

**Titre:** Propriétés viscoélastiques d'hydrogels de chitosane avec acides organiques et inorganiques  
Title: organiques et inorganiques

**Auteur:** Mélina Hamdine  
Author:

**Date:** 2004

**Type:** Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

**Référence:** Hamdine, M. (2004). Propriétés viscoélastiques d'hydrogels de chitosane avec acides organiques et inorganiques [Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie. <https://publications.polymtl.ca/7391/>  
Citation:

## Document en libre accès dans PolyPublie Open Access document in PolyPublie

**URL de PolyPublie:** <https://publications.polymtl.ca/7391/>  
PolyPublie URL:

**Directeurs de recherche:** Marie-Claude Heuzey, & André Bégin  
Advisors:

**Programme:** Non spécifié  
Program:

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

PROPRIÉTÉS VISCOÉLASTIQUES D'HYDROGELS DE CHITOSANE  
AVEC ACIDES ORGANIQUES ET INORGANIQUES

MÉLINA HAMDINE  
DÉPARTEMENT DE GÉNIE CHIMIQUE  
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION  
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES  
(GÉNIE CHIMIQUE)  
DÉCEMBRE 2004



Library and  
Archives Canada

Published Heritage  
Branch

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

Bibliothèque et  
Archives Canada

Direction du  
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file Votre référence*

*ISBN: 0-494-01336-2*

*Our file Notre référence*

*ISBN: 0-494-01336-2*

#### NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

#### AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

---

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé :

PROPRIÉTÉS VISCOÉLASTIQUES D'HYDROGELS DE CHITOSANE  
AVEC ACIDES ORGANIQUES ET INORGANIQUES

présenté par : HAMDINE Mélina

en vue de l'obtention du diplôme de : Maîtrise ès sciences appliquées  
a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

M. TANGUY Philippe, Ph.D., président

Mme HEUZEY Marie-Claude, Ph.D., membre et directrice de recherche

M. BÉGIN André, Ph.D., membre et codirecteur de recherche

Mme TURGEON Sylvie, Ph.D., membre

## **REMERCIEMENTS**

Mes remerciements s'adressent à :

Madame Marie-Claude Heuzey pour son encadrement, la confiance qu'elle m'a témoignée et son soutien tout au long de cette maîtrise; aussi pour m'avoir permis d'entreprendre cette belle expérience scientifique et humaine au Québec.

Monsieur André Bégin pour m'avoir accueillie au sein du Centre de Recherche et Développement sur les Aliments (CRDA) et avoir mis à ma disposition les équipements nécessaires pour mener à bien ma recherche.

Monsieur Pierre Carreau pour m'avoir accueillie au sein de son groupe de recherche sur les polymères (CRASP) et m'avoir fait profiter de ses recommandations et discussions avec les autres étudiants du groupe.

Enfin mes amis Catherine Billotte et Pascal Vuillaume, tout le personnel du CRDA et du CRASP ainsi que les étudiants à la maîtrise et au doctorat pour leur aide et leur sympathie.

## RÉSUMÉ

Le chitosane, un des rares polysaccharides chargé positivement, a connu ces dernières années un intérêt croissant grâce à ses groupements amines très réactifs, qui lui permettent d'être complexé avec des polymères naturels chargés négativement tels que le xanthane, les protéines, ou de synthèse tel le polyvinyle alcool. Ses applications sont nombreuses, entre autres, le traitement des eaux, l'agriculture, le biomédical, la cosmétologie et le domaine alimentaire comme supplément diététique. Une autre voie de valorisation de ce sous produit intéressant et peu coûteux serait son utilisation en tant qu'agent texturant similairement aux protéines, gélatines, et pectine et/ou comme conservateur alimentaire vu ses propriétés antibactériennes.

Dans ce projet, nous nous sommes intéressés à obtenir des gels thermoréversibles de chitosane de haut poids moléculaire par interactions non covalentes avec des acides en solution. Dans un premier temps, plusieurs acides ont été testés afin de recenser les différents mécanismes régissant la gélification. Dans un deuxième temps, deux systèmes (l'un potentiellement alimentaire, l'autre de comparaison) ont été retenus pour mettre en évidence l'effet de paramètres tels que les concentrations du biopolymère et de l'acide, le type d'anion, le temps et la température de gélification. Ces deux systèmes sont dans l'ordre, le chitosane - acide phosphorique et le chitosane - acide oxalique. La caractérisation a été réalisée en utilisant différentes techniques : la rhéologie, la calorimétrie différentielle, la mesure de pH et la microscopie optique à lumière polarisée.

Les systèmes obtenus avec les différents acides ont été classés en gels et solutions enchevêtrées selon leurs modules viscoélastiques  $G'$  et  $G''$  à 10°C, leur énergie apparente d'activation  $E_a$  et la présence ou non de biréfringence.

Les interactions entre la macromolécule et l'acide ont semblé être gouvernées par: la structure chimique et la longueur de chaîne de l'acide ainsi que le type du contre ion

mis en jeu. Dans l'acide chlorhydrique, la gélification a été produite par neutralisation du biopolymère à pH = 6,2 à sa limite de solubilisation; tandis que dans l'acide oxalique et phosphorique, la gélification a été générée à pH < 2 par des interactions ioniques simples entre les anions monovalents HOOC-COO<sup>-</sup> et H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> et le biopolymère chargé positivement. La structure gélifiée a été stabilisée par des liaisons hydrogènes dont l'influence a été démontrée par la chute des propriétés rhéologiques observée après ajout de l'urée.

L'acide sulfurique a également donné un gel à pH < 2 par non seulement des interactions ioniques simples dues à la présence des anions H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub><sup>-</sup> mais aussi par pontage ionique entre les chaînes du biopolymère grâce aux anions divalents SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>. Ce gel a montré un plus important module élastique, probablement à cause du faible volume moléculaire de ses deux contre ions (43,4019 et 44,0620 Å<sup>3</sup>) qui a permis un plus important rapprochement des sites de liaisons hydrogènes sur les chaînes macromoléculaires. Dans tous les systèmes étudiés, la présence d'interactions hydrophobes ne peut être négligée à cause des hautes concentrations et du haut poids moléculaire de chitosane utilisé.

L'effet de la concentration du biopolymère et de l'acide a été mis en évidence par des tests rhéologiques dynamiques à température constante (25°C). La gélification a eu lieu lorsque la concentration de biopolymère a excédé une certaine concentration critique ( $C_{gel}$ ) décrivant deux régimes : un régime de concentration à  $C < C_{gel}$  où les modules viscoélastiques ont été dépendants de la fréquence, et un régime de gélification où  $G'$  et  $G''$  ont été indépendants de la fréquence.

L'effet de la concentration de l'acide a été différent entre l'acide phosphorique et l'acide oxalique. Le contre ion mis en jeu a semblé influencer la rigidité et par conséquent la conformation de la macromolécule.

La cinétique de gélification a également été étudiée en effectuant des tests rhéologiques dans le temps à 6,28 rad/s et 10°C. Elle s'est déroulée en trois phases distinctes : une phase de latence ou d'incubation, une phase d'accélération où  $G'$  croît très rapidement par rapport à  $G''$  et une phase lente où  $G'$  tend à atteindre l'équilibre. L'application des lois de puissance reliées à la loi de percolation a permis de calculer un exposant de relaxation de 0,55 pour les gels à l'acide oxalique et à l'acide phosphorique, tous deux proches de celui d'un gel chimique en équilibre stoechiométrique (0,5).

Des transitions sol-gel et gel-sol ont été déterminées respectivement par mesure rhéologique dynamique à 6,28 rad/s et un taux de refroidissement de 3°C/min de 80 à 10°C, et par mesure calorimétrique à un taux de chauffe de 20 °C/min, dans le même intervalle de température.  $T_{\text{sol-gel}}$  a été détectée à 50°C pour le système oxalique et à 40°C pour le système phosphorique. Ces tests ont également révélé leur caractère thermoréversible.

## ABSTRACT

Due to the very reactive amine groups, chitosan is cationic in weak acidic aqueous media and therefore can interact with many anionic polymers, synthetic or natural such as carboxylmethyl cellulose, carrageenan, xanthan and polyvinyl alcohol. It can be used in waste water treatment, in agriculture, in biomedical fields, in cosmetology, and in food and dietary as a food-supplement to reduce plasma cholesterol content in the blood. As a food ingredient, chitosan has great potential; it can be used as a gelling or texturing agent just like proteins, gelatins and pectin or as a preservative.

In this project, our objective was to produce chitosan thermally reversible gels by non covalent interactions with different acidic solutions. In the first step, we tested various acids (organic and inorganic) varying their valence, their chain length and their chemical structure, aiming to explore gelation feasibility and explain it in terms of solution physicochemistry, and to select two systems (one potential food system and one for comparison). In the second step, parameters such as polymer concentration, solvent concentration, counter-ion type, time and temperature have been examined to see their effect on gelation. Different techniques such as rheology, differential scanning calorimetry, pH-metry and polarizing optical microscopy were used to investigate gelation mechanisms.

Frequency sweep tests at 10°C (maturation temperature) allowed to classify all the systems into gels and entangled solutions according to their viscoelastic moduli. This classification was in concordance with the apparent activation energy and birefringence results.

It seemed that chitosan-acid interactions were governed by: the chemical structure, chain length and the nature of the counter ion in the solution. At pH = 6,2 in

hydrochloric acid, gelation was promoted by neutralization, whereas at pH < 2, in oxalic and phosphoric acids, it was generated gels by simple ionic interactions between the positive macromolecule and the monovalent anions HOOC-COO<sup>-</sup> and H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>. Hydrogen bondings were also present to stabilize the network structure.

At pH < 2, sulfuric acid also enhanced gelation by simple ionic cross linking with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub><sup>-</sup> but also by ionic bridging due to divalent anions SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> present in a small amount. The corresponding gel was the strongest one among all, probably because of the very small counter ions molecular volume (44,0620 and 43,4019 Å<sup>3</sup> respectively) which allowed the macromolecular chains to be closer, and linked by hydrogen bonding.

Effect of parameters such as polymer concentration, acid concentration and counter-ion type was explored by running isothermal dynamic rheological experiments in the linear viscoelastic regime. Gelation occurred when polymer concentration  $C$  was above a certain critical concentration  $C_{\text{gel}}$ . Two distinct regimes were observed: the first corresponded to concentrated regime, where the storage modulus  $G'$  and the complex viscosity  $\eta^*$  increased with a small slope, the second corresponded to the gelling regime where the slope changed and became more abrupt.

Gelation kinetics were also explored at 10°C and a constant frequency (6,28 rad.s<sup>-1</sup>). It was found that it occurred in three steps: gelation incubation; rapid increase of  $G'$ , and a slow stage where  $G'$  reached equilibrium due to the molecular controlled diffusion. At the gel point, scaling laws derived from percolation theory gave a relaxation exponent  $n$  of 0,55 for chitosan-oxalic and chitosan-phosphoric gels.

Thermal transitions were determined by applying respectively temperature sweep tests from 80 to 10°C and a differential calorimetric in the same temperature interval. T<sub>sol-gel</sub> was found to be around 50°C for oxalic gels and 40°C for phosphoric gels.

**TABLE DES MATIÈRES**

REMERCIEMENTS.....	IV
RÉSUMÉ.....	V
ABSTRACT.....	VIII
TABLE DES MATIÈRES.....	X
LISTE DES TABLEAUX.....	XIII
LISTE DES FIGURES.....	XIV
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS.....	XVII
<b>INTRODUCTION ET OBJECTIFS.....</b>	<b>1</b>
<b>ORGANISATION DU MÉMOIRE.....</b>	<b>3</b>
<b>CHAPITRE 1 REVUE DE LA LITTÉRATURE.....</b>	<b>4</b>
1.1 Définition et structure chimique.....	4
1.2 Comportement de la macromolécule en milieux acides.....	4
1.3 Les théories de gélification.....	8
1.3.1 Les théories de percolation.....	9
1.3.2 Les équations constitutives de Winter et Chambon.....	11
1.3.3 Les lois de puissance dérivées de la théorie de percolation.....	13
<b>CHAPITRE 2 MÉTHODOLOGIE.....</b>	<b>18</b>
2.1 Matériaux utilisés.....	18

2.2 Préparation des gels de chitosane.....	19
2.3 Mesures rhéologiques et thermiques.....	19
2.3.1 Balayage en fréquence et spectres des temps de relaxation.....	20
2.3.2 Balayage en temps et transitions thermiques.....	20
2.3.3 Principe de superposition temps température et calcul de l'énergie.....	21
apparente d'activation $E_a$ .....	21
2.4 Mesures des pH.....	22
2.5 Observation au microscope optique à lumière polarisée (MOP).....	22
 <b>CHAPITRE 3 EFFET DES ACIDES ORGANIQUES ET INORGANIQUES SUR LES SOLUTIONS CONCENTRÉES ET LES GELS DE CHITOSANE.....</b>	 25
3.1 Présentation de l'article.....	25
3.2 Effect of organic and inorganic acids on concentrated chitosan solutions and gels.....	26
3.2.1 Abstract.....	26
3.2.2 Introduction.....	27
3.2.3 Methods.....	30
3.2.4 Results and discussion.....	32
3.2.5 Conclusions.....	52
3.2.6 Acknowledgements.....	54
3.2.7 References.....	54
 <b>CHAPITRE 4 PROPRIÉTÉS VISCOÉLASTIQUES D'HYDROGELS DE CHITOSANE DANS LES SOLUTIONS D'ACIDES PHOSPHORIQUE ET OXALIQUE.....</b>	 57
4.1 Présentation de l'article.....	57
4.2 Viscoelastic properties of phosphoric and oxalic acid-based chitosan hydrogels.....	58
4.2.1 Abstract.....	58

4.2.2 Introduction.....	59
4.2.3 Materials and methods.....	65
4.2.4 Results and discussion.....	71
4.2.5 Conclusions.....	97
4.2.6 Acknowledgements.....	98
4.2.7 References.....	98
<b>CHAPITRE 5 DISCUSSION GÉNÉRALE.....</b>	<b>102</b>
5.1 Solubilité et gélification du chitosane.....	102
5.2 Classification des systèmes testés.....	104
5.3 Effet des différents paramètres sur la gélification.....	105
5.3.1 Effet de la concentration du biopolymère sur la gélification.....	105
5.3.2 Effet de la concentration de l'acide et de la nature du contre ion mis en jeu.....	106
5.3.3 Effet du temps de stockage et cinétique de la gélification.....	107
5.3.4 Effet de la température et thermoréversibilité.....	107
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>109</b>
<b>PERSPECTIVES.....</b>	<b>111</b>
<b>RÉFÉRENCES.....</b>	<b>113</b>
<b>ANNEXE 1.....</b>	<b>122</b>

**LISTE DES TABLEAUX**

Tableau 2.1 Structures et pKa des acides testés, tirés de CRC- Handbook of chemistry and physics, 81st edition, D.R. Lide 2000-2001 .....	23
Table 3.1 pH (forces ioniques (M)) des solutions de chitosane.....	35
Table 3.2 Volume moléculaire de contre ions de quelques acides (calculés avec le logiciel CS Chem 3D Ultra version 7.0.0 de Cambridge Park drive (Cambridge,MA)) .....	40
Table 3.3 Énergies apparentes d'activation calculées pour les systèmes concentrés en chitosane (Tref = 293K).....	52
Table 4.1 Forces ioniques et pH à différentes concentrations de polymère .....	68
Table 4.2 Forces ioniques et pH à différentes concentrations d'acide .....	69

## LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 Structures chimiques idéales de la chitine (a) et du chitosane (b) (Roberts 1992). ....	5
Figure 1.2 Grille de distribution des sites et des liaisons de percolation selon de Gennes (1979).....	9
Figure 3.1 Structures chimiques idéales de la chitine (a) et du chitosane (b) (Roberts 1992). ....	29
Figure 3.2 Modules dynamiques et viscosité complexe en fonction de la fréquence pour les gels forts [chitosane 5%-acide sulfurique 0,25M, chitosane 5%- acide oxalique1M, chitosane 5%-acide phosphorique 0,5M] (à 10°C et à une contrainte de 50 Pa) .....	43
Figure 3.3 Modules dynamiques et viscosité complexe en fonction de la fréquence pour le gel faible au HCl [chitosane 5%- acide chlorhydrique 0,25M]. (à 10°C et à une déformation de 0,1) .....	44
Figure 3.4 Modules dynamiques et viscosité complexe en fonction de la fréquence pour quelques exemples de solutions enchevêtrées [chitosane 5%-acide lactique 0,5M, chitosane 5%- acide acétique 1M] (à 10°C et à une déformation de 0,1) .....	45
Figure 3.5 Micrographes MOP de deux gels observés à la température ambiante: a) Chitosane 6%-acide oxalique 0,5 M; b) Chitosane 5,5%-acide phosphorique 0,5 M.....	46
Figure 3.6 Viscosité complexe en fonction de la fréquence pour les systèmes aux acides monocarboxyliques et organochlorés (à 10°C et à une déformation de 0,1) .....	48
Figure 3.7 Courbe maîtresse obtenue pour le système chitosane 5%- acide phosphorique 0,5 M, comme exemple de comportement des gels (Tref = 293K) .....	50

Figure 3.8 Courbe maîtresse obtenue pour le système chitosane 5%– acide acétique 0,5 M, comme exemple de comportement des solutions enchevêtrées (Tref = 293K) .....	51
Figure 4.1(a). Effet de la concentration de chitosane sur G', G'' dans le système acide phosphorique 0,5M –chitosane, à la température ambiante .....	73
Figure 4.1(b). Effet de la concentration de chitosane sur la viscosité complexe du système acide phosphorique 0,5M –chitosane, à la température ambiante .....	74
Figure 4.2 $\eta^*$ à 0,1 rad/s en fonction de la concentration du polymère à température ambiante dans le système phosphorique .....	75
Figure 4.3 (a) Effet de la concentration de chitosane sur les spectres de relaxation à 0,5M d'acide: (a) 2% .....	77
Figure 4.3 (b) Effet de la concentration de chitosane sur les spectres de relaxation à 0,5M d'acide: (b) 4% .....	78
Figure 4.4 Effet de la concentration de chitosane sur H( $\lambda$ ). Courbe montrée seulement pour le système oxalique .....	79
Figure 4.5 Effet de la concentration de l'acide sur $\eta^*$ à 0,1 rad/s dans les solutions concentrées de chitosane (mesurée à température ambiante) .....	81
Figure 4.6 (a) Effet de l'urée sur G' dans le système chitosane 5,5%-acide phosphorique.....	83
Figure 4.6(b) Effet de l'urée sur G'' dans le système chitosane 5,5%-acide phosphorique.....	84
Figure 4.7 Effet du temps sur les propriétés rhéologiques dans le système chitosane 5%-acide phosphorique 0,5M. G' et G'' mesurés à température ambiante et à une déformation de 0,1 pour les systèmes enchevêtrés et à une contrainte de 50Pa pour les gels .....	86
Figure 4.8 Effet du temps de stockage sur le pH des gels (mesurés à température ambiante).....	87
Figure 4.9 Cinétique de gélification dans le système chitosane 5%-acide oxalique 1M. Propriétés mesurées à 10°C, 6,28 rad/s, et 0,1 de déformation.....	89

Figure 4.10 Propriétés rhéologiques du système chitosane 5%-acide oxalique 1M au point de gel. Balayage en fréquence réalisé à 10°C et à 0,1 de déformation.....	92
Figure 4.11(a). Évolution des propriétés rhéologiques du gel chitosane-acide oxalique, au refroidissement (1) et au chauffage (2) .....	93
Figure 4.11(b). Évolution des propriétés rhéologiques du gel chitosane-acide phosphorique, au refroidissement (1) et au chauffage (2) .....	94
Figure 4.12 Transitions thermiques du système chitosane 5% - 1M d'acide oxalique. Mesures prises sur trois échantillons (a), (b) et (c) de deux fabrications différentes (Gels 1 and 2).....	95
Figure 4.13. Pontage ionique entre deux unités de glucosamine assuré par un dication d'acide oxalique.....	96
Figure A1.1(a). Vérification du glissement à plusieurs entrefers dans la géométrie rugueuse. (Balayage en fréquence effectué sur le gel d'acide phosphorique à 50 Pa et à température ambiante).....	123
Figure A1.1(b). Vérification du glissement à plusieurs entrefers dans la géométrie lisse. (Balayage en déformation effectué sur le système à l'acide chlorhydrique à 0,628 rad/s et à température ambiante) .....	124
Figure A1.2(a). Balayage en contrainte obtenu pour le gel à l'acide oxalique effectué à température ambiante et à différentes fréquences. (Des courbes similaires ont été également obtenues pour les gels sulfurique et phosphorique) ...	125
Figure A1.2(b). Balayage en déformation obtenu pour le système à l'acide chlorhydrique effectué à température ambiante et à différentes fréquences.....	126
Figure A1.2(c). Balayage en déformation obtenu pour le système à l'acide lactique effectué à température ambiante et à différentes fréquences. (Des courbes similaires ont été également obtenues pour les systèmes aux acides : butyrique, propionique, isobutyrique, formique, acétique, monochloroacétique, dichloroacétique, trichloroacétique, malique, maléique, citrique et succinique)....	127
Figure A1.3 Tests de reproductibilité effectués à 6% de chitosane et 0,5M d'acide oxalique, à 25°C.....	128

## LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

$a_T$  - facteur de glissement

B - une constante numérique

$c$  - concentration de monomères (g/mol)

$C$  - concentration du polymère (g/mol)

$C_{\text{sol-gel}}$  - concentration du polymère au point de transition sol-gel (g/mol)

$E_a$  - énergie apparente d'activation

$f_g$  - fraction de gel

F - entropie du système

$G(t-t')$  - module de relaxation

$G'$  - module dynamique élastique (Pa)

$G''$  - module dynamique visqueux (Pa)

$G^*(\omega)$  - module dynamique complexe

$G_e$  - module d'équilibre (Pa)

$K_B$  - constante de Boltzman ( $1,381 \times 10^{-23}$  JK $^{-1}$ )

$K_B T$  - énergie d'activation par point de jonction (KJmol $^{-1}$ )

I - forces ioniques

L - distance moyenne entre deux points de jonction

$\overline{M_w}$  - poids moléculaire moyen (g/mol)

$n$  - exposant de relaxation

$N$  - nombre de monomères par chaîne

$p_b$  - probabilité d'occupation d'un site de percolation.

$p_c$  - probabilité critique de percolation

$p_s$  - probabilité de liaison de percolation

R - constante des gaz parfaits ( $8,314$  J mol $^{-1}$  K $^{-1}$ )

$R_{char}$  - taille caractéristique d'amas moléculaire  
 $S$  - exposant des lois de puissance  
 $S$  - force du réseau au point de gel  
 $t$  - exposant d'élasticité  
 $T$  - température absolue (K)  
 $T_{sol-gel}$  -température critiques au point de transition sol-gel  
 $v$  - volume spécifique du polymère ( $m^3/g$ )  
 $v'$  - volume exclu du monomère  
 $w'$  - volume exclu ( $m^3$ )  
 $w$  - paramètre d'interaction entre 3 corps  
 $Z$  - exposant des lois de puissance

$\beta$  -exposant des lois de puissance  
 $\gamma$  - exposant des lois de puissance  
 $\dot{\underline{\gamma}}(t')$  - tenseur de vitesse de déformation  
 $\delta$  - angle de déphasage (rad)  
 $\Delta$  -.concentration réduite (la distance relative du point de gel)  
 $\bar{\Delta}$  -.la concentration réduite au point de gel  
 $\Delta_c$  .- concentration critique  
 $\Delta_{percolation}$  - concentration réduite de percolation.  
 $\Delta G$  – Énergie libre de Gibbs ( $J \text{ mol}^{-1}$ )  
 $\varepsilon$  – variable réduite de percolation  
 $\eta(t)$  - viscosité (Pa.s)  
 $\eta_0$  - viscosité plateau (Pa.s)  
 $\eta(t)$  - viscosité (Pa.s)  
 $\eta_0$  - viscosité plateau (Pa.s)

$\Phi$  - fraction volumique du polymère

$\Phi_{\text{gel}}$  - fraction volumique de gélification

$\Gamma(n)$  - fonction gamma

$\lambda$  - temps de relaxation

$\nu$  - exposant des lois de puissance

$\underline{\tau}(t)$  - tenseur de contrainte

$\tau_1$  - temps de relaxation d'une chaîne

$\tau_{\max}$  - temps de relaxation terminale

$\omega$  - fréquence angulaire (rad/s)

DDA – degré de déacétylation (%)

MOP - microscope optique à lumière polarisée

## INTRODUCTION ET OBJECTIFS

Le chitosane est un hétéro polysaccharide binaire et linéaire obtenu par déacétylation alcaline à haute température de la chitine, élément principal constituant les carapaces de crustacées et les parois cellulaires de certains champignons. Grâce à ses groupements positifs, le chitosane peut être complexé avec la plupart des polymères anioniques naturels tel que le xanthane, l'ADN, les protéines, ou synthétiques tel que le polyvinyle alcool.

Parmi les innombrables applications, le chitosane est utilisé en traitement des eaux comme agent coagulant et comme piège pour les métaux lourds; en agriculture comme film protecteur contre les attaques bactériennes et fongiques; dans le domaine biomédical comme vecteur de médicaments ou de vaccins et comme agent aidant à la reconstruction du cartilage, à la fabrication de peaux artificielles et de lentilles cornéennes et en cosmétologie comme agent hydratant.

Dans le domaine alimentaire, notre champ d'intérêt, il est surtout utilisé comme supplément alimentaire diététique pour réduire le taux de cholestérol dans le sang. Il est proposé aux consommateurs en poudre encapsulée qui, une fois libérée, forme un gel dans l'intestin, par effet de pH. Une autre alternative de valorisation de ce sous produit peu coûteux serait son utilisation comme agent de texture et/ou comme conservateur alimentaire grâce à ses propriétés antibactériennes. Il a notamment fait ses preuves dans l'inhibition de croissance bactérienne par exemple, celle de la bactérie *Escherichia coli*. D'un point de vue légal, le chitosane est autorisé en tant qu'ingrédient alimentaire au Japon seulement et ne l'est pas encore aux États-Unis ni au Canada.

Les études les plus répandues sur le chitosane ont surtout porté sur son comportement en solution diluée ou sa complexation chimique avec d'autres polymères

anioniques. Très peu de travaux ont été réalisés sur sa gélification non covalente avec acides seuls. Citons toutefois les travaux de Hayes et Davies (1978) et de Yamaguchi et al. (1978) qui ont rapporté la possibilité de produire des gels physiques thermoréversibles de chitosane en le solubilisant dans des solutions acides (oxalique, dichloroacétique, sulfurique).

Dans ce projet, nos objectifs ont été dans une première étape, d'étendre l'étude à d'autres acides, afin de recenser les différents mécanismes pouvant régir la gélification. Ce processus dans les gels physiques est un phénomène assez complexe à cause de la nature transitoire des liens non covalents qui assurent la formation du réseau tridimensionnel. Leur position ainsi que leur nombre varient avec les différents paramètres expérimentaux, comme la nature du contre ion mis en jeu, la température et le temps. Ces liens non covalents peuvent être formés par l'un ou plusieurs des mécanismes suivants : interactions ioniques, liaisons hydrogènes, forces de van der Walls, forces dipole-dipole, interactions hydrophobes etc... Dans une seconde étape, nous avons voulu étudier l'effet de paramètres tels que la concentration du biopolymère et celle de l'acide, le type d'anion, le temps et la température sur les propriétés viscoélastiques de deux systèmes gélifiants retenus (chitosane – acide oxalique et chitosane – acide phosphorique). Pour cela différentes techniques ont été utilisées: la rhéologie, la calorimétrie différentielle, la pH-métrie et la microscopie à lumière polarisée.

## ORGANISATION DU MÉMOIRE

Le présent mémoire comprend les chapitres suivants :

- Le chapitre 1 est la revue de la littérature qui s'intéresse à la compréhension du comportement chimique du chitosane en solutions acides et aux théories de gélification initialement développées pour des gels chimiques et ultérieurement appliquées aux gels physiques.
- Le chapitre 2 qui présente les tests expérimentaux réalisés ainsi que les produits utilisés.
- Les chapitres 3 et 4 qui contiennent, dans l'ordre, le premier article concernant l'étude de faisabilité de gélification du chitosane dans les différentes solutions acides et la discussion des interactions, soumis à *International Journal of Biological Macromolecules*, le second article consacré à la caractérisation rhéologique dans la zone de réponse viscoélastique linéaire de deux gels physiques de chitosane, soumis à *Rheologica Acta*. Ces deux articles sont présentés en anglais.
- Le chapitre 5 qui comprend une discussion générale en français, englobant les résultats des deux articles, suivi d'une conclusion et de perspectives.

## CHAPITRE 1

### REVUE DE LA LITTÉRATURE

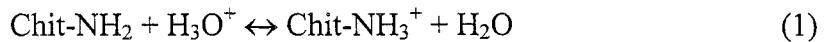
#### 1.1 Définition et structure chimique

Le chitosane nommé poly[ $\beta$ -(1 → 4)-2-amino-2-deoxy-D-glucopyranose] est un polysaccharide linéaire extrait de la chitine par déacétylation alcaline (Roberts 1992, Prochazkova et al. 1999). La chitine nommée poly[ $\beta$ -(1 → 4)-2-acétamido-2-déoxy-D-glucopyranose] est le polysaccharide le plus abondant dans la nature, après la cellulose. On la retrouve dans les carapaces des crustacés et des insectes ainsi que dans la paroi cellulaire de certains champignons. Leurs structures chimiques idéales d'après la monographie de Roberts (1992) est présentée dans la Figure 1.1.

A l'échelle commerciale, on retrouve des chitosanes pouvant contenir de 70 à 100% de glucosamine et jusqu'à 30% de N-Acetylglucosamine (Roberts 1992, Whistler 1993). Le nombre d'unités de glucosamine sur la chaîne macromoléculaire exprimé en pourcentage, détermine le degré de déacétylation (DDA) qui peut varier de 70 à 100%.

#### 1.2 Comportement de la macromolécule en milieux acides

En solution acide, les groupements amines du chitosane se chargent positivement, lui permettant de passer en solution suivant l'équation simplifiée suivante:



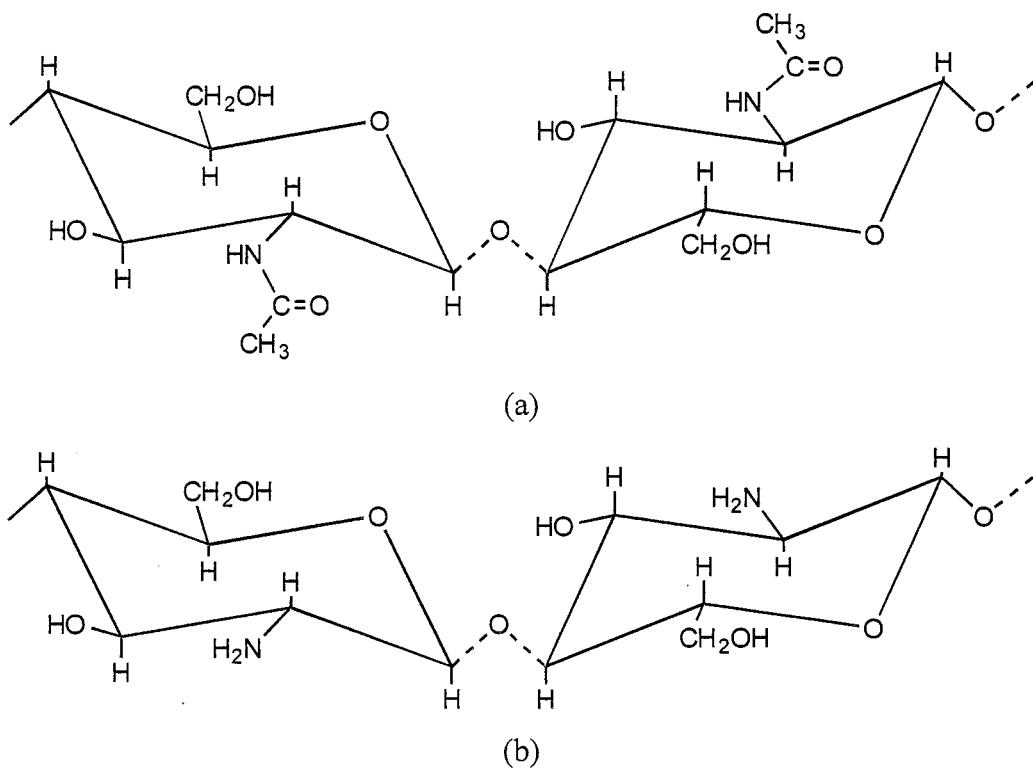


Figure 1.1 Structures chimiques idéales de la chitine (a) et du chitosane (b) (Roberts 1992).

La solubilisation du chitosane dans les solutions d'acides organiques a été très largement explorée. Muzzarelli (1977) par exemple, a rapporté que le chitosane est soluble dans les acides formique, acétique, citrique, pyruvique et lactique. Dans sa revue de littérature, Roberts (1992) a élargi la liste à d'autres acides organiques et même inorganiques en précisant ceux pour lesquels le chitosane est soit insoluble, soit a une solubilité limitée comme l'acide sulfurique.

Rinaudo et al. (1999 a et b) ont observé que la solubilité du chitosane dans les acides acétique et chlorhydrique est reliée au pH et à la force ionique du milieu, tandis que Kurita et al. (1991) ont conclu que sa solubilité est dépendante de la flexibilité, du degré de protonation de la macrochaîne, de la cristallinité ainsi que de la présence ou non des blocs d'acetylglucosamine. Chen et al. (1994) ainsi que Shamov et al. (2002) ont observé que la solubilité du chitosane est également influencée par les interactions entre la macrochaîne hydrocarbonnée et le groupement carboxylique des acides qu'ils ont utilisés.

Le degré de protonation de la chaîne macromoléculaire dépend de la force ionique dans le milieu, de la concentration et de la nature du solvant. Son augmentation engendre des répulsions électrostatiques (appelée également par les auteurs, les effets electrovisqueux de 3<sup>ème</sup> ordre) entre les différents segments qui augmentent la rigidité de la chaîne ainsi que son volume hydrodynamique. Une conformation étendue est alors adoptée déduite de l'augmentation de la viscosité apparente (Chen et al. 1994).

La présence en excès d'anions provenant de sels (ex. NaCl) ou d'autres électrolytes de faible poids moléculaire tel que l'acide chlorhydrique, diminue ces répulsions par effet écran permettant la rétraction de la chaîne plus flexible et l'adoption d'une conformation moins étendue déduite par la diminution de la viscosité apparente. Cette conformation est généralement stabilisée par des liaisons hydrogènes dont la présence a été mentionnée dans plusieurs travaux par la chute des propriétés rhéologiques, après ajout de l'urée en solution qui est connue pour être un agent de

dissociation de ces liaisons (Noguchi et al. 1978, Hayes et Davies 1978, Roberts 1992, Chen et al. 1994).

Le comportement du biopolymère en solution acide est aussi dépendant de sa concentration. En effet, à des concentrations massiques inférieures à 2 %, des études rhéologiques ont montré que la viscosité des solutions de chitosane dans les acides acétique, butyrique et propionique croît lorsque le pH décroît de 5 à 2, à cause de l'augmentation du degré de protonation, de la répulsion entre les segments et par conséquent de l'expansion de la macromolécule (Chen et al. 1994).

Lorsque l'acide chlorhydrique à 2N est ajouté à ces mêmes solutions, Chen et al. (1994) ainsi que Rinaudo et al. (1999) b) ont observé la diminution de la viscosité en abaissant le pH, révélant l'effet écran des contre ions  $\text{Cl}^-$  en excès dans la solution, sur les répulsions électrostatiques et le volume hydrodynamique de la macromolécule. Rinaudo et al. (1999) b) ont également trouvé que la solubilité du chitosane dans l'acide chlorhydrique (un acide fort) est obtenue lorsque le degré de protonation a atteint approximativement 0,5 autrement dit, lorsque la concentration de HCl est proche de la concentration des groupements amines ( $\text{NH}_2$ ). Le  $pK_a$  du chitosane a été estimé à  $6,0 \pm 0,1$  pour un DDA de 88% et un poids moléculaire moyen (de viscosité) de  $295 \times 10^3$  g/mol.

Shamov et al. (2002) ont trouvé une corrélation entre l'adsorption du chitosane et les valeurs de  $pK_a$  de quelques acides organiques (acétique, propionique, butyrique, valérique et isovalérique) utilisés comme solvants. Leur étude montre que l'adsorption du chitosane diminue avec la force ionique et dépend de la structure chimique de l'acide (plus elle est complexe moins l'adsorption est favorisée). Ils ont aussi émis l'hypothèse d'une conformation tridimensionnelle hélicoïdale.

D'autres études ont également été réalisées sur des solutions semi-concentrées de chitosane (entre 2,5 et 4% m/vol) et ont révélé que la viscosité complexe de la solution de chitosane dans l'acide acétique à concentration constante (0,66M) augmente avec la

concentration du biopolymère due à l'enchevêtrement des chaînes. La viscosité cependant continue à augmenter lorsque la concentration d'acide augmente, indiquant un accroissement de la densité de charge et l'expansion de la macromolécule (Giles et al. 1958).

En ce qui concerne la gélification en solutions acides du chitosane, très peu de travaux ont été réalisés. Hayes et Davies (1978) et Yamaguchi et al. (1978) ont exploré la possibilité de gélifier le chitosane en le dissolvant dans des solutions d'acides sulfurique, oxalique ou dichloroacétique et ont mentionné la nature thermoréversible des gels obtenus.

Selon Kavanagh et Ross-Murphy (1998), les gels de polysaccharides peuvent être différenciés des solutions enchevêtrées par leurs modules dynamiques indépendants de la fréquence et un module élastique  $G'$  plus important que le module visqueux  $G''$ .

### 1.3 Les théories de gélification

De nombreuses théories ont été développées pour prédire l'évolution des amas moléculaires pendant la gélification. Parmi elles, les premières théories de branchement covalent développées par Flory (1953) et Stockmayer (1943) dans les années soixante-dix basées sur les statistiques combinatoires, les théories de diffusion moléculaire (Küntzel, 2003), les théories de percolation (Tokida et Hikichi 1986, Winter et Mours 1997, Jespersen 2002, Chakrabarti et al. 2004), les équations constitutives de Winter et Chambon (1986, 1987) et les lois de puissance, très souvent utilisées pour leur simplicité (Leibler et al. 1990, Bromberg 1998, Semenov et Rubinstein, 1998, Borchard et Lechtenfeld. 2000, Li 2002, Nordby et al. 2003, Warlus et al. 2003, Guo et al, 2003). Nous avons choisi de décrire brièvement la théorie de percolation, la théorie de Winter et Chambon et les lois de puissance.

### 1.3.1 Les théories de percolation

Ces théories décrivent la croissance aléatoire des amas moléculaires dans une solution représentée par une grille multidimensionnelle (Figure 1.2). Les groupements chimiques évoluent dans cet espace pour former des liaisons intermoléculaires, avec une mobilité et une accessibilité limitées et selon une certaine probabilité (Winter et Mours 1997).

Les modèles développés peuvent considérer la probabilité ( $p_b$ ) de former une liaison aléatoire entre deux amas moléculaires voisins, applicables surtout aux monomères, ou la probabilité ( $p_s$ ) d'occuper aléatoirement des sites représentés par des noeuds et distribués de façon périodique dans la grille (voir Figure 1.2).

À titre d'exemple, dans leur étude de la transition sol-gel dans les gels thermoréversibles d'agarose, Tokita et Hikichi (1987) ont utilisé un modèle de

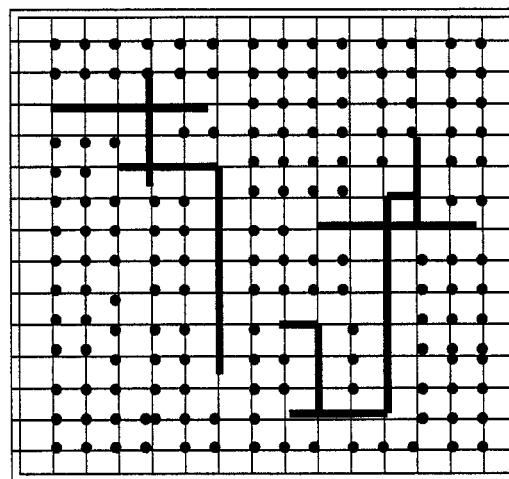


Figure 1.2 Grille de distribution des sites et des liaisons de percolation selon de Gennes (1979).

percolation comprenant les deux paramètres  $p_b$  et  $p_s$ . Ils ont rapporté que la correspondance entre le processus de percolation site-liaison et le gel thermoréversible suggère les relations (2) et (3) entre les paramètres expérimentaux (tels que la concentration du polymère  $C$  et la température  $T$ ) et les variables de probabilité  $p_s$  et  $p_b$  :

$$p_s = vC \quad (2)$$

$$p_b = 1 - \exp\left(-\frac{\text{const}}{T}\right) \quad (3)$$

où  $v$  est le volume spécifique du polymère.

La transition sol-gel atteinte par augmentation de la concentration du polymère à température constante, ou par variation de la température à concentration de polymère fixe, implique que le module élastique  $G'$  d'un gel thermoréversible peut être analysé soit par le modèle de percolation par liaison aléatoire entre les amas à concentration constante, ou par le modèle de percolation d'occupation aléatoire des sites à température constante.

Dans les deux processus, le module élastique au point de gel sera modélisé par l'équation de puissance (4) suivante :

$$G' = B \varepsilon^t \quad (4)$$

$$\varepsilon = |p - p_c| \quad (5)$$

$B$  est une constante numérique,  $\varepsilon$  est la variable réduite,  $p_c$  est la probabilité critique de percolation et  $t$  est l'exposant d'élasticité.

La variable réduite de percolation  $\varepsilon$  peut alors s'exprimer de deux façons :

1) Avec le processus de percolation par site aléatoire à  $T$  constante;

$$\varepsilon \sim (C - C_{sol-gel}) \quad (6)$$

2) Avec le processus de percolation par liaison aléatoire entre deux amas moléculaires voisins à  $C$  constante.

$$\varepsilon \sim (T_{sol-gel} - T) \quad (7)$$

D'où les expressions du module élastique suivantes :

$$G' \sim |C - C_{sol-gel}|^t \quad (8)$$

$$G' \sim |T - T_{sol-gel}|^t \quad (9)$$

$C_{sol-gel}$  et  $T_{sol-gel}$  sont la concentration du polymère et la température critiques au point de transition sol-gel.  $|C - C_{sol-gel}|$  et  $|T_{sol-gel} - T|$  sont des variables réduites.  $t$  a été calculé étant égal à 1,98 (Tokida et Hikichi 1997) proche de [1,7 à 1,9], l'intervalle mentionné par de Gennes (1979).

### 1.3.2 Les équations constitutives de Winter et Chambon

Le tenseur de contrainte dans un solide ou liquide viscoélastique à masse volumique constante, dans la zone de réponse linéaire peut être décrit par l'équation (10) suivante :

$$\underline{\underline{\tau}}(t) = \int_{-\infty}^t G(t-t') \dot{\underline{\underline{\gamma}}}(t') dt' \quad (10)$$

où  $G(t-t')$  est le module de relaxation et  $\dot{\underline{\underline{\gamma}}}(t') = \nabla v(x, t') + (\nabla v(x, t'))^T$  est le tenseur de vitesse de déformation.

Cette équation constitutive proposée par Winter et Chambon (1986, 1987) peut être utilisée pour décrire la contrainte dans les systèmes ramifiés lors de leur transition de l'état liquide à l'état solide.

Afin de décrire le tenseur de contrainte dans les gels chimiques et physiques à l'équilibre stœchiométrique ou non ils ont proposé l'équation constitutive simplifiée (11):

$$\underline{\tau}(t) = S \times \int_{-\infty}^t (t - t')^{-n} \dot{\gamma}(t') dt' \quad 0 < n < 1 \quad (11)$$

Cette équation comprend deux propriétés matérielles : la force du réseau  $S$  au point de gel et l'exposant de relaxation  $n$  donnés par (12) et (13) :

$$S = \frac{G'(\omega)}{\omega^n \cos(n\pi/2) \Gamma(1-n)} \quad (12)$$

$$n = \frac{2}{\pi} \tan^{-1} \frac{G''(\omega)}{G'(\omega)} \quad (13)$$

$\Gamma(n)$  est la fonction gamma.

Les modules  $G'$  et  $G''$  sont définis par les expressions (14) et (15) suivantes :

$$G'(\omega) = \omega \int_0^\infty G(t) \sin(\omega t) dt \quad (14)$$

$$G''(\omega) = \omega \int_0^\infty G(t) \cos(\omega t) dt \quad (15)$$

avec  $\omega$ , la fréquence.

Au point de gel, Winter et Chambon ont stipulé que  $G'$  et  $G''$  deviennent parallèles et  $\text{tg}\delta = G''/G'$  indépendant de la fréquence,  $\delta$  étant l'angle de déphasage. L'exposant  $n$  peut être alors calculé directement par :  $n = 2\delta/\pi$ . Lorsque  $n = 0,5$  le gel est dit idéal

ou à l'équilibre stœchiométrique ; lorsque  $n$  tend vers 0 le gel est purement élastique et lorsque  $n$  tend vers 1 le gel est dit purement visqueux.

Pour  $n = 0,5$ , les transformées de Fourier, une solution simple satisfaisant (14) et (15) est donnée comme suit :

$$G(t) = St^{-1/2} \quad (16)$$

et l'expression de la viscosité sera :

$$\eta(t) = \frac{\tau_{12}(t)}{\gamma_{12}} = S \int_0^t (t-t')^{-1/2} dt' = 2St^{1/2} \text{ pour } t > 0 \quad (17)$$

Ce qui implique que la viscosité plateau devient infinie tout près du point de gel :

$$\eta_0 = \lim_{t \rightarrow \infty} \eta(t) = \infty \quad (18)$$

et que le module d'équilibre devient  $G(t) = G_e = 0$ , spécifique au point de gel et comme condition nécessaire pour satisfaire l'égalité entre  $G'$  et  $G''$ .

### 1.3.3 Les lois de puissance dérivées de la théorie de percolation

Winter et Mours (1997) ont stipulé que le comportement de tout matériau suit une loi de puissance au point critique de son changement d'état, par exemple, les gels au seuil de leur transition sol-gel. Ces lois empiriques ont tout d'abord été développées pour des gels chimiques puis étendues aux gels physiques. Elles relient les propriétés statiques et dynamiques linéaires à une variable réduite décrivant la distance par rapport au point de gel.

Les propriétés statiques telles que le poids moléculaire moyen  $\overline{M_w}$  ; la taille caractéristique d'amas moléculaire  $R_{char}$  et la fraction de gel  $f_g$  suivent les lois suivantes :

$$\overline{M_w} \sim |p - p_c|^{-\gamma} \text{ pour } p < p_c \quad (19)$$

$$R_{\text{char}} \sim |p - p_c|^{-\nu} \text{ pour } p < p_c \quad (20)$$

$$f_g \sim |p - p_c|^{\beta} \text{ pour } p > p_c \quad (21)$$

où  $\gamma$ ,  $\nu$  et  $\beta$  sont les exposants des lois de puissance. Des valeurs typiques leur sont attribuées selon différentes théories, comme  $\gamma = 1,76$ ;  $\nu = 0,89$  et  $\beta = 0,39$  selon la théorie de percolation ou  $\gamma = 1$ ;  $\nu = 0,5$  et  $\beta = 0,1$  selon les prédictions de Flory-Stockmayer.

Quant aux propriétés dynamiques telles que la viscosité plateau  $\eta_0$ , les modules dynamiques  $G'$  et  $G''$  et le module d'équilibre  $G_e$  généralement pris à la plus faible fréquence  $\omega$ , sont reliés comme suit :

$$\eta_0 \sim \varepsilon^{-s} \text{ pour } p < p_{\text{gel}} \quad (\text{avant le point de gel}) \quad (22)$$

$$G'(\omega) \sim G''(\omega) \sim \omega^n \quad \text{au point de gel } p_{\text{gel}} \quad (23)$$

$$G_e \sim \varepsilon^z \text{ pour } p > p_{\text{gel}} \quad (\text{après le point de gel}) \quad (24)$$

et  $\varepsilon = \frac{|p - p_{\text{gel}}|}{p_{\text{gel}}}$  est la distance relative entre la variable de gélification  $p$  et le point de gel  $p_{\text{gel}}$ .

$p_{\text{gel}}$ .

D'après Winter et Chambon (1986, 1987)  $s$ ,  $n$  et  $z$  varient respectivement de 1,3 à 1,7 ; de 0 à 1 et de 2 à 3. Ces paramètres sont reliés entre eux par :  $n = z / (z + s)$  (Bromberg 1998, Borchard et Lechtenfeld 2001).

A partir des années 90, plusieurs chercheurs ont essayé de développer des expressions mathématiques décrivant l'évolution de ces mêmes propriétés.

Rubinstein et Semenov en 1998, ont développé un modèle simple décrivant analytiquement les propriétés d'équilibre des solutions de polymères amphiphiles (qui contiennent des groupements hydrophobes connectés par des segments hydrophiles ; des ionomères ou des copolymères bloc dans un solvant sélectif) au point de gel et loin du point de gel.

Ils ont stipulé que ces propriétés sont en général, gouvernées par la présence de points de jonction assurés par des interactions plus ou moins fortes (ioniques, ponts hydrogènes) pour former des agrégats réversibles entre les différentes chaînes macromoléculaires.

Ils ont développé une expression pour l'énergie libre du polymère en solution basée sur l'analyse combinatoire et pris en compte deux variables statiques: le nombre de points de jonction dans un volume unitaire  $v$ , qui peut être associé à la taille caractéristique de l'amas moléculaire, et la fraction  $p$  des points de jonction associés par paires, également définie comme le degré de conversion.

Le modèle considère l'entropie du système, les termes d'interaction entre 2 et 3 corps exprimés en volume exclu  $w$  et le terme d'association des points de jonction :

$$F = F_{\text{interaction}} + F_{\text{points de jonction}} \quad (25)$$

$$\underbrace{\frac{F}{\kappa_B T}}_{\substack{\text{densité de l'énergie} \\ \text{libre du système}}} = \left\{ \underbrace{\left[ \frac{c}{N} \ln \left( \frac{c}{eN} \right) \right]}_{\substack{\text{entropie du système}}} + \underbrace{\left[ \frac{v'}{2} c^2 + \frac{w'}{6} c^3 \right]}_{\substack{\text{termes d'interaction entre 2 et 3 corps} \\ \text{prenant en compte le volume exclu}}} \right\} + \underbrace{\left[ \frac{c}{L} \left( \frac{p}{2} + \ln(1-p) \right) \right]}_{\substack{\text{terme d'association des points de jonction}}}$$

$$(26)$$

où  $v'$  est le volume exclu du monomère,  $c$  la concentration de monomères dans la solution,  $w'$  le paramètre d'interaction entre 3 corps,  $\kappa_B T$  l'énergie d'activation par

point de jonction,  $K_B$  est la constante de Boltzman,  $T$  la température,  $N$  le nombre de monomères par chaîne et  $L$  est la distance moyenne entre deux points de jonction (elle est égale à la longueur de chaîne divisée par le nombre de monomères constituants la chaîne).

Quant aux propriétés dynamiques linéaires, elles sont gouvernées par la taille des enchevêtements des chaînes moléculaires et par le temps de vie des zones de jonction réversibles (agrégats qui contiennent les points de jonction), également relié au temps moyen de formation et/ou de division d'un amas en deux parties de tailles comparables. Le modèle basé sur la théorie de Rouse-Zimm (régime de non enchevêtrement), prend en compte la possibilité de dissociation ou de recombinaison multiples d'une même paire de points de jonction. Ce phénomène peut augmenter l'énergie d'activation apparente du système.

Les auteurs ont proposé quatre régions pour décrire la cinétique de gélification:

1) Avant le point de gel,

$$G' \sim \left[ \frac{\kappa_B T}{a^3} \frac{\Phi}{N} \tau_1 \tau_{\max} \right] \omega^2 \quad (27)$$

et

$$G'' \sim \left[ \frac{\kappa_B T}{a^3} \frac{\Phi}{N} \tau_1 \right] \omega^1 \quad (28)$$

$1 < \omega < \tau_{\max}$  à la plus faible fréquence  $\omega$  ou  $1/\tau_{\max}$  (correspondant à la zone terminale).

$\Phi$  est la fraction volumique du polymère,  $\tau_1$  est le temps de relaxation d'une chaîne,  $\tau_{\max}$  est le temps de relaxation terminale.

2) Au point de gel où la fraction volumique du polymère est égale à la fraction volumique de gélification  $\Phi_{gel}$ , et la viscosité plateau devient quasiment indépendante de la fréquence

$$\eta_0 = \lim_{\omega \rightarrow 0} \frac{G''}{\omega} = \left[ \frac{\kappa_B T}{a^3} \frac{\Phi}{N} \right] \tau_1 \quad (29)$$

3) Après le point de gel mais non loin,

$$\eta_0 \sim \left[ \frac{\kappa_B T}{a^3} \frac{\Phi}{N} \tau_b \right] \Delta^4 \quad (30)$$

$\tau_b$  est le temps de vie d'un point de jonction,  $\Delta$  est la concentration réduite (la distance relative du point de gel  $\Delta = \frac{|C - C_{gel}|}{C_{gel}}$  ).

4) Après et loin du point de gel, ils ont proposé des résultats en (31) très proches de ceux donnés par la théorie classique de gélification en (32),

$$\eta_0 \sim \begin{cases} \Delta^4 & \text{pour } \tilde{\Delta} < \Delta < \Delta_c \\ \Delta^{5,5} & \text{pour } \Delta_c < \Delta < 1 \end{cases} \quad (31)$$

$$\eta_0 \sim \begin{cases} \Delta^{3,5} & \text{pour } \tilde{\Delta} < \Delta < \Delta_c \\ \Delta^{6,1} & \text{pour } \Delta_c < \Delta < \Delta_{\text{percolation}} \end{cases} \quad (32)$$

$\tilde{\Delta}$  est la concentration réduite au point de gel,  $\Delta_c$  la concentration critique et  $\Delta_{\text{percolation}}$  est la concentration réduite de percolation.

## CHAPITRE 2

### MÉTHODOLOGIE

#### 2.1 Matériaux utilisés

Le chitosane ( $\overline{M_w} = 2 \times 10^6$  g/mol; polydispersité = 3,86, matières insolubles <0.01%, cendres résiduelles < 0.3%, protéines < 0.2%) est fourni par la compagnie Marinard Biotech (Rivière-aux-Renards, Qc). Son degré de déacétylation (DDA) a été estimé autour de 90% par spectroscopie infra-rouge (BIO-RAD FTS 3000) et a été calculé, à partir du rapport d'absorbance ( $A_{1550}/A_{2878}$ ). Les lignes de base considérées sont entre 1900 et 1500  $\text{cm}^{-1}$  pour l'absorbance du groupement amide II ( $1550 \text{ cm}^{-1}$ ) et entre 4000 et 1850  $\text{cm}^{-1}$  pour l'étirement du groupement C-H. Les échantillons ont été moulés en pastilles de 0,25 mm d'épaisseur, en mélangeant 1 mg de chitosane à 100 mg de KBr et séchés à 60°C pendant 24 heures.

Des acides alimentaires et non alimentaires (sont spécifiés dans le Tableau 2.1) de valence et de structures chimiques différentes ont été utilisés pour solubiliser le chitosane. Ils ont été fournis par la compagnie Sigma-Aldrich (Oakville, On). Leur longueur de chaîne principale a été variée de 2 à 6 carbones (Tableau 2.1).

L'urée également fournie par la compagnie Sigma-Aldrich a été utilisée comme agent de décomposition des liaisons hydrogènes afin de vérifier leur présence dans les structures gélifiées.

## 2.2 Préparation des gels de chitosane

Des solutions acides de chitosane ont été préparées en solubilisant 1 à 6 g de biopolymère dans 100 mL de solution aqueuse d'acide dont la concentration a été variée de 0,25 à 1M. Les quantités de chitosane ont été choisies de façon à obtenir une évolution dans le comportement rhéologique, de la solution au gel et jusqu'à la limite de solubilisation. Les différents mélanges ont été chauffés dans un bain-marie à 75-80°C jusqu'à dissolution de la poudre et stabilisation de leur pH. Les échantillons obtenus, ont été centrifugés à 3700 tours par minutes à 25°C pendant 10 minutes (temps suffisant pour les désaérer), puis moulés sous forme de disque de 2,5mm d'épaisseur et entreposés pendant une semaine, à 10°C afin d'accélérer le processus de gélification qui peut également se dérouler à température ambiante.

Les acides mentionnés dans le Tableau 2.1 ont tous été testés dans la première partie de ce projet. Deux d'entre eux ont été retenus pour effectuer la caractérisation approfondie des gels résultants. Il s'agit de l'acide phosphorique qui a un potentiel d'application alimentaire et l'acide oxalique pris comme système de comparaison est dans lequel le chitosane est soluble à plusieurs concentrations

## 2.3 Mesures rhéologiques et thermiques

La mesure des propriétés viscoélastiques des différents systèmes a été effectuée à l'aide d'un rhéomètre à contrainte imposée AR 1000N de TA-Instruments (New Castle, DE). Pour les solutions enchevêtrées, une géométrie plan-plan à surface lisse de 40 mm de diamètre a été utilisée, tandis que pour les gels une géométrie plan-plan à surface rugueuse (rugosité de l'ordre de 400 microns) de 60 mm de diamètre a été choisie pour éviter le glissement aux parois souvent rencontré dans les systèmes gélifiés (voir Annexe 1.1). Les différents tests ont été réalisés au minimum sur deux fabrications différentes et répétés au moins deux fois (c'est-à-dire sur au moins deux échantillons différents).

### 2.3.1 Balayage en fréquence et spectres des temps de relaxation

Dans le but de classer les différents systèmes obtenus et de mettre en évidence l'effet des différents paramètres choisis (concentrations du biopolymère et de l'acide; type d'anion; temps et température) des tests en fréquence, dans la zone du régime viscoélastique linéaire, ont été menés dans l'intervalle 0,062 – 570 rad/s et à une déformation de 0,1 pour les solutions enchevêtrées et une contrainte de 50 Pa pour les gels (voir Annexe 1.2).

Les spectres des temps de relaxation constituent un outil efficace pour mettre en évidence le changement de structure dans les différents systèmes choisis selon la concentration du biopolymère. Les modules dynamique  $G^*(\omega)$  et de relaxation  $G(t)$  sont respectivement reliés au spectre des temps de relaxation  $H(\lambda)$  par les expressions suivantes:

$$G^*(\omega) = \int_{-\infty}^{+\infty} (\omega\lambda + i) \left( \frac{\omega\lambda H(\lambda)}{1 + \omega^2\lambda^2} \right) d(\ln\lambda) \quad (33)$$

$$G(t) = \int_{-\infty}^{+\infty} H(\lambda) e^{\left(\frac{-t}{\lambda}\right)} d(\ln\lambda) \quad (34)$$

Le calcul des spectres à partir des données viscoélastiques linéaires a nécessité l'utilisation du logiciel NLReg (non-linear-regularization) (Roths et al. 2001).

### 2.3.2 Balayage en temps et transitions thermiques

La cinétique de gélification a été explorée dans la zone du régime viscoélastique linéaire à 0,062 rad/s, 10°C (température choisie pour la maturation) et 50 Pa, sur des échantillons préalablement laissés au repos à température ambiante pendant 6 heures afin d'avoir un temps de référence pour tous les tests.

La transition sol-gel pour des gels fondus dans un bain-marie a été détectée en effectuant un balayage en température de 80 à 10°C à 6,23 rad/s et à une déformation de 0,1. Les températures limites ont été choisies de façon à éviter l'évaporation de l'eau ainsi que sa cristallisation. La thermoréversibilité des gels a également été investiguée dans les mêmes conditions, en effectuant plusieurs cycles de refroidissement et de chauffage.

La transition gel-sol a été mesurée avec un calorimètre différentiel (DSC 2910) fourni par TA-Instruments (New Castle-DE) en effectuant un chauffage des gels de 5 à 80°C. Des taux de chauffage de 2, 5, 10 et 20°C /min ont été essayés et les résultats les plus intéressants ont été obtenus avec le dernier. Les échantillons (45 mg) ont été mis dans des porte échantillons hermétiques en aluminium de 90 µL de capacité. La ligne de base et la calibration ont été réalisées avec du cadmium.

### 2.3.3 Principe de superposition temps-température et calcul de l'énergie apparente d'activation $E_a$

L'énergie apparente d'activation a été estimée dans quelques systèmes représentatifs (voir Tableau 3.2) en utilisant l'équation d'Arrhénius:

$$\ln(a_T) = \frac{E_a}{R} \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}} \right) \quad (35)$$

$a_T$  est le facteur de glissement,  $E_a$  est l'énergie apparente d'activation, R est la constante des gaz parfaits ( $8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ),  $T$  et  $T_{ref}$ , la température (K) de l'échantillon et la température de référence, respectivement.

Pour évaluer  $a_T$ , un balayage en fréquence à différentes températures (de 10 à 50°C) a été effectué. Les courbes obtenues ramenées à celle de la température de référence (20°C) ont permis de déterminer  $a_T$ . Le calcul de  $E_a$  est effectué en utilisant l'équation (35).

## 2.4 Mesures des pH

Le pH a été mesuré dans tous les systèmes obtenus à l'aide d'un pH-mètre de type Bernant 30 digital pH/Température/mV/ORP de VWR (Ville-Mont-Royal, Qc) doté d'un système automatique de compensation de température et de précision de 0,1. Des électrodes pour colloïdes de type PerpHect Ag/AgCl, modèle 9272 pour les solutions enchevêtrées et pour les solides, une sonde plate de type Ross pH electrode Thermo Orion, modèle 8135 ont été utilisées. Tous les pH mesurés sont une moyenne d'au moins trois mesures avec un écart type inférieur à l'incertitude du pH-mètre (<0.1).

## 2.5 Observation au microscope optique à lumière polarisée (MOP)

Après une semaine de maturation à 10°C (temps de référence choisi pour tous les systèmes), des spécimens de différents systèmes ont été observés à température ambiante au microscope optique à lumière polarisée de type Axioskop 2 Plus Microscope fourni par Carl Zeiss Company (Göttingen, Allemagne) équipé d'objectifs Leica (10 et 50X) et d'un filtre de polarisation. Les observations ont été faites sur au moins trois échantillons de deux fabrications différentes.

Tableau 2.1 Structures et  $pK_a$  des acides testés, tirés de *CRC- Handbook of chemistry and Physics*, 81<sup>st</sup> edition, D. R. Lide 2000-2001.

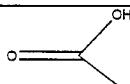
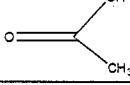
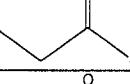
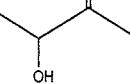
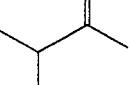
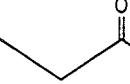
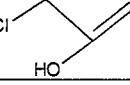
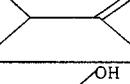
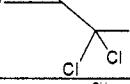
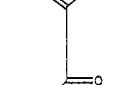
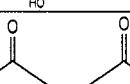
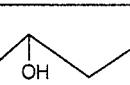
	Acides	Structure chimique	$pK_a$ à 25°C
Acides mono-carboxyliques	Formique		3,75
	Acétique (alimentaire)		4,75
	Propionique		4,87
	Lactique (alimentaire)		3,86
	Isobutyrique (alimentaire)		4,80
	Butyrique (alimentaire)		4,83
Acides chlorés	Chloroacétique		2,87
	Di-chloroacétique		1,35
	Tri-chloroacétique		0,70
Acides di-carboxyliques	Oxalique		$pK_{a1}= 1,25$ $pK_{a2}= 3,81$
	Malonique		$pK_{a1}= 2,85$ $pK_{a2}= 5,70$
	Malique (alimentaire)		$pK_{a1}= 3,40$ $pK_{a2}= 5,11$

Tableau 2.1 (suite)

	Acide	Structure chimique	$pK_a$ à 25°C
Acides di-carboxyliques	Succinique		$pK_{a1}=4,21$ $pK_{a2}=5,64$
	Maléique (alimentaire)		$pK_{a1}=1,92$ $pK_{a2}=6,23$
	Adipique		$pK_{a1}=4,43$ $pK_{a2}=5,28$
Acides tri-carboxyliques	Trans-aconitique		$pK_{a1}=2,80$ $pK_{a2}=4,46$
	Citrique (alimentaire)		$pK_{a1}=3,13$ $pK_{a2}=4,76$ $pK_{a3}=6,40$
Acide aromatique	Ascorbique (alimentaire)		$pK_{a1}=4,04$ $pK_{a2}=11,51$
	Chlorhydrique	HCl	$\infty$
	Phosphorique (alimentaire)		$pK_{a1}=2,16$ $pK_{a2}=7,21$ $pK_{a3}=12,32$
	Sulfurique		$pK_{a1}=\infty$ $pK_{a2}=1,99$

## CHAPITRE 3

### EFFET DES ACIDES ORGANIQUES ET INORGANIQUES SUR LES SOLUTIONS CONCENTRÉES ET LES GELS DE CHITOSANE

#### 3.1 Présentation de l'article

Ce chapitre présente le premier article de ce projet soumis à *International Journal of Biological Macromolecules* en novembre 2004 par M. Hamdine, A. Bégin et M.C. Heuzey sous le titre «Effect of organic and inorganic acids on concentrated chitosan solutions and gels». Il répertorie une vingtaine de solutions aqueuses d'acide dans lesquels, des essais de gélification du chitosane ont été réalisés. On y retrouve une étude rhéologique servant à les classer selon leur réponse viscoélastique linéaire et leur énergie apparente d'activation. Les différentes interactions intervenant dans le réseau tridimensionnel ont été reliées principalement à la force ionique du milieu et au type et volume moléculaire du contre ion mis en jeu. Cet article vient résumer tout le travail effectué en amont de la caractérisation rhéologique des hydrogels de chitosane, le sujet principal du présent mémoire.

### 3.2 Effect of organic and inorganic acids on concentrated chitosan solutions and gels

Méline Hamdine<sup>1</sup>, André Bégin <sup>2\*</sup>, Marie-Claude Heuzey<sup>1</sup>

<sup>1</sup> CRASP, Department of Chemical Engineering, École Polytechnique, P.O. Box 6079, Stn Centre-Ville, Montreal, QC, H3C 3A7, CANADA

<sup>2</sup> Food Research and Development Centre, 3600 Casavant Blvd West, Saint-Hyacinthe, QC, J2S 8E3, CANADA

\* Corresponding author. E-mail: [begina@agr.gc.ca](mailto:begina@agr.gc.ca); tel.: +1-450-773-1105; fax: +1-450-773-8461.

#### 3.2.1 Abstract

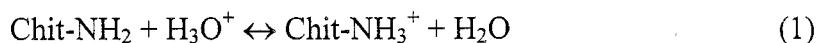
Rheological properties of aqueous chitosan solutions acidified with different acids were investigated. Viscosities increased with the degree of ionization and polymer concentration. Solvent polarity also affected chitosan flexibility. Strong gels were obtained at pH around 2 with oxalic, phosphoric and sulfuric acids, while weak gels were obtained in the vicinity of chitosan  $pK_a$  (pH=6.2) with hydrochloric acid. Gelation was favored by simple and short chain length acids and was governed by neutralization in one case (HCl) and ionic interactions in the others. The gels could be distinguished from entangled solutions by the frequency independence of their dynamic moduli and their high apparent activation energy.

**Keywords:** Chitosan gelation, Apparent activation energy, Chain flexibility.

### 3.2.2 Introduction

Chitin is the most abundant organic polysaccharide on earth after cellulose. It constitutes the principal fibril polymer in the shell of crustaceans and insects, and in the cell wall of certain fungi. Its derived product, chitosan, can be used as a coagulant in waste water treatment [1,2,3], in agriculture against fungal and bacterial diseases [4], in biomedical fields as drug-delivery vehicle [5,6,7], and in cosmetology for its capacity of water retention and film forming properties [5]. In food and dietary, chitosan is nowadays used as a supplement to reduce plasma cholesterol and triglycerides intestinal absorption. It acts by forming gels in the intestinal tract which entrap lipids, and is usually commercialized to this end in encapsulated powder form [1,5,8]. As a food ingredient, chitosan has great potential; it can be used as a gelling or texturing agent just like proteins, gelatins and pectin. It constitutes especially a good alternative to those because it can be used in addition as a preservative, since it inhibits bacteria's growth such as *Escherichia coli* [5]. From the regulation side, it is approved in Japan for various food applications but has not received approval in North America and in Europe as a food ingredient, but only as a food supplement [4].

Chitosan is a linear binary heteropolysaccharide composed by  $\beta$ -(1 $\rightarrow$  4)-2-amino-2-deoxy-D-glucopyranose (glucosamine units) and  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranose (acetylglucosamine units) (Figure 3.1). Most chitosan commercial grades are obtained by alkaline deacetylation of chitin and contain 70-100% of glucosamine and 0-30% of N-acetylglucosamine units [9,10,11]. The glucosamine content, also named degree of deacetylation (DDA), and the molecular weight determine chitosan solubility and solution properties. The  $pK_a$  of the glucosamine in chitosan varies from 6.2 to 6.5 [9]. In acidic aqueous solutions, glucosamine units are protonated making chitosan soluble:



Parameters such as temperature, electric charge density on the macromolecule and screening of these charges by small anions affect the hydrodynamic volume and the chain flexibility of chitosan [1,12]. The solvent polarity [2], the type of ions [1,2,13,14,15] and the presence of hydrogen bonding [1,9,16,17] also have an effect on chitosan conformation. At polymer concentration below 2% (weight/weight), rheological studies [1] have shown that the apparent viscosity of chitosan in acetic, butyric or propionic acids increases when pH decreases from 5 to 2, because intra and intermolecular electrostatic repulsions due to protonation are enhanced and generate larger macromolecular hydrodynamic volumes. However, in the presence of large amounts of small ions such as  $\text{Cl}^-$ , the viscosity decreases with pH due to electrostatic charges screening and enhanced chain flexibility. In semi-dilute chitosan solutions in acetic acid, within the range 2.5-4.0% (weight/volume), it was observed that the complex viscosity increased with polymer concentration and acid concentration [18,19].

Chitosan solubility in aqueous organic acids has been widely investigated. Mazzarelli [20] reported that chitosan is soluble in formic, acetic, citric, pyruvic and lactic acids, but other organic acids failed to dissolve it. Rinaudo et al. [21,22] observed that for acetic and hydrochloric acids, the chitosan solubility was entirely related to the pH and to the ionic strength, while Kurita et al. [23] concluded that it was dependent on chain flexibility, degree of ionization, solvation of the chain, crystallinity, and the presence of acetylglucosamine blocks. Other authors [1,2] have observed that chitosan solubility is also influenced by interactions between the hydrocarbon chains of the carboxylic acids.

Yamaguchi and Davies [24,25] reported that multivalent acids, such as oxalic and sulfuric, can form ionic cross-linked chitosan gels at low pH upon cooling. Hayes and Davies [26] stated that gel formation occurred with dichloroacetic acid, a monovalent acid, but no results were presented

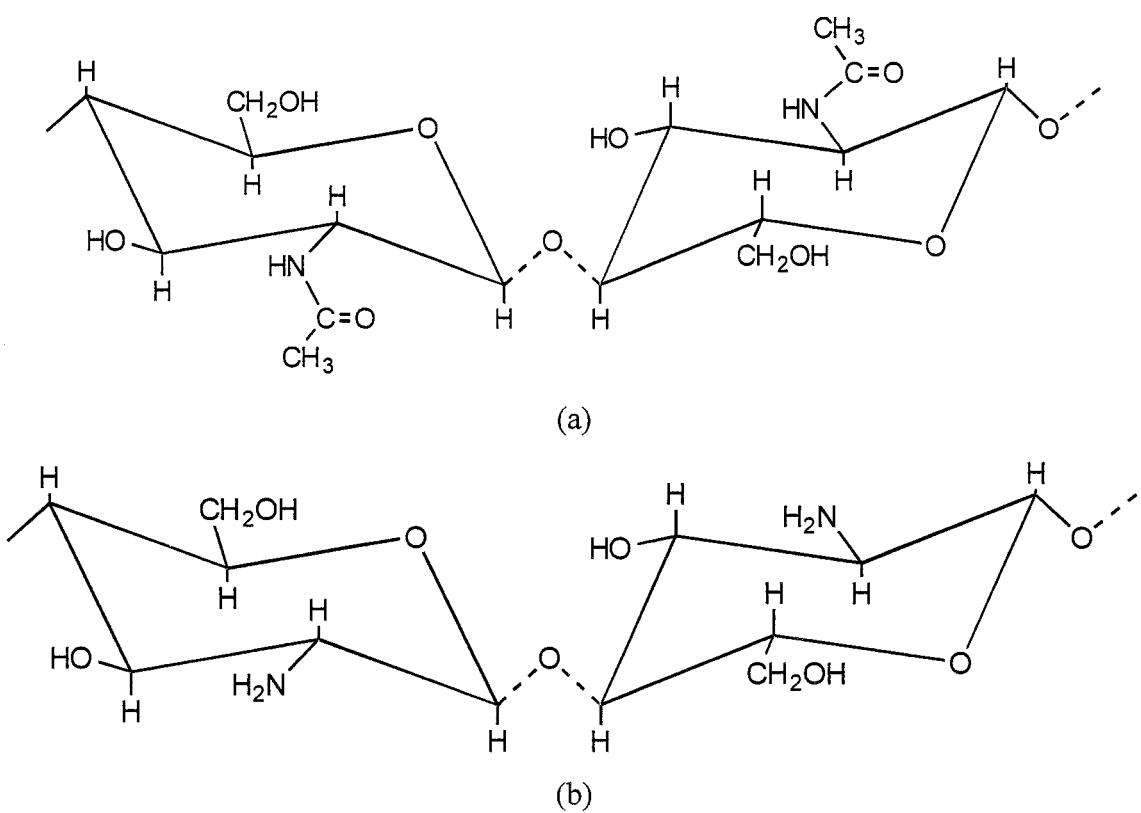


Figure 3.1 Chitin (a) and chitosan (b) chemical structures.

In this work, rheological properties of highly concentrated chitosan solutions were evaluated. We tested various organic and inorganic acids aiming to explore gelation feasibility. The systems were classified according to their linear viscoelastic responses. The interactions between the biopolymer and the various aqueous solvents were interpreted in terms of pH and ionic forces.

### 3.2.3 Methods

Chitosan ( $\overline{M}_w = 2 \times 10^6$  g/mol; polydispersity = 3.86) was purchased from Marinard Biotech (Rivière-aux-Renards, QC). The DDA was estimated to be 90% by infrared spectroscopy from the absorbance ratio ( $A_{1550}/A_{2878}$ ), considering baselines between 2000 and 1500  $\text{cm}^{-1}$  for the amide II stretching band, and between 4000 and 1850  $\text{cm}^{-1}$  for the 2878  $\text{cm}^{-1}$  reference band. The IR spectra were recorded on a BIO-RAD FTS 3000 infrared spectrophotometer (Mississauga, ON) from 0.25 mm thickness KBr pellets dried during 24 hours at 60°C. Inorganic and organic acids were obtained from Sigma-Aldrich (Oakville, ON).

#### 3.2.3.1 Preparation of chitosan gels

Chitosan powder was dissolved at 80°C in different acid solutions (Table 1). Chitosan and acid concentrations were adjusted to obtain 1, 3 or 5% (g/100mL) chitosan concentrations and 0.25, 0.5 or 1M of acid (Table 1). After cooling at 25°C, the solutions were centrifuged (3700 RPM, 10 minutes) to eliminate trapped air bubbles, poured in molds and stored to gelify at 10°C. The pH was measured in viscous solutions with an electrode for colloids (Thermo Orion electrode, model 9272; VWR, Ville-Mont-Royal, QC) and on gel surface with a flat electrode (Thermo Orion electrode, model 8135; VWR, Ville-Mont-Royal, QC).

Acids dissociation constants  $K_{as}$  ( $pK_a = -\log K_a$ ) were obtained from the literature [27], and adjusted to the experimental temperature (25°C) for isobutyric, adipic and ascorbic acids, using Equation 2:

$$\Delta G = 2.3026RTpK_a \quad (2)$$

where  $\Delta G$  is the Gibbs free energy ( $J \text{ mol}^{-1}$ ),  $R$  the gas constant ( $8.314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ) and  $T$  the absolute temperature (K).

The degree of dissociation ( $\alpha$ ) of the weak acids was calculated from the  $pK_{as}$  and the measured pH:

$$\alpha = \frac{[\text{Conjugated base}]}{[\text{Acid}] + [\text{Conjugated base}]} = \frac{10^{-pK_a}}{10^{-pH} + 10^{-pK_a}} \quad (3)$$

Solutions ionic forces ( $I$ ) were calculated from the concentration of charged ions obtained from the dissociation constants of the acids at the measured pH:

$$I = \frac{1}{2} \sum_1^n Z_i^2 c_0 \alpha_i + 10^{-pH} \quad (4)$$

with  $Z_i$  the ion  $i$  charge,  $c_0$  the acid concentration (M), and  $\alpha_i$  the degree of dissociation (Equation 2). The protonated amine groups of chitosan were neglected in this calculation.

### 3.2.3.2 Rheological measurements

A controlled stress rheometer, AR-1000-N from TA-Instruments (New Castle, DE), was used to measure the dynamic properties of the systems. Parallel plates of 60 mm diameter with smooth surfaces were used for the viscous systems, while 40 mm diameter parallel plates with rough surfaces (with approximately 400  $\mu\text{m}$  of roughness), were employed for the gels. The measurements were carried out by applying frequency sweeps from 0.062 to 565  $\text{rad.s}^{-1}$  in the linear viscoelastic regime at different temperatures, under the following conditions: 0.1 strain for liquid systems, and a stress of 50 Pa for solid systems.

### **3.2.3.3 Activation energy ( $E_a$ ) calculation**

To compare the different behaviors, the apparent activation energy was estimated using the time-temperature superposition principle from the Arrhenius type equation:

$$\ln(a_T) = \frac{E_a}{R} \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}} \right) \quad (5)$$

where  $a_T$  is the shift factor,  $E_a$  the apparent energy of activation ( $\text{J mol}^{-1}$ ),  $R$  the gas constant,  $T$  and  $T_{ref}$  the temperature of the sample and the reference temperature, respectively. To evaluate  $a_T$ , frequency sweeps at different temperatures (10 to 50°C) were carried out. The resulting curves were shifted to a reference temperature ( $T_f$ ) of 20°C and  $E_a$  was obtained using Equation 5.

### **3.2.3.4 Morphology by polarizing optical microscopy (POM)**

Finally, to investigate the morphology of the different systems, specimens were examined by polarizing optical microscopy (POM) at room temperature after one week maturation at 10°C. We used an Axioskop 2 Plus microscope from Carl Zeiss Company (Gottigen, Germany), equipped with 10 and 50X Leica objectives and a polarized filter.

## **3.2.4 Results and discussion**

### **3.2.4.1 Chitosan solubilization**

At constant acid concentration, the increase of chitosan concentration resulted in higher pH values and the increase of acid concentration in lower ones (Table 1). Therefore, the pH was dependent on the types of acid (strong or weak), and on the concentrations of acid and chitosan. In certain cases, it was lower than 3 which might be too low for food applications. The degree of dissociation of chitosan and weak acids

could be estimated from their  $pK_a$ s and the measured pH ( $\text{pH} = -\log \alpha_{\text{H}}$ ) (Equation 2), with  $\alpha_{\text{H}}$  the hydrogen ions activity. The real hydrogen concentration in solution ( $[\text{H}^+]_s$ ) can be estimated using the Debye-Hückel equation which predicts variation of the activity coefficient with the ionic force (Equation 6) (i.e.  $\alpha_{\text{H}} = \gamma [\text{H}^+]_s$ ):

$$[\text{H}^+]_s = \frac{\alpha_{\text{H}^+}}{\gamma} = 10^{-\text{pH} + 0.509 Z_i^2 I^{0.5}} \quad (6)$$

At 0.25 M HCl, the pH of a solution without chitosan should be 0.6. The measured pH of 6.2 at 5% w/v chitosan concentration (Table 1) reflects the buffering capacity of the glucosamine units (Equation 1). The lower pH of the 5% w/v chitosan solutions (0.30M glucosamine) prepared with 0.25 M of weak acids that are between 3.3 and 5.3 (Table 1) results from the buffering capacity of these acids. A general correlation between the  $pK_a$ s and the measured pH was observed (Table 1).

According to Domard [28], the  $pK_a$  of chitosan can vary from 5.5 to 6.5 depending on the degree of dissociation and on the DDA. Considering the molecular weight and the DDA of our material, the 1, 3 and 5% w/v chitosan concentration correspond to glucosamine concentrations of 0.06, 0.18 and 0.30 M, respectively. At a  $pK_a$  of 6.5, 0.25 M HCl and 0.30 M glucosamine, the solution should give a pH of 6. Therefore, the measured pH of 6.2 indicates the small presence of alkaline salts in the chitosan, probably due to remaining traces of the chitin deacetylation treatment.

Hydrochloric and sulfuric acids gave the highest ionic forces with values varying between 0.25 and 1.125 (Table 1). For these strong acids, the ionic force was mostly controlled by the acid concentration, while for weak acids it was controlled by their concentrations and  $pK_a$ s. As the acid concentration increased, the pH decreased. At pH larger than the acid  $pK_a$ , the ionization of the acid increased rapidly, increasing the ionic force at the same time. Therefore, for most weak acids the highest ionic forces were observed at 5:0.25 polymer-acid ratio (Table 1), at pH slightly higher than their  $pK_a$ .

Chitosan was soluble in all monovalent and multivalent acids. The latter were all in their mono-anionic form, except sulfuric acid that was in its monovalent and divalent ionized forms.

### 3.2.4.2 Chitosan gelation

Gelation occurred in two pH zones: a) with hydrochloric acid, at pH close to chitosan  $pK_a$  (6.2); and b) with oxalic, phosphoric and sulfuric acids at pH around 2 (Table 3.1, values in bold) which showed higher self holding than with the hydrochloric acid gel. In the first case, gel formation at pH 6.2 resulted from divergent effects. Chitosan dissolution at 80°C was facilitated by the increase of its chain flexibility due to the breaking of the intra and intermolecular hydrogen bonds. The decrease of glucosamine's  $pK_a$  from 6.5 to 5.5, at 25 and 80°C respectively, did not affect chitosan solubility. As temperature decreased from 80°C to 25°C, the rigidity of the molecule increased resulting in higher viscosities and chain expansion [15]. According to Kubota et al. [29], homogeneously deacetylated chitosan is soluble at DDA as low as 50%. At a DDA of 90% and a degree of dissociation of 55%, Domard [28] reported that the  $pK_a$  of glucosamines is around 6.2. Therefore the measured pH of 6.2, where chitosan gel formed with HCl, corresponds to the limiting solubility proposed by Kubota et al. [29].

In hot boiling oxalic acid solutions, Yamaguchi et al. [24] reported that chitosan is soluble but they did not mention the molecular weight of the chitosan, the pH and the ionic forces of the solutions. In our case, the calculated ionic forces were high (between 0.1 and 0.25 M) because of the low oxalic acid  $pK_{as}$ s. By increasing the temperature to 80°C, these  $pK_{as}$ s decreased more to reach the values of 1.05 and 3.21 respectively, generating at pH 1.6, for example, more than 78% of mono-anionic species and a very small amount of di-anionic species (less than 3%). However, on cooling at room temperature, the  $pK_{as}$ s increase and the oxalic acid should dissociate only into monovalent

Table 3.1 pH (ionic forces (M)) of chitosan solutions

%chitosan (g/100mL)	1	3	5	pKa (25°C)
[acid] (mol/l)	0,25	0,25	0,25	
HCl	1,4 (0,290)	3,7 (0,250)	<b>6,2 (0,250)</b>	∞
Chloroacetic	2,2 (0,028)	2,8 (0,059)	3,8 (0,112)	2,87
Dichloroacetic	1,4 (0,106)	1,7 (0,106)	4,6 (0,125)	1,35
Trichloroacetic	1,1 (0,169)	1,4 (0,144)	3,3 (0,125)	0,70
Formic	3,0 (0,020)	3,6 (0,052)	4,7 (0,112)	3,75
Acetic	3,9 (0,016)	4,5 (0,045)	5,1 (0,086)	4,75
Lactic	2,9 (0,014)	3,7 (0,051)	5,3 (0,121)	3,86
Propionic	4,0 (0,016)	4,6 (0,046)	5,3 (0,093)	4,84
Butyric	/	4,6 (0,046)	5,3 (0,093)	4,83
Isobutyric	4,0 (0,017)	4,6 (0,048)	5,3 (0,095)	4,80
<b>Divalent acids</b>				
Sulphuric	insoluble	insoluble	insoluble	1,99
Oxalic	insoluble	<b>1,6 (0,114)</b>	/	1,25 3,81
Succinic	3,4 (0,026)	3,8 (0,047)	/	4,21 5,64
Malic	2,6 (0,020)	3,1 (0,044)	/	3,40 5,11
Maleic	1,5 (0,066)	1,9 (0,074)	/	1,92 6,23
Ascorbic	3,0 (0,011)	3,9 (0,053)	/	4,04 11,51
Adipic	3,8 (0,027)	4,1 (0,050)	/	4,43 5,28
<b>Trivalent acids</b>				
Phosphoric	1,8 (0,054)	2,2 (0,072)	1,4 (0,058)	2,16 7,21 12,32
Trans-aconitic	2,1 (0,029)	2,5 (0,047)	/	2,80 4,46
Citric	2,4 (0,024)	2,8 (0,043)	/	3,13 4,76 6,40

Table 3.1 pH (ionic forces (M)) of chitosan solutions

%chitosan (g/100mL)	1	3	5	pKa (25°C)
[acid] (mol/l)	0,5	0,5	0,5	
HCl	1,0 (0,600)	1,2 (0,563)	1,6 (0,525)	∞
Chloroacetic	2,0 (0,040)	2,3 (0,058)	2,6 (0,090)	2,87
Dichloroacetic	1,2 (0,167)	1,3 (0,168)	1,4 (0,172)	1,35
Trichloroacetic	0,9 (0,279)	0,9 (0,279)	1,0 (0,267)	0,70
Formic	2,6 (0,019)	3,1 (0,046)	3,4 (0,078)	3,75
Acetic	3,6 (0,017)	4,0 (0,038)	4,3 (0,066)	4,75
Lactic	2,6 (0,016)	3,1 (0,038)	3,5 (0,076)	3,86
Propionic	3,7 (0,017)	4,2 (0,047)	4,4 (0,067)	4,84
Butyric	/	4,1 (0,038)	4,4 (0,068)	4,83
Isobutyric	3,7 (0,019)	4,1 (0,042)	4,4 (0,071)	4,80
<b>Divalent acids</b>				
Sulphuric	insoluble	<b>0,9 (0,451)</b>	Insoluble	1,99
Oxalic	insoluble	<b>1,1 (0,184)</b>	<b>1,4 (0,188)</b>	1,25 3,81
Succinic	3,1 (0,024)	3,4 (0,052)	3,6 (0,088)	4,21 5,64
Malic	2,2 (0,021)	2,7 (0,044)	3,1 (0,087)	3,40 5,11
Maleic	1,3 (0,098)	1,5 (0,100)	/	1,92 6,23
Ascorbic	2,8 (0,015)	3,4 (0,047)	/	4,04 11,51
Adipic	3,8 (0,054)	4,1 (0,099)	/	4,43 5,28
<b>Trivalent acids</b>				
Phosphoric	1,5 (0,076)	1,7 (0,084)	<b>1,9 (0,101)</b>	2,16 7,21 12,32
Trans-aconitic	1,8 (0,039)	2,1 (0,050)	/	2,80 4,46
Citric	2,1 (0,029)	2,3 (0,038)	2,6 (0,061)	3,13 4,76 6,40

Table 3.1 pH (ionic forces (M)) of chitosan solutions

%chitosan (g/100mL)	1	3	5	pKa (25°C)
[acid] (mol/l)	1	1	1	
HCl	0,6 (1,251)	0,8 (1,158)	0,9 (1,126)	∞
Chloroacetic	/	2,0 (0,070)	2,2 (0,094)	2,87
Dichloroacetic	1,0 (0,255)	1,1 (0,259)	1,1 (0,259)	1,35
Trichloroacetic	0,6 (0,473)	0,6 (0,473)	/	0,70
Formic	2,3 (0,022)	2,7 (0,043)	2,9 (0,063)	3,75
Acetic	3,2 (0,014)	3,6 (0,033)	3,8 (0,051)	4,75
Lactic	2,3 (0,019)	2,7 (0,034)	3,0 (0,062)	3,86
Propionic	3,4 (0,018)	3,8 (0,042)	4,0 (0,063)	4,84
Butyric	3,6 (0,028)	3,8 (0,043)	4,0 (0,065)	4,83
Isobutyric	/	3,8 (0,046)	4,1 (0,083)	4,80
<b>Divalent acids</b>				
Sulphuric	insoluble	insoluble	1,1 (0,808)	∞ 1,99
Oxalic	/	1,1 (0,288)	1,1 (0,280)	1,25 3,81
Succinic	3,1 (0,047)	3,4 (0,103)	/	4,21 5,64
Malic	1,9 (0,028)	2,3 (0,042)	3,3 (0,235)	3,40 5,11
Maleic	1,0 (0,154)	1,2 (0,143)	/	1,92 6,23
Ascorbic	2,5 (0,017)	3 (0,043)	/	4,04 11,51
Adipic	3,8 (0,107)	4,1 (0,199)	/	4,43 5,28
<b>Trivalent acids</b>				
Phosphoric	1,2 (0,113)	1,3 (0,111)	1,4 (0,114)	2,16 7,21 12,32
Trans-aconitic	1,5 (0,056)	1,7 (0,057)	/	2,80 4,46
Citric	1,7 (0,038)	1,9 (0,041)	/	3,13 4,76 6,40

ions, which would tend to screen the charged glucosamine units but would not act as ionic bridges that requires di-anionic species.

One can also notice that gels were mostly obtained at high concentration of polymer. In addition to ionic interactions, gel formation can be stabilized by intermolecular hydrogen bonding that is favoured upon cooling. These interactions might occur between the second oxalic carboxyl group and the non-reactive parts of the polymer, such as C(3)OH, C(6)OH and glucosidic oxygen sites. The presence of hydrogen bonding in these gels has been investigated in another work [30].

Phosphoric acid, which is a weak multivalent inorganic acid, produced chitosan entangled solutions and gels in this study. Gels were formed only at high chitosan (5% w/v) and acid concentrations (0.5 and 1 M), corresponding to relatively high ionic forces (0.1 M). Between pH 1.2 and 2.2, and because of its high  $pK_{a2}$ , phosphoric acid could only dissociate into mono-anionic species which screened the charged glucosamine units, similarly to oxalic acid. We can again assume that the physical networks were stabilized by intermolecular hydrogen bonding between the second and/or third hydroxyl and/or P=O groups of phosphoric acid, and non-reactive parts of the polymer. The thermoreversibility of the oxalic and phosphoric acid gel systems was also investigated [30].

Chitosan was difficult to solubilize in sulfuric acid and only two conditions, resulting in the highest ionic forces (Table 1 in bold, 0.45 and 0.80 M), allowed gelation. At room temperature chitosan is not soluble in sulfuric acid [9], but Yamaguchi et al. [24] reported that chitosan could be dissolved in hot boiling solutions. At pH near 1, the ions in solution were monovalent ( $\text{HSO}_4^-$ ) and divalent ( $\text{SO}_4^{2-}$ , 11.4%), and therefore, ionic bridging between the charged glucosamine units was possible. In comparison with  $\text{HOOC-COO}^-$  (oxalate anion) and  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  (phosphate anion),  $\text{HSO}_4^-$  and  $\text{SO}_4^{2-}$  have the smallest molecular volume (Table 3.2), and consequently, the potential hydrogen bonding

sites are closer from each other and thus can stabilize further the physical network, resulting in very strong gels.

In summary, gelation in this study occurred with three different mechanisms: 1) by ionic screening helped by hydrogen bonding with oxalic and phosphoric acids; 2) by ionic cross-linking, or bridging, with sulfuric acid; and 3) by neutralization due to chitosan solubility limit with the hydrochloric acid. In addition, the presence of hydrophobic interactions could not be neglected as these gels were obtained at high DDA, polymer concentration and molecular weight.

We should point out that other acids such as chloroacetic, dichloroacetic, trichloroacetic, formic and lactic resulted in similar ionic forces to those calculated for oxalic and phosphoric acids, but did not promote gelation, and it is not clear at this point why this was so. Also, acid chain length and structure affected considerably gelation. Oxalic acid which has two carbons on its chain promoted gelation, while succinic acid which counts four carbons did not. In consideration of this, we later attempted to use malonic acid (three carbons) and did observe gelation. It seemed therefore that with dicarboxylic acids, a limit of three carbons on the chain is a condition to produce chitosan gels. Finally, gelation was inhibited when ascorbic, maleic and trans-acconitic acids were used. Because of their more complex structure and their large anions molecular volume (Table 2), they could not easily interact with chitosan. Shamov et al. [2] assumed that chitosan in aqueous solution can adopt a three dimensional configuration and suggested that the internal domains are hardly accessible by branched carboxylic acids such as valeric and isovaleric acids, indirectly confirming our findings.

Table 3.2 Counter ions molecular volume for some acids (calculated with CS Chem 3D Ultra version 7.0.0 from Cambridge Park drive (Cambridge,MA))

Counter ion type	Molecular volume ( $\text{\AA}^3$ )
$\text{H}_2\text{SO}_4$	44,7599
$\text{HSO}_4^-$	44,0620
$\text{SO}_4^{2-}$	43,4019
$\text{H}_3\text{PO}_4$	47,0015
$\text{H}_2\text{PO}_4^-$	46,6630
$\text{HPO}_4^{2-}$	46,1003
$\text{PO}_4^{3-}$	45,5563
HOOC-COOH	48,9908
HOOC-COO <sup>-</sup>	48,6850
HOOC-CH <sub>2</sub> -COOH	66,1787
HOOC-CH <sub>2</sub> -COO <sup>-</sup>	66,0284
HOOC-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -COOH	66,1787
HOOC-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -COO <sup>-</sup>	66,0284

### 3.2.4.3 Rheological classification

The rheological behavior of the gels obtained with sulfuric, oxalic and phosphoric acids are shown in Figure 3.2. The storage and loss moduli  $G'$  and  $G''$  were almost frequency independent, with  $G' > G''$ . It is reported that a slight difference in the ratio  $G''/G'$  can distinguish a strong gel from a weak one. For a “true” gel, this ratio should be below  $10^{-2}$ , while for a “weak gel”, it should be around  $10^{-1}$  [31]. For our systems, we have observed a ratio below than  $10^{-2}$  only for sulfuric acid, which is in agreement with the highest ionic force and the proposed ionic bridging gelation mechanism, while for oxalic and phosphoric acids a ratio of  $10^{-1}$  was obtained. This also supports the fact that these gels were most probably produced by electrostatic charges screening, and not by ionic cross-linking. Nevertheless,  $G'$  and  $G''$  of oxalic and phosphoric acids gel systems were almost frequency independent, typical of strong gels, and both had a good self holding similar to that of the sulfuric acid system.

Hydrochloric acid produced gels only at pH 6.2 (5% chitosan, 0.25 M HCl), which corresponded to chitosan solubility limit as mentioned earlier. This system had a cross-over of  $G'(\omega)$  and  $G''(\omega)$  at very low frequency as shown in Figure 3.3. It also showed a certain self-holding proved by  $G'$  slightly larger than  $G''$ , and an almost linear complex viscosity curve on the frequency range investigated, which allowed to classify it as a weak gel.

Entangled solutions were obtained with all the other acids (formic, acetic, propionic, lactic, isobutyric, butyric, malic, succinic, maleic, adipic, trans-aconitic, citric, ascorbic, chloroacetic, dichloroacetic, trichloroacetic), and had  $G'$  and  $G''$  strongly frequency dependent. Dynamic rheological properties of entangled solutions of lactic and acetic acids are presented in Figure 3.4 as typical responses of the other acidic solutions. At low frequencies, the entangled systems showed a liquid-like behavior since their loss modulus  $G''$  was larger than their storage modulus  $G'$ , explained by polymer chains that

disentangle dynamically and rearrange at long times. At high frequencies, these systems showed a solid-like behavior, i.e.  $G'$  larger than  $G''$ . During short times, polymer chains cannot disentangle, and thus topological entanglement points play a role of knots of a 3D network. This was also reported by Miyoshi et al. while studying gellan systems [32]. The cross-over point between  $G'(\omega)$  and  $G''(\omega)$  corresponds to equilibrium between storage and dissipative energies. Complex viscosity curves  $\eta^*(\omega)$  as shown in Figure 4 presented a typical polymer melt behavior with a Newtonian plateau at low frequencies and a shear thinning region at high frequencies. At high frequencies, it was difficult to distinguish between the different entangled solutions, because the hydrodynamic forces are dominant over the various molecular interactions.

The gels obtained with oxalic, phosphoric and sulfuric acids at high chitosan concentration displayed birefringence when observed under polarizing optical microscopy (Figure 3.5 (a) and (b) for oxalic and phosphoric acid, respectively). Birefringent materials split light that passes through them into two plane polarized waves, and it was reported that most birefringence is due to orientation (or ordering) of optically anisotropic elements [33]. In opposition, the entangled solutions did not display birefringence or anisotropy.

### **3.2.4.4 Effect of the acids on entangled solutions**

According to Rinaudo and Domard [34], the relative viscosity of chitosan is constant between pH 3.5 and 5.4 and ionic forces between 0.1 and 0.2 (acetate buffer). Therefore the ratio 5% w/v chitosan – 0.25 M monovalent organic acid was considered as the best condition to compare different acids having different  $pK_{as}$  and resulting in entangled solutions. The pH of the corresponding solutions varied between pH 3.3 and 5.3 and the ionic forces between 0.09 and 0.12. If we consider a  $pK_0$  of 6.5 or a  $pK_a$  of 6.2 for glucosamine units, the percentage of ionization should vary between 94 and 89%,

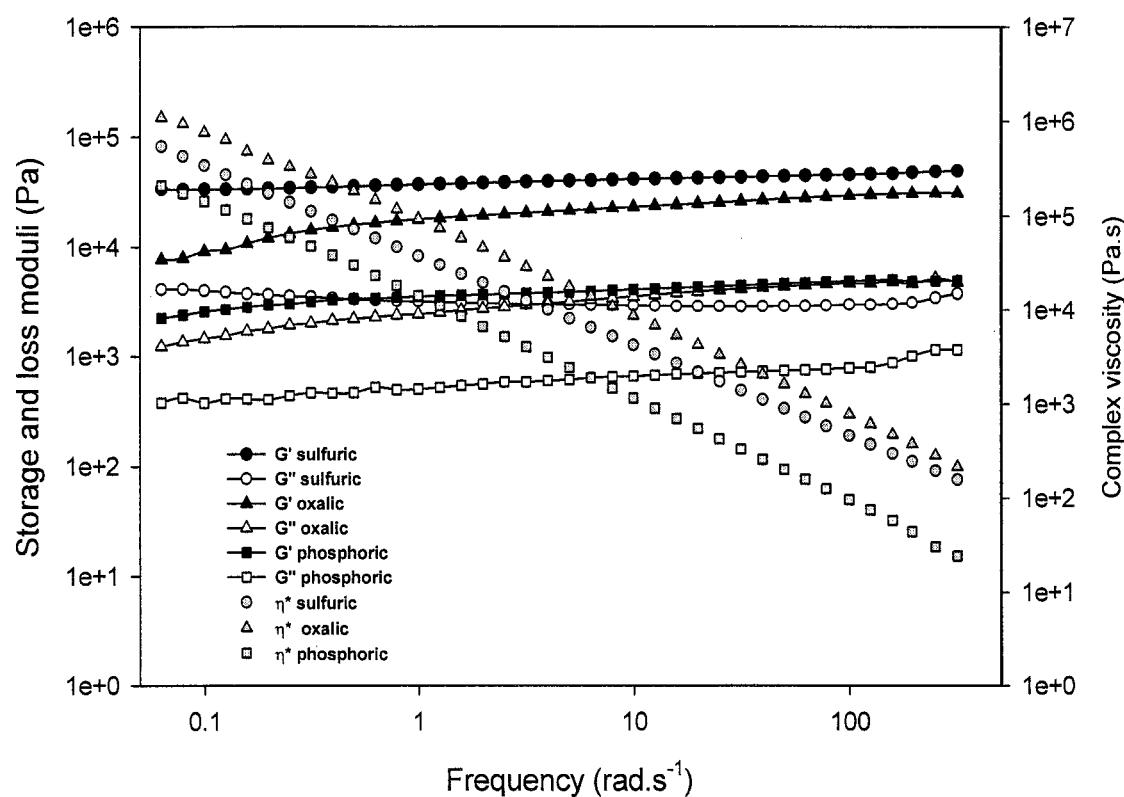


Figure 3.2 Strong gels complex moduli and viscosity as functions of frequency [5% w/v chitosan-0.25M sulfuric, 5% w/v chitosan-1M oxalic, 5% w/v chitosan-0,5M phosphoric]. (10°C, stress = 50 Pa).

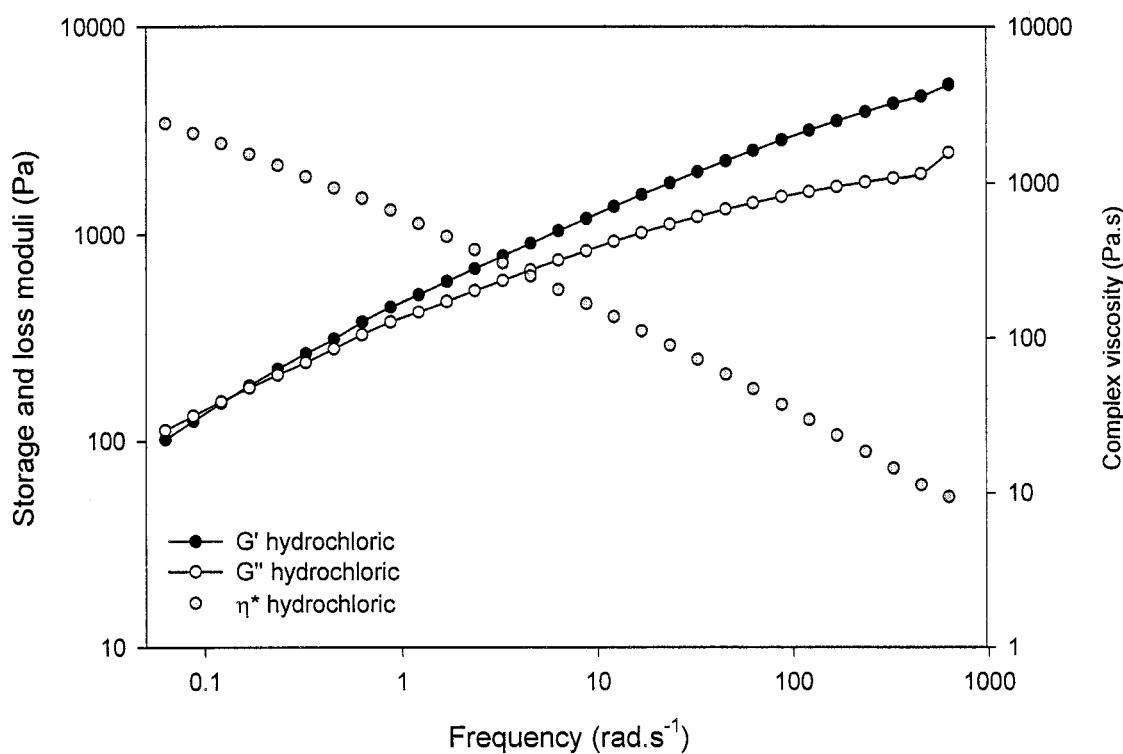


Figure 3.3 Weak HCl gel complex moduli and viscosity as functions of frequency [5% w/v chitosan-0,25M hydrochloric]. (10°C, strain = 0.1).

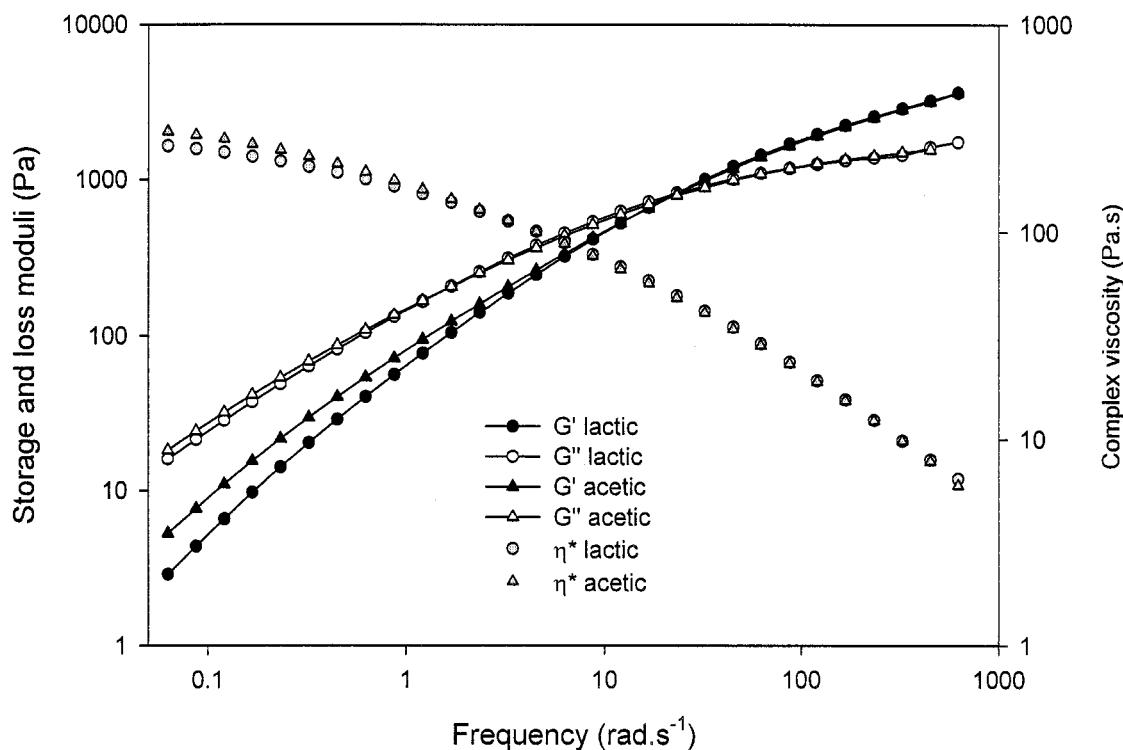


Figure 3.4 Examples of entangled solutions complex moduli and viscosity as functions of frequency [5% w/v chitosan-0.5M lactic, 5% w/v chitosan-1M acetic]. (10°C, strain = 0.1).

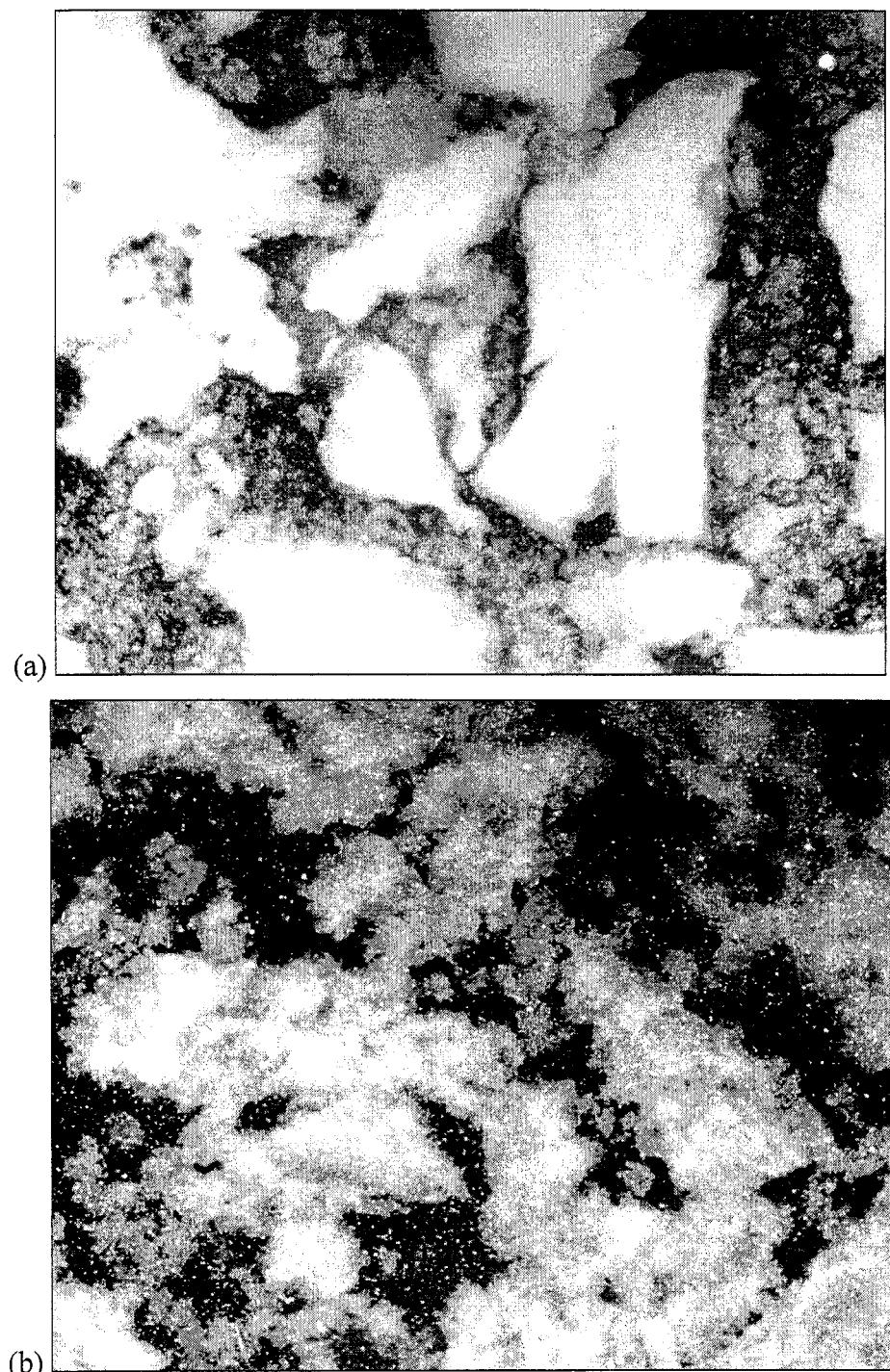


Figure 3.5 MOP micrographs of two gels observed at room temperature: a) Chitosan 6% w/v - oxalic acid 0.5 M; b) Chitosan 5.5% w/v - phosphoric acid 0.5 M.

respectively. In the case of a highly DDA chitosan such as here (90%), we considered that their observations were applicable to our solutions.

Complex viscosities of monocarboxylic and organochloridric systems are presented in Figure 3.6. At high frequencies, the corresponding curves were very close to each other due to high flow. However, at low frequencies the acids structure seemed to affect chitosan solubility and conformation. Comparing the complex viscosity at a frequency of 0.1 rad/s, the acids were classified according to their effect on chitosan solubility. A first group consisting of butyric, propionic, isobutyric and dichloroacetic acids gave the highest viscosities ( $\approx 1000 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ ). Formic acid was alone in his class ( $\approx 600 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ ). The third group ( $\approx 200 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ ) was composed of acetic, trichloroacetic and lactic acids. Except for the dichloroacetic acid, acids of group I had aliphatic linear and branched chains and had the more voluminous substituents of the carboxylic group. Group II was composed of the smallest substituent (H). The substituents of class III were a methyl, a hydroxymethyl or a trichloromethyl group.

Shamov et al. [2] found that acetic acid is more adsorbed by chitosan than butyric and propionic acids. Higher acid adsorption should be reflected in a higher screening of the charged glucosamine units and a decrease in viscosity, as we observed for the same organic acids. Shamov et al. [2] also proposed that the adsorption was related to the  $pK_a$  values of the organic acid. We found the same tendency, but the particular position of the dichloroacetic and formic acids suggests that structural parameters related to the local electronegativity of the anion and its molecular volume are also involved in the adsorption phenomenon.

### 3.2.4.5 Apparent energy of activation $E_a$

The apparent energy of activation ( $E_a$ ) was calculated using the Arrhenius type equation (Equation 5). It was experimentally obtained by shifting complex viscosity

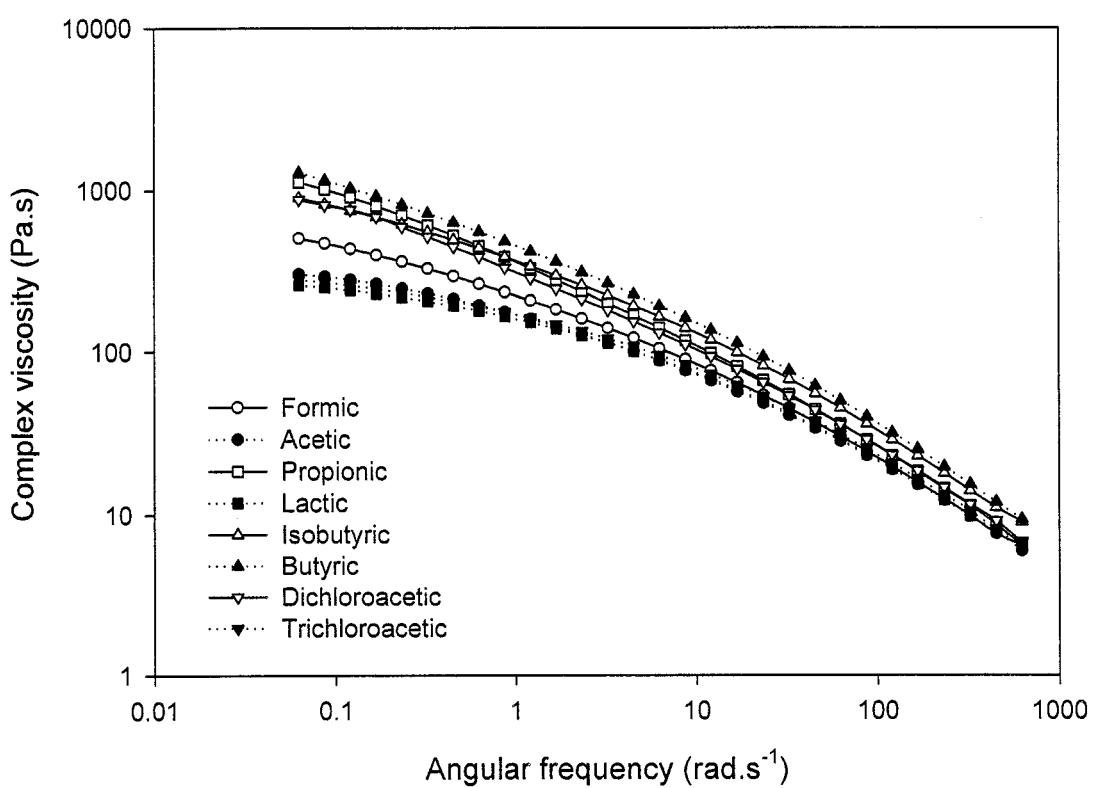


Figure 3.6 Complex viscosity as a function of frequency for monocarboxylic and organochloridric acids systems. (10°C, strain = 0.1).

curves using room temperature as a reference temperature, and assuming that all relaxation times had the same temperature dependence. The plot of  $\eta^*/a_T$  as a function of  $\omega.a_T$  was quasi-linear for gels (Figure 3.7), whereas for entangled solutions, the plot was typically that of molten polymers (Figure 3.8), with the acetic acid system given as an example of entangled solutions and the phosphoric acid system as an example of gels (Figure 3.7). The activation energy calculations resulted in different values:  $E_a < 60 \text{ kJ.mol}^{-1}$  for entangled solutions, and  $E_a > 200 \text{ kJ.mol}^{-1}$  for gels (Table 3.3).

For entangled solutions, the apparent energy of activation is related to the expansion coefficient of the free volume, which is temperature dependent.  $E_a$  decreased in the following order: acetic > malic > lactic > citric having values of 58, 49, 42, and 23  $\text{kJ.mol}^{-1}$ , respectively. Bégin and Van Calsteren [15] have reported  $E_a$  values of 22.9, 21.4 and 8.5 for acetic, lactic and citric acids, respectively, and 2% chitosan (weight/weight). Chen et al [1] determined  $E_a = 20 \text{ kJ.mol}^{-1}$  for 1% chitosan (weight/weight) dissolved in 0.1M acetic acid. It seemed that activation energy increases with increasing polymer and acid concentrations, probably related to the increased number of junction zones [35].

As in the case of absorption reported by Shamov et al., a general, but not exact, correlation between  $pK_a$  values and activation energy seems to exist. This correlation is however not linear, suggesting that parameters related to the chemical structure are also involved. It is interesting to point out that malic acid, a bivalent dicarboxylic acid, has a similar  $E_a$  value to the monovalent organic (acetic and lactic) acids.

For thermoreversible physical gels,  $E_a$  reflects the change of the number and strength of interchain junctions. Activation energies of the HCl, phosphoric and oxalic gels were respectively 33, 202 and 265  $\text{kJ.mol}^{-1}$ . All the gels were produced with 5% w/v chitosan solutions, and therefore the number and strength of the junctions zones are related to changes associated to the acid type and not to chitosan concentration.

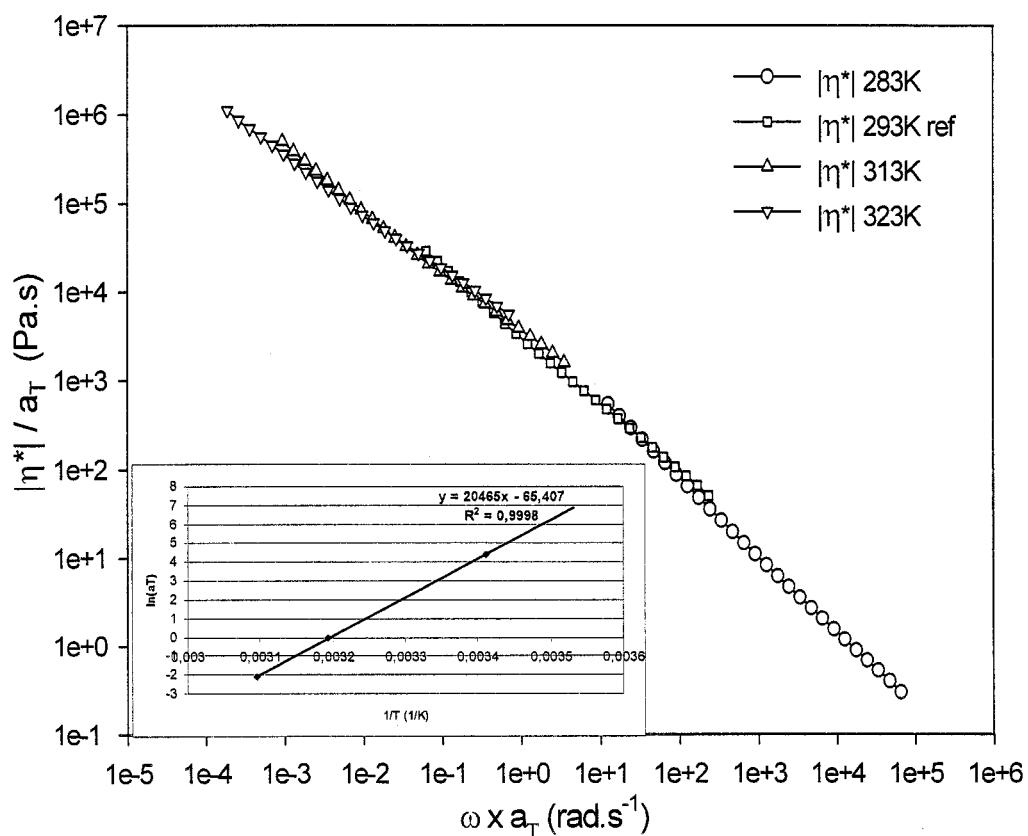


Figure 3.7 Complex viscosity master curve for 5% w/v chitosan – 0.5 M phosphoric acid system, as an example of gel systems behavior ( $T_{ref} = 293\text{K}$ ).

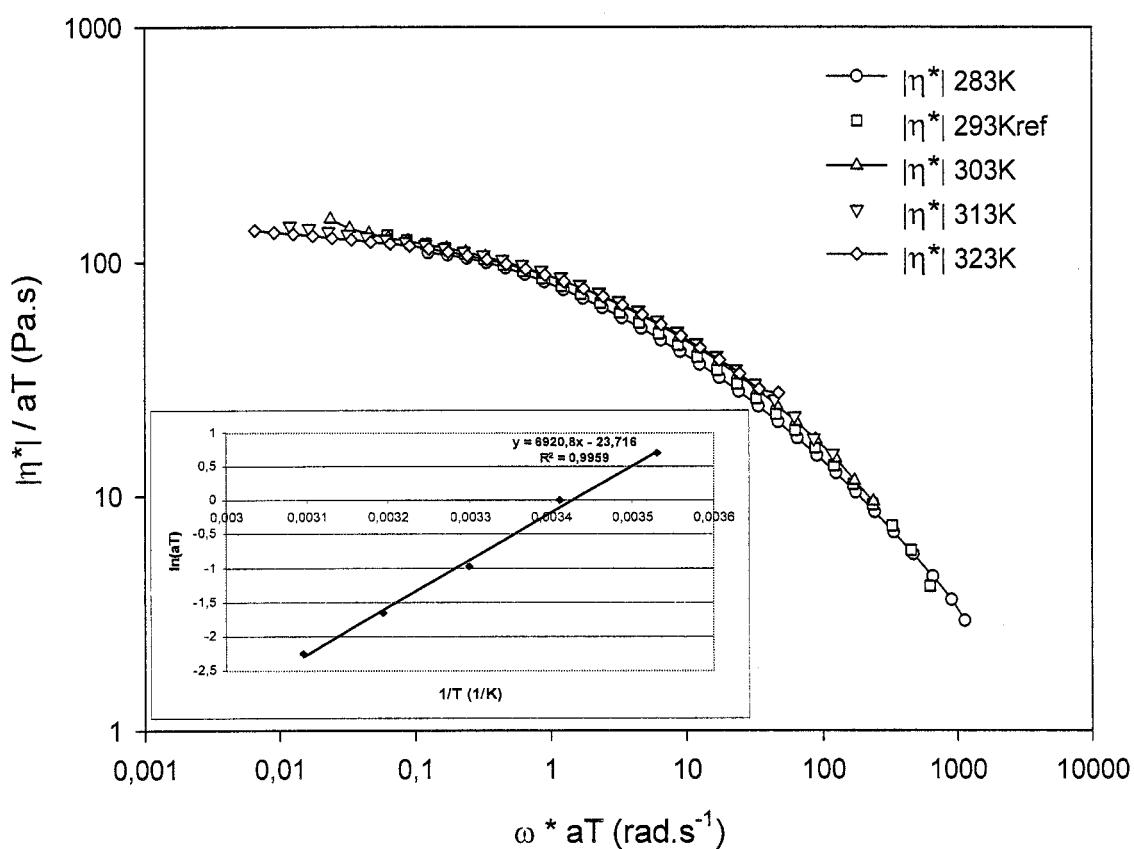


Figure 3.8 Complex viscosity master curve for 5% w/v chitosan – 0.5 M acetic acid system, as an example of entangled solutions behavior ( $T_{ref} = 293K$ ).

Hydrochloric acid-based gel activation energy is lower than  $E_a$  of acetic, malic and lactic entangled solutions, but higher than that of citric acid. The low  $E_a$  value of the HCl gels, obtained by neutralization, suggests that most of the junctions are hydrogen bonds. The high  $E_a$  values of the phosphoric and oxalic acid gels suggest formation of ionic crosslinking between chitosan chains, but this was not confirmed by their dissociation state that showed that the acids were in their monovalent anionic form.

Table 3.3 Activation energy calculated in highly concentrated chitosan systems ( $T_{ref} = 293\text{K}$ ).

Acid	Acid concentration (mol.L <sup>-1</sup> )	Chitosan concentration (g/100mL)	$E_a$ (kJ.mol <sup>-1</sup> )	State
Citric	0,50	5,0	23	solutions
Lactic	0,50	5,0	42	
Malic	0,50	5,0	49	
Acetic	1,00	5,0	58	
Hydrochloric	0,25	5,0	33	weak gel
Phosphoric	0,50	5,5	202	gels
Oxalic	1,00	5,0	265	

### 3.2.5 Conclusions

In this work, chitosan was soluble in all monovalent and multivalent acid solutions tested, and produced gels with hydrochloric, oxalic, phosphoric and sulfuric acids. All the acids were for most of them in their mono-anionic form, except sulfuric acid which was also in its divalent ionized form. The interactions between chitosan and the different acids that involved gelation were qualitatively interpreted in terms of type,

structure, chain length,  $pK_a$  value of the acid, pH and ionic forces. Gelation occurred at high ionic forces with the strong acids (hydrochloric and sulfuric), at pH 6.2 with HCl and at pH below 2 for sulfuric acid, revealing two different gelation mechanisms: by neutralization in the first case, due to chitosan solubility limit; and by ionic bridging or cross-linking of the polymer chains, in the second case.

At high ionic force, gelation was promoted by electrostatic charges screening with two weak multivalent acids (oxalic and phosphoric), but not with weak monovalent acids, even though the multivalent acids were shown to be in their mono-anionic form. Taking into account their respective  $pK_{as}$  we assumed that in addition to the ionic interactions, intermolecular hydrogen bonding played an important role to stabilize the physical network. In addition, the existence of hydrophobic interactions enhanced by high molecular weight and high concentration of the polymer was considered as an important constituent of the physical networks.

Chain length and acid structure seemed to influence gelation. Long molecules with more than three carbons and complex structures inhibited gelation, probably because of the large molecular volume of the different acids anions. From this series of experiments, a molecular volume limit of  $66.0284 \text{ \AA}^3$  above which no gelation could occur was proposed.

According to their viscoelastic behavior, the systems could be classified as follows: a) gel systems with  $G'$  and  $G''$  almost independent of frequency, that was the case of oxalic, phosphoric and sulfuric acids systems, b) entangled solutions with  $G'$  and  $G''$  strongly frequency dependent, for formic, acetic, propionic, lactic, isobutyric, butyric, malic, succinic, maleic, adipic, trans-aconitic, citric, ascorbic, chloroacetic, dichloroacetic, trichloroacetic acids, while c) hydrochloric acid system showed an intermediate behavior. It could not be clearly distinguished from entangled solutions

according to its  $G'$  and  $G''$ , but its complex viscosity curve  $\eta^*(\omega)$ , which was almost linear, made it classified as a weak gel.

Time-temperature superposition was also applied to these systems in order to confirm their classification according to the apparent activation energy. It revealed a quite large difference between the gels and the entangled solutions. Apparent activation energy for phosphoric and oxalic systems was found to be larger than  $200 \text{ kJ.mol}^{-1}$ , while for entangled solutions  $E_a$  did not exceed  $60 \text{ kJ.mol}^{-1}$  at the same polymer concentration. Hydrochloric acid weak gel, with a low apparent activation energy, remained an exception because gelation occurred by neutralization. The obtained gels displayed birefringence when observed under polarizing optical microscope, confirming the existence of an organized structure, which was not the case of entangled chitosan solutions.

### 3.2.6 Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the financial support of Conseil de Recherches en Pêche et en Agroalimentaire du Québec (CORPAQ).

### 3.2.7 References

- 
- [1] Chen RH, Lin WC, Lin JH. *Acta Polym.* 1994; 45 : 41-46.
  - [2] Shamov MV, Bratskaya SY, Avramenko VA. *J Colloid Interf Sci.* 2002; 249: 316-321.
  - [3] Brack HP, Tirmizi SA, Risen WM. *Polymer.* 1997; 38: 2351-2362.
  - [4] Mark HF, Bikales NM, Overberger CG, Menges G, Kroschwitz JI. (Eds). In: *Encyclopedia of Polymer Science and Engineering*, vol. 3: *Cellular materials to composites*. 1985; 430-441. John Wiley and sons, Inc.

- 
- [5] Winterowd JG, Sandford PA. Chitin and chitosan. *Food polysaccharides and their applications*. 1995; 441-462. Stephen, AM Ed; Marcel Dekker: New York.
  - [6] Francis FJ. Food Science and Technology, Wiley&Sons. 2000; 1, 581.
  - [7] Yamamoto H, Amaike M. Macromolecules. 1997; 30; 3936-3937.
  - [8] Koide SS. Nutr Res. 1998 ; 18 : 1091-1101.
  - [9] Roberts G A E. *Chitin Chemistry*. 1992. Macmillan Press: London.
  - [10] Prochazkova S, Vårum KM, Østgaard K. Carbohyd. Polym. 1999; 38: 115-122.
  - [11] Whilster RL. Chitin. In *Industrial gums*. 1993; 601-604. Whilster, R.L., BeMiller, J.N. Eds.; Academic Press: New-York.
  - [12] Berth G, Dautzenberg H, Peter M.G. Carbohyd. Polym. 1998; 36: 205-216.
  - [13] Hayes ER, Davies DH, Munroe VG. In *Proceedings of the First International Conference on Chitin/Chitosan*. 1978, 103-106. Muzzarelli, R.A.A., Parsier, E.R., Eds. MIT Sea Grant Program: Cambridge.
  - [14] Rinaudo M, Milas M, Le Dung P. Int. J. Biol. Macromol. 1993; 15: 281-285.
  - [15] Bégin A, Van Calsteren MR. Int. J. Biol. Macromol. 1999; 26: 63-67.
  - [16] Vincendon M. In *Chitin in nature and technology*. 1986; 343-345. Muzzarelli RRA, Jeuniaux C, Gooday GW, Eds.; Plenum Press: New York.
  - [17] Gross P, Konrad E, Mager H. In *Chitin and chitosan*. 1982; 205-209.
  - [18] Rha CK, Rodriguez-Sanchez D, Kienzle-Sterzer C. In *Biotechnology of Marine Polysaccharides*. 1982; 283-311. Colwell RR, Pariser ER, Sinskey AJ, Eds; McGraw Hill: New York.
  - [19] Noguchi J, Tokura S, Nishi N. In *Proceedings of the First International Conference on Chitin/Chitosan*. 1978; 315-326. Muzzarelli RAA, Parsier ER, Eds.; MIT Sea Grant Program: Cambridge.
  - [20] Muzzarelli RAA. *Chitin*. Pergamon, Oxford. 1977; 380.
  - [21] Rinaudo M, Pavlov G, Desbrieres J. Int. J. Polym. Anal. Charact. 1999; 5: 267-276.
  - [22] Rinaudo, M, Pavlov, G, Desbrieres, J. Polymer. 1999; 40: 7029-7032.
  - [23] Kurita K, Kamiya M, Nishimura S. Carbohydrate Polymers. 1991; 16 (1): 83-92.

- 
- [24] Yamaguchi R, Hirano S, Arai Y, Ito T. Agr. Biol. Chem. 1978 ; 42 : 1981-1982.
  - [25] Hirano S, Yamaguchi R, Fukui N, Iwata M. Carbohyd. Res. 1990; 201: 145-149.
  - [26] Hayes ER, Davies DH. In *Proceedings of the First International Conference on Chitin/Chitosan*; Muzzarelli RAA, Parsier ER, Eds. MIT Sea Grant Program: Cambridge. 1978; 193-197.
  - [27] Lide DR. CRC- Handbook of chemistry and Physics, 81st edition, 2000-2001.
  - [28] Domard A. Int. J. Biol. Macromol. 1987; 9: 98-104.
  - [29] Kubota N, Tatsumoto N, Sano T, Toya K. Carbohyd. Res. 2000; 324: 268-274.
  - [30] Hamdine M, Heuzey MC, Bégin A. Viscoelastic properties of phosphoric and oxalic acid-based chitosan hydrogels. to be submitted to *Rheologica Acta*. 2004.
  - [31] Ross-Murphy SB. In Critical Reports in Applied Chemistry, vol.5: *Biophysical methods in food research*; 1984; 138-199. Chan, HWS, E.D. Blackwell Scientific: Oxford.
  - [32] Miyoshi E, Takaya T, Nishinari K. Macromol. Symp. 1995; 99: 83-91.
  - [33] Sawyer LC, Grubb DT. In *Polymer Microscopy*. 1987; 18-22. Chapman and Hall: London.
  - [34] Rinaudo M, Domard A. In: Skjåk-Bræk G, Anthonsen T, Sanford P. Chitin and chitosan: sources, chemistry, physical properties and applications, Elsevier Applied Science, N.Y. 1989; 71-86.
  - [35] Desbrieres J., Biomacromolecules. 2002; 3: 342-349.

## CHAPITRE 4

### PROPRIÉTÉS VISCOÉLASTIQUES D'HYDROGELS DE CHITOSANE DANS LES SOLUTIONS D'ACIDES PHOSPHORIQUE ET OXALIQUE

#### 4.1 Présentation de l'article

Ce chapitre présente le deuxième article de ce projet qui a été soumis à la revue *Rheologica Acta* en décembre 2004 par M. Hamdine, M.C. Heuzey et A. Bégin sous le titre «Viscoelastic properties of phosphoric and oxalic acid-based chitosan hydrogels». Une étude plus approfondie sur les propriétés viscoélastiques des gels thermoréversibles de chitosane préparés dans les solutions aqueuses d'acides phosphorique et oxalique y est présentée. Elle donne suite à l'étude de faisabilité de gélification du chitosane en milieux acides, déjà documentée dans le chapitre 3. L'influence de paramètres tels que la concentration du polymère, la concentration et le type de contre ion, le temps et la température sur la gélification a été étudiée. Plusieurs travaux proposent la caractérisation de gels de polysaccharides mais très peu ont concerné les gels physiques de chitosane. Cette étude s'intéresse justement à trouver une nouvelle voie de valorisation de ce sous produit en vue d'application alimentaire.

## 4.2 Viscoelastic properties of phosphoric and oxalic acid-based chitosan hydrogels

Mélina Hamdine (1), Marie-Claude Heuzey (1)\*, André Bégin (2)

<sup>1</sup> CRASP, Department of Chemical Engineering, École Polytechnique, P.O. Box 6079, Stn Centre-Ville, Montreal, QC, H3C 3A7, CANADA

<sup>2</sup> Food Research and Development Centre, 3600 Casavant Blvd West, Saint-Hyacinthe, QC, J2S 8E3, CANADA

\* Corresponding author. E-mail: [marie-claude.heuzey@polymtl.ca](mailto:marie-claude.heuzey@polymtl.ca); tel.: +1-514-340-4711; fax: +1-514-340-4159

### 4.2.1 Abstract

In a previous work, we have shown that chitosan physical gelation occurs in some organic and inorganic acids (Hamdine et al. 2004). Two systems presenting similar gelation mechanisms were characterized furthermore in order to investigate the sol-gel transition: the chitosan-phosphoric acid and the chitosan-oxalic acid systems. By performing rheological measurements in the framework of linear viscoelasticity, we have investigated the effect of polymer concentration, ionic strength and temperature on gelation evolution. For both acid-based systems, gelation occurred above a critical polymer concentration, while no clear trend was observed in terms of ionic strength. Isothermal time sweep experiments showed that the gelation occurs in three stages: 1) incubation; 2) rapid increase of  $G'$ ; and 3) a last stage where  $G'$  slowly reached its equilibrium value due to slow molecular diffusion. At the gel point,  $G'$  and  $G''$  scaled with  $\omega^n$ , with  $n = 0.55$  for both acid-based systems. Cooling-heating cycles revealed that

the gels showed thermoreversibility after one sequence, but became permanent during subsequent cycles.

**Keywords:** Chitosan physical gelation, Viscoelastic properties, Relaxation spectra, Sol-gel transition.

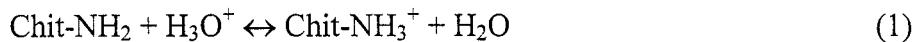
#### 4.2.2 Introduction

Chitosan is a linear binary heteropolysaccharide extracted from chitin by alkaline deacetylation (Roberts 1992; Prochazkova et al. 1999). Chitin is the most abundant organic material after cellulose. It constitutes the principle fibril polymer in the shell of crustaceans and insects and in the cell wall of certain fungi. Chitin is poly[ $\beta$ -(1 $\rightarrow$  4)-2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranose] (GlcNac), while chitosan is poly[ $\beta$ -(1 $\rightarrow$  4)-2-amino-2-deoxy-D-glucopyranose] (GlcN). Most commercial grades of chitosan contain 70-100% glucosamine units (GlcN) and 0-30% N-acetylglucosamine units (GlcNac) (Whistler 1993). The number of glucosamine units on the chain, in percentage, is defined as the degree of deacetylation (DDA) (Roberts 1992). These units become protonated in acidic solutions and make chitosan soluble, while chitin is not.

Polysaccharides have received a considerable amount of interest in the last decades because of their various applications areas. In the biomedical field, they can be used for bones, cartilages and tissues reconstruction, and as drug delivery vehicles in pharmaceuticals. In food applications, they mostly served as gelling or texturing agents, and chitosan consists of a specially good alternative to proteins, gelatins and pectins because it can also be used as a preservative agent since it inhibits bacteria's growth such as *Escherichia coli*. Chitosan can furthermore serve as a health promoting agent in food formulations in order to lower plasma cholesterol and triglycerides levels, and help dental

disease prevention (Winterowd and Sandford 1995). From the regulation point of view, it is approved in Japan for food applications but has not received approval yet as a food ingredient by the FDA in the United-States (Francis 2000) and in Europe, but is accepted as a food supplement.

In acidic aqueous solutions, chitosan is protonated as followed:



The resulting electrostatic charge density on the macromolecule backbone affects its hydrodynamic volume, and hence its conformation. The charge density can be changed by varying pH, ionic strength, concentration or solvent nature (Chen et al. 1994). When a low molecular weight electrolyte such as sodium chloride is added, the electrostatic repulsion between segments is reduced by a screening effect of the counter-ions. The polymer chains become more flexible and a more compact structure is adopted and stabilized by intermolecular hydrogen bonding. If a hydrogen bonds disturbing agent such as urea is added, the flexible conformation expands (Gross et al. 1982; Vincendon 1986; Chen et al. 1994). Chitosan chain flexibility is also DDA and temperature dependent (Roberts 1992). These conformation changes have been confirmed by rheological measurements (Rha et al. 1982; Chen et al. 1994; Iversen et al. 1997).

Acid solvent counter-ions can also play a role in electrostatic charges screening, and in some cases lead to physical gelation through a delicate interplay of molecular interactions. A study (Hamidine et al. 2004) has been conducted in our laboratories to investigate the feasibility of chitosan gelation by using food and non-food graded acids in aqueous solutions, based on the pioneering work by Hayes and Davies (1978) and Yamaguchi et al. (1978) using oxalic acid. We have looked at a variety of monovalent and multivalent acids and compared the acid type (organic and mineral), the counter-ion type ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{COO}^-$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{HSO}_4^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ), the chain length and the chemical structure of the solvent on the possibility of achieving chitosan gelation. The study revealed that physical

gelation was possible with three inorganic acids (sulfuric, phosphoric and hydrochloric) and one organic (oxalic) acid, confirming in the latter case the previous research (Hayes and Davies 1978; Yamaguchi et al. 1978).

In the present work, we report an investigation of the sol-gel transition and viscoelastic properties of two of these hydrogels, one inorganic and one organic acid-based, presenting similar gelation mechanisms: the chitosan-phosphoric acid system, which can be considered for food applications, and the chitosan-oxalic acid system that serves as a comparison. We have examined how parameters such as polymer concentration, ionic strength, counter-ion type, time and temperature affect the properties of the various solutions and gels, using complementary techniques such as dynamic rheology in the linear regime, differential scanning calorimetry and polarized optical microscopy. We have also used simple scaling laws derived from percolation theory (Miller and Mocosko 1976; Martin and Adolf 1988; Adolf and Martin 1990) and a viscoelastic gel equation (Chambon and Winter 1987; Winter and Chambon 1986; Winter and Mours 1997) to model the rheological properties in the vicinity of the sol-gel transition and to have insight of the gels microstructure.

#### **4.2.2.1 Gelation mechanisms**

The distinction between chemical and physical gels is related to the type of intermolecular interactions, with the former occurring mainly by covalent cross-linking and the latter through various interactions such as ionic bridging, hydrogen bonding, and/or hydrophobic associations. Chemical gels are irreversible, while physical gels, which can be triggered by pH and/or temperature changes, are reversible. According to their apparent activation energy  $E_a$ , which reflects the number of the junction points and their strength, chemical gels have  $E_a > 400$  KJ/mol while physical gels have  $E_a < 400$  KJ/mol. (Clark and Ross-Murphy 1987; Kavanagh and Ross-Murphy 1998). Gelation mechanisms in physical gels are quite complex due to the transient nature of the non-

covalent junctions. For instance, their number and position can fluctuate with parameters such as time, temperature, ionic strength and the nature of the counter-ions. This is explained by the disparate forces that are often involved, e.g. Coulombic, dipole-dipole, van der Walls, charge transfer and hydrophobic and hydrogen bonding interactions (Kavanagh and Ross-Murphy 1998) . Non-covalent cross-links are formed by one or more of these interactions, combined with other specific mechanisms such as the formation of multiple helices and ion mediated “egg-box” structures, also known as ionic bridging or cross-linking (Clark and Ross-Murphy 1987) .

The first authors to report physical gelation of chitosan in oxalic acid were Hayes and Davis (1978) and Yamaguchi et al. (1978), the latter also mentioning the thermoreversible nature of the sol-gel transition. Even though they had no information about the types of bonding present in the gels, Hayes and Davies (1978) explained the gelation as a change of conformation of the chitosan molecules, from random coil in solution to double helices in the presence of oxalic acid, and described the creation of cross-links leading to gel formation. They also reported that chitosan gelation was not possible with other carboxylic acids, whereas Yamaguchi et al. (1978) could not obtain chitosan gels with other di- and multivalent acids such as phosphoric, boric, maleic, succinic, malic and citric acids.

In a previous study (Hamdine et al. 2004), we have looked at the possibility of obtaining chitosan hydrogels with a) inorganic acids: sulphuric, phosphoric, hydrochloric; b) organic monocarboxylic acids: formic, acetic, lactic, propionic, butyric, isobutyric, adipic; c) organic di- and tri- carboxylic acids: oxalic, succinic, malic, maleic, acotinic, ascorbic, citric; and d) chloro-organic acids: chloroacetic and di- and tri-chloroacetic. The study revealed that with long acid molecules (more than three carbons on the main chain) and/or complex chemical structure (branched, double-bounded or aromatic), gelation could not occur, probably due to the large hydrodynamic volume which hindered the interaction with the macromolecule. Whereas with more simple

chemical structure and short chain solvent, gelation occurred in two pH ranges depending on the ionic strength, the  $pK_a$  of the acid and the degree of protonation of the macromolecule in solution. In the vicinity of chitosan  $pK_a = 6.2$ , and with polymer concentration / acid concentration = 5g/100 ml / 0.25M, gelation occurred in hydrochloric acid. This gelation was related to neutralization and solubility limit of chitosan in HCl (Hamidine et al. 2004). Around pH = 2, gels were obtained when strong and weak divalent and trivalent acids were used: sulfuric, oxalic and phosphoric. Through acid dissociation and ionic strength calculations, we concluded that sulfuric acid played a role of “ionic cross-linker”, forming a strong ion mediated structure. This mechanism of gelation has been proposed for many other gelling systems such as gellan and alginate gels in the presence of di-cations (Clark and Ross-Murphy 1987). In the two other systems (oxalic and phosphoric), acid dissociation and ionic strength calculations indicated that the chitosan gels were formed by electrostatic charges screening by monovalent acids counter-ions, and that intermolecular hydrogen bonding and hydrophobic interactions also played an important role to stabilize the physical networks. The role of hydrogen bonding in the phosphoric and oxalic acids systems is further addressed in the present work.

#### 4.2.2.2 Gelation scaling theories

Gelation theories have been proposed to predict the evolution of clusters growth. The branching theory developed by Flory (1941) and Stockmayer (1943) using combinatorial approaches, and known as the classical theory, is based on multifunctional molecules that can form networks through covalent bonds. Percolation theory (Macosko and Miller 1976; Martin and Adolf 1988; Adolf and Martin 1990), also initially developed for chemical gels and applied later to physical systems, describes the random growth of molecular clusters on a  $d$ -dimensional lattice with limited mobility and accessibility of all groups. It is based on bond formation probability  $p$  and the existence of a critical value  $p_{gel}$  beyond which the likelihood of finding a percolating cluster is non-

zero. Percolation theory results in scaling relationships in the vicinity of the sol-gel transition for static and dynamic properties, with specific relationships between the critical exponents. Winter and Mours (1997), in their review paper on the rheology of polymers near liquid-solid transitions, emphasized that scaling is common for material behavior near any critical point, including the sol-gel transition. Scaling of dynamic properties such as the zero-shear viscosity  $\eta_0$ , the dynamic moduli  $G'$  and  $G''$ , and the equilibrium modulus  $G_e$  before, at, and beyond the sol-gel transition respectively, are expressed as (Winter and Mours 1997):

$$\eta_0 \sim \varepsilon^{-s} \quad \text{for } p < p_{gel} \quad (2)$$

$$G'(\omega) \sim G''(\omega) \sim \omega^n \quad \text{at } p_{gel} \quad (3)$$

$$G_e \sim \varepsilon^z \quad \text{for } p > p_{gel} \quad (4)$$

With  $\varepsilon = \frac{|p - p_{gel}|}{p_{gel}}$ , the relative distance of a gelation variable  $p$  from the gel point  $p_{gel}$ ,

and  $s$ ,  $n$  and  $z$  are the three positive indexes for the scaling laws. Relaxation exponent  $n$  must be within 0 and 1 as reported by Chambon and Winter (1987), while typical experimental values for  $s$  and  $z$  are scattered, between 1.3-1.7 and 2-3 respectively (Larson 1999). Different approaches to the percolation theory have proposed values of the exponents such as:  $n = 0.66$ ;  $s = 1.35$ ;  $z = 2.7$  with Rouse theory, and  $n = 0.7$ ;  $s = 0.75$ ;  $z = 1.94$  with the electrical analogy model Winter and Mours 1997). A scaling relationship has also been suggested, i.e.  $n = z / (z + s)$  ( Goldbart and Goldenfeld 1992). These scaling laws have been extensively applied for many chemical and physical polymeric gels such as gelatin (Guo et al. 2003), methylcellulose (Li 2002), agarose (Tokida and Hikichi 1987), polydimethylsiloxane (Chambon and winter 1987) and hydrogels of polyethylene-oxide (Bromberg 1998). However, two limitations should be considered: first, there are no universal values of the three indexes, and second, the scaling laws are not valid for all gels (Li 2002). In this work, the application of the

percolation scaling laws is verified for the chitosan-phosphoric and chitosan-oxalic acid systems, with time as the gelation variable.

Another highly cited model for gels is the equation of Winter and Chambon (1986, 1987, 1997). They proposed a constitutive equation to describe chemical gels with balanced and imbalanced stoichiometry that has been applied later on to physical gels. In that model, the shear extra-stress  $\tau$  is expressed as:

$$\tau(t) = S \times \int_{-\infty}^t (t-t')^{-n} \dot{\gamma}(t') dt' \quad 0 < n < 1 \quad (5)$$

with  $S$ , the effective strength (or gel stiffness) of the network at the gel point. The two parameters can be obtained from dynamic data as followed:

$$n = \frac{2}{\pi} \tan^{-1} \frac{G''}{G'} \quad (6)$$

$$S = \frac{G'(\omega)}{\omega^n \cos(n\pi/2) \Gamma(1-n)} \quad (7)$$

with  $\Gamma(1-n)$  the gamma function of  $1-n$  (Winter and Mours, 1987).

At the gel point, the loss and storage moduli are parallel, resulting in a frequency independent value of  $\tan(\delta) = G''/G'$ , where  $\delta$  is the phase angle from which the value of  $n$  can be derived. For  $n$  approaching 1, the gel is purely viscous, while for  $n \rightarrow 0$ , the gel is purely elastic. The value of  $n = 0.5$  suggests a stoichiometrically balanced gel. The Winter and Chambon equation is used in this work to gain insight at the gels microstructure.

#### 4.2.3 Materials and methods

Chitosan ( $\overline{M}_w = 2 \times 10^6$  g/mol; polydispersity = 3.86) was purchased from Marinard Biotech (Rivière-aux-Renards, QC). The DDA was estimated to be 90% by infrared spectroscopy from the absorbance ratio ( $A_{1550}/A_{2878}$ ), considering baselines

between 2000 and 1500  $\text{cm}^{-1}$  for the amide II stretching band, and between 4000 and 1850  $\text{cm}^{-1}$  for the 2878  $\text{cm}^{-1}$  reference band. The IR spectra were recorded on a BIO-RAD FTS 3000 infrared spectrophotometer (Mississauga, ON) from 0.25 mm thickness KBr pellets dried during 24 hours at 60°C. Phosphoric and oxalic acids, supplied by Sigma-Aldrich (Oakville, ON), were used without further purification. Urea, a decomposing hydrogen bonding agent, was purchased from the same company, and was added at a concentration of 0.66 M to selected chitosan solutions.

#### **4.2.3.1 Preparation of chitosan gels**

Phosphoric and oxalic aqueous solutions at different concentrations (0.3 to 1 M and 1.5 M, respectively) were prepared. Within the range of 1-6% w/v (g/100mL), chitosan was dissolved in each medium. Solubilization was achieved in 100 mL beakers by heating in a hot water bath (80°C). To avoid air bubbles in the sample, which might affect subsequent rheological measurements, the samples were centrifuged (3700 RPM, 10 minutes) at 25°C, and were poured in disk-shaped moulds then subsequently stored in a cold room at 10°C to allow gelation. The pH was measured at room temperature in viscous solutions with an electrode for colloids (Thermo Orion electrode, model 9272; VWR, Ville-Mont-Royal, QC) and on gels surfaces with a flat electrode (Thermo Orion electrode, model 8135; VWR, Ville-Mont-Royal, QC).

Chitosan polymer in acidic aqueous solutions acts as a weak base (Roberts 1992) (Equation 1), therefore, by increasing its concentration, pH increased towards an almost constant value corresponding to the limit of solubilization of the polymer, reflecting the buffering capacity of the glucosamine units (Table 4.1). Solutions ionic strengths ( $I$ ) were calculated from the concentration of charged ions obtained from the dissociation constants of the weak acids at the measured pH:

$$I = \frac{1}{2} \sum_1^n Z_i^2 c_0 \alpha_i + 10^{-pH} \quad (8)$$

with  $Z_i$  the ion  $i$  charge,  $c_0$  the acid concentration (M), and  $\alpha_i$  the degree of dissociation, described by Equation 9. The protonated amine groups of chitosan were neglected in this calculation. The degree of dissociation ( $\alpha$ ) of the weak acids was calculated from the acids dissociation constants  $K_{as}$  ( $pK_a = -\log K_a$ ) and the measured pH:

$$\alpha = \frac{[\text{Conjugated base}]}{[\text{Acid}] + [\text{Conjugated base}]} = \frac{10^{-pK_a}}{10^{-pH} + 10^{-pK_a}} \quad (9)$$

The dissociation constants at 25°C were obtained from the literature (Lide 2000-2001) for oxalic, a divalent acid (1.25, 3.81), and for phosphoric, a trivalent acid (2.16, 7.21, 12.32). Measured pH and calculated ionic strengths for chitosan solutions and gels are presented in Tables 4.1 and 4.2, at constant acid concentration in Table 4.1, and constant polymer concentration in Table 4.2. As mentioned earlier, pH increased slightly with polymer concentration, while ionic strengths remained almost constant. Increase in acid concentration, however, resulted in lower values of pH and increase of ionic strengths, as expected. Ionic strengths were larger for the oxalic acid systems, due to its lower  $pK_a$ . Acid dissociation calculations at 25°C showed that both the oxalic and phosphoric acids were predominantly in their mono-anionic form. Monovalent dissociation at 25°C was achieved between 37 and 80% for oxalic acid, and 18 to 67% for phosphoric acid, depending upon pH. Divalent dissociation was however extremely low, of the order of 1 and 0.002% for oxalic and phosphoric acid, respectively. Since  $pK_{as}$  increase with temperature decrease, the dissociation was even less at 10°C, the gel maturation temperature.

In our preliminary study of these gels (Hamidine et al. 2004), we concluded that the predominant presence of mono-anions in the oxalic and phosphoric acid solutions

would lead to a screening of the charged glucosamine units, but that ionic bridging that requires di-anionic species would not play an important role. In addition to ionic interactions, we proposed that gel formation was stabilized by intermolecular hydrogen bonding that is favoured upon cooling. These interactions might occur between the second oxalic carboxyl group for oxalic acid, the second and/or third hydroxyl and/or P=O groups for phosphoric acid, and the non-reactive parts of the polymer, such as C(3)OH, C(6)OH and glucosidic oxygen sites. This issue is discussed further in the results section.

Table 4.1. pH and ionic strength of chitosan solutions at different polymer concentrations.

System	Polymer concentration % (g/100ml)	pH	Ionic strength (M)
Chitosan - phosphoric acid (0.5 M)	1.0	1.2	0.08
	2.0	1.4	0.08
	3.0	1.6	0.08
	4.0	1.7	0.09
	5.0	1.8	0.09
	5.5	1.6	0.08
	6.0	1.6	0.08
Chitosan – oxalic acid (0.5 M)	1.0	1.1	0.18
	2.0	1.2	0.18
	3.0	1.3	0.18
	4.0	1.5	0.19
	5.0	1.5	0.20
	6.0	1.6	0.20

Table 4.2. pH and ionic strength of chitosan solutions at different acid concentrations.

System	Acid concentration (M)	pH	Ionic strength (M)
<b>Chitosan (5.5% w/v) - phosphoric acid</b>			
1	1.5	0.12	
0.75	1.6	0.11	
0.5	1.8	0.09	
0.4	2.0	0.09	
0.3	2.5	0.10	
<b>Chitosan (5.0% w/v) – oxalic acid</b>			
1.5	1.0	0.37	
1	1.1	0.29	
0.75	1.2	0.24	
0.5	1.4	0.19	
0.4	1.6	0.17	
0.3	1.8	0.14	

#### 4.2.3.2 Rheological measurements

A controlled stress rheometer, AR-1000N from TA-Instruments (New Castle, DE), was used to measure the dynamic properties of the systems. Parallel plates of 60 mm diameter with smooth surfaces were used for the viscous systems, while 40 mm diameter parallel plates with rough surfaces (with approximately 400  $\mu\text{m}$  roughness), were employed for the gels. The molded gels of 2.5mm thickness and in the shape of disks were directly placed between the parallel plates. The measurements were carried out by applying frequency sweeps from 0.062 to 570  $\text{rad.s}^{-1}$  in the linear viscoelastic regime at room temperature, under the following conditions: 0.1 strain for liquid systems, and a stress of 50 Pa for solids.

Data from frequency sweep tests were used to calculate stress relaxation spectra using the commercial software NLREG<sup>TM</sup> (Roths 2001). The spectrum describes the time dependency of the stress relaxation process and is particularly sensitive to molecular structure. The dynamic modulus  $G^*(\omega)$  is related to the stress relaxation spectrum  $H(\lambda)$  by the following relationship:

$$G^*(\omega) = \int_{-\infty}^{+\infty} (\omega\lambda + i) \left( \frac{\omega\lambda H(\lambda)}{1 + \omega^2\lambda^2} \right) d(\ln\lambda) \quad (10)$$

The zero-shear viscosity can be estimated from the area under the time weighted relaxation spectra:

$$\eta_0 = \int_{-\infty}^{\infty} \tau H(\tau) d(\ln\tau) \quad (11)$$

Monitoring of time and temperature evolution of the systems was carried out by applying small deformation or stress amplitude and small frequency (6.23 rad/s) oscillatory shear. For time sweeps, the tests were run at 10°C under a stress of 50 Pa. For temperature sweeps, the tests were carried out in the range of 80-10°C under a strain of 0.1 to investigate sol-gel transitions and thermo-reversibility. For these tests, the gels

were first melted in a hot water bath (80°C) and then placed in the rheometer for successive cooling and heating cycles at 3°C/min.

#### **4.2.3.4 Thermal measurement by DSC**

Gel-sol transitions were investigated using a differential scanning calorimeter (DSC 9210) from TA-Instrument (New Castle, DE). Sampling was in aluminum coated hermetic pans of 90 µL capacity (sample weights of 40 mg). Baseline and temperature calibration was achieved with cadmium. Transitions were studied by heating up the gels from 5 to 80°C at the rate of 20°C/min.

#### **4.2.3.4 Polarized optical microscopy**

To characterize the evolution of the gels morphology with temperature and time, specimens were examined by polarizing optical microscopy (POM). We used Axioskop 2 Plus microscope from Carl Zeiss Company (Gottigen, Germany) with 10 and 50X Leica objectives. A THMS600 hot stage from Linkam Scientific Instrument Ltd (Surrey, England) was used to follow thermal transitions within the range of 25-80°C at a similar heating rate as for DSC measurements, i.e. 20°C/min. Aged gels after one week maturation at 10°C were also examined at room temperature in POM by directly squeezing them between lamellas.

### **4.2.4 Results and discussion**

#### **4.2.4.1 Polymer concentration effect on rheological dynamic properties**

To investigate the effect of polymer concentration on the dynamic rheological properties of oxalic and phosphoric acid-chitosan systems, frequency sweeps were conducted in the linear viscoelastic regime. Both systems showed similar rheological

behaviors divided in two ranges of polymer concentration, as shown for the phosphoric acid system in Figure 4.1 (a) and (b). Up to 4% (w/v) (5% for oxalic acid), storage and loss moduli were frequency dependent, and  $G''$  was larger than  $G'$  until the crossover (Figure 4.1 (a)), presenting therefore a typical polymer solution or melt behavior. At low frequencies,  $G''$  showed a linear dependence with  $\omega$ , while a relationship of  $G'' \propto \omega^{1.8}$  was found for the storage modulus, which is close to the exponent of 2 in the linear viscoelastic regime terminal zone. The complex viscosity also increased with increasing polymer concentration, the Newtonian plateau width decreased and the shear-thinning behavior increased, as shown in Figure 4.1 (b).

Above the critical polymer concentration  $C_{\text{gel}}$ , defined as the concentration below which no gelation occurs,  $G'$  and  $G''$  were almost frequency independent and  $G'$  was larger than  $G''$  at all frequencies (Figure 4.1 (a)). The complex viscosity showed a nearly linear curve going towards infinity at low frequencies, which is typical of gels (Figure 4.1 (b)). This behavior was also observed for many anionic polysaccharide gels such as gellan gums (Miyoshi et al. 1994; 1995), carrageenan (Cuvelier et al. 1989) and methylcellulose (Lin 2002). At low frequencies, the gels loss modulus  $G''$  showed a particular slight dip as shown in Figure 4.1 (a). Ross-Murphy (Clark and Ross-Murphy 1987) attributed this phenomenon to a specific relaxation mode typical of certain gels. Miyoshi et al. (1994 and 1995) also observed the same shape of the  $G''$  curve when they studied sol-gel transition in gellan aqueous solutions. This characteristic is discussed further in the results section.

In Figure 4.2 we present the evolution of  $\eta^*$  at a constant low frequency (0.1 rad/s) as a function of polymer concentration on a double-logarithmic scale for the phosphoric acid system. A similar behavior was observed for the oxalic acid one. The break point  $C_{\text{gel}}$  corresponded to a value around 5% w/v for both acids. In the first region ( $C < C_{\text{gel}}$ ), the storage modulus and the complex viscosity followed typical scaling laws for polyelectrolytes.

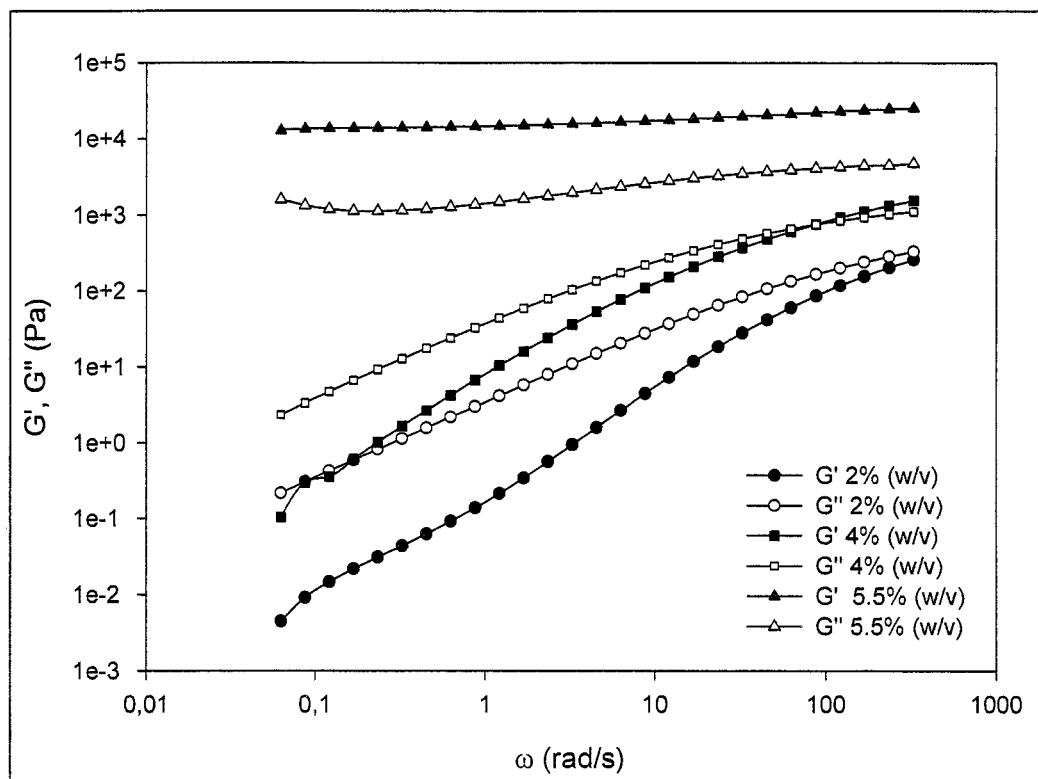


Figure 4.1 (a). Effect of chitosan concentration on complex moduli for 0.5 M phosphoric acid-chitosan system at room temperature.

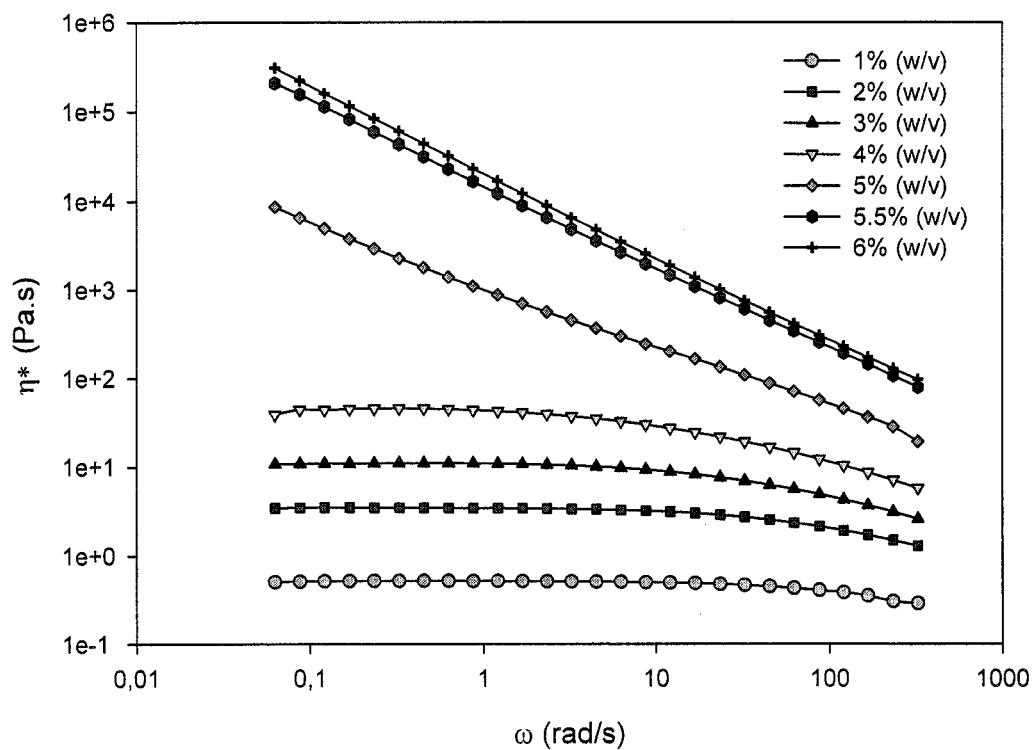


Figure 4.1(b). Effect of chitosan concentration on complex viscosity for 0.5 M phosphoric acid-chitosan system at room temperature.

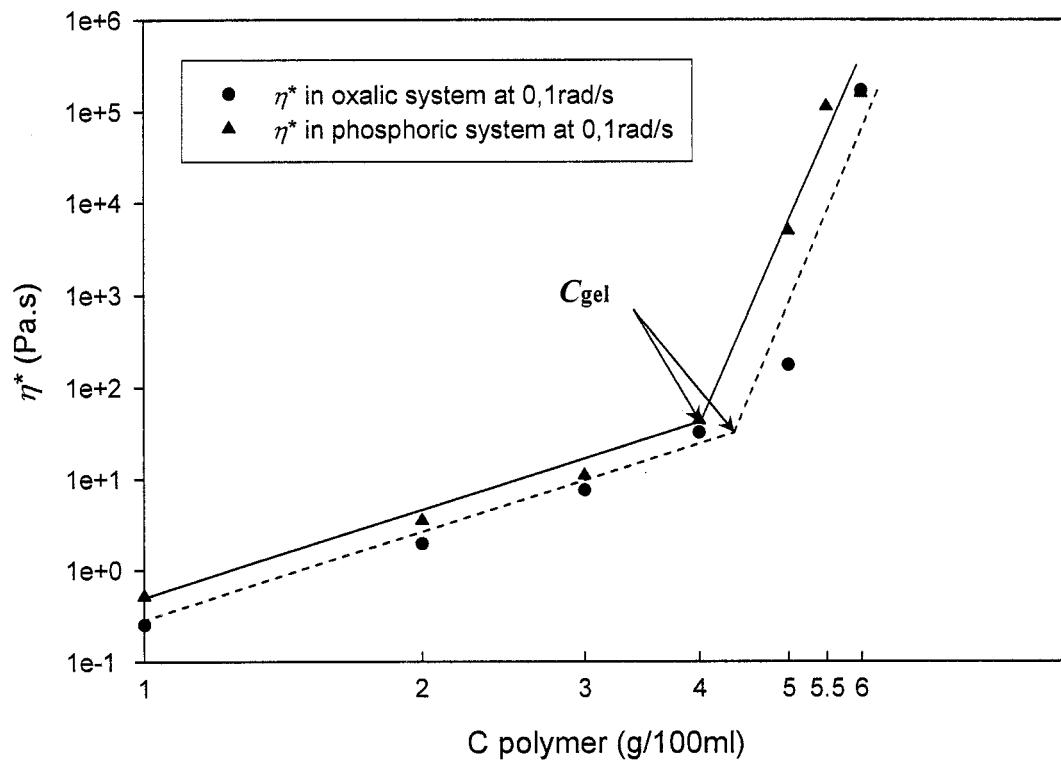


Figure 4.2 Complex viscosity at 0.1 rad/s and room temperature as a function of polymer concentration in chitosan-phosphoric acid and chitosan-oxalic acid systems.

$$\eta^*_{\text{phosphoric}} \sim C^{3.1} \text{ and } \eta^*_{\text{oxalic}} \sim C^{3.4} \quad (12)$$

$$G'_{\text{phosphoric}} \sim C^{3.9} \text{ and } G'_{\text{oxalic}} \sim C^{4.6} \quad (13)$$

The exponents of the zero-shear viscosity (3.1 and 3.4) were similar to that observed for most random-coil polysaccharides and polymers, i.e. 3.4 (Mitchell and Ledward 1996; Ferry 1980).

In the gelation region ( $C > C_{\text{gel}}$ ) the slopes increased dramatically as followed:

$$\eta^*_{\text{phosphoric}} \sim C^{21} \text{ and } \eta^*_{\text{oxalic}} \sim C^{28} \quad (14)$$

$$G'_{\text{phosphoric}} \sim C^{28} \text{ and } G'_{\text{oxalic}} \sim C^{28} \quad (15)$$

The intermolecular interactions in this region become increasingly important and finally cause a transition into the gel state (Hoffman et al. 1996). Polarizing optical microscopy revealed a large difference between entangled solutions and gels. Both chitosan-oxalic acid and chitosan-phosphoric acid gels displayed birefringence at high polymer concentrations, while entangled solutions below  $C_{\text{gel}}$  displayed isotropy, confirming the absence of organized structures.

In order to enlarge our frequency window, the curves of  $G'(\omega)$ ,  $G''(\omega)$  and  $\eta^*(\omega)$  were shifted by applying time-temperature superposition using 293K as a reference temperature and apparent activation energies (for flow and dynamic junctions) of 200 and 265 kJ/mol for phosphoric acid and oxalic acid gels, respectively (Hamdine et al. 2004). The data of the corresponding master curves served to calculate the stress relaxation spectra as a function of chitosan concentration, shown in Figures 4.3 and 4.4. It can firstly be noticed that the zero-shear viscosity of the phosphoric acid-based solutions are always larger than of the oxalic acid ones. Secondly, the spectra differed considerably

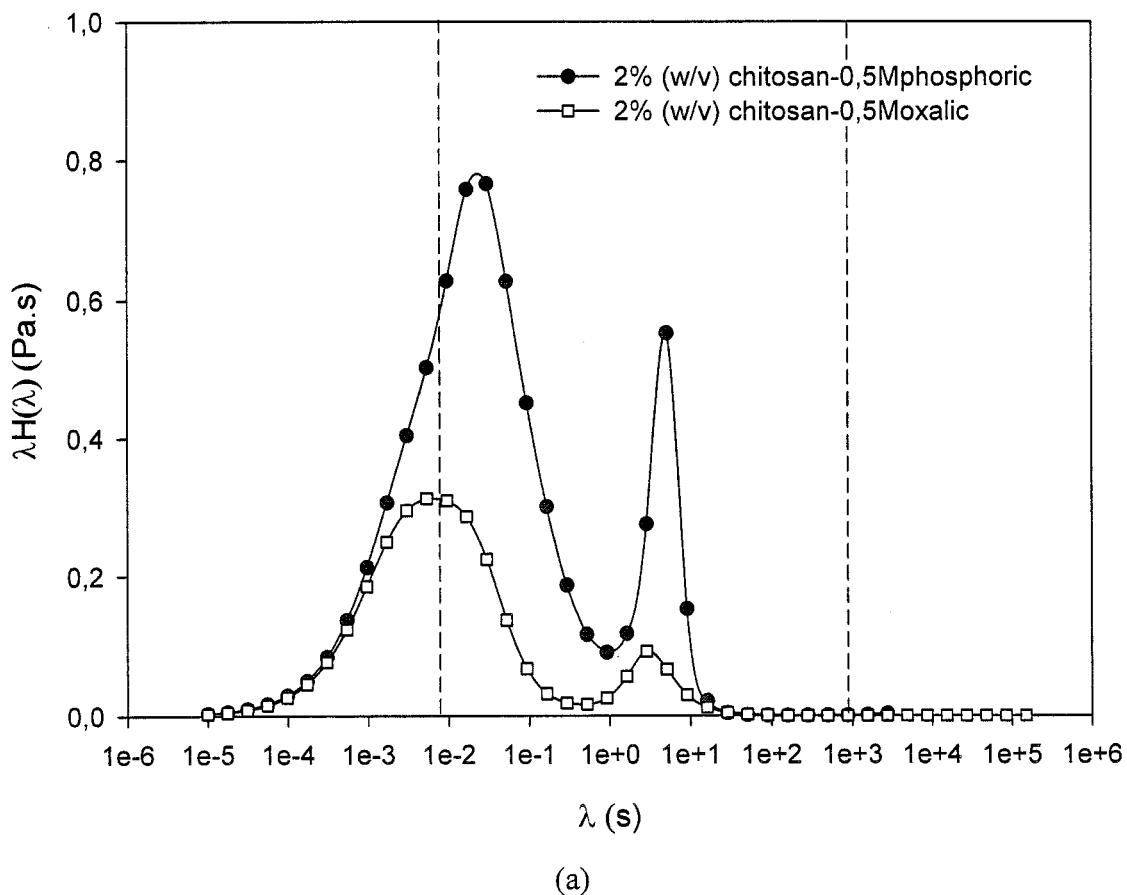


Figure 4.3 Effect of chitosan concentration in 0,5M acid concentration on relaxation time spectra: (a) 2% (w/v); (b) 4% (w/v). (Dashed lines are to determine the experimental window).

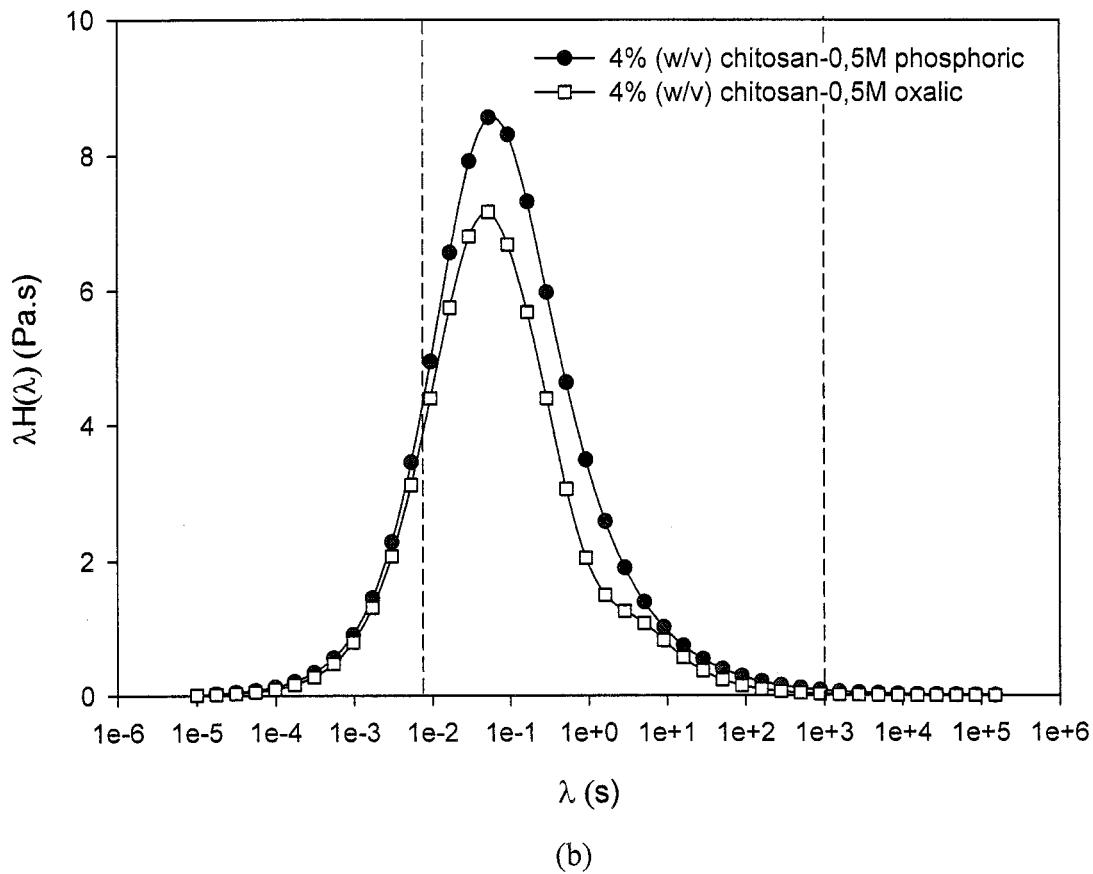


Figure 4.3 Effect of chitosan concentration in 0,5M acid concentration on relaxation time spectra: (a) 2% (w/v); (b) 4% (w/v). (Dashed lines are to determine the experimental window).

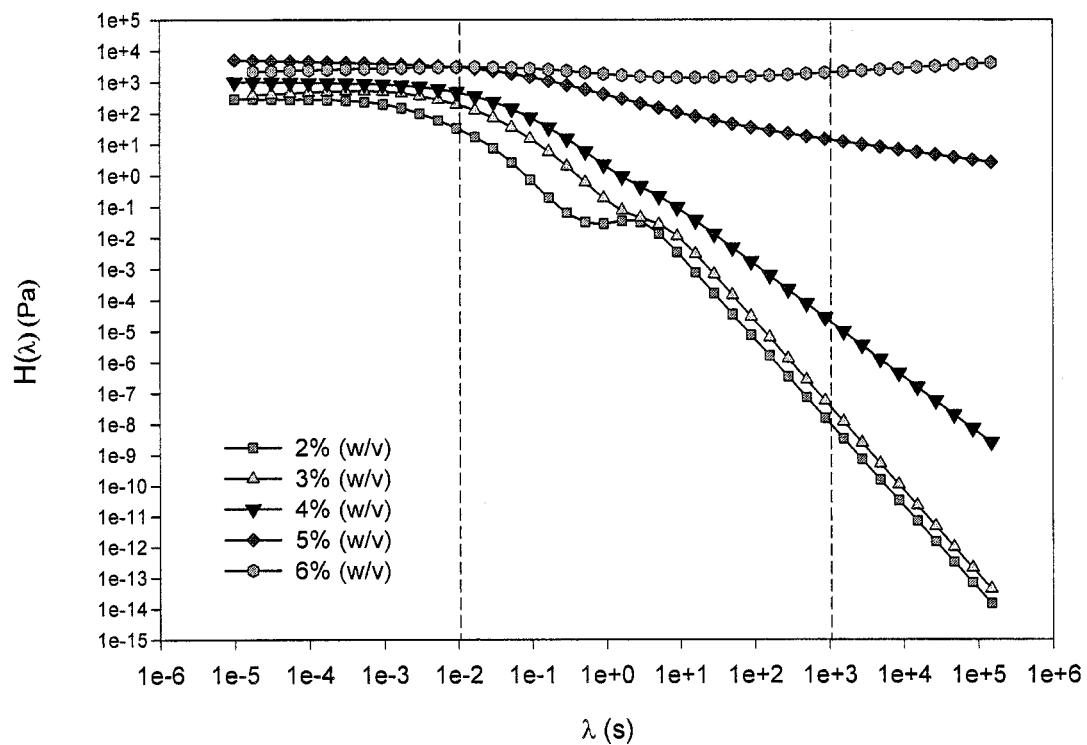


Figure 4.4 Effect of chitosan concentration in 0,5M acid concentration on  $H(\lambda)$ . Curve shown for oxalic system. (Dashed lines are to determine the experimental window).

according to polymer concentration. Below  $C_{\text{gel}}$  ( $C = 2\%$  w/v), two peaks were observed in the time weighted spectra  $\lambda H(\lambda)$  ((Figure 4.3 (a)), revealing two different stress relaxation modes. The predominant peak at short times was related to the relaxation of shorter chains, while the second peak observed at long times was most probably due to the presence of high molecular weight molecules. The influence of these longer chains on the spectra disappeared with increasing polymer concentration ( $C = 4\%$  w/v), and the average relaxation time shifted to longer times (Figure 4.3 (b)). Watase et al. also observed that relaxation times shifted to larger values for higher agarose concentration (Watase and Nishinari 1993). Above  $C_{\text{gel}}$ , when the gel transition was achieved, the relaxation times tended towards infinity as shown in Figure 4.4 for the relaxation spectra  $H(\lambda)$  of the chitosan-oxalic acid system. This is in agreement with the complex viscosity that showed no plateau at low frequencies. The influence of high molecular weight chains is seen again for the 2 and 3% w/v concentration with a small lump in the  $H(\lambda)$  curves, more apparent at 2%.

#### **4.2.4.2 Acid concentration effect**

An increase in acid concentration, and therefore ionic strength, did not have a clear effect on the gelation evolution of the various systems. Figure 4.5 shows the value of  $\eta^*$  at a constant frequency of 0.1 rad/s as a function of ionic strength after seven days storage at 10°C. Increase of the ionic strength seemed to slow down the gelation of phosphoric acid systems, while it did enhance that of some oxalic acid-based ones, as shown in Figure 4.5. These measurements have been repeated at least three times each. It is not clear at this point why the two systems behave differently, despite the predominance of monovalent dissociation in both cases and at all acid concentrations.

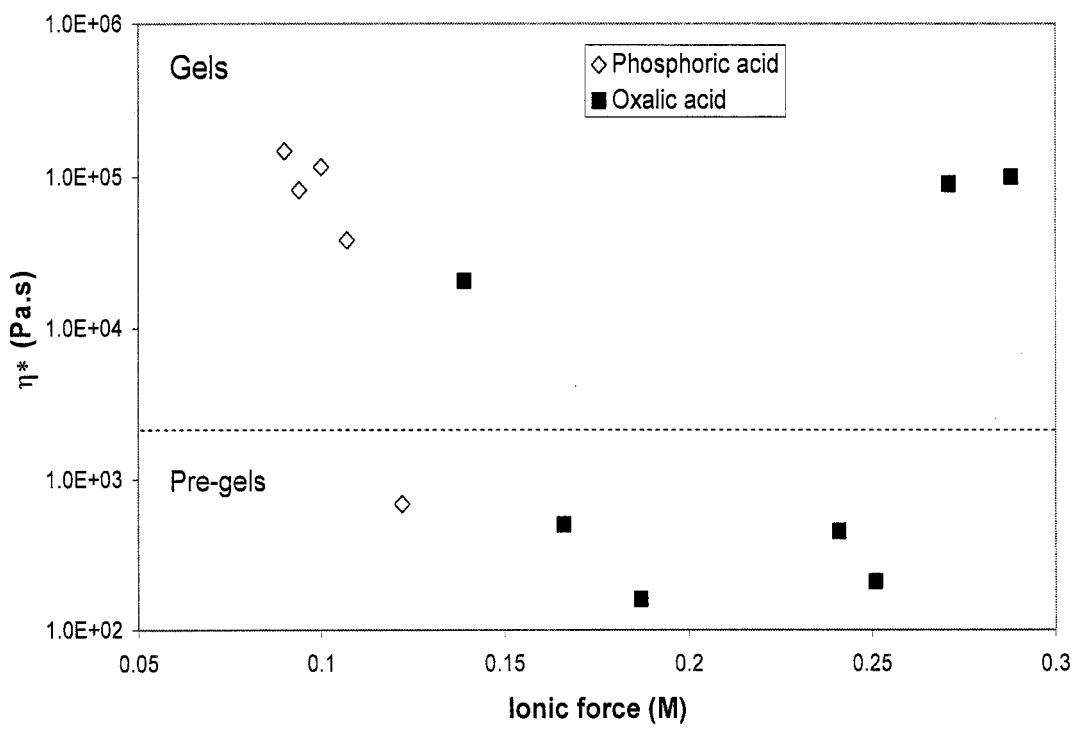


Figure 4.5 Effect of ionic strength on the evolution of complex viscosity at 0.1 rad/s in 5% (w/v) chitosan solutions after one week maturation at 10°C, and measured at room temperature.

#### 4.2.4.3 *Urea effect*

The presence of hydrogen bonds in the chitosan-phosphoric and oxalic acid gels was investigated using urea. Urea, known as a hydrogen bonding decomposing agent (Gross et al. 1982; Rha et al. 1982; Chen et al. 1994), i.e. that it disrupts and monopolizes hydrogen bonds, was added at a concentration of 0.66 M to various chitosan solutions that went afterwards through the standard gel preparation protocol. Urea had different effects on both systems. In oxalic acid-based systems, the resulting gels were not homogeneous anymore (they were severely cracked), and showed phase separation, therefore indicating the importance of hydrogen bonding in the continuous network structures. As a result, no rheological experiments were conducted on the urea-oxalic acid-based systems. The presence of hydrogen bonds was also highlighted in the phosphoric acid-based gels, with urea decreasing the mechanical properties, as shown in Figure 6 (a) for  $G'$  and (b) for  $G''$ . The complex moduli  $G'$  and  $G''$  decreased largely and became more frequency dependent, similarly to pre-gel systems. The minimum in the  $G''$  curve was more apparent in the curves without urea, indicating that “stickers” along the chain (Rubinstein and Semenov 2001) caused by hydrogen bonding may have an effect on this specific relaxation mechanism. It is most probable that the hydrogen bonds between the phosphoric hydroxyl groups and the non reactive parts of chitosan such as C(6)OH and/or between polymer chains were displaced by urea, as it contains two amide groups. Some authors have reported that the conformation would consequently change from a compact to a more expanded structure (Gross et al. 1982; Rha et al. 1982; Chen et al. 1994). Figure 4.6 also shows the effect of acid concentration, with the moduli decreasing with increasing acid concentration, confirming the observations of Figure 4.5 for phosphoric acid.

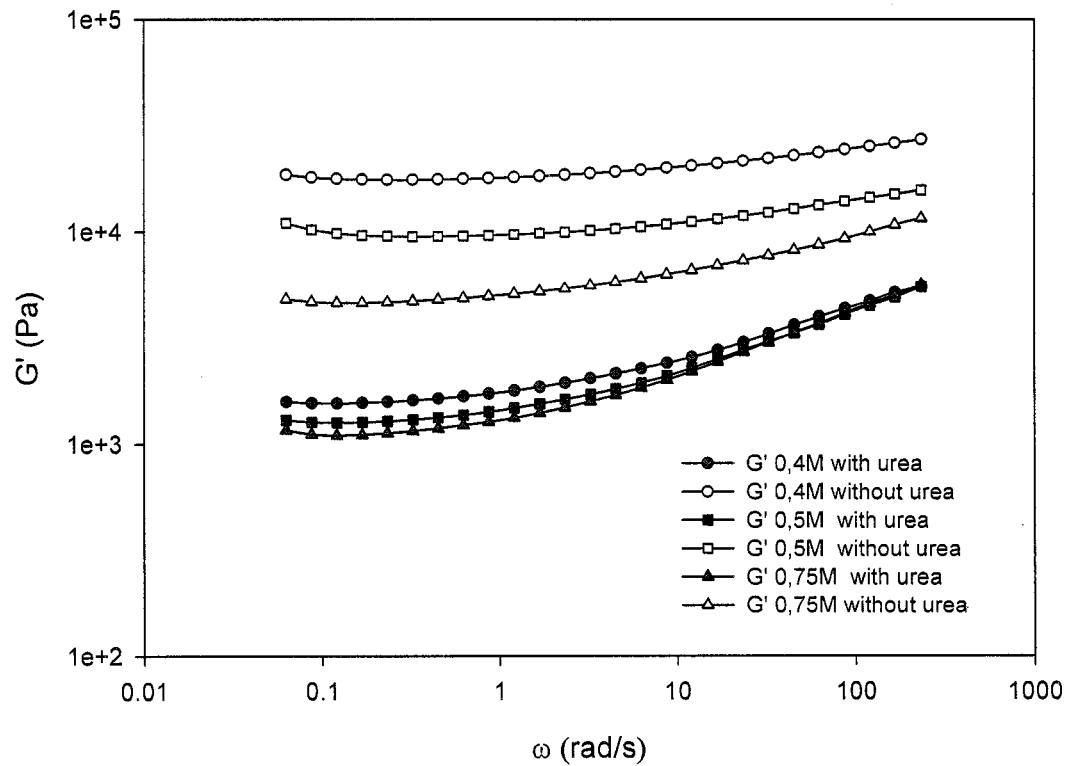


Figure 4.6(a). Effect of urea and acid concentration on storage modulus in chitosan 5.5% (w/v)-phosphoric acid.

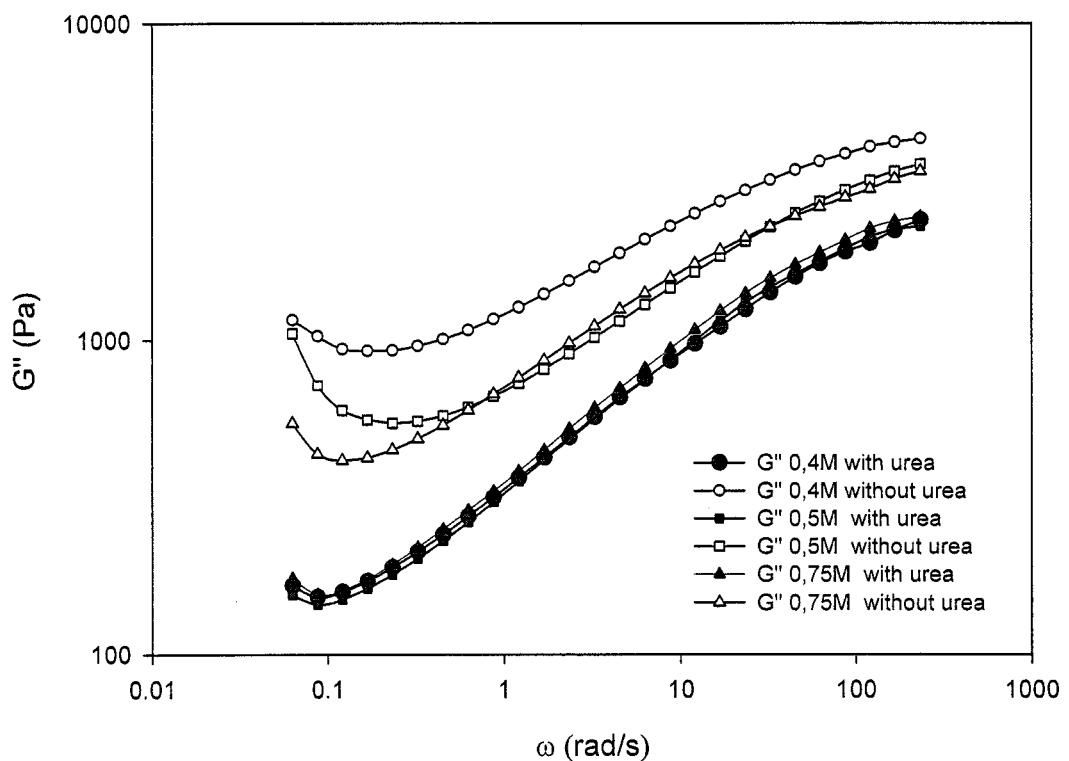


Figure 4.6(b). Effect of urea and acid concentration on elastic modulus in chitosan 5.5% (w/v)-phosphoric acid system.

#### **4.2.4.4 Time effect: systems ageing**

Solutions and gel samples were stored at 10°C to investigate ageing effect. For entangled solutions, storage time showed a strong effect on the rheological properties. For the 5% (w/v) chitosan - 0.5M acid systems, complex moduli  $G'$  and  $G''$  evolved from liquid-like to solid-like curves. In Figure 4.8 (shown for phosphoric acid), it can be seen that after eleven days (between two and four weeks for oxalic acid),  $G'$  reached a plateau with  $G''$  an order of magnitude smaller, showing a solid-like behavior. Similar experiments were run on less concentrated chitosan solutions. It was observed that rheological properties also evolved with time but took longer to reach the gel point.

For mature gels, the maximum value in storage modulus  $G'$  was reached after one week, and no significant evolution was observed afterwards until the gels started to shrink, making further rheological measurements impossible. However, pH measurements and visual observations revealed interesting information about the shelf-life and the stability of these gels. It was noticed that the phosphoric acid system was more stable than the oxalic acid one. This latter showed phase separation in the fourth week but no phase separation was noticed even after eight weeks. This separation was firstly observed by polarized optical microscopy and later visible by crystallization on the sample surface. In addition, the pH in both systems decreased with time as illustrated in Figure 4.8. This is most probably due to the metastable nature of physical gels that have a tendency to shrink with time, causing a concentration effect of the clusters and generating an exclusion of the solvent molecules (Winter and Mours 1997). This phenomenon is known as syneresis (Vachoud 2000).

#### ***Kinetics and scaling laws validation***

In order to follow the kinetics of gelation in isothermal conditions, time sweep tests under small amplitude oscillatory shear were conducted at 10°C for both chitosan-

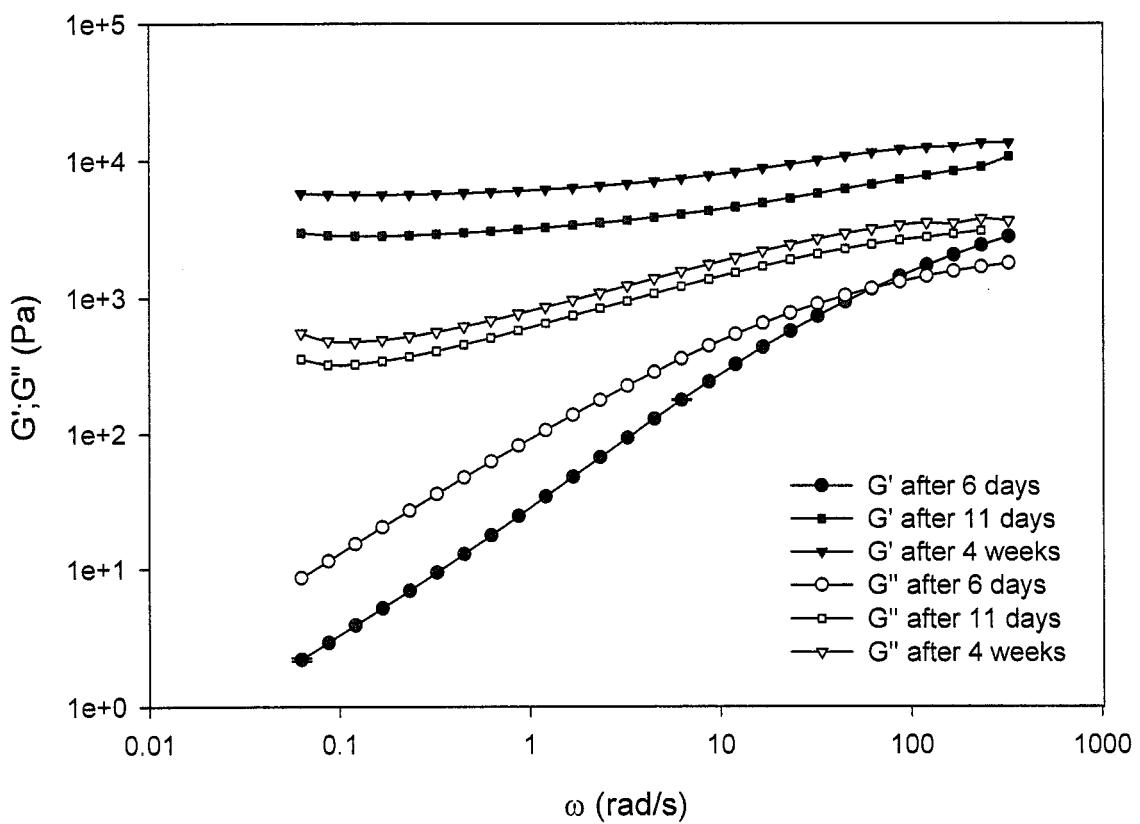


Figure 4.7 Ageing effect on the rheological properties in 5.5% (w/v) chitosan-0.5M phosphoric acid system. Complex moduli measured at room temperature and 0.1 strain for entangled solutions and 50 Pa for gels.

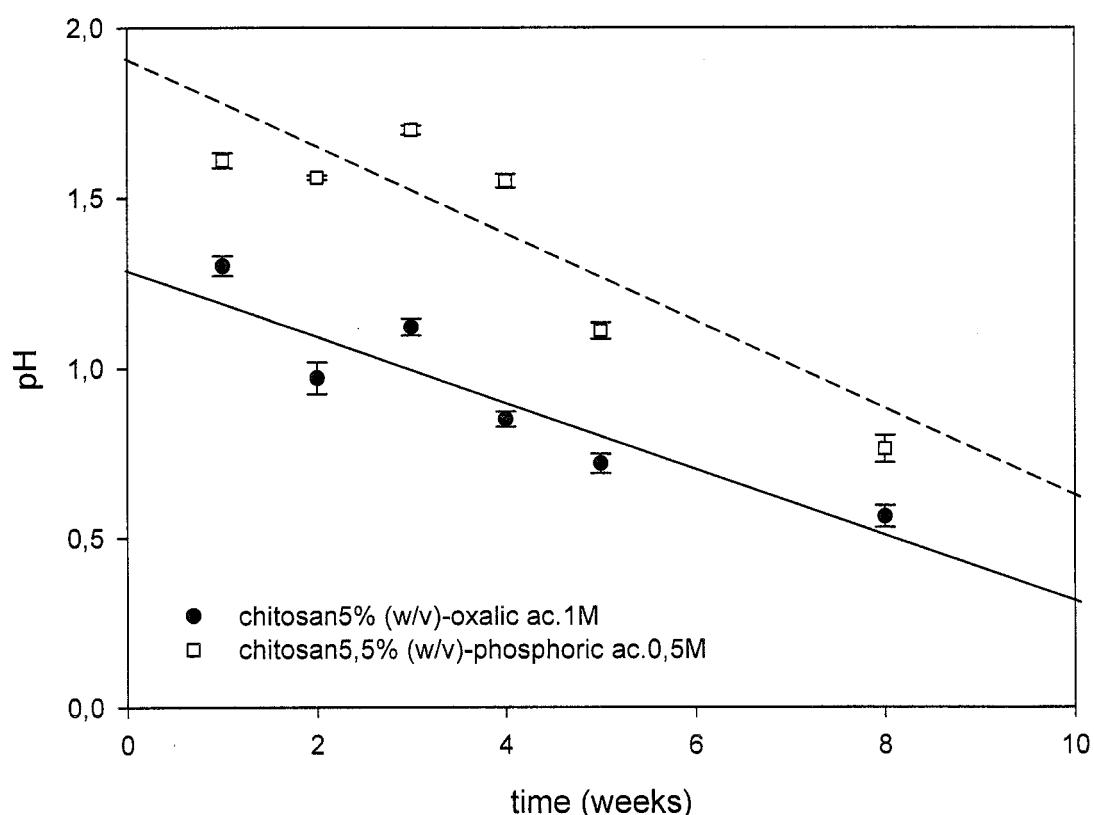


Figure 4.8 Effect of storage time on the pH of gels measured at room temperature. Lines are to guide the eye.

acid solutions. Figure 4.9 shows the increase of the storage modulus  $G'$  as a function of time for the chitosan-oxalic acid system. A similar behavior was observed with phosphoric acid. Gelation seemed to occur in three stages: 1) a lag stage where  $G'$  and  $G''$  were almost constant with  $G''$  larger than  $G'$ , representing gelation incubation; 2) a rapid increase in  $G'$  past the crossover point (gel point), indicating a structure assembling; and 3) once the gel was formed,  $G'$  continued to increase but more slowly due to the diffusion controlled motion of the molecules caused by the viscosity increase. In this last stage, the gel network rearranged slowly into more stable conformations to reach equilibrium. Tosh et al. (2003) reported that two processes can occur concurrently in gelatin systems, which are temperature dependent as chitosan gels. The first one is a process of aggregation of individual polymers, which dominates during the early stage of gelation. The second stage is the restructuring of the gel network into more energetically favorable conformations. Once the initial aggregation has been completed, the major contribution to the increase of  $G'$  is the rearrangement of the polymer interactions which conducts the clusters to pack more closely. When this latter step is completed, the microstructure of the gels continued to reorganize, but more slowly.

Frequency sweep experiments run at the gel point showed the superposition of  $G'$  and  $G''$  (Figure 4.10). It should be noticed that the gel point (which corresponds in our case to the crossover time  $t_{gel}$ ) varied from one sample to another ( $\overline{t_{gel}} = 5 \text{ hours} \pm 0.8$ ), probably because of the transient nature of the non-covalent junctions which are generated by disparate forces (Kavanagh and Ross-Murphy 1998). In the vicinity of the gel point, percolation theory-based scaling laws revealed that for chitosan-oxalic acid system,  $n = 0.55$ ,  $z = 0.81$  and  $s = 0.40$ . For chitosan-phosphoric acid system, it was found that  $z = 0.73$  and  $s = 0.59$ , giving  $n = 0.55$  ( $n = z / (z + s)$ ). The  $n$  exponent shows that both gels are close to a stoichiometrically balanced gel, but  $z$  and  $s$  were very different from those reported in the literature probably because the zero shear viscosity and the equilibrium modulus were not exactly taken at a very low frequency.

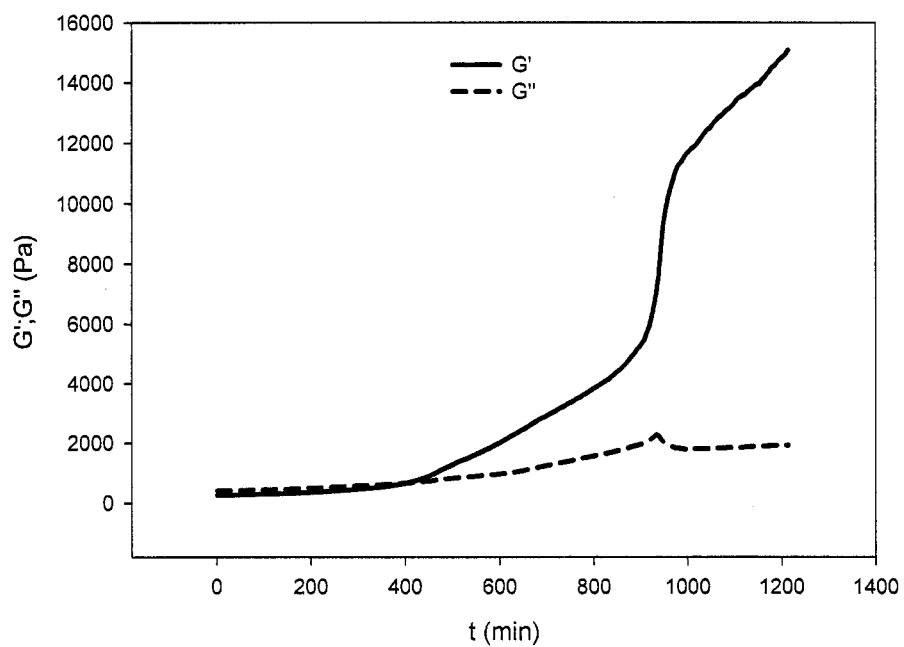


Figure 4.9 Gelation kinetics in 5% (w/v) chitosan-1M oxalic acid system. Complex moduli measured at 10°C, 6.28 rad/s and 0.1 strain.

Gel strength  $S$  at the gel point in both systems was also evaluated with Winter and Chambon equation (7). At a frequency of 12 rad/s,  $S = 109.4$  ( $\text{Pa}\cdot\text{s}^{0.55}$ ) for oxalic gel while  $S = 169.1$  ( $\text{Pa}\cdot\text{s}^{0.55}$ ) for phosphoric gel

#### **4.2.4.6 Temperature effect**

Temperature ramp tests under small amplitude oscillatory shear and differential scanning calorimetry (DSC) measurements were carried out to investigate the relationship between chitosan gels properties and temperature. Sol-gel transitions were determined by running temperature sweep experiments on molten chitosan gels, from 80 to 10°C. Upon cooling of the oxalic acid system (Figure 4.11 (a)), the storage modulus started to increase with decreasing temperature. The crossover of  $G'$  and  $G''$  corresponds to sol-gel transition temperature. For 5% (w/v) chitosan-1M oxalic acid,  $T_{\text{sol-gel}}$  was determined at 50°C, while for 5.5% (w/v) chitosan-0.5M phosphoric acid (Figure 4.11 (b)), the transition was not clear probably because the cycling was too rapid. It was at least qualitatively determined at 40°C corresponding to the onset of the curve. In the heating cycle, the storage modulus decreased monotonically with increasing temperature without any distinct transition. It seemed that with the rate of 3°C/min, the instrument was not sensitive enough to detect the melting temperature.

Gel-sol transition was also investigated by DSC upon heating the gels from 5 to 80°C at 20°C/min. The endothermic transition in the second cycle which corresponds to gel-sol transition was detected only for the oxalic acid system and was weak. This is probably because the sample weight was too small (40 mg), due to instrument limitations.  $T_{\text{gel-sol}}$  determined by DSC was around 53°C ( $\pm 8^\circ\text{C}$ ) for oxalic acid system as shown in Figure 4.12, this value was reproducible for a same batch (shown in the figure as (a), (b) and (c)) but not from one batch to another (shown as gel1 and gel 2 in the figure), probably because of the transient nature of the non-covalent junctions. No gel-sol transition was clearly observed for the phosphoric acid system at the same heating rate,

most likely because of the small sample weight. Polarizing optical microscopy also showed the disappearance of birefringence upon heating starting from 50°C for oxalic gel but no clear transition was seen in the phosphoric gel.

Finally, thermoreversibility was investigated using small amplitude oscillatory shear at small deformation and frequency (0.1 strain and 6.28 rad/s) by applying several cooling-heating cycles on molten gels, within the range of 80-10°C as shown in Figure 4.11 (a) and (b). During the first cooling-heating cycle both systems recovered their initial state. However, when further cycling was applied on the same gels they gradually lost their thermoreversibility and became permanent. The kinetics of gel formation also became faster, as reported by Hayes and Davies (1978)] for the chitosan-oxalic acid system. We observed that this system became permanent at the second cycle, while the phosphoric acid system could be solidified and molten two more times, revealing a higher thermoreversibility. These results gave an indication that the physical interactions making the gels became stronger as thermal energy was added, to the point of showing a permanent character as for chemical gels. It was also noticed that the mechanical properties of the oxalic acid gels in the first cycle were much larger than those of the phosphoric acid one even at the third cycle. Its apparent activation energy (265 kJ/mol) was also higher than that of the phosphoric acid-based system (202 kJ/mol) (Hamidine et al. 2004), slightly closer to that of chemical gels (~ 400 kJ/mol) (Clark and Ross-Murphy 1987).

The loss of the thermoreversible character may be explained by the presence of di-anions in the gel network. Upon heating to 80°C, the presence of divalent species becomes larger due to the decrease of the dissociation constants  $K_a$ , and the divalent species can be up to 4% for the oxalic acid. We have hypothesized that rapid successive cooling-heating cycles may trap some di-anions in the physical network (Figure 4.13) through hydrogen bonding and hydrophobic associations, giving therefore an ionically cross-linked character to the systems. Further investigation using Fourier-Transform

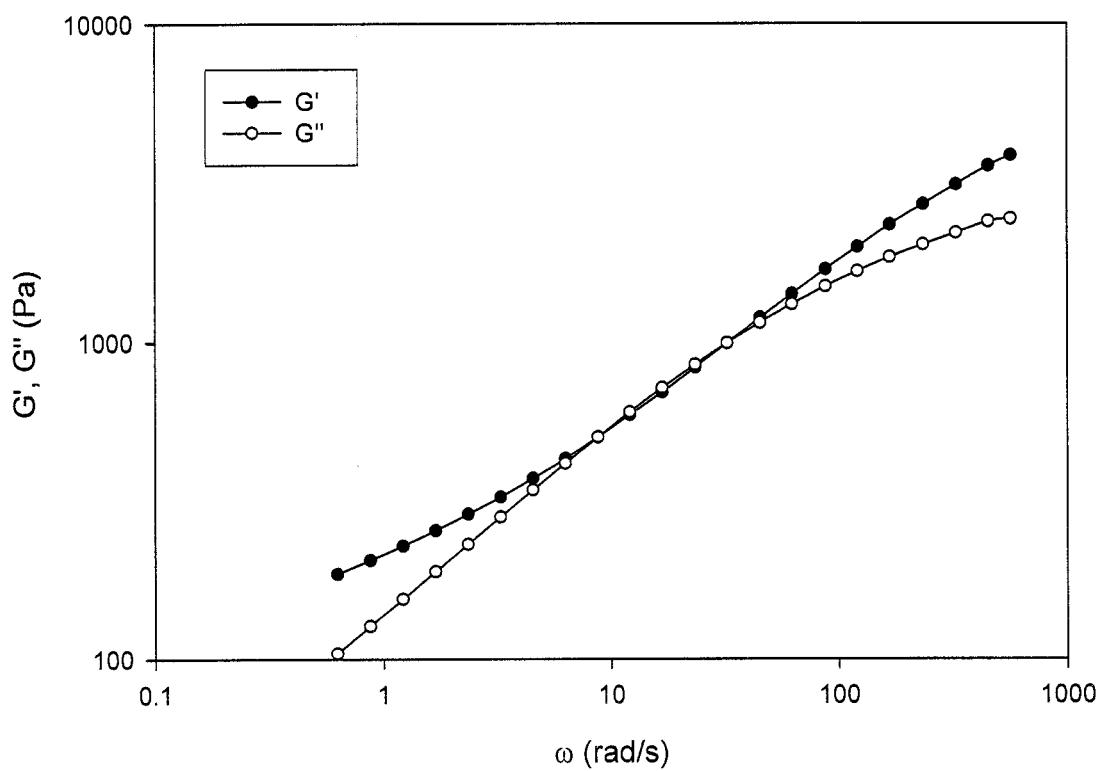


Figure 4.10 Complex moduli of 5% (w/v) chitosan-1M oxalic acid system at the gel point. Frequency sweep test run at 10°C and 0.1 strain.

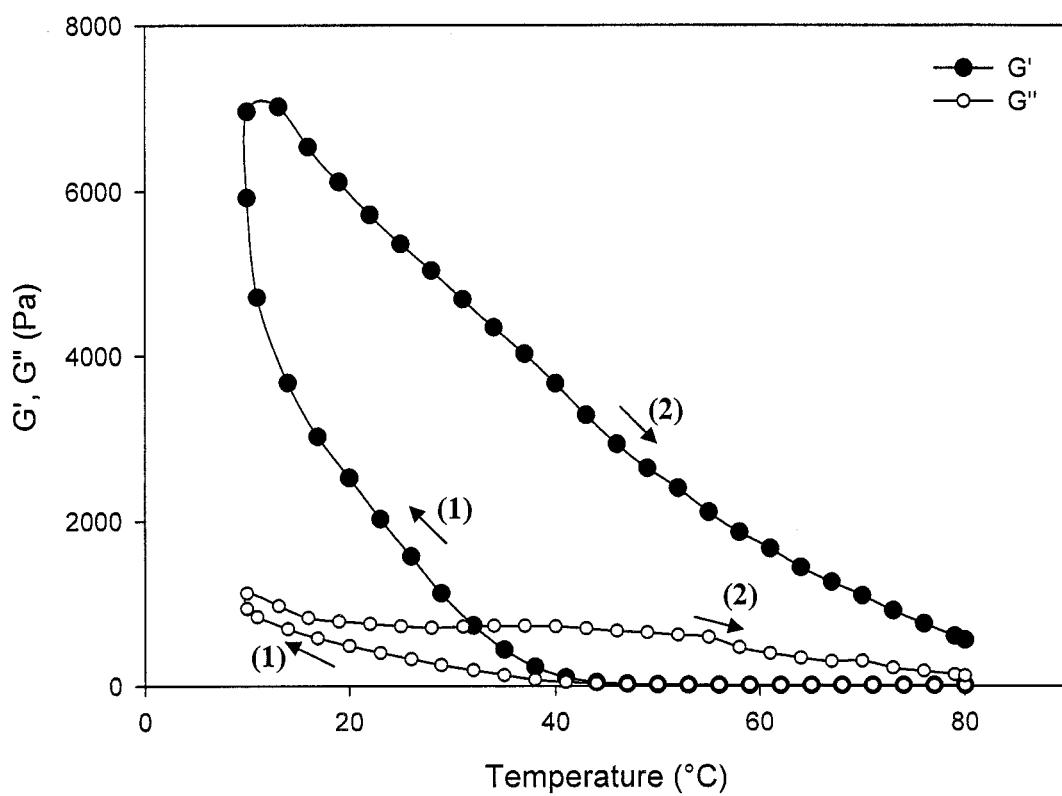


Figure 4.11(a) Evolution of complex moduli of chitosan-oxalic acid system in cooling (1) and heating (2).

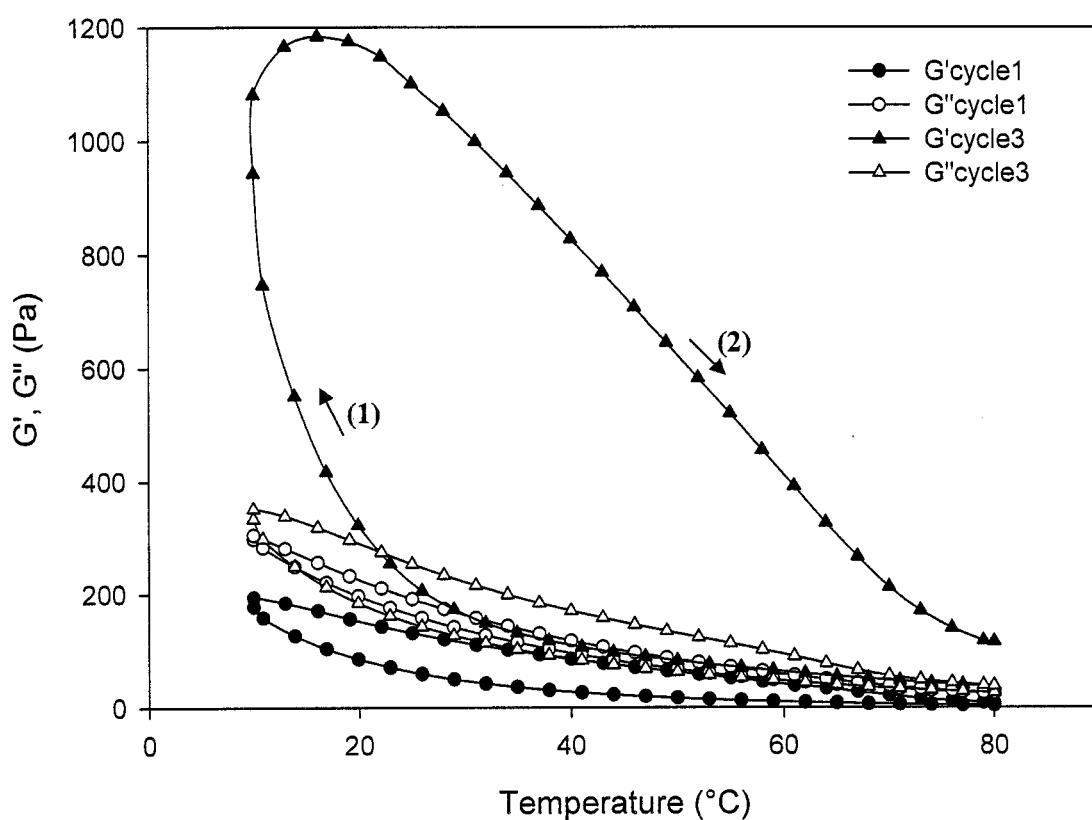


Figure 11 (b) Evolution of complex moduli of chitosan-phosphoric acid system in cooling (1) and heating (2).

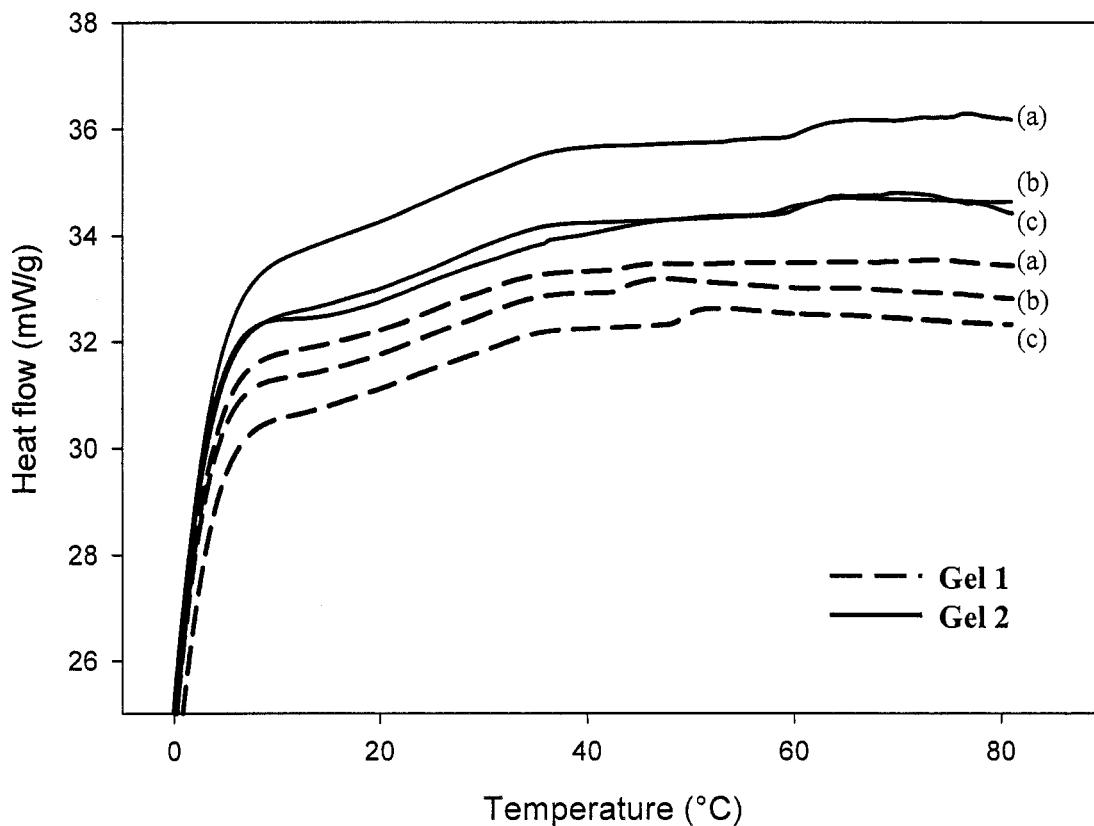


Figure 4.12. Differential scanning calorimetry data for the 5% w/v chitosan-1M oxalic acid system. Measurements were carried out with three samples (a), (b) and (c) of two different batches (Gels 1 and 2).

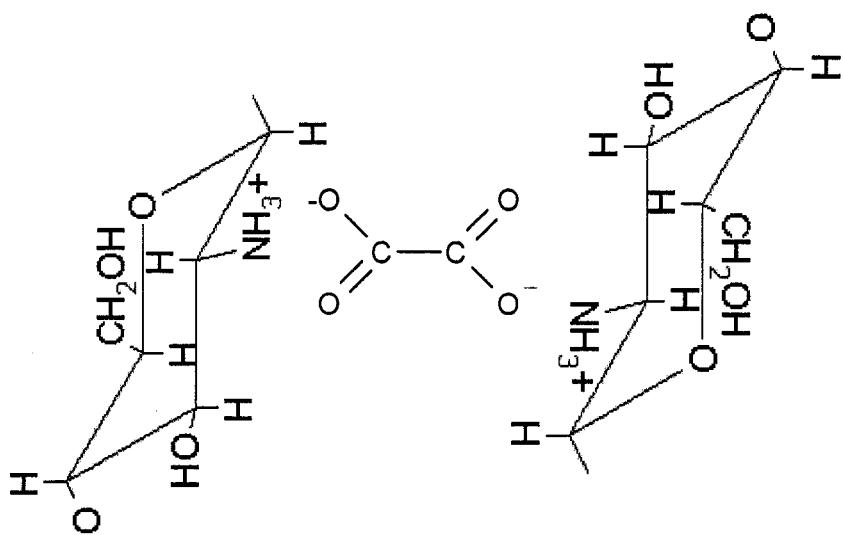


Figure 4.13. Oxalic acid di-cations ionically bridging two chitosan glucosamine units.

infra-red spectroscopy (FTIR) may help us infer the presence of permanent oxalic or phosphoric acid anions in the gel structures.

## Conclusions

In this work, the gelation of chitosan-phosphoric acid and chitosan-oxalic acid systems was investigated. Dynamic rheological measurements revealed that gelation required high polymer concentration to occur, i.e. above 5% w/v. Stress relaxation spectra were very sensitive to structure evolution due to the polymer concentration effect. At low concentration, two peaks were observed for both acid systems, revealing the presence of high molecular weight chains. Above 2% w/v but below  $C_{\text{gel}}$ , the main peak average relaxation time shifted to longer times, while it tended towards infinity when gel transition was achieved above  $C_{\text{gel}}$ .

The effect of acid concentration, or ionic strength, on gelation was not clear when comparing both systems. While the gel formation was slowed down for the chitosan-phosphoric acid system with increasing ionic strength, no clear trend could be observed for the oxalic acid one. This difference of behavior has not been explained yet. The presence of hydrogen bonds in the gel systems was investigated using urea. While urea generated phase separation in the oxalic acid-based gels, it decreased mechanical properties of homogeneous phosphoric acid based ones.

Kinetic studies revealed that gelation occurred in three stages: 1) an incubation stage with an almost stable  $G'$  and  $G''$  up to the gel point; 2) a fast stage with a rapid increase of  $G'$ , indicating an increase in the number of long chains and a structure assembling; 3) and a slow stage where  $G'$  continued to increase slowly and reached equilibrium through gel network rearrangement into more stable conformations.

In the vicinity of the gel point, percolation theory-based scaling laws revealed that for chitosan-oxalic acid and chitosan-phosphoric acid systems  $n = 0.55$  showing that they

are close to a stoichiometrically balanced gel, but  $z$  and were different from those reported in the literature probably because the zero shear viscosity and the equilibrium modulus were not exactly taken at a very low frequency. Using Winter and Chambon equation, the gel strength at the gel point in both systems evaluated at 12 rad/s, was  $S = 109.4 \text{ (Pa.s}^n\text{)}$  for oxalic gel and  $S = 169.1 \text{ (Pa.s}^n\text{)}$  for phosphoric gel

Sol-gel transition temperatures determined in small amplitude oscillatory shear at the cross-over of  $G'$  and  $G''$  were around 50°C for chitosan-oxalic acid and 40°C for chitosan-phosphoric acid. DSC gave a gel-sol transition of 53°C for chitosan-oxalic acid system, therefore similar to the inverse transition. Successive cooling-heating cycles applied on molten gels within the range 80-10°C showed that the systems recovered their initial state during the first cycle, and therefore thermoreversibility. However, in subsequent cycles the gels became permanent, possibly due to increased ionic cross-linking by divalent anions species.

### Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the financial support of Conseil des Recherches en Pêche et en Agroalimentaire du Québec (CORPAQ). They would also like to thank Karine Gerdaoui for providing oxalic acid kinetics data.

### References

- Adolf D, Martin, JE (1990) Time-cure superposition during cross-linking. *Macromolecules* 23: 3700-3704
- Bromberg L (1998) Scaling of rheological properties of hydrogels from associating polymers. *Macromolecules* 31: 6148-6156.
- Chakrabarti BK, Chattopadhyay AK, Dutta (2004) A Dynamics of linear polymers in random media. *Physica A* 333: 34-40
- Chambon F, Winter HH (1987) Linear viscoelasticity at the gel point of crosslinking PDMS with unbalanced stoichiometry. *Journal of Rheology* 31(8): 683-697

- Chen RH, Lin WC, Lin JH (1994) *Acta Polym* 45: 41-46
- Clark AH, Ross-Murphy SB (1987) Structural and mechanical properties of biopolymer gels *Advances. Polymer Science* 83: 57-184
- Cuvelier R, Peigney-Noury C, Launay B (1989) Viscoelastic properties of physical gels: critical behaviour at the gel point. *Gums and stabilizers for the food industry* 5: 549-552
- Ferry JD (1980) Viscoelastic properties of polymers. J. Willey & Sons, New York.
- Flory PJ (1941) *J. Am. Chem. Soc.* 63: 3083
- Francis FJ (2000) *Food Science and Technology*. Wiley&Sons. 1: 581
- Goldbart P, Goldenfeld N (1992) *Phys Rev A* 45:R5343
- Gross P, Konrad E, Mager H (1982) Chitin and chitosan. 205-209
- Guo L, Colby RH, Lusignan CP Howe AM (2003) Physical gelation of gelatin studied with rheo-optics. *Macromolecules* 36: 10009-10020
- Hamdine M, Bégin A, Heuzey MC (2004) Effect of organic and inorganic acids on concentrated chitosan solutions and gels. submitted to *Int. J. Biol. Macromolecules*
- Hayes ER, Davies DH (1978) Proceedings of the First International Conference on Chitin/Chitosan. Muzzarelli RAA, Parsier ER Eds. MIT Sea Grant Program: Cambridge 193-197
- Hoffman H, Kästner U, Dönges R, Ehrler R (1996) Gels from modified hydroxyethyl cellulose and ionic surfactants. *Polymer Gels and Networks* 4: 509-526
- Iversen C, Kjoniksen AL, Nystrom B, Nakken T, Palmgren O, Tande T (1997) Linear and nonlinear rheological responses in aqueous systems of hydrophobically modified chitosan and its unmodified analogue. *Polymer Bulletin* 39: 747-754
- Kavanagh GM, Ross-Mutphy SB (1998) Rheological characterization of polymer gels. *Prog. Polym. Sci.* 23: 533-562
- Larson RG (1999) The structure and rheology of complex fluids. Oxford University Press. Oxford. 232

- Li L (2002) Thermal gelation of methylcellulose in water: scaling and thermoreversibility. *Macromolecules*: 35 5990-5998
- Lide D R (2000-2001) CRC- Handbook of Chemistry and Physics. 81st edition
- Macosko C W, Miller D R (1976). A new derivation of average molecular weights of nonlinear polymers. *Macromolecules* 9(2): 199-206
- Martin JE, Adolf D, Wilcoxon JP (1988) Viscoelasticity near critical gels. *Phys. Rev. Letters* 61: 2620-2623
- Mitchell JR, Ledward DA (1996). Functional properties of food macromolecules. Elsevier Applied Science Publishers. New York
- Miyoshi E, Takaya T, Nishinari K (1994) Gel-sol transition in gellan gum solutions. I. Rheological studies on the effects of salts. *Food Hydrocolloids* 8(6): 505-527
- Miyoshi E, Takaya T, Nishinari K (1995) Gel-sol transition gellan aqueous solutions. *Macromol. Symp.* 99: 83-91
- Prochazkova S, Vårum KM, Østgaard K (1999) Carbohyd. Polym. 38: 115-122
- Rha CK, Rodriguez-Sanchez D, Kienzle-Sterzer C (1982) Biotechnology of Marine Polysaccharides 283-311. Colwell R R, Pariser E R, Sinskey A J Eds. McGraw Hill New York
- Roberts G A E (1992) Chitin Chemistry. Macmillan Press London
- Roths T, Marth M, Weese J, Honerkamp J (2001) A generalized regularization method for nonlinear ill-posed problems enhanced for nonlinear regularization terms. *Computer Physics communications* 139: 279-296
- Rubinstein M, Semenov AN (2001) Dynamics of entangled solutions of associating polymers. *Macromolecules* 34: 1058-1068
- Stockmayer WH (1943) *J. Chem. Phys.* 11: 45
- Tokita M, Hikichi K (1987) Mechanical studies of sol-gel transition: Universal behavior of elastic modulus. *The American Physical Society* 35: 4329-4333
- Tosh SM, Marangoni AG, Hallet FR, Britt IJ (2003) Aging dynamics in gelatin gel microstructure. *Food Hydrocolloids* 17: 503-513

- Vachoud L, Zydowicz N, Domard A (2000) Physicochemical behaviour of chitin gels. Carbohydrate Research 326 (4): 295-304
- Vincendon M (1986) Chitin in nature and technology. Muzzarelli RRA, Jeuniaux C, Gooday GW Eds. Plenum Press: New York 343-345
- Watase M, Nishinari K (1993) Effect of potassium on the rheological and thermal properties of gellan gum gels. Food Hydrocolloids 7:5 449-456
- Whistler RL (1993) Chitin. Industrial gums Whilster RL, BeMiller JN Eds. Academic Press: New-York 601-604
- Winter HH, Chambon F (1986) Analysis of linear viscoelasticity of a crosslinking polymer at the gel point. Journal of Rheology 30 (2): 367-382
- Winter HH, Mours M (1997) Rheology of polymers near liquid-solid transitions. Advances in Polymer Science 134: 165-234
- Winterowd JG, Sandford PA (1995) Chitin and chitosan. Food polysaccharides and their applications. Stephen AM Ed. Marcel Dekker: New York 441-462
- Yamaguchi R, Hirano, S, Arai Y, Ito T (1978) Agr. Biol. Chem 42: 1981-1982

## CHAPITRE 5

### DISCUSSION GÉNÉRALE

Cette partie est consacrée à la combinaison des points discutés dans les chapitres 3 et 4 pour donner une vue d'ensemble du sujet traité. Elle est divisée en trois idées principales : la description des interactions entre les acides et le chitosane, la classification des systèmes résultants, et l'effet de paramètres tels que : la concentration du biopolymère et celle de l'acide, la nature de l'anion mis en jeu, le temps et la température sur les propriétés viscoélastiques des systèmes phosphorique et oxalique.

#### 5.1 Solubilité et gélification du chitosane

En solution acide, le chitosane réagit comme une base faible et forme un sel. La solubilité du chitosane dépend du pH du milieu, de la force ionique et de la nature de l'anion. Le degré de protonation relié au pH et à la force ionique affecte la flexibilité de la chaîne, son volume hydrodynamique et sa conformation.

Le chitosane a été soluble dans la plupart des acides monovalents et multivalents testés comme également rapporté dans la littérature (Roberts, 1992). Il a cependant donné un gel avec les acides chlorhydrique, oxalique, phosphorique et sulfurique à des forces ioniques élevées (Tableau 3.1). Dans le cas des acides forts, la force ionique est gouvernée par leur concentration tandis que dans le cas des acides faibles, elle est en plus gouvernée par leur  $pK_a$ .

Avec l'acide chlorhydrique, le chitosane a donné un gel par neutralisation à  $pH = 6,2$  proche de son  $pK_a$  et à une force ionique élevée (1,25M). Ce pH inattendu en

comparaison avec les pH obtenus aux autres concentrations de chitosane et d'acide chlorhydrique (voir Tableau 3.1) révèle le pouvoir tampon du biopolymère. On remarquera cependant que dans les autres conditions de ratios acide / biopolymère, une dégradation des liens glucosidiques est probable. D'ailleurs cet acide est aussi utilisé pour fractionner le chitosane en oligomères (Roberts, 1992).

Avec les trois autres acides, la gélification a été observée à  $\text{pH} < 2$ . A ce pH, les acides oxalique et phosphorique ont été sous leur forme monovalente et ont généré un gel par interaction ionique simple entre leur contre ions  $\text{HOOC-COO}^-$  et  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ , respectivement, et la macromolécule chargée positivement.

Quant à l'acide sulfurique, sa dissociation à  $10^\circ\text{C}$  a donné des espèces ioniques monovalentes ( $\text{HSO}_4^-$ ) et divalentes ( $\text{SO}_4^{2-}$ ), générant ainsi une gélification par non seulement des interactions ioniques simples mais aussi par pontage ionique entre les chaînes macromoléculaires chargée positivement. La gélification a été observée à deux ratios acide / biopolymère correspondant aux forces ioniques les plus élevées (0,45 et 0,81M) après celle obtenue avec l'acide chlorhydrique.

Il reste à noter aussi qu'en sus des interactions ioniques, la structure tridimensionnelle des gels est stabilisée par des liaisons hydrogènes dont la présence a été prouvée par des tests à l'urée pour les systèmes phosphorique et oxalique. Aussi à haute concentration de polymère, l'augmentation des enchevêtrements augmente les interactions hydrophobes qui viennent s'ajouter à celles déjà mentionnées.

La variation des structures chimiques des acides a permis de mettre en évidence une limite structurelle (longueur de chaîne et degré de branchement) au-delà de laquelle la gélification ne peut avoir lieu. Cette limite pourrait être reliée au volume moléculaire du contre ion de l'acide mis en jeu. Il s'est avéré qu'à partir de  $66,0832 \text{ \AA}^3$ , correspondant à une longueur de chaîne de 4 carbones (Tableau 2.1), la gélification n'a pu être promue. D'ailleurs avec l'acide sulfurique, les contre ions  $\text{HSO}_4^-$  et  $\text{SO}_4^{2-}$  qui ont

les plus faibles volumes moléculaires (voir tableau 3.2) ont généré le gel le plus fort. Cela peut s'expliquer par le fait qu'en plus du pontage ionique, ce faible volume moléculaire a permis un plus important rapprochement des chaînes macromoléculaires et a favorisé d'avantage les liaisons hydrogènes.

## 5.2 Classification des systèmes testés

Après avoir fixé les conditions opératoires de contrainte ou de déformation et vérifié les effets de glissement aux parois des géométries utilisées, les tests en fréquence réalisés sur tous les systèmes étudiés ont permis de les classer en deux catégories : Les gels obtenus avec les acides sulfurique, phosphorique et oxalique et les solutions enchevêtrées obtenues avec les acides : formique, acétique, propionique, lactique, isobutyrique, butyrique, malique, succinique, maléique, adipique, trans-aconitique, citrique, ascorbique, chloroacétique, dichloroacétique et trichloroacétique.

Les gels ont montré des modules viscoélastiques  $G'$  et  $G''$  indépendants de la fréquence avec  $G'$  plus important que  $G''$  tandis que les solutions enchevêtrées ont montré des modules fortement dépendants de la fréquence. A faibles fréquences,  $G'$  était moins important que  $G''$  révélant un comportement liquide dû au désenchevêtrement des chaînes macromoléculaires pendant les temps de relaxation longs. A hautes fréquences,  $G'$  devenait plus important que  $G''$  révélant le comportement d'un solide. Ces gels ont été classés selon leur force décroissante (module élastique décroissant) comme suit : sulfurique, oxalique et phosphorique, ordre cohérent avec le nombre de mécanismes proposés précédemment dans chacun des systèmes.

Il est cependant important de noter ici le cas particulier du système à l'acide chlorhydrique, qui a montré un comportement intermédiaire situé entre le gel et la solution enchevêtrée et a été classé comme gel faible. Ses modules viscoélastiques étaient

dépendants de la fréquence tandis que sa viscosité restait linéaire proche du comportement solide.

Le calcul de l'énergie apparente d'activation dans les différents systèmes utilisant l'équation d'Arrhénius et le principe de superposition temps-température vient appuyer la classification rhéologique. Pour les solutions enchevêtrées, les systèmes malique et lactique par exemple, l'énergie  $E_a$  reliée au coefficient d'expansion du volume libre était inférieure à  $60 \text{ kJ.mol}^{-1}$  tandis que pour les gels (sulfurique, oxalique et phosphorique)  $E_a$  reliée au changement du nombre et de la force des points de jonction, était supérieure à  $200 \text{ kJ.mol}^{-1}$  révélant des liaisons plus fortes dans la structure. Cette énergie restait tout de même inférieure à  $400 \text{ kJ.mol}^{-1}$ , valeur typique pour un gel chimique. De la biréfringence a été également observée au microscope optique à lumière polarisée, indiquant la présence d'une certaine structure organisée. Dans le cas du gel faible avec l'acide chlorhydrique,  $E_a$  était faible révélant probablement la présence de liaisons beaucoup moins fortes dans la structure.

### **5.3 Effet des différents paramètres sur la gélification**

#### **5.3.1 Effet de la concentration du biopolymère sur la gélification**

L'évolution des propriétés viscoélastiques en fonction de la concentration du biopolymère  $C$  a révélé l'existence d'un régime de concentration à  $C < C_{\text{gel}}$  (la concentration critique en dessous de laquelle il n'y a pas de gélification) et un régime de gélification à  $C \geq C_{\text{gel}}$  différencié par une courbe de cinétique plus abrupte.

Les tests en fréquences ont révélé un comportement Newtonien à  $C < 2\%$  (m/v), avec  $G'$  et  $G''$  dépendants de la fréquence ; un comportement rhéofluidifiant entre  $2 < C < C_{\text{gel}}$  suivant les lois de puissance  $G'' \propto \omega^1$  et  $G' \propto \omega^{1,8}$  près de la zone terminale ; puis un comportement solide à  $C \geq C_{\text{gel}}$  où  $G' > G''$  et sont tous deux indépendants de la

fréquence. De la biréfringence a également été observée dans ce cas-ci au MOP, indiquant l'existence d'une certaine structure tridimensionnelle (figures montrées dans le chapitre 3).

Les spectres des temps de relaxation ont également été très sensibles à l'effet de la concentration du chitosane, autrement dit au changement de la structure dans les deux systèmes. À  $C < C_{\text{gel}}$ , deux pics ont constitué les spectres pondérés par le temps indiquant l'existence de deux modes de relaxation des molécules. La présence de longues molécules à haut poids moléculaire a été révélée par un pic secondaire, qui devient négligeable à mesure que la concentration augmentait. À  $C \geq C_{\text{gel}}$ , les spectres ainsi que les temps moyens de relaxation se sont déplacés vers les temps plus longs jusqu'à tendre vers l'infini, une fois la transition sol-gel atteinte. Cela a été confirmé par la viscosité complexe qui tendait vers l'infini à faible fréquence.

### **5.3.2 Effet de la concentration de l'acide et de la nature du contre ion mis en jeu**

Contrairement à l'effet similaire de la concentration du chitosane sur les propriétés viscoélastiques des deux gels (oxalique et phosphorique), la concentration de l'acide a révélé un effet dépendant de sa nature. Il semblerait que la force ionique n'a pas d'influence claire sur la gélification dans les deux systèmes étudiés. La disponibilité des contre ions dans ces cas-ci ne semble pas constituer la seule condition pour la gélification, d'autres interactions secondaires pourraient également influencer la conformation de la macromolécule surtout à haute concentration comme les liaisons hydrogènes, les forces de van der Walls, les associations par transfert de charge ou encore les liaisons hydrophobes. Ces interactions refléteraient la nature aléatoire de la gélification physique.

### 5.3.3 Effet du temps de stockage et cinétique de la gélification

Dans les systèmes moyennement concentrés ( $2\% < C < C_{gel}$ ), une augmentation de  $G'$  et  $G''$  avec le temps a été observée. Cependant, le système oxalique a été moins stable que le système phosphorique. Une séparation de phase à partir de la 4<sup>ème</sup> semaine de stockage pour des concentrations de chitosane de 5% et d'acide oxalique de 1M a été observée. De la synérèse a également été notée cependant trop lente pour être illustrée.

La cinétique de gélification dans nos systèmes a comporté trois phases : une phase de latence, une phase d'accélération où  $G'$  croît très rapidement dû à l'augmentation de l'association des chaînes et la construction de la structure tridimensionnelle et une phase lente due à la diffusion contrôlée des macromolécules et où  $G'$  continue à croître mais plus lentement jusqu'à atteindre un plateau d'équilibre de conformation plus stable.

Autour du point de gel, les lois de puissance ont révélé que pour le système chitosane – acide oxalique  $n = 0,55$ ;  $z = 0,81$  et  $s = 0,40$ , tandis que pour le système chitosane – acide phosphorique,  $z = 0,73$ ;  $s = 0,59$  donnant  $n = 0,55$  proche de celui d'un gel à l'équilibre stœchiométrique. Les valeurs de  $s$  et  $z$  qui ne correspondent pas aux valeurs empiriques trouvées dans la littérature, sembleraient être très sensibles aux valeurs de  $\eta_0$  et  $G_e$  prises comme des valeurs plateaux correspondant à la plus faible fréquence.

### 5.3.4 Effet de la température et thermoréversibilité

Les balayages en température effectués sur les gels fondus de chitosane ont révélé une augmentation de  $G'$  et de  $\eta^*$  avec la décroissance de la température révélant une transition sol-gel située à 44°C pour le système chitosane – acide oxalique et à 40°C pour le système chitosane – acide phosphorique. Et par chauffage en DSC, une faible

transition gel-sol à 43°C a été observée pour le chitosane – acide oxalique, tandis que pour le gel phosphorique cette transition n'a pas pu être détectée avec le type d'Instrument utilisé dans nos laboratoires.

Après un cycle de refroidissement et de chauffage, les gels étudiés ont retrouvé leurs propriétés viscoélastiques initiales démontrant leur thermoréversibilité. Cependant en appliquant plusieurs cycles successifs entre 10 et 80°C et à 3°C/min, le système oxalique est devenu permanent à partir du 2<sup>ème</sup> cycle tandis que le système phosphorique ne l'est devenu à partir du 4<sup>ème</sup>.

## CONCLUSION

Ce projet a eu pour objectif de voir la possibilité de produire des hydrogels non covalents et thermoréversibles de chitosane, en le solubilisant simplement dans des solutions acidulées puis de les caractériser. Visant une application alimentaire, des acides organiques ont été testés ainsi que des acides inorganiques pour la comparaison.

Cette étude a montré que la gélification physique du chitosane, un phénomène complexe à cause de la nature transitoire des points de jonction assurant la structure 3D, dépend significativement de la structure chimique de l'acide, de la nature et du volume moléculaire du contre ion mis en jeu. Les interactions pouvant intervenir sont les interactions ioniques simples et doubles (pontage ionique) entre le contre ion de l'acide et les chaînes macromoléculaires chargées positivement, les liaisons hydrogènes intra et intermoléculaires stabilisant la structure 3D et favorisées d'avantage par les faibles volumes moléculaires de contre ion et les interactions hydrophobes polymère-polymère et polymère-solvant, qui ne sont pas négligeables à haute concentration et haut poids moléculaire de chitosane.

Les systèmes étudiés ont été classés selon leur comportement viscoélastique et leur énergie apparente d'activation, en trois groupes : les gels forts (sulfurique, oxalique et phosphorique), les gels faibles (chlorhydrique) et les solutions enchevêtrées (formique, acétique, propionique, lactique, isobutyrique, butyrique, malique, succinique, maléique, adipique, trans-aconitique, citrique, ascorbique, chloroacétique, dichloroacétique et trichloroacétique). La gélification a eu lieu à  $\text{pH} < 2$  principalement par interactions simples et pontage ioniques avec les acides du premier groupe (sulfurique, oxalique et phosphorique) et à  $\text{pH} = 6,2$  proche du  $\text{pK}_a$  du chitosane avec l'acide chlorhydrique.

L'effet de la concentration du biopolymère et de l'acide, le temps et la température a également été investigué dans deux systèmes sélectionnés : le système avec acide oxalique et celui avec acide phosphorique. La gélification semble être favorisée par l'augmentation de la concentration du biopolymère et le temps de stockage (le vieillissement). L'effet du solvant cependant semble dépendre de la nature du contre ion présent et affecter la flexibilité ainsi que la conformation de la macromolécule et en résultat, la promotion ou non des liaisons hydrogènes inter et intra chaînes. La cinétique de gélification s'est déroulée en trois étapes : une phase d'incubation, une phase d'accélération et une phase lente pour atteindre un équilibre dû à la diffusion de plus en plus lente des chaînes macromoléculaires. Les lois de puissance dérivées de la théorie de percolation ont donné des exposants de relaxation identiques pour les deux systèmes et aussi proche de celui d'un gel chimique à l'équilibre stoechiométrique. Enfin, les transitions sol-gel et gel-sol ont été déterminées par la rhéologie et la DSC et ont été proches pour les deux systèmes. La propriété de thermoréversibilité a également été vérifiée. En effectuant plusieurs cycles successifs, il a été observé que le système phosphorique était plus thermoréversible que le système oxalique, mais que tous deux finissaient par devenir permanents.

## PERSPECTIVES

Bien qu'une réponse sur la faisabilité de fabriquer des gels physiques de chitosane soit fournie, cette étude reste non exhaustive. Un complément d'information pourrait être apporté sur les plans fondamental et appliqué :

Des informations intéressantes sur les interactions possibles régissant la gélification ont été apportées par la rhéologie. Cependant, il serait aussi intéressant de les aborder d'un point de vue thermodynamique surtout lorsqu'il s'agit de bien comprendre les interactions entre la macromolécule et le solvant. En effet à l'échelle macromoléculaire, des interactions secondaires doivent aussi être prises en compte comme : les liaisons hydrogènes, les forces de Van der Walls, les interactions par transfert de charge, les interactions dipôle-dipôle et les interactions hydrophobes. D'autres techniques d'analyse comme la résonance magnétique nucléaire (RMN) ou la spectroscopie infra-rouge (FTIR), pourraient être utilisées pour apporter des informations sur la conformation et les groupements interagissant.

A cause des délais courts de ce projet, la cinétique de gélification a été abordée brièvement et de façon qualitative. Ce point pourrait être approfondi en faisant des parallèles avec d'autres phénomènes similaires comme la cristallisation, en adaptant ses modèles à la gélification comme par exemple le modèle d'Avrami qui semblerait être très proche de celui proposé pour les gels de polysaccharides (Nishinari 1997).

Cette étude a révélé des indices de lois de puissance  $\gamma$  et  $z$  loin de ceux mentionnés dans la littérature. Un projet de fin d'étude au baccalauréat est en cours de réalisation afin de vérifier la validité de ces lois.

Le système chitosane - acide phosphorique potentiellement alimentaire a donné des valeurs de pH trop faibles pour les conditions humaines (pH de l'estomac étant entre 3 et 4). Des tentatives d'augmentation du pH ont été faites dans nos laboratoires en ajoutant une solution de soude à 1N à la solution acidulée de chitosane. Une gélification locale instantanée a été observée ouvrant ainsi la porte à d'autres travaux possibles.

Des paramètres procédé (vitesse d'agitation, température, temps de séjour...) et/ou qualité (texture, contrainte seuil pour le démoulage de l'emballage) pourraient également être investigués dans la perspective d'une production industrielle de gels de chitosane consommables ou rentrant dans la formulation alimentaire.

## RÉFÉRENCES

- ADOLF, D. et Martin, JE. (1990). «Time-cure superposition during cross-linking». *Macromolecules.*, 23: 3700-3704.
- BÉGIN, A. et VAN CALSTEREN M.-R. (1999). « Antimicrobial films produced from chitosan». *Int. J. Biol. Macromol.*, 26, 63-67.
- BERTH, G., DAUTZENBERG, H. et PETER M.G. (1998). «Physico-chemical characterization of chitosans varying in degree of acetylation». *Carbohyd. Polym.*, 36, 205-216.
- BORCHARD, W. et LECHTENFELD, M. (2001). «Time dependent properties of thermoreversible gels». *Mat Res Innovat.*, 4, 381-387.
- BRACK, H.P., TIRMIZ, S.A. et RISEN, W.N. (1997). « A spectroscopic and viscometric study of the metal ion-induced gelation of the biopolymer chitosan». *Polymer.*, 38, 2351-2362,
- BROMBERG, L. (1998). «Scaling of rheological properties of hydrogels from associating polymers». *Macromolecules.*, 31, 6148-6156.
- CHAKRABARTI, B.K., CHATTOPADHYAY, A.K. et DUTTA, A. (2004). «Dynamics of linear polymers in random media». *Physica A.*, 333, 34-40.
- CHAMBON, F. et WINTER, H.H. (1987) «Linear viscoelasticity at the gel point of crosslinking PDMS with unbalanced stoichiometry». *Journal of Rheology.*, 31(8), 683-697.

CHEN, R.H., LIN, W.C. et LIN, J.H. (1994). «Effects of pH, ionic strength, and type of anion on the rheological properties of chitosan solutions». *Acta Polym.*, 45, 41-46.

CLARK, A.H. et ROSS-MURPHY, S.B. (1987). «Structural and mechanical properties of biopolymer gels». *Advances in Polymer Science*. 83. 57-184.

CUVELIER, R., PEIGNEY-NOURY, C., LAUNAY, B. (1989). «Viscoelastic properties of physical gels: critical behaviour at the gel point». *Gums and stabilizers for the food industry*, 5: 549-552.

de GENNES, P.G. (1979). *Scaling Concepts in Polymer Physics*, Cornell University Press.

DESBRIERES, J. (2002). « Viscosity of Semiflexible Chitosan Solutions: Influence of Concentration, Temperature, and Role of Intermolecular Interactions». *Biomacromolecules*, 3, 342-349.

DOMARD, A. (1987). «pH and c.d. measurements on a fully deacetylated chitosan: application to Cu<sup>II</sup> – polye interactions». *Int. J. Biol. Macromol.*, 9, 98-104.

FLORY, P.J. (1953). *Principles of polymer chemistry*. Cornell University Press, Ithaca, New York.

FRANCIS, F.J. (2000). *Food Science and Technology*. Wiley&Sons. 1, 581.

GILES, C.H., HASSAN, A.S.A., LAIDLAW, M et SUBRAMANIAN, R.V.R., J. (1958). «Adsorption at organic surfaces. V.A study of the adsorption of dyes and other organic by cellulose and chitine». *Soc. Dyers Colourists*, 74, 647.

GOLDBART, P. et GOLDENFELD, N. (1992). «Dynamic scaling and spontaneous symmetry breaking at the gel point». *Phys Rev A.*, 45 (8):R5343-R5346.

GROSS, P., KONRAD, E., et MAGER, H. (1982). «Chitin and chitosan». *Proceedings of the second International Conference on Chitin and Chitosan*. S. Hirano and S. Tokura , Eds.; Sapporo, Japon. 205-209.

GUO, L, COLBY, R. H., LUSIGNAN, C. P. et HOWE. A,M. (2003). «Physical gelation of gelatin studied with Rheo-Optics». *Macromolecules.*, 36, 10009-10020.

HAMDINE, M., BÉGIN, A. et HEUZEY, M.-C. (2004). «Effect of organic and inorganic acids on concentrated chitosan solutions and gels». Soumis à *Int. J. Biol. Macromolecules*.

HAMDINE, M., HEUZEY, M.-C. et BÉGIN, A. (2004). «Viscoelastic properties of phosphoric and oxalic acid-based hydrogels». Soumis à *Rheologica Acta*.

HAYES, E.R., DAVIES, D.H. et MUNROE, V.G. (1978). «Characterization of chitosan: I: Thermoreversible chitosan gels». *Proceedings of the First International Conference on Chitin/Chitosan*. Muzzarelli, R.A.A., Parsier, E.R., Eds.; MIT Sea Grant Program: Cambridge. 103-106.

HIRANO, S., YAMAGUCHI, R., FUKUI, N. et HOIUCHI, K. (1990). «Gelation of chitin and chitosan, and their intermolecular conversion». *Polymeric Materials Science and Engineering, Proceedings of the ACS Division of Polymeric Materials Science and Engineering*. Bonston. 492-496.

HOFFMAN, H., KÄSTNER, U., DÖNGES, R. et EHRLER,R. (1996). «Gels from modified hydroxyethyl cellulose and ionic surfactants». *Polymer Gels and Networks.*, 4, 509-526.

IVERSEN, C., KJONIKSEN, A.L., NYSTROM, B., NAKKEN, T., PALMGREN, O. et TANDE, T. (1997). «Linear and nonlinear rheological responses in aqueous systems of hydrophobically modified chitosan and its unmodified analogue». *Polymer Bulletin.*, 39, 747-754.

JESPERSEN, S.N. (2002). «Cluster diffusion at the gelation point». *Physical Review.*, E 66. 031502.

KAVANAGH, G.M. et ROSS-MURPHY, S.B.(1998). «Rheological characterization of polymer gels». *Prog. Polym. Sci.*, 23, 533-562.

KOIDE, S.S. (1998). «Chitin-chitosan: Properties, benefits and risks». *Nutr Res.*, 18, 1091-1101.

KUBOTA, N., TATSUMOTO, N., SANO, T. et TOYA, K. (2000). « A simple preparation of half N-acetylated chitosan highly soluble in water and aqueous organic solvents ». *Carbohydr. Res.*, 324, 268-274.

KÜNTZEL, M., LÖWE, H., MÜLLER, P., et ZIPPELIUS, A. (2003). «Diffusion of gelation clusters in the Zimm model». *Eur. Phys. J. E* 12. 325-331.

KURITA, K., KAMIYA, M. et NISHIMURA, S. (1991). «Solubilization of a rigid polysaccharide: Controlled partial N-Acetylation of chitosan to develop solubility». *Carbohydrate Polymers.*, 16 (1), 83-92.

LARSON, RG. (1999). «The structure and rheology of complex fluids». Oxford University Press. Oxford. 232.

LEE, S.J., KIM, S.S et LEE, Y.M. (2000). «Interpenetrating polymer network hydrogels based on poly(ethylene glycol) macromer and chitosan». *Carbohydrate Polymers.*, 41, 197-205.

LEIBLER, L., RUBINSTEIN, M. et COLBY, R.H. (1990). «Dynamics of reversible networks». *Macromolecules.* 24, 4701-4707.

LI, L. (2002). «Thermal gelation of methylcellulose in water : Scaling and thermoreversibility». *Macromolecules.* 35, 5990-5998.

LIDE, D.R. (2000-2001). *CRC- Handbook of chemistry and Physics.*, 81st edition.

MACOSKO, C.W. et MILLER, D.R. (1976). «A new derivation of average molecular weights of nonlinear polymers». *Macromolecules.*, 9(2), 199-206

MARK, H.F., BIKALES, N.M., OVERBERGER, C.G., MENGES, G., et KROSCHWITZ, J.I. (1985). *Encyclopedia of Polymer Science and Engineering, vol. 3: Cellular materials to composites*. John Wiley and sons, Inc. 430-441.

MITCHELL, J.R. et LEDWARD, D.A. (1996). *Functional properties of food macromolecules*. Elsevier Applied Science Publishers. New York

MIYOSHI, E., TOMOHISA, T. et NISHINARI, K. (1995). «Effects if salts on the gel-sol transition of gellan gum by differential scanning calorimetry and thermal scanning rheology». *Thermochimia Acta.*, 267, 269-287.

MOYOSHI, E.; TAKAYA, T. et NISHINARI, K. (1995). «Gel-sol transition in gellan aqueous solutions». *Macromol. Symp.*, 99, 83-91.

MUZZARELLI, R.A.A. (1977). *Chitin*. Pergamon, Oxford. 380.

NOGUSHI, J., TOKURA, S. et NISHI, N. (1978). «Studies of preparation of chitin fibers». *Proceedings of the First International Conference on Chitin/Chitosan*. Muzzarelli R.A.A., Parsier E.R., Eds. MIT Sea Grant Program: Cambridge. 315-326.

NORDBY, M.H., KJØNIKSEN, A.L., NYSTRÖM, B. et ROOTS, J. (2003). «Thermoreversible gelation of aqueous mixtures of pectin and chitosan. Rheology». *Biomacromolecules*, 4, 337-343.

PROCHAZKOVA, S., VÅRUM, K.M. et ÓSTGAARD, K. (1999). «Quantitative determination of chitosans by ninhydrin». *Carbohydr. Polym.*, 38, 115-122.

RHA, C.K., RODRIGEZ-SANCHEZ, D. et KIENZLE-STERZER, C. (1982). «Novel Applications of chitosan». *Biotechnology of Marine Polysaccharides*. Colwell R. R., Pariser E. R., Sinskey A. J., Eds; McGraw Hill: New York. 283-311.

RINAUDO, M. et DOMARD, A. (1989). *Chitin and chitosan: sources, chemistry, physical properties and applications*. Elsevier Applied Science, N.Y. 71-86.

RINAUDO, M., MILAS, M. et Le DUNG, P. (1993). «Characterization of chitosan. Influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion» *Int. J. Biol. Macromol.*, 15, 281-285.

RINAUDO, M., PALOV, G. et DESBRIÈRES, J. (1999). «Influence of acetic acid concentration on the solubilization of chitosan». *Polymer*, 40, 7029-7032.

RINAUDO, M., PALOV, G. et DESBRIÈRES, J. (1999). «Solubilization of chitosan in strong acid medium». *Int. J. Polym. Anal. Charact.*, 5, 267-276.

ROBERTS, G. A. E. (1992). *Chitin Chemistry*. Macmillan Press: London.

ROSS-MURPHY, S.B. (1984). «*Biophysical methods in food research*». Critical Reports in Applied Chemistry, vol.5. Chan, H.W.S., E.D.; Blackwell Scientific: Oxford. 138-199.

ROTHS, T., MARTH, M., WEESE, J. et HONERKAMP, J. (2001). «A generalized regularization method for nonlinear ill-posed problems enhanced for nonlinear regularization terms». *Computer Physics communications.*, 139, 279-296.

RUBINSTEIN, M. et SEMENOV, A.N. (1998). «Thermoreversible gelation in solutions of associative polymers. 2.Linear dynamics». *Macromolecules*. 31, 1386-1397.

SAWYER, L.C. et GRUBB, D.T. (1987). *Polymer Microscopy*. Chapman and Hall: London. 18-22.

SEMENOV A.N. et RUBINSTEIN, M. (1998). «Thermoreversible gelation in solutions of associative polymers. 1\_Statics». *Macromolecules*. 31, 1373-1385.

SHAMOV, M.V., BRATSKAYA, S.Y. et AVRAMENKO, V.A. (2002). «Interaction of carboxylic acids with chitosan: Effect of pK and hydrocarbon chain length». *J Colloid Interf Sci.*, 249, 316-321.

STOCKMAYER, W.H. (1943). «Theory of molecular size distribution and gel formation in branched-chain polymers». *J Chem. Phys.* 11: 45-55.

- TOKITA, M et HIKICHI, K. (1987). «Mechanical studies of sol-gel transition : Universal behavior of elastic modulus». *Physical Review A.* 35 (10), 4329-4333.
- TOSH, S.M., MARANGONI, A.G., HALLET, F.R. et BRITT, I.J. (2003). «Aging dynamics in gelatin gel microstructure». *Food Hydrocolloids.*, 17, 503-513.
- VACHOUD, L., ZYDOWICZ, N., et DOMARD, A. (2000). «Physicochemical behaviour of chitin gels». *Carbohydrate Research.*, 326 (4), 295-304.
- VINCENDON, M (1986). *Chitin in nature and technology*. Muzzarelli R.R.A., Jeuniaux C., Gooday G.W. Eds.; Plenum Press: New York. 343-345.
- WARLUS, S., PONTON, A. et LESLOUS, A. (2003). «Dynamic viscoelastic properties of silica alkoxide during the sol-gel transition. *Eur. Phys. J. E* 12, 275-282.
- WATASE, M. et NISHINARI, K. (1993). «Effect of potassium on the rheological and thermal properties of gellan gum gels». *Food Hydrocolloids.*, 7 (5), 449-456.
- WHISTLER, R.L. (1993). «Chitin». *Industrial gums*. Whilster, R.L., BeMiller, J.N. Eds.; Academic Press: New-York. 601-604.
- WINTER, H.H. et CHAMBON, F. (1986). «Analysis of linear viscoelasticity of a crosslinking polymer at the gel point». *Journal of Rheology.*, 30 (2), 367-382.
- WINTER, H.H. et MOURS, M. (1997). «Rheology of polymers near liquid-solid transitions». *Advances in Polymer Science.*, 134, 165-234.
- WINTERROWD, J.G. et SANFORD, P.A. (1995). «Food polysaccharides and their applications». *Chitin and chitosan*. Stephen, A.M. Ed; Marcel Dekker: New York. 441-462.

YAMAGUCHI, R., HIRANO, S., ARAI, Y. et ITO, T. (1978). «Chitosan salts gels. Thermally reversible gelation of chitosan». *Agr. Biol. Chem.*, 42, 1981-1982.

YAMAMOTO, H. et AMAIKE, M. (1997). «Biodegradation of Cross-Linked Chitosan Gels by a Microorganism». *Macromolecules*, 30, 3936-3937.

## Annexe 1

### **A1.1 Étude du glissement aux parois des géométries plan-plan**

L'effet de glissement aux parois de la géométrie a été vérifié en effectuant un balayage en fréquences dans la zone de réponse viscoélastique linéaire à plusieurs entrefers : 1; 2; 2,5 et 3 mm. Les résultats obtenus ont montré qu'il n'y avait pas de glissement car le signal n'a pas décru en diminuant l'entrefer. Deux exemples (système à l'acide phosphorique et chloridrique sont montrés dans la Figure A1.1 (a) et (b)).

### **A1.2 Détermination des conditions opératoires correspondant à la réponse viscoélastique linéaire**

La zone de réponse viscoélastique linéaire a été définie en appliquant des tests en contrainte entre 10 et 5000 Pa pour les gels et en déformation entre 0,01 et 1 pour les systèmes semi-liquides à 23°C et à différentes fréquences : 0,623; 6,23 et 62,3 rad/s comme le montre la Figure A1.2 (a), (b) et (c). En résultat, une contrainte opératoire de 50 Pa et une déformation de 0,1 ont été choisies pour analyser les systèmes solides et semi-liquides respectivement.

### **A1.3 Reproductibilité à haute concentration de polymère**

Les tests de vérification du glissement aux parois de la géométrie effectués au début du projet ont montré un manque de reproductibilité des résultats. Pour cela, des tests de répétition ont été réalisés plus tard sur un système à haute concentration de chitosane et ont montré une variation de la viscosité à basse fréquence de moins de 12% (écart type exprimé en pourcent) comme le montre la Figure A1.3, révélant une bonne reproductibilité. La variation observée au début du projet est probablement liée à l'erreur expérimentale.

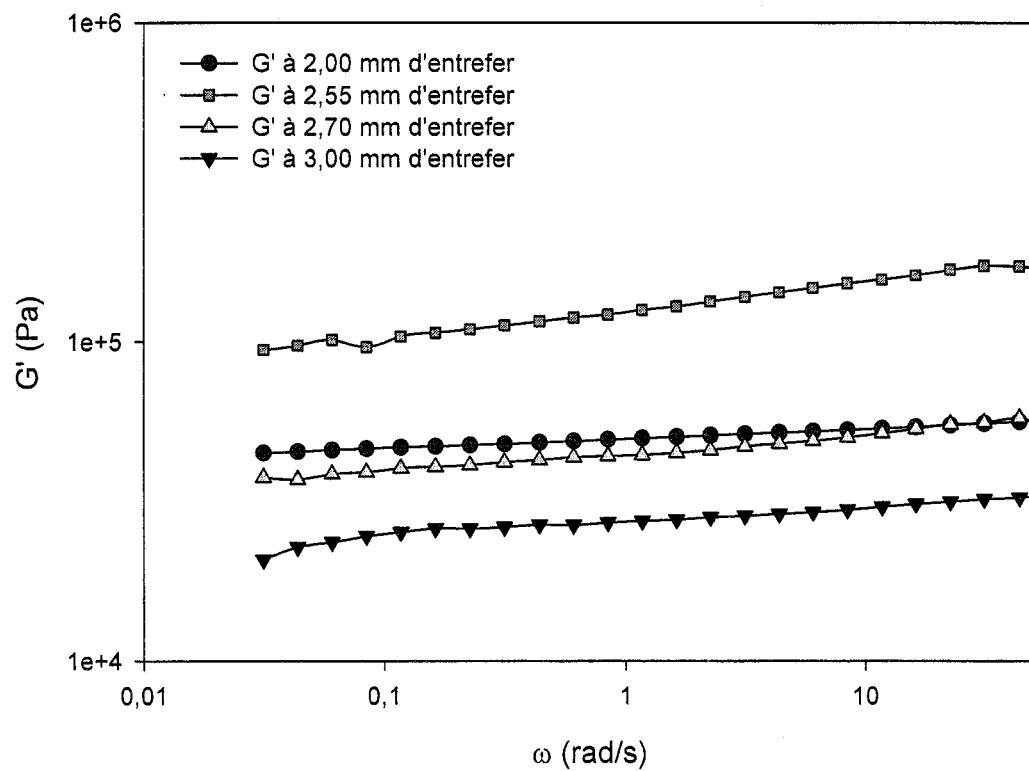


Figure A1.1(a). Vérification du glissement à plusieurs entrefers dans la géométrie rugueuse. (Balayage en fréquence effectué sur le gel d'acide phosphorique à 50 Pa et à température ambiante).

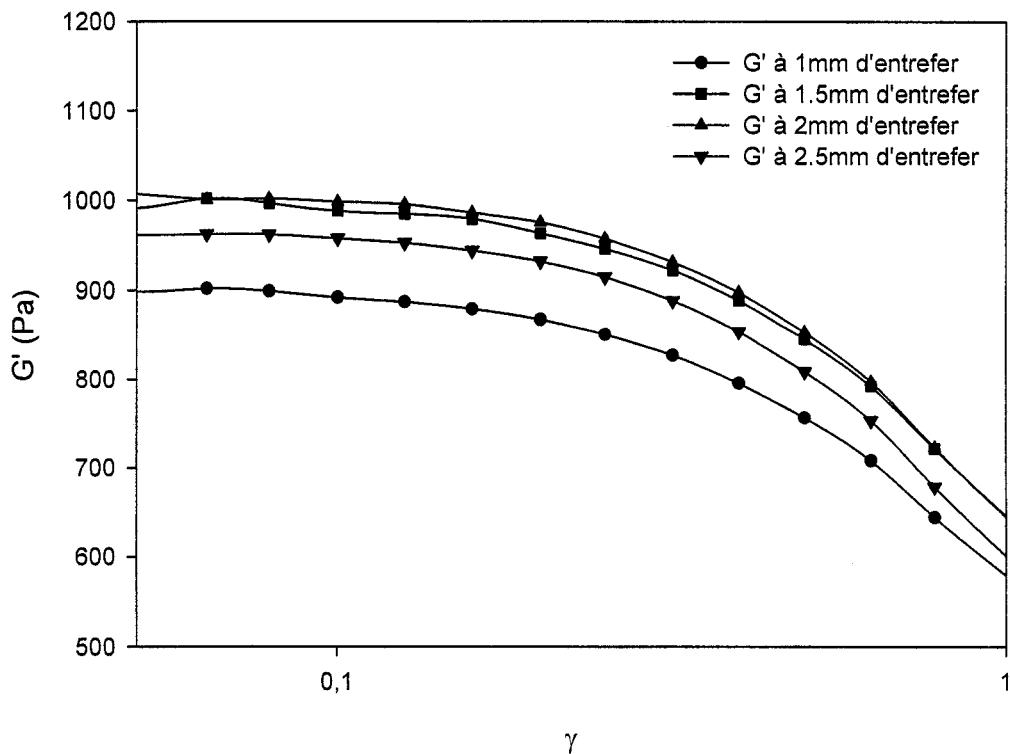


Figure A1.1(b). Vérification du glissement à plusieurs entrefers dans la géométrie lisse.  
(Balayage en déformation effectué sur le système à l'acide chlorydrique à 0,628 rad/s et à température ambiante).

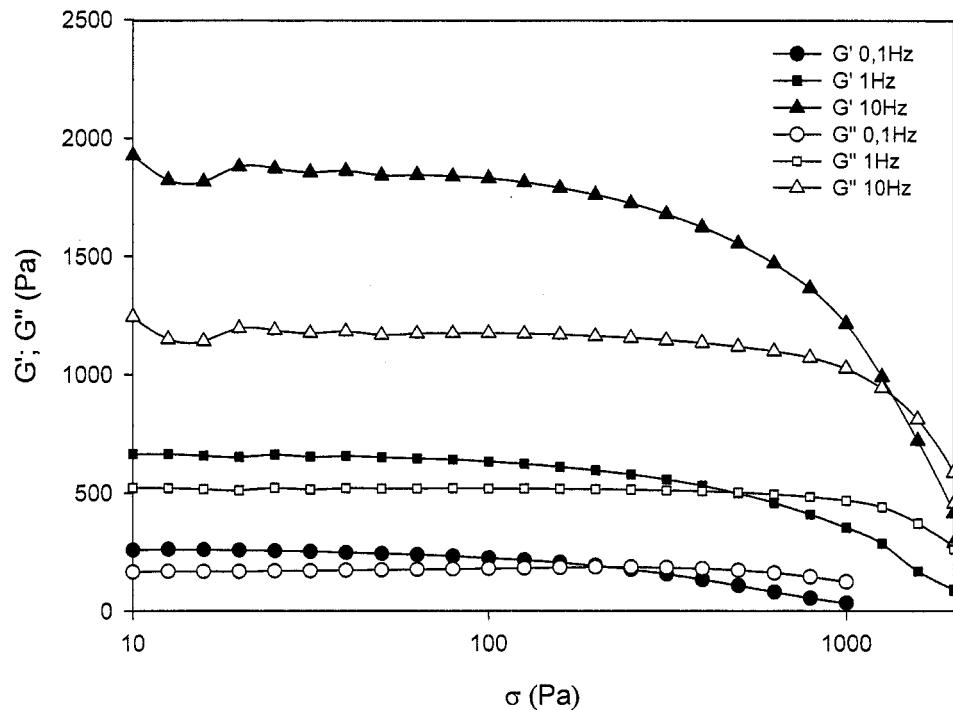


Figure A1.2(a). Balayage en contrainte obtenu pour le gel à l'acide oxalique effectué à température ambiante et à différentes fréquences. (Des courbes similaires ont été également obtenues pour les gels sulfurique et phosphorique).

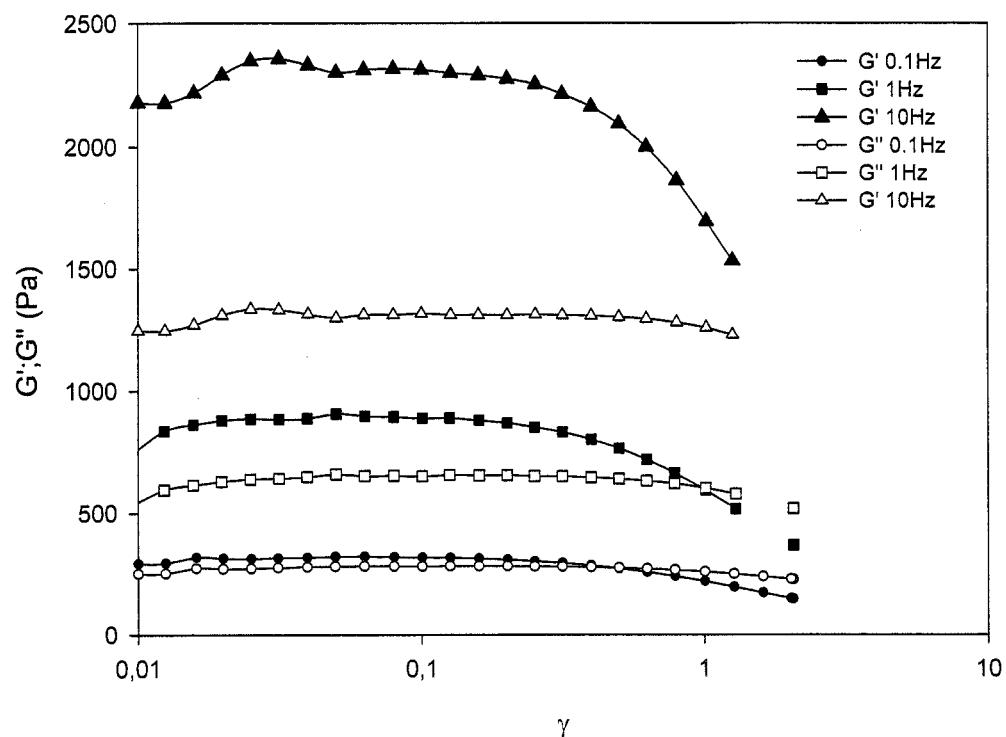


Figure A1.2(b). Balayage en déformation obtenu pour le système à l'acide chlorhydrique effectué à température ambiante et à différentes fréquences.

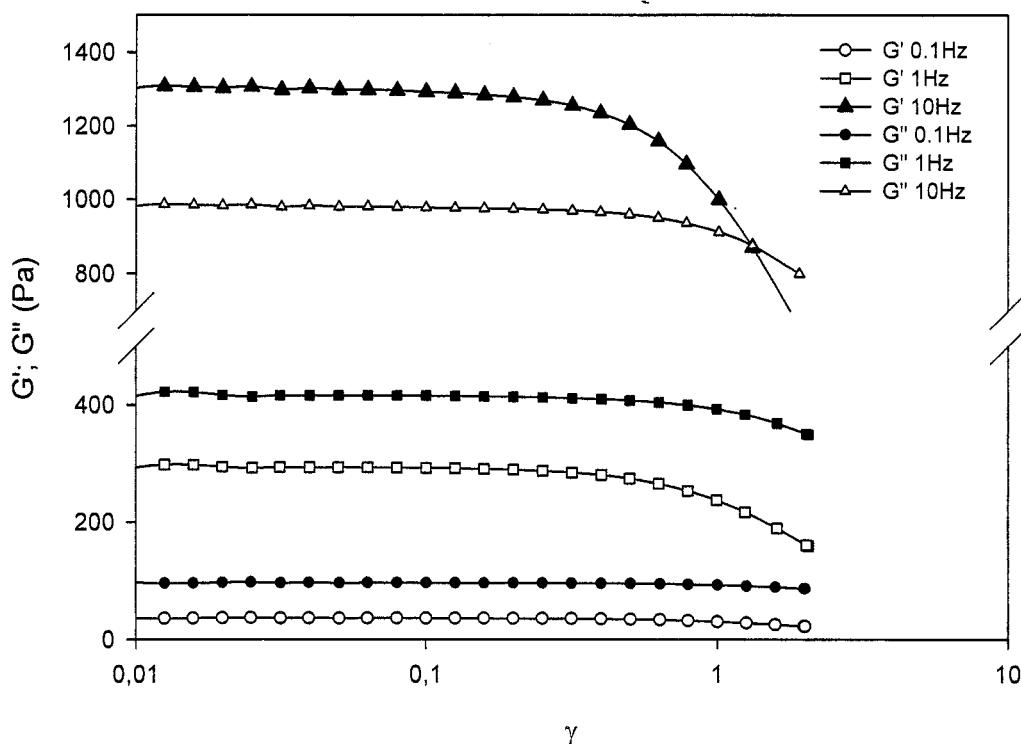


Figure A1.2(c). Balayage en déformation obtenu pour le système à l'acide lactique effectué à température ambiante et à différentes fréquences. (Des courbes similaires ont été également obtenues pour les systèmes aux acides : butyrique, propionique, isobutyrique, formique, acétique, monochloroacétique, dichloroacétique, trichloroacétique, malique, maléique, citrique et succinique).

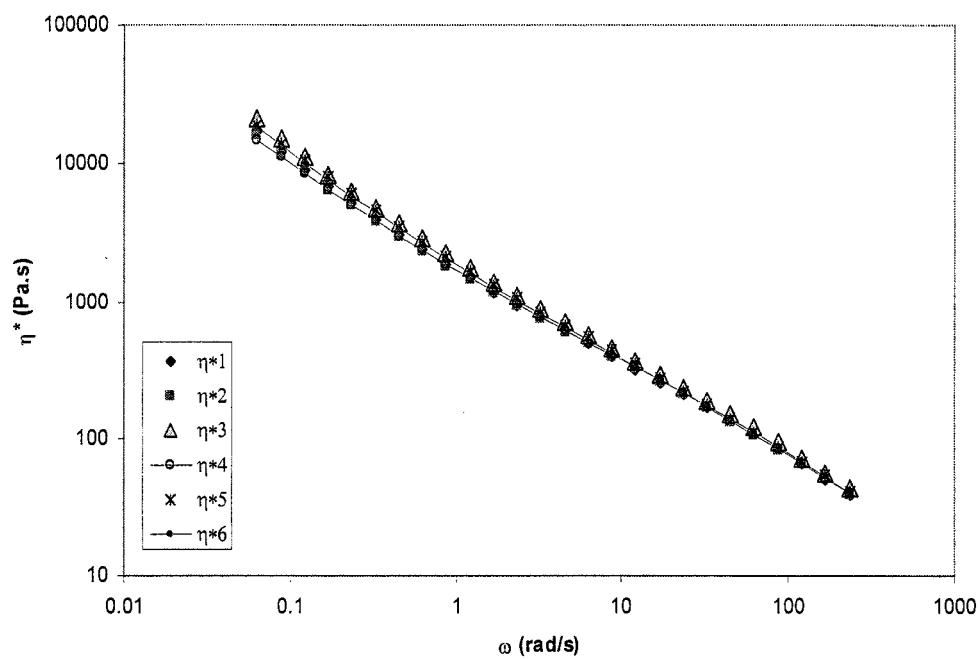


Figure A1.3 Tests de reproductibilité effectués à 6% de chitosane et 0,5M d'acide oxalique, à 25°C.