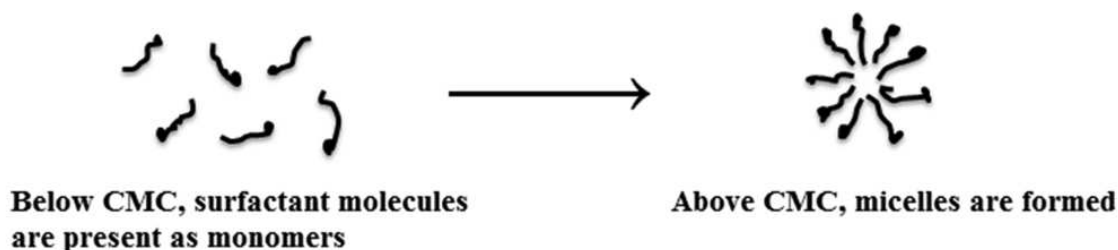
- Anionici: il gruppo idrofilo è carico negativamente (es. solfati, solfonati);
- Cationici: il gruppo idrofilo è carico positivamente (es. sali di ammonio quaternario);
- Non ionici: il gruppo idrofilo è elettricamente neutro (es. alcoli etossilati come il Triton X-100);
- Zwitterionici: il gruppo idrofilo contiene sia cariche positive che negative (es. betaine o amminoacidi) [5].

All'aumentare della concentrazione di tensioattivo, si raggiunge un valore critico denominato Concentrazione Micellare Critica (CMC). Oltre questo punto, la tensione superficiale

**Tabella 1.1:** Classificazione dei tensioattivi.

<b>Classe</b>	<b>Proprietà</b>	<b>Esempi</b>
Non ionici	La testa idrofila non è carica.	Poliossietileni
Anionici	Il gruppo idrofilo contiene una parte anionica come carbossilato, solfonato o solfato.	Sodio dodecil solfato
Cationici	La testa idrofila contiene gruppi positivi come l'ammonio quaternario.	Cetiltrimetilammonio bromuro
Zwitterionici	Esistono come cationici, anionici o neutri a seconda del pH della soluzione.	4-(Dodecildimetil ammonio) butirrato

rimane costante e le molecole iniziano ad auto-associarsi in aggregati detti micelle [6]. In questi aggregati, le code idrofobiche si orientano verso l'interno, formando un nucleo (core) idrofobico capace di ospitare e solubilizzare molecole organiche o farmaci altrimenti insolubili, mentre le teste idrofile si rivolgono verso l'esterno per interagire con il solvente. Questa proprietà rende i tensioattivi vettori ideali per la pre-concentrazione di ioni metallici, lo studio della mobilità dei farmaci e l'analisi di sistemi biologici complessi [5].



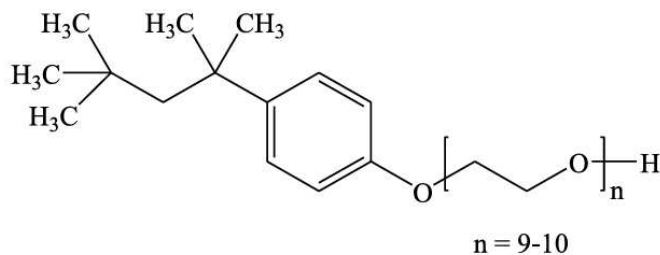
**Figura 1.1:** Formazione delle micelle [7].

In particolare, i tensioattivi non ionici mostrano un comportamento peculiare al variare della temperatura: riscaldando la soluzione, si osserva la comparsa di torbidità seguita dalla separazione in due fasi isotrope coesistenti. Questo fenomeno è dovuto alla disidratazione delle catene polietossilate, che rende il tensioattivo meno solubile e porta alla formazione della fase ricca di micelle [8].

### **1.3 Triton X-100**

Tra i tensioattivi non ionici, il Triton X-100 è stato selezionato in questo lavoro per la sua elevata capacità solubilizzante. Chimicamente si presenta come un ottilfenolo etossilato

(Figura 1.2), costituito da una porzione idrofobica p-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenile e una regione idrofila composta da una catena media di 9,5 unità di ossido di etilene. Grazie alla sua natura non ionica può interagire con le membrane e i lipidi senza denaturare le proteine globulari, rendendolo uno strumento fondamentale nella lisi cellulare e nei protocolli di immunostochimica.



**Figura 1.2:** Struttura molecolare del Triton X-100 [9].

I parametri chiave che definiscono l'efficacia del TX-100 includono:

- a) Concentrazione Micellare Critica (CMC): circa 0,2 - 0,9 mM a temperatura ambiente (valore influenzato da temperatura e forza ionica);
- b) Solubilità: elevata in fase acquosa, il che facilita l'estrazione di analiti idrofobici come la curcumina;
- c) Temperatura di Cloud Point (TCP), temperatura alla quale avviene la separazione di fase necessaria per la CPE: circa 65 °C.

In ambito biomolecolare, il TX-100 è ampiamente utilizzato per la lisi cellulare e la solubilizzazione delle membrane citoplasmatiche, grazie alla sua capacità di interagire con i lipidi di membrana senza denaturare le proteine. È inoltre impiegato nei protocolli di immunostochimica per facilitare la penetrazione degli anticorpi nei tessuti. Nelle scienze dei materiali e nelle nanotecnologie, viene utilizzato per la stabilizzazione di nanoparticelle in sospensione e per la dispersione di nanotubi di carbonio, prevenendone l'aggregazione mediante impedimento sterico [10].

È tuttavia fondamentale rilevare che il TX-100 è oggi soggetto a restrizioni normative (es. Regolamento REACH) poiché la sua degradazione produce ottifenoli, noti per la loro attività di interferenti endocrini. Nonostante la spinta verso alternative più biodegradabili, il Triton X-100 rimane in questo lavoro il benchmark analitico fondamentale. La scelta di questo tensioattivo è supportata dalla sua consolidata rilevanza industriale e dalla sua ampia diffusione in ambito farmaceutico e biotecnologico. Tali caratteristiche, unite all'elevata solubilità in acqua e alla pronta disponibilità commerciale, rendono il TX-100 un modello ideale per la validazione di protocolli di estrazione scalabili e trasferibili a contesti applicativi reali.

## 1.4 Il fenomeno del Cloud Point (CP)

Il Cloud Point (CP) è un fenomeno chimico-fisico che si verifica in soluzioni acquose di tensioattivi non ionici, come il Triton X-100, quando il sistema viene riscaldato oltre un valore critico di temperatura. Al raggiungimento di tale soglia, il tensioattivo perde bruscamente solubilità e la soluzione, originariamente isotropa e limpida, assume un aspetto torbido o lattiginoso. Questa transizione macroscopica è la manifestazione di una separazione di fase istantanea che porta alla formazione di due domini distinti: una fase coacervata, di volume ridotto ed estremamente ricca di tensioattivo, e una fase acquosa bulk, in cui la concentrazione di tensioattivo risulta prossima alla sua Concentrazione Micellare Critica (CMC) [11]. La temperatura alla quale si innesca tale fenomeno è definita Temperatura di Cloud Point (TCP). Il processo è termodinamicamente reversibile: abbassando la temperatura al di sotto della TCP, il sistema riacquista la sua limpidezza originaria. A livello molecolare, al di sotto della TCP le micelle sono stabili e disperse omogeneamente; al di sopra di tale valore, le catene polari polietossilate subiscono una progressiva disidratazione, che riduce le repulsioni steriche inter-micellari e favorisce l'aggregazione. Il core idrofobico di questi aggregati si rivela un ambiente ideale per solubilizzare molecole scarsamente idrosolubili, come la curcumina, facilitandone l'estrazione quantitativa dalla fase acquosa.

Risulta fondamentale distinguere concettualmente la CMC dalla TCP: mentre la prima descrive il processo di auto-assemblaggio dei monomeri anfifilici in strutture micellari, il Cloud Point rappresenta una vera e propria transizione di fase macroscopica del sistema micellare preesistente. Per tensioattivi non ionici etossilati come il TX-100, l'aumento dell'energia termica del sistema causa la rottura dei legami idrogeno tra l'acqua e le catene di polietilenglicole (PEG), innescando la coalescenza delle micelle e la conseguente separazione bifasica [6].

Il valore della TCP non è assoluto, ma è strettamente influenzato da variabili composizionali e termodinamiche, tra cui la concentrazione del tensioattivo, la forza ionica (presenza di sali) e l'aggiunta di co-solventi come gli alcoli. Comprendere e modellizzare l'impatto di tali fattori è un prerequisito essenziale per ottimizzare le condizioni operative della CPE e massimizzarne l'efficienza estrattiva [11]. Inoltre, fattori fisici come l'agitazione meccanica e un gradiente termico controllato possono favorire cineticamente l'equilibrio di separazione delle fasi.

In questo contesto, lo sviluppo di sistemi acquosi bifasici basati su tensioattivi risponde perfettamente ai dettami della Green Analytical Chemistry: essi impiegano composti non volatili, scarsamente tossici, tendenzialmente biodegradabili e biocompatibili. I tensioattivi non ionici, in particolare la serie Triton X, garantiscono costi operativi contenuti, cinetiche di separazione rapide e l'assenza di rischi legati all'inflammabilità dei solventi

organici tradizionali.

Sulla base di queste premesse, la prima parte del presente studio sperimentale è stata dedicata alla caratterizzazione sistematica del comportamento di fase del sistema multicomponente acqua/Triton X-100, valutando l'andamento della TCP in funzione dell'aggiunta di diverse concentrazioni molali di sale e di diverse tipologie e concentrazioni di alcoli. L'obiettivo primario di tale indagine è stata la costruzione di diagrammi di fase accurati per ciascun sistema investigato [12].

Un diagramma di fase costituisce la rappresentazione grafica dei domini di stabilità termodinamica di un sistema in funzione di variabili intensive quali temperatura, pressione e composizione. Esso definisce le condizioni di equilibrio macroscopico in cui il sistema minimizza la propria energia libera di Gibbs, segregandosi, laddove termodinamicamente favorito, in fasi distinte. Nei sistemi colloidali di tensioattivi non ionici, il diagramma delinea la curva binodale, ovvero il confine di solubilità che separa la regione monofasica dalla lacuna di miscibilità. Per il sistema TX-100/acqua, tale curva è caratterizzata da una Lower Critical Solution Temperature (LCST), che riflette proprio la transizione indotta dalla deidratazione termica delle catene polietossilate.

Come precedentemente accennato, la *natura dell'alcol* addizionato esercita un profondo impatto sulla TCP, correlato principalmente alla lunghezza della sua catena idrocarburica. Numerosi studi evidenziano una dicotomia comportamentale: l'aggiunta di alcoli a catena corta (es. metanolo, etanolo, propanolo, iso-propanolo) induce un netto innalzamento del punto di intorbidimento rispetto al valore del TX-100 puro (circa 67 °C); viceversa, l'inserimento di alcoli a catena medio-lunga (es. n-butanolo, isobutanolo, n-ottanolo) ne determina una drastica riduzione. Come regola generale, all'aumentare della lunghezza della catena alchilica, diminuisce la concentrazione di alcol necessaria per indurre la separazione di fase [13].

Questo fenomeno è spiegabile analizzando la ripartizione dell'alcol tra il solvente bulk e la fase micellare. La solubilità acquosa degli alcoli diminuisce all'aumentare del peso molecolare. Gli alcoli a catena corta agiscono prevalentemente come co-solventi nella fase acquosa, modificando la costante dielettrica e ostacolando la disidratazione del tensioattivo, il che si traduce in un aumento della TCP. Al contrario, gli alcoli a catena lunga esibiscono un comportamento da co-tensioattivi: essi si ripartiscono preferenzialmente all'interno delle micelle, intercalandosi tra le catene idrofobiche del TX-100 (effetto di impacchettamento). Questa penetrazione aumenta l'idrofobicità complessiva dell'aggregato micellare e ne facilita la disidratazione termica, portando a una conseguente diminuzione della TCP [13] [14]. Inoltre, l'inserimento di queste molecole altera la struttura micellare, abbassando il valore della CMC del tensioattivo in misura proporzionale alla lunghezza

della catena alcolica e alla sua concentrazione [13] [11].

Un ulteriore e decisivo parametro in grado di modulare la TCP è la forza ionica del mezzo. L'aggiunta di sali inorganici promuove generalmente un abbassamento del valore di CP attraverso il noto effetto di *salting-out*. A livello molecolare, si instaura una competizione per l'acqua di idratazione: le interazioni ione-dipolo tra gli elettroliti e le molecole d'acqua risultano termodinamicamente più favorevoli rispetto ai legami idrogeno che solvatano le catene polietossilate del tensioattivo. Conseguentemente, gli ioni "sottraggono" acqua alle micelle, inducendone una deidratazione prematura che abbassa la temperatura necessaria per la separazione di fase. L'entità di questo effetto è direttamente proporzionale alla concentrazione salina [15]. In ottica estrattiva, l'impiego del *salting-out* è strategico, poiché la disidratazione spinge gli analiti organici a ripartirsi in modo ancora più quantitativo verso il core idrofobico micellare [8].

Nel presente lavoro è stato selezionato il cloruro di sodio (NaCl) come elettrolita modello, in virtù della sua elevata solubilità in acqua, del basso costo, della ridotta tossicità e della ben nota efficacia nel promuovere fenomeni di *salting-out* nei sistemi micellari non ionici.

La capacità degli ioni di indurre questo effetto non è universale, ma segue le tendenze descritte dalla serie di Hofmeister. Questa serie ordina gli ioni in base al loro impatto sulla struttura dell'acqua e sulla stabilità dei sistemi idrofili. Gli ioni fortemente idratati (kosmotropici), avendo un'elevata affinità per l'acqua, agiscono come efficaci agenti di *salting-out*, privando le micelle della loro sfera di idratazione e abbassando drasticamente la TCP. Al contrario, ioni meno idratati (caotropici) esibiscono un effetto di *salting-in*, interagendo diversamente con le interfacce acquose e portando, in alcuni casi, a un innalzamento della temperatura di intorbidimento [15].

## 1.5 Cloud Point Extraction

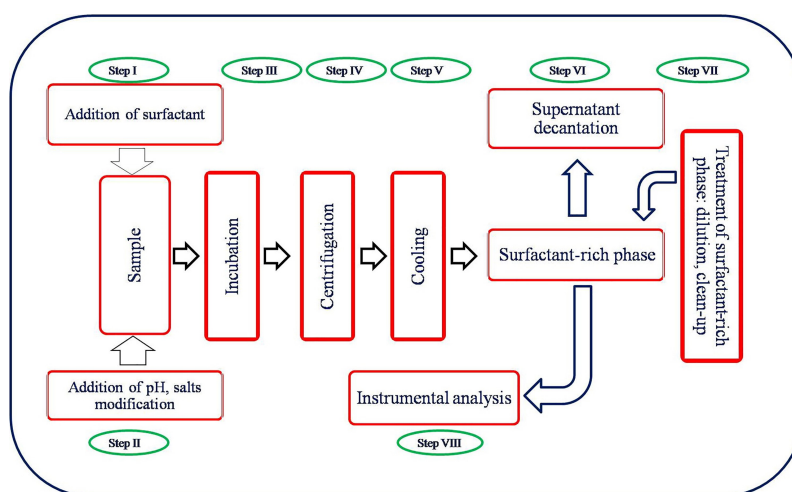
La Cloud Point Extraction (CPE) si configura come una metodologia di pre-concentrazione e separazione analitica altamente efficiente ed ecosostenibile, capace di superare molte delle criticità associate alla tradizionale estrazione liquido-liquido. La tecnica si distingue per essere rapida, economica, selettiva e per garantire un'elevata accuratezza analitica [16].

Storicamente, l'estrazione con solventi è stata lo strumento di elezione per la separazione di innumerevoli analiti, dai metalli pesanti fino alle biomolecole. Tuttavia, la LLE convenzionale presenta svantaggi intrinseci non trascurabili: impiega volumi ingenti di solventi organici tossici e infiammabili, richiede tempi operativi spesso lunghi e, a causa

della forte diluizione nella fase organica, offre un'efficienza di pre-concentrazione talvolta limitata. Al contrario, la CPE si avvale di tensioattivi impiegati a basse concentrazioni come agenti estraenti, operando interamente in un mezzo acquoso omogeneo. Questo approccio minimizza l'impiego di solventi nocivi, abbattendo drasticamente l'impatto ambientale e i costi di smaltimento, e rendendo la tecnica pienamente aderente ai principi della Green Analytical Chemistry [8] [17].

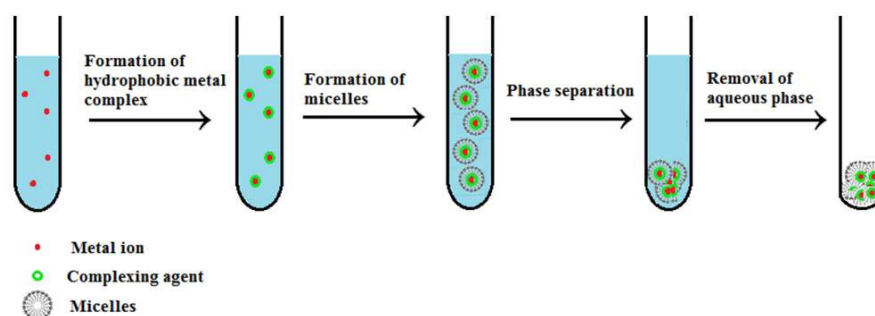
La prima applicazione di questa metodologia risale agli anni '70, quando Watanabe e collaboratori la impiegarono per l'estrazione dello ione  $Ni^{2+}$  da soluzioni acquose, sfruttando la formazione di un complesso metallico e l'azione del Triton X-100 come fase estraente micellare [3] [16]. Da quell'esordio, la versatilità della CPE ha permesso di espanderne l'utilizzo ben oltre l'analisi inorganica, diventando una tecnica di riferimento per la pre-concentrazione di inquinanti organici, proteine, pesticidi, e numerosi principi attivi farmaceutici, inclusi agenti antimicrobici e molecole bioattive [16]. Dal punto di vista operativo, la CPE sfrutta la capacità del core idrofobico delle micelle di intrappolare e solubilizzare l'analita bersaglio. Il protocollo standard prevede l'aggiunta del tensioattivo al campione acquoso a una concentrazione superiore alla sua CMC, consentendo la formazione termodinamicamente spontanea delle micelle e la conseguente solubilizzazione dell'analita [18].

Successivamente, l'induzione del fenomeno del Cloud Point provoca la disidratazione dei gruppi polari del tensioattivo e la riduzione delle repulsioni inter-micellari. Questo porta all'aggregazione delle micelle e alla separazione del sistema in due fasi: una fase superiore acquosa (fortemente diluita e impoverita di analita) e una fase inferiore coacervata (di volume estremamente ridotto, ricca di tensioattivo e contenente l'analita pre-concentrato). Per velocizzare e rendere netta questa separazione macroscopica, il sistema viene sottoposto a centrifugazione, dopodiché la fase micellare viene prelevata e analizzata [16].



**Figura 1.3:** Schema del sistema CPE per analiti da matrici complesse [7].

Tradizionalmente, la transizione di fase viene indotta fornendo calore al sistema fino al superamento della TCP. Tuttavia, questo approccio termico presenta una vulnerabilità procedurale significativa: durante la successiva fase di centrifugazione (spesso eseguita in apparecchiature non termostate ad alte temperature), la soluzione subisce un inevitabile calo termico. Se la temperatura scende al di sotto della TCP del sistema, si verifica una parziale ri-solubilizzazione del tensioattivo nella fase acquosa bulk, con conseguente perdita dell'analita e drastica diminuzione dell'efficienza estrattiva (vedi Figura 1.4) [19].



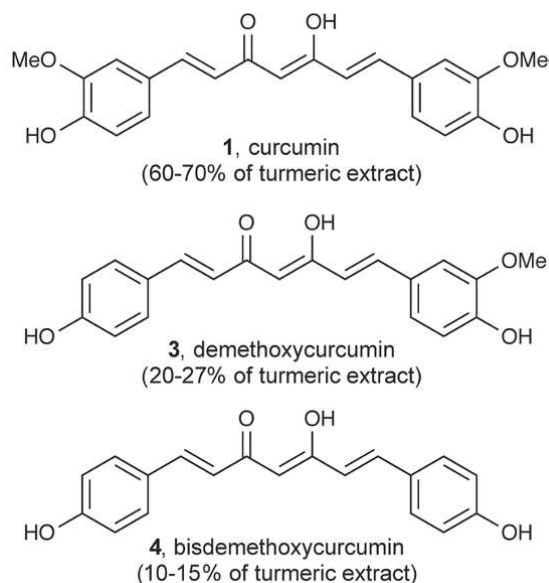
**Figura 1.4:** Rappresentazione della CPE di ioni metallici [7].

Una strategia elegante ed estremamente efficace per ovviare a questa problematica consiste nell'eseguire una Room Temperature Cloud Point Extraction (RT-CPE). Sfruttando il fenomeno del salting-out, l'aggiunta di elettroliti (come il già citato NaCl) abbassa la TCP del tensioattivo al di sotto della temperatura ambiente. In questo modo, la separazione di fase viene indotta a freddo, eliminando del tutto la necessità di riscaldamento preventivo. Questa modifica non solo azzerava il rischio di ri-solubilizzazione durante la centrifugazione, garantendo recuperi percentuali più elevati e riproducibili, ma riduce ulteriormente i tempi operativi e il consumo energetico, rendendo il protocollo ideale per l'estrazione di molecole termolabili [16].

## 1.6 I Curcuminoidi: composizione e rilevanza analitica

Il rizoma della *Curcuma longa* non contiene un unico principio attivo isolato, bensì un fitocomplesso di metaboliti secondari lipofili noti collettivamente come curcuminoidi. Questo gruppo di composti polifenolici è costituito da tre principali analoghi strutturali: la curcumina (diferuloilmetano), che rappresenta nettamente la frazione maggioritaria (circa il 77% del complesso totale), la demetossicurcumina (DMC, circa il 17%) e la bisdemetossicurcumina (BDMC, circa il 3%) [20]. Dal punto di vista chimico, i curcuminoidi condividono il medesimo scheletro diarileptanoide di base e le stesse peculiarità chimico-fisiche (scarsa solubilità acquosa, instabilità idrolitica e fotodegradazione). Le uniche

differenze strutturali risiedono nell'assenza di uno o di entrambi i gruppi metossilici sugli anelli aromatici periferici.



**Figura 1.5:** Struttura molecolare dei curcuminoidi [20].

Biologicamente, questi tre composti esibiscono un profilo farmacologico ampiamente sovrapponibile, agendo spesso in profonda sinergia per esplicitare le potenti attività antiossidanti, antinfiammatorie e neuroprotettive associate agli estratti della pianta [20].

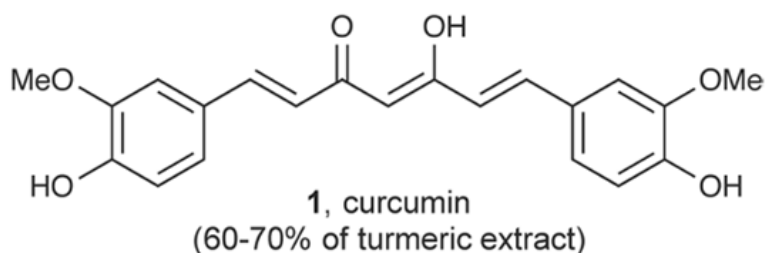
Da un punto di vista normativo e commerciale, le formulazioni farmaceutiche e gli integratori alimentari (come le matrici reali indagate nel presente studio) riportano in etichetta la concentrazione riferita ai "curcuminoidi totali", piuttosto che alla singola molecola. Tuttavia, a livello analitico, procedere con l'estrazione frazionata e la costruzione di curve di calibrazione individuali per ciascun analogo risulterebbe proceduralmente oneroso e strumentalmente complesso. Poiché i tre curcuminoidi condividono lo stesso cromoforo, il sistema di doppi legami coniugati responsabile dell'assorbimento nella regione del visibile, essi presentano un comportamento spettrofotometrico quasi identico, con un picco di massimo assorbimento ( $\lambda_{max}$ ) condiviso intorno ai 430 nm.

Per tali ragioni, in accordo con la prassi analitica consolidata per la spettrofotometria UV-Vis, nel presente lavoro di tesi si è scelto di utilizzare la curcumina pura come standard di riferimento assoluto per la fase di ottimizzazione del metodo e la costruzione della retta di taratura. La quantificazione dell'analisato estratto dai campioni commerciali mediante CPE verrà conseguentemente espressa in equivalenti di curcumina, fornendo una stima accurata e rappresentativa del contenuto totale di curcuminoidi presenti nella matrice.

## 1.7 La Curcumina: struttura e proprietà chimico-fisiche

L'impiego di estratti vegetali nel trattamento di diverse patologie sta vivendo una fase di rinnovato interesse scientifico, guidando la ricerca verso l'estrazione e l'analisi rigorosa dei composti bioattivi naturali [21]. In questo scenario, un ruolo di primo piano è occupato dalla curcumina (diferuloilmetano), il principale polifenolo bioattivo estratto dal rizoma della *Curcuma longa* [22].

La curcumina, il cui nome IUPAC è (1E,6E)-1,7-bis(4-idrossi-3-metossifenil)-1,6-eptadiene-3,5-dione, è il principale polifenolo bioattivo estratto dal rizoma della *Curcuma longa*. Dal punto di vista strutturale, si classifica come un diarileptanoide simmetrico. La sua complessa architettura molecolare è costituita da due anelli fenolici, recanti ciascuno un gruppo metossilico in posizione orto rispetto al gruppo ossidrilico, collegati da una catena alifatica a sette atomi di carbonio. Tale catena centrale ospita un sistema  $\alpha,\beta$ -insaturo e una porzione  $\beta$ -dichetonica.



**Figura 1.6:** Struttura molecolare della curcumina [23].

Una caratteristica chimico-fisica peculiare della curcumina è la spiccata tautomeria cheto-enolica. Sia allo stato solido che nella maggior parte dei solventi in soluzione, la forma enolica risulta termodinamicamente favorita rispetto a quella dichetonica. Questa stabilità è garantita dalla formazione di un forte legame idrogeno intramolecolare e dalla presenza di un'estesa delocalizzazione elettronica  $\pi$  lungo l'intera struttura molecolare. L'elevato grado di coniugazione dei doppi legami conferisce alla molecola le sue peculiari proprietà ottiche: una marcata fluorescenza intrinseca e un intenso assorbimento nella regione del visibile, con un picco massimo ( $\lambda_{max}$ ) tipicamente centrato tra i 420 e i 430 nm, responsabile della caratteristica colorazione giallo-dorata. Tali proprietà fotofisiche costituiscono il fondamento teorico per la sua rapida e accurata determinazione quantitativa mediante spettrofotometria UV-Vis [23].

Sotto il profilo chimico-fisico, la curcumina è una molecola spiccatamente lipofila, caratterizzata da un coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua ( $\log P$ ) stimato intorno a 3.2. Di conseguenza, presenta una solubilità in acqua quasi trascurabile (nell'ordine di 11 ng/mL a temperatura ambiente e pH neutro), mentre risulta facilmente solubile in

solventi organici polari (come etanolo, metanolo e acetone) e in lipidi. Oltre alla marcata idrofobicità, la curcumina è caratterizzata da una notevole instabilità chimica: risulta altamente fotosensibile e va incontro a una rapida degradazione idrolitica in ambienti acquosi, specialmente a pH neutro o alcalino, frammentandosi in composti come l'acido ferulico, la vanillina e l'acido vanillico. È proprio l'interazione tra queste criticità intrinseche, la scarsissima solubilità acquosa e l'elevata suscettibilità alla degradazione, a rendere complessa l'estrazione e l'analisi quantitativa di questo analita in matrici acquose convenzionali. In tale contesto, l'impiego di sistemi contenenti, ad esempio, i tensioattivi non ionici (es. Triton X-100) utilizzati nella tecnica Cloud Point Extraction (CPE), rappresenta una soluzione analitica ed estrattiva ideale. La curcumina, infatti, si ripartisce quantitativamente all'interno del core idrofobico delle micelle, il quale agisce come uno "scudo" termodinamico e sterico: non solo ne permette un'efficace solubilizzazione in un mezzo prevalentemente acquoso, ma la protegge simultaneamente dai fenomeni di degradazione idrolitica e fotochimica, garantendone la stabilità fino al momento dell'analisi strumentale.

## **1.8 La Curcumina: profilo farmacologico e potenziale terapeutico**

**Proprietà antiossidanti e pro-ossidanti della curcumina.** Numerosi studi evidenziano come la curcumina possieda un comportamento ambivalente, potendo agire sia come antiossidante che come pro-ossidante a seconda del microambiente cellulare e della concentrazione. L'azione antiossidante è cruciale per prevenire o rallentare la progressione di innumerevoli stati patologici [24]. Essa si esplica con estrema efficacia sia in vitro che in vivo, neutralizzando le Specie Reattive dell'Ossigeno (ROS) e proteggendo i tessuti sani dallo stress ossidativo. Questa spiccata azione scavenger deriva chimicamente dalla capacità dei gruppi fenolici e del gruppo metilenico centrale (porzione  $\beta$ -dicetonica) di donare atomi di idrogeno o accettare elettroni, neutralizzando i radicali liberi e stabilizzandosi per risonanza [23]. La molecola ha inoltre dimostrato la rara capacità di rigenerarsi dopo aver accettato elettroni [25]. Paradossalmente, in determinati contesti patologici come il cancro, la curcumina esplica un'attività pro-ossidante: essa induce la generazione intracellulare di ROS (fondamentali per innescare l'apoptosi nelle cellule tumorali) e si lega alla tioredossina reduttasi (TR), alterando l'equilibrio redox e promuovendo effetti antiproliferativi selettivi [23].

**Effetti antinfiammatori della curcumina.** Lo stress ossidativo e l'infiammazione cronica sono processi fisiopatologici intimamente connessi; pertanto, la spiccata capacità antiossidante della curcumina si traduce direttamente in una potente azione antinfiammatoria. Tale proprietà si manifesta attraverso l'inibizione di varie vie di segnalazione intracellu-

lare. Il target principale è il fattore nucleare kappa B (NF- $\kappa$ B): la curcumina ne inibisce l'attivazione, bloccando a cascata la trascrizione di numerosi geni pro-infiammatori [23]. Parallelamente, la molecola down-regola l'espressione di enzimi chiave della cascata infiammatoria, come la cicloossigenasi-2 (COX-2) e l'ossido nitrico sintasi inducibile (iNOS), e inibisce direttamente la 5-lipoossigenasi (5-LOX) legandosi al suo sito catalitico. Si osserva inoltre una marcata riduzione dei livelli sierici di proteina C-reattiva (PCR), del fattore di necrosi tumorale alfa (TNF- $\alpha$ ) e la soppressione della migrazione dei linfociti T [23].

**Effetti regolatori su citochine, fattori di crescita e angiogenesi.** La curcumina è un potente modulatore della comunicazione cellulare. Essa agisce sui recettori dei fattori di crescita: diminuisce l'espressione e l'attività del recettore per il fattore di crescita epidermico (EGFR) e modula l'attività di HER2, un recettore strettamente correlato alla patogenesi dei tumori al seno, polmone, rene e prostata. Inoltre, sopprime l'attività della citochina IL-6 inibendo la via di trasduzione del segnale STAT3 [23]. Questi effetti si integrano con una potente azione anti-angiogenica, fondamentale per bloccare la vascolarizzazione e la progressione dei tumori solidi [26]. La curcumina inibisce l'angiogenesi bloccando l'espressione del fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF), tramite l'inibizione di NF- $\kappa$ B, e modulando negativamente sia il fattore di crescita dei fibroblasti (FGF-2) che enzimi come la COX-2 [23].

**Cancro e curcumina.** In ambito oncologico, la curcumina ha dimostrato formidabili potenzialità sia preventive che terapeutiche. L'inibizione della proliferazione tumorale avviene tramite la modulazione di fattori di trascrizione oncogenici (NF- $\kappa$ B, AP-1, STAT3) e l'induzione dell'apoptosi cellulare mediata dall'attivazione delle caspasi e dalla regolazione delle proteine della famiglia Bcl-2. Inoltre, la molecola contrasta attivamente la metastatizzazione inibendo le metalloproteasi della matrice (MMP), riducendo l'espressione delle molecole di adesione cellulare e, come già descritto, sopprimendo la cascata delle citochine angiogeniche (IL-6, IL-23, IL-1 $\beta$ ) [23].

**Diabete e curcumina.** Nel contesto del diabete mellito di tipo II, patologia caratterizzata da insulino-resistenza, la curcumina si rivela un alleato multifunzionale. Grazie ai suoi effetti ipoglicemizzanti, ipolipemizzanti e antinfiammatori, combinati con la capacità di ridurre i livelli di emoglobina glicata (HbA1c), questo composto è in grado di rallentare significativamente la progressione della malattia, fornendo al contempo un'importante neuroprotezione contro le complicanze diabetiche [23].

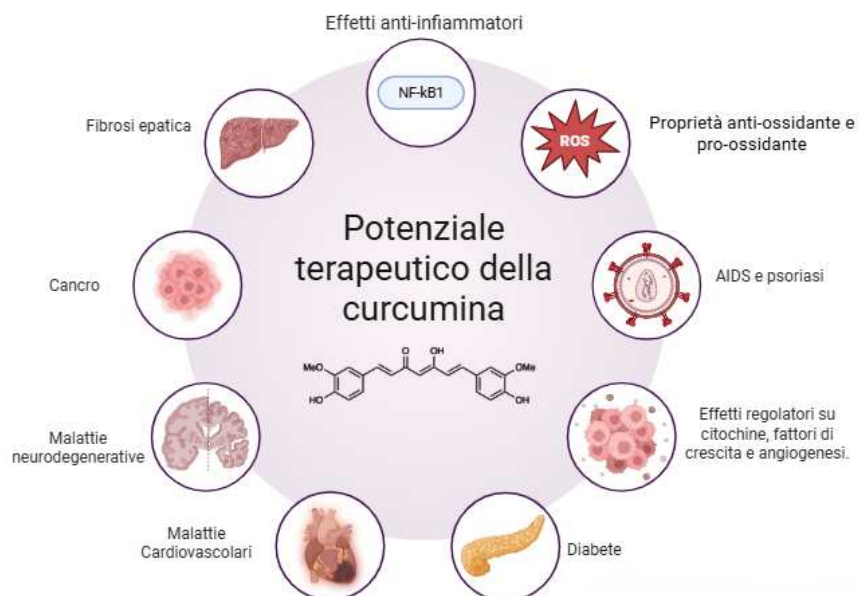
**Malattie cardiovascolari e curcumina.** I benefici della curcumina si estendono al sistema cardiovascolare, in particolare nella prevenzione dell'aterosclerosi. Questa patologia è scatenata dall'accumulo di lipidi, colesterolo e fibrina nell'intima delle arterie, con conseguente formazione di placche ateromatose che, ostruendo il lume vasale, possono esitare in eventi ischemici acuti come l'infarto del miocardio. L'azione cardioprotettiva della curcumina è legata alle sue forti proprietà anti-piastriniche: inibendo la sintesi di trombosano e potenziando l'attività della prostaciclina, riduce drasticamente il rischio di trombosi. Contemporaneamente, il suo potere antiossidante abbassa i livelli sierici di trigliceridi e colesterolo LDL, previene lo stress ossidativo dell'endotelio e mitiga l'infiammazione vascolare, ostacolando anche la calcificazione arteriosa [23].

**Malattie neurodegenerative e curcumina.** Data la spiccata lipofilia che le permette di attraversare la barriera emato-encefalica, la curcumina è considerata un agente promettente per il trattamento di disordini neurodegenerativi quali il morbo di Alzheimer, il morbo di Parkinson, la depressione e l'epilessia [27]. Nella patogenesi dell'Alzheimer, lo stress ossidativo e l'anomalo ripiegamento proteico giocano ruoli cardine. Diversi studi in vivo hanno dimostrato che la curcumina non solo previene i danni da radicali liberi a livello neuronale, ma contrasta direttamente l'amiloidogenesi, riducendo l'accumulo delle placche di  $\beta$ -amiloide. Tali effetti neuroprotettivi preservano l'integrità della barriera emato-encefalica e mitigano i deficit cognitivi e mnemonici associati alla neurodegenerazione [23] [27].

**Fibrosi epatica e curcumina.** La fibrosi epatica e la conseguente cirrosi, esiti di danni epatici cronici (spesso di natura alcolica o dismetabolica), rappresentano sfide cliniche globali [28]. Essendo stress ossidativo e infiammazione i motori principali della fibrogenesi, l'integrazione di curcumina ha dimostrato eccellenti capacità epatoprotettive. La molecola riduce i livelli sierici di lipidi e acido urico, smorza la risposta infiammatoria epatica e previene l'evoluzione del danno strutturale del fegato [23] [29].

**AIDS, psoriasi e curcumina.** Studi recenti hanno evidenziato inaspettate potenzialità antivirali: la curcumina inibisce la trascrizione dell'HIV agendo come inibitore delle proteasi virali e inducendo la degradazione della proteina Tat, offrendo nuove prospettive per la gestione dell'infezione da HIV-1 e HIV-2. Infine, in ambito dermatologico, la curcumina si rivela efficace contro la psoriasi, una malattia infiammatoria cronica immuno-mediata. Rimodulando l'attività del sistema immunitario, la molecola down-regola l'espressione di citochine chiave nella patogenesi psoriasica (IL-17A, IL-22 e IL-6), inibisce

l'iper-proliferazione dei cheratinociti e riduce sensibilmente l'inflammazione cutanea [23] [30].



**Figura 1.7:** Rappresentazione del potenziale terapeutico della curcumina (immagine creata con BioRender).

## 2 Materiali e Strumenti

### 2.1 Materiali

Tutti i reagenti e i solventi sono stati acquistati da fornitori commerciali dai quali si rifornisce il Dipartimento di Chimica dell'Università degli Studi di Pavia, e sono stati utilizzati senza ulteriori purificazioni. Per la preparazione e le procedure è stata utilizzata acqua bidistillata in laboratorio in modo da minimizzare la contaminazione dei campioni.

Elenco dei materiali utilizzati:

- Triton X-100,
- Cloruro di sodio,
- Etanolo 96%,
- Isopropanolo,
- Metanolo,
- 1-propanolo,
- Curcumina in polvere,
- Campione a titolo noto di curcuminoidi, fornito da Farmalabor (si tratta di un'azienda italiana specializzata nella produzione e distribuzione di materie prime, principi attivi, imballaggi e attrezzature per farmacie, ospedali e laboratori),
- Integratore alimentare, fornito da Agolab (si tratta di un laboratorio farmaceutico italiano specializzato nella produzione e vendita online di integratori nutraceutici di alta qualità).

### 2.2 Strumenti

#### 2.2.1 Bagno a ultrasuoni

Per poter ottenere soluzioni omogenee necessarie per gli esperimenti condotti nel presente lavoro, è stato impiegato un bagno a ultrasuoni. Il bagno a ultrasuoni è uno strumento utilizzato per la pulizia, la dispersione e il trattamento di materiali mediante onde ultrasoniche trasmesse in un mezzo liquido. Queste onde, tipicamente nell'intervallo di frequenza 20-45 kHz, inducono il fenomeno della cavitazione acustica nel liquido: si formano microbolle di vapore che, collassando violentemente (implosione), generano onde d'urto localizzate ad elevata energia. Tale processo consente di rimuovere contaminanti dalle superfici e di favorire la dissoluzione di soluti e la dispersione di particelle.

Il bagno a ultrasuoni è costituito da una vasca in acciaio inossidabile riempita con acqua; sul fondo della vasca sono installati trasduttori piezoelettrici che convertono l'energia elettrica in onde ultrasoniche. Queste onde vengono trasmesse attraverso l'acqua, inducendo

la cavitazione acustica nel campione immerso nella vasca.

Lo strumento utilizzato è il bagno ad ultrasuoni Bandelin Sonorex.

### **2.2.2 Bagno termostato**

Una delle fasi più importanti dell'analisi delle soluzioni di TX-100 a diverse concentrazioni è stata la determinazione della temperatura di cloud point mediante l'utilizzo del bagno termostato. Il bagno termostato è uno strumento impiegato per il mantenimento di una temperatura costante e controllata nel tempo. Esso garantisce stabilità, uniformità e riproducibilità delle condizioni termiche, consentendo di ottenere risultati sperimentali affidabili e confrontabili.

Lo strumento è costituito da una vasca in acciaio contenente un fluido termovettore, solitamente acqua. La temperatura reale del bagno viene continuamente misurata da un sensore ad alta precisione; i dati sono inviati a un sistema di controllo elettronico che confronta la temperatura misurata con quella impostata dall'utente, regolando automaticamente il riscaldamento o il raffreddamento per mantenere la temperatura desiderata.

Nel presente lavoro, il termostato è stato collegato, mediante due tubi in gomma, a un bagno d'acqua termostato dotato di ancoretta magnetica e posto su un agitatore magnetico. All'interno del bagno d'acqua, mediante l'utilizzo di una pinza, è stato inserito il vial contenente la soluzione in esame, anch'esso dotato di ancoretta magnetica. Quest'ultima è necessaria per garantire una miscelazione omogenea della soluzione durante il riscaldamento o il raffreddamento. All'interno del bagno d'acqua è stato inoltre inserito un termometro per monitorare costantemente la temperatura in prossimità del campione. La temperatura di cloud point della soluzione è stata determinata associando l'osservazione visiva della comparsa di torbidità alla lettura della temperatura sul termometro.

In primo luogo è necessario impostare la temperatura desiderata sul pannello di controllo del termostato. A questo punto l'acqua fluisce attraverso i tubi in gomma e riscalda il bagno d'acqua. Dopo aver osservato la comparsa della torbidità della soluzione nel vial, si annota la temperatura letta sul termometro; a questo punto l'analisi è conclusa. È necessario riportare il termostato a temperatura ambiente prima di effettuare un nuovo esperimento.

Lo strumento utilizzato è il termostato Lauda EcoLine RE207 (Figura 2.1).



(a)



(b)

**Figura 2.1:** a) vial e termometro immersi nel bagno termostato collegato tramite due tubi di gomma al termostato, b) termostato.

### 2.2.3 Dynamic Light Scattering

Il *Dynamic Light Scattering* (DLS) è stato impiegato per eseguire le analisi delle soluzioni di TX-100 a diverse concentrazioni, attraverso le quali è stato possibile ottenere una determinazione accurata della temperatura di cloud point per ogni soluzione in esame. Si tratta di una tecnica non invasiva che fornisce informazioni sulla distribuzione dimensionale (*size*), sul grado di aggregazione e, quando applicabile, sul potenziale zeta delle particelle in soluzione.

Il DLS è una tecnica utilizzata per misurare la dimensione di particelle in sospensione o di molecole in soluzione, basata sull'analisi delle fluttuazioni di intensità della luce diffusa (*scattered*) causate dal moto browniano delle particelle, ossia il loro movimento casuale e termicamente indotto. Quando il fascio laser incide sulle particelle in soluzione, la luce viene diffusa in tutte le direzioni. Poiché le particelle sono in movimento continuo, la distanza reciproca tra di esse varia nel tempo, determinando fluttuazioni nel pattern di interferenza della luce diffusa. Tali fluttuazioni di intensità vengono misurate dal rivelatore dello strumento. Analizzando queste fluttuazioni mediante la funzione di autocorrelazione, è possibile ricavare il coefficiente di diffusione traslazionale ( $D$ ) delle particelle, dal quale si calcola il diametro idrodinamico ( $D_h$ ) mediante l'equazione di Stokes-Einstein:

$$D_h = \frac{k_B T}{3\pi\eta D} \quad (1)$$

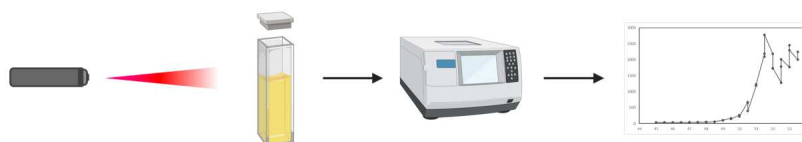
dove  $k_B$  è la costante di Boltzmann,  $T$  la temperatura assoluta,  $\eta$  la viscosità del mezzo e  $D$  il coefficiente di diffusione traslazionale.

Il diametro idrodinamico rappresenta la dimensione apparente della particella, includendo l'eventuale strato di solvatazione. A parità di temperatura e viscosità, le particelle più piccole si muovono più velocemente rispetto a quelle più grandi: si ottengono rispettivamente fluttuazioni rapide di intensità dello scattering per le particelle piccole e fluttuazioni più lente per quelle di dimensioni maggiori. Il movimento delle particelle dipende pertanto dalla loro dimensione, dalla viscosità del solvente e dalla temperatura.

Dal punto di vista strumentale, il DLS è costituito da una sorgente laser, una cuvetta otticamente trasparente contenente la soluzione in esame, un rivelatore di luce e un sistema di analisi dei dati. La sorgente laser emette un fascio di luce monocromatica che attraversa la cuvetta contenente la soluzione. La luce diffusa dalle particelle viene raccolta dal rivelatore, che misura le fluttuazioni di intensità della luce diffusa nel tempo. I dati raccolti vengono analizzati da un software dedicato, che calcola le dimensioni delle particelle in base alle fluttuazioni osservate.

Per le analisi DLS è stata utilizzata una cuvetta in quarzo ottico dotata di tappo in teflon. Rispetto alle cuvette in vetro o plastica, le cuvette in quarzo sono trasparenti non solo nel campo del visibile, ma anche in quello degli ultravioletti, e presentano un'altissima qualità ottica e una bassa fluorescenza residua. Il tappo in teflon consente di eseguire misure a temperature controllate, evitando l'evaporazione del solvente e mantenendo la concentrazione costante durante l'analisi.

La cuvetta doveva essere sempre accuratamente pulita e priva di impurità prima di ogni misura, per evitare che contaminanti potessero influenzare i risultati ottenuti. Analogamente, la soluzione doveva risultare limpida al momento dell'inserimento nella cuvetta; questo passaggio, per le soluzioni contenenti determinati alcoli, ha rappresentato un aspetto critico.



**Figura 2.2:** Schema rappresentativo dello strumento (immagine creata con BioRender).

La procedura sperimentale dettagliata adottata per le misure DLS, inclusa la strategia a due cicli di analisi con intervalli di temperatura progressivamente ridotti, è descritta nella

Sezione 3.1.3.

Lo strumento utilizzato è l'analizzatore Malvern Panalytical Zetasizer Nano.



**Figura 2.3:** Strumento Malvern Zetasizer Nano utilizzato per le analisi di DLS.

## 2.2.4 Spettroscopia infrarossa

L'analisi mediante spettroscopia IR è stata utilizzata per effettuare la caratterizzazione della polvere di curcumina, del campione titolato e dell'integratore, successivamente impiegati per gli esperimenti di "cattura". La spettroscopia infrarossa (IR, *Infrared Spectroscopy*) è una tecnica analitica non distruttiva utilizzata per l'identificazione e la caratterizzazione di sostanze chimiche attraverso l'interazione tra la radiazione elettromagnetica nell'intervallo dell'infrarosso e la materia. Il principio fisico su cui si basa è l'assorbimento selettivo di radiazione IR da parte delle molecole, che provoca transizioni tra livelli energetici vibrazionali. Le frequenze a cui avviene l'assorbimento dipendono dalla massa degli atomi coinvolti, dalla forza dei legami chimici e dalla geometria molecolare, dando luogo a moti vibrazionali di *stretching* (allungamento) e *bending* (deformazione angolare). Lo spettro infrarosso di ogni sostanza costituisce una sorta di "impronta digitale" molecolare, utile per il riconoscimento dei composti e l'analisi della struttura.

Lo strumento utilizzato è lo spettrometro Thermo Scientific Nicolet iS20.



**Figura 2.4:** Spettrometro Thermo Scientific Nicolet iS20.

### 2.2.5 Diffrattometro a raggi X

Un ulteriore metodo utilizzato per caratterizzare la polvere di curcumina è stata la diffrattometria a raggi X su polveri (XRPD, *X-Ray Powder Diffraction*). La cristallografia a raggi X rappresenta il metodo di elezione per la caratterizzazione dello stato solido. L'apparecchio registra un pattern prodotto dalla diffrazione dei raggi X da parte del reticolo cristallino, fornendo informazioni sulla struttura della sostanza in esame e sulla tipologia di reticolo cristallino.

Il principio fisico alla base della tecnica è descritto dalla legge di Bragg:

$$n\lambda = 2d \sin \theta \quad (2)$$

dove  $n$  è un numero intero (ordine di diffrazione),  $\lambda$  la lunghezza d'onda della radiazione incidente,  $d$  la distanza interplanare tra i piani cristallini e  $\theta$  l'angolo di incidenza. Quando la condizione espressa da questa equazione è soddisfatta, si verifica interferenza costruttiva tra le onde diffuse dai piani reticolari e si osserva un massimo di diffrazione.

Nel caso in cui il campione si trovi sotto forma di polvere, come nel presente lavoro, i cristalliti sono orientati in modo casuale nello spazio; si ottiene pertanto un pattern di diffrazione caratteristico, che rappresenta il risultato della sovrapposizione dei contributi diffrattivi di tutti i cristalliti dispersi in modo casuale.

Lo strumento necessita di un generatore di raggi X, costituito da un catodo (filamento) e un anodo metallico. Gli elettroni emessi dal catodo vengono accelerati verso l'anodo: l'impatto provoca l'espulsione di elettroni dai livelli energetici interni degli atomi dell'anodo, e la successiva transizione elettronica di rilassamento genera raggi X caratteristici, con lunghezza d'onda dell'ordine degli Ångström, molto più piccola rispetto a quella della luce visibile. Lo strumento è dotato di un generatore di raggi X, il quale ruota di un angolo  $\theta$  sulla circonferenza goniometrica, mentre il braccio dotato di rivelatore (contatore) ruota di un angolo pari a  $\theta$  sulla stessa circonferenza in senso opposto (geometria Bragg-Brentano).

Dall'analisi di una polvere è generalmente difficile ottenere i parametri completi della cella cristallina, ma il pattern ottenuto consente di confermare la natura cristallina o amorfa del campione, di identificare le fasi cristalline presenti mediante confronto con banche dati e di valutare il grado di cristallinità.

Lo strumento utilizzato è il diffrattometro Bruker D6 PHASER.



**Figura 2.5:** Diffrattometro a raggi X da banco Bruker D6 PHASER utilizzato per la caratterizzazione dei campioni in polvere.

### 2.2.6 Centrifuga

La centrifuga è stata utilizzata nel presente lavoro per permettere un'efficiente separazione tra la fase acquosa e la fase coacervata ricca di tensioattivo, nella quale è concentrata la curcumina estratta mediante CPE.

La centrifuga è uno strumento di laboratorio che sfrutta l'azione della forza centrifuga, generata da una rapida rotazione, per separare i componenti di una miscela in base alla loro densità. Questo processo consente di ottenere una separazione efficiente in tempi relativamente brevi rispetto alla sedimentazione spontanea per gravità.

Dal punto di vista teorico, durante la rotazione le particelle sospese in un fluido sono soggette a una forza proporzionale alla loro massa, alla distanza dall'asse di rotazione e al quadrato della velocità angolare. La velocità con cui una particella sedimenta dipende inoltre dalla viscosità del mezzo e dalle dimensioni della particella stessa. In ambito pratico, l'efficacia della separazione viene espressa in termini di forza centrifuga relativa (RCF, *Relative Centrifugal Force*), indicata come multiplo dell'accelerazione gravitazionale ( $\times g$ ); questo parametro permette di confrontare in modo oggettivo le condizioni operative di centrifughe diverse. Il parametro giri al minuto (RPM, *Revolutions Per Minute*) indica la velocità di rotazione del rotore, ossia quante volte il rotore compie un giro completo in un minuto. Tuttavia, a differenza della RCF, il valore di RPM da solo non fornisce informazioni sulla forza effettiva che agisce sui campioni, poiché questa dipende anche dal raggio del rotore.

La centrifuga è costituita da un rotore, componente meccanico progettato per ospitare provette o contenitori per campioni e capace di ruotare a elevate velocità (ne esistono diverse tipologie: ad angolo fisso, oscillante, verticale); da un motore elettrico controllato elettronicamente, che permette di impostare la velocità, il tempo di centrifugazione e altre

condizioni operative; il tutto è racchiuso in una camera protettiva dotata di sistemi di sicurezza che impediscono l'apertura durante il funzionamento. Alcune centrifughe sono dotate di un sistema di termostatazione per permettere di eseguire la centrifugazione a temperature controllate.

Lo strumento utilizzato è la centrifuga da banco refrigerata VWR Mega Star 1.6R.



**Figura 2.6:** Centrifuga da banco refrigerata VWR Mega Star 1.6R utilizzata per la ripartizione dei campioni.

### 2.2.7 Spettroscopia UV-Vis

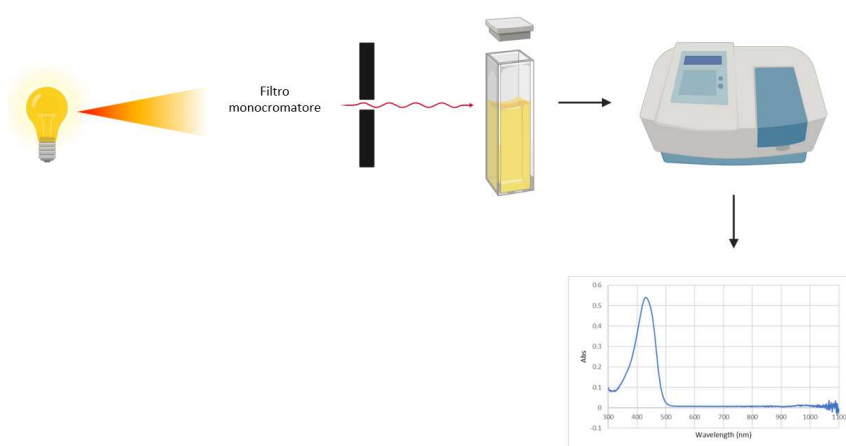
La spettroscopia UV-Vis è stata utilizzata per eseguire le analisi delle soluzioni contenenti curcumina, al fine di determinare la quantità di principio attivo presente in soluzione dopo il processo di estrazione.

La spettroscopia UV-Vis è una tecnica analitica basata sull'interazione tra la radiazione elettromagnetica nelle regioni dell'ultravioletto (190–400 nm) e del visibile (400–800 nm) e la materia. Permette di ottenere informazioni sia qualitative sia quantitative su specie chimiche in soluzione, attraverso la misura dell'assorbimento della luce a specifiche lunghezze d'onda. Il principio fondamentale su cui si fonda è che le molecole possono assorbire fotoni la cui energia corrisponde alla differenza tra livelli energetici elettronici, promuovendo transizioni da orbitali di legame ( $\sigma$ ,  $\pi$ ) o non leganti ( $n$ ) a orbitali antileganti ( $\sigma^*$ ,  $\pi^*$ ). Tali transizioni si verificano a lunghezze d'onda caratteristiche, dipendenti dalla struttura elettronica della specie chimica in esame. Quando un fascio di radiazione monocromatica attraversa una soluzione contenente un analita, una parte della luce viene assorbita e la restante viene trasmessa. L'entità dell'assorbimento è descritta dalla legge di Lambert-Beer:

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c \quad (3)$$

dove  $A$  è l'assorbanza (grandezza adimensionale),  $\varepsilon$  il coefficiente di estinzione molare ( $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ),  $l$  il cammino ottico (cm) e  $c$  la concentrazione della specie assorbente ( $\text{mol L}^{-1}$ ). Questa relazione lineare costituisce la base per le determinazioni quantitativi-

ve: misurando l'assorbanza a una lunghezza d'onda opportuna, è possibile risalire alla concentrazione dell'analita. Lo strumento impiegato per questa analisi prende il nome di spettrofotometro, il quale è costituito da diverse componenti: una sorgente luminosa, che produce radiazione policromatica; un monocromatore, in grado di selezionare le singole componenti monocromatiche; una fenditura, che definisce la banda passante spettrale; una cuvetta, che contiene la soluzione in esame; un rivelatore, che misura l'intensità della luce trasmessa attraverso il campione e converte il segnale ottico in un segnale elettrico, successivamente elaborato per fornire il valore di assorbanza. Il risultato dell'analisi è uno spettro di assorbimento in cui sull'asse delle ascisse è riportata la lunghezza d'onda e sull'asse delle ordinate l'assorbanza.



**Figura 2.7:** Schema rappresentativo dello strumento (immagine creata con BioRender).

Le applicazioni della spettroscopia UV-Vis sono estremamente ampie, sia in ambito chimico sia in ambito biologico e biochimico. Nell'industria farmaceutica e nel controllo qualità è utilizzata per determinazioni di purezza e concentrazione di principi attivi.

Nel contesto delle analisi quantitative, la spettroscopia UV-Vis viene frequentemente utilizzata per la costruzione di curve di taratura. In queste ultime si misurano le assorbanze di soluzioni standard a concentrazione nota dell'analita, ottenendo una relazione lineare tra assorbanza e concentrazione. Tale curva di taratura consente di determinare la concentrazione di campioni incogniti, purché siano rispettate le condizioni di linearità della legge di Lambert-Beer e sia selezionata la lunghezza d'onda corrispondente al massimo di assorbanza dell'analita.

In questo studio, tale procedura ha rappresentato un passaggio fondamentale per quantificare la curcumina estratta dalle soluzioni micellari di TX-100.

Lo strumento utilizzato è lo spettrofotometro Agilent Cary 60 UV-Vis.



**Figura 2.8:** Spettrometro Agilent Cary 60 UV-Vis utilizzato per le caratterizzazioni ottiche dei campioni.

### 2.2.8 Calorimetria Differenziale a Scansione

La Calorimetria Differenziale a Scansione (DSC, *Differential Scanning Calorimetry*) è una tecnica termoanalitica impiegata per la caratterizzazione dello stato solido e la valutazione del profilo termico delle sostanze in esame. In questo lavoro di tesi, si è rivelata utile per indagare le transizioni di fase (come la fusione) e confermare l'identità e la purezza della polvere di curcumina.

Il principio di base della DSC consiste nel misurare la differenza di flusso di calore richiesto per mantenere un campione in esame e un riferimento inerte alla stessa temperatura, mentre entrambi vengono sottoposti a un programma termico controllato (riscaldamento o raffreddamento).

Durante l'analisi, se il campione va incontro a una transizione di fase o a un processo chimico-fisico, si verificherà un assorbimento di calore (processo endotermico, come nel caso della fusione o della transizione vetrosa) o un rilascio di calore (processo esotermico, come nella cristallizzazione o degradazione). Il sistema di controllo dello strumento compensa immediatamente questa differenza di energia per mantenere le due posizioni alla medesima temperatura. Lo strumento registra queste variazioni energetiche generando un termogramma, in cui sull'asse delle ascisse è riportata la temperatura e sull'asse delle ordinate il flusso di calore. Dall'analisi del termogramma (dalla posizione, dalla forma e dall'area dei picchi) è possibile ricavare parametri termodinamici fondamentali, quali la temperatura di *onset* (inizio della transizione), la temperatura di picco e la variazione di entalpia del processo ( $\Delta H$ ).

L'apparecchiatura è costituita principalmente da una cella calorimetrica contenente due alloggiamenti posizionati su un sensore termoelettrico ad alta sensibilità: uno destinato al crogiolo (generalmente in alluminio) contenente il campione da analizzare, e uno destinato a un crogiolo vuoto che funge da riferimento. Il sistema è completato da una fornace di riscaldamento, un sistema di raffreddamento e un circuito per il passaggio di un gas di

spurgo inerte (solitamente azoto o argon). L'utilizzo del gas inerte è fondamentale per garantire una distribuzione omogenea del calore e per prevenire eventuali fenomeni di ossidazione del campione alle alte temperature. Lo strumento utilizzato è il calorimetro a flusso di calore TA Instruments DSC Q2000.



**Figura 2.9:** Calorimetro differenziale a scansione (DSC) modello Q2000 della TA Instruments.

### 3 Metodologie sperimentali

In questo capitolo sono descritte le procedure sperimentali adottate per lo studio del sistema acqua/Triton X-100 e per la successiva ottimizzazione dell'estrazione della curcumina mediante Cloud Point Extraction. L'impostazione metodologica si articola in due fasi consecutive: una fase di caratterizzazione fisico-chimica del sistema micellare e una fase applicativa dedicata alla validazione del protocollo estrattivo su matrici a complessità crescente.

#### 3.1 Caratterizzazione del comportamento di fase del sistema acqua/Triton X-100

Questa prima sezione è dedicata allo studio della separazione di fase del sistema acqua/Triton X-100 in funzione della temperatura e della composizione. In ordine cronologico, le procedure eseguite sono state le seguenti:

- preparazione della soluzione di riferimento di Triton X-100 all'1% in peso (p/p);
- preparazione delle soluzioni contenenti Triton X-100 1% (p/p), sale e alcol in concentrazioni variabili;
- analisi delle soluzioni mediante bagno termostato per la determinazione della temperatura di intorbidimento;
- analisi delle soluzioni mediante Dynamic Light Scattering (DLS) per ottenere un valore il più preciso possibile della temperatura di cloud point.

L'additivo utilizzato per modificare il comportamento di fase del sistema è stato il cloruro di sodio (NaCl), in quanto permette di modulare efficacemente la temperatura di cloud point del sistema micellare e risulta essere di facile reperibilità e basso costo. Le analisi sono state condotte a tre diverse concentrazioni molali di sale: 0 m, 1 m e 2 m.

Le analisi sono state condotte anche con l'aggiunta di alcoli differenti a concentrazioni variabili, allo scopo di valutare l'effetto di un co-solvente organico sulla stabilità delle micelle e sulla temperatura di cloud point. Come discusso nella Sezione 1.4, gli alcoli possono interagire con il sistema micellare modificandone la struttura e le proprietà termodinamiche, con un effetto sulla TCP che dipende dalla lunghezza della catena alchilica. Gli alcoli utilizzati sono stati: etanolo, metanolo, 1-propanolo e 2-propanolo (isopropanolo). Le concentrazioni di alcol sono state espresse in termini di frazione molare ( $x_{ROH}$ ) e scelte in modo da coprire un intervallo significativo; i valori specifici sono stati: 0,005; 0,01; 0,02; 0,03; 0,04; 0,05 e 0,08.

La prima fase dello studio si inserisce nel contesto di un lavoro di caratterizzazione avviato precedentemente nel medesimo gruppo di ricerca, i cui risultati preliminari hanno

permesso di identificare le condizioni di base per la formazione delle micelle di Triton X-100 e per la determinazione della temperatura di cloud point. Tali risultati sono stati fondamentali per completare i diagrammi di fase in termini di punti sperimentali, in modo da poter effettuare un confronto sistematico tra i diversi additivi e le diverse condizioni sperimentali.

### 3.1.1 Preparazione delle soluzioni di TX-100

La soluzione di riferimento è stata preparata pesando 1 g di Triton X-100 e aggiungendo acqua Milli-Q fino a una massa totale di 100 g, ottenendo una concentrazione dell'1% in peso (p/p). La soluzione è stata lasciata sotto agitazione su piastra magnetica fino a completa dissoluzione del tensioattivo. La soluzione è stata considerata pronta per l'uso quando risultava perfettamente limpida e priva di particelle sospese visibili a occhio nudo. A partire da questa soluzione madre, sono state preparate le miscele di lavoro contenenti Triton X-100 e gli additivi selezionati (NaCl e alcoli). Una preparazione accurata e riproducibile è stata fondamentale per garantire l'affidabilità delle successive misure di cloud point. Le soluzioni di TX-100 + NaCl + ROH sono state preparate per pesata, utilizzando bilance analitiche per garantire la precisione delle concentrazioni.

La massa totale di ciascuna soluzione di lavoro è stata fissata a 10 g. La massa di NaCl necessaria è stata calcolata mediante la seguente relazione:

$$m_{\text{NaCl}} = b_{\text{NaCl}} \cdot MM_{\text{NaCl}} \cdot \frac{m_{\text{solvente}}}{1000} \quad (4)$$

dove  $m_{\text{NaCl}}$  è la massa di cloruro di sodio (g),  $b_{\text{NaCl}}$  è la molalità desiderata (mol/kg),  $MM_{\text{NaCl}}$  è la massa molare del cloruro di sodio (58,44 g/mol) e  $m_{\text{solvente}}$  è la massa del solvente (acqua) espressa in grammi.

La massa di soluzione di TX-100 all'1% da aggiungere è stata calcolata sottraendo alla massa totale della soluzione (10 g) la massa di NaCl necessaria.

Dopo aver calcolato e pesato la quantità di sale corretta, questa è stata inserita nel vial. La bilancia è stata quindi tarata e la soluzione di TX-100 all'1% è stata aggiunta goccia a goccia, mediante pipetta in vetro, fino al raggiungimento della massa calcolata.

Come ultimo passaggio, è stato aggiunto l'alcol. La massa di alcol da aggiungere è stata calcolata a partire dalla frazione molare desiderata mediante la seguente relazione:

$$m_{\text{ROH}} = \frac{x_{\text{ROH}}}{1 - x_{\text{ROH}}} \cdot \frac{m_{\text{solvente}}}{MM_{\text{H}_2\text{O}}} \cdot MM_{\text{ROH}} \quad (5)$$

dove  $m_{\text{ROH}}$  è la massa di alcol da aggiungere (g),  $x_{\text{ROH}}$  è la frazione molare desiderata

dell'alcol,  $m_{\text{solvente}}$  è la massa del solvente (g),  $MM_{\text{H}_2\text{O}}$  è la massa molare dell'acqua (18,015 g/mol) e  $MM_{\text{ROH}}$  è la massa molare dell'alcol (g/mol).

La bilancia è stata tarata e l'alcol è stato aggiunto goccia a goccia all'interno del vial contenente già il sale e la soluzione di Triton, fino al raggiungimento della massa calcolata. Nel caso in cui il sale non risultasse completamente disciolto, si è ricorso all'utilizzo del bagno a ultrasuoni per alcuni minuti.



**Figura 3.1:** Esempio delle soluzioni preparate per l'analisi. I vial contengono miscele a base di TX-100, NaCl e ROH.

Durante lo studio della separazione di fase è stato seguito un ordine logico nella preparazione e nell'analisi delle soluzioni: per ciascun alcol, sono state dapprima preparate e analizzate tutte le soluzioni con NaCl a concentrazione 0 m, successivamente quelle con NaCl 1 m e infine quelle con NaCl 2 m.

### 3.1.2 Analisi delle soluzioni mediante bagno termostato

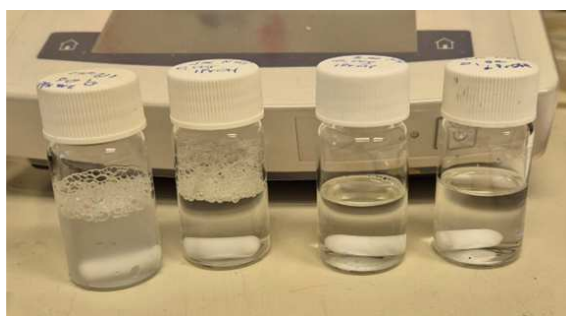
Le soluzioni preparate sono state analizzate in bagno termostato per determinare sperimentalmente la temperatura di intorbidimento. Il monitoraggio visivo della comparsa di torbidità, associato al controllo della temperatura, ha consentito di individuare il punto di transizione tra regime monofasico e bifasico. Questa fase ha rappresentato un primo passo fondamentale per la costruzione dei diagrammi di fase: l'analisi al termostato ha permesso di ottenere un valore approssimativo di TCP, utile per identificare il range di temperatura da analizzare successivamente con il DLS al fine di ottenere una stima più precisa.

Il vial contenente la soluzione in esame, dotato di ancorotta magnetica, è stato inserito nel bagno d'acqua termostato. La temperatura è stata incrementata gradualmente e la soluzione è stata monitorata visivamente. Quando è stata osservata la comparsa di torbidità (Figura 3.2), è stata annotata la temperatura corrispondente letta sul termometro immerso nel bagno. Tale valore ha costituito la stima approssimativa della TCP.

È importante sottolineare che l'analisi al termostato è stata eseguita inserendo direttamente

il vial all'interno del bagno d'acqua, senza consumo di campione. Inoltre, il processo è risultato completamente reversibile: raffreddando la soluzione a temperatura ambiente, questa ha riacquisito la propria limpidezza.

In alcuni casi, nonostante la temperatura del termostato fosse stata portata fino a 80 °C, non è stata osservata la comparsa di torbidità. Queste soluzioni non sono state sottoposte all'analisi DLS, poiché la mancanza di intorbidimento visibile ha suggerito che la TCP fosse superiore al limite operativo raggiungibile con il setup sperimentale. Tali soluzioni non sono state pertanto considerate per la costruzione dei diagrammi di fase.



**Figura 3.2:** Confronto visivo del fenomeno del cloud point. Si osserva il passaggio dalla fase limpida (vial a destra) alla fase torbida (vial a sinistra), segno dell'avvenuta transizione di fase nel sistema.

Nel presente lavoro, l'indagine è stata completata analizzando i sistemi non ancora caratterizzati in studi precedenti, ovvero:

- le soluzioni con NaCl 2 m contenenti metanolo;
- le soluzioni con NaCl 0 m contenenti 1-propanolo;
- le soluzioni con NaCl 2 m contenenti 2-propanolo.

Una volta ottenute le temperature di cloud point approssimative per ciascuna soluzione, si è proceduto con l'analisi al DLS per affinare la determinazione.

### 3.1.3 Analisi delle soluzioni mediante DLS

Le misure mediante Dynamic Light Scattering (DLS) sono state impiegate come tecnica complementare per valutare la variazione della dimensione idrodinamica degli aggregati micellari al variare della temperatura. Questo approccio ha permesso di supportare quantitativamente i risultati ottenuti con il termostato e di affinare la stima della temperatura di cloud point.

Per l'analisi al DLS è stata utilizzata una cuvetta in quarzo ottico dotata di tappo in teflon, le cui caratteristiche sono descritte nella Sezione 2.2.3. Prima di ogni misura, la cuvetta è stata accuratamente lavata con acqua Milli-Q e completamente asciugata,

in modo da evitare contaminazioni o la presenza di acqua residua che avrebbero potuto alterare le misure di scattering. Successivamente, un'aliquota di campione (1 mL) è stata prelevata dal vial mediante micropipetta e trasferita all'interno della cuvetta, avendo cura di non introdurre bolle d'aria, in quanto anch'esse avrebbero potuto interferire con la misura. Una volta inserito il campione, la cuvetta è stata chiusa con il tappo in teflon per prevenire l'evaporazione del solvente durante l'analisi a temperature elevate. La cuvetta è stata quindi inserita all'interno dell'apposito alloggiamento dello strumento e il protocollo di misura è stato impostato in modalità *temperature trend*, con acquisizione del diametro idrodinamico medio (*z-average*) a intervalli di temperatura crescenti, partendo da una temperatura inferiore alla stima approssimativa della TCP ottenuta al termostato. Il range di temperatura è stato scelto considerando il valore ottenuto mediante l'analisi al termostato, in modo da coprire un intervallo che includesse la TCP stimata.

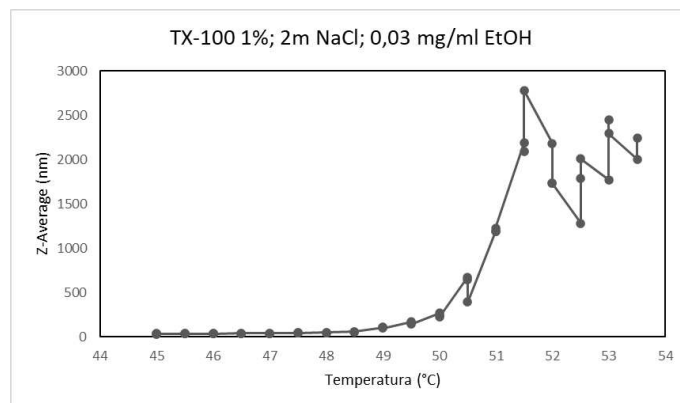
Mediante il DLS sono state effettuate due serie di misure successive per ogni singola soluzione:

1. *Scansione preliminare a intervallo ampio*: è stato considerato un intervallo di temperatura più ampio, con incrementi di 2 °C, allo scopo di identificare in modo generale la zona di transizione;
2. *Scansione di affinamento a intervallo ristretto*: sulla base della TCP individuata nella prima scansione, è stata eseguita una seconda misura con un intervallo di temperatura più stretto e centrato intorno alla TCP stimata, con incrementi di 0,5 °C, al fine di ottenere una determinazione più precisa della temperatura di cloud point.

Durante l'analisi è stata monitorata la variazione della dimensione idrodinamica degli aggregati micellari. La TCP è stata definita operativamente come la temperatura alla quale si è osservato un aumento brusco e significativo del diametro idrodinamico medio (*z-average*, Figura 3.3), corrispondente alla formazione di aggregati di dimensioni molto superiori rispetto alle micelle singole e indicativo dell'insorgenza della separazione di fase.

Questo iter procedurale a due stadi è stato seguito sistematicamente per tutte le soluzioni preparate, con l'obiettivo di costruire diagrammi di fase completi e accurati, in grado di evidenziare l'effetto di ciascun additivo sulla stabilità delle micelle e sulla temperatura di cloud point del sistema acqua/Triton X-100.

I diagrammi di fase ottenuti e la discussione dei risultati sono riportati nel Capitolo 4.



**Figura 3.3:** Esempio di grafico che si ottiene da un'analisi al DLS. Profilo termico dello *z-average* per il sistema TX-100/NaCl/EtOH. L'improvviso incremento dimensionale (da valori inferiori a 100 nm a oltre 2500 nm) evidenzia la formazione di aggregati di grandi dimensioni, fenomeno che identifica sperimentalmente il cloud point.

### 3.2 Caratterizzazione chimico-fisica delle polveri di partenza

Prima di procedere con le analisi del processo di estrazione, sono stati effettuati degli studi di caratterizzazione chimico-fisica sulle polveri di partenza, al fine di confermare la composizione e la struttura chimica delle sostanze in esame. In particolare, sono state eseguite analisi mediante spettroscopia infrarossa (IR), calorimetria differenziale a scansione (DSC) e diffrazione a raggi X (XRD) sulle polveri dello standard di curcumina, campione a titolo noto di curcuminoidi e integratore alimentare.

Per tutte le analisi IR descritte nelle sezioni seguenti, sono stati impiegati i medesimi parametri strumentali, riportati nella Tabella 3.1.

**Tabella 3.1:** Parametri strumentali utilizzati per l'acquisizione degli spettri IR di tutti i campioni analizzati (standard di curcumina, campione a titolo noto di curcuminoidi e integratore alimentare).

Parametro	Valore
Accessorio	Smart iTX – Diamond Crystal (ATR)
Numero di scansioni	64
Risoluzione	4 cm <sup>-1</sup>
Data spacing	0,482 cm <sup>-1</sup>
Formato finale	% Transmittance
Correzione	Nessuna
Soppressione atmosferica automatica	Attivata
Acquisizione del background	Ogni 120 minuti (64 scansioni)

### 3.2.1 Caratterizzazione chimico-fisica dello standard di curcumina

**Analisi spettroscopica IR.** L'analisi spettroscopica nell'infrarosso (IR) dello standard di curcumina è stata eseguita al fine di confermare la presenza dei principali gruppi funzionali caratteristici della molecola. L'acquisizione dello spettro è stata condotta mediante i parametri riassunti nella Tabella 3.1.

**Analisi calorimetrica differenziale a scansione (DSC).** L'analisi calorimetrica differenziale a scansione (DSC) dello standard di curcumina è stata condotta al fine di determinarne il comportamento termico e confermarne la purezza e l'identità sulla base del punto di fusione e dell'entalpia associata. La misura è stata eseguita mediante i parametri strumentali riassunti nella Tabella 3.2.

**Tabella 3.2:** Parametri strumentali utilizzati per l'acquisizione del termogramma DSC dello standard di curcumina.

Parametro	Valore
Strumento	DSC Q2000 V24.10 Build 122 (TA Instruments)
Massa del campione	2,2000 mg
Intervallo di temperatura	-50 – 350 °C
Velocità di riscaldamento	10 °C/min
Atmosfera	Azoto
Portacampione	Crogiolo in alluminio sigillato

**Analisi diffrattometrica a raggi X (XRD).** L'analisi diffrattometrica a raggi X su polveri (XRD) dello standard di curcumina è stata condotta allo scopo di valutare lo stato fisico, l'ordine strutturale e il grado di cristallinità del campione di partenza. Le misurazioni sono state effettuate al fine di confermare la natura cristallina del solido, già suggerita dalle precedenti analisi termiche. I parametri strumentali impostati tramite il software operativo per l'acquisizione del diffrattogramma sono riassunti nella Tabella 3.3.

**Tabella 3.3:** Parametri strumentali utilizzati per l'acquisizione del diffrattogramma a raggi X (XRD) dello standard di curcumina.

Parametro	Valore
Sorgente	Tubo a raggi X in Cu ( $K\alpha$ , $\lambda = 1,54184 \text{ \AA}$ )
Tensione del generatore	40 kV
Corrente del generatore	15 mA
Tipo di scansione	Coupled $2\theta/\theta$
Modalità di scansione	Continuous PSD fast
Range angolare ( $2\theta$ )	$5^\circ - 70^\circ$
Incremento (Step size)	$\sim 0,02^\circ$

### 3.2.2 Caratterizzazione chimico-fisica del campione a titolo noto di curcuminoidi

**Analisi spettroscopica IR.** L'analisi spettroscopica nell'infrarosso (IR) del campione a titolo noto di curcuminoidi è stata eseguita al fine di verificare la presenza dei principali gruppi funzionali caratteristici della miscela e di confermarne la compatibilità con una composizione costituita prevalentemente da curcuminoidi, comprendenti curcumina, demetossicurcumina e bisdemetossicurcumina. L'acquisizione dello spettro è stata eseguita mediante i parametri strumentali riportati nella Tabella 3.1.

**Analisi calorimetrica differenziale a scansione (DSC).** L'analisi calorimetrica differenziale a scansione (DSC) del campione a titolo noto di curcuminoidi è stata eseguita con lo scopo di valutarne il comportamento termico complessivo e verificare la presenza della frazione cristallina riconducibile alla classe dei curcuminoidi, costituita principalmente da curcumina, demetossicurcumina e bisdemetossicurcumina. I parametri strumentali impiegati per l'acquisizione del termogramma sono riportati nella Tabella 3.4.

**Tabella 3.4:** Parametri strumentali utilizzati per l'acquisizione del termogramma DSC del campione a titolo noto di curcuminoidi.

Parametro	Valore
Strumento	DSC Q2000 V24.11 Build 124 (TA Instruments)
Massa del campione	4,4000 mg
Intervallo di temperatura	0 – 250 °C
Velocità di riscaldamento	10 °C/min
Atmosfera	Azoto
Portacampione	Crogiolo in alluminio sigillato

**Analisi diffrattometrica a raggi X (XRD).** L'analisi diffrattometrica a raggi X su polveri (XRD) del campione a titolo noto di curcuminoidi è stata condotta allo scopo di indagarne lo stato solido e valutarne il grado di cristallinità. La misura è stata eseguita impiegando il diffrattometro da banco Bruker D6 PHASER (descritto nella Sezione 2.2). La polvere è stata posizionata sull'apposito portacampione e analizzata operando in geometria Bragg-Brentano. I parametri operativi dettagliati utilizzati per l'acquisizione del diffrattogramma sono riassunti nella Tabella 3.5.

**Tabella 3.5:** Parametri strumentali utilizzati per l'acquisizione del diffrattogramma a raggi X del campione titolato di curcuminoidi.

<b>Parametro</b>	<b>Valore</b>
Sorgente radiogena	Tubo a Cu ( $K\alpha$ , $\lambda = 1.54184 \text{ \AA}$ )
Tensione del generatore	40 kV
Corrente del generatore	15 mA
Tipo di scansione	Coupled $2\theta/\theta$
Modalità di scansione	Continuous PSD fast
Intervallo angolare di scansione ( $2\theta$ )	$5.000^\circ - 49.995^\circ$
Incremento (Step size)	$0.0206^\circ$
Tempo per step	3.000 s
Rivelatore	SSD160_2 (Modalità 1D)

### 3.2.3 Caratterizzazione chimico-fisica dell'integratore alimentare

**Analisi spettroscopica IR.** L'analisi spettroscopica nell'infrarosso (IR) è stata condotta su un campione di integratore alimentare la cui formulazione comprende glucosamina, condroitina, metilsulfonilmetano (MSM), collagene marino idrolizzato, curcuminoidi ed estratto di *Boswellia*. L'obiettivo dell'analisi è stato quello di ottenere un'impronta spettrale complessiva della matrice e, in particolare, di verificare la presenza di bande riconducibili ai curcuminoidi. L'acquisizione dello spettro è stata effettuata mediante i parametri strumentali riassunti nella Tabella 3.1.

**Analisi calorimetrica differenziale a scansione (DSC).** L'analisi calorimetrica differenziale a scansione (DSC) dell'integratore alimentare è stata eseguita al fine di valutarne il comportamento termico complessivo e, in particolare, di verificare la presenza dei curcuminoidi all'interno della matrice formulativa. Poiché il campione è costituito da una miscela complessa di componenti con diversa natura chimica e differente stabilità termica, il profilo DSC risulta necessariamente più articolato rispetto a quello dello standard puro di curcumina. La misura è stata effettuata utilizzando i parametri strumentali riportati nella Tabella 3.6.

**Analisi diffrattometrica a raggi X (XRD).** Al fine di caratterizzare lo stato solido della complessa matrice formulativa, è stata condotta un'analisi diffrattometrica a raggi X su polveri (XRD) anche sul campione di integratore alimentare commerciale. L'analisi è stata eseguita utilizzando la stessa configurazione impiegata per il campione titolato. La

polvere, prelevata direttamente dall'interno delle capsule senza subire pretrattamenti, è stata posta sul portacampione e analizzata in geometria Bragg-Brentano. Le condizioni operative e i parametri di acquisizione, mantenuti costanti per garantire la confrontabilità dei risultati, sono riportati nella Tabella 3.5.

**Tabella 3.6:** Parametri strumentali utilizzati per l'acquisizione del termogramma DSC dell'integratore alimentare.

<b>Parametro</b>	<b>Valore</b>
Strumento	DSC Q2000 V24.11 Build 124 (TA Instruments)
Massa del campione	4,4000 mg
Intervallo di temperatura	0 – 250 °C
Velocità di riscaldamento	10 °C/min
Atmosfera	Azoto
Portacampione	Crogiolo in alluminio sigillato

### **3.3 Ottimizzazione del processo di estrazione**

La seconda parte del lavoro riguarda l'ottimizzazione del protocollo CPE per l'estrazione della curcumina. La procedura è stata messa a punto in modo progressivo, partendo da sistemi modello fino ad arrivare a matrici reali, così da valutarne efficienza, accuratezza e robustezza. In ordine cronologico, le fasi di ottimizzazione sono state le seguenti:

- prove di solubilità dello standard di curcumina;
- costruzione della curva di calibrazione per la quantificazione della curcumina mediante spettrofotometria UV-Vis;
- analisi del processo di estrazione con campione standard di curcumina, utilizzando concentrazioni di sale diverse;
- ottimizzazione del processo di estrazione con lo standard di curcumina;
- analisi del processo di estrazione utilizzando campione titolato;
- analisi del processo di estrazione utilizzando integratore alimentare.

Le prestazioni del processo di estrazione sono state valutate in termini di resa di estrazione (extraction efficiency, E%) e percentuale di recupero (recovery, R%), calcolate a partire dalla quantificazione della curcumina sia nella fase micellare sia nella fase acquosa residua mediante spettrofotometria UV-Vis. Le definizioni operative di tali grandezze e le relative equazioni sono riportate nella Sezione 4.3.2.

#### **3.3.1 Studio della solubilità dello standard di curcumina**

La prima fase ha riguardato l'analisi della solubilità dello standard di curcumina in diversi solventi o miscele di solventi, al fine di identificare la matrice più adatta per la preparazione

delle soluzioni standard e per l'applicazione del protocollo CPE. Come discusso nella Sezione 1.7, la curcumina è un composto idrofobico con scarsa solubilità in acqua, mentre risulta più solubile in solventi organici come etanolo, metanolo e acetone.

Analizzando i dati ottenuti mediante la costruzione dei diagrammi di fase, si è scelto come alcol ottimale per il processo di estrazione l'etanolo, in quanto ha mostrato un effetto moderato sulla temperatura di cloud point, consentendo di mantenere una buona stabilità delle micelle e una temperatura di separazione accessibile. Inoltre, l'etanolo è un solvente comunemente utilizzato in applicazioni alimentari e farmaceutiche, risultando compatibile con la matrice di interesse (integratore alimentare) e con la curcumina stessa.

Al fine di identificare la minor percentuale di alcol necessaria per garantire una completa dissoluzione della molecola, sono state condotte prove sistematiche di solubilità:

- **Prova in acqua pura:** In un becher da 50 mL sono stati pesati 30,5 mg di curcumina a cui sono stati aggiunti 10 mL di acqua Milli-Q. A seguito di sonicazione per 20 minuti, il soluto è rimasto macroscopicamente insolubile, evidenziando una torbidità persistente.
- **Prova in etanolo assoluto:** L'aggiunta di 10 mL di etanolo a 25,8 mg di curcumina, seguita da pochi minuti di sonicazione, ha restituito una soluzione perfettamente limpida, confermando l'ottima affinità del soluto per questo solvente.
- **Prova in miscela idroalcolica:** Sono stati inseriti 22,5 mg di curcumina in 10 mL di acqua Milli-Q. Successivamente, si è proceduto con aggiunte sequenziali di 1 mL di etanolo, seguite ciascuna da sonicazione. La completa solubilizzazione, indicata dall'assenza di particolato in sospensione, si è ottenuta dopo l'aggiunta totale di 15 mL di etanolo e 10 minuti di sonicazione.

In conclusione, si è dimostrato che la curcumina risulta stabilmente solubile in una miscela etanolo/acqua in rapporto 60:40 v/v; tale composizione è stata pertanto adottata come matrice di riferimento per la preparazione delle soluzioni standard e l'applicazione del protocollo.

### 3.3.2 Determinazione della retta di calibrazione in matrice idroalcolica

Prima di poter applicare il protocollo CPE per l'estrazione della curcumina, è stato necessario costruire la curva di calibrazione per la quantificazione della curcumina mediante spettrofotometria UV-Vis. Questa curva è necessaria per poter quantificare la quantità di curcumina estratta nei campioni di interesse. In particolare, è stato necessario costruire due curve di calibrazione distinte: una per la quantificazione della curcumina nella fase

micellare (fase estrattiva), costruita in matrice etanolo/acqua 60:40, e una per la quantificazione della curcumina nella fase acquosa (fase residua), costruita in matrice TX-100/NaCl (descritta nella Sezione 3.3.3), in modo da poter valutare le rese di estrazione e di recupero in modo accurato.

**Preparazione della soluzione madre di curcumina.** Seguendo i risultati ottenuti dalle prove di solubilità, si è preparata una miscela di etanolo/acqua 60:40 (v/v) in un matraccio da 100 mL, con l'aiuto di pipette in vetro (da 10 mL). Successivamente è stata aggiunta la polvere di curcumina, precedentemente pesata mediante bilancia analitica (massa effettiva: 20,4 mg). La soluzione è stata sottoposta a sonicazione per 5 minuti, per ottenere una soluzione completamente limpida e priva di particelle sospese. In questo modo è stata ottenuta una soluzione madre di curcumina con concentrazione pari a 0,204 mg/mL.



**Figura 3.4:** Matraccio tarato contenente la soluzione madre di curcumina a concentrazione 0,204 mg/mL.

**Preparazione degli standard.** A partire dalla soluzione madre di curcumina, sono state preparate una serie di soluzioni standard a concentrazioni decrescenti, mediante diluizione con la stessa matrice etanolo/acqua 60:40. Le concentrazioni finali degli standard sono state: 0,001; 0,003; 0,005; 0,007; 0,009 mg/mL. I volumi di soluzione madre e di matrice sono stati calcolati mediante la seguente formula di diluizione:

$$C_1V_1 = C_2V_2 \quad (6)$$

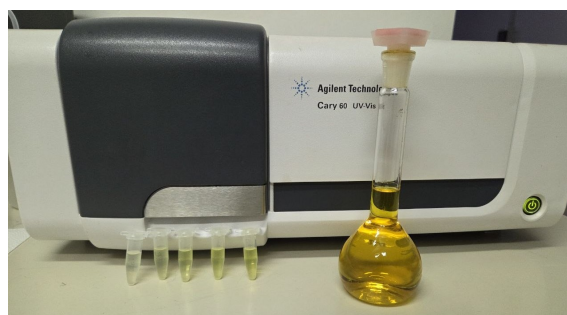
dove  $C_1$  è la concentrazione della soluzione madre,  $V_1$  è il volume di soluzione madre da prelevare,  $C_2$  è la concentrazione desiderata dello standard e  $V_2$  è il volume finale dello standard (1 mL).

Il volume esatto della soluzione madre e della matrice sono stati prelevati mediante l'utilizzo di micropipette (con portata massima di 1 mL, 200  $\mu$ L e 20  $\mu$ L). I volumi prelevati per la preparazione delle soluzioni standard sono rappresentati nella Tabella 3.7. Inoltre è stata preparata anche una soluzione di matrice pura (etanolo/acqua 60:40)

da utilizzare come bianco per la calibrazione e per le misure successive, in modo da correggere eventuali assorbimenti di fondo dovuti alla matrice stessa.

**Tabella 3.7:** Volumi di soluzione madre e di matrice utilizzati per la preparazione degli standard della curva di taratura della curcumina (intervallo di concentrazione 0,001–0,009 M).

[EtOH] (M)	V Sol. madre ( $\mu\text{L}$ )	V matrice ( $\mu\text{L}$ )
<b>Bianco</b>	-	1000
<b>0,001</b>	5	995
<b>0,003</b>	15	985
<b>0,005</b>	25	975
<b>0,007</b>	35	965
<b>0,009</b>	45	955



**Figura 3.5:** Soluzioni standard preparate mediante soluzione madre (matraccio), all'interno di Eppendorf.

**Misurazione allo spettrofotometro UV-Vis.** Le soluzioni standard preparate sono state misurate mediante spettrofotometria UV-Vis, al fine di ottenere i valori di assorbanza corrispondenti a ciascuna concentrazione di curcumina. Per eseguire le analisi, la soluzione standard è stata trasferita all'interno della cuvetta, che a sua volta è stata inserita nel portacampione dello strumento. La cuvetta è stata pulita e asciugata accuratamente prima di ogni misura, per evitare contaminazioni.

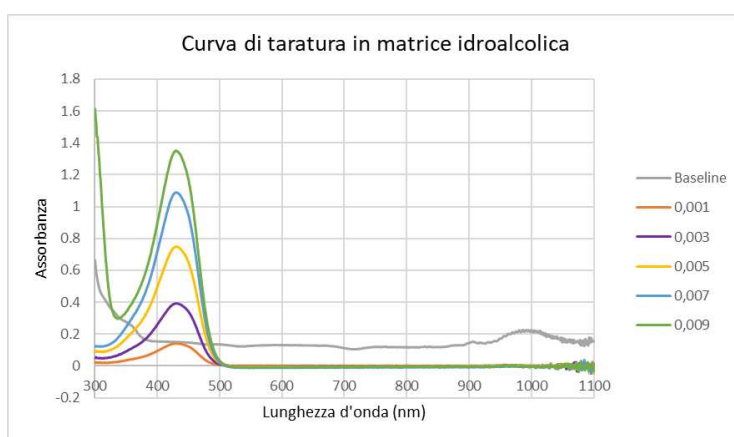
I parametri utilizzati per eseguire l'analisi mediante spettrofotometro UV-Vis sono riassunti nella Tabella 3.8.

Dopo aver impostato il setup, è stata eseguita la misura del bianco (soluzione di matrice pura) e successivamente sono state misurate le soluzioni standard, procedendo dalla soluzione meno concentrata a quella più concentrata, in modo da minimizzare il rischio di contaminazioni dovute a residui di campione più concentrato nella cuvetta. In questo modo il software dello strumento ha generato un grafico di assorbanza in funzione della lunghezza d'onda, contenente lo spettro del bianco e i cinque spettri di assorbimento delle soluzioni standard di curcumina a concentrazioni crescenti (Figura 3.6).

**Tabella 3.8:** Parametri sperimentali impostati per le analisi UV-Vis.

Parametro	Valore
Intervallo di scansione	300 – 1100 nm
Modalità	Assorbanza (Abs)
Configurazione ottica	Doppio raggio (Dual Beam)
Velocità di scansione	Fast
Correzione linea di base	Attiva (Baseline correction)

I dati ottenuti dall'analisi allo spettrofotometro sono stati esportati in formato .csv e successivamente elaborati mediante Microsoft Excel, in modo da costruire la curva di calibrazione discussa nella Sezione 4.



**Figura 3.6:** Esempio di spettro UV acquisito dall'analisi della Replica 1.

Per garantire l'affidabilità e la riproducibilità dei dati, sono state eseguite tre repliche per ciascuna soluzione standard, in tre giorni diversi. I valori con cui è stata costruita la curva di calibrazione sono stati ottenuti come media dei tre valori di assorbanza misurati per ciascuna soluzione standard; l'errore associato a ciascun punto della curva di calibrazione è stato calcolato come deviazione standard dei tre valori di assorbanza.

### 3.3.3 Valutazione dell'effetto matrice nel sistema micellare (TX-100/NaCl)

Per consentire la corretta quantificazione della frazione di curcumina non estratta (ovvero rimasta nella fase acquosa residua), è stata costruita una seconda curva di calibrazione in grado di riprodurre l'effetto matrice generato dalla concomitante presenza di Triton X-100 (1% p/p) e sale ad elevata forza ionica.

Per la costruzione di questa curva si è seguita la stessa procedura descritta nella Sezione 3.3.2, con la differenza che le soluzioni standard sono state preparate diluendo la soluzione madre di curcumina con una soluzione contenente TX-100 1% (p/p) e NaCl 3 m, in modo da simulare la matrice presente nella fase acquosa residua dopo l'estrazione.

**Preparazione della soluzione madre di curcumina.** In seguito a una serie di prove preliminari, la soluzione madre è stata preparata solubilizzando 10 mg di curcumina (massa effettiva: 10,19 mg) in 50 mL di etanolo. In questo modo si è ottenuta una soluzione madre di curcumina con concentrazione pari a 0,2038 mg/mL.

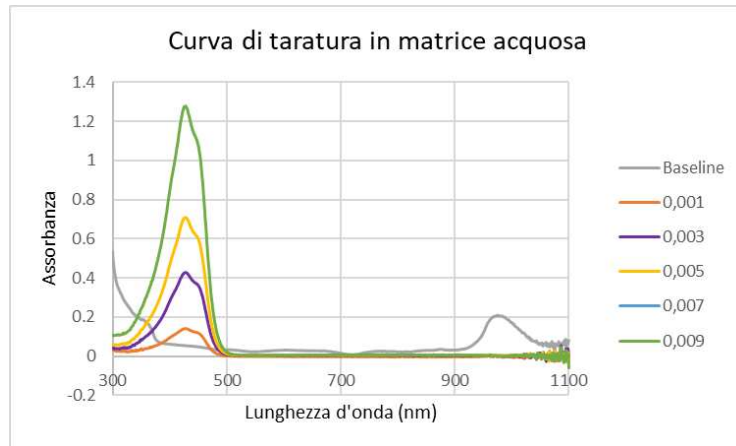
La matrice della soluzione madre qui è etanolo puro, mentre nella sezione precedente era etanolo/acqua 60:40. Questa differenza è intenzionale, teoricamente in questo caso, la curcumina doveva essere solubilizzata nella matrice TX-100 1% e NaCl, ma data la sua solubilità non è possibile solubilizzarla in una matrice acquosa. Per questo motivo è stato deciso di solubilizzarla in etanolo e successivamente creare delle soluzioni standard con la matrice in esame.

**Preparazione degli standard.** A partire dalla soluzione madre di curcumina, sono state preparate una serie di soluzioni standard a concentrazioni decrescenti, mediante diluizione con la matrice costituita da Triton X-100 1% (p/p) e NaCl 3 m. Le concentrazioni finali degli standard sono state: 0,001; 0,003; 0,005; 0,007; 0,009 mg/mL. I volumi di soluzione madre e di matrice sono stati calcolati mediante l'Equazione 6.

I volumi prelevati per la preparazione delle soluzioni standard sono rappresentati nella Tabella 3.7. Inoltre è stata preparata anche una soluzione di matrice pura (Triton X-100 1% e NaCl 3 m) da utilizzare come bianco per la calibrazione e per le misure successive, in modo da correggere eventuali assorbimenti di fondo dovuti alla matrice stessa.

**Misurazione allo spettrofotometro UV-Vis.** Le soluzioni standard preparate sono state misurate mediante spettrofotometria UV-Vis, al fine di ottenere i valori di assorbanza corrispondenti a ciascuna concentrazione di curcumina. Il setup strumentale utilizzato è il medesimo riportato nella Tabella 3.8. Dopo aver impostato il setup, è stata eseguita la misura del bianco (soluzione di matrice pura) e successivamente sono state misurate le soluzioni standard (Figura 3.7). I dati ottenuti sono stati esportati in formato .csv e successivamente elaborati mediante Microsoft Excel, in modo da costruire la curva di calibrazione discussa nella Sezione 4.

Analogamente a quanto descritto nella Sezione 3.3.2, sono state eseguite tre repliche per ciascuna soluzione standard, in tre giorni diversi. I valori della curva di calibrazione sono stati ottenuti come media dei tre valori di assorbanza e l'errore associato è stato calcolato come deviazione standard.



**Figura 3.7:** Esempio di spettro UV acquisito dall'analisi della Replica 1.

### 3.3.4 Studio dell'influenza della forza ionica sull'efficienza di estrazione della curcumina

A questo punto si è focalizzata l'attenzione sull'ottimizzazione del processo di estrazione, con l'obiettivo di identificare le condizioni operative che massimizzassero la resa di estrazione della curcumina. In particolare, si è deciso che la temperatura massima di cloud point da raggiungere durante il processo di estrazione non dovesse superare i 35 °C. Inoltre, si è effettuata una serie di prove di estrazione al fine di utilizzare una concentrazione molale di sale il più bassa possibile, in modo da ridurre al minimo l'impatto ambientale del processo di estrazione. Le concentrazioni molali di sale studiate sono le seguenti: 4,5 m; 4 m; 3,5 m; 3 m; 2,5 m; 2 m. A concentrazioni superiori a 4,5 m si raggiunge il limite di solubilità del sale e non è stato possibile preparare la soluzione di estrazione. A concentrazioni inferiori a 2 m, invece, la temperatura di cloud point risulta superiore a 35 °C e non è stato possibile raggiungere la separazione di fase alle condizioni operative desiderate.

**Preparazione della soluzione madre di curcumina.** È stato necessario preparare una soluzione madre di curcumina solubilizzata in etanolo, utilizzata per tutte le prove di estrazione; in questo modo si è garantita la stessa concentrazione di curcumina in tutte le prove e si è potuto valutare l'effetto della forza ionica sulla resa di estrazione in modo accurato. In 25 mL di etanolo sono stati solubilizzati 100 mg di curcumina, ottenendo una soluzione madre con concentrazione pari a 4 mg/mL (Figura 3.8). La scelta di questa concentrazione è stata dettata dalla necessità di far rientrare la concentrazione finale di curcumina nella fase estrattiva all'interno del range di concentrazioni degli standard della curva di calibrazione, in modo da poter quantificare la curcumina estratta con buona accuratezza.



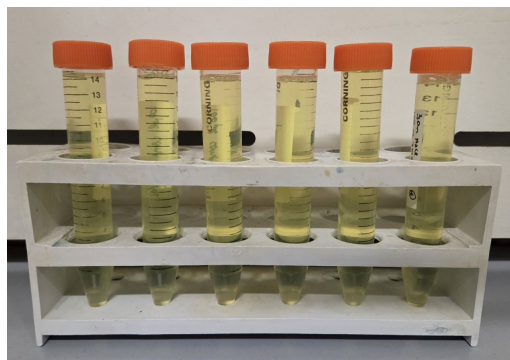
**Figura 3.8:** Becher contenente la soluzione madre di curcumina a concentrazione 4 mg/ml.

**Preparazione della soluzione di TX-100 all'1%.** La soluzione di TX-100 all'1% (p/p) è stata preparata fresca prima di ogni serie di prove di estrazione, in modo da garantire la riproducibilità dei risultati. Come già descritto nella Sezione 3.1.1, è stata preparata pesando 1 g di TX-100 e aggiungendo acqua Milli-Q fino a raggiungere una massa totale di 100 g. La soluzione è stata sottoposta ad agitazione mediante piastra magnetica fino a completa dissoluzione del tensioattivo, ottenendo una soluzione limpida e priva di particelle sospese.

**Procedura generale di estrazione.** La procedura di estrazione, comune a tutte le concentrazioni di sale studiate, è di seguito descritta. Le variazioni specifiche per ciascuna concentrazione sono riportate nella Tabella 3.9.

In un becher da 250 mL sono stati inseriti 100 mL di soluzione di TX-100 all'1% (p/p) e la quantità di NaCl necessaria per ottenere la concentrazione molale desiderata. La soluzione è stata sottoposta a sonicazione per favorire la completa solubilizzazione del sale. Successivamente è stata verificata la temperatura di cloud point della soluzione, mediante monitoraggio visivo su piastra riscaldante dotata di agitazione magnetica e termometro immerso nella soluzione. Nel caso delle soluzioni a più alta concentrazione salina (4,5 m), la separazione di fase è avvenuta spontaneamente a temperatura ambiente; per le altre concentrazioni è stato necessario un blando riscaldamento fino al raggiungimento della TCP. A questo punto sono stati aggiunti 100  $\mu$ L di soluzione madre di curcumina (4 mg/mL), ottenendo una concentrazione finale di curcumina pari a 0,004 mg/mL. Mediante leggera agitazione, la curcumina si è distribuita in modo omogeneo all'interno della soluzione e il fenomeno del cloud point è stato verificato.

Un volume pari a 14 mL della soluzione è stato trasferito in ciascuna delle 6 Falcon da 15 mL (provette coniche con tappo a vite e guarnizione in teflon, idonee alla centrifugazione), come mostrato in Figura 3.9.



**Figura 3.9:** In 6 Falcon sono stati inseriti 14 mL della soluzione da centrifugare.

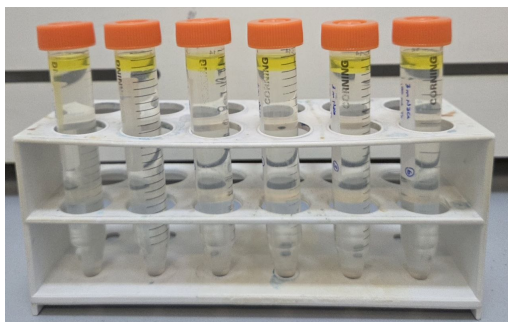
Le Falcon sono state sottoposte a centrifugazione nelle condizioni riportate in Tabella 3.9. Dopo la centrifugazione (Figura 3.10), la fase estrattiva (fase micellare superiore, di colore giallo intenso) è stata prelevata in due aliquote successive:

- **Primo prelievo ( $V_1$ ):** aliquota destinata all'analisi UV-Vis. Questo volume è stato trasferito in una Falcon da 15 mL e ridisperso in un volume noto di miscela etanolo/acqua 60:40 ( $V_{ridisp}$ ), al fine di ottenere una concentrazione di curcumina compresa nel range della curva di calibrazione. Per recuperare quantitativamente il campione, il puntale della micropipetta è stato lavato più volte con la miscela di ridispersione. La concentrazione di curcumina in questa aliquota ( $C_{V_1}$ ) è stata determinata mediante spettrofotometria UV-Vis (Figura 3.11), utilizzando come bianco la miscela etanolo/acqua 60:40 e la curva di calibrazione costruita nella medesima matrice (Sezione 3.3.2).
- **Secondo prelievo ( $V_2$ ):** aliquota residua della fase estrattiva, prelevata con particolare cura per evitare di aspirare la fase acquosa sottostante. Si è preferito prelevare un volume leggermente inferiore a quello effettivamente presente piuttosto che rischiare la contaminazione con la fase acquosa. Assumendo che la concentrazione di curcumina sia uniforme all'interno della fase estrattiva, la massa di curcumina nella seconda aliquota è stata stimata per proporzione diretta rispetto a quella determinata analiticamente nella prima aliquota:

$$m_{curc,V_2} = \frac{m_{curc,V_1}}{V_1} \times V_2 \quad (7)$$

La massa totale di curcumina nella fase estrattiva è stata calcolata come somma del contributo determinato analiticamente ( $V_1$ ) e di quello stimato ( $V_2$ ):

$$m_{curc,estratta} = m_{curc,V_1} + m_{curc,V_2} \quad (8)$$



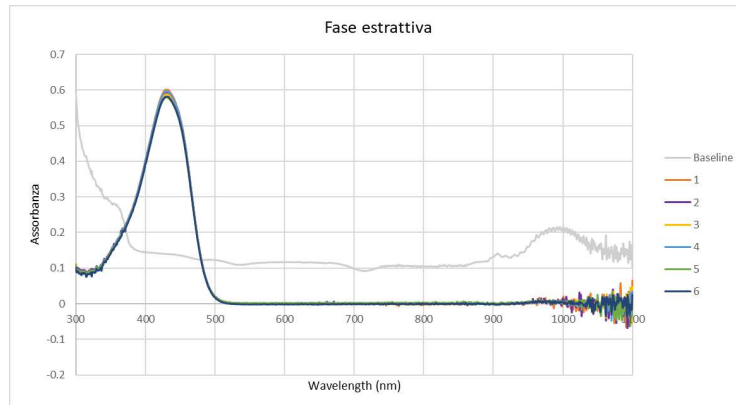
**Figura 3.10:** Dopo aver eseguito la centrifugazione, si ottiene la ripartizione della soluzione: superiormente si ripartisce la fase estrattiva, contenente la curcumina; inferiormente vi è la fase residua. A questo punto è possibile eseguire i prelievi della fase estrattiva, per poter quantificare la curcumina estratta.

**Tabella 3.9:** Parametri operativi delle prove di estrazione a diverse concentrazioni di NaCl.  $V_1$ : volume del primo prelievo della fase estrattiva;  $V_2$ : volume del secondo prelievo;  $V_{ridisp}$ : volume di ridispersione in etanolo/acqua 60:40; TCP: temperatura di cloud point osservata; Centr.: condizioni di centrifugazione (RCF  $\times$  g, tempo, temperatura).

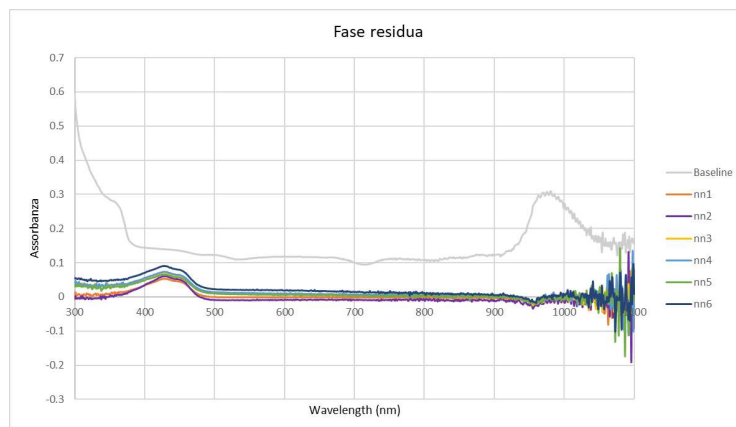
[NaCl] (m)	$m_{NaCl}$ (g)	TCP (°C)	Centrifugazione	$V_1$ ( $\mu$ L)	$V_2$ ( $\mu$ L)	$V_{ridisp}$ (mL)
4,5	26,3	$\sim T_{amb}$	13000 $\times$ g, 20 min, 35 °C	250	200	7
4,0	23,4	21	13000 $\times$ g, 20 min, 35 °C	250	300	7
3,5	20,45	24	13000 $\times$ g, 20 min, 35 °C	500	500	7
3,0	17,53	30	13000 $\times$ g, 20 min, 35 °C ( $\times 2$ )	500	400	7
2,5	14,61	>35	—	—	—	—
2,0	11,69	>35	—	—	—	—

È stata inoltre eseguita un'analisi UV-Vis sulla fase acquosa residua, in modo da quantificare la curcumina non estratta (Figura 3.12). Per l'analisi della fase acquosa residua, sono state necessarie diverse prove preliminari per identificare il bianco più adatto. Nelle prove preliminari è stata utilizzata una soluzione di etanolo/acqua 1:1000 per simulare la proporzione di etanolo presente nella matrice dopo l'aggiunta della soluzione madre. Negli esperimenti definitivi (standard di curcumina 3 m NaCl, campione a titolo noto e integratore) è stata utilizzata come bianco la soluzione di matrice TX-100 1% e NaCl alla stessa concentrazione dell'estrazione.

È importante sottolineare che, nella stanza in cui è collocato lo spettrofotometro UV-Vis, la temperatura ambiente è elevata. Per questo motivo è stato necessario utilizzare un bagno di ghiaccio per mantenere la temperatura della fase acquosa residua al di sotto della TCP, in modo da evitare che la soluzione raggiungesse il cloud point durante l'analisi.



**Figura 3.11:** Esempio di spettro UV acquisito dall'analisi della fase estrattiva, di 6 Falcon analizzate, contenenti la stessa soluzione di partenza.



**Figura 3.12:** Esempio di spettro UV acquisito dall'analisi della fase residua acquosa, di 6 Falcon analizzate, contenenti la stessa soluzione di partenza.

Di seguito sono riportate le note specifiche per le prove condotte a ciascuna concentrazione di NaCl.

**Estrazione con NaCl 4,5 m.** La soluzione non ha necessitato di alcun trattamento termico per osservare la separazione di fase, in quanto la temperatura di cloud point risultava prossima alla temperatura ambiente. Il fenomeno del cloud point è avvenuto in modo spontaneo dopo l'aggiunta della curcumina, osservando la formazione di una soluzione torbida e opaca a occhio nudo.

**Estrazione con NaCl 4 m.** Dopo la sonicazione, la separazione di fase non è avvenuta spontaneamente. È stato effettuato un blando trattamento termico mediante piastra riscaldante con agitazione magnetica; la soluzione è diventata torbida a una temperatura pari a 21 °C, misurata mediante termometro immerso nella soluzione.

**Estrazione con NaCl 3,5 m.** La procedura è stata analoga a quella descritta per le altre concentrazioni. Anche in questo caso è stato necessario riscaldare la soluzione, in modo tale da far avvenire il fenomeno del cloud point, TCP pari a 26°C.

**Estrazione con NaCl 3 m.** Dopo la sonicazione, la separazione di fase non è avvenuta spontaneamente. È stato effettuato un blando trattamento termico e la soluzione è diventata torbida a una temperatura pari a 30 °C. Per questa concentrazione, dopo il primo ciclo di centrifugazione (13000 ×g, 20 min, 30 °C), la separazione di fase all'interno delle Falcon risultava parziale. È stato pertanto eseguito un secondo ciclo di centrifugazione nelle medesime condizioni, al termine del quale la separazione di fase è risultata completa, con formazione di una fase micellare (fase estrattiva) ben definita e separata dalla fase acquosa sottostante.

**Estrazione con NaCl 2,5 m e 2 m.** La TCP delle soluzioni con concentrazioni di sale pari a 2,5 m e 2 m è risultata superiore a 35 °C. Non è stato pertanto possibile osservare il fenomeno del cloud point alle condizioni operative desiderate ( $T_{CP} < 35$  °C). Questi sistemi di estrazione non sono stati ulteriormente studiati.

### 3.3.5 Protocollo operativo ottimizzato

Sulla base delle prove di estrazione descritte nella sezione precedente, sono state identificate le condizioni operative ottimali. Come discusso nella Sezione 4, la concentrazione salina pari a 3 m di NaCl ha fornito il miglior bilancio tra resa estrattiva, riduzione dell'impatto ecologico (minor consumo di sale) e garanzia di un innesco termico controllato (TCP  $\approx$  30 °C).

Rispetto alle prove preliminari, il protocollo definitivo prevede un tempo di centrifugazione più lungo (45 minuti anziché 20 minuti) e una temperatura di centrifugazione di 35 °C, al fine di garantire il mantenimento della separazione di fase durante l'intera durata della centrifugazione e una ripartizione più completa della curcumina nella fase micellare.

Il processo di estrazione definitivo si articola nelle seguenti fasi:

1. preparazione della matrice di estrazione costituita da Triton X-100 1% (p/p) e NaCl 3 m;
2. solubilizzazione del sale mediante sonicazione, se necessario;
3. verifica della TCP della soluzione di estrazione;
4. aggiunta della soluzione madre alla matrice di estrazione;
5. agitazione per favorire l'omogenea distribuzione delle due parti;
6. eventuale verifica della TCP dopo l'aggiunta della soluzione madre;

7. trasferimento di un volume noto di soluzione di estrazione in Falcon da 15 mL;
8. centrifugazione a temperatura controllata ( $13000 \times g$ , 45 min, 35 °C);
9. prelievo della fase micellare (fase estrattiva) in due aliquote ( $V_1$  e  $V_2$ );
10. ridispersione di  $V_1$  in un volume noto di etanolo/acqua 60:40;
11. quantificazione della curcumina nella fase estrattiva mediante spettrofotometria UV-Vis (retta di calibrazione in matrice etanolo/acqua 60:40);
12. quantificazione della curcumina nella fase acquosa residua mediante spettrofotometria UV-Vis (retta di calibrazione in matrice TX-100/NaCl);
13. calcolo delle rese di estrazione e di recupero mediante le Equazioni 11–8.

### 3.3.6 Applicazione del metodo a campione standard di curcumina

Dopo aver messo a punto il protocollo operativo e aver identificato le condizioni ottimali per l'estrazione della curcumina, è stata eseguita una replica definitiva di estrazione utilizzando il campione standard di curcumina (lo stesso utilizzato per le prove preliminari e per la costruzione della curva di calibrazione), in modo da valutare l'efficienza del processo di estrazione e la correttezza del protocollo operativo. Il protocollo è stato eseguito seguendo le fasi descritte nella Sezione 3.3.5.

Per questa analisi è stata preparata una nuova soluzione madre di curcumina: 40,19 mg di curcumina sono stati solubilizzati in 10 mL di etanolo, ottenendo una soluzione madre con concentrazione pari a 4,019 mg/mL. La scelta di preparare una nuova soluzione madre è stata fatta per garantire la freschezza della soluzione e la riproducibilità dei risultati.

L'estrazione è stata condotta seguendo fedelmente la procedura ottimizzata descritta nella Sezione 3.3.5. Nello specifico per questa prova, i volumi prelevati in fase di campionamento sono stati costanti per tutte le sei repliche analizzate: un primo volume  $V_1$  pari a 400  $\mu\text{L}$  è stato prelevato, sottoposto a lavaggio del puntale e portato al volume finale di 7 mL con la miscela di ridispersione per la lettura strumentale. Il volume secondario prelevato prima del raggiungimento dell'interfaccia di fase è risultato pari a  $V_2 = 350 \mu\text{L}$ . In questa analisi è stata introdotta una modifica rispetto alle prove preliminari riguardante il bianco utilizzato per l'analisi UV-Vis della fase acquosa residua: è stata impiegata la soluzione di matrice TX-100 1% (p/p) e NaCl 3 m, anziché la miscela etanolo/acqua 1:1000 utilizzata in precedenza. In questo modo si è garantita una più accurata correzione degli assorbimenti di fondo dovuti alla matrice. Per la quantificazione della curcumina nella fase estrattiva è stata utilizzata la retta di calibrazione costruita in matrice etanolo/acqua 60:40 (Sezione 3.3.2), mentre per la fase acquosa residua è stata utilizzata la retta di calibrazione costruita in matrice TX-100/NaCl (Sezione 3.3.3).

### 3.3.7 Applicazione del metodo a campione a titolo noto di curcuminoidi

Dopo aver eseguito l'analisi con il campione standard di curcumina, si è deciso di testare il protocollo operativo su un campione a titolo noto di curcuminoidi, in modo da valutare l'accuratezza del metodo rispetto a un contenuto noto di analita. Per eseguire questa analisi si è scelto di partire da una quantità arbitraria di polvere, in modo da confrontare nella fase finale la resa di estrazione con il valore dichiarato nella scheda tecnica del campione a titolo noto, valutando così la correttezza della procedura estrattiva e analitica.

In questo caso la polvere non contiene solo curcumina come principio attivo, ma contiene la miscela dei tre curcuminoidi (curcumina, demetossicurcumina e bisdemetossicurcumina). Poiché questi composti condividono il medesimo cromoforo e presentano un comportamento spettrofotometrico pressoché identico (come discusso nella Sezione 1.6), si è ritenuto che l'utilizzo della curva di calibrazione costruita con lo standard di curcumina pura non introducesse errori significativi nella quantificazione. La quantificazione è stata pertanto espressa in equivalenti di curcumina.

Le prove preliminari sono state eseguite solo sullo standard della curcumina perché eseguirle su tutti i curcuminoidi presenti nella polvere avrebbe richiesto la preparazione di standard per ciascun curcuminoide, rendendo il processo di calibrazione molto più complesso. La soluzione madre è stata preparata solubilizzando 20,79 mg di polvere a titolo noto di curcuminoidi in 5 mL di etanolo, ottenendo una soluzione madre con concentrazione pari a 4,158 mg/mL. In questo caso la TCP osservata è stata di circa 27°C, inferiore ai 30°C osservati per il solo standard di curcumina con NaCl 3 m. Questo potrebbe suggerire che la composizione del campione influenzi leggermente la TCP.

La procedura operativa è stata la stessa descritta nella Sezione 3.3.5, con le medesime condizioni operative.

Sono state eseguite 3 repliche in giorni diversi della completa procedura di estrazione, ciascuna comprendente l'analisi di 6 Falcon, in modo da garantire una buona robustezza dei dati. I parametri di prelievo e ridispersione sono riportati nella Tabella 3.10.

**Tabella 3.10:** Parametri di prelievo e ridispersione per l'applicazione del protocollo ottimizzato al campione a titolo noto di curcuminoidi.

	$V_1$ ( $\mu\text{L}$ )	$V_2$ ( $\mu\text{L}$ )	$V_{\text{ridisp}}$ (mL)
<b>Replica 1</b>	400	350	7
<b>Replica 2</b>	400	350	7
<b>Replica 3</b>	400	350	7

Durante la *Replica 2*, la Falcon n° 2 è stata scartata a causa della contaminazione del campione (il puntale è caduto all'interno della Falcon durante il prelievo di  $V_2$ ). I dati

relativi a questa Falcon non sono stati considerati per l'analisi dei risultati; pertanto, la *Replica 2* è basata su 5 Falcon anziché 6.

La *Replica 3* è stata eseguita dopo un periodo di tempo più lungo rispetto alle prime due. Per questo motivo è stata preparata una nuova soluzione madre: 20,83 mg di polvere in 5 mL di etanolo, ottenendo una concentrazione della soluzione pari a 4,166 mg/mL. Le rese sono state calcolate utilizzando la concentrazione corrispondente a ciascuna replica.

### **3.3.8 Applicazione del metodo a campione reale: integratore alimentare**

Dopo aver testato il protocollo operativo su campioni standard e a titolo noto di curcumina, si è deciso di trasferire e testare il metodo su una matrice reale complessa, rappresentata da un integratore alimentare. L'integratore alimentare, fornito dal relatore, si presenta in capsule (Figura 3.13a) contenenti una polvere composta da diversi ingredienti: glucosamina, condroitina, metilsulfonilmetano, collagene marino idrolizzato, curcuminoidi, *Boswellia* e altri componenti in quantità minori. La scelta di testare il metodo su questo integratore alimentare è stata fatta per valutare l'efficacia del processo di estrazione e la correttezza del protocollo operativo in una matrice reale complessa, che contiene diversi componenti potenzialmente interferenti con il processo di estrazione e con l'analisi mediante spettrofotometria UV-Vis. Inoltre, testare il metodo su un integratore alimentare permette di confrontare il contenuto di curcumina determinato sperimentalmente con quanto dichiarato nella scheda tecnica del prodotto.

La soluzione madre è stata preparata solubilizzando il contenuto di due capsule in 20 mL di etanolo. La scelta di utilizzare due capsule è stata dettata dalla possibilità di riferirsi direttamente alla tabella nutrizionale riportata sulla confezione, che indica il quantitativo di ciascun componente per 2 capsule. All'interno di una Falcon da 50 mL sono stati solubilizzati 926,34 mg di polvere (quantità presente in due capsule) in 20 mL di etanolo. La soluzione è stata sottoposta a sonicazione per favorire la solubilizzazione dei componenti. Poiché alcuni ingredienti (glucosamina, condroitina, collagene marino idrolizzato) non sono solubili in etanolo, si è osservata la formazione di un precipitato sul fondo della Falcon (Figura 3.13b). Nel momento del prelievo della soluzione madre per le prove di estrazione, si è prestata particolare attenzione a prelevare esclusivamente il surnatante limpido, evitando di aspirare il precipitato in modo da non contaminare la matrice di estrazione con componenti non solubilizzati.

Durante l'iter procedurale è stata verificata la temperatura alla quale avviene il cloud point; si è osservata una TCP pari a 27 °C. Il motivo per cui risulta diversa rispetto alle prove preliminari può essere associato al fatto che il campione in esame contiene molti componenti, non solo la curcumina, i quali possono influenzare la TCP.

Anche in questo caso, il campione contiene curcuminoidi e non solo curcumina pura; la

quantificazione è stata pertanto espressa in equivalenti di curcumina, come discusso nella Sezione 3.3.7.

La procedura operativa è stata la stessa descritta nella Sezione 3.3.5, con le medesime condizioni operative. Sono state eseguite 3 repliche in giorni diversi della completa procedura di estrazione, ciascuna comprendente l'analisi di 6 Falcon. I parametri di prelievo e ridispersione sono riportati nella Tabella 3.11.

**Tabella 3.11:** Parametri di prelievo e ridispersione per l'applicazione del protocollo ottimizzato al campione di integratore alimentare.

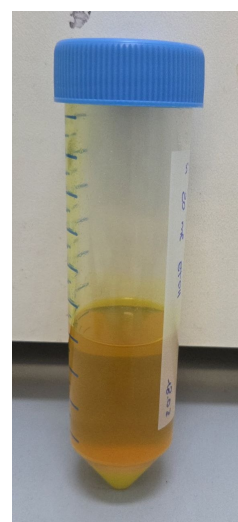
	$V_1$ ( $\mu\text{L}$ )	$V_2$ ( $\mu\text{L}$ )	$V_{\text{ridisp}}$ (mL)
<b>Replica 1</b>	500	300	9
<b>Replica 2</b>	500	300	9
<b>Replica 3</b>	500	300	9

Si osserva che in queste analisi il volume  $V_1$  è maggiore ( $500 \mu\text{L}$ ) e la differenza  $V_1 - V_2$  è più ampia ( $200 \mu\text{L}$ ) rispetto alle prove precedenti (dove era tipicamente  $50 \mu\text{L}$ ). Il volume di ridispersione è stato conseguentemente aumentato a 9 mL, calcolato per proporzione rispetto al volume di ridispersione delle prove precedenti (7 mL per  $400 \mu\text{L}$  di fase estrattiva), in modo da mantenere la concentrazione finale di curcumina nel medesimo range della curva di calibrazione:

$$V_{\text{ridisp,nuovo}} = V_{\text{ridisp,precedente}} \times \frac{V_{1,\text{nuovo}}}{V_{1,\text{precedente}}} = 7 \times \frac{500}{400} = 8,75 \approx 9 \text{ mL} \quad (9)$$



(a)



(b)

**Figura 3.13:** a) integratore alimentare in capsule; b) Falcon contenente 926,34 mg di polvere e 20 mL di etanolo, come si può notare è presente del precipitato.

## 4 Risultati e Discussione

Nel seguente paragrafo vengono presentati e discussi i risultati ottenuti dalle analisi sperimentali condotte, con particolare riferimento alla caratterizzazione del comportamento di fase del sistema acqua/Triton X-100, alla caratterizzazione chimico-fisica delle polveri di partenza e all'ottimizzazione del metodo CPE per l'estrazione della curcumina.

### 4.1 Caratterizzazione del comportamento di fase del sistema acqua/Triton X-100

Come riportato nella sezione precedente, questa fase di caratterizzazione del comportamento di fase del sistema acqua/Triton X-100 in funzione della temperatura e della composizione è inserita in un lavoro di caratterizzazione avviato precedentemente nel medesimo gruppo di ricerca. Per questo motivo, di seguito verranno riportati solo i risultati relativi ai sistemi analizzati in questo lavoro, ovvero:

- le soluzioni con NaCl 2 m contenenti metanolo;
- le soluzioni con NaCl 0 m contenenti 1-propanolo;
- le soluzioni con NaCl 2 m contenenti 2-propanolo.

I risultati relativi allo studio dell'etanolo, condotto in precedenza all'interno del medesimo gruppo di ricerca, saranno integrati nelle sezioni comparative (Sezioni 4.1.5 e 4.1.6), in quanto hanno contribuito alla selezione di questa sostanza come co-solvente per l'ottimizzazione del protocollo CPE. Inoltre nella Sezione 4.1.5 verranno discussi anche i dati ottenuti dalle analisi condotte sulle altre soluzioni, oltre a quelle studiate in questo lavoro.

#### 4.1.1 Determinazione preliminare della Temperatura di Cloud Point mediante bagno termostato

Una volta preparate le soluzioni come descritto nella Sezione 3.1.1, è stata condotta una prima determinazione della Temperatura di Cloud Point (TCP) mediante osservazione visiva del campione riscaldato in un bagno termostato. Tale procedura ha permesso di identificare approssimativamente la temperatura alla quale si verifica il fenomeno del Cloud Point, ovvero la temperatura alla quale la soluzione micellare inizia a diventare opaca a causa della formazione di una fase separata.

Nella Tabella 4.1 sono riportati i valori di TCP, ottenuti mediante bagno termostato, delle soluzioni analizzate.

**Tabella 4.1:** Variazione della temperatura in funzione della concentrazione per diverse miscele di alcoli e NaCl.

Concentrazione	Metanolo (2m NaCl)	1-Propanolo (0m NaCl)	2-Propanolo (2m NaCl)
<b>0.005</b>	40.5°C	67°C	43°C
<b>0.01</b>	41.5°C	65.5°C	48°C
<b>0.02</b>	38.5°C	63°C	51.5°C
<b>0.03</b>	45.5°C	60°C	52°C
<b>0.04</b>	50°C	53.5°C	52°C
<b>0.05</b>	52.5°C	> 80°C	55.5°C
<b>0.08</b>	61°C	> 80°C	> 80°C

#### 4.1.2 Determinazione accurata della Cloud Point Temperature mediante DLS

Attraverso i risultati ottenuti mediante bagno termostato è stata identificata la regione di temperatura in cui si verifica il Cloud Point per ciascuna soluzione analizzata. Per ciascuna soluzione sono state eseguite due analisi mediante DLS: la prima con un incremento di temperatura di 2°C, al fine di identificare con maggiore precisione la zona di transizione; la seconda con un incremento di 0,5°C, al fine di ottenere una stima più accurata della TCP. Nelle Tabelle 4.2, 4.3 e 4.4 sono riportati i range di temperatura utilizzati per ciascuna soluzione analizzata mediante DLS.

**Tabella 4.2:** Range di temperatura utilizzati per le analisi DLS delle soluzioni contenenti 1-propanolo a diverse frazioni molari in assenza di NaCl (0 m).

(\* ) Per le soluzioni con  $x_{PrOH} \geq 0,03$ , la TCP risulta superiore al limite strumentale (80°C) e non è stato possibile determinarla.

1-Propanolo	DLS $\Delta T=2^\circ C$	DLS $\Delta T=0,5^\circ C$
<b>0.005</b>	58-76	64-73
<b>0.01</b>	56-76	61-69
<b>0.02</b>	55-71	64-70
<b>0.03</b>	*	*
<b>0.04</b>	*	*

Per il sistema 1-propanolo/0 m NaCl, mediante il bagno termostato è stato possibile osservare la comparsa di torbidità fino alla concentrazione  $x_{PrOH} = 0,04$ . Tuttavia, le analisi DLS hanno permesso di determinare con precisione la TCP solo per le soluzioni con  $x_{PrOH} \leq 0,02$ . La soluzione con  $x_{PrOH} = 0,02$  ha mostrato una TCP prossima a

75°C, ai limiti del range operativo dello strumento. Per la soluzione con  $x_{\text{PrOH}} = 0,03$  non è stato possibile identificare la transizione, poiché lo strumento non è in grado di raggiungere temperature superiori a 80°C. Lo stesso vale per le soluzioni con  $x_{\text{PrOH}} = 0,04$  e concentrazioni superiori, che non sono state pertanto incluse nei diagrammi di fase.

**Tabella 4.3:** Range di temperatura utilizzati per le analisi DLS delle soluzioni contenenti 2-propanolo a diverse frazioni molari in presenza di NaCl 2 m.

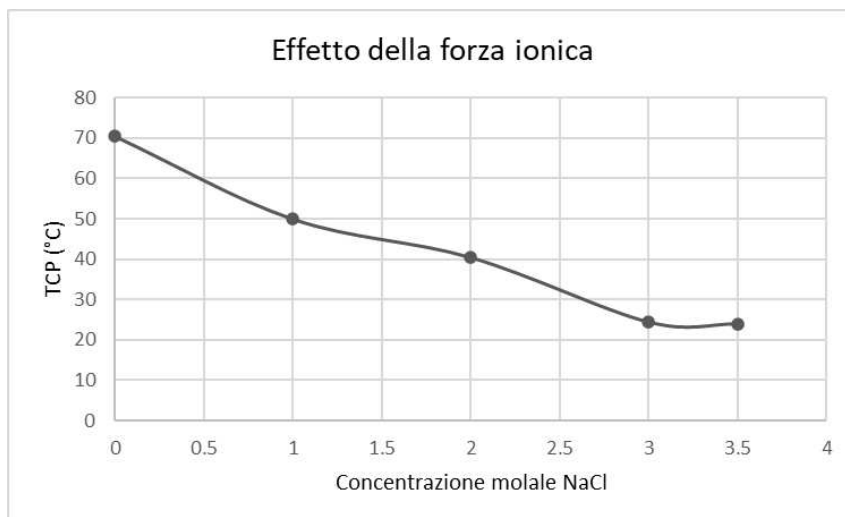
<b>2-Propanolo</b>	<b>DLS <math>\Delta T=2^\circ\text{C}</math></b>	<b>DLS <math>\Delta T=0,5^\circ\text{C}</math></b>
<b>0.005</b>	30-48	40-47
<b>0.01</b>	36-50	44-50
<b>0.02</b>	43-57	48-55
<b>0.03</b>	44-58	49-54
<b>0.04</b>	44-58	48-52
<b>0.05</b>	49-59	53-56

**Tabella 4.4:** Range di temperatura utilizzati per le analisi DLS delle soluzioni contenenti metanolo a diverse frazioni molari in presenza di NaCl 2 m.

<b>Metanolo</b>	<b>DLS <math>\Delta T=2^\circ\text{C}</math></b>	<b>DLS <math>\Delta T=0,5^\circ\text{C}</math></b>
<b>0.005</b>	35-50	45-50
<b>0.01</b>	35-50	40-47
<b>0.02</b>	25-50	36-44
<b>0.03</b>	25-50	42-49
<b>0.04</b>	30-55	48-54
<b>0.05</b>	35-60	46-53
<b>0.08</b>	45-65	48-56

#### **4.1.3 Effetto della forza ionica: influenza del NaCl sulla TCP del sistema in assenza di alcol**

Come riportato in Figura 4.1, l'aggiunta di cloruro di sodio al sistema micellare di Triton X-100 1% (p/p) determina un marcato e progressivo abbassamento della TCP. Il valore della TCP passa da 70,5°C in assenza di sale a circa 24°C per concentrazioni molali di NaCl pari a 3,5 m.



**Figura 4.1:** Andamento della temperatura di Cloud Point (TCP) del sistema TX-100 1% (p/p) in funzione della concentrazione molale di NaCl, in assenza di alcol. I valori di TCP sono stati determinati mediante DLS con incrementi di 0,5°C.

Questo andamento conferma sperimentalmente il noto effetto di salting-out indotto da ioni kosmotropici [15]. Gli ioni  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ , caratterizzati da un'elevata densità di carica, competono efficacemente con i gruppi etossilati del Triton X-100 per l'acqua di idratazione. La progressiva sottrazione di molecole d'acqua dalla corona idrofila delle micelle favorisce le interazioni attrattive inter-micellari, riducendo l'energia termica necessaria per innescare la separazione di fase. L'analisi mediante DLS ha confermato questi valori, evidenziando un brusco aumento del diametro idrodinamico (Z-average) in corrispondenza delle transizioni termiche osservate macroscopicamente.

L'abbassamento della TCP, pari a circa 20°C per il passaggio da 0 a 1 m e di ulteriori 10°C per il passaggio da 1 a 2 m, evidenzia inoltre una lieve non linearità dell'effetto di salting-out, coerente con la progressiva saturazione dell'interazione ione-solvente ad alte concentrazioni saline.

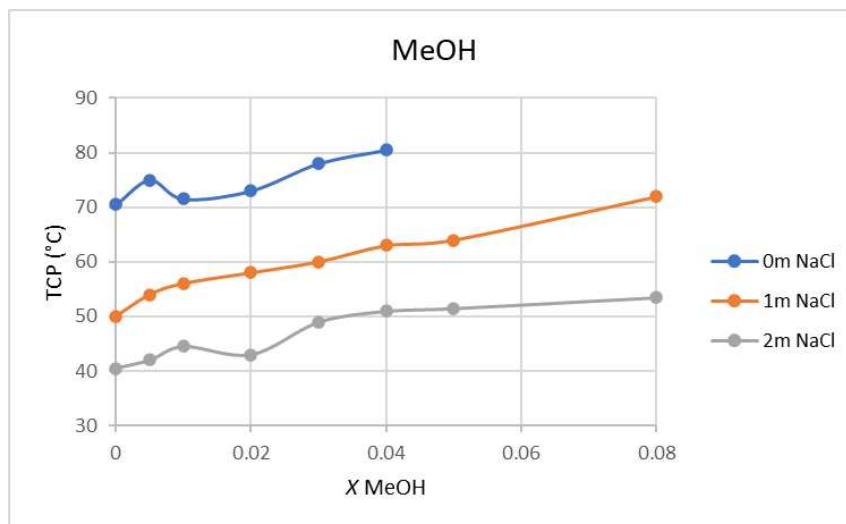
#### 4.1.4 Analisi dell'effetto degli alcoli sul comportamento di fase del sistema

**Effetto del metanolo.** L'indagine sull'effetto del metanolo ha rivelato un comportamento marcatamente differente rispetto a quello osservato per gli alcoli a catena più lunga. Come si evince dalla Figura 4.2, l'aggiunta di metanolo determina una tendenza generale all'innalzamento della TCP per tutte le concentrazioni saline investigate (0 m, 1 m e 2 m NaCl).

Nel sistema privo di sale (0 m NaCl), l'aggiunta di metanolo causa un incremento della TCP tale da superare rapidamente il limite operativo del setup sperimentale (fissato a 80°C). Per tale motivo, non è stato possibile registrare la separazione di fase per frazioni

molari superiori a 0,04. Un andamento crescente e approssimativamente lineare si osserva in modo ancora più netto per il sistema a 1 m NaCl, dove la TCP passa da 50,0°C a 72,0°C nell'intervallo di concentrazioni esplorato. Nel sistema a 2 m NaCl, il trend complessivo si conferma in salita, raggiungendo i 53,5°C per  $x = 0,05$ . Il valore a  $x = 0,02$  risulta inferiore rispetto a quelli adiacenti, per questo viene considerato un outlier.

Questo comportamento è strettamente correlato alla natura spiccatamente idrofila del metanolo (alcol  $C_1$ ). La sua elevata polarità fa sì che esso si ripartisca quasi esclusivamente all'interno della fase acquosa (bulk), agendo unicamente come co-solvente. La presenza del metanolo altera la costante dielettrica del solvente, favorendo termodinamicamente la solvatazione delle catene polietossilate del Triton X-100; di conseguenza, è richiesta una maggiore energia termica per indurre la disidratazione e la successiva coalescenza delle micelle [13].



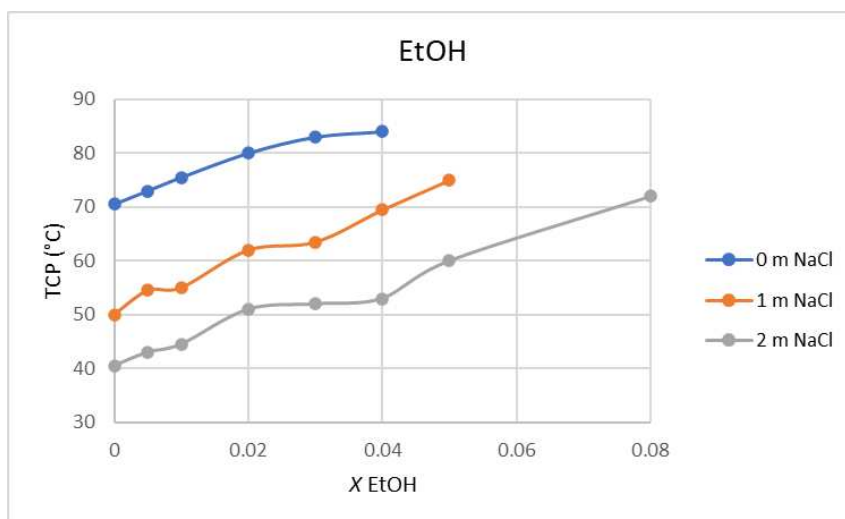
**Figura 4.2:** Andamento della TCP del sistema TX-100 1% (p/p) in funzione della frazione molare di metanolo ( $x_{MeOH}$ ) a tre diverse concentrazioni molali di NaCl (0 m, 1 m e 2 m). I valori di TCP sono stati determinati mediante DLS.

**Effetto dell'etanolo.** I dati relativi all'etanolo, acquisiti nel corso di un'indagine precedente condotta nel medesimo gruppo di ricerca, sono qui riportati a fini comparativi.

L'etanolo, alcol alifatico a due atomi di carbonio ( $C_2$ ), presenta un comportamento termodinamico che si pone come anello di congiunzione tra le dinamiche osservate per il metanolo e i propanoli. Come illustrato in Figura 4.3, l'aggiunta di etanolo determina un innalzamento generale della TCP a tutte le concentrazioni saline indagate.

In assenza di cloruro di sodio (0 m NaCl), l'incremento della TCP risulta continuo e marcato, passando da 70,5°C a 84,0°C per una frazione molare pari a 0,04. Nei sistemi ad elevata forza ionica (1 m e 2 m NaCl), la curva assume un profilo caratterizzato da incrementi seguiti da temporanei plateau. Ad esempio, nella curva a 2 m NaCl, si osserva una

stabilizzazione della TCP intorno ai 51–53°C nell'intervallo di frazione molare compreso tra 0,02 e 0,04, seguita da una nuova ascesa fino a 72,0°C a frazioni molari superiori. Questo andamento riflette la natura anfipatica intermedia dell'etanolo: la componente idrofila del gruppo ossidrilico prevale sulla ridotta lipofilia della catena etilica, facendo sì che l'etanolo si ripartisca prevalentemente nella fase acquosa bulk, dove esplica il suo ruolo di co-solvente stabilizzando l'idratazione delle micelle e innalzando la temperatura necessaria per la transizione di fase [13, 14].

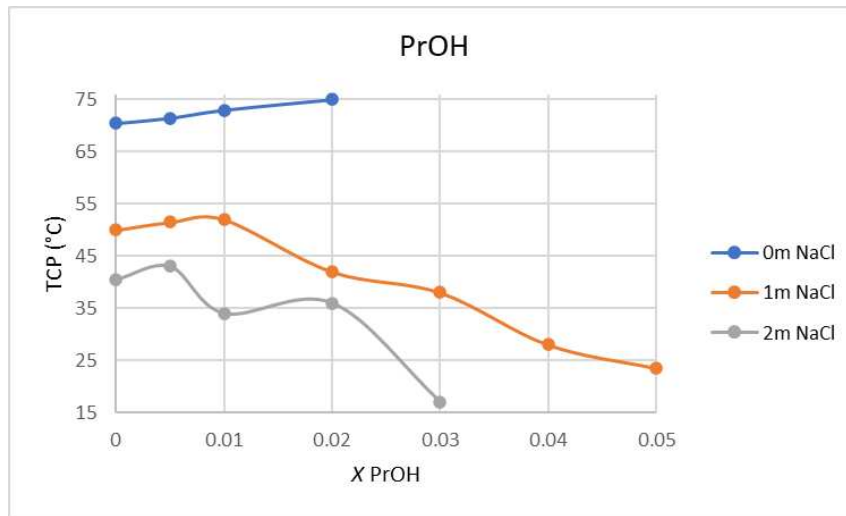


**Figura 4.3:** Andamento della TCP del sistema TX-100 1% (p/p) in funzione della frazione molare di etanolo ( $x_{\text{EtOH}}$ ) a tre diverse concentrazioni molali di NaCl (0 m, 1 m e 2 m). I valori di TCP sono stati determinati mediante DLS.

**Effetto del 1-propanolo.** L'indagine sull'effetto del 1-propanolo ha rivelato un comportamento termodinamico complesso, strettamente dipendente dalla forza ionica del sistema. I risultati, riassunti nel diagramma di fase in Figura 4.4, mostrano due tendenze contrapposte. In assenza di sale (curva a 0 m NaCl), l'aggiunta di 1-propanolo induce un innalzamento della TCP.

Il comportamento del sistema subisce una drastica inversione in presenza di elevate concentrazioni saline (curve a 1 m e 2 m NaCl). A basse frazioni molari di alcol si osserva un modesto e transitorio innalzamento della TCP, superato il quale la temperatura di intorbidimento subisce un marcato abbassamento non lineare (scendendo, nel caso del sistema a 1 m NaCl, da circa 52°C a 23,5°C). Tale fenomeno è imputabile a un effetto di salting-out spiegato dal NaCl non solo sul tensioattivo, ma anche sulle molecole di 1-propanolo. L'alta forza ionica rende la fase acquosa termodinamicamente sfavorevole per l'alcol, forzandone la ripartizione all'interno dell'aggregato micellare (all'interfaccia o nel nucleo idrofobico). In questa configurazione, l'1-propanolo muta il suo ruolo da co-solvente a co-tensioattivo: intercalandosi tra le molecole di Triton X-100, ne altera

l'impacchettamento e incrementa l'idrofobicità complessiva dell'aggregato, innescando una coalescenza prematura delle micelle e abbassando significativamente la TCP [14].



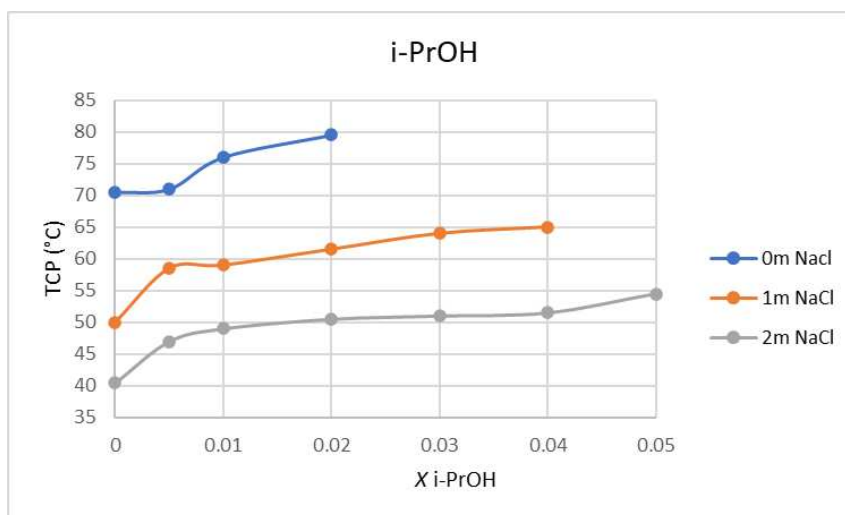
**Figura 4.4:** Andamento della TCP del sistema TX-100 1% (p/p) in funzione della frazione molare di 1-propanolo ( $x_{\text{PrOH}}$ ) a tre diverse concentrazioni molali di NaCl (0 m, 1 m e 2 m). I valori di TCP sono stati determinati mediante DLS.

Si osserva, inoltre, come l'andamento delle temperature di transizione TCP ottenute mediante termostato differisca da quello rilevato tramite DLS per le soluzioni a 0 m di NaCl. Nel primo caso, si riscontra un *trend decrescente* che non giustifica, tuttavia, gli elevati valori di TCP misurati per le concentrazioni 0.05 e 0.08; al contrario, i dati DLS mostrano un *trend crescente*. Tale discrepanza può essere attribuita alle criticità emerse durante la fase di preparazione e di analisi di questi specifici campioni. Per risolvere tale ambiguità, sarebbe opportuno effettuare delle repliche delle soluzioni di PrOH a diverse concentrazioni in assenza di sale (0m NaCl), così da caratterizzare il sistema in modo più approfondito. Tali indagini esulano, tuttavia, dagli obiettivi del presente lavoro.

**Effetto del 2-propanolo.** L'indagine è stata estesa al 2-propanolo (isopropanolo), isomero ramificato dell'1-propanolo, al fine di valutare l'impatto dell'architettura molecolare del co-solvente sulla stabilità micellare. Come illustrato in Figura 4.5, l'aggiunta di 2-propanolo determina un netto innalzamento della TCP in tutte le condizioni di forza ionica studiate. Nel sistema privo di sale (0 m NaCl), si osserva un incremento significativo della temperatura di intorbidimento: già a una frazione molare di 0,02 la TCP raggiunge i 79,5°C, prossima al limite strumentale (80°C), precludendo la raccolta di dati a concentrazioni superiori.

Nei sistemi addizionati con cloruro di sodio (1 m e 2 m NaCl), si osserva un innalzamento iniziale rapido a bassissime concentrazioni di alcol (fino a  $x = 0,005$ ), seguito

da un progressivo appiattimento della curva verso una crescita più lenta. Ad esempio, nel sistema a 2 m NaCl la TCP passa da 40,5°C a 47,0°C con la prima aggiunta, per poi assestarsi a 54,5°C alla frazione molare di 0,05. Questo andamento suggerisce che il 2-propanolo agisca prevalentemente come co-solvente nella fase acquosa bulk: le prime aggiunte alterano significativamente le proprietà del solvente, stabilizzando l'idratazione delle micelle, mentre ulteriori incrementi di concentrazione producono effetti marginali sulla termodinamica della separazione di fase.



**Figura 4.5:** Andamento della TCP del sistema TX-100 1% (p/p) in funzione della frazione molare di 2-propanolo ( $x_{i-PrOH}$ ) a tre diverse concentrazioni molali di NaCl (0 m, 1 m e 2 m). I valori di TCP sono stati determinati mediante DLS.

#### 4.1.5 Analisi comparativa dei diagrammi di fase ottenuti

L'indagine sistematica condotta sui quattro alcoli a catena corta (metanolo, etanolo, 1-propanolo e 2-propanolo), a tre diverse concentrazioni di NaCl (0, 1 e 2 m), consente di tracciare un quadro coerente dell'effetto degli additivi sul comportamento di fase del sistema acqua/TX-100 1% (p/p).

**Effetto del NaCl: il salting-out come fattore dominante.** In assenza di alcol, la TCP diminuisce in modo consistente all'aumentare della concentrazione di NaCl, passando da 70,5 °C (0 m) a 50,0 °C (1 m) e a 40,5 °C (2 m) (Figura 4.1). Questi valori, riproducibili attraverso tutti i set sperimentali, confermano quantitativamente l'effetto di salting-out: gli ioni  $Na^+$  e  $Cl^-$ , fortemente idratati, sottraggono molecole d'acqua alla sfera di idratazione delle catene polietossilate del tensioattivo, inducendone una disidratazione prematura.

**Classificazione degli alcoli: co-solventi vs co-tensioattivi.** L'analisi dei profili TCP vs  $x_{ROH}$  rivela una chiara dicotomia comportamentale.

- *Alcoli a comportamento co-solvente (metanolo, etanolo, 2-propanolo)*: questi tre alcoli determinano, in tutte le condizioni di forza ionica, un innalzamento monotono della TCP, confermando la loro distribuzione prevalente nella fase acquosa bulk, dove rafforzano la solvatazione delle catene PEG del tensioattivo. L'entità dell'innalzamento segue l'ordine: etanolo > metanolo  $\approx$  2-propanolo. L'etanolo si rivela il co-solvente più efficace, con innalzamenti fino a +31,5 °C (NaCl 2 m,  $x = 0,08$ ), capace di compensare interamente l'effetto di salting-out. Metanolo e 2-propanolo mostrano effetti più moderati, con tendenza al plateau alle frazioni molari più elevate (Figure 4.2, 4.3, 4.5).
- *Alcol a comportamento misto (1-propanolo)*: il 1-propanolo è l'unico a esibire un comportamento bifasico. A basse frazioni molari innalza lievemente la TCP, ma al di sopra di una concentrazione critica (dipendente dalla forza ionica) si osserva un'inversione seguita da un marcato abbassamento. Tale concentrazione critica si sposta verso frazioni molari più basse all'aumentare del NaCl ( $x \approx 0,02$  a 1 m,  $x < 0,01$  a 2 m), a riprova della sinergia tra salting-out e penetrazione intramicellare. Nelle condizioni più estreme (NaCl 2 m,  $x = 0,03$ ), la TCP scende sotto 20 °C, rendendo possibile la separazione di fase a temperatura ambiente (Figura 4.4).

**Il ruolo della topologia molecolare: 1-propanolo vs 2-propanolo.** Il confronto tra i due isomeri  $C_3H_8O$  rappresenta il risultato di maggiore rilevanza. Nonostante abbiano la stessa formula bruta, essi esibiscono comportamenti opposti: il 1-propanolo lineare induce l'abbassamento della TCP, mentre il 2-propanolo ramificato provoca esclusivamente un innalzamento monotono. Il parametro determinante è la topologia molecolare: la linearità della catena alchilica consente un'efficace intercalazione nel core micellare del TX-100 (effetto co-tensioattivo), mentre la ramificazione dell'isopropanolo genera un ingombro sterico che ne impedisce la penetrazione, confinandolo nella fase bulk.

**Effetto della forza ionica sulle curve alcol/TCP.** Per tutti gli alcoli, l'aumento di NaCl produce: uno spostamento verso il basso dell'intera curva TCP vs  $x_{ROH}$  e una modulazione della pendenza. Per gli alcoli co-solventi, l'efficacia relativa dell'innalzamento tende ad aumentare a forze ioniche intermedie per poi attenuarsi, con l'eccezione dell'etanolo che mantiene un effetto crescente anche a 2 m. Per il 1-propanolo, l'aumento della forza ionica anticipa e amplifica l'inversione, confermando la sinergia tra salting-out e co-tensioattività.

La Tabella 4.5 indica in maniera riassuntiva le Temperature di Cloud Point di tutte le soluzioni analizzate, sia in questo lavoro sia in quelli precedenti.

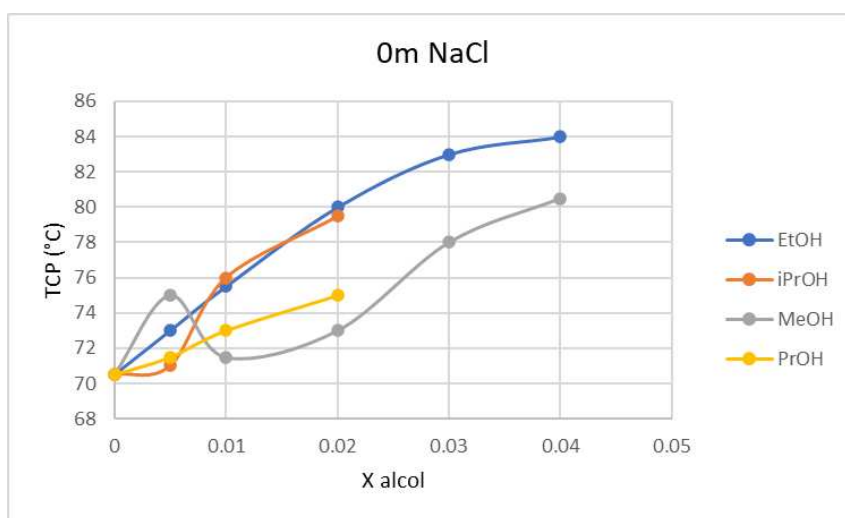
**Tabella 4.5:** Valori di TCP determinati via DLS in funzione della frazione molare dell'alcol ( $x_{ROH}$ ) e della molalità di NaCl.

Alcol	$x_{ROH}$	TCP (°C) da DLS		
		0 m NaCl	1 m NaCl	2 m NaCl
MeOH	0	70.5	50.0	40.5
	0.005	75.0	54.0	42.0
	0.01	71.5	56.0	44.5
	0.02	73.0	58.0	43.0
	0.03	78.0	60.0	49.0
	0.04	80.5	63.0	51.0
	0.05	—	64.0	51.5
	0.08	—	72.0	53.5
EtOH	0	70.5	50.0	40.5
	0.005	73.0	54.5	43.0
	0.01	75.5	55.0	44.5
	0.02	80.0	62.0	51.0
	0.03	83.0	63.5	52.0
	0.04	84.0	69.5	53.0
	0.05	—	75.0	60.0
	0.08	—	—	72.0
PrOH	0	70.5	50.0	40.5
	0.005	71.5	51.5	43.0
	0.01	73.0	52.0	34.0
	0.02	75.0	42.0	36.0
	0.03	—	38.0	17.0
	0.04	—	28.0	—
	0.05	—	23.5	—
i-PrOH	0	70.5	50.0	40.5
	0.005	71.0	58.5	47.0
	0.01	76.0	59.0	49.0
	0.02	79.5	61.5	50.5
	0.03	—	64.0	51.0
	0.04	—	65.0	51.5
0.05	—	—	54.5	

#### 4.1.6 Analisi comparativa dell'effetto degli alcoli sulla TCP a concentrazione salina costante

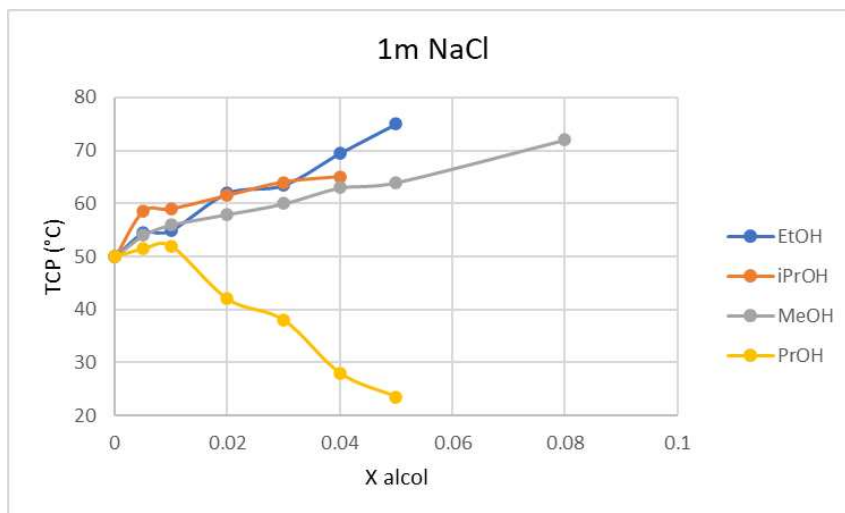
I valori di TCP sono stati rappresentati in funzione di  $x_{\text{alcol}}$  a concentrazione di NaCl costante, generando tre diagrammi comparativi (Figure 4.6, 4.7 e 4.8).

**Sistema a 0 m NaCl (Figura 4.6).** In assenza di sale, tutti gli alcoli innalzano la TCP rispetto al valore di riferimento ( $70,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). A basse frazioni molari ( $x < 0,01$ ) le curve sono sovrapposte; all'aumentare della concentrazione, l'etanolo produce l'innalzamento più marcato ( $T_{CP} \approx 84\text{ }^{\circ}\text{C}$  per  $x \approx 0,04$ ), seguito da isopropanolo e metanolo con andamenti intermedi. Il 1-propanolo mostra un innalzamento progressivamente meno pronunciato, riflettendo l'incipiente contributo da co-tensioattivo.



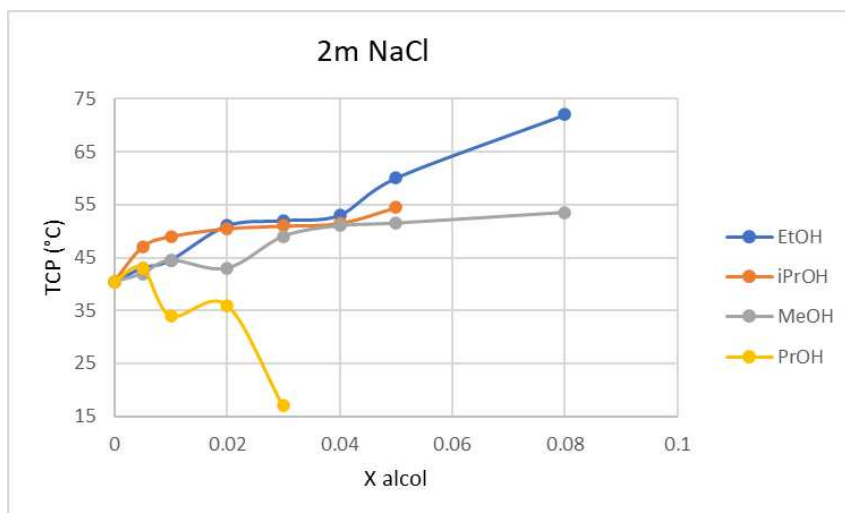
**Figura 4.6:** Confronto dell'effetto dei quattro alcoli (EtOH, iPrOH, MeOH, PrOH) sulla TCP del sistema TX-100 1% (p/p) in funzione della frazione molare dell'alcol, in assenza di NaCl (0 m). I valori di TCP sono stati determinati mediante DLS.

**Sistema a 1 m NaCl (Figura 4.7).** Il salting-out abbassa il valore di partenza a circa  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Etanolo, isopropanolo e metanolo continuano a innalzare la TCP, con l'etanolo più efficace ( $\approx 75\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $x \approx 0,05$ ). Il 1-propanolo, dopo un modesto innalzamento iniziale ( $\approx 52\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $x \approx 0,01$ ), inverte nettamente la tendenza, scendendo sotto  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  per  $x \approx 0,05$ , a conferma della penetrazione intramicellare.



**Figura 4.7:** Confronto dell'effetto dei quattro alcoli (EtOH, iPrOH, MeOH, PrOH) sulla TCP del sistema TX-100 1% (p/p) in funzione della frazione molare dell'alcol, in presenza di NaCl 1 m. I valori di TCP sono stati determinati mediante DLS.

**Sistema a 2 m NaCl (Figura 4.8).** Con TCP basale intorno a 40 °C, l'etanolo mantiene la capacità di innalzamento significativo ( $\approx 70$  °C per  $x \approx 0,08$ ), mentre metanolo e isopropanolo confermano andamenti crescenti. Il 1-propanolo abbassa la TCP sotto 20 °C già a  $x \approx 0,03$ .



**Figura 4.8:** Confronto dell'effetto dei quattro alcoli (EtOH, iPrOH, MeOH, PrOH) sulla TCP del sistema TX-100 1% (p/p) in funzione della frazione molare dell'alcol, in presenza di NaCl 2 m. I valori di TCP sono stati determinati mediante DLS.

**Sintesi.** L'etanolo si configura come l'additivo più efficace nell'innalzare la TCP in tutte le condizioni saline, comportandosi da co-solvente puro. Il metanolo segue una logica analoga. L'isopropanolo presenta un comportamento intermedio. Il 1-propanolo,

in virtù della catena alchilica lineare e della minore solubilità acquosa, si ripartisce nella fase micellare agendo da co-tensioattivo, con progressivo abbassamento della TCP particolarmente evidente in presenza di NaCl. Questa dicotomia, coerente con la letteratura [13, 14], ha orientato la selezione dell'etanolo come co-solvente ottimale per il protocollo CPE.

#### 4.1.7 Implicazioni dei risultati di fase per lo sviluppo del protocollo CPE

I diagrammi di fase forniscono le basi termodinamiche per la progettazione razionale del protocollo CPE. La selezione delle condizioni operative si è fondata su tre requisiti:

1. ottenere una  $T_{CP} \leq 35$  °C, compatibile con l'operatività e con la preservazione dell'integrità della curcumina;
2. minimizzare la concentrazione di additivi, in accordo con i principi della Green Analytical Chemistry;
3. garantire una separazione di fase netta e riproducibile.

**Scelta dell'agente di salting-out.** Il NaCl si conferma efficace nell'abbassare la TCP di circa 30 °C passando da 0 a 2 m. Tuttavia, a 2 m la TCP (40,5 °C) rimane superiore al limite operativo di 35 °C, rendendo necessarie concentrazioni saline più elevate (3 – 4,5 m), come verificato nella Sezione 3.3.4. I diagrammi a 1 e 2 m hanno comunque rappresentato un riferimento per l'estrapolazione del trend a concentrazioni superiori.

**Selezione dell'alcol per il protocollo CPE.** L'analisi comparativa ha orientato la scelta dell'etanolo come co-solvente operativo, motivata da:

- *Compatibilità con il comportamento di fase.* L'etanolo innalza la TCP in modo prevedibile e controllato, senza indurre inversioni. Nelle condizioni operative (NaCl 3 m), l'aggiunta di 100  $\mu$ L di soluzione madre etanolica a 100 mL di soluzione TX-100/NaCl produce una frazione molare trascurabile, con effetto sulla TCP contenuto entro 1–2 °C.
- *Capacità solubilizzante.* L'etanolo garantisce la completa dissoluzione della curcumina in miscela etanolo/acqua 60:40 (v/v), fornendo una matrice idonea per la preparazione degli standard e la ridispersione della fase estrattiva (Sezione 3.3.1).
- *Compatibilità normativa.* L'etanolo è classificato GRAS dalla FDA, a differenza del metanolo la cui tossicità ne limiterebbe l'impiego in contesti applicativi reali.
- *Inadeguatezza degli altri alcoli.* Il 1-propanolo introduce complessità termodinamica indesiderabile (inversione della TCP) e minore compatibilità con matrici

alimentari. Il 2-propanolo ha mostrato un effetto innalzante inferiore e minore capacità solubilizzante verso la curcumina.

## 4.2 Caratterizzazione chimico-fisica delle polveri di partenza

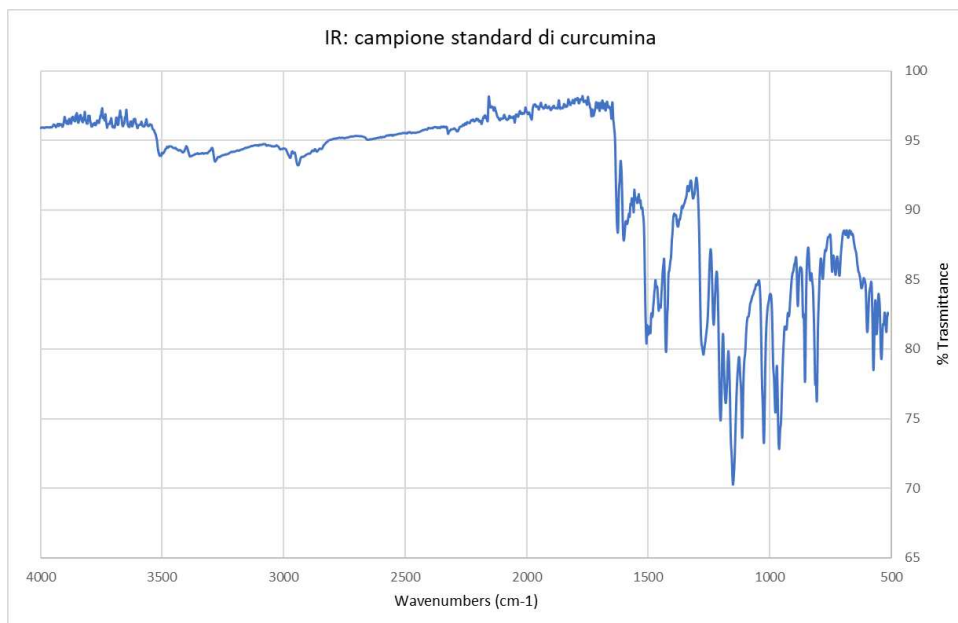
Il presente paragrafo è dedicato alla discussione dei risultati ottenuti dalla caratterizzazione chimico-fisica delle matrici solide impiegate nel presente lavoro di tesi. Prima di procedere con l'ottimizzazione e l'applicazione del protocollo di *Cloud Point Extraction* (CPE), è risultato infatti imprescindibile verificare l'identità, il grado di purezza, il profilo termico e l'organizzazione allo stato solido dei materiali di partenza. Questa progressione analitica ha un duplice scopo: da un lato, confermare l'effettiva composizione dei campioni in esame; dall'altro, fornire le basi chimico-fisiche necessarie per comprendere e anticipare le possibili interazioni e interferenze di matrice che influenzeranno le dinamiche di ripartizione micellare e la successiva quantificazione spettrofotometrica discusse nella Sezione 4.3 .

### 4.2.1 Standard di curcumina

**Analisi IR dello standard di curcumina.** Lo spettro ottenuto risulta coerente con la struttura della curcumina, evidenziando i gruppi funzionali caratteristici della molecola. Nella regione ad alto numero d'onda si osserva un assorbimento largo e strutturato tra circa  $3500\text{ cm}^{-1}$  e  $3280\text{ cm}^{-1}$ , attribuibile allo stiramento O–H dei gruppi fenolici e del tautomero enolico del sistema  $\beta$ -dichetonico; l'ampiezza della banda riflette la presenza di legami a idrogeno intra- e intermolecolari. Il debole segnale a  $2941\text{ cm}^{-1}$  è riconducibile allo stiramento C–H dei gruppi metossilici ( $-\text{OCH}_3$ ). Le bande intense a  $1626\text{ cm}^{-1}$  e  $1601\text{ cm}^{-1}$  sono associate rispettivamente allo stiramento del carbonile coniugato C=O e allo stiramento C=C del sistema enonico. I segnali compresi tra circa  $1560\text{ cm}^{-1}$  e  $1501\text{ cm}^{-1}$  sono invece associati alle vibrazioni dei doppi legami C=C coniugati e dello scheletro aromatico.

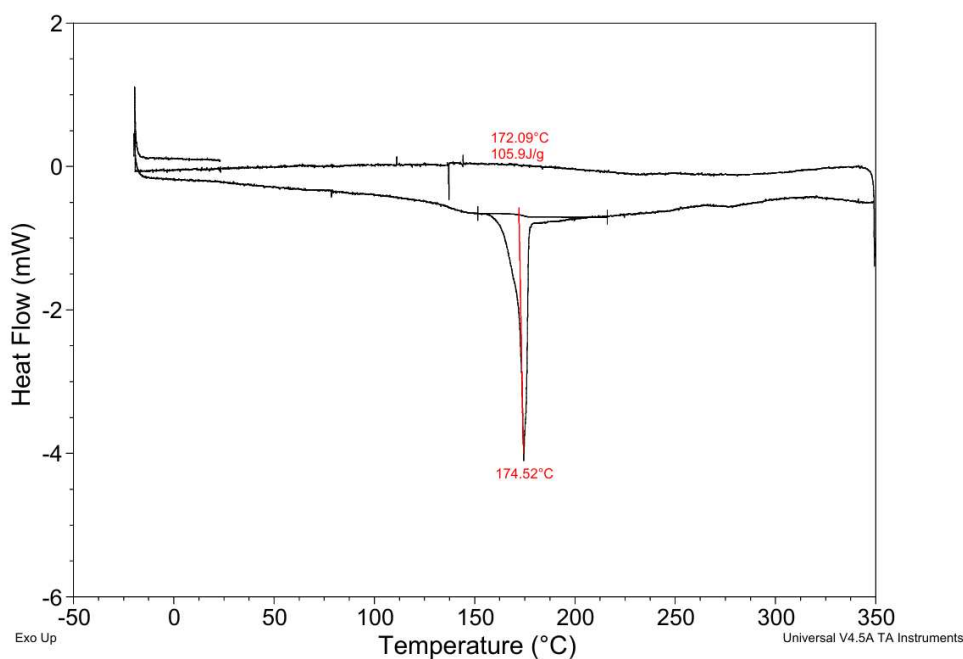
Nella regione fingerprint, le bande intense tra  $1274\text{ cm}^{-1}$  e  $1025\text{ cm}^{-1}$  sono attribuibili agli stiramenti C–O dei gruppi fenolici e metossilici e alle vibrazioni C–O–C, mentre gli assorbimenti al di sotto di  $960\text{ cm}^{-1}$  sono compatibili con le deformazioni fuori dal piano dei legami =C–H olefinici e C–H aromatici.

Nel complesso, il profilo spettrale acquisito risulta pienamente coerente con la struttura molecolare della curcumina, confermandone l'identità e suggerendo l'assenza di evidenti impurità strutturalmente differenti [31].



**Figura 4.9:** Spettro IR del campione standard di curcumina.

**Analisi DSC dello standard di curcumina** Il termogramma ottenuto (Figura 4.10) mostra un unico evento termico endotermico acuto e ben definito nella regione compresa tra circa 150 °C e 185 °C, attribuibile alla fusione della curcumina in forma cristallina. Il picco endotermico presenta una temperatura di onset pari a 172.09 °C e un massimo (temperatura di picco) a 174.52 °C, con un'entalpia di fusione di 105.9 J/g. Tali valori confermano l'identità del composto analizzato.



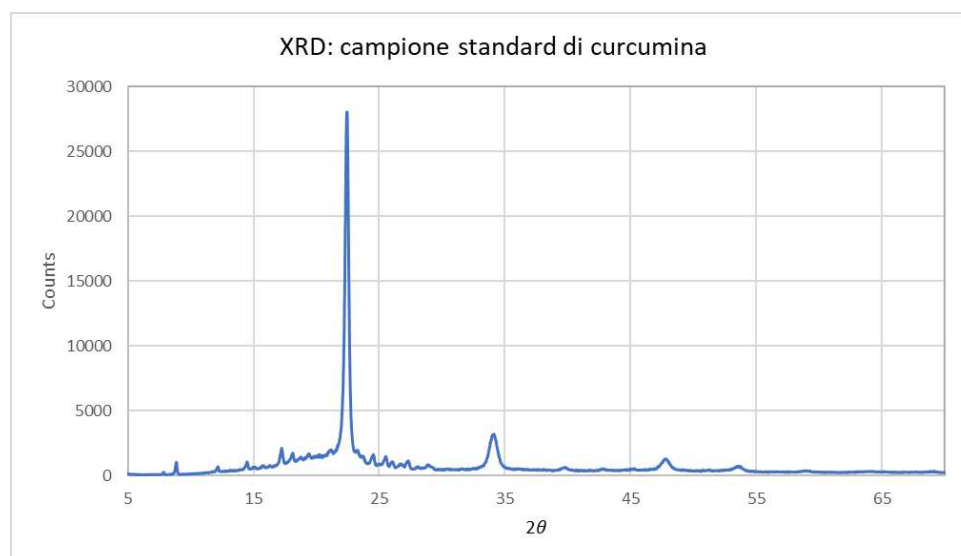
**Figura 4.10:** Termogramma DSC del campione standard di curcumina.

La presenza di un singolo picco endotermico intenso e relativamente stretto è coerente con il comportamento termico atteso per la curcumina cristallina ed è indicativa di una buona purezza del campione analizzato. L'assenza di ulteriori transizioni termiche significative nel range esplorato suggerisce inoltre che non siano presenti quantità rilevanti di fasi cristalline secondarie, solventi residui o impurità termicamente distinguibili [31].

Nel complesso, il profilo DSC risulta quindi compatibile con quello atteso per lo standard di curcumina, confermandone l'identità e il buon grado di purezza.

**Analisi diffrattometrica a raggi X dello standard di curcumina.** Il diffrattogramma a raggi X acquisito per la polvere di curcumina standard (Figura 4.11) conferma inequivocabilmente la natura altamente cristallina del campione, in perfetto accordo con quanto precedentemente osservato nell'analisi DSC, la quale mostrava un singolo e netto picco endotermico di fusione tipico di una struttura solida ben ordinata.

Il diffrattogramma è caratterizzato da un bump amorfo tra  $9^\circ$  e  $30^\circ$  su cui si innesta un riflesso di intensità elevata (quasi 30.000 counts) centrato a circa  $2\theta = 22^\circ$ , seguito da una zona caratterizzata da una linea di base piatta e stabile, con pochi picchi di diffrazione stretti, intensi e ben definiti. La presenza di un picco così prominente rispetto agli altri segnali suggerisce non solo un elevato grado di cristallinità, ma evidenzia la probabile presenza di un fenomeno di orientazione preferenziale dei cristalliti all'interno del portacampione, o un'elevata simmetria di specifici piani reticolari caratteristici del polimorfo in esame. Oltre al picco principale, sono chiaramente distinguibili ulteriori riflessi minori ma definiti a circa  $34^\circ$  e  $48^\circ$  ( $2\theta$ ), accompagnati da un pattern di segnali a bassa intensità nella regione angolare compresa tra  $15^\circ$  e  $20^\circ$ .



**Figura 4.11:** Diffrattogramma a raggi X (XRD) del campione standard di curcumina.

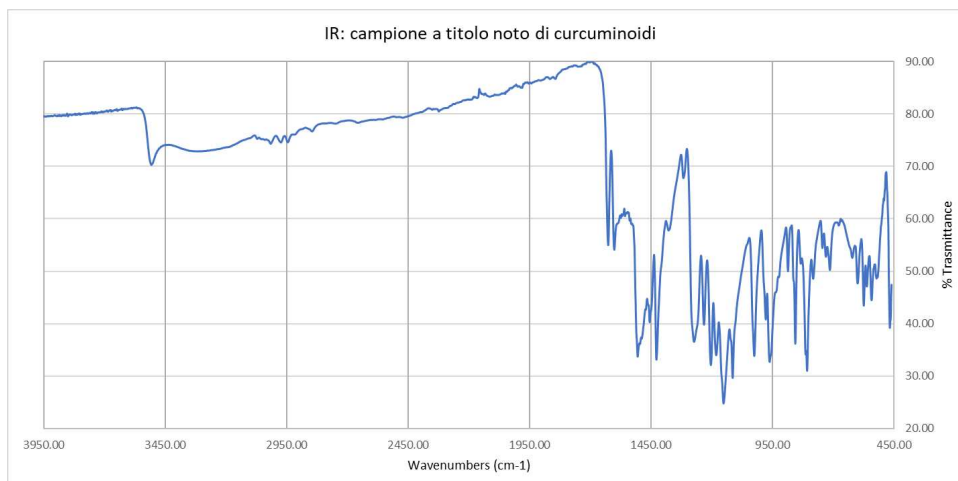
Nel complesso, la nitidezza dei picchi e l'assenza di rumore di fondo confermano l'elevata purezza e l'ordine strutturale a lungo raggio dello standard di curcumina allo stato solido. Tali caratteristiche chimico-fisiche confermano l'idoneità del campione per essere utilizzato come riferimento assoluto (standard) nelle successive fasi di calibrazione spettrofotometrica e di ottimizzazione del protocollo di CPE [31].

#### 4.2.2 Campione a titolo noto di curcuminoidi

**Analisi IR del campione a titolo noto di curcuminoidi.** Lo spettro IR ottenuto per il campione a titolo noto presenta un profilo complessivamente riconducibile alla famiglia dei curcuminoidi. Poiché curcumina, demetossicurcumina e bisdemetossicurcumina condividono lo stesso scheletro dienonico  $\alpha,\beta$ -insaturo e differiscono esclusivamente per il numero di sostituenti metossilici ( $-\text{OCH}_3$ ) sugli anelli aromatici, le bande principali risultano largamente sovrapponibili; le differenze attese riguardano principalmente l'intensità relativa delle vibrazioni associate ai gruppi C–O–C e C–H metossilici.

Nella regione ad alto numero d'onda si osserva un assorbimento largo centrato a circa  $3507\text{ cm}^{-1}$ , attribuibile allo stiramento O–H dei gruppi fenolici, presenti in tutti e tre i curcuminoidi, e del tautomero enolico del sistema  $\beta$ -dichetonico; l'ampiezza della banda riflette la presenza di legami a idrogeno intra- e intermolecolari. Il segnale a  $3016\text{ cm}^{-1}$  è riconducibile allo stiramento C–H aromatico e olefinico, comune all'intera classe dei curcuminoidi. Le bande intense a  $1626\text{ cm}^{-1}$  e  $1601\text{ cm}^{-1}$  sono associate rispettivamente allo stiramento del carbonile coniugato C=O e allo stiramento C=C del sistema enonico, gruppi funzionali condivisi da tutti i curcuminoidi. I segnali presenti a  $1505\text{ cm}^{-1}$  e  $1455\text{ cm}^{-1}$  risultano anch'essi compatibili con le vibrazioni dello scheletro aromatico e dei doppi legami coniugati.

Nella regione fingerprint, le bande comprese tra  $1272\text{ cm}^{-1}$  e  $1024\text{ cm}^{-1}$  sono attribuibili agli stiramenti C–O dei gruppi fenolici e metossilici e alle vibrazioni C–O–C. In questa regione è ragionevole attendersi un contributo variabile in funzione della composizione relativa dei tre curcuminoidi: la bisdemetossicurcumina, priva di gruppi metossilici, contribuisce in misura minore alle vibrazioni C–O–C e C–H metossiliche rispetto alla curcumina e alla demetossicurcumina. Ciò può spiegare le lievi differenze di intensità relativa osservate in questa regione rispetto allo spettro dello standard di curcumina pura. Gli assorbimenti osservati al di sotto di  $960\text{ cm}^{-1}$  sono compatibili con le deformazioni fuori dal piano dei legami =C–H olefinici e C–H aromatici, nonché con le vibrazioni di deformazione dell'anello aromatico, comuni a tutti i curcuminoidi.



**Figura 4.12:** Spettro IR del campione a titolo noto di curcuminoidi.

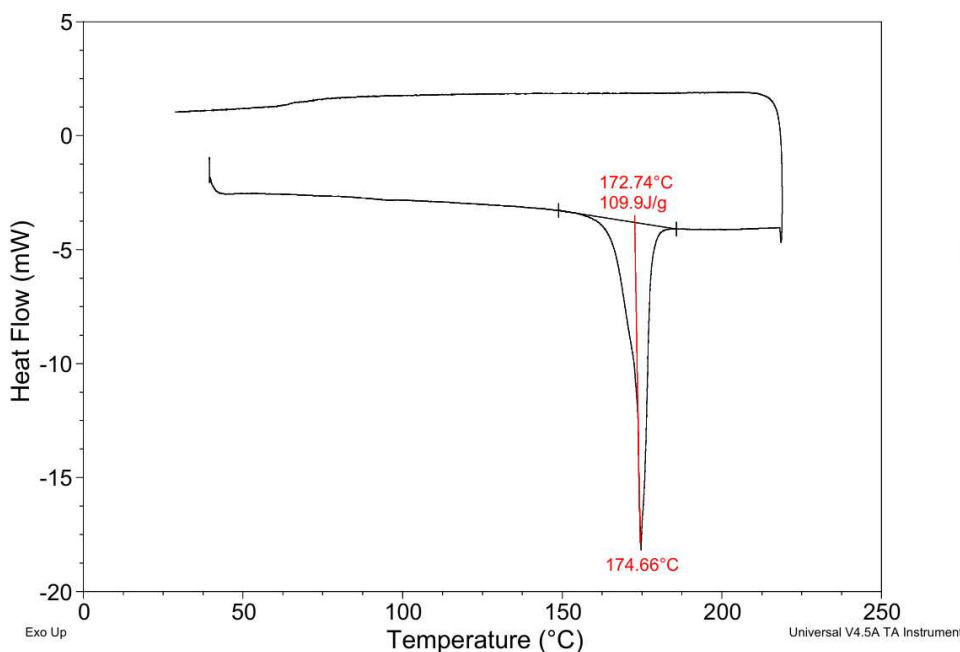
Nel complesso, il profilo spettrale è pienamente compatibile con un campione costituito da curcuminoidi e conferma la presenza delle funzionalità chimiche attese per questa classe di composti. Le differenze riscontrate nelle intensità relative di alcune bande, in particolare nella regione degli stiramenti C–O e C–O–C, sono coerenti con la presenza contemporanea di curcumina, demetossicurcumina e bisdemetossicurcumina in proporzioni variabili, oltre che con possibili contributi della matrice.

**Analisi DSC del campione a titolo noto di curcuminoidi.** Il campione analizzato presenta un singolo evento endotermico intenso e ben definito nella regione compresa approssimativamente tra 160 °C e 185 °C, attribuibile principalmente alla fusione della frazione cristallina dei curcuminoidi. In particolare, il termogramma evidenzia una temperatura di onset pari a 172.74 °C e una temperatura di picco pari a 174.66 °C, con un'entalpia associata di 109.9 J/g. Il profilo ottenuto risulta molto simile a quello osservato per lo standard di curcumina, suggerendo che il comportamento termico del campione sia dominato dalla presenza della curcumina stessa, verosimilmente componente maggioritaria della miscela.

È significativo osservare che il termogramma mostra un singolo picco endotermico stretto e simmetrico, senza evidenza di spalle, sdoppiamenti o eventi termici aggiuntivi a temperature inferiori. Poiché la demetossicurcumina e la bisdemetossicurcumina pure presentano punti di fusione attorno a 168–172 °C e 222–224 °C, l'assenza di transizioni termiche distinte riconducibili a tali componenti suggerisce che essi siano presenti in quantità minoritarie e probabilmente incorporati nella fase cristallina della curcumina, formando soluzioni solide o co-cristallizzando con il componente principale, senza dare origine a eventi di fusione separati e termicamente distinguibili.

Dopo l'evento di fusione, il ritorno del segnale verso una nuova linea di base non evidenzia

ulteriori transizioni significative nel range esplorato, confermando la sostanziale semplicità del comportamento termico del campione nelle condizioni sperimentali adottate. Infatti l'assenza di ulteriori eventi termici significativi nel range di temperatura analizzato suggerisce inoltre la mancanza di quantità apprezzabili di solventi residui, acqua adsorbita o impurità termicamente distinguibili.



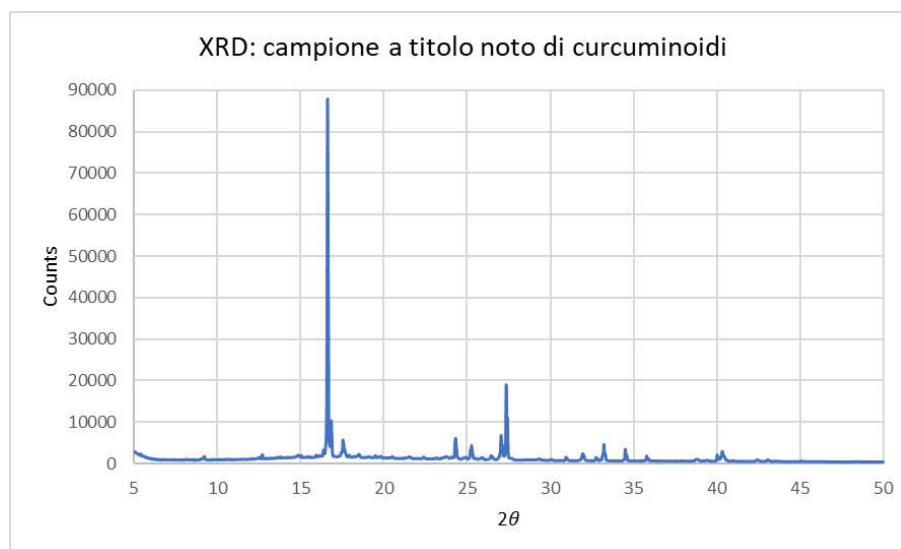
**Figura 4.13:** Termogramma DSC del campione a titolo noto di curcuminoidi.

Nel complesso, il profilo DSC risulta quindi compatibile con un campione a titolo noto contenente curcuminoidi ad elevato contenuto di fase cristallina, con comportamento termico prevalentemente riconducibile alla curcumina [31].

**Analisi diffrattometrica a raggi X del campione a titolo noto di curcuminoidi.** Il diffrattogramma a raggi X (XRD) ottenuto per il campione a titolo noto di curcuminoidi è riportato in Figura 4.14. L'analisi dello spettro fornisce informazioni cruciali sulla natura strutturale della matrice solida analizzata.

Come si evince dal grafico, il profilo di diffrazione è caratterizzato da picchi stretti, molto intensi e ben definiti, che si ergono su una linea di base piatta. Questa morfologia è l'impronta tipica di un materiale dotato di un elevato grado di ordine tridimensionale a lungo raggio, confermando la natura marcatamente cristallina della polvere. L'assenza di un alone diffuso nella regione a bassi angoli indica che la frazione di materiale allo stato amorfo è del tutto trascurabile o assente.

Entrando nel dettaglio dei riflessi, il pattern è dominato da un picco principale di massima intensità (picco a 100% di intensità relativa) situato a circa  $2\theta \approx 17^\circ$ .



**Figura 4.14:** Diffattogramma a raggi X (XRD) del campione a titolo noto di curcuminoidi.

Un secondo riflesso di notevole intensità si osserva a circa  $2\theta \approx 27.5^\circ$ . Oltre a questi segnali diagnostici principali, lo spettro presenta una serie di riflessioni minori ma nettamente risolte, in particolare raggruppate nell'intervallo angolare compreso tra  $23^\circ$  e  $26^\circ$ , e ulteriori picchi secondari a circa  $9^\circ$  e oltre i  $30^\circ$ .

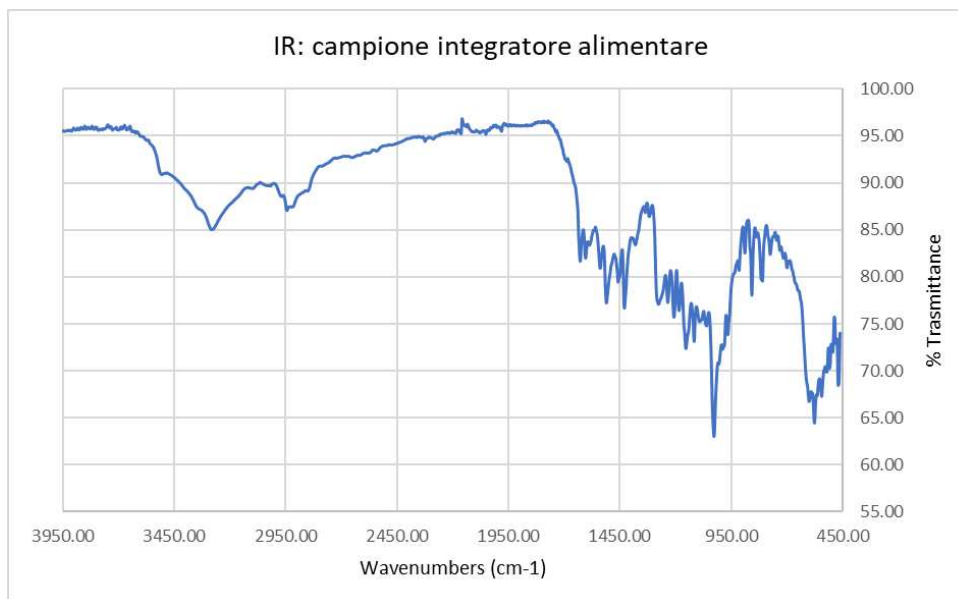
Tale pattern di diffrazione risulta del tutto caratteristico per i curcuminoidi in forma cristallina. In particolare, l'eccellente risoluzione dei picchi e l'assenza di segnali larghi confermano in modo inequivocabile i dati emersi dalla precedente caratterizzazione termica: l'evidenza diffrattometrica è infatti in perfetto accordo con l'analisi DSC (discussa precedentemente), la quale aveva mostrato un singolo e stretto evento endotermico di fusione ad alta entalpia. La configurazione dei riflessi cristallografici supporta l'ipotesi che le diverse molecole del fitocomplesso (curcumina, demetossicurcumina e bisdemetossicurcumina) siano intimamente impacchettate nella medesima matrice cristallina, senza generare separazioni di fase amorphe o impurezze macroscopiche.

### 4.2.3 Integratore alimentare commerciale

**Analisi IR dell'integratore alimentare.** Lo spettro ottenuto evidenzia la natura composta del campione, con contributi sovrapposti riconducibili a polisaccaridi solfatati, composti solforati organici, materiale proteico e componenti fenolici/aromatici. Nella regione ad alto numero d'onda si osserva una banda ampia centrata a circa  $3280\text{ cm}^{-1}$ , attribuibile prevalentemente agli stiramenti O–H e N–H, compatibili con la presenza di glucosamina, condroitina, collagene idrolizzato e gruppi fenolici dei curcuminoidi; l'ampiezza del segnale suggerisce inoltre un esteso coinvolgimento in legami a idrogeno intra- e intermolecolari.

Il segnale a  $2943\text{ cm}^{-1}$  è riconducibile allo stiramento C–H alifatico, con contributi dei gruppi metossilici ( $-\text{OCH}_3$ ) dei curcuminoidi, delle catene alifatiche del collagene e dei gruppi metilici del metilsulfonilmetano. Il debole assorbimento osservato a circa  $2050\text{ cm}^{-1}$  non è associato ai curcuminoidi ed è probabilmente riconducibile ad artefatti strumentali o a combinazioni armoniche di modi vibrazionali della matrice complessa. Particolarmente significativa, ai fini dell'identificazione dei curcuminoidi, è la regione compresa tra  $1650\text{ cm}^{-1}$  e  $1500\text{ cm}^{-1}$ . In essa si osservano le bande a  $1626.14\text{ cm}^{-1}$  e  $1602.26\text{ cm}^{-1}$ , che risultano coerenti con la presenza del sistema coniugato tipico dei curcuminoidi: la prima è attribuibile principalmente allo stiramento del carbonile coniugato C=O in equilibrio cheto-enolico, mentre la seconda è riferibile allo stiramento C=C del sistema aromatico-enonico coniugato. Tali segnali rappresentano le principali evidenze spettroscopiche della frazione curcuminoidica del campione e risultano in buon accordo con quanto atteso per curcumina, demetossicurcumina e bisdemetossicurcumina, i cui spettri IR mostrano bande molto simili in questa regione. I segnali a  $1537\text{ cm}^{-1}$  e  $1508\text{ cm}^{-1}$  sono inoltre compatibili con vibrazioni dello scheletro aromatico e dei doppi legami coniugati dei curcuminoidi, pur potendo ricevere contributi anche dalla matrice vegetale della boswellia e dalla componente proteica.

Nella regione fingerprint si osservano numerosi assorbimenti intensi. Le bande a  $1456\text{ cm}^{-1}$  e  $1428\text{ cm}^{-1}$  possono essere ricondotte a deformazioni C–H e a vibrazioni dell'anello aromatico. Il segnale intenso a  $1274\text{ cm}^{-1}$  è particolarmente rilevante per i curcuminoidi, in quanto attribuibile agli stiramenti C–O dei gruppi fenolici e metossilici aromatici; tale banda è tipica soprattutto della curcumina e della demetossicurcumina, mentre tende a modificarsi di intensità nella bisdemetossicurcumina per la minore metossilazione. Le bande comprese tra  $1233\text{ cm}^{-1}$  e  $1026\text{ cm}^{-1}$  riflettono un'importante sovrapposizione di contributi: da un lato gli stiramenti C–O e C–O–C dei curcuminoidi, dall'altro le vibrazioni dei gruppi ossidrilici e dei legami glicosidici della glucosamina e della condroitina. In questa stessa regione possono inoltre contribuire le vibrazioni S=O del metilsulfonilmetano e dei gruppi solfato della condroitina, rendendo il profilo particolarmente articolato. I segnali a  $1114\text{ cm}^{-1}$  e  $1059\text{ cm}^{-1}$  risultano verosimilmente influenzati in misura importante dalla presenza della condroitina solfato e dei carboidrati aminati, mentre le bande a  $963.64$ ,  $896.90$ ,  $855.76$ ,  $808.16$  e  $773.13\text{ cm}^{-1}$  sono compatibili con deformazioni fuori dal piano dei legami =C–H e C–H aromatici, in parte attribuibili anche alla frazione curcuminoidica e ai composti triterpenici/aromatici della Boswellia. Infine, gli assorbimenti a più basso numero d'onda ( $575$ ,  $542$  e  $507\text{ cm}^{-1}$ ) possono riflettere vibrazioni complesse della matrice, con possibile contributo di gruppi contenenti zolfo e deformazioni dello scheletro molecolare.



**Figura 4.15:** Spettro IR del campione integratore alimentare.

Nel complesso, lo spettro IR del campione conferma la presenza di una matrice multi-componente coerente con la composizione dichiarata dell'integratore. In particolare, la combinazione delle bande a 3280, 1626, 1602, 1537, 1508 e 1274  $\text{cm}^{-1}$  fornisce una chiara evidenza della presenza della frazione curcuminoidica. Tuttavia, trattandosi di una miscela complessa, l'attribuzione delle singole bande deve essere considerata in termini di contributi sovrapposti piuttosto che come identificazione univoca di un singolo componente. Lo spettro risulta comunque pienamente compatibile con la presenza dei curcuminoidi all'interno della formulazione analizzata.

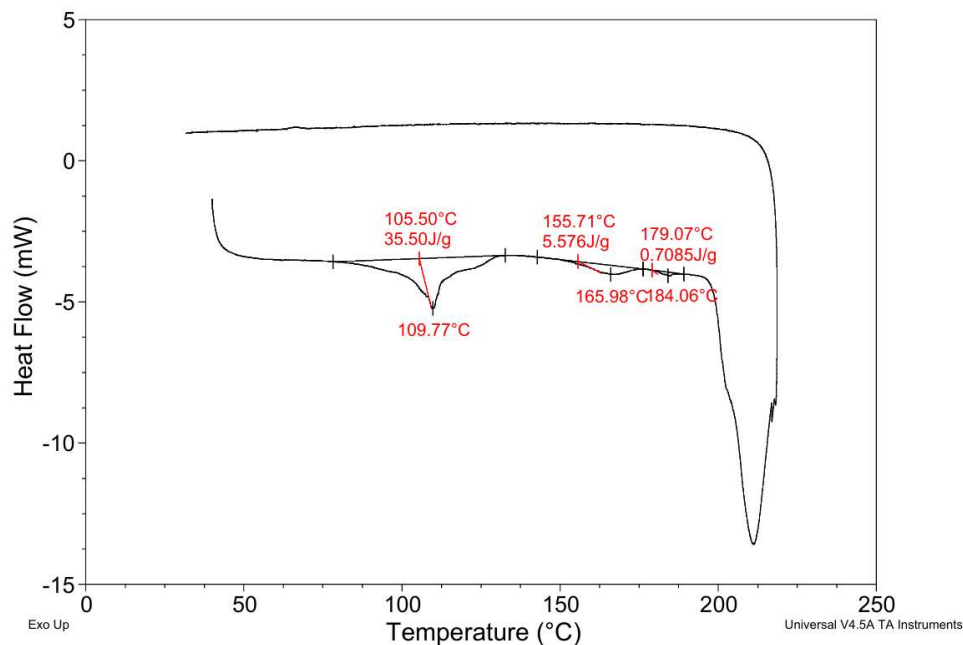
**Analisi DSC dell'integratore alimentare.** Il termogramma DSC dell'integratore (Figura 4.16) evidenzia tre principali eventi endotermici.

Il primo, più intenso e ben definito, presenta una temperatura di picco a 109.77 °C, con onset a 105.50 °C ed entalpia pari a 35.50 J/g. Tale evento è verosimilmente attribuibile alla perdita di acqua adsorbita e/o di umidità residua, nonché a fenomeni di rilassamento o transizioni associate ai componenti più idrofili della formulazione, quali glucosamina, condroitina e collagene idrolizzato.

Il secondo evento endotermico, di intensità nettamente inferiore, si manifesta con una temperatura di onset di 155.71 °C e un massimo a 165.98 °C, con un'entalpia di 5.576 J/g. Questa transizione può essere ricondotta alla fusione di uno o più componenti della matrice, quali la glucosamina o frazioni dell'estratto di *Boswellia*, i cui punti di fusione ricadono in questo intervallo termico. Non si può escludere un contributo parziale della demetossicurcumina o della bisdemetossicurcumina, curcuminoidi minori il cui punto di fusione è rispettivamente nell'intervallo 168–172 °C e 222–224 °C.

Il terzo evento endotermico, di entità molto modesta, presenta una temperatura di onset di 179.07 °C e un massimo a 184.06 °C, con un'entalpia di soli 0.7085 J/g. Tale transizione ricade in una regione prossima, seppur leggermente spostata verso temperature più alte, a quella osservata per la fusione dello standard di curcumina pura (onset 172.09 °C, picco 174.52 °C). Lo spostamento verso temperature superiori e la drastica riduzione dell'entalpia di fusione rispetto allo standard puro (0.7085 J/g vs 105.9 J/g) possono essere attribuiti a diversi fattori: la bassa percentuale in peso dei curcuminoidi nella formulazione complessiva, possibili interazioni con gli altri componenti della matrice che ne modificano il comportamento termico, nonché una parziale amorfizzazione dei curcuminoidi conseguente al processo di formulazione dell'integratore. Ciononostante, la presenza di questo evento endotermico, ancorché di piccola entità, suggerisce che una frazione dei curcuminoidi sia ancora presente in forma cristallina all'interno della matrice dell'integratore. Infatti, eseguendo una proporzione tra l'entalpia osservata nel termogramma del campione standard di curcumina (pari a 105.9 J/g) e l'entalpia osservata nel termogramma del campione di integratore, si ottiene una percentuale pari al 7%, la quale conferma la presenza in quantità basse dei curcuminoidi nell'integratore.

Oltre i 200 °C si osserva un ampio evento endotermico intenso, attribuibile a fenomeni di degradazione termica e/o decomposizione dei componenti organici della formulazione, quali il collagene marino idrolizzato e i polisaccaridi.

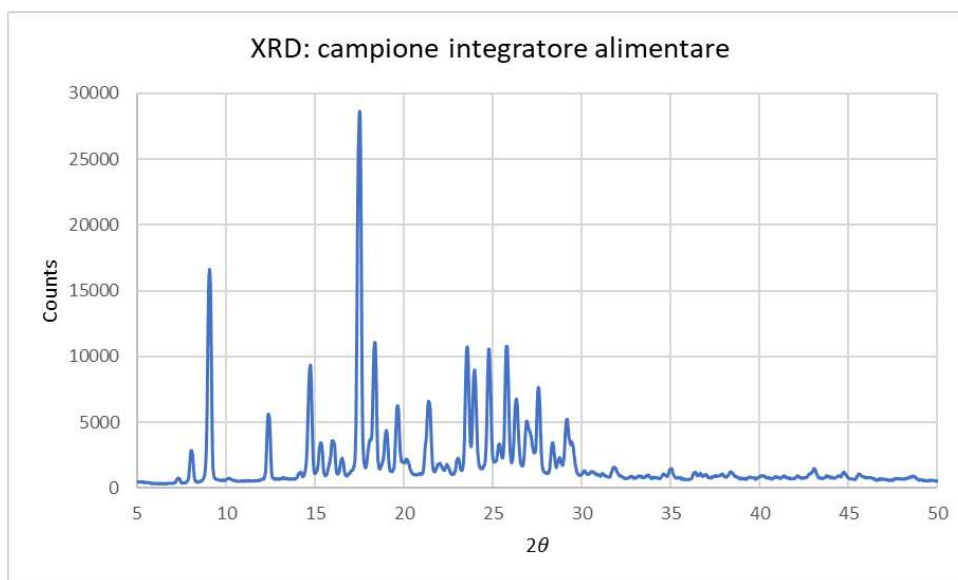


**Figura 4.16:** Termogramma DSC del campione integratore alimentare.

Nel complesso, il profilo DSC dell'integratore alimentare riflette la complessità della matrice multicomponente. L'identificazione dei curcuminoidi risulta più complessa rispetto

all'analisi dello standard puro, a causa della sovrapposizione con le transizioni termiche degli altri ingredienti e della loro ridotta concentrazione nella formulazione. Tuttavia, la presenza del piccolo evento endotermico nella regione 179–184 °C è compatibile con la presenza di curcuminoidi in forma almeno parzialmente cristallina, confermandone l'effettiva inclusione nell'integratore analizzato.

**Analisi diffrattometrica a raggi X dell'integratore alimentare.** Il diffrattogramma a raggi X (XRD) acquisito per il campione di integratore alimentare commerciale è riportato in Figura 4.17. A differenza del profilo precedentemente discusso per il campione a titolo noto di curcuminoidi, il pattern di questo campione si presenta marcatamente più articolato e complesso, riflettendo la natura multicomponente della matrice in esame.



**Figura 4.17:** Diffrattogramma a raggi X (XRD) del campione di integratore alimentare commerciale.

Il profilo diffrattometrico è dominato da una fitta serie di riflessioni nette e ad alta intensità, indicative di una spiccata cristallinità globale del campione. Si osservano segnali diagnostici particolarmente acuti, tra cui spiccano un intenso picco a circa  $2\theta \approx 9^\circ$ , il picco di massima intensità a circa  $2\theta \approx 17.5^\circ$ , e una famiglia di riflessioni multiple densamente raggruppate nell'intervallo angolare compreso tra i  $23^\circ$  e i  $28^\circ$ . Questa elevata complessità strutturale è coerente con la composizione dichiarata della formulazione. Molecole organiche come il metilsulfonilmetano (MSM) e i sali di glucosamina (spesso presenti sotto forma di cloridrato o solfato) sono intrinsecamente caratterizzate da reticoli cristallini altamente ordinati, capaci di generare segnali di diffrazione molto intensi. I picchi predominanti osservati nello spettro sono pertanto ascrivibili principalmente a questi eccipienti e principi attivi maggioritari, i quali dettano il comportamento allo stato solido

della miscela.

Per quanto concerne la frazione dei curcuminoidi, risulta evidente come l'identificazione univoca dei loro riflessi caratteristici (come il picco principale a 17° osservato nel campione a titolo noto) risulti ostacolata. A causa del loro contenuto percentuale minoritario rispetto alla massa totale della capsula, i segnali dei curcuminoidi subiscono un "effetto diluizione" e risultano significativamente mascherati o sovrapposti dalle intense bande di diffrazione degli altri costituenti cristallini della matrice. Basti notare che l'intensità assoluta massima registrata è di circa 28.000 conteggi, contro gli oltre 88.000 del campione a titolo noto. Questi dati diffrattometrici confermano in modo eccellente le evidenze emerse in fase di analisi termica (DSC, discussa in precedenza): in entrambe le caratterizzazioni fisiche, il segnale della curcumina risulta marginale, sovrapposto dal preponderante comportamento cristallino ed endotermico degli altri ingredienti strutturali dell'integratore.

#### **4.2.4 Considerazioni complessive sulla caratterizzazione delle matrici solide**

L'indagine multi-tecnica condotta (IR, DSC, XRD) ha permesso di delineare le differenze strutturali dei tre campioni, evidenziando una progressiva complessità della matrice. Da un lato, lo *standard di curcumina* e il *campione a titolo noto di curcuminoidi* hanno confermato un'elevata purezza e un chiaro stato cristallino, restituendo segnali analitici netti e ben definiti. Dall'altro lato, l'*integratore alimentare* ha mostrato le marcate criticità tipiche di una formulazione multicomponente. In questo caso, l'elevata concentrazione di eccipienti (come glucosamina e MSM) ha generato un forte "effetto matrice", andando a sovrapporsi e a mascherare quasi del tutto i segnali termici, vibrazionali e diffrattometrici riconducibili ai curcuminoidi.

In sintesi, la caratterizzazione allo stato solido ha confermato la presenza del principio attivo nei campioni, ma ha dimostrato l'impossibilità di analizzarlo in modo diretto nella matrice complessa. Tale limite strumentale avvalorava e giustifica l'impiego della *Cloud Point Extraction (CPE)* come step preparatorio indispensabile per pre-concentrare e isolare la curcumina dalle interferenze prima della sua quantificazione.

### **4.3 Ottimizzazione del metodo CPE per l'estrazione della curcumina**

Nel seguente paragrafo verranno elencati e discussi i risultati ottenuti dalle svariate prove CPE effettuate nel corso di questo lavoro e descritte nella Sezione 3.3.

#### 4.3.1 Studio preliminare della solubilità della curcumina

Dopo aver effettuato delle analisi di caratterizzazione chimico-fisica delle polveri, è stato necessario studiare la solubilità della curcumina nelle diverse matrici al fine di identificare le condizioni più idonee per l'estrazione.

Dagli studi descritti nella Sezione 3.3.1 è emerso che la curcumina risulta insolubile in acqua e completamente solubile in etanolo. Per questo motivo sono state effettuate anche delle prove di solubilità utilizzando delle miscele etanolo/acqua a diverse proporzioni, al fine di identificare la matrice più adatta per la fase di estrazione. La miscela idonea per la solubilizzazione della curcumina è risultata essere quella con rapporto 60:40 (etanolo:acqua), ed è stata pertanto utilizzata durante tutte le fasi del processo di estrazione, in quanto consente di solubilizzare efficacemente la curcumina, garantendo al contempo una buona compatibilità con il sistema micellare utilizzato nella CPE.

#### 4.3.2 Sviluppo del metodo UV-Vis e individuazione del massimo di assorbimento

Per poter quantificare la curcumina nelle fasi di estrazione, è stato necessario costruire delle curve di calibrazione UV-Vis. Mediante tali curve, è possibile convertire i valori di assorbanza misurati in concentrazioni di curcumina, sfruttando l'equazione della retta di calibrazione.

La massa di curcumina nella fase analizzata è stata ottenuta come:

$$m_{\text{curc}} = C \times V_{\text{soluzione}} \quad (10)$$

dove  $V_{\text{soluzione}}$  è il volume della soluzione in cui la fase estrattiva è stata ridispersa o il volume della fase acquosa residua.

In questo modo, è possibile determinare la concentrazione di curcumina estratta nella fase micellare e quella residua nella fase acquosa, al fine di calcolare la resa di estrazione. La resa di estrazione (*extraction efficiency*,  $E\%$ ) è stata calcolata come:

$$E\% = \frac{m_{\text{curc,estratta}}}{m_{\text{curc,iniziale}}} \times 100 \quad (11)$$

dove  $m_{\text{curc,estratta}}$  è la massa di curcumina determinata nella fase micellare e  $m_{\text{curc,iniziale}}$  è la massa di curcumina totale aggiunta alla soluzione di estrazione.

Invece, la percentuale di recupero (*recovery*,  $R\%$ ) è stata calcolata come:

$$R\% = \frac{m_{\text{curc,estratta}} + m_{\text{curc,acquosa}}}{m_{\text{curc,iniziale}}} \times 100 \quad (12)$$

dove  $m_{\text{curc,acquosa}}$  è la massa di curcumina determinata nella fase acquosa residua.

Come prima cosa, è stato individuato il massimo di assorbimento ( $\lambda_{\text{max}}$ ) della curcumina mediante acquisizione dello spettro UV-Vis nella matrice idroalcolica. Il valore di  $\lambda_{\text{max}}$  è risultato pari a 430 nm, coerente con quanto riportato in letteratura (Sezione 1.7). Tutte le misure di assorbanza per la costruzione delle curve di calibrazione e per la quantificazione dell'analita sono state effettuate a questa lunghezza d'onda.

Sono state costruite due curve di calibrazione: la prima in matrice idroalcolica (etanolo/acqua 60:40), la seconda in matrice micellare (TX-100/NaCl). Il processo di costruzione delle curve di calibrazione è descritto nelle Sezioni 3.3.2 e 3.3.3.

### 4.3.3 Curva di calibrazione in matrice etanolo/acqua 60:40

Dopo aver eseguito le analisi mediante spettrofotometria UV-Vis delle soluzioni standard di curcumina preparate in matrice idroalcolica (etanolo/acqua 60:40) a concentrazioni crescenti, è stato possibile costruire la curva di calibrazione riportata in Figura 4.18. In particolare, sono state eseguite 3 repliche per ogni soluzione standard, ottenendo quindi 3 valori di assorbanza, da cui sono state ricavate la media e la deviazione standard. Del bianco sono state invece eseguite 5 repliche, ottenendo quindi 5 valori di assorbanza, da cui sono state ricavate la media e la deviazione standard. Tali repliche sono state utilizzate anche per il calcolo del limite di rilevabilità (LOD) e del limite di quantificazione (LOQ) del metodo, mediante le seguenti formule:

$$\text{LOD} = \frac{3 \times \sigma_{\text{bianco}}}{m_{\text{cal}}} \quad \text{LOQ} = \frac{10 \times \sigma_{\text{bianco}}}{m_{\text{cal}}} \quad (13)$$

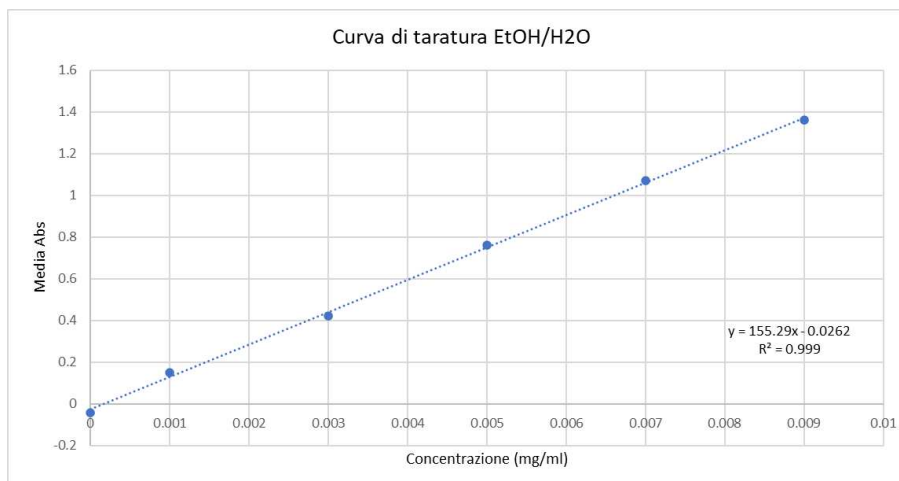
dove  $\sigma_{\text{bianco}}$  è la deviazione standard delle repliche del bianco e  $m_{\text{cal}}$  è la pendenza della retta di calibrazione. Si sono ottenuti così i seguenti valori:

- $\text{LOD} = 9,6 \times 10^{-5} \text{ mg/mL}$ ;
- $\text{LOQ} = 3,2 \times 10^{-4} \text{ mg/mL}$ .

Nella Figura 4.18 è riportata la curva di calibrazione ottenuta. La curva mostra una buona linearità, con un coefficiente di determinazione ( $R^2$ ) pari a 0,9990, indicando che la legge di Lambert-Beer è rispettata nella gamma di concentrazioni analizzate. La retta ottenuta dalla curva di calibrazione è descritta dall'equazione:

$$A = 155,29 \times C - 0,0262 \quad (14)$$

dove  $A$  è l'assorbanza misurata a  $\lambda = 430 \text{ nm}$  e  $C$  è la concentrazione di curcumina espressa in mg/mL.



**Figura 4.18:** Rappresentazione della curva di taratura in matrice idroalcolica.

#### 4.3.4 Curva di calibrazione in matrice micellare TX-100/NaCl e valutazione dell'effetto matrice

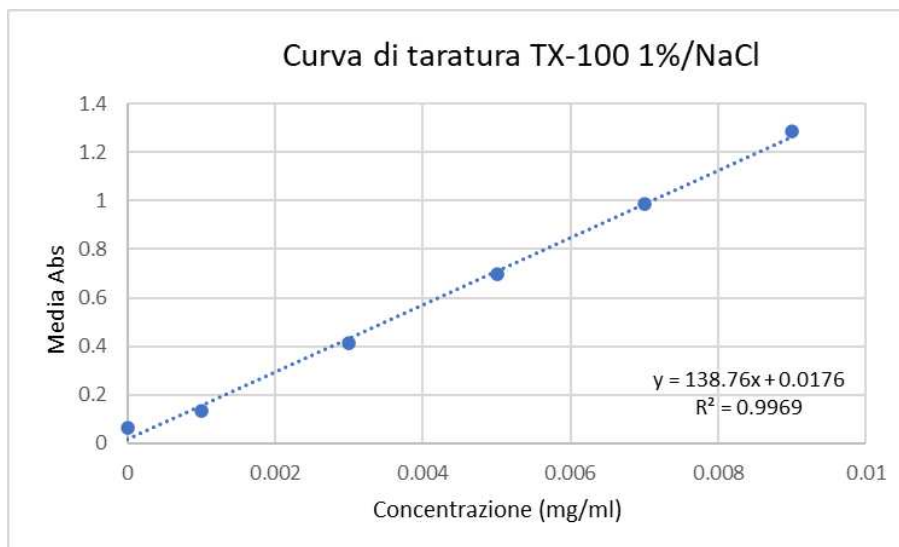
Per valutare l'effetto matrice e garantire una quantificazione accurata della curcumina nella fase acquosa residua, è stata costruita una curva di calibrazione specifica per la matrice micellare utilizzata nella CPE (TX-100 1%/NaCl). Sono state preparate soluzioni standard di curcumina a concentrazioni crescenti in matrice micellare, come descritto nella Sezione 3.3.3. Per la costruzione della curva di calibrazione in matrice micellare è stato eseguito lo stesso procedimento utilizzato per la matrice idroalcolica, con 3 repliche per ogni soluzione standard e 5 repliche per il bianco. In questo caso i valori ottenuti per il LOD e il LOQ sono risultati essere:

- LOD =  $3,4 \times 10^{-4}$  mg/mL;
- LOQ =  $1,1 \times 10^{-3}$  mg/mL.

Nella Figura 4.19 è riportata la curva di calibrazione ottenuta per la matrice micellare. La curva mostra una buona linearità, con un coefficiente di determinazione ( $R^2$ ) pari a 0,9969, indicando che la legge di Lambert-Beer è rispettata anche in questa matrice, sebbene con una leggera diminuzione della linearità rispetto alla matrice idroalcolica. La retta ottenuta dalla curva di calibrazione è descritta dall'equazione:

$$A = 138,76 \times C + 0,0176 \quad (15)$$

dove  $A$  è l'assorbanza misurata a  $\lambda = 430$  nm e  $C$  è la concentrazione di curcumina espressa in mg/mL.



**Figura 4.19:** Rappresentazione della curva di taratura in matrice acquosa.

Il confronto tra le due rette di calibrazione evidenzia un effetto matrice quantificabile: la pendenza della retta in matrice micellare (138,76) risulta inferiore di circa l'11% rispetto a quella ottenuta in matrice idroalcolica (155,29). Tale riduzione della sensibilità è attribuibile all'assorbimento di fondo e alle possibili interazioni tra il tensioattivo, il sale e la curcumina nella matrice micellare, che modificano l'ambiente chimico-fisico in cui avviene la transizione elettronica dell'analita. Questa differenza giustifica la necessità di utilizzare due curve di calibrazione distinte per le due fasi, al fine di garantire una quantificazione accurata.

Per le prove preliminari volte a verificare l'influenza della forza ionica sull'estrazione (Sezione 3.3.4), la fase acquosa residua è stata analizzata utilizzando la retta di calibrazione in matrice idroalcolica, impiegando come bianco una miscela etanolo/acqua 1:1000. Sono state effettuate diverse prove per identificare un bianco adeguato alla matrice acquosa residua; solo nelle ultime fasi è stato possibile individuare una matrice idonea (TX-100 1%/NaCl) che permettesse una quantificazione accurata della curcumina residua, la quale necessitava però di una curva di calibrazione specifica. La curva di taratura in matrice acquosa è stata utilizzata per l'analisi dei dati ottenuti: dalla prova definitiva con lo standard di curcumina, dalle analisi con il campione a titolo noto di curcuminoidi e dalle analisi con l'integratore alimentare.

#### **4.3.5 Influenza della concentrazione di NaCl sull'efficienza di estrazione**

A questo punto sono state eseguite una serie di prove per valutare l'influenza della forza ionica (NaCl) sull'efficienza di estrazione della curcumina mediante CPE. L'obiettivo di queste prove è stato quello di identificare la concentrazione ottimale di NaCl che

massimizza la resa di estrazione della curcumina, di creare un protocollo di estrazione che sia efficiente e riproducibile, utilizzando un TCP che sia inferiore a 35 °C e di ridurre al massimo le quantità dei componenti in gioco. Sono state preparate soluzioni di estrazione con concentrazioni crescenti di NaCl, come descritto nella sezione 3.3.4: partendo da 2 m fino ad arrivare a 4,5 m. Non è stata analizzata una concentrazione di NaCl superiore a 4,5 m, in quanto si era vicini al limite di solubilità del sale in acqua e quindi rendeva più complicata la preparazione delle soluzioni di estrazione. Le soluzioni sono state preparate utilizzando una soluzione madre di curcumina con concentrazione pari a 4 mg/ml e una soluzione di TX-100 al 1%. Di seguito verranno analizzati nel dettaglio i risultati ottenuti per ciascuna soluzione studiata, al fine di identificare la concentrazione di NaCl che garantisce le migliori prestazioni estrattive per la curcumina.

**Estrazione a 4,5 m di NaCl.** A tale forza ionica, l'effetto di *salting-out* è risultato sufficientemente intenso da indurre la separazione di fase in modo del tutto spontaneo a temperatura ambiente. I risultati relativi all'analisi spettrofotometrica UV-Vis delle due fasi separate (fase micellare e fase acquosa residua) per le sei repliche analizzate sono riassunti nella Tabella 4.6.

**Tabella 4.6:** Rese di estrazione della curcumina nella fase micellare a 4,5 m NaCl. Condizioni: TX-100 1% (p/p),  $V_1 = 250 \mu\text{L}$ ,  $V_2 = 200 \mu\text{L}$ ,  $V_{\text{ridisp}} = 7 \text{ mL}$ .

Replica	Abs	$C_{V_1}$ (mg/mL)	$m_{\text{estr}}$ (mg)	$m_{\text{tot}}$ (mg)	$E\%$
1	0,5790	0,00389	0,02728	0,04910	88
2	0,6065	0,00407	0,02852	0,05134	92
3	0,6024	0,00405	0,02834	0,05101	91
4	0,5441	0,00367	0,02571	0,04628	83
5	0,4837	0,00328	0,02298	0,04137	74
6	0,5376	0,00363	0,02541	0,04574	82
<b>Media</b>	0,559	0,00377	0,02637	0,04747	<b>85</b>
<b>DS</b>	$\pm 0,046$	—	—	—	$\pm 7$

I dati evidenziano una spiccata tendenza dell'analita a ripartirsi all'interno del *core* idrofobico micellare. L'efficienza di estrazione media calcolata si attesta su un valore molto soddisfacente dell'85%, con picchi di resa sul singolo campione che raggiungono il 92%. Si osserva tuttavia una deviazione standard del 6,8%, indicativa di una discreta dispersione dei dati tra le repliche. Questa variabilità inter-campione può essere dovuta all'elevata forza ionica del mezzo, la quale conferisce alla fase estratta una densità e una viscosità tali da rendere particolarmente complesso, e soggetto a errore sistematico, il prelievo volumetrico esatto durante le operazioni di campionamento.

Per completare lo studio di questo sistema, è stato necessario determinare la percentuale di recupero totale ( $R\%$ ), andando ad analizzare la porzione acquosa residua. In questo caso specifico, l'analisi del *bulk* acquoso è stata effettuata utilizzando come bianco spettrofotometrico una miscela etanolo/acqua in rapporto 1:1000, interpolando i valori di assorbanza sulla retta di calibrazione costruita in matrice idroalcolica. I dati così ottenuti confermano che la massa di curcumina non estratta è di fatto trascurabile. Conseguentemente, il calcolo della percentuale di recupero totale ( $R\%$ ) ha restituito un valore medio dell'84%, in eccellente accordo statistico con l'efficienza estrattiva ( $E\%$ ).

**Estrazione a 4,0 m di NaCl.** I dati relativi all'analisi spettrofotometrica, a 4,0 m NaCl, delle due fasi ripartite sono riassunti nella Tabella 4.7.

**Tabella 4.7:** Rese di estrazione della curcumina nella fase micellare a 4,0 m NaCl. Condizioni: TX-100 1% (p/p),  $V_1 = 250 \mu\text{L}$ ,  $V_2 = 300 \mu\text{L}$ ,  $V_{\text{ridisp}} = 7 \text{ mL}$ .

Replica	Abs	$C_{V_1}$ (mg/mL)	$m_{\text{estr}}$ (mg)	$m_{\text{tot}}$ (mg)	$E\%$
1	0,4943	0,00335	0,02346	0,05162	92
2	0,4869	0,00330	0,02313	0,05088	91
3	0,4848	0,00329	0,02303	0,05067	90
4	0,4847	0,00329	0,02303	0,05067	90
5	0,5029	0,00341	0,02385	0,05247	94
6	0,4867	0,00330	0,02312	0,05086	91
<b>Media</b>	0,490	0,00332	0,02327	0,05120	<b>91</b>
<b>DS</b>	$\pm 0,008$	—	—	—	<b><math>\pm 1</math></b>

Come si evince dai dati, la riduzione della forza ionica ha portato a un netto miglioramento delle prestazioni analitiche. L'efficienza di estrazione media ( $E\%$ ) si è attestata al 91%, un valore superiore rispetto a quello ottenuto a 4,5 m. Il dato di maggior rilievo è tuttavia il drastico crollo della deviazione standard, passata dal 6,8% della prova precedente a un eccellente 1,3%. Questo incremento nella riproducibilità conferma l'ipotesi formulata in precedenza: la minore concentrazione salina ha ridotto significativamente la densità e la viscosità della fase coacervata, rendendo le operazioni di prelievo volumetrico molto più agevoli e abbattendo l'errore sistematico in fase di campionamento.

Per la quantificazione della quota di analita non estratto, l'analisi è stata eseguita utilizzando come bianco spettrofotometrico la miscela etanolo/acqua (1:1000) e la medesima retta di calibrazione idroalcolica impiegata per la fase micellare. La massa di curcumina quantificata in questa fase rappresenta mediamente solo il 3% del quantitativo totale inserito inizialmente nel sistema.

Integrando la frazione estratta nella fase micellare con la modesta quota rimasta in solu-

zione acquosa, il calcolo della percentuale di recupero totale ( $R\%$ ) ha restituito un valore medio del 94%. Anche in questo caso si dimostra la robustezza del metodo e si conferma che le condizioni termodinamiche del sistema preservano l'integrità chimica della curcumina.

**Estrazione a 3,5 m di NaCl.** I risultati derivanti dall'analisi spettrofotometrica, delle soluzioni caratterizzate da una concentrazione di sale pari a 3,5 m NaCl, sono riassunti nella Tabella 4.8.

**Tabella 4.8:** Rese di estrazione della curcumina nella fase micellare a 3,5 m NaCl. Condizioni: TX-100 1% (p/p),  $V_{\text{prelevato}} = 0,5 \text{ mL}$ ,  $V_{\text{ridisp}} = 7 \text{ mL}$ .

Replica	Abs	$C_{V_1}$ (mg/mL)	$m_{\text{estr}}$ (mg)	$m_{\text{tot}}$ (mg)	$E\%$
1	0,5291	0,00358	0,02503	0,05007	89
2	0,5193	0,00351	0,02459	0,04918	88
3	0,5089	0,00345	0,02412	0,04824	86
4	0,5070	0,00343	0,02404	0,04808	86
5	0,5291	0,00358	0,02503	0,05007	89
6	0,5199	0,00352	0,02462	0,04923	88
<b>Media</b>	0,519	0,00351	0,02457	0,04914	<b>88</b>
<b>DS</b>	$\pm 0,010$	—	—	—	<b><math>\pm 1,5</math></b>

Analizzando i dati, si osserva che l'ulteriore diminuzione della concentrazione salina ha comportato una lieve flessione delle prestazioni analitiche rispetto alle condizioni precedenti. L'efficienza di estrazione media ( $E\%$ ) è scesa all'88% (rispetto al 91% ottenuto a 4,0 m). Questo comportamento riflette l'inevitabile attenuazione dell'effetto di *salting-out*: una minore forza ionica sfavorisce, seppur in misura contenuta, la migrazione dell'analita idrofobico verso la fase ricca di tensioattivo. Tuttavia, la deviazione standard si mantiene su un ottimo livello ( $\pm 1,5\%$ ), confermando che la minore densità e viscosità della fase coacervata continuano a garantire un campionamento agevole e riproducibile.

Per valutare la ripartizione complessiva all'interno del sistema, si è proceduto alla quantificazione della quota di analita rimasta nella porzione inferiore. Anche in questo caso, l'analisi del residuo acquoso è stata eseguita utilizzando come bianco spettrofotometrico la miscela etanolo/acqua (1:1000) e calcolando le concentrazioni mediante la medesima retta di calibrazione idroalcolica. Coerentemente con la riduzione dell'efficienza estrattiva, la massa di curcumina quantificata in questa fase risulta maggiore rispetto al sistema a 4,0 m, rappresentando mediamente il 7% del quantitativo teorico inizialmente inserito.

Infine, sommando la frazione isolata nella fase micellare e la quota quantificata nel residuo

acquoso, la percentuale di recupero totale ( $R\%$ ) ha restituito un valore medio eccellente, pari al 95%.

**Estrazione a 3,0 m di NaCl.** Riducendo la concentrazione salina a 3,0 m, per innescare il fenomeno del *cloud point* e la conseguente separazione di fase è stato necessario un blando riscaldamento controllato (circa 30 °C). I risultati relativi all'analisi spettrofotometrica UV-Vis della fase micellare per le sei repliche analizzate sono riassunti nella Tabella 4.9.

**Tabella 4.9:** Rese di estrazione della curcumina nella fase micellare a 3,0 m NaCl. Condizioni: TX-100 1% (p/p),  $V_1 = 500 \mu\text{L}$ ,  $V_2 = 400 \mu\text{L}$ ,  $V_{\text{ridisp}} = 7 \text{ mL}$ .

Replica	Abs	$C_{V_1}$ (mg/mL)	$m_{\text{estr}}$ (mg)	$m_{\text{tot}}$ (mg)	$E\%$
1	0,6007	0,00404	0,02826	0,05087	91
2	0,5904	0,00397	0,02779	0,05003	89
3	0,5897	0,00397	0,02777	0,04998	89
4	0,5976	0,00402	0,02812	0,05061	90
5	0,5787	0,00390	0,02727	0,04908	88
6	0,5815	0,00391	0,02739	0,04931	88
<b>Media</b>	0,590	0,00397	0,02777	0,04998	<b>89</b>
<b>DS</b>	$\pm 0,009$	—	—	—	<b><math>\pm 1</math></b>

I dati evidenziano un'efficienza estrattiva ( $E\%$ ) non solo molto elevata, con un valore medio dell'89% e picchi che raggiungono il 91%, ma soprattutto estremamente riproducibile. A differenza di quanto osservato con l'estrazione a 4,5 m, in questo caso si registra una deviazione standard nettamente inferiore (circa l'1%). Questo drastico calo della variabilità inter-campione dimostra che la riduzione della forza ionica del mezzo si traduce in una fase coacervata meno densa e meno viscosa, fattore che riduce l'errore sistematico e rende le operazioni di prelievo volumetrico tramite micropipetta molto più accurate e agevoli.

Per completare lo studio e determinare la percentuale di recupero totale ( $R\%$ ), è stata analizzata anche la porzione acquosa residua. In questo caso specifico, l'analisi del *bulk* acquoso è stata eseguita utilizzando come bianco spettrofotometrico una miscela etanolo/acqua in rapporto 1:1000, interpolando i successivi valori di assorbanza direttamente sulla retta di taratura costruita in matrice idroalcolica. L'analisi ha rilevato un quantitativo medio di curcumina non estratta pari a circa il 9%.

Conseguentemente, sommando la massa dell'analita ripartita all'interno della fase micellare e quella rimasta nella fase acquosa, il calcolo della percentuale di recupero totale ( $R\%$ ) ha restituito un valore medio eccellente del 98%.

**Limiti operativi a 2,5 m e 2,0 m di NaCl.** Dato che queste soluzioni presentavano un TCP superiore a 35°C, non si sono eseguite ulteriori analisi relative alla quantificazione della curcumina estratta e residua, in quanto si era già identificato un limite operativo per la concentrazione di NaCl al di sotto di 3,0 m.

#### **4.3.6 Selezione delle condizioni operative ottimali**

Alla luce dei risultati ottenuti, la selezione delle condizioni operative ottimali per il metodo CPE ha richiesto una valutazione globale che tenesse conto non solo della resa di estrazione, ma anche della riproducibilità analitica, delle proprietà reologiche del sistema, della temperatura di *cloud point* e della necessità di minimizzare l'impiego di reattivi. Sebbene le concentrazioni di NaCl pari a 4,0 m e 4,5 m abbiano garantito le efficienze di estrazione più elevate in termini assoluti, l'utilizzo di quantità così massive di sale comporta un notevole aumento della densità e della viscosità della fase coacervata, oltre a rappresentare uno svantaggio in ottica di sostenibilità, costo e semplicità di preparazione del campione. D'altro canto, concentrazioni saline pari o inferiori a 2,5 m sono state scartate a priori, in quanto inducono un innalzamento della TCP oltre i 35 °C, inficiando l'obiettivo primario di sviluppare un protocollo facilmente applicabile a temperature miti (TCP < 35 °C). Nonostante ciò, si è provato ad aggiungere la soluzione madre al sistema TX-100 all'1% con NaCl 2,5 m (e analogamente nel caso di NaCl 2,0 m). A seguito della centrifugazione, si è ottenuto un sistema non ripartito; questa ulteriore prova ha confermato quanto ipotizzato precedentemente.

Pertanto, la concentrazione di NaCl pari a 3,0 m è stata identificata come la condizione d'elezione per il metodo. Questa scelta rappresenta il miglior compromesso termodinamico e operativo: permette infatti di ridurre significativamente la quantità di agente di *salting-out* impiegato nel sistema, garantendo al contempo una separazione di fase ottimale e il mantenimento di una TCP idonea. Dal punto di vista analitico, pur operando con una forza ionica ridotta, le prestazioni del sistema si confermano eccellenti: l'efficienza di estrazione si mantiene su un ottimo 83%, con un recupero totale dell'analita ( $R\%$ ) pari al 90%. Inoltre, il grande vantaggio di operare a 3,0 m risiede nelle eccellenti proprietà reologiche della fase micellare estratta. Infatti si può notare nella Tabella 3.9 che i volumi dei prelievi della soluzione 3,0 m sono maggiori rispetto a quelli della soluzione 4,5 m, in quanto la soluzione 3,0 m risulta sufficientemente fluida da garantire prelievi volumetrici più facili, eliminando il più possibile l'errore sistematico di campionamento e assicurando una riproducibilità dell'analisi elevata. Di conseguenza, la miscela estraente composta da TX-100 1% (p/p) e NaCl 3,0 m è stata adottata come protocollo standardizzato per

tutte le successive analisi applicative su standard di riferimento, campione a titolo noto e integratore alimentare (sezione 3.3.5).

#### 4.3.7 Applicazione del metodo al campione standard di curcumina

Una volta definito il protocollo di estrazione, come mostrato nella sezione 3.3.5, è stata eseguita un'analisi definitiva sullo standard di curcumina (Sezione 3.3.6). Questa analisi ha portato ai seguenti risultati, Tabella 4.10.

**Tabella 4.10:** Rese di estrazione della curcumina nella fase micellare a 3,0 m NaCl. Condizioni: TX-100 1% (p/p),  $V_{\text{estr}} = 400 \mu\text{L}$ ,  $V_{\text{ridisp}} = 7 \text{ mL}$ .

Replica	Abs	$C_{V_1}$ (mg/mL)	$m_{\text{estr}}$ (mg)	$m_{\text{tot}}$ (mg)	$E\%$
1	0,5194	0,00351	0,02459	0,04611	82
2	0,5390	0,00364	0,02548	0,04777	85
3	0,5338	0,00361	0,02525	0,04734	85
4	0,5226	0,00353	0,02474	0,04639	83
5	0,5266	0,00356	0,02492	0,04672	83
6	0,5175	0,00350	0,02451	0,04596	82
<b>Media</b>	0,526	0,00356	0,02492	0,04671	<b>83</b>
<b>DS</b>	$\pm 0,008$	—	—	—	<b><math>\pm 1</math></b>

L'efficienza di estrazione media ( $E\%$ ) subisce infatti un ulteriore calo, attestandosi all'83%. D'altra parte, le caratteristiche reologiche del sistema rimangono eccellenti: il basso tenore salino garantisce una fase coacervata fluida e facilmente campionabile, come dimostrato dalla deviazione standard che si mantiene su un ottimo 1,3% (riportato come  $\pm 1$  in tabella), confermando il superamento degli errori sistematici di prelievo riscontrati ad alte molarità.

Per la quantificazione della quota di analita rimasta nel *bulk* acquoso, in questo set di esperimenti è stato necessario adottare un approccio analitico differente per evitare l'insorgere di effetti matrice. L'analisi spettrofotometrica del residuo acquoso è stata eseguita utilizzando come bianco una soluzione di TX-100 1% e NaCl 3,0 m, e le concentrazioni sono state estrapolate sfruttando un'apposita retta di calibrazione costruita direttamente in matrice acquosa (anziché nella miscela idroalcolica utilizzata in precedenza). Coerentemente con il calo dell'efficienza estrattiva, la massa di curcumina quantificata nel residuo è aumentata, rappresentando in media il 6% del quantitativo totale iniziale.

Integrando la frazione recuperata nella fase micellare con quella determinata nella fase acquosa, la percentuale di recupero totale ( $R\%$ ) è risultata pari al 90%. Seppur leggermente inferiore rispetto alle condizioni più concentrate, il *mass balance* si mantiene su livelli del tutto soddisfacenti. Tuttavia, questo calo suggerisce che la concentrazione di

3,0 m rappresenti verosimilmente il limite inferiore di forza ionica per garantire un effetto di *salting-out* adeguato alle finalità del metodo.

#### 4.3.8 Applicazione del metodo al campione a titolo noto di curcuminoidi

A seguito dell'ottimizzazione delle condizioni estrattive su standard, il metodo analitico basato sulla CPE (TX-100 1%, NaCl 3,0 m) è stato applicato a un campione reale, costituito da una polvere commerciale con un titolo dichiarato in etichetta pari al 95% in curcuminoidi. Lo scopo di questa fase è stato quello di valutare l'affidabilità, la riproducibilità e l'eventuale influenza dell'effetto matrice sulle rese del processo di ripartizione. Per garantire la solidità del dato statistico, l'analisi è stata condotta eseguendo tre preparazioni indipendenti del campione, utilizzando la stessa soluzione madre (concentrazione pari a 4,158 mg/mL). I valori di efficienza e recupero sono stati normalizzati tenendo conto del titolo nominale del 95%. I dati aggregati relativi a questo set di prove sono riassunti nella Tabella 4.11.

**Tabella 4.11:** Rese di estrazione e bilancio di massa (recupero totale) sul campione a titolo noto di curcuminoidi in polvere (titolo dichiarato 95%). Condizioni: TX-100 1% (p/p), NaCl 3,0 m.

Replica	<i>E</i> % (Fase Micellare)	% in Fase Acquosa	<i>R</i> % (Recupero Totale)
1	74	8	82
2	88	10	98
3	77	8	85
<b>Media</b>	<b>80</b>	<b>9</b>	<b>88</b>
<b>DS</b>	<b>±7</b>	<b>±1</b>	<b>±9</b>

I risultati ottenuti dimostrano che il metodo mantiene buone prestazioni anche se applicato a una matrice reale più complessa, della precedente. L'efficienza di estrazione media (*E*%) nella fase coacervata si attesta all'80%. Il lieve calo registrato e la maggiore dispersione del dato (deviazione standard del ±7%) rispetto alla soluzione standard pura (83% ±1) sono del tutto fisiologici e imputabili ai prevedibili effetti di interferenza generati dagli eccipienti presenti nella formulazione, i quali possono competere per la solubilizzazione micellare o alterare localmente la forza ionica.

Parallelamente, l'analisi della frazione acquosa residua, condotta utilizzando il bianco in matrice acquosa e la relativa retta di taratura (TX-100 1% e NaCl 3,0 m), ha permesso di quantificare una quota media di analita non estratto pari al 9%.

Integrando le due frazioni, il *mass balance* restituisce una percentuale di recupero totale (*R*%) media dell'88% (con picchi fino al 98% nella seconda replica). Tali valori confermano l'efficacia dell'effetto di *salting-out* a 3,0 m di NaCl anche sul campione

reale, validando la procedura estrattiva proposta come un approccio utile e quantitativo per l'analisi di routine di preparazioni a base di curcuminoidi.

#### 4.3.9 Applicazione del metodo a matrice reale: integratore alimentare commerciale

Dopo aver testato il protocollo operativo su campioni standard e su una polvere a titolo noto di curcumina, si è deciso di trasferire e testare il metodo su una matrice reale di estrema complessità, rappresentata da un integratore alimentare. L'integratore, fornito dal relatore, si presenta in capsule contenenti una polvere composta da numerosi principi attivi ed eccipienti. Nello specifico, la formulazione relativa a due capsule (massa totale della polvere pari a 926,34 mg) prevede: glucosamina (400 mg), condroitina (100 mg), metilsulfonilmetano (100 mg), collagene marino idrolizzato (100 mg), estratto di *Boswellia* (100 mg) e 100 mg di estratto di curcuminoidi. Essendo quest'ultimo titolato all'85%, i calcoli di resa teorica sono stati normalizzati considerando una massa di curcuminoidi effettiva pari a 85 mg per l'aliquota considerata.

I dati ottenuti mediante analisi spettrofotometrica UV-Vis hanno permesso di confrontare il contenuto di analita determinato sperimentalmente con quanto dichiarato nella scheda tecnica del prodotto.

Le soluzioni sono state preparate come descritto nella sezione 3.3.8. La procedura di estrazione (TX-100 1% p/p, NaCl 3,0 m) è rimasta fedele a quella descritta nella Sezione 3.3.5. Sono state eseguite tre repliche indipendenti (in giorni diversi) dell'intera procedura, utilizzando la stessa soluzione madre (concentrazione totale pari a 46,317 mg/mL e concentrazione curcuminoidi pari a 4,25 mg/ml) ciascuna comprendente l'analisi di 6 aliquote. Tuttavia, per esigenze analitiche legate al campione, i parametri volumetrici di prelievo e ridispersione sono stati modificati, come riassunto nella Tabella 3.11.

I dati riguardanti le rese del processo di estrazione e il bilancio di massa complessivo sono riportati nella Tabella 4.12. L'analisi spettrofotometrica della frazione acquosa di scarto è stata eseguita utilizzando il bianco in matrice (TX-100 1% e NaCl 3,0 m) per annullare l'assorbimento di fondo.

**Tabella 4.12:** Rese di estrazione e bilancio di massa sull'integratore alimentare (titolo teorico in curcuminoidi 85%). Condizioni: TX-100 1% (p/p), NaCl 3,0 m.

Replica	E% (Fase Micellare)	% in Fase Acquosa	R% (Recupero Totale)
1	69	8	77
2	80	4	84
3	84	5	89
<b>Media</b>	<b>78</b>	<b>6</b>	<b>83</b>
<b>DS</b>	<b>±8</b>	<b>±2</b>	<b>±6</b>

L'efficienza di estrazione media ( $E\%$ ) nella fase estraente risulta pari al 78%, con una deviazione standard del  $\pm 8\%$ , indicando una maggiore variabilità rispetto all'analisi dello standard puro. Contestualmente, nel *bulk* acquoso è stata ritrovata in media una quota del 6% dell'analita. L'efficienza di estrazione è risultata pari al 78% del totale dei curcuminoidi presenti.

I curcuminoidi presenti nel campione rappresentano il 9,2% della massa totale. Di conseguenza l'efficienza di estrazione dei curcuminoidi rispetto alla massa totale analizzata risulta essere in media pari a 7%. Essendo stato prelevato unicamente il surnatante etanolico per evitare i composti insolubili, è probabile che una percentuale minoritaria dei curcuminoidi sia rimasta intrappolata all'interno del precipitato sul fondo della provetta e non sia mai entrata nel processo di CPE, abbassando la  $E\%$ . Nonostante le fisiologiche interferenze di matrice e le sfide poste dalla solubilizzazione differenziale degli eccipienti, il metodo ha comunque garantito rese del tutto soddisfacenti e un'ottima fluidità della fase coacervata. L'approccio proposto si dimostra pertanto robusto e validamente applicabile anche per il controllo qualità di integratori alimentari multicomponente.

## 5 Conclusioni

Il presente lavoro di tesi ha avuto come obiettivo lo sviluppo, l'ottimizzazione e la validazione di un metodo di estrazione al punto di intorbidimento (*Cloud Point Extraction*, CPE) basato sul tensioattivo non ionico Triton X-100, finalizzato all'analisi quantitativa della curcumina in matrici a complessità crescente. L'indagine sperimentale, divisa in una fase di caratterizzazione fisico-chimica del sistema micellare e in una fase applicativa dedicata al recupero dell'analita, ha permesso di raggiungere i seguenti risultati.

### 5.1 Caratterizzazione del comportamento di fase

Lo studio del sistema acqua/Triton X-100 1% (p/p) ha consentito la costruzione di diagrammi di fase completi, evidenziando il ruolo determinante della forza ionica e della natura del co-solvente sulla temperatura di *Cloud Point* (TCP). L'aggiunta di cloruro di sodio ha confermato l'efficacia dell'effetto di *salting-out*, inducendo un abbassamento progressivo della TCP. La TCP è stata ottenuta mediante l'integrazione di due tecniche: monitoraggio in bagno termostato e analisi mediante DLS, le quali hanno permesso di determinare la TCP per ogni soluzione analizzata, garantendo un'elevata affidabilità dei dati.

L'analisi dell'effetto di quattro alcoli a catena corta (metanolo, etanolo, 1-propanolo e 2-propanolo) ha rivelato una chiara divisione comportamentale: metanolo, etanolo e 2-propanolo agiscono come co-solventi, innalzando la TCP, mentre il 1-propanolo esibisce un comportamento bifasico, fungendo da co-tensioattivo ad elevate forze ioniche e inducendo un abbassamento della temperatura di cloud point. Il confronto tra i due isomeri C<sub>3</sub> ha evidenziato che la tipologia molecolare (catena lineare vs ramificata) costituisca il parametro critico nel determinare la ripartizione dell'alcol tra la fase acquosa e il core micellare. Sulla base di ciò, l'etanolo è stato selezionato come co-solvente ottimale per il protocollo CPE, in virtù del suo effetto prevedibile sulla TCP, dell'eccellente capacità solubilizzante nei confronti della curcumina e della piena compatibilità normativa (classificazione GRAS).

### 5.2 Ottimizzazione del protocollo estrattivo

Lo studio preliminare della solubilità della curcumina ha individuato nella miscela etanolo/acqua 60:40 (v/v) la matrice di riferimento ottimale per la preparazione degli standard e la ridispersione della fase estrattiva. Sono state costruite due curve di calibrazione UV-Vis distinte: in matrice idroalcolica ( $R^2 = 0,9990$ ; pendenza 155,29) e in matrice micellare TX-100/NaCl ( $R^2 = 0,9969$ ; pendenza 138,76). Questo ha portato a evidenziare un ef-

fetto matrice quantificabile (riduzione della sensibilità di circa l'11%) che ha giustificato l'utilizzo di rette di calibrazione specifiche per ciascuna fase.

Lo studio relativo all'influenza della forza ionica sull'efficienza estrattiva, condotto a concentrazioni di NaCl comprese tra 2,0 e 4,5m, ha permesso di identificare nella concentrazione di 3,0m il miglior compromesso operativo. Tale condizione garantisce:

- una TCP pari a circa 30 °C;
- un'efficienza di estrazione ( $E\%$ ) media dell'83% con una deviazione standard di  $\pm 1\%$ ;
- una percentuale di recupero totale ( $R\%$ ) del 90%;
- proprietà reologiche ottimali della fase coacervata, che risulta sufficientemente fluida da consentire prelievi volumetrici agevoli e accurati.

È stato inoltre dimostrato che concentrazioni saline più elevate (4,0–4,5 m), pur fornendo rese di estrazione leggermente superiori (fino al 91%), comportano un aumento della viscosità della fase estrattiva, con conseguente incremento dell'errore sistematico di campionamento. Al contrario, concentrazioni inferiori a 2,5 m si sono rivelate inadeguate, poiché la TCP risultante supera il limite operativo di 35 °C.

### 5.3 Validazione su matrici a complessità crescente

Il protocollo ottimizzato (TX-100 1% p/p, NaCl 3,0 m, centrifugazione a 13 000×g per 45 min a 35 °C) è stato applicato con successo a tre livelli di complessità della matrice:

1. *Standard di curcumina pura*:  $E\% = 83 \pm 1\%$ ;  $R\% = 90\%$ . I dati confermano l'accuratezza e la precisione del metodo in condizioni ideali.
2. *Campione a titolo noto di curcuminoidi* (titolo dichiarato 95%):  $E\% = 80 \pm 7\%$ ;  $R\% = 88\%$ . Il lieve calo della resa e l'aumento della variabilità sono attribuibili alle interferenze di matrice generate dalla presenza contemporanea di curcumina, demetossicurcumina e bisdemetossicurcumina, che tuttavia non compromettono la validità del protocollo.
3. *Integratore alimentare commerciale* (titolo in curcuminoidi 85%):  $E\% = 78 \pm 8\%$ ;  $R\% = 83\%$ . Nonostante l'estrema complessità della formulazione multicomponente (glucosamina, condroitina, MSM, collagene, *Boswellia*), il metodo ha garantito rese del tutto soddisfacenti. Il moderato calo del bilancio di massa è in parte riconducibile al pre-trattamento del campione, durante il quale una frazione minoritaria di curcuminoidi può essere rimasta intrappolata nel precipitato di componenti insolubili in etanolo.

## 5.4 Considerazioni conclusive

In definitiva, il presente studio ha dimostrato che la *Cloud Point Extraction* basata su Triton X-100 e NaCl costituisce una tecnica *green*, rapida, economica e affidabile per la pre-concentrazione e l'analisi quantitativa della curcumina. Il metodo sviluppato soddisfa i requisiti della *Green Analytical Chemistry*: opera in mezzo prevalentemente acquoso, impiega un tensioattivo a basse concentrazioni e un sale inorganico atossico come unici reagenti e consente di lavorare a temperature inferiori a 35°C, preservando l'integrità di analiti termolabili.

Le percentuali di recupero stabilmente superiori all'80% su tutte le matrici analizzate, unite all'elevata riproducibilità del dato analitico, confermano la validità del protocollo proposto come strumento applicabile al controllo qualità di formulazioni farmaceutiche e integratori alimentari contenenti curcuminoidi.

La correlazione tra i diagrammi di fase costruiti nella prima parte del lavoro e le prestazioni estrattive ottenute nella seconda parte evidenzia come la comprensione approfondita del comportamento termodinamico del sistema micellare sia un prerequisito fondamentale per la progettazione razionale di protocolli CPE efficienti e riproducibili.

## 6 Prospettive Future

I risultati ottenuti nel presente lavoro di tesi aprono numerose direzioni di sviluppo, sia sul piano della caratterizzazione del sistema micellare sia su quello dell'applicazione analitica e tecnologica del protocollo di Cloud Point Extraction (CPE).

Come evidenziato nella Sezione 1.3, il Triton X-100 è oggi soggetto a restrizioni normative (Regolamento REACH) a causa della formazione di ottifenoli, interferenti endocrini, durante la sua degradazione ambientale. Sebbene nel presente lavoro il TX-100 sia stato impiegato come tensioattivo di riferimento a causa della sua consolidata letteratura e della sua ampia disponibilità commerciale, una naturale evoluzione del protocollo potrebbe prevedere la sostituzione con tensioattivi non ionici di nuova generazione, maggiormente biodegradabili e privi di gruppi alchilfenolici. I candidati includono i tensioattivi della serie Tween (polisorbati), i glucosidi alchilici e gli alcoli grassi etossilati. La caratterizzazione del comportamento di fase di tali sistemi, secondo la metodologia sviluppata in questo lavoro, consentirebbe di identificare alternative operative pienamente conformi ai principi della *Green Analytical Chemistry*.

La caratterizzazione del sistema multicomponente acqua/TX-100/NaCl/alcol ha fornito una mappa termodinamica dettagliata ma non esaustiva. In particolare, l'analisi del sistema 1-propanolo in assenza di NaCl ha evidenziato discrepanze tra i dati ottenuti mediante bagno termostato e quelli acquisiti via DLS, suggerendo la necessità di ulteriori repliche sperimentali per chiarire il comportamento di fase in queste condizioni. Sarebbe opportuno anche effettuare delle repliche per ogni tipologia di soluzione in modo tale da avere un quadro più completo e robusto. Inoltre, si potrebbe estendere questo studio anche ad altri alcoli, ad esempio a catena lunga, in modo tale da effettuare un confronto completo in ogni direzione.

L'applicazione del protocollo all'integratore alimentare ha evidenziato come il pre-trattamento del campione costituisca un passaggio critico per matrici multicomponente. Sviluppi futuri dovrebbero prevedere l'ottimizzazione di questa fase mediante, ad esempio, l'introduzione di fasi di lavaggio sequenziale del precipitato per massimizzare il recupero dell'analita.

Nel presente lavoro, la quantificazione della curcumina è stata eseguita mediante spettrofotometria UV-Vis, sfruttando la condivisione dello stesso cromoforo da parte dei tre curcuminoidi per esprimere il risultato in *equivalenti di curcumina*. Sebbene questo approccio si sia dimostrato adeguato per le finalità analitiche dello studio, esso non consente

la discriminazione individuale dei singoli curcuminoidi (curcumina, demetossicurcumina e bisdemetossicurcumina). Un significativo avanzamento del metodo consisterebbe nell'accoppiare la fase di pre-concentrazione CPE con una tecnica di separazione cromatografica, quale l'HPLC-UV o l'HPLC-MS.

Il protocollo CPE sviluppato nel presente lavoro non è concettualmente limitato alla sola curcumina. La sua architettura operativa, basata sulla solubilizzazione micellare di analiti lipofili seguita da separazione di fase indotta per *salting-out*, è potenzialmente trasferibile a un'ampia gamma di composti bioattivi caratterizzati da elevata idrofobicità e scarsa solubilità acquosa.

Il protocollo sviluppato è stato validato su scala di laboratorio con volumi dell'ordine dei 100 mL. Una prospettiva di rilevante interesse applicativo è rappresentata dallo *scale-up* del processo per il controllo qualità industriale di integratori alimentari e formulazioni farmaceutiche.

Tra i futuri sviluppi di questo studio, si evidenzia la necessità di ottimizzare il processo di separazione. L'obiettivo è garantire un recupero quantitativo della fase organica/estraente, escludendo il campionamento accidentale della fase acquosa, per evitare contaminazioni che potrebbero alterare i dati sperimentali.

## Riferimenti bibliografici

- [1] F. A. Hansen e S. Pedersen-Bjergaard. «Emerging Extraction Strategies in Analytical Chemistry». In: *Analytical Chemistry* 92.1 (2020), pp. 2–15. DOI: 10.1021/acs.analchem.9b04677.
- [2] M. Moradi. «Surfactant roles in modern sample preparation techniques: A review». In: *Journal of Separation Science* (2012). Accesso: 08 Feb. 2026. DOI: 10.1002/jssc.201200368.
- [3] W. R. Melchert e F. R. P. Rocha. «Cloud point extraction in flow-based systems». In: *Reviews in Analytical Chemistry* 35.2 (2016), pp. 41–52. DOI: 10.1515/revac-2015-0022.
- [4] S. Mandal e S. Lahiri. «A review on extraction, preconcentration and speciation of metal ions by sustainable cloud point extraction». In: *Microchemical Journal* 175 (2022), p. 107150. DOI: 10.1016/j.microc.2021.107150.
- [5] Milton J. Rosen e Joy T. Kunjappu. *Surfactants and Interfacial Phenomena*. 4th. John Wiley & Sons, Ltd, 2012. DOI: 10.1002/9781118228920.
- [6] Milton J. Rosen e Joy T. Kunjappu. «Micelle Formation by Surfactants». In: *Surfactants and Interfacial Phenomena*. John Wiley & Sons, Ltd, 2012, pp. 123–201. DOI: 10.1002/9781118228920.ch3.
- [7] Shivpoojan Kori. «Cloud point extraction coupled with back extraction: a green methodology in analytical chemistry». en. In: *Forensic Sciences Research* 6.1 (gen. 2021), pp. 19–33. ISSN: 2096-1790, 2471-1411. DOI: 10.1080/20961790.2019.1643567. URL: <https://academic.oup.com/fsr/article/6/1/19-33/6802631>.
- [8] P. Samaddar e K. Sen. «Cloud point extraction: A sustainable method of elemental preconcentration and speciation». In: *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 20.4 (2014), pp. 1209–1219. DOI: 10.1016/j.jiec.2013.10.033.
- [9] Sharmin Akhter Maya et al. «Assessment of clouding behaviour and physico-chemical parameters of triton X-100 and metformin hydrochloride drug mixture: Understanding the impacts of hydrotropic compounds». In: *Journal of the Indian Chemical Society* 102.3 (mar. 2025), p. 101608. ISSN: 0019-4522. DOI: 10.1016/j.jics.2025.101608. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0019452225000433>.

- [10] Sharmin Akhter Maya et al. «Impacts of Short-Chain Alcohols on the Cloudy Development and Thermodynamics of Triton X-100 and Metformin Hydrochloride Drug Mixture». en. In: *Journal of Solution Chemistry* 53.11 (nov. 2024), pp. 1527–1543. ISSN: 1572-8927. DOI: 10.1007/s10953-024-01391-7. URL: <https://doi.org/10.1007/s10953-024-01391-7>.
- [11] A. S. Sadaghiani e A. Khan. «Clouding of a nonionic surfactant: The effect of added surfactants on the cloud point». In: *Journal of Colloid and Interface Science* 144.1 (1991), pp. 191–200. DOI: 10.1016/0021-9797(91)90250-C.
- [12] G. Teymoornejad e M. Jabbari. «Thermodynamic insights into phase behavior a new aqueous two-phase system at different temperatures: Experimental equilibria, data correlation and modeling». In: *Journal of Molecular Liquids* 375 (2023), p. 121282. DOI: 10.1016/j.molliq.2023.121282.
- [13] T. Gu e P. A. Galera-Gómez. «The effect of different alcohols and other polar organic additives on the cloud point of Triton X-100 in water». In: *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 147.3 (1999), pp. 365–370. DOI: 10.1016/S0927-7757(98)00710-9.
- [14] R. Zana. «Aqueous surfactant-alcohol systems: A review». In: *Advances in Colloid and Interface Science* 57 (1995), pp. 1–64. DOI: 10.1016/0001-8686(95)00235-I.
- [15] M. A. R. Khan et al. «Effect of Various Electrolytes on the Phase Separation and Thermodynamic Properties of p-Tert-Alkylphenoxy Poly (Oxyethylene) Ether in the Absence/Presence of Drugs». In: *Journal of Surfactants and Detergents* 22.3 (2019), pp. 613–623. DOI: 10.1002/jsde.12248.
- [16] W. I. Mortada. «Recent developments and applications of cloud point extraction: A critical review». In: *Microchemical Journal* 157 (2020), p. 105055. DOI: 10.1016/j.microc.2020.105055.
- [17] M. Llompart, M. Celeiro e T. Dagnac. «Microwave-assisted extraction of pharmaceuticals, personal care products and industrial contaminants in the environment». In: *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 116 (2019), pp. 136–150. DOI: 10.1016/j.trac.2019.04.029.
- [18] H. Tani, T. Kamidate e H. Watanabe. «Micelle-mediated extraction». In: *Journal of Chromatography A* (1997). Riferimento bibliografico [15].
- [19] V. Varchenko. «Clouding of Triton X-100 solutions in the presence of resorcinol or  $\beta$ -naphthol and their application for mercury cloud point extraction». In: (2024).

- [20] Kathryn M. Nelson et al. «The Essential Medicinal Chemistry of Curcumin: Mini-perspective». en. In: *Journal of Medicinal Chemistry* 60.5 (mar. 2017), pp. 1620–1637. ISSN: 0022-2623, 1520-4804. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.6b00975. URL: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jmedchem.6b00975>.
- [21] M. Mohajeri, M. Rezaee e A. Sahebkar. «Cadmium-induced toxicity is rescued by curcumin: A review». In: *BioFactors* 43.5 (2017), pp. 645–661. DOI: 10.1002/biof.1376.
- [22] M. Mohajeri et al. «Curcumin: a phytochemical modulator of estrogens and androgens in tumors of the reproductive system». In: *Pharmacological Research* 156 (2020), p. 104765. DOI: 10.1016/j.phrs.2020.104765.
- [23] M. Mohajeri et al. «Curcumin as a Natural Therapeutic Agent: A Rapid Review of Potential Clinical Uses and Mechanisms of Action». In: *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 24.1 (2025). DOI: 10.5812/ijpr-156983.
- [24] S. K. Sandur et al. «Role of pro-oxidants and antioxidants in the anti-inflammatory and apoptotic effects of curcumin (diferuloylmethane)». In: *Free Radical Biology and Medicine* 43.4 (2007), pp. 568–580. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.05.009.
- [25] J. Z. Pedersen et al. «Antioxidant activity of 4-methylcoumarins». In: *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 59.12 (2007), pp. 1721–1728. DOI: 10.1211/jpp.59.12.0015.
- [26] H. Mirzaei et al. «Anti-Cancer Activity of Curcumin on Multiple Myeloma». In: *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* 21.5 (2021), pp. 575–586. DOI: 10.2174/1871520620666200918113625.
- [27] A. Monroy, G. J. Lithgow e S. Alavez. «Curcumin and neurodegenerative diseases». In: *BioFactors* 39.1 (2013), pp. 122–132. DOI: 10.1002/biof.1063.
- [28] Y. Cao, C. Ji e L. Lu. «Mesenchymal stem cell therapy for liver fibrosis/cirrhosis». In: *Annals of Translational Medicine* 8.8 (2020), p. 562. DOI: 10.21037/atm.2020.02.119.
- [29] M. Nouri-Vaskeh et al. «Effect of curcumin supplementation on disease severity in patients with liver cirrhosis: A randomized controlled trial». In: *Phytotherapy Research* 34.6 (2020), pp. 1446–1454. DOI: 10.1002/ptr.6620.
- [30] R. L. Thangapazham, A. Sharma e R. K. Maheshwari. «Beneficial Role of Curcumin in Skin Diseases». In: *The Molecular Targets and Therapeutic Uses of Curcumin in Health and Disease*. A cura di B. B. Aggarwal, Y.-J. Surh e S. Shishodia. Springer US, 2007, pp. 343–357. DOI: 10.1007/978-0-387-46401-5\_15.

- [31] Nomula Mamatha Vardhini. «Purification and characterization of pure curcumin, desmethoxycurcumin, and bisdemethoxycurcumin from North-East India Lakadong turmeric ( *Curcuma longa* )». en. In: *Journal of Chromatography A* ().



## Ringraziamenti

Vorrei esprimere la mia più sincera gratitudine alla mia Relatrice, la *Professoressa Chiara Milanese*. Grazie per avermi guidata con pazienza e dedizione, e per aver trasformato questo periodo di tesi in un'esperienza così speciale. La ringrazio per la fiducia che mi ha accordato, permettendomi di imparare, migliorare e crescere attraverso questo progetto, a cui ho cercato di dedicarmi nel migliore dei modi.

Un sentito ringraziamento va anche al *Professore Yuri Antonio Diaz Fernandez*, per avermi accolta nel suo laboratorio e per avermi dato la bellissima opportunità di contribuire attivamente a una parte delle affascinanti ricerche in corso.

Infine, un abbraccio e un grazie speciale a Emanuele, Vittorio, Sara, Marzia, Laura, Serena e a tutti i dottorandi, post-dottorandi e tesisti che mi hanno affiancata. Grazie per avermi fatta sentire subito a casa e per non avermi mai fatto pesare la mia inesperienza in un ambiente così denso di sapere. Avete riempito di gioia e di ottima compagnia questi mesi, rendendo davvero speciale ogni mia singola giornata in laboratorio.