

POLITECNICO DI TORINO

Collegio di Ingegneria Biomedica

**Corso di Laurea Magistrale
in Ingegneria Biomedica**

Tesi di Laurea Magistrale

**Idrogeli con nanocellulosa estratta da canapa:
sintesi mediante fotopolimerizzazione e
caratterizzazione di sistemi bulk e porosi**



Relatori

Prof.ssa Roberta Maria Bongiovanni

Prof.ssa Alessandra Vitale

Candidato

Irene Rinaldi s316817

Luglio 2026

Sommario

1. Introduzione e obiettivo del lavoro	5
2. Stato dell'arte	6
2.1 Idrogeli	6
2.1.1 Definizione e classificazione	6
2.1.2 Metodi di reticolazione chimica	9
2.1.3 Proprietà	11
2.1.4 Applicazioni	12
2.2 Idrogeli basati su nanocellulosa	13
2.2.1 Ruolo della nanocellulosa in gel fotopolimerizzati	13
2.2.2 Sintesi	14
2.2.3 Proprietà e applicazioni	16
3. Materiali e metodi	18
3.1 Materiali	18
3.2 Procedura di estrazione dei CNC a partire da fogli di canapa	18
3.3 Preparazione degli idrogeli bulk	19
3.4 Preparazione degli idrogeli porosi	20
3.5 Tecniche di caratterizzazione delle nanocellulose e degli idrogeli	21
3.5.1 Microscopia ottica	21
3.5.2 Microscopia elettronica di trasmissione	21
3.5.3 Spettroscopia ad infrarossi FT-IR	22
3.5.4 Frazione di insolubile (gel content)	22
3.5.5 Test di rigonfiamento in peso e risalita capillare	23
3.5.6 Monitoraggio della polimerizzazione tramite camera termica	24
4. Risultati e discussione	25
4.1 Estrazione dei cristalli di nanocellulosa e loro caratterizzazione	25
4.2 Preparazione di idrogeli e idrogeli porosi	27
4.2.1 Idrogeli bulk	27
4.2.2 Idrogeli porosi	33
4.3 Determinazione della conversione della reticolazione fotoindotta	38
4.4 Determinazione della frazione di insolubile o gel content degli idrogeli dopo essiccamento	40
4.5 Test di rigonfiamento in peso e risalita capillare	41
5. Conclusioni e prospettive future	45
Appendice: Preparazione di CNC funzionalizzate con gruppi acrilici	47
A. Metodi per la modifica superficiale di CNC	47
A.1 Ossidazione TEMPO	47

A.2 Titolazione conduttimetrica dei CNC TEMPO-ossidati	47
A.3 Acrilazione dei CNC TEMPO-ossidata	48
B. Risultati delle modifiche superficiali dei CNC	48
B.1 Caratterizzazione dei CNC-TEMPO ossidati	48
B.2 Caratterizzazione dei CNC acrilati	51
Bibliografia.....	54

1. Introduzione e obiettivo del lavoro

Gli idrogeli sono biomateriali polimerici sviluppati a partire dalla metà del secolo scorso. La loro struttura tridimensionale reticolata consente di assorbire e trattenere elevate quantità di acqua, mentre le loro proprietà distintive, tra cui biodegradabilità, biocompatibilità e idrofilicità, unite alla possibilità di impiegare polimeri sia sintetici sia naturali e di modulare le proprietà chimico-fisiche e meccaniche, li rendono materiali promettenti in numerosi settori, da quello ambientale a quello biomedico. Gli idrogeli possono essere sviluppati sia in forma bulk sia con un'architettura porosa controllata, modulando la dimensione e la morfologia dei pori durante il processo di preparazione. La presenza di una struttura porosa interconnessa permette lo scambio di gas, nutrienti e fluidi, rendendo questi materiali particolarmente promettenti nell'ambito della medicina rigenerativa e dell'ingegneria tissutale.

Tra le diverse strategie di reticolazione utilizzate per ottenere strutture polimeriche solide a partire da soluzioni liquide di monomeri e oligomeri, la fotoreticolazione rappresenta una tecnica semplice e veloce, in grado di generare reticoli polimerici tridimensionali stabili e irreversibili mediante l'irraggiamento con luce (tipicamente ultravioletta) in presenza di un opportuno fotoiniziatore.

Negli ultimi anni, l'interesse si è rivolto all'integrazione di filler all'interno delle matrici polimeriche, con l'obiettivo di migliorare le proprietà chimico-fisiche e meccaniche degli idrogeli. In quanto additivo ecocompatibile e rinnovabile, i nanocristalli di cellulosa (CNC) hanno riscosso notevole interesse. I CNC vengono estratti dalla cellulosa, il polimero naturale più abbondante sulla Terra, attraverso diversi metodi, tra cui l'idrolisi acida, che idrolizza le regioni amorfe preservando quelle cristalline. Grazie alla loro elevata rigidità e idrofilicità, i CNC risultano particolarmente adatti all'incorporazione all'interno di matrici polimeriche. I CNC possono essere integrati all'interno del reticolo polimerico attraverso interazioni fisiche oppure mediante modifiche chimiche superficiali, finalizzate all'introduzione di gruppi funzionali reattivi che consentano la formazione di legami covalenti con la matrice polimerica.

L'obiettivo del presente lavoro di tesi è lo sviluppo e l'ottimizzazione di idrogeli fotoreticolati a base di polietilenglicoldiacrilato (PEGDA) contenenti CNC in due differenti tipologie di sistemi, bulk e porosi, mediante fotopolimerizzazione UV. A tale scopo, i CNC sono stati estratti a partire da fogli di canapa e caratterizzati, quindi impiegati nella preparazione delle formulazioni. Gli idrogeli ottenuti sono stati successivamente caratterizzati mediante analisi morfologiche, spettroscopiche e prove di assorbimento in acqua, per valutare l'influenza del contenuto di CNC e della struttura del materiale sulle loro proprietà.

L'IA generativa non è stata utilizzata per generazione del presente documento; ha fornito supporto nella creazione dell'immagine in Figura 2.

2. Stato dell'arte

2.1 Idrogeli

2.1.1 Definizione e classificazione

Gli idrogeli sono reticoli (network) tridimensionali (3D) formati da catene polimeriche idrofiliche reticolate, in grado di assorbire e trattenere elevate quantità di acqua e caratterizzati da un'ampia gamma di proprietà fisiche e chimiche che ne consentono l'impiego in diversi settori. La capacità di assorbire grandi volumi di acqua è data dalla presenza di gruppi idrofilici come -OH, -O-, -COOH, -CONH, -NH₂, e -SO₃H, mentre la reticolazione favorisce l'integrità strutturale e impedisce l'immediata dissoluzione del materiale in ambiente acquoso [1]. In Figura 1 è rappresentata la struttura tridimensionale di un idrogelo [2]: si vede che le catene polimeriche formano un reticolo, sono legate l'un l'altra attraverso nodi fisici (junction), interlacciamenti (entanglements) e, nel caso di sistemi reticolati chimicamente, attraverso legami chimici primari o covalenti con presenza di tratti di catena (crosslink) a ponte tra le catene. In questo ultimo caso si definisce una lunghezza media dei crosslinks M_c ; nei casi di reticoli basati su legami secondari si parla di mesh size.

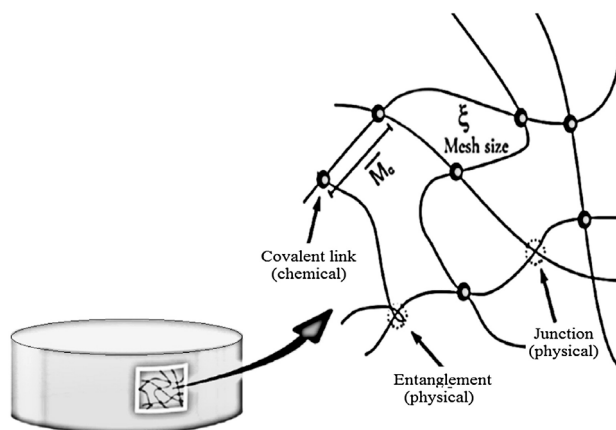


Figura 1: Struttura tridimensionale di un idrogelo [2]; riprodotto con il permesso di Elsevier

Gli idrogeli possono essere classificati secondo diversi criteri, tra cui l'origine, i meccanismi di reticolazione e le proprietà fisico-chimiche [1]. Una prima classificazione può essere fatta in base alla natura della matrice polimerica. In particolare, utilizzando polimeri naturali, come polisaccaridi e proteine, si ottengono idrogeli naturali. In questo caso i polimeri sono ottenuti a partire da diverse fonti naturali e possiedono una serie di caratteristiche vantaggiose: sono facilmente accessibili, presenti in grandi quantità in natura, non tossici, economici, biocompatibili e biodegradabili [1]. In più, la presenza di gruppi idrossilici, carbossilici e amminici e ammidici che caratterizzano polisaccaridi e proteine fornisce una piattaforma conveniente per ancorare altri gruppi, formare legami a idrogeno, funzionalizzazione o modifiche chimiche. Lo svantaggio principale degli idrogeli naturali è il limitato controllo delle proprietà meccaniche e la difficoltà di produrli su larga scala [1]. Se, invece, il materiale di partenza è sintetico si parla di idrogeli sintetici: i principali polimeri sintetici utilizzati sono poli(vinilalcol) (PVA), poliacrilammide (PAM) e poli(etilenglicole) (PEG). Essi rappresentano un'ottima alternativa agli idrogeli naturali per via delle migliori proprietà chimiche, fisiche e meccaniche. Tuttavia, a differenza dei polimeri naturali, sono meno biocompatibili [1]. Per

superare le limitazioni degli idrogeli naturali e sintetici si possono sintetizzare idrogeli ibridi, contenenti sia polimeri naturali, per una migliore biocompatibilità, che sintetici, per la facilità di progettazione delle proprietà [1].

Un altro criterio di classificazione degli idrogeli comunemente utilizzato si basa sul tipo di reticolazione, in quanto esistono diversi modi di formare un reticolo a partire dalle catene polimeriche idrofiliche per formare sistemi stabili. La reticolazione è fondamentale poiché regola l'assorbimento di acqua ed aiuta l'idrogelo a mantenere una struttura tridimensionale. I tipi di reticolazione più comuni sono basati su interazioni fisiche o reazioni chimiche [1]. Nella reticolazione fisica si formano punti di giunzione tra le catene polimeriche tramite processi fisici di aggregazione basati su legami a idrogeno, interazioni tra cariche, interazione ioniche o elettrostatiche. Questi processi avvengono in condizioni blande senza l'utilizzo di agenti di reticolazione che, almeno nel caso di uso biomedico, potrebbero aumentare il rischio di tossicità per cellule e tessuti. I gel ottenuti tramite reticolazione fisica vengono anche chiamati gel reversibili, perché sono tenuti insieme da forze deboli che possono essere interrotte applicando stress o modificando le condizioni circostanti [1,3]. Nella reticolazione chimica, invece, gli idrogeli sono reticolati tramite legami covalenti, stabili e permanenti, per cui i materiali formati tramite questo tipo di reticolazione vengono detti gel permanenti. I legami chimici vengono prodotti in vari modi, per esempio attraverso la polimerizzazione radicalica indotta da luce, sistemi redox, variazioni termiche o radiazione e la reticolazione enzimatica [1,3]. In Figura 2 sono rappresentati i metodi di reticolazione basati su interazioni fisiche (sinistra) o reazioni chimiche (destra) in cui si evidenzia la differenza nel meccanismo di reticolazione: nel primo caso si hanno interazioni non covalenti tra le catene dei due polimeri, rappresentate da linee tratteggiate, che formano una struttura flessibile e reversibile; nel secondo caso le catene dei due polimeri sono legate in modo permanente tramite legami chimici covalenti, rappresentati dai nodi bianchi, e formano una struttura in genere più rigida e più stabile.

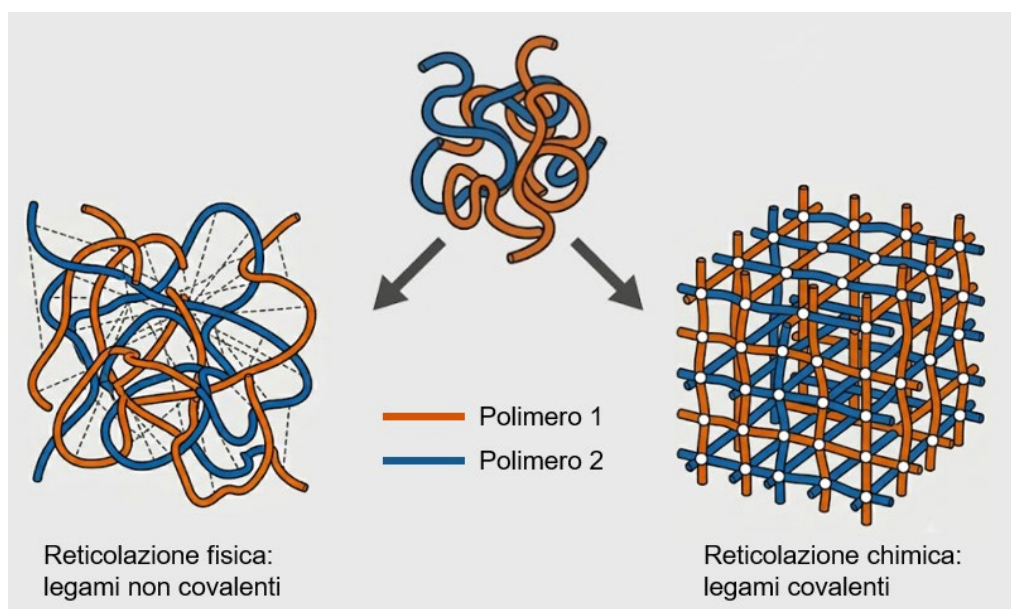


Figura 2: Metodi di reticolazione fisica e chimica

Il crosslinking covalente può essere ottenuto anche operando non su polimeri ad alto peso molecolare come rappresentato in Figura 2, ma anche operando su monomeri o prepolimeri a basso peso molecolare con funzioni reattive come verrà spiegato in seguito.

È possibile classificare gli idrogeli anche in base alla loro porosità e alla dimensione caratteristica dei pori presenti nella rete polimerica. In generale, tutti gli idrogeli possono considerarsi porosi, perché la loro struttura 3D reticolata presenta spazi intermolecolari definiti dalla mesh size (ξ), distanza che congiunge due punti di legame e tipicamente dell'ordine di nm. Oltre alla porosità intrinseca della rete polimerica, è possibile introdurre pori fisicamente definiti mediante specifiche tecniche di preparazione, come il freeze-drying. In questi casi, gli idrogeli possono essere classificati in base alla dimensione dei pori secondo la nomenclatura IUPAC in materiali microporosi (<1,4 nm), mesoporosi (3–50 nm) e macroporosi (>50 nm) [4].

In particolare, questo lavoro di tesi si concentra sulla sintesi di idrogeli fotopolimerizzati a base di polietileglicoldiacrilato (PEGDA), con inclusioni di cristalli di nanocellulosa ottenuti dalla canapa.

Il PEGDA è un monomero ottenuto a partire dal polietilenglicole o polietilenossido, un polimero idrofilo, idrosolubile e biocompatibile. Ai gruppi OH presenti alle estremità delle catene sono sostituiti gruppi acrilati come si vede in Figura 3. Gli idrogeli a base di PEGDA sono considerati idrogeli sintetici reticolati chimicamente attraverso la tecnica della fotopolimerizzazione, in cui viene utilizzata una sorgente di luce UV o visibile per indurre la reticolazione [5].

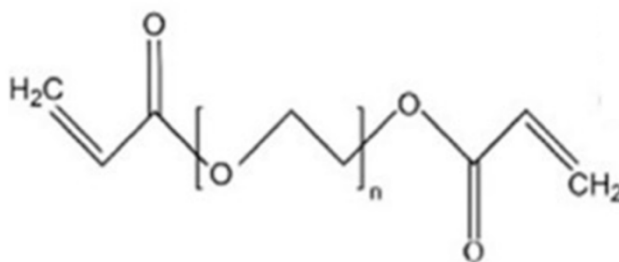


Figura 3: Struttura chimica del PEGDA

La cellulosa ($C_6H_{10}O_5$)_n è il polimero organico più abbondante in natura, essendo il principale componente della parete strutturale delle piante. La Figura 4 riporta la struttura chimica della cellulosa, costituita da una catena lineare di unità di β -D-glucosio legate tramite legami β -1,4 glicosidici.

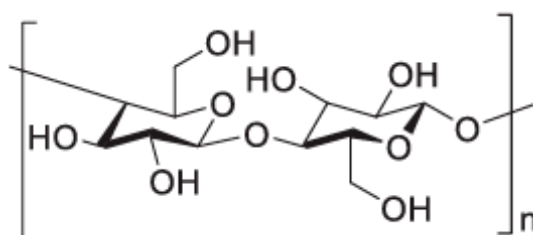


Figura 4: Struttura chimica della cellulosa

La struttura della cellulosa è altamente ordinata, le catene possono essere formate da migliaia di unità di glucosio e sono allineate parallelamente le une alle altre, tenute insieme da legami a idrogeno. La cellulosa è semicristallina, ovvero è caratterizzata dall'alternarsi di regioni cristalline e amorfe. Le regioni cristalline, dove le catene di cellulosa sono strettamente impaccettate, conferiscono stabilità e capacità di resistenza alla degradazione, mentre le regioni amorfe, meno organizzate, facilitano le modifiche chimiche e l'interazione con i solventi. Recentemente la cellulosa ha assunto importanza grazie alle sue proprietà meccaniche,

alla biocompatibilità e biodegradabilità, nonostante la sua cristallinità la renda insolubile in acqua e molti solventi. I materiali cellulosici e i loro derivati sono sempre più utilizzati in diverse applicazioni, tra cui l'industria medica e farmaceutica, l'industria della carta e della cellulosa, i biocarburanti e le bioplastiche. Vengono inoltre esplorati in altri settori come quello tessile, degli adesivi, dei rivestimenti, degli alimenti e dei prodotti biodegradabili [6].

2.1.2 Metodi di reticolazione chimica

La reticolazione o crosslinking è un processo di sintesi che porta alla formazione di un network tridimensionale con integrità strutturale e proprietà meccaniche. In particolare, la reticolazione chimica è un processo irreversibile basato sulla formazione di legami covalenti tra gruppi funzionali specifici presenti sulle catene polimeriche. La formazione di questi legami permanenti rappresenta una strategia efficace per migliorare la stabilità chimica e le proprietà meccaniche degli idrogeli. I metodi di reticolazione chimica possono essere suddivisi in diverse categorie, comprendenti reazioni tra gruppi funzionali complementari, polimerizzazione radicalica, processi indotti da luce o irradiazione ad alta energia [7] e polimerizzazione enzimatica:

1. Reticolazione tramite reazioni di gruppi funzionali complementari: le giunzioni tra le catene polimeriche possono essere stabilite dalla reazione di polimeri con specifici gruppi funzionali con agenti reticolanti aventi reattività complementare, reazioni tipiche sono la reazione tra gruppi amminici e gruppi carbossilici, la reazione isocianato-OH/NH₂, la formazione di basi di Schiff, che danno luogo a legami covalenti tra le catene polimeriche [7].
2. Polimerizzazione radicalica-termica o fotoindotta di monomeri: questo metodo consiste nel promuovere la formazione di catene macromolecolari reticolate a partire da monomeri polifunzionali usando iniziazione termica o fotoindotta. I monomeri possono essere dei sistemi insaturi, ad esempio i diacrilati.
3. Irradiazione ad alta energia: le radiazioni ad alta energia, come i raggi gamma e i fasci di elettroni, possono essere utilizzate per reticolare senza l'impiego di un agente reticolante. Un vantaggio di questo metodo è che non richiede alcun iniziatore e la capacità di rigonfiamento dell'idrogelo può essere controllata semplicemente regolando la dose di radiazione. Inoltre, gli idrogeli ottenuti con questo approccio sono relativamente puri, il che li rende utili per diverse applicazioni biomediche [7].
4. Polimerizzazione enzimatica: il principale vantaggio del metodo enzimatico è che la reticolazione dell'idrogel avviene in condizioni blande, senza l'impiego di agenti reticolanti o l'utilizzo di radiazioni. Gli enzimi, grazie alla loro elevata specificità verso un substrato, consentono di ridurre al minimo le reazioni collaterali durante la reticolazione, permettendo un migliore controllo della cinetica e della velocità complessiva del processo. Questa caratteristica rende il metodo particolarmente adatto per sistemi di gelazione *in situ*. Il processo si basa sull'interazione tra l'enzima e il substrato disponibile, che porta alla formazione di legami covalenti all'interno della rete polimerica dell'idrogelo [8].

Approfondiamo la reticolazione fotoindotta. Il principio della fotoreticolazione radicalica o consiste nel trasformare monomeri o oligomeri liquidi in materiali solidi mediante l'esposizione a radiazione luminosa con lunghezza d'onda appropriata. Un sistema fotosensibile è generalmente costituito da monomero, oligomero e fotoiniziatore. Monomeri ed oligomeri contengono più gruppi funzionali in grado di partecipare alla reazione di polimerizzazione, come doppi legami, gruppi acrilici, gruppi tiolici. Le cui caratteristiche influenzano in modo significativo il processo e le proprietà del polimero risultante. I fotoiniziatori rappresentano l'1-

4% in peso del sistema di fotopolimerizzazione. Sono in grado di generare specie attive radicaliche sotto irradiazione luminosa per avviare reazioni di polimerizzazione e rivestono un ruolo cruciale nel determinare la velocità di fotopolimerizzazione e le prestazioni del materiale polimerizzato [9].

I fotoiniziatori radicalici generano radicali liberi in grado di avviare la reazione di polimerizzazione e sono suddivisi in due tipi a seconda del meccanismo di produzione di radicali liberi: fotoiniziatori tipo I e tipo II. I fotoiniziatori di tipo I, in seguito all'esposizione alla luce di lunghezza d'onda appropriata, assorbono i fotoni incidenti e subiscono una scissione in due radicali primari che avviano la reazione di fotoreticolazione. Alcuni esempi di fotoiniziatori di tipo I sono il TPO (difetil(2,4,6-trimetilbenzoin)ossido di fosfina) e il Genocure DMHA (dimetilidrossiacetofenone), utilizzato in questo lavoro di tesi per via della sua solubilità in acqua. I fotoiniziatori di tipo II, invece, producono radicali attraverso interazioni con donatori di idrogeno [9-10]. Confrontando lo spettro di assorbimento UV-VIS di tre fotoiniziatori di tipo I, 2-idrossi-2-metil-1-fenil-propanone (Darocur 1173), 1-idrossicicloesil fenil chetone (Irgacure 184) e 2,2-dimetossi-1,2-difeniletanone (Irgacure 651), si nota che il Darocur 1173 presenta picchi di assorbimento a 244 nm, 278 nm e 322 nm. Oltre la soglia dei 350 nm l'assorbanza decresce drasticamente, azzerandosi in prossimità dei 365 nm [11]. Il fotoiniziatore Darocur 1173 possiede la stessa struttura chimica del Genocure DMHA utilizzato in questo lavoro sperimentale.

La Figura 5 mostra il processo di fotoreticolazione radicalica: sotto l'effetto dell'irradiazione, il fotoiniziatore nello stato fondamentale assorbe fotoni a specifiche lunghezze d'onda, subendo una transizione ad uno stato elettronico eccitato. Da questo stato instabile si generano specie attive, tipicamente radicali liberi o ioni, in grado di interagire con i gruppi funzionali di monomeri o oligomeri e innescando reazioni a catena che portano alla formazione dei polimeri reticolati.

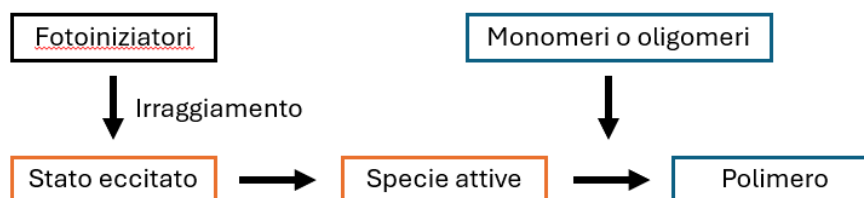


Figura 5: Schema del processo di fotopolimerizzazione

La fotopolimerizzazione radicalica presenta i vantaggi di un'elevata efficienza e di una notevole reattività. Tuttavia, presenta alcune limitazioni, tra cui l'elevata sensibilità all'ossigeno, che inibisce la reazione favorendo la produzione di radicali perossilici scarsamente reattivi. Questo problema causa una diminuzione sia della velocità di polimerizzazione sia del grado di conversione finale, con conseguente formazione di sostanze indesiderate e altamente viscosi. Altri limiti, derivanti dalla natura intrinsecamente casuale della polimerizzazione di crescita a catena, includono eterogeneità strutturali nella rete polimerica, un controllo inefficiente della cinetica di reticolazione e la presenza di doppi legami non reagiti che possono reagire negativamente con le molecole biologiche [9-10].

2.1.3 Proprietà

Le proprietà degli idrogeli possono essere regolate in base all'applicazione desiderata, controllando la natura del polimero, il meccanismo di reticolazione, la densità di crosslinking, il contenuto d'acqua e l'eventuale presenza di additivi o agenti rinforzanti all'interno della rete polimerica [1].

La resistenza meccanica degli idrogeli è decisiva per le varie applicazioni. Le proprietà meccaniche desiderate possono essere ottenute usando polimeri, co-monomeri e reticolanti specifici e modificando il grado di reticolazione. L'aumento del grado di reticolazione consente di ottenere una rete più robusta e stabile. Tuttavia, un grado di reticolazione troppo elevato comporterà una bassa elongazione ed elasticità con maggiore fragilità. L'elasticità è molto importante per conferire maggiore flessibilità alla rete reticolata e per facilitare il movimento delle molecole incorporate. Pertanto, un grado ottimale di reticolazione per gli idrogeli è essenziale per mantenere il compromesso tra resistenza meccanica ed elasticità [12].

Per quanto riguarda le applicazioni in campo biomedico le proprietà desiderate sono principalmente due: biocompatibilità e biodegradabilità. L'utilizzo di polimeri (naturali o sintetici) contenenti gruppi idrofilici per la sintesi di idrogeli è estremamente vantaggioso, poiché questi gruppi idrofilici non solo facilitano un elevato assorbimento d'acqua, ma contribuiscono anche all'interazione con i tessuti biologici. La superficie idrofila di questi materiali minimizza la tensione interfacciale con i fluidi corporei, riducendo l'adsorbimento proteico e le interazioni non specifiche con i tessuti. Inoltre, la morbidezza superficiale e la consistenza gommosa li rendono meccanicamente simili a molti tessuti biologici, riducendo le sollecitazioni meccaniche all'interfaccia materiale-tessuto e contribuendo a ridurre la risposta infiammatoria locale. Tutti questi fattori contribuiscono alla biocompatibilità degli idrogeli [3]. La biodegradabilità, invece, riguarda la decomposizione degli idrogeli in prodotti finali innocui per l'organismo e dipende dalle componenti presenti nel sistema e dal metodo di preparazione [12].

Infine, la caratteristica più significativa di un idrogelo è la capacità di rigonfiamento. Il rigonfiamento degli idrogeli avviene in tre fasi: il primo passaggio consiste nell'incorporazione di acqua nella rete dell'idrogelo, il secondo riguarda l'allentamento delle catene polimeriche e il terzo è l'espansione della rete dell'idrogelo. La cinetica e l'equilibrio del rigonfiamento sono influenzati da diversi fattori, come il rapporto di reticolazione, la natura chimica dei polimeri e lo stato di sintesi. La capacità di rigonfiamento viene solitamente espressa tramite il rapporto di rigonfiamento (SR), che quantifica l'aumento di massa dell'idrogelo in seguito all'assorbimento di acqua. In letteratura sono stati osservati valori di SR estremamente variabili, da valori trascurabili fino a oltre il 5000% [13]. Per quanto riguarda i reticoli fotoreticolati a base PEGDA, il grado di rigonfiamento varia notevolmente in funzione del peso molecolare del monomero di partenza e quindi del grado di reticolazione dopo reazione, oscillando tra il 100% e il 3000% [5]. Anche la porosità gioca un ruolo fondamentale nel regolare questi parametri. In particolare, strutture caratterizzate da pori aperti e interconnessi favoriscono un assorbimento più rapido del solvente e una maggiore permeabilità grazie all'azione capillare che permette all'acqua di risalire rapidamente nei canali macroscopici. Inoltre, i pori sono in grado di riempirsi di acqua che non ha bisogno di interagire con le catene polimeriche, permettendo al gel di trattenere una quantità di liquido molto elevata. Negli idrogeli più densi, invece, l'acqua diffonde solo attraverso gli spazi definiti dalla mesh size, in questo caso le catene devono rilassarsi per fare spazio all'acqua, rendendo il processo lungo ore o giorni e permettendo solo l'assorbimento di una quantità limitata di liquido [4]. Gli idrogeli inoltre possono essere sintetizzati in modo da mostrare risposte diverse ai cambiamenti degli stimoli

ambientali, generalmente classificati in stimoli fisici (temperatura, luce), chimici (pH e forza ionica) e biologici (enzimi) [3,12].

2.1.4 Applicazioni

Grazie alle loro caratteristiche distintive, gli idrogeli svolgono un ruolo primario nelle applicazioni biomediche, principalmente nel campo dell'ingegneria tissutale e del drug delivery [12]. Negli ultimi anni sono stati sviluppati e utilizzati numerosi scaffold a base di idrogeli per riparare i tessuti danneggiati grazie alla loro somiglianza strutturale con la matrice extracellulare (ECM) e alle loro proprietà, tra cui idrofilicità, biodegradabilità, biocompatibilità, porosità e viscoelasticità. Gli idrogeli possono imitare organi e tessuti biologici in termini di proprietà biologiche, chimiche e fisiche e di risposta a variazioni di temperatura, campo elettrico, pH ed enzimi. La principale limitazione rispetto ai tessuti umani riguarda le scarse proprietà meccaniche degli idrogeli [14].

Per quanto riguarda i sistemi di rilascio, invece, l'obiettivo è quello di somministrare una quantità terapeutica di farmaco al sito interessato nel corpo per raggiungere, trattenere e controllare rapidamente il processo di rilascio previsto, sfruttando la struttura porosa, la biocompatibilità, la facilità di modifica e la permeabilità ai soluti. Nonostante le proprietà vantaggiose, gli idrogeli presentano ancora diverse limitazioni. Ad esempio, l'elevato volume d'acqua e i pori di grandi dimensioni tendono a indebolire il controllo dell'impacchettamento del farmaco nella rete dell'idrogelo e spesso portano a un rapido rilascio del farmaco [14-15].

Molti dei principi discussi precedentemente sono analoghi e trasferibili a diverse applicazioni non biomediche, tra cui quelle per i settori agricoltura, bonifica delle acque, recupero del petrolio, stoccaggio dell'acqua, produzione di biocarburanti. Le caratteristiche funzionali, come l'incapsulamento di ingredienti attivi, il loro rilascio controllato e attivato da stimoli esterni e il tasso di degradazione, possono essere pianificate attraverso un'appropriata progettazione chimica e meccanica degli idrogeli. Nel complesso, questi attributi rendono la tecnologia degli idrogeli non solo estremamente versatile, ma anche implementabile in molteplici applicazioni commerciali e industriali. Un settore particolarmente promettente è rappresentato dall'ingegneria ambientale. In particolare, la tecnologia degli idrogeli offre nuove prospettive per la bonifica delle acque e la gestione delle risorse idriche, grazie alla loro capacità di aumentare la ritenzione idrica del suolo e di ridurre il deflusso superficiale. La selezione appropriata di materiali, struttura e composizione chimica richiede un'attenta valutazione delle funzionalità desiderate, come la capacità e la velocità di assorbimento dell'acqua, l'entità del rigonfiamento, la durabilità durante l'utilizzo e lo stoccaggio, e aspetti legati a tossicità, biodegradabilità e costo di produzione [15]. Inoltre, grazie alle notevoli capacità di assorbimento, gli idrogeli vengono utilizzati come materiali per l'adsorbimento di contaminanti idrosolubili: le acque reflue provenienti dalle industrie tessili e della carta contengono elevate concentrazioni di coloranti e metalli che, una volta rilasciati nell'ambiente, rappresentano un rischio per la salute umana e per gli ecosistemi. In questo contesto, gli idrogeli sono oggetto di crescente interesse nell'ambito delle tecnologie di separazione, grazie al loro impiego come materiali adsorbenti per la rimozione di coloranti e ioni di metalli pesanti tossici dalle acque contaminate [16].

In sintesi, molte delle strategie di progettazione dei materiali per queste applicazioni risultano analoghe a quelle sviluppate per l'utilizzo di idrogeli nel campo biomedico e suggeriscono che i concetti ideati per le applicazioni biomediche possono essere applicati a diversi contesti e viceversa. Tuttavia, ambiti quali l'ingegneria ambientale presentano vincoli specifici legati ai costi, alla compatibilità ambientale e alle strategie di rilascio, ponendo sfide differenti rispetto

a quelle tipiche del settore biomedico. Di conseguenza, i prodotti commerciali basati su idrogeli per applicazioni agricole e sostenibili risultano ancora relativamente poco diffusi.

Nonostante ciò, questo scenario offre ampie opportunità per lo sviluppo di soluzioni innovative nella progettazione e nella fabbricazione degli idrogeli, evidenziando al contempo la necessità di collaborazioni interdisciplinari affinché tali tecnologie possano trovare concreta applicazione in numerosi contesti industriali e commerciali [15].

2.2 Idrogeli basati su nanocellulosa

2.2.1 Ruolo della nanocellulosa in gel fotopolimerizzati

I nanocristalli di cellulosa (CNC) sono promettenti nanomateriali derivati da una varietà di fonti cellulosiche naturali attraverso trattamenti meccanici o idrolisi acida, in particolare con acido solforico. In Figura 6 si vede la struttura della cellulosa, caratterizzata da domini cristallini altamente ordinati, alternati in modo irregolare a regioni disordinate, definite regioni amorphe [17]. Inoltre, la superficie della cellulosa presenta numerosi gruppi OH. La Figura 6 mostra come, tramite l'idrolisi con acido solforico, le regioni amorphe della cellulosa vengono idrolizzate e, simultaneamente, la superficie dei CNC viene rivestita con gruppi solfato caricati negativamente. La repulsione elettrostatica tra questi gruppi migliora notevolmente la disperdibilità dei CNC in soluzione acquosa, prerequisito fondamentale per la preparazione di idrogeli basati sulle interazioni tra CNC disperse in modo omogeneo. Tuttavia, in matrici meno idrofile o in condizioni non ottimali, i CNC tendono all'aggregazione, rendendo necessaria un'adeguata modifica superficiale [18-19].

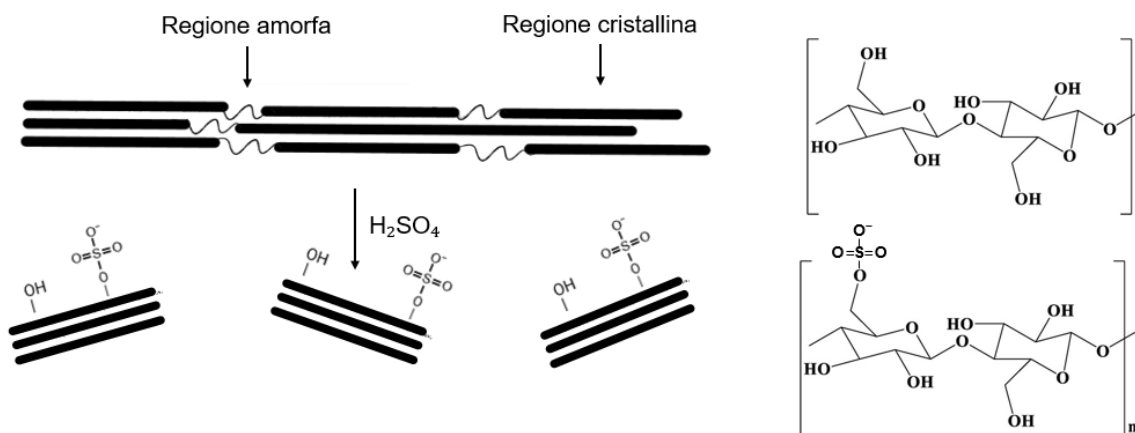


Figura 6: Schema delle fibre di cellulosa con regioni cristalline e amorphe; formazione dei CNC dopo idrolisi con acido solforico, con gruppi solfato superficiali

Nei sistemi di idrogeli chimici, i CNC svolgono un ruolo fondamentale come agenti di rinforzo. In questi sistemi, oltre alla formazione di una rete legata covalentemente, possono presenti anche numerose interazioni fisiche reversibili, rappresentate principalmente dai legami a idrogeno che si formano tra la matrice e i gruppi idrossilici dei CNC. Quando i CNC vengono incorporati, il punto di gelificazione si sposta leggermente, mostrando un modesto aumento del tempo di polimerizzazione rispetto al sistema privo di CNC [20]. Questo riflette il ruolo dei CNC nell'alterare il microambiente della rete: l'interazione tra CNC e catene polimeriche può

limitare parzialmente la mobilità dei gruppi reattivi, rallentando il movimento delle catene durante la polimerizzazione. Allo stesso tempo, queste interazioni promuovono ulteriori giunzioni fisiche che migliorano la densità di reticolazione finale una volta che il sistema è completamente polimerizzato. Pertanto, la presenza di CNC bilancia un iniziale ostacolo cinetico con un effetto di rinforzo strutturale, risultando in idrogeli robusti e resilienti [20].

Un altro aspetto rilevante riguarda le proprietà reologiche dei precursori utilizzati per la formazione di idrogeli, ovvero monomeri ed oligomeri da sottoporre al processo di reticolazione. Con la formazione di interazioni non covalenti e la conseguente formazione di una rete fisica debole all'interno della dispersione, la soluzione subisce una transizione da un comportamento tipicamente liquido a uno più simile a un weak-gel. Questo si traduce in un aumento della viscosità e in un comportamento viscoelastico più marcato rispetto al sistema puro. Inoltre, tali sistemi presentano comportamento shear-thinning: la viscosità diminuisce all'aumentare dello shear rate a causa della rottura temporanea della rete fisica sotto flusso, mentre a basse deformazioni la rete contribuisce alla stabilità del sistema. I CNC agiscono quindi come elementi strutturanti che modulano la transizione da comportamento liquido a comportamento gel-like [21].

Tra le diverse tipologie di idrogeli, i CNC hanno un enorme potenziale grazie alla biocompatibilità, alle buone proprietà meccaniche e alla natura anisotropica dei cristalli che possono orientarsi in condizioni di shear o deformazione permettendo di controllare la struttura e la funzione dei gel [18].

2.2.2 Sintesi

Esistono diversi metodi per la sintesi di idrogeli contenenti nanocellulosa, a seconda del ruolo dei CNC all'interno del reticolo. In particolare, è possibile distinguere tra idrogeli costituiti esclusivamente da CNC, idrogeli in cui i cristalli sono intrappolati nella rete polimerica come additivi o idrogeli in cui i CNC partecipano attivamente alla formazione di legami covalenti all'interno della matrice polimerica [18].

Per quanto riguarda gli idrogeli basati solo su CNC, si deve tenere conto che i CNC non hanno la capacità di legarsi tra loro con legami covalenti e formare idrogeli stabili, a causa della loro struttura rigida. Tuttavia, al di sopra di una concentrazione critica, i CNC si trasformano in una fase aggregata simile a un gel. L'aumento della concentrazione di CNC comporta un'aggregazione spontanea in quanto le interazioni a idrogeno tra CNC prevalgono sulla repulsione elettrostatica tra gruppi solfato. In generale, la concentrazione critica di gelificazione dei CNC e le proprietà del gel possono essere regolate variando le condizioni della soluzione, come la forza ionica e il pH, la funzionalizzazione superficiale, l'aggiunta di polimeri idrosolubili adsorbenti o non adsorbenti e la temperatura. Per esempio, è stato dimostrato che l'aumento della forza ionica delle sospensioni di CNC ottenuto mediante l'aggiunta di sali inerti o polimeri adsorbenti consente di schermare la repulsione elettrostatica tra cariche negative superficiali e favorisce l'instaurarsi di forze attrattive tra CNC [22].

In alternativa, è possibile sintetizzare idrogeli a base di CNC utilizzando stimoli fisici per indurre la gelificazione. Per esempio, funzionalizzando i CNC con gruppi carbossilici o amminici, si ottiene una gelificazione responsiva al pH. Nel caso dei CNC funzionalizzati con ammine, a pH elevato, i gruppi amminici hanno una carica neutra, consentendo alle forze attrattive di prevalere. Al contrario, a basso pH, i gruppi amminici sono protonati, facilitando la repulsione elettrostatica tra i CNC e inibendo l'aggregazione. La tendenza opposta si osserva con i CNC modificati con acido carbossilico. Un altro stimolo fisico utilizzato è la temperatura:

ad alte temperature, infatti, avviene la desolfatazione dei CNC che favorisce la formazione di gel [18].

Un approccio differente prevede lo sviluppo idrogeli basati solo su CNC introducendo una funzionalizzazione superficiale, per procedere alla reticolazione tramite legami ionici o legami chimici. Per esempio, CNC ottenuti dall'idrolisi con acido solforico sono stati reticolati utilizzando due agenti reticolanti, glutaraldeide (GA) ed epicheloidrina (EC). La reticolazione tra i gruppi aldeidici del GA o i gruppi epossidici dell'EC e i gruppi idrossilici dei CNC porta alla formazione di legami acetalici ed eterei, rispettivamente. Queste due reazioni avvengono in condizioni acide per il GA e alcaline l'EC. Inoltre, si vengono a formare ulteriori legami a idrogeno secondari tra i gruppi OH dei cristalli di cellulosa [23]. Un altro metodo di reticolazione chimica tra CNC è rappresentato dalla formazione di legami idrazone, che avvengono tra CNC funzionalizzati con gruppi idrazinici ($\text{NHNH}_2\text{-CNC}$) e CNC funzionalizzati con gruppi aldeidici (CHO-CNC). La reazione di condensazione crea legami covalenti C=N stabili in ambiente acquoso, fornendo integrità strutturale, elevato assorbimento d'acqua e proprietà di memoria di forma [24]. Infine, è stata documentata la sintesi di materiali gel-like sfruttando la click chemistry tra due set di CNC funzionalizzati con gruppi azidici e alchinnici, rispettivamente [25].

Più comunemente, le proprietà dei CNC rendono questi materiali particolarmente adatti come agenti di rinforzo degli idrogeli, sia fisici che chimici. In entrambi i casi, i cristalli vengono incorporati fisicamente nella rete dell'idrogelo, attraverso interazioni come l'interazione elettrostatica, l'interazione idrofobica, il legame idrogeno e le forze di van der Waals. I CNC sono generalmente incorporati fisicamente negli idrogeli a basse concentrazioni, con la maggior parte degli studi che impiegano concentrazioni dello 0,1–5% in peso, basate sul peso totale del gel rigonfio. I principali metodi di reticolazione fisica degli idrogeli includono l'utilizzo di polimeri termoresponsivi, che raggiungono lo stato di gel in seguito a una variazione di temperatura; l'instaurarsi di interazioni ioniche o elettrostatiche, vantaggiose grazie alle condizioni di reazione blande e alle buone prestazioni a temperatura ambiente; le interazioni host-guest che sfruttano la formazione di legami non covalenti tra le molecole dotate di strutture complementari; e il metodo di freeze-thaw nel quale il congelamento della soluzione induce una separazione di fase. Come accennato, i gel possono essere ottenuti anche tramite reticolazione chimica delle specie polimeriche all'interno della dispersione di CNC, principalmente tramite polimerizzazione radicalica e fotoreticolazione. Questi metodi sono stati ampiamente impiegati con diversi polimeri sintetici, tra cui materiali a base di PAV, PAM e PEG, nonché con polimeri naturali, come agarosio, alginato e gelatina, per formare idrogeli meccanicamente più stabili [18,26].

Gli idrogeli polimerici contenenti nanocristalli di cellulosa possono essere ottenuti anche mediante reticolazione chimica dei CNC. L'incorporazione chimica dei CNC può avvenire sia tra i CNC stessi che agiscono come reticolanti oppure tramite la formazione di legami covalenti tra i cristalli e la matrice polimerica. Questo approccio richiede generalmente la modifica superficiale dei CNC con specifici gruppi funzionali, come gruppi silicici, carbossilici o aldeidici, in grado di partecipare alla formazione del reticolo polimerico. La funzionalizzazione può essere ottenuta tramite modifica chimica superficiale diretta o attraverso l'adsorbimento fisico di molecole sulla superficie dei cristalli. Il caricamento dei CNC è simile a quello che avviene nei gel fisici, ma mostra una maggiore stabilità meccanica anche a basse concentrazioni di CNC. La presenza di legami covalenti tra filler e matrice consente infatti una rete più stabile, con migliori proprietà. Tuttavia, l'effetto rinforzante non è sempre monotono: a concentrazioni elevate possono verificarsi aggregazione o interferenza con la reticolazione della matrice, con conseguente riduzione delle prestazioni meccaniche. Tra i metodi di preparazione riportati, i più comuni sono stati l'omogeneizzazione e la polimerizzazione radicalica. La reticolazione

chimica consente di ottenere idrogeli con proprietà regolabili, come rigidità, elasticità, porosità e capacità di rigonfiamento, che possono essere ulteriormente modulate attraverso la chimica di funzionalizzazione dei CNC e la densità di crosslinking. Nel complesso, gli idrogeli reticolati chimicamente rappresentano materiali meccanicamente robusti, stabili e versatili, con un forte potenziale per diverse applicazioni [18,26].

2.2.3 Proprietà e applicazioni

La presenza di punti di interconnessione tra CNC e catene polimeriche, unita alla rigidità intrinseca dei nanocristalli, conferisce agli idrogeli un notevole miglioramento delle proprietà meccaniche, aumentando il modulo di Young, la resistenza a trazione e la tenacità del materiale. Inoltre, i legami a idrogeno tra CNC e matrice possono comportarsi come legami sacrificali reversibili: durante la deformazione si rompono e si riformano, dissipando energia e contribuendo a ritardare la propagazione delle fratture. Tuttavia, concentrazioni eccessive di CNC possono indurre aggregazione e difetti strutturali con conseguente peggioramento delle proprietà meccaniche e compromissione dell'omogeneità del materiale [19].

La presenza di gruppi idrossilici distribuiti sulla superficie del CNC influenza anche il rigonfiamento degli idrogeli, favorendo l'interazione con l'acqua e quindi lo swelling. Di contro, la formazione di legami fisici tra CNC e matrice ha un effetto negativo sul processo di rigonfiamento all'equilibrio. Come conseguenza risulta spesso un comportamento non lineare, con una concentrazione ottimale di CNC oltre la quale l'effetto sul rigonfiamento tende a saturare o a ridursi [19].

Infine, i CNC conferiscono anche particolari proprietà ottiche ai gel. In soluzione acquosa, essi sono in grado di autoassemblarsi in strutture ordinate anisotrope, capaci di interagire selettivamente con la luce visibile. In particolare, questi sistemi possono mostrare fenomeni di birifrangenza, osservabili tramite luce polarizzata, dovuti al diverso modo in cui la luce attraversa il materiale in funzione dell'orientamento dei CNC. Le proprietà ottiche dei materiali contenenti CNC dipendono quindi dall'organizzazione e dall'allineamento dei nanocristalli all'interno della matrice polimerica. Quando il materiale viene sottoposto a stiramento, i CNC tendono ad allinearsi lungo la direzione della deformazione, provocando variazioni nei colori di interferenza e nella risposta ottica del sistema. Per questo motivo, gli idrogeli contenenti CNC possono essere utilizzati anche come materiali otticamente responsivi e sensibili a stimoli esterni [27].

Gli idrogeli contenenti nanocellulosa cristallina trovano applicazione in diversi settori, grazie alla biocompatibilità, elevata area superficiale, stabilità dei gel e migliori proprietà meccaniche e reologiche.

Nel settore cosmetico, le sospensioni di CNC vengono impiegate nei prodotti per la cura della pelle grazie alla loro capacità di migliorare le proprietà di barriera delle emulsioni cosmetiche e di favorire il mantenimento dell'idratazione cutanea. In questo ambito, le sospensioni di CNC sono state utilizzate come alternativa ad emulsionanti e addensanti in creme solari e idratanti, dove contribuiscono a stabilizzare le formulazioni mediante la formazione di strati densi attorno alle gocce disperse, favorita dalla loro naturale tendenza all'aggregazione [28]. Inoltre, i gel a base di CNC possono migliorare la stabilità e la viscosità delle formulazioni cosmetiche e prolungare la durata di conservazione. Le proprietà superficiali e ottiche dei CNC hanno anche favorito lo sviluppo di prodotti cosmetici avanzati e materiali intelligenti [18].

Nel campo biomedico, i CNC vengono solitamente utilizzati come agenti di rinforzo in matrici polimeriche sintetiche e naturali, con applicazioni nell'ingegneria tissutale e nei sistemi di rilascio di farmaci. L'elevata resistenza meccanica ed elasticità dei gel risultanti li rendono

adatti a essere sottoposti a carichi elevati, favorendone l'impiego in applicazioni di ingegneria del tessuto osseo. Per quanto riguarda i sistemi di rilascio di farmaco, vengono sfruttate la porosità modulabile degli idrogeli per il caricamento del farmaco e la possibilità di regolarne il rilascio in risposta a stimoli locali. In questo contesto, l'incorporazione di CNC all'interno di matrici polimeriche è stata studiata per ridurre i vuoti nella struttura dell'idrogelo, al fine di limitare la fuoriuscita prematura del farmaco, permettendo un rilascio più graduale nel tempo e una maggiore capacità di caricamento [29]. Un esempio significativo è rappresentato da un sistema costituito esclusivamente da CNC, nel quale la gelificazione è ottenuta riducendo la repulsione elettrostatica tra i nanocristalli. In questo studio, il farmaco Donepezil cloridrato (DPZ-HCl) è stato incorporato nella dispersione di CNC. La formazione di legami a idrogeno tra i gruppi ossidrilici dei CNC e le molecole di Donepezil potrebbe contribuire ulteriormente alla gelificazione. In questo sistema il Donepezil agisce sia come agente reticolante sia come principio attivo terapeutico [18,30].

Nel settore alimentare, le sospensioni di CNC agiscono come emulsionanti e addensanti nelle formulazioni alimentari per migliorarne la stabilità. Gli idrogeli che incorporano CNC con matrici polimeriche possono essere utilizzati come sistemi per veicolare nutrienti, probiotici o conservanti alimentari, preservandone la stabilità e controllandone il rilascio [18,31].

Nel settore industriale rientra il trattamento delle acque reflue, in cui gli idrogeli vengono utilizzati per l'adsorbimento di coloranti e metalli. In questo ambito, l'aggiunta di CNC a matrici polimeriche incrementa la capacità di adsorbimento di ioni positivi grazie alla presenza di gruppi funzionali anionici sulla superficie dei CNC, come gruppi carbossilici introdotti mediante modifiche chimiche. Per incrementarne ulteriormente l'efficienza adsorbente, sono stati sviluppati sistemi basati su CNC sottoposti a modifiche superficiali o all'innesto di specifici monomeri. Per esempio, sono stati riportati idrogeli a base di CNC e grafene sotto forma di ossido di grafene (GO) e quantum dots di grafene (GQDs). Nel caso degli idrogeli CNC/GO viene sfruttata la capacità dell'ossido di grafene di autoassemblarsi in strutture porose, mentre i cristalli di cellulosa contribuiscono all'integrità della struttura e alla stabilità meccanica [32]. Nel secondo caso, invece, i GQDs sono stati funzionalizzati con gruppi amminici e i CNC con gruppi aldeidici permettendo la formazione di legami covalenti tramite reazioni di condensazione che portano alla formazione di basi di Schiff [33]. Questa combinazione aumenta la superficie specifica disponibile per l'adsorbimento e migliora contemporaneamente le proprietà meccaniche del materiale. In generale, l'efficienza del processo di adsorbimento dipende dalla concentrazione degli inquinanti, dal pH, dalla temperatura e dal tempo di contatto tra idrogeli e inquinanti [29].

Grazie alle loro eccezionali proprietà fisiche e meccaniche, i gel contenenti CNC si sono dimostrati molto promettenti come materiale utile e adattabile per una varietà di applicazioni, tra cui la biomedicina, la cosmetica e le scienze ambientali. Tuttavia, sono necessari ulteriori studi per comprendere appieno le caratteristiche dei gel di CNC e per adattarli a specifiche applicazioni [18].

3. Materiali e metodi

3.1 Materiali

In questo lavoro di tesi sono stati impiegati i seguenti materiali: poli(etilene glicole) diacrilato (PEGDA, Mn 575), acido solforico (95.0-98.0%), 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-ossil (TEMPO), bromuro di sodio, ipoclorido di sodio (6-14%), idrossido di sodio, acido cloridrico (37%), 2-amminoetil metacrilato (AEMA), acido 2-(N-morfolino)etansolfonico (MES), N-idrossisuccinimide (NHS), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimmide cloridrato (EDC), bicarbonato di sodio, acido citrico anidro (>99.5%), acido acetico (99,8%), acquistati da Sigma-Aldrich, dimetilidrossiacetofenone (Genocure DMHA) acquistato da Rahn, soluzione standard di idrossido di sodio (0,01 mol/l) acquistata da Supelco, fogli di canapa acquistati da OP Papírna, s.r.o. (Repubblica Ceca).

3.2 Procedura di estrazione dei CNC a partire da fogli di canapa

La procedura di estrazione è stata derivata da [34]. Si prepara, sotto agitazione meccanica, una soluzione di acido solforico al 64% versando lentamente 140 mL di acido solforico puro in 140 mL di acqua deionizzata all'interno di un pallone da 500 mL, immerso in un bagno di ghiaccio. Il pallone è trasferito in un bagno ad olio ed è termostato a 55°C. A partire dai fogli di canapa, si ritagliano circa 20g di cellulosa sottoforma di pezzi di 2x2 mm, che vengono aggiunti nella soluzione, lasciandola sotto forte agitazione per 1 ora. La Figura 7 mostra i fogli di canapa nello stato iniziale e i pezzi ritagliati utilizzati nell'estrazione. La soluzione viene agitata meccanicamente utilizzando un agitatore meccanico a pala per garantire l'omogeneizzazione del sistema. Il pallone è poi rimosso dal bagno e si aggiungono 200 mL di acqua deionizzata. La sospensione viene trasferita in provette da centrifuga in polycarbonato, diluendo ancora di un fattore 1:2 con acqua. La miscela viene centrifugata 3 volte a 16200rpm per 30 minuti, rimuovendo di volta in volta il surnatante e ridisperdendo la cellulosa in acqua deionizzata. Al termine di questa fase, la cellulosa viene trasferita in una beuta e si aggiunge acqua distillata fino a raggiungere un volume di 500 mL. La sospensione viene lasciata in forte agitazione per una notte. La sospensione risultante viene trasferita in un tubo da dialisi da 14 kDa. Il bagno di dialisi viene cambiato due volte al giorno fino a quando la conducibilità dell'acqua del bagno non eguaglia quella dell'acqua deionizzata ($\approx 1 \mu\text{S}/\text{cm}$). Al termine della dialisi, la sospensione di nanocristalli di cellulosa viene recuperata dal tubo di dialisi, suddivisa in frazioni da circa 300 mL che vengono posti in beute immerse in un bagno di ghiaccio, e vengono sottoposti a sonicazione, con un tip sonicator con punta 100mL-1L con amplitudine del 40% per 25 minuti. Infine, la sospensione è filtrata sotto vuoto, prima con un filtro da 5 μm e successivamente con uno da 0,65 μm .

La concentrazione di nanocellulosa della sospensione ottenuta è misurata essiccando in stufa per 24 ore a 70°C un triplicato di campioni di pochi grammi e utilizzando la seguente formula:

$$\text{Concentrazione} = \frac{\text{massa secca}}{\text{massa iniziale}} \times 100$$

Equazione 1: Formula per il calcolo della concentrazione di CNC in sospensione acquosa

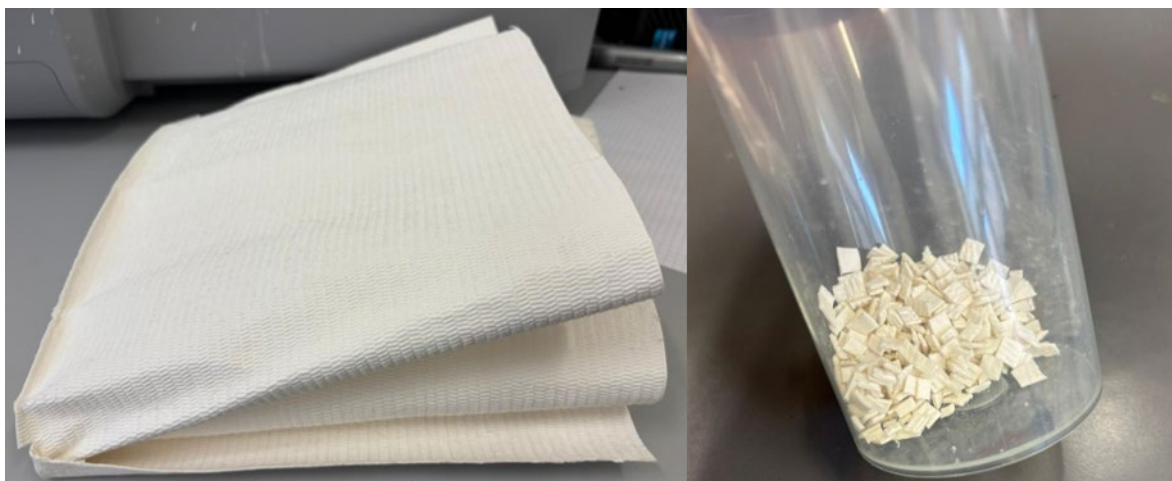


Figura 7: Fogli di canapa utilizzati per estrarre i CNC

La concentrazione ottenuta è pari al 1,63% p/p.

3.3 Preparazione degli idrogeli bulk

Si preparano soluzioni di PEGDA in acqua per la sintesi di idrogeli senza CNC. Per gli idrogeli contenenti CNC si preparano soluzioni di PEGDA a cui si aggiunge la sospensione di CNC: in questo caso si agita la soluzione manualmente o tramite bagno ad ultrasuoni. L'acqua viene eventualmente rimossa per riscaldamento con piastra agitante-riscaldante e con Rotavapor, mostrato in Figura 8, a 45°C e 150 min^{-1} fino ad avere la concentrazione desiderata.



Figura 8: Heidolph Standard Rotatory Evaporator

Alle formulazioni viene aggiunto il fotoiniziatore Genocure DMHA in quantità pari all'1% p/p rispetto al monomero PEGDA. Le miscele sono trasferite in stampi circolari in silicone (diametro=2,5cm, spessore circa 1,26mm) e sottoposte a fotopolimerizzazione con lampade UV Hamamatsu o Dymax a un'intensità di 100 mW/cm^2 , misurata con apposito radiometro, per 1 minuto su ciascun lato. In Figura 9 e in Figura 10 vengono mostrati i sistemi di fotopolimerizzazione UV Hamamatsu e Dymax, rispettivamente.

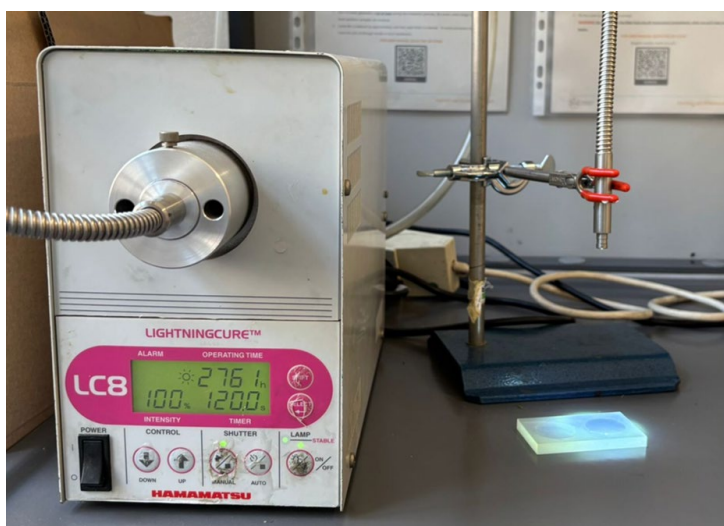


Figura 9: Sistema di fotopolimerizzazione UV Hamamatsu

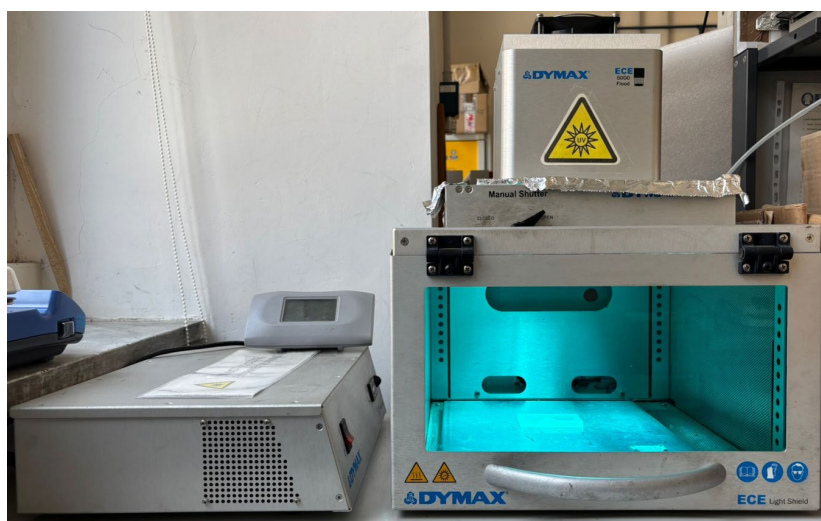


Figura 10: Sistema di fotopolimerizzazione UV Dymax

3.4 Preparazione degli idrogeli porosi

Si preparano soluzioni di PEGDA in acqua per la sintesi di idrogeli senza CNC. Per gli idrogeli contenenti CNC si preparano soluzioni di PEGDA a cui si aggiunge la sospensione di CNC: in questo caso si agita la soluzione manualmente o tramite bagno ad ultrasuoni. Alle formulazioni viene aggiunto il fotoiniziatore Genocure DMHA in quantità pari all'1% p/p rispetto al monomero PEGDA.

Adattando una metodologia di letteratura [35], si ricopre il fondo di uno stampo circolare in silicone (diametro=4cm) con polvere di bicarbonato di sodio; quindi, si aggiunge la soluzione a base PEGDA. Lo stampo viene posto sotto lampada UV Hamamatsu e si aggiunge acido acetico direttamente nello stampo utilizzando una micropipetta, avviando immediatamente l'irraggiamento per 1 minuto, nelle stesse condizioni di illuminazione descritte sopra.

Alternativamente, si preparano soluzione di PEGDA in acqua o PEGDA a cui si aggiunge la sospensione di CNC, agitandola manualmente o tramite bagno a ultrasuoni. Si ricopre il fondo di uno stampo circolare in silicone (diametro=4cm) con polvere di bicarbonato di sodio e si aggiunge acido citrico alla soluzione a base PEGDA, mescolando manualmente. Lo stampo viene posto sotto lampada UV Dymax, in Figura 10, e si versa la soluzione direttamente nello stampo avviando immediatamente l'irraggiamento per 1 minuto, nelle stesse condizioni di illuminazione descritte sopra.

3.5 Tecniche di caratterizzazione delle nanocellulose e degli idrogeli

3.5.1 Microscopia ottica

La struttura porosa degli idrogeli è stata indagata mediante microscopia ottica utilizzando il microscopio Olympus BX53M in Figura 11.



Figura 11: Microscopio ottico BX53M

3.5.2 Microscopia elettronica di trasmissione

La sospensione di CNC è stata caratterizzata mediante TEM. Gocce di sospensione a circa lo 0,001% in peso sono depositate su griglie rivestite di carbonio appena attivate con scarica a bagliore e colorate negativamente con acetato di uranile al 2% in peso. I campioni vengono osservati con un microscopio Jeol JEM-2100 Plus operante a 200 kV e le immagini sono registrate mediante telecamera Gatan Rio 16. La dimensione delle particelle viene misurata dalle micrografie FE-SEM e TEM utilizzando il software ImageJ. I valori medi di lunghezza, larghezza e aspect ratio sono calcolati dopo aver misurato 200 particelle per ciascun campione.

3.5.3 Spettroscopia ad infrarossi FT-IR

Per eseguire le analisi di spettroscopia ad infrarossi è stato utilizzato lo spettrofotometro Thermo Scientific Nicolet™ iS™50, in Figura 12. Lo strumento è stato impiegato sia in modalità trasmissione sia in modalità riflettanza totale attenuata (ATR). Per poter essere analizzati, i campioni ottenuti vengono essiccati in forno sottovuoto a 40°C per un giorno.



Figura 12: Spettrofotometro Thermo Scientific Nicolet™

Il materiale secco è stato usato per la preparazione di pastiglia mescolandolo o in un mortaio con bromuro di potassio (KBr) e pressando il tutto tramite pressa idraulica.

Le analisi in modalità ATR sono state utilizzate per monitorare l'andamento del processo di reticolazione. Nel caso della fotopolimerizzazione del PEGDA, il picco C=O associato al carbonile è stato utilizzato come picco di riferimento di legame che non varia durante il processo di reticolazione e il picco C=C associato al doppio legame vinilico è stato utilizzato per verificare che l'avvenuta reticolazione, osservandone la relativa diminuzione o scomparsa. La percentuale di conversione è stata calcolata secondo la formula:

$$\text{Conversione (\%)} = \left(1 - \frac{A_t / A_t^{ref}}{A_0 / A_0^{ref}} \right) \times 100$$

Equazione 2: Formula per il calcolo della percentuale di conversione

Dove A_t e A_0 sono le aree del picco relative al legame C=C al tempo t e al tempo 0, rispettivamente, mentre A_t^{ref} e A_0^{ref} sono le aree relative al legame C=O al tempo t e al tempo 0.

3.5.4 Frazione di insolubile (gel content)

Da ciascun idrogelo polimerizzato si ricavano almeno 3 pezzi, sia per gli idrogeli bulk sia per quelli porosi, mediante l'ausilio di un taglierino. I campioni ottenuti vengono essiccati in forno

sottovuoto a 40°C fino al raggiungimento di una massa costante. In seguito, i campioni bulk sono vengono immersi direttamente in acqua all'interno di una vial di vetro. I campioni porosi si inseriscono all'interno di retine di metallo di massa nota per evitare la perdita di materiale e successivamente vengono immersi in acqua all'interno di vial di vetro. Infine, i campioni si mantengono in immersione in acqua per 72 ore, sostituendola una volta al giorno per garantire la completa rimozione della frazione insolubile. Al termine del periodo di estrazione, i campioni vengono nuovamente essiccati fino al raggiungimento di una massa costante. La frazione di insolubile viene calcolata tramite la seguente formula:

$$\text{Frazione di insolubile (\%)} = \frac{m_t}{m_0} \times 100$$

Equazione 3: Formula per il calcolo della frazione di insolubile

Dove m_t indica la massa secca al termine delle 72 ore e m_0 la massa secca iniziale.

3.5.5 Test di rigonfiamento in peso e risalita capillare

Almeno 3 campioni per ogni tipo di idrogelo sono stati pesati immediatamente dopo la polimerizzazione e successivamente immersi in acqua all'interno di piastre Petri. La massa dei campioni è stata pesata a intervalli regolari ed è stata calcolata la percentuale assorbita tramite formula:

$$\text{Swelling (\%)} = \frac{m_t - m_0}{m_0} \times 100$$

Equazione 4: Formula per il calcolo della percentuale di rigonfiamento

Dove m_t indica la massa dell'idrogelo gonfio al tempo t e m_0 indica la massa dell'idrogelo post-polimerizzazione.

Sulla formulazione al 10% di CNC è stata eseguita una prova di rigonfiamento a partire dal peso secco per valutare la capacità di riassorbimento dell'acqua evaporata. A tal fine, i campioni sono stati lasciati essiccare all'aria fino al raggiungimento di una massa costante e successivamente re-immersi in acqua e pesati ad intervalli regolari.

Sugli idrogeli porosi, sono stati eseguiti test di risalita capillare. La procedura sperimentale dei test di risalita capillare è stata definita sulla base di una metodologia già utilizzata per i mattoni di argilla [36,37], secondo la norma di riferimento UNI EN 15801:2010 [38]. Su 4 fogli di carta assorbente Whatman immersi in acqua in una piastra Petri sono stati posizionati gli idrogeli in modo tale da avere solo la superficie inferiore a contatto con l'acqua. La variazione di massa è stata quindi monitorata a intervalli regolari per valutare l'assorbimento dell'acqua per effetto della risalita capillare. Il contenuto di acqua per unità di superficie viene misurato secondo la formula:

$$Q_i = \frac{m_i - m_0}{A}$$

Equazione 5: Formula per il calcolo del contenuto d'acqua per unità di superficie

Dove m_i è la massa del campione al tempo t_i dopo immersione, m_0 è la massa iniziale del campione post-polimerizzazione e A è l'area del campione a contatto con l'acqua. È stato valutato anche il coefficiente di assorbimento di acqua per effetto capillare (AC), definito come la pendenza della sezione lineare della curva Q_i , rispetto alla radice quadrata del tempo.

3.5.6 Monitoraggio della polimerizzazione tramite camera termica

Si prepara un campione poroso a partire da una soluzione di PEGDA in acqua secondo la procedura descritta sopra, posizionando lo stampo sotto lampada UV Hamamatsu. La camera termica FLIR A700 viene posizionata in modo da inquadrare l'intero stampo. Le immagini termiche e i dati vengono acquisiti durante l'intero processo di polimerizzazione e successivamente analizzati tramite software FLIR Research Studio per determinare l'andamento della temperatura nel tempo.

4 Risultati e discussione

4.1 Estrazione dei cristalli di nanocellulosa e loro caratterizzazione

I nanocristalli di cellulosa (CNC) sono stati estratti a partire da fogli di canapa mediante idrolisi acida con acido solforico come descritto nell'articolo di Riccioni et al [39]. Il trattamento permette di idrolizzare selettivamente le porzioni amorfe della cellulosa, preservando quelle cristalline e permettendo di ottenere nanocristalli. Al termine del processo la superficie dei cristalli presenta gruppi solfato: la loro carica negativa ne facilita la dispersione e la stabilizzazione in ambiente acquoso.

La sospensione di CNC, dopo prolungata dialisi in acqua fino a neutralizzazione della soluzione estraente, si presenta con aspetto omogeneo e trasparente, priva di agglomerati. Essiccando la sospensione in stufa a 70°C per 24 ore si ottengono dei film sottili e iridescenti. L'iridescenza osservata nei CNC essiccati è dovuta alla formazione di una struttura nematica chirale, caratterizzata da un'organizzazione elicoidale periodica dei nanocristalli che si sviluppa durante il processo di evaporazione del solvente [40].

In Figura 13 si vede l'aspetto della sospensione di CNC in acqua e dei film di CNC ottenuti per essiccamento.

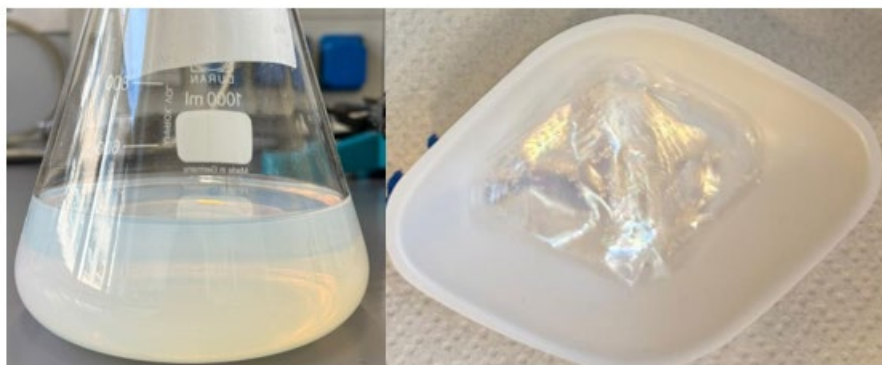


Figura 13: CNC in sospensione acquosa (sinistra) e CNC a seguito dell'evaporazione di acqua in forno (destra)

La concentrazione della sospensione di CNC ottenuta in questo lavoro di estrazione è pari al 1,63% p/p. La sospensione è stata diluita per aggiunta di acqua o concentrata per trattamento termico (su piastra agitante-riscaldante o con Rotavapor).

Per confermare la riuscita del processo di estrazione è stata eseguita un'analisi spettroscopica a infrarossi in modalità trasmissione, ottenendo lo spettro riportato in Figura 14. La spettroscopia a infrarossi permette di identificare i gruppi funzionali presenti in un materiale sfruttando la loro interazione con la radiazione infrarossa. L'assorbimento dei fotoni da parte del materiale induce transizioni tra diversi stati vibrazionali delle molecole, rendendo possibile lo studio delle loro vibrazioni caratteristiche.

Ciascun gruppo funzionale presenta bande di assorbimento infrarosso caratteristiche, associate alle corrispondenti vibrazioni fondamentali. L'analisi di tali bande permette quindi di ottenere informazioni sulla struttura chimica del materiale e di confermare la presenza di specifiche funzionalità.

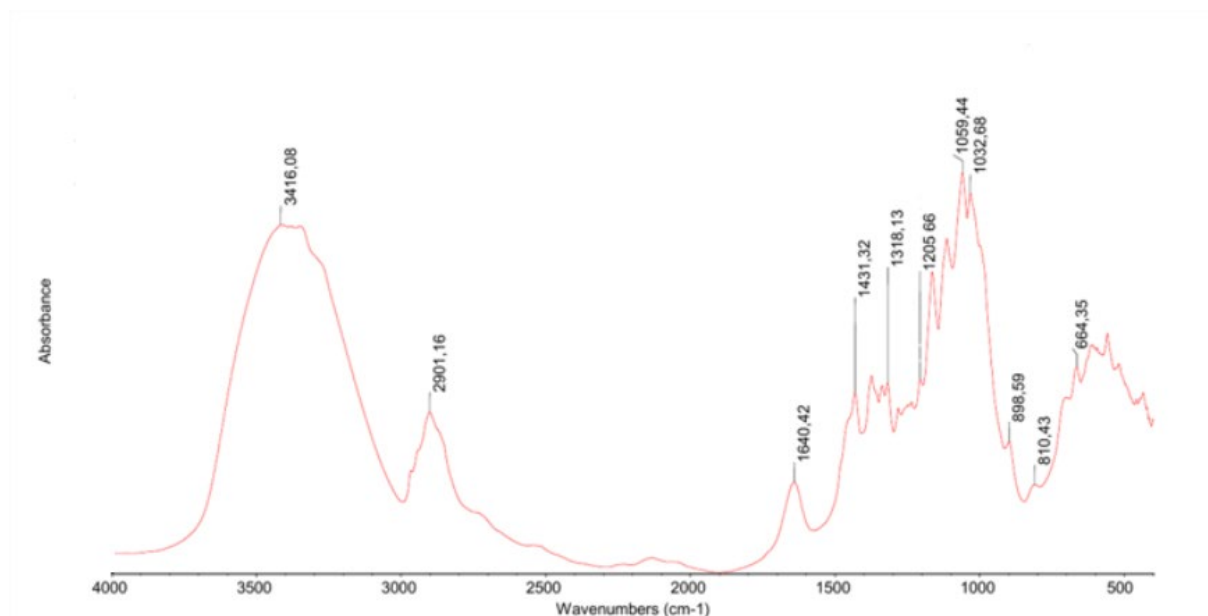


Figura 14: Spettro FT-IR della sospensione di CNC

Lo spettro FTIR dei CNC presenta tutti i picchi caratteristici della cellulosa nelle diverse regioni di assorbimento. I picchi a 3400 cm^{-1} e 2900 cm^{-1} sono dovuti allo stretching dei gruppi -OH e C-H , rispettivamente. I picchi a 1430 cm^{-1} e dei 1318 cm^{-1} sono dovuti allo stretching e al bending dei legami -CH_2 . La banda a 1059 cm^{-1} è attribuibile allo stretching del legame C-O . Un'altra banda situata a circa 1030 cm^{-1} è correlata alla vibrazione dell'anello piranosidico C-O-C [41]. Il picco intorno a 1640 cm^{-1} è attribuibile al bending dei gruppi O-H , dovuto all'acqua assorbita sulla superficie dei nanocristalli: nonostante il trattamento di essiccamento applicato per l'ottenimento del campione di CNC da sottoporre ad analisi, a causa dei forti legami idrogeno tra -OH del CNC e -OH dell'acqua, è difficile rimuovere completamente l'acqua adsorbita nel CNC. Come atteso i picchi nell'intorno dei 1200 cm^{-1} e 810 cm^{-1} sono, rispettivamente, la vibrazione di stiramento di S=O e C-O-S nel gruppo solfato -OSO_3 – a seguito dell'idrolisi acida [42].

La microscopia elettronica viene utilizzata per caratterizzare i CNC estratti da pasta di canapa mediante idrolisi acida con acido solforico. In particolare, la microscopia elettronica a trasmissione (TEM) permette di determinare l'efficacia del trattamento di idrolisi acida e confermare la presenza di CNC all'interno delle sospensioni acquose. I CNC sono costituiti principalmente da singoli cristalli e tramite analisi al TEM è possibile stimare la lunghezza, larghezza e aspect ratio. Le immagini al TEM in Figura 15 mostrano chiaramente la presenza di CNC isolati caratterizzati da una morfologia a bastoncino (rod-like), con una lunghezza tra 151 e 285 nm e larghezza tra 12 e 24 nm. Tali risultati confermano l'efficacia dell'idrolisi acida nel rimuovere le regioni amorfe della cellulosa e ottenere particelle nanometriche [39].

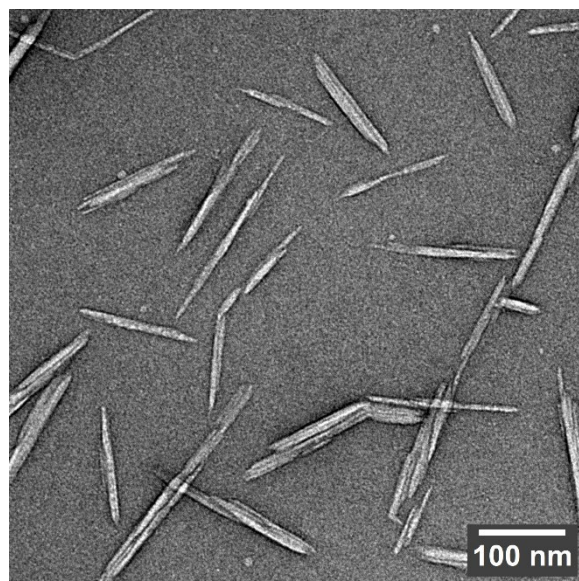


Figura 15: Immagine TEM dei CNC estratti da canapa tramite TEM

4.2 Preparazione di idrogeli e idrogeli porosi

Sono stati preparati idrogeli fotoreticolati a base di polietilenossido diacrilato (PEGDA), monomero idrofilo con due funzioni reattive reticolabili con processi radicalici fotoindotti. In presenza di agente porogenico sono stati ottenuti anche idrogeli porosi.

4.2.1 Idrogeli bulk

Si indica come idrogelo bulk qualsiasi sistema non poroso.

Gli idrogeli bulk sono stati preparati utilizzando soluzioni acquose di PEGDA. Ad esse sono stati aggiunti in proporzioni variabile in CNC, mescolando alla soluzione di PEGDA la sospensione di nanocristalli e poi eventualmente rimuovendo l'acqua in eccesso per evaporazione. Alle formulazioni viene aggiunto il fotoiniziatore in quantità pari all'1% p/p rispetto al monomero PEGDA. Le miscele sono trasferite in stampi circolari in silicone. In seguito all'irraggiamento con lampada UV secondo la procedura descritta precedentemente, si ottengono idrogeli bulk sottoforma di dischi di spessore pari a circa 1,3mm. Il PEGDA fotopolimerizza secondo il meccanismo illustrato in Figura 16: i radicali liberi prodotti dal fotoiniziatore attaccano i doppi legami dei gruppi acrilati presenti alle estremità della catena PEGDA, promuovendo la formazione di una struttura reticolata.

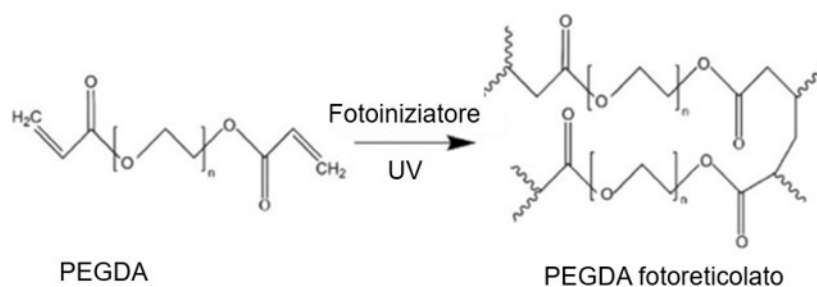


Figura 16: Meccanismo di fotopolimerizzazione del PEGDA

Al fine di ottimizzare la composizione degli idrogeli bulk sono stati svolti diversi esperimenti preliminari.

Inizialmente, sono stati studiati idrogeli senza CNC ed è stato investigato l'effetto del contenuto di acqua sul sistema a base PEGDA, mediante la preparazione di soluzioni con contenuto crescente di acqua, come riportato in Tabella 1.

Formulazione	PEGDA (%p/p)	Acqua (%p/p)
P100	100	0
P50	50	50
P30	30	70
P10	10	90
P4	4	96

Tabella 1: Formulazioni di idrogeli a base di PEGDA al variare del contenuto di acqua

Ciascuna formulazione preparata è stata osservata dal punto di vista macroscopico rilevandone l'omogeneità.

Comparando manualmente gli idrogeli ottenuti dalle formulazioni in Tabella 1 dopo reticolazione, si è osservato che sono stati ottenuti sistemi trasparenti, macroscopicamente più morbidi al crescere del contenuto di acqua. In particolare, la formulazione contenente il 96% p/p di acqua non ha portato alla formazione di un gel autosostenente, come mostrato in Figura 17, permettendo di stabilire un limite superiore del contenuto di acqua che consente la sintesi di idrogeli bulk.

In generale, sulla superficie di tutti i campioni polimerizzati si nota la presenza di uno strato liquido e talvolta appiccicoso, più marcato nei campioni all'aumentare del contenuto di acqua. Questo fenomeno può essere attribuito sia all'elevata frazione acquosa delle formulazioni più diluite, sia a una parziale inibizione della fotopolimerizzazione superficiale dovuta alla presenza di ossigeno, che può ridurre il grado di reticolazione negli strati più esterni del materiale, in quanto i radicali formati durante l'avvio della reazione reagiscono con l'ossigeno, dando origine a radicali perossilici che inibiscono la reazione di polimerizzazione. Inoltre, l'ossigeno è anche in grado di disattivare gli stati eccitati del fotoiniziatore [43]. Questo fenomeno avviene particolarmente alle interfacce a diretto contatto con l'ossigeno, dove si verifica una competizione tra la reazione di fotopolimerizzazione e la diffusione dell'ossigeno dovuta al continuo rifornimento di ossigeno [44].

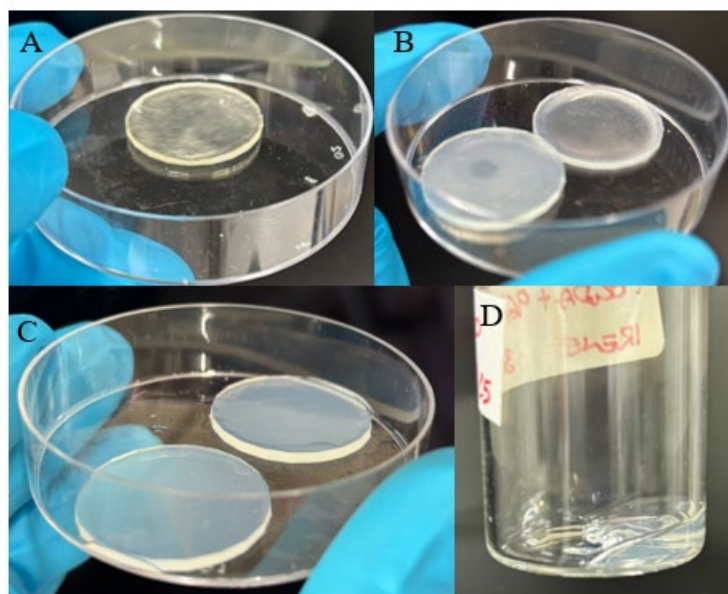


Figura 17: P50 (A); P30 (B); P10 (C); P4 (D)

Successivamente sono state effettuate prove preliminari di polimerizzazione preparando sistemi tipo P100 e P50 contenenti CNC in rapporto pari al 1,5% p/p rispetto al PEGDA, come riportato in Tabella 2.

Formulazione	PEGDA (%p/p)	CNC (%p/p)	Acqua (%p/p)
P-CNC1,5	98,5	1,5	0
P-CNC0,75	49,25	0,75	50

Tabella 2: Formulazioni di idrogeli a base di CNC/PEGDA al variare del contenuto di acqua

La formulazione P-CNC0.75 è omogenea; è stata osservata la presenza di birifrangenza associata ai CNC: essa verrà commentata successivamente in un confronto con altri idrogeli.

Nel caso della formulazione P-CNC1,5 si osserva come disperdere CNC tal quale porti alla formazione di agglomerati, come si vede in Figura 18 sulle pareti del palloncino. I cristalli di nanocellulosa rimangono ben dispersi in soluzione acquosa grazie alla repulsione elettrostatica delle loro cariche superficiali; in PEGDA (senza acqua) l'aggregazione presente allo stato secco non è variabile per dispersione meccanica nel monomero [45].



Figura 18: Soluzione P-CNC1,5

In seguito alla fotopolimerizzazione, eseguita secondo la procedura descritta precedentemente, si ottengono gli idrogeli in Figura 19: entrambi si presentano maneggevoli, flessibili e abbastanza trasparenti. Il campione P-CNC1,5 privo di acqua mostra un aspetto più opaco e una maggiore compattezza rispetto all'idrogelo contenente acqua.

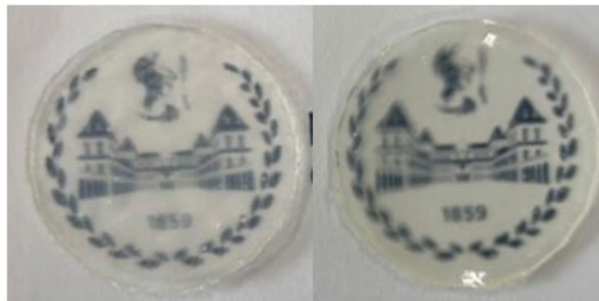


Figura 19: P-CNC1,5 (sinistra) e P-CNC0,75 (destra)

Sulla base degli esperimenti preliminari condotti, è stato definito di preparare idrogel con un contenuto di acqua attorno al 70% p/p e variare il contenuto di CNC. La Tabella 3 riporta la composizione percentuale in peso delle varie formulazioni, espressa rispetto alla massa totale del campione.

Formulazione	PEGDA (%p/p)	CNC (%p/p)	Acqua (%p/p)
P-CNC0,45	30	0,45	69,55
P-CNC1,2	27,3	1,2	71,5
P-CNC9	18	9	73
P-CNC11	18	11	71
P-CNC13	17	13	70
P-CNC17	17	17	66

Tabella 3: Formulazioni di idrogeli a base di CNC/PEGDA al variare del contenuto di CNC

All'aumentare del contenuto di CNC è stata osservata una progressiva perdita di omogeneità del sistema: nel sistema P-CNC13 contenente il 13% p/p di CNC sono comparsi aggregati, mostrati in Figura 20, rendendo difficile il prelievo e il trasferimento della formulazione nello stampo. Analoghe osservazioni per P-CNC17. Tuttavia, tutti i sistemi sono stati reticolati tramite irraggiamento.

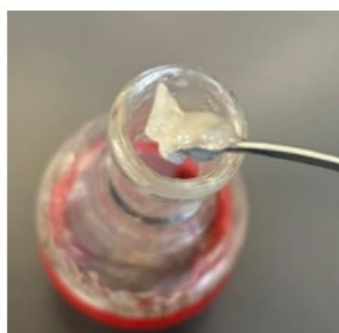


Figura 20: Soluzione P-CNC13

In seguito alla fotopolimerizzazione secondo la procedura descritta precedentemente, si ottengono gli idrogeli in Figura 21. La differenza tra i campioni contenenti il 10% e il 13% p/p risulta evidente a livello macroscopico: gli idrogeli P-CNC13 e P-CNC17 presentano difetti superficiali e una minore omogeneità strutturale rispetto alle formulazioni con minore contenuto di CNC. Inoltre, in seguito alla polimerizzazione gli idrogeli con un elevata percentuale di CNC hanno mostrato una maggiore fragilità, evidenziata dalla rottura dei bordi durante la manipolazione.

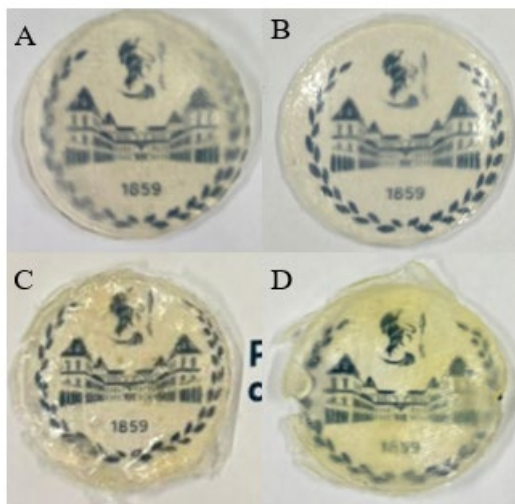


Figura 21: P-CNC9 (A); P-CNC11 (B); P-CNC13 (C); P-CNC17 (D)

Un'ulteriore proprietà osservata negli idrogeli bulk contenenti CNC è stata la presenza di birifrangenza. Tale fenomeno è associato alla natura anisotropa dei nanocristalli di cellulosa e alla loro capacità di interagire con la luce polarizzata. Per la sospensione di CNC la birifrangenza è osservabile in Figura 22: la sospensione è confrontata prima e dopo agitazione manuale.

La birifrangenza della sospensione di CNC ottenuta è stata valutata qualitativamente mediante osservazione in luce polarizzata, utilizzando un filtro polarizzatore posto davanti al campione. La rotazione del polarizzatore fino all'oscuramento dello sfondo ha permesso di evidenziare la presenza di zone luminose all'interno della sospensione.

Prima di essere sottoposta ad agitazione, la sospensione di nanocristalli di cellulosa mostra un comportamento isotropo; quando la sospensione di CNC viene agitata, il campione diventa intensamente birifrangente. La sospensione acquosa ha mostrato una forte birifrangenza indotta da taglio (shear-induced birefringence), evidenziando la capacità dei nanocristalli di formare una fase cristallina liquida nematica chirale in equilibrio con la fase isotropa [46].

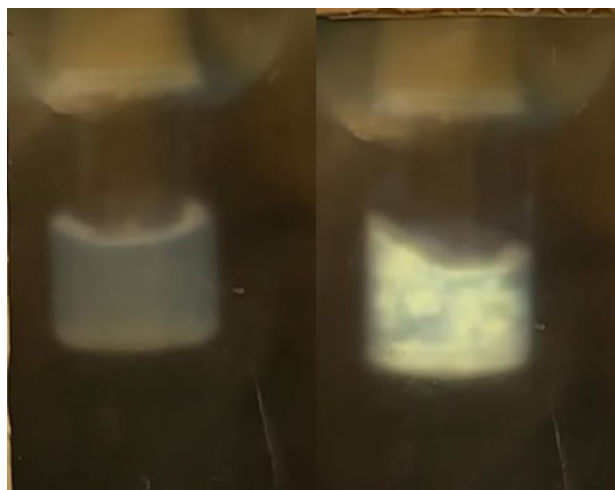


Figura 22: Sospensione di CNC prima e dopo agitazione manuale

La birifrangenza osservata nella sospensione acquosa di nanocristalli di cellulosa è stata studiata anche nelle formulazioni P-CNC0,75 e P-CNC11 in seguito a fotopolimerizzazione.

Per l'idrogel P-CNC11 la birifrangenza è osservabile in Figura 23: il campione è confrontato con il campione P-CNC0.75 e con il campione di solo PEGDA (P100).

Le zone luminose osservate all'interno degli idrogeli attraverso luce polarizzata sono indicative della presenza e dell'organizzazione anisotropa dei CNC nella matrice di PEGDA. La luminosità è attribuibile all'effetto depolarizzante e birifrangente dei CNC: i materiali anisotropi sono in grado di scomporre la luce incidente in due componenti, luce ordinaria e straordinaria, che hanno cammini ottici differenti attraverso il materiale. Quando queste due luci escono dal materiale anisotropo, il materiale a bassa birifrangenza produce colori di interferenza di primo ordine (bianco sporco, grigio scuro), all'aumentare della birifrangenza del materiale compaiono colori di interferenza di ordine superiore (blu, verde, giallo-arancio, violetto-rosso). L'incorporazione di un materiale altamente birifrangente come i CNC in una matrice a bassa birifrangenza come il PEGDA può aumentare la risposta ottica dei materiali compositi [27,47].

Come mostrato in Figura 23, anche un basso contenuto di CNC è risultato sufficiente a conferire birifrangenza al materiale, mentre il campione di controllo costituito dal solo PEGDA non ha mostrato tale comportamento.

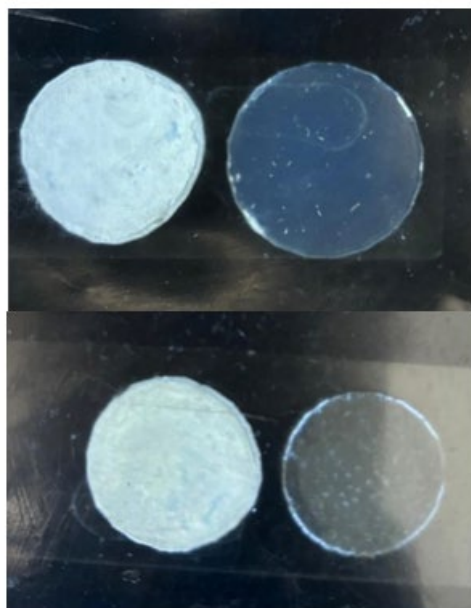


Figura 23: Confronto della birifrangenza di P-CNC0,75 e P100 (sopra) e tra P-CNC11 e P100 (sotto)

4.2.2 Idrogeli porosi

Per quanto riguarda gli idrogeli porosi, per la generazione dei pori è stata sfruttata una reazione acido/base in grado di produrre CO_2 . A tale scopo, sono stati impiegati bicarbonato di sodio e un acido: in ambiente acido il bicarbonato di sodio reagisce liberando acqua e anidride carbonica sotto forma di bolle gassose, secondo il meccanismo mostrato in Figura 24. La reazione tra bicarbonato di sodio e l'acido porta alla formazione di un sale e di acido carbonico, prodotto altamente instabile che si decompone rapidamente in anidride carbonica e acqua.

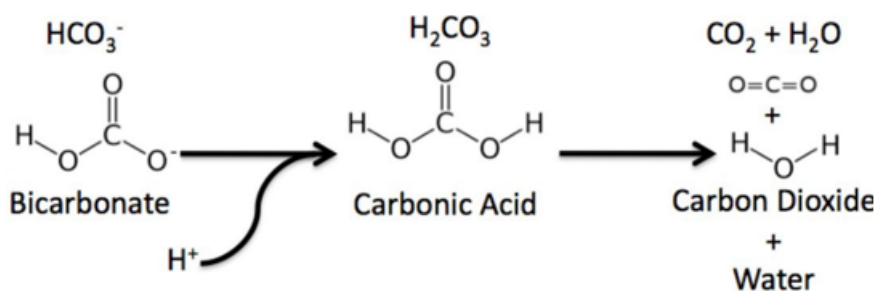


Figura 24: Meccanismo per la produzione di anidride carbonica

La reazione acido/base è stata eseguita contestualmente alla fotopolimerizzazione che consente di fissare la struttura schiumosa generata, permettendo la sintesi di idrogeli caratterizzati da una porosità macroscopica. Adattando una metodologia di letteratura [35], si ricopre il fondo dello stampo con una quantità fissa di polvere di bicarbonato di sodio passata in mortaio; si aggiunge la formulazione per l'idrogelo scelto. Lo stampo viene posto sotto lampada UV, si aggiunge l'acido in eccesso rispetto al bicarbonato e si avvia l'irraggiamento.

Al fine di ottimizzare l'architettura porosa degli idrogeli sono stati svolti diversi esperimenti preliminari. In una prima fase è stato impiegato un sistema porogeno costituito da acido acetico (AA) e bicarbonato di sodio (SBC) applicato a formulazioni a base PEGDA e PEGDA/CNC, le cui composizioni percentuali sono riportate nella Tabella 4. Le quantità dei reagenti sono state

calcolate assumendo come riferimento 2 g di soluzione precursore, utilizzando 0,12 g di bicarbonato di sodio e 0,14 g di acido acetico.

Formulazione	PEGDA (%p/p)	CNC (%p/p)	Acqua (%p/p)
P-SBC/AA	20	0	80
P-CNC-SBC/AA	21,8	1,3	76,9

Tabella 4: Formulazioni di idrogeli porosi a base di CNC/PEGDA ottenute a partire da acido acetico e bicarbonato di sodio

In seguito alla fotopolimerizzazione secondo la procedura descritta precedentemente, si ottengono idrogeli porosi di spessore variabile, tra 7 e 10 mm.

In Figura 25 sono riportate le immagini della superficie superiore dei campioni P-SBC/AA e P-CNC-SBC/AA fotopolimerizzati. Il campione privo di cellulosa mostra una superficie relativamente rigida e compatta, caratterizzata dalla presenza di una struttura superficiale simile a un film e da una porosità scarsamente sviluppata. Il campione contenente CNC è insoddisfacente, presenta una morfologia non uniforme, con distribuzione disomogenea della porosità.

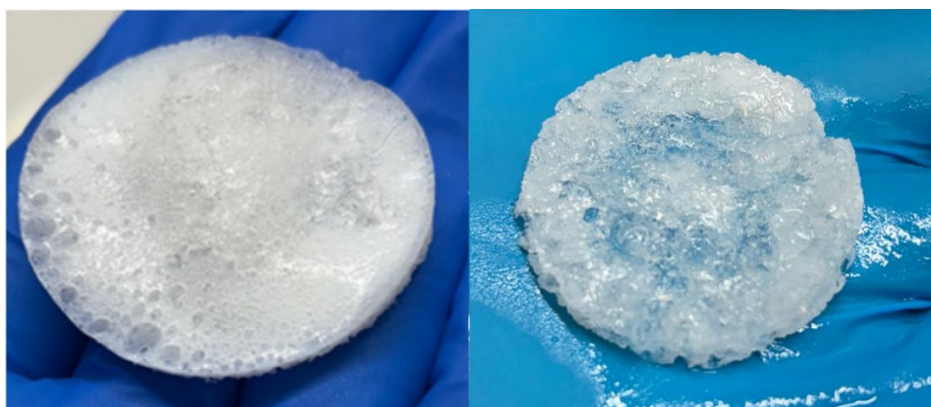


Figura 25: P-SBC/AA (destra) e P-CNC-SBC/AA (sinistra)

Successivamente l'acido acetico è stato sostituito con acido citrico (CA). Sono stati eseguiti diversi esperimenti variando la quantità di CNC, come indicato dalle composizioni percentuali riportate in Tabella 5. Per queste formulazioni è stato mantenuto lo stesso rapporto degli agenti porogeni rispetto alla soluzione precursore. Considerando 3 g di soluzione precursore per ciascun campione, sono stati utilizzati 0,18 g di bicarbonato di sodio e 0,21 g di acido citrico.

Formulazione	PEGDA (%p/p)	CNC (%p/p)	Acqua (%p/p)
P20-SBC/CA	20	0	80
P30-SBC/CA	30	0	70
P-CNC1,2-SBC/CA	27,3	1,2	71,5
P-CNC1,3-SBC/CA	21,8	1,3	76,9
P-CNC6-SBC/CA	21,9	5,9	72,2

Tabella 5: Formulazioni di idrogeli porosi a base di CNC/PEGDA ottenute a partire da acido citrico e bicarbonato di sodio

In seguito alla fotopolimerizzazione secondo la procedura descritta precedentemente, si ottengono idrogeli porosi di spessore variabile, tra 7 e 10 mm.

In Figura 26, Figura 27, Figura 28 e Figura 29 sono mostrate le immagini relative alle superfici superiore e inferiore dei campioni in Tabella 6.

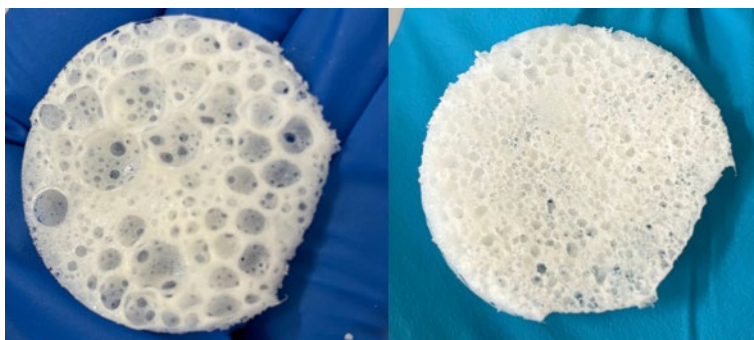


Figura 26: P20-SBC/CA; faccia superiore (destra) e inferiore (sinistra)

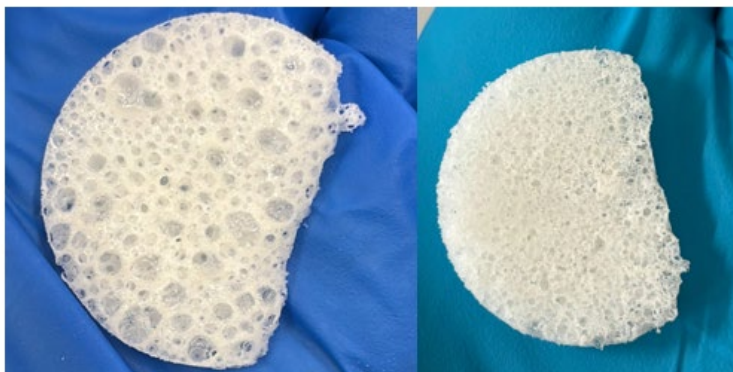


Figura 27: P-CNC1,3-SBC/CA; faccia superiore (destra) e inferiore (sinistra)



Figura 28: P-CNC6-SBC/CA; faccia superiore (destra) e inferiore (sinistra)

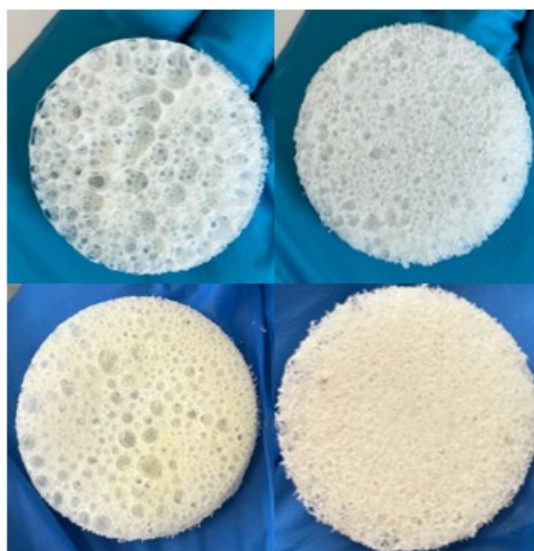


Figura 29: Campioni P30-SBC/CA (sopra) e P-CNC1,2-SBC/CA (sotto)

I campioni ottenuti mostrano un'architettura porosa interconnessa, sebbene caratterizzata da una distribuzione non uniforme dei pori tra le due superfici dei campioni. La superficie inferiore è a contatto con lo stampo e quindi con il bicarbonato di sodio durante la generazione della fase gas e presenta pori di dimensioni inferiori e una morfologia più uniforme, mentre la faccia superiore, esposta all'aria durante la fotopolimerizzazione, mostra pori di dimensioni maggiori e distribuzione più eterogenea.

È stata osservata anche l'influenza del contenuto di CNC sull'architettura porosa. Il campione privo di nanocristalli presenta pori più ampi e maggiormente distribuiti sulla superficie superiore, mentre il campione contenente una quantità intermedia di CNC mostra una diminuzione della dimensione dei pori associata a migliore omogeneità della faccia superiore. Al contrario, il campione con il 6% p/p di CNC evidenzia una formazione dei pori meno definita e una maggiore disomogeneità morfologica, presentando una superficie superiore caratterizzata dalla formazione di uno strato compatto e continuo, associato a una minore porosità superficiale. Queste analisi preliminari hanno permesso di individuare un limite superiore sul contenuto di CNC che permette di ottenere una buona architettura porosa.

Per le formulazioni P30-SBC/CA e P-CNC1,2-SBC/CA è stata valutata qualitativamente la distribuzione e omogeneità dei pori sulla superficie superiore e inferiore mediante microscopia ottica, acquisendo diverse immagini. L'analisi al microscopio ottico ha permesso di valutare l'effetto dell'introduzione dei CNC sulla morfologia tridimensionale degli idrogeli porosi.

In Figura 30 sono mostrate le superfici superiore e inferiore di P30-SBC/CA. La superficie superiore mostra una struttura porosa regolare e interconnessa, caratterizzata da cavità prevalentemente sferiche separate da pareti polimeriche sottili e uniformi. L'architettura risulta caratterizzata da pori di dimensioni elevate e distribuiti in modo omogeneo all'interno della matrice polimerica. La superficie inferiore del campione P30-SBC/CA presenta pori con forma più irregolare e di dimensioni inferiori rispetto a quelli osservati sulla superficie superiore, con una distribuzione meno uniforme.

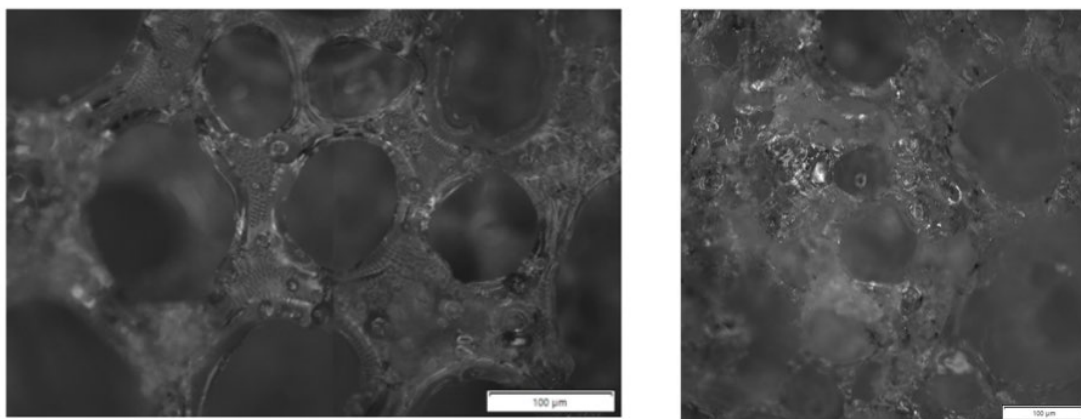


Figura 30: Immagine al microscopio ottico della superficie superiore (destra) e inferiore (sinistra) di P30-SBC/CA

Le superfici superiore e inferiore del campione P-CNC1,2-SBC/CA sono mostrate in Figura 31. La superficie superiore conserva l'architettura porosa e l'interconnessione tra pori. Le pareti dei pori appaiono più rugose e frastagliate rispetto al controllo. Inoltre, si osserva una riduzione del diametro medio dei pori, che risultano più piccoli e meno numerosi rispetto al controllo con conseguente aumento della frazione di matrice polimerica continua. Questo può essere attribuibile al fatto che i CNC tendono ad aumentare la viscosità della soluzione precursore e possono ostacolare la crescita e coalescenza delle bolle di CO₂ durante il processo di nucleazione. La superficie inferiore del campione P-CNC1,2-SBC/CA mostra pori di forma più irregolare, analogamente a quanto osservato per la superficie inferiore di P30-SBC/CA. Rispetto alla superficie superiore, i pori sono più numerosi, pur mantenendo un diametro contenuto.

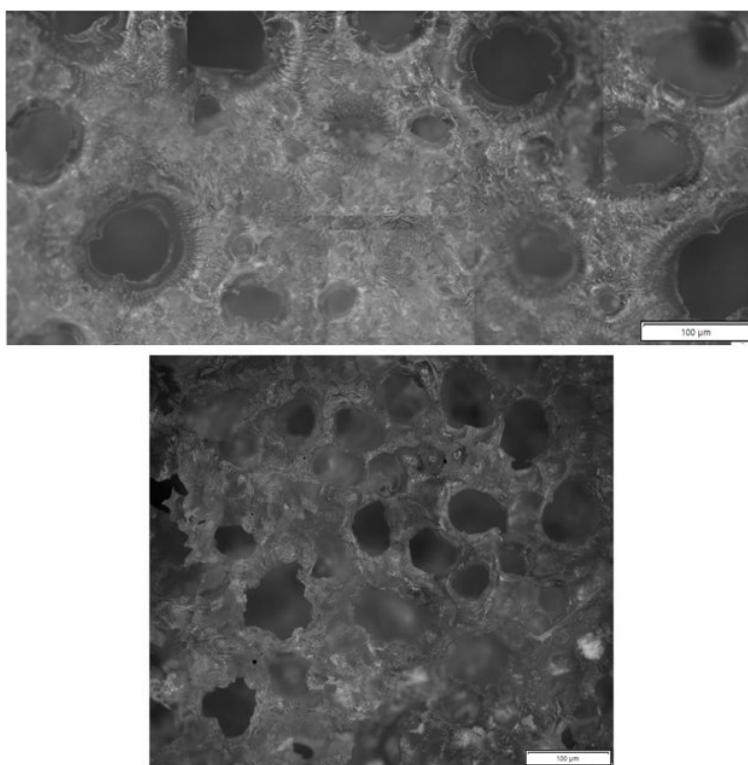


Figura 31: Immagine al microscopio ottico della superficie superiore (sopra) e inferiore (sotto) di P-CNC1,2-SBC/CA

Infine, la temperatura durante il processo di polimerizzazione è stata monitorata mediante camera termica, dal momento che sia la reazione tra bicarbonato di sodio e acido citrico sia l'irraggiamento della lampada possono influenzare l'andamento termico del sistema. La misura è stata effettuata durante la fotopolimerizzazione della formulazione P30-SBC/CA, secondo la procedura descritta precedentemente. L'andamento della temperatura in funzione del tempo è riportato in Figura 32. All'accensione della lampada si osserva un rapido aumento della temperatura, che raggiunge un massimo di 38,65 °C, attribuibile principalmente all'irraggiamento luminoso.

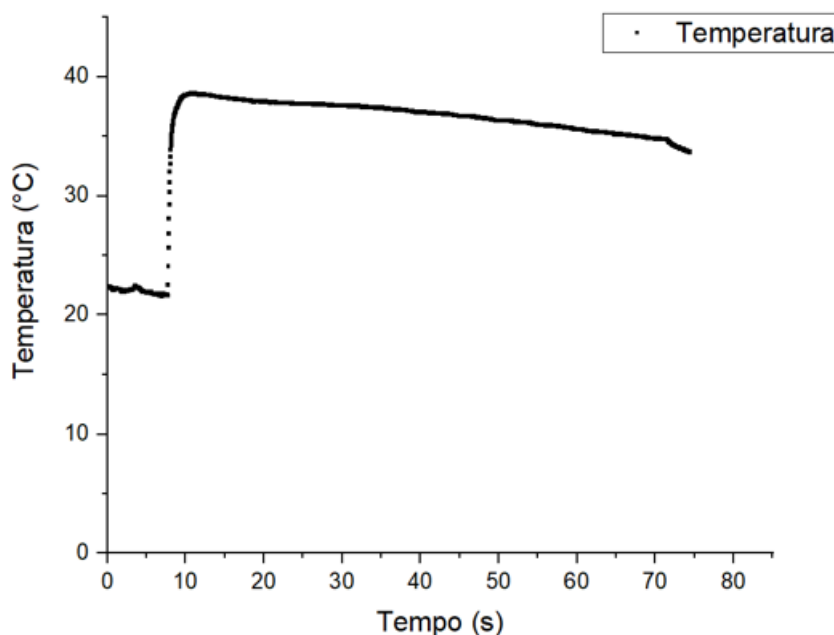


Figura 32: Andamento della temperatura durante la fotopolimerizzazione di P30-SBC/CA

4.3 Determinazione della conversione della reticolazione fotoindotta

Il grado di conversione della reazione di reticolazione è stato calcolato per le diverse formulazioni secondo la formula qui riportata:

$$Conversione (\%) = \left(1 - \frac{A_t / A_t^{ref}}{A_0 / A_0^{ref}} \right) \times 100$$

Dove A_t e A_0 sono le aree del picco relative al legame C=C al tempo t e al tempo 0, rispettivamente, mentre A_t^{ref} e A_0^{ref} sono le aree relative al legame C=O al tempo t e al tempo 0.

In Figura 33 sono riportati gli spettri FTIR-ATR del campione P100 acquisiti prima e dopo fotoreticolazione. Il grado di conversione degli altri campioni è stato determinato con la stessa procedura, confrontando gli spettri acquisiti prima e dopo la polimerizzazione. I campioni

contenenti acqua sono stati preventivamente essiccati, al fine di rimuovere il contributo dell'acqua, il cui assorbimento intorno a 1640 cm^{-1} interferisce con l'osservazione del picco relativo al legame C=C.

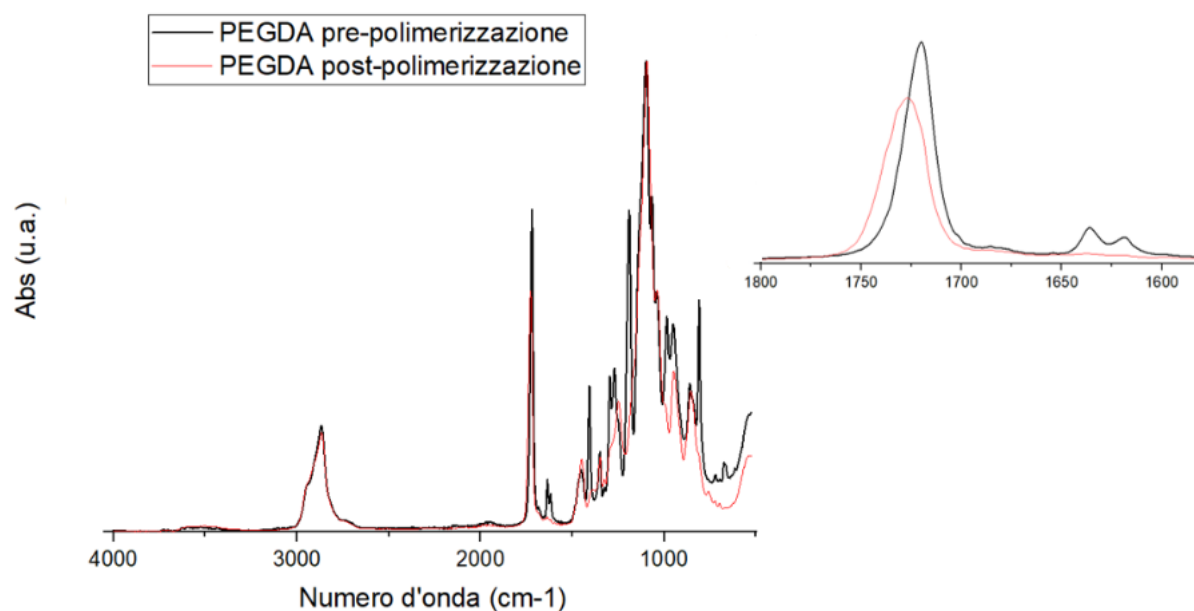


Figura 33: Spettro FTIR-ATR del campione P100 prima (nero) e dopo (rosso) fotopolimerizzazione

Per il calcolo della percentuale di conversione sono stati utilizzati come riferimenti il picco relativo al gruppo carbonilico C=O, centrato intorno a 1720 cm^{-1} , che non partecipa alla reazione di polimerizzazione, e il picco relativo al doppio legame acrilico C=C, localizzato intorno a 1635 cm^{-1} , che viene consumato durante la reazione. Nel riquadro in alto a destra della Figura 33 si può osservare la riduzione dell'intensità del picco relativo al legame C=C dopo la fotoreticolazione, indice di un elevato grado di conversione.

Le percentuali di conversione sono riportate in Tabella 6.

Campione	Conversione (%)
P100	96,0%
P50	91,0%
P30	93,6%
P10	88,5%
P-CNC0,45	93,4%
P-CNC0,75	89,5%
P-CNC1,2	93,7%
P-CNC1,5	93,5%
P-CNC11	89,3%
P30-SBC/CA	89,2%
P-CNC1,2-SBC/CA	89,4%

Tabella 6: Percentuali di conversione dei gruppi acrilati ottenuto per le diverse formulazioni

Il grado di conversione risulta elevato per tutte le formulazioni (88%-96%), indicando che la fotopolimerizzazione è avvenuta con successo. Pertanto, l'elevato contenuto di acqua, l'incorporamento dei CNC e la formazione di un'architettura porosa sembrano non compromettere significativamente la formazione della rete polimerica.

4.4 Determinazione della frazione di insolubile o gel content degli idrogeli dopo essiccamento

Il calcolo della frazione di insolubile è stato utilizzato come misura indiretta del grado di reticolazione degli idrogeli e rappresenta la percentuale di materiale che forma una rete tridimensionale insolubile.

La frazione di insolubile degli idrogeli è stata determinata su campioni dopo completo essiccamento, mediante immersione dei campioni stessi in acqua per 72 ore per rimuovere la frazione non reticolata, calcolata con l'Equazione 3. I valori ottenuti sono riportati in Tabella 7.

Campione	Gel content (%)
P30	98,7 $\pm$ 0,82
P-CNC0,45	97,4 $\pm$ 1,6
P-CNC1,2	98,4 $\pm$ 0,43
P-CNC11	97,3 $\pm$ 0,62
P30-SBC/CA	68,9 $\pm$ 2,7
P-CNC1,2-SBC/CA	66,2 $\pm$ 8,5

Tabella 7: Frazione di insolubile delle formulazioni

I valori di gel content risultano elevati per le formulazioni bulk con valori prossimi al 100% e basse deviazioni standard, confermando l'elevata efficienza di reticolazione e la formazione di reti polimeriche altamente insolubili.

Le due formulazioni porose, invece, mostrano valori significativamente inferiori, circa 66-68%, associati ad una maggiore frazione solubile rimossa durante il processo di estrazione. La maggiore frazione di materiale estratto può essere attribuita all'architettura porosa che aumenta l'accessibilità della matrice al solvente e può favorire la rimozione di frazioni polimeriche non completamente integrate nella rete tridimensionale. Inoltre, questa differenza può essere correlata alla modalità di formazione della struttura porosa mediante gas foaming. Durante la reazione tra bicarbonato di sodio e acido citrico si generano specie solubili che potrebbero rimanere intrappolate nella struttura porosa, insieme a eventuali residui di reagenti non consumati. Queste specie vengono solubilizzate in acqua, determinando una maggiore perdita di massa e una conseguente diminuzione del gel content. Tuttavia, le formulazioni porose mostrano elevate percentuali di conversione dei gruppi acrilici, indicando che la fotopolimerizzazione è avvenuta efficacemente.

4.5 Test di rigonfiamento in peso e risalita capillare

Il rigonfiamento degli idrogeli bulk, calcolato in base alla variazione di peso del campione immerso in acqua, secondo l'Equazione 4, è riportato in funzione del tempo in Figura 34.

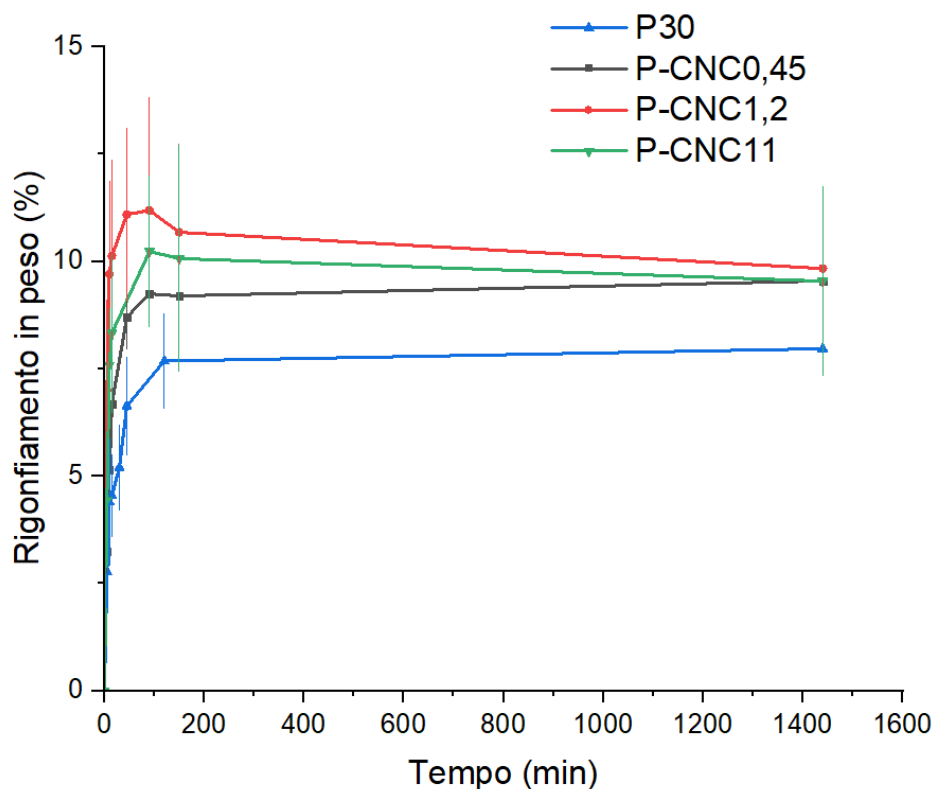


Figura 34: Andamento del rigonfiamento in peso nelle varie formulazioni

La percentuale d'acqua assorbita è stata calcolata su campioni subito dopo fotopolimerizzazione per quantificare la capacità delle strutture reticolate di inglobare ulteriore acqua. I valori raggiunti dopo 24 ore si attestano tra l'8% e l'11%, mostrando un rapido incremento nei primi minuti seguiti da una stabilizzazione nel corso delle 24 ore. Nel caso di ciascuna formulazione analizzata, i campioni hanno mantenuto la propria integrità strutturale lungo tutto l'arco delle 24 ore, senza fenomeni visibili di degradazione o dissoluzione nel mezzo acquoso, indice della buona stabilità del reticolo tridimensionale ottenuto.

Dal momento che le catene di PEGDA sono densamente reticolate e l'idrogelo è altamente idratato in partenza, la quantità di acqua in grado di essere assorbita nelle maglie dell'idrogelo risulta limitata.

Si nota, invece, un leggero aumento nell'assorbimento di acqua per le formulazioni contenenti CNC rispetto al PEGDA puro. Questo andamento può essere attribuito all'elevata idrofilicità dei nanocristalli che presentano numerosi gruppi -OH sulla superficie, favorendo la diffusione dei liquidi all'interno della matrice. Al contrario, all'11% p/p di CNC si registra una diminuzione del rigonfiamento in peso che può essere dovuta ad un aumento di rigidità

strutturale indotto dai nanocristalli e una limitazione del volume disponibile all'interno del reticolo dell'idrogelo [48-51].

È stato inoltre effettuato un test di rigonfiamento sul campione P-CNC11 partendo dallo stato secco, ottenendo il grafico mostrato in Figura 35, per valutare la massima capacità di rigonfiamento. Il valore di equilibrio raggiunto è pari a circa il 200% del peso secco, indice di un'elevata capacità di assorbimento di acqua. Questo risultato si discosta da quanto osservato per il campione non seccato, il cui limitato assorbimento di acqua è attribuibile allo stato già altamente idratato del materiale. Il confronto evidenzia che dopo l'essiccamento il materiale è in grado di riassorbire un'elevata quantità di acqua, mantenendo integrità strutturale e ritornando allo stato rigonfio originario.

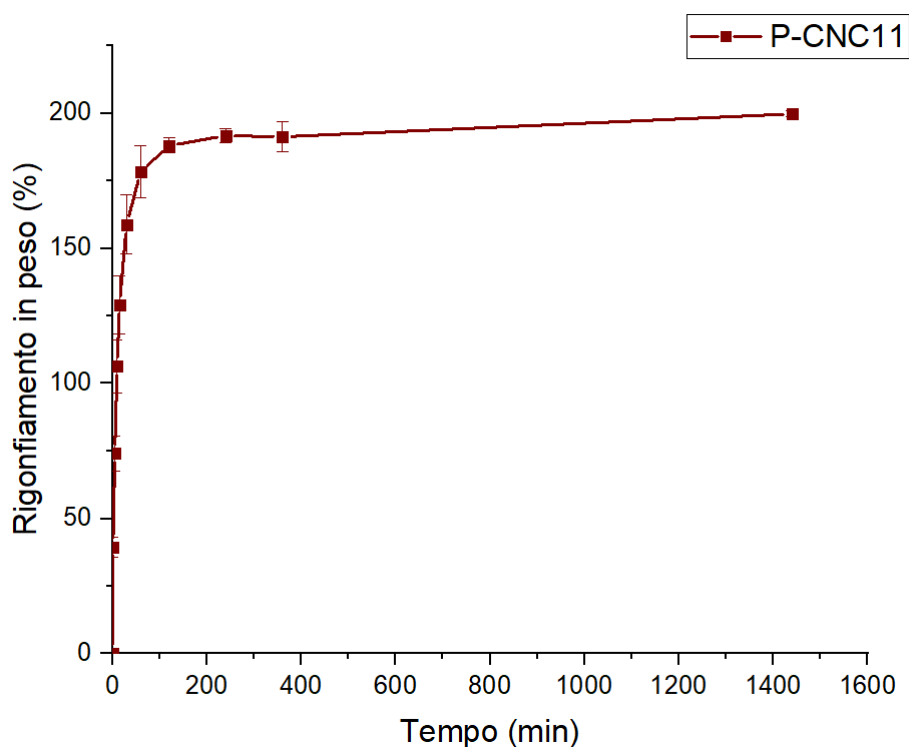


Figura 35: Andamento del rigonfiamento sul campione P-CNC11 essiccato

Per valutare l'assorbimento d'acqua negli idrogeli porosi sono stati effettuati test di risalita capillare, che consentono di valutare l'ingresso e il trasporto di acqua in strutture altamente porose. La risalita capillare è il processo mediante cui un materiale poroso assorbe acqua spontaneamente attraverso la propria rete porosa grazie all'azione della tensione superficiale del liquido e delle forze di adesione tra l'acqua e la superficie solida. L'entità e la velocità dell'assorbimento capillare dipendono dalle caratteristiche del materiale, in particolare dall'idrofilicità della matrice e dalla morfologia della rete porosa, come dimensione, distribuzione e interconnessione dei pori. I risultati ottenuti sono riportati in Figura 36 per P30-SBC/CA e in Figura 37 per P-CNC1,2-SBC/CA.

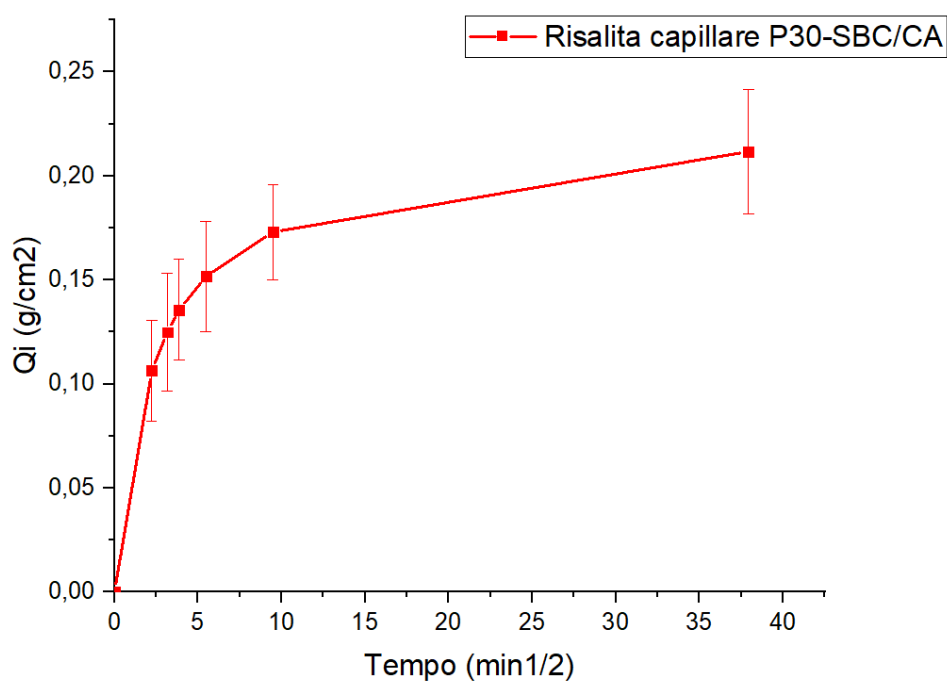


Figura 36: Risalita capillare per il campione P30-SBC/CA

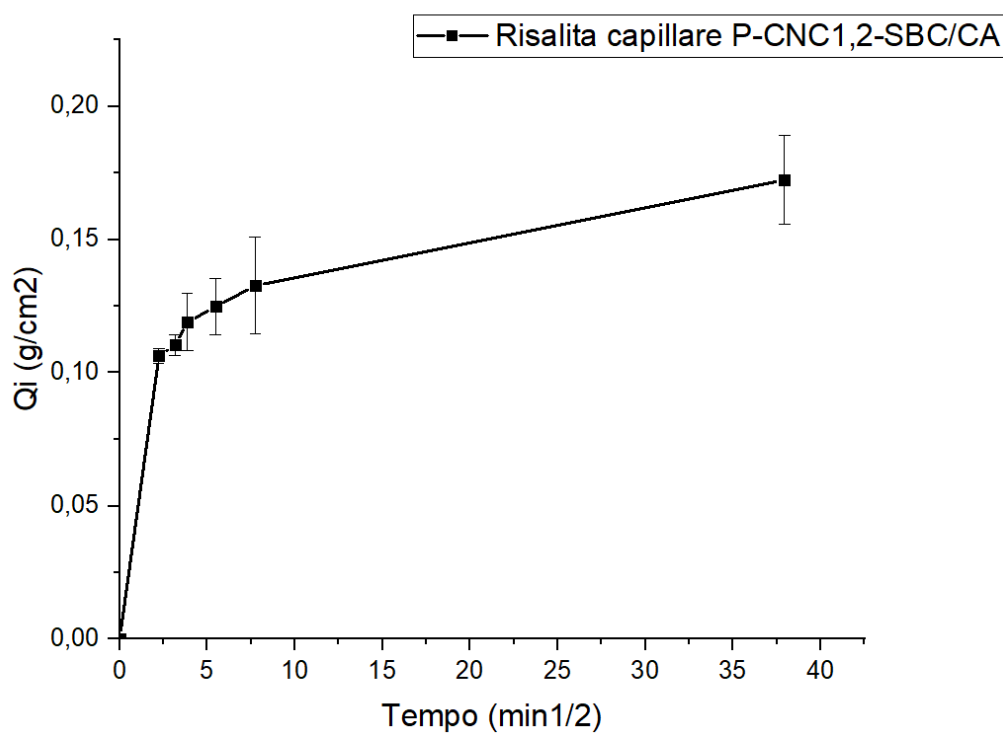


Figura 37: Risalita capillare per il campione P30-SBC/CA

I grafici mostrano l'andamento della quantità di acqua assorbita per unità di superficie Q_i (g/cm^2) in funzione della radice quadrata del tempo ($\text{min}^{1/2}$) per i campioni P30-SBC/CA e P-CNC1,2-SBC/CA. Entrambi i materiali mostrano un profilo cinetico simile caratterizzato da una fase iniziale molto rapida in cui la risalita capillare mostra un andamento quasi verticale,

che evidenzia un'ottima affinità del reticolo polimerico nei confronti dell'acqua e la presenza di una struttura porosa interconnessa capace di favorire un rapido trasporto del liquido per capillarità. Successivamente, l'assorbimento rallenta progressivamente fino al raggiungimento di un plateau. L'assorbimento massimo al termine delle 24 ore è molto simile per i due campioni, raggiungendo un Q_i pari a circa 0.21 g/cm^2 per il campione P30-SBC/CA e 0.17 g/cm^2 per il campione P-CNC1,2-SBC/CA. La differenza osservata nella quantità massima di acqua assorbita può essere correlata alla diversa morfologia della struttura porosa osservata nei due campioni, caratterizzata da eterogeneità nella distribuzione e dimensioni dei pori.

Il coefficiente di assorbimento capillare AC, calcolato come pendenza della regressione lineare della parte iniziale della curva, quantifica la velocità dell'assorbimento capillare prima che subentrino gli effetti di saturazione del materiale. I valori ottenuti per i due campioni sono molto simili, pari a $0.036 \text{ g cm}^{-2} \text{ min}^{-1/2}$ per P30-SBC/CA e $0.037 \text{ g cm}^{-2} \text{ min}^{-1/2}$ per P-CNC1,2-SBC/CA. I valori comparabili di AC evidenziano un comportamento cinetico iniziale analogo tra i due campioni, indicando che la presenza di CNC non influenza significativamente la velocità di ingresso dell'acqua. A differenza del rigonfiamento osservato negli idrogeli bulk in cui i CNC favoriscono l'assorbimento di acqua grazie alla loro natura idrofilica, nella risalita capillare il comportamento è principalmente governato dalla morfologia della rete porosa.

Nel complesso, entrambi gli idrogeli mostrano un comportamento fortemente idrofilico e un'elevata capacità di assorbimento di acqua per capillarità.

5 Conclusioni e prospettive future

Il presente lavoro sperimentale ha avuto come obiettivo la preparazione di idrogeli a base di PEGDA e l'incorporazione di nanocristalli di cellulosa (CNC) come additivi all'interno della matrice polimerica, valutandone l'impatto in sistemi bulk e porosi. I CNC sono stati estratti secondo un protocollo consolidato e caratterizzati tramite spettroscopia FTIR, per confermare la presenza delle bande caratteristiche della cellulosa prima del loro utilizzo nelle formulazioni sviluppate.

Le analisi morfologiche hanno permesso di verificare l'efficacia del processo di sintesi degli idrogeli bulk in presenza di differenti contenuti di acqua, (50%, 70% e 90% p/p), e di studiare l'effetto dell'aggiunta progressiva di CNC, con contenuti compresi tra lo 0% e il 17% p/p, sulle caratteristiche delle formulazioni. È stato individuato un limite massimo di concentrazione di CNC pari al 13% p/p, oltre il quale l'elevato contenuto di nanocristalli interferisce con il processo di sintesi di idrogeli bulk. Tale analisi ha consentito di identificare le composizioni ottimizzate per le successive caratterizzazioni, contenenti il 70% p/p di acqua e diverse concentrazioni di CNC.

Per quanto riguarda le strutture porose, la metodologia di preparazione, proposta dalla letteratura, è stata modificata sostituendo l'acido acetico con l'acido citrico, dimostrandosi efficace nella produzione di strutture stabili e con morfologie differenti in funzione del contenuto di CNC. Anche in questo caso è stato individuato un limite massimo di concentrazione di CNC, pari al 6% p/p, oltre il quale l'elevato contenuto di nanocristalli interferisce con la morfologia dell'architettura porosa. Tale analisi ha consentito di identificare due composizioni ottimizzate per le successive caratterizzazioni, caratterizzate dal 70% p/p di acqua e contenuto di CNC pari a 0% e 1,2% p/p. La successiva osservazione al microscopio ottico ha permesso di verificare la forma e la distribuzione dei pori sulle superfici degli idrogeli porosi.

Le analisi FTIR hanno confermato un'elevata efficienza di conversione dei gruppi acrilici C=C, pari a circa il 90%, dimostrando l'efficacia del processo di fotopolimerizzazione radicalica indotto dalla radiazione UV e la formazione di strutture solide stabili sia nel caso di sistemi bulk sia nel caso di sistemi porosi. Questi risultati sono stati confermati dalla determinazione della frazione di insolubile per gli idrogeli bulk, mentre nei sistemi porosi l'analisi è risultata maggiormente influenzata dalla presenza di specie solubili generate durante il processo di foaming, con risultati pari a 66-68%.

Le analisi di assorbimento di acqua hanno permesso di valutare l'influenza della composizione e della morfologia degli idrogeli sulle loro capacità di idratazione. Nei sistemi bulk, l'analisi condotta su campioni essiccati ha evidenziato la capacità degli idrogeli di recuperare lo stato idratato iniziale arrivando ad assorbire il 200% del loro peso secco, mentre le prove di rigonfiamento post-fotopolimerizzazione hanno consentito di quantificare la capacità residua di assorbimento di acqua pari a circa il 10% del peso secco, evidenziando il ruolo dei CNC idrofilici all'interno del reticolo e il loro contributo al miglioramento delle capacità di assorbimento. Per gli idrogeli porosi le analisi di risalita capillare hanno confermato la buona bagnabilità delle strutture ottenute e l'elevata capacità di assorbimento di acqua, caratterizzata da una rapida velocità iniziale di assorbimento e arrivando ad assorbire un contenuto di acqua per unità di superficie pari a 0,21 g/cm² e 0,17 g/cm² rispettivamente. In questi sistemi, il contenuto di CNC non ha mostrato un'influenza significativa sul comportamento di risalita,

suggerendo che tale fenomeno sia principalmente governato dall'architettura porosa del materiale.

Nel complesso, i risultati ottenuti hanno evidenziato il potenziale dei CNC come filler funzionali nella formulazione di idrogeli a base PEGDA. Entro determinate concentrazioni la loro presenza non compromette il processo di sintesi né la formazione della struttura porosa, contribuendo invece a modulare la porosità.

Sviluppi futuri dello studio potrebbero riguardare la caratterizzazione meccanica degli idrogeli, al fine di valutare in modo più approfondito l'effetto dell'incorporazione dei CNC sulle proprietà meccaniche dei sistemi bulk e porosi.

Per gli idrogeli bulk un possibile approccio futuro potrebbe riguardare la modifica chimica della superficie dei CNC: l'interesse verso la modifica superficiale mediante l'introduzione di gruppi funzionali deriva dalla possibilità di utilizzarli attivamente in processi di reticolazione chimica. A tale scopo, durante questo lavoro sperimentale, sono stati svolti esperimenti preliminari per la modifica superficiale dei CNC con gruppi acrilato. Parte della sospensione di CNC ottenuta è stata sottoposta a ossidazione TEMPO per consentire l'introduzione di funzionalità acriliche sulla superficie dei nanocristalli. Le metodologie utilizzate e i risultati ottenuti sono illustrati in Appendice A e Appendice B. Idealmente, l'ottimizzazione di questa strategia potrebbe consentire la sintesi di gel di soli A-CNC reticolati.

Per quanto riguarda gli idrogeli porosi, oltre alla caratterizzazione meccanica, ulteriori sviluppi potrebbero concentrarsi sull'ottimizzazione del processo di formazione dei pori, con l'obiettivo di ottenere strutture maggiormente omogenee e controllate. Inoltre, potrebbe essere interessante valutare l'introduzione di ulteriori additivi o l'incremento del contenuto di CNC, al fine di modulare ulteriormente le proprietà dei materiali ottenuti.

Appendice: Preparazione di CNC funzionalizzate con gruppi acrilici

Una delle prospettive di questo lavoro di tesi è la preparazione di idrogeli utilizzando nanocellulosa contenente in superficie dei gruppi reattivi capaci di formare legami covalenti con il reticolo polimerico,

Durante l'attività sperimentale è stata fatta della sperimentazione in tale senso: i CNC sono stati dapprima sottoposti ad ossidazione ottenendo gruppi superficiali carbossilici, questi sono stati utilizzati per reazioni di ammidazioni in grado di introdurre gruppi acrilici.

La sintesi e la caratterizzazione dei CNC acrilati è brevemente riportata qui insieme con un commento sui risultati

A. Metodi per la modifica superficiale di CNC

A.1 Ossidazione TEMPO

La metodica di questa reazione è tratta da [52]. 0,5 g di cellulosa sono dispersi in 50 mL di acqua deionizzata contenente 0,016 g di TEMPO e 0,1g di bromuro di sodio. La miscela è lasciata in agitazione fino a completa dissoluzione dei sali, poi si aggiungono 6,2 mL di soluzione acquosa di NaClO al 6-14% in peso. La miscela è lasciata reagire per 2,5 ore a temperatura ambiente dopo aggiunta di soluzione di NaOH fino a portare il pH della soluzione a valore di 10 e controllandolo con una cartina tornasole circa ogni 10 minuti. Al termine delle 2,5 ore la reazione è bloccata aggiungendo circa 5 mL di etanolo. La miscela è infine trasferita in tubo per dialisi da 14 kDa ed è dializzata in acqua deionizzata per circa una settimana.

A.2 Titolazione conduttimetrica dei CNC TEMPO-ossidati

100 mg di cellulosa sono dispersi in 20 mL di soluzione 0,01 mol/l di HCl. All'interno della miscela è inserita la sonda del conduttimetro. La sospensione è lasciata in agitazione fino al raggiungimento di un valore stabile di conducibilità; quindi, si esegue la titolazione con una soluzione standard 0,01 mol/l di NaOH. La conducibilità è corretta per il fattore di diluizione, utilizzando la seguente formula:

$$\text{Conducibilità corretta} = \text{conducibilità} \times \frac{(V_i + V_{\text{aggiunto}})}{V_i}$$

Equazione 6: Formula per il calcolo della conducibilità corretta

Dove la conducibilità indica il valore misurato direttamente dallo strumento, V_i è il volume iniziale di analita e V_{aggiunto} è il volume raggiunto dal titolante. La conducibilità corretta è posta in grafico in funzione del volume di NaOH aggiunto.

Il grado di ossidazione della cellulosa è calcolato con la seguente formula:

$$DO = \frac{162 \times (V_{eq2} - V_{eq1}) \times [NaOH]}{massa - 36 \times (V_{eq2} - V_{eq1}) \times [NaOH]}$$

Equazione 7: Formula per il calcolo del grado di conversione

Dove 36 è la differenza tra la massa dell'unità anidroglucosidica (AGU), che rappresenta l'unità ripetitiva della cellulosa, ossidata (198g/mol) e AGU non ossidata (162g/mol), V_{eq1} e V_{eq2} sono i volumi di titolazione ai due punti di inflessione della curva e la massa indica i grammi di cellulosa titolati.

A.3 Acrilazione dei CNC TEMPO-ossidata

La procedura di acrilazione è derivata da [53]. La cellulosa metacrilata viene preparata facendo reagire la sospensione di cellulosa TEMPO ossidata con AEMA. Per sintetizzare la cellulosa acrilata circa 370g di sospensione di cellulosa al 1,52% vengono disciolti in una soluzione tampone contenente circa 4g di MES, con l'aggiunta di NaCl fino al raggiungimento di pH pari a 5,5. Per attivare i gruppi carbossilici della cellulosa ossidata si aggiungono NHS e EDC in rapporto molare NHS: EDC = 1:1. Dopo qualche minuto, viene aggiunto AEMA in rapporto molare NHS: EDC: AEMA = 1:1:1 e la reazione è mantenuta a temperatura ambiente per 24 ore. In seguito all'aggiunta dell'acrilato viene raggiunto un pH pari a 6,26. La miscela viene purificata mediante dialisi contro acqua distillata per una settimana. La concentrazione di nanocellulosa della sospensione ottenuta è misurata essiccando sottovuoto un triplicato di campioni di pochi grammi e utilizzando l'Equazione 1.

B. Risultati delle modifiche superficiali dei CNC

B.1 Caratterizzazione dei CNC-TEMPO ossidati

La reazione di ossidazione catalizzata dal sistema TEMPO permette di introdurre delle funzionalità carbossiliche sui CNC attraverso l'ossidazione selettiva del gruppo -OH presente sul carbonio in posizione 6 dell'unità della cellulosa. L'introduzione di gruppi carbossilici migliora la reattività chimica dei CNC e permette di introdurre cariche negative superficiali più numerose e stabili rispetto a quelle fornite dai gruppi solfato [54]. La Figura 38 schematizza il processo di ossidazione mediante TEMPO dei gruppi idrossilici presenti sulla cellulosa.

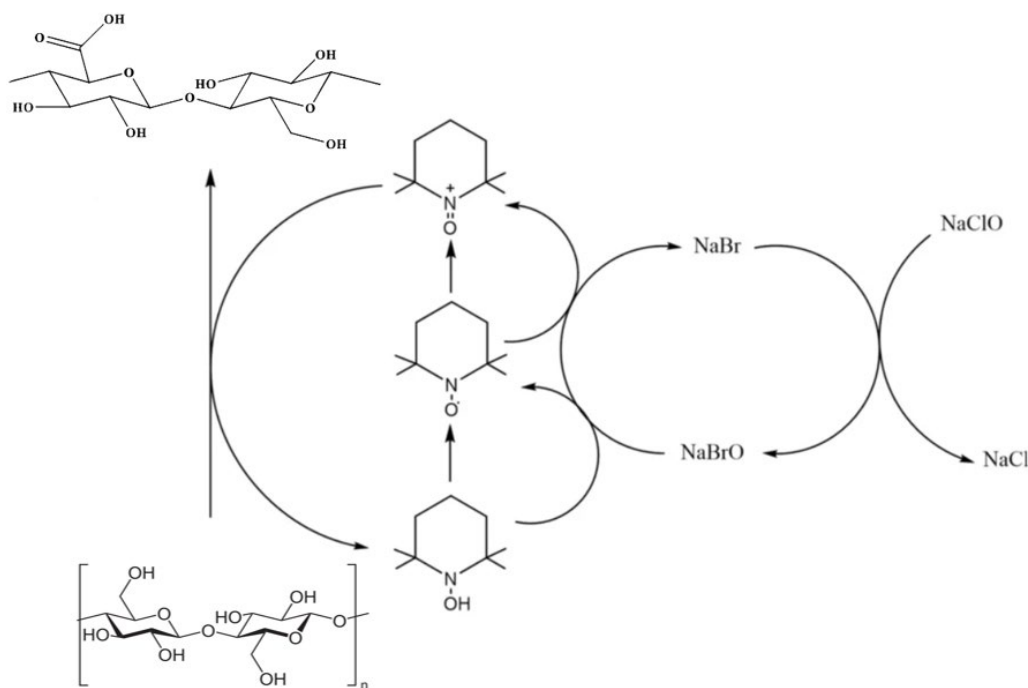


Figura 38: Processo di ossidazione dei gruppi idrossilici della cellulosa

Per verificare la riuscita del processo di ossidazione è stata effettuata un'analisi tramite spettroscopia a infrarossi. In Figura 39 si vedono gli spettri FT-IR dei CNC non modificati e dei CNC ossidati, osservando come i CNC-TEMPO ossidati mantengono le bande caratteristiche della cellulosa.

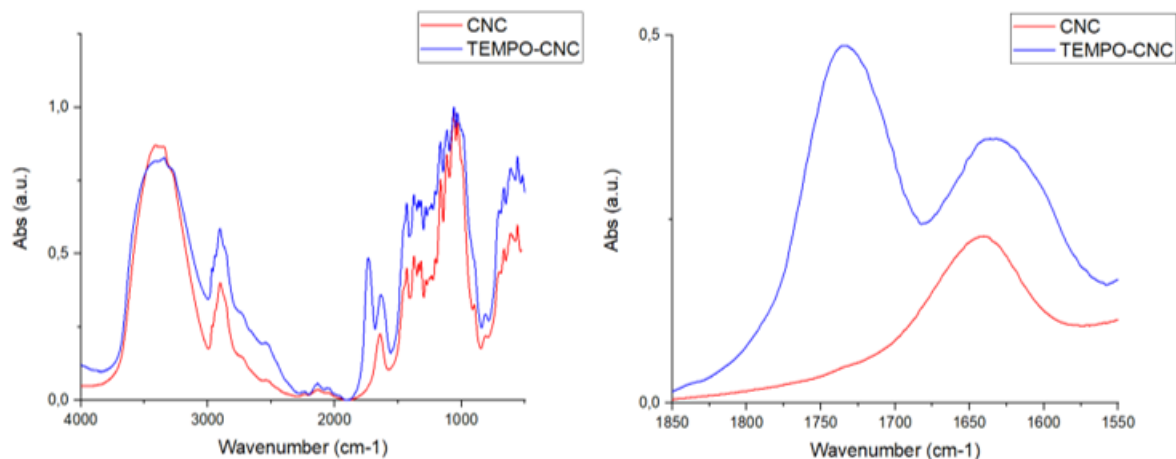


Figura 39: Intero spettro FT-IR dei CNC e CNC-TEMPO ossidati (sinistra) e spettro tra 1850cm⁻¹ e 1550cm⁻¹ (destra)

In Figura (a destra) è riportato un ingrandimento dello spettro nella regione compresa tra 1850 cm⁻¹ e 1550 cm⁻¹, intervallo in cui si trovano le bande caratteristiche dei gruppi carbossilici. Intorno a 1730 cm⁻¹ appare un nuovo picco rispetto allo spettro dei CNC non modificati, attribuibile allo stretching del legame C=O dei gruppi carbossilici nella sua forma acida. Ciò suggerisce che i gruppi idrossilici primari presenti sull'unità della cellulosa sono stati ossidati con successo in gruppi carbossilici [55]. È sempre presente il picco relativo al bending dei gruppi OH dell'acqua assorbita dai CNC, intorno a 1640cm⁻¹. In seguito all'ossidazione

TEMPO, i gruppi carbossilici possono essere presenti sia in forma acida (COOH) sia in forma deprotonata (COONa) a seconda delle condizioni di pH [34].

Per quantificare il grado di ossidazione è stata eseguita una titolazione conduttimetrica sui CNC-TEMPO ossidati. Tale analisi permette di ottenere una curva della conducibilità in funzione del volume di NaOH aggiunto. Il grado di ossidazione (D.O.) è definito come il numero di gruppi carbossilici per unità di anidroglucosio (AGU) [34].

L'AGU rappresenta l'unità ripetitiva della cellulosa e viene utilizzato come riferimento per normalizzare il contenuto di gruppi funzionali in quanto la cellulosa non ha un peso molecolare fisso, presentando catene con lunghezze differenti

In Figura 40 è riportata la curva di titolazione ottenuta per i CNC-TEMPO ossidati.

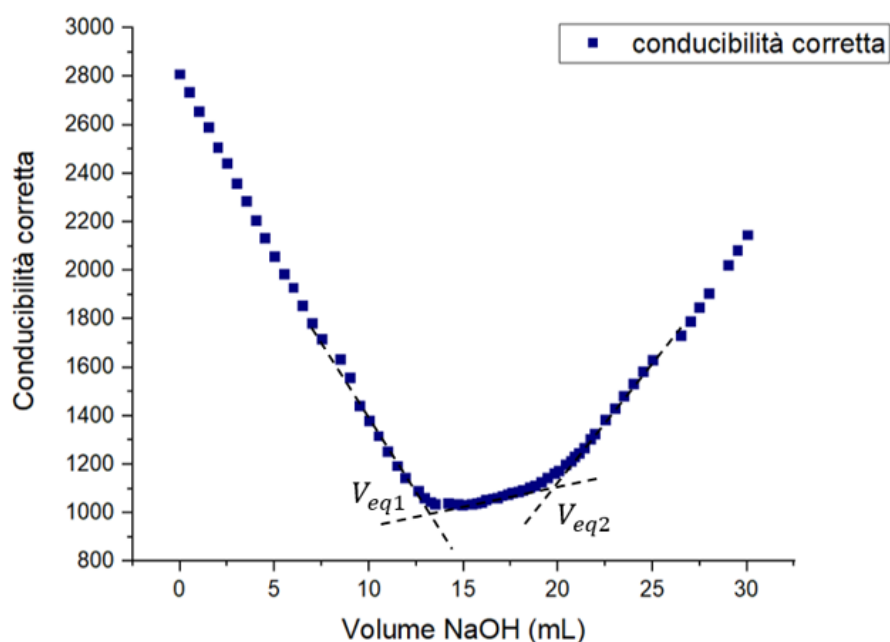


Figura 40: Curva di titolazione CNC-TEMPO ossidati

La curva mostra tre zone caratteristiche. La prima è rappresentata dalla regione con una repentina diminuzione della conducibilità che corrisponde alla neutralizzazione degli ioni H^+ derivanti dall'eccesso di acido forte (HCl) in sospensione. Nella seconda zona la conducibilità rimane teoricamente costante, questa regione corrisponde alla neutralizzazione degli ioni H^+ derivanti dai gruppi carbossilici deboli della cellulosa ossidata. Infine, nella terza zona si ha un esaurimento degli ioni H^+ disponibili e la conducibilità aumenta notevolmente a causa dell'eccesso di NaOH aggiunto. Il volume di NaOH utilizzato per titolare i gruppi carbossilici sulla cellulosa ossidata può essere calcolato a partire dai volumi corrispondenti ai limiti delle tre regioni della curva, $V_{eq2} - V_{eq1}$ [34,56].

Dalla media dei risultati ottenuti da tre curve di titolazione è stato ottenuto un D.O. medio pari al 14,9% quindi circa il 14,9% dei gruppi idrossilici primari sulla cellulosa pura sono stati ossidati in gruppi carbossilici durante l'ossidazione mediata da TEMPO.

B.2 Caratterizzazione dei CNC acrilati

Il processo di acrilazione si basa sulla reazione dei gruppi -COOH introdotti dall'ossidazione TEMPO e il reagente AEMA, per ottenere funzionalità acriliche sulla superficie della cellulosa, come mostrato in Figura 41 [57]. Nel caso dell'acrilazione, i gruppi metacrilato introdotti sull'A-CNC partecipano direttamente alla polimerizzazione radicalica durante l'irradiazione UV, formando legami covalenti con monomeri acrilici e oligomeri a base di metacrilato. Questo processo cambia il ruolo della cellulosa da un additivo con interazioni fisiche a una fase di rinforzo chimicamente integrata all'interno della matrice polimerica. Pertanto, le funzionalità acriliche presenti sulla superficie degli A-CNC possono agire come ulteriori siti di reticolazione con la matrice polimerica a base di PEGDA, contribuendo al miglioramento delle proprietà meccaniche del materiale. Idealmente, questa strategia potrebbe consentire la sintesi di gel di soli A-CNC reticolati

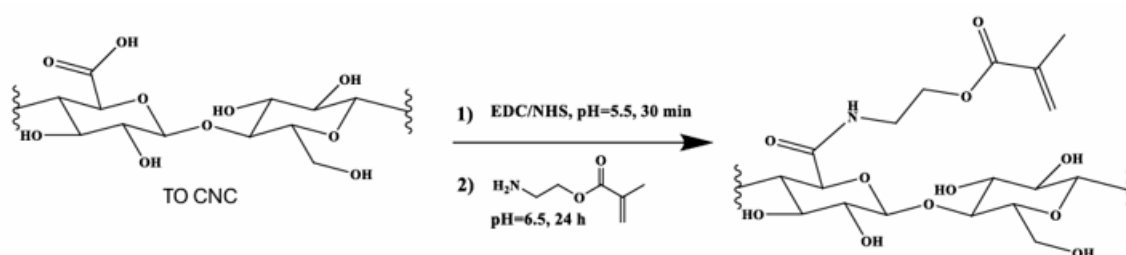


Figura 41: Processo di acrilazione dei CNC-TEMPO ossidati

A partire dal grado di ossidazione determinato per i CNC-TEMPO sono state calcolate le quantità stechiometriche del reagente AEMA e degli agenti di coupling EDC/NHS necessarie per la riuscita della reazione.

Per verificare l'avvenuta funzionalizzazione dei CNC è stata effettuata un'analisi mediante spettroscopia FTIR, il cui spettro è riportato in Figura 42.

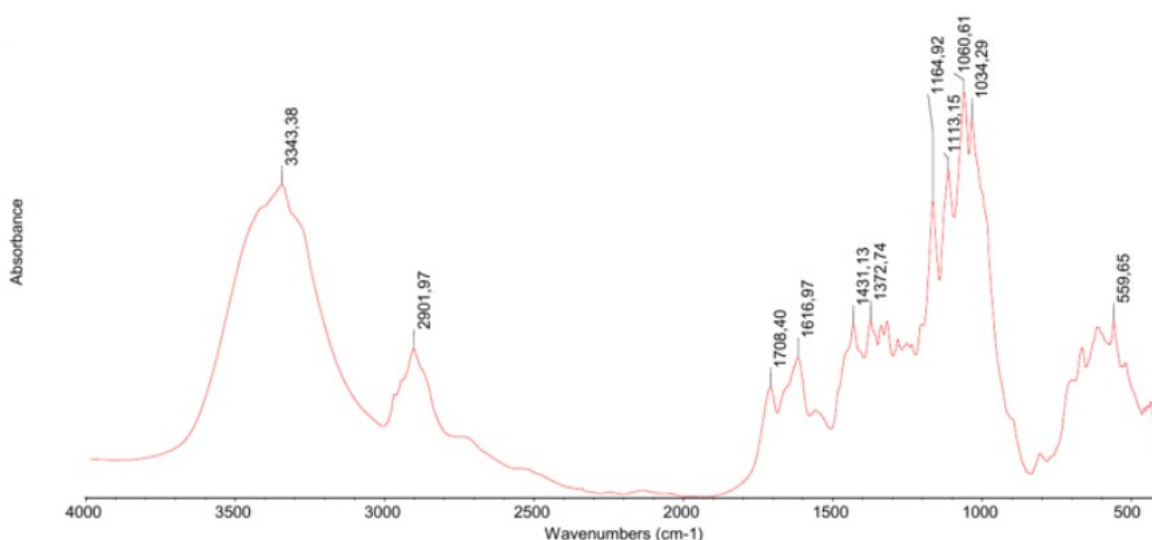


Figura 42: Spettro FT-IR di A-CNC

Nello spettro dei CNC modificati si osservano due nuovi picchi a 1704 cm^{-1} e 1616 cm^{-1} . Il picco a 1704 cm^{-1} è legato allo stretching del gruppo carbonile $\text{C}=\text{O}$, coniugato al sistema insaturo del monomero AEMA. Il picco a 1616 cm^{-1} è dovuto alla sovrapposizione tra lo stretching del doppio legame $\text{C}=\text{C}$ del metacrilato e lo stretching della forma salificata del COOH . Di conseguenza, non è possibile utilizzare il solo segnale a 1616 cm^{-1} come conferma dell'avvenuta funzionalizzazione; tuttavia, la sua associazione con il segnale a 1704 cm^{-1} conferma l'avvenuto innesto dell'AEMA sui CNC, sebbene l'intensità moderata dei picchi possa suggerire una conversione parziale dei gruppi carbossilici disponibili durante la reazione di funzionalizzazione [58].

Bibliografia

- [1] J. M. Dodda, K. Deshmukh, D. Bezuidenhout, and Y.-C. Yeh, "Hydrogels: Definition, History, Classifications, Formation, Constitutive Characteristics, and Applications." [Online]. Available: www.rsc.org
- [2] F. Ullah, M. B. H. Othman, F. Javed, Z. Ahmad, and H. M. Akil, "Classification, processing and application of hydrogels: A review," Dec. 01, 2015, *Elsevier Ltd.* doi: 10.1016/j.msec.2015.07.053.
- [3] P. Mehta, M. Sharma, and M. Devi, "Hydrogels: An overview of its classifications, properties, and applications," Nov. 01, 2023, *Elsevier Ltd.* doi: 10.1016/j.jmbbm.2023.106145.
- [4] R. Foudazi, R. Zowada, I. Manas-Zloczower, and D. L. Foke, "Porous Hydrogels: Present Challenges and Future Opportunities," Feb. 14, 2023, *American Chemical Society.* doi: 10.1021/acs.langmuir.2c02253.
- [5] M. Hakim Khalili, R. Zhang, S. Wilson, S. Goel, S. A. Impey, and A. I. Aria, "Additive Manufacturing and Physicomechanical Characteristics of PEGDA Hydrogels: Recent Advances and Perspective for Tissue Engineering," May 01, 2023, *MDPI.* doi: 10.3390/polym15102341.
- [6] E. Marinho, "Cellulose: A comprehensive review of its properties and applications," Sep. 01, 2025, *Elsevier B.V.* doi: 10.1016/j.scenv.2025.100283.
- [7] E. C. de Siqueira, J. A. A. de França, R. F. M. de Souza, D. M. da S. Leoterio, J. N. Cordeiro, and B. Doboszewski, "Mechanisms of the chemical crosslinking to obtain the hydrogels: Synthesis, conditions of crosslinking and biopharmaceutical applications," *Research, Society and Development*, vol. 12, no. 8, p. e18312943072, Sep. 2023, doi: 10.33448/rsd-v12i8.43072.
- [8] M. Bustamante-Torres, D. Romero-Fierro, B. Arcentales-Vera, K. Palomino, H. Magaña, and E. Bucio, "Hydrogels classification according to the physical or chemical interactions and as stimuli-sensitive materials," Dec. 01, 2021, *MDPI.* doi: 10.3390/gels7040182.
- [9] X. He, L. Ziang, Y. Xin, and Y. Zou, "An Overview of Photopolymerization and Its Diverse Applications," *Applied Research*, vol. 2, no. 6, 2023.
- [10] J. R. Choi, K. W. Yong, J. Y. Choi, and A. C. Cowie, "Recent advances in photocrosslinkable hydrogels for biomedical applications," Jan. 01, 2019, *Future Science.* doi: 10.2144/btn-2018-0083.
- [11] Y. Dai *et al.*, "Effect of different photoinitiators on the properties of UV-cured electromagnetic shielding composites," *Journal of Polymer Engineering*, vol. 35, no. 3, pp. 209–222, Apr. 2015, doi: 10.1515/polyeng-2014-0192.
- [12] S. Bashir *et al.*, "Fundamental concepts of hydrogels: Synthesis, properties, and their applications," Nov. 02, 2020, *MDPI AG.* doi: 10.3390/polym12112702.

- [13] W. Feng and Z. Wang, "Tailoring the Swelling-Shrinkable Behavior of Hydrogels for Biomedical Applications," Oct. 06, 2023, *John Wiley and Sons Inc.* doi: 10.1002/advs.202303326.
- [14] S. Pina *et al.*, "Scaffolding strategies for tissue engineering and regenerative medicine applications," Jun. 01, 2019, *MDPI AG*. doi: 10.3390/ma12111824.
- [15] S. Correa *et al.*, "Translational Applications of Hydrogels," Sep. 22, 2021, *American Chemical Society*. doi: 10.1021/acs.chemrev.0c01177.
- [16] S. Thakur, V. K. Thakur, and O. A. Arotiba, "History, Classification, Properties and Application of Hydrogels: An Overview," 2018, pp. 29–50. doi: 10.1007/978-981-10-6077-9_2.
- [17] E. Kontturi, "Supramolecular Aspects of Native Cellulose: Fringed-fibrillar Model, Leveling-off Degree of Polymerization and Production of Cellulose Nanocrystals," in *Cellulose Science and Technology: Chemistry, Analysis, and Applications*, T. Rosenau, A. Potthast, and J. Hell, Eds., John Wiley & Sons, 2018.
- [18] S. R. S. Veloso, A. G. Azevedo, P. F. Teixeira, and C. B. P. Fernandes, "Cellulose Nanocrystal (CNC) Gels: A Review," Jul. 01, 2023, *Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)*. doi: 10.3390/gels9070574.
- [19] J. Yang, C. R. Han, J. F. Duan, F. Xu, and R. C. Sun, "Mechanical and viscoelastic properties of cellulose nanocrystals reinforced poly(ethylene glycol) nanocomposite hydrogels," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 5, no. 8, pp. 3199–3207, Apr. 2013, doi: 10.1021/am4001997.
- [20] K. W. Chuang, P. K. Li, Y. A. Huang, and Y. C. Liao, "Photocurable Nanocellulose-Based Hydrogel for Real-Time Electrochemical Sweat Monitoring in Smart Textiles," *Langmuir*, vol. 41, no. 51, pp. 34474–34483, Dec. 2025, doi: 10.1021/acs.langmuir.5c04977.
- [21] K. Hou, Y. Li, Y. Liu, R. Zhang, B. S. Hsiao, and M. Zhu, "Continuous fabrication of cellulose nanocrystal/poly(ethylene glycol) diacrylate hydrogel fiber from nanocomposite dispersion: Rheology, preparation and characterization," *Polymer (Guildf)*, vol. 123, pp. 55–64, Aug. 2017, doi: 10.1016/j.polymer.2017.06.034.
- [22] K. R. Peddireddy, I. Capron, T. Nicolai, and L. Benyahia, "Gelation Kinetics and Network Structure of Cellulose Nanocrystals in Aqueous Solution," *Biomacromolecules*, vol. 17, no. 10, pp. 3298–3304, Oct. 2016, doi: 10.1021/acs.biomac.6b01061.
- [23] J. Batta-Mpouma, G. Kandhola, J. Sakon, and J. W. Kim, "Covalent Crosslinking of Colloidal Cellulose Nanocrystals for Multifunctional Nanostructured Hydrogels with Tunable Physicochemical Properties," *Biomacromolecules*, vol. 23, no. 10, pp. 4085–4096, Oct. 2022, doi: 10.1021/acs.biomac.2c00417.
- [24] X. Yang and E. D. Cranston, "Chemically cross-linked cellulose nanocrystal aerogels with shape recovery and superabsorbent properties," *Chemistry of Materials*, vol. 26, no. 20, pp. 6016–6025, Oct. 2014, doi: 10.1021/cm502873c.
- [25] I. Filpponen and D. S. Argyropoulos, "Regular linking of cellulose nanocrystals via click chemistry: Synthesis and formation of cellulose nanoplatelet gels," *Biomacromolecules*, vol. 11, no. 4, pp. 1060–1066, Apr. 2010, doi: 10.1021/bm1000247.

- [26] K. J. De France, T. Hoare, and E. D. Cranston, "Review of Hydrogels and Aerogels Containing Nanocellulose," *Chemistry of Materials*, vol. 29, no. 11, pp. 4609–4631, Jun. 2017, doi: 10.1021/acs.chemmater.7b00531.
- [27] J. Zhao, P. Wang, L. Sun, S. Sun, and X. Cao, "Cellulose nanocrystals reinforced polyvinyl alcohol hydrogel with thermal, mechanical, and ionic responsive behavior," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 321, Sep. 2025, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2025.146589.
- [28] C. Miao, M. Zhao, and W. Y. Hamad, "Applications of cellulose nanocrystal (CNC) in cosmetic products – Case studies," *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 718, Aug. 2025, doi: 10.1016/j.colsurfa.2025.136904.
- [29] J. Shojaeiarani, D. Bajwa, and A. Shirzadifar, "A review on cellulose nanocrystals as promising biocompounds for the synthesis of nanocomposite hydrogels," Jul. 15, 2019, *Elsevier Ltd.* doi: 10.1016/j.carbpol.2019.04.033.
- [30] D. I. Jeong *et al.*, "Donepezil hydrochloride-reinforced cellulose nanocrystal-aggregated gel structure for long-acting drug delivery," *Carbohydr. Polym.*, vol. 296, Nov. 2022, doi: 10.1016/j.carbpol.2022.119887.
- [31] R. Mu *et al.*, "Recent trends and applications of cellulose nanocrystals in food industry," Nov. 01, 2019, *Elsevier Ltd.* doi: 10.1016/j.tifs.2019.09.013.
- [32] N. Yousefi *et al.*, "Hierarchically porous, ultra-strong reduced graphene oxide-cellulose nanocrystal sponges for exceptional adsorption of water contaminants," *Nanoscale*, vol. 10, no. 15, pp. 7171–7184, Apr. 2018, doi: 10.1039/c7nr09037d.
- [33] M. Alizadehgiashi *et al.*, "Nanocolloidal Hydrogel for Heavy Metal Scavenging," *ACS Nano*, vol. 12, no. 8, 2018.
- [34] F. Ellassadi, "Elastomères chargés en nanocellulose, mise en forme et propriétés." [Online]. Available: <https://hal.science/tel-05044534v1>
- [35] S. Gonella *et al.*, "Fabrication and Characterization of Porous PEGDA Hydrogels for Articular Cartilage Regeneration," *Gels*, vol. 10, no. 7, Jul. 2024, doi: 10.3390/gels10070422.
- [36] S. L. Pagliolico, E. D. Ozzello, G. Sassi, and R. Bongiovanni, "Testing organic and organic–inorganic fluorinated hybrid coatings as protective materials for clay bricks," *J. Coat. Technol. Res.*, vol. 16, no. 1, pp. 81–92, Jan. 2019, doi: 10.1007/s11998-018-0102-3.
- [37] S. L. Pagliolico, E. D. Ozzello, G. Sassi, and R. Bongiovanni, "Characterization of a hybrid nano-silica waterborne polyurethane coating for clay bricks," *J. Coat. Technol. Res.*, vol. 13, no. 2, pp. 267–276, Mar. 2016, doi: 10.1007/s11998-015-9758-0.
- [38] UNI EN 15801:2010, "Conservation of Cultural Property Test Methods–Determination of Water Absorption by Capillarity", 2010.
- [39] A. Riccioni *et al.*, "Unusual structure and morphology of cellulose nanocrystals obtained by room temperature acid extraction: effect of cellulose source and pretreatment," *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, vol. 14, Jun. 2026, doi: 10.1016/j.carpta.2026.101125.

- [40] M. Parit, P. Saha, V. A. Davis, and Z. Jiang, "Transparent and Homogenous Cellulose Nanocrystal/Lignin UV-Protection Films," *ACS Omega*, vol. 3, no. 9, pp. 10679–10691, Sep. 2018, doi: 10.1021/acsomega.8b01345.
- [41] M. El Achaby *et al.*, "Cellulose nanocrystals from Miscanthus fibers: insights into rheological, physico-chemical properties and polymer reinforcing ability," *Cellulose*, vol. 25, no. 11, pp. 6603–6619, Nov. 2018, doi: 10.1007/s10570-018-2047-1.
- [42] G. Zhao, S. Zhang, S. Zhai, and M. Pan, "Fabrication and characterization of photonic cellulose nanocrystal films with structural colors covering full visible light," *J. Mater. Sci.*, vol. 55, no. 20, pp. 8756–8767, Jul. 2020, doi: 10.1007/s10853-020-04616-4.
- [43] C. Belon, X. Allonas, C. Croutxé-Barghorn, and J. Lalevée, "Overcoming the oxygen inhibition in the photopolymerization of acrylates: A study of the beneficial effect of triphenylphosphine," *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.*, vol. 48, no. 11, pp. 2462–2469, Jun. 2010, doi: 10.1002/pola.24017.
- [44] D. Debroy, J. Oakey, and D. Li, "Interfacially-mediated oxygen inhibition for precise and continuous poly(ethylene glycol) diacrylate (PEGDA) particle fabrication," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 510, pp. 334–344, Jan. 2018, doi: 10.1016/j.jcis.2017.09.081.
- [45] S. Wojno, A. Ahlinder, A. Altskär, M. Stading, T. Abitbol, and R. Kádár, "Percolation and phase behavior in cellulose nanocrystal suspensions from nonlinear rheological analysis," *Carbohydr. Polym.*, vol. 308, May 2023, doi: 10.1016/j.carbpol.2023.120622.
- [46] E. Fortunati *et al.*, "Extraction of Cellulose Nanocrystals from Phormium tenax Fibres," *J. Polym. Environ.*, vol. 21, no. 2, pp. 319–328, Jun. 2013, doi: 10.1007/s10924-012-0543-1.
- [47] F. Zhang, Q. Li, and G. Qing, "Matrix-Engineered Cellulose Nanocrystals for Robust and Water-Stable Chiral Photonic Devices," *Acc. Mater. Res.*, Jan. 2025, doi: 10.1021/accountsmr.5c00253.
- [48] L. S. Lim, I. Ahmada, M. A. S. M. Lazima, and M. C. I. M. Aminb, "Chemical crosslinking of acrylic acid to form biocompatible pH sensitive hydrogel reinforced with cellulose nanocrystals (CNC)," in *AIP Conference Proceedings*, American Institute of Physics Inc., 2014, pp. 366–370. doi: 10.1063/1.4895224.
- [49] T. M. S. U. Gunathilake, Y. C. Ching, and C. H. Chuah, "Enhancement of curcumin bioavailability using nanocellulose reinforced chitosan hydrogel," *Polymers (Basel)*, vol. 9, no. 2, p. 64, 2017, doi: 10.3390/polym9020064.
- [50] B. Gautam *et al.*, "Hybrid CNCs/PNIPAAm Thermoresponsive Hydrogels Showing Enhanced Mechanical Strength and Biocompatibility," *Journal of Polymer Science*, vol. 63, no. 20, pp. 4320–4333, Oct. 2025, doi: 10.1002/pol.20250320.
- [51] K. Zubik, P. Singhsa, Y. Wang, H. Manuspiya, and R. Narain, "Thermo-responsive poly(N-isopropylacrylamide)-cellulose nanocrystals hybrid hydrogels for wound dressing," *Polymers (Basel)*, vol. 9, no. 4, Mar. 2017, doi: 10.3390/polym9040119.
- [52] Y. Okita, T. Saito, and A. Isogai, "Entire Surface Oxidation of Various Cellulose Microfibrils by TEMPO-Mediated Oxidation," *Biomacromolecules*, vol. 11, no. 6, 2010.

- [53] O. Jeon, K. H. Bouhadir, J. M. Mansour, and E. Alsberg, “Photocrosslinked alginate hydrogels with tunable biodegradation rates and mechanical properties,” *Biomaterials*, vol. 30, no. 14, pp. 2724–2734, May 2009, doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.01.034.
- [54] C. Fraschini, G. Chauve, and J. Bouchard, “TEMPO-mediated surface oxidation of cellulose nanocrystals (CNCs),” *Cellulose*, vol. 24, no. 7, pp. 2775–2790, Jul. 2017, doi: 10.1007/s10570-017-1319-5.
- [55] Z. Tang *et al.*, “TEMPO-Oxidized cellulose with high degree of oxidation,” *Polymers (Basel)*, vol. 9, no. 9, Sep. 2017, doi: 10.3390/polym9090421.
- [56] J. M. Buffa, M. A. Grela, M. I. Aranguren, and V. Mucci, “EPR spectroscopy applied to the study of the TEMPO mediated oxidation of nanocellulose,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 136, pp. 744–749, 2016.
- [57] Z. Qu, G. T. Schueneman, M. L. Shofner, and J. C. Meredith, “Acrylic Functionalization of Cellulose Nanocrystals with 2-Isocyanatoethyl Methacrylate and Formation of Composites with Poly(methyl methacrylate),” *ACS Omega*, vol. 5, no. 48, pp. 31092–31099, Dec. 2020, doi: 10.1021/acsomega.0c04246.
- [58] J. Choi, D. Thakur, J. Min, J. Lee, H. Kim, and J. Hyun, “Incorporation of acrylated cellulose nanocrystals into photocurable resin for high-fidelity printing of transparent 3D structures,” *J. Manuf. Process.*, vol. 139, pp. 1–11, Apr. 2025, doi: 10.1016/j.jmapro.2025.02.023.