



Università degli studi di Parma
Facoltà di Scienza Matematiche Fisiche Naturali
Corso di Laurea in Fisica

Anno Accademico 2009-2010

Studio dell'autoassemblaggio molecolare in network
complessi Polimero-Nanoparticella tramite spettroscopie
Raman, Fluorescenza e Dynamic Light Scattering

Relatore

Luigi Cristofolini

Correlatore

Paolo Camorani

Elaborato finale di:

Alessandro Kovtun

Indice

1 Introduzione.....	5
2 Materiali.....	6
2.1 Nanoparticelle d'oro (GNP).....	6
2.2 PEG Funzionalizzato.....	8
2.3 Processo di assemblaggio.....	9
3 Tecniche.....	10
3.1 Effetto Raman	10
3.2 Fluorescenza.....	19
3.3 Diffusione dinamica della luce.....	20
4 Risultati Sperimentali.....	27
4.1 Spettri di Fluorescenza.....	27
4.2 Spettri Raman	30
4.3 Risultati DLS.....	35
Conclusioni.....	44
Ringraziamenti.....	45
Bibliografia.....	46

- D'accordo – disse Pensiero Profondo.

-La risposta alla Grande domanda sulla Vita, l'Universo e Tutto quanto...

è ... quarantadue.

[Guida Galattica per autostoppisti, Douglas Adams]

1 Introduzione

L'attività di tirocinio è consistita nello studio della dinamica di autoassemblaggio e disassemblaggio di una rete i cui nodi sono nanoparticelle d'oro collegate da catene polimeriche, tramite le tecniche di spettroscopia Raman, fluorescenza e Dynamic Light Scattering (DLS). In letteratura sono presenti diverse descrizioni di sistemi autoassemblanti composti da polimero e nanoparticella; in particolare è noto che quando le dimensioni delle componenti sono simili è possibile ottenere mesostrutture ordinate. La caratteristica saliente del network da noi studiato è la sua reversibilità: le catene polimeriche (polietilen glicole, PEG) sono funzionalizzate nei due estremi con un gruppo piridinio, mentre le nanoparticelle d'oro (diametro tipico 6nm) sono funzionalizzate con dei cavitandi tiolati, secondo una procedura messa a punto dal gruppo di ricerca guidato dal prof Dalcanale, del Dipartimento di Chimica Industriale della nostra Università. In soluzione il gruppo piridinio penetra nel cavitando formando un complesso relativamente stabile (costante di associazione 10^5), che tuttavia può essere disassemblato per via elettrochimica o per sostituzione ad es con Butil-metil-Ammonio (BMA). In seguito al disassemblaggio, in condizioni favorevoli, ci si attende una separazione di fase su scala mesoscopica tra il polimero e le nanoparticelle, ottenendo così una rete conduttiva immersa in una matrice isolante, che può essere utilizzata in vari contesti, ad esempio nell'elaborazione "intelligente" di segnali elettrici, dato che il disassemblaggio può essere controllato spazialmente.

Ho impiegato tecniche spettroscopiche ben consolidate: la spettroscopia Raman e di fluorescenza ed la diffusione dinamica della luce.

L'elaborato è così strutturato: dapprima si descrivono le proprietà salienti dei materiali, poi si descrivono le fondamenta delle tecniche impiegate e infine i risultati ottenuti.

2 Materiali

2.1 Nanoparticelle d'oro (GNP)

Le nanoparticelle d'oro oggetto di studio sono sfere di diametro medio di 6 nm sospese in soluzione. I diametri delle diverse nanoparticelle si distribuiscono intorno a tale valore in frequenza tale da includere il 90% delle nanoparticelle entro 6 ± 2 nm. Una proprietà che è associabile a GNP di dimensione definita è la presenza di una banda plasmonica (identificabile nello spettro di assorbimento) con un picco di assorbimento, che in questo caso si trova nella regione dei 520 nm, quindi le GNP in soluzione assorbono nel blu e nel verde, rendendo la soluzione di colore rosso-viola [*Optical Properties of Gold Nanospheres.*].

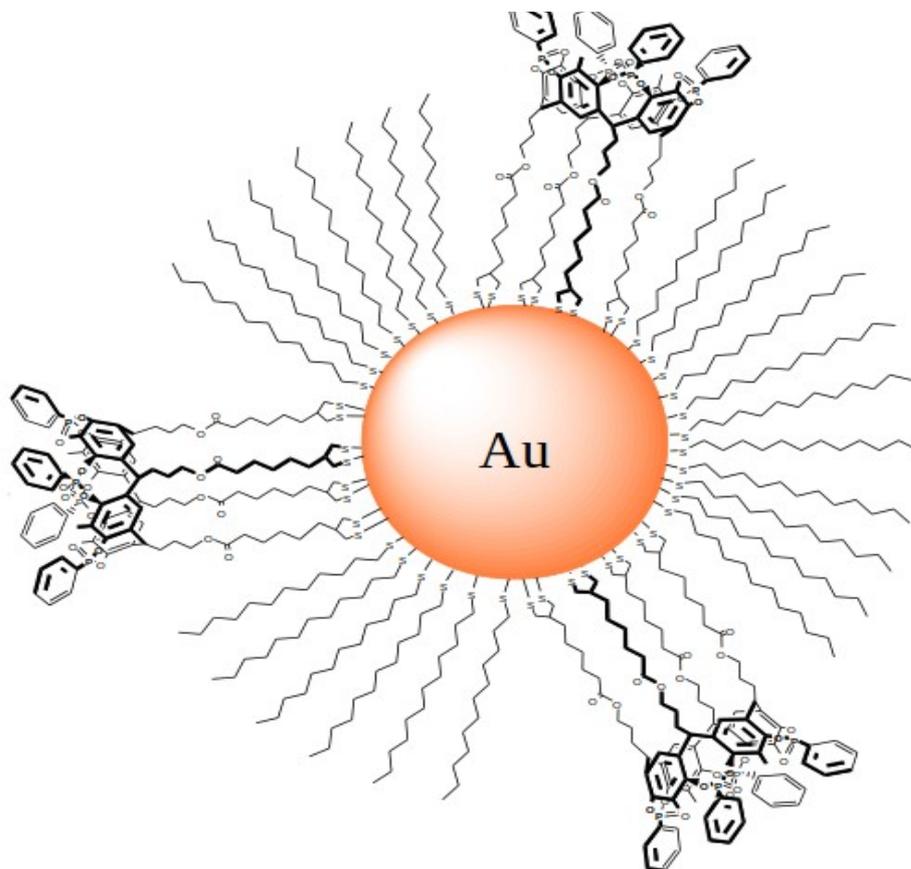
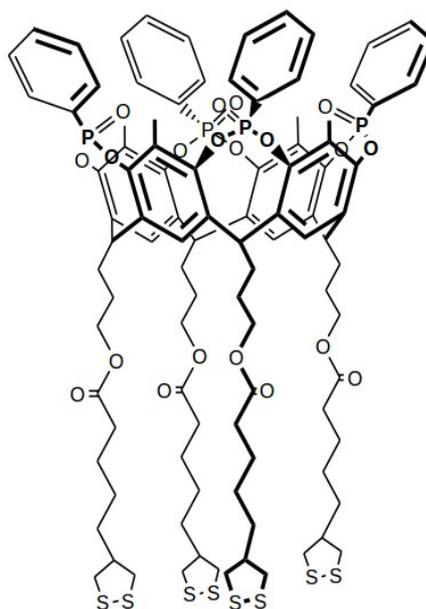
Le nanoparticelle sono ricoperte da molecole di decantiolo, che le stabilizzano e rendono possibile la solubilità delle nanoparticelle in solventi organici apolari (diclorometano, toluene, cloroformio etc...). Lo zolfo del decantiolo si lega alla superficie della nanoparticella d'oro, mentre le code alchiliche si interpongono tra la superficie dell'oro e il liquido esterno. Quindi la dimensione effettiva aumenta di circa 1 nm, abbiamo quindi oggetti di 7 ± 2 nm.

Il solvente utilizzato è il diclorometano (CH_2Cl_2), ma è possibile utilizzare anche altri solventi organici, che ovviamente devono avere un basso assorbimento nel visibile se si vuole usare l'ottica in questa regione.

Tali nanoparticelle sono ulteriormente funzionalizzate, dal gruppo di ricerca del prof. Dalcanale, tramite l'aggiunta sulla superficie di molecole con una precisa funzione, quella di avere una cavità grande abbastanza per ospitare altre molecole e per questo è detto Host o cavitando. Un capo della molecola è composto dal cavitando mentre l'altro è molto simile al decantiolo, infatti del cesto della base del "cesto" che rappresenta il cavitando si sviluppano diverse catene di carbonio che terminano con un gruppo funzionale tiolo. Lo zolfo forma un legame con l'oro delle superficie come nel decantiolo.

La capacità di ospitare molecole all'interno della cavità terminale è regolata in base all'interazione con la molecola ospitata, ad esempio un polimero opportunamente funzionalizzato con un gruppo funzionale opportuno (il piridinio nel nostro caso) o altre molecole le cui dimensioni consentono di soggiornare nel host. La struttura della molecola del cavitando è qui rappresentata in prospettiva:

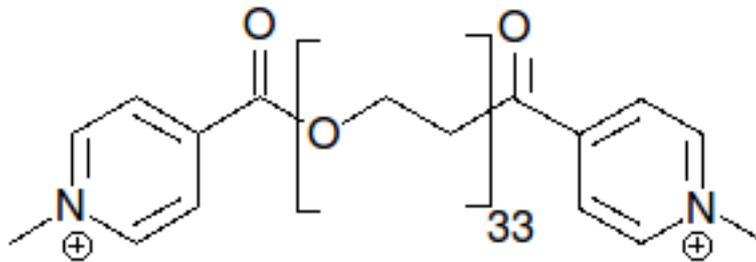
Struttura molecolare del cavitando



GNP ricoperte in superficie da decantiolo e funzionalizzate con il cavitando (non in scala)

2.2 PEG Funzionalizzato

Come link tra le nanoparticelle è stato scelto il Glicole Polietilenico, in forma oligomerica, in quanto è un tipico polimero dalle caratteristiche ben note. Solitamente il polimero ha catene di diversa lunghezza e dalla distribuzione delle lunghezze dipendono le sue proprietà fisiche, come modulo di elasticità, temperatura di fusione, etc..., ma visto che siamo interessati ad usarlo come elemento di collegamento il polimero utilizzato deve avere un numero di monomeri ben definito, per avere link di lunghezza costante. È stato scelto un PEG con 33 monomeri. Il PEG viene funzionalizzato alle estremità con un gruppo piridinio, che ha grande affinità a posizionarsi nel cavitando (host) presente sulla superficie delle nanoparticelle. La lunghezza complessiva della catena, con i 2 gruppi pirini attaccati è quindi 13 nm.



Struttura molecolare del PEG funzionalizzato

La lunghezza della catena non ci fornisce per l'ingombro che ha il polimero in soluzione, infatti è improbabile che la catena del polimero sia lineare, visto che le diverse configurazioni sono energeticamente molto simili. Un polimero ha quindi la tendenza di piegarsi in diversi punti, quindi ci serve una grandezza che fornisca le dimensioni medie effettive del polimero: Il raggio di girazione.

Nel caso di una catena di lunghezza L (13nm) il raggio di girazione si riduce a $R_G = \frac{L}{\sqrt{12}}$, otteniamo un valore di $R_G = 3.8$ nm, valore molto simile al raggio delle GNP funzionalizzate (circa 3.5 nm). Questo è voluto perché in tali condizioni è noto in letteratura [Science 314, 1107 (2006)] che il disassemblaggio della rete può portare a mesostrutture ordinate.

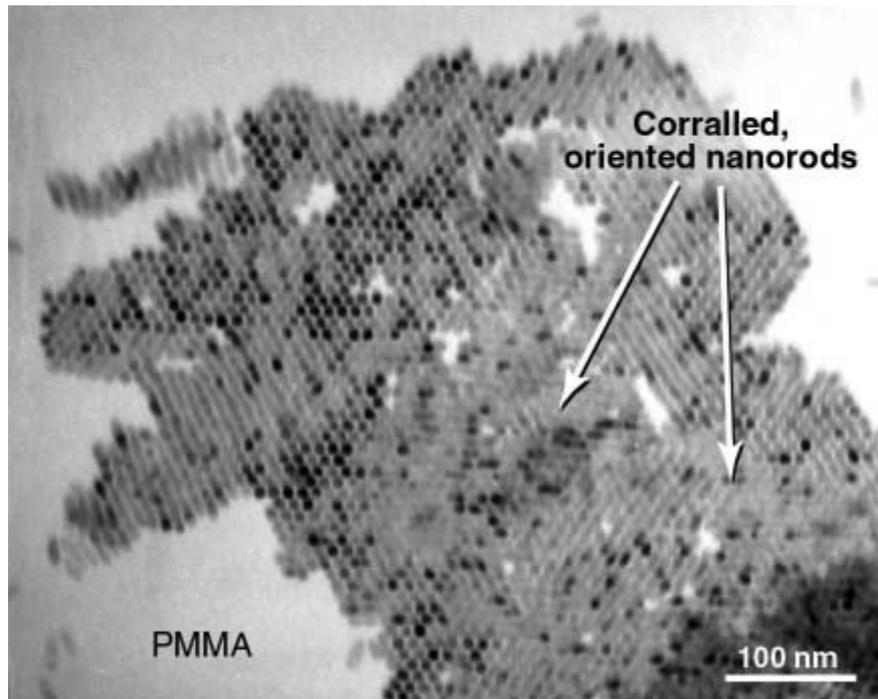


Immagine TEM di nanobacchette ordinate in struttura esagonale con passo di 8 nm.
Tratta da [Science 314, 1107 (2006)]

2.3 Processo di assemblaggio

Per avviare la reazione è sufficiente aggiungere una piccola quantità di PEG funzionalizzato e il processo inizierà spontaneamente.

Il cavitando ha la tendenza ad ospitare molecole di opportune dimensioni al suo interno, ma possono esserci diversi candidati a soggiornare nel cavitando, quando le GNP sono in soluzione la cavità è riempita dal solvente, mentre se aggiungiamo il PEG il gruppo piridinio avrà una probabilità molto elevata di sostituirsi al solvente. Tale complesso risulta relativamente stabile all'equilibrio (costante di associazione 10^5). Quindi possiamo avere diverse affinità tra il cavitando e i diversi ospiti, ad esempio il Butil-Metil-Ammonio ha un'affinità maggiore del PEG, per cui tramite l'aggiunta di questo è possibile innescare la reazione inversa di smontaggio della rete.

3 Tecniche

3.1 Effetto Raman

Lo scattering Raman è un fenomeno legato alla diffusione non lineare della luce visibile nella materia. L'effetto è dovuto alle fluttuazioni della polarizzabilità a livello molecolare; la radiazione elettromagnetica incidente sulla materia provoca un'oscillazione di cariche che è valutabile come un dipolo che irradia luce della stessa frequenza incidente. La grandezza microscopica che regola l'irradiazione è la polarizzabilità elettrica della molecola o dell'atomo, in particolare la sua derivata seconda rispetto al tempo. La polarizzabilità ha un andamento crescente con il volume della molecola e presenta fluttuazioni non stocastiche dovute a gradi di libertà cinetici della molecola, come le rotazioni e le vibrazioni.

Queste fluttuazioni della polarizzabilità (che è un tensore che rispecchia la simmetria della molecola) modulano la radiazione emessa anelasticamente dalla molecola, portando all'emissione di luce di frequenza diversa rispetto a quella elastica (ν_0), precisamente di frequenza $\nu_0 \pm \nu_{\text{oscilazioni}}$.

La spettroscopia Raman permette di sondare tali dinamiche vibrazionali e rotazionali parallelamente alla spettroscopia di assorbimento infrarosso, alla spettroscopia neutronica e dei raggi X.

Ci occuperemo in particolare delle vibrazioni elastiche delle molecole ed è importante notare che i modi vibrazionali attivi in Raman non sono gli stessi attivi nell'infrarosso, infatti nell'assorbimento infrarosso sono attivi tutti i modi normali che sono associabili ad un'oscillazione di dipolo, mentre nel Raman è necessario che la derivata della polarizzabilità rispetto alla direzione di oscillazione all'equilibrio sia diversa da zero, quindi un'oscillazione intorno all'equilibrio porta a fluttuazioni armoniche della polarizzabilità. In base a questo principio è possibile selezionare i modi attivi in Raman in base alla simmetria della vibrazione.

Spiegazione quantistica dell'effetto Raman

Per comprendere la natura dello scattering Raman è necessaria la meccanica quantistica, visto che si tratta di un fenomeno di interazione materia-radiazione. Per la descrizione quantomeccanica del fenomeno si ricorre alla teoria delle perturbazioni dipendenti dal tempo, che al primo ordine fornisce ad esempio l'assorbimento o l'emissione di un fotone da parte di una molecola o atomo, mentre al secondo ordine si spiegano i processi a due quanti, come l'effetto Raman.

La vibrazione della molecola è risolvibile come un oscillatore armonico a livelli discreti di energia

$$E(n) = \hbar\omega\left(\frac{1}{2} + n\right) \quad \text{e frequenza } \omega.$$

Il fenomeno Raman può essere visto come un assorbimento del fotone ($\hbar\omega_0$) da parte della molecola e la conseguente transizione da un livello fondamentale ad uno stato virtuale eccitato, quest'ultimo ha una vita media tendente a zero e ritorna quasi immediatamente ad un livello di energia poco eccitato riemettendo un fotone. Il fotone emesso avrà caratteristiche differenti a seconda dell'accoppiamento elettrone-vibrazione del sistema. Possiamo distinguere diversi fenomeni a seconda degli stati iniziali e finali:

1. Nel caso in cui lo stato iniziale e finale coincidono abbiamo l'energia del fotone assorbito uguale a quella del fotone emesso, quindi la diffusione elastica della luce (Rayleigh)
2. Nel caso di transizione da uno stato fondamentale ad uno eccitato oppure da stato eccitato a uno ancora più eccitato, ad esempio da $n=0$ a $n=1$ abbiamo la creazione di un quanto di vibrazione e l'emissione di un fotone di energia minore rispetto a quello assorbito, $\hbar\omega_R = \hbar\omega_0 - \hbar\omega$, in questo caso abbiamo un evento Stokes.
3. Se la transizione è tra uno stato eccitato e uno meno eccitato, ad esempio tra $n=1$ e $n=0$, abbiamo la distruzione di un quanto di vibrazione e l'emissione di un fotone di energia $\hbar\omega_R = \hbar\omega_0 + \hbar\omega$, evento antistokes.
4. Se la transizione avviene con una differenza di livelli energetici di 2 abbiamo un fenomeno a 3 quanti, chiamato effetto Raman di secondo ordine, che non verrà trattato.

Parametrizzazione dello spettro e righe stokes - antistokes

Per confrontare e modellizzare l'intensità dello spettro Raman si ricorre ad una parametrizzazione dei dati sperimentali. L'intensità Stokes (Creazione fonone) è data da:

$$I_R(\omega) \propto \omega_0^4 \frac{n(\omega, T) + 1}{\omega} F(\omega_0, \omega) \Gamma(\omega)$$

dove:

1. ω è la frequenza della vibrazione relativa al fonone creato
2. ω_0 è la frequenza di eccitazione della luce visibile;
3. $n(\omega, T) = \frac{1}{e^{\frac{\hbar\omega}{kT}} - 1}$ è il fattore statistico di Bose-Einstein, che fornisce il numero medio di stati vibrazionali alla frequenza ω ;
4. $F(\omega_0, \omega)$ è la funzione fenomenologica che approssima l'accoppiamento elettrone-vibrazione;
5. $\Gamma(\omega)$ è la densità degli stati vibrazionali, approssimabile ad una lorenziana se il materiale è cristallino;

La funzione di accoppiamento elettrone-vibrazione è molto laboriosa da calcolare direttamente a partire dal tensore di polarizzabilità del sistema, ma è comunque possibile averne una forma sperimentale una volta noto lo spettro Raman e la densità degli stati vibrazionali.

Risulta quindi conveniente normalizzare lo spettro sperimentale Stokes con

$$I(\omega) = \frac{I_R(\omega)}{\frac{n(\omega, T) + 1}{\omega}} \propto F(\omega_0, \omega) \Gamma(\omega)$$

in modo da ottenere una grandezza legata ai fenomeni fondamentali che regolano il processo Raman.

È possibile inoltre fare un confronto tra l'intensità Stokes e anti-Stokes, sostituendo $n(\omega, T)$ a $n(\omega, T) + 1$, visto che il processo anti-Stokes distrugge un fotone.

$$\frac{I_{Stokes}}{I_{anti-Stokes}} \approx \frac{n(\omega, T) + 1}{n(\omega, T)} = e^{\frac{\hbar\omega}{kT}}$$

Che per alte Temperature tende a 1, per $T \rightarrow 0$ l'intensità anti-Stokes tende a 0, mentre a temperatura ambiente, considerando $kT \approx 1/40 \text{ eV} \approx \hbar\omega \approx 200 \text{ cm}^{-1}$ l'intensità anti-Stokes è circa il 37% di quella Stokes, questo risultato è intuibile anche considerando che gli stati a bassa energia sono più popolati rispetto a quelli ad alta energia.

Effetto Raman nei cristalli

In cristallo, a differenza di una molecola, sono possibili oscillazioni elastiche a tutte le frequenze, in particolare le vibrazioni sono descritte dalle leggi di dispersione. Un cristallo presenta quindi uno spettro continuo nell'assorbimento dell'infrarosso, mentre lo spettro raman presenta caratteristiche tipiche delle molecole: picchi stretti e ben definiti. Tale fenomenologia è facilmente spiegabile prendendo in considerazione la quantità di moto scambiata nello scattering tra il fotone (luce visibile) e fonone:

$$\hbar \vec{k}_{Incidente} - \hbar \vec{k}_{diffuso} = \hbar \vec{q}_{fonone}$$

In particolare la quantità di moto del fonone risulterà molto più piccola della quantità di moto del fotone nel visibile, che a sua volta è trascurabile rispetto al vettore d'onda massimo del cristallo (π/a , dove a è la costante reticolare); questo porta a considerare una regione molto limitata della zona di

Brillouin in cui il momento $\vec{Q} \rightarrow \vec{0}$.

I fononi interessati a scattering con la radiazione elettromagnetica sono quelli associati a oscillazioni trasversali di carica, detti fononi trasversali ottici, che nell'intorno di $\vec{Q} = \vec{0}$ assumono un valore costante e indipendente da \vec{Q} .

In un solido amorfo non è presente una legge di dispersione che associa a un vettore d'onda una frequenza e quindi anche la diffusione risulta molto diversa rispetto a quella molecolare (gas o liquidi)

Lo scattering Raman in un cristallo risulta quindi molto utile per avere un valore di riferimento in energia, in particolare la riga dei 521 cm^{-1} del silicio cristallino, infatti è impiegato come strumento di calibrazione

Descrizione dell'apparato sperimentale

Il rapporto tra l'intensità del segnale Raman e lo scattering elastico è compreso tra 10^{-8} e 10^{-12} , quindi è estremamente debole e richiede un'elevata precisione e un'ottica di alto livello.

La risoluzione richiesta dal sistema ottico deve essere molto elevata: la luce visibile, ad esempio nel verde, ha un'energia nell'ordine dei 20 000 cm^{-1} , mentre lo spostamento delle righe Raman in energia va dai pochi cm^{-1} a qualche migliaio con una larghezza di riga tipica di qualche cm^{-1} .

I monocromatori utilizzati hanno una risoluzione nel visibile di circa 10^4 , questo risulterebbe già sufficiente per rilevare il segnale Raman, ma corriamo il rischio di avere troppa luce elastica, proveniente da altre sorgenti spurie: possiamo stimare che un singolo monocromatore faccia passare circa 10^{-4} volte il segnale incidente ad una fissata energia, quindi combinandone 2 avremo sulla CCD 10-8 volte la luce incidente; in tale modo la luce elastica spuria risulta ordini di grandezza inferiore rispetto al segnale Raman, rendendo possibile discriminare tra il fondo e lo scattering Raman.

La spettroscopia Raman richiede una sorgente di radiazione il più possibile monocromatica, nel nostro caso il Laser Argon Krypton. Inoltre il laser ha un'elevata collimazione, necessaria nei sistemi ottici di precisione.

Il raggio laser viene filtrato da un passa banda che ne assorbe le frequenze spurie, dovute ai plasmi all'interno del risonatore, in modo da avere una sorgente realmente monocromatica. La potenza della luce laser viene così tagliata di un ordine di grandezza, quindi la potenza realmente incidente sul campione, misurata post-filtro, è nell'ordine delle decine di mW e un centinaio nelle righe più intense.

Dopo il filtro il raggio laser viene indirizzato sul campione tramite un sistema di specchi e una lamina semi riflettente.

Apparato ottico di raccolta del segnale

L'efficienza del sistema ottico deve essere tale da disperdere il meno possibile del segnale, quindi è necessario un allineamento e una messa a fuoco molto efficiente.

Per rilevare il segnale Raman è necessario focalizzare il fascio laser in una zona molto ristretta del campione. Un microscopico ottico confocale permette tale operazione. La luce laser filtrata viene indirizzata sul campione tramite una lente convergente, quindi l'area macroscopica interessata al fenomeno di scattering è definita dal size-spot del fascio laser, stimabile nell'ordine dei 50 micrometri, con un fascio incidente di 1.5 mm di diametro e una fuoco di 1 cm. La messa a fuoco della lente è visibile dalla telecamera installata sul microscopio: fornisce un'immagine della zona studiata e dello spot laser; consente di valutare la qualità della messa a fuoco e anche il livello di allineamento dell'ottica dal laser al campione (l'immagine del punto laser sul campione può presentare una non perfetta collimazione, essere soggetto a traslazioni se si sfoca di poco il campione o essere particolarmente irregolare). La scelta del tipo di obiettivo dipende molto dallo stato di aggregazione del campione.

La geometria di diffusione utilizzata è quella del back-scattering: la lente che focalizza il segnale sul campione raccoglie la luce emessa a 180° , che ritorna sulla lamina semi riflettente e deviata verso lo spettrometro.

Nel caso del silicio cristallino, usato per calibrare lo strumento, si utilizza una lente 50x a corta focale (1mm) che permette di raccogliere il massimo del segnale emesso dalla superficie solida, mentre per studiare una soluzione liquida il fuoco deve essere nel mezzo, all'interno del contenitore trasparente, quindi la focale da 1mm risulta troppo corta per penetrare oltre il vetro del contenitore. Le lenti 10x o 50x a lunga focale (1cm) permettono di focalizzare il laser nella soluzione, ma la messa a fuoco non è supportata da un'immagine significativa della telecamera, per cui richiede più tempo e tentativi.

La regolazione del sistema ottico tra laser e campione è abbastanza agevole e permette di ottenere il massimo rendimento del segnale Raman. Risulta più complessa e laboriosa l'operazione di allineamento dell'ottica compresa tra il campione e lo spettrometro: il segnale raccolto dalla lente deve entrare nello strumento con il massimo allineamento. All'ingresso dello strumento è presente una fenditura che regola il diametro del fascio entrante: se il raggio è disallineato il segnale misurato sarà molto debole o assente e sarà necessario aprire la fenditura d'ingresso. Se la fenditura è troppo aperta si lascia passare luce presente nella stanza (pc, telecamera) che farà aumentare il rumore dello spettro o addirittura lo coprirà del tutto.

Spettrofotometro Raman

La luce raccolta dal microscopio ottico confocale è poi convogliata all'interno dello spettrofotometro, il T64000 costruito dalla Jobin Yvon, andando ad incidere sul monocromatore per essere analizzata.

Lo strumento utilizzato permette di impostare il livello di risoluzione in energia tramite le

configurazioni in singolo e in triplo monocromatore.

All'interno dello spettrometro Raman il cammino della luce viene regolato da un sistema di specchi e scomposto da reticoli diffrattivi (1800 righe/mm).

Il singolo monocromatore ha il vantaggio di far compiere a segnale un percorso dal campione alla CCD più breve rispetto al triplo, portando a far diminuire le perdite di segnale dovute all'allineamento non perfetto del sistema. Quindi i picchi Raman risultano molto più intensi rispetto al triplo, ma porta ad avere molto più rumore e a non disperdere abbastanza la luce diffusa elasticamente, quindi le informazioni vicine qualche centinaio di cm^{-1} alla riga elastica vengono completamente perse; facendo misure vicino alla riga elastica si rischia inoltre di danneggiare la CCD anche a basse potenze! Si ricorre per questo ad un filtro Noch da anteporre alla fenditura d'ingresso del monocromatore. Il filtro Noch è schematizzabile come un taglia banda, quindi è specifico per ogni riga di emissione del laser. Per esempio nella riga del rosso a 647 nm filtra la luce elastica lasciando passare solo fotoni con energia shiftata maggiore di $\pm 380 \text{ cm}^{-1}$ circa.

Il triplo monocromatore è una configurazione che utilizza un pre monocromatore, che elimina la riga elastica e seleziona un intervallo di lunghezze d'onda centrate su un valore λ_0 , mandando tale segnale su un secondo monocromatore che riconcentra il fascio e lo fa passare all'interno di una fenditura. Qui è presente il monocromatore finale, che scompone la luce nelle sue diverse lunghezze d'onda e la porta sulla CCD. Questa configurazione presenta una dispersione maggiore di segnale e richiede una cura particolare all'allineamento degli strumenti, ma permette di indagare su tutto lo spettro di interesse del Raman, anche a frequenze prossime alla riga elastica.

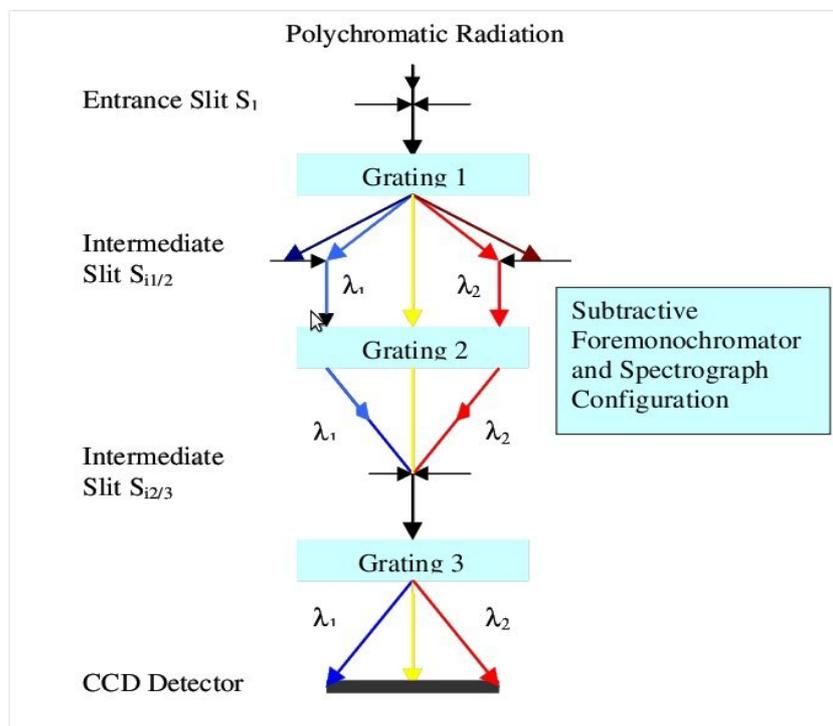


Diagramma schematico della configurazione a triplo monocromatore

L'elemento sensibile: la CCD

La CCD (Charged Coupled Device) è composta da 2048x512 pixels, ognuno dei quali è sensibile alla luce visibile e fornisce il numero di fotoni incidenti nell'unità di tempo accumulazione. Un fotone incidente sul pixel di silicio provoca la creazione di una coppia elettrone – lacuna che viene accumulata in condensatori, la carica accumulata nei condensatori viene letta tramite impulsi alternati ed è possibile ricondursi all'intensità della radiazione incidente.

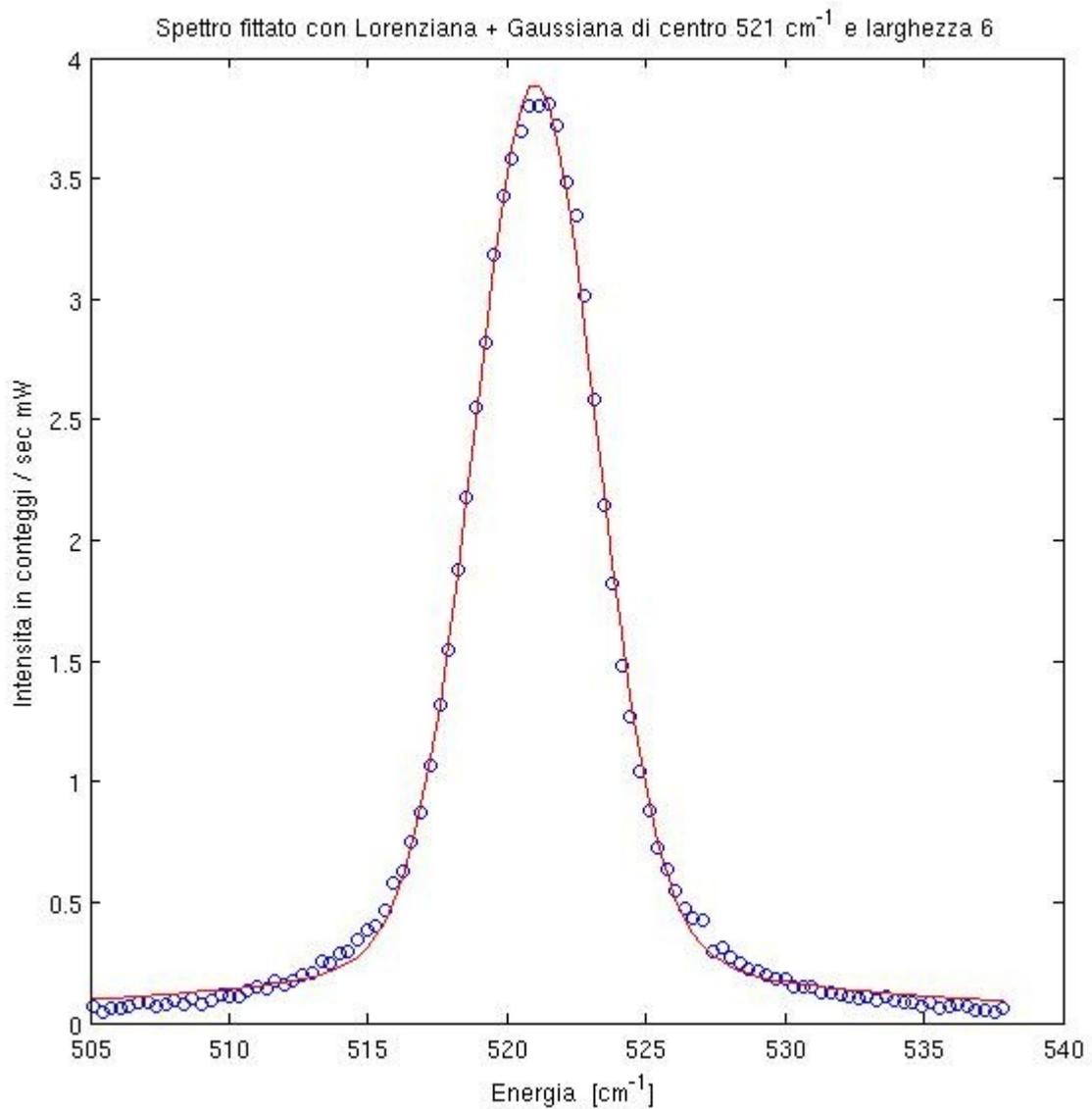
L'efficienza della CCD, cioè il rapporto tra fotoni rilevati e fotoni incidenti, dipende dalla lunghezza d'onda del fotone, in particolare ci aspettiamo che un fotone con alta energia, nella regione del violetto, abbia una probabilità maggiore rispetto ad uno nel rosso di far avvenire la transizione interbanda nel semiconduttore e creare una coppia elettrone libero – lacuna rilevabile elettronicamente. Sono possibili anche transizioni spontanee per effetto termico del mare di elettroni. Per ovviare tale fonte di disturbo la CCD è tenuta a bassa temperatura mediante azoto liquido.

La posizione del pixel fornisce la lunghezza d'onda del fotone rilevato.

Calibrazione del monocromatore

Lo strumento memorizza la lunghezza d'onda associata alla posizione dei monocromatori, ma è possibile che questa associazione sia leggermente errata rispetto al valore reale (bastano piccoli disallineamenti o posizionamenti errati). Si ricorre dunque ad una misura dello spettro del silicio cristallino, citato in precedenza, per aver una buona calibrazione dello strumento in energia. Misurando la posizione della riga 521 cm^{-1} possiamo vedere subito se l'associazione posizione-lunghezza d'onda fornita dalla macchina è esatta. Altrimenti si procede a impostarla.

Il segnale di un determinato picco viene solitamente raccolto da più canali di pixels, in modo da formare una curva centrata sull'energia del modo vibrante e di larghezza pari a circa una decina di cm^{-1} . Per valutare al meglio lo shift dell'energia e l'intensità non è saggio affidarsi ad un valore di picco, visto che questo corrisponde ad un solo canale di raccolta, soggetto a rumore e fluttuazioni. Sfruttando al massimo l'informazione contenuta nello spettro possiamo ricavare con minor arbitrarietà e casualità le caratteristiche dello spettro. approssimare i dati con una curva lorentziana o gaussiana permette di ricavare intensità, posizione del picco e la larghezza in energia del picco. La larghezza del picco è legato al principio di indeterminazione di Heisenberg e va come l'inverso della vita media dello stato eccitato. La riga potrebbe essere ulteriormente allargata anche da fenomeni dovuti all'ottica del sistema o all'agitazione termica (effetto doppler in emissione). Prendiamo la riga 521 cm^{-1} del silicio cristallino, è possibile approssimare il picco con una curva data dalla somma di una lorentziana e una gaussiana:



Caratterizzazione dell'efficienza complessiva del sistema

Si è proceduto ad una verifica dell'efficienza dell'efficienza complessiva dello spettrometro Raman tramite misure in back scattering su wafer di silicio lucidato.

L'efficienza valutata corrisponde a tutto il sistema ottico dello strumento, quindi sono comprese tutte le perdite di segnale tra l'emissione e la rivelazione finale, come quelle dovute alla diversa efficienza dei reticoli a seconda della lunghezza d'onda oppure perdite dovute a lievi disallineamenti, perché è impossibile determinarla accuratamente a priori, va quindi misurata.

Le lunghezze d'onda interessanti per lo scattering sono quelle che risultano avere maggior potenza

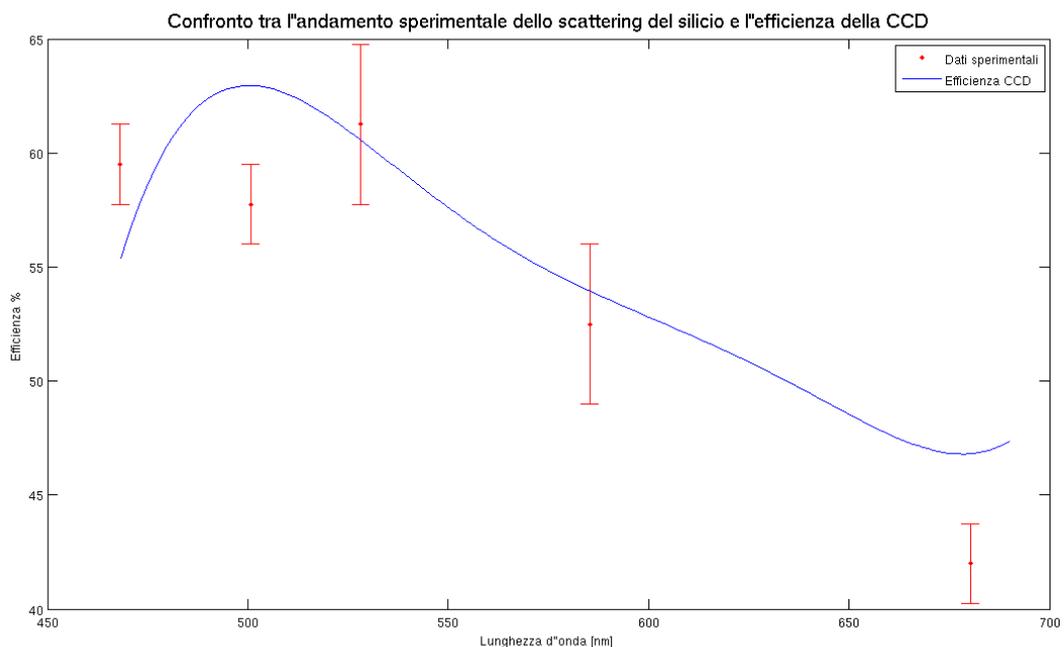
d'uscita nel laser Argon Krypton, in particolare 457, 488, 514.5, 568, 647 nm; alle quali corrisponderà un segnale Raman spostato verso il rosso di 521 cm^{-1} (righe Stokes).

Il wafer di silicio presenta una faccia liscia e una ruvida; il segnale Raman prodotto dalla faccia ruvida risulta amplificato per via di una maggiore superficie di interazione tra materia e radiazione, ma intervengono fenomeni diffrattivi legati alla lunghezza d'onda e alla natura periodica della rugosità, risulta quindi non adatta per apprezzare l'efficienza della CCD.

E' stata misurata l'intensità dello scattering sulla faccia liscia del wafer di silicio a diverse potenze incidenti per avere una media di valori per ogni lunghezza d'onda.

Per valutare e confrontare le intensità Raman delle diverse lunghezze d'onda consideriamo i conteggi al secondo della CCD divisi per la potenza incidente sul silicio in mW per poter confrontare il segnale indipendentemente dalla potenza incidente.

Sono riportati i valori sperimentali confrontati con i dati forniti dal manuale della CCD 3000 corrispondenti all'efficienza complessiva di reticolo (1800 linee/mm) e CCD della configurazione utilizzata.



L'accordo con i dati forniti dal manuale è da considerarsi buono, da notare che l'efficienza massima della CCD si trova verso la regione del blu-verde dello spettro del visibile. Nella regione del rosso si ha una caduta d'efficienza significativa dovuta principalmente all'efficienza quantistica della CCD, mentre verso l'ultravioletto la caduta è dovuta soprattutto al reticolo.

3.2 Fluorescenza

Il fenomeno della fluorescenza riveste un ruolo di disturbo sul segnale Raman. L'emissione in fluorescenza è associabile a transizioni elettro – vibrazionali, l'assorbimento di un fotone da parte della molecola coincide con una transizione elettronica che porta gli elettroni ad un livello di energia più alto, tale processo si può trattare in approssimazione adiabatica (Bohr Oppenheimer). L'emissione non avviene per transizione inversa, visto che lo stato eccitato non è puramente elettronico, ma anche vibrazionale. Quindi il sistema si diseccita tramite transizioni vibrazionali ed elettroniche. Questo porta ad avere una parte dell'energia dispersa per via cinetica (vibrazioni) e conseguentemente l'energia radiante assorbita è maggiore rispetto a quella emessa e la lunghezza d'onda di assorbimento è maggiore rispetto a quella di emissione. La regione tipica dell'assorbimento è l'ultravioletto, mentre l'emissione è nel visibile. Sono presenti assorbimenti anche nel visibile (blu-verde) che in questo caso sono di particolare disturbo per la spettroscopia Raman.

Nella spettroscopia di Fluorescenza si possono misurare sia lo spettro d'emissione che quello di eccitazione: nel primo caso possiamo acquisire lo spettro di emissione ad una determinata lunghezza d'onda di eccitazione (tenendo fissa quest'ultima) oppure, nel secondo caso, possiamo misurare lo spettro di eccitazione, valutando l'intensità emessa ad una lunghezza d'onda fissata al variare della lunghezza d'eccitazione.

Ho usato uno spettrofluorimetro, che per l'eccitazione sfrutta una lampada a spettro continuo che copre un intervallo spettrale che va dai 250 nm fino ai 850 nm. La luce viene fatta incidere su un monocromatore e fatta passare tramite una fenditura sul campione. La luce emessa dal campione viene raccolta a 90° da una fenditura regolabile e indirizzata su un ulteriore monocromatore per essere infine analizzata con un fototubo che ne rivela l'intensità.

SPETTROFLUORIMETRO

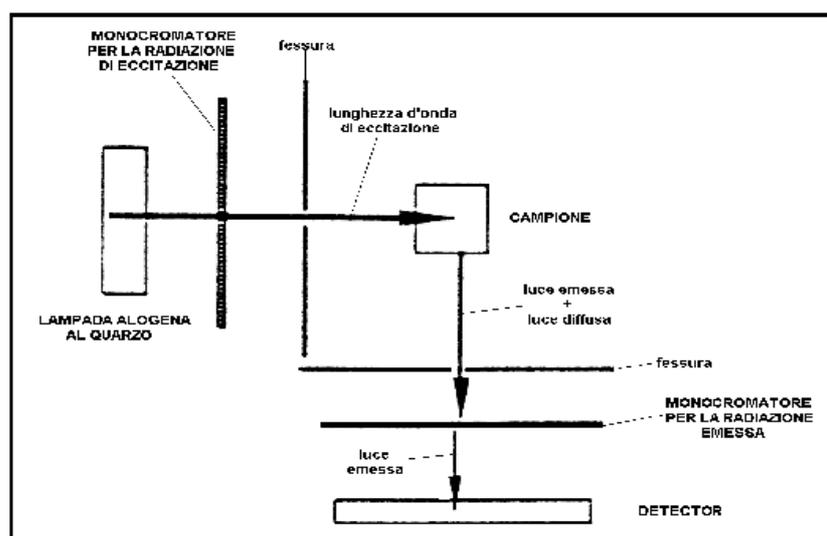


Diagramma di uno spettrofluorimetro.

3.3 Diffusione dinamica della luce

Definizioni:

Consideriamo un'osservabile macroscopica $A(t)$ il cui valore misurato fluttua intorno al valor medio $\langle A \rangle$. Prendiamo in considerazione la sua funzione di autocorrelazione:

$$f(\tau) = \langle A(0)A(\tau) \rangle = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_0^T A(t)A(t+\tau) dt$$

di cui è importante sottolineare 2 caratteristiche:

La funzione di autocorrelazione nel punto $\tau=0$ è il valor medio del modulo quadro di $A(t)$:

$$f(0) = \langle A(0)A(0) \rangle = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_0^T A(t)^2 dt = \langle A^2 \rangle$$

Mentre per $\tau \rightarrow \infty$ tende verso il quadrato del valore medio della nostra osservabile:

$$f(\infty) = \langle A(0)A(\infty) \rangle = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_0^T A(t)A(t+\infty) dt = \langle A \rangle^2$$

Se le fluttuazioni fossero realmente casuali (rumore bianco) la funzione di correlazione avrebbe il valore costante di $\langle A \rangle^2$ in tutto l'intervallo di tempi, con un picco in $\tau=0$ di valore $\langle A^2 \rangle$ (in un esperimento reale questo picco avrebbe larghezza pari alla frequenza di campionamento dello strumento). Mentre se è presente una qualche forma di correlazione temporale del segnale la funzione assume altra forma.

Molti fenomeni naturali hanno associata un'osservabile macroscopica la cui funzione di correlazione ha un andamento di tipo esponenziale decrescente. Uno di questi processi naturali è il moto Browniano di macromolecole all'interno di una soluzione studiato tramite Diffusione dinamica della luce, dove l'osservabile è l'intensità della luce diffusa. Una funzione di autocorrelazione di questo tipo è in accordo con quello detto prima e si può esprimere come:

$$f(\tau) = \langle A(0)A(\tau) \rangle = \langle A \rangle^2 + [\langle A^2 \rangle - \langle A \rangle^2] e^{-\frac{\tau}{\tau_c}}$$

Dove il valore di τ_c è il tempo di coerenza dell'osservabile che è in relazione con con le dinamiche microscopiche del sistema studiato. Risulta quindi interessante non il valore medio dell'osservabile, ma la natura delle deviazioni nel tempo dal valor medio, definiamo dunque lo scarto

$\Delta A(t) = A(t) - \langle A(t) \rangle$ e ricaviamo l'autocorrelazione degli scarti, chiamati appunto fluttuazioni:

$$\langle \Delta A(0) \Delta A(\tau) \rangle = \langle \Delta A^2 \rangle e^{-\frac{\tau}{\tau_c}}$$

Teoria Elettromagnetica

Sperimentalmente, lo studio di particelle sospese in una soluzione è portato avanti tramite diffusione di luce laser e l'analisi della intensità della radiazione diffusa a diversi angoli rispetto alla direzione incidente.

Risulta fondamentale l'uso di una sorgente luminosa coerente come il laser, visto che la correlazione riguarda le posizioni e quindi le fasi della luce emessa dalle singole particelle. Una sorgente non coerente porterebbe un elemento di casualità nella fase della luce diffusa.

Il campo elettrico della luce visibile incidente su un mezzo provoca la polarizzazione del mezzo. Prendiamo in considerazione piccoli volumi di materiale rispetto alla lunghezza d'onda incidente, ma abbastanza grandi da poter contenere un grande numero di molecole e poter considerare continuo il mezzo; possiamo ragionevolmente considerare uniforme il campo elettrico e la polarizzazione da esso generata nell'istante t . La variazione della polarizzabilità nel tempo porterà queste regioni ad emettere radiazione con la stessa frequenza incidente in tutte le direzioni, ma se il mezzo fosse realmente omogeneo, quindi con una costante dielettrica relativa (legata alla polarizzabilità) costante nello spazio e nel tempo, la radiazione si propagherebbe solo nella direzione d'incidenza, infatti i contributi laterali andrebbe a sommarsi in fase casuale e sarebbero nulli lontano dalla zona di incidenza. Nella realtà non esistono mezzi perfettamente continui ed omogenei. Quindi la costante dielettrica relativa del mezzo non è uguale nello spazio e nel tempo, ha delle fluttuazioni intorno ad un valore medio misurato che consente la diffusione della luce in tutte le direzioni. Nel caso del DLS queste fluttuazioni sono dovute anche e soprattutto al moto di traslazione e rotazione delle macromolecole nella soluzione.

Si dimostra che esiste una precisa relazione tra le fluttuazioni dell'intensità della luce diffusa a diversi angoli e le fluttuazioni microscopiche della costante dielettrica che a loro volta sono connesse alle dinamiche molecolari della materia.

In un mezzo non dispersivo, isolante e con costante dielettrica ϵ_0 possiamo esprimere il campo elettrico incidente come un'onda piana:

$$\vec{E}_i(\vec{r}, t) = \hat{n}_i E_0 e^{i(\vec{k}_i \cdot \vec{r} - \omega_i t)}$$

dove \mathbf{n} è il versore della direzione di propagazione, E_0 è l'ampiezza del campo, \mathbf{k}_i è il vettore d'onda e ω_i la pulsazione.

La costante dielettrica locale del mezzo sarà un tensore della forma:

$$\epsilon_i(\vec{r}, t) = \epsilon_0 I + \delta\epsilon(\vec{r}_i, t)$$

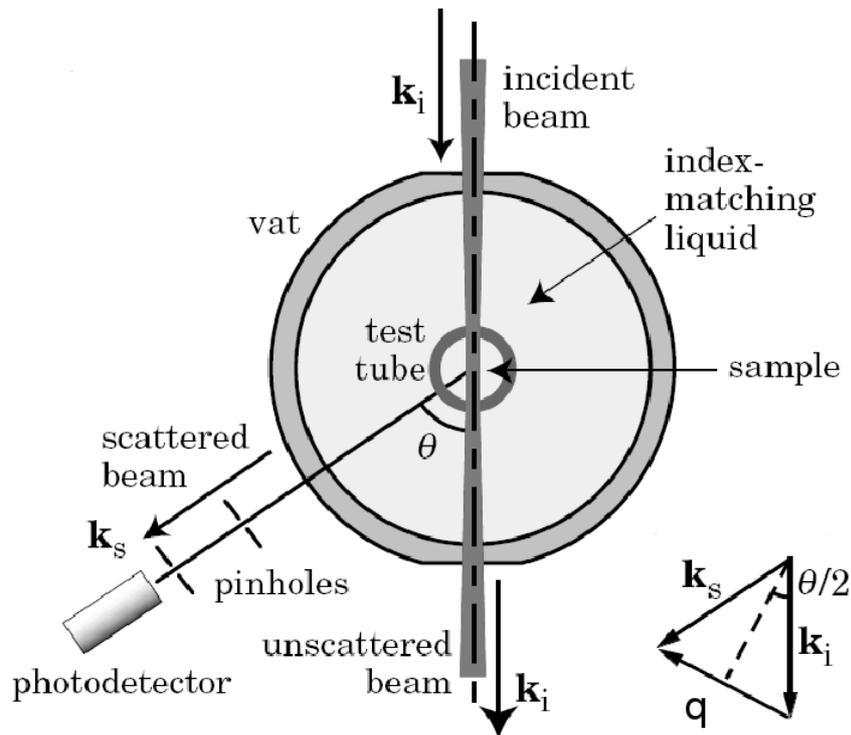
con I tensore unitario di primo ordine e $\delta\epsilon$ il tensore delle fluttuazioni della funzione dielettrica nel mezzo. Si dimostra che il campo elettrico diffuso e quindi l'intensità dipendono dalla trasformata di Fourier del tensore $\delta\epsilon(\mathbf{r}, t)$ che è $\delta\epsilon(\mathbf{q}, t)$, in ultimo la funzione di autocorrelazione dell'intensità diffusa è proporzionale alla funzione di autocorrelazione temporale di $\delta\epsilon(\mathbf{q}, t)$.

Viene definito il vettore \mathbf{q} , che fornisce la direzione dello scattering:

$$\vec{q} = \vec{k}_i - \vec{k}_f$$

La dinamica da noi studiata è quella traslazionale (è possibile comprendere anche quella rotazionale), quindi il momento scambiato tra radiazione e materia è trascurabile rispetto al momento della radiazione visibile, ragion per cui possiamo considerare lo scattering come elastico. Con $|\mathbf{k}_i| = |\mathbf{k}_f|$ il modulo di \mathbf{q} risulta:

$$\vec{q} = \frac{4\pi n}{\lambda_i} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)$$



Configurazione sperimentale

Per chiarire la natura del problema dello scattering dinamico della luce sono necessarie alcune importanti considerazioni:

Nel nostro caso avremo un liquido come solvente e macromolecole in soluzione la cui dimensione è maggiore delle dimensioni delle molecole del mezzo, quindi le macromolecole in soluzione saranno molto più lente rispetto a quelle del solvente. Si farà in modo di avere una polarizzabilità delle molecole molto maggiore rispetto al mezzo (di norma il mezzo è scelto trasparente). Questo porta a considerare che la diffusione dovuta alle macromolecole sarà molto più significativo rispetto a quella del solvente, inoltre, vista la lentezza delle molecole di soluto, i tempi di coerenza saranno molto più lunghi rispetto al solvente, nell'ordine delle decine di microsecondi. Questo porta a dire che le fluttuazioni di intensità saranno legate principalmente alla dinamica delle macromolecole di soluto.

Possiamo inoltre considerare che la nostra soluzione risulta particolarmente diluita (10^{-3} M) per cui le macromolecole si potranno considerare indipendenti tra loro. L'indipendenza implica che lo scattering sia associabile alle singole molecole, trascurando le interazioni tra loro.

Un primo approccio per calcolare il campo diffuso, quindi l'intensità, è quello di considerare i centri di diffusione come sferici (cosa perfettamente giustificata per le GNP, meno per il polimero).

Si riduce il tensore della costante dielettrica ad uno scalare anche il tensore di polarizzabilità, proporzionale al tensore della costante dielettrica, è ridotto a scalare. La radiazione diffusa è quella generata da un dipolo oscillante nella stessa direzione del campo elettrico incidente. Tali considerazioni portano a semplificare di molto i calcoli necessari per ricavare l'autocorrelazione dell'intensità.

Le fluttuazioni del campo elettrico diffuso saranno quindi proporzionali alle fluttuazioni della polarizzabilità, che sono proporzionali a loro volta alle fluttuazioni della fase risultante dall'emissione delle singole macromolecole. I centri di diffusione avranno una definita distribuzione spaziale all'istante t e un'altra distribuzione nell'istante $t + \tau$, se il tempo τ è abbastanza piccolo rispetto ai tempi della dinamica diffusiva, la variazione di intensità sarà correlata alla variazione di posizione delle singole particelle. In particolare il tempo di coerenza è associabile all'intervallo di tempo entro cui un centro di diffusione si sposta di una distanza tale da far cambiare la fase della radiazione emessa rispetto alla media delle altre particelle di π con la conseguente variazione di intensità.

L'andamento esponenziale dell'autocorrelazione dell'intensità diffusa e la relazione tra il tempo di correlazione e la dinamica sono dimostrabili rigorosamente. Si definisce una funzione di Autocorrelazione spaziotemporale:

$$G(\vec{R}, t) = \langle \delta(\vec{R} - \Delta \vec{r}_j(t)) \rangle$$

che ha il significato di densità di probabilità, quindi $G(\vec{R}, t) d^3R$ è la probabilità che la particella j -esima abbia uno spostamento di Δr nel tempo t . Se consideriamo la situazione con $t=0$, tale

probabilità coincide con la probabilità di trovare la particella nel volume microscopico d^3R , quindi è perfettamente giustificato dire che $G(R,t)$ è proporzionale alla concentrazione di particelle e quindi che obbedisce all'equazione della diffusione

$$\frac{\partial G(\vec{R}, t)}{\partial t} = D \nabla^2 G(\vec{R}, t)$$

La trasformata di Fourier della funzione della densità di probabilità è la funzione caratteristica della distribuzione:

$$F_s(\vec{q}, t) = \int G(\vec{R}, t) e^{i\vec{q}\cdot\vec{R}} d^3\vec{R} = \langle e^{i\vec{q}\cdot\Delta\vec{r}_j(t)} \rangle$$

che è proporzionale alle fluttuazioni della polarizzabilità, ed è l'autocorrelazione temporale della somma delle fasi risultanti delle onde piane scatterate nelle direzione q della particelle illuminate nel volume macroscopico V (zona illuminata dal laser e osservata dal rivelatore)

Grazie a questa importante relazione è possibile risolvere l'equazione della diffusione esprimendo $G(R,t)$ come antitrasformata di $F(q,t)$, sfruttando le proprietà della trasformata di Fourier e applicando le condizioni al contorno $F(q,0)=1$ si ottiene la relazione tra tempo di autocorrelazione e la dinamica microscopica:

$$F_s(\vec{q}, t) = e^{-q^2 D t} = e^{-t/t_c}$$

da cui segue

$$t_c = (q^2 D)^{-1}$$

Le fluttuazioni dell'intensità avranno quindi un andamento dato dal modulo quadro di $F(q,t)$

$$\langle I(0) I(\tau) \rangle \propto e^{-2q^2 D t}$$

Conoscendo il valore del coefficiente di diffusione è possibile risalire alle dimensioni del sistema, con le dovute precisazioni per quello che intendiamo per dimensione.

L'equazione Stokes-Einstein ci fornisce una relazione tra coefficiente di diffusione e raggio

idrodinamico:

$$D = \frac{k_B T}{6 \pi \eta R_H}$$

Dove k_B è la costante di Boltzmann, T la temperatura assoluta, η la viscosità del mezzo e R_H è il raggio idrodinamico delle macromolecola. Da questa formula ricaviamo una grandezza che è legata alla dimensione del sistema, in particolare all'ingombro dinamico delle molecole nel mezzo circostante, questa grandezza risulterà maggiore rispetto alle dimensioni effettive delle molecole.

Apparato sperimentale e trattazione dati

Il laser incide sul campione, come mostrato nelle figura precedente. È possibile utilizzare luce polarizzata, per valutare le eventuali anisotropie dei centri di diffusione, ma nel nostro caso ci siamo limitati a considerare solo la luce emessa a prescindere dalla polarizzazione.

L'acquisizione dei dati avviene tramite un fotomoltiplicatore che opera in regime di conteggio fotoni ed è montato su un goniometro, quindi posizionabile a diversi angoli rispetto al fascio incidente. Il campione è immerso in un fluido index-matching. La luce diffusa è filtrata spazialmente prima di giungere al fotomoltiplicatore. Al fine di determinare il tempo d'arrivo di ciascun fotone si impiega un registro contatore associato ad un clock da 20 MHz: all'arrivo di ogni fotone sul fotomoltiplicatore, l'elettronica legge dal contatore quanto tempo è intercorso dall'ultimo fotone e resetta il contatore, che servirà a determinare il prossimo intervallo di tempo. Quindi l'informazione che viene salvata su file è la durata dell'intervallo di tempo tra l'arrivo di ciascun fotone ed il successivo, misurata in unità del clock pari a 50ns. Da ciò un'apposita suite di programmi filtra i dati in modo da eliminare gli eventuali effetti spurie e poi calcola la funzione di correlazione della serie.

Il correlatore calcola in tempo reale una funzione di correlazione parziale, permettendo di valutare il risultato, in modo da tenere sotto controllo eventuali problemi e valutare eventuali cambiamenti nel tempo della funzione di correlazione.

La funzione di correlazione misurata ad un certo q , risente di tutte le dinamiche nella scala spaziale accessibile da quel q , che si svolgono nella finestra temporale in esame (da qualche μ s fino a qualche secondo). Come anticipato per una soluzione colloidale diluita ci aspettiamo una funzione di correlazione esponenziale, la realtà è più complessa, infatti se osserviamo soluzioni colloidali formate da particelle di dimensione diversa ci aspettiamo di trovare diversi tempi di correlazione. Nei casi esaminati abbiamo avuto a che fare con funzioni di correlazione con 2 tempi caratteristici, quindi la approssimeremo con la combinazione lineare di 2 esponenziali.

$$f(t) = A [p_1 e^{-\Gamma_1 t} + (1-p_1) e^{-\Gamma_2 t}]^2$$

Dove A è un parametro di ampiezza, Γ_1 è l'inverso del tempo di correlazione ($\Gamma_1 = 1/\tau_C$) del primo esponenziale, Γ_2 del secondo, p_1 è il peso del primo esponenziale (valore compreso tra 0 e 1).

Oppure, nei casi in cui l'attuale approssimazione non sia abbastanza soddisfacente, possiamo aggiungere un parametro di stiramento β su uno o entrambi gli esponenziali

$$f(t) = A [p_1 e^{-(\Gamma_1 t)^\beta} + (1-p_1) e^{-\Gamma_2 t}]^2$$

Le interpolazioni sono state eseguite con una versione della libreria Minuit del CERN, interfacciata per Matlab dal prof G. Allodi, scelta per la robustezza dell'algoritmo di minimizzazione e per la possibilità di aver un errore associato ai parametri dell'approssimazione.

Considerando una dinamica Browniana, come anticipato sopra, ci si attende che il tempo di correlazione vari come q^{-2} per il coefficiente di diffusione. Abbiamo quindi misurato i tempi di correlazione a diversi angoli (e quindi a diversi valori di q) per controllare se ciò accade.

4 Risultati Sperimentali

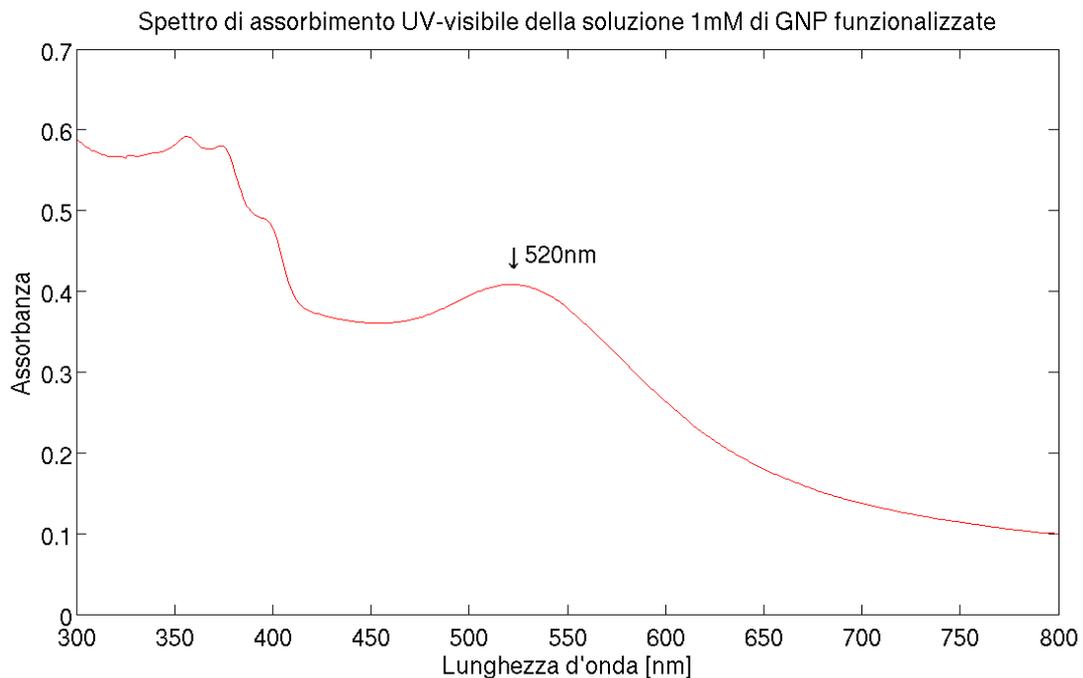
4.1 Spettri di Fluorescenza

Studio in fluorescenza delle nanoparticelle d'oro funzionalizzate

Si è proceduto a caratterizzare la fluorescenza, per tentare di capire se sia possibile ottenere spettri Raman senza il rumore dovuto alla fluorescenza, in modo da poter individuare le eventuali righe del cavitando.

Prima di provare ad eccitare il sistema a diverse lunghezze d'onda valutiamo le regioni di maggior assorbimento, la presenza di eventuali picchi e la loro larghezza nello spettro del UV-visibile.

Misurando lo spettro d'assorbimento nell'UV-visibile delle nanoparticelle si possono notare 3 picchi nella regione ultravioletta tra i 350 e i 400 nm, riconducibili forse alle molecole che funzionalizzano la superficie delle nanosfere d'oro; mentre il picco largo nel visibile a 520 nm corrisponde a quello che si avrebbe con nanoparticelle non funzionalizzate.



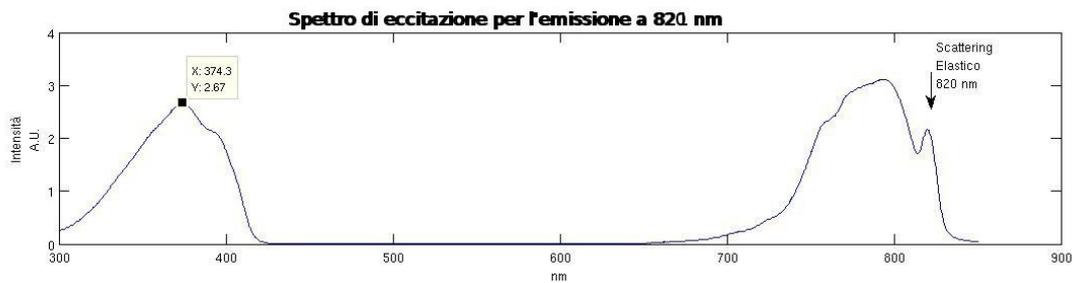
Sono stati misurati gli spettri di emissione in fluorescenza delle nanoparticelle d'oro funzionalizzate, eccitando alle diverse lunghezze d'onda del laser ad Argon-Krypton.

La fluorescenza è presente anche nel solvente CH_2Cl_2 , alle diverse lunghezze d'onda disponibili ma il suo contributo in termini di intensità è modesto, quindi non è stato ulteriormente studiato.

Per valutare a pieno la fluorescenza del sistema si è proceduto a individuare le transizioni più

intense nell'intervallo UV-visibile studiato, nel nostro caso 300-850 nm. Come osservato nello spettro di assorbimento, sono presenti 3 picchi nella regione UV ad alta assorbanza, che risultano anche i canali di maggior eccitazione nello spettro di fluorescenza.

Nello spettro di emissione a 820 nm si vede molto bene che l'eccitazione maggiore è fornita dalle lunghezze d'onda intorno al 374 e al 790. L'intensità è in unità arbitrarie, ma è importante notare che tale spettro è preso con una bassa potenza di eccitazione, infatti l'intensità della radiazione emessa per fluorescenza nelle due regioni a maggior efficienza ha lo stesso ordine di grandezza della luce diffusa elasticamente; questo porta a pensare che l'efficienza di eccitazione sia alta rispetto alle altre transizioni.

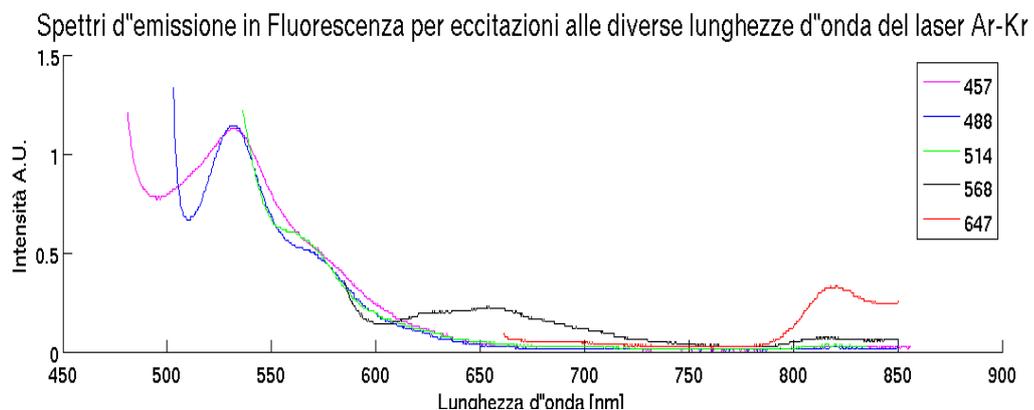


Nella regione tra i 450 e 700 nm l'emissione relativa a questa transizione è contenuta e l'assorbanza è costante,

Eccitando alle diverse lunghezze d'onda del laser sono visibili altre transizioni elettro-vibrazionali, meno efficienti rispetto a quelle visibili a 820 nm, infatti l'intensità della radiazione fluorescente è almeno 2 ordini di grandezza inferiore.

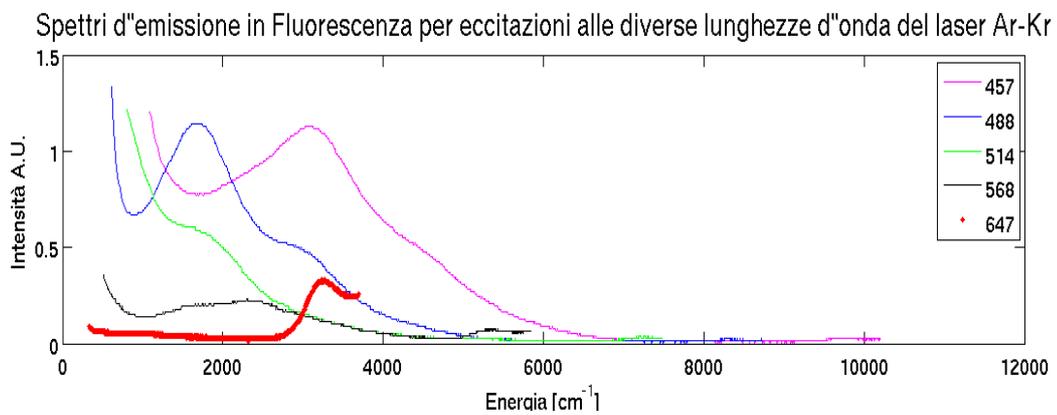
In dettaglio sono riportati gli spettri di eccitazione in fluorescenza con le diverse lunghezze di eccitazione del laser.

Gli spettri sono stati acquisiti eccitando con la stessa potenza alle diverse lunghezze d'onda, risultano quindi perfettamente confrontabili.



Lo spettro di fluorescenza corrispondente alla lunghezza di eccitazione di 647 nm è particolarmente interessante vista la bassissima fluorescenza nell'intervallo 670-800 nm. Lo spettro

precedente è convertito da nm a cm^{-1} , per valutare un possibile intervallo in cui il segnale Raman è poco disturbato dalla la fluorescenza.



Utilizzando la luce laser a 647 nm e indagando nella regione ad energie inferiori a 3000 cm^{-1} abbiamo la possibilità di ottenere il segnale Raman libero da fluorescenza e quindi potremmo osservare le righe Raman del cavitando.

4. 2 Spettri Raman

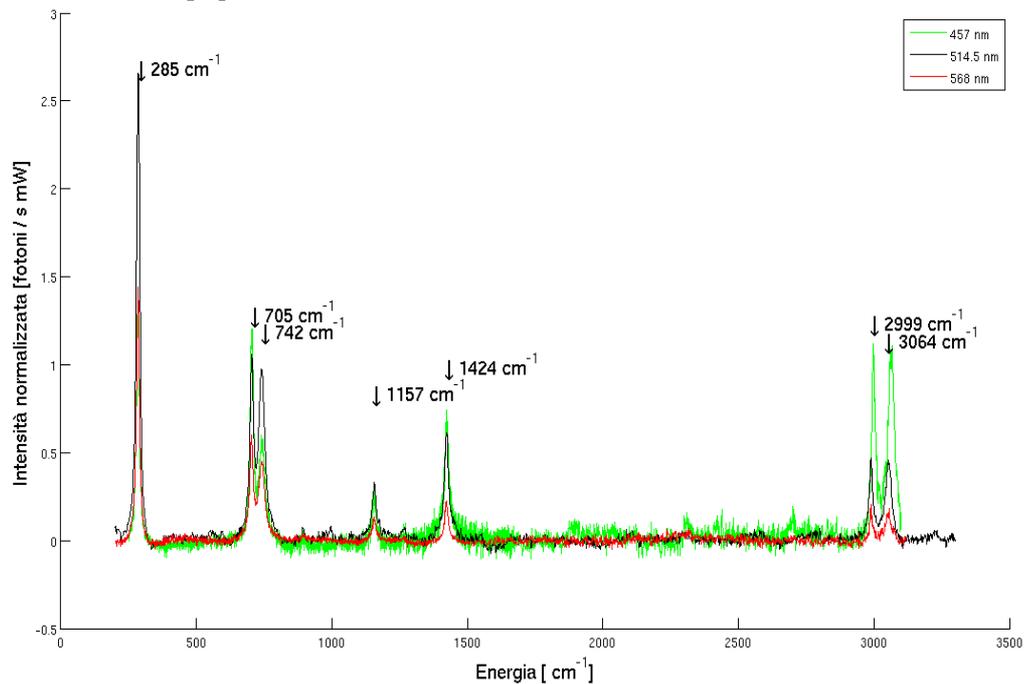
Si tenterà di utilizzare la spettroscopia Raman per verificare l'autoassemblamento del network polimero nanoparticella. In particolare si ipotizza che la formazione del legame tra il cavitando e il polimero funzionalizzato possa spostare le righe dello spettro Raman del cavitando. Quindi si tenterà di ottenere uno spettro del cavitando e di identificare i modi normali attivi.

Spettro del diclorometano (CH_2Cl_2)

Una misura preliminare necessaria è quella del solvente, le cui righe Raman sono ben note e ci consente di avere un riferimento per i successivi spettri, che saranno presi in soluzione di diclorometano. Potremmo così individuare le eventuali righe dovute al cavitando sulle nanoparticelle.

Lo spettro del CH_2Cl_2 è da misurare con una geometria diversa rispetto alla misura sul silicio, dove il raggio laser, collimato tramite lente 50x a corta focale, incide perpendicolarmente sul campione di silicio. La volatilità e la tossicità del solvente ci costringono a tenere con cura la soluzione in chiusa ermeticamente, quindi per studiare il diclorometano (e le soluzioni in cui esso fa da solvente) il laser deve incidere lateralmente sul contenitore in vetro contenente la soluzione. Il fuoco del laser deve essere posizionato all'interno del contenitore, per collimare il fascio nel mezzo studiato, ma non troppo in profondità, altrimenti il segnale si disperde nel mezzo. Una volta regolato la posizione del fuoco (basandosi sulla luce trasmessa in back scattering e su misure del segnale raman) possiamo acquisire lo spettro del solvente in un intervallo spettrale che va dai 200 ai 30000 cm^{-1} circa. Si procede quindi al fit dei picchi per ottenere le informazioni sullo spettro, per poi confrontare picchi e intensità con i valori noti in letteratura (si è fatto riferimento al database del sito governativo USA del NIST). Disponendo di diverse lunghezze d'onda del laser si è fatto uso delle righe 457 nm, 514.5 nm e 568 nm, che corrispondono alla zona dello spettro visibile a maggior efficienza della CCD.

Spettri Raman CH_2Cl_2 normalizzati alla potenza incidente, a diverse lunghezze d'onda di eccitazione



Possiamo brevemente classificare le diverse righe Raman in base ai modi normali di vibrazione ad esse associate, riferendoci alla letteratura troviamo lo spettro teorico (sempre in cm^{-1}), con lo spostamento che si ha rispetto del valore sperimentale.

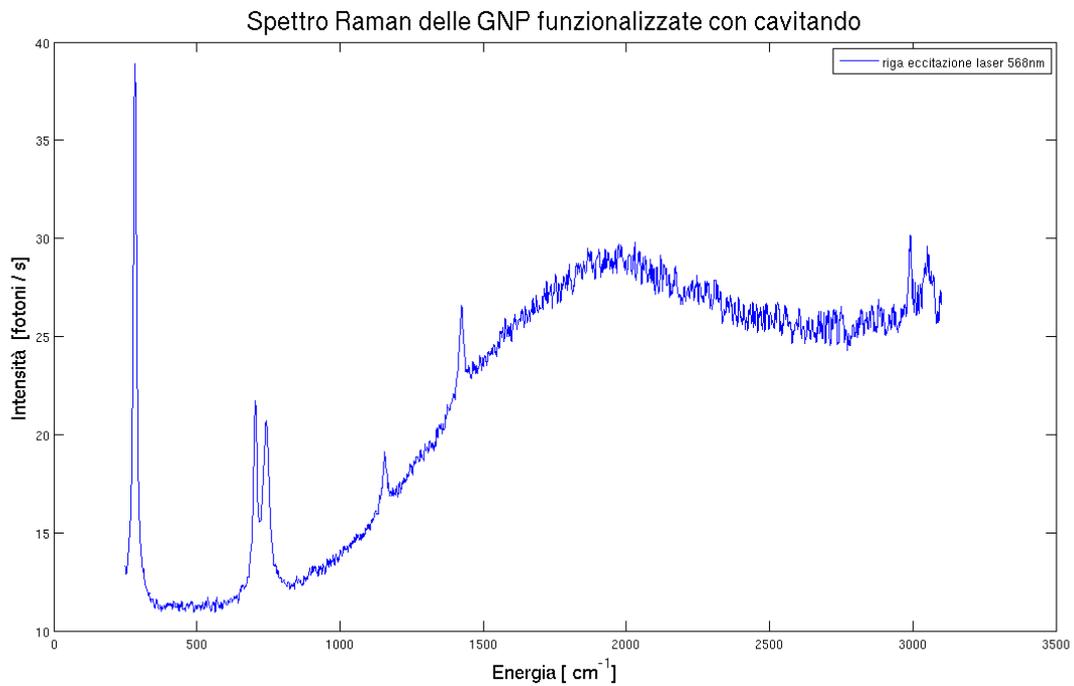
Energia [cm^{-1}]		Modo Vibrante	Spostamento valore Sperimentale in cm^{-1}
282	Cl-C-Cl	Plane scissoring	0
713	Cl-C-Cl	Simmetric - stretching	-8
758	Cl-C-Cl	Asimmetric – stretching	-18
1157	H-C-H	Out-plane twisting	-1
1430	H-C-H	In plane scissoring	-6
2996	H-C-H	Simmetric - stretching	3
3040	H-C-H	Simmetric – stretching	-24
1265	H-C-H	Wagging	non presente

La corrispondenza con le righe presenti in letteratura è abbastanza buona, entro qualche cm^{-1} e gli eventuali spostamenti dovuti allo stato di aggregazione del solvente, che è liquido a temperatura ambiente, mentre la letteratura fornisce le righe Raman allo stato gassoso, per cui possiamo considerare lo spettro ottenuto come base di partenza per i successivi spettri delle GNP.

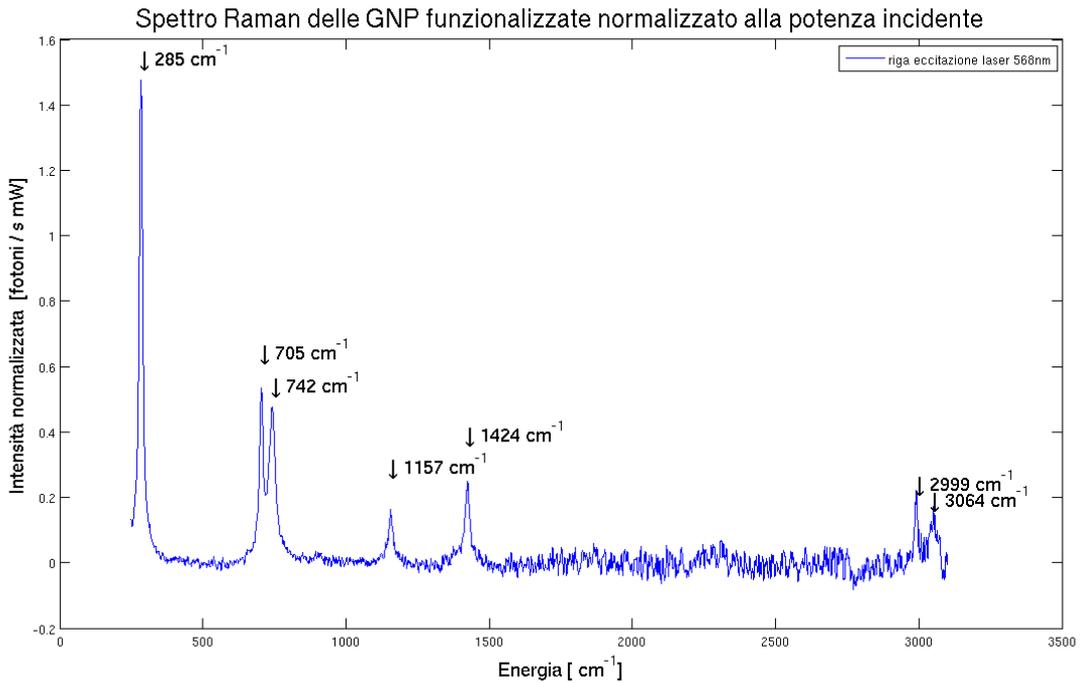
Spettro delle nanoparticelle d'oro funzionalizzate con cavitando(GNP)

In modalità analoghe al solvente si è proceduto ad acquisire lo spettro Raman delle GNP in soluzione, che presenta un'intensa emissione in fluorescenza. Ad esempio, utilizzando la lunghezza d'onda d'eccitazione dei 568 nm possiamo vedere lo spettro di fluorescenza e alcuni picchi Raman, riconoscibile per la larghezza del picco (pochi cm^{-1} , invece la fluorescenza ha una larghezza di migliaia di cm^{-1}).

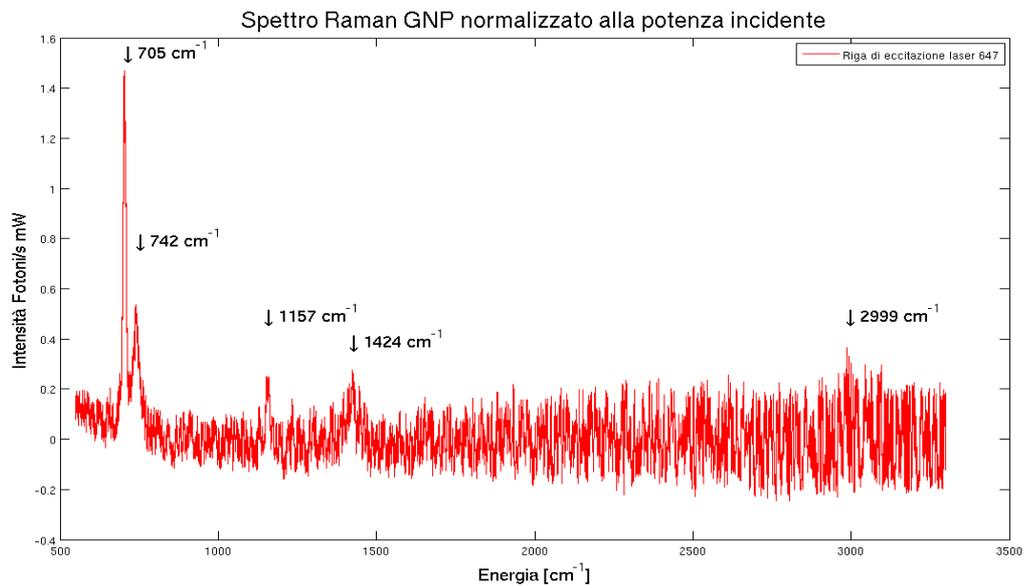
Possiamo ottenere lo spettro Raman sottraendo l'effetto della fluorescenza dallo spettro. La fluorescenza è fittata da un polinomio e quindi sottratta come baseline dallo spettro misurato.



Le righe presenti nello spettro sono tutte dovute al solvente, infatti gli spettri si sovrappongono perfettamente. Questo ci porta a considerare che le eventuali righe del cavitando, che immaginiamo molto deboli rispetto alle righe del solvente, siano coperte dall'intensissimo rumore di fondo dovuto alla fluorescenza delle GNP in soluzione.



Si è tentato di minimizzare il disturbo della fluorescenza, utilizzando la lunghezza d'onda di eccitazione a 647nm, che tra le tante ha la minor fluorescenza associata (come visto nello studio sulla fluorescenza del sistema, cap. 4.1). Lo spettro ottenuto è il seguente:



Misurando lo spettro Raman delle GNP ci accorgiamo subito delle difficoltà e degli svantaggi che si presentano operando in questa zona. Nonostante la quasi assenza di Fluorescenza lo spettro risulta molto rumoroso, con un rapporto segnale rumore molto basso; l'efficienza della CCD diminuisce

notevolmente in questa zona. Per massimizzare il segnale raccolto si utilizza una configurazione a singolo monocromatore, che fornisce segnale maggiore, ma necessita un filtro Noch che taglia le basse energie (caratterizzando il filtro con luce bianca si è trovato che taglia sotto i 380 cm^{-1}).

Non solo il segnale è basso, ma anche il rumore non è casuale e non si riesce ad eliminare aumentando i tempi di integrazione o mediando più misurazioni consecutive. Questo è dovuto all'efficienza complessiva del sistema, che risulta ottimizzata per lavorare nella regione del verde-blu, mentre nella regione del rosso la CCD registra effetti diffrattivi parassiti.

Sono comunque riconoscibili le righe del solvente, ma questo non ci porta ad un risultato migliore rispetto allo spettro misurato eccitando nella regione dove la CCD è più efficiente.

Togliendo il solvente dalle GNP (lasciando semplicemente evaporare una goccia di soluzione su un porta campioni sotto cappa) lo spettro Raman del solvente sparisce del tutto, resta solo la fluorescenza, con spettri del tutto simili a quelli già riportati.

Sono state tentate misure considerando la zona antistokes, limitandoci alle basse energie visto la natura del segnale Raman antistokes, ma senza risultati significativi.

Conclusioni

Gli spettri Raman della soluzione non presentano righe dovute al cavitando che funzionalizza la superficie della GNP e questo è imputabile ad una serie di fattori:

l'uso di una geometria di scattering con alta dispersione di segnale, la fluorescenza intensa nelle regioni ad alta efficienza del sistema, mentre dove non è presente la bassa efficienza porta ad un rumore troppo grande (CCD back-thinned); inoltre la concentrazione delle GNP nella soluzione è molto bassa e questo porta ad avere un rapporto tra il segnale del solvente e le GNP.

Concludiamo che l'approccio di indagine scelto inizialmente non ci ha portato a caratterizzare la proprietà scelta, quindi risulta poco sensato proseguire la caratterizzazione del PEG e tentare di osservare spostamenti di righe Raman che non riusciamo a rilevare!

Si tenterà un diverso approccio al problema, che verrà discusso nel prossimo capitolo.

4.3 Risultati DLS

Per prima cosa si sono caratterizzate le soluzioni diluite (10^{-3}M) di GNP e PEG funzionalizzati in diclorometano (CH_2Cl_2), per avere un valore delle dimensioni iniziali delle nanoparticelle e degli eventuali aggregati o impurezze (polvere) che sono difficili da eliminare del tutto dalla soluzione. Quindi si è caratterizzato l'autoassemblaggio del network, che sarà indotto tramite aggiunte successive di $20\mu\text{L}$ di PEG 1 mM in diclorometano.

Ultimo passo sarà il disassemblaggio, utilizzando una soluzione 12 mM di Butil-Metil-Ammonio (BMA), che si inserisce nel cavitando al posto del PEG.

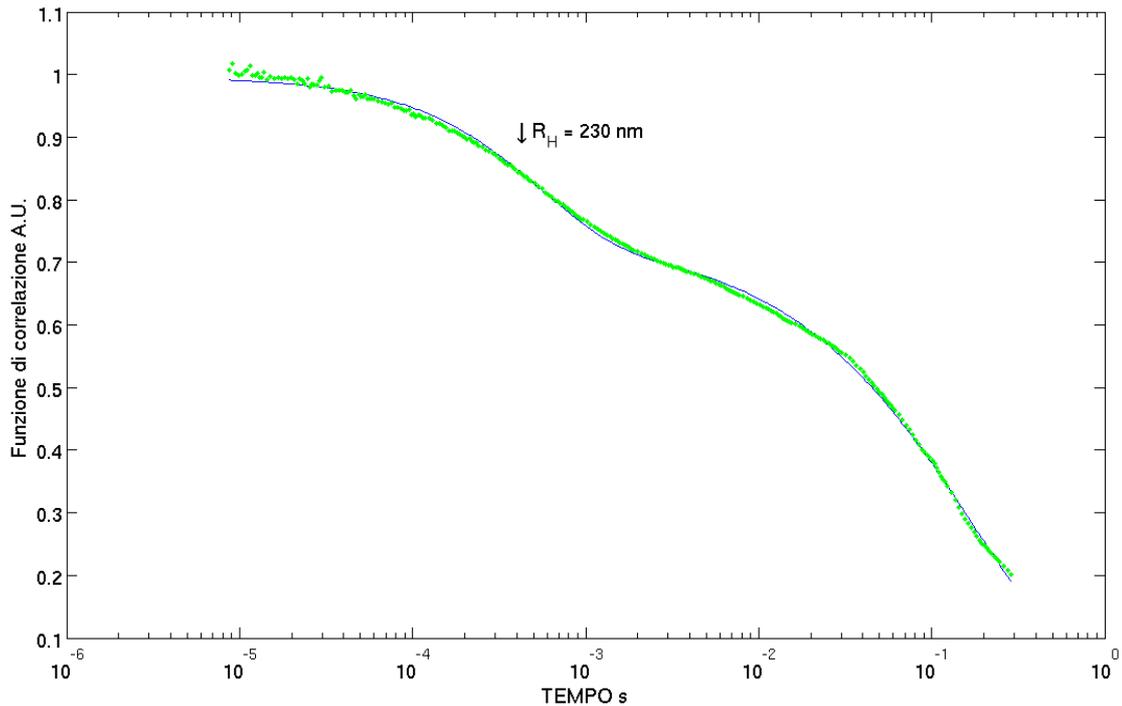
Caratterizzazione componenti: GNP

Le GNP e il PEG presentano funzioni di correlazione molto simili: la loro dimensione effettiva è nell'ordine dei 6-7 nm, che nel caso delle GNP corrisponde al raggio idrodinamico, mentre per il PEG si tratta del raggio di girazione del polimero, con tempi di correlazione, nelle nostre condizioni operative (con misura a 90°), di circa $10\mu\text{s}$.

Tale valore risulta molto difficile da rilevare: dovremmo avere una funzione di autocorrelazione definita fino a tempi di $1\mu\text{s}$, cosa molto difficile visto che siamo al limite delle fluttuazioni di intensità intrinseche del laser He-Ne impiegato. Altro elemento di disturbo è la presenza di eventuali impurezze che va a coprire con tempi molto più grandi l'eventuale segnale dato dalle nanoparticelle e/o dal polimero. Infatti gli oggetti grandi ($>1\mu\text{m}$) diffondono la maggior parte dei fotoni che vengono in seguito acquisiti, i cui tempi di coerenza sono nell'ordine del millisecondo, quindi la loro funzione di correlazione risulta molto più intensa rispetto a quella che si avrebbe con solo piccoli centri di diffusione, che diffondono un numero di fotoni correlati molto minore.

Le nanoparticelle presentano aggregati spontanei, che si formano in tempi molto lunghi rispetto ai tempi della reazione di formazione del network, quindi una caratterizzazione iniziale è necessaria per conoscere lo stato di aggregazione iniziale della GNP.

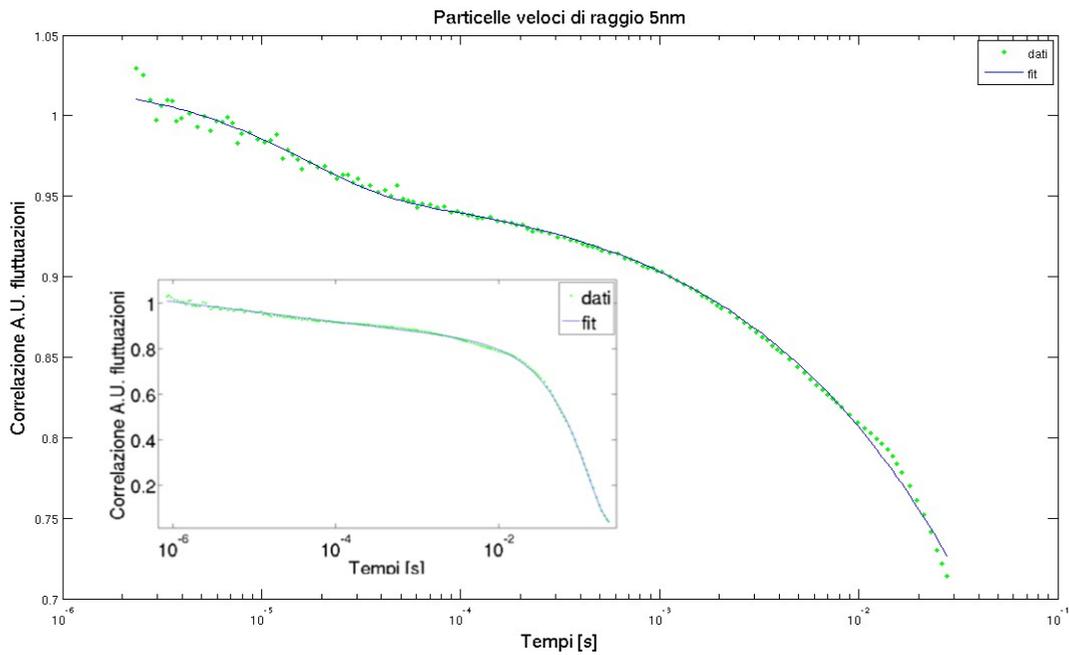
Le GNP fornite presentavano una distribuzione di aggregati spontanei con due grandezza caratteristiche: la più piccola era nell'ordine del μm , mentre gli oggetti più grandi superavano le decine di μm .



Funzione di correlazione misurata a 90° della soluzione contenente GNP 1mM. Presenti aggregati da 230 nm nella soluzione (ai tempi lunghi sono associabili dimensioni di decine di micrometri)

Questa distribuzione renderebbe difficile ed ambigua lo studio della formazione del network, si è proceduto quindi ad eliminare dalla soluzione questi aggregati. Inizialmente si è pensato al filtraggio con filtri micrometrici, ma con risultati tragici, le nanoparticelle hanno una forte tendenza ad attaccarsi alle superfici e rimanerci. Per cui si è sottoposto la soluzione a diverse sessioni di ultrasuoni e successive centrifugazioni. Questo ha consentito di eliminare buona parte degli aggregati spontanei.

Successive e ripetute misure hanno mostrato la scomparsa del segnale dovuto ad aggregati piccoli, cioè dell'ordine de 230 nm, mentre persiste un segnale a tempi lenti, dovuto probabilmente alle dinamiche dei centri di diffusione grandi anche se sono pochissimi. É stato possibile tuttavia visualizzare e approssimare un tempo di correlazione di 10 μ s: si è acquisito una misura molto lunga, in modo da avere una funzione di correlazione abbastanza ben definita, anche per i tempi brevissimi del μ s, è stata compiuta un operazione di filtraggio sui dati, togliendo i picchi di alta intensità, dovuti al passaggio della polvere. La funzione di correlazione risultante è quella delle GNP con un fondo di tempi lunghi, ma è stato possibile ottenere un'approssimazione abbastanza buona della funzione, dalla quale ricaviamo un valore di 6 nm di raggio; tale valore risulta essere soggetto ad un errore pari al parametro!, quindi l'unica informazione che ci fornisce è che nella soluzione è presente un oggetto di grandezza compresa tra 1 e 24 nm.



Funzione di correlazione interpolata misurata a 90° delle GNP in soluzione dopo essere state sottoposte a ultrasuoni e la centrifuga, notare il flesso nell'intorno dei 10 μs, collegabile alla presenza GNP.

Un discorso analogo si può fare per il polimero, che però non mostrava flessi associabili a tempi brevi, ma solo tempi di correlazione nell'ordine dei decimo di secondo.

Importante sottolineare che i tempi legati ai rilassamenti lunghi (>100ms) si presentano grosso modo indipendenti dall'angolo di scattering. Questo porta ad escludere una dinamica di diffusione Browniana, per la quale è previsto che $\tau \sim q^{-2}$. Quindi nella trattazione non abbiamo preso in considerazione i tempi lunghi, visto che non siamo stati in grado di associarvi una precisa dinamica (rotazionale o moti interni alla rete).

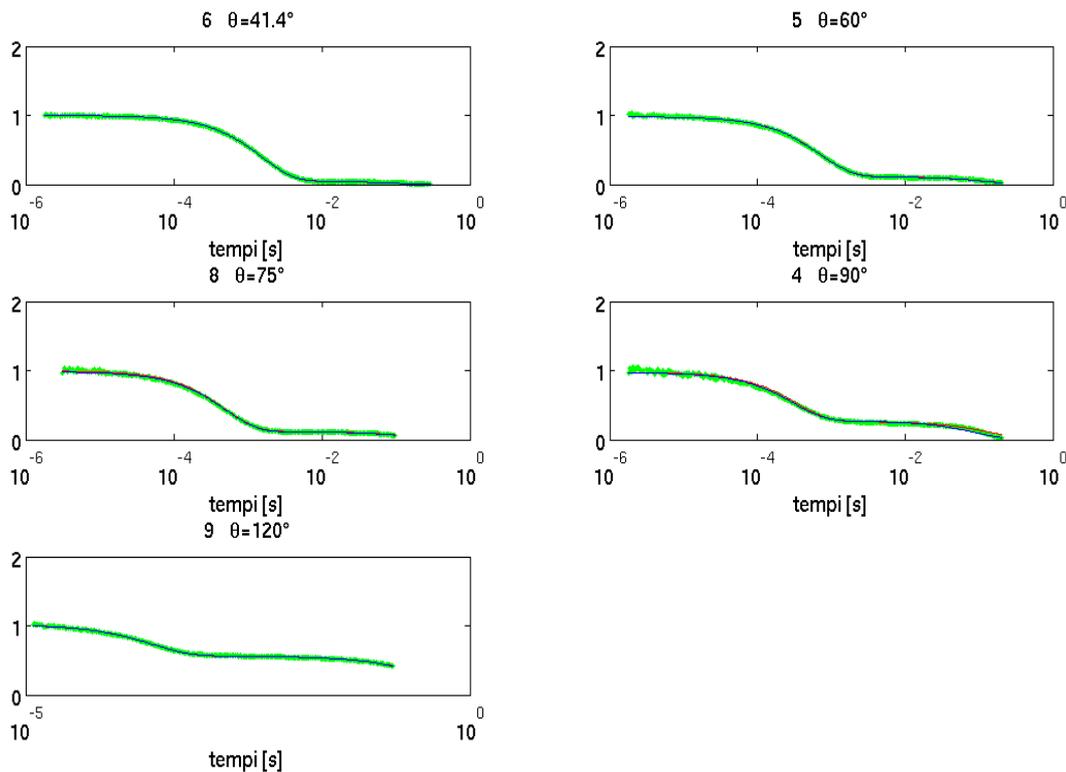
Viste queste considerazioni possiamo stabilire l'intervallo di tempi entro il quale possiamo indagare considerando Browniana la dinamica, che va dalla decina di μs fino a qualche centinaio di millisecondi. Tempi ai quali possono essere associate lunghezze comprese tra le decine di nanometri a una decina di micrometri, osservabili durante l'assemblaggio del network.

Assemblaggio del Network

Una volta caratterizzati i componenti, si passa allo studio del processo di assemblaggio, in particolare incentrato su: i) la velocità di formazione del network dopo ogni singola aggiunta di PEG misurando la funzione di correlazione ad un angolo (fisso a 90°) e ii) la caratterizzazione con una misura della funzione di correlazione a diversi angoli degli oggetti aggregati una volta raggiunto un punto di equilibrio nella reazione. Per quanto riguarda il network formato non possiamo conoscere la forma che assumerà, ma solo il valore del raggio di girazione, che ci fornisce comunque l'ingombro medio delle particelle collegate tra loro.

Prima aggiunta di $20\mu\text{L}$ di PEG (1 mM) alla soluzione contenente le GNP.

La reazione risulta essere molto veloce e raggiunge subito l'equilibrio (verificato facendo misure a distanza di una notte). La funzione di correlazione cambia nettamente rispetto a quella delle GNP, infatti quasi immediatamente dopo l'aggiunta, compare un tempo di correlazione nell'ordine dei millisecondi prima completamente essente.

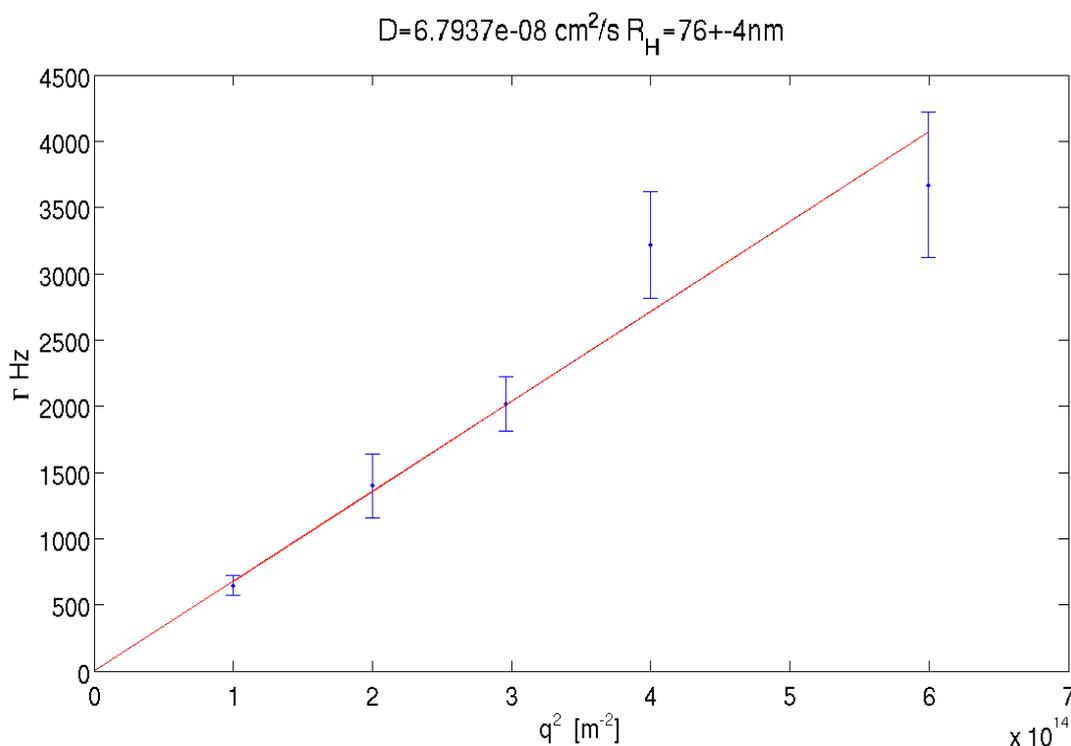


Interpolazioni a diversi angoli delle funzioni di correlazione dopo la prima aggiunta

Misurando la funzione di correlazione a diversi angoli e interpolando i singoli dati con una combinazione di 2 esponenziali semplici, otteniamo un valore di raggio idrodinamico di circa 73 ± 4 nm per le particelle piccole, notiamo di passaggio che tale valore è ottenuto stimando la viscosità nella

soluzione pari a $\eta=4.21 \cdot 10^{-4}$ Pa s. Questo valore corrisponde alla viscosità del diclorometano a temperatura di 22°C.

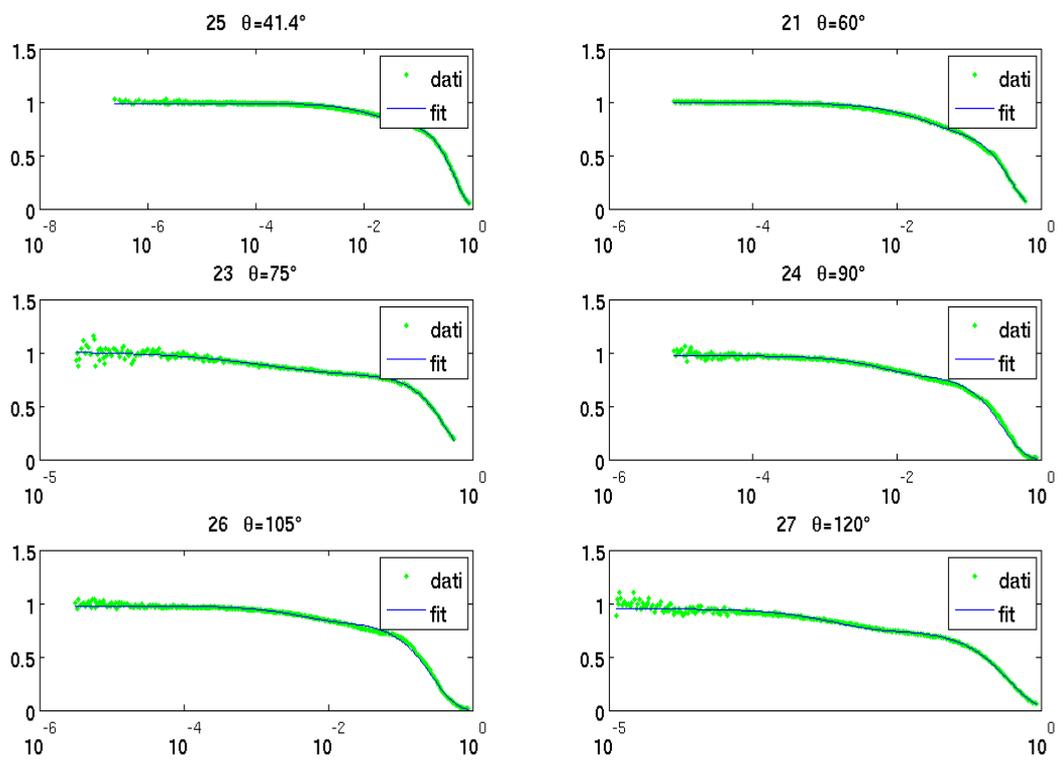
Sarà necessaria un'ulteriore misura indipendente della viscosità per ottenere un valore assoluto di raggio idrodinamico. In ogni caso la viscosità entra linearmente nella formula, quindi non ci aspettiamo grossi stravolgimenti sul valore trovato.



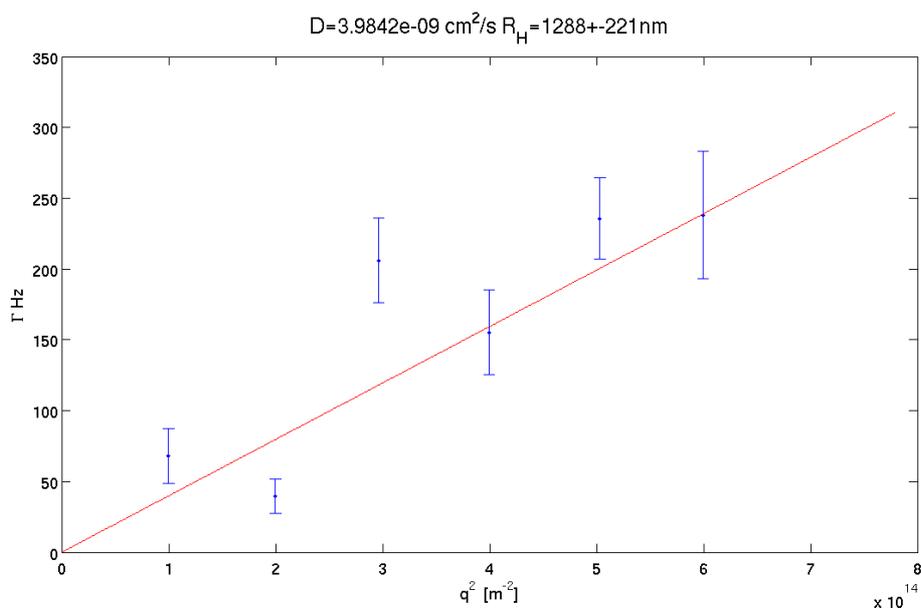
Fit Lineare delle frequenze ottenute a diversi angoli. Il modello lineare in questo caso è perfettamente compatibile con l'andamento dei dati presi a diversi angoli (quasi tutti i valori sono sulla retta entro il margine d'errore). Il coefficiente angolare della retta è il coefficiente di diffusione degli aggregati in soluzione. La presenza di un andamento lineare così netto porta un importante argomento a sostegno dell'ipotesi sulla natura Browniana del moto e la conseguente stima delle dimensioni della rete.

Seconda aggiunta di 20 μ L di PEG (1 mM) alla soluzione

La dinamica dovuta agli aggregati formati da quest'aggiunta è molto più lenta rispetto alla prima aggiunta. I tempi di correlazione brevi risultano meno definiti rispetto alla prima aggiunta, infatti aumenta la componente legata alle dinamiche lente che si somma alla funzione di correlazione dei tempi brevi, rendendoli meno netti e definiti. Questo si riscontra anche nell'approssimazione dei dati, che in questo caso sono stati eseguiti con esponenziali stirati, con un errore molto grande sui parametri.



Interpolazioni a diversi angoli delle funzioni di correlazione dopo la seconda aggiunta



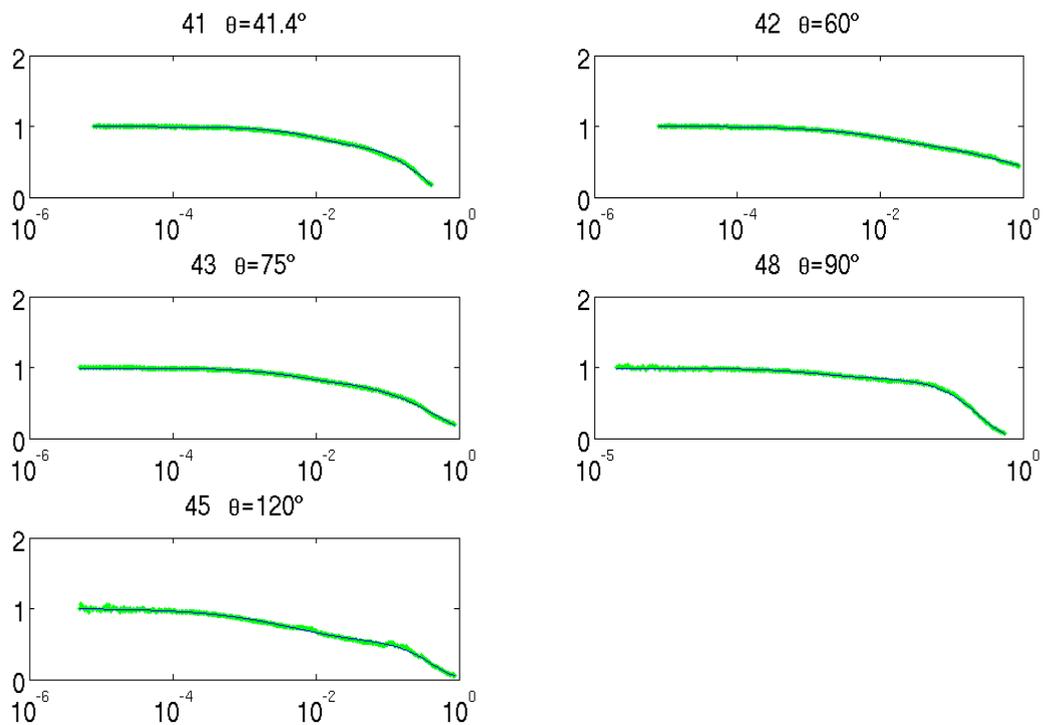
Fit lineare delle frequenze ottenute a diversi angoli. È importante notare che l' approssimazione lineare dell'andamento in questo caso risulta peggiore rispetto alla prima aggiunta, vista la natura più

dispersa dei dati nel grafico. Mentre nel caso precedente la natura Browniana risultava perfettamente giustificata, in questo caso abbiamo una situazione più complessa.

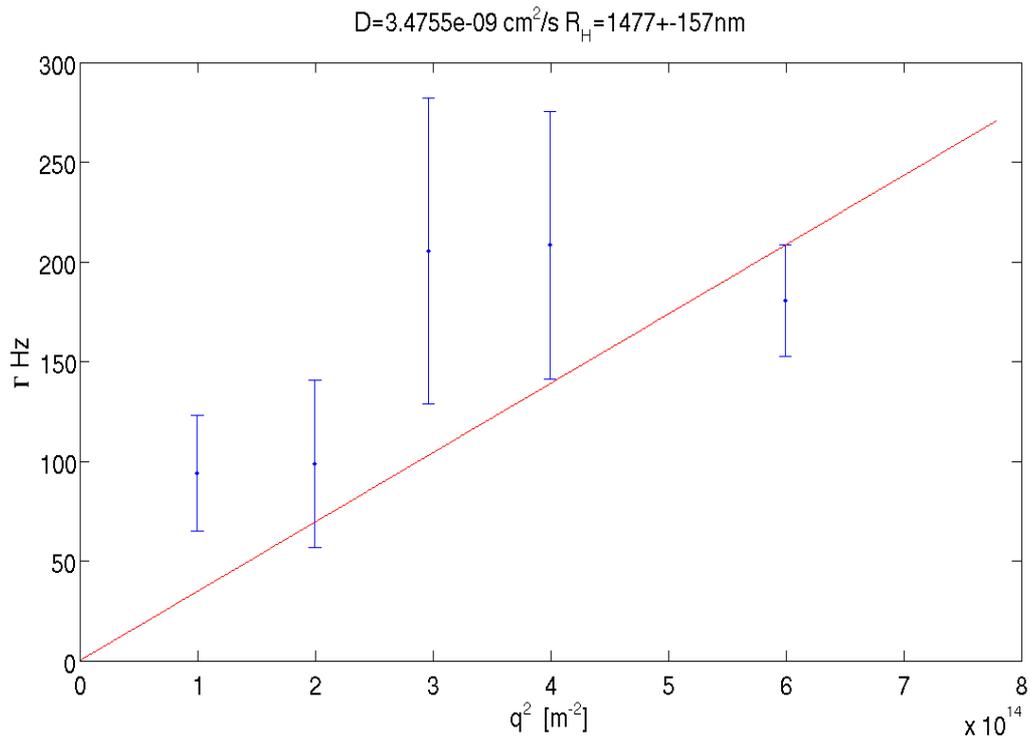
Terza aggiunta di 20 μ L di PEG (1 mM) alla soluzione

Dopo la terza aggiunta non abbiamo grandi variazioni sui tempi di coerenza della dinamica veloce, mentre il peso della funzione di correlazione associata ad esse risulta sempre più piccolo, indicando qualitativamente che una sempre maggior frazione di campione sia bloccata e non partecipi ad una dinamica diffusiva. Una conseguenza della riduzione d'ampiezza è che anche la determinazione di questi tempi cala diventa meno accurata.

Utilizzando lo stesso metodo di fit del precedente otteniamo 1477 ± 160 nm, quindi la crescita del network sembra essere molto rallentata rispetto alle prime 2 aggiunte.



Interpolazioni delle funzioni di correlazione acquisite a diversi angoli.



Fit Lineare delle frequenze ottenute a diversi angoli. La dipendenza lineare inizia ad essere meno marcata rispetto alle situazioni precedenti.

Questo ci ha portato a pensare che l'assemblaggio sia arrivato ad un livello di estensione e complessità tale da rendere sempre meno giustificata l'ipotesi Browniana per l'interpretazione dei tempi di correlazione e che le altre dinamiche inizino a prendere il sopravvento. Quindi ulteriori aggiunte di PEG funzionalizzato porterebbero sicuramente ad un aumento dell'estensione della rete, ma renderebbero tale crescita sempre meno osservabile e più ambigua se studiata tramite DLS, mentre altre tecniche di imaging nello spazio diretto risultano più appropriate.

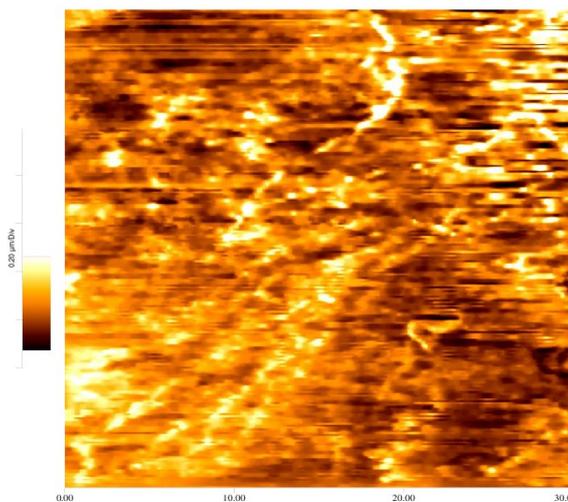


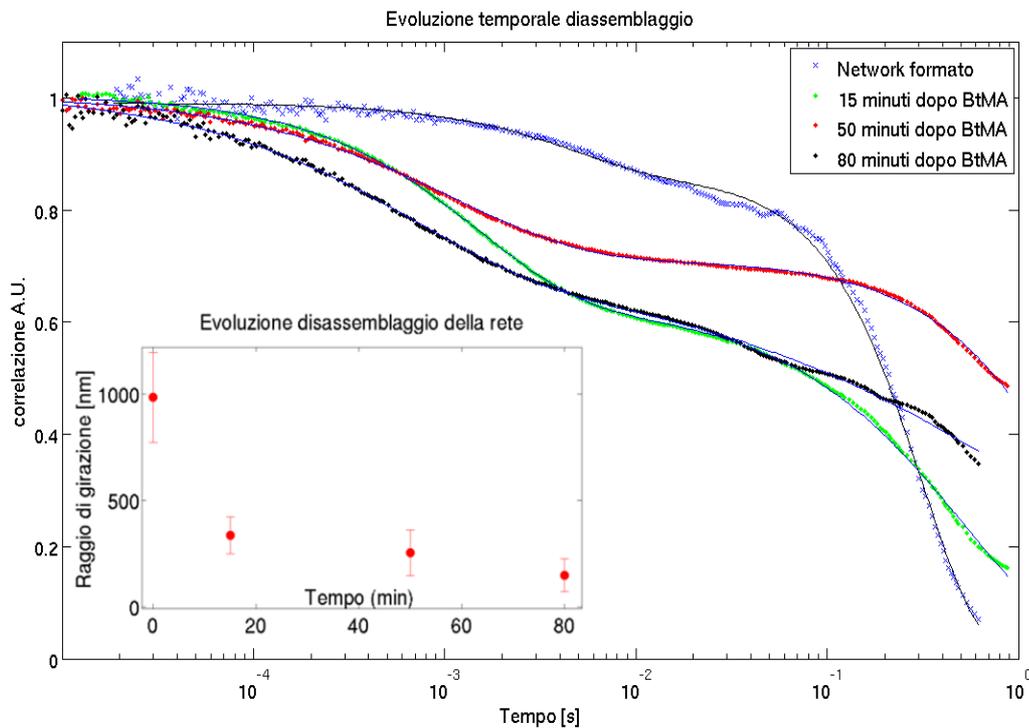
Immagine ATM del network depositato su silicio

A fini dimostrativi è stata acquisita un'immagine AFM della rete; una goccia di soluzione contenente il network formato è stata messa su silicio e dopo che il solvente è evaporato si è proceduto a rilevare l'immagine. Si possono notare rilievi di diversa altezza e una mappa contenente oggetti grandi qualche micrometro.

Disassemblaggio

Considerato soddisfacente il livello di assemblaggio del network si è proceduto a disassemblarlo con l'aggiunta di 10 μL di soluzione 12 mM di Butil-Metil-Ammonio (BtMA), si stima che il sostituito sia in rapporto di almeno 2 : 1 rispetto al PEG. Questo per avere la completa sostituzione del PEG da parte del BtMA nel cavitando (ogni molecola PEG possiede due gruppi pirini da sostituire).

Una volta aggiunto il BtMA abbiamo misurato la funzione di correlazione con angolo di 90° per seguire la cinetica del disassemblaggio. La misura è andata avanti per un tempo sufficiente a far raggiungere un valore di tempo di correlazione costante (il che ci fa presumere il raggiungimento dell'equilibrio).



Sempre in approssimazione Browniana possiamo ricavare i raggi di girazione associati ai tempi di correlazione e riportare l'evoluzione temporale delle dimensioni del sistema. Notiamo che il network passa da una dimensione di circa $1\mu\text{m}$ fino a 360 nm in 15 minuti, mentre nella successiva ora le dimensioni diminuiscono molto più lentamente fino ai 150 nm. Il non totale disassemblaggio della rete è probabilmente dovuto agli errori presenti nella determinazione delle concentrazioni. In ogni caso, questo processo dimostra che il BtMA si è sostituito al PEG in molti cavitando facendo così diminuire drasticamente la dimensione media dei cluster che formano la rete.

Conclusioni

Le misure dell'estensione spaziale della rete formata dopo l'aggiunta del PEG funzionalizzato alle GNP hanno fornito una prova dell'assemblaggio a livello nanometrico. Ancora più importante è la diminuzione dell'estensione della rete dopo l'aggiunta del BtMA, che ci conferma la natura dell'assemblaggio che è reso possibile grazie alla presenza del cavitando sulle nanoparticelle e alla funzionalizzazione del PEG, in ultimo alla formazione del legame tra cavitando e polimero.

Tutto questo ci porta a confermare le importanti proprietà della rete autoassemblante e ci forniscono ulteriori spunti di ricerca in questa direzione.

Le aggiunte di PEG sono stati associabili a drastici aumenti del raggio di girazione della rete portando a saturare l'assemblaggio della rete. Noto quest'andamento qualitativo di crescita della rete in funzione della concentrazione del PEG, risulterà interessante seguire il processo di assemblaggio in maniera più scrupolosa tramite aggiunte più contenute di PEG e misure più precise di concentrazione, in modo da avere una caratterizzazione del processo stesso di assemblaggio con una valutazione quantitativa oltre che qualitativa. Per un'analisi quantitativa dei risultati sarà necessario inoltre misurare la viscosità macroscopica del sistema nei vari stati di formazione e di disassemblaggio della rete.

Inoltre nel gel formato è possibile investigare le dinamiche a tempi lunghi, non considerate in questo studio, tramite modelli diversi da quello diffusivo Browniano, andando ad investigare diverse dinamiche fino ad ora trascurate.

Ringraziamenti

Ho piacere di ringraziare le persone che hanno contribuito a questa tesi e mi hanno supportato con le loro conoscenze e la loro presenza. Un grande e sincero grazie al mio relatore Luigi Cristofolini per avermi fatto da guida in questo tortuoso percorso che culmina con la stesura e la discussione della tesi, per avermi ricordato incessantemente di scrivere questa tesi e per avermi supportato con nuovi stimoli ad ogni insuccesso sperimentale!

Grazie a Paolo Camorani, per avermi pazientemente insegnato i segreti della diffusione dinamica della luce quando le misure Raman sono naufragate nella fluorescenza, dandomi la speranza di ottenere dei risultati!

Grazie a Marco Dionisio per avermi fornito le preziosissime nanoparticelle da lui funzionalizzate, per il tempo dedicato ad ascoltare le ipotesi e i resoconti sulle mie sventure con le nanoparticelle, per i consigli e il materiale di studio fornito.

Grazie a Davide Orsi per i saggi consigli e il tempo dedicato a insegnarmi ad usare lo strumento per le misure Raman.

Grazie ai miei genitori che mi hanno sopportato e mantenuto in questi anni fidandosi delle mie scelte.

Grazie ai miei amici e compagni di corso che mi hanno supportato con la loro presenza, i caffè presi insieme e le chiacchierate in mensa, all'osservatorio e in tutti i posti in cui siamo stati. In particolare grazie alla Laetitia che mi ha accompagnato nei viaggi e nelle bevute, fondamentali per mantenere quel poco di sanità mentale che mi resta, alla Sara che mi ha ricordato di dare gli ultimi esami (senza di lei avrei dimenticato di darle un paio e non sarei qui) e a Marco per il supporto informatico!

Bibliografia

Rayford C.E.; Schatz G; Shuford K.; *Optical Properties of Gold Nanospheres*.
Spring Nanoscape 2005 Volume 2, Issue 1, pp.27-32.

Balazs A. C.; Emrick T.; Russell T.P.; *Nanoparticle Polymer Composites: Where
Two Small Worlds Meet*. SCIENCE Vol 314 17 november 2006 pp.1107-1110.

Kneipp K.; Moskovits M.; Kneipp H.; *Surface-Enhanced Raman Scattering –
Physics and Applications*. Series Topics in Applied Physics 102, Springer,
Heidenlberg, Berlin 2006;

Berne J.B.; Pecora R. *Dynamic Light Scattering*. Ed: Wiley & Sons 1975

Spettri Raman consultati sul database online del NIST: <http://webbook.nist.gov/chemistry>

Manuale spettrometro triplo Raman T64000, costruito dalla Jobin Yvon

Manuale del fotomoltiplicatore del DLS, PSC100 prodotto dalla Malvern

Descalzo A. B.; Martínez-Manèz R; Sancenón F.; Hoffmann K.; Rurack K. *The
Supramolecular Chemistry of Organic–Inorganic*. Hybrid Materials . Angew. Chem.
Int. Ed. 2006, 45, 5924 – 5948