

Vincenzo Villani

Laboratorio di Chimica delle Macromolecole, Dipartimento di Scienze, Università della Basilicata

✉ vincenzo.villani@unibas.it

Proprietà viscosimetriche della gelatina di collagene*

RIASSUNTO Le misure al viscosimetro rotazionale con accurato controllo della temperatura sono capaci di caratterizzare il comportamento reologico della gelatina di collagene. L'organizzazione dell'apparato sperimentale e le procedure di misura adottate permettono lo studio didattico (in particolar modo nella scuola secondaria ad indirizzo chimico) di un materiale polimerico d'uso comune la cui manipolazione è completamente innocua, mettendo in luce una ricca galleria di comportamenti di chimica-fisica dei polimeri.

Introduzione

La gelatina è un materiale tanto comune quanto complesso dal punto di vista chimico.

Se lasciamo riposare un brodo di carne o di pesce, possiamo osservare la formazione di un solido gelatinoso. Il prelibato *pollo in gelatina* si ottiene tenendo a bollire pollo e stinco di maiale per almeno sette ore: è quest'ultimo a fornire il collagene necessario. Infine, la carne e il brodo tenuti in frigorifero, vengono utilizzati per preparare le appetitose terrine (Figura 1).

La pelle, l'osso, la cartilagine, i tendini sono ricchi di fibre di collagene, una proteina strutturale dall'elaborata morfologia in fasci di fibre, fibrille, eliche.



Fig. 1 Terrina di pollo in gelatina

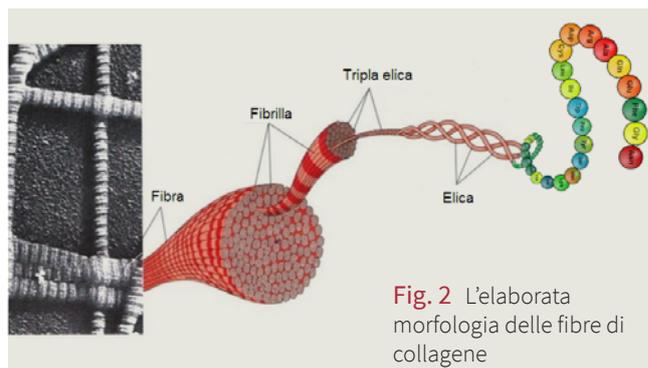


Fig. 2 L'elaborata morfologia delle fibre di collagene

Il collagene estratto dalla prolungata ebollizione in condizioni acide o basiche si denatura e idrolizza: la tripla elica si srotola in catene singole e frammentate, dando luogo alla soluzione acquosa di polipeptidi alla base della gelatina (Figura 2). Dal punto di vista chimico-fisico la gelatina è un *hydrogel*, ovvero uno speciale materiale solido (*soft matter*) costituito fino al 99% di acqua e da lunghe catene polimeriche il cui groviglio (stabilizzato dalla formazione di legami idrogeno) forma la rete estesa di macromolecole che intrappola l'acqua alla base dello stato gelatinoso.

In generale, gli *hydrogel* sono detti *fluidi plastici* (o *fluidi di Bingham*), sono solidi fino a uno sforzo critico (*sforzo di soglia*), al di sopra del quale la rete *gel* si disfa formando una dispersione liquida di aggregati isolati, detta *sol*.

Gli *hydrogel* sono oggi materiali all'avanguardia in settori avanzati, dalla cosmetica alla medicina, dall'alimentazione alla Difesa. Un obiettivo ambito della Ricerca è quello di replicare il *tessuto connettivo* dei vertebrati, coltivando cellule in un mezzo biocompatibile, ottenendo un tessuto biologico da poter impiantare nel corpo del paziente. Le cellule della pelle, vasi sanguigni, polmoni, ... sono disperse in una *matrice extracellulare* a base di elastina, collagene, polisaccaridi, proteoglicani, ... e naturalmente tanta

* Dedicato a Giorgio Parisi Premio Nobel per la Fisica 2021 per le ricerche sui Sistemi Complessi, dove sono date le leggi dell'equilibrio tra ordine e disordine.

acqua. L'obiettivo è di usare un *hydrogel* come *impalcatura (scaffold)* per mimare la matrice extracellulare in cui seminare e coltivare le specifiche cellule del tessuto connettivo, ad esempio i pneumociti dei polmoni, moltiplicarli usando fattori di crescita e stimoli meccanici, realizzando in questo modo un tessuto biologico artificiale: un sogno che la *tissue engineering* ha trasformato in realtà. A questo scopo è necessario un *hydrogel* stabile a 37 °C, cosa che non vale per la gelatina di collagene usuale.

Dunque, la gelatina è un *hydrogel* naturale e rappresenta un modello di quelli artificiali (a base di polivinilalcol, polietilenglicole, poliacrilati, polipeptidi di sintesi, gelatina di collagene non denaturato, ...) con i quali condivide tutta la complessità chimico-fisica. Come tutti i materiali polimerici solidi, è caratterizzato da un modulo elastico (in questo caso molto basso) che ne indica la resistenza meccanica e da grandezze dinamico-meccaniche che ne caratterizzano le proprietà viscoelastiche, evidenziandone il carattere complesso di solido e liquido. Al contrario, una soluzione acquosa di gelatina è caratterizzata dalla viscosità (circa 5 mPa s a 30 °C) che la rende più viscosa dell'acqua (1 mPa s), ma molto meno dell'olio d'oliva (50 mPa s) e simile ad una soluzione acquosa di glicerina (10 mPa s). Lo stato *sol* ha caratteristiche intermedie tra la soluzione e lo stato *gel*, con una viscosità dell'ordine di 100 - 1.000 mPa s a 20 °C e un comportamento non-newtoniano; quello *gel* ha viscosità superiori a 25.000 mPa s a 12 °C (ricordiamo che la viscosità del miele varia tra 2.000 - 10.000 mPa s) per sforzi al di là della soglia di scorrimento.

Apparato e procedura sperimentale

È possibile condurre esperimenti sufficientemente semplici per caratterizzare il comportamento viscosimetrico della soluzione acquosa, dell'*hydrosol* e dell'*hydrogel* della gelatina di collagene. Saranno evidenziate le esigenze sperimentali e la ricchezza concettuale che questa sperimentazione fornisce. Innanzitutto, è necessario realizzare una soluzione acquosa di gelatina. A questo scopo utilizziamo la gelatina animale in fogli per uso alimentare, nota come *Colla di pesce (Gelatina in fogli, Paneangeli)*. Questi fogli sono nello stato di solido amorfo, trasparente, flessibile, con rottura fragile in modo simile ad una sottile lastra di vetro. Il loro peso è ben calibrato dal produttore e corrisponde a circa 3,6 g, sufficiente a gelificare 500 ml d'acqua.

Sciogliamo i fogli di gelatina in 330 ml d'acqua distillata: il volume del nostro contenitore, adatto ad ospitare la girante del viscosimetro rotazionale. Affinché questo sia possibile, è necessario riscaldare



Fig. 3 Il viscosimetro Brookfield accoppiato al bagno termostatico

ad una temperatura $T \geq 40$ °C. Inseriamo il portacampione nel *becher incamiciato e termostato* accoppiato al viscosimetro rotazionale per assicurare il controllo della temperatura.

Le misure viscosimetriche sono effettuate mediante un viscosimetro rotazionale del tipo *Brookfield* (un'apparecchiatura che ha costi contenuti). In questo modo, determiniamo la viscosità della soluzione in funzione del tempo di scorrimento, della velocità di rotazione applicata, della temperatura e della concentrazione della soluzione. (Figura 3).

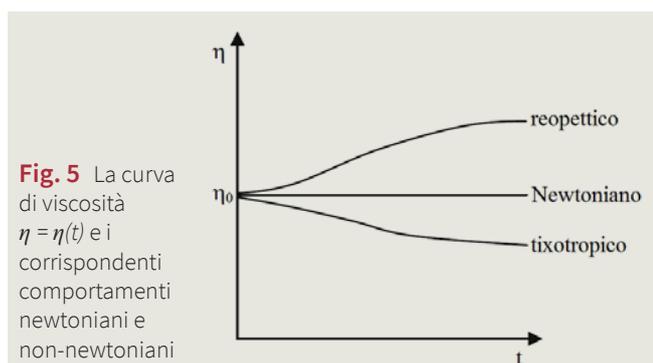
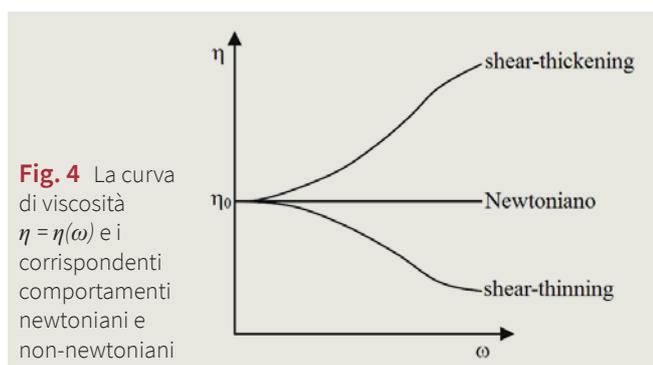
Il *viscosimetro Brookfield* misura la resistenza alla rotazione di un cilindro d'acciaio di dimensioni calibrate (detto rotore o girante) immerso nel liquido in esame. All'interfaccia rotore-liquido abbiamo lo *sforzo di taglio* τ determinato dal *momento torcente* M applicato che determina la *velocità di rotazione* ω . L'apparecchiatura misura il momento meccanico M corrispondente alla velocità angolare ω applicata e tenendo conto della geometria del sistema mediante la costante K calcola la viscosità η :

$$\eta = K \cdot \frac{M}{\omega}$$

In generale, la viscosità è una funzione delle variabili chimico-fisiche del sistema: velocità e tempo di scorrimento, temperatura, concentrazione, peso molecolare del soluto, acidità e forza ionica della soluzione, polarità del soluto e del solvente.

$$\eta = f(\omega, t, T, c, m, pH, I, \text{soluto}, \text{solvente}...)$$

Mediante il viscosimetro rotazionale determiniamo le *curve di viscosità* in funzione del tempo di scorrimento e della velocità angolare al variare della temperatura e della concentrazione della soluzione. Se la viscosità del fluido è indipendente dalla velocità



di rotazione, la curva di viscosità $\eta(\omega) = \eta_0$ è una retta costante, e il fluido è detto *newtoniano* $\eta = \eta_0$ in caso contrario, è detto *non-newtoniano*. Se si osserva una diminuzione della viscosità all'aumentare della velocità di rotazione, il fluido è detto *pseudoplastico* (comportamento *shear-thinning*); se osserviamo un aumento della viscosità, il fluido è detto *dilatante* (comportamento *shear-thickening*) (Figura 4).

In genere, i polimeri liquidi (*polymer melt*) sono pseudoplastici, mentre le dispersioni fluide di micro-particelle sono dilatanti.

Operando a velocità di rotazione costante $\omega = \omega_0$, se la viscosità di un liquido è costante durante la misura della curva di viscosità in funzione del tempo di scorrimento $\eta(t) = \eta_0$ il comportamento è detto newtoniano; al contrario, se la viscosità diminuisce il fluido è detto *tixotropico*, se aumenta è detto *reopettico* (Figura 5).

Alla transizione *gel-sol* corrisponde il comportamento tixotropico di diminuzione della viscosità; alla transizione inversa *sol-gel* quello reopettico.

L'*hydrogel* presenta uno *sforzo di soglia allo scorrimento*, ovvero per sforzi minori di questo valore critico, risulta solido: è il motivo per cui la gelatina non scorre giù dalla torta! Tuttavia, per sforzi appena maggiori, la gelatina scorre come un liquido newtoniano o non-newtoniano: è il motivo per cui appare così soffice.

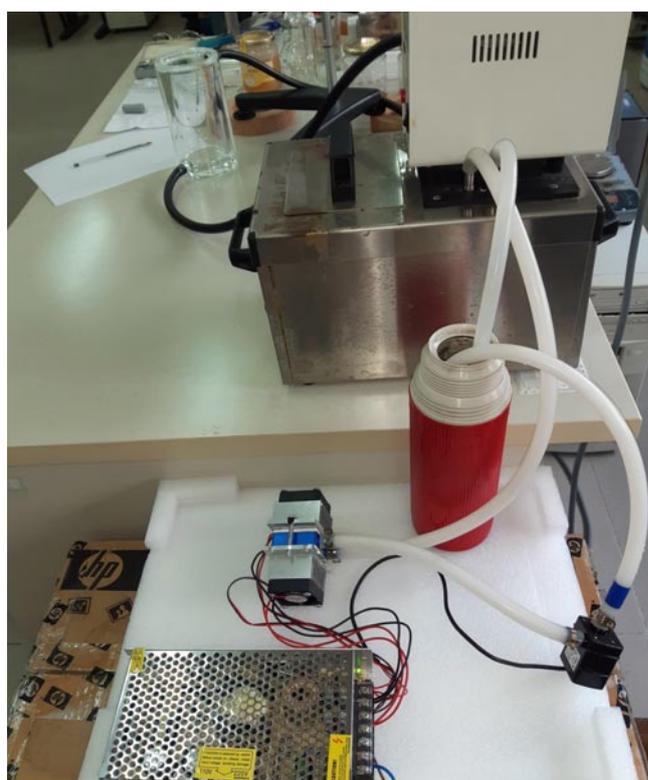


Fig. 6 Il circuito refrigerante basato sulla cella di Peltier accoppiato al bagno termostatico

La viscosità di una soluzione dipende sensibilmente dalla temperatura. In generale, si ottiene una diminuzione esponenziale della viscosità all'aumentare della temperatura, secondo un'equazione tipo Arrhenius: dove E_a è l'*energia d'attivazione* del processo di scorrimento viscoso, nel nostro caso pari a circa 3 kcal mol^{-1} . Pertanto, è fondamentale studiare la viscosità in condizioni di temperatura accuratamente controllate.

Affidiamo il controllo della temperatura ad un bagno termostatico programmabile (*Haake DC10*) accoppiato al viscosimetro. Affinché sia possibile in modo semplice ed efficiente lavorare a temperature inferiori a quell'ambiente, il bagno termostatico deve essere dotato di un sistema refrigerante. Se il bagno termostatico non è equipaggiato con un criostato, è possibile operare in vario modo. Un metodo semplice è quello di realizzare un *ponte termico* tra il bagno termostatico e un bagno freddo esterno a temperatura costante (ad esempio a base di ghiaccio e cloruro di sodio): il ponte termico è ottenuto mediante un buon conduttore metallico (ad esempio un collegamento in rame o più semplicemente, un foglio d'alluminio arrotolato) coibentato che peschi nei due bagni; si realizza in questo modo un *dito freddo* che assicura un blando raffreddamento a temperature inferiori a quella ambiente. Alternativamente, possiamo sfruttare la possibilità di refrigerare il bagno



Fig. 7 La gelatina solida rammollisce in acqua a 32 °C



Fig. 8 La soluzione acquosa di gelatina a 38 °C



Fig. 9 L'*hydrocolloid* di gelatina a 21 °C

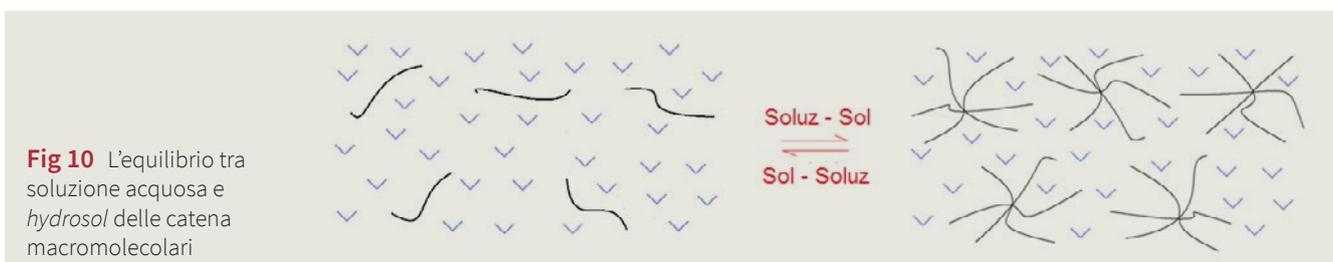


Fig. 10 L'equilibrio tra soluzione acquosa e *hydrocolloid* delle catene macromolecolari

termostatico mediante la circolazione di un fluido freddo nella serpentina di raffreddamento in dotazione al bagno. Nel caso più semplice utilizziamo l'acqua corrente. Il metodo può essere ottimizzato raffreddando l'acqua in ingresso mediante uno scambiatore termico, ad esempio una serpentina di rame immersa nel bagno freddo. In questo modo è possibile partire agevolmente da una temperatura di 20 °C. Comunque, il metodo più razionale è risultato quello di realizzare un circuito refrigerante esterno mediante un fluido raffreddato da una *cella di Peltier* (Figura 6) e fatto circolare da una pompa, inserendo in serie un serbatoio termostatico. Utilizzando una cella frigorifera di Peltier (alimentata a 12 V da una corrente di 5 mA) è agevole partire da temperature prossime ai 10 °C.

La soluzione acquosa di gelatina è preparata a $T = 40$ °C: a temperature maggiori comincia l'idrolisi

dei legami peptidici e la riduzione del peso molecolare delle catene polipeptidiche.

Abbiamo verificato che il foglio solido di gelatina rammollisce in acqua a $T = 32$ °C (temperatura di transizione vetrosa) (Figura 7) e la soluzione omogenea è ottenuta a partire da $T = 38$ °C (Figura 8).

Se la soluzione omogenea è raffreddata, a circa 20 °C, otteniamo un fluido opalescente a causa della formazione della fase *hydrocolloid* (Figura 9).

A livello molecolare le catene isolate della soluzione omogenea si aggregano in ammassi isolati formando la dispersione acquosa dello stato *sol* (Figura 10).

Se raffreddiamo l'*hydrocolloid* a temperature intorno ai 10 °C, si realizza l'*hydrogel* che presenta lo sforzo di soglia allo scorrimento: capovolgendo il contenitore, il materiale non scorre mostrando il suo stato solido (Figura 11). Tuttavia, applicando uno sforzo di taglio



Fig. 11 L'*hydrogel* di gelatina a 12 °C

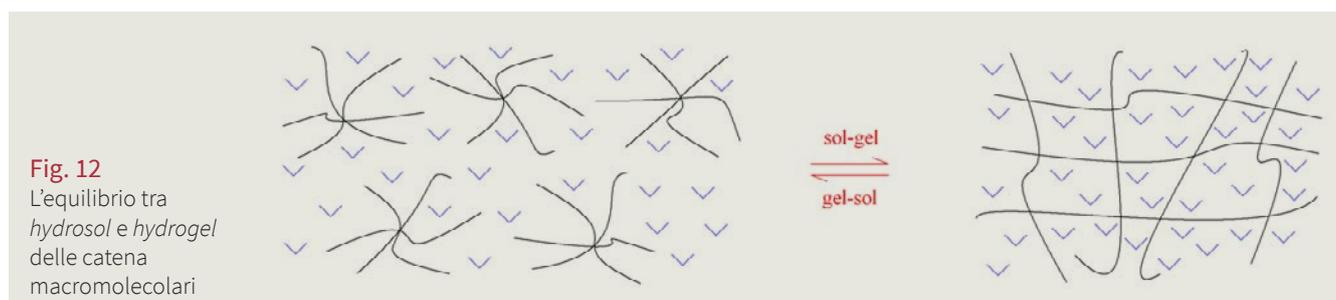


Fig. 12
L'equilibrio tra
hydrosol e *hydrogel*
delle catene
macromolecolari

maggiore del limite di scorrimento, l'*hydrogel* inizia a fluire.

A livello molecolare gli ammassi isolati della dispersione acquosa dello stato *sol*, si aggregano formando la rete connessa estesa all'intero campione dello stato *gel* che risulta pertanto solido al disotto dello sforzo di taglio critico (Figura 12).

Alla superficie della gelatina, tenuta in frigo alla temperatura di 12 °C, dopo alcuni giorni si formano colonie di muffe varie. In Figura 13 muffe del genere *Penicillium* sono prosperate e uno spesso strato di *hydrogel* appare ridotto a *hydrosol*: gli enzimi proteolitici delle colonie hanno idrolizzato le lunghe catene polipeptidiche, rompendo la rete estesa e riformando ammassi isolati.

I problemi connessi al controllo della temperatura possono essere alquanto problematici quando si ha a che fare con volumi consistenti di sostanze con alta capacità termica. Per ampliare il campo operativo delle temperature, è necessario assicurarsi che la temperatura sia uniforme in tutto il campione: utilizzando un portacampione di 330 ml, questa condizione non è banale. A tale scopo è necessario verificare mediante un accurato termometro o una termocoppia immersa che la temperatura della soluzione in esame corrisponda a quella desiderata. Per facilitare il raggiungimento dell'equilibrio termico facciamo ricorso all'agitazione meccanica della soluzione e inseriamo il portacampioni prima in un bagno freddo (per raffreddare rapidamente la soluzione), equilibrandolo infine, sotto agitazione, nel bagno termostatico alla temperatura richiesta.

Misure viscosimetriche e discussione dei risultati

Abbiamo preparato una soluzione acquosa di gelatina di collagene di 330 ml a tre diverse concentrazioni utilizzando 1 foglio (3,52 g, soluzione A), 2 fogli (7,17 g, soluzione B) e 3 fogli (10,0 g, soluzione C) di Colla di pesce.

In Figura 14 sono riportate le curve di viscosità della soluzione acquosa B in funzione del tempo di scorrimento (10 minuti) alla velocità angolare di 60 rpm



Fig. 13 L'*hydrogel* colonizzato e idrolizzato a *hydrosol* dalle colonie di *Penicillium*

(rate per minute) variando la temperatura da 40 a 24 °C.

Le curve di viscosità risultano costanti tra 40 - 26 °C evidenziando un comportamento newtoniano. A 24 °C osserviamo il comportamento reopettico corrispondente alla transizione dalla soluzione acquosa omogenea alla dispersione dell'*hydrosol* con la formazione degli ammassi isolati di catene. Da 40 a 35 °C osserviamo una diminuzione della viscosità e successivamente l'atteso aumento esponenziale al diminuire della temperatura. Il comportamento anomalo a 35 °C corrisponde alla transizione disordine-ordine dalla conformazione disordinata *random-coil* delle catene in soluzione a 40 °C alla conformazione ordinata a elica a 35 °C (Figura 15). La caduta di viscosità è dovuta sia alla facilità delle eliche ad orientarsi con il flusso in virtù della forma idrodinamica

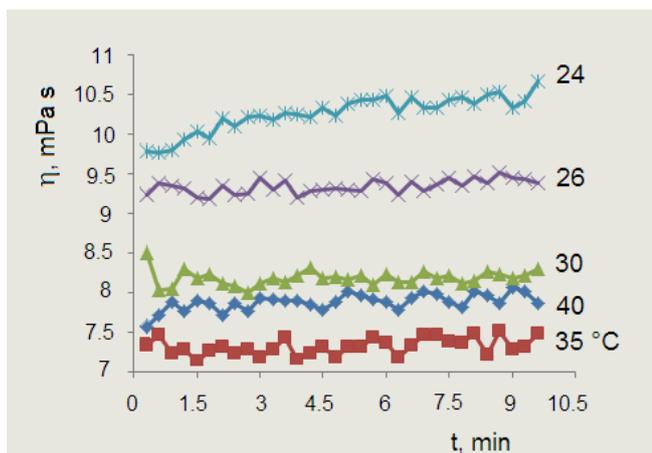


Fig. 14 Curve di viscosità in funzione del tempo $\eta(t)$ per la soluzione acquosa A di gelatina tra 24 e 40 °C e alla velocità angolare di 60 rpm

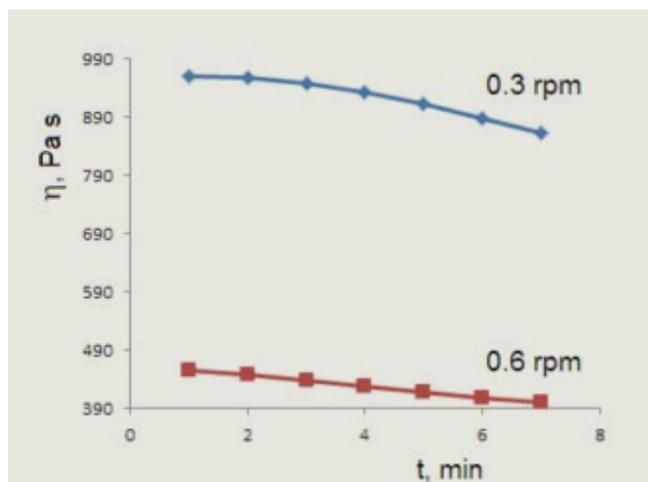


Fig. 16 Curve di viscosità in funzione del tempo $\eta(t)$ dell'hydrogel B a 21 °C e alle velocità angolari di 0,3 e 0,6 rpm

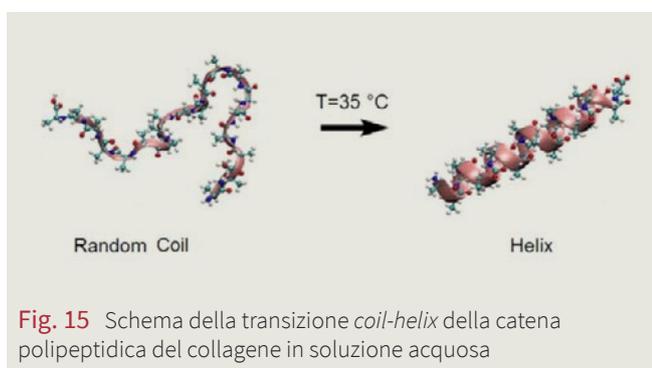


Fig. 15 Schema della transizione *coil-helix* della catena polipeptidica del collagene in soluzione acquosa

mica dell'elica e sia alla riduzione delle interazioni di legame idrogeno tra soluto e solvente: interazioni che per l'elica sono prevalentemente di natura intramolecolare.

In Figura 16 sono riportate le curve di viscosità dell'hydrogel B alle velocità di 0,3 e 0,6 rpm a 21 °C. Osserviamo un forte aumento della viscosità rispetto alla soluzione omogenea in corrispondenza della formazione dello stato *sol* e un comportamento non-newtoniano sia rispetto alla velocità (*shear-thinning*, orientamento delle catene con il flusso) sia rispetto al tempo (tixotropia, apertura degli ammassi di catena).

In Figura 17 la curva di viscosità in funzione della velocità di rotazione dell'hydrogel B a 12 °C mostra elevati valori di viscosità e un comportamento fortemente non-newtoniano (*shear-thinning*): per sollecitazioni al di sopra del limite di scorrimento la rete di catene tende a disfarsi all'aumento della velocità di deformazione.

In Figura 18 sono riportate le curve di viscosità della soluzione acquosa concentrata C. A tutte le temperature osserviamo un comportamento non-newtoniano reopettico e l'atteso aumento della viscosità al diminuire della temperatura.

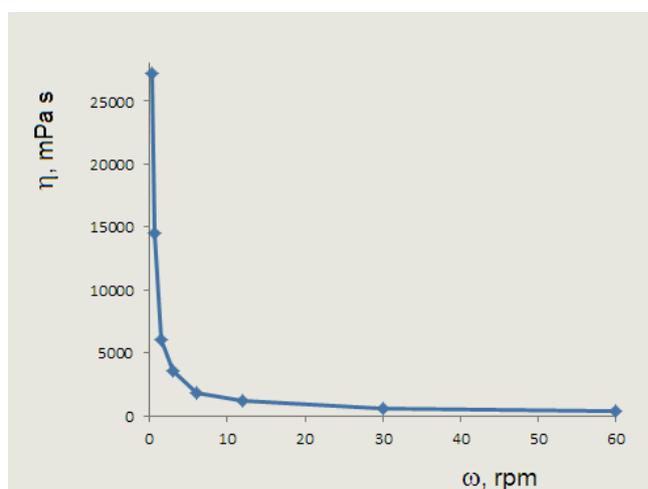


Fig. 17 Curva di viscosità a 12 °C in funzione della velocità angolare $\eta(\omega)$ per l'hydrogel di gelatina A

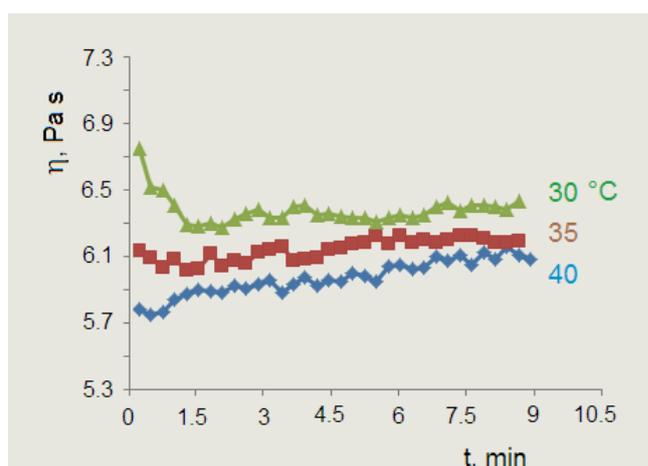


Fig. 18 Curve di viscosità in funzione del tempo $\eta(t)$ per la soluzione acquosa C di gelatina tra 30 e 40 °C alla velocità angolare di 60 rpm

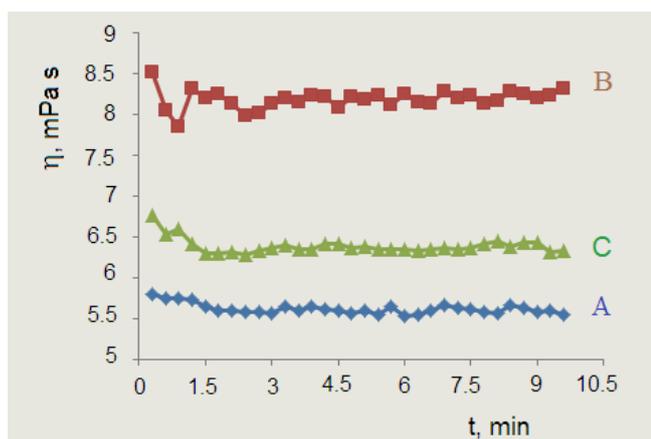


Fig. 19 Curve di viscosità in funzione del tempo $\eta(t)$ per le soluzioni acquose A, B e C di gelatina alla temperatura di 30 °C e alla velocità angolare di 60 rpm

In Figura 19 sono messe a confronto le curve di viscosità in funzione del tempo a 30 °C e 60 rpm alle concentrazioni A, B e C. La transizione coil-elica è avvenuta in tutti i casi; pertanto, le catene prevalentemente in conformazione elicoidale ed osserviamo un comportamento newtoniano. Passando da A a B abbiamo l'atteso aumento di viscosità. Tuttavia, aumentando ulteriormente la concentrazione da B a C osserviamo un'anomala diminuzione di viscosità. Questa diminuzione è da attribuire alla transizione detta *liotropica* da fase *isotropica* a *mesofase liquido-cristallina*: in corrispondenza di un valore critico di concentrazione, le eliche orientate in modo casuale (isotropico) si orientano parallelizzando l'asse di catena (fase *nematica* liquido-cristallina). Si tratta di una transizione liquido-cristallina: l'orientamento delle catene con il flusso dà luogo alla caduta di viscosità osservata (Figura 20).

Conclusioni

In conclusione, le misure al viscosimetro rotazionale con accurato controllo della temperatura hanno permesso di caratterizzare il comportamento viscosimetrico della soluzione acquosa, dell'*hydrosol* e dell'*hydrogel* della gelatina di collagene. In modo sufficientemente semplice, abbiamo evidenziato un comportamento reologico quanto mai ricco e complesso: il comportamento newtoniano delle soluzioni

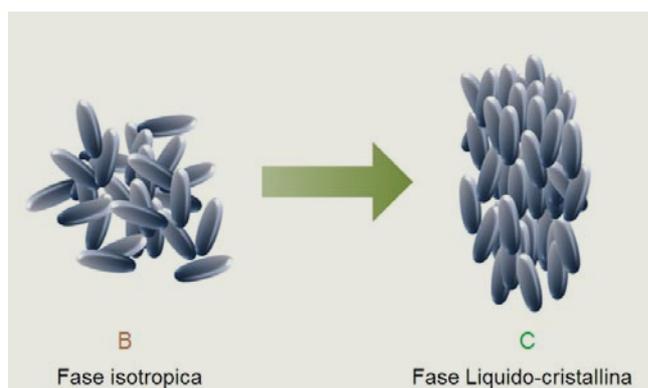


Fig. 20 Schema della transizione liquido-cristallina dalla fase disordinata alla mesofase ordinata della soluzione acquosa di gelatina

diluite, reopettico di quelle concentrate; non-newtoniano (*shear-thinning* e reopettico) dell'*hydrosol* e tixotropico dell'*hydrogel* al di sopra del limite di scorrimento. Inoltre, sono state messe in luce le transizioni disordine-ordine (*coil-helix*) in soluzione acquosa a 35 °C e liquido-cristallino (liotropica, fase isotropica-fase nematica) a 30 °C in corrispondenza della concentrazione critica.

L'organizzazione dell'apparato sperimentale e le procedure adottate permettono lo studio didattico di un materiale d'uso comune la cui manipolazione è completamente innocua, mettendo in luce in modo esemplare i più importanti comportamenti di reologia dei polimeri dal punto di vista viscosimetrico. ■

Testi di approfondimento

- J. Alipal, et al. A review of gelatin: Properties, sources, process, applications, and commercialisation, *Material Today: Proceedings*, 2021, 42.
- N. Grizzuti, *Reologia dei materiali polimerici: scienza ed ingegneria*, Edizioni Nuova Cultura, 2012.
- V. Villani, *Lezioni di Scienza dei Materiali Polimerici*, Aracne Editrice, 2020.
- V. Villani, *Lezioni di Chimica e Tecnologia dei Polimeri*, Aracne Editrice, 2021.