

# Determinazione sperimentale delle proprietà macromolecolari

## Caratterizzazione di macromolecole in soluzione diluita

Per **caratterizzare a livello macroscopico** le catene macromolecolari c'è bisogno che queste siano molto distanti l'una dall'altra, ciò è possibile in soluzioni molto diluite. Quando si parla di soluzioni diluite di polimeri l'ordine di grandezza è di  $10^{-10}$ .

Il **processo di dissoluzione di un solido cristallino** avviene in due stadi:

- la rottura delle interazioni del reticolo cristallino, stadio assimilabile alla fusione;
- il mescolamento casuale delle molecole di soluto e di solvente, stadio paragonabile al mescolamento di due liquidi.

Se si utilizzano **solidi cristallini** il primo stadio è cruciale. La solubilità in questo caso è tanto minore quanto più grande è il valore di entalpia di fusione, quindi maggiore sarà la temperatura di fusione.

Per ottenere una perfetta miscibilità e l'assenza di forti **interazioni omo-tattiche** che porterebbero ad una ri-associazione delle molecole di soluto il secondo stadio deve garantire una sufficiente energia di scambio. Entrambi gli stadi producono un aumento di entropia.

Data la mancanza di una struttura cristallina per **solidi amorfi, definiti come liquidi sotto-raffreddati**, il primo stadio viene saltato. Si tratta quindi il processo di dissoluzione come un mescolamento tra due liquidi, di cui quello sotto-raffreddato ha viscosità interna e **forze di coesione** molto grandi. Da ciò deriva che nonostante il processo sia termodinamicamente favorito potrebbe essere molto lento a livello cinetico. Le forze di coesione possono assumere un carattere cooperativo su scala di segmenti polimerici. Quando si opera con polimeri con interazioni intermolecolari medio-forti (biopolimeri idrofilici) o interazioni polari, per facilitare il processo di dissoluzione, bisogna far in modo che le catene nel solido amorfo siano disperse e non compatte. Per ottenere questo si ricorre alla **liofilizzazione**. La **giunta di un polimero amorfo ad un solvente** comporta una successione di microstadi:

- migrazione del solvente dalla superficie verso l'interno del polimero amorfo;
- solvatazione microscopica di segmenti della catena (rigonfiamento);
- dispersione di microaggreganti solubili;
- soluzione omogenea, in cui le catene polimeriche sono distribuite in modo statistico e su tutto il volume della soluzione.

La maggior parte delle proprietà dei polimeri in soluzione dipende dal volume entro cui immaginiamo sia contenuta la catena polimerica. Se si considera una soluzione diluita di un polimero qualsiasi, tanto più distanti e solvate saranno le catene, tanto maggiore sarà il contributo dato dalla soluzione alla viscosità. Dal momento che i metodi sperimentali applicati alla determinazione della massa molecolare sfruttano proprietà che dipendono dal "volume occupato" la dipendenza del volume dalle condizioni di solvatazione e temperatura acquista una relativa importanza.

Nelle prove sperimentali non si può ragionare con delle "catene isolate", ma si devono immaginare anche interazioni tra segmenti di catena e solvente. Se queste interazioni "miste" sono energeticamente favorevoli rispetto a quelle omologhe ci si dovrà attendere un valore sperimentale di  $\langle R_g \rangle$  superiore a quello,  $\langle R_g \rangle_0$ , della catena isolata. Qui nasce una definizione per il solvente che viene definito:

- buono se il rapporto  $\alpha^2 = \langle R_g \rangle / \langle R_g \rangle_0$  è elevato;
- cattivo se  $\langle R_g \rangle$  è minore di  $\langle R_g \rangle_0$ .

Per ogni coppia polimero-solvente esiste una temperatura  $\Theta$  alla quale si ha la compensazione delle interazioni eccesso tra segmenti di catena e solvente. A questa temperatura si possono assumere **per soluzioni diluite all'equilibrio un approccio statistico**

Un'ulteriore considerazione va fatta sul volume definito da  $R_g$  che corrisponde alle catene a "riposo", non è lo stesso per le catene sotto flusso.

Infine si ricorda che i valori di massa e di dimensioni delle molecole che possono essere determinati sperimentalmente non possono che essere dei valori medi data la polidispersione dei campioni.

## Osmometria

Per la determinazione della massa molecolare di macromolecole in modo diretto viene utilizzata la pressione osmotica che è il fenomeno che coinvolge due soluzioni di diversa concentrazione separate da una membrana semipermeabile. Dato che la variazione del potenziale chimico è una funzione di concentrazione, pressione e temperatura, la variazione del potenziale chimico del solvente nella soluzione può essere annullata variando la pressione, se la temperatura viene mantenuta costante.

Come si può leggere dalla figura i potenziali chimici  $\mu$  delle due soluzioni sono diversi, in particolare  $\mu_1^\circ$ , il potenziale chimico del solvente puro è maggiore di  $\mu_1$ , che è il potenziale chimico della soluzione. Per cui dato che come appena detto  **$\mu_1 < \mu_1^\circ$** , le molecole di solvente, le uniche che possono attraversare la membrana,

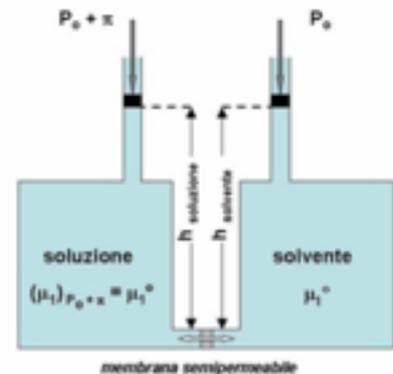
passeranno dal solvente puro alla soluzione. Il passaggio inverso, ovvero le molecole di soluto della soluzione che passano al solvente puro è impedito dalla impermeabilità della membrana. Di conseguenza si avrà un aumento del livello del capillare della soluzione e una diminuzione del livello del capillare del solvente puro. Nei moderni osmometri la pressione osmotica  $\pi$  è la sovrappressione che deve essere esercitata sulla soluzione per far sì che i livelli idrostatici  $h$  restino uguali. In questo modo dato che non avviene la diluizione la misura è molto veloce perché non è necessario che si realizzi l'equilibrio, cosa che verrebbe lentamente.

C'è un'equazione termodinamica che correla la concentrazione del soluto,  $C_2$ , e la massa molecolare,  $M_2$ , alla pressione osmotica per soluzioni infinitamente diluite:

$$\lim_{c_2 \rightarrow 0} \frac{\pi}{c_2} = \frac{RT}{M_2}$$

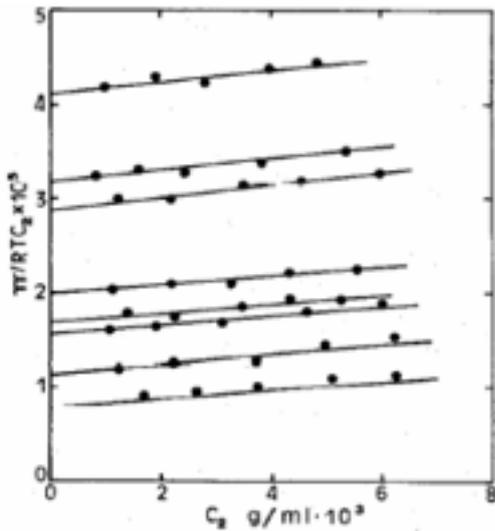
Possiamo notare che la  $\pi$  è inversamente proporzionale alla massa, perciò ci sarà un limite superiore per la massa sopra al quale la pressione osmotica sarà troppo piccola per essere misurata. A determinare dunque il limite superiore della massa molecolare sarà la minima differenza di pressione apprezzabile dallo strumento. Per gli osmometri ad equilibrizzazione rapida, in certe condizioni, si possono determinare masse molecolari di qualche milione di Dalton.

Se si utilizza un osmometro a membrana si avrà anche un limite inferiore per la determinazione delle masse molecolari dovuto alla permeabilità della membrana per molecole troppo piccole. Se queste piccole molecole fluiscono attraverso la membrana, il valore di pressione osmotica viene determinato con un errore in eccesso. È importante riflettere sul fatto che la permeabilità della membrana dipende dalla bontà del solvente e della temperatura perché sono funzioni del volume idrodinamico. Trattando con soluzioni di macromolecole non è possibile trascurare la non-idealità perciò bisogna utilizzare **l'equazione virale**

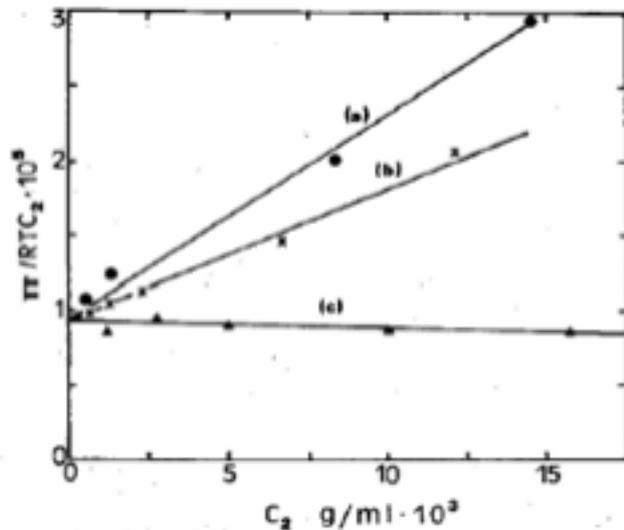


$$\frac{\pi}{c_2} = RT \left( \frac{1}{M_2} + A_2 c_2 + A_3 c_2^2 + \dots \right)$$

I vari coefficienti A sono i coefficienti virali e la concentrazione della soluzione è dell'ordine di 0.01 g/cm<sup>3</sup> i termini del polinomio di grado superiore al secondo possono essere trascurati, si ottiene così una retta di intercetta 1/M<sub>2</sub> e di pendenza A<sub>2</sub>.



Il grafico rappresenta uno studio effettuato su una serie di campioni di acetato di cellulosa a 25°C con lo stesso solvente e con lo stesso metodo sperimentale. Si nota che le rette che vengono ottenute graficando  $\pi/RTC_2 \cdot 10^5$  su  $C_2$  sono tutte parallele tra di loro con diverse intercette. Ricordiamo che l'intercetta è 1/M<sub>2</sub>.



Questo grafico rappresenta uno studio di pressione osmotica dello stesso campione contenete un determinato polimero posto in tre diversi solventi:

- a) acetone;
- b) metanolo
- c) nitrobenzene.

Si nota che, poiché la concentrazione tende a zero l'intercetta rimane costante, ma varia la pendenza, A<sub>2</sub>, che infatti dipende dalle dimensioni della macromolecola e dalle interazioni catena-solvente, quindi dipende dalla "bontà" del solvente.

Analizziamo due dei tre casi:

- a) ci troviamo in presenza di un buon solvente, si ha un'espansione delle catene di macromolecole dovuta da un'energia di solvatazione favorevole e un percettibile aumento di A<sub>2</sub>;
- c) ci troviamo in presenza di un cattivo solvente, infatti si ha la tendenza all'aggregazione tra le molecole, A<sub>2</sub> < 0.

Esiste una condizione sperimentale, Θ, in cui A<sub>2</sub>=0, ciò dipende da solvente e temperatura. In questa situazione si ha la compensazione delle forze attrattive e repulsive tra soluto e solvente, e si può associare il sistema ad un gas reale diluito alla temperatura di Boyle.

Per concludere è importante specificare che la determinazione della massa molecolare con metodi osmotici è basata su un'analisi di tipo termodinamico e non dipende da nessuno tipo di modello o approssimazione alla idealità. Per una corretta estrapolazione si richiede l'utilizzo di soluzioni diluite.

## Viscosità

Data la grande differenza di dimensione tra le molecole di polimero e quelle del solvente, il polimero ha la capacità di aumentare la viscosità del solvente. Si ha l'aumento di viscosità anche per soluzioni molto diluite specialmente se la massa molecolare del polimero è alta o se è un polielettrolita. L'aumento della viscosità è proporzionale al volume occupato dalla catena polimerica. Si può correlare l'aumento di viscosità alla massa molecolare del polimero e alle dimensioni idrodinamiche le quali dipendono anche dalla struttura della molecola, dalla forma spaziale e dalla solvatazione.

Principalmente tramite misure di viscosità si va a determinare la massa molecolare del polimero. Il vantaggio è che questa tecnica è semplice, veloce e molto economica, lo svantaggio è che la determinazione si basa su una curva di calibrazione.

Le misure vengono effettuate su un viscosimetro di tipo Ubbelohde in cui si misura il tempo di scorrimento di un volume costante di soluzione attraverso un capillare di cui si conosce la sezione. Il tempo di scorrimento viene determinato dal passaggio del liquido attraverso due cursori segnati. Tramite la legge di Hagen-Poiseuille si può correlare il volume per unità di tempo alla viscosità,  $\eta$ , e alla densità,  $\rho$ :

$$\frac{V}{t} = \frac{hg\rho\pi r^4}{8l\eta}$$

Si noti che  $hgp = \Delta P$  che è la pressione esercitata sul menisco del liquido, da cui:

$$\eta = \rho t \left( \frac{\pi r^4 hg}{8 l V} \right) = \rho t Q$$

Q tiene conto dei parametri strumentali.

La misura della viscosità di base sui tempi di scorrimento della soluzione,  $t$ , e del solvente puro,  $t_0$ . La viscosità specifica della soluzione viene definita come:

$$\eta_{sp} = \eta_r - 1 = \frac{(\eta - \eta_0)}{\eta_0} = \left( \frac{t\rho}{t_0\rho_0} \right) - 1 \approx \left( \frac{t}{t_0} \right) - 1$$

$\eta_r$  è la viscosità relativa, ovvero il rapporto tra la viscosità del polimero e quella del solvente e in soluzioni diluite è associabile al rapporto  $t/t_0$ , dato che le densità sono in pratica uguali.

A livello empirico la viscosità sperimentale può essere associata alla concentrazione del polimero,  $c$ :

$$\eta_{sp} = [\eta]c_2 + k'[\eta]^2 c_2^2 + \dots$$

$k'$  è la costante di Huggins che è compresa tra 0,2 e 0,5 e dipende dalla solvatazione.  $[\eta]$  è la viscosità intrinseca e si esprime come intervallo di concentrazioni. L'equazione di Huggins per soluzioni diluite è:

$$\frac{\eta_{sp}}{c} = [\eta] + k' [\eta]^2 c$$

Così si ottiene una forma lineare in cui  $[\eta]$  è l'intercetta e  $k'$  la pendenza. Un'ulteriore equazione utilizzata è l'equazione di Kraemer:

$$\frac{(\ln \eta_r)}{c} = [\eta] + k'' [\eta]^2 c$$

in cui compare la costante di Kraemer,  $k''$ , negativa, che è in relazione con la costante di Huggins secondo l'equazione:

$$k'' = k' - \frac{1}{2}$$

Con lo sviluppo in serie si può studiare la relazione tra  $k'$  e  $k''$ .

Analizziamo  $[\eta]$ .

Innanzitutto la viscosità intrinseca deriva dalla misura dell'aumento di viscosità normalizzato per la concentrazione, perciò l'unità di misura è l'inverso di quella di una concentrazione, ovvero quella di un volume specifico.

La viscosità intrinseca quindi si può immaginare come il rapporto tra il volume occupato dalla catena e la sua massa molecolare. In questo modo è più semplice comprendere che  $[\eta]$  è proporzionale al fattore di espansione, ovvero alla bontà del solvente.

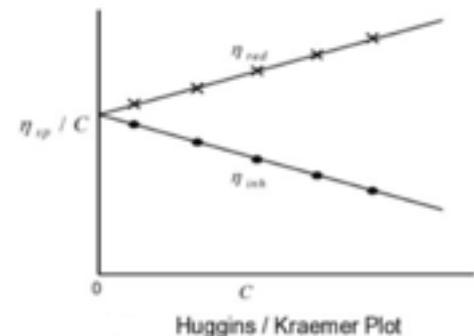
A temperatura e solvente definiti il volume occupato dalla macromolecola sarà funzione della massa molecolare. Perché questa dipendenza sia lineare però le molecole dovrebbero essere delle sfere compatte. In questo caso volume e massa molecolare sarebbero linearmente proporzionali e  $[\eta]$  sarebbe costante e indipendente dalla massa molecolare.

Per i polimeri invece viene applicata la legge di Mark-Houwink:

$$[\eta] = KM^a$$

in cui il sistema polimero-solvente-temperatura è espresso dalla costante  $K$  mentre le caratteristiche di espansione e di forma della catena sono espresse da  $a$ .

Per un polimero di forma sferica  $a$  varia da 0,5 a 1. Il valore minimo esprime una condizione non-perturbata, mentre il valore 1 esprime una catena molto espansa. La catena può avere un'ulteriore



espansione che porta ad un'asimmetria spaziale della catena fino a raggiungere un valore massimo di 1,8.

Se si conoscono le condizioni di solvente e temperatura e i valori di K e a si può ricavare la massa molecolare incognita di un campione dello stesso polimero.

### Cromatografia di esclusione sferica

La cromatografia di esclusione sferica SEC o cromatografia di penetrazione su gel GPC è un metodo di separazione di molecole in base alla loro dimensione.

La soluzione da separare viene introdotta in testa alla colonna che è riempita di materiale poroso e trascinata lungo tutta la lunghezza da un apposito eluente. Il materiale poroso è costituito da polimeri reticolati semirigidi (polistirene reticolato con o-divinilbenzene), oppure gel di silice o vetri porosi. Questi materiali servono a garantire la pressione necessaria per mantenere un buon flusso e tempi di analisi brevi. All'uscita dalla colonna le frazioni separate verranno identificate mediante metodi ottici.

$$V_c = V_m + V_o + V_p$$

Questa equazione rappresenta il volume totale della colonna,  $V_c$ , dato dalla somma del volume della matrice, ovvero del materiale di impaccamento,  $V_m$ , del volume interstiziale,  $V_o$ , e dal volume dei pori,  $V_p$ . Il liquido presente nei pori costituisce la fase stazionaria, mentre quello negli interstizi la fase mobile. Le molecole fluide possono distribuirsi nella fase mobile e nella parte di fase stazionaria composta dai pori più grandi, ovviamente non possono entrare nei pori di dimensione inferiore alla loro. Il tempo di ritenzione,  $V_r$  dipende quindi dalla dimensione della molecole da quella dei pori.

Il volume di ritenzione:

- per le molecole più piccole che possono entrare in tutti i pori sarà  $V_r = V_o + V_p$ ,
- per le molecole più grandi delle dimensioni di tutti i pori sarà  $V_r = V_o$ ,
- per le molecole che possono entrare solo in alcuni pori sarà  $V_r = V_o + KV_p$  dove K è il coefficiente di diffusione del solido nella FS. K è un valore compreso tra 0 e 1.

La dimensione media e la disposizione dei pori determinano l'intervallo di dimensioni delle catene che possono essere separate e la risoluzione della cromatografia.

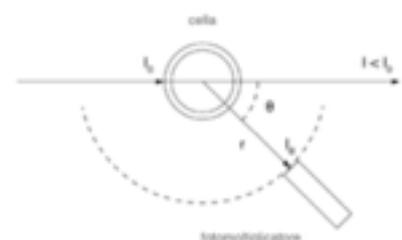
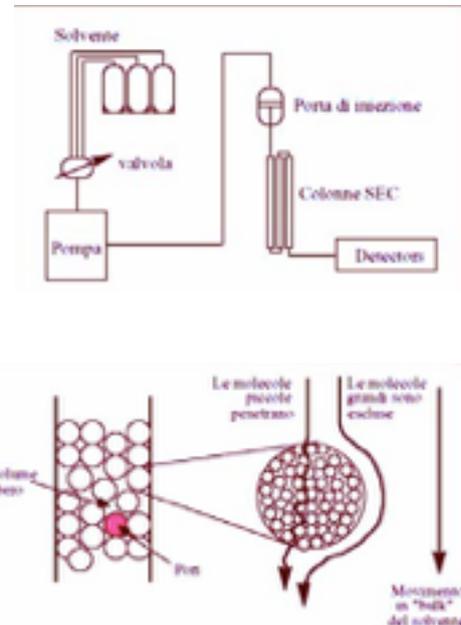
$$K_{SEC} = \frac{V_r - V_o}{V_p} = x_s$$

$V_r - V_o$  è l'intervallo di volume dei pori accessibili dal soluto.

La difficoltà di descrivere le strutture porose con accuratezza e la complessità dei fenomeni operanti nella separazioni porta al fatto che la relazione tra le dimensioni delle macromolecole e il coefficiente K non possono essere esplicitate quantitativamente. Per risolvere questo inconveniente si opera con una taratura.

### Diffusione della luce

È possibile determinare la massa molecolare di una macromolecola in soluzione grazie alla misura dell'intensità di una radiazione elettromagnetica diffusa da un sistema di



particelle. In questo modo si può anche studiare la termodinamica e le configurazioni di un sistema non-cristallino.

Una soluzione diluita di polimeri diffonde una radiazione elettromagnetica incidente in tutte le direzioni. L'intensità della radiazione diffusa dipende da:

- angolo di diffusione,
- frequenza ,
- polarizzazione,
- dimensione e forma della molecola,
- temperatura,
- concentrazione,
- altre variabili.

Solitamente si misura l'intensità della radiazione in funzione di concentrazione e angolo tra la direzione della radiazione incidente e quella diffusa.

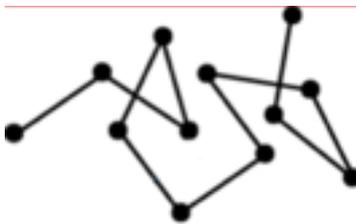
Abbiamo due possibilità:

- la lunghezza d'onda,  $\lambda$ , della radiazione è molto maggiore delle dimensioni della molecola,
- le dimensioni della molecola sono maggiore della lunghezza d'onda della radiazione utilizzata.

Nell'ultimo caso si verificheranno dei fenomeni di interferenza intramolecolare oltre a quelli intermolecolari.

Analizziamo il caso in cui  $\lambda \ll R_g$ , nel limite di diluizione infinita. Lungo la catena polimerica sono presenti diversi centri di diffusione della radiazione, che sono rappresentati dagli atomi. Si pongono delle semplificazioni che permettono di descrivere quantitativamente l'intensità diffusa:

- la soluzione polimerica è infinitamente diluita, perciò le distanze tra centri presenti su una catena sono molto più piccole rispetto a una catena diversa;
- l'orientazione della catena rispetto alla radiazione incidente è statistica;
- la radiazione è monocromatica e polarizzata;
- non esistono fenomeni di assorbimento della radiazione;
- l'indice di rifrazione del solvente è omogeneo;
- non si hanno fenomeni di diffusione multipla, ciò significa che la radiazione diffusa viene integralmente misurata.



Prendiamo in considerazione una catena polimerica costituita da N centri di diffusione uniti da legami, la sua massa molecolare sarà proporzionale a N. Se un campo magnetico oscillante colpisce uno degli N centri, si verificherà un dipolo elettrico oscillante in quel centro di diffusione. Il dipolo emetterà una radiazione elettromagnetica in tutte le direzioni. Dato che ogni centro diffonderà in questo modo la radiazione, le interferenze tra due centri sono definite dalla lunghezza d'onda della radiazione, dalla distanza tra i

due centri e dall'angolo  $\theta$  che è l'angolo di osservazione.

La media temporale su tutte le possibili orientazioni e su tutte le possibili conformazioni del polimeri sono definite come l'intensità luminosa se vengono registrate in tempi lunghi.



$P(\theta)$  è una funzione di diffusione relativa in cui  $I(\theta=0)$  è l'intensità della radiazione con  $\theta=0$ .

$$P(\theta) = \frac{I(\theta)}{I(\theta=0)}$$

$$I(\theta) = \frac{A^2}{2} \sum \sum \cos 2\pi(\phi_i - \phi_j)$$

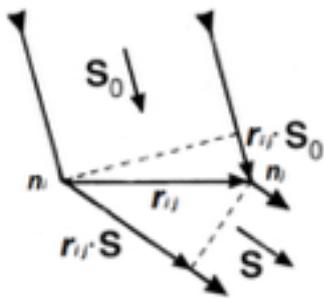
Quando la differenza di fase è nulla, ciascuna sommatoria è uguale a N, quindi

$$I(\theta = 0) = \frac{A^2 N^2}{2}$$

Lo sviluppo del calcolo della differenza di fase tra centri diversi in termini delle distanze tra i centri stessi conduce all'espressione:

$$P(\theta) = \frac{1}{N^2} \sum \sum \cosh r_{ij}$$

dove  $h = 4\pi/\sin\theta/2$ .  $h$  è chiamato **vettore di scattering** ed è funzione dell'angolo di diffusione e della lunghezza d'onda.



Nella figura si possono vedere due raggi in fase tra di loro in direzione  $S_0$ . Entrambi diffondono in direzione  $S$  ma con una differenza di fase. La differenza di fase è proporzionale alla differenza di cammino ottico:  $r_{ij}S - r_{ij}S_0$ .  $S$  e  $S_0$  sono i versori delle direzioni. Il vettore scattering viene definito come

$$\vec{h} = \frac{\vec{S}}{\lambda} - \frac{\vec{S}_0}{\lambda} = \frac{\vec{S} - \vec{S}_0}{\lambda}$$

Il modulo di  $h$  è:

$$\vec{h} \cdot \vec{h} = \frac{\vec{S}^2 + \vec{S}_0^2 - 2 \vec{S} \vec{S}_0}{\lambda^2}$$

poiché  $S$  e  $S_0$  sono versori si ottiene

$$|\vec{h} \cdot \vec{h}| = \frac{1+1-2 \cos\theta}{\lambda^2} = \frac{2(1-\cos\theta)}{\lambda^2}$$

L'angolo  $\theta$  conviene scriverlo come  $2\alpha$ , in questo modo abbiamo che

$$\cos 2\alpha = \cos^2 \alpha - \sin^2 \alpha = 1 - 2 \sin^2 \alpha$$

dato che  $\alpha = \theta/2$  di ha che  $\cos\theta = 1 - \sin^2 \theta/2$ , quindi

$$|\vec{h} \cdot \vec{h}| = \frac{2(1 - \cos\theta)}{\lambda^2} = \frac{2\left(1 - 1 + 2\sin^2 \frac{\theta}{2}\right)}{\lambda^2}$$

$$|\vec{h} \cdot \vec{h}| = \frac{4\left(\sin^2 \frac{\theta}{2}\right)}{\lambda^2} \quad h = \frac{2\sin \frac{\theta}{2}}{\lambda}$$

moltiplicando per  $2\pi$  per avere il valore angolare della fare si ottiene h

$$h = \frac{4\pi \sin \frac{\theta}{2}}{\lambda}$$

Inserendo adesso la differenza di cammino ottico,  $r_{ij} \cdot (S - S_0)$  otteniamo il termine:  
 $2\pi (\phi_i - \phi_j) = r_{ij} h$  da inserire nella funzione cos dell'espressione di  $P(\theta)$ .

Integrando

$$P(\theta) = \frac{1}{N^2} \sum \sum \cosh r_{ij}$$

si arriva a scrivere

$$\langle \cosh r_{ij} \rangle = \frac{\sinh r_{ij}}{hr_{ij}}$$

estendendo l'espressione a tutte le possibili conformazioni spaziali si riscrive come

$$P(\theta) = \frac{1}{N^2} \sum \sum \left\langle \frac{\sinh r_{ij}}{hr_{ij}} \right\rangle$$

chiamata **funzione di Debye**. Questa funzione contiene tutte le informazioni sulla distribuzione media spaziale dei centri diffondenti. Ora bisogna cercarne un utilizzo pratico. Partendo dall'equazione

$$R_g^2 = \frac{1}{2N^2} \sum \sum \langle r_{ij}^2 \rangle$$

se  $x = h r_{ij}$  tende ad essere molto piccolo, allora

$$\frac{\sinh r_g}{hr_g} = \frac{\sin x}{x} = 1 - \frac{x^2}{3!} + \frac{x^4}{5!} - \dots$$

Da ciò deriva almeno una delle seguenti conclusioni:

- il valore di  $R_g^2$  è piccolo
- il valore di  $h$  è piccolo, ciò significa che o l'angolo di diffusione o la lunghezza d'onda sono piccoli.

Quindi al limite di  $x$  molto piccolo si avrà una delle due equazioni

$$P(\theta) = \frac{1}{N^2} \sum \sum \left\langle \frac{\sinh r_g}{hr_g} \right\rangle = 1 - \frac{h^2 R_g^2}{3!}$$

$$P(\theta)^{-1} = 1 + \frac{h^2 R_g^2}{3!}$$

Sono ottenute dalla prima conclusione,

$$P(\theta) = \frac{1}{N^2} \sum \sum \left( 1 - \frac{h^2 \langle r_g^2 \rangle}{3!} \right) = \frac{1}{N^2} \left( \sum \sum 1 - \frac{h^2}{3!} \sum \sum \langle r_g^2 \rangle \right)$$

$$P(\theta) = \frac{1}{N^2} \left( N^2 - \frac{h^2}{3!} \sum \sum \langle r_g^2 \rangle \right) = 1 - \frac{h^2}{3! N^2} \sum \sum \langle r_g^2 \rangle = 1 - \frac{2h^2}{3!} R_g^2$$

La conclusione che si trae è che la dipendenza angolare nella condizione limite è funzione esclusivamente di  $R_g$  e non dipende dalla forma della macromolecola. Quindi tramite misure di intensità della diffusione della luce al variare dell'angolo  $\theta$  in funzione della concentrazione di polimero si può estrapolare la concentrazione  $C=0$  ad ogni angolo, così si ottiene la funzione di Debye  $P(\theta)$  e  $R_g$ .

Utilizzando i logaritmi

$$P(\theta) = \frac{I(\theta)}{I(\theta)_{\theta=0}} = 1 - \frac{h^2}{3} R_g^2$$

$$\ln \frac{I(\theta)}{I(\theta)_{\theta=0}} = \ln \left( 1 - \frac{h^2}{3} R_g^2 \right)$$

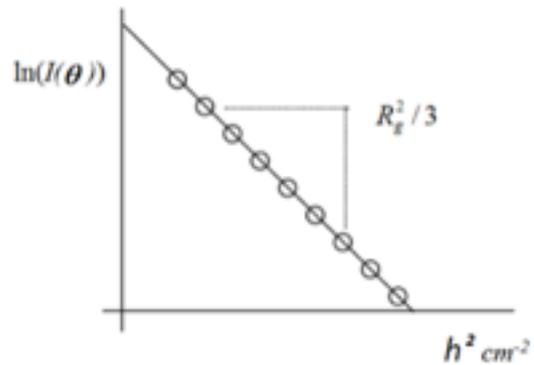
è possibile ricavare  $R_g$  dal grafico di Guinier.

$$\ln I(\theta) = \ln I(\theta)_{\theta=0} + \ln \left( 1 - \frac{h^2}{3} R_g^2 \right) = \ln I(\theta)_{\theta=0} - \frac{h^2}{3} R_g^2$$

Dato che  $\ln(1-x) \approx -x$  si ha che dalla pendenza si ricava  $R_g$ , mentre dall'intercetta è possibile determinare la massa molecolare.

Nella realtà ogni catena polimerica si comporta come un centro di diffusione, quindi va valutata la funzione di diffusione ad angolo basso ed estrapolata ad angolo 0, oltre all'estrapolazione a concentrazione 0.

Per un sistema statistico disordinato di centri diffondenti molti più piccoli della lunghezza d'onda della radiazione incidente, l'intensità della radiazione diffusa ad ogni angolo è:



$$\frac{I_\theta}{I_{\theta=0}} = \frac{2\pi^2 n_0^2 \left(\frac{\partial n}{\partial c}\right)^2 (1 + \cos^2 \theta) c}{\lambda^4 r^2 N \left[ \frac{1}{M} + 2A_2 c + \dots \right]}$$

dove:

$r$  è la distanza del rivelatore dal centro diffondente;

$N$  è il numero di particelle del centro diffondente;

$\partial n / \partial c$  è l'incremento dell'indice di rifrazione con la concentrazione.

L'espressione precedente viene riportata come

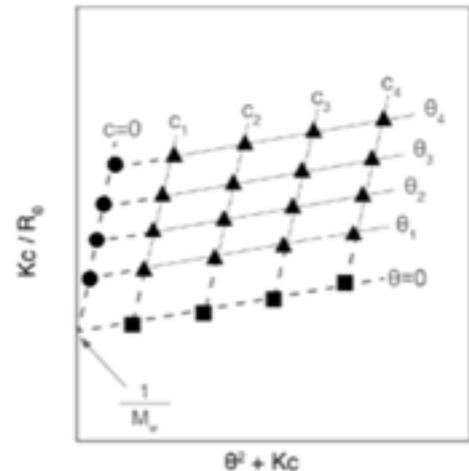
$$\frac{K_c}{R_\theta} = \frac{1}{P(\theta)} \left[ \frac{1}{M} + 2A_2 c + \dots \right]$$

in cui

$$K_c = \frac{2\pi^2 n_0^2 \left(\frac{\partial n}{\partial c}\right)^2}{\lambda^4 N} \quad R_\theta = \frac{r^2}{(1 + \cos^2 \theta) c}$$

L'intensità di diffusione dipende da due variabili sperimentali, l'angolo di osservazione e la concentrazione di polimero. L'intensità di diffusione ad angolo zero fornisce valore del secondo coefficiente viriale (pendenza), mentre se estrapolata a concentrazione zero fornisce il valore della massa molecolare.

Il grafico di Zimm riporta la doppia estrapolazione. I punti sperimentali sono indicati con dei triangoli, i punti estrapolati a  $C=0$  da cerchi e i punti estrapolati ad angolo uguale a 0 da quadrati.



## Microscopia non-ottica

I microscopi ottici sfruttano lo spettro elettromagnetico, nell'intervallo della luce visibile, per ingrandire oggetti di minori dimensioni. Il problema di questi microscopi è che non possono avere una risoluzione maggiore della lunghezza d'onda dell'onda elettromagnetica, in questo caso circa un micrometro ( $10^{-6}\text{m}$ ).

Le distanze di legame tra atomi si aggirano sull'ordine di grandezza degli Angstrom ( $10^{-10}\text{m}$ ), quindi i microscopi ottici si rivelano inutili per osservare fenomeni a livello molecolare.

Per superare questo limite si possono utilizzare microscopi di diversa specie; come i microscopi elettronici, che sfruttano fasci di elettroni, o microscopi con sonda a scansione (SPM), che sfruttano l'interazione tra sonda-superficie.

Con microscopi elettronici non è possibile ottenere un'immagine 3D; l'unico modo per ottenere immagini tridimensionali in ordini di grandezza del nanometro è con SPM.

Con questi strumenti si possono ottenere informazioni con accuratezze praticamente irraggiungibili da altri strumenti di campioni sia immersi in aria che in liquidi. Vengono applicati in innumerevoli settori, come metalli, semiconduttori polimeri, ceramiche, membrane sintetiche o biologiche, fenomeni di abrasione, corrosione, adesione, catalisi, lubrificazione, contaminazione, ecc.

## Microscopia elettronica

La spettroscopia elettronica utilizza due diversi strumenti: Microscopio Elettronico a Scansione (SEM) e Microscopio Elettronico a Trasmissione (TEM).

Entrambe sono dotate di una sorgente che genera un fascio di elettroni ad alta energia, la quale attraversa un campo elettrico/magnetico, generato da "lenti" magnetiche, che indirizzano e focalizzano tale fascio.

Gli elettroni in questo modo riescono a raggiungere lunghezze d'onda nell'ordine dei nanometri ( $10^{-9}\text{m}$ ) e quindi risoluzioni molto superiori rispetto ai microscopi ottici.

Inoltre la misurazione deve avvenire in un ambiente sotto vuoto spinto al fine di evitare che particelle presenti nell'aria interferiscano il fascio.

Questa spettroscopia ha una forte interazione con il campione che inevitabilmente viene alterato dal fascio di elettroni. Le immagini contengono informazioni ottenute da uno strato di atomi, la dimensione di questo strato dipende dalla natura del campione e dall'energia del fascio.

Si ottengono quindi informazioni strutturali e di composizione a livello microscopico dello strato superficiale, ma non si ha un'immagine tridimensionale reale della superficie.

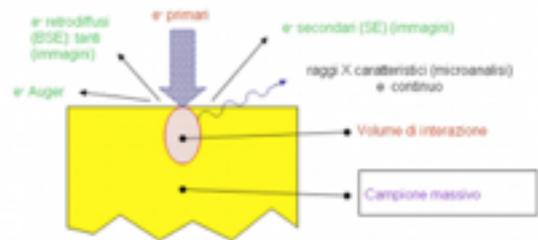
**SEM**

Il microscopio elettronico a scansione sfrutta l'emissione da parte del campione di elettroni, fotoni e raggi X caratteristici per ricostruire l'immagine. Infatti quando il fascio di elettroni colpisce la superficie del campione si liberano elettroni secondari da parte degli atomi sulla superficie del materiale, i quali vengono rilevati da opportuni rilevatori.

Il fascio di elettroni viene fatto scorrere lungo il campione, in questo modo si rilevano più immagini della superficie, che vengono poi riassemblate in un'immagine completa.

Il SEM è utile per studiare la topografia e la composizione della superficie del campione d'interesse, il quale può essere trattato con vapori di platino, o metalli pesanti in genere, per essere reso riflettente agli elettroni. Riesce a raggiungere una risoluzione di circa  $10^{-5}$  nm, fino ad un massimo di 1nm, e riesce ad avere un'immagine nitida fino ad 1mm di profondità.

Microscopio Elettronico a Scansione SEM



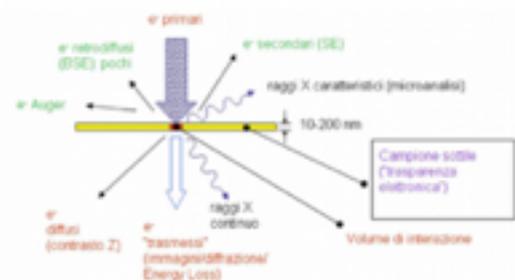
**TEM**

In un microscopio elettronico a trasmissione il fascio di elettroni deve attraversare il campione. Per questo motivo il campione deve avere uno spessore ridotto di massimo poche centinaia di nanometri.

Una volta attraversato il campione, il fascio di elettroni viene ingrandito da lenti magnetiche, finché colpisce uno schermo fluorescente (sensibile agli stessi) proiettando su di esso un'immagine reale e fortemente ingrandita del campione precedentemente attraversato.

Si raggiunge una risoluzione fino a 0,2nm.

Microscopio Elettronico a Trasmissione TEM



**STEM**

Il microscopio elettronico a scansione e a trasmissione (Scanning Transmission Electron Microscope) combina le caratteristiche di un SEM con quelle di un TEM e ha potere risolutivo estremamente elevato, tale da arrivare a distinguere gli atomi del campione.

**Microscopia a scansione di sonda**

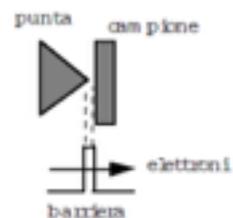
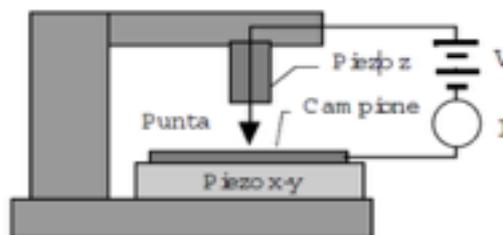
Le microscopie a scansione di sonda analizzano la superficie del campione studiando le interazioni campione-sonda che si creano. A questo scopo nelle SPM si utilizzano materiali piezoelettrici, che permettono di avere una altissima precisione.

Ci sono vari tipi di SPM, ognuno sfrutta diverse forze, come ad esempio forze interatomiche, magnetiche, elettrostatiche, di frizione, di adesione, ecc.

**STM: scanning tunneling microscope**

Questa spettroscopia applica l'effetto "tunnel", effetto di carattere quantistico, che consiste nell'attraversamento di una barriera di potenziale da parte di una particella.

Analizziamo questo caso: siamo in presenza di particelle cariche, per esempio elettroni, con un'energia totale pari a  $E_0$ , rinchiusi in una scatola che può



essere considerata come un guscio con energia potenziale  $E_1$ . La relazione tra le energie è  $E_1 > E_0$ . Per la trattazione classica del problema, dato che l'energia delle particelle è minore di quella del guscio è impossibile che le particelle escano dalla scatola.

Per la trattazione quantistica invece questo è possibile. La probabilità finita che ciò avvenga è definita effetto tunnel.

A livello pratico questo caso lo troviamo in un sistema in cui si è in presenza di una sottile punta metallica, ricca di elettroni, affacciata ad un altro conduttore. Nel mezzo c'è un isolante come l'aria. L'energia potenziale degli elettroni dell'isolante è maggiore rispetto quella del conduttore. Per la fisica classica oltre ad applicare una differenza di potenziale tra i due conduttori, perché si abbia il passaggio di elettroni si dovrebbe applicare una grande energia cinetica in modo da superare la barriera data dall'aria, ma la meccanica quantistica sostiene che se lo spessore dell'isolante è sufficientemente piccolo si può creare una corrente più o meno debole tra il campione e la punta piezoelettrica.

La corrente sarà proporzionale al voltaggio  $V$  ed alla distanza  $z$ .

$$I \propto (V/z) e^{-z/k}$$

Ed essendo  $z$  esponente, possiamo quindi avere risultati con una precisione notevole.

Per un STM è considerata buona una risoluzione laterale di 0,1nm e una risoluzione in profondità di 0,01nm.

**SFM o AFM** : sensore meccanico ottico di forze interatomiche

SFM (Scanning Force Microscope), o AFM (Atomic Force Microscopy), è costituito da una microleva molto flessibile, detta cantilever, alla cui estremità libera è attaccata la punta. Un laser prodotto da un diodo viene riflesso sulla superficie del cantilever e viene misurato da un fotodetector.

Quando la punta piezoelettrica si muove, per via delle interazioni atomiche con il campione, anche il laser varia il suo percorso quando riflesso, ed il segnale viene registrato dal fotodetector.

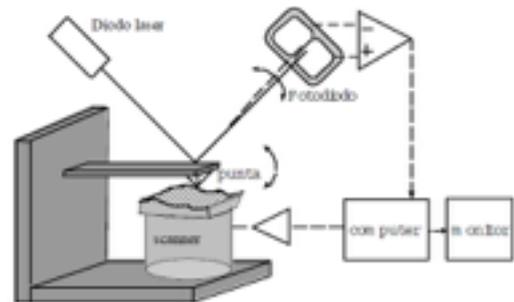
La differenza di luminosità dei due fotodiodi produce un segnale elettrico correlato alla distanza punta campione da cui dipendono le forze interatomiche.

Per l'acquisizione del segnale si possono utilizzare vari metodi, che possono essere più o meno sensibili. Li dividiamo in due categorie: di contatto e di non contatto.

**Immagine SFM ad altezza costante (contatto)**: dopo aver individuato il raggio riflesso a metà tra i due settori del fotodiodo, in modo da eliminare il segnale differenza, la punta viene avvicinata alla superficie del campione, fino al momento in cui si nota una piccola oscillazione del segnale del fotorilevatore (posizione di quasi contatto). La scansione viene effettuata nel piano x-y, così da ottenere una matrice bidimensionale. La microleva viene fatta scorrere sul materiale, se incontra delle perturbazioni, esse provocheranno una forza repulsiva, la leva si allontanerà ed il laser andrà a colpire il settore più in alto del fotodiodo.

**Immagine a forza costante (contatto)**: è il metodo normalmente utilizzato durante le SPM. Viene applicata una forza retroattiva per comandare le deformazioni  $\Delta z$  dello scanner che permette di avere una deflessione costante della leva e ricorreggere in tempo reale la coordinata  $z$ . Vengono registrati i vari valori di tensione e si ottiene una topografia tridimensionale più fedele perché non c'è più la limitazione della deflessione massima della leva che porta quindi ad una maggiore dinamica. Lato negativo di questo metodo è che richiede un tempo maggiore di scansione e si riduce la sensibilità.

**Immagini a forza attrattiva (contatto o non contatto)**, in questa tecnica si aumenta il valore di  $z$  fino a qualche nm dalla superficie del campione, in questo modo prevalgono le interazioni attrattive



alla Van der Waals. Queste forze di carattere attrattivo hanno un modulo molto minore e variano molto più debolmente con la distanza.

Il gradiente  $\partial F/\partial z$  ad una certa distanza, come si nota nel grafico, cambia segno. A brevi distanze è grande, mentre a distanze maggiori è molto più piccolo.

Nella zona in cui  $F > 0$  e  $\partial f/\partial z > 0$  si ha una situazione di **non-contatto**, in questa modalità la leva deve avere una costante elastica maggiore rispetto alla modalità a contatto perché dato che il gradiente è positivo si potrebbe instaurare una retroazione positiva e la punta verrebbe risucchiata dalla superficie.

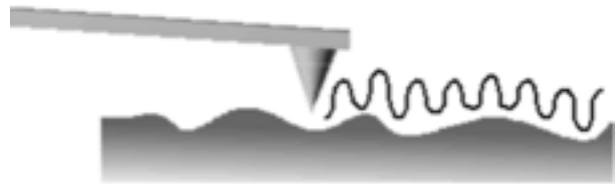
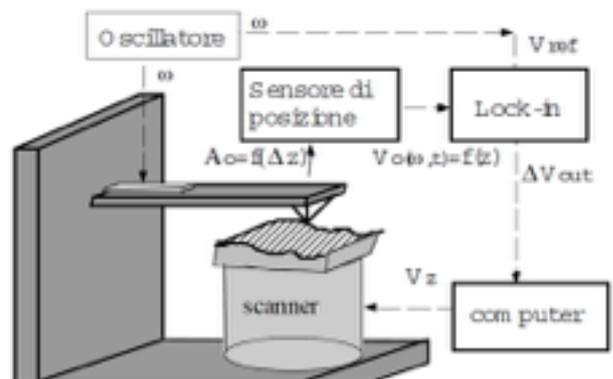
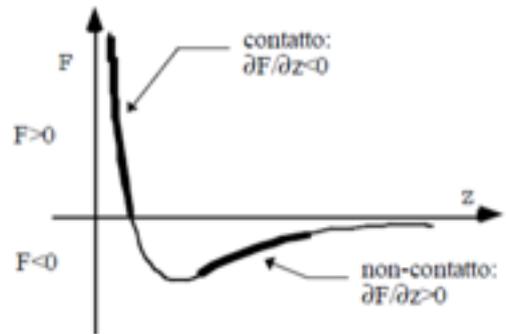
Operando con una pendenza di  $F(z)$  minore si entra nella modalità a contatto, in cui però dato che la deflessione del raggio laser è molto inferiore si ha una sensibilità inferiore rispetto alla modalità di non-contatto.

**Tecniche di lavoro in modalità di non-contatto**

Comunemente si pone la leva in una condizione di oscillazione forzata attorno alla frequenza di risonanza propria chiamata  $\omega_0$ . Al variare della forza di interazione punta-superficie si misura la variazione dell'ampiezza di oscillazione,  $A$ , oppure della frequenza di risonanza.

Si può operare su campioni biologici e su tutti i campioni denominati soffici perché la forza d'interazione in modalità di non-contatto è molto piccola e permette di ottenere un'immagine senza danneggiare il campione.

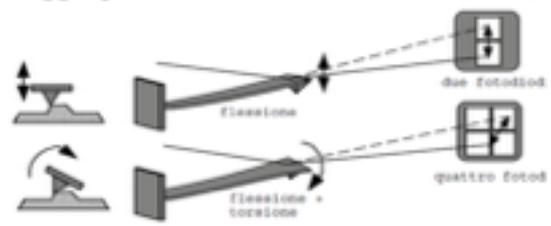
A causa della maggior distanza si devono utilizzare delle punte più sottili per ottenere una risoluzione laterale paragonabile. Se il gradiente di forza è minore o il raggio di curvatura della punta è maggiore, il volume di campione interessato sarà maggiore e anche la forza efficace tra atomi della punta e del campione.



**Tapping mode o laterale-force-mode (mista):** questo metodo mescola i due metodi di contatto e di non contatto. La leva vibra con un'ampiezza ( $A$ ) di un centinaio di nanometri fino a "toccare" il materiale, per poi risalire e continuare il suo moto armonico.

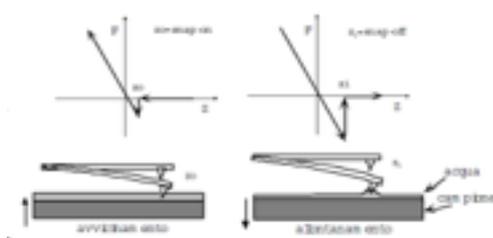
Come dice il nome, questo metodo permette di studiare anche la forza laterale e per tale scopo si sfrutta la torsione della leva.

Questo comporta ovviamente anche uno spostamento bidimensionale del laser sul fotorilevatore (verrà riflesso non solo più solamente in alto o in basso, ma anche ai lati) che quindi dovrà avere quattro quadranti (e non più due) per rilevare anche le torsioni laterali della leva.



**Effetto capillarità**

In condizioni ambientali la superficie di materiali si ricopre di un film d'acqua che crea una forza capillare dell'ordine dei  $10^{-8}$ N. Questo comporta una isteresi, fenomeno fisico per cui una grandezza non dipende solo dai valori di quell'istante, ma anche da quelli

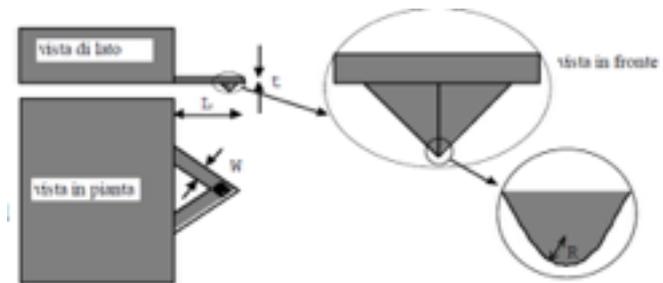


degli istanti precedenti. Quando la punta della leva si avvicina alla sottile superficie d'acqua, viene attratta sempre di più, finché la forza attrattiva è superiore alla costante elastica  $k$  della leva (altezza  $z_0$ ). A questo punto la leva è "intrappolata" nel film d'acqua. Nel momento in cui la leva si ritrae, gli effetti di capillarità impediscono alla leva di staccarsi finché la flessione della leva è sufficientemente forte per vincere le forze attrattive (altezza  $z_1$ ,  $z_1 > z_0$ ). La distanza  $z_1 - z_0$  è detta *distanza di snap-off*.

## Le microleve e le punte

### Leva

La leva può avere varie forme e materiali a seconda del metodo utilizzato, ma generalmente sono a base di silicio. Si possono trovare leve in silicio puro, ma anche in borosilicati oppure in nitrato di silicio ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ ). Per avere buona sensibilità laterale col tapping mode, è meglio utilizzare una barra di forma rettangolare che permetta la torsione laterale della leva; mentre per gli altri metodi è più utile usare una leva a due bracci, a forma di V, più resistente agli sforzi.



### Punte

Come per le leve, esistono vari tipi di punte a seconda del tipo di interazione a cui siamo interessati. Possiamo trovare punte in oro (per molecole biologiche), in diamante (per aumentare la resistenza all'usura) oppure anche in materiali magnetici (per studiare le proprietà magnetiche della superficie). Inoltre in commercio troviamo anche punte a varie forme (piramidali, coniche o con ricrescite) e con diversi raggi di curvatura  $R$  (vedi immagine), cosa importante per la risoluzione dell'immagine.

## Risoluzione immagine dell'AFM

In generale in un microscopio a forza atomica si riesce ad avere una risoluzione di 1 nm, o addirittura di 0.1 nm in caso di materiali con struttura regolare (mentre in STM 0.1 nm grazie al fatto che la corrente è esponenzialmente dipendente dall'altezza  $z$ ).

Tuttavia la risoluzione è altamente influenzabile dal tipo di punta usata e dall'effetto di convoluzione di essa.

## Effetto convoluzione della punta

In prossimità di ostacoli o fessure sulla superficie il segnale risulta disturbato. Osservando il piano  $x-z$  della punta notiamo:

- in caso di strutture basse ( $a \ll b$ ) notiamo due semiarchi (con raggio  $R$ ) ed un segmento che li congiunge.
- in prossimità di scalini ( $b \ll a$ ) la linea riproduce la forma della punta.
- con fessure invece avremo un effetto della convoluzione complementare a quelle precedenti, e si osserveranno sistematicamente dimensioni inferiori a quelle reali

