



**Politecnico  
di Torino**

Politecnico di Torino

Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria

Chimica e dei Processi Sostenibili

Anno accademico 2023/2024

Sessione di Laurea marzo 2024

**Caratterizzazione strutturale  
biopolimeri compositi  
amido-cellulosa**

Relatori:

Prof.ssa Elena Simone

Dott.ssa Cecilia Fiore

Candidati:

Riccardo Busetta

## **Abstract**

Negli ultimi anni i compositi di amido e cellulosa sono stati studiati per ottenere diverse applicazioni come biopolimeri, pellicole e scaffold per ambito medico. La cellulosa viene utilizzata spesso come riempitivo nei materiali compositi, nel caso dell'amido si vogliono migliorare le scarse capacità come: fragilità, bassa resistenza meccanica, elevata permeabilità ai gas e ridotte proprietà di barriera all'acqua. L'obiettivo di questo studio è la comprensione di come la cellulosa interagisca con i fenomeni di auto-associazione delle catene di amilosio e i fenomeni di retrogradazione dell'amido che avvengono nel tempo. Vengono studiati tre diversi tipi di amido per valutare l'effetto della differente composizione di amilosio e amilopectina. Gli amidi studiati sono: Maize starch (25% amilosio), Amilomaize starch (50% amilosio) e Waxy Maize (0% amilosio). Per quanto riguarda la cellulosa, se ne utilizza una non comune, altamente cristallina e con alte capacità meccaniche; Vengono utilizzate nano fibrille di cellulosa batterica (CNF) e nano cristalli di cellulosa (CNC). Le nano fibrille di cellulosa batterica devono essere prima trattate tramite: idratazione, omogeneizzazione, filtrazione, bagno ad ultrasuoni. La fase successiva prevede che le nano fibrille vengano aggiunte in sospensione con l'amido. Tramite un trattamento termico vengono fatti gelificare. Vengono studiati i campioni al 0%,2%,6% in peso di CNF e CNC di ciascun amido. L'intero processo di gelificazione è stato osservato con microscopio a luce polarizzata, il processo termico che porta alla gelificazione è regolato dal Linkam che provvede alla corretta curva di temperatura. I gel sono analizzati tramite spettroscopia Raman dove viene valutata la retrogradazione tra il giorno 1 e il giorno 7 seguendo lo spostamento dei picchi più rilevanti quello a  $480\text{ nm}^{-1}$  e  $785\text{ nm}^{-1}$  e calcolata la cristallinità dei campioni. Successivamente gli spettri vengono sottoposti a *principal component analysis* (PCA) per visualizzare

i cluster dei campioni e capire dove si trovano le maggiori differenze tra di essi. Sempre tramite PCA è possibile analizzare gli spettri e capire dove sono situate le maggiori differenze. Vengono esaminati tramite WAXS e SAXS sia i campioni gelificati sette giorni prima e i campioni gelificati sul momento tramite il processo termico prestabilito. Le prove vengono processate tramite PCA andando così a cogliere le maggiori differenze nei campioni. Lo studio delle interazioni a livello molecolare tra amido e cellulosa è importante per migliorare i loro compositi ottenendo così materiali ad alte prestazioni.

# Sommario

1. INTRODUZIONE.....	9
1.1. CARATTERISTICHE CHIMICO FISICHE DI AMIDO E CELLULOSA .....	9
1.2. SCOPO E STRUTTURA DELLA TESI .....	10
2. BASI TEORICHE .....	11
2.1 STRUTTURA DELL'AMIDO.....	11
2.2. PROCESSO DI GELIFICAZIONE.....	12
2.3. AUTO ASSOCIAZIONE E RETROGRAZIONE DELL'AMIDO .....	13
2.4. STRUTTURA DELLA CELLULOSA .....	13
2.4.1. NANO FIBRILLE DI CELLULOSA BATTERICA .....	14
2.4.2. NANO CRISTALLI DI CELLULOSA .....	15
2.5. TECNICHE DI ANALISI.....	17
2.5.1. MICROSCOPIO A LUCE POLARIZZATA .....	17
2.5.2. SMALL & WIDE ANGLE X-RAY SCATTERING (SWAXS) .....	18
2.5.3. SPETTROSCOPIA RAMAN.....	20
2.5.4. PRINCIPAL COMPONENT ANALYSIS.....	22
3. MATERIALI E METODI .....	23
3.1. MATERIALI .....	23
3.2. PROCESSO DI GELATINIZZAZIONE .....	24
3.2.1 <i>CRYSTAL 16</i> .....	24
3.2.2 <i>HOT PLATE</i> .....	25
3.3 GELIFICAZIONE SOTTO AL MICROSCOPIO A LUCE POLARIZZATA.....	26
3.4. SPETTROSCOPIA RAMAN .....	26
3.4.1. ANALISI CRISTALLINITÀ TRAMITE SPETTROSCOPIA .....	29
3.5. SMALL AND WIDE-ANGLE X-RAY SCATTERING (SWAXS).....	30
3.6 PRINCIPAL COMPONENT ANALYSIS (PCA) .....	34
4. RISULTATI .....	35
4.1. ANALISI MICROSCOPIO A LUCE POLARIZZATA .....	35
4.2. SPETTROSCOPIA RAMAN .....	36
4.2.2 ANALISI DEI PICCHI DEGLI SPETTRI RAMAN.....	39
4.2.3. Analisi della cristallinità.....	44
4.2.4 PRINCIPAL COMPONENT ANALYSIS (PCA) DEGLI SPETTRI RAMAN .....	49
4.3. ANALISI PROVE SMALL ANGLE X-RAY SCATTERING (SAXS).....	52
4.4. ANALISI PROVE WIDE ANGLE X-RAY SCATTERING (WAXS) .....	58
5. CONCLUSIONI .....	64
APPENDICE A: RACCOLTA SPETTRI RAMAN .....	66

APPENDICE B: RACCOLTA DIFFRATTOGRAMMI SAXS .....	103
APPENDICE C: SCRIPT MATLAB .....	107
BIBLIOGRAFIA.....	110
RINGRAZIAMENTI.....	112

## INDICE FIGURE

Figura 1:Struttura dell'amilopectina (sx), Struttura dell'amilosio(dx) <sup>7</sup> .....	11
Figura 2:Struttura dei granuli di amido(a), Struttura delle lamelle amorfe/cristalline(b), Amilopectina(c), Amilosio (d) <sup>9</sup> .....	12
Figura 3:Legami ad idrogeno tra le molecole di glucosio che compongono la cellulosa <sup>11</sup> .....	14
Figura 4: nano fibrille di cellulosa batterica. <sup>6</sup> .....	15
Figura 5:Nano cristalli di cellulosa. <sup>6</sup> .....	17
Figura 6: microscopio a luce polarizzata. <sup>13</sup> .....	18
Figura 7: Diffrazione di raggi X secondo legge di Bragg.....	19
Figura 8:rampa temperature Crystal 16 per esperimenti di gelificazione .....	25
Figura 9: Esempio di smoothing di spettro Raman (SG).....	27
Figura 10:linea di base di uno spettro Raman. ....	28
Figura 11: spettro Raman dopo la sottrazione della linea di base. ....	28
Figura 12: funzione Origin per il calcolo dei valori dei picchi.....	29
Figura 13: calcolo della fase amorfa e cristallina .....	30
Figura 14:Rampa temperatura SWAXS .....	31
Figura 15: Prova WAXS dopo la sottrazione del diffrattogramma dell'acqua.....	32
Figura 16:Prova dopo lo smooth in 240 WP .....	33
Figura 17: Prova SAXS dopo la derivata prima .....	33
Figura 18: processo di gelificazione del Maize osservato al microscopio a luce polarizzata..	36
Figura 19:Granuli di Amilomaize secchi .....	37
Figura 20:granuli di Maize secchi .....	38
Figura 21:granuli di Waxy maize secchi .....	38
Figura 22: score plot dei campioni con i nano cristalli .....	50
Figura 23: Analisi del Raman shift (PCA) .....	52
Figura 24: Diffrattogrammi del processo di gelificazione dell'Amilomaize 6%CNC .....	53
Figura 25: Diffrattogrammi del processo di gelificazione dell'Amilomaize 6%CNF.....	53
Figura 26: pca SAXS Amilomaize.....	55
Figura 27: pca SAXS Maize .....	56
Figura 28: pca SAXS Waxy Maize.....	56
Figura 29: prove SAXS dopo 7 giorno dalla gelificazione.....	57
Figura 30: Esempio di prova WAXS processata .....	59
Figura 31: Ingrandimento dei picchi prova WAXS1 .....	60
Figura 32: Ingrandimento dei picchi prova WAXS2 .....	60
Figura 33: PCA prove WAXS dei campioni Maize .....	61
Figura 34: PCA prove WAXS dei campioni Amilomaize.....	62
Figura 35: PCA prove WAXS dei campioni Waxy-Maize .....	62

Figura 36: prova WAXS dai campioni dop sette giorni dalla gelificazione .....	63
Figura 37: Spettro Amilomaize 0% CNC Crystal16 giorno 1 .....	66
Figura 38: Spettro Amilomaize 2% CNC Crystal16 giorno 1 .....	66
Figura 39: Spettro Amilomaize 6% CNC Crystal16 giorno 1 .....	67
Figura 40: Spettro Maize 0% CNC Crystal16 giorno 1 .....	67
Figura 41: Spettro Maize 2% CNC Crystal16 giorno 1 .....	68
Figura 42: Spettro Maize 6% CNC Crystal16 giorno 1 .....	68
Figura 43: Spettro Waxy Maize 0% CNC Crystal16 giorno 1 .....	69
Figura 44: Spettro Waxy Maize 2% CNC Crystal16 giorno 1 .....	69
Figura 45: Spettro Waxy Maize 6% CNC Crystal16 giorno 1 .....	70
Figura 46: Spettro Amilomaize 0% CNC Hot plate giorno 1 .....	70
Figura 47: Spettro Amilomaize 2% CNC Hot plate giorno 1 .....	71
Figura 48: Spettro Amilomaize 6% CNC Hot plate giorno 1 .....	71
Figura 49: Spettro Maize 0% CNC Hot plate giorno 1 .....	72
Figura 50: Spettro maize 2% CNC Hot plate giorno 1 .....	72
Figura 51: Spettro Maize 6% CNC Hot plate giorno 1 .....	73
Figura 52: Spettro Waxy Maize 0% CNC Hot plate giorno 1 .....	73
Figura 53: Spettro Waxy Maize 2% CNC Hot plate giorno 1 .....	74
Figura 54: Spettro Waxy Maize 6% CNC Hot plate giorno 1 .....	74
Figura 55: Spettro Amilomaize 0% CNC Crystal 16 giorno 7 .....	75
Figura 56: Spettro Amilomaize 2% CNC Crystal 16 giorno 7 .....	75
Figura 57: Spettro Amilomaize 6% CNC Crystal 16 giorno 7 .....	76
Figura 58: Spettro Maize 0% CNC Crystal 16 giorno 7 .....	76
Figura 59: Spettro Maize 2% CNC Crystal 16 giorno 7 .....	77
Figura 60: Spettro Maize 6% CNC Crystal 16 giorno 7 .....	77
Figura 61: Spettro Waxy Maize 0% CNC Crystal 16 giorno 7 .....	78
Figura 62: Spettro Waxy Maize 2% CNC Crystal 16 giorno 7 .....	78
Figura 63: Spettro Waxy Maize 6% CNC Crystal 16 giorno 7 .....	79
Figura 64: Spettro Amilomaize 0% CNC Hot plate giorno 7 .....	80
Figura 65: Spettro Amilomaize 2% CNC Hot plate giorno 7 .....	80
Figura 66: Spettro Amilomaize 6% CNC Hot plate giorno 7 .....	81
Figura 67: Spettro Maize 0% CNC Hot plate giorno 7 .....	81
Figura 68: Spettro Maize 2% CNC Hot plate giorno 7 .....	82
Figura 69: Spettro Maize 6% CNC Hot plate giorno 7 .....	82
Figura 70: Spettro Waxy Maize 0% CNC Hot plate giorno 7 .....	83
Figura 71: Spettro Waxy Maize 2% CNC Hot plate giorno 7 .....	83
Figura 72: Spettro Waxy Maize 6% CNC Hot plate giorno 7 .....	84
Figura 73: Spettro Maize 2% CNF prova 1 Hot plate giorno 1 .....	85
Figura 74: Spettro Maize 2% CNF prova 2 Hot plate giorno 1 .....	85
Figura 75: Spettro Maize 2% CNF prova 3 Hot plate giorno 1 .....	86
Figura 76: Spettro Maize 6% CNF prova 1 Hot plate giorno 1 .....	86
Figura 77: Spettro Maize 6% CNF prova 2 Hot plate giorno 1 .....	87
Figura 78: Spettro Maize 6% CNF prova 3 Hot plate giorno 1 .....	87
Figura 79: Spettro Amilomaize 2% CNF prova 1 Hot plate giorno 1 .....	88
Figura 80: Spettro Amilomaize 2% CNF prova 2 Hot plate giorno 1 .....	88
Figura 81: Spettro Amilomaize 2% CNF prova 3 Hot plate giorno 1 .....	89
Figura 82: Spettro Amilomaize 6% CNF prova 1 Hot plate giorno 1 .....	89
Figura 83: Spettro Amilomaize 6% CNF prova 2 Hot plate giorno 1 .....	90

Figura: 84: Spettro Amilomaize 6% CNF prova 3 Hot plate giorno 1 .....	90
Figura: 85: Spettro Waxy Maize 2% CNF prova 1 Hot plate giorno 1 .....	91
Figura 86: Spettro Waxy Maize 2% CNF prova 2 Hot plate giorno 1 .....	91
Figura 87: Spettro Waxy Maize 2% CNF prova3 Hot plate giorno 1 .....	92
Figura 88: Spettro Waxy Maize 6% CNF prova 1 Hot plate giorno 1 .....	92
Figura 89: Spettro Waxy Maize 6% CNF prova 2 Hot plate giorno 1 .....	93
Figura 90: Spettro Waxy Maize 6% CNF prova 3 Hot plate giorno 1 .....	93
Figura 91: Spettro Maize 2% CNF prova 1 Hot plate giorno 7 .....	94
Figura 92: Spettro Maize 2% CNF prova 2 Hot plate giorno 1 .....	94
Figura 93: Spettro Maize 2% CNF prova3 Hot plate giorno 7 .....	95
Figura 94: Spettro Maize 6% CNF prova 1 Hot plate giorno 7 .....	95
Figura 95: Spettro Maize 6% CNF prova 2 Hot plate giorno 7 .....	96
Figura 96: Spettro Maize 6% CNF prova 3 Hot plate giorno 7 .....	96
Figura 97: Spettro Amilomaize 2% CNF prova 1 Hot plate giorno 7 .....	97
Figura 98: Spettro Amilomaize 2% CNF prova 2 Hot plate giorno 7 .....	97
Figura 99: Spettro Amilomaize 2% CNF prova 3 Hot plate giorno 7 .....	98
Figura 100: Spettro Amilomaize 6% CNF prova 1 Hot plate giorno 7 .....	98
Figura 101: Spettro Amilomaize 6% CNF prova 2 Hot plate giorno 7 .....	99
Figura 102: Spettro Amilomaize 6% CNF prova 3 Hot plate giorno 7 .....	99
Figura 103: Spettro Waxy Maize 2% CNF prova 1 Hot plate giorno 7.....	100
Figura 104: Spettro Waxy Maize 2% CNF prova 2 Hot plate giorno 7.....	100
Figura 105: Spettro Waxy Maize 2% CNF prova 3 Hot plate giorno 7.....	101
Figura 106: Spettro Waxy Maize 6% CNF prova 1 Hot plate giorno 7.....	101
Figura 107: Spettro Waxy Maize 6% CNF prova 2 Hot plate giorno 7.....	102
Figura 108: Spettro Waxy Maize 6% CNF prova 3 Hot plate giorno 7.....	102
Figura 109: Diffrattogrammi del processo di gelificazione del Amilomaize .....	103
Figura 110: Diffrattogrammi del processo di gelificazione del Maize .....	104
Figura 111: Diffrattogrammi del processo di gelificazione del Maize 6%CNC .....	104
Figura 112: Diffrattogrammi del processo di gelificazione del Maize 6%CNF.....	105
Figura 113: Diffrattogrammi del processo di gelificazione del Waxy Maize .....	105
Figura 114: Diffrattogrammi del processo di gelificazione del Waxy Maize 6% CNC.....	106
Figura 115: Diffrattogrammi del processo di gelificazione del Waxy Maize 6% CNF .....	106

## INDICE TABELLE

Tabella 1: Parametri per l'analisi dei picchi dei campioni secchi .....	39
Tabella 2: Analisi della cristallinità dei campioni secchi .....	39
Tabella 3: Parametri degli spettri Raman per l'analisi dei picchi .....	39
Tabella 4: Risultati dell'analisi dei picchi: campioni con CNC al CRYSTAL16.....	41
Tabella 5: <i>Risultati dell'esperimento hot plate con nanocristalli di cellulosa (CNC)</i> .....	42
Tabella 6: <i>Risultati dell'esperimento hot plate con nano fibrille di cellulosa batterica (CNF) con prove ripetute</i> .....	43
Tabella 7: Valori per il calcolo della cristallinità (giorno 1).....	45
Tabella 8: Valori per il calcolo della cristallinità (giorno 7).....	46
Tabella 9: Differenza di cristallinità tra giorno 1 e 7.....	46
Tabella 10: Valori per il calcolo della cristallinità delle prove ripetute (2%CNF).....	47

Tabella 11: Valori per il calcolo della cristallinità delle prove ripetute (6%CNF giorno1) .....	47
Tabella 12: Valori per il calcolo della cristallinità delle prove ripetute (2%CNF giorno 7) .....	48
Tabella 13: Valori per il calcolo della cristallinità delle prove ripetute (6%CNF giorno 7) .....	48
Tabella 14: Confronto tra campioni dentro e fuori il cluster.....	50

# 1.INTRODUZIONE

## 1.1. CARATTERISTICHE CHIMICO FISICHE DIAMIDO E CELLULOSA

L'amido e la cellulosa sono composti naturali molto diffusi in natura. L'amido è molto utilizzato nell'industria alimentare, visto il suo elevato contenuto energetico, e rappresenta una fonte indispensabile per l'alimentazione dell'uomo. Negli ultimi anni l'amido, la cellulosa e i loro compositi sono stati studiati per ottenere biopolimeri applicabili in diversi settori. Tra questi ricordiamo la produzione di pellicole commestibili e sottili<sup>1</sup> per la conservazione degli alimenti e la produzione di bioplastiche per imballaggio<sup>2</sup>. Un possibile riempitivo per amido è la gomma di semi di salvia utilizzata per diminuire la cinetica di retrogradazione dell'amido dopo gelificazione, e mantenerlo morbido, caratteristica richiesta nell'industria dolciaria<sup>3</sup>.

La cellulosa viene utilizzata spesso come riempitivo nei materiali compositi, quindi potrebbe essere usata in miscela con amido per migliorarne le scarse proprietà come: fragilità, bassa resistenza meccanica, elevata permeabilità ai gas e ridotte proprietà di barriera all'acqua<sup>4</sup>. Lo sviluppo di questi materiali composti richiede una profonda comprensione di come la cellulosa interagisca con i fenomeni di auto associazione delle catene di amilosio e i fenomeni di retrogradazione.

La produzione della cellulosa da fonti alternative è di largo interesse nella ricerca odierna, alcuni esempi sono la cellulosa da batteri, tunicati e alghe. Altro settore d'interesse è la produzione di nano cristalli di cellulosa detti anche "CNC". Questi sono ottenuti tramite idrolisi acida ad elevata temperatura di materia cellulosica, come fibre vegetali native o materiali da biomasse.

Vista la loro alta biocompatibilità, idrofilia e dimensioni ridotte, questi nanomateriali possono essere utilizzati come eccipienti per i farmaci. Recenti studi hanno dimostrato che degli scaffold di aerogel di nano cellulosa altamente porosi garantiscono rilascio prolungato di farmaci e possono essere utilizzati come trasportatori per la somministrazione controllata.

Di particolare interesse è la produzione di cellulosa da parte di batteri, il *gluconacetobacter xylinus* è il più produttivo e con una produzione extracellulare che facilita il recupero del prodotto<sup>5</sup>.

Le nano fibrille di cellulosa batterica "CNF" hanno una cristallinità superiore rispetto alla cellulosa che si può trovare in natura.

Recenti studi hanno riportato come l'aggiunta di cellulosa possa migliorare le proprietà reologiche del gel di amido, in particolare la sua viscosità<sup>6</sup>. La cellulosa viene normalmente usata come riempitivo nell'amido in una percentuale tra lo 0,5% e il 10% in peso.

## 1.2. SCOPO E STRUTTURA DELLA TESI

In questo studio si cercherà di capire come e se la cellulosa batterica (CNF) e i nano cristalli di cellulosa (CNC) interagiscano a livello molecolare con l'amido andando a modificare il meccanismo e la cinetica dei fenomeni di auto associazione e di retrogradazione. Verranno studiati dei campioni con diverse concentrazioni di cellulosa (0%w, 2%w, 6%w) tramite varie tecniche come: spettroscopia Raman, Small angle X-ray scattering, Wide angle X-ray scattering e osservazione sotto microscopio a luce polarizzata. I campioni vengono osservati dopo un giorno e dopo sette giorni per analizzare la retrogradazione.

## 2. BASI TEORICHE

### 2.1 STRUTTURA DELL'AMIDO

Gli amidi sono polimeri formati dalla ripetizione di molecole di glucosio (D- $\alpha$ - (+) glucosio). Sono composti da due tipi di catene polimeriche: l'amilosio e l'amilopectina. L'amilosio è una catena lineare formata da legami 1-4 glicosidici grazie ai quali assume una struttura primaria elicoidale di una lunghezza tipica tra 50-300 unità. L'elica è costituita da 6 molecole di glucosio per spira, stabilizzate da legami a idrogeno come nel DNA. L'amilopectina invece è una catena ramificata contenente legami 1-4 e 1-6 glicosidici. Ha una struttura a grappolo ed ogni polimero è costituito da circa 1000-1600 unità. Le catene laterali si innestano circa ogni 24-30 unità. Possiamo osservare le due strutture in figura 1. Il rapporto tra i due polimeri nell'amido dipende dalla specie e può essere molto variabile, in media si ha il 20% di amilosio e l'80% di amilopectina.

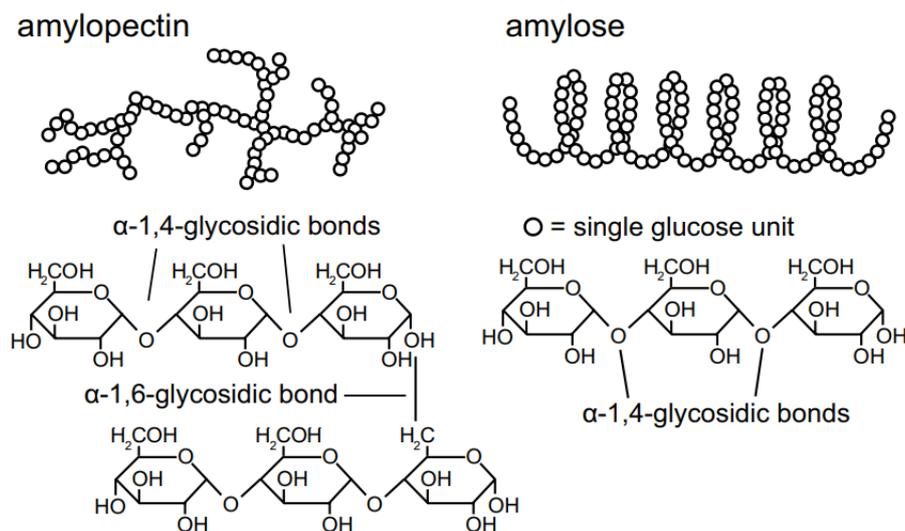


Figura 1: Struttura dell'amilopectina (sx), Struttura dell'amilosio(dx)<sup>7</sup>

## 2.2. PROCESSO DI GELIFICAZIONE

In natura l'amido ha una struttura semi-cristallina legata ai legami intermolecolari fra le catene di amilosio e amilopectina. L'amido si presenta in granuli insolubili (fig.2) in acqua a temperatura ambiente. I granuli di amido devono essere portati a temperatura elevata e in ambiente acquoso per poter assorbire acqua e creare un gel. In queste condizioni essi si idratano, perdono la struttura ordinata e assumono una struttura disordinata, appunto con le caratteristiche di un gel.

La temperatura minima di gelatinizzazione dipende dal tipo di amido, ma è sempre inferiore a 85°C<sup>8</sup>. I granuli di amido si idratano progressivamente, gonfiandosi e perdendo la struttura cristallina. L'amilosio e l'amilopectina entrano in soluzione acquosa, formando legami idrogeno con l'acqua e generando una miscela con basso contenuto di acqua libera ed elevata viscosità.

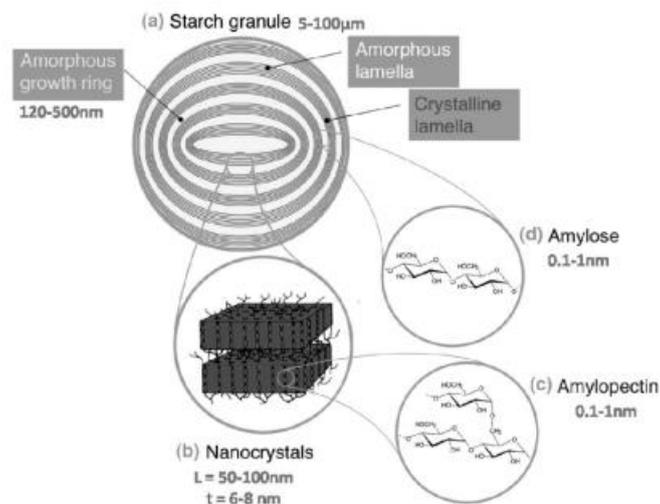


Figura 2: Struttura dei granuli di amido (a), Struttura delle lamelle amorse/cristalline (b), Amilopectina (c), Amilosio (d)<sup>9</sup>.

## 2.3. AUTO ASSOCIAZIONE E RETROGRAZIONE DELL'AMIDO

Durante la fase di raffreddamento a seguito del processo di gelificazione dell'amido, avviene un fenomeno chiamato retrogradazione (o ricristallizzazione). Questo processo tende a far tornare l'amido in una configurazione simile a quella iniziale, cioè più ordinata, ma mai identica a quella di partenza in quanto la gelatinizzazione è un processo irreversibile. Quello che avviene con la retrogradazione è un riarrangiamento delle catene di amilosio e amilopectina, con conseguente esclusione di una parte dell'acqua che era stata inglobata dalla struttura. La retrogradazione è un processo reversibile, infatti è possibile generare nuovamente una struttura disordinata alzando la temperatura e senza degradare la struttura dell'amido. Il riarrangiamento avviene velocemente per le catene di amilosio, mentre per le catene di amilopectina avviene più lentamente e si completa in circa 20 giorni, ma già al settimo giorno si osserva una retrogradazione del 60%<sup>10</sup> anche per questo polimero.

## 2.4. STRUTTURA DELLA CELLULOSA

La cellulosa, il polisaccaride naturale più abbondante sulla Terra, è un polimero lineare di unità di  $\beta$ -D-glucosio con grado di polimerizzazione (DP) fino a 20.000 unità, condensate attraverso legami  $\beta$ -1,4-O-glicosidici. L'elevata linearità è data da legami idrogeno che si formano tra i carboni C3 e C5 dei diversi anelli piranosici (fig.3). La linearità induce un'ampia predisposizione alla formazione di ulteriori legami idrogeno tra le catene, proprietà che conferisce alla cellulosa fibrosità, resistenza meccanica e insolubilità in acqua<sup>11</sup>. La cellulosa è un materiale polimorfo dal punto di vista cristallografico.

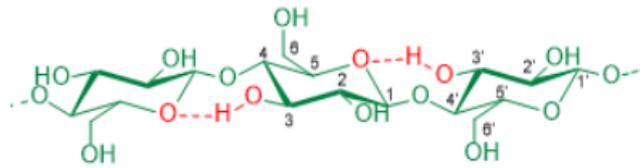


Figura 3: Legami ad idrogeno tra le molecole di glucosio che compongono la cellulosa<sup>11</sup>

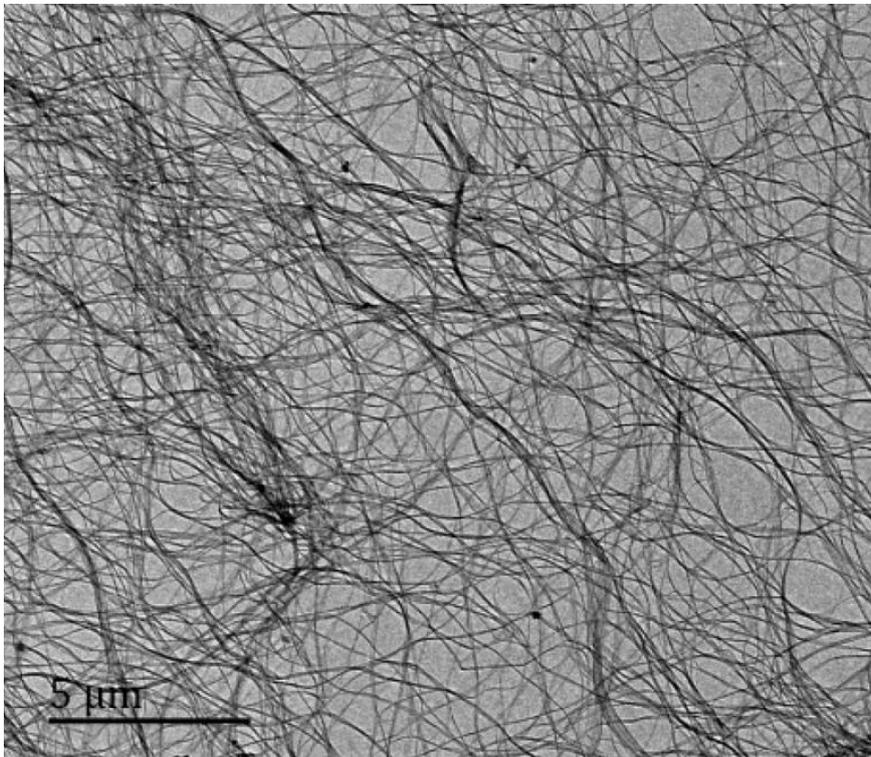
Le principali fonti di cellulosa sono le piante, da cui la cellulosa è estratta in particolare dalla pasta di legno e dalle fibre di cotone. Altre possibili fonti di cellulosa sono i batteri e le alghe. I tunicati sono animali marini invertebrati in grado di produrre grandi quantità di cellulosa, con la quale è composto il loro esoscheletro.

#### 2.4.1. NANO FIBRILLE DI CELLULOSA BATTERICA

La cellulosa batterica (fig.4) è chiamata così perché prodotta da batteri, principalmente del genere *Acetobacter*, *Sarcina ventriculi* e *Agrobacterium*, che producono i polisaccaridi, che formano strati protettivi attorno alle cellule. La cellulosa batterica presenta diversi vantaggi rispetto ad altre tipologie di cellulosa:

- può essere ottenuta ad elevatissima purezza, senza lignina o altri contaminanti, non è richiesta energia per la sua purificazione, come invece lo è per la cellulosa vegetale;
- i microrganismi possono essere geneticamente modificati per produrre la cellulosa con le proprietà desiderate;
- i rifiuti agricoli e industriali possono essere utilizzati come terreno di crescita, perciò -ò la produzione è relativamente economica e sostenibile.
- Hanno una nano struttura che conferisce maggiore resistenza meccanica e stabilità, maggiore capacità di trattenere l'acqua.

La cellulosa batterica è biodegradabile ed è intrinsecamente sicura. È formata da fibre di dimensioni nanometriche, chiamate nano fibrille, che possono aggregarsi formando delle microfibrille con larghezza di 50–80 nm e spessore di 3–8 nm. Queste microfibrille a loro volta possono poi formare una struttura tridimensionale, il che rende la cellulosa batterica più adatta per gli imballaggi alimentari rispetto alla cellulosa vegetale. Ad esempio, ha una buona resistenza meccanica, idrofilia, buone proprietà di stampabilità, buone capacità di assorbimento dei liquidi, non è allergenica (tant'è che è già usata in ambito medico).



*Figura 4: nano fibrille di cellulosa batterica.<sup>6</sup>*

## 2.4.2. NANO CRISTALLI DI CELLULOSA

Per ottenere i nano cristalli di cellulosa bisogna eliminare le zone amorphe nella struttura della cellulosa, in particolare rimuovere l'emicellulosa, la lignina e altri componenti eventualmente presenti nella fibra. Esistono diverse tipologie di

apparecchiature in cui può avvenire la fase di purificazione tramite la combinazione di trattamenti chimici ed enzimatici. La cellulosa può essere di diverse tipologie, il processo dipende dal materiale di partenza, in genere si prevede una serie di operazioni unitarie il cui obiettivo principale è l'isolamento delle fibre cellulosiche. Ciò avviene attraverso lo smembramento del complesso della lignina cellulosa, mediante tecniche di pretrattamento e de-lignificazione, senza distruggere le fibrille di cellulosa, metodo comunemente noto come "pulping".<sup>12</sup> Esistono diversi trattamenti chimici utilizzati nella fase di "pulping" per rimuovere l'emicellulosa e la lignina dalle fibre vegetali. Il più utilizzato è il trattamento alcalino, dove la fibra viene immersa in una soluzione di NaOH.

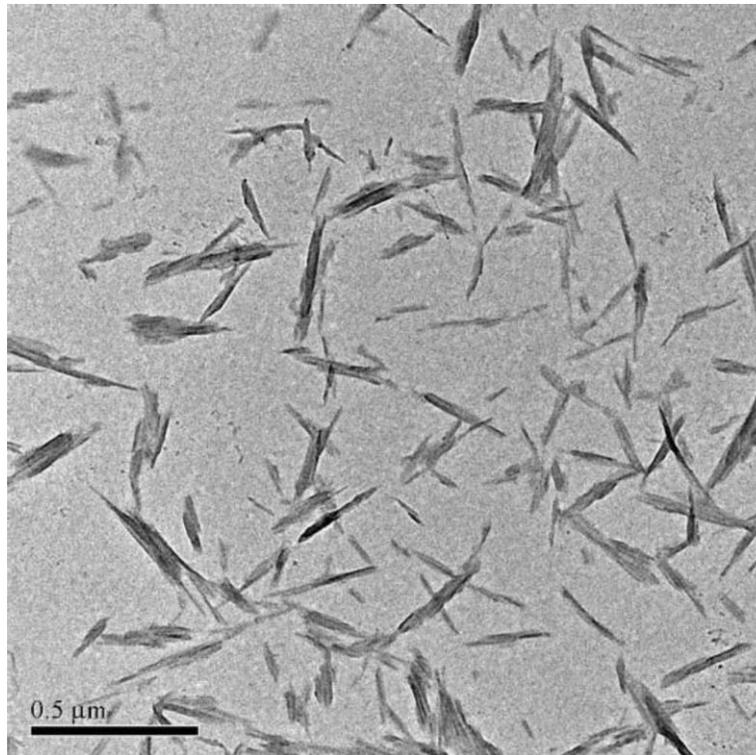
Invece, il processo principale per isolare i nano cristalli di cellulosa dalle fibre naturali si basa sull'idrolisi acida. Nel trattamento acido, gli ioni idronio attaccano le regioni amorfe delle nano fibrille. Questi liberano le regioni cristalline che, avendo una maggiore resistenza all'attacco acido, rimanendo intatte. L'acido solforico è l'acido più comunemente utilizzato, poiché genera una soluzione colloidale stabile dei nano cristalli di cellulosa. Alcuni fattori come: l'acido utilizzato, la sua concentrazione, il tempo di idrolisi e la temperatura determinano la dimensione, la resa e la qualità dei nano cristalli ottenuti.<sup>12</sup>

La cellulosa batterica prodotta dal *Gluconacetobacter xilinus* è comunemente utilizzata per produrre i nano cristalli di cellulosa. Dato l'elevato grado di purezza e di cristallinità (60-90%) permette di ottenere dei cristalli, evitando i normali step di purificazione della lignina e altri composti. L'idrolisi avviene tramite acido solforico (64%w) a 50 °C per 90 minuti, così si eliminano tutte le zone amorfe e si creano dei cristalli della dimensione desiderata.

I nano cristalli di cellulosa hanno delle ottime caratteristiche meccaniche:

- Elevato modulo elastico circa 150 Mpa.

- Resistenza a trazione pari a 7,6 Gpa.
- Modulo trasversale tra i 18 e 50 Gpa.



*Figura 5: Nano cristalli di cellulosa.<sup>6</sup>*

## 2.5. TECNICHE DI ANALISI

### 2.5.1. MICROSCOPIO A LUCE POLARIZZATA

La microscopia a luce polarizzata è una tecnica analitica non distruttiva, che utilizza un raggio polarizzato di luce visibile per migliorare il contrasto dell'immagine. Viene principalmente utilizzato per l'analisi di materiali che hanno un indice di rifrazione dipendente dall'orientamento. La luce è composta da onde che vibrano lungo tutti i piani perpendicolari alla direzione di propagazione. Se le onde vengono limitate lungo un unico piano, tramite filtrazione del raggio

luminoso, la luce viene detta polarizzata e le onde vibrano lungo lo stesso asse. Nel microscopio è presente un filtro polarizzatore posto tra la sorgente luminosa e il campione. Un secondo filtro polarizzatore chiamato analizzatore che è posto tra l'obiettivo e l'oculare. L'interazione della luce polarizzata con il campione birfrangente genera due componenti d'onda, che vibrano su piani reciprocamente perpendicolari. Dopo aver lasciato il campione, le onde sono "fuori fase", ma si ricombinano con un'interferenza costruttiva o distruttiva passando attraverso l'analizzatore. I campioni appariranno più luminosi su uno sfondo scuro. Ciò porta alla generazione finale di un'immagine ad alto contrasto.

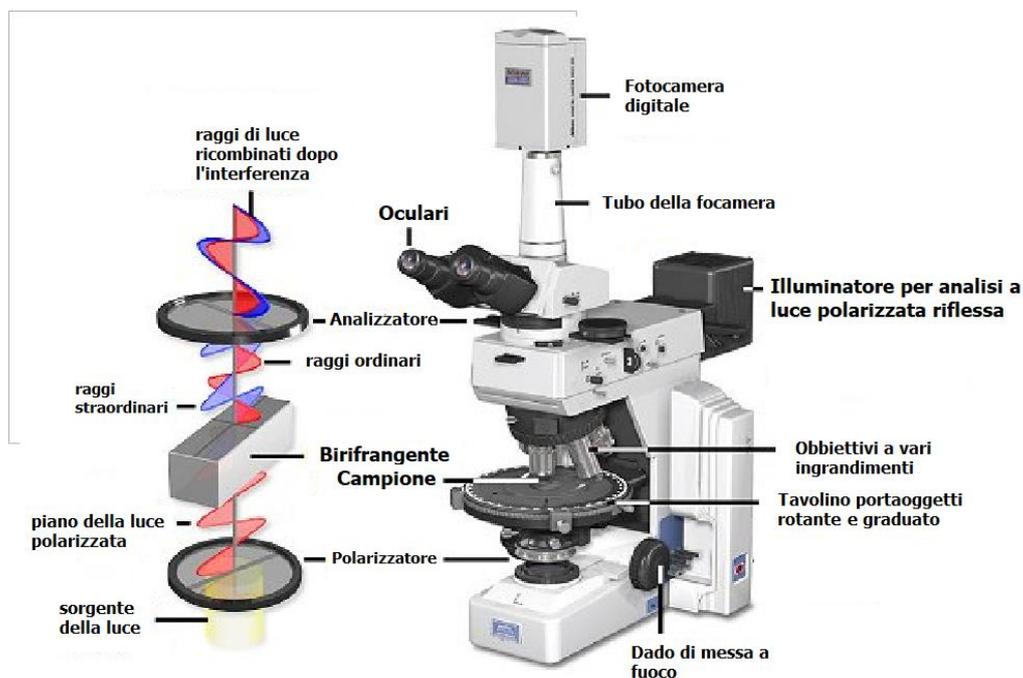


Figura 6: microscopio a luce polarizzata.<sup>13</sup>

## 2.5.2. SMALL & WIDE ANGLE X-RAY SACATTERING (SWAXS)

Sono tecniche utilizzate per la caratterizzazione superficiale e l'analisi strutturale dei materiali senza andare a distruggere il campione. La diffrazione dei raggi X è il risultato dell'interferenza costruttiva tra i raggi X e un campione cristallino.



dispersa da un campione colpito da raggi X, in funzione dell'intensità del raggio di incidenza e l'angolo di dispersione. Le misurazioni SAXS vengono effettuate con angoli di diffusione molto piccoli ( $0,1^\circ - 5^\circ$ ), mentre per angoli maggiori di  $5^\circ$  prende il nome di WAXS. Dalla legge di Bragg, il valore di  $2\theta$  è inversamente proporzionale alla distanza tra i piani cristallini.

Il SAXS viene utilizzato per la determinazione della struttura su microscala o nanoscala dei sistemi di particelle. I parametri ricavabili dal SAXS sono: dimensioni medie delle particelle, forme, distribuzione e rapporto superficie-volume. La tecnica WAXS può essere utilizzata per determinare il grado di cristallinità dei campioni, e per determinare la struttura cristallografica. L'intensità della dispersione viene diagrammata in funzione del modulo del vettore di dispersione:

$$q = \frac{4\pi \sin(\theta)}{\lambda}$$

In accordo con la legge di Bragg, possiamo definire la  $q$  funzione della distanza  $d$  tra i piani cristallini.

$$q = \frac{2\pi}{d}$$

### 2.5.3. SPETTROSCOPIA RAMAN

La spettroscopia Raman è una tecnica in cui viene utilizzata la luce emessa da una sorgente laser per misurare le variazioni dei livelli energetici vibrazionali di un campione. I fotoni sono emessi da una sorgente laser monocromatica, quando colpiscono il campione vengono riemessi. Sono possibili due tipi di riemissione:

- Scattering elastico (Rayleigh scattering): la luce emessa ha la stessa energia delle radiazioni luminose incidenti. Pertanto, si avrà anche la stessa frequenza, lunghezza d'onda e colore.
- Scattering anelastico (scattering Raman): in questo caso c'è un trasferimento di energia tra la molecola e fotoni emessi. Pertanto, la luce emessa avrà un'energia, frequenza, lunghezza d'onda e colore diverso rispetto a quella incidente.

Lo scattering elastico è il fenomeno più comune, mentre lo scattering di Raman è molto più raro, dove si ha una perdita di energia da parte della radiazione elettromagnetica in favore della molecola e quindi un aumento della lunghezza d'onda. Questo fenomeno è chiamato diffusione di Stokes-Raman.

Al contrario se la molecola si rilassa a un livello energetico più basso, il fotone emesso aumenta di energia e diminuisce la sua lunghezza d'onda, questo viene chiamato Scattering Raman-Anti-Stokes.

La differenza di frequenza tra la luce incidente e quella emessa in un processo di diffusione anelastica è chiamata Raman Shift ( $\Delta\omega$ ) ed è solitamente espressa nell'unità di misura del numero d'onda ( $\text{nm}^{-1}$ ).

$$\Delta\omega = \frac{1}{\lambda_0} - \frac{1}{\lambda_1}$$

Dove  $\lambda_0, \lambda_1$  sono rispettivamente la lunghezza d'onda incidente ed emessa.

In uno spettrofotometro il campione viene illuminato con un laser monocromatico, che emette luce con specifica lunghezza d'onda e frequenza, parte della luce interagisce con il campione e crea vibrazioni molecolari, causando il Raman scattering.

La luce emessa anelasticamente viene quindi raccolta da un rilevatore per determinarne la frequenza. Tracciando un grafico con l'intensità della radiazione emessa in funzione del Raman shift, è possibile identificare le vibrazioni di diversi

gruppi funzionali delle molecole che formano il campione, che appaiono come picchi in corrispondenza di determinati valori di Raman shift.

#### 2.5.4. PRINCIPAL COMPONENT ANALYSIS

Quando ci troviamo ad operare con un gran numero di dati, è naturale pensare di proiettare questi dati in un sottospazio di dimensionalità inferiore, cercando di non perdere le informazioni più importanti sulle variabili originali. L'analisi delle componenti principali (PCA) è una tecnica finalizzata a derivare, a partire da un set di variabili numeriche correlate, un insieme più ridotto di variabili ortogonali "artificiali". L'insieme ridotto di proiezioni ortogonali lineari (noto come "componenti principali" o "principal components", "PC") è ottenuto combinando linearmente in maniera appropriata le variabili originarie. Il punto centrale della PCA è la cosiddetta scomposizione spettrale (chiamata anche scomposizione in autovalori e autovettori) della matrice di varianze/covarianze campionaria. Questa scomposizione restituisce gli autovalori e autovettori della matrice di covarianze. Gli autovalori (in ordine decrescente) rappresentano l'ammontare della variabilità totale osservata sulle variabili originarie, "spiegata" da ciascuna componente principale. Gli autovettori invece rappresentano le corrispondenti direzioni (ortogonali) di massima variabilità estratte dalle componenti principali. L'auspicio nell'applicazione della PCA è che le varianze delle prime Componenti Principali (PC) siano grandi, mentre le varianze delle altre componenti siano abbastanza piccole, da poterle considerare trascurabili. Una variabile, tra le componenti principali, che non vari in maniera significativa relativamente alle altre variabili del set di dati può essere trattata approssimativamente come una costante<sup>14</sup>.

## 3. MATERIALI E METODI

### 3.1. MATERIALI

Per questo studio sono stati presi in considerazione tre diversi tipi di amido:

- Waxy Maize: essenzialmente tutto amilopectina con solo delle tracce di amilosio prodotto dall'azienda Sigma-Aldrich in Germania.
- Maize starch: 25% di amilosio e 75% di amilopectina prodotto dall'azienda Sigma-Aldrich in Germania.
- Amilomaize starch: 50% amilosio e 50% amilopectina prodotto dall'azienda Roquette in France.

Tramite questa scelta è stato possibile studiare le possibili interazioni tra la cellulosa e i diversi tipi di amido, così da capire se le interazioni dipendano dalla percentuale di amilopectina e amilosio.

A questo scopo, Waxy Maize (~0% amilosio), Maize starch (~25% amilosio) e Amilomaize starch (~50% amilosio) sono stati miscelati con nanocristalli di cellulosa (CNC) o nano fibrille di cellulosa batterica (CNF), entrambi a concentrazioni dello 0%, 2% e 6% w/w di nano cellulosa secca:

$$\text{concentrazione di nanocellulosa} \left( \% \frac{w}{w} \right) = \left( \frac{\text{peso di nano cellulosa}}{\text{peso di nanocellulosa} + \text{peso di amido}} \right) * 100$$

Le cellulose utilizzate sono:

- Nano fibrille secche di cellulosa batterica (CNF): prodotta in Brasile dalla Vuelo-pharma.
- Nano cristalli di cellulosa (CNC) ottenuti da fibra di cotone: prodotta in USA dal Process Development Center of The University of Maine.

La cellulosa batterica secca prima di poter essere utilizzata deve essere lasciata in ammollo per circa 24 ore per essere idratata. Successivamente deve essere

omogenizzata tramite un frullatore (300W) per circa 20 minuti e filtrata sottovuoto. La pasta idrata di cellulosa che si ottiene può essere utilizzata per ottenere una sospensione (0-6%w) in acqua deionizzata.

I CNC e CNF completamente dispersi in acqua vengono omogenizzati, utilizzando un bagno ad ultrasuoni a temperatura ambiente per 50 minuti, per promuovere la completa dispersione. Successivamente viene aggiunto l'amido calcolato tramite l'equazione riportata precedentemente così da ottenere la sospensione di amido cellulosa.

## 3.2. PROCESSO DI GELATINIZZAZIONE

Una volta ottenute le sospensioni uniformemente disperse di cellulosa e amido, i campioni vengono fatti gelificare tramite un processo termico. I gel sono stati prodotti in due modalità:

- Tramite Crystal 16
- Esperimento sull'Hot plate

### 3.2.1 CRYSTAL 16

Nel Crystal 16 vengono utilizzate delle vials da un 1 ml contenenti le sospensioni di Maize, Amilomaize e Waxy Maize.

L'agitazione avviene tramite un'ancoretta magnetica a 760 rpm dal fondo e viene seguita la seguente rampa di temperatura (fig.8).

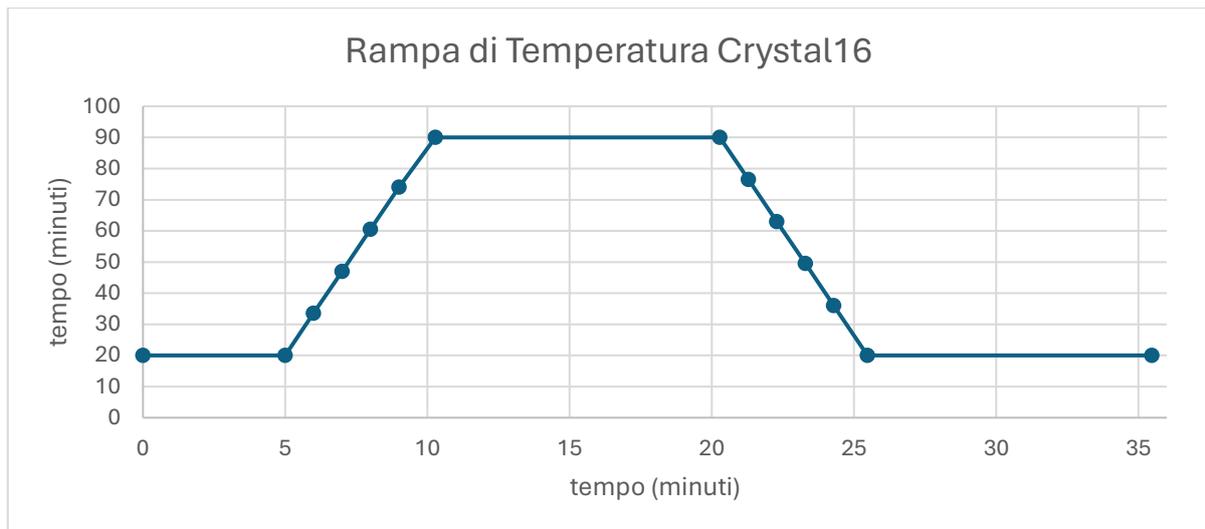


Figura 8:rampa temperature Crystal 16 per esperimenti di gelificazione

Gli step della rampa di temperatura seguita sono i seguenti:

- Mantenimento a 20°C
- Riscaldamento a 13,5°C/min fino a 90°C
- Mantenimento a 90°C per 10 minuti
- Raffreddamento a -13.5C°/min fino a 20°C
- Mantenimento a temperatura ambiente per 10 minuti.

### 3.2.2 HOT PLATE

Il gel realizzato sull'Hot plate è preparato in delle vials da 3ml che vengono immerse parzialmente in olio silconico. La temperatura è misurata tramite una sonda ad immersione e la miscelazione è realizzata tramite ancorette magnetiche dal fondo a 760 rpm. Il processo termico è meno accurato di quello nel Crystal 16.

Nel hot plate si ha:

- Mantenimento a 25°C per 5 minuti
- Riscaldamento fino a 90°C in circa 20 minuti (circa 4 C°/min)
- Mantenimento a 90°C per 20 minuti
- Raffreddamento non controllato fino a temperatura ambiente.

### 3.3 GELIFICAZIONE SOTTO AL MICROSCOPIO A LUCE POLARIZZATA

Le sospensioni di acqua e amido vengono prelevate tramite una pipetta e poste in un vetrino cavo. Successivamente, vista l'elevata temperatura del processo di gelificazione, viene posizionato il coprivetrino per evitare l'eccessiva evaporazione dell'acqua. Il vetrino viene posizionato sulla piastra riscaldante del Linkam PE120 e collegato a una pompa di circolazione dell'acqua (Linkam Scientific Instruments, Regno Unito). La piastra a sua volta è stata posizionata su un microscopio Zeiss Axiolab 5 (Zeiss, Germania) con una lente a luce polarizzata. La temperatura è stata variata tramite il controller Peltier LinkPad T96.

Ciascun campione ha ricevuto il seguente trattamento termico:

- Mantenimento a 20°C
- Riscaldamento a 13,5°C/min fino a 90°C
- Mantenimento a 90°C per 10 minuti
- Raffreddamento a -13.5°C/min fino a 20°C
- Mantenimento a temperatura ambiente per 10 minuti.

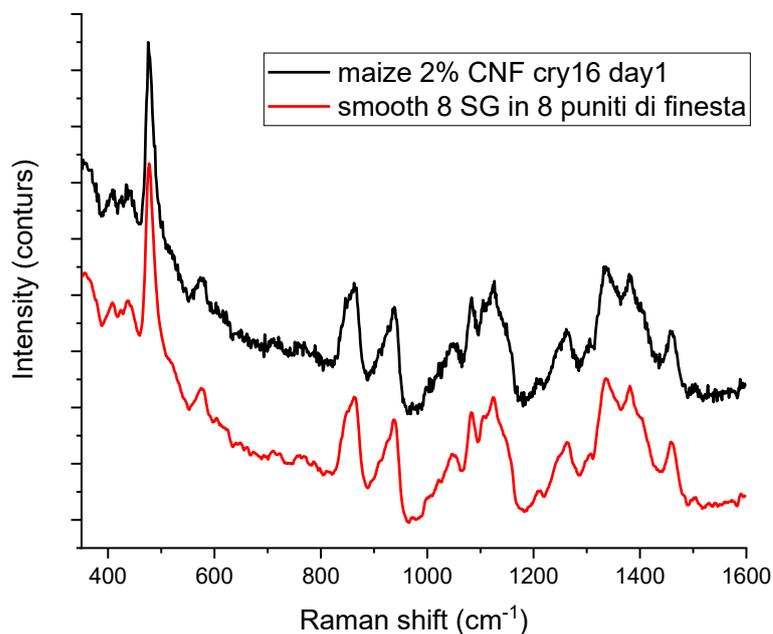
I video della gelatinizzazione dei campioni sono stati registrati con un iPhone 13 (Apple, USA), utilizzando un obiettivo 10x. Si sono osservate così le differenti temperature a cui avvengono le gelatinizzazioni e la variazione di acqua libera.

### 3.4. SPETTROSCOPIA RAMAN

La spettroscopia Raman è stata eseguita con uno spettrometro LabRAM HR Evolution (Horiba, Giappone). Per eseguire le misurazioni sono stati utilizzati un laser da 785 nm e un rilevatore Synapse Plus (Horiba). Sono state registrate scansioni della regione spettrale tra i 350-1600  $\text{cm}^{-1}$ , con un tempo di acquisizione

di 4 s ed un numero di accumulo pari a 35 s. Con un obiettivo 10x e un Grating di 300 (1000nm).

Gli spettri Raman dei campioni sono registrati a temperatura ambiente. Successivamente i dati vengono processati per poter essere confrontati. Per prima cosa viene effettuato uno smoothing tramite la funzione di savitzky golay con otto punti di finestra (fig.9).



*Figura 9: Esempio di smoothing di spettro Raman (SG).*

Successivamente viene sottratta la "linea di base" calcolata utilizzando come metodo una derivata seconda (fig.10). Il metodo di interpolazione è una funzione spline che passa per quattro punti e viene sottratta allo spettro originale come vediamo in fig.11.

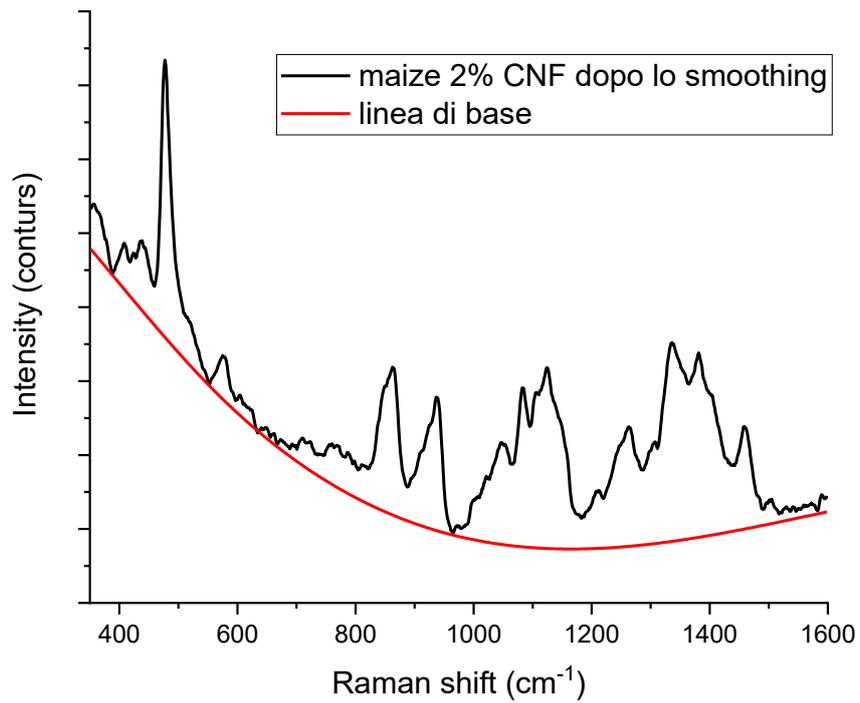


Figura 10: linea di base di uno spettro Raman.

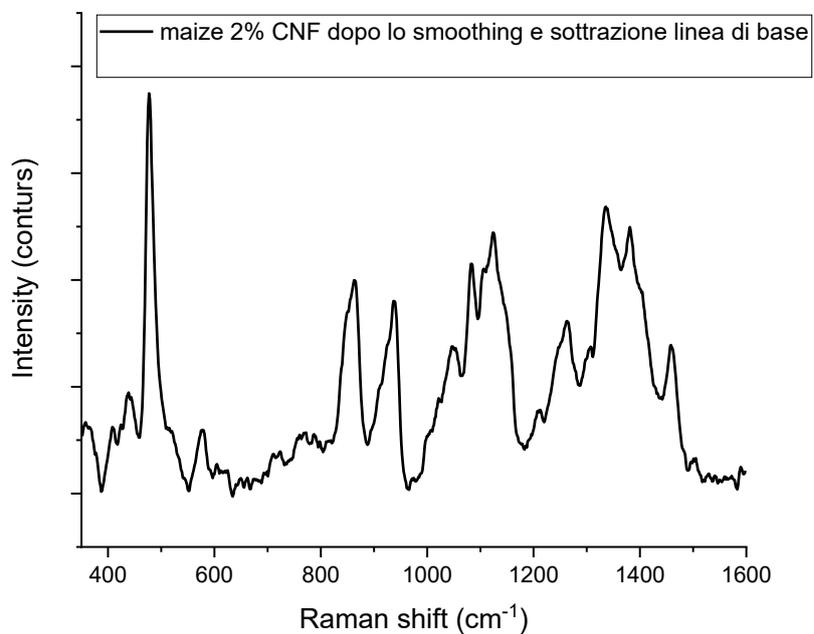


Figura 11: spettro Raman dopo la sottrazione della linea di base.

Infine, gli spettri vengono normalizzati prendendo come valore di riferimento quello del picco a  $\sim 480 \text{ cm}^{-1}$  che è il più intenso e il più rilevante per le analisi

effettuate. Tramite la funzione peak analyzer di Origin (fig.12) vengono calcolati i parametri fondamentali per l'analisi dei picchi ( $\sim 480 \text{ cm}^{-1}$  e  $\sim 865 \text{ cm}^{-1}$ ) quali: larghezza a mezza altezza (FWHM), intensità, posizione (Raman shift), area dei picchi.

Il software Origin 2018 64Bit è stato utilizzato per processare gli spettri ed effettuare i calcoli.

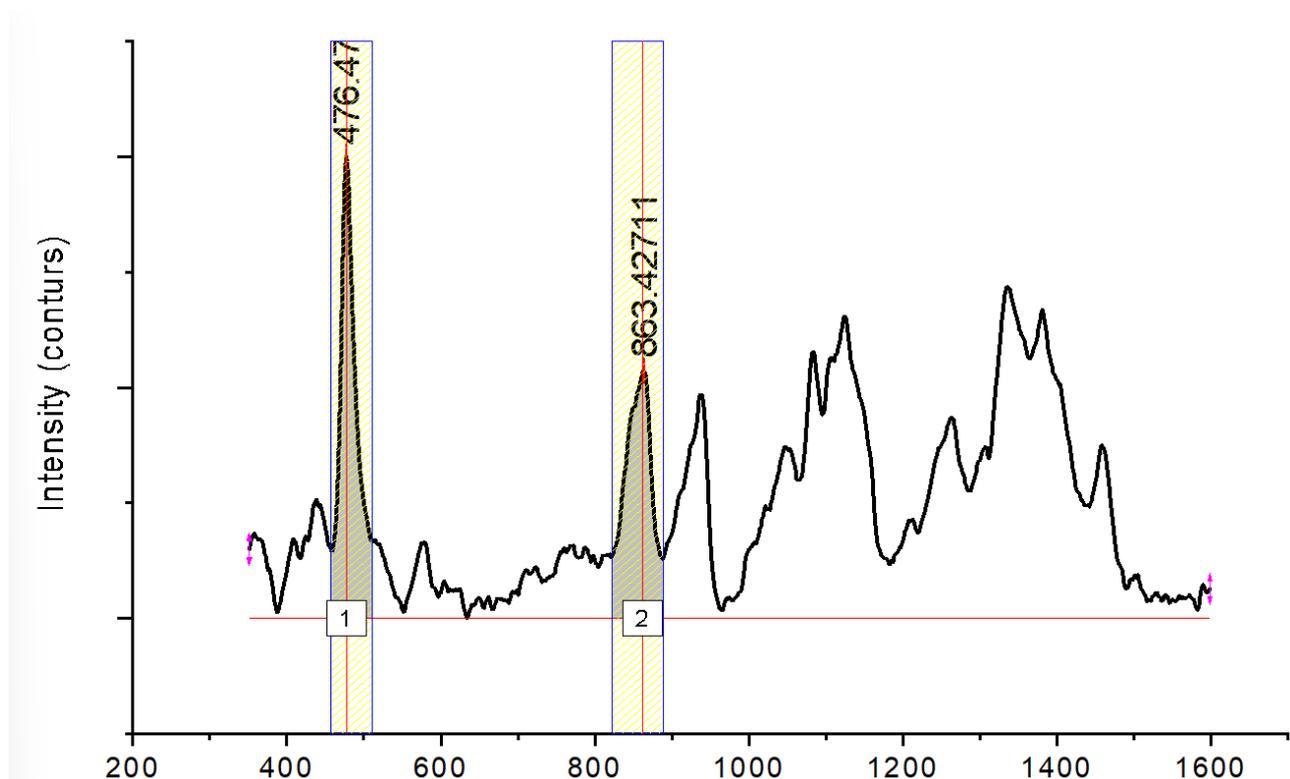


Figura 12: funzione Origin per il calcolo dei valori dei picchi

### 3.4.1. ANALISI CRISTALLINITÀ TRAMITE SPETTROSCOPIA

Tramite una correlazione empirica è stata calcolata la cristallinità dei campioni.<sup>15</sup>

Come si osserva in fig.12, l'area sottostante alla linea di base rappresenta la zona amorfa ( $X_a$ ) dell'amido. Mentre l'area sottostante tra i picchi e la linea di base rappresenta sua zona cristallina ( $X_c$ ).

La cristallinità può essere calcolata come:

$$\text{cristallinit\`a} = \frac{\text{area cristallina } (X_c)}{\text{area amorfa } (X_a) + \text{area cristallina } (X_c)} \quad (2)$$

Lo studio di Starch/Stärke (2015, 67, 612–619)<sup>15</sup> ha provato come la cristallinità è osservabile anche utilizzando la spettroscopia Raman, con lo stesso metodo adottato per la diffrazione a raggi X. Secondo questo studio la cristallinità dell'amido è calcolabile come il rapporto tra l'area sottostante ai picchi e l'area sottostante alla linea base<sup>16</sup>.

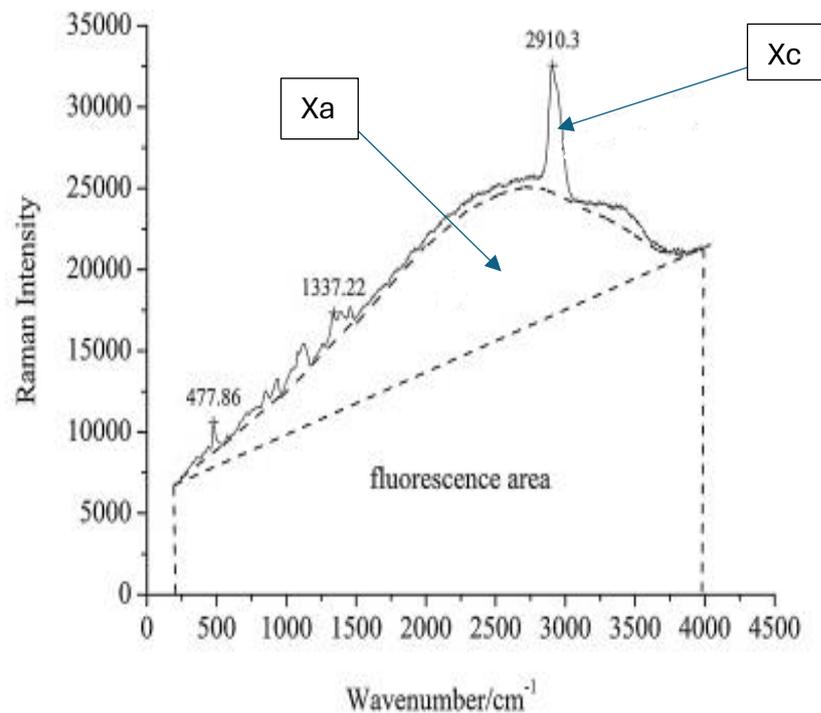


Figura 13: calcolo della fase amorfa e cristallina

### 3.5. SMALL AND WIDE-ANGLE X-RAY SCATTERING (SWAXS)

Le misurazioni SAXS E WAXS sono state eseguite presso il European Synchrotron Research Facility (ESRF) di Grenoble. L'energia del fascio era di 27keV. I modelli

SAXS sono stati misurati nell'intervallo di  $q$  tra  $0,048-5.37 \text{ nm}^{-1}$  e registrati da un rivelatore Pilatus 1M.

Mentre l'intervallo di  $q$  per il WAXS è osservato tramite un rivelatore Pilatus da 300 K-W, tra  $4,37-40,53 \text{ nm}^{-1}$ .

I capillari di quarzo contenenti i gel di amido-cellulosa sono stati preparati una settimana prima. In loco sono state preparate le varie sospensioni di amido e cellulosa nei capillari, per verificare il processo di gelificazione. I campioni sono stati sottoposti ad una rampa di temperatura con una scansione ogni 60 secondi.

Il profilo di temperatura applicato è qui descritto e riportato in figura 14.

- Mantenimento a  $20^{\circ}\text{C}$  per 1 minuto
- Riscaldamento a  $90^{\circ}\text{C}$  a  $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$
- Mantenimento a  $90^{\circ}\text{C}$  per 5 minuti
- Raffreddamento a  $20^{\circ}\text{C}$  a  $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$
- Mantenimento a  $20^{\circ}\text{C}$  per 5 minuti

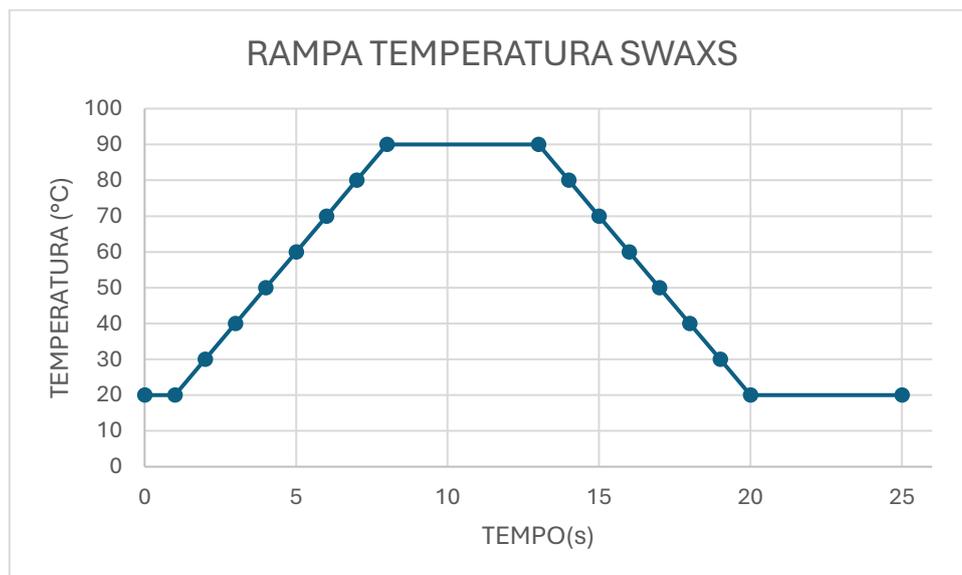


Figura 14:Rampa temperatura SWAXS

Le misure WAXS prima di essere analizzate sono state sottoposte a una sottrazione di un diffrattogramma dell'acqua tramite uno script implementato in MATLAB 2021.

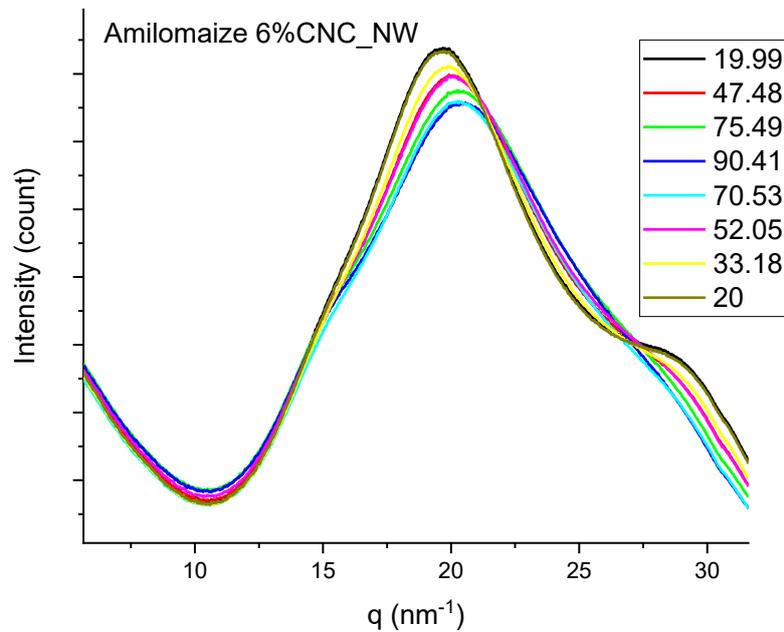


Figura 15: Prova WAXS dopo la sottrazione del diffrattogramma dell'acqua.

La sottrazione è stata effettuata tenendo in considerazione anche l'effetto termico sul segnale di scattering dell'acqua

Tramite Origin 2018 64Bit si è effettuato uno smoothing dei diffrattogrammi, utilizzando la funzione di savitzky golay in 240 punti di finestra (Fig.16) implementata sulla derivata prima (Fig.17) del segnale di origine.

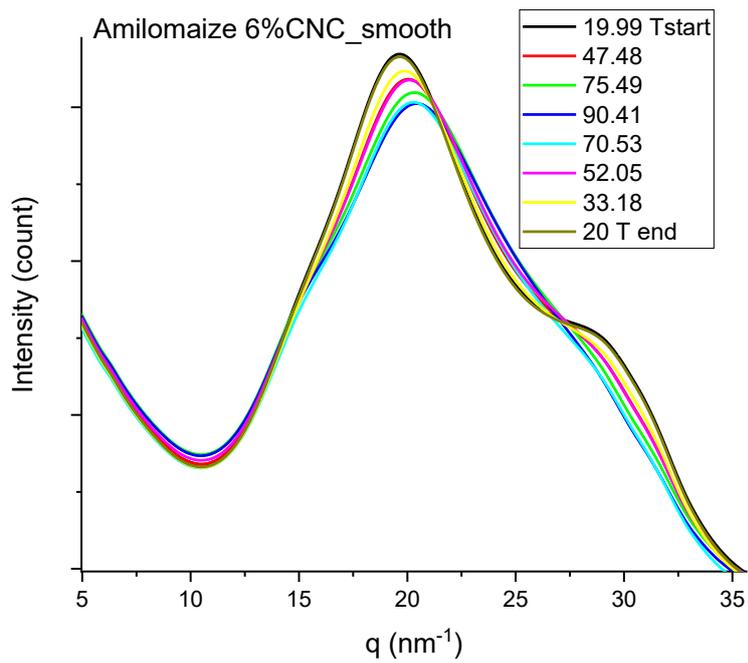


Figura 16: Prova dopo lo smooth in 240 WP

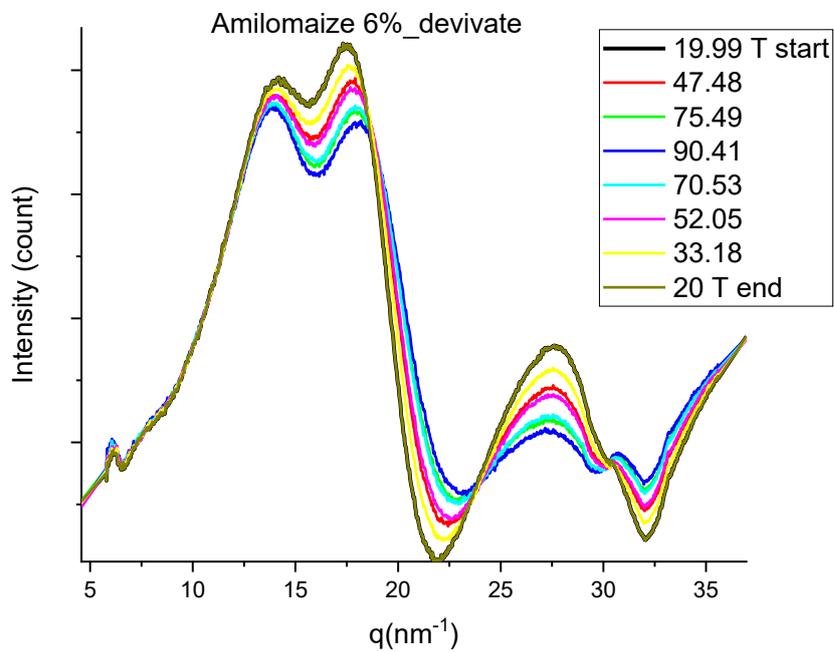


Figura 17: Prova SAXS dopo la derivata prima

## 3.6 PRINCIPAL COMPONENT ANALYSIS (PCA)

Per il calcolo della *principal component analysis* è utilizzata la funzione MATLAB di default *pca* dalla quale si ottiene:

- **Coeff:** restituisce i coefficienti della componente principale
- **Score:** score dei componenti principali
- **Explained:** la percentuale della varianza totale di ogni componente principale
- **mu:** la media stimata di ciascuna variabile in X.
- **Latent:** le varianze delle componenti principali

La PCA viene utilizzata per analizzare qualitativamente eventuali i cluster formati dai campioni analizzati tramite spettroscopia e le zone di principale interesse nello spettro Raman.

La PCA viene utilizzata anche per analizzare la varianza dei campioni SAXS e WAXS e quindi comprendere quali campioni presentano maggiori differenze durante gli esperimenti di gelificazione e dopo una settimana a temperatura ambiente.

## 4. RISULTATI

### 4.1. ANALISI MICROSCOPIO A LUCE POLARIZZATA

Nei video registrati al microscopio a luce polarizzata si osservano le principali fasi della gelificazione. Inizialmente i granuli di amido sono in sospensione alla temperatura di 25°C. Successivamente i granuli vengono sottoposti al seguente processo termico:

- Mantenimento a 25°C per 2 minuti
- Riscaldamento a 95°C a 13.5°C/min
- Mantenimento a 95°C per 15 minuti
- Raffreddamento a 25°C a -13,5°C/min
- Mantenimento a 25°C per 10 minuti

Tutti gli amidi durante la fase di riscaldamento presentano una temperatura alla quale si rompono i granuli e inizia la vera e propria gelificazione. Durante la gelificazione le strutture lamellari di amilopectina e amilosio si rompono. Le catene polimeriche vengono stabilizzate dall'acqua, che va a diminuirne la quantità libera in sospensione. Nei video si osservano diverse temperature di gelificazione che dipendono dalla composizione dell'amido e anche la diminuzione dell'acqua libera attraverso la formazione di bolle d'aria.

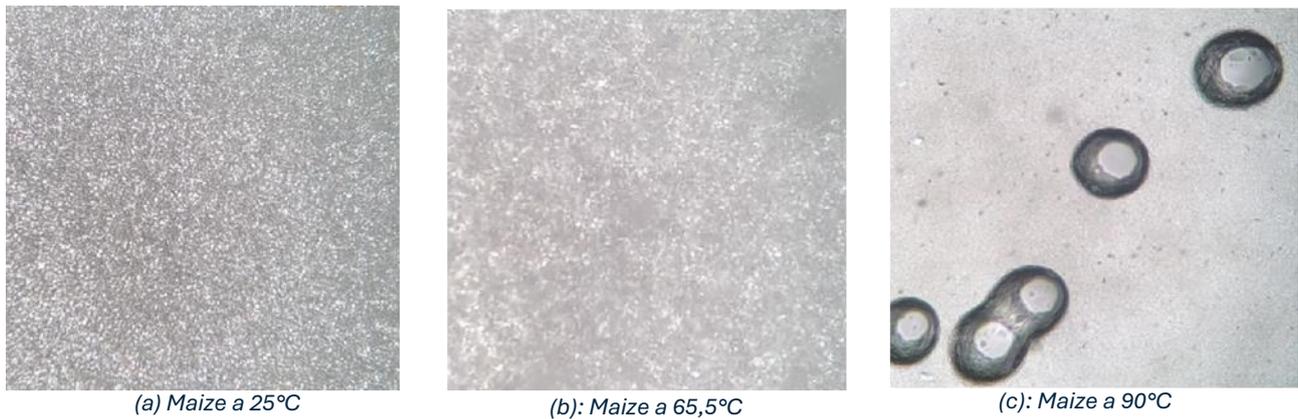


Figura 18: processo di gelificazione del Maize osservato al microscopio a luce polarizzata

In figura 18 (b) si osserva che i granuli di Maize iniziano a rompersi in buona parte alla temperatura di 65.5°C, successivamente l'acqua libera inizia a diminuire (fig.18 (c)). La temperatura di gelatinizzazione teorica per il Maize è di 67°C, molto simile a quella osservata. Bisogna sempre considerare che la temperatura di gelatinizzazione dipende dalla concentrazione dell'amido in acqua. Mentre per il Waxy Maize e Amilomaize abbiamo una temperatura di gelatinizzazione intorno ai 70°C.

## 4.2. SPETTROSCOPIA RAMAN

Gli spettri Raman prima di essere analizzati vengono processati con Origin 2018 64Bit (smooth, sottrazione di linea di base e normalizzazione).

Il picco a 480  $\text{cm}^{-1}$  è dovuto alle vibrazioni dei legami contenuti nelle spire di amilosio ed è quindi indice dell'ordine tridimensionale della macromolecola (conformazione a elica).

Il picco a 865  $\text{cm}^{-1}$  è dovuto alla struttura ordinata dell'amilopectina.

Nel nostro studio si vuole capire se la cellulosa influenza l'auto associazione e la retrogradazione dell'amilosio e dell'amilopectina, per questo vengono presi in considerazione questi i due picchi a 480  $\text{cm}^{-1}$  e 865  $\text{cm}^{-1}$ , essendo direttamente collegati all'ordine strutturale delle molecole in questione.

Vengono calcolati i parametri più importanti dei picchi ( $480\text{cm}^{-1}$  e  $865\text{cm}^{-1}$ ):

- FWHM (larghezza a mezza altezza)
- Intensità
- Area
- Posizione del picco (Raman shift)

### *Campioni di amido secchi (granuli)*

Negli spettri dei campioni secchi l'intensità relativa del picco  $\sim 480\text{ cm}^{-1}$  è elevata rispetto agli altri, ciò deriva dall'elevato grado d'ordine nelle strutture dell'amilosio nell'amido. Il picco a  $2900\text{ cm}^{-1}$  è associato allo stretching del legame C-H, questo picco si riesce osservare solo nei campioni secchi.

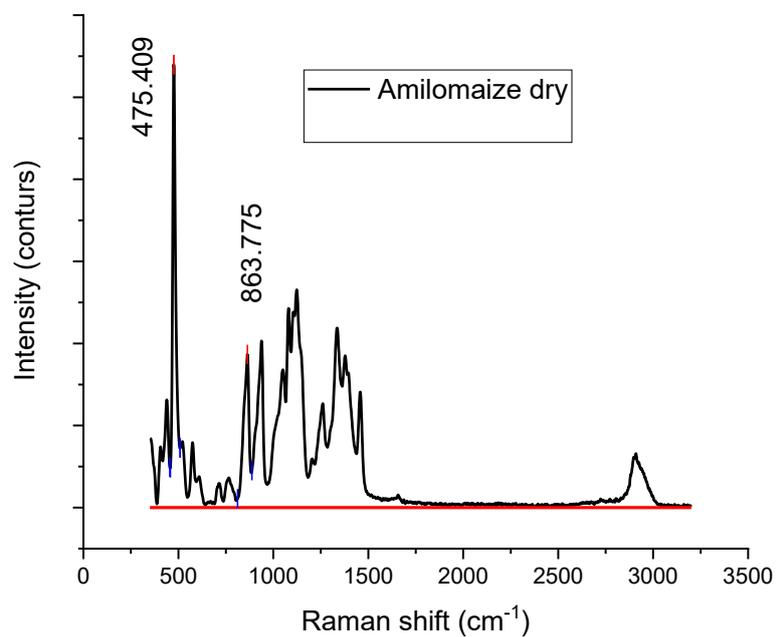


Figura 19: Granuli di Amilomaize secchi

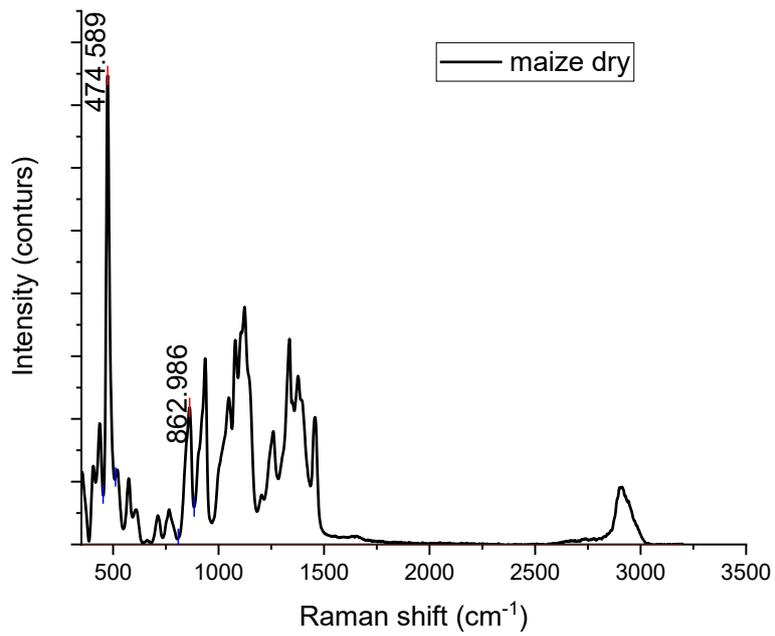


Figura 20:granuli di Maize secchi

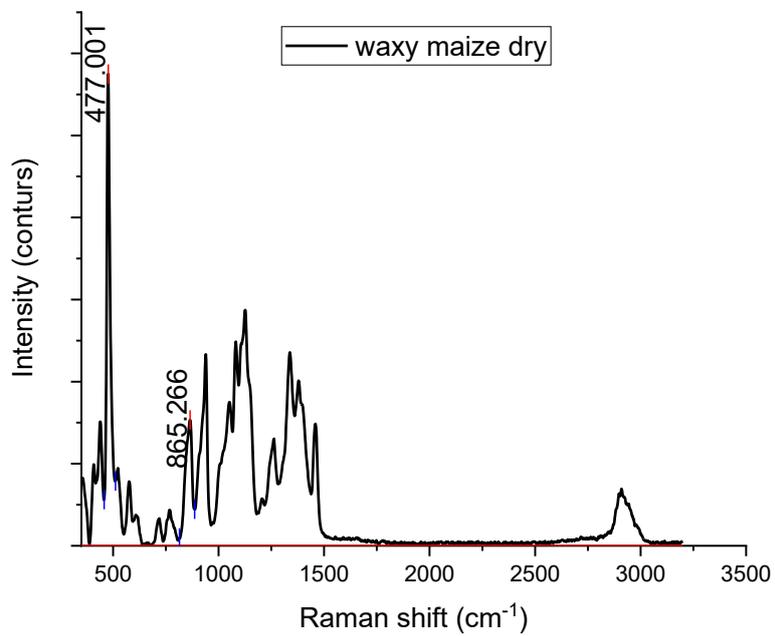


Figura 21:granuli di Waxy maize secchi

I valori di intensità dei picchi dei campioni secchi (fig. 19,20e21) sono riportati nella seguente tabella:

Tabella 1: Parametri per l'analisi dei picchi dei campioni secchi

	RSP1	RSP2	FWHH1	AREA1	ALTEZZA1	FWHH2	AREA2	ALTEZZA2
Amilomaize dry	475.40	863.75	17.23	5,869.10	1.00	32.78	3,325.45	0.34
Maize dry	474.58	863.98	18.50	17,740.21	1.00	37.00	8,334.46	0.29
Waxy Maize	477.00	865.27	17.70	6,464.35	1.00	38.10	2,969.28	0.27

Il calcolo della cristallinità dei campioni secchi a partire dai valori dei picchi è osservabile nella tabella sottostante:

Tabella 2: Analisi della cristallinità dei campioni secchi

Camp. Dry	Amilomaize	Maize	Waxy Maize
Vb	79509.5	237425.7	74778.0
Va	19942.3	74763.5	12457.3
$XA=Vb/(Vb+Va)$	79.90%	76.10%	85.70%

## 4.2.2 ANALISI DEI PICCHI DEGLI SPETTRI RAMAN

Tramite la funzione peak analyzer di Origin 2018 64Bit, dagli spettri vengono estrapolati i seguenti parametri:

Tabella 3: Parametri degli spettri Raman per l'analisi dei picchi

	RSP1	RSP2	FWHH1	AREA1	ALTEZZA1	FWHH2	AREA2	ALTEZZA2
Amilomaize 0% CNC CRY16 DAY1	478.23	866.42	17.27	21.73	1.00	32.77	17.36	0.50
Amilomaize2% CNC CRY16 DAY1	478.23	866.42	16.39	20.57	1.00	31.53	15.55	0.46
Amilomaize6% CNC CRY16 DAY1	478.23	866.42	16.08	20.22	1.00	27.05	13.25	0.44
Maize 0% CNC CRY16 DAY1	479.88	864.92	20.11	23.73	1.00	39.81	21.86	0.54
Maize2% CNC CRY16 DAY1	479.88	864.92	19.04	23.63	1.00	36.41	18.23	0.49
Maize6% CNC CRY16 DAY1	478.23	864.92	18.61	22.57	1.00	41.45	18.41	0.49
Waxy Maize0% CNC CRY16 DAY1	478.23	863.43	19.01	22.87	1.00	35.00	17.82	0.49
Waxy Maize2% CNC CRY16 DAY1	478.23	863.43	19.18	23.22	1.00	35.13	17.72	0.49
Waxy Maize6% CNC CRY16 DAY1	478.23	864.92	18.88	22.98	1.00	34.91	18.16	0.49
Amilomaize0% CNC CRY16 DAY7	478.70	865.74	16.98	22.19	1.00	33.52	19.14	0.52
Amilomaize2% CNC CRY16 DAY7	478.70	866.96	16.64	20.87	1.00	29.84	15.72	0.47
Amilomaize6% CNC CRY16 DAY7	478.70	866.96	16.33	21.02	1.00	33.26	17.77	0.49
Maize0% CNC CRY16 DAY7	478.70	866.96	18.42	23.39	1.00	36.97	19.12	0.50
Maize2% CNC CRY16 DAY7	478.70	866.96	16.64	20.87	1.00	29.84	15.72	0.47
Maize6% CNC CRY16 DAY7	478.70	866.96	16.33	21.02	1.00	33.26	17.77	0.49
Waxy Maize0% CNC CRY16 DAY7	478.70	866.96	18.42	23.39	1.00	36.97	19.12	0.55
Waxy Maize2% CNC CRY16 DAY7	478.70	865.74	18.24	22.78	1.00	37.01	20.08	0.51

Waxy Maize6% CNC CRY16 DAY7	478.70	866.96	19.11	23.84	1.00	35.85	19.57	0.52
Amilomaize0% CNC HOT PLATE DAY1	479.82	867.91	16.87	22.29	1.00	38.84	19.85	0.54
Amilomaize2% CNC HOT PLATE DAY1	479.82	867.91	16.32	20.72	1.00	34.82	17.86	0.47
Amilomaize6% CNC HOT PLATE DAY1	479.82	867.91	16.39	20.91	1.00	38.37	19.76	0.53
Maize0% CNC HOT PLATE DAY1	479.82	866.42	18.29	22.96	1.00	44.00	25.73	0.57
Maize2% CNC HOT PLATE DAY1	479.82	864.92	18.67	22.61	1.00	38.96	20.08	0.53
Maize6% CNC HOT PLATE DAY1	479.82	861.94	19.02	22.29	1.00	38.37	25.21	0.58
Waxy Maize0% CNC HOT PLATE DAY1	479.82	860.45	20.96	27.43	1.00	42.63	27.43	0.63
Waxy Maize2% CNC HOT PLATE DAY1	479.82	861.94	20.23	24.48	1.00	40.37	24.30	0.55
Waxy Maize6% CNC HOT PLATE DAY1	479.82	863.43	19.53	24.02	1.00	43.20	26.36	0.57
Amilomaize0% CNC HOT PLATE DAY7	478.70	866.96	15.99	20.86	1.00	39.77	22.04	0.59
Amilomaize2% CNC HOT PLATE DAY7	478.70	866.96	15.95	20.12	1.00	38.79	21.05	0.57
Amilomaize6% CNC HOT PLATE DAY7	478.70	866.96	16.09	20.78	1.00	35.93	20.93	0.52
Maize0% CNC HOT PLATE DAY7	480.29	866.79	20.04	24.81	1.00	39.77	24.22	0.56
Maize2% CNC HOT PLATE DAY7	480.11	863.98	19.41	23.59	1.00	35.98	18.56	0.50
Maize6% CNC HOT PLATE DAY7	480.29	866.96	18.52	23.85	1.00	35.59	18.61	0.51
Waxy Maize0% CNC HOT PLATE DAY7	480.29	865.47	18.63	24.09	1.00	38.88	23.11	0.54
Waxy Maize2% CNC HOT PLATE DAY7	480.29	865.47	20.06	25.18	1.00	38.53	25.48	0.59
Waxy Maize6% CNC HOT PLATE DAY7	478.70	865.47	20.32	24.40	1.00	39.15	23.50	0.57

Nella tabella precedente, possiamo leggere i valori estrapolati dagli spettri dove:

- RSP1: è la posizione del picco (Raman shift) a  $\sim 480 \text{ cm}^{-1}$  che può spostarsi in base alla retrogradazione dell'amilosio
- RSP2 è la posizione del picco (Raman shift) a  $\sim 865 \text{ cm}^{-1}$
- FWHM1 è la larghezza a mezza altezza del picco a  $\sim 480 \text{ cm}^{-1}$
- FWHM2 è la larghezza a mezza altezza del picco a  $\sim 865 \text{ cm}^{-1}$
- AREA 1 e ALTEZZA1: del picco a  $\sim 480 \text{ cm}^{-1}$
- AREA 2 e ALTEZZA2: del picco a  $\sim 865 \text{ cm}^{-1}$

Si è osservato che la diminuzione del FWHM e dell'altezza del picco a  $\sim 480 \text{ cm}^{-1}$  è correlata al fenomeno di retrogradazione, altro possibile indice della retrogradazione è lo spostamento del picco  $\sim 480 \text{ cm}^{-1}$  verso valori più piccoli di Raman shift. Per completezza è stata considerata l'area del picco, pur non avendo fondamenti bibliografici.

Per l'analisi dei picchi vengono calcolati:

- Variazione tra giorno 1 e giorno 7 del FWHM 1.<sup>10</sup>
- Variazione tra giorno 1 e giorno 7 del rapporto delle altezze (altezza2/altezza1) tra picco 2 (~865cm<sup>-1</sup>) e picco 1 (~480cm<sup>-1</sup>).<sup>17</sup>
- Variazione tra giorno 1 e giorno 7 del rapporto delle aree (area2/area1) tra picco 2 (~865cm<sup>-1</sup>) e picco 1 (~480cm<sup>-1</sup>).
- La variazione tra giorno 1 e giorno 7 lungo il Raman shift del picco 1 (~480cm<sup>-1</sup>).<sup>10</sup>

Tabella 4: Risultati dell'analisi dei picchi: campioni con CNC al CRYSTAL16

<b>CRYSTAL16 Giorno 1-&gt;7</b>	Spostamento picco 1	Variazione FWHM 1	Variazione rapporto aree (A2/A1)	Variazione del rapporto delle altezze (H2/H1)
Amilomaize 0% CNC	0.466	-0.290	-0.093	0.023
Amilomaize 2% CNC	0.466	0.2452	0.005	0.009
Amilomaize 6% CNC	0.466	0.249	-0.343	0.048
Maize 0% CNC	-1.186	-1.690	0.137	-0.042
Maize 2% CNC	-1.186	-2.409	0.031	-0.015
Maize 6% CNC	0.466	-2.271	-0.042	-0.005
Waxy Maize 0% CNC	0.466	-0.592	-0.061	0.058
Waxy Maize 2% CNC	0.466	-0.938	-0.176	0.023
Waxy Maize 6% CNC	0.466	0.233	-0.047	0.032

I valori negativi di FWHM, lo spostamento del picco e la variazione del rapporto delle altezze corrispondono a possibili fenomeni di retrogradazione dell'amido nel periodo 1 a 7 giorni. Lo spostamento del picco 1 è negativo quando ci si sposta verso valori minori di Raman shift. Questo avviene solo nei campioni di Maize allo 0% e 2%. Nei restanti campioni assume un valore positivo, andando a restituire un risultato poco sensato secondo la teoria.

Un valore negativo della variazione del FWHM 1 ne indica una sua diminuzione nel tempo. In questo caso tutti i campioni mostrano retrogradazione secondo questo parametro, fanno eccezione: Waxy Maize 6%, Amilomaize 2% e 6%.

Dalle analisi svolte non si è trovata nessuna correlazione specifica che lega il fenomeno di retrogradazione con i rapporti delle aree. La variazione del rapporto dell'altezza è molto simile al FWHM, un suo valore negativo indica che l'intensità relativa dei picchi è diminuita; ciò avviene solo nei campioni di Maize.

Dalle analisi svolte, solo due campioni (Maize al 2% e 6%.) hanno mostrato retrogradazione secondo tutti e tre i parametri.

Tabella 5: *Risultati dell'esperimento hot plate con nanocristalli di cellulosa (CNC)*

<b>Hot plate Giorno 1-&gt;7</b>	Spostamento picco 1	Variazione FWHM 1	Variazione rapporto aree (A2/A1)	Variazione rapporto altezza (H2/H1)
Amilomaize 0% CNC	-1.126	-0.878	-0.177	0.045
Amilomaize 2% CNC	-1.126	-0.375	-0.204	0.093
Amilomaize 6% CNC	-1.126	-0.299	-0.065	-0.006
Maize 0% CNC	0.467	1.759	0.132	-0.008
Maize 2% CNC	0.285	0.743	0.145	-0.030
Maize 6% CNC	0.467	-0.502	0.397	-0.077
Waxy Maize 0%	0.467	-2.328	0.042	-0.084
Waxy Maize 2% CNC	0.467	-0.174	-0.019	0.039
Waxy Maize 6% CNC	-1.126	0.788	0.127	0.007

Per questo set di esperimenti si osserva che lo spostamento del picco 1 è negativo solo nei campioni di Amilomaize allo 0%, 2%, 6% e nel Waxy Maize 6%. Nei restanti campioni assume un valore positivo andando a restituire secondo la teoria un valore poco sensato.

Un valore negativo della variazione del FWHM 1 ne indica una sua diminuzione nel tempo. In questo caso tutti i campioni mostrano retrogradazione per questo parametro tranne tre: Waxy Maize 6%, Maize 0% e 2%. Dalle analisi svolte non si è

trovata nessuna correlazione che lega il fenomeno di retrogradazione con i rapporti delle aree.

Nella variazione del rapporto dell'altezza si ha suo valore negativo solo campioni di Maize, Amilomaize 6% e Waxy 0%.

Tramite l'analisi di questi tre parametri vediamo che non concordano mai, diversamente da quanto visto per l'esperimento al Crystal 16.

Per verificare la variabilità degli spettri Raman per lo stesso campione, sono stati ripetuti più spettri in punti diversi dello stesso campione, in modo da calcolare i parametri attraverso la media matematica e poter verificare l'accuratezza del metodo utilizzato.

Tabella 6: Risultati dell'esperimento hot plate con nano fibrille di cellulosa batterica (CNF) con prove ripetute

<b>Hot plate Giorno 1-→7</b>	Spostamento picco 1	Variazione FWHM 1	Variazione rapporto aree (A2/A1)	Variazione rapporto altezza (H2/H1)
Maize 2% CNF prova1	3.186	0.777	-0.118	0.078
Maize 2%CNF prova2	3.186	0.365	-0.458	0.276
Maize 2% CNF prova3	1.593	-0.697	-0.656	0.277
Maize 6% CNF prova1	1.593	1.452	0.427	-0.162
Maize 6% CNFprova2	0.000	1.798	0.251	-0.093
Maize 6% CNFprova3	3.186	1.264	0.263	-0.148
Amilomaize 2% CNF prova1	1.593	-2.459	-0.520	0.184
Amilomaize 2% CNF prova2	1.593	1.217	0.024	-0.072
Amilomaize 2% CNF prova3	1.593	-0.834	-0.016	0.139
Amilomaize 6% CNF prova1	1.593	-0.441	0.373	-0.160
Amilomaize 6% CNF prova2	3.187	-0.150	0.129	-0.031
Amilomaize 6% CNF prova3	1.593	-2.442	0.089	-0.083
Waxy Maize 2% CNF prova1	1.593	0.447	0.048	0.043
Waxy Maize 2% CNF prova2	1.593	1.309	0.092	-0.042

Waxy Maize 2% CNF prova3	1.593	-1.692	0.152	-0.087
Waxy Maize 6% CNF prova1	1.593	-1.970	0.311	-0.136
Waxy Maize 6% CNF prova2	3.187	-3.944	0.150	-0.192
Waxy Maize 6% CNF prova3	3.187	-1.596	0.267	-0.342

Analizzando la tabella si può osservare che i parametri variano di molto anche se le analisi sono ripetute sullo stesso campione. In particolare, vediamo che la variazione di Raman shift del picco tra il primo e settimo giorno è sempre positiva, non mostrando retrogradazione. Quando la variazione del FWHM del picco 1 è negativa indica retrogradazione, questo solo per il 50% dei campioni, nei restanti assume valori positivi. Si è cercato, anche in questo caso, di trovare una correlazione tra le variazioni delle aree sottostanti ai picchi e la retrogradazione del campione, ma come nei casi precedenti, la variazione sembra essere indipendente. La variazione del rapporto delle altezze è il parametro che mostra più stabilità, essendo quasi sempre negativo. Studiando queste prove, e ripetendo la medesima analisi sullo stesso campione si osserva una variazione dei parametri molto elevata.

#### 4.2.3. Analisi della cristallinità

La cristallinità è calcolata secondo la formula empirica ottenuta nello studio di Starch/Stärke (2015, 67, 612–619)<sup>16</sup>:

$$Cristallinita (X_c) = \frac{\text{area della zona cristallina (V}_b)}{\text{area della zona amorfa (V}_a) + \text{area della zona cristalliana (V}_b)}$$

L'area della zona cristallina è individuata come quella tra i picchi e la linea di base, mentre l'area della zona amorfa è quella sottostante alla linea di base.

Tabella 7: Valori per il calcolo della cristallinità (giorno 1)

<b>Crystal 16 day1</b>	Amilomaize 0% CNC	Amilomaize 2% CNC	Amilomaize 6% CNC
Va	39064	44192	58178
Vb	15346	22084	30055
$Xc=Vb/(Vb+Va)$	28%	33%	34%
<b>Crystal 16</b>	Maize 0% CNC	Maize 2% CNC	Maize 6% CNC
Va	90453	77295	72740
Vb	25354	30812	26819
$Xc=Vb/(Vb+Va)$	22%	29%	27%
<b>Crystal 16</b>	Waxy Maize 0% CNC	Waxy Maize 2% CNC	Waxy Maize 6% CNC
Va	92302	61089	92768
Vb	35993	29746	39147
$Xc=Vb/(Vb+Va)$	28%	33%	30%
<b>Hot plate day1</b>	Amilomaize 0% CNC	Amilomaize 2% CNC	Amilomaize 6% CNC
Va	48962	61474	56082
Vb	12473	17565	12530
$Xc=Vb/(Vb+Va)$	20%	22%	18%
<b>Hot plate</b>	Maize 0% CNC	Maize 2% CNC	Maize 6% CNC
Va	114512	159219	153533
Vb	31811	46586	35145
$Xc=Vb/(Vb+Va)$	22%	23%	19%
<b>Hot plate</b>	Waxy Maize 0% CNC	Waxy Maize 2% CNC	Waxy Maize 6% CNC
Va	52615	74277	103380
Vb	13898	20714	27222
$Xc=Vb/(Vb+Va)$	21%	22%	21%

I dati evidenziati in arancione indicano i campioni con la maggiore cristallinità, si osserva che i campioni con il 2% di nano cristalli di cellulosa risultano i più cristallini (fa eccezione l'Amilomaize del Crystal 16 dove il campione più cristallino risulta quello al 6%).

La seguente tabella riporta invece i valori di cristallinità calcolati per i campioni al giorno 7:

Tabella 8: Valori per il calcolo della cristallinità (giorno 7)

<b>Crystal 16 day 7</b>	Amilomaize 0% CNC	Amilomaize 2% CNC	Amilomaize 6% CNC
Va	42909.65	41379.32	52575.43
Vb	15641.69	21151.55	17332.22
$X_c=V_b/(V_b+V_a)$	27%	34%	25%
Crystal 16	Maize 0% CNC	Maize 2% CNC	Maize 6% CNC
Va	65448.73	50504.37	83796.35
Vb	25607.79	21475.31	29793.82
$X_c=V_b/(V_b+V_a)$	28%	30%	26%
Crystal 16	Waxy maize 0% CNC	Waxy maize 2% CNC	Waxy maize 6% CNC
Va	63196.08	49664.11	69004.26
Vb	23329.89	21049.00	24082.40
$X_c=V_b/(V_b+V_a)$	27%	30%	26%
<b>Hot plate day 7</b>	Amilomaize 0% CNC	Amilomaize 2% CNC	Amilomaize 6% CNC
Va	42979.46	45357.96	59467.15
Vb	10162.95	11249.48	12995.34
$X_c=V_b/(V_b+V_a)$	19%	20%	18%
Hot plate	Maize 0% CNC	Maize 2% CNC	Maize 6% CNC
Va	76656.88	87976.62	121080.91
Vb	23335.40	24375.25	32465.27
$X_c=V_b/(V_b+V_a)$	23%	22%	21%
Hot plate	Waxy Maize 0% CNC	Waxy Maize 2% CNC	Waxy Maize 6% CNC
Va	64220.81	66748.30	80347.27
Vb	18059.15	20573.60	17323.99
$X_c=V_b/(V_b+V_a)$	22%	24%	18%

Dai valori di cristallinità ottenuti al giorno 7 vediamo che nella maggioranza dei casi i campioni più cristallini sono quelli con il 2% di CNC; Fa eccezione il Maize preparato all'Hot plate che risulta essere più cristallino allo 0%.

Tabella 9: Differenza di cristallinità tra giorno 1 e 7

<b>Crystal16</b>	0%	2% CNC	6% CNC
AmiloMaize	-1.5%	0.5%	-9.3%
Maize	6.2%	1.3%	-0.7%
Waxy Maize	-1.1%	-3.0%	-3.8%
<b>Hot plate</b>	0%	2% CNC	6% CNC
AmiloMaize	-1.2%	-2.4%	-0.3%
Maize	1.6%	-0.9%	2.5%
Waxy Maize	1.1%	1.8%	-3.1%

Queste variazioni di cristallinità associate al contenuto di CNC hanno tutte andamenti molto diversi. Non si riesce ad osservare una relazione tra variazione di cristallinità nel tempo e il contenuto di cellulosa. Ciò potrebbe indicare che il metodo suggerito da letteratura non sia particolarmente attendibile.

Sono state eseguite delle prove di spettroscopia ripetute, analizzando in diverse zone i campioni. In questo modo viene calcolata la cristallinità media e l'errore compiuto, ciò permette di capire se le variazioni di cristallinità tra i campioni con diverse concentrazioni di CNC, sono apprezzabili oppure se l'errore della misura è troppo elevato.

I risultati dei calcoli effettuati sui campioni analizzati in tre punti diversi al giorno 1 sono riportati nella seguente tabella.

*Tabella 10: Valori per il calcolo della cristallinità delle prove ripetute (2%CNF)*

Hot plate day1	Amilomaize 2% CNF prova 1	Amilomaize 2% CNF prova 2	Amilomaize 2% CNF prova 3	Valore medio
Va	18091	18800	17675	
Vb	5935	4733	5149	
$X_c = V_b / (V_b + V_a)$	24.7%	20.1%	22.6%	22.5%
Errore medio	2.2%	-2.3%	0.1%	
Hot plate	Maize 2% CNF prova1	Maize 2% CNF prova2	Maize 2% CNF prova3	Valore medio
Va	31134	35323	32950	
Vb	8817	10362	10906	
$X_c = V_b / (V_b + V_a)$	22.1%	22.7%	24.9%	23.2%
Errore medio	-1.1%	-0.5%	1.7%	
Hot plate	Waxy Maize 2% CNF prova 1	Waxy Maize 2% CNF prova 2	Waxy Maize 2% CNF prova 3	Valore medio
Va	22838	25381	23367	
Vb	5764	6666	614900%	
$X_c = V_b / (V_b + V_a)$	20.2%	20.8%	20.8%	20.6%
Errore medio	-0.4%	0.2%	0.2%	

*Tabella 11: Valori per il calcolo della cristallinità delle prove ripetute (6%CNF giorno1)*

Hot plate day 1	Amilomaize 6% CNF prova 1	Amilomaize 6% CNF prova 2	Amilomaize 6% CNF prova 3	Valore medio
-----------------	---------------------------	---------------------------	---------------------------	--------------

Va	19492	18010	23679	
Vb	4528	5026	4479	
$Xc=Vb/(Vb+Va)$	18.9%	21.8%	15.9%	18.9%
Errore medio	0.0%	3.0%	-3.0%	
Hot plate	Maize 6% CNF prova 1	Maize 6% CNF prova 2	Maize 6% CNF prova 3	Valore medio
Va	23357	22703	34894	
Vb	5309	5757	6231	
$Xc=Vb/(Vb+Va)$	18.5%	20.2%	15.2%	18.0%
Errore medio	0.6%	2.3%	-2.8%	
Hot plate	Waxy Maize 6% CNF prova 1	Waxy Maize 6% CNF prova 2	Waxy Maize 6% CNF prova 3	Valore medio
Va	21350	21619	22710	
Vb	5839	4515	4226	
$Xc=Vb/(Vb+Va)$	21.5%	17.3%	15.7%	18.1%
Errore medio	3.3%	-0.9%	-2.5%	

Tabella 12: Valori per il calcolo della cristallinità delle prove ripetute (2%CNF giorno 7)

Hot plate day 7	Amilomaize 2% CNF prova 1	Amilomaize 2% CNF prova 2	Amilomaize 2% CNF prova 3	Valore medio
Va	22917	19344	20846	
Vb	5033	6078	5335	
$Xc=Vb/(Vb+Va)$	18.0%	23.9%	20.4%	20.8%
errore medio	-2.8%	3.1%	-0.4%	
Hot plate	Maize 2% CNF prova 1	Maize 2% CNF prova 2	Maize 2% CNF prova 3	Valore medio
Va	28398	27451	44778	
Vb	6257	5631	6445	
$Xc=Vb/(Vb+Va)$	18.1%	17.0%	12.6%	15.9%
Errore medio	2.2%	1.1%	-3.3%	
Hot plate	Waxy Maize 2% CNF prova 1	Waxy Maize 2% CNF prova 2	Waxy Maize 2% CNF prova 3	Valore medio
Va	30493	29565	30622	
Vb	6128	6956	8031	
$Xc=Vb/(Vb+Va)$	16.7%	19.0%	20.8%	18.9%
Errore medio	-2.1%	0.2%	1.9%	

Tabella 13: Valori per il calcolo della cristallinità delle prove ripetute (6%CNF giorno 7)

Hot plate day 1	Amilomaize 6% CNF- prova 1	Amilomaize 6% CNF prova 2	Amilomaize 6% CNF prova 3	Valore medio
Va	23363	20968	21210	
Vb	7196	5924	5689	
$Xc=Vb/(Vb+Va)$	23.5%	22.0%	21.1%	22.2%
Errore medio	1.3%	-0.2%	-1.1%	

Hot plate	Maize 6% CNF prova 1	Maize 6% CNF -P2	Maize 6% CNF -P3	Valore medio
Va	35408	32696	35257	
Vb	10259	9648	10393	
$X_c = V_b / (V_b + V_a)$	22.5%	22.8%	22.8%	22.7%
Errore medio	-0.2%	0.1%	0.1%	
Hot plate	Waxy-Maize 6% CNF prova 1	Waxy-Maize 6% CNF prova 2	Waxy-Maize 6% CNF prova 3	Valore medio
Va	30887	28854	30557	
Vb	8197	8557	8337	
$X_c = V_b / (V_b + V_a)$	21.0%	22.9%	21.4%	21.8%
Errore medio	-0.8%	1.1%	-0.3%	

L'errore medio ottenuto con questa tecnica è per la maggior parte dei campioni del ~3%, questo valore è superiore alle differenze che si osservano tra i campioni con diverse percentuali di cellulosa (CNC e CNF), rendendo questa tecnica sperimentale poco utile nel nostro caso, dove si vuole trovare una correlazione tra percentuale di cellulosa nell'amido e la retrogradazione.

#### 4.2.4 PRINCIPAL COMPONENT ANALYSIS (PCA) DEGLI SPETTRI RAMAN

La PCA viene calcolata tramite la funzione *pca* di Matlab alla quale viene passata la matrice degli spettri. Dove le righe sono i diversi campioni di amido e lungo le colonne si ha l'intensità dello spettro. Per evitare le interferenze del vetrino che si presentano dopo i 1000  $\text{cm}^{-1}$  di Raman shift, si prendono in considerazione solo i valori tra 350  $\text{cm}^{-1}$  e 1000  $\text{cm}^{-1}$ .

Dai valori del vettore della varianza spiegata dalle diverse componenti principali vediamo che le più importanti sono le prime due, con varianza percentuale del 90% la prima e dell'8% la seconda; tramite solo le prime due componenti si può descrivere in maniera abbastanza precisa il sistema.

Prendendo dalla matrice degli score le prime due colonne e diagrammando la prima sull'asse delle x e la seconda sull'asse y è possibile ottenere uno score plot.

Gli score plot ci permettono di capire quali campioni hanno più somiglianze e quali si comportano diversamente. In questi grafici si possono individuare dei cluster, cioè gruppi di campioni che si comportano in maniera simile.

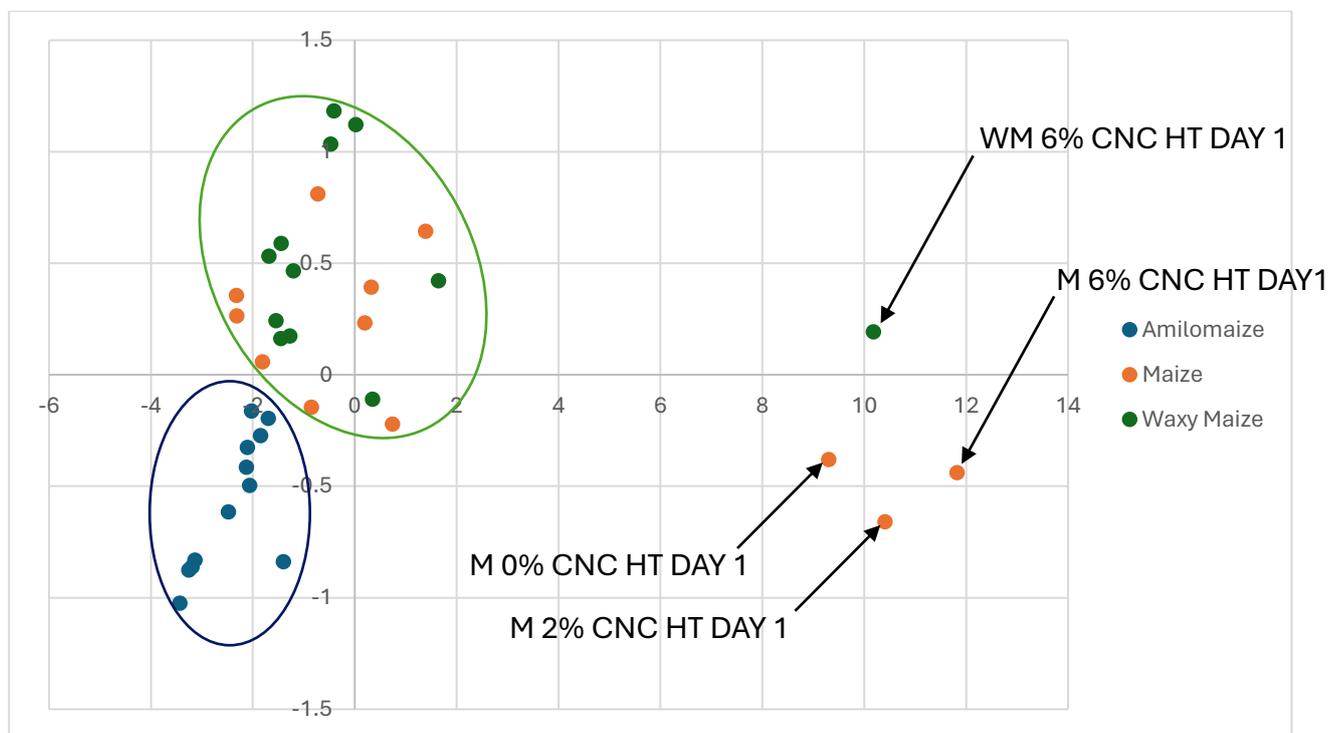


Figura 22: score plot dei campioni con i nano cristalli

Nello score plot è possibile visualizzare due possibili grandi cluster il primo è quello in blu formato da campioni tutti di Amilomaize, il secondo è cerchiato di verde che è composto da campioni di Maize e Waxy Maize. Sono di particolare interesse i campioni al di fuori dei cluster, che quindi differiscono maggiormente dal resto del dataset. Per comprendere queste differenze possiamo confrontare i parametri dei picchi dei campioni al di fuori del cluster con uno o più campioni dentro il cluster:

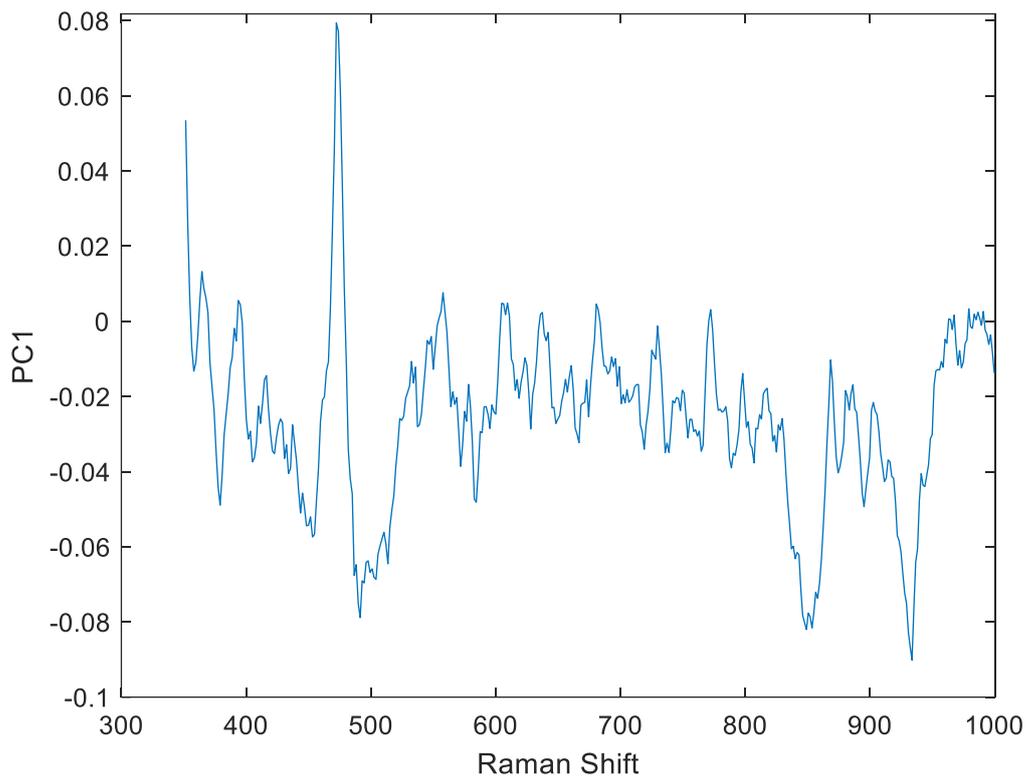
Tabella 14: Confronto tra campioni dentro e fuori il cluster

Hot plate	FWHM 1	Area 1	Intensità relativa dei picchi
Maize 0% CNC DAY1	18.29	22.96	0.57
Maize 2% CNC DAY1	18.67	22.61	0.53
Maize 6% CNC DAY1	19.02	22.29	0.58

Waxy Maize 6% CNC DAY1	19.53	24.02	0.57
Esempio di campione nel cluster	16.09	20.78	0.52

I campioni esterni al cluster vengono analizzati tramite l'analisi dei picchi (nell'intensità relativa, la FWHM e l'area del picco) e confrontati con un campione di riferimento che viene preso dal cluster. I tre parametri delle prove in questione sono prossimi ai massimi osservati di tutte le prove. I campioni fuori dal cluster hanno quindi valori molto alti dei parametri d'interesse. Queste differenze potrebbero essere dovute alla variabilità dei campioni, i parametri infatti variano in base a dove vengono analizzati come si osserva nelle prove ripetute.

La seconda analisi svolta tramite PCA è quella che riguarda le zone di interesse dello spettro Raman. Viene calcolata la prima componente principale come il prodotto tra la matrice dei coefficienti e la matrice degli score trasposta, la prima colonna viene diagrammata con il Raman shift. In questo modo si ottiene un grafico dove sono presenti dei picchi che indicano i valori di Raman shift di maggiore interesse per l'analisi degli spettri (Fig.23).



*Figura 23: Analisi del Raman shift (PCA)*

I picchi trovati sono quelli più spesso citati in letteratura ( $480\text{ cm}^{-1}$  e  $865\text{ cm}^{-1}$ ), il terzo picco a  $930\text{ cm}^{-1}$  anch'esso interessante, ma poco correlato alla retrogradazione.

### 4.3. ANALISI PROVE SMALL ANGLE X-RAY SCATTERING (SAXS)

I grafici SAXS sono stati processati su Origin 2018 64Bit per avere una migliore visualizzazione dei picchi.

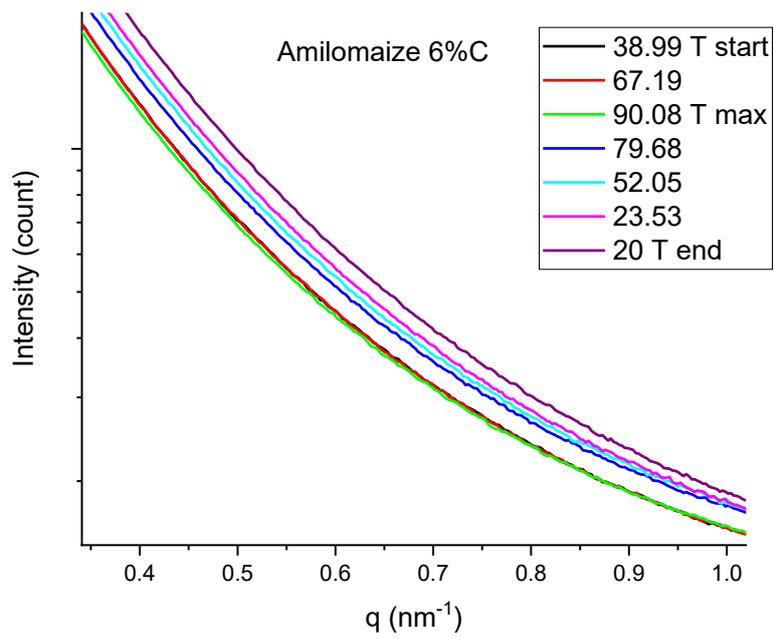


Figura 24: Diffattogrammi del processo di gelificazione dell'Amilomaize 6%CNC

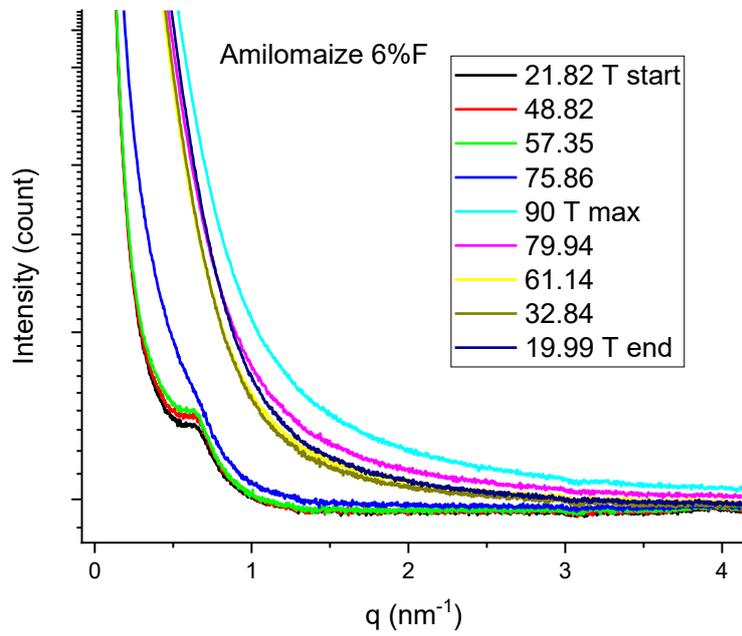


Figura 25: Diffattogrammi del processo di gelificazione dell'Amilomaize 6%CNF

Secondo l'analisi dei diffrattogrammi SAXS, i campioni possono essere divisi in due gruppi:

1. Campioni che presentano un unico picco a  $0,7 \text{ nm}^{-1}$ : Amilomaize 6%F, Waxy Maize 6%F, Maize 6%F e Maize 0%.  
(F=nano fibrille di cellulosa batterica)
2. Campioni che non presentano picchi.

Il picco a  $0,7 \text{ nm}^{-1}$  è dovuto teoricamente alla struttura lamellare dei granuli di amido<sup>18</sup>.

I campioni sono sottoposti a un processo termico:

- Riscaldamento a  $10^\circ\text{C}/\text{min}$
- Mantenimento a  $90^\circ\text{C}$  per 5 minuti
- Raffreddamento a  $10^\circ\text{C}/\text{min}$

Il diffrattogramma di partenza a  $20^\circ\text{C}$  (fig.25) è quello che in genere nei campioni evidenzia un picco a  $0,7 \text{ nm}^{-1}$  più intenso, dovuto all'elevato ordine strutturale dell'amido. Avvicinandosi alla temperatura di gelificazione (che è leggermente diversa per ogni tipologia di amido), la struttura lamellare inizia rompersi e di conseguenza l'intensità del picco diminuisce fino a scomparire nel diffrattogramma a  $75,86^\circ\text{C}$  come vediamo in figura 25. Questo è indice della gelatinizzazione della sospensione che è stata sottoposta al processo termico.

I dati del SAXS sono stati elaborati tramite la funzione `pca` di Matlab R2021b. Dal vettore `explained` è possibile capire quante componenti principali considerare. Nel caso dei dati SAXS la varianza delle componenti principali è contenuta nella

maggior parte nella prima componente. Si è andato a diagrammare così il primo score con il tempo nel quale avviene la prova.

Si ottengono i seguenti grafici:

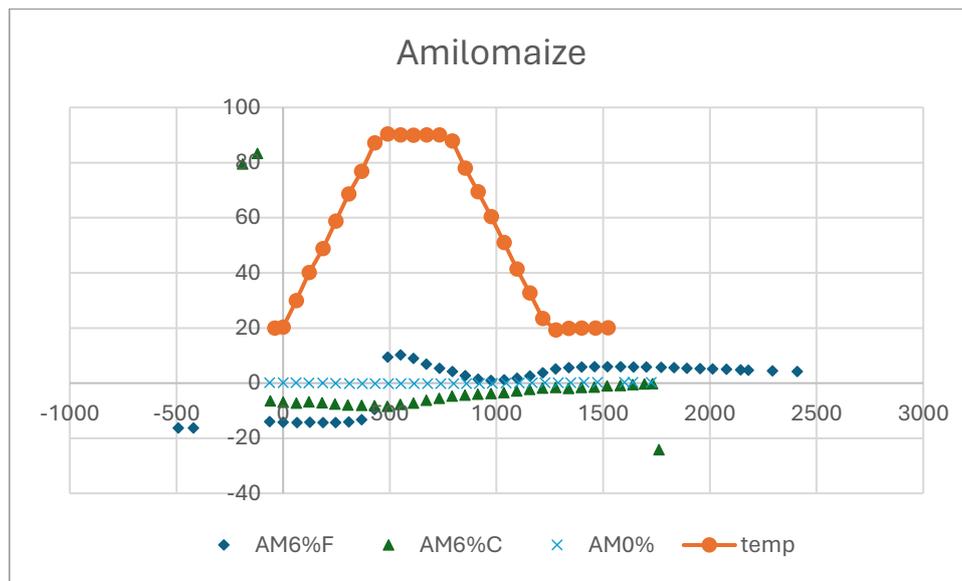


Figura 26: pca SAXS Amilomaize

Le variazioni dei diffrattogrammi del Amilomaize sono molto basse, praticamente nulle per il campione allo 0% e al 6% di nano cristalli. Il campione con il 6% di nano fibrille mostra delle variazioni in corrispondenza della temperatura di gelatinizzazione, dove il picco visto precedentemente a  $0.7 \text{ nm}^{-1}$  inizia ad appiattirsi per la rottura della struttura lamellare dell'amido.

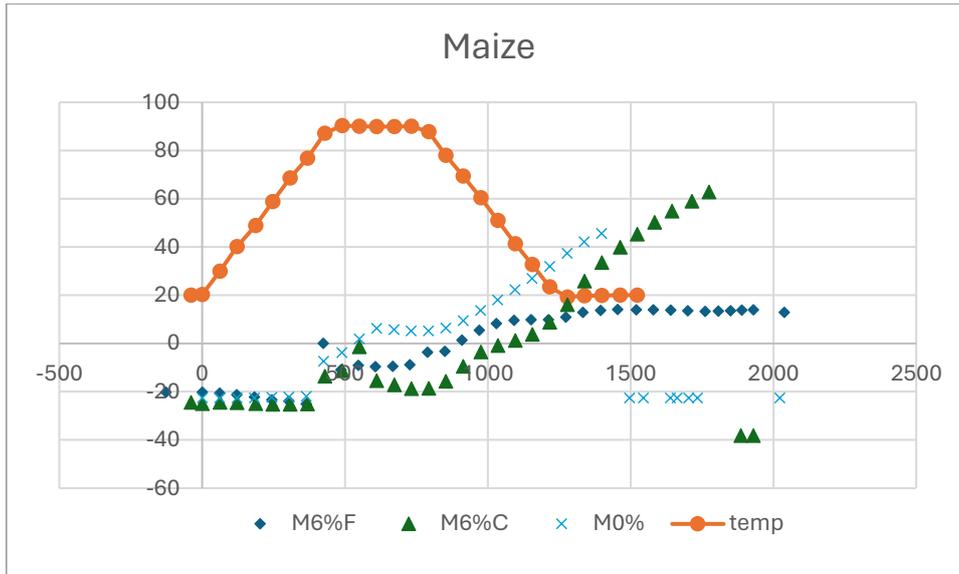


Figura 27: pca SAXS Maize

Dall'analisi PCA dei diffrattogrammi SAXS, i campioni di Maize hanno più evidenti variazioni successive alla temperatura di gelificazione (circa 70°C), che non sono dovuti alla variazione di picchi. Sarebbe necessaria un'analisi più approfondita e una conoscenza specifica del comportamento di questi campioni durante un esperimento SAXS"

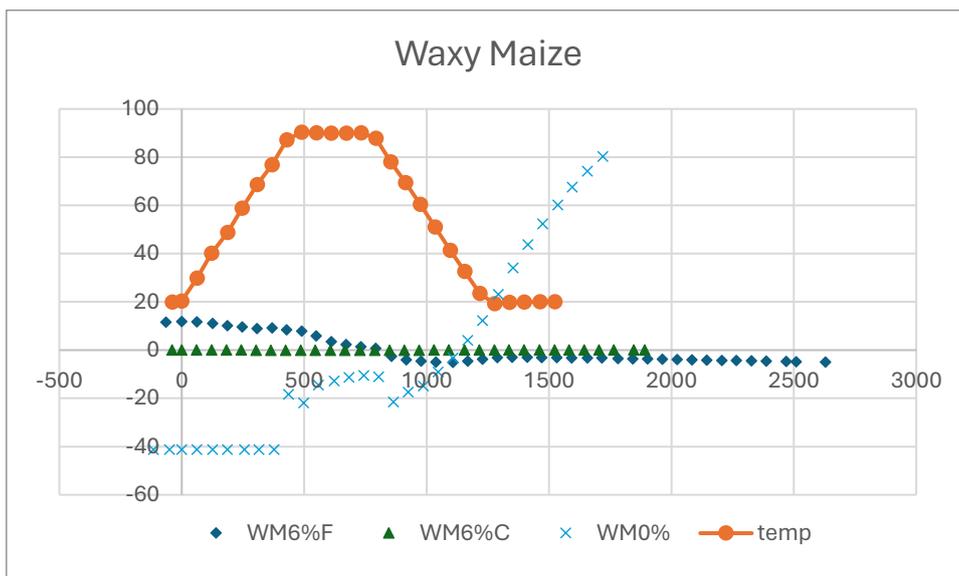


Figura 28: pca SAXS Waxy Maize

Nel caso del Waxy Maize si hanno pochissime variazioni nel campione al 6% di nano cristalli.

Mentre quello al 6% di nano fibrille mostra delle piccole variazioni dovute al processo di gelificazione e quindi alla perdita del picco a  $0.7 \text{ nm}^{-1}$ , dovuto alla struttura lamellare di amido che va rompendosi durante la formazione del gel.

Il campione di Waxy Maize senza cellulosa mostra una certa variazione successiva alla temperatura di gelificazione. Si ha anche un'ampia variazione dei dati analizzati con la PCA durante il raffreddamento. Come per il Maize queste variazioni non sono attribuibili a variazioni dei picchi. Sarebbe necessaria un'analisi più approfondita e una conoscenza specifica del comportamento di questi campioni durante un esperimento SAXS"

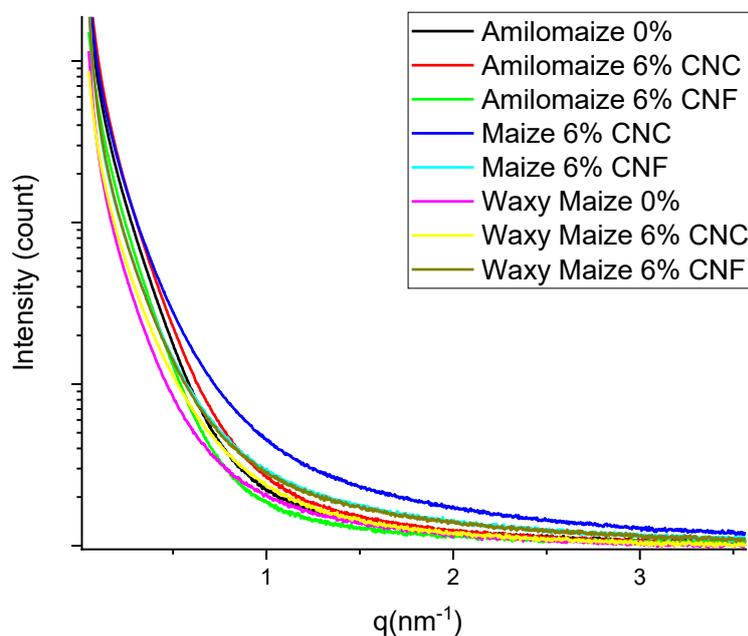


Figura 29: prove SAXS dopo 7 giorno dalla gelificazione

Dalla figura 26 è possibile osservare che i campioni di gel al giorno 7 non presentano picchi visibili nella zona del SAXS, non essendo più visibile il picco a  $0.7 \text{ nm}^{-1}$  caratteristico della struttura lamellare dei granuli di amido, come per gli

altri campioni SAXS appena gelificati. Sono presenti diversi andamenti nella curvatura dei diffrattogrammi, che potrebbero evidenziare differenze strutturali nel gel.

#### 4.4. ANALISI PROVE WIDE ANGLE X-RAY SCATTERING (WAXS)

I diffrattogrammi WAXS sono stati processati per ottenere dei dati che non fossero influenzati dalla acqua presente nel campione. Il segnale dell'acqua è stato sottratto tramite uno script MATLAB, che calcola con un'interpolazione lineare il diffrattogramma dell'acqua alla temperatura di misura effettuata dal WAXS sull'amido. Successivamente viene fatto uno smoothing e una derivata prima del segnale 2018 64Bit così da avere dei dati confrontabili tra loro. I campioni che inizialmente sono una sospensione di amido e cellulosa in acqua sono sottoposti ad un processo termico per gelificare:

- Riscaldamento a 10°C/min
- Mantenimento a 90°C per 5 minuti
- Raffreddamento a 10 °C/min fino a 20°C

I campioni appaiono tutti molto simili tra loro, soprattutto in corrispondenza dei picchi d'interesse:

Esempio prova WAXS con sottrazione dell'acqua, smooth e derivata prima

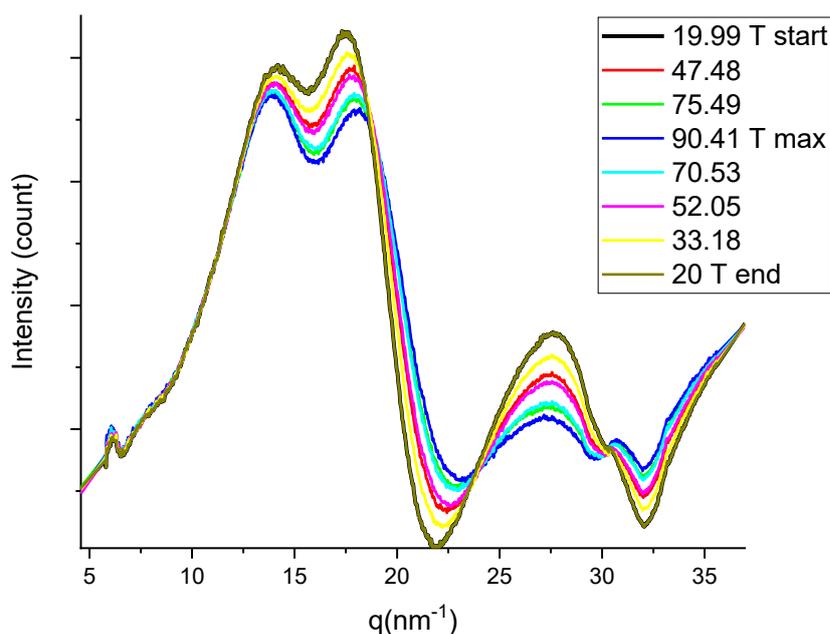


Figura 30: Esempio di prova WAXS processata

Analizzando i picchi si osserva che ci sono delle variazioni di intensità associate alla variazione di temperatura. Nella figura 31 e 32 possiamo vedere degli ingrandimenti dei diffrattogrammi riportati in figura 30. L'intensità generale dei picchi diminuisce fino al raggiungimento della temperatura massima a 90°C, durante la fase di raffreddamento questa tende nuovamente ad aumentare fino a ritornare al valore iniziale. Dall'analisi di tutti i campioni, le differenze tra l'intensità iniziale e finale sono molto piccole o addirittura nulle. Queste variazioni, quindi possono essere attribuite al processo termico e non ad eventuali modifiche strutturali del materiale.

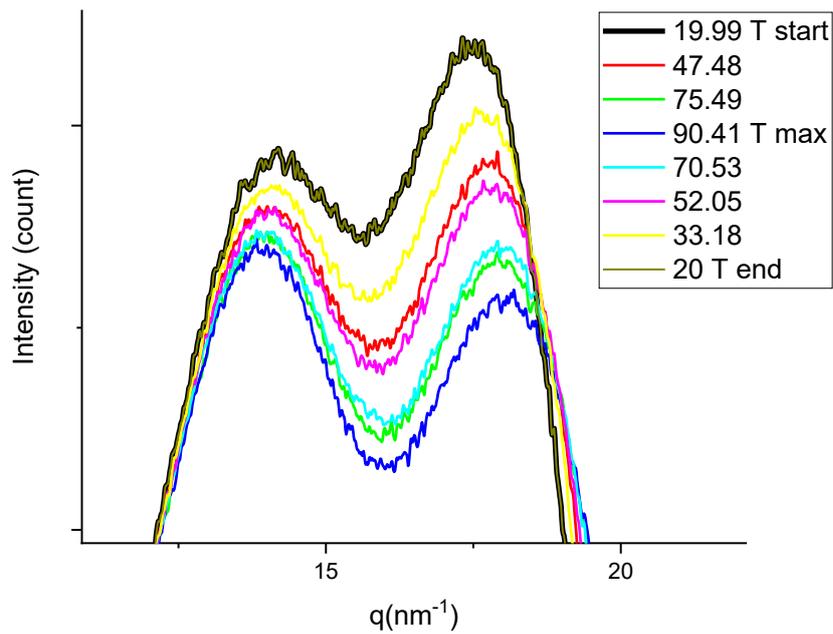


Figura 31: Ingrandimento dei picchi prova WAXS1

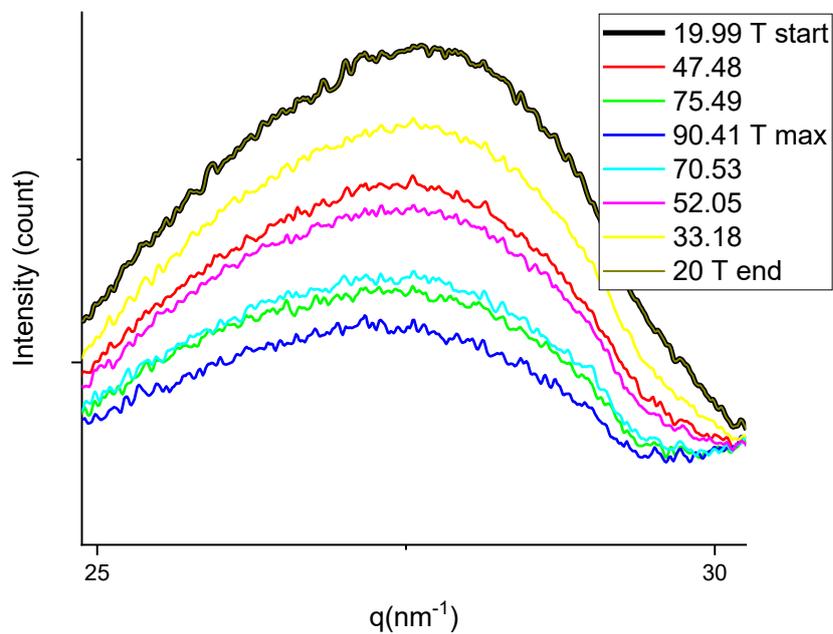


Figura 32: Ingrandimento dei picchi prova WAXS2

I dati del WAXS vengono elaborati tramite PCA. Nel caso dei dati WAXS la maggior parte della varianza è contenuta nella prima componente principale, questo

viene visualizzato tramite il vettore explained, dal quale possiamo osservare dove sono contenute le maggiori informazioni riguardati i nostri dati.

Si è andato a diagrammare il primo score con il tempo nel quale avviene la prova.

Si ottengono i seguenti grafici:

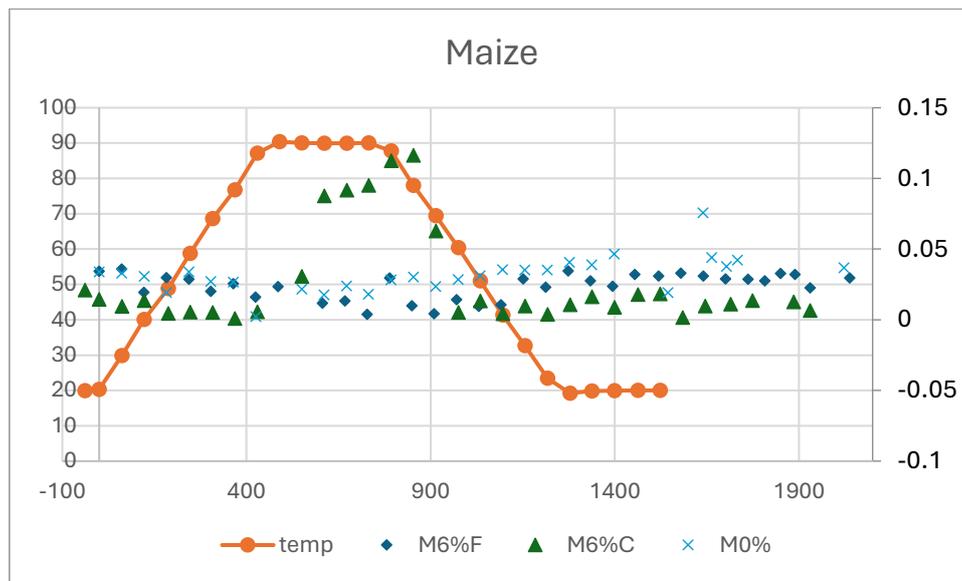


Figura 33: PCA prove WAXS dei campioni Maize

I campioni di Maize senza cellulosa e con le nano fibrille (CNF) hanno delle variazioni trascurabili, mentre quello con i nano cristalli (CNC) ha delle variazioni che sono riconducibili al processo termico per la gelatinizzazione, non appena si ritorna alla temperatura di partenza queste variazioni sono minime.

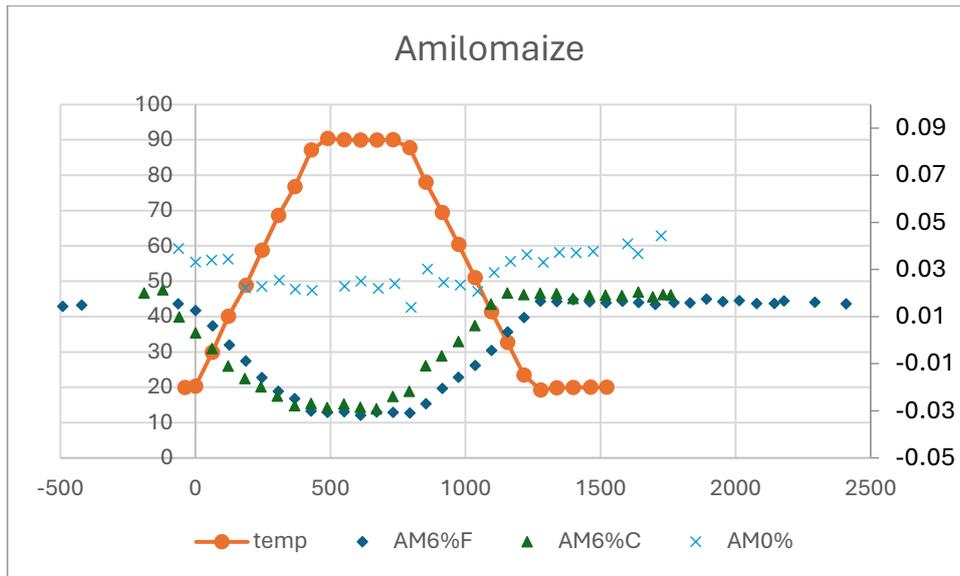


Figura 34: PCA prove WAXS dei campioni Amilomaize

I campioni di Amilomaize senza cellulosa hanno delle variazioni trascurabili. Quelli di Amilomaize con i nano cristalli (CNC) e con le nano fibrille (CNF) ha delle variazioni che anche in questo caso sono riconducibili al processo termico, ritornati alla temperatura di partenza (20°C) queste variazioni sono reversibili.

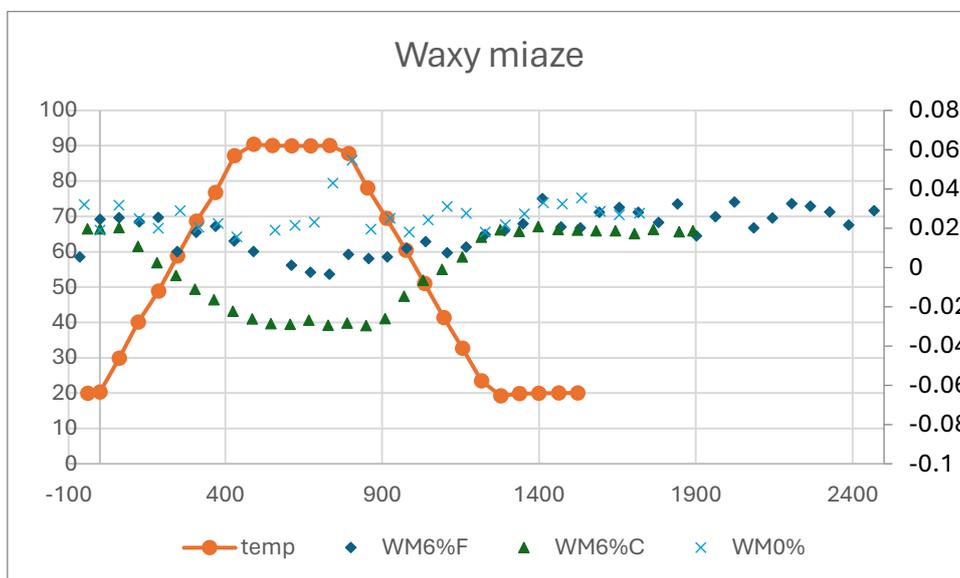


Figura 35: PCA prove WAXS dei campioni Waxy-Maize

In tutti i campioni di Waxy Maize, ci sono delle variazioni che sono riconducibili al processo termico per la gelatinizzazione.

Tramite l'elaborazione dei dati con la PCA si è quindi confermato quello osservato nell'analisi dei picchi, cioè, che le variazioni dei diffrattogrammi WAXS sono dovute al profilo di temperatura applicato e non ci sono variazioni strutturali del campione

La Figura 36 riporta i diffrattogrammi WAXS misurati dopo 7 giorni dal processo di gelificazione.

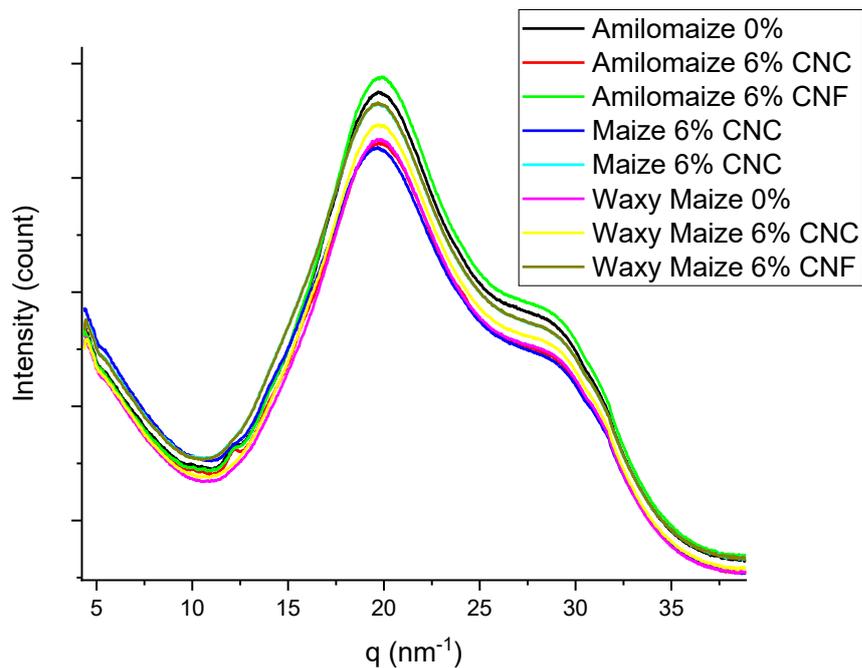


Figura 36: prova WAXS dai campioni dop sette giorni dalla gelificazione

Analizzando il picco a  $20 \text{ nm}^{-1}$  si possono notare delle differenze d'intensità che però sembrano scollegate dalla contrazione di cellulosa o dalla tipologia di amido impiegato.

## 5. CONCLUSIONI

Durante lo studio degli spettri Raman sono state utilizzate diverse tecniche capaci di rilevare possibili interazioni a livello molecolare tra l'amido e la cellulosa (CNC e CNF). Nell'analisi dei picchi sono stati valutati diversi parametri trovati in letteratura.

Dalla analisi della retrogradazione dell'amido, si è riscontrato che le differenze fra spettri Raman misurati in più punti dello stesso campione sono spesso più grandi delle differenze fra campioni diversi. Si è dedotto che, per quanto questi metodi possono essere utili per osservare la retrogradazione, risultano poco precisi per l'analisi dei campioni presi in esame in questo studio. Dall'analisi della cristallinità sembra esserci una relazione tra quest'ultima e il contenuto di cellulosa, i campioni con il 2% di cellulosa risultano essere i più cristallini. Dallo studio delle prove ripetute con le nano fibrille, si è osservato che la variabilità degli spettri misurati sullo stesso campione da questo metodo è maggiore rispetto alle differenze misurate tra i campioni con diverse concentrazioni di cellulosa. Per questo motivo il metodo risulta poco adatto ad osservare le differenze nei campioni in esame.

La principal component analysis (PCA) applicata ai risultati ottenuti tramite spettroscopia è risultata molto più utile dei metodi analitici sia nell'individuare i campioni con le maggiori differenze sia quelli che possiedono un comportamento simile. Tramite PCA sono state studiate le principali variazioni tra gli spettri, andando a comprendere quali fossero le zone di maggiore interesse. L'analisi dei picchi delle prove WAXS non hanno prodotto risultati d'interesse, si osservano solamente delle variazioni dovute all'effetto termico sul campione. Tramite PCA delle prove WAXS si osserva solamente l'effetto termico dovuto al profilo di temperatura utilizzato. Le prove SAXS sono state studiate tramite analisi

dei picchi dove non si sono evidenziate sostanziali interazioni tra la cellulosa e l'amido. Quest'ultime sono state elaborate tramite PCA, in alcuni campioni si sono riscontrate importanti variazioni durante la fase di raffreddamento del processo di gelatinizzazione. Queste variazioni potrebbero essere collegate alla presenza di cellulosa e quindi a fenomeni di interesse.

# APPENDICE A: RACCOLTA SPETTRI RAMAN

Le figure di seguito mostrano gli spettri Raman dei campioni processati

*Campioni al Crystal 16 con i nano cristalli di cellulosa, analizzati al giorno 1*

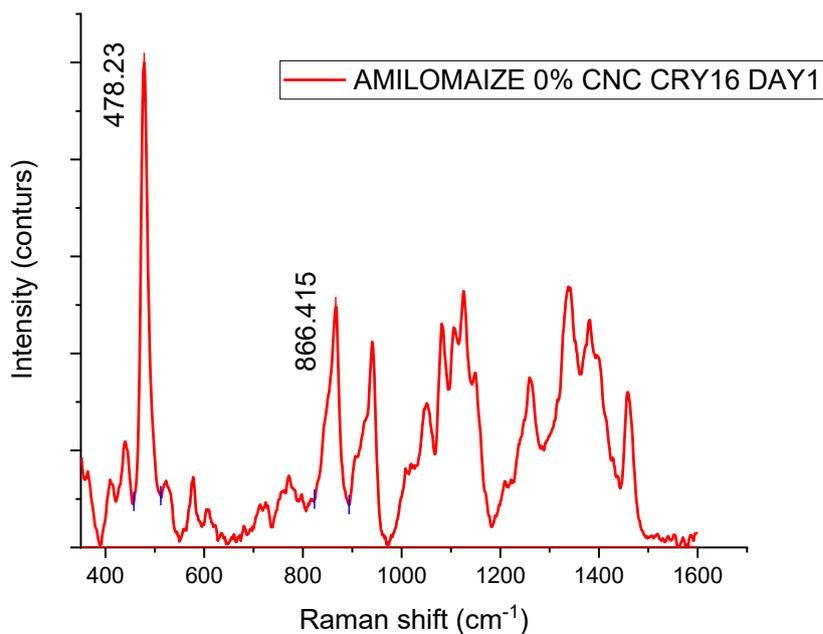


Figura 37: Spettro Amilomaize 0% CNC Crystal16 giorno 1

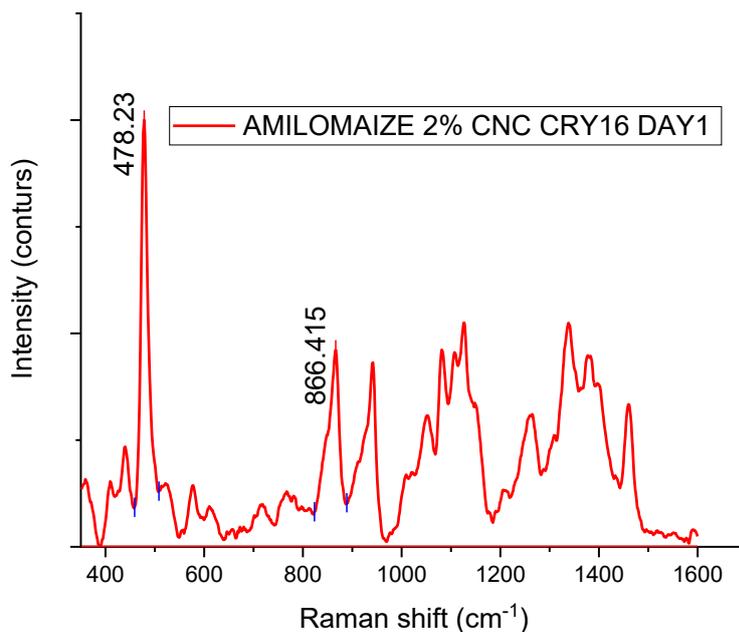


Figura 38: Spettro Amilomaize 2% CNC Crystal16 giorno 1

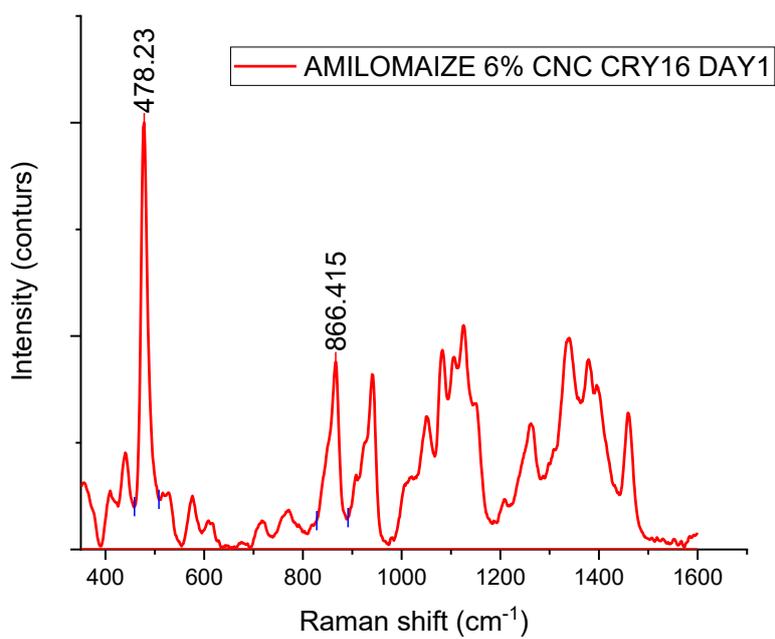


Figura 39: Spettro Amilomaize 6% CNC Crystal16 giorno 1

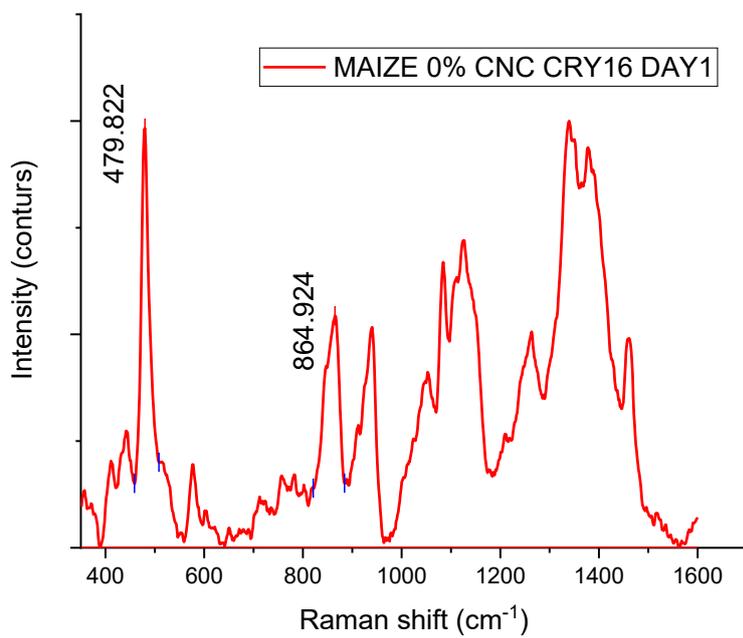


Figura 40: Spettro Maize 0% CNC Crystal16 giorno 1

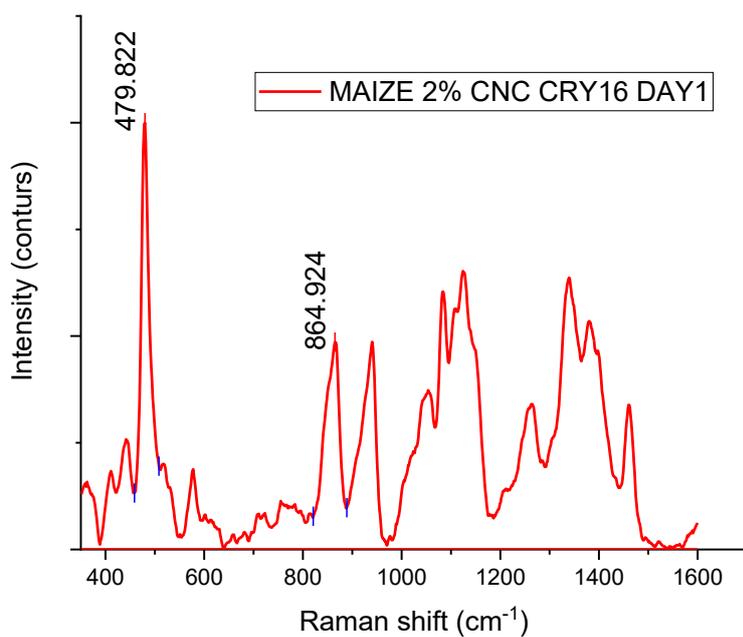


Figura 41: Spettro Maize 2% CNC Crystal16 giorno 1

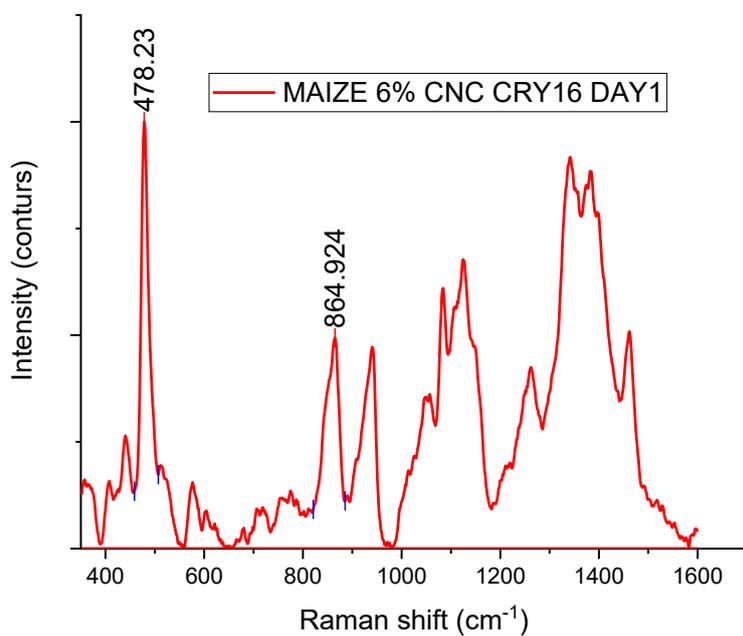


Figura 42: Spettro Maize 6% CNC Crystal16 giorno 1

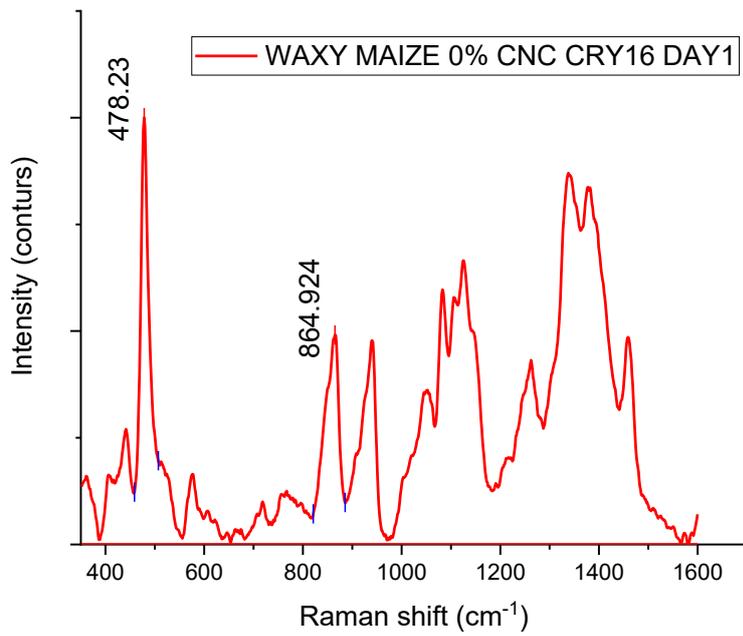


Figura 43: Spettro Waxy Maize 0% CNC Crystal16 giorno 1

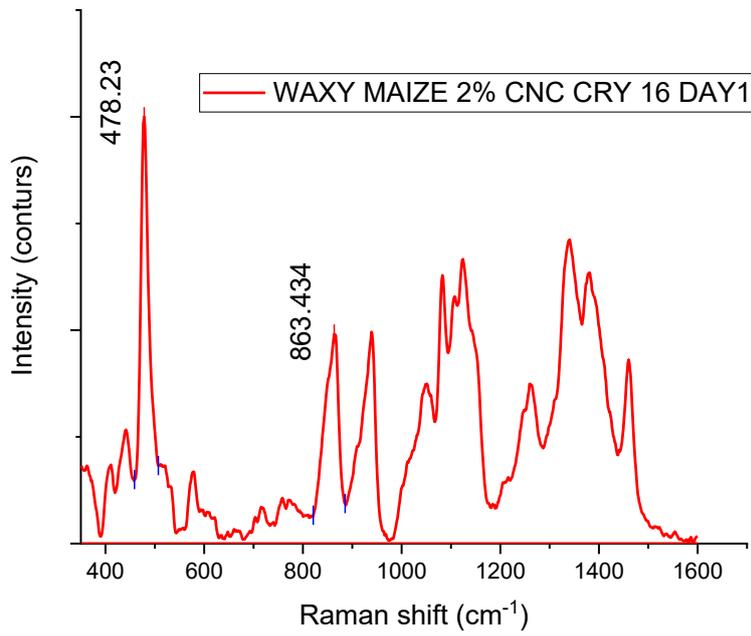


Figura 44: Spettro Waxy Maize 2% CNC Crystal16 giorno 1

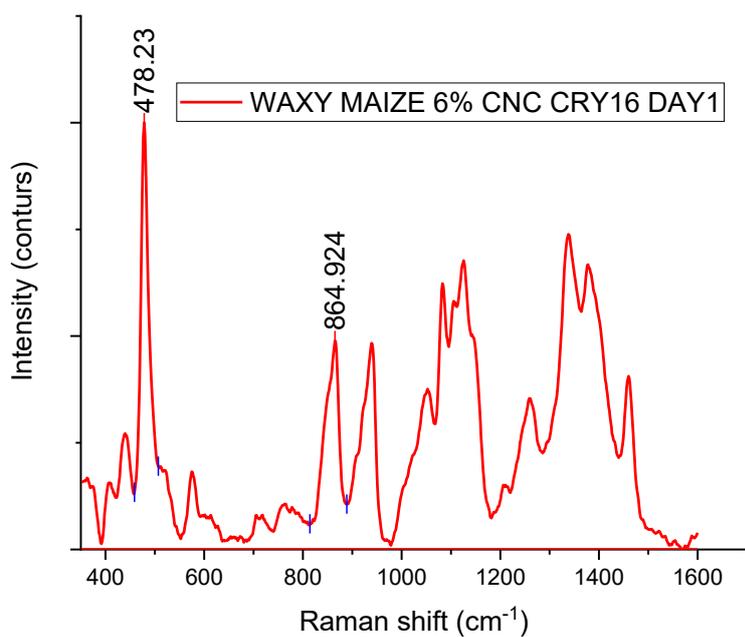


Figura 45:: Spettro Waxy Maize 6% CNC Crystal16 giorno 1

Campioni al hot plate con i nano cristalli di cellulosa analizzati a giorno 1

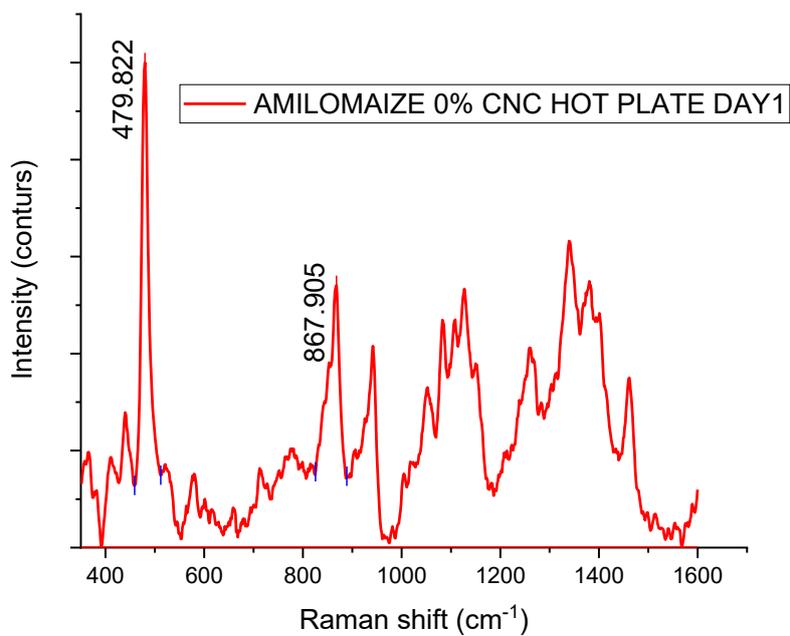


Figura 46: Spettro Amilomaize 0% CNC Hot plate giorno 1

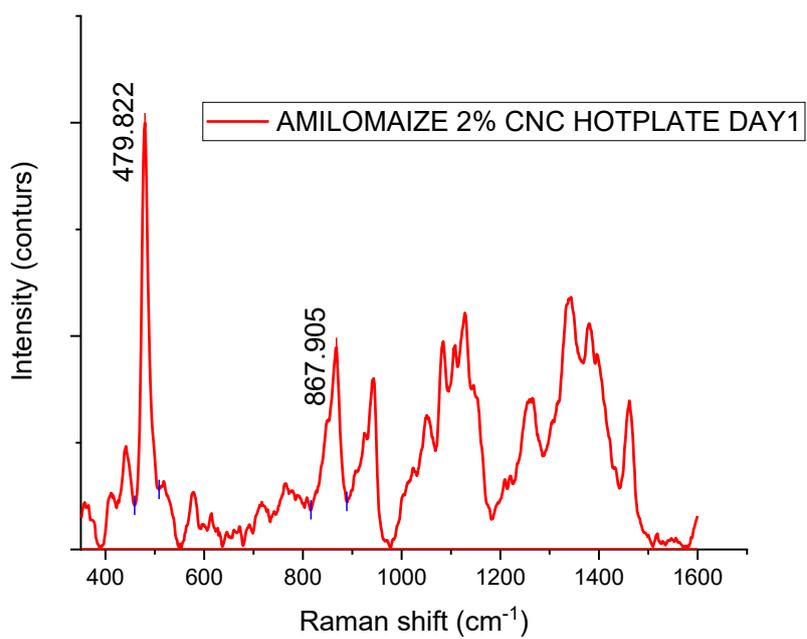


Figura 47: Spettro Amilomaize 2% CNC Hot plate giorno 1

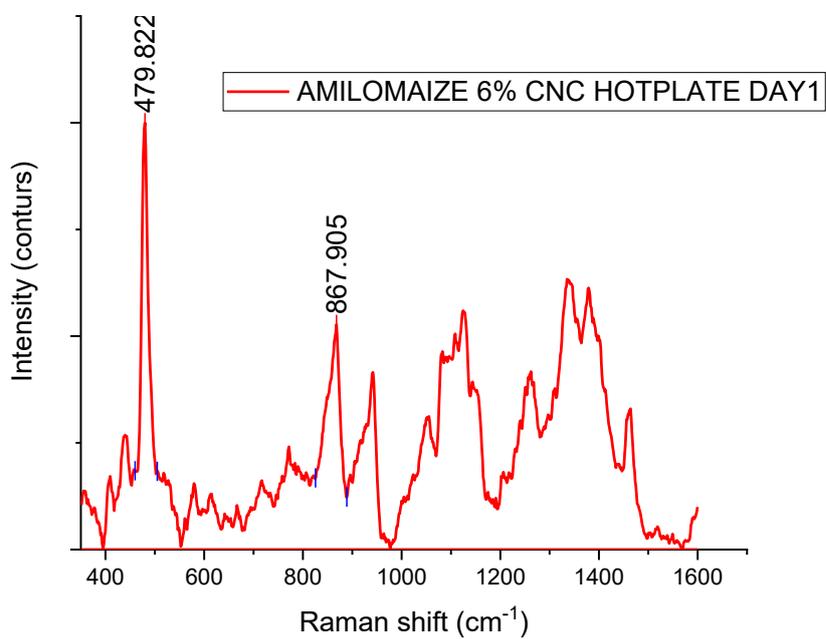


Figura 48: Spettro Amilomaize 6% CNC Hot plate giorno 1

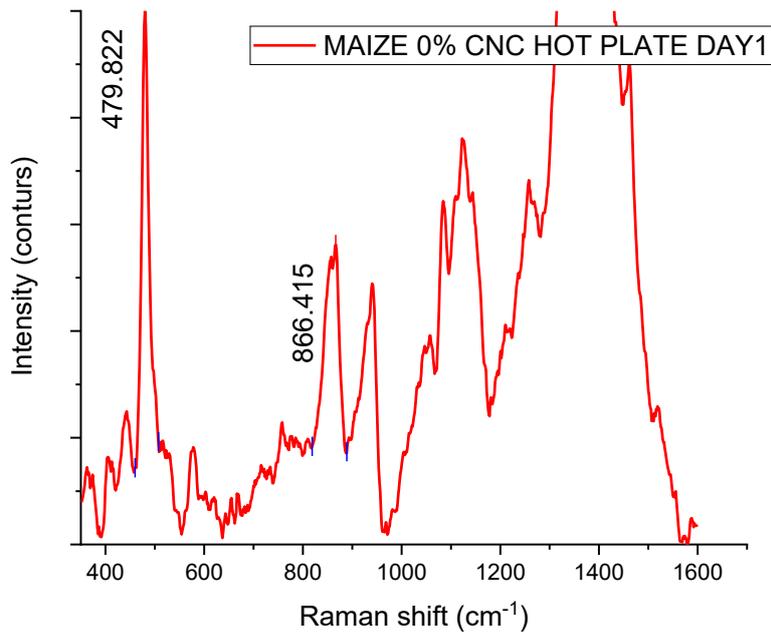


Figura 49: Spettro Maize 0% CNC Hot plate giorno 1

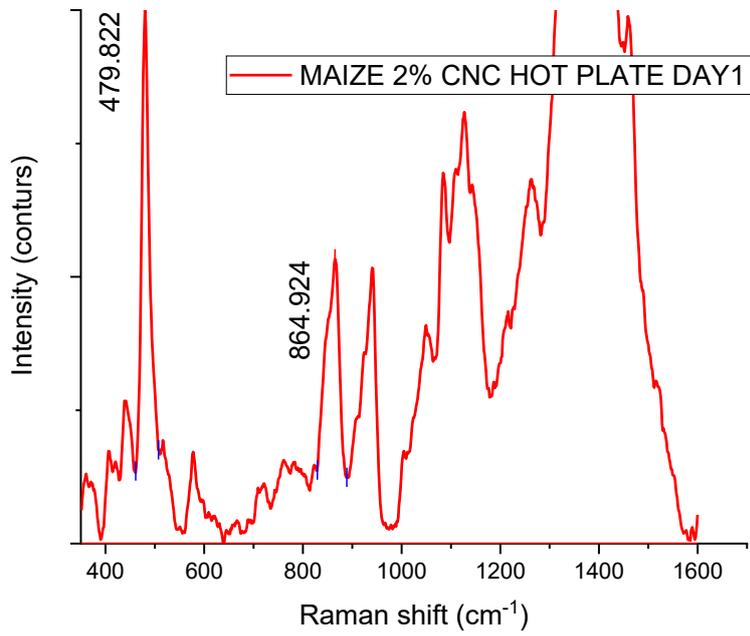


Figura 50: Spettro maize 2% CNC Hot plate giorno 1

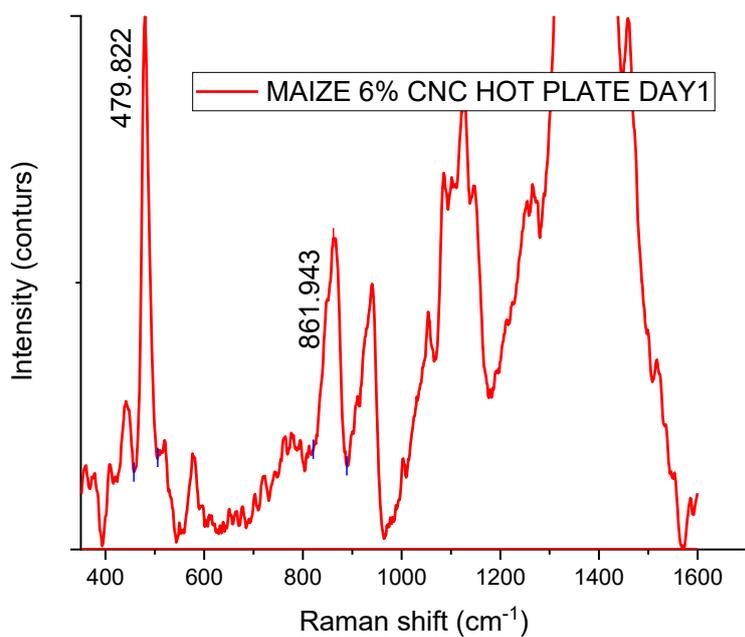


Figura 51: Spettro Maize 6% CNC Hot plate giorno 1

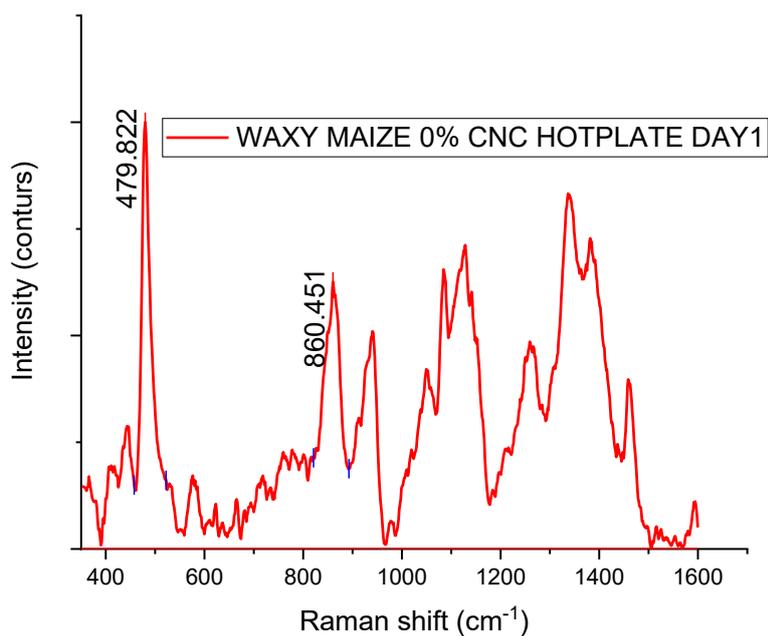


Figura 52: Spettro Waxy Maize 0% CNC Hot plate giorno 1

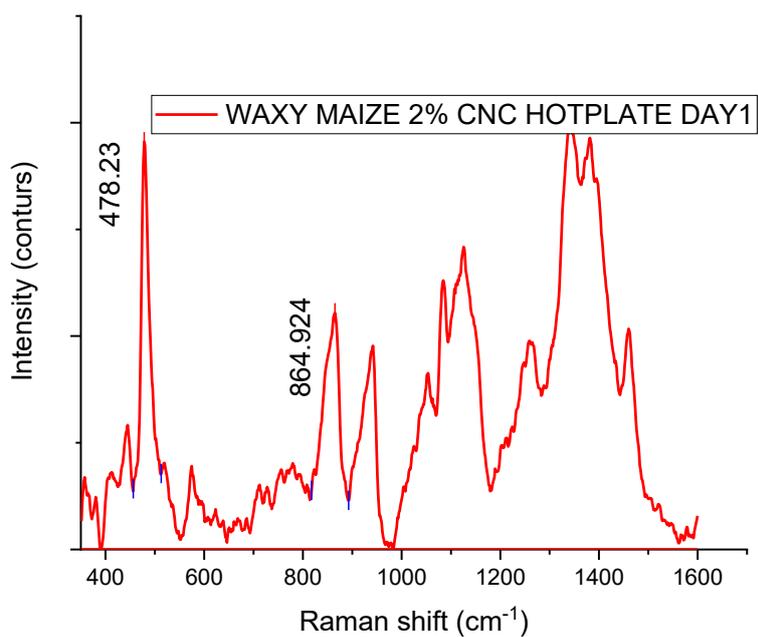


Figura 53: Spettro Waxy Maize 2% CNC Hot plate giorno 1

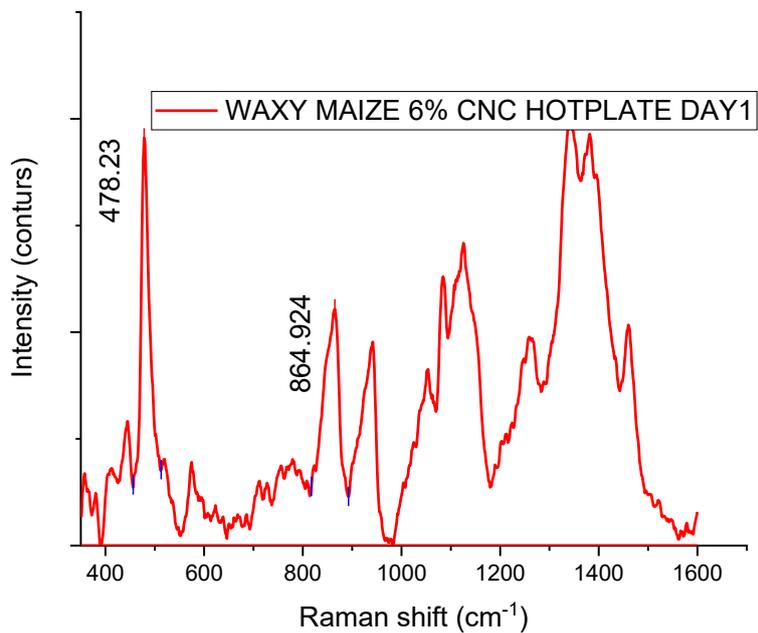


Figura 54: Spettro Waxy Maize 6% CNC Hot plate giorno 1

*Campioni del Crystal 16 con nano cristalli di cellulosa analizzati al giorno 7*

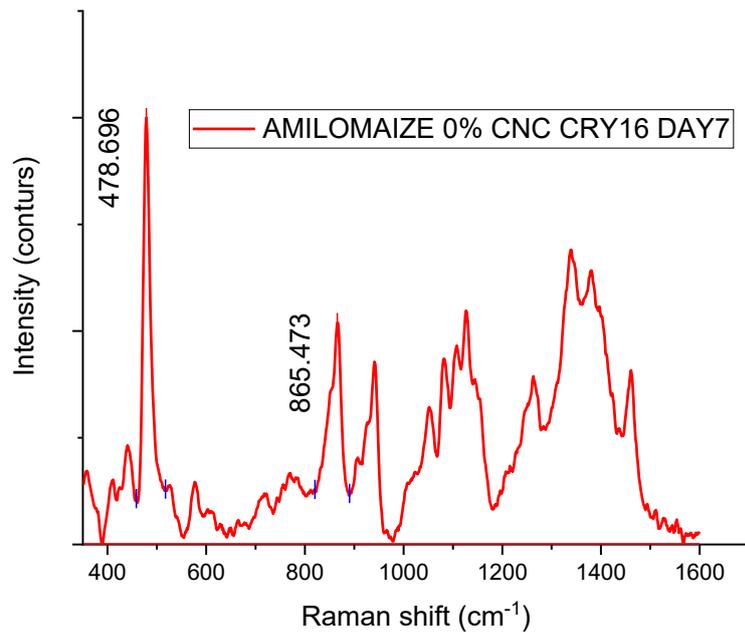


Figura 55: Spettro Amilomaize 0% CNC Crystal 16 giorno 7

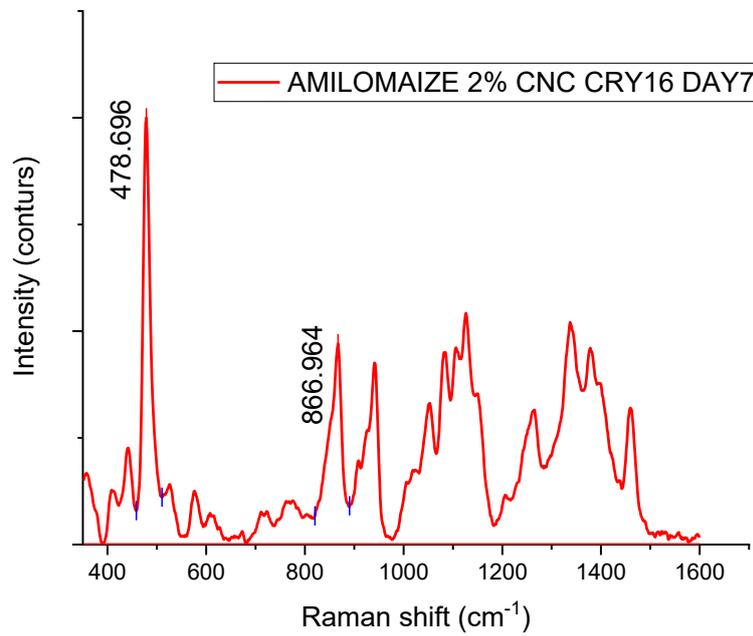


Figura 56: Spettro Amilomaize 2% CNC Crystal 16 giorno 7

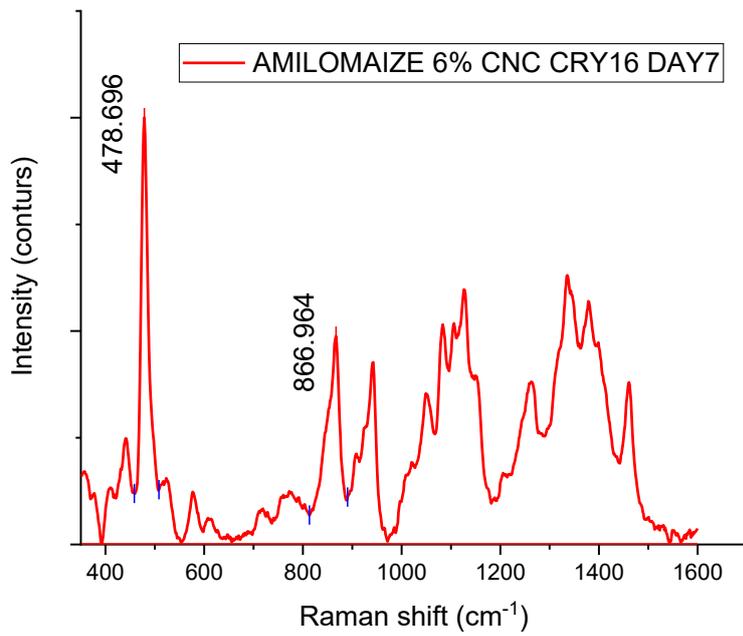


Figura 57: Spettro Amilomaize 6% CNC Crystal 16 giorno 7

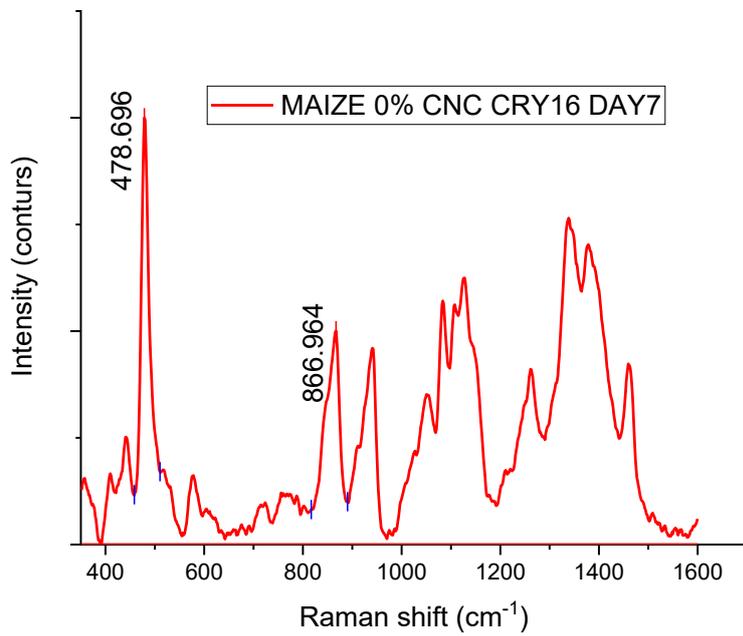


Figura 58: Spettro Maize 0% CNC Crystal 16 giorno 7

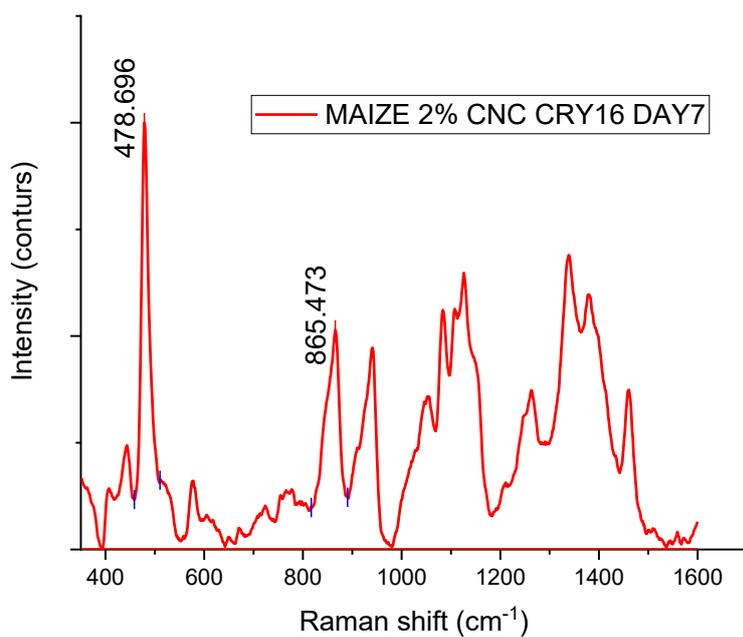


Figura 59: Spettro Maize 2% CNC Crystal 16 giorno 7

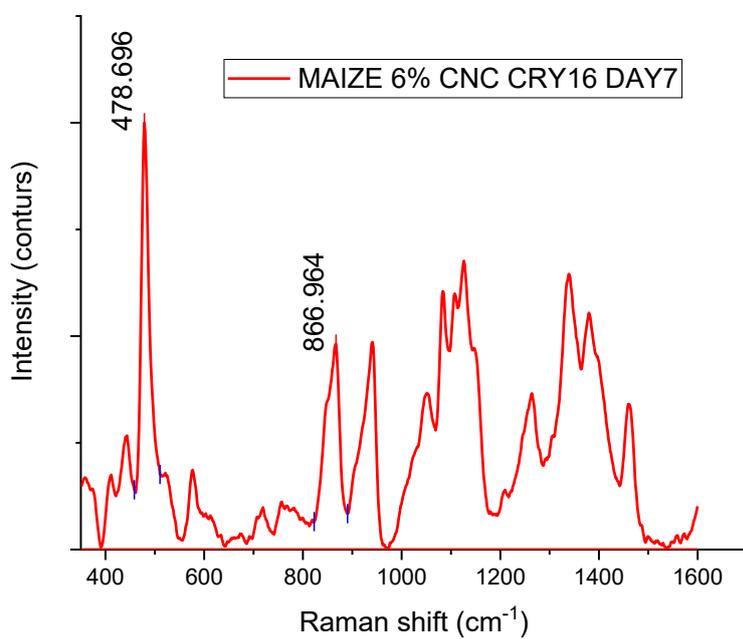


Figura 60: Spettro Maize 6% CNC Crystal 16 giorno 7

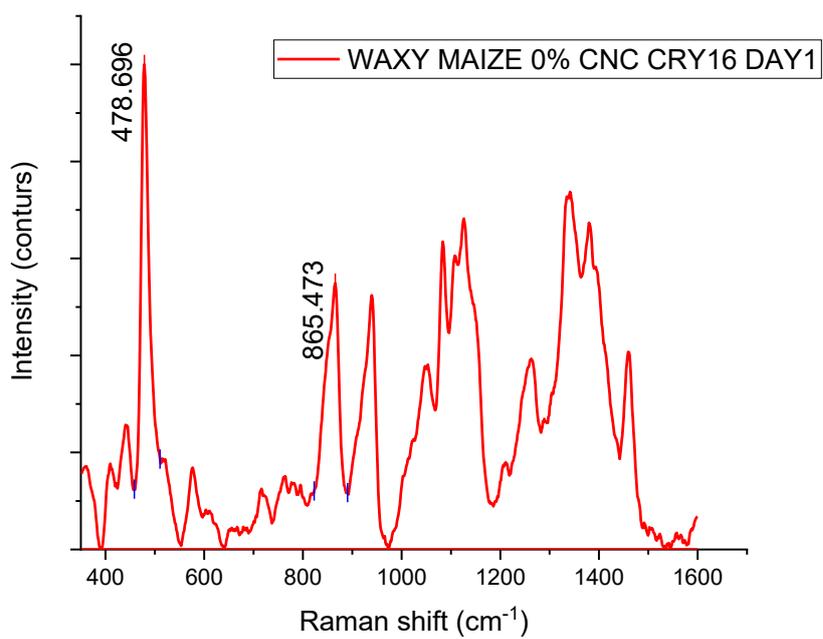


Figura 61: Spettro Waxy Maize 0% CNC Crystal 16 giorno 7

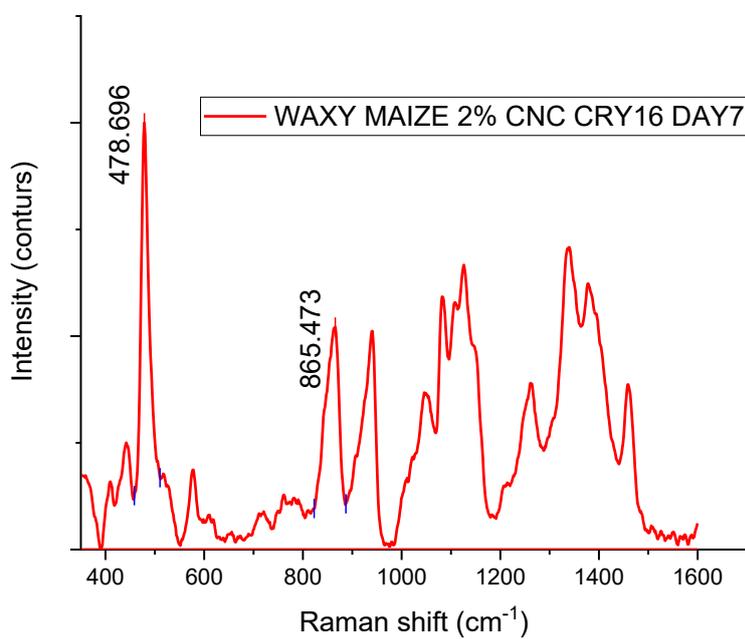


Figura 62: Spettro Waxy Maize 2% CNC Crystal 16 giorno 7

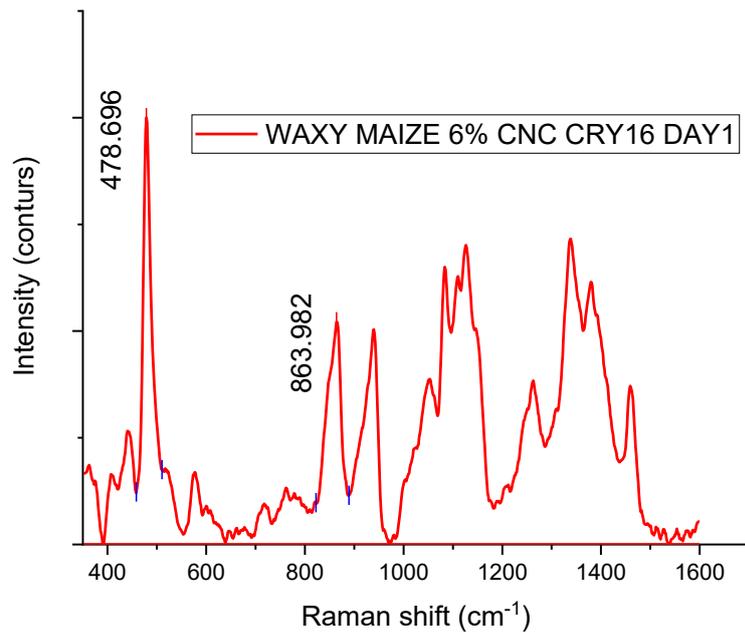
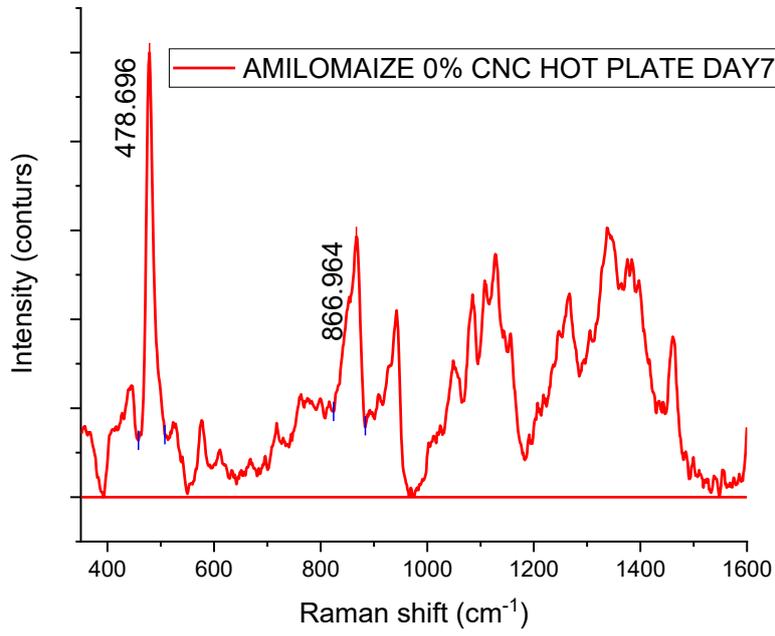
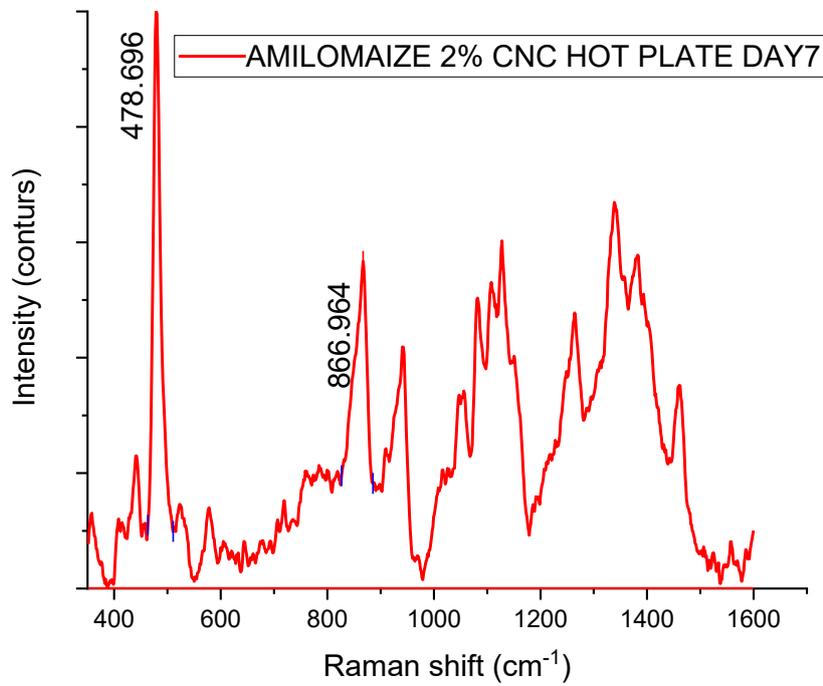


Figura 63: Spettro Waxy Maize 6% CNC Crystal 16 giorno 7

*Campioni al hot plate con nano cristalli di cellulosa analizzati al giorno 7*



*Figura 64: Spettro Amilomaize 0% CNC Hot plate giorno 7*



*Figura 65: Spettro Amilomaize 2% CNC Hot plate giorno 7*

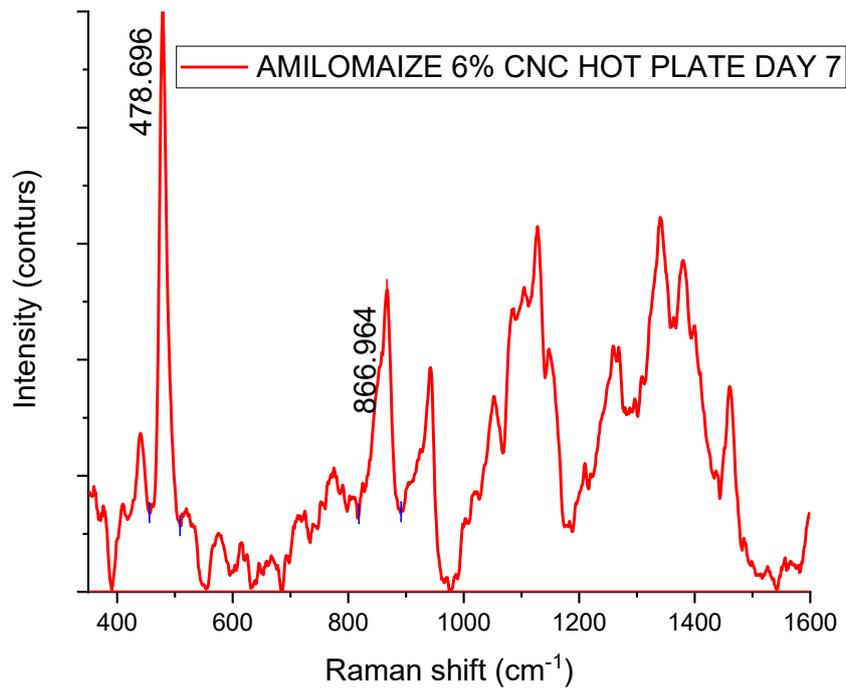


Figura 66: Spettro Amilomaize 6% CNC Hot plate giorno 7

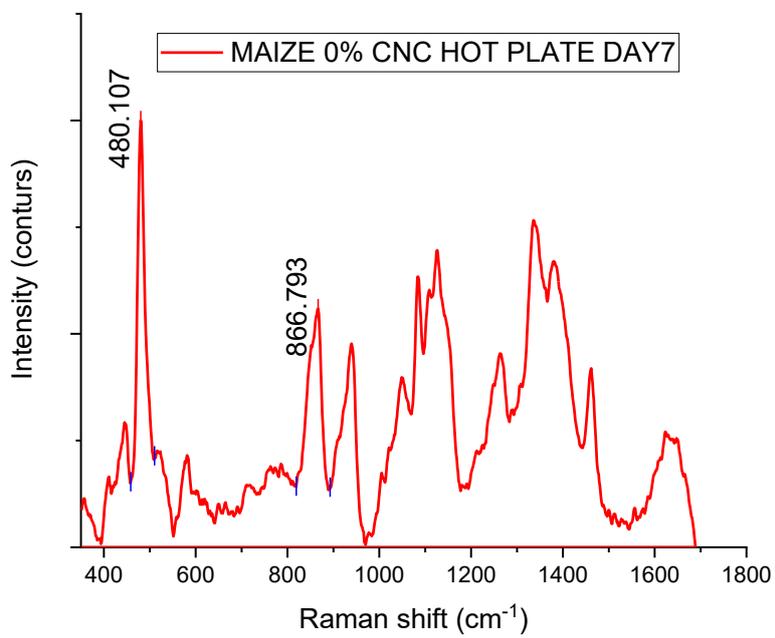


Figura 67: Spettro Maize 0% CNC Hot plate giorno 7

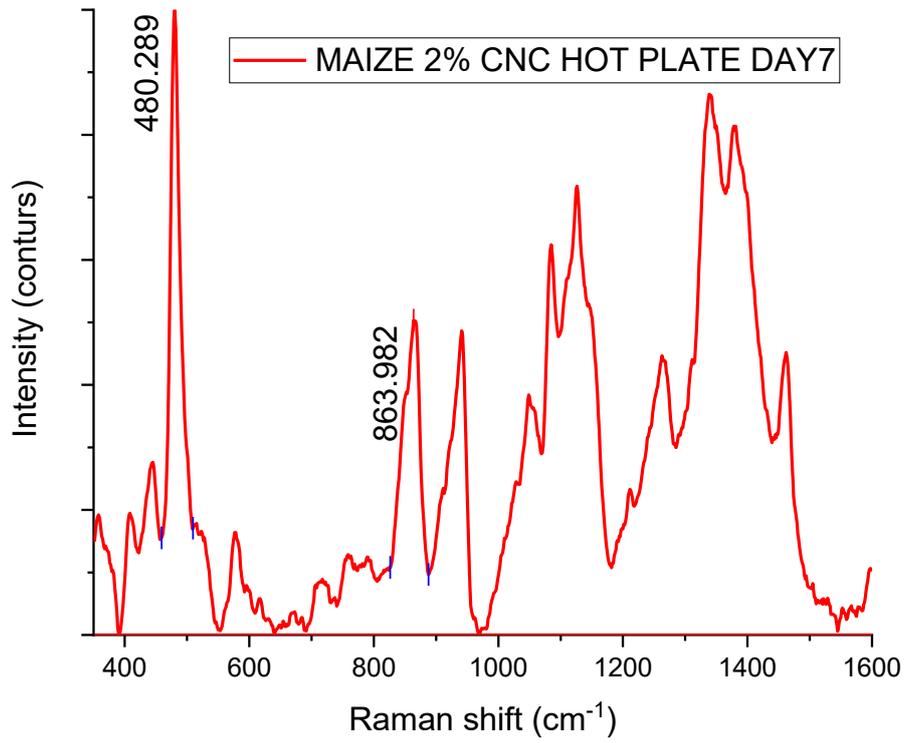


Figura 68: Spettro Maize 2% CNC Hot plate giorno 7

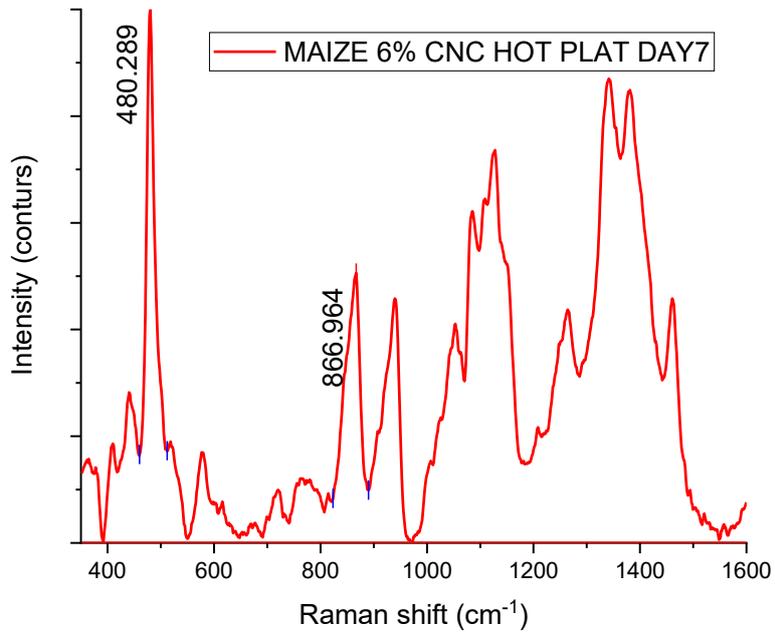


Figura 69: Spettro Maize 6% CNC Hot plate giorno 7

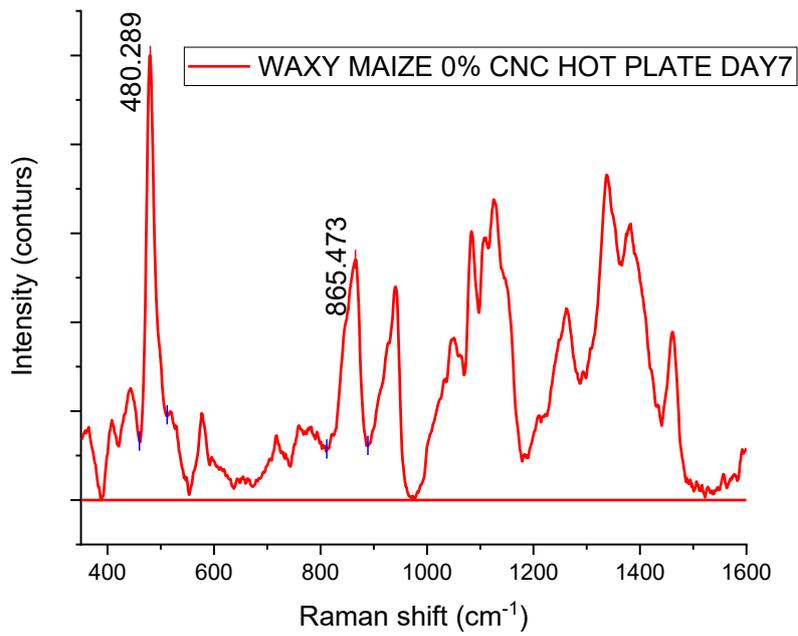


Figura 70: Spettro Waxy Maize 0% CNC Hot plate giorno 7

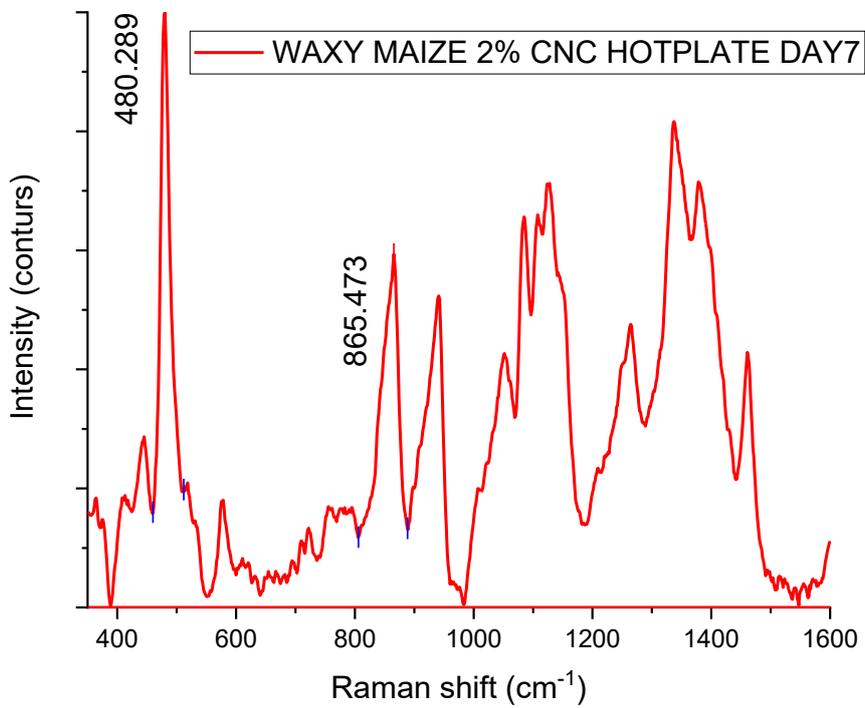


Figura 71: Spettro Waxy Maize 2% CNC Hot plate giorno 7

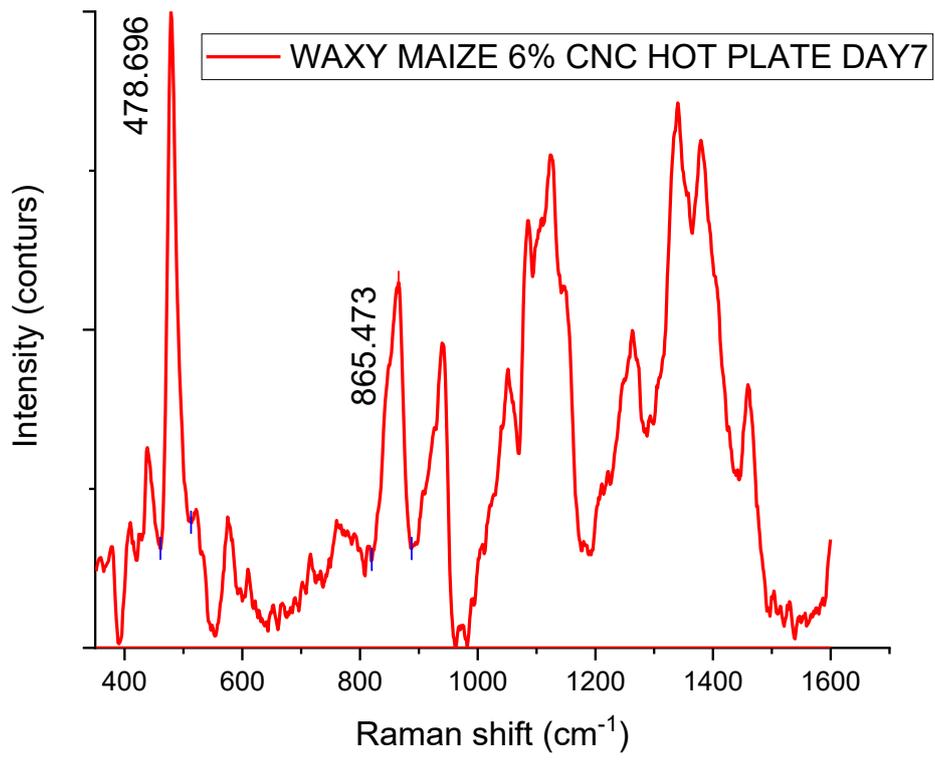


Figura 72: Spettro Waxy Maize 6% CNC Hot plate giorno 7

Campioni al hot plate con nano fibrille di cellulosa batterica al giorno 1 (prove ripetute)

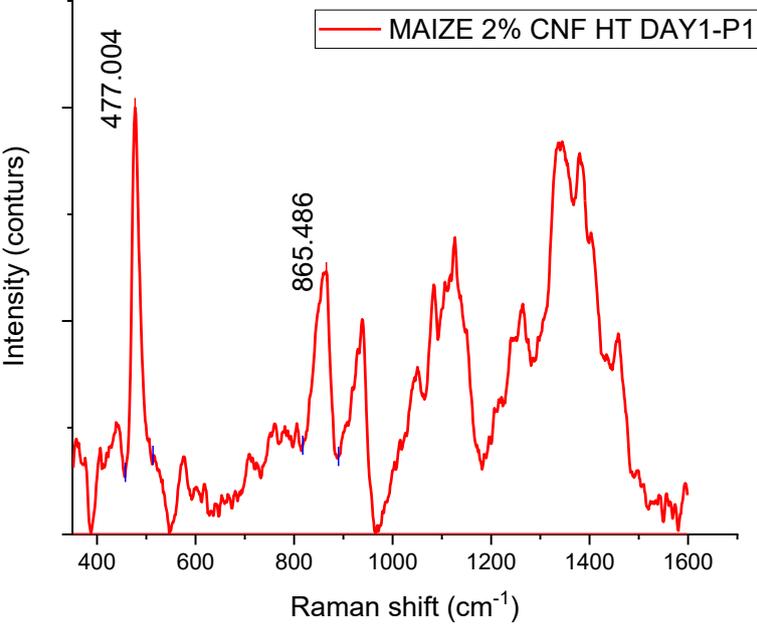


Figura 73: Spettro Maize 2% CNF prova 1 Hot plate giorno 1

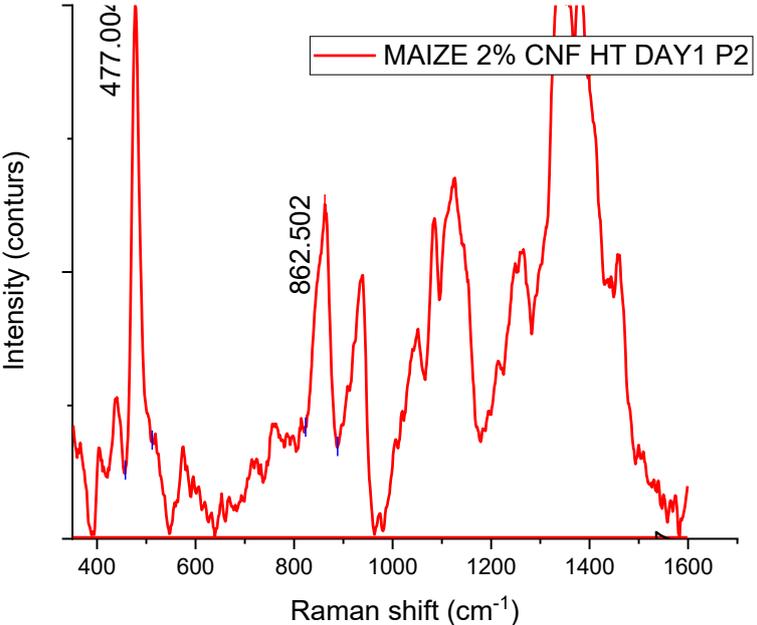


Figura 74: Spettro Maize 2% CNF prova 2 Hot plate giorno 1

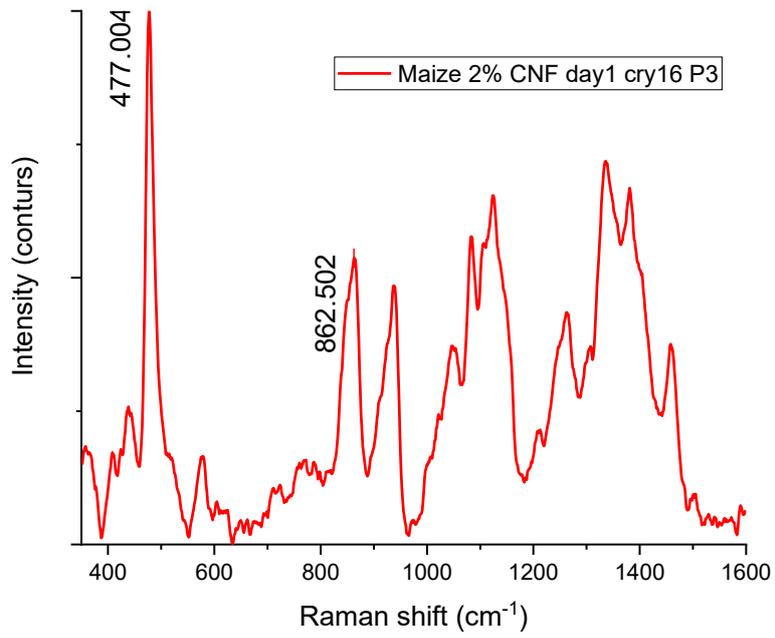


Figura 75: Spettro Maize 2% CNF prova 3 Hot plate giorno 1

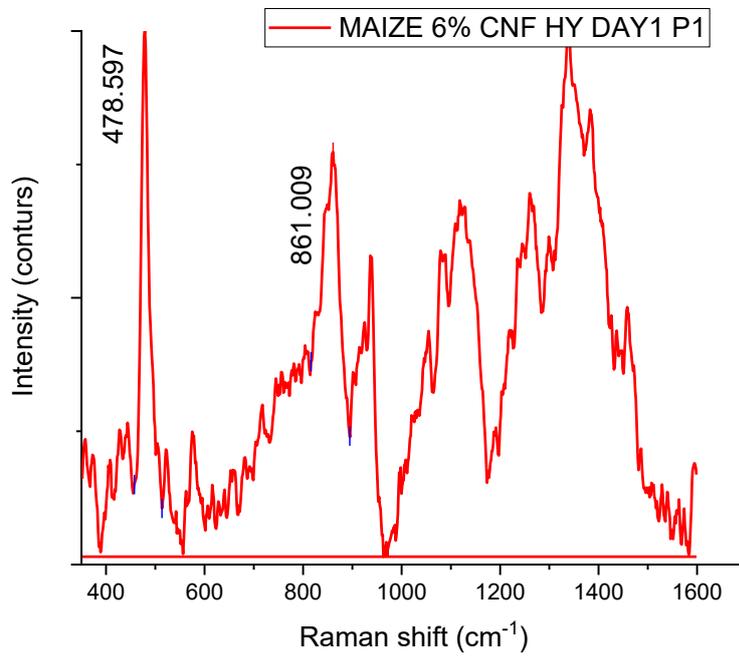


Figura 76: Spettro Maize 6% CNF prova 1 Hot plate giorno 1

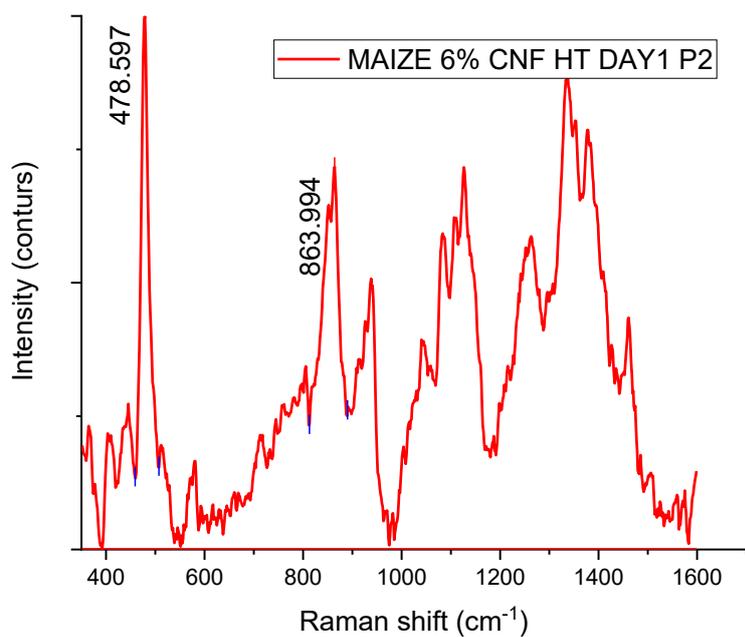


Figura 77: Spettro Maize 6% CNF prova 2 Hot plate giorno 1

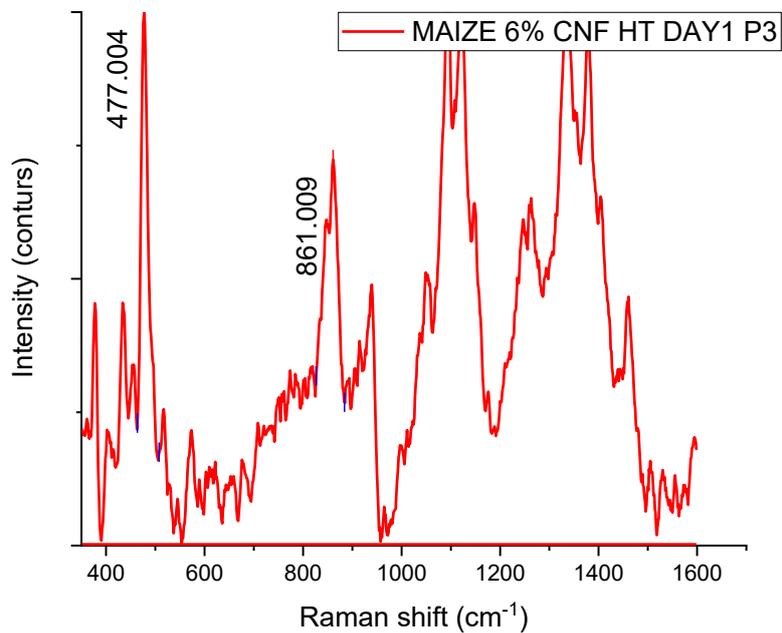


Figura 78: Spettro Maize 6% CNF prova 3 Hot plate giorno 1

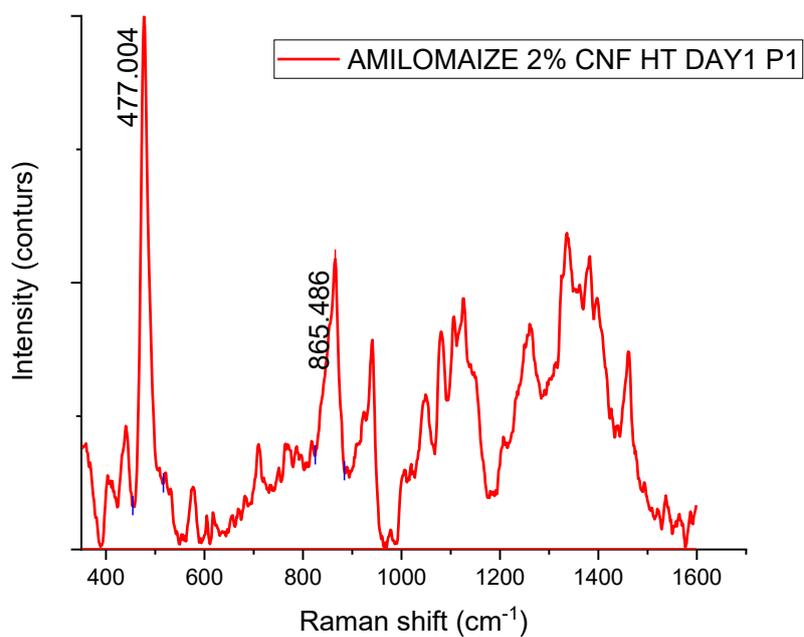


Figura 79: Spettro Amilomaize 2% CNF prova 1 Hot plate giorno 1

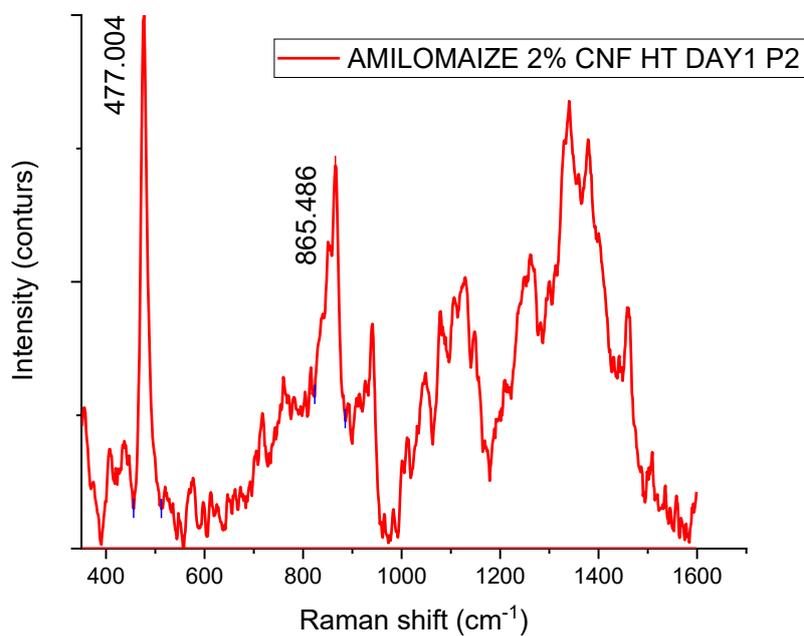


Figura 80: Spettro Amilomaize 2% CNF prova 2 Hot plate giorno 1

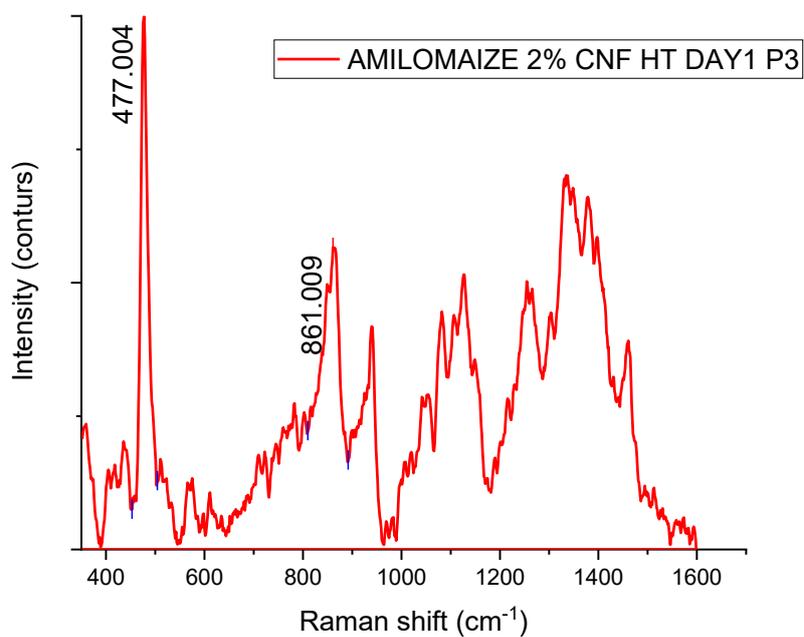


Figura 81: Spettro Amilomaize 2% CNF prova 3 Hot plate giorno 1

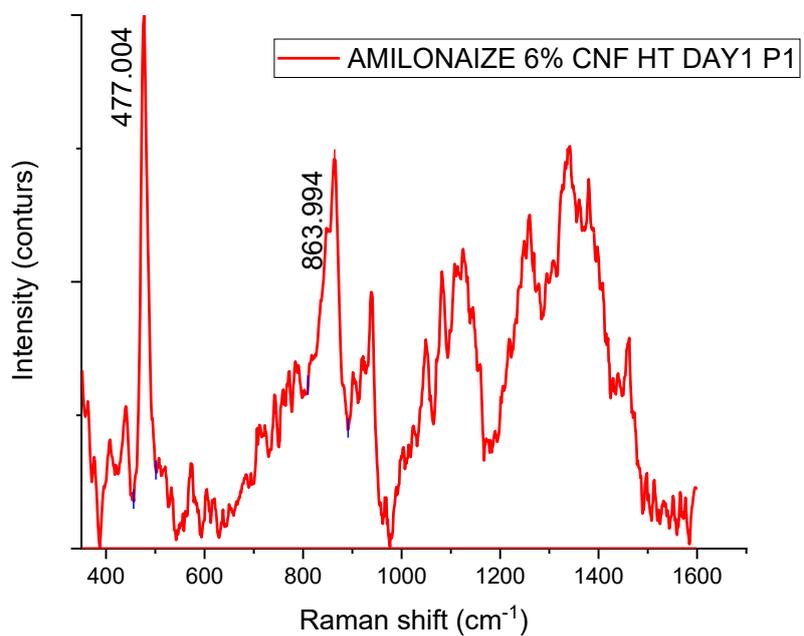


Figura 82: Spettro Amilomaize 6% CNF prova 1 Hot plate giorno 1

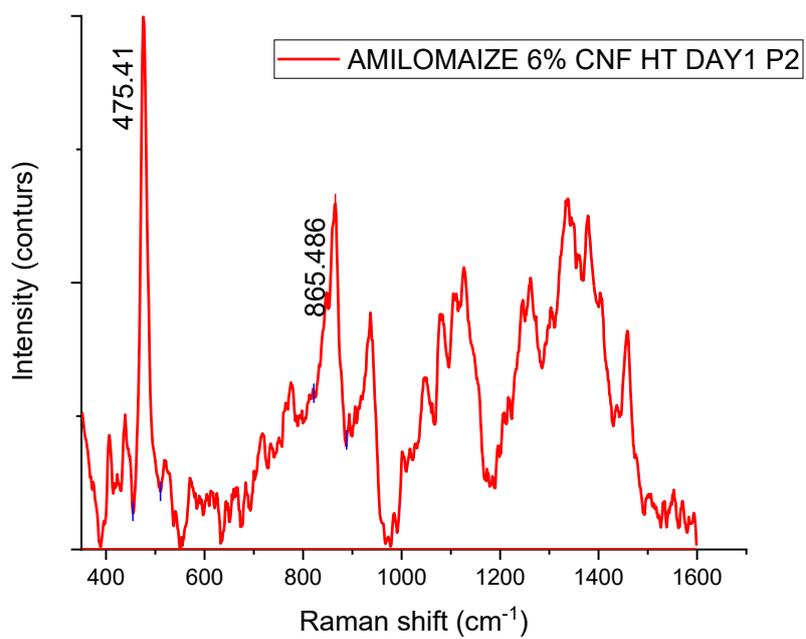


Figura 83: Spettro Amilomaize 6% CNF prova 2 Hot plate giorno 1

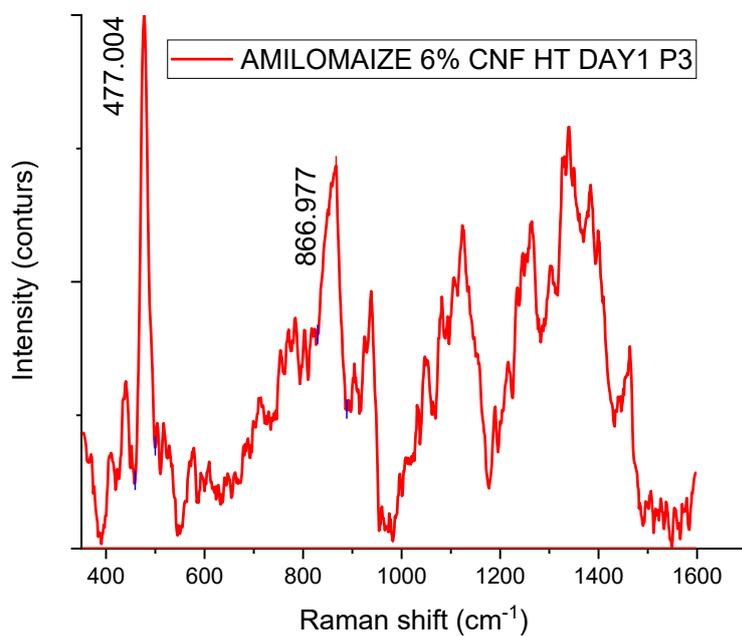


Figura 84: Spettro Amilomaize 6% CNF prova 3 Hot plate giorno 1

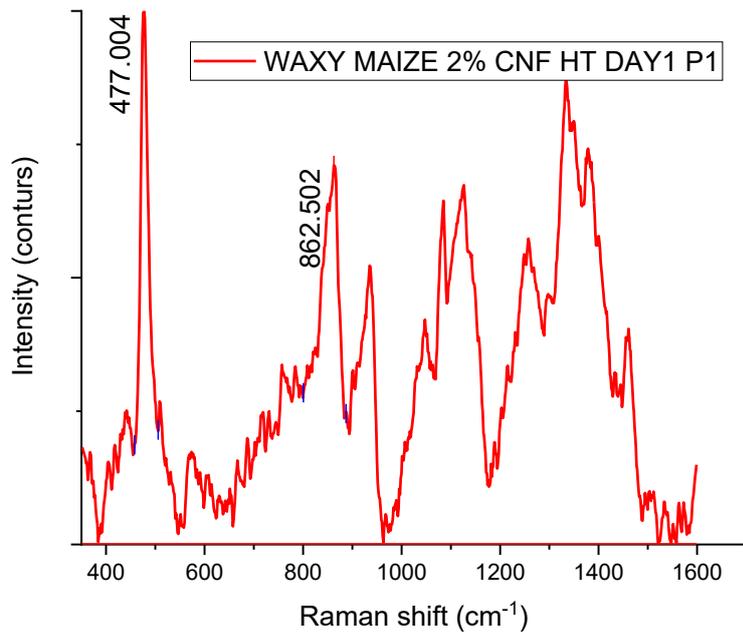


Figura 85: Spettro Waxy Maize 2% CNF prova 1 Hot plate giorno 1

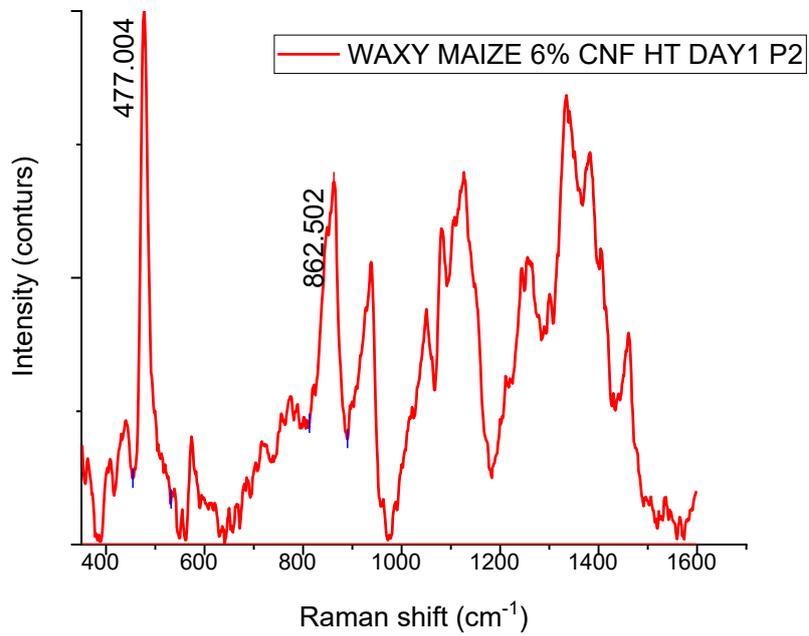


Figura 86: Spettro Waxy Maize 2% CNF prova 2 Hot plate giorno 1

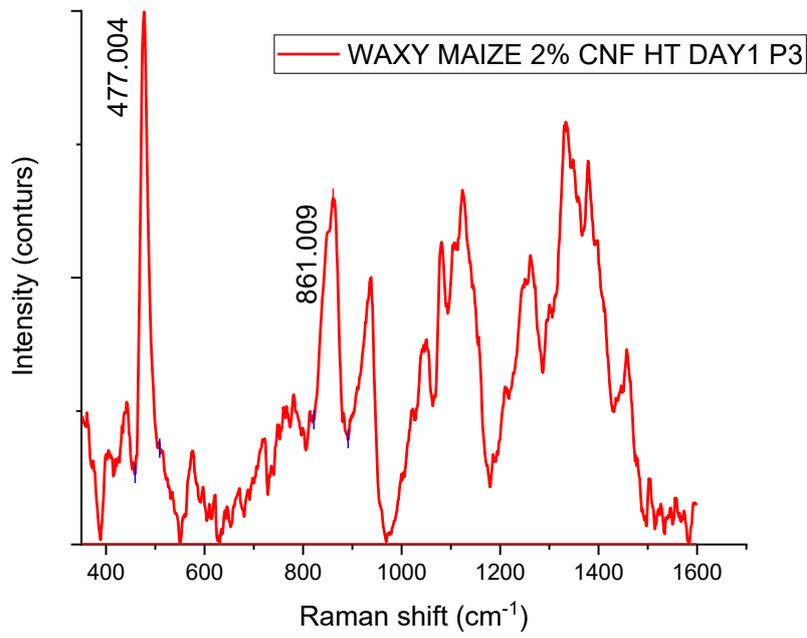


Figura 87: Spettro Waxy Maize 2% CNF prova3 Hot plate giorno 1

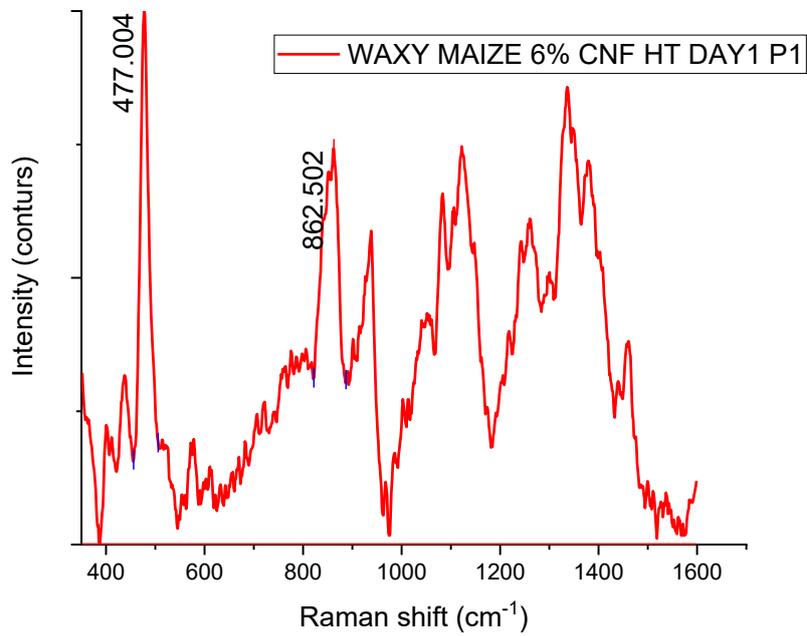


Figura 88: Spettro Waxy Maize 6% CNF prova 1 Hot plate giorno 1

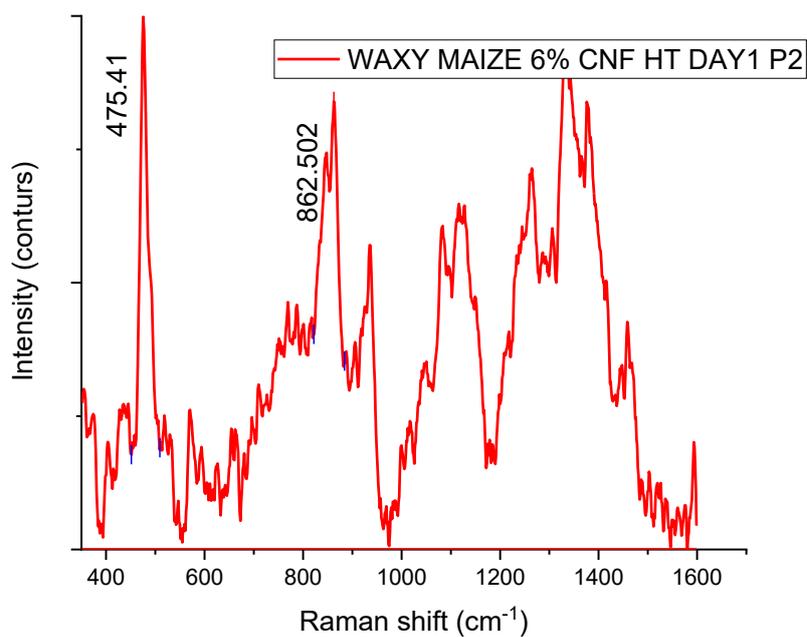


Figura 89: Spettro Waxy Maize 6% CNF prova 2 Hot plate giorno 1

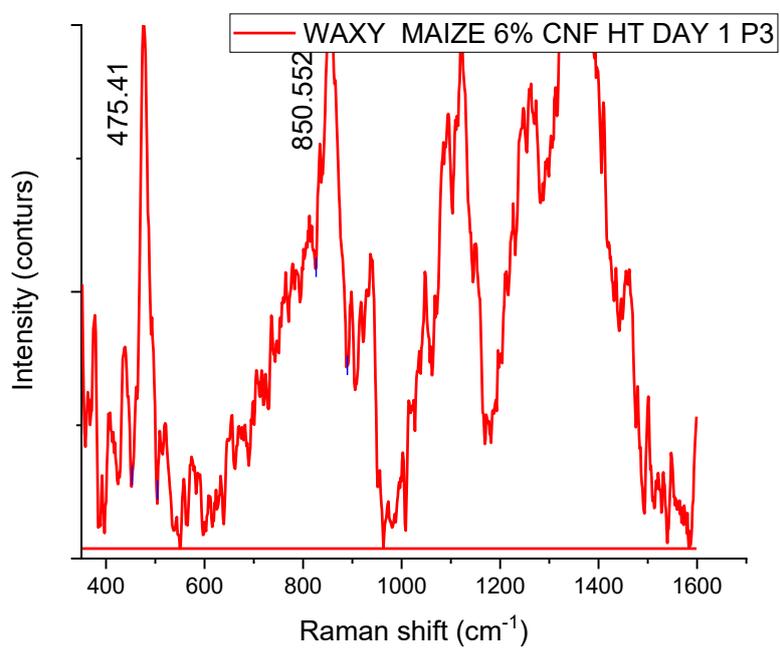


Figura 90: Spettro Waxy Maize 6% CNF prova 3 Hot plate giorno 1

Campioni al hot plate con nano fibrille di cellulosa batterica al giorno 7 (prove ripetute)

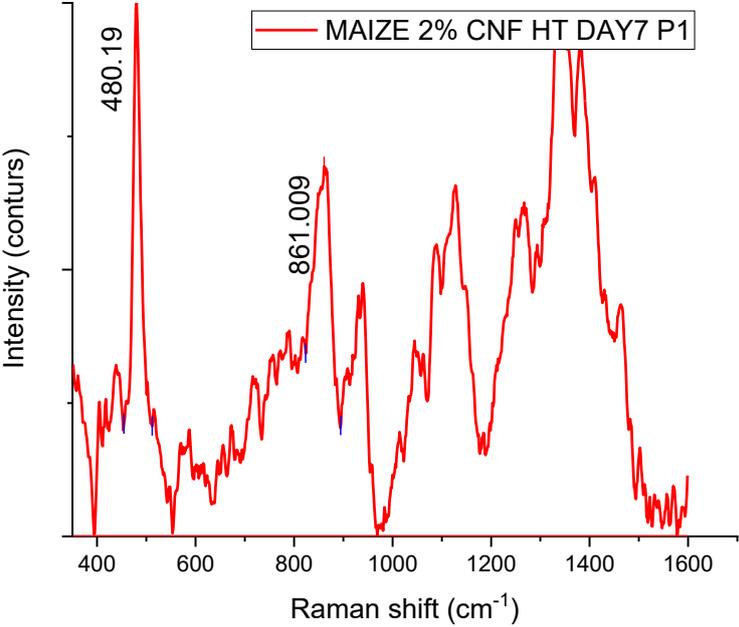


Figura 91: Spettro Maize 2% CNF prova 1 Hot plate giorno 7

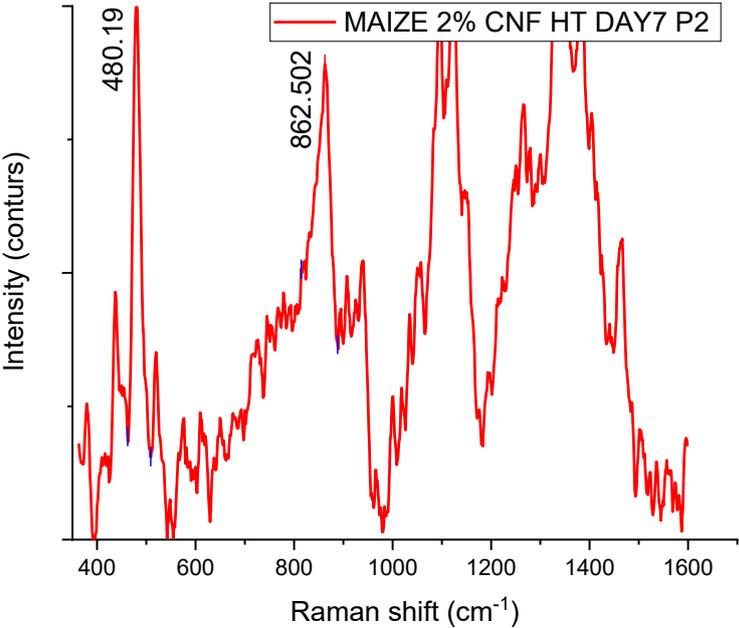


Figura 92: Spettro Maize 2% CNF prova 2 Hot plate giorno 1

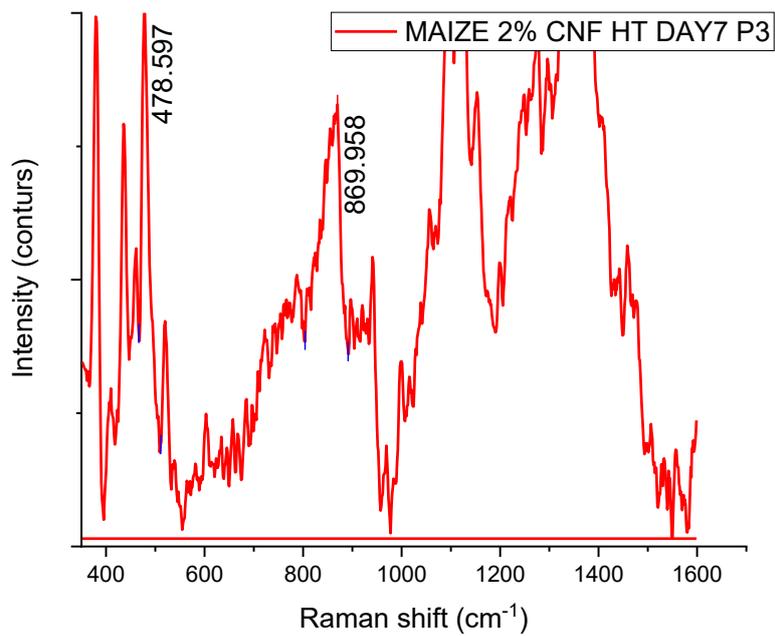


Figura 93: Spettro Maize 2% CNF prova3 Hot plate giorno 7

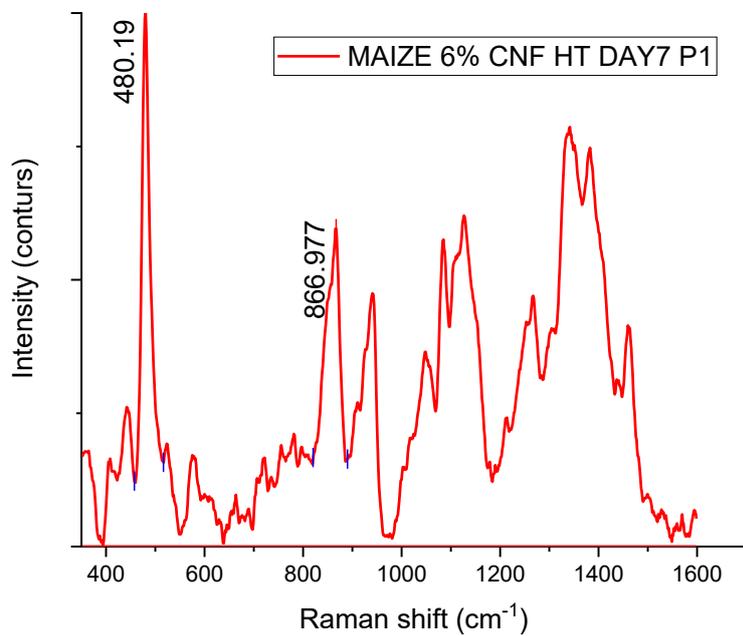


Figura 94: Spettro Maize 6% CNF prova 1 Hot plate giorno 7

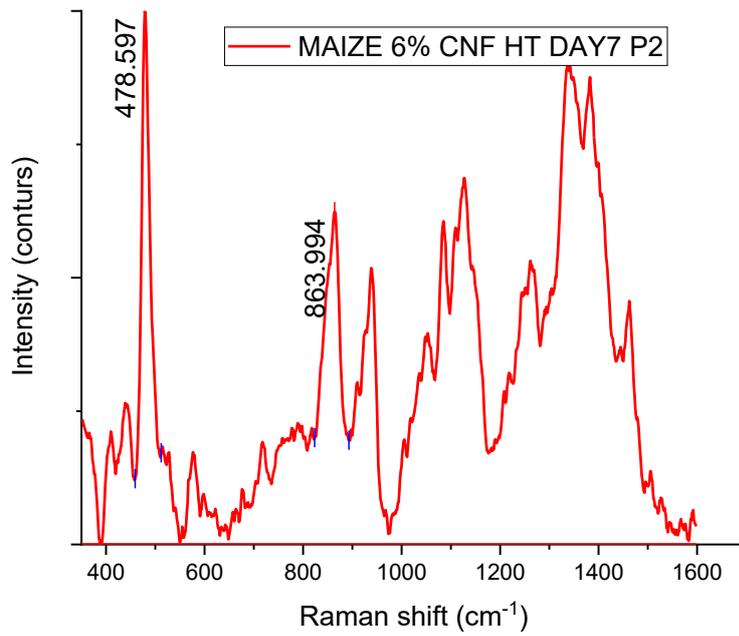


Figura 95: Spettro Maize 6% CNF prova 2 Hot plate giorno 7

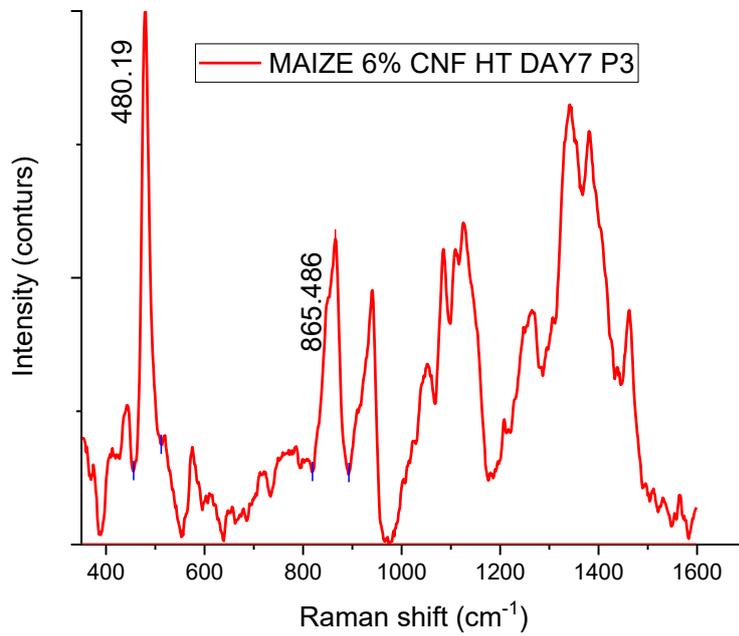


Figura 96: Spettro Maize 6% CNF prova 3 Hot plate giorno 7

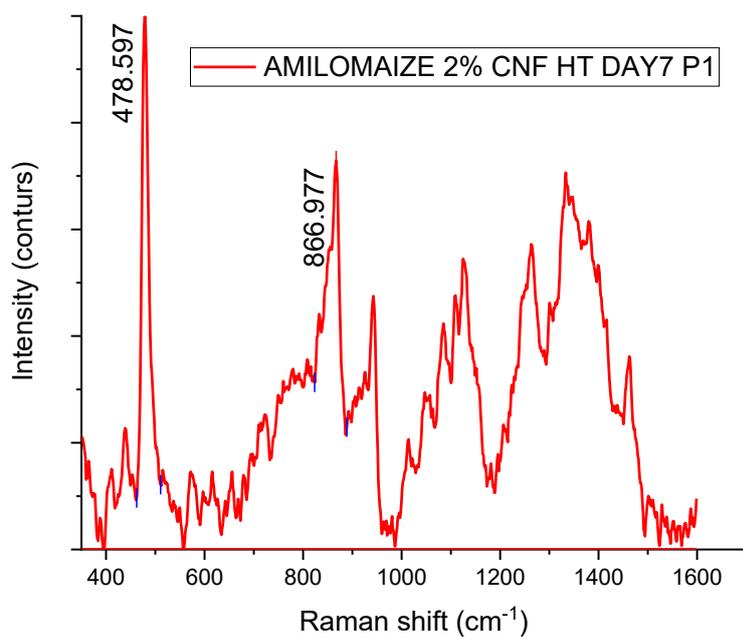


Figura 97: Spettro Amilomaize 2% CNF prova 1 Hot plate giorno 7

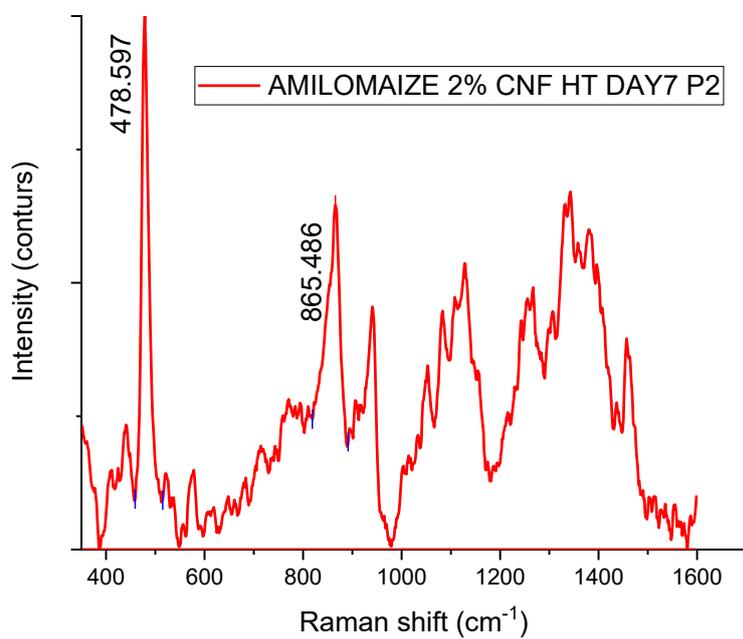


Figura 98: Spettro Amilomaize 2% CNF prova 2 Hot plate giorno 7

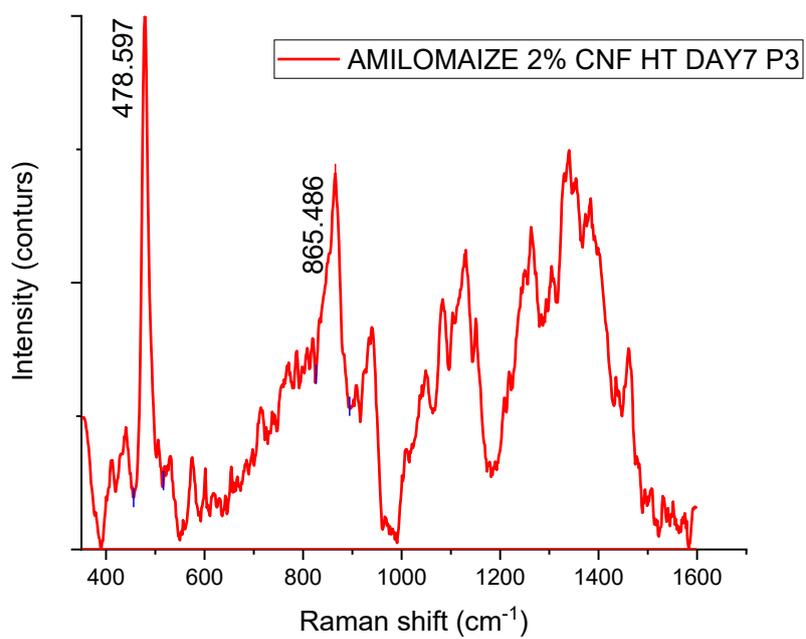


Figura 99: Spettro Amilomaize 2% CNF prova 3 Hot plate giorno 7

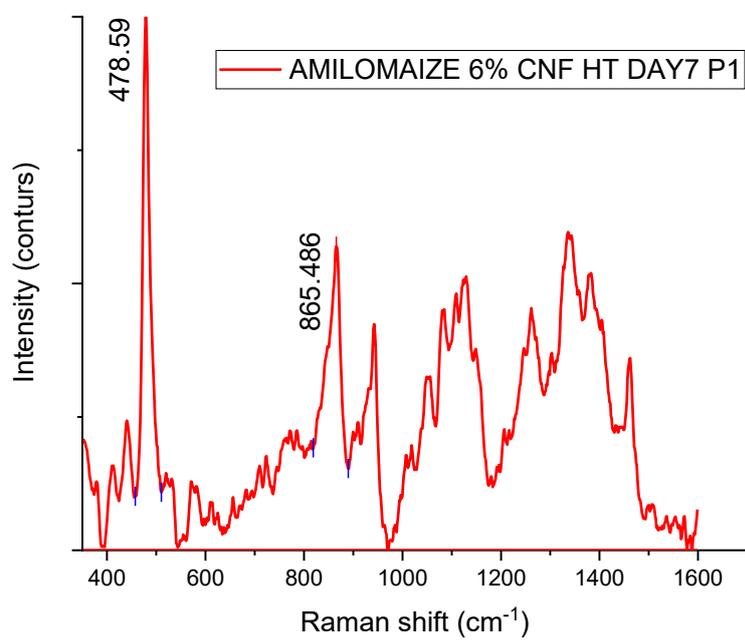


Figura 100: Spettro Amilomaize 6% CNF prova 1 Hot plate giorno 7

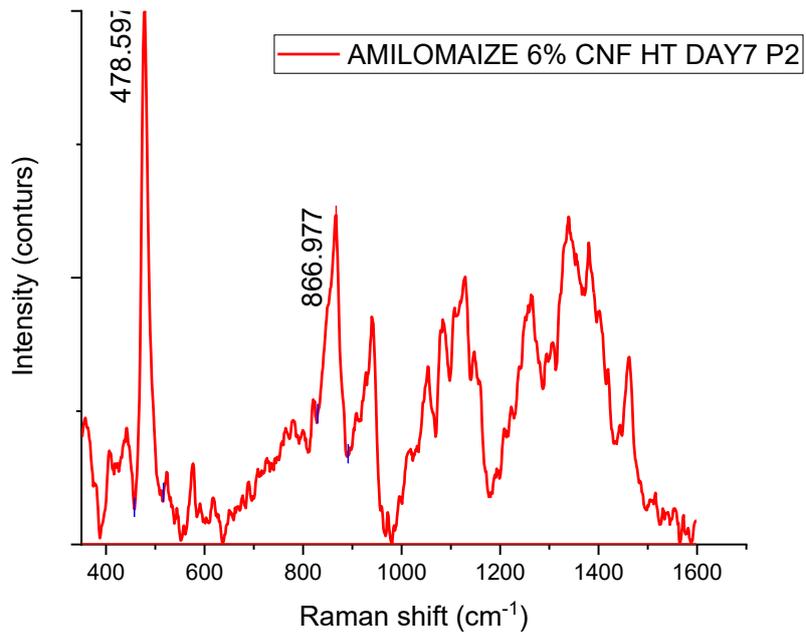


Figura 101: Spettro Amilomaize 6% CNF prova 2 Hot plate giorno 7

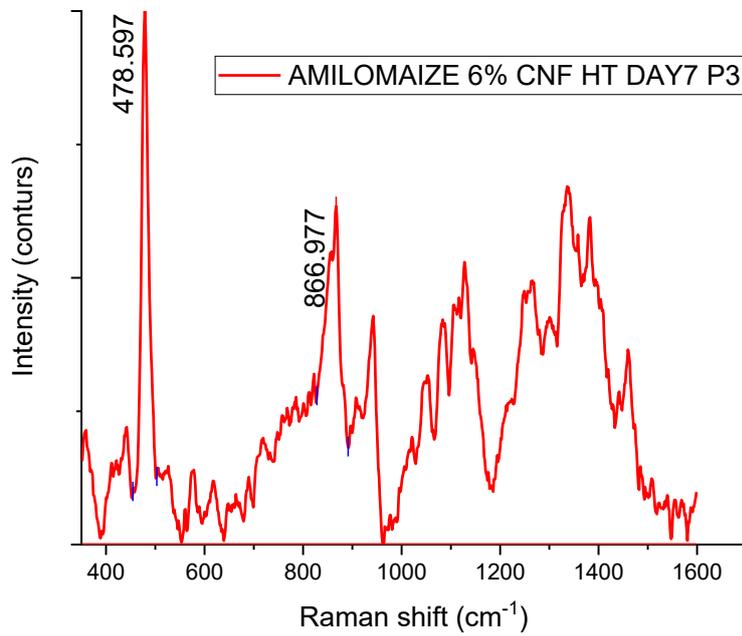


Figura 102: Spettro Amilomaize 6% CNF prova 3 Hot plate giorno 7

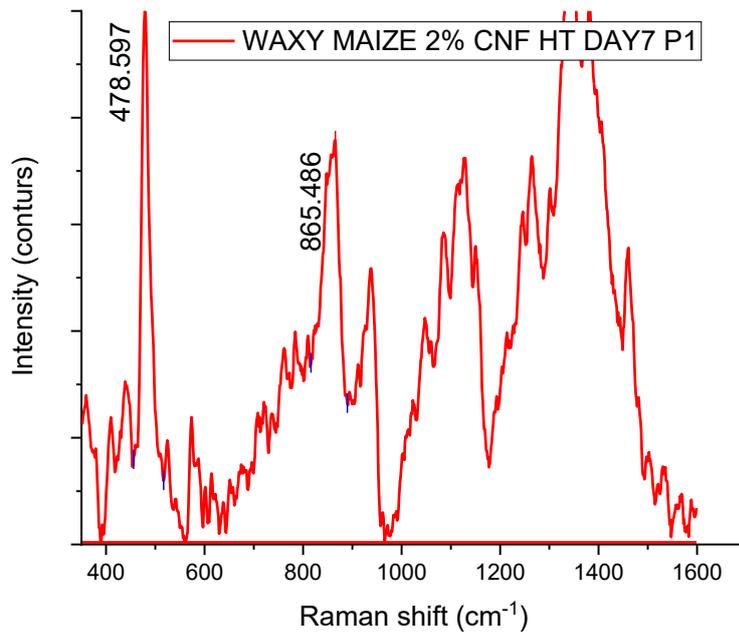


Figura 103: Spettro Waxy Maize 2% CNF prova 1 Hot plate giorno 7

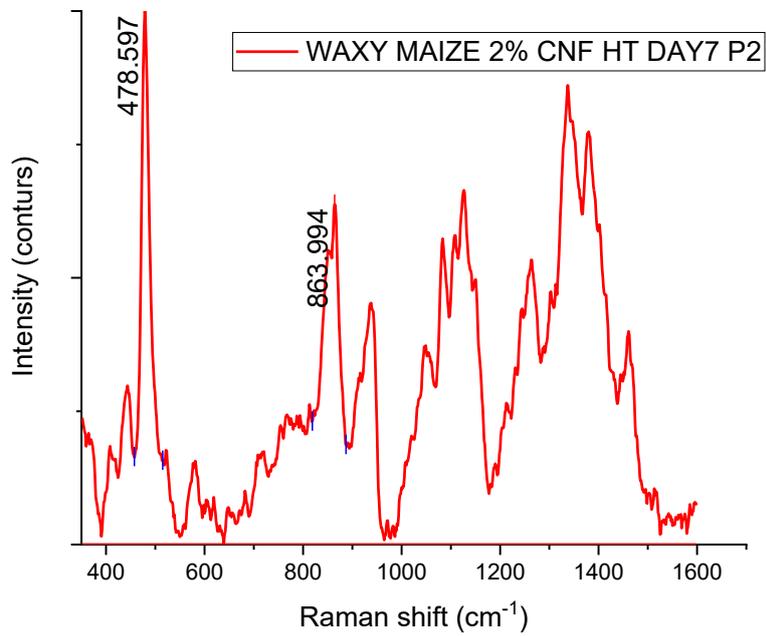


Figura 104: Spettro Waxy Maize 2% CNF prova 2 Hot plate giorno 7

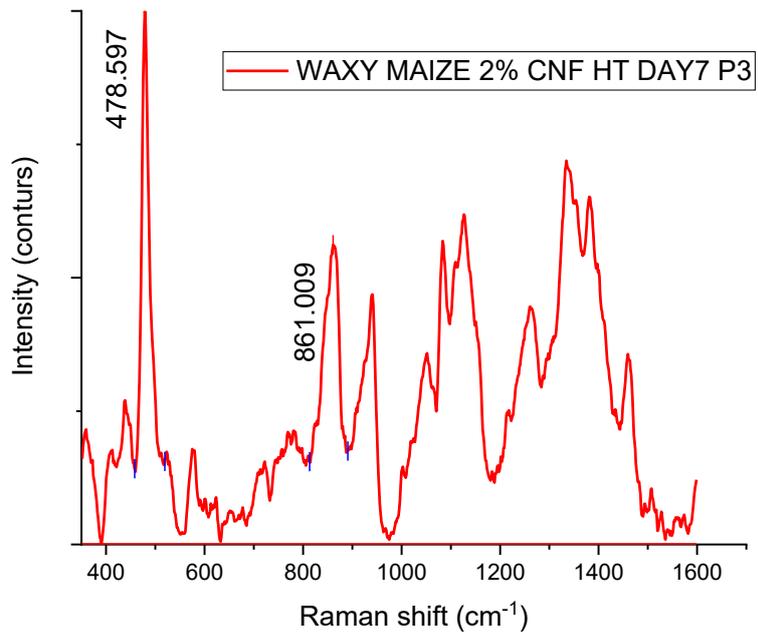


Figura 105: Spettro Waxy Maize 2% CNF prova 3 Hot plate giorno 7

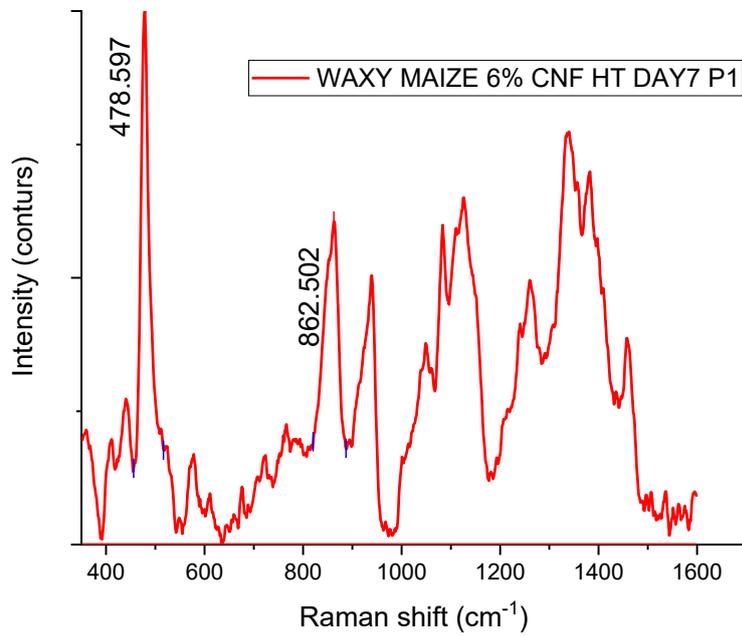


Figura 106: Spettro Waxy Maize 6% CNF prova 1 Hot plate giorno 7

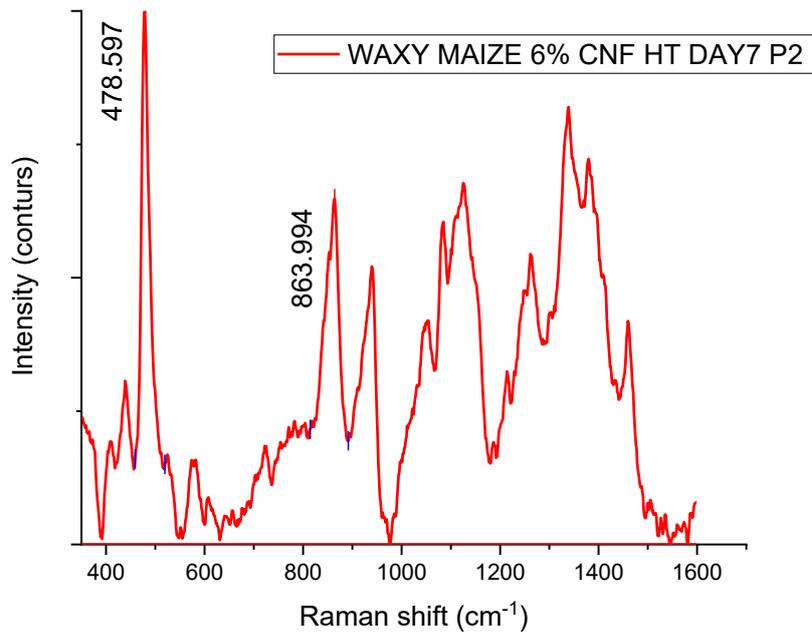


Figura 107: Spettro Waxy Maize 6% CNF prova 2 Hot plate giorno 7

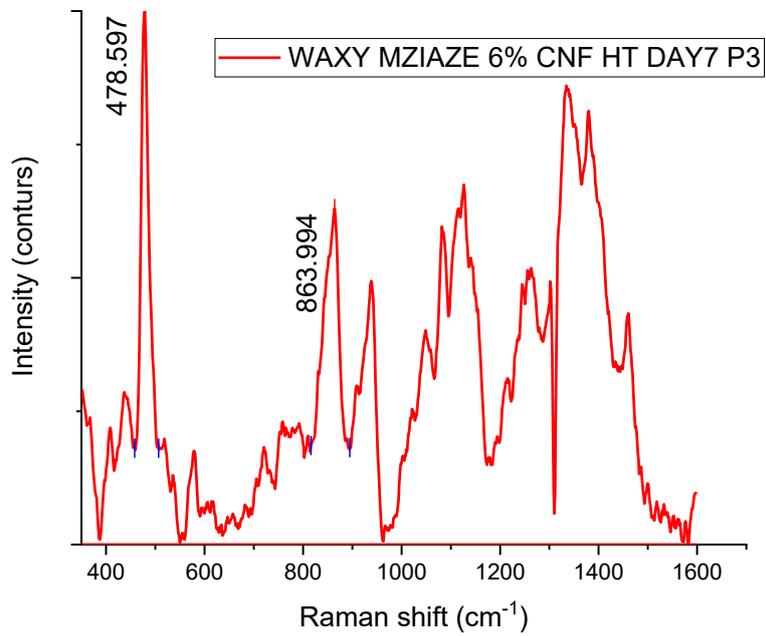


Figura 108: Spettro Waxy Maize 6% CNF prova 3 Hot plate giorno 7

## APPENDICE B: RACCOLTA DIFFRATTOGRAMMI SAXS

### SAXS

Le figure in seguito mostrano i diffrattogrammi SAXS del processo termico che porta alla gelificazione dell'amido.

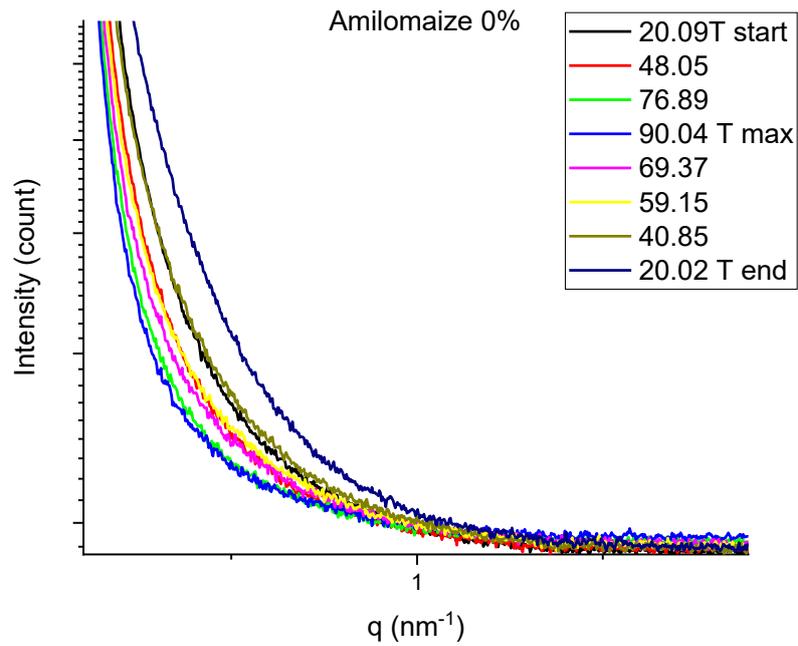


Figura 109: Diffrattogrammi del processo di gelificazione del Amilomaize

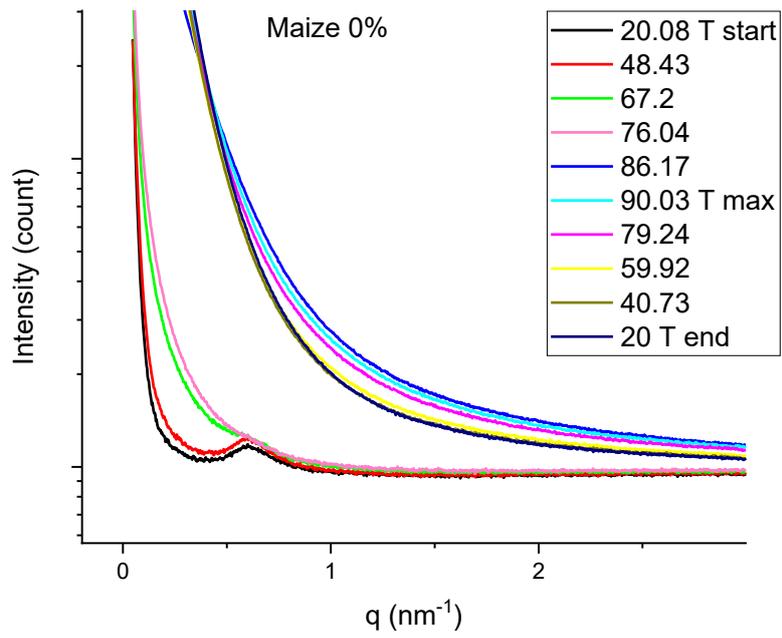


Figura 110: Diffratogrammi del processo di gelificazione del Maize

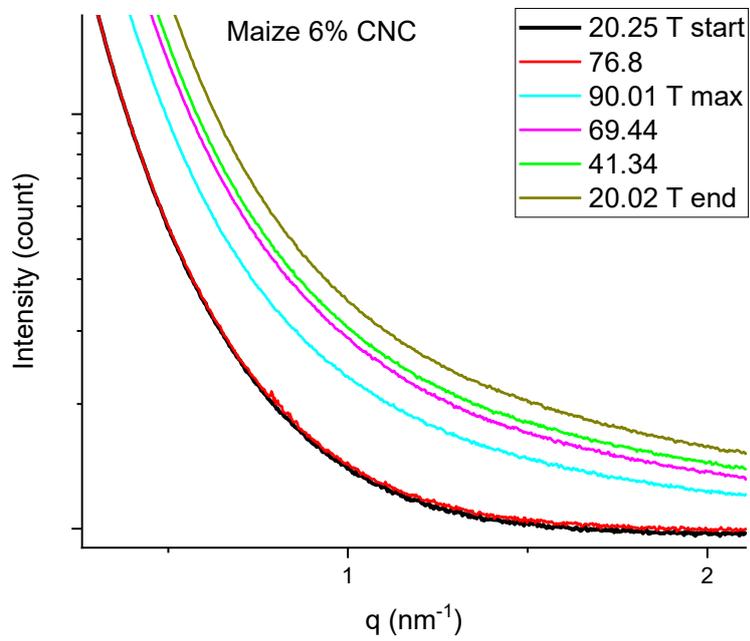


Figura 111: Diffratogrammi del processo di gelificazione del Maize 6%CNC

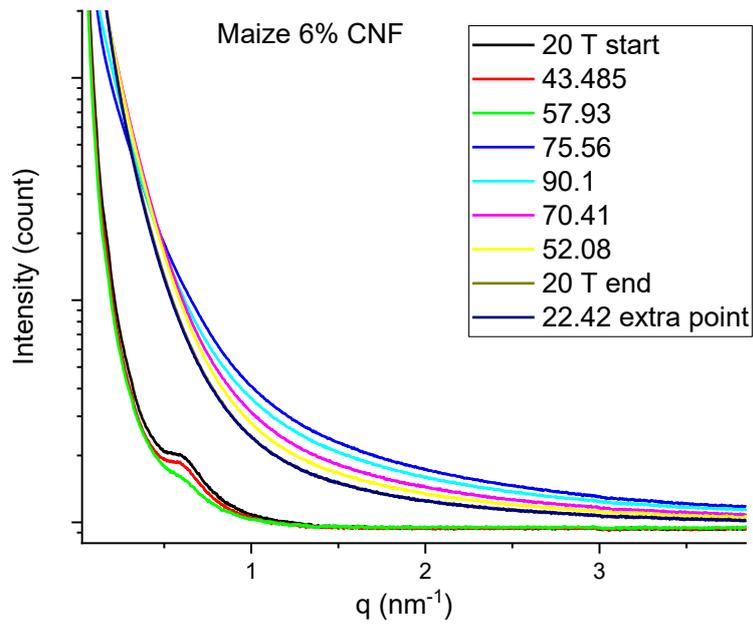


Figura 112: Diffattogrammi del processo di gelificazione del Maize 6%CNF

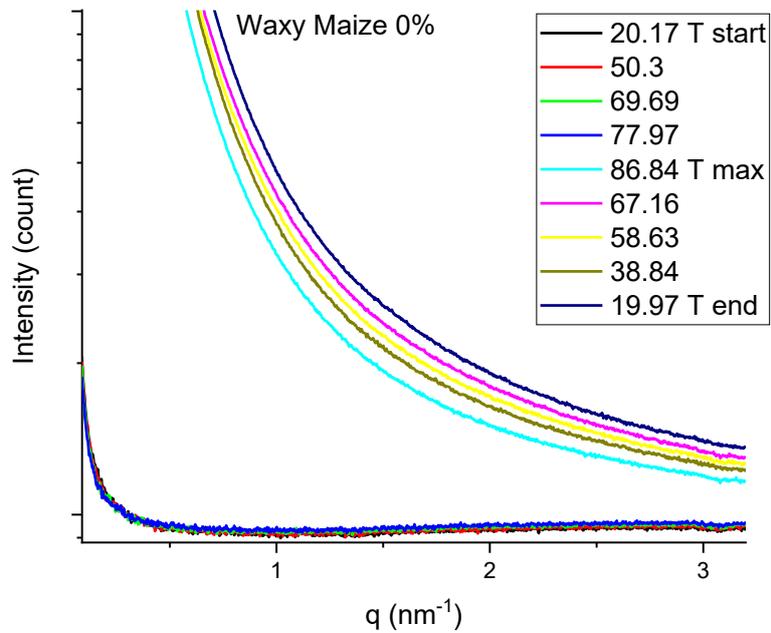


Figura 113: Diffattogrammi del processo di gelificazione del Waxy Maize

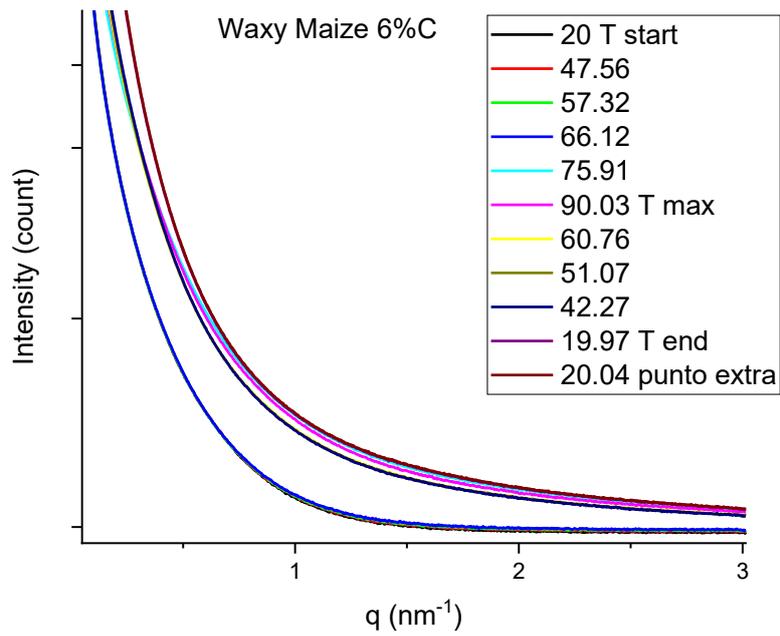


Figura 114: Diffattogrammi del processo di gelificazione del Waxy Maize 6% CNC

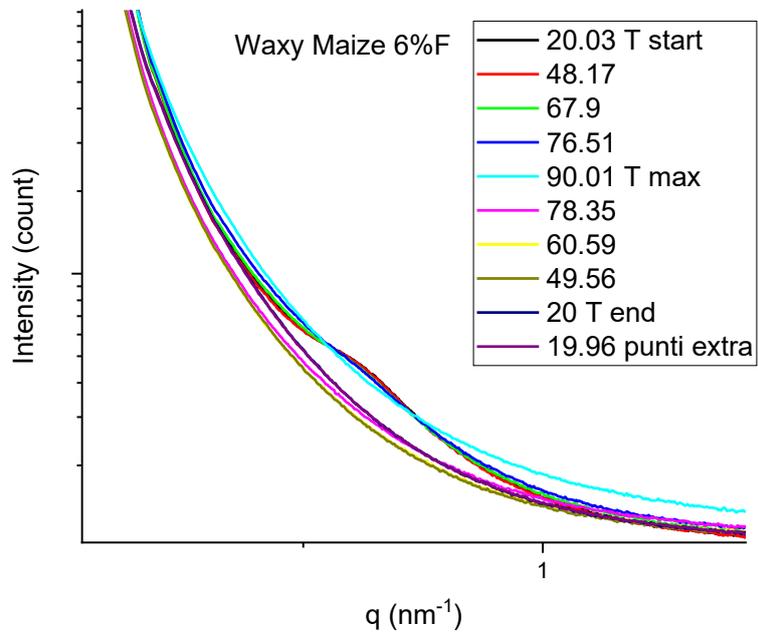


Figura 115: Diffattogrammi del processo di gelificazione del Waxy Maize 6% CNF

## APPENDICE C: SCRIPT MATHLAB

Si riportano in seguito tutti gli script utilizzati per l'elaborazione dei dati SAXS, WAXS e degli spettri Raman

### *Script per la sottrazione del segnale dell'acqua*

I diffrattogrammi del WAXS e la temperatura delle prove vengono inseriti grazie alla funzione import data di MATHLAB R2021 b

```
Water=[...] %dati dei diffrattogrammi del acqua pura
T= [...]; % valori di temperatura dell'acqua durante la prova SAXS
% RENDI DEGLI ARREY DAL WORKSPACE e rinomina se serve in waxs e Twaxs

i=0;
for i=1:length(Twaxs1)
    j=0;
    for j=1:length(T)
        if Twaxs1(i) > T(j)

            j=j+1;
        else Twaxs1(i) <= T(j)
            T1=T(j-1);
            T2=T(j);
            T3=Twaxs1(i);
            for k=1:length(water)-1
                Vq(i,k)= water(j,k+1)+(T1-T3)/(T2-T1)*(water(j-1,k)-water(j,k+1));
                k=k+1;
            end
            break
        end
    end

    i=i+1;
end

% a=waxs;
b=Vq-waxs(:,3066);
nowater=b';
```

### *Script della PCA della spettroscopia Raman*

La Matrice X contenente gli spettri e il vettore rs vengono inseriti utilizzando la funzione import data di MATLAB R2021b

```
clc
```

```
clear all
```

```
close all
```

```
X=[] % matrice degli spettri Raman, sulle righe le diverse prove
```

```
rs=[] % Raman shift di interesse nel nostro caso tra 350 e 1000
```

```
Y=X(1:36,1:422); % si taglia la parte dove spesso il vetrino da "interferenze", OVER  
1000 DI RAMAN SHIFT
```

```
[coeff,score,latent,tsquared,explained,mu] = pca(Y);
```

```
pc=coeff*score';
```

```
%plot(rs1,pc(:,1)); % grafico delle zone di interesse dei picchi, questo caso la  
varianza della pc1 è del 99%
```

```
%plot(rs,mu) %la media stimata di ciascuna variabile in X.
```

```
%
```

```
scatter(score(:,1),score(:,2))
```

```
% axis equal
```

```
% xlabel('1st Principal Component')
```

```
% ylabel('2nd Principal Component')
```

```
% xlabel('3rd Principal Component') %cluster, ma come si riconosce a chi
```

```
%appartengono i punti? risolto su excel ma ci sono metodi più furbi
```

```
%plot(explained(1:5))
```

```
%plot(latent(1:7)); latent, stores the variances of the four principal components.
```

### *Script della PCA delle prove SAXS/WAXS*

La Matrice X contenente i diffrattogrammi e il vettore time vengono inseriti utilizzando la funzione import data di MATLAB R2021b

```
close all
```

```
%import data time, temperatura, saxs/waxs
```

```
%X=WAXS'; %SE IL FILE È PER COLONNE E NON PER RIGHE
```

```
[coeff,score,latent,tsquared,explained,mu] = pca(X);

pc=coeff*score';

%plot(time,score(:,1),'*r',time,temp,'*b')
figure

% plot(time(1:6,1),latent(1:6,1),'*g')

% scatter3(score(:,1),score(:,2),score(:,3))
% axis equal
% xlabel('1st Principal Component')
% ylabel('2nd Principal Component')
% zlabel('3rd Principal Component') %cluster,

plot(explained(1:5),'*','LineWidth',3)

% plot(latent(1:7)); %latent, stores the variances of the four principal
components.
```

## BIBLIOGRAFIA

- (1) Miao, C.; Hamad, W. Y. Cellulose Reinforced Polymer Composites and Nanocomposites: A Critical Review. *Cellulose* **2013**, *20* (5), 2221–2262. <https://doi.org/10.1007/S10570-013-0007-3>.
- (2) Fazeli, M.; Keley, M.; Biazar, E. Preparation and Characterization of Starch-Based Composite Films Reinforced by Cellulose Nanofibers. *Int J Biol Macromol* **2018**, *116*, 272–280. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2018.04.186>.
- (3) Anbarani, N. M.; Ali Razavi, S. M.; Taghizadeh, M. Impact of Sage Seed Gum and Whey Protein Concentrate on the Functional Properties and Retrogradation Behavior of Native Wheat Starch Gel. *Food Hydrocoll* **2021**, *111*, 106261. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2020.106261>.
- (4) Benito-González, I.; López-Rubio, A.; Martínez-Sanz, M. High-Performance Starch Biocomposites with Celullose from Waste Biomass: Film Properties and Retrogradation Behaviour. *Carbohydr Polym* **2019**, *216*, 180–188. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2019.04.030>.
- (5) Ullah, H.; Santos, H. A.; Khan, T. Applications of Bacterial Cellulose in Food, Cosmetics and Drug Delivery. *Cellulose* **2016**, *23* (4), 2291–2314. <https://doi.org/10.1007/S10570-016-0986-Y>.
- (6) Díaz-Calderón, P.; Simone, E.; Tyler, A. I. I.; Enrione, J.; Foster, T. A Structural Study of the Self-Association of Different Starches in Presence of Bacterial Cellulose Fibrils. *Carbohydr Polym* **2022**, *288*, 119361. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2022.119361>.
- (7) Amido-nanocellulosa, C. D. I. Comprendere Il Ruolo Della Nanocellulosa Sull'autoassociazione e l'autoassemblaggio Nei Compositi a Base Di Amilosio e Amilopectina. **2025**, 1221099.
- (8) Ubwa, S. T.; Abah, J.; Asemave, K.; Shambe, T. Studies on the Gelatinization Temperature of Some Cereal Starches. *Int J Chem* **2012**, *4* (6), p22. <https://doi.org/10.5539/IJC.V4N6P22>.
- (9) Le Corre-Bordes, D.; Dufresne, A.; Bras, J. Bm200673n. January 17, 2013.
- (10) Piccinini, M.; Fois, S.; Secchi, N.; Sanna, M.; Roggio, T.; Catzeddu, P. The Application of NIR FT-Raman Spectroscopy to Monitor Starch Retrogradation and Crumb Firmness in Semolina Bread. <https://doi.org/10.1007/s12161-011-9360-8>.
- (11) *NANOCARTA DI CELLULOSA: PROPRIETÀ E PROSPETTIVE*. [https://www.researchgate.net/publication/319154221\\_NANOCARTA\\_DI\\_CELLULOSA\\_PROPRIETA\\_E\\_PROSPETTIVE](https://www.researchgate.net/publication/319154221_NANOCARTA_DI_CELLULOSA_PROPRIETA_E_PROSPETTIVE) (accessed 2024-02-12).
- (12) *Scopus - Document details - Cellulose nanocrystals from bacterial cellulose*. <https://www-scopus-com.ezproxy.biblio.polito.it/record/display.uri?eid=2-s2.0-84951979181&origin=resultslst&sort=plf-f&src=s&sid=431963f06d0289d63da07768a65289b4&sot=b&sdt=b&s=TITLE-ABS-KEY+%28nanocrystals+celulose%29&sl=36&sessionSearchId=431963f06d0289d63da07768a65289b4&relpos=6> (accessed 2024-02-13).
- (13) *L'analisi microscopica facilita la determinazione della specie mineralogica*. <https://manualedelgeologo.it/riconoscimento-microscopico-dei-minerali/> (accessed 2024-03-09).

- (14) *Capitolo 4 Analisi delle Componenti Principali (PCA) e Analisi Fattoriale Esplorativa (EFA) | Statistica per Data Science con R - V. 03.* [http://www.r-project.it/\\_book/analisi-delle-componenti-principali-pca-e-analisi-fattoriale-esplorativa-efa.html#](http://www.r-project.it/_book/analisi-delle-componenti-principali-pca-e-analisi-fattoriale-esplorativa-efa.html#) (accessed 2024-02-15).
- (15) Liu, Y.; Xu, Y.; Yan, Y.; Hu, D.; Yang, L.; Shen, R. Application of Raman Spectroscopy in Structure Analysis and Crystallinity Calculation of Corn Starch. *Starch - Stärke* **2015**, 67 (7–8), 612–619. <https://doi.org/10.1002/STAR.201400246>.
- (16) Liu, Y.; Xu, Y.; Yan, Y.; Hu, D.; Yang, L.; Shen, R. Application of Raman Spectroscopy in Structure Analysis and Crystallinity Calculation of Corn Starch. *Starch/Staerke* **2015**, 67 (7–8), 612–619. <https://doi.org/10.1002/star.201400246>.
- (17) Flores-Morales, A.; Jiménez-Estrada, M.; Mora-Escobedo, R. Determination of the Structural Changes by FT-IR, Raman, and CP/MAS <sup>13</sup>C NMR Spectroscopy on Retrograded Starch of Maize Tortillas. *Carbohydr Polym* **2012**, 87 (1), 61–68. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.07.011>.
- (18) Dutch, J.; Gilbert, E. P. Characterisation of Large Scale Structures in Starch Granules via Small-Angle Neutron and X-Ray Scattering. *Carbohydr Polym* **2013**, 91 (1), 444–451. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2012.08.002>.

# **RINGRAZIAMENTI**

Ringrazio la professoressa Elena Simone, in quanto mia relatrice, per la professionalità e disponibilità dimostratami in questi mesi di lavoro, i suoi suggerimenti sono stati molto preziosi e costruttivi.

Un grande ringraziamento va alla Dottoressa Cecilia Fiore, alla quale vorrei dimostrare tutta la mia riconoscenza per i buoni consigli e per il tempo impiegato in questo progetto.