

Caractérisation rhéologique de la gélification d'alginate et de chitosane : effet de la température.

L. Payet ^a, A. Ponton ^a, F. Agnely ^b, P. Colinart ^a, J.L. Grossiord ^b

^a *Laboratoire de Biorhéologie et d'Hydrodynamique Physico-chimique UMR CNRS 7057 et Fédération MSC FR CNRS 2438, case 7056, 2 place Jussieu 75251 Paris cedex 05, France*

^b *Laboratoire de Physique Pharmaceutique UMR CNRS 8612, 5 rue J. B. Clément 92296 Châtenay-Malabry, France*

Reçu le 25 mai 2002 – Version finale acceptée le 8 octobre 2002

Résumé : L'étude de la cinétique de gélification des gels d'alginate et de chitosane en fonction de la température a été effectuée à l'aide de mesures rhéologiques oscillatoires qui permettent de déterminer les modules visqueux et élastique à plusieurs fréquences au cours du temps. L'observation expérimentale du comportement en loi de puissance de ces modules a permis de vérifier le critère de Winter pour ces systèmes, de déterminer le temps de gélification et de caractériser les structures à ce temps par l'exposant de relaxation relié à une dimension fractale.

Mots-clé : Alginate, chitosane, critère de Winter, temps de gélification, dimension fractale, température.

[Abridged English version on last page]

1. Introduction

Le chitosane et l'alginate sont des polymères naturels de la famille des polysaccharides, dont les applications multiples et variées ne cessent de se développer. En effet, ces polymères possèdent de nombreuses propriétés physico-chimiques et biologiques intéressantes (biocompatibilité, propriétés cicatrisantes, chélatantes...). Elles sont d'un grand intérêt pour de nombreuses applications industrielles et pharmaceutiques [1, 2]. La formation d'hydrogels est l'une des caractéristiques les plus appréciées pour les applications. Les processus de gélification sont différents pour ces deux polymères [3]. Le chitosane peut être réticulé par formation de liaisons covalentes (gel chimique) avec un agent réticulant (le plus souvent un dialdéhyde tel le glyoxal) [4]. La gélification de l'alginate se fait par formation de liaisons physiques avec des ions calcium [5]. De nombreuses études ont été réalisées pour caractériser ces systèmes mais très peu ont porté sur le suivi de la cinétique de formation de gel à partir de ces polymères. Celles qui existent, portent surtout sur l'évolution des modules élastique G' et visqueux G'' en fonction du temps, telle l'étude de Bo Guo et al. pour le système chitosane-scléraldéhyde [6] et celle de B.T. Stokke pour l'alginate [7]. De plus, les travaux portant sur

les alginates concernent en général la formation instantanée de nanoparticules pour laquelle un contrôle de cinétique est impossible. L'objet de cette publication est de présenter une étude cinétique de la gélification de ces deux polysaccharides par rhéologie. La méthode utilisée est la mesure de l'évolution du module élastique G' et du module visqueux G'' sous contrainte oscillante de faible amplitude au cours de la gélification. Le critère utilisé pour déterminer le temps de gélification est celui de Winter qui prévoit que les modules G' et G'' ont un comportement en loi de puissance lors de la formation d'un gel ayant des propriétés d'autosimilarité. Nous avons ainsi déterminé l'influence de la température sur la cinétique de gélification pour les deux polymères.

2. Partie théorique

Depuis une dizaine d'années, Winter et al. ont proposé un nouveau critère de détermination du temps de gélification. Il est basé sur les considérations suivantes. En accord avec les propriétés d'autosimilarité du gel, il a été observé expérimentalement une loi d'échelle [8] pour $G'(\omega)$ et $G''(\omega)$ qui suivent à un coefficient de

proportionnalité près une même loi de puissance en fonction de la fréquence au temps de gélification t_g :

$$G'(\omega) \sim G''(\omega) \sim \omega^\Delta \text{ pour } \omega_1 < \omega < \omega_0 \quad (1)$$

où ω est la pulsation pour les mesures en dynamique, Δ l'exposant de relaxation, ω_1 et ω_0 étant des fréquences de coupure.

De l'équation (1) et des relations de Kronig-Kramers [9], on déduit la relation suivante :

$$\tan\delta = G''(\omega) / G'(\omega) = \text{cste} = \tan(\Delta\pi/2) \quad (2)$$

où δ représente le déphasage entre la contrainte et la déformation lors des expériences en oscillation. Il s'ensuit que lors d'une expérience en balayage de fréquences, où G''/G' est mesuré au cours du temps, le temps de gélification est donné par l'intersection des différentes courbes, chaque courbe correspondant à une fréquence donnée. On peut aussi, grâce au critère de Winter, caractériser la structure au temps de gélification en déterminant Δ . En effet, les valeurs de Δ sont comprises entre 0 (gel élastique) et 1 (gel visqueux).

Cet exposant peut être calculé à partir de l'équation (2). Les valeurs des modules visqueux et élastique ne sont pas toujours mesurées au temps de gélification. Dans ce cas, on fait une interpolation linéaire entre deux valeurs expérimentales pour déterminer G' et G'' au temps de gélification pour chaque fréquence. En moyennant sur toutes les fréquences, on détermine G''/G' au temps de gélification pour déterminer Δ . On peut aussi obtenir Δ en traçant $\log G'$ et $\log G''$ en fonction de $\log(\omega)$ au temps de gélification. D'après l'équation (1), on obtient deux droites dont les pentes Δ' et Δ'' doivent être égales à Δ au temps de gélification.

Le comportement en loi de puissance des modules G' et G'' (équation (1)) traduit le fait qu'il n'existe pas d'échelle de temps ni d'échelle de taille caractéristique du matériau à l'état gel critique (matériau au temps de gélification). On peut alors décrire la croissance des amas qui participent à la formation du gel en termes de géométrie fractale sur des échelles de longueur comprise entre la taille des monomères et la longueur de corrélation de connectivité. La masse moléculaire M et le rayon R d'un amas fractal sont reliés par $M \propto R^{d_f}$ où d_f est la dimension fractale de l'amas. Une relation entre l'exposant de relaxation et la dimension fractale d_f a été déterminée [10].

Dans le cas où le volume exclu est écranté, l'expression est :

$$d_f = 5/2 [(2\Delta-3)/(\Delta-3)] \quad (3)$$

pour un espace à 3 dimensions.

3. Partie expérimentale

3.1 Synthèse des réseaux d'alginate

Le principe de la formulation du gel d'alginate est la mise en solution de l'alginate (fourni par SKW) en présence d'ions Ca^{2+} séquestrés par l'EDTA (Ethylene Diamine Tetra-acetic Acid fourni par Sigma), l'initiateur de la réaction étant un agent acidifiant, le GDL (Glucono Delta Lactone fourni par Fluka) [11, 12]. L'utilisation d'un séquestrant permet de contrôler la cinétique de prise en gel et de déterminer un temps initial de réaction qui correspond à l'addition de l'agent acidifiant. La préparation d'un gel d'alginate se fait en 4 étapes. La première consiste à préparer une solution tampon d'un pH de l'ordre de 9 à partir de glycine et de NaOH dont les concentrations sont respectivement 0,05 et 0,088 mol.l⁻¹ dans la solution. Cette solution tampon constitue alors le solvant. Lors de la seconde étape, on prépare une solution de CaCl_2 (8,35 g.l⁻¹) et d'EDTA (18,61 g.l⁻¹). On ajoute des pastilles de NaOH pur pour obtenir une solution basique de pH de l'ordre de 9. Cette étape correspond à la séquestration des ions Ca^{2+} . L'introduction d'alginate, préalablement séché à 100°C, dans cette dernière solution, permet ensuite de réaliser une solution mère à une concentration massique en polymère fixée à 1,1% (troisième étape). La dissolution complète est effectuée par agitation magnétique. Cette solution mère dont on vérifie la basicité est laissée au repos pendant 12 heures. Enfin on ajoute une quantité donnée de GDL correspondant à des concentrations massiques comprises entre 1% et 2% à la solution mère préalablement mise à la température désirée pour l'étude rhéologique. La dissolution de GDL se fait par agitation magnétique pendant 2 min.

3.2 Synthèse des réseaux de chitosane

Le chitosane fourni par Sigma possède une masse molaire moyenne viscosimétrique de 2,05.10⁶g.mol⁻¹ et un degré de déacétylation de 84% déterminé par spectroscopie infra-rouge à transformée de Fourier. Le mode opératoire de fabrication du gel de chitosane est plus simple que celui de l'alginate. Il consiste à dissoudre le chitosane dans de l'acide acétique 0,1M. La dissolution et une bonne homogénéisation sont assurées par une agitation magnétique pendant 24 heures. La solution est ensuite filtrée sur un support swixness 25 équipé d'un papier filtre sans cendre afin d'éliminer les matières non dissoutes. On obtient la solution mère de chitosane dont la concentration massique a été fixée à 1,5%. La réticulation est initiée par l'ajout d'une solution aqueuse de glyoxal à 40% en poids fourni par Riedel-De-Haen. La concentration massique d'agent réticulant a été fixée à 10,2%.

L'homogénéisation se fait par agitation magnétique pendant 1min.

3.3 Protocole de mesure

Les mesures rhéologiques ont été faites à l'aide d'un rhéomètre Haake RS150 fonctionnant à contrainte imposée. La géométrie utilisée est un cône/plateau en titane de 60mm de diamètre, d'angle 1° et d'entrefer 0,052mm. Le contrôle de température se fait à l'aide d'un bain thermostaté. Les mesures rhéologiques consistent en des cycles successifs de balayage en fréquence de 0,1 à 1Hz par pas de 0,15Hz, pour une amplitude de contrainte de 0,1Pa suivi d'un temps de repos de 30s pour éviter des mesures en continu. La gamme de fréquences a été déterminée expérimentalement en prenant initialement des plages plus larges sachant qu'il existe, d'après la théorie de Winter, des fréquences de coupure au delà desquelles le critère n'est plus vérifié [13].

4. Résultats et discussion

4.1 Comportement général

4.1.1 Gel d'alginate

La discussion qui suit se base sur une seule expérience, choisie parmi les autres pour son caractère représentatif des différentes expériences réalisées. Pour un système préparé à partir d'une solution mère d'alginate de pH=8,95, avec 1,4% (p/p) de GDL à 20°C, l'évolution de $\tan\delta$ en fonction du temps pour 7 valeurs de la fréquence est donnée sur la figure 1.

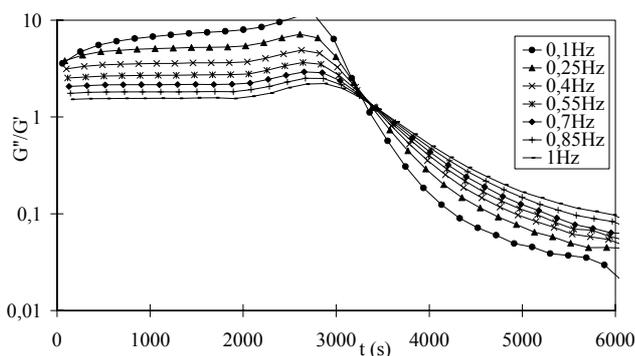


Figure 1 : Evolution de $\tan\delta$ en fonction du temps pour l'alginate (pH=8,95, 1,4% (p/p) de GDL, T=20°C).

Selon le critère de Winter, exposé dans la partie théorique, le temps de gélification, t_g , est atteint lorsque $\tan\delta$ est indépendant de la fréquence (équation (2)) sur une plage déterminée de fréquence. Pour notre système celle-ci s'étend de

0,25Hz à 1Hz. Pour les fréquences inférieures à 0,25Hz et supérieures à 1Hz, les courbes ne se coupent pas en un même point. C'est ce que l'on observe pour la courbe correspondant à 0,1Hz représentée sur la figure 1.

On peut ainsi déterminer $t_g = 3410 \pm 30$ s.

La formation du gel peut être également caractérisée par le sens de variation de $\tan\delta$ avec la fréquence, pour un temps donné. En effet, avant le temps de gélification, $\tan\delta$ augmente lorsque la fréquence diminue : ceci est typique d'un liquide viscoélastique. En revanche, après le temps de gélification, $\tan\delta$ croît avec la fréquence : on est en présence d'un solide viscoélastique.

Il faut souligner que différentes définitions du temps de gélification ont été proposées : l'une d'elle [14] consiste à identifier le temps de gélification au temps où $G' = G''$. Cependant cet instant dépend de la fréquence. Ainsi, pour les mesures de la figure 1, on a pour 0,25Hz, $t = 3440$ s et pour 1Hz, $t = 3560$ s, soit une différence de 120 s alors que t_g est de 3410 ± 30 s selon le critère de Winter. Le critère $G' = G''$ qui est couramment utilisé à cause de sa facilité de mise en œuvre ne possède donc pas de signification intrinsèque. Il fournit néanmoins un ordre de grandeur du temps de gélification.

On peut déterminer l'exposant de relaxation Δ à partir de l'équation (2). Dans le cas de la figure 1, on obtient $\Delta = 0,57 \pm 0,01$. Pour ce calcul de Δ , on fait une interpolation linéaire entre deux valeurs expérimentales pour déterminer les modules G' et G'' au temps de gélification. Les résultats obtenus, en particulier l'allure régulière des courbes d'évolution de $\tan\delta$, permettent de dire que l'approximation est justifiée.

La figure 2 présente l'évolution des modules G' et G'' en fonction de ω en coordonnées logarithmiques.

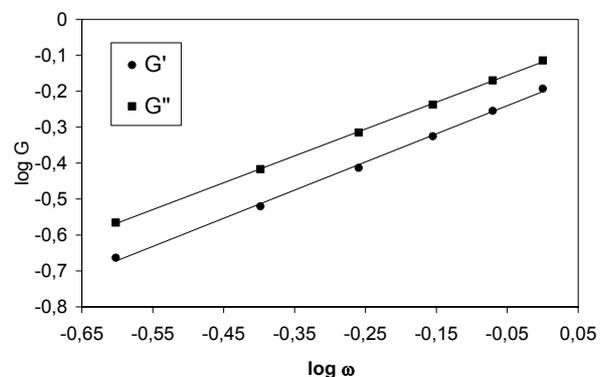


Figure 2 : Variation de $\log G'$ et $\log G''$ en fonction de $\log(\omega)$ pour l'alginate (pH=8,95, 1,4% de GDL (p/p), T=20°C) au voisinage de t_g .

On observe un comportement en loi de puissance et les pentes des droites correspondant respectivement à G' et G'' sont 0,78 et 0,75. On ne peut cependant pas associer ces valeurs à l'exposant de relaxation car cela supposerait que le temps d'évolution des modules est négligeable devant le temps de mesure lors d'un balayage en fréquence. Pour nos expériences, ce temps de mesure est de l'ordre de 100s durant lequel les modules peuvent varier rapidement comme nous avons pu l'observer pour l'alginate. En conséquence, l'exposant de relaxation sera toujours calculé à partir de l'équation (2). On en déduit ensuite la dimension fractale (équation (3)).

Pour $\Delta=0,57\pm0,01$ (figure 1), on trouve $d_f=1,91\pm0,02$.

Il est à noter que ces résultats sont peu différents de ceux de B.T. Stokke et al [7] qui ont déterminé par diffusion des rayons X aux petits angles une dimension fractale pour l'alginate variant de 1,8 à 2,5 selon la quantité de calcium, la masse molaire et les proportions relatives d'acide guluronique et mannuronique du copolymère.

4.1.2 Gel de chitosane

Comme pour le gel d'alginate, toutes les courbes d'évolution de $\tan\delta$ en fonction du temps pour le gel de chitosane présentent un point d'intersection et les paramètres t_g , Δ et d_f sont déterminés de la même façon.

Nous avons toutefois remarqué que pour les gels de chitosane, les valeurs de l'exposant de relaxation déterminé à partir de l'équation (2) et de l'évolution des modules G' et G'' en fonction de ω sont en très bon accord.

A titre d'exemple, pour une solution de chitosane à 1,5 % avec 10,2% de glyoxal à $T=25$ °C, pour laquelle $t_g=2130 \pm 40$ s, on trouve $\Delta = 0,53 \pm 0,01$, $\Delta' = 0,54$ et $\Delta'' = 0,53$ et donc une dimension fractale de l'ordre de 1,96. Ce meilleur accord par rapport au gel d'alginate est dû à l'évolution temporelle plus lente des modules G' et G'' au voisinage du temps de gélification, ce qui entraîne une plus grande précision pour déterminer Δ' et Δ'' (voir théorie).

4.2 Influence de la température

La variation de la température s'est faite sur une plage dont la limite inférieure est fixée par la thermostatisation utilisée (température de congélation d'eau 0°C), la limite supérieure par les risques d'évaporation de l'échantillon en cours d'expérience.

Les valeurs des différents paramètres déterminées à l'aide de l'équation 2 sont données dans les tableaux 1 et 2 suivants, respectivement pour l'alginate et le chitosane.

T (°C)	t_g (s)	Δ	d_f
5	7290 ± 50	0,77 ± 0,02	1,64 ± 0,03
10	3290 ± 30	0,77 ± 0,02	1,63 ± 0,02
15	3760 ± 30	0,80 ± 0,02	1,58 ± 0,04
20	2840 ± 30	0,80 ± 0,02	1,59 ± 0,03
25	2605 ± 25	0,79 ± 0,02	1,60 ± 0,03
30	2180 ± 20	0,83 ± 0,02	1,54 ± 0,03

Tableau 1 : Valeurs des paramètres cinétiques et de structure pour le gel d'alginate (pH=9,17, 2% (p/p) de GDL) en fonction de la température.

T (°C)	t_g (s)	Δ	d_f
15	10970 ± 30	0,50 ± 0,01	2,00 ± 0,02
20	7530 ± 50	0,47 ± 0,01	2,04 ± 0,01
25	2130 ± 40	0,53 ± 0,01	1,97 ± 0,01
30	1030 ± 20	0,44 ± 0,01	2,07 ± 0,01
37	380 ± 20	0,58 ± 0,01	1,90 ± 0,01

Tableau 2 : Valeurs des paramètres cinétiques et de structure pour le gel de chitosane (chitosane 1,5%, 10,2% (p/p) de glyoxal) en fonction de la température.

D'après les tableaux 1 et 2, il apparaît que l'augmentation de la température entraîne une diminution du temps de gélification.

On remarque sur la figure 3 que l'évolution de $\ln(t_g)$ en fonction de l'inverse de la température suit une loi de type Arrhénius :

$$\ln(t_g) = E_a/RT + cste \tag{4}$$

où E_a est l'énergie d'activation liée au processus de gélification, R la constante des gaz parfaits et T la température absolue.

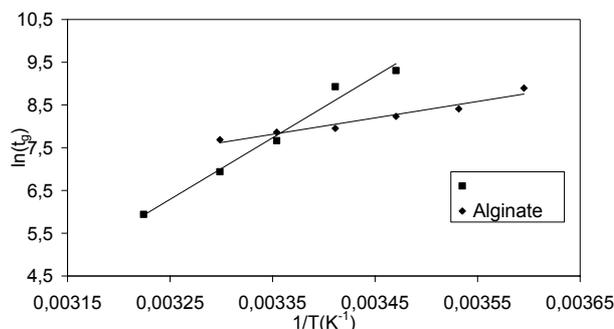


Figure 3 : Evolution de $\ln(t_g)$ en fonction de l'inverse de la température pour le gel d'alginate (pH=9,17, 1% de GDL) et de chitosane (chitosane 1,5%, 10,2 % de glyoxal).

Nous pouvons ainsi déterminer une énergie d'activation, $E_a = 32 \text{ kJ.mol}^{-1}$ pour l'alginate et $E_a = 120 \text{ kJ.mol}^{-1}$ pour le chitosane.

Il semble difficile d'associer ces énergies à une réaction particulière. On peut seulement dire, qu'en ordre de grandeur, l'énergie d'activation de l'alginate est voisine de l'énergie de liaisons faibles (quelques kJ.mol^{-1}) comme les liaisons de Van der Waals ou les liaisons Hydrogène, alors que celle du chitosane est plus proche de l'énergie d'activation d'une liaison covalente (plus de 100 kJ.mol^{-1}).

Cette différence peut s'expliquer par la différence des interactions mises en jeu lors de la gélification pour les deux gels : pour le chitosane il y a principalement formation de liaisons chimiques, alors que pour l'alginate ce sont des ponts ioniques.

En revanche, la température ne semble pas avoir d'influence sur la structure du gel au temps de gélification puisque Δ et d_f sont indépendants de celle-ci dans les plages de température étudiées.

5. Conclusion

Au cours de ces travaux, nous avons étudié la formation d'hydrogels d'intérêt pharmaceutique et cosmétique. Cette étude a été effectuée à l'aide de mesures rhéologiques oscillatoires non invasives qui permettent de déterminer le module visqueux et le module élastique à plusieurs fréquences au cours du temps. Les mesures ont été effectuées pour deux gels de polysaccharides, l'alginate et le chitosane, respectivement réticulés par liaisons physiques et chimiques. L'observation expérimentale du comportement en loi de puissance de ces modules a permis de vérifier le critère de Winter pour ces systèmes, de déterminer le temps de gélification et de caractériser les structures à ce temps par l'exposant de relaxation et la dimension fractale. Pour les deux gels, nous avons montré que la variation du temps de gélification en fonction de la température suit une loi de type Arrhénius. La nature différente des liaisons formées lors de la gélification se traduit par une énergie d'activation plus élevée pour le chitosane que pour l'alginate. En revanche la température n'a pas d'influence significative sur la structure des gels formés au voisinage du temps de gélification.

Références

[1] Majeti N.V. Ravi Kumar, *A review of chitin and chitosan applications*, Reactive and Functional Polymers, 46, 1-27 (2000).

[2] W. Paul et C.P. Sharma, *Chitosan a drug carrier for the 21st century: a review*, ST.P. Pharm. Sci., 10, 5-22 (2000).

[3] D. Durand, *Les réseaux macromoléculaires et les gels*, Groupe Français des Polymères, chap 5.

[4] A. Riccardo et A. Muzzarelli, *Chitine*, chap 2 (Pergamon Press, Oxford, 1977).

[5] C. Bouffar-Roupe, *Structure et propriétés gélifiantes des alginates*. Thèse CNRS, Université Joseph-Fourier de Grenoble I, Grenoble, France (1989).

[6] Bo Guo, Arnljot Elgsaeter, Bjorn T. Stokke, *Gelification kinetics of scleraldehyde-chitosan co-gels*, Polymer Gels and Networks, 6, 113-135 (1998).

[7] Bjørn T. Stokke, Kurt I. Draget, Olav Smidsrød, Yoshiaki Yuguchi, Hiroshi Urakawa and Kanji Kajiwara, *Small-Angle X-ray Scattering and Rheological Characterization of Alginate Gels I. Ca-Alginate Gels*, Macromolecules, 33, 1853-1863 (2000).

[8] H.H. Winter et F. Chambon, *Linear viscoelasticity at the gel point of a crosslinking PDMS with imbalanced stoichiometry*, J. Rheol., 31, 683-697 (1987).

[9] M. In et R.H. Prud'homme, *Fourier transform mechanical spectroscopy of the sol-gel transition in zirconium alkoxide ceramic gels*, Rheology Acta, 32, 556-565 (1993).

[10] M. Muthukumar, *Screening effect on viscoelasticity near the gel point*, Macromolecules, 22, 4656-4658 (1989).

[11] Société Kelco International, *Les alginates, comment les gélifier ?*

[12] Y. Pocker et E. Green, *Hydrolysis of D-Glucono-d-lactone : I. General acid-base catalysis, solvent deuterium isotope effects and transition state characterisation*, J. Am. Chem. Soc. 95, 113-119 (1973).

[13] H. H. Winter, *Polymer gels, materials that combine liquid and solid properties*, MRS Bulletin, 44-48 (1991).

[14] C. Y. M. Tung et P. J. Dynes, *Relationship between Viscoelastic Properties and Gelation in Thermosetting Systems*, J. Appl. Polym. Sci., 27, 569-574 (1982).

Abstract

Temperature effect on the gelation kinetics of chitosan and alginate studied with rheology

Chitosan and alginate are biopolymers in the family of polysaccharides. Their physico-chemical and biological properties (biocompatibility, healing and chelating properties...) make them very useful for many biomedical, food, environmental and agricultural applications [1, 2]. The hydrogel formation is one of the most appreciated characteristics for these applications. The gelation process is different for these two polymers [3]. Chitosan is chemically cross-linked by covalent bonds between chitosan amine groups and a dialdehyde such as glyoxal [4]. Ionic interactions between divalent cations such as calcium and the alginate chains lead to the formation of a physical network [5]. Many studies were carried out to characterize these biopolymers but the gel formation kinetics has not yet been systematically studied with rheology.

We present in this paper a study of the gelation kinetics of these two polysaccharides as a function of temperature by small amplitude shear oscillatory measurements.

The storage modulus G' and loss modulus G'' have been measured as a function of time at several frequencies. The frequency dependence of G' and G'' are found to be well-described by a power law at a characteristic time defined as the gelation time t_g according to Winter's criterium [6,7]:

$$G'(\omega) \sim G''(\omega) \sim \omega^\Delta \text{ with } \omega_1 < \omega < \omega_0 \quad (1)$$

The relaxation exponent Δ whose values lie between 0 (elastic gel) and 1 (viscous gel) can be determined at the gelation time by:

$$G''(\omega) / G'(\omega) = \text{cst} = \tan(\Delta\pi/2) \quad (2)$$

This behaviour is due to a self-similar structure of the gel characterized by a fractal dimension deduced from Δ [12].

The verification of the Winter's criterium for alginate is given in Figures 1 and 2. For both polysaccharides the decrease of the gelation time with an increase of the temperature is well described by an Arrhenius type law (Figure 3).

It is then possible to determine an apparent activation energy that is higher for chitosan ($E_a=120\text{kJ/mol}$) than for alginate ($E_a=32\text{kJ/mol}$). This result can be explained by the different nature

of bonds involved in the gelation process of each gel.

On the other hand the temperature independence of the relaxation exponent indicate that this parameter has no significant effect on the structures at the gelation time. Moreover the values of the relaxation exponent are in a same order of the ones found in the literature for different gels [7].