

POLITECNICO DI MILANO
Scuola di Ingegneria Industriale e dell'Informazione
Corso di laurea in Ingegneria Biomedica



TECNICHE OTTICHE DI
CORRELAZIONE PER LO STUDIO DI
SISTEMI D'INTERESSE BIOMEDICALE

Relatori: Chiar.mo Prof. Roberto Piazza
Chiar.ma Prof.ssa Paola Petrini
Correlatore: Dott. Matteo David Alaimo

Tesi di Laurea di:
Stefano Bosisio Matr. 782166

Anno Accademico 2012-2013

Indice

Sommario	xiii
Summary	xxiii
1 Tecniche ottiche di correlazione	1
1.1 Introduzione	2
1.1.1 Dynamic Light Scattering	4
1.2 Near Field Scattering	7
1.2.1 Ghost Particle Image Velocimetry	9
1.2.2 Photon Correlation Imaging	13
2 Gel	19
2.1 Hydrogels	21
2.2 Pectina	22
2.2.1 Analisi della produzione di hydrogel di pectina median- te gelazione interna	30
2.2.2 Studio di gel di alginato mediane PCI	34
3 Sedimentazione	39
3.1 Derivazione fisica della sedimentazione	40
3.1.1 Equilibrio	43
3.2 Fluttuazioni di velocità	44
3.2.1 Boycott effect e gradienti termici	46
3.3 Heterodyne Speckle Velocimetry	49
3.3.1 HSV con sorgente parzialmente coerente	57
3.4 Acquisizione	58
3.5 Analisi dati	60
3.6 Conclusioni	66

4	Studio delle dinamiche microscopiche e proprietà macroscopiche di gel di pectina	67
4.1	Materiali e Metodi	68
4.1.1	Gel di Pectina	68
4.1.2	Photon Correlation Imaging (PCI)	70
4.1.3	Test reologici	72
4.2	Gelazione esterna: dinamica microscopica	72
4.2.1	Gelazione esterna: reologia	88
4.3	Gelazione Interna: dinamica microscopica	91
4.3.1	Gelazione interna: reologia	101
4.4	Conclusioni	103
	Ringraziamenti	105
	Bibliografia	107

Elenco delle figure

1	Campo di velocità di sedimentazione per particelle di PMMA con diametro di $1\mu m$ in una cella di larghezza/profondità $1cm$ e altezza $2cm$	xv
2	Indice di correlazione $c_I(\tau, t, \mathbf{r})$ per un gel $25mM$ con NaCl, con $\tau = 20s, 100s, 600s$, e la sua corrispondente funzione di correlazione $g_2(\tau) - 1$, presa a un ageing time variabile tra 0.5 e 33 ore.	xviii
3	(a) Mappa di correlazione per un gel $25mM$ a $40h$ dall'inizio del processo di gelazione. Le tre regioni evidenziate corrispondono a: una struttura completamente arrestata (T), una parzialmente arrestata (M), e una soluzione di pectina dove la gelazione non è ancora avvenuta (B). La dipendenza dell'indice di correlazione c_I dalla posizione z lungo la cella per un ritardo $\tau = 600s$ Correlation map for a 25 mM gel è mostrata in (b). In (c) il modulo della viscosità complessa $ \eta^* $ (Pa·s) è rappresentato in funzione della frequenza di shear f (Hz), per campioni estratti dalle regioni T, M, B. Le curve sono poste a confronto con la legge di potenza $ \eta^* =Af^{-0.9}$ (linea tratteggiata)	xix
4	Settling velocity pattern for PMMA particles with diameter $1\mu m$ in a sedimentation cell of width/depth $1cm$ and height $2cm$ xxv	
5	Correlation index $c_I(\tau, t, \mathbf{r})$ for a 25 mM gel with NaCl, with $\tau = 20 s, 100 s, 600 s$, and its corresponding full correlation function $g_2(\tau) - 1$, taken at ageing time variable between 0.5 and 33 hours.	xxviii

6	(a) Correlation map for a 25 mM gel obtained 40 hours after gelation has started. The three evidenced regions correspond to a completely arrested gel (T), a partially correlated structure (M), and a fluid pectin solution where gelation has not occurred yet (B). The dependence of the correlation index c_I on the position z along the cell for a delay $\tau = 600$ s and an ageing time of 40 h is shown in (b). In (c) the magnitude of complex viscosity $ \eta^* $ (Pa·s) is plotted as a function of shear frequency f (Hz), for sample extracted from T, M, B regions. A comparison with power law $ \eta^* =Af^{-0.9}$ is given (dashed line)	xxix
1.1	Fattore di struttura e funzione di distribuzione radiale per un sistema di sfere rigide. A fraz.vol. = 0.1; B fraz.vol. = 0.3; C fraz.vol.=0.5 [3].	4
1.2	Esempio di sorgente lineare, di dimensione L, che dà un contributo diffusivo in P e P'.	5
1.3	Raggio con diametro D che illumina una particella di dimensioni L. Il rilevatore S, posto a distanza z dalla particella, riceve luce solo da una parte L^* del campione, da un angolo Θ [9].	7
1.4	Nei pannelli si mostrano le immagini di cross correlazione prese a 1 (a), 3 (b), 5 (c) frames di distanza. A destra: cross area dei tre picchi di correlazione [29].	10
1.5	Mappa di correlazione del flusso attorno a un ostacolo triangolare [29].	11
1.6	Nel grafico viene rappresentata la velocità con profilo parabolico come atteso. Nei riquadri si mostrano le funzioni di autocorrelazione [29].	12
1.7	Decomposizione spinodale di C10E5, con gradiente di temperatura. Si osservi il campo speckle e il pattern di velocità a diversi tempi [29].	12
1.8	Esempio di correlation index di un gel di pectina, a ritardi di : 2s, 5s, 8s, 10s. La freccia indica degli spike di decorrelazione, eventi repentini all'interno della struttura del gel che ne modificano l'organizzazione interna.	14
1.9	(a) Indice di correlazione per un sistema di particelle colloidali e (b) la relativa distribuzione di probabilità [7].	15
1.10	(a) Indice di correlazione per un gel e (b) la sua distribuzione di probabilità [7].	15
1.11	DMAP di un gel colloidale. La correlazioni vengono espresse in funzione della varianza [11].	17

2.1	Acido ramnmgalatturonico , α -L-Rhap	23
2.2	β -D-Apif	24
2.3	<i>Rhamnogalacturonan model</i> . Con U si indica l'acido galatturonico, con R l'acido ramnagalatturonico [60].	25
2.4	Modello <i>smooth hairy regions</i> e relativi monosaccaridi che costituiscono i domini [17].	26
2.5	Egg box creato dall'acido galatturonico, costituente principale della pectina [60].	27
2.6	Gli angoli torsionali γ e γ' sono riferiti agli acidi carbossilici in posizione 6 e 6', mentre Φ e Ψ al legame β -1'-4 [61].	27
2.7	Mappa adiabatica in funzione degli angoli di torsione Φ e Ψ . Con A e B vengono indicati due minimi in energia potenziale [61].	28
2.8	in a) doppia e tripla elica in prospettiva. In b) e c) rappresentazione in stick e Van der Waals rispettivamente di due catene di acido galatturonico disposte a: doppia elica, antiparallela e tripla elica, interagenti con ioni Ca^{2+} (sfere nere) [62].	29
2.9	Rappresentazione Van der Waals della doppia elica pectinica secondo la teoria egg box. Le sfere nere sono gli ioni Ca^{2+} [62].	30
2.10	Curve di titolazione per la pectina, con titolante NaOH e NaHCO_3 [18].	32
2.11	Campioni di gel di pectina a diverse concentrazioni di NaHCO_3 e di CaCO_3 [18].	32
2.12	Evoluzione dei moduli G' e G'' di un gel di pectina 23 mM in NaHCO_3 e 12.5 mM in CaCO_3 . Il punto d'incontro delle due curve identifica il gel point a circa 17 minuti [18].	32
2.13	Storage modulus per gel di pectina in funzione della frequenza. Con P si indica Pectina, Na indica la molarità di bicarbonato di sodio, Ca la concentrazione di carbonato di calcio [18].	33
2.14	Creep test per gel di pectina: deformazione e creep compliance [18].	34
2.15	Dipendenza temporale del rapporto $I(t)/I(0)$ delle intensità (punti aperti, asse sulla destra) e dell'indice di correlazione $\hat{c}_I(\tau, t, z)$ calcolato a un ritardo $\tau = 30$ s (punti pieni), misurati per una ROI posizionata a $z = 5$ mm. La linea continua è un'esponenziale che fitta la curva del rapporto delle intensità per $t > t_g$ con una costante di tempo $t_a \simeq 850$ s. Nel riquadro si mostra l'indice di correlazione normalizzato a ritardo $\tau = 10$ min e $\tau = 50$ min [11].	35

2.16	Funzioni di correlazione $g_2(\tau) - 1$ ottenute a una ROI in $z = 0.5$ mm, misurata a differenti tempi di agint $t - t_g$: il grafico semilogaritmico nel riquadro mostra la funzione di correlazione che decade esponenzialmente con costante di tempo τ_r e che cresce col tempo t [11].	36
3.1	Simulazione mediante COMSOL di una sospensione colloidale di particelle di PMMA di $1\mu m$ di diametro in acqua, in una cella di $2cm$ di altezza e $1cm$ di larghezza. È stata posta una differenza di temperatura orizzontale di $0.2K$. In scala di colore viene rappresentata il modulo del campo di velocità della miscela.	47
3.2	Apparato di Heterodyne Speckle Velocimetry. A: sorgente laser; B: filtro neutro; C: Filtraggio spaziale; D: lente collimatrice; E: campione; F: lente di raccolta; G: iride; H: videocamera.	50
3.3	In alto: immagine acquisita col setup HSV, di un campione di particelle di PMMA da $1\mu m$ di diametro. In basso: campo speckle ottenuto mediante differenze tra immagini.	53
3.4	(a): funzione di autocorrelazione del campo speckle ottenuto per differenza di immagini a distanza $\tau = 140s$. I punti neri rappresentano i termini di cross correlazione. (b): sezione lungo i picchi di cross correlazione dell'immagine (a), in cui si nota il picco di correlazione e uno spostamento di $\sim 8\mu m$ cui corrisponde una velocità $0.057\mu m/s$	54
3.5	Spettro di potenza di un campione di particelle colloidali di PMMA da $1\mu m$ di diametro ottenuto per differenza tra immagini.	55
3.6	Particelle da $600nm$ di diametro. In questa acquisizione è presenta anche un pattern circolare d'interferenza che rovina la misura.	56
3.7	HSV con sorgente parzialmente coerente. A partire da sinistra: camera Orca Flash V4.0, sistema telescopico, campione, sorgente luminosa LED.	59
3.8	A sinistra: cella con particelle di PMMA da $600nm$ di diametro, in soluzione acquosa, a $\Phi = 10^{-3}$. A destra: Campo speckle ottenuto per differenza di immagini	60
3.9	Campo di velocità per un campione di particelle di PMMA $600nm$ in diametro e $\Phi = 10^{-3}$, nei primi istanti di sedimentazione. Si nota la presenza di due roll convettivi.	62

3.10	In alto: Profilo di sedimentazione per un campione di PMMA da $600nm$ di diametro con $\Phi = 10^{-3}$. Il grafico mostra l'andamento del profilo di sedimentazione a tempi: $0.3h$, $14h$, $28h$, $42h$, $56h$. In basso le immagini del campione relative ai tempi: $0.3h$, $28h$, $56h$	64
3.11	Velocità del fronte di sedimentazione per una sospensione di particelle di PMMA da $600nm$ di diametro a $\Phi = 10^{-3}$. Il fronte mostra una velocità di $0.0341\mu m/s$ compatibile alla velocità di Stokes stimata $\sim 0.037\mu m/s$	65
4.1	Main: immagine al microscopio ottico degli aggregati di nanoparticelle di carbonato di calcio. Nell'inset viene riportato un ingrandimento effettuato tramite TEM, di singole particelle e aggregati. Le dimensioni variano da $43nm$ a $123nm$	68
4.2	Indice di correlazione $c_I(\tau, t, z_0)$ per una ROI $0,8mm \times 5,41mm$ posta a $4,1mm$ dalla membrana dialitica per un gel $25mM$ in $CaCl_2$ a ritardi $\tau=20s$, $100s$, $600s$	73
4.3	Indice di correlazione per diverse ROI ($5.4mm \times 0.8mm$) a ritardi τ : $20s$ in alto, $100s$ nel mezzo, $600s$ in basso. Si nota, dal grafico in alto, che all'avvicinarsi del fondo della cella l'indice di correlazione assume una forma diversa nella crescita. Inoltre, vi è un meccanismo di gelazione a due step, evidenziato nel grafico in mezzo e in basso.	74
4.4	Tempo di gelazione t_g in funzione della posizione z , con un fit $t_g = z^2/4D$, dove il coefficiente di diffusione $D \simeq 0.57 \times 10^{-5}cm^2/s$	75
4.5	Funzione di correlazione $g_2(\tau)$ (punti) di un gel $25mM$ in $CaCl_2$ a tempi di ageing: $5h$, $11h$, $16h$, $22h$, $27h$, $33h$ e fitting tramite eq.4.5 (linea continua).	76
4.6	Indice di correlazione per diverse ROI ($0.8mm \times 5.41mm$), a partire da $z_0 = 3mm$. In alto: correlazione a ritardo $\tau=20s$; al centro: ritardo $\tau=100s$; in basso: ritardo $\tau=600s$	77
4.7	Funzione di correlazione $g_2(\tau)$ di un gel $50mM$ in $CaCl_2$ a diversi tempi di ageing. Fit con l'eq.4.5 e mostrano un meccanismo a due step.	78

4.8	Indice di correlazione per un gel 50mM con NaCl a ritardo $\tau=2s$ per una ROI $0.8mm \times 5.41mm$. A $t_A \sim 18h$ si vede una mappa di correlazione per l'intera cella, in cui è netta la separazione tra regione gel (in rosso) e pectina (in blu). Dopo 2 secondi si nota che la correlazione muta radicalmente, a causa di un burst di decorrelazione. Dopo 4 secondi la c_I ritorna ai valori iniziali. Lo stesso comportamento si ritrova in B, per un tempo $t_B \sim 40h$	79
4.9	Indice di correlazione per una ROI posta a 5.41 mm dalla membrana ($0.8mm \times 5.41mm$), per un gel 25mM in $CaCl_2$ in assenza di NaCl. Si nota che la cinetica a doppio step è visibile già su un ritardo $\tau=20s$	80
4.10	Indice di correlazione per sezioni di gel da $0.8mm \times 5.41mm$ per un gel 25mM in $CaCl_2$ in assenza di NaCl. In alto: ritardo $\tau=20s$; in mezzo: $\tau=100s$; in basso: $\tau=600s$	81
4.11	Confronto degli indici di correlazione tra gel a 25mM con NaCl e senza NaCl, sopra a ritardo $\tau=10s$, sotto: $\tau=20s$	82
4.12	Confronto delle funzioni $g_2(\tau)$ tra gel 25mM con NaCl (punti pieni) e senza NaCl (punti vuoti). Per 16h il gel senza NaCl una $g_2(\tau)$ più bassa rispetto ai gel con NaCl. A 33h dall'inizio della gelazione la situazione è invertita e i gel a 25mM senza NaCl presentano un valore di correlazione maggiore rispetto a quelli con NaCl.	83
4.13	Indice di correlazione per una ROI ($0.8mm \times 5.41mm$) a 4.59mm dalla membrana per un gel 50mM senza NaCl, a ritardi τ : 2s, 20s, 100s, 600s.	84
4.14	In alto: mappa di correlazione dopo un tempo $t_A \sim 20h$ dall'inizio del processo di gelazione per un gel 50mM senza NaCl con $\Delta t = 2s$; in basso: mappa di correlazione per il medesimo gel a $t_B \sim 40h$ dall'inizio del processo, con $\Delta t = 2s$	85
4.15	Confronto tra gli indici di correlazione di gel a 50mM con e senza NaCl e la situazione dei gel al momento del primo evento di decorrelazione. In A: mappe di correlazione a $t_A \sim 10h$, in concomitanza con il primo evento di spike, per un gel 50mM con NaCl. In B: mappe di correlazione di un gel 50mM senza NaCl a $t_B \sim 20h$, tempo in cui si ha il primo spike di decorrelazione	86

4.16	Confronto della $g_2(\tau) - 1$ per gel $50mM$ con NaCl (punti pieni) e senza NaCl (punti vuoti). Per tempi di ageing inferiori a $16h$ i gel senza cloruro di sodio hanno un valore di correlazione in modulo molto più basso di quelli con NaCl. Al crescere del tempo d'invecchiamento del gel la dinamica diventa sempre più arrestata, arrivando a $33h$ dall'inizio della gelazione in cui i due sistemi hanno circa gli stessi valori di correlazione. . . .	87
4.17	(a) Mappa di correlazione per un gel $25mM$ dopo $40h$ dall'inizio del processo di gelazione. Si notano tre distinte regioni: T gel completamente arrestato, M zona intermedia con una struttura parzialmente correlata, B soluzione pectinica, dove la gelazione non è avvenuta. In (b) si riporta il rispettivo indice di correlazione $c_I(\tau = 600s, 40h, z)$ mediato lungo l'asse della cella. In (c) grafico del modulo della viscosità complessa, $ \eta^* $, in funzione della frequenza di shear f , per i campioni estratti dalle regioni T, M e B, confrontati con la legge di potenza $ \eta^* = Af^{-0.9}$ (riga tratteggiata).	88
4.18	Modulo della viscosità complessa per gel $6.25mM$ (punti pieni) e $12.5mM$ (punti vuoti). I gel a minor concentrazione presentano dopo 5 minuti di gelazione un comportamento simile a liquidi altamente viscosi. Per i gel $12.5mM$, al contrario, già dai primi minuti di gelazione il comportamento è di tipo solido.	89
4.19	Indice di correlazione $c_I(\tau, t, z_0)$ per una ROI di $1.3mm \times 1.3mm$ di un gel $6.25mM$, per ritardi $\tau = 2s, 20s, 200s, 600s$. . .	91
4.20	Mappe di correlazione per un gel $6.25mM$ di $CaCO_3$ a ritardi $\tau = 1000s$. Si noti come la gelazione, in questo caso, sia un processo disomogeneo, arrivando a $20h$ con zone non ancora arrestate totalmente.	92
4.21	Funzione di correlazione $g_2(\tau) - 1$ di diverse ROI di $2.7mm \times 2.7mm$ per un gel $6.25mM$, a un tempo di ageing di $10h$. La $g_2(\tau)$ cambia sensibilmente e le costanti di tempo, al variare delle ROI, evidenziano una notevole disomogeneità spaziale del gel.	93
4.22	Rapporto tra deviazione standard dell'indice di correlazione, σ_{c_I} , e indice di correlazione, a un ritardo $\tau = 1000s$, per una ROI di $8.11mm \times 5.41mm$ di un gel $6.25mM$	94
4.23	Indice di correlazione $c_I(\tau, t, z)$ per un gel $12.5mM$ in $CaCO_3$ a ritardi $\tau = 2s, 20s, 200s, 600s$	95

4.24	Rapporto tra deviazione standard dell'indice di correlazione, σ_{c_I} , e indice di correlazione, a un ritardo $\tau = 1000s$, per una ROI di $8.11mm \times 5.41mm$ di un gel $12.5mM$. Con A-F si rappresentano le mappe di correlazione per il gel, corrispondenti ai tempi di ageing indicati sulla curva.	96
4.25	Funzione di correlazione $g_2(\tau)$ valutata per varie ROI e relativa mappa di correlazione.	97
4.26	Indice di correlazione $c_I(\tau, t, z)$ per un gel $25mM$ in $CaCO_3$ a ritardi $\tau = 2s, 20s, 200s$ e $600s$	98
4.27	Mappe di correlazione per un gel $25mM$. Tra $5h-6h$ avviene il primo evento di decorrelazione, che lascia traccia negli istanti successivi. A $15h$ vi è un secondo evento, quindi la gelazione riprende arrivando a correlazione $\langle c_I \rangle \sim 0.8$ a $23h$	99
4.28	Rapporto tra deviazione standard dell'indice di correlazione, σ_{c_I} , e indice di correlazione, a un ritardo $\tau = 1000s$, per una ROI di $8.11mm \times 5,41mm$ di un gel $25mM$	100
4.29	Funzione di correlazione $g_2(\tau)$ ed un tempo di ageing di $10h$ per un gel $25mM$ calcolato su diverse ROI ($8.11mm \times 5.41mm$)	101
4.30	Modulo della viscosità complessa $\eta^*(f)$ in funzione della frequenza f dello shear applicato. Dopo 5 minuti dall'inizio della gelazione si presenta come un liquido ad altissima viscosità. Col passare del tempo di ageing il campione cambia struttura, aumentando la rigidità, con $\alpha \simeq 1$	102
4.31	A sinistra: modulo della viscosità complessa per un gel a concentrazione $12.5mM$ di $CaCO_3$; a destra: andamento dell'ampiezza A per un gel $12.5mM$	103

Elenco delle tabelle

2.1	Valori conformazionali nei minimi d'energia A e B	28
2.2	M_w e M_n della pectina a differenti pH.	31
3.1	Dati tecnici della sorgente laser.	50
3.2	Dati tecnici telecamera Optikam Pro5.	52
3.3	Dati tecnici telecamera Orca Flash V4.0	58
4.1	Dati tecnici telecamera PikeF032.	71

Sommario

Questa Tesi è uno studio sperimentale su sistemi colloidali per applicazioni biomediche, mediante nuove tecniche di correlazione ottica, svolto sotto la guida del Prof. Roberto Piazza nel Soft Matter Lab del Dipartimento di Chimica, Materiali, e Ingegneria Chimica. La prima parte del mio lavoro è dedicata allo sviluppo di una nuova tecnica per velocimetria e la sua applicazione sulla sedimentazione di particelle colloidali Browniane. Questa tecnica di correlazione ottica permette di misurare il moto di sedimentazione delle particelle, anche se la loro dimensione è troppo piccola per poter essere otticamente risolta, permettendo allo stesso tempo di calcolare la velocità locale di sedimentazione su un ampio field of view. Nella seconda parte del lavoro, eseguito in collaborazione con Prof. Paola Petrini del BioMAT Lab, una recente tecnica di scattering, la Photon Correlation Imaging [6], è stata utilizzata per l'indagine su gel di Pectina d'interesse biomedico. Il meccanismo di gelazione della Pectina è stato confrontato a quello di un biopolimero simile, l'Alginato, sul quale è stato condotto un recente lavoro [11] con tecniche simili.

Sedimentazione di particelle Browniane

Nella prima parte di questo lavoro è stata sviluppata una nuova tecnica di correlazione ottica, che permette il calcolo della velocità locale all'interno di una sospensione di particelle colloidali. Questa tecnica può essere applicata per l'indagine di numerosi processi d'interesse fisico: in particolare, in questa tesi, è stata testata la sua applicabilità al problema della sedimentazione di particelle Browniane, ovvero particelle che sedimentano molto lentamente sotto l'effetto del loro stesso peso, concentrandosi sul fondo della cella. Molti aspetti della sedimentazione di particelle Browniane sono ancora dibattuti, ad esempio le interazioni idrodinamiche tra le particelle (cioè l'effetto sul moto di una singola particella da parte del flusso generato dalle altre). Queste interazioni danno origine a enormi fluttuazioni di velocità, le quali, sebbene

teoricamente delineate e osservate sperimentalmente, non sono ancora state completamente capite [35–37, 42].

Per confrontare l’influenza della gravità sulla sedimentazione rispetto alla diffusione Browniana, è conveniente introdurre un numero adimensionale, il numero di Peclét, $Pe = l_g/D$ dove $l_g = k_B T/mg$ è la lunghezza gravitazionale, data dal rapporto tra l’energia termica della particella e il peso (galleggiante), e D è il coefficiente di diffusione della particella stessa. Nei sistemi Browniani il moto termico domina sulla sedimentazione per gravità, dunque si ha $Pe \ll 1$. Sebbene tali sistemi siano stati indagati tramite simulazioni numeriche [46–48], vi è una quasi totale assenza di studi sperimentali a riguardo [45]. Infatti, siccome la dimensione delle particelle è tipicamente minore di $1\mu m$, le tecniche tradizionali di velocimetria devono raggiungere un compromesso tra la necessità di avere un’alta risoluzione ottica, per seguire le particelle, e un ampio field of view, necessario perché si prevede che le scale di lunghezza su cui si manifestano le fluttuazioni di velocità siano parecchi ordini di grandezza maggiori rispetto alle dimensioni delle particelle.

Per superare queste richieste contrastanti, in questo lavoro è stato progettato e testato un nuovo setup ottico, che prende ispirazione da una tecnica recentemente introdotta, l’Heterodyne Speckle Velocimetry (HSV) [27]. Nell’HSV una radiazione coerente illumina il campione, da qui il campo diffuso è acquisito a bassi angoli tramite un array due-dimensionale di pixel CCD o CMOS. Spazialmente, l’intensità diffusa è caratterizzata da un pattern random di “speckles” che fluttuano e, quando il campione presenta moti interni, queste si spostano nel tempo. L’HSV recupera le informazioni sugli spostamenti delle particelle, correlando spazialmente il pattern speckle, generato dalle particelle che si muovono nel tempo, così da rappresentare, con un grande field of view, l’intero campo di velocità all’interno del campione, anche se le dimensioni delle particelle diffondenti sono di molto al di sotto della risoluzione ottica del sistema. A causa della coerenza della sorgente luminosa questa tecnica è affetta da problemi di stray light, introdotti da riflessioni multiple tra le ottiche. L’utilizzo di un laser, tuttavia, non è strettamente necessario. Infatti, si è dimostrato che ciò che realmente bisogna avere è soltanto una sorgente con sufficiente coerenza spaziale (idealmente una sorgente puntiforme). Quindi, per illuminare il campione, si è scelto di utilizzare una sorgente LED ad alta potenza, la cui estensione spaziale è limitata da un diaframma: con una tale sorgente, il campo speckle generato dalle particelle diffondenti è ancora visibile, e il pattern di velocità si può ricostruire utilizzando un software sviluppato durante questa tesi.

Gli esperimenti sono stati eseguiti su sospensioni di particelle di polimetilmetacrilato (PMMA), con una dimensione che varia da $600nm$ a $1\mu m$, e di MFA, un copolimero di politetrafluoroetilene, con diametro di $180nm$. Le

volume fraction Φ per le particelle di PMMA variano da $7 \times 10^{-5} \leq \Phi \leq 10^{-3}$, mentre per i polimeri fluorinati MFA vanno da $10^{-3} \leq \Phi \leq 0.1$.

In Fig.1 si mostra un esempio di un complesso campo di velocità di particelle in sedimentazione, caratterizzato dalla presenza di roll convettivi, ottenuti per particelle di PMMA con dimensioni di $1\mu m$. Sebbene l'analisi del pattern porta a una velocità di sedimentazione media consistente con quella predetta dalla formula di Stokes, e nonostante l'intera popolazione di particelle sedimenti, la presenza di questi roll convettivi è evidente. Questi effetti sono totalmente indipendenti dalle interazioni idrodinamiche delle particelle, e sono imputabili a piccoli gradienti di temperatura che, sebbene la cella fosse immersa in un bagno termico, sono persistenti per tutta la durata della misura. La costruzione di un apparato molto più sofisticato per il controllo termico della cella va oltre gli scopi di questo lavoro, ciononostante, i risultati preliminari ottenuti dimostrano che la tecnica è adatta all'indagine di fluttuazioni di velocità per particelle in sedimentazione con $Pe \ll 1$.

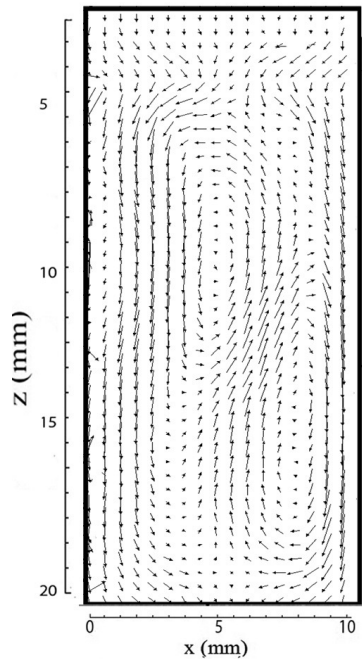


Figura 1: Campo di velocità di sedimentazione per particelle di PMMA con diametro di $1\mu m$ in una cella di larghezza/profondità $1cm$ e altezza $2cm$.

Pectina

La Pectina è un complesso biopolimero, costituito da più di 20 monosaccaridi, ampiamente presente in natura come componente principale della parete cellulare delle piante e abbondantemente usata nell'industria alimentare e biomedica. In presenza di elettroliti multivalenti, la Pectina forma dei gel biocompatibili, che hanno trovato interessanti applicazioni nell'ingegneria dei tessuti, nel drug e gene delivery. [17,60]. Sebbene le proprietà meccaniche macroscopiche di questi gel siano stati estensivamente studiate, le loro dinamiche microscopiche sono ancora scarsamente conosciute. Cospicuo il meccanismo di gelazione della Pectina è ancora dibattuto e molti sono i modelli proposti a riguardo. Il meccanismo più accreditato è basato sul modello "egg box", che, tuttavia, sembra in contrasto con le simulazioni molecolari [61,62], le quali suggeriscono un meccanismo "shifted egg box", che permette disposizioni più efficienti per i legami idrogeno e per le associazioni di tipo Van Der Waals per mezzo di una traslazione tra una catena e l'altra. Nella seconda parte della mia tesi, ho studiato i gel di Pectina ottenuti da due distinte strategie di gelazione: *gelazione esterna*, dove la diffusione di elettroliti divalenti, da un reservoir esterno, nella soluzione pectinica attivano la formazione del gel, e *gelazione interna*, dove gli elettroliti, sotto forma di nanoparticelle, sono mischiati assieme alla soluzione di Pectina e la loro dissoluzione permette la gelazione.

Sebbene le proprietà macroscopiche di questi gel siano state ricavate con misure tradizionali di reologia, le loro dinamiche microscopiche sono indagate tramite una nuova e potente tecnica di correlazione ottica, chiamata Photon Correlation Imaging (PCI) [6]. La misura simultanea della funzione di correlazione dell'intensità diffusa da molte speckle, permette a questa tecnica di indagare su strutture quasi arrestate come gel e vetri, sorpassando il problema della non ergodicità (ovvero la media temporale non coincide con la media d'ensemble) che affligge i tradizionali esperimenti di Dynamic Light Scattering (DLS). Il campione viene illuminato da una sottile lama di luce laser, e il volume diffondente, visto ad un angolo di 90° rispetto al raggio incidente, viene ripreso su un sensore multi-pixel attraverso una lente resa "stopped-down" mediante un diaframma nel suo fuoco. Oltre a definire la direzione di scattering, la presenza di un diaframma ha il ruolo cruciale di generare un'immagine "speckled". Similmente a quanto visto nel caso dell'HSV, le dinamiche temporali di questo campo speckle portano informazioni sia sulla dinamica Browniana microscopica sia, attraverso lo spostamento collettivo, sugli eventi di ristrutturazione presenti su larga scala. Utilizzando questa configurazione è quindi possibile realizzare un esperimento di DLS preservando, tuttavia, la risoluzione spaziale come in un sistema di imaging. In

particolare, le informazioni riguardo ai riarrangiamenti strutturali del campione possono essere ricavate dalle correlazioni del campo speckle, descritte dall'indice di correlazione $c_I(\tau, t, \mathbf{r})$, che misura la correlazione dell'intensità diffusa, in funzione di un ritardo τ , per una specifico tempo di ageing del gel t , che per gel spazialmente eterogenei dipende anche dalla posizione \mathbf{r} :

$$c_I(\tau, t, \mathbf{r}) = \frac{\langle I_p(t)I_p(t + \tau) \rangle_{\mathbf{r}}}{\langle I_p(t) \rangle_{\mathbf{r}} \langle I_p(t + \tau) \rangle_{\mathbf{r}}} \quad (1)$$

dove I_p è l'intensità diffusa misurata dal p -esimo pixel e $\langle \dots \rangle_{\mathbf{r}}$ indica la media su tutti i pixel presenti all'interno di una regione centrata attorno a \mathbf{r} . La media temporale di questa funzione:

$$\langle c_I(\tau, t, \mathbf{r}) \rangle_{\delta t} = g_2(\tau) - 1 \quad (2)$$

dà la funzione di correlazione $g_2(\tau) - 1$, usualmente calcolata negli esperimenti di DLS.

I risultati ottenuti per le dinamiche microscopiche sono stati confrontati con test di reologia, eseguiti al BioMAT Lab, utilizzando un reometro a geometria cono troncato-piatto. Sia lo storage (G') che il loss (G'') moduli dei gel sono stati misurati a sforzo costante $\sigma = 2Pa$, variando la frequenza di oscillazione in un range $0.2 - 10Hz$. Per deformazioni di piccola ampiezza, il sistema si trova nel cosiddetto regime di viscoelasticità lineare, che è caratterizzato da una debole dipendenza dalla frequenza di $G'(f)$ e $G''(f)$. In questo regime l'evoluzione reologica del gel può essere seguita misurando l'ampiezza della viscosità complessa:

$$|\eta^*| = |\eta' - i\eta''| = \frac{\sqrt{(G'^2 + G''^2)}}{f} \quad (3)$$

Gelazione esterna

Per i campioni a gelazione esterna si è partiti da una soluzione di Pectina all'1%(w/v), costituita da 9.5 mM NaHCO₃ e 70mM di NaCl, versata con cura in una cuvette ottica. Quindi, le soluzioni di calcio, preparate per ottenere una concentrazione finale nel gel a 25mM e 50mM di CaCl₂, sono state attentamente riversate in un reservoir separato dalla soluzione di Pectina da una membrana dialitica.

In tutti gli esperimenti di gelazione esterna, è stata trovata una peculiare cinetica di gelazione a due step, evidenziata da un doppio plateau dell'indice di correlazione $c_I(\tau, t, z)$ nel tempo, Fig.2. Sebbene il primo plateau, che avviene nei primi istanti del processo, è testimone di un iniziale rallentamento,

è solo dopo il secondo, che si manifesta su tempi più lunghi, che l'indice c_I raggiunge un valore molto vicino a 1, che è segno di un completo arresto della cinetica della struttura. Inoltre, la funzione di correlazione dell'intensità diffusa, $g_2(\tau)$, mostra un doppio decadimento esponenziale:

$$g_2(\tau) - 1 = ae^{-\tau/\tau_s} + (1 - a)e^{-\tau/\tau_l} \quad (4)$$

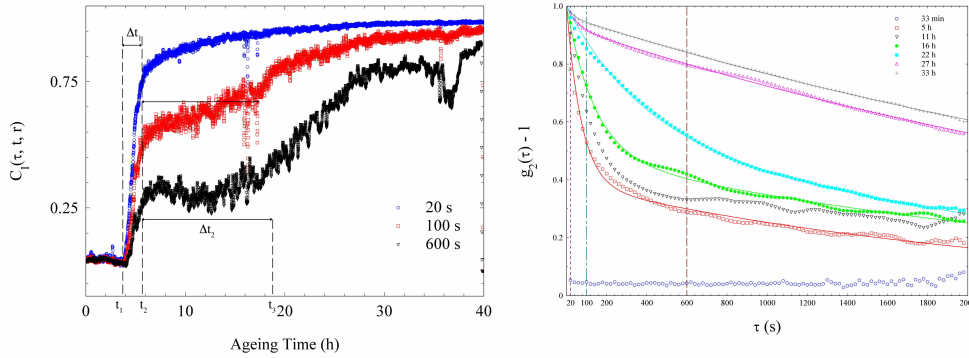


Figure 2: Indice di correlazione $c_I(\tau, t, \mathbf{r})$ per un gel $25mM$ con NaCl, con $\tau = 20s, 100s, 600s$, e la sua corrispondente funzione di correlazione $g_2(\tau) - 1$, presa a un ageing time variabile tra 0.5 e 33 ore.

Nei gel $25mM$ di $CaCl_2$ con NaCl si ritrovano entrambi i plateau, in particolare per tempi di ageing inferiori a 1 giorno si calcolano $\tau_s \sim 120s$ e $\tau_l \sim 2500s$, mentre per tempi di ageing più lunghi la funzione $g_2(\tau)$ può essere fittata da un singolo esponenziale con $\tau_l \sim 3000s$. In assenza di NaCl, i tempi di rilassamento sono più veloci con $\tau_s \sim 27s$ e $\tau_l \sim 670s$ per bassi tempi di ageing, mentre si ha $\tau_l \sim 2500s$ per alti tempi lunghi, mostrando che gli eventi di riarrangiamento sono molto più forti quando le interazioni elettrostatiche non sono schermate dall'aggiunta di sale. I gel preparati con $50mM$ di $CaCl_2$ mostrano un ulteriore interessante comportamento, ossia, la presenza di veloci “burst di decorrelazione”, che portano a cadute dell'indice c_I in tempi molto più corti rispetto a quelli di acquisizione della camera ($2s$). In particolare, questi eventi di decorrelazione sembrano cominciare a bassi tempi di ageing ($9 - 10h$) per i gel con NaCl rispetto a quelli senza NaCl, in cui fanno comparsa solo quando il fronte di gelazione ha diffuso per i $2/3$ della cella.

I tests reologici, eseguiti solo per i gel $25mM$ con NaCl, suggeriscono una diretta relazione tra l'indice di correlazione e la rigidità macroscopica della struttura. Come mostrato in Fig.3, 40 ore dopo la gelazione, il gel può essere suddiviso in tre regioni, che differiscono in indice di correlazione c_I . A partire da una distanza di $7mm$ dalla membrana, c_I si attesta a un valore vicino a

1, anche dopo un ritardo $\tau = 10min$, il che significa che il gel è una struttura completamente arrestata (regione T, $c_I \simeq 1$). A questa regione ne segue una intermedia (regione M) dove $c_I \simeq 0.5$, che si unisce a una regione vicino al fondo della cella, dove il gel è ancora prevalentemente un liquido (regione B). Sono stati estratti con una spatola dei campioni da queste tre regioni e si è misurato il modulo della viscosità complessa. In tutte e tre le regioni la dipendenza dalla frequenza è ben fittata da una legge di potenza:

$$|\eta^*| = Af^{-\alpha} \quad (5)$$

con $\alpha \simeq 0.9$, che rappresenta un comportamento che spesso è riportato per strutture solide [65] (per un solido ideale, dove la viscosità complessa è completamente dominata da un modulo elastico G' indipendente dalla frequenza, si troverebbe $\alpha = 1$). Tuttavia, l'ampiezza A mostra una drastica diminuzione di più di due ordini di grandezza muovendosi dalla regione T alla regione B.

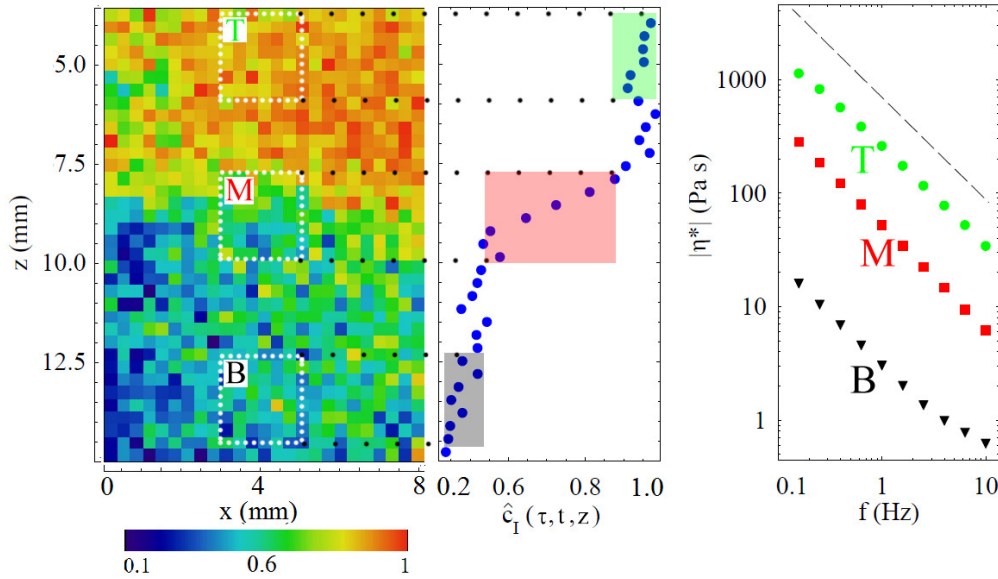


Figure 3: (a) Mappa di correlazione per un gel 25mM a 40h dall'inizio del processo di gelazione. Le tre regioni evidenziate corrispondono a: una struttura completamente arrestata (T), una parzialmente arrestata (M), e una soluzione di pectina dove la gelazione non è ancora avvenuta (B). La dipendenza dell'indice di correlazione c_I dalla posizione z lungo la cella per un ritardo $\tau = 600s$ Correlation map for a 25 mM gel è mostrata in (b). In (c) il modulo della viscosità complessa $|\eta^*|$ (Pa·s) è rappresentato in funzione della frequenza di shear f (Hz), per campioni estratti dalle regioni T, M, B. Le curve sono poste a confronto con la legge di potenza $|\eta^*|=Af^{-0.9}$ (linea tratteggiata)

Gelazione interna

Diamo una breve descrizione degli esperimenti di gelazione interna, che sono ancora a uno stage preliminare. L'idea di base è fornire ioni divalenti per mezzo di nanoparticelle di carbonato di calcio, che progressivamente si dissolvono in un ambiente debolmente acido, quale la soluzione di Pectina. Questa strategia è già stata sfruttata con particelle colloidali di qualche micrometro, tuttavia la loro dissoluzione è generalmente molto lenta. Invece, le particelle qui utilizzate sono dell'ordine di decine di nanometri: nonostante in acqua si aggregino, la struttura che formano è molto aperta, frattale, caratterizzata da un'enorme interfaccia col solvente che garantisce un più veloce afflusso di ioni. Per eseguire questi esperimenti di gelazione interna, una sospensione di queste nanoparticelle è stata mischiata con cura con una soluzione all'1.2% di Pectina, in presenza di 9.5 mM NaHCO_3 e 70mM NaCl , così da ottenere una concentrazione finale di ioni calcio che va da 6.25 a 25mM.

La peculiare cinetica osservata nella gelazione esterna si rispecchia, in questo caso, in eventi di ricostruzione, che sono osservati per tutti i campioni indagati. Tuttavia, la deviazione standard dell'indice di correlazione è consistentemente più alta rispetto al caso della gelazione esterna: questo è probabilmente una conseguenza dell'intrinseca eterogeneità della sorgente di ioni calcio, poiché vi è maggior concentrazione nelle regioni attorno alle nanoparticelle in dissoluzione. I gel di Pectina ottenuti tramite gelazione interna sono quindi sostanzialmente meno omogenei di quelli a gelazione esterna. Inoltre, per concentrazioni di calcio di 12.5 e 25mM vi sono rapidi eventi di decorrelazione, che compaiono a circa 5 e 15h dopo la preparazione del campione, e influenzano fortemente la struttura. Il fatto che la gelazione interna non proceda progressivamente col tempo è una caratteristica confermata anche da misure reologiche. A brevi tempi dall'inizio della gelazione il modulo della viscosità complessa mostra un andamento a legge di potenza con dipendenza dalla frequenza, con l'esponente α che è di poco più piccolo di 1. Con l'aumentare dell'ageing, l'ampiezza A cresce, ma non costantemente nel tempo: dopo una rapida ascesa, di durata 10-15 minuti, il valore non va oltre se non dopo 10h più tardi. Questo comportamento può essere spiegato dal fatto che il numero di cross link disponibili è già saturato e solo gli eventi di riarrangiamento possono rendere più rigido il gel.

Conclusioni

Il principale scopo di questa tesi è stato mostrare che l'applicazione di avanzate tecniche di correlazione ottica, che combinano scattering e imaging,

permette di ottenere nuove informazioni su parecchi importanti fenomeni che interessano la scienza dei colloidi e la soft matter. Per esempio, nel caso della sedimentazione di particelle Browniane, caratterizzata da bassi numeri di Peclet e troppo piccole per poter essere risolte, è stato visto che un riadattamento dell'HSV a livello della sorgente luminosa, permette di ricostruire completamente il pattern di velocità locale indotto dalle particelle in sedimentazione su un ampio field of view. Gli esperimenti evidenziano che la macroscopica "calma" di sedimentazione della sospensione, che va con una velocità media di Stokes, in realtà può originarsi da un complesso moto convettivo microscopico. Sebbene questi effetti convettivi siano da attribuire a piccole disomogeneità termiche piuttosto che alle fluttuazioni di velocità predette dalla teoria, la tecnica mostra che è possibile effettuare una misura di velocimetria molto accurata per questi sistemi, cosa che prima era assolutamente difficile da immaginare. Questa tecnica, inoltre, può essere indirizzata a problemi di interesse biomedico, come ad esempio la microfluidica.

La parte principale di questa tesi è stata dedicata allo studio del meccanismo di gelazione della Pectina, un biopolimero di interesse biomedicale e alimentare. La caratterizzazione dei processi di gelazione in questi sistemi è generalmente svolta con metodi reologici macroscopici, possibilmente accoppiati a studi di microscopia elettronica o scattering di raggi X o neutroni per l'indagine microscopica. Qui, abbiamo mostrato che l'indagine sulle dinamiche microscopiche Browniane del sistema, seguite nel corso della gelazione, forniscono importanti informazioni che possono combinate con le proprietà meccaniche macroscopiche del gel e, per di più, è possibile evidenziare eterogeneità dinamiche microscopiche ed eventi di riarrangiamento che non erano mai stati visti prima. Questi risultati sono stati ottenuti con la PCI, una nuova tecnica che combina la potenza del light scattering con la microscopia. In particolare, sono stati indagati e comparati due differenti meccanismi di gelazione, basati l'uno sulla perfusione esterna di ioni divalenti, l'altro sfruttando la dissoluzione di nanoparticelle colloidali disperse in soluzione di Pectina. È stato trovato che la gelazione della pectina procede con due meccanismi distinti, caratterizzati da differenti costanti di tempo. Il primo meccanismo è attivo solo nei primi istanti della gelazione, il secondo è sempre presente e prosegue fino a tempi di ageing molto lunghi. I risultati ottenuti da misure reologiche macroscopiche dimostrano questo quadro. Inoltre, è possibile redigere un confronto con i risultati ottenuti per la gelazione di un altro bio polimero, l'Alginato, recentemente studiato con tecniche simili [11]. I risultati dedotti suggeriscono che, nonostante la struttura dei due gel polimerici sia simile, i loro processi di gelazione e le dinamiche microscopiche possono essere piuttosto differenti. In particolare, mentre i gel di Alginato non mostrano un completo arresto delle dinamiche microscopiche (in realtà

sono dei “creeping gels” [11]), i gel di Pectina mostrano dinamiche microscopiche più lente che si confondono con la cinetica dell’ageing, e arrivano a una struttura completamente arrestata, ossia a un comportamento simile ad un “vero” materiale solido. Inoltre, a differenza dei gels di Alginato, dove dei veloci “burst di decorrelazione” sono le cause di creeping macroscopico sul lungo tempo, nel caso della pectina questi bursts sono osservati solo per alte concentrazioni di agente gelante, indipendentemente dalla presenza di NaCl. Una possibile spiegazione delle differenze è che la gelazione dell’Alginato porta ad un accumulo di una grande quantità di sforzi che progressivamente si rilassano, a differenza della Pectina che mostra un comportamento molto più “plastico”. Ulteriore lavoro è necessario per una completa valutazione di tutti i risultati.

Summary

The subject of this Master Thesis is an experimental study on colloidal systems for biomedical application using novel optical correlation techniques, carried out under the direction of Prof. Roberto Piazza in the Soft Matter Lab of the Chemistry, Material Science, and Chemical Engineering Department. The first part of my work has been devoted to the development of a new technique for velocimetry and to its application to the investigation of the sedimentation of Brownian colloidal particles. This optical correlation method allows to measure the settling motion of the particles even if the size of the latter is far too small to be optically resolved, allowing to map, at the same time, the local sedimentation velocity over a wide field. In the second part of the work, made in collaboration with Prof. Paola Petrini of the BioMAT Lab, a recently introduced scattering technique, Photon Correlation Imaging [6], has been used to investigate Pectin gels of interest for biomedical applications. The gelation mechanism of Pectin has been compared to the that of Alginate, a related biopolymer gels investigated in a recent work with the same technique [11].

Sedimentation of Brownian particles

In the first part of this work we have developed a new optical technique suitable to map the local velocity field within a suspension of colloidal particles that scatter light. This technique can be applied to investigate a large number of interesting physical effects: specifically, we tested its applicability to the problem of sedimentation of Brownian particles, namely, particles that slowly settle under the effect of their own weight concentrating to the bottom of the container. Many aspects of Brownian particle settling are still debated. In particular, the hydrodynamic interactions between the particles (namely, the effect on the motion of a given particle of the hydrodynamic flow generated by the other ones) give rise to huge velocity fluctuations, that, although theoretically predicted and experimentally observed, are not completely understood yet [35–37, 42].

To compare the relative strength of gravity-induced settling to Brownian diffusion, it is convenient to introduce the dimensionless Peclet number $Pe = l_g/D$ where $l_g = k_B T/mg$ is the gravitational length, given by the ratio of the thermal energy to the particle (buoyant) weight, and D is its diffusion coefficient. Hence, those systems where thermal motion is dominant over gravity settling have $Pe \ll 1$. We have specifically been interested in these “Brownian” systems, which so far have mostly been investigated by numerical simulation [46–48], whereas experimental studies are still lacking [45]. Since the size of the settling particles is typically less than $1 \mu\text{m}$, traditional velocimetry techniques have to compromise between the need of high resolution, to track the particles, and to obtain a wide field of view, which is required because the length scales of velocity fluctuations are expected to be order of magnitudes larger than the particles size.

To overcome these conflicting requirements, a novel optical setup, inspired by a recently developed technique, Heterodyne Speckle Velocimetry (HSV) [27], has been designed and tested in this work. In a HSV setup, a coherent radiation illuminates the sample to be studied and the field scattered by the sample at very small angles is recorded by the two-dimensional pixel array of a CCD or CMOS camera. Spatially, the scattered intensity is characterized by a random pattern of “speckles” that fluctuates and, when the sample displays internal motion, it displaces in time: HSV retrieves information about particles displacements from the spatial correlation of the speckle patterns, generated by the moving particles at different time, allowing to map, with a large field of view, the full velocity field within the sample even when the scattering particles have a size well below the resolution of the optical system. Due to the coherent nature of the illuminating source this technique is affected by problems of stray light, introduced by multiple reflection in the optical system. Using a laser is however not a strict requirement: conversely, spurious interference effects may actually limit the effectiveness of temporally coherent (monochromatic) sources. As a matter of fact, what one really needs is just a source with a sufficient *spatial* coherence (namely, with a small spatial size, ideally a point-like source). We then choose to illuminate the sample with a simple high-power LED, whose spatial extent is simply limited by a small diaphragm: with such a source, the speckle field generated by the scattering particles is still visible, and the velocity pattern of the settling particles is reconstructed using a custom software developed during this thesis.

Experiments were made on suspensions of poly-methylmetacrylate (PMMA) particles, with a size ranging between 600 nm and $1 \mu\text{m}$, and of MFA, a copolymer of poly-tetrafluoroethylene, with a diameter of 180 nm . The volume fraction Φ of PMMA particles was varied between $7 \times 10^{-5} \leq \Phi \leq 10^{-3}$

while the high transparency of the fluorinated MFA polymer allowed to explore a much wider volume fraction range $10^{-3} \leq \Phi \leq 0.1$.

Fig.4 shows an example of the complex settling velocity pattern, characterized by the presence of convective rolls, obtained for PMMA particles with a size of $1\mu\text{m}$. Although the analysis of the pattern yields an average settling velocity in the downward direction which is consistent with the overall sedimentation velocity with which the suspension is observed to settle, the presence of convective rolls is evident. Yet, these convective effects were found to be unrelated to intrinsic hydrodynamic interactions, but rather to be due to tiny temperature gradients that, although we tried to accurately thermalize the cell by placing it in a stirred water bath, are still sufficient to drive a slow, but persistent thermal convection. Although building a much more sophisticated thermal control is beyond the purposes of my work, these preliminary results nevertheless show that the technique we developed is suited to probe velocity fluctuations for settling particles with $\text{Pe} \ll 1$.

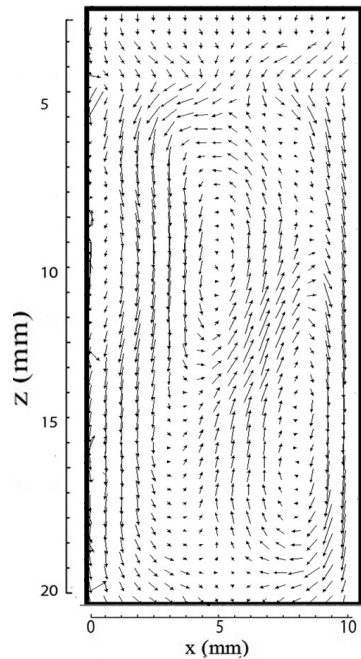


Figure 4: Settling velocity pattern for PMMA particles with diameter $1\mu\text{m}$ in a sedimentation cell of width/depth 1cm and height 2cm

Pectin gels

Pectin is a complex biopolymer, made up of more than 20 monosaccharides, widely present in nature as a main component of plant cells walls, and used in the food and biomedical industry. In the presence of multi-valent electrolytes, Pectin forms biocompatible gel structures that have found interesting applications for tissue engineering, drug and gene delivery [17, 60]. Although the macroscopic mechanical properties of these gels have been extensively studied, their microscopic dynamics is poorly known. Even pectin gelation mechanisms are still debated, and different models are proposed: the more widely accepted gelation mechanism, based on the so-called “egg-box” model, seems for instance to contrast with molecular simulations [61, 62], which rather suggest a different mechanism, allowing for more efficient hydrogen bonding and Van der Waals associations between couple of chains “shifted” along each other. In the second part of my thesis, I have studied pectin gels obtained with two distinct strategies: *external* gelation, where the diffusion of a divalent electrolyte from an external reservoir into the Pectin solution triggers the gel formation, and *internal* gelation, where the electrolyte is mixed with the Pectin solution right from the start in the form of nanoparticles which slowly dissolve.

Whereas the macroscopic properties of these gels were obtained by standard rheology measurements, their microscopic dynamics was investigated using a novel and powerful optical correlation technique, called Photon correlation imaging (PCI) [6]. The simultaneous measurement of the correlation function of the scattered intensity over many speckles allows this technique to investigate quasi-arrested structures like gels or glasses, overcoming the basic “non-ergodicity” problem (averages over time do not coincide with a true statistical average) encountered in standard Dynamic Light Scattering (DLS) experiments. The sample is illuminated by a thin sheet of laser light, and the scattering volume, seen from an angle of 90° with respect to the direction of the incident beam, is imaged on the multi-pixel sensor through a lens “stopped-down” by placing a diaphragm in its focus. Besides defining the scattering direction, the diaphragm has the crucial role of generating a less-defined “speckled” image. Similarly to what we have seen in the case of HSV, the time-dynamics of this speckle fields yield basic information both on the microscopic Brownian dynamics and, through the collective displacement of the speckle pattern, on the presence of large-scale restructuring effects. Using this configuration, it is then possible to realize a kind of DLS experiment, preserving however the spatial resolution of an imaging system. More specifically, information about the structural rearrangements of the sample can be inferred from the time correlations of the speckle pattern described by the

correlation index $c_I(\tau, t, \mathbf{r})$ which measures the degree of scattered intensity correlation after a delay time τ , for a specific ageing time of gel t , which for spatially heterogenous gels, depends also on the position \mathbf{r} :

$$c_I(\tau, t, \mathbf{r}) = \frac{\langle I_p(t)I_p(t + \tau) \rangle_{\mathbf{r}}}{\langle I_p(t) \rangle_{\mathbf{r}} \langle I_p(t + \tau) \rangle_{\mathbf{r}}} \quad (6)$$

where I_p is the scattered intensity measured by the p -th pixel and $\langle \cdot \cdot \cdot \rangle_{\mathbf{r}}$ denotes an average over all the pixels within an averaging block centered around \mathbf{r} . The temporal average of this function:

$$\langle c_I(\tau, t, \mathbf{r}) \rangle_{\delta t} = g_2(\tau) - 1 \quad (7)$$

give the correlation function $g_2(\tau)-1$, usually computed in DLS experiments.

The results we obtained for the microscopic dynamics were compared with macroscopic rheological tests made in the BioMAT Lab using a truncated cone-plate geometry rheometer. Both the storage (G') and loss (G'') moduli of the gels were measured at constant stress $\sigma = 2$ Pa, varying the oscillation frequency in the range $0.2 - 10$ Hz. For small-amplitude strain, the system is in the so-called linear viscoelastic regime, which is characterized by a weak frequency dependence of the $G'(f)$ and $G''(f)$ moduli. In this regime the rheological evolution of the gel can be followed measuring the magnitude of the complex viscosity

$$|\eta^*| = |\eta' - i\eta''| = \frac{\sqrt{(G'^2 + G''^2)}}{f} \quad (8)$$

External Gelation

For external gelation, samples were made by pouring a pectin solution at 1% (w/v), prepared in a 9.5 mM NaHCO₃ solution with 70 mM NaCl, in an optical cuvette. Then, solutions of calcium chloride, prepared to obtain a final concentration of CaCl₂ in the gel of either 25 or 50 mM, were gently poured in a reservoir separated by the Pectin solution by a dialysis membrane.

In all experiments with external gelation, we found a peculiar two-step gelation kinetics, evidenced by a double plateau in the time behavior degree of correlation $c_I(\tau, t, z)$, fig.5. Whereas the first relaxation, usually occurring at the beginning of gelation, witnesses an initial fast structural slowing down, it is only after the second one, occurring at long ageing times, that c_I reaches values very close to 1, which is the flag of full kinetic arrest and of totally arrested structure. Consistently, the full correlation function of the scattered intensity $g_2(\tau)$ displays a double exponential decay:

$$g_2(\tau) - 1 = ae^{-\tau/\tau_s} + (1 - a)e^{-\tau/\tau_l} \quad (9)$$

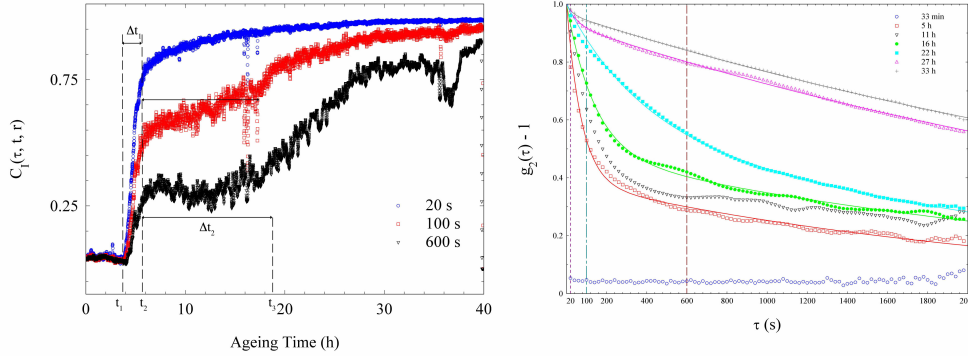


Figure 5: Correlation index $c_I(\tau, t, r)$ for a 25 mM gel with NaCl, with $\tau = 20$ s, 100 s, 600 s, and its corresponding full correlation function $g_2(\tau) - 1$, taken at ageing time variable between 0.5 and 33 hours.

Both relaxations are detected in 25 mM CaCl_2 gels with added NaCl for an ageing time less than 1 day, with $\tau_s \sim 120$ s and $\tau_l \sim 2500$ s, while for longer ageing time $g_2(\tau)$ can be fitted by a single simple exponential with $\tau_l \sim 3000$ s. In the absence of NaCl, both relaxations are faster with $\tau_s \sim 27$ s and $\tau_l \sim 670$ s for short ageing time, and $\tau_l \sim 2500$ s in the final stage, showing that restructuring events are much stronger when electrostatic interactions are not screened by the addition of salt. Gels prepared with 50 mM CaCl_2 gels show an additional peculiar feature, namely, the presence of very fast “decorrelation bursts”, which yield a substantial drop of c_I in a time shorter than the camera acquisition delay (2 s). In particular, decorrelation events seems to begin at an earlier ageing time (9 – 10 h) for gels with NaCl than for gels without NaCl, approximately starting when the gelation front has diffused by 2/3 of the cell.

The rheological tests, made only for 25 mM gels with added NaCl, suggest a direct relationship between the correlation index and the macroscopic rigidity of the structure. As shown in Fig.6, 40 hours after gelling, the gel can be roughly subdivided into three region, differing for the value of c_I . Up to a distance of about 7 mm from the membrane, the correlation index remains very close to 1 even after a delay τ as long as 10 min, meaning that the gel is a fully arrested structure (region T, $c_I \simeq 1$). This region is followed by an intermediate one (region M) where $c_I \simeq 0.5$, which eventually merges with the region close to the cell bottom, where the gel is fully uncorrelated (region B). Samples from the three regions were scooped with a tiny spatula, and the magnitude of their complex viscosity measured. In all three regions, the frequency dependence of the latter is nicely fitted by a power law:

$$|\eta^*| = Af^{-\alpha} \quad (10)$$

with $\alpha \simeq 0.9$, a behavior which has often be reported for disordered solid–

like structures [65] (for an ideal solid, where the complex viscosity is fully dominated by a frequency-independent elastic modulus G' , one would of course find $\alpha = 1$). However, the amplitude A displays a drastic decrease of more than two orders of magnitude by moving from region T to region B.

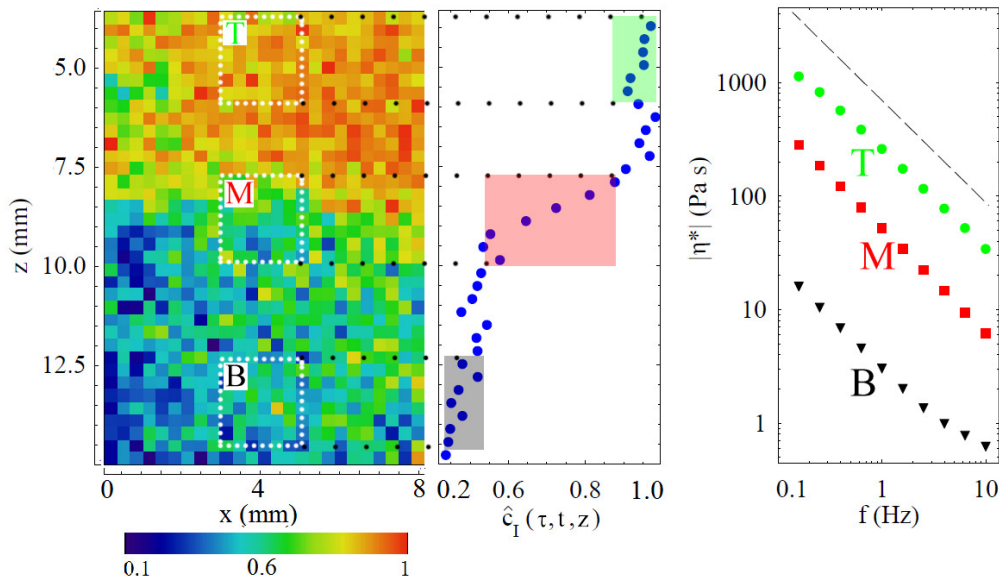


Figure 6: (a) Correlation map for a 25 mM gel obtained 40 hours after gelation has started. The three evidenced regions correspond to a completely arrested gel (T), a partially correlated structure (M), and a fluid pectin solution where gelation has not occurred yet (B). The dependence of the correlation index c_T on the position z along the cell for a delay $\tau = 600$ s and an ageing time of 40 h is shown in (b). In (c) the magnitude of complex viscosity $|\eta^*|$ (Pa·s) is plotted as a function of shear frequency f (Hz), for sample extracted from T, M, B regions. A comparison with power law $|\eta^*| = Af^{-0.9}$ is given (dashed line)

Internal Gelation

We just give a brief description of internal gelation experiments, which are still at a preliminary stage. The basic idea is supplying the divalent ion via calcium carbonate nanoparticles, which progressively dissolve into a weakly acidic environment provided by pectin. This strategy has already been exploited using colloidal particles in the micron size range: however, dissolution is generally slow. Conversely, the particle we used have a size of few tens of nanometers: although they show aggregation in aqueous solutions, the aggregates they form have a very open, fractal structure, characterized by a huge interface with the solvent that ensure a much faster ion supply. To perform internal gelation, a suspension of these nanoparticles is gently mixed with a 1.2% solution of pectin, in the presence of 9.5 mM NaHCO_3

and 70 mM NaCl, in order to obtain a final concentration of viable calcium ions ranging between 6.25 and 25 mM, which induce pectin gelation.

The peculiar kinetics observed in external gelation is mirrored by several restructuring events in internal gelation, which were observed for all samples we investigated. However, the standard deviation of correlation index is found to be consistently higher than in the case of external gelation: this is probably a consequence of the intrinsically heterogeneous supply of calcium ions, which are far more concentrated in the region surrounding the dissolving nanoparticles. Pectin gels obtained by internal gelation are then substantially less homogeneous than those made by external perfusion. Besides, for calcium concentration of 12.5 mM and 25 mM, rapid decorrelation events start to take place, respectively 5 and 15 h after sample preparation, and strongly affect the gel structure. Hence, internal gelation does not proceed steadily in time, a feature also confirmed by rheological measurements. For very short gelling time the magnitude of complex viscosity shows again a power-law frequency dependence, with an exponent α that is slightly smaller than 1. With ageing, the amplitude A increases, but not steadily in time: after a rapid increase lasting 10-15 minutes the value does not increase further until 10 h later. This behavior can be probably explained by the fact that the number of cross link available is already saturated and only rearrangements events can stiffen the gel.

Conclusions

Main aim of this work has been showing that the application of advanced optical correlation methods, which combine scattering and imaging, allows to gather novel information on several important phenomena of interest for colloid and soft matter science. For instance, in the case of sedimentation at low Peclet number of Brownian particles that are too small to be resolved, we have seen that a suitable adaptation of HSV, which gets rid of the problem associated with using a laser, allows to fully reconstruct the pattern of local velocity induced by particle settling over a wide field of view. The experiments evidenced that the “quiet” macroscopic settling of the suspension at the average Stokes velocity may actually stem from a complex, convective microscopic velocity patterns. Although these convective effects can rather be attributed to tiny thermal inhomogeneities rather than to the elusive velocity fluctuations predicted by theory, the technique showed that accurate velocimetry can be done for systems where this was formerly regarded as unfeasible. We point out that the same technique can be applied to

other problems of interest for the biomedical field, such as in microfluidics experiments.

But the main part of this thesis has been devoted to the study of gelation of pectin, a biopolymer of interest for food and biomedical application. The characterization of gelation processes in systems of this kind is generally made with macroscopic rheological methods, possibly combined with microscopic structural investigations via electron microscopy and scattering of X rays or neutrons. Here we showed that an investigation for the microscopic Brownian dynamics of the system, performed while gelation evolves, provides important information that correlates with the macroscopic mechanical properties of the gel, and furthermore highlights microscopic dynamical heterogeneities and restructuring events that has not be spotted before. These results were obtained by PCI, a novel optical technique which fully combines the powers of scattering and microscopy studies. In particular, we have investigated and contrasted two gelation strategies, based either on the external perfusion of divalent ions, or in supplying the same ions via the progressive dissolution of colloidal nanoparticles dispersed in the pectin solution. We found that pectin gelation proceeds via two successive mechanisms, characterized by widely different time constants: whereas the first mechanism is active only in the early stages of gelation, the latter is always present and it goes on up to very long gel ageing time. Several evidences obtained from macroscopic rheological measurements are consistent with this picture. Our results can be compared with those obtained for another gelling biopolymer, alginate, which has recently be investigated with similar techniques [11]. The evidence we collect for pectin suggest that, despite the structure of the two polymer gels is usually suppose to be related, their gelation process and microscopic dynamics can be rather different. Specifically, while alginate gels do not show a complete arrest of the microscopic dynamics (they are actually “creeping gels” [11]), pectin gels show a slower microscopic dynamics which actually intermix with the ageing kinetics, and that eventually leads to a fully arrested structure, namely, to a “true” solid material. Furthermore, at variance with alginate gels, where fast microscopic “decorrelation bursts” are arguably the source of macroscopic creeping over long times, in the case of pectin these bursts are observed only for high concentration of the gelling agent, regardless the presence of NaCl. A possible explanation of the differences is that alginate gelation lead to the occurrence of a large amount of “frozen stresses”, which then progressively relax, whereas pectin displays a much more “plastic” behavior. Further work is however needed for a full assessment of these ideas.

Capitolo 1

Tecniche ottiche di correlazione

Con Light Scattering si intende un'ampia gamma di esperimenti, che utilizzano come probe d'indagine una radiazione elettromagnetica incidente su un campione. Lo studio delle deviazioni dalla direzione di propagazione della radiazione permette di ottenere informazioni sulle strutture spaziali e le proprietà dinamiche del campione in esame. In particolare è possibile indagare su campioni integri come proteine, polimeri o macromolecole, nel loro ambiente naturale e determinarne il peso molecolare, il raggio di girazione o il secondo coefficiente del viriale. Si possono effettuare studi su sistemi complessi come gel e vetri e indagare le dinamiche microscopiche su scale spaziali dei nanometri. Nei nostri sistemi d'interesse, gel e particelle colloidali, la radiazione elettromagnetica utilizzata ha la lunghezza d'onda nel visibile ($400nm < \lambda < 700nm$) con sorgente luminosa sia coerente che parzialmente coerente.

1.1 Introduzione

Per le applicazioni di Light Scattering un'importanza centrale assume il valore di $q = 4\pi/\lambda \sin(\theta)$, dove λ è la lunghezza d'onda della radiazione, θ l'angolo di scattering, detto *vettore d'onda di scattering*, il quale dimensionalmente è l'inverso di una lunghezza, che rappresenta la scala alla quale è possibile indagare. Per esempio, se si utilizza una sorgente luminosa che abbia lunghezza d'onda λ nel visibile ($\simeq 600$ nm), e ci si pone a piccoli angoli di rilevamento si ottiene un valore un vettore: $q \sim 18\mu m^{-1}$ che permette di indagare su una dimensione caratteristica di $0.05\mu m$ mentre a 90° $q \sim 0.0104nm^{-1}$ da cui la lunghezza d'indagine è di circa 95 nm. In generale, la variazione di frequenza, tra onda incidente e onda diffusa, è connessa alla presenza di dinamiche che avvengono nel mezzo su tempi caratteristici dati dall'inverso di $\Delta\omega$:

$$\Delta\omega = \omega_i - \omega_s = \frac{2\pi}{\tau} \quad (1.1)$$

dove ω_i è la pulsazione della radiazione incidente e ω_s la pulsazione del campo diffuso. Siccome le variazioni in pulsazione della luce diffusa, nei nostri esperimenti, sono dovute a variazioni di fase per moti Browniani, con tempi caratteristici estremamente lunghi rispetto a quelli della radiazione incidente (per la quale ω è dell'ordine dei THz), si ha un piccolissimo allargamento $\frac{\Delta\omega}{\omega_i} \ll 1$ e, dunque, è corretto ritenere lo scattering *quasi elastico*, tale per cui $\omega_i = \omega_s$ e ne segue che pure i vettori d'onda $|k_i| = |k_s|$, dove $k = 2\pi/\lambda$. Quindi, nel caso quasi-elastico, ogni angolo θ è definito da un univoco vettore d'onda di scattering \mathbf{q} .

Inoltre, per ogni particella presente nel sistema indagato, è possibile definire un vettore posizione ρ_j , così da poter definire il *fattore di struttura*:

$$S(\mathbf{q}) = \frac{1}{N} \sum_{j,k=1}^N \left\langle e^{-i\mathbf{q}\cdot(\rho_j - \rho_k)} \right\rangle \quad (1.2)$$

dove le parentesi angolari definiscono una media spaziale, e il prodotto scalare tra il vettore d'onda di scattering q e la distanza tra le particelle rappresenta lo shift di fase tra la luce diffusa dalla particella j e la particella k . Il fattore di struttura è il dato che dà un'informazione rilevante su come sono disposte le particelle all'interno del campione e da lì è possibile calcolare numerose proprietà termodinamiche in gioco. Supponiamo di trovarci in una dispersione colloidale e mettiamoci a cavallo di una particella. Vogliamo chiederci quante particelle si trovano ad una distanza compresa tra r e $r + dr$ dalla nostra particella. Il numero di particelle cercate sarà $n(r)$, si assume che la densità ρ dipende dalla posizione r , che il numero totale di particelle è N ,

quindi:

$$n(r) = 4\pi r^2 \rho g(r) dr \quad (1.3)$$

e la densità di probabilità:

$$p(r)dr = \frac{n(r)}{N} = g(r) \frac{dV}{V} \quad (1.4)$$

dove con $g(r)$ definiamo la *funzione di distribuzione radiale* [3]. Tale funzione corregge la probabilità di trovare le particelle nella corona sferica desiderata tenendo conto delle correlazioni di densità indotte dalle interazioni tra le particelle. Infatti in un liquido le particelle sono soggette ad un potenziale d'interazione che dipende dalla posizione di ciascuna di esse: $U = U(r_1 r_2 \dots r_n)$. La teoria prevede che la *funzione di distribuzione radiale* è proporzionale al fattore di Boltzmann: $e^{\frac{-U(r)}{k_b T}}$, addirittura approssimabile a tale fattore nel caso di soluzioni molto diluite. In particolare è possibile riscrivere il fattore di struttura in funzione della funzione $g(r)$:

$$g(\mathbf{r}) = \frac{V}{N(N-1)} \left\langle \sum_{i \neq j} \delta(\mathbf{r} - (\mathbf{r}_j - \mathbf{r}_i)) \right\rangle \quad (1.5)$$

$$S(\mathbf{q}) = \left\langle \sum_{j,k} e^{i\mathbf{q} \cdot (\rho_k - \rho_j)} \right\rangle = \rho \int d^3r (g(r) - 1) e^{i\mathbf{k} \cdot \mathbf{r}} \quad (1.6)$$

Quindi il fattore di struttura e l'intensità diffusa sono direttamente legati alla trasformata di Fourier spaziale della funzione di distribuzione radiale. Quindi è chiaro che se si misura il fattore di struttura si determina la funzione di distribuzione radiale, e da lì si può calcolare le proprietà termodinamiche del sistema, tra cui il potenziale interparticellare, la forza media, la pressione e le comprimibilità, arrivando all'equazioni di stato. Questo, comunque, avviene in casi particolari e solo se si dispone di un ampio range di dati, privi di rumore, poichè l'inversione della trasformata di Fourier rientra nei cosiddetti "problemi mal posti". Nel grafico di Fig.1.1 si può notare l'andamento del fattore di struttura per il modello colloidale a sfere rigide a diversi valori della frazione di volume totale occupata dalle particelle. Qui il potenziale va come:

$$e^{-\beta U(r)} \begin{cases} 0, & r < \sigma \\ 1, & r > \sigma \end{cases} \quad (1.7)$$

Sull'asse delle ascisse per la funzione $g(r)$ si ha il rapporto tra r/σ . Notiamo che all'aumentare della frazione di volume il comportamento è più simile a quello di un solido cristallino dove le posizioni degli atomi sono fisse e

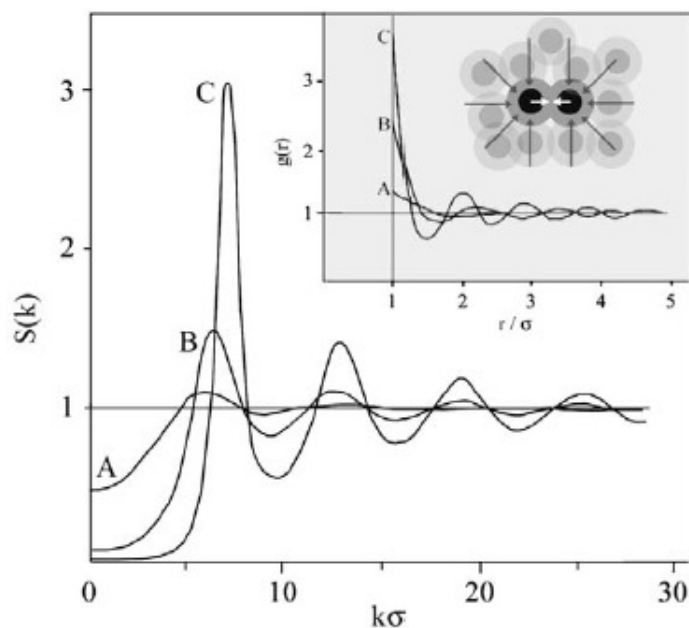


Figura 1.1: Fattore di struttura e funzione di distribuzione radiale per un sistema di sfere rigide. A fraz.vol. = 0.1; B fraz.vol. = 0.3; C fraz.vol.=0.5 [3].

regolari. A basse Φ invece vi è una struttura lassa, un liquido, che richiama la struttura di un solido su brevi distanze, e un gas a lungo range, dove la funzione di distribuzione tende a 1. Per il fattore di struttura si nota un andamento simile a quello della $g(r)$.

1.1.1 Dynamic Light Scattering

Con le tecniche di Dynamic Light Scattering (DLS) è possibile indagare le proprietà dinamiche del campione. Il campione è illuminato da un raggio laser e il segnale diffuso viene rilevato ad un certo angolo di scattering. Da qui è possibile analizzare le fluttuazioni d'intensità presenti tramite correlazioni e calcolare i coefficienti di diffusione o studiare la dinamica di sistemi complessi come gel e vetri. Di particolare importanza per l'utilizzo di questa tecnica sono: il *tempo di coerenza* τ , definito passando dalla *lunghezza di coerenza* $l_c = c\tau$, che si riferisce al concetto di *coerenza spaziale*. La coerenza è la proprietà della radiazione di fare interferenza con una versione traslata di sé stessa. Neanche un laser è perfettamente coerente perchè dopo un certo tempo τ devia dal comportamento sinusoidale per un breve periodo perdendo così la sua coerenza temporale. Nel caso in cui la larghezza di banda del laser sia definita su un intervallo $\Delta\omega$, il tempo di coerenza è quantificabile come $\tau = 2\pi/\Delta\omega$.

Per quanto riguarda la coerenza spaziale bisogna riferirsi alla natura geometrica della sorgente. Si immagini di irradiare con luce laser una superficie molto ruvida, tanto che le asperità son più grandi della lunghezza d'onda incidente. Ogni irregolarità della superficie darà il suo contributo di luce diffusa, introducendo ciascuna un proprio ritardo di fase rispetto all'onda incidente [4]. In figura 1.2 si ha una sorgente lineare di lunghezza L . Calco-

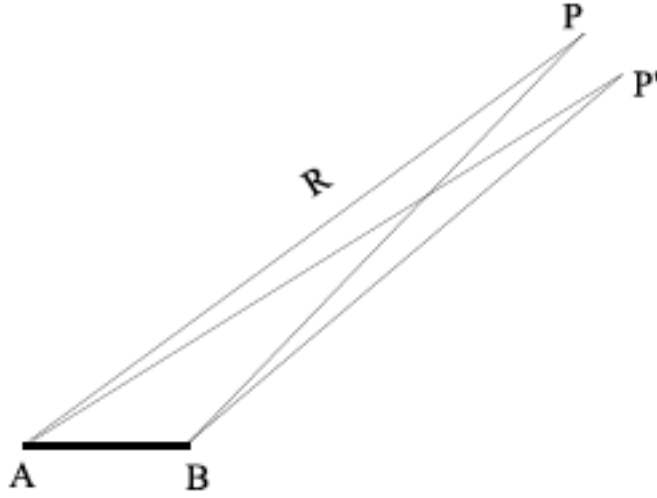


Figura 1.2: Esempio di sorgente lineare, di dimensione L , che dà un contributo diffusivo in P e P' .

lando la differenza di fase che si ha tra ai punti P e P' a distanza R nel Far Field:

$$\Delta\phi = \frac{2\pi}{\lambda}(AP - AP' - BP' + BP) = \frac{2\pi}{\lambda} \frac{\Delta P L \sin(\theta)}{R} \quad (1.8)$$

si nota che, per avere uno sfasamento di $\Delta\phi=\pi$, che garantisce interferenza costruttiva, ΔP è:

$$\Delta P = \frac{\lambda R}{2L \sin\theta} \quad (1.9)$$

e quindi si può definire un angolo di coerenza $\theta = \frac{\Delta P}{R}$. Se si è a distanza R ciò che si può vedere è l'interferenza di tutte le onde diffuse dalle irregolarità della superficie, che sono in ritardo di fase rispetto all'onda incidente, e contribuiscono a creare quello che viene definito *campo speckle*, ovvero una fluttuazione dell'intensità che si manifesta come un pattern di macchie chiare e scure. Si può trovare una relazione in termini della grandezza della sorgente definendo un'area di coerenza, ovvero una regione entro la quale i due punti in far field mantengono una correlazione di fase:

$$A_c = \frac{R\lambda^2}{L} \quad (1.10)$$

a cui è associato un angolo solido di scattering $\Delta\Omega = (\frac{\lambda}{D})^2$. Questo ragionamento intuitivo per descrivere il campo speckle può essere dimostrato in maniera più rigorosa con il teorema di Van Cittert-Zernike [25]. Tale teorema afferma che più grande è la distanza dalla sorgente incoerente, come può essere la luce diffusa da due particelle in sospensione, dove con “grande” intendiamo maggiore del rapporto D^2/λ , dove D è la dimensione caratteristica del rivelatore e λ la lunghezza d’onda, tanto più il fronte d’onda sarà coerente.

Si definisce una funzione che metta in correlazione i campi elettrici a istanti temporali diversi:

$$g_1(\mathbf{r}, t + \tau) = \frac{\langle E(\mathbf{r}, t)E^*(\mathbf{r}, t + \tau) \rangle}{\sqrt{I(t)I(t + \tau)}} \quad (1.11)$$

dove \mathbf{r} è la coordinata dei centri diffusori, $E(\mathbf{r}, t)$ è il campo elettrico diffuso, $I(t)$ è l’intensità corrispondente. Tale funzione prende il nome di *funzione di correlazione dei campi* e descrive la fluttuazioni temporali del campo. In maniera analoga si calcola la *funzione di correlazione d’intensità*:

$$g_2(\mathbf{r}, t + \tau) = \frac{\langle I(\mathbf{r}, t) I(\mathbf{r}, t + \tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} \quad (1.12)$$

che mette in relazione tra loro le intensità del campo a vari istanti, rispetto a un valore di intensità $I(t)$ di riferimento. Nel caso in cui il campo E diffuso sia una variabile casuale Gaussiana, si può sfruttare la relazione di Siegert per la quale:

$$g_2(t) = 1 + |g_1(t)|^2 \quad (1.13)$$

Infine, sottolineiamo che in DLS è possibile svolgere gli esperimenti in due configurazioni: in *eterodina* e in *omodina*. In eterodina usualmente si lavora a bassi angoli θ poichè è necessario che ci sia battimento tra campo incidente e campo diffuso. Il segnale rilevato sarà la somma di questi due contributi e se:

- le fluttuazioni del campo incidente sono trascurabili;
- il campo incidente e quello diffuso sono scorrelati;
- il campo incidente è molto maggiore in intensità rispetto a quello diffuso

allora si può dimostrare si misura la parte reale di $g_1(t)$. In omodina, invece, si blocca il campo incidente, e si rileva solo il campo diffuso.

1.2 Near Field Scattering

Abbiamo visto che se ci si pone nel campo lontano le speckle che si formano hanno una dimensione caratteristica che va come $\Delta P = \frac{\lambda R}{2L \sin \theta} \simeq \frac{\lambda z}{L}$, ovvero dipendono dalla lunghezza d'onda incidente λ , dalla dimensione della sorgente L e dalla distanza dello schermo z . Più lo schermo viene posto lontano, cioè più aumenta z , più le dimensioni delle speckle aumentano. Ma se ci avviciniamo al campione sempre più, le ipotesi del teorema di Van Cittert-Zernike vengono a cadere. Giglio *et al.* [9] hanno considerato questo caso e hanno sviluppato, in questa configurazione, la tecnica di particle sizing detta *Near Field Scattering (NFS)*, dove si dimostra che il teorema di Van Cittert-Zernike, a distanze ravvicinate dal campione, vale ancora, non più in termini spaziali bensì angolari. Supponiamo di illuminare con un'onda piana un sistema di particelle con dimensioni caratteristiche d , confrontabili a quelle della lunghezza d'onda e di andare a raccogliere la radiazione diffusa su un piano prossimo al campione. Per diffrazione ogni particella diffonderà radiazione in un angolo di circa $\theta = \lambda/d$. Ogni punto del sensore riceverà dunque radiazione sotto lo stesso angolo, Fig.1.3. Facendo riferimento alla Fig.1.3 si può dunque vedere che ogni punto del sensore riceve radiazione da un'area del campione di dimensioni lineari: $D^* = \Theta z = \frac{\lambda}{d} z$. Come abbiamo

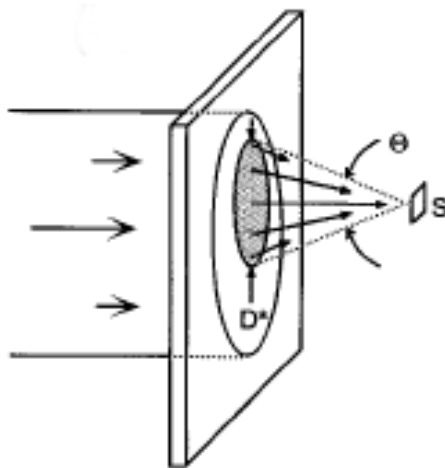


Figura 1.3: Raggio con diametro D che illumina una particella di dimensioni L . Il rivelatore S , posto a distanza z dalla particella, riceve luce solo da una parte L^* del campione, da un angolo Θ [9].

visto nel Far Field la dimensione delle speckle é data da $\Delta P = \lambda z/L$, quindi

nel Near Field avremo:

$$\Delta P = \frac{\lambda z}{L^*} = \frac{\lambda z}{\frac{\lambda z}{d}} = d \quad (1.14)$$

ovvero le dimensioni delle speckle sono esattamente come quelle delle particelle in esame. In questa configurazione è possibile dunque fare particle sizing ed è possibile dimostrare che una semplice trasformata di Fourier dà il fattore di struttura del campione, $S(q)$. La distanza dal campione z per la quale valgono queste relazioni si può determinare con:

$$\begin{aligned} L^* &\ll L \\ z &\ll \frac{dL}{\lambda} \end{aligned} \quad (1.15)$$

In questa configurazione oltre ad esperimenti di Static Light Scattering e Dynamic Light Scattering, è possibile effettuare misure di *velocimetria*. La velocimetria permette di calcolare il campo di velocità del sistema in esame, che sarà oggetto di studio nella parte sperimentale di questa tesi. Per poter ricavare il campo di velocità, si valuta la cross-correlazione spaziale del campo speckle per tempi diversi, quindi lo spostamento del picco massimo di correlazione rapportato ad ogni intervallo di tempo trascorso, ottenendo la velocità presente nel sistema.

Si sottolinea che la condizione di NFS per fare velocimetria è molto più stringente del necessario, è possibile dimostrare che in configurazione di *subjective speckle* si possono effettuare misure di velocimetria. In questa situazione tra il rilevatore e la superficie vi è posta un'ottica. Le dimensioni delle speckle dipendono ancora dalla lunghezza d'onda e dalla apertura numerica della lente di raccolta utilizzata.

Dunque, analizziamo cosa succede se si esegue un esperimento di velocimetria su una dispersione colloidale, ponendoci o in objective speckle o in subjective speckle e in eterodina. Nel momento in cui ci si basa sulle *objective speckle*, in eterodina, si può catturare tutto il field of view (FOV) potendo indagare su tutto il campione e sbarazzarsi di dispositivi ottici, quali le lenti. Tuttavia quando avvengono delle traslazioni, per moti interni al campione, non è possibile rintracciare il percorso delle particelle, perchè in un campo così grande è certo che il contributo in fase di una particella può venire eliminato dal contributo in fase opposta di un'altra particella. Quindi si perdono informazioni e non si riesce ad estrarre un campo di velocità.

Quando si è in regime di *subjective speckle*, invece, la presenza di una lente permette di rilevare il contributo di campo diffuso che riesce a diffondere secondo l'angolo di accettazione della lente, definito dall'apertura numerica della stessa. In eterodina la presenza del campo incidente elimina i termini

d'interazione particella-particella, permettendo di effettuare esperimenti di velocimetria con qualsiasi tipo di traslazione presente.

In termini matematici si può formalizzare il ragionamento appena svolto, considerando il campo totale:

$$E(\mathbf{r}, t) = E_0 + E_s(\mathbf{r}, t) \quad (1.16)$$

dove con E_0 si indica il campo incidente, E_s il campo diffuso. Quello che si rileva è l'intensità:

$$I(\mathbf{r}, t) = E_0^2 + E_0^* E_s(\mathbf{r}, t) + E_0 E_s^*(\mathbf{r}, t) + |E_s(\mathbf{r}, t)|^2 \quad (1.17)$$

Quindi [27]:

- *Eterodina in objective speckle*: In questo caso, usualmente, il campo diffuso E_s è molto minore di quello incidente E_0 , quindi il termine $|E_s|^2$ è trascurabile. Tuttavia, vi è la presenza di contributi in fase che possono elidersi l'un l'altro e, dunque, non si ottengono informazioni rilevanti sulla velocità;
- *Eterodina in subjective speckle*: Anche in questo caso si può ritenere E_s molto minore di E_0 , per cui la relazione diventa:

$$I(\mathbf{r}, t) = E_0^2 + 2E_0 \text{Re}(|E_s(\mathbf{r}, t)|) \quad (1.18)$$

calcolando la funzione di cross correlazione si trova la dipendenza solo dal ritardo in fase e non più dall'interazione particella-particella, ed è quindi possibile seguire il campo di velocità del campione in ogni situazione.

Ma fino a che punto può arrivare l'indagine con le tecniche di Light Scattering? Come vedremo con le tecniche sviluppate e utilizzate in questa tesi, è possibile spingersi a un'unione tra tecniche di scattering e tecniche di microscopia. In questi ultimi due paragrafi analizzeremo delle tecniche di indagine che sottolineano questo aspetto, permettendo un'analisi locale dettagliata non solo sulla morfologia ma anche sull'intera dinamica ed evoluzione del sistema.

1.2.1 Ghost Particle Image Velocimetry

Questa tecnica rappresenta una soluzione ai problemi introdotti dai comuni metodi d'indagine in velocimetria microfluidica. Una comune metodica

utilizzata è la Particle Image Velocimetry, PIV, dove viene monitorato il flusso tramite traccianti risolubili otticamente. Una seconda tecnica di recente sviluppo è μ PIV che, tuttavia, necessita di tracers fluorescenti, di un setup ottico costoso, costituito da un laser a impulsi sincronizzato con una camera ad alta velocità. Con solo un microscopio con illuminazione Kohler e una videocamera per acquisire immagini, la GPV si configura come un potente tool d'indagine, a basso costo, permettendo una raffinata analisi.

Tale metodica è stata introdotta da Buzzaccaro *et al.* [29] e permette studi di velocimetria su un'ampia tipologia di flussi. Nel caso più semplice si possono studiare particelle che si muovono con velocità costante v , dando un flusso uniforme. Dopo un intervallo di tempo Δt sarà possibile misurare lo spostamento di tali particelle come $v\Delta t$. Inoltre, è possibile estrarre la funzione di autocorrelazione normalizzata dell'intensità:

$$G_{x,t}(\Delta t, \Delta x) = i(t, x + \Delta x)i(t + \Delta t, x + \Delta x) \quad (1.19)$$

e se si rappresenta in un grafico come funzione dello spostamento Δx si ottiene una funzione il cui picco si trova a $\Delta x = v\Delta t$ e si può ricavare la velocità della sospensione misurando gli spostamenti dei picchi di correlazione (Fig 1.4).

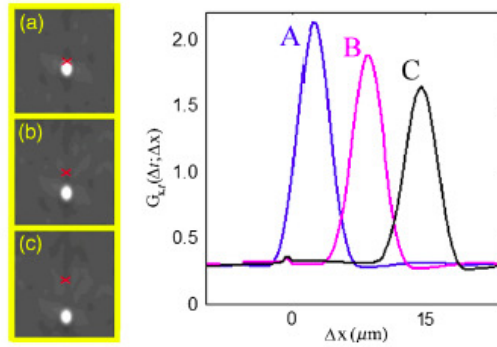


Figura 1.4: Nei pannelli si mostrano le immagini di cross correlazione prese a 1 (a), 3 (b), 5 (c) frames di distanza. A destra: cross area dei tre picchi di correlazione [29].

Inoltre la larghezza di tali funzioni di autocorrelazione è legata al moto Browniano presente e permette di calcolare il coefficiente di diffusione di tali particelle. Il vantaggio principale della GPV, rispetto a altri metodi PIV, è di utilizzare dei tracers di dimensioni nanometriche e la velocità è estratta semplicemente seguendo il campo speckle che creano, il quale è costituito da speckle di dimensione determinata dall'apertura angolare dell'ottica di raccolta.

Oltre a ciò, l'analisi di velocità può essere condotta su flussi non stazionari. Un esempio è il caso della presenza di un ostacolo triangolare in un canale microfluidico di $100\ \mu\text{m}$ di larghezza e $30\ \mu\text{m}$ di profondità. Semplicemente suddividendo l'immagine in regioni d'interesse (ROI) e analizzando i picchi di cross correlazione si riesce a dedurre il campo di velocità nell'intera zona (Fig. 1.5)

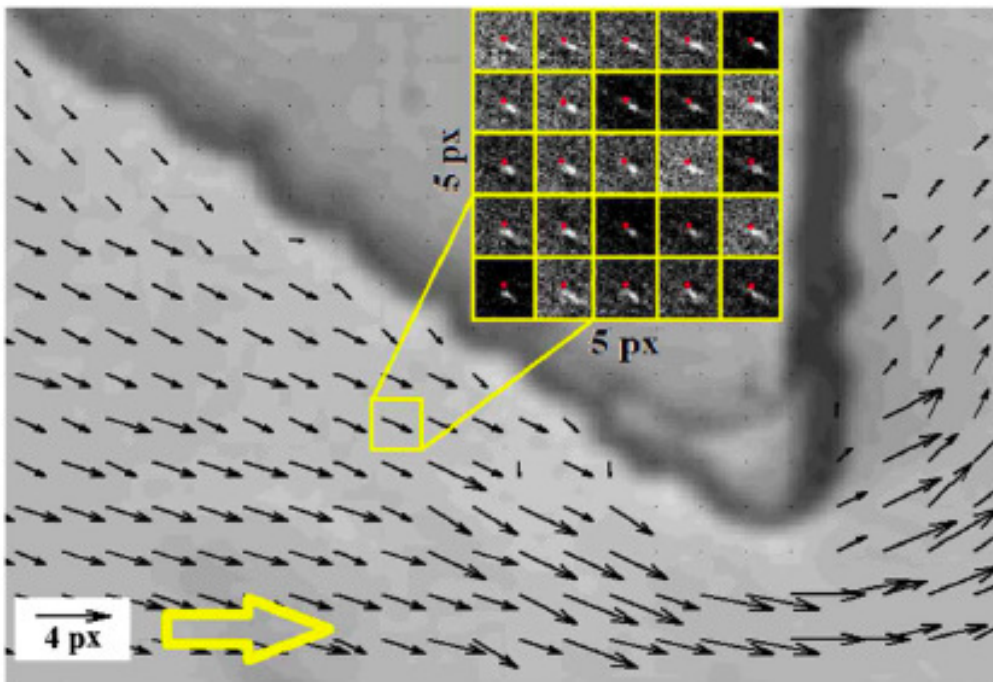


Figura 1.5: Mappa di correlazione del flusso attorno a un ostacolo triangolare [29].

La luce raccolta dal sensore proviene da una regione, la cui profondità dipende dall'ottica di raccolta e dall'illuminazione. Modulando l'illuminazione con il condensatore è possibile creare un "mosaico" di aree di coerenza indipendenti, che presentano una dimensione trasversale $\delta x \simeq \lambda/NA_c$ e una dimensione longitudinale $\delta z = \lambda/NA_c^2$. Con questa impostazione Buzzaccaro *et al.* [29] hanno indagato su un flusso in un canale profondo $600\ \mu\text{m}$, effettuando uno scan di $20\ \mu\text{m}$ per volta. Come si evince dalla Fig. 1.6 si ricava un andamento della funzione di correlazione che riporta al profilo parabolico atteso per un flusso alla Poiseuille.

Infine con la GPV è possibile fare a meno dei tracers: fluidi complessi come le emulsioni o composti in transizione di fase possono essere studiati nella loro forma naturale, senza disturbi indotti da particelle di tracking. Un esempio è dato dalla transizione di fase del C10E5 (pentaetilenglicole

monodecil etere), dove riscaldando un lato oltre la temperatura critica del composto, si nota la decomposizione spinodale e il campo di velocità del campo speckle (Fig. 1.7)

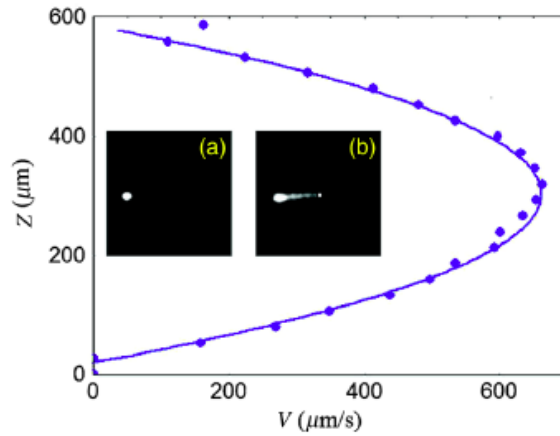


Figura 1.6: Nel grafico viene rappresentata la velocità con profilo parabolico come atteso. Nei riquadri si mostrano le funzioni di autocorrelazione [29].

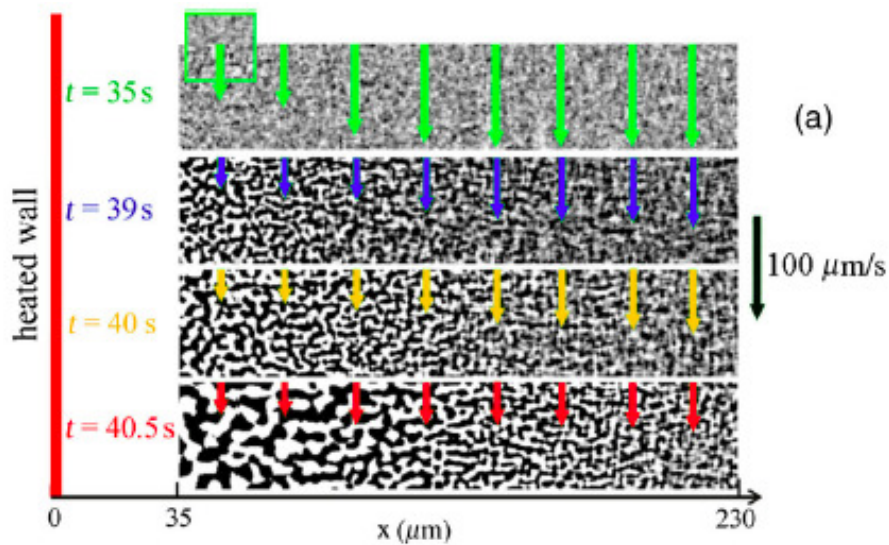


Figura 1.7: Decomposizione spinodale di C10E5, con gradiente di temperatura. Si osservi il campo speckle e il pattern di velocità a diversi tempi [29].

1.2.2 Photon Correlation Imaging

In tecniche tradizionali come il DLS si rileva il segnale proveniente da una singola speckle ad un determinato angolo. Si misurano, quindi, la fluttuazione in intensità e la durata di queste fluttuazioni fornisce informazioni sulla dinamica delle particelle. Tuttavia questo tipo di analisi funziona solo se, in prima istanza, il processo è stazionario, dunque la dinamica del sistema non cambia repentinamente nel tempo, e la misura delle funzioni di correlazione è accurata solo se le fluttuazioni in intensità sono misurate su un periodo molto lungo. In secondo luogo il sistema deve essere ergodico, ovvero ogni speckle deve dare la stessa distribuzione d'intensità diffusa delle altre speckles del campione sul periodo d'acquisizione. In questo lavoro di tesi analizzeremo dei gel colloidali che, come i vetri, sono dei campioni che non hanno un comportamento ergodico, ovvero media temporale e media d'insieme non coincidono, quindi non soddisfano le richieste della DLS. Dopo un certo tempo in cui il gel si assesta e trova una configurazione d'equilibrio, la dinamica interna può arrestarsi e le particelle possono rimanere confinate nella loro posizione, senza poter esplorare tutto lo spazio delle fasi a loro disposizione [5]. Per una struttura "quasi arrestata", il campo diffuso può essere visto come la somma di due termini: $\mathbf{E}_s(q, t) = \mathbf{E}_f(q, t) + \mathbf{E}_c(q)$. Il primo, $\mathbf{E}_f(q, t)$, è fluttuante, il secondo $\mathbf{E}_c(q)$, è indipendente dal tempo. Ne consegue che se la media è fatta su tutto l'ensemble questa sarà nulla, mentre la media temporale sarà: $\langle \mathbf{E}_s(q, t) \rangle_t = \mathbf{E}_c(q)$. Il valore di \mathbf{E}_c dipende dalla specifica configurazione dei centri diffusori rispetto al vettore q d'indagine, rendendo tale contributo diverso da speckle a speckle.

Una possibile soluzione è data dalla tecnica messa a punto da Cipelletti *et al.* [6] che va sotto il nome Photon Correlation Imaging. Gli elementi che costituiscono tale apparato sperimentale sono: un laser e un sensore d'acquisizione multipixel CCD o CMOS. I sensori CCD e CMOS sono efficaci pur avendo una velocità d'acquisizione moderata, riuscendo a catturare in maniera ottimale i tempi caratteristici presenti nel materiale in esame. Siccome ogni speckle è indipendente dalle altre, ottenere dati con una camera CCD è come avere N dati indipendenti, dove N è il numero delle speckles che insistono sull'array CCD. Nel momento in cui N è sufficientemente grande si ottiene una media d'insieme, come se si eseguisse un esperimento di DLS simultaneamente su più speckles.

Con la PCI è possibile seguire il riarrangiamento strutturale del sistema, e studiarne l'evoluzione, tramite l'indice di correlazione c_I :

$$c_I(t, \tau) = \frac{\langle I_p(t) I_p(t + \tau) \rangle_p}{\langle I_p(t) \rangle_p \langle I_p(t + \tau) \rangle_p} \quad (1.20)$$

che fornisce il grado di correlazione tra un'immagine al tempo t e una al tempo $t + \tau$, dove con $\langle \dots \rangle_p$ la media sui pixel della regione d'interesse (ROI) indagata. Tale indice si può normalizzare con la correlazione al ritardo $\tau = 0s$, così da avere valori che vanno da 0 a 1, dove con 1 si indica la massima correlazione mentre con 0 l'assenza di correlazione (Fig.1.8).

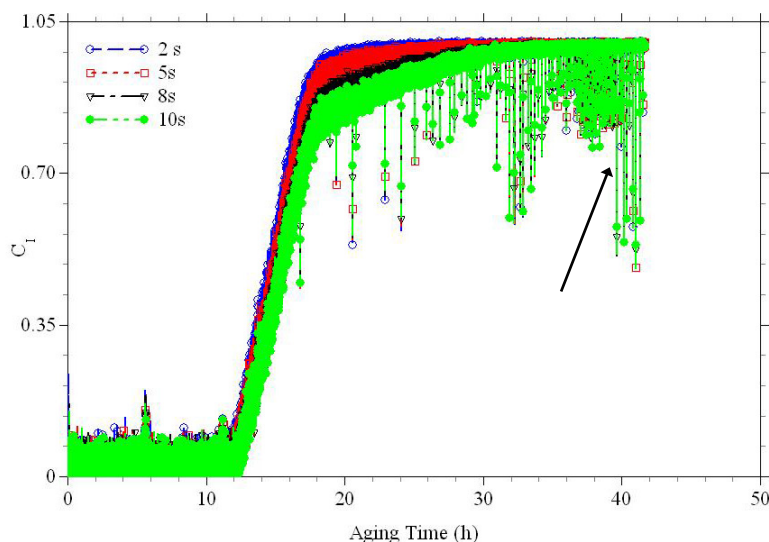


Figura 1.8: Esempio di correlation index di un gel di pectina, a ritardi di : 2s, 5s, 8s, 10s. La freccia indica degli spike di decorrelazione, eventi repentini all'interno della struttura del gel che ne modificano l'organizzazione interna.

Con tale indice si può seguire la dinamica d'invecchiamento del gel (*aging time*), evidenziando gli eventi ricostruttivi all'interno della struttura, come si può vedere nella Fig.1.8.

Per capire meglio le potenzialità di questo strumento si può fare un confronto tra un sistema di particelle colloidali e un gel

In Fig.1.9(a), si vede che per un dato lag τ il valore di correlazione per una sospensione di particelle Browniane fluttua intorno a un valore medio. Questo indica che in media le particelle si muovono della stessa quantità tra un'immagine e l'altra, indipendentemente dal lag, e contribuiscono allo stesso modo nella perdita di correlazione della luce diffusa. Come conseguenza del *teorema centrale del limite* siccome le fluttuazioni presenti sulla $c_I(t_w, \tau)$ sono dovute solo al rumore, ci si aspetta che la distribuzione di probabilità della funzione di correlazione per un dato lag sia gaussiana, come mostrato in Fig.1.9(b)

Mentre per un gel l'indice di correlazione evidenzia delle disomogeneità, caratterizzate da fluttuazioni repentine che sono imputabili alla riorganizzazione strutturale del sistema. Come mostra la Fig.1.10 non si ha più un

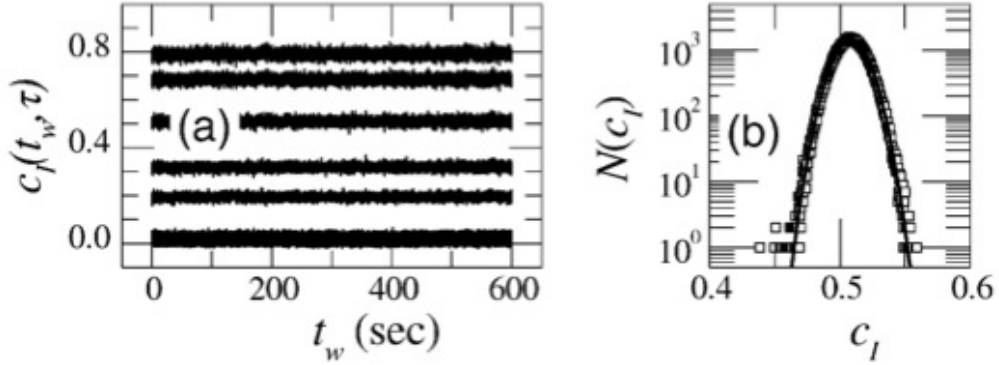


Figura 1.9: (a) Indice di correlazione per un sistema di particelle colloidali e (b) la relativa distribuzione di probabilità [7].

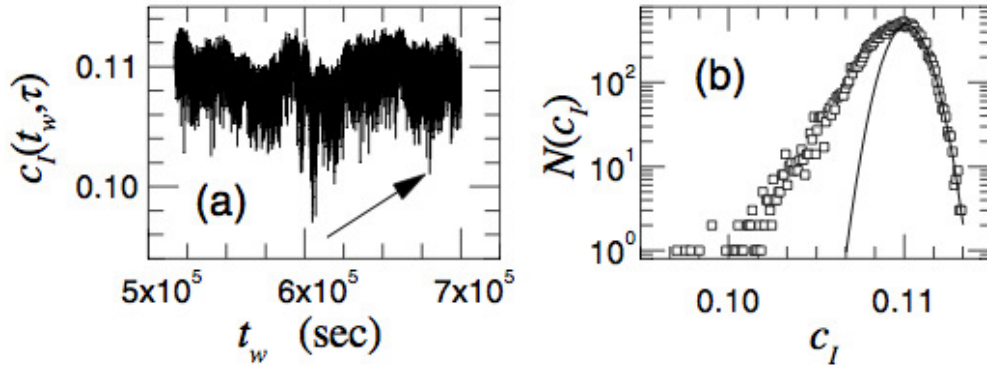


Figura 1.10: (a) Indice di correlazione per un gel e (b) la sua distribuzione di probabilità [7].

ottimo fit con una gaussiana, bensì la curva è distorta, per via dei grandi movimenti di riorganizzazione che portano a perdite di correlazione.

Se si indaga su un intervallo di tempo, dove il gel presenta un indice di correlazione che non cambia di molto, e si media su un tempo che è più piccolo del tempo caratteristico di evoluzione della cinetica indagata, si ottiene una nostra cara conoscenza:

$$g_2(\tau) = \left\langle \frac{\langle I_p(t)I_p(t+\tau) \rangle_p}{\langle I_p(t) \rangle_p \langle I_p(t+\tau) \rangle_p} \right\rangle_t \quad (1.21)$$

dove con $\langle \dots \rangle_t$ si indica la media nel tempo, ottenendo un risultato statisticamente consistente e libero da rumore statistico dovuto al campionamento [8].

Quindi con solo l'*indice di correlazione* si possono trarre le informazioni di in un esperimento di DLS, ma con il vantaggio di avere una migliore

accuratezza statistica e di indagare su tempi δt molto inferiori rispetto a quelli richiesti da una misura standard in DLS. In ultima analisi dando un'occhiata ancora all'*indice di correlazione* c_I si può estrarre la varianza relativa χ :

$$\chi(\tau) = \langle (c_I(\tau; t, \mathbf{r}))^2 \rangle_{\delta t} - \langle c_I(\tau; t, \mathbf{r}) \rangle_{\delta t}^2 \quad (1.22)$$

che quantifica l'evoluzione temporale in termini di dinamica lenta e dinamica veloce, dovuta ad eventi improvvisi all'interno del gel. Infatti gli eventi di ricostruzione che hanno dinamica lenta sono evidenziati con un picco nel grafico della $\chi(\tau)$ che è comparabile temporalmente col tempo di rilassamento τ della funzione g_2 , mentre gli improvvisi riarrangiamenti, che esistono su una dinamica veloce, caratterizzano χ con repentini aumenti di valore.

Un ulteriore pregio di questa tecnica è riuscire a identificare esattamente le informazioni spaziali. Infatti, sull'ottica di raccolta viene formata un'immagine del volume diffondente: da un lato i centri diffusori non sono perfettamente risolti, ma dall'altro si crea uno speckle pattern raccogliendo luce all'interno di tutta la profondità di campo concessa dalle lenti, acquisendo così anche il segnale di Near Field. Ogni speckle riceve un contributo da un diffusore localizzato in un piccolo volume. In questo modo le fluttuazioni d'intensità di ogni speckle sono legate alla dinamica di una piccola porzione ben definita localmente del campione. Quindi, con i dati relativi al coefficiente di correlazione è possibile ridisegnare il volume d'indagine e creare delle *Dynamic activity Maps*, ovvero delle vere e proprie mappe che danno il comportamento in tempo reale del campione in termini di correlazione e decorrelazione:

In ultima analisi con questa tecnica possiamo si può andare oltre e indagare i moti locali all'interno del fluido indagato. Infatti il movimento stesso della speckle è il movimento idrodinamico locale. Quindi semplicemente lavorando sul campo speckle è possibile estrarre anche l'idrodinamica del sistema.

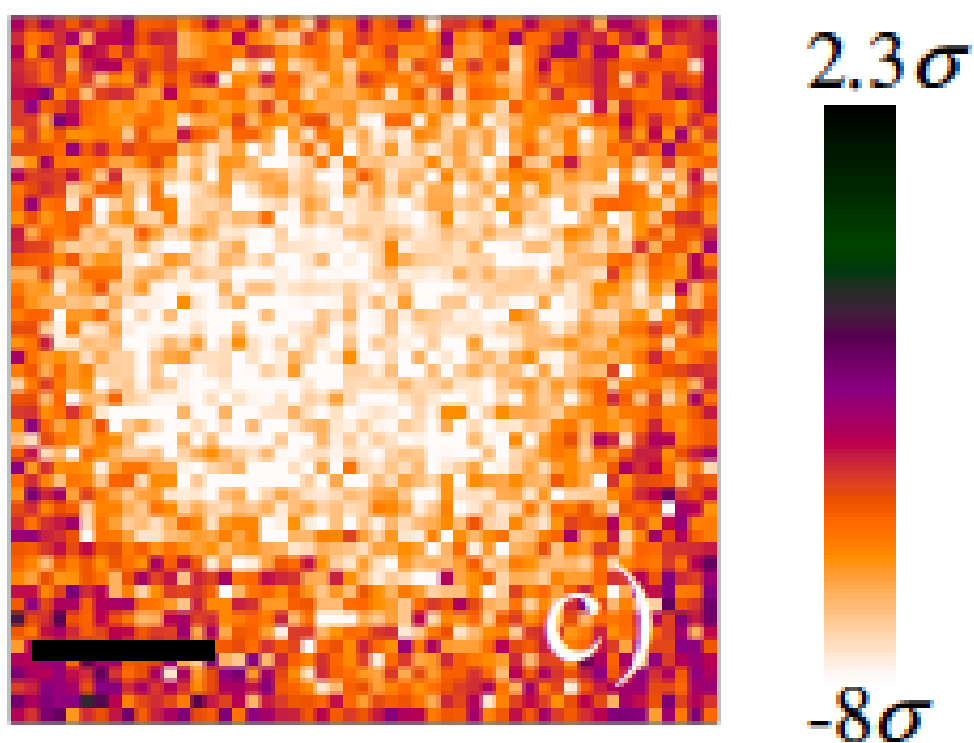


Figura 1.11: DMAP di un gel colloidale. La correlazioni vengono espresse in funzione della varianza [11].

Capitolo 2

Gel

I sistemi che verranno studiati e descritti in questa tesi appartengono alla categoria *soft matter*. Con questo nome si designa un vasto mondo, che va dalle sospensioni colloidali, alle macchine molecolari, ai polimeri, ai cristalli liquidi. Tutti questi materiali sono “soffici” ovvero facilmente deformabili, e caratterizzati da comportamenti fisici che avvengono per lo più con un’energia termica a temperatura ambiente. In questo mondo rientrano anche delle forme di materiali molto particolari, caratterizzate da uno stato microscopico quasi arrestato: gel e vetri. In questo capitolo ci focalizzeremo sulla classe dei gel, poi oggetto di studio nella parte sperimentale.

I gel sono sistemi che vivono in uno stato metastabile, quindi fuori equilibrio, dove la transizione a uno stato è dettata solo dalla cinetica presente e non dalla termodinamica [15]. Infatti le funzioni di stato termodinamiche sono sempre definibili basta che ci si riferisca a una scala temporale adeguata. Ciò che realmente porta da uno stato all’altro, ovvero dallo stato liquido allo stato gassoso è la cinetica. Un gel è un sistema costituito da particelle che si aggregano col passare del tempo e presentano comportamento Browniano. La cinetica di gelazione prevede un continuo rallentamento dell’organizzazione interna della struttura, arrivando ad una situazione di non equilibrio e cadendo in uno stato metastabile. Dei movimenti interni rimangono ma su scale temporali, a volte, estremamente lunghe.

Nell’analizzare il cambiamento di struttura avvenuto nei gel, ci riferiremo al *tempo di aging*, ovvero il tempo d’invecchiamento del gel, che tiene conto di quanto tempo è passato dalla formazione del gel allo stadio attuale. Saranno poi definiti *tempi di decadimento di correlazione*, ovvero i tempi caratteristici della dinamica microscopica del sistema, dove la struttura non subisce modificazioni rilevanti. Per alcune classi di gel questi due tempi sono nettamente distinti, come nel caso dell’alginato [11], mentre in altri casi i tempi di decadimento e quello di aging possono essere molto simili.

I gel di nostro interesse saranno in particolare hydrogel polimerici realizzati con un polimero naturale: la Pectina. Analizziamo nel seguito le caratteristiche di formazione e struttura degli hydrogel, delineando utilizzi ed applicazioni, quindi rivolgeremo l'attenzione al polimero di nostro interesse, la Pectina.

2.1 Hydrogels

Gli hydrogels sono un'importante categoria di materiali, appartenenti alla macro-famiglia dei gel, con un altissimo interesse applicativo in settori che vanno dall'industria biomedica, all'industria alimentare, a quella dei giocattoli. Strutturalmente sono dei macropolimeri tridimensionali in grado di trattenere elevatissime quantità di solvente, di solito acqua, con grandissima affinità termodinamica per il solvente stesso, senza però sciogliersi in esso [14]. Il reticolo polimerico costituisce una parte del gel ma principalmente tutto il peso è dovuto all'enorme quantità di acqua presente. Il processo con cui si formano va sotto il nome di *gelazione* che prevede due fasi principali. Nella prima fase si crea il "sol", dove le macromolecole vengono unite l'una all'altra formando un polimero di grosse dimensioni ancora solubile in acqua. Col passare del tempo si entra nella seconda fase dove il numero delle macromolecole associate l'una all'altra cresce sempre più fino a realizzare un polimero "infinito" con transizione di fase, arrivando a uno stadio metastabile compreso tra la fase liquida e quella solida. Tale punto, in un diagramma di fase, è caratteristico per ogni gel e prende il nome di *gel point*, mentre tutta la seconda fase va sotto il nome di "*sol-gel*" [16]. La gelazione può avvenire in due modi: mediante legami *fisici* oppure *chimici*. Legami fisici sono legami dovuti a interazioni ioniche, idrofobiche e legami idrogeno. In particolare gli hydrogels con gelazione di tipo fisico si suddividono a loro volta in *gel forti*, dove i legami che si sono stabiliti sono permanenti e portano ad un gel molto denso con un alto modulo elastico, e *gel deboli*, dove i legami sono temporanei che si rompono e si riformano continuamente, con un caratteristico tempo di vita. Gli hydrogels con legami fisici possono essere solubilizzati controllando le condizioni dell'ambiente, pH, temperatura, forza ionica, e quindi sono detti reversibili. Esempi di gel di tipo fisico sono gel di alginato o pectina, che si formano mediante intercanalazione di ioni Ca^{2+} . I gel creati mediante gelazione chimica presentano legami di tipo covalente, quindi legami forti che non permettono riarrangiamenti strutturali. Esempi di tali gel sono i gel di poliacrilammide, utilizzato in ambito biomedico per indagini come SDS-PAGE.

La forte presenza di acqua porta l'hydrogel ad avere caratteristiche simili a quelle di un fluido, con la capacità d'inglobare un soluto sotto opportune condizioni chimico fisiche e rilasciarlo successivamente in un altro ambiente. Questo aspetto ha indirizzato la ricerca biomedica verso lo sviluppo di beads per drug delivery, ovvero piccole sferette di hydrogel caricate con un farmaco, che in condizioni di pH a temperatura fisiologica, rilasciano il soluto. Le proprietà degli hydrogels sono influenzate dalle proprietà meccaniche, influenzate dalla composizione chimica del polimero, dagli agenti reticolanti,

dalle condizioni dell'ambiente di sintesi e dal grado di rigonfiamento. Di fatti nell'intero hydrogel c'è un sottile equilibrio di forze, tra cui:

- le *forze primarie di legame con l'acqua*, che sono costituite dall'interazione tra le parti idrofiliche del polimero e l'acqua,
- le *forze di legame secondarie*, con la creazione di cluster idrofobici che intrappolano le molecole d'acqua,
- la *forza di richiamo elastico* dovuta alla presenza di ioni o agenti chimici cross linkanti che richiamano la struttura con una forza opposta a quella di rigonfiamento.

Quindi più è grande la densità di reticolazione, tanto più cresce la rigidità del materiale e le catene polimeriche sono impaccate tra di loro, tanto diminuisce la capacità di rigonfiamento del materiale. Questo gioco tra forze porta gli hydrogel a mostrare un'ampissima gamma di comportamento elastico e di proprietà reologiche sotto sforzo, mostrando comportamenti che vanno dall'essere dei semplici fluidi a gel molto resistenti.

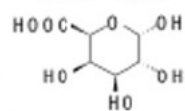
2.2 Pectina

La pectina è un polimero complesso costituito da più di 20 differenti monosaccaridi ampiamente presente in natura e utilizzata in svariati campi che vanno dall'industria alimentare a quella medica. In natura rappresenta la componente principale della parete cellulare delle piante, della frutta e della verdura. La sua funzione è quella di apportare forza e rigidità alle strutture cellulari in crescita, oltre a influenzare caratteristiche come la porosità, la carica superficiale, il pH, il bilancio ionico, configurandosi quindi come elemento di grandissima importanza per il trasporto intercellulare. Nell'industria alimentare la pectina, estratta principalmente dalla buccia di mele o limoni, è utilizzata come gelificante, stabilizzante o come addensante in prodotti come marmellate, yoghurt, bevande e gelati. Un sempre più grande interesse è rivolto alla pectina come medicinale, che sembra dare buoni risultati contro problemi dell'apparato digerente, addirittura avere un effetto sul livello di colesterolo nel sangue, e di controllo sul glucosio. [57–59] Recenti utilizzi sono stati fatti nell'ingegneria dei tessuti e medicina rigenerativa. La pectina viene gelificata per formare delle beads biocompatibili su cui caricare farmaci, oppure per formare degli scaffold per la crescita cellulare. Nella medicina rigenerativa viene utilizzato come dermal filler, o cerotti per ustioni. [60]

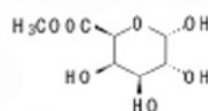
La comprensione della struttura di questo polimero, dei meccanismi di gelificazione, e la caratterizzazione delle sue proprietà meccaniche hanno

notevoli risvolti pratici. La pectina è definita come un biopolimero eteropolisaccaride, costituito da una catena principale *acido galatturonico* (*GalA*), che prevede delle zone formate da zuccheri neutri, come l'*acido ramnogalatturonico I* e *ramnogalatturonico II*.

La regione *omogalatturonica* (*HG*) costituisce il 60% del peso totale della pectina e ha una lunghezza di circa 70-100 residui di GalA. HG presenta legami (1→4)-d- tra acidi galatturonici (1,4-d-GalpA), alcuni dei quali presentano delle estremità metil-esterificate a livello del carbonio C-6 o, talvolta, acetil-esterificate sull'ossigeno O-2 od O-3. La metilesterificazione, in partico-



(a) α -D-GalpA



(b) 6-O-metil- α -D-GalpA

lare, ha guadagnato attenzione nella ricerca, siccome influenza pesantemente le capacità della pectina di formare cross link con ioni divalenti come Ca^{2+} , anche la distribuzione stessa dei residui esterificati può essere un elemento determinante. Tuttavia queste sono solo argomentazioni preliminari e molto dibattute. Ciò che è certo è che il rapporto tra i residui metil-esterificati (6-O-metil-D-GalpA) del backbone pectinico e il totale delle unità carbossiliche dà il *grado di esterificazione* (*DE*). In base al grado di esterificazione, le pectine sono classificate come *a basso metossile*, indicate con LM e con un $\text{DE} < 50\%$, o ad *alto metossile*, HM con $\text{DE} > 50\%$. Tale caratteristica è predominante nella formazione di gel ad uso biomedico per il drug delivery e la formazione di gel [56].

Lo scheletro principale della pectina vede delle inserzioni di *acido ramnogalatturonico* (*RG I*), composto dalla ripetizione del disaccaride galatturonico-ramnosio (1,4- α -D-GalpA-1,2- α -L-Rhap)_n, dove l'acido galatturonico (GalA) non presenta metil-esterificazione.

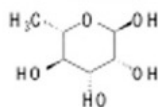
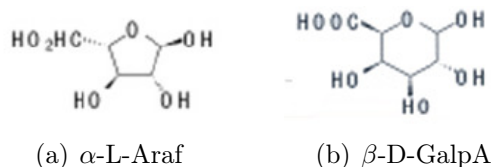


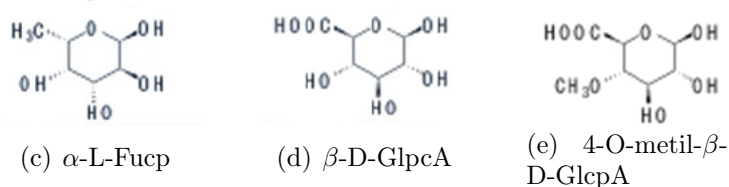
Figura 2.1: Acido ramnmgalatturonico , α -L-Rhap

La quantità di queste unità disaccardiche varia da pectina a pectina, andando dalle centinaia di ripetizioni nella pectina ricavata dal Sycamore,

ai 20 residui, invece, della barbabietola [60]. In ogni pectina, tuttavia, questo scheletro presenta delle catene laterali, dette *hairy region*, con delle modifiche chimiche, a livello dell'ossigeno O-4, dove vi è la sostituzione del residuo ramnosile con uno zucchero neutro come l'arabinofuranosio e galattosio (α -L-Araf e β -D-Galp),



oltre a fucosio, glucopiranosio e 4-O-metilglucopiranosio (α -L-Fucp, β -D-GlcpA, 4-O-metil- β -D-GlcpA) [17].



In alcune pectine, come quella derivata dalla mela, si parla di *modified hairy region*, per la presenza di ripetizioni $[\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GalpA-(1}\rightarrow]$, con sostituzioni alternate e periodiche di residui di ramnosio con galattosio.

A seguire, la seconda inserzione che si può trovare sulla catena principale di acido galatturonico, è costituita da un secondo dominio di *acido ramnogalatturonico* (RG II). Questa parte presenta una struttura più complessa: un piccolo backbone, che consiste di residui 1,4- α -D-GalpA, con catene laterali costituite da differenti zuccheri quali il ramnosio, l'acido galatturonico, galattosio, arabinofuranosio, fucosio, apiofuranosio (I-Rhap, -D-GalpA, -I-Araf, -I-Fucp, -D-Apif). Queste catene laterali sono attaccate a frammenti di HG di

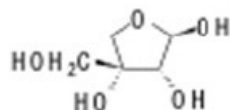


Figura 2.2: β -D-Apif

circa nove residui di GalA metil esterificati. La struttura del RG II sembra altamente conservativa nel regno vegetale.

Sulla catena di HG possono seguire ulteriori sostituzioni dall'acido galatturonico, una delle quali è la presenza dell'*acido xilogalatturonico*, abbondantemente presente nelle mele, 75%. Un altro zucchero presente è l'*arabinogalattano I (AG I)* composto da α -L-Araf attaccato a livello dell'O3 del residuo galattosile. Infine, è possibile trovare anche dell'*arabinogalattano II (AG II)* composto da catene corte, talvolta legate a proteine. [60]

Da questo quadro la complessità del biopolimero pectina, che prevede un vastità di stati possibili per il posizionamento dei singoli domini, rende problematica la comprensione di come siano arrangiati spazialmente tutti i costituenti. Un primo modello è il *Rhamnogalacturonan model*, fig.2.3, che prevede un backbone principale costituito da legami α -1,4- tra residui di galatturanosio con ramnosio. I residui di rammosile non sono distribuiti casualmente nella catena, ma presentano una sequenza disaccaridica del tipo: rammosile-(1-4)-galatturonosile(1 \rightarrow 2). A questa sequenza si alterna una sequenza di 4/10 HG. Inoltre, il residuo ramnosile presenta un sito d'attacco per il galattano [60].

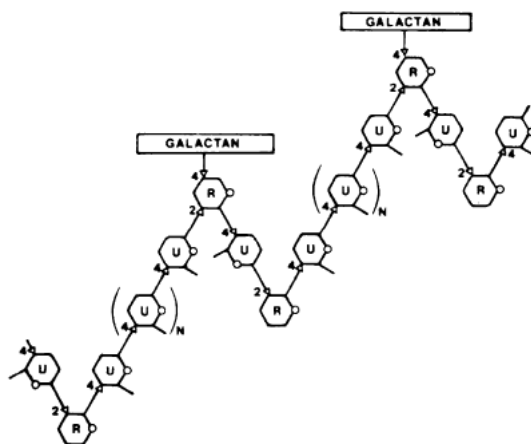


Figura 2.3: *Rhamnogalacturonan model*. Con U si indica l'acido galatturonico, con R l'acido ramnogalatturonico [60].

Un secondo modello, più accreditato, è il *Smooth Hairy Regions*, Fig.2.4, che prevede una regione di HG come backbone principale, senza ramificazioni (*smooth*), in cui vi sono delle inserzioni di altri zuccheri che portano a delle ramificazioni, *hairy*, che sono neutre elettricamente. Le hairy regions sono costituite principalmente da segmenti di acido xilogalatturonico, XGA, disaccaridi di ramnogalatturonico e arabinonico, e oligosaccaridi di ramnogalatturonico. Da questo quadro emerge che la pectina è un blocco polimerico composto da elementi strutturali posizionati nelle hairy regions, interdistribuiti da una catena di 70-100 residui di GalA (HG region) [60].

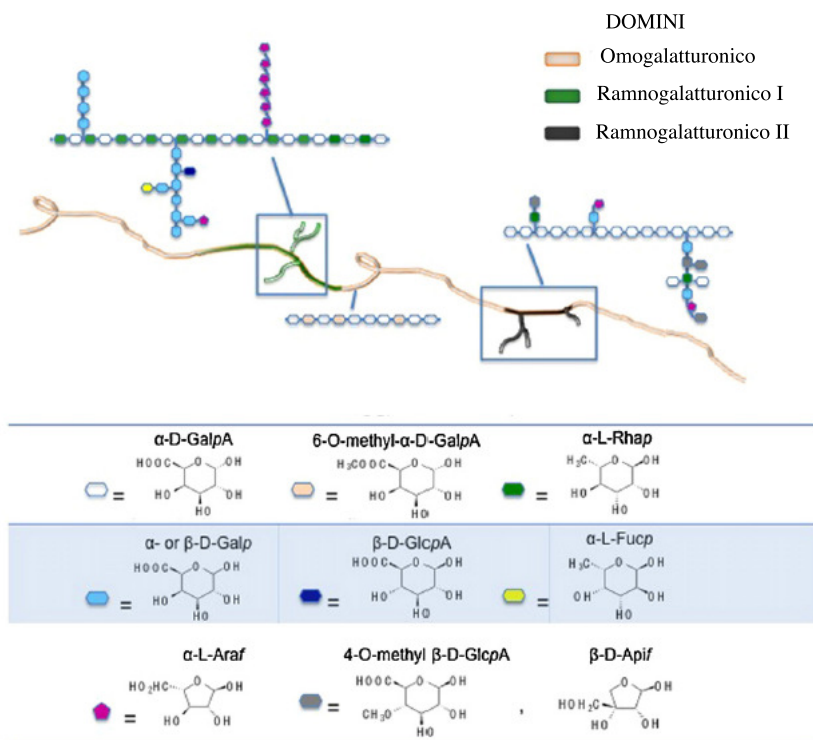


Figura 2.4: Modello *smooth hairy regions* e relativi monosaccaridi che costituiscono i domini [17].

Delineate le caratteristiche chimiche passiamo alla descrizione della fisica implicata nel processo di sintesi dei gel di pectina. Come è stato detto precedentemente il grado di esterificazione presente nella catena pectinica può determinare la formazione di un gel o meno. Oltre a questo intervengono anche altri parametri come il pH, la temperatura e la presenza di cosoliti o cationi. Per pectine HM, quindi con più del 50% di carbossili esterificati, i gel possono essere formati solo con $\text{pH} < 3.5$ e in presenza di più del 55% (w/v) di cosoliti, come il saccarosio, a causa della formazione di impedimenti sterici, interazioni idrofobiche e legami a idrogeno.

La formazione di gel con pectina LM avviene, invece, in presenza di ioni positivi divalenti, come il Ca^{2+} in un'ampio intervallo di valori di pH, con o senza co-soliti. La pectina che verrà utilizzata nella parte sperimentale è a basso grado di esterificazione, quindi analizziamo come avviene la gelazione in questo caso. Il modello teorico a cui si riferisce per polimeri come la pectina è quello detto a *egg box* (Fig.2.5), ovvero le catene si dispongono parallelamente l'una all'altra, formando così della cavità in cui è possibile intrappolare uno ione tramite legami elettrostatici dovuti alla carica negativa degli atomi di ossigeno appartenenti a due catene adiacenti [11].

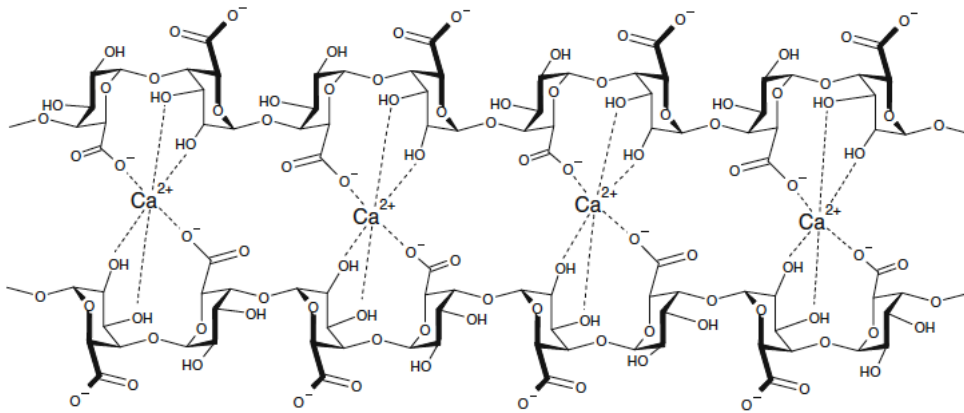


Figura 2.5: Egg box creato dall'acido galatturonico, costituente principale della pectina [60].

All'inizio lo ione induce una dimerizzazione tra catene parallele, quindi in cascata segue la formazione di tetrameri, esameri ecc. solo con legami elettrostatici. Braccini *et al.* [61] tramite simulazioni molecolari hanno analizzato le possibili conformazioni del dimero pectinico e della catena polimerica corrispondente. Partendo dall'unità di base, ovvero dell'acido galatturonico, Fig. 2.6, hanno delineato le proprietà conformazionali in termini di energia torsionale.

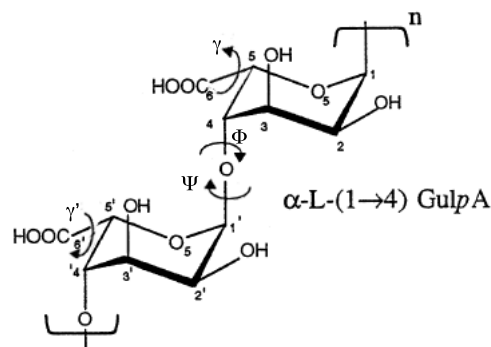


Figura 2.6: Gli angoli torsionali γ e γ' sono riferiti agli acidi carbossilici in posizione 6 e 6', mentre Φ e Ψ al legame β -1'-4 [61].

Il dimero presenta un grado di libertà torsionale a livello degli acidi carbossilici, angoli γ e γ' , che hanno un minimo di energia per valori di $\gamma=130^\circ$ e $\gamma'=-140^\circ$, e un grado di libertà nel legame assiale che coinvolge gli atomi O5'-C1'-O4-C4, angolo ϕ , e C1'-O4-C4-C5, angolo ψ . Per questi ultimi due angoli è stato possibile definire una mappa adiabatica, Fig.2.7, in cui si evidenziano due zone di minimo A e B, con parametri conformazionali elen-

cati in Tabella 2.1, e mostrano la presenza di un debole legame a idrogeno $O2 \cdots O6'$.

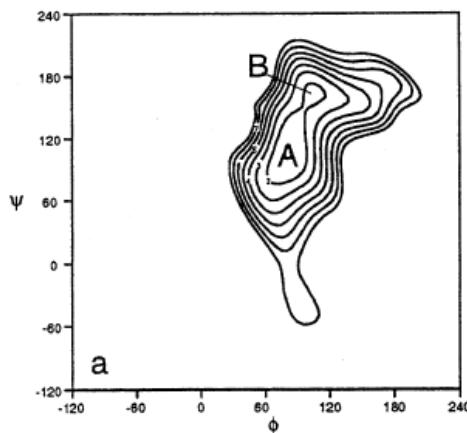


Figura 2.7: Mappa adiabatica in funzione degli angoli di torsione Φ e Ψ . Con A e B vengono indicati due minimi in energia potenziale [61].

Tabella 2.1: Valori conformazionali nei minimi d'energia A e B

Disaccaride	Minimi	Φ	Ψ	γ'	γ
α -D-di-GalpA	A	-99	-169	-133	-137
α -D-di-GalpA	B	-72	-108	-133	-143

Secondo la configurazione ottenuta, Braccini *et al.* hanno analizzato catene polimeriche di più residui, andando a definire la configurazione spaziale estrapolabile dai minimi A e B. La struttura tridimensionale che si ricava è una doppia elica per il minimo in A e una tripla elica per B, come mostrato in figura 2.8 in prospettiva. Non si può definire quale sia l'orientamento preferenziale, tuttavia da qui è possibile studiare la rigidità e le proprietà polimeriche della pectina e definire un confronto con la *lunghezza persistente* L_p . Tale parametro quantifica la rigidità di un polimero, ed è definito come k_f/K_bT , dove k_f è la rigidità flessionale misurata in Jm , K_b è la costante di Boltzmann, e T la temperatura. Dalle misure di microscopia elettronica e dinamica molecolare Braccini definisce una lunghezza persistente di 166 Å, che rappresenta la lunghezza di una catena con 50 residui, configurando il polimero pectinico come un polimero ad alta rigidità.

Oltre alla lunghezza persistente queste catene polimeriche ad elica presentano efficaci disposizioni dei siti di legame per il calcio. La conformazione a tripla elica in particolare offre dei siti in più rispetto alla doppia elica, e

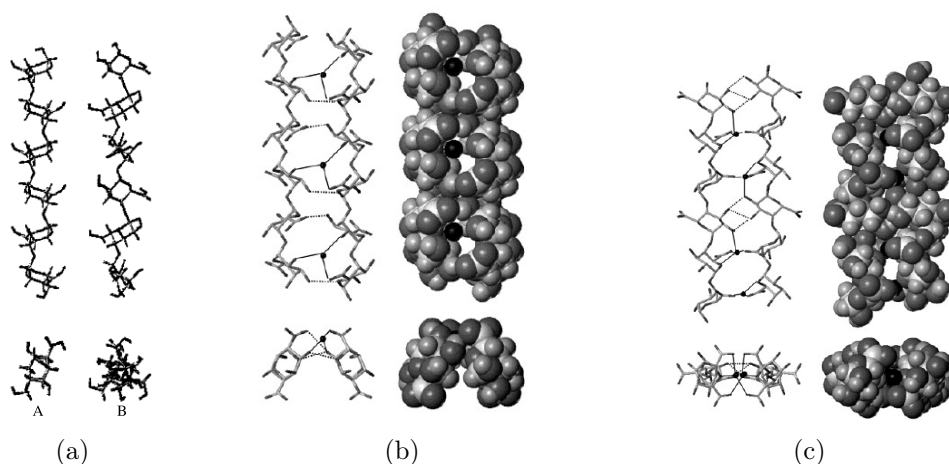


Figura 2.8: in a) doppia e tripla elica in prospettiva. In b) e c) rappresentazione in stick e Van der Waals rispettivamente di due catene di acido galatturonico disposte a: doppia elica, antiparallela e tripla elica, interagenti con ioni Ca^{2+} (sfere nere) [62].

presenta cavità tetradentate adatte per la chelazione, tramite quattro atomi di ossigeno. Tuttavia, da esperimenti di diffrazione con raggi X di pectina in sovrasaturazione di calcio, emerge che non tutti e quattro gli ossigeni sono coinvolti nel legame, per l'esattezza solo gli ossigeni O-5, O-6, O-2' per una catena e O-6 e O-2' per l'altra coordinano l'interazione col calcio. Dunque, è plausibile che l'egg box model non sia applicabile alla pectina.

In [62], Braccini *et al.* viene studiato quindi il modello adatto per la gelazione pectinica. Tramite dinamica molecolare viene definito l'orientamento delle singole catene che costituiscono l'elica. Dai dati dedotti la disposizione migliore risulta essere quella a doppia elica con catene antiparallele. In particolare questa struttura presenta un network di legami a idrogeni efficienti tra $\text{O6} \cdots \text{O3}$, di $2,78\text{\AA}$, e $\text{O5} \cdots \text{O3}$, $2,67\text{\AA}$, che si alternano con i siti d'interazione per il calcio.

Le cavità, Fig.2.8, presentano tre ossigeni impegnati nel legame elettrostatico con il calcio, con una distanza $\text{Ca} \cdots \text{O}$ di $2,43\text{-}2,82\text{\AA}$. Inoltre, è stato effettuato un confronto con una pectina a egg box model, Fig.2.9, che però presenta delle cavità che sono di dimensioni superiori a quelle consentite per un'efficiente chelazione dello ione Ca^{2+}

Quindi il modello che più si adatta per la gelazione della pectina è un *shifted egg box*, che presenta tra una catena e l'altra uno shift di circa $1,7\text{\AA}$ che permette:

- un'ottima associazione con numerosi contatti di tipo Van der Waals



Figura 2.9: Rappresentazione Van der Waals della doppia elica pectinica secondo la teoria egg box. Le sfere nere sono gli ioni Ca^{2+} [62].

- la riduzione della grandezza delle cavità così da migliorare la chelazione dello ione gelante
- un network di legami a idrogeno periodico, che può portare un grande contributo alla resistenza e forza del gel finale

Dunque, la teoria [62] sembra prevedere i risultati sperimentali e rafforza l'idea di un processo a due step proposto per la gelazione indotta da ioni calcio. Si ha un'iniziale dimerizzazione, che corrisponde a forti associazioni intercatena, a cui segue una cascata che porta alla formazione di tetrameri, esameri e così via.

2.2.1 Analisi della produzione di hydrogel di pectina mediante gelazione interna

Concludiamo questo sguardo sulla pectina descrivendo i due articoli di riferimento per il lavoro di tesi. Il primo di P. Petrini *et al.* [18] presenta una caratterizzazione macroscopica di gel di pectina, definendo le proprietà reologiche, il controllo del pH e la cinetica di gelazione. Il secondo lavoro, di E. Secchi *et al.* [11], descrive l'utilizzo della PCI, tecnica utilizzata nella parte sperimentale, e le informazioni dal punto di vista microscopico, che si possono ottenere da questa tecnica sullo studio di gel.

Petrini *et al.* [18] hanno analizzato gli effetti del pH e della concentrazione di gelante (CaCO_3) sui gel di pectina e le proprietà meccaniche che ne derivano. Il pH è stato controllato mediante l'utilizzo di NaHCO_3 e NaOH .

Tabella 2.2: M_w e M_n della pectina a differenti pH.

Soluzione	pH	M_w (kDa)	M_n (kDa)	M_w/M_n
Pectina + NaHCO_3	3.62	387	164	2.3
	3.88	341	117	2.9
	4.63	344	107	3.2
	6.25	99	32	3.1
	8.07	93	44	2.1
Pectina + NaOH	3.63	398	151	2.6
	3.86	n.a.	n.a.	n.a.
	4.21	355	68	5.1
	4.72	374	131	2.8
	5.35	328	135	2.4
	11.0	118	28	4.1

Come descritto in Tab. 2.2, all'aumentare del pH corrisponde un aumento del peso molecolare, fino a un valore di pH pari a 5.35. Questo risultato indica che il volume idrodinamico delle catene di pectina aumenta per via della reazione di salificazione che vede coinvolti gli acidi carbossilici e di conseguenza aumenta la repulsione elettrostatica tra carbossilati. Sopra il valore di $\text{pH}=5.35$ avviene una riduzione in termini di peso molecolare per via della depolimerizzazione per β -eliminazione dello scheletro pectinico. Mediante le curve di titolazione, Fig.2.10, è possibile stabilire la velocità di variazione del pH con NaOH e NaHCO_3 . Come si può vedere la variazione del pH di una soluzione di pectina diventa più veloce con l'utilizzo di bicarbonato di sodio (NaHCO_3) per via del suo lento effetto tampone e una più moderata neutralizzazione dei gruppi carbossilici, così da garantire un controllo più raffinato del pH finale.

Quindi sono state effettuate prove reologiche sui gel a differenti valori di pH, controllato con NaHCO_3 , e a diverse concentrazioni di carbonato di calcio (CaCO_3). All'aumentare del pH e del contenuto di calcio l'aspetto dei gel diventa sempre più simile a quello di un solido come mostrato in figura 2.11. Tramite i valori di G' , storage modulus, e G'' , loss modulus, si può definire il "gel point" ($\tan\delta \simeq 1$) che definisce il passaggio da comportamento liquido a solido/gel. In figura 2.12, viene riportata l'evoluzione dei due moduli per un gel di pectina 23 mM in NaHCO_3 e 12.5 mM in CaCO_3 indicando il relativo gel point. Analizzando più tipologie di gel, si nota che il tempo di gelazione

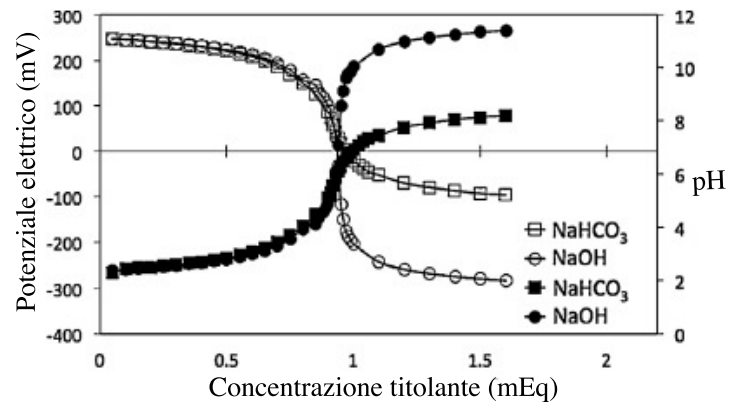


Figura 2.10: Curve di titolazione per la pectina, con titolante NaOH e NaHCO₃ [18].

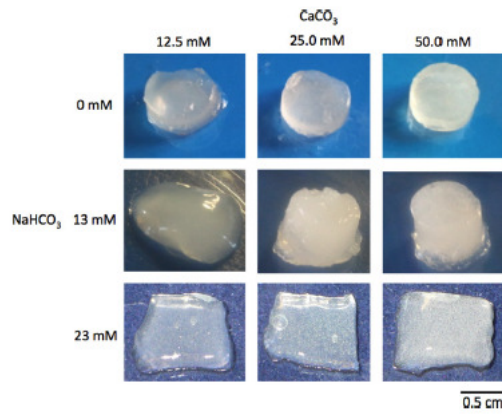


Figura 2.11: Campioni di gel di pectina a diverse concentrazioni di NaHCO₃ e di CaCO₃ [18].

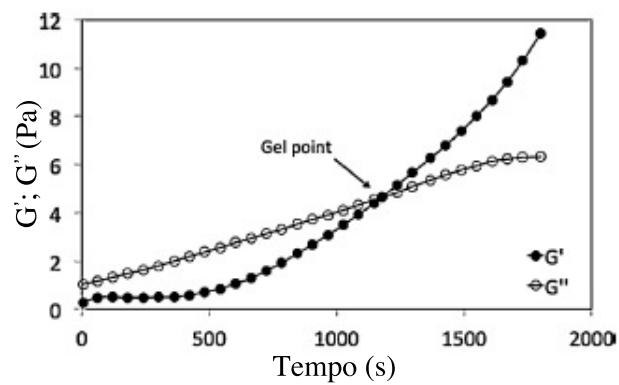


Figura 2.12: Evoluzione dei moduli G' e G'' di un gel di pectina 23 mM in NaHCO₃ e 12.5 mM in CaCO₃. Il punto d'incontro delle due curve identifica il gel point a circa 17 minuti [18].

è dipendente dalla concentrazione di CaCO_3 e di pH, in particolare all'aumentare di calcio si anticipa la posizione del gel point. Inoltre, più è acida la soluzione più aumenta la solubilità del carbonato di calcio e diminuisce il tempo necessario per gelare.

Per testare le proprietà meccaniche vengono effettuate prove di reologia a diverse frequenze, nel regime viscoelastico lineare. In figura 2.13 vengono comparati i valori di G' per differenti concentrazioni di NaHCO_3 . Si vede che all'aumentare di pH diminuisce il modulo di G' , ma sostanzialmente tutti e i tre tipi di pectina a uguale pH hanno lo stesso valore medio. Quindi viene analizzato il valore della viscosità complessa, che permette di definire un comportamento comune per tutti i gel di tipo shear-thinning, associato a una diminuzione della viscosità. Infine, vengono proposti dei creep test, che di-

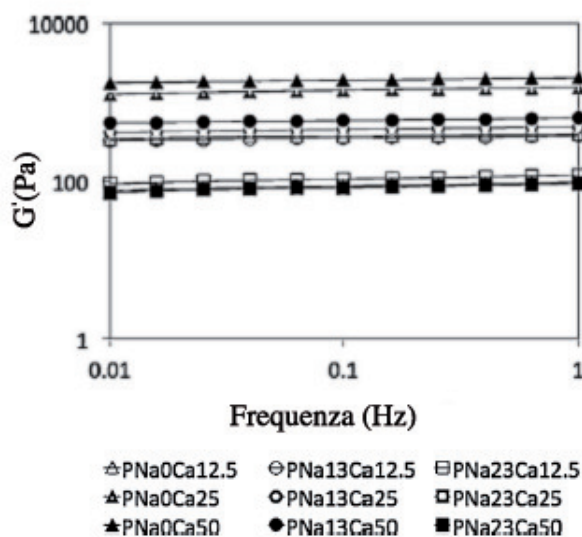


Figura 2.13: Storage modulus per gel di pectina in funzione della frequenza. Con P si indica Pectina, Na indica la molarità di bicarbonato di sodio, Ca la concentrazione di carbonato di calcio [18].

mostrano che al diminuire del pH la deformazione e la compliance complessa diminuiscono, evidenziando un aumento in rigidità del materiale (Fig.2.14). Inoltre mediante la creep compliance si possono vedere dei lenti cambiamenti su tempi lunghi. Questo fatto suggerisce che i crosslink tra le catene dell'hydrogel non siano permanenti ma possano rompersi e riorganizzarsi quando il gel è deformato.

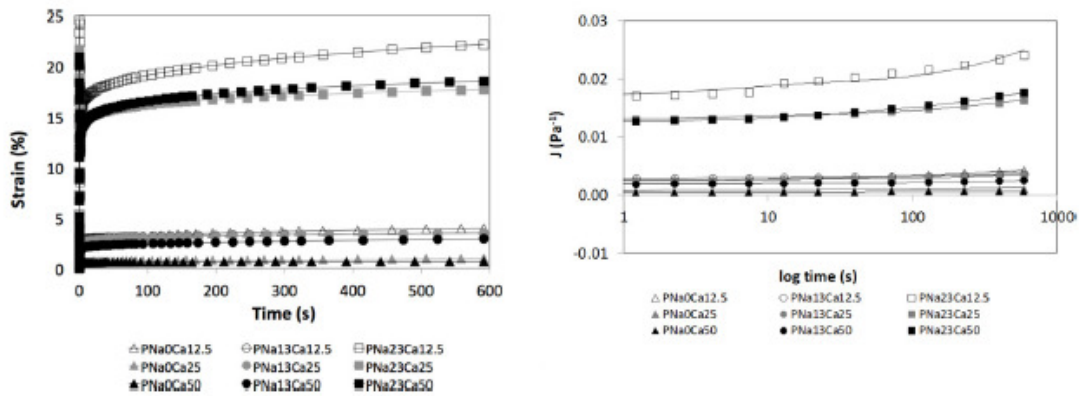


Figura 2.14: Creep test per gel di pectina: deformazione e creep compliance [18].

2.2.2 Studio di gel di alginato mediante PCI

L'alginato è un polisaccaride non ramificato, isolato dalle alghe marroni, ed è ampiamente utilizzato come materiale per la tissue engineering, ad es. per immobilizzare cellule e, recentemente, per ottenere, mischiato con poliacrilammide, dei gel che sopportano altissime deformazioni senza rompersi. Strutturalmente l'alginato è costituito da blocchi di copolimeri, composti da acido β -D-mannuronico (M) e acido α -L-guluronico (G) posizionati in pattern a blocchi, dove tra catene omopolimeriche di M, M-blocks, e G, G-blocks, si interpongono regioni di strutture alternate (GM-blocks). L'aggiunta di cationi divalenti come il Ca^{2+} , porta alla formazione di gel ionici, per via della formazione degli egg-boxes. La caratteristica di questi legami fisici è la loro natura reversibile, che permette riarrangiamenti continui, che portano a uno shrink del gel su tempi lunghi.

Per seguire la gelazione [11], la soluzione di alginato è confinata nella parte bassa di una cuvette otticamente accessibile, e separata da una membrana con pori da $100 \mu\text{m}$, al di sopra della quale viene posta un reservoir contenente $CaCl_2$. La geometria della cella permette di indagare un'area rettangolare, di altezza $L \simeq 16 \text{ mm}$ e con una larghezza $W \simeq 6.4 \text{ mm}$, così da poter seguire anche l'interfaccia Calcio-Alginato. La gelazione viene fatta cominciare riversando il cloruro di calcio, 0.1 M , nella parte superiore della reservoir, ed evitando che si formino bolle d'aria. La tecnica ottica utilizzata per lo studio del gel è la PCI, descritta nel cap.1. L'illuminazione è fornita da un laser a 50 mW , operante a $\lambda = 656 \text{ nm}$ e con l'aiuto di una lente cilindrica di lunghezza focale $f = 300 \text{ mm}$ è possibile creare una lama di luce di spessore $w = 20 \text{ mm}$. Un sensore CMOS ($300\text{px} \times 120\text{px}$) attraverso un'iride, con cui controllare la grandezza delle speckle, acquisisce le immagini. Infine, il tempo di esposizione scelto è di $1/15 \text{ s}$, con un intervallo temporale tra le

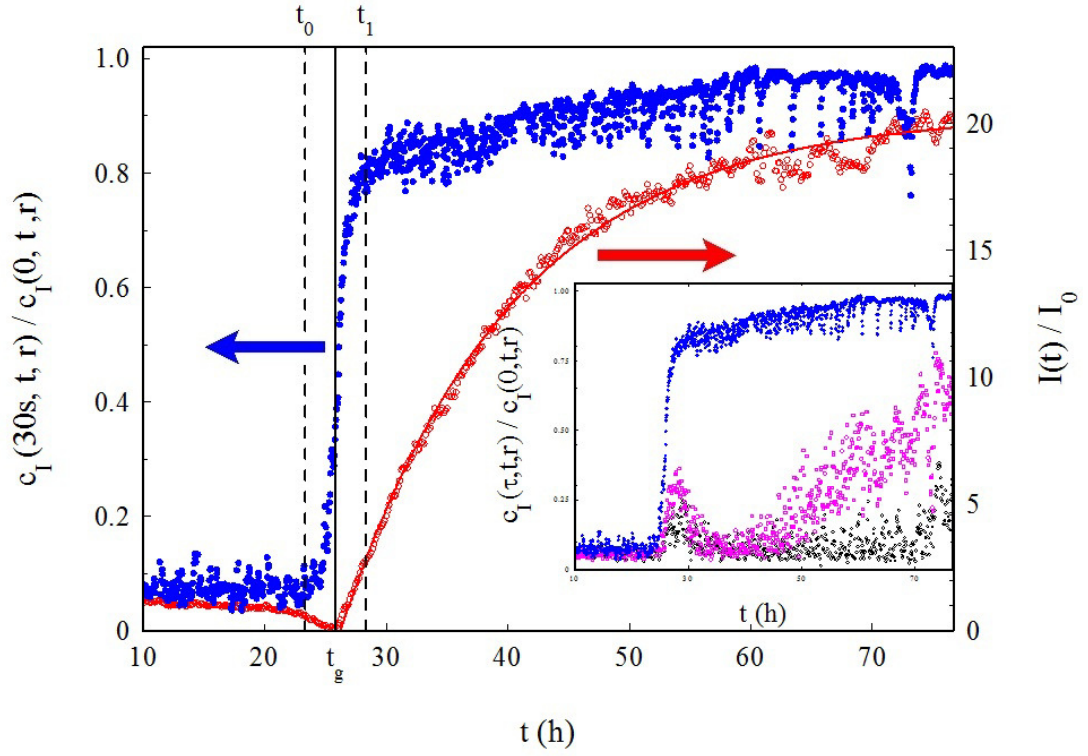


Figura 2.15: Dipendenza temporale del rapporto $I(t)/I(0)$ delle intensità (punti aperti, asse sulla destra) e dell'indice di correlazione $\hat{c}_I(\tau, t, z)$ calcolato a un ritardo $\tau = 30$ s (punti pieni), misurati per una ROI posizionata a $z = 5$ mm. La linea continua è un'esponenziale che fitta la curva del rapporto delle intensità per $t > t_g$ con una costante di tempo $t_a \simeq 850$ s. Nel riquadro si mostra l'indice di correlazione normalizzato a ritardo $\tau = 10$ min e $\tau = 50$ min [11].

immagini di 30 s.

Dopo 24 h il calcio attraversa la ROI scelta, posizionata a $z = 5$ mm dal fondo. Il rapporto di intensità, dopo un calo iniziale comincia a crescere, raggiungendo un plateau che è circa 20 volte più grandi del valore a $t=0$ (Fig.2.15). L' aumento dell'intensità diffusa è dovuto ad un cambio nel fattore di struttura del campione. L'indice di correlazione c_I con un ritardo $\tau = 30$ s fornisce un tempo $t > t_1$ per cui il pattern speckle è sempre più correlato e dove l'intera soluzione di alginato nella ROI è un gel quasi arrestato, che presenta comunque degli riarrangiamenti strutturali, mostrati dal persistente aumento di $I(t)$. Inoltre, il tempo dato da $t_1 - t_0$ è paragonabile al tempo che impiegano gli ioni Ca^{2+} ad attraversare la ROI, e il passaggio da soluzione a struttura dinamicamente arrestata è quasi istantaneo non appena arrivano gli ioni. Questo profilo molto definito permette di prendere $t_g = (t_0 + t_1)/2$ come un tempo medio ragionevole per definire la transizione che avviene nella ROI da fluido a gel. Nel riquadro interno di figura 2.15 si mostra il grado

di correlazione che decade su periodi di tempi molto più lunghi. Infatti, dopo un ritardo di $\tau=50$ min, $\hat{c}_I(\tau, t, z)$ è scesa a zero anche se $I(t)$ ha ormai raggiunto un plateau, confermando che la dinamica strutturale non è ancora completamente arrestata.

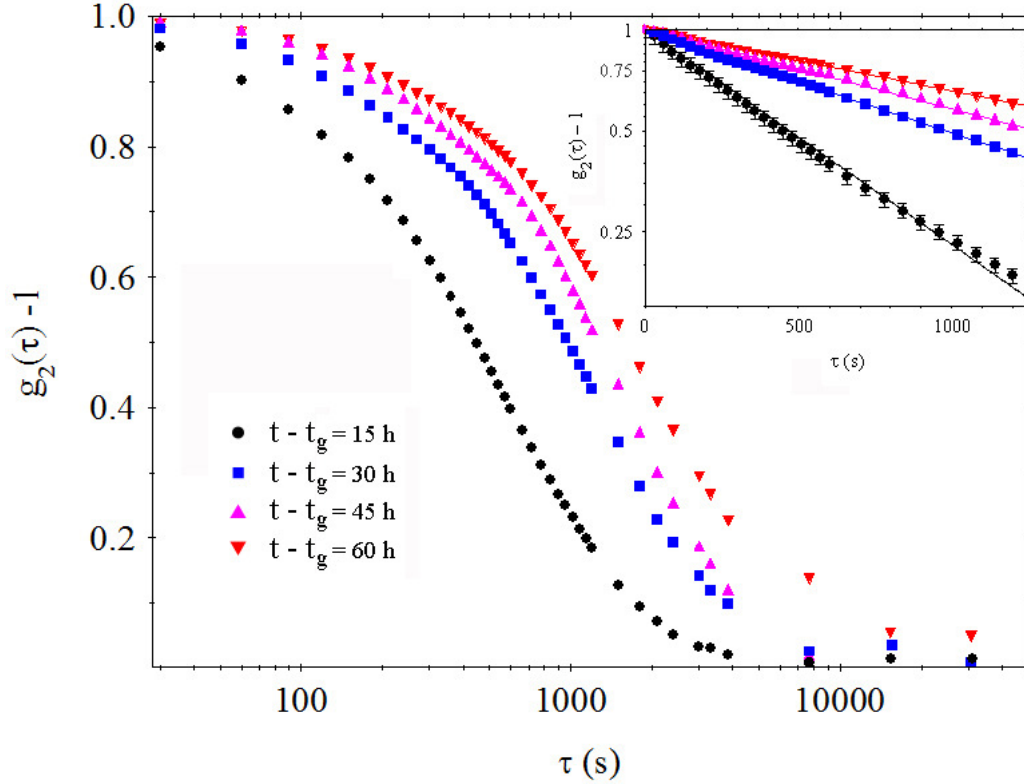


Figura 2.16: Funzioni di correlazione $g_2(\tau) - 1$ ottenute a una ROI in $z = 0.5$ mm, misurata a differenti tempi di aging $t - t_g$: il grafico semilogaritmico nel riquadro mostra la funzione di correlazione che decade esponenzialmente con costante di tempo τ_r e che cresce col tempo t [11].

I riarrangiamenti strutturali all'interno del gel possono essere indagati ricorrendo al calcolo della funzione $g_2(\tau)$ su un intervallo di tempo $\delta t = 100$ min che è un tempo più corto di quello della scala di aging del gel. In fig.2.16 si mostra che tutte le funzione di correlazione $g_2(\tau) - 1$, ottenute nella ROI scelta, decadono a zero a prescindere dal tempo di aging, confermando che la dinamica del gel non è mai completamente arrestata. Il grafico semi logaritmico nel riquadro supplementare di Fig.2.16 mostra che tale decadimento è ben interpolato da un esponenziale, con tempo di rilassamento parti a τ_r che cresce con il tempo di aging, aumentando di più di due ordini di grandezza prima di appiattirsi. Un andamento qualitativamente simile si ritrova in differenti ROI. Questo significa che la dinamica di evoluzione del gel, quando riferita a un valore di tempo $\Delta t(z) = t - [t_g(z) + t_a(z)]$ non dipende dalla

posizione lungo il campione. Inoltre, le funzioni di correlazione ottenute nelle differenti ROI allo stesso valore di Δt si sovrappongono, suggerendo che la dinamica microscopia è spazialmente omogenea lungo il campione e dipende solo dall'età locale del gel.

Capitolo 3

Sedimentazione

Nella prima parte di questo lavoro di tesi mi sono occupato dello sviluppo di una nuova tecnica ottica di velocimetria, che ho utilizzato per lo studio di sistemi di particelle *Browniane* in sedimentazione. Nonostante la sedimentazione sia un fenomeno facilmente osservabile in molti sistemi fisici, numerosi aspetti sono ancora incompresi: in particolare le fluttuazioni di velocità in sistemi a molte particelle, la sedimentazione di particelle con dimensioni molto ridotte, nonché sedimentazione diversi tipi di particelle contemporaneamente.

L'importanza dello studio della sedimentazione si può evidenziare con il seguente estratto di Jean Perrin, pioniere degli studi di sedimentazione:

“The principal results established in the course of this work are in summary: the preparation of emulsion with equal spherical granules, of an exactly measured radius, chosen at will. The extension of Stokes’s law to the domain of microscopic magnitudes. The demonstration that the laws of perfect gases apply to uniform emulsions. The exact determination, from this experimental fact, of the various molecular magnitudes, and of the charge of the electron. The experimental confirmation, for the rotation as well for the translations, of the equipartition of energy, and of the beautiful theoretical investigation by Einstein.”

Perrin studiando fenomeni di sedimentazione trovò conferma della teoria sul moto browniano di Einstein, riuscì a stimare le dimensioni delle molecole d'acqua e degli atomi, ricavò il numero di Avogadro e mostrò l'uguaglianza formale delle leggi che governano gas ideali a particelle in sedimentazione.

Di seguito diamo un inquadramento teorico del problema e, successivamente, descriviamo l'approccio sperimentale adottato.

3.1 Derivazione fisica della sedimentazione

Lo studio delle particelle colloidali trova un potente strumento nella meccanica statistica [3]. La meccanica statistica fa da trait d'union tra la meccanica quantistica e la meccanica classica, cercando di spiegare come in un sistema la presenza di numerosissimi microstati porti ad avere un unico macrostato. Nel caso della sedimentazione si può analizzare ogni particella come se fosse un grande atomo, a cui è assegnato un determinato microstato, mentre l'insieme di tutte le particelle sarà l'intero sistema definito da un unico macrostato. Ogni sistema sarà influenzato principalmente da: il numero totale di particelle N , la temperatura T , la pressione P , il volume V e energia E . Usualmente quando si fa un esperimento è più comodo porsi in una configurazione dove il numero di particelle, il volume e la temperatura sono costanti (NVT), poiché sono parametri facilmente controllabili e regolabili, mentre tutte le altre caratteristiche sono libere di cambiare.

Il sistema più generale è chiamato *ensemble canonico* o NVT . In questo ensemble la probabilità di trovare una particella in un preciso microstato di energia E_i è data da:

$$P_i = \frac{e^{-\beta E_i}}{\sum_j e^{-\beta E_j}} = \frac{1}{Z} e^{-\beta E_i} \quad (3.1)$$

Dove $\beta = 1/k_B T$, (k_B costante di Boltzmann) e Z è la *funzione di partizione*, che è una sommatoria sulle probabilità di tutti gli stati. Z fa da costante di normalizzazione, ma è anche un importante parametro utile per trovare le grandezze termodinamiche, come vedremo di seguito. Al sistema è associata un'energia media, definita come $\langle E \rangle = E_i P_i$, ovvero [3]:

$$\langle E \rangle = \frac{1}{Z} \sum_i E_i e^{-\beta E_i} = -\frac{\partial \ln(Z)}{\partial \beta} = k_B T^2 \frac{\partial \ln(Z)}{\partial T} \quad (3.2)$$

quindi conoscendo la funzione di partizione è possibile calcolare l'energia del sistema. Si può dimostrare inoltre che l'entropia S può essere calcolata conoscendo Z :

$$S = k_B (\ln(Z) + \beta \langle E \rangle) \quad (3.3)$$

e da qui, sapendo che l'energia libera di Helmholtz è $F = E - TS$, ricaviamo:

$$F = -k_B T \ln(Z) \quad (3.4)$$

ottenendo la *relazione fondamentale* che connette la funzione di partizione della distribuzione canonica all'energia libera di Helmholtz. L'energia libera, per un sistema chiuso, assume valore minimo all'equilibrio. Dunque se

vogliamo trovare l'equilibrio di un sistema, sia esso una proteina o particelle colloidali, il problema viene ricondotto al calcolo della funzione di partizione. Infine, sempre utilizzando Z , possiamo ricavare le *forze generalizzate* che agiscono sul sistema:

$$\langle X \rangle = k_B T \frac{\partial \left(\frac{F}{k_B T} \right)}{\partial x} \quad (3.5)$$

Nel caso di una particella che sedimenta, vi sarà la presenza di moto browniano, oltre alla forza gravitazionale e alle interazioni con le altre particelle. Considerando solo la direzione di sedimentazione, la forza totale F_T può quindi essere espressa come un contributo di tali termini.

$$F_T = \frac{k_B T \partial(\ln(\Psi))}{\partial x} \frac{\partial U}{\partial x} - V_p \Delta \rho g \quad (3.6)$$

dove il primo termine indica le forze generalizzate dovute al moto Browniano e con $\Psi(x, t)$ si intende la probabilità di trovare la particella in posizione \mathbf{x} all'istante t ; $\frac{\partial U}{\partial \mathbf{x}}$ è la forza dovuta all'interazione particella-particella, U è il potenziale; il secondo termine è la forza di galleggiamento, dove $\Delta \rho$ è la differenza di densità tra la particella e il liquido in cui è dispersa. Nella sedimentazione, il numero totale di particelle N si deve conservare, quindi la densità di probabilità Ψ deve soddisfare un'equazione di bilancio:

$$\frac{\partial \psi(x, t)}{\partial t} = - \sum_{n=1}^N \frac{\partial (\Psi_n v_n)}{\partial x_n} \quad (3.7)$$

con v_n velocità della n -esima particella.

Inoltre, si possono definire delle grandezze che aiutano a caratterizzare il sistema come:

$$D_0 = \frac{k_B T}{6\pi\eta a} \quad (3.8)$$

che è il coefficiente di diffusione della particella, con a raggio, η viscosità del solvente, e

$$u_s = \frac{2}{9} \frac{\Delta \rho}{\eta g a^2} \quad (3.9)$$

velocità di sedimentazione, o velocità di Stokes, che si ottiene nel caso in cui non vi siano interazioni idrodinamiche o tra particelle. Si può definire un ulteriore parametro:

$$l_g = \frac{D_0}{u_s} = \frac{k_B T}{\Delta \rho V_p g} \quad (3.10)$$

che è chiamato *lunghezza gravitazionale* e indica quanto sia importante il contributo delle forze browniane rispetto a quelle gravitazionali. In particolare

se ci riferiamo alla grandezza delle particelle in esame possiamo introdurre un ulteriore parametro, adimensionale, che è il *numero di Péclet* definito come:

$$Pe = \frac{\Delta\rho g V_p a}{k_B T} = \frac{a}{l_g} \quad (3.11)$$

Se $Pe \gg 1$ il raggio della particella è molto maggiore della lunghezza gravitazionale, quindi prevale la forza gravitazionale sul contributo Browniano, e si parla di *particelle non browniane*. Noi soffermeremo la nostra attenzione, invece, su $Pe \ll 1$, per cui il termine Browniano sarà maggiore. In questo regime è possibile esplicitare la velocità di sedimentazione delle particelle in funzione della volume fraction ϕ [20]:

$$u(\phi) = u_s [1 - 6.55\phi + O(\phi^2)] \quad (3.12)$$

detta *approssimazione di Batchelor* e si può dimostrare che, per interazioni lievemente attrattive, la velocità di sedimentazione cresce con ϕ , mentre per alte interazioni repulsive questa velocità è approssimata come $u(\phi) = u_s(1 - \alpha\phi^{-1/3})$, con α costante positiva.

A questo punto le forze che agiscono sulla particella sono funzione solo della volume fraction ϕ ed è possibile riscrivere l'Eq.3.7 come:

$$\frac{\partial\phi}{\partial t} = \frac{\partial(\phi v)}{\partial x} \quad (3.13)$$

e la forza totale che agisce sulla particella:

$$F_T(x) = \frac{V_p}{\phi} \frac{d\Pi}{d\phi} \frac{\partial\phi}{\partial x} - V_p \Delta\rho g \quad (3.14)$$

dove Π è la pressione osmotica locale.

In modo analogo, può essere scritta anche l'equazione di continuità per il fluido:

$$\frac{\partial(1 - \phi)}{\partial t} = \frac{\partial[(1 - \phi) w]}{\partial x} \quad (3.15)$$

dunque:

$$\frac{\partial}{\partial x} [\phi v + (1 - \phi) w] = 0 \quad (3.16)$$

dove w è la velocità del fluido. Se si considera il dominio chiuso, il flusso netto di materia è nullo, quindi:

$$\phi v + (1 - \phi) w = 0 \quad (3.17)$$

Si può introdurre un termine:

$$H(\phi) = \frac{u(\phi)}{u_s} \quad (3.18)$$

ed esplicitare il coefficiente di diffusione come:

$$D(\phi) = V_p \frac{\partial \Pi}{\partial \phi} \frac{H(\phi)}{f} = \frac{1}{g \Delta \rho} \frac{\partial \Pi}{\partial \phi} v(\phi) \quad (3.19)$$

dove V_p è il volume della particella e f il coefficiente di frizione. Dunque l'equazione che governa un sistema di particelle browniane in sedimentazione è:

$$\frac{\partial \phi}{\partial t} - v_0 \frac{\partial [\phi H(\phi)]}{\partial z} = D_0 \frac{\partial}{\partial z} \left\{ H(\phi) \frac{\partial [\phi K(\phi)]}{\partial \phi} \frac{\partial \phi}{\partial z} \right\}, \quad (3.20)$$

dove con $K(\phi) = \Pi(\phi)/nk_B T$ si indica il fattore di compressibilità osmotica. Da questa equazione si ricava il profilo di sedimentazione, in cui s'individuano tre regioni: una "fan region" sopra, unita al surnatante, una colonna di particelle con $\phi \simeq \phi_0$ e un denso sedimento detto "cake". Se riscriviamo l'Eq.3.20 nella forma:

$$\frac{\partial Y}{\partial x_2} + Y \frac{\partial Y}{\partial x_1} - \frac{\partial^2 Y}{\partial x_1^2} = 0 \quad (3.21)$$

prende l'aspetto di un'equazione di Burgers [21], la cui soluzione è rappresentata da un'onda di shock. Questo significa che la "fan region" si comporta come un'onda di shock che si muove a velocità costante e con una forma che non cambia nel tempo, definita dalla competizione tra la velocità di sedimentazione dipendente da ϕ , la quale tende a rendere più netta la "fan region", e la diffusione Browniana, che invece allarga il fronte. I tempi per cui si raggiunge questo comportamento asintotico dipendono inversamente da Φ e a basse concentrazioni possono diventare molto lunghi. Poichè $v(\phi)$ è una funzione monotona decrescente della concentrazione ϕ , particelle che si trovano in prossimità dell'interfaccia, quindi a concentrazione inferiore, tendono a muoversi a una velocità $v \simeq u_s$, ovvero più velocemente di quelle che si trovano al di sotto. I due strati tenderebbero così a fondersi l'uno con l'altro, ma interviene il gradiente di pressione osmotica esercitando una forza che controbilancia questo effetto. Il bilanciamento tra i due contributi fa in modo che la forma del profilo rimanga costante nel tempo e che scenda ad una velocità $v(\phi_0)$ costante.

3.1.1 Equilibrio

All'equilibrio, non si osserva più il flusso di massa $\frac{\partial \Phi}{\partial t}$ e, quindi, dall'Eq.3.20 si ottiene:

$$\frac{\partial \Pi}{\partial z} = -\Delta \rho g \Phi \quad (3.22)$$

Con una semplice integrazione si ottiene:

$$\Pi(z) - \Pi(0) = -\Delta\rho g \int_0^z \Phi(z') dz' \quad (3.23)$$

dove z è la direzione secondo cui avviene la sedimentazione. L'Eq.3.22 afferma che, in condizioni di equilibrio, la pressione osmotica all'altezza z bilancia la forza peso per unità di area delle particelle che si trovano al di sotto. Dalla dipendenza del profilo di concentrazione da z è possibile ottenere l'equazione di stato per l'intero sistema, $\Pi(\Phi)$. Con sospensioni diluite, per le quali vale l'approssimazione $\Pi(\Phi) \simeq \frac{k_B T \Phi}{V_p}$, l'Eq.3.22 permette di ricavare la legge barometrica analoga a quella dei gas ideali:

$$\Phi(z) = \Phi_0 e^{-\frac{z}{l_g}} \quad (3.24)$$

ottenendo il risultato di Perrin [19].

3.2 Fluttuazioni di velocità

L'approssimazione di Batchelor Eq.3.12 definisce la velocità media del sistema, ma non permette di calcolare le fluttuazioni di velocità: $\langle \delta v^2 \rangle = \langle v^2 \rangle - \langle v \rangle^2$, le quali si manifestano su ogni scala spaziale. Questo risultato fu ottenuto da Caffish e Luke [35], i quali dimostrarono che, teoricamente, sommando su tutte le perturbazioni dovute alle interazioni idrodinamiche, le fluttuazioni in velocità andavano come $\langle \delta v^2 \rangle \sim u_s^2 \phi L/a$, dove L è la dimensione della cella in cui vi è la sospensione, a è il raggio della particella. E' interessante notare che secondo la teoria di Caffish e Luke [35] le fluttuazioni di velocità non sembrano dipendere dalle fluttuazioni di concentrazione. Sperimentalmente si sono osservate fluttuazioni di velocità con particelle non-Browniane, ma non sembra esserci divergenza con l'aumentare delle dimensioni della cella, come atteso da Caffish e Luke [35]. Inoltre esperimenti di Segrè *et al.* [49] suggeriscono che queste fluttuazioni in velocità siano in realtà indipendenti dalla dimensione del sistema e che la loro lunghezza di correlazione ξ e ampiezza siano universali e legati alla volume fraction: $\langle \delta v^2 \rangle^{1/2} \sim v_s \phi^{1/3}$ $\xi \sim a \phi^{-1/3}$. Dedicate a queste discordanze tra risultati sperimentali e teorici sono nati eccellenti reviews [36, 37, 42].

Koch e Shaqfeh [38] hanno indagato i regimi con alti numeri di Pe , dimostrando che le interazioni idrodinamiche nell'intorno di una data particella portano a definire una fluttuazione della massa galleggiante m^* della particella stessa. Tali fluttuazioni $\Delta m = m^*$ sono contenute in un volume sferico V con un raggio confrontabile alla ξ . In tal modo l'intero volume V arriva

ad essere neutralmente galleggiante e non mostra più fluttuazioni di velocità, che non si estendono su lunghezze caratteristiche maggiori di ξ . Invece, per Felderhof [39], sempre a alti numero di Peclet, un tale meccanismo può essere dovuto a una combinazione di interferenza distruttiva del flusso in una singola particella e di un riarrangiamento delle posizioni della particella, il che implica un fattore di struttura anisotro del tipo:

$$S(\mathbf{q}) = [1 - e^{-q^2 \xi^2 \psi(\theta_{\mathbf{q}})/4}]^2$$

dove $\psi(\theta_{\mathbf{q}})$ è una generica funzione angolare, che soddisfa la relazione: $\psi(\pi/2) = 1$, $\psi(\pi - \theta) = \psi(\theta)$, che va asintoticamente come $(q\xi)^4$ per $q \rightarrow 0$, dove \mathbf{q} è il vettore d'onda di scambiato. Una conseguenza di queste correlazioni di non equilibrio è che, su lunghezze di scala confrontabili con ξ , le fluttuazioni di concentrazione per una sospensione diluita dovrebbero mostrare un comportamento subpoissoniano, cosa osservata sperimentalmente [40].

Un meccanismo alternativo [41, 42] si basa sull'osservazione che, come originariamente indicato da Lee *et al.* [43], la presenza di forti fluttuazioni idrodinamiche può consistentemente modificare lo sviluppo del fronte di sedimentazione. Infatti, per $Pe \gg 1$, le dispersioni idrodinamiche portano ad un meccanismo di diffusione molto più efficiente rispetto a quello Browniano: il fronte di sedimentazione si allarga velocemente, possibilmente senza raggiungere la sua forma invariante temporale, per ϕ piccole, prima che la sedimentazione sia completata.

Diverso invece se si considerano le particelle Browniane: a bassi Pe , infatti, $S(\mathbf{q})$ non dovrebbe apprezzabilmente differire dal fattore di struttura all'equilibrio e, ipotizzando che la frazione di volume iniziale non sia troppo piccola, il profilo di sedimentazione dovrebbe rapidamente raggiungere un profilo temporalmente invariante. C'è tuttavia un terzo meccanismo che può, in principio, spegnere le fluttuazioni di velocità, anche a bassi Pe . L'argomentazione originaria di Hinch [45], e poi rifinita e supportata da simulazioni grazie a Ladd [46], è basata su due considerazioni: i) che le fluttuazioni di velocità sono fisicamente dovute alla presenza di fluttuazioni spontanee di densità di numero (di tipo Poissoniano per un sistema diluito) e che il galleggiamento ne viene di conseguenza modificato; ii) che la presenza di una parete nel fondo della cella, tuttavia, inevitabilmente genera un backflow che tende ad omogeneizzare la sospensione. Una fluttuazione di dimensione ξ porta a convezione con una velocità che va come $v_c(\xi) \sim \sqrt{(\phi\xi/a)}u_s$, così da essere spazzata via per diffusione su un tempo caratteristico $t_c \sim (\xi/a\phi)^{1/2}t_s$. Le fluttuazioni sono quindi spente, nonostante siano su un tempo scala $t_\xi < t_c$. Siccome $t_\xi \sim \xi^2/D_h \sim \xi^2/v_s a$, la più grande fluttuazione avrà una dimensione $\xi_{max} \sim a\phi^{-1/3}$, in accordo con gli esperimenti. Quando $D_o \gg D_h$,

tuttavia, dovremmo scrivere $t_\xi = \xi^2/D_o$, portando $\xi_{max} \sim a\phi^{-1/3}Pe^{-2/3}$, che ancora diverge per $Pe \rightarrow 0$.

3.2.1 Boycott effect e gradienti termici

Prima di terminare questo rapido sguardo al mondo della sedimentazione, è giusto citare ancora due fenomeni importanti che possono intervenire e limitare sperimentalmente lo studio della sedimentazione. Sperimentalmente sono molte le insidie nascoste. In primis il *Boycott effect*, che prende il nome dallo scopritore [54], dove si dimostra che un'inclinazione della cella di sedimentazione, seppur minima, porta a una misura erronea. In questo caso, le particelle si trovano a contatto con la parete inclinata, creando un agglomerato molto denso che sedimenta più facilmente lungo la parete stessa, poichè non risente del flusso retrogrado del solvente.

L'altro grande problema che si presenta sono i moti convettivi introdotti da gradienti di temperatura. Una stima dell'effetto può essere fatta considerando il gradiente di temperatura in direzione verticale z , che coincide con quella di sedimentazione [23]:

$$\frac{\Delta T}{\Delta z} > \frac{-g}{c_p} \quad (3.25)$$

dove con ΔT si indica la differenza di temperatura, Δz la distanza tra due porzioni di fluido all'interno di una cella, con l'asse z orientato secondo l'altezza di quest'ultima, e c_p il calore specifico a pressione costante del fluido. Dall'Eq.3.25 si nota che tanto più è alta la cella, tanto più si può ridistribuire il gradiente di temperatura, così da evitare i fenomeni convettivi. Se proviamo a fare due conti, per un gradiente di temperatura di 0.1 K, considerando il calore specifico dell'acqua, c_p di 4186 J/kg K, avremmo bisogno di una cella alta almeno 42 metri per evitare i moti convettivi.

Questi moti convettivi si instaurano anche se il gradiente di temperatura è presente in altre direzioni, oltre a z . Come esempio si propone il risultato di una simulazione numerica per una sospensione colloidale in una cella di 2cm di altezza e 1cm di larghezza, come quelle utilizzate nella parte sperimentale, in cui è stata applicata una differenza di temperatura tra una parete e l'altra. La simulazione è stata effettuata tramite il software COMSOL Multiphysics. È stato usato il pacchetto *Flusso non isoterma* per l'analisi dei moti all'interno della cella, impostando come parametri per il fluido (acqua) una pressione p di 1atm, una conducibilità termica k di 0.6W/mK, densità di 1kg/m³, calore specifico a pressione costante c_p di 4186J/KgK e viscosità dinamica η di 1cP. Tramite l'opzione *Temperatura* si è impostata una differenza di temperatura tra i due lati della cella, imponendo una differenza di temperatura

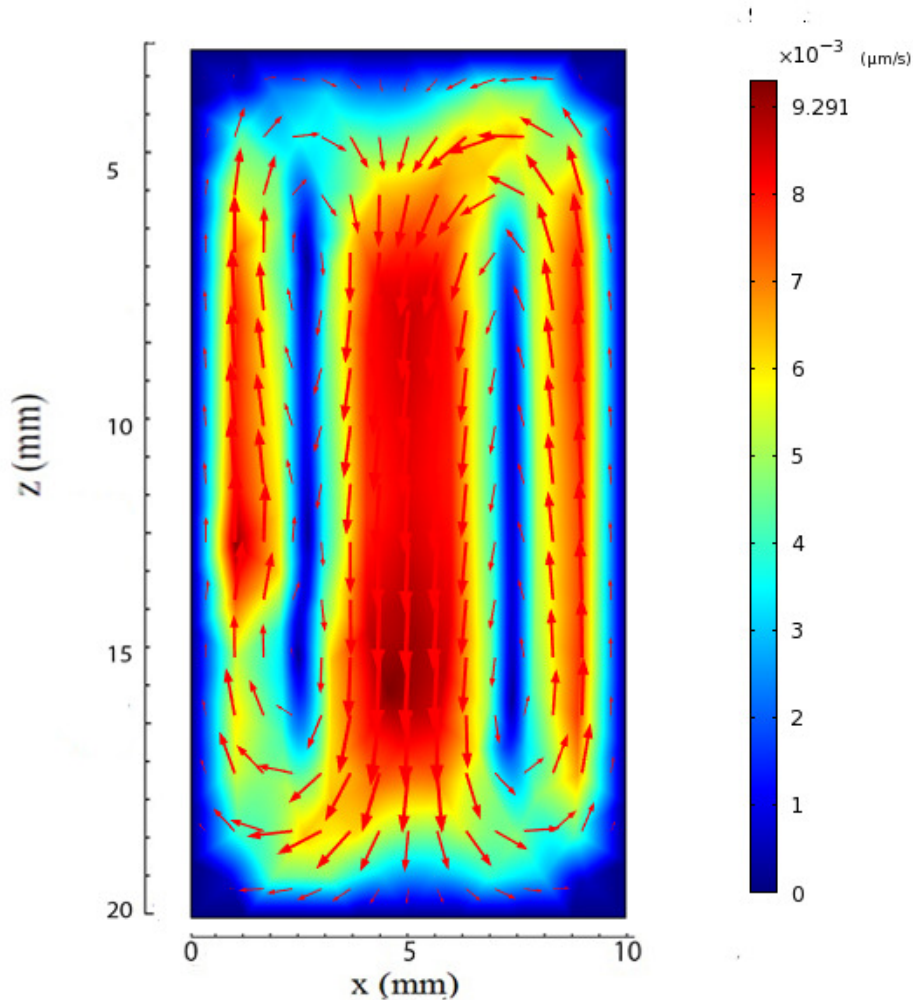


Figura 3.1: Simulazione mediante COMSOL di una sospensione colloidale di particelle di PMMA di $1\mu m$ di diametro in acqua, in una cella di $2cm$ di altezza e $1cm$ di larghezza. È stata posta una differenza di temperatura orizzontale di $0.2K$. In scala di colore viene rappresentata il modulo del campo di velocità della miscela.

di $0.2K$ tra un lato e l'altro. Quindi tramite il pacchetto *Modello miscela* si è creata la dispersione colloidale, con particelle di PMMA (polimetilmetacrilato) da $1\mu m$ di diametro, disperse in soluzione acquosa, con volume fraction $\Phi = 10^{-4}$ e una velocità di sedimentazione ideale di Stokes $u_s = 0.392\mu m/s$. Da ultimo, si è definita una mesh *triangolare libera* su tutta la geometria, con elementi di dimensioni che vanno da un minimo di $3 \times 10^{-4}cm$ a un massimo di $0.06cm$, con un rapporto di crescita massimo di 1.3. In Fig.3.1 viene mostrato il risultato della simulazione. In scala di colore viene rappresentato il modulo della velocità, la cui direzione è mostrata dalle frecce. Si vede la

presenza di moti convettivi che interessano tutta la cella. Ai fini dell'attività sperimentale è necessario porre tutto il sistema in un bagno termico o in un mezzo che garantisca l'uniformità di temperatura.

3.3 Heterodyne Speckle Velocimetry

La maggior parte dei lavori prettamente sperimentali è limitata allo studio di colloidi di grandi dimensioni (qualche micron) e non Browniani ($Pe \gg 1$). La scelta di questi campioni dipende essenzialmente dal fatto che le tradizionali tecniche ottiche di particle tracking, utilizzate per mappare i campi di velocità, da una parte sono limitate dalla necessità di risolvere i traccianti e dall'altra viene loro richiesto di indagare estese porzioni di campione. Proponiamo ora lo sviluppo di un sistema, elaborato nella prima parte del lavoro di tesi, col quale indagare la sedimentazione di particelle di piccole dimensioni ($d \leq 1\mu m$) aventi un comportamento dominato dai processi diffusivi ($Pe \ll 1$). Inizialmente era stata scelta la tecnica ottica di velocimetria detta Heterodyne Speckle Velocimetry (HSV) [27], la quale impiega sorgenti di illuminazione con elevata coerenza spaziale e temporale e ricava i campi di velocità dall'analisi dinamica del campo stocatico diffuso dal campione. In un secondo momento si è tuttavia deciso di derivare una nuova tecnica dalla HSV mostrando che è possibile ottenere benefici tecnici utilizzando sorgenti illuminanti con limitata coerenza spaziale e temporale.

L'HSV è una tecnica ottica che sfrutta l'interferenza stocastica tra la radiazione diffusa dal campione e il campo che lo attraversa imperturbato. Essendo una tecnica interferometrica autoreferenziale ha il vantaggio di essere meno sensibile alle vibrazioni rispetto ad altre tecniche. Tuttavia i sistemi in esame hanno una dinamica estremamente lenta ed è dunque necessario garantire il massimo della stabilità meccanica dell'apparato su tutto il tempo di misura che a volte è stato anche di alcuni giorni. L'apparato sperimentale è dunque montato su un tavolo ottico Newport (*Super Invar Breadboard*), realizzato in lega d'acciaio. Rispetto ad altri materiali, come l'alluminio o l'acciaio inossidabile, ha il vantaggio di avere una dilatazione termica molto inferiore, anche di due ordini di grandezza, garantendo l'assenza di perturbazioni legate alla variazione di temperatura.

Nella seguente figura, Fig.3.2, riportiamo lo schema di tutte le componenti e di come si presentano sul tavolo ottico.

Il tavolo ottico presenta un reticolo di fori filettati, sui quali è possibile fissare le varie componenti ottiche necessarie. Tutto il tavolo poggia sul supporto *Performance* della Melles Griot. Sul tavolo sono state quindi montate le varie componenti utilizzate:

- **Sorgente di luce:** La sorgente coerente impiegata è un laser HeNe della Melles Griot con una potenza di picco di 5 mW e una lunghezza d'onda $\lambda = 632,8nm$. I dati tecnici sono riportati in tabella 3.1:

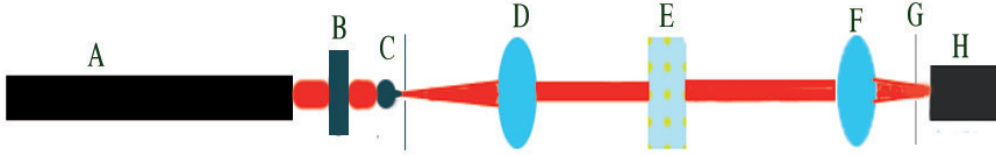


Figura 3.2: Apparato di Heterodyne Speckle Velocimetry. A: sorgente laser; B: filtro neutro; C: Filtraggio spaziale; D: lente collimatrice; E: campione; F: lente di raccolta; G: iride; H: videocamera.

Tabella 3.1: Dati tecnici della sorgente laser.

Modello	05-LHP-111
Potenza di picco	5 mW
Lunghezza d'onda (nm)	632.8
Diametro del fascio $1/e^2$ (mm)	0.59
Divergenza del fascio (mrad)	1.3
Rapporto di polarizzazione	>500:1
Profilo	TEM00
Longitudinal Mode Spacing (MHz)	685
Power Stability	$\pm 5\%$
Potenziale di lavoro (VDC)	1800
Corrente di lavoro (mA)	6.5

Premesso che la potenza del laser deve essere sufficiente a fornire un'illuminazione in grado di garantire il massimo della dinamica sulla telecamera, il parametro che maggiormente influisce sulle misure è la *power stability*. Questo termine fornisce l'indicazione circa la fluttuazione relativa della potenza del laser che illumina il campione. Nel limite in cui la fluttuazione dell'intensità risulta non eccessiva è possibile introdurre delle opportune compensazioni via software, in fase di riduzione dei dati, sull'intensità media dell'immagine registrata dalla telecamera.

- **Filtro neutro:** Permette di regolare l'intensità della radiazione incidente sul campione in modo da mantenere al massimo i conteggi di fotoni a valle sul sensore evitando la saturazione.
- **Filtraggio spaziale:** Il filtraggio spaziale è un accorgimento standard usato in ottica per eliminare dal fascio laser i contributi ad alta fre-

quenza spaziale introdotti da rumore termico e da una non perfetta cavità di risonanza. È costituito da un obiettivo da microscopio 40X con apertura numerica 0.4 che focalizza il laser, quindi nel suo piano focale viene poi posto un pinhole da $40\mu\text{m}$ che blocca le componenti di Fourier ad alta frequenza spaziale. A valle del filtraggio si ottiene un modo TEM00 ripulito e divergente.

- **Lente collimatrice:** La lente collimatrice viene posta ad una distanza dal pinhole pari alla sua focale in modo da rendere parallelo il fascio divergente. La lente utilizzata ha una focale $f=300\text{ mm}$, quindi per la legge del fabbricante di lenti, se si pone una sorgente in un fuoco:

$$\frac{1}{p} + \frac{1}{q} = \frac{1}{f} \quad (3.26)$$

si arriva ad avere $q \rightarrow \infty$ dunque si rende il fascio da divergente a parallelo. Il raggio che va ad incidere sulla lente ha una grandezza di 1.32 cm, permettendo di coprire per metà la cella

- **Supporto portacella:** È costituito da una base ancorata al banco ottico. La sua posizione è regolata finemente tramite tre slitte micrometriche ortogonali che permettono di spostare il campione sia nella direzione dell'asse ottiche che trasversalmente ad esso.
- **Ottica di raccolta:** L'ottica di raccolta coniuga un piano adiacente al campione con il piano del sensore. È costituito da una lente di focale $f=7,6\text{ cm}$ e diametro $d=2\text{ cm}$ posta ad una distanza p' dal campione e q' dal sensore, in modo da ottenere un fattore 5 in magnificazione (M). Applicando l'Eq.3.26 si ottiene $p' = 45,6\text{ cm}$ e $q' = 9,12\text{ cm}$.

Per mezzo di un'iride posto nel piano focale della lente è possibile restringere l'apertura numerica del sistema di raccolta entrando così nel regime di speckle soggettive¹ ed ottenere sul sensore delle modulazioni di intensità di dimensione spaziale superiore a quelle dei pixel al fine di massimizzare il contrasto ed evitare il fenomeno dell'aliasing.

- **Sensore:** Le immagini del campo speckle diffuso dal campione vengono catturate da una telecamera digitale a 10bit *Optikam Pro5*. Questa camera è composta da una matrice di diodi CMOS (2560×1920) per un totale di 5 MPixel, che trasferiscono il segnale in parallelo. Permette di mantenere un'elevata risoluzione e raggiungere un frame rate massimo di 5 frames/sec. Le specifiche della camera sono riportate in tabella 3.2

¹Come visto in ?? in subjective speckle le dimensioni dipendono dall'inverso dell'apertura numerica NA .

Tabella 3.2: Dati tecnici telecamera Optikam Pro5.

Modello	Optikam Pro5
Sensore	2560×1920 (5M Pixel)
Dimensione Pixel	2.77μm × 2.77 μm
Area Immagine	7.33mm × 5.44 mm
Frame rate (Max)	5 frames/s
Formato Ottico	1/1.18"
Rapporto di formato	4:3
Rapporto S/N	42 dB max
Range dinamico	61 dB
ADC	10 bit
Range di esposizione	0.125 - 249.7 ms

I campioni sono stati preparati utilizzando particelle di PMMA, con diametro che varia da $600nm$ a $1\mu m$, acquistate presso la Sigma Aldrich, con una densità media $\rho_{pmma} = 1.19g/cm^3$. Si è preparata dapprima una madre $\Phi=7 \times 10^{-3}$, effettuando una diluizione con acqua distillata, filtrata con filtri HEPA da $0.2\mu m$ con membrana in polipropilene. Quindi sono stati preparati campioni al 7×10^{-5} e 2×10^{-5} . Oltre a questi, sono state utilizzate particelle di MFA, con un diametro di $180nm$, sintetizzate dalla Solvais Solexis, con cui si è preparato un campione in volume fraction 10^{-3} e 0.1 .

Prima di ogni acquisizione si è calibrata la posizione della cella, in modo da evitare inclinazioni che potessero dare l'effetto Boycott. Tramite software si può monitorare la posizione della cella e misurare garantendo un'inclinazione di meno di mezzo grado.

In Fig.3.3 viene mostrata un'immagine acquisita con questo setup.

Per estrarre il campo speckle si segue il metodo di NFS [27], facendo la differenza tra un'immagine $f(\mathbf{r}, t)$ e un'altra $f(\mathbf{r}, t + \tau)$ a un ritardo τ rispetto alla prima, così da ottenere il segnale di eterodina:

$$\delta f(\mathbf{r}, t, \tau) = 2Re \{ E_0^* [E_s(\mathbf{r}, t + \tau) - E_s(\mathbf{r}, t)] \} \quad (3.27)$$

che è indipendente dall'intensità trasmessa $|E_0|^2$, Fig.3.3. Da qui, calcolando la funzione di autocorrelazione si ottiene [27]:

$$g_\tau(\mathbf{x}) = 4|E_0|^2 Re \{ 2G(\mathbf{x}, 0) - G(\mathbf{x}, \tau) - G(-\mathbf{x}, \tau) \} \quad (3.28)$$

Il primo termine, $G(\mathbf{x}, 0)$, è la funzione di autocorrelazione del campo speckle, positiva, gli altri due termini sono funzioni di cross correlazione che dipendono dal moto delle particelle. A questo punto, riportando in un grafico x-y

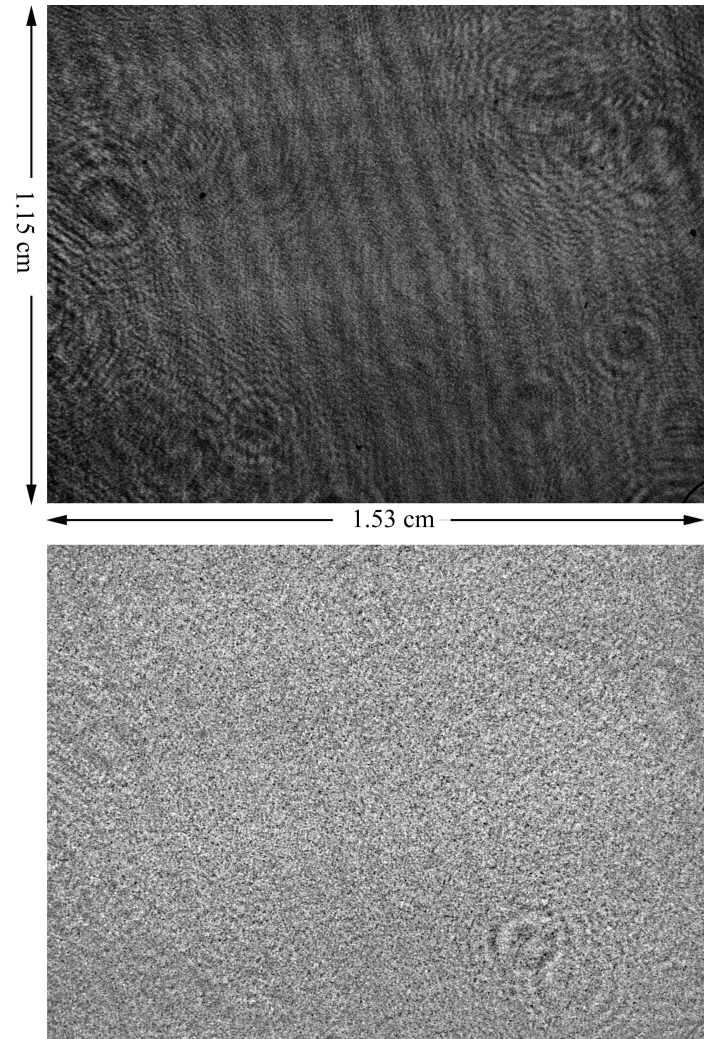


Figura 3.3: In alto: immagine acquisita col setup HSV, di un campione di particelle di PMMA da $1\mu m$ di diametro. In basso: campo speckle ottenuto mediante differenze tra immagini.

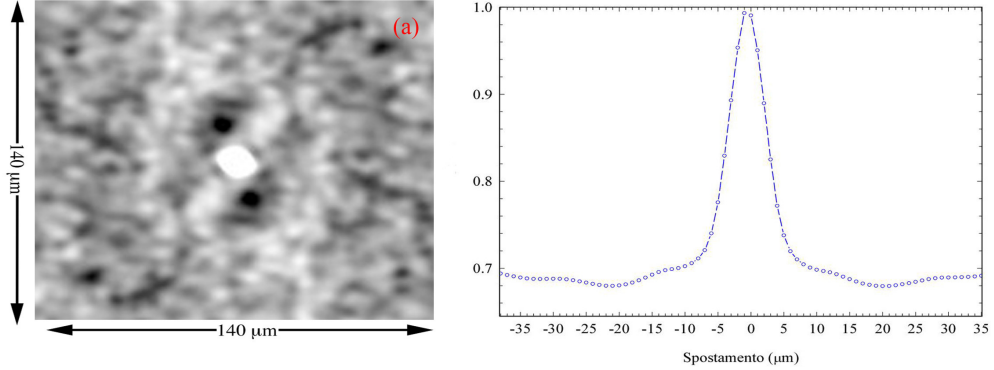


Figura 3.4: (a): funzione di autocorrelazione del campo speckle ottenuto per differenza di immagini a distanza $\tau = 140s$. I punti neri rappresentano i termini di cross correlazione. (b): sezione lungo i picchi di cross correlazione dell'immagine (a), in cui si nota il picco di correlazione e uno spostamento di $\sim 8\mu m$ cui corrisponde una velocità $0.057\mu m/s$

questa funzione è possibile quantificare lo spostamento $\Delta x \simeq 8\mu m$, a cui corrisponde una velocità di circa $0.057\mu m/s$. Nel caso in cui le particelle si muovano solo per traslazioni rigide rispetto all'asse ottico, il campo diffuso osservato su un piano $\mathbf{r} + \Delta\mathbf{r}$ al tempo $t + \tau$ è semplicemente la versione spostata del campo a \mathbf{r} al tempo t per cui:

$$\Phi_i(\mathbf{r} + \Delta\mathbf{r}, t + \tau) = \Phi_i(\mathbf{r}, t) \quad (3.29)$$

e dunque la funzione di correlazione a $\mathbf{x} + \Delta\mathbf{r}$ al tempo $t + \tau$ coincide con la funzione di autocorrelazione. La funzione di autocorrelazione presenta un tempo caratteristico che va come $1/Dq^2$, dopo il quale la funzione cade a un valore $1/e$. La dinamica diffusionale della particella, infatti, provoca una fluttuazione dell'onda diffusa a un certo angolo q , dunque, è necessario quantificare quali siano i vettori d'onda di scattering che provengono dalla radiazione del campione. Per ogni componente di Fourier presente in ogni immagine catturata, è possibile definire due vettori d'onda di scattering:

$$\begin{aligned} q_{min} &= \frac{2\pi}{L} \\ q_{max} &= \frac{\pi}{l_{px}} \end{aligned} \quad (3.30)$$

dove L indica la dimensione lineare della zona in esame, l_{px} la dimensione del pixel. Il conto di questi vettori, tuttavia, non è così banale siccome sono influenzati dall'apertura numerica NA presente dall'ottica che precede la videocamera che, di solito, ne limita l'ampiezza. Calcolando lo spettro di potenza dell'immagine del campo speckle ottenuto per differenza tra immagini, Fig.3.5, si vede un pattern di frange chiare e scure, che sono dovute

alla funzione di trasferimento dell'ottica di raccolta (*effetto Talbot*). Da qui si può individuare il vettore d'onda q_{max} , dunque il contributo spaziale più grande, a cui è associata la lunghezza d'onda più corta. In questo caso risulta che $q_{min} = 0.0031\mu m^{-1}$ e $q_{max} = 1.162\mu m^{-1}$, sapendo che il coefficiente di diffusione delle particelle a $20^\circ C$ in acqua è $D = 0.8573\mu m^2/s$, si ottiene un tempo caratteristico $\tau = 860ms$, per cui il tempo di acquisizione scelto è stato $500ms$ con un'esposizione di $6ms$.

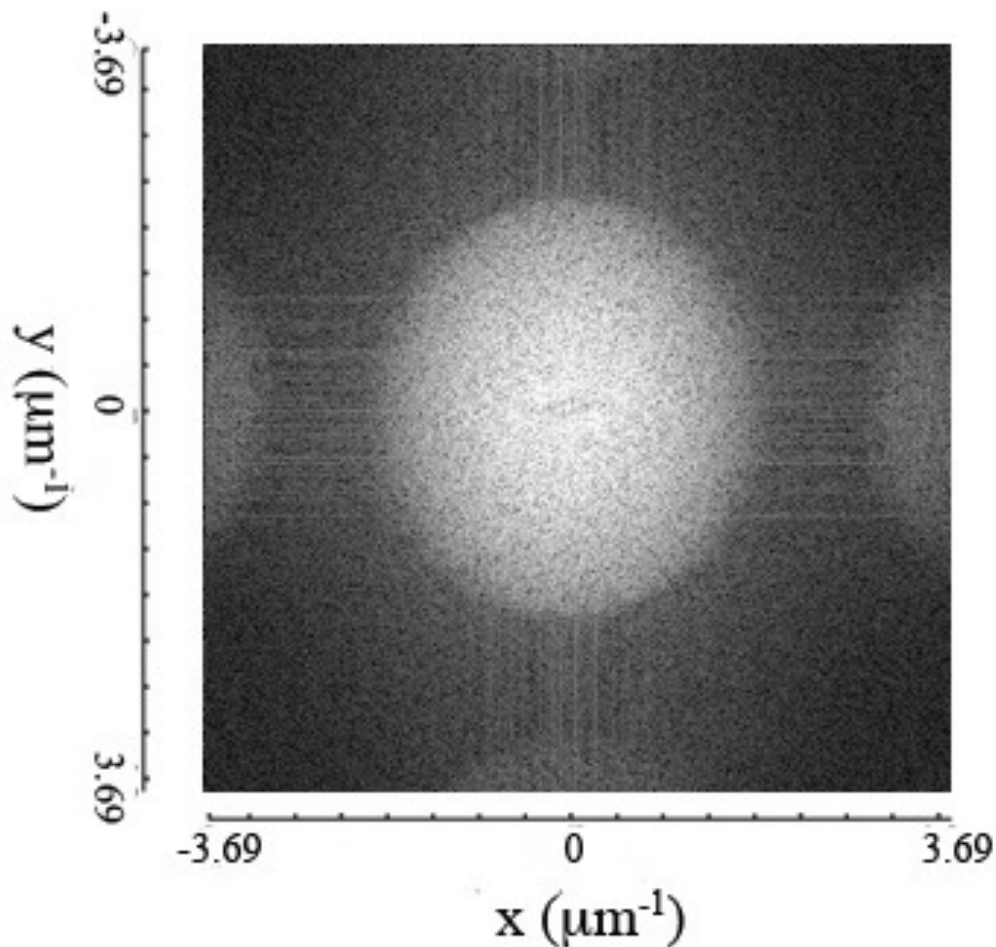


Figura 3.5: Spettro di potenza di un campione di particelle colloidali di PMMA da $1\mu m$ di diametro ottenuto per differenza tra immagini.

Purtroppo i risultati ottenuti con questa tecnica mostravano gravose limitazioni: le misure erano fortmenete influenzate da piccole vibrazioni, che portano alla formazione di frange, oscillante, intorno al campo speckle, che non permetteva di svolgere velocimetria, come viene mostrato in Fig.3.6

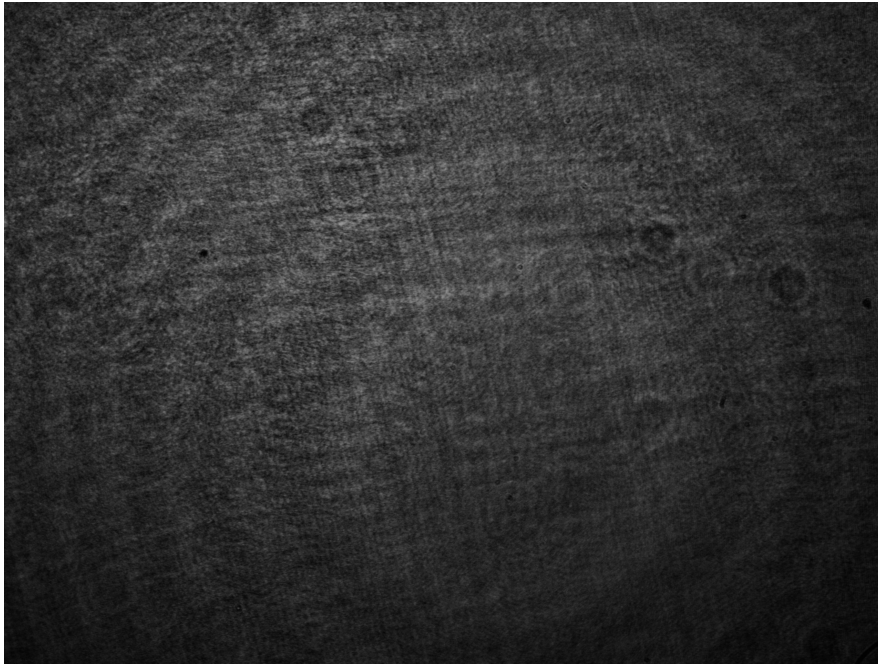


Figura 3.6: Particelle da $600nm$ di diametro. In questa acquisizione è presente anche un pattern circolare d'interferenza che rovina la misura.

Si è cercato di capire da dove provenisse tale problema, effettuando dapprima delle misure senza campione, acquisendo così immagini della sola luce laser per un lungo intervallo di tempo. L'analisi di tali dati non ha però mostrato alcuna variazione d'intensità. Dunque, il problema delle frange è stato imputato a riflessioni multiple sui vetri della cella e dell'ottica di raccolta dovute all'elevata coerenza della sorgente, ovvero il laser interferiva con se stesso. Per ovviare a questo problema si è pensato di passare a una sorgente meno coerente, ovvero una matrice di LED.

3.3.1 HSV con sorgente parzialmente coerente

La seconda configurazione strumentale utilizzata prevede la sostituzione della sorgente laser con una sorgente di luce bianca. Gli elementi dell'apparato sono:

- **Sorgente luminosa:** *ENFIS UNO Air Cooled Light Engine*. È un array di High Output LED, fino a 337 lm, che emettono luce bianca. Necessita di un'alimentazione di 9V fornita da un generatore di tensione continua. La potenza d'uscita della sorgente può essere comandata da PC tramite un'interfaccia USB.
- **Vetro diffusore:** se si usasse solo l'array di LED si avrebbe una sorgente non omogenea, con zone fortemente illuminate e zone d'ombra. Quindi si pone a un vetro finemente smerigliato posto subito dopo il LED in modo da uniformare l'illuminazione.
- **Iride:** un'iride di diametro variabile a ridosso del vetro smerigliato permette di definire la dimensione angolare della sorgente luminosa che proietta radiazione sul campione. Volendo utilizzare una tecnica interferometrica la dimensione spaziale delle aree di coerenza che incidono sul campione è di capitale importanza per ottenere interferenza. Per il già citato teorema di Van Cittert-Zernike [4] la dimensione trasversale delle aree di coerenza è inversamente proporzionale alla dimensione angolare della sorgente.
- **Sistema telescopico:** un sistema telescopico permette di formare un'immagine limitandone le aberrazioni, e di regolare la magnificazione desiderata. In questo setup si è reso necessario apportare una demagnificazione di un fattore di circa 4, così d'acquisire immagini dell'intera cella. Per un sistema di due lenti la magnificazione totale è il prodotto delle magnificazioni delle singole lenti. Avendo a disposizione due lenti, una con focale $f_1 = 5$ cm e una con $f_2 = 10$ cm, e supponendo che il campione si trovi a circa $p_1 = 7.5$ cm dalla prima lente, è possibile calcolare, tramite l'eq.3.26, la distanza q_1 , pari a 15cm. Quindi l'ingrandimento che dà la prima lente sarà $m_1 = -\frac{q_1}{p_1} = -2$. Dunque, per avere una demagnificazione di un fattore 4, la seconda lente deve demagnificare di un fattore 8, da cui si deduce $p_2 = 0.011$ cm.
- **Fotocamera:** CMOS *Orca C11440 Flash V4.0* dell'Hamamatsu (specifiche in 3.3). Il vantaggio dell'utilizzo di questa camera è un SNR, ad alta risoluzione (2048×2048), e con un'interfaccia PC-camera *Camera Link*.

Tabella 3.3: Dati tecnici telecamera Orca Flash V4.0

Modello	C11440-22CU
Efficienza Quantica	70%
Imagene device	CMOS Sensor FL-400
Risoluzione	2048×2048
Dimensione Pixel	6.5μm × 6.5μm
Area sensore	13.312 mm × 13.312 mm
Frame rate (max)	200 fps
Tempo di esposizione	da 38.96 μs a 10 s
Metodo di raffreddamento	Peltier
Binning	2×2, 4×4, 8×8

A questo punto l'aggiunta di una sorgente parzialmente incoerente porta a fare qualche considerazione sull'*area di coerenza* che vedono le particelle del campione². Per una sorgente incoerente l'area di coerenza si può calcolare come:

$$A_c = \frac{\bar{\lambda} z^2}{A_s} \quad (3.31)$$

dove, $\bar{\lambda}$ è la lunghezza d'onda media incidente, z la distanza sorgente-campione, A_s l'area della sorgente. Considerando che $z \simeq 40$ cm, la sorgente misura 2mm^2 , e la lunghezza d'onda $\lambda = 445.81$ nm, calcolata con la *legge di Wien*, per la quale $\lambda = b/T$, con b costante di Wien e T temperatura della sorgente (6500 K). L'area di coerenza misura $75,72 \mu\text{m}^2$, che confrontata con la grandezza del singolo pixel porta a confermare che vi è interferenza.

3.4 Acquisizione

L'apparato realizzato permette di eseguire esperimenti di velocimetria in eterodina con speckle soggettive. A causa della limitata coerenza, il segnale di eterodina è molto debole e costringe a lavorare al limite della sensibilità della telecamera. Infatti, la sorgente presenta un'area di coerenza molto ridotta rispetto a una sorgente coerente, il che porta una quantità di radiazione che interferisce con la radiazione diffusa molto più piccola. Il sensore legge, interferenzialmente, una potenza diffusa che si potrebbe confondere con lo *shot noise*. Shot noise è un fenomeno tipico della interazione radiazione-materia e obbedisce alla *statistica di Poisson*. Mediamente il numero di

²Ricordiamo che l'area di coerenza è quell'area all'interno della quale due particelle possono dare fenomeni di interferenza con una radiazione incidente, la speckle

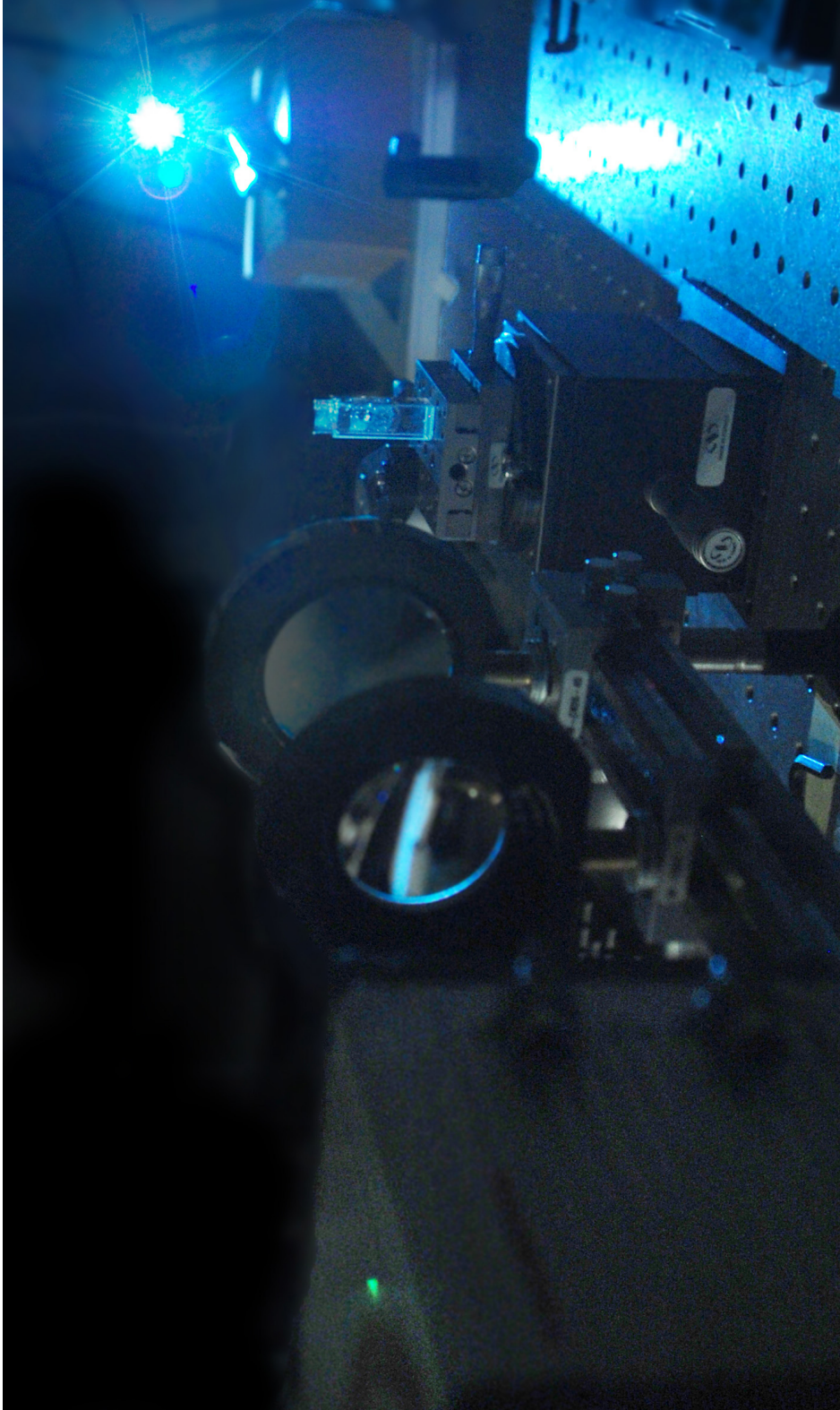


Figura 3.7: HSV con sorgente parzialmente coerente. A partire da sinistra: camera Orca Flash V4.0, sistema telescopico, campione, sorgente luminosa LED.

fotoni catturati dal sensore dipende dall'efficienza quantica, tuttavia ogni misura è affetta da un errore relativo, dove la deviazione standard va come la radice del numero medio di fotoni, $\sigma = \sqrt{\langle N \rangle}$. Per diminuire l'errore dovuto al ridotto fotoconteggio è possibile sfruttare una funzione della telecamera *Rolling Average*, che tiene in memoria N immagini di cui viene fatta la media. In questo modo si può estendere il tempo di esposizione senza saturare la dinamica. Nelle nostre misure si è imposto un rolling average su 50 immagini, prese in 0.5s, che è compatibile con i tempi di misura, siccome le particelle non compiono apprezzabili movimenti, e non si ha blurring del segnale.

3.5 Analisi dati

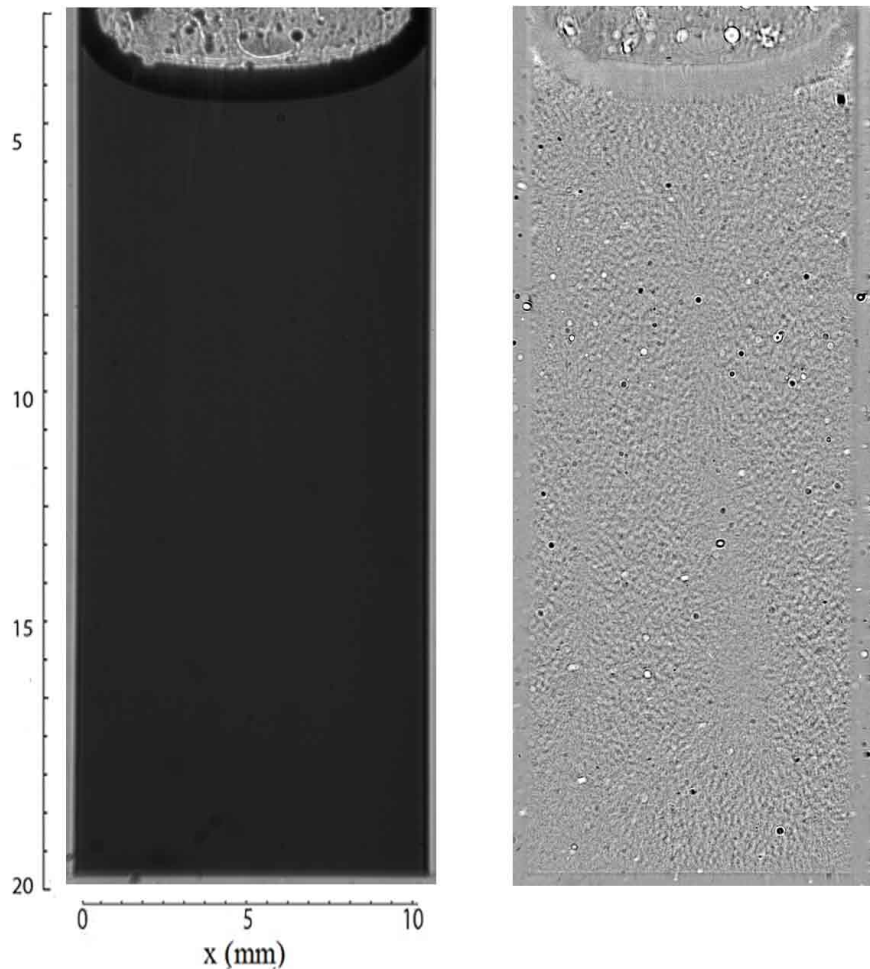


Figura 3.8: A sinistra: cella con particelle di PMMA da $600nm$ di diametro, in soluzione acquosa, a $\Phi = 10^{-3}$. A destra: Campo speckle ottenuto per differenza di immagini

L'analisi dei dati ottenuti è stata fatta mediante programmi appositamente creati in ambiente Labview2012. Per estrarre il segnale di eterodina si sottrae la media dell'intensità del segnale ottenuto:

$$I(\mathbf{r}, t) - \langle I(\mathbf{r}, t) \rangle = I_0 + 2E_0 Re E_s - \langle I_0 \rangle = 2E_0 Re(E_s) \quad (3.32)$$

siccome il termine $2E_0 Re(E_s)$ in media è nullo, si può normalizzare per l'intensità media:

$$\frac{I(\mathbf{r}, t) - \langle I(\mathbf{r}, t) \rangle}{\langle I(\mathbf{r}, t) \rangle} = \frac{2}{\langle I_0 \rangle} Re E_0 E_s \quad (3.33)$$

Effettuando la correlazione tra due immagini, a un ritardo τ l'una dall'altra, è stato possibile estrarre il campo di velocità del campione. In questo modo si è potuta mantenere la direzionalità del campo di velocità di tutta la popolazione di particelle. In figura 3.8 si riporta un'immagine acquisita nei primissimi istanti del processo di sedimentazione, in cui non è ancora possibile osservare significativi avanzamenti del fronte di sedimentazione. Successivamente è stata applicata una differenza tra immagini a ritardo $\tau = 100s$ l'una dall'altra, alle quali era stato precedentemente sottratto il fondo come descritto e, tramite un programma sviluppato in Labview2012. Quindi, entrambe le immagini vengono divise in sotto aree di $1.05mm \times 1.05mm$ e, spostandosi di $0.4mm$ tra un'area e la successiva, vengono effettuate le correlazioni e, dalla misura dello spostamento dei picchi di correlazione, è possibile estrarre il campo di velocità per l'intero campione, mostrato in figura 3.9.

Nonostante la presenza di un bagno termico, si nota la presenza di due roll convettivi, che si estendono per tutta la lunghezza della cella. Con le misure effettuate è stato messo in luce che tali roll sono estremamente lenti. Per queste particelle di PMMA da $600nm$ di diametro, il tempo per effettuare un intero giro supera le 6 ore. Alla formazione di roll seguono momenti in cui si raggiunge un equilibrio termico, dove questi moti convettivi scompaiono e le particelle sedimentano seguendo una traiettoria pressoché rettilinea. Dopodiché si assiste ancora la riformazione di un roll, finché le particelle, arrivate a circa $1/3$ di distanza dal fondo, creano un equilibrio per cui i roll spariscono e le particelle sedimentano normalmente. Tuttavia, questi moti non sono dovuti a interazioni idronamiche tra le particelle, bensì sono correlati con i moti convettivi presenti all'interno del bagno termico. La creazione di un setup di termalizzazione accurata esula dagli scopi di questa tesi.

Poiché la tecnica utilizzata è in primo luogo una tecnica di imaging è possibile ricavare informazioni circa il profilo di sedimentazione partendo da semplici considerazioni sulla turbidità del campione. Sfruttando la legge di Lambert Beer:

$$I(t) = I_0 e^{-\alpha \Phi} \quad (3.34)$$

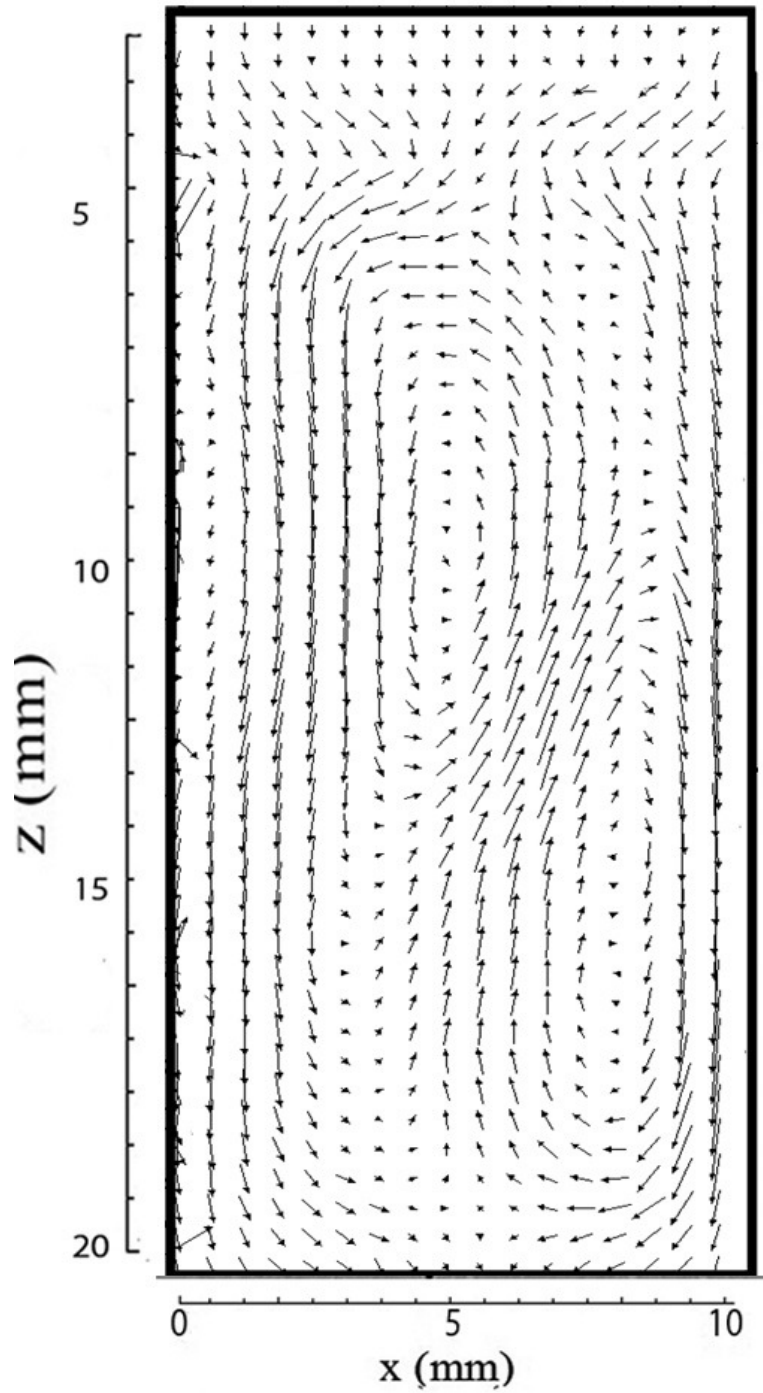


Figura 3.9: Campo di velocità per un campione di particelle di PMMA $600nm$ in diametro e $\Phi = 10^{-3}$, nei primi istanti di sedimentazione. Si nota la presenza di due roll convettivi.

dove $I(t)$ è l'intensità al tempo t , I_0 l'intensità incidente, α una costante, è stato possibile calcolare la volume fraction Φ del profilo di sedimentazione. Per il calcolo dell'intensità incidente si è utilizzata l'ultima immagine, dove il campione era quasi completamente sedimentato, cosicché l'intensità incidente e quella trasmessa erano le stesse. Per il calcolo del coefficiente α ci si è basati sul rapporto dell'immagine iniziale, dove $\Phi = 10^{-3}$, e l'ultima immagine. Da qui è stato possibile calcolare la volume fraction per tutte le altre immagini acquisite, tenendo α costante.

In Fig.3.10 viene mostrato il profilo del fronte di sedimentazione in funzione della posizione. Si possono notare le tre regioni che caratterizzano il profilo, come detto precedentemente: la "fan region", cui segue il fronte di sedimentazione e infine la "cake region". I profili, a diversi istanti temporali, sono equispaziati, dunque, la velocità di sedimentazione è costante nel tempo. Inoltre, mentre le particelle continuano a sedimentare, si vede una diminuzione della volume fraction del fronte stesso. Se si prende il punto di flesso di questo profilo nel tempo è possibile definire la velocità del fronte, ottenendo Fig.3.11.

Il fronte si muove con una velocità lineare nel tempo di $0.0341\mu m/s$ che è compatibile alla velocità di Stokes stimata $\sim 0.037\mu m/s$, nonostante vi sia la presenza di un moto convettivo che si estende per l'intera cella.

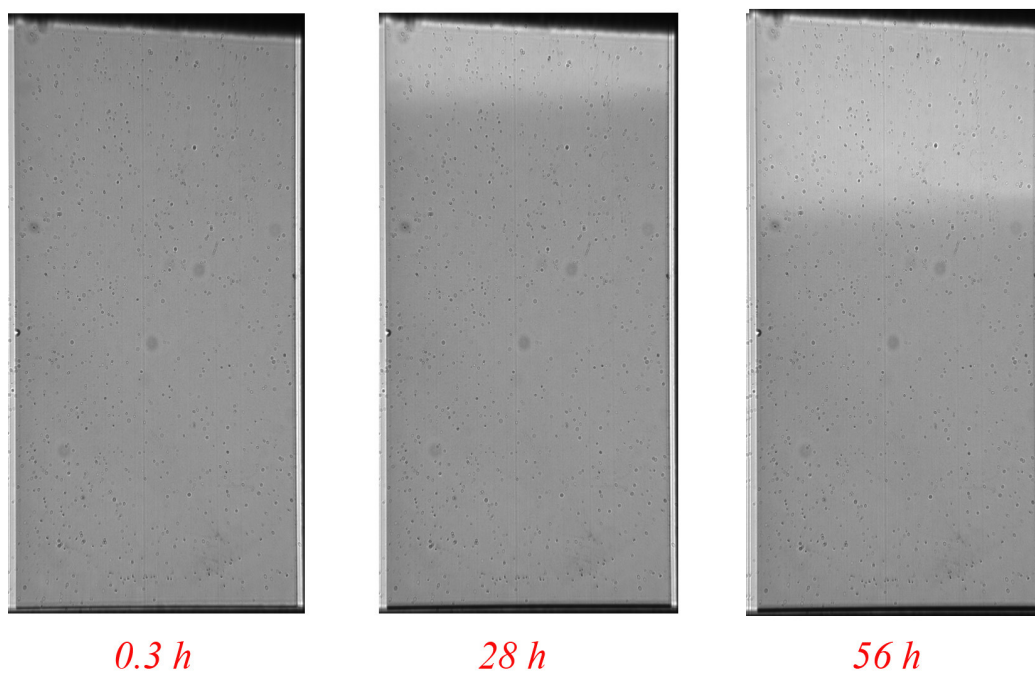
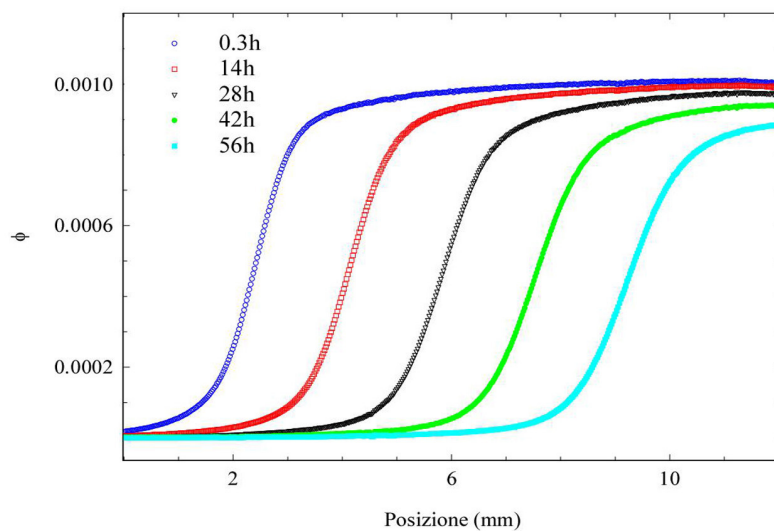


Figura 3.10: In alto: Profilo di sedimentazione per un campione di PMMA da $600nm$ di diametro con $\Phi = 10^{-3}$. Il grafico mostra l'andamento del profilo di sedimentazione a tempi: $0.3h$, $14h$, $28h$, $42h$, $56h$.
In basso le immagini del campione relative ai tempi: $0.3h$, $28h$, $56h$.

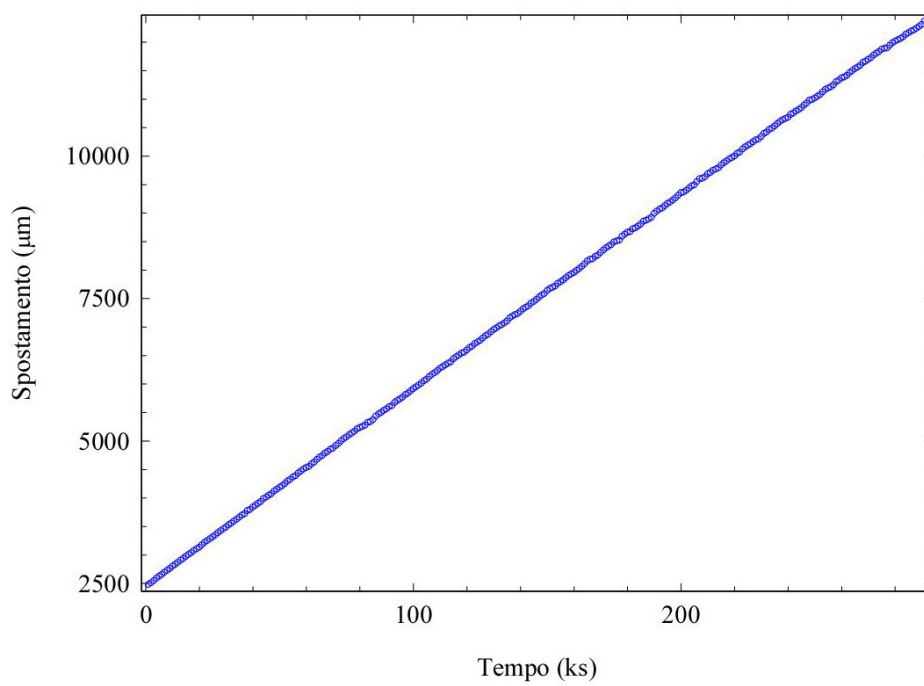


Figura 3.11: Velocità del fronte di sedimentazione per una sospensione di particelle di PMMA da $600nm$ di diametro a $\Phi = 10^{-3}$. Il fronte mostra una velocità di $0.0341\mu m/s$ compatibile alla velocità di Stokes stimata $\sim 0.037\mu m/s$.

3.6 Conclusioni

Partendo da una tecnica recentemente introdotta, l'Heterodyne Speckle Velocimetry [27], è stato sviluppato un nuovo tool ottico che si è dimostrato altamente affidabile per l'indagine di particelle Browniane, a bassi numeri di Peclét, in sedimentazione. In particolare, sono stati risolti i problemi di sottrazione del fondo dovuti all'utilizzo di luce coerente ed è stato possibile acquisire immagine con un field of view di $2\text{cm} \times 1\text{cm}$ che copre l'intera dimensione della cella. La potenza di questa tecnica risiede nella possibilità di ricostruire l'intero campo di velocità di particelle che hanno dimensioni troppo piccole per poter essere risolte, basandosi su un'illuminazione a luce bianca parzialmente coerente.

Le analisi di velocimetria hanno evidenziato la presenza di moti convettivi su scale spaziali pari alle dimensioni della cella che però sono da imputare a dei difetti nel sistema di termalizzazione del campione. La presenza di moti convettivi suggerisce di curare maggiormente l'aspetto dell'isolamento termico. Il bagno termico, una cella cubica di lato 10 cm, in cui la cella di sedimentazione era immersa, necessitava di controlli attivi. Lo sviluppo di un sistema termalizzato esula dallo scopo di questa tesi. Tuttavia, nonostante la presenza di questi moti convettivi, è stata misurata la velocità di sedimentazione per particelle di PMMA da 600nm di diametro a $\Phi = 10^{-3}$. Si è dimostrato che il profilo di sedimentazione è in linea con le previsioni teoriche, e la velocità di sedimentazione calcolata $0.00341\mu\text{m}/\text{s}$ è compatibile a quella di Stokes $0.037\mu\text{m}/\text{s}$, e si mantiene costante per tutto il processo.

Questo set up ottico si propone, quindi, come una tecnica affidabile e accurata per gli esperimenti di velocimetria e imaging su particelle Browniane. Inoltre, non si presta solo a misure su particelle per la soft matter, ma può essere adattata anche al puro campo biomedico. In particolare, è possibile eseguire velocimetria o microscopia di fluidi in sistemi microfluidici.

Capitolo 4

Studio delle dinamiche microscopiche e proprietà macroscopiche di gel di pectina

Come visto nel capitolo 2, la Pectina è un polimero biologico altamente complesso, di vasto interesse nella ricerca biomedica, coprendo applicazioni che vanno dal drug delivery alla gene delivery, fino ad arrivare alla tissue engineering. In presenza di ioni divalenti si ha la formazione di gel, le cui caratteristiche sono fortemente influenzate da fattori come densità, forza ed estensione dei cross link tra catene e, soprattutto, dalla loro cinetica di riorganizzazione.

In questo capitolo viene descritta la tecnica, i metodi di preparazione e i risultati ottenuti nello studio di gel di pectina. In particolare si propone un confronto tra dinamiche microscopiche indagate tramite PCI [6, 11] e proprietà macroscopiche meccaniche-reologiche di gel a *gelazione esterna* e *gelazione interna*. Viene descritta la cinetica di gelazione esterna, attivata dalla diffusione di ioni Ca^{2+} in una soluzione di pectina all'1% e i relativi studi reologici, quindi si propone un confronto con la gelazione interna, ottenuta utilizzando nanoparticelle carbonato di calcio (CaCO_3) come agente gelante e verranno analizzate le relative proprietà meccaniche.

Parte dei risultati descritti in questo capitolo sono inoltre pubblicati su [66].

4.1 Materiali e Metodi

4.1.1 Gel di Pectina

Per la preparazione dei gel sono stati utilizzati: pectina, cloruro di sodio (NaCl), bicarbonato di sodio (NaHCO_3), nanoparticelle di carbonato di calcio (CaCO_3) e cloruro di calcio (CaCl_2). La pectina utilizzata è a basso metossile (lot CU701), con un grado di esterificazione $\text{DE} = 38\%$ e peso molecolare $M_w = 317kDa$ ($M_n = 74kDa$), concessa da Herbstreith & Fox (Neuemburg, Germany). NaHCO_3 , NaCl e CaCl_2 sono state comprate dalla Sigma-Aldrich (Italia), e utilizzati senza ulteriori modifiche. Le nanoparticelle di CaCO_3 sono state sintetizzate secondo il protocollo descritto in [63], utilizzando calcio cloruro deidratato 99.99% ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Aldrich, USA). La sospensione di particelle di carbonato di calcio è stata caratterizzata tramite microscopio ottico, microscopio a trasmissione elettronica (TEM) e microscopio elettronico a scansione (SEM). In Fig.4.1 vengono mostrati gli aggregati, di dimensio-

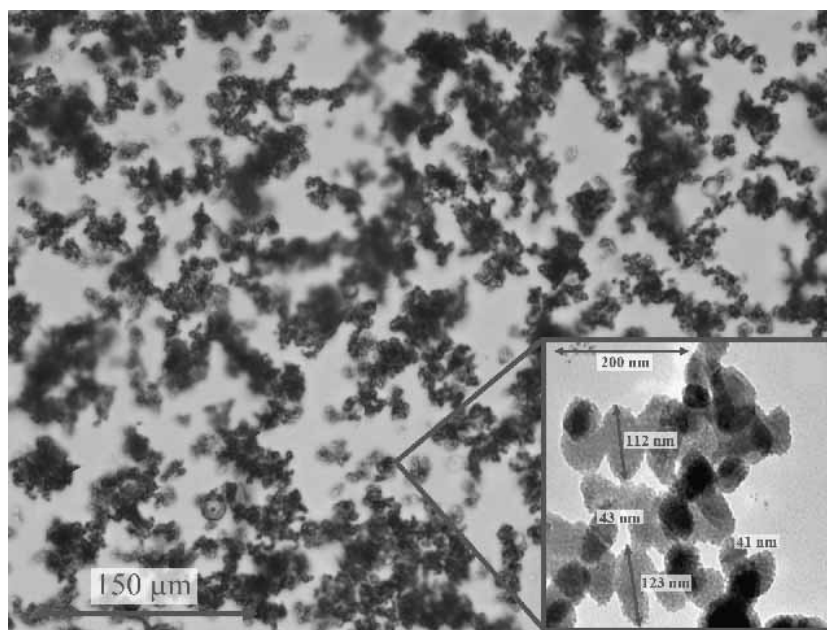


Figura 4.1: Main: immagine al microscopio ottico degli aggregati di nanoparticelle di carbonato di calcio. Nell'inset viene riportato un ingrandimento effettuato tramite TEM, di singole particelle e aggregati. Le dimensioni variano da 43nm a 123nm .

ni dell'ordine dei centinaia di micrometri, che queste particelle tendono a formare. Per ridurre le dimensioni di questi aggregati, al fine di aumentare la velocità di dissoluzione nella pectina, tutte le sospensioni di carbonato di calcio sono state sonicate per circa 1 h prima della preparazione dei campioni.

In particolare, per la *gelazione esterna* si è partiti da una soluzione all'1% (w/v) di pectina in 9.5mM NaHCO₃ e 70mM di NaCl. Si è preparata una soluzione di cloruro di calcio CaCl₂ in 9.5mM di bicarbonato di sodio, e 70mM di cloruro di sodio, in concentrazioni: 23mM e 45mM, così da ottenere dei gel finali concentrazioni in calcio da 12.5mM e 25mM. In questo caso la gelazione avviene per diffusione degli ioni Ca²⁺ da un reservoir, quindi è stata utilizzata una cuvette (VWR International), che presenta due compartimenti, uno per la pectina e uno per il cloruro di calcio, separati da una membrana dialitica Sigma D-9402 (molecular weight cutoff = 14000). Dunque, si è versato, con una pipetta elettronica Eppendor, la soluzione di cloruro di calcio al di sopra della membrana dialitica, cercando di evitare la formazione di bolle che ostacolerebbero la libera diffusione del gelante. In ogni esperimento si è cercato di evitare la presenza di moti convettivi dovuti alle differenze di densità tra i due compartimenti. Per alcuni esperimenti si è reso necessario capovolgere la cella, di modo da avere nella parte sottostante la soluzione di calcio e sopra la pectina. Per comodità di lettura, in tutte le immagini che verranno mostrate, la membrana sarà nella parte superiore della figura. Per le prove reologiche sono stati preparati 3mL di soluzione di pectina con 70mM di NaCl e 9.5mM di NaHCO₃ all'1% su una Petri da 5cm di diametro, sulla quale è stata posta una membrana per dialisi. Quindi, dopo aver riversato accuratamente una soluzione di cloruro di calcio, sono stati estratti campioni di 2mm di diametro.

Per la *gelazione interna*, si è preparato una soluzione 9.5mM di NaHCO₃ e 70mM di NaCl in acqua distillata, preventivamente filtrata tramite siringa con filtro da 0.2μm in polipropilene. Quindi, dopo aver posto la soluzione su un agitatore ad ancoretta magnetica, si è riversata dolcemente la pectina, di modo d'avere una soluzione finale all'1.2% (w/v). A questo punto la soluzione ottenuta viene degasata per 3 h, per poi essere trasferita in una celletta ottica a sezione quadrata di 10mm di lato. Infine, viene immessa, tramite pipetta elettronica Eppendorf, una soluzione di carbonato di calcio, precedentemente sonicato, così da ottenere un gel finale all'1% in pectina, e con differenti concentrazioni di CaCO₃: 6.25mM, 12.5mM, 25mM. Dopo aver agitato la celletta, evitando di formare bolle d'aria, immediatamente viene posto il tutto sul set up PCI. Per le prove reologiche, inerenti la gelazione interna, è stato preparato in un becker la soluzione di pectina all'1.2% a cui si è aggiunta la sospensione di CaCO₃, di modo d'avere 6.25mM, 12.5mM, 25mM di concentrazione finale di calcio. Quindi, dopo aver rimescolato con una spatola, si è riversato il gel in formazione in una Petri e, a diversi intervalli di tempo, si è estratto dal centro della Petri un campione di 2mm di diametro, che, successivamente, viene posto nel reometro.

4.1.2 Photon Correlation Imaging (PCI)

Per l'analisi microscopica è stato montato un apparato di PCI, di cui si è data una descrizione in 1.2.2. Questa tecnica permette l'indagine su campioni quasi arrestati, dove viene a cadere l'ipotesi di ergodicità, motivo per cui le tecniche tradizionali di DLS non sono più completamente affidabili. In un gel i moti Browniani non sono mai completamente arrestati e vi sono spostamenti su piccolissime scale spaziali. Ciò che si misura con un esperimento tradizionale di DLS è la funzione di correlazione dell'intensità diffusa, $g_2(\tau) = \langle I(t)I(t+\tau) \rangle_t / \langle I(t) \rangle_t^2$ mediata sul tempo t . I gel tipicamente non sono sistemi ergodici quindi le medie spaziali e temporali non forniscono le stesse informazioni. Per questo motivo il comune DLS, indagando una sola regione del campione, soffre di notevoli limitazioni. L'utilizzo di sensori multipixel CCD o CMOS ha portato alla risoluzione di questo problema, permettendo di ottenere una media d'insieme *a posteriori* via software.

La PCI prevede un'ottica di imaging con un sistema stop down, rappresentato da un'iride. Quest'ultima permette che ogni pixel del sensore CCD riceva luce da un'area limitata del campione, cosicché, analizzando la dinamica del campo speckle sul sensore, si possa risalire alla stessa informazione degli esperimenti di DLS ma mantenendo un'informazione spaziale. Ciò che si ottiene è un'immagine dove l'intensità di ogni speckle varia nel tempo secondo la dinamica Browniana del campione, come in un esperimento di DLS, ma con specificità spaziale tra il campione e l'immagine.

L'apparato sperimentale è montato su un tavolo ottico Newport (*Super Invar Breadboard*). Le componenti che presenta sono:

- **Laser:** Un laser, sorgente di luce coerente e monocromatica, della Melles Griot. La potenza di picco in uscita è $5mW$ e la lunghezza d'onda λ è pari a $632.8nm$ (I dati tecnici sono riportati in 3.3)
- **Lente:** Una lente LEICA Achromat 10/0,25 che serve da lente collimatrice per il raggio laser. La lente è posta a una distanza $p = 10cm$ dalla sorgente laser, che coincide con la focale, così avere in uscita un raggio laser perfettamente collimato
- **Lente Cilindrica:** La peculiarità di una lente cilindrica è quella di focalizzare la luce che l'attraversa su una linea piuttosto che su un punto. Seguendo [26] si può calcolare la funzione di trasferimento introdotta dalla lente, che è:

$$t_l(x, y) = e^{jkn\Delta_0} e^{-jk^2fy^2} \quad (4.1)$$

dove il primo fattore del membro a destra presenta il ritardo di fase introdotto dalla lente per via dello spessore Δ_0 , mentre il secondo fattore

Tabella 4.1: Dati tecnici telecamera PikeF032.

Modello	Pike F-032
Interfaccia	IEEE 1394b - 800 Mb/s
Risoluzione Massima	640 x 480
Sensore	CCD
Dimensioni Pixel	$7.4\mu\text{m} \times 7.4 \mu\text{m}$
Massimo Frame Rate	200 fps
A/D	14bit

mostra che la lente mette a fuoco a una distanza f ma solo lungo un asse. Approssimativamente si può dimostrare che l'altezza della lama di luce generata va come:

$$L = 2 \frac{r_0}{f} (z + f) \quad (4.2)$$

dove r_0 è la larghezza del fascio laser collimato, z è la distanza dalla lente, f è la distanza focale. Nel nostro caso L è pari a 2cm , dove $r_0 = 1\text{mm}$, $z = 20\text{cm}$ e $f = 300\text{mm}$. La larghezza che si misura è di circa $200\mu\text{m}$.

- **Videocamera:** le acquisizioni vengono effettuate con una videocamera *Pike F032* della *AlliedVision Technologies* sulla quale è montato un diaframma e un obiettivo $12.5 - 75\text{mm } F1.8$. Tramite il relativo software è possibile regole molteplici parametri tra cui: dimensioni dei video, esposizione, guadagno, velocità di acquisizione, velocità di trasferimento e memoria interna alla videocamera. Il frame rate varia da un minimo di 0.20fps a un massimo di 200fps . I dati tecnici sono riportati in Tab.4.1

Quindi, nella configurazione finale il campione è illuminato da una lama di luce laser, di lunghezza 2cm e spessore $200\mu\text{m}$, con una lunghezza d'onda λ pari a 632.8nm , e la luce diffusa dal campione viene rilevata ad un angolo $\theta = 90^\circ$. A tale angolo corrisponde un vettore d'onda di scattering pari a $0,0164\text{nm}^{-1}$ che permette, dunque, di indagare su una dimensione $d = 2\pi/q = 60\text{nm}$.

Una volta acquisite le immagini è possibile seguire e indagare la dinamica microscopica via software, con programmi sviluppati appositamente in ambiente Labview2012, partendo dal cosiddetto *indice di correlazione* $c_I(\tau, t, \mathbf{r})$, calcolato tra due immagini prese al tempo t e $t + \tau$:

$$c_I(\tau, t, \mathbf{r}) = \frac{\langle I_p(t) I_p(t + \tau) \rangle_{\mathbf{r}}}{\langle I_p(t) \rangle_{\mathbf{r}} \langle I_p(t + \tau) \rangle_{\mathbf{r}}} - 1 \quad (4.3)$$

dove I_p è l'intensità diffusa misurata dall' p -esimo pixel e $\langle \dots \rangle_{\mathbf{r}}$ denota la media su tutti i pixel all'interno di un blocco centrato attorno al vettore posizione \mathbf{r} . La dipendenza dell'indice di correlazione dal ritardo τ , dal *ageing time* t e dal vettore posizione \mathbf{r} all'interno del campione, fa di questa funzione la chiave per capire la dinamica microscopica e gli eventi di riorganizzazione interna del gel. Siccome la cinetica indagata è sufficientemente lenta, mediando su una finestra δt , più corta del tempo caratteristico di evoluzione della dinamica in studio, la funzione $c_I(\tau, t, \mathbf{r})$ fornisce la funzione di correlazione d'intensità d'ensemble $g_2(\tau)$: $\langle c_I(\tau, t, \mathbf{r}) \rangle_{\delta t} = g_2(\tau) - 1$.

4.1.3 Test reologici

Le due tipologie di gel sono state sottoposte a test reologici, attraverso l'applicazione di una deformazione oscillante a frequenza variabile f in un reometro a geometria cono-troncato-piatto. Da queste misure si ottiene lo *storage modulus* $G'(f)$, parametro legato alla quantità di energia che può immagazzinare il sistema, e il *loss modulus* $G''(f)$, dipendente, invece, dalla quantità di energia dissipata. Il valore scelto per il modulo della deformazione garantisce di porsi in un regime di viscoelasticità lineare, che permette di avere la dipendenza dalla frequenza delle funzioni G' e G'' . Per seguire l'evoluzione cinetica nella gelazione si è fatto riferimento anche a un altro parametro, la *viscosità complessa*, definita come:

$$|\eta^*(f)| = |\eta'(f) - i\eta''(f)| = \frac{\sqrt{(G'^2(f) + G''^2(f))}}{f} \quad (4.4)$$

Tutte le misure di reologia sono state effettuate con un AR-1500ex Rheometer (TA Instrument), mediante una geometria cono-piatto con diametro di 2 cm, una troncatura di 32 μm e un working gap di 32 μm . Gli storage e loss moduli sono stati misurati a temperatura costante $T = 25^\circ\text{C}$ a sforzo costante $\sigma = 2$ Pa, variando la frequenza f su un intervallo 0.2 - 10 Hz.

4.2 Gelazione esterna: dinamica microscopica

Per i gel di pectina a gelazione esterna, diversamente da quanto osservato per la gelazione dell'alginato [11], l'avanzamento del fronte di gelazione non è definito da un apprezzabile aumento dell'intensità diffusa: questo fatto suggerisce che le eterogeneità presenti sono molto meno pronunciate per i gel di pectina piuttosto che per quelli di alginato. La gelazione può essere indagata e seguita accuratamente tramite l'indice di correlazione $c_I(\tau, t, z_0)$, in funzione del tempo t , di un ritardo fissato τ e a una data distanza z_0

dalla membrana. In Fig.4.2 si mostra il risultato per un gel $25mM$ in $CaCl_2$ per ritardi τ di $20s$, $100s$, $600s$. La ROI studiata è posta a $z_0 = 4.1$ mm dalla membrana e, considerando che il gel è omogeneo lungo la direzione orizzontale, è stata scelta un'altezza di $0.8mm$, una larghezza di $5.41mm$. Per la curva con $\tau = 20s$, si può definire un tempo $t_1 < 4h$, al di sotto del

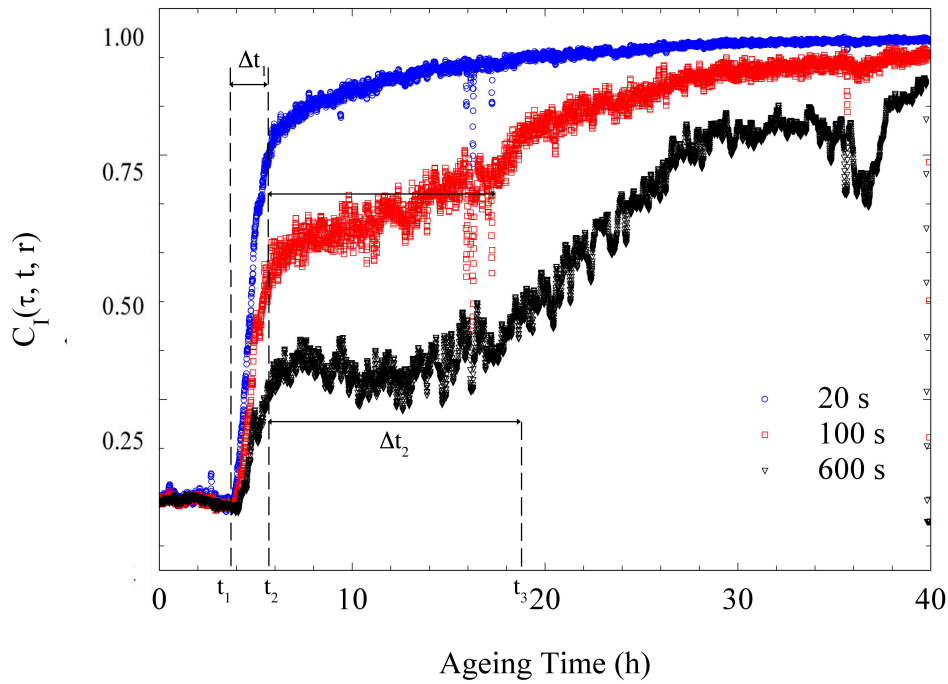


Figura 4.2: Indice di correlazione $c_I(\tau, t, z_0)$ per una ROI $0,8mm \times 5,41mm$ posta a $4,1mm$ dalla membrana dialitica per un gel $25mM$ in $CaCl_2$ a ritardi $\tau = 20s, 100s, 600s$.

quale il gel non si è ancora formato, per cui $c_I(20s, t, 4.1mm) \simeq 0$. In questo intervallo la c_I misura i tempi caratteristici della soluzione pectinica, che però ha una correlazione che decade con un tempo estremamente più corto rispetto al ritardo fissato. Dopodichè si nota un intervallo di tempo $\Delta t_1 = t_2 - t_1 \simeq 2h$, dove il fronte di gelazione attraversa la ROI. Il repentino aumento del valore di $c_I(20s, t, 4.1mm)$ è testimone della rapida gelazione che avviene in questo intervallo di tempo Δt_1 , arrivando a raggiungere un plateau $\simeq 1$. Così per tempi di ageing maggiori di t_2 il campione si comporta come un gel con struttura completamente arrestata, almeno su ritardi di $20s$. Analizzando ritardi maggiori è ravvisabile lo stesso comportamento, dove per tempi $t > t_2$ si raggiunge un plateau, che decresce per $\tau = 100s$ a 0.65 , e per $\tau = 200s$ a 0.30 . Dopo un periodo di tempo Δt_2 di quiescenza

apparente, $c_I(\tau, t, z_0)$ ricomincia a salire, raggiungendo un nuovo plateau che viene quindi mantenuto su tempi molto più lunghi rispetto al precedente.

In Fig.4.3 si riporta l'indice di correlazione $c_I(\tau, t, z_0)$ per diverse ROI di altezza $0.8mm$ e larghezza $5.41mm$ a distanze z_0 variabili, su diversi ritardi τ . Si nota che il comportamento analizzato precedentemente è comune ad ogni sezione del gel.

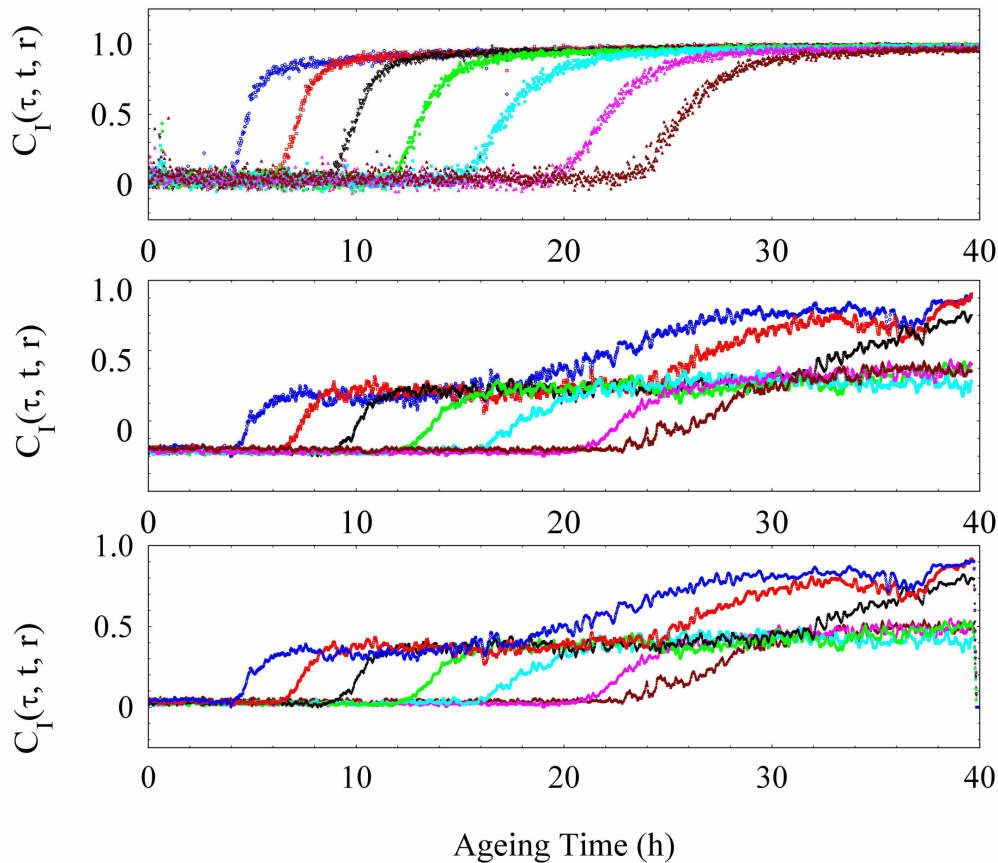


Figura 4.3: Indice di correlazione per diverse ROI ($5.4mm \times 0.8mm$) a ritardi τ : 20s in alto, 100s nel mezzo, 600s in basso. Si nota, dal grafico in alto, che all'avvicinarsi del fondo della cella l'indice di correlazione assume una forma diversa nella crescita. Inoltre, vi è un meccanismo di gelazione a due step, evidenziato nel grafico in mezzo e in basso.

Dapprima l'indice di correlazione $c_I(\tau, t, z_0)$ cresce repentinamente raggiungendo un plateau, testimone della diffusione del cloruro di calcio nella ROI e di un drastico rallentamento della dinamica microscopica. Quindi, vi è una seconda fase in cui il gel prevede riarrangiamenti strutturali che lo portano in una configurazione ancor più arrestata, dove l'indice di correlazione arriva a un plateau finale. Inoltre più ci si avvicina al fondo della cella, più il profilo del fronte si allarga, come chiaramente visibile confrontando le

curve in Fig.4.3, mostrando come il trasporto del calcio avvenga per pura diffusione. In Fig.4.4 viene mostrato che il tempo di gelazione, considerando l'intera cella, cresce linearmente con il quadrato della distanza dalla membrana, implicando un comportamento diffusivo del fronte di gelazione con un coefficiente di diffusione $D \simeq 0.57 \times 10^{-5} \text{cm}^2/\text{s}$. Per indagare sulla peculiare

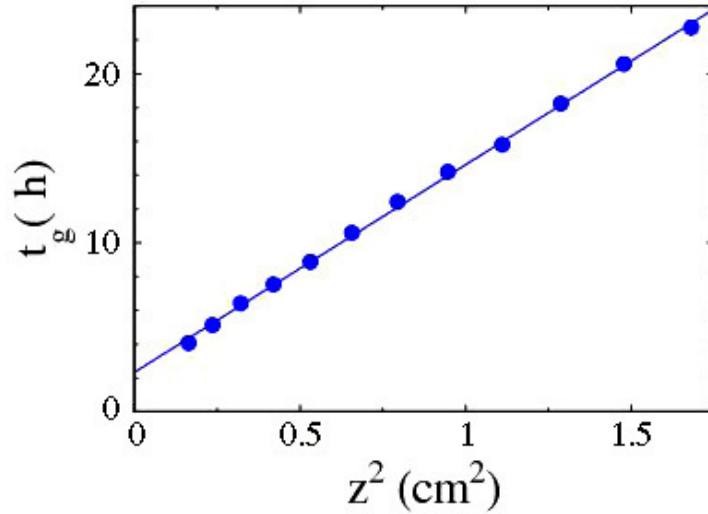


Figura 4.4: Tempo di gelazione t_g in funzione della posizione z , con un fit $t_g = z^2/4D$, dove il coefficiente di diffusione $D \simeq 0.57 \times 10^{-5} \text{cm}^2/\text{s}$

cinetica a due step si può far ricorso alla funzione di correlazione $g_2(\tau)$, mostrata in figura 4.5. All'aumentare del tempo di ageing vi è un progressivo aumento della correlazione e, conseguentemente, un aumento del tempo di decadimento. $g_2(\tau)$ cambia forma funzionale per tempi di ageing inferiori a 1 giorno, dove si nota un decadimento iniziale pronunciato. È possibile eseguire un fit delle curve con la somma di due esponenziali:

$$g_2(\tau) - 1 = ae^{-\frac{\tau}{\tau_s}} + (1 - a)e^{-\frac{\tau}{\tau_l}} \quad (4.5)$$

dove τ_l è una costante di tempo di circa $2500s$, per tempi di ageing < 1 giorno, la costante a ha un valore di circa 0.5 e $\tau_s \simeq 120s$. Al crescere dell'ageing times ($22h, 27h, 33h$) si oltrepassa il primo plateau e si osserva un progressivo aumento del valore di τ_l fino ad arrivare a un valore di $3000s$ e una veloce diminuzione di $a \simeq 0.034$ e di $\tau_s \simeq 10s$. Per lunghi tempi di ageing, quindi, le curve sono ben fittate da un singolo esponenziale, dominato dalla costante di tempo τ_l . La cinetica a due step è correlata ad un progressivo cambio di forma della funzione $g_2(\tau)$, a causa della concorrenza tra due distinti meccanismi di decorrelazione nella dinamica microscopica, uno veloce che opera

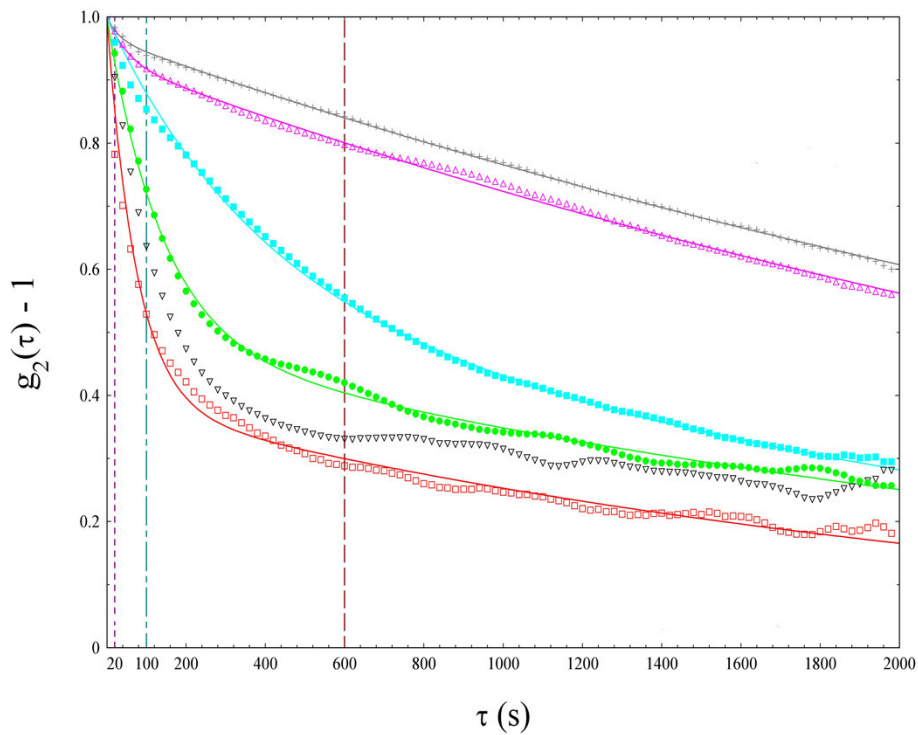
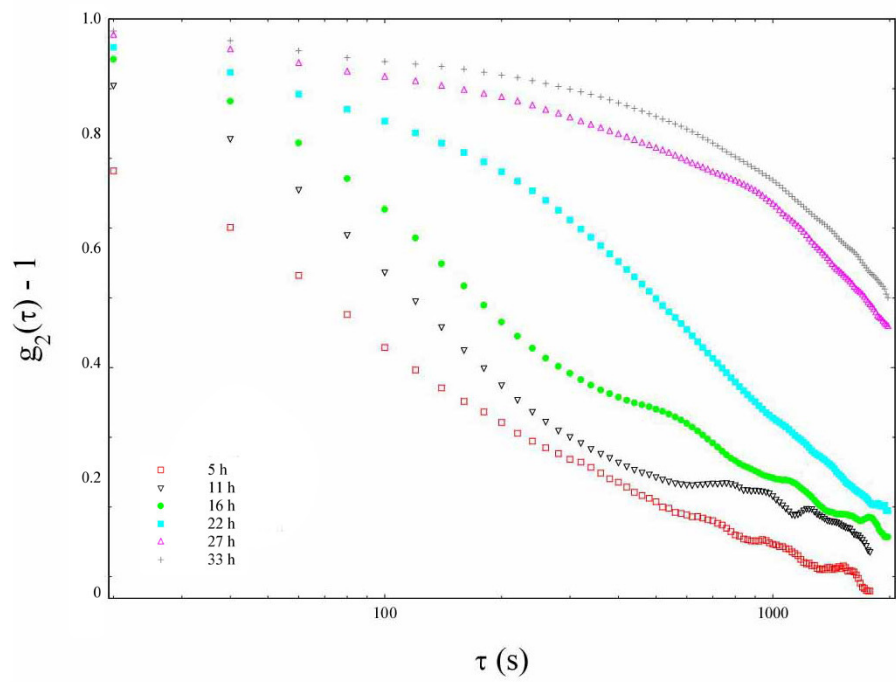


Figura 4.5: Funzione di correlazione $g_2(\tau)$ (punti) di un gel 25mM in CaCl_2 a tempi di ageing: 5h, 11h, 16h, 22h, 27h, 33h e fitting tramite eq.4.5 (linea continua).

a bassi tempi di invecchiamento, τ_s , seguito da un altro molto più lento ma persistente fino a tempi di invecchiamento molto lunghi, caratterizzato dalla costante di tempo τ_l .

Anche per i gel a $50mM$ in $CaCl_2$ si riscontra una cinetica di gelazione a due step, come mostra l'indice di correlazione $c_I(\tau, t, z_0)$ in Fig.4.6, che passa da un plateau iniziale, imputabile a un primo rallentamento della dinamica, a uno finale più stabile.

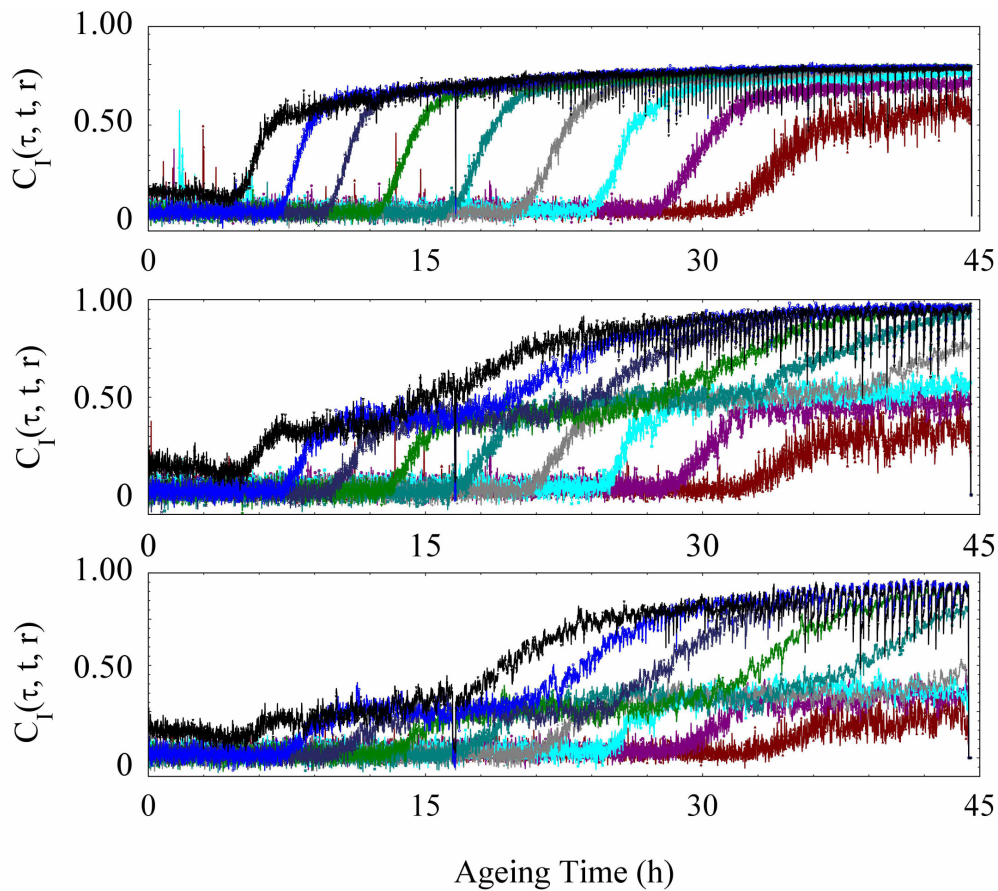


Figura 4.6: Indice di correlazione per diverse ROI ($0.8mm \times 5.41mm$), a partire da $z_0 = 3mm$. In alto: correlazione a ritardo $\tau=20s$; al centro: ritardo $\tau=100s$; in basso: ritardo $\tau=600s$.

L'analisi della funzione di correlazione $g_2(\tau)$ (Fig.4.7) conferma la presenza di due distinti meccanismi di decorrelazione nella dinamica microscopica, come visto per i gel a $25mM$ in cloruro di calcio.

La grande differenza che intercorre tra questi gel rispetto quelli a concentrazione minore, tuttavia, è la presenza di *burst di decorrelazione*. Nell'indice di correlazione $c_I(\tau, t, z_0)$, su il ritardo minimo a $\tau = 2s$, si notano dei

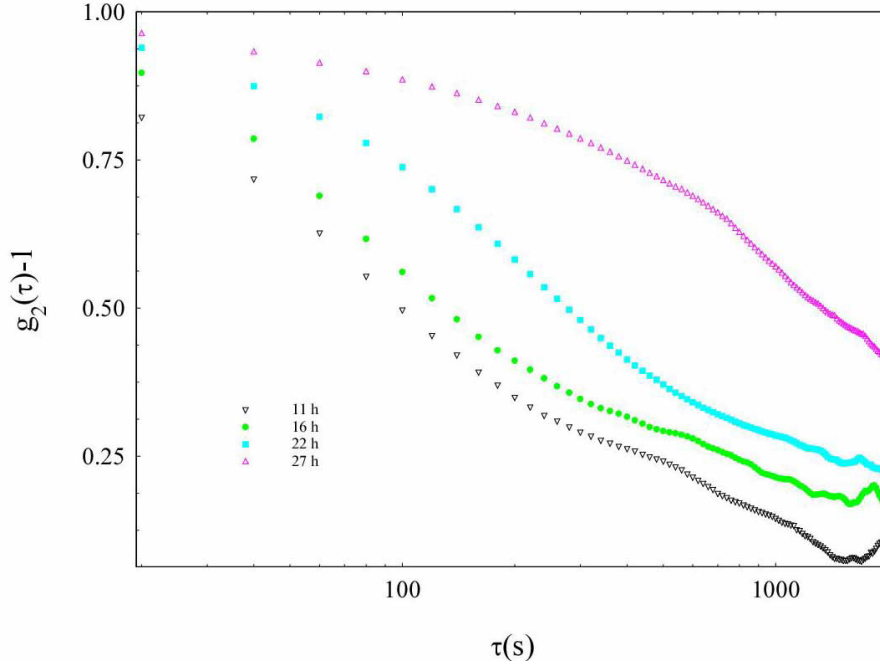


Figura 4.7: Funzione di correlazione $g_2(\tau)$ di un gel $50mM$ in $CaCl_2$ a diversi tempi di ageing. Fit con l'eq.4.5 e mostrano un meccanismo a due step.

decrementi improvvisi di correlazione, *spikes*, conseguenza di violenti riarrangiamenti strutturali. Per visualizzare spazialmente l'effetto di questi riarrangiamenti si è fatto ricorso alle mappe di correlazione, come mostrato in Fig.4.8, dove viene rappresentata la distribuzione spaziale di correlazione in falsi colori, evidenziando il grado di correlazione locale nel campione.

Nella prima mappa, A, presa a un tempo $t_A \simeq 18h$, si nota la presenza di due regioni distinte, la prima è il gel (in rosso), al di sopra del fronte di gelazione, con una struttura pienamente arrestata con correlazione attorno a 1, l'altra al di sotto del fronte, costituita da una soluzione di pectina (in blu) in cui la gelazione non è ancora avvenuta. Nella seconda mappa di correlazione, 2 secondi dopo la prima, la situazione è completamente cambiata. Il gel diventa una struttura attiva, mostrando un riarrangiamento repentino, che interessa l'intera regione, portando l'indice di correlazione a un valore di 0.5. Successivamente, come si vede nella terza mappa, 2 secondi dopo l'evento, il gel è correlato come nella situazione di partenza. La stessa situazione si ritrova anche su tempi di ageing molto lunghi, B, $t_0 \simeq 40h$, in cui il fronte è sceso di parecchio, e il gel copre quasi tutta la cella.

Quindi, in questi gel, oltre alla presenza di due meccanismi distinti di decorrelazione, che operano su scale temporali differenti, vi sono riarran-

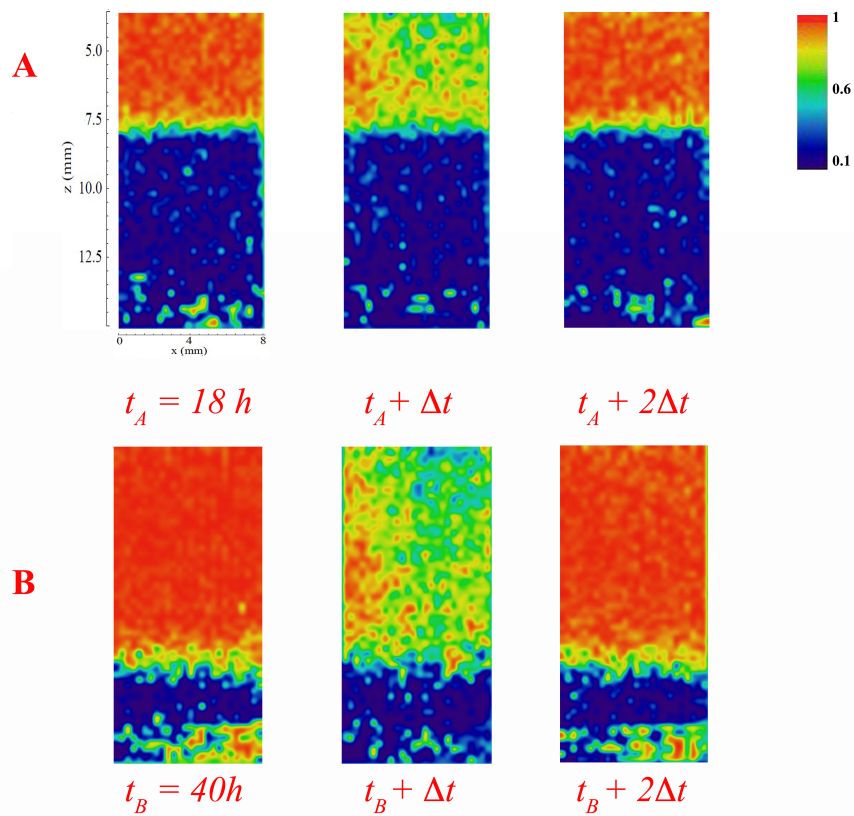
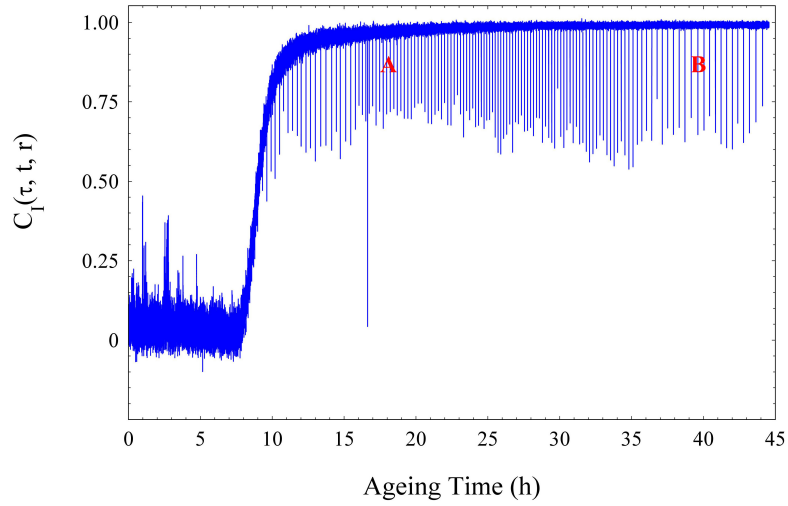


Figura 4.8: Indice di correlazione per un gel 50mM con NaCl a ritardo $\tau=2s$ per una ROI $0.8mm \times 5.41mm$. A $t_A \sim 18h$ si vede una mappa di correlazione per l'intera cella, in cui è netta la separazione tra regione gel (in rosso) e pectina (in blu). Dopo 2 secondi si nota che la correlazione muta radicalmente, a causa di un burst di decorrelazione. Dopo 4 secondi la c_I ritorna ai valori iniziali. Lo stesso comportamento si ritrova in B, per un tempo $t_B \sim 40h$

giamenti strutturali, che si manifestano come “burst” di decorrelazione, che coinvolgono l’intera struttura del gel e avvengono su tempi estremamente brevi.

Si è indagato, inoltre, gel preparati senza NaCl, così da togliere la schermatura dai gruppi carbossilici. Per i gel a $25mM$ l’indice di correlazione $c_I(\tau, t, z_0)$, fig.4.9, per una ROI di $0.8mm \times 5.41mm$ a distanza $z_0=5mm$ dalla membrana, presenta una cinetica a doppio step, come visto precedentemente, ma più pronunciata. A $20s$ di ritardo il gel presenta già un primo rallentamento della dinamica, con un plateau che si mantiene per 8 ore, per poi crescere arrivando a un valore di correlazione confrontabile con quello dei gel $25mM$ con NaCl.

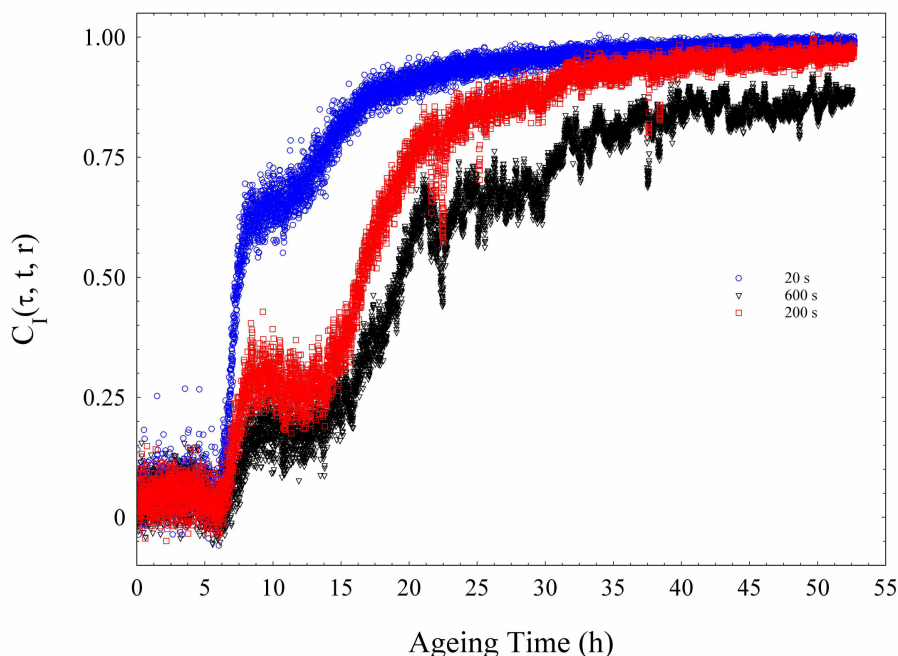


Figura 4.9: Indice di correlazione per una ROI posta a 5.41 mm dalla membrana ($0.8mm \times 5.41mm$), per un gel $25mM$ in $CaCl_2$ in assenza di NaCl. Si nota che la cinetica a doppio step è visibile già su un ritardo $\tau=20s$.

Calcolando l’indice di correlazione $c_I(\tau, t, z_0)$ per ROI di $0.8mm \times 5.41mm$ su un’area di $1.12cm \times 5.41mm$ (Fig.4.10), per qualsiasi quota z_0 si vede che la cinetica a due step è un comportamento comune e che la gelazione avviene grazie alla diffusione degli ioni calcio.

In figura 4.11 si mostra un confronto tra gli indici di correlazione di gel $25mM$ con e senza NaCl, su ritardi $\tau = 10s$ e $\tau = 20s$. Si vede come la dinamica sia notevolmente più arrestata nei gel senza cloruro di sodio.

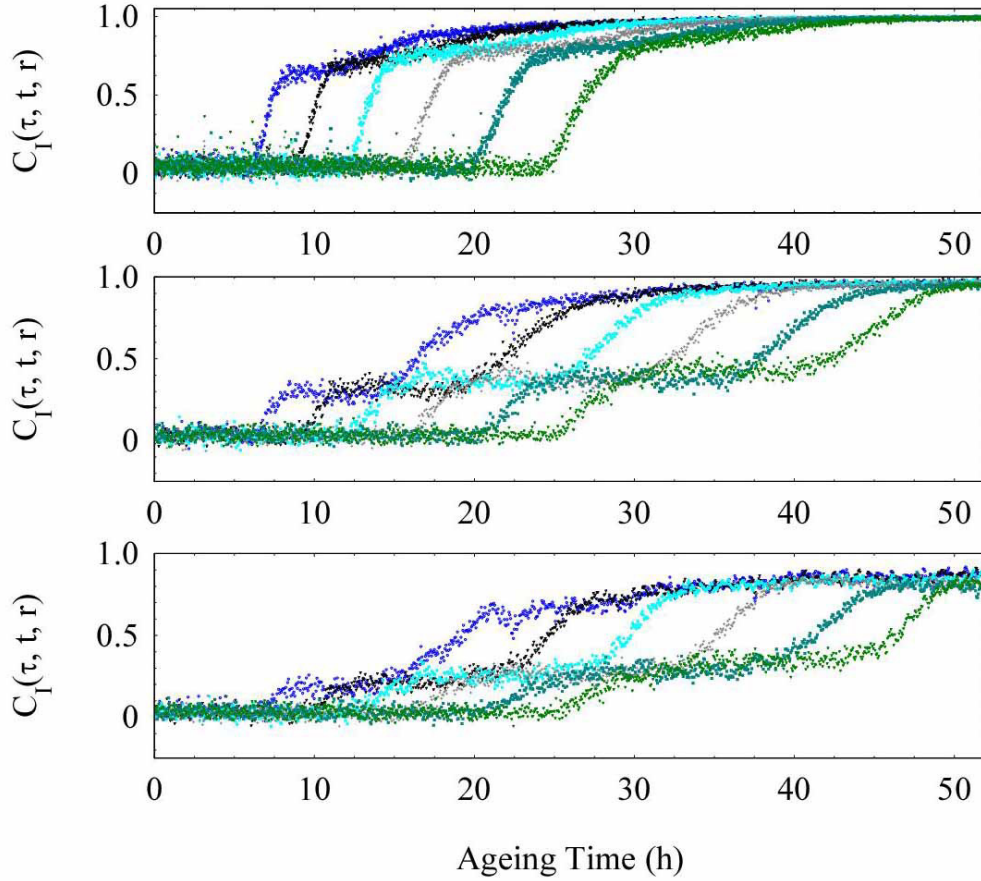


Figura 4.10: Indice di correlazione per sezioni di gel da $0.8mm \times 5.41mm$ per un gel $25mM$ in $CaCl_2$ in assenza di $NaCl$. In alto: ritardo $\tau=20s$; in mezzo: $\tau=100s$; in basso: $\tau=600s$

Probabilmente in assenza di ioni Na^+ che complessano i gruppi carbossilici COO^- , si ha una più alta densità di siti carichi disponibili per legami elettrostatici con gli ioni Ca^{2+} e ne può conseguire una più rapida formazione di cross link e un conseguente rallentamento della dinamica microscopica.

Un confronto più accurato, dal punto di vista della dinamica microscopica, si ottiene mediante la funzioni di correlazione $g_2(\tau)$, mostrato in Fig.4.12, per due ROI prese all'incirca alla stessa distanza dalla membrana. Si vede che su tempi di ageing di $16h$ avviene il primo rallentamento per i gel senza $NaCl$, presentando un valore di correlazione $g_2(\tau) - 1$ minore rispetto a quello per i gel con cloruro di sodio. Le costanti di tempo che caratterizzano questa dinamica iniziale s'attestano attorno a un valore $\tau \simeq 27s$ e $\tau_l \simeq 670s$ per i gel senza cloruro di sodio, molto più basse rispetto a $\tau_s \simeq 120s$ e $\tau_l \simeq 2500s$ dei gel con cloruro di sodio, che indicano una struttura non ancora arrestata

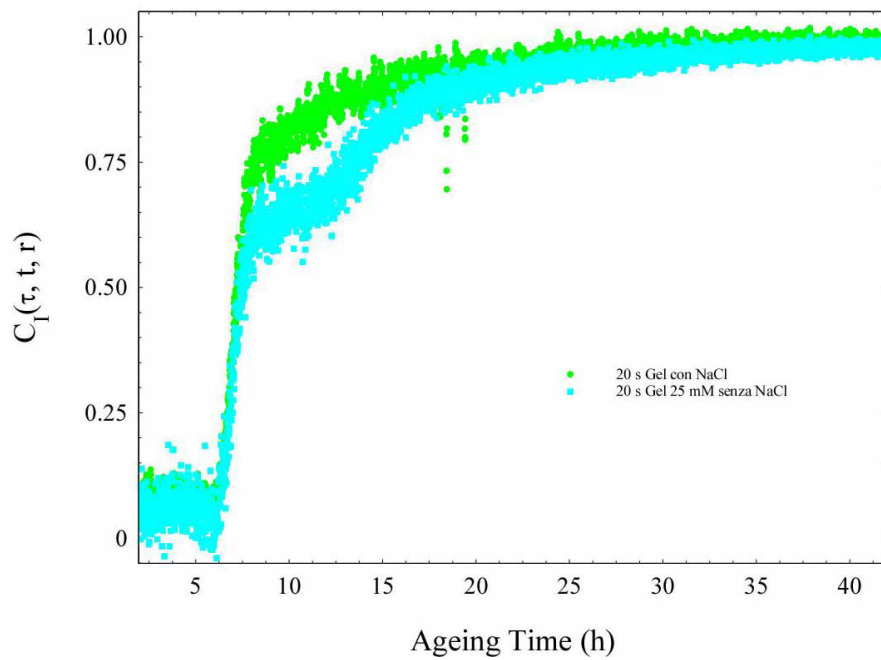
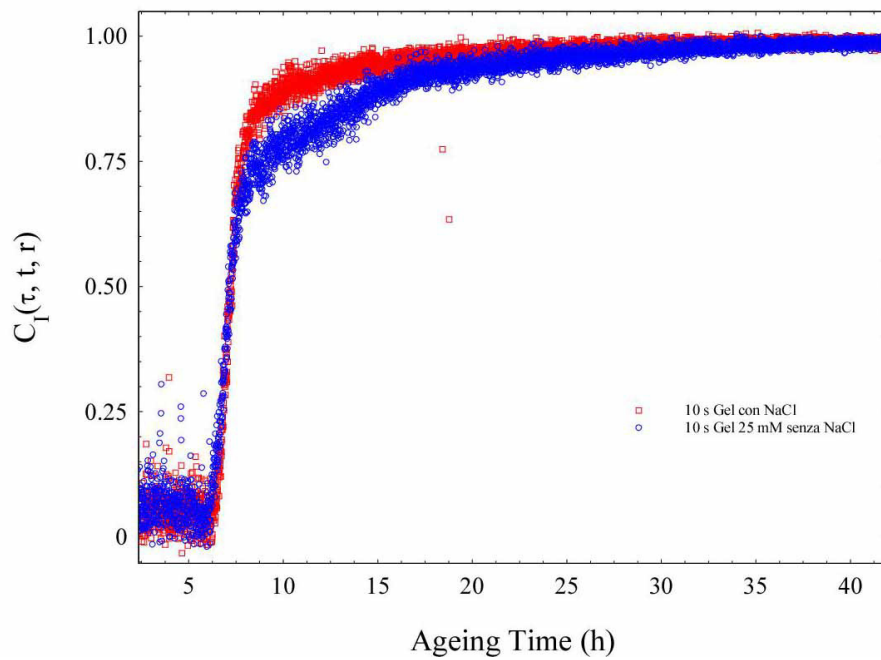


Figura 4.11: Confronto degli indici di correlazione tra gel a 25mM con NaCl e senza NaCl, sopra a ritardo $\tau=10s$, sotto: $\tau=20s$.

e in pieno rimodellamento. Successivamente, per i gel senza NaCl, vi è una modifica di pendenza e di costanti di tempo delle curve, arrivando per tempi di ageing di $27h$ ad avere valori trascurabili di τ_s poichè la costante $a \simeq 0.0070$ e una dinamica dominata dalla costante di tempo $\tau_l \simeq 2300s$ fino a $\tau_l \simeq 2500s$ a $33h$ di ageing. Il modulo della funzione di correlazione dimostra, inoltre, che la struttura che si crea è più rigida rispetto a quella dei gel con cloruro di sodio, anche se questi gel, come visto precedentemente, presentano una costante di tempo $\tau_l \simeq 3000s$ a $33h$ di ageing.

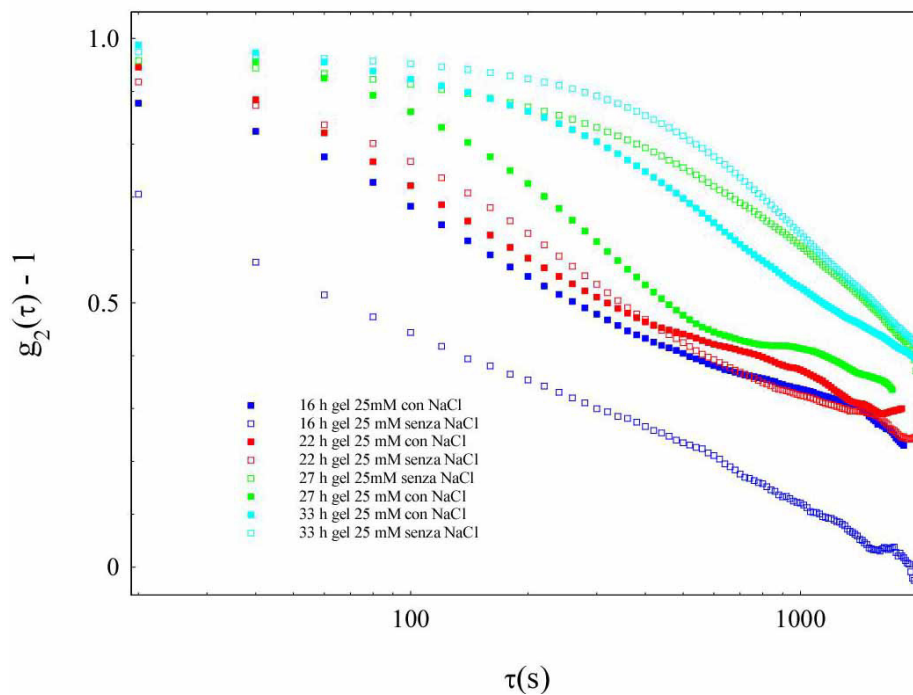


Figura 4.12: Confronto delle funzioni $g_2(\tau)$ tra gel $25mM$ con NaCl (punti pieni) e senza NaCl (punti vuoti). Per $16h$ il gel senza NaCl una $g_2(\tau)$ più bassa rispetto ai gel con NaCl. A $33h$ dall'inizio della gelazione la situazione è invertita e i gel a $25mM$ senza NaCl presentano un valore di correlazione maggiore rispetto a quelli con NaCl.

Per i gel a $50mM$ in $CaCl_2$ senza $NaCl$ si mostra in Fig.4.13 l'andamento dell'indice di correlazione. Anche in questo caso, come per i gel con cloruro di sodio, la dinamica è caratterizzata da burst di decorrelazione improvvisi, che si manifestano a partire da $20h$ dalla gelazione, che coinvolgono intere regioni di gel, ma non lasciano traccia del loro passaggio sulla struttura negli istanti successivi. Analogamente a quanto fatto in precedenza, in Fig.4.14 si mostrano le mappe di correlazione, a $20h$ e $40h$, dove si vede un comportamento uguale a quello occorso nel caso di gel $50mM$ con $NaCl$.

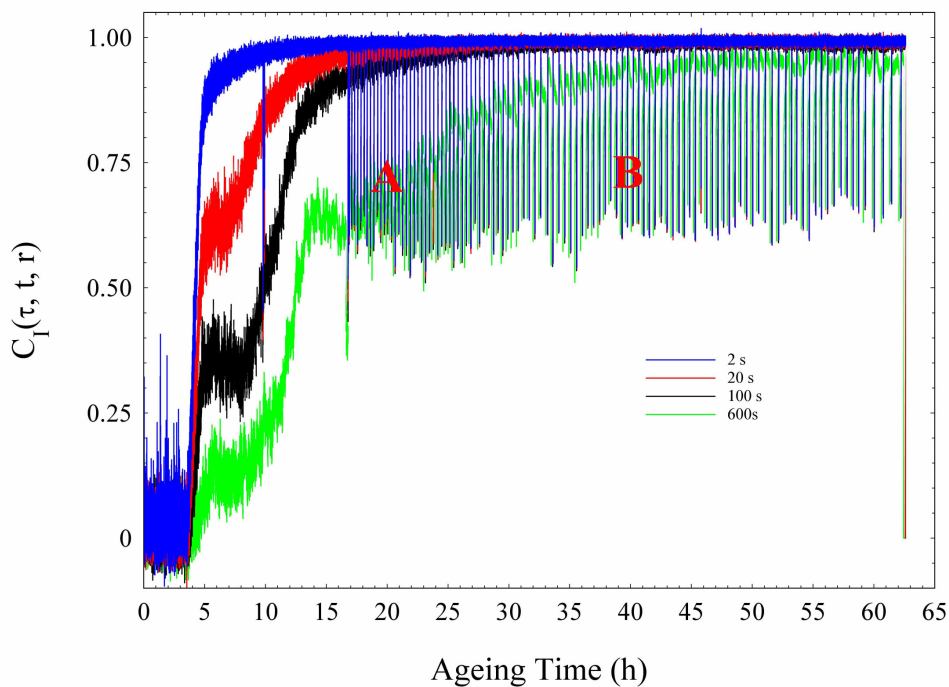


Figura 4.13: Indice di correlazione per una ROI ($0.8mm \times 5.41mm$) a $4.59mm$ dalla membrana per un gel $50mM$ senza $NaCl$, a ritardi τ : $2s$, $20s$, $100s$, $600s$.

Ciò che diversifica le dinamiche con e senza $NaCl$ è quando questi eventi iniziano. Per i gel a $50mM$ con $NaCl$ gli eventi cominciano anche dopo $10h$ dalla gelazione, mentre in assenza di $NaCl$ questi burst sembrano assenti fino a $20h$, quando il fronte ha raggiunto almeno i $2/3$ della cella, Fig.4.15.

Ciononostante, confrontando le funzioni di correlazione $g_2(\tau)$, mostrate in figura 4.16, per i gel a $50mM$ con e senza $NaCl$, emerge un comportamento microscopico simile a quello discusso precedentemente per i gel $25mM$. Per bassi tempi di aging ($t_{aging} < 16h$) i gel senza cloruro di sodio presentano riarrangiamenti strutturali, con una $g_2(\tau)$ che decorrela con costanti di tempo $\tau_s \simeq 70s$ e $\tau_l \simeq 1380$ più brevi rispetto ai gel con cloruro di sodio, per i quali

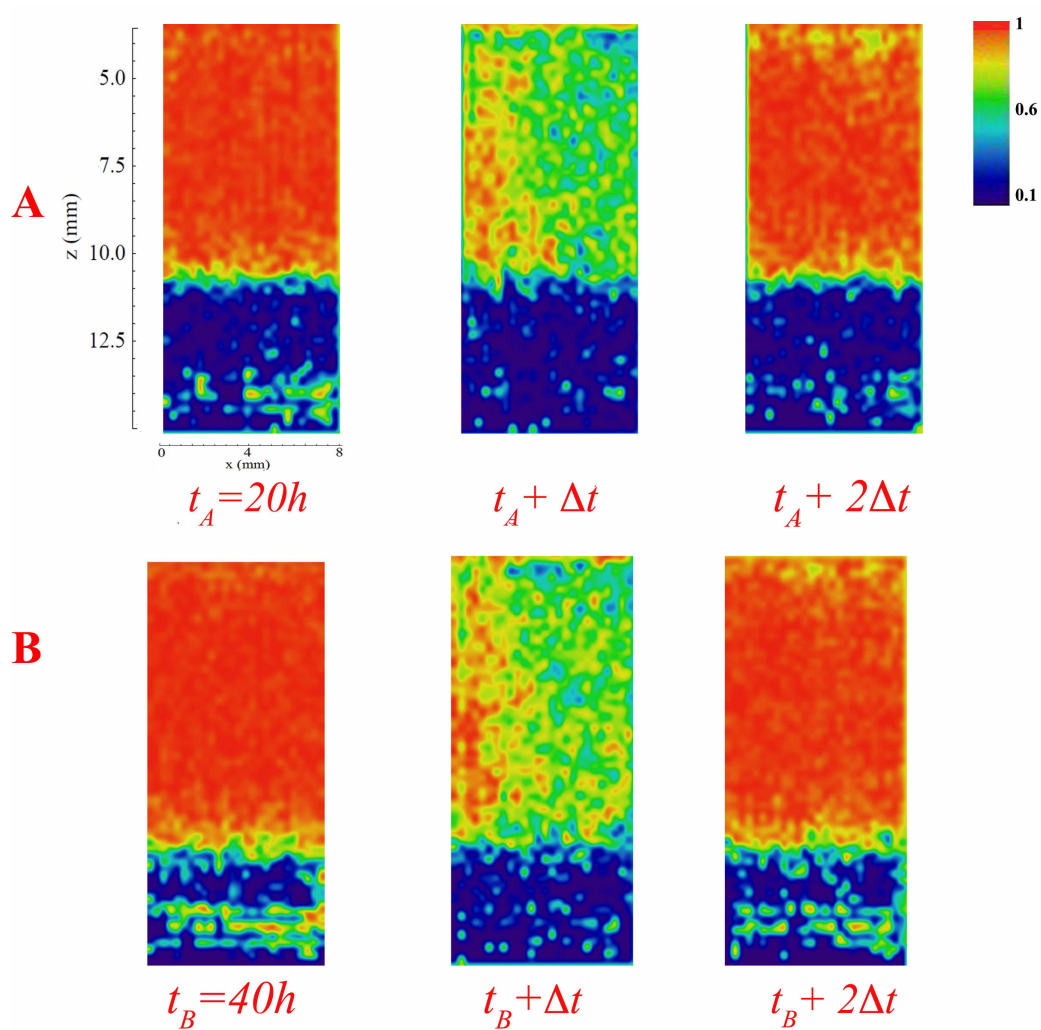


Figura 4.14: In alto: mappa di correlazione dopo un tempo $t_A \sim 20h$ dall'inizio del processo di gelazione per un gel $50mM$ senza NaCl con $\Delta t = 2s$; in basso: mappa di correlazione per il medesimo gel a $t_B \sim 40h$ dall'inizio del processo, con $\Delta t = 2s$.

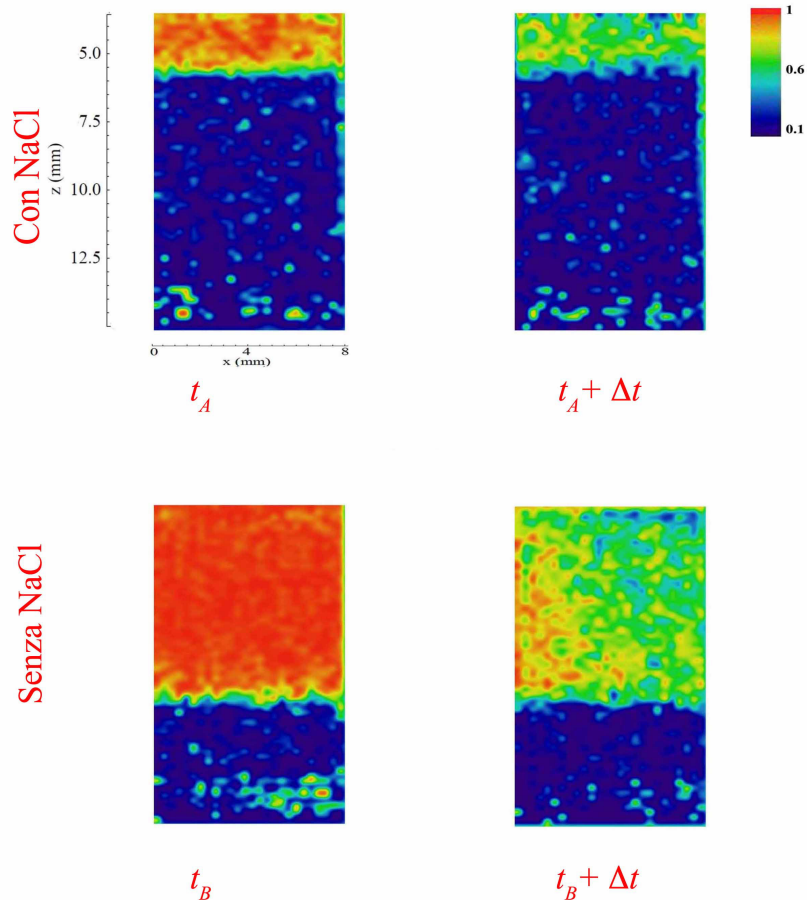
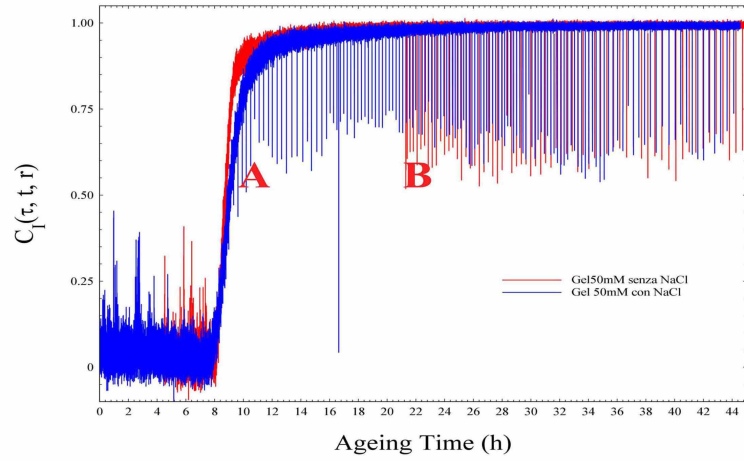


Figura 4.15: Confronto tra gli indici di correlazione di gel a 50mM con e senza NaCl e la situazione dei gel al momento del primo evento di decorrelazione. In A: mappe di correlazione a $t_A \sim 10h$, in concomitanza con il primo evento di spike, per un gel 50mM con NaCl. In B: mappe di correlazione di un gel 50mM senza NaCl a $t_B \sim 20h$, tempo in cui si ha il primo spike di decorrelazione

$\tau_s \simeq 120s$ e $\tau_l \simeq 2000s$. Successivamente la correlazione cresce, la struttura in assenza di NaCl diventa più arrestata, come si nota dalla funzione $g_2(\tau)$ per tempi di ageing di $22h$. Infine, arrivando a tempi di ageing di $33h$ non è ben definibile una struttura dominante. Entrambi presentano una dinamica molto arrestata, caratterizzata da una costante di tempo di decorrelazione τ_l molto simile, attorno a un valore di $6000s$. Probabilmente, la densità di cross link gioca un ruolo fondamentale nelle prime ore di gelazione, dove l'assenza di NaCl permette agli ioni Ca^{2+} di trovare più siti liberi per i legami, causando una dinamica più eterogenea. Tuttavia, su scale temporali molto lunghe, la densità di cross link formati è la stessa per entrambi i tipi di gel.

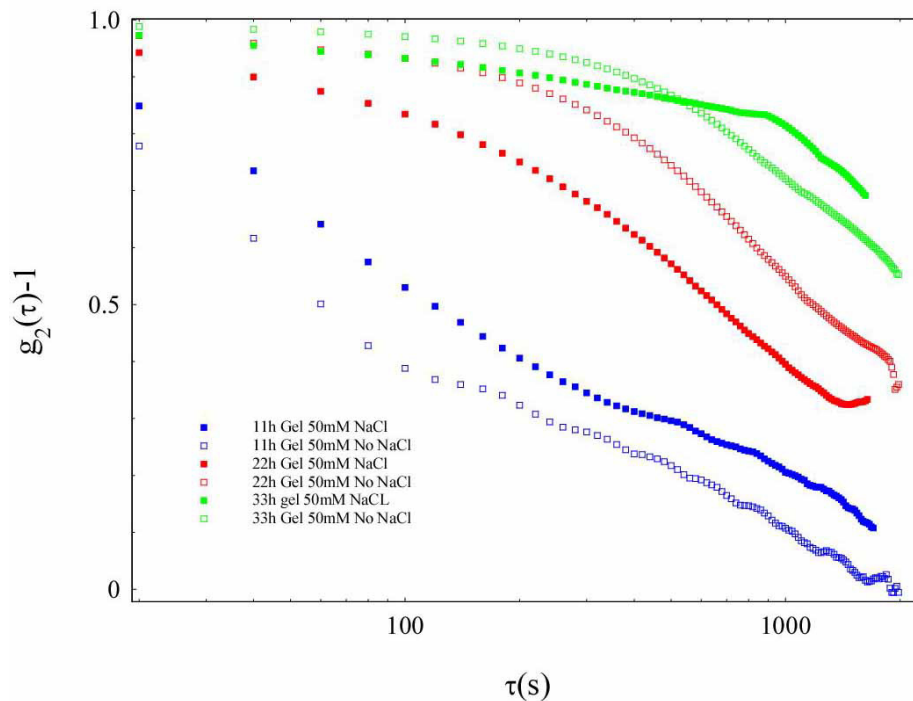


Figura 4.16: Confronto della $g_2(\tau) - 1$ per gel $50mM$ con NaCl (punti pieni) e senza NaCl (punti vuoti). Per tempi di ageing inferiori a $16h$ i gel senza cloruro di sodio hanno un valore di correlazione in modulo molto più basso di quelli con NaCl. Al crescere del tempo d'invecchiamento del gel la dinamica diventa sempre più arrestata, arrivando a $33h$ dall'inizio della gelazione in cui i due sistemi hanno circa gli stessi valori di correlazione.

4.2.1 Gelazione esterna: reologia

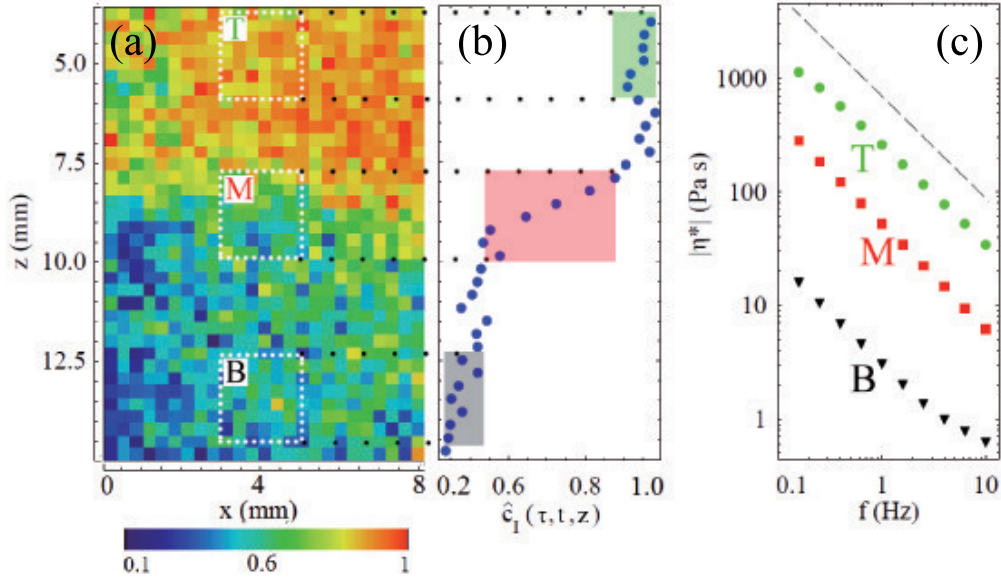


Figura 4.17: (a) Mappa di correlazione per un gel $25mM$ dopo $40h$ dall'inizio del processo di gelazione. Si notano tre distinte regioni: T gel completamente arrestato, M zona intermedia con una struttura parzialmente correlata, B soluzione pectinica, dove la gelazione non è avvenuta. In (b) si riporta il rispettivo indice di correlazione $c_I(\tau = 600s, 40h, z)$ mediato lungo l'asse della cella. In (c) grafico del modulo della viscosità complessa, $|\eta^*|$, in funzione della frequenza di shear f , per i campioni estratti dalle regioni T, M e B, confrontati con la legge di potenza $|\eta^*|=Af^{-0.9}$ (riga tratteggiata).

Tramite prove reologiche si è analizzato il comportamento meccanico macroscopico dei gel a gelazione esterna. Per i gel a $25mM$ in $CaCl_2$ con $NaCl$ emerge che su tempi di ageing molto lunghi, quando la gelazione è avvenuta in tutta la cella, la struttura del gel e la dinamica microscopica si rivelano essere molto disomogenee. In Fig.4.17a si mostra una mappa di correlazione, dove si possono distinguere 3 regioni differenti, di cui viene dato l'indice di correlazione $c_I(600s, 40h, z)$, in Fig.4.17b, valutato su un ritardo $\tau=600s$ a $40h$ dall'inizio della gelazione. Sebbene la regione superiore del gel è una struttura totalmente correlata anche su ritardi molto lunghi, più ci si allontana dalla membrana più rapidamente l'indice di correlazione decresce fino a valori minimi sul fondo della cella, indicando che una consistente dinamica microscopica persiste anche dopo 40 h dalla preparazione del campione. A questo punto la cella è stata tolta dal setup PCI e dal campione sono state prelevate tramite una spatola tre regioni approssimativamente rappresentate dai quadrati T, M, B in figura 4.17. Quindi, i campioni estratti sono stati sottoposti a test reologici sotto sforzo costante con una frequenza che variava da $0.2Hz \leq f \leq 10Hz$. In Fig.4.17c viene mostrato che in tutte e tre

le regioni, il modulo della viscosità complessa presenta un comportamento a legge di potenza $|\eta^*| = Af^{-\alpha}$. L'esponente $\alpha \simeq 0.9$ è uguale per tutte le regioni, mentre l'ampiezza A decresce di quasi due ordini di grandezza da T a B. Questo decremento indica che a una più lenta dinamica microscopica, presente nella regione superiore del gel, corrisponde una più grande e rigida dinamica macroscopica, a differenza di quella che si ritrova sul fondo della cella.

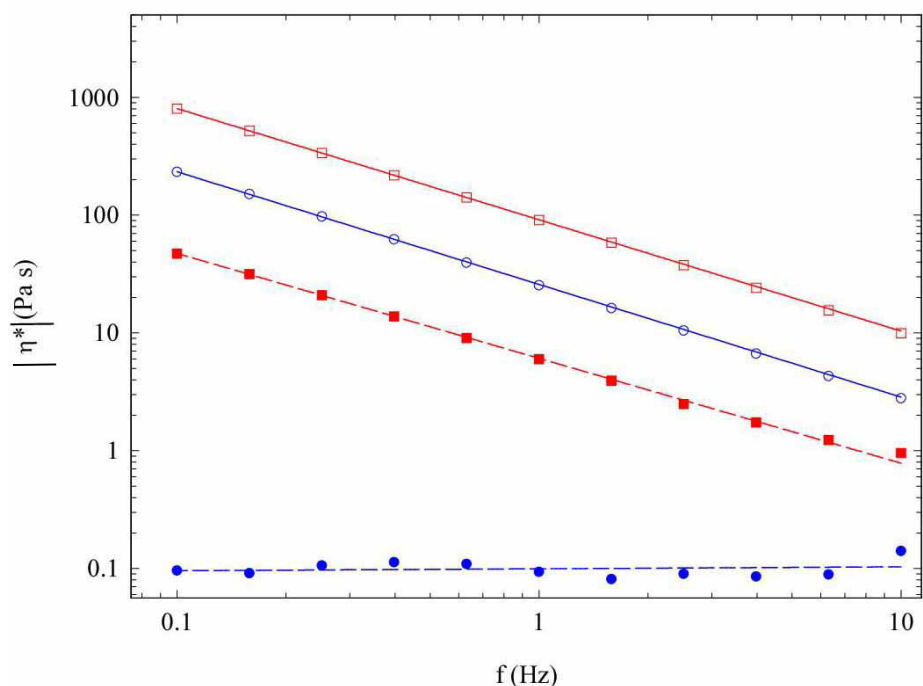


Figura 4.18: Modulo della viscosità complessa per gel $6.25mM$ (punti pieni) e $12.5mM$ (punti vuoti). I gel a minor concentrazione presentano dopo 5 minuti di gelazione un comportamento simile a liquidi altamente viscosi. Per i gel $12.5mM$, al contrario, già dai primi minuti di gelazione il comportamento è di tipo solido.

Inoltre, sono state effettuate misure reologiche su gel a concentrazione $12.5mM$ e $6.25mM$ di cloruro di calcio. Si è estratto a $2h$ e $24h$ dopo l'inizio della gelazione dei campioni da $1.5mm$ di spessore. Si sono ricavate delle curve del modulo della viscosità complessa, come mostrato in figura 4.18. Le curve in blu indicano il gel dopo $2h$ mentre quelle in rosso dopo $24h$, con i punti pieni il gel a $6.25mM$ mentre con i punti vuoti si indica il gel a $12.5mM$. L'andamento che si ricava per i gel $6.25mM$ in cloruro di calcio dopo $2h$ mostra la formazione di un network molto lasso, che può essere descritto come un liquido ad altissima viscosità. Dopo $24h$, invece, si vede che la curva a $6.25mM$ cambia pendenza, trovandosi con un coefficiente angolare uguale

a quella del gel a $12.5mM$, testimone del fatto che la gelazione è avvenuta e la struttura presenta un comportamento quasi arrestato, ma una rigidità notevolmente inferiore rispetto al gel a concentrazione $12.5mM$. Per quest'ultimo gel, infatti, la gelazione avviene già dopo 2h, e presenta una netta variazione nel modulo A della viscosità. Infatti, la costante d'ampiezza A , che caratterizza la viscosità complessa come $|\eta^*| = Af^{-\alpha}$, cambia significativamente, poichè è legata alla densità di cross link presenti. Infatti, a parità di siti disponibili per legami con gli ioni calcio, più è alta la concentrazione dello ione più cross link è possibile formare. Da qui si ha la formazione di una struttura pienamente arrestata, così da rendere il gel molto più rigido rispetto a uno con concentrazione minore.

4.3 Gelazione Interna: dinamica microscopica

In questi esperimenti la gelazione avviene tramite dissoluzione di nanoparticelle di carbonato di calcio, CaCO_3 , in ambiente relativamente acido, rappresentato dalla soluzione all'1.2% di pectina, dopo una rapida agitazione. In questo modo si ottengono gel all'1% di pectina, a concentrazioni di calcio: 6.25mM , 12.5mM , 25mM . La peculiare cinetica osservata per la gelazione esterna si rispecchia, in questo caso, in eventi di decorrelazione che avvengono durante l'ageing. In figura 4.19 si mostra l'indice di correlazione per una ROI di $1.3\text{mm} \times 1.3\text{mm}$ situata a 0.8mm dall'estremità superiore e a 1.4mm dal bordo laterale per un gel 6.25mM in CaCO_3 . Si evince che la formazione di una struttura quasi arrestata avviene in circa 3 ore e, quindi, su brevi ritardi la struttura non mostra apprezzabili cambiamenti. Tuttavia analizzando la funzione per ritardi τ di 200s e 600s si nota la presenza di una dinamica microscopica, che porta a cadute di correlazione, indicando come la struttura sia in realtà ancora attiva.

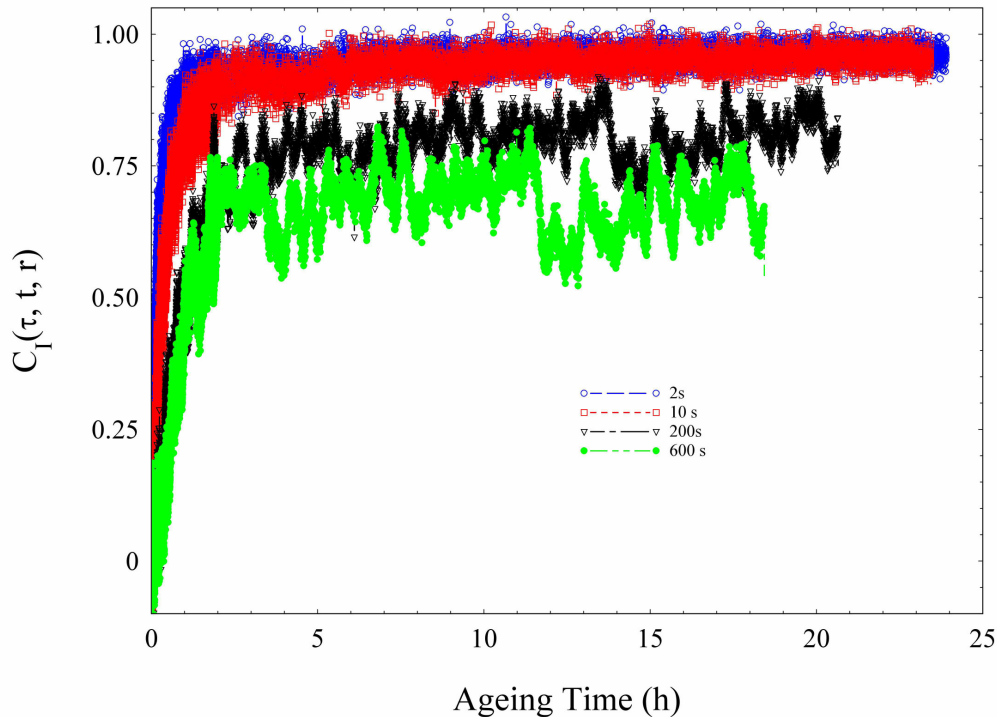


Figura 4.19: Indice di correlazione $c_I(\tau, t, z_0)$ per una ROI di $1.3\text{mm} \times 1.3\text{mm}$ di un gel 6.25mM , per ritardi $\tau=2\text{s}$, 20s , 200s , 600s .

Questo comportamento si analizza meglio vedendo le mappe di correlazione Fig.4.20. Per gel a 6.25mM di carbonato di calcio, la gelazione è

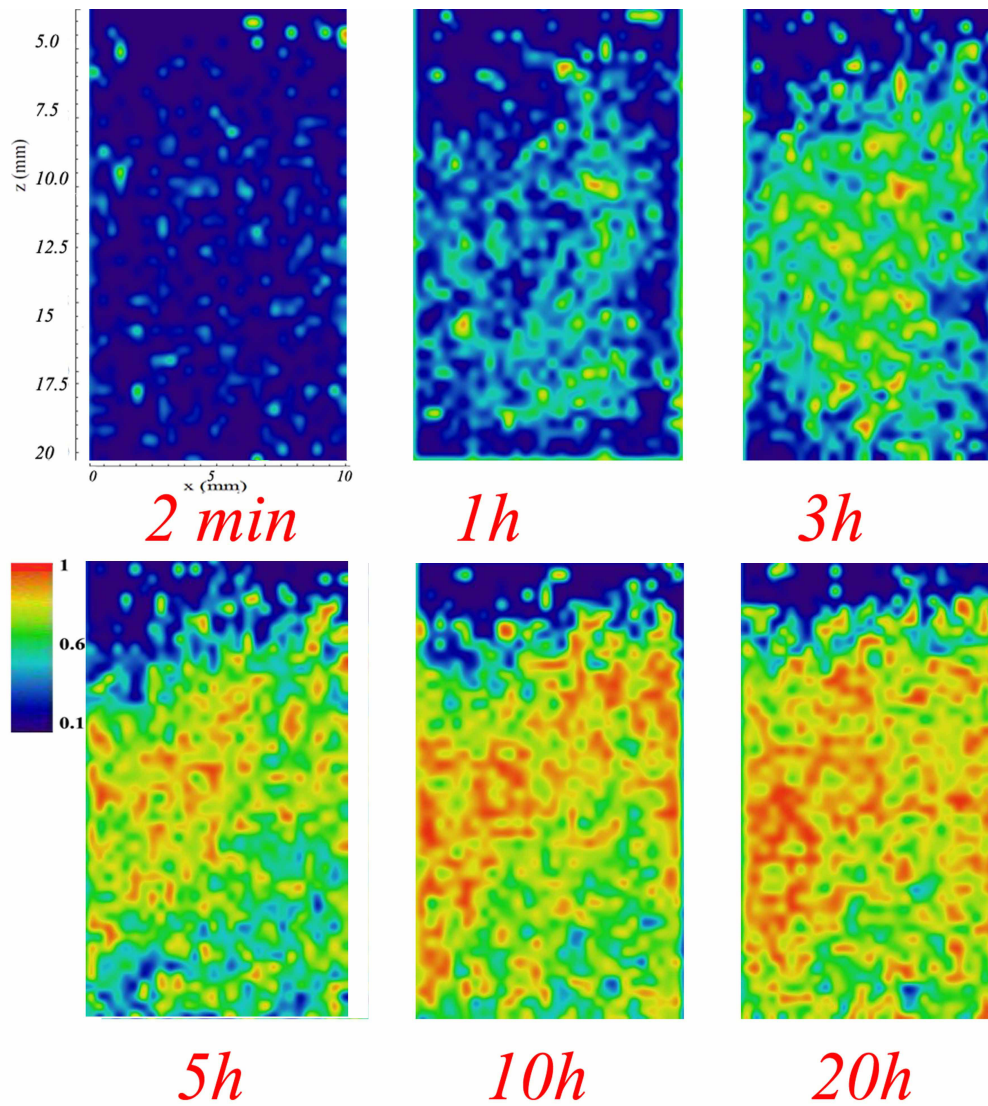


Figura 4.20: Mappe di correlazione per un gel $6.25mM$ di $CaCO_3$ a ritardi $\tau = 1000s$. Si noti come la gelazione, in questo caso, sia un processo disomogeneo, arrivando a $20h$ con zone non ancora arrestate totalmente.

un processo localmente disomogeneo, che si manifesta progressivamente con l'aumento del tempo di ageing. A $5h$ dall'inizio della gelazione vi è la formazione di una struttura quasi arrestata, che, con l'invecchiare del gel, diventa sempre più correlata. La presenza di disomogeneità nel campione e di dinamiche microscopiche di riarrangiamento può essere valutata usando le funzioni di correlazione $g_2(\tau)$ per delle ROI di $2.7mm \times 2.7mm$ prese in un'area di $8.11mm \times 5.41mm$ a $5mm$ dal bordo superiore.

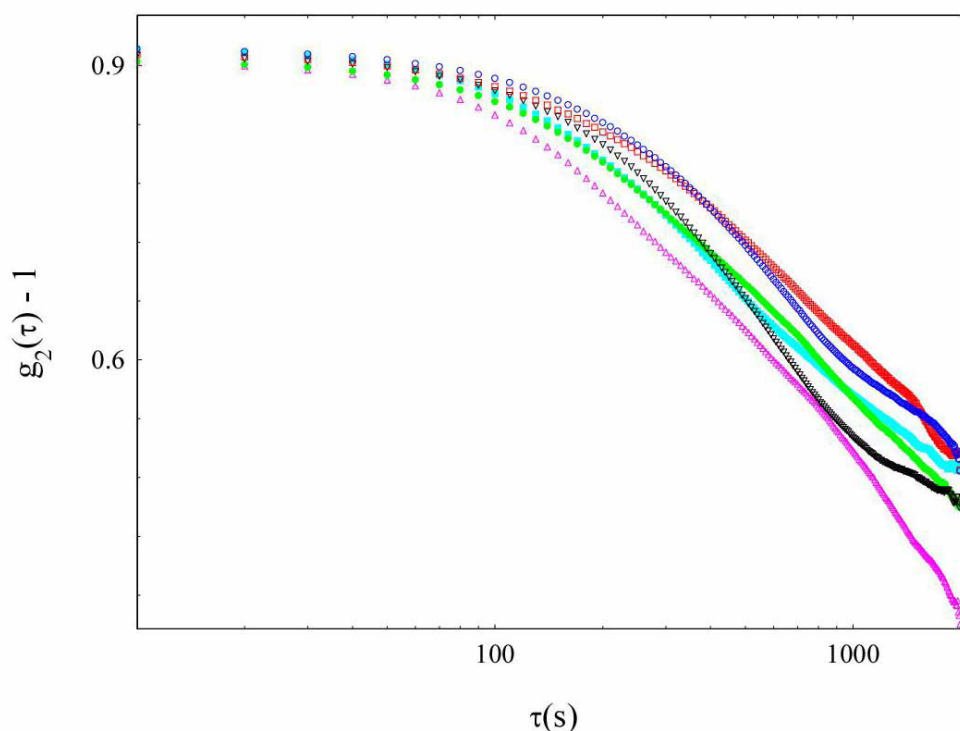


Figura 4.21: Funzione di correlazione $g_2(\tau) - 1$ di diverse ROI di $2.7mm \times 2.7mm$ per un gel $6.25mM$, a un tempo di ageing di $10h$. La $g_2(\tau)$ cambia sensibilmente e le costanti di tempo, al variare delle ROI, evidenziano una notevole disomogeneità spaziale del gel.

La funzione, Fig.4.21, presa per un tempo di ageing di $10h$, conferma la presenza di più meccanismi di decorrelazione nella dinamica microscopica: τ_s oscilla tra $142s \sim 250s$, con una costante a intorno a 0.20 , e τ_l va da $2400s$ a $6000s$. Al crescere del tempo di ageing le disomogeneità sono sempre presenti, ma aumenta il valore di correlazione di $g_2(\tau)$ globale, ed è possibile eseguire un fit delle curve con un singolo esponenziale con costante di tempo $\tau_l = 7000s \sim 10000s$, mostrando da un lato l'aumento di rigidità strutturale del gel e dall'altro la presenza di due meccanismi di decorrelazione come nella gelazione esterna. In Fig.4.22 viene mostrato il rapporto tra la varianza dell'indice di correlazione c_I del gel e l'indice stesso a un ritardo $\tau = 1000s$

per una regione di $8.11mm \times 5.41mm$, così da monitorare lo scostamento dal valore medio di correlazione. Si nota che il valore di σ_{c_I} rimane attorno al 25% anche dopo 24 ore dalla gelazione. Questo comportamento testimonia che il gel rimane molto più disomogeneo rispetto a quelli ottenuti per gelazione esterna, per via della sorgente di ioni calcio localizzata in precise regione, nonostante il mixing iniziale.

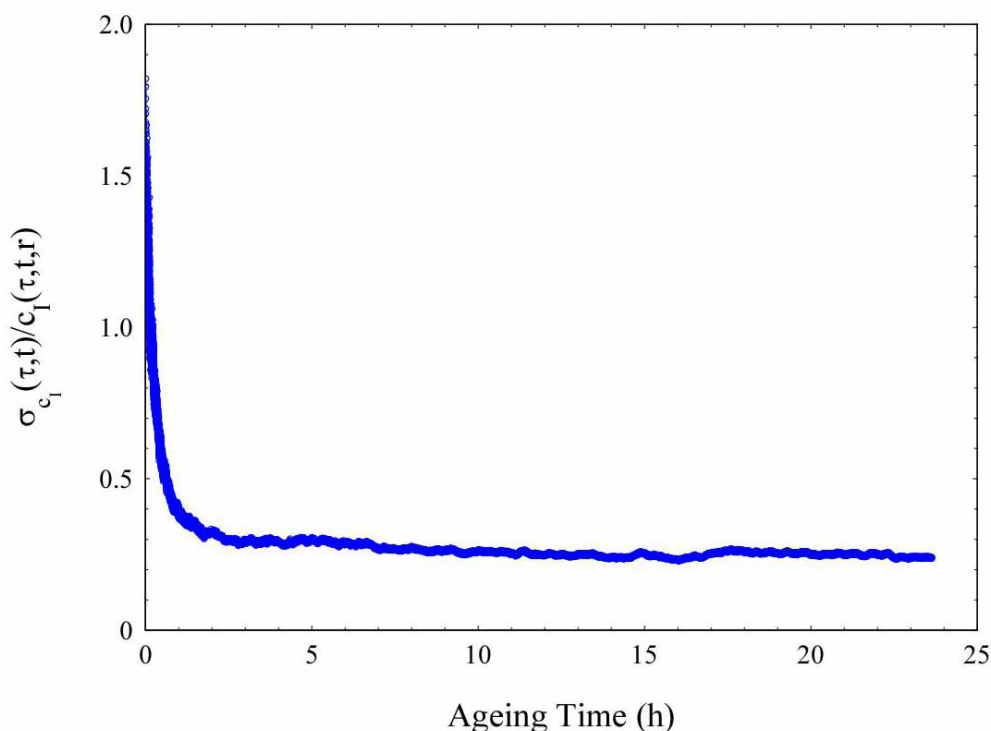


Figura 4.22: Rapporto tra deviazione standard dell'indice di correlazione, σ_{c_I} , e indice di correlazione, a un ritardo $\tau = 1000s$, per una ROI di $8.11mm \times 5.41mm$ di un gel $6.25mM$.

Questa disomogeneità strutturale si presenta in modo più lampante nei gel a concentrazione superiore. Per i gel a $12.5mM$ in $CaCO_3$ si notano degli eventi di decorrelazione, che si trovano a 5h e 16h dall'inizio della gelazione come mostrato in Fig.4.23. Nelle mappe da A-F (Fig.4.24) si vede che l'indice $\langle c_I \rangle$, mediato su un'area di $8.11mm \times 5.41mm$ a un ritardo $\tau=1000s$, ha un andamento monotono crescente, testimone del progressivo arresto della struttura apportato dalla lenta dissoluzione degli aggregati di nanoparticelle di $CaCO_3$. Al crescere del tempo di ageing, dopo circa $4h$, il valore di $\langle c_I \rangle$ è più alto di 0.9 e la sua deviazione standard è scesa a circa 20% e il processo di gelazione sembra andare a completamento. Successivamente, vedendo la mappa C, si registra un grande evento di decorrelazione, che porta a una

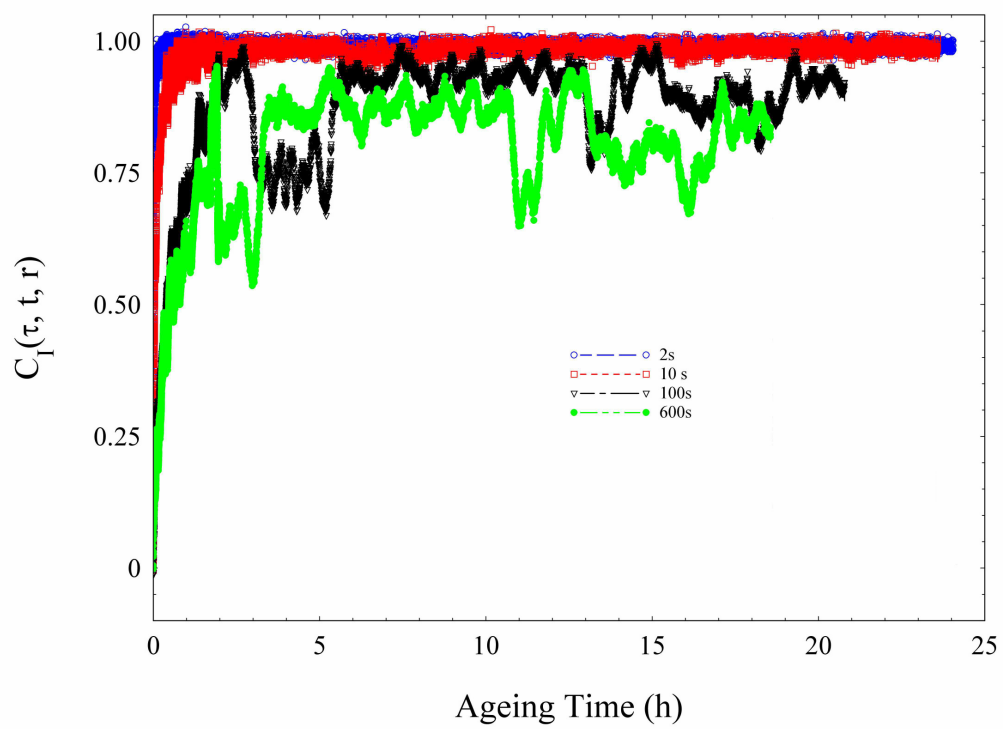


Figura 4.23: Indice di correlazione $c_I(\tau, t, z)$ per un gel $12.5mM$ in $CaCO_3$ a ritardi $\tau=2s, 20s, 200s, 600s$

diminuzione del modulo di $\langle c_I \rangle$ e ad un aumento del rapporto $\sigma_{c_I}/\langle c_I \rangle$, che dura per circa $2h$, dopo le quali la struttura del gel torna ben correlato, D, con $\langle c_I \rangle = 0.96$. Quindi segue un periodo di $10h$ in cui il sistema evolve ad uno stato più omogeneo, quantificato dalla diminuzione del rapporto $\sigma_{c_I}/\langle c_I \rangle$. A $16h$, tuttavia, vi è un nuovo evento di decorrelazione, (E), che porta $\langle c_I \rangle$ a 0.84 e un aumento del rapporto $\sigma_{c_I}/\langle c_I \rangle$, per un periodo di circa $1h$ di durata. Dopo $24h$ dall'inizio della gelazione il gel presenta disomogeneità al suo interno.

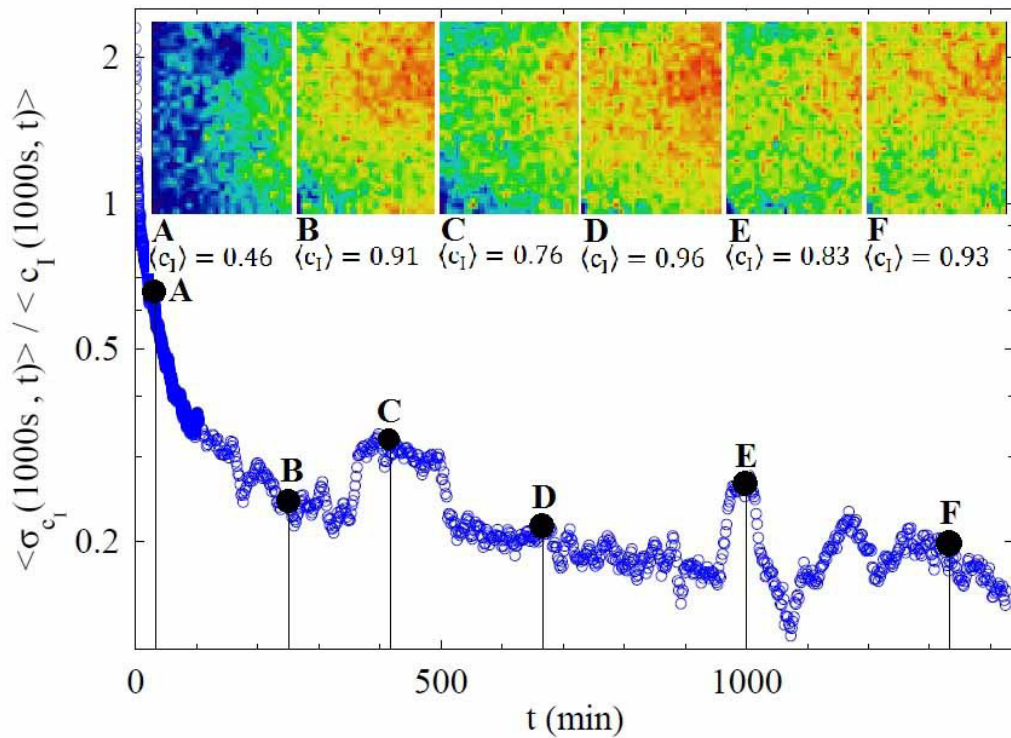


Figura 4.24: Rapporto tra deviazione standard dell'indice di correlazione, σ_{c_I} , e indice di correlazione, a un ritardo $\tau = 1000s$, per una ROI di $8.11mm \times 5.41mm$ di un gel $12.5mM$. Con A-F si rappresentano le mappe di correlazione per il gel, corrispondenti ai tempi di ageing indicati sulla curva.

In Fig.4.25 viene riportata la funzione $g_2(\tau)$ per diverse ROI da $2.7mm \times 2.7mm$. Aiutandosi con la mappa di correlazione, si evidenzia l'eterogeneità di meccanismi che intervengono nella dinamica microscopica di questi gel.

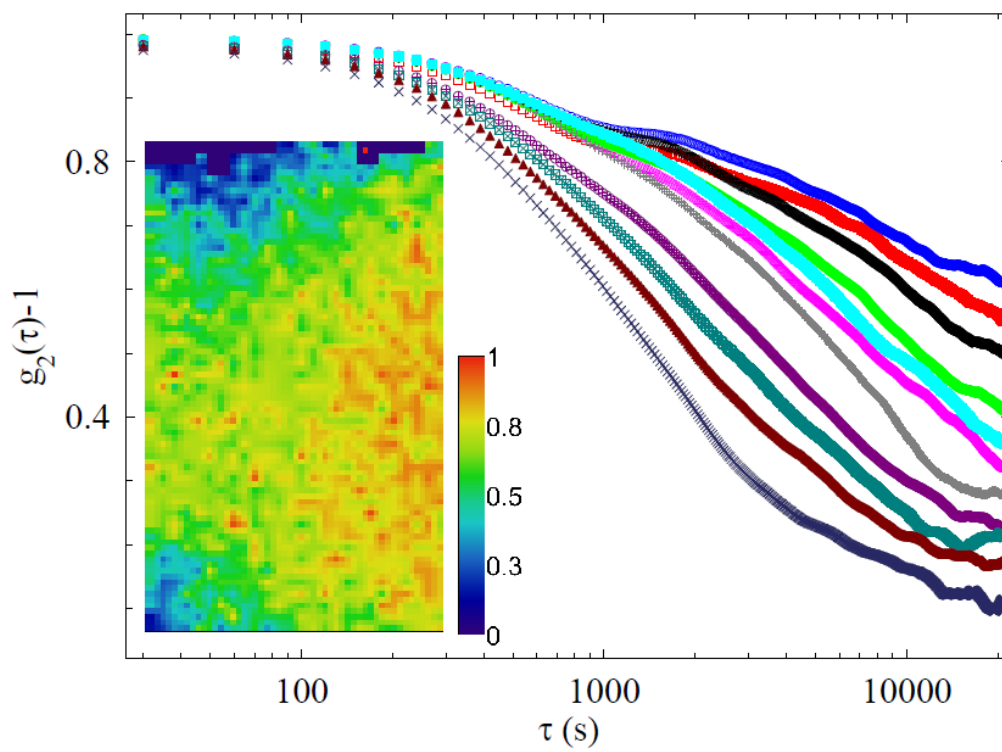


Figura 4.25: Funzione di correlazione $g_2(\tau)$ valutata per varie ROI e relativa mappa di correlazione.

Il medesimo comportamento si ritrova nei gel da $25mM$ in $CaCO_3$. In questo caso gli eventi ricostruttivi sono visibili già su ritardi τ di $10s$, per poi manifestarsi in modo esteso su ritardi maggiori, $200s$ e $600s$. Anche in questo caso gli eventi di decorrelazione avvengono intorno a $5h$ e $15h$. A quest'ultima decorrelazione segue una rapida crescita della correlazione fino a $c_I \sim 0.75$, dopo il quale vi è una nuova caduta di correlazione. In questo caso analizzando

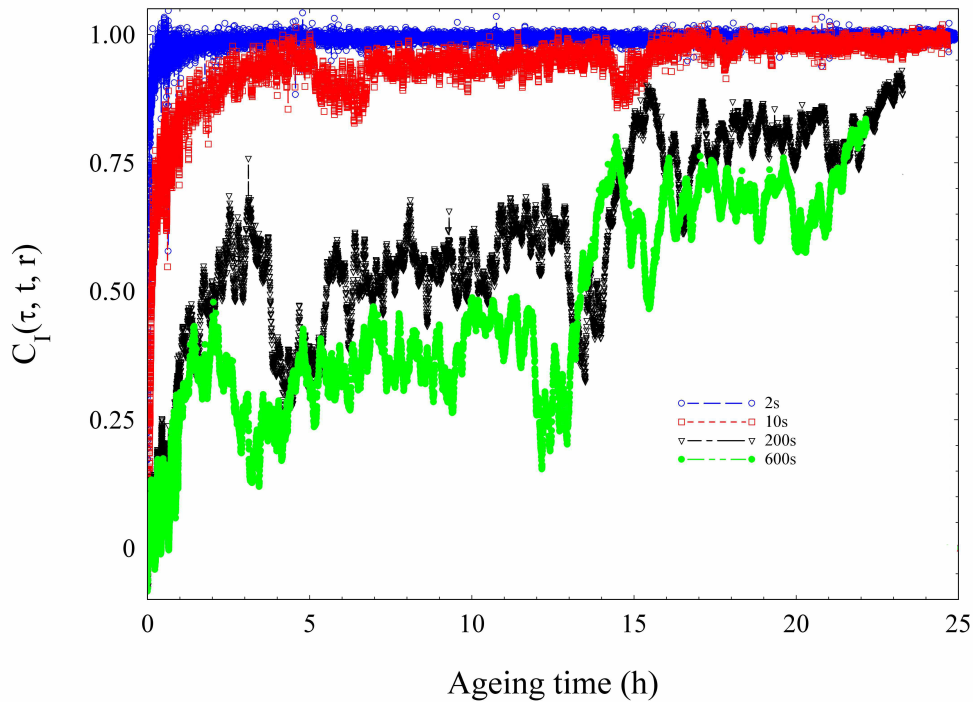


Figura 4.26: Indice di correlazione $c_I(\tau, t, z)$ per un gel $25mM$ in $CaCO_3$ a ritardi $\tau = 2s, 20s, 200s$ e $600s$.

le mappe di correlazione, Fig.4.27, su un ritardo di $1000s$, si vede che il gel dopo $1h$ dall'inizio della gelazione presenta una struttura con un network prevalentemente lasso, soggetto a riarrangiamenti. A $4h$ si ha una deviazione standard σ_{c_I} del 20%, Fig.4.28, e un corrispondente aumento dell'indice di correlazione medio a 0.6 . A seguire avviene il primo evento di decorrelazione, che porta un aumento del rapporto $\sigma_{c_I} / \langle c_I \rangle$ fino a un valore di 30%, con un collasso della correlazione a 0.20 , intorno alle $6h$. Quindi il processo di gelazione vede un lento aumento della correlazione $\langle c_I \rangle$, che passa da 0.53 a $10h$ e 0.62 a $13h$. La struttura non riesce a formarsi completamente, poiché a $15h$ compare un nuovo evento di decorrelazione, seguito, dopo circa $1h$, da una rapida correlazione. La deviazione standard oscilla da 34% nel picco di decorrelazione a $15h$ al 20% nella rapida correlazione che segue. Infine,

dopo quest'ultimo evento di decorrelazione, il gel evolve a una configurazione finale più stabile, arrivando a un indice di correlazione $\langle c_I \rangle$ di 0.8 a 23h mostrando una rapida caduta della deviazione standard al 20%. L'alto valore della deviazione standard dell'indice di correlazione è testimone, ancora una volta, della forte disomogeneità che caratterizza questa categoria di gel

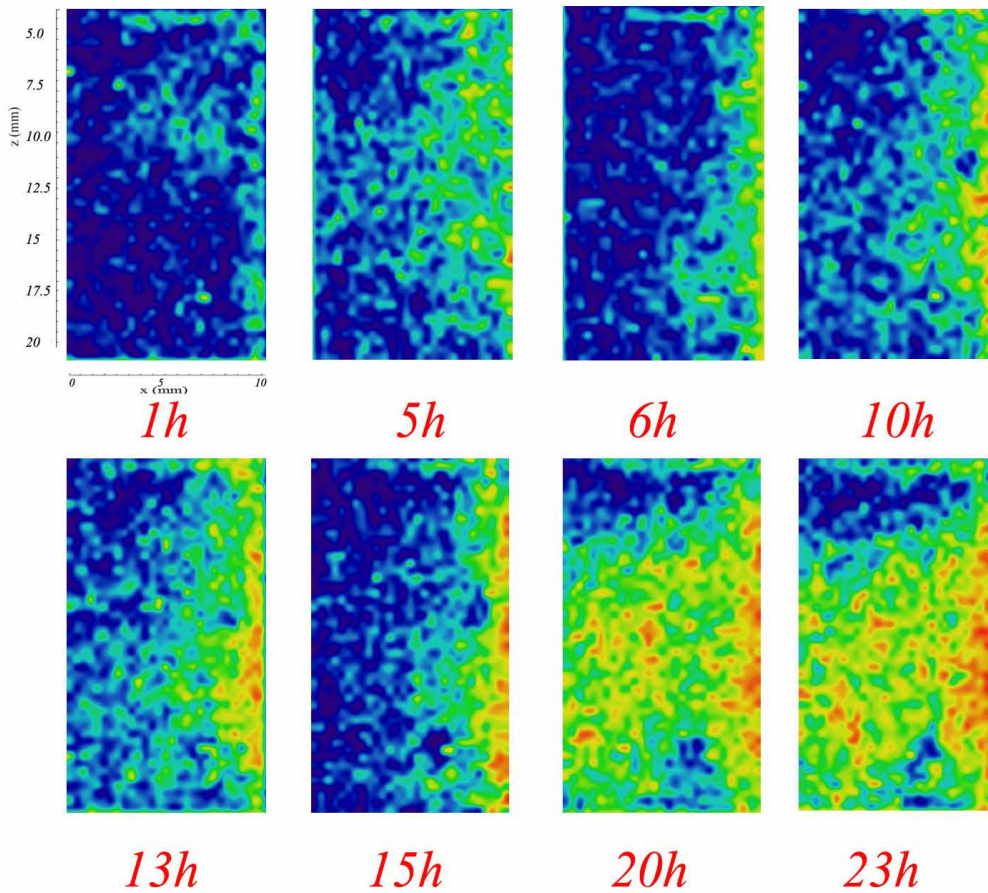


Figura 4.27: Mappe di correlazione per un gel 25mM. Tra 5h-6h avviene il primo evento di decorrelazione, che lascia traccia negli istanti successivi. A 15h vi è un secondo evento, quindi la gelazione riprende arrivando a correlazione $\langle c_I \rangle \sim 0.8$ a 23h.

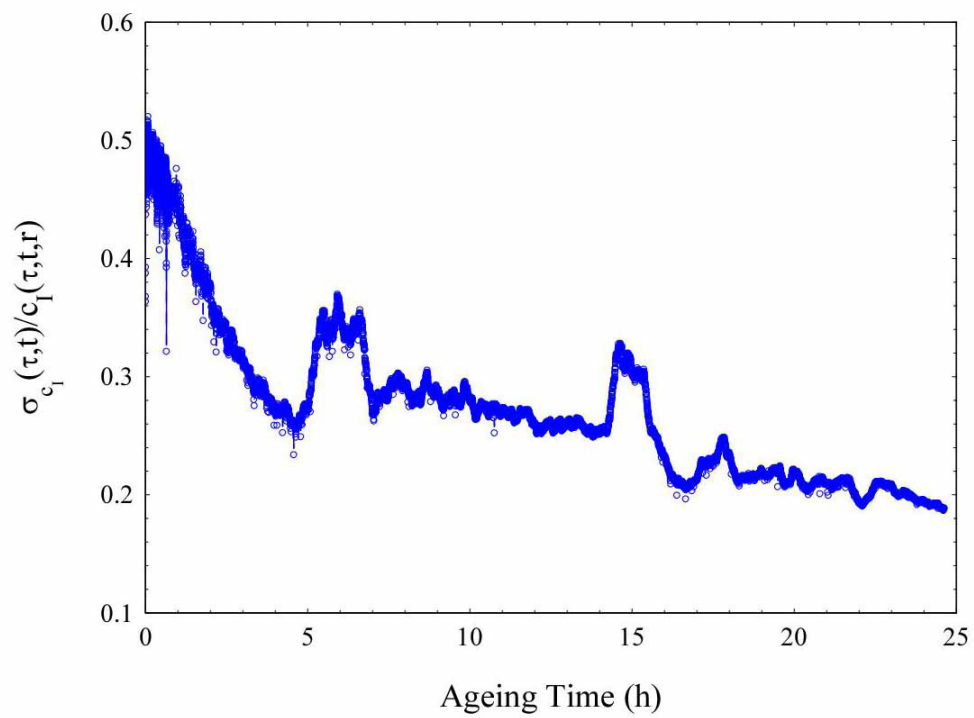


Figura 4.28: Rapporto tra deviazione standard dell'indice di correlazione, σ_{c_1} , e indice di correlazione, a un ritardo $\tau = 1000s$, per una ROI di $8.11mm \times 5,41mm$ di un gel $25mM$.

In Fig.4.29 viene mostrato il grafico di $g_2(\tau)$ per diverse ROI su un tempo di ageing di $10h$, con costante di tempo $\tau_s \simeq 300s - 500s$, un valore di a che si attesta attorno a 0.53 , e una costante di tempo $\tau_l \simeq 2700s - 6000s$. Al crescere dell'ageing fino a $21h$ il valore delle costanti scende, arrivando a valori di a di circa 0.06 , rendendo così trascurabile il contributo della costante τ_s , e trovando una $\tau_l \simeq 3000s - 6000s$, indice di una struttura ormai quasi completamente arrestata. Dall'indagine sui gel a concentrazione $25mM$

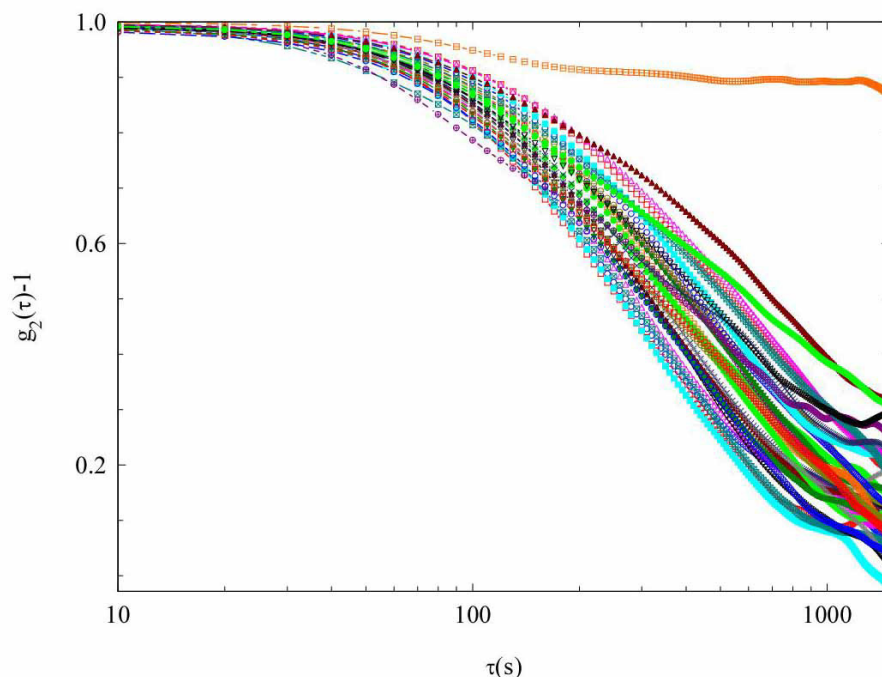


Figura 4.29: Funzione di correlazione $g_2(\tau)$ ed un tempo di ageing di $10h$ per un gel $25mM$ calcolato su diverse ROI ($8.11mm \times 5.41mm$)

emerge un comportamento totalmente diverso da quello che si potrebbe immaginare. Infatti più è alto il contenuto di calcio più la struttura ha tempi di correlazione bassi, ovvero difficilmente si riesce a mantenere la correlazione e numerosi processi di riarrangiamento avvengono all'interno della struttura.

4.3.1 Gelazione interna: reologia

Per i gel $6.25mM$ si mostra in fig.4.30 l'andamento del modulo della viscosità complessa. Il gel presenta inizialmente a 5 minuti dall'inizio della gelazione un comportamento assimilabile a un liquido altamente viscoso, con valore della costante $\alpha \ll 1$, ricordando che $|\eta^*(f)| = Af^{-\alpha}$. Si può seguire, successivamente, l'evoluzione del processo di gelazione, fino ad arrivare a

$\alpha \simeq 1$, che indica un comportamento di tipo solido, con valori della viscosità complessa confrontabili con i gel a concentrazione superiore. L'analisi

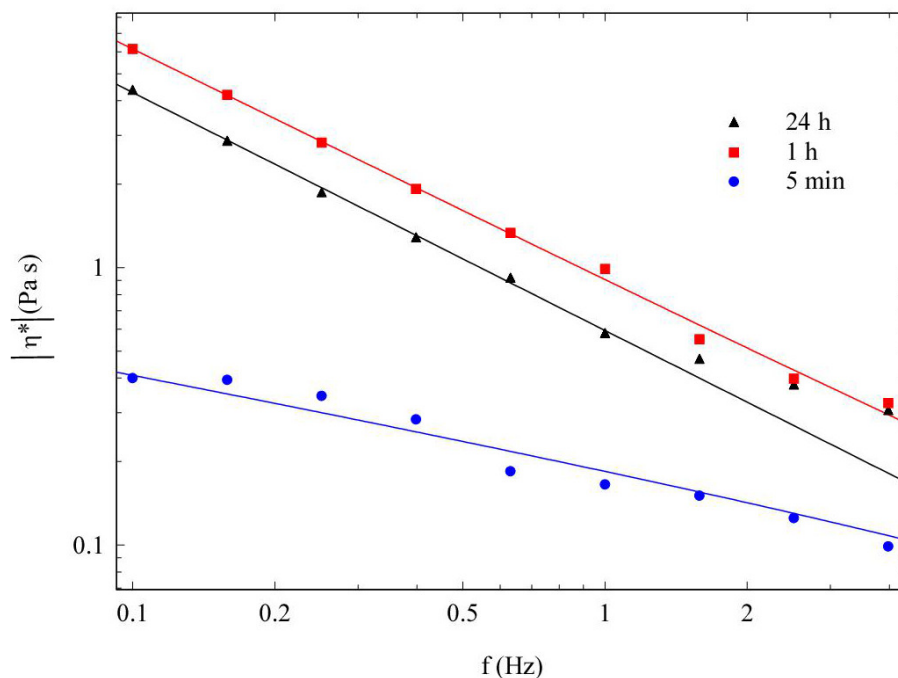


Figura 4.30: Modulo della viscosità complessa $\eta^*(f)$ in funzione della frequenza f dello shear applicato. Dopo 5 minuti dall'inizio della gelazione si presenta come un liquido ad altissima viscosità. Col passare del tempo di ageing il campione cambia struttura, aumentando la rigidità, con $\alpha \simeq 1$.

reologica dei gel $12.5mM$ in $CaCO_3$, Fig.4.31, conferma che il processo di gelazione in questi gel non è uniforme nel tempo. Dopo un breve tempo di gelazione, 5 minuti, il modulo della viscosità complessa mostra già un andamento a legge di potenza dipendente dalla frequenza con esponente α di poco minore di 1, valore usualmente trovato per gel completamente arrestati. Con l'ageing l'ampiezza A aumenta, mostrando che il gel progressivamente si irrigidisce. Tuttavia questo aumento in rigidità non è regolare nel tempo: come mostrato in Fig.4.31(b), dopo un rapido aumento che dura per solo 10-15 minuti, $|\eta^*(f)|$ non mostra alcun apprezzabile aumento fino alle 5h, dopo le quale ricomincia a crescere costantemente nel tempo. Perciò, similmente a quanto visto per la gelazione esterna, anche la gelazione interna sembra mostrare una cinetica a due step.

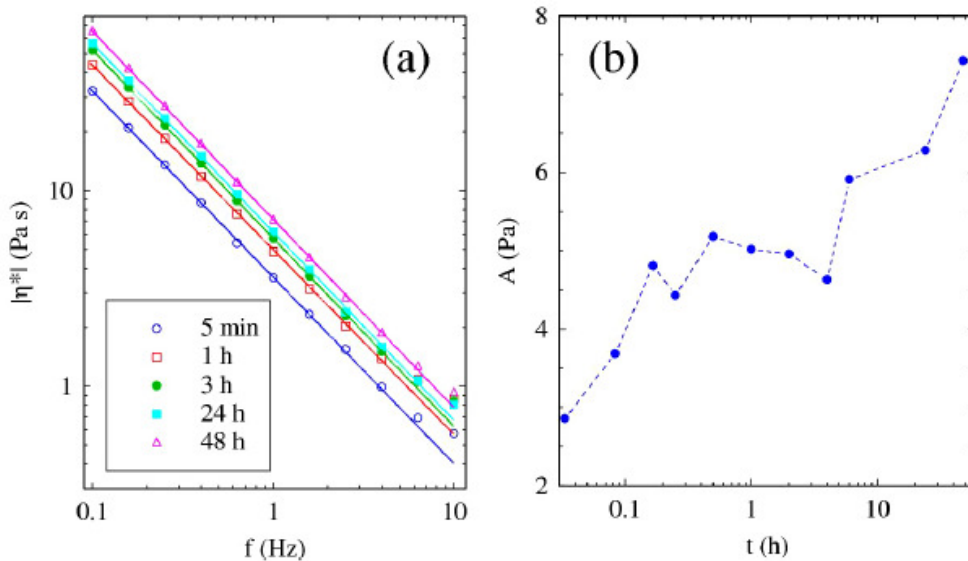


Figura 4.31: A sinistra: modulo della viscosità complessa per un gel a concentrazione $12.5mM$ di $CaCO_3$; a destra: andamento dell'ampiezza A per un gel $12.5mM$.

4.4 Conclusioni

Combinando la tecnica ottica di Photon Correlation Imaging (PCI) e prove di reologia, si è potuto indagare le cinetiche di formazione e l'invecchiamento di gel di pectina in presenza di un elettrolita neutro. La ricerca è stata indirizzata a due differenti meccanismi di gelazione: gelazione esterna, generata dalla perfusione di una soluzione acquosa di ioni calcio, metodo utilizzato anche da [11] per studiare la gelazione dell'alginato, e gelazione interna, ottenuta dalla lenta e progressiva dissoluzione di nanoparticelle di carbonato di calcio disperse nella soluzione di pectina all'1.2%. Sebbene il meccanismo di gelazione e di associazione delle catene di pectina è considerato simile a quello dell'alginato [17, 56, 60], i risultati ottenuti nei nostri esperimenti suggeriscono che esiste una significativa differenza tra i due sistemi, sia per quanto riguarda la cinetica di gelazione sia per le strutture che formano i gel.

Innanzitutto, in presenza di NaCl l'avanzamento del fronte di gelazione nella pectina è diffusivo, in netto contrasto con la peculiare dipendenza lineare col tempo riportata in [11]. Sebbene una spiegazione dettagliata per il comportamento non diffusivo di gelazione nell'alginato non vi sia, un meccanismo plausibile è legato alla presenza di uno sbilancio in pressione osmotica a livello del fronte, dove la forza ionica locale mostra un ripido gradiente. Nelle sospensioni colloidali i gradienti di salinità generano effetti

Donnan, che possono fortemente influenzare la diffusione delle particelle e la loro sedimentazione [19]. Che simili effetti si ritrovino durante la formazione di gel polimerici ionici è ancora una questione aperta, tuttavia la presenza di un comportamento completamente diffusivo nella pectina con aggiunta di elettroliti supporta l'origine elettrostatica di questo comportamento anomalo trovato per l'alginato.

Secondo, nell'alginato le scale temporali della dinamica microscopica e dell'ageing sono ampiamente differenti, e la funzione di correlazione $g_2(\tau) - 1$ cade a zero indipendentemente dal tempo di aging, mostrando che la dinamica microscopica non è mai completamente arrestata. Al contrario, i gel di pectina, sebbene abbiano una dinamica microscopica molto più lenta che si confonde con la cinetica di ageing, presentano uno stato finale totalmente arrestato. Inoltre, sebbene le funzioni di correlazione dell'alginato studiate in [11] siano ben fittate da un singolo decadimento esponenziale a ogni ageing time, la dinamica della pectina mostra una cinetica a due tempi sia per la gelazione interna che esterna. A lunghi tempi di ageing, tuttavia, si ritrova un decadimento delle funzioni di correlazione con legge esponenziale, similmente alla gelazione esterna dell'alginato. Rispetto a quest'ultimo sistema, comunque, la pectina non mostra burst di decorrelazione se non in presenza di un'altissima concentrazione di calcio, $50mM$, suggerendo che i gel di pectina siano molto meno sotto sforzo, probabilmente grazie alla presenza di elettroliti neutri che riducono la rigidità della catena polimerica, ostacolando la formazione di sforzi fissi e localizzati.

Infine è stata trovata una corrispondenza tra risultati macroscopici e dinamica microscopica. Il modulo della viscosità complessa, $|\eta^*(f)|$, che indica la rigidità che assume un gel, mostra analogie con la funzione di correlazione $c_I(\tau, t, z)$. Più il valore della correlazione della struttura è alto, più il gel presenta rigidità dal punto di vista reologico.

È necessario, dunque, effettuare ulteriori indagini per capire una possibile connessione tra la cinetica di gelazione a due step osservata e il meccanismo a due step di gelazione del calcio, proposto in [62, 64], dove la formazione di dimeri fortemente concatenati è seguita dalla formazione di deboli associazioni inter-catene. Ciononostante, i risultati mostrati indicano che è doveroso prestare attenzione nel confrontare differenti esperimenti, perché la gelazione biopolimerica risulta particolarmente sensibile al metodo di gelazione e alla composizione dei campioni.

Ringraziamenti

Un grazie di cuore a tutte le persone che mi hanno sostenuto fino ad oggi

Bibliografia

- [1] GS Johnson, DA Gabriel, *Laser Light Scattering*, (Dover Publications, New York, 1981)
- [2] HC van de Hulst, *Light Scattering by Small Particles*, (Dover Publications, New York, 1957)
- [3] R Piazza, *Note di Fisica Statistica*, (Springer-Verlag Italia, Milano, 2011)
- [4] JC Dainty, *Laser Speckle and Related Phenomena*, (Springer-Verlag, New York, 1984)
- [5] R Piazza, *Statistical Optics Concepts in Light Scattering and Microscopy of Colloidal Systems*, Proc. Internat. School Phys. Enrico Fermi, 184, 245-315, (2012)
- [6] A Duri, DA Sessoms, V Trappe, L Cipelletti, Phys Rev. Lett.,102,085702, (2009)
- [7] L Cipelletti, *et al* , J. Phys.: Condens. Matter, 15, S257 , (2003)
- [8] A Duri, H Bissig, V Trappe, L Cipelletti, Phys. Rev. E., 72, 514-531, (2005)
- [9] M Giglio, M Carpineti, A Vailati, D Brogioli, Applied Optics, 40, 4036-4040, (2001)
- [10] M Giglio, M Carpineti, A Vailati, Phys. Rev. Lett., 85, 1416-1419, (2000)
- [11] E Secchi, T Roversi, S Buzzaccaro, L Piazza, R Piazza, Soft Matter, 9, 3931-3944, (2013)
- [12] R Cerbino, V Trappe, Phys. Rev. Lett, 100, 188102, (2005)
- [13] F Giavazzi, *et al.*, Phys. Rev. E., 80, 031403, (2009)

- [14] MC Tanzi, *Fondamenti di Bioingegneria Chimica: non solo Biomateriali*, (Pitagora, Bologna, 2010)
- [15] E Zaccarelli, *Arrested states of matter*, Proc. Internat. School Phys. Enrico Fermi, 184, 95-154
- [16] SKH Gulrez, S Al- Assaf, G O'Phillips, *Hydrogels: Methods of Preparation, Characterisation and Applications*, Progress in Molecular and Environmental Bioengineering, (2011)
- [17] F Munarin, MC Tanzi, P Petrini, Int. J. Biol Macromol. , 51, 681-689, (2012)
- [18] HR Moreira, F Munarin, R Gentilini, L Visai, PL Granja, MC Tanzi, P Petrini, Carbohydr. Polym., 2014, 103, 339-347
- [19] R Piazza, S Buzzaccaro, E Secchi, J. Phys. Condens. Matter, 24, 284109,(2012)
- [20] GK Batchelor, J. Fluid Mech., 74, 1-29, (1976)
- [21] SE Esipov, Phys. Rev. E. , 52, 3711-3718, (1995)
- [22] R Piazza, S Buzzaccaro, E Secchi, A Parola, Soft Matter, 8, 7112-7115, (2012)
- [23] LD Landau, EM Lifshitz, *Fluids Mechanics*, (Pergamon Press, Oxford, 1987)
- [24] MD Alaimo, *et al.*, Phys. Rev. L., 193, 194805, (2009)
- [25] JW Goodman, *Statistical Optics* (Wiley-Interscience, New York, 1985).
- [26] JW Goodman, *Introduction to Fourier Optics*, (McGraw-Hill, Singapore, 1988)
- [27] MD Alaimo, D Magatti, F Ferri, MAC Potenza, Appl. Phys. Lett., 88, 191101, (2006)
- [28] MD Alaimo, MAC Potenza, D Magatti, F Ferri, J. Appl. Phys., 102, 073113, (2007)
- [29] S Buzzaccaro, E Secchi, R Piazza, Phys. Rev. L., 111, 048101, (2013)
- [30] D Brogioli, *Near Field Speckles*, PhD Thesis (2001)

- [31] GK Batchelor, CS Wen, *J. Fluid Mech.*, 124:495–528, 1982.
- [32] GK Batchelor, *J. Fluid Mech.*, 52:245–268, 1972.
- [33] S Buzzaccaro , A Tripodi, R Rusconi, D Vigolo, R Piazza, *J. Phys: Condens. Matt.*, 20:494219, 2008
- [34] WB Russel, DA Saville, WR Schowalter, *Colloidal Dispersions*, chapter 12, Cambridge Univ. Press, Cambridge, 1992.
- [35] RE Caffisch, JHC Luke, *Phys. Fluids*, 1985
- [36] S Ramaswmy, *Adv. Phys*, 2001
- [37] MP Brenner, *Phys.Fluids*,1999
- [38] DL Koch, ESG Shaqfeh, *J. Fluid Mech.*, 224:275–303, 1991.
- [39] BU Felderhof, *Physica A*, 387:5999–6012, 2008.
- [40] X Lei, BJ Ackerson, P Tong, *Phys. Rev. Lett.*, 86:3300–3303, 2001.
- [41] SY Tee, PJ Mucha, L Cipelletti, S Manley, MP Brenner, PN Segre, DA Weitz, *Phys. Rev. Lett.*, 89:054501, 2002.
- [42] PJ Mucha, SY Tee, DA Weitz, BI Shraiman, MP Brenner, *J. Fluid Mech.*, 501:71–104, 2004.
- [43] S Lee, Y Jang, C Choi, T Lee, *Phys. Fluids A*, 4:2601–2606, 1992.
- [44] L Bergougnoux, S Ghicini , E Guazzelli, EJ Hinch, *Phys. Fluids*, 15:1875–1887, 2003.
- [45] EJ Hinch, *Sedimentation of small particles*, E Guyon, Y Pomeau, JP Nadal, editors, Disorder and Mixing, Dordrecht. Kluwer Academic.
- [46] AJC Ladd, *Phys. Rev. Lett.*, 88:048301, 2002.
- [47] JT Padding and AA Louis,*Phys. Rev. Lett.*, 93:220601, 2004.
- [48] JT Padding and AA Louis, *Phys. Rev. E*, 77:011402, 2008.
- [49] PN Segré, E Herbolzheimer, PM Chaikin, *Phys. Rev. Lett.*, 79:2574–2577, 1997.
- [50] L Cipelletti, G Brambilla, S Maccarrone, S Caroff, *Opt. Express*, 21:22353–22366, 2013.

- [51] KE Davis, WB Russel, WJJ Glantschnig, Chem. Soc. Faraday Trans., 87:411–424, 1991.
- [52] BJ Ackerson, SE Paulin, B Johnson, W van Megen, S Underwood, Phys. Rev. E, 59:6903–6913, 1999.
- [53] S Torquato and FH Stillinger, Phys. Rev. E, 68:041113, 2003.
- [54] AE Boycott, Nature, 104:532, 1920.
- [55] B. Kim, J Nikolovski, J Bonadio, D Mooney, Nat. Biotechnol., 1999, 17, 979-983
- [56] S Sungthongieen, P Sriamornsak, T Pitaksuteepong, A Somsiri, S Puttpipatkachorn, AAPS PharmSciTech., 2004, 5 (1) Article 9
- [57] JP Guggenbichler, A De bettignies-Dutz, P Meissner, S Schellmoser, J Jurenitsch, Pharm. Pharmacol. Lett., 1997, 7(1), 35
- [58] U Kastner, S Glasl, B Folrich, JP Guggenbichler, J Jurenitsch, Wien Med Wochenschr, 2002, 152(15-16):379
- [59] DJ Langhout, JB Schutte, P Van Leeuwen, J Wiebenga, S Tamminga, Br. Poult. Sci., 1999, 40(3):340
- [60] G Alphons, J Voragen, GJ Coenen, RP Verhoef, Schols H.A., Struct. Chem., 2009, 20:263-275
- [61] I Braccini, RP Grasso, S Pérez, Carbohydr. Res., 1999, 317, 119-130
- [62] I Braccini, S Pérez, Biomacromol., 2(4):1089-1096, 2001
- [63] SF Chen, H Cölfen, M Antonietti, SH Yu, Chem. Comm., 49(83):9564-9566, 2013
- [64] DA Powell, ER Morris, MJ Gidley, DA Rees, J. Mol. Bio., 155(4):517-531, 1982
- [65] H Winter ,*In Permanent and Transient Networks*, 104–110. Springer (1987
- [66] E Secchi, F Munarin, MD Alaimo, S Bosisio, S Buzzaccaro, G Ciccarella, V Vergaro, P Petrini, R Piazza, J. Phys.: Condens. Matter, accepted