



DIPARTIMENTO DI SCIENZE E INNOVAZIONE TECNOLOGICA

Corso di Laurea Magistrale in Scienze Chimiche

Classe LM-54

**Sviluppo e validazione di un metodo HPLC-DAD per la
caratterizzazione di estratti polifenolici da scarti
agroalimentari**

Relatrice:

Prof.ssa Valentina Gianotti

Correlatrici:

Dott.ssa Marysol Ferretti

Dott.ssa Mariachiara Lo Scalzo

Candidato:

Matteo Piccinini

Anno accademico 2025/2026

SOMMARIO

1.	introduzione.....	1
1.1	Green Chemistry e progetto NINSOLA.....	1
1.2	I polifenoli	2
1.2.1	Definizione e classificazione strutturale.....	2
1.2.2	Proprietà chimico-fisiche: solubilità e assorbimento nell'UV	7
1.2.3	Attività antiossidante	7
1.2.4	Presenza in natura e nelle matrici di scarto: gusci di nocciole.....	8
1.2.5	Applicazioni.....	9
1.2.6	Obiettivi del progetto.....	10
2.	Parte teorica.....	10
2.1	Metodi di estrazione “green” dei polifenoli	10
2.2	Stato dell'arte delle tecniche cromatografiche per l'analisi di polifenoli 12	
2.3	HPLC (High Performance Liquid Chromatography).....	12
2.3.1	Valvola d'iniezione a 6 vie	15
2.3.2	Colonna Core-Shell	17
2.3.3	Rivelatore a serie di diodi DAD (Diode Array Detector).....	18
2.4	Analiti	19
2.4.1	Standard interno.....	40
2.5	Validazione del metodo analitico	41
2.5.1	Linearità.....	41
2.5.1.1	ANOVA (Analisi della varianza).....	42
2.5.2	Limite di rilevabilità (LOD)	45
2.5.3	Limite di quantificazione (LOQ).....	46

2.5.4	Ripetibilità (precisione intra-day).....	46
3.	Parte sperimentale	47
3.1	Materiali e metodi.....	47
3.1.1	Materiali.....	47
3.1.2	Strumentazione	49
3.1.3	Metodo cromatografico	50
3.1.4	Preparazione soluzioni standard	52
3.1.5	Preparazione campioni	53
3.1.6	Saggio di Folin-Ciocalteu.....	54
4.	Risultati e discussione	55
4.1	Sviluppo e ottimizzazione del metodo	55
4.2	Validazione del metodo	59
4.2.1	Linearità e analisi statistica	59
4.2.2	LOD e LOQ	61
4.2.3	Ripetibilità	61
4.3	Metodo cromatografico applicato a campioni reali.....	62
4.3.1	Quantificazione in estratti acquosi	63
4.3.2	Semiquantificazione in estratto DES.....	65
4.4	Metodo di Folin-Ciocalteu applicato a campioni reali.....	66
5.	CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE	68
5.1	Conclusioni.....	68
5.2	Prospettive future.....	69
	APPENDICE A	70
	bibliografia	89

1. INTRODUZIONE

1.1 Green Chemistry e progetto NINSOLA

L'evoluzione industriale e il costante progresso tecnologico hanno radicalmente trasformato lo stile di vita della società moderna, sollevando tuttavia profonde e urgenti preoccupazioni di natura ambientale. L'esaurimento delle risorse naturali non rinnovabili, l'accumulo di gas serra in atmosfera e la contaminazione degli ecosistemi acquatici e terrestri [1,2] hanno reso imprescindibile l'adozione di un modello di sviluppo sostenibile [3]. Tale approccio mira a soddisfare i bisogni delle generazioni presenti senza compromettere la capacità di quelle future di rispondere ai propri [4].

In questo scenario globale si inseriscono i principi della Green Chemistry (Chimica Verde), un paradigma scientifico e industriale che si propone di progettare prodotti e processi chimici innovativi riducendo o eliminando l'uso e la generazione di sostanze pericolose per la salute umana e per l'ambiente [5]. La Green Chemistry promuove l'efficienza energetica, l'impiego di solventi ecocompatibili e soprattutto l'utilizzo di materie prime rinnovabili, favorendo la transizione da un'economia lineare a un'economia circolare [6].

Un pilastro fondamentale dell'economia circolare è rappresentato dalla valorizzazione dei sottoprodotti e degli scarti dell'industria agroalimentare. Annualmente, le filiere alimentari generano ingenti volumi di residui che, sebbene tradizionalmente gestiti come rifiuti da smaltire o bruciare con conseguente impatto ambientale, costituiscono in realtà preziose “materie prime seconde” [7]. La biomassa di scarto è infatti ricca di composti bioattivi ad alto valore aggiunto, quali polimeri strutturali (lignina) e molecole antiossidanti (polifenoli), il cui recupero risponde alla crescente domanda di ingredienti naturali da parte dei settori cosmetico, farmaceutico e nutraceutico [8].

Nell'ambito della valorizzazione delle biomasse locali si colloca il progetto NINSOLA (*filiera sosteNibile della Nocciola piemontese e dei suoi SOttoprodotti*

di Lavorazione) [9], un'iniziativa che mira a massimizzare la sostenibilità della filiera corilicola attraverso il riutilizzo di cortecce, foglie, perisperma e gusci. Questi sottoprodotti, sebbene storicamente privi di valore economico, racchiudono una matrice complessa da cui è possibile estrarre composti fenolici di eccezionale interesse per le loro proprietà antiossidanti, antimicrobiche e protettive [10,11].



Figura 1.1 Logo della Regione Piemonte, ente finanziatore del progetto



Figura 1.2 Logo del progetto NINSOLA (Filiera sostenibile della Nocciola piemontese e dei suoi Sottoprodotti di Lavorazione)

1.2 I polifenoli

1.2.1 Definizione e classificazione strutturale

I polifenoli costituiscono un gruppo vasto ed eterogeneo di sostanze naturali prodotte dal regno vegetale, all'interno del quale operano come metaboliti secondari [12]. A differenza dei metaboliti primari (quali proteine, lipidi e carboidrati), queste molecole non sono direttamente implicate nei processi vitali fondamentali come la crescita o la replicazione cellulare. Esse operano invece come sofisticati strumenti di interazione e difesa: proteggono la pianta dagli stress biotici (infezioni fungine, attacchi batterici o erbivori) e abiotici (radiazioni ultraviolette, stress idrici o termici), oltre a fungere da pigmenti per l'attrazione degli impollinatori [13,14,15].

Dal punto di vista chimico sono caratterizzati dalla presenza di almeno una struttura fenolica (*Figura 1.3*), definita dall'esistenza di uno o più anelli benzenici (aromatici) legati a uno o più gruppi ossidrilici (-OH).

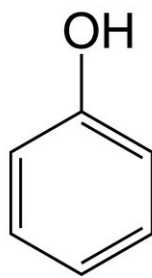


Figura 1.3 Struttura chimica del fenolo, costituente l'unità aromatica fondamentale e la base strutturale minima dei composti polifenolici.

Il vasto numero e l'ampia varietà dei polifenoli in natura hanno portato a diversi modi di classificare questi composti (figura 1.4). Essi possono essere classificati in base alla loro fonte d'origine, distribuzione naturale, funzione biologica e struttura chimica.

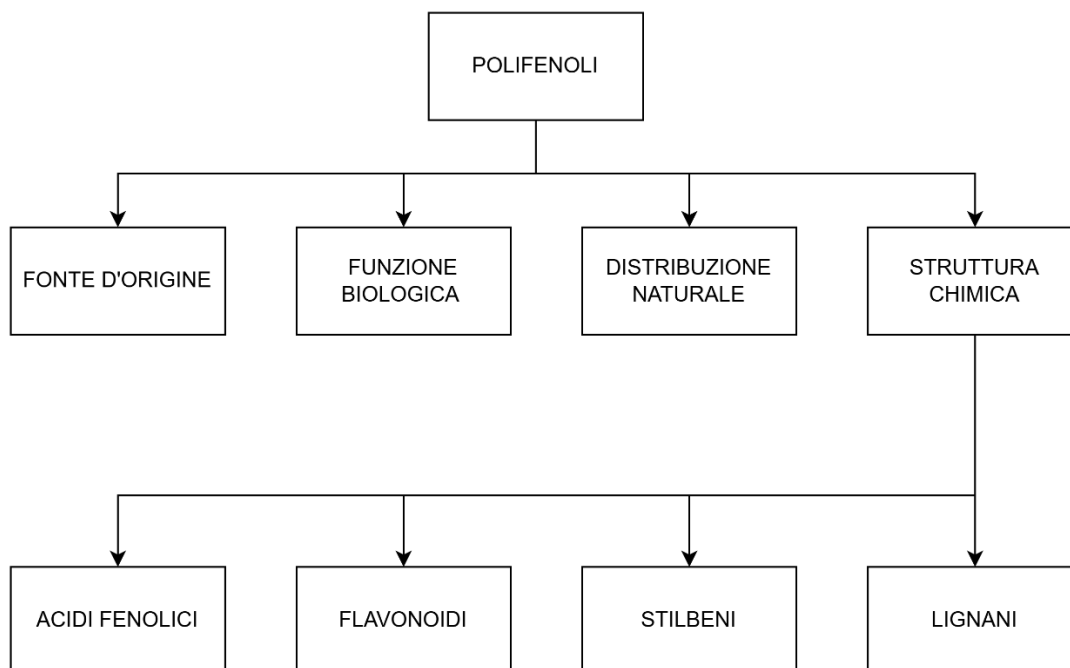


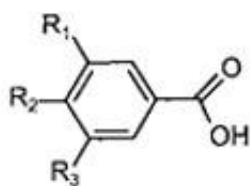
Figura 1.4 Rappresentazione schematica dei parametri di classificazione dei polifenoli

A tal proposito, Manach et. al [13] propongono una classificazione in funzione del numero di anelli fenolici presenti nella molecola e degli elementi strutturali che li connettono tra di loro.

I polifenoli possono quindi essere quindi distinti principalmente in 4 classi (Figura 1.5):

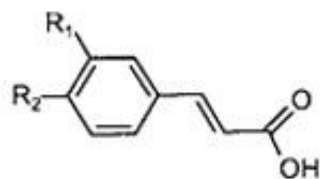
- Acidi fenolici: divisi a loro volta in acidi idrossibenzoici (struttura C₆-C₁, come l'acido gallico ed ellagico) e acidi idrossicinnamici (struttura C₆-C₃, come l'acido caffeico, ferulico e p-coumarico).
- Flavonoidi: la classe più abbondante, caratterizzata da uno scheletro carbonioso a 15 atomi di carbonio configurato come C₆-C₃-C₆, in cui due anelli aromatici sono uniti da un eterociclo a tre atomi di carbonio. In base allo stato di ossidazione e alla geometria, si distinguono in flavonoli, flavoni, isoflavoni, flavanoni, antocianidine e flavanoli (*Figura 1.6*).
- Stilbeni: contenenti una struttura a 14 atomi di carbonio (C₆-C₂-C₆) basata sul nucleo dell'1,2-difeniletilene, il cui esponente più noto è il resveratrolo.
- Lignani: polimeri o dimeri originati dall'accoppiamento ossidativo di unità fenilpropanoidiche (C₆-C₃) [16,17].

Hydroxybenzoic acids



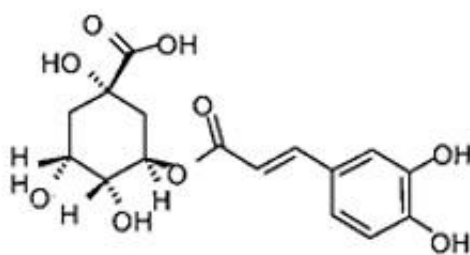
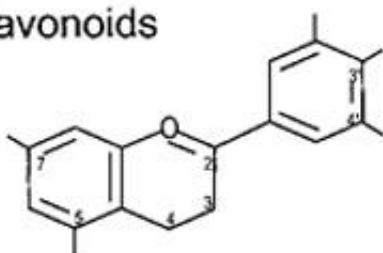
$R_1 = R_2 = OH, R_3 = H$: Protocatechuic acid
 $R_1 = R_2 = R_3 = OH$: Gallic acid

Hydroxycinnamic acids



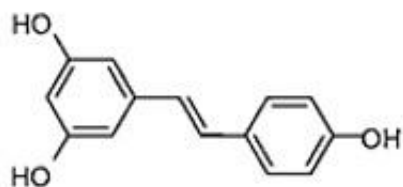
$R_1 = OH$: Coumaric acid
 $R_1 = R_2 = OH$: Caffeic acid
 $R_1 = OCH_3, R_2 = OH$: Ferulic acid

Flavonoids



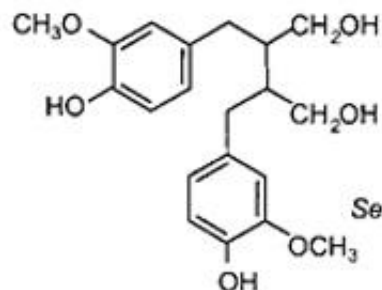
Chlorogenic acid

Stilbenes



Resveratrol

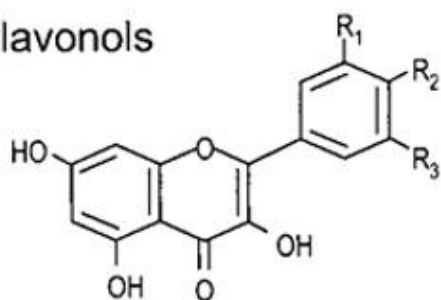
Lignans



Secoisolariciresinol

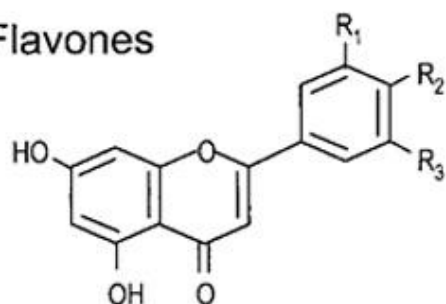
Figura 1.5 Classificazione strutturale dei polifenoli

Flavonols



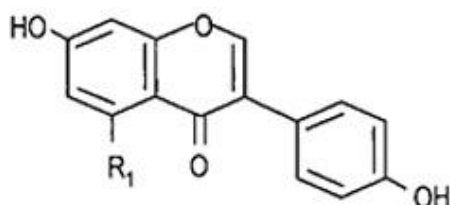
$R_2 = OH; R_1 = R_3 = H$: Kaempferol
 $R_1 = R_2 = OH; R_3 = H$: Quercetin
 $R_1 = R_2 = R_3 = OH$: Myricetin

Flavones



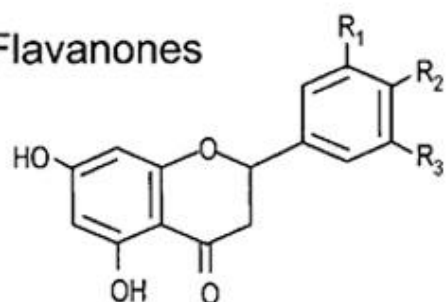
$R_1 = H; R_2 = OH$: Apigenin
 $R_1 = R_2 = OH$: Luteolin

Isoflavones



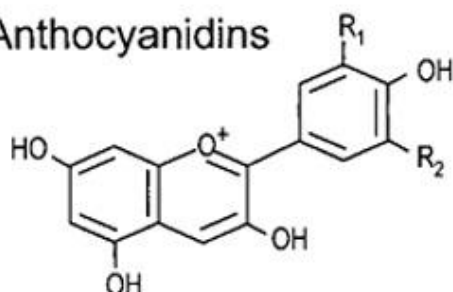
$R_1 = H$: Daidzein
 $R_1 = OH$: Genistein

Flavanones



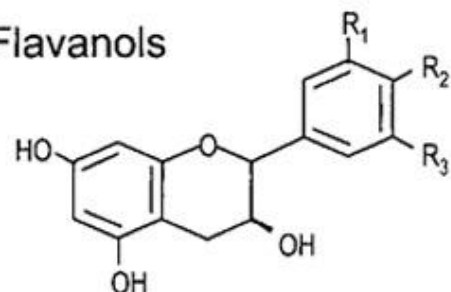
$R_1 = H; R_2 = OH$: Naringenin
 $R_1 = R_2 = OH$: Eriodictyol
 $R_1 = OH; R_2 = OCH_3$: Hesperetin

Anthocyanidins



$R_1 = R_2 = H$: Pelargonidin
 $R_1 = OH; R_2 = H$: Cyanidin
 $R_1 = R_2 = OH$: Delphinidin
 $R_1 = OCH_3; R_2 = OH$: Petunidin
 $R_1 = R_2 = OCH_3$: Malvidin

Flavanols



$R_1 = R_2 = OH; R_3 = H$: Catechins
 $R_1 = R_2 = R_3 = OH$: Gallocatechin

Figura 1.6 Classificazione strutturale dei flavonoidi

1.2.2 Proprietà chimico-fisiche: solubilità e assorbimento nell'UV

In linea generale, i composti fenolici mostrano una buona solubilità nei solventi organici polari, proprietà che viene meno soltanto quando le molecole subiscono modificazioni strutturali complete, quali processi di esterificazione, eterificazione o glicosilazione. Per quanto riguarda il comportamento in ambiente acquoso, la presenza di porzioni zuccherine nei glicosidi fenolici garantisce un'elevata idrosolubilità, che risulta invece ridotta nelle rispettive forme libere, prive di zuccheri (agliconi). Salvo rare eccezioni, la capacità di questi composti di sciogliersi in acqua è direttamente proporzionale al numero di gruppi ossidrilici presenti nella loro struttura molecolare [14].

Riguardo l'interazione con la radiazione luminosa, tutti i composti fenolici mostrano un intenso assorbimento nella regione ultravioletta (compresa tra 190 e 400 nm circa), mentre quelli con colorazione intrinseca sono in grado di assorbire anche nella regione del visibile (compresa tra 400 e 800 nm circa). Ciascuna classe di composti fenolici presenta caratteristiche di assorbimento distinte a causa delle diverse strutture; ad esempio, massimi di assorbimento tipici di acidi fenolici e flavonoidi sono presenti tra 270 e 320 nm. Questa capacità di assorbimento nella regione dell'ultravioletto è dovuta alla presenza degli anelli aromatici e all'effetto della coniugazione dei doppi legami all'interno delle molecole. La delocalizzazione degli elettroni π tipica di questi sistemi coniugati consente infatti l'eccitazione elettronica (transizione $\pi \rightarrow \pi^*$) grazie all'energia fornita dai fotoni della radiazione UV [14].

1.2.3 Attività antiossidante

La straordinaria importanza dei polifenoli risiede principalmente nella loro marcata attività antiossidante, una proprietà chimica legata alla loro struttura molecolare. Lo stress ossidativo biologico è causato da un eccesso di radicali liberi, in particolare dalle specie reattive dell'ossigeno (ROS, come il radicale idrossile $\cdot\text{OH}$ o l'anione superossido $\cdot\text{O}_2^-$), molecole instabili dotate di un elettrone spaiato che danneggiano le strutture cellulari (lipidi di membrana, proteine e

filamenti di DNA) [17]. I polifenoli agiscono come efficienti inibitori di questi radicali attraverso due meccanismi chimici principali:

1. Donazione di un atomo di idrogeno: il gruppo ossidrilico fenolico (Ar-OH) cede prontamente un atomo di idrogeno al radicale libero ($\cdot R$), neutralizzandolo (RH).

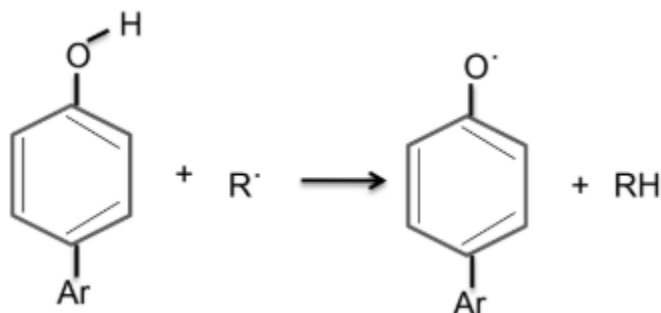


Figura 1.8 Meccanismo HAT (Hydrogen Atom Transfer)

2. Donazione di un singolo elettrone: il polifenolo cede un elettrone al radicale, stabilizzandone la carica.

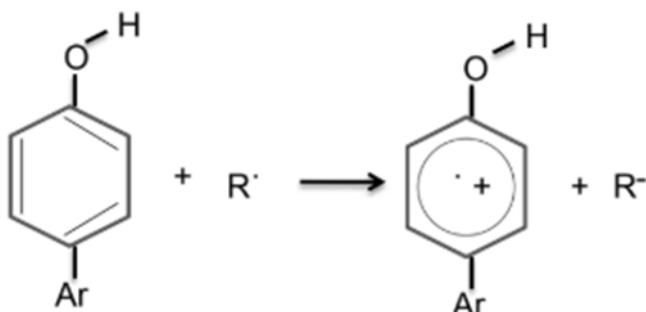


Figura 1.9 Meccanismo SET (Single-Electron Transfer)

Il fattore cruciale che rende i polifenoli così efficaci è che il radicale fenossilico risultante ($ArO^\cdot$) è eccezionalmente stabile e non reattivo. Questa stabilità è dovuta alla delocalizzazione risonante dell'elettrone spaiato lungo tutto l'anello aromatico coniugato [17].

1.2.4 Presenza in natura e nelle matrici di scarto: gusci di nocciole

Sebbene i polifenoli siano ampiamente diffusi nella dieta umana attraverso frutta, verdura, tè, vino e cacao, le concentrazioni più elevate si riscontrano spesso nei

tessuti esterni e protettivi dei vegetali, come le cortecce, i tegumenti e i gusci, dove la necessità di difesa dagli agenti atmosferici e biologici è massima [14].

Nel contesto della valorizzazione degli scarti alimentari locali, i gusci delle nocciole rappresentano matrici legnose di straordinario interesse chimico. Essi costituiscono circa il 50% del peso totale del frutto e sono tradizionalmente considerati un rifiuto industriale a basso valore termico, nonostante la loro struttura complessa racchiuda preziosi acidi fenolici (tra cui acido gallico, caffeico e p-coumarico) e un'elevata frazione di flavonoidi polimerici, come le procianidine, note per il loro eccezionale potere antiossidante e strutturale [11].

Storicamente privi di valore economico e destinati alla combustione o allo smaltimento, questi scarti rappresentano invece delle preziose riserve di molecole bioattive stabili, la cui architettura chimica complessa è difficile e costosa da replicare per via sintetica.

1.2.5 Applicazioni

A livello industriale, si assiste a una crescente domanda da parte dei consumatori per gli ingredienti di origine naturale, che ha spinto le aziende a sostituire gli antiossidanti sintetici con i polifenoli estratti da fonti vegetali. In questo contesto, assume una grande rilevanza la valorizzazione di questi sottoprodotti agro-industriali, i quali si sono rivelati fonti economiche e abbondanti di composti fenolici ad alto valore commerciale [18].

Come già introdotto nel paragrafo 1.1, i polifenoli trovano ampia applicazione in campo farmaceutico; infatti, il loro consumo è associato ad un rischio ridotto di numerose malattie croniche, tra cui il cancro, malattie cardiovascolari e neurodegenerative. Composti come gli acidi fenolici e i flavonoidi mostrano importanti effetti antiallergici, antimicrobici e di contrasto allo stress ossidativo [19].

Sempre grazie alle loro proprietà antiossidanti, i polifenoli trovano ampio utilizzo nel settore cosmetico, per la produzione di cosmetici eco-sostenibili in grado di proteggere la pelle e contrastare l'invecchiamento cutaneo [20].

1.2.6 Obiettivi del progetto

Se l'ottimizzazione dei processi estrattivi (mediante tecnologie green) costituisce la prima fase di questa catena di valorizzazione, il successo dell'intero processo è strettamente vincolato dalla capacità di caratterizzare e quantificare accuratamente le specie chimiche ottenute. È in questa specifica parte che si inserisce il presente lavoro di tesi: una volta estratti i campioni attraverso metodologie ottimizzate a monte del progetto, sorge la necessità di disporre di strumenti analitici robusti, selettivi e validati per monitorare l'efficacia del recupero.

Il cuore di questa ricerca si focalizza quindi sull'ottimizzazione e sulla validazione di un metodo di cromatografia liquida ad alta prestazione accoppiato a un rivelatore a serie di diodi (HPLC-DAD), utilizzato per la separazione e successiva quantificazione dei polifenoli derivanti dagli estratti di gusci di nocciole. Il lavoro analitico svolto non rappresenta quindi un elemento isolato, ma costituisce lo strumento di controllo fondamentale per validare l'intera filiera di recupero, dimostrando come la chimica analitica sia indispensabile per rendere affidabili e riproducibili i processi di valorizzazione del materiale di scarto alimentare.

2. PARTE TEORICA

2.1 Metodi di estrazione “green” dei polifenoli

L'estrazione dei polifenoli da matrici agroalimentari, ed in particolare da sottoprodotti complessi come i gusci di nocciole, rappresenta un passaggio fondamentale e al contempo critico. La complessa natura strutturale e le caratteristiche chimico-fisiche delle matrici vegetali limita fortemente l'accessibilità a questi preziosi composti; è per questo motivo che la ricerca

scientifica si è orientata verso lo sviluppo di metodiche sempre più innovative ed efficienti.

Tradizionalmente, l'isolamento di questi composti avveniva tramite metodiche classiche, come ad esempio la macerazione o l'infusione, caratterizzate da tempi prolungati e dall'impiego di elevate quantità di solventi organici, spesso tossici, infiammabili e non biodegradabili. Al giorno d'oggi, in un'ottica di green chemistry, l'attenzione si è spostata verso tecnologie avanzate capaci di massimizzare la resa estrattiva in tempi ridotti, minimizzando l'impatto ambientale grazie all'uso di soluzioni acquose o di solventi ecocompatibili. Tra le principali tecniche in soluzione acquosa spiccano l'estrazione assistita da ultrasuoni (UAE), l'estrazione assistita da microonde (MAE) e l'estrazione con liquidi pressurizzati (PLE) [8,21].

Parallelamente allo sviluppo di queste tecnologie avanzate in fase acquosa, la chimica verde ha guidato l'introduzione di una nuova generazione di solventi ecocompatibili e biodegradabili: i solventi eutettici profondi “DES” (Deep Eutectic Solvents), la cui applicazione sta ridefinendo i protocolli di recupero dei polifenoli da scarti agroalimentari. Essi sono considerati come analoghi ai liquidi ionici, ma con proprietà diverse. La loro caratteristica principale è che la miscela presenta un punto di fusione unico e minimo (chiamato punto eutettico), che è più basso rispetto ai punti di fusione dei componenti presi singolarmente. A causa di questo abbassamento del punto di fusione, nella maggior parte dei casi i DES si presentano in forma liquida a temperatura ambiente o a temperature inferiori ai 70 °C. Le miscele dei DES sono formate dall'unione di due componenti principali: un accettore di legami ad idrogeno, come ad esempio il cloruro di colina (ChCl); ed un donatore di legami ad idrogeno, come ad esempio l'urea. Oltre ad avere un'elevata biodegradabilità, una tossicità molto bassa e una grande facilità di preparazione, consentono anche un'efficientissima estrazione dei composti fenolici da matrici complesse come quelle agroalimentari [22].

2.2 Stato dell'arte delle tecniche cromatografiche per l'analisi di polifenoli

L'analisi dei polifenoli all'interno di matrici agroalimentari rappresenta una sfida analitica di notevole complessità. Tale complessità deriva dalla grande eterogeneità chimica dei composti (che variano significativamente per polarità, peso molecolare e grado di polimerizzazione), dalla loro suscettibilità alla degradazione ossidativa e termica, e dalle forti interazioni (effetto matrice) che essi stabiliscono con le strutture lignocellulosiche della biomassa di partenza. Per superare queste limitazioni, la chimica analitica moderna ha eletto le tecniche separative e, nello specifico, la cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC), come la tecnica madre per le analisi qualitative e quantitative dei composti fenolici. Rispetto ad altri approcci, l'HPLC offre un'eccellente risoluzione e versatilità, permettendo la separazione simultanea di numerose sottoclassi di analiti all'interno di una singola corsa cromatografica. L'approccio sperimentale prevede l'utilizzo di sistemi in fase inversa (RP-HPLC), dove le fasi stazionarie più impiegate sono quasi esclusivamente colonne a base di silice idrofobica legata con catene alchiliche a diciotto atomi di carbonio (C18). L'eluizione dei composti viene generalmente condotta sfruttando solventi binari in regime di gradiente lineare, dove la fase mobile è tipicamente composta da una fase acquosa fortemente polare e da un solvente organico a polarità inferiore, come acetonitrile o metanolo. Nonostante la letteratura scientifica proponga l'utilizzo di tecniche ad altissima risoluzione, come LC-MS/MS o LC-NMR, l'impiego dell'HPLC con rivelatore ad array di diodi (DAD) rimane un'alternativa robusta, accessibile ed efficiente per il controllo qualità e la quantificazione di routine. [23,24,25]

2.3 HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

La cromatografia Liquida ad Alta Prestazione HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) è una delle tecniche analitiche più utilizzate per la separazione, identificazione e quantificazione di composti non volatili. Il principio si basa sulla diversa affinità che gli analiti hanno rispetto a due fasi distinte: una fase mobile

(solvente o miscela di solventi) e una fase stazionaria (materiale impaccato all'interno della colonna). Ciascun analita impiegherà infatti un tempo caratteristico per attraversare l'intera colonna, definito tempo di ritenzione (t_R); quindi analiti con maggiore affinità per la fase stazionaria saranno maggiormente trattenuti e usciranno dalla colonna a tempi di ritenzione più lunghi, mentre analiti più affini alla fase mobile eluiranno più rapidamente.

L'efficienza di una separazione cromatografica si riferisce alla capacità del sistema di separare i componenti della miscela in modo netto e preciso. Più un sistema cromatografico è efficiente, più i componenti saranno separati con una buona risoluzione, riducendo al minimo il sovrapporsi tra i picchi nel cromatogramma. Questo importantissimo parametro viene stimato attraverso l'altezza equivalente del piatto teorico (HETP, indicata con H). Più è piccolo il valore di H , maggiore è il numero di piatti teorici (N) in relazione alla lunghezza della colonna (L), che si traduce in una migliore efficienza. La relazione che lega queste grandezze tra di loro è la seguente:

$$HETP = \frac{L}{N}$$

Il valore dell'altezza del piatto teorico non è costante, ma varia in funzione delle condizioni operative dell'analisi. In particolare, l'efficienza del sistema risente fortemente della velocità con cui il solvente attraversa la colonna e dei fenomeni diffusivi che subiscono le molecole di soluto durante il percorso (figura 2.1). La relazione tra l'efficienza della colonna e la velocità del flusso (μ) della fase mobile è descritta quantitativamente dall'Equazione di Van Deemter:

$$H = A + \frac{B}{\mu} + C \cdot \mu$$

Dove il termine A si riferisce alla diffusione vorticoso o cammini multipli, B alla diffusione longitudinale e C al trasferimento di massa. [26]

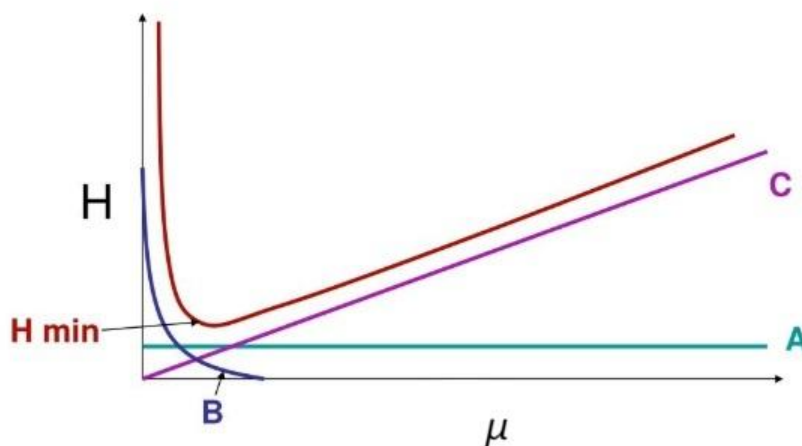


Figura 2.1 Rappresentazione grafica dell'equazione di Van Deemter

Dal punto di vista strumentale il grande vantaggio dell'HPLC risiede nella capacità di operare ad elevate pressioni e flussi costanti, necessità derivante dall'utilizzo di colonne analitiche impaccate con particelle di fase stazionaria estremamente fini (paragrafo 2.3.2). Il piccolo diametro di queste particelle, infatti, genera una fortissima contropressione al passaggio del liquido, che viene superata grazie ai componenti dell'HPLC, progettati appositamente per operare ad alta pressione.

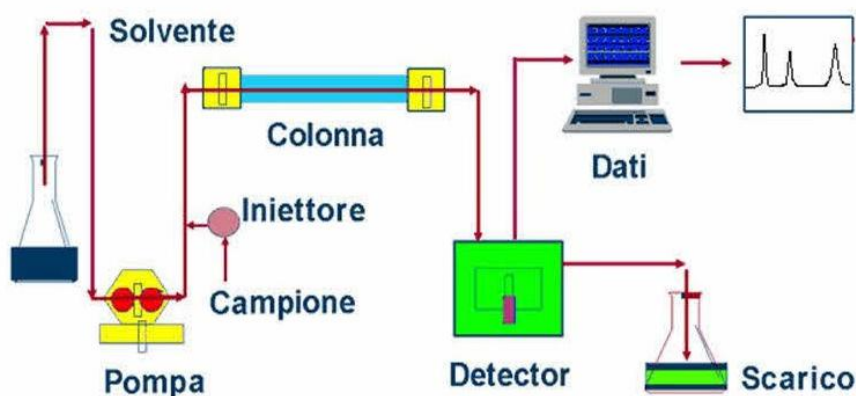


Figura 2.2 Rappresentazione schematica dei componenti di un HPLC

Un comune sistema HPLC (figura 2.2) è generalmente costituito dalle seguenti componenti:

- Vassoio dei solventi: contiene i solventi per la fase mobile, i quali possono essere mantenuti a composizione costante per tutta la durata della corsa

(eluizione isocratica) oppure miscelati in proporzioni variabili nel tempo (eluizione in gradiente). Al fine di evitare l'introduzione di bolle d'aria nel sistema è necessario privare i solventi di tutti i gas disciolti in essi.

- Pompa ad alta pressione: serve a convogliare la fase mobile con un flusso costante.
- Iniettore: è il punto dove il campione viene immesso in colonna senza interrompere il flusso e può essere effettuato tramite autocampionatore o manualmente (paragrafo 2.3.1).
- Colonna cromatografica: è la componente responsabile della separazione degli analiti (2.3.2) ed è riposta in una camera termostata.
- Rivelatore (Detector): è posizionato subito dopo la colonna ed ha il compito di rilevare gli analiti, trasformando le loro proprietà chimico-fisiche in un segnale elettrico (paragrafo 2.3.3).
- Sistema di elaborazione dati: consiste in un software dedicato che elabora il segnale elettrico proveniente dal detector e genera il cromatogramma [27].

2.3.1 Valvola d'iniezione a 6 vie

Nei sistemi HPLC privi di autocampionatore, come nel caso del seguente lavoro, l'introduzione del campione all'interno del sistema avviene manualmente attraverso l'utilizzo di una valvola d'iniezione a sei vie (figura 2.3). Questo dispositivo è fondamentale per garantire la riproducibilità dell'analisi in quanto permette l'inserimento del volume di campione in colonna, evitando drastiche cadute di pressione nel sistema e l'interruzione del flusso della fase mobile; fattori che danneggerebbero la colonna e comprometterebbero la stabilità della linea di base.



Figura 2.3 Valvola di iniezione manuale “Rheodyne” a 6 vie

Il funzionamento dell’iniettore manuale si basa sul “passaggio” tra due modalità, che avviene effettuando una rotazione manuale:

- Caricamento (LOAD) (figura 2.4): il campione viene introdotto con una siringa in un capillare (sample loop) a volume tarato, collegato al capillare di spurgo, mentre il flusso di fase mobile fluisce dalla pompa direttamente alla colonna.

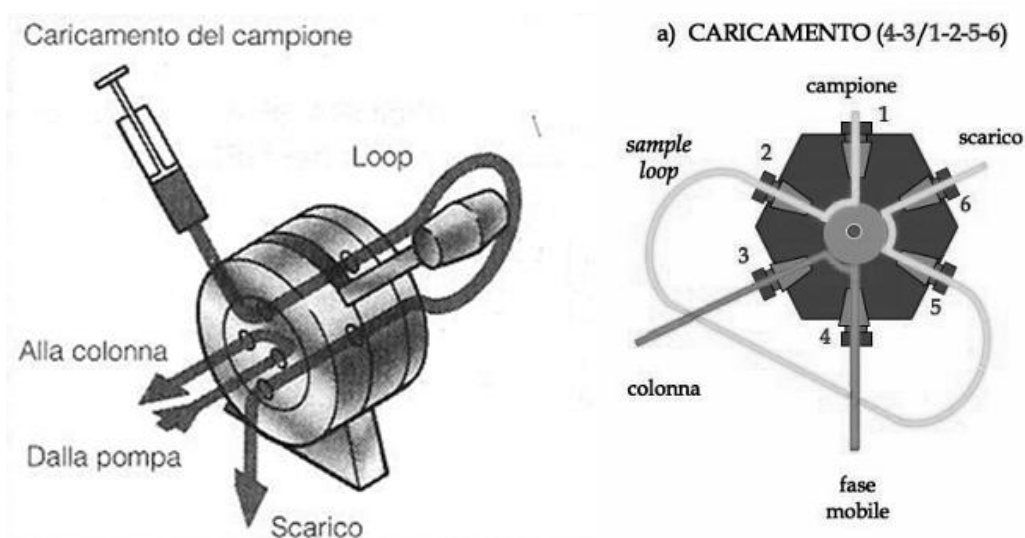


Figura 2.4 Rappresentazione grafica della modalità di caricamento

- Iniezione (INJECT) (figura 2.5): Ruotando la leva, i collegamenti interni cambiano: il sample loop entra in serie con il circuito della fase mobile e il

campione che lo riempie viene “spinto” nella colonna senza interruzione del flusso della fase mobile. Il volume di campione iniettato coincide con il volume del sample loop [27].

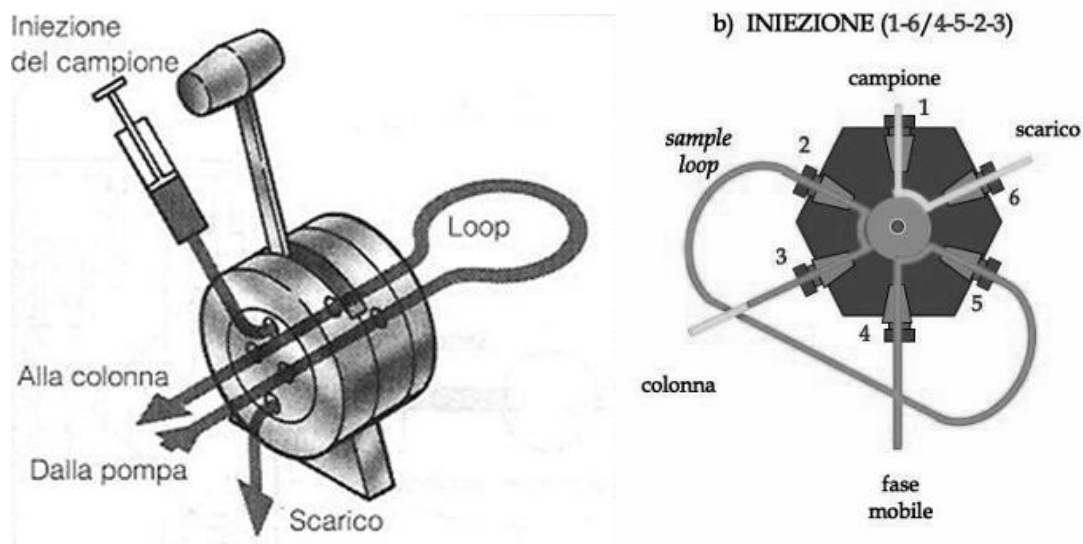


Figura 2.5 Rappresentazione grafica della modalità di iniezione

2.3.2 Colonna Core-Shell

Per lo sviluppo di questo metodo è stata utilizzata una colonna Core-Shell C18 (figura 2.6).



Figura 2.6 Colonna Core-Shell C18

La natura apolare e idrofobica della fase stazionaria permette di lavorare in regime di fase inversa, impiegando una fase mobile acquosa in combinazione con solventi organici polari. La caratteristica che rende uniche queste colonne è la struttura geometrica delle particelle che compongono la fase stazionaria: esse presentano un nucleo solido e impermeabile di silice fusa (Core), rivestito da un guscio esterno poroso (Shell) (figura 2.7) [28].

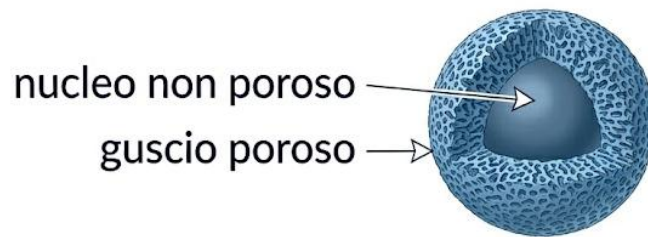


Figura 2.7 Particella Core-Shell

L'utilizzo di queste particelle apporta modifiche significative all'equazione di Van Deemter (paragrafo 2.3), ottimizzando l'efficienza globale del sistema cromatografico minimizzando i principali fattori di allargamento della banda. Il termine “*A*” (diffusione vorticoso e cammini multipli) diminuisce drasticamente grazie all' omogeneità dimensionale delle particelle, che consente un impaccamento regolare della colonna, rendendo i percorsi degli analiti più lineari e di conseguenza stringendo i picchi cromatografici. Allo stesso modo, diminuisce anche il termine “*C*” (trasferimento di massa), in quanto la struttura core-shell confina la diffusione dell'analita al solo guscio poroso superficiale, azzerando l'effetto dei pori profondi e minimizzando il contributo della fase mobile stagnante [29].

Queste colonne consentono quindi di ottenere un incremento del numero di piatti teorici e una maggiore efficienza, che si traduce in una migliore risoluzione, aumento del rapporto segnale/rumore ed elevata sensibilità.

2.3.3 Rivelatore a serie di diodi DAD (Diode Array Detector)

Nel seguente lavoro di tesi è stato utilizzato un rivelatore DAD (*Diode Array Detector*) (figura 2.8), un detector spettrofotometrico UV-Visibile la cui caratteristica fondamentale che lo distingue dai classici rivelatori è la capacità di effettuare un'acquisizione simultanea e continua di tutto lo spettro d'assorbimento in tempo reale. La sorgente luminosa emette un fascio di luce policromatica che attraversa direttamente la cella di flusso in cui scorre l'analita eluito dalla colonna, il quale assorbirà lunghezze d'onda specifiche in base alla sua struttura chimica.

Una volta superata la cella di flusso la radiazione viene scomposta da un policromatore, per poi essere convogliata su un chip a serie di diodi, dove ogni diodo misura una diversa lunghezza d'onda simultaneamente. Questo permette al DAD di catturare un intero spettro di assorbimento in una frazione di secondo: una vera "fotografia istantanea" della composizione della fase mobile in quel preciso istante [27].

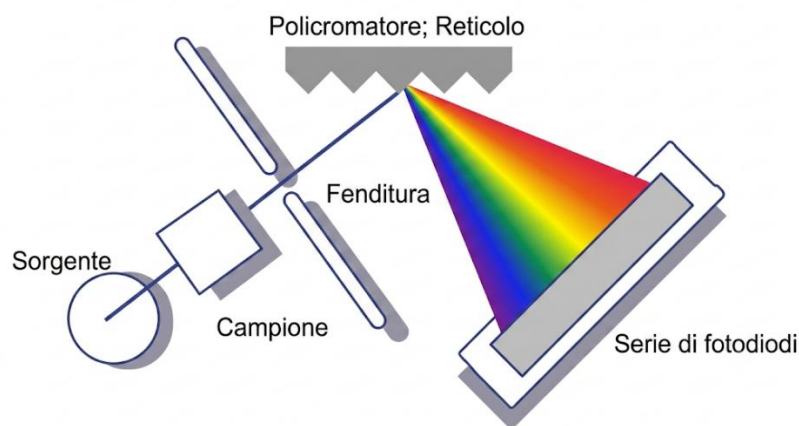


Figura 2.8 Rappresentazione schematica di un rivelatore ad array di diodi (DAD)

L'utilizzo del DAD in questo caso specifico ha portato a molti vantaggi durante l'ottimizzazione del metodo. Esso ha consentito di individuare istantaneamente la lunghezza d'onda massima di assorbimento di ogni analita ed ha permesso di monitorare contemporaneamente più lunghezze d'onda differenti. Essendo infatti gli analiti caratterizzati da massimi di assorbimento diversi, questa tecnologia ha permesso di acquisire contemporaneamente i cromatogrammi alle rispettive lunghezze d'onda di riferimento.

2.4 Analiti

Per la validazione del metodo sono stati scelti 13 standard polifenolici comunemente presenti nelle matrici vegetali, uniti ad uno standard interno utilizzato per il monitoraggio della stabilità del segnale e per l'analisi semiquantitativa.

Nel seguente paragrafo vengono riportate, per ciascuna molecola, le principali proprietà chimico-fisiche e il relativo spettro di assorbimento UV-Vis, registrato

nell'intervallo di lunghezze d'onda compreso tra 190 e 400 nm nel rispettivo solvente di diluizione (paragrafo 3.1). Per la polarità dei composti, in merito alla ritenzione cromatografica, è stato riportato il coefficiente di ripartizione sperimentale “logP” o, in sua assenza, il rispettivo valore computazionale “XlogP3”.

I dati chimico-fisici e strutturali relativi a ciascun analita sono stati ricavati dalla banca dati ufficiale “PubChem” della National Library of Medicine [30] e vengono riportati di seguito:

- Acido gallico

L'acido gallico (noto anche come acido 3,4,5-triidrossibenzoico) (figura 2.9) è un acido fenolico naturale appartenente alla classe degli acidi idrossibenzoici, con formula molecolare $C_7H_6O_5$ e massa molare pari a 170,12 g/mol. Dal punto di vista strutturale, presenta un anello benzenico sostituito da tre gruppi ossidrilici e da un gruppo carbossilico, la cui presenza conferisce alla molecola una spiccata polarità rispetto ad altri composti fenolici meno idrossilati. Il composto si presenta come un solido cristallino di colore bianco o giallognolo, con un punto di fusione compreso tra 210 °C e 240 °C. Dal punto di vista della polarità, il valore di logP pari a 0,7 indica una buona idrofilia, determinando di conseguenza una scarsa ritenzione nelle separazioni cromatografiche in fase inversa.

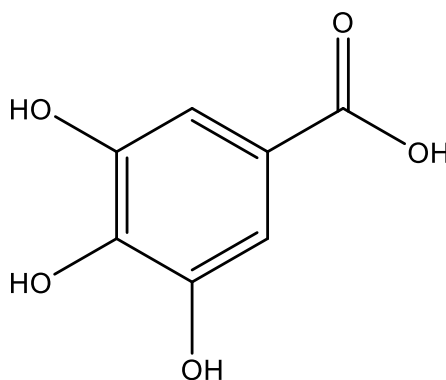


Figura 2.9 Struttura chimica dell'acido gallico

Osservando lo spettro UV-Vis dell'acido gallico (figura 2.10) è possibile notare due picchi distinti: uno a 217 nm, associato alla transizione elettronica $\pi \rightarrow \pi^*$

dell'anello aromatico benzenico; e uno a 272 nm, dovuto alla coniugazione tra gli elettroni del medesimo anello e il gruppo carbossilico.

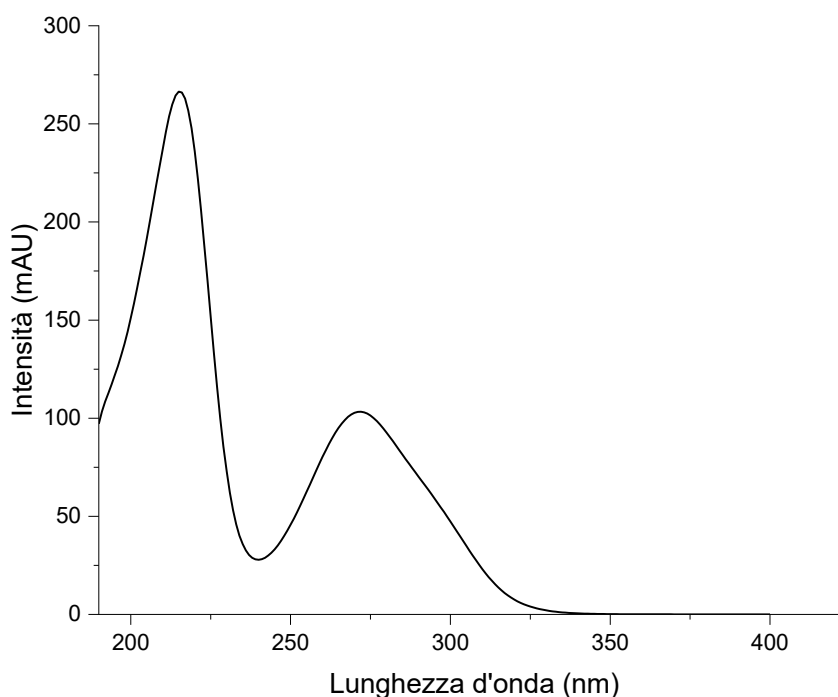


Figura 2.10 Spettro UV-Vis dell'acido gallico

- **Acido caftarico**

L'acido caftarico (noto anche come acido caffeoiltartarico) (figura 2.11) è un acido fenolico naturale appartenente alla classe degli acidi idrossicinnamici, con formula molecolare $C_{13}H_{12}O_9$ e massa molare pari a 312,23 g/mol. Dal punto di vista strutturale, si tratta di un estere fenolico che presenta un anello benzenico diidrossilato legato ad una catena laterale insatura, legata a sua volta a una porzione tartarica ricca di funzioni carbossiliche, che conferisce alla molecola una spiccata polarità e un carattere poliacido. Il composto si presenta come un solido cristallino, con un punto di fusione di circa 125 °C. Dal punto di vista della polarità, il valore di XlogP3 pari a 0,1 indica una forte idrofilia, dovuta alla massiccia presenza di gruppi funzionali idrossilici e carbossilici, determinando una ritenzione estremamente debole e un'eluizione precoce nelle separazioni cromatografiche in fase inversa.

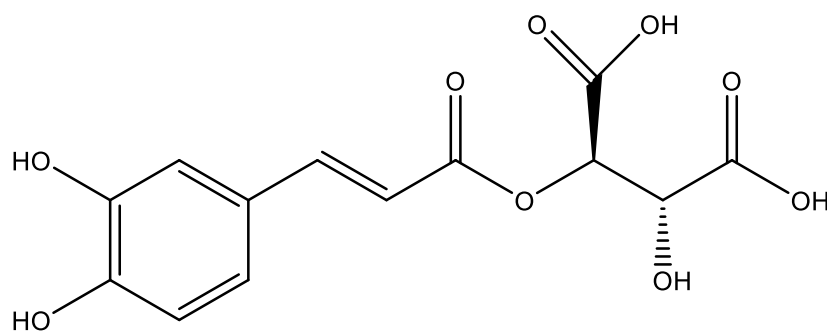


Figura 2.11 Struttura chimica dell'acido caftarico

Osservando lo spettro UV-Vis dell'acido caftarico (figura 2.12) è possibile notare due picchi distinti: uno a circa 217 nm, associato alla transizione elettronica $\pi \rightarrow \pi^*$ dell'anello aromatico benzenico; e uno a circa 327 nm, dovuto alla forte coniugazione tra il medesimo anello e la catena laterale insatura.

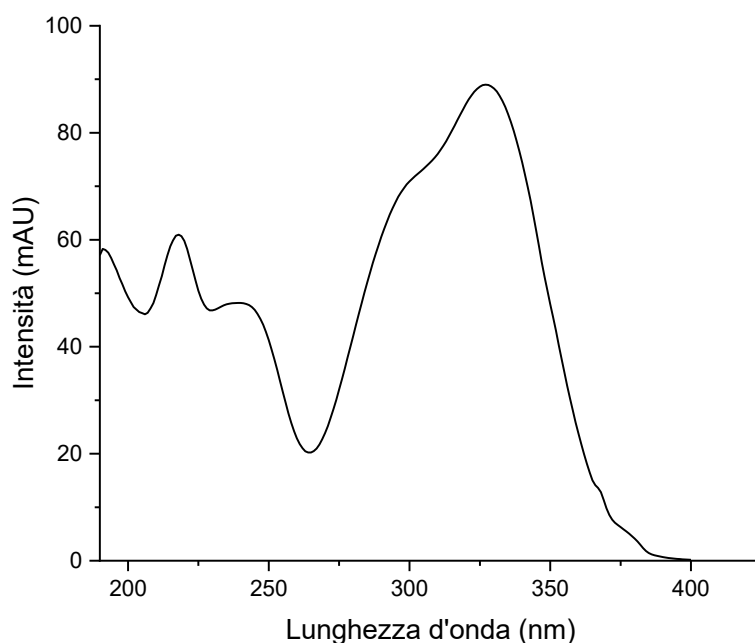


Figura 2.12 Spettro UV-Vis dell'acido caftarico

- Acido protocatecuico

L'acido protocatecuico (noto anche come acido 3,4-diidrossibenzoico) (figura 2.13) è un acido fenolico naturale appartenente alla classe degli acidi idrossibenzoici, con formula molecolare $C_7H_6O_4$ e massa molare pari a 154,12 g/mol. Dal punto di vista strutturale, presenta un anello benzenico sostituito da

due gruppi ossidrilici e da un gruppo carbossilico, che conferiscono una notevole polarità alla molecola. Il composto si presenta come un solido cristallino, contraddistinto da un punto di fusione di circa 221 °C. Dal punto di vista della polarità, il valore di logP pari a 0,86 evidenzia un carattere idrofilo che si traduce in un'eluizione rapida nelle separazioni cromatografiche a fase inversa.

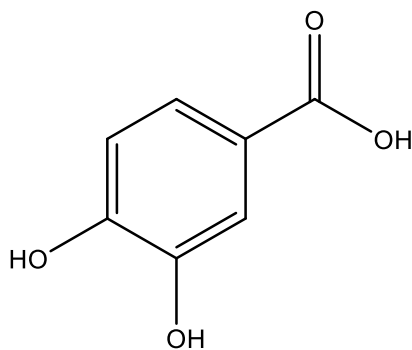


Figura 2.13 Struttura chimica dell'acido protocatecuico

Osservando lo spettro UV-Vis dell'acido protocatecuico (figura 2.14) è possibile notare due picchi distinti: uno a circa 216 nm, associato alla transizione elettronica $\pi \rightarrow \pi^*$ dell'anello aromatico benzenico; e uno a circa 259 nm, dovuto alla coniugazione tra il medesimo anello e il gruppo carbossilico.

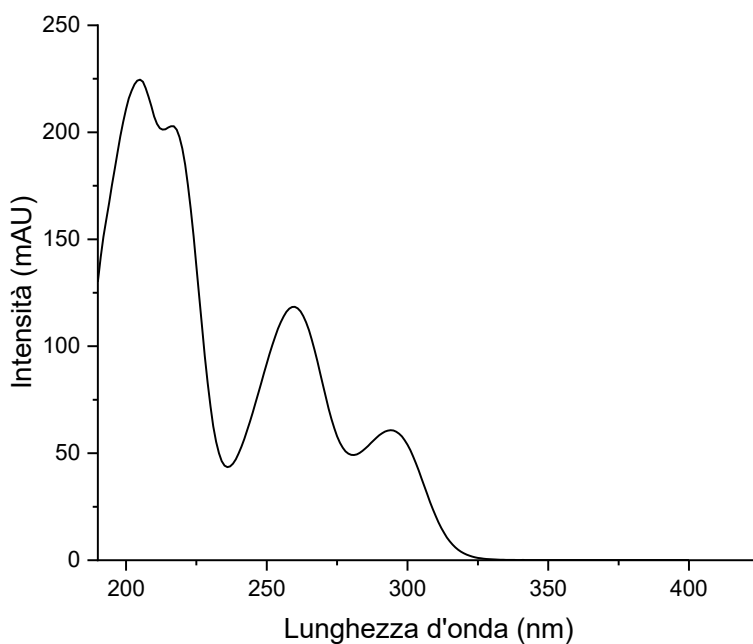


Figura 2.14 Spettro UV-Vis dell'acido protocatecuico

- Catechina

La catechina (nota anche come cianidolo) (figura 2.15) è un composto fenolico appartenente alla classe dei flavonoidi, più precisamente alla sottoclasse dei flavan-3-oli, con formula molecolare $C_{15}H_{14}O_6$ e massa molare pari a 290,27 g/mol. Dal punto di vista strutturale, presenta due anelli aromatici collegati da un eterociclo contenente ossigeno, ai quali sono collegati alcuni gruppi ossidrilici. Il composto si presenta come un solido, contraddistinto da un punto di fusione pari a 214 °C. Dal punto di vista della polarità, il valore di logP pari a 0,51 evidenzia un carattere idrofilo, mitigato però dalla complessità dello scheletro flavanico. Questo si traduce in una ritenzione moderata rispetto ad alcuni acidi fenolici e idrossicinnamici.

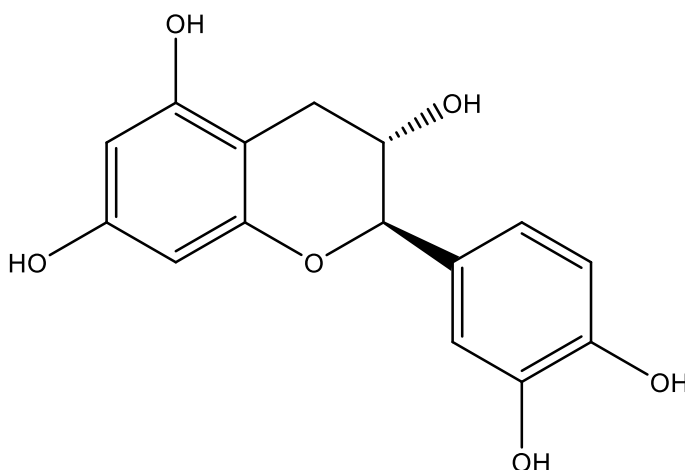


Figura 2.15 Struttura chimica della catechina

Osservando lo spettro UV-Vis della catechina (figura 2.16) è possibile notare due picchi distinti: uno a 210 nm, associato alla transizione $\pi \rightarrow \pi^*$ ad alta energia degli anelli benzenici; e uno a 280 nm dovuto alla transizione $\pi \rightarrow \pi^*$ a minore energia dei medesimi anelli aromatici. La natura non coniugata dello scheletro flavanico agisce isolando questi due sistemi elettronici.

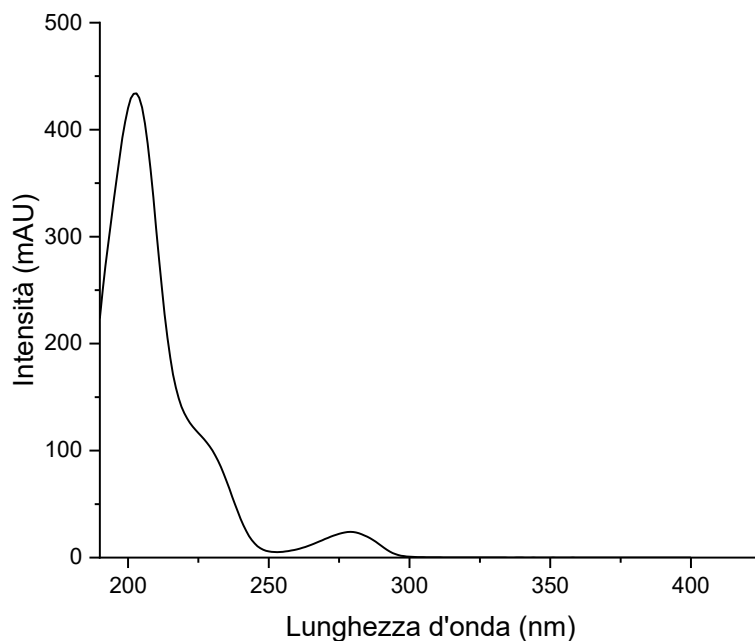


Figura 2.16 Spettro UV-Vis della catechina

- **Acido Caffeico**

L'acido caffeico (noto anche come acido trans-3,4-diidrossicinnamico) (figura 2.17) è un composto fenolico naturale appartenente alla classe degli acidi idrossicinnamici, con formula molecolare $C_9H_8O_4$ e massa molare pari a 180,16 g/mol. Dal punto di vista strutturale, si caratterizza per la presenza di un anello benzenico diidrossilato coniugato a una catena laterale acrilica. Il composto si presenta come un solido cristallino di colore giallo, contraddistinto da un punto di fusione compreso tra 223 °C e 225 °C. Dal punto di vista della polarità, il valore di logP pari a 1,15 evidenzia un carattere idrofilo, che risulta però inferiore rispetto a quello degli acidi idrossibenzoici. L'estensione idrofobica generata dalla catena idrocarburica insatura provoca una ritenzione moderata nelle separazioni a fase inversa.

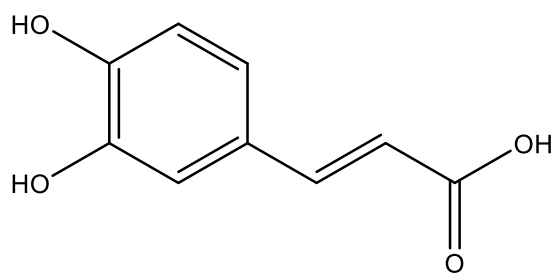


Figura 2.17 Struttura chimica dell'acido caffeico

Osservando lo spettro UV-Vis dell'acido caffeico (figura 2.18) è possibile notare due picchi distinti: uno a circa 218 nm, associato alla transizione elettronica $\pi \rightarrow \pi^*$ dell'anello aromatico benzenico; e uno a circa 326 nm, dovuto alla forte coniugazione tra il medesimo anello e la catena laterale insatura.

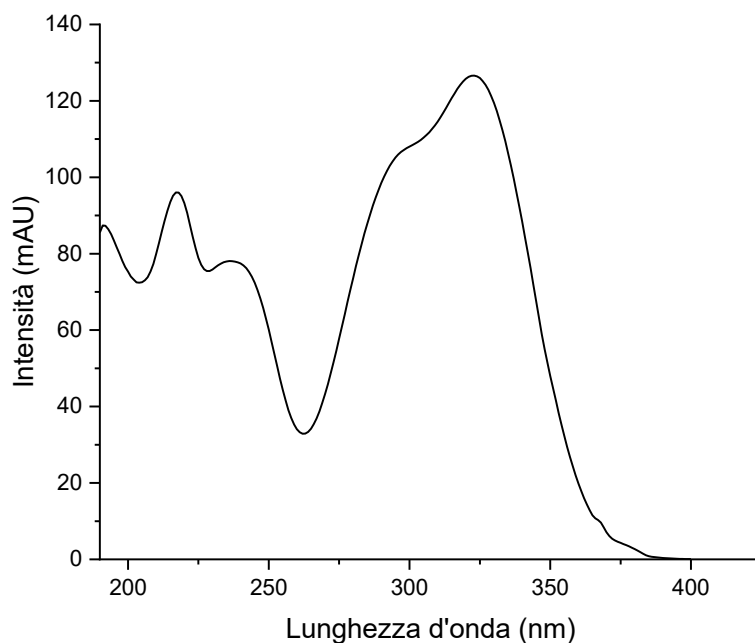


Figura 2.18 Spettro UV-Vis dell'acido caffeico

- Epicatechina

L'epicatechina (figura 2.19) è un composto fenolico appartenente alla classe dei flavonoidi, più precisamente alla sottoclasse dei flavan-3-oli, con formula molecolare $C_{15}H_{14}O_6$ e massa molare pari a 290,27 g/mol. Dal punto di vista strutturale, essa si presenta come l'epimero della catechina, condividendo il medesimo scheletro carbonioso composto da due anelli aromatici collegati da un

eterociclo a sei membri. Il composto si presenta come un solido cristallino, contraddistinto da un punto di fusione pari a 240 °C. Dal punto di vista della polarità, il valore di logP pari a 0,49 conferma un carattere idrofilo. A causa della diversa geometria tridimensionale, l'epicatechina risulta meno idrofila rispetto alla catechina evidenziando una ritenzione moderata nelle separazioni a fase inversa.

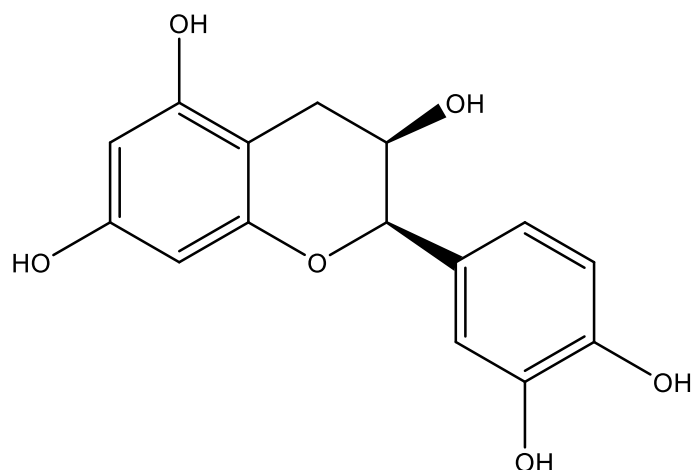


Figura 2.19 Struttura chimica dell'epicatechina

Osservando lo spettro UV-Vis dell'epicatechina (figura 2.20) è possibile notare due picchi distinti: uno a 210 nm, associato alla transizione $\pi \rightarrow \pi^*$ ad alta energia degli anelli benzenici; e uno a 280 nm dovuto alla transizione $\pi \rightarrow \pi^*$ a minore energia dei medesimi anelli aromatici. La natura non coniugata dello scheletro flavanico agisce isolando questi due sistemi elettronici, come nel caso della catechina.

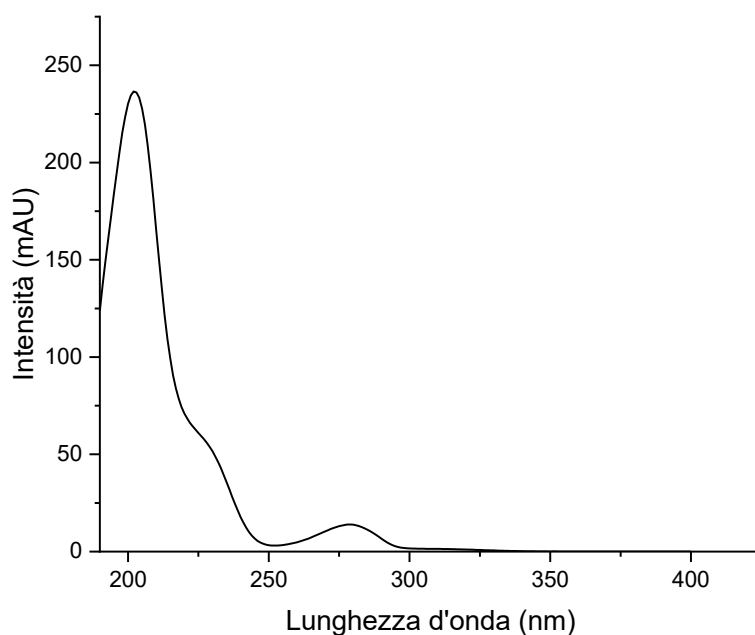


Figura 2.20 Spettro UV-Vis dell'epicatechina

- Acido p-coumarico

L'acido p-coumarico (noto anche come acido trans-4-idrossicinnamico) (figura 2.21) è un composto fenolico naturale appartenente alla classe degli acidi idrossicinnamici, con formula molecolare $C_9H_8O_3$ e massa molare pari a 164,16 g/. Dal punto di vista strutturale è caratterizzato da un anello benzenico, sostituito da un singolo gruppo ossidrilico, coniugato a una catena laterale acrilica. Il composto si presenta come un solido cristallino di colore giallo-verdastro, contraddistinto da un punto di fusione pari a 211,5 °C. Dal punto di vista della polarità, il valore di logP pari a 1,79 evidenzia un carattere significativamente meno idrofilo e più lipofilo rispetto ad altri acidi fenolici corti o maggiormente idrossilati. Questa affinità per gli ambienti apolari si traduce in un'interazione intensa con la fase stazionaria idrofobica, determinando tempi di ritenzione prolungati e un'eluizione tardiva nelle separazioni a fase inversa.

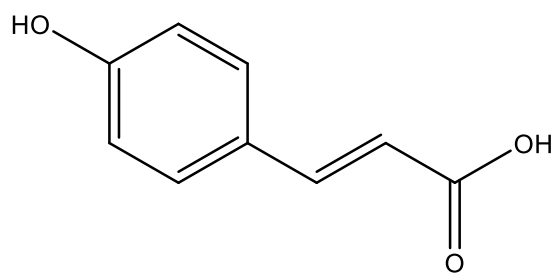


Figura 2.21 Struttura chimica dell'acido *p*-coumarico

Osservando lo spettro UV-Vis dell'acido *p*-coumarico (figura 2.22) è possibile notare due picchi distinti: uno a 225 nm, associato alla transizione $\pi \rightarrow \pi^*$ ad alta energia dell'anello aromatico benzenico; e uno a 310 nm, dovuto alla forte coniugazione tra il medesimo anello e la catena laterale insatura.

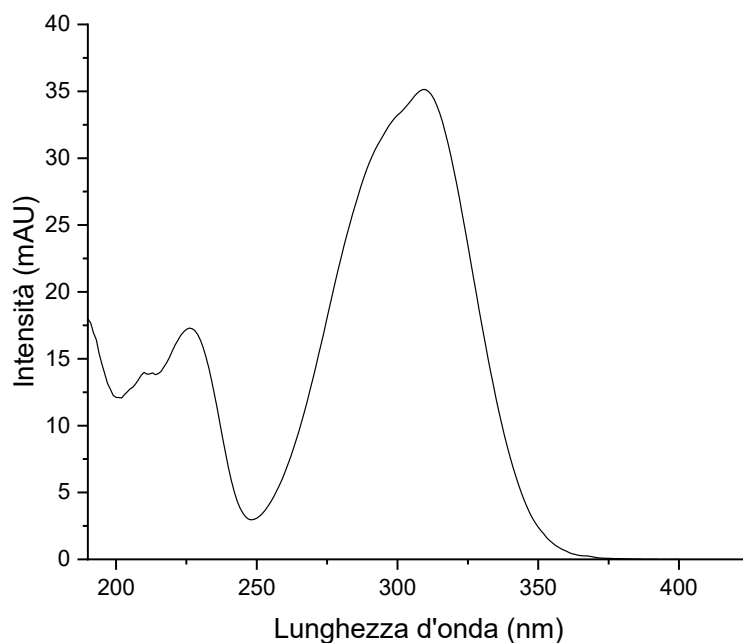


Figura 2.22 Spettro UV-Vis dell'acido *p*-coumarico

- Acido trans-ferulico

L'acido trans-ferulico (noto anche come acido trans-4-idrossi-3-metossicinnamico) (figura 2.23) è un composto fenolico naturale appartenente alla classe degli acidi idrossicinnamici, con formula molecolare $C_{10}H_{10}O_4$ e massa molare pari a 194,18 g/mol. Dal punto di vista strutturale, si presenta come un derivato dell'acido caffeico in cui un ossidrile viene sostituito da un gruppo

metossilico, mentre rimane inalterato il resto della molecola. Il composto si presenta allo stato solido sotto forma di polvere, contraddistinto da un punto di fusione compreso tra 168 °C e 171 °C. Dal punto di vista della polarità, il valore di logP pari a 1,51 evidenzia un carattere lipofilo moderato e superiore rispetto a quello dell'acido caffeico, a causa dell'effetto schermante e idrofobico del gruppo metossilico. Questa affinità per le fasi apolari si traduce in una buona interazione con la fase stazionaria, determinando un'eluizione tardiva nelle separazioni a fase inversa.

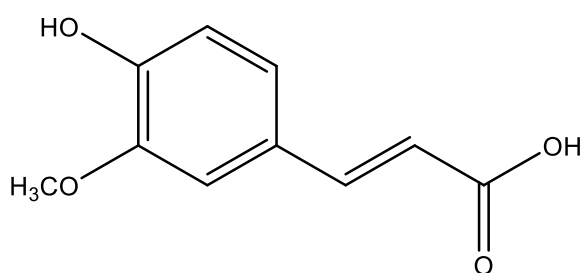


Figura 2.23 Struttura chimica dell'acido trans-ferulico

Osservando lo spettro UV-Vis dell'acido trans-ferulico (figura 2.24) è possibile notare due picchi distinti: uno a circa 218 nm, associato alla transizione elettronica $\pi \rightarrow \pi^*$ dell'anello aromatico benzenico; e uno a circa 326 nm, dovuto alla forte coniugazione tra il medesimo anello e la catena laterale insatura.

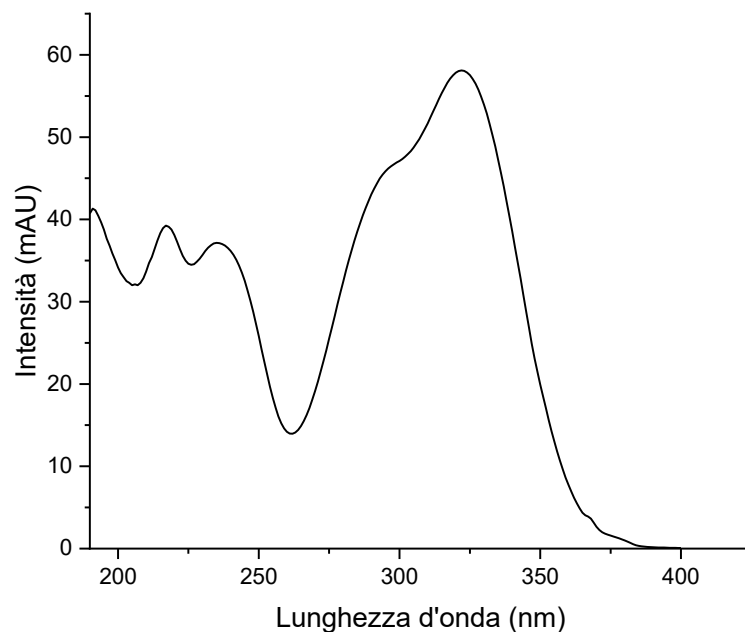


Figura 2.24 Spettro UV-Vis dell'acido trans-ferulico

- Iperoside

L'iperoside (nota anche come quercetina-3-O-galattoside) (figura 2.25) è un composto fenolico naturale appartenente alla classe dei flavonoidi, più precisamente alla sottoclasse dei flavonoli, con formula molecolare $C_{21}H_{20}O_{12}$ e massa molare pari a 464,38 g/mol. Dal punto di vista strutturale, la molecola è formata dall'unione dell'aglicone (quercetina) e di una molecola di galattosio. Il composto si presenta allo stato solido come una polvere cristallina di colore giallo chiaro, contraddistinto da un punto di fusione pari a 225-226 °C. Dal punto di vista della polarità, il valore di XlogP3 pari a 0,4 evidenzia un carattere marcatamente idrofilo. Questa forte idrofilia viene però unita all'ingombrante volume molecolare dell'addotto zuccherino, provocando una ritenzione moderata e un'eluizione tardiva nelle separazioni a fase inversa.

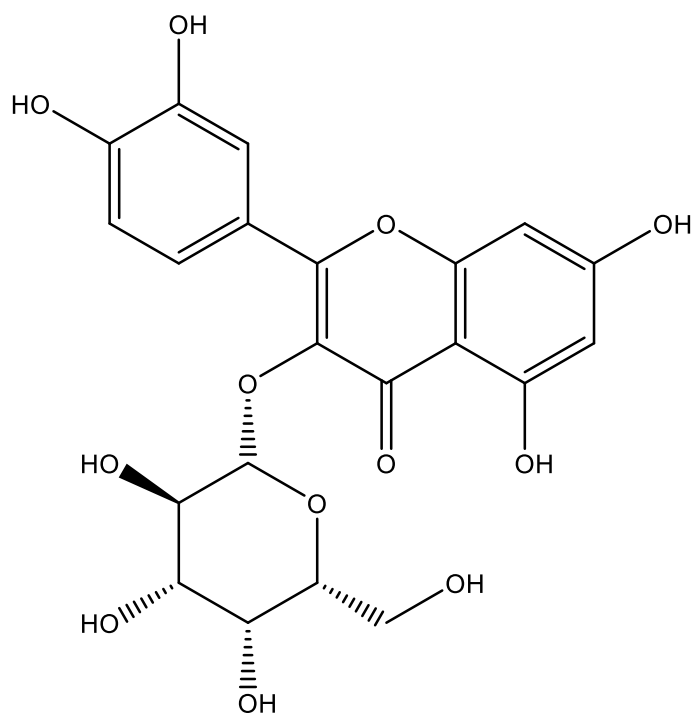


Figura 2.25 Struttura chimica dell'Iperoside

Osservando lo spettro UV-Vis dell'iperoside (figura 2.26) è possibile notare tre picchi distinti: uno a 205 nm, associato alla transizione $\pi \rightarrow \pi^*$ ad alta energia dell'anello aromatico benzenico condensato a destra della molecola; uno a 256 nm, corrispondente alla transizione $\pi \rightarrow \pi^*$ a minore energia del medesimo anello aromatico; e uno a 354 nm, dovuto alla transizione $\pi \rightarrow \pi^*$ originata dalla coniugazione dell'anello aromatico benzenico a sinistra della molecola con il gruppo carbonilico del ciclo centrale.

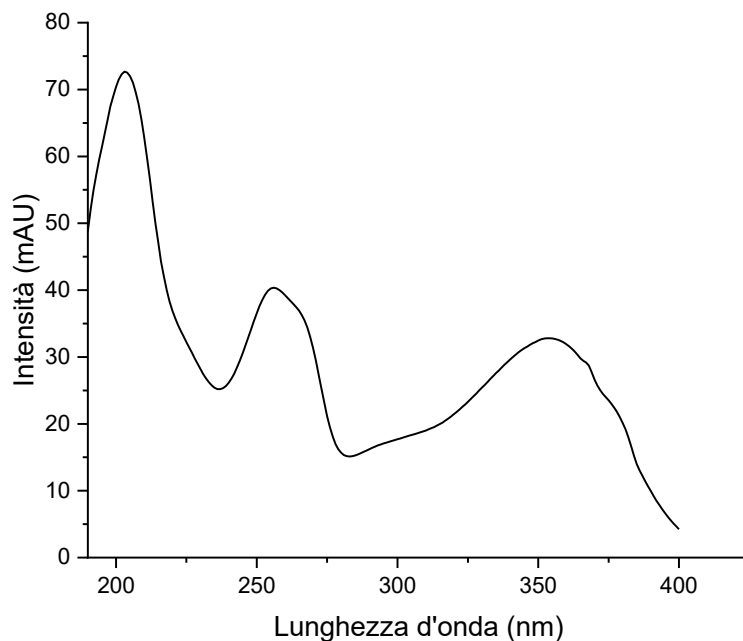


Figura 2.26 Spettro UV-Vis dell'iperoside

- Isoquercetina

L'isoquercetina (nota anche come quercetin-3-O-glucoside) (figura 2.27) è un composto fenolico naturale appartenente alla classe dei flavonoidi, più precisamente alla sottoclasse dei flavonoli, con formula molecolare $C_{21}H_{20}O_{12}$ e massa molare pari a 464,4 g/mol. Dal punto di vista strutturale, la molecola è formata dall'unione dell'aglicone (quercetina) e di una molecola di D-glucosio. Il composto si presenta allo stato solido, contraddistinto da un punto di fusione compreso tra 238 °C e 242 °C. Dal punto di vista della polarità, il valore di XlogP3 pari a 0,4, evidenzia un carattere marcatamente idrofilo. Questo profilo idrofilico, combinato all'elevato volume molecolare del residuo glucosidico, provoca una ritenzione moderata e un'eluizione tardiva nelle separazioni a fase inversa. A causa della diversa geometria tridimensionale, l'isoquercetina risulta meno idrofila rispetto all'iperoside.

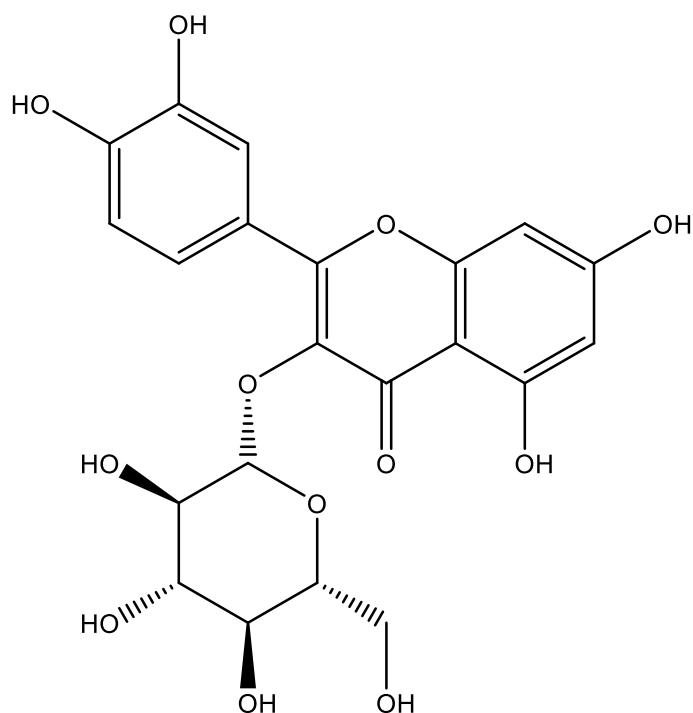


Figura 2.27 Struttura chimica della quercetina-3-O-glucoside

Osservando lo spettro UV-Vis dell'isoquercetina (figura 2.28) è possibile notare tre picchi distinti: uno a 205 nm, associato alla transizione $\pi \rightarrow \pi^*$ ad alta energia dell'anello aromatico benzenico condensato a destra della molecola; uno a 256 nm, corrispondente alla transizione $\pi \rightarrow \pi^*$ a minore energia del medesimo anello aromatico; e uno a 354 nm, dovuto alla transizione $\pi \rightarrow \pi^*$ originata dalla coniugazione dell'anello aromatico benzenico a sinistra della molecola con il gruppo carbonilico del ciclo centrale.

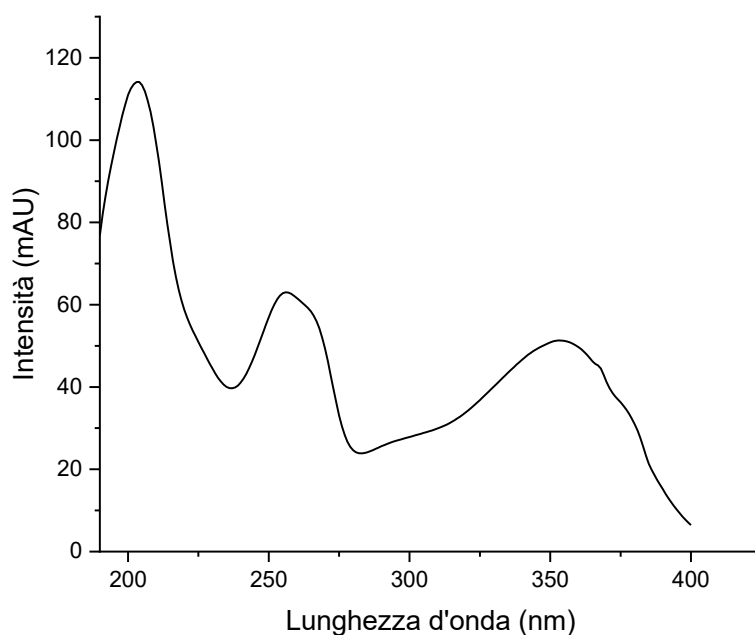


Figura 2.28 Spettro UV-Vis dell'isoquercetina

- **Acido rosmarinico**

L'acido rosmarinico (figura 2.29) è un composto fenolico naturale appartenente alla classe degli acidi idrossicinnamici, con formula molecolare $C_{18}H_{16}O_8$ e massa molare pari a 360,31 g/mol. Dal punto di vista strutturale, si presenta come un dimero derivante dalla condensazione del gruppo carbossilico dell'acido trans-caffeico con l'ossidrile alcolico dell'acido 3,4-diidrossifenillattico. Il composto si presenta allo stato solido, contraddistinto da un punto di fusione compreso tra 171°C e 175°C. Dal punto di vista della polarità, il valore di XlogP3 pari a 2,4 evidenzia un carattere marcatamente lipofilo. Questa affinità per le fasi apolari, guidata dall'esteso scheletro carbonioso dei due anelli aromatici, si traduce in un'interazione intensa con la fase stazionaria, determinando una forte ritenzione e un'eluizione tardiva nelle separazioni a fase inversa.

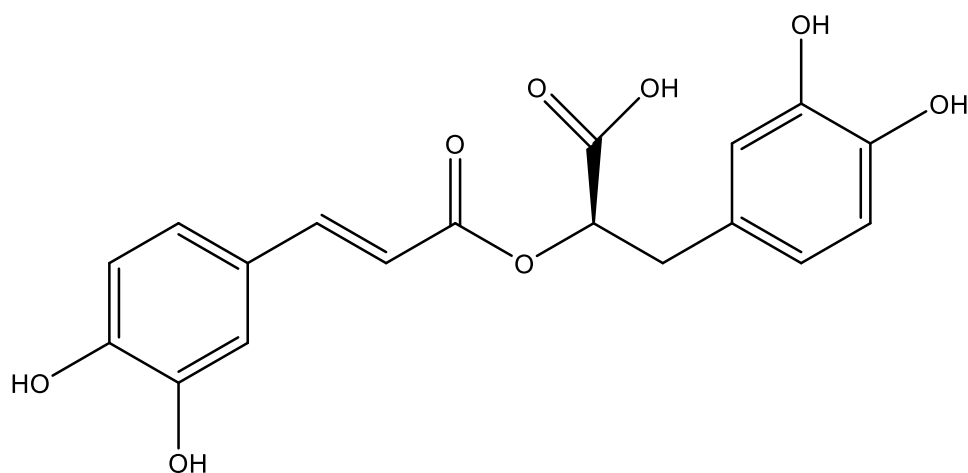


Figura 2.29 Struttura chimica dell'acido rosmarinico

Osservando lo spettro UV-Vis dell'acido rosmarinico (figura 2.30) è possibile notare tre picchi distinti: uno a 198 nm, associato alle transizioni $\pi \rightarrow \pi^*$ ad alta energia degli anelli aromatici benzenici; uno intorno a 220 nm, dovuto alle transizioni $\pi \rightarrow \pi^*$ locali dei sistemi fenolici; e un picco ampio e intenso a 328 nm, generato dalla transizione $\pi \rightarrow \pi^*$ dovuta alla coniugazione della porzione caffeica insatura posizionata sulla sinistra della molecola.

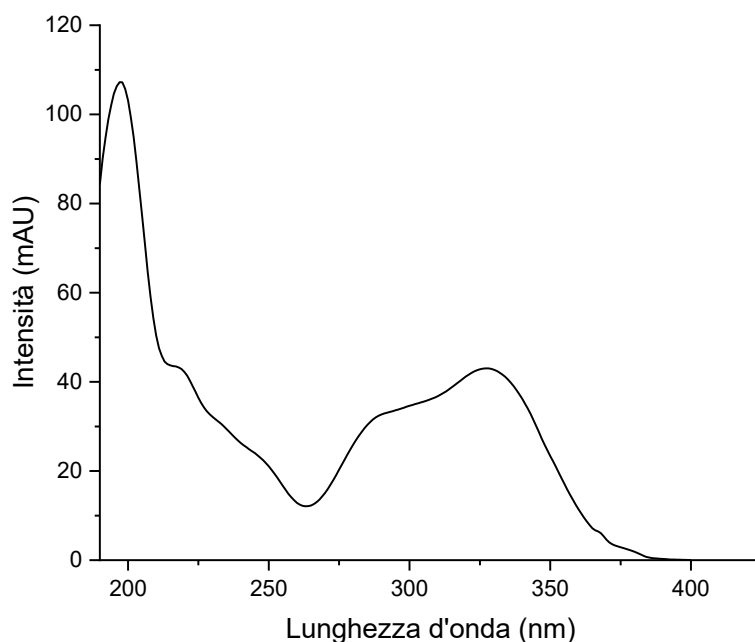


Figura 2.30 Spettro UV-Vis dell'acido rosmarinico

- Apigenina

L'apigenina (nota anche come 4',5,7-triidrossiflavone) (figura 2.31) è un composto fenolico naturale appartenente alla classe dei flavonoidi, più precisamente alla sottoclasse dei flavoni, con formula molecolare $C_{15}O_{10}H_5$ e massa molare pari a 270,24 g/mol. Dal punto di vista strutturale, è caratterizzata da un anello aromatico posto a sinistra della molecola, condensato ad un eterociclo centrale contenente un gruppo carbonilico; e un singolo anello fenolico monoidrossilato legato all'eterociclo. Il composto si presenta come un solido di colore giallo, contraddistinto da un elevato punto di fusione compreso tra 345 °C e 350 °C. Dal punto di vista della polarità, il valore di logP pari a 3,02 evidenzia un carattere fortemente lipofilo. Questa affinità per gli ambienti apolari si traduce in un'interazione profonda con la fase stazionaria, determinando una fortissima ritenzione e un'eluizione marcatamente tardiva nelle separazioni a fase inversa.

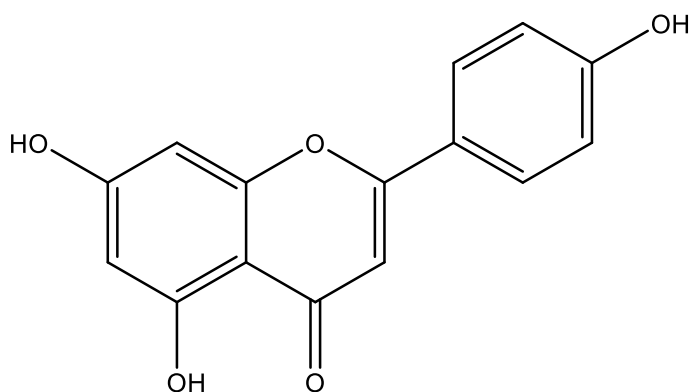


Figura 2.31 Struttura chimica dell'apigenina

Osservando lo spettro UV-Vis dell'apigenina (figura 2.32) è possibile notare tre picchi distinti: uno a 198 nm, associato alle transizioni $\pi \rightarrow \pi^*$ ad alta energia del sistema aromatico condensato a sinistra della molecola; uno a 267 nm, dovuto alle transizioni $\pi \rightarrow \pi^*$ locali del medesimo sistema fenolico; e un picco ampio e intenso a 337 nm, generato dalla transizione $\pi \rightarrow \pi^*$ dovuta alla coniugazione dell'anello fenolico laterale posizionato sulla destra della molecola.

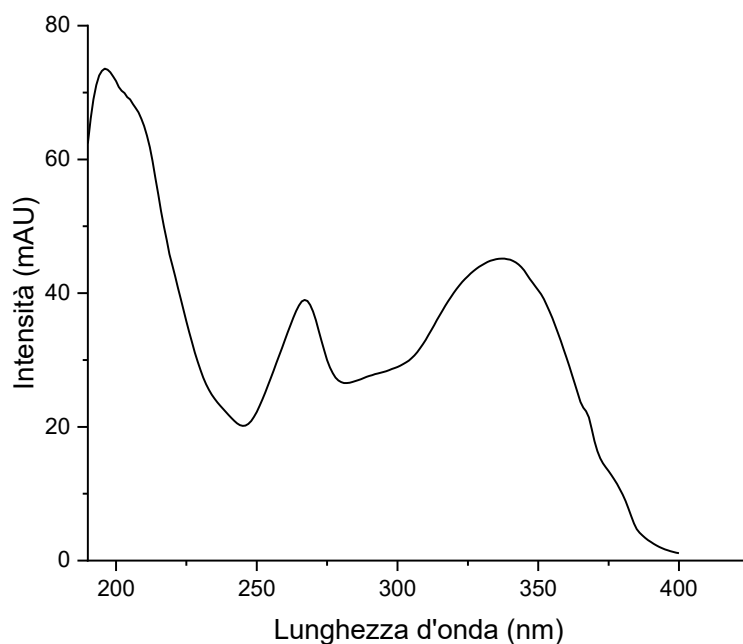


Figura 2.32 Spettro UV-Vis dell'apigenina

- Kaempferolo

Il kaempferolo (noto anche come 3,4',5,7-tetraidrossiflavone) (figura 2.33) è un composto fenolico naturale appartenente alla classe dei flavonoidi, più precisamente alla sottoclasse dei flavonoli, con formula molecolare $C_{15}H_{10}O_6$ e massa molare pari a 286,23 g/mol. La struttura del kaempferolo è strettamente analoga a quella dell'apigenina, ma si differenzia per la presenza di un gruppo ossidrilico addizionale. L'architettura mantiene lo stesso sistema aromatico condensato e lo stesso anello fenolico monoidrossilato; tuttavia, in questo analita, il gruppo ossidrilico aggiuntivo si trova legato direttamente sull'eterociclo centrale. Il composto si presenta come un solido di colore giallo chiaro, contraddistinto da un elevato punto di fusione compreso tra 276 °C e 278 °C. Dal punto di vista della polarità, il valore di XlogP3 pari a 1,9 evidenzia un carattere lipofilo. Questa affinità per gli ambienti apolari si traduce in una buona interazione con la fase stazionaria, determinando una forte ritenzione e un'eluizione tardiva nelle separazioni a fase inversa.

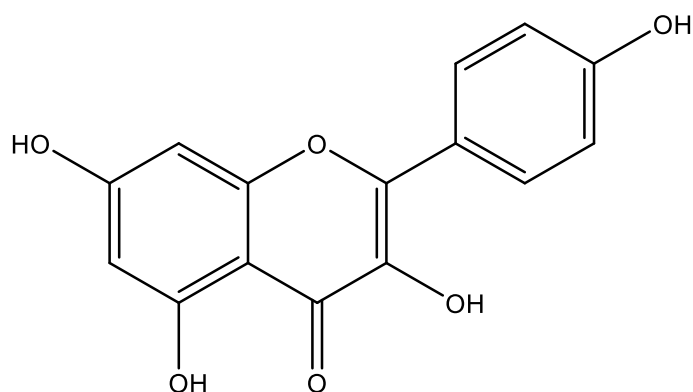


Figura 2.33 Struttura chimica del kaempferolo

Osservando lo spettro UV-Vis del kaempferolo (figura 2.34) è possibile notare tre picchi distinti: uno a 198 nm, associato alle transizioni $\pi \rightarrow \pi^*$ ad alta energia del sistema aromatico condensato; uno a 267 nm, dovuto alle transizioni $\pi \rightarrow \pi^*$ locali del medesimo sistema fenolico condensato a sinistra della molecola; e un picco ampio e intenso a 365 nm, generato dalla transizione $\pi \rightarrow \pi^*$ dovuta alla coniugazione dell'anello fenolico laterale posizionato sulla destra della molecola.

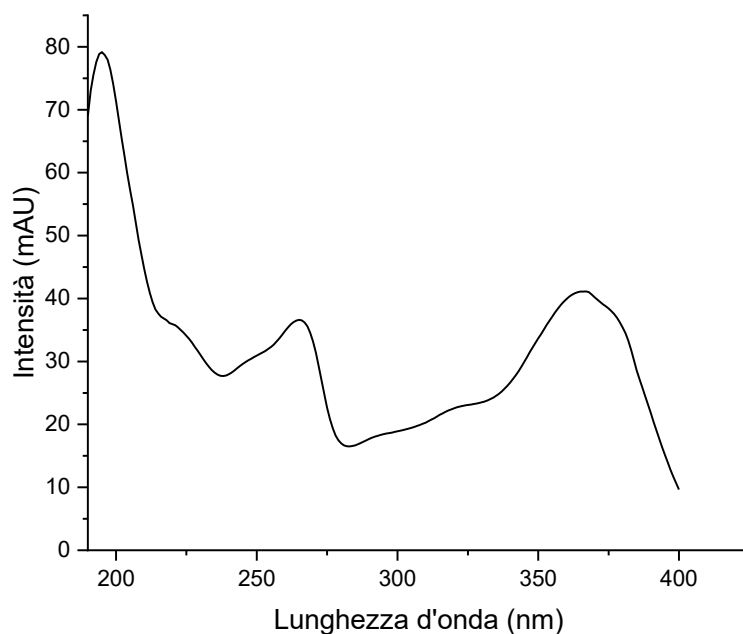


Figura 2.34 Spettro UV-Vis del kaempferolo

2.4.1 Standard interno

Lo standard interno (IS) è una sostanza pura che viene aggiunta in quantità nota e costante a tutti i campioni, bianchi e standard di calibrazione. Esso viene utilizzato principalmente per correggere e compensare gli errori sistematici e casuali che si verificano durante la manipolazione del campione e l'analisi strumentale. Ha il compito di correggere efficacemente eventuali fluttuazioni e consente di monitorare la stabilità del segnale. Inoltre, può essere utilizzato anche per condurre analisi semiquantitative.

L'area del picco di un analita si può quindi normalizzare secondo la formula riportata di seguito:

$$\text{Area}_{\text{corretta}} = \frac{\text{Area analita}}{\text{Area IS}}$$

Affinché lo standard interno sia efficace, è necessario che abbia delle determinate caratteristiche. Esso deve essere assente nel campione originale, possedere un'ottima stabilità chimica, comportarsi in modo analogo agli altri analiti ed infine deve eluire come picco isolato, senza sovrapporsi ad altri analiti o interferenti [31].

Per questo lavoro di tesi è stato scelto di utilizzare il 2-fenilfenolo (figura 2.35), in quanto ritenuto appropriato ai requisiti sopra descritti.

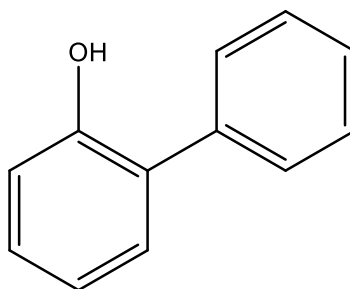


Figura 2.35 Struttura chimica del 2-fenilfenolo

2.5 Validazione del metodo analitico

Il processo di validazione di un metodo analitico costituisce la dimostrazione sperimentale e documentata che il metodo stesso possiede caratteristiche prestazionali tali da garantire risultati riproducibili, accurati e idonei all'uso previsto. Come sancito dalla linea guida internazionale ICH Q2(R2) (Guideline on Validation of Analytical Procedures), l'obiettivo primario della validazione non è la semplice determinazione della performance del metodo, bensì la conferma scientifica che l'intero processo analitico sia robusto e affidabile per l'applicazione specifica in esame. La validazione rappresenta il raccordo tra le esigenze analitiche del problema reale e le capacità operative del laboratorio. Essa richiede una definizione preliminare dei requisiti prestazionali necessari e la successiva verifica che il metodo sia in grado di soddisfarli, soprattutto quando l'oggetto dell'analisi è costituito da matrici complesse, come gli estratti polifenolici. Per le ragioni appena descritte, la procedura analitica sviluppata in questo lavoro è stata sottoposta a un protocollo di validazione basato sulle linee guida internazionali ICH Q2(R2) e sulla guida Eurachem “Fitness for Purpose” [32,33]. L'approccio combinato di queste due normative ha permesso di strutturare uno studio solido, focalizzato sulla determinazione e sulla valutazione statistica delle seguenti figure di merito:

- Linearità
- Limiti di rilevabilità e quantificazione (LOD e LOQ)
- Ripetibilità (precisione intra-day)

Nei paragrafi successivi verranno approfonditi i principi teorici, i modelli matematici e i test statistici applicati per la verifica di ciascuno di questi parametri.

2.5.1 Linearità

La linearità di un metodo analitico rappresenta la sua capacità, all'interno di un intervallo specificato, di ottenere risultati che siano direttamente proporzionali alla concentrazione dell'analita nel campione. Essa garantisce la validità del

modello matematico utilizzato per convertire il segnale grezzo dello strumento in un valore di concentrazione reale. Il modello matematico di riferimento per descrivere la risposta strumentale è la retta di calibrazione, formalizzata mediante l'equazione di una regressione lineare semplice basata sul metodo dei minimi quadrati:

$$Y = mX + q$$

Dove Y rappresenta la risposta dello strumento, m il coefficiente angolare (pendenza della retta), X la concentrazione nota dello standard e q l'intercetta sull'asse delle ordinate. Per una solida validazione della linearità, le normative internazionali raccomandano l'impiego di standard di riferimento e di almeno 5-6 livelli di concentrazione distribuiti nell'intervallo di lavoro. Inoltre, per valutare l'errore sperimentale ed effettuare test statistici avanzati, ciascun livello di concentrazione deve essere analizzato eseguendo repliche indipendenti.

2.5.1.1 ANOVA (*Analisi della varianza*)

Per verificare l'adeguatezza del modello lineare in modo statisticamente ineccepibile, l'approccio raccomandato, applicabile quando si dispone di repliche sperimentali indipendenti per ciascun livello di concentrazione, consiste nell'analisi della varianza (ANOVA) applicata alla regressione. L'obiettivo fondamentale dell'ANOVA in questo contesto è di dividere i diversi contributi alla variabilità dei dati sperimentali, al fine di stabilire se lo scostamento dei punti dalla retta di calibrazione sia interamente imputabile all'errore casuale (rumore di fondo e riproducibilità strumentale) o se includa un errore sistematico dovuto all'inadeguatezza del modello matematico lineare (lack of fit). La valutazione della linearità, infatti, non può basarsi esclusivamente sul calcolo del coefficiente di determinazione R^2 . Esso esprime quanta varianza (informazione) viene spiegata dal modello, ma è insensibile alla presenza di curvature locali o deviazioni sistematiche dall'andamento lineare.

La variabilità totale dei punti sperimentali rispetto alla media globale delle risposte $\bar{y}$ viene espressa attraverso la somma totale dei quadrati (SS_t , total sum of squares) e può essere scomposta in questo modo:

$$SS_t = SS_{reg} + SS_r$$

Dove:

- La somma dei quadrati totali (SS_t) misura la dispersione complessiva dei valori sperimentali y_i attorno alla loro media aritmetica $\bar{y}$:

$$SS_t = \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2$$

- La somma dei quadrati di regressione (SS_{reg}) rappresenta la variabilità totale spiegata dal modello lineare. È calcolata come la somma dei quadrati delle differenze tra i valori previsti dal modello $\hat{y}_i$ e la media globale $\bar{y}$:

$$SS_{reg} = \sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2$$

- La somma dei quadrati dei residui (SS_r) rappresenta la variabilità residua, la dispersione che il modello non riesce a descrivere. È calcolata come la somma dei quadrati delle differenze tra i valori reali y_i e quelli previsti $\hat{y}_i$:

$$SS_r = \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2$$

Disponendo di tali contributi alla variabilità, è possibile procedere alla verifica statistica mediante il Test F, volto a mettere a confronto la varianza di regressione con quella residua:

$$F_{calcolato} = \frac{MS_{reg}}{MS_r}$$

Dove MS_{reg} e MS_r sono i quadrati medi (Mean Square), ovvero le somme dei quadrati divise per i rispettivi gradi di libertà (df), in questo caso pari a 1 per la regressione e pari a $n-2$ per i residui. Se il risultato del test fornisce un valore di $F_{calcolato}$ maggiore di $F_{tabulato}$, identificato per un livello di significatività ($\alpha=0,05$), si assume che la varianza di regressione è significativamente maggiore della varianza residua e quindi il modello descrive in modo solido la relazione lineare tra la concentrazione dell'analita e la risposta strumentale.

Quando si effettuano delle repliche (j) per ogni livello di concentrazione (i), è possibile scomporre ulteriormente la variabilità residua SS_r :

$$SS_r = SS_{lof} + SS_{pe}$$

Dove:

- La somma dei quadrati del difetto di adattamento (SS_{lof} , lack of fit) misura lo scostamento tra il valore medio sperimentale di ciascun livello $\bar{y}_i$ e il valore teorico previsto dalla retta di calibrazione $\hat{y}_i$ e quantifica l'errore sistematico del modello scelto:

$$SS_{lof} = \sum_{i=1}^k n_i (\bar{y}_i - \hat{y}_i)^2$$

Con k il numero dei livelli di concentrazione e n_i numero di repliche eseguite per il livello.

- La somma dei quadrati dell'errore puro (SS_{pe} , Pure Error) misura la variabilità delle repliche eseguite nello stesso livello di concentrazione rispetto alla loro stessa media $\bar{y}_i$. Questo calcolo rappresenta l'errore puramente sperimentale, legato alla precisione del sistema analitico:

$$SS_{pe} = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2$$

In modo analogo a prima è possibile eseguire un ulteriore test F volto a confrontare la varianza del difetto di adattamento con la varianza dell'errore puro:

$$F_{calcolato} = \frac{MS_{lof}}{MS_{pe}}$$

Dove MS_{lof} e MS_{pe} sono i quadrati medi (Mean Square), ovvero le somme dei quadrati divise per i rispettivi gradi di libertà (df), in questo caso pari a $k-2$ per il difetto di adattamento e pari a $n-k$ per l'errore puro. Se il risultato del test fornisce un valore di $F_{calcolato}$ minore o uguale di $F_{tabulato}$, identificato per un livello di significatività ($\alpha=0,05$), si assume che l'errore sistematico del modello è della stessa entità dell'errore casuale dello strumento, rendendo il modello lineare adeguato.

2.5.2 Limite di rilevabilità (LOD)

Il limite di rilevabilità LOD (Limit of Detection) viene definito come la più bassa concentrazione di analita in un campione che può essere rilevata, ma non necessariamente quantificata. Rappresenta il limite oltre il quale il segnale dello strumento si distingue in modo statisticamente significativo dal rumore di fondo del sistema o dal segnale del bianco. Sotto questa soglia, non è possibile stabilire con certezza se il segnale registrato sia dovuto alla reale presenza dell'analita o a fluttuazioni casuali della linea di base. Per il calcolo dell'LOD è stato scelto il seguente approccio:

$$LOD = \frac{3,3 \sigma}{m}$$

Dove σ è la deviazione standard delle repliche del bianco e m è il coefficiente angolare della retta di calibrazione [32,33].

2.5.3 Limite di quantificazione (LOQ)

Il limite di quantificazione LOQ (Limit of Quantification) è la più bassa concentrazione o quantità di analita nel campione che può essere determinata con un livello idoneo e accettabile di accuratezza e precisione (ripetibilità). Rappresenta il limite oltre il quale il dato è statisticamente affidabile e quindi dove è possibile stimare esattamente la concentrazione di un analita. Per il calcolo dell'LOQ è stato scelto il seguente approccio:

$$\text{LOQ} = \frac{10 \sigma}{m}$$

Dove σ è la deviazione standard delle repliche del bianco e m è il coefficiente angolare della retta di calibrazione [32,33].

2.5.4 Ripetibilità (precisione intra-day)

La precisione di un metodo analitico esprime il grado di concordanza tra una serie di misurazioni indipendenti. Essa si concentra sulla dispersione dei risultati dovuta agli errori casuali: minore è tale dispersione, maggiore risulta la precisione del metodo. Questa figura di merito deve essere indagata a diversi livelli gerarchici, a seconda delle variabili operative che vengono modificate nel disegno sperimentale. La ripetibilità costituisce il livello più restrittivo ed elementare di precisione, definendo la variabilità del sistema analitico quando le misurazioni vengono eseguite sotto la massima costanza dei fattori causali. A tal fine, le repliche vengono effettuate dallo stesso operatore, utilizzando lo stesso strumento, nello stesso laboratorio e in un breve intervallo di tempo.

In questo lavoro di validazione, la ripetibilità è stata valutata a tre differenti livelli di concentrazione (basso, medio e alto), ognuno replicato tre volte, in modo da ottenere un coefficiente di variazione (CV%) o deviazione standard relativa

(RSD%) per ogni livello. Questo parametro consente di quantificare la variabilità della risposta e viene calcolato mediante la seguente equazione:

$$\text{RSD\%} = \left(\frac{\sigma}{\bar{x}} \right) \cdot 100$$

Dove σ rappresenta la deviazione standard delle repliche effettuate per lo specifico livello di concentrazione e $\bar{x}$ il valore medio [32,33].

3. PARTE SPERIMENTALE

3.1 *Materiali e metodi*

In questo capitolo vengono descritti i materiali impiegati e le procedure sperimentali adottate per lo sviluppo del metodo e per le successive analisi strumentali.

3.1.1 *Materiali*

- Acetonitrile HPLC grade (HiPerSolv CHROMANORM), VWR Chemicals (Fontenay-sous-Bois, Francia), codice prodotto 83639.320
- Acqua ultra-pura, ottenuta mediante sistema di purificazione Milli-Q® Reference A+, Merck Millipore (Billerica, MA, USA)
- Acido formico purezza $\geq 97\%$, Toronto Research Chemicals (Toronto, ON, Canada), codice prodotto F692895
- Dimetilsolfossido AnhydroScan purezza $\geq 99,5\%$, Lab-Scan Analytical Sciences (Dublino, Irlanda), codice prodotto H34C11X
- Acido L(+)-ascorbico grado RPE-ACS, Carlo Erba Reagents (Milano, Italia), codice prodotto 402406
- Acido gallico purezza $>99,7\%$, TraceCERT®, Sigma-Aldrich Production GmbH (Buchs, Svizzera), codice prodotto 91215
- Acido protocatecuico purezza $98,6\%$, HWI pharma services GmbH (Ruelzheim, Germania), codice prodotto 0393-05-90

- Acido caftarico purezza >95%, Toronto Research Chemicals (Toronto, ON, Canada), codice prodotto C083000
- Catechina purezza $\geq 98\%$, Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA), codice prodotto C1788
- Acido caffeico purezza 99,04%, Dr.Ehrenstorfer (Augsburg, Germania), codice prodotto DRE-C10934700
- Epicatechina purezza $\geq 98\%$, Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA), codice prodotto 68097
- Acido p-coumarico purezza 98%, Toronto Research Chemicals (Toronto, ON, Canada), codice prodotto TRC-C757365
- Acido trans-ferulico purezza 98,59%, Dr.Ehrenstorfer (Augsburg, Germania), codice prodotto DRE-C10934700
- Iperoside purezza >95%, Toronto Research Chemicals (Toronto, ON, Canada), codice prodotto DRE-C13644100
- Isoquercetina purezza >95%, Toronto Research Chemicals (Toronto, ON, Canada), codice prodotto Q509495
- Acido rosmarinico purezza >95%, Toronto Research Chemicals (Toronto, ON, Canada), codice prodotto R684800
- Apigenina purezza 96%, Toronto Research Chemicals (Toronto, ON, Canada), codice prodotto TRC-A726500
- Kaempferolo purezza 97%, Toronto Research Chemicals (Toronto, ON, Canada), codice prodotto K10000
- 2-fenilfenolo purezza 99%, Aldrich Chemical Company, Inc. (Milwaukee, WI, USA), codice prodotto P2,826-3
- Soluzioni madre di ciascun analita
- Soluzioni di lavoro preparate per diluizione delle soluzioni madre
- Reattivo di Folin-Ciocalteu 2M, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), codice prodotto 47641

- Sodio carbonato monoidrato grado RPE-ACS, Carlo Erba Reagents (Milano, Italia), codice prodotto 479257

3.1.2 Strumentazione

Le analisi cromatografiche sono state eseguite utilizzando un sistema HPLC/UHPLC Thermo Scientific Dionex Ultimate™ 3000 (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) (figura 3.1), costituito da una pompa modulare della serie UltiMate 3000, un comparto termostatato per colonna TCC-3000 e un rivelatore a serie di diodi DAD-3000 (RS). Sebbene il sistema fosse equipaggiato con un autocampionatore automatico WPS-3000, il caricamento dei campioni è stato effettuato manualmente mediante una valvola di iniezione manuale (Dionex Manual Sample Injector Valve, tipo Rheodyne). La separazione è stata condotta impiegando una colonna a fase inversa Agilent Poroshell 120 EC-C18 4,6 X 50 mm, 2,7 μ m (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Il controllo della strumentazione e l'elaborazione dei dati sono stati gestiti tramite il software Chromeleon™ (Thermo Fisher Scientific).



Figura 3.1 HPLC/UHPLC Thermo Scientific Dionex Ultimate™ 3000

Le letture spettrofotometriche per il saggio di Folin-Ciocalteu (paragrafo 3.1.6) sono state effettuate mediante uno spettrofotometro UV-VIS a doppio raggio JASCO V-630 (Jasco Corporation, Tokyo, Giappone) (figura 3.2), utilizzando cuvette monouso in materiale plastico con cammino ottico di 1 cm.



Figura 3.2 Spettrofotometro UV-VIS JASCO V-630

3.1.3 Metodo cromatografico

Il metodo analitico ottimizzato ha previsto la separazione simultanea di 13 polifenoli e dello standard interno. La colonna è stata mantenuta ad una temperatura costante di 25°C e le singole corse cromatografiche sono state eseguite iniettando un volume di campione pari a 20 μ L. L'eluizione è avvenuta utilizzando 2 fasi mobili:

- Fase mobile A: Acqua ultra-pura Milli-Q acidificata con acido formico allo 0,1% v/v.
- Fase mobile B: Acetonitrile acidificato con acido formico allo 0,1% v/v.

Le singole analisi sono state condotte ad un flusso costante di 0,6 ml/min applicando un programma in gradiente lineare (figura 3.3) per una durata totale di 60 minuti, in cui è contenuto un tempo di riequilibrio della colonna di 5 minuti prima dell'iniezione successiva. Il profilo del gradiente ottimizzato è riportato nella tabella 3.1:

Tempo (min)	A%	B%
0	98	2
2,5	98	2
5,5	90	10
12	88	12
37	75	25
47	55	45
48	1	99
53	1	99
55	98	2
60	98	2

Tabella 3.1 Programma di eluizione in gradiente lineare

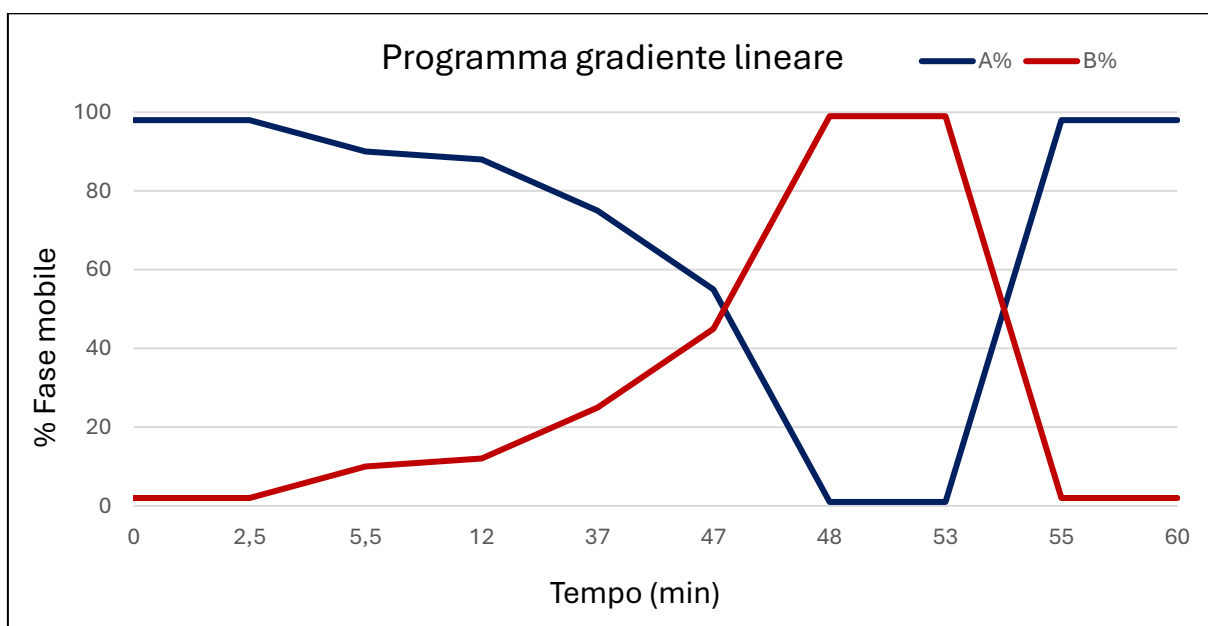


Figura 3.3 Programma di eluizione in gradiente lineare

La registrazione dei cromatogrammi è stata effettuata monitorando contemporaneamente quattro lunghezze d'onda specifiche, selezionate in base ai massimi di assorbimento e al miglior rapporto segnale/rumore possibile: 280 nm, 300 nm, 325 nm e 370 nm.

3.1.4 Preparazione soluzioni standard

Per la preparazione delle soluzioni madre, ogni standard è stato solubilizzato in base alle proprie caratteristiche chimico-fisiche. Per prevenire i fenomeni di degradazione ossidativa, in ciascuna soluzione madre è stata addizionata un'opportuna aliquota di una soluzione stabilizzante di acido L(+)-ascorbico in modo da garantire una concentrazione finale pari all'1% m/v. Inoltre, per garantire un ambiente inerte, ogni vial è stato sottoposto ad insufflaggio con azoto (N₂) prima della sigillatura con parafilm.

Le condizioni specifiche di solubilizzazione e la concentrazione finale di ciascuna soluzione madre sono riportate di seguito:

- Acido gallico: solubilizzato in miscela acetonitrile:acqua (25:75 v/v) alla concentrazione 250 mg/L
- Acido caftarico: solubilizzato in miscela acetonitrile:acqua (90:10 v/v) alla concentrazione 1000 mg/L
- Acido protocatecuico: solubilizzato in miscela acetonitrile:acqua (90:10 v/v) alla concentrazione 1000 mg/L
- Catechina: solubilizzato in miscela acetonitrile:acqua (90:10 v/v) alla concentrazione 1000 mg/L
- Acido caffeico: solubilizzato in miscela acetonitrile:acqua (90:10 v/v) alla concentrazione 1000 mg/L
- Epicatechina: solubilizzato in miscela acetonitrile:acqua (90:10 v/v) alla concentrazione 1000 mg/L
- Acido p-coumarico: solubilizzato in miscela acetonitrile:acqua (90:10 v/v) alla concentrazione 1000 mg/L
- Acido trans-ferulico: solubilizzato in miscela acetonitrile:acqua (90:10 v/v) alla concentrazione 1000 mg/L
- Iperoside: solubilizzato in miscela acetonitrile:acqua (35:65 v/v) alla concentrazione 500 mg/L

- Isoquercetina: solubilizzato in miscela acqua:dimetilsolfossido (2,5:97,5 v/v) alla concentrazione 250 mg/L
- Acido rosmarinico: solubilizzato in miscela acetonitrile:acqua (90:10 v/v) alla concentrazione 1000 mg/L
- Apigenina: solubilizzato in miscela acetonitrile:acqua (45:55 v/v) alla concentrazione 250 mg/L
- Kaempferolo: solubilizzato in miscela acetonitrile:acqua (90:10 v/v) alla concentrazione 1000 mg/L
- 2-fenilfenolo: solubilizzato in miscela acetonitrile:acqua (90:10 v/v) alla concentrazione 1000 mg/L

A partire da queste soluzioni madri singole, è stata preparata una soluzione mix contenente tutti i 13 analiti e lo standard interno, successivamente diluita per ottenere i diversi livelli di lavoro. Tutte le soluzioni sono state conservate in frigorifero ad una temperatura di 4°C al riparo dalla luce.

3.1.5 Preparazione campioni

Al fine di applicare il metodo a matrici reali e verificarne l'efficacia, sono stati sottoposti ad analisi HPLC sia campioni acquosi, sia un estratto ottenuto in solvente eutettico profondo (DES). Date le differenti proprietà chimico-fisiche delle due matrici, è stato necessario effettuare procedure di pretrattamento diverse.

Nello specifico, tutti i campioni acquosi sono stati preventivamente diluiti in rapporto 1:10 v/v con la fase mobile iniziale, costituita da acqua e acetonitrile nel rapporto 98:2 v/v con l'aggiunta dello 0,1% v/v di acido formico. Successivamente sono stati filtrati e addizionati di acido ascorbico e standard interno, per raggiungere concentrazioni finali rispettivamente dello 0,01% m/v e di 2 mg/L. Al contrario, la preparazione del campione DES ha previsto la pesata di 1,9 mg di estratto, sciolto nella medesima fase mobile di partenza e addizionato di acido ascorbico e standard interno, per raggiungere concentrazioni finali

rispettivamente dello 0,01% m/v e di 2 mg/L. La soluzione, caratterizzata da una concentrazione finale di DES di 1,7 mg/mL, è stata infine sottoposta a sonicazione in bagno d'ultrasuoni per favorire solubilizzazione e filtrata prima dell'analisi.

Per la preparazione del bianco è stata utilizzata la medesima fase mobile di partenza addizionata di acido ascorbico e standard interno, per raggiungere concentrazioni finali rispettivamente dello 0,01% m/v e di 2mg/L.

3.1.6 Saggio di Folin-Ciocalteu

Il saggio di Folin-Ciocalteu è stato eseguito con l'obiettivo di ottenere una stima complessiva del contenuto di polifenoli totali presenti all'interno dei diversi campioni estratti. Esso consiste in un metodo colorimetrico standard basato su una reazione di ossido-riduzione: in ambiente alcalino, i composti fenolici fungono da agenti riducenti nei confronti del reattivo di Folin-Ciocalteu, portando alla formazione di un complesso di colore blu [34]. Questo complesso presenta un massimo di assorbimento a circa 765 nm e l'intensità di questo assorbimento è direttamente proporzionale alla concentrazione di polifenoli totali presenti nella matrice. La procedura sperimentale è stata condotta facendo rigoroso riferimento alla metodologia standardizzata a livello internazionale dalla normativa ISO 14502-1:2005 [35].

Come prima cosa sono stati preparati i reagenti necessari allo svolgimento del saggio. Nello specifico, è stata preparata una soluzione di carbonato di sodio al 7,5% m/v utilizzando acqua milliQ e, con il medesimo solvente, il reattivo di Folin-Ciocalteu è stato opportunamente diluito in rapporto 1:10 v/v.

Per la costruzione della retta di calibrazione è stata preparata una soluzione madre di acido gallico a 100 mg/L, da cui per successiva diluizione sono stati ottenuti i tre punti della retta: 10 mg/L, 40 mg/L, 70 mg/L. È importante sottolineare che nella preparazione degli standard non è stato introdotto l'acido ascorbico, poiché l'azione riducente avrebbe generato interferenze con il meccanismo del reattivo.

Il protocollo operativo è stato applicato in modo identico e parallelo ai punti della curva di calibrazione, ai campioni reali e al bianco, quest'ultimo composto da acqua milliQ e dai reattivi del saggio. La successione dei passaggi è stata pianificata mantenendo costante il rapporto volumetrico di 1:5:4 tra il volume di campione (o standard), il reattivo di Folin-Ciocalteu diluito e la soluzione di carbonato di sodio.

Dal punto di vista pratico, il procedimento ha previsto l'iniziale introduzione di 0,5 mL di campione all'interno di una provetta Falcon. A questa sono stati addizionati 2,5 mL di reattivo di Folin-Ciocalteu al 10% v/v, omogeneizzando e lasciando a riposo a temperatura ambiente per un intervallo di tre minuti. Successivamente, sono stati aggiunti 2 mL di carbonato di sodio al 7,5% m/v e, dopo un'ulteriore agitazione, la provetta Falcon è stata posta al buio a 25°C per un'ora, consentendo il completo sviluppo cromatico e la stabilizzazione del complesso blu. Al termine di questo periodo, le soluzioni sono state trasferite nelle cuvette per procedere alla misurazione dell'assorbanza alla lunghezza d'onda di 765 nm. I campioni sottoposti al saggio corrispondono agli stessi impiegati per l'analisi HPLC. Gli estratti acquosi sono stati filtrati e diluiti in rapporto 1:10 v/v con acqua milliQ, mentre il campione DES è stato filtrato e diluito 1:1000 v/v con il medesimo solvente.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 Sviluppo e ottimizzazione del metodo

Lo sviluppo del metodo analitico ha preso come punto di partenza il lavoro recentemente riportato in letteratura da Muthulingam et al. [36]. Alcune condizioni cromatografiche originali sono state modificate e adattate sia per rispondere alle specifiche della strumentazione e dei reagenti disponibili in laboratorio, sia per ottimizzare la risoluzione degli analiti e dello standard interno.

L'ottimizzazione è stata condotta attraverso un approccio incrementale. Inizialmente, sono stati iniettati i singoli standard di polifenoli per determinarne i

tempi di ritenzione e le caratteristiche spettrali nelle condizioni cromatografiche di base; successivamente, si è proceduto all'iniezione di miscele a complessità crescente. Questa procedura ha permesso di identificare le zone di coeluizione e di intervenire in modo mirato sul profilo del gradiente di eluizione. Il gradiente è stato progressivamente aggiustato ad ogni step, fino ad ottenere la completa e soddisfacente separazione cromatografica dei 13 polifenoli e dello standard interno. In figura 4.1 viene riportato un cromatogramma di uno standard mix di 6 analiti registrato a 280 nm, un esempio di come nelle fasi preliminari dello sviluppo, l'uso di gradienti più brevi e non ottimizzati portava inevitabilmente all'accavallamento di alcuni analiti.

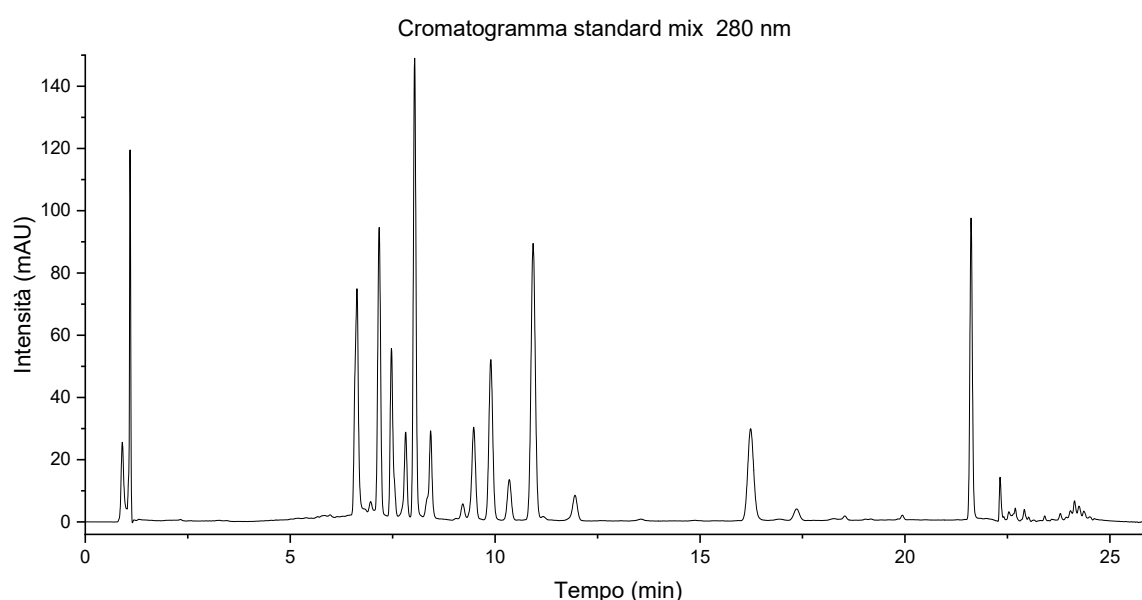


Figura 4.1 Cromatogramma di uno standard mix di 6 analiti registrato a 280 nm

L'aggiunta di analiti e la sovrapposizione tra i picchi degli standard e delle impurezze ha portato inevitabilmente ad allungare il tempo della corsa e ad ottimizzare il gradiente.

Nella Tabella 4.1 sono riportati, in ordine di eluizione, i tempi di ritenzione ottenuti in condizioni ottimizzate e le rispettive lunghezze d'onda selezionate per la quantificazione di ciascun polifenolo:

Analita	t _r (min)	λ _{rivelazione} (nm)
Acido gallico	3,2	280
Acido protocatecuico	6,5	280
Acido caftarico	7,8	325
Catechina	9,6	280
Acido caffeico	10,5	325
Epicatechina	12,5	280
Acido p-coumarico	14,3	300
Acido trans-ferulico	16,8	325
Iperoside	20,6	370
Isoquercetina	21,4	370
Acido rosmarinico	28,1	325
Apigenina	40,5	325
Kaempferolo	41,5	370
2-fenilfenolo (IS)	48,0	280

Tabella 4.1 Tempi di ritenzione e lunghezze d'onda di rivelazione dei polifenoli

La selettività e l'efficacia della separazione sono visibili nei cromatogrammi riportati di seguito, registrati alle quattro lunghezze d'onda selezionate:

- 280 nm

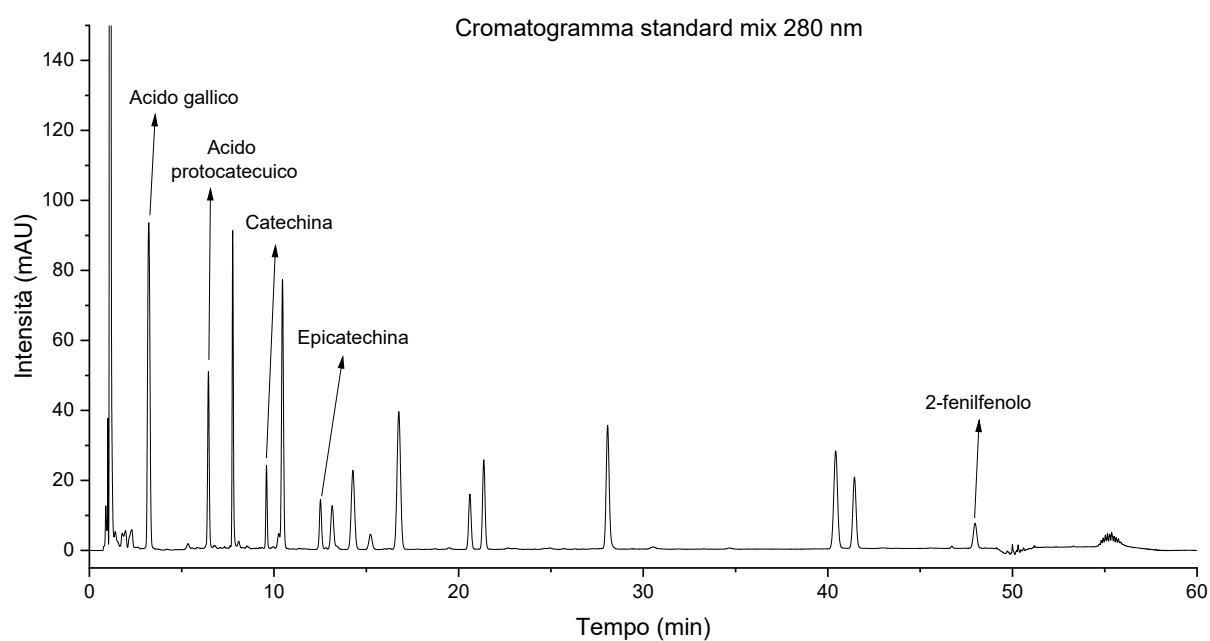


Figura 4.2 Cromatogramma standard mix a 5 mg/L registrato a 280 nm

- 300 nm

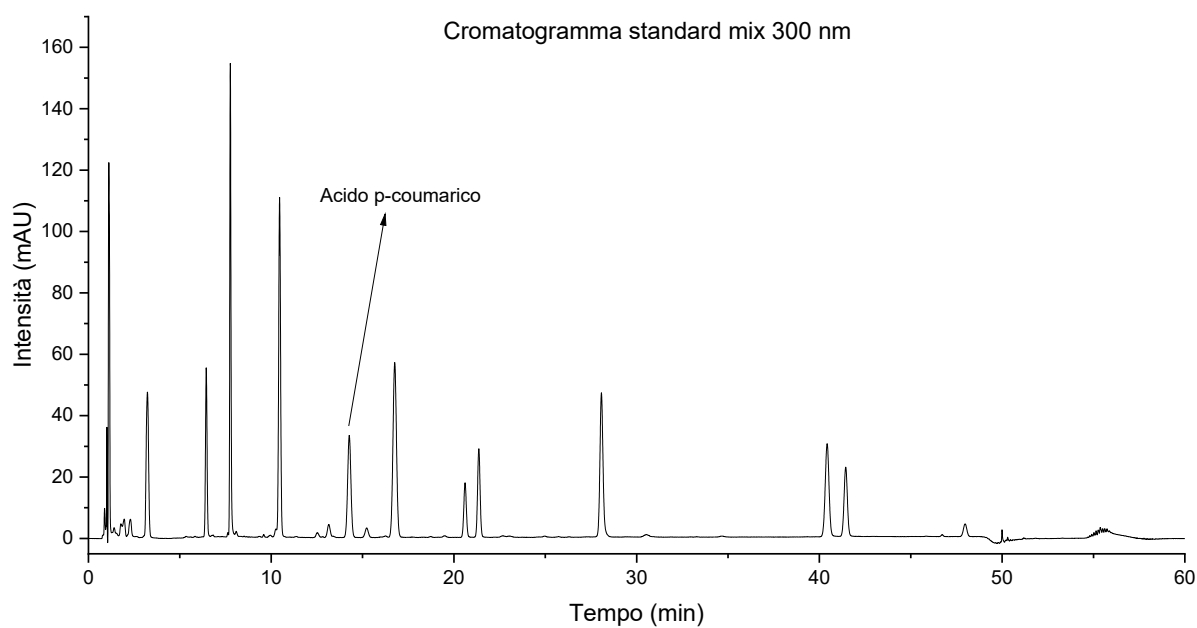


Figura 4.3 Cromatogramma standard mix a 5 mg/L registrato a 300 nm

- 325 nm

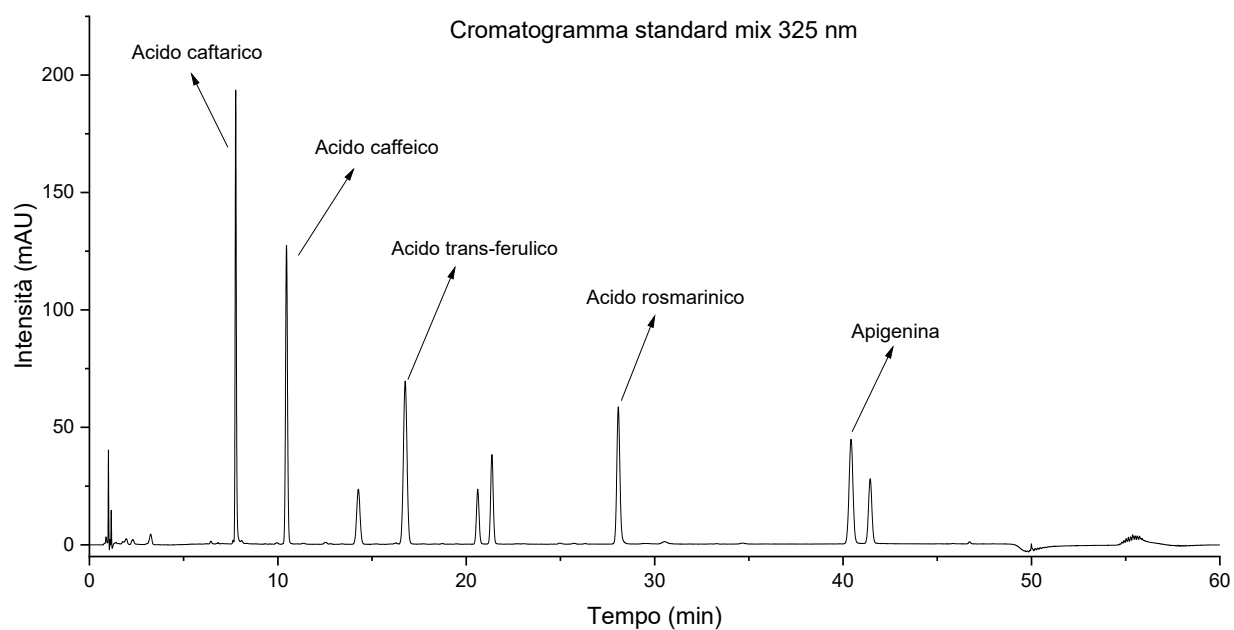


Figura 4.4 Cromatogramma standard mix a 5 mg/L registrato a 325 nm

- 370 nm

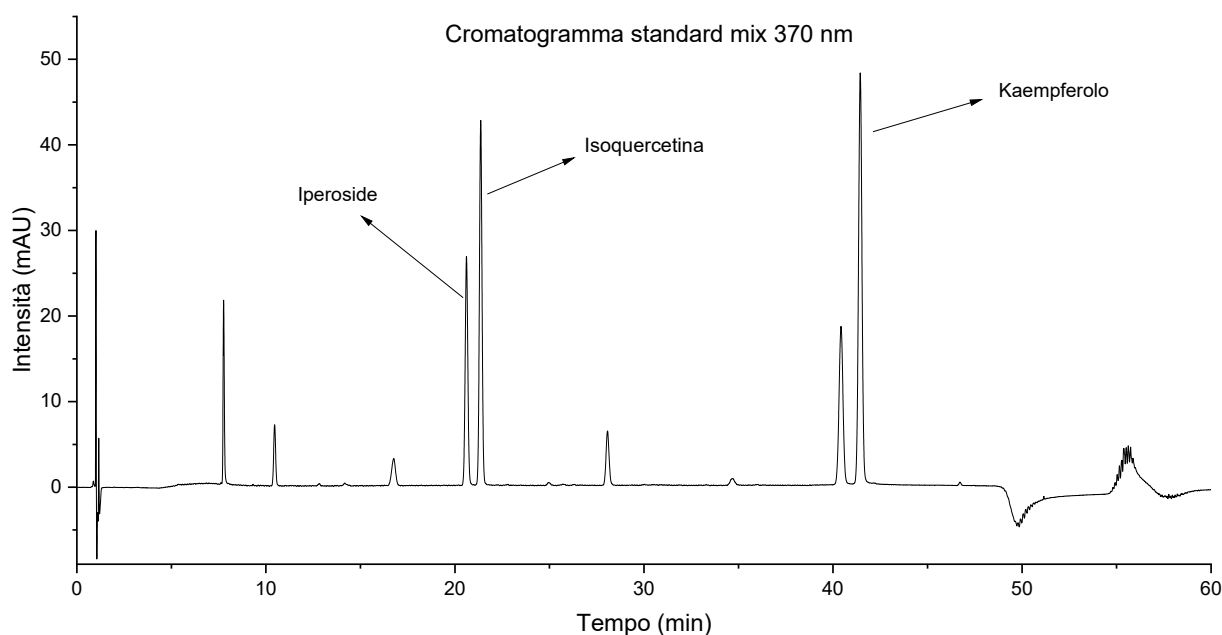


Figura 4.5 Cromatogramma standard mix a 5 mg/L registrato a 370 nm

Come si può notare, il gradiente impostato ha permesso di risolvere efficacemente la miscela dei 13 polifenoli e dello standard interno in una corsa di 60 minuti, mantenendo una linea di base stabile e un rumore di fondo estremamente contenuto su tutti e quattro i canali analizzati.

4.2 Validazione del metodo

4.2.1 Linearità e analisi statistica

La linearità del metodo è stata valutata studiando 8 livelli di concentrazione (0,05 mg/L, 0,1 mg/L, 0,25 mg/L, 0,5 mg/L, 1 mg/L, 2 mg/L, 3,5 mg/L, 5 mg/L), effettuando 3 repliche genuine per ciascun livello per ogni composto. Per tutti gli analiti i coefficienti di determinazione R^2 sono risultati superiori a 0,99, evidenziando un'eccellente correlazione lineare tra il segnale e la concentrazione. L'analisi della varianza (ANOVA) applicata alla regressione ha dimostrato che per tutti i 13 analiti il modello matematico lineare è statisticamente significativo e pienamente adeguato a descrivere la relazione tra concentrazione e risposta strumentale. Parallelamente, il test-t condotto sull'intercetta (q) ha fornito per tutti

i composti un valore di $p > 0,05$. Questo indica che l'intercetta non è statisticamente significativa (non è statisticamente diversa da zero) e quindi il modello di regressione passa idealmente per l'origine degli assi. Infine, l'analisi dei residui rivela, per diverse molecole, una parziale distribuzione a "imbuto" all'aumentare della concentrazione, segnale tipico della presenza di eteroschedasticità. Tale andamento è da considerarsi prevedibile per questo tipo di metodo che opera su intervalli di calibrazione estesi (pari a due ordini di grandezza), dove la variabilità del segnale tende naturalmente a incrementare ai livelli di concentrazione più elevati. Questa lieve tendenza all'eteroschedasticità non inficia però l'adeguatezza del modello: l'assenza di trend non lineari nel test dei residui e l'elevata significatività dell'ANOVA confermano che la linearità complessiva è preservata e che il modello mantiene un'eccellente capacità predittiva lungo tutto il range analizzato.

I grafici delle rette di calibrazione, le tabelle ANOVA, l'esito dei test-t e i grafici dei residui per ciascun analita sono consultabili nell'appendice A.

La tabella 4.2 riportata di seguito riassume le equazioni delle rette di calibrazione per ciascun analita e il corrispondente valore di R^2 , ottenuti nell'intervallo di calibrazione 0,05-5 mg/L:

Analita	Equazione retta ($y=mx+q$)	R^2
Acido gallico	$y = 2,76451x - 0,00142$	0,9999
Acido protocatecuico	$y = 1,0097x - 0,0088$	0,9995
Acido caftarico	$y = 2,901x - 0,0197$	0,9999
Catechina	$y = 0,4093x + 0,0011$	0,9999
Acido caffeico	$y = 3,0962x - 0,0019$	0,9999
Epicatechina	$y = 0,3808x + 0,0024$	0,9999
Acido p-coumarico	$y = 1,4008x + 0,0091$	0,9999
Acido trans-ferulico	$y = 3,1228x + 0,0177$	0,9999
Iperoside	$y = 0,8693x + 0,0044$	0,9999
Isoquercetina	$y = 1,3802x + 0,0064$	0,9999
Acido rosmarinico	$y = 2,284x - 0,0163$	0,9999
Apigenina	$y = 2,1998x - 0,0573$	0,9996
Kaempferolo	$y = 2,0705x - 0,0824$	0,9990

Tabella 4.2 Equazioni delle rette e relativi R^2 per ogni analita

4.2.2 LOD e LOQ

La sensibilità del metodo è stata valutata attraverso la determinazione dei Limiti di Rilevabilità (LOD) e di Quantificazione (LOQ), come descritto nei precedenti paragrafi 2.5.2 e 2.5.3. Tali parametri sono stati calcolati sperimentalmente effettuando 8 repliche genuine del bianco di calibrazione, composto dalla fase mobile di partenza con aggiunta di acido ascorbico al 0,0025% m/v e di standard interno in concentrazione 2 mg/L. Di seguito in tabella 4.3 vengono riportati i valori di LOD e LOQ calcolati:

Analita	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
Acido gallico	0,0015	0,0047
Acido protocatecuico	0,0051	0,0154
Acido caftarico	0,0012	0,0035
Catechina	0,0069	0,0211
Acido caffeico	0,0017	0,0051
Epicatechina	0,0090	0,0273
Acido p-coumarico	0,0021	0,0063
Acido trans-ferulico	0,0011	0,0034
Iperoside	0,0033	0,0101
Isoquercetina	0,0024	0,0074
Acido rosmarinico	0,0017	0,0050
Apigenina	0,0154	0,0466
Kaempferolo	0,0011	0,0034

Tabella 4.3 Valori di LOD e LOQ degli analiti

Tali valori evidenziano un'elevata sensibilità e si rivelano ampiamente adeguati allo scopo del metodo.

4.2.3 Ripetibilità

La ripetibilità, come specificato nel paragrafo 2.5.4, è stata valutata su 3 livelli di concentrazione diversi: un livello basso (0,05 mg/L), un livello medio (2,5 mg/L) ed un livello alto (5 mg/L). In tabella 4.4 vengono riportati i valori di RSD% per ciascun livello di concentrazione:

Analita	Ripetibilità (RSD %)		
	Livello basso (0,05 mg/L)	Livello medio (2,5 mg/L)	Livello alto (5 mg/L)
Acido gallico	5,39	2,42	0,08
Acido protocatecuico	4,49	0,89	0,98
Acido caftarico	6,78	1,71	0,72
Catechina	18,51	1,24	0,02
Acido caffeico	6,00	1,89	0,13
Epicatechina	16,11	1,70	0,34
Acido p-coumarico	9,52	2,17	0,06
Acido trans-ferulico	6,43	1,99	0,11
Iperoside	16,82	1,60	0,32
Isoquercetina	12,23	1,89	0,39
Acido rosmarinico	5,96	1,62	0,23
Apigenina	9,30	3,18	0,51
Kaempferolo	8,87	1,51	0,09

Tabella 4.4 Valori di RSD% di ciascun analita ai 3 livelli di concentrazione

Come si può notare dai dati sperimentali della tabella 4.4, il metodo sviluppato mostra una precisione ampiamente soddisfacente, con un andamento dei valori di RSD% strettamente legato alla concentrazione dei composti analizzati.

Ai livelli medio e alto i valori di RSD% si attestano su livelli eccellenti, risultando quasi sistematicamente inferiori al 2% e confermando un'ottima stabilità della risposta strumentale e una minima dispersione dovuta agli errori casuali. Al livello basso si registra inevitabilmente un incremento dei valori di RSD%, dovuto alla diminuzione del rapporto segnale/rumore e alla vicinanza dei limiti di quantificazione. Si può affermare quindi che la precisione complessiva del metodo sia ampiamente soddisfacente lungo l'intero range indagato, evidenziando performance eccezionali e una dispersione quasi nulla degli errori casuali soprattutto in corrispondenza dei livelli di concentrazione più elevati

4.3 Metodo cromatografico applicato a campioni reali

Al fine di valutare l'applicabilità e l'efficacia del metodo analitico sviluppato, si è proceduto ad analizzare 4 campioni di estratti acquosi e 1 campione di estratto

DES. Tutti i campioni oggetto dello studio sono stati gentilmente forniti dal Dipartimento per lo Sviluppo Sostenibile e la Transizione Ecologica (DiSSTE) dell'Università degli Studi del Piemonte Orientale "Amedeo Avogadro" (UPO), con sede a Vercelli.

4.3.1 Quantificazione in estratti acquosi

I quattro campioni acquosi rappresentano soluzioni estrattive ottenute mediante l'applicazione di differenti tecnologie e processi di estrazione. Per la preparazione del campione è stato utilizzato 1 g di gusci di nocciole in 35 ml di solvente di estrazione (17,5 ml di acqua + 17,5 ml di etanolo). Ad ogni campione è stato assegnato un codice identificativo basato sul metodo di estrazione:

- N-MWO2: estratto acquoso ottenuto mediante assistenza con microonde con durata di 45 minuti
- CN-PO3: estratto acquoso ottenuto mediante processo di pressurizzazione con durata di 45 minuti
- CN-TO4: estratto acquoso ottenuto tramite metodo tradizionale in agitazione termostata a 60 °C con durata di 45 minuti
- CN-USO5: estratto acquoso ottenuto mediante assistenza con ultrasuoni con durata di 45 minuti

Dall'analisi HPLC-DAD dei quattro estratti acquosi reali, la determinazione qualitativa ha permesso di identificare con certezza la presenza di due specifici acidi fenolici: l'acido gallico e l'acido protocatecuico.

Per quanto riguarda gli altri composti polifenolici indagati nel metodo, nei rispettivi tempi di ritenzione non sono stati rilevati segnali analitici utili. Nei casi in cui si è registrata la presenza di picchi cromatografici a tempi analoghi a quelli degli standard, il confronto dei relativi spettri UV-Vis registrati ha mostrato una totale assenza di corrispondenza con gli spettri degli analiti ricercati.

Dato che i due unici analiti identificati vengono registrati ad una lunghezza d'onda di 280 nm, l'elaborazione dei dati è stata condotta su questo specifico canale. I corrispondenti profili cromatografici sono illustrati in Figura 4.6.

Al fine di ottimizzare la risoluzione visiva e facilitare il confronto diretto tra le diverse tecniche estrattive, i cromatogrammi sono stati focalizzati sull'intervallo temporale compreso tra 2 e 20 minuti, porzione di corsa che racchiude interamente i picchi d'interesse e i rispettivi tempi di ritenzione.

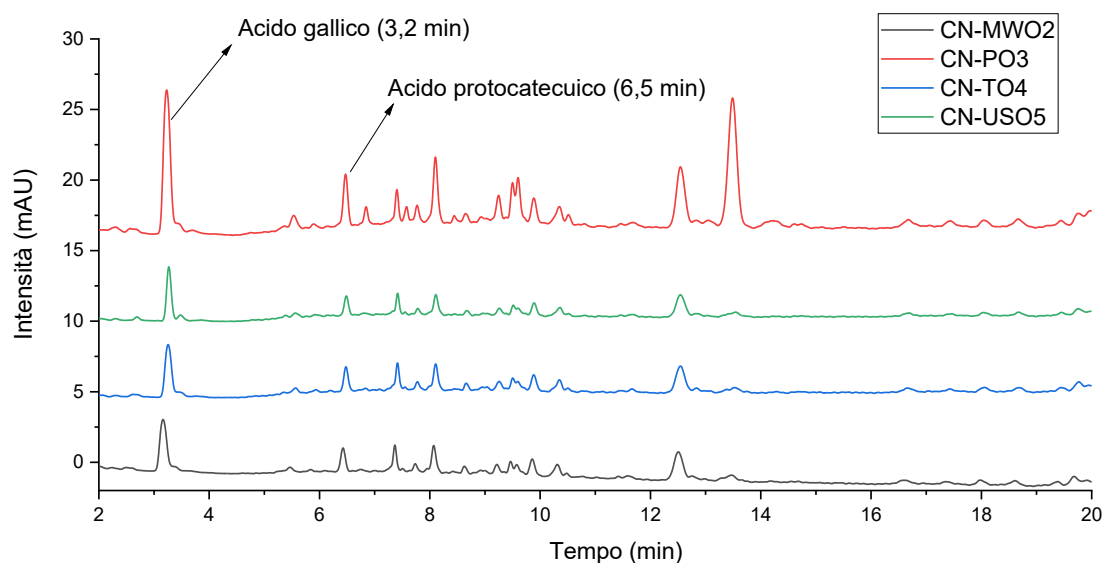


Figura 4.6 Cromatogrammi nell'intervallo da 2 a 20 minuti dei campioni registrati a 280 nm

La successiva quantificazione dei due acidi fenolici identificati è stata eseguita mediante le rette di taratura precedentemente costruite per ciascun analita. I risultati ottenuti sono stati successivamente riferiti alla massa di solido (biomassa iniziale) impiegata nel processo estrattivo. I valori quantitativi ottenuti per i quattro estratti acquosi sono riassunti nella Tabella 4.5:

Campioni	Acido Gallico (mg/g)	Acido Protocatecuico (mg/g)
CN-MWO2	0,0624	0,0615
CN-PO3	0,1740	0,1302
CN-TO4	0,0585	0,0610
CN-USO5	0,0471	0,0472

Tabella 4.5 Quantità di acido gallico e acido protocatecuico espressi in mg/g presenti nel solido

L'analisi comparativa dei dati evidenzia differenze marcate nell'efficienza di estrazione in funzione della tecnologia applicata. In particolare, il processo assistito da pressurizzazione (CN-PO3) ha mostrato performance nettamente superiori rispetto a tutte le altre metodiche indagate.

4.3.2 Semiquantificazione in estratto DES

Per quanto riguarda il campione in estratto DES l'analisi qualitativa non ha evidenziato picchi cromatografici i cui spettri UV-Vis corrispondessero a quelli degli standard di riferimento a disposizione. Tuttavia, il profilo mostrava la presenza di diversi picchi spettralmente riconducibili a sostanze fenoliche non incluse nei composti scelti. Per ovviare a ciò e ricavare comunque una stima sull'entità dell'estrazione, si è proceduto alla semiquantificazione dei componenti mediante l'uso dello Standard Interno. Tale elaborazione è stata condotta esclusivamente a 280 nm, in quanto è risultata l'unica lunghezza d'onda in cui lo standard interno presentava un assorbimento ottimale e un segnale chiaramente integrabile.

In figura 4.7 viene riportato il cromatogramma inerente al campione estratto con DES. Ogni picco isolato e potenzialmente riconducibile ad un composto di natura fenolica è stato numerato progressivamente e registrato per la successiva elaborazione.

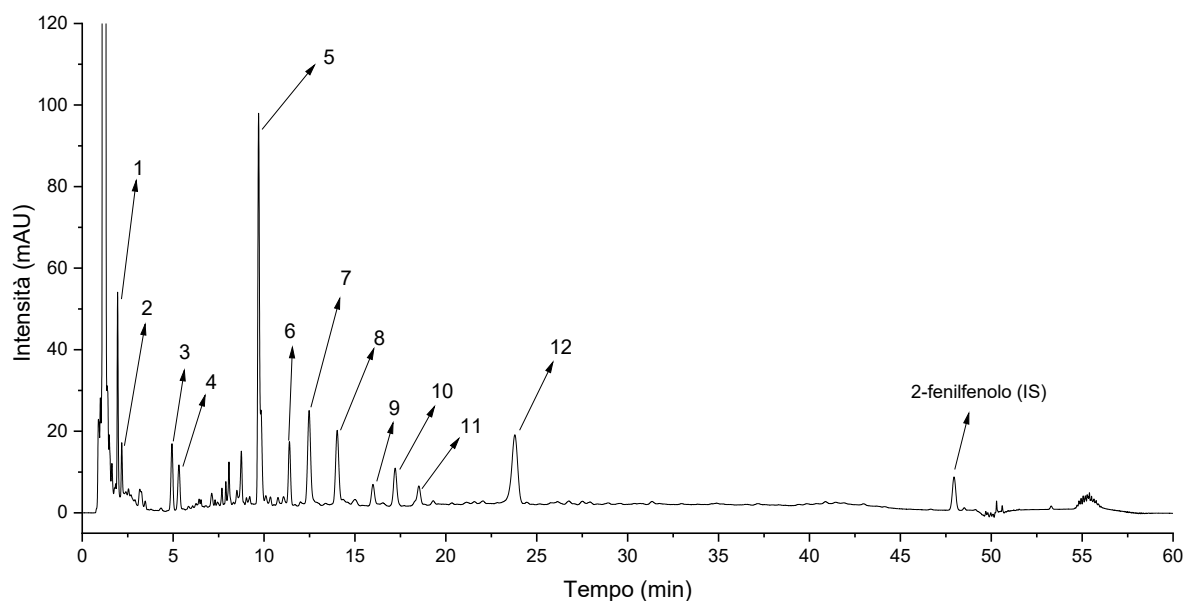


Figura 4.7 Cromatogramma campione DES a 280 nm

Picco	t_r (min)	Concentrazione stimata (mg/g)
1	1,94	0,33
2	2,17	0,09
3	4,93	0,22
4	5,31	0,16
5	9,7	1,33
6	11,39	0,22
7	12,48	0,51
8	14,02	0,41
9	15,99	0,11
10	17,21	0,22
11	18,51	0,13
12	23,79	0,70

Tabella 4.6 Risultati quantitativi dei picchi ignoti dell'estratto DES

4.4 Metodo di Folin-Ciocalteu applicato a campioni reali

Seguendo la procedura illustrata nel paragrafo 3.1.6. sono stati sottoposti al saggio di Folin-Ciocalteu i medesimi campioni analizzati con il metodo cromatografico sviluppato e validato in questo studio. Il protocollo ha previsto inizialmente la costruzione di una retta di calibrazione a 3 livelli di acido e successivamente la registrazione dell'assorbanza di ciascun campione alla lunghezza d'onda di 768 nm, corrispondente al massimo di assorbimento del complesso blu. I segnali così

ottenuti sono stati interpolati sulla retta di calibrazione e i risultati finali sono stati espressi in milligrammi di acido gallico equivalenti su grammo di biomassa iniziale (mg GAE/g). Di seguito vengono riportati la retta di calibrazione (figura 4.7) e i risultati quantitativi ottenuti (tabella 4.7):

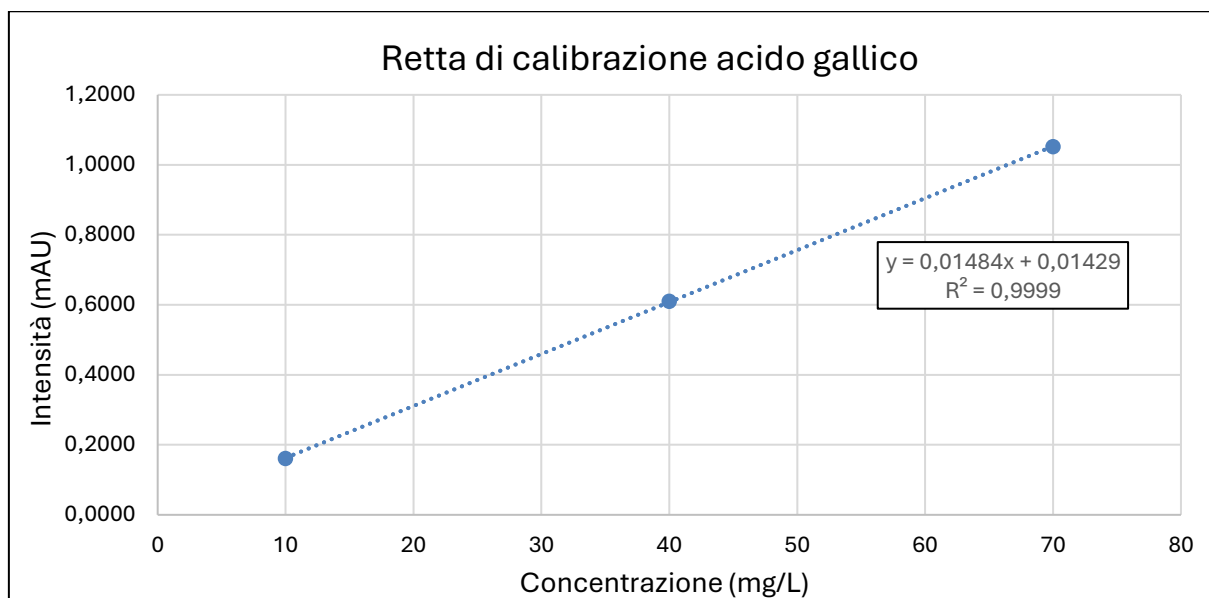


Figura 4.7 Retta di calibrazione dell'acido gallico a 768 nm

Campione	Assorbanza a 768 nm	Concentrazione (mg/L)	Concentrazione (mg GAE/g)
DES 1:1000	0,3593	23251,5	38,76
CN-PO3 1:10	0,5276	345,9	12,10
CN-TO4 1:10	0,2285	144,3	5,055
CN-MWO2 1:10	0,2212	139,4	4,880
CN-USO5 1:10	0,1194*	70,83*	2,479*

Tabella 4.7 Contenuto di polifenoli totale presente nei campioni

*Fuori range di calibrazione

Per quanto riguarda le matrici acquose, il processo assistito da pressurizzazione (CN-PO3) si conferma indiscutibilmente come la metodologia più efficiente, andamento già convalidato e discusso durante l'analisi cromatografica. Dall'altro lato, il DES dimostra una capacità estrattiva straordinariamente superiore rispetto all'acqua. Nonostante le elevatissime diluizioni necessarie per l'analisi, il DES fa registrare concentrazioni polifenoliche totali altissime, confermando l'elevata affinità chimica con la biomassa di partenza.

5. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

Il presente lavoro di tesi ha riguardato lo sviluppo, la validazione e l'applicazione di un metodo analitico ottimizzato in HPLC-DAD per la caratterizzazione di estratti polifenolici da matrici agroalimentari, in questo specifico caso gusci di nocciole.

5.1 Conclusioni

L'ottimizzazione delle condizioni cromatografiche ha permesso di ottenere una separazione efficiente e ad alta risoluzione di 13 composti fenolici e del relativo standard interno, evitando coeluzioni e garantendo la pulizia dei segnali anche in presenza di interferenti e impurezze. La successiva fase di validazione ha confermato l'elevata robustezza e l'affidabilità del metodo sviluppato. Per quanto riguarda l'intervallo di linearità, i modelli di calibrazione hanno mostrato un'eccellente linearità in tutto l'intervallo di concentrazione indagato, rendendo la risposta strumentale precisa e affidabile.

I limiti di rilevabilità (LOD) e di quantificazione (LOQ) bassi testimoniano un'elevata sensibilità del metodo, rendendolo idoneo all'analisi di componenti anche in tracce.

La precisione del metodo è stata valutata tramite ripetibilità (precisione intra-day), calcolando valori di RSD% per diversi livelli di concentrazione. I valori bassi di RSD% dimostrano una buona precisione del metodo non solo a concentrazioni alte, ma anche a concentrazioni basse dove è plausibile un aumento dell'errore.

L'applicazione del metodo a campioni reali ha fornito risposte importanti dal punto di vista estrattivo. Negli estratti acquosi sono stati quantificati con successo acido gallico e acido protocatecuico, consentendo di decretare la tecnica estrattiva assistita con pressurizzazione come la metodologia a più alta efficienza; risultato confermato anche dal saggio di Folin-Ciocalteu. Nel caso dell'estratto DES, sebbene non sia stato possibile assegnare con certezza nessun picco ai 13 analiti, l'approccio basato sulla semiquantificazione tramite standard interno ha

consentito di quantificare 12 picchi incogniti di natura fenolica. I risultati ottenuti, supportati dalle risposte del saggio di Folin-Ciocalteu, hanno evidenziato la straordinaria capacità estrattiva del DES, capace di isolare composti polifenolici ad alta concentrazione.

In conclusione, il metodo proposto si è dimostrato validato, altamente performante e pienamente applicabile alla caratterizzazione di estratti polifenolici provenienti da diverse strategie di recupero.

5.2 Prospettive future

Le evidenze sperimentali raccolte in questo studio pongono le basi per successive ottimizzazioni e migliorie, a partire dall'estensione del metodo anche ad altri tipi di matrici agroalimentari. Dal punto di vista strumentale, un possibile sviluppo riguarda l'accoppiamento del metodo con la spettrometria di massa (HPLC-MS) che consente di superare i limiti strutturali di rivelazione del DAD, sfruttando i pattern di frammentazione per identificare in modo univoco ogni singolo picco. Un'ulteriore ottimizzazione operativa riguarderà la selezione di un nuovo standard interno, sarà infatti indispensabile trovare una molecola che assorba a tutte le lunghezze d'onda a cui si registra il segnale.

APPENDICE A

- Acido gallico

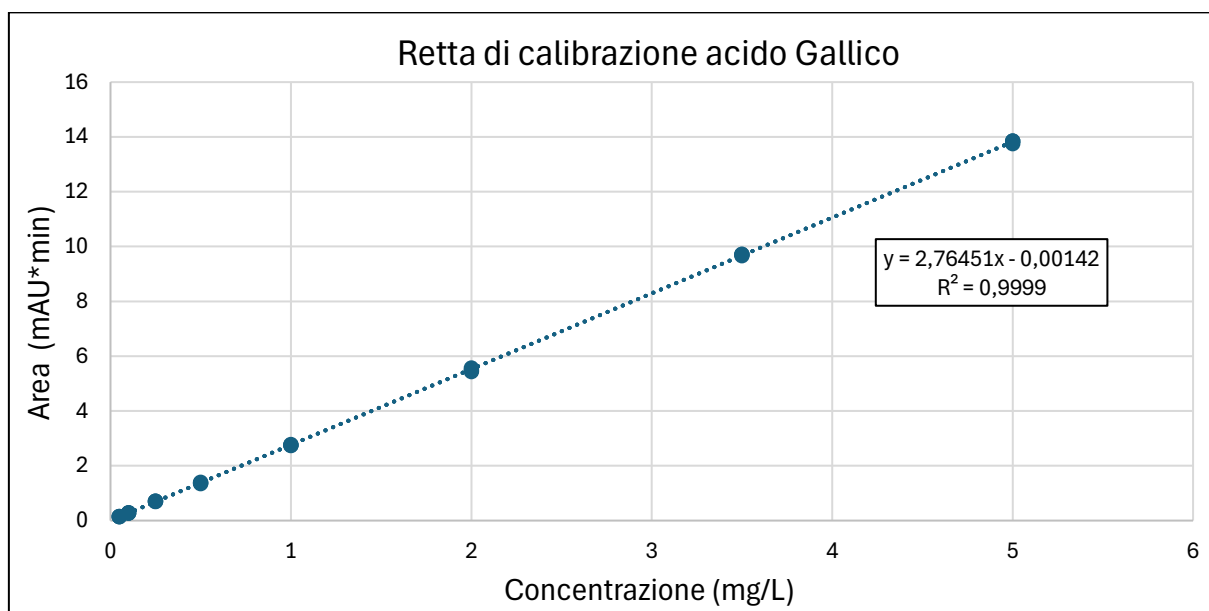


Figura A.1 Retta di calibrazione dell'acido gallico a 280 nm

ANALITA	Acido Gallico					
n	24					
k	8					
Sorgente	SS	df	MS	Fcalc	Ftab	Ipotesi
Regressione	535,4721981	1	535,4721981	529888,86	4,300949502	Esiste
residuo	0,02223181	22	0,001010537			
LOF	0,006187323	6	0,001031221	1,028361	2,741310828	Adeguate
PE	0,016044487	16	0,00100278			
TOT	535,4944299	23				

Figura A.2 Test statistico ANOVA dell'acido gallico

Intercetta (b_0)	Errore Standard (Sb_0)	Gradi di libertà (df)	$t_{tab}(\alpha=0,05)$	t_{calc}	p-value
-0,00142122	0,031788942	22	2,073873068	0,044708	0,964743

Tabella A.1 Test-t intercetta dell'acido gallico

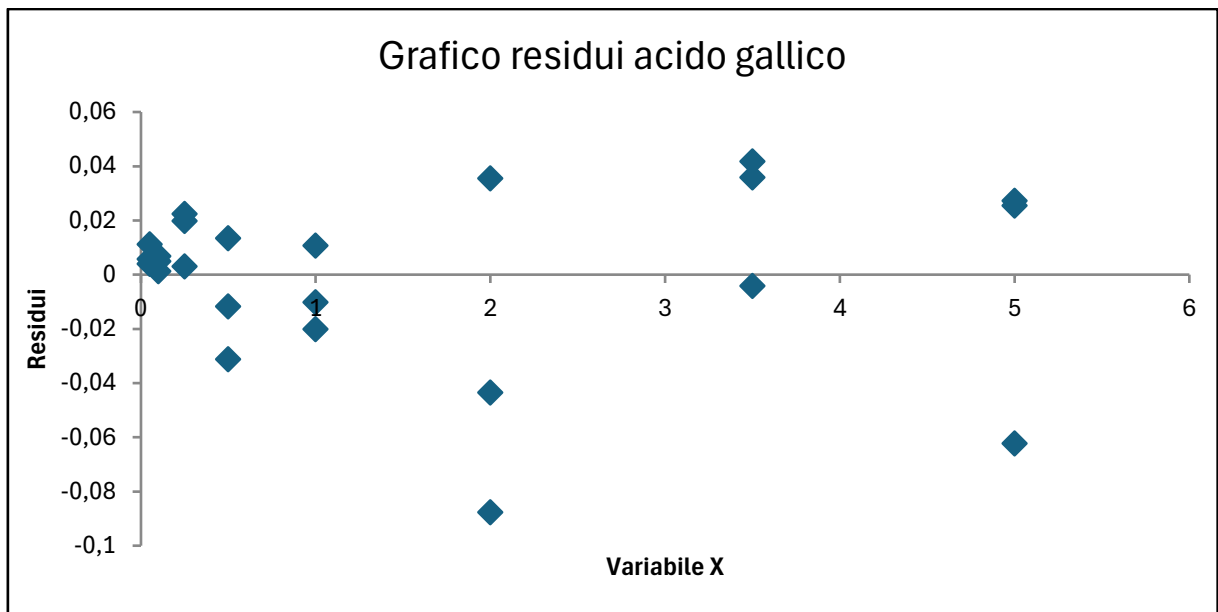


Figura A.3 Grafico dei residui dell'acido gallico

- Acido protocatecuico

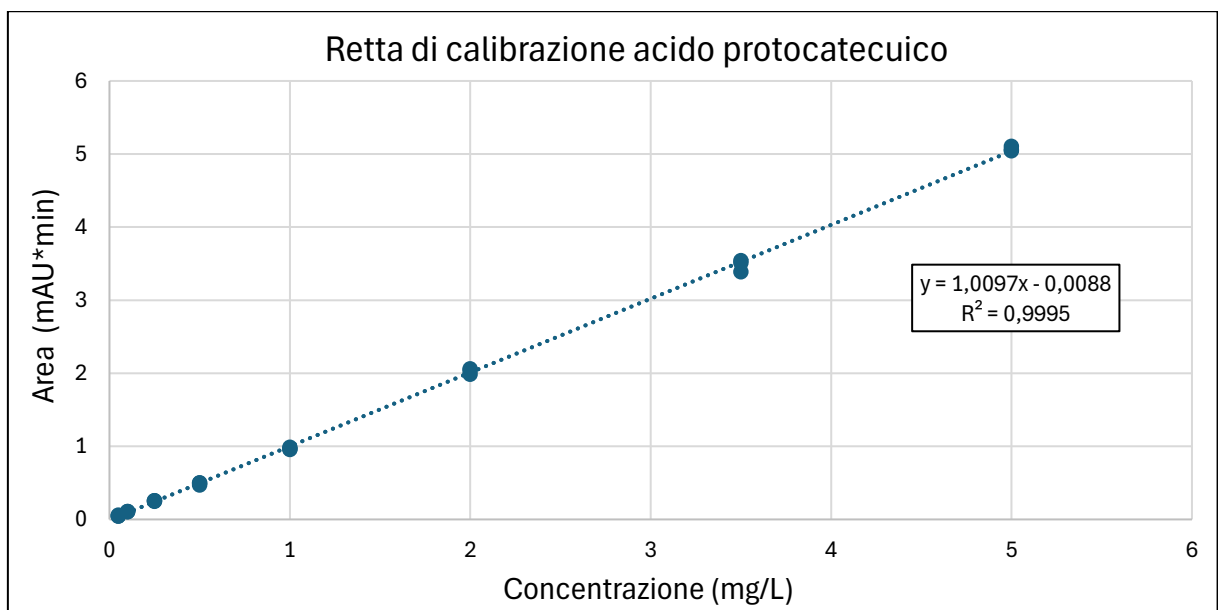


Figura A.4 Retta di calibrazione dell'acido protocatecuico a 280 nm

ANALITA	Acido Protocatecuico						
n	24						
k	8						
Sorgente	SS	df	MS	Fcalc	Ftab	Ipotesi	
Regressione	7,14E+01	1	7,14E+01	46685,73628	4,300949502	Esiste	Fcalc> Ftab
residuo	3,37E-02	22	0,001530144				
LOF	1,43E-02	6	0,002379961	1,964534877	2,741310828	Adeguate	Fcalc< Ftab
PE	1,94E-02	16	0,001211463				
TOT	7.15E+01	23					

Figura A.5 Test statistico ANOVA dell'acido protocatecuico

Intercetta (b_0)	Errore Standard (Sb_0)	Gradi di libertà (df)	$t_{tab}(\alpha=0,05)$	t_{calc}	p-value
-0,008802905	0,039117058	22	2,073873068	0,22504	0,824025

Tabella A.2 Test-t intercetta dell'acido protocatecuico

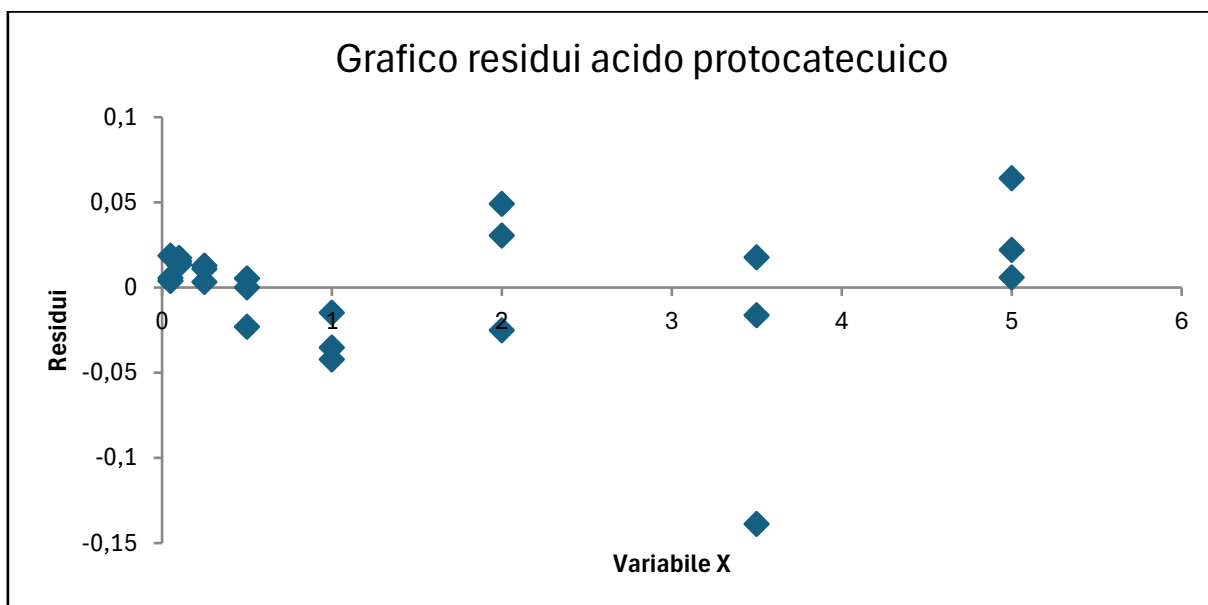


Figura A.6 Grafico dei residui dell'acido protocatecuico

- Acido caftarico

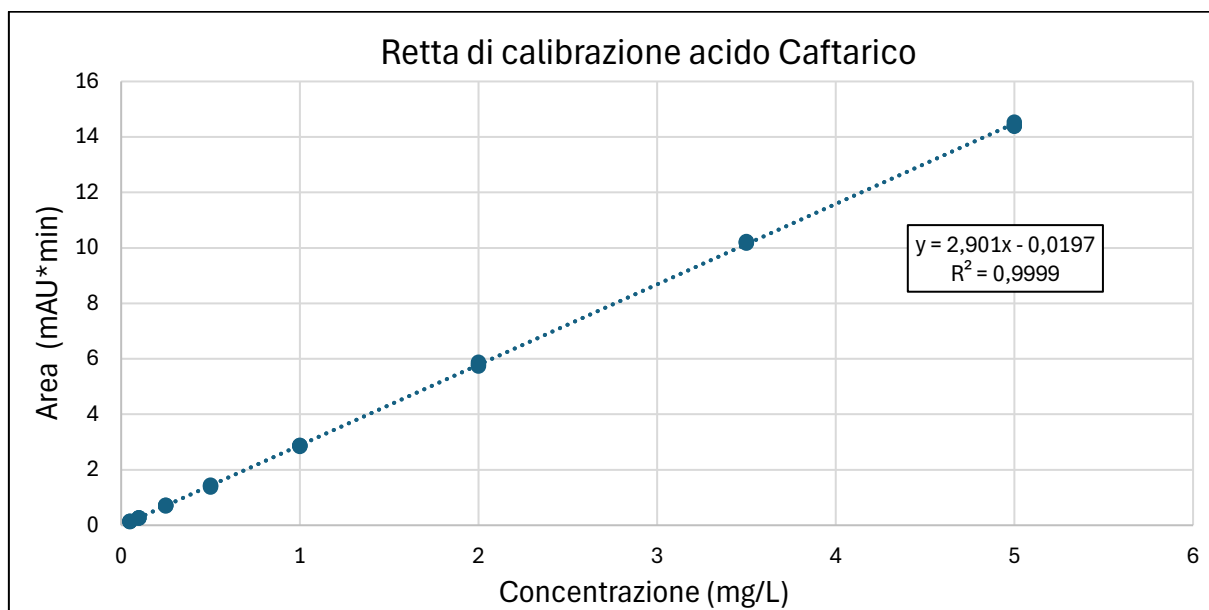


Figura A.7 Retta di calibrazione dell'acido caftarico a 325 nm

ANALITA	Acido Caftarico					
n	24					
k	8					
Sorgente	SS	df	MS	Fcalc	Ftab	Ipotesi
Regressione	5,90E+02	1	5,896362134E+02	2,562519167E+05	4,300949502	Esiste
residuo	5,06E-02	22	2,301002158E-03			Adeguate
LOF	2,48E-02	6	4,130611245E-03	2,55781438	2,741310828	Adeguate
PE	2,58E-02	16	1,614898750E-03			
TOT	5,90E+02	23				

Figura A.8 Test statistico ANOVA dell'acido caftarico

Intercetta (b_0)	Errore Standard (Sb_0)	Gradi di libertà (df)	$t_{tab}(\alpha=0,05)$	t_{calc}	p-value
-0,019718957	0,047968762	22	2,073873068	0,411079	0,684991

Tabella A.3 Test-t intercetta dell'acido caftarico

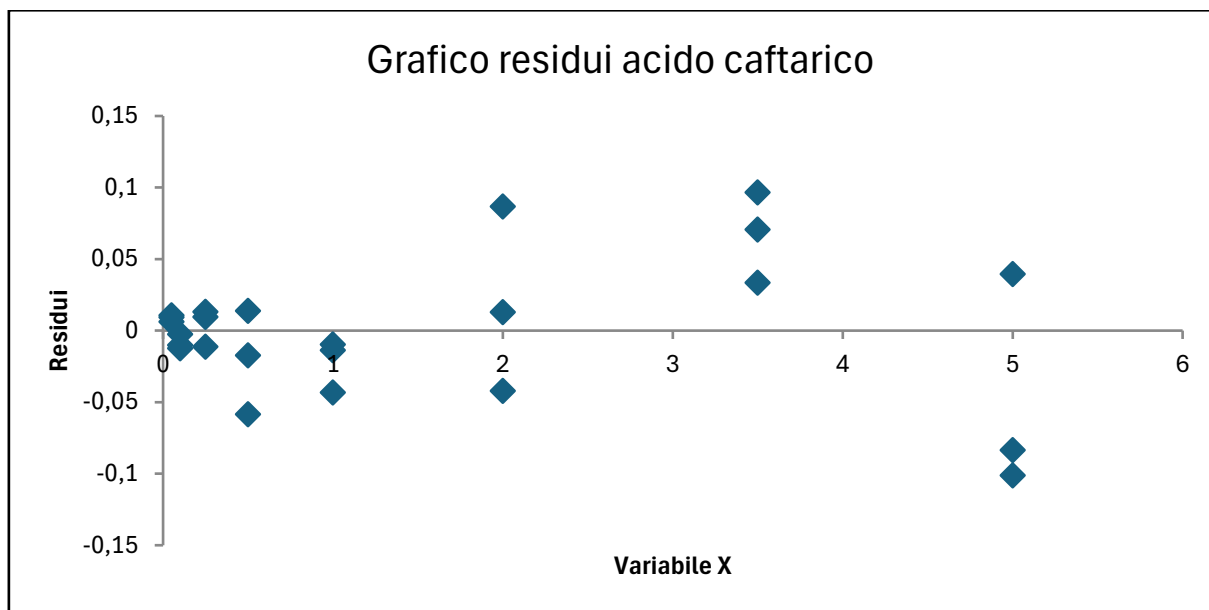


Figura A.9 Grafico dei residui dell'acido caftarico

- Catechina

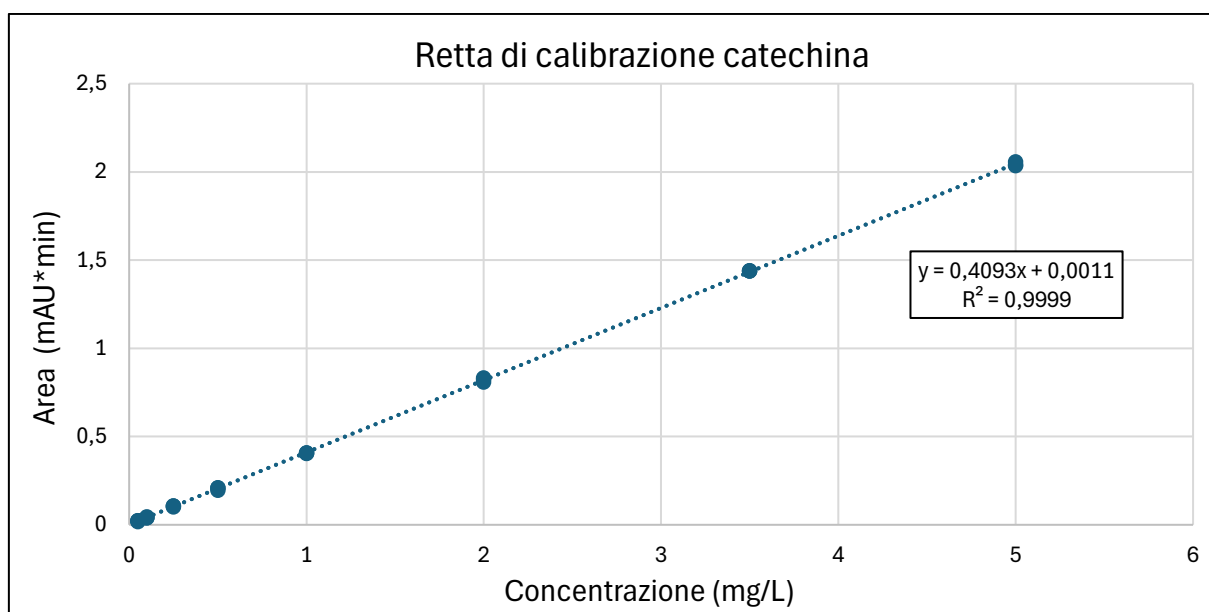


Figura A.10 Retta di calibrazione della catechina a 280 nm

ANALITA	Catechina						
n	24						
k	8						
Sorgente	SS	df	MS	Fcalc	Ftab	Ipotesi	
Regressione	1,17373E+01	1	1,173730598E+01	274301,4418	4,300949502	Esiste	Fcalc > Ftab
residuo	9,41376E-04	22	4,278980784E-05				
LOF	2,06809E-04	6	3,446818431E-05	0,750770453	2,741310828	Adeguate	Fcalc < Ftab
PE	7,34567E-04	16	4,591041667E-05				
TOT	1,17382E+01	23					

Figura A.11 Test statistico ANOVA della catechina

Intercetta (b_0)	Errore Standard (Sb_0)	Gradi di libertà (df)	$t_{tab}(\alpha=0,05)$	t_{calc}	p-value
0,001146824	0,006541392	22	2,073873068	0,175318	0,862433

Tabella A.4 Test-t intercetta della catechina

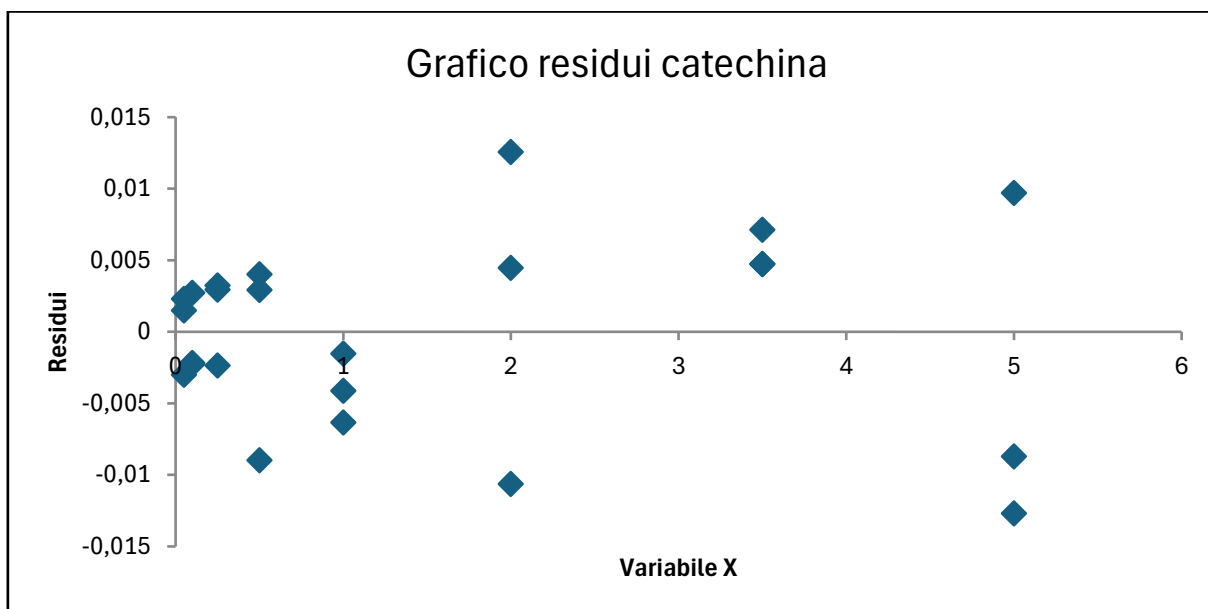


Figura A.12 Grafico dei residui della catechina

- Acido caffeico

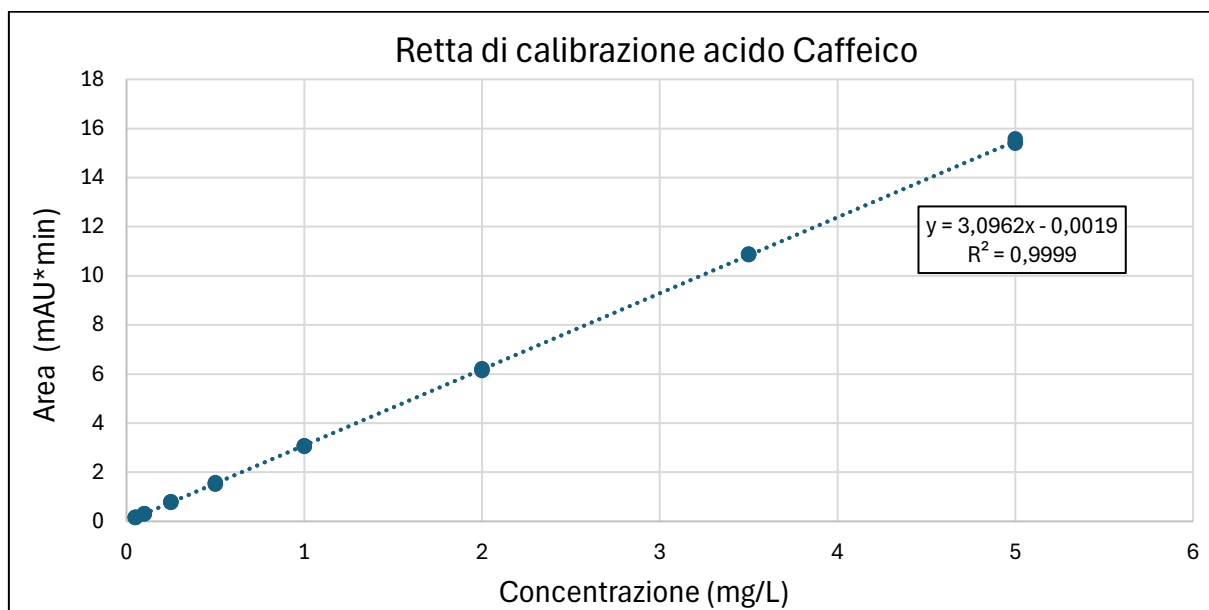


Figura A.13 Retta di calibrazione della dell'acido caffeico a 325 nm

ANALITA	Acido Caffeico					
n	24					
k	8					
Sorgente	SS	df	MS	Fcalc	Ftab	Ipotesi
Regressione	6,71687E+02	1	6,716867083E+02	402533,9979	4,300949502	Esiste
residuo	3,67102E-02	22	1,668645908E-03			
LOF	8,96972E-03	6	1,494953884E-03	8,622509916E-01	2,741310828	Adeguate
PE	2,77405E-02	16	1,733780417E-03			
TOT	6,71723E+02	23				

Figura A.14 Test statistico ANOVA dell'acido caffeico

Intercetta (b_0)	Errore Standard (Sb_0)	Gradi di libertà (df)	$t_{tab}(\alpha=0,05)$	t_{calc}	p-value
-0,001877077	0,040849063	22	2,073873068	0,045952	0,963763

Tabella A.5 Test-t intercetta dell'acido caffeico

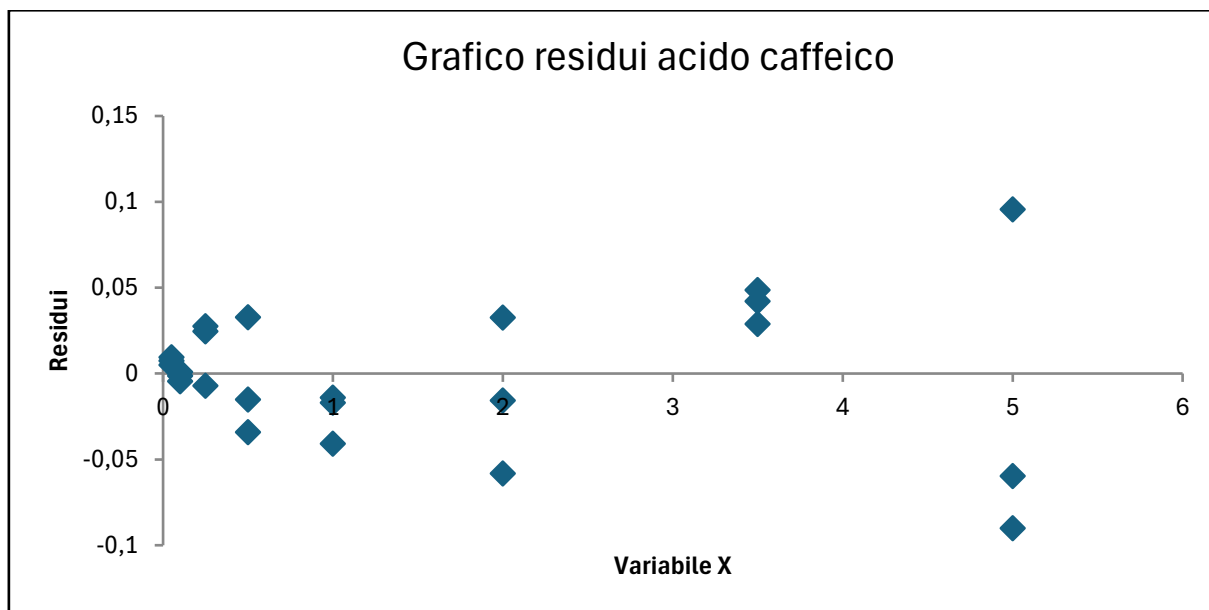


Figura A.15 Grafico dei residui dell'acido caffeico

- Epicatechina

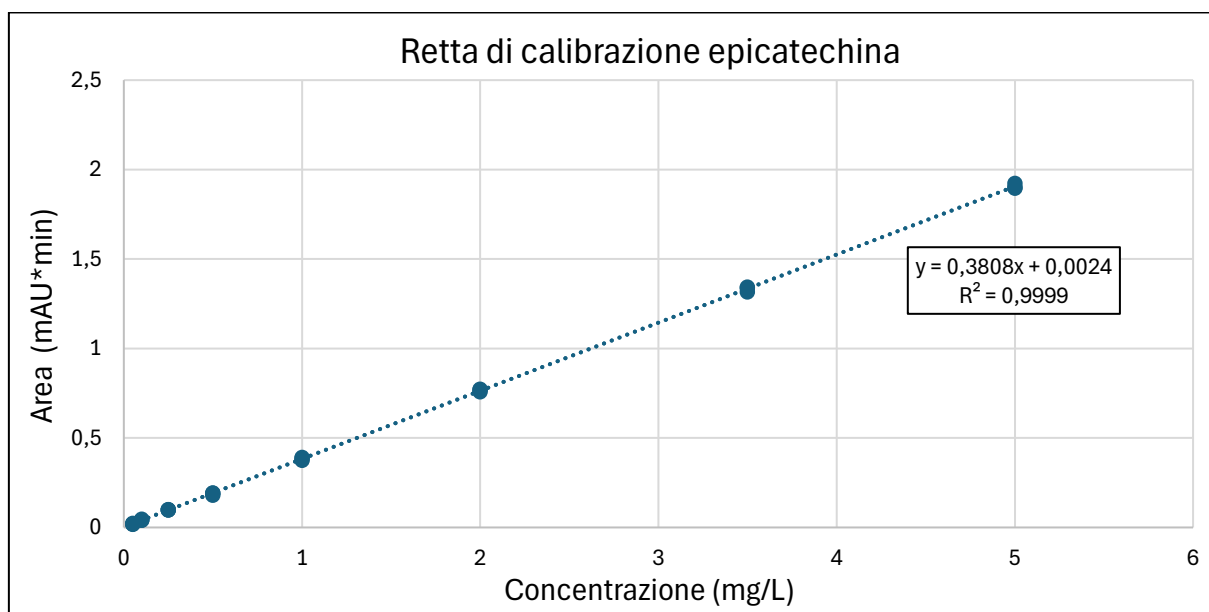


Figura A.16 Retta di calibrazione dell'epicatechina a 280 nm

ANALITA	Epicatechina					
n	24					
k	8					
Sorgente	SS	df	MS	Fcalc	Ftab	Ipotesi
Regressione	1,01584E+01	1	1,015841812E+01	168312,2409	4,300949502	Esiste
residuo	1,32780E-03	22	6,035460085E-05			
LOF	1,53535E-04	6	2,558909199E-05	0,348664816	2,741310828	Adeguate
PE	1,17427E-03	16	7,339166667E-05			
TOT	1,01597E+01	23				

Figura A.17 Test statistico ANOVA dell'epicatechina

Intercetta (b_0)	Errore Standard (Sb_0)	Gradi di libertà (df)	$t_{tab}(\alpha=0,05)$	t_{calc}	p-value
0,002361	0,007768822	22	2,073873068	0,303907	0,764054

Tabella A.6 Test-t intercetta dell'epicatechina

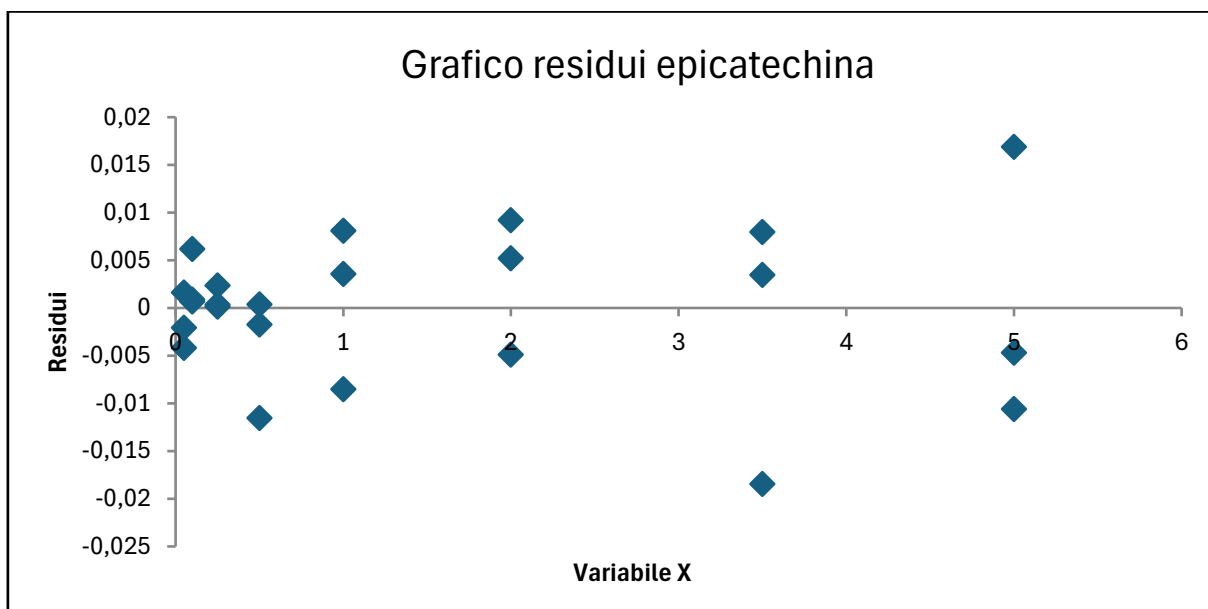


Figura A.18 Grafico dei residui dell'epicatechina

- Acido p-coumarico

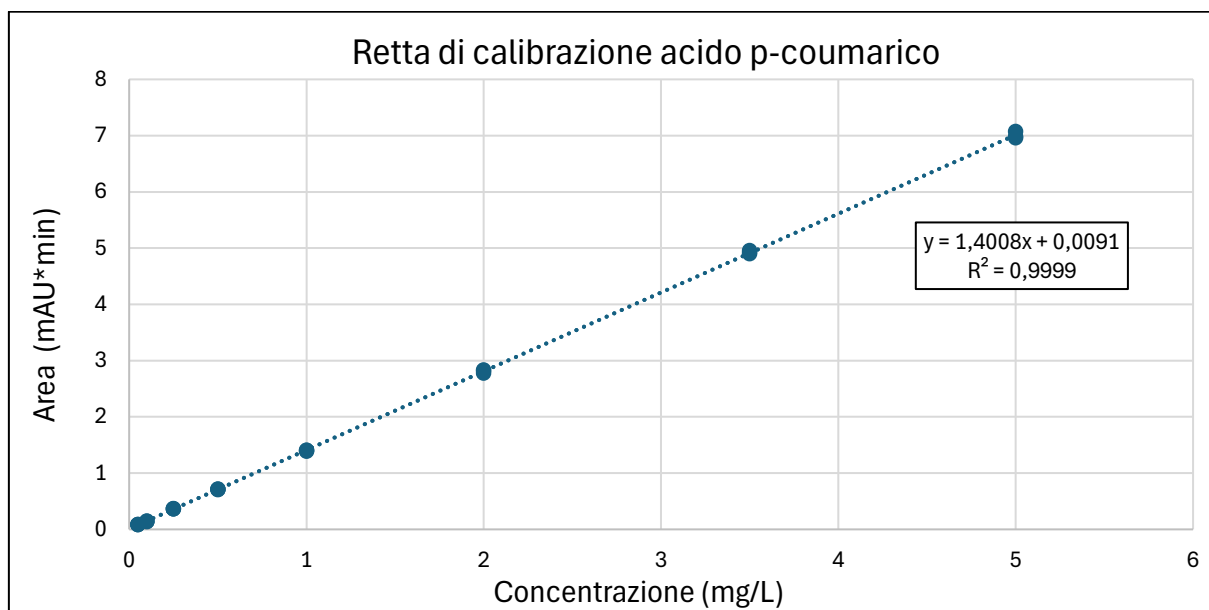


Figura A.19 Retta di calibrazione dell'acido p-coumarico a 300 nm

ANALITA	Acido p-Coumarico					
n	24					
k	8					
Sorgente	SS	df	MS	Fcalc	Ftab	Ipotesi
Regressione	1,37476E+02	1	1,374762743E+02	238656,7829	4,300949502	Esiste
residuo	1,26729E-02	22	5,760417644E-04			Adeguate
LOF	1,42149E-03	6	2,369142472E-04	0,336901783	2,741310828	Adeguate
PE	1,12514E-02	16	7,032145833E-04			
TOT	1,37489E+02	23				

Figura A.20 Test statistico ANOVA dell'acido p-coumarico

Intercetta (b_0)	Errore Standard (Sb_0)	Gradi di libertà (df)	$t_{tab}(\alpha=0,05)$	t_{calc}	p-value
0,009099088	0,02400087	22	2,073873068	0,379115	0,708237

Tabella A.7 Test-t intercetta dell'acido p-coumarico

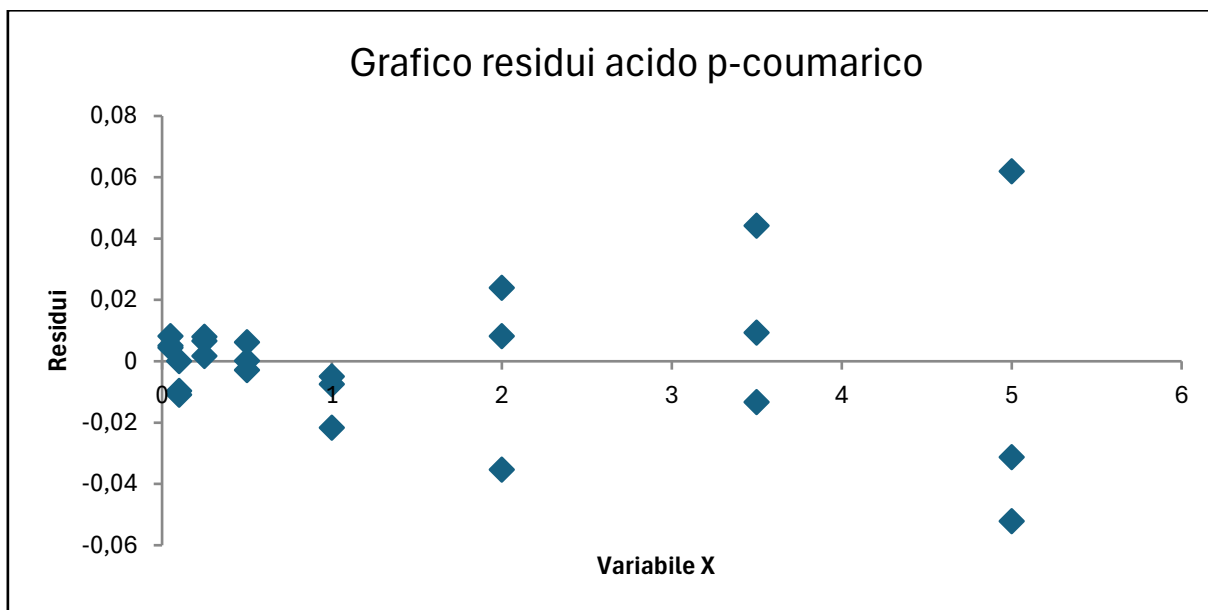


Figura A.21 Grafico dei residui dell'acido p-coumarico

- Acido trans-ferulico

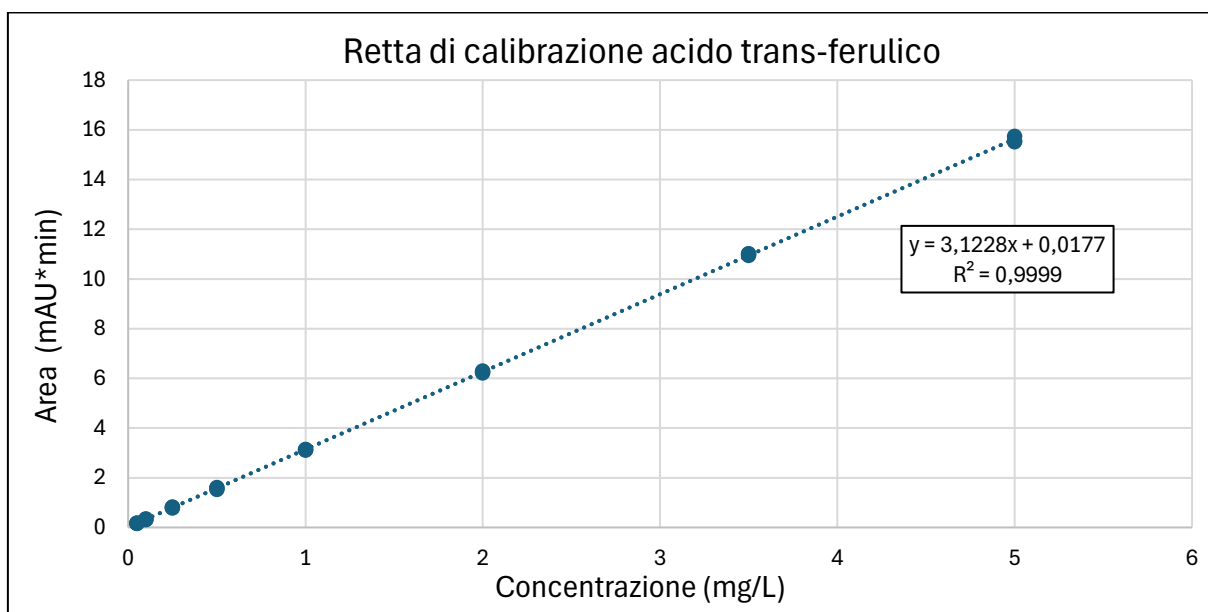


Figura A.22 Retta di calibrazione dell'acido trans-ferulico a 325 nm

ANALITA	Acido trans-ferulico					
n	24					
k	8					
Sorgente	SS	df	MS	Fcalc	Ftab	Ipotesi
Regressione	6,83282E+02	1	6,832821556E+02	307055,6362	4,300949502	Esiste
residuo	4,89560E-02	22	2,225271498E-03			
LOF	9,99821E-03	6	1,666367715E-03	0,684379155	2,741310828	Adeguate
PE	3,89578E-02	16	2,434860417E-03			
TOT	6,83331E+02	23				

Figura A.23 Test statistico ANOVA dell'acido trans-ferulico

Intercetta (b_0)	Errore Standard (Sb_0)	Gradi di libertà (df)	$t_{tab}(\alpha=0,05)$	t_{calc}	p-value
0,017717534	0,047172783	22	2,073873068	0,375588	0,71082

Tabella A.8 Test-t intercetta dell'acido p-coumarico

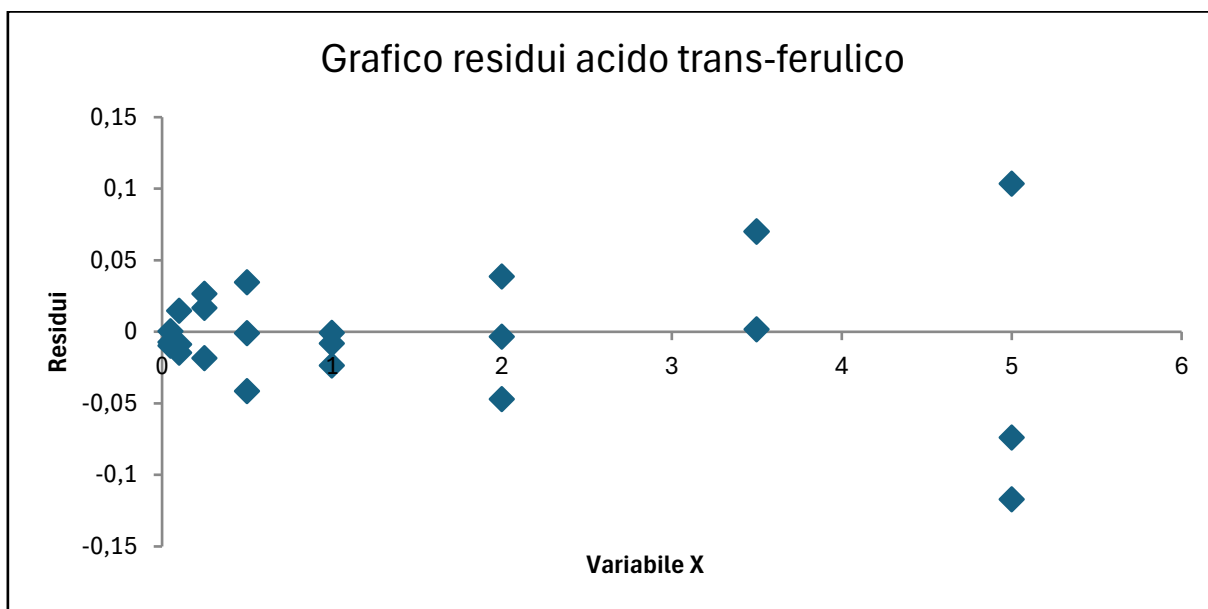


Figura A.24 Grafico dei residui dell'acido trans-ferulico

- Iperoside

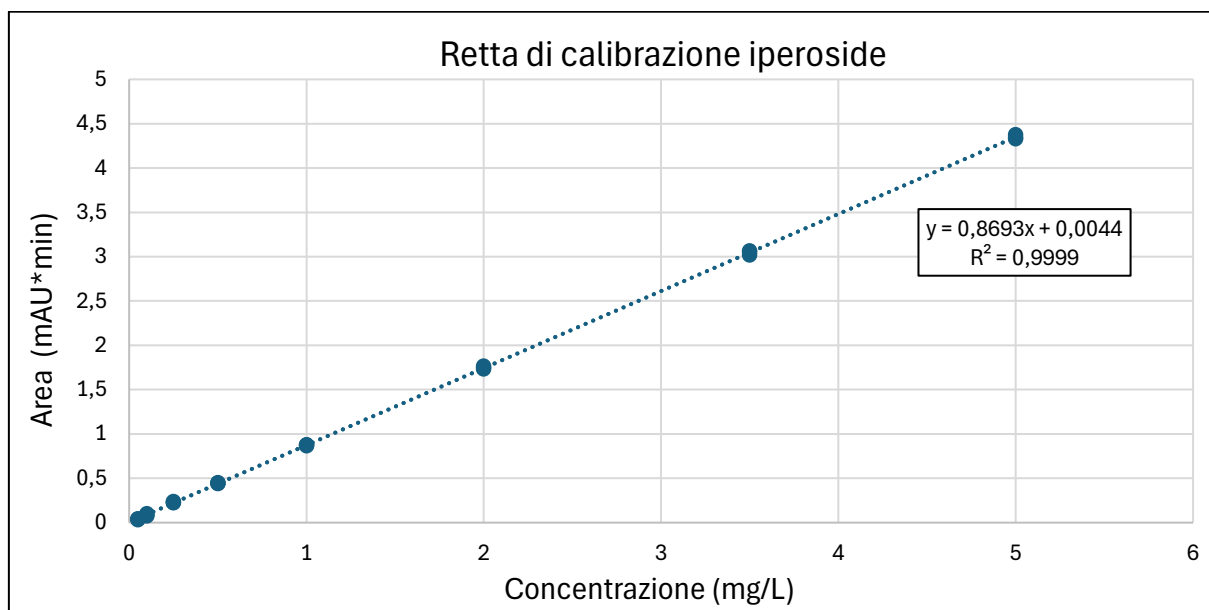


Figura A.25 Retta di calibrazione dell'iperoside a 370 nm

ANALITA	Iperoside					
n	24					
k	8					
Sorgente	SS	df	MS	Fcalc	Ftab	Ipotesi
Regressione	5,29439E+01	1	5,294394765E+01	263764,499	4,300949502	Esiste
residuo	4,41593E-03	22	2,007243122E-04			
LOF	7,37168E-04	6	1,228613671E-04			
PE	3,67877E-03	16	2,299229167E-04	0,534358944	2,741310828	Adeguate
TOT	5,29484E+01	23				

Figura A.26 Test statistico ANOVA dell'iperoside

Intercetta (b_0)	Errore Standard (Sb_0)	Gradi di libertà (df)	$t_{tab}(\alpha=0,05)$	t_{calc}	p-value
0,004372486	0,014167721	22	2,073873068	0,308623	0,760512

Tabella A.9 Test-t intercetta dell'iperoside

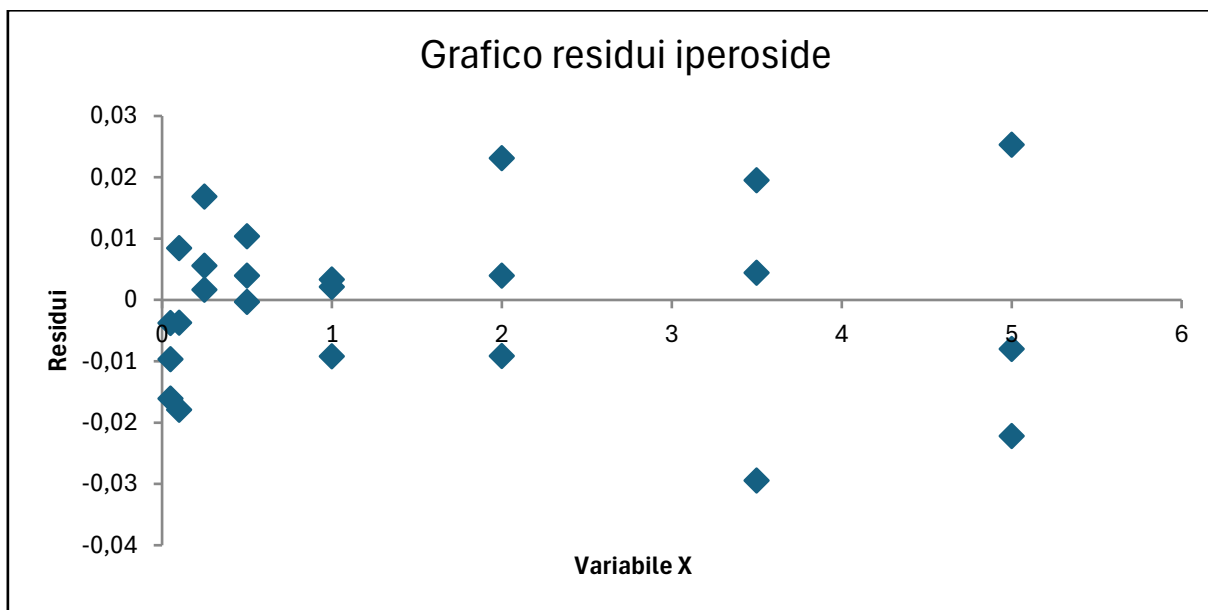


Figura A.27 Grafico dei residui dell'iperoside

- Isoquercetina

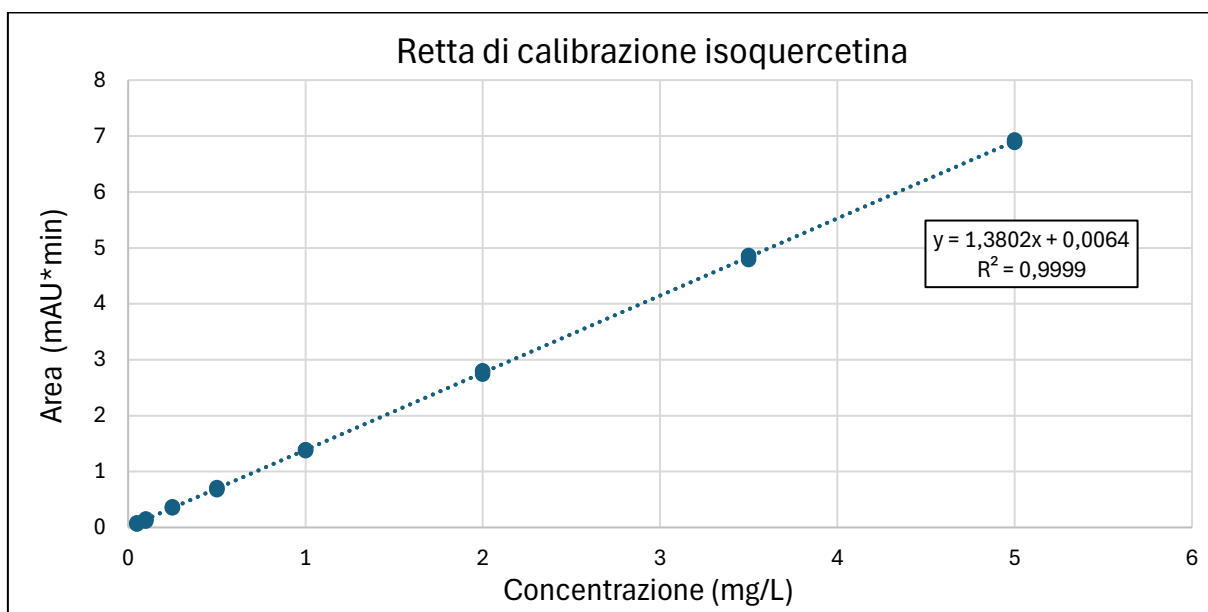


Figura A.28 Retta di calibrazione dell'isoquercetina a 370 nm

ANALITA	Isoquercetina					
n	24					
k	8					
Sorgente	SS	df	MS	Fcalc	Ftab	Ipotesi
Regressione	1,33467E+02	1	1,334674614E+02	320763,7201	4,300949502	Esiste
residuo	9,15404E-03	22	4,160927593E-04			
LOF	8,35521E-04	6	1,392534508E-04	0,267842743	2,741310828	Adeguate
PE	8,31852E-03	16	5,199075000E-04			
TOT	1,33477E+02	23				

Figura A.29 Test statistico ANOVA dell'isoquercetina

Intercetta (b_0)	Errore Standard (Sb_0)	Gradi di libert� (df)	$t_{tab}(\alpha=0,05)$	t_{calc}	p-value
0,006389069	0,020398352	22	2,073873068	0,313215	0,757067

Tabella A.10 Test-t intercetta dell'isoquercetina

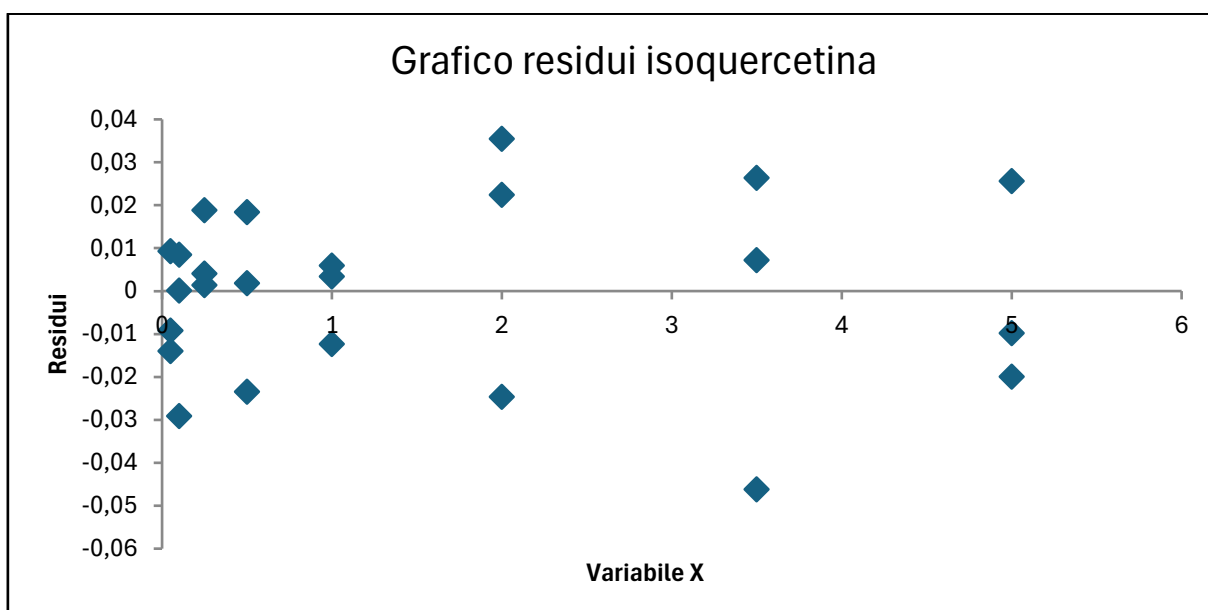


Figura A.30 Grafico dei residui dell'isoquercetina

- Acido rosmarinico

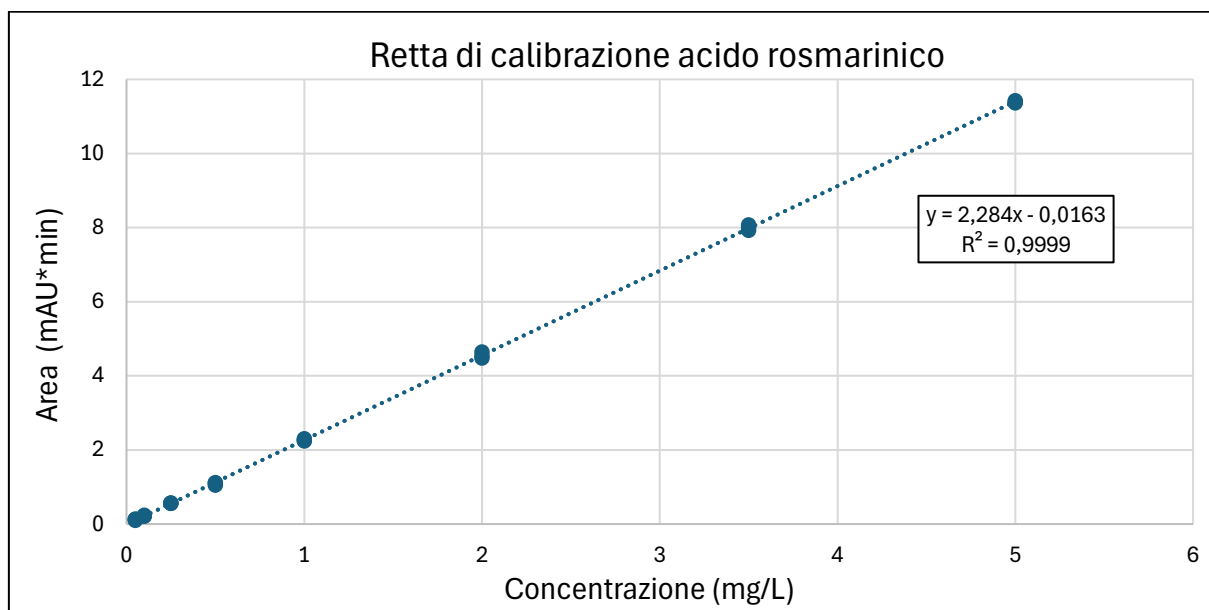


Figura A.31 Retta di calibrazione dell'acido rosmarinico a 325 nm

ANALITA	Acido Rosmarinico					
n	24					
k	8					
Sorgente	SS	df	MS	Fcalc	Ftab	Ipotesi
Regressione	3,65502E+02	1	3,655015538E+02	203715,6578	4,300949502	Esiste
residuo	3,94719E-02	22	1,794175066E-03			
LOF	8,36118E-03	6	1,393530797E-03	0,71668322	2,741310828	Adeguate
PE	3,11107E-02	16	1,944416667E-03			
TOT	3,65541E+02	23				

Figura A.32 Test statistico ANOVA dell'acido rosmarinico

Intercetta (b_0)	Errore Standard (Sb_0)	Gradi di libertà (df)	$t_{tab}(\alpha=0,05)$	t_{calc}	p-value
-0,016304131	0,042357704	22	2,073873068	0,384915	0,703996

Tabella A.11 Test-t intercetta dell'acido rosmarinico

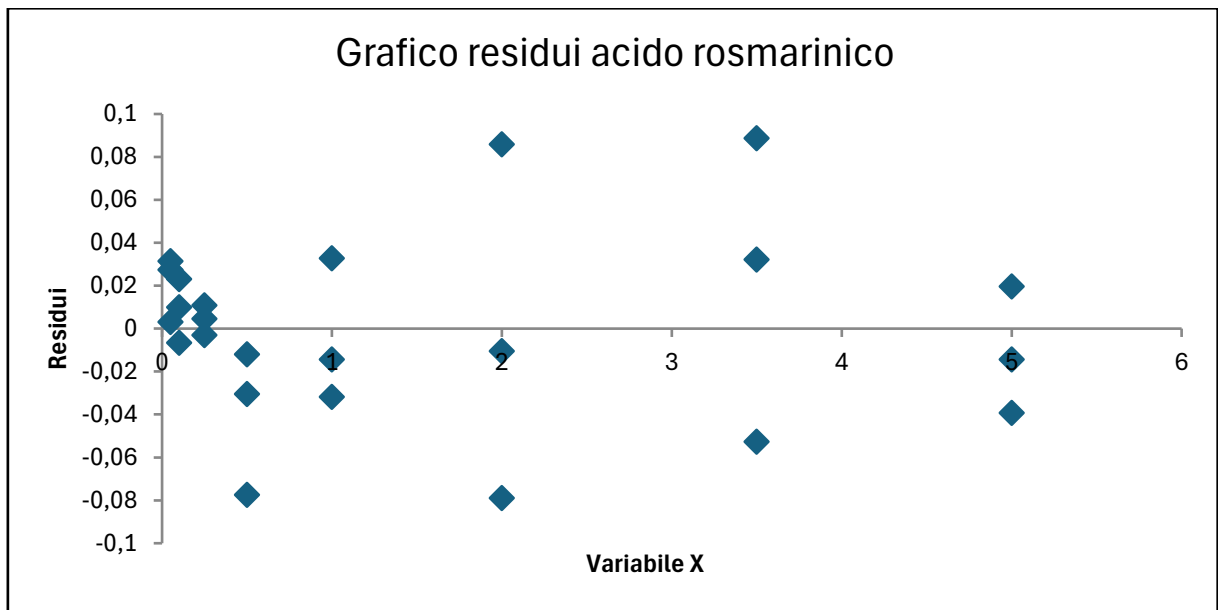


Figura A.33 Grafico dei residui dell'acido rosmarinico

- Apigenina

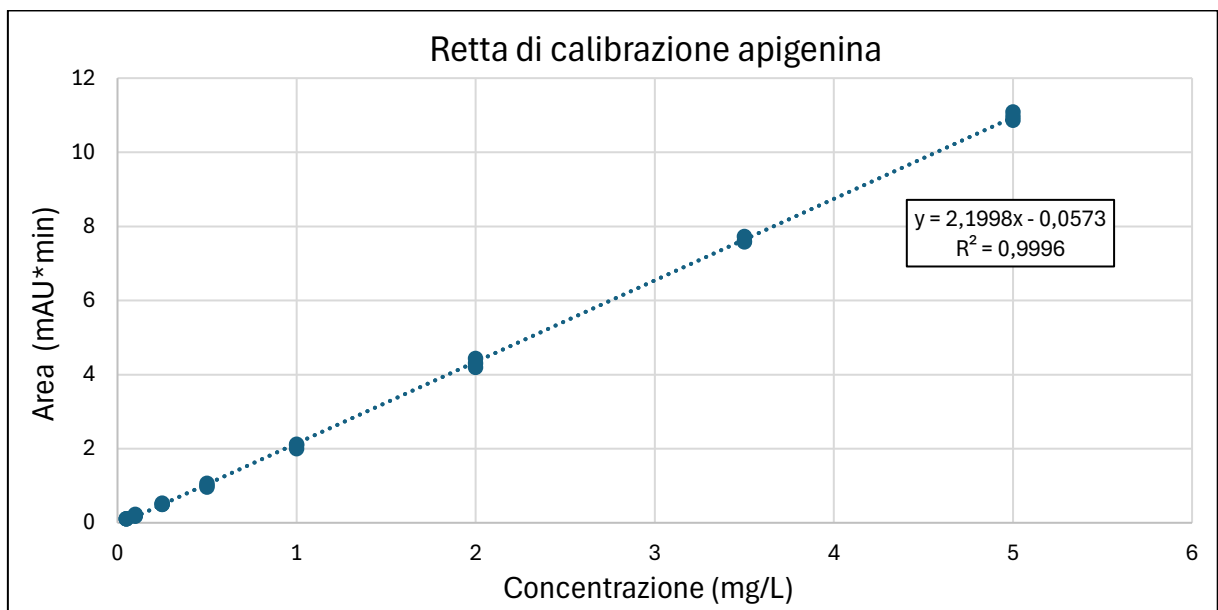


Figura A.34 Retta di calibrazione dell'apigenina a 325 nm

ANALITA	Apigenina						
n	24						
k	8						
Sorgente	SS	df	MS	Fcalc	Ftab	Ipotesi	
Regressione	3,39051E+02	1	3,390513090E+02	62479,81094	4,300949502	Esiste	Fcalc > Ftab
residuo	1,19385E-01	22	5,426573862E-03				
LOF	3,66149E-02	6	6,102485271E-03	1,179655703	2,741310828	Adeguate	Fcalc < Ftab
PE	8,27697E-02	16	5,173107083E-03				
TOT	3,39171E+02	23					

Figura A.35 Test statistico ANOVA dell'apigenina

Intercetta (b_0)	Errore Standard (S_{b_0})	Gradi di libert� (df)	$t_{tab}(\alpha=0,05)$	t_{calc}	p-value
-0,057323437	0,073665283	22	2,073873068	0,778161	0,444763

Tabella A.12 Test-t intercetta dell'apigenina

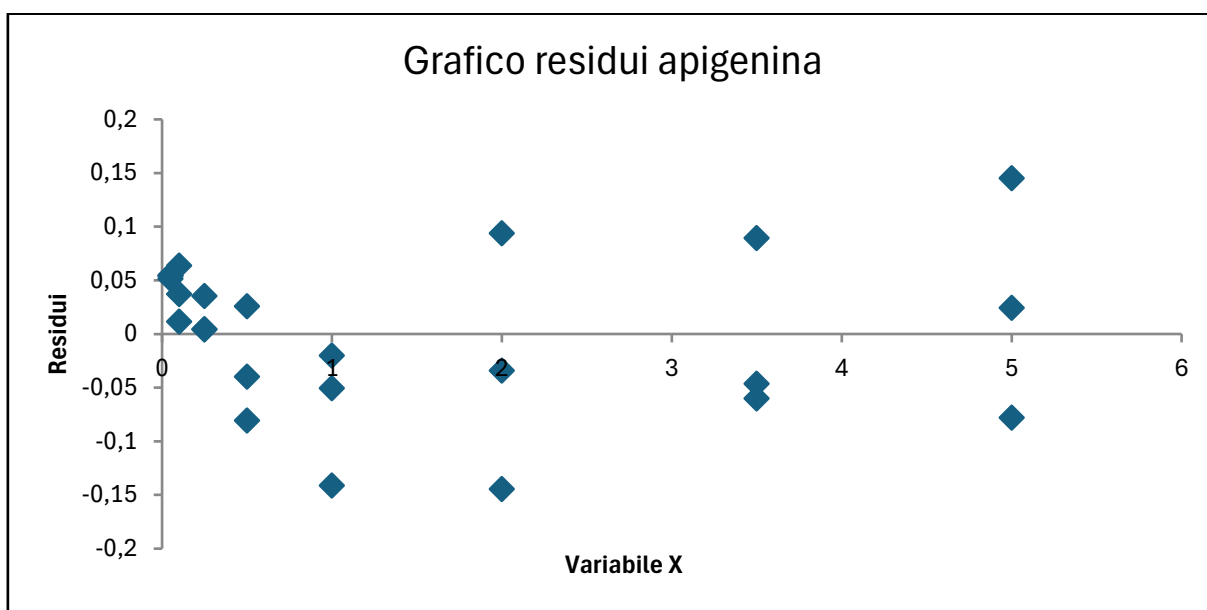


Figura A.36 Grafico dei residui dell'apigenina

- Kaempferolo

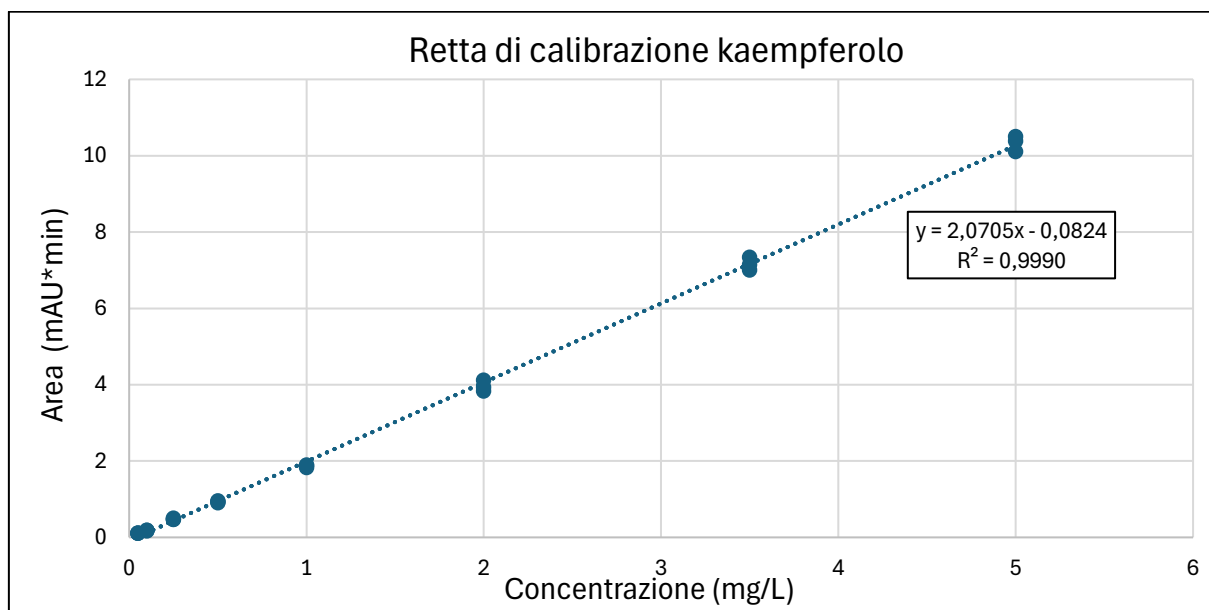


Figura A.37 Retta di calibrazione del kaempferolo a 370 nm

ANALITA	Kaempferolo					
n	24					
k	8					
Sorgente	SS	df	MS	Fcalc	Ftab	Ipotesi
Regressione	3,00354E+02	1	3,003537854E+02	21787,67903	4,300949502	Esiste
residuo	3,03281E-01	22	1,378548789E-02			Adeguate
LOF	1,19370E-01	6	1,989503003E-02	1,730844015	2,741310828	Adeguate
PE	1,83911E-01	16	1,149440958E-02			
TOT	3,00657E+02	23				

Figura A.38 Test statistico ANOVA dell'kaempferolo

Intercetta (b_0)	Errore Standard (Sb_0)	Gradi di libertà (df)	$t_{tab}(\alpha=0,05)$	t_{calc}	p-value
-0,082448364	0,117411617	22	2,073873068	0,702216	0,444763

Tabella A.13 Test-t intercetta del kaempferolo

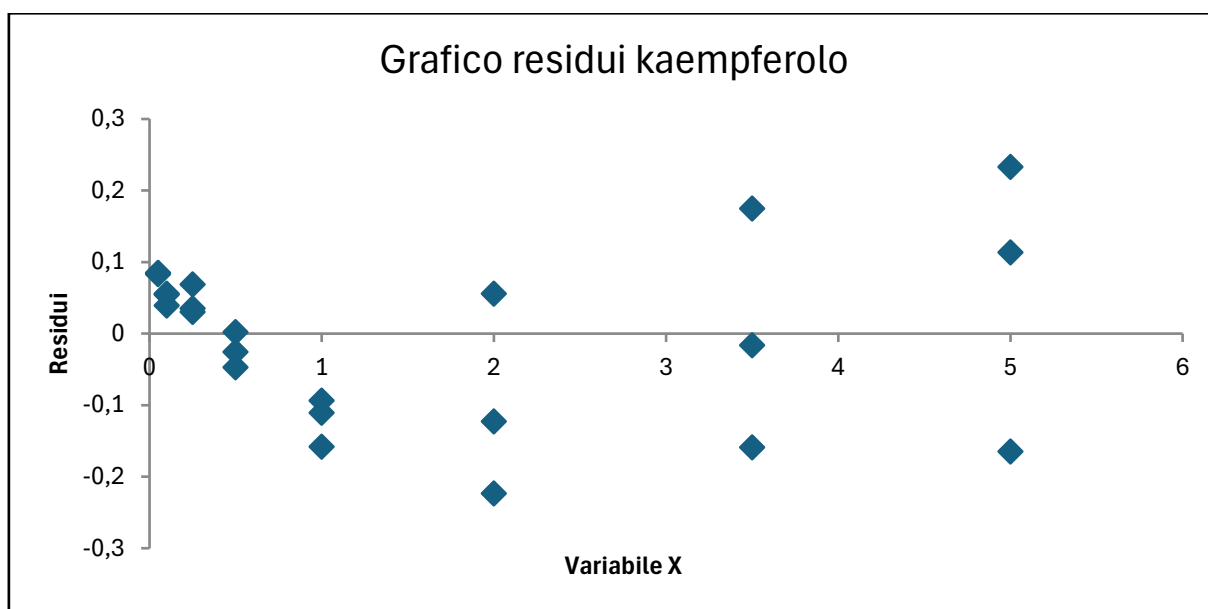


Figura A.39 Grafico dei residui del kaempferolo

BIBLIOGRAFIA

- [1] Rockström, J., Steffen, W., Noone, K. *et al.* A safe operating space for humanity. *Nature* **461**, 472–475 (2009). <https://doi.org/10.1038/461472a>
- [2] Calvin, K., Dasgupta, D., Krinner, G., Mukherji, A., Thorne, P. W., Trisos, C., ... Orendain, D. J. (2023). *IPCC, 2023: Climate Change 2023: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Core Writing Team, H. Lee and J. Romero (eds.)]. IPCC, Geneva, Switzerland.* (P. Arias, M. Bustamante, I. Elgizouli, G. Flato, M. Howden, C. Méndez-Vallejo, ... C. Péan, Eds.). <https://doi.org/10.59327/ipcc/ar6-9789291691647>
- [3] Will Steffen et al., Planetary boundaries: Guiding human development on a changing planet. *Science* **347**, 1259855 (2015). DOI:10.1126/science.1259855
- [4] World Commission on Environment and Development. *Our Common Future*; Oxford University Press: Oxford, UK, 1987.
- [5] Anastas, P. T.; Warner, J. C. *Green Chemistry: Theory and Practice*; Oxford University Press: New York, NY, 1998.

- [6] Anastas, P. T.; Zimmerman, J. B. The Period Table of Green Chemistry. *Green Chem.* 2019, *21*, 6545. DOI: 10.1039/c9gc01293a
- [7] Mrunal S. Wagh, Sowjanya S, Pinku Chandra Nath, Arnab Chakraborty, Rajshree Amrit, Bishwambhar Mishra, Awdhesh Kumar Mishra, Yugal Kishore Mohanta, Valorisation of agro-industrial wastes: Circular bioeconomy and biorefinery process – A sustainable symphony, *Process Safety and Environmental Protection*, Volume 183, 2024, Pages 708-725, ISSN 0957-5820, <https://doi.org/10.1016/j.psep.2024.01.055>.
- [8] Palash Panja, Green extraction methods of food polyphenols from vegetable materials, *Current Opinion in Food Science*, Volume 23, 2018, Pages 173-182, ISSN 2214-7993, <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.11.012>.
- [9] Filiera sostenibile della Nocciola piemontese e dei suoi Sottoprodotti di Lavorazione - Università del Piemonte Orientale
- [10] Di Michele, A.; Pagano, C.; Allegrini, A.; Blasi, F.; Cossignani, L.; Raimo, E.D.; Faieta, M.; Oliva, E.; Pittia, P.; Primavilla, S.; et al. Hazelnut Shells as Source of Active Ingredients: Extracts Preparation and Characterization. *Molecules* **2021**, *26*, 6607. <https://doi.org/10.3390/molecules26216607>
- [11] Neslihan Göncüoğlu Taş, Vural Gökmen, Phenolic compounds in natural and roasted nuts and their skins: a brief review, *Current Opinion in Food Science*, Volume 14, 2017, Pages 103-109, ISSN 2214-7993, <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.03.001>.
- [12] Augustin Scalbert, Gary Williamson, Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols, *The Journal of Nutrition*, Volume 130, Issue 8, 2000, Pages 2073S-2085S, ISSN 0022-3166, <https://doi.org/10.1093/jn/130.8.2073S>.
- [13] Claudine Manach, Augustin Scalbert, Christine Morand, Christian Rémésy, Liliana Jiménez, Polyphenols: food sources and bioavailability, *The American*

Journal of Clinical Nutrition, Volume 79, Issue 5, 2004, Pages 727-747, ISSN 0002-9165, <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.5.727>.

[14] Lattanzio, Vincenzo & Kroon, Paul & Quideau, Stéphane & Treutter, Dieter. (2009). Recent Advances in Polyphenol Research, Volume 1. DOI: 10.1002/9781444302400.ch1

[15] Véronique Cheynier,

Polyphenols in foods are more complex than often thought, The American Journal of Clinical Nutrition, Volume 81, Issue 1, 2005, Pages 223S-229S, ISSN 0002-9165, <https://doi.org/10.1093/ajcn/81.1.223S>.

[16] Bravo, L. (1998), Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. Nutrition Reviews, 56: 317-333. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1998.tb01670.x>

[17] Ana Belščak-Cvitanović, Ksenija Durgo, Ana Huđek, Višnja Bačun-Družina, Draženka Komes, 1 - Overview of polyphenols and their properties, Editor(s): Charis M. Galanakis, Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications, Woodhead Publishing, 2018, Pages 3-44, ISBN 9780128135723, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813572-3.00001-4>.

[18] Di Lorenzo, C.; Colombo, F.; Biella, S.; Stockley, C.; Restani, P. Polyphenols and Human Health: The Role of Bioavailability. *Nutrients* **2021**, *13*, 273. <https://doi.org/10.3390/nu13010273>

[19] Vauzour, D.; Rodriguez-Mateos, A.; Corona, G.; Oruna-Concha, M.J.; Spencer, J.P.E. Polyphenols and Human Health: Prevention of Disease and Mechanisms of Action. *Nutrients* **2010**, *2*, 1106-1131. <https://doi.org/10.3390/nu2111106>

[20] Idha Kusumawati, Gunawan Indrayanto, Chapter 15 - Natural Antioxidants in Cosmetics, Editor(s): Atta-ur-Rahman, Studies in Natural Products Chemistry,

Elsevier, Volume 40, 2013, Pages 485-505, ISSN 1572-5995, ISBN 9780444596031, <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59603-1.00015-1>.

[21] Khan, Karishma & Dawda, Himanshu. (2014). Polyphenols: methods of extraction. *Scientific Reviews & Chemical Communications*. 51. 1-6.

[22] Ruesgas-Ramón, M.; Figueroa-Espinoza, M. C.; Durand, E. Application of Deep Eutectic Solvents (DES) for Phenolic Compounds Extraction: Overview, Challenges, and Opportunities. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, 65, 3591–3601. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b01054>

[23] Savic, S.; Petrovic, S.; Knezevic-Jugovic, Z. Separation Strategies for Polyphenols from Plant Extracts: Advances, Challenges, and Applications. *Separations* **2026**, 13, 46. <https://doi.org/10.3390/separations13020046>

[24] Merken, Howard & Beecher, Gary. (2000). Measurement of Food Flavonoids by High-Performance Liquid Chromatography: A Review. *Journal of agricultural and food chemistry*. 48. 577-99. 10.1021/jf990872o.

[25] Chiriac, E.R.; Chițescu, C.L.; Geană, E.-I.; Gird, C.E.; Socoteanu, R.P.; Boscencu, R. Advanced Analytical Approaches for the Analysis of Polyphenols in Plants Matrices—A Review. *Separations* **2021**, 8, 65. <https://doi.org/10.3390/separations8050065>

[26] J.J. van Deemter, F.J. Zuiderweg, A. Klinkenberg, Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography, *Chemical Engineering Science*, Volume 50, Issue 24, 1995, Pages 3869-3882, ISSN 0009-2509, [https://doi.org/10.1016/0009-2509\(96\)81813-6](https://doi.org/10.1016/0009-2509(96)81813-6)

[27] Skoog, D. A., Holler, J. F., & Crouch, S. R. “Chimica analitica strumentale “(2a ed.), 2009. Edises.

[28] Swartz, Michael E., and Brian Murphy. "New frontiers in chromatography." *American Laboratory* 37.3 (2005): 22-27

- [29] Richard Hayes, Adham Ahmed, Tony Edge, Haifei Zhang, Core-shell particles: Preparation, fundamentals and applications in high performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, Volume 1357, 2014, Pages 36-52, ISSN 0021-9673, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.05.010>.
- [30] National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov> (accessed June 2026)
- [31] Dolan, J. W. When Should an Internal Standard be Used? *LCGC North Am.* **2012**, 30 (6)
- [32] International Council for Harmonisation (ICH). *ICH Q2(R2) Guideline on validation of analytical procedures*; Step 5; European Medicines Agency (EMA): Amsterdam, 2023; EMA/CHMP/ICH/82072/2006.
- [33] H. Cantwell (ed.) Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods - A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, (3rd ed. 2025). Available from <http://www.eurachem.org>
- [34] Kokoro Matsushita, Chihiro Honda, Yoriyuki Nakamura, Shigenori Kumazawa, Comparison of colorimetric methods for the analysis of total polyphenols in green tea extracts, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, Volume 88, Issue 7, July 2024, Pages 798–803, <https://doi.org/10.1093/bbb/zbae054>
- [35] ISO 14502-1:2005. *Determination of substances characteristic of green and black tea — Part 1: Content of total polyphenols in tea — Colorimetric method using Folin-Ciocalteu reagent*. International Organization for Standardization.
- [36] Prishanthini Muthulingam, David G. Popovich, P.A. Nimal Punyasiri, Chandrika M. Nanayakkara, Carl H. Mesarich, Ali Rashidinejad, Development of a validated efficient HPLC-DAD analysis for assessing polyphenol transformation during black tea processing, *Journal of Food Composition and Analysis*, Volume 148, Part 2, 2025, 108330, ISSN 0889-1575, <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2025.108330>.