



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA
“TOR VERGATA”

FACOLTA' DI SCIENZE M.M.F.F.N.N.

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE CHIMICHE XXII CICLO

***Studio sulla struttura e sul comportamento dinamico di
idrogel polisaccaridici per la formulazione di nuovi
dispositivi biomedicali***

Dr. Ivana Finelli

A.A. 2009/2010

Tutor: Prof. Gaio Paradossi

Coordinatore: Prof. Bruno Crociani

INDICE

Capitolo 1	9
1.1 Introduzione	9
<i>Idrogel</i>	11
1.2 I sistemi	15
Hyadd4-G	16
XGE	24
1.3 Struttura del lavoro di tesi	29
<i>PARTE I: idrogel Hyadd4-G</i>	30
<i>PARTE II: idrogel XGE</i>	32
 Bibliografia	 34
 <u>PARTE I: Hyadd4-G</u>	 <u>36</u>
Capitolo 2	36
<i>Materiali e metodi</i>	36
2.1 Materiali	36
2.2 Metodi	37
<i>Hyadd4-G: procedura di sintesi</i>	37
Hyadd4p5	37
Hyadd4-G	39
<i>Scattering Dinamico della Luce (DLS)</i>	39
<i>Recupero di Fluorescenza dopo Photobleaching (FRAP)</i>	40
<i>Fluorescenza</i>	41
<i>Reologia</i>	42
<i>Scattering di neutroni</i>	43

NEAT	43
PAXE	45
IN13	46
<i>Bibliografia</i>	49
<i>Capitolo 3</i>	50
<hr/>	
<i>Dynamic Light Scattering (DLS)</i>	50
3.1 Strumentazione	51
3.2 Funzione di correlazione	52
3.3 Sistemi ergodici e non ergodici	54
3.4 Modello per le dinamiche di gel frattali	57
3.5 Risultati e discussione	60
<i>Hyadd4-G</i>	60
<i>Hyadd4-G con Tween 80</i>	71
<i>Hya</i>	73
<i>Bibliografia</i>	76
<i>Capitolo 4</i>	78
<hr/>	
<i>Microscopia Confocale</i>	78
4.1 Introduzione	78
4.2 Strumentazione	80
4.3 Fluorescence Recovery after Photobleaching (FRAP)	84
4.4 Risultati e discussione	89
<i>Hyadd4-G in presenza di destrano-FITC</i>	89
Sintesi e caratterizzazione	90
<i>Hyadd4-FITC</i>	98
Procedura di sintesi	98
FRAP su Hyadd4-FITC	99

FRAP su Hya-FITC	100
Bibliografia	102
Capitolo 5	104
<hr/>	
<i>Fluorescenza</i>	104
5.1 Risultati e discussione	104
<i>Hyadd4-G con Nile Red</i>	105
<i>Hya con Nile Red</i>	108
Bibliografia	110
Capitolo 6	111
<hr/>	
<i>Reologia</i>	111
6.1 Viscoelasticità lineare	111
<i>Analisi dinamica in regime oscillatorio</i>	115
<i>Analisi in regime transiente</i>	120
Risposta elastica ritardata (“creep”)	120
Rilassamento dello sforzo (“stress relaxation”)	124
6.2 Proprietà dei fluidi	125
6.3 Strumentazione	128
6.4 Viscoelasticità: modelli meccanici	133
<i>Modello di Maxwell</i>	133
<i>Modello di Voigt</i>	137
6.5 Viscoelasticità: a) misure in regime oscillatorio	139
<i>Scansione di deformazione e di sforzo (“strain e stress sweep”)</i>	140
Strain sweep	140
Stress sweep	141
<i>Evoluzione temporale (“time sweep”)</i>	142

Recupero di struttura (“structural recovery”)	144
<i>Scansione in frequenza (“frequency sweep”)</i>	148
Hyadd4-G	148
Hya	155
6.6 Viscoelasticità: b) misure in regime di flusso	156
<i>Flusso in stato stazionario (“steady state flow”)</i>	157
Hyadd4-G	157
Hya	161
<i>Viscosità dei fluidi polimerici</i>	162
<i>Confronto con i modelli teorici</i>	166
6.7 Viscoelasticità: c) misure in regime transiente	173
<i>Risposta elastica ritardata (“creep-recovery”)</i>	173
<i>Rilassamento dello sforzo (“stress-relaxation”)</i>	178
<i>Bibliografia</i>	181
<i>Capitolo 7</i>	183
<hr/>	
<i>Scattering di neutroni</i>	183
7.1 Interazione con la materia	187
7.2 QENS	192
<i>Modello di $S(Q, \omega)$ in sistemi confinati ad alta idratazione</i>	197
<i>Dipendenza di Γ da Q: modello della diffusione a salti</i>	199
<i>Risultati e discussione</i>	201
NEAT	201
7.3 Scattering elastico	206
<i>Risultati e discussione</i>	206
7.4 SANS	212
<i>Risultati e discussione</i>	212
Hyadd4-G	212
Hya	218
<i>Bibliografia</i>	221

PARTE II: idrogel XGE **223**

Capitolo 8 **223**

<i>Materiali e metodi</i>	223
8.1 Materiali	223
8.2 Metodi	224
<i>Idrogel XGE: procedura di sintesi</i>	224
<i>Reologia</i>	225
<i>Studi di vitalità cellulare</i>	226
Saggio di vitalità “Live-Dead”	227
<i>Scattering di neutroni</i>	228
IN13	228
<i>Bibliografia</i>	230

Capitolo 9 **231**

<i>Proprietà elastiche e di rigonfiamento (“swelling”)</i>	231
9.1 Risultati e discussione	232
<i>Cinetica di reticolazione</i>	232
<i>Rigonfiamento</i>	234
<i>Proprietà elastiche</i>	238
<i>Studi di vitalità cellulare</i>	245
<i>Bibliografia</i>	248

Capitolo 10 **250**

<i>Scattering di neutroni</i>	250
10.1 Risultati e discussione	250

<i>Bibliografia</i>	257
<u><i>Conclusioni</i></u>	<u>258</u>
<i>Ringraziamenti</i>	263
<u><i>Appendice A</i></u>	<u>264</u>
<i>Valori delle grandezze più utilizzate nella tesi e fattori di conversione</i>	264
<u><i>Appendice B</i></u>	<u>266</u>
<i>Lavori e contributi a congressi</i>	266
<i>Scuole e corsi di perfezionamento</i>	267

CAPITOLO 1

1.1 Introduzione

Il lavoro descritto in questa tesi s'inquadra nel progetto ministeriale "*Giovani Ricercatori*", tematica "*Nuove applicazioni dell'industria biomedicale*".

Con il termine "*biomateriale*" si definisce un materiale bioattivo concepito per interfacciarsi con sistemi biologici allo scopo di guidare la crescita cellulare o sostituire un qualsiasi tessuto, fluido o organo mimandone la funzione naturale. La medicina e la chirurgia fanno ricorso, in maniera crescente, a materiali estranei all'organismo al fine di porre rimedio, in via provvisoria o definitiva, al deficit di una funzione fisiologica. Tali materiali, denominati *biomateriali* proprio per la loro capacità di sostituire parzialmente o completamente le funzioni di un organismo vivente, devono possedere il requisito fondamentale della biocompatibilità, vale a dire non devono interagire in maniera dannosa con l'organismo. Naturalmente i biomateriali vengono usati non solo come dispositivi destinati ad essere impiantati nel corpo umano, ma anche come materiali che hanno un contatto extracorporeo con i tessuti oppure col sangue. In questa classificazione vengono compresi anche i sistemi che consentono un rilascio controllato dei

farmaci. Un'importante applicazione in questo contesto riguarda l'utilizzo di micro/nano dispositivi farmaceutici come veicolatori di farmaci per terapie geniche, sviluppando la loro multifunzionalità diagnostica (imaging molecolare) e terapeutica.

A monte di queste considerazioni ogni biomateriale deve sottostare a stringenti test riguardanti le interazioni con il tessuto o con materiale cellulare che possono dar luogo a processi degradativi nei materiali ed a reazioni di intolleranza o rigetto nell'organismo. Due sono le caratteristiche principali che vanno considerate nella valutazione della biocompatibilità di un materiale:

- la resistenza del materiale ai processi di degradazione,
- gli effetti che i prodotti di tali processi hanno sui tessuti.

La biocompatibilità di un materiale non va intesa comunque solo in riferimento alla sua sicurezza biologica, ma è strettamente legata anche alle caratteristiche chimico-fisiche ed alle proprietà meccaniche del materiale e deve pertanto essere validata dalla progettazione fino alla produzione del biomateriale.

Alcuni materiali polimerici presentano numerosi vantaggi rispetto ad altre classi di materiali in quanto risultano avere una maggiore biocompatibilità, la possibilità di essere modificati ampiamente nella loro struttura e nelle proprietà fisico-meccaniche, sono facilmente lavorabili anche in forme e strutture complesse, è possibile modificarne chimicamente o fisicamente la

superficie, possono formare idrogel e simulare la matrice extracellulare permettendo l'immobilizzazione di cellule o biomolecole al loro interno o sulla superficie. Possono essere ricordati in questo contesto materiali ibridi costituiti da polimeri di origine naturale e sintetica che consentono di realizzare strutture dalle proprietà modulabili in funzione della specifica applicazione.

Idrogel

In generale un gel è considerato un sistema monofasico a multicomponenti (almeno due: il mezzo disperdente e il soluto). In questa classe occupano un posto di tutto rilievo gli idrogel, sistemi in cui il mezzo disperdente è l'acqua e il soluto è un reticolo tridimensionale costituito da polimeri idrofilici o anfifilici. Questi sistemi polimerici utilizzati come base per la progettazione di biomateriali hanno caratteristiche proprie dei sistemi complessi.

L'uso di idrogel basati su polisaccaridi, grazie all'alta biodegradabilità di questi biopolimeri, alla possibilità di controllare la morfologia dei pori della loro matrice e alla loro capacità di coordinare e interagire con l'acqua, è sempre più considerato per applicazioni che vanno dal rilascio controllato di farmaci all'ingegneria tissutale.

Possiamo individuare diverse proprietà che caratterizzano i sistemi trattati in questa tesi come "sistemi complessi".

I processi non reattivo che avvengono sugli idrogel si sviluppano su tempi scala che coprono diverse decadi. I processi diffusivi dell'acqua associata alle matrici polimeriche si estende su scale dal pico-, fino al nanosecondo, mentre i moti segmentali delle catene macromolecolari costituenti il reticolo si realizzano sulla scala di qualche millisecondo. Su scale di tempi ancora più lunghi (qualche ora o giorni), se il gel è di tipo fisico, avvengono le traslazioni di macromolecole. Per tali gel spesso si parla di dinamica "arrestata".

Alla gerarchia temporale è correlata una gerarchia di tipo spaziale.

Gli idrogel sono caratterizzati da maglie reticolari con dimensioni medie che possono variare da qualche decina o centinaia di nanometri fino a qualche micron, mentre le dimensioni globali di un gel monolitico possono essere macroscopiche. Le caratteristiche spazio-temporali di questi sistemi pongono nuove problematiche riguardanti gli approcci sperimentali da utilizzare per il loro studio sperimentale. Lo scattering di radiazione a diversa lunghezza d'onda risolta in tempo è un utile strumento per l'indagine dinamico-strutturale già utilizzata su fasi gel [1-4].

Il fattore di struttura dinamico, $S(Q, t)$, ricavabile dalla radiazione diffusa nel visibile, è descritto in termini di valori di vettore di scattering

$$Q = \frac{4\pi}{\lambda} \cdot \sin\left(\frac{\theta}{2}\right),$$

avente le dimensioni di un inverso della distanza, e

permette l'esplorazione di distanze tra qualche nanometro a qualche centinaio di nm. Queste sono le dimensioni tipiche della struttura reticolare della fase gel, che può essere quindi esplorata con tecniche di autocorrelazione dello scattering della luce diffusa per la determinazione

delle dimensioni medie e dei moti di rilassamento, aventi tempi caratteristici da qualche microsecondo a qualche secondo accessibili con le attuali schede di correlazione in un intervallo temporale. In questo range dinamico cadono la maggior parte dei processi molecolari di rilassamento del reticolo.

Gli spettri meccanici danno informazioni su processi che avvengono con tempi scala molto più lunghi e che riguardano la risposta elastica e viscosa della struttura macroscopica del gel. Con la reologia è anche possibile stimare i tempi di recupero di struttura della fase gel dopo shock meccanico. Con quest'ultimo aspetto si entra in una delle proprietà più interessanti del gel come sistema complesso: la possibilità di auto-assemblaggio e di organizzazione gerarchica delle strutture a partire da elementi semplici (la catena polimerica) fino ad una struttura macroscopica con vario grado di complessità. L'auto-assemblaggio di fasi gel è un aspetto molto importante quando tali sistemi vengono utilizzati per applicazioni biomediche.

Il ruolo dell'acqua in questi materiali è fondamentale per il mantenimento dell'integrità conformazionale e dell'attività delle specie macromolecolari costituenti il farmaco genico o per la corretta proliferazione cellulare durante la crescita tissutale. Le modalità d'interazione dei polisaccaridi con l'acqua sono complesse e modulano le proprietà conformazionali delle catene polimeriche al punto che si parla dell'acqua come agente plasticizzante per le catene polisaccaridiche del reticolo. Queste considerazioni valgono sia per idrogel di tipo fisico, in cui l'organizzazione reticolare è realizzata mediante interazione non covalente delle catene (ponti a idrogeno, interazioni di Van der Waals, interazioni ioniche e dipolari), sia per idrogel di tipo chimico, in cui i punti di giunzione reticolare sono di natura covalente.

Gli idrogel chimici possono essere sintetizzati utilizzando degli agenti reticolanti che creano dei ponti tra le catene polisaccaridiche conferendo al sistema una resistenza termica impossibile da ottenersi con i gel fisici.

In particolare la ricerca si sta indirizzando verso sistemi polisaccaridici con caratteristiche tali da permettere il trasporto e il rilascio di farmaci ad alto peso molecolare come proteine, sequenze geniche e peptidi farmacologicamente attivi. Generalmente il materiale utilizzato per queste piattaforme è un sistema a multicomponenti costituito da una soluzione acquosa con soluti a basso peso molecolare e da una parte polimerica che impartisce differenti funzionalità e proprietà alla matrice.

La formulazione e la caratterizzazione di tali dispositivi rappresenta una delle tematiche principali dell'attuale ricerca sulla materia condensata "soffice", *soft matter*, un dominio dove fisica, chimica e biologia si sovrappongono con lo scopo di raggiungere una descrizione integrata di questi materiali.

Per la comprensione del comportamento del gel fisico e chimico vanno presi in considerazione fattori come la lunghezza di catena dei polisaccaridi, l'organizzazione strutturale delle catene, il ruolo dell'acqua nell'interazione e nella costituzione di zone di giunzione a struttura ordinata responsabili della formazione del gel. Tra gli svantaggi principali che un biomateriale può presentare bisogna annoverare le scarse proprietà meccaniche.

Avere informazioni sul comportamento viscoelastico del materiale può essere di fondamentale importanza per la progettazione e l'ingegnerizzazione di dispositivi per applicazioni biomediche. La comprensione delle relazioni esistenti tra struttura, proprietà e funzione dei tessuti naturali costituisce una sfida per la moderna scienza dei materiali in quanto è fondamentale per

la progettazione e la realizzazione di biomateriali in grado di sostituire o riparare tali tessuti, nonché per mettere a punto ed ottimizzare trattamenti terapeutici per la cura di patologie. Le competenze di base sulle proprietà chimico-fisiche, meccaniche, reologiche e di trasporto di materiali polimerici sono sinergicamente utilizzate per correlare tali proprietà alla struttura dei tessuti naturali ai diversi livelli di organizzazione.

L'obiettivo, quindi, è quello di progettare ed ingegnerizzare biomateriali in grado di mimare le funzioni delle strutture naturali e di interagire positivamente con le cellule favorendone la crescita e/o preservandone la funzione. Solo avvalendosi delle conoscenze sulle proprietà chimico-fisiche, meccaniche, reologiche di tali materiali si possono realizzare sistemi in grado di sostituire o riparare tessuti soffici, tessuti duri, o di visco-supplementare fluidi biologici e di progettare dispositivi in grado di favorire la ricrescita cellulare (scaffolds per rigenerazione tissutale) nonché di supportare il rilascio di farmaci controllato.

1.2 I sistemi

Partendo da queste considerazioni, è nato e si è sviluppato questo lavoro di Dottorato riguardante due diversi sistemi: Hyadd4-G, un idrogel fisico a base di acido ialuronico modificato, e XGE, un idrogel chimico basato su due polisaccaridi, lo xantano e il glucomannano, noti per dare gel sinergici.

Hyadd4-G

L'idrogel Hyadd4-G è un sistema a base di acido ialuronico modificato, di interesse per l'industria biomedicale. È utile accennare brevemente alla scoperta dell'acido ialuronico e alle caratteristiche chimico-strutturali di questo polisaccaride. La storia della ricerca dell'acido ialuronico, che in questo lavoro indicheremo come Hya, può essere paragonata all'immagine di un albero in cui ogni ramoscello cresce a partire da un ramo preesistente nato dalle esperienze accumulate nel tempo (**Figura 1**).

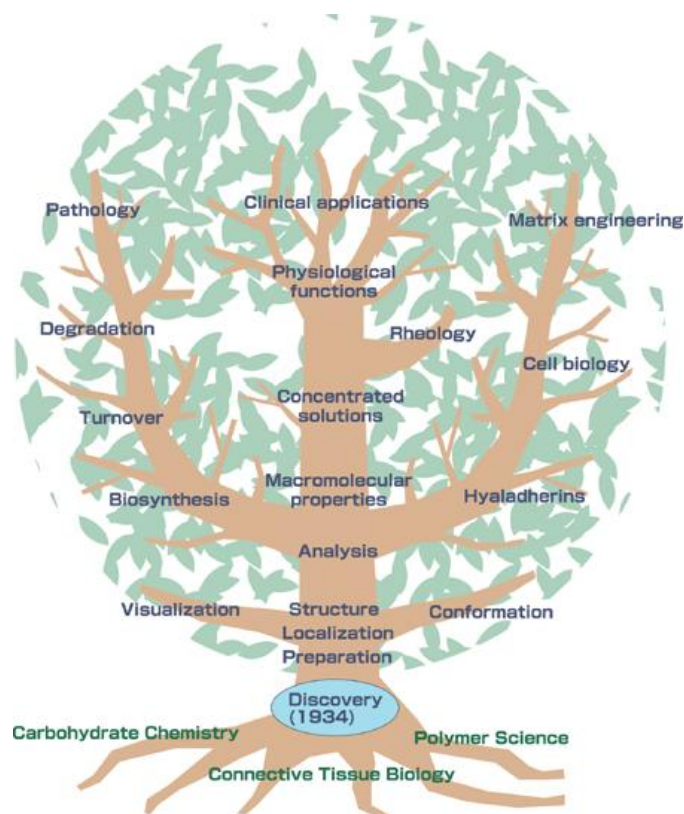


Figura 1: albero della ricerca dell'acido ialuronico.

Le radici di questo albero sono ancorate principalmente alla chimica dei carboidrati, alla biologia dei tessuti connettivi e alla scienza dei polimeri.

I carboidrati erano noti fin dalla fine dell'800 e già alcuni anni più tardi cominciarono le prime estrazioni di polisaccaridi da tessuti connettivi.

Il termine "acido ialuronico" risale al 1934 quando Karl Meyer e John Palmer, della Columbia University, descrissero un nuovo polisaccaride isolato dall'umor vitreo bovino contenente acidi uronici, pertanto coniarono il termine "hyaluronic acid" da *hyaloid* (vitreo) e *uronic acid*.

Inizialmente isolato come acido, in condizioni fisiologiche è presente come sale sodico. Bisognerà attendere il 1950 per conoscere esattamente la struttura di questo polisaccaride, quando Karl Meyer e i suoi collaboratori isolarono degli oligosaccaridi, ottenuti per attacco enzimatico all'acido ialuronico mediante ialuronidasi, studiandone così la struttura nel dettaglio [5].

L'acido ialuronico chimicamente è definibile come una catena polisaccaridica lineare prodotta da migliaia di unità disaccaridiche legate mediante legame glucosidico β -(1→4) formate a loro volta da residui di acido glucuronico e N-acetilglucosammina, concatenati attraverso legami β -(1→3) (**Figura 2**).

Il pK dei gruppi carbossilici dei residui di acido glucuronico è 3-4, quindi a pH 7 le molecole di acido ialuronico tendono ad associare controioni per stabilizzare la carica [6].

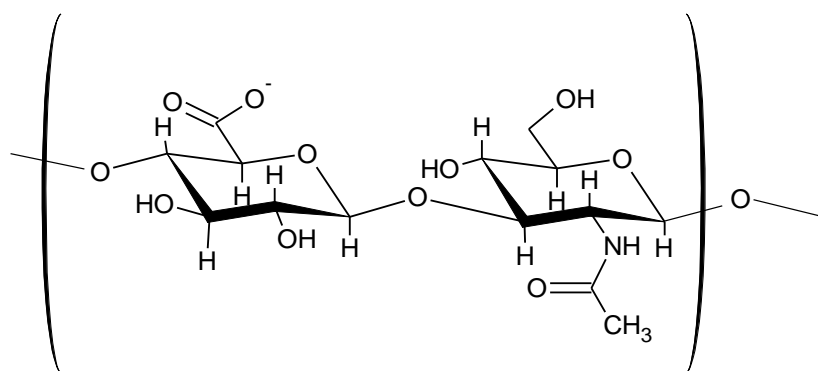


Figura 2: struttura dell'unità disaccaridica dell'acido ialuronico.

L'acido ialuronico è un polisaccaride con proprietà meccaniche e viscoelastiche fondamentali per il normale funzionamento delle giunzioni osteoarticolari ed è comunemente utilizzato nel trattamento di infiammazioni e malattie degenerative articolari che comportano una sua degradazione e di conseguenza una diminuzione della viscosità del liquido sinoviale all'interno delle giunture. In questi casi il trattamento medico è finalizzato a sostituire localmente i fluidi sinoviali che riempiono le giunzioni osteoarticolari [7].

Iniezioni di acido ialuronico sono utilizzate in chirurgia e dermatologia estetica per eliminare rughe e prevenire l'invecchiamento della pelle. In chirurgia otologica viene utilizzato come rigenerante di membrane timpaniche forate. In chirurgia oftalmica è utilizzato come principale costituente nella produzione di lacrime artificiali e inoltre in interventi sul corpo vitreo dell'occhio. In artrologia viene utilizzato come lubrificante antiflogistico e preservante del liquido sinoviale delle articolazioni.

In condizioni fisiologiche tutti i gruppi carbossilici dell'acido glucuronico sono completamente ionizzati conferendo alla molecola di acido ialuronico

un'elevata polarità e, di conseguenza, un'elevata solubilità in acqua. Grazie a questa sua proprietà l'acido ialuronico è in grado di coordinare molte molecole di acqua raggiungendo un elevato grado di idratazione.

Nella matrice amorfa di un tessuto connettivo e in generale nella matrice extracellulare (ECM), l'acido ialuronico si occupa quindi di mantenerne il grado di idratazione, la turgidità, la plasticità e la viscosità incamerando un notevole numero di molecole d'acqua. È anche in grado di agire come ammortizzatore di shock meccanici nonché come efficiente lubrificante (ad es. nel liquido sinoviale) prevenendo il danneggiamento delle cellule del tessuto da stress fisici.

L'alto peso molecolare dell'acido ialuronico insieme al suo alto grado di idratazione permette a più catene di organizzarsi a formare una struttura dinamica di tipo reticolare (**Figura 3**) con due funzioni principali nelle concentrazioni fisiologiche (3 mg/ml):

- creare un'impalcatura molecolare con architettura interna nanoscopica per mantenere la forma ed il tono del tessuto,
- funzionare come *filtro* contro la diffusione libera nel tessuto di particolari sostanze, batteri, agenti infettanti.

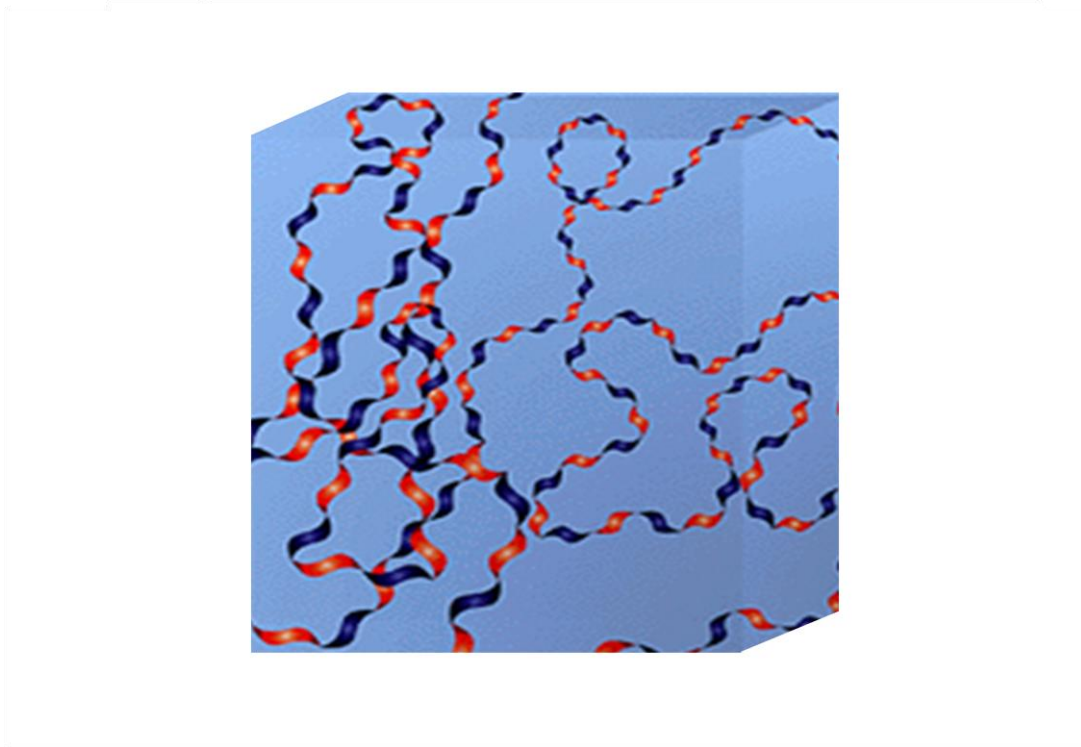


Figura 3: “nastro” di acido ialuronico in una struttura reticolare tridimensionale.

Solamente le sostanze con peso molecolare abbastanza basso da poter passare attraverso le “maglie” di questo reticolo potranno diffondere liberamente nel tessuto; tutte le molecole e metaboliti, come anche batteri o virus, con dimensioni maggiori (qualche micron) saranno trattenuti nelle maglie del reticolo. Tuttavia bisogna notare che molti batteri sono dotati di ialuronidasi, enzima in grado di idrolizzare i legami β -(1→4) dell’acido ialuronico, permettendo loro di aprirsi un varco nella struttura 3D del polisaccaride.

Fra le principali proprietà dell’acido ialuronico (o della sua forma salificata, *ialuronato*) si ha la capacità di aumentare notevolmente la viscosità delle soluzioni in cui è presente anche a concentrazioni dello 0.1%.

Le proprietà viscoelastiche di tali sistemi dipendono dalla concentrazione, dal peso molecolare delle catene polimeriche in soluzione e dalla loro organizzazione spaziale. Processi di associazione reversibili possono dar luogo a diversi comportamenti sotto sollecitazioni esterne (**Figura 4**):

- piccoli flussi di lunga durata attraverso il reticolo possono parzialmente separare e allineare le molecole e di conseguenza il sistema mostra proprietà viscosive,
- alti flussi di durata minore mettono in risalto le proprietà elastiche del sistema e il reticolo conserva le sue caratteristiche [8].

Sono state sviluppate procedure per introdurre punti di reticolazione chimici nelle matrici ialuroniche in modo da creare network stabili e materiali con le proprietà viscoelastiche volute. La modifica chimica dell'acido ialuronico è stata usata in medicina come componente principale di impalcature polimeriche per l'ingegneria tissutale e come materiale utilizzabile per il rilascio di farmaci.

Nel caso studiato in questa tesi si è scelta una strategia diversa: le modifiche chimiche introdotte nell'acido ialuronico servono alla costituzione di un idrogel di tipo fisico, in cui sono presenti punti di reticolazione permanenti.

Come mostrato in **Figura 5**, l'idrogel Hyadd4-G è un idrogel fisico limpido e trasparente che presenta caratteristiche di solido.

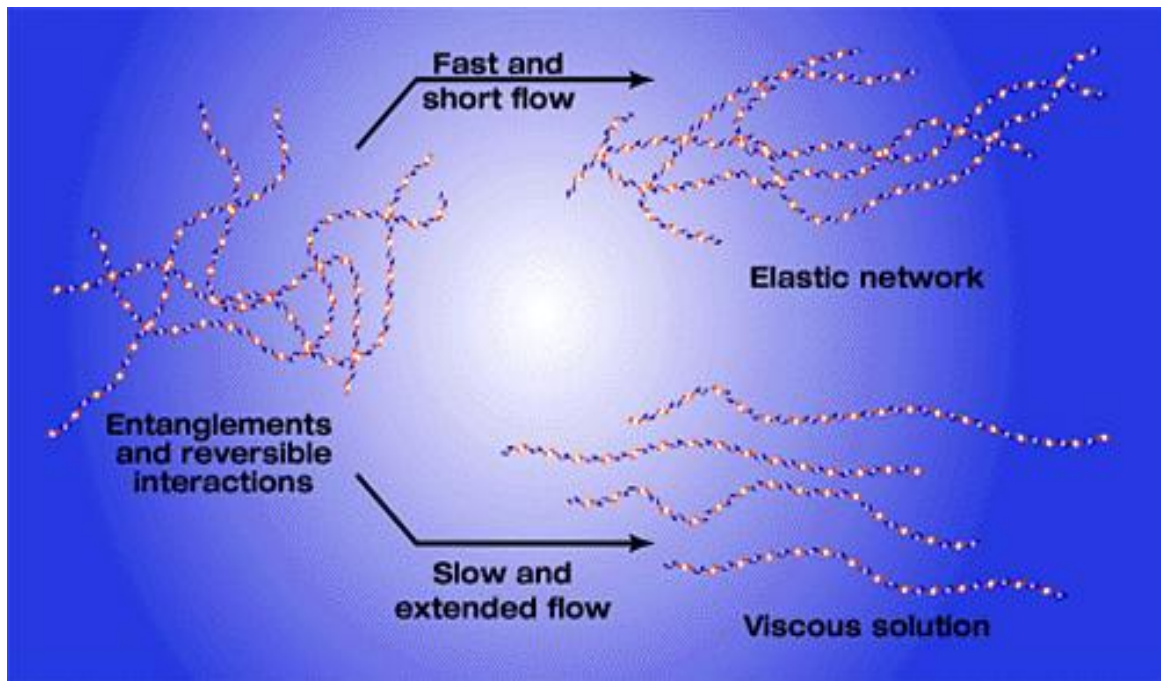


Figura 4: schema delle proprietà elastiche e viscosive di una soluzione di acido ialuronico.



Figura 5: idrogel Hyadd4-G.

In questo idrogel la modificazione consiste nell'introduzione di catene alifatiche idrofobiche C₁₆ sull'unità glucuronica del polisaccaride (**Figura 6**) con basso grado di sostituzione (~2% mol di sostituzione/mol di unità ripetitiva), prodotto in via sperimentale dall'industria *Fidia Farmaceutici S.p.A.*

Il risultato di questa sostituzione è un idrogel fisico iniettabile stabile anche a concentrazioni di polimero estremamente basse (0.3-0.8% w/w). In questi sistemi la quantità di soluzione salina è il 99.2-99.7% della massa totale.

Sono state recentemente sviluppate applicazioni basate su questa nuova biomacromolecola come sistema regolatore viscoelastico in patologie osteoarticolari [9]. Inoltre, grazie al basso grado di sostituzione, le caratteristiche chimico-fisiche e le modalità d'interazione con i tessuti dello Hyadd4-G non risultano modificate rispetto al corrispondente polimero non modificato, Hya.

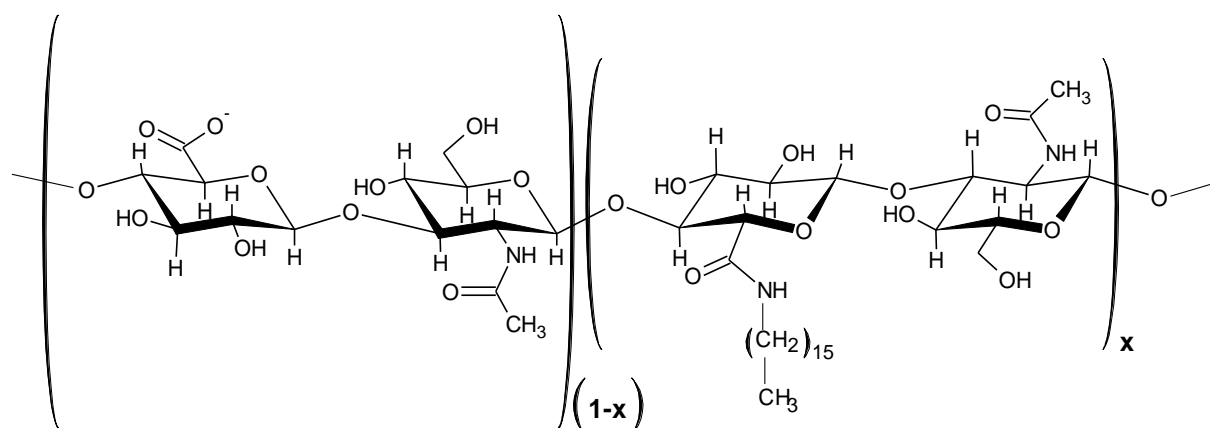


Figura 6: struttura dell'unità disaccaridica di Hyadd4-G.

La caratterizzazione strutturale e dinamica di questo sistema ha mostrato che la formazione del gel è dovuta alle interazioni idrofobiche tra le catene laterali alifatiche introdotte sulla catena polimerica principale, nonostante il basso grado di sostituzione.

XGE

L'idrogel chimico XGE è un sistema a base di due polisaccaridi, lo xantano e il glucomannano (KGM), legati da epiclorigidrina (ECH) (**Figura 7**).

Lo xantano e il glucomannano sono due polisaccaridi che separatamente in soluzione acquosa non danno luogo a fenomeni di gelazione; se essi, però, vengono mescolati insieme in determinate condizioni di concentrazione si ottengono gel fisici detti *sinergici*, in quanto per la loro formazione è necessaria la presenza di entrambi i polisaccaridi [**10-13**].

Tali idrogel sono biocompatibili e sono largamente usati nell'industria alimentare proprio per le proprietà sinergiche che essi sviluppano, dovute essenzialmente a interazioni specifiche tra le catene polisaccaridiche.

L'associazione di questi polisaccaridi è accoppiata con una variazione conformazionale ordine-disordine dello xantano. Il fenomeno è specifico per questa coppia di polisaccaridi, indicando che la formazione del gel fisico sinergico richiede specifiche interazioni e vincoli strutturali tali da stabilizzare tratti di catene polisaccaridiche ordinate. Un aumento di temperatura comporta la fusione di queste giunzioni ordinate con conseguente transizione di fase da gel a sol [**14, 15**].

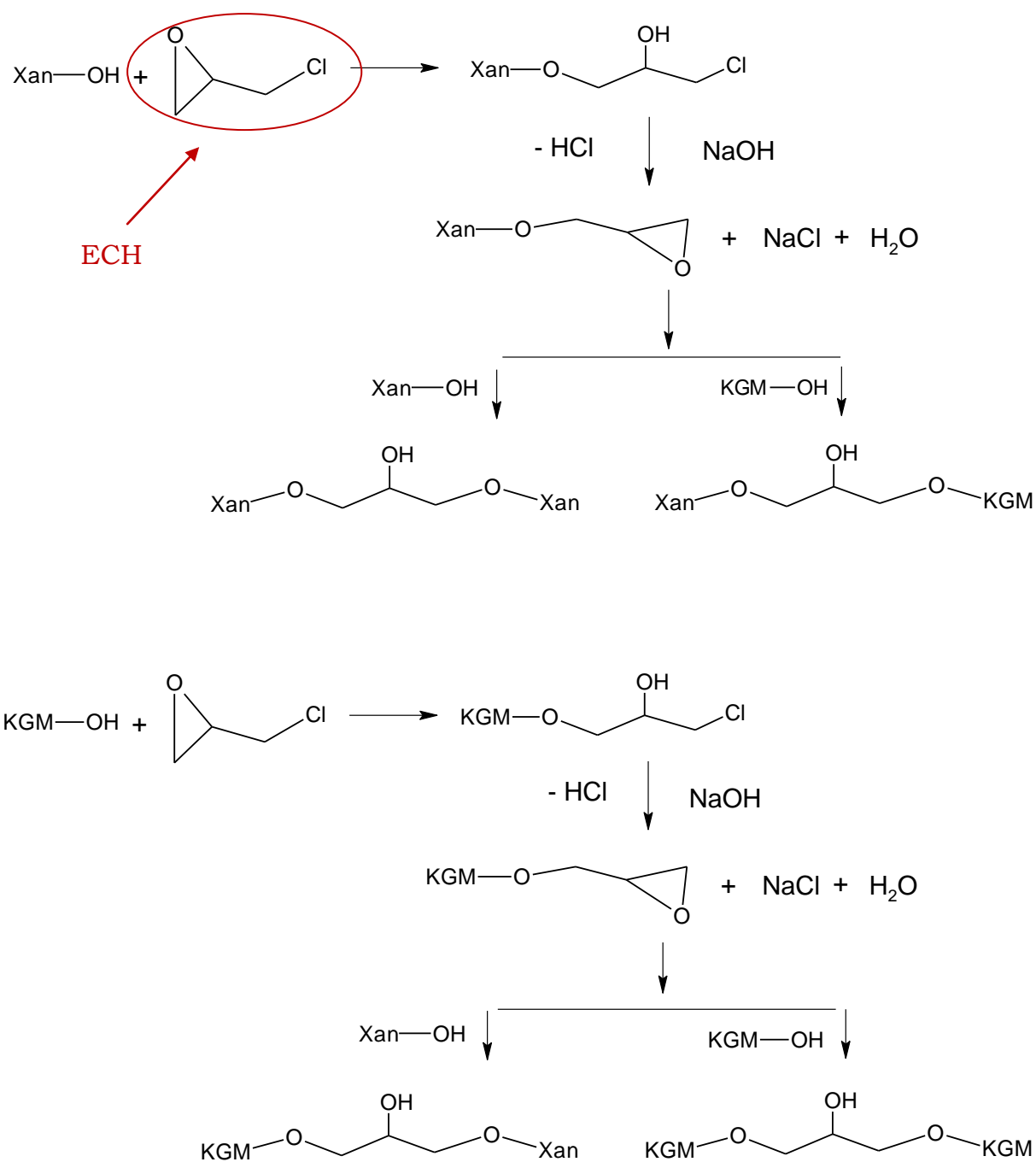


Figura 7: schema di cross-link con epicheloridrina.

In questa tesi si è estesa l'indagine al corrispondente gel chimico (**Figura 8**) in cui gli stessi componenti polisaccaridici vengono reticolati chimicamente con epicloridrina [**16-19**] in modo da ottenere un sistema con nuove proprietà quali la risposta al pH e alla forza ionica. Inoltre l'introduzione di punti di reticolazione chimica possono, in principio, fornire una risposta termoreversibile al sistema.

Gli idrogel presentano un reticolo tridimensionale costituito da catene polimeriche interconnesse da giunzioni che tengono insieme l'intera struttura. Tali strutture hanno la capacità di rigonfiarsi in acqua principalmente per effetto osmotico. Questa proprietà dipende sia dal tipo di polimero (flessibilità, eventuale carica sulla catena) che dal grado di reticolazione. La reticolazione può essere sia chimica, se le interazioni tra le zone di giunzione sono di natura covalente, sia fisica, con interazioni non covalenti come legami ionici, legami idrogeno o di Van der Waals.

Gli idrogel sono una classe di composti che trova sempre più applicazioni nelle industrie alimentari o farmaceutiche e nel campo biomedico. Gel fisici di polisaccaridi trovano applicazione in vasta scala come additivi alimentari o come addensanti. Anche i gel chimici presentano moltissime applicazioni, in particolare nel campo biomedico e farmaceutico, con la sintesi di materiali biocompatibili e in grado di rispondere selettivamente e in modo reversibile a stimoli esterni (come variazioni di pH, temperatura, forza ionica) variando le loro proprietà, come ad esempio il contenuto di acqua all'interno del reticolo. Molti idrogel chimici sono risultati efficaci per il rilascio controllato di farmaci.

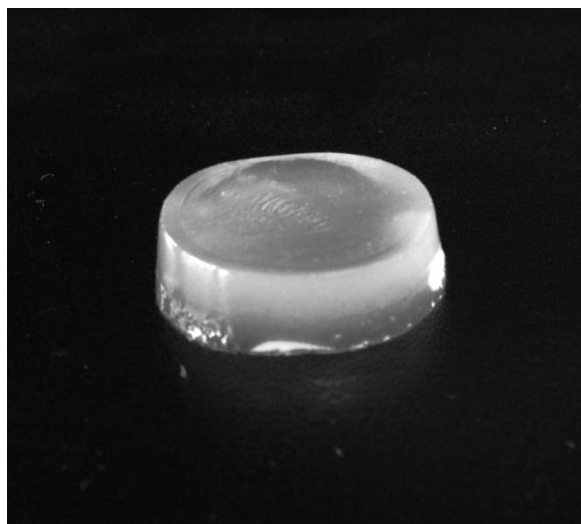


Figura 8: idrogel chimico XGE.

Lo *xantano* è un polisaccaride di origine microbica, ionico, la cui unità ripetitiva è costituita da una catena principale formata da unità glucosidiche concatenate attraverso legami β -(1 \rightarrow 4) (**Figura 9**).

Su ogni seconda unità in catena c'è una ramificazione trisaccaridica costituita da un acido glucuronico tra due unità mannosidiche. Inoltre possono essere presenti un gruppo acetilico sul primo residuo mannosidico e un gruppo piruvile sul secondo. La quantità di acetile e di piruvile presenti dipendono dalle condizioni di fermentazione della coltura batterica da cui si estrae il polisaccaride. A temperatura ambiente e in presenza di forza ionica (0.1M NaCl) lo xantano si presenta in una conformazione ordinata a doppia elica con una lunghezza di persistenza di circa 100 nm [20].

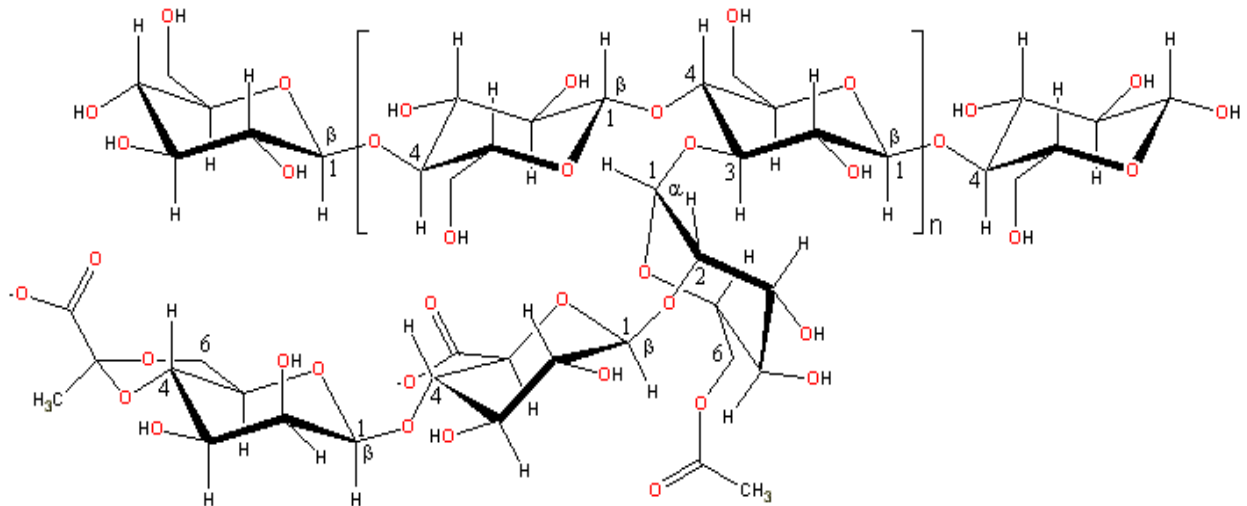


Figura 9: struttura dell'unità ripetitiva dello xantano.

Il *Konjac glucomannano*, *KGM*, (Konjac dal nome del tubero da cui si estrae) è un polisaccaride di natura vegetale con una unità ripetitiva costituita dal concatenamento statistico di unità glucosidiche e mannosidiche legate con legami β -(1 \rightarrow 4) (**Figura 10**). E' inoltre presente una quantità di ramificazione dell'ordine del 6% circa e anche in questo caso possono essere presenti sul campione gruppi acetilici.

Su questi sistemi sinergici sono stati introdotti dei cross-link chimici tra le catene polimeriche del sistema utilizzando un agente reticolante.

Le giunzioni presenti nel gel hanno un forte impatto sulle proprietà chimico-fisiche del sistema, primo fra tutti la capacità dei gel chimici di resistere anche ad alta temperatura, proprietà che non si riscontra nei gel fisici di xantano-KGM.

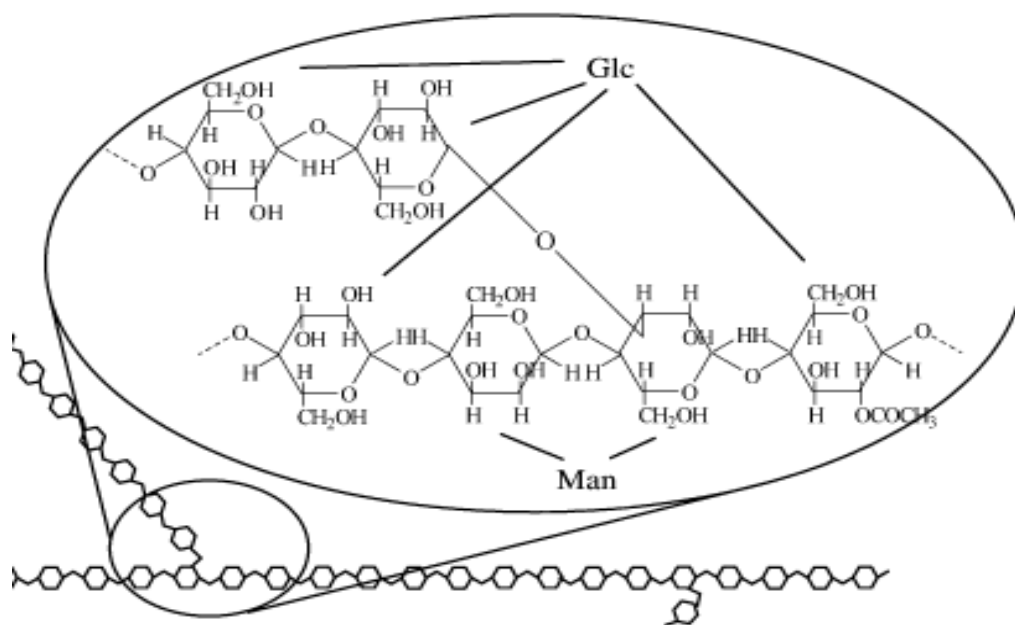


Figura 10: struttura del KGM.

1.3 Struttura del lavoro di tesi

Questo lavoro di tesi è sviluppato su due temi:

- lo studio di un idrogel fisico, l'idrogel Hyadd4-G,
- lo studio di un idrogel chimico, l'idrogel XGE.

PARTE I: idrogel Hyadd4-G

- La prima parte è dedicata a Hyadd4-G, un idrogel dall'aspetto trasparente senza eterogeneità macroscopiche.

Grazie a questa sua proprietà, è stato possibile caratterizzarlo mediante misure di scattering dinamico della luce (DLS).

Tali misure hanno permesso la valutazione delle dimensioni medie delle maglie del reticolo polimerico e del loro tempo caratteristico di rilassamento per diverse concentrazioni di polimero.

Misure di DLS sono state utilizzate anche per osservare il comportamento del reticolo polimerico in presenza del tensioattivo *Tween 80*, valutando la sua influenza sulla stabilità del gel stesso e per confrontare i risultati ottenuti sul gel con quelli ottenuti su analoghe soluzioni di polimero non modificato, Hya (**Capitolo 3**).

- Sono state, inoltre, condotte misure di recupero di fluorescenza dopo photobleaching (FRAP) che hanno permesso di valutare il coefficiente di diffusione di sonde fluorescenti di destrano-FITC a diversi pesi molecolari introdotte nei gel, in funzione della concentrazione di ialuronico modificato.

Tali misure hanno permesso la validazione delle dimensioni di maglia determinate attraverso le misure di scattering dinamico della luce.

Questa stessa tecnica è stata inoltre utilizzata per una stima della mobilità delle catene polimeriche nell'idrogel, legando chimicamente sulle catene di ialuronico molecole-sonda fluorescenti (**Capitolo 4**).

- Per studiare le fasi iniziali della formazione del gel (passaggio sol \leftrightarrow gel), stabilizzato da interazioni idrofobiche tra le catene laterali alifatiche, sono state condotte misure di fluorescenza in soluzione a concentrazioni inferiori alla concentrazione critica di formazione del gel (0.3% w/w), utilizzando un probe fluorescente specifico proprio per le zone idrofobiche, il *Nile Red* (**Capitolo 5**).
- Le proprietà reologiche dell'idrogel, la viscoelasticità, le proprietà meccaniche statiche, il comportamento a fatica, la resistenza allo scorrimento plastico e alla deformazione, le proprietà meccaniche dinamiche e la resistenza alla frattura sono caratteristiche rilevanti per la progettazione e lo studio di materiali visco-supplementanti. Con questo studio, infatti, si possono prevedere, ai fini pratici, il comportamento di un materiale sotto determinate condizioni di utilizzo, sia in regime statico che in regime oscillatorio (**Capitolo 6**).
- Si è, inoltre, condotto uno studio dinamico-strutturale mediante diffusione a basso angolo e diffusione quasielastica incoerente di neutroni, un approccio in grado di fornire informazioni sulla struttura e sulla dinamica del sistema in esame. Grazie alla scala spazio-temporale esplorata dai neutroni (dei ps e da 1 Å a qualche nm), questi risultati sperimentali possono essere comparati direttamente con simulazioni di dinamica molecolare portate avanti nel nostro laboratorio.

In particolare sono state condotte misure di scattering quasielastico di neutroni (QENS) condotte al *BENSC* (Berlin Neutron Scattering Center) di Berlino che hanno dato informazioni sulla dinamica dell'acqua all'interno della matrice polimerica.

All'*ILL* (Istituto Laue-Langevin) di Grenoble sono state condotte misure di scattering elastico di neutroni che hanno fornito informazioni sulle fluttuazioni strutturali della matrice polimerica.

Al fine di investigare a livello strutturale l'influenza della sostituzione presente sull'idrogel Hyadd4-G sono state condotte misure di scattering a basso angolo di neutroni (SANS) all'*LLB* (Laboratoire Leon Brillouin) di Saclay (Parigi) (**Capitolo 7**).

PARTE II: idrogel XGE

- La seconda parte è dedicata all'idrogel XGE nel quale lo xantano e il KGM vengono reticolati chimicamente in presenza di epicloridrina.

In particolare sono state seguite le cinetiche di reticolazione in presenza di diverse frazioni in peso di agente reticolante attraverso misure di reologia. Sono state inoltre seguite le cinetiche di rigonfiamento degli idrogel XGE a diversi gradi di reticolazione, osservando l'influenza del pH e della forza ionica su tali cinetiche, che rivela il comportamento polielettrolitico dello xantano, e valutate le proprietà elastiche di tali sistemi.

L'epicloridrina è spesso riconosciuta come tossica pertanto sono state condotti sui gel anche esperimenti di citotossicità (**Capitolo 9**).

- All'*ILL* (Istituto Laue-Langevin) di Grenoble sono state condotte misure di scattering elastico di neutroni che hanno fornito informazioni sulle fluttuazioni strutturali della matrice polimerica degli idrogel e in particolare sono state condotte misure su gel a diverso grado di reticolazione, confrontando i risultati ottenuti anche su idrogel fisici di xantano-KGM (**Capitolo 10**).

BIBLIOGRAFIA

- 1** J. G. H. Joosten, *Progress in Colloid & Polymer Science*, **1993**, Vol. 91, 149-152.
- 2** A.H. Krall, D.A. Weitz, *Phys. Rev. Lett.*, **1998**, 80, 778-781.
- 3** F. Bordi, G. Paradossi, C. Rinaldi, B. Ruzicka, *Physica A*, **2002**, 304, 119-128.
- 4** P. Barretta, F. Bordi, C. Rinaldi, G. Paradossi, *J. Phys. Chem. B*, **2000**, 104, 11019-11026.
- 5** <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA23/HA23E.html>
- 6** L. Lapčik, Jr. and L. Lapčik, S. De Smedt and J. Demeester, P. Chabreček, *Chem. Rev.* **1998**, Vol. 98, No. 9, 2663-2684.
- 7** M. E. Adams, M. H. Atkinson, A. J. Lussier, J. I. Schulz, K. A. Siminovitch, J. P. Wade, M. Zummer, *Osteoarthr. Cartilage*, **1995**, 3, 213-226.
- 8** <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html>
- 9** M. M. Smith, M. A. Cake, P. Ghosh, A. Schiavinato, R. A. Read and C. B. Little, *Rheumatology*, **2008**, 47, 1172-1178.
- 10** F. M. Goycoolea, R. K. Richardson, E. R. Morris, M. J. Gildey, *Macromolecules*, **1995**, 28, 8308-8320.

- 11** P. Annable, P. A. Williams, K. Nishinari, *Macromolecules*, **1994**, *27*, 4204-4211.
 - 12** G. Paradossi, E. Chiessi, A. Barbiroli, D. Fessas, *Biomacromolecules*, **2002**, *3*, 498-504.
 - 13** Montri Chaisawang, Manop Suphantharika, *Carbohydrate Polymers*, **2005**, *61*, 288-295.
 - 14** Paulo B. Fernandes, *Journal of Food Engineering*, **1995**, *24*, 269-283.
 - 15** Tania M. B. Bresolin, M. Milas, M. Rinaudo, Joana L. M. S. Ganter, *International Journal of Biological Macromolecules*, **1998**, *23*, 263-275.
 - 16** I. C. Alupeii, M. Popa, M. Hamcerencu, M.J.M. Abadie, *European Polymer Journal*, **2002**, *38*, 2313-2320.
 - 17** I. De Miguel, V. Rieumajou, D. Betbeder, *Carbohydrate Research*, **1999**, *319*, 17-23.
 - 18** Hatice Kaplan Can, Betul Kırıcı Denizli, Ali Güner, Zakir M.O. Rzaev, *Carbohydrate Polymers*, **2005**, *59*, 51-56.
 - 19** C. Chebli, L. Cartilier, *International Journal of Pharmaceutics*, **1998**, *171*, 101-110.
 - 20** G. Paradossi, D. A. Brant, *Macromolecules*, **1982**, *15*, 874-879.
-

PARTE I: Hyadd4-G

CAPITOLO 2

Materiali e metodi

2.1 Materiali

Il polimero *Hyadd4p5*, utilizzato per la sintesi dell'idrogel Hyadd4-G, e l'acido ialuronico (*Hyalectin* 700 kDa) fermentativo, utilizzato per le soluzioni di Hya, sono prodotti forniti dalla *Fidia Farmaceutici S.p.A.* (Italia).

Il *Tween 80* (poliossietilene sorbitan monooleato), le frazioni di *destrano-FITC* (fluoresceina isotiocianato-destrano) con peso molecolare di 500, 250 e 20

kDa con un grado di sostituzione da 0.003 a 0.02 mol di FITC/mol di glucosio e il *Nile Red* (9-dietilammino-5H-benzo[α]fenossazina-5-one) sono prodotti Sigma.

2.2 Metodi

Hyadd4-G: procedura di sintesi

Hyadd4p5

La sintesi del polimero Hyadd4p5, utilizzato per l'ottenimento dell'idrogel Hyadd4-G, è stata condotta negli stabilimenti della *Fidia Farmaceutici S.p.A.* (Abano Terme, Padova, Italia) [21].

1 g di HATBA (sale di tetrabuttilammonio dell'acido ialuronico) viene solubilizzato a temperatura ambiente in 100 ml di DMSO, quindi 30 ml di acido metansolfossido e 26 mg di 1,1' carbonildiimidazolo vengono aggiunti lentamente. La soluzione viene mantenuta a temperatura ambiente e sotto agitazione per 60 minuti. Successivamente vengono aggiunti 272 mg di esadecilamina e la reazione di amidazione è eseguita a 42 °C per 16 ore sotto agitazione. Si aggiunge una soluzione satura di NaCl (10 ml) e il

prodotto di reazione viene recuperato precipitandolo in 200 ml di etanolo e filtrando la soluzione. Il precipitato viene lavato diverse volte in una miscela di etanolo e acqua e infine seccato in stufa.

Attraverso HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) con rilevazione dell'indice di rifrazione (RI) si garantisce l'assenza di residui di ioni di tetrabuttilammonio, ricavando 600 mg di polimero con una resa del 60%.

La determinazione del grado di sostituzione ammidica è stata condotta con un'analisi HPLC/fluorimetria sul totale di esadecilammine (HPLC system Perkin Elmer series 200, detector Luminescent Spectr. LS30, colonna Versapack C18 10 μ 25 cm, fase mobile MeOH/H₂O 95/5, velocità di flusso 1.3 ml·min⁻¹) dopo idrolisi alcalina (NaOH 2M a 70 °C per 3 h sotto agitazione), neutralizzazione, estrazione con MeOH e derivatizzazione delle ammine con oftaldialdeide (OPA). Il campione di Hyadd4p5 è stato, quindi, sospeso in MeOH per 30 min per estrarre le ammine non legate. Il prodotto esadecilamina-OPA è stato quantificato usando il metodo HPLC/fluorimetria. Il detector fluorimetrico è predisposto su una lunghezza d'onda d'eccitazione di 330 nm e con lunghezza d'onda di emissione di 440 nm. Il grado di sostituzione del prodotto sintetizzato risulta di 2.4% (mol/mol di unità ripetitiva).

La struttura chimica di Hyadd4p5 è stata confermata attraverso spettroscopia (FT-IR) e spettroscopia NMR (2D).

Hyadd4-G

L'idrogel Hyadd4-G viene preparato sospendendo il polimero Hyadd4p5 in tampone PBS (pH 6.9) a concentrazioni comprese tra 0.3 e 0.8% (w/w). Per permettere la completa idratazione del polimero si lascia in agitazione per una notte e successivamente la sospensione idratata viene sottoposta ad un trattamento termico in autoclave a 120 °C per circa 15 minuti. In questo modo si ottiene un idrogel viscoso completamente limpido e trasparente, privo di disomogeneità macroscopiche [22].

La stessa procedura è stata utilizzata per la solubilizzazione dell'acido ialuronico (Hya) in tampone PBS.

Scattering Dinamico della Luce (DLS)

Le misure di DLS sono state condotte con un fotometro dotato di una sorgente laser a stato solido di 200 mW di potenza massima (Photop Suwtech Inc., Shanghai, China) con emissione a 532 nm e solitamente usato ad una potenza di output di 20 mW.

In questo strumento l'alloggiamento per la cella portacampione è montato su un piatto goniometrico BI-200SM (Brookhaven Instrument, USA), collegato ad un fotomoltiplicatore HC120 (Brookhaven Instrument, USA).

Il correlatore (BI-9000AT) e il software della Brookhaven Instrument (USA) vengono utilizzati con un array di 200 canali spazati logaritmicamente per la

raccolta e l'elaborazione dei dati. Inoltre, un termostato refrigerante (Julabo, F30-C) è usato per il controllo della temperatura da 25 a 60 °C.

La funzione di correlazione dei campioni è registrata ad angoli di scattering θ di 60, 90 e 120°. Il tempo di acquisizione per ogni misura è di 15 minuti.

Le quantità direttamente misurabili con questa tecnica sono l'intensità di scattering mediata nel tempo $\langle I(q) \rangle_T$ e quella mediata sull'insieme delle configurazioni $\langle I(q) \rangle_E$.

Quando la misura viene effettuata su un campione ponendo la cella in posizione fissa si ottiene la $\langle I(q) \rangle_T$. Per ottenere invece la $\langle I(q) \rangle_E$ la misura viene condotta facendo ruotare la cella contenente il campione con l'ausilio di una movimentazione eseguita ad una velocità angolare di 10 rpm ("metodo della forza bruta"). Esplorando diverse parti del gel, infatti, si esplorano diverse configurazioni del sistema ottenendo una media sull'intero spazio di configurazioni.

Recupero di Fluorescenza dopo Photobleaching (FRAP)

I gel utilizzati per le misure di Microscopia Confocale a Scansione Laser (CLSM) vengono preparati incorporando molecole di destrano-FITC con differenti pesi molecolari all'interno dei campioni. I probe di fluorescenza vengono aggiunti al termine del ciclo termico in autoclave condotto sui campioni al fine di permettere la formazione del gel, con una concentrazione finale di probe nel sistema di 0.08% (v/v).

Gli esperimenti di FRAP sono stati effettuati con un microscopio confocale a scansione laser, Nikon PCM 2000 (Nikon Instruments), equipaggiato con un laser He-Ne (543.5 nm) e un laser ad Ar (488 nm). L'obiettivo utilizzato per tutte le acquisizioni è un plan Apo (Nikon) 60x/1.4 oil.

Nella tecnica di FRAP viene registrata la diffusione laterale nel piano x-y della sonda fluorescente (destrano-FITC).

In questa tecnica un punto della zona focale viene “spento” (bleaching), utilizzando la sorgente laser, osservandone subito dopo il recupero di fluorescenza dovuto alla diffusione laterale delle molecole-sonda che, trovandosi nelle zone prossime all'area di bleaching, rimpiazzano le molecole “spente” fotochimicamente.

Fluorescenza

Le misure di fluorescenza in soluzione per Hyadd4-G sono condotte con l'ausilio di uno spettrofotometro RF-5301 PC (Shimadzu) con una lunghezza d'onda di eccitazione di 578 nm. Gli spettri di emissione vengono registrati tra 550 e 750 nm. Il probe di fluorescenza usato, il Nile Red, è stato aggiunto alle soluzioni dopo il ciclo termico in autoclave ad una concentrazione finale di 2 μ M e tutti gli esperimenti vengono condotti 90 min dopo l'aggiunta del fluoroforo, in modo da minimizzare la variazione di intensità di fluorescenza nel tempo dovuta allo “spegnimento” del Nile Red in soluzione acquosa.

Reologia

Le misure di reologia vengono condotte utilizzando un reometro AR 2000 Advanced (TA Instruments). Il regime di viscoelasticità lineare dei campioni in esame viene determinato preliminarmente attraverso misure in oscillazione di tipo “strain sweep” o “stress sweep” (scansioni di deformazione o di carico). Queste misure sono fondamentali per individuare gli intervalli di deformazione e di stress applicato in cui i campioni rispondono in modo lineare e sono preliminari ad ogni altra misura. Il modulo elastico e il modulo viscoso (G' e G'') degli idrogel di Hyadd4-G e delle corrispondenti soluzioni di Hya a concentrazioni comprese tra 0.3 e 0.8% (w/w) vengono registrati attraverso misure di tipo “time sweep” (scansioni nel tempo) che consentono di osservare il comportamento di tali moduli nel tempo. Tutte le misure vengono registrate alla frequenza di 1 Hz e ad una percentuale di deformazione o ad uno stress per cui è garantito il comportamento viscoelastico lineare. Per acquisire gli spettri meccanici dei campioni vengono condotte misure, sempre in oscillazione, di tipo “frequency sweep” (scansioni di frequenza) che permettono di osservare il comportamento elastico e/o viscoso dei campioni in funzione della frequenza. Misure in flusso stazionario, “steady state flow”, hanno permesso di determinare la viscosità di punto zero dei campioni e di poter osservare il loro comportamento all'aumentare della velocità di scorrimento, “shear rate”, o dello sforzo allo scorrimento, “shear stress”, applicati. Misure in regime transiente (recupero di deformazione, “creep-recovery”, e rilassamento dello stress, “stress-relaxation”) hanno permesso di ottenere gli spettri di risposta elastica

ritardata e di rilassamento dei campioni analizzati, sottoponendo i campioni a deformazioni o stress istantanei e costanti in un determinato intervallo di tempo. La geometria utilizzata per gli esperimenti di reologia è di tipo piatto-piatto (20 mm di diametro e 500 μm di gap) e i campioni vengono posti direttamente sul piatto fisso dello strumento, termostatato a 25 °C.

Scattering di neutroni

Misure di scattering di neutroni sono state condotte in diverse facilities europee.

NEAT

Sono state condotte misure di scattering quasielastico incoerente di neutroni (QENS) alla linea NEAT (***Figura 11***) del reattore BENSC presso l'Helmholtz Zentrum di Berlino. Tali misure hanno fornito informazioni sulla dinamica del solvente all'interno della matrice polimerica. NEAT è uno spettrometro a tempo di volo che lavora con neutroni freddi pulsati aventi una lunghezza d'onda incidente compresa fra $0.18 \leq \lambda_0 \text{ (nm)} \leq 1.9$. I neutroni prima di arrivare al campione attraversano una serie di choppers che ruotano ad una velocità di 20,000 rpm sincronizzati in modo da selezionare solo i neutroni di determinata energia. Per interazione con i nuclei del campione i neutroni diffusi vengono deviati, cambiando velocità. Tali neutroni sono rilevati da

una seconda parte dello spettrometro che si basa sulla misura del tempo di volo necessario ai neutroni diffusi per arrivare dai campioni ai detectors che si trovano ad una distanza di 2.5 m. Questo spettrometro secondario di NEAT (SD) contiene un array di 388 detectors a singolo conteggio a ^3He aventi un'area complessiva di 60 cm^2 per coprire un ampio angolo di scattering. La caratteristica di NEAT è un ulteriore detector bidimensionale (MD) a ^3He con un'area di 1 m^2 costituito da 64×64 elementi [23]. Gli angoli di scattering Φ sono compresi tra $13.35^\circ \leq \Phi \leq 136.65^\circ$.

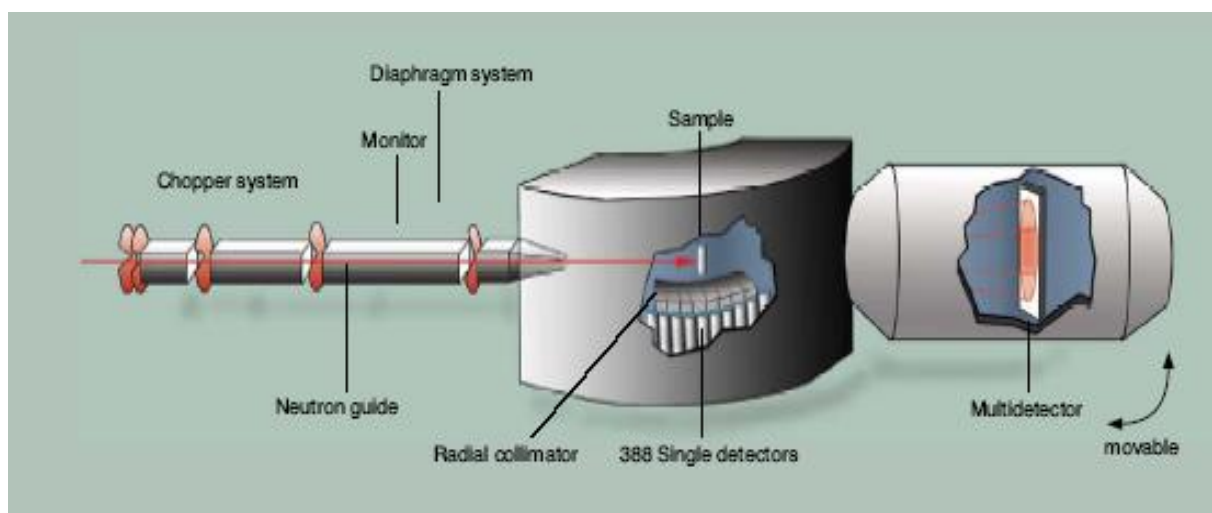


Figura 11: schema dello spettrofotometro NEAT.

NEAT ha una risoluzione in energia (FWHM) per SD nel range $6 \leq \Delta E (\mu\text{eV}) \leq 5,400$ e per MD nel range $2 \leq \Delta E (\mu\text{eV}) \leq 3,800$. Tale strumento ha uno spettro di applicazioni veramente ampio e permette di studiare fenomeni

dinamici direttamente in domini temporali di 10^{-13} - 10^{-9} s e a lunghezze d'onda su scala molecolare (0.5 \AA) fino alla nanoscala (50 nm).

PAXE

Con questo strumento si sono effettuate misure di scattering a basso angolo di neutroni (SANS) per avere informazioni strutturali sulla matrice polimerica. Lo strumento si trova sulla linea PAXE (**Figura 12**) del reattore ORPHEE all'LLB di Saclay (Parigi).

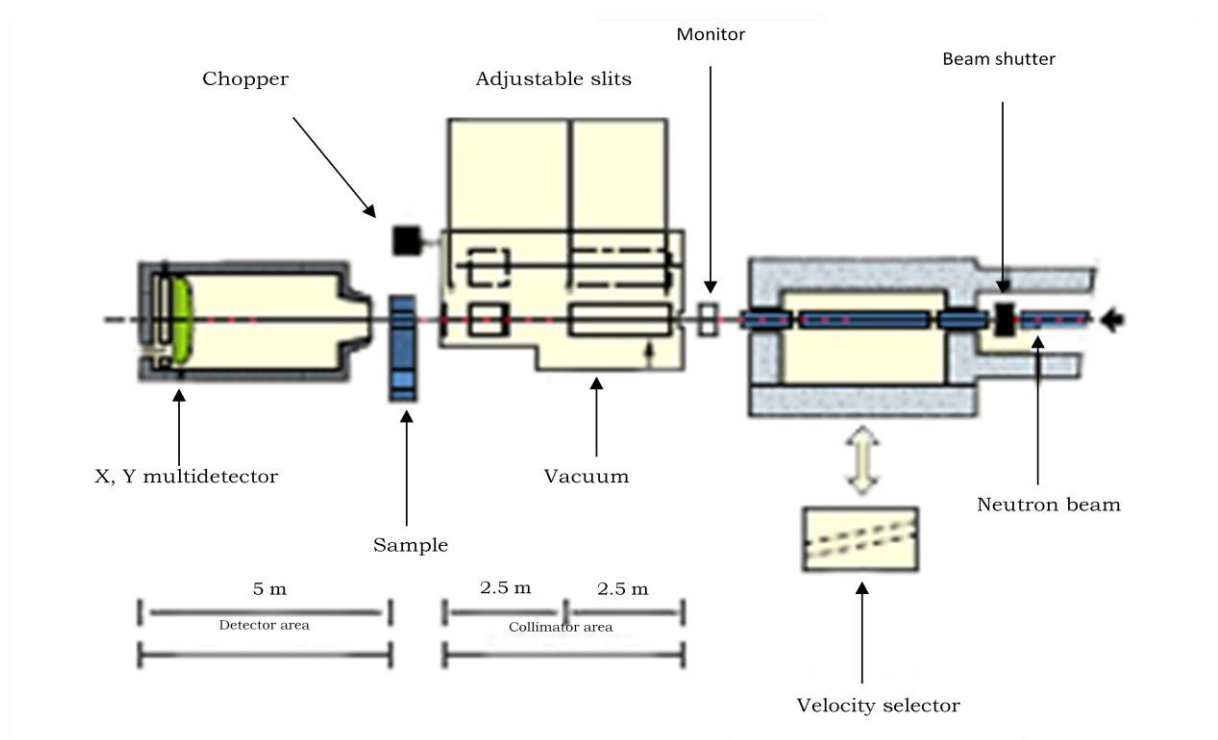


Figura 12: schema dello spettrofotometro PAXE.

Le misure possono essere condotte o utilizzando un fascio monocromatico di neutroni con un range $4 < \lambda \text{ (\AA)} < 25$, utilizzando dei selettori di velocità, con risoluzione di lunghezza d'onda $\Delta\lambda/\lambda$ che si può scegliere tra il 5 e il 15%, oppure con un fascio policromatico (metodo in tempo di volo, $1 \cdot 10^{-3} < Q \text{ (\AA}^{-1}) < 0.5$) usando un chopper. Il detector si trova in posizione x-y e contiene 64×64 celle di $1 \times 1 \text{ cm}^2$. La distanza tra il campione e il detector è compresa tra 0.8 e 5 m esplorando un range angolare tra $6 \cdot 10^{-3}$ e 0.8 rad [24].

IN13

Con questo strumento si sono condotte misure di scattering elastico di neutroni in funzione della temperatura. IN13 (**Figura 13**) è uno spettrometro in backscattering che utilizza neutroni termici (neutroni con energia inferiore a 0.1 eV). Grazie all'alta risoluzione (8 μeV) e alla possibilità di analizzare alti momenti trasferiti ($0.2 < Q \text{ (\AA}^{-1}) < 4.9$), IN13 risulta particolarmente utile per studiare la dinamica di processi molecolari, ad esempio fluttuazioni strutturali in sistemi organizzati [25].

L'energia dei neutroni incidenti viene selezionata facendo variare la temperatura di un monocromatore (CaF_2) ($-196 < T \text{ (}^\circ\text{C)} < 450$) posto ad un angolo fisso di Bragg, esplorando un range in energia $-125 \leq \Delta E \text{ (\mu eV)} \leq 300$. In alternativa si può fissare la temperatura e far variare l'angolo di Bragg del monocromatore. Un deflettore di grafite convoglia il fascio sul campione e l'energia dei neutroni diffusi viene analizzata da 7 analizzatori circolari che

coprono un largo angolo solido e altri 3 centrati attorno al fascio trasmesso che coprono la regione dei piccoli angoli ($0.2 < Q \text{ (\AA}^{-1}) < 0.8$).

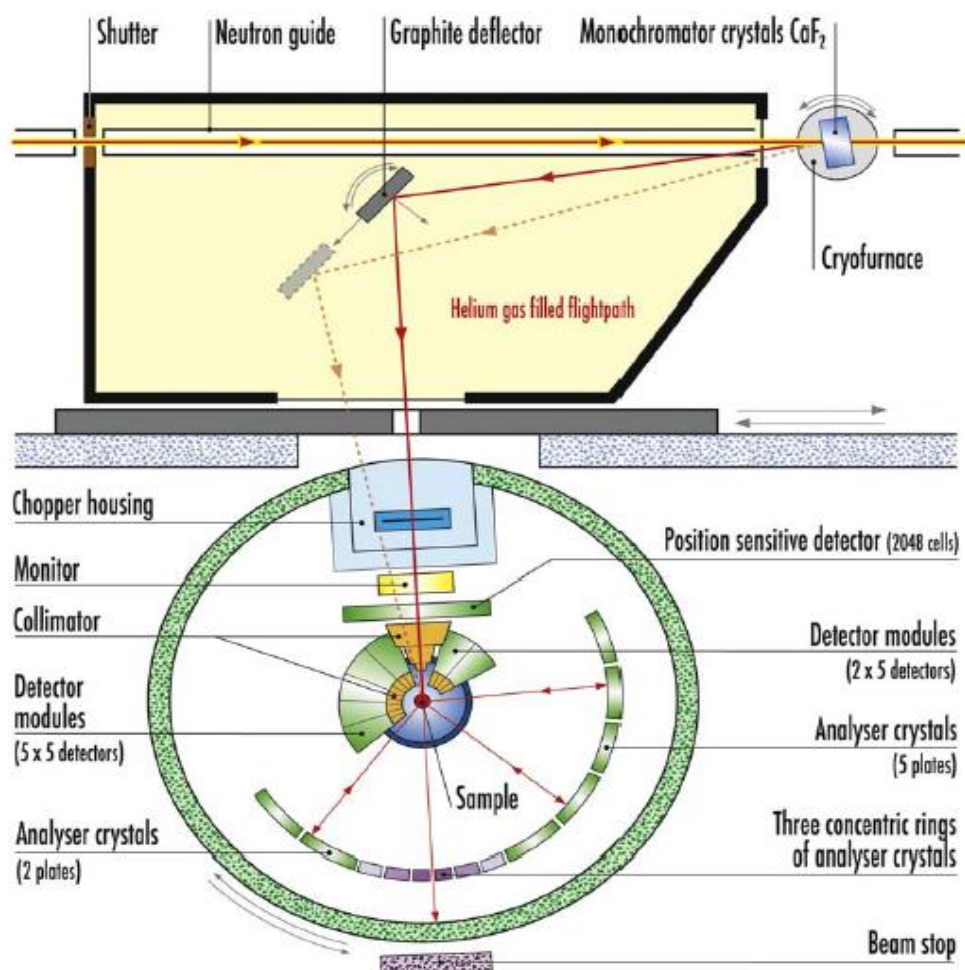


Figura 13: schema dello spettrofotometro IN13.

Il monocromatore e i cristalli analizzatori (CaF₂) sono orientati nel vicino backscattering in modo da ottenere una risoluzione in energia di pochi μeV .

Il conteggio dei neutroni viene effettuato da un multidetector cilindrico costituito da 35 tubi di ^3He e il range dei piccoli angoli è coperto da un PSD (position sensitive detector) costituito da 16 tubi di ^3He .

BIBLIOGRAFIA

- 21** US 0069884 A1, **2008**, Fidia Farmaceutici, S.p.A. invs.: A. Schiavinato, D. Bellini.
- 22** I. Finelli, E. Chiessi, D. Galesso, D. Renier, G. Paradossi, *Macromolecular Bioscience*, **2009**, 9, 646-653.
- 23** http://www.helmholtz-berlin.de/userservice/neutrons/instrumentation/neutron-instruments/v3/index_en.html
- 24** http://www-llb.cea.fr/en/fr-en/spectros_p.php
- 25** <http://www.ill.eu/instruments-support/instruments-groups/instruments/in13/>
-

CAPITOLO 3

Dynamic Light Scattering (DLS)

Le macromolecole in soluzione colpite da una luce laser di lunghezza d'onda λ diventano a loro volta centri di diffusione di radiazione con frequenze leggermente diverse da quella incidente in ragione della loro velocità di diffusione in soluzione (Effetto Doppler).

L'intensità del campo elettrico diffuso è una grandezza statisticamente fluttuante nel tempo.

Dall'analisi di tali fluttuazioni si possono ricavare importanti informazioni strutturali e dinamiche sulle particelle in soluzione.

Nel caso di sistemi colloidali molto concentrati e di idrogel, l'analisi dell'intensità di luce diffusa è effettuata in modo diverso, come verrà descritto in seguito.

3.1 Strumentazione

La sorgente laser monocromatica convoglia il fascio di luce su una cella contenente un liquido, utilizzato per limitare le riflessioni vetro-aria e per permettere il controllo della temperatura mediante un circuito di termostatazione esterna. La cella contiene la provetta col campione, collegata ad un motorino elettrico che permette di ruotare il campione durante la misura. Su un piatto goniometrico è montato un fotomoltiplicatore che misura i fotoni diffusi dal materiale. Il fotomoltiplicatore a conteggio singolo di fotoni può essere posizionato a diversi angoli θ ed è collegato ad un correlatore che costruisce la funzione di correlazione temporale.

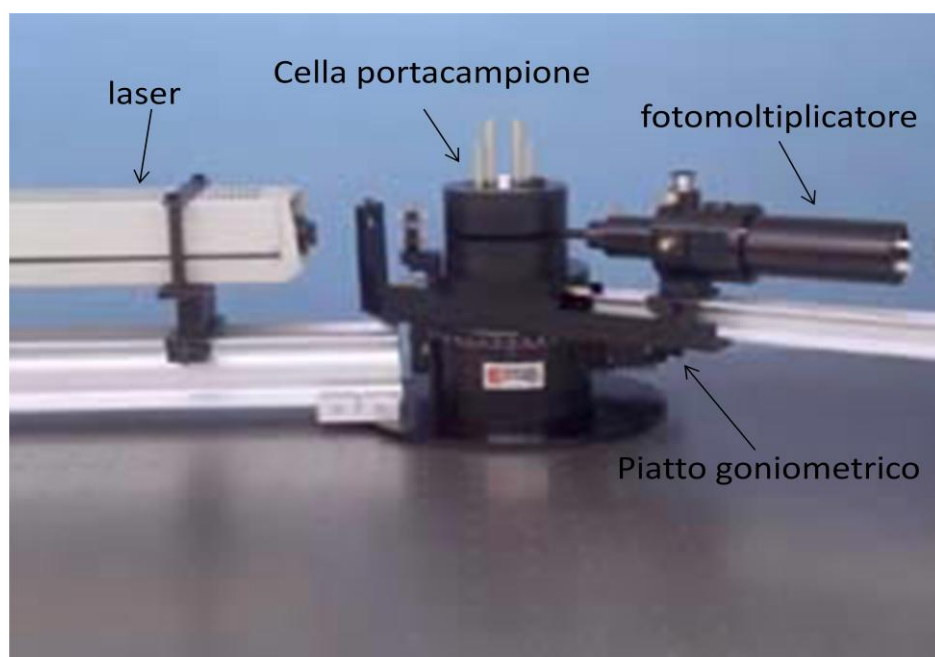


Figura 14: strumentazione di DLS.

3.2 Funzione di correlazione

La funzione di autocorrelazione definisce il grado di correlazione tra due valori di una proprietà dinamica di un sistema in un certo intervallo di tempo: $\langle A(0) \cdot A(t) \rangle$. Tale funzione rimane uguale al suo valore iniziale per tutti i tempi se $A(t)$ è una costante, altrimenti presenta un decadimento che indica la perdita di correlazione tra il valore della proprietà $A(t)$ e $A(t+\tau)$. Il correlatore costruisce la funzione di correlazione partendo dal numero di fotoni che arrivano al fotomoltiplicatore in due intervalli di tempo successivi, $A(t)$ e $A(t+\tau)$. Il prodotto $A(t) \cdot A(t+\tau)$ viene memorizzato in canali ottenuti suddividendo l'asse dei tempi in intervalli discreti di ampiezza τ , per un dato valore del vettore di scattering Q :

$$Q = \frac{4\pi}{\lambda} \cdot \text{sen}\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (1)$$

dove λ è la lunghezza d'onda della radiazione monocromatica incidente e θ è l'angolo tra la radiazione incidente e il fotomoltiplicatore. Indicando con A_i il numero di fotoni letti nell'intervallo i -esimo, con N il numero di canali con ampiezza Δt e con $t=N\Delta t$, si avrà nell' n -esimo canale:

$$\langle A_0 A_n \rangle = \sum_{i=1}^n (A_i A_{i+1}) \quad (2)$$

Lungo tutto l'intervallo t la funzione di correlazione dell'intensità di luce diffusa a un dato Q , $g^{(2)}(Q,t)$, è data dall'eq. **(3)**:

$$\langle A_0 A_n \rangle = \frac{\langle I(Q,0) \cdot I(Q,t) \rangle}{\langle I(Q,0) \rangle^2} \quad (3)$$

dove $I(Q,t)$ è l'intensità del campo elettrico diffuso, che dipende sia dal tempo che dal vettore di scattering Q .

La funzione di autocorrelazione temporale normalizzata viene messa in relazione con il fattore di struttura dinamico, $f(Q,t)$, contenente le informazioni strutturali e dinamiche del sistema attraverso la *relazione di Siegert* (eq. **(4)**):

$$g^{(2)}(Q,t) = \frac{\langle I(Q,0) \cdot I(Q,t) \rangle}{\langle I(Q,0) \rangle^2} = 1 + |\beta \cdot f(Q,t)|^2 \quad (4)$$

β , il *fattore di coerenza*, dipende da θ , dal volume di scattering e dall'allineamento ottico-meccanico dello strumento. Per un volume di scattering puntiforme e quindi per un'apertura del fotomoltiplicatore infinitesima β è uguale a 1. In pratica β ha dei valori attorno a 0.7-0.8 utilizzando un'apertura di 200 μm e viene determinato sperimentalmente con standard di sospensioni di latex di polistirene con dimensioni note.

3.3 Sistemi ergodici e non ergodici

Una soluzione polimerica è un sistema in cui le particelle di soluto, responsabili della diffusione della luce, possono esplorare tutte le possibili configurazioni grazie a moti disordinati di traslazioni, rotazioni e di riarrangiamenti interni. In sistemi di questo tipo il valore di una proprietà mediata nel tempo coincide col valore della stessa proprietà mediata sull'insieme delle configurazioni. Tale sistema è detto *ergodico* e l'andamento della $g^{(2)}(Q,t)$ decade nel tempo. Al contrario, in un sistema in cui le particelle occupano delle posizioni fisse, come in un solido, l'andamento della funzione di correlazione è costante al suo valore iniziale. Un gel può considerarsi come un sistema disordinato intermedio fra una soluzione polimerica e un solido in cui i centri di diffusione della luce sono localizzati attorno a posizioni medie costanti nel tempo, pertanto l'andamento della funzione di correlazione avrà caratteristiche intermedie tra i due sistemi descritti. Le particelle, inoltre, sono vincolate attorno a posizioni fisse come se il sistema fosse parzialmente "congelato". In questa situazione il valore di una proprietà mediata nel tempo non coincide più col valore della stessa proprietà mediata sull'insieme delle posizioni, come accade per i sistemi ergodici (soluzioni).

Per i gel, quindi, si possono ottenere informazioni dinamico-strutturali con misure DLS utilizzando la *teoria di Pusey e van Megen* [26-31] valida per sistemi non ergodici. Si considera il campo elettrico diffuso come la somma di una componente fluttuante $E_F(Q,t)$ e di una componente indipendente dal tempo $E_C(Q)$ (eq. (5)).

$$E(Q,t) = E_F(Q,t) + E_C(Q) \quad (5)$$

Attraverso opportune considerazioni si ricava un'espressione analoga alla relazione di Siegert valida per le soluzioni che permette di ricavare il fattore dinamico di struttura $f(Q,t)$ sperimentale:

$$f(Q,t) = 1 + \frac{\left\{ \left[\frac{(g_T^{(2)}(Q,t) - 1 - \sigma_I^2)}{\beta^2} + 1 \right]^{1/2} - 1 \right\}}{Y} \quad (6)$$

$g_T^{(2)}(Q,t)-1$ è la funzione di correlazione mediata nel tempo fornita dal correlatore. β^2 si ricava estrapolando a $t=0$ la funzione di correlazione temporale di un sistema di riferimento costituito da una soluzione acquosa di microsfere di polistirene aventi un diametro noto (nel nostro caso di 57 nm). Y , che si ricava direttamente dai dati sperimentali, è il rapporto tra l'intensità del campo elettrico mediato sull'insieme e l'intensità del campo elettrico mediato sul tempo (eq. (7)):

$$Y = \frac{\langle I(Q) \rangle_E}{\langle I(Q) \rangle_T} \quad (7)$$

σ_I^2 è l'ampiezza iniziale della funzione di correlazione temporale e si ricava sperimentalmente estrapolando tale funzione a $t=0$ (eq. **(8)**):

$$\sigma_I^2 = g_T^{(2)}(Q,0) - 1 = \frac{\langle I^2(Q) \rangle_T}{\langle I(Q) \rangle_T^2} - 1 \quad (8)$$

Per un sistema ergodico in cui sia Y che σ_I^2 sono uguali a 1, l'eq. **(6)** coincide con la relazione di Siegert (eq. **(4)**).

La funzione di correlazione mediata nel tempo si determina con una misura dell'intensità di luce diffusa dal campione a riposo, mentre quella mediata sull'insieme si determina effettuando una misura con il campione in movimento. Questo si realizza facendo ruotare la provetta contenente il campione mentre si acquisisce la misura. In questo modo la funzione di correlazione mediata sull'insieme sarà il risultato di una media eseguita campionando diverse posizioni dello spazio **[32]**. Questo comporta un aumento dell'ampiezza della $g^{(2)}(Q,t)-1$, con un andamento comparabile con le funzioni di correlazione tipiche di sistemi in soluzione. Esplorando diverse parti del gel, infatti, si esplorano diverse configurazioni delle catene polimeriche e quindi si riesce ad ottenere una media soddisfacente dell'intero spazio di configurazioni.

3.4 Modello per le dinamiche di gel frattali

Una volta ricavata la corretta $f(Q,t)$, bisogna estrarre da questa le informazioni dinamico-strutturali che caratterizzano il gel.

A tal proposito si è utilizzato un modello [33, 34] che descrive la complessa struttura di questi gel in termini di una struttura frattale formata da unità di base dette “blobs” (**Figura 15**). Questo modello tratta il gel come un insieme di domini elementari.

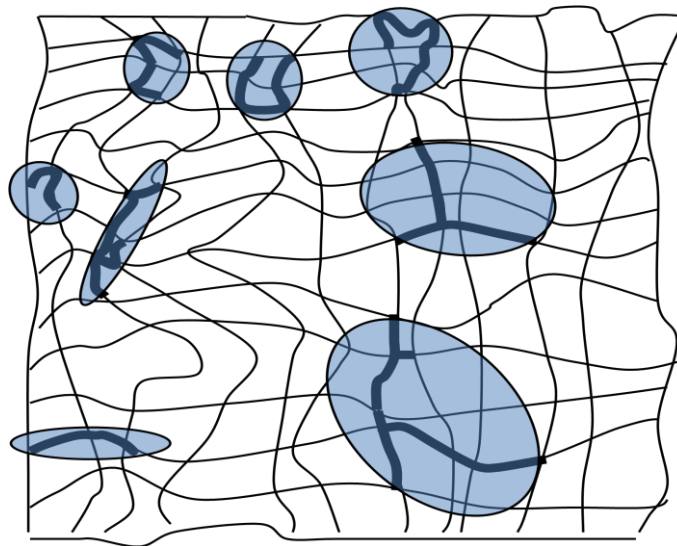


Figura 15: schema del modello a “blobs”.

In tal caso, considerati “congelati” i moti traslazionali e rotazionali, le dinamiche interne del sistema sono discusse in termini di subunità trattate come oscillatori armonici indipendenti con costante elastica k_i e tempo di rilassamento τ_i , dimensioni R_i e viscosità η :

$$\tau_i = \frac{6\pi\eta R_i}{k_i} \quad (9)$$

Lo spostamento quadratico medio del sistema, $\langle \Delta r_i^2(t) \rangle$, rappresenta l'insieme degli spostamenti dei singoli blobs che riguardano porzioni di gel con dimensioni Q^{-1} :

$$\langle \Delta r_i^2(t) \rangle = \frac{3kT}{k_i} \left[1 - \exp\left(\frac{-t}{\tau_i}\right) \right] \quad (10)$$

con k costante di Boltzmann. Integrando sul volume del sistema si ottiene un valore per la $f(Q,t)$ valido in un intervallo di tempi inferiori a $10 \tau_c$, dove τ_c è il tempo di rilassamento caratteristico. Con questo modello si ricava un'espressione per il fattore di struttura dinamico (eq. **(11)**):

$$f(Q,t) = \exp \left[-Q^2 \left(\frac{\langle \Delta r^2(t) \rangle}{6} \right) \right] \quad (11)$$

da cui si ricava un'equazione contenente un andamento di esponenziale "stretchato" [35, 36] con cui si analizza la $f(Q,t)$ sperimentale (eq. (12)).

$$f(Q,t) = \exp\left\{-Q^2 \delta^2 \left[1 - \exp\left(\frac{-t}{\tau_C}\right)^P\right]\right\} \quad (12)$$

δ^2 è l'ampiezza quadratica media dell'oscillazione della subunità, che può essere interpretata come una misura delle dimensioni medie caratteristiche della maglia del reticolo, τ_C rappresenta il tempo caratteristico di correlazione della dinamica della maglia stessa e P è un parametro legato al carattere frattale del sistema.

Nel processo di fit sono stati pesati maggiormente i dati a tempi brevi in modo da garantire l'applicazione del modello, sui dati tempi $t < 10 \tau_C$, inserendo sulla $f(Q,t)$ sperimentale barre di errore crescenti.

I parametri di fit sono indipendenti da Q .

Ponendo $D_P = \delta^2 / \tau_C$, per piccoli tempi di rilassamento l'eq. (12) si può approssimare a:

$$f(Q,t) = \exp\left(-D_P Q^2 t^P\right) \quad (13)$$

3.5 Risultati e discussione

Hyadd4-G

Sui gel sintetizzati, limpidi e trasparenti, sono state condotte misure di DLS per ottenere informazioni sulle dimensioni reticolari e sui tempi di rilassamento in funzione della concentrazione di polimero all'interno del gel. Sono stati analizzati campioni a concentrazioni comprese in un intervallo tra 0.3 e 0.8% (w/w).

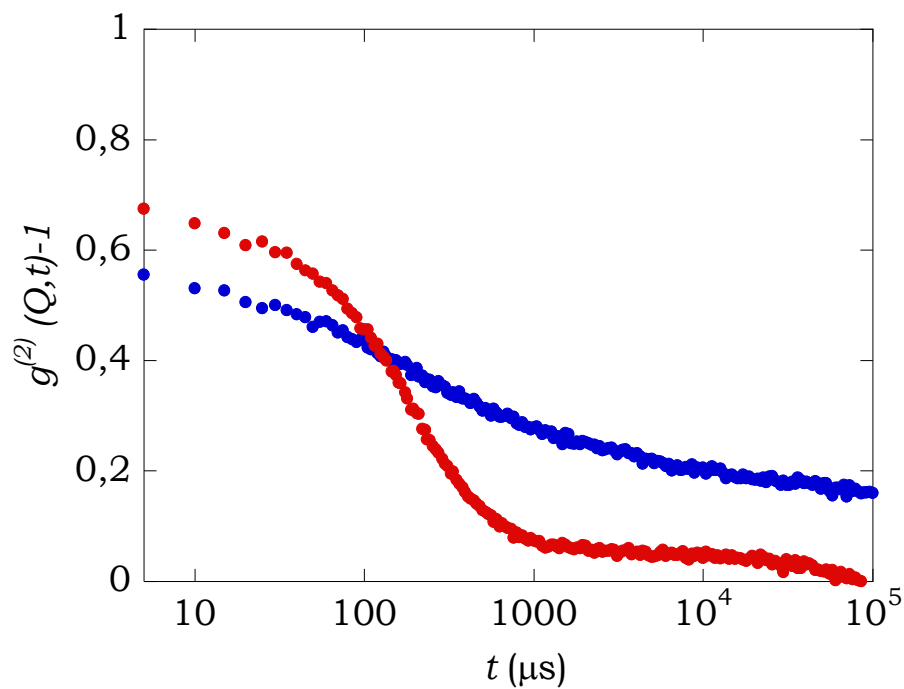


Figura 16: $g^{(2)}(Q,t)-1$ mediata nel tempo (●) e sull'insieme delle configurazioni (●) di Hyadd4-G alla concentrazione 0.3% (w/w) e ad un angolo di scattering di 90° .

Su tutti i campioni analizzati, da quello allo 0.3% (w/w) (**Figura 16**) fino a quello a più alta concentrazione, 0.8% (w/w) (**Figura 17**), si osserva che per tempi sufficientemente lunghi la funzione di autocorrelazione mediata nel tempo, $g_T^{(2)}(Q,t)-1$, tende asintoticamente a un valore finito.

Questo andamento si spiega considerando che alcuni gradi di libertà del sistema gel reticolato (come quelli traslazionali e rotazionali delle catene polimeriche) sono inattivi o “congelati”.

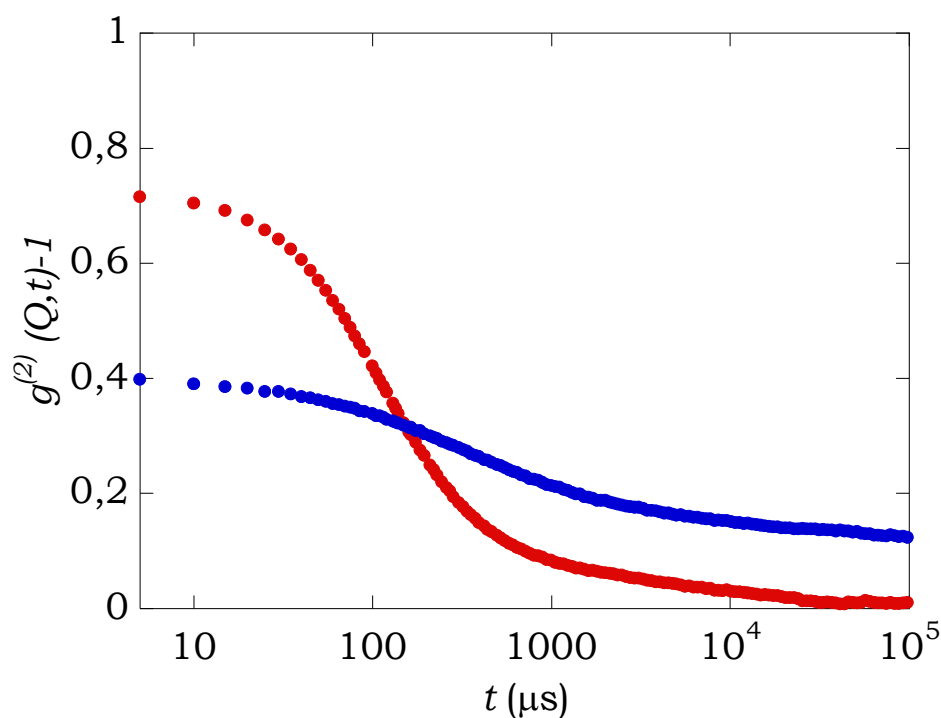


Figura 17: $g^{(2)}(Q,t)-1$ mediata nel tempo (●) e sull'insieme delle configurazioni (●) di Hyadd4-G alla concentrazione 0.8% (w/w) e ad un angolo di scattering di 90°.

La funzione di correlazione di un sistema ergodico, invece, tende a zero per tempi sufficientemente lunghi a causa della completa perdita di correlazione del sistema. Questo andamento viene recuperato quando la $g^{(2)}(Q,t)-1$ viene correttamente mediata su tutte le configurazioni (vedi **Figura 16** e **Figura 17**, simboli ●). La presenza, quindi, di dinamiche arrestate in tali sistemi provoca un andamento progressivo del fattore dinamico di struttura, $f(Q,t)$, che indica una maggiore correlazione all'aumentare della concentrazione di polimero nel gel (**Figura 18**).

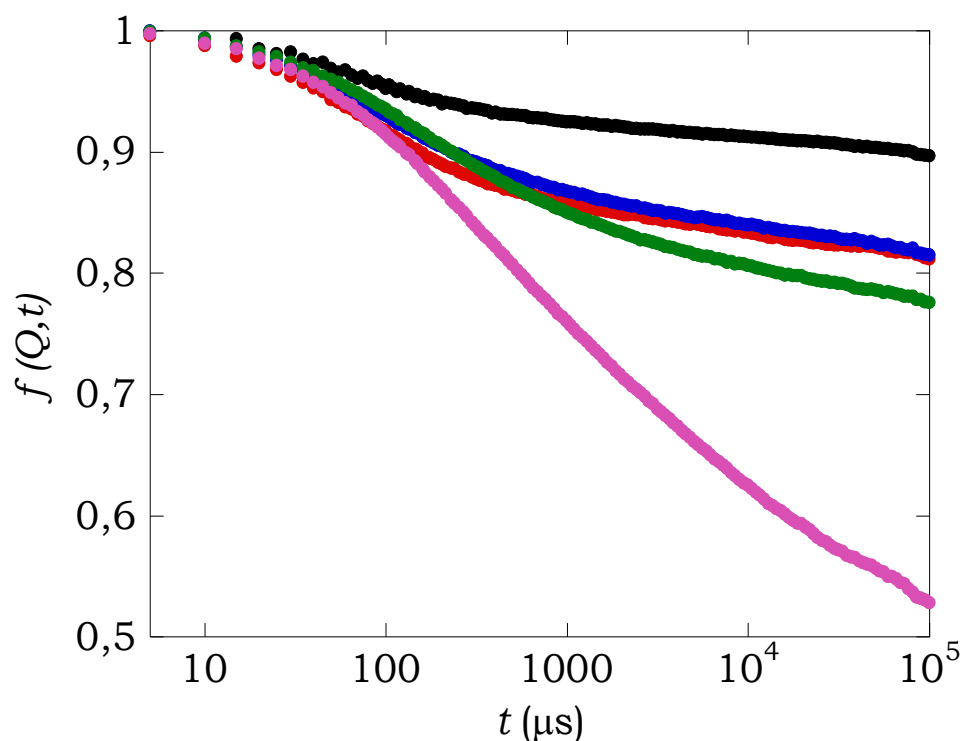


Figura 18: $f(Q,t)$, di Hyadd4-G in funzione della concentrazione (w/w): 0,3% (●), 0,4% (●), 0,6% (●), 0,7% (●), 0,8% (●).

Per ricavare i parametri strutturali e dinamici d'interesse, queste curve sono state interpolate per tutti i campioni mediante l'eq. (12) (**Figura 19**), ricordando che la funzione descritta in tale equazione ha validità fino a $t < 10 \tau_c$ (pag. 59).

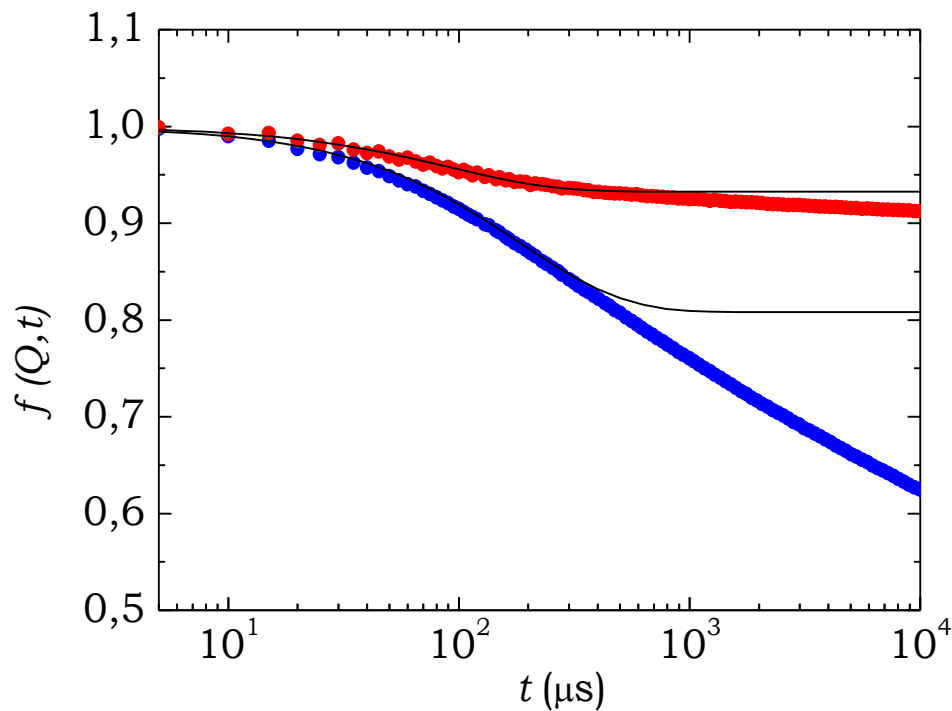


Figura 19: $f(Q,t)$ e relativo fit per Hyadd4-G con concentrazioni (w/w) di 0.8% (●) e 0.3% (●).

Una validazione del modello adottato per l'interpretazione dei dati può essere ottenuta dall'osservazione dell'indipendenza dell'angolo dalla funzione $\ln[f(Q,t)]$, riportata in funzione della variabile ridotta $\delta^2 Q^2 (t/\tau_c)^p$ (**Figura 20**) [33, 34].

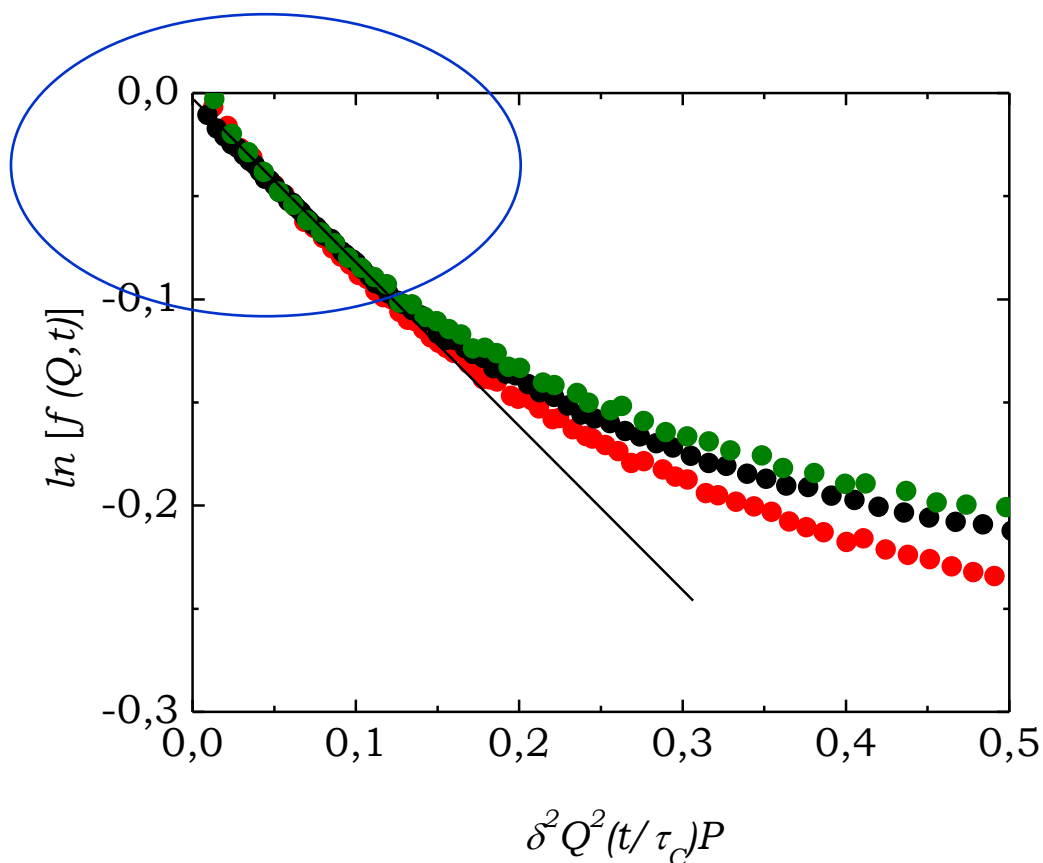


Figura 20: validazione del modello per un gel Hyadd4-G 0.6% (w/w) per i tre angoli di scattering, 60° (●), 90° (●) e 120° (●).

Le curve di correlazione mediate sulle configurazioni e analizzate con il modello di gel frattale (eq. (12)) forniscono gli andamenti di δ e di τ_c in funzione della concentrazione per i campioni in esame a tre diversi angoli di scattering, 60°, 90° e 120° (**Figura 21**) e i risultati ottenuti per δ , τ_c e P sono riportati in **Tabella 1**.

Ricordiamo che δ e τ_c sono rispettivamente la dimensione media di maglia del reticolo e il tempo caratteristico della struttura reticolare tridimensionale.

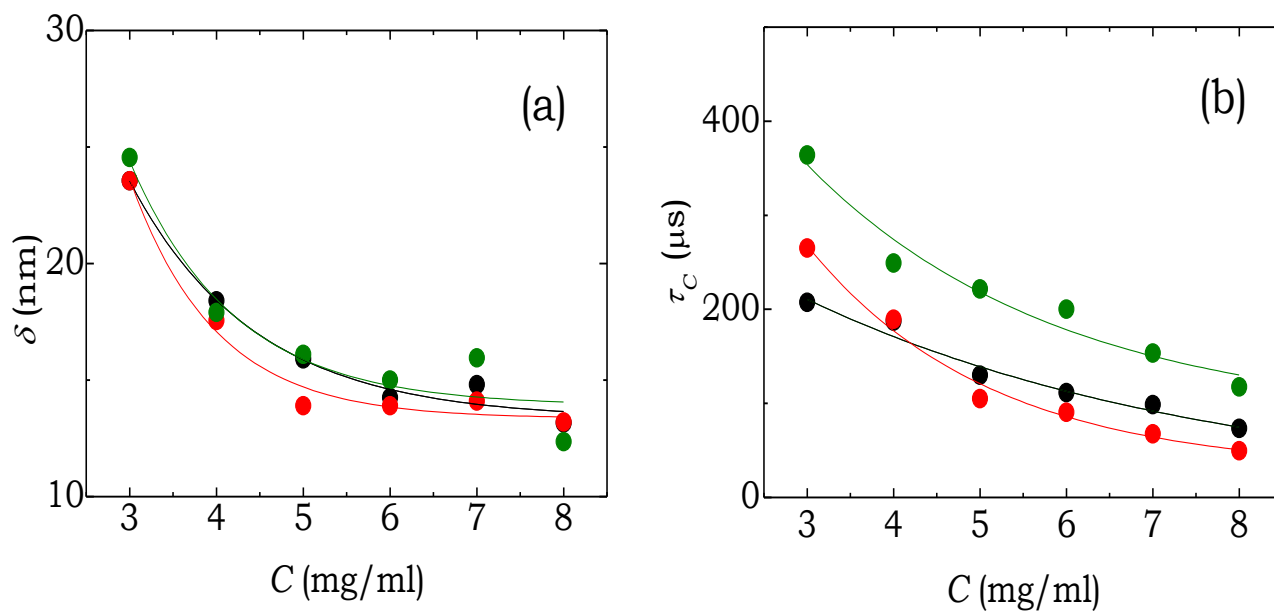


Figura 21: valori sperimentali di δ (a) e τ_c (b) in funzione della concentrazione di Hyadd4-G per tre diversi angoli di scattering, 60° (●), 90° (●) e 120° (●).

(a)

Angolo di scattering 60°			
Hyadd4-G (w/w)	δ (nm)	τ_c (μs)	P
0.3%	25 ± 3	360 ± 13	0.80 ± 0.01
0.4%	18 ± 3	250 ± 12	0.90 ± 0.01
0.5%	16 ± 3	220 ± 13	0.80 ± 0.01
0.6%	15 ± 3	200 ± 13	0.90 ± 0.01
0.7%	16 ± 2	155 ± 7	0.90 ± 0.01
0.8%	12 ± 2	120 ± 7	0.90 ± 0.01

(b)

Angolo di scattering 90°			
Hyadd4-G (w/w)	δ (nm)	τ_c (μs)	P
0.3%	24 \pm 2	210 \pm 3	0.91 \pm 0.02
0.4%	18 \pm 2	190 \pm 4	0.90 \pm 0.04
0.5%	16 \pm 1	130 \pm 3	0.92 \pm 0.05
0.6%	14 \pm 1	110 \pm 2	0.98 \pm 0.02
0.7%	15 \pm 1	100 \pm 2	0.99 \pm 0.01
0.8%	13 \pm 1	75 \pm 1	0.99 \pm 0.01

(c)

Angolo di scattering 120°			
Hyadd4-G (w/w)	δ (nm)	τ_c (μs)	P
0.3%	24 \pm 2	265 \pm 4	0.81 \pm 0.03
0.4%	18 \pm 2	190 \pm 3	0.82 \pm 0.03
0.5%	14 \pm 1	105 \pm 1	0.91 \pm 0.04
0.6%	14 \pm 1	90 \pm 1	0.99 \pm 0.01
0.7%	14 \pm 1	70 \pm 1	0.99 \pm 0.01
0.8%	13 \pm 1	50 \pm 1	0.99 \pm 0.01

Tabella 1: valori di δ , τ_c e P per Hyadd4-G al variare della concentrazione e ad angoli di scattering di 60° (a), 90° (b) e 120° (c).

Come era prevedibile la dimensione media di maglia, δ , diminuisce con l'aumento della concentrazione come anche il tempo di correlazione, τ_c . Questo andamento è caratteristico di un sistema che acquista maggiore densità di catene aumentando la concentrazione.

Per il gel a più bassa concentrazione (0.3% w/w) sono state effettuate anche misure a diverse temperature, da 25 a 65 °C (**Figura 22**), constatando che l'aumento di temperatura provoca solo un parziale allentamento della struttura del gel.

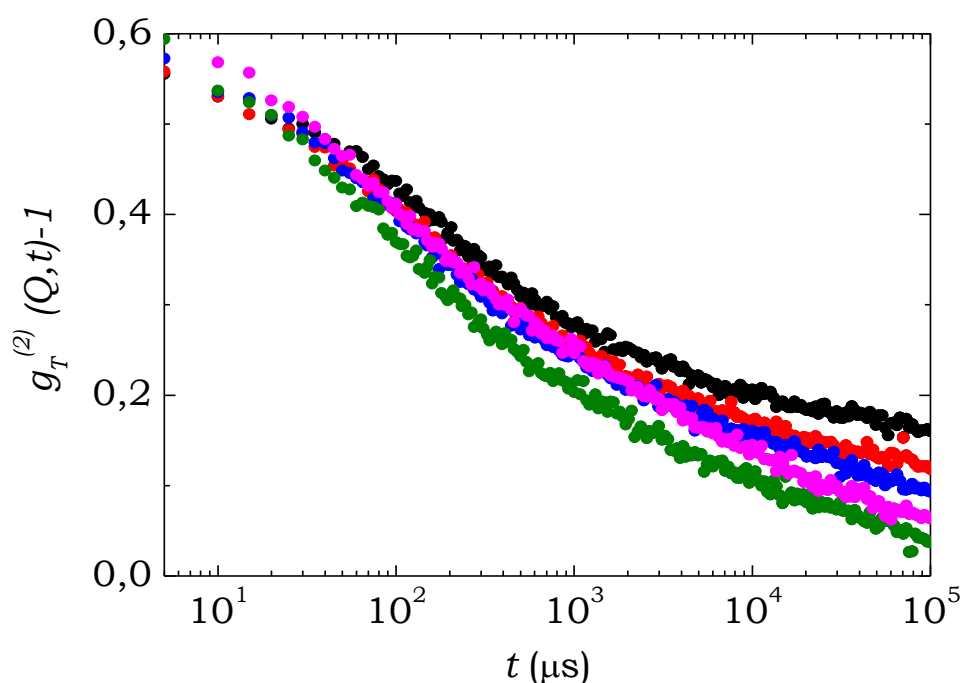


Figura 22: andamento della funzione di correlazione $g_T^{(2)}(Q,t)-1$ al variare della temperatura per Hyadd4-G 0.3% (w/w): 25 (●), 35 (●), 45 (●), 55 (●) e 65° C (●).

Questo comportamento causa un aumento dell'ampiezza della curva di correlazione (**Figura 23**) e indica una tendenza del gel ad assumere il comportamento tipico delle soluzioni polimeriche.

Da questi andamenti si nota che anche a 65 °C il comportamento di “soluzione diluita” non viene mai completamente recuperato e che, come prevedibile, la dimensione media della maglia e il tempo caratteristico di correlazione aumentano con la temperatura (**Figura 24**).

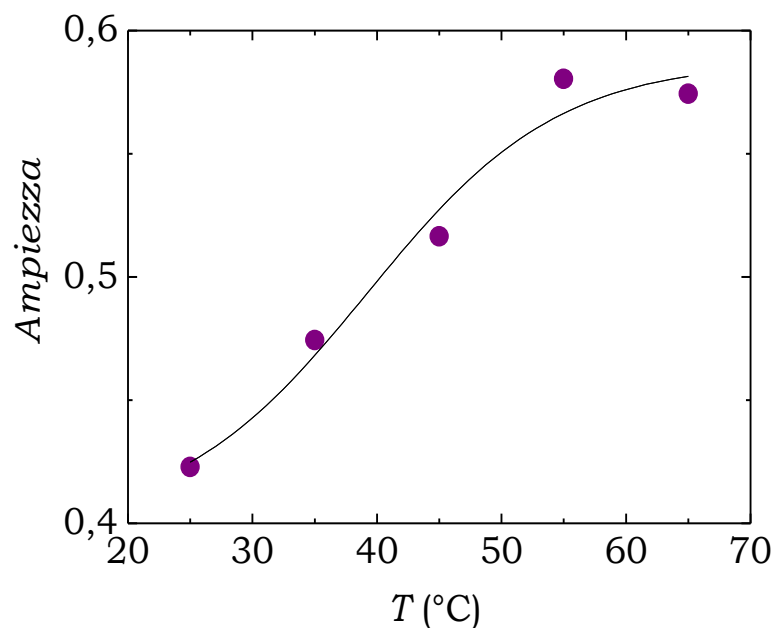


Figura 23: ampiezza della funzione di correlazione $g_T^{(2)}(Q,t)-1$ in funzione della temperatura per Hyadd4-G 0.3% (w/w).

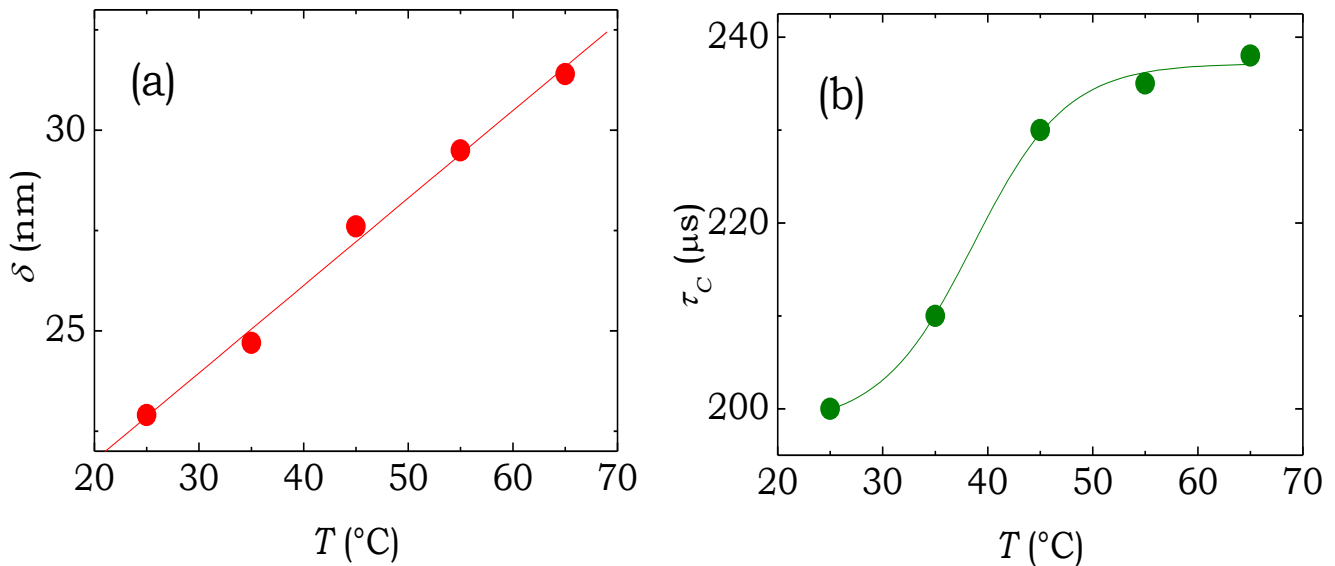


Figura 24: andamento di δ (a) e τ_c (b) in funzione della temperatura per Hyadd4-G 0.3% (w/w).

Con il modello utilizzato per l'interpretazione dei dati è stato, inoltre, possibile legare una proprietà dinamica microscopica del sistema, quale il tempo di rilassamento caratteristico, τ_c , con una proprietà macroscopica come il modulo elastico del gel, G' (eq. (14)):

$$G' = \frac{6\pi\eta b}{\tau_c} \quad (14)$$

con η viscosità del solvente e b un parametro fissato a 0.3 in relazione al modello scelto.

L'andamento di G' in funzione della concentrazione misurato a 60° , 90° e 120° assieme ai valori di G' ottenuti con misure di reologia in oscillazione sono riportati in **Figura 25** e in **Tabella 2**.

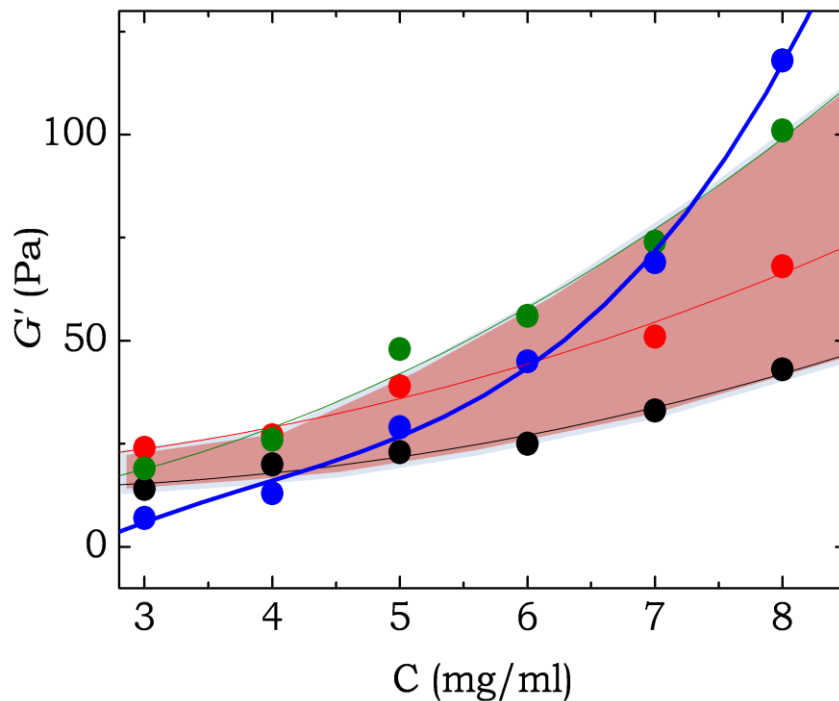


Figura 25: G' (Pa) di Hyadd4-G in funzione della concentrazione per tre angoli di scattering, 60° (●), 90° (●), 120° (●), determinati con l'eq. (14), e con misure reologiche (●). Per facilitare la lettura si è evidenziata la zona in cui cadono i valori di G' ottenuti dalle misure DLS.

I valori teorici di G' determinati con le misure di DLS sono stati confrontati con i valori sperimentali del modulo elastico determinato attraverso misure di reologia (**Capitolo 6**). Il buon accordo fra i due set di valori del modulo elastico G' , ottenuti indipendentemente con DLS e reologia, è una validazione

del modello del gel frattale utilizzato per estrarre dai dati di DLS le caratteristiche strutturali e dinamiche del sistema Hyadd4-G.

Hyadd4-G (w/w)	G' - 60°	G' - 90°	G' - 120°	G' reologia
0.3%	14 ± 2	24 ± 2	19 ± 3	7 ± 1
0.4%	20 ± 3	27 ± 2	26 ± 1	13 ± 3
0.5%	23 ± 1	39 ± 3	48 ± 2	29 ± 2
0.6%	25 ± 4	45 ± 1	56 ± 3	45 ± 1
0.7%	33 ± 2	51 ± 5	74 ± 3	69 ± 4
0.8%	43 ± 5	68 ± 2	101 ± 6	118 ± 5

Tabella 2: valori di G' (Pa) in funzione della concentrazione per tre angoli di scattering determinati con l'eq. (14) e con misure reologiche.

Hyadd4-G con Tween 80

Ci si è avvalsi di misure di DLS anche per osservare l'effetto della presenza di un tensioattivo all'interno della struttura reticolata del gel [37-39].

Sono stati pertanto preparati gel di Hyadd4-G alla concentrazione di 0.8% (w/w) disperdendo in soluzione un tensioattivo, il Tween 80 (Figura 26).

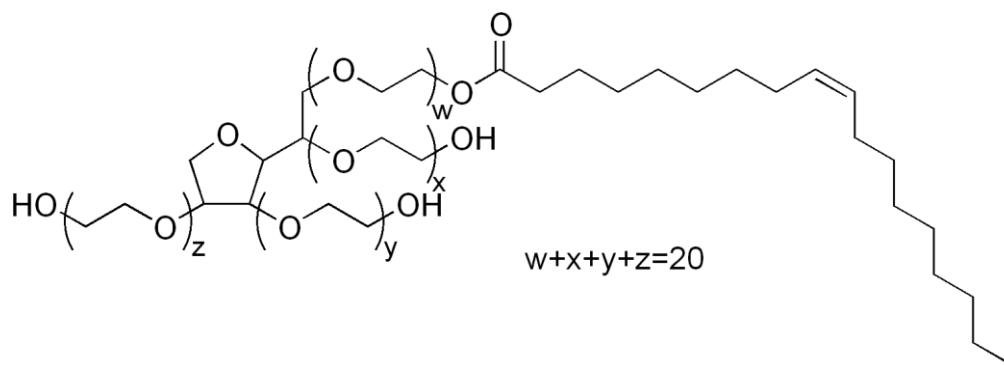


Figura 26: Tween 80.

Il tensioattivo viene aggiunto al termine del ciclo termico in autoclave condotto sui campioni al fine di permettere la formazione del gel (sez. **Hyadd4-G: procedura di sintesi**, pag. **37**), nella fase di raffreddamento, con una concentrazione finale del 4% (v/v).

Questo tensioattivo si dimostra molto più efficace della temperatura per promuovere la transizione sol↔gel. Infatti l'andamento delle curve delle funzioni di correlazione temporale dell'idrogel Hyadd4-G in presenza di Tween 80 rivela che il gel è stato destrutturato passando ad un comportamento sol (**Figura 27**). Si vede, infatti, che la funzione di correlazione temporale del sistema Hyadd4-G con Tween 80 tende a zero per una scala di tempi inferiori al secondo.

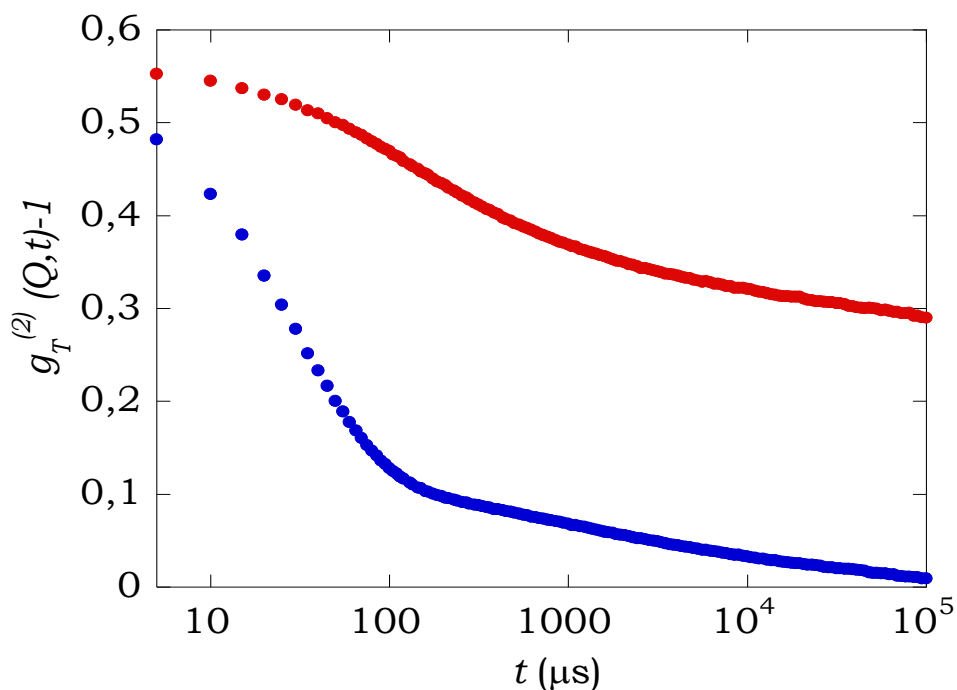


Figura 27: $g_T^{(2)}(Q,t)-1$, di Hyadd4-G alla concentrazione di 0.8% (w/w) in assenza (●) e in presenza (●) del Tween 80.

Questo comportamento è ascrivibile alla rottura delle giunzioni presenti nel gel e stabilizzate da interazioni idrofobiche tra le catene laterali alchiliche da parte del tensioattivo che trasforma, quindi, il gel in una soluzione polimerica.

Hya

Misure di DLS sui gel di Hyadd4-G hanno fornito informazioni sulle dimensioni reticolari e sui tempi di rilassamento dei gel a diversi gradi di reticolazione. Per apprezzare la differenza di comportamento fra Hyadd4-G e

il suo polimero parente Hya, senza ramificazioni esadeciliche, sono state condotte misure di DLS su soluzioni di acido ialuronico nelle stesse condizioni di concentrazione e solvente.

Lo Hyadd4-G si presenta come un gel limpido e trasparente anche a concentrazioni molto basse, come lo 0.3% (w/w). Al contrario lo Hya resta sotto forma di soluzione trasparente anche ad alte concentrazioni (10% (w/w)). Sono state preparate soluzioni di Hya nelle stesse condizioni dei gel di Hyadd4-G e sottoponendole a misure di DLS si osserva che la funzione di correlazione mediata nel tempo, per tempi sufficientemente lunghi, tende a zero. Questo comportamento è caratteristico delle soluzioni polimeriche in cui non ci sono gradi di libertà congelati con la conseguente perdita di correlazione del sistema.

In **Figura 28** si osserva, infatti, che a tempi lunghi la funzione di autocorrelazione mediata nel tempo va a zero per una soluzione di Hya, mentre tende a un valore finito per i gel Hyadd4-G, andamento dovuto proprio al fatto che alcuni gradi di libertà del sistema gel reticolato (come quelli traslazionali e rotazionali) sono “congelati”.

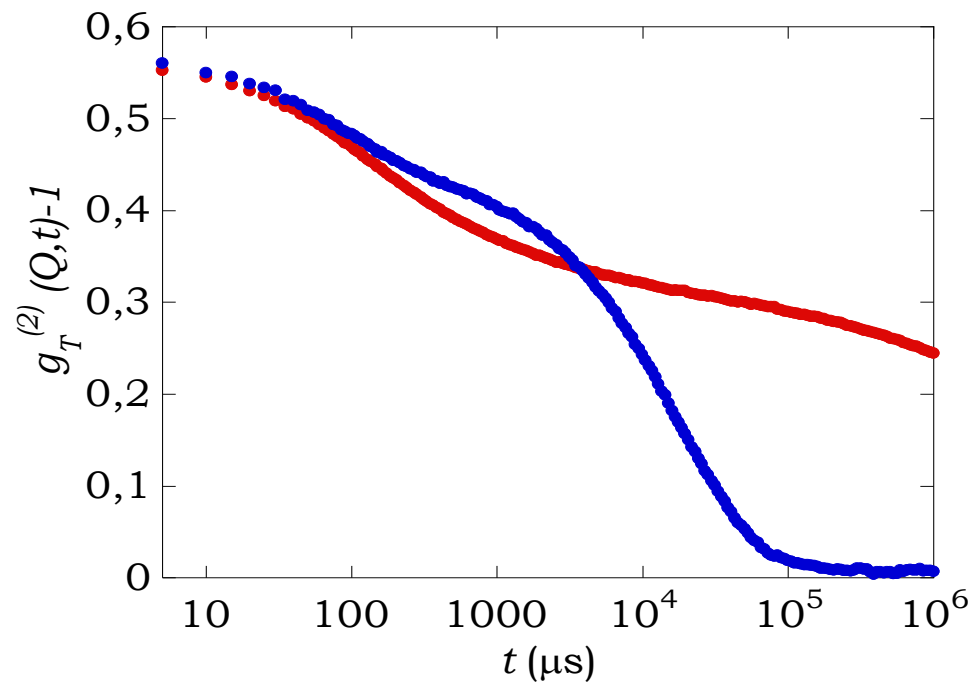


Figura 28: $g_T^{(2)}(Q,t)-1$ di Hyadd4-G (●) e di Hya (●) alla concentrazione di 0.3% (w/w).

BIBLIOGRAFIA

- 26** P. N. Pusey, W. van Megen, *Physica A*, **1989**, 157, 705-741.
- 27** J. G. H. Joosten and E. T. F. Geladé, P. N. Pusey, *Physical Review A*, **1990**, Vol. 42, No. 4, 2161-2175.
- 28** J. G. H. Joosten and J. L. McCarthy, P. N. Pusey, *Macromolecules*, **1991**, 24, 6690-6699.
- 29** J. G. H. Joosten, *Progress in Colloid & Polymer Science*, **1993**, Vol. 91, 149-152.
- 30** W. van Megen, P. N. Pusey, *Physical Review A*, **1991**, Vol. 43, No. 10, 5429-5440.
- 31** L. Fang and W. Brown, *Macromolecules*, **1992**, 25, 6897-6903.
- 32** J.-Z. Xue, D. J. Pine and S. T. Milner, X.-I. Wu, P. M. Chaikin, *Physical Review A*, **1992**, Vol. 46, No. 10, 6550-6563.
- 33** A. H. Krall, Z. Huang, D. A. Weitz, *Physica A*, **1997**, 235, 19-33.
- 34** A.H. Krall, D.A. Weitz, *Phys. Rev. Lett.*, **1998**, 80, 778-781.
- 35** F. Bordi, G. Paradossi, C. Rinaldi, B. Ruzicka, *Physica A*, **2002**, 304, 119-128.

- 36** P. Barretta, F. Bordi, C. Rinaldi, G. Paradossi, *J. Phys. Chem. B*, **2000**, *104*, 11019-11026.
- 37** Wei Wang, Y. John Wang, D .Q. Wang, *International Journal of Pharmaceutics*, **2008**, *347*, 31-38.
- 38** R. Barreiro-Iglesias, C. Alvarez-Lorenzo, A. Concheiro, *International Journal of Pharmaceutics*, **2003**, *258*, 165-177.
- 39** Suraj Chandra Sharma, Koji Tsuchiya, Kenichi Sakai, Hideki Sakai, Masahiko Abe, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, **2009**, *335*, 23-27.
-

CAPITOLO 4

Microscopia Confocale

I notevoli progressi tecnologici di cui hanno usufruito negli ultimi anni alcune tecniche di microscopia ottica, e in particolare quelle in fluorescenza, hanno portato alla possibilità di analisi 3D di sistemi cellulari e subcellulari mediante la tecnica del sezionamento ottico realizzato in modo particolarmente efficace nella Microscopia Confocale a Scansione Laser (*CLSM, Confocal Laser Scanning Microscopy*).

4.1 Introduzione

Un comune microscopio ottico non è di per sé predisposto per lo studio di oggetti tridimensionali. Esso fornisce un'immagine bidimensionale che consiste nella sovrapposizione di regioni del campione a fuoco e fuori fuoco.

La risoluzione dell'immagine è determinata soprattutto dalla diffrazione della luce da parte del campione e da parte della lente dell'obiettivo. La risoluzione laterale, ovvero la risoluzione nel piano focale, è definita come la minima distanza a cui si possono avvicinare lateralmente due oggetti senza che le figure di diffrazione li rendano indistinguibili. Questa può essere determinata considerando due oggetti puntiformi.

La figura di diffrazione di un oggetto puntiforme è formata da un disco luminoso centrale e da anelli concentrici alternativamente scuri e luminosi, dette figure di Airy; quindi, secondo il criterio di Rayleigh, i due punti sono risolvibili quando il centro di uno dei due dischi luminosi coincide con il minimo del primo anello scuro dell'altra figura (**Figura 29**).

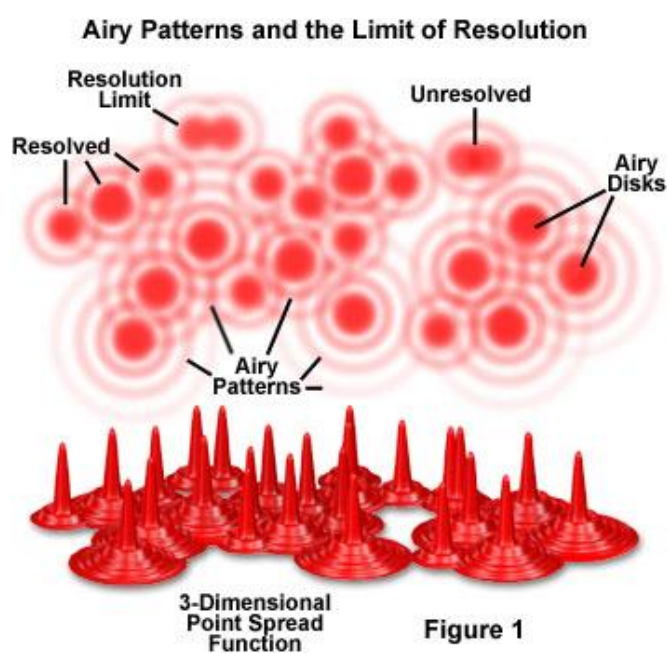


Figura 29: figure di diffrazione di oggetti puntiformi.

La risoluzione assiale è definita analogamente a quella laterale, ma si riferisce all'immagine di diffrazione tridimensionale che è periodica anche lungo l'asse perpendicolare al piano di fuoco; è quindi la distanza minima di avvicinamento di due oggetti lungo questo asse continuando a vederli distinti. La profondità di campo è lo spessore di immagine che appare a fuoco, misurato lungo l'asse del microscopio (asse z), quindi due oggetti che si trovano all'interno di tale spessore vengono visti sullo stesso piano x - y .

In teoria la profondità di campo è determinata dalla risoluzione assiale, ma nella microscopia convenzionale la luce di eccitazione possiede un'intensità significativa anche al di sopra e al di sotto del piano di fuoco; quindi gli oggetti fuori fuoco producono luce non desiderata che viene raccolta dal condensatore e che riduce il contrasto della regione a fuoco.

I principali limiti della microscopia ottica convenzionale, pertanto, sono risoluzione assiale, messa a fuoco e contrasto. Questi limiti si possono superare usando tecniche di scansione e sistemi ottici confocali.

4.2 Strumentazione

L'uso di una geometria confocale permette di adoperare per la luce lo stesso percorso (cioè lo stesso obiettivo microscopico) una volta per eccitare il campione e una seconda volta per raccogliere il segnale in fluorescenza che il campione emette. Quello che sarà sufficiente fare allora è introdurre nel

campione alcune molecole fluorescenti. Per aumentare l'intensità della luce proveniente dal campione, quest'ultimo viene completamente illuminato dalla radiazione d'eccitazione: a seguito di ciò, all'emissione fluorescente proveniente dai punti del piano focale, si sovrappone quella originata da piani non a fuoco, fenomeno responsabile di quegli indesiderati effetti di sfuocamento che degradano la qualità dell'immagine. L'architettura confocale è stata, in questo ambito, concepita proprio per eliminare i contributi luminosi provenienti dalle regioni fuori fuoco. Il miglioramento del potere risolutivo assiale è ottenuto sostituendo all'illuminazione *a campo largo* un'illuminazione *punto per punto* ottenuta piazzando prima dell'ottica di raccolta una fenditura o "pinhole". Nei moderni microscopi confocali la luce di un laser viene fatta convergere dalle lenti dell'obiettivo in un punto estremamente piccolo del campione osservato. In questo modo le aree superiori ed inferiori al piano di fuoco, non venendo eccitate, non contribuiscono alla formazione dell'immagine, limitando la formazione di aloni e riducendo il "rumore di fondo". La luce emessa dai fluorofori presenti nel campione viene catturata dalle lenti dell'obiettivo e deviata da uno specchio dicroico su un fotomoltiplicatore che trasforma l'intensità luminosa rilevata in un segnale elettrico di intensità proporzionale. Tra lo specchio dicroico e il fotomoltiplicatore il fascio luminoso attraversa il pinhole, che impedisce alla luce proveniente dalle zone fuori fuoco (che, seppure in minima parte vengono illuminate per effetto di fenomeni di rifrazione all'interno del campione) di raggiungere il fotomoltiplicatore. In questo modo solo il segnale luminoso relativo al piano di fuoco viene registrato e utilizzato nella formazione dell'immagine finale (**Figura 30**).

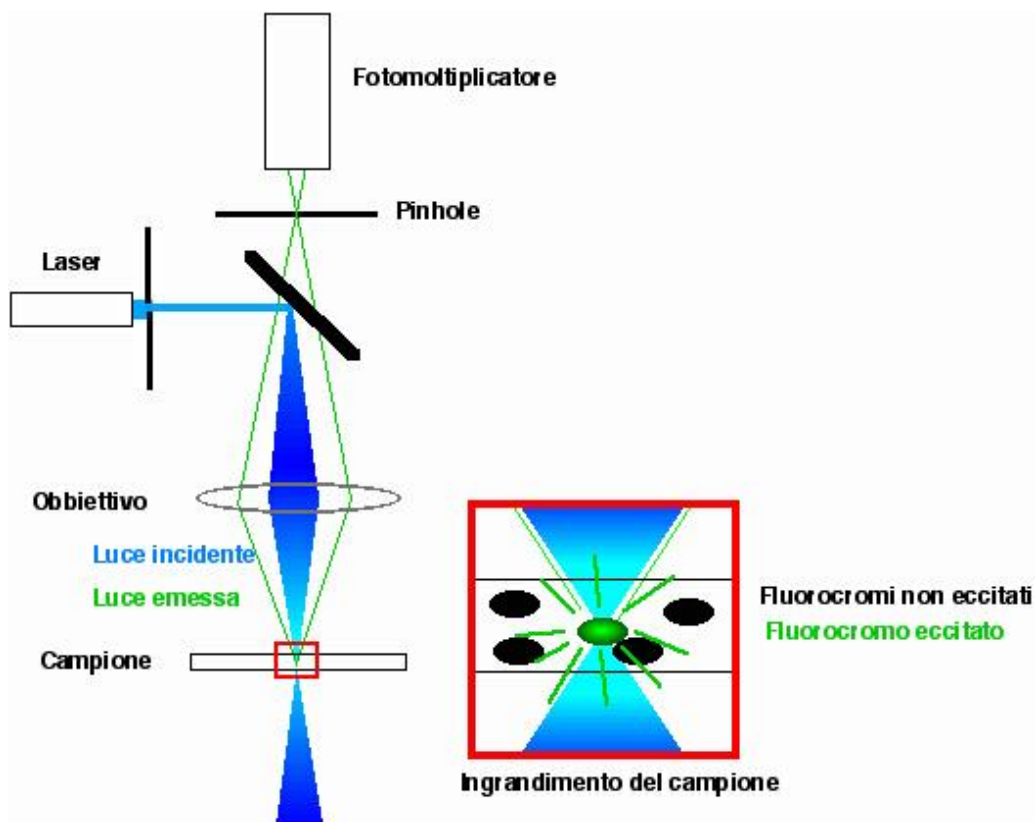


Figura 30: schema di una architettura confocale.

La fluorescenza è il fenomeno fisico secondo cui alcune molecole, eccitate con radiazioni di lunghezza d'onda opportuna, dopo una prima diseccitazione non radiativa, riemettono ad una energia più bassa (lunghezza d'onda più grande). Questo comporta uno spostamento nello spettro visibile dei due processi, quello di eccitazione e quello di emissione o fluorescenza, che permette con l'uso di particolari filtri di separare completamente la luce adoperata per l'eccitazione dal segnale di fluorescenza. Questo è un concetto chiave, perché il segnale di fluorescenza che si osserva è proveniente direttamente dal campione. Attraverso questo accorgimento, automatizzato nella cosiddetta *procedura di scansione*, è possibile discriminare, a mezzo di

un pinhole collocato di fronte al detector (fotomoltiplicatore), i contributi provenienti da punti a fuoco da quelli originati da punti fuori fuoco.

L'alto potere risolutivo raggiunto da un'architettura confocale viene pagato in termini di una maggiore complessità strumentale dell'apparato e di una minore intensità del segnale raccolto.

La necessità di compiere una scansione punto per punto del campione, riduce la velocità di acquisizione del sistema e, contemporaneamente, anche il numero di fotoni rilevati per un fissato tempo di esposizione. Dal momento, poi, che molti fotoni sono "bloccati" dal pinhole, il segnale può risultare debole se confrontato con quello ottenibile nelle medesime condizioni sperimentali nel caso a campo largo. Per far fronte a questi inconvenienti, vengono tipicamente impiegate per l'eccitazione sorgenti in grado di fornire radiazioni luminose di maggiore intensità, spesso accoppiate a tempi di esposizione del detector più lunghi, e a sonde fluorescenti. È questo, ad esempio, uno dei motivi che sta alla base dell'impiego di sorgenti laser fortemente focalizzate in eccitazione. Spostando lungo l'asse verticale il campione dopo ogni scansione, è possibile eseguire una serie di scansioni successive corrispondenti a piani focali via via più profondi all'interno del campione. Queste scansioni prendono il nome di *sezioni ottiche* e la loro sovrapposizione ordinata, eseguita via software, consente di ricostruire un'immagine complessiva dell'intero volume di scansione (**Figura 31**), in cui tutti i piani sono contemporaneamente a fuoco.

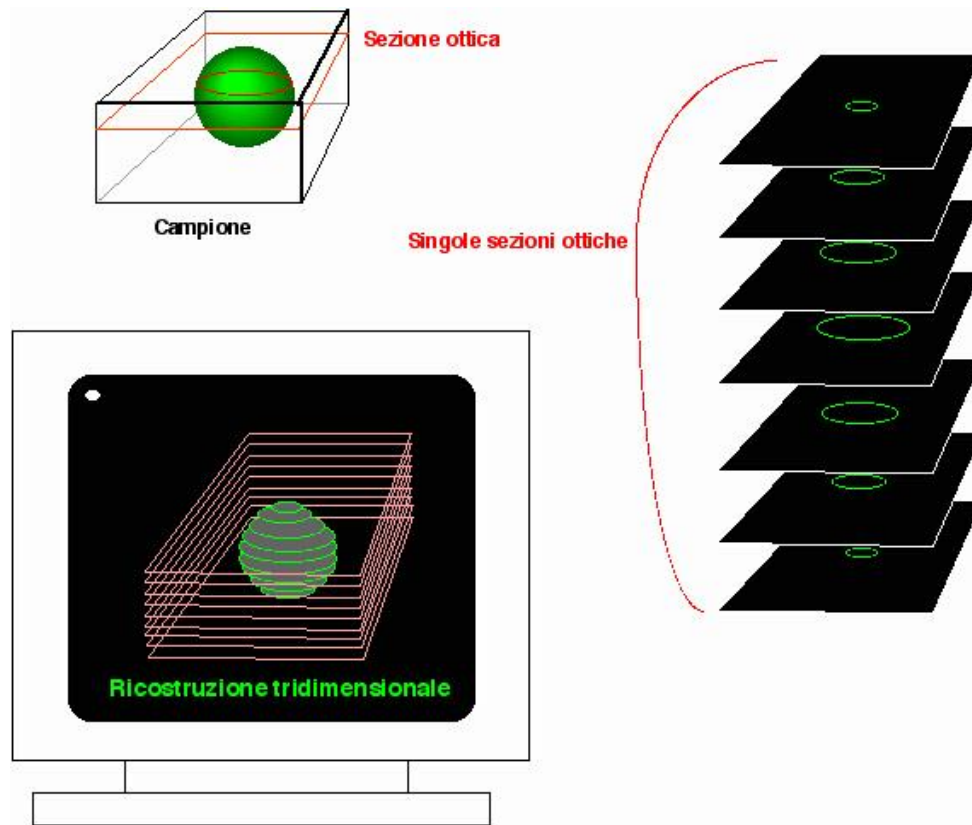


Figura 31: ricostruzione 3D di un'immagine con un sistema confocale.

4.3 Fluorescence Recovery after Photobleaching (FRAP)

Con “photobleaching” si indica la distruzione fotochimica di un fluoroforo.

Questo effetto, considerato spesso un problema, è sfruttato nella tecnica

FRAP per studi diffusionali in cellule e gel [40-42].

Con questa metodologia si procede alla scansione di un singolo punto sul piano focale illuminando il campione con un fascio che determina in esso un doppio cono di illuminazione simile ad una clessidra. I piani al di sotto e al di sopra del punto di interesse sul piano focale vengono eliminati con l'ausilio del pinhole di uscita.

In un protocollo di FRAP la fluorescenza proveniente dalla regione in esame viene inattivata tramite photobleaching con un fascio laser ad alta energia. Il risultato è la formazione di una zona oscura nel piano focale. In sistemi in cui è attivo un flusso di molecole, lo scambio continuo di materia rinnova le molecole inattivate con nuovi fluorofori intatti portando ad un recupero della fluorescenza nel tempo e alla ricostruzione del segnale luminoso all'interno della zona precedentemente oscurata. La velocità di ricostituzione del segnale fornisce una misura della mobilità della specie molecolare fluorescente all'interno dell'ambiente in esame. Il processo comprende tre fasi:

- PreBleaching: osservazione del campione per individuare la regione target e misurare l'intensità di fluorescenza al suo interno (F_{PRE}).
Si effettua con una frazione della potenza ottenibile dal laser.

- Bleaching: irraggiamento della regione d'interesse con un fascio ad alta potenza per inattivare la fluorescenza fino ad un determinato livello (F_0).

- Recovery: fase di raccolta del segnale e registrazione del suo andamento temporale (F_t), fino al raggiungimento di nuove condizioni di equilibrio (F_∞).

La frazione di segnale ricostituito ad un istante t rispetto al recupero totale è data dalla funzione $f(t, \tau_D)$:

$$\frac{F_t - F_0}{F_\infty - F_0} = f(t, \tau_D) \quad (15)$$

dove τ_D è il tempo caratteristico del recupero di fluorescenza e fornisce una misura della rapidità del processo.

τ_D si ricava attraverso la scelta di un'opportuna funzione f , che fornisca un'interpolazione appropriata dell'andamento temporale dell'intensità di fluorescenza recuperata.

Per una diffusione su un piano di spessore infinitesimo la $f(t, \tau_D)$ è descritta dall'equazione di Axelrod [43] (eq. (16)):

$$f(t, \tau_D) = \sum_{n=0}^{n=\infty} \frac{-k^n}{n!} \cdot \frac{1}{1 + n \cdot \left[1 + \frac{2t}{\tau_D} \right]} \quad (16)$$

in cui $f(t, \tau_D)$ è il profilo dell'intensità di fluorescenza e k è la costante di bleaching. τ_D è legato al coefficiente di diffusione D secondo l'eq. **(17)**:

$$\tau_D = \frac{\omega^2}{4D} \quad (17)$$

in cui ω è il raggio dell'area oscurata col bleaching definito come la semiampiezza del profilo gaussiano d'intensità dell'area di bleaching al valore fissato di e^{-2} e a $t=0$ **[40, 44]**.

L'eq. **(16)** si basa su alcune assunzioni fondamentali:

- il recupero di fluorescenza deve essere il risultato della sola diffusione bidimensionale delle molecole all'interno della zona del bleaching,
- non ci deve essere diffusione all'interno di tale zona durante il bleaching stesso.

Se il fenomeno fosse troppo rapido si avrebbe uno scambio di molecole fluorescenti fra il volume irraggiato e l'ambiente circostante con velocità superiore al processo di fotodecadimento e non si riuscirebbe mai ad oscurare la zona d'interesse.

Il coefficiente di diffusione può essere messo in relazione al grado di idratazione del gel utilizzando la teoria del volume libero [45-47], secondo l'eq. (18):

$$\ln\left(\frac{D}{D_0}\right) = \ln(\phi) - \left(\frac{kr^2}{V_{f,water}}\right)\left(\frac{1}{H} - 1\right) \quad (18)$$

in cui D è il coefficiente di diffusione del soluto nella matrice, D_0 è il coefficiente di diffusione del soluto in acqua, ϕ indica l'effetto di screening del reticolo ($\phi=1$ quando la dimensione del soluto è minore della dimensione della maglia del reticolo), r è il raggio idrodinamico del soluto, $V_{f,water}$ è il volume libero in acqua, k è una costante legata a fattori strutturali e H indica l'idratazione del gel (frazione in volume di acqua nel gel).

L'eq. (18) stabilisce una relazione lineare tra $\ln\left(\frac{D}{D_0}\right)$ e $\left(\frac{1}{H} - 1\right)$.

Utilizzando molecole polimeriche monodisperse di dimensioni note, coniugate a sonde fluorescenti, mediante FRAP si può determinare sperimentalmente l'andamento lineare previsto dall'eq. (18) e, per effetto dell'esclusione sterica, la dimensione media di maglia dei pori che caratterizzano il gel.

4.4 Risultati e discussione

Hyadd4-G in presenza di destrano-FITC

Le molecole fluorescenti utilizzate per i nostri esperimenti di FRAP sono frazioni monodisperse e con peso molecolare noto di destrano, un polisaccaride i cui gruppi ossidrilici sono coniugati in maniera statistica con molecole di FITC (fluoresceina isotiocianato) [48], con un grado di sostituzione compreso in un intervallo tra 0.003-0.02 mol di FITC/mol di glucosio (**Figura 32**).

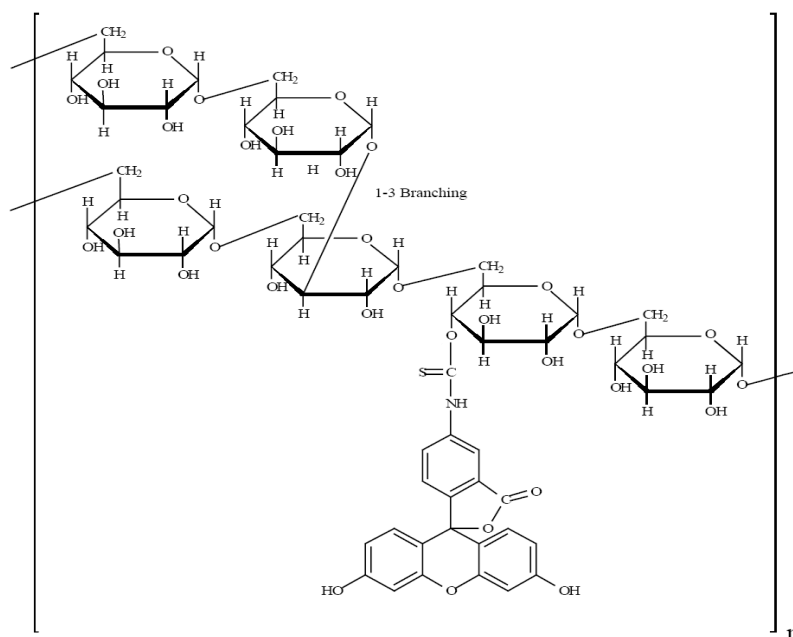


Figura 32: struttura del destrano-FITC.

Sintesi e caratterizzazione

Si preparano soluzioni di destrano-FITC alla concentrazione di 0.6% (w/w) in PBS con pesi molecolari di 20, 250 e 500 kDa in forma monodispersa (sez. **2.1 Materiali**, pag. **36**). I gel di Hyadd4-G, preparati come descritto nella sez. **Hyadd4-G: procedura di sintesi**, pag. **37**, a concentrazioni comprese tra 0.3 e 0.8% (w/w) vengono addizionati con destrano-FITC a peso molecolare noto subito dopo il ciclo termico in autoclave, quando cioè non si è ancora formato il gel. La concentrazione finale di fluoroforo nel gel è di 0.08% (w/w). Su tali gel sono stati condotti esperimenti di FRAP.

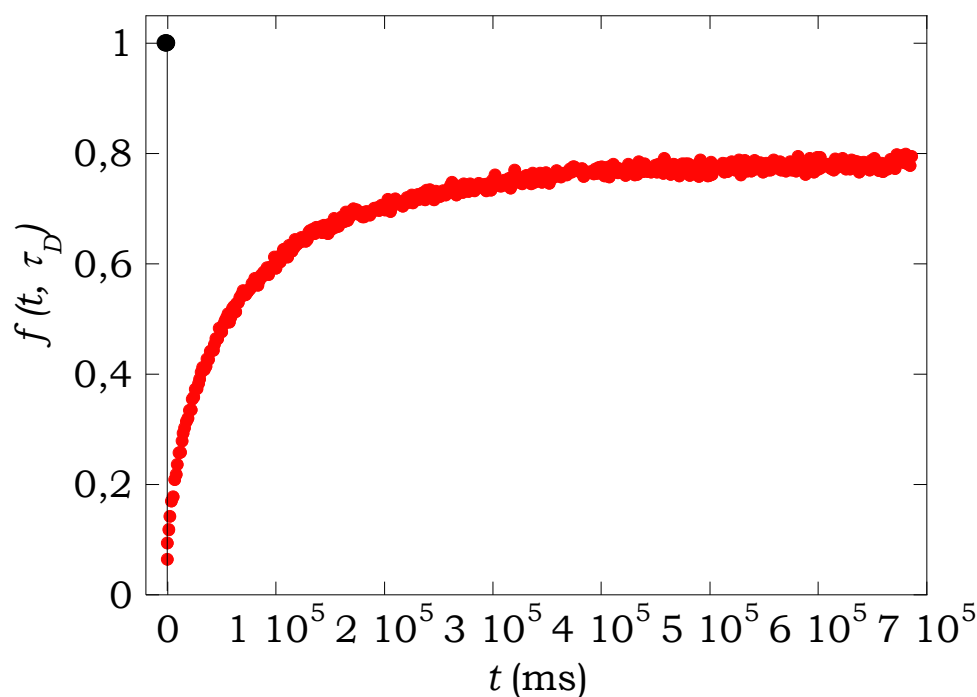


Figura 33: recupero di fluorescenza (●) di Hyadd4-G 0.8% (w/w) con destrano-FITC 500 kDa normalizzata rispetto a F_{PRE} (●).

Viene misurata l'intensità di fluorescenza prima del bleaching (F_{PRE}) e poi la stessa zona osservata (del diametro di circa 40 μm) viene "spenta", acquisendo, a partire dall'intensità subito dopo il bleaching (F_0), una serie di immagini che mostrano il recupero di fluorescenza nel tempo (**Figura 33**).

I dati, normalizzati a F_0 , vengono analizzati con un'equazione mono- o biesponenziale utilizzando l'eq. (19).

$$f(t, \tau_D) = \sum_{n=1}^{n=2} A_n \cdot \left(1 - e^{-t/\tau_n} \right) + B \quad (19)$$

dove A_n e τ_n rappresentano rispettivamente le intensità e i tempi caratteristici di diffusione delle due componenti e B è una costante.

Per $n=1$ si riesce ad ottenere un buon fit ($R^2=0.998$) solo con i campioni di Hyadd4-G in presenza di destrano-FITC 20 kDa (**Figura 34**).

Con destrano-FITC 250 e 500 kDa, per $n=1$ si ottiene il fit riportato in **Figura 35** ($R^2=0.989$).

Con l'utilizzo di due esponenziali, invece, l'interpolazione è molto più soddisfacente ($R^2=0.997$) (**Figura 36**).

Oltre all'ovvio miglioramento dell'interpolazione dovuto al maggior numero di parametri aggiustabili, il trattamento con la forma biesponenziale dell'eq. (19) per sonde polimeriche di peso molecolare 250 e 500 kDa, indica la presenza di due meccanismi di diffusione, al contrario di quanto trovato per la sonda fluorescente di peso molecolare 20 kDa.

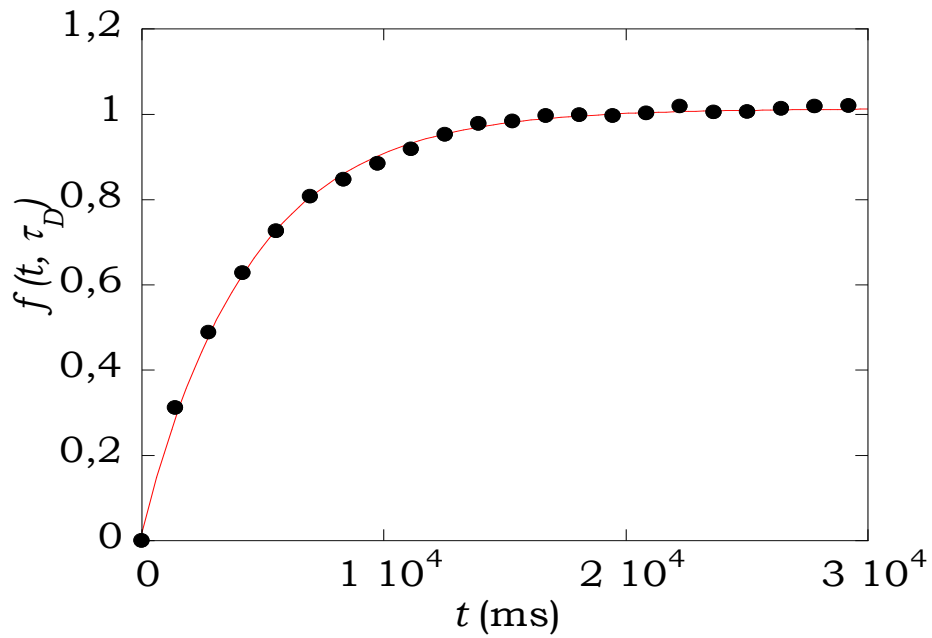


Figura 34: recupero di fluorescenza (\bullet) normalizzata rispetto a F_0 di Hyadd4-G 0.8% (w/w) con destrano-FITC 20 kDa e relativo fit (-) monoesponenziale.

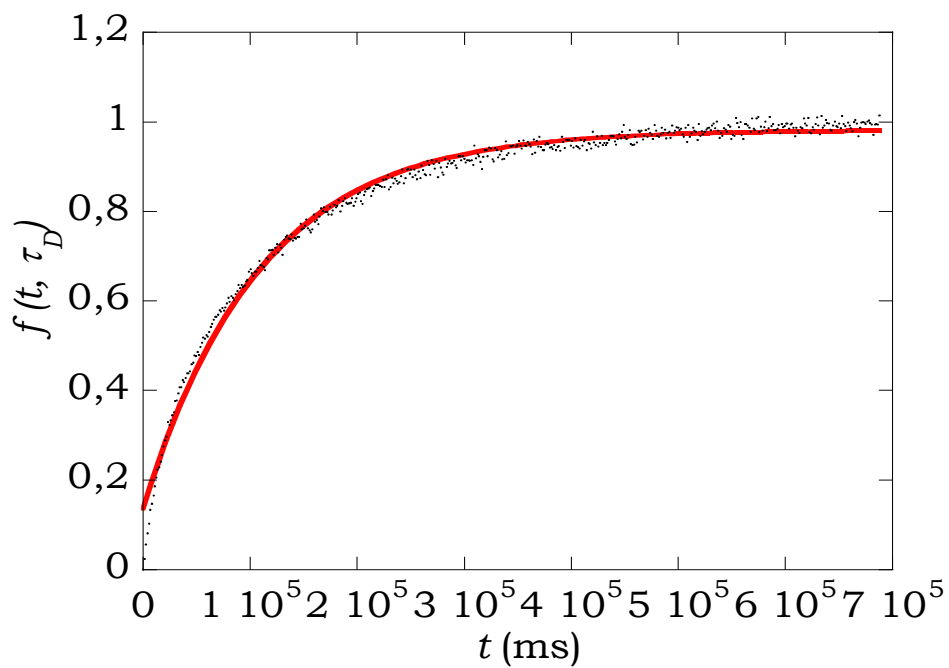


Figura 35: recupero di fluorescenza (\circ) normalizzata rispetto a F_0 di Hyadd4-G 0.8% (w/w) con destrano-FITC 500 kDa e relativo fit (-) monoesponenziale.

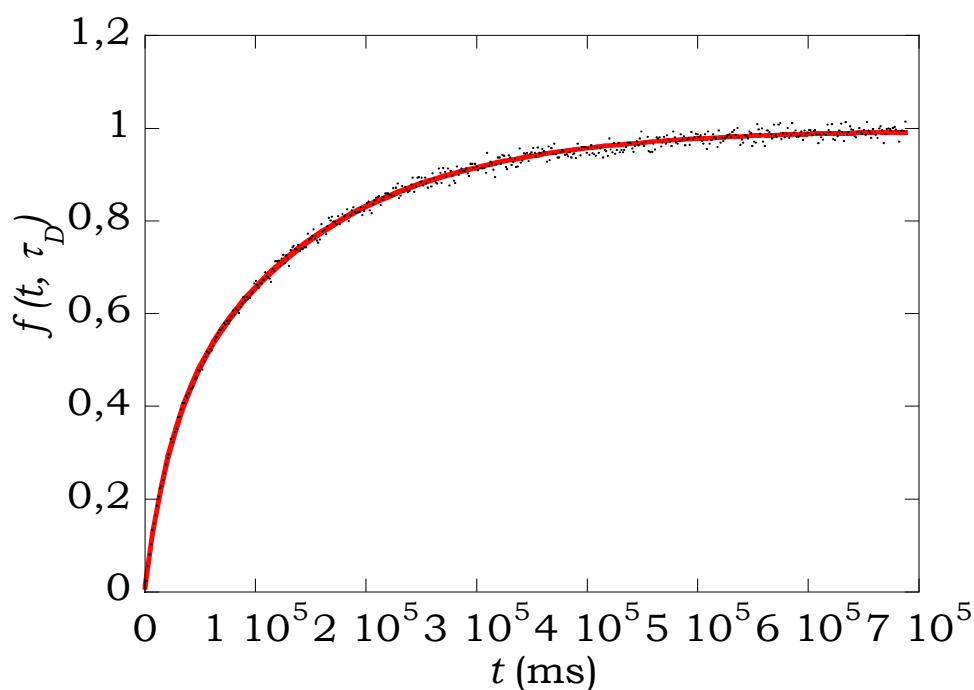


Figura 36: recupero di fluorescenza (\circ) normalizzata rispetto a F_0 di Hyadd4-G 0.8% (w/w) con destrano-FITC 500 kDa e relativo fit (-) bi esponenziale.

Questo ci ha permesso di ricavare i valori di τ_{D1} e τ_{D2} , tempi caratteristici di diffusione.

Conoscendo i parametri τ_D per il destrano-FITC 20 kDa e τ_{D2} per il destrano-FITC 250 e 500 kDa abbiamo determinato i coefficienti di diffusione delle molecole all'interno del gel per tutte le concentrazioni in esame.

In **Tabella 3** e in **Tabella 4** sono riassunti i comportamenti diffusivi delle sonde a diverso peso molecolare per diverse concentrazioni di Hyadd4-G.

a)	Hyadd4-G con destrano-FITC 500 kDa			
	τ_{D1} (s)	τ_{D2} (s)	Peso componente 1	Peso componente 2
0.8%	24 ± 3	136 ± 9	0.40 ± 0.02	0.60 ± 0.02
0.7%	24 ± 2	110 ± 1	0.30 ± 0.05	0.70 ± 0.05
0.6%	30 ± 1	114 ± 18	0.4 ± 0.1	0.6 ± 0.1
0.5%	30 ± 1	178 ± 8	0.4 ± 0.1	0.6 ± 0.1
0.4%	19 ± 5	104 ± 25	0.30 ± 0.05	0.70 ± 0.05
0.3%	14 ± 2	87 ± 8	0.2 ± 0.1	0.8 ± 0.1

b)	Hyadd4-G con destrano-FITC 250 kDa			
	τ_{D1} (s)	τ_{D2} (s)	Peso componente 1	Peso componente 2
0.8%	2.8 ± 0.2	18 ± 4	0.30 ± 0.05	0.70 ± 0.05
0.7%	2.9 ± 0.5	15 ± 3	0.30 ± 0.03	0.70 ± 0.03
0.6%	2.6 ± 0.8	13 ± 1	0.30 ± 0.05	0.70 ± 0.05
0.5%	3.1 ± 0.6	16 ± 1	0.40 ± 0.01	0.60 ± 0.01
0.4%	2.3 ± 0.1	15 ± 1	0.30 ± 0.01	0.70 ± 0.01
0.3%	2.1 ± 0.1	12 ± 1	0.30 ± 0.02	0.70 ± 0.02

c)	Hyadd4-G con destrano-FITC 20 kDa
	τ_D (s)
0.8%	5.5 ± 0.1
0.7%	4.3 ± 0.2
0.6%	5.8 ± 0.1
0.5%	5.6 ± 0.2
0.4%	6.5 ± 0.1
0.3%	3.8 ± 0.3

Tabella 3: parametri di fit per destrano-FITC con pesi molecolari di 500 (a), 250 (b) e 20 kDa (c) in Hyadd4-G a diversa concentrazione.

I coefficienti di diffusione sono stati ricavati per mezzo dell'eq. (17), nel caso delle frazioni 250 e 500 kDa, dal τ_{D2} . Come descritto dall'eq. (18), è possibile mettere in relazione il coefficiente di diffusione dei destrani-FITC con la composizione della matrice.

Hyadd4-G con destrano-FITC	$D (\cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s})$		
	500 kDa	250 kDa	20 kDa
0.8%	0.46 ± 0.07	1.3 ± 0.2	7.5 ± 0.1
0.7%	0.48 ± 0.04	1.2 ± 0.5	7.8 ± 0.1
0.6%	0.53 ± 0.12	1.1 ± 0.3	7.0 ± 0.2
0.5%	0.43 ± 0.04	1.2 ± 0.1	7.4 ± 0.2
0.4%	0.64 ± 0.09	1.1 ± 0.1	5.9 ± 0.3
0.3%	0.9 ± 0.2	1.6 ± 0.8	7.0 ± 0.2

Tabella 4: coefficienti di diffusione di destrano-FITC con pesi molecolari 20, 250 e 500 kDa in Hyadd4-G a diversa concentrazione.

Riportando il $\ln\left(\frac{D}{D_0}\right)$ in funzione di $\left(\frac{1}{H}-1\right)$ si ottiene un andamento lineare per tutti campioni analizzati in accordo con l'eq. (18) (Figura 37).

La relazione lineare che si riscontra per i campioni analizzati conferma la validità del modello utilizzato nella teoria del volume libero e, nel caso del destrano-FITC 20 kDa, l'unico campione che presenta un solo tempo di

diffusione all'interno della maglia del polimero, si nota che non c'è effetto di screening ($\phi=1$).

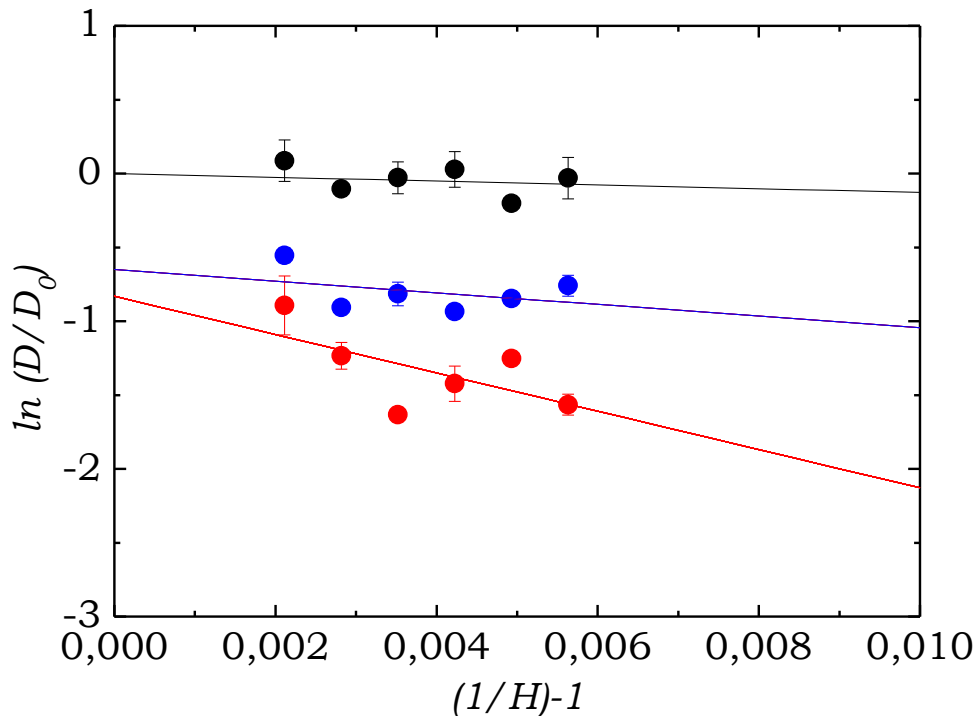


Figura 37: $\ln(D/D_0)$ del destrano-FITC in Hyadd4-G in funzione dell'inverso del grado di idratazione. Destrano-FITC 20 kDa (●), 250 kDa (●) e 500 kDa (●).

Un'intercetta nulla indica che la diffusione della sonda macromolecolare avviene senza impedimenti sterici dovuti al reticolo. Nel nostro caso questo si realizza solo con il destrano-FITC 20 kDa, in cui il processo di recupero di fluorescenza è mono-esponenziale. Al contrario, per gli altri due pesi molecolari, 250 e 500 kDa, l'intercetta è negativa indicando che il reticolo polimerico svolge la funzione di setaccio ("sieving effect").

Si riportano in **Tabella 5** i valori dei coefficienti di diffusione in acqua [49] dei destrani monodispersi con pesi molecolari corrispondenti a quelli utilizzati nell'esperimento di FRAP. Le dimensioni medie delle macromolecole di destrano-FITC utilizzate [50], mostrate in **Tabella 6**, possono essere messe in relazione con le dimensioni medie delle maglie del gel (δ), comprese tra 14 e 25 nm in dipendenza della concentrazione del gel, determinate mediante scattering della luce quasielastico (DLS) (**Tabella 1**). I risultati di esperimenti di FRAP sono in accordo con le misure di DLS condotte sui gel.

Destrano-FITC	20 kDa	250 kDa	500 kDa
D_0 (cm²/s)	$7.2 \cdot 10^{-7}$	$2.8 \cdot 10^{-7}$	$2.2 \cdot 10^{-7}$

Tabella 5: coefficienti di diffusione in acqua di destrano-FITC con pesi molecolari di 20, 250 e 500 kDa.

Destrano-FITC	Raggio idrodinamico, R_H, (nm) del destrano-FITC	$\delta/2R_H$	Effetto sieving
500 kDa	17	0.3	+
250 kDa	10	0.5	+
20 kDa	~5	1.6	-

Tabella 6: dimensioni medie di maglia delle molecole di destrano-FITC utilizzate negli esperimenti di FRAP.

Il rapporto $\delta/2R_H$ è maggiore di 1 quando non si verifica effetto di schermo da parte del reticolo, mentre è minore di 1 in presenza di tale effetto.

Hyadd4-FITC

Per valutare la mobilità intrinseca delle catene polimeriche all'interno del reticolo del gel è stato sintetizzato il polimero Hyadd4-FITC, nel quale le molecole di FITC vengono legate direttamente sulla catena polimerica.

In questo modo è possibile osservare la mobilità della catena polimerica con un esperimento di FRAP.

Procedura di sintesi

Si sciolgono 100 mg di Hyadd4p5 in 20 ml di PBS. Si aggiungono lentamente e sempre sotto agitazione 2 mg di FITC. Si lascia una notte in agitazione a temperatura ambiente. Si sottopone il campione al ciclo termico in autoclave e si ottiene un gel di colore giallo molto intenso. Per evitare la possibilità che parte della FITC legata al polimero si stacchi in seguito a tale ciclo, l'idrogel viene precipitato in etanolo (1:2 in volume), lavato fino a vedere la scomparsa del colore giallo della FITC nell'etanolo di lavaggio e seccato in stufa a 37 °C.

Il prodotto secco viene risolubilizzato in PBS, formando nuovamente un gel in un intervallo di tempo di 2-3 ore. L'idrogel si presenta di colore giallo pallido per la presenza della FITC sulla catena polimerica.

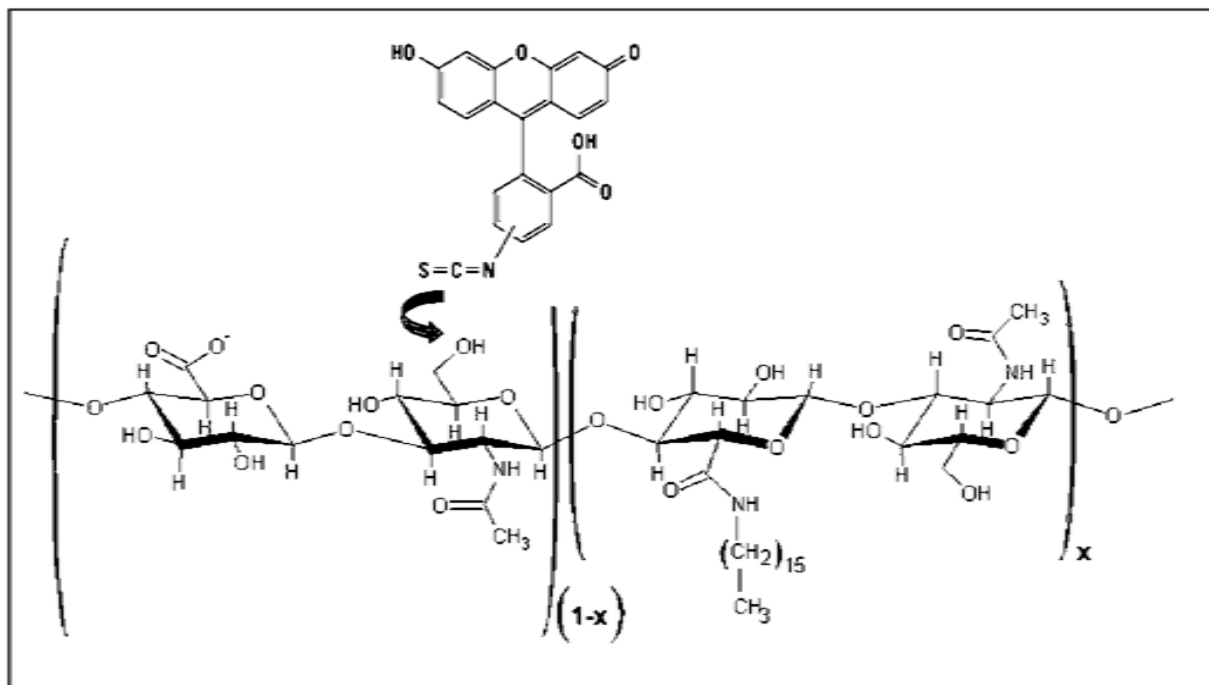


Figura 38: schema di sintesi di Hyadd4-FITC.

FRAP su Hyadd4-FITC

Sono stati condotti esperimenti di FRAP sull'idrogel Hyadd4-FITC (**Figura 39**). Osservando il recupero di fluorescenza dopo photobleaching dell'idrogel si nota che non vi è praticamente alcun recupero. Questo è indice di una scarsissima mobilità delle catene molecolari all'interno del reticolo polimerico del gel nelle condizioni di analisi, cioè in condizioni di sistema non perturbato.

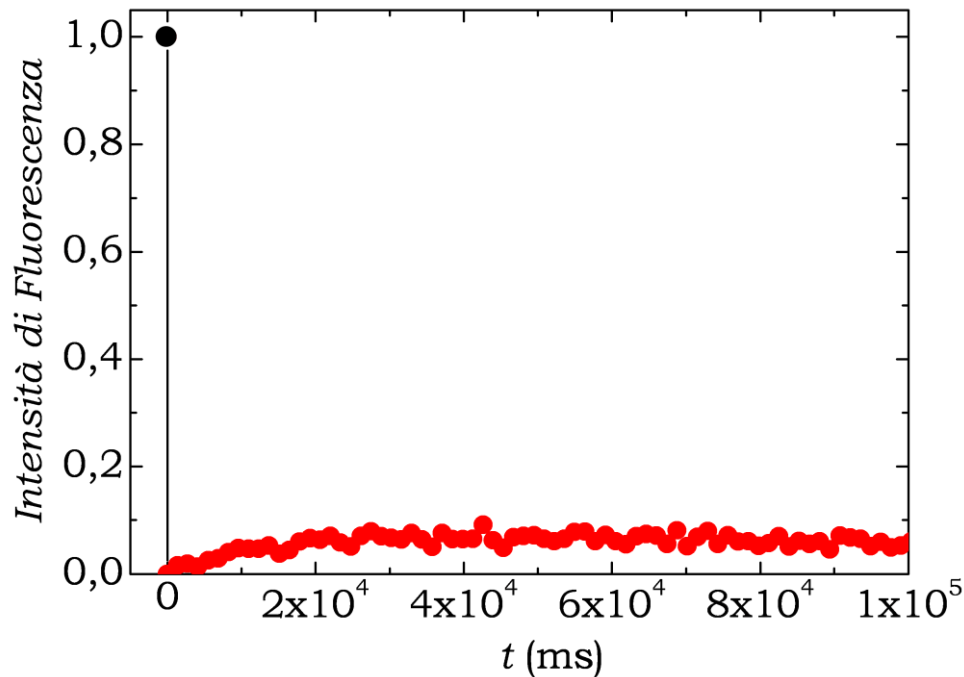


Figura 39: recupero di fluorescenza (●) di Hyadd4-FITC 0.8% (w/w) normalizzata rispetto a F_{PRE} (●).

FRAP su Hya-FITC

La procedura di coniugazione della sonda fluorescente su Hya è identica a quella utilizzata per Hyadd4-FITC. L'analogo esperimento di FRAP compiuto su Hya-FITC (**Figura 40**) alle stesse concentrazioni utilizzate nello Hyadd4-FITC, mostra che la fluorescenza viene recuperata molto velocemente con costante di tempo caratteristica, τ_D , pari a 12 ± 2 s.

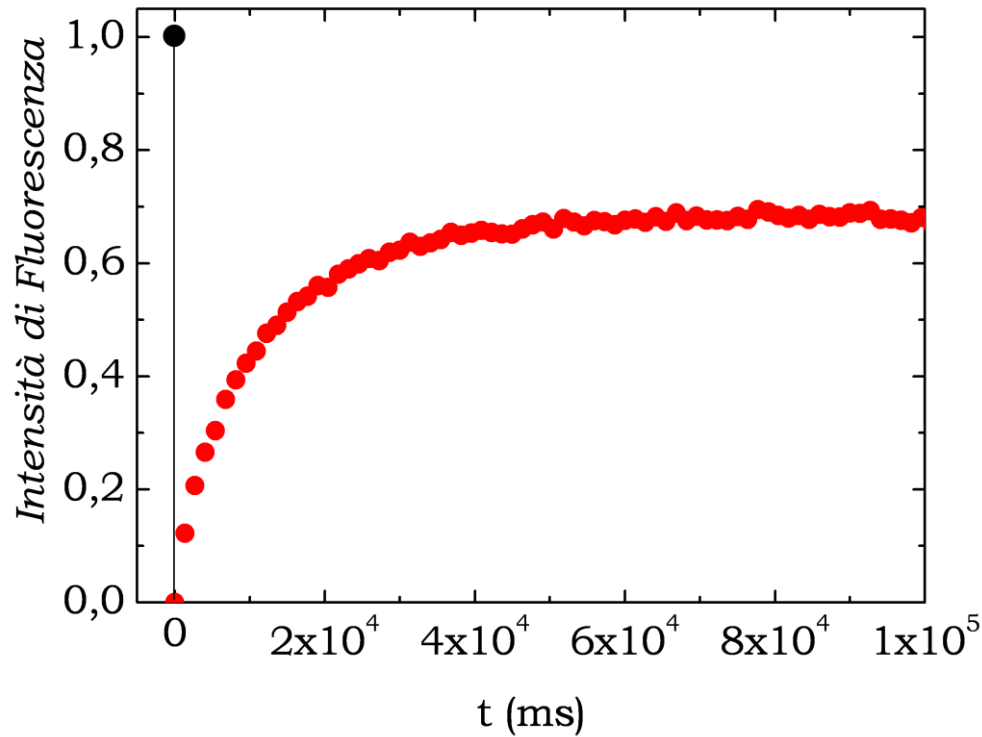


Figura 40: recupero di fluorescenza (●) normalizzata rispetto a F_{PRE} (●) di Hya-FITC 0.8% (w/w).

La possibilità di movimento in una soluzione di Hya è giustificata dal fatto che non sono presenti le interazioni idrofobiche che invece esistono nell'idrogel Hyadd4-FITC.

Questo risultato avvalorava e conferma l'ipotesi che la formazione del gel sia dovuta proprio alle interazioni idrofobiche tra le catene laterali alchiliche presenti sulle catene polimeriche.

BIBLIOGRAFIA

- 40** Tom K. L. Meyvis, Stefaan C. De Smedt, Patrick Van Oostveldt and Joseph Demeester, *Pharmaceutical Research*, **1999**, Vol. 16, No. 8, 1153-1162.
- 41** Brian L. Sprague and James G. McNally, *TRENDS in Cell Biology*, **2005**, Vol. 15, No. 2, 84-91.
- 42** Yoav I. Henis, Barak Rotblat, Yoel Kloog, *Methods*, **2006**, 40, 183-190.
- 43** D. Axelrod, D. E. Koppel, J. Schlessinger, E. Elson, W. W. Webb, *Biophysical Journal*, **1976**, 16, 1055-1069.
- 44** Holly A. Leddy and Farshid Guilak, *Annals of Biomedical Engineering*, **2003**, 31, 753-760.
- 45** Brian Amsden, *Macromolecules*, **2001**, 34, 1430-1435.
- 46** Brian Amsden, *Macromolecules*, **1998**, 31, 8382-8395.
- 47** W.E. Hennink, O. Franssen, W.N.E. van Dijk-Wolthuis, H. Talsma, *Journal of Controlled Release*, **1997**, 48, 107-114.
- 48** A. N. de Belder and Kirsti Granath, *Carbohydrate Research*, **1973**, 30, 375-378.
- 49** Philip Gribbon and Timothy E Hardingham, *Biophysical Journal*, August **1998**, 75, 1032-1039.

- 50** G. Bolle, P. Codastefano, G. Paradossi, *IEEE transactions on instrumentation and measurement*, **1994**, 43, 553-557.
-

CAPITOLO 5

Fluorescenza

Per convalidare l'ipotesi che la formazione del gel sia dovuta a interazioni idrofobiche tra le catene laterali alchiliche sono state condotte misure di fluorescenza in soluzione [51].

5.1 Risultati e discussione

Sono state preparate soluzioni di Hyadd4-G a concentrazioni comprese tra 0.001 e 0.2% (w/w) ed è stato utilizzato un probe di fluorescenza specifico per i domini idrofobici [52, 53], il *Nile Red* (**Figura 41**).

La fluorescenza di questo colorante dipende dal mezzo in cui è disperso. Tanto più bassa è la costante dielettrica del solvente tanto maggiore è la resa quantica del Nile Red. In soluzione acquosa la fluorescenza è completamente soppressa.

In presenza di domini idrofobici, la sonda emette fluorescenza in modo proporzionale alla quantità e all'estensione dei domini.

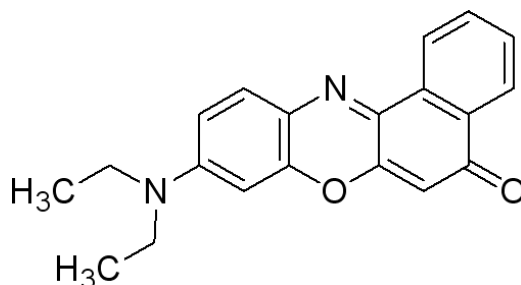


Figura 41: struttura del Nile Red.

Hyadd4-G con Nile Red

Il Nile Red viene dissolto in etanolo [54, 55], ottenendo una soluzione madre ad una concentrazione di 80 μ M.

Le soluzioni dei campioni analizzati vengono preparate utilizzando la stessa procedura necessaria alla formazione del gel, pertanto vengono sottoposte al ciclo termico in autoclave e la sonda fluorescente viene aggiunta durante la fase di raffreddamento delle soluzioni ad una concentrazione finale di 2 μ M.

Si preparano campioni di Hyadd4-G a concentrazioni comprese tra lo 0.001 e lo 0.2% (w/w), cioè prima di raggiungere la concentrazione alla quale si forma l'idrogel (0.3% w/w).

L'esperimento viene condotto dopo 90 minuti dall'aggiunta del fluoroforo per avere una stabilizzazione dell'intensità di fluorescenza. Subito dopo l'aggiunta, infatti, si ha una diminuzione dell'intensità di fluorescenza del Nile Red. Questo comportamento è dovuto alla scarsa solubilità del fluoroforo in soluzione acquosa che tende a formare aggregati. Questi aggregati precipitano nel tempo provocando una diminuzione di intensità di fluorescenza [56].

Dopo aver equilibrato per 90 min, si raggiunge una stabilizzazione dell'intensità di fluorescenza e il segnale rilevato sarà dovuto all'interazione del Nile Red con le zone idrofobiche presenti nel campione.

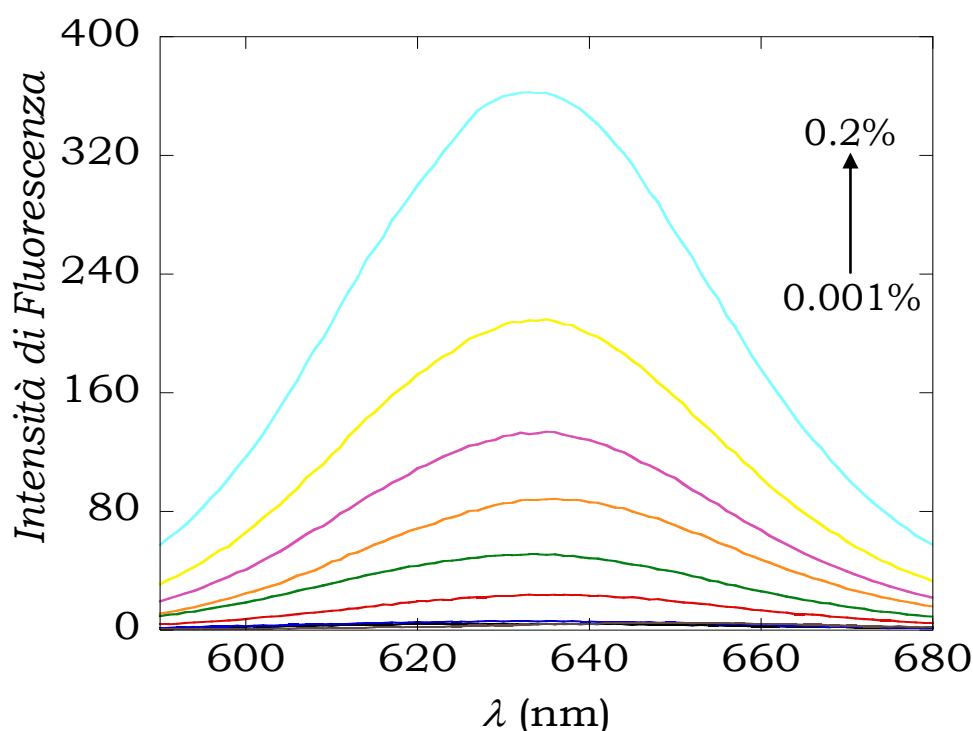


Figura 42: spettro di fluorescenza del Nile Red in presenza di differenti concentrazioni di Hyadd4-G in PBS a pH 6.9, da 0.001 a 0.2% (w/w).

L'esperimento di emissione di fluorescenza viene condotto ad una lunghezza d'onda di eccitazione di 578 nm e lo spettro di emissione viene registrato tra 600 e 750 nm [57]. La formazione di zone di giunzione idrofobiche in soluzione viene osservata sullo spettro di emissione di fluorescenza del Nile Red (**Figura 42**); infatti si nota un aumento di intensità con la concentrazione di polimero in soluzione. Questo aumento di intensità è dovuto all'estensione dei domini idrofobici del sistema, poiché in soluzione acquosa la fluorescenza del Nile Red è totalmente spenta.

In **Figura 43** si riporta l'intensità di fluorescenza a 633 nm in funzione della concentrazione di polimero in soluzione fino al punto di gelazione (alla concentrazione di 0.3% w/w).

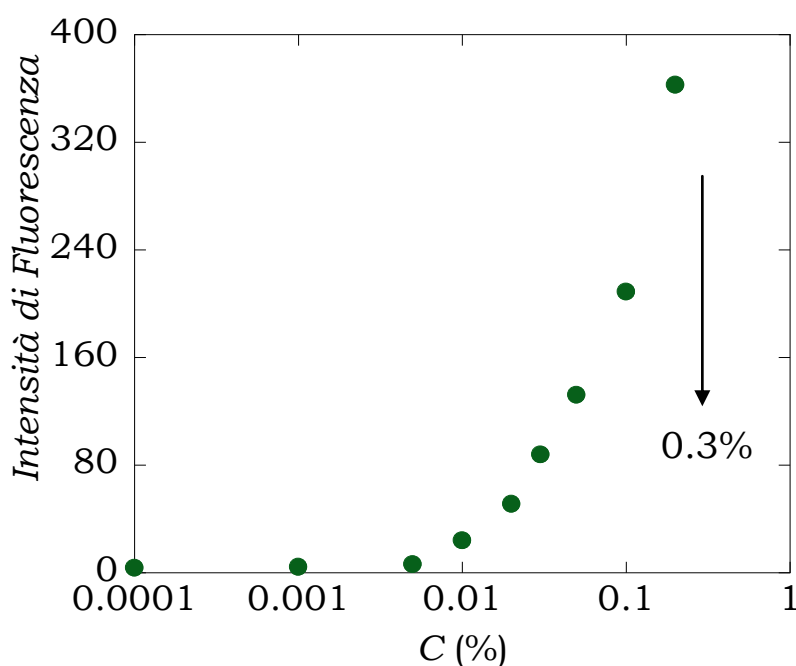


Figura 43: intensità di fluorescenza del Nile Red a 633 nm in funzione della concentrazione di Hyadd4-G in PBS a pH 6.9, da 0.001 a 0.2% (w/w).

L'aumento di fluorescenza è proporzionale al numero e all'estensione dei domini idrofobici presenti nel gel.

Hya con Nile Red

Per completezza si è studiato il comportamento del Nile Red in presenza Hya. Negli spettri di fluorescenza ottenuti con soluzioni di Hya preparate nelle stesse condizioni di quelle di Hyadd4-G e alle stesse concentrazioni non si osserva nessun incremento di fluorescenza con l'aumentare della concentrazione di polimero in soluzione (**Figura 44**).

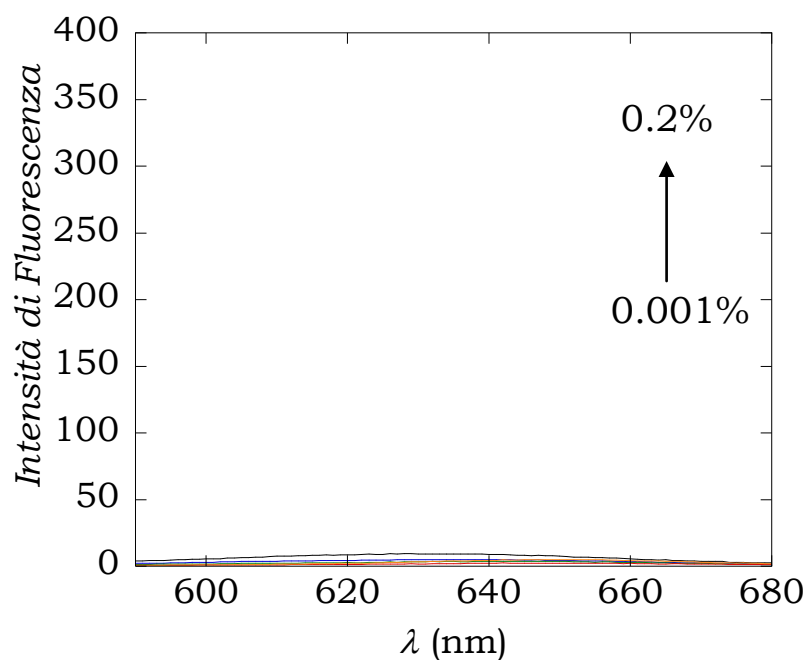


Figura 44: spettro di fluorescenza del Nile Red in presenza di differenti concentrazioni di Hya in PBS a pH 6.9, da 0.001 a 0.2% (w/w).

L'assenza di un incremento di fluorescenza nelle soluzioni di Hya, che non possiede le catene laterali alifatiche invece presenti su Hyadd4-G, conferma l'ipotesi che la formazione e la stabilizzazione del gel sono dovute soprattutto ad interazioni di tipo idrofobiche tra le catene esadecilammidiche.

Nonostante il basso grado di sostituzione sulla catena principale la formazione di domini idrofobici anche a concentrazioni polimeriche estremamente basse è la condizione necessaria per la costituzione della fase gel.

BIBLIOGRAFIA

- 51** *Experimental Methods in Polymer Science*, Edited by Toyochi Tanaka, **2000**.
- 52** B. D. Wagner, N. Stojanovic, G. Leclair, C. K. Jankowski, *J. Incl. Phenom. Macro. Chem.*, **2003**, 45, 275-283.
- 53** G. Diaz, M. Melis, B. Batetta, F. Angius, A. M. Falchi, *Micron*, **2008**, 39, 819-824.
- 54** Barthélemy Demeule, Robert Gurny, Tudor Arvinte, *International Journal of Pharmaceutics*, **2007**, 329, 37-45.
- 55** Dieter Jendrossek, *Biomacromolecules*, **2005**, 6, 598-603.
- 56** M. B. Brown, J. N. Miller, N. J. Seare, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **1995**, 13, 1011-1017.
- 57** So Yeon Kim, Alexander N. Semyonov, Robert J. Twieg, Arthur L. Horwich, Judith Frydmann and W. E. Moerner, *J. Phys. Chem. B*, **2005**, 109, 24517-24525.
-
-

CAPITOLO 6

Reologia

Per avere informazioni sul comportamento viscoelastico e sulla dinamica dei sistemi analizzati, abbiamo valutato la risposta viscoelastica degli idrogel sottoponendo i sistemi a diverse sollecitazioni meccaniche [58]. La parola “reologia” deriva dal verbo greco $\rho\epsilon\omega$, scorrere, per descrivere la scienza che studia il flusso e le deformazioni dei corpi. La celebre frase del filosofo Eraclito di Efeso, $\pi\alpha\nu\tau\alpha \rho\epsilon\iota$, fu scelta come motto della Società di Reologia, fondata a Columbus, Ohio, il 29 aprile 1929, e la clessidra fu eletta a suo simbolo, a rimarcare l’intrinseca importanza della variabile “tempo” nello studio della reologia.

6.1 Viscoelasticità lineare

Il comportamento dinamico dei polimeri prende il nome di *viscoelasticità*. Il comportamento di *fluido viscoso* o *solido elastico* rappresentano solo gli

estremi di uno spettro continuo di risposte dei materiali al cui interno si collocano i polimeri. Per comprendere la teoria della viscoelasticità facciamo riferimento a due modelli ideali:

- il solido elastico,
- il liquido viscoso.

Un solido ideale soggetto ad uno sforzo si deforma elasticamente: l'energia spesa nella deformazione si conserva sotto forma di energia potenziale elastica ed è restituita quando viene rimosso lo sforzo applicato.

Al contrario, fluidi ideali subiscono deformazioni totalmente irreversibili: in altre parole, tutta l'energia spesa per imporre la deformazione è dissipata sotto forma di calore e non può essere restituita annullando la deformazione stessa (comportamento puramente viscoso).

La *legge di Hooke* e la *legge di Newton* descrivono rispettivamente il comportamento dei corpi elastici e dei fluidi viscosi, definendo le relazioni sforzo-deformazione per i due casi.

LEGGE DI HOOKE:

$$\sigma = G \cdot \gamma \quad (20)$$

σ è lo *sforzo (stress)* [Pa], G è il *modulo di elasticità* [Pa] e γ è la *deformazione (strain)* [m/m]. Nei corpi elastici lo sforzo è direttamente proporzionale alla deformazione subita dal materiale ed indipendente dalla velocità di deformazione. Il modulo di elasticità definisce la resistenza del solido alla deformazione ed è una proprietà che dipende dal materiale e dalla sua storia termica. La legge di Hooke è valida sia per sforzi normali che per sforzi tangenziali.

LEGGE DI NEWTON:

$$\sigma = \eta \cdot \dot{\gamma} \quad (21)$$

η è la *viscosità* [Pa·s] e $\dot{\gamma}$ è la *velocità di deformazione* [m/m].

Nei fluidi puramente viscosi lo sforzo è proporzionale alla velocità di deformazione ed indipendente dall'entità della deformazione stessa. La viscosità definisce la resistenza di un fluido alla variazione irreversibile di posizione dei suoi elementi di volume.

Ci sono due tipi importanti di deviazioni dal comportamento puramente Hookeano o Newtoniano:

- la deformazione in un solido o la velocità di deformazione in un liquido possono non essere direttamente proporzionali allo sforzo applicato ma avere una dipendenza più complessa,

- lo sforzo può dipendere sia dalla deformazione sia dalla velocità di deformazione.

Tali anomalie riflettono un comportamento insieme elastico e viscoso e tale comportamento è chiamato *viscoelastico*.

La reologia studia le relazioni sforzo-deformazione nei corpi, permettendo così di prevedere, ai fini pratici, il comportamento di un materiale sotto determinate condizioni di utilizzo. La relazione più semplice che descrive il legame sforzo-deformazione in un materiale è di tipo lineare:

$$\sigma = G \cdot \gamma + \eta \cdot \dot{\gamma} \quad (22)$$

Questa equazione rappresenta il *comportamento viscoelastico lineare* ed implica che gli sforzi connessi a deformazione e velocità di deformazione sono additivi.

La procedura sperimentale prevede l'applicazione di una deformazione tangenziale (*shear strain*) oscillatoria con una data frequenza ω e la misura simultanea dello sforzo di taglio (*shear stress*), o viceversa.

Le prove sono condotte con l'ausilio di un reometro rotazionale e si possono utilizzare tecniche "ad impulso", cioè con applicazione di carichi o deformazioni istantanei (esperimenti di *creep* o *stress relaxation*) oppure tecniche dinamiche per analizzare le proprietà meccaniche di un campione da testare [59-61].

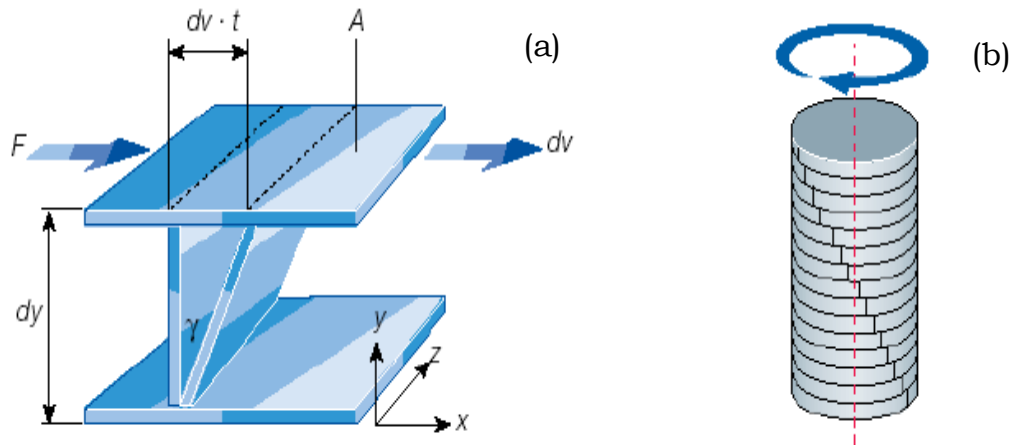


Figura 45: lo sforzo o la deformazione tangenziale (*shear stress o shear strain*) nel caso di un reometro rotazionale sono basati sullo scorrimento, “shearing”, tra piani paralleli **(a)** in rotazionale l'uno rispetto agli altri **(b)**.

Analisi dinamica in regime oscillatorio

I metodi dinamici in regime sinusoidale permettono di estendere la curva di caratterizzazione di un materiale in un range di frequenze molto vasto (10^{-9} - 10^9 Hz). Supponiamo che al campione in esame sia applicata una deformazione di ampiezza γ_0 e andamento sinusoidale:

$$\gamma(t) = \gamma_0 \cdot \sin(\omega \cdot t) \quad (23)$$

La velocità di applicazione della deformazione (*strain rate*) è definita come la derivata di γ rispetto al tempo (eq. **(24)**).

$$\dot{\gamma}(t) = \omega \cdot \gamma_0 \cdot \cos(\omega \cdot t) \quad (24)$$

Se il materiale in studio presenta un comportamento viscoelastico lineare risponderà alla sollecitazione con uno sforzo, σ , anch'esso sinusoidale sfasato di un angolo δ rispetto alla deformazione applicata, il cui valore dipende dalle caratteristiche del materiale:

$$\sigma(t) = \sigma_0 \cdot \sin(\omega \cdot t + \delta) \quad (25)$$

o equivalentemente secondo la relazione **(26)**:

$$\sigma(t) = \sigma_0 \cdot [\cos(\delta) \cdot \sin(\omega \cdot t) + \sin(\delta) \cdot \cos(\omega \cdot t)] \quad (26)$$

$$\sigma(t) = \gamma_0 \cdot G' \cdot \sin(\omega \cdot t) + \gamma_0 \cdot G'' \cdot \cos(\omega \cdot t) \quad (27)$$

Le quantità $G'=(\sigma_0/\gamma_0) \cos(\delta)$ e $G''=(\sigma_0/\gamma_0) \sin(\delta)$ sono definite rispettivamente modulo elastico e modulo viscoso.

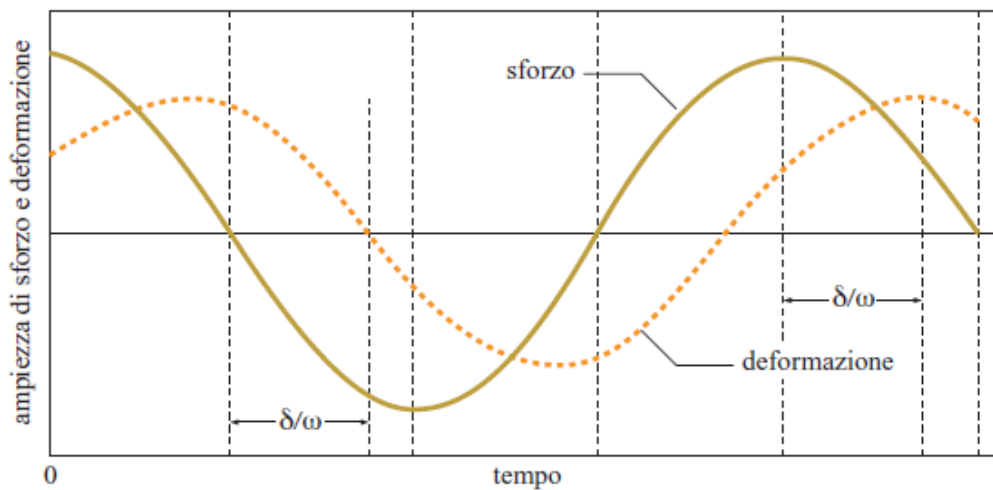


Figura 46: risposta del materiale ad una deformazione subita.

Un solido elastico presenterà un angolo di fase nullo, mentre $\delta=\pi/2$ caratterizza il comportamento viscoso; molti materiali presentano un comportamento intermedio, cioè “viscoelastico”; se δ è prossimo a $\pi/2$ prevarrà il comportamento viscoso, mentre angoli di fase vicini a 0° indicano caratteristiche elastiche prevalenti.

La notazione con i numeri complessi ci permette di scrivere:

$$\gamma^*(\omega) = \gamma_0 \cdot e^{i\omega t} \quad (28)$$

$$\sigma^*(\omega) = \sigma_0 \cdot e^{i(\omega t + \delta)} \quad (29)$$

$$\frac{\sigma^*}{\gamma^*} = \frac{\sigma_0}{\gamma_0} \cdot e^{i\delta} = G^* = G' + i \cdot G'' \quad (30)$$

Le misure dinamiche forniscono infatti il valore del *modulo complesso* $G^*(\omega)$, definito come il rapporto fra lo stress e la deformazione totali subiti dal materiale ad una data frequenza:

$$\frac{\sigma(\omega)}{\gamma(\omega)} = G^*(\omega) = G'(\omega) + i \cdot G''(\omega) \quad (31)$$

$G'(\omega)$ descrive la capacità del campione di immagazzinare energia elastica (*storage modulus*), mentre $G''(\omega)$ è connesso alla capacità di dissiparla (*loss modulus*).

Il rapporto fra l'energia persa e quella immagazzinata in ogni oscillazione, definito *loss tangent*, è dato dall'equazione **(32)**.

$$\text{tg } \delta = \frac{G''(\omega)}{G'(\omega)} \quad (32)$$

Il valore di ω per cui $G'(\omega)$ e $G''(\omega)$ si eguagliano, ossia quando $\text{tg}\delta=1$, è definita *frequenza di cross-over* (ω_c). Questo valore rappresenta il punto in cui si passa da un comportamento prevalentemente viscoso ad un comportamento prevalentemente elastico, o viceversa.

L'inverso della frequenza di intersezione dei due moduli rappresenta il *tempo caratteristico di rilassamento*, τ_c , del materiale:

$$\tau_c = \frac{1}{\omega_c} \quad (33)$$

e delimita il comportamento principalmente viscoso a basse frequenze e quello elastico ad alte frequenze.

Il concetto di tempo caratteristico di rilassamento è direttamente connesso alla particolare struttura “entangled” [62] esibita dai fusi polimerici o da soluzioni polimeriche concentrate su scala molecolare, ovvero una struttura costituita da lunghe catene aggrovigliate le une alle altre in legami fisici e/o chimici. Tali strutture possono essere “sgrovigliati” in caso di deformazione lenta (dando luogo ad un comportamento principalmente viscoso) e di contro possono agire come nodi rigidi di un network tridimensionale in caso di deformazione veloce (contribuendo alla risposta elastica del materiale).

Analisi in regime transiente

Risposta elastica ritardata (“creep”)

Le prove di *creep* sono condotte applicando uno stress costante al campione e misurando l'andamento temporale della deformazione; tolto il carico si può valutare il *recovery*, cioè il ritorno della deformazione nel tempo.

Nel caso di fluido ideale si osserva che la deformazione, γ , cresce linearmente con il tempo. La deformazione finale è irreversibile e dipende dal tempo di applicazione e dal valore dello sforzo; il lavoro di deformazione viene dissipato sotto forma di calore (***Figura 47-a***).

Nel caso del solido elastico la risposta del materiale, in termini di deformazione, è istantanea; la deformazione, γ , è indipendente dal tempo ed è del tutto reversibile; il lavoro di deformazione è conservato sotto forma di energia elastica (***Figura 47-c***).

Ripetendo l'identico esperimento per un corpo viscoelastico si osserva che la deformazione varia con il tempo, ma non linearmente, e che essa può essere parzialmente o totalmente recuperata. Il lavoro di deformazione è in parte dissipato ed in parte conservato elasticamente (***Figura 47-b***).

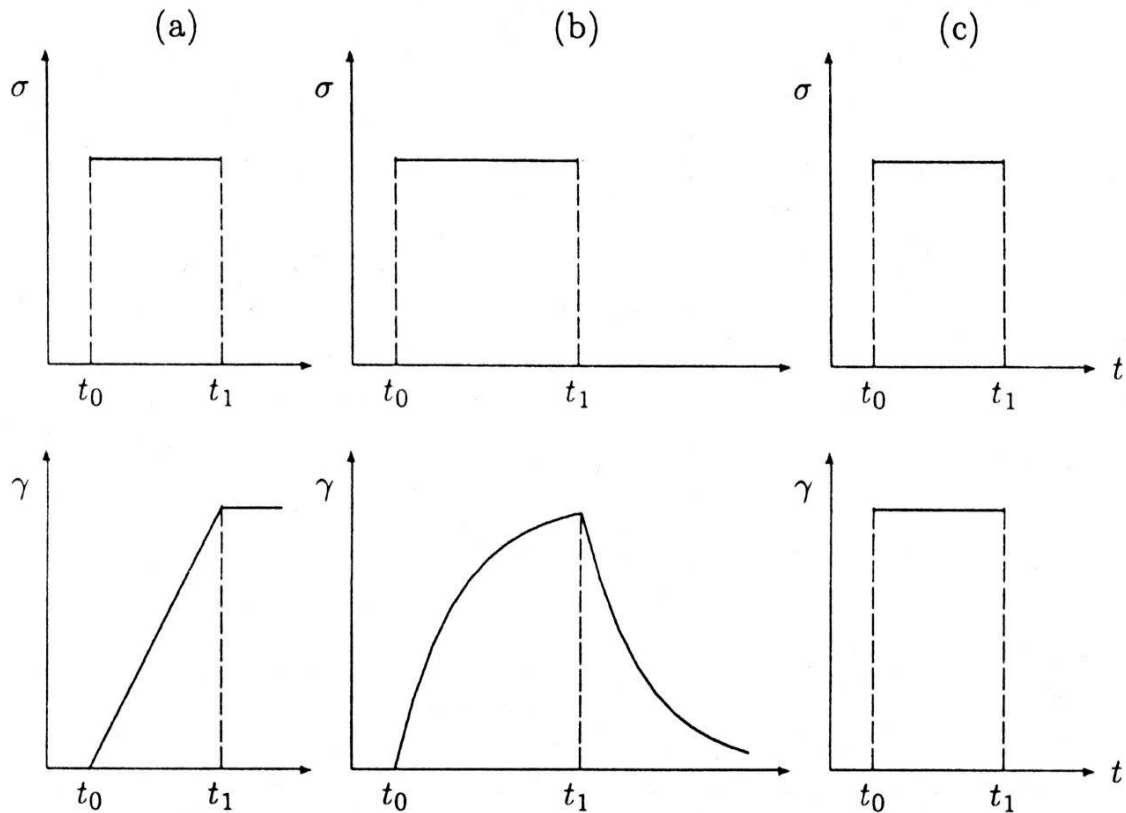


Figura 47: deformazione γ , causata dall'applicazione istantanea di uno stress σ , di un fluido ideale **(a)**, di un corpo viscoelastico **(b)** e di un corpo elastico ideale **(c)**.

Si arriva pertanto alle seguenti conclusioni:

- le risposte viscoelastiche dei materiali sono molte di più dei due casi limite del corpo elastico e del fluido ideale,
- non è più possibile definire in modo univoco i coefficienti di proporzionalità fra sforzo e deformazione in quanto il loro valore dipende infatti dal tempo di osservazione,

- il comportamento osservabile dipende dalla storia meccanica; esso infatti è differente a seconda che si imponga una forza costante (esperimento di *creep*) o una deformazione costante (esperimento di *stress-relaxation*),
- non è ben definito il confine fra comportamento di un corpo solido e di un corpo liquido.

Applicando, quindi, ad un materiale viscoelastico un carico istantaneo σ_0 dal tempo t_0 al tempo t_1 si ha la risposta rappresentata in **Figura 48**: dopo una immediata risposta elastica, lo strain aumenta fino al cessare del carico al tempo t_1 , dopodiché si osserva un recupero di deformazione.

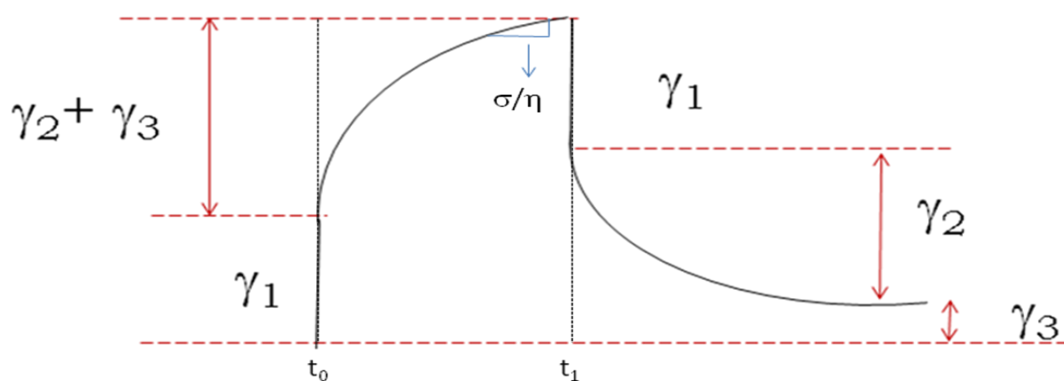


Figura 48: risposta a creep di un generico materiale viscoelastico lineare.

La deformazione totale è la somma di tre contributi, γ_1 , γ_2 e γ_3 : γ_1 e γ_2 sono rispettivamente la deformazione elastica istantanea e ritardata, mentre γ_3 è una deformazione residua non recuperabile, dovuta allo scorrimento viscoso. Si definisce in tal modo una grandezza $J(t)$, detta “cedevolezza” o *creep compliance*, funzione del tempo e somma di più contributi:

$$\frac{\gamma(t)}{\sigma} = J(t) = J_1 + J_2 + J_3 \quad (34)$$

Nei polimeri reticolati, se il carico è applicato per un tempo sufficientemente lungo, la deformazione raggiunge un valore limite J_e (*equilibrium compliance*), e non si presenta il termine J_3 , vale a dire che la deformazione è completamente recuperata; i termini J_1 e J_2 rappresentano rispettivamente il termine *unrelaxed*, cioè la risposta immediata elastica, ed il termine *relaxed*, il cui valore dipende dal tempo.

La presenza di una *equilibrium compliance* permette di definire un materiale come un *solido* viscoelastico, mentre in caso contrario la presenza di uno scorrimento viscoso indica che abbiamo a che fare con *liquidi* viscoelastici.

In maniera analoga alla relazione **(31)** si definisce la *compliance complessa* $J(\omega)$:

$$\frac{\gamma(\omega)}{\sigma(\omega)} = J^*(\omega) = J'(\omega) - i \cdot J''(\omega) \quad (35)$$

dove J' e J'' (*storage e loss compliance*) hanno lo stesso significato di G' e G'' . Dal valore della compliance si può ricavare la viscosità di punto zero, cioè la viscosità a sollecitazione nulla:

$$\frac{\partial J}{\partial t} = \frac{1}{\eta_0} \quad (36)$$

Rilassamento dello sforzo (“stress relaxation”)

La controparte delle prove di creep è costituita dagli esperimenti di *stress relaxation*. In questo caso si applica sul materiale una deformazione costante istantanea e si misura il rilassamento della tensione (stress); questo fenomeno è dovuto alla redistribuzione delle molecole nel materiale senza che ci siano variazioni macroscopiche di volume. L'assunzione di linearità definisce il modulo di rilassamento di stress (*stress relaxation modulus*):

$$\frac{\sigma(t)}{\gamma} = G(t) \quad (37)$$

E' importante rimarcare che quanto detto è valido esclusivamente nel campo delle piccole deformazioni.

Gli esperimenti di creep e stress relaxation sono metodi utili per misurare il comportamento a tempi lunghi di carico o di deformazione.

6.2 Proprietà dei fluidi

I modelli lineari sono in grado di descrivere svariati tipi di comportamenti reologici e sono quindi di grandissima utilità; tuttavia essi possono essere considerati validi solo per variazioni limitate di γ e di $\dot{\gamma}$, in un regime detto lineare, e in genere G ed η sono funzioni di γ e $\dot{\gamma}$.

Nel regime di viscoelasticità lineare i coefficienti di proporzionalità (moduli e viscosità) sono indipendenti sia dallo sforzo che dalla deformazione/velocità di deformazione.

Una parte molto rilevante della reologia è lo studio delle variazioni di viscosità η dei fluidi in funzione della velocità di deformazione di taglio $\dot{\gamma}$, in quanto allo stesso materiale possono essere richiesti comportamenti diversi a seconda del campo di γ a cui è sottoposto.

In un grafico σ - $\dot{\gamma}$ (**Figura 49**) la viscosità è data dalla pendenza delle curve rappresentate:

$$\eta = \frac{\partial \sigma}{\partial \dot{\gamma}} \quad (38)$$

Un fluido newtoniano è rappresentato da una retta passante per l'origine, cioè ad una sollecitazione il fluido risponde con una velocità di deformazione linearmente proporzionale.

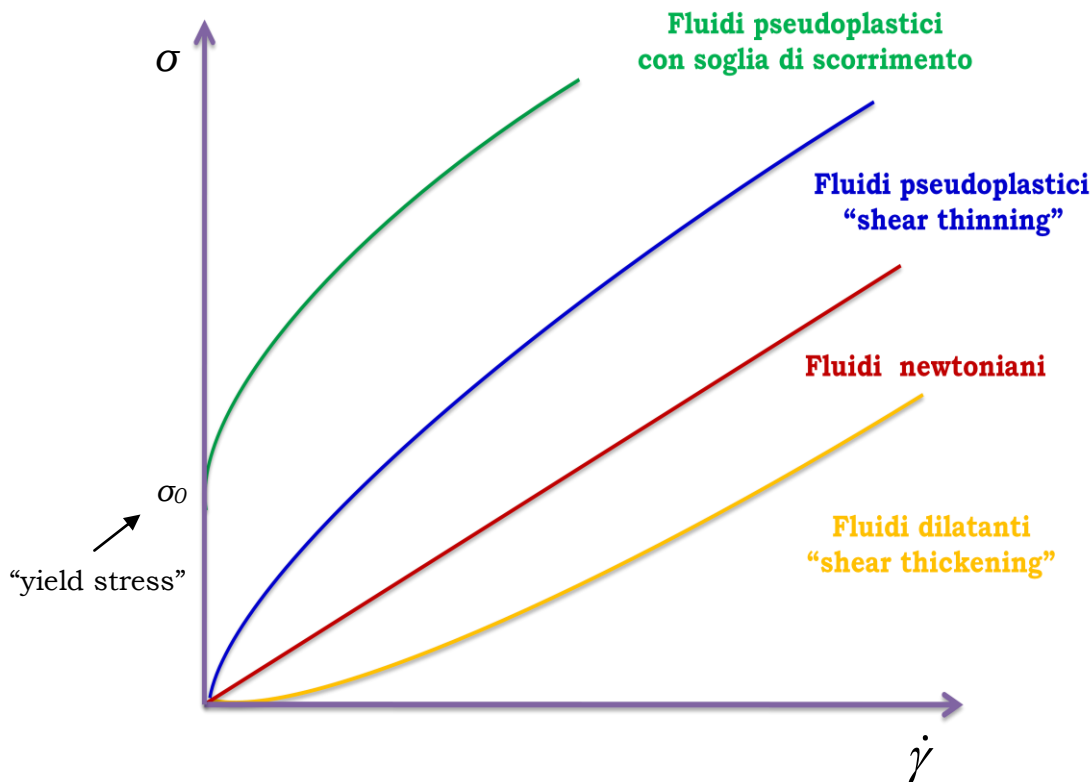


Figura 49: andamento della sollecitazione di taglio σ in funzione della velocità di deformazione per diversi tipi di fluidi.

Ci sono i fluidi pseudoplastici che mostrano una zona iniziale non lineare in cui σ aumenta più velocemente di $\dot{\gamma}$. Possono, inoltre, presentare una soglia di scorrimento, *yield stress*, che rappresenta lo stress critico, ossia lo stress massimo che bisogna applicare al campione per farlo fluire e quindi il valore

di stress oltre il quale nel campione si ha prevalenza del modulo viscoso su quello elastico [63, 64].

Questi fluidi hanno proprietà di *shear-thinning*, cioè la loro viscosità diminuisce al crescere dell'intensità dello sforzo applicato.

Nei fluidi dilatanti, invece, la viscosità aumenta con lo sforzo applicato (comportamento di *shear-thickening*).

La maggior parte dei fluidi di interesse pratico, a cui la reologia dedica attenzioni particolari, è di tipo pseudoplastico.

Ancora una volta si può definire una quantità indice del comportamento di un materiale, la *viscosità complessa*, come rapporto fra lo stress applicato e la velocità di deformazione:

$$\frac{\sigma(\omega)}{\dot{\gamma}(\omega)} = \eta^*(\omega) = \frac{G^*(\omega)}{i\omega} = \eta'(\omega) - i \cdot \eta''(\omega) \quad (39)$$

con $\eta'(\omega) = G''(\omega)/\omega$ e $\eta''(\omega) = G'(\omega)/\omega$.

La parte reale η' , definita *viscosità dinamica*, è un termine atto a descrivere gli effetti dissipativi; è infatti il rapporto fra lo stress in fase con la strain rate e lo strain applicato.

6.3 Strumentazione

Sui gel sintetizzati sono state condotte misure di reologia con l'utilizzo di un reometro avente geometria piatto-piatto. Tale geometria è costituita da due piatti circolari e il campione viene posto fra le due superfici in rotazione l'una rispetto all'altra in maniera tale da non avere fuoriuscita di campione dal piatto durante l'esperimento [65].

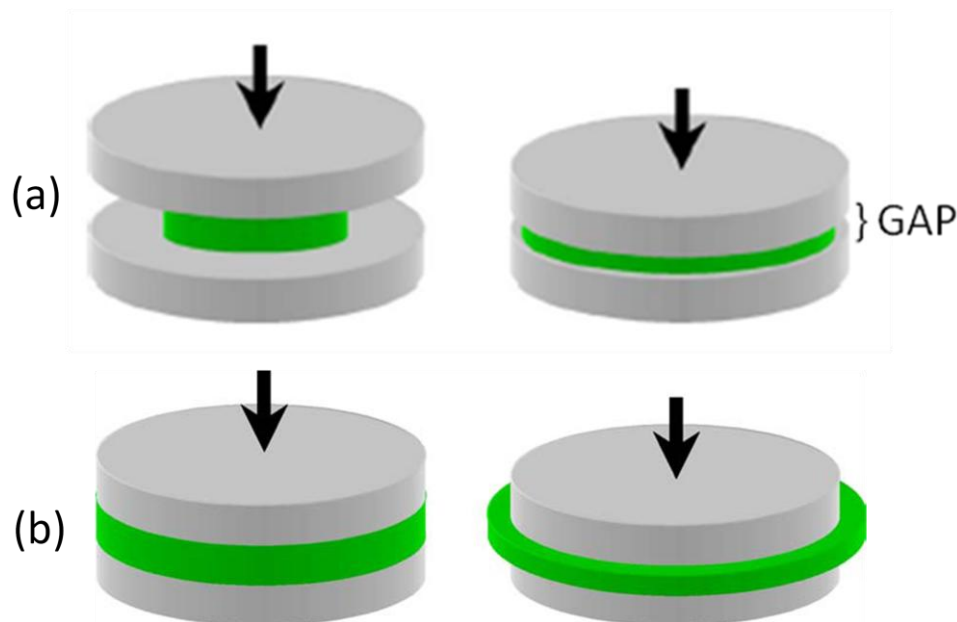


Figura 50: schema del caricamento del campione su una geometria piatto-piatto: campione in quantità insufficiente **(a)** e fuoriuscita del campione dal piatto **(b)**.

Il piatto superiore (direttamente collegato al motore) è posto in movimento ed è un piatto acrilico del diametro di 20 mm, mentre quello inferiore è fermo.

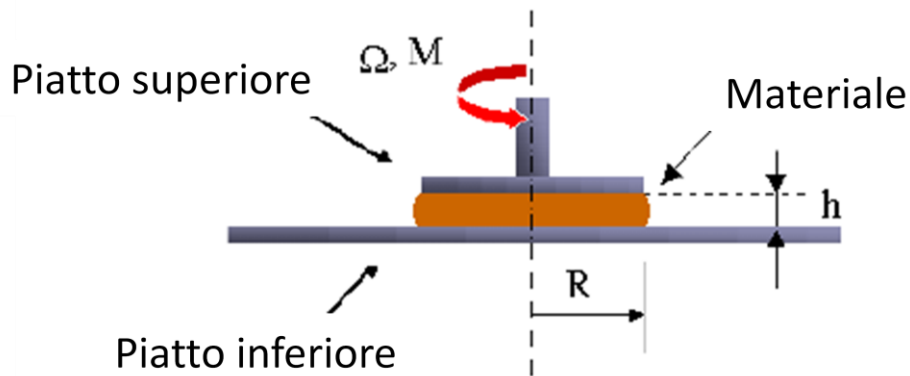
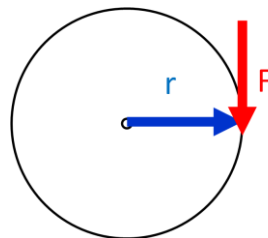


Figura 51: schema di una geometria piatto-piatto.

h è la distanza (gap) fra i piatti, r è il raggio del piatto e Ω la velocità angolare del motore. In un esperimento di reologia si studia la relazione tra *stress* (forza/area) e *deformazione*. I fattori che in un reometro rotazionale si possono direttamente controllare sono il *torque*, lo *spostamento angolare* e la *velocità angolare*.

1) Torque:



Il *torque* M in un reometro rotazionale rappresenta l'entità della forza di taglio (*shear*) che il motore deve applicare al campione per farlo ruotare.

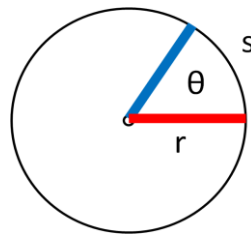
$$M = r \cdot F \cdot \sin(\theta) \quad (40)$$

r è il raggio della geometria, F è la forza applicata e θ è l'angolo percorso in rotazione. La relazione tra **torque** e **shear stress** è:

$$\sigma = \frac{2}{\pi \cdot r^3} \cdot M \quad (41)$$

È evidente dalla relazione **(41)** che la valutazione dello stress dipende dalla geometria del sistema.

2) Spostamento angolare:



Lo *spostamento angolare* s rappresenta l'angolo percorso (in radianti) dal motore durante lo spostamento:

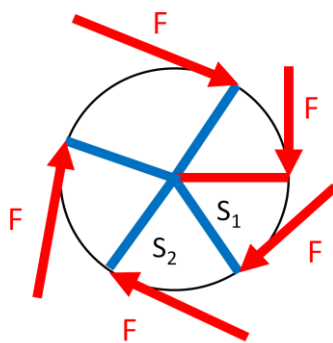
$$s = r \cdot \theta \quad (42)$$

La relazione tra **spostamento angolare** e **shear strain** è:

$$\gamma = \frac{r}{h} \cdot \theta \quad (43)$$

Anche in questo caso c'è dipendenza dalla geometria.

3) Velocità angolare:



La **velocità angolare** Ω del motore può essere messa in relazione allo shear rate, cioè alla variazione di deformazione per unità di tempo della misura.

La relazione tra **velocità angolare** e **shear rate** è:

$$\dot{\gamma} = \frac{r}{h} \cdot \Omega \quad (44)$$

I tipi di test che si effettuano in un esperimento di reologia sono:

- **test in oscillazione:** permettono di individuare la zona di viscoelasticità dei campioni (scansione di sforzo-deformazione, “*stress-strain sweep*”) e il comportamento dei moduli elastico e viscoso nel tempo e/o dopo sollecitazione (pre-shear) (scansione nel tempo, “*time sweep*”). I test in oscillazione permettono, inoltre, di ottenere spettri meccanici del materiale (scansione in frequenza, “*frequency sweep*”);
- **test in flusso:** permettono di avere informazioni sulla viscosità dinamica dei campioni, cioè l’andamento della viscosità in funzione dell’intensità della sollecitazione applicata (flusso in stato stazionario, “*steady state flow*”);
- **test transienti:** permettono di valutare la capacità o meno di recuperare la deformazione subita dal campione all’applicazione di un carico costante (“*creep-recovery*”) o viceversa la capacità di rilassamento dello stress all’applicazione di una deformazione costante (“*stress relaxation*”).

6.4 Viscoelasticità: modelli meccanici

Per schematizzare il comportamento dei materiali dal punto di vista macroscopico si fa riferimento a due modelli di comportamento meccanico ideale: la molla e il pistone idraulico; con il primo si modella la risposta puramente elastica, mentre il secondo elemento serve a descrivere un comportamento puramente viscoso. L'opportuna combinazione di questi due elementi dà vita a modelli utili per la comprensione delle relazioni sforzo-deformazione dei materiali. I più noti sono quelli di Maxwell e di Voigt, ma proprio in virtù della loro semplicità non sono in grado di descrivere in modo quantitativo la risposta viscoelastica dei materiali reali.

Modello di Maxwell

Tale modello considera un elemento viscoelastico come la somma di un elemento elastico e di uno viscoso in serie. Se G_i è la rigidità della molla e η_i la viscosità del pistone, si definisce:

$$\tau_i = \frac{\eta_i}{G_i} \quad (45)$$

τ_i è il *tempo di rilassamento* di un elemento di Maxwell e rappresenta il tempo richiesto per il rilassamento della tensione.

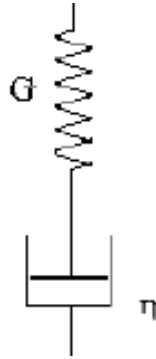


Figura 52: modello di Maxwell con un elemento elastico e uno viscoso in serie.

Si ottiene, così, l'espressione delle funzioni viscoelastiche per lo *stress relaxation modulus* (eq. **(37)**):

$$G(t) = G_i \cdot \exp\left(\frac{-t}{\tau_i}\right) \quad (46)$$

e per lo *storage* e il *loss modulus* (sez. **Analisi dinamica in regime oscillatorio**, pag. **115**):

$$G'(\omega) = G_i \cdot \frac{(\omega \tau_i)^2}{1 + (\omega \tau_i)^2} \quad (47)$$

$$G''(\omega) = G_i \cdot \frac{\omega \tau_i}{1 + (\omega \tau_i)^2} \quad (48)$$

Questo modello permette di rappresentare prove di rilassamento sotto deformazione (*stress relaxation*): applicando una deformazione istantanea γ_0 si osserva come rilassa la tensione nel tempo. In questo modo, però, si descrive un comportamento viscoelastico semplice, quasi mai corrispondente al comportamento viscoelastico reale, di conseguenza nasce la necessità di creare modelli meccanici in grado di simulare l'andamento reale delle relazioni sforzo-deformazione, basandosi sulla combinazione di questi elementi base. Si possono ad esempio ipotizzare più elementi di Maxwell in parallelo per produrre il reale andamento di un sistema viscoelastico.

Un gruppo di elementi di Maxwell in parallelo rappresenta uno spettro discreto dei tempi di rilassamento:

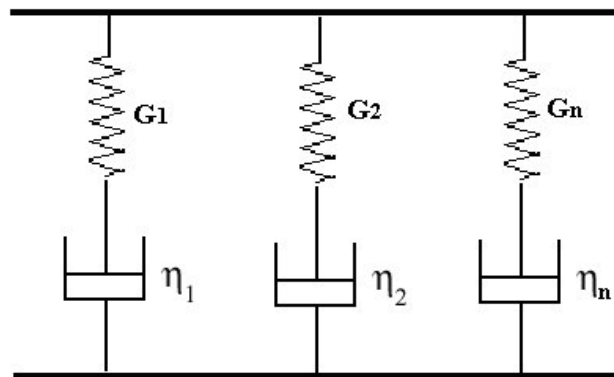


Figura 53: gruppo di n elementi di Maxwell in parallelo.

in questa disposizione di i -esimi elementi, le forze applicate sono additive e l'espressione della funzione $G(t)$ diventa:

$$G(t) = G_e + \sum_{i=1}^N G_i \cdot \exp\left(\frac{-t}{\tau_i}\right) \quad (49)$$

G_e è il modulo di equilibrio:

$$\lim_{t \rightarrow \infty} \sigma(t) = G_e \gamma_0 \quad (50)$$

I moduli elastico e viscoso diventano:

$$G'(\omega) = G_e + \sum_{i=1}^N G_i \cdot \frac{(\omega \tau_i)^2}{1 + (\omega \tau_i)^2} \quad (51)$$

$$G''(\omega) = \sum_{i=1}^N G_i \cdot \frac{\omega \tau_i}{1 + (\omega \tau_i)^2} \quad (52)$$

Se il numero di elementi di Maxwell tende all'infinito si ottiene uno spettro continuo $H(\tau)$ definito *spettro di rilassamento*.

Modello di Voigt

Il modello di Voigt è costituito da un elemento elastico e uno viscoso in parallelo.

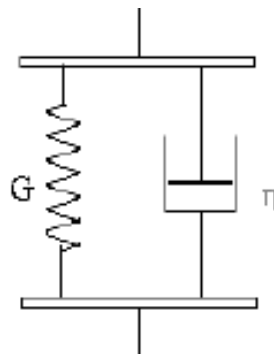


Figura 54: modello di Voigt con un elemento elastico e uno viscoso in parallelo.

Non è adatto a modellizzare una prova di stress relaxation, in quanto non è possibile applicare una deformazione istantanea al sistema per la presenza in parallelo dell'elemento viscoso. Per lo stesso motivo è adeguato a rappresentare la *risposta elastica ritardata* e permette una buona modellizzazione delle prove di recupero di deformazione sotto sforzo (*creep*).

La stessa quantità τ (eq. (45)), per un elemento di Voigt, è detta *tempo di ritardo* ed è una misura del tempo che occorre all'elemento elastico per tornare alla configurazione di equilibrio, ritardato dalla presenza dell'elemento viscoso in parallelo.

Si ottiene, così, l'espressione delle funzioni viscoelastiche:

$$J(t) = J_i \cdot \left[1 - \exp\left(\frac{-t}{\tau_i}\right) \right] \quad (53)$$

$$J'(\omega) = J_i \cdot \frac{1}{1 + (\omega \tau_i)^2} \quad (54)$$

$$J''(\omega) = J_i \cdot \frac{\omega \tau_i}{1 + (\omega \tau_i)^2} \quad (55)$$

Anche in questo caso è possibile combinare più elementi di Voigt in serie per rappresentare uno spettro discreto di tempi di ritardo:

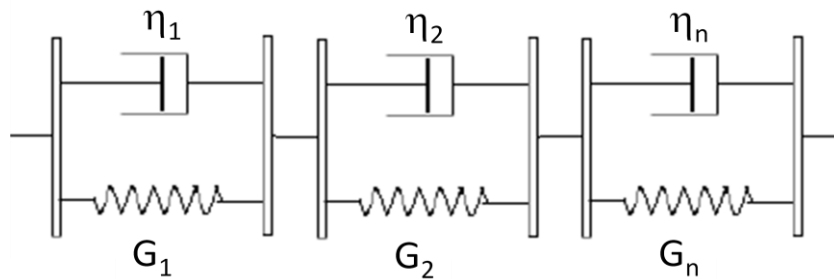


Figura 55: gruppo di n elementi di Voigt in serie.

In questo caso sono le deformazioni ad essere additive e quindi per il modello di Voigt si ottiene:

$$J(t) = \frac{t}{\eta_0} + \sum_{i=1}^N J_i \cdot \left[1 - \exp\left(\frac{-t}{\tau_i}\right) \right] \quad (56)$$

La procedura per ottenere $G'(\omega)$ e $G''(\omega)$ si ripete esattamente per $J'(\omega)$ e $J''(\omega)$ considerando un numero infinito di elementi di Voigt in serie dai quali si ottiene lo spettro continuo dei tempi di ritardo $L(\tau)$.

6.5 Viscoelasticità: a) misure in regime oscillatorio

Sono stati effettuati test in oscillazione sia su gel di Hyadd4-G che su soluzioni di Hya a concentrazioni comprese tra 0.3 e 0.8% (w/w).

Scansione di deformazione e di sforzo ("strain e stress sweep")

Per poter fare misure in regime oscillatorio e registrare quindi uno spettro meccanico del campione in esame è fondamentale che esso si trovi sempre in una regione di viscoelasticità lineare (LVR) durante tutte le misure effettuate. A questo scopo sono state condotte misure preliminari facendo variare la percentuale di strain o gli stress applicati, osservando il comportamento dei moduli elastici e viscosi di tutti i campioni esaminati.

Strain sweep

Queste misure ci permettono di determinare la massima deformazione in oscillazione che il campione può sopportare prima che la sua struttura si degradi e si rompa. Inoltre questo esperimento è necessario per stabilire la regione di risposta lineare del campione. Il modulo elastico G' e quello viscoso G'' nel regime di viscoelasticità lineare devono essere costanti e quindi indipendenti dallo strain applicato. Per l'idrogel Hyadd4-G 0.8% (w/w) tale regime si estende fino a deformazioni in oscillazione di circa il 30%.

Per Hyadd4-G 0.3% (w/w), invece, una deformazione del 10% è già al limite delle possibilità del gel (**Figura 56**).

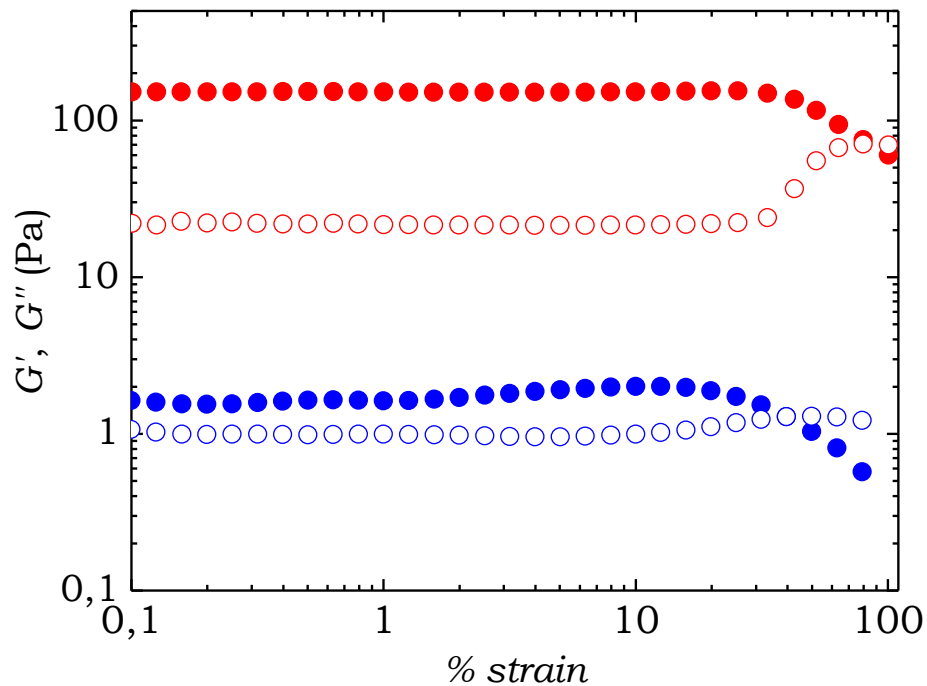


Figura 56: G' (●) e G'' (○) per Hyadd4-G 0.8% e G' (●) e G'' (○) per Hyadd4-G 0.3% (w/w) al variare della percentuale di strain.

Stress sweep

Queste misure ci permettono, invece, di determinare i moduli G' e G'' in funzione di uno sforzo periodico alla frequenza fissa di 1 Hz e inoltre indicano il carico massimo in oscillazione che i campioni riescono a sopportare. Anche in questo caso G' e G'' devono essere indipendenti dallo stress applicato. Hyadd4-G 0.8% (w/w) riesce a sopportare carichi fino a 50 Pa, mentre per Hyadd4-G 0.3% (w/w) si può raggiungere un carico massimo di 10 Pa (**Figura 57**).

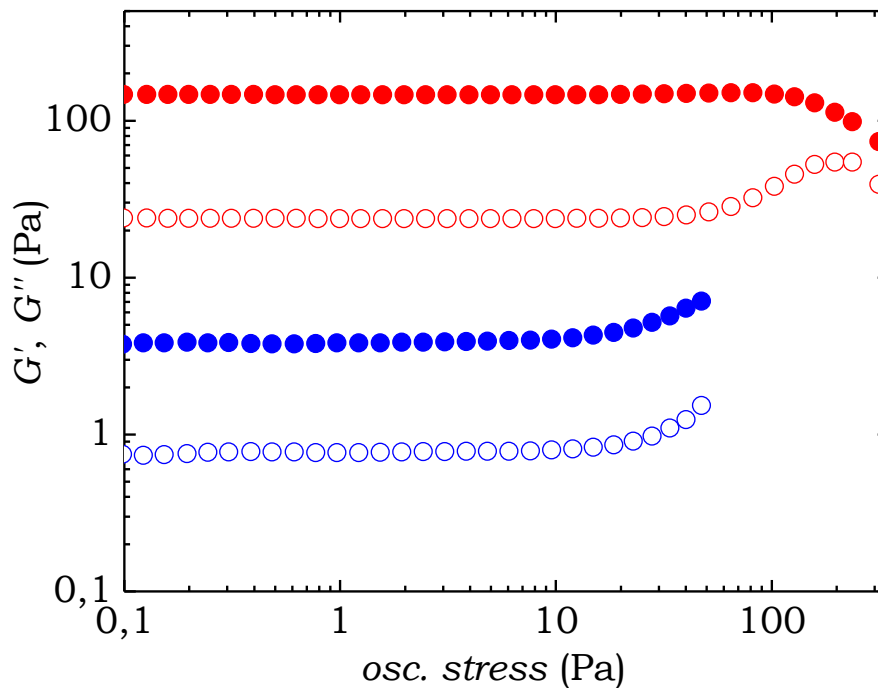


Figura 57: G' (●) e G'' (○) per Hyadd4-G 0.8% e G' (●) e G'' (○) per Hyadd4-G 0.3% (w/w) al variare dello stress applicato.

Evoluzione temporale (“time sweep”)

Una volta individuato l'intervallo di strain e di stress in cui il campione si trova in un regime di viscoelasticità lineare, è possibile verificare la stabilità temporale dei moduli elastico e viscoso. Inoltre la scansione temporale di G' e di G'' , alla frequenza di 1 Hz imponendo una deformazione del 5%, permette la valutazione dei moduli e in definitiva il comportamento reologico del gel.

Per tutti i campioni analizzati i moduli G' e G'' risultano costanti nel tempo. In **Tabella 7** vengono riassunti i valori di G' e G'' per lo Hyadd4-G a diversa concentrazione. Questi valori, ottenuti direttamente da misure reologiche, sono comparati con i G' ricavati dalle curve di correlazione di intensità di scattering attraverso il modello teorico del gel frattale (sez. **3.4 Modello per le dinamiche di gel frattali**, pag. 57).

Hyadd4-G (w/w)	G' (Pa)	G'' (Pa)
0.3%	8.0 ± 0.5	2.0 ± 0.1
0.4%	16 ± 1	3.0 ± 0.1
0.5%	36 ± 1	7.1 ± 0.1
0.6%	60 ± 2	12.2 ± 0.5
0.7%	115 ± 5	21.1 ± 0.6
0.8%	140 ± 2	22.0 ± 0.4

Tabella 7: G' , G'' per Hyadd4-G a concentrazioni tra 0.3% e 0.8% (w/w).

Il buon accordo dei valori di G' ottenuti con metodi completamente diversi è una validazione dell'approccio DLS alla risposta dinamica del gel Hyadd4-G.

Recupero di struttura (“structural recovery”)

La procedura “time sweep” può essere utilizzata per osservare, ove possibile, un recupero delle proprietà meccaniche e di struttura da parte del materiale dopo averlo sottoposto ad una intensa sollecitazione [66].

L’esperimento viene condotto sui campioni alla concentrazione di 0.3, 0.5 e 0.8% (w/w): si registra inizialmente il modulo elastico G' con il sistema non perturbato, successivamente si applica al campione un pre-shear molto intenso e tale da distruggere il reticolo del gel e infine si osserva l’andamento di G' nel tempo.

Ai campioni più concentrati viene applicato inizialmente un pre-shear di 1500 s^{-1} , per 1 minuto, che su un gap di $500\text{ }\mu\text{m}$ corrisponde, secondo l’eq. (44), ad una velocità di rotazione di 75 rad/s , registrando come G' recupera nel tempo dopo la sollecitazione. Questo esperimento viene ripetuto in successione temporale per sei volte.

Il recupero di G' risulta completo in tutti i cicli. Si procede quindi con altri 6 cicli raddoppiando il pre-shear (3000 s^{-1} per 1 minuto) corrispondente ad una velocità di rotazione di 150 rad/s . Anche in questo caso G' ritorna sempre al suo valore iniziale (**Figura 58**).

Questi esperimenti mettono in risalto la capacità del gel a ripristinare la sua struttura reticolare anche dopo ripetute rotture.

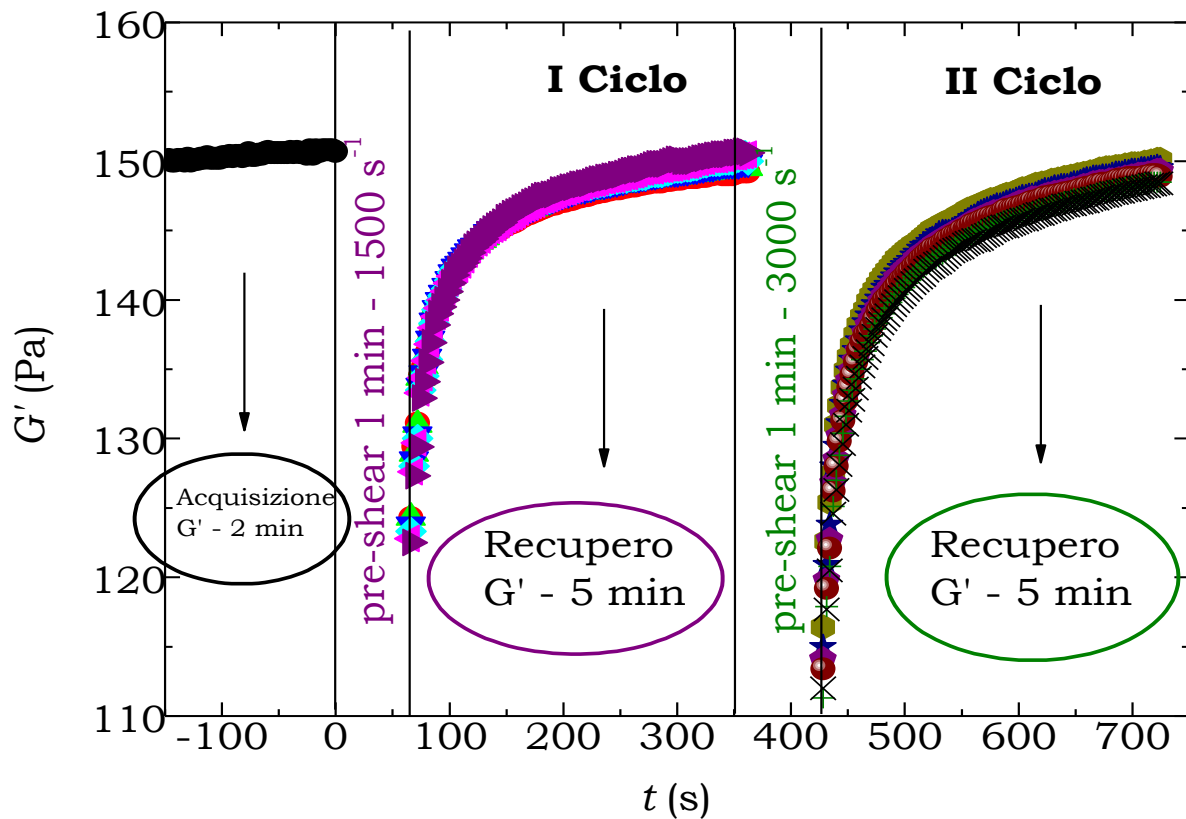


Figura 58: schema dell'esperimento con cicli consecutivi di pre-shear/recupero, in cui si osserva l'andamento di G' nel tempo, per Hyadd4-G 0.8% (w/w).

Questo comportamento è di fondamentale importanza per il tipo di applicazione per cui Hyadd4-G è stato progettato. Infatti l'introduzione del gel è effettuata con l'utilizzo di una siringa, pertanto il gel deve poter fluire attraverso l'ago ma recuperare la propria struttura una volta arrivato.

Il primo aspetto peculiare dello Hyadd4-G che emerge da queste misure è la capacità di recupero totale di struttura dopo forte sollecitazione. Questa capacità risulta inoltre inalterata anche dopo una ripetizione di 6 cicli di sollecitazione. Questa proprietà si riscontra solo nel campione più

concentrato. Applicando, infatti, lo stesso pre-shear ai campioni allo 0.5 e allo 0.3% (w/w) si verifica solo un parziale recupero del modulo elastico (**Figura 59**). I campioni recuperano, cioè, solo una parte dell'elasticità che possedevano prima di essere sottoposti ad un pre-shear tale da distruggerne la struttura.

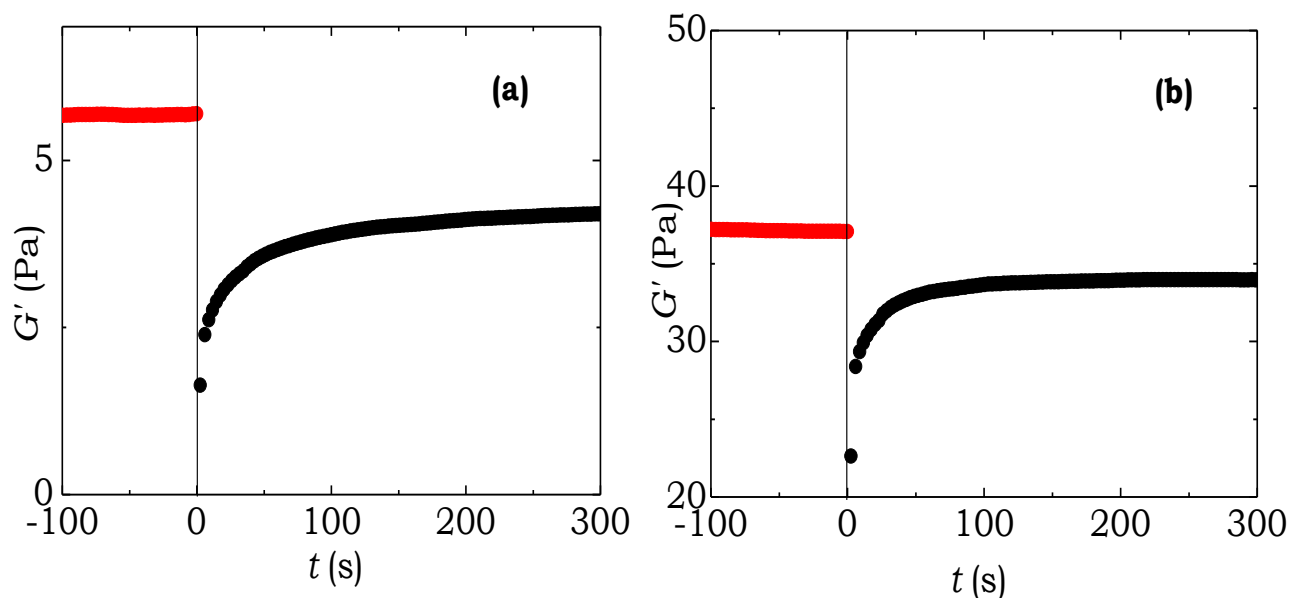


Figura 59: esperimento di recupero di G' in funzione del tempo, prima (●) e dopo (●) il pre-shear di 3000 s^{-1} , per il campione allo 0.3% (a) e allo 0.5% (w/w) (b).

La curva di recupero del campione allo 0.8% (w/w) è stata interpolata con una equazione biesponenziale (eq. (57)) che permette di ottenere i tempi di recupero τ_1 e τ_2 di Hyadd4-G (**Figura 60**).

$$G'(\omega) = G_0 + A_1 \cdot \left(1 - e^{-t/\tau_1}\right) + A_2 \cdot \left(1 - e^{-t/\tau_2}\right) \quad (57)$$

G_0 è il modulo elastico al tempo t_0 , cioè subito dopo la fine del pre-shear e A_1 e A_2 rappresentano le ampiezze dei due termini esponenziali.

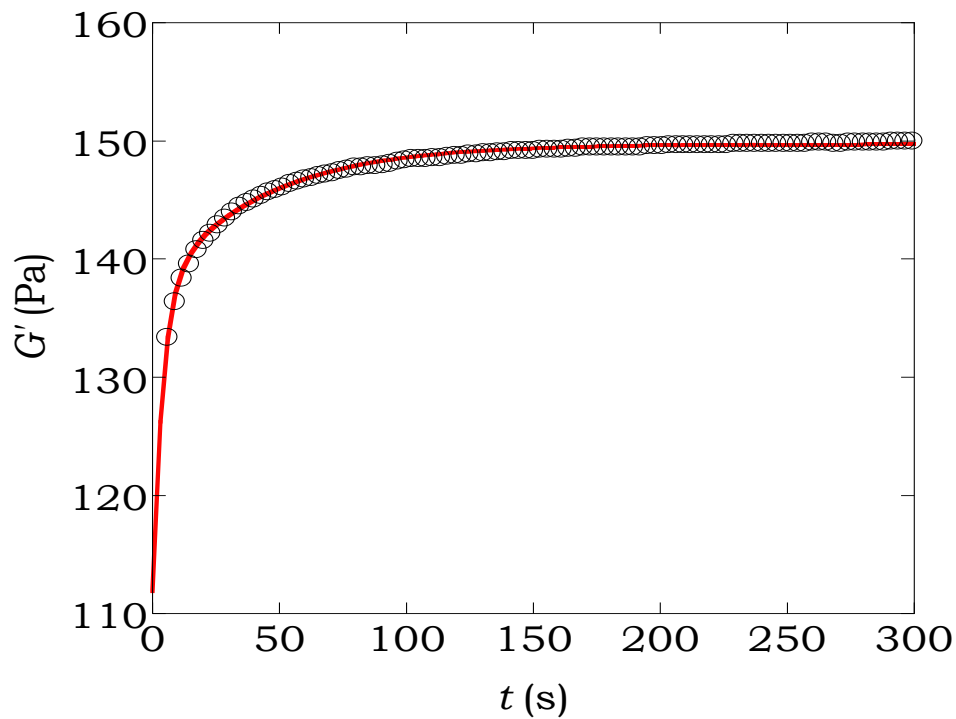


Figura 60: fit (-) di G' (o) nel tempo per un esperimento di recupero di struttura dopo pre-shear di 3000 s^{-1} per Hyadd4-G 0.8% (w/w).

Da questi dati emerge un comportamento bimodale del gel Hyadd4-G in cui prevale un meccanismo di ricostituzione della struttura con tempi scala dell'ordine di qualche secondo e un meccanismo più lungo relativo a riorganizzazioni strutturali a distanze più grandi.

I risultati ottenuti sono riportati in **Tabella 8**.

Hyadd4-G	G_0 (Pa)	τ_1 (s)	τ_2 (s)	Peso componente 1	Peso componente 2
0.8% (w/w)	112 ± 3	4.0 ± 0.4	42 ± 1	0.67 ± 0.04	0.33 ± 0.05

Tabella 8: parametri del fit di recupero di struttura di Hyadd4-G 0.8% (w/w) dopo pre-shear di 3000 s⁻¹.

Scansione in frequenza (“frequency sweep”)

Hyadd4-G

Nella zona di viscoelasticità del campione si può procedere con l’analisi degli spettri meccanici, utilizzando la procedura “frequency sweep”, osservando l’andamento del modulo elastico e di quello viscoso al variare della frequenza, una volta fissata la % di strain o lo stress da applicare per evitare che il campione esca dalla zona di viscoelasticità lineare durante la misura.

ω_c è la frequenza caratteristica in cui i valori dei moduli G' e G'' si eguagliano e rappresenta la frequenza alla quale si passa da un comportamento prevalentemente dissipativo ad un comportamento prevalentemente elastico.

Le concentrazioni di Hyadd4-G studiate (0.3, 0.5 e 0.8% (w/w)) in funzione della frequenza presentano valori di frequenze di cross-over (ω_c) nella regione a bassa frequenza come c'è da aspettarsi per sistemi gel.

Il valore di ω_c per le concentrazioni più basse è difficile da determinare in quanto il tempo richiesto per una scansione in frequenza è dell'ordine di diverse decine di ore. Questo comporta una evaporazione del solvente e una disidratazione del campione nella porzione del portacampione esposto all'aria.

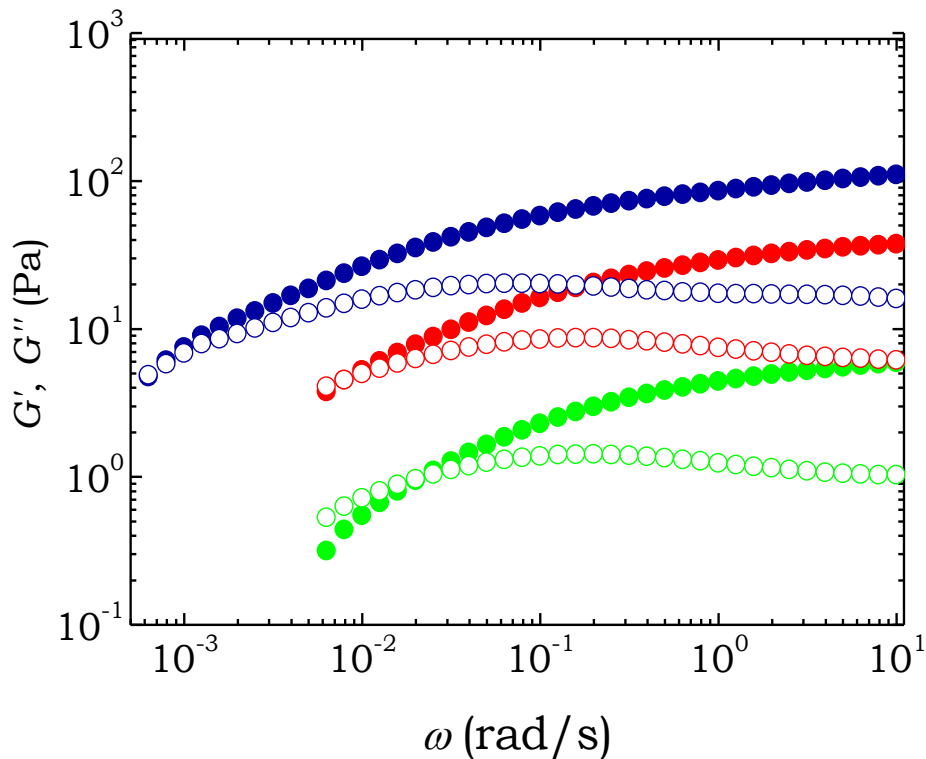


Figura 61: Hyadd4-G 0.8% (w/w), G' (●) e G'' (○); 0.5%, G' (●) e G'' (○) e 0.3%, G' (●) e G'' (○) al variare della frequenza.

Dato che ω_c cade a valori di frequenza molto bassi, si può affermare che il modulo elastico prevale su quello viscoso in un intervallo di frequenze molto ampio, indicando che la risposta del sistema è sempre quella tipica di un gel. La determinazione della frequenza di cross-over, ω_c , e del tempo caratteristico, τ_c , permette di valutare il tempo di rilassamento più lungo necessario per rompere/formare i punti di giunzione del gel permettendo una risposta viscosa/elastica del materiale.

Il risultato di τ_c (eq. (33)) per i campioni analizzati è:

Hyadd4-G (w/w)	0.3%	0.5%	0.8%
τ_c (s)	47 ± 2	124 ± 5	1400 ± 110
ω_c (rad/s) ($\cdot 10^{-3}$)	21 ± 1	8.1 ± 0.7	7.1 ± 0.4

Tabella 9: tempi caratteristici di rilassamento per Hyadd4-G alle concentrazioni di 0.3, 0.5 e 0.8% (w/w).

Il processo di rilassamento dello Hyadd4-G alla base degli spettri meccanici misurati è molto complesso ed è la risultanza di diversi rilassamenti, ciascuno con un dato tempo caratteristico. Si può stimare il maggiore dei tempi di rilassamento caratteristici (vedi eq. (58)).

$$T_R = \lim_{\omega \rightarrow 0} \left(\frac{1}{\omega} \cdot \frac{G'}{G''} \right) \quad (58)$$

I valori dei tempi di rilassamento più lunghi T_R dei sistemi in esame [64] possono essere comparati con i valori di τ_C di **Tabella 9**.

Riportando quindi in grafico i valori di $\frac{1}{\omega} \cdot \frac{G'}{G''}$ a basse frequenze in funzione di ω si ricavano i valori di T_R dall'intercetta a $\omega=0$ della regione lineare (**Figura 62**).

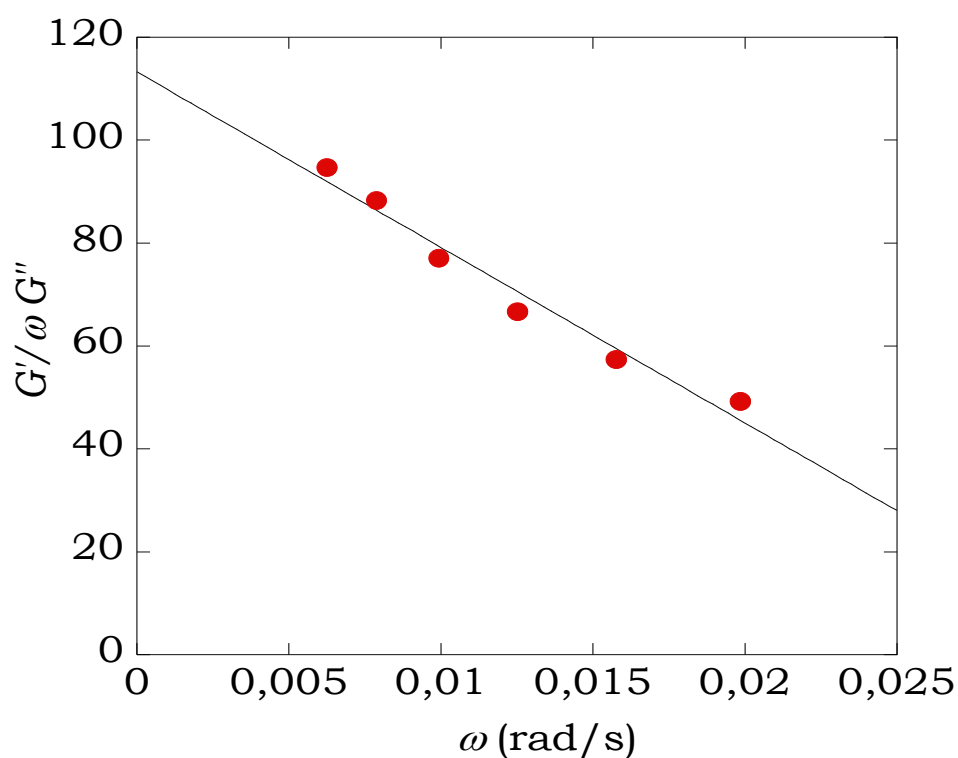


Figura 62: $(G'/\omega G'')$ a bassa frequenza per Hyadd4-G 0.3% (w/w).

I risultati ottenuti per i campioni allo 0.3, 0.5 e 0.8% (w/w) sono riportati in **Tabella 10**.

Hyadd4-G (w/w)	0.3%	0.5%	0.8%
T_R (s)	113 ± 4	173 ± 10	1836 ± 121

Tabella 10: tempi caratteristici di rilassamento massimi per Hyadd4-G alle concentrazioni di 0.3, 0.5 e 0.8% (w/w).

Per avere una conferma dei risultati ottenuti con questa estrapolazione sono state analizzate le curve di G' e G'' in funzione di ω utilizzando l'equazione del modello di Maxwell.

Gli spettri in frequenza dei campioni sono stati interpolati usando le equazioni (47) e (48) sommando 6 elementi di Maxwell, numero minimo di elementi necessario ad interpolare in modo soddisfacente lo spettro meccanico, ottenendo il più alto e il più basso valore dei tempi di rilassamento dei sistemi analizzati (**Tabella 11**).

Hyadd4-G	0.3%	0.5%	0.8%
τ_{\min} (s)	1.2 ± 0.3	1.3 ± 0.1	1.2 ± 0.5
τ_{\max} (s)	110 ± 5	130 ± 17	1410 ± 112

Tabella 11: tempi caratteristici di rilassamento minimi e massimi utilizzando il modello di Maxwell (6 elementi) per Hyadd4-G alle concentrazioni di 0.3, 0.5 e 0.8% (w/w).

I valori di tempo di rilassamento, τ , ottenuto con l'eq. (33) (Tabella 9) sono in buon accordo con quelli ottenuti utilizzando le eq. (47) e (48) con 6 elementi di Maxwell, mentre il T_R ottenuto con l'eq. (58) (Tabella 10) risulta essere il più alto di tutti.

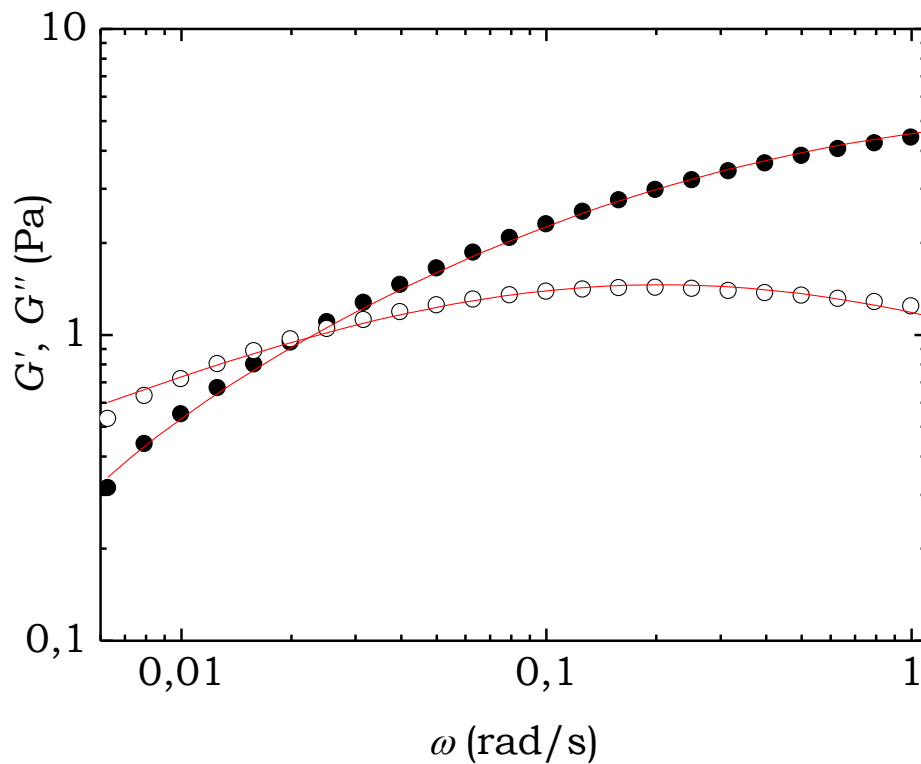


Figura 63: Hyadd4-G 0.3% (w/w), G' (●) e G'' (○) al variare di ω e relativi fit (-).

Abbiamo, infine, studiato il comportamento degli idrogel ad alta frequenza individuando le frequenze di rottura dei sistemi a diversa concentrazione di polimero (Figura 64).

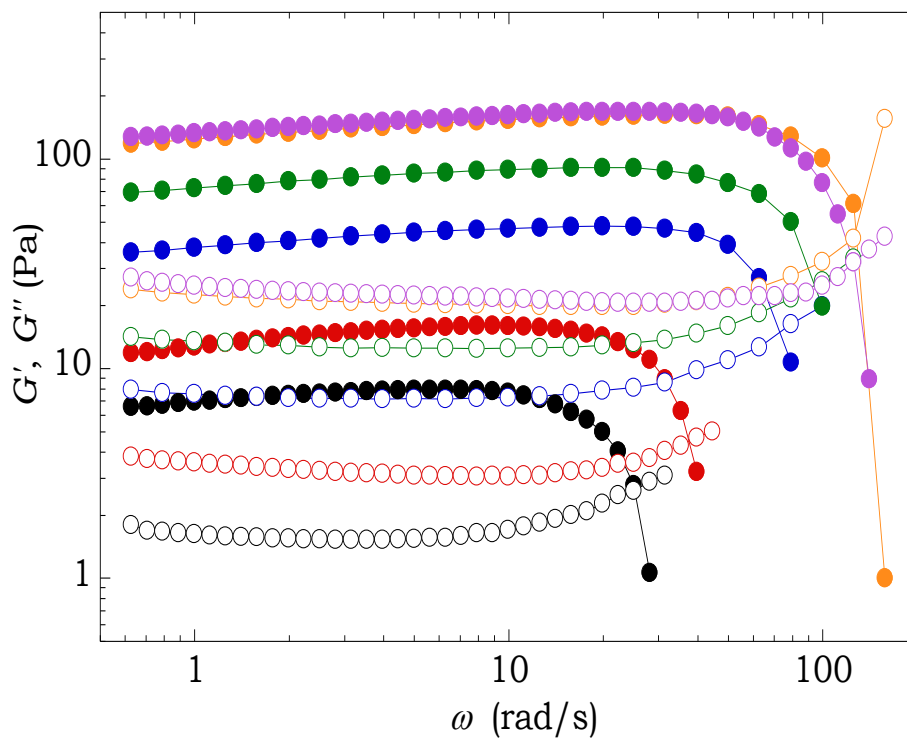


Figura 64: Hyadd4-G: G' (●) e G'' (○) 0.3%; G' (●) e G'' (○) 0.4%; G' (●) e G'' (○) 0.5%; G' (●) e G'' (○) 0.6%; G' (●) e G'' (○) 0.7% e G' (●) e G'' (○) 0.8% (w/w) in funzione di ω .

È possibile osservare le transizioni gel \leftrightarrow sol dei campioni analizzati che presentano punti di cross-over terminali dei moduli G' e G'' in funzione della frequenza. Ciò indica il passaggio da un comportamento prevalentemente elastico in cui prevale G' ad un comportamento prevalentemente dissipativo. In tutti i campioni studiati G' è molto maggiore di G'' in un ampio intervallo di frequenze (fino a ~ 25 rad/s per la più bassa concentrazione, 0.3% w/w, e fino a ~ 100 rad/s per la concentrazione più alta, 0.8% w/w) mostrando un comportamento viscoelastico tipico del gel.

In **Tabella 12** sono riportati i valori delle frequenze di cross-over terminali, ω_t , per i campioni analizzati alla frequenza di 1 Hz.

Hyadd4-G (w/w)	ω_t (rad/s)
0.3%	26 ± 1
0.4%	40 ± 2
0.5%	73 ± 1
0.6%	92 ± 2
0.7%	120 ± 1
0.8%	127 ± 1

Tabella 12: ω_t per Hyadd4-G a concentrazioni tra 0.3 e 0.8% (w/w).

Hya

Osservando invece il comportamento viscoelastico di una soluzione di Hya si nota che i moduli G' e G'' sono prossimi a zero a basse frequenze, come ci si aspetta per soluzioni macromolecolari di polisaccaridi, e la netta prevalenza del modulo G'' su G' ad alte frequenze indica che siamo in presenza di una risposta da parte del materiale tipica delle soluzioni.

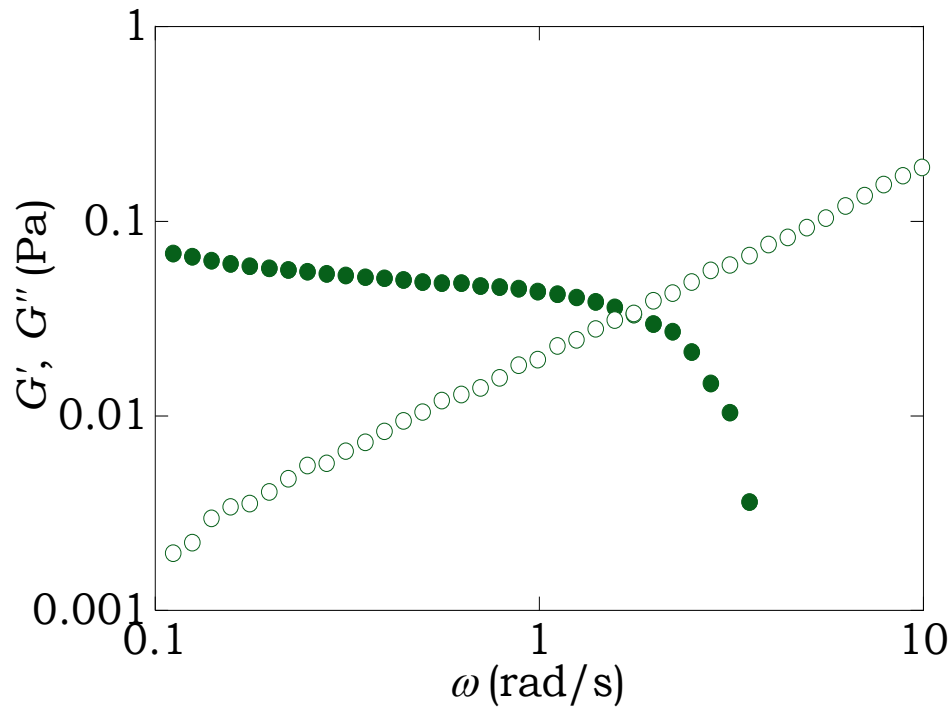


Figura 65: storage e loss modulus, G' (●) e G'' (○), per una soluzione di Hya ad una concentrazione di 0.5% (w/w) in funzione della frequenza.

6.6 Viscoelasticità: b) misure in regime di flusso

Nei fluidi non-Newtoniani la viscosità dipende dal tempo e dalla velocità di deformazione. Il possibile comportamento di fluido pseudoplastico si può osservare sia in un grafico della viscosità in funzione dello shear rate ($\dot{\gamma}$), che in uno in funzione dello shear stress (σ).

Abbiamo pertanto effettuato misure su campioni di Hyadd4-G, sia in fase gel che in soluzione diluita.

Flusso in stato stazionario (“steady state flow”)

Il comportamento viscoelastico di una fase gel può essere studiato osservando l'andamento della viscosità, in Pa·s, in funzione dello sforzo da flusso applicato (shear stress), in Pa, o della velocità di scorrimento (shear rate), in s⁻¹.

Hyadd4-G

Per i due tipi di esperimento l'idrogel Hyadd4-G ha mostrato i comportamenti riportati in **Figura 66** e **Figura 67**.

In questo tipo di esperimento è possibile individuare uno stress massimo in flusso che il sistema può sopportare, corrispondente allo sforzo necessario per far fluire il campione.

Tale valore risulta essere di circa 30 Pa (vedi σ_{max} **Figura 66**) per il campione a più alta concentrazione (0.8% w/w) e risulta confrontabile con il dato ottenuto mediante misure in oscillazione (**Figura 57**).

Dagli andamenti riportati in **Figura 66** è possibile, per ciascuna concentrazione, determinare il valore soglia di sforzo di flusso oltre il quale il gel inizia a fluire.

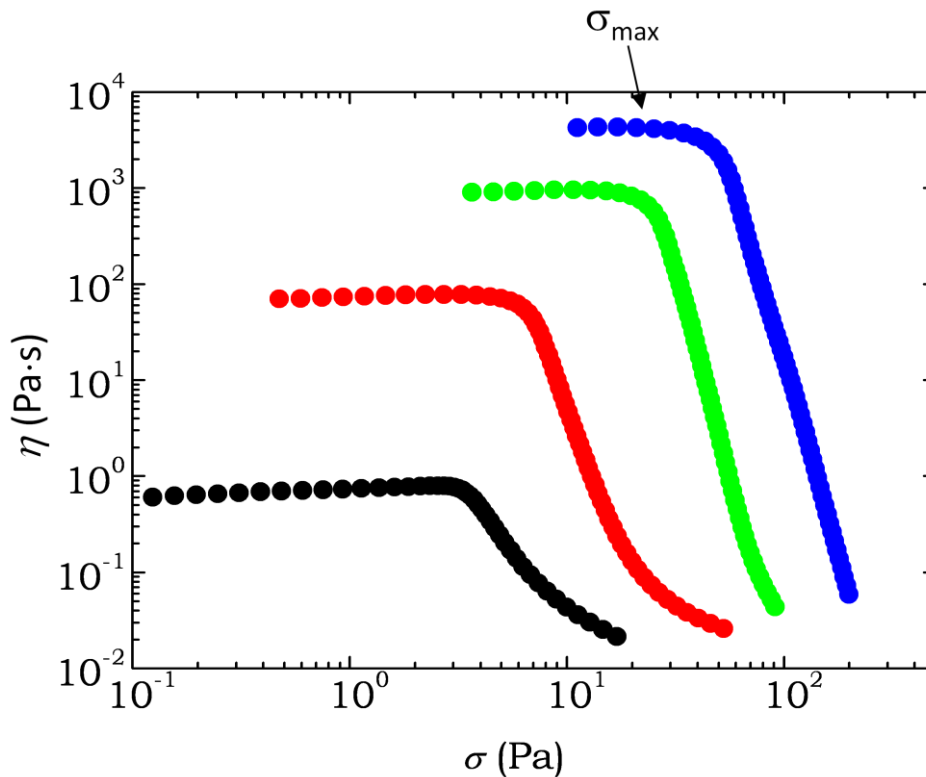


Figura 66: viscosità in funzione dello shear stress per Hyadd4-G 0.2% (●); 0.3% (●); 0.5% (●) e 0.8% (w/w) (●).

Anche l'andamento della viscosità in funzione della velocità di scorrimento (**Figura 67**) evidenzia il comportamento di shear-thinning dei campioni; in particolare si nota che anche a concentrazioni molto basse, quindi in regime di soluzione diluita, le soluzioni di Hyadd4-G presentano la stessa fenomenologia, sebbene molto più ridotta.

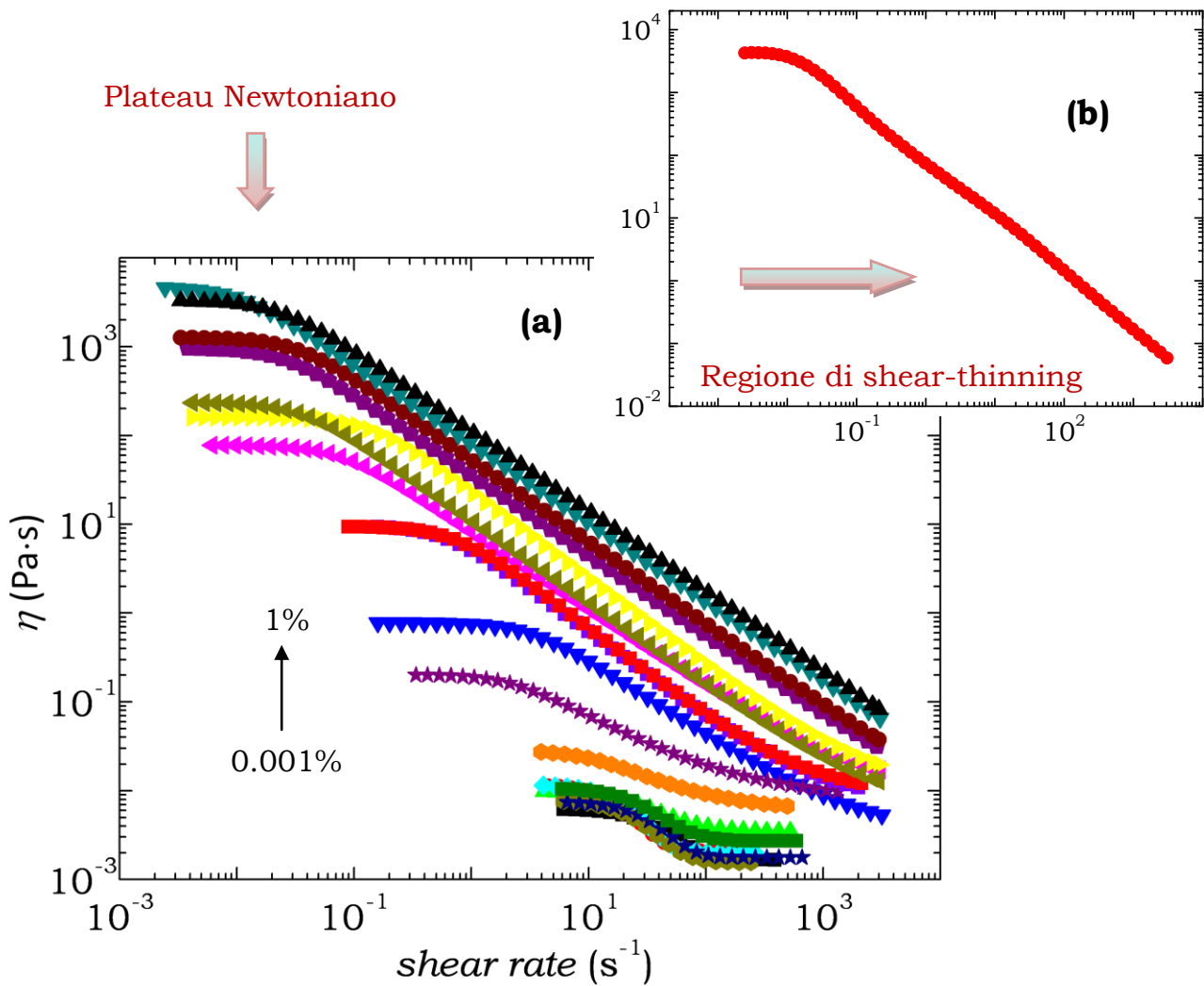


Figura 67: viscosità in funzione dello shear rate per Hyadd4-G a concentrazioni tra 0.001 e 1% (w/w) (a) e per Hyadd4-G 0.8% (w/w) (b).

In tali grafici, in particolare per le basse concentrazioni, si osserva l'esistenza di due zone piatte, denominate rispettivamente *prima* e *seconda regione newtoniana* ai più bassi e ai più alti valori di $\dot{\gamma}$ in cui la viscosità varia molto poco. La variazione di η , invece, nella regione di shear-thinning è molto rapida. Questo comportamento è di fondamentale importanza per le

applicazioni dello Hyadd4-G, progettato per essere iniettato direttamente nell'articolazione senza affrontare resistenza particolarmente elevata.

Nei campioni a più alta concentrazione non si è potuto evidenziare il secondo plateau per limitazioni sperimentali, cioè non è stato possibile raggiungere valori di velocità di deformazione così alti da permettere di individuarlo.

Il valore della viscosità nella prima regione viene detto *viscosità di punto zero* (η_0), cioè viscosità a sollecitazione nulla, mentre il valore nella seconda regione newtoniana viene detto *viscosità a sollecitazione infinita* (η_∞). Ovviamente si tratta di estrapolazioni poiché nessun metodo sperimentale consente di eseguire misure a sollecitazioni nulle o infinite. Sono state suggerite diverse equazioni per descrivere la forma generale della curva $\eta(\dot{\gamma})$ [67, 68].

$$\frac{\eta - \eta_\infty}{\eta_0 - \eta_\infty} = \frac{1}{\left[1 + \left(\frac{\dot{\gamma}}{\dot{\gamma}_c}\right)^2\right]^s} \quad (59)$$

Le curve sperimentali sono state interpolate con l'equazione empirica di Carreau (eq. (59)) che ci ha permesso di determinare i valori di η_0 e η_∞ e i tempi caratteristici di questi sistemi, determinati con $1/\dot{\gamma}_c$: per i sistemi in esame i valori ottenuti vanno da un minimo di 20 ms per la soluzione più diluita (0.001% w/w) ad un massimo di 90 s per il gel più concentrato 1% (w/w).

Hya

Osservando l'andamento della viscosità in funzione della velocità di scorrimento (**Figura 68**) per soluzioni di Hya si evidenzia un comportamento di shear-thinning soltanto a partire da concentrazioni dei campioni superiori allo 0.8% (w/w).

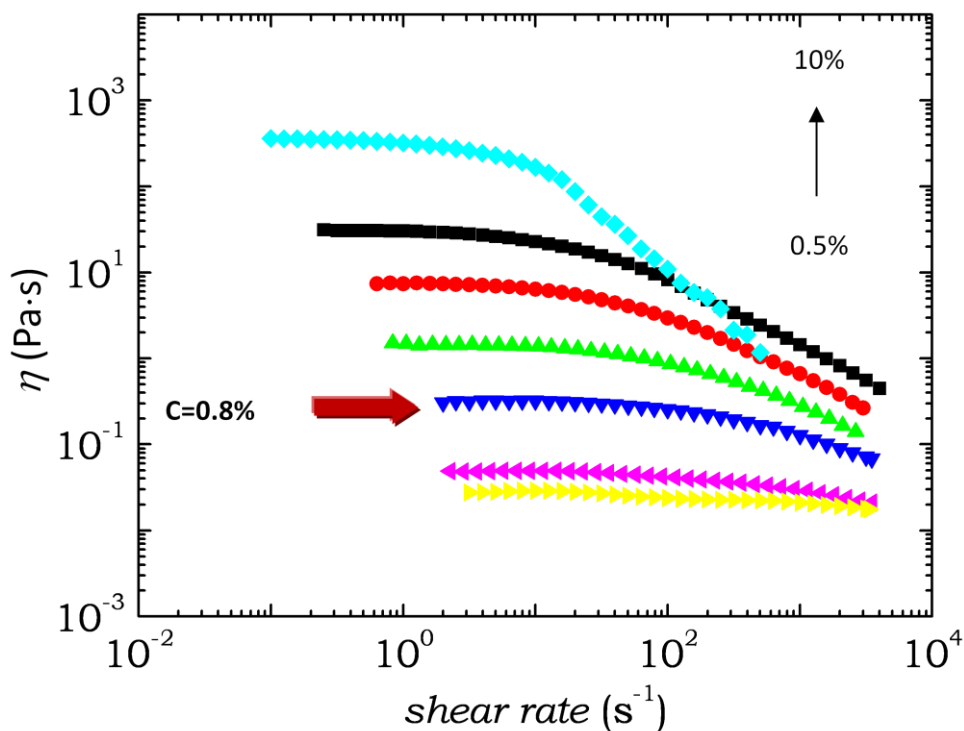


Figura 68: viscosità in funzione dello shear rate per Hya a concentrazioni tra 0.5 e 10% (w/w).

Quindi, a differenza dello Hyadd4-G (**Figura 67**), lo Hya non presenta nessun impedimento allo scorrimento fino a concentrazioni dello 0.8% (w/w).

Viscosità dei fluidi polimerici

Sotto il nome generico di *fluidi polimerici* sono compresi sistemi molto diversi che vanno da sistemi poco viscosi, come per esempio le soluzioni di polimeri molto diluite, a materiali via via più viscosi che si ottengono aumentando la concentrazione del polimero in soluzione, fino ad arrivare ai fusi polimerici.

Comunque, in generale, i fluidi polimerici mostrano spesso forti effetti viscoelastici tra cui pseudoplasticità, sforzi normali e comportamenti dipendenti dal tempo.

Il fattore più rilevante che regola il comportamento reologico dei fluidi polimerici è la lunghezza della catena, oltre al fatto che le macromolecole possono facilmente subire distorsioni anche quando sono sottoposte a flussi piuttosto lenti. Molto importante ai fini del comportamento reologico è anche la possibilità che le catene formino dei legami temporanei mediante forze intermolecolari deboli (legami idrogeni, forze dipolari) o permanenti mediante reticolazione chimica. Quando le catene sono abbastanza lunghe si formano poi associazioni intermolecolari, dette *entanglements*, presenti anche in assenza di interazioni specifiche, che sono responsabili di fenomeni di elasticità. Gli *entanglements* sono vincoli topologici del moto molecolare che derivano dal fatto che le macromolecole occupano un volume finito.

Analizzando il comportamento in flusso di un generico fluido polimerico pseudoplastico si può vedere che a basse sollecitazioni l'agitazione termica cui sottostanno i segmenti delle macromolecole prevale sull'effetto orientante del campo di forze di taglio e le macromolecole stesse mantengono la forma di gomitolo statistico che loro compete allo stato di quiete. Esse sono

fortemente aggrovigliate le une con le altre (elevata densità di entanglements) e questo spiega la resistenza che oppongono a fluire, ossia l'elevato valore di viscosità. Aumentando l'intensità della sollecitazione le macromolecole tendono ad allinearsi nella direzione dello sforzo e a liberarsi dagli aggrovigliamenti (diminuisce la densità di entanglements): la resistenza al flusso diminuisce gradualmente e conseguentemente si manifestano le caratteristiche di pseudoplasticità. A sollecitazioni estremamente intense le macromolecole si distendono completamente e si liberano del tutto dagli aggrovigliamenti (densità di entanglements nulla) e la viscosità raggiunge un valore minimo determinato dall'attrito presente fra le diverse macromolecole in assenza di entanglements.

Riportando in grafico la η_0 in funzione della concentrazione (**Figura 69**) per campioni di Hyadd4-G con concentrazioni che coprono tre decenni, comprese tra 0.001 e 1% (w/w), si verificano andamenti diversi in tre diverse zone rappresentanti distinte topologie [**64, 69-71**]:

- **$C < C_\eta$** : regime diluito con viscosità molto basse. C_η è la concentrazione limite di sovrapposizione di catena. In questo intervallo di concentrazioni, compreso tra 0.001 e 0.1% (w/w), le variazioni della viscosità della soluzione con la concentrazione sono piccole. Il volume disponibile per ogni molecola polimerica è maggiore di quello della singola catena. Questa condizione rimane predominante fino alla concentrazione alla quale le catene polimeriche saturano il volume della soluzione.

- $C_\eta < C < C_T$: regime semidiluito, con un rapido incremento di viscosità dovuto alla formazione di interazioni transienti (nel nostro caso di tipo idrofobico). C_T è la concentrazione limite di reticolazione in cui iniziano a prevalere effetti elastici. Nello Hyadd4-G ci si trova oltre la concentrazione critica di sovrapposizione, a concentrazioni tra lo 0.1 e lo 0.3% (w/w), pertanto si avrà una progressiva interpenetrazione dei coils, concomitante con la contrazione del dominio occupato dalle catene. Questo causa un rapido incremento della viscosità con la concentrazione. Gli entanglements, ossia le associazioni intermolecolari che si formano, sono dovuti ad una costrizione topologica per contatto fra le catene. La dimensione di maglia del network decresce al crescere della concentrazione, come già evidenziato dalle misure dinamico-strutturali ottenute con DLS.

Sovrapposizione di coils → **interazioni idrodinamiche intermolecolari.**

- $C > C_T$: regione in cui la densità di reticolazione supera quella di interazione idrofobica. La soluzione diviene un network dove le catene hanno perso completamente il loro carattere individuale. La viscosità continua ad aumentare con la concentrazione ma in misura minore. La sola dimensione caratteristica del sistema è la dimensione del network che continua a decrescere all'aumentare della concentrazione.

Entanglements coupling → **impone confinamenti di catena su larga scala prolungandone la dinamica.**

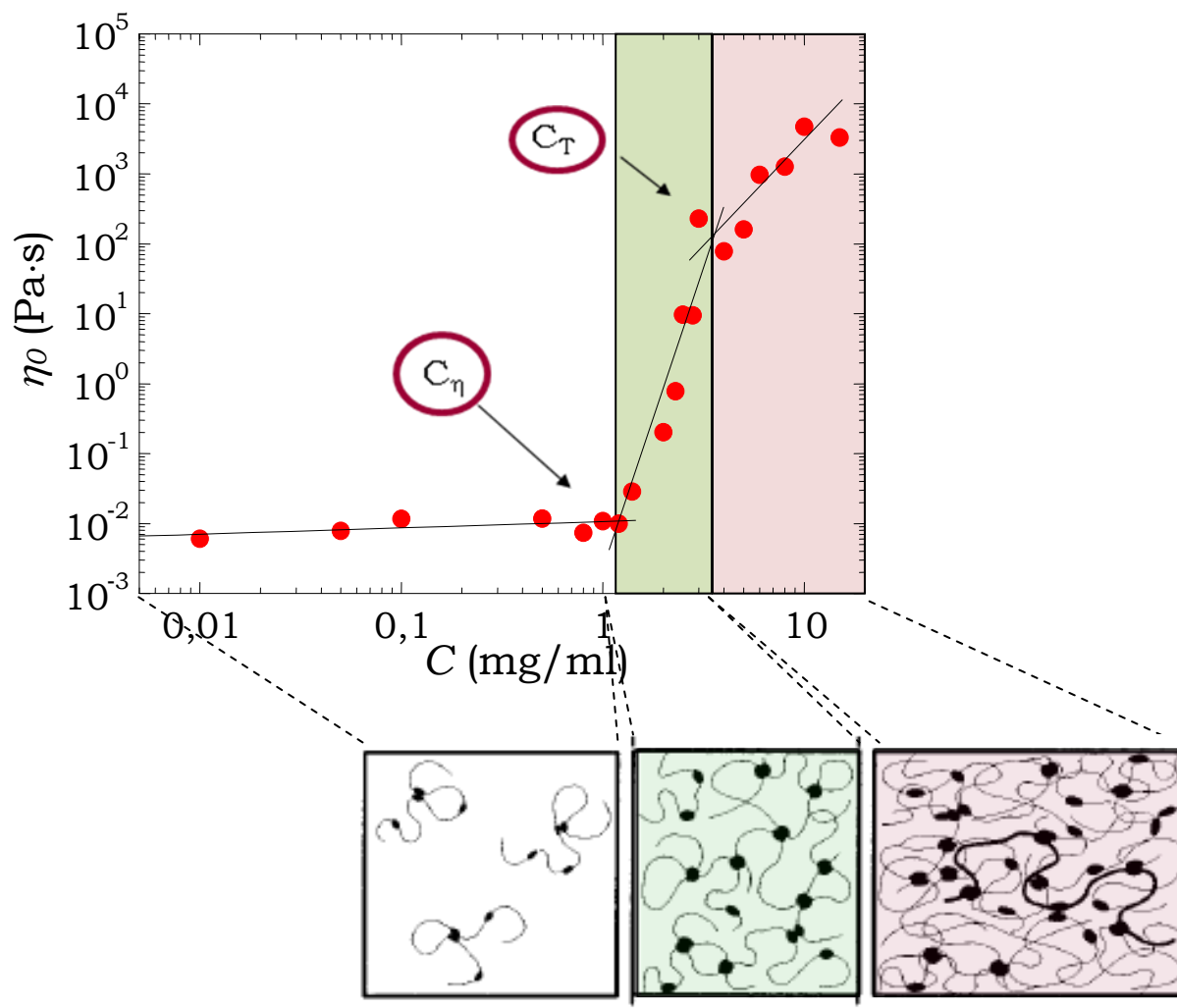


Figura 69: andamento della viscosità di punto zero in funzione della concentrazione per Hyadd4-G tra 0.001 e 1% (w/w), con l'individuazione di tre diverse zone di comportamento.

Confrontando i risultati ottenuti su Hyadd4-G con quelli ottenuti su soluzioni di Hya, nelle stesse condizioni (**Figura 70**), è subito evidente che l'aumento della viscosità con la concentrazione per Hya non è così drastico come si osserva per Hyadd4-G. Questo comportamento è dovuto all'assenza delle interazioni idrofobiche tra le catene laterali alchiliche.

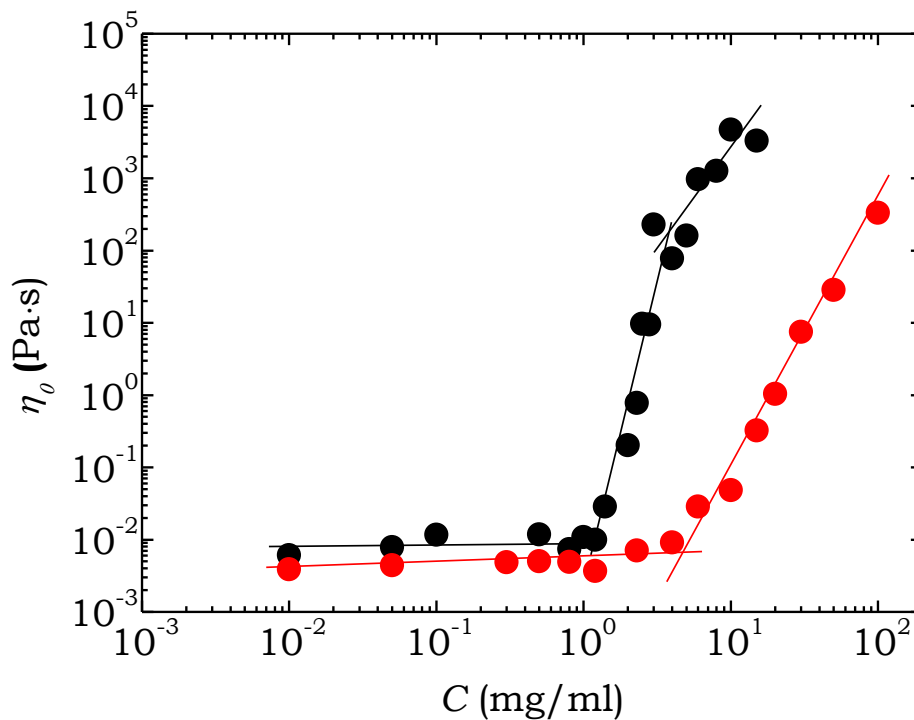


Figura 70: andamento della viscosità di punto zero in funzione della concentrazione per Hyadd4-G (●) e Hya (●), con l'individuazione delle diverse zone di comportamento.

Confronto con i modelli teorici

A causa della presenza degli entanglements una macromolecola circondata da altre non è in grado di muoversi in direzioni perpendicolari al suo contorno molecolare. Per questo motivo la diffusione o il rilassamento molecolare si limitano a un moto che viene detto di *reptazione*, simile al movimento di un serpente, che avviene lungo il tubo che circonda il profilo

del polimero. Per tale motivo il rilassamento di un polimero che forma degli entanglements è lento e la viscosità è elevata.

Nella seconda metà degli anni novanta e fino al 2001, sono stati pubblicati una serie di lavori riguardanti l'estensione del modello della reptazione elaborata da *de Gennes* [72] e relativa alla diffusione di macromolecole in reticoli formati dall'aggrovigliamento intra- e intermolecolare (entanglements) in diversi regimi di concentrazione. In questa nuova teoria, chiamata "sticky reptation" [73], si aggiungono agli entanglements di tipo topologico, punti di associazione reversibili che rallentano ulteriormente la diffusione delle catene. Questo modello prende in considerazione catene polimeriche anfifiliche che diffondono in un tubo di flusso grazie alla rottura temporanea di alcuni punti di associazione.

I tempi di rilassamento globali di un sistema viscoelastico aumentano molto così come la dipendenza della viscosità dalla concentrazione quando agli entanglements si aggiungono i punti di associazione lungo la catena. Questa situazione si applica al nostro sistema Hyadd4-G, in cui i gruppi responsabili dell'associazione (le catene laterali idrofobiche del polimero) sono detti "stickers". La teoria della "sticky reptation" è una generalizzazione della teoria della reptazione in cui le interazioni attrattive tra le catene non sono previste. Limitando la discussione alle associazioni a coppie di stickers, abbiamo la situazione rappresentata in **Figura 71-a** in cui ciascuno sticker può essere in uno dei due stati: aperto (dissociato) o chiuso (associato) con un altro sticker.

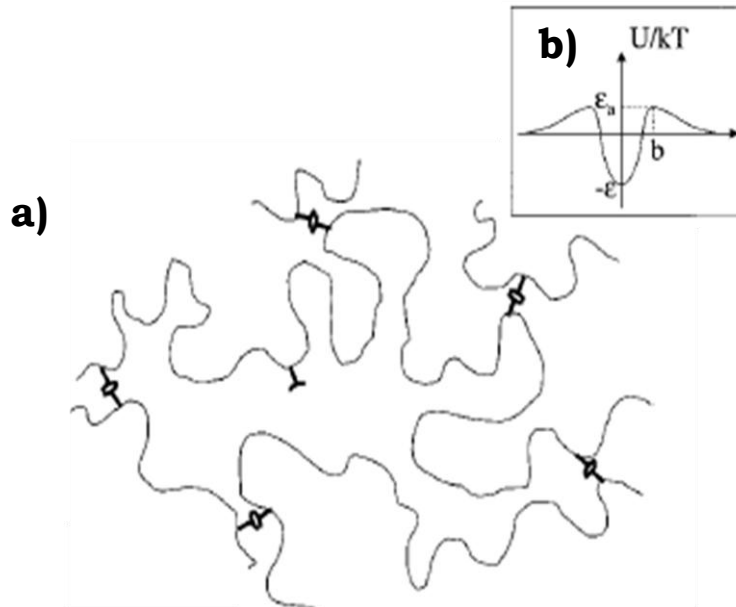


Figura 71: (a) network reversibile con coppie di stickers associati. (b) energia di una coppia di stickers come funzione della distanza tra essi ($-\varepsilon$, energia di legame; ε_a , barriera di attivazione).

La frazione di stickers in stato associato o chiuso, P , è data dall'energia di binding ($-\varepsilon kT$), con k costante di Boltzmann (**Figura 71-b**).

Ad una energia di associazione più grande corrisponde una frazione di stickers associati, P , maggiore.

In generale P sarà data dall'eq. (60).

$$P = \frac{\exp\left[\frac{-(-\varepsilon kT)}{kT}\right]}{1 + \exp\left[\frac{-(-\varepsilon kT)}{kT}\right]} = \frac{\exp(+\varepsilon)}{1 + \exp(+\varepsilon)} \quad (60)$$

Inoltre la dinamica del punto reversibile di associazione è regolata dall'energia di attivazione $\varepsilon_a kT$ e il tempo medio di esistenza di una coppia, τ_b , dipende sia dall'energia di binding che dall'ulteriore barriera di attivazione, $\varepsilon_a kT$:

$$\tau_b = \tau_0 \exp\left[\frac{-(-\varepsilon + \varepsilon_a) \cdot kT}{kT}\right] = \tau_0 \exp(\varepsilon + \varepsilon_a) \quad (61)$$

e il tempo medio in cui due stickers sono a distanza b necessario per formare una coppia sarà:

$$\tau_a = \tau_0 \exp \varepsilon_a \quad (62)$$

La concentrazione agisce in due modi sulla risposta viscoelastica del sistema:

- per frazioni di volume $\phi < \phi_s$ abbiamo formazione di entanglements che contribuiscono come vincoli topologici transienti al comportamento elastico della soluzione polimerica. A queste concentrazioni gli stickers sono prevalentemente intercatena, non contribuendo all'elasticità della soluzione;

- per frazioni di volume $\phi > \phi_s$ le associazioni prevalenti fra gli stickers sono di tipo intermolecolare.

Una caratteristica del sistema rappresentato dalla “sticky reptation” è il numero di stickers per catena. Nel caso dello Hyadd4-G, sostituito al 2%, sono presenti $\sim \frac{700,000}{400} \cdot 0.02 \sim 30$ stickers.

Il tubo di flusso lungo cui avviene la reptazione è caratterizzato dalle proprietà strutturali della catena polimerica. In **Figura 72-a**, la zona tratteggiata rappresenta il corridoio in cui le catene diffondono, i punti pieni rappresentano coppie di stickers in associazione, i punti vuoti gli stickers dissociati. Questa rappresentazione grafica ha avuto un riscontro computazionale con la simulazione di dinamica molecolare sviluppata dalla Dr.ssa Chiessi (Università di Roma Tor Vergata) in cui è stata studiata l'evoluzione temporale delle associazioni fra gli stickers. La **Figura 72-b** è l'istante a 30 ns delle catene di Hyadd4-G con un punto di associazione attivo.

Nel caso dello Hyadd4-G, quindi, possiamo dire che la dinamica su tempi scala lunghi è principalmente governata da movimenti di reptazione rallentati da processi di associazione-dissociazione delle catene polimeriche, mentre la dinamica su tempi scala brevi è governata dai tempi di vita di attacco-distacco delle catene laterali idrofobiche [62, 73].

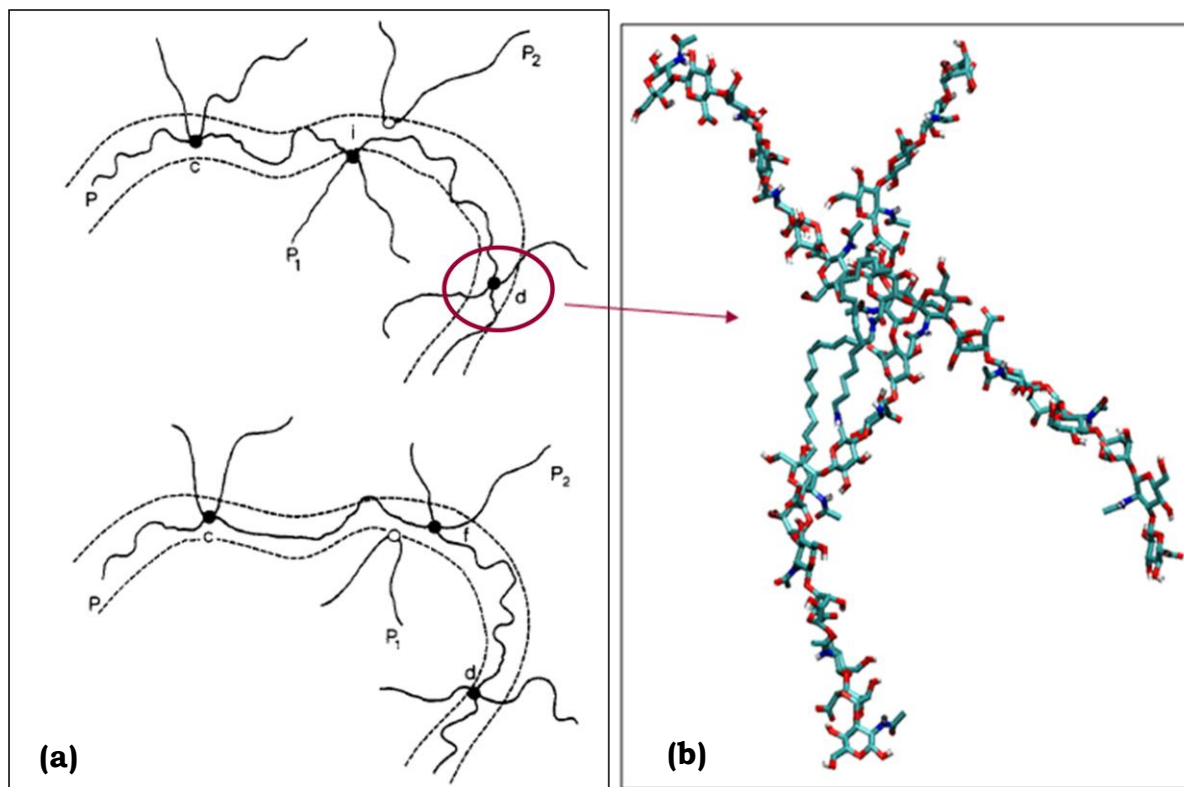


Figura 72: modello di reptazione che evidenzia la rottura e la formazione di nuovi punti di contatto **(a)**, regolati da movimenti di attacco-distacco delle side-chain idrofobiche **(b)**.

Secondo questa trattazione, le proprietà di trasporto, come la viscosità, saranno maggiormente influenzate quando da un regime di giunzioni intracatena si passerà a contatti fra catene per effetto dell'aumento della concentrazione polimerica. Considerando solo la regione di concentrazione in cui le catene con punti di associazione reversibile formano un reticolo 3D per mezzo di entanglements, la “sticky reptation” prevede che la viscosità sia proporzionale alla concentrazione con legge di potenza $\eta \propto 6.8$ e, per concentrazioni maggiori, $\eta \propto 8.5$ (**Figura 73-a**).

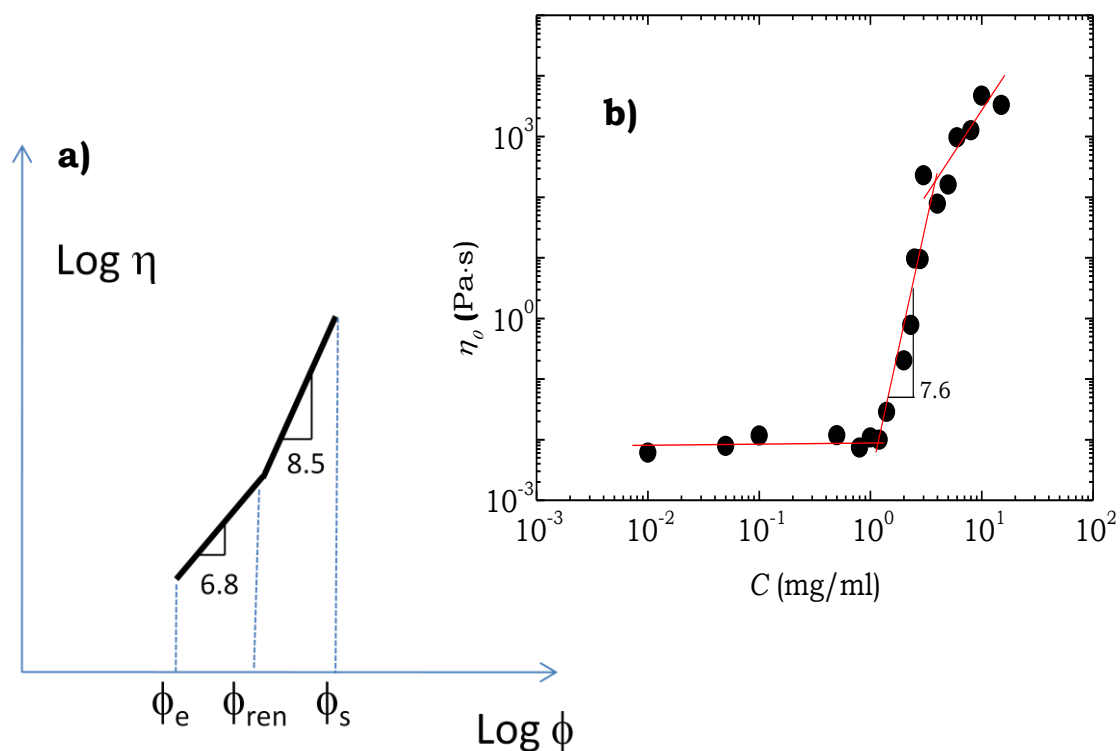


Figura 73: viscosità in funzione della concentrazione per un network reversibile, **(a)**, con ϕ_e frazione in volume di catene fra due entanglements, ϕ_s frazione in volume di catene comprese fra due coppie di stickers (*M. Rubinstein, A. N. Semenov, Macromolecules, 2001, 34, 1058-1068*) e Hyadd4-G, **(b)**.

Sebbene sia molto difficile individuare sperimentalmente i campi di esistenza dei due andamenti, le viscosità di punto zero sperimentali riportate in funzione della concentrazione individuano una legge di potenza $\eta \propto 7.6$ (**Figura 73-b**), che costituisce il valore medio fra i due regimi previsti dalla teoria della “sticky reptation” in presenza di entanglements.

6.7 Viscoelasticità: c) misure in regime transiente

Esperimenti in regime transiente permettono di comprendere le relazioni sforzo-deformazione dei materiali. È possibile infatti osservare la risposta viscoelastica di un materiale sia ad una deformazione istantanea che ad uno stress istantaneo, cioè è possibile osservare lo spettro di rilassamento e lo spettro di risposta elastica ritardata con esperimenti rispettivamente di *stress-relaxation* e di *creep-recovery*.

Risposta elastica ritardata (“creep-recovery”)

Un'altra manifestazione del comportamento viscoelastico dei polimeri, come abbiamo già visto (sez. **Risposta elastica ritardata (“creep”)**, pag. 120), è rappresentata dal *creep*, ovvero la capacità o meno di recuperare la deformazione di un carico costante. In un esperimento del genere si valuta, pertanto, la resistenza alla deformazione dei campioni analizzati.

Le prove di *creep* sono condotte applicando uno stress istantaneo e costante al campione e misurando l'andamento temporale della deformazione; tolto il carico si può valutare il *recovery*, cioè il ritorno della deformazione nel tempo. Si osserva quindi sui campioni di Hyadd4-G allo 0.8% (w/w) il recupero di elasticità del sistema dopo deformazione, ovviamente applicando

un carico che consenta comunque al campione di restare in un range di viscoelasticità lineare. In **Figura 74** è mostrato il comportamento di deformazione di un gel di Hyadd4-G a concentrazione di 0.8% (w/w) sottoposto ad uno sforzo istantaneo σ di 2 Pa. Lo sforzo viene applicato ad un tempo t_0 e mantenuto costante fino ad un tempo t_1 di 2 minuti, quindi viene tolto istantaneamente.

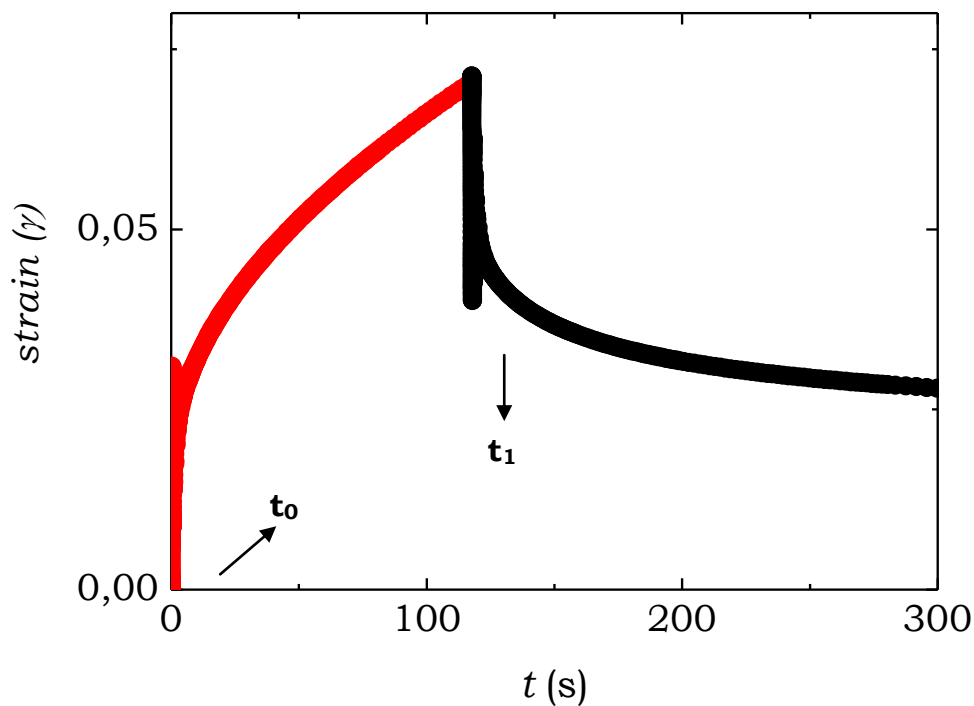


Figura 74: esperimento di creep (●) - recovery (●) per un campione di Hyadd4-G 0.8% (w/w), osservando lo strain γ in funzione del tempo, per $t_1=2$ min.

Lo Hyadd4-G 0.8% (w/w) si comporta come un corpo viscoelastico: la deformazione γ subita dal campione durante lo sforzo σ varia con il tempo, ma non linearmente e può essere parzialmente o totalmente recuperata nel

tempo. Il lavoro di deformazione è in parte dissipato ed in parte conservato elasticamente. Si ha, infatti, una immediata risposta elastica del campione alla sollecitazione con una deformazione che cresce nel tempo fino al tempo t . La deformazione subita viene recuperata ma non totalmente: è presente la componente J_3 della creep compliance, eq. (34), ad indicare la presenza della componente viscosa del sistema. Il sistema quindi si comporta come un fluido viscoelastico. In questi casi il recupero non è mai totale e dipende dal tempo di applicazione e dall'entità del carico applicato. Come abbiamo visto con l'eq. (36), dal valore della compliance $J(t)$ si può ricavare la viscosità di punto zero, cioè la viscosità a sollecitazione nulla. Quindi dal fit della zona lineare in **Figura 75** si determina η_0 .

Il risultato ottenuto per Hyadd4-G allo 0.8% (w/w) è di una viscosità di punto zero di 6800 Pa·s che permette di confermare il risultato ottenuto con la curva di flusso (**Figura 67**).

Per un fluido viscoelastico, come lo Hyadd4-G 0.8% (w/w), il recupero della deformazione non è mai totale e dipende dal tempo di applicazione e dall'entità del carico applicato. A parità di carico, infatti, ma a tempi di applicazione molto più lunghi (3 ore) il campione risponde alla sollecitazione con un recupero di deformazione minore (**Figura 76**).

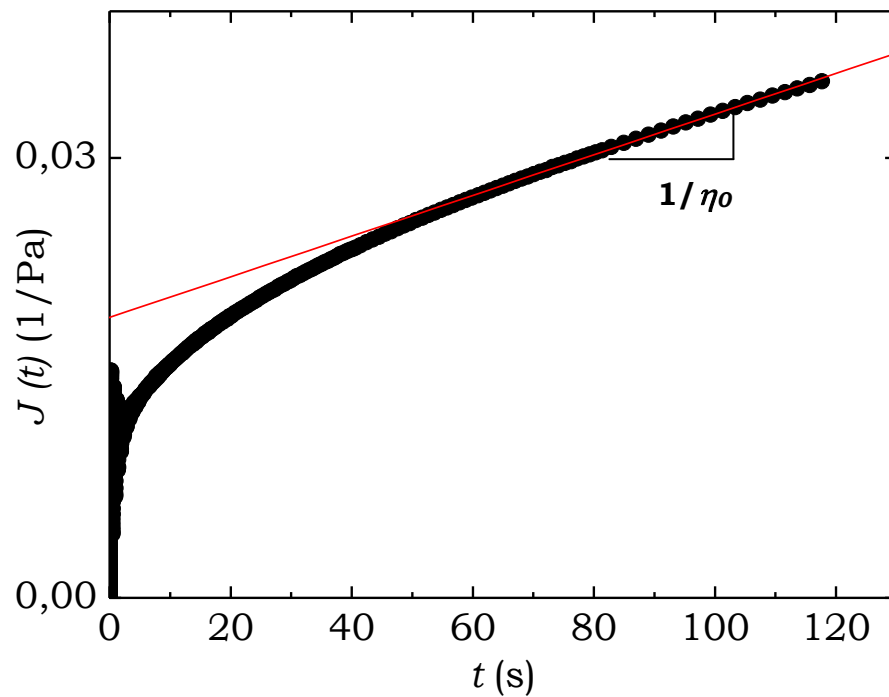


Figura 75: creep compliance, $J(t)$, (•) per un campione di Hyadd4-G 0.8% (w/w), e relativo fit della zona lineare (-), per $t_i=2$ min.

Per Hyadd4-G 0.8% (w/w) un tempo di applicazione del carico di 3 ore corrisponde ad un tempo molto più lungo del più alto tempo di rilassamento del sistema (**Tabella 10**). Quindi un recupero di elasticità minore in questo esperimento può essere giustificato anche dalla possibilità di rilassamento del sistema durante l'applicazione stessa del carico.

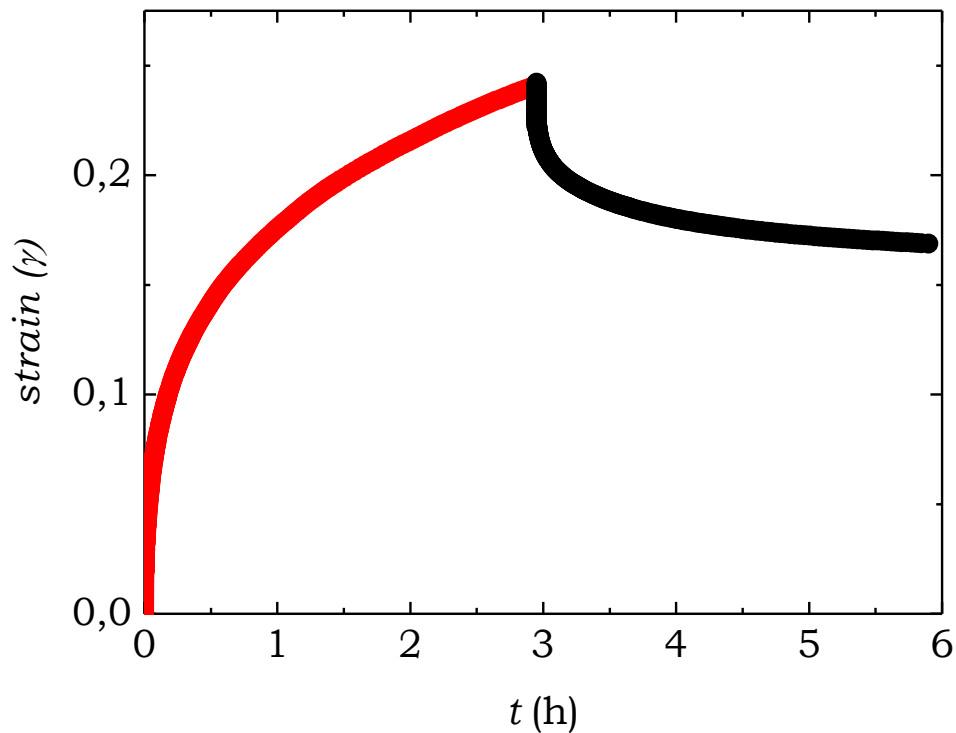


Figura 76: esperimento di creep (●) - recovery (●) per un campione di Hyadd4-G 0.8% (w/w), osservando lo strain γ in funzione del tempo, per $t_i=3$ ore.

Diverso è il comportamento nel caso del gel meno concentrato. In **Figura 77** si osserva la deformazione subita da un campione di Hyadd4-G 0.3% (w/w) a parità di carico e per un tempo di applicazione della sollecitazione di 2 minuti: dopo una minima risposta elastica, γ cresce linearmente con il tempo e rimane costante per $t > t_i$. La deformazione finale quindi è irreversibile: il lavoro di deformazione viene dissipato sotto forma di calore. Questo è un comportamento caratteristico di un fluido in cui γ cresce linearmente nel tempo e resta costante al cessare dello sforzo applicato.

Il campione meno concentrato, quindi, sottoposto alle stesse sollecitazioni del campione allo 0.8% (w/w) si comporta come un fluido.

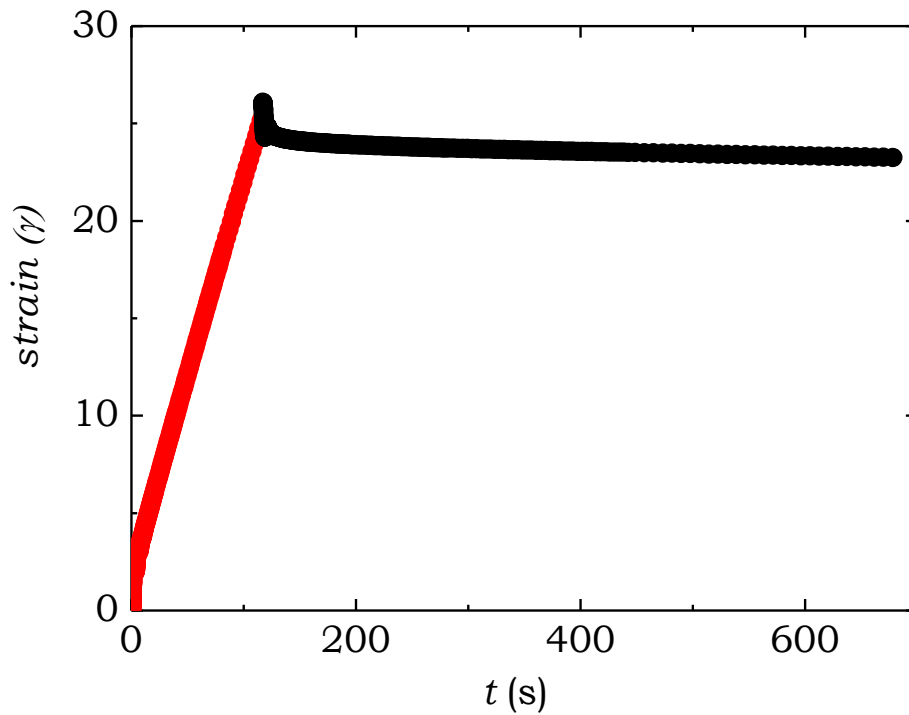


Figura 77: esperimento di creep (●) - recovery (●) per un campione di Hyadd4-G 0.3% (w/w), osservando lo strain γ in funzione del tempo, per $t_1=2$ min.

Rilassamento dello sforzo (“stress-relaxation”)

In un esperimento di stress relaxation si applica una deformazione istantanea e costante γ_0 al campione e si valuta la variazione dello sforzo nel tempo, $\sigma(t)$.

È stato condotto un esperimento di stress relaxation su un campione di Hyadd4-G 0.8% (w/w) applicando una deformazione del 5% e lasciando quindi rilassare il sistema (**Figura 78**).

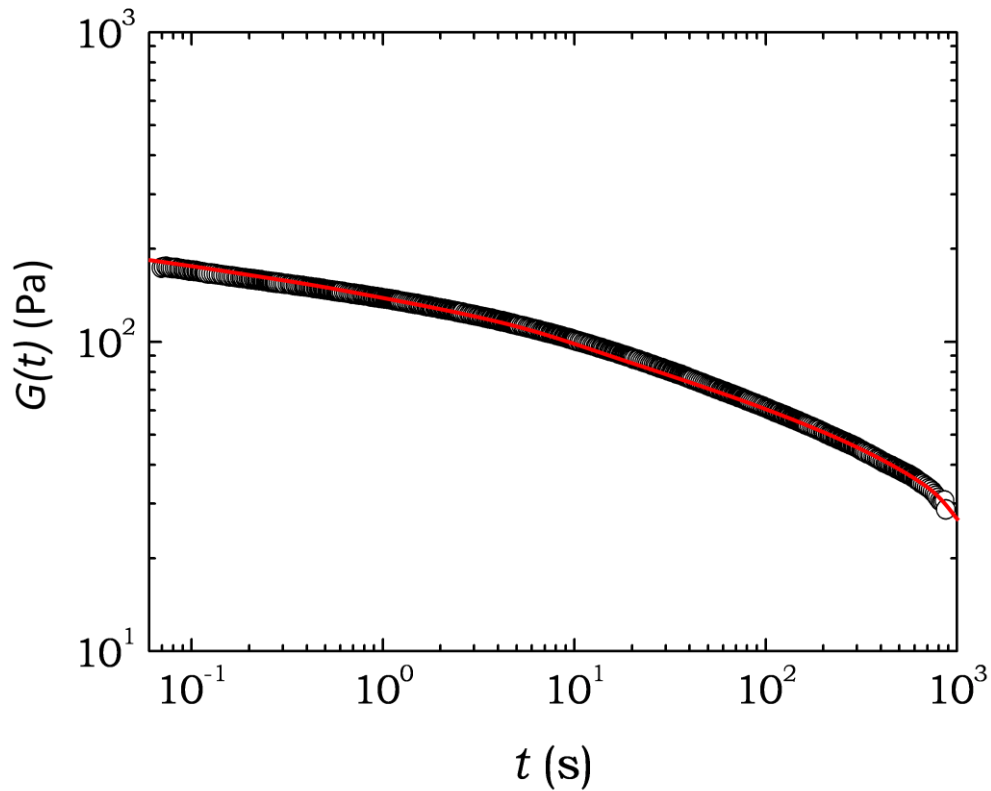


Figura 78: esperimento di stress relaxation per Hyadd4-G 0.8% (w/w) e relativo fit (-) osservando il modulo di rilassamento $G(t)$ in funzione del tempo.

La curva sperimentale è stata interpolata utilizzando l'eq. (49) con 6 elementi di Maxwell e i risultati ottenuti sono riportati in **Tabella 13**.

Hyadd4-G (w/w)	0.8%
τ_{\min} (s)	0.020 ± 0.002
τ_{\max} (s)	1380 ± 115

Tabella 13: tempi di rilassamento minimi e massimi per Hyadd4-G 0.8% (w/w).

Come si può notare dalle **Tabella 9** e **Tabella 11** il risultato ottenuto per il più alto tempo di rilassamento di Hyadd4-G 0.8% (w/w) è in accordo con i risultati ottenuti dagli spettri meccanici del campione.

BIBLIOGRAFIA

- 58** R. J. Young and P. A. Lovell, *Introduction to Polymers*, Chapman & Hall, **1991**.
- 59** *Experimental Methods in Polymer Science*, Edited by Toyochi Tanaka, **2000**.
- 60** John D. Ferry, *Viscoelastic Properties of Polymers*, John Wiley & Sons, Inc., **1961**.
- 61** Kristi S. Anseth, Christofer N. Bowman and Lisa Brannon-Peppas, *Biomaterials*, **1996**, *17*, 1647-1657.
- 62** Michael Rubinstein, Alexander N. Semenov, *Macromolecules*, **2001**, *34*, 1058-1068.
- 63** J. P. Celli, S. Turner, N. H. Afdhal, R. H. Ewoldt, G. H. McKinley, R. Bansil and S. Erramilli, *Biomacromolecules*, **2008**, *8*, 1580-1586.
- 64** E. J. Regalado, J. Selb, F. Candau, *Macromolecules*, **1999**, *32*, 8580-8588.
- 65** J. Engmann, C. Servais, A. S. Burbidge, *J. Non-Newtonian Fluid Mech.*, **2005**, *132*, 1-27.
- 66** Shyamal Kumar Kundu, Takuro Matsugana, Masaru Yoshida and Mitsuhiro Shibayama, *J. Phys. Chem. B*, **2008**, *112*, 11537-11541.

- 67** G. P. Roberts, H. . Barnes, P. Carew, *Chemical Engineering Science*, **2001**, 56, 5617-5623.
- 68** J. M. Franco, C. Gallegos, H. A. Barnes, *Journal of Food Engineering*, **1998**, 36, 89-102.
- 69** E. Fouissac, M. Milas and M. Rinaudo, *Macromolecules*, **1993**, 26, 6945-6951.
- 70** E. Volpert, J. Selb and F. Candau, *Polymer*, **1998**, Vol. 39, No. 5, 1025-1033.
- 71** E. Volpert, J. Selb and F. Candau, *Macromolecules*, **1996**, 29, 1452-1463.
- 72** P. G. De Gennes, *The Journal of Chemical Physics*, **1971**, Vol. 55, No. 2, 572-579.
- 73** L. Leibler, M. Rubinstein, R. H. Colby, *Macromolecules*, **1991**, 24, 4701-4707.
-
-

CAPITOLO 7

Scattering di neutroni

Lo scattering di neutroni fornisce un accesso ideale alle proprietà microscopiche e permette di studiare in modo quantitativo la struttura e la dinamica di un sistema macromolecolare [74]. Inoltre la finestra spazio-temporale esplorata con la tecnica di scattering di neutroni è la stessa in cui vengono sviluppate la maggior parte delle simulazioni di dinamica molecolare. È quindi possibile confrontare una serie di parametri strutturali e dinamici con gli analoghi valori simulati, permettendo una comprensione dettagliata dei sistemi studiati. In un esperimento di scattering neutronico si ricavano informazioni sull'energia e sul momento scambiati dai neutroni per interazione col campione in esame (**Figura 79**).

Dalla conservazione dell'energia e del momento si possono ottenere le seguenti relazioni:

$$\Delta E = E - E_0 = \frac{\hbar^2 (\vec{k}^2 - \vec{k}_0^2)}{2m_n} \quad (63)$$

$$\hbar\vec{Q} = \hbar(\vec{k} - \vec{k}_0) \quad (64)$$

in cui E è l'energia del neutrone diffuso, E_0 quella del neutrone incidente, k_0 è il vettore d'onda incidente, k è quello diffuso, m_n è la massa del neutrone e Q è il vettore di scattering.

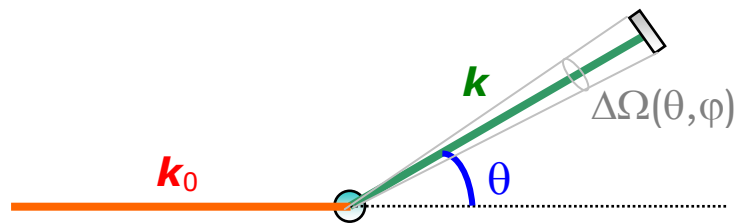


Figura 79: schema di interazione con il campione in un esperimento di scattering di neutroni. k_0 è il vettore d'onda incidente, k è il vettore d'onda diffuso.

La relazione (63) mette in evidenza come l'energia assorbita o ceduta dal campione è uguale alla differenza di energia tra il neutrone diffuso (E) e quello incidente (E_0).

Il momento dei neutroni incidenti e dei neutroni diffusi, assumendo un comportamento di particelle libere, è descritta dai vettori d'onda incidente e diffuso.

I moduli di tali vettori sono definiti dalle seguenti relazioni:

$$|\vec{k}_0| = \frac{2\pi}{\lambda_0} \quad |\vec{k}| = \frac{2\pi}{\lambda} \quad (65)$$

dove λ_0 è la lunghezza d'onda del neutrone incidente e λ la lunghezza d'onda del neutrone diffuso. La direzione e il verso dei vettori sono date dalla direzione e dal verso del fascio incidente e del fascio diffuso.

La relazione (64) mette in evidenza come il momento ceduto o acquistato dal campione, Q , sia uguale alla differenza di momento tra il neutrone incidente e quello diffuso. In termini vettoriali possiamo rappresentare Q come in

Figura 80.

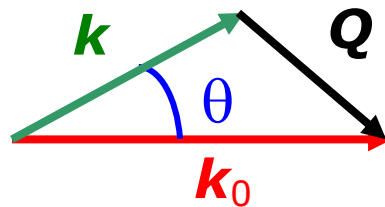


Figura 80: vettore di scattering Q come differenza tra il vettore d'onda incidente k_0 e quello diffuso k .

$$|\vec{Q}| = \frac{4\pi}{\lambda_0} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (66)$$

dove λ_0 è la lunghezza d'onda del neutrone incidente e θ l'angolo compreso tra il vettore d'onda incidente e il vettore d'onda diffuso.

In un esperimento di scattering quasielastico, oltre al momento scambiato si misura anche l'energia scambiata per ciascun Q . Quindi conoscendo l'angolo tra il fascio neutronico incidente e quello diffuso si può ricavare il vettore di scattering e il momento trasferito.

Per determinare l'energia ceduta o acquistata dal neutrone nel processo di diffusione vengono utilizzati degli spettrometri detti in "tempo di volo".

Questi strumenti sfruttano il fatto che il neutrone, interagendo con il campione, acquista o cede energia e perciò rispettivamente aumenta o diminuisce la propria velocità. Questo cambiamento di velocità, e quindi di energia, si può determinare misurando il tempo necessario al neutrone per percorrere una distanza nota. Poiché il moto del neutrone è rettilineo uniforme, conoscendo la distanza ed il tempo, si può ricavare la velocità del neutrone e di conseguenza la sua energia.

La variazione di energia del neutrone si misura mantenendo fissa l'energia incidente e variabile l'energia finale o viceversa. Gli strumenti che utilizzano il primo metodo sono generalmente definiti spettrometri a geometria diretta, mentre quelli che utilizzano il secondo metodo spettrometri a geometria inversa.

7.1 Interazione con la materia

Lo scattering neutronico ha origine dall'interazione tra il neutrone ed i nuclei degli atomi, costituenti la materia. L'interazione tra nucleo e neutrone dipende dal fatto che il neutrone è una particella avente momento di spin non nullo ($\mu_s=1/2$) e che può quindi interagire con il momento di spin dei nuclei.

L'ordine di grandezza della distanza di interazione è di circa 10^{-15} - 10^{-14} metri. Essendo il raggio di interazione così piccolo, l'assunzione più ragionevole possibile è considerare l'interazione tra nucleo e neutrone come isotropa. Un'interazione puramente isotropa comporta il fatto che è necessario un solo parametro per descrivere la capacità di un nucleo di deviare i neutroni rispetto al fascio incidente. Questo parametro viene definito *lunghezza di scattering* e viene in genere indicato con b .

La lunghezza di scattering è una quantità misurabile sperimentalmente per ogni singolo nucleo ed è direttamente correlata con un'altra proprietà detta *sezione d'urto di scattering* e generalmente indicata con σ .

La sezione d'urto di scattering è una caratteristica di ogni nucleo e viene definita come il numero di neutroni diffusi al secondo da un determinato nucleo diviso il numero di neutroni incidenti per unità di tempo e per unità di superficie. Maggiore è la sezione d'urto di un nucleo, maggiore è la sua capacità di interagire con il neutrone e deviarlo dalla sua direzione originaria.

La misura delle lunghezze di scattering b di tutti i nuclei del sistema periodico ha dimostrato che questa grandezza è una proprietà casuale della tavola periodica, cioè essa non dipende da alcuna caratteristica del singolo atomo, come ad esempio la massa atomica o la densità elettronica.

In un esperimento il neutrone va ad interagire con un campione costituito da una serie di specie atomiche costituite a loro volta da una miscela di diversi isotopi che possiedono uno spin nucleare differente. La lunghezza di scattering, infatti, è una grandezza che varia non solo da un atomo all'altro, ma anche per i diversi isotopi della stessa specie atomica. Questa variazione si verifica in quanto l'interazione non dipende soltanto dal tipo di nucleo, ma anche dallo stato di spin totale del sistema nucleo-neutrone.

La media su tutti gli isotopi e su tutti gli stati di spin della lunghezza di scattering di una determinata specie atomica viene definita *lunghezza di scattering coerente*:

$$b_{coh} = \langle b \rangle \quad (67)$$

La deviazione standard della lunghezza di scattering per una specie atomica viene definita *lunghezza di scattering incoerente*:

$$b_{inc} = \left[\langle b^2 \rangle - \langle b \rangle^2 \right]^{1/2} \quad (68)$$

Le lunghezze di scattering coerente ed incoerente sono legate rispettivamente alla sezione d'urto coerente e alla sezione d'urto incoerente dalle espressioni (69) e (70).

$$\sigma_{coh} = 4\pi \langle b \rangle^2 \quad (69)$$

$$\sigma_{inc} = 4\pi \left[\langle b^2 \rangle - \langle b \rangle^2 \right] \quad (70)$$

L'unità di misura della sezione d'urto è il *barn* che corrisponde a 10^{-24} cm².

Il neutrone, quando va ad interagire con un campione, vede un potenziale che varia da punto a punto, in virtù delle diverse specie isotopiche e dei diversi stati di spin del sistema. Per descrivere questa situazione, si può introdurre una lunghezza di scattering media $\langle b \rangle$, che rappresenta il potenziale medio che il neutrone sente quando interagisce con il campione producendo quindi effetti di interferenza, ed una sua fluttuazione relativa.

Le deviazioni dal potenziale medio $[\langle b^2 \rangle - \langle b \rangle^2]^{1/2}$, essendo distribuite in modo casuale, non danno luogo ad effetti di interferenza ma a diffusione incoerente, che dipende dal moto indipendente dei singoli centri di scattering. La sezione d'urto coerente sarà quindi correlata con gli effetti di interferenza tra atomi differenti che si trovano all'interno del campione e risentirà delle posizioni relative degli atomi nel campione e quindi della sua struttura.

Per quanto riguarda la sezione d'urto incoerente si può dire che essa è legata all'evoluzione temporale del moto del singolo centro di scattering e che, derivando da fluttuazioni statistiche della lunghezza di scattering media, non può produrre alcun effetto di interferenza.

Lo scattering incoerente non è quindi in grado di fornire informazioni sulla correlazione tra le posizioni dei vari centri di scattering nel campione ma è in grado di fornire la correlazione temporale delle posizioni del singolo centro di scattering.

Un caso molto particolare è costituito dall'idrogeno.

La sezione d'urto coerente dell'idrogeno è uguale a 1.8 barns, mentre la sezione d'urto incoerente è uguale a 79.9 barns. L'idrogeno presenta la sezione d'urto incoerente più grande di ogni altro elemento della tavola periodica. Questo fatto rende lo scattering neutronico incoerente uno strumento unico per lo studio di composti contenenti l'idrogeno.

Un altro caso degno di nota è quello del deuterio. La sezione d'urto coerente del deuterio è di 5.6 barns, quella incoerente è di 2.0 barns.

Come si può vedere la sezione d'urto incoerente del deuterio è molto minore di quella dell'idrogeno. Questa proprietà del deuterio può essere sfruttata nelle misure di scattering incoerente per variare i contributi all'intensità di scattering dovuti a differenti specie o gruppi funzionali e per discriminare tra essi. Spesso si utilizza come solvente la D_2O in modo da trascurare ragionevolmente il contributo del solvente all'intensità di scattering misurata e per mettere in risalto il contributo degli idrogeni della matrice polimerica.

E' importante notare che, oltre all'idrogeno, altri due elementi sono molto importanti per lo scattering neutronico: l'alluminio e il vanadio.

L'alluminio assorbe molto debolmente i neutroni (1% per millimetro di spessore) e quindi viene utilizzato per costruire le celle portacampione o le finestre dei criostati.

Il vanadio invece è un elemento diffusore quasi completamente incoerente ($\sigma_{coh}(V)=0.02$ barns; $\sigma_{inc}(V)=5.1$ barns) e viene utilizzato come materiale standard per la determinazione della risoluzione in energia degli strumenti, in quanto il suo spettro fornisce solamente il contributo elastico allo scattering costituendo quindi una δ di Dirac nello spettro quasielastico.

In conclusione, quando un fascio di neutroni attraversa un materiale l'intensità del fascio risulta attenuata a causa di due possibili processi, l'*assorbimento* e lo *scattering* da parte degli atomi attraversati e l'intensità del fascio risultante è proporzionale alla sezione d'urto del materiale attraversato.

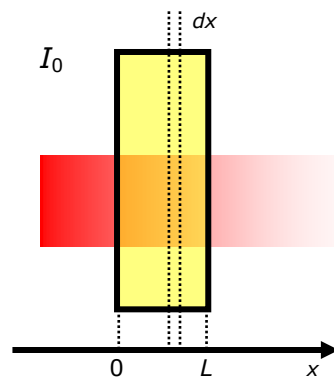


Figura 81: attenuazione di un fascio di neutroni per interazione con la materia.

$$I(x) = I_0 \exp(-\mu_T x) \quad (71)$$

$$\mu_T = n \cdot \sigma_T \quad (72)$$

$$\sigma_T = \sigma_A + \sigma_S \quad (73)$$

σ_T è la sezione d'urto totale del materiale attraversato dal fascio ed è data dalla somma delle sezioni d'urto di assorbimento e di scattering.

7.2 QENS

La diffusione quasielastica di neutroni è una tecnica molto potente in grado di fornire numerose informazioni sulla dinamica e sulla struttura del sistema in esame su scala atomica. Questa peculiarità dipende sostanzialmente dalle proprietà dei neutroni a bassa energia.

L'energia dei neutroni è paragonabile all'energia dei livelli energetici rotazionali molecolari e la lunghezza d'onda associata al neutrone è dell'ordine delle distanze interatomiche in fase condensata.

I processi dinamici studiati nello scattering quasielastico di neutroni riguardano trasferimenti di energia molto piccoli e appaiono sullo spettro non come dei picchi discreti ma come un allargamento della riga elastica corrispondente alla risoluzione strumentale in energia.

Questi trasferimenti di energia possono essere attribuiti a moti traslazionali o di riorientazione delle catene laterali delle molecole. I tempi scala di questi processi sono generalmente compresi tra 10^{-12} e 10^{-10} secondi.

La diffusione quasielastica di neutroni si interessa principalmente della regione dello spettro di distribuzione in energia dei neutroni diffusi corrispondente a trasferimenti di energia compresi tra intervalli variabili in dipendenza della strumentazione utilizzata. Questa tecnica è in grado di investigare la dinamica di moti traslazionali e rotazionali. Le vibrazioni molecolari nell'intervallo energetico dello scattering quasielastico, in genere, contribuiscono allo spettro sperimentale solamente per un fondo piatto. L'osservabile sperimentale di un esperimento di scattering in cui vi sia trasferimento di energia viene definito sezione d'urto doppio differenziale:

$$\frac{\partial^2 \sigma}{\partial \omega \partial \Omega} \quad (74)$$

Questa grandezza è la derivata parziale della sezione d'urto di scattering del sistema rispetto all'energia scambiata nel processo di scattering ω e rispetto all'angolo solido Ω .

Tenendo conto della definizione di sezione d'urto di scattering, la sezione d'urto doppio differenziale rappresenta il numero di neutroni diffusi al secondo che hanno subito un trasferimento di energia nell'angolo solido $\partial\Omega$ diviso il numero di neutroni incidenti per unità di tempo e per unità di superficie.

Per un sistema di n nuclei identici è fornita dalla seguente espressione:

$$\frac{\partial^2 \sigma}{\partial \omega \partial \Omega} = \frac{1}{4\pi n} \frac{\vec{k}}{k_0} \left[\sigma_{coh} \cdot S_{coh}(Q, \omega) + \sigma_{inc} \cdot S_{inc}(Q, \omega) \right] \quad (75)$$

ed è costituita da una combinazione lineare della sezione d'urto coerente e della sezione d'urto incoerente del singolo nucleo, pesate rispettivamente per il fattore di struttura dinamico coerente $S_{coh}(Q, \omega)$ ed il fattore di struttura dinamico incoerente $S_{inc}(Q, \omega)$.

I fattori di struttura contengono tutte le informazioni strutturali e dinamiche del sistema in considerazione.

Data l'alta idratazione degli idrogel di Hyadd4-G e la presenza di numerosi idrogeni nella struttura dell'acido ialuronico, e dei polisaccaridi in genere, ci concentreremo sul contributo incoerente, dovuto principalmente all'idrogeno, della sezione d'urto doppio differenziale (secondo termine dell'eq. **(75)**) in quanto esso è predominante su quello coerente.

I processi dinamici che osserveremo negli esperimenti di scattering quasielastico saranno dovuti, nella quasi totalità, al moto degli atomi di idrogeno dell'acqua e della matrice polimerica.

Il fattore di struttura incoerente di un sistema costituito da n nuclei identici è fornito dalla seguente relazione:

$$S_{inc}(Q, \omega) = \frac{1}{n} \sum_j \int_{-\infty}^{\infty} \left\langle e^{-iQ \cdot r_j(0)} \cdot e^{-iQ \cdot r_j(t)} \right\rangle \cdot e^{-i\omega t} dt \quad (76)$$

Tale fattore fornisce informazioni sulla dinamica del singolo centro di scattering in quanto la media temporale all'interno dell'integrale è relativa al prodotto tra due termini legati alla posizione del nucleo j al tempo zero, $r_j(0)$, e la posizione del medesimo nucleo al tempo t , $r_j(t)$.

L'argomento all'interno dell'integrale viene generalmente definito *funzione intermedia di scattering* e questa funzione corrisponde all'antitrasformata di Fourier del fattore di struttura dinamico incoerente dal dominio delle frequenze al dominio dei tempi.

$$I_{inc}(Q, t) = \frac{1}{n} \sum_j \left\langle e^{-iQ \cdot r_j(0)} \cdot e^{-iQ \cdot r_j(t)} \right\rangle \quad (77)$$

Questa funzione intermedia di scattering è legata ad un'altra funzione detta *funzione di correlazione spazio-temporale* $G_s(r, t)$.

Tale funzione è definita come la trasformata di Fourier dallo spazio reciproco Q (\AA^{-1}) allo spazio reale della funzione intermedia di scattering:

$$G_S(r,t) = \frac{1}{(2\pi)^3} \int I_{inc}(Q,t) \cdot e^{-iQ \cdot r} dQ \quad (78)$$

e rappresenta fisicamente la probabilità che il centro di scattering al tempo t si trovi alla distanza r dall'origine.

Se si è in grado di conoscere la funzione di correlazione spazio-temporale, si può conoscere praticamente tutta l'evoluzione temporale del sistema e quindi la natura della dinamica del centro di scattering che si osserva nell'esperimento.

Il fattore di struttura dinamico incoerente, la funzione intermedia di scattering e la funzione di correlazione spazio-temporale sono tre funzioni legate tra loro tramite una trasformata di Fourier; quindi, conoscendo il fattore di struttura dinamico incoerente, $S_{inc}(Q,\omega)$, si potrebbe risalire tramite una doppia trasformata di Fourier, dal dominio delle frequenze al dominio dei tempi e dallo spazio reciproco a quello reale, alla funzione di correlazione spazio-temporale $G_S(r,t)$, secondo lo schema:

$$S_{inc}(Q,\omega) \xrightarrow{F.T.} I_{inc}(Q,t) \xrightarrow{F.T.} G_S(r,t)$$

Il fattore di struttura dinamico incoerente, come mostrato in precedenza, si ricava dallo spettro sperimentale di diffusione quasielastica, ma, poiché lo spazio reciproco e il dominio delle frequenze campionati in un esperimento di diffusione quasielastica sono troppo limitati, non è possibile ricavare la funzione di correlazione spazio-temporale applicando la doppia trasformata di Fourier.

Si ragiona, quindi, in senso inverso, cioè cercando di formulare dei modelli plausibili in Q e ω che possano descrivere l'andamento sperimentale osservato. Il fattore di struttura dinamico del modello va poi confrontato con quello ottenuto sperimentalmente per vedere se il modello utilizzato è corretto e se le assunzioni fatte sono sufficienti a descrivere l'andamento osservato.

Modello di $S(Q, \omega)$ in sistemi confinati ad alta idratazione

La relazione (79) descrive i rilassamenti dei tre componenti presenti in un idrogel: il reticolo polimerico (p), l'acqua coordinata dal reticolo (n) e l'acqua libera (o meno associata) residente all'interno della maglia del reticolo (b).

La dinamica di queste tre specie è descritta, in questo modello, rispettivamente dalle Lorentziane L_p , L_n e L_b .

Il fattore di struttura quindi è descritto dalla somma:

$$S_{inc}(Q, \omega) = \frac{1}{A} \left\{ p [A_0(Q) \delta(\omega) + (1 - A_0) L_p(Q, \omega)] + (1 - p) [w_n L_n(Q, \omega) + (1 - w_n) L_b(Q, \omega)] \right\} + bkg \quad (79)$$

Questa relazione tiene conto del contributo quasielastico sia per il polimero che per l'acqua, descritto dalle Lorentziane L_p , L_n e L_b .

Inoltre nella (79) si è considerato un contributo elastico alla curva sperimentale da parte del polimero.

Ricordiamo che l'espressione del fattore di struttura dinamico di una Lorentziana è dato dall' eq. (80).

$$S_{inc}(Q, \omega) = \frac{1}{\pi} \frac{\Gamma(Q)}{\omega^2 + (\Gamma Q)^2} \quad (80)$$

dove Γ è la semiampiezza a metà altezza della Lorentziana (Half Width at Half Maximum, HWHM).

Le informazioni di interesse in questo studio sono contenute nei parametri Γ_p , Γ_n e Γ_b , le HWHM delle rispettive Lorentziane L_p , L_n e L_b .

Nel caso dei dati ottenuti con NEAT, il contributo quasielastico del polimero è stato azzerato imponendo $A_0=1$. Questa approssimazione è ragionevole perché i moti di rilassamento del polimero cadono nella risoluzione di NEAT.

Inoltre il peso dei protoni del polimero rispetto a quelli dell'acqua è in prima approssimazione trascurabile a causa della bassa concentrazione di polimero nel gel (la concentrazione più alta corrisponde infatti ad una frazione in peso di 0.04). Sempre per questo motivo il parametro p , che tiene conto del peso della frazione di polimero, viene fatto variare tra 0.01 a 0.03. Per l'acqua abbiamo invece tenuto conto di due Lorentziane, una larga e una stretta.

Dipendenza di Γ da Q : modello della diffusione a salti

In questo modello si assume che il moto avvenga considerando che un atomo vibra per un certo tempo t su un sito di equilibrio descrivendo un ellissoide termico di vibrazione. L'atomo effettua un salto dal sito di equilibrio in cui si trova ad un altro sito di equilibrio in un tempo τ' , molto minore del tempo di residenza nel sito (τ_0). Inoltre la dimensione del salto da un sito di equilibrio all'altro è molto maggiore della dimensione dell'ellissoide termico di vibrazione. Utilizzando queste assunzioni si ricava la funzione di correlazione spazio-temporale e quindi anche il fattore di struttura dinamico incoerente. La Lorentziana L (eq. **(80)**) è una funzione centrata in $\omega=0$ e con semiampiezza Γ . La dipendenza di Γ da Q è data dall'eq. **(81)**.

$$\Gamma(Q) = \frac{1}{\tau_0} \left[1 - \int_0^{\infty} \frac{\sin(Q \cdot r)}{Q \cdot r} \cdot \rho(r) dr \right] \quad (81)$$

dove $\rho(r)$ è la distribuzione della lunghezza dei salti.

La diffusione dell'acqua è spesso trattata con il modello che va sotto il nome di “*Random Jump Diffusion Model*”, elaborato da Singwi e Sjölander del 1960 [75]. Questo modello assume una distribuzione gaussiana delle lunghezze dei salti. Con questa assunzione la $\Gamma(Q)$ diventa:

$$\Gamma(Q) = \frac{DQ^2}{1 + D\tau_0 Q^2} \quad (82)$$

dove D è il coefficiente di diffusione traslazionale e τ_0 il tempo di residenza nel sito di equilibrio.

Assumendo valida la teoria del moto browniano di Einstein-Smoluchowsky, possiamo collegare D e τ_0 con r_0^2 (eq. (83)), la lunghezza quadratica media di un salto, anche per le distanze esplorate dai neutroni, qualche Å.

$$D = \frac{\langle r_0^2 \rangle}{6 \cdot \tau_0} \quad (83)$$

Risultati e discussione

NEAT

Sono state condotte misure di scattering quasielastico al BENSCH di Berlino sullo spettrometro in tempo di volo NEAT (sez. **NEAT**, pag. **43**).

Tali misure hanno permesso di ottenere informazioni sulla dinamica dell'acqua intrappolata all'interno della matrice analizzata e il modello di "Random Jump Diffusion" è risultato molto efficace per studiarne la dinamica traslazionale [**76**, **77**]. Come già detto, l'informazione che si ricava dalle misure sperimentali è il fattore di struttura dinamico incoerente $S_{inc}(Q, \omega)$ a diversi valori di Q .

Le curve sperimentali sono interpolate utilizzando la relazione (**79**) convoluta per la risoluzione dello spettrometro (Van) determinata preliminarmente misurando lo scattering fornito da una placchetta di Vanadio (eq. (**84**)).

$$S_{obs}(Q, \omega) = S_{inc}(Q, \omega) \otimes Van \quad (84)$$

Sono state condotte misure su campioni di Hya e sul corrispondente derivatizzato Hyadd4-G a concentrazioni del 10, del 5 e dell'1% (w/w), in quanto il flusso di neutroni non ha permesso di ottenere risultati accettabili

alle concentrazioni in cui è stata fatta la caratterizzazione DLS, confocale e di reologia.

Le misure sono state condotte a 285, 300 e 320 K.

Due esempi per Hyadd4-G e Hya al 10% (w/w) e a 300 K sono riportati in **Figura 82** e in **Figura 83**.

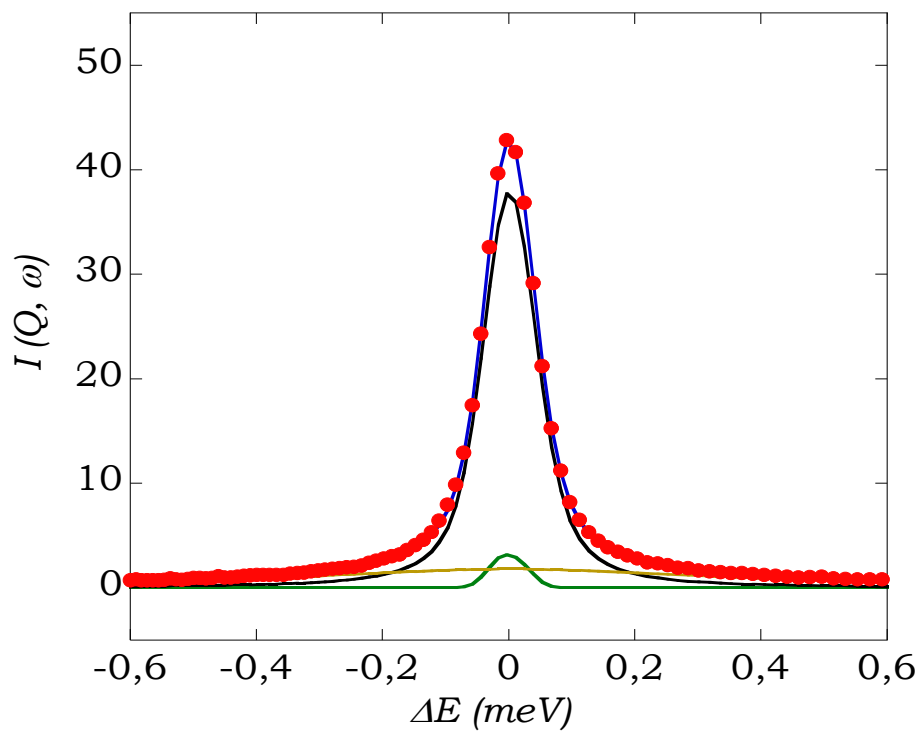


Figura 82: $I(Q, \omega)$ in funzione di ΔE per Hyadd4-G 10% (w/w), per $Q=0.43 \text{ \AA}^{-1}$ a 300 K: (•) dati sperimentali e relativo fit (-), L_p (-), L_n (-) e L_b (-).

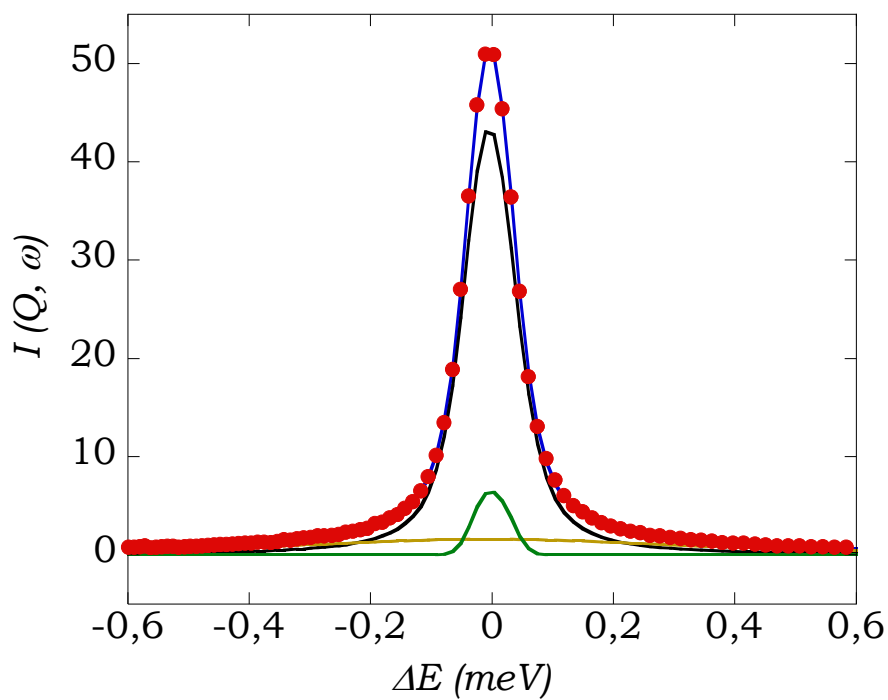


Figura 83: $I(Q, \omega)$ in funzione di ΔE per Hya al 10% (w/w) a 300 K, per $Q=0.43 \text{ \AA}^{-1}$:
 (•) dati sperimentali e relativo fit (-), L_p (-), L_n (-) e L_b (-).

Riportando la semiampiezza della Lorentziana L_n dell'acqua, Γ_n (meV), in funzione del quadrato del vettore di scattering per tutti i Q si ottengono le curve riportate in **Figura 84**.

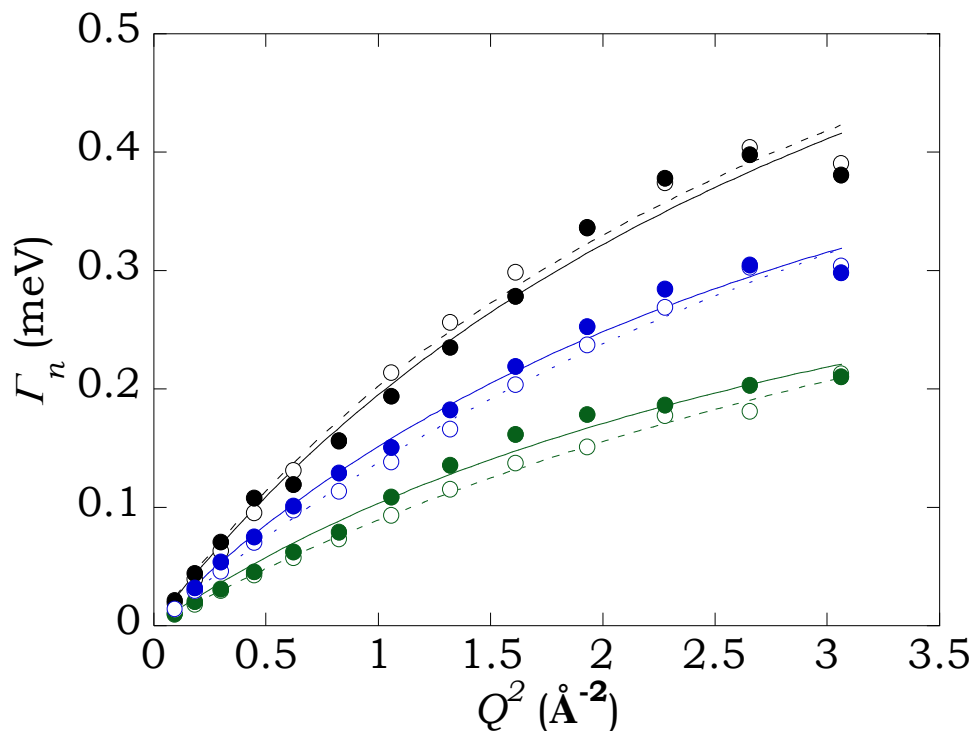


Figura 84: Γ_n in funzione di Q^2 per Hyadd4-G (●) e Hya (○) al 10% (w/w) a 285 K, Hyadd4-G (●) e Hya (○) a 300 K, Hyadd4-G (●) e Hya (○) a 320 K.

I punti sperimentali sono stati trattati usando il modello di Singwi e Sjölander (eq. (82)), con D e τ_0 presi come parametri del fit.

Si vede come tale modello sia in grado di descrivere in maniera adeguata l'andamento sperimentale osservato.

Il coefficiente di diffusione traslazionale (D), rappresentato dal coefficiente angolare della retta che interpola i punti sperimentali a Q bassi, tende ad aumentare all'aumentare della temperatura, mentre il tempo di residenza (τ_0), che rappresenta l'inverso dell'asintoto della curva per $Q \rightarrow \infty$, tende a diminuire. Si può interpretare questo andamento come un effetto dell'aumento della temperatura che aumenta D e riduce τ_0 .

Occorre dire che, come mostrato in **Figura 84**, i valori sperimentali di Γ_n ad alti Q sono ancora lontani da un andamento asintotico. Per questa ragione la stima dei valori di τ_0 è solo indicativa e quindi non vengono riportati in **Tabella 14**, in cui invece si riportano i coefficienti di diffusione determinati per i campioni a più alta concentrazione, con un errore minore del 10%.

Hyadd4-G - T=285 K	$D=1.4 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$
Hya - T=285 K	$D=1.3 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$
Hyadd4-G - T=300 K	$D=2.3 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$
Hya - T=300 K	$D=2.1 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$
Hyadd4-G - T=320 K	$D=2.7 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$
Hya - T=320 K	$D=2.9 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$

Tabella 14: coefficienti di diffusione per Hyadd4-G e Hya alla concentrazione del 10% (w/w) e alle temperature di 285, 300 e 320 K.

Confrontando i risultati ottenuti per Hyadd4-G e per Hya non si riscontrano differenze sostanziali nei valori dei coefficienti di diffusione dell'acqua. Possiamo, pertanto, affermare che la modificazione chimica presente su Hyadd4-G non influenza la diffusione dell'acqua all'interno della struttura

polimerica. Inoltre i valori ottenuti in entrambi i sistemi non si discostano molto dai valori dei coefficienti di diffusione dell'acqua libera [78].

7.3 Scattering elastico

E' stato condotto un esperimento di scattering elastico incoerente all'ILL di Grenoble sullo spettrometro in backscattering IN13. Come abbiamo già visto (sez. **IN13**, pag. **46**), grazie all'alta risoluzione ($8 \mu\text{eV}$) e alla possibilità di analizzare alti momenti trasferiti ($0.2 < Q < 4 \text{ \AA}^{-1}$), IN13 risulta particolarmente utile per studi microscopici di processi di dinamica, ad esempio in strutture organizzate.

Risultati e discussione

Sono state condotte misure su campioni di Hya e sul corrispondente derivatizzato Hyadd4-G a concentrazioni del 10 e del 5% (w/w). I polimeri analizzati sono stati idratati con una soluzione di PBS deuterato per evidenziare meglio la parte polimerica dell'idrogel. Con IN13 sono possibili misure di scattering elastico in funzione della temperatura, quindi le misure sono state condotte a temperature da 280 a 320 K (**Figura 85**).

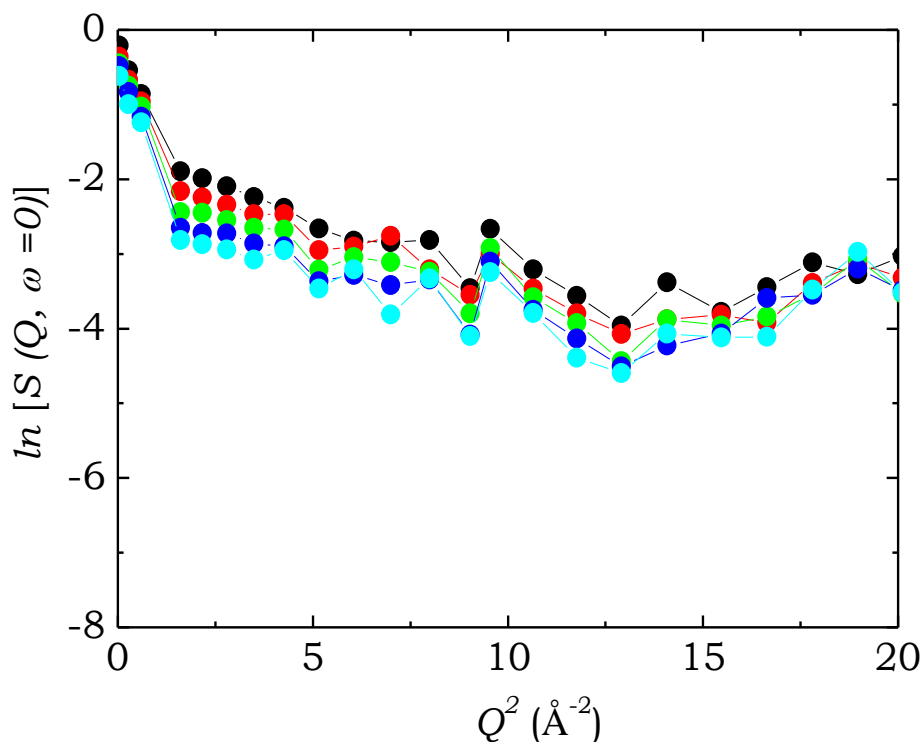


Figura 85: $\ln [S(Q, \omega=0)]$ in funzione di Q^2 per Hyadd4-G al 10% (w/w) in funzione della temperatura: 280 K (●); 290 K (●); 300 K (●); 310 K (●); 320 K (●).

Analizzando il fattore dinamico di struttura $S(Q, \omega=0)$ per tutti i campioni in due diverse regioni di Q possiamo vedere:

- $Q < 1.2 \text{ \AA}^{-1}$: a bassi valori di Q le fluttuazioni interne strutturali $\langle u^2 \rangle$ possono essere descritte con una approssimazione Gaussiana nella forma del fattore di Debye-Waller (eq. (86)).

$$S(Q) \propto \exp\left(-\frac{1}{6}\langle u^2 \rangle \cdot Q^2\right) \quad (85)$$

$\langle u^2 \rangle$ rappresenta la piena ampiezza dei moti e non lo spostamento dalla posizione di equilibrio. L'eq. (85) è valida per $\langle u^2 \rangle \cdot Q^2 \leq 2$ [79].

La pendenza della retta ottenuta riportando $\ln[S(Q, \omega=0)]$ in funzione di Q^2 nella regione a bassi Q , ($0 < Q < 1 \text{ \AA}^{-1}$) (Figura 86), può essere messa in relazione alle fluttuazioni nella posizione degli idrogeni dell'anello saccaridico ($\langle u^2 \rangle / 6$) e in particolare di quelli relativi ai legami glucosidici β -(1 \rightarrow 4) e β -(1 \rightarrow 3) [80-82]. Ai piccoli angoli la pendenza dell'intensità è molto forte per tutti i campioni di Hya e Hyadd4-G al 10 e al 5% (w/w): i valori di $\langle u^2 \rangle$ (\AA^2) che si ottengono sono molto elevati e non rientrano nell'approssimazione Gaussiana (Figura 87).

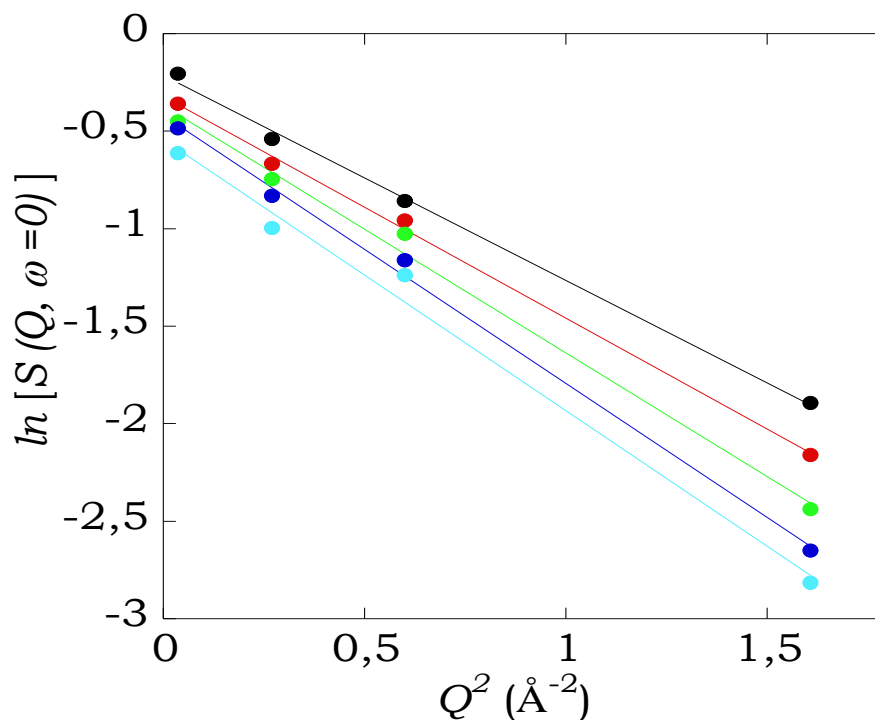


Figura 86: $\ln [S(Q, \omega=0)]$ in funzione di Q^2 e relativi fit lineari per Hyadd4-G al 10% (w/w) a bassi Q : 280 K (●); 290 K (●); 300 K (●); 310 K (●); 320 K (●).

- $Q > 1.2 \text{ \AA}^{-1}$: i valori di $\langle u^2 \rangle$ che si ottengono dal fit lineare nella zona di Q^2 tra 2 e 5 \AA^{-2} per i gel al 5 e al 10% (w/w) mostrano una decrescita dell'intensità elastica.

I valori di $\langle u^2 \rangle$ sono dell'ordine di 1 \AA^2 .

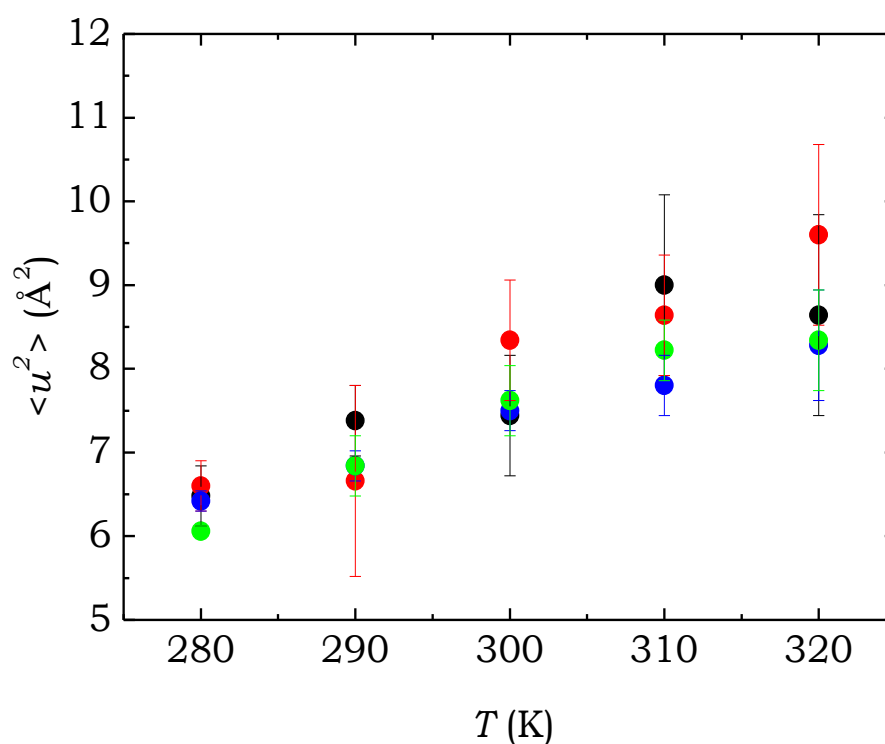


Figura 87: valori di $\langle u^2 \rangle$ ottenuti dal fit lineare della zona a bassi Q per Hya al 5% (w/w) (●); Hyadd4-G al 5% (●); Hya al 10% (●); Hyadd4-G al 10% (●) in funzione della temperatura.

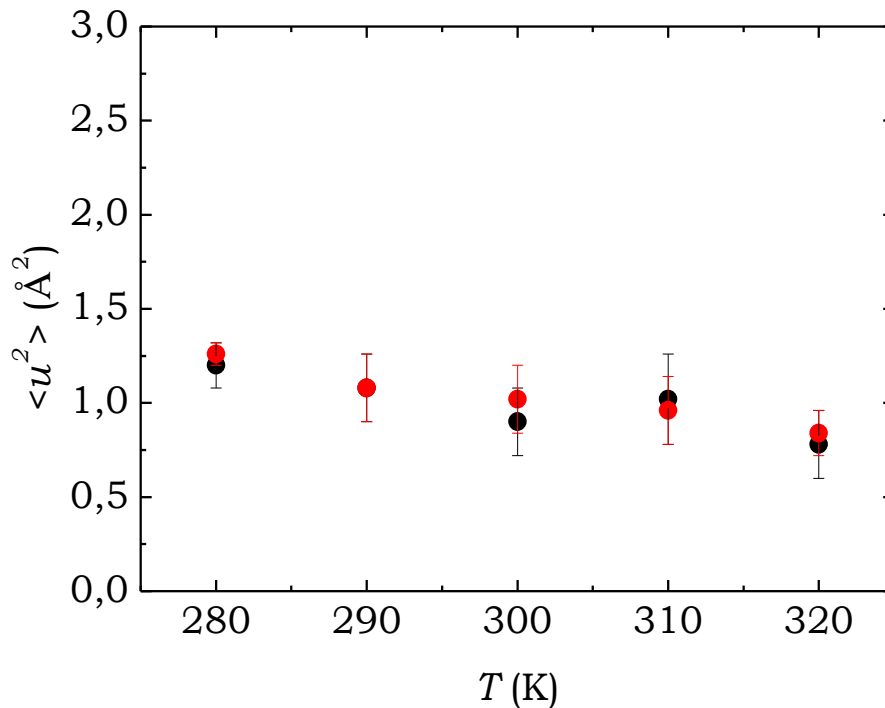


Figura 88: valori di $\langle u^2 \rangle$ per Hya (\bullet) e Hyadd4-G al 10% (w/w) (\bullet) in funzione della temperatura.

Il fatto che questi spostamenti quadratici medi non aumentino all'aumentare della temperatura, (**Figura 88**), significa che a questi livelli di concentrazione i gel di Hya e Hyadd4-G hanno fluttuazioni troppo grandi per la finestra di IN13 e non si riesce ad isolare i loro segnali da quelli del solvente. Da un confronto degli spettri sperimentali di Hyadd4-G e dei rispettivi gel di Hya con pari concentrazione alla temperatura di 300 K (**Figura 89** e **Figura 90**) si può notare che i gel al 5% (w/w) danno un segnale sovrapponibile, mentre in quelli al 10% (w/w) c'è più scattering elastico nel gel di Hyadd4-G.

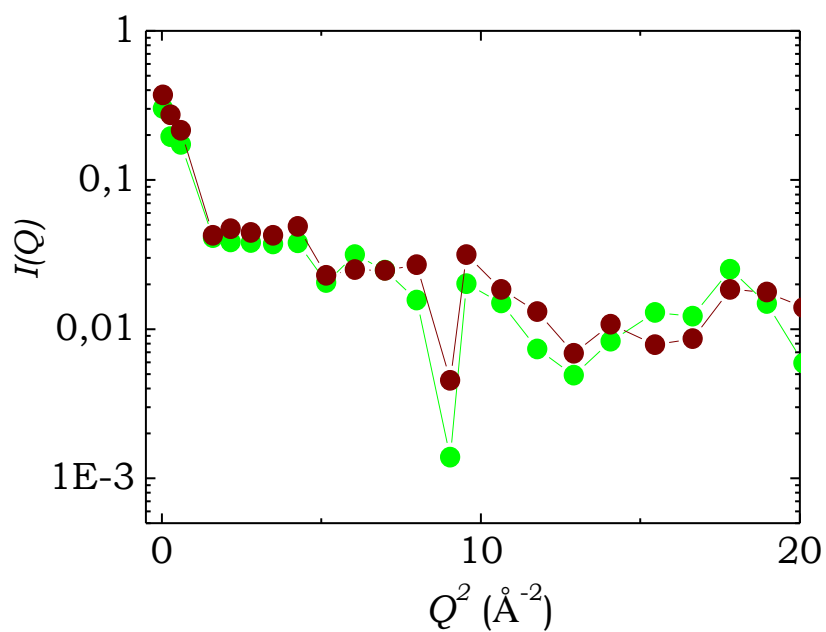


Figura 89: $I(Q)$ in funzione di Q^2 per Hyadd4-G (●) e Hya al 5% (w/w) (●) alla temperatura di 300 K.

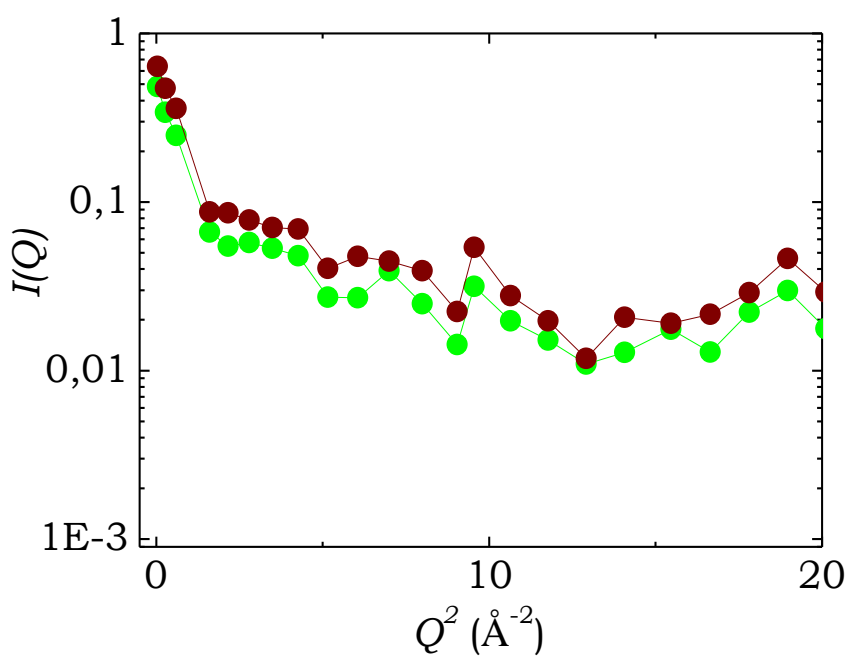


Figura 90: $I(Q)$ in funzione di Q^2 per Hyadd4-G (w/w) (●) e Hya al 10% (w/w) (●) alla temperatura di 300 K.

7.4 SANS

Per investigare strutture su distanze maggiori di quelle interatomiche è necessario che il vettore di scattering Q , definito con l'eq. (66), sia piccolo.

Questo si può realizzare sia aumentando la lunghezza d'onda dei neutroni incidenti che diminuendo l'angolo di scattering. Questo è il motivo per cui questa tecnica viene chiamata *Small Angle Neutron Scattering* (SANS) [83, 84]. Lo spettrofotometro utilizzato è PAXE (sez. PAXE, pag. 45).

La tecnica di SANS permette di investigare strutture nel range delle nanoscale. Il vettore di scattering, nel caso di scattering di neutroni a basso angolo, può essere approssimato a $Q=2\pi\theta/\lambda$ e il tipico range di Q per il SANS è da 0.001 \AA^{-1} a 0.45 \AA^{-1} che corrisponde ad un intervallo spaziale compreso tra 630 e 1.4 nm.

Risultati e discussione

Hyadd4-G

Sono stati registrati spettri SANS di Hyadd4-G e Hya alle concentrazioni di 1, 3, 5 e 10% (w/w). Inoltre si sono studiati campioni di Hyadd4-G prima e dopo annealing in autoclave alla concentrazione di 5 e 10% (w/w), al fine di evidenziare eventuali differenze strutturali a lungo raggio e di osservare che

influenza ha sulla struttura il trattamento termico (sez. **Hyadd4-G: procedura di sintesi**, pag. 37). PAXE è stato utilizzato in 3 configurazioni diverse in funzione della distanza campione-detector e della lunghezza d'onda dei neutroni:

- 5.05 m e 12 Å,
- 3 m e 4 Å,
- 1.3 m e 4 Å.

Con questa configurazione si è potuto esplorare un range in Q da $4 \cdot 10^{-3}$ a 0.4 \AA^{-1} (tra ~160 e 16 nm).

Gli spettri sono stati analizzati considerando l'intensità di scattering come la somma di due contributi, uno dovuto alla concentrazione della soluzione polimerica, I_{soln} (contributo osmotico), e uno dovuto allo scattering, I_{ex} (contributo strutturale).

Questo contributo è dovuto alla riorganizzazione strutturale del polimero ed è chiamato "disomogeneità di reticolazione" [85]:

$$I(Q) = I_{soln}(Q) + I_{ex}(Q) \quad (86)$$

Le disomogeneità presenti a livello della scala spaziale esplorata è dovuta al congelamento nella struttura topologica di network eterogenei dovuti alla presenza di punti di reticolazione. Negli idrogel di Hyadd4-G questo si verifica proprio grazie alle interazioni tra le catene laterali alchiliche. Un network polimerico mostra gradienti localizzati di concentrazione dovuti a fluttuazioni termiche, nel caso in cui è immerso in un solvente (come nel caso di un gel), e presenta sia disomogeneità strutturali che fluttuazioni di densità di concentrazione. Siccome in entrambi i casi si ha contribuito allo scattering neutronico, la funzione di scattering per un network polimerico presenta due contributi. Per molti gel, quindi, l'intensità totale di scattering si può trattare come la somma di una componente statica ed una dinamica [86-89]. Il primo termine, la componente dinamica, è:

$$I_{so\ln}(Q) = \frac{kT\Delta\rho^2\phi^2}{K_{osm}} \cdot \frac{1}{1+Q^2\xi^2} \quad (87)$$

in cui k è la costante di Boltzman, ξ è la lunghezza di correlazione che caratterizza la distanza tra elementi strutturali del sistema, $\Delta\rho$ è il fattore di contrasto di scattering neutronico tra il network e il solvente (D_2O) ed è rappresentato dalla differenza di densità della lunghezza di scattering tra solvente, D_2O , e network idratato con D_2O , ϕ è la frazione in volume del polimero e K_{osm} è il modulo di comprimibilità osmotica (eq. (88)).

$$K_{osm} = \phi \left(\frac{\partial \pi}{\partial \phi} \right) \quad (88)$$

dove π è la pressione osmotica. Questo termine si identifica con una spalla che tipicamente appare a $Q \sim 0.1 \text{ \AA}^{-1}$ e rappresenta lo scattering prodotto dai moti delle catene nel solvente indotti termodinamicamente. L'intensità statica, $I_{ex}(Q)$, è dovuta a variazioni di concentrazione all'equilibrio e a lungo raggio dovute a vincoli elastici e permanenti (punti di reticolazione) all'interno del network. E' rappresentata dall'espressione di Debye-Bueche:

$$I_{ex}(Q) = \frac{\Delta\rho^2 8\pi\Xi^3 \langle \delta\phi^2 \rangle}{(1 + Q^2\Xi^2)^2} \quad (89)$$

in cui Ξ è il raggio medio delle fluttuazioni di concentrazione statica, lunghezza caratteristica dovuta alla presenza di clusters reticolati, e $\langle \delta\phi^2 \rangle$ è la semiampiezza della disomogeneità. Tale componente contribuisce all'eccesso di scattering che si ha a bassi Q (grandi distanze) per la presenza di macrostrutture che nei gel non reticolati non sono presenti.

Assumendo l'additività dei contributi ed essendo per il momento interessati solo alla caratterizzazione strutturale dell'idrogel, il modello utilizzato per analizzare i dati sperimentali è quindi dato dall'eq. (90).

$$I(Q) = \frac{A}{1 + Q^2 \xi^2} + \frac{B}{(1 + Q^2 \Xi^2)^2} + C \quad (90)$$

Abbiamo inglobato nelle costanti A e B tutti i parametri indipendenti da Q ,

con $A = \frac{kT\Delta\rho^2\phi^2}{K_{osm}}$, $B = \Delta\rho^2 8\pi\Xi^3 \langle \delta\phi^2 \rangle$ e C che indica un background dovuto

allo scattering incoerente dei campioni in esame. I parametri di interesse del fit sono la distanza media fra gli elementi del sistema e la dimensione media fra i punti di reticolazione, ξ e Ξ . L'esperimento era finalizzato anche a confrontare le strutture di gel di Hyadd4-G con i campioni non sottoposti al ciclo termico in autoclave.

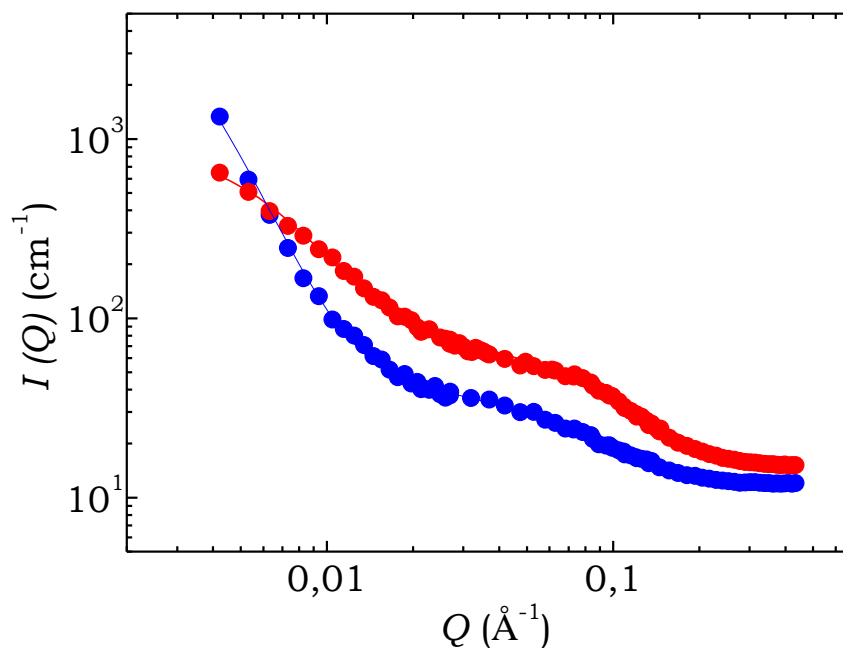


Figura 91: $I(Q)$ in funzione di Q per Hyadd4-G in autoclave (●) e senza autoclave (●) alla concentrazione di 10% (w/w).

Gli andamenti di $I(Q)$ in funzione di Q per i gel che non hanno subito il processo in autoclave mostrano a bassi Q uno scattering maggiore che sta ad indicare la presenza di macrostrutture assenti invece nei campioni autoclavati.

Analizzando questi dati con la funzione descritta in eq. (90) si ottengono i valori di ξ e E in funzione della concentrazione per Hya e Hyadd4-G riportati in **Tabella 15**.

Hyadd4-G (w/w)	ξ (Å)	E (Å)
1%	22 ± 2	150 ± 3
3%	23 ± 1	152 ± 3
5%	20 ± 5	130 ± 6
5% no autocl.	17 ± 5	570 ± 40
10%	14 ± 1	121 ± 2
10% no autocl.	17 ± 6	350 ± 16

Tabella 15: valori ottenuti dal fit per ξ e E per diversi campioni di Hyadd4-G.

Dai dati in **Tabella 15** emerge una differenza sostanziale nei campioni con e senza trattamento termico in autoclave a concentrazione del 10% (w/w): la

distanza di correlazione tra le catene polimeriche ξ resta la stessa, nei limiti dell'errore sperimentale indipendentemente dal trattamento termico, mentre la lunghezza caratteristica delle disomogeneità \mathcal{E} è fortemente dipendente da tale processo. Il più basso valore di \mathcal{E} ottenuto con il trattamento termico è indice di una distribuzione spaziale più omogenea delle catene polimeriche nel gel. Inoltre i parametri ξ e \mathcal{E} diminuiscono all'aumentare della concentrazione polimerica a causa dell'aumento delle disomogeneità con minori dimensioni. È da notare che il valore ottenuto per Hyadd4-G 1% (w/w) (150 Å), con una concentrazione confrontabile al campione analizzato attraverso misure di DLS (0.8% w/w), è in buon accordo con la dimensione media di maglia di 140 Å misurata con lo scattering della luce dinamico (DLS) (sez. **Scattering Dinamico della Luce (DLS)**, pag. 50).

Hya

I dati ottenuti per le soluzioni di Hya sono stati analizzati con il seguente modello frattale spesso utilizzato per l'analisi di dati SANS e SAXS di soluzioni polimeriche [83, 90]:

$$I(Q) = \frac{A}{Q^n} + \frac{C}{1 + (Q\xi)^m} + B \quad (91)$$

Il primo termine descrive lo scattering di Porod per i cluster e il secondo termine descrive lo scattering delle catene polimeriche.

Questo secondo termine caratterizza le interazioni polimero-solvente. I fattori A e C , il background incoerente B e i due esponenti n e m sono parametri usati per il fit. Il parametro ξ è la lunghezza delle catene polimeriche vincolate e ci dà una stima della lunghezza degli entanglements, cioè della distanza media tra gli entanglements.

Il parametro di interesse del fit è ξ e i risultati ottenuti sono riportati in

Tabella 16.

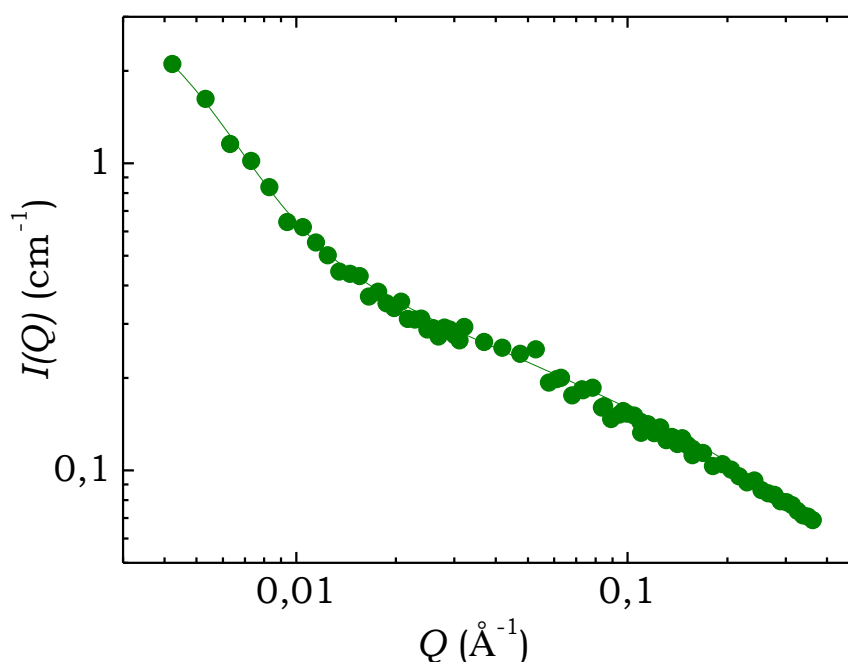


Figura 92: $I(Q)$ in funzione di Q per Hya in autoclave al 10% (w/w).

<i>Hya</i> (w/w)	ξ (Å)
1%	290 ± 60
3%	260 ± 40
5%	210 ± 10
10%	215 ± 15

Tabella 16: valori ottenuti dal fit per ξ per diversi campioni di Hya.

BIBLIOGRAFIA

- 74** M. Bée, *Quasielastic Neutron Scattering*, Bristol, **1988**.
- 75** K. S. Singwi and Alf Sjölander, *Phys. Rev.* **1960**, *119*, 863-871.
- 76** J. Teixeira and M.-C. Bellissent-Funel, S. H. Chen, A. J. Dianoux, *Phys. Rev. A*, **1985**, Vol. 31, No. 3, 1913-1917.
- 77** A. Meyer, S. Stüber, D. Holland-Moritz, O. Heinen and T. Unruh, *Phys. Rev. B*, **2008**, Vol. 77, No. 9, 092201 (1-4).
- 78** Kenneth R. Harris and Lawrence A. Woolf, *J. C. S. Faraday I*, **1980**, *76*, 377-385.
- 79** F. Gabel, *Eur Biophys J*, **2005**, *34*, 1-12.
- 80** A. Stoeckli, A. Furrer, Ch. Schoenenberger, B. H. Meier, R. R. Ernst, I. Anderson, *Physica 136B*, **1986**, 161-164.
- 81** G. Paradossi, F. Cavalieri, E. Chiessi, C. Mondelli, M. T. F. Telling, *Chemical Physics*, **2004**, *302*, 143-148.
- 82** G. Paradossi, F. Cavalieri, E. Chiessi, *Carbohydrate Research*, **2005**, *340*, 921-927.
- 83** http://www.ncnr.nist.gov/staff/hammouda/the_SANS_toolbox.pdf

- 84** John D. F. Ramsay, *Advances in Colloid and Interface Science*, **1998**, 76-77, 13-37.
- 85** M. Shibayama, H. Jinnai, T. Hashimoto. "Neutron Scattering" in *Experimental Methods in Polymer Science*. T. Tanaka Ed. Academic Press, **2000**, San Diego.
- 86** Anne-Marie Hecht, Ferenc Horkay and Erik Geissler, *J. Phys. Chem. B*, **2001**, 105, 5637-5642.
- 87** Ferenc Horkay, Gregory B. McKenna, Pascal Deschamps and Erik Geissler, *Macromolecules*, **2000**, 33, 5215-5220.
- 88** Ferenc Horkay, Peter J. Basser, Anne-Marie Hecht, Erik Geissler, *Polymer*, **2005**, 46, 4242-4247.
- 89** Ferenc Horkay, Anne-Marie Hecht, Isabelle Grillo, Peter J. Basser, Erik Geissler, *Journal of Chemical Physics*, **2002**, Vol. 117, No. 20, 9103-9106.
- 90** Boualem Hammouda, Derek L. Ho and Steve Kline, *Macromolecules*, **2004**, 37, 6932-6937.
-

PARTE II: idrogel XGE

CAPITOLO 8

Materiali e metodi

8.1 Materiali

Il polisaccaride microbico *xantano* da *Pseudomonas Campestris* e il polisaccaride *Konjac glucomannano* (KGM) da *Amorphophallus Konjac* sono stati forniti rispettivamente dalla Sigma e dalla Semm Chemicals (Svizzera).

L'*epicloridrina* è stata fornita dalla Fluka (Germania).

Per i test di biocompatibilità sono stati utilizzati fibroblasti di topo *NIH 3T3*, forniti dall'Istituto Sperimentale Zooprofilattico della Lombardia e dell'Emilia Romagna (Italia).

8.2 Metodi

Idrogel XGE: procedura di sintesi

L'idrogel XGE è un idrogel chimico a base di xantano e Konjac glucomannano (KGM) reticolati per mezzo di epicloridrina (sez. **Capitolo 1: XGE**, pag. **24**). Lo xantano è un polisaccaride che non forma gel ma è in grado di formare idrogel sinergici fisici e termoreversibili in presenza di altri polisaccaridi, come il KGM [**91-93**]. Alla base della formazione di questa classe di gel ci sono interazioni specifiche fra i due polisaccaridi.

La presenza di punti di reticolazione covalenti permette la formazione di un reticolo capace di assorbire acqua restando insolubile.

Sono stati sintetizzati idrogel chimici ad una concentrazione di 20 mg/ml solubilizzando i due polisaccaridi nativi, lo xantano e il glucomannano, in rapporto 1:1 (w/w) in fase eterogenea in ambiente alcalino (NaOH, 1.5M) e in presenza di urea (3.3M) [**94**].

Per migliorare la solubilità dei polisaccaridi, il sistema è stato sottoposto a due cicli termici di congelamento: si congela per 18 ore e poi si lascia scongelare a T ambiente per 6 ore. Al termine del secondo ciclo si inietta l'agente reticolante, l'epicloridrina, goccia a goccia direttamente all'interno della soluzione. La reazione di reticolazione, fortemente dipendente dal tempo e dalla temperatura di reazione, viene condotta a T ambiente per ulteriori 72 ore [95].

Sono stati sintetizzati gel a diversa concentrazione di agente reticolante ed in particolare a concentrazione 0.6M, 1M e 1.4M di epicloridrina (ECH) [96, 97]. Il gel così ottenuto viene posto in acqua e il pH fortemente alcalino viene neutralizzato con acido acetico. Successivamente i gel vengono lavati con acqua/acetone (3:1) per tre volte per garantire l'eliminazione dell'epicloridrina in eccesso (solubile in acetone).

I sistemi non hanno mostrato fusione, restando infatti inalterati anche a T superiori a 60 °C, temperatura alla quale il gel sinergico di xantano e KGM fonde. Questo risultato conferma la presenza di ponti chimici tra le catene.

I gel a questo punto, neutralizzati e lavati, vengono usati per misure di rigonfiamento e di reologia [98].

Reologia

Le misure di reologia vengono condotte utilizzando un reometro AR 2000 Advanced (TA Instruments). Il regime di viscoelasticità lineare dei campioni

in esame viene determinato preliminarmente attraverso misure in oscillazione di tipo “strain sweep” o “stress sweep” (scansioni di deformazione o di carico). Queste misure sono fondamentali per individuare gli intervalli di deformazione e di stress applicato in cui i campioni rispondono in modo lineare e sono preliminari ad ogni altra misura. Il modulo elastico e il modulo viscoso (G' e G'') degli idrogel XGE a concentrazioni di ECH di 0.6 e 1.4M vengono registrati attraverso misure di tipo “time sweep” (scansioni nel tempo) che consentono di osservare il comportamento di tali moduli nel tempo. Tutte le misure vengono registrate alla frequenza di 1 Hz e ad una percentuale di deformazione o ad uno stress per cui è garantito il comportamento viscoelastico lineare. Per acquisire gli spettri meccanici dei campioni vengono condotte misure, sempre in oscillazione, di tipo “frequency sweep” (scansioni di frequenza) che permettono di osservare il comportamento elastico e/o viscoso dei campioni in funzione della frequenza. La geometria utilizzata per gli esperimenti di reologia è di tipo piatto-piatto (20 mm di diametro e 500 μm di gap) e i campioni vengono posti direttamente sul piatto fisso dello strumento, termostato a 25 °C.

Studi di vitalità cellulare

Per i test di biocompatibilità è stata utilizzata la linea cellulare fibroblastica di origine murina *NIH 3T3*, coltivata nel terreno di coltura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) ad alto contenuto di glucosio, complementato con

siero fetale bovino (10%), L-Glutamina (20mM), penicillina (100 U/ml) e streptomycin (100 µg/ml) a 37 °C in CO₂ (5%). Le prove sono state condotte sugli idrogel reticolati 0.6M. I campioni sono stati posti in piastre da 12 pozzetti e coperti con DMEM per permettere lo scambio tra l'acqua, contenuta nei gel, e il mezzo di coltura cellulare. Il terreno di coltura è stato cambiato due volte in modo da garantire lo scambio completo dell'acqua e successivamente i gel sono stati sterilizzati con una esposizione agli UV per 30 minuti. Sui campioni sono state seminate approssimativamente 700,000 cellule *NIH 3T3* e sono state lasciate aderire per 12 ore. A questo punto si è proceduto all'osservazione al microscopio ottico (Nikon Eclipse TE 2000-S) per verificarne la capacità di adesione sulla superficie dell'idrogel.

Saggio di vitalità “Live-Dead”

È stato usato il kit Live/Dead® Reduced Biohazard Viability (Molecular Probe) per osservare la vitalità e la citotossicità cellulare.

Questo saggio permette di distinguere le cellule metabolicamente attive da quelle danneggiate o morte, sfruttando la diversa permeabilità cellulare di due coloranti fluorescenti, SYTO 10 e DEAD Red (ethidium homodimer-2). Questi coloranti si legano all'acido nucleico. Il primo, di colore verde, è altamente permeabile e marca tutte le cellule, incluse quelle con membrana plasmatica intatta; il secondo, di colore rosso, è impermeabile nelle cellule e marca solamente quelle con membrane compromesse.

Per il saggio si procede nel seguente modo: le cellule, lavate con la soluzione HBSS (135mM NaCl, 5mM KCl, 1mM MgSO₄, 1.8mM CaCl₂, 10mM HEPES, pH 7.4), si incubano per 15 minuti a temperatura ambiente, al riparo dalla luce, in una soluzione diluita (1:500) dei due coloranti fluorescenti. Dopo l'incubazione le cellule sono state lavate con HBSS e fissate con glutaraldeide (4%) per 1 ora a temperatura ambiente e al riparo dalla luce. L'eccesso di glutaraldeide viene poi rimosso e sostituito con HBSS. Tramite microscopia in fluorescenza è possibile distinguere le cellule vive, che appaiono di colore verde, da quelle morte che saranno colorate in rosso.

Scattering di neutroni

Misure di scattering di neutroni sono state condotte in diverse facilities europee.

IN13

Con questo strumento si sono condotte misure di scattering elastico di neutroni in funzione della temperatura. IN13 (**Figura 13**, pag. **47**) è uno spettrometro in backscattering che utilizza neutroni termici (neutroni con energia inferiore a 0.1 eV). Grazie all'alta risoluzione (8 μeV) e alla possibilità di analizzare alti momenti trasferiti ($0.2 < Q \text{ (\AA}^{-1}) < 4.9$), IN13 risulta

particolarmente utile per studiare la dinamica di processi molecolari, ad esempio fluttuazioni strutturali in sistemi organizzati [99].

L'energia dei neutroni incidenti viene selezionata facendo variare la temperatura di un monocromatore (CaF_2) ($-196 < T \text{ (}^\circ\text{C)} < 450$) posto ad un angolo fisso di Bragg, esplorando un range in energia $-125 \leq \Delta E \text{ (}\mu\text{eV)} \leq 300$. In alternativa si può fissare la temperatura e far variare l'angolo di Bragg del monocromatore. Un deflettore di grafite convoglia il fascio sul campione e l'energia dei neutroni diffusi viene analizzata da 7 analizzatori circolari che coprono un largo angolo solido e altri 3 centrati attorno al fascio trasmesso che coprono la regione dei piccoli angoli ($0.2 < Q \text{ (}\text{\AA}^{-1}\text{)} < 0.8$).

Il monocromatore e i cristalli analizzatori (CaF_2) sono orientati nel vicino backscattering in modo da ottenere una risoluzione in energia di pochi μeV .

Il conteggio dei neutroni viene effettuato da un multidetector cilindrico costituito da 35 tubi di ^3He e il range dei piccoli angoli è coperto da un PSD (position sensitive detector) costituito da 16 tubi di ^3He .

BIBLIOGRAFIA

- 91** A. Martínez-Ruvalcaba, E. Chornet, D. Rodrigue, *Carbohydrate Polymers*, **2007**, 67, 586-595.
- 92** P. Annable, P. A. Williams, K. Nishinari, *Macromolecules*, **1994**, 27, 4204-4211.
- 93** G. Paradossi, E. Chiessi, A. Barbiroli, D. Fessas, *Biomacromolecules*, **2002**, 3, 498-504.
- 94** Jinping Zhou, Chunyu Chang, Ruping Zhang, Lina Zhang, *Macromolecular Bioscience*, **2007**, 7, 804-809.
- 95** *Polysaccharides in Medicinal Applications*, Edited by Severian Dumitriu, **1996**.
- 96** I. De Miguel, V. Rieumajou, D. Betbeder, *Carbohydrate Research*, **1999**, 319, 17-23.
- 97** C. Chebli, L. Cartilier, *International Journal of Pharmaceutics*, **1998**, 171, 101-110.
- 98** G. Paradossi, I. Finelli, B. Cerroni and E. Chiessi, *Molecules*, **2009**, 14(9), 3662-3675.
- 99** <http://www.ill.eu/instruments-support/instruments-groups/instruments/in13/>
-
-

CAPITOLO 9

Proprietà elastiche e di rigonfiamento (“swelling”)

Gli idrogel (sez. **Capitolo 1: Idrogel**, pag. 11) possiedono strutture tridimensionali costituite da polimeri idrofilici che hanno la capacità di rigonfiarsi in acqua. Questa capacità dipende principalmente dal tipo di polimeri che costituiscono l'idrogel e dal grado di reticolazione.

In particolare l'idrogel XGE, costituito da xantano e KGM, possiede reticolazioni chimiche introdotte mediante l'agente reticolante epicloridrina.

La reazione di reticolazione degli idrogel XGE eseguita con diverse concentrazioni di epicloridrina è stata seguita monitorando nel tempo la variazione del modulo elastico, G' , con misure in regime oscillatorio, applicando una deformazione massima del 10% alla frequenza di 1 Hz. In base alla teoria dell'elasticità [100] il comportamento al rigonfiamento, il modulo elastico e quello viscoso risentono della presenza di punti di reticolazione. Anche il pH e la forza ionica influenzano le proprietà elastiche e di rigonfiamento se le catene che formano il reticolo sono cariche, come nel caso dello xantano. Si è quindi studiato il gel XGE in acqua e a pH acido

oltre che in NaCl 0.1M su campioni preparati con concentrazione di epicloridrina di 0.6 e 1.4M.

9.1 Risultati e discussione

Cinetica di reticolazione

La formazione del gel è stata monitorata attraverso misure reologiche in regime oscillatorio (sez. ***Analisi dinamica in regime oscillatorio***, pag. **115**). Il campione viene posto tra i piatti del reometro immediatamente dopo l'aggiunta dell'agente reticolante, l'epicloridrina, e si segue l'andamento del modulo elastico G' nel tempo, utilizzando una procedura di "time sweep" alla frequenza di 1 Hz. Lo xantano e il KGM formano un gel sinergico anche in assenza di punti di reticolazione chimici e questo è evidente perché, anche a $t=0$, quando viene aggiunta ECH, il modulo elastico G' è maggiore di quello viscoso G'' (**Figura 93**). È stata seguita quindi la cinetica di reticolazione a diverse concentrazioni di ECH, 0.1, 0.3, 0.6 e 1.4M (**Figura 94**), mantenendo la concentrazione totale di polimero costante e pari al 2% (w/w). Quando la reazione di reticolazione ha inizio si osserva un notevole e rapido incremento del modulo elastico indice proprio dell'aumento di punti di reticolazione nel network.

In particolare l'andamento di G' mostra l'andamento caratteristico per le reazioni di reticolazione:

- un tempo di induzione presente in tutti i campioni, indipendentemente dall'ammontare di epicloridrina, sebbene l'estensione di tale fase dipenda dalla concentrazione di reticolante,
- una fase di crescita lineare di G' , più marcata all'aumentare della concentrazione di reticolante,
- un comportamento asintotico a tempi lunghi.

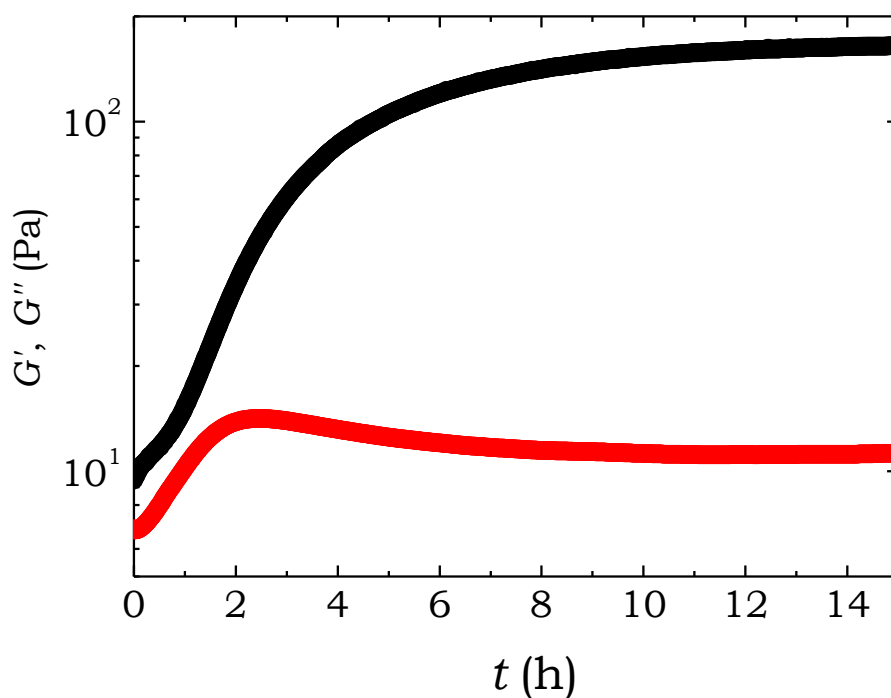


Figura 93: G' (●) e G'' (●) nel tempo per l'idrogel XGE 0.6M.

Si può notare dalla **Figura 94** che per concentrazioni di epicloridrina inferiori allo 0.1M non si osserva nessun incremento del modulo elastico; il sistema resta fluido e non reticola neanche per tempi lunghi.

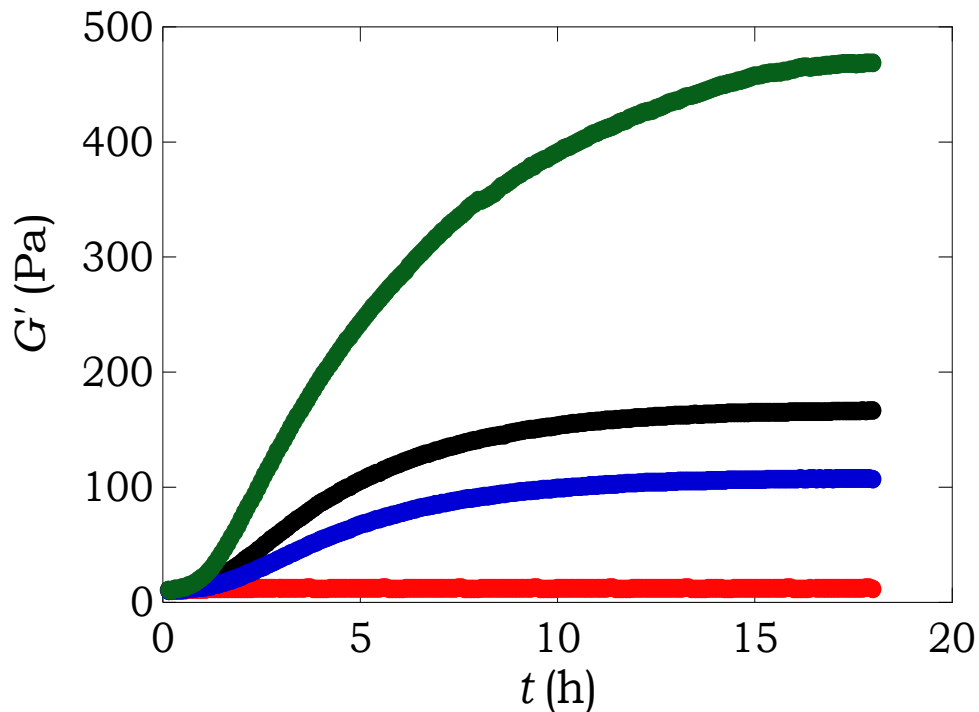


Figura 94: variazione di G' nel tempo per XGE 0.1 (●); 0.3 (●); 0.6 (●) e 1.4M (●).

Rigonfiamento

La cinetica di rigonfiamento [101] è stata monitorata in acqua, in soluzione acida (pH 3) e in forza ionica (0.1M NaCl).

Dopo neutralizzazione e lavaggi, XGE è posto in un volume molto maggiore (rapporto 1:250) del solvente in cui si vuole studiare il comportamento del gel. I cicli di rigonfiamento vengono seguiti fino ad uno stato di equilibrio dell'idrogel in un volume di solvente avente le caratteristiche di pH o forza ionica voluti. Si determina la quantità di solvente incorporato o espulso dal gel per pesata, ripetendo questa operazione fino al raggiungimento dell'equilibrio (**Figura 95**). Le proprietà di rigonfiamento ed elastiche degli idrogel sinergici stabilizzati con punti di reticolazione chimici dipendono dalla massa di polimero presente nell'idrogel e dalla massa di solvente, W_{gel} e W_{sol} , incorporata nel reticolo [**102-104**].

La quantità di polimero che effettivamente partecipa alla formazione del network, W_{gel} , viene determinata seccando l'idrogel dopo averlo abbondantemente lavato con acqua. Allo stesso modo, W_{sol} viene determinata secondo l'eq. (**92**).

$$W_{sol} = W_{gel} - W_0 \quad (92)$$

in cui W_0 è la massa iniziale di polisaccaride usato. Il grado di rigonfiamento è:

$$Q = \frac{W_s}{W_{sol}} \quad (93)$$

con W_s peso del gel rigonfiato.

S è la frazione in peso di acqua ed è definita secondo l'eq. (94):

$$S = \frac{W_s - W_{gel}}{W_{gel}} \quad (94)$$

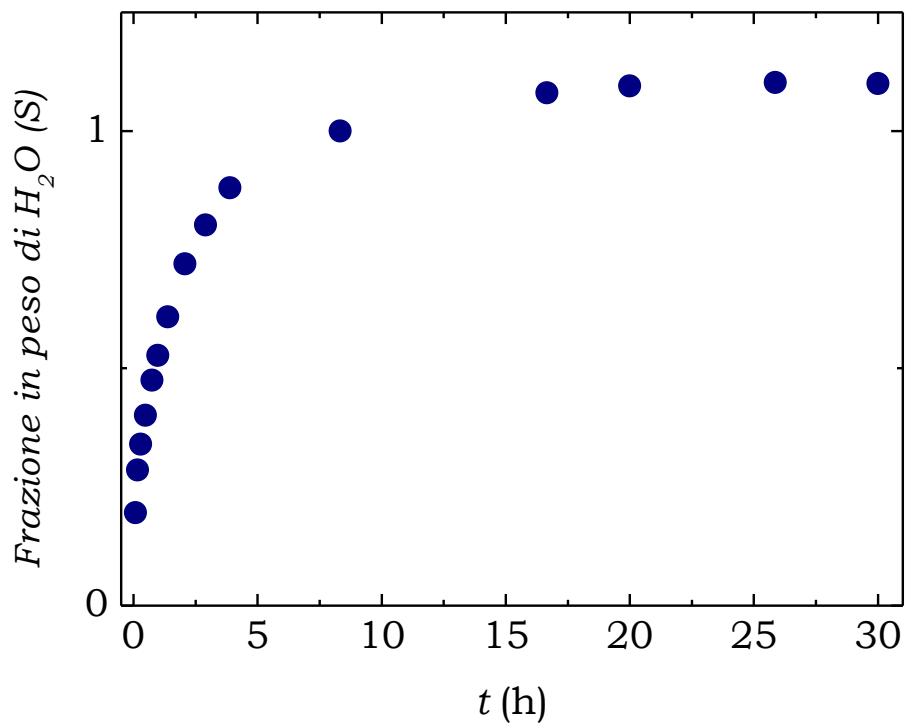


Figura 95: frazione in peso di acqua, S , per l'idrogel XGE 0.6M in acqua.

Le cinetiche di rigonfiamento per XGE con concentrazione di ECH 0.6 e 1.4M sono state studiate in acqua, in soluzione acida e in forza ionica (**Figura 96**).

I gel, rigonfiati in acqua, successivamente vengono posti in soluzione acida osservando la progressiva riduzione di volume dei campioni fino a stabilità. Posti di nuovo in acqua, si controlla se i gel recuperano il rigonfiamento iniziale. Raggiunto l'equilibrio si mettono in soluzione con forza ionica e si nota un'ulteriore progressiva riduzione di volume.

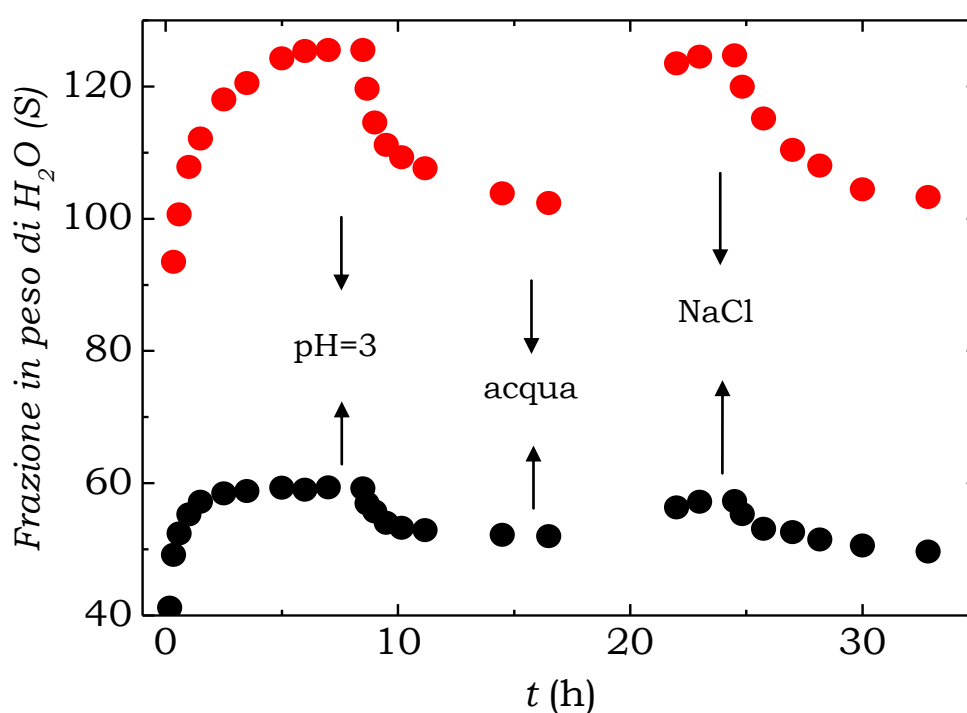


Figura 96: frazione in peso di acqua, S , in idrogel XGE 1.4M (●) e 0.6M (●); determinata in sequenza in acqua, HCl 10^{-3} M, nuovamente acqua e 0.1M NaCl.

Questo comportamento è da attribuirsi alla struttura chimica dello xantano. La presenza di gruppi carbossilici sulla struttura dell'idrogel porta ad una variazione della struttura del network: in ambiente acido si ha un collasso del network dovuto al fatto che le cariche presenti sulla catena laterale dello

xantano sono schermate riducendo le repulsioni tra le catene polimeriche e favorendone un avvicinamento con conseguente restringimento del gel.

L'influenza della soluzione elettrolitica è dovuta al fatto che i polimeri inclusi nel network dell'idrogel subiscono un processo di salificazione caratterizzato da una diminuzione della solubilità. Questo processo può essere considerato come una deidratazione del gel caratterizzata da un aumento della concentrazione del sale. La dissociazione elettrolitica consuma una parte dell'acqua disponibile per la solvatazione del polimero. Nel caso di un idrogel questo fenomeno porta ad una diminuzione del massimo grado di swelling [105].

Proprietà elastiche

Sui campioni all'equilibrio di swelling, sia in acqua che a pH 3 e in forza ionica, vengono condotte misure reologiche per valutarne gli spettri meccanici (**Figura 97**). In tutti i casi G' risulta sempre ampiamente maggiore di G'' , confermando che si tratta di un materiale "solid-like". Inoltre uno spettro meccanico che si presenta con due linee orizzontali di G' e G'' è uno spettro caratteristico di un gel rigido [106, 107].

Si nota, inoltre, nello spettro meccanico dell'idrogel una diminuzione dei moduli elastici e viscosi passando da una soluzione acquosa ad una a pH 3 e ancora ad una 0.1M di NaCl.

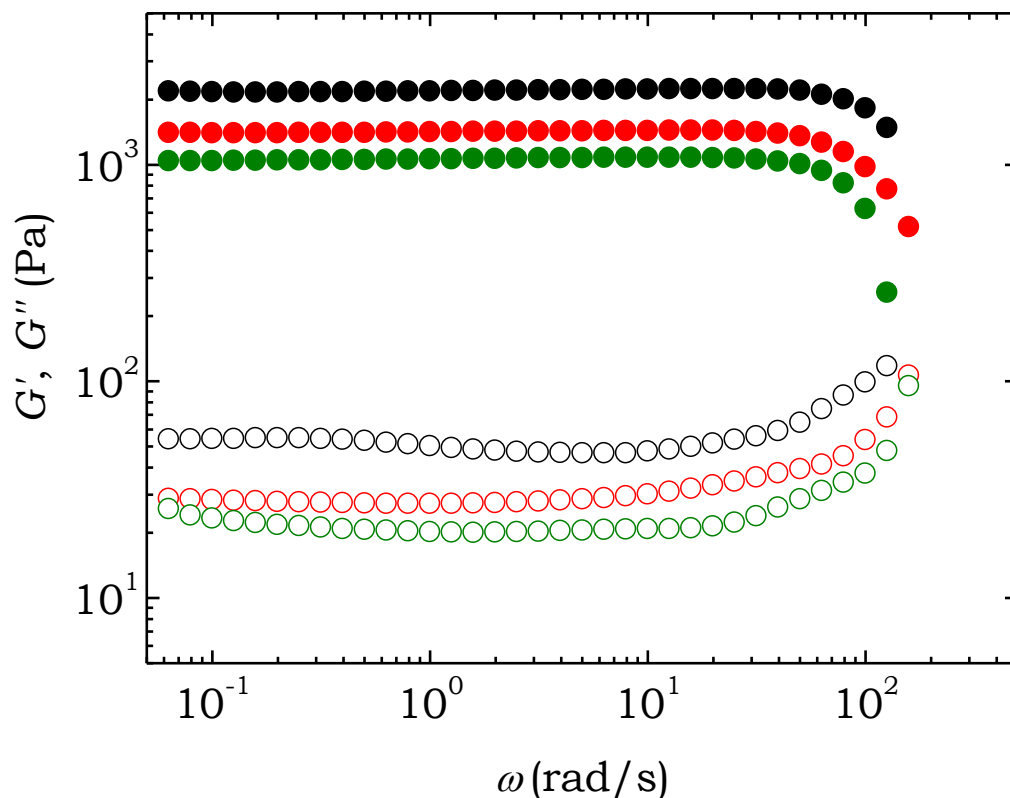


Figura 97: XGE 1.4M in acqua: G' (●) e G'' (○), a pH3: G' (●) e G'' (○), in NaCl 0.1M: G' (●) e G'' (○).

Passare da una soluzione acquosa ad una a pH 3 e ancora ad una 0.1M di NaCl comporta rispettivamente la protonazione dello xantano o la schermatura delle sue cariche. Come conseguenza si verifica una riduzione del volume del gel iniziale in acqua con relativa diminuzione della tensione delle catene polimeriche, inizialmente al massimo grado di rigonfiamento, e diminuzione delle proprietà elastiche dei sistemi. I moduli G' e G'' vengono utilizzati per determinare come la densità di punti di reticolazione contribuisca all'elasticità del sistema.

In particolare, secondo la teoria dell'elasticità [100] modificata da Peppas per il caso di reticolazione in soluzione [108], la densità di punti di reticolazione nello stato iniziale (v_e/V_0) prima del processo di swelling può essere messo in relazione al G' :

$$\frac{v_e}{V_0} = \frac{G'}{RT} \left[\frac{\varphi_0}{\varphi_2} \right]^{1/3} \quad (95)$$

φ_0 è la frazione in volume di polimero nello stato rilassato, cioè dopo la formazione dei cross-link ma prima dello swelling e φ_2 è quella dopo lo swelling.

Il valore teorico della densità di catena, $(v_e/V)_{th}$, basato sulla quantità di epichelidrina inizialmente aggiunta può essere ricavato tramite l'eq. (96).

$$\left(\frac{v_e}{V} \right)_{th} = \frac{2[\text{crosslinker}] \cdot V_0 d_{water}}{(W_s - W_{gel})} \quad (96)$$

in cui d_{water} è la densità dell'acqua (1 g/cm³) e V_0 è il volume del gel prima della reazione di cross-link (2 ml). Si considerano network ideali quelli in cui tutti i cross-link forniscono lo stesso contributo all'elasticità macroscopica e la deformazione delle catene sottoposte ad uno sforzo risultano le stesse.

I parametri di swelling e le densità di cross-link degli idrogel in acqua, a pH 3 e in NaCl 0.1M sono riportati in **Tabella 17** e in **Tabella 18**.

In particolare il grado di swelling Q può essere definito come $1/\varphi_2$.

XGE	$W_{gel}(g)$	$W_0(g)$	$W_{sol}(g)$	$W_s(g)$	φ_0	φ_2	Q
0.6M	0.042	0.16	0.12	5.4	0.015	0.006	127
1.4M	0.055	0.31	0.26	3.3	0.020	0.013	59
0.6M-pH 3	0.042	0.16	0.12	4.4	0.015	0.020	37
1.4M-pH 3	0.055	0.31	0.26	3.0	0.020	0.014	54
0.6M-NaCl	0.068	0.16	0.092	4.4	0.025	0.011	65
1.4M-NaCl	0.073	0.31	0.24	3.1	0.026	0.018	42

Tabella 17: parametri di swelling degli idrogel XGE.

Il comportamento reologico degli idrogel fornisce informazioni riguardo alle catene elastiche attive negli idrogel (vedi eq. (95) e (96)).

XGE	G'(Pa)	ν_e/V_0 $\cdot 10^6$ (mol·cm⁻³)	ν_e/V $\cdot 10^6$ (mol·cm⁻³)	$(\nu_e/V)_{th}$ $\cdot 10^3$ (mol·cm⁻³)
0.6M	1180	0.669	0.271	0.448
1.4M	2270	1.086	0.762	1.728
0.6M-pH 3	780	0.291	0.393	0.550
1.4M-pH 3	1500	0.696	0.526	1.898
0.6M-NaCl	1050	0.546	0.250	0.551
1.4M-NaCl	395	0.186	0.136	1.84

Tabella 18: moduli elastici e densità di catena degli idrogel XGE.

Osservando i valori della densità di catena nello stato rilassato, ν_e/V_0 , ottenuto con l'utilizzo dei moduli elastici secondo l'eq. (95), i valori della densità di catena negli idrogel rigonfiati, ν_e/V , tenendo conto della variazione di volume del gel rigonfiato (W_s), e quelli teorici basati sulla quantità di epicloridrina aggiunta inizialmente, $(\nu_e/V)_{th}$, si nota che i cross-link elastici effettivi sono all'incirca di tre ordini di grandezza inferiori rispetto alla quantità di epicloridrina inizialmente aggiunta, con una massa di epicloridrina convertita in cross-link pari a circa lo 0.4% del peso secco totale nel gel XGE 0.6M e lo 0.5% per quello 1.4M.

Il peso molecolare tra i cross-link può essere stimato in accordo all'eq. (97) [108, 109] e risulta di circa 32,000 e 23,000 g/mol rispettivamente per i gel 0.6M e 1.4M, corrispondenti a 180 e 130 residui saccaridici, calcolati

assumendo un peso molecolare medio pari a 180 g/mol per unità saccaridica.

$$M_c = \frac{\varphi_2 \rho_2}{\left(\frac{v_e}{V} \right)} \quad (97)$$

Una rappresentazione molecolare delle zone di giunzione è stata ottenuta considerando che i cross-link con l'ECH avvengono sul network di xantano-KGM di un idrogel sinergico.

Quindi è stato supposto che le molecole reticolanti andassero ad unire le due catene polisaccaridiche in posizioni stericamente favorevoli all'interno delle regioni connesse dalle giunzioni fisiche, già presenti prima della reticolazione.

La stechiometria del complesso è all'incirca di 1:1 in massa e possono essere suggeriti pertanto due modelli compatibili di associazione molecolare, considerando la catena del KGM lineare o reticolata:

- KGM non sostituito: si ottiene un complesso macromolecolare 1:2, in cui una catena di xantano lega due catene di KGM,
- KGM sostituito (considerando un grado di sostituzione del 10%): si ottiene un complesso macromolecolare 1:1, in cui una catena di xantano lega una catena di KGM.

Per entrambi i complessi sono stati costruiti, con la dinamica molecolare, sviluppata dalla Dr.ssa Chiessi (Università di Roma Tor Vergata), modelli stabilizzati attraverso legami idrogeno intermolecolari e interazioni di Van der Waals.

Durante la sintesi degli idrogel XGE sono stati introdotti dei legami chimici nel complesso macromolecolare che coinvolgono i gruppi ossidrilici dell'unità saccaridica.

In **Figura 98** è rappresentato un complesso di xantano-KGM 1:1. In questo complesso sono rappresentati un decasaccaride di KGM e una catena di xantano con cinque unità ripetitive, legati con un ponte di epiclorigidrina (atomi in giallo) tra gli atomi di carbonio C6 del KGM e la catena principale dello xantano.

Il sistema è organizzato in un arrangiamento a doppia elica con orientazione delle catene antiparallele e la distanza media tra le catene è di circa 8 Å.

Il grado di cross-linking mostrato in **Figura 98** (una ECH ogni 18 residui saccaridici) non riproduce la situazione sperimentale ma fornisce una descrizione della giunzione con un dettaglio atomico in un dominio spaziale di pochi nanometri.

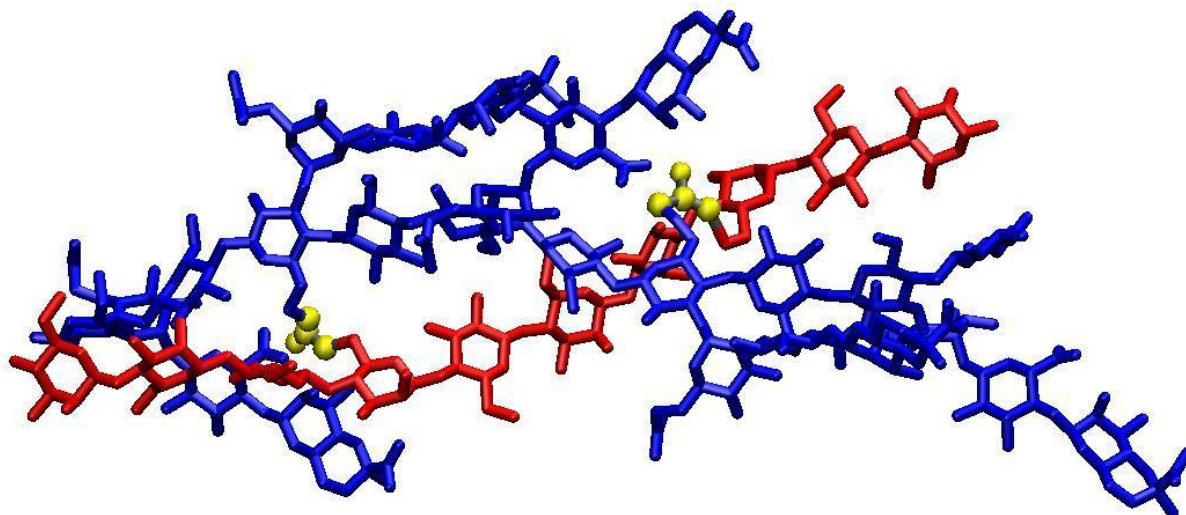


Figura 98: rappresentazione molecolare di domini di giunzione nell'idrogel XGE. I cross-link di ECH in giallo, le catene di xantano e KGM sono rispettivamente in blu e in rosso. Gli atomi di idrogeno non sono mostrati.

La presenza dei cross-link chimici nel gel XGE, come abbiamo visto, rende il gel sensibile a variazioni di parametri esterni come il pH e la forza ionica permettendo un comportamento reversibile del sistema.

Queste proprietà possono rappresentare un vantaggio per un'applicazione di questi materiali nella biomedicina.

Studi di vitalità cellulare

La reticolazione degli idrogel, come abbiamo visto, è effettuata con epicheloridrina che è un agente reticolante spesso riconosciuto come tossico.

L'impatto dell'ECH presente negli idrogel sulla vitalità cellulare è stato stimato mediante l'incubazione di fibroblasti *NIH 3T3* sui gel XGE.

In **Figura 99** è mostrata la vitalità dei fibroblasti dopo 12 ore di incubazione sulla superficie del gel 0.6M [**110**].

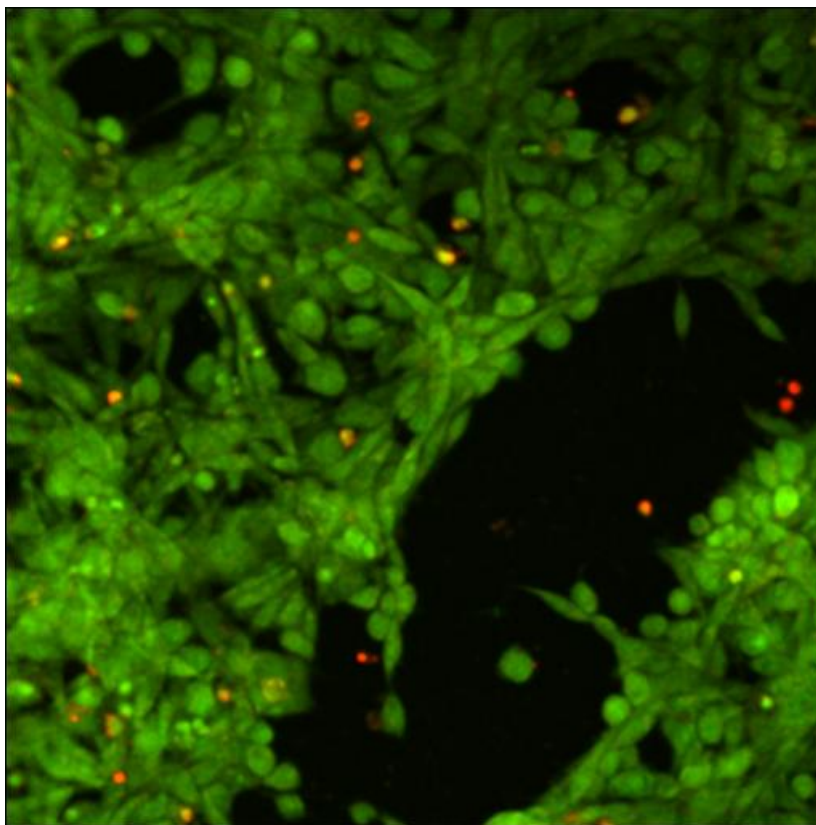


Figura 99: immagine del test di vitalità “Live-Dead” su fibroblasti *NIH 3T3* con Confocal Laser Scanning Microscopy: cellule vive in verde, cellule morte in rosso.

Come si può notare, il numero di cellule vive (colorate in verde) è nettamente predominante rispetto a quelle morte (colorate in rosso) e inoltre mostrano la tipica morfologia delle cellule *NIH 3T3* adese.

Si può pertanto concludere che un basso contenuto di epiclorigrina (0.6M) non incide sulla vitalità cellulare e nello stesso tempo la concentrazione di punti di reticolazione presenti nel gel, anche se bassa, è comunque sufficiente ad aggiungere caratteristiche di responsività agli idrogel fisici sinergici.

BIBLIOGRAFIA

- 100** P. J. Flory, R. Rehner, Jr. Statistical Mechanics of Cross-linked Polymer Networks, *J. Chem. Phys.*, **1943**, *11*, 521-526.
- 101** Hans Scott, *J. Macromol. Sci.-Phys.*, **1992**, *B31(1)*, 1-9.
- 102** José R. Quintana, Nora E. Valderruten and Issa Katime, *Langmuir*, **1999**, *15*, 4728-4730.
- 103** Anca Bejenariu, Marcel Popa, Didier Le Cerf, Luc Picton, *Polimer Bulletin*, **2008**, *61*, 631-641.
- 104** Hatice Kaplan Can, Betül Kırıcı Denizli, Ali Güner, Zakir M.O. Rzaev, *Carbohydrate Polymers*, **2005**, *59*, 51-56.
- 105** I. C. Alupei, M. Popa, M. Hamcerencu, M. J. M. Abadie, *European Polymer Journal*, **2002**, *38*, 2313-2320.
- 106** Shinsaku Kobayashi, Shigetomo Tsujihata, Naruhiro Hibi, Yoshinori Tsukamoto, *Food Hydrocolloids*, **2002**, *16*, 289-294.
- 107** Vipul Dave, Mihir Sheth, Stephen P. McCarthy, Jo Ann Ratto and David L. Kaplan, *Polymer*, **1998**, Vol. 39, No. 5, 1139-1148.
- 108** Nikolaos A. Peppas and Edward W. Merrill, *Journal of Polymer Science: Polymer Chemistry Edition*, **1976**, Vol. 14, 459-464.
- 109** G. Paradossi, F. Cavalieri, D. Capitani, V. Crescenzi, *Journal of Polymer Science Part B-Polymer Physics*, **1999**, *37*, 1225-1233.

110 G. Paradossi, I. Finelli, B. Cerroni and E. Chiessi, *Molecules*, **2009**, *14* (9), 3662-3675.

CAPITOLO 10

Scattering di neutroni

Sui gel XGE e su un gel fisico ad uguale concentrazione totale di polimero sono state effettuate misure di scattering di neutroni (**Capitolo 7**) condotte all'ILL di Grenoble sulla linea IN13 (sez. **IN13**, pag. **46**).

10.1 Risultati e discussione

Sono state studiate le fluttuazioni locali (sez. **7.3 Scattering elastico**, pag. **206**) dei gel chimici XGE a diverso grado di reticolazione e del gel fisico, cioè del corrispondente gel formatosi in assenza di epicloridrina, sia allo stato solido che idratati con un contenuto di D₂O pari a 0.4% w/w, in funzione della temperatura esplorando l'intervallo da 270 a 320 K. I gel disidratati si ottengono liofilizzando i campioni, dopo neutralizzazione e equilibratura in

acqua (sez. **Idrogel XGE: procedura di sintesi**, pag. **224**), mentre quelli idratati si ottengono disponendo i liofilici in atmosfera satura di D_2O .

Sono stati, quindi, registrati gli spettri di XGE a diversi gradi di reticolazione: 1.4M, 1M e 0.6M, sia secchi che idratati, e del corrispondente gel fisico, osservando il fattore di struttura $S(Q, \omega=0)$ per tutti i campioni (**Figura 100**, **Figura 101**, **Figura 102**).

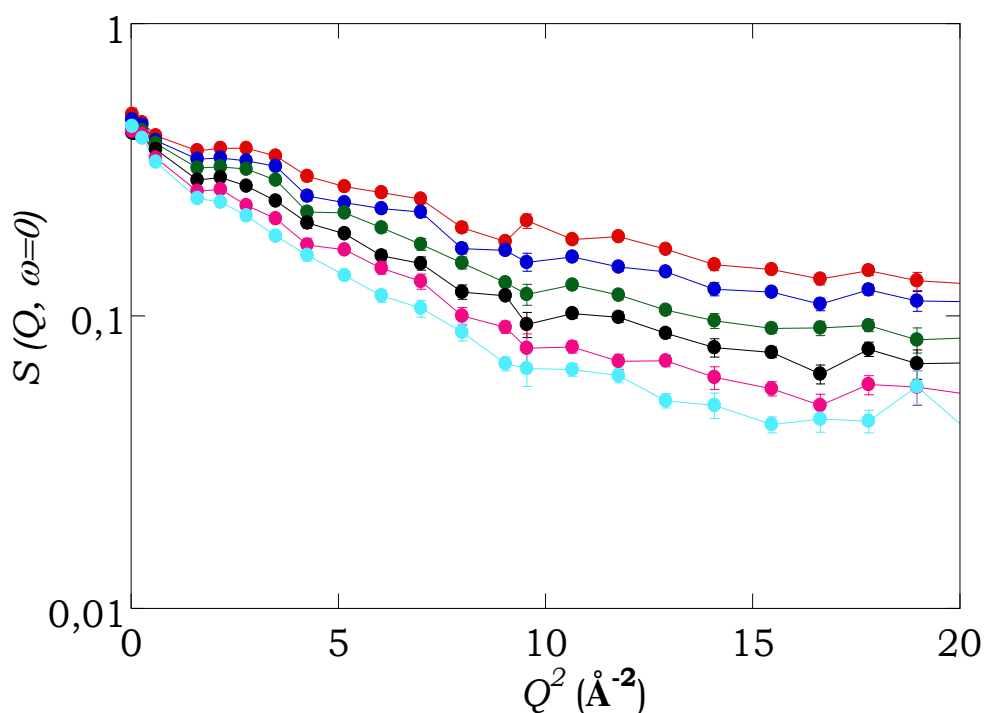


Figura 100: $S(Q, \omega=0)$ per XGE 1.4M in D_2O in funzione della temperatura: 270 K (●); 280 K (●); 290 K (●); 300 K (●); 310 K (●); 320 K (●).

Osservando gli spettri riportati in **Figura 100**, relativi ad un campione d'idrogel 1.4M idratato, si nota una accentuazione della pendenza

aumentando la temperatura. Questo risultato indica un aumento delle fluttuazioni strutturali a temperature più alte.

Gli spettri riportati in **Figura 101** mostrano il comportamento dello stesso gel allo stato solido. In questo caso il campione sembra non risentire della variazione di temperatura.

Dalla comparazione fra i risultati ottenuti sui campioni secchi e idratati risulta evidente la funzione “plasticizzante” dell’acqua.

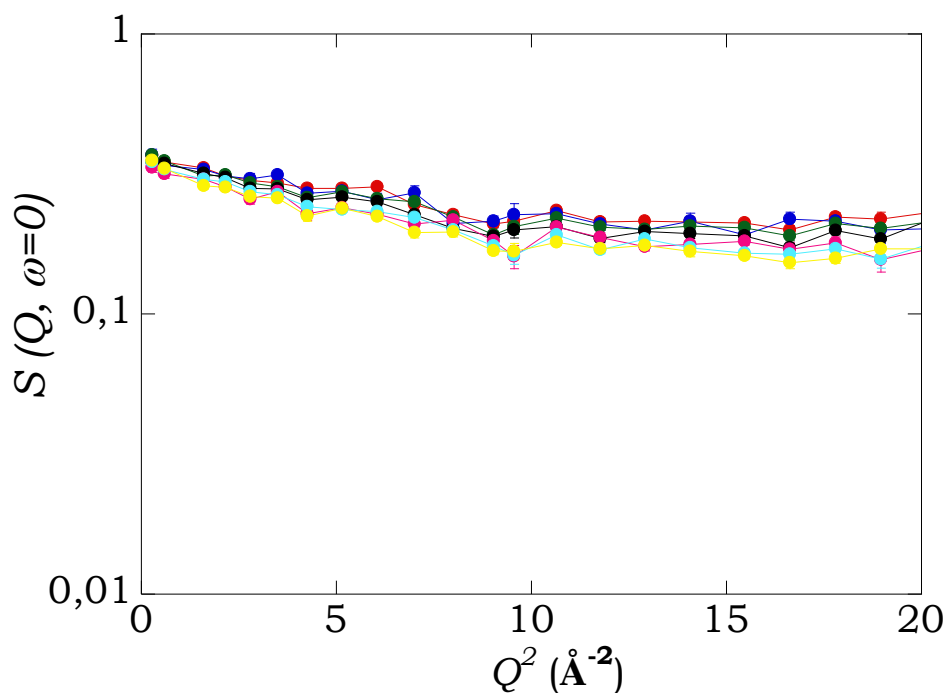


Figura 101: $S(Q, \omega=0)$ per XGE 1.4M secco in funzione della temperatura: 270 K (●); 275 K (●); 280 K (●); 290 K (●); 300 K (●); 310 K (●); 320 K (●).

Osservando poi il comportamento dell'idrogel fisico XGE (**Figura 102**) si nota una dipendenza dalla temperatura meno marcata rispetto al gel chimico idratato XGE 1.4M.

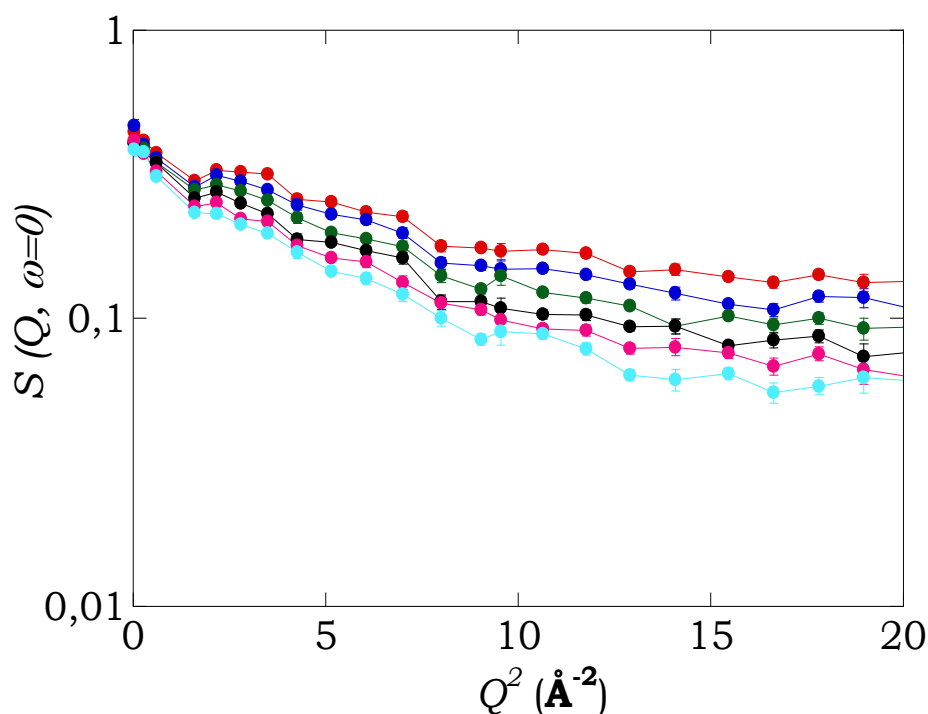


Figura 102: $S(Q, \omega=0)$ per XGE fisico in funzione della temperatura: 270 K (●); 280 K (●); 290 K (●); 300 K (●); 310 K (●); 320 K (●).

A bassi valori di Q ($Q < 1.2 \text{ \AA}^{-1}$) le fluttuazioni dei protoni della catena polisaccaridica, $\langle u^2 \rangle$, possono essere descritte mediante il fattore di Debye-Waller, eq. (98), valida per $\langle u^2 \rangle Q^2 \leq 2$ [111].

$$S(Q) \propto \exp\left(-\frac{1}{6}\langle u^2 \rangle \cdot Q^2\right) \quad (98)$$

$\langle u^2 \rangle$ è valutato dalla pendenza della retta ottenuta riportando $\ln[S(Q, \omega=0)]$ in funzione di Q^2 nella regione a bassi Q (**Figura 103**) [112-114].

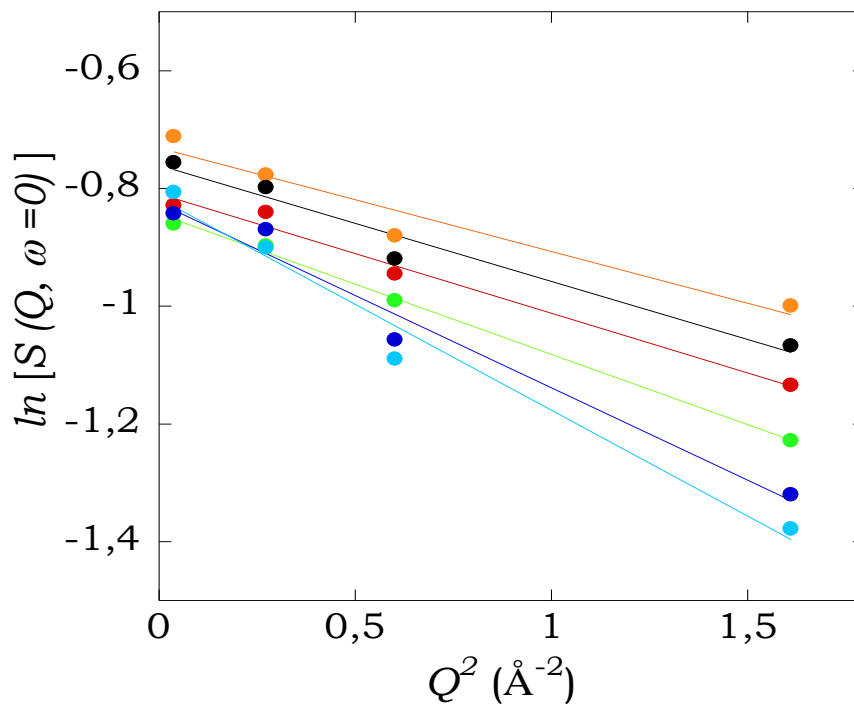


Figura 103: $\ln [S(Q, \omega=0)]$ in funzione di Q^2 e relativi fit lineari per XGE 1.4M in D_2O a bassi Q : 270 K (●); 280 K (●); 290 K (●); 300 K (●); 310 K (●); 320 K (●).

L'andamento degli $\langle u^2 \rangle$ in funzione della temperatura per XGE 1.4M, allo stato secco e idratato (**Figura 104**) evidenzia quanto detto precedentemente e cioè che la presenza del solvente attiva le dinamiche locali di tali idrogel,

con $\langle u^2 \rangle$ pari a 0.8 e a 1.8 Å² andando da 270 a 320 K. In assenza del solvente le fluttuazioni medie sono molto ridotte.

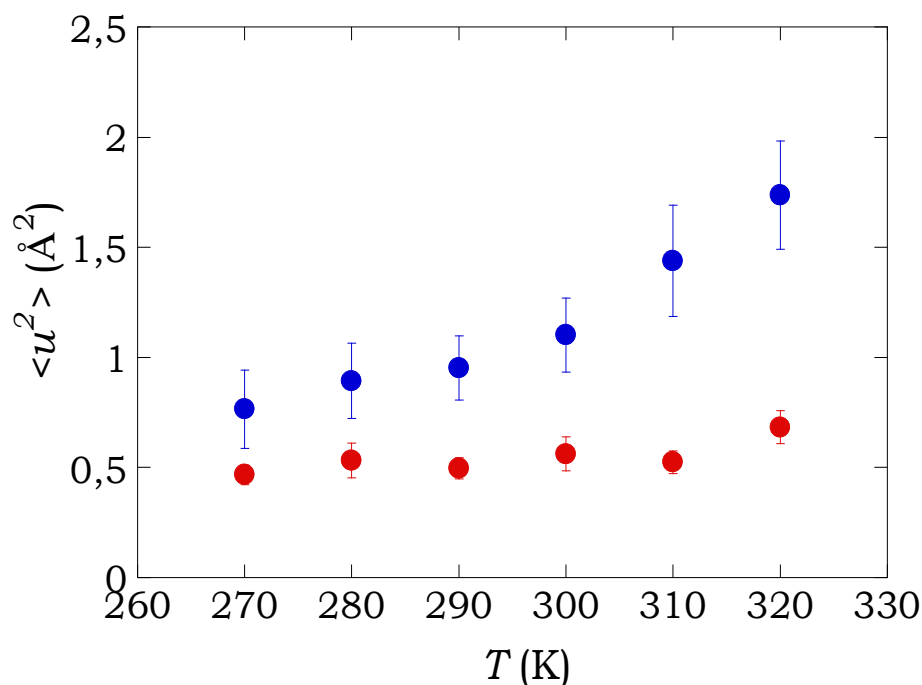


Figura 104: valori di $\langle u^2 \rangle$ in funzione di T (K) per XGE 1.4M secco (●) e in D₂O (●).

L'influenza della quantità di punti di reticolazione sulla fluttuazione quadratica media nell'intervallo $270 < T$ (K) < 320 per i campioni idratati 0.6M e 1.4M con ECH e per il gel fisico è riportata in **Figura 105**.

Si osserva una $\frac{\partial \langle u^2 \rangle}{\partial T}$ maggiore per il gel XGE 0.6M contenente un numero minore di cross-link, indicando una maggiore flessibilità di struttura [115].

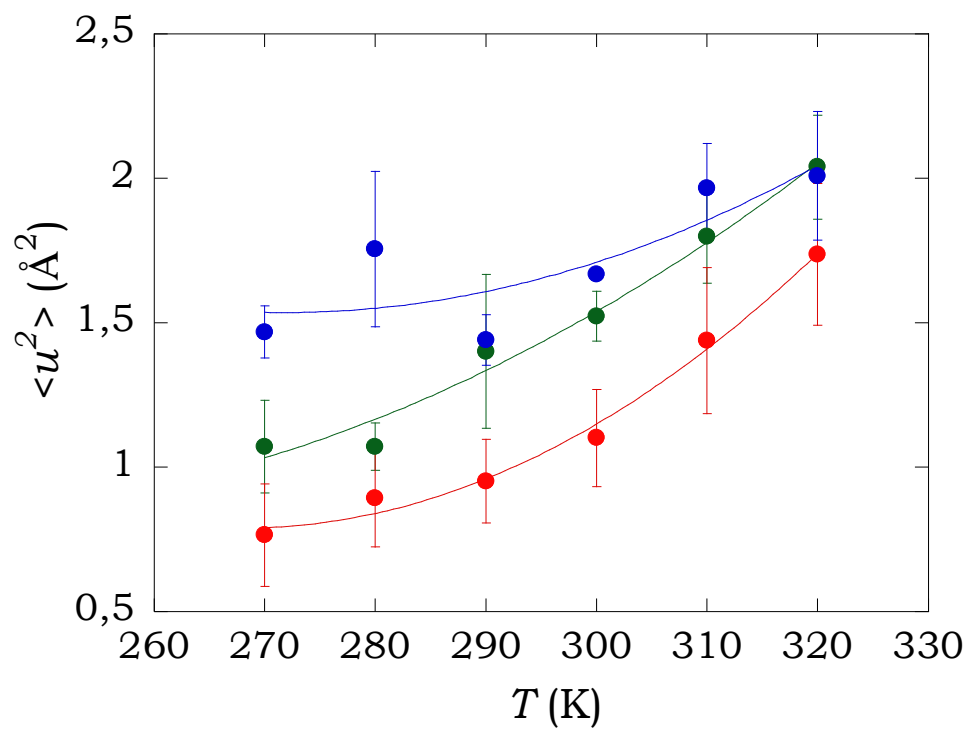


Figura 105: valori di $\langle u^2 \rangle$ in funzione di T (K) per XGE 1.4M (●); 0.6M (●) e per il gel fisico (●).

BIBLIOGRAFIA

- 111** F. Gabel, *Eur Biophys J*, **2005**, 34, 1-12.
- 112** A. Stoeckli, A. Furrer, Ch. Schoenenberger, B. H. Meier, R. R. Ernst, I. Anderson, *Physica 136B*, **1986**, 161-164.
- 113** G. Paradossi, F. Cavalieri, E. Chiessi, C. Mondelli, M. T. F. Telling, *Chemical Physics*, **2004**, 302, 143-148.
- 114** G. Paradossi, F. Cavalieri, E. Chiessi, *Carbohydrate Research*, **2005**, 340, 921-927.
- 115** G. Zaccai, *Science*, **2000**, 288, 1604-1607.
-
-

CONCLUSIONI

Il lavoro descritto in questa tesi ha una connotazione particolare. E' infatti la prima tesi sviluppata nell'ambito della tematica "*Nuove applicazioni dell'industria biomedicale*" del progetto MIUR "*Giovani Ricercatori*" nel nostro Dipartimento. Per questo motivo, fra le problematiche affrontate in questo lavoro, ci è quindi sembrato appropriato mettere in risalto l'attività di ricerca portata avanti in stretta collaborazione con l'industria farmaceutica italiana *Fidia Farmaceutici S.p.A.* e che rappresenta un esempio di sinergia fra ricerca di base e applicata. Per rispondere ad alcune delle istanze rappresentate dall'industria farmaceutica si sono aperte inaspettate prospettive di studio di base che hanno permesso una descrizione quantitativa delle proprietà principali del sistema investigato.

I sistemi descritti nella tesi hanno un denominatore comune: sono entrambi basati su polisaccaridi naturali.

Nel caso dell'idrogel fisico Hyadd4-G, di interesse industriale, il polimero di partenza, l'acido ialuronico, è stato sostituito al 2% con catene laterali esadecilammidiche. Questa minima modifica della catena principale ha cambiato completamente il comportamento in soluzione. L'introduzione di catene idrofobiche aumenta il carattere anfifilico della catena polisaccaridica di acido ialuronico e permette interazioni intra- e intermolecolare. L'aumento di concentrazione polimerica permette il passaggio da un tipo di interazione

all'altro e apre la strada alla formazione di un reticolo 3D macroscopico mediante un meccanismo di percolazione assente nel polimero di partenza. Si ottiene così un sistema con caratteristiche radicalmente nuove, pur preservando la biocompatibilità e la funzionalità del glicosaminoglicano di partenza.

Per l'altro sistema studiato, XGE, siamo partiti dalla miscela di un polisaccaride microbico, lo xantano, e di uno di origine vegetale, il glucomannano, noti per dar luogo ad un gel fisico sinergico. Con il termine "gel sinergico" si indica un gel fisico che si instaura solo quando alcune coppie di polisaccaridi vengono mescolate. Nelle stesse condizioni di concentrazione totale di polimero e di temperatura, i singoli polisaccaridi non formano gel. Queste semplici evidenze rivelano che la stabilizzazione della fase gel è dovuta ad interazioni dipolari specifiche che coinvolgono tratti delle due catene saccaridiche. Questa classe di idrogel fisici, già noti e largamente impiegati nell'industria alimentare e cosmetica, mostrano una transizione ordine \leftrightarrow disordine, impartendo carattere di termoreversibilità al gel. Per migliorarne il comportamento meccanico e ottenere un gel in cui la transizione termica sia ancora presente senza destabilizzare il reticolo, sono stati introdotti dei punti di giunzione chimici nelle catene.

Lo studio delle caratteristiche strutturali e dinamiche di un idrogel rappresenta una sfida che richiede l'uso di diverse metodologie sperimentali e teoriche.

Un idrogel può essere considerato un sistema auto-organizzato gerarchico, nel senso che ogni livello strutturale è caratterizzato da una "unità media" con una dinamica caratteristica. Si passa quindi da caratteristiche

dinamico-strutturali che spaziano dai nanosecondi alle ore o addirittura ai giorni, e da qualche nanometro a dimensioni meso- e macroscopiche.

In dipendenza di queste caratteristiche, le metodologie nello spazio diretto e reciproco per caratterizzare un gel sono rispettivamente la microscopia (ottica, elettronica) e lo scattering elastico e quasielastico (SAXS e SANS, DLS e QENS) permettendo di esplorare momenti trasferiti o vettori di scattering e quindi distanze d'interesse per i sistemi gel. Le dimensioni mesoscopiche (da qualche micron a qualche decina di micron) indirizzano a strutture e tempi scala caratteristici dei processi diffusivi (dai millisecondi a qualche frazione di secondo). Queste caratteristiche sono chiaramente riferite alla costruzione di sistemi interagenti con la materia cellulare (che hanno stesse dimensioni spazio-temporali). Il comportamento macroscopico, studiato con metodi reologici, è particolarmente riferito alle proprietà elastiche e di scorrimento di tali sistemi. Dall'integrazione fra queste metodologie (**Figura 106**) si è cercato di ottenere un quadro complessivo del comportamento dei sistemi studiati in questa tesi.

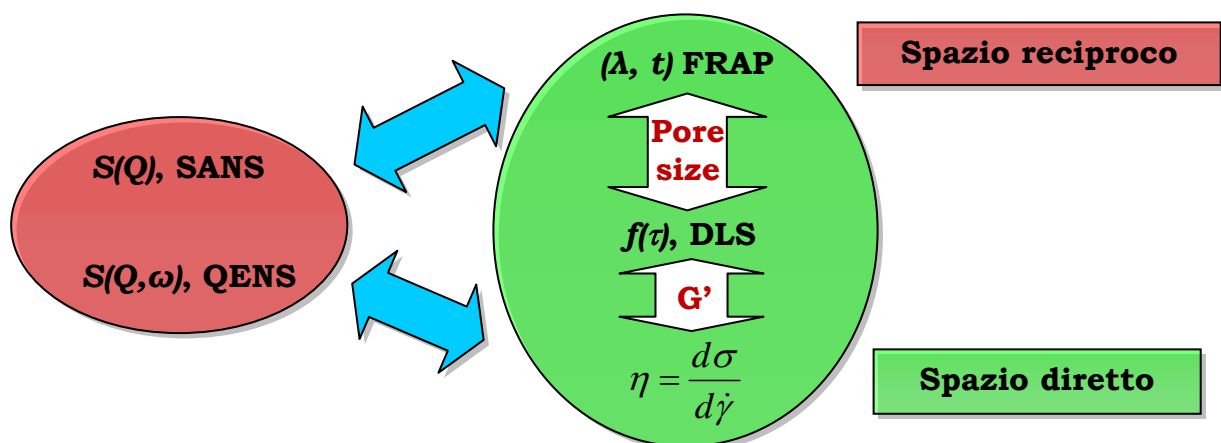


Figura 106: interdipendenza degli approcci utilizzati in questa tesi.

Il panorama riguardante le correlazioni dinamico-strutturali studiate nell'idrogel Hyadd4-G mostra alcune caratteristiche peculiari di questo sistema.

- Dalle misure di scattering dinamico della luce, facendo uso di un modello di gel con dimensione frattale per l'interpretazione del fattore di struttura dinamico, sono emerse caratteristiche strutturali e dinamiche degli idrogel Hyadd4-G che, riassunte in un modulo elastico G' calcolato sulla base del tempo di correlazione caratteristico (eq. **(14)**), risulta in buon accordo con le misure reologiche dirette in regime oscillatorio. La possibilità di comparare i valori di G' provenienti da misure di natura completamente diversa conferma la validità del modello utilizzato per ricavare la dimensione media di maglia e il tempo di correlazione caratteristico del reticolo.
- Il fattore di struttura ricavato da misure di scattering di neutroni a basso angolo (SANS), da cui si ricava una distanza di correlazione spaziale caratteristica del gel, è in accordo con le $f(Q,t)$ dello scattering dinamico della luce.
- Le misure reologiche confermano che il network 3D, stabilizzato da interazioni intercatena di tipo idrofobico, origina una fase gel stabile.
- Dalle misure viscoelastiche con cui si è seguito il recupero di struttura dopo shock meccanico, si dimostra che lo Hyadd4-G è in grado di

ristabilire la struttura viscoelastica iniziale e di mantenere tale comportamento anche dopo ripetuti cicli. In base a questo comportamento, dovuto alla reversibilità dei punti di giunzione della matrice, l'idrogel basato su Hyadd4-G può essere classificato nella classe di materiali che si "autoriparano" (self healing, self repairing materials).

- Lo studio della viscosità di punto zero dimostra che lo Hyadd4-G è un buon modello sperimentale per validare le leggi di potenza previste dalle moderne teorie di *reptation* in presenza di gruppi idrofobici sulla catena, responsabili per un'associazione di tipo reversibile.
- Si è dimostrata la possibilità di aumentare la funzionalità degli idrogel sinergici, tramite l'introduzione di cross-link chimici fra catene polisaccaridiche di xantano e glucomannano con minimo impatto sulla biocompatibilità del sistema complessivo.

RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia il MIUR per la borsa di studio per il corso di Dottorato in chimica nell'ambito "Giovani Ricercatori" e per il finanziamento PRIN 2007.

Inoltre si ringraziano il Dr. Davide Renier e il Dr. Devis Galesso per aver stimolato e seguito il lavoro di questa tesi con entusiasmo e disponibilità e la *Fidia Farmaceutici S.p.A.* per il supporto economico fornito.

Un ringraziamento particolare va al Prof. Gaio Paradossi, guida costante in questi anni di lavoro, che, con i suoi preziosi suggerimenti e il suo incoraggiamento, ha reso possibile la realizzazione di questo lavoro di tesi.

Si ringraziano inoltre la Dr.ssa Ester Chiessi, per il suo supporto nell'elaborazione dei dati di scattering di neutroni e per le simulazioni di dinamica molecolare, e la Dr.ssa Barbara Cerroni per la pazienza e l'entusiasmo con cui ha condotto gli studi di vitalità cellulare.

Infine un ringraziamento speciale va a tutto il gruppo di laboratorio, Silvia Margheritelli, Letizia Oddo, Alice Lonardi, Patrizia Andreozzi, Shivkumar Gugare e Sidhendra Kupal, il cui sostegno in questi anni di Dottorato ha reso il lavoro sempre piacevole e stimolante.

APPENDICE A

Valori delle grandezze più utilizzate nella tesi e fattori di conversione

Grandezza	Simbolo	Valore
Costante di Plank h	$\hbar = h/2\pi$	1.054×10^{-34} J s
Massa del neutrone	m_n	1.675×10^{-24} g
Costante di Boltzmann	k	1.381×10^{-23} J K ⁻¹
Sezione d'urto coerente	σ_{coh}	
	H	1.7599 barns
	D	5.597 barns
Sezione d'urto incoerente	σ_{inc}	
	H	79.9 barns
	D	2.04 barns

Grandezza	Simbolo	Fattore di conversione	
Lunghezza	$1 \mu m$	$1 \times 10^{-6} \text{ m}$	
	1 nm	$1 \times 10^{-9} \text{ m}$	
	1 \AA	$1 \times 10^{-10} \text{ m}$	
Sezione d'urto	1 barn	$1 \times 10^{-24} \text{ cm}^2$	
Energia	1 meV	8.006 cm^{-1}	$0.0965 \text{ kJ mol}^{-1}$
Frequenza	1 Hz	6.238 rad s^{-1}	
Tempo	$1 \mu s$	$1 \times 10^{-6} \text{ s}$	
	1 ns	$1 \times 10^{-9} \text{ s}$	
	1 ps	$1 \times 10^{-12} \text{ s}$	
Pressione	1 Pa	$1 \text{ kg m}^{-1} \text{ s}^{-2}$	

APPENDICE B

Lavori e contributi a congressi

- [1] F. Cavaliere, I. Finelli, M. Tortora, P. Mozetic, E. Chiessi, F. Polizio, T. B. Brismar, and G. Paradossi, *Polymer Microbubbles As Diagnostic and Therapeutic Gas Delivery Device*, Chem. Mater., **2008**, 20, 3254-3258.
- [2] Finelli, E. Chiessi, D. Galesso, D. Renier, G. Paradossi, *Gel-Like Structure of a Hexadecyl Derivative of Hyaluronic Acid for the Treatment of Osteoarthritis*, Macromol. Biosci., **2009**, 9, 646-653.
- Cover per il vol. 9, n. 7, July 7, 2009 della suddetta rivista.
- [3] I. Finelli, B. Cerroni, E. Chiessi and G. Paradossi, *Adding Chemical Cross-links to a Physical Hydrogel*, Molecules, **2009**, 14, 3662-3675.
- [4] S.V. Ghugare, I. Finelli, E. Chiessi, G. Paradossi, *Soft Matter for Biomedicine: Two case studies*, Eur. Biophys J., **2009**, 38 (Suppl 1) S35-S212.

21st Conference of the European Colloid and Interface Society ECIS 2007, 10-14 settembre 2007, Ginevra, *Gel-like structural and dynamic behaviour of HYADD™4, a derivative of hyaluronic acid*, I. Finelli, E. Chiessi, D. Galesso, D. Renier and G. Paradossi.

XXIII Congresso Nazionale della Società Chimica Italiana SCI 2009, 5-10 luglio 2009, Sorrento, *Soft Matter for biomedicine: two case studies*, I. Finelli, S. V. Ghugare, E. Chiessi and G. Paradossi

- Poster vincitore del “Premio Senatore” come miglior poster di giovane ricercatore.

Scuole e corsi di perfezionamento

Settembre 2007: **Scuola SISN** (Società Italiana di Spettroscopia Neutronica), Giornate didattiche 2007, 10-14/9/2007, Sestri Levante (GE).

Aprile 2009: **Corso sulla viscoelasticità** indetto dalla TA Instruments div. della Waters SpA, 9/4/2009, Vimodrone (MI).

Settembre 2009: **Scuola SIR** (Società Italiana di Reologia), *Corso di formazione e aggiornamento per ricercatori e tecnici industriali*, 7-10/9/2009, Valeggio sul Mincio (VR).