

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II



STUDIO DELLE DINAMICHE DEI GEL FISICI: GEL IONICI A BASE DI ALGINATO

Ciro Siviello

**DOTTORATO DI RICERCA IN INGEGNERIA DEI MATERIALI E DELLE STRUTTURE
(XXVIII CICLO)**

DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA CHIMICA, DEI MATERIALI E DELLA PRODUZIONE INDUSTRIALE

Tutors: Prof. Ing. Giuseppe Mensitieri
Dott. Domenico Larobina

Aprile 2016

A Mamma...

A te che troppo presto mi hai lasciato,

nel tentativo di colmare quel vuoto

col ricordo del tuo amore...

INDICE

INTRODUZIONE	5
CAPITOLO I: <i>HYDROGELS</i> DI ALGINATO	7
I.1: Introduzione ai gel di alginato.....	8
<i>I.1.1: Alginati.....</i>	<i>8</i>
I.2: Struttura e gelazione degli alginati	11
<i>I.2.1: Struttura molecolare.....</i>	<i>11</i>
<i>I.2.2: Gelazione</i>	<i>12</i>
<i>I.2.3: Metodi di gelazione</i>	<i>16</i>
I.3: Proprietà dei gel di alginato	17
<i>I.3.1: Coefficienti di selettività.....</i>	<i>17</i>
<i>I.3.2: Proprietà chimiche</i>	<i>18</i>
<i>I.3.3: Proprietà meccaniche</i>	<i>19</i>
<i>I.3.4: Biocompatibilità</i>	<i>24</i>
<i>I.3.5: Degradazione degli alginati</i>	<i>27</i>
I.4: Tecniche di caratterizzazione degli alginati.....	28
<i>I.4.1: Studi di spettroscopia vibrazionale</i>	<i>28</i>
<i>I.4.2: Determinazione del rapporto M/G.....</i>	<i>32</i>

CAPITOLO II: MATERIALI E METODI	39
II.1: Materiali	39
II.2: Preparazione dei campioni	39
II.3: Analisi spettroscopica	42
II.4: Test meccanici	43
<i>II.4.1: Test di compressione</i>	<i>43</i>
<i>II.4.2: Test di torsione</i>	<i>48</i>
II.5: Monitoraggio dell'invecchiamento dei campioni	50
II.6: Light scattering dinamico (DLS)	50
CAPITOLO III: CARATTERIZZAZIONE SPETTROSCOPICA	57
III.1: Caratterizzazione spettroscopica di gel di alginato con diversi cationi	57
CAPITOLO IV: COMPORTAMENTO MECCANICO.....	67
IV.1: Elasticità istantanea	67
IV.2: Proprietà viscoelastiche	77
<i>IV.2.1: Rilassamento dopo la compressione</i>	<i>77</i>
<i>IV.2.2: Diffusione</i>	<i>80</i>
<i>IV.2.3: Rilassamento dopo la torsione</i>	<i>89</i>
<i>IV.2.4: Un'interpretazione del comportamento di rilassamento dei gel</i>	<i>93</i>

CAPITOLO V: <i>AGING</i>	97
V.1: Perdita di peso	97
V.2: Prove a $\varepsilon=0$.....	98
V.3: Prove di Stress-relaxation.....	102
V.4: Prove a diverse temperature.....	104
V.5: Valutazione di $E(t=0)$.....	105
V.6: DLS.....	107
CONCLUSIONI.....	111
APPENDICE	117
BIBLIOGRAFIA	123

INTRODUZIONE

Il presente lavoro di ricerca è stato incentrato principalmente sulla caratterizzazione di gel fisici a base di bio-polimeri e, in particolare, di gel ionici a base di alginato. Le motivazioni di questa scelta sono legate al fatto che questi materiali possono sicuramente essere considerati come un valido modello che rappresenti l'intera classe dei gel ionici, nonché al crescente interesse riscontrato, negli ultimi decenni, per applicazioni biologiche. Interesse dovuto, di sicuro, a fattori quali: la loro non tossicità, biocompatibilità, il metodo di preparazione piuttosto semplice, la facile formazione del gel. Tra gli esempi applicativi di maggiore interesse troviamo: sistemi iniettabili di "*drug delivery*" per il rilascio controllato di farmaci, *scaffolds* per colture cellulari, per l'incapsulamento ed il trapianto di cellule, sostituti intervertebrali, materiale reattivo agli stimoli per dispositivi bio-mimetici. Ciò giustifica sia la ricerca costante di nuovi biomateriali, sempre più affidabili, più efficienti e aventi prestazioni superiori, nonché i continui tentativi di chiarire sempre meglio le caratteristiche e le proprietà intrinseche di questa classe di materiali. Infatti, è evidente, l'importanza di una profonda conoscenza delle loro

proprietà, sia dal punto di vista meccanico e strutturale, che dal punto di vista molecolare.

Lo scopo del presente lavoro è, appunto, quello di rendere disponibile una conoscenza più dettagliata del comportamento degli *hydrogels* a base di alginato sia dal punto di vista delle performance meccaniche che sui meccanismi molecolari.

La parte sperimentale è stata concentrata i) sulla messa a punto del più opportuno processo di sintesi per la realizzazione di un materiale che presentasse le caratteristiche ottimali per i nostri scopi, ii) sullo studio del comportamento meccanico degli stessi, con particolare riferimento al comportamento in *stress-relaxation* e iii) sui fenomeni di invecchiamento cui sono soggetti questo tipo di materiali, allo scopo di comprendere a pieno i fenomeni che avvengono all'interno del gel ed averne una più ampia padronanza, iv) fornire informazioni dettagliate sulla struttura e le proprietà dei materiali su scala molecolare. Per quanto concerne l'ultimo obiettivo, faremo uso di una particolare tecnica, la spettroscopia vibrazionale, in quanto risulta tuttora il metodo più comune ed efficace per analisi di tipo molecolare. Inoltre, questa tecnica ha il vantaggio di essere non distruttiva, veloce e di richiedere quantità limitate di materiale.

CAPITOLO I: *HYDROGELS* DI ALGINATO

Prima di introdurre nello specifico i materiali utilizzati nell'ambito del presente progetto di ricerca, è utile presentare la classe dei polisaccaridi, cui appartengono gli alginati.

I polisaccaridi rappresentano una classe di composti chimici organici appartenenti alla più ampia classe dei carboidrati (detti anche glucidi). Rispetto agli altri glucidi, hanno la caratteristica di essere costituiti da un numero elevato di unità ripetitive, legate insieme da legami glicosidici, a formare molecole grandi e complesse.

Questa classe comprende una vasta varietà di polimeri, che differiscono nella composizione monomerica, nella configurazione anomeric, nella sequenza, nella posizione dei legami, nella densità di carica, nelle dimensioni molecolari, presentando così un'ampia gamma di proprietà fisiche.^[1]

In natura, i polisaccaridi si trovano comunemente nelle piante terrestri (delle quali costituiscono dal 50% al 90% del loro peso secco), come la cellulosa e l'amido, o nelle alghe marine, come l'alginato, l'agar e la

carragenina; si trovano anche negli animali, anche se in quantità minori, ma la loro presenza è essenziale nella loro nutrizione, svolgendo soprattutto una funzione di scorta energetica.

Tali materiali trovano impiego in molteplici settori, quali l'industria alimentare, la biomedicina, la produzione di carta, la produzione di adesivi e tanti altri.

Come tutti i polimeri di origine naturale, le molecole di alginato, così come quelle di tutti i polisaccaridi, non sono tutte uguali, dipendendo da una molteplicità di fattori, quali ad esempio: la specie, l'età della pianta, la parte dell'alga da cui vengono estratte. Pertanto, nell'ambito di questa presentazione preliminare verranno prese in considerazione le loro caratteristiche medie.

I.1: Introduzione ai gel di alginato

I.1.1: Alginati

Gli alginati sono copolimeri lineari di origine naturale estratti dalla parete cellulare delle alghe brune *Laminaria* e *Ascophillum*, piuttosto diffuse in Europa e negli Stati Uniti.

Anche se le alghe marine restano la principale fonte di alginati, sono state individuate anche diverse fonti microbiche, come *Azotobacter vinelandii* e *Pseudomonas aeruginosa*. A differenza degli alginati estratti dalle alghe, quelli batterici sono acetilati. Anche se non sono ampiamente utilizzati attualmente, gli alginati di origine batterica potrebbero diventare una valida alternativa nel futuro, tenendo conto che l'inquinamento marino ha prodotto una certa instabilità nella fornitura a lungo termine di queste specie di alghe.^[2]

Gli alginati da alghe devono subire una serie di trattamenti prima di poter essere effettivamente utilizzati in una forma idonea, o per applicazioni in cui è richiesta una loro elevata purificazione. In generale, il processo di estrazione dell'alginato può essere schematizzato secondo il modello riportato nella figura 1:

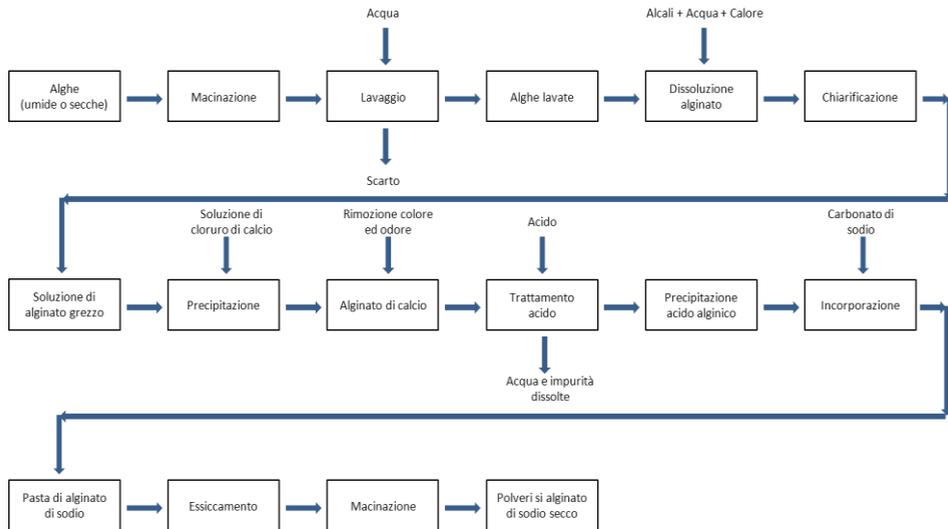


Figura 1: Schema del processo di produzione dell'alginato di sodio.^[3]

Poiché i sali di alginato che si trovano nelle alghe sono insolubili, è necessario una loro trasformazione in alginato di sodio, che è solubile.

La decisione riguardante il tipo di alga da scegliere da processare commercialmente è basata su una valutazione attenta di vari fattori: i costi della materia prima, il suo contenuto di alginato, nonché il tipo di alginato contenuto, poiché la sua struttura determina quelle che ne saranno poi le prestazioni.

Tali materiali riscontrano un notevole interesse applicativo soprattutto per la loro abilità di formare, in presenza di cationi bivalenti (quali ad esempio Ca^{2+} , Sr^{2+} , Cu^{2+} , Ba^{2+} , Zn^{2+}) gel polimerici.

I.2: Struttura e gelazione degli alginati

I.2.1: Struttura molecolare

Chimicamente gli alginati sono copolimeri a blocchi random composti da monomeri di acido β -D-mannuronico (M) e acido α -L-guluronico (G). All'interno del polimero di alginato, i monomeri M e G sono assemblati in blocchi sia a sequenza ripetuta (MM o GG) che a sequenza alternata (MG).^[4] L'ammontare e la distribuzione dei due monomeri dipende, ovviamente, dalla specie, dall'età e dalla parte dell'alga da cui il polimero è stato isolato.

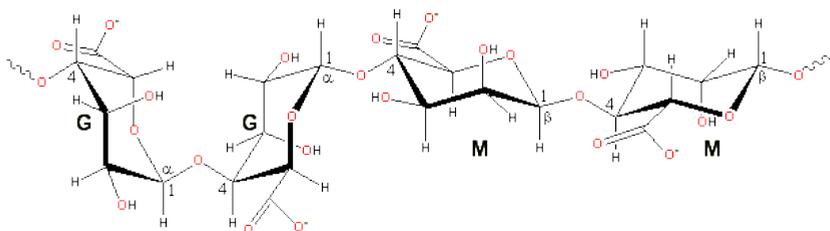


Figura 2: Rappresentazione schematica di una catena polimerica di acido alginico.

Tra i diversi tipi di alghe considerate sono state evidenziate delle differenze nel contenuto relativo dei blocchi M e G: *Ascophyllum nodosum* e *Macrocystis pyrifera* presentano un contenuto relativamente basso di G (35-42%) mentre alcune parti della *Laminaria hyperborea* hanno un contenuto di G tra il 65 ed il 75%. I due acidi uronici (M e G) adottano diverse conformazioni con il gruppo carbossilico COO^- in posizione equatoriale favorita, indipendentemente dalla loro unità vicina.^[5,6] È stato inoltre osservato, da un'analisi conformazionale, che la rotazione intorno ai legami glicosidici è fortemente limitata; questo può spiegare l'alto peso molecolare e l'elevato grado di rigidità meccanica osservati nella catena polimerica.^[7] Regioni in cui predomina l'acido β -D-mannuronico (M) formano estese strutture a nastro, mentre quelli ricchi di acido α -L-guluronico (G) sembrano formare una catena inarcata.^[8]

1.2.2: Gelazione

L'interesse applicativo per gli alginati deriva, come accennato in precedenza, principalmente dalla loro capacità di formare gel. Pertanto, lo studio del processo di gelazione assume un'importanza fondamentale. Ricordiamo che, per definizione, un gel è un solido costituito da un network tridimensionale di molecole tenute insieme da zone di giunzione (di natura

fisica o chimica), a costituire una fase solida nella quale resta inglobato il mezzo liquido disperso. Il network conferisce al gel le proprietà caratteristiche di un solido, mentre la fase liquida controlla la sua densità. Tali polimeri, posti in soluzione in presenza di cationi bivalenti (quali ad esempio Ca^{2+} , Sr^{2+} , Cu^{2+} , Ba^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} eccetto Mg^{2+}), inducono l'instaurarsi di legami ionici tra le diverse catene polimeriche, promuovendo una transizione sol-gel. Infatti i cationi bivalenti, portati in soluzione, interagiscono con il polimero riuscendo a coordinare i gruppi G su diverse catene polimeriche, consentendo la formazione di un network tridimensionale. La struttura di questi cross-links fisici è stata ampiamente studiata, con lo scopo di chiarire il suo ruolo nella stabilità del gel. In letteratura è proposto, ed ampiamente condiviso, il cosiddetto modello "egg-box" (vedi figura 3), che descrive il network polimerico come blocchi GG in parallelo tenuti insieme da cationi bivalenti.

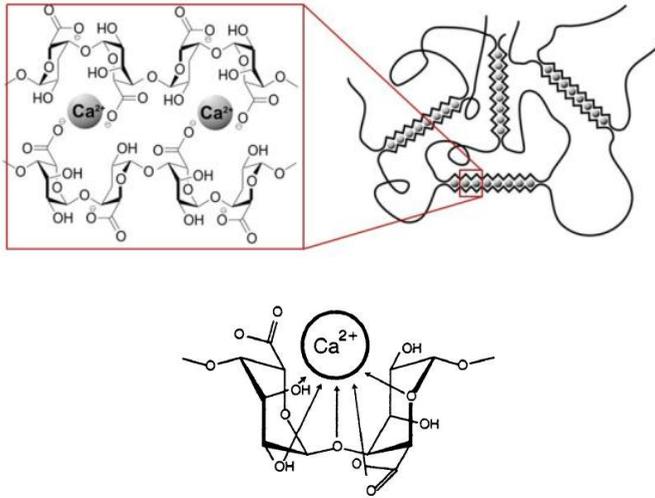


Figura 3: Rappresentazione schematica del modello "egg-box".

Tale modello è stato presentato in particolare per i gel di alginato di calcio, in quanto i più ampiamente studiati ed utilizzati nel campo medico ed alimentare.

Studi di spettroscopia NMR e dicroismo circolare^[9,10,11] hanno suggerito che i cationi Ca^{2+} legano, in primo luogo, i gruppi G fino a saturazione dei siti di legame disponibili. Successivamente, procedono i legami con i gruppi M (almeno a livello macroscopico e, soprattutto, quando le unità vicine sono costituite da residui G) finché l'associazione delle catene viene limitata dal network. La spiegazione di tale osservazione risiede nella diversa capacità di formare zone di giunzione con i cationi Ca^{2+} dei blocchi M e G. Questi

ultimi sono entrambi polianionici e formeranno legami anionici intermolecolari con i cationi bivalenti. Tuttavia, i blocchi G sono anche in grado di chelare i Ca^{2+} a causa della loro organizzazione spaziale, formando un sito di legame tra due blocchi G adiacenti e dando luogo, dunque, a un più forte tipo di interazione.^[8] Si formano così giunzioni dimeriche piuttosto che aggregati. Da qui il modello "egg-box" proposto in figura 3, che prende il nome dalla caratteristica forma della struttura molecolare che si viene a creare.^[9,12]

In figura 4 è riportata un'immagine TEM di un campione di gel di alginato reticolato con Ca^{2+} , che mostra chiaramente il network polimerico che si viene a creare.

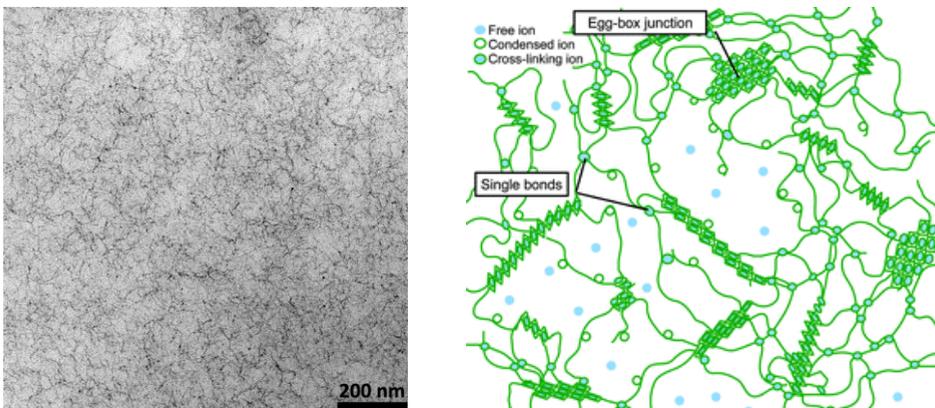


Figura 4: Network polimerico di un gel di alginato.

I.2.3: Metodi di gelazione

Esistono diversi metodi per ottenere un gel:

- un metodo molto comune, data la sua semplicità, è il metodo per *dialisi/diffusione*: una soluzione acquosa di alginato viene fatta gelificare per diffusione dei cationi bivalenti da una soluzione esterna posta a contatto con la prima (ad esempio da una soluzione di CaCl_2). Tale procedura, però, porta alla formazione di un gel eterogeneo, con una maggiore concentrazione di *crosslinks* nella regione che per prima viene a contatto con la soluzione di cationi. Lo svantaggio principale di questa tecnica, pertanto, è costituito dal fatto che, a causa anche della bassa velocità di diffusione, essa è limitata alla realizzazione di film di gel di spessore relativamente ridotto.^[3]
- Un altro metodo molto utile è la gelazione *in situ* (o "*inner gelation*")^[13]: la tecnica consiste nello sciogliere una forma inattiva del catione bivalente (il complesso catione-EDTA) in una soluzione di alginato (alla concentrazione desiderata) in presenza di una sostanza lentamente idrolizzante, il D-glucono- δ -lactone (GDL). La lenta idrolisi del GDL a sua volta dà luogo ad un graduale rilascio di cationi che, legando fisicamente le catene di alginato, danno luogo al processo di gelificazione. Questa è la tecnica che

consente, più delle altre, di ottenere un gel omogeneo dal punto di vista macroscopico e di forma regolare.

- Il terzo metodo è il cosiddetto “*setting by cooling*”^[3]: questa terza tecnica di gelazione è basata sul fatto che i cationi non possono legare le catene di alginato a temperature elevate. Pertanto, l’associazione cationi/molecole di alginato si verifica solo quando la soluzione viene raffreddata. I gel così formato sono termoreversibili. Tale metodo, così come la gelazione *in situ*, conferisce al gel finale una maggiore stabilità. Dato che gli ioni calcio sono disponibili per tutte le catene di alginato, si formeranno i sistemi energeticamente più favoriti.

I.3: Proprietà dei gel di alginato

I.3.1: Coefficienti di selettività

Un parametro utile da valutare, per la produzione dei gel, è l’affinità dei vari cationi metallici con il sodio alginato. A tale scopo sono stati introdotti i coefficienti di selettività k ,^[14] espressi come:

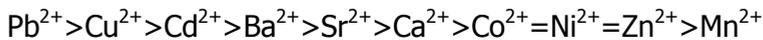
$$k = \frac{[\text{ione metallico nel gel}] [\text{ione sodio in soluzione}]^2}{[\text{ione sodio nel gel}]^2 [\text{ione metallico in soluzione}]}$$

Clare (1993) ha misurato questo parametro per alcuni cationi bivalenti per due diversi alginati (vedi tabella 1).

	<i>L. Hyperborea</i> (M/G = 0.5)	<i>L. Digitata</i> (M/G = 1.6)
Cu ²⁺	340	230
Ba ²⁺	52	21
Ca ²⁺	20	7.5
Co ²⁺	4	3.5

Tabella 1: Esempio di alcuni valori dei coefficienti di selettività.^[3]

È stata, inoltre, stabilita una scala relativa di affinità con l'alginato per diversi cationi bivalenti di interesse:^[15]



1.3.2: Proprietà chimiche

Il problema principale riscontrato nei gel di alginato è la bassa stabilità chimica.

Dato che essi formano il più delle volte *crosslinks* con ioni calcio, sostanze dotate di un'alta affinità per questi ultimi (come fosfati o citrati) possono sequestrare ioni calcio e destabilizzare il gel iniziale. Il gel sarà, inoltre,

destabilizzato dalla presenza di concentrazioni di altri cationi non gelificanti, quali ad esempio Na^+ e Mg^{2+} a causa di reazioni di scambio ionico.^[16] È stato riscontrato che un aumento del contenuto di acido glicuronico G contribuisce a migliorare la stabilità chimica del gel.

1.3.3: Proprietà meccaniche

Gli idrogeli sono materiali di grande interesse applicativo in svariati settori. Tale interesse scaturisce da molteplici fattori, quali ad esempio: il metodo di preparazione piuttosto semplice, la facile formazione del gel, la loro non tossicità. In particolare, negli ultimi anni si è osservato un interesse crescente per questi materiali, in particolare per applicazioni biomediche: ad esempio sistemi iniettabili di “*drug delivery*”, *scaffolds* per colture cellulari. È evidente, quindi, l’importanza di conoscere a fondo questi materiali, sia dal punto di vista chimico e strutturale che dal punto di vista meccanico, al fine di poterne padroneggiare l’utilizzo in ciascuna delle applicazioni menzionate e in diverse altre.

Le proprietà meccaniche e reologiche dei gel di alginato sono state ampiamente studiate. Tali materiali manifestano generalmente un comportamento elastico a gelazione completa, con moduli di compressione che variano da 1 kPa a diverse centinaia di kPa, mentre i moduli a taglio

variano solitamente nel range 0.02-40 kPa.^[17-19] Nonostante i numerosi studi condotti su questi materiali, l'origine dell'elasticità non è ancora completamente chiarita. Infatti, la teoria generale di elasticità delle gomme non è applicabile a questi materiali, in quanto le catene di alginato non presentano il tipico comportamento *random coil* assunto dalla teoria a causa della natura dei legami fisici che si instaurano. I gel di alginato hanno *junction zones* di ioni di complessazione e si presume che le lunghezze di tali giunzioni possano essere responsabili della loro caratteristica risposta meccanica, compresa la loro resistenza a frattura. I gel di alginato reticolati ionicamente sono considerati come sistemi di non-equilibrio con un comportamento governato dalla cinetica piuttosto che dalla termodinamica.^[20,21] I loro moduli presentano una complessa dipendenza dalla temperatura che non coincide con considerazioni di carattere termodinamico. Inoltre, il loro comportamento viscoelastico è evidenza di effetti cinetici in un sistema non elastico di non equilibrio; si tratta quindi di sistemi non realmente elastici. Tuttavia, i gel di alginato mostrano un comportamento tipicamente elastico a basse sollecitazioni.

In tutti gli studi disponibili in letteratura, è mostrato che sia la resistenza che i moduli a compressione di questi gel subiscono un incremento con

l'aumento di concentrazione di alginato, il contenuto totale di ioni bivalenti, il peso molecolare ed il contenuto relativo di acido guluronico (G).^[22]

Per gran parte dei test condotti su questi gel, vengono utilizzate piccole sfere di materiale ottenute facendo semplicemente gocciolare la soluzione di alginato (alla concentrazione desiderata) in una soluzione acquosa del catione utilizzato per la gelazione, spesso da cloruro di calcio (CaCl_2). Tuttavia, per i test meccanici, ed in particolare per i test a compressione, vengono richiesti campioni di geometria regolare e con superfici piate e parallele, pertanto viene preferita la procedura di gelazione di "inner gelation".^[23]

In tutti i test, generalmente condotti su campioni cilindrici, la forma della tipica curva *stress-strain* ($\sigma - \varepsilon$) è caratterizzata da concavità verso l'alto. Tale comportamento, definito *strain hardening*, viene generalmente attribuito a strutture densificate o sistemi polimerici altamente reticolati. All'applicazione di piccole deformazioni, la loro struttura resta praticamente inalterata e, all'atto della rimozione del carico applicato, ritornano alla loro forma originale.

A grandi deformazioni i *crosslinks* possono fratturarsi, limitando così la resistenza meccanica della struttura del gel. La concavità verso l'alto viene

mantenuta, in tutti i test, indipendentemente dall'utilizzo dei valori reali o quelli ingegneristici; ciò rappresenta un'indicazione di vera compressibilità. Tra i numerosi modelli empirici proposti in letteratura, il migliore per la descrizione della relazione *stress-strain* non lineare ottenuta sperimentalmente sembra essere il modello potenza:

$$\sigma_E = k \varepsilon_E^n$$

Il comportamento elastico lineare osservato alle basse deformazioni è stato confermato da diversi studi disponibili in letteratura. Ad esempio, esaminando il comportamento in *stress-relaxation* di idrogel di alginato (con un contenuto di alginato pari al 2% in peso) è stato osservato un comportamento lineare fino a circa il 15% di deformazione in compressione. La pendenza del tratto lineare fornisce una stima del modulo elastico di questi materiali $E_0^{[24]}$ (nel caso di gel di alginato al 2% in peso, reticolati con cationi calcio, si osserva un modulo elastico di circa 26 kPa, e la pendenza della curva *stress-strain* appare indipendente dalle dimensioni del campione).

Come detto in precedenza, soluzioni acquose di alginato sono in grado di formare idrogel in presenza di vari cationi bivalenti (tranne Mg^{2+}). Tuttavia, è stato osservato che i cationi mostrano diverse affinità per alginato e una diversa influenza sulle proprietà del gel finale. Recentemente, diversi studi sono stati condotti al fine di esaminare l'influenza dei diversi cationi sul comportamento meccanico e sulla struttura del gel di alginato.^[25] Tale influenza è stata dimostrata attraverso metodi calorimetrici e dilatometrici. Il modulo di Young per questi materiali segue l'ordine $Cd^{2+} > Ba^{2+} > Cu^{2+} > Ca^{2+} > Ni^{2+} > Mn^{2+}$.^[26] Esiste una relazione lineare tra i valori osservati del modulo di Young ed il logaritmo della costante di associazione per i diversi complessi catione bivalente/alginato. Gli alginati con un elevato contenuto di acido guluronico forniscono gel più resistenti rispetto a quelli con un contenuto minore di G. Ciò è stato attribuito alla maggiore affinità dei residui guluronici per i cationi bivalenti. L'effetto dei diversi cationi crosslinkanti sulle proprietà del gel sono state analizzate in diversi studi. Per esempio, troviamo l'analisi dell'effetto di tre dei cationi più utilizzati, Ca^{2+} , Ba^{2+} and Sr^{2+} .^[27] È stato osservato che la stabilità dimensionale e la resistenza aumentano per gel ad alto contenuto di G scambiando i tradizionali ioni Ca^{2+} con ioni Ba^{2+} . Inoltre, l'utilizzo di ioni Ba^{2+} comporta

una diminuzione delle dimensioni dei campioni ottenuti. Con l'utilizzo di ioni Sr^{2+} si ottengono gel con caratteristiche intermedie tra il calcio e il bario. Più precisamente, è stato osservato che Ca^{2+} si lega a gruppi G- e MG-, Ba^{2+} a gruppi G- e M- e Sr^{2+} ai soli gruppi G-.

Dato che sia la composizione che la struttura del gel variano enormemente per i diversi tipi di alginato, ne consegue che le proprietà finali saranno fortemente influenzate dalla scelta sia del tipo di alginato che del catione crosslinkante.

1.3.4: Biocompatibilità

La biocompatibilità di alcuni materiali è una proprietà di grande interesse per applicazioni in campo bio-medico. La proprietà di essere biologicamente compatibile è in linea di principio quella di non produrre una risposta tossica, lesiva o immunologica nel tessuto vivente. Così, la biocompatibilità è la capacità di un materiale di rimanere biologicamente innocuo durante il suo periodo di funzionalità in una creatura vivente. L'ultima parte della precedente affermazione pone l'accento sull'importanza della natura dell'individuo. In effetti, la biocompatibilità è una nozione che deve essere interpretata come una serie di eventi od interazioni che avvengono all'interfaccia tra il tessuto ed il materiale, il cui risultato deve essere

almeno soddisfacente o possibilmente ottimale. Queste interazioni sono influenzate dalle caratteristiche intrinseche dei materiali, ma anche dalle circostanze di confronto, in particolare il sito biologico destinato all'implantazione e, soprattutto, dal contesto infiammatorio indotto dall'atto chirurgico e mantenuto dalla presenza del materiale.

Al fine di poter essere utilizzati come biomateriali, i materiali devono possedere alcune proprietà indispensabili:

- nessuna risposta infiammatoria o tossica;
- accettabile durata prima della scadenza (shelf life);
- tempo di degradazione confrontabile con il tempo di guarigione o rigenerazione;
- proprietà meccaniche adeguate per l'applicazione: la variazione delle proprietà meccaniche dev'essere compatibile con il processo di guarigione o rigenerazione;
- prodotti di degradazione non tossici, ed in ogni modo metabolizzati o purificati tramite processi corporei;
- sufficiente permeabilità e processabilità per l'applicazione desiderata.

I gel di alginato mostrano ottime potenzialità per applicazioni in questo settore.

La preoccupazione principale quando si considera alginato come materiale per applicazioni biomediche è il contatto diretto con le ferite e, quindi, la sua compatibilità con il sangue. Gli alginati sono materiali gelificanti altamente assorbenti con proprietà emostatiche. A contatto con il sangue, l'alginato di calcio rilascia ioni Ca^{2+} in cambio di ioni sodio. Questo stimola l'attivazione piastrinica e fattori di coagulazione^[28] riducendo il tempo di coagulazione del sangue.^[29] L'alginato di sodio è poi soggetto a rompersi in semplici residui monosaccaridi che vengono poi totalmente assorbiti per dissoluzione. Tutte le fibre residue che restano all'interno della ferita sono poi biodegradabili e ciò elimina la necessità di una loro completa rimozione.^[30] Mayer et al. (1987) hanno analizzato l'attività biologica dell'alginato di sodio sui tumori nei topi. Il sale sodico non sembra presentare alcun effetto sui tumori, nessuna significativa citotossicità in vitro, e risulta relativamente non tossico.

Una certa attività antitumorale è risultata essere correlata al contenuto di acidi uronici,^[31] osservando che alginati con un maggior contenuto di blocchi MM hanno una maggiore attività antitumorale.

1.3.5: Degradazione degli alginati

Spesso degradabilità può rappresentare una proprietà fondamentale di alcuni dei materiali utilizzati nell'ingegneria dei tessuti. Tuttavia, nel caso dell'alginato, pur essendo un materiale attraente per il settore grazie alla sua biocompatibilità e la capacità di formare idrogel, il suo degrado lento ed incontrollabile può essere una caratteristica indesiderata.

Haug et al. (1963) hanno suggerito che al di sopra di un $\text{pH} = 10$, l'aumento del tasso di degradazione è dovuto ad un aumento del tasso di un β -eliminazione, mentre a valori di pH inferiori a 5, un'idrolisi proton-catalizzata è responsabile del rapido degrado.

Le liasi degli alginati, enzimi che catalizzano la rottura dei legami chimici, sono state isolate da una vasta gamma di organismi, compresi batteri, funghi marini, molluschi e alghe brune. Secondo Gacesa (1988), questi enzimi dell'alginato sono specifici sia per i legami con l'acido β -D-mannuronico che con l'acido α -L-guluronico. Per contro, Larsen et al. (1993) sostengono che gli enzimi preparati da *Bacillus circulans* degradano entrambi i tipi di blocchi, anche se con una diversa efficienza.

Finora, la maggior parte delle liasi dell'alginato che sono state segnalate sono di β -eliminazione. Le liasi sono in grado di degradare il polimero per

produrre oligosaccaridi contenenti il prodotto insaturo 4-diossi-L-eritro-esa-4-ene piranosiluronato. Il meccanismo proposto dell'azione delle liasi è basata su una reazione a tre fasi, comprendente:

- (i) la rimozione della carica negativa sul anione carbossilato (COO^-);
- (ii) l'estrazione base-catalizzata del protone sul carbonio C(5);
- (iii) una β -eliminazione del legame 4-O-glicosidico.^[32]

I.4: Tecniche di caratterizzazione degli alginati

I.4.1: Studi di spettroscopia vibrazionale

Al fine di ottenere informazioni sulla struttura molecolare e la forza dei legami tra gli atomi per un dato materiale (nel nostro caso per l'alginato) è possibile far riferimento ad un'ampia gamma di tecniche spettroscopiche. La conoscenza della struttura molecolare acquisisce un'importanza notevole, anche perché permette, a sua volta, di comprendere alcune proprietà del materiale a livello macroscopico. Vediamo più nel dettaglio alcune delle principali tecniche spettroscopiche:

- *Spettroscopia FTIR (Fourier transform infrared spectroscopy)*

La spettroscopia FTIR è una delle tecniche maggiormente utilizzate per l'analisi strutturale a livello molecolare. Si tratta di una tecnica

spettroscopica di assorbimento, normalmente utilizzata nel campo della chimica analitica e della caratterizzazione dei materiali, oltre che in chimica fisica per lo studio dei legami chimici. Quando un fotone infrarosso viene assorbito da una molecola, questa passa dal suo stato vibrazionale fondamentale ad uno stato vibrazionale eccitato.

Grazie all'interazione con la radiazione infrarossa, parte della radiazione incidente viene assorbita a lunghezze d'onda specifiche dal campione. La molteplicità di vibrazioni che si verificano produce contemporaneamente uno spettro di assorbimento molto complesso che è unico e caratteristico per ciascun materiale.^[33]

Essa consente di individuare specifici moti vibrazionali delle molecole in un dato materiale, quali ad esempio *twisting*, *bending*, *rotating* intorno ai legami atomici.

È importante, tuttavia, rendersi conto che le vibrazioni in un sistema molecolare non sono isolate l'una dall'altra e questo è ancor più evidente per molecole complesse come i polisaccaridi, che contengono molti legami C-C e C-O che hanno costanti di forza e masse simili.^[34]

In tabella 2 sono riportate le principali frequenze IR caratteristiche degli alginati:

Numero d'onda (cm⁻¹)	Intensità - Forma	Assegnazione
3370	<i>very strong – broad</i>	O-H <i>stretching</i> , H-bonded
3250	<i>strong – shoulder</i>	O-H <i>stretching</i> , H-bonded
2930	<i>weak – broad</i>	C-H <i>stretching asym.</i>
2750	<i>weak – shoulder</i>	C-H <i>stretching asym.</i>
1610	<i>very strong – sharp</i>	COO ⁻ <i>stretching asym.</i>
1414	<i>medium – sharp</i>	COO ⁻ <i>stretching sym.</i>
1335	<i>weak – shoulder</i>	-
1320	<i>weak – broad</i>	C-H <i>in-plane deformation</i>
1295	<i>weak – shoulder</i>	C-H <i>in-plane deformation</i>
1165	<i>weak – shoulder</i>	-
1125	<i>medium – sharp</i>	C-O e C-C <i>stretching</i>
1088	<i>medium – sharp</i>	C-O, COC e C-C <i>stretching</i>
1060	<i>medium – shoulder</i>	O-H <i>in-plane deformation</i>
1030 – 1035	<i>very strong – sharp</i>	C-O, COC e C-C <i>stretching</i>
997	<i>medium – shoulder</i>	COC <i>stretching</i>
948	<i>weak -sharp</i>	CCH <i>deformation</i>
935	<i>weak – shoulder</i>	-
903	<i>weak -sharp</i>	O-H <i>out-of-plane deformation</i>
892	<i>weak – shoulder</i>	C-H <i>out-of-plane deformation</i>
815	<i>weak -sharp</i>	C-C <i>stretching</i>
780	<i>weak – broad</i>	C-C <i>stretching</i>
670	<i>weak – broad</i>	C-H <i>out-of-plane deformation</i>
625	<i>weak -sharp</i>	-
500	<i>weak – broad</i>	C-O <i>deformation</i>

Tabella 2: Principali frequenze IR caratteristiche degli alginati.

- *Spettroscopia Raman*

La spettroscopia Raman, così come quella FTIR, è una spettroscopia vibrazionale.

Le due tecniche sono più complementari che competitive. Innanzitutto, i fenomeni che stanno alla base delle due tecniche sono diversi: assorbimento selettivo di radiazioni che provocano transizioni energetiche nell'IR, diffusione anelastica della luce nel Raman. Inoltre, le cosiddette regole di selezione, che determinano quali modi di vibrazione sono attivi e quali no, sono diverse: nell'IR sono assorbite energie che provocano cambiamenti nel momento di dipolo di una molecola, mentre nel Raman è richiesto un cambiamento della sua polarizzabilità, proprietà legata alla possibilità di distorsione della nuvola elettronica. In conseguenza di ciò, alcuni modi di vibrazione sono attivi nell'IR e non nel Raman e viceversa. A vantaggio della tecnica Raman vi è il fatto che l'acqua e il vetro non causano interferenze, diversamente dall'IR, e che le linee dello spettro Raman sono generalmente più strette e quindi più semplici da identificare. A vantaggio della tecnica IR vi è invece il fatto che gli spettri sono solitamente più ricchi di segnali e, quindi, la tecnica risulta di più generale applicazione.

- *Spettroscopia INS (Inelastic neutron scattering spectroscopy)*

Una terza tecnica spettroscopica è la spettroscopia INS. Tale tecnica consente di ottenere gli spettri vibrazionali di materiali solidi. L'interazione, in questo caso, è con il nucleo piuttosto che con gli elettroni e questo si traduce in significative differenze con la spettroscopia infrarossa e Raman. In particolare, non ci sono regole di selezione, le intensità sono semplici da calcolare ed i moti che coinvolgono l'idrogeno dominano lo spettro. A questo scopo, può essere utilizzato l'analizzatore TFXA (*time focused crystal analyser*). Si tratta di uno strumento a geometria invertita progettato per minimizzare gli effetti di *scattering* multiplo utilizzando una bassa energia di analisi.^[35]

L'intensità delle bande nella spettroscopia INS è proporzionale alla sezione trasversale di *scattering* anelastico di neutroni (σ) di tutti gli atomi coinvolti nel modo vibrazionale considerato. Le sezioni trasversali di *scattering* sono una caratteristica di ciascun elemento e non dipendono dall'*environment* chimico.

1.4.2: Determinazione del rapporto M/G

Come precedentemente osservato, esiste una profonda correlazione tra le proprietà degli alginati ed il rapporto tra acido mannuronico (M) ed acido

guluronico (G). Gli alginati vengono tipicamente descritti attraverso il loro rapporto M/G, la distribuzione delle unità M- G- lungo la catena molecolare e il peso molecolare medio, poiché questi parametri sono strettamente correlati alla funzionalità degli alginati, quindi alla solubilità, all'interazione con i metalli, alle proprietà del gel, alla viscosità. Inoltre, le alghe da cui vengono estratti presentano uno spettro molto ampio di percentuali di acido uronico, a seconda di dove e quando sono stati raccolti. Pertanto, si rende necessaria la disponibilità di metodi appropriati per la determinazione delle proporzioni di acido mannuronico ed acido guluronico, espresse generalmente come rapporto M/G, nonché la conoscenza della struttura. A tale scopo sono a disposizione diverse tecniche, le quali riguardano sia metodi chimici che metodi fisici.

- *Metodo chimico*

Il metodo chimico utilizzato per determinare il rapporto M/G^[36] si basa sull'idrolisi dell'alginato con l'acido solforico a 293 K, seguita da un trattamento con acido 2N a 373 K e successiva separazione dell'acido uronico mediante cromatografia in una colonna a scambio anionico. La frazione di ciascun acido uronico può poi essere determinata con metodi colorimetrici.

Sono stati fatti vari tentativi nel tentativo di correggere i risultati per le diverse percentuali di rottura dei due acidi uronici; questo perché per l'idrolisi sono necessarie condizioni relativamente severe e, di conseguenza, si assiste ad una certa decarbossilazione, particolarmente dell'acido L-guluronico. Gli autori hanno suggerito di moltiplicare la proporzione tra M e G per un fattore 0,66.

Il principale vantaggio di questo metodo chimico risiede nella sua relativa semplicità e nel fatto di non richiedere apparecchiature particolarmente sofisticate. Tuttavia, presenta alcune limitazioni. Si tratta di una tecnica che richiede un certo tempo per la sua esecuzione e, pertanto, non si presta in maniera agevole per la caratterizzazione di routine di un grande numero di campioni.

- *Metodo NMR (nuclear magnetic resonance spectroscopy)*

La spettroscopia di risonanza magnetica nucleare, è una tecnica analitica strumentale basata sulle proprietà magnetiche dei nuclei di alcuni atomi ed isotopi. Essa permette di ottenere dettagliate informazioni sulla struttura molecolare dei composti in esame.

La spettroscopia NMR misura l'assorbimento di radiazione elettromagnetica di frequenza radio in molecole immerse in un forte campo magnetico.

Queste radiazioni provocano transizioni di spin nucleare in particolari atomi (tipicamente ^1H o ^{13}C). Quindi, con la spettroscopia NMR, le informazioni sulla struttura molecolare vengono dedotte osservando il comportamento dei nuclei atomici.

Tale metodologia si presenta, pertanto, come un efficace strumento nell'analisi della composizione e della struttura degli alginati e, quindi, nella determinazione del rapporto M/G. Tuttavia, alle concentrazioni richieste per ottenere un buon rapporto segnale/rumore nell'analisi NMR, le soluzioni di alginato sono troppo viscosi per dare un segnale ben risolto, anche a temperature elevate (fino a $90\text{ }^\circ\text{C}$). Per ridurre la viscosità è, dunque, necessario degradare parzialmente la catena di alginato prima dell'analisi, attraverso una blanda idrolisi acida. Questa idrolisi è, tuttavia, lunga e laboriosa. Pertanto, si ritiene spesso utile ricorrere a tecniche più semplici e veloci.

Attualmente, le tecniche più utilizzate per analisi di routine sono la spettroscopia NMR del nucleo ^1H e ^{13}C .^[37-39,11]

Il solvente comunemente usato è l'ossido di deuterio (D_2O). Queste tecniche forniscono informazioni sulla frequenza vicina più prossima (frequenza diade): F_{MG} , F_{GM} , F_{MM} e F_{GG} .

Il vantaggio del metodo ^{13}C -NMR rispetto a quello ^1H -NMR è che aumenta il potere di risoluzione della tecnica, anche se il metodo è meno sensibile rispetto al ^1H -NMR, che può risultare un problema per indagini quantitative. Inoltre, l'utilizzo del metodo ^{13}C -NMR è meno adatto per le analisi di routine perché richiede un tempo di accumulazione prolungato per ottenere spettri con una buona risoluzione.^[8] L'uso di ^{13}C -NMR consente di determinare le frequenze di triade.^[40,41]

Grasdalen et al. (1981) hanno misurato l'intera gamma delle triadi aumentando la frequenza da 25 a 50 MHz (che ha portato alla risoluzione delle diadi in triadi). La consistenza dei valori può essere controllata dalla relazione tra le frequenze di diade e triade, che per le unità M sono date da: $F_{MM} = F_{MMM} + F_{MGM}$ e $F_{MG} = F_{MMG} + F_{GMG}$. La determinazione delle frequenze di diade e triade fornisce l'arrangiamento sequenziale dei due acidi uronici.

Il metodo NMR risulta essere più efficace del metodo chimico, precedentemente descritto, perché comporta solo una moderata depolimerizzazione. In pratica, i campioni possono essere considerati come intatti.

- *Spettroscopia vibrazionale*

Le tecniche di spettroscopia vibrazionale, quali infrarossi (IR), Raman e vicino infrarosso (NIR) sono utili strumenti analitici in grado di fornire informazioni dettagliate relative alla composizione e alle proprietà dei materiali a livello molecolare. Alcuni dei vantaggi di queste tecniche, comparate alla tecnica NMR, sono rappresentati dal fatto che sono metodi rapidi, non distruttivi, facili da usare e, nella maggior parte dei casi, non richiedono una particolare preparazione del campione. Tuttavia, solo la spettroscopia Raman e NIR possono essere implementate direttamente sulla linea di produzione utilizzando fibre ottiche di quarzo per analisi *on-line*.

La spettroscopia IR si è dimostrata utile per la stima quantitativa del rapporto M/G degli alginati.^[42-44] In questi studi, è stato trovato che il rapporto tra le intensità delle bande di assorbimento a 1290 e 1320 cm^{-1} ,^[42] 808 e 787 cm^{-1} ^[43] e 1030 e 1080 cm^{-1} ^[44] gli spettri IR di pasticche o film di KBr contenenti alginato fornisce una discreta stima del rapporto M/G. La spettroscopia IR viene utilizzata anche per la determinazione della concentrazione di alginato in soluzione o per l'identificazione del tipo di polisaccaride (alginato, carragenina o agar) ottenuto dalle alghe.

La letteratura relativa alla caratterizzazione degli alginati mediante spettroscopia Raman e NIR non è molto vasta. Pereira et al. (2003) hanno mostrato che la spettroscopia Raman può essere utilizzato per differenziare gli alginati da altri polisaccaridi delle alghe (agar e carragenina); Horn, Moen, e Ostgaard (1999) hanno riportato l'uso della spettroscopia NIR per determinare il contenuto di alginato nell'alga *Laminaria hyperborea* durante la biodegradazione e Solomonses et al. (2007) hanno impiegato queste due tecniche anche per la determinazione del rapporto M/G.

- *Dicroismo circolare*

Il dicroismo circolare è una tecnica spettroscopica basata sul fenomeno fisico secondo il quale si ha un diverso assorbimento da parte di una sostanza chirale delle due componenti, destra e sinistra, della luce polarizzata circolarmente.

E' stato dimostrato che lo spettro di dicroismo circolare di alginati dipende dal rapporto M/G e dalla disposizione dei due blocchi all'interno della struttura della molecola.^[8,45] Uno dei principali vantaggi di questo metodo è la richiesta di piccole quantità del campione da analizzare (circa 10 mg), aspetto che può risultare particolarmente attraente nell'ambito di studi biologici.

CAPITOLO II: MATERIALI E METODI

II.1: Materiali

Per la realizzazione dei gel è stato utilizzato un campione commerciale di alginato di sodio, acquistato dalla FMC BioPolymer; le polveri di alginato sono state utilizzate così come sono state ricevute. La composizione dell'alginato, riportata dal produttore, è del 36% di acido guluronico e 64% di acido manuronico. Tali indicazioni sono state controllate mediante misure NMR e sono risultate abbastanza affidabili. Il peso molecolare è stato stimato pari a circa 34.000 g/mol attraverso misure di viscosità intrinseca. Inoltre, una soluzione di sodio etilen-di-ammina-tetra-acetico (EDTA) 0,05 M, un sale di CaCl_2 e del D-glucono- δ -lattone (GDL) in polvere sono stati tutti acquistati da Sigma Aldrich e usati così come ricevuti. Come solvente si è utilizzate acqua bidistillata con una resistività di 18 M Ω cm.

II.2: Preparazione dei campioni

Per la preparazione dei campioni destinati ai test per la caratterizzazione meccanica è stata utilizzata la tecnica di "gelazione interna"; scelta dettata

dal fatto che è la tecnica che consente, più delle altre, di ottenere un gel macroscopicamente omogeneo ed in grado di preservare una forma regolare.

I campioni di gel sono stati realizzati utilizzando una procedura a due step successivi: il primo step riguarda la realizzazione di un gel di forma ben definita e stabile (utilizzando il meccanismo di "*inner gelation*"), mentre nel secondo step i gel preformati vengono esposti ad una soluzione di cationi a concentrazione nota per un certo lasso di tempo, a temperatura costante.

Secondo tale tecnica, precedentemente descritta nel Capitolo I, quantità equimolari di MCl_2 ($M^{2+} = Ca^{2+}, Sr^{2+}$) e Na_2 -EDTA sono state disciolte in acqua, in modo tale da ottenere una concentrazione finale 0.01 M del complesso M-EDTA. La soluzione (acida) è stata successivamente titolata con una soluzione 1 M di NaOH fino al raggiungimento di un pH neutro (pH=7), a cui il complesso M-EDTA risulta essere stabile. Alla soluzione così ottenuta, è stata aggiunta una quantità di alginato tale da ottenere una soluzione finale con una concentrazione di polimero pari al 2% in peso. Il tutto è stato tenuto in vigorosa agitazione fino all'ottenimento di una soluzione omogenea. A questo punto è stata aggiunta una quantità di GDL tale da avere un pH finale del gel leggermente acido (tra 5 e 6). Infine, la

soluzione è stata posta in delle piastre Petri e tenute in atmosfera satura di umidità per almeno 24 h.

Una volta completata la gelazione interna, i gel ottenuti sono stati tagliati in campioni cilindrici aventi un fissato diametro e spessore e, successivamente, condizionati in soluzione acquosa di MCl_2 0.005 M a temperatura costante (25 °C) e per tempi prestabiliti.

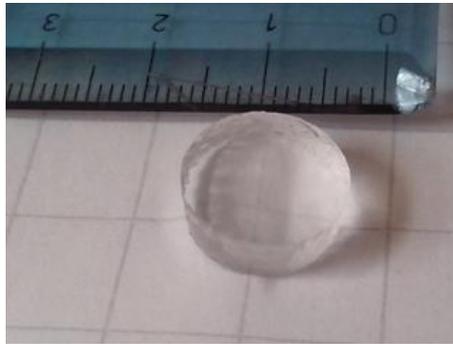


Figura 5: Gel di Ca-Alg condizionato in $CaCl_2$ 0.005 M per 24 h.

Per la realizzazione dei campioni destinati all'analisi spettroscopica, invece, si è scelta la tecnica di gelazione per "diffusione". Sono state preparate cinque soluzioni acquose 0,005 M con 5 diversi cationi bivalenti (Ca^{2+} , Sr^{2+} , Cu^{2+} , Ba^{2+} , Zn^{2+}) e una soluzione di alginato al 2% (w/w), aggiungendo le polveri di alginato sodico in acqua bidistillata in condizioni di forte

agitazione. La soluzione di alginato così ottenuta è stata versata in cinque diverse piastre Petri fino ad ottenere uno spessore di circa 1 mm. In ciascuna delle piastre è stata poi versata una delle cinque soluzioni precedentemente preparate. Dopo 24 ore la soluzione in eccesso è stata rimossa, ottenendo un film di gel per ogni catione bivalente. I campioni sono stati testati sia in forma di hydrogel (o wet gel), che nella forma di dry gel, ottenuta dalla loro essiccazione in stufa a 50 °C per circa 2 ore.

II.3: Analisi spettroscopica

Nel tentativo di approfondire quale sia la struttura molecolare dei gel esaminati, il tipo di legame che si instaura con i vari ioni considerati, la loro stabilità al variare della natura dello ione metallico, la loro affinità con l'alginato, è stata condotta una caratterizzazione spettroscopica dei nostri materiali.

La stessa trattazione è stata, inoltre, riferita sia ai gel nella forma di *hydrogel* (o "*wet*" gel) che nella loro forma disidratata (o "*dry*" gel). Questo per verificare la presenza di una eventuale differenza tra la struttura e l'organizzazione molecolare del gel nelle due forme, dato che, nei diversi

lavori disponibili in letteratura basati su un'analisi spettroscopica di questo tipo di materiali, l'analisi viene sempre riferita ai gel secchi.

L'analisi spettroscopica è stata condotta mediante l'ausilio di uno spettrometro in ATR (*infrared attenuated total reflection*). Gli spettri sono stati registrati in un *range* di 4000-400 cm^{-1} eseguendo 64 scansioni e imponendo una risoluzione di 4 cm^{-1} . Per ciascuno spettro ottenuto, prima dell'analisi, è stata eseguita la correzione ATR (*crystal: diamond, angle of incidence: 45.0°, number of bounces: 1.0, sample refractive index: 1.5*) e, nel caso dei gel *wet*, si è eseguita la sottrazione dello spettro dell'acqua (utilizzando il più opportuno fattore di sottrazione).

II.4: Test meccanici

II.4.1: Test di compressione

Allo scopo di chiarire quale sia il *range* di risposta elastica lineare dei gel, si è deciso di condurre diversi set di esperimenti meccanici. La prima tipologia è quella di test di compressione uniassiale non confinata, avente l'obiettivo di determinare il comportamento di *stress-strain* dei campioni. Nel secondo set di prove è stato, invece, analizzato il rilassamento dei gel attraverso prove di *stress-relaxation*, osservando l'evoluzione nel tempo degli stress

dopo l'applicazione di una determinata deformazione in compressione uniassiale. Inoltre, le misure di *stress-strain* sono state accompagnate da una caratterizzazione geometrica dei campioni testati, misurando *on-line* il raggio dei campioni cilindrici durante la prova. Alcune delle prove sono state eseguite anche su campioni cilindrici con tre differenti raggi iniziali al fine di rilevare un eventuale effetto della dimensione iniziale sulla risposta del materiale. Infatti, attraverso tali osservazioni, si intende quantificare l'accoppiamento stress-diffusione e, quindi, la migrazione di acqua da/verso il gel in risposta alla deformazione applicata.

Le prove meccaniche dei campioni di gel sono state effettuate utilizzando un reometro HAAKE MARS III accoppiato con una camera CCD, al fine di quantificare, attraverso l'osservazione *on-line* del profilo laterale del campione, la variazione del raggio del gel durante le prove. Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti a 25 °C, utilizzando una geometria piatto-piatto e applicando al campione una forza di compressione uniassiale. Le prove di compressione eseguite sono state: (i) determinazione del comportamento *stress-strain* su campioni di 15 mm di diametro a diverse velocità di deformazione; (ii) misure di *stress-relaxation* su campioni di 15 mm di diametro a diverse percentuali di deformazione; (iii) misure di

stress-relaxation al 3% di deformazione su campioni con diversi diametri (15, 24 e 35 mm). Per garantire un perfetto *slipping* alle pareti tra il campione e i piatti durante la compressione, è stato depositato un sottile film di vaselina su entrambi i piatti del reometro.

Per evitare l'evaporazione del solvente durante le prove, i campioni testati sono stati circondati con una soluzione di CaCl_2 5 mM per tutta la durata del test. Inoltre, per le prove eseguite sui campioni di diametri 15 e 24 mm, questi ultimi sono stati tagliati, subito prima del test, da campioni iniziali di 35 mm condizionati per 24. Tale procedura ha garantito che tutti i campioni avessero subito esattamente le stesse condizioni, indipendentemente dalle dimensioni richieste per la prova.

Per analizzare il fenomeno dell'*aging*, cui sono soggetti i nostri materiali, si è fatto ricorso a prove di *stress-relaxation*. A tale scopo, è stata utilizzata un'apparecchiatura per analisi dinamico-meccanica (DMA, TA Instrument serie Q800). Sono stati testati campioni di gel ottenuti da due diversi cationi (Ca^{2+} , Sr^{2+}), a diversi tempi di condizionamento in soluzione (1, 2, 5 e 12 giorni) e a 3 diverse temperature (30, 35 e 40 °C). I test sono stati condotti applicando al campione una deformazione a compressione del 3%

per almeno 120 min e misurando il conseguente decadimento nel tempo del modulo di rilassamento.

Dati i tempi di prova relativamente lunghi, per evitare la progressiva evaporazione del contenuto di acqua dei campioni, è stato realizzato un sistema (da adattare alla macchina di prova), dotato di un *oring* confinante, che consentisse di eseguire le prove tenendo il campione costantemente a contatto con la soluzione in cui era stato condizionato, per tutta la durata della prova. Il sistema realizzato è raffigurato in Figura 6.





Figura 6: Clamp smontate e sistema realizzato per le prove a compressione. L'oring raffigurato è il sistema confinante che, incollato alla piastra inferiore consente di contenere la soluzione di condizionamento posta a contatto con il campione.

Per essere certi che durante il test campione avesse una temperatura uniforme, le prove a compressione vere e proprie sono state precedute da un periodo di termostatazione del campione alla temperatura desiderata per 10 min.

Al fine di scongiurare eventuali problemi di adesione ai piatti lisci delle *clamp* da parte del campione, che potrebbero falsare la misura, sulle due superfici metalliche è stato spalmato, anche in questo caso, un sottilissimo film di vasellina che ha assicurato un perfetto *slipping* del campione sui piatti durante la compressione. Infatti, osservando con una telecamera la simulazione di una prova in assenza di soluzione, non si è osservato nessun fenomeno di *bulging* delle pareti del campione, a supporto dell'ipotesi ideale di perfetto *slipping* del campione.

Sono state eseguite anche prove di *stress-relaxation* a deformazione nulla, condotte su campioni cilindrici di gel di alginato di Ca^{2+} dello stesso diametro e agli stessi tempi di invecchiamento stabiliti (1, 2, 5 e 12 giorni). Il campione è stato incollato ai piatti della macchina di prova con un sottile strato di colla di ciano-acrilato, è stato circondato da una soluzione di CaCl_2 0.005 M per evitare l'evaporazione del solvente e se ne è osservata, in maniera indiretta, la variazione di dimensione nel tempo.

II.4.2: Test di torsione

È stata, infine, misurata la risposta del materiale a diverse deformazioni in torsione, sia dopo un unico step di torsione (elasticità "istantanea" e conseguente rilassamento) che in regime oscillatorio di piccole deformazioni, al fine di confermare, se possibile, l'intero *range* di linearità osservato nei due precedenti esperimenti.

Le prove di torsione eseguite sono state: (i) *Amplitude-sweep* su campioni con diametro di 35 mm, alla frequenza di 1 Hz; (ii) *Frequency-sweep* su campioni con diametro di 35 mm, imponendo una deformazione in torsione di ampiezza pari all'1%; e (iii) misure di *stress-relaxation* al 3% di deformazione, ancora una volta su campioni con diversi diametri (15, 24 e

35 mm). A differenza delle prove di compressione, in questo caso, è stato applicato uno strato di colla di ciano-acrilato tra i piatti del reometro e le superfici del gel, per evitare fenomeni di *slipping* dei campioni durante la torsione.

Va sottolineato che il tempo caratteristico della deformazione applicata è diverso per le due diverse tipologie di prove. In particolare, per gli esperimenti torsionali il tempo di applicazione della deformazione è di circa 10^{-2} minuti (0,6 s), mentre per prove di compressione è 10^{-1} min (6 s).

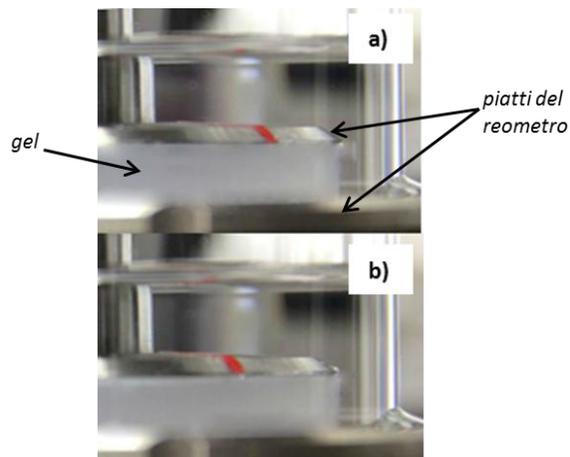


Figura 7: Immagine di un campione di gel caricato tra i piatti del reometro e sottoposto a) a compressione uniassiale b) a torsione. La torsione in figura b) è stata accentuata per renderla visibile al lettore.

II.5: Monitoraggio dell'invecchiamento dei campioni

I campioni cilindrici di ciascuno dei gel realizzati sono stati monitorati ai diversi tempi di condizionamento prestabiliti (1, 2, 5 e 12 giorni) in soluzione 0.005 M di CCl_2 . Di ogni campione è stato registrato il peso iniziale (prima di immergerlo in soluzione) e dopo il periodo di condizionamento, così da determinarne l'eventuale variazione di peso subita.

In tutte le misure, la superficie del campione è stata leggermente asciugata con un po' di carta assorbente in modo tale da eliminare l'eccesso di acqua esterna che avrebbe potuto falsare le misure.

È stato anche misurato il modulo iniziale $E(t=0)$ dei campioni sottoposti a compressione ai diversi tempi di invecchiamento stabiliti per verificare l'influenza che lo stesso ha sulle proprietà meccaniche del materiale.

II.6: Light scattering dinamico (DLS)

Purtroppo, i test meccanici non sono in grado, da soli, di investigare direttamente quelli che sono i processi microscopici alla base del rilassamento dei nostri materiali. Tuttavia, la comprensione delle dinamiche microscopiche dei gel può essere ottenuta attraverso misure di *light*

scattering dinamico (DLS) che indaga il rilassamento di fluttuazioni di densità su scale temporali che vanno dai microsecondi a decine di secondi e scale di lunghezza che vanno da frazioni di micron e qualche micron.

Il *light scattering* dinamico è una tecnica ampiamente utilizzata per investigare le dinamiche microscopiche di *soft materials* come sospensioni colloidali, emulsioni, soluzioni polimeriche, gel polimerici.^[46] Il DLS viene utilizzato per campioni quasi trasparenti per i quali solo un singolo *scattering* è rilevante, per cui può essere convenientemente applicato ai gel studiati nell'ambito del presente lavoro di ricerca, che risultano essere quasi trasparenti. Nel DLS il campione viene illuminato con un fascio laser, quindi monocromatico e coerente, tale che le molecole in sospensione siano piccole rispetto alla sua lunghezza d'onda. Si osserverà, così, nell'intensità di dispersione (*scattering*) una fluttuazione dipendente dal tempo. Queste fluttuazioni sono dovute al fatto che le molecole in soluzione sono sottoposte al moto browniano e, così, la distanza tra gli *scatterers* nella soluzione è in continua evoluzione nel tempo. Questa luce diffusa, viene sottoposta a un'interferenza costruttiva o distruttiva da parte delle particelle circostanti e all'interno di questa fluttuazione di intensità le informazioni sono contenute riguardo alla scala del tempo del movimento

degli *scatterers*. Le informazioni dinamiche delle particelle vengono derivate da un'autocorrelazione della traccia di intensità registrata durante l'esperimento. La seconda curva di autocorrelazione dell'ordinamento è generata dalla intensità della traccia come segue:

$$g_2(q, \tau) = \frac{I(t) I(t + \tau)}{I(t)^2}$$

dove $g_2(q, \tau)$ è la funzione di autocorrelazione per un particolare vettore d'onda, q , τ è il tempo di ritardo (*delay*) e I è l'intensità. Nei ritardi (*delays*) a breve tempo, la correlazione è alta perché le particelle non hanno la possibilità di muoversi in larga misura dallo stato iniziale, nel quale si trovavano. I due segnali sono, quindi, sostanzialmente invariati quando vengono confrontati dopo un intervallo di tempo molto breve. Non appena i ritardi di tempo si allungano, la correlazione inizia a decadere in modo esponenziale a zero, il che significa che, dopo un lungo periodo di tempo trascorso, non vi è alcuna correlazione tra l'intensità di dispersione degli stati iniziale e finale. Questo decadimento esponenziale è legato al movimento delle particelle, in particolare alla diffusività di materia. Per

adeguare il decadimento (vale a dire, la funzione di autocorrelazione), vengono usati metodi numerici, basati su calcoli di distribuzioni assunte. Se il campione è monodisperso allora il decadimento è semplicemente un singolo esponenziale. L'equazione di Siegert riporta la seconda funzione di autocorrelazione d'ordinamento con la prima $g_1(q, \tau)$ nel modo seguente:

$$g_2(q, \tau) = 1 + \beta g_1(q, \tau)^2$$

dove il parametro β è un fattore di correzione che dipende dalla geometria e dall'allineamento del fascio laser nel *setup* della dispersione (*scattering*) della luce.

Nel DLS, i dati sono collegati a un ben definito vettore di *scattering* q , definito come:

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda_0} \sin \frac{\vartheta}{2}$$

dove λ_0 è la lunghezza d'onda del laser incidente (532.5 nm), n è l'indice di rifrazione del campione e ϑ è l'angolo in cui il rivelatore è posizionato rispetto alla cella campione (angolo di *scattering*).

Nei nostri esperimenti DLS abbiamo scelto quattro angoli di scattering $\vartheta = 2.5, 4.1, 5.8$ e 8.0° .

Particolare attenzione deve essere prestata quando si tratta con campioni che sono non ergodici e che, quindi, esplorano solo una parte limitata dello spazio delle fasi su scale temporali sperimentalmente accessibili. Questo è, infatti, il caso dei nostri gel, dato che le molecole di alginato sono intrappolate in un network che, come vedremo, continua a rimodellarsi nel corso di scale temporali anche superiori a diverse ore. Per questi campioni, il tempo medio di solito applicato per misurare $g_2 - 1$ è praticamente irrealizzabile. Per aggirare tale difficoltà, abbiamo utilizzato, per le nostre misure, il metodo *Time Resolved Correlation* (TRC). Una camera CCD multi-pixel è stata utilizzata come rivelatore, invece di un singolo rivelatore quale un fototubo, come nel *light scattering* tradizionale. Il segnale di ciascun pixel è stato trattato indipendentemente e la funzione di correlazione di intensità è mediata sui pixel piuttosto che sul tempo. Più precisamente, viene calcolato il grado di correlazione c_I tra due immagini della luce scatterata prese ai tempi t e $t + \tau$:

$$c_I(t, \tau) = \frac{I_p(t, \tau)_p}{I_p(t)_p} - 1$$

dove $I_p(t)$ è l'intensità al tempo t per il p -esimo pixel e \dots_p denota una media sui pixel della camera CCD. Per le dinamiche stazionarie, c_I può essere ulteriormente mediato su t per migliorare la statistica, fornendo l'usuale $g_2 - 1$. Se la dinamica evolve con l'età del campione t_w , come per i nostri campioni, c_I è mediato su una breve finestra di tempo t_{ave} così da ottenere una funzione di correlazione di intensità indipendente dall'invecchiamento del materiale:

$$g_2(t_w, \tau) - 1 = c_I(t, \tau)_{t_w \leq t \leq t_w + t_{ave}}$$

dove tipicamente utilizziamo $t_{ave} \leq t_w/10$. Da notare che l'utilizzo di un rivelatore CCD limita il più piccolo *delay* accessibile all'inverso della velocità di frame, tipicamente dell'ordine di diversi ms almeno. Tuttavia, questa non risulta essere una limitazione severa per i sistemi che esibiscono un rilassamento molto lento, come i gel qui studiati.

CAPITOLO III: CARATTERIZZAZIONE SPETTROSCOPICA

III.1: Caratterizzazione spettroscopica di gel di alginato con diversi cationi

Lo scopo di questa fase del lavoro è stato quello di acquisire una maggiore conoscenza dei gel di alginato su scala molecolare e chiarirne, così, alcuni aspetti. Tale scopo è stato perseguito mediante un'analisi di spettroscopia vibrazionale. Sono stati condotti diversi lavori basati su un'analisi spettroscopica di questo tipo di materiali, nel tentativo di comprendere la struttura molecolare del gel e la sua stabilità al variare la natura dello ione metallico, della sua affinità con l'alginato, della concentrazione di ioni, del pH del solvente, del tipo di alginato e così via. Tuttavia, questi studi sono stati generalmente riferiti ai gel secchi. Tale trattazione ci appare però incompleta, in quanto, sulla base della nostra analisi sperimentale, riteniamo che vi sia una differenza tra la struttura e l'organizzazione molecolare del gel in forma di *hydrogel* (o "*wet*" gel) e in forma disidratata (o "*dry*" gel). Pertanto, la nostra analisi è stata condotta sui nostri gel in entrambe le forme menzionate.

In figura 8 sono riportati gli spettri registrati per la soluzione di Na-alginato e il corrispondente film essiccato, nel range di numeri d'onda di interesse.

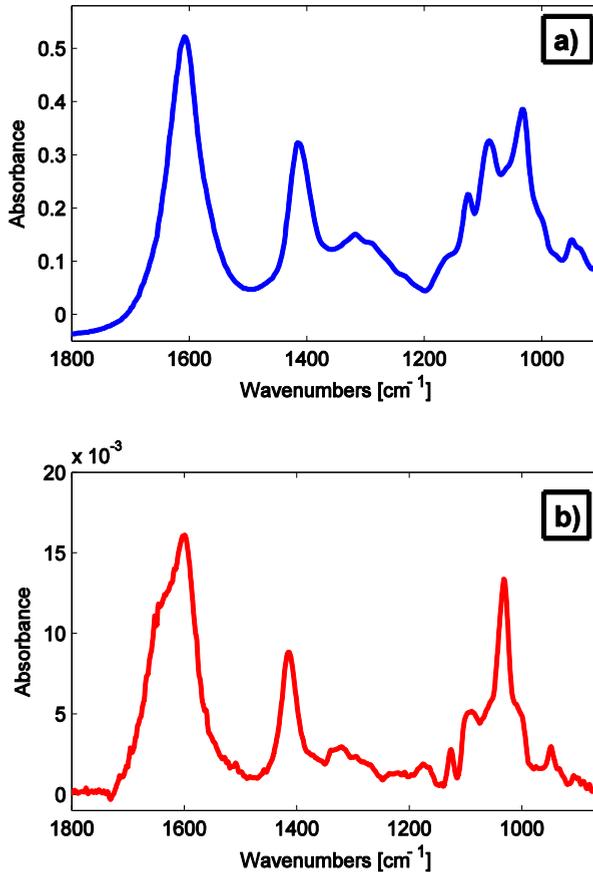


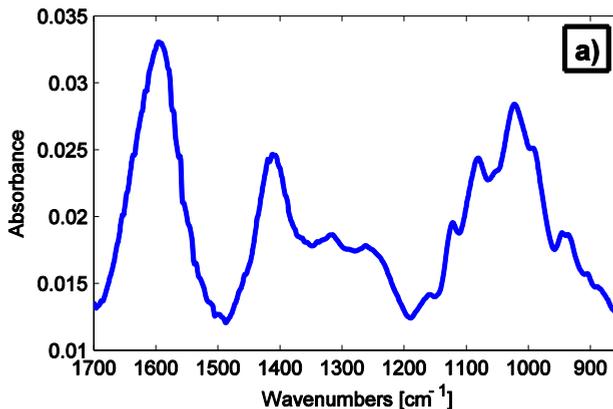
Figura 8: Spettri ATR relativi a:
 a) alla soluzione di Na-Alginato
 b) al corrispondente film secco, nel range di numeri d'onda di interesse.

L'assegnazione dei principali modi vibrazionali per l'acido alginico ed i suoi complessi metallici è già riportata in letteratura. In particolare, studi relativi

al gruppo carbossilico COO^- associano la banda osservata a circa 1600 cm^{-1} alla vibrazione di stretching anti-simmetrico del gruppo COO^- , $\nu_{\text{asym}}(\text{COO}^-)$, e la banda intorno ai 1410 cm^{-1} alla vibrazione di stretching simmetrico, $\nu_{\text{sym}}(\text{COO}^-)$.

Un rapido sguardo ai due spettri di figura 8 mostra chiaramente la presenza di alcune differenze tra quello relativo alla soluzione di alginato sodico e quello relativo alla sua forma disidratata, sia in termini di forma che in termini di shifts in frequenza dei picchi caratteristici. In particolare, nello spettro relativo alla soluzione, si osserva la comparsa di una spalla, intorno ai 1650 cm^{-1} , che non è visibile nello stato secco. Tale spalla è stata attribuita al legame idrogeno tra il gruppo carbossilato e il gruppo idrossilico dell'acqua. Quindi, il picco COO^- a 1600 cm^{-1} può essere scomposto in due sotto-picchi, in cui il picco a frequenza maggiore è attribuito a un legame $\text{COO}^- \cdots \text{HO}$, mentre il picco di frequenza inferiore è attribuito al legame ione metallico-carbossilato. Il legame $\text{COO}^- \cdots \text{OH}$ è un legame a idrogeno (con un'energia tipica di circa 50 kJ/mol), mentre l'interazione tra i gruppi COO^- e lo ione metallico è prevalentemente un legame ionico (con il Ca^{2+} , per esempio, circa $600\text{-}1500 \text{ kJ/mol}$).

Una discrepanza simile tra la forma *wet* e quella *dry* è stata osservata anche per tutti gli altri spettri dei gel con i cinque cationi esaminati (Ca^{2+} , Sr^{2+} , Cu^{2+} , Ba^{2+} , Zn^{2+}). In figura 9 riportiamo, a titolo di esempio, i due spettri registrati per il gel di alginato ottenuto con il calcio. Dai dati sperimentali è, quindi, evidente che la presenza del solvente (acqua nel nostro caso) produce un cambiamento significativo nel segnale osservato, dando prova della notevole influenza dell'*environment* sul comportamento del gel a livello molecolare.



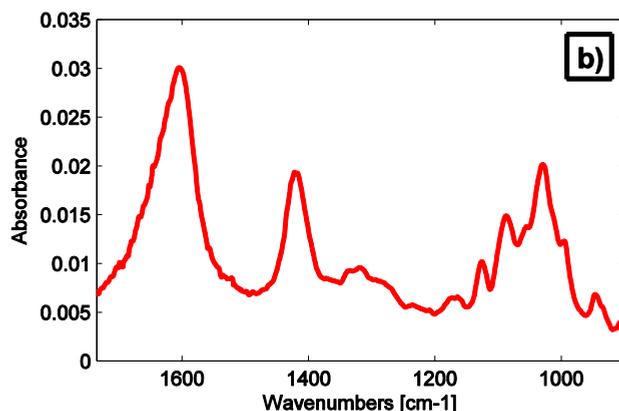


Figura9: Spettri ATR relativi al campione di Ca-Alginate:
 a) dry
 b) wet nel range di numeri d'onda di interesse.

Diversi studi, riportati in letteratura, mettono in evidenza l'esistenza di una relazione tra le bande $\nu_{\text{asym}}(\text{COO}^-)$ e $\nu_{\text{sym}}(\text{COO}^-)$ ed il tipo di coordinazione catione bivalente-carbossilato che si viene ad instaurare durante la formazione del gel. Infatti, il primo passo del processo di gelificazione è la complessazione degli ioni metallici con i carbossilati. Pertanto, in un primo approccio, l'analisi dei picchi relativi a questi gruppi molecolari è in grado di fornire informazioni sulla struttura locale risultante del gruppo carbossilato e la loro relazione con la conformazione della catena per i diversi cationi. Sono stati, quindi, analizzati gli shifts dei due picchi principali menzionati, nonché il loro spostamento relativo. In figura 10 è riportata, a titolo di

esempio, la deconvoluzione dello spettro nella regione di interesse ottenuto per il calcio, sia per il gel *wet* che per il *dry*. In tabella 3 sono riassunti i valori dei picchi estrapolati per ciascuno dei cationi esaminati.

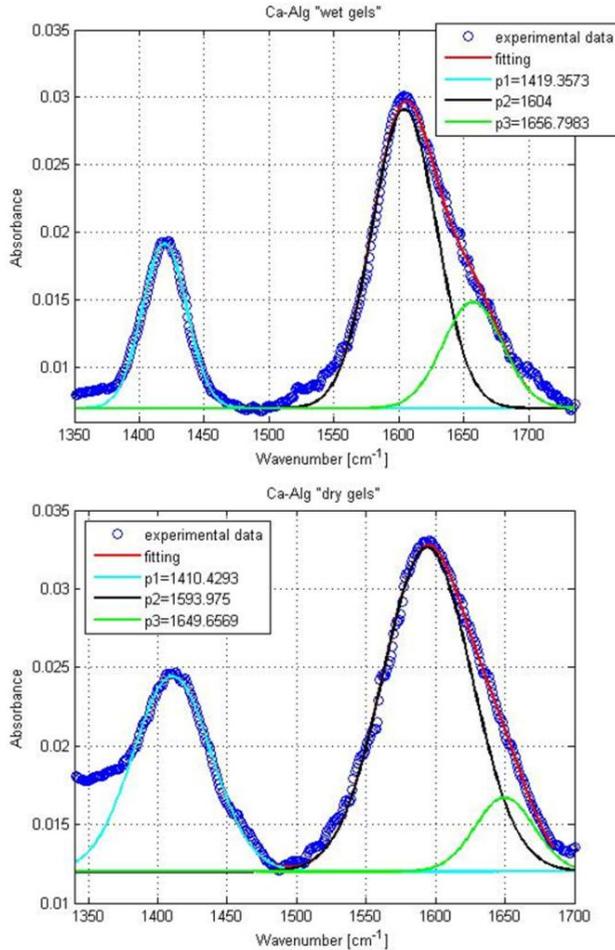


Figura10: Deconvoluzione dello spettro nella regione di interesse ottenuto per il calcio, sia per il gel *wet* che per il *dry*.

"Dry gels":

	$\nu_{\text{sym}}(\text{COO}^-)$	$\nu_{\text{asym}}(\text{COO}^-)$	$\Delta\nu$
Cu^{2+}	1405.56	1585.00	179.44
Zn^{2+}	1409.51	1596.47	186.96
Ca^{2+}	1410.43	1593.98	183.55
Sr^{2+}	1409.00	1586.00	177.00
Ba^{2+}	1414.14	1604.21	190.07
Na-Alg	1413.00	1607.00	194.00

"Wetgels":

	$\nu_{\text{sym}}(\text{COO}^-)$	$\nu_{\text{asym}}(\text{COO}^-)$	$\Delta\nu$
Cu^{2+}	1415.94	1607.73	191.79
Zn^{2+}	1419.97	1607.37	187.40
Ca^{2+}	1419.36	1604.00	184.64
Sr^{2+}	1417.73	1603.13	185.40
Ba^{2+}	1413.93	1594.00	180.07
Na-Alg	1413.68	1597.00	183.32

Tabella 3: Frequenze dei picchi caratteristici registrate per i diversi cationi esaminati.

Le frequenze relative alle suddette bande risultano essere sensibilmente dipendenti dalla struttura del gruppo carbossilico, dalla natura del solvente nonché dallo ione metallico.

L'idea è quella di verificare la relazione empirica, proposta da Nakamoto (1978), tra il tipo di coordinazione del gruppo carbossilato con lo ione

metallico e la separazione tra le bande vibrazionali relative allo stretching simmetrico e anti-simmetrico del gruppo carbossilato, $\Delta\nu(\text{COO}^-)$:

$$\Delta\nu(\text{COO}^-) = \nu_{\text{asym}}(\text{COO}^-) - \nu_{\text{sym}}(\text{COO}^-)$$

Il complesso catione metallico –carbossilato può presentare quattro diversi tipi di coordinazione: i) una forma ionica o non coordinata, ii) una coordinazione unidentata, iii) una coordinazione chelante bidentata e iv) una coordinazione a ponte bidentata (figura 11).

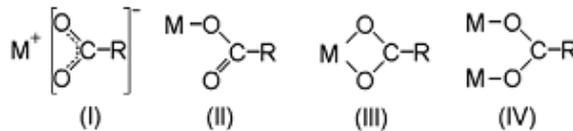


Figura 11: Diversi tipi di coordinazione ione metallico-carbossilato.

Più precisamente, secondo tale relazione empirica, si riscontra che:

- A $\Delta\nu(\text{COO}^-)_{\text{complesso}} \ll \Delta\nu(\text{COO}^-)_{\text{Na}}$ è associata una coordinazione di tipo iii;
- A $\Delta\nu(\text{COO}^-)_{\text{complesso}} \approx \Delta\nu(\text{COO}^-)_{\text{Na}}$ è associata una coordinazione di tipo iv;
- A $\Delta\nu(\text{COO}^-)_{\text{complesso}} \gg \Delta\nu(\text{COO}^-)_{\text{Na}}$ è associata una coordinazione di tipo ii.

Lo stesso tipo di correlazione può essere applicato al complesso ione metallico-carbossilato dei nostri materiali, al fine di avere informazioni sul tipo di coordinazione che si instaura con ciascuno dei cationi esaminati.

I valori delle frequenze dei picchi considerati, e il corrispondente valore di $\Delta\nu$, sono riportati in tabella 3.

Per i gel secchi abbiamo riscontrato il caso $\Delta\nu(\text{COO}^-)_{\text{complesso}} \ll \Delta\nu(\text{COO}^-)_{\text{Na}}$ per tutti i cationi; quindi possiamo affermare che il tipo di coordinazione bidentata domina sugli altri, in accordo con risultati riportati in letteratura.^[47,48] Al contrario, per i gel *wet*, abbiamo il caso $\Delta\nu(\text{COO}^-)_{\text{complesso}} \approx \Delta\nu(\text{COO}^-)_{\text{Na}}$ per i cationi Ca^{2+} , Ba^{2+} e Sr^{2+} (corrispondente ad una coordinazione a ponte bidentata) e il caso $\Delta\nu(\text{COO}^-)_{\text{complesso}} \gg \Delta\nu(\text{COO}^-)_{\text{Na}}$ per i cationi Cu^{2+} e Zn^{2+} (corrispondente ad una coordinazione unidentata). Per i gel *wet* si osserva anche un leggero decremento dei valori di $\Delta\nu$ con il raggio cationico (r_{ion}), come riportato in figura 12. Tale andamento può essere connesso all'aumento di simmetria ed equalizzazione delle lunghezze di legame nel gruppo carbossilato delle specie investigate.^[47] Per i gel *dry*, invece, non si osserva alcun *trend* con il raggio ionico.

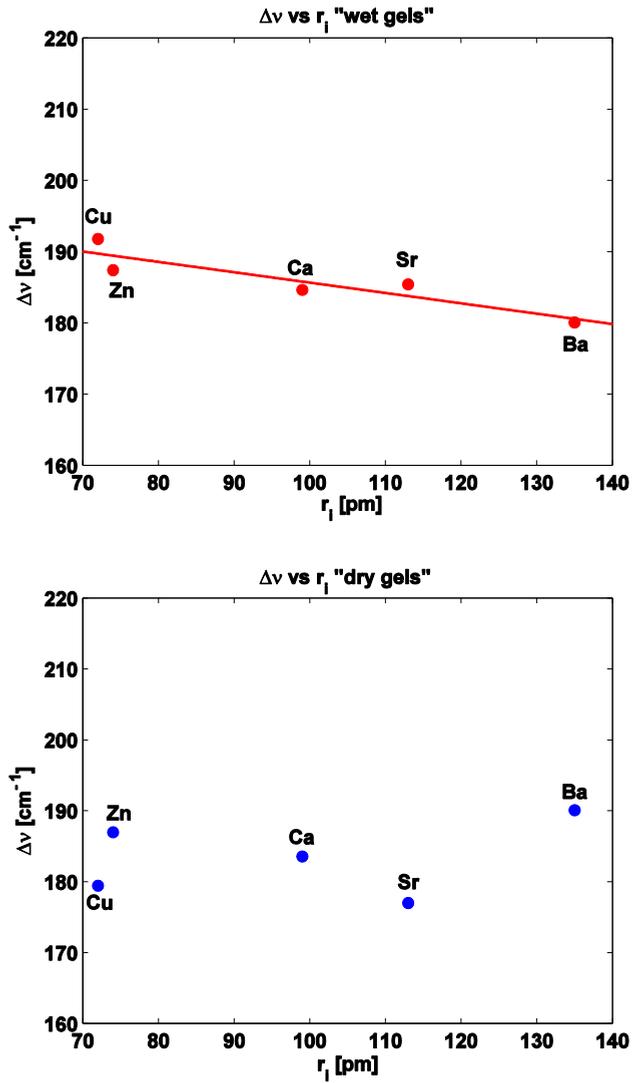


Figura 12: $\Delta\nu$ (COO^-) in funzione del raggio cationico per i gel wet (pallini rossi) e per i gel dry (pallini blu).

CAPITOLO IV: COMPORTAMENTO MECCANICO

IV.1: Elasticità istantanea

Come precedentemente descritto, nel capitolo Materiali e Metodi, sono stati eseguiti test di compressione in *stress-strain* a diverse velocità di deformazione, misurando la forza normale f ed il raggio r dei campioni cilindrici in funzione del rapporto di *stretch* longitudinale, λ , applicato:

$$\lambda \equiv \frac{h(t)}{h_0}$$

dove $h(t)$ è lo spessore del campione in funzione del tempo e h_0 è il suo valore iniziale. La velocità di deformazione è stata fatta variare nel *range* $0.06-2 \text{ min}^{-1}$ raggiungendo una deformazione totale prossima a $\lambda = 0.77$ e, quindi, circa il 25% di compressione del campione. Entro i limiti dell'errore sperimentale, né la forza né il raggio misurati hanno manifestato una evidente dipendenza dalla velocità di deformazione imposta. Pertanto, sia

$f(\lambda)$ che $r(\lambda)$ possono essere definiti, senza alcuna ambiguità, nei limiti indicati di deformazione e velocità di deformazione (e prima che si verifichi qualsiasi rilassamento). Data l'assenza di effetti del tempo, faremo riferimento ai risultati riportati nella presente trattazione come pertinenza di una elasticità "istantanea" del gel.

Iniziamo col discutere prima gli aspetti "geometrici" (espansione laterale) legati ai nostri test di compressione. In figura 13 viene riportato il "rapporto trasversale" misurato:

$$\lambda_T \equiv \frac{r(\lambda)}{R_0}$$

in funzione di quello longitudinale λ , insieme alla predizione teorica:

$$\lambda_{T,incomp} = \lambda^{-0.5}$$

calcolata sulla base dell'assunzione di incomprimibilità.

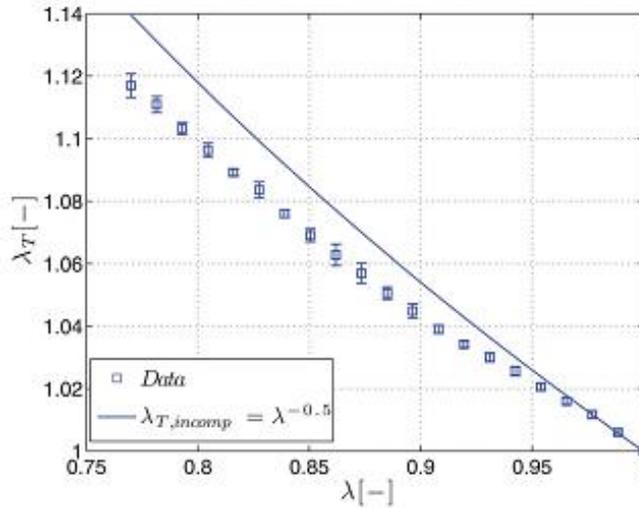


Figura 13: Rapporto di dilatazione trasversale (λ_T) in funzione del rapporto di compressione (λ) per campioni compressi a diverse velocità di deformazione ($0.06-2 \text{ min}^{-1}$). I simboli rappresentano i dati mediati su 20 ripetizioni, mentre la linea continua rappresenta la predizione teorica basata sull'assunzione di incomprimibilità.

Come si può osservare dalla figura 13, la dilatazione laterale dei campioni cilindrici segue la curva teorica solo per basse deformazioni, fino a circa $\lambda \approx 0.94$, per poi divergere progressivamente dalla teoria per valori più bassi di λ .

Per fare un esempio numerico, per $\lambda = 0.816$, misuriamo un $\lambda_T = 1.089$, mentre il valore teorico è $\lambda_{T,incomp} = 1.107$. Quindi, il raggio del campione risulta essere circa del 2% inferiore al valore teorico predetto per un gel perfettamente incomprimibile. Tale discrepanza osservata tra λ_T e

$\lambda_{T, incomp}$ per valori inferiori a $\lambda \approx 0.94$ è confermata, da una misura indipendente di perdita di massa del gel come funzione del rapporto di compressione.

In particolare, i campioni cilindrici al termine di una rampa di compressione sono stati estratti dall'apparato di misura e pesati; ciò è stato fatto per diversi valori del rapporto di compressione finale: la relativa perdita di peso $\Delta p / p_0$ misurata, in funzione della compressione raggiunta, è riportata in figura 14. Dall'altro lato, dalla conoscenza della dilatazione laterale reale in funzione del rapporto di compressione, $\lambda_T(t)$ (vedi figura 13), è possibile stimare la perdita di massa subita durante la compressione. Infatti, assumendo una uguale densità dei due mezzi che compongono il gel (acqua e alginato) e facendo un'ipotesi di miscelazione ideale (assenza di variazione di volume con la miscelazione), la relativa perdita di peso può essere calcolata come:

$$\frac{\Delta p}{p_0} = 1 - \lambda_T^2 \lambda$$

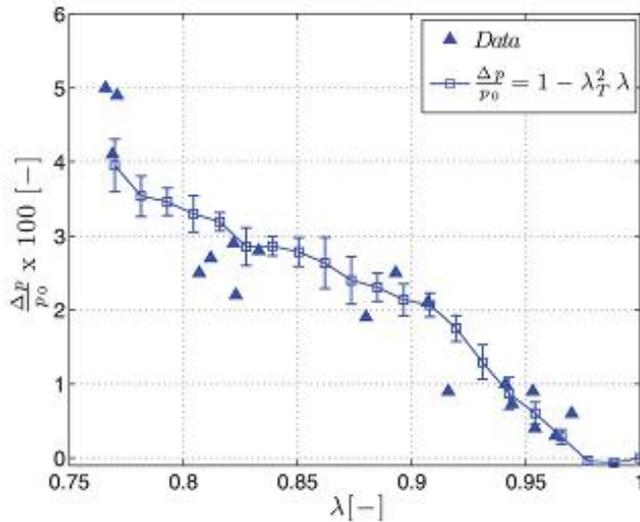


Figura 14: Perdita di peso relativa, a fine compressione, in funzione del rapporto di compressione finale. I simboli pieni rappresentano i dati sperimentali, mentre i simboli vuoti sono stati calcolati (attraverso l'equazione su riportata) dal rapporto di dilatazione trasversale (vedi figura 13), assumendo che i due mezzi (acqua ed alginato) sono incomprimibili e di uguale densità ($\rho_{H_2O} = \rho_{polimero} = 1 \text{ g cm}^{-3}$).

Nonostante la dispersione dei dati, il *trend* in figura 14 è di chiara interpretazione: a meno di valori di compressione molto bassi, maggiore è la compressione finale, maggiore è la perdita di massa che si osserva.

Tale comportamento appare coerente con quello osservato per il rapporto trasversale λ_T , il quale aumenta con la compressione imposta meno di quanto non lo faccia il $\lambda_{T,incomp}$ relativo ad un materiale ideale incomprimibile (figura 13).

Siamo inclini ad attribuire questi fenomeni indotti dalla compressione, cioè, la perdita di peso e la non idealità nel cambiamento del rapporto trasversale ad una fuoriuscita di acqua dal *network* di alginato tramite un meccanismo di tipo convettivo. Tale meccanismo può essere attribuito all'esistenza, spesso osservata all'interno di un gel, di eterogeneità microscopiche su piccola scala (generalmente dell'ordine di 100 nm).^[49,50] Sotto l'azione della compressione ci si aspetterebbe che i "vuoti" presenti in queste strutture eterogenee siano soggetti a "*shrinking*" o in qualche modo collassino, forse oltre una certa compressione critica. Si otterrebbe così, come risultato, un allontanamento convettivo del solvente, causa della perdita di peso osservata nei campioni, in accordo qualitativo con i dati riportati in figura 14.

In termini di espansione laterale macroscopica dei campioni, il meccanismo appena citato implicherebbe che il raggio effettivo risultasse più piccolo di quello che si otterrebbe se tutto il gel fosse incomprimibile. Ancora una volta, ciò è in accordo con le nostre osservazioni riportate in figura 13. Dunque, guardando i nostri dati, possiamo affermare che una certa espulsione di solvente si verifica per valori di compressione inferiori a $\lambda \approx 0.94$, mentre, per piccole deformazioni, il comportamento generale del

gel è in pratica indistinguibile da quello che si sarebbe osservato nel caso di un solido incomprimibile.

Parliamo ora delle misure di forza nelle nostre prove di compressione. In figura 15 è stato riportato lo stress nominale:

$$\sigma \equiv \frac{f}{\pi R_0^2}$$

in funzione del rapporto di compressione.

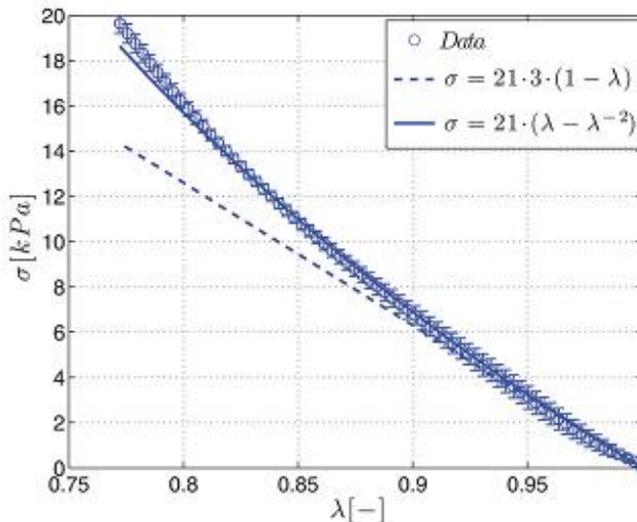


Figura 15: Variazione dello stress nominale in funzione del rapporto di compressione longitudinale. La curva continua rappresenta il fitting con l'equazione di un materiale neo-Hookeano incomprimibile, mentre quella tratteggiata rappresenta l'elasticità lineare. Il modulo elastico G calcolato è 21 kPa.

Ricordiamo che i dati mostrati in figura 15 sono stati calcolati da una media su 20 rampe di compressione a varie velocità di deformazione e, dato che tali dati risultano indipendenti dalla storia di deformazione, possono essere considerati come rappresentativi dell'equazione costitutiva "istantanea" dei gel.

Per tale motivo, in figura 15 sono state riportate anche due previsioni teoriche per lo stress, ovvero, per un solido elastico lineare e per un solido neo-Hookeano, entrambi i quali sono presumibilmente incompruibili.

I dati mostrano sicuramente una risposta lineare nella curva stress vs λ per valori superiori a $\lambda \approx 0.9$, e sono abbastanza ben descritti da un'equazione costitutiva neo-Hookeana fino a valori di almeno $\lambda \approx 0.8$. Infatti, il comportamento osservato in figura 15 è molto simile a quello previsto per una gomma incompruibile.

Tutti questi risultati sono in accordo con i più comuni risultati disponibili in letteratura sui gel fisici, il che giustifica forse l'assunzione comune secondo la quale il regime lineare in compressione non confinata dei gel si estende fino al 10-15% di deformazione.^[25]

Tuttavia, i nostri precedenti risultati, riportati nelle figure 13 e 14, indicano chiaramente che l'incompruibilità dei gel potrebbe non essere

un'assunzione accettabile già per deformazioni moderate. Almeno per i nostri gel di alginato, bisogna essere molto cauti nel valutare il *range* di linearità dai dati riportati in figura 15; ancora più sospetto è l'apparente accordo tra i nostri dati e l'equazione costitutiva di materiale neo-Hookeano incomprimibile.

In realtà, i nostri risultati riassunti nelle figure 13-15, ci consentono, nel loro insieme, di dedurre che l'elasticità "istantanea" dei nostri gel mantiene la linearità (e l'incomprimibilità) solo per valori superiori a $\lambda \approx 0.94$, vale a dire, fino al 6% di compressione. È certamente plausibile che un comportamento simile sia valido anche per altri gel fisici.

È stata eseguita anche una misura diretta dello sforzo di taglio τ_{xy} in un esperimento di *stress-sweep* in oscillatorio, la quale ha confermato che i gel si comportano come materiali elastici lineari fino a deformazioni di almeno $\gamma \approx 0.2$ e, quindi, ben oltre il 6%, come mostrato in figura 16. Tuttavia, il valore del modulo a taglio ottenuto dai dati in figura 16 ($G = 22$ kPa) conferma il valore ottenuto dal *fitting* dei dati di compressione per basse deformazioni (21 kPa).

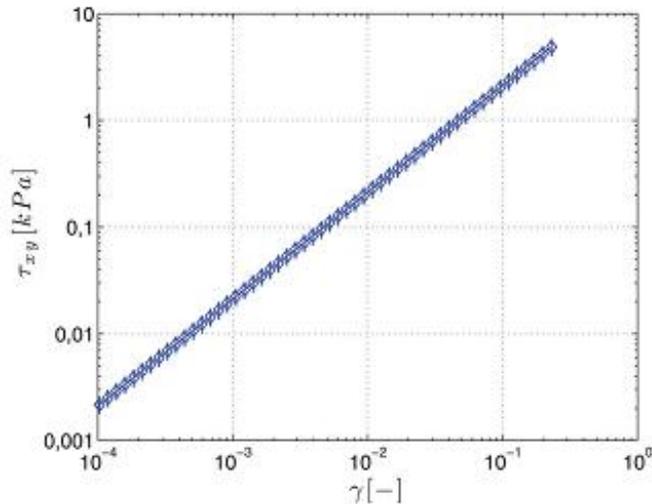


Figura 16: Prove di stress sweep a 1 Hz. I dati sono il risultato di una media su tre prove. La pendenza della curva in scala logaritmica è uguale a 1, indicando una relazione lineare tra τ_{xy} e γ . Dall'intercetta estrapolata per $\gamma = 10^0$, il modulo elastico G risulta pari a 22 kPa, in accordo con quello stimato dai test di compressione (vedi figura 15).

Per riassumere, l'intera serie di esperimenti precedentemente descritti testimonia che, anche nel nostro caso di un network caricato (catene di alginato, acqua, più cationi bivalenti), il contributo reologico dominante deriva dall'entropia conformazionale delle catene polimeriche, come per l'elasticità delle gomme. Le condizioni di incomprimibilità e linearità nel comportamento elastico risultano entrambe essere valide solo per piccole deformazioni, cioè fino al 6% di compressione.

IV.2: Proprietà viscoelastiche

IV.2.1: Rilassamento dopo la compressione

L'analisi e le conclusioni precedenti sono state ulteriormente confermate ed arricchite con test di *stress-relaxation* eseguiti a varie percentuali di deformazione in compressione, su campioni cilindrici di stesso diametro. I risultati, riportati in termini di forza normalizzata rispetto al suo valore iniziale ($f(t)/f(0^+)$), sono riportati in figura 17.

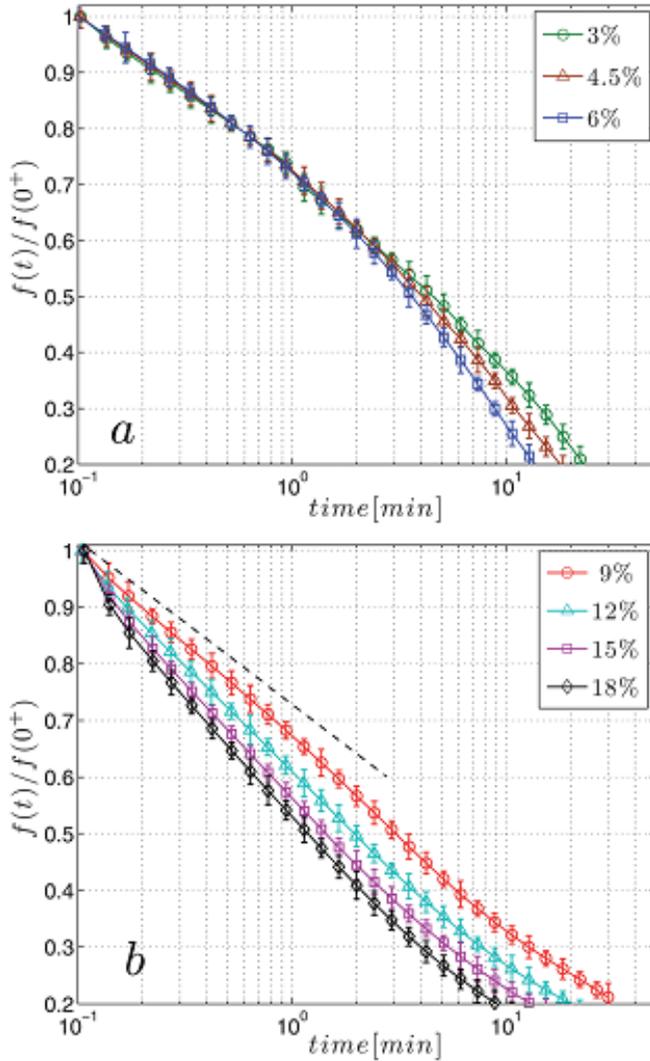


Figura 17: Prove di stress-relaxation a diverse percentuali di deformazione in compressione:
 a) 3, 4.5 e 6%,
 b) 9, 12, 15, 18%.
 Ogni set di dati è il risultato della media di tre prove. La curva tratteggiata nella figura b) rappresenta la pendenza comune iniziale delle curve di rilassamento riportate in figura a).

Le curve di rilassamento fino al 6% di compressione (figura 17.a) mostrano un comportamento analogo, mentre per più alti valori di deformazione (figura 17.b) le curve si discostano sempre più tra loro e sono anche qualitativamente diverse dalle curve di rilassamento a basse deformazioni. Ancora una volta, così come nel caso delle prove riportate nel paragrafo precedente, osserviamo che il 6% di compressione rappresenta una sorta di valore critico oltre il quale il comportamento del gel subisce un cambiamento, ad esempio, venendo meno l'incompressibilità del materiale. I profili di rilassamento a basse compressioni esibiscono tutti lo stesso andamento nel tempo, con un comportamento diverso (in scala semi-logaritmica) a tempi brevi e a tempi più lunghi. La prima fase del decadimento, per tempi brevi, risulta essere la stessa per tutte e tre le basse compressioni esaminate, che è infatti il comportamento che ci si aspetta per un materiale entro il suo regime di viscoelasticità lineare. D'altro canto, per tempi di rilassamento più lunghi, i decadimenti sono diversi a compressioni differenti, indicando che, dopo tempi più lunghi, all'interno dei gel di alginato intervengono probabili cambiamenti compositivi e/o strutturali. Pertanto, anche confinando i nostri esperimenti a compressioni che rientrano nel *range* di risposta elastica "istantanea" di

gel incompressibili (<6%, come verificato nel precedente paragrafo), dopo un po' di tempo si verifica un rilassamento non-standard ed il *range* di linearità viscoelastica non è più identificabile.

Il decadimento della forza, dopo l'applicazione di piccole compressioni, nel gel di alginato può essere attribuita a tre diversi meccanismi:^[51,52] i) un rilassamento interno, molto probabilmente dovuto ad un riarrangiamento interno del *network* polimerico, conseguente alla rottura e riformazione di legami ionici tra le catene di alginato; ii) accoppiamento stress-diffusione, legato alla diffusione dell'acqua guidata da un gradiente di stress all'interno del *network*, generato dalla compressione istantanea; iii) sineresi spontanea del gel, probabilmente conseguenza di una metastabilità innata ed inevitabile dei gel di alginato e forse diversamente "attivata" alle diverse compressioni.

IV.2.2: Diffusione

Per indagare sui diversi contributi, appena citati, al rilassamento della forza e tentare di valutare la loro tempistica per i nostri gel di alginato, si è proceduto ad eseguire test di compressione non confinata su campioni cilindrici aventi diversi diametri, monitorando contemporaneamente la superficie laterale dei gel, cioè i raggi del campione, in funzione del tempo.

In figura 18 sono riportati i dati di rilassamento della forza normalizzata, dopo uno step di compressione del 3% ($\lambda = 0.97$) per tre campioni con tre diversi diametri: 15, 24 e 35 mm.

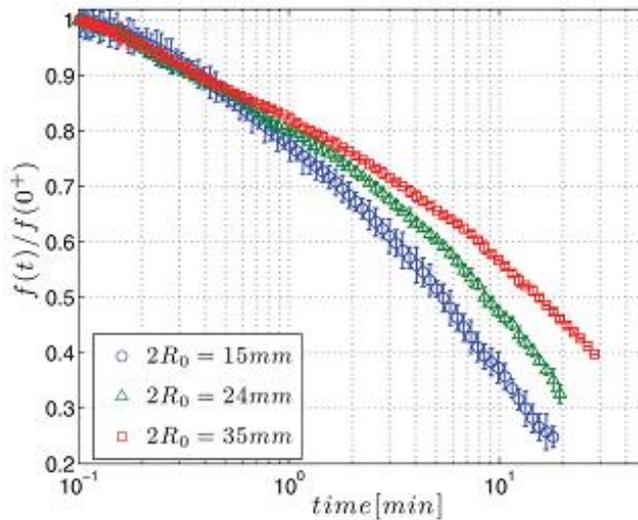


Figura 18: Prove di stress-relaxation al 3% di compressione a tre diversi diametri: 15, 24 e 35 mm. I dati sono stati ottenuti come media di tre prove. L'effetto del raggio dei campioni appare evidente a tempi relativamente lunghi.

Tutti i dati mostrano chiaramente le due fasi del rilassamento già discusse in precedenza, come mostrato in figura 18.

Il rilassamento dei campioni con i diversi raggi è abbastanza simile fino a circa 1 minuto dopo la fase di compressione, per poi discostarsi l'uno dall'altro per tempi maggiori. È evidente che, nella seconda fase del

decadimento, la forza rilassa più “velocemente” quanto più piccolo è il raggio iniziale. Pertanto, si evidenzia un “tempo di transizione” a circa 1 min dalla fase di compressione.

Passiamo ora ad esaminare come evolvono nel tempo i raggi dei campioni.

In figura 19 è riportato lo spostamento radiale:

$$u_r(t) = r(t) - R_0$$

normalizzato rispetto al suo valore iniziale dopo la compressione:

$$u_r(t^+) = r(t^+) - R_0$$

in funzione del tempo, per tutti e tre i diametri.

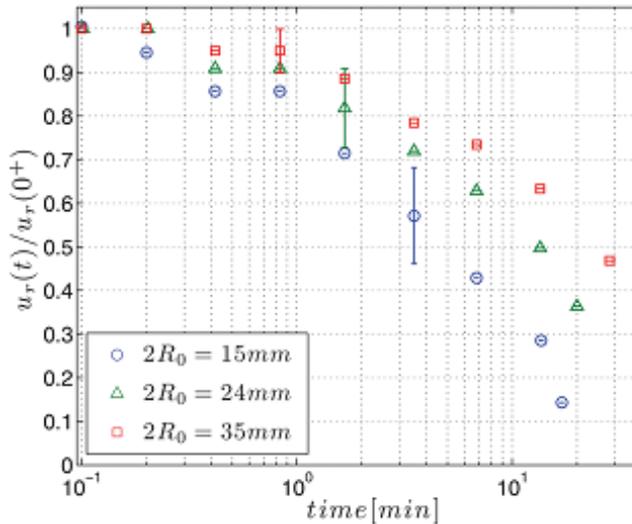


Figura 19: Spostamento radiale normalizzato in funzione del tempo per i tre raggi esaminati. Le misure dei raggi sono state ricavate dalle stesse prove riportate in figura 18. Per chiarezza, le barre di errore sono riportate solo per alcuni punti.

Anche se in maniera meno chiara rispetto ai dati di rilassamento, anche l'andamento del rilassamento dei raggi nel tempo mostra (in scala semi-logaritmica) un "lento" decadimento iniziale seguito da un decadimento più "veloce" e, ancora una volta, possiamo individuare un "tempo di transizione" a 1-2 minuti dopo la fase di compressione. Anche in questo caso, così come abbiamo visto per il rilassamento della forza, si può osservare che più piccolo è il raggio iniziale del campione più rapido è il rilassamento.

Siamo ora in grado di discutere come i dati finora collezionati possono essere interpretati in termini di diversi meccanismi che intervengono presumibilmente nel rilassamento dei gel. L'osservazione chiave da fare riguarda la riduzione dei raggi dei gel osservata nei primi tempi delle prova, fino a circa 2 minuti. Entro tale intervallo di tempo, lo spostamento radiale $u_r(t)$ decresce di circa il 20-30% rispetto al suo valore iniziale. Poiché una diminuzione del raggio è una conseguenza dell'espulsione di acqua dal gel dobbiamo concludere che, entro un arco di tempo breve dopo la deformazione, è attivo un meccanismo di accoppiamento stress-diffusione. Ciò conduce a chiedersi se l'accoppiamento stress-diffusione sia l'unico meccanismo attivo durante le prime fasi di rilassamento e, in altre parole, se vi sia qualche indicazione di una copresenza di diversi meccanismi di rilassamento.

Per rispondere a tale domanda, andiamo, in primo luogo, a ritracciare i dati di rilassamento della forza della figura 18 in funzione del tempo riscaldato, vale a dire, il rapporto tra il tempo effettivo ed il raggio R_0 del campione prima della compressione (raggio dopo il condizionamento).

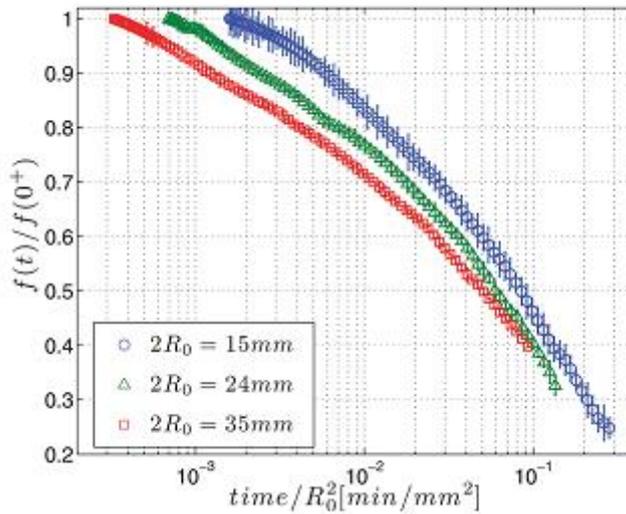


Figura 20: Rilassamento della forza vs. il tempo riscaltato (t/R_0^2). I dati riscaltati non collasano in una singola curva, indicando che la diffusione del solvente non è l'unico meccanismo di rilassamento attivo dopo la fase di compressione.

Attraverso tale *rescaling*, usuale per un processo di guidato dalla diffusione, si dovrebbe verificare che i dati dei campioni con diversi raggi collasano in una singola curva, se la diffusione fosse l'unica forza trainante. Questo non è chiaramente il caso dei nostri dati, come si può osservare dalla figura 20; infatti, dati appartenenti a campioni con diversi raggi restano bene distinti. Si osserva, tuttavia, una tendenza a coincidere in un'unica curva per tempi lunghi.

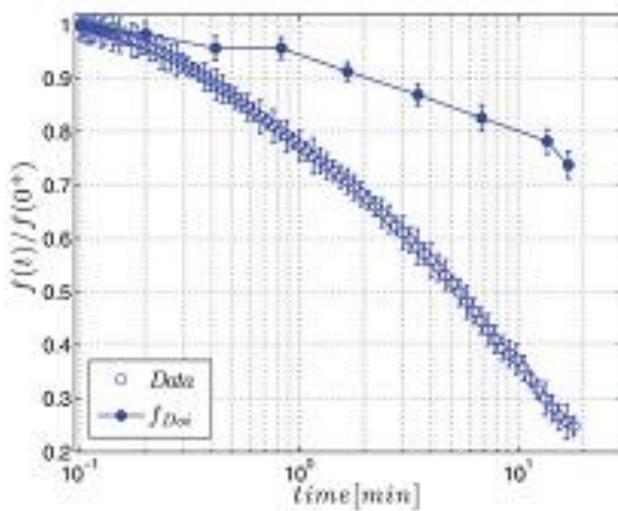
Come secondo step nella nostra analisi, faremo uso della teoria di Doi dell'accoppiamento lineare stress-diffusione per calcolare la caduta della

forza dovuta al meccanismo di diffusione conoscendo il raggio del gel durante il rilassamento (vedi figura 19). Infatti, il decadimento della forza normalizzata viene calcolato dalla teoria di Doi come:

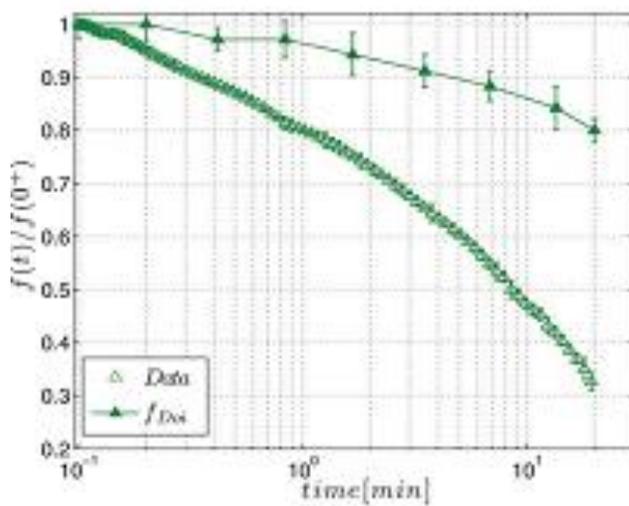
$$\frac{f(t)}{f_0} = \frac{2}{3} \left[1 - \frac{u_r(t)}{R_0} \frac{I}{(I-\lambda)} \right]$$

dove $(I-\lambda)$ rappresenta la deformazione applicata (3% in tutti i nostri test di compressione).

Pertanto, dai dati sperimentali disponibili dei raggi vs. il tempo di figura 19, possiamo ottenere le forze corrispondenti attraverso l'equazione sopra riportata, da confrontare con quelli misurati. La figura 21 mostra sia il calcolo attraverso l'equazione di Doi che i dati sperimentali.



(a)



(b)

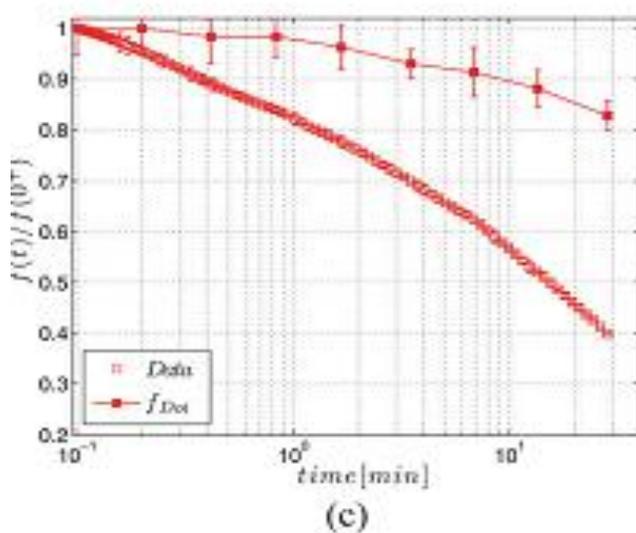


Figura 21: Forza normalizzata in funzione del tempo, dopo l'applicazione di una deformazione a compressione del 3%, per i tre diametri investigati: 15, 24, 35 mm (nell'ordine dalla a alla c). I simboli pieni rappresentano i dati di forza normalizzata predetti dall'equazione di Doi, dove il solo meccanismo di rilassamento è la diffusione dell'acqua. Il rilassamento misurato è senza dubbio più rapido di quello predetto.

E' evidente che i rilassamenti della forza calcolati stanno ben al di sopra rispetto a quelli misurati. Considerando anche in questo caso la situazione a $t=2$ minuti (vale a dire, al "tempo di transizione"), troviamo che la forza normalizzata è di circa 0.9, mentre i valori misurati sono compresi tra 0.7 e 0.75, e tale discrepanza è ben al di fuori delle incertezze sperimentali.

Dai risultati di cui sopra, possiamo sicuramente concludere che il rilassamento della forza osservato e l'espulsione dell'acqua fino al 'tempo di transizione' non possono essere attribuiti solo all'accoppiamento stress-

diffusione. Nel seguito, quindi, verrà discussa più nel dettaglio l'esistenza e la possibile rilevanza di un meccanismo di rilassamento intrinseco.

IV.2.3: Rilassamento dopo la torsione

Nelle figure 22 e 23 è riportato il comportamento di rilassamento dei gel dopo una fase di deformazione torsionale, in termini di momento torcente M e forza normale f_N , rispettivamente.

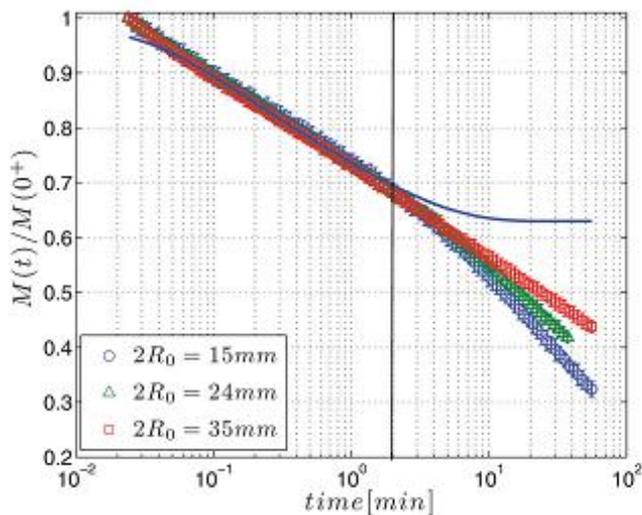


Figura 22: Curve di rilassamento torsionale normalizzate dopo una deformazione a torsione del 3% per tre diversi diametri. Ogni set di dati è mediato su tre prove. Le tre curve collasano in un'unica fino ad un tempo caratteristico di circa 2 minuti (indicato dalla barra verticale). La curva continua rappresenta il fitting ottenuto attraverso il modello descritto in Appendice.

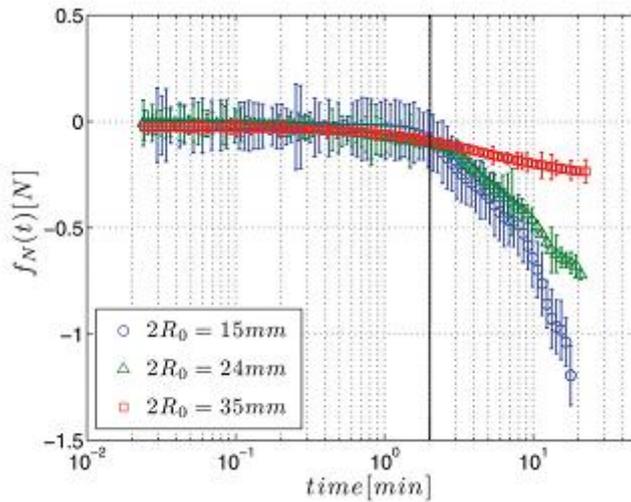


Figura 23: Forza normale in funzione del tempo misurata negli esperimenti torsionali riportati in figura 22. Anche in questo caso la barra verticale evidenzia il “tempo di transizione”.

In entrambe le figure, i dati sono riportati per campioni cilindrici di tre diversi diametri. Come già ricordato nel capitolo Materiali e Metodi, i piatti del reometro sono stati in questo caso trattati in maniera tale da evitare qualsiasi fenomeno di *slipping* tra il campione ed i piatti del reometro. Si segnala al lettore che le prove di rilassamento a torsione a basse deformazioni ($\gamma = 0.01, 0.03, 0.06$) forniscono esattamente risultati normalizzati sovrapponibili (dati non mostrati), come ci si aspetta in regime di viscoelasticità lineare; di conseguenza, a queste deformazioni non si osserva alcuna variazione del raggio del campione di gel.

Fino a circa 2 minuti dopo la fase di deformazione, il momento torcente in figura 22 presenta essenzialmente lo stesso comportamento per tutti e tre i raggi investigati, cioè un decadimento logaritmico, mentre lievi (ma riproducibili) differenze diventano visibili in tempi più lunghi. La presenza, ancora una volta, di un "tempo di transizione", comparabile con quello trovato negli esperimenti di compressione, è ulteriormente confermata dai dati di forza normale riportati in figura 23.

In linea di principio, per le deformazioni torsionali lineari, non dovrebbe sorgere alcuna forza normale e, in effetti, tale aspettativa è soddisfatta dai nostri dati fino a 2 minuti dopo la torsione. Per tempi più lunghi, al contrario, la forza normale cresce, tanto più quanto minore è il raggio del campione. Tale comportamento inaspettato potrebbe essere legato, probabilmente, ad un "lento" cambiamento strutturale nei gel (quello precedentemente indicato come meccanismo iii)).

D'altro canto, i risultati sperimentali delle figure 22 e 23 nei primi due minuti dopo la torsione, possono essere visti come rappresentativi di una viscoelasticità lineare standard dei gel. Per sottolineare ulteriormente questa caratteristica, è stato eseguito un test di *frequency sweep* sui gel così da ottenere i loro *storage modulus* e *loss modulus* in funzione della

frequenza, nel *range* di frequenze corrispondente alle prime due decadi di tempo menzionate (circa 2 minuti).

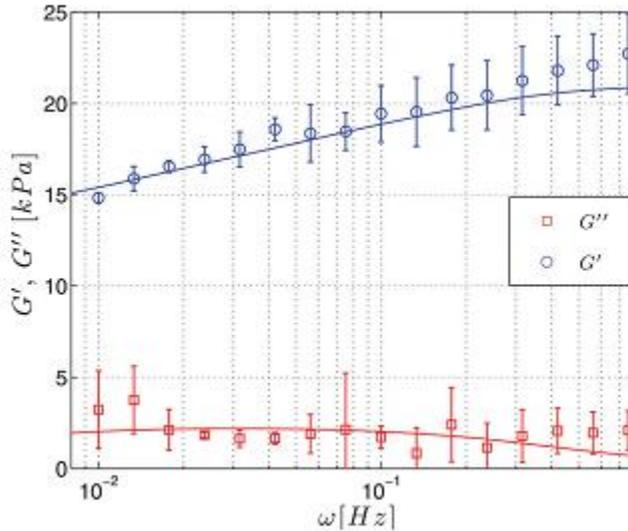


Figura 24: Prova di *frequencysweep* eseguita su un campione cilindrico di gel di 35 mm di diametro, all'1% di deformazione torsionale. I dati sono ottenuti dalla media di tre prove. Le curve continue rappresentano i moduli $G'(\omega)$ e $G''(\omega)$ calcolati secondo il modello descritto in Appendice.

I dati ottenuti, mostrati in figura 24, si comportano infatti come ci si aspetterebbe per un gel, con un modulo elastico molto più alto rispetto al *loss modulus* per tutto il range di frequenze considerate.

Per completare il quadro, in figura 24 sono riportati anche lo *storage modulus* ed il *loss modulus* calcolati in funzione della frequenza, predetti dal modello descritto in Appendice.

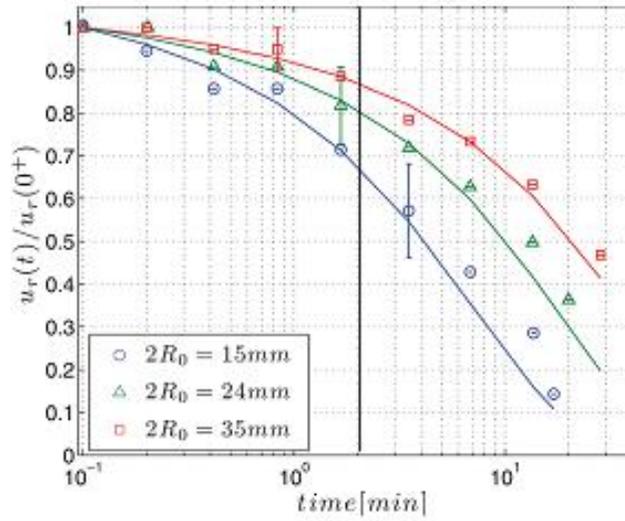
Il buon accordo tra i moduli misurati e quelli calcolati conferma che gli esperimenti di rilassamento torsionale ben rientrano nell'ambito della viscoelasticità lineare standard fino al "tempo di transizione" (circa 2 minuti). I dati di rilassamento torsionale in figura 22, fino a 2 minuti dalla fase di deformazione torsionale, sono un chiaro segno di un rilassamento costitutivo ("*inner relaxation*") del network polimerico del gel, che abbiamo precedentemente indicato come meccanismo i).

IV.2.4: Un'interpretazione del comportamento di rilassamento dei gel

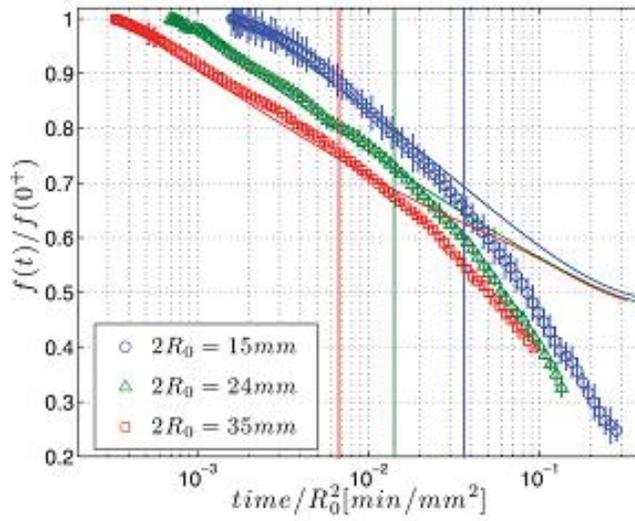
Mettendo insieme tutte le informazioni discusse nei precedenti paragrafi, prevediamo che i suddetti meccanismi di rilassamento costitutivo e accoppiamento stress-diffusione sono molto probabilmente concomitanti nei gel di alginato, dopo la compressione, per un certo periodo di tempo, cioè fino al "tempo di transizione". Nella risposta del materiale a tempi più lunghi, invece, interviene anche un ulteriore complesso riarrangiamento del gel, con caratteristiche peculiari.

Limitandoci alla risposta del gel per tempi brevi, abbiamo già dimostrato (vedi figura 21) come la teoria di Doi dell'accoppiamento stress-diffusione, nella sua versione originale, non è in grado di predire i risultati dei nostri esperimenti di rilassamento. In questa sezione, illustreremo come invece una semplice estensione della teoria di Doi,^[52] risulta essere in ragionevole accordo con i dati di sperimentali.

In questo nuovo modello, il gel viene visto come una miscela omogenea di un solvente e un solido viscoelastico. Nel caso specifico in esame, il solido viscoelastico è un network fisico di alginato. Dunque, il rilassamento meccanico del gel è dovuto sia alla diffusione del solvente che ad un rilassamento costitutivo del network. Tale modello è sommariamente descritto in Appendice, dove vengono riportate le equazioni adottate e la valutazione dei parametri del modello. In figura 25 riportiamo sia la predizione del modello che i dati sperimentali precedentemente riportati nelle figure 19 e 20.



(a)



(b)

Figura 25: Dati delle figure 19 e 20 insieme alla simulazione del modello descritto in Appendice. Le barre verticali indicano i tempi di transizione per i tre raggi esaminati.

Possiamo osservare l'esistenza di un buon accordo dei due casi. A tale proposito, vogliamo sottolineare che tale accordo è stato ottenuto solo inserendo due parametri correttivi (cioè, una costante di Darcy k e una costante di Lamè λ_M , vedi Appendice). Come ci si aspetta, la qualità del *fitting* peggiora man mano che ci si allontana dal "tempo di transizione", dove la sineresi inizia a prevalere. Dall'accordo tra il modello ed i dati sperimentali, fino al "tempo di transizione", tuttavia, possiamo dedurre che sono in gioco entrambi i meccanismi di *inner relaxation* ed accoppiamento stress-diffusione e il modello proposto descrive correttamente tale interazione.

CAPITOLO V: AGING

V.1: Perdita di peso

In questa parte del lavoro è stato analizzato più nel dettaglio il fenomeno dell'invecchiamento dei nostri materiali. In particolare, è stato osservato il comportamento a diversi tempi di invecchiamento di gel formati da due diversi cationi: Ca^{2+} e Sr^{2+} .

In tabella 4 sono riportate le variazioni di peso dei campioni ai diversi tempi di condizionamento in soluzione 0.005 M del catione corrispondente.

Aging [gg]	Perdita di peso (Ca^{2+}) [%]	Perdita di peso (Sr^{2+}) [%]
1	15.7	34.3
2	15.8	36.1
5	19.3	38.9
12	24.2	41.7

Tabella 4: Variazione percentuale del peso dei diversi campioni ai diversi tempi di aging.

Si osserva una riduzione nel tempo del peso di ciascun campione.

E' stata osservata anche la variazione di peso nel tempo di un campione di gel di alginato da Sr^{2+} , sottoposto ad un pre-condizionamento di 24 h in soluzione e, successivamente, tolto dalla soluzione e lasciato in ambiente

saturo di umidità. Registrando i pesi del campione agli stessi tempi sopra indicati, si è osservato che il campione manifesta una perdita di peso confrontabile con quella del campione corrispondente tenuto in soluzione. Da tali risultati si evidenzia chiaramente che si tratta di materiali metastabili, che manifestano una continua tendenza a raggiungere una condizione di equilibrio. Pertanto, il tempo ha una notevole influenza sulle proprietà di questo tipo di materiali.

V.2: Prove a $\varepsilon=0$

Sono state condotte prove di *stress-relaxation* a deformazione imposta nulla, su campioni cilindrici di gel di alginato da Ca^{2+} dello stesso diametro e ai tempi di invecchiamento stabiliti (1, 2, 5 e 12 giorni). I risultati ottenuti sono riportati in figura 26 in termini di forza normale in funzione del tempo:

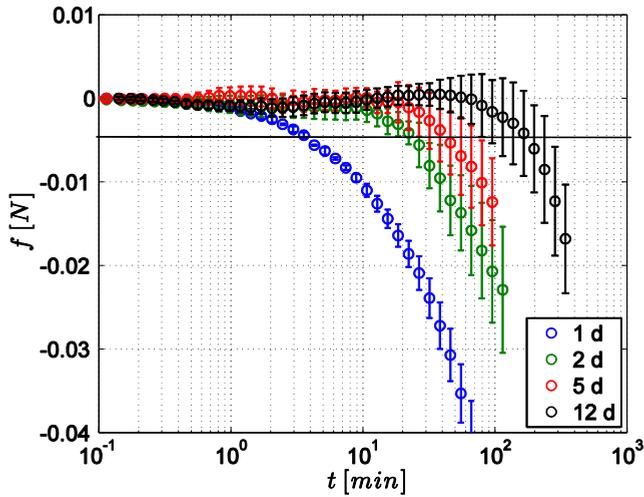


Figura 26: Prove di stress-relaxation a percentuale di deformazione nulla, condotte su campioni cilindrici di Ca-alginato dello stesso diametro a diversi tempi di invecchiamento: 1, 2, 5 e 12 giorni. Ogni set di dati è il risultato della media di tre prove.

Osserviamo in tutti i casi un decadimento della forza normale, indice del fatto che si sta assistendo ad una evoluzione spontanea del sistema, anche senza l'applicazione di una sollecitazione esterna, a conferma del fatto che si tratta di materiali metastabili, in continua evoluzione nel tempo. Ancora una volta, all'aumentare del tempo di invecchiamento del campione, il decadimento della forza è più lento, ad indicare un aumento del tempo caratteristico di rilassamento del materiale.

Considerazioni analoghe possono essere effettuate analizzando come evolve nel tempo il raggio dei campioni testati. In figura 27 è riportato il

raggio dei campioni normalizzato rispetto al suo valore iniziale, per tutti e quattro i tempi di invecchiamento:

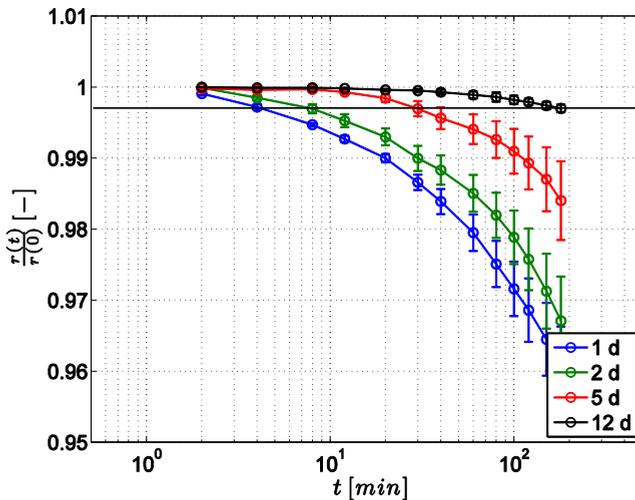


Figura 27: Evoluzione nel tempo del raggio dei campioni sottoposti alle prove di stress-relaxation a percentuale di deformazione nulla a diversi tempi di invecchiamento: 1, 2, 5 e 12 giorni. Ogni set di dati è il risultato della media di tre prove.

Ancora una volta, a tempi di invecchiamento maggiori si osserva una più lenta riduzione del raggio del campione.

Inoltre, all'aumentare del tempo di *aging* registriamo un aumento del "tempo di transizione", come evidenziato dalla linea continua orizzontale riportata nelle figure 26 e 27 e schematizzato nelle figure 28 e 29. Da notare che sia i dati di figura 29 che quelli di figura 30 seguono la stessa legge di potenza del tipo $t_f, t_r \propto t_w^{1.4}$.

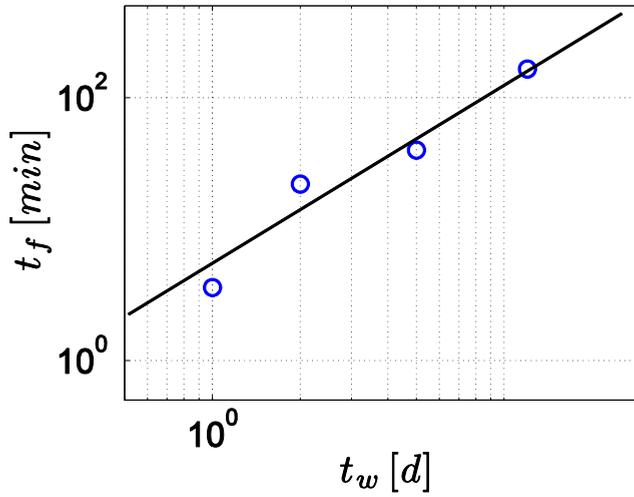


Figura 28: Tempo di “transizione” della forza normale, relativa alle prove di figura 27, in funzione del tempo di aging dei campioni.

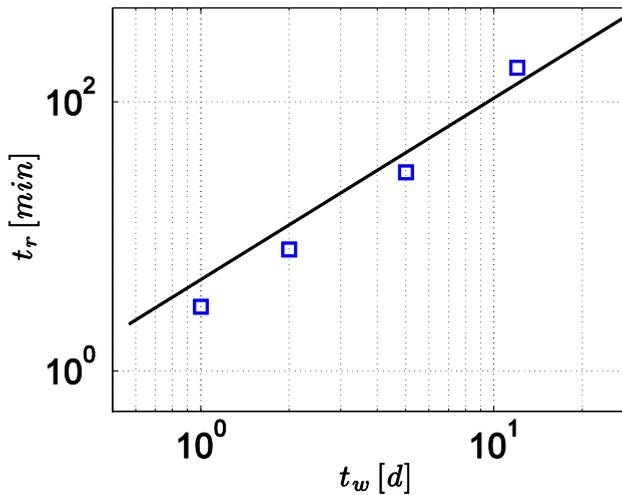
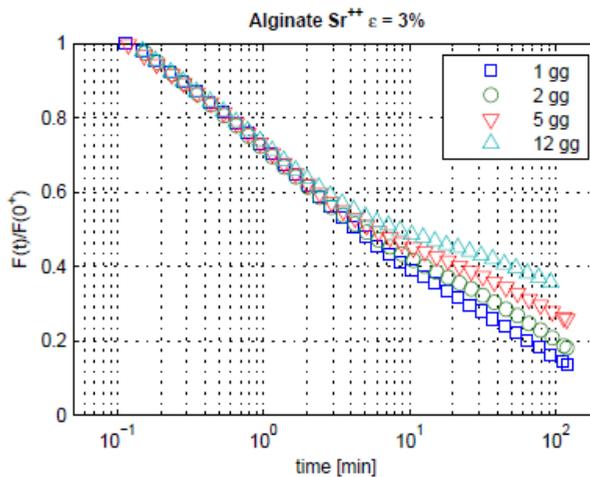


Figura 29: Tempo di “transizione” del raggio dei gel, relativo alle prove di figura 28, in funzione del tempo di aging dei campioni.

V.3: Prove di Stress-relaxation

In figura 30 sono riportati i profili normalizzati ottenuti dalle prove di *stress relaxation*, precedentemente descritte. È possibile osservare che tutti i campioni esibiscono un comportamento qualitativamente analogo. Infatti, in ciascun caso, si possono osservare due diverse fasi di rilassamento del materiale: una prima fase è caratterizzata da una caduta piuttosto rapida degli stress entro i primi 10 min della prova, seguita da una seconda fase di rilassamento più lenta che procede per tutta la durata della prova. Tale evidenza mette ancora una volta in risalto la copresenza di diversi meccanismi di rilassamento che intervengono nei nostri gel.



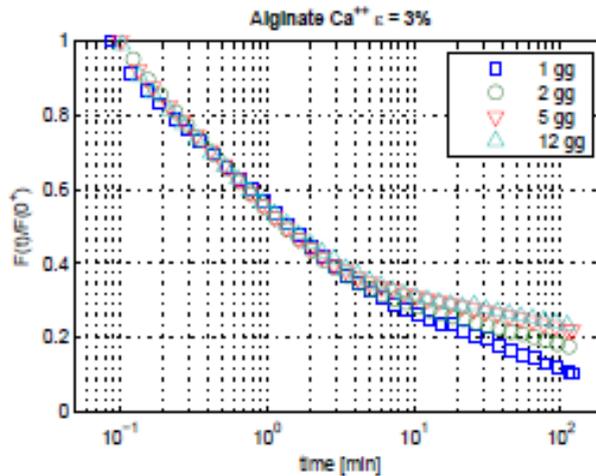


Figura 30: Curve di stress-relaxation normalizzate in funzione del tempo, ottenute a diversi tempi di aging.

In ogni caso, osserviamo un primo tratto della curva in cui l'invecchiamento non sembra avere influenza sul comportamento del gel; infatti, in questa fase si può notare la sovrapposizione delle diverse curve ottenute. Per quanto riguarda, invece, la seconda fase del rilassamento, si osserva che a un maggiore tempo di invecchiamento corrisponde una minore pendenza della curva e, quindi, una più lenta caduta degli stress. Ciò lascia intuire che sta avvenendo qualcosa all'interno del materiale, qualche fenomeno interno che è fortemente influenzato dal tempo.

V.4: Prove a diverse temperature

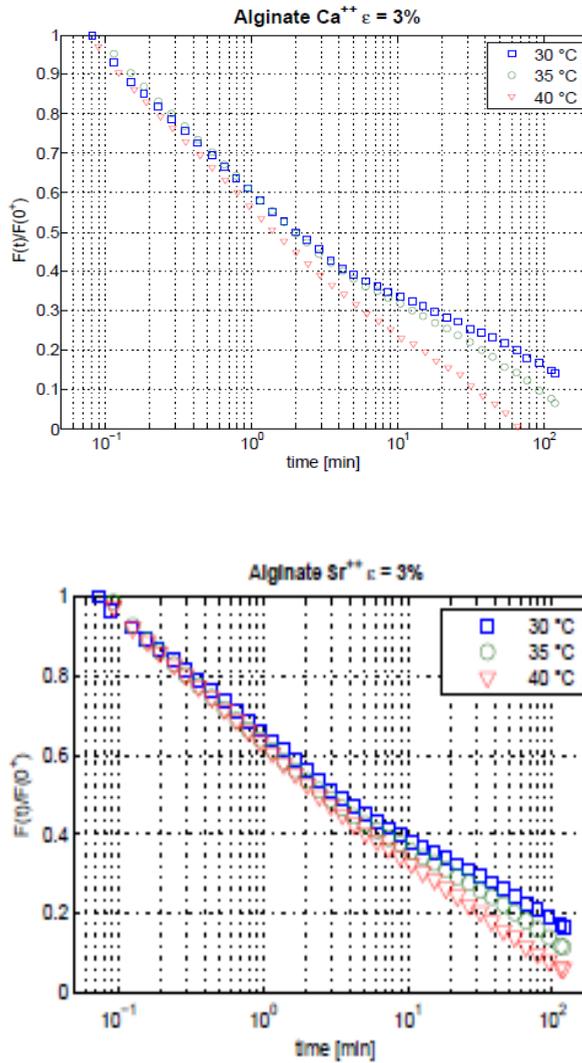
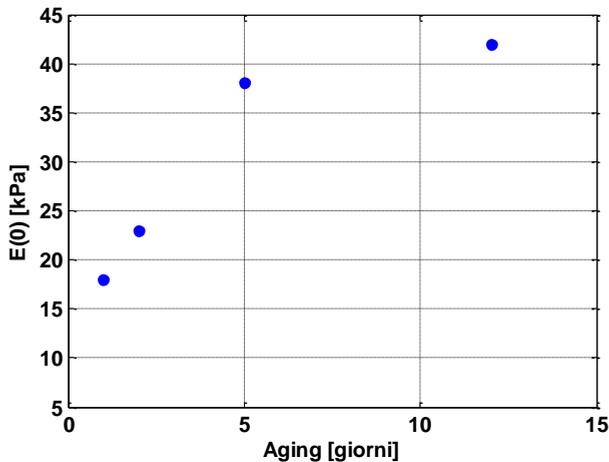


Figura 31: Curve di stress-relaxation normalizzate in funzione del tempo, ottenuto per i tre diversi gel di alginato da Ca²⁺ e Sr²⁺ per diverse temperature: 30, 35 e 40°C.

Dai risultati ottenuti dalle prove condotte a diverse temperature (figura 27), si osserva che la prima parte, legata alla prima fase del rilassamento, non risulta essere sostanzialmente influenzata dalla temperatura; in questa fase, infatti, si osserva una sovrapposizione delle tre curve ottenute per ciascuna delle tre temperature. La seconda fase del rilassamento, invece, manifesta chiaramente una certa dipendenza dalla temperatura; ad un aumento della temperatura, infatti, corrisponde una più rapida caduta degli stress.

V.5: Valutazione di $E(t=0)$



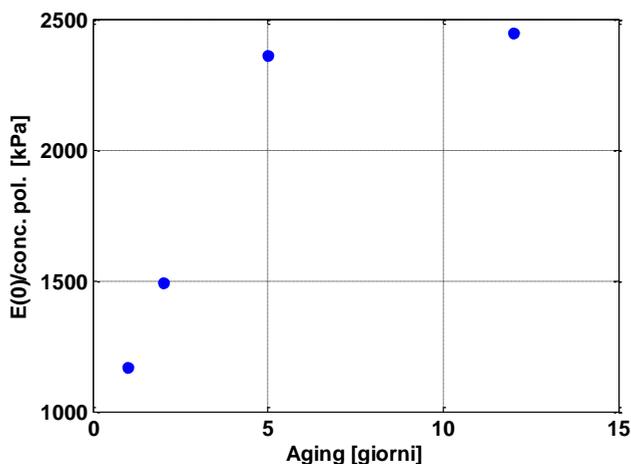


Figura 32: Variazione di $E(t=0)$ in funzione dell'invecchiamento, registrata per il campione di gel di alginato da Sr^{2+} .

È stata valutata anche la variazione del modulo E all'istante iniziale $t=0$, osservando, ancora una volta, una significativa influenza del tempo di invecchiamento sulle proprietà meccaniche dei gel (figura 32). Data la perdita di peso dei campioni, osservata durante il loro condizionamento in soluzione (vedi Tabella 4), è stato verificato che tale variazione delle proprietà meccaniche non fosse attribuibile esclusivamente ad un aumento della concentrazione di polimero nel campione, derivante da una riduzione del volume dello stesso dovuta alla fuoriuscita di solvente. Tuttavia, riportando gli stessi risultati, normalizzati rispetto alla concentrazione di polimero (figura 32), si osserva comunque un trend dei dati dello stesso

tipo. Ciò indica chiaramente che il tempo di invecchiamento ha modificato le proprietà del materiale.

V.6: DLS

Al fine di investigare l'origine microscopica del rilassamento dei nostri gel ionici, osservato nei test meccanici di DMA e di reologia, sono state condotte misure di *light scattering* dinamico su campioni di gel della stessa composizione.

Sono state eseguite prove DLS su campioni di gel ottenuti da Sr^{2+} a diversi tempi di invecchiamento: 6, 9 e 12 ore. Sono stati scelti questi tempi perché per tempi di *aging* più lunghi non si riusciva ad apprezzare alcuna variazione nel segnale registrato.

La figura 33 mostra, a titolo di esempio, la dinamica del gel osservata per uno degli angoli di *scattering* considerati e per un invecchiamento del campione di 12 ore:

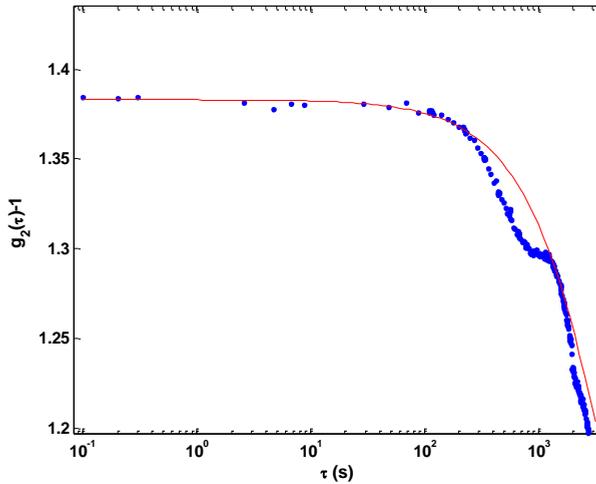


Figura 33: Funzione di correlazione di intensità misurata con DLS ad un angolo ϑ e per un tempo di condizionamento di 12 ore.

La prima parte della curva dei dati ottenuti è stata fittata con un'equazione esponenziale del tipo:

$$g_2 = 1 + \beta \exp \frac{-2t}{\tau}$$

la quale fitta bene i dati sperimentali entro i primi 300 secondi della prova.

Questo decadimento esponenziale osservato nella funzione di autocorrelazione è indice del fatto che si sta assistendo ad un riarrangiamento interno del network polimerico, su una scala di lunghezze

di almeno alcuni microns. Quindi, le misure meccaniche e quelle DLS possono considerarsi come due facce della stessa medaglia, mettendo entrambe in risalto la presenza di tale fenomeno.

In figura 34 è riportata la dipendenza da q del tempo di rilassamento τ per tutti e tre gli invecchiamenti considerati.

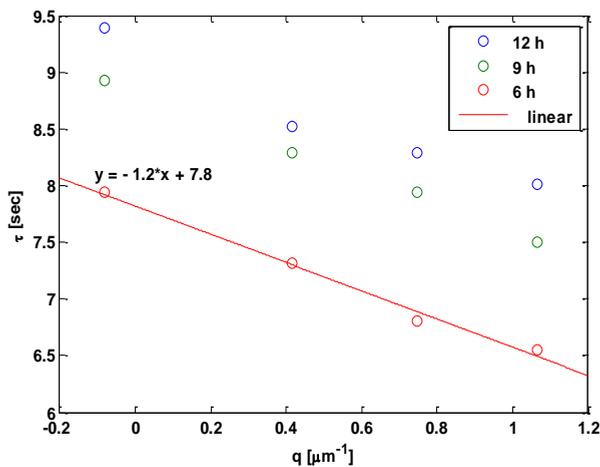


Figura34: Variazione del tempo di decadimento τ con il vettore d'onda q per tre tempi di invecchiamento: 6, 9 e 12 ore.

Osserviamo che all'aumentare del tempo di invecchiamento si verifica un aumento del tempo caratteristico di decadimento, ad indicare che, man mano che il materiale invecchia, il rilassamento diviene sempre più lento, così come abbiamo visto per le prove di *stress-relaxation* a diversi tempi di *aging*, descritte in precedenza.

La linea continua in figura 30 rappresenta una legge del tipo $\tau \propto q^{-1.2}$ ed i dati, per tutti e quattro gli angoli di *scattering*, appaiono consistenti con tale comportamento. Quindi, i dati sono chiaramente incompatibili con una dipendenza del tipo $\tau \propto q^{-2}$ [52, 53] che viene predetta per un meccanismo di tipo diffusivo. Pertanto, le misure confermano che, per tempi brevi, il materiale rilassa per riorganizzazione del network polimerico, a supporto dei dati meccanici discussi nei precedenti paragrafi.

CONCLUSIONI

Il presente progetto di ricerca ci ha condotto a una maggiore comprensione delle dinamiche dei gel di alginato. Un primo risultato è pervenuto dallo studio della loro struttura molecolare e, in particolare, del tipo di coordinazione che si instaura con ciascuno dei cationi metallici esaminati. Tale obiettivo è stato perseguito mediante un'analisi spettroscopica dei nostri materiali, i quali sono stati analizzati, contrariamente a quanto si verifica nei lavori disponibili in letteratura, sia nella loro forma originale di *wet gel* che nella loro forma disidratata di *dry gel*. I dati sperimentali hanno chiaramente evidenziato che la presenza del solvente produce un cambiamento significativo nel segnale registrato, mostrando una notevole influenza dell'*environment* sul comportamento del gel a livello molecolare. Quanto osservato è una dimostrazione evidente del fatto che vi è una differenza sostanziale a livello molecolare tra i gel allo stato secco e gli stessi nel loro stato originale di *hydrogel*. Pertanto, per avere una adeguata conoscenza delle proprietà di questi materiali su scala molecolare, è necessario studiarli soprattutto nello stato in cui vengono effettivamente utilizzati nella pratica: quella di *wet gel*.

Un secondo rilevante risultato si riferisce all'analisi dei diversi meccanismi di rilassamento attivi nei gel ionici a base di alginato. Sono stati condotti diversi test meccanici: test di compressione *stress-strain* a diverse velocità di deformazione per valutare il range di elasticità "istantanea" lineare; test di *stress-relaxation* a diverse compressioni per valutare il range di viscoelasticità lineare; prove di *stress-relaxation* in compressione su campioni con differenti diametri per analizzare i diversi meccanismi di rilassamento dei gel; prove di *stress-relaxation* in deformazione torsionale per studiare il comportamento di rilassamento senza trasporto del solvente. In più casi, abbiamo misurato, con l'ausilio di una telecamera CCD, le variazioni il raggio del campione durante la prova.

I risultati ottenuti possono essere riassunti come segue:

(i) Con deformazioni "istantanee", il gel, nel suo complesso, risponde come materiale elastico incomprimibile lineare solo fino al 6% di deformazione. Si osserva, inoltre, l'accordo tra i dati di compressione e quelli torsionali (entro l'errore sperimentale) ad identificare tale limite superiore. Oltre il 6% di deformazione il gel è comprimibile, come chiaramente evidenziato dal confronto del raggio effettivo vs. quello teorico (cioè, per un materiale incomprimibile ideale), e dalle variazioni di perdita

di peso dopo le compressioni. Le misure mostrano che la compressibilità dei gel si traduce in espulsione di acqua dal campione. Tale espulsione, forse attraverso qualche meccanismo convettivo, in teoria è una diretta conseguenza dell'eterogeneità dei gel su una scala di lunghezza mesoscopica. L'intera gamma di risultati delle prove di *stress-strain* a compressione segue strettamente un comportamento neo-Hookeano.

(ii) Anche i test di *stress-relaxation* mostrano un range lineare fino a circa il 6% di deformazione, in linea con i dati di elasticità "istantanea". Sia i dati in torsione che in compressione mostrano un doppio regime di rilassamento, con un tempo di "transizione" a circa 2 minuti dallo step di deformazione imposto. Le misure della forza normale dopo uno step di torsione mostra chiaramente che gli effetti di sineresi dominano il rilassamento a tempi più lunghi di 2 minuti.

(iii) Per tempi inferiori a 2 minuti, è necessario distinguere tra le prove di torsione e quelle di compressione. Dalle misure di rilassamento in torsione, dove l'effetto dell'accoppiamento stress-diffusione è dimostrato essere nullo, è possibile valutare il contributo al rilassamento dovuto a riarrangiamenti interni del network. Il meccanismo di rilassamento interno segue un decadimento logaritmico nel tempo; il rilassamento può quindi

essere descritto mediante una distribuzione dei tempi caratteristici. D'altra parte, i test compressione condotti su campioni con differenti diametri mostrano che il decadimento della forza non è imputabile alla sola diffusione dell'acqua. In questo caso, sia il meccanismo di rilassamento interno che quello per diffusione risultano essere attivi.

Infine, abbiamo applicato un modello generalizzato, dove il gel viene considerato come una miscela omogenea di un solvente e un solido viscoelastico, per simulare i test di rilassamento in compressione con campioni di diversi diametri. Per descrivere il rilassamento del network, si è utilizzato il modello di Maxwell generalizzato, con quattro tempi viscoelastici caratteristici e uno stato stazionario di risposta elastica lineare (vedi Appendice).

La maggior parte dei parametri del modello sono stati valutati attraverso fitting dei dati di rilassamento in torsione. Successivamente, il fitting dei dati in compressione è stato sviluppato con un numero ridotto di parametri (due).

Il modello è in grado di descrivere ragionevolmente l'accoppiamento tra il rilassamento interno e la diffusione del solvente e i dati disponibili fino all'avvento della sineresi.

Abbiamo, inoltre, analizzato il fenomeno dell'aging dei nostri materiali, mediante l'ausilio di test meccanici di *stress-relaxation* in compressione non confinata e prove di DLS, condotti su campioni sottoposti a diversi tempi di invecchiamento e la valutazione delle relative perdite di peso. Tali esperimenti hanno confermato, ancora una volta, l'esistenza di più meccanismi di rilassamento che intervengono nei nostri gel, nonché evidenziato che si tratta di materiali metastabili, che manifestano una continua tendenza a raggiungere una condizione di equilibrio e, pertanto, una notevole dipendenza dal tempo.

Grazie alle loro proprietà di biocompatibilità, biodegradabilità, adeguate proprietà meccaniche, struttura tridimensionale stabile e riproducibile, tale classe di materiali presenta tutti i requisiti necessari per essere ottimi candidati per applicazioni biomediche ed, in particolare, per la produzione di *scaffolds*, una delle applicazioni più all'avanguardia dell'ingegneria dei tessuti. A tale proposito, in via preliminare, abbiamo anche testato la capacità dei nostri gel di alginato di formare *aerogels*, mediante estrazione del solvente con CO₂ supercritica: si è ottenuta prima la sostituzione dell'acqua con etanolo, immergendo il campione in miscele acqua/etanolo via via a concentrazione crescente di alcool e, poi, si è eliminato il solvente

ponendo il campione in flusso continuo di CO₂ supercritica a 43 °C e 110 bar.

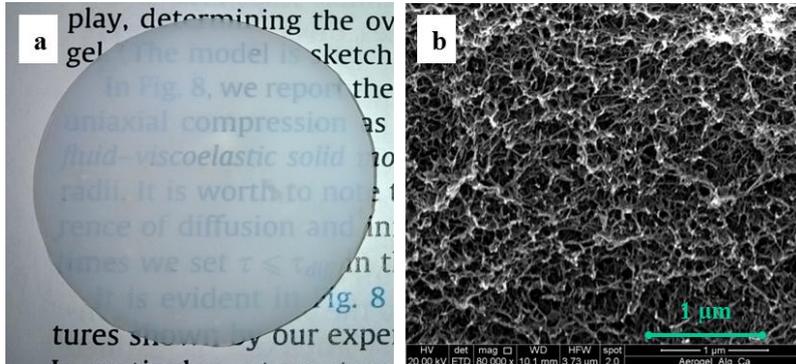


Figura 35: a) Aerogel di Ca-Alginato ottenuto per estrazione con CO₂ supercritica.
b) Immagine SEM del gel privato del solvente.

In figura 35 è riportato un campione di aerogel di alginato di Ca²⁺ realizzato con tale procedura. La prova ha dato luogo ad ottimi risultati, lasciando intravedere interessanti sviluppi futuri in tal senso.

APPENDICE

In questa sezione viene descritto il modello adottato per descrivere il comportamento meccanico dei nostri gel di alginato.

Nel caso dei nostri gel abbiamo due componenti: il solvente (acqua) e il network polimerico di alginato. Sotto varie assunzioni semplificative (non descritte nel presente lavoro; si rimanda al riferimento bibliografico per approfondimenti)^[52] le equazioni del modello sono:

$$\nabla \frac{\partial \mathbf{u}^N}{\partial t} = k \nabla^2 p^S \quad (\text{A1})$$

$$\nabla \mathbf{T}^N - p^S \mathbf{I} = \mathbf{0} \quad (\text{A2})$$

dove, la pressione p^S è attribuita al solvente, la velocità $\partial \mathbf{u}^N / \partial t$ è attribuita al network (il campo $\mathbf{u}^N(\mathbf{r}, t)$ è lo spostamento al tempo t che si trova in \mathbf{r} in uno sistema di riferimento) e \mathbf{T}^N è il tensore degli stress del network.

L'equazione (A1) è un'equazione simil Darcy, che descrive la permeazione del solvente nel network della matrice polimerica, con k la costante di permeabilità solvente/network. L'equazione (A2) è l'equazione di bilanciamento del momento per tutto il gel, fatto di un solvente ed un network. Da notare che nell'equazione (A2) è stata trascurata l'inerzia.

Per ottenere la pressione del solvente e la velocità del network (quindi lo spostamento del network), le equazioni (A1) e (A2) devono essere completate da un'equazione costitutiva per gli stress del network \mathbf{T}^N .

Il solido viscoelastico lineare è descritto da uno schema multimodale e lo stress del network è dato dalla somma degli stress \mathbf{t}_i di ciascuno dei modi:

$$\tau_i \frac{\partial \mathbf{t}_i}{\partial t} + \mathbf{t}_i = 2G_{\infty,i} \mathbf{E}^N + 2G_{0,i} \tau_i \mathbf{D}^N + 2 \lambda_{\infty,i} \text{tr} \mathbf{E}^N + \lambda_{0,i} \tau_i \text{tr} \mathbf{D}^N \mathbf{I} \quad (\text{A3})$$

$$\mathbf{T}^N = \sum_i \mathbf{t}_i \quad (\text{A4})$$

In tale equazione costitutiva, $\mathbf{E}^N = \frac{1}{2} (\nabla \mathbf{u}^N + \nabla \mathbf{u}^{N T})$ è il tensore deformazione simmetrizzato dallo spostamento del network $\mathbf{u}^N(\mathbf{r}, t)$, $\mathbf{D}^N = \partial \mathbf{E}^N / \partial t$ è il tensore velocità di deformazione e $tr \cdot$ è l'operatore traccia. Le costanti $G_{\infty, i}$ e $G_{0, i}$ sono i moduli di taglio, $\lambda_{\infty, i}$ e $\lambda_{0, i}$ sono le costanti di Lamè e τ_i è il tempo caratteristico dell'i-esimo modo del network.

L'equazione (A3) è la forma più generale per l'i-esimo stress per un solido viscoelastico lineare. Tuttavia, occupandoci dei nostri gel ionici a base di alginato, abbiamo deciso di adottare una versione minimale di tale equazione, così da minimizzare il numero dei parametri e trovare che il seguente set di equazioni è, infatti, del tutto adeguato:

$$\tau_i \frac{\partial \mathbf{t}_i}{\partial t} + \mathbf{t}_i = 2G_M \tau_i \mathbf{D}^N + 2\lambda_M \tau_i tr \mathbf{D}^N \mathbf{I}, \quad i = 1, \dots, 4 \quad (\text{A3}')$$

$$\mathbf{t}_5 = 2G_{\infty} \mathbf{E}^N$$

Infatti, il rilassamento del gel misurato dopo uno step di torsione (e fino al "tempo di transizione") può essere ben descritto dalle precedenti equazioni (A3') e (A4), come illustrato in figura 22. I valori dei parametri necessari,

ottenuti operando un fitting dei dati di rilassamento dello step di torsione, sono riportati in Tabella 5.

τ_1 [min]	τ_2 [min]	τ_3 [min]	τ_4 [min]	G_M [-]	τ_4 [-]
0.0794	0.2818	1.0	3.548	0.0925	0.63

Tabella 5: Parametri del modello ottenuti dal fitting dei dati di rilassamento in torsione (figura 22). I moduli riportati sono normalizzati rispetto al modulo di taglio $G = 21$ kPa.

Ricordiamo che l'analisi è ristretta ai primi 2 minuti di rilassamento. Oltre questo tempo, assumiamo che non si verificano ulteriori rilassamenti interni: la risposta del network per tempi lunghi è quella di un solido elastico ideale, con un modulo uguale a G_∞ .

Con gli stessi parametri, la risposta in frequenza è prontamente calcolata attraverso le seguenti espressioni analitiche:

$$G'(\omega) = G_\infty + G_M \sum_{i=1}^4 \frac{\tau_i^2 \omega^2}{1 + \tau_i^2 \omega^2} \quad (\text{A5})$$

$$G''(\omega) = G_M \sum_{i=1}^4 \frac{\tau_i \omega}{1 + \tau_i^2 \omega^2} \quad (\text{A6})$$

e l'accordo con i corrispondenti dati è mostrato in figura 24.

Anche la possibile copresenza di un rilassamento costitutivo e la diffusione del solvente è coperta dal modello completo, quindi con le equazioni (A1),

(A2), (A3') e (A4). Infatti, la matematica completa del rilassamento dopo uno step di compressione uniassiale dei campioni cilindrici lateralmente non confinati fornisce la predizione mostrata in figura 25. Avendo già fissato sei dei parametri sulla base della risposta torsionale del gel (vedi tabella 5), i rimanenti due parametri sono la costante di Lamè (λ_M) e la costante di Darcy (k). Questi due parametri sono stati determinati attraverso il fitting di tutti i dati di compressione per i tre raggi esaminati, quindi, le tre forze di rilassamento normalizzate e le corrispondenti tre variazioni nel raggio normalizzato. I parametri derivanti da questa procedura sono $\lambda_M = 1526 \text{ Pa}$ e $k = 0.9 \times 10^{-4} \text{ mm}^2 \text{ Pa}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Skjak-Bnek G., SmidsrødO., Larsen B., *Int. J. Bioi. Macromol.* **8** (1986b) 330-336.
- [2] Ott C.M. & Day D.F., *Trends In Polymer Science* **3(12)** (1995) 402-406.
- [3] Clare K., *Industrial Gums*, Academic Press, **3rd Ed.** (1993) 105-142.
- [4] Haug A., Larsen B., SmidsrødO., *Acta Chemica Scandinavica* **21** (1967b) 691-704.
- [5] Atkins E.D.T., Mackie W., Smolko E.E., *Nature* **225** (1970) 626-628.
- [6] Skjak-Bnek G., *Biochemical Society Transactions* **20(1)** (1992) 27-33.
- [7] SmidsrødO., *Faraday Discuss. Chem. Soc.* **57** (1974) 263-274.
- [8] Gacesa P., *Carbohydrate Polymers* **8** (1988) 161-182.
- [9] Grant G.T., Moms E.R., Rees D.A., Smith P.J.C., Thorn D., *FEBS Letters* **32(1)** (1973) 195-198.
- [10] Rees D.A., *Biochem. J.* **126** (1972) 257-273.
- [11] Wang Z.-Y., Zhang Q.-Z., Konno M., Saito S., *Biopolymers* **33** (1993) 703-711.

- [12] Bryce T.A., McKinnon A.A., Morris E.R., Rees D.A., Thorn D., *Faraday Discuss. Chem. Soc.* **57** (1974) 221-229.
- [13] Draget K.I., Ostgaard K., Smidsrød O., *Carbohydrate Polymers* **14** (1991) 159-178.
- [14] Haug A., *Acta Chemica Scandinavica* **13(6)** (1959) 1250-1251.
- [15] Haug A. & Smidsrød O., *Acta Chemica Scandinavica* **19** (1965) 341-351.
- [16] Smidsrød O. & Skjak-Bnek G., *Tibtech* **8** (1990) 71-78.
- [17] LeRoux M. A.; Guilak, F.; Setton, L. A.; *Journal of Biomedical Materials Research* **47**(1999) 46-53.
- [18] Rowely J. A.; Mooney D. J.; *Journal of Biomedical Materials Research* **60**(2002) 217-23.
- [19] Lee K. Y.; Bouhadir K. H.; Mooney, D. J.; *Macromolecules* **33**(2000) 97-101.
- [20] Moe, S. T.; Draget, K. I.; Skjakbreak, G.; Smidsrød, O. *Carbohydr. Polym* **19**(1992) 279.
- [21] Andresen, I. L.; Smidsrød, O. *Carbohydr. Res* **302**(1977) 97.
- [22] Mancini, M.; Moresi, M.; Rancini, R.; *Journal of Food Engineering* **39**(1999) 369-378.
- [23] Kuo, C.K.; Ma, P.X.; *Biomaterials* **22** (2001) 511-521.

- [24] Stokke, B. T.; Draget, K. I.; Smidsrød, O.; Yuguchi, Y.; Urakawa, H.; Kajiwara, K. *Macromolecules* **33**(2000) 1853-1863.
- [25] Zhao, X.; Huebsch, N.; Mooney, D. J.; Suo, Z. *Journal of Applied Physics* **107**(2010) 63509.
- [26] Agulhon, P.; Robitzer, M.; David, L.; Quignard, F. *BioMacromolecules* **13**(2012) 215-220.
- [27] Mørch, A.; Donati, I.; Strand, B.L.; Skjak-Bræk, G. *BioMacromolecules* **7** (2006) 1471-1480.
- [28] Kneafsey B., O'Shaughnessy M., Condon K.C., *Burns* **22(1)** (1996) 40-43.
- [29] Jarvis P.M., Galvin D.A.1., Blair S.D., McCollum C.N, *Thrombosis and Haemostasis* **58** (1987) 80.
- [30] Barnett S.E. & Varley S.J., *Annals of the Royal College of Surgeons of England* **69** (1987) 153-155.
- [31] Fujihara M. & Nagurno I., *Carbohydrate Research* **224** (1992) 343-347.
- [32] Gacesa P., *FEES Letter* **212(2)** (1987) 199-202.
- [33] Willard H.H., Merritt L.L. Jr., Dean I.A., Settle F.A, Jr., *Instrumental Methods of Analysis*, Wadsworth Press, **7nd Ed.** (1988).
- [34] Aspinall G.O. (Ed.), *The polysaccharides*, Academic Press, **1** (1982) 172-184.

- [35] Parker S.F., *Spectroscopy Europe* **6(6)** (1994) 14-20.
- [36] Haug A. & Larsen B., *Acta Chemica Scandinavica* **16** (1962) 1908-1918.
- [37] Grasdalen H., Larsen B., Smidsrød O., *Carbohydrate Research* **68** (1979) 23-31.
- [38] Kawarada H., Hirai A., Odani H., Lida T., Nakajima A., *Polymer Bulletin* **24** (1990) 551-557.
- [39] Penman A. & Sanderson G.R., *Carbohydrate Research* **25** (1972) 273-282.
- [40] Grasdalen H., Larsen B., Smidsrød O., *Carbohydrate Research* **56** (1977) C11-C15.
- [41] Grasdalen H., Larsen B., Smidsrød O., *Carbohydrate Research* **89** (1981) 179-191.
- [42] Filippov M.P. & Kohn R., *Chem. Svesti* **28(6)** (1974) 817-819.
- [43] Mackie W., *Carbohydrate Research* **20** (1971) 413-415.
- [44] Sakugawa K., Ikeda A., Takemura A., & Ono H., *Journal of Applied Polymer Science* **93(3)** (2004) 1372-1377.
- [45] Stockton B., Evans L.V., Morris E.R., Rees D.A., *Int. 1. BioMacromol* **2**(1980a) 176-178.
- [46] Barne B.J. & Pecora R., *Dynamic Light Scattering*, Wiley, New York (1976).

- [47] Filipiuk D., Fuks L., Majdan M., *Journal of Molecular Structure* **744-747** (2005) 705-709.
- [48] Papageorgiou S.K., Kouvelos E.P., Favvas E.P., Sapalidis A.A., Romanos G.E., Katsaros F.K., *Carbohydrate Research* **345** (2010) 469-473.
- [49] Hecht A.M., Duplessix R., Geissler E., *Macromolecules* **18(11)** (1985) 2167–2173.
- [50] Liu R. & Oppermann W., *Macromolecules* **39(12)** (2006) 4159–4167.
- [51] Gentile G., F. Greco F., Larobina D., *Eur. Polym. J.* **49(12)** (2013) 3929–3936.
- [52] Larobina D. & Cipelletti L., *Soft Matter* **9** (2013) 10005-10015.
- [53] Kaloun S., Skouri R., Skouri M, Munch J.P., Schosseler F., *Physical Review E* **72** (2005) 011403.
- [54] Larobina D. & Greco F., *J. Chem. Phys.* **136(13)** (2012) 134904.