

Research Papers

Approche du mécanisme de gélification des sols d'agarose II. Températures de gélification

E. Bourret et L. Bardet * avec la collaboration technique de R. Fortuné

Laboratoire de Physique Industrielle Pharmaceutique, Faculté de Pharmacie, av. Charles Flahaut, 34060 Montpellier Cedex (France)

(received March 20th, 1981)

(Accepted April 13th, 1981)

Résumé

L'étude rhéologique de divers agaroses est poursuivie en examinant l'évolution de la viscosité au cours du temps en fonction de la température et de la concentration. Les températures de gélification isothermiques de plusieurs sols ont été déterminées et confrontées aux températures de gélification statiques. Ces deux températures se sont révélées fondamentalement différentes. Les variations dans le temps de la viscosité des sols d'agarose placés à des températures progressivement décroissantes étaient l'hypothèse selon laquelle quatre températures critiques caractérisent le processus de gélification. Enfin, à la température de gélification dynamique, le temps de formation du gel a pu être défini.

Summary

Rheological studies on unlike types of agarose show viscosity variations depending on time and concentration. The isothermal gelling temperatures are determined with intention to compare these to static gelling temperatures; these characteristic temperatures are not the same. Increase of viscosity with time and during temperature decreases up to the dynamic gelling temperature allows for the assumption that 4 temperatures characterize the gelling process. Network-forming time is defined at dynamic gelling temperature.

Introduction

Plusieurs températures semblent caractériser la gélification. Une première température de gélification est habituellement déterminée lors du refroidissement

* Auteur auquel toute correspondance doit être adressée.

d'un sol soit par retournement du tube contenant le sol, soit par contrôle de la chute d'une goutte de mercure, soit encore par pénétration de l'extrémité d'un thermomètre agitateur (Fuse et Goto, 1971; Guiseley et Renn, 1975). Cette température, déterminée sous une certaine vitesse de refroidissement et appelée pour cette raison *température de gélification dynamique*, ne correspond pas cependant à l'apparition des premières modifications structurales donnant naissance au gel; en effet, la température de gélification dynamique dépend de la vitesse de refroidissement et à vitesse de refroidissement infiniment lente, elle tend vers la *température de gélification statique* (Guiseley et Renn, 1975).

Par ailleurs, le point de transition sol-gel, caractérisé par une augmentation de la viscosité au cours du temps, peut être déterminé en suivant les propriétés rhéologiques des solutions maintenues à température constante; la température ainsi définie, appelée *température de gélification isothermique* est théoriquement égale à la température de gélification statique. La détermination de cette température est relativement longue et Guiseley (1971) a montré qu'elle peut être connue plus rapidement par une technique différente: en utilisant deux types d'agarose, Seakem et Seaplaque provenant de la Marine Colloids Division, cet auteur a admis que la température à laquelle la courbe de viscosité $\eta_{app} = f(t^\circ C)$ dévie de sa trajectoire linéaire horizontale est équivalente à la température de gélification isothermique.

Dans un travail antérieur axé sur la mise au point d'un test biologique (Bourret, 1978) nous avons été amenés à déterminer la température maximale à laquelle aucun changement des propriétés rhéologiques du milieu ne pouvait être décelé. Poursuivant notre étude rhéologique sur les agaroses, nous envisageons maintenant de suivre l'influence du temps sur la viscosité des sols d'agarose à différentes températures et différentes concentrations dans le but de déterminer d'une part la température de gélification isothermique des sols d'agarose considérés, d'autre part le temps de formation du gel à une température et une concentration données, car la mise en évidence de propriétés thixotropes au moment de la formation du gel et surtout la croissance de l'aire d'hystérésis en fonction de temps prouve que la constitution du réseau tridimensionnel n'est pas spontanée même à la température de gélification dynamique (Bourret et Bardet, 1981).

Conditions expérimentales et mesures

L'appareillage et le principe de la mesure ne seront pas décrits, les mesures de la viscosité étant effectuées comme précédemment à l'aide d'un Rotovisko Haake RVI (Bourret et Bardet, 1981).

Les mesures sont pratiquées sur des sols à différentes concentrations et à température constante et la solution est renouvelée après chaque modification de la température, celle-ci étant choisie successivement croissante et supérieure à la température de gélification dynamique; les mesures sont donc véritablement exécutées sous des conditions statiques. En outre, afin d'éliminer tout effet que pourrait entraîner un gradient de cisaillement élevé, toutes les expériences sont réalisées à faible gradient de vitesse 97.04 s^{-1} sur l'agarose Indubiose A37; une étude semblable est menée parallèlement sur des agaroses d'origine différente.

Résultats

Les températures de gélification

Détermination de la température de gélification isothermique pour l'agarose A37

L'évolution dans le temps de la viscosité apparente η_{app} des solutions d'agarose IBF A37 est du type de celle représentée dans la Fig. 1 pour un sol d'agarose à 10 g/l. Les variations sont d'autant plus importantes que la température expérimentale est proche de la température de gélification dynamique du sol considéré.

De 33–36.5°C, l'élévation de la viscosité est excessivement rapide pour s'amoindrir à des températures plus élevées; à noter cependant sur les courbes obtenues à 33 et 34°C, l'apparition d'un point de cassure sur lequel on reviendra ultérieurement. A 40°C, l'augmentation reste nette avec un accroissement de 50% de la valeur initiale au bout d'une heure; à 41°C il faut attendre 2 h pour la même variation de la viscosité tandis qu'à 42°C aucune variation de viscosité n'apparaît après la même période de temps.

Nous conviendrons que la température de gélification isothermique correspond à la première température dans l'ordre croissant qui ne provoque aucun changement structural susceptible de se manifester par une diminution de la fluidité du milieu; cette convention favorise la comparaison avec la valeur de la température, supposée équivalente, lue sur la courbe de viscosité $\eta_{app} = f(t°C)$: pour la solution d'agarose

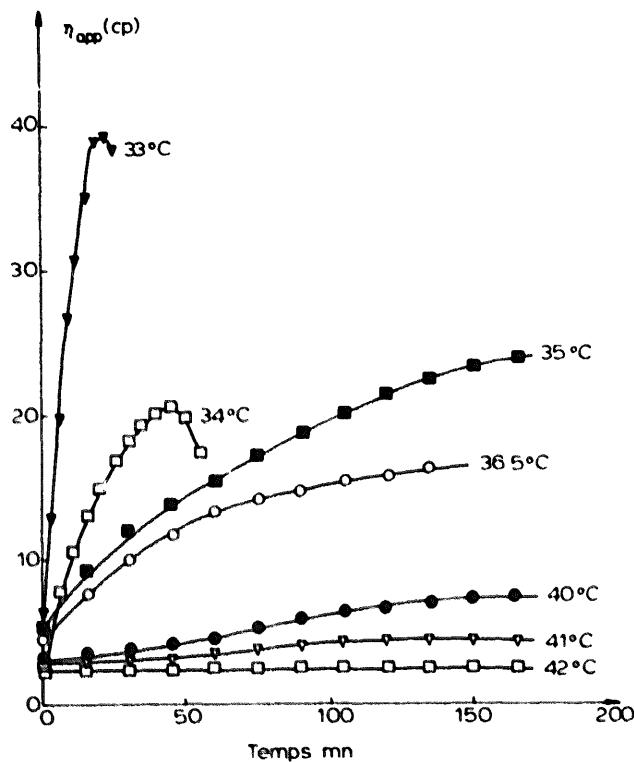


Fig. 1. Evolution de la viscosité au cours du temps d'un sol d'agarose indubiose A37 à 10 g/l à température constante (gradient de vitesse 97.04 s^{-1}).

A37 à 10 g/l la température de gélification isothermique est donc de 42°C (Fig. 1).

Des mesures identiques ont été reproduites sur des solutions d'agarose dont les concentrations étaient de 6 et 15 g/l; leurs températures de gélification isothermique sont respectivement égales à 40°C et 44°C.

Ces 3 déterminations successives réalisées à des concentrations différentes permettent de supposer par interpolation sur la courbe représentant $t^\circ\text{C} = f(c)$ (Fig. 2), la température de gélification d'un sol à 3 g/l d'agarose A37 à 39°C. Dans les mêmes conditions Hayashi et al. (1977) indique 40°C pour la température induisant le processus de gélification, soit un écart d'un degré avec nos mesures ce qui n'est pas significatif puisque les températures de gélification isothermiques sont connues à un degré près (Fig. 1).

Comparaison des températures isothermiques et des températures statiques

L'étude rhéologique précédente nous avait conduit à relever sur les courbes de viscosité $\eta_{app} = f(t^\circ\text{C})$ tracées au gradient de cisaillement 870 s^{-1} d'une part la température de gélification commençante supposée égale à la température statique ou isothermique, d'autre part la température de gélification dynamique; cette dernière s'était révélée parfaitement similaire à la température de gélification connue à l'aide des variations du seuil d'écoulement. Ces diverses températures sont rappelées dans le Tableau 1.

Pour éliminer l'influence possible du gradient de vitesse, les courbes de viscosité $\eta_{app} = f(t^\circ\text{C})$ ont été construites aux différentes concentrations au gradient de vitesse 97.04 s^{-1} utilisé dans le travail actuel, afin de déterminer les températures de gélification statiques et dynamiques correspondantes (Tableau 1).

L'examen de ce tableau prouve que les températures de gélification isothermiques déterminées par la méthode rigoureuse qui consiste à maintenir la solution à température constante, ne peuvent pas être confondues, même en tenant compte des erreurs expérimentales, avec les températures "statiques" déterminées à partir des courbes $\eta_{app} = f(t^\circ\text{C})$.

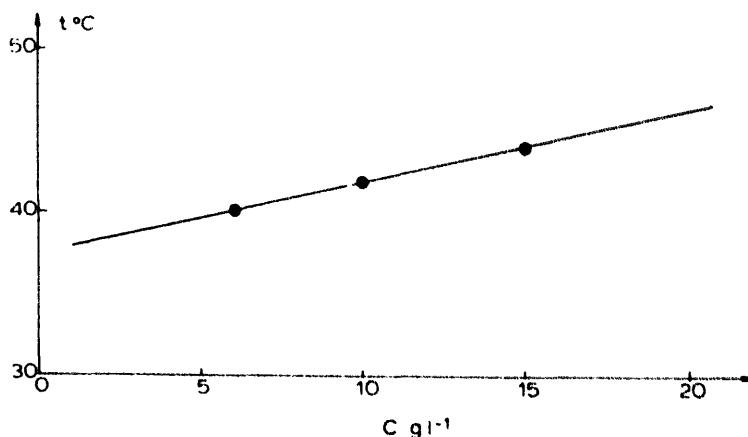


Fig. 2. Température de gélification isothermique de l'agarose A37 à différentes concentrations.

TABLEAU 1

TEMPÉRATURES DE GÉLIFICATION POUR L'AGAROSE A37 AUX DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS

C g/l	Selon $F_0 = f(t^\circ C)$	Gradient de vitesse		$\eta_{app} = f(\text{temps})$	
		870 s^{-1}			
		dynamique	statique		
4	30.5	30.5	35	34	
6	31.5	31	36	36	40
8	32.5	32	37	37	
10	33	33	38	38	41
12	33.5	33.5	39	38	
15	35	34.5	40	39	44
18	35	35	41	40	
20	35.5	35	41.5	41.5	

Influence de l'origine de l'agarose

Afin d'infirmer ou de confirmer les résultats précédents, ces mêmes expériences ont été reconduites systématiquement sur des agaroses de diverses origines à deux concentrations 10 et 15 g/l (Tableau 2). Ces nouveaux résultats corroborent entièrement notre première conclusion.

Il faut noter en particulier qu'un lot d'agarose Seakem HEEO à 15 g/l présente sa température de gélification isothermique à 54°C, sa température de gélification statique étant à 43°C, alors que Guiseley (1971) annonce pour ces deux températures

TABLEAU 2

TEMPÉRATURES DE GÉLIFICATION DE DIFFÉRENTS AGAROSE

Agarose	C g/l	$t^\circ C_{\text{gel}}$ dynamique	$t^\circ C_{\text{gel}}$ statique	$t^\circ C_{\text{gel}}$ isothermique
IBF A37	6	31	36	40
	10	33	38	42
	15	34.5	40	44
IBF A45	10	41	45	50
	15	42	47	53
Seakem HEEO	10	34	40	51
	15	34	43	54
Seakem HGT (P)	10	41.5	44	51
	15	42.5	48	52
Sea plaque	10	27	32	35
	15	27.5	34	37
origine inconnue B	10	34	37.5	52
	15	34.5	40	55.5

la même valeur 42°C. Or à cette dernière température (42°C), une élévation de 50% de la viscosité apparente est enregistrée au cours de nos expériences au bout de 90 min (Fig. 3); cette température ne peut donc être considérée comme la température de gélification isothermique de la solution examinée par nos soins. Quant à la température de gélification dynamique, nous la trouvons à 35°C contre la valeur 35.8°C déterminée par Guiseley sur un sol renfermant 15 g/l de l'agarose envisagé ce qui montre qu'il n'y a pas désaccord entre les valeurs obtenues à l'aide des courbes de viscosité et qu'il est exclu de mettre en doute le processus expérimental pour expliquer les différences constatées sur la température de gélification isothermique; la vitesse de refroidissement employée pour établir les courbes de viscosité, plus rapide que celle notée par Guiseley, est donc hors de cause.

Ces considérations prouvent donc que la véritable température de gélification isothermique ne peut être obtenue en utilisant une courbe de viscosité $\eta_{app} = f(t°C)$; aussi dans la suite de ce travail, la température de gélification "statique" déterminée à partir des courbes de viscosité $\eta_{app} = f(t°C)$ sera simplement dénommée *température de gélification commençante*.

Evolution de la viscosité η_{app} en fonction du temps

Temps de formation du gel

L'étude de la thixotropie du milieu a montré que le temps joue un rôle important

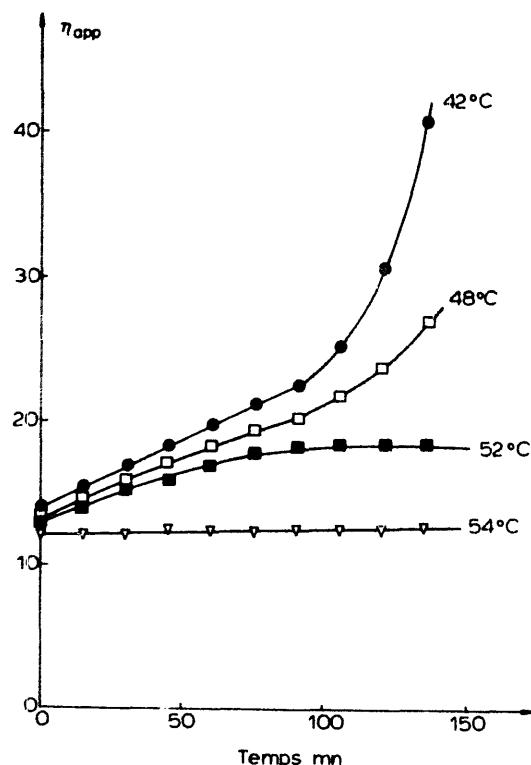


Fig. 3. Evolution de la viscosité au cours du temps d'un sol d'agarose Sea Kem HEEO à 15 g/l à température constante (gradient de vitesse 97.04 s^{-1}).

dans la mise en place des liaisons intermoléculaires assurant la formation du réseau gélifié: sur le tracé ascendant des courbes d'hystérésis apparaissait dans notre étude précédente une cassure caractéristique de la rupture de la cohésion du réseau après un repos de 20 min à la température de gélification dynamique (Bourret et Bardet, 1981).

On observe de la même façon une cassure sur la courbe de viscosité $\eta_{app} = f$ (temps) aux températures de 33 et 34°C après une durée d'expérience respectivement égale à 20 et 45 min; à 35°C, de même qu'aux températures supérieures, aucune manifestation semblable ne se produit après 3 h d'attente (Fig. 1). Ainsi l'évolution dans le temps de la viscosité apparente met en évidence une diminution de la fluidité du milieu d'autant plus rapide que l'on se trouve près du point de gel.

L'anomalie des deux courbes signalée ci-dessus à 33 et 34°C, est significative d'un changement des propriétés de la substance. Au cours du temps, le réseau se structure peu à peu, opposant au cisaillement une résistance de plus en plus élevée; au bout d'un temps variable avec la température et la concentration, les liaisons assurant la cohésion du réseau microcristallin du gel sont établies et la première sollicitation au cisaillement engendre une rupture des forces de cohésion. Il s'en suit alors la constitution dans l'espace de mesure, d'un milieu non homogène qui se traduit expérimentalement par un abaissement de la viscosité mesurée.

Influence de la concentration

En considérant les mesures exécutées dans les mêmes conditions à d'autres concentrations et en maintenant les solutions à leurs températures de gélification dynamiques respectives, on constate que l'abaissement de la viscosité n'est pas constant en poursuivant les mesures plus longtemps: en effet, une fois la viscosité maximale atteinte les courbes suivent un tracé irrégulier au delà du point marquant la destruction du gel (Fig. 4). Ce comportement peut être expliqué en considérant que l'effleurement de microagrégats par le mobile tournant provoque une augmentation momentanée des forces de frottement et donc de la viscosité; dès qu'il y a détérioration des structures internes, l'écoulement n'est plus laminaire et les mesures ne reflètent plus le comportement rhéologique de la substance dans la totalité de l'espace de mesure. On peut donc estimer qu'au premier point de rupture de la courbe correspond le temps de formation du gel à une concentration donnée et à sa température de gélification dynamique.

Deux autres observations doivent être faites sur l'évolution de la viscosité aux différentes concentrations (Fig. 4): pour un sol d'agarose à 2 g/l, l'accroissement de la viscosité à 29.5°C est négligeable; par contre pour un sol à 4 g/l, la cassure apparaît mais la viscosité enregistrée est alors deux fois moins élevée que pour les concentrations suivantes.

Dans l'hypothèse vraisemblable que les 3 paramètres, concentration, température et temps de formation du gel, interviennent dans la constitution du réseau gélifié, il nous a paru intéressant d'établir un abaque de type triangulaire reliant les 3 paramètres sus-désignés en prenant en considération pour chaque concentration la valeur interpolée sur la courbe $\eta_{app} = f$ (temps) du temps nécessaire pour atteindre une viscosité apparente du sol égale à 34 cp au gradient de vitesse 97.04 s^{-1} (Fig. 4),

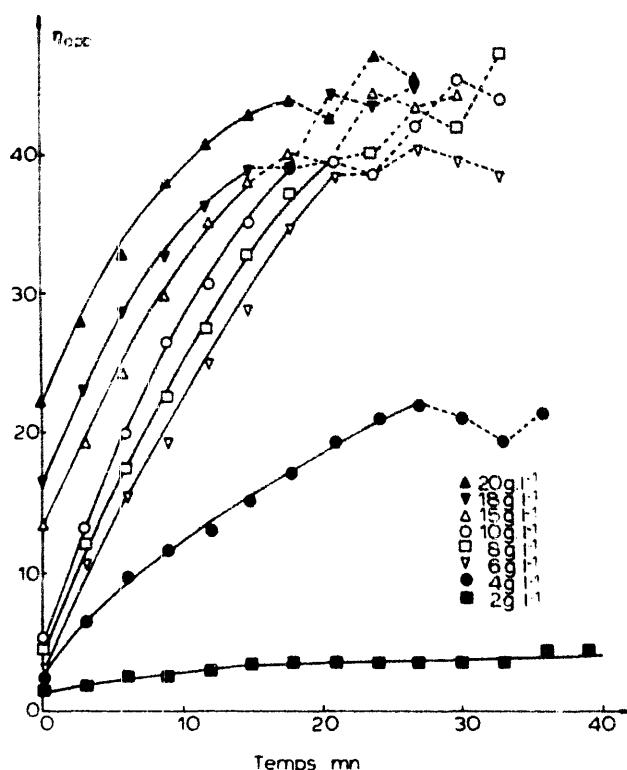


Fig. 4. Evolution de viscosité au cours du temps de l'agarose Indubiose A37 aux différentes températures de gélification dynamiques (gradient de vitesse 97.04 s^{-1}).

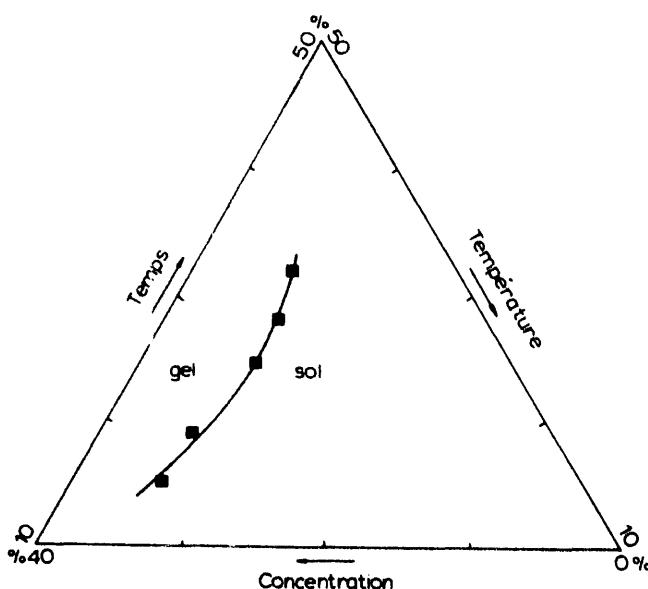


Fig. 5. Abaque triangulaire reliant concentration, température de gélification dynamique et temps de formation du gel pour les sols d'agarose Indubiose A37 de 6-18 g/l.

la température de gélification dynamique du sol étudié ayant été déterminée au préalable (Tableau 1). Nous donnons Fig. 5 le tracé de l'abaque triangulaire sur lequel est matérialisée la limite de transition sol-gel à partir de laquelle on peut déterminer approximativement température et temps de gélification d'un gel d'une concentration donnée. Cette abaque n'a qu'un intérêt pratique et nous essaierons dans une prochaine publication de donner la relation théorique qui doit relier les 3 paramètres responsables de la gélification du système étudié.

Interprétation et conclusion

L'étude rhéologique des solutions d'agarose à bas gradient de vitesse en fonction du temps permet de préciser plusieurs points dans le processus de gélification.

La température de gélification isothermique et la température de gélification commençante, considérées comme équivalentes par Guiseley, se sont révélées distinctes, toutes les sources d'erreurs possibles ayant été examinées et éludées. La température de gélification commençante est en fait déterminée sous des conditions dynamiques puisque les courbes de viscosité $\eta_{app} = f(t^{\circ}C)$ sont tracées à partir des mesures pratiquées au cours du refroidissement progressif des solutions; ainsi, cette température ne correspond certainement pas à la température de gélification statique. Cependant le protocole expérimental et notamment la vitesse de refroidissement ne peut être responsable de l'écart important qui existe dans nos résultats pour certains agaroses entre température de gélification commençante et température isothermique.

Il semble d'ailleurs à l'examen des graphes $\eta_{app} = f(\text{temps})$ (Fig. 1) que ces deux températures sont fondamentalement différentes. En effet, la cassure traduisant la destruction des structures internes est décelée uniquement dans les expériences exécutées à des températures égales ou proches de la température de gélification dynamique; l'augmentation de la viscosité aux températures voisines de la température de gélification commençante peut laisser envisager l'apparition d'une structure rigide mais seulement au bout d'un temps suffisamment long. Au contraire, immédiatement au dessous de la température de gélification isothermique, on doit exclure qu'un réseau dense et organisé puisse se former.

Ces données associées aux travaux de divers auteurs (Hayashi et al. 1977 et 1978) autorisent alors à envisager les différentes étapes du mécanisme de gélification qui, tout comme pour les carraghénanes (Rees et al., 1969), présenterait 4 températures caractéristiques: (1) *température de formation de l'hélice* (Hayashi et al., 1977) que nous ne pouvons mettre en évidence par notre technique viscosimétrique; (2) *température de gélification isothermique* à laquelle l'organisation d'un gel est improbable et seule, la présence d'un nombre croissant d'hélices est responsable de la faible élévation de la viscosité; (3) *température de gélification commençante* qui coïncide avec une résistance croissante à l'écoulement (Bourret et Bardet, 1981), l'élévation de la viscosité au cours du temps laisse supposer l'éventualité d'un gel. Dès cette température, l'association des hélices en agrégats est possible puis ceux-ci ont la faculté de se connecter entre eux en des points de jonction électifs; et (4) *température de gélification dynamique* qui correspond à la constitution rapide du réseau tridi-

mensionnel, le gel pouvant se structurer à des températures supérieures (dès l'étape précédente) mais avec une cinétique plus lente.

L'étude actuelle confirme également qu'une solution à 2 g/l ne peut donner naissance à un gel comme nous l'avions pressenti dans nos travaux précédents. Enfin, la synthèse entre les 3 paramètres, concentration, temps de formation du gel, température de gélification dynamique, définit une zone de concentration de 4–18 g/l favorable à la création de liaisons intermoléculaires assurant un édifice stable et rigide. A l'examen des résultats, il semblerait que le gel à 4 g/l d'agarose aurait une consistance moins rigide où l'enchevêtrement des chaînes serait lâche alors que 18 g/l serait la concentration maximale pour un gonflement complet du soluté lors de la mise en solution de l'agarose.

Bibliographie

- Bourret, E., Etude Statistique Critique du Dosage du Complément Total par Immuno-Hémolyse Radiale, Thèse Doct. ès Sc. Pharm., Montpellier, 1978.
- Bourret, E. Bardet L., Approche du mécanisme de gélification des sols d'agarose I. Evolution des caractéristiques rhéologiques des sols. Int. J. Pharm., in press.
- Fuse, T. and Goto, F., Studies on utilization of agar. Agr. Biol. Chem. 35 (1971) 799–804.
- Guiseley, K.B. and Renn, D.W., Agarose: purification, properties and biomedical applications. In Marine Colloids, Rockland, Me. 04841, 1975, pp. 1–35.
- Guiseley, K.B., Viscosimetric determination of agarose gelling temperature. Proc. VII Int. Seaweed Symp., 1971, pp. 455–459.
- Hayashi, A., Kinoshita, K. and Kuwano, M., Studies of agarose gelling system by the fluorescence polarization method. Polym. J., 9 (1977) 219–225.
- Hayashi, A., Kinoshita, K., Kuwano, M. and Nose, A., Studies of agarose gelling system by the fluorescence polarization method. II. Polym. J., 10 (1978) 485–494.
- Rees, D.A., Steele, I.W., Williamson, F.B., Conformational analysis of polysaccharides. J. Polymer Sci. Part C, 28 (1969) 261–276.