

Corso di
Proprietà di Biopolimeri

Prof. R. URBANI

Dipartimento di Scienze Chimiche e Farmaceutiche
a.a. 2023-2024



GEL di BIOPOLIMERI

GEL BIOPOLIMERICI

Caratteristica interessante di alcuni biopolimeri:
formare gel acquosi (**hydrogel**)

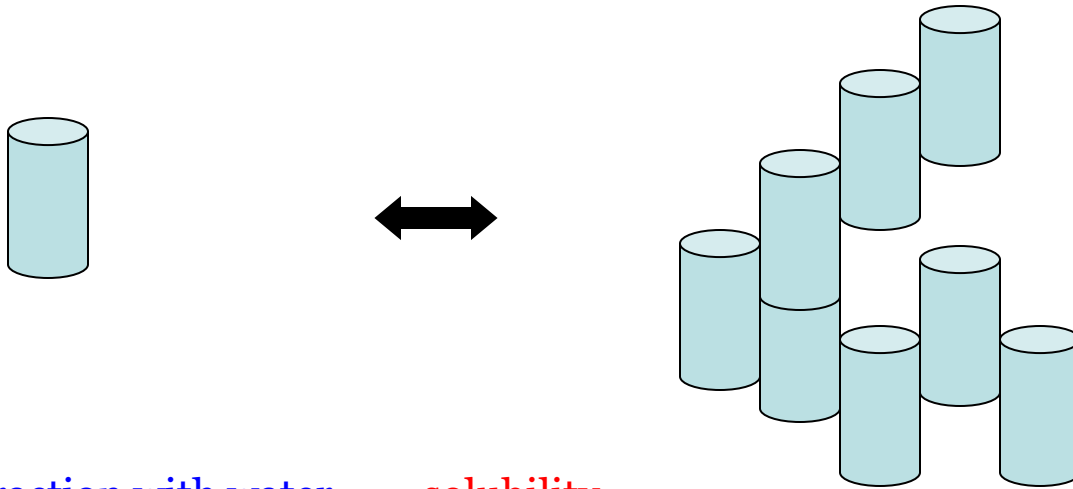
La definizione non è semplice:
ha proprietà dei solidi e dei liquidi.

La presenza di un gel si verifica soprattutto mediante la misura
delle **proprietà viscoso /reologiche** del sistema.

Gel di alginato



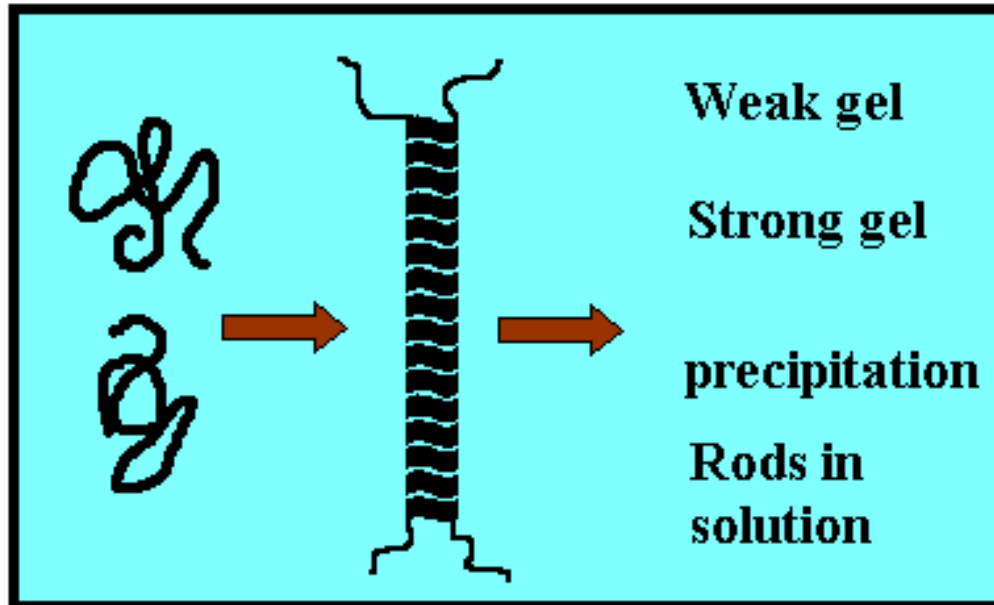
Solubility



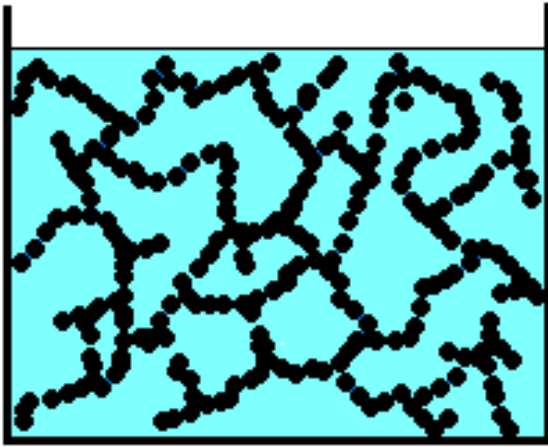
- Strong interaction with water = solubility
- Strong, extended interaction with polymer = insolubility (phase separation)
- Local, limited interaction with polymer = gelation

EXAMPLE: gelation/isolation of biopolymers

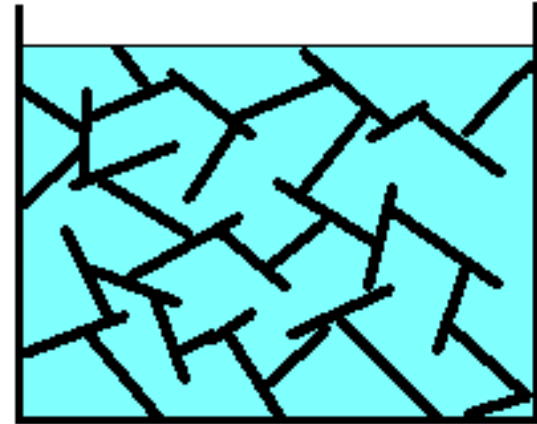
- Change temperature
- Change solvent quality
- Change ionic environment



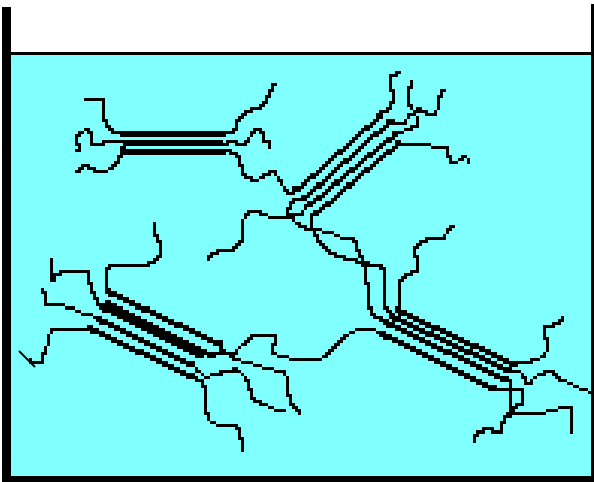
Gel structures



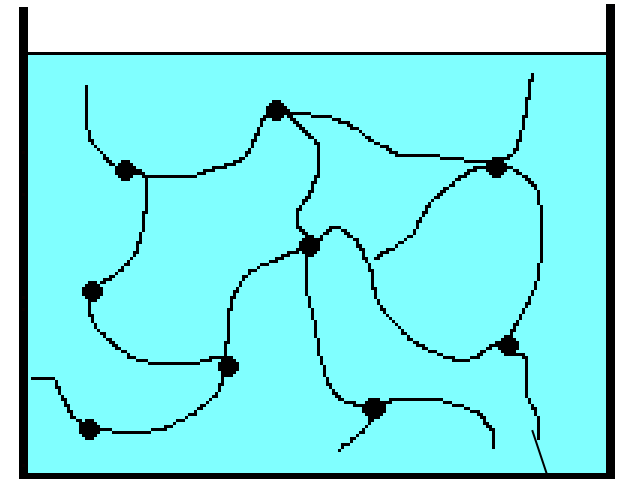
Aggregates of spherical particles



Framework of Rod-like particles



Physical gel with crystalline junctions



Chemical gel -covalent junctions

Determinazione del gel-point

La variabile più importante è la **connettività**, cioè l'insieme di legami chimici o fisici che legano tra di loro le unità del materiale.

Durante la gelificazione il sistema evolve da una connettività su scala ridotta **all'intero campione**.

In una situazione intermedia è possibile identificare un punto in cui la connettività si espande: per esempio, la temperatura (onset) di transizione sol-gel.

What's a gel ?



P.J.Flory (1974) ha definito i gels in quattro tipi sulla base di caratteristiche strutturali:

- 1) Strutture lamellari strutturate*
- 2) Network polimerici covalenti*
- 3) Aggregazione fisica di polimeri, prevalentemente in conformazione coil ma con tratti di ordine locale.*
- 4) Strutture disordinate di particolato su nano- o micro-scala*

Rimanendo nel campo dei polimeri, un gel è un polimero reticolato che ha assorbito **una grande quantità di solvente**.

I polimeri reticolati aumentano molto di volume quando assorbono i solventi.

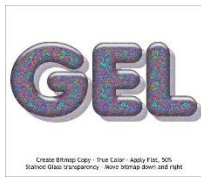
I reticoli possono essere generati da **legami covalenti** (gel di poliacrilammide) o da **legami non covalenti** (gel fisici).

Generalmente i gel polisaccaridici sono gel fisici la cui struttura è determinata dalla presenza di forze non covalenti:

- legami idrogeno
- interazioni ioniche
- forze di van der Waals



- Un gel in generale è costituito da una **concentrazione** di biopolimero molto bassa (0.1-1% w/v)
- Si comporta come un solido (comportamento elastico) e come un liquido (comportamento viscoso)**
- Il liquido previene il collassamento del biopolimero in un aggregato che così potrebbe separarsi dalla soluzione, mentre il network biopolimerico ritiene il liquido all'interno della maglia tridimensionale.

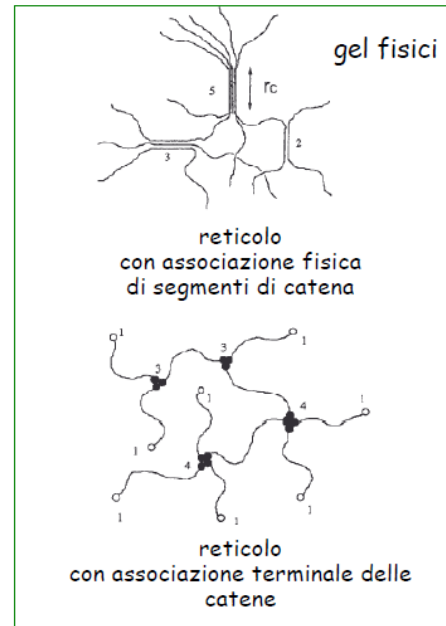
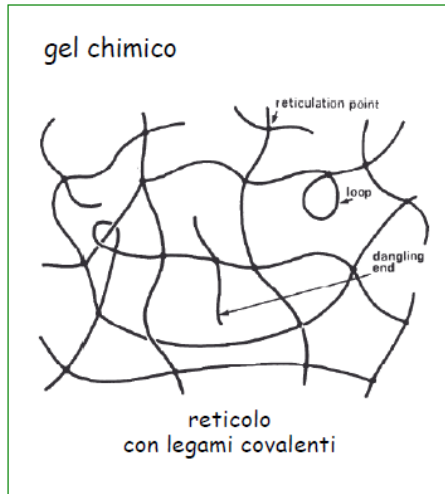


- Si forma quando una **piccola** quantità di sostanza solida è dispersa in una quantità relativamente **grande** di solvente (di solito acqua), grazie a proprietà di rigidità meccanica.



- Definito anche come un fenomeno di aggregazione dei biopolimeri. Le forze attrattive e repulsive sono così bilanciate da formare una rete o matrice terziaria ben ordinata.
- I gel sono costituiti da matrici o reti tridimensionali di biopolimeri interconnessi e parzialmente associati in cui è intrappolata l'acqua.
- È una rete continua di dimensioni macroscopiche immersa in un liquido.

Gel chimici e gel fisici

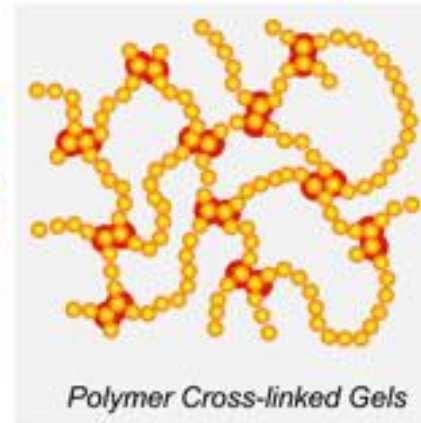
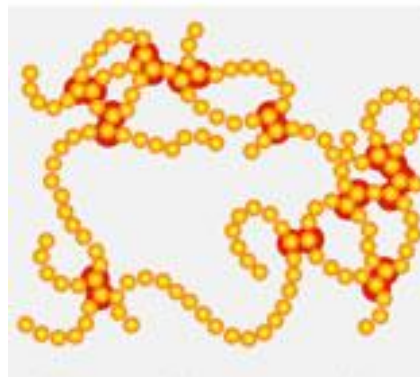
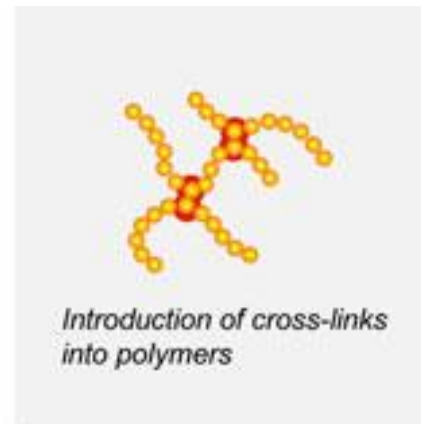
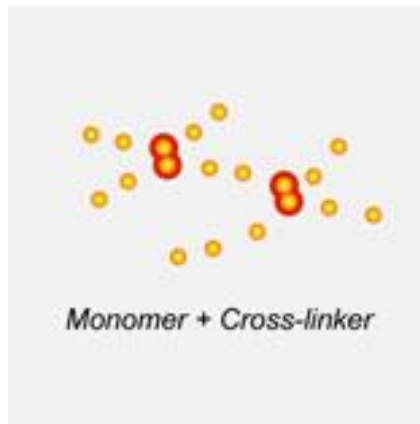


I gel vengono distinti in base al tipo d'interazione esistente fra le catene polimeriche in:

Gel chimici, nei quali il reticolo è assicurato da legami covalenti

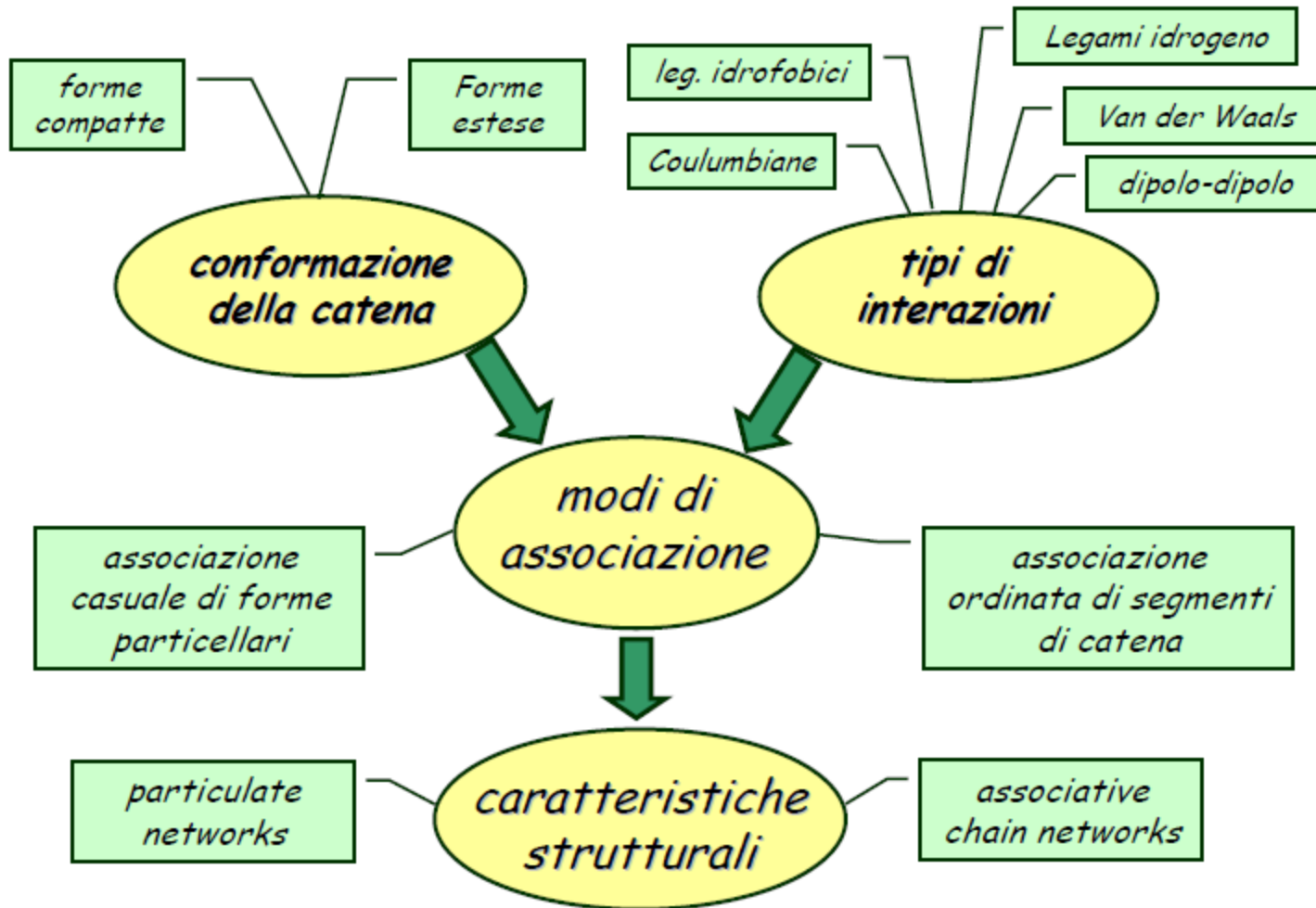
Gel fisici, caratterizzati da legami di tipo fisico.

Schema generale della formazione di un gel chimico



Gel fisici

Meccanismi di formazione nel campo dei biopolimeri



Elasticità:

Un materiale elastico ritorna alla sua forma e dimensione originale quando la forza viene rimossa.

Un materiale plastico si deforma facilmente, ma non si rompe.

Forza:

Un materiale forte è caratterizzato da un'alta forza di rottura, cioè è necessaria una forte tensione per romperlo.

Rigidità:

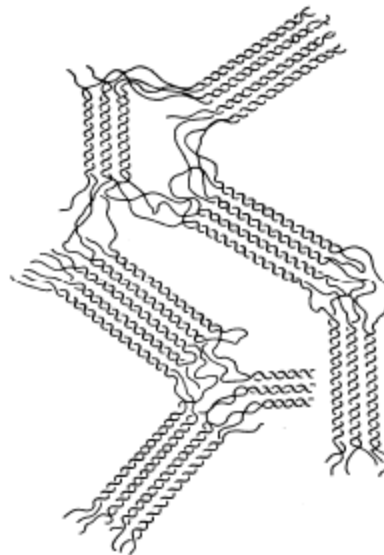
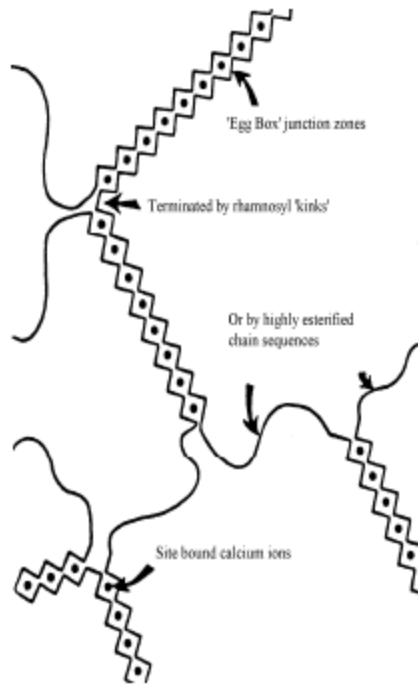
Un materiale rigido ha bisogno di una alta forza di tensione per produrre una piccola deformazione. E' difficile cambiare la sua forma.

Un materiale flessibile ha una grande deformazione con una forza piccola – Non è difficile cambiare la sua forma.

Gel fisici

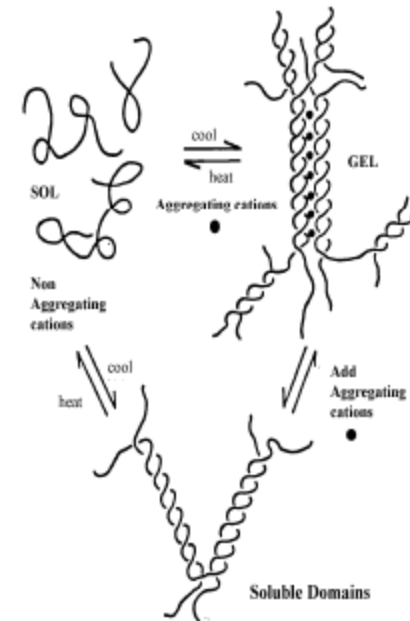
Meccanismi di formazione nel campo dei polisaccaridi

pectato di calcio



agarosio

carrageenano



Quando il modulo elastico del sistema supera quello viscoso si è in presenza di gel

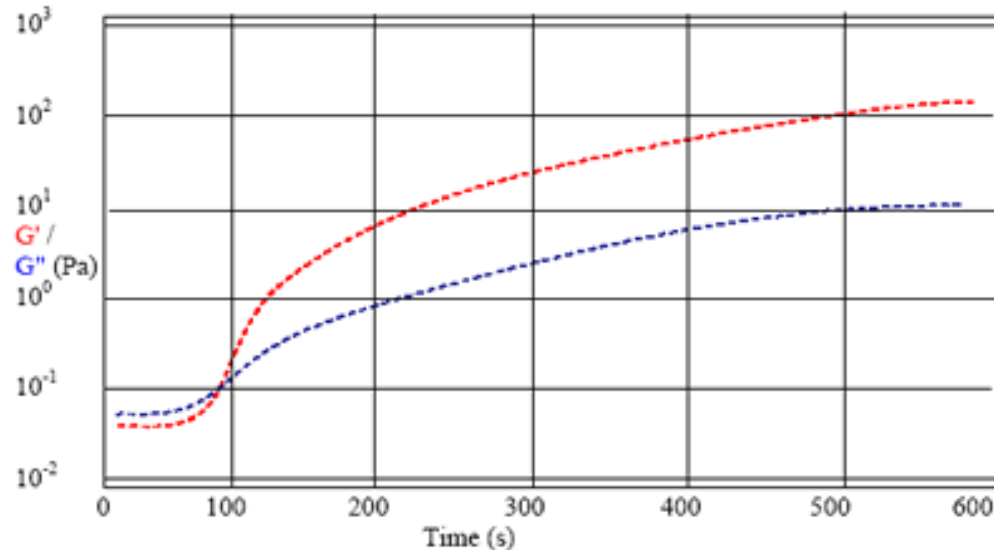


Grafico del modulo elastico e modulo viscoso in funzione del tempo di gelazione.

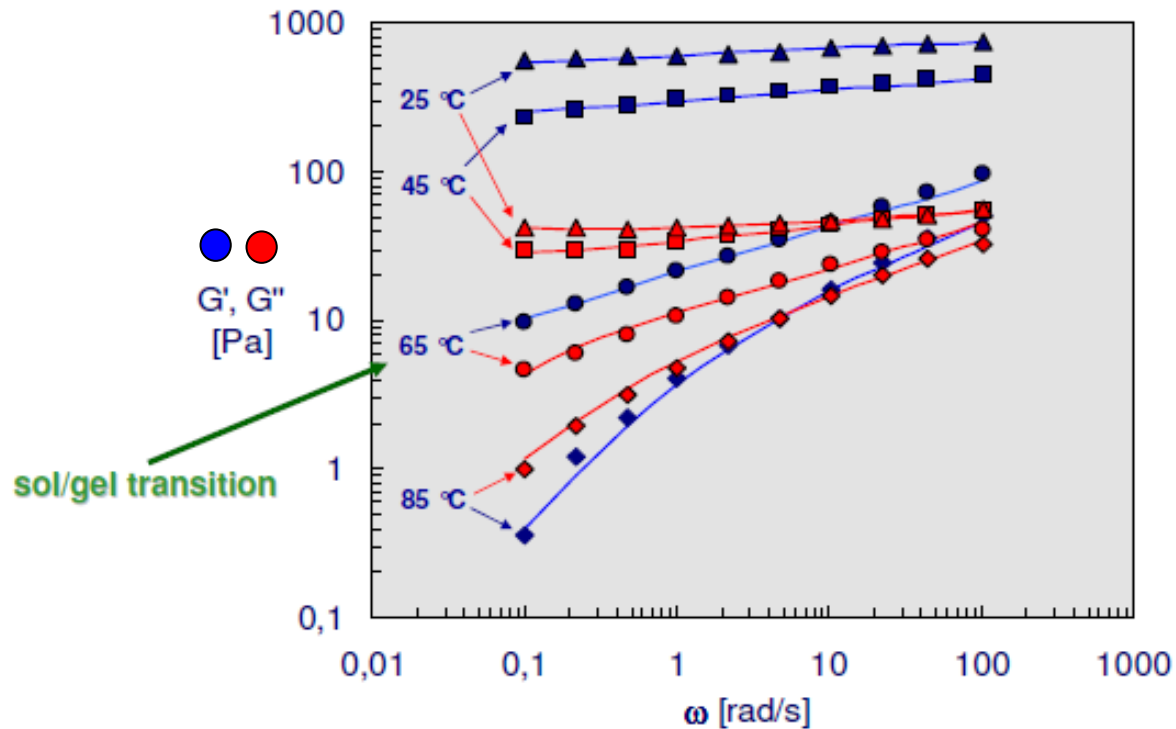
Dopo il punto di incrocio, la struttura del materiale diviene prevalentemente elastica ed il campione non fluisce più.

Osservando l'esperimento per più tempo si osserva il raggiungimento di un plateau.

Il **modulo elastico G'** , fornisce informazioni sull'energia elastica accumulata durante la deformazione, mentre il modulo viscoso G'' tiene conto dell'energia dissipata come calore durante la deformazione.

Spettri meccanici di soluzioni e gel polisaccaridici

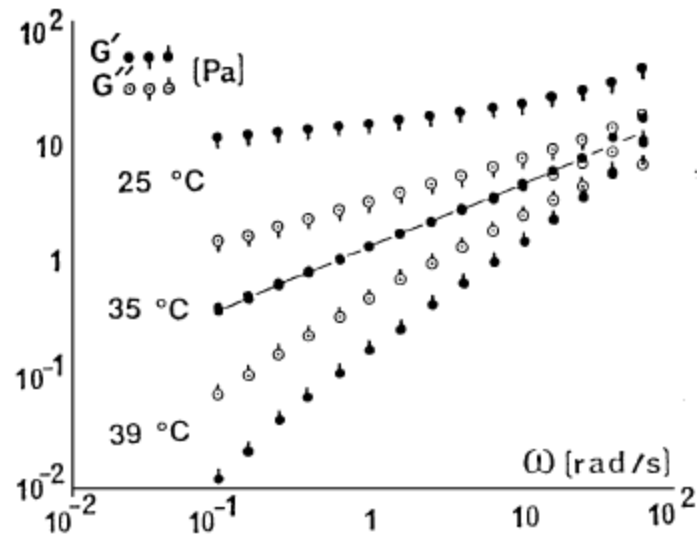
aqueous xanthan-locust bean gum blend (1:1)
KCl 20mM, total polymer concentration 1%
25 - 85 °C



Gel fisici

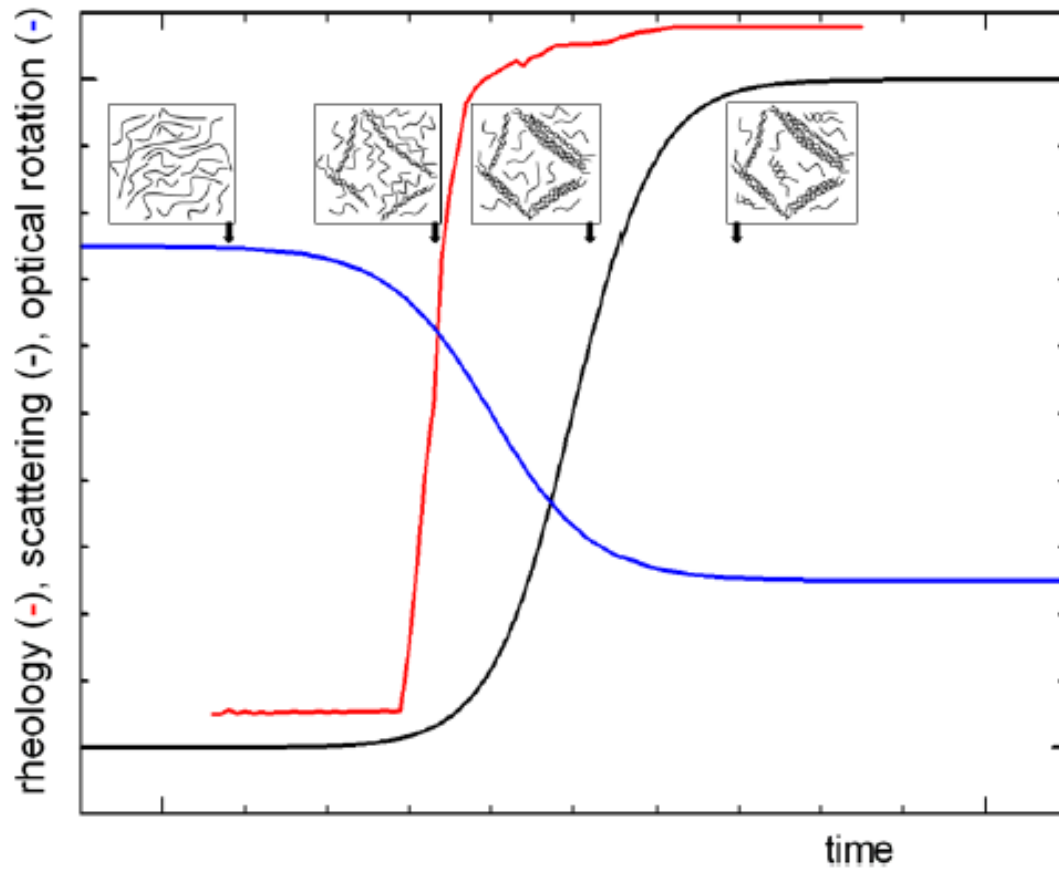
Criterio sol-gel

applicazione alla transizione strutturale in sistemi polisaccaridici



evoluzione degli spettri meccanici
di un sistema ι -carragenano-acqua (1% w/w)
al variare della temperatura

Figure 1. General mechanism (nucleation and growth) of gel formation as macroscopically measured by viscoelastic, optical and chiroptical properties. The insets show sketch of the polymer solution microstructure at the various stages.



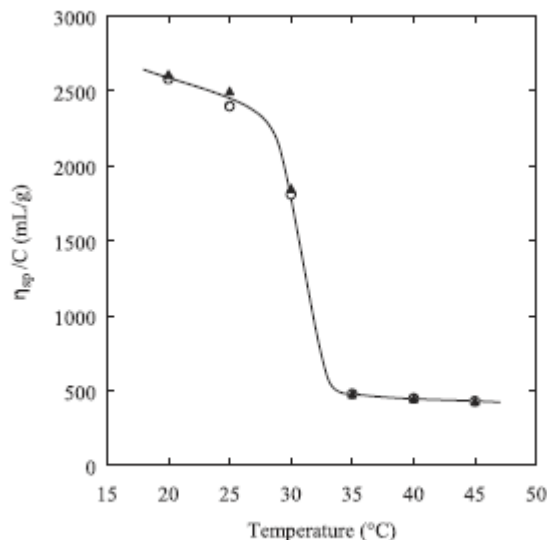


Fig. 6 Temperature-dependence of reduced specific viscosity on heating (\blacktriangle) and cooling (\circ) for 0.05 wt % Me_4N^+ gellan in 30 mM Me_4NCl (Crescenzi et al., 1987).

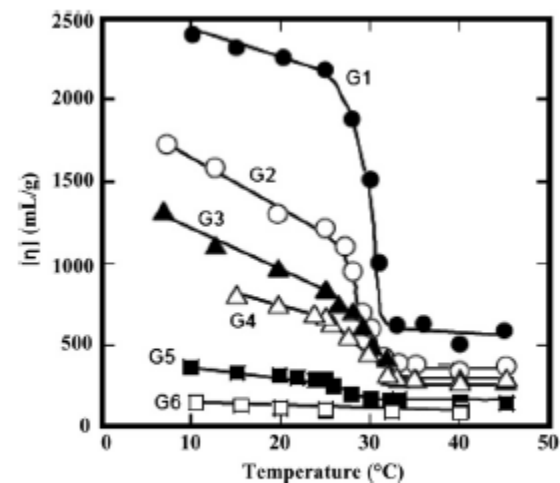


Fig. 7. Temperature-dependence of intrinsic viscosity, $[\eta]$, for Na^+ gellan in 25 mM NaCl (Ogawa et al., 2006). The molecular weights (kD) of the samples studied (measured in the disordered state at 40 °C) were: G1: 120; G2: 71; G3: 62; G4: 57; G5: 32 and G6: 17.

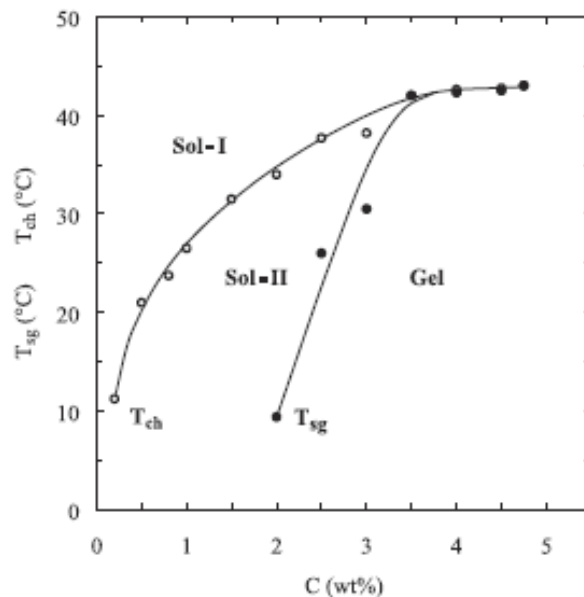
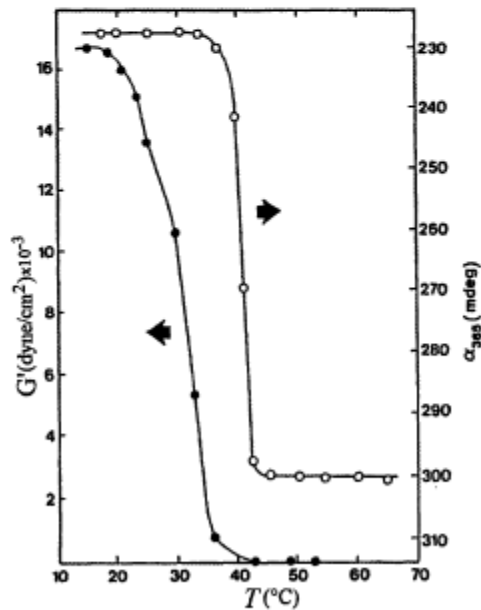
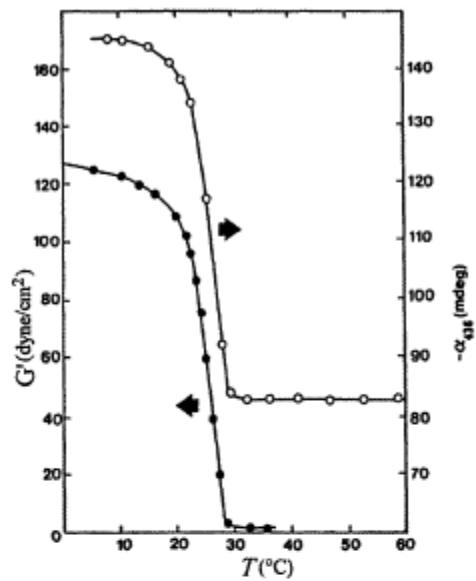


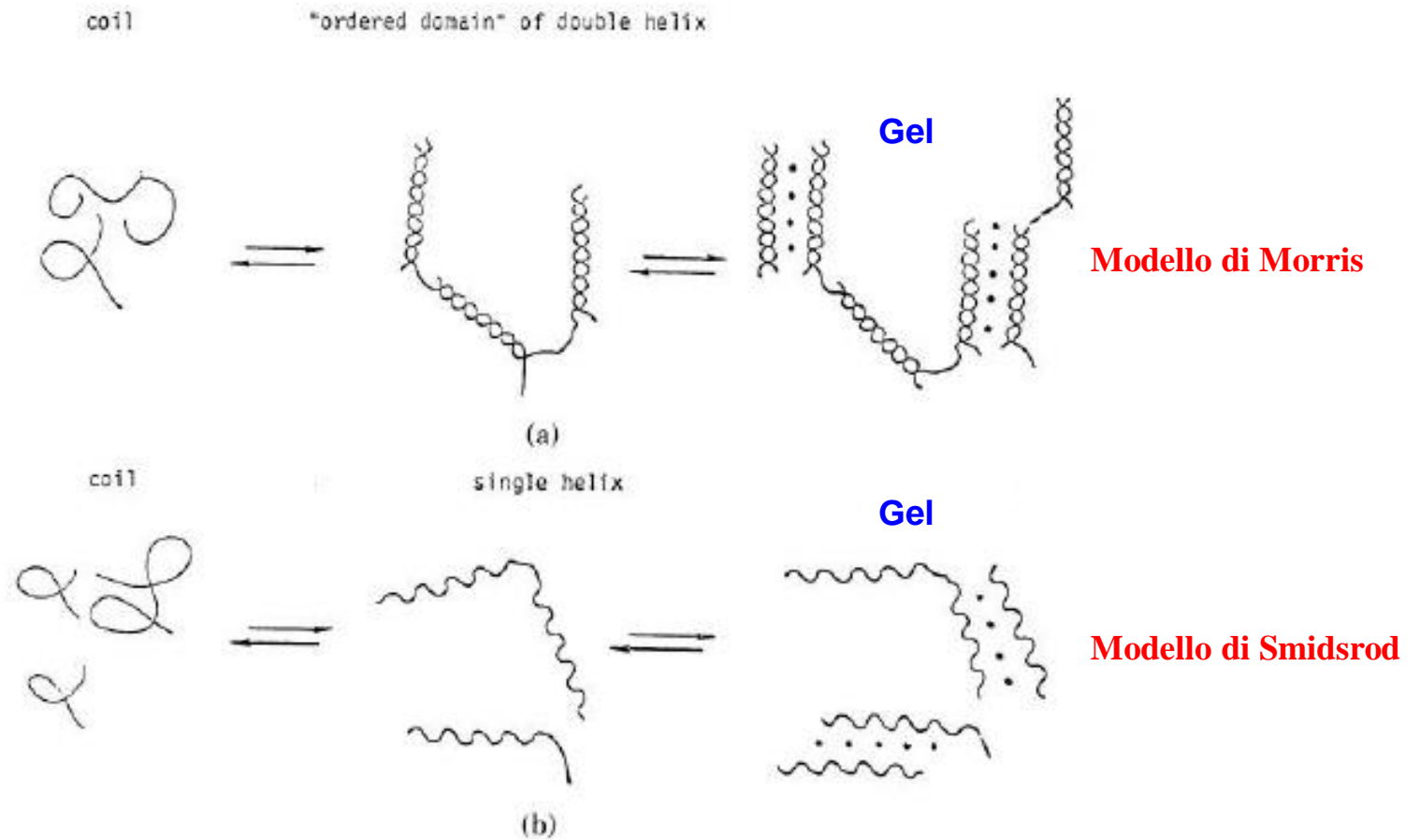
Fig. 23. Variation of coil-helix (\circ) and sol-gel (\bullet) transition temperatures (T_{ch} and T_{sg}) on cooling (see Fig. 21) with concentration (C) of Na^+ gellan (NaGG-3; Table 1) in water; the region labelled Sol-I corresponds to solutions of disordered coils, Sol-II to ordered (helical) structures in solution, and Gel to continuous networks (Miyoshi & Nishinari, 1999a).



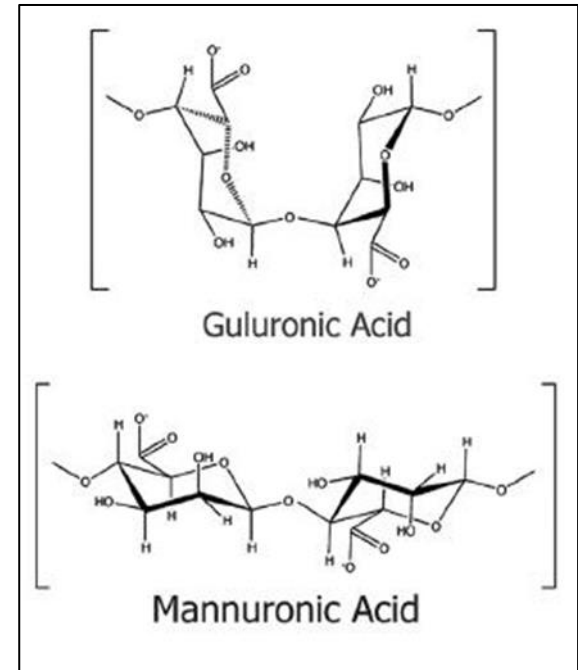
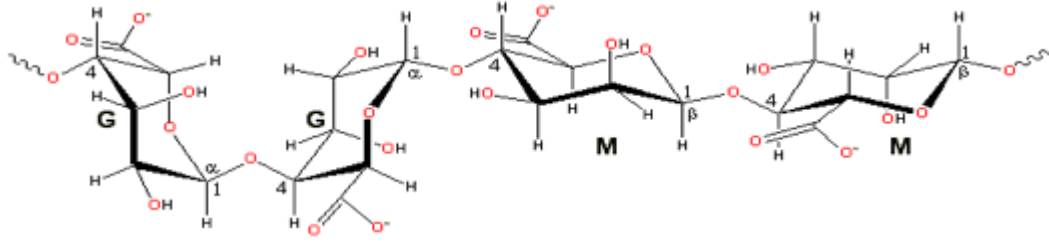
rheological changes that monitor variations in molecular organization
 Figures show the temperature course of **gel formation** for two microbial polysaccharides:
 1) XM-6, an anionic exopolysaccharide from an *Enterobacter spp.*
 2) a neutral capsular polysaccharide (CPS) produced by many *Rhizobium* strains

Fig. 4.69. Temperature variation of the storage modulus G' (●) and optical rotation α (○) for XM-6 polysaccharide (a) (top) and *Rhizobium* capsular polysaccharide (b) (bottom). From E.R. Morris, in *Industrial Polysaccharides*, eds. S.S. Stivala, V. Crescenzi and I.C.M. Dea, Gordon & Breach, New York, 1987, pp. 431-57.

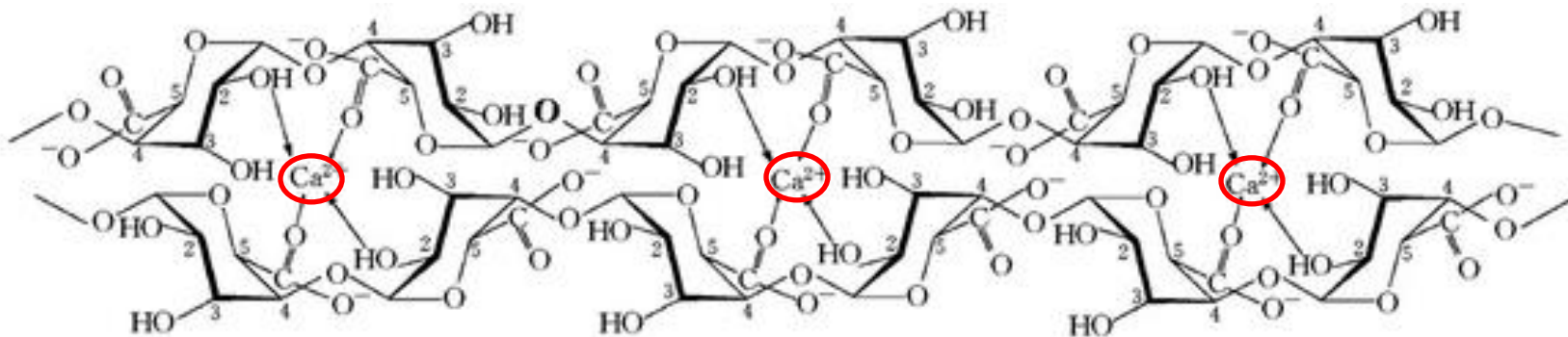
Esempio: aggregazione di k-carragenano



alginato

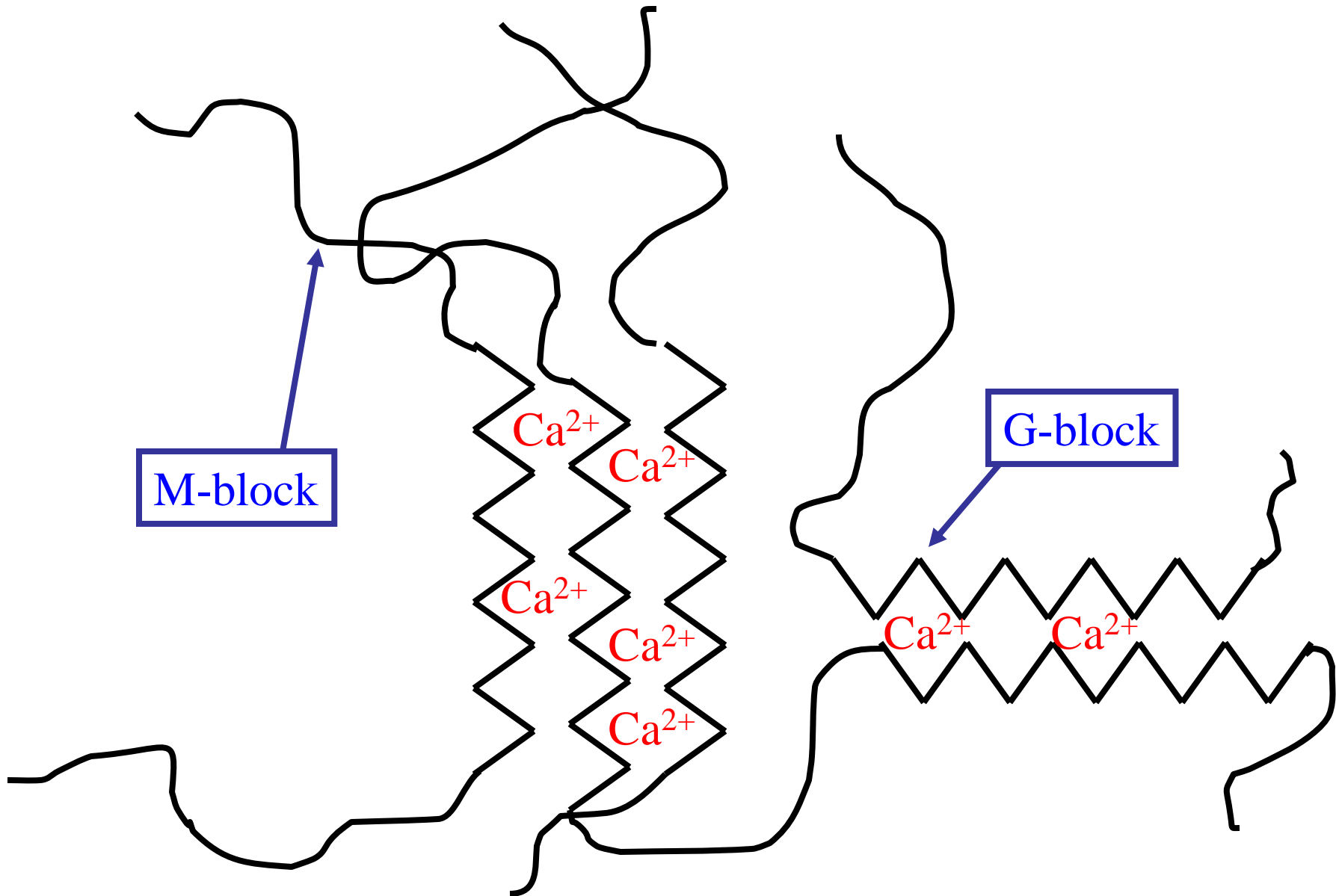


“Egg-box” structure



alginato

“Egg-box” structure



Strutture secondarie
elicoidali di agarosio

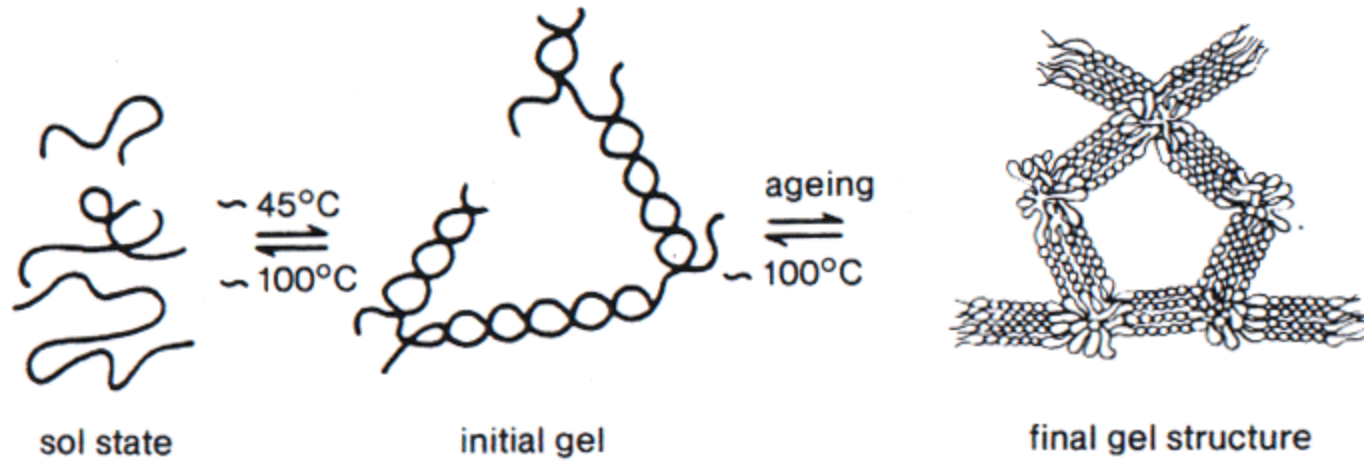


Fig. 25. Gel structure of agarose. (Låås, T. Doctoral thesis. Acta Universitatis Upsaliensis 1975. Reproduced by kind permission of the Author.)

Polisaccaridi che formano gel sono noti da molto tempo ed utilizzati in diverse applicazioni tecnologiche.

Molto spesso sono polisaccaridi di origine vegetale che hanno un'ottima biocompatibilità e quindi sono utilizzati per la formulazione di farmaci ed alimenti

Alcuni polisaccaridi gelificanti sono anche ottenuti da batteri

I più comuni sono:

alginato

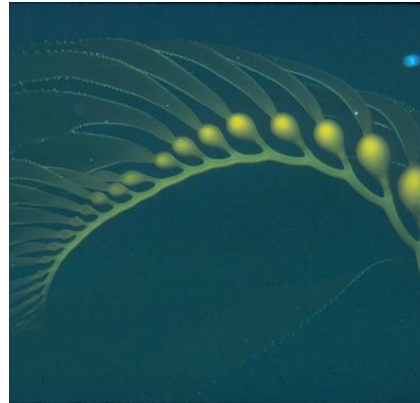
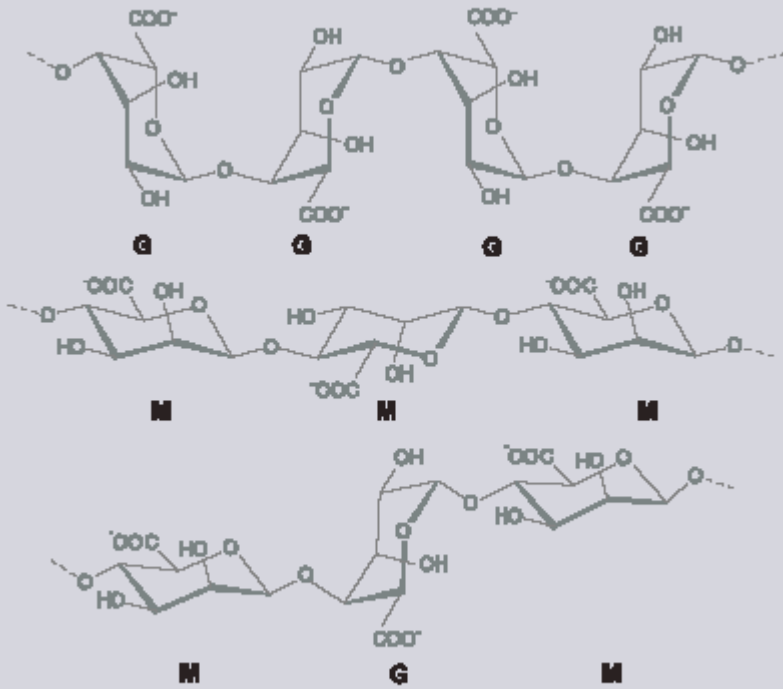
pectina

carragenano

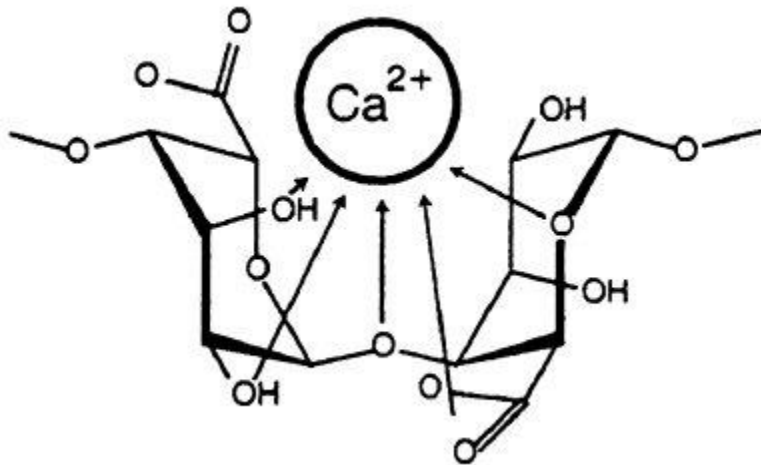
agarosio

gellano

Figure 5- Alginate block types



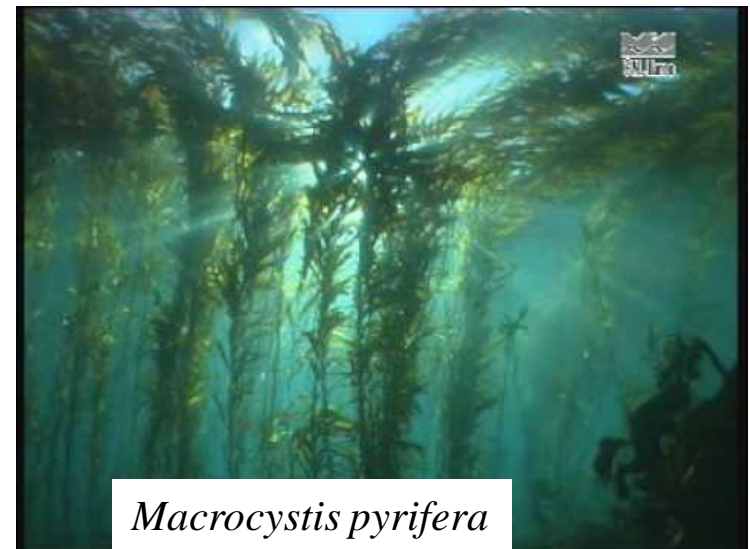
Struttura dell' Alginate (E 400-401-402-403-404-405)



prodotto dall'alga bruna
Macrocystis pyrifera
e
Laminaria digitata

da alghe brune (classe *Phaeophyceae*)

SPECIE ALGHE	ALGINATO % w/W	Ac. Mann. % w/W	Ac. Gul. % w/W	M/G	M(n)	G(n)
Macrocystlis pyrifera	13-14	61	39	1.56	40.6	17.7
Ascophyllum nodosum	20-30	65	35	1.85	38.4	20.7
Laminaria digitata	15-40	59	41	1.45	—	—
Laminaria hyperborea	18-23	31	69	0.45	12.7	60.5
Ecklonia	29-38	62	38	1.60	—	—



Utilizzi di gel polisaccaridici

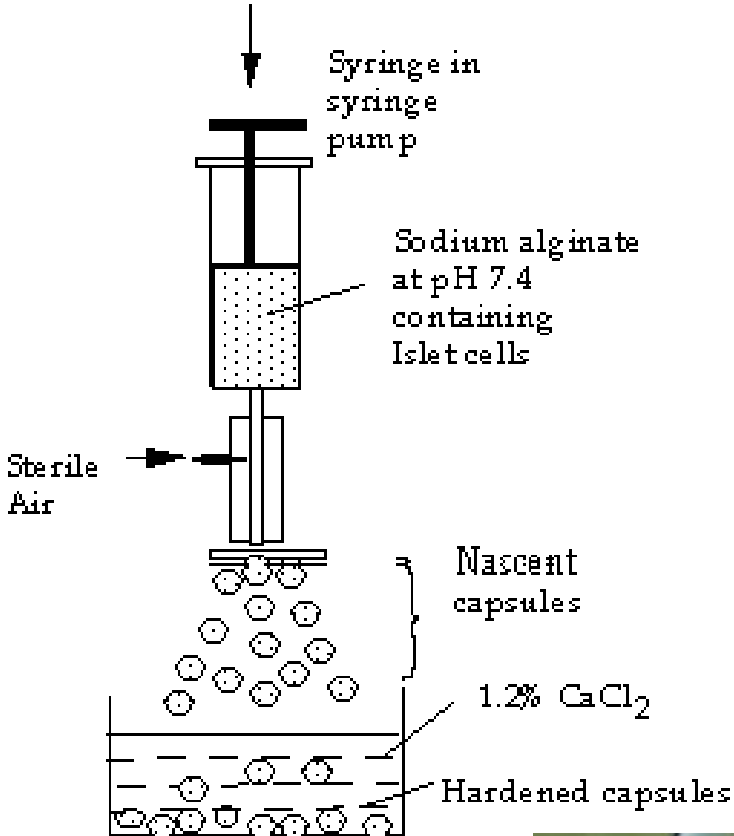
Le caratteristiche dei gel polisaccaridici li rendono adatti a numerose applicazioni tecnologiche:

- **ambiente acquoso**
- **biocompatibilità**
- **edibilità**
- **biodegradabilità**

Uso farmaceutico / fitosanitario dell'alginato di calcio

Incapsulazione di principi attivi (in «GEL BEADS»)





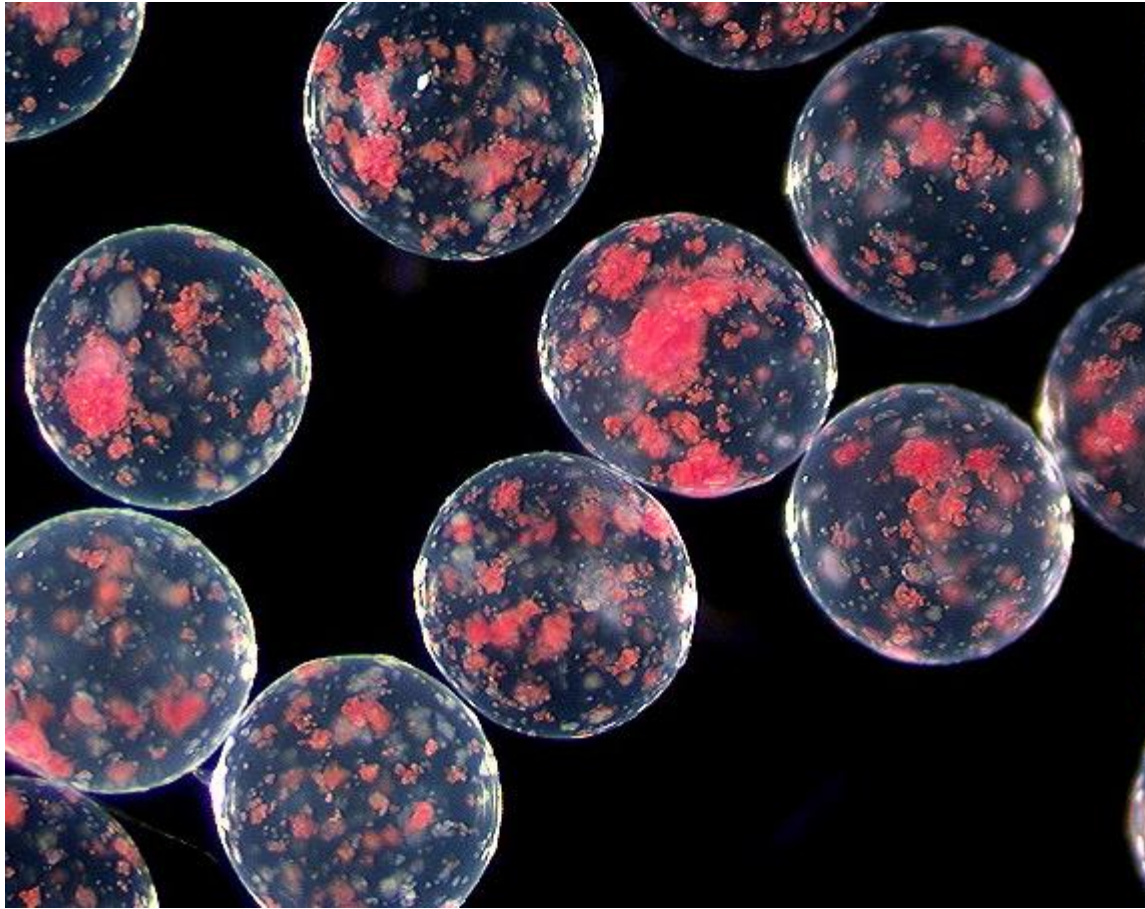


Immagine al microscopio ottico di cellule pancreatiche incapsulate in un gel di alginato a forma di palline. Il diametro delle palline va da **25 micrometri fino a millimetri**. Le palline contengono più di una cellula pancreatica.

USO BIOMEDICO del gel di alginato di calcio:

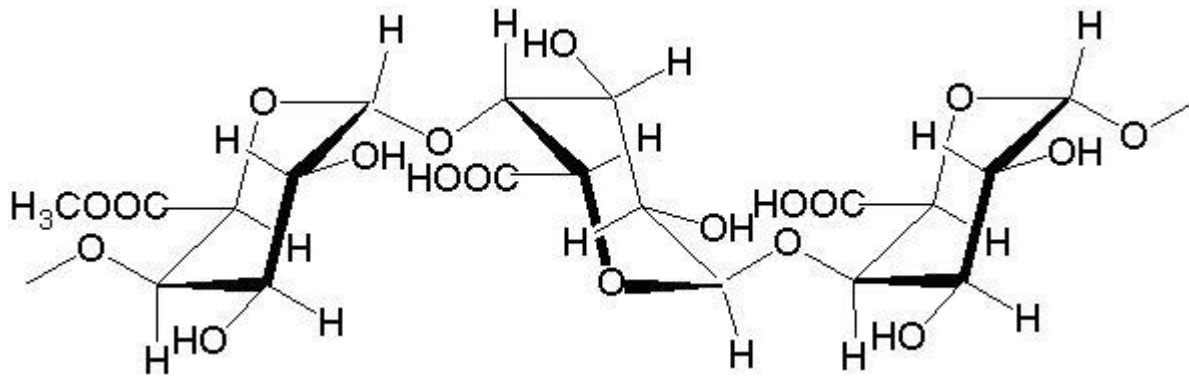
- ferite con essudato abbondante
- ferite superficiali o profonde
- nella fase essudativa e di granulazione, per esempio:
 - ulcere da pressione
 - ulcere arteriose
 - ulcere venose del polpaccio
 - ulcere arteriose
 - siti di prelievo cutaneo

Gel di alginato per la ricrescita dei tessuti dopo necrosi della ferita



alginato





Struttura della Pectina

La pectina (**E440**) consiste in un gruppo di polisaccaridi acidi ed eterogenei che si trova nei frutti ed in vegetali ed è ottenuto principalmente da scarti di scorze di limone e della lavorazione delle mele. E' prevalentemente un acido poligalatturonico.

Schema di gelazione dell'alginato e della pectina

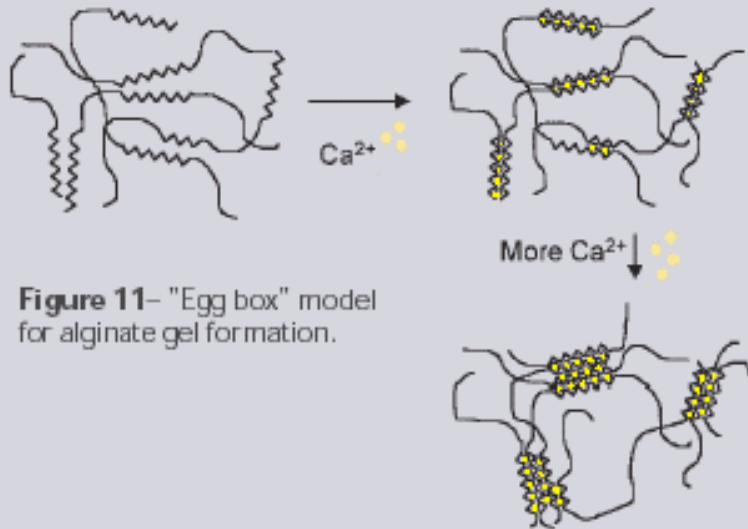
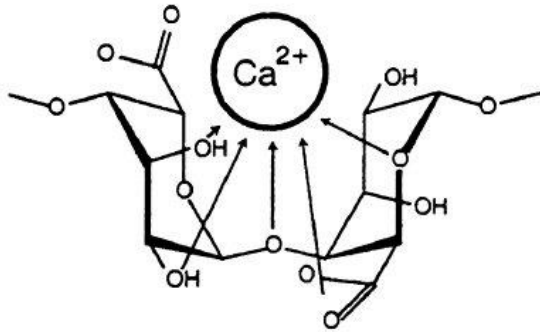
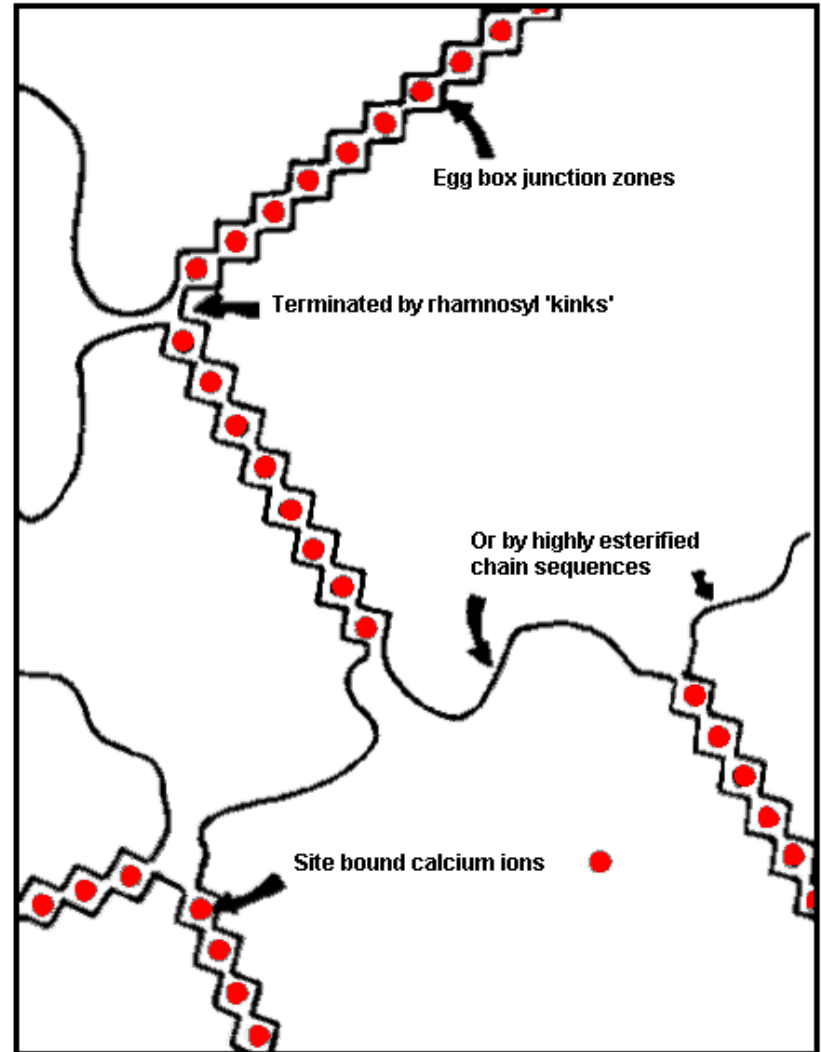


Figure 11- "Egg box" model for alginate gel formation.



L'utilizzo principale delle **pectine** è nel campo degli agenti gelificanti, ispessenti e stabilizzanti per l'industria alimentare:

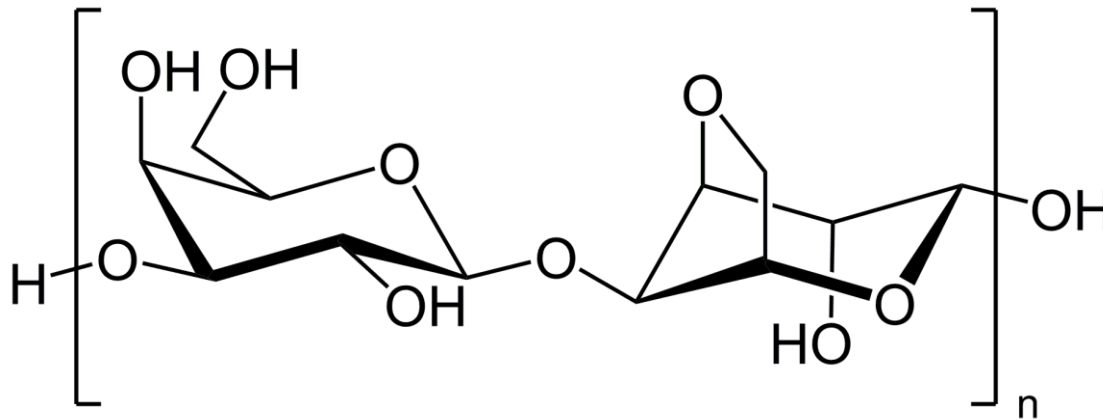
Gelatine

Marmellate

Sono utilizzate in medicina nel controllo delle funzioni intestinali, per la formazione di film su mucose, per abbassare l'infiammazione e nel trattamento delle ferite come proteggente.

Nella cosmetica sono utilizzate come stabilizzanti.

Agarosio (agar, E 406)



(1 \rightarrow 4)-3,6-anidro- α -L-galattopiranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-galattopiranano



Si ottiene da alghe rosse del genere *Gelidium*

L'agar viene principalmente utilizzato come supporto per colture batteriche. Per questo deve rispondere a requisiti chimico-fisici stringenti, non deve avere sostanze litiche e agenti antibatterici.

Le proprietà dell'agar sono particolarmente interessanti:

Temperatura di gelazione 32-36°C

Temperatura di fusione 85-86 °C

Concentrazione ottimale 10-11 g di agar per litro di coltura liquida.

Assenza di sostanze antibatteriche

L'**agar** viene anche utilizzato nell'industria alimentare come additivo:

agente gelante e stabilizzante
controllo della viscosità

Il potere gelificante dell'agar è così alto che viene utilizzato in concentrazioni dell'1%.

Come additivo viene utilizzato in quantità minori e non essendo digeribile può anche essere utilizzato come additivo per cibi dietetici.

L'agarosio si estrae dalle **alghe rosse** ed in particolare da quelle appartenenti alla famiglia delle gelidiaceae



Principali sorgenti di agar

ALGA	LOCAZIONE
<i>Gelidiella acerosa</i>	Giappone, India
<i>Gelidium amansii</i>	Giappone
<i>Gelidium cartilagineum</i>	USA, Messico, Giappone
<i>Gelidium corneum</i>	Sud Africa, Portogallo, Spagna, Marocco
<i>Gelidium liatulum</i>	Giappone
<i>Gelidium lingulatum</i>	Cile
<i>Gracilaria confervoides</i>	Sud Africa
<i>Pirocladia</i>	Egitto, Giappone, Nuova Zelanda
<i>Pirocladia lucida</i>	Nuova Zelanda



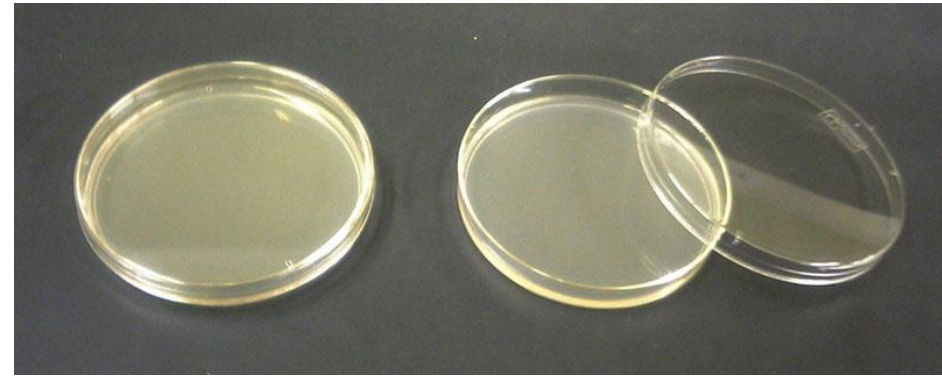
...alcune applicazioni

Settore Estetica/cosmetica

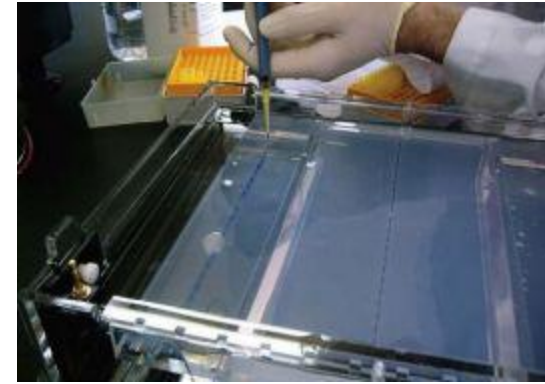


filler a base di gel di agarosio

Gastroprotettore, lassativo,
dieta



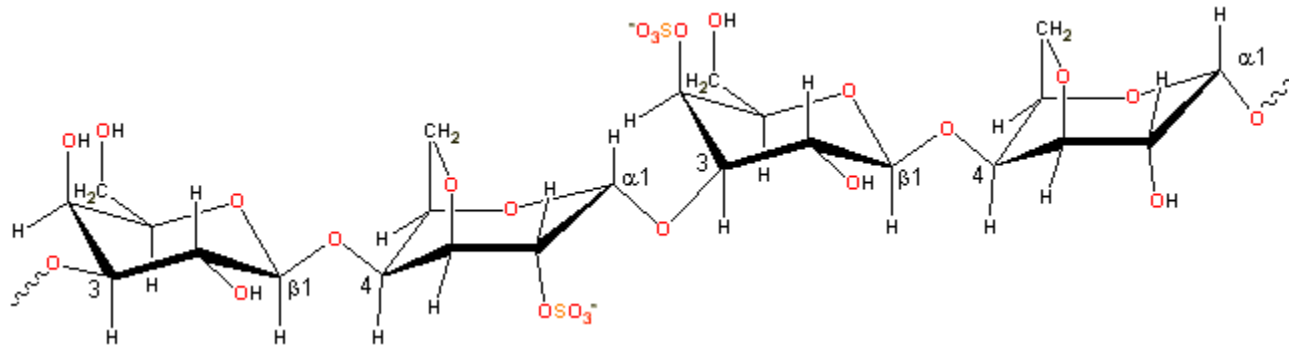
Ricerca & Sviluppo



Settore Alimentare: Condensante agar-agar E406



Carragenano

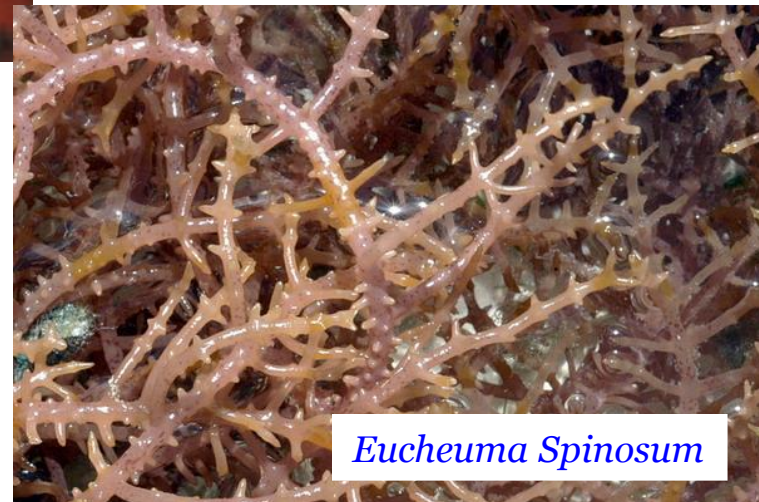


Il Carragenano (E 407) è costituito da un dimero di β -D-galattopiranosio legato in 3 e α -D-galattopiranosio (3,6 anidro) legato in 4.

Si ottiene da diverse alghe rosse fra del genere *Chondrus*



Polisaccaridi da alghe (rosse, Rhodophyta)
carragenani



Carrageenan (**E407**)
Ind. Alimentare: ca. 10,000 t/a

Utilizzi del Carragenano

Produzione di gelati e dessert a base di latte (frullati)

Produzione di salse (controllo della viscosità)

Manifattura della birra (chiarificante)

Manifattura di patè (ritenzione di acqua, aumento di volume)

Paste per dentifrici (evita la separazione dei costituenti)

Shampoo e gel (ispessente)

Gel per profumare ambienti

Schiume antincendio (favorisce l'adesione)

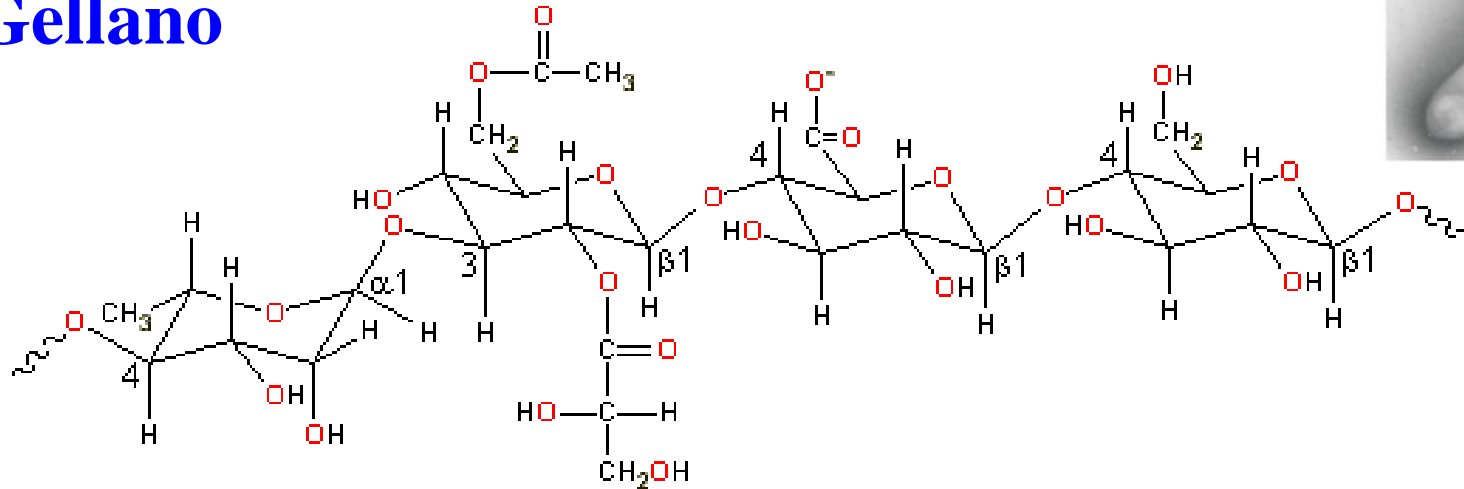
Crema da scarpe (gelificante e controllo della viscosità)

Manifattura della carta (effetti di invecchiamento e marmorizzazione)

In biotecnologia per immobilizzare enzimi e/o cellule

In farmaceutica come eccipiente nella formulazione di pillole.

Gellano



Il Gellano è costituito da un tetrasaccaride lineare:



con sostituenti O(2) L-glicerile and O(6) acetile sul glucosio legato in 3.

E' un polisaccaride solubile in acqua prodotto dal batterio *Spingomonas elodea*.

E' utilizzato come agente gelificante in alternativa all'agar in colture microbiologiche. Resiste a temperature di 120°C (organismi termofili). Richiede concentrazioni meno alte dell'agar per aver un gel della stessa consistenza, ma questa dipende anche dalla presenza di cationi bivalenti.

Il **gellano** è utilizzato

Nell'industria alimentare:

- Rilascio di aromi
- Stabilità al pH
- Ritenzione di acqua nella cottura

In medicina:

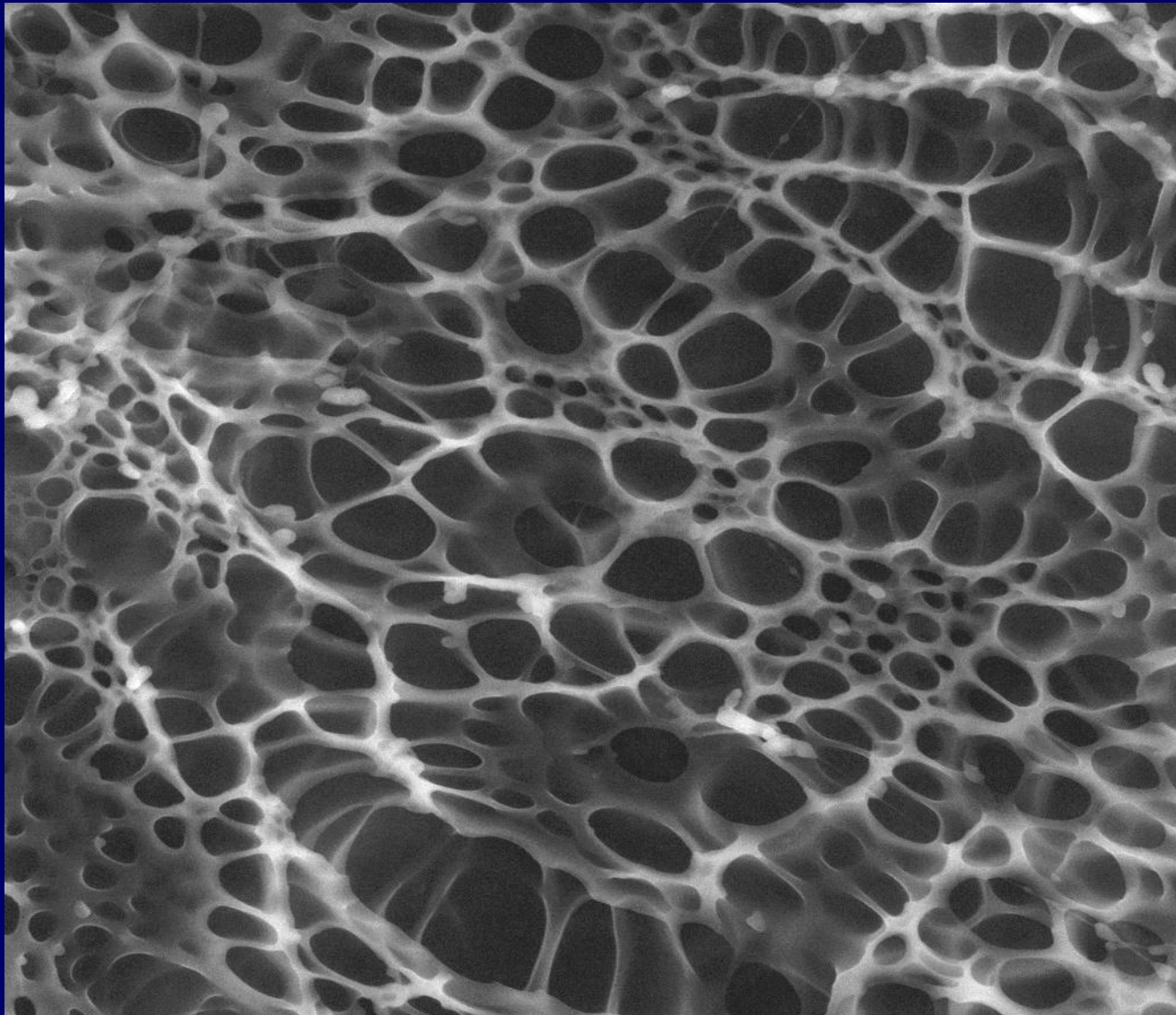
- Veicolante di farmaci in oftalmologia
- Rilascio controllato di farmaci (in funzione del pH)

In cosmetica:

- Deodoranti (buone formulazioni anche a bassa concentrazione)

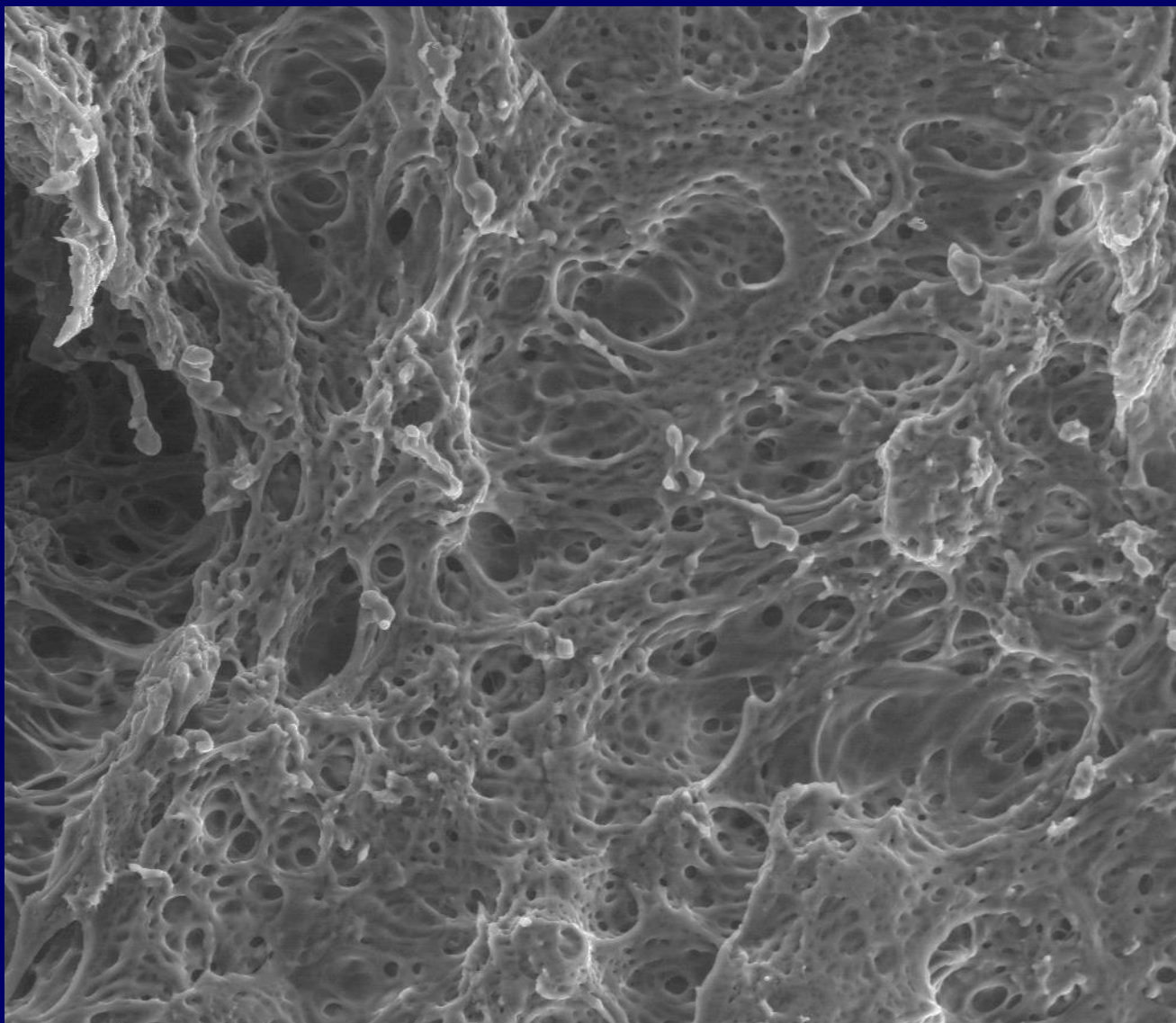
Microbiologia:

- Colture di batteri termofili



HV	Spot	Mag	Sig	VacMode	10 μ m
15.0 kV	4.0	6000x	SE	ESEM	

Surface picture (208035) (ESEM)

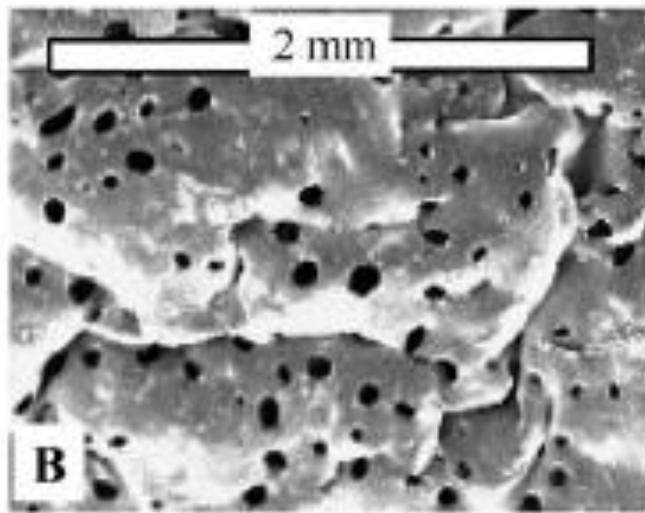
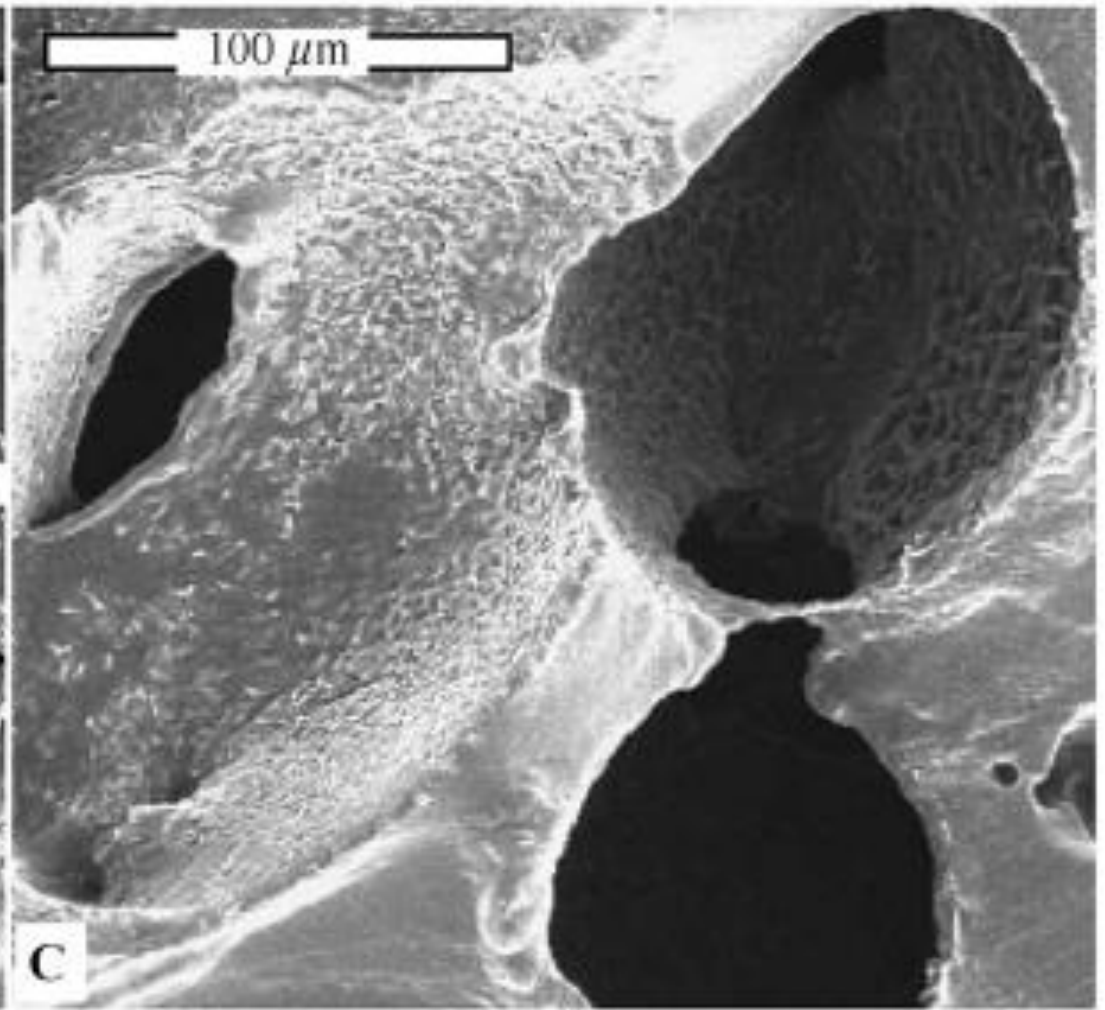
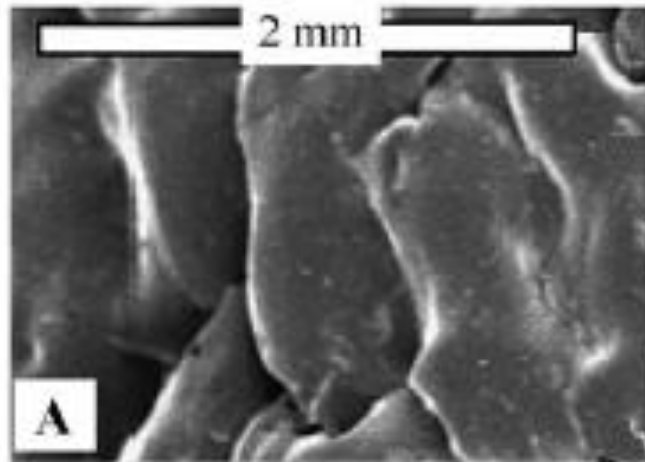


HV	Mag	Spot	VacMode	Sig	100 μ m
15.0 kV	600x	4.0	ESEM	SE	

Gel 208035

Cross-section picture (208035) (ESEM)

GEL SUPERPOROSI



IDROGEL

Injectable, Biodegradable Hydrogels for Tissue Engineering Applications

Injectable hydrogels are promising substrates for tissue engineering applications due to high tissue-like water content, ability to homogeneously encapsulate cells, efficient mass transfer, easily manipulated physical properties and minimally invasive delivery

The hydrogel precursor loaded with growth factors and/or targeted cells can be injected into the wound site and experiences a solution-to-gelation transition (sol-gel) *in situ* due to physical or chemical stimuli

Highly hydrated hydrogels can better mimic the chemical and physical environments of ECM and therefore are ideally cellular microenvironment for cell proliferation and differentiation.

Most importantly, injectable hydrogels have a similar microstructure to the extracellular matrix (ECM) and allow good physical integration into the defect, potentially avoiding an open surgery procedure and facilitating the use of minimally invasive approaches for material and cell delivery

Figure 1. Schematic illustration of injectable hydrogel for tissue regeneration approaches. Cells are isolated from a small biopsy, expanded *in vitro*, and encapsulated in hydrogel precursors, which are subsequently transplanted into the patient by injection using a needle. Hydrogel provide the initial structural support and retain cells in the defective area for cell growth, metabolism and new ECM synthesis. The hydrogel is readily degradable when the cells secrete ECM. This strategy enables the clinician to transplant the cell, growth factor and hydrogel combination in a minimally invasive manner.

