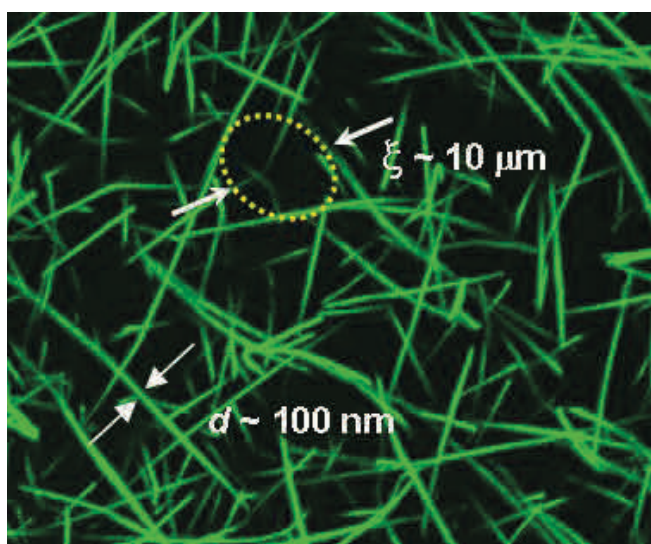


TECNICHE DI LIGHT SCATTERING E TURBIDIMETRIA PER LA CARATTERIZZAZIONE DI BIOMATERIALI: L'ESEMPIO DEI GEL DI FIBRINA

Le proprietà meccaniche e le funzionalità biologiche delle reti biopolimeriche dipendono dalla loro struttura. Utilizzando le tecniche di light scattering a basso angolo e turbidimetria, integrabili in un unico strumento, è possibile misurare dimensione dei pori, diametro e densità delle fibre e la morfologia, spesso frattale, che caratterizza tali reti.



Le tecniche di *diffusione della luce* ("Light Scattering", LS) [1, 2] sono tecniche classiche per lo studio dei cosiddetti fluidi complessi, che vanno dai liquidi puri a sospensioni o soluzioni di particelle o macromolecole, fino a microemulsioni e gel. Tali tecniche hanno il grande vantaggio di essere non-invasive, fornire informazioni quasi in tempo reale, ed essere altamente riproducibili (dal punto di vista statistico) poiché applicate a campioni costituiti da un gran numero di particelle. Tra le varie tecniche di LS, le più comuni sono indubbiamente quelle note con il nome di *Dynamic Light Scattering* (DLS), *Static Light Scattering* (SLS) e *Multi-Wavelength Turbidimetry* (MWT).

Nella prima tecnica (DLS) si misura la *funzione di autocorrelazione temporale* delle *fluttuazioni di intensità* della luce diffusa dal campione ad un

assegnato angolo. Nel caso di soluzioni diluite di particelle, se l'angolo di scattering θ è sufficientemente piccolo ($\theta < \lambda/d$, dove λ è la lunghezza d'onda della radiazione incidente e d il diametro delle particelle), tale tecnica fornisce informazioni sul loro *coefficiente di diffusione traslazionale* e quindi, via la relazione di Stokes-Einstein, sul *raggio idrodinamico* delle stesse. Parallelamente, utilizzando la tecnica della *diffusione della luce depolarizzata in modo dinamico* (DDLS), può essere ricavato anche il *coefficiente di diffusione rotazionale*. Tipicamente, con la tecnica DLS è possibile misurare raggi idrodinamici nell'intervallo ~5-200 nm.

La seconda tecnica (SLS) consiste nel misurare la distribuzione angolare e l'ampiezza dell'intensità media (media temporale) della luce diffusa elasticamente o staticamente dal campione su un intervallo angolare che, complessivamente, può andare da ~0,1° a ~170°. Tuttavia, non esiste una singola macchina in grado di coprire un così ampio intervallo e si deve ricorrere a tecniche strumentali molto diverse tra loro che operano a diversi angoli: tra ~0,1° e ~10° (Low Angle Light Scattering, LALS) vengono utilizzati sensori bidimensionali, come ad esempio CCD o array di fotodiodi, mentre a più grandi angoli, tra ~10° e ~170° (Wide Angle Light Scattering, WALS) si utilizzano rivelatori unidimensionali più sensibili, come ad esempio fotomoltiplicatori o fotodiodi a valanga. A seconda che si operi nel regime LALS o WALS è possibile caratterizzare sospensioni di particelle con dimensioni comprese tra ~1-100 μm (LALS) e ~0,05-2 μm (WALS), ricavando in ambo i casi il peso molecolare, le dimensioni medie (raggio di girazione) e la morfologia della struttura dei macrosoluti in soluzione. Dall'analisi dei dati WALS in funzione della concentrazione dei soluti è inoltre possibile determinare il secondo coefficiente del viriale della pressione osmotica, un parametro correlato alle interazioni soluto-soluto e soluto-solvente.

La terza tecnica (MWT) consiste nel misurare il coefficiente di estinzione del campione in funzione della lunghezza d'onda, tipicamente in un intervallo spettrale che comprende il NIR-VIS-UV (~0,3-1 μm). La tecnica

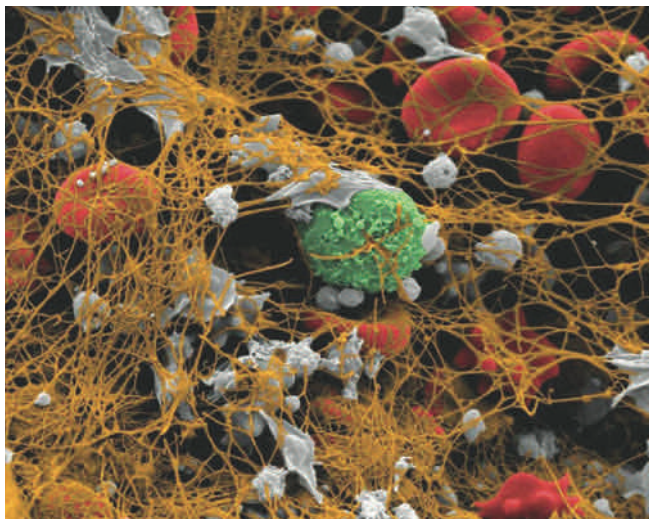


Fig. 1 - Immagine da microscopio a scansione elettronica di un coagulo di sangue. I falsi colori denotano: in marrone le fibre, in rosso i globuli rossi, in grigio le piastrine, e in verde i globuli bianchi. La figura è stata adattata dalla pagina web <http://www.med.upenn.edu/apps/faculty/index.php/g275/p20310>

MWT non è propriamente una tecnica di scattering in quanto non misura direttamente l'intensità della luce diffusa ai vari angoli, ma la potenza della luce complessivamente trasmessa dal campione, il cui valore è attenuato rispetto alla potenza incidente a causa dello scattering. Tramite la MWT è possibile ricavare informazioni su dimensioni di particelle con diametri compresi tra e $\sim 0,1-2 \mu\text{m}$, quindi in un intervallo molto simile a quello della tecnica WALS.

Risulta quindi evidente come combinando le varie tecniche (come ad esempio DLS e WALS, oppure LALS e MWT), sia possibile estrarre informazioni su un intervallo di lunghezze di scala molto più ampio di quello permesso dai singoli metodi. In alcuni casi è possibile studiare anche la cinetica di evoluzione dei vari parametri di interesse in funzione del tempo o della temperatura, ottenendo quindi informazioni dettagliate sulla struttura di prodotti intermedi durante, per esempio, reazioni di polimerizzazione, aggregazione, nucleazione e degradazione.

In questo articolo descriveremo una specifica applicazione delle tecniche di scattering allo studio della cinetica di formazione di gel di fibrina e mostreremo come, attraverso misure simultanee di LALS e MWT, sia possibile ricavare informazioni strutturali e cinetiche sul processo di polimerizzazione che porta dalla formazione dei primi oligomeri alla crescita del gel finale.

Gel di fibrina

I gel di fibrina sono reti biopolimeriche di fondamentale importanza nel processo di emostasi poiché costituiscono il principale fattore strutturale del coagulo del sangue [3, 4]. Infatti, a seguito di

una ferita, la rete di fibrina che si forma in prossimità del danno vascolare, inizia ad intrappolare i vari componenti del sangue (piastrine, globuli rossi, globuli bianchi), formando il coagulo che nel giro di pochi minuti ferma il sanguinamento (vedi Fig. 1). I gel di fibrina giocano un ruolo importante anche in altre situazioni patologiche, come ad esempio nel caso di trombosi e di cancro, poiché è noto che le cellule tumorali tendono a migrare nei vasi sanguigni attraverso reti di fibrina. Grazie alle loro straordinarie proprietà meccaniche (elasticità, estensibilità, resistenza) e alla loro origine naturale, i gel di fibrina sono materiali completamente bio-compatibili. Di conseguenza, rappresentano substrati ideali per molte applicazioni biotecnologiche, che vanno dalla chirurgia (adesivi e sigillanti noti con il nome di colle di fibrina), all'ingegneria tissutale (crescita di cellule per rigenerazione di tessuti biologici), alla somministrazione localizzata di farmaci.

I gel di fibrina si formano a partire dalla polimerizzazione del fibrinogeno (FG), una macromolecola presente nel sangue dei vertebrati che, attivata dall'enzima trombina (Thr), aggrega formando lunghe fibrille inizialmente sottili ($\sim 5-10 \text{ nm}$) che poi cominciano a ramificare e crescere lateralmente. Il risultato finale è la formazione di fibre molto più spesse (diametro $\sim 100-150 \text{ nm}$) delle fibrille di partenza, intrecciate insieme in modo disordinato a costituire una rete polimerica che pervade l'intero volume a disposizione ed è caratterizzata da una porosità relativamente grande, con dimensioni di maglia dell'ordine di $5-50 \mu\text{m}$. La struttura finale del gel dipende dalle proprietà chimico-fisiche della soluzione polimerizzante (concentrazione di FG e Thr, pH, forza ionica, presenza di ioni Ca^{2+} , etc.) che controlla, al tempo stesso, anche la cinetica del processo di crescita. Ne segue che struttura e cinetica sono strettamente legate, a dimostrazione del fatto che le modalità di crescita determinano la struttura finale del gel che ne deriva e di conseguenza la sua funzionalità biologica. Quest'ultima dipende sia da parametri microscopici, quali diametro e densità delle fibre, ma anche dalle proprietà morfologiche e

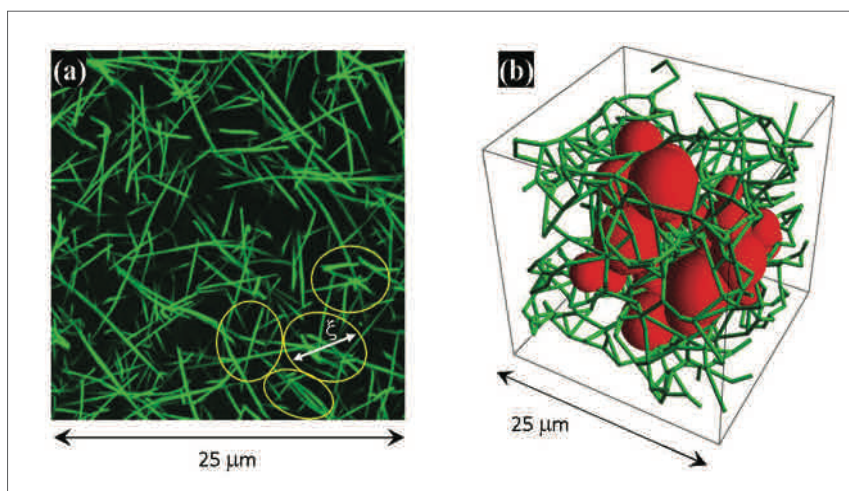


Fig. 2 - (a) Rappresentazione grafica 3D di un gel di fibrina ottenuto da immagini prese con un microscopio confocale. Le regioni all'interno delle ellissi rappresentano le zone a più alta concentrazione di fibre, utilizzate nel modello (vedi testo) per schematizzare il gel come un insieme di blob frattali di dimensione ξ . (b) Rappresentazione grafica 3D di un gel di fibrina *in silico* ottenuto ricostruendo la struttura del gel mediante assemblaggio di oggetti cilindrici di ugual diametro e diverse lunghezze [9, 10]. Le sfere rosse rappresentano le sfere le più grandi che possono essere inserite tra le fibre (tangenti a quattro fibre) e il loro diametro medio fornisce una stima accurata delle dimensioni medi dei pori del gel. La figura è stata adattata da [9, 10]

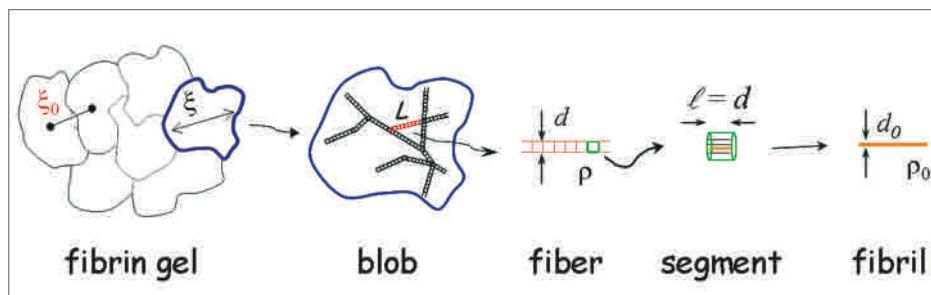


Fig. 3 - Modello a blob di un gel di fibrina: il gel viene schematizzato come un insieme di blob frattali di dimensione ξ , impaccettati densamente ad una distanza media ξ_0 . Ogni blob è costituito assemblando con morfologia frattale fibre dritte di ugual diametro d e diverse lunghezze L . Le fibre sono legate insieme in diversi punti nodali, che costituiscono i punti di ramificazione della rete. Ogni fibra è formata impilando insieme segmenti cilindrici di diametro d , densità ρ e lunghezza $\ell = d$. Infine, ogni segmento è ottenuto impaccettando non densamente molte fibrille, in modo tale che $d > d_0$ e $\rho < \rho_0$. La figura è stata adattata da [9]

meccaniche dell'intera rete, quale ad esempio la sua porosità e deformabilità sotto stress.

Avere quindi una tecnica di indagine che ci permette di misurare questi parametri è di grande interesse, ma di non facile realizzazione poiché essi coprono lunghezze di scala che si estendono su diverse decadi, da centinaia di nanometri a decine di micron. In passato abbiamo utilizzato varie tecniche di scattering statico [5-7], ma sempre in maniera indipendente le une dalle altre, ovvero applicate a campioni diversi (anche se preparati con la stessa procedura), la cui riproducibilità è una delle limitazioni più grandi. Solo recentemente abbiamo realizzato uno strumento in grado di effettuare misure *simultanee* di LALS e MWT esattamente sullo *stesso campione* all'interno della stessa cella di analisi.

Modellizzazione e analisi dati

Se analizzato con un microscopio confocale [Fig. 2(a)], un gel di fibrina appare come una rete di fibre, abbastanza monodisperse in diametro, non uniformemente distribuite nello spazio e connesse tra loro attraverso diversi punti di ramificazione. Sebbene ciascuna fibra sia piuttosto dritta e quindi rappresenti un oggetto con dimensione frattale di

massa $D_m \sim 1$, quando si considera l'intero sistema la disposizione spaziale delle fibre produce una struttura che su piccole lunghezze di scala è caratterizzata da una morfologia frattale con $1 < D_m < 2$, mentre su scale confrontabili o più grandi della dimensione media dei pori, il gel appare essere piuttosto uniforme, con una tendenza a mostrare una certa periodicità nella quale si alternano zone più dense a zone meno dense.

Una struttura così complessa può essere descritta utilizzando un *modello a blob* [8] simile a quello proposto diversi anni fa da P.G. De Gennes (premio Nobel in Fisica nel 1991) per descrivere un aggregato o

polimero costituito da tanti monomeri confinati in una regione spaziale limitata senza una geometria ben definita. Facendo ricorso a questo modello (vedi Fig. 3), possiamo quindi descrivere un gel di fibrina come un insieme di blob frattali (aventi dimensione frattale D_m), di dimensione ξ , impaccettati densamente e correlati spazialmente. I blob sono centrati intorno alle regioni dove la concentrazione delle fibre è più alta, ad una distanza media ξ_0 tra i loro centri di massa in modo che possano sovrapporsi di un fattore $\eta = \xi/\xi_0$. Ciascun blob è costruito assemblando molti segmenti che possono essere schematizzati come oggetti cilindrici di diametro d , lunghezza ℓ e densità ρ . Questi segmenti sono uniti con legami di tipo end-to-end in modo da formare fibre dritte di diametro d e lunghezza $L > \ell$. Tuttavia in qualche sito di legame essi possono anche ramificare dando luogo ad una struttura completamente interconnessa fatta da fibre dritte di diverse lunghezze L . Come mostrato in nostri lavori precedenti [9-11], la distanza media tra i blob ξ_0 fornisce un'accurata stima della dimensione media dei pori, che può essere quantitativamente definita come il diametro medio delle sfere più grandi che possono essere inserite tra le fibre del gel [vedi Fig. 2(b)].

Sulla base del modello sopra descritto, abbiamo sviluppato uno speci-

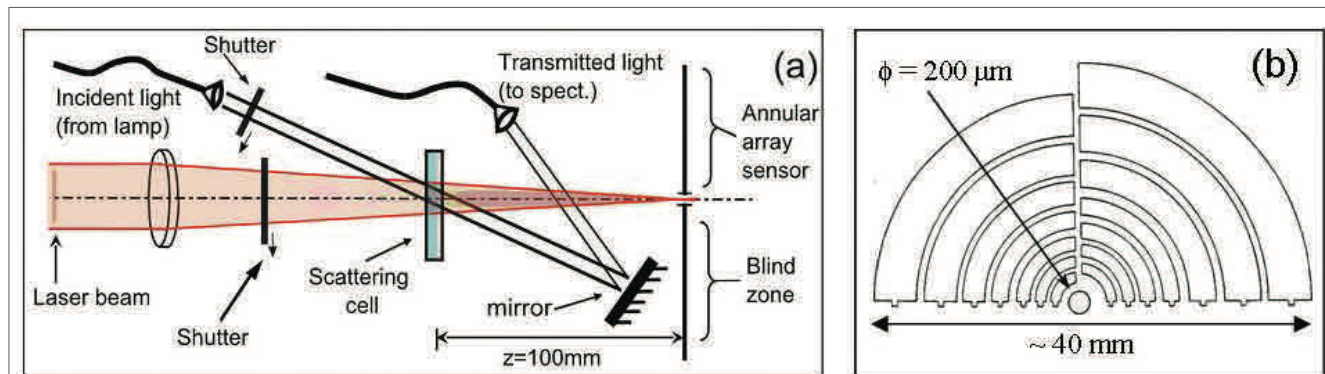


Fig. 4 - (a) Schema dell'apparato sperimentale LALS + MWT. Utilizzando due otturatori, il campione viene alternativamente illuminato con un fascio laser focalizzato e un fascio di luce bianca proveniente da una fibra ottica. Per la misura della luce diffusa a basso angolo viene utilizzato un sensore ad anelli posto nel piano focale della lente, mentre per la misura di turbidimetria si utilizza uno spettrofotometro a fibra ottica che raccoglie la luce bianca trasmessa dal campione. (b) Geometria del sensore utilizzato per la misura LALS: è costituito da 31 fotodiodi a forma di quarto di corona circolare concentrica, posizionati ad una distanza dal centro che aumenta secondo una progressione geometrica, da un raggio minimo di $200 \mu\text{m}$ ad un raggio massimo di 20 mm . Un piccolo foro ($\phi = 200 \mu\text{m}$) posizionato al centro del sensore permette al fascio focalizzato trasmesso di passare indisturbato. La figura è adattata da [12] con il permesso della American Chemical Society (2015)



fico fattore di forma in grado di interpolare i dati di SLS e di ricavare i vari parametri d'interesse che caratterizzano la struttura del gel, quali il diametro d e la densità ρ delle fibre, la dimensione media ξ_0 dei pori e la dimensione frattale D_m che descrive la morfologia della rete. Tuttavia al fine di ricavare stime attendibili per questi parametri c'è bisogno di un ampio intervallo angolare su cui misurare la distribuzione angolare di SLS, e uno strumento da solo (LALS o WALS) non è sufficiente. In compenso, abbiamo dimostrato come combinando insieme LALS e MWT sia possibile ricavare tutti e quattro i parametri di cui sopra quando le dimensioni soprattutto laterali dei polimeri superino un certo valore di soglia. Ciò è possibile poiché la tecnica LALS, che è sensibile alle grandi lunghezze di scala, è in grado di stimare ξ_0 e D_m senza essere influenzata dai valori di d e ρ . Al contrario la tecnica MWT, che si basa sull'integrazione angolare della distribuzione della luce diffusa in accordo al fattore di forma sviluppato secondo il modello sopra descritto, ha bisogno della conoscenza di ξ_0 e D_m per poter ricavare in modo accurato d e ρ . Ne segue che solo combinando insieme le due tecniche (o ricavando ξ_0 e D_m , per altra via e utilizzando solo MWT) è possibile ricavare tutti e quattro i parametri d'interesse del gel.

Apparato sperimentale

L'apparato sperimentale per le misure simultanee di LALS e MWT consiste in uno strumento non commerciale LALS progettato e realizzato [12] presso il laboratorio To.Sca.Lab. a Como sul quale è stato implementato uno spettrofotometro commerciale a fibra ottica che permette di eseguire misure di MWT nell'intervallo spettrale IR-VIS-UV. Entrambe le misure sono eseguite nella modalità *time-resolved*, così da poter studiare non solo la struttura del gel finale, ma anche la cinetica del processo di polimerizzazione.

Come mostrato in Fig. 4(a), la cella contenente il campione è alternativamente illuminata, usando due otturatori controllati da PC, con un fascio laser focalizzato (laser He-Ne, $\lambda=0,6328 \mu\text{m}$) e un fascio di luce bianca ottenuto utilizzando un collimatore a fibra ottica. Il rivelatore LALS, che è costituito da una serie di 31 fotodiodi a forma di quarti di corone circolari concentriche [Fig. 4(b)], è posizionato sul piano di Fourier, ovvero il piano sul quale il fascio viene focalizzato. In questa configurazione esiste una corrispondenza biunivoca tra la luce che viene diffusa ad un assegnato angolo di scattering e una posizione radiale sul piano del sensore. Pertanto, ogni fotodiodo raccoglie la luce diffusa ad un assegnato angolo θ dato da $\theta=\text{tg}^{-1}(r/z)$, dove r è la distanza media del fotodiodo dall'asse ottico e z la distanza tra la cella e il piano di Fourier. Poiché i raggi minimo e massimo degli anelli sono di rispettivamente $\sim 180 \mu\text{m}$ e $\sim 17 \text{mm}$, l'intervallo angolare coperto dallo strumento è notevolmente ampio, tra $\sim 0,1^\circ$ e $\sim 10^\circ$ ($z=100 \text{mm}$). Un'altra caratteristica premiante del nostro

senso è quella di avere al centro, in corrispondenza dell'asse ottico, un piccolo foro ($\phi=200 \mu\text{m}$) che permette al fascio focalizzato di passare indisturbato. In tal modo l'intensità di luce spuria, che altrimenti cadrebbe sui vari fotodiodi, viene ridotta in maniera drastica.

Poiché il sensore copre solamente metà del piano di Fourier, è stato possibile posizionare sul restante semipiano uno specchio che riflette il fascio di luce bianca trasmesso dal campione e lo indirizza sulla lente di collezione accoppiata allo spettrofotometro. In questo modo le misure di LALS e MWT vengono eseguite sulla stessa porzione di campione illuminata, alternativamente dal laser e dal fascio di luce bianca.

Risultati sperimentali

L'apparato di Fig. 4 è stato usato per studiare la cinetica di polimerizzazione di gel di fibrina che si formano a partire da una soluzione di fibrinogeno attivato dall'enzima trombina in condizioni quasi-fisiologiche. Dettagli sulla preparazione del campione possono essere trovati in [5, 6]. Come già descritto in passato [5, 6], la cinetica di crescita di un tale sistema è caratterizzata da tre regimi distinti: una prima fase (detta di "*networking*") durante la quale si forma l'impalcatura della rete dovuta alla formazione di legami tra le fibrille che stanno crescendo in lunghezza. Durante questa fase, la soluzione è trasparente poiché in soluzione ci sono prevalentemente monomeri liberi di muoversi, mentre le fibrille ferme che costituiscono la rete sono così sottili da non diffondere abbastanza luce da poter essere rivelata da entrambe le tecniche LALS e MWT. Segue poi una seconda fase (detta di "*ripening*") durante la quale la rete iniziale comincia a riaggiustare la sua struttura a causa dell'aggiunta dei monomeri/oligomeri e delle altre fibrille ancora libere in soluzione. Ne segue che le fibrille che costituivano l'impalcatura originale della rete

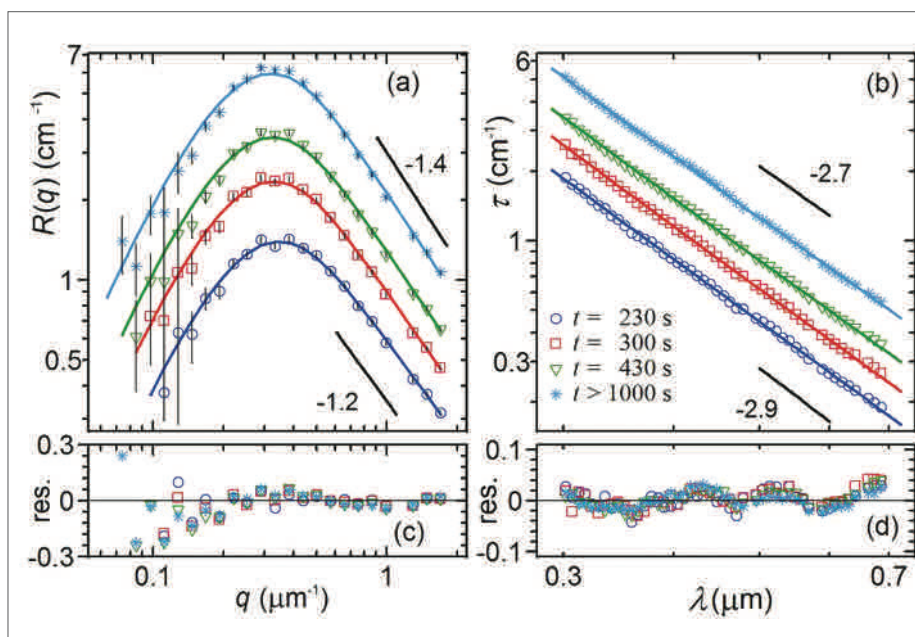


Fig. 5 - Dati LALS (a) e MWT (b) presi su una soluzione di fibrina ($c_{\text{FG}}=0,45 \text{ mg/ml}$ con rapporto molare di trombina, Thr/FG=1/100) a vari tempi di polimerizzazione dopo il mixing di fibrinogeno e trombina. Le linee continue rappresentano i fitting ottenuti con il metodo di analisi accennato nel testo e descritto in dettaglio in [12]. La figura è riprodotta da [12] con il permesso della American Chemical Society (2015)

iniziano a crescere lateralmente formando delle fibre (costituite da bandoli di fibrille) il cui diametro cresce progressivamente con il tempo. È questo il momento al quale i segnali di diffusione e turbidità cominciano ad essere rilevabili dalla strumentazione e analizzabili quantitativamente. C'è poi una terza fase (detta di "thickening") durante la quale la struttura della rete è già così consolidata che l'aggiunta di altre fibrille non produce alcun riaggiustamento strutturale e l'unico effetto è un ispessimento progressivo delle fibre, con relativi aumenti dei segnali di scattering e turbidità, fino ad esaurimento dei monomeri a disposizione.

Tale comportamento è facilmente riscontrabile nella Fig. 5 che si riferisce parzialmente alla fase di ripening e totalmente a quella di thickening, al termine della quale ($t > 1000$ s) sia le curve di LALS che di MWT rimangono stazionarie. Dal fit globale di queste ultime due curve, come descritto al paragrafo precedente, è stato possibile ricavare che il gel formatosi in queste condizioni è caratterizzato da una dimensione media di maglia $\xi_0 \sim 13$ μm , dimensione frattale $D_m \sim 1,4$, diametro medio delle fibre $d \sim 90$ nm e densità delle fibre $\rho \sim 0,4$ g/cm³.

Tale metodo di analisi dati non può essere applicato alle altre curve di LALS e MWT prese a tempi precedenti (quando il gel è ancora in fase di crescita). In questo caso infatti, la concentrazione del fibrinogeno presente nelle fibre che formano la rete è solo una frazione della concentrazione totale messa inizialmente in soluzione e non è nota. Tuttavia, facendo l'ipotesi che il modello a blob che descrive il gel finale sia valido anche per il gel in fase di crescita, è possibile ricavare anche per quest'ultimo i quattro parametri di interesse, ovvero ξ_0 , D_m , d e ρ . Come corollario, si ha anche una stima della concentrazione di fibrinogeno che viene usata per formare la rete iniziale, con il risultato assai sorprendente che al tempo di *networking* ~80% del fibrinogeno è ancora in soluzione come monomeri (o oligomeri) non legati alla rete. Altro risultato molto interessante da questa analisi è il valore della densità delle fibre del gel finale che essendo $\rho \sim 0,4$ g/cm³, è molto più piccolo della densità del fibrinogeno ($\rho_{FG} \sim 1,4$ g/cm³). Le fibrille quindi non sono unite in modo compatto all'interno delle fibre, ma intercalate con molte molecole di solvente, e formano un bandolo la cui struttura è consistente con le peculiari proprietà elastiche dei gel di fibrina [13].

Infine è interessante notare come il meccanismo di formazione basato sulle tre fasi di *networking*, *ripening* e *thickening*, sia perfettamente consistente con la funzionalità fisiologica del fibrinogeno, il cui scopo è formare rapidamente una rete che pervada la zona nella quale è avvenuto il danno vascolare intrappolando le prime piastrine, e successivamente irrobustendo le sue fibre in modo che la rete sia sufficientemente forte ed elastica da creare un tappo emostatico in grado di reggere la pressione sanguigna.

Conclusioni

In questo breve articolo abbiamo mostrato come, attraverso l'utilizzo combinato della tecnica di diffusione a basso angolo (LALS) e della tecnica di turbidimetria a molte lunghezze d'onda (MWT), sia possibile caratterizzare le proprietà fisiche di reti biopolimeriche di natura filamentosa, determinandone dimensione dei pori, diametro e densità delle fibre, e dimensione frattale, che descrive la loro morfologia. Le due tecniche LALS e MWT sono state integrate in un unico strumento che ci ha permesso di studiare non solo la struttura finale del gel, ma anche la sua cinetica di crescita, determinando l'evoluzione temporale dei vari

parametri durante le diverse fasi del processo di polimerizzazione. L'utilizzo combinato delle due tecniche è stato di vitale importanza poiché, data l'enorme differenza di lunghezze di scala dei parametri da ricavare (da ≤ 100 nm per il diametro a ≥ 10 μm per i pori), ciascuna delle due tecniche, singolarmente, non sarebbe stata in grado di fornire stime attendibili.

Sebbene in questo lavoro ci siamo focalizzati sui gel di fibrina, l'approccio sperimentale proposto è di validità generale e può essere applicato a varie altre reti biopolimeriche filamentose, quali ad esempio actina e collagene, ma anche a reti di natura non organica, quali ad esempio gel di silice o gel colloidali. Inoltre va citato che in questo lavoro ci siamo limitati alla combinazione delle due sole tecniche LALS e MWT. In linea di principio (ma anche con molte più difficoltà di natura tecnica) è possibile costruire un apparato sperimentale che riesca ad integrare insieme LALS, MWT e WALS, estendendo ancor di più l'intervallo di lunghezze di scala investigabili. Ed infine, tale intervallo può essere esteso ulteriormente integrando le tecniche di scattering di luce con la analoga tecnica di scattering a raggi X a basso angolo (Small Angle X-ray Scattering, SAXS) [13]. In quest'ultimo caso, tuttavia, al fine di effettuare misure risolte in tempo, è necessario ricorrere ad una sorgente di raggi X a grande brillantezza e l'intero apparato deve essere installato presso una sorgente di luce di sincrotrone.

BIBLIOGRAFIA

- [1] B.J. Berne, R. Pecora, *Dynamic Light Scattering*, Wiley, NY, 1976.
- [2] F. Scheffold, R. Cerbino, *Curr. Op. Coll. Int. Science*, 2007, **12**, 50.
- [3] J.W. Weisel, *Adv. Protein. Chem.*, 2005, **70**, 247.
- [4] P.A. Janmey, J.P. Winer, J.W. Weisel, *J. R. Soc. Interface*, 2009, **6**, 1.
- [5] F. Ferri *et al.*, *Phys. Rev. E*, 2001, **63**, 31401/1-17.
- [6] F. Ferri *et al.*, *Phys. Rev. E*, 2002, **66**, 11913/1-13.
- [7] M. De Spirito *et al.*, *J. Appl. Cryst.*, 2003, **36**, 636.
- [8] P.G. De Gennes, *Scaling concepts in polymer physics*, Cornell University Press, Ithaca, NY, 1979.
- [9] D. Magatti *et al.*, *Bioph. J.*, 2013, **104**, 1150.
- [10] M. Molteni *et al.*, *Bioph. J.*, 2013, **104**, 1160.
- [11] M. Molteni *et al.*, *Bioph. J.*, 2013, **104**, 2776.
- [12] F. Ferri *et al.*, *Macromolecules*, 2015, **48**, 5423.
- [13] M. Rocco *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 2014, **136**, 5376.

Light Scattering and Turbidimetry for the Characterization of Biomaterials: the Case of Fibrin Gels

The mechanical properties and biological functionalities of biopolymeric networks depend on their structure. By using low angle light scattering and turbidimetry techniques, which are implementable in a single instrument, it is possible to determine the gel pore size, the diameter and density of the fibers, and the fractal morphology of the network.