Università
Ca'Foscari
Venezia

Corso di Laurea Magistrale
in Chimica e Tecnologie Sostenibili

Tesi di Laurea

Preparazione e caratterizzazione di soluzioni acquose a pH neutro di lignina

Relatore
Prof. Matteo Gigli

Correlatore
Dr. Massimo Sgarzi

Laureando
Nicola Rosso
Matricola 860548

Anno Accademico
2021 / 2022

Indice

Capitolo I: Introduzione 7

1.1 Biomasse: le risorse lignocellulosiche.....8

1.2 La struttura della lignina.....11

1.3 Estrazione della lignina.....15

1.3.1 Processo Kraft 16

1.3.2 Processo al solfito.....18

1.3.3 Processo organosolv.....19

1.3.3 Processo soda.....20

1.4 Valorizzazioni della lignina.....21

1.4.1 Nanomateriali a base di lignina.....22

1.4.2 Materiali e polimeri a base di lignina.....24

Capitolo II: Scopo del lavoro di tesi 27

Capitolo III: Parte sperimentale 29

3.1 Reagenti, solventi e materiali.....29

3.2 Metodiche e strumentazione.....29

3.2.1 Dialisi.....30

3.2.2 Centrifugazioni.....31

3.3 Caratterizzazioni.....32

3.3.1 Cromatografia di permeazione di gel (GPC).....32

3.3.2 Spettroscopia NMR.....32

3.3.3 Diffusione dinamica della luce (DLS).....33

3.3.4 Analisi termogravimetrica (TGA).....33

3.3.5 Calorimetria differenziale a scansione (DSC).....33

Capitolo IV: Risultati e discussione 35

4.1 Lignina SKL: dialisi con cut-off di membrana da 7 000 dalton.....35

4.2 Dialisi lignina SKL: studio dell'effetto cationico 41

4.3 Dialisi lignina SKL: studio dell'effetto della concentrazione.....48

4.4 Dialisi lignina WSOL: studio dell'effetto della concentrazione.....58

4.5 Centrifugazioni della lignina WSOL e dei prodotti di dialisi 69

Conclusioni 73

Bibliografia 75

Abbreviazioni

DLS: *dynamic light scattering*

DMF: dimetilformammide

DMSO: dimetilsolfossido

DSC: *differential scanning calorimetry*

GPC: *gel permeation chromatography*

HPLC: *high performance liquid chromatography*

H-SQC: *heteronuclear single quantum*

LNPs: *lignin nanoparticles*

M_n : massa molare media numerale

M_W : massa molare media ponderale

NMR: *nuclear magnetic resonance*

RFC: forza centrifuga relativa

RPM: rotazioni per minuto

PDI: *polydispersion index*

SKL: *softwood Kraft lignin*

T_g : temperatura di transizione vetrosa

TGA: analisi termogravimetrica

WSOL: *wheat straw organosolv lignin*

^{31}P-NMR: *phosphorus nuclear magnetic resonance*

Capitolo I

Introduzione

Viviamo in un mondo crepuscolare. A causa degli ovvi inconvenienti associati all'impiego di materie prime fossili, è necessario esplorare nuove fonti alternative per i combustibili e le sostanze chimiche da essi derivati.

La quasi totalità dei carburanti, la maggior parte dei polimeri e dei composti chimici organici attualmente utilizzati sono prodotti da fonti fossili. Quasi tutti questi prodotti, però, possono potenzialmente essere ricavati da fonti rinnovabili. Tale tipo di produzione, tuttavia, in diversi casi supera in costo i processi petrolchimici. Il prezzo accessibile delle fonti fossili, perciò, è stato spesso un freno per la generazione di *commodities* bioderivate [1].

Data l'urgenza di un'azione per mitigare il cambiamento climatico, le fonti alternative alle risorse fossili sono un argomento di notevole interesse ed importanza. Questo periglio ambientale sta fortunatamente spostando risorse ed interesse di ricerca verso la valorizzazione e lo sfruttamento di differenti risorse ecosostenibili [2].

Una delle risorse rinnovabili più promettenti risulta essere la biomassa lignocellulosica, grazie alla sua quantità e disponibilità. Attualmente risulta solo parzialmente sfruttata, ma la sua totale valorizzazione è un obiettivo concreto di ricercatori accademici e industriali.

1.1 Biomasse: le risorse lignocellulosiche

Il termine biomassa viene usato per indicare il vastissimo gruppo di materie prime organiche che hanno in comune l'origine biologica naturale.

Di queste fanno parte le cosiddette lignocellulose (**Figura 1.1**), il principale elemento costitutivo delle pareti delle cellule vegetali. La biomassa vegetale è infatti composta principalmente da cellulosa, emicellulosa e lignina, insieme a quantità minori di pectina, proteine, estrattivi (materiali non strutturali solubili come zuccheri non strutturali, materiale azotato, clorofilla) e composti inorganici necessari per la vita della pianta [3].

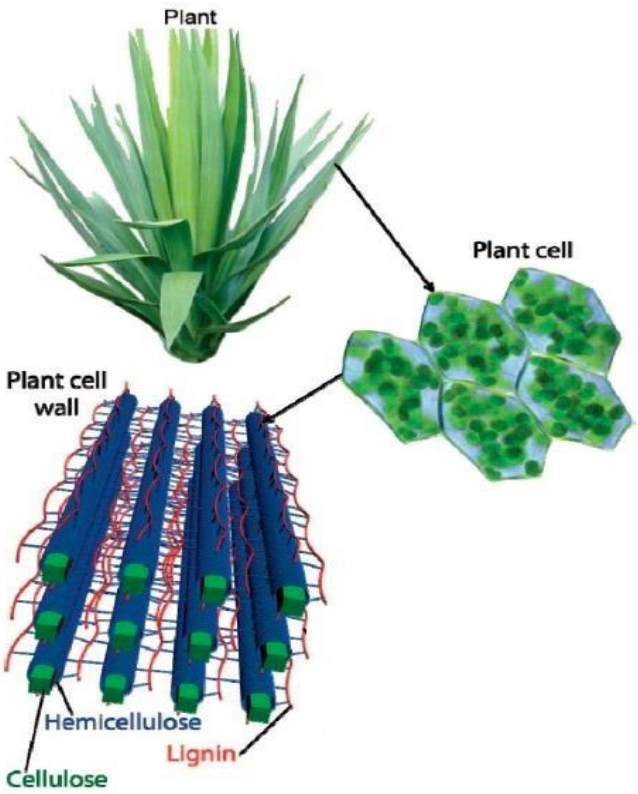

Figura 1.1: Struttura della biomassa lignocellulosica [4]

La composizione di questi componenti può variare da una specie vegetale all'altra (**Tabella 1.1**). Ad esempio, il legno duro ha maggiori quantità di cellulosa, mentre la

paglia e le foglie di grano hanno più emicellulosa. Inoltre, i rapporti tra i vari componenti all'interno di una singola pianta variano con l'età, lo stadio di crescita e le condizioni ambientali [5].

Tabella 1.1: Contenuto di cellulosa, emicellulosa e lignina nei residui e nei rifiuti agricoli comuni

Materiale lignocellulosico	Cellulosa (%)	Emicellulosa (%)	Lignina (%)
Steli di legno duro	40−55	24−40	18-25
Steli di legno tenero	45−50	25−35	25−35
Pannocchie di mais	45	35	15
Paglia di grano	30	50	15
Erbe	25−40	35−50	10−30
Fogliame	15-20	80−85	0

La cellulosa è il principale costituente strutturale nelle pareti delle cellule vegetali ed è articolata in una struttura fibrosa ordinata (**Figura 1.2**).

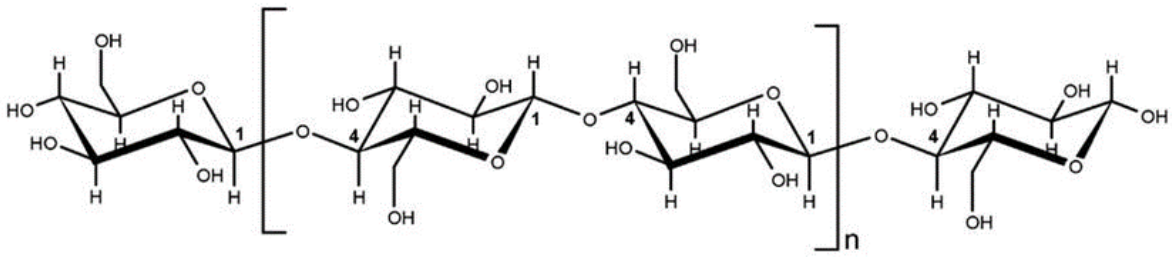

Figura 1.2: Illustrazione di una catena di cellulosa

Questo polimero lineare è costituito da subunità di glucosio collegate tra di loro da legami β-(1,4)-glicosidici. Il cellobiosio è l'unità ripetitiva stabilita attraverso questo legame e costituisce le catene di cellulosa. Le diverse catene polimeriche sono legate tra loro da legami idrogeno e van der Waals che permettono l'impacchettamento della cellulosa in microfibrille (emicellulosa e lignina ricoprono le microfibrille). La cellulosa nella biomassa è presente sia in forma cristallina che amorfa. La cellulosa cristallina comprende la maggior parte della cellulosa, mentre una piccola percentuale di catene di cellulosa non organizzate forma la cellulosa amorfa.

La caratteristica principale che differenzia la cellulosa dall'emicellulosa (**Figura 1.3**) è la presenza di ramificazioni laterali in quest'ultima, costituita da diversi monosaccaridi che includono pentosi (xilosio, ramnosio e arabinosio), esosi (glucosio, mannosio e galattosio) e acidi uronici.

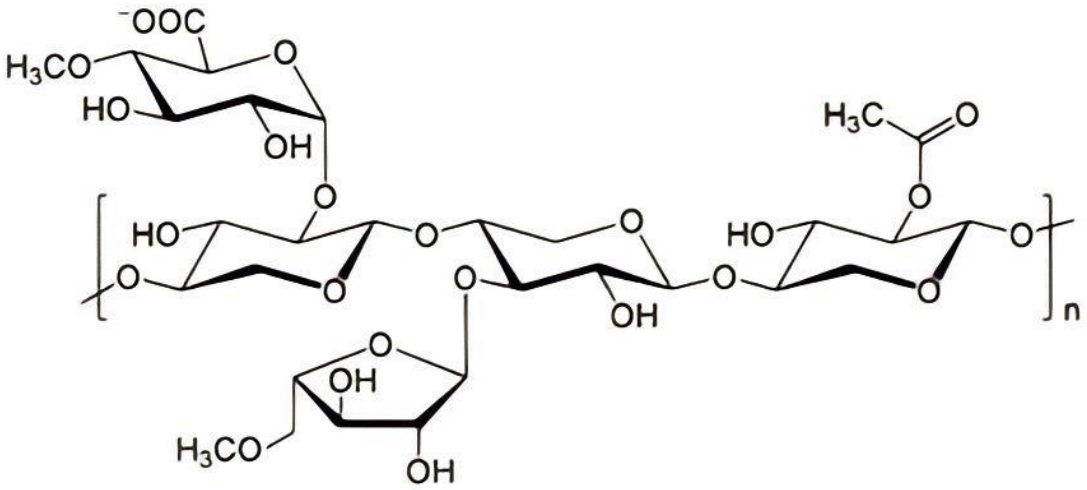

Figura 1.3: Rappresentazione della struttura chimica dell'emicellulosa

La catena principale dell'emicellulosa non è costituita da sole unità di glucosio, ma è un polisaccaride formato da diversi zuccheri, collegati da legami β-(1,4)-glicosidici e occasionalmente legami β-(1,3)-glicosidici [6]. Oltre ad avere un più basso peso

molecolare, l'emicellulosa, a differenza della cellulosa, è facilmente idrolizzabile e non tende a formare aggregati.

La lignina possiede una struttura molecolare complessa contenente strutture ramificate di monomeri fenolici. Risulta quindi totalmente differente rispetto alle matrici precedenti. È presente nella parete cellulare primaria conferendo supporto strutturale, impermeabilità e resistenza contro l'attacco microbico.

1.2 La struttura della lignina

La struttura chimica della lignina fu studiata per la prima volta grazie al lavoro di Peter Klason, il quale postulò che la lignina fosse costituita da unità di alcol coniferilico. Freudenberg (1965), Alder (1977) e Brunow sono ricercatori pionieri che successivamente hanno determinato la struttura della lignina del legno tenero (abete rosso), mentre Nimz (1974) ha sviluppato la struttura della lignina del legno duro (faggio) [7].

La struttura chimica primaria della lignina nativa è composta principalmente da tre unità di fenilpropano prodotte dalla polimerizzazione ossidativa di monolignoli catalizzata da enzimi. I monolignoli, alcoli *p*-coumarilico, sinapilico e coniferilico, biosintetizzati attraverso la deaminazione dell'amminoacido aromatico fenilalanina, sono i tre fenilpropanoidi da cui deriva la lignina generando le subunità *p*-idrossifeniliche (H), siringiliche (S) e guaiaciliche (G) [8][9].

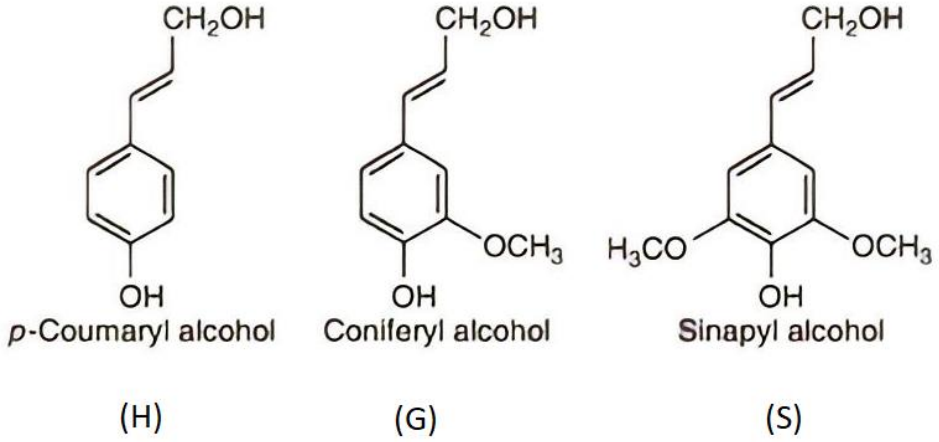

Figura 1.4 Le unità monomeriche della lignina: alcol *p*-cumarilico (unità H), alcol coniferilico (unità G) e alcol sinapilico (unità S) [10]

Ciascuno di questi alcoli idrossicinnamici contiene una porzione aromatica e una catena laterale alifatica di 3 atomi di carbonio denominati α, β e γ. Le unità H non contengono gruppi -OCH_3 , le unità S comprendono due gruppi aril-OCH_3 , mentre le unità G comprendono un gruppo aril-OCH_3 [11].

I legami interunità predominanti sono quelli β-O-4 (**Tabella 1.2**), che rappresentano circa il 50% della totalità. Questi legami eterei risultano essere i più deboli e si scindono più facilmente rispetto ad altri, ad esempio durante i processi di spappolamento della biomassa lignocellulosica [12].

Tabella 1.2: Legami chimici tra le varie unità di lignine (valori in % rispetto al totale dei legami) [13]

Legame	Legno tenero	Legno duro
β-O-4	43–50	50–65
5–5	10–25	4–10
β-5	9–12	4–6
4-O-5	4	6–7
β-1	3–7	5–7
β-β	2–4	3–7

La tabella 1.2 mostra il contenuto tipico dei legami presenti nel legno duro (gruppo delle angiosperme) e nel legno tenero (tipico delle conifere, gruppo delle gimnosperme) [14]. È doveroso precisare che i dati riportati potrebbero differire notevolmente anche per specie simili a causa di alcuni parametri come l'età, l'area e l'ambiente di crescita della biomassa e anche il metodo analitico.

Anche la distribuzione relativa delle unità costitutive nella lignina varia fortemente tra le specie vegetali; i rapporti H/G/S differiscono infatti tra i genotipi e tra le piante transgeniche e quelle selvatiche (**Tabella 1.3**).

Tabella 1.3: Abbondanza delle unità primarie di lignina in vari tipi di piante [15]

Monolignoli	Legno duro	Legno tenero	Erba
Alcol sinapilico (S)	50–75%	0–1%	25–50%
Alcol coniferilico (G)	25–50%	90–95%	25–50%
Alcol *p*-cumarilico (H)	Tracce	0.5–34%	10–25%

La lignina del legno duro (ad es. eucalipto, pioppo, betulla), chiamata guaiacil-siringil lignina, è composta da unità G e S in quantità comparabili e da bassi livelli di unità H. La lignina del legno tenero (ad es. abete rosso, pino), solitamente indicata come guaiacil lignina, comprende unità G con tracce di unità H. Nel caso della biomassa erbacea, la lignina comprende unità *p*-idrossifenile, guaiacile e siringile, sebbene statisticamente il contenuto delle unità H sia tipicamente basso.

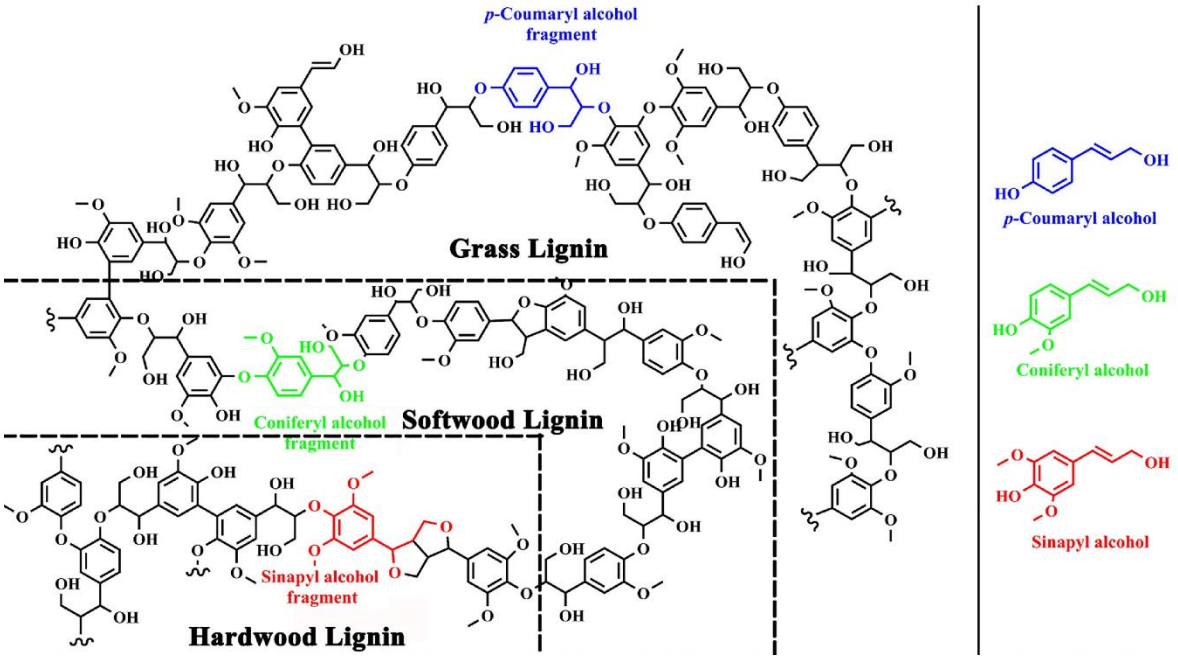

Figura 1.5: Struttura esemplificativa della lignina con i principali collegamenti inter-subunità [16]

Oltre ai tre principali nuclei fenolici, nella lignina si possono trovare notevoli quantità di altri componenti come coniferaldeide, sinapaldeide, *p*-idrossibenzoato, acetato ferulico, idrossicinnamati e altri sottoprodotti della biosintesi incompleta dei monolignoli [17].

Il peso molecolare della lignina risulta difficoltoso da determinare a causa dei cambiamenti strutturali che si verificano durante la sua estrazione. Il tipo di processo di isolamento e la sua intensità influenzano la chimica e la struttura della lignina. Vari cromofori si formano nella lignina tecnica provocandone l'aspetto marrone o marrone scuro, a differenza della lignina nativa che risulta invece quasi incolore [18] [19].

1.3 Estrazione della lignina

Come detto, la lignina non esiste in forma pura e isolata, ma è parte costituente della biomassa lignocellulosica. L'eterogeneità e la complessità intrinseca della lignina rendono difficile sviluppare approcci efficaci per il suo isolamento e il suo utilizzo come prodotto ad alto valore aggiunto. Ad oggi l'estrazione avviene principalmente nei processi di produzione della polpa di cellulosa per le industrie cartarie e delle moderne bioraffinerie che adottano condizioni piuttosto spinte che causano ulteriori modifiche nella struttura chimica della lignina, rendendone più difficile un'efficace valorizzazione.

Infatti, i trattamenti industriali a cui viene sottoposta la biomassa lignocellulosica consentono di separare la lignina da cellulosa ed emicellulosa, generando così le cosiddette lignine tecniche o industriali. Queste lignine differiscono notevolmente da quelle native corrispondenti, perché sono il risultato di una combinazione di molteplici reazioni tra cui l'idrolisi della biomassa, la condensazione dei frammenti di lignina, l'eliminazione dei gruppi funzionali nativi, la formazione di nuovi gruppi funzionali ed altro. Durante la delignificazione possono verificarsi numerose reazioni e interazioni tra cui l'eliminazione dei gruppi funzionali nativi della lignina, la condensazione dei

frammenti di lignina, la formazione di nuovi gruppi funzionali [20]. Inoltre, il processo di estrazione gioca un ruolo di primo piano nel contenuto di gruppi funzionali, quali solfonici, carbossilici, idrossilici e fenolici [21].

Dunque le lignine tecniche sono sensibilmente più eterogenee (in termini di struttura chimica e massa molecolare) rispetto alle lignine native e risultano pesantemente influenzate dallo specifico processo a cui è stata sottoposta la biomassa lignocellulosica [22].

Per queste ragioni la lignina è rimasta per molto tempo sottoutilizzata venendo principalmente bruciata per la produzione di energia che alimenta i processi stessi [23].

1.3.1 Processo Kraft

Il metodo Kraft è il principale processo utilizzato per la delignificazione delle biomasse lignocellulosiche, con una quota di circa l'85% sul totale trattato. Il tradizionale processo di spappolamento Kraft vede in primo luogo il trattamento della lignina con idrossido di sodio e solfuro di sodio a temperature di circa 170 °C e valori di pH di 13-14. Durante tale trattamento, gli anioni idrossido e idrosolfuro reagiscono con la lignina provocando la frammentazione del polimero in molecole a minore peso molecolare, solubilizzandola [24].

La lignina viene quindi separata dalla soluzione mediante precipitazione nell'intervallo di pH 5.5–7.5, grazie all'aggiunta di acido. La lignina prodotta con questo processo è altamente condensata (**Figura 1.6**), contiene una minore quantità di legami β-O-4 e presenta delle piccole quantità di zolfo. La si può ritenere composta da due frazioni: una a più basso peso molecolare, maggiormente condensata e ricca in idrossili aromatici, e una a più alto peso molecolare più simile alla lignina nativa e con una concentrazione maggiore di gruppi idrossilici alifatici. Quest'ultima contiene inoltre una percentuale relativa maggiore di legami β-O-4 residui.

L’elevata modifica chimica rende la lignina Kraft un materiale complesso che ne causa uno scarso impiego se non per scopi energetici [25].

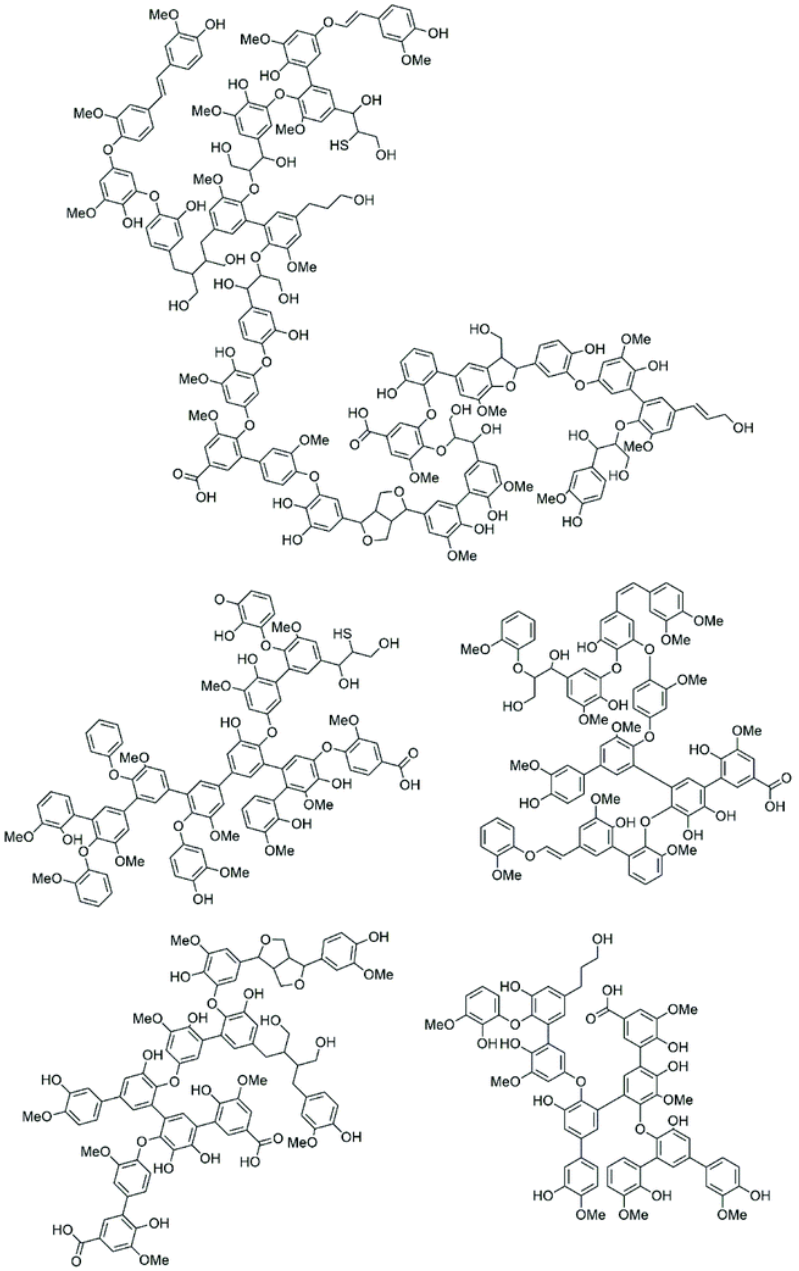

Figura 1.6: Struttura ipotizzata della lignina Kraft [26]

1.3.2 Processo al solfito

Il processo al solfito è il secondo più importante trattamento delle risorse lignocellulosiche a livello industriale, nonché il principale in termini di estrazione di lignine tecniche con usi commerciali. Viene condotto a 120–180 °C per 1–5 h, in un range di pH tra 2 e 12, utilizzando una soluzione acquosa di sali di solfiti (o idrosolfiti) d'ammonio, di magnesio, di sodio o di calcio. Generalmente tale processo viene eseguito in condizioni acide e la principale reazione è la solfonazione, che porta alla rottura dei legami eterei. [27].

Questa lignina presenta un contenuto di zolfo maggiore rispetto alla lignina Kraft, e proprio l'introduzione di gruppi solfonici (**Figura 1.7**) ne migliora notevolmente la solubilità in soluzioni acquose anche a pH neutro [28].

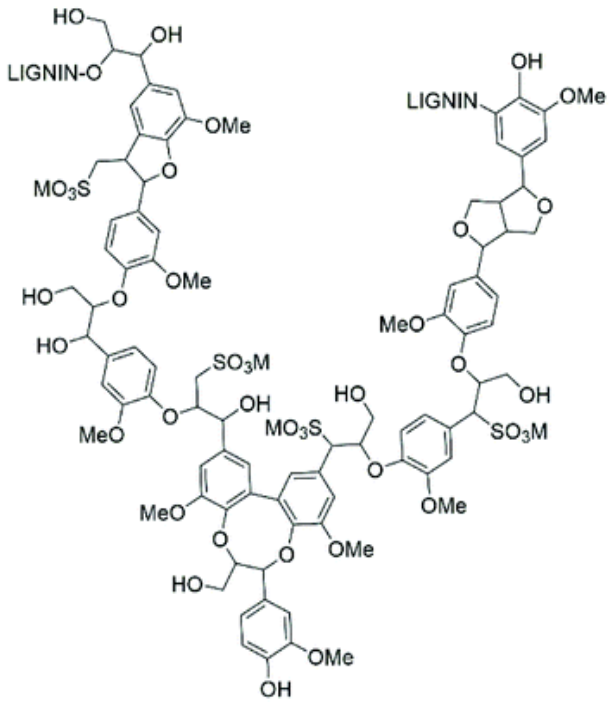

Figura 1.7: Struttura ipotizzata del lignosolfonato [26]

1.3.3 Processo organosolv

La lignina organosolv si ottiene trattando la biomassa lignocellulosica con solventi organici come agenti di delignificazione. Il processo organosolv consente la separazione dei principali costituenti della lignocellulosa utilizzando vari solventi durante lo spappolamento come alcoli (metanolo, etanolo, butanolo), chetoni (acetone), eteri (diossano, alcol tetraidrofurfurilico) e polioli (glicerolo, glicole etilenico), i quali spesso vengono miscelati con acqua e portati a temperature comprese tra 110 e 190 °C.

Il processo può essere condotto in assenza o in presenza di acidi (minerali o organici) come catalizzatori [29]. Questi ultimi vengono aggiunti al mezzo di spappolamento per garantire un'efficiente scissione del legame etereo nonché la distruzione dei legami lignina-carboidrati.

Nonostante si ottenga una lignina priva di zolfo e molto simile a quella nativa (**Figura 1.8**), questo processo non è ancora ampiamente utilizzato a causa dell'elevato costo di recupero del solvente e degli impianti che devono essere resistenti alla corrosione [30]. Tuttavia, la lignina è disponibile in commercio su scala pilota nei processi Organocell, Alcell, Chempolis, CIMV ed altri. In particolare, il processo CIMV vede l'utilizzo di paglia di grano, la quale viene trattata con una miscela di acido acetico e formico per 3.5 ore a 105 °C.

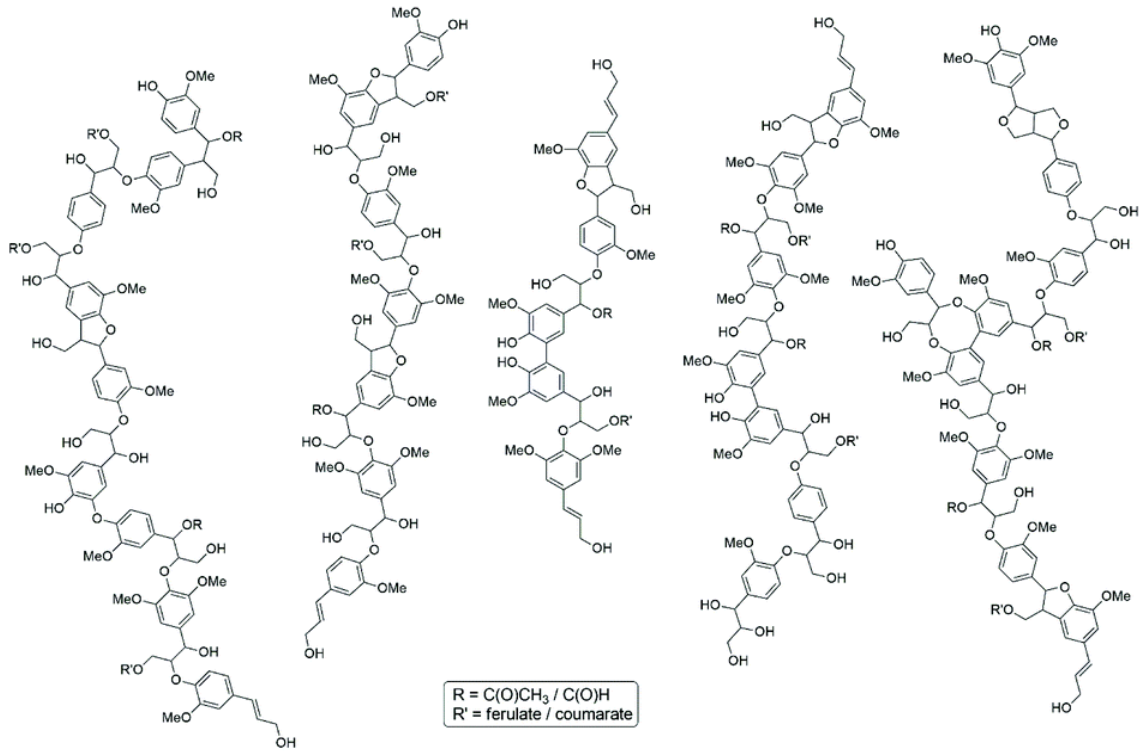

Figura 1.8: Struttura ipotizzata della lignina organosolv [26]

1.3.4 Processo soda

Il processo soda è stato spesso utilizzato per il trattamento di piante erbacee come paglia di grano, bagassa di canna da zucchero, kenaf e lino [31]. Durante il processo, la biomassa lignocellulosica subisce una solubilizzazione in una soluzione acquosa di idrossido di sodio ad alta pressione a 140–170 °C [32]. Questo processo alcalino, simile al processo Kraft, non implementa Na_2S e avviene a bassa severità, il che porta a una depolimerizzazione meno efficiente e ad un prodotto privo di zolfo e più puro [33].

L'efficienza di questo processo di spappolamento può essere migliorata con l'aggiunta di antrachinone, che stimola la scissione riduttiva dei legami eterei e allo stesso tempo diminuisce la degradazione dei carboidrati [34]. A causa dell'ossidazione dei gruppi idrossilici alifatici, la lignina soda ha un maggiore contenuto di acidi carbossilici

rendendone così difficile il recupero mediante centrifugazione o filtrazione [34]. Tuttavia, l'assenza di zolfo consente l'impiego in alcune applicazioni ad alto valore aggiunto come nella realizzazione di biocompositi.

1.4 Valorizzazioni della lignina

Nei vari processi di estrazione la lignina è tradizionalmente utilizzata per la generazione di energia nel sito produttivo, necessaria al fabbisogno energetico del processo stesso [35]. Attualmente, solo una piccola frazione, circa il 2% in peso delle più di 75 milioni di tonnellate di lignina prodotte durante l'estrazione della cellulosa, viene impiegato per altri scopi [36]. Si attesta così una produzione mondiale di lignina tecnica commerciale pari a circa 1.65 Mt/anno (**Tabella 1.4**), tra i quali i lignosolfonati rappresentano quasi l'80% del mercato.

Va sottolineato però che i crescenti miglioramenti del processo Kraft e l'efficientamento degli impianti produttivi danno potenzialmente modo di prelevare fino al 20% della lignina dall'impiego quale vettore energetico, riservandola così a scopi di valorizzazione a più alto valore aggiunto [37].

Tabella 1.4: Produzione e simulazioni della produzione commerciale delle principali lignine tecniche (valori in kt) [37]

Lignina	Produzione nel 2015	Previsione per il 2020	Previsione per il 2025	Potenziale di produzione
Lignosolfonato	1 100	1 400	1 550	3 000
Lignina Kraft	75	200	250	78 000

La produzione di lignina organosolv, soda o derivante da altri processi è ancora modesta. Alcune delle loro caratteristiche chimiche però, come l'assenza di zolfo, alimenta grande interesse per alcune applicazioni ad alto valore aggiunto come ad esempio l'utilizzo quale *filler* per la preparazione di materiale composito con caratteristiche attive, come attività antiossidante, antimicrobica, etc. Promettente anche il loro utilizzo per lo sviluppo di fibre di carbonio e di carboni attivi [38].

D'altro canto il mercato dei lignosolfonati risulta essere ben consolidato e le sue principali applicazioni riguardano il campo dei tensioattivi, dei disperdenti in ceramiche e degli additivi per cementi/calcestruzzi [37].

Dati gli elevati volumi di lignina annualmente estratta, ne risulta evidente l'elevata potenzialità come soluzione alternativa alla dipendenza dal petrolio. Come specificato, però, le sue applicazioni attuali sono compromesse dalla complessa e variabile natura chimica. Ciò richiede quindi un attento studio al fine di selezionare la strategia di valorizzazione più appropriata.

1.4.1 Nanomateriali a base di lignina

Una tra le opzioni più promettenti in questo senso riguarda la trasformazione della lignina in nanomateriali. Con il termine nanomateriale si intendono sostanze chimiche di dimensioni estremamente ridotte, in cui almeno una dimensione esterna è nell'intervallo di grandezza 1 – 100 nm.

Materiali micro e nano strutturati possono dare un alto valore aggiunto alle formulazioni industriali e a prodotti di consumo: dai dentifrici alle batterie, fino a vernici e all'abbigliamento [39].

Tuttavia, l'uso di nanomateriali costituiti da metalli, semiconduttori o vari composti inorganici rappresenta un rischio ambientale significativo, data la loro persistenza

nell'ambiente. Inoltre possono attraversare le membrane cellulari accumulandosi nel tempo ed entrando nella catena alimentare [40]. Nanoparticelle preparate da biomateriali naturali possono invece potenzialmente risultare innocue per l'uomo, oltre che benigne per l'ambiente [41].

In questo senso, la preparazione di nanoparticelle di lignina e di altre nanostrutture ha aperto una nuova strada per la trasformazione e la valorizzazione di questa risorsa [42]. Vengono così fornite possibili applicazioni per sistemi di rilascio di farmaci, per il rilascio di molecole idrofobiche [43], per migliorare l'assorbimento di radiazione ultravioletta, implementare proprietà antibatteriche e antiossidanti [44], per rinforzare polimeri o come materiale per elettrodi [45].

Molteplici sono i metodi già sviluppati per la formazione di nanoparticelle di lignina (LNPs) [46]. I più comuni sono quelli che prevedono uno scambio di solvente. Il processo vede generalmente la solubilizzazione della lignina in un solvente organico opportuno a cui viene aggiunto un antisolvente (solitamente acqua) favorendo così la precipitazione della lignina. Il precipitato viene lavato ed essiccato per preparare il corrispondente particolato solido. Il metodo di scambio del solvente presenta i vantaggi di un funzionamento semplice e condizioni di sintesi blande [47]. Tra le diverse opzioni, la metodica di dialisi viene utilizzata di frequente per la semplicità operativa e per la possibilità di controllare e modulare facilmente le dimensioni delle nanoparticelle. Studi hanno dimostrato che il solvente utilizzato per dissolvere la lignina ha un effetto sulle proprietà delle nanoparticelle ottenute [48]. Ciò è dovuto alla migliore o peggiore miscibilità del solvente scelto con l'acqua, antisolvente del processo. Inoltre, le differenti interazioni di scambio dei solventi con l'acqua e la loro stessa polarità potrebbero giocare un ruolo importante nella formazione delle nanoparticelle.

È stato anche riportato un effetto indotto dalla concentrazione della soluzione di lignina pre-dialisi sulle caratteristiche delle nanoparticelle di lignina. Nei processi di

scambio di solvente le nanoparticelle di lignina si formano tramite un meccanismo di nucleazione-crescita, poiché il solvente viene via via sostituito con acqua. Diverse concentrazioni iniziali portano a differenze sul diametro delle particelle ottenute, mostrando un valore minimo a basse concentrazioni iniziali e un massimo ad alte [48]. Una maggiore concentrazione di lignina nel sistema si traduce quindi in una maggiore possibilità per la crescita delle nanoparticelle e il conseguente aumento del diametro medio. Inoltre, concentrazioni iniziali maggiori aumentano la probabilità di formazione di nuclei di crescita, portando quindi ad un'ampia distribuzione delle dimensioni.

Questa semplice metodica permette di produrre dispersioni acquose di nanoparticelle di lignina senza nessuna modifica chimica della stessa. Il particolato ottenuto può essere essiccato (mediante evaporazione o liofilizzazione) e ridisperso in acqua mediante sonicazione. Queste ulteriori possibilità di trattamento rendono le nanoparticelle di lignina adatte per essere utilizzate in molti processi industriali, come la fabbricazione di colle e materiali compositi.

1.4.2 Materiali e polimeri a base di lignina

La lignina ha una T_g normalmente compresa tra 100 e 170 °C, a seconda delle specie vegetali e dei metodi di isolamento. Il valore relativamente alto della T_g è causato dalle forti interazioni intra e intermolecolari, che ne ostacolano la mobilità. In aggiunta, la lignina può incorrere in reazioni di autocondensazione indotte dai radicali fenossido ad alta temperatura, conferendo alla lignina caratteristiche termoindurenti [49] [50]. È per questo motivo, oltre che alla presenza di un elevato numero di funzionalità per ciascuna molecola, che la maggior parte dei materiali a base di lignina sono polimeri altamente reticolati [51].

D’altro canto, i materiali termoplastici a base di lignina suscitano un grande interesse per la loro migliore lavorabilità e riciclabilità rispetto a quella dei reticoli polimerici termoindurenti. Per i polimeri termoplastici, la processabilità è fondamentale per il loro utilizzo in diverse applicazioni. Tuttavia, la lignina tal quale non può essere utilizzata per sintetizzare questi polimeri a causa della sua bassa stabilità termica, delle scarse proprietà di flusso, che ne ostacolano la lavorazione allo stato fuso, oltre all’elevata reattività e concentrazione di gruppi funzionali.
Per questo motivo generalmente la lignina viene modificata chimicamente agendo selettivamente sui gruppi ossidrilici reattivi mediante esterificazioni, eterificazioni o innesti polimerici [52]. In tal modo si ottengono derivati della lignina con maggior stabilità termica e lavorabilità permettendone, grazie anche ad una maggior compatibilità con altri polimeri, un ruolo in formulazioni polimeriche principalmente in qualità di additivo [53].

Va ricordato che la lignina ottenuta commercialmente è molto eterogenea e ha un'ampia gamma di pesi molecolari. Tale eterogeneità può portare a una reattività imprevedibile. Sono state applicate diverse strategie per affrontare e mitigare questo problema, tra cui il frazionamento attraverso estrazione con solvente o ultrafiltrazione su membrana (in entrambi i casi prevedendo l’impiego di solventi organici). Questo necessario passaggio, in aggiunta alle modifiche chimiche, rende la sintesi di polimeri termoplastici a base di lignina non immediata. Molto rari sono gli studi che vedono invece la lignina utilizzata direttamente per la formulazione di nuovi materiali, permettendo così, tra l’altro, di preservare tutte le sue proprietà intrinseche [54] [55]. La metodica utilizzata è quella del *solvent casting*, la quale però vede l’impiego di solventi organici alto bollenti quali dimetilsolfossido, che aumentano le tempistiche del processo e ne inficiano la sostenibilità.

Capitolo II

Scopo del lavoro di tesi

La biomassa lignocellulosica rappresenta una delle più valide alternative al petrolio per la produzione di carburanti, materiali plastici e composti chimici comunemente impiegati a livello sia industriale che civile. La lignina in particolare, però, risulta essere una delle materie prime di origine naturale meno valorizzate. Ciò è sostanzialmente legato alla sua complessa struttura chimica che non solo manca di un'unità ripetitiva univoca e varia da specie a specie, ma viene ulteriormente modificata a seguito dei processi chimici di estrazione operati dalle industrie della polpa di cellulosa e dalle moderne bioraffinerie. Il risultato è un materiale altamente eterogeneo e variabile che viene in gran parte utilizzato per produrre energia. Ciononostante, la lignina è un polimero dalle notevoli potenzialità, avendo proprietà uniche quali elevata capacità antiossidante e di schermo UV, attività antibatterica, nonché biocompatibile e, in specifiche condizioni, biodegradabile.

In tale contesto si inserisce il presente lavoro di tesi che ha come obiettivo finale la valorizzazione della lignina attraverso la realizzazione di film che possano trovare impiego in varie applicazioni, ad esempio in agricoltura come teli per pacciamatura con proprietà attive.

Le lignine tecniche, su tutte la lignina Kraft, purtroppo non sono facilmente processabili attraverso le classiche strategie adottate per i polimeri termoplastici (e.g. estrusione, stampaggio ad iniezione, stampaggio per soffiaggio) avendo una finestra di lavorabilità molto ristretta e una reattività non controllabile. Inoltre, ad eccezione dei lignosolfonati, risultano solubili solo in solventi organici tossici e/o altobollenti quali dimetilsolfossido o dimetilformammide o in soluzioni acquose a pH alcalino (> 12). Ciò

limita notevolmente la possibilità di adottare metodiche semplici e sostenibili per la produzione di film anche attraverso *solvent casting*. Basti pensare all'effetto negativo che la presenza di quantità non risibili di idrossidi, rimanendo all'interno del film, esercita sull'integrità, l'estetica e le proprietà meccaniche e funzionali del film stesso.

Per superare tali problematiche l'attività di ricerca qui presentata si focalizza sullo studio di procedure di dialisi per valutare la possibilità di ottenere soluzioni acquose a pH neutro di lignine tecniche, nello specifico una lignina Kraft e una lignina organosolv, che possano essere poi utilizzate in formulazioni per la produzione di film attraverso evaporazione del solvente.

Approfondite analisi saranno volte a confermare l'ottenimento di una soluzione, escludendo quindi la formazione di nanoparticelle, attraverso tecniche di *dynamic light scattering*, e a delucidare la struttura chimica delle molecole di lignina in soluzione attraverso tecniche cromatografiche (permeazione su gel, GPC), spettroscopiche (NMR) e calorimetriche (analisi termogravimetrica, TGA, e calorimetria differenziale a scansione, DSC) per comprendere se e quanto il trattamento di dialisi possa aver influito sulle caratteristiche della lignina di partenza.

Capitolo III

Parte sperimentale

3.1 Reagenti, solventi e materiali

I campioni di lignina Kraft da legno tenero (SKL) e di lignina organosolv da paglia di grano (WSOL) sono stati forniti rispettivamente da "Stora Enso" e "CIMV".

I reagenti cloruro di litio (≥99 %), colesterolo (≥99%), cromo(III) acetilacetonato (≥97%), idrossido di sodio (≥98%), idrossido di potassio (≥99%), sono stati acquistati da Sigma Aldrich. Il reattivo 2-cloro-4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-diossafosfolano era stato precedentemente sintetizzato in laboratorio impiegando reagenti e solventi ad alta purezza acquistati presso Sigma Aldrich.

I solventi etanolo (96%), acetone (≥99,5%), DMF (≥99,8%), cloroformio (≥99,8%), cloroformio deuterato (99,8% d), DMSO (≥99,9%), dimetilsolfossido deuterato (99,9% d6), piridina (≥99,9%) sono stati acquistati da Sigma Aldrich.

Nei protocolli sperimentali sono state inoltre utilizzate acqua ultrapura e acqua distillata.

3.2 Metodiche e strumentazione

Per le pesate dei reagenti solidi e di lignina sono state utilizzate a seconda della necessità, la bilancia analitica "Precisa LX 220A", che garantisce una sensibilità di ±0.0001 g, e la bilancia tecnica "Precisa BJ 1000C" con sensibilità ±0,01 g. Le misure di

pH sono state effettuate grazie allo strumento “Hanna pH 211” con una sensibilità di ±0.1 pH.

3.2.1 Dialisi

I processi di dialisi sono stati effettuati con cassette per dialisi “Slide-A-Lyzer ThermoFischer” con cut-off di 2 000 o 7 000 dalton con capacità massima di carico del campione di 30 e 12 ml, rispettivamente. Le varie dialisi sono state condotte su soluzioni a concentrazione differente, sia di lignina SKL che WSOL.

La procedura sperimentale di caricamento della membrana, controllo della variazione del pH e prelievo finale della soluzione neutra è la medesima per tutti gli esperimenti.

La lignina è stata pesata con una bilancia tecnica per poi essere aggiunta lentamente in un becher contenente una soluzione 1 M di NaOH (o KOH) in acqua ultrapura, in un quantitativo commisurato all’esperimento in corso. Si è quindi lasciato il sistema sotto vigorosa agitazione grazie ad un’ancoretta magnetica. La soluzione è stata inoltre posta in un bagno a ultrasuoni per 15 minuti per favorire il processo di dissoluzione.

Si è misurato il pH della soluzione ottenuta per poi prelevare tutta la soluzione all’interno del becher con una siringa, iniettandola all’interno della cassetta per dialisi attraverso gli appositi setti forabili. La membrana è stata quindi immersa in un bagno di acqua distillata posto sotto agitazione. L’acqua è stata cambiata almeno una volta al giorno fino al termine dell’esperimento.

Il pH interno della soluzione è stato misurato ad intervalli di tempo regolari prelevando una piccola aliquota, reiniettata nella cassetta per dialisi al termine dell’analisi.

Al raggiungimento della neutralità la soluzione è stata prelevata e ne è stato quantificato il volume. Una aliquota è stata essiccata attraverso liofilizzazione e

ulteriore passaggio in stufa sottovuoto a 40 °C per 12 ore prima delle successive caratterizzazioni.

Per calcolare la percentuale di retentato, 5 ml di soluzione dializzata sono stati posti in un apposito contenitore precedentemente tarato e la massa di campione è stata pesata previa completa evaporazione del solvente in stufa a 90°C sottovuoto.

La membrana da 7 000 dalton è l'unica che ha richiesto delle attenzioni sperimentali aggiuntive. In particolare, data la natura dell'esperimento, si è riscontrato una significativa quantità di permeato nel bagno di dialisi. Si è dunque deciso di cambiare l'acqua più frequentemente e di recuperare la lignina permeata inducendone la precipitazione attraverso l'acidificazione della soluzione. Il campione così ottenuto è stato accuratamente lavato, essiccato (stufa sottovuoto a 40 °C per 12 ore) e caratterizzato.

3.2.2 Centrifugazioni

Per le centrifugazioni sono stati utilizzati due strumenti: una centrifuga "Sartorius centrisart G-16" e una ultracentrifuga "Thermo Scientific Sorvall wX+ Ultra Series". Nello specifico, 8 g di lignina WOSL sono stati disciolti in 75 ml di una soluzione 1 M di NaOH. La prima centrifugazione è avvenuta in flaconi da centrifuga, a 8 422 g per circa 45 minuti. Il surnatante è stato raccolto e sottoposto a una seconda centrifugazione avvenuta a 20 627 g per circa 60 min.

Al termine di ogni centrifugazione il corpo di fondo è stato opportunamente lavato e raccolto per fini qualificativi e quantitativi. Il surnatante è stato raccolto anch'esso per analisi DLS.

L'ultracentrifugazione è stata effettuata su piccole aliquote dei campioni dializzati della lignina OS e sul surnatante sottoposto alla seconda centrifugazione. La centrifugazione

è stata condotta con un valore medio di 100 000 g per 60 minuti. Al termine, una piccola aliquota del surnatante è stata raccolta dalla testa della provetta in policarbonato e analizzata al DLS.

3.3 Caratterizzazioni

3.3.1 Cromatografia di permeazione su gel (GPC)

Le analisi cromatografiche sono state condotte su un sistema "HPLC Shimadzu" corredato di una colonna "PLgel MiniMIX-C (Agilent)". Come fase mobile è stato utilizzato dimetilsolfossido contenente 0.1% di LiCl. Si è tenuta per tutte le prove una portata costante di 0.5 mL/min ed una temperatura di 70°C.

La retta di calibrazione è stata ottenuta impiegando standard di polistirene solfonato nel range 2.6 – 4.3 kDa. I campioni iniettati sono stati precedentemente sciolti in DMSO e filtrati con "Iso-Disc", una membrana di PTFE con pori di 0.2 μm.

3.3.2 Spettroscopia NMR

L'acquisizione degli spettri è stata eseguita grazie ad uno spettrometro "Bruker 400 MHz NMR". Per le analisi ^{31}P i campioni sono stati funzionalizzati attraverso l'impiego di 2-cloro-4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-diossafosfolano, in accordo con una procedura riportata in letteratura [56]. Una miscela di cloroformio deuterato e piridina anidra in rapporto volumetrico 1:1,6 è stata usata come solvente e colesterolo come standard interno.

3.3.3 Diffusione dinamica della luce (DLS)

Le analisi DLS, per la verifica della presenza di nanoparticelle e per l'eventuale determinazione del diametro idrodinamico medio, sono state possibili grazie allo strumento "Malvern Zetasizer Ultra". I campioni liquidi sono stati analizzati in celle di policarbonato "DTS1070", scegliendo come mezzo disperdente l'acqua e considerando l'indice di rifrazione del materiale di analisi (lignina) pari a 1.61.

Prima di ogni analisi si è atteso che la soluzione nella cella raggiungesse una temperatura costante e pari a 25°C. Lo strumento è stato impostato in modo da effettuare dieci acquisizioni fornendo come risultato la media di tali analisi, per poi ripetere la procedura di acquisizione altre due volte. Per ogni campione, si è considerato quindi il valore medio delle tre analisi effettuate.

3.3.4 Analisi termogravimetriche (TGA)

I dati termogravimetrici sono stati raccolti con uno strumento "Perkir Elmer TGA 4000". Tutti i campioni (circa 10 mg) sono stati opportunamente pesati in un apposito crogiolo in materiale ceramico. Tutte le analisi sono state condotte sotto flusso costante di azoto (20 mL/min) con una rampa di temperatura di 10 °C/min da 50 fino a 900°C.

3.3.5 Calorimetria differenziale a scansione (DSC)

Le calorimetrie sono state eseguite con uno strumento "Mettler Toledo DSC 3 STAR system", in costante flusso di azoto (30 mL/min), nell'intervallo di temperatura da 40 °C fino a 240°C ad una velocità pari a 20 °C/min. Sono stati utilizzati crogioli di alluminio, riempiti con circa 8 mg di campione. Ogni analisi è stata in seguito normalizzata per il peso del campione analizzato (precedentemente determinato su bilancia analitica).

Capitolo IV

Risultati e discussione

L'idea di creare film di lignina vede come step fondamentale l'ottenimento di una soluzione a pH neutro di lignina. Il processo di dialisi a partire da soluzioni acquose alcaline è stato quello prescelto per lo scopo. Inizialmente sono state utilizzate due membrane con cut-off differente per studiare il processo di dialisi con soluzioni di SKL. Si sono effettuati poi, mantenendo costante il cut-off della membrana, due studi: il primo sull'effetto cationico indotto dall'utilizzo di differenti idrossidi alcalini ed il secondo riguardante l'effetto di differenti concentrazioni di lignina nelle soluzioni di dialisi. Quest'ultimo è stato condotto anche su campioni di WSOL.

4.1 Lignina SKL: dialisi con cut-off di membrana da 7 000 dalton

La sola lignina Kraft ha visto l'utilizzo di membrane per dialisi differenti: una con cut-off di 2 000 dalton mentre l'altra da 7 000 dalton. Si sono voluti utilizzare due differenti porosità per valutare, in relazione al cut-off, l'andamento e la velocità del processo di analisi. Le differenze strutturali delle due cassette di dialisi, in termini di dimensione e capacità, non hanno impedito di seguire la metodica sperimentale prefissata: dializzare una soluzione al 25% di SKL ottenuta attraverso dissoluzione in una soluzione 1 M di idrossido di sodio.

I dati sperimentali ottenuti sono riportati in **Tabella 4.1**.

Tabella 4.1: Dati di dialisi esperimento con membrana da 7 000 Da

Campione	Lignina (g)	ml iniziali	ml finali	pH iniziale	pH finale	Giorni di dialisi
7 000 Da	4	16	15	12.10	6.73	8

La bassa concentrazione della soluzione finale ottenuta ha reso non significativo il calcolo della resa, poiché la quasi totalità della lignina risultava permeata attraverso la membrana. Il fenomeno è risultato ben evidente già nelle prime ore di dialisi nelle quali si è avuto un indicativo cambio di colore dell'acqua del bagno abbinato ad una rapida decrescita del pH, come mostrato in **Figura 4.1**.

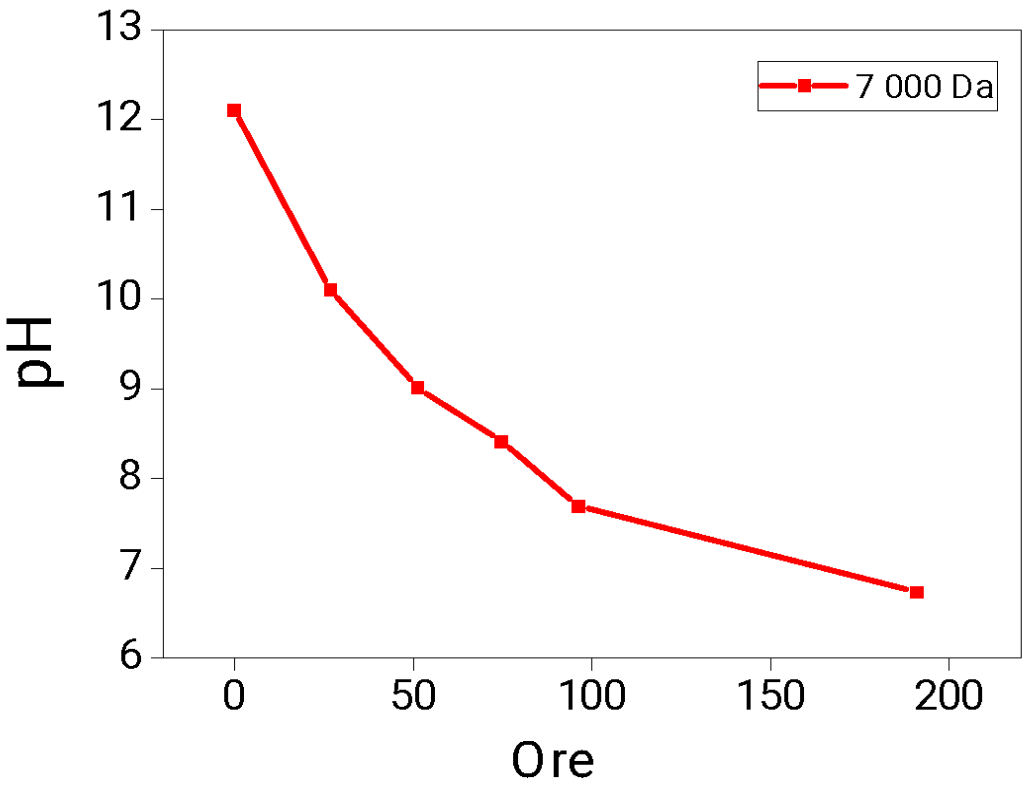

Figura 4.1: Andamento del pH della soluzione durante il processo di dialisi

La lignina permeata nel bagno è stata raccolta dopo 3.5, 17 e 42 ore dall'inizio del processo. I campioni così raccolti, assieme al poco residuo della soluzione finale, sono stati caratterizzati con analisi GPC (**Tabella 4.2**).

Tabella 4.2: Dati cromatografici dei campioni di permeato (P), della lignina SKL e del retentato (R) di dialisi

Campione	**M_n**	**PDI**
SKL	1200	5.0
P_3.5 h	750	2.5
P_17 h	1300	4.7
P_42 h	2200	4.1
R_7000 Da	3500	3.2

Il cromatogramma riportato in **Figura 4.2** e i dati in **Tabella 4.2** rendono evidente che ci sia stato un significativo frazionamento della lignina durante la dialisi. Lo spostamento dei picchi cromatografici verso tempi di ritenzione minori è ben visibile, come il correlato aumento dei pesi molecolari. Ciò sta ad indicare che nelle prime ore sono permeate le frazioni a più basso peso molecolare, seguite via via da unità con pesi molecolari crescenti fino alla neutralizzazione della soluzione. Inoltre, il campione finale presenta un M_n elevato e una polidispersità più contenuta rispetto alla lignina SKL, evidenza della perdita delle frazioni a più basso peso molecolare.

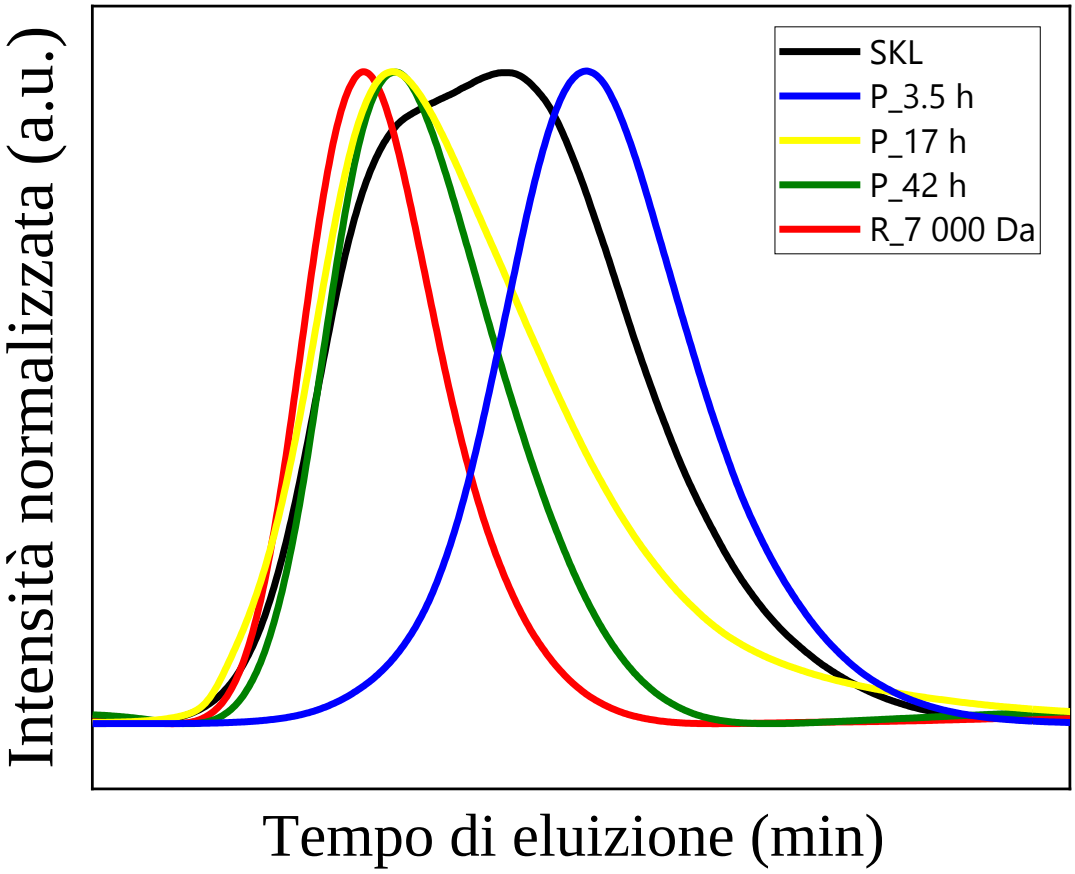

Figura 4.2: Analisi GPC del campione di dialisi, dei permeati della lignina SKL non trattata

Dei medesimi campioni è stata effettuata l'analisi ^{31}P-NMR (**Tabella 4.3**), tranne che per il campione dializzato (data l'esigua quantità raccolta).

Tabella 4.3: Analisi quantitativa dei gruppi ossidrilici dei campioni permeati (P) e della lignina SKL di partenza (valori in mmol/g)

Campione	-OH alifatici	-OH fenolici condensati	-OH fenolici non condensati	-OH fenolici totali	-OH carbossilici
SKL	1.95	1.73	2.26	4.00	0.37
P_3.5h	0.65	0.80	1.91	2.71	0.51
P_17h	1.56	1.24	1.65	2.89	0.42
P_42h	1.69	1.34	1.67	3.01	0.40

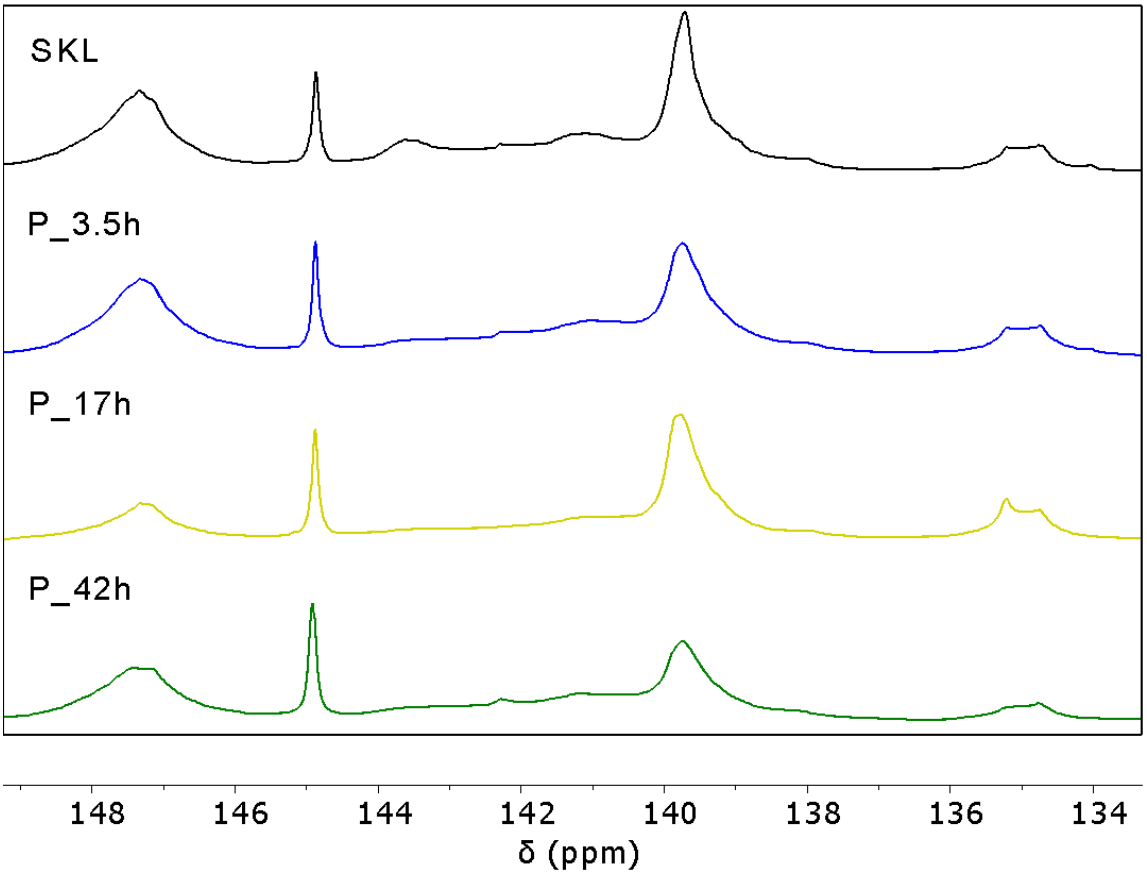

Figura 4.3: Spettri ^{31}P-NMR dei campioni permeati dalla membrana e della lignina SKL di partenza

Dal confronto con la lignina non trattata emerge una significativa differenza in termini di concentrazione di gruppi ossidrilici sia nella regione fenolica (144-137 ppm) sia in quella alifatica (150-145 ppm). Nei campioni permeati si osserva un progressivo e significativo aumento del contenuto di ossidrili alifatici: si denota infatti una concentrazione molto ridotta di ossidrili alifatici nel campione di lignina permeata dopo 3.5 ore, che aumenta nei campioni P_17h e P_42h. Queste variazioni sono da ricondursi al fatto che le frazioni di lignina a più basso peso molecolare tipicamente presentano una bassa concentrazione di ossidrili di natura alifatica, in completo accordo con le analisi GPC.

Riassumendo, come già detto il processo di dialisi ha palesato un significativo frazionamento della lignina e una notevole permeazione della stessa attraverso la membrana legato all'elevato cut-off. Il processo è risultato quindi molto veloce ma poco efficiente, creando soluzioni di lignina eccessivamente diluite. Per questi motivi si è deciso di non procedere ulteriormente con l'utilizzo di membrane con questo specifico cut-off.

4.2 Dialisi lignina SKL: studio dell'effetto cationico

Come riportato nel paragrafo precedente, la membrana con porosità 7 000 Da si è rivelata poco adatta per gli scopi prefissati. Per questo motivo, nello studio dell'effetto di controioni differenti si è utilizzata una membrana da 2 000 Da. Sono state preparate due soluzioni al 25 % di SKL, ottenute rispettivamente da soluzioni 1 M di sodio e potassio idrossido. I dati sperimentali e i relativi studi del pH sono riportati in Tabella 4.4.

Tabella 4.4: Dati di dialisi con soluzioni basiche in presenza di cationi sodio o potassio

Campione	Lignina (g)	ml iniziali	ml finali	pH iniziale	pH finale	Giorni di dialisi
SKL_Na	7.5	30	78	12.10	6.85	45
SKL_K	7.5	30	79	12.05	7.05	46

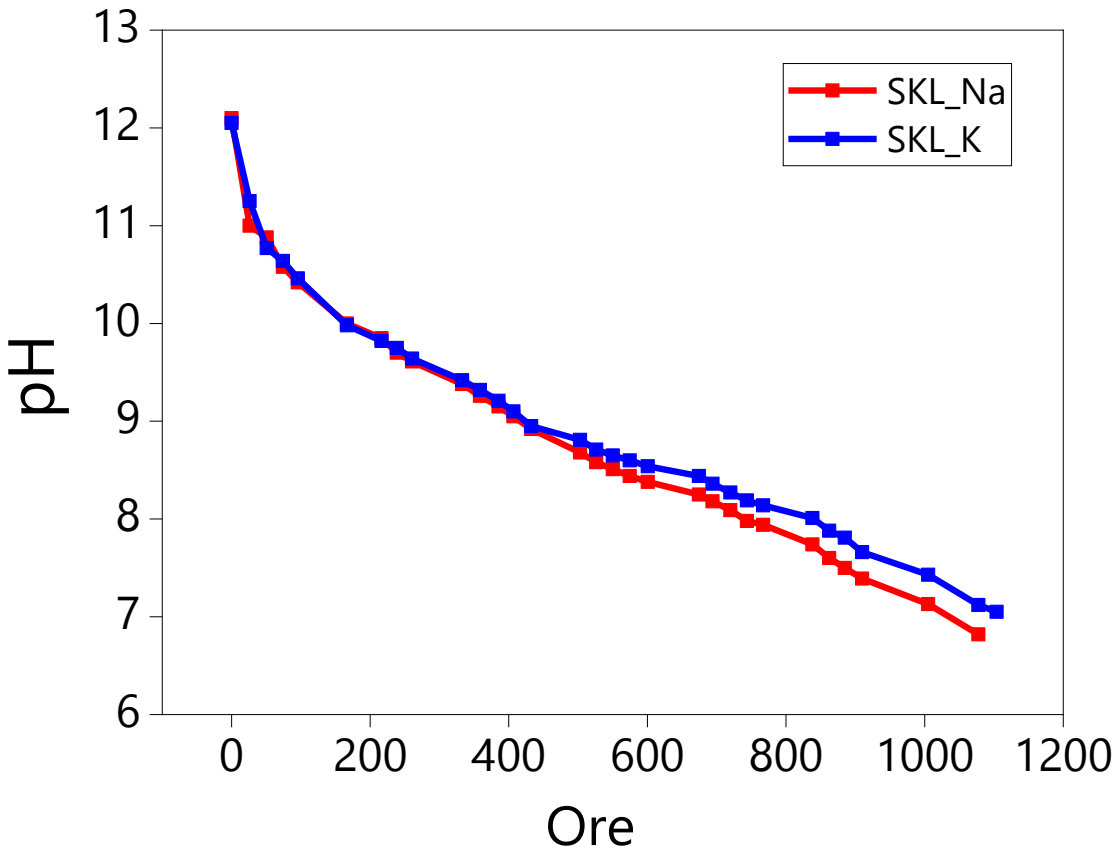

Figura 4.4: Andamento del pH delle soluzioni durante il processo di dialisi

Il calcolo della resa di lignina dializzata ottenuta risulta parzialmente inficiato da inevitabili perdite dovute ai ripetuti prelievi per la misurazione del pH. Ciononostante è possibile riportare come attendibile un valore pari a circa il 70% di resa. È interessante notare come le due dialisi abbiano avuto un andamento di decrescita del pH molto simile (**Figura 4.4**) e come questo sia stato più lento se comparato alla membrana con porosità 7 000 Da. Si può quindi affermare che la ridotta porosità abbia rallentato lo scambio ionico ed impedito l'eccessiva permeazione della lignina durante la dialisi.

I campioni di retentato sono stati caratterizzati attraverso analisi GPC (**Tabella 4.5**).

Tabella 4.5: Dati cromatografici dei campioni dializzati e della lignina SKL di partenza

Campione	**M_n**	**PDI**
SKL	1200	5.0
SKL_Na	3500	4.1
SKL_K	3600	4.2

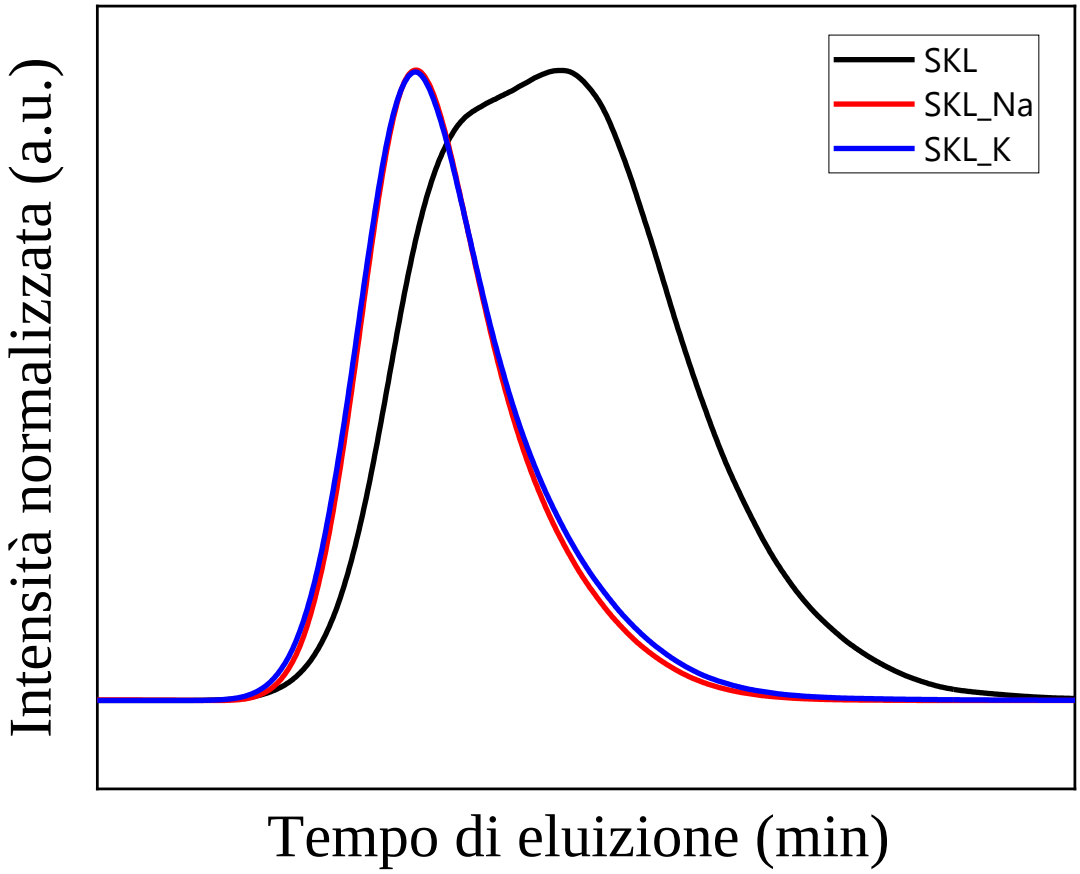

Figura 4.5: Analisi GPC dei campioni dializzati e della lignina SKL di partenza

Il confronto dei cromatogrammi riportati in Figura 4.5 porta ad un'importante conclusione già tratta nel paragrafo precedente. In entrambi i campioni il valore di M_n risulta maggiore rispetto alla lignina tal quale mentre la polidispersità si riduce. I valori ottenuti portano a concludere che anche in questo caso si sia verificato un processo di frazionamento, seppur molto meno marcato rispetto alla membrana con cut-off maggiore, che ha visto la permeazione delle molecole di lignina a più basso peso molecolare.

Dei campioni è stata in seguito effettuata l'analisi ^{31}P-NMR (**Tabella 4.6**).

Tabella 4.6: Analisi quantitativa dei gruppi ossidrilici dei campioni dializzati e della lignina SKL di partenza (valori in mmol/g)

Campione	-OH alifatici	-OH fenolici condensati	-OH fenolici non condensati	-OH fenolici totali	-OH carbossilici
SKL	1.95	1.73	2.26	4.00	0.37
SKL_Na	1.59	1.16	1.58	2.74	0.39
SKL_K	1.63	1.19	1.63	2.82	0.44

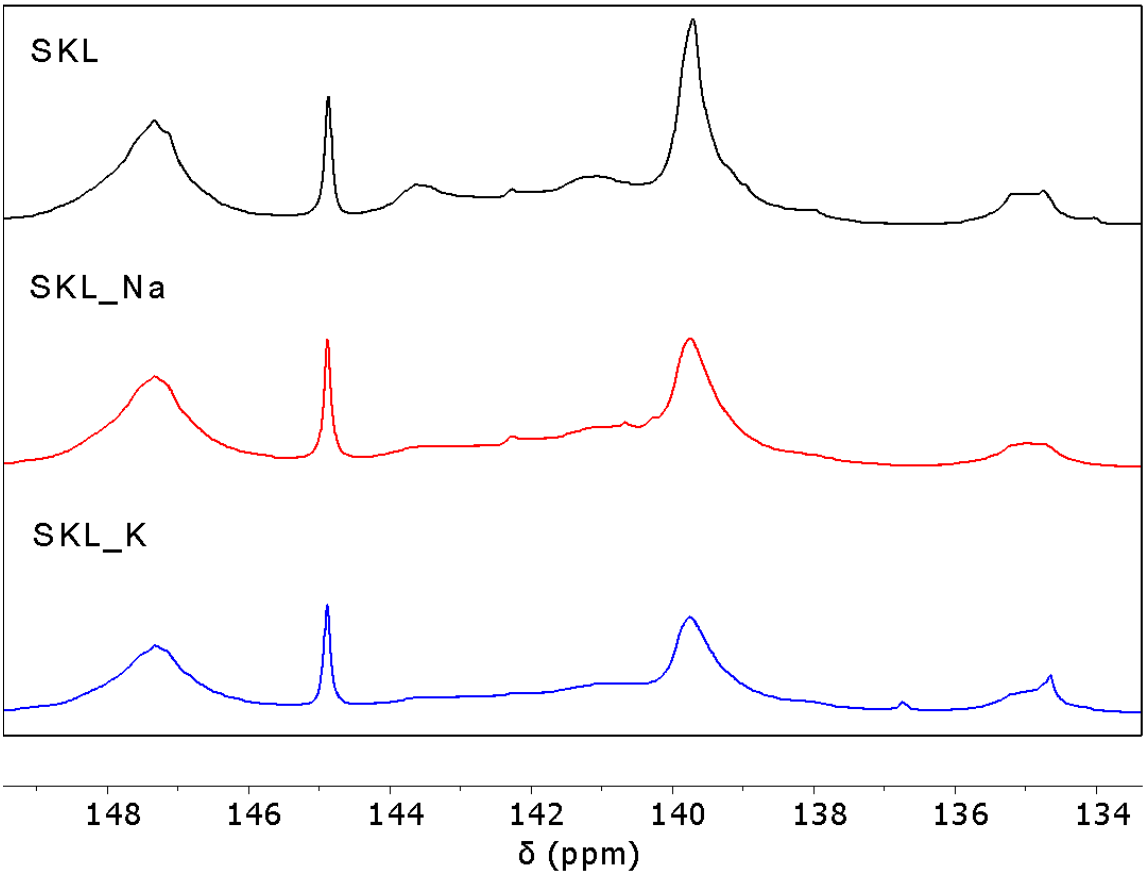

Figura 4.6: Spettri ^{31}P-NMR dei campioni di dialisi e della lignina SKL di partenza

Dalle integrazioni dei vari picchi caratteristici dei due campioni dializzati (**Figura 4.6**) emergono, rispetto alla lignina non trattata, delle variazioni comuni. I segnali riconducibili agli ossidrili di natura carbonilica rimangono pressoché invariati mentre risultano ridotti gli ossidrili alifatici e ancor di più quelli fenolici. Queste basse concentrazioni di funzionalità ossidriliche, in particolar modo fenoliche, sono tipiche delle frazioni di lignina a più alto peso molecolare, confermando così l'avvenuto frazionamento della lignina stessa.

I prodotti di dialisi sono inoltre stati caratterizzati con analisi termogravimetrica (**Figura 4.7**) e calorimetrica (**Figura 4.8**).

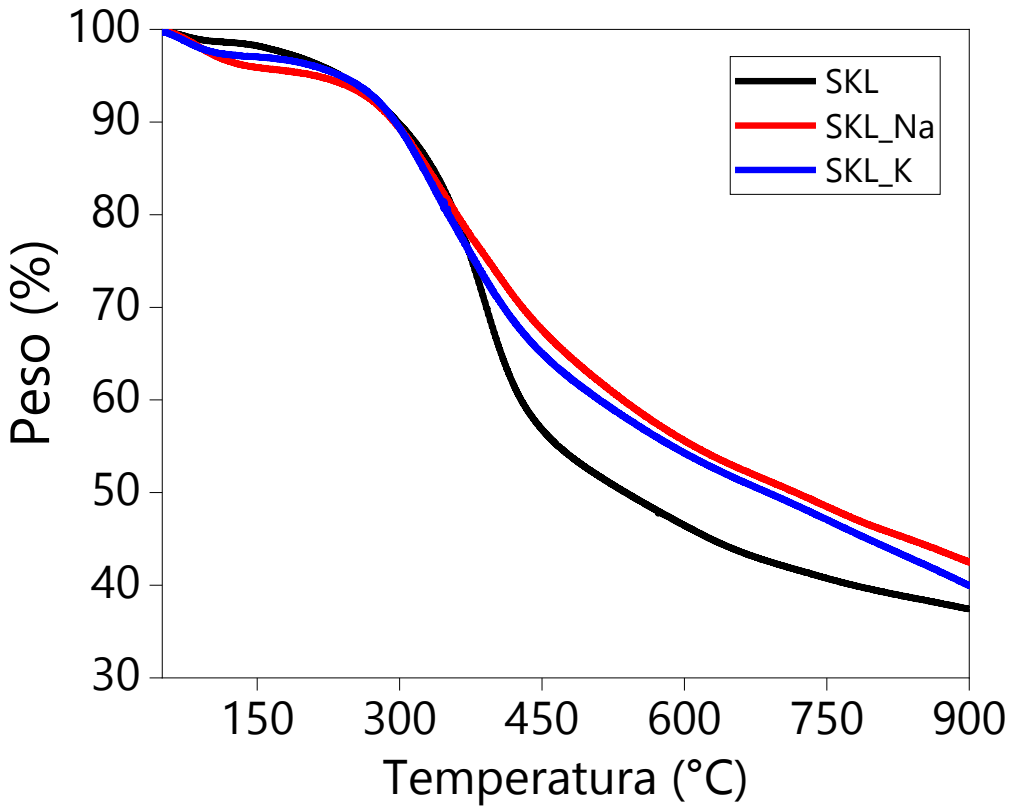

Figura 4.7: Curve termogravimetriche dei campioni di dialisi e della lignina SKL di partenza

La TGA dei campioni riporta risultati e due profili termogravimetrici (**Figura 4.7**) molto simili tra loro. Il confronto con l'analisi della lignina non trattata non evidenzia particolari variazioni nel quantitativo di ceneri finali rimaste dopo il processo di analisi, che si attestano intorno al 40% della massa iniziale per ogni campione. Si nota invece la presenza di un maggior quantitativo di acqua nelle lignine dializzate, come evidenziato dalla più marcata perdita di massa in prossimità dei 100 °C. Differenti sono gli andamenti di degradazione al variare della temperatura, che risultano più repentini nella lignina originale e più graduali in quelle dializzate. Ciò evidenzia come la perdita delle frazioni a più basso peso molecolare abbia portato ad una presumibile variazione del percorso di degradazione. La stabilità termica delle lignine non sembra però significativamente diversa, dato che in tutti i casi il processo inizia intorno a 250°C.

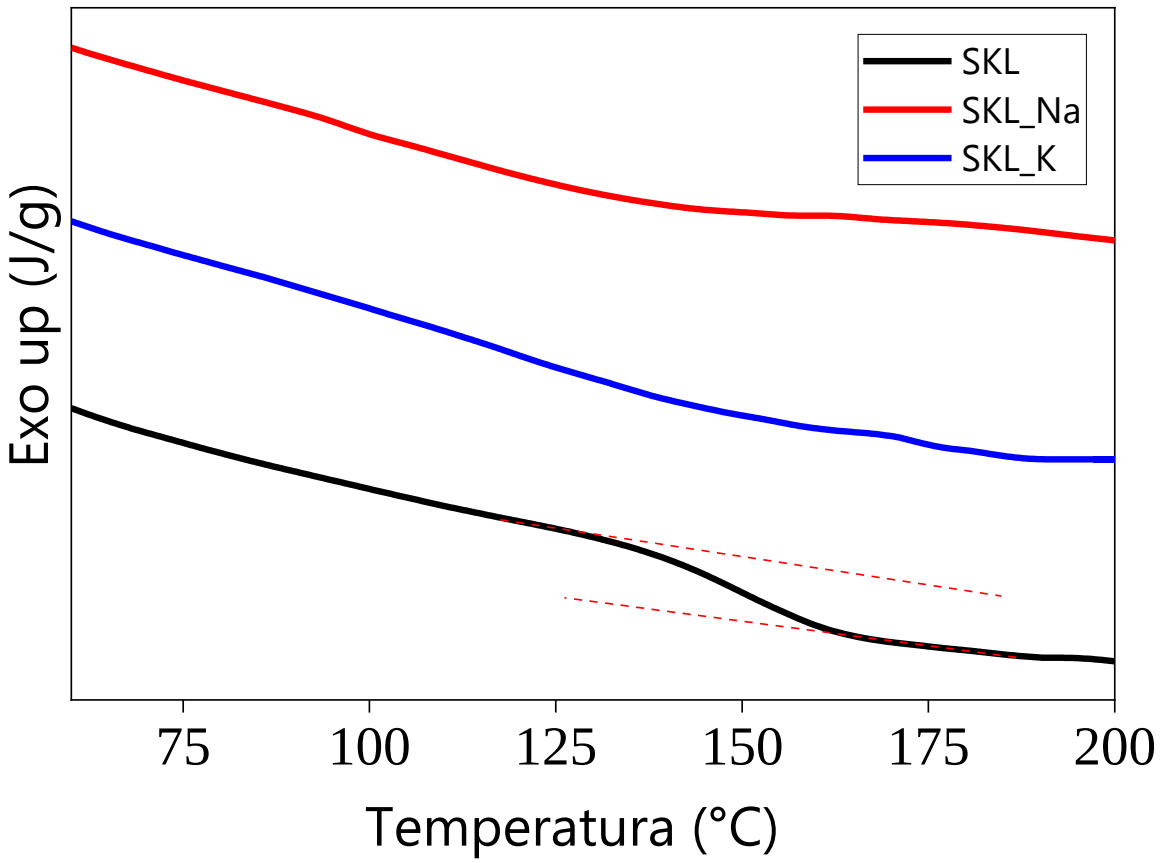

Figura 4.8: Analisi DSC dei campioni di dialisi e della lignina SKL di partenza

Dall'analisi DSC (**Figura 4.8**) è possibile notare nella lignina di partenza una temperatura di transizione vetrosa (T_g) pari a 149 °C, mentre per i prodotti dializzati non è possibile evidenziare con certezza una variazione della linea di base ascrivibile a questo fenomeno. È possibile che sia presente un picco calorimetrico anche nei campioni dializzati, il quale però potrebbe risultare troppo modesto per essere rivelato dallo strumento o, più probabilmente, la temperatura di transizione vetrosa si è spostata a valori di temperatura più elevati e superiori alla temperatura di degradazione. L'assenza delle frazioni a più basso peso molecolare può avere infatti un effetto plasticizzante, con conseguente aumento della T_g.

Le due soluzioni dializzate sono state sottoposte ad analisi DLS per valutare l'eventuale formazione di nanoparticelle durante il processo di dialisi e, in caso, determinarne le dimensioni.

In tutte le prove di analisi, condotte sia utilizzando le soluzioni tal quali, sia diluendo fino a 100 volte il campione, non si è ottenuto un correlogramma tale da poter ritenere attendibile la misura. Questo può essere dovuto a:

- la presenza di nanoparticelle subnanometriche, non rilevabili dallo strumento;
- la presenza di nanoparticelle di dimensione compresa fra 1 e 1000 nm, ma in concentrazioni inferiori al limite di rivelabilità dello strumento.

La prima ipotesi risulta poco ragionevole. La seconda risulta essere molto interessante. Per quanto possa essere azzardato affermare in modo assoluto che non siano presenti nanoparticelle, l'aver creato soluzioni stabili di lignina in acqua a pH neutro, con una così esigua (se non nulla) concentrazione di nanoparticelle è un risultato non riportato in precedenza in letteratura.

Riassumendo, si può concludere che la membrana con porosità 2 000 Da si sia rivelata molto più funzionale rispetto alla membrana da 7 000 seppur anche in questo caso si

sia osservato un frazionamento della lignina di partenza in quanto le molecole più a basso peso sono permeate attraverso la membrana di dialisi.

Dallo studio non sono emerse evidenze nei prodotti di dialisi indotte dai differenti controioni: per questo motivo non si è proseguito ulteriormente con l'utilizzo dell'idrossido di potassio.

4.3 Dialisi lignina SKL: studio dell'effetto della concentrazione

I risultati ottenuti con la membrana da 2 000 Da hanno dato origine a studi più approfonditi volti a valutare l'effetto della concentrazione della soluzione iniziale di lignina sull'eventuale formazione di nanoparticelle, così come riportato in letteratura [48]. A tal fine sono state dializzate soluzioni di SKL a concentrazione: 2.5, 12.5, 16.5, 20, 25 e 35 %. Non sì è potuto procedere con concentrazioni maggiori a causa del limite di solubilità della lignina in una soluzione 1 M di NaOH. Si è effettuata nuovamente la dialisi della soluzione al 25 %, per poter notare eventuali differenze di velocità di dialisi rispetto a quelle riportate nel paragrafo precedente. I dati sperimentali vengono riportati in Tabella 4.7.

Tabella 4.7: Dati di dialisi con soluzioni di SKL a concentrazione iniziale differente

Campione	Lignina (g)	ml iniziali	ml finali	pH iniziale	pH finale	Giorni di dialisi
SKL_2.5%	0.5	20	52	12.97	7.01	9
SKL_12.5%	1.88	15	66	12.95	6.94	24
SKL_16.5%	1.65	10	69	12.89	7.06	18
SKL_20%	2	10	73	12.70	7.04	18
SKL_25%	2.5	10	67	11.99	6.97	18
SKL_35%	1.75	5	58	11.15	6.96	18

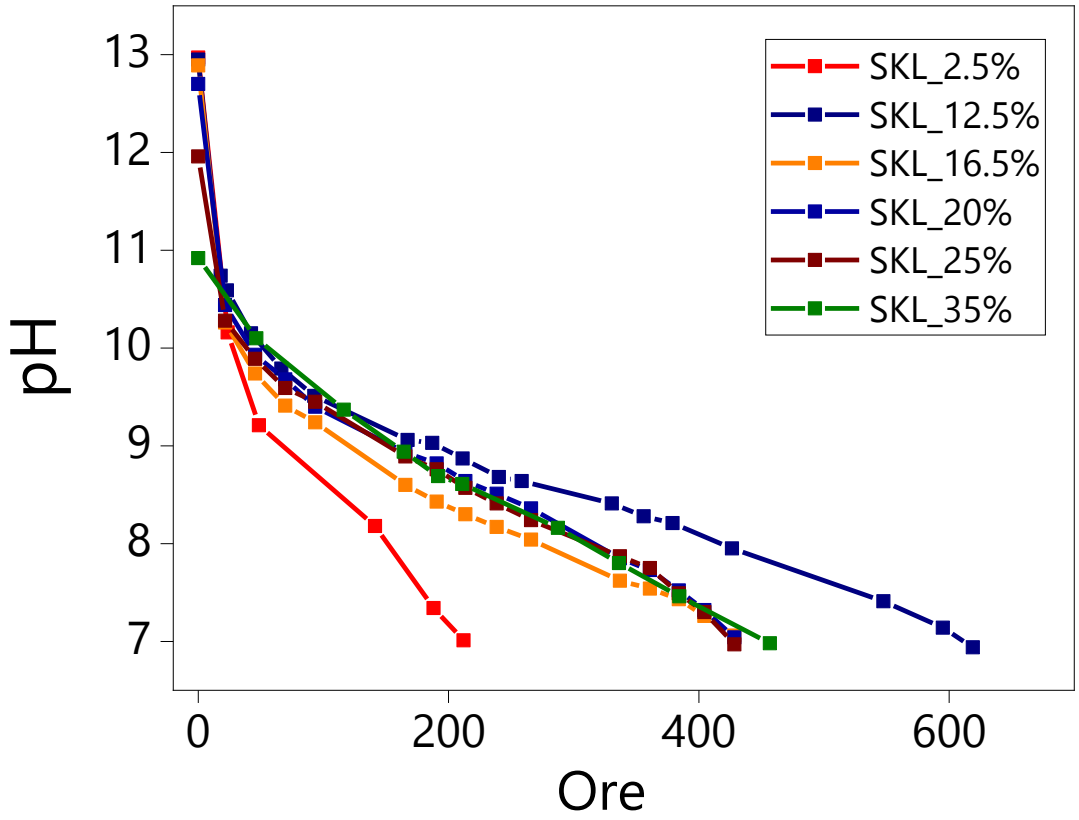

Figura 4.9: Andamento del pH delle soluzioni durante il processo di dialisi

Come è possibile notare in Figura 4.9, tutti i processi di dialisi si sono conclusi più velocemente rispetto a quelli riportati nel paragrafo precedente. Inoltre, non tutti gli andamenti riportati seguono un medesimo percorso di decrescita del pH. Quelli che apparentemente possono sembrare andamenti non correlati, in realtà portano ad osservazioni e considerazioni rilevanti.

È evidente la differenza di tempo di dialisi, tra la soluzione al 25 % in esame e quella riportata nel paragrafo precedente. La principale motivazione la si trova nella differente quantità di soluzione caricata nella cassetta per dialisi, tre volte minore in questo esperimento. È logico che un maggior quantitativo di soluzione richieda più tempo per la neutralizzazione completa. Come si può notare, infatti, gli esperimenti con concentrazione 16.5, 20, 25 % riportano un tempo e un andamento di dialisi similari.

Malgrado un maggior quantitativo di soluzione, l'esperimento con soluzione al 2.5 % è stato il più rapido. Ciò trova ragione nel fatto che in tali dialisi si sia utilizzato il minor quantitativo di lignina (meno di un terzo rispetto a tutti gli altri esperimenti) e una concentrazione significativamente inferiore rispetto agli altri casi, mostrando così come questo parametro influenzi la velocità complessiva del processo.

Ulteriori differenze possono essere imputabili a variazioni di temperatura del processo, essendo l'esperimento condotto a temperatura ambiente, dunque in condizioni non termostatate e in periodi dell'anno differenti.

La maggior velocità dei processi ha ridotto il numero di prelievi necessari, limitando le perdite e garantendo così in tutti i casi una resa pari a circa il 75 %. Oltre alla porosità sono emersi, grazie al confronto appena stilato, altri importanti fattori che influenzano la velocità del processo di dialisi: la concentrazione di lignina, il volume iniziale della soluzione e, seppur questo parametro non sia stato direttamente controllato, la temperatura del processo.

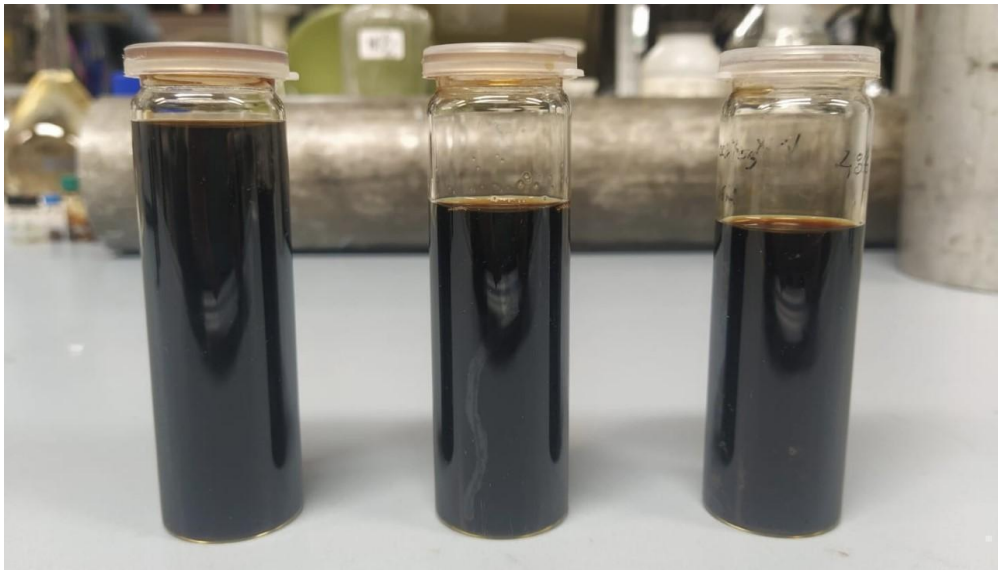

Figura 4.10: Alcune delle soluzioni di lignina SKL ottenute dal processo di dialisi. Da sinistra a destra i campioni: SKL_35%, SKL_20%, SKL_12.5%.

Di tutti i campioni solidi, è stata effettuata caratterizzazione con analisi GPC (**Tabella 4.8**).

Tabella 4.8: Dati cromatografici dei campioni dializzati e della lignina SKL di partenza

Campione	**M_n**	**PDI**
SKL	1200	5.0
SKL_2.5%	3400	4.0
SKL_12.5%	3600	4.1
SKL_16.5%	3500	4.0
SKL_20%	3500	3.9
SKL_25%	3400	4.0
SKL_35%	3600	4.2

In tutti i campioni il valore di M_n risulta maggiore rispetto alla lignina non trattata, mentre la polidispersità si riduce. Gli stessi profili cromatografici delle analisi (**Figura 4.11**) risultano similari tra tutti i campioni. In accordo con gli esperimenti precedenti, si può concludere che si sia verificato un processo di frazionamento della lignina durante il processo di dialisi (le frazioni a più basso peso sono permeate attraverso la membrana) e che la variazione di concentrazione della soluzione iniziale non influisca in modo evidente sul prodotto finale.

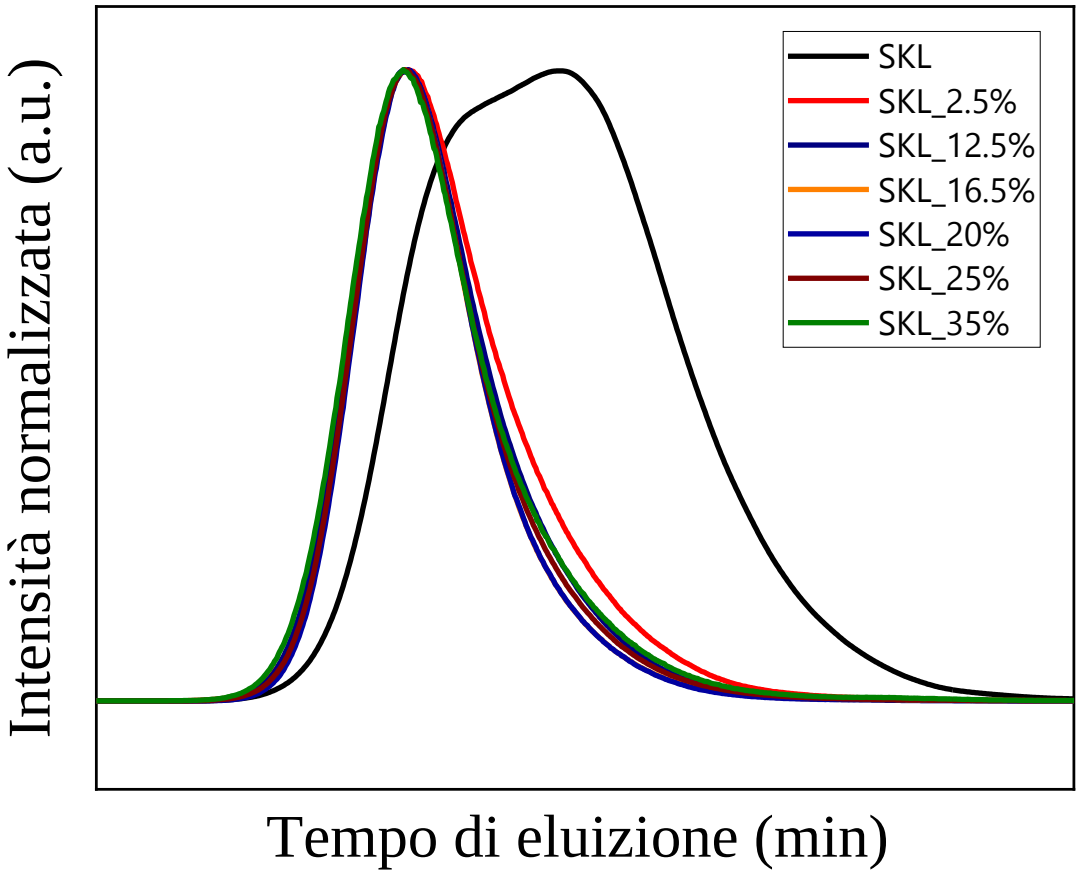

Figura 4.11: Analisi GPC dei campioni di dialisi e della lignina SKL di partenza

Le analisi spettroscopiche ^{31}P-NMR sono riportate in Tabella 4.9 e in Figura 4.12.

Tabella 4.9: Analisi quantitativa dei gruppi ossidrilici dei campioni dei campioni dializzati e della lignina SKL di partenza (valori in mmol/g)

Campione	-OH alifatici	-OH fenolici condensati	-OH fenolici non condensati	-OH fenolici totali	-OH carbossilici
SKL	1.95	1.73	2.26	4.00	0.37
SKL_2.5%	1.72	1.15	1.59	2.74	0.40
SKL_12.5%	1.71	1.16	1.63	2.79	0.39
SKL_16.5%	1.67	1.20	1.60	2.80	0.44
SKL_20%	1.62	1.17	1.54	2.71	0.42
SKL_25%	1.65	1.14	1.61	2.75	0.38
SKL_35%	1.61	1.17	1.55	2.72	0.45

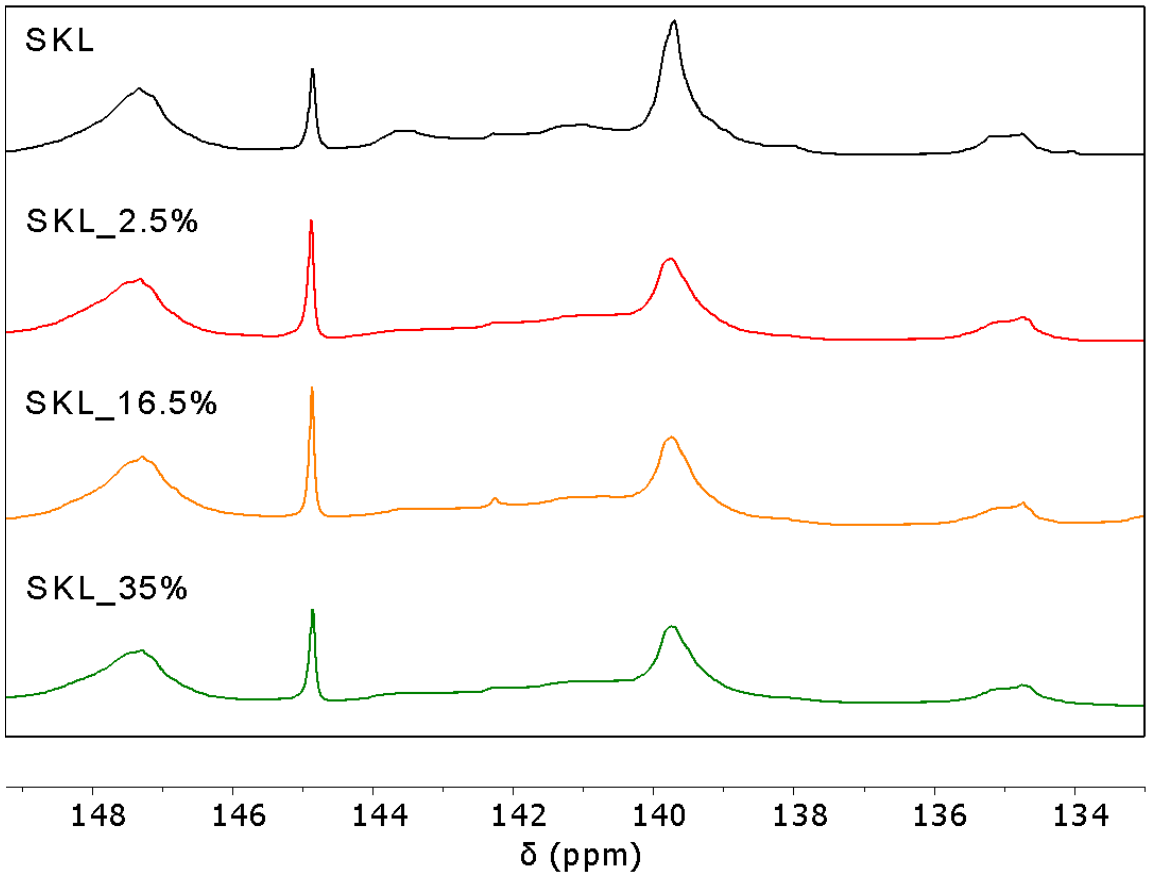

Figura 4.12: Spettri ^{31}P-NMR dei campioni di dialisi e della lignina SKL di partenza. A titolo di esempio sono riportati solo gli spettri dei campioni SKL_2.5%, SKL_16.5% e SKL_35%.

Tutti i campioni analizzati riportano valori similari tra loro, dimostrando nuovamente come la differente concentrazione iniziale non abbia influito significativamente sui prodotti. Il confronto con la lignina di partenza rende evidente come la lignina dializzata risulti a più alto peso molecolare rispetto l'originale e con un contenuto ridotto di ossidrili fenolici.

Le lignine dializzate sono state caratterizzate con analisi TGA e DSC. In figura sono riportate solo le analisi dei campioni a concentrazione 2.5, 16.5 e 35 % in quanto entrambe le analisi hanno dato risultati del tutto simili per i diversi campioni.

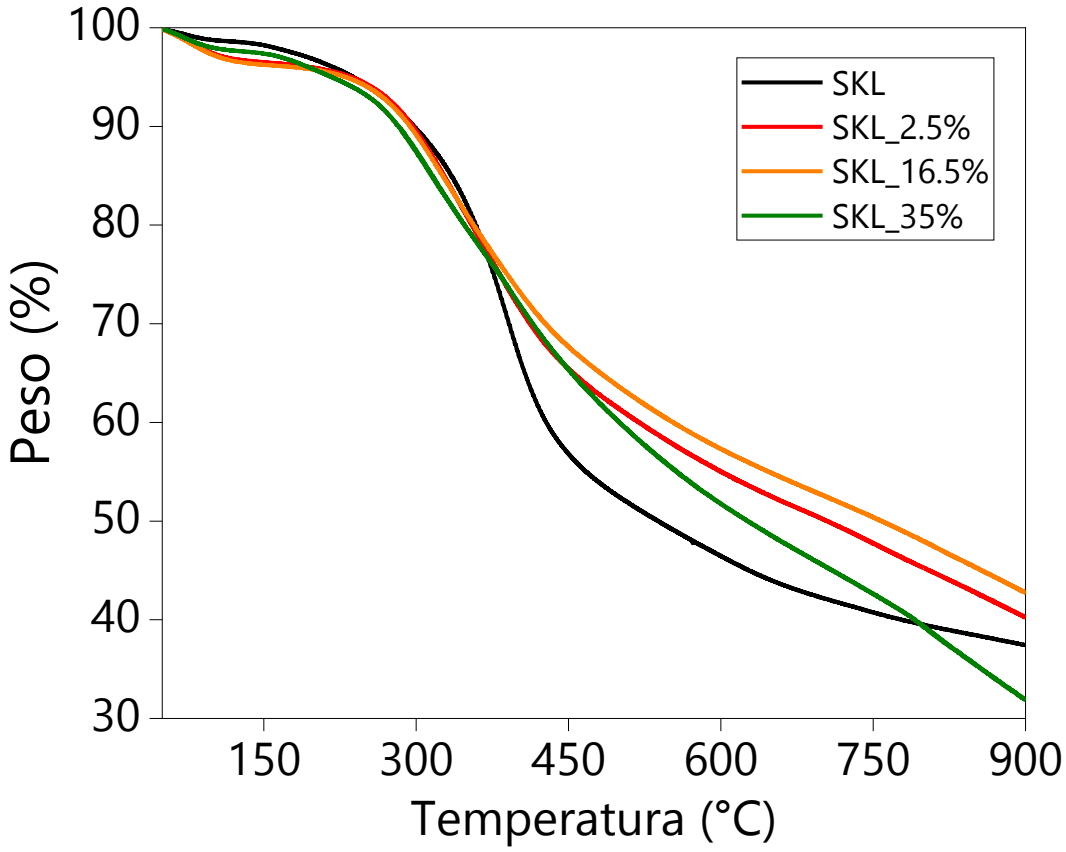

Figura 4.13: Curve termogravimetriche dei campioni di dialisi e della lignina SKL di partenza

Le analisi TGA (**Figura 4.13**) evidenziano dei profili termogravimetrici del tutto simili nei vari prodotti e comparabili con quelli precedentemente presentati (**Figura 4.7**). Il confronto con l'analisi della lignina non dializzata permette di confermare quanto già riscontrato, ovvero una non significativa variazione della stabilità termica, un maggior quantitativo di acqua nelle lignine dializzate e la più graduale variazione di peso ascrivibile a variazioni nel processo di termodegradazione legato alla perdita delle molecole più a basso peso.

Per quanto riguarda le analisi DSC (**Figura 4.14**) i prodotti dializzati risultano anche in questo caso privi di transizioni termiche caratteristiche nell'intervallo di temperature studiato, suggerendo come l'assenza delle frazioni a più basso peso molecolare porti

nelle lignine dializzate ad uno spostamento della transizione vetrosa a temperature superiori alla degradazione. Le analisi termogravimetriche e calorimetriche hanno quindi evidenziato come la diversa concentrazione di lignina usata nel processo di dialisi non abbia influito sulle caratteristiche chimico-fisiche del retentato.

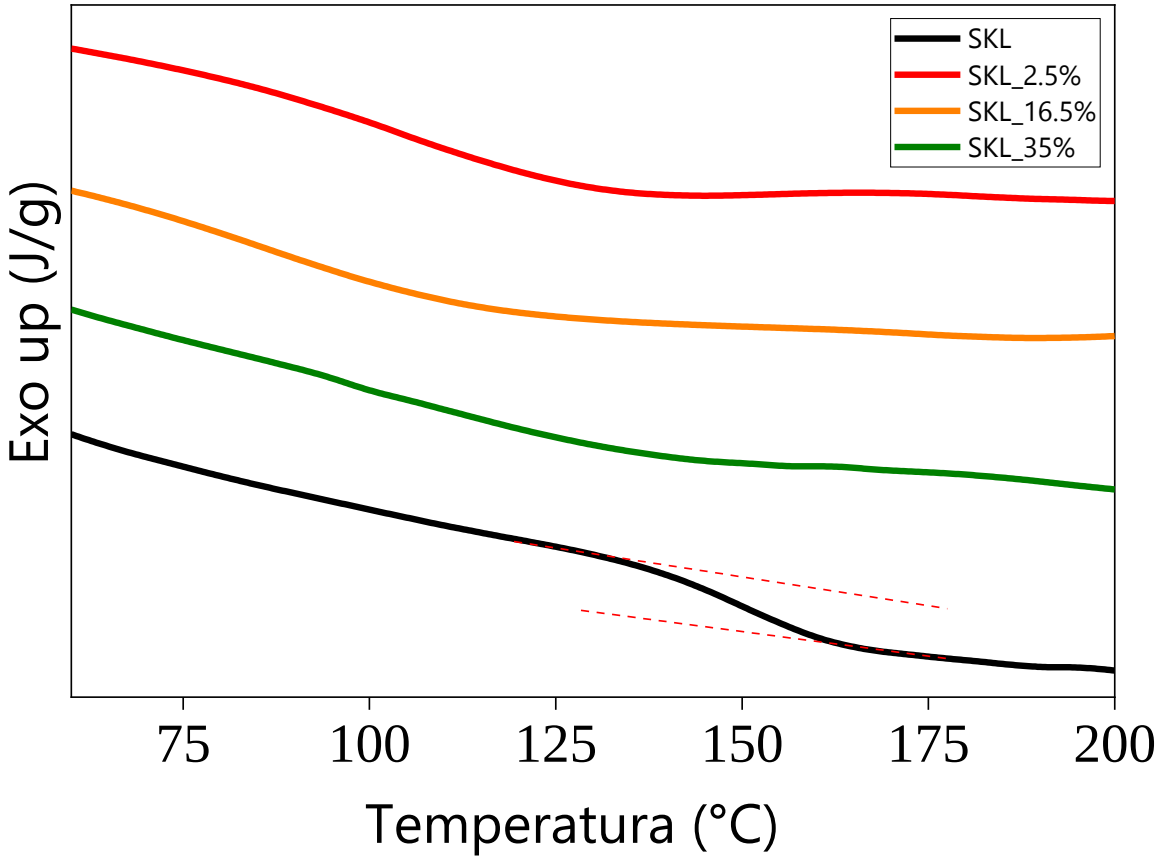

Figura 4.14: Analisi DSC dei campioni di dialisi e della lignina SKL non trattata

Anche in questo caso, attraverso analisi DLS, è emerso che per tutti i campioni (analizzati utilizzando soluzioni a varia concentrazione nel tentativo di ottenere la risposta strumentale migliore) si è ottenuto un correlogramma insufficiente per poter ritenere attendibile la misura ottenuta. Si può quindi nuovamente affermare di essere

riusciti ad ottenere delle soluzioni stabili di lignina a pH neutro, nelle quali la lignina risulta ancora solvatata.

I risultati appena esposti hanno spinto ad un approfondimento circa la solubilità dei prodotti ottenuti mediante dialisi con membrana da 2000 Da. I campioni liofilizzati sono stati sottoposti a delle prove di solubilità in acqua, etanolo e acetone (ad una concentrazione pari a 1 mg/mL) (**Figura 4.15**). Solo in acqua si è formata una soluzione, mentre in acetone ed etanolo si è ottenuta una sospensione. Si è osservato però che l'aggiunta di piccole aliquote di acqua nei solventi organici (rapporto 1:10 v/v) portava ad una completa solubilizzazione della dispersione di lignina. Medesimo risultato si è ottenuto andando a diluire una soluzione concentrata in acqua con il solvente organico d'interesse. Saranno necessarie ulteriori analisi tramite DLS per poter confermare l'assenza di nanoparticelle, seppur indagini preliminari tramite spettrofotometria UV non abbiano evidenziato presenza di torbidità nella soluzione.

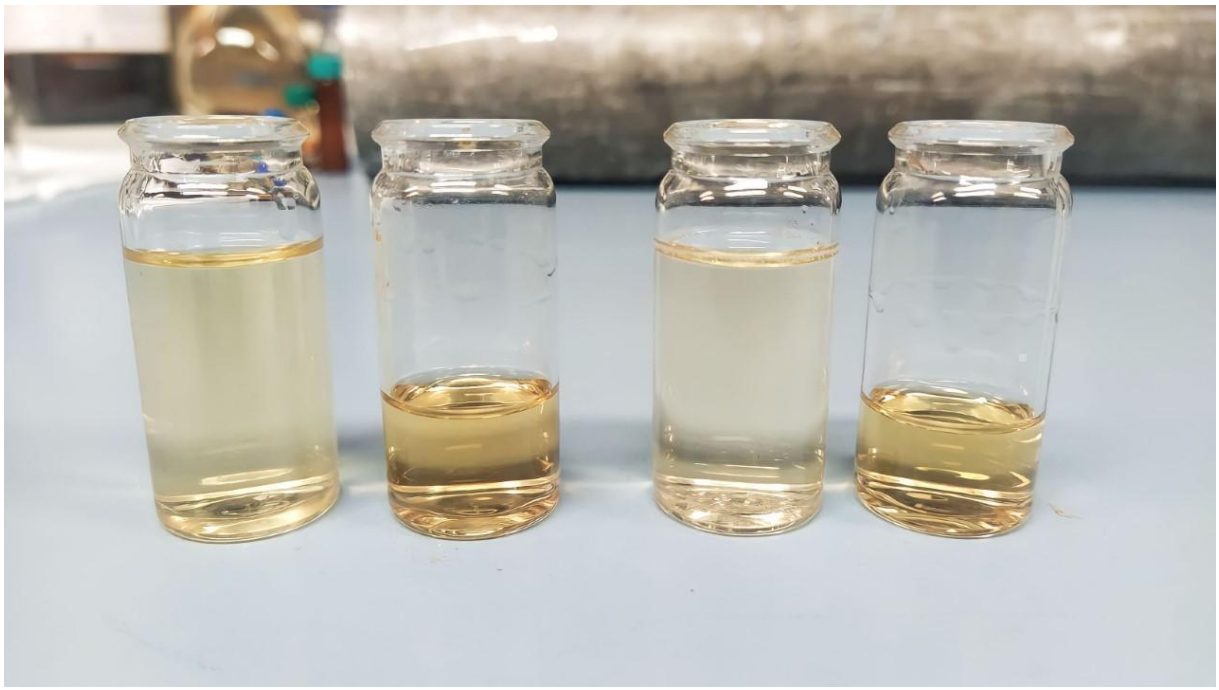

Figura 4.15: Soluzioni di campioni dializzati e liofilizzati. Da sinistra, la prima e la terza soluzione sono in una miscela 10 a 1 acetone-acqua, la seconda e la quarta in sola acqua.

Lo studio di questi processi di dialisi ha portato ad una interessante conclusione: differenti concentrazioni iniziali di lignina non influiscono in modo evidente sulle caratteristiche chimico-fisiche dei prodotti finali.

4.4 Dialisi lignina WSOL: studio dell'effetto della concentrazione

I risultati preliminari ottenuti attraverso la dialisi della lignina SKL hanno spinto a studiare tale metodica anche su di un'altra lignina tecnica, la lignina organosolv. Per questo motivo state dializzate soluzioni di lignina WSOL con concentrazione 2.5 e 25 % in cassette per dialisi con cut-off da 2 000 dalton. I dati sperimentali e dell'andamento del pH sono riportati in Tabella 4.10 e Figura 4.16.

Tabella 4.10: Dati di dialisi con soluzioni a concentrazione iniziale differente

Campione	Lignina (g)	ml iniziali	ml finali	pH iniziale	pH finale	Giorni di dialisi
WSOL_2.5 %	0.5	20	38	13.16	7.05	7
WSOL_25 %	6.25	20	75	12.25	7.10	25

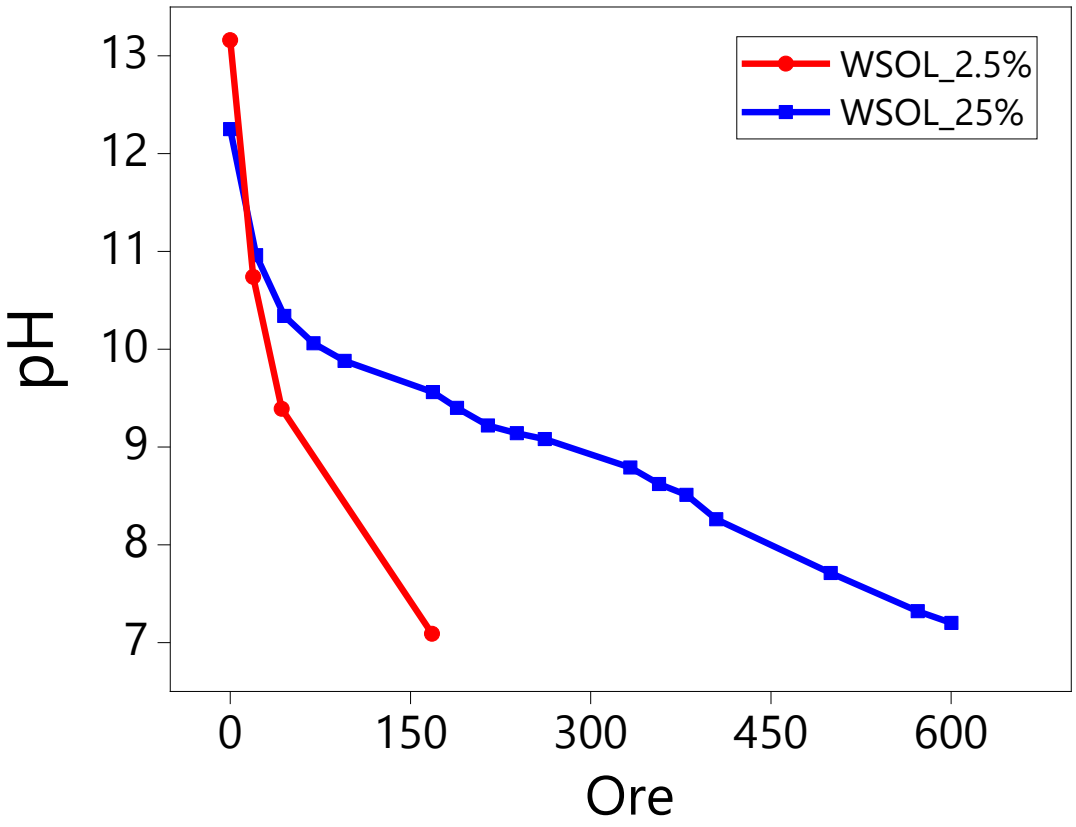

Figura 4.16: Andamento del pH delle soluzioni di WSOL durante il processo di dialisi

Le differenti concentrazioni iniziali evidenziano, come osservato nel caso della lignina SKL, una diversa velocità di neutralizzazione. Il confronto dell'esperimento a concentrazione 2.5 % con l'analogo svolto con lignina SKL porta ad un'importante osservazione. Nei due processi tutte le variabili ritenute avere un ruolo regolatorio sulla velocità di dialisi erano le medesime. È risultato però più veloce il processo di dialisi con lignina WSOL, lasciando presupporre che anche la natura chimica stessa della lignina influisca sulla velocità dell'intero processo di dialisi, seppur non sulla resa che si attesta conformemente intorno al 75%.

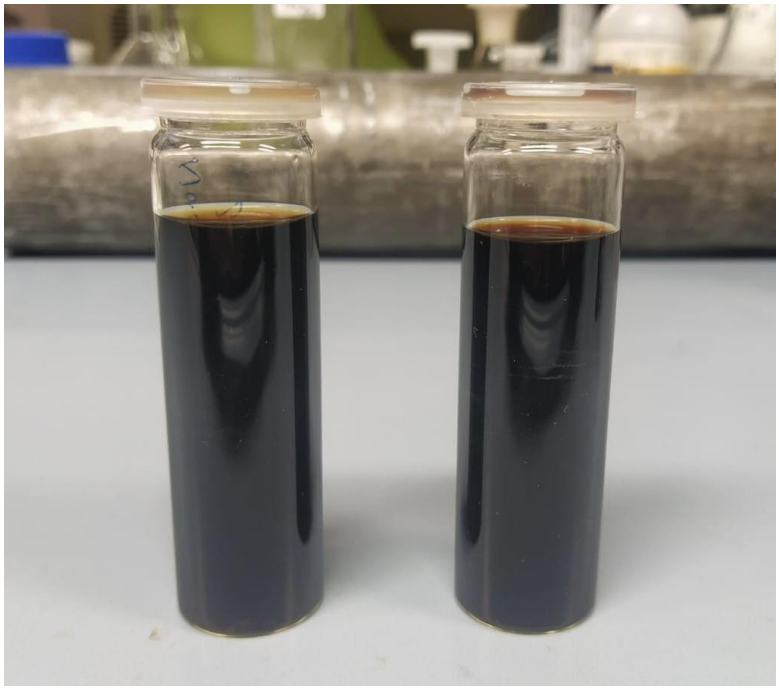

Figura 4.17: Soluzioni di lignina WSOL ottenute dal processo di dialisi: a sinistra il campione WSOL_2.5%, a destra WSOL_25%.

Le analisi GPC (**Tabella 4.11** e **Figura 4.18**) hanno portato a conclusioni simili a quelle tratte negli esperimenti con lignina SKL. Durante il processo di dialisi sì è avuto infatti un parziale frazionamento della lignina che ha portato alla permeazione delle frazioni più a basso peso. In questo caso però, data la diversa struttura chimica della lignina, l'aumento di M_n non risulta così significativo, mentre si assiste ad un evidente calo della polidispersità. I due campioni evidenziano risultati molto simili, indicando quindi come la concentrazione non influisca in modo apprezzabile sul processo di dialisi.

Tabella 4.11: Dati cromatografici dei campioni dializzati e della lignina WSOL di partenza

Campione	M_n	PDI
WSOL	4000	6.5
WSOL_2.5%	4400	3.7
WSOL_25%	4500	4.0

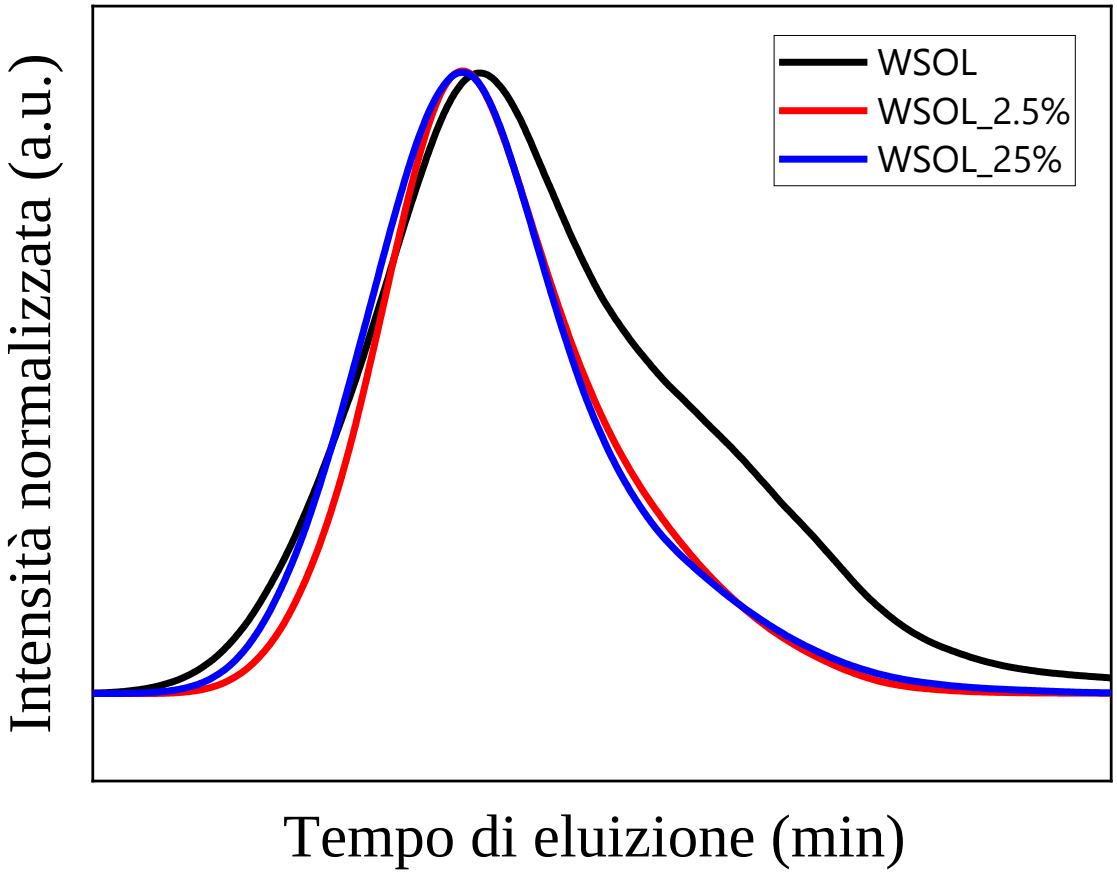

Figura 4.18: Analisi GPC dei campioni di dialisi e della lignina WSOL di partenza

Le analisi ^{31}P-NMR e i relativi dati di integrazione sono riportate in Tabella 4.12 e Figura 4.19.

Tabella 4.12: Analisi quantitativa dei gruppi ossidrilici dei campioni dializzati e della lignina WSOL di partenza (valori in mmol/g)

Campione	-OH alifatici	-OH fenolici condensati	-OH fenolici non condensati	-OH fenolici totali	-OH carbossilici
WSOL	1.27	0.60	1.09	1.69	0.55
WSOL_2.5%	1.58	0.70	1.03	1.73	0.60
WSOL_25%	1.65	0.77	0.94	1.71	0.65

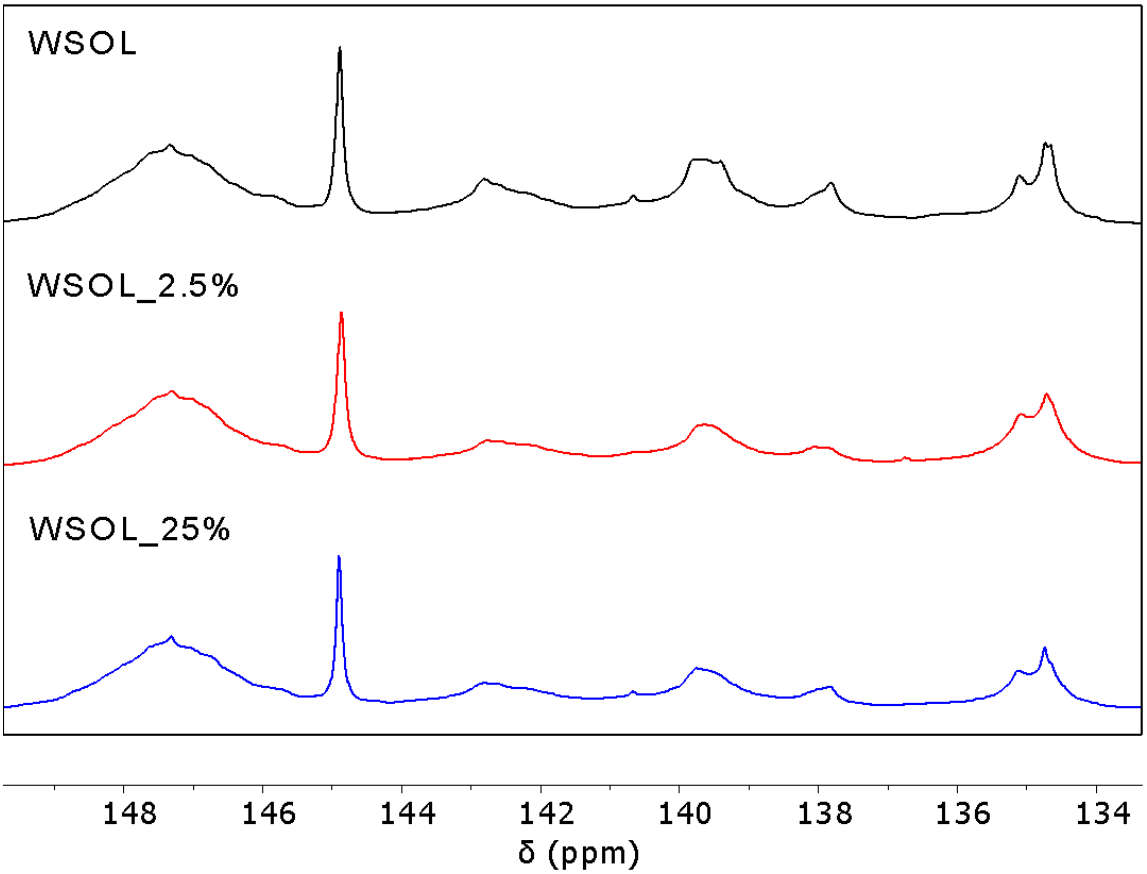

Figura 4.19: Spettri ^{31}P-NMR dei campioni di dialisi e della lignina WSOL non trattata

I campioni dializzati mostrano risultati del tutto comparabili, mentre dal raffronto con la lignina di partenza emerge solo un aumento del contenuto degli ossidrili alifatici. Questo è dovuto al fatto che, proprio per la natura meno modificata delle lignine organosolv rispetto alle lignine native, la distribuzione degli ossidrili risulta essere abbastanza omogenea in tutte le frazioni.

I campioni dializzati sono poi stati analizzati tramite TGA (**Tabella 4.13** e **Figura 4.20**) e DSC (**Figura 4.21**) al fine di valutare la stabilità termica e le transizioni termiche caratteristiche.

Tabella 4.13: Dati termogravimetrici dei campioni di dialisi e della lignina WSOL non trattata

Campione	**T_{Onset} (°C)**	**T_{Max} (°C)**	**Ceneri residue (%)**
WSOL	215	315	34.0
WSOL_2.5%	255	314	40.0
WSOL_25%	258	316	42.5

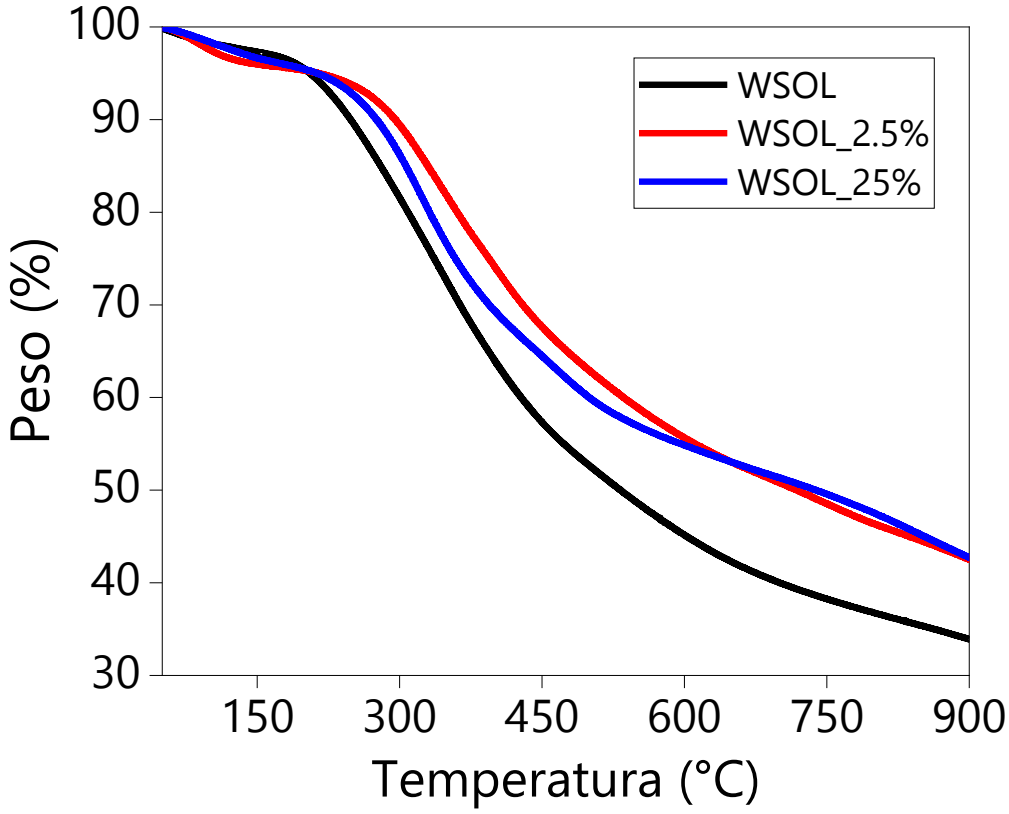

Figura 4.20: Curve termogravimetriche dei campioni di dialisi e della lignina WSOL di partenza

Si può asserire che i profili termogravimetici dei due campioni siano similari tra loro. Il confronto con la lignina WSOL originale non mostra evidenti variazioni di T_{Max} (temperatura alla quale si ha la massima velocità di degradazione), ma le lignine dializzate mostrano una T_{Onset} più elevata, indice di una maggiore stabilità termica.

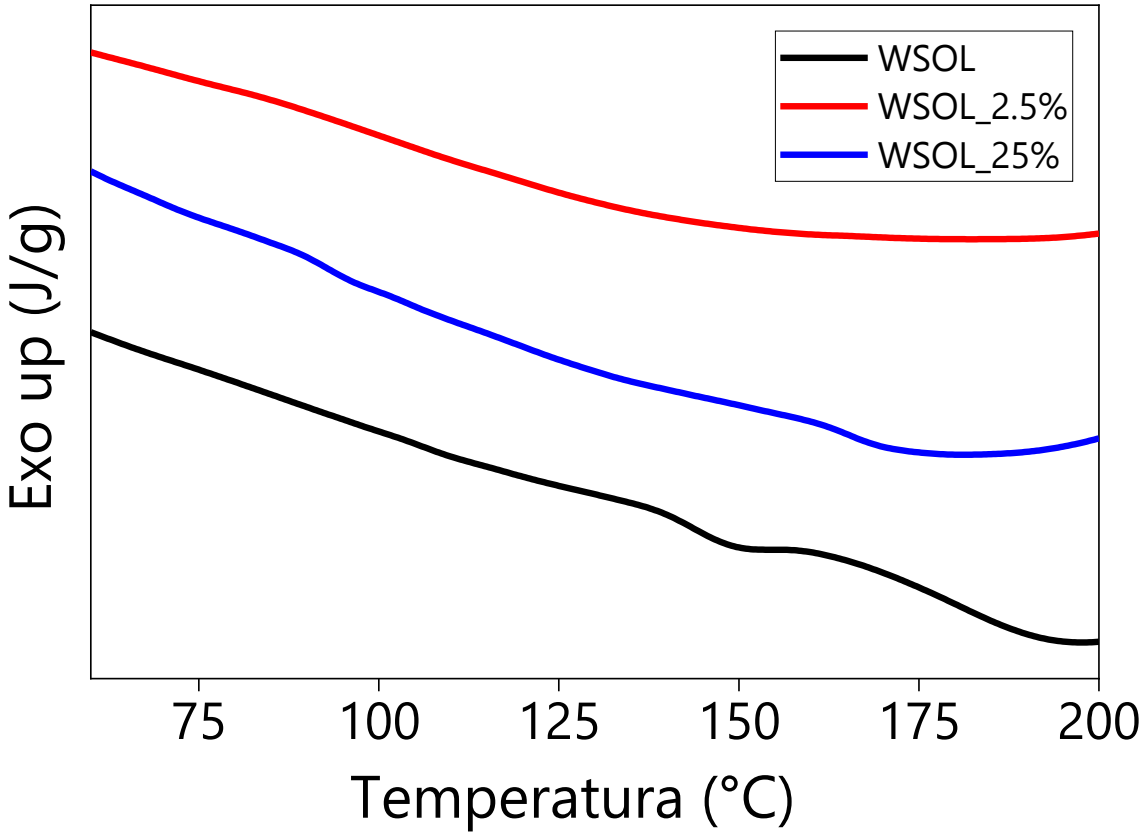

Figura 4.21: Analisi DSC dei campioni di dialisi e della lignina WSOL di partenza

L'analisi calorimetrica della lignina di partenza presenta una piccola variazione della linea di base misurata a circa 150 °C e ascrivibile alla transizione vetrosa. Al contrario, nei prodotti finali, tale fenomeno non è presente, indice dell'assenza di transizioni vetrose nell'intervallo di temperature considerate. È ragionevole pensare che le frazioni a più basso peso molecolare, permeate durante il processo di dialisi, fungessero da agente plasticizzante all'interno della lignina, come visto per la lignina SKL.

Così come nel caso della lignina SKL, si è voluta verificare la presenza/assenza di nanoparticelle anche nelle soluzioni dializzate di lignina WSOL attraverso analisi DLS. Queste però, hanno portato a dei risultati totalmente differenti.

Come è possibile notare nei campioni dializzati sono presenti due popolazioni ben distinte di nanoparticelle (**Tabella 4.14** e **Figura 4.22**): la prima centrata a 40 nm, la seconda a 200 nm. L'analisi denota inoltre come numericamente predominanti le popolazioni che presentano la dimensione minore. Questo risultato, in completo contrasto con quelli ottenuti con la lignina SKL, ha dato modo di riflettere sul fatto che le nanoparticelle potessero formarsi nel corso della dialisi, a causa del continuo abbassamento del pH.

Tabella 4.14: Dimensioni medie del particolato dei campioni WSOL dializzati (valori in nm)

Campione	Primo picco	Secondo picco	PDI
WSOL_2.5%	49±8	210±20	0.47
WSOL_25%	35±4	173±4	0.51

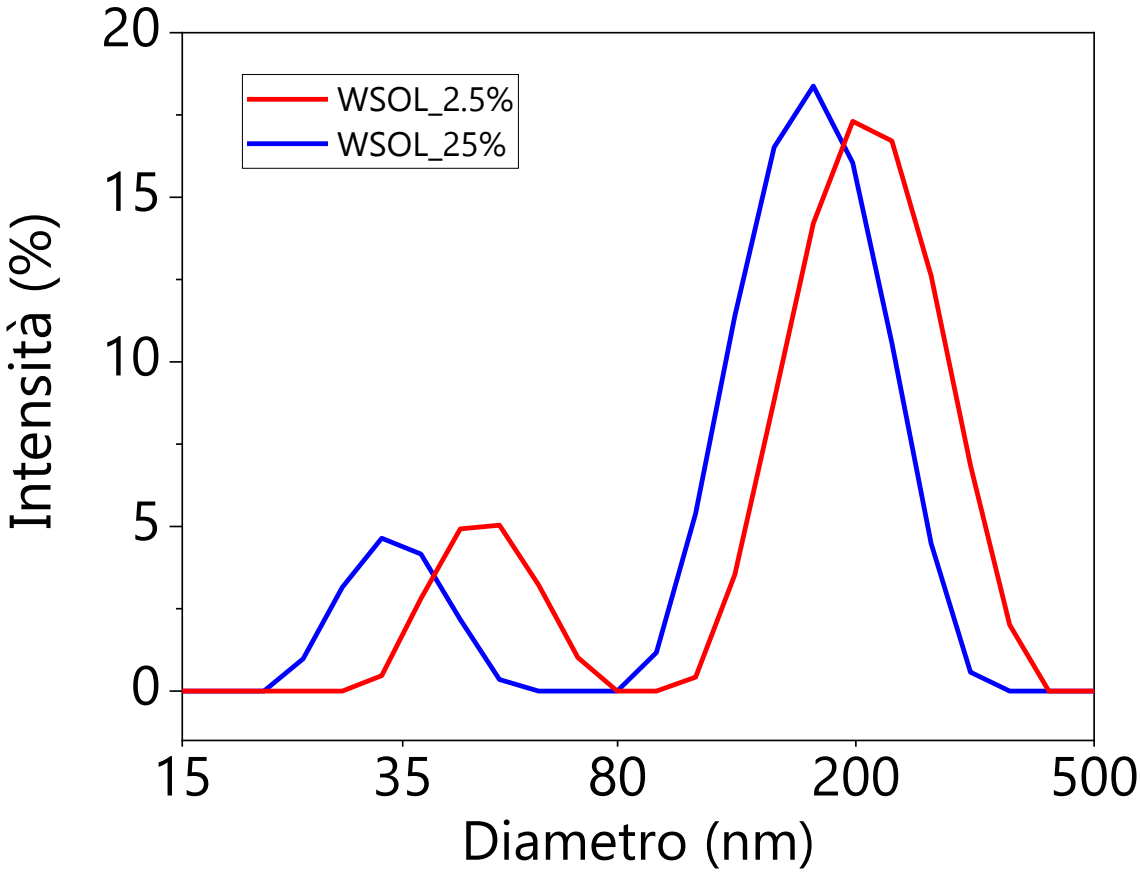

Figura 4.22: Analisi DSL dei campioni di dialisi

Questa supposizione, però, è stata smentita: analisi al DLS di campioni prelevati dopo 19 e 48 ore dall'inizio del processo di dialisi hanno mostrato già la presenza del particolato. Il pH delle soluzioni, rispettivamente 10.70 nel primo e 9.90 nel secondo prelievo, risulta ancora piuttosto elevato e ha reso necessari maggiori approfondimenti. Sono state perciò analizzate soluzioni di lignina WSOL disciolta nella soluzione basica di partenza.

Le analisi evidenziano anche in questo caso la presenza di due popolazioni di nanoparticelle nei rispettivi campioni (**Tabella 4.15** e **Figura 4.23**). Questo porta a concludere che la lignina WSOL non sia in realtà completamente solubile anche in ambienti fortemente alcalini. È quindi ragionevole supporre che le nanoparticelle

presenti nei prodotti di dialisi siano le stesse presenti prima ancora dell'inizio del processo.

Tabella 4.15: Dimensioni medie del particolato dei campioni WSOL prima del processo di dialisi (valori in nm)

Campione	Primo picco	Secondo picco	PDI
WSOL_CIMV_2.5%	98±26	315±24	0.42
WSOL_CIMV_25%	37±19	207±6	0.46

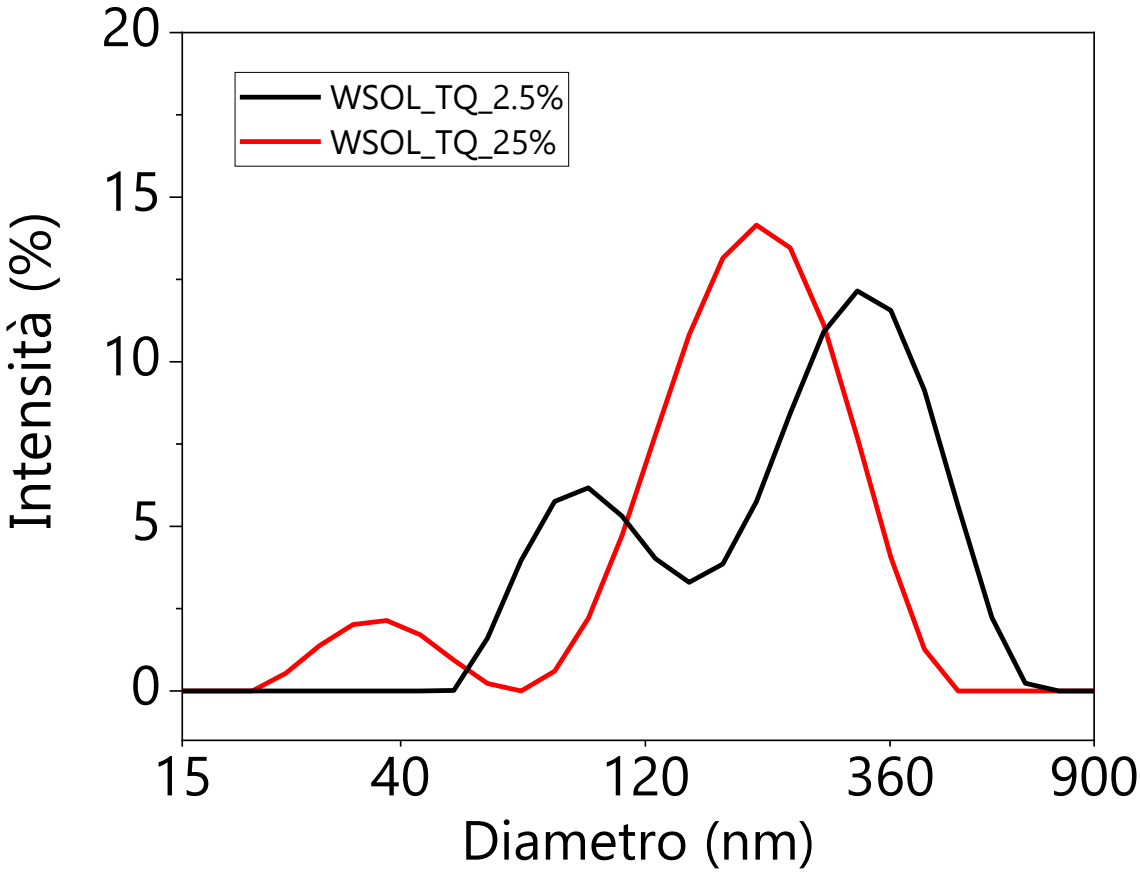

Figura 4.23: Analisi DSL di soluzioni di lignina WSOL tal quale (TQ), in soluzione basica prima del processo di dialisi

Sono stati condotti test di solubilità dei prodotti di dialisi liofilizzati, come fatto con la lignina Kraft (**Figura 4.24**). Si sono osservate le medesime solubilità con i differenti solventi, ma l'analisi DLS ha evidenziato la presenza di nanoparticelle così come riscontrato nei prodotti di dialisi ancora liquidi.

Figura 4.24: Soluzioni di campioni WSOL dializzati e liofilizzati: a sinistra soluzione in miscela 10 a 1 acetone-acqua, a destra in sola acqua.

4.5 Centrifugazioni della lignina WSOL e dei prodotti di dialisi

I risultati ottenuti con la lignina WSOL hanno reso necessari degli approfondimenti per comprendere al meglio la natura chimica di queste nanoparticelle. Nel tentativo di isolare le nanoparticelle dal resto della soluzione di lignina si è deciso di procedere a delle centrifugazioni successive, applicando inizialmente 8 422 g e in un secondo momento 20 627 g.

Entrambe le centrifugazioni hanno mostrato un corpo di fondo, ma già la prima centrifugazione ha dato modo di raccogliere un quantitativo significativo di nanoparticelle. Degli 8 grammi di lignina WSOL centrifugata sono stati infatti raccolti 90 mg di materiale, di poco superiore all'1% del peso totale.

Il surnatante, prelevato in piccole aliquote dalle centrifugazioni, è stato analizzato al DLS (**Tabella 4.16** e **Figura 4.25**).

Tabella 4.16: Diametri medi del particolato presente nel surnatante (valori in nm)

Campione	Primo picco	Secondo picco	PDI
Surnatante	43±4	150±10	0.27

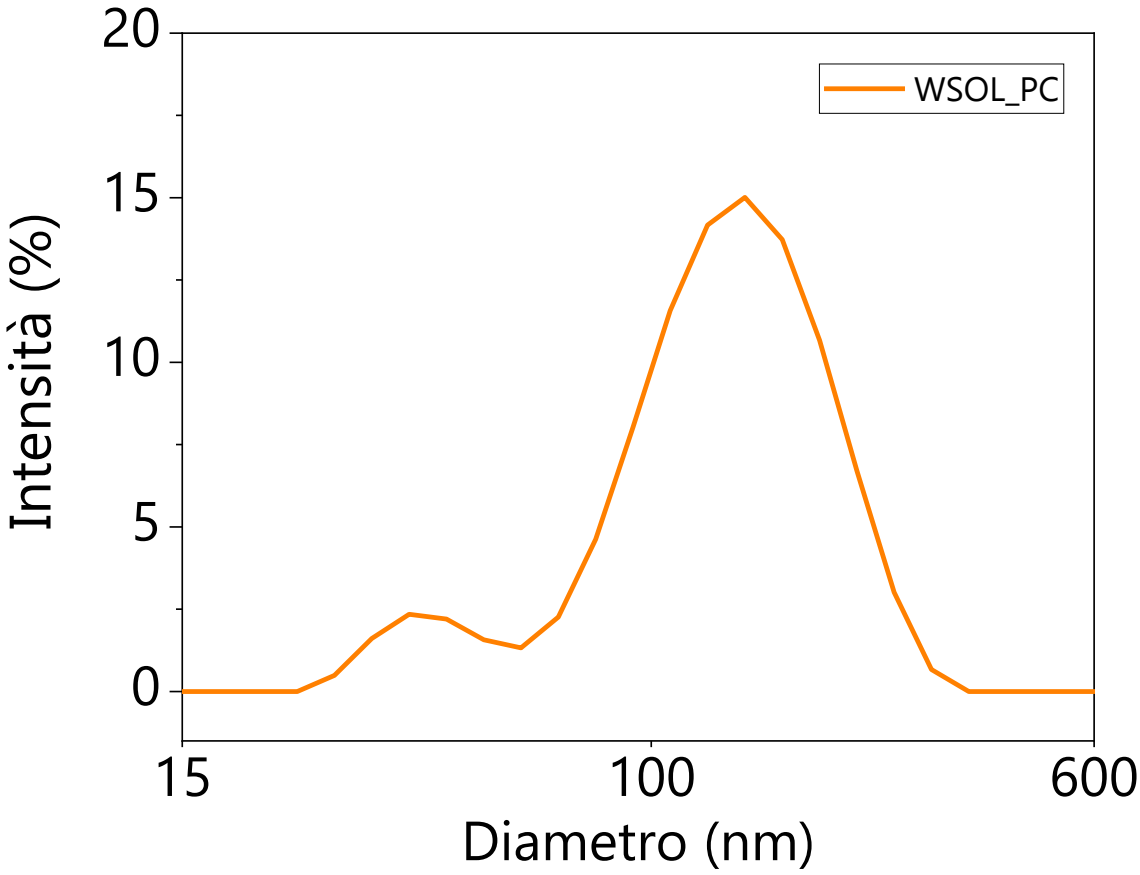

Figura 4.25: Analisi DSL del surnatante post centrifugazione (PC)

Il risultato è evidente: malgrado le ripetute centrifugazioni, nella soluzione permangono delle nanoparticelle disperse. Ciò ha indotto all'impiego di un processo di ultracentrifugazione, il quale è stato effettuato anche sui campioni dializzati di lignina. Tale centrifugazione ha portato alla formazione di un corpo di fondo (in quantità risibile rispetto alle centrifugazioni condotte a g inferiori), ed il surnatante è stato analizzato al DLS. L'analisi questa volta ha mostrato l'assenza di nanoparticelle, suggerendo che tale trattamento abbia garantito la precipitazione delle nanoparticelle sospese.

La natura chimica delle nanoparticelle, raccolte come corpo di fondo dalle centrifugazioni, è stata oggetto di studio. Con l'intento di caratterizzarle, sono state effettuate delle prove di solubilità che hanno evidenziato la natura insolubile del materiale, che nello specifico è risultato insolubile in acqua, acetone, etanolo, cloroformio, DMSO, piridina, DMF, acido acetico glaciale e in una soluzione 10 M di NaOH. Ciò lascia ipotizzare che tali nanoparticelle non siano costituite da lignina.

Nonostante non siano presenti in letteratura studi che possano chiarire questi aspetti, si può ipotizzare che tali nanoparticelle siano costituite da umine generate nei processi di bioraffineria. La loro natura insolubile rende molto complessa, seppur non meno interessante, una specifica caratterizzazione, per cui in questo lavoro di tesi non si è avuto modo di procedere ulteriormente in merito.

In conclusione, sulla base delle analisi effettuate, si può quindi ragionevolmente affermare che è possibile ottenere soluzioni a pH neutro anche di lignina organosolv.

Conclusioni

Questo lavoro di tesi ha evidenziato come lo sviluppo di un'idea possa a volte portare al conseguimento di risultati totalmente inattesi. Le lignine Kraft e organosolv sono note per la loro scarsa solubilità, dato che solo pochi solventi organici e soluzioni fortemente alcaline riescono a solvatarle completamente. In questo lavoro di tesi si è riusciti a realizzare delle soluzioni stabili di lignina SKL a pH neutro; le analisi DLS delle soluzioni dializzate di lignina SKL hanno infatti evidenziato l'assenza di nanoparticelle nei prodotti. Inoltre, i campioni solidi ricavati tramite liofilizzazione del retentato di dialisi mostrano una totale solubilità in acqua e in diverse miscele acqua-solventi organici.

Lo studio ha evidenziato come la porosità della membrana, la concentrazione di lignina in soluzione ed il volume della soluzione dializzata siano parametri molto importanti, in quanto consentono di modificare la velocità del processo di dialisi, ma non le caratteristiche chimico-fisiche dei prodotti ottenuti.

Le analisi ^{31}P-NMR e GPC hanno evidenziato come la lignina sia andata incontro ad un processo di frazionamento durante il processo di dialisi, che ha portato alla permeazione delle frazioni a più basso peso molecolare. Sono in corso analisi NMR più approfondite (HSQC) per caratterizzare ulteriormente dal punto di vista delle unità strutturali le lignine ottenute attraverso il processo di dialisi. I primi risultati sembrano confermare l'assenza di significative modifiche rispetto alla lignina di partenza.

Lo studio del permeato durante la dialisi con cassette per dialisi da 7 000 dalton ha permesso di dimostrare come il peso molecolare medio delle molecole di lignina nel permeato aumenti gradualmente con il tempo, suggerendo che le frazioni a più basso peso molecolare permeino più velocemente.

Lo studio del retentato di dialisi di una lignina organosolv ha messo in evidenza un fenomeno apparentemente diverso, in quanto in un primo momento si è riscontrata presenza di nanoparticelle a seguito del processo di dialisi, in contrasto con i risultati ottenuti con la lignina SKL. L'analisi al DLS di soluzioni alcaline di lignina WSOL prima del processo di dialisi ha però dimostrato la presenza di nanoparticelle anche a pH ben superiori 12, suggerendo la non completa solubilità di questa lignina anche a pH fortemente alcalini.

Processi di centrifugazione hanno permesso di separare e raccogliere queste nanoparticelle che si suppone non siano costituite da lignina, ma da umine probabilmente generate durante il processo di trattamento della biomassa. Una volta separate le nanoparticelle, sono state ottenute soluzioni a pH neutro anche di lignina organosolv, dimostrando la bontà del processo indipendentemente dalla struttura della lignina tecnica di partenza.

Il lavoro di tesi qui presentato ha portato a dei risultati molto interessanti che aprono le porte a future attività di ricerca. La ricerca delle condizioni chimico fisiche migliori in termini di resa/velocità della dialisi, così come caratterizzazioni chimico-fisiche più approfondite sulle lignine dializzate, rappresentano step importanti nell'ottimizzazione del processo. Anche lo studio della natura chimica delle nanoparticelle presenti nella lignina WSOL, nonostante sia stato poco approfondito a causa dell'esiguo quantitativo disponibile e della sua laboriosa caratterizzazione, rappresenta una sfida molto stimolante.

Quello appena riportato, nonostante sia rilevante e promettente, è solo un piccolo progresso in quello che è il mondo della chimica della lignina, che rappresenta una risorsa rinnovabile tanto stimolante quanto difficile data la sua complicata natura e un sistema industriale che l'ha sempre trattata come scarto o, al massimo, come vettore energetico. La sua valorizzazione si è resa però fondamentale per tutelare noi e il mondo che ci ospita.

Bibliografia

[1] Fodil Cherif, M., Trache, D., Brosse, N. et al. Comparison of the Physicochemical Properties and Thermal Stability of Organosolv and Kraft Lignins from Hardwood and Softwood Biomass for Their Potential Valorization. Waste Biomass Valor 11, **2020**, 6541–6553

[2] Dessbesell, L., Paleologou, M., Leitch, M.A., Pulkki, R., & Xu, C.C. Global lignin supply overview and Kraft lignin potential as an alternative for petroleum-based polymers. Renewable & Sustainable Energy Reviews, 123, **2020**, 109768.

[3] Jorgensen, H.; Kristensen, J. B.; Felby, C. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: Challenges and opportunities. Biofuels, Bioprod. Bioref. **2007**, 1, 119–134.

[4] Weekly U.S. Retail Gasoline Prices, Regular Grade. Energy Information Administration, U.S. Department of Energy: Washington, DC, June, **2008**

[5] Perez, J.; Dorado, J. M.; Rubia, T. D.; Martinez, J. Biodegradation and biological treatment of cellulose, hemicellulose and lignin: An overview. Int. Microbiol. **2002**, 5, 53–63

[6] Kuhad, R. C.; Singh, A.; Eriksson, K. E. Microorganisms and enzymes involved in degradation of plant fiber cell walls. AdV. Biochem. Eng./Biotechnol. **1997**, 57, 45–125

[7] S. Thakur, P.P. Govender, M.A. Mamo, Y.K. Mishra, V.K. Thakur Progress in lignin hydrogels and nanocomposites for water purification: future perspectives Vacuum, 146, **2017**, pp. 342-355

[8] A. Voxeur, Y. Wang, R. Sibout Lignification: different mechanisms for a versatile polymer Curr. Opi. Plant Biol., 23 ,**2015**, pp. 83-90

[9] W.O. Doherty, P. Mousavioun, C.M. Fellows Value-adding to cellulosic ethanol: lignin polymers Ind. Crop. Prod., 33, **2011**, pp. 259-276

[10] Xiaojia Lu, Lucas Lagerquist, Kari Eränen, Jarl Hemming, Patrik Eklund, Lionel Estel, Sébastien Leveneur, and Henrik Grénman Industrial & Engineering Chemistry Research, **2021,** 60 (47), 16827-16838

[11] S. Laurichesse, L. Avérous Chemical modification of lignins: towards biobased polymers Prog. Polym. Sci., 39, **2014**, pp. 1266-1290

[12] A. Tribot, G. Amer, M.A. Alio, C. Delattre, M. Callois, C. Vial, P. Michaud Wood-lignin: supply, extraction processes and use as bio-based material Eur. Polym. J., 112, **2019**, pp. 228-240

[13] D.V. Evtuguin, C.P. Neto, P.M. Domingues, O. Faix, Comprehensive study on the chemical structure of dioxane lignin from plantation Eucalyptus globulus wood J. Agr. Food Chem., 49, **2001**, pp. 4252-4261

[14] P.C.R. Pinto, A.E. Rodrigues Insights into oxidative conversion of lignin to high-added-value phenolic aldehydes Ind. Eng. Chem. Res., 50, **2010**, pp. 741-748

[15] C. Li, X. Zhao, A. Wang, G.W. Huber, T. Zhang Catalytic transformation of lignin for the production of chemicals and fuels Chem. Rev., 115, **2015**, pp. 11559-11624

[16] Q. Mei, X. Shen, H. Liu, B. Han Selectively transform lignin into value-added chemicals Chinese Chem. Lett., 30, **2019**, pp. 15-24

[17] W. Schutyser, T. Renders, S. Van den Bosch, S.-F. Koelewijn, G. Beckham, B.F. Sels Chemicals from lignin: an interplay of lignocellulose fractionation, depolymerisation, and upgrading Chem. Soc. Rev., 47, **2018**, pp. 852-908

[18] S.C. Lee, T.M.T. Tran, J.W. Choi, K. Won Lignin for white natural sunscreens Inter. J. Biol. Macromol., 122, **2019**, pp. 549-554

[19] C. Crestini, H. Lange, M. Sette, D.S. Argyropoulos On the structure of softwood Kraft lignin Green Chem., 19, **2017**, pp. 4104-4121

[20] A. Berlin, M. Balakshin Chapter 18-industrial lignins: analysis, properties, and applications Bioenergy Research Advances and Applications, **2014**, pp. 315-336

[21] M. Norgren, H. Edlund Lignin: recent advances and emerging applications Curr. Opin. Colloid Interface Sci., 19, **2014**, pp. 409-416

[22] Balakshin, M., Capanema, Elucidation of the structures of residual and dissolved pine Kraft lignins using an HMQC NMR technique. J. Agric. Food Chem. 51 (21), **2003**, 6116-6127

[23] Fodil Cherif, M., Trache, D., Brosse, N. et al. Comparison of the Physicochemical Properties and Thermal Stability of Organosolv and Kraft Lignins from Hardwood and Softwood Biomass for Their Potential Valorization. Waste Biomass Valor 11, **2020**, 6541–6553

[24] Fadi S. Chakar e Arthur J. Ragauskas. «Review of Current and Future Softwood Kraft Lignin Process Chemistry». Industrial Crops and Products, 6th International Lignin Institute conference, 20, **2004**: 131–41

[25] Tang Q, Qian Y, Yang D, Qiu X, Qin Y, Zhou M. Lignin-Based Nanoparticles: A Review on Their Preparations and Applications. Polymers (Basel). **2020,**12(11):2471

[26] Gigli, M.; Crestini, C. Fractionation of Industrial Lignins: Opportunities and Challenges. *Green Chem.* **2020**, *22* (15), 4722–4746

[27] Dávid Kun e Béla Pukánszky. «Polymer/Lignin Blends: Interactions, Properties, Applications». European Polymer Journal 93, **2017**, 618–41

[28] Lintinen, K.; Latikka, M.; Sipponen, M.H.; Ras, R.H.A.; Österberg, M.; Kostiainen, M.A. Structural diversity in metal-organic nanoparticles based on iron isopropoxide treated lignin. RSC Adv. **2016**, 6, 31790–31796

[29] R. Rinaldi, R. Jastrzebski, M.T. Clough, J. Ralph, M. Kennema, P.C. Bruijnincx, B.M. Weckhuysen, Paving the way for lignin valorisation: recent advances in bioengineering, biorefining and catalysis, Angew. Chem. Int. Ed. 55, **2016**, 8164–8215

[30] W.O. Doherty, P. Mousavioun, C.M. Fellows, Value-adding to cellulosic ethanol: lignin polymers, Ind. Crop. Prod. 33 (2011) 259–276

[31] Wang, Z.; Ganewatta, M.S.; Tang, C. Sustainable polymers from biomass: Bridging chemistry with materials and processing. Prog. Polym. Sci. ,**2020**, 101, 101197

[32] P. Figueiredo, K. Lintinen, J.T. Hirvonen, M.A. Kostiainen, H.A. Santos, Properties and chemical modifications of lignin: towards lignin-based nanomaterials for biomedical applications, Prog. Mater. Sci. 93, **2018**, 233–269

[33] A.G. Vishtal, A. Kraslawski, Challenges in industrial applications of technical lignins, BioResour 6, **2011**, 3547–3568

[34] Doherty, W.O.S.; Mousavioun, P.; Fellows, C.M. Value-adding to cellulosic ethanol: Lignin polymers. Ind. Crop. Prod. , **2011**, 33, 259–276

[35] Tran H, Vakkilainnen EK. The Kraft chemicial recovery process, **2008**

[36] Bajwa DS. A concise review of current lignin production, applications, products and their environmental impact, **2019**, p. 11

[37] VanCaeseele S. Kraft lignin production: a LignoForceTM perspective, **2018**

[38] S. Laurichesse, L. Avérous, Synthesis, thermal properties, rheological and mechanical behaviors of lignins-grafted-poly (ε-caprolactone), Polym 54, **2013**, 3882–3890

[39] S. Sharifi, S. Behzadi, S. Laurent, ML Forrest, P. Stroevee, M. Mahmoudi, Chem. Soc. Riv. , **2012**, 41, 2323-2334

[40] C. Hanley, A. Thurber C. Hanna, A. Punnoose, JH Zhang, DG Wingett, Nanoscale Res. Lett. , **2009**, 4, 1409-1420

[41] Frangville, C.; Rutkevičius, M.; Richter, A.P.; Velev, O.D.; Stoyanov, S.D.; Paunov, V.N. Fabrication of environmentally biodegradable lignin nanoparticles, ChemPhysChem, **2012**, 13, 4245-4243

[42] Qian, Y.; Deng, Y.; Qiu, X.; Li, H.; Yang, D. Formation of uniform colloidal spheres from lignin, a renewable resource recovered from pulping spent liquor. Green Chem. , **2014**, 16, 2156

[43] Tortora, M. Cavalieri, F.; Mosesso, P.; Ciaffardini, F.; Melone, F.; Crestini, C. Ultrasound driven assembly of lignin into microcapsules for storage and delivery of hydrophobic molecules. Biomacromolecules, **2014**, 15, 1634–1643

[44] Gîlcă, I.-A.; Popa, V.I. Study on biocidal properties of some nanoparticles based on epoxy lignin. Cellul. Chem. Technol. , **2013**, 47, 3–4

[45] Yang, W.; Kenny, J.M.; Puglia, D. Structure and properties of biodegradable wheat gluten bionanocomposites containing lignin nanoparticles. Ind. Crops Prod. , **2015**, 74, 348–356

[46] Beisl, S.; Miltner, A.; Friedl, A. Lignin from Micro- to Nanosize: Production Methods. Int. J. Mol. Sci. , **2017**, 18, 1244

[47] Figueiredo, P.; Lahtinen, M.H.; Agustin, M.B.; de Carvalho, D.M.; Hirvonen, S.P.; Penttilä, P.A.; Mikkonen, K.S. Green Fabrication Approaches of Lignin Nanoparticles from Different Technical Lignins: A Comparison Study. ChemSusChem. , **2021**, 14, 4718–4730

[48] Lievonen, M.; Valle-Delgado, J.J.; Mattinen, M.-L.; Hult, E.-L.; Lintinen, K.; Kostiainen, M.A.; Paananen, A.; Szilvay, G.R.; Setälä, H.; Österberg, M. A simple process for lignin nanoparticle preparation. Green Chem. , **2016**, 18, 1416–1422

[49] C. Cui, H. Sadeghifar, S. Sen, D. S. Argyropoulos, BioResources, 2013, 8, 864–886

[50] S. Sen, S. Patil, D. S. Argyropoulos, GreenChem. , **2015**, 17, 1077–1087

[51] C. Wang, S. S. Kelley, R. A. Venditti, Lignin-Based Thermoplastic Materials, ChemSusChem, **2016**, 9, 770

[52] M. Parit, Z. Jiang, Towards lignin derived thermoplastic polymers, Int. JBM, v.165, b, 2020, 3180-3197

[53] Young, E.L.; McDonald, A.G. Preparation and Characterization of Biobased Lignin-Co-Polyester/Amide Thermoplastics, Molecules, **2021**, 26, 2437

[54] Y. Y. Wang, S. Sarkanen, Blend configuration in functional polymeric materials with a high lignin content, Faraday Discuss, **2017**, 202, 43-59

[55] Chen, Y.-r.; Sarkanen, S.; Wang, Y.-Y. Lignin-Only Polymeric Materials Based on Unmethylated Unfractionated Kraft and Ball-Milled Lignins Surpass Polyethylene and Polystyrene in Tensile Strength. Molecules, **2019**, 24, 4611

[61] Meng, X.; Crestini, C.; Ben, H.; Hao, N.; Pu, Y.; Ragauskas, A. J.; Argyropoulos, D. S. Determination of Hydroxyl Groups in Biorefinery Resources via Quantitative 31P NMR Spectroscopy. Nat Protoc. , **2019**, 14 (9), 2627–2647