

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS
MATERIAIS - PGCIMAT- INSTITUTO DE QUÍMICA, ESCOLA
DE ENGENHARIA E INSTITUTO DE FÍSICA

Dinâmica em solução aquosa de dextrano dentro
de matriz de gel rígido de agarose. †

CARMEN LUISA KLOSTER

Tese apresentada ao PGCIMAT da UFRGS em preenchimento final dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciência dos Materiais. Realizada em cooperação (modalidade sanduiche) sob orientação de Prof. Dr. Dimitrios Samios (I.Q.-UFRGS-Brasil) e Dr. Erik Geissler (Laboratoire de Spectrométrie Physique -Grenoble, França), com co-orientação da Profa. Dra. Clara Bica.

PORTO ALEGRE, DEZEMBRO DE 1999.

†Trabalho Parcialmente Financiado pela CAPES e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul- FAPERGS.

INSTITUTO DE QUÍMICA
BIBLIOTECA

Dedico esse trabalho ao colega e
amigo Ivan. Com saudades.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Dimitrios Samios, meu orientador, pela longa convivência e pela orientação .

Ao Dr. Erik Geissler pela orientação , profissionalismo e pela agradável acolhida em seu grupo em Grenoble.

Ao Dr. Cyrille Rochas pela colaboração científica incansável, sem a qual certamente esse trabalho não teria sido realizado.

A professora Clara Bica pela co-orientação e profunda amizade.

Ao professor e grande amigo Dr. José Schifino pelas discussões científicas, amizade e compreensão.

Ao Dr. Redouane Borsali pelas discussões científicas e pelos conselhos que tem me dado durante essa longa caminhada.

A Dra. Anne-Marie Hecht pelas proveitosas discussões científicas.

A Dra. Colette Lartigue pelas discussões científicas e pela amizade.

A professora Dra. Nádyá Pesce pelo incentivo e exemplo como profissional e ser humano.

Ao Schelp pelo companheirismo e grandes sugestões científicas.

A todos meus colegas de trabalho pelo carinho e amizade em todas as horas, boas e más.

RESUMO

As propriedades do gel e da solução de dextrano foram investigadas por espalhamento de luz dinâmico. Medidas do coeficiente de difusão e da razão Rayleigh R_θ foram realizadas para moléculas de dextrano tanto em solução livre como aprisionadas dentro do hidrogel de agarose de diferentes concentrações. As três massas moleculares de dextrano investigadas $7 \times 10^4 g.mol^{-1}$, $5 \times 10^5 g.mol^{-1}$ e $2 \times 10^6 g.mol^{-1}$. O peso molecular da agarose é $1,2 \times 10^5 g.mol^{-1}$.

A presença de luz heteródina originária da matriz rígida de agarose não impediu a obtenção de resultados de espalhamento de luz confiáveis e adequados para a avaliação da dinâmica do dextrano em soluções aquosas confinada dentro desta. A avaliação foi realizada em termos do coeficiente de difusão e da razão Rayleigh. Para a menor massa molecular é constatado que, abaixo da concentração crítica c^* , o produto $D_z R_\theta$ é independente da concentração da agarose, mostrando que a redução no coeficiente de difusão dentro do gel é resultado do decréscimo da pressão osmótica na geometria confinada. Para as massas moleculares maiores, efeitos de entrelaçamento entre o dextrano e a rede de agarose podem ser observados para os géis mais concentrados. Para concentrações de dextrano maiores que c^* , com esse aprisionado dentro da matriz, a estrutura do gel apresenta uma separação de fases.

As medidas de espalhamento de luz dinâmica permitiram a obtenção de estimativas razoáveis da massa molecular M_w e do raio de giro R_g das moléculas de dextrano aprisionadas. O segundo coeficiente virial A_2 é positivo, indicando que o sistema agarose-água atua como um bom solvente para o dextrano, mas a razão entre R_g e R_h é menor do que 1,5. Esses resultados são interpretados em termos da ramificação da molécula de dextrano.

ABSTRACT

The dynamic properties of water dextran solutions both in free state and inside agarose gels were investigated using photo correlation dynamic light scattering technique. The measurements were performed at different agarose-dextran-water solution compositions. Three molecular weights of dextran were investigated, $7 \times 10^4 \text{ g.mol}^{-1}$, $5 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$ and $2 \times 10^6 \text{ g.mol}^{-1}$. The agarose molecular weight is $1,2 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$. The obtained results were evaluated in terms of dextran diffusion coefficients and Rayleigh ratio R_θ .

The light scatterer from the rigid agarose matrix strongly heterodynes the signal from the mobile component, thereby allowing measurements both of the diffusion coefficient and the Rayleigh ratio. For the lowest molar mass it is confirmed that, below the dextran critical concentration c^* , the product $D_z R_\theta$ is independent of the agarose concentration, showing that the reduction of the rate of diffusion inside the gel is the result of a decrease in the osmotic pressure in the confined geometry. For higher molar masses, entanglement effects between the dextran and the network became noticeable in the more highly concentrated gels. For concentrations of dextran greater than c^* , inside gels, the gel structure undergoes a phase separation.

The dynamic light scattering measurements are also found to yield reasonable estimates of the molar mass M_w and radius of gyration R_g of the trapped dextran molecules. The second virial coefficient A_2 is positive, indicating that the agarose-water acts as a good solvent for dextran, but the radius of gyration R_g to the hydrodynamic radius R_h is less than 1,5. These results are interpreted in terms of branching of the dextran molecule.

LISTA DE SÍMBOLOS

Símbolo	Significado
θ	Ângulo de espalhamento.
R_g	Raio de giro.
M_W	Massa molecular.
A_2	Segundo coeficiente virial.
A_3	Terceiro coeficiente virial.
SANS	Espalhamento de neutrons a baixo ângulo.
SAXS	Espalhamento de RX a baixo ângulo.
DLS	Espalhamento de luz dinâmico.
SLS	Espalhamento de luz estático.
p_I	Polarizador.
k_I	Vetor de propagação do feixe incidente.
k_S	Vetor de propagação do feixe espalhado.
q	Vetor de onda.
λ_o	Comprimento de onda da luz incidente.
n	Índice de refração do meio.
ℓ	Dimensão máxima do objeto.
c	Concentração .
F	Magnitude do campo elétrico.
p	Momento de dipolo.
α	Polarizabilidade.
I_s	Intensidade de luz espalhada.
I_o	Intensidade de luz incidente.
r	Distância do centro de espalhamento até o detector.
n_o	Índice de refração do solvente.
∂p	Derivada parcial da pressão.

$\partial\rho$	Derivada parcial da densidade da solução .
$\partial\pi$	Derivada da pressão osmótica.
N	Número de moléculas por unidade de volume.
N_A	Número de Avogadro.
α	Magnitude da polarizabilidade.
$\partial\alpha$	Flutuação em α .
T	Temperatura.
k	Pré fator dependente da natureza química do polímero e do solvente.
v_θ	Volume de espalhamento no ângulo θ .
v_s	Volume de espalhamento no ângulo 90° .
p_1 e p_2	Centros de espalhamento.
P_θ	Fator forma.
R_o	Intensidade de espalhamento a ângulo zero.
I	Intensidade de luz.
g_τ	Função de correlação de campo elétrico.
τ	Tempo de retardo.
D_z	Coefficiente de difusão translacional.
ω	Frequência.
Γ	Taxa de relaxação .
D_o	Coefficiente de difusão extrapolado para $q \rightarrow 0$ e $c \rightarrow 0$.
$2t$	Tempo total de medida.
R_h	Raio hidrodinâmico.
η	Viscosidade do solvente.
k_D	Coefficiente dinâmico.
k_f	Coefficiente de fricção de primeira ordem.
V_1	Volume molar do polímero.
d_h	Diâmetro hidrodinâmico.
$S(q, \omega)$	Densidade espectral total.

E_s	Campo elétrico estático.
E_f	Campo elétrico flutuante.
I_s	Intensidade estática.
I_f	Intensidade flutuante.
E^*	Complexo conjugado de E.
t	tempo.
t_E	Tempo total de acumulação .
β	Fator de coerência do arranjo óptico.
g_2	Função de correlação de campo referente ao movimento lento.
T_∞	Tempo de retardo do último correlador.
$G(\tau)$	Função de correlação da intensidade.
X	Grau de heterodinagem.
T_r	Transmissão das amostras.
R_v	Razão Rayleigh do padrão tolueno.
N_p	Grau de polimerização .
R	Distância média entre as extremidades da cadeia.
a	Comprimento do segmento polimérico.
ν	Expoente do volume excluído.
Π	Pressão osmótica.
ξ	Comprimento de correlação .
ϕ	fração de volume.
$I(t)$ e $J(t)$	Sinais que dependem do tempo.
G_2	Dados brutos de intensidade.
C_b	Linha de base.
F_p	Fair point.
L	litro.
c_g	Concentração do gel agarose.

Sumário

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Histórico	1
1.2	Biopolímeros	4
1.2.1	Dextrano	4
1.2.2	Agarose	6
2	OBJETIVOS	8
3	FUNDAMENTOS TEÓRICOS	9
3.1	Espalhamento de luz estático	12
3.2	Espalhamento de luz dinâmico	18
3.2.1	Fundamentos do espalhamento de luz dinâmico	20
3.2.2	Espalhamento de luz dinâmico em géis de agarose	24
3.3	Regimes dinâmicos	30
3.3.1	Regime diluído	30
3.3.2	Regime semidiluído ($c > c^*$)	32
4	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	34
4.1	Desafios experimentais	34
4.2	Amostras	35
4.3	Procedimento	35
4.4	O Correlador	37
5	APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	42

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

1.1 Histórico

Grande parte do conhecimento atual sobre a estrutura e as propriedades de soluções poliméricas foi obtido através de técnicas de espalhamento de luz[1]. A primeira teoria para o espalhamento produzido por soluções diluídas, desenvolvida de forma independente por Flory e Huggins na década de 40, assumia que as moléculas se comportavam idealmente, ou seja, com o segundo coeficiente virial igual a zero, condição que se mostra válida para um específico par polímero-solvente ou para uma mistura solvente-não-solvente em uma temperatura particular, dita temperatura teta (θ) ou simplesmente estado θ . A partir dessas bases, o espalhamento de luz estático em solução diluída passou a ser utilizado na obtenção do raio de giro da molécula e de sua massa molecular. Nos anos 70,[2] foi mostrado que as propriedades das soluções poliméricas diluídas dependem do comprimento da cadeia e, por isso, podem ser entendidas por relações de escala[3]. Adicionalmente, propriedades como o coeficiente de difusão, tanto nos regimes diluído como semidiluído, passaram a ser medidas através da análise do espalhamento dinâmico. Outras grandezas, como comprimento de correlação em soluções semidiluídas, tornaram-se acessíveis por espalhamento de nêutrons a baixos ângulos, técnica correlata do espalhamento de luz.

Nas últimas décadas, uma variedade de questões em diferentes sistemas poliméricos foi estudada por espalhamento de luz, como, por exemplo, o comportamento de cadeias livres dentro de redes poliméricas inchadas, a dependência dos raios de giro

e hidrodinâmico com a massa molecular para o poliestireno diluído em benzeno, o comportamento de géis de cadeias flexíveis ou rígidas ou, ainda, a formação de hidrogéis de poliacrilamida[4].

O comportamento de cadeias livres dentro de redes poliméricas inchadas já foi objeto de estudo através de medidas da pressão de inchamento e de espalhamento de raios-X a baixo ângulo. Esses estudos mostraram que as cadeias livres dentro de um gel do mesmo polímero não têm o mesmo comportamento que a solução polimérica, mas se comportam como se fossem cadeias adicionais da matriz[5-7]. Medidas de espalhamento de neutrons a baixo ângulo indicaram, por sua vez, que a cadeia livre dentro da matriz inchada tem uma configuração colapsada que é ainda menor que o tamanho da molécula não perturbada em solvente θ [8,9]. A redução do espaço disponível na matriz faz com que o novelo polimérico encolha como se estivesse em presença de solvente pobre. Além das medidas de pressão de inchamento[5,6], pouco se conhece sobre o efeito da matriz gel na susceptibilidade osmótica das soluções poliméricas, usualmente definida como o inverso do módulo osmótico, K_{osm} .

Através do espalhamento de luz por soluções poliméricas diluídas de poliestireno em benzeno, observou-se que o raio hidrodinâmico não tem a mesma dependência da massa molecular que o raio de giro[10]. Mostrou também que uma solução diluída de macromoléculas pode ser descrita pelo modelo de esferas rígidas que leva em consideração interações hidro e termodinâmicas.

No estudo dos géis de cadeias flexíveis[11-19] tornou-se importante a consideração do alargamento da linha Rayleigh[5-9,20-24]. O comportamento observado em géis de polímeros flexíveis reticulados foi semelhante ao encontrado nas soluções poliméricas diluídas, ou seja, a largura do componente alargado da linha varia de acordo com $\text{sen}^2\theta/2$, podendo o coeficiente de difusão ser calculado da mesma maneira como é calculado para uma solução macromolecular diluída. Nos géis, os pontos de ligação da rede atuam como um oscilador local que contribui com uma componente estática para o espectro de luz dinamicamente espalhada [25]. Segundo a teoria de Tanaka[12] o coeficiente de difusão corresponde a flutuações na densidade que se difundem livremente nos segmentos poliméricos e é igual à

razão do módulo elástico longitudinal pela força por unidade de volume necessária para manter unitária a velocidade relativa entre a rede polimérica e o solvente. Na maioria dos casos, o grau de alargamento da linha Rayleigh é muito pequeno. A maior parte da luz espalhada é devida a flutuações espaciais estacionárias de longo alcance na densidade do segmento polimérico, de modo que os sistemas devem ser investigados como heteródinos. Os coeficientes de difusão encontrados para géis de polímeros flexíveis reticulados são da mesma ordem que os coeficientes de difusão das macromoléculas que se difundem com tempos de relaxação da ordem de μs para a luz espalhada a 90° .

A influência do polímero dissolvido na formação de hidrogéis de poliacrilamida foi estudada por Giglio e colaboradores através de espalhamento de luz estático[4]. O espalhamento de luz dinâmico em sistemas ternários serviu, inicialmente, mais para a medida do coeficiente de difusão do que para a medida da intensidade da luz dinamicamente espalhada, ou seja, a razão Rayleigh. Fazendo o ajuste do índice de refração do solvente e do polímero para anular o sinal da matriz, Bansil[21] analisou o movimento de um polímero dentro do gel. Essa estratégia garantiu que a intensidade da luz espalhada fosse referente somente ao movimento do polímero livre que está dentro da matriz. Também foram feitos estudos sobre a dinâmica de cadeias livres aprisionadas dentro de hidrogéis de biopolímeros[22,23], e aqui, devido à grande diferença entre o índice de refração do solvente e da matriz, as técnicas de ajuste dos índices de refração são, usualmente, problemáticas. É geralmente encontrado que o coeficiente de difusão do polímero aprisionado é menor do que o da solução livre. Para que a termodinâmica da solução seja compreendida, no entanto, faz-se necessária a medida da intensidade de luz dinamicamente espalhada.

O estudo do comportamento dinâmico de misturas poliméricas foi realizado por Borsali[26,27] e Benmouna[28]. Em géis de cadeias rígidas, como o gel do polisacarídeo agarose, que apresenta uma estrutura fibrosa ramificada, morfologicamente diferente da estrutura de soluções diluídas e de géis de polímeros flexíveis reticulados, o grau de alargamento espectral de luz espalhada é menor ainda. Além disso, as funções de autocorrelação não são exponenciais, os tempos de relaxação são muito maiores (da ordem ms) e a largura do componente alargado não varia

com $\text{sen}^2\theta/2$ [22]. Foi sugerido que o pequeno alargamento da linha está associado com arranjos e rearranjos na estrutura filamentosa dos géis. Esses géis podem, portanto, ser considerados quase que completamente estáticos ao nível molecular. A virtual ausência de alargamento da linha espectral facilita a medida do coeficiente de difusão das macromoléculas compactas (como das frações de dextrano medidas neste trabalho) em movimento dentro do gel, tornando possível a investigação de seus espaços intersticiais. Ela permite, ainda, que seja feita uma estimativa de massa média por unidade de comprimento da rede fibrosa.

Apesar do grande número de trabalhos dedicados aos biopolímeros, o estudo da dinâmica molecular desses sistemas ainda é incipiente. Algumas propriedades e transições estruturais em polissacarídeos, como dextrano e agarose, biopolímeros de larga aplicação na pesquisa e indústria, são ainda motivo de certa controvérsia. Nesse sentido, com o objetivo de esclarecer o ponto referente à dinâmica deste sistema, o movimento das cadeias livres de dextrano dentro da agarose foi estudado por espectroscopia de correlação de fótons[29].

1.2 Biopolímeros

1.2.1 Dextrano

O dextrano é um polímero biocompatível e biodegradável produzido em escala industrial e comercializado de acordo com a aplicação almejada, em diferentes massas moleculares[30]. A razão de três grupos hidroxílicos por unidade glicosídica faz com que o polímero seja facilmente modificável através de reações de reticulação ou formação de complexos, obtendo-se, assim, hidrogéis que diferem em suas propriedades e aplicações.

Naturalmente ele é produzido a partir de materiais que contêm sacarose e que não são adequadamente preservados, sendo dessa forma contaminados por bactérias presentes no meio ambiente. Em laboratório, os dextransos são produzidos a partir do crescimento dos organismos e da subsequente purificação da enzima por eles produzida.

Pasteur em 1861 estudou o dextrano, e Scheubler em 1874 determinou sua

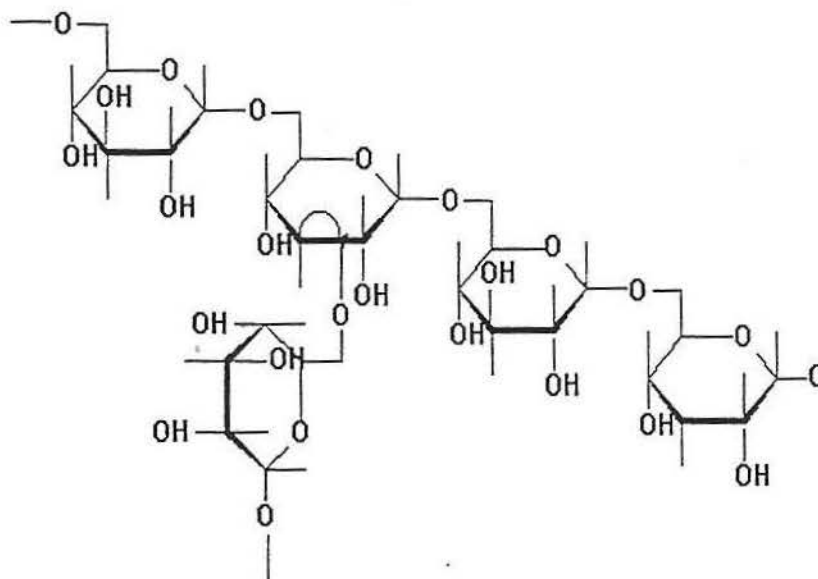


Figura 1.1: Estrutura química do dextrano.

fórmula empírica, tendo-o denominado de dextrano[31].

A estrutura do dextrano, conforme figura 1.1, foi determinada em 1954, época em que a natureza das ramificações, seu comprimento e sua distribuição ainda não tinham sido bem definidas.

Este polímero e seus derivados têm uso importante na fabricação do substitutivo do plasma sanguíneo e de anticoagulante, na manufatura de peneira molecular, aditivos alimentícios, na indústria de explosivos e de gomas de alta viscosidade.

O derivado de dextrano mais largamente usado é obtido pela reação de uma solução alcalina de dextrano com epícloridrina resultando em cadeias reticuladas. O produto é um gel usado como peneira molecular. Matrizes de dextrano reticulado também têm sido usadas como um suporte sólido para fins cromatográficos.

Os mercaptodextranos têm grande afinidade por íons de metal pesado, tais como prata, mercúrio, cobre e ouro. A alta afinidade por íons de metais pesados combinado com a baixa toxidez sugere o seu uso para descontaminação do meio ambiente poluído por esses materiais.

Muitos outros derivados do dextrano como carbonatos, triacetatos, palmitatos, fosfatos, nitratos e éteres benzílicos e hidroxialquílicos, têm uso no encapsulamento e

na manufatura de comprimidos na indústria farmacêutica como agente emulsificante e espessante, em gomas de alta viscosidade, em explosivos, e em condicionadores do solo. Em 1970, o dextrano foi reconhecido como o principal componente da placa dental com participação ativa no desenvolvimento das cáries dentárias.

1.2.2 Agarose

Algas marinhas têm sido usadas pelo homem há mais de dois mil anos [32]. Suas aplicações iniciais foram reservadas a alimentação animal, fertilizantes e, nos séculos XVIII e XIX, como fonte de soda e iodo. Durante os últimos quatro séculos, as algas também têm sido usadas na produção de ficolóides. Esses são os polissacarídeos solúveis em água, obtidos a partir de algas marinhas. Entre eles, os mais importantes na escala econômica são o agar e a agarose extraídos das algas vermelhas do gênero *Gelidium* ou *Gracilaria*[33,34].

O agar é formado por um conjunto de vários polissacarídeos, todos formados por agarobiose, diferindo quanto ao grau de substituintes e às suas propriedades físico-químicas. Por fracionamento físico-químico do agar, segundo Duckworth e Yaphe, é possível separar esses polissacarídeos em diferentes frações: as que apresentarem elevadíssimas propriedades gelificantes e baixíssimo conteúdo de cargas são chamadas de agarose, sendo classificadas em função da natureza, da fonte e dos métodos de extração e do fracionamento.

A estrutura química da agarose é descrita como um dissacarídeo repetitivo idealizado, a agarobiose: $[\rightarrow 3) - \beta - D - \text{galactose} - (1 \rightarrow 4) - 3,6 - \text{anidro} - \alpha - L - \text{galactose} - (1)]_n$, conforme a figura 1.2[32,35,36]. A agarose é caracterizada por apresentar uma baixo grau de substituição com os grupos sulfatos e piruviratos e por conter quantidades variadas de grupos metóxi.

A agarose forma géis firmes, de alta resistência mesmo a baixas concentrações do polímero (menor que 1% em massa) com boa transparência, adquirindo em solução uma conformação mais flexível. Porém, quando o gel se forma, ocorre uma mudança na conformação das moléculas e essas passam por uma transição de novelo para hélice[18]. A transição é verificada quando ocorre um abaixamento da temperatura, na faixa 30 a 40°C.

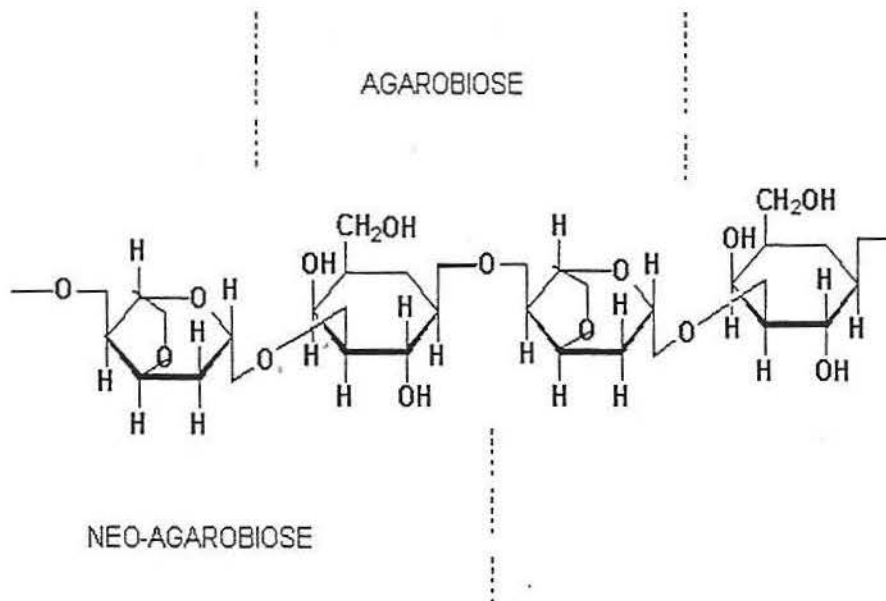


Figura 1.2: Estrutura repetitiva da agarose.

Soluções de agarose quando resfriadas formam géis espontaneamente. A formação do gel é termoreversível, mas mostra certa histerese, isto é, temperaturas de fusão e gelificação não as mesmas, 80-90°C e 30-45°C, respectivamente[32,37]. As propriedades físico-químicas e reológicas desses polissacarídeos estão ligadas a sua estrutura química, massa molecular ponderal média e distribuição da massa molecular.

A agarose é um suporte inerte de origem natural, modificável por síntese orgânica com o mais alto poder de gelificação entre os colóides naturais. Na forma de gel, a agarose mostra quase que ilimitada estabilidade, e nem reagentes nem modificações químicas são necessárias para preservá-la. Assim, evitam-se interferentes nos produtos destinados a técnicas como cromatografia e eletroforese que envolvem agarose.

As aplicações da agarose variam desde seu uso em laboratório até a larga utilização na indústria. Por estar livre de micro impurezas, pode ser usada como meio de cultura para micro-organismos e para o fracionamento de macromoléculas biológicas. Pelo fato de ser um polissacarídeo praticamente neutro, encontra aplicação na bioquímica, na indústria de alimentos e como agente gelificante[38].

Capítulo 2

OBJETIVOS

Os objetivos desse trabalho foram centrados basicamente em duas proposições . A primeira delas foi conhecer o comportamento dinâmico do polímero flexível dextrano, de diferentes massas moleculares, aprisionado como solução aquosa em uma matriz de gel rígido. Esse estudo foi feito de forma a comparar os resultados obtidos para a solução do polímero livre como soluto em água com aqueles obtidos para a solução confinada dentro da matriz rígida de agarose. A metodologia de espalhamento de luz dinâmico através da técnica de correlação de fótons foi usada para avaliar a sua aplicabilidade em sistemas de géis rígidos , os quais podem apresentar luz espalhada heteródina. Posteriormente, a partir da análise da função de correlação , obtivemos os parâmetros dinâmicos do sistema.

A segunda proposição foi, a partir da avaliação das medidas de intensidades de luz dinamicamente espalhada, determinar parâmetros relacionados com o soluto (dextrano) tais como M_w , R_g e também o parâmetro A_2 característico do sistema soluto-solvente. Classicamente esses parâmetros são determinados por medidas de espalhamento de luz estático.

Em relação ao modelo teórico utilizado nesse trabalho, o mesmo constitui-se da adaptação da teoria clássica de espalhamento de luz para sistemas de macromoléculas e géis.

A combinação dos resultados do comportamento dinâmico (D_z) com os da intensidade (R_θ) permitiram a avaliação da influência da matriz de gel rígido sobre a pressão osmótica da solução de dextrano.

Capítulo 3

FUNDAMENTOS TEÓRICOS

As técnicas de espalhamento utilizadas para a caracterização de sistemas poliméricos podem empregar radiação eletromagnética de diferentes comprimentos de onda [24,39]. Podem ser citadas técnicas, como SANS (espalhamento de nêutrons a baixo ângulo), SAXS (espalhamento de raios-X a baixo ângulo), DLS (espalhamento de luz dinâmico) e SLS (espalhamento de luz estático)[40,41]. As técnicas SANS e SAXS são adequadas para obter medidas numa escala que varia de $10 - 10^3 \text{ \AA}$, enquanto os resultados obtidos por DLS e SLS se situam na faixa de $10^2 - 10^4 \text{ \AA}$. Embora o embasamento teórico dessas técnicas seja semelhante, as informações fornecidas por cada uma delas são diferentes no que diz respeito às escalas de magnificação, que podem caracterizar propriedades globais ou locais do sistema.

Quando uma fonte de luz laser monocromática passa através de um meio transparente, essa é espalhada devido às flutuações de densidade (líquidos puros) ou devido às flutuações de concentração (soluções)[42]. Se a luz espalhada é medida num período de tempo muito maior que o tempo característico das flutuações, não há deslocamento na frequência e o espalhamento é dito elástico; as flutuações de densidade nas soluções e suspensões, porém, são dependentes do tempo devido ao movimento browniano das partículas. Assim, a frequência da luz espalhada por tais materiais tem um espectro de frequência característico com dependência temporal das flutuações e do movimento das partículas. Como a diferença entre as frequências da luz espalhada e incidente é pequena, esse tipo de espalhamento é chamado quase elástico[43]. A figura 3.1 representa um experimento esquemático de espalhamento

de luz[39], onde o feixe de luz incidente que passa através de um polarizador p_1 com vetor de propagação k_I é espalhada em todas as direções.

Somente a luz espalhada do vetor de onda k_S com polarização p_S atingem o detector. O ângulo entre k_I e k_S é denominado ângulo de espalhamento θ e os comprimentos de onda da luz incidente e espalhada praticamente não variam. Com base nessas considerações podemos definir geometricamente o vetor de onda q através da lei dos cossenos, conforme segue abaixo:

$$k_I \cong k_S \quad (3.1)$$

onde k_I e k_S são os vetores de propagação da luz incidente e espalhada respectivamente.

$$|k_S| = \left(\frac{2\pi n}{\lambda_o} \right) \quad (3.2)$$

$$q^2 = |k_I - k_S|^2 \quad (3.3)$$

Se o produto escalar

$$k_I \bullet k_S = k_I \bullet \cos \theta \quad (3.4)$$

e

$$k_I = k_S \quad (3.5)$$

$$q^2 = 2k_I^2 - 2k_I \cdot \cos \theta \quad (3.6)$$

$$\left(\pm \sqrt{\frac{1 - \cos \theta}{2}} \right)^2 = \left(\frac{\sin \theta}{2} \right)^2 \quad (3.7)$$

sendo

$$1 - \cos \theta = 2 \sin^2 \frac{\theta}{2} \quad (3.8)$$

Substituindo a equação 3.8 na equação 3.6 chegamos na equação do vetor de espalhamento, definida como

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin \frac{\theta}{2}. \quad (3.9)$$

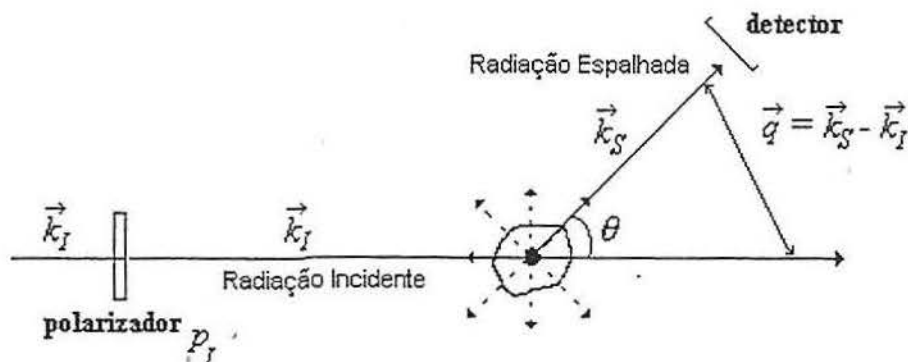


Figura 3.1: Experimento genérico de espalhamento de luz, onde \mathbf{k}_I é o vetor de onda do feixe incidente; p_I é o polarizador; \mathbf{k}_S é o vetor de onda da luz espalhada que será detectada pela fotomultiplicadora e θ é o ângulo de espalhamento. O volume de espalhamento é a região definida pela intersecção do feixe incidente com o feixe espalhado.

onde n é o índice de refração do meio, λ_o é o comprimento de onda da radiação incidente e θ é o ângulo de espalhamento.

O vetor de espalhamento q (cm^{-1}) está relacionado com as dimensões do objeto observado e é diretamente proporcional ao ângulo, conforme figura 3.2, onde ℓ é a dimensão máxima do objeto observado e $\frac{1}{q}$ é a escala de comprimento.

Variando o ângulo de espalhamento e, conseqüentemente, o valor de q , diferentes porções da cadeia podem ser observadas. Isso se traduz na observação de propriedades locais quando $q\ell > 1$ (observação da conformação e movimentos internos da cadeia polimérica) ou de propriedades globais quando $q\ell < 1$ (leis de escala)[3].

No caso do espalhamento DLS ou SLS, o espalhamento de luz ocorre, porque o meio é não-homogêneo. O movimento aleatório das moléculas, como no caso de soluções poliméricas, cria zonas com diferenças de concentração, tendo como conseqüência diferentes constantes dielétricas e índices de refração.

O espalhamento de luz no modo estático (SLS) permite determinar massa molecular (M_W), raio de giro (R_g) e segundo coeficiente virial (A_2). Já as propriedades dinâmicas fornecem o valor do coeficiente de difusão de onde se pode obter o raio hidrodinâmico R_h [2].

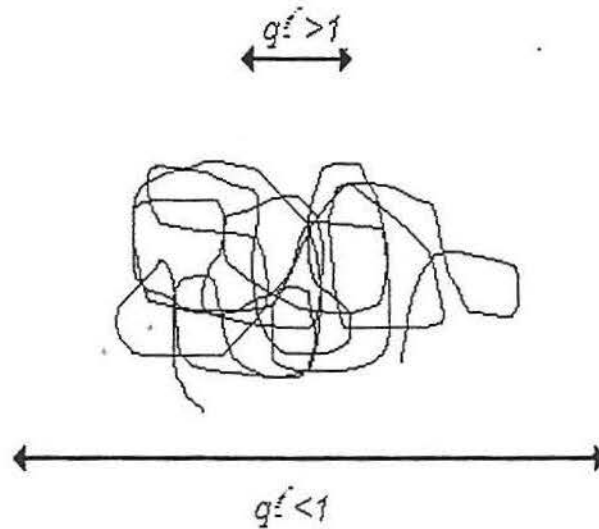


Figura 3.2: Relação entre a dimensão máxima do objeto (ℓ) e o vetor de espalhamento q .

3.1 Espalhamento de luz estático

O desenvolvimento da teoria do espalhamento de luz estático começou em 1871 com Rayleigh, prosseguiu com Smoluchowsky e Einstein e, mais tarde, Debye aplicou-a para soluções de polímeros e de colóides[44].

O espalhamento de luz estático ou clássico (SLS) é um dos métodos mais utilizados para a caracterização de polímeros. As partículas que espalham luz estão em movimento térmico durante a medida, porém a luz espalhada é detectada durante um período de tempo muito mais longo que a escala de tempo do movimento das partículas. A luz espalhada é uma média sobre o número de partículas no volume de espalhamento, ou seja, é uma medida equivalente ao estado estático[2].

Conhecido o incremento do índice de refração do sistema polímero-solvente, dn/dc , a partir de um mesmo experimento, em regime diluído ou com $qL < 1$, a intensidade média da luz espalhada, a diferentes ângulos, para diferentes concentrações, pode ser relacionada com a massa molecular ponderal média (\overline{M}_w), o segundo coeficiente virial A_2 e o raio de giro médio da molécula $\langle R_g^2 \rangle^{1/2}$. A expansão do novolo polimérico e as propriedades termodinâmicas da solução de polímero dependem das interações polímero-solvente, ou seja, o segundo coeficiente virial e o raio de giro são dependentes do solvente.

Os parâmetros \overline{M}_w , A_2 e $\langle R_g^2 \rangle^{1/2}$ são propriedades estáticas da macromolécula solvatada, ou seja, não dependem da dinâmica browniana da cadeia, que é resultante das forças de fricção entre segmentos da cadeia e solvente, desconsiderando as flutuações ou distribuições de frequência.

Se uma partícula opticamente isotrópica for submetida a um campo elétrico de magnitude F e um momento de dipolo p for induzido na partícula, p será paralelo à direção do campo elétrico. A magnitude do momento de dipolo é proporcional à intensidade do campo elétrico, e α é a polarizabilidade da partícula

$$p = \alpha F. \quad (3.10)$$

Rayleigh deduziu uma equação para descrever o espalhamento de luz em gases:

$$R_\theta = \frac{I_S}{I_o} = \frac{16\pi^4 \alpha^2}{\lambda_o^4 r^2} \quad (3.11)$$

onde, R_θ , a razão Rayleigh, é a razão entre I_S , a intensidade da luz espalhada total menos a intensidade da luz espalhada pelo solvente puro dividido pela intensidade da luz do feixe incidente, I_o , r é a distância do centro de espalhamento até o detector. A equação 3.11 não é válida para o espalhamento em soluções macromoleculares[44].

Em solução, as moléculas que espalham luz estão imersas em um solvente, de índice refração n_o , enquanto, em um gás diluído, elas estão livres no espaço, onde o índice de refração é a unidade.

A intensidade da luz espalhada é determinada pelo quadrado do valor médio das flutuações da polarizabilidade da molécula, $\langle \Delta\alpha \rangle^2$. Na solução, as flutuações resultam das flutuações de densidade e concentração. As flutuações de densidade são governadas pela compressibilidade isotérmica $RT(\partial\rho/\partial p)$, e as flutuações de concentração, pela compressibilidade osmótica $RT(\partial c/\partial\pi)$, onde p é a pressão, ρ é a densidade da solução, π é a pressão osmótica e c é a concentração[45].

A polarizabilidade α da equação 3.11 está relacionada com o índice de refração n por

$$\alpha = \frac{n - 1}{n^2 - n_o^2} \quad (3.12)$$

sendo n o índice de refração da solução e n_o o índice de refração do solvente. O numerador da equação 3.12 é a medida da polarizabilidade total por unidade de volume, incluindo a polarizabilidade do solvente. A polarizabilidade α é a diferença entre a polarizabilidade de uma molécula de soluto e uma de solvente. Para soluções diluídas e moderadamente concentradas, as flutuações de densidade são consideradas praticamente iguais às do solvente puro: a diferença entre os índices de refração da solução e soluto são desprezíveis. A aplicação da expansão de Taylor para uma solução diluída resulta em $n^2 - n_o^2 = 2n_o(dn/dc)c$

$$\alpha = \frac{n_o(dn/dc)c}{2\pi N} \quad (3.13)$$

onde $c = N \frac{M_w}{N_A}$ é a concentração do soluto na solução, N é o número de moléculas por unidade de volume, M_w é massa molecular ponderal do soluto e N_A é o número de Avogadro.

A equação 3.11 combinada com a equação 3.13 resulta na equação abaixo, a partir da qual se calcula a intensidade da luz espalhada para N partículas

$$R_\theta = \frac{4\pi^2 c M_w (dn/dc)^2 n_o^2}{\lambda_o^4 N_A r^2} \quad (3.14)$$

onde alguns termos podem ser agrupados como valores constantes para um determinado experimento de espalhamento de luz, do que resulta um fator de contraste ótico para luz incidente verticalmente polarizada igual a

$$K = \frac{4\pi^2 n_o^2 (dn/dc)^2}{\lambda_o^4 N_A} \quad (3.15)$$

e com $\theta_v = 90^\circ$, a expressão pode ser simplificada para

$$\frac{Kc}{R_\theta} = \frac{1}{M_w} \quad (3.16)$$

Essa equação é aplicada no caso limite, onde as interações intermoleculares não sejam consideradas, como em $c = 0$. Uma vez que interações existem para concentrações finitas, é necessário encontrar uma expressão que as considere. Debye e Einstein[2] escreveram a polarizabilidade como

$$\alpha = \alpha' + \delta\alpha \quad (3.17)$$

onde α' é a magnitude da polarizabilidade e $\delta\alpha$ é a flutuação em α . Com argumentos termodinâmicos, pode ser mostrado que a temperatura constante T , a pressão p , o número de espalhadores N e as flutuações em α são relacionadas ao potencial químico, o que pode ser expressado em termos da pressão osmótica da solução. Assim, a na equação básica do espalhamento de luz estático será

$$\frac{Kc}{R_\theta} = \left(\frac{1}{RT} \frac{\partial \pi}{\partial c} \right). \quad (3.18)$$

Ela expressa a dependência da pressão osmótica com a concentração em termos de uma expansão virial, de modo que a equação 3.16 pode ser reescrita como

$$\frac{Kc}{R_\theta} = \frac{1}{M_w} + 2.A_2c + 3.A_3c^2 + \dots \quad (3.19)$$

onde A_2 e A_3 são o segundo e terceiro coeficiente virial, respectivamente, e descrevem o afastamento da equação limite 3.16 causado pelas interações intermoleculares em concentração finita. O terceiro coeficiente virial, por ser muito pequeno, pode muitas vezes ser desprezado, a menos que a moderadas concentrações de soluto ocorra curvatura na dependência da concentração na razão c/R_θ . Na maioria dos casos, os dados de espalhamento são rigorosamente lineares para concentrações razoavelmente grandes[2].

Na década de 40, a teoria para soluções poliméricas diluídas foi apresentada por Flory e Huggins separadamente. O resultado desses trabalhos indicou que cadeias poliméricas poderiam se comportar idealmente ($A_2 = 0$). Essa condição é válida tanto para um par específico polímero-solvente a uma dada temperatura teta (θ) quanto para uma combinação solvente-não solvente chamada de estado teta (θ). Na condição teta, o volume excluído desaparece e uma estimativa segura do raio da partícula a partir de A_2 é impossível. Um número qualquer de cadeias poliméricas pode ser adicionado ao volume, e todas poderiam se misturar identicamente. De uma maneira simplificada, as forças atrativas e repulsivas entre as macromoléculas e o solvente e entre qualquer outro componente da solução se cancelariam[2].

O segundo coeficiente virial, como conseqüência, pode ser descrito em termos das forças entre o solvente e a cadeia polimérica, ou seja, interações polímero-polímero e solvente-polímero. Se a interação polímero-solvente é grande, o novelo estará estendido e o solvente é bom. Nesse caso, A_2 apresenta um valor positivo. De modo oposto, se as forças polímero-polímero dominam as interações na solução, as cadeias podem colapsar inter e/ou intramolecularmente. Neste caso, o segundo coeficiente virial e o volume excluído são negativos. Quando as forças atrativas são dominantes, pode ocorrer separação de fases. Um solvente que produz um valor negativo para A_2 é dito um solvente pobre. Tal como outros parâmetros característicos da macromolécula (raio de giro, viscosidade intrínseca e coeficiente de difusão translacional), o segundo coeficiente virial, para uma série de frações quimicamente homogêneas, pode ser expresso em termos da massa molecular como

$$A_2 = k\overline{M}_w^b \quad (3.20)$$

onde o pré fator k depende da natureza química do polímero e do solvente, e o expoente b depende do solvente e da forma do polímero. Em bom solvente, para cadeias lineares e flexíveis, o valor teórico de b está entre -0.20 e -0.30.

A equação 3.19 é válida para qualquer tipo de partícula que espalhe luz com dimensões menores que $\lambda/20$ e, nesse sentido, a razão Rayleigh será independente do ângulo se for feita uma correção de volume tal que

$$v_s = v_\theta \sin \theta \quad (3.21)$$

onde v_θ é o volume de espalhamento no ângulo θ , e v_s é o volume de espalhamento em $\theta = 90^\circ$.

Se a partícula que espalha luz é maior que $\lambda/20$, diferentes pontos da partícula estarão sujeitos a diferentes intensidades do campo elétrico, o que determinará a ocorrência de diferenças de fase entre a radiação espalhada por dois centros espalhantes p_1 e p_2 . A distância entre dois centros espalhantes pode ser expressa pelo ângulo de espalhamento segundo a equação 3.9.

Essas diferenças de fase entre os vários pares de centros espalhadores de luz causam interferência destrutiva da luz espalhada. A intensidade da luz espalhada

apresenta dependência angular conforme a equação 3.21, devido à diferença entre os comprimentos dos caminhos do espalhamento dos dois centros que espalham luz, apresentando valor máximo quando o ângulo de espalhamento é zero e diminuindo conforme aumenta o ângulo de observação. Essa dependência angular é sensível à forma das partículas individuais e também ao arranjo das moléculas em solução mais concentrada. Para soluções diluídas somente a partícula espalhante é relevante, sendo a dependência angular descrita pelo fator forma da partícula. Essa redução na intensidade é o fator forma e é representado por $P(\theta)$ [45,46]

$$P(\theta) = \frac{R_\theta}{R_0}, \quad (3.22)$$

onde $R(\theta)$ é a intensidade de espalhamento a ângulo finito e R_0 é a intensidade de espalhamento a ângulo zero.

O fator forma $P(\theta)$ depende da forma geométrica da partícula que espalha luz ou da forma média no caso de partículas flexíveis. No entanto, $P(\theta)$ torna-se independente da forma geométrica das partículas quando θ se aproxima de zero e esta condição limite vem a ser a medida do raio de giro da partícula. É preciso realizar o experimento em regime diluído e é necessário que os dados obtidos para cada ângulo sejam extrapolados à concentração zero para o cálculo do raio de giro. Ao mesmo tempo, também é necessário extrapolar os dados de cada concentração para ângulo zero de forma a se obter a massa molecular ponderal média M_w e o segundo coeficiente virial A_2 [44].

Desprezando os termos maiores que os de segunda ordem, $P(\theta)$ é dado por

$$\lim_{q \rightarrow 0} P(\theta) = 1 - q^2 \langle R_g^2 \rangle / 3 \quad (3.23)$$

e $\langle R_g^2 \rangle$ é o raio de giro quadrático médio da partícula.

Correções devidas às interações $P(\theta)$ inter e intramoleculares foram feitas por Zimm e fornecem[2]

$$\frac{K_c}{R_\theta} = \frac{1}{M_w} \left[1 + \frac{16\pi^2 n_o^2}{3\lambda_o^2} \langle R_g^2 \rangle \sin^2 \frac{\theta}{2} \right] + 2A_2 c. \quad (3.24)$$

O valor da massa molecular ponderal média (M_w), do segundo coeficiente virial

(A_2) e do raio de giro (R_g^2) podem ser obtidos pelo método de Zimm. Tal método é aplicado, traçando-se um gráfico $\frac{Kc}{R_\theta}$ versus $\sin^2\theta/2 + kc$, onde k é uma constante arbitrária para separar graficamente as curvas de espalhamento individual a diferentes concentrações. Extrapolando os dados para $\theta = 0$, obtém-se um gráfico de $\frac{Kc}{R_\theta}$ versus kc , o qual através da equação 3.19 fornece $1/M_w$, inverso da massa molecular ponderal, como resultado da intersecção com o eixo das ordenadas. Já $2A_2/k$, o dobro do segundo coeficiente virial dividido por k é a inclinação dessa reta. Extrapolando os mesmos dados para $c = 0$, obtém-se um gráfico de $1/R_\theta$ versus $\sin^2\theta/2$. A intersecção desse gráfico é a mesma que a anterior, $1/M_w$, e a inclinação limite é a medida do raio de giro R_g .

3.2 Espalhamento de luz dinâmico

Nos últimos vinte anos, as modernas técnicas de espalhamento de luz dinâmico tornaram-se extremamente sofisticadas e suas aplicações muito diversificadas [47,48].

O estudo do espalhamento de luz dinâmico data de 1914 quando Leon Brillouin publicou uma curta nota teórica descrevendo a distribuição das frequências da luz espalhada das flutuações de densidade termicamente excitadas em um corpo isotrópico.

Gross fez a primeira determinação experimental da distribuição de frequência da luz espalhada por um líquido, observando uma linha central além do dublete de Brillouin. Landau e Placzek, em 1933, explicaram a linha central devendo-se a flutuações de densidade por flutuações da entropia que não se propagam a pressão constante.

Vários grupos de pesquisa nos anos seguintes estenderam e aplicaram a teoria para estudar espalhamento em corpos viscoelásticos, superfícies e espalhamento despolarizado. A grande dificuldade constituiu-se na obtenção de resultados experimentais confiáveis e precisos devido ao uso de fontes óticas clássicas combinadas com técnicas de detecção fotográfica.

Com o desenvolvimento do laser na década de 1960 combinado com o uso de sistemas de detecção do tipo fotomultiplicadores, as técnicas de espalhamento de luz

dinâmico obtiveram uma rápida evolução. O desenvolvimento de fontes a laser cada vez mais estáveis e sofisticados permitiram a medida de deslocamento de frequências menores do que megahertz, capaz de detectar linhas de espalhamento muito fracas.

Em 1964, Robert Pecora, tendo revisado a bibliografia existente na época, formulou uma teoria com base na função de correlação, introduzindo a técnica de espalhamento de luz quase elástico ou espectroscopia de correlação de fótons. O destaque foi a possibilidade de medir deslocamentos de frequências muito pequenos que, para a luz espalhada por soluções diluídas de macromoléculas, informam sobre a difusão das mesmas.

Foi mostrada teoricamente a utilidade do espalhamento de luz quase elástico para caracterizar a dinâmica translacional, rotacional e interna das cadeias poliméricas.

As técnicas "*optical beating*" foram introduzidas por Forrester, Gudmunsen e Johnson em 1955, como uma alternativa para a espectroscopia convencional de alta resolução. Cummins, Knable e Yeh imaginaram que variações da técnica discutida por Forrester poderiam ser usadas para medir as pequenas mudanças na frequência previstas por Pecora em espalhamento de luz em soluções macromoleculares diluídas. Com um laser He-Ne como fonte de luz e usando a chamada técnica heteródina "*optical beating*" eles mediram o coeficiente de difusão de esferas de látex de poliestireno dispersas em água. Depois Ford e Benedek, mediram a difusividade térmica do SF_6 próximo de seu ponto crítico, usando técnica homódina "*optical beating*". Alpert, Yeh e Lipworth da Universidade de Columbia estudaram o decaimento da flutuação de concentração de uma mistura líquida binária próximo ao seu ponto consolutivo.

Gradualmente os analisadores de espectro, inicialmente utilizados como filtros de pós-deteção, foram substituídos por autocorreladores, e novos termos surgiram para designar esse tipo de estudo, tais como espectroscopia de flutuação de intensidade e espectroscopia de correlação de fótons. Espectroscopia de correlação de fótons é uma técnica digital para medir as flutuações de intensidade onde um número de fótons chega ao detector num intervalo de tempo. Esse número de fótons é contado repetidamente e sua função de autocorrelação temporal é computada. Técnicas de correlação digital melhoram em muito a razão sinal-ruído em experimentos de espalhamento de luz dinâmico.

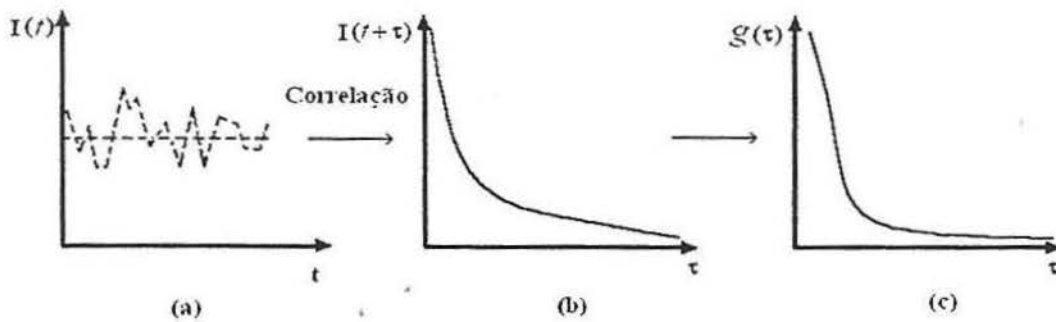


Figura 3.3: a) Flutuação da intensidade da luz espalhada (dados brutos); b) Função de correlação de intensidade normalizada; c) Função de correlação do campo elétrico da luz espalhada.

Na década de 70, foram escritas importantes monografias sobre espalhamento de luz dinâmico. Em uma delas, Benjamin Chu[39] enfatizou o aspecto experimental, e, na outra, Berne e Pecora enfocaram o aspecto teórico[24,48].

3.2.1 Fundamentos do espalhamento de luz dinâmico

Espalhamento de luz dinâmico, também chamado de espalhamento de luz quase-elástico, estuda as flutuações temporais da concentração numa escala de tempo menor que 10^{-6} s. Através da análise da distribuição de frequência das flutuações de concentração, obtém-se o coeficiente de difusão translacional das moléculas ou partículas. Uma vez obtidos os sinais das flutuações de intensidade de luz espalhada no tempo, esses são correlacionados por uma função de autocorrelação, que é uma medida da similaridade entre duas quantidades. Por meio da aplicação da transformada de Fourier na curva de correlação, obtém-se o espectro de flutuação das frequências (Figura 3.3).

As partículas que espalham luz estão numa faixa de tamanho relativamente estreita e, por isso, apresentam velocidades similares seja qual for a direção de seus movimentos aleatórios. Devido a essa similaridade, a luz espalhada é correlacionada no tempo.

A função de autocorrelação entre os sinais $I(t)$ e $I(t + \tau)$ é definida como

$$G(\tau) = \lim_{2t \rightarrow \infty} \left[\frac{1}{2t} \int_{-t}^t I(t)I(t + \tau)dt \right] = \langle I^2 \rangle (1 + g^2(\tau)) \quad (3.25)$$

onde $2t$ é o tempo total das medidas, t o tempo inicial de cada medida, e $I(t + \tau)$ é a forma do sinal $I(t)$ depois de um tempo de retardo τ . Do gráfico da função de correlação $g(\tau)$, obtém-se o tempo de relaxação definido como o tempo médio para uma molécula difundir sobre uma distância $1/q$ e dado por

$$\tau = \frac{1}{D_z q^2}. \quad (3.26)$$

A aplicação da transformada de Fourier na função de correlação resulta num espectro de intensidade em função da frequência, aproximada por

$$I(\omega) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} \exp i\omega t \langle E(t)E(t + \tau) \rangle dt \quad (3.27)$$

onde $I(\omega)$ é a "quantidade" do sinal I que está na frequência ω , sendo $I(\omega)$ denominada densidade espectral. As funções $I(\omega)$ e $E(t)E(t + \tau)$ são transformadas de Fourier uma da outra de modo que, a partir da determinação experimental de uma, tem-se a outra[24].

No caso de partículas esféricas que se movem em um fluido e que não interagem entre si, bem como no caso de soluções monodispersas, onde $qR_g \ll 1$, a função de correlação é definida como

$$g(\tau) = A \exp(-\Gamma t) \quad (3.28)$$

onde Γ é dado por

$$\Gamma = D_z q^2. \quad (3.29)$$

O termo D_z é o coeficiente de difusão translacional. Γ , chamado de taxa de relaxação, também pode ser obtido por meio do ajuste dos dados experimentais da correlação por uma curva gaussiana ou lorentziana, sendo Γ a meia largura à meia altura da curva da distribuição de frequências, conforme figura 3.4.

Conhecendo-se os parâmetros para o cálculo de q , o coeficiente de difusão translacional D_z pode ser calculado. Esse coeficiente de difusão translacional aparente é

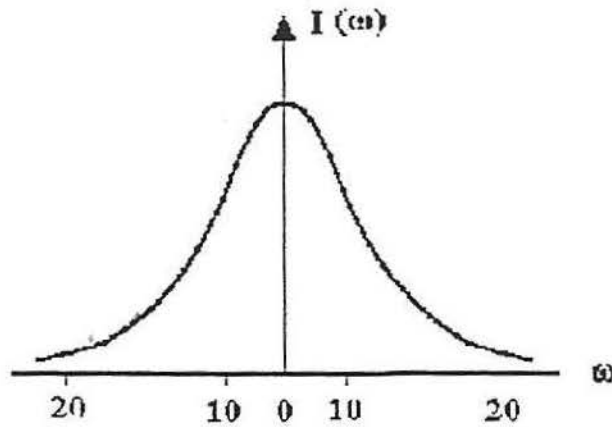


Figura 3.4: Espectro de correlação no domínio da frequência.

um valor médio, considerando-se que ele seja o mesmo para todos os valores de q . Através do coeficiente de difusão translacional podem ser determinadas certas propriedades das partículas ou moléculas das soluções e dispersões[43,49,50].

Na parte (a) da figura 3.3, estão representadas as flutuações de intensidade da luz espalhada. Aplicando-se a equação 3.25, obtém-se a função de correlação das intensidades no domínio do tempo, figura 3.3 parte (b), de onde se obtém o valor do tempo de relaxação τ , e aplicando a transformada de Fourier na equação 3.25, temos a função de correlação de campo elétrico no domínio do tempo, parte (c) da figura 3.3.

Para cada ângulo medido há um valor para Γ , de modo que o coeficiente de difusão será um valor constante para macromoléculas suficientemente pequenas. Se o gráfico de $\Gamma(q^2)$ for linear passando pela origem, significa que temos um único centro de massa se difundindo. Nesse caso, o coeficiente de difusão translacional refere-se somente a relaxações intramoleculares, de modo que $qL < 1$.

Porém D_o também é dependente da concentração, podendo ser obtido desde que se determine o coeficiente de difusão para cada concentração e se extrapolando a $q \rightarrow 0$ e a $c \rightarrow 0$. Ou seja,

$$D_o = \left(\frac{\Gamma}{q^2} \right)_{q \rightarrow 0} \quad (3.30)$$

Para o valor de D_o , isto é, coeficiente de difusão translacional à diluição infinita

extrapolado para ângulo zero, vale a relação de Stokes-Einsten

$$D_o = \frac{kT}{6\pi\eta R_h} \quad (3.31)$$

da qual se pode calcular o raio hidrodinâmico R_h que corresponde ao raio de uma esfera compacta que apresenta o mesmo coeficiente de difusão do polímero em estudo. Na equação 3.31, k é a constante de Boltzmann, T é a temperatura da solução em Kelvin, e η é a viscosidade do solvente.

Da inclinação do gráfico de $D_o = \left(\frac{\Gamma}{q^2}\right)_{q \rightarrow \infty}$ versus c (concentração) obtém-se o coeficiente k_D , conhecido como coeficiente dinâmico.

No caso de soluções moleculares onde fortes interações das moléculas com solvente estão presentes, grandes efeitos da concentração podem ocorrer de modo que

$$D_t = D_o(1 + k_D C + \dots) \quad (3.32)$$

onde

$$k_D = 2A_2M - k_f - (N_A V_1/M) \quad (3.33)$$

sendo M a massa molecular, k_f o coeficiente de fricção de primeira ordem, e V_1 o volume molecular do polímero. Se o solvente for solvente teta, $A_2 = 0$ e k_D terá valor negativo. A relação de k_D com as propriedades moleculares pode ser estabelecida através do cálculo do diâmetro hidrodinâmico d_h .

Para moléculas em forma de bastões rígidos a difusão rotacional também pode ser medida por espalhamento de luz. A densidade espectral total $S(\mathbf{q}, \omega)$ para tais partículas é

$$S(\mathbf{q}, \omega) = S_{trans}(\mathbf{q}, \omega) + S_{rot}(\mathbf{q}, \omega) + S_{trans+rot}(\mathbf{q}, \omega) \quad (3.34)$$

onde os termos são, respectivamente, as contribuições translacionais, rotacionais e translacionais misturadas com rotacionais. O termo \mathbf{q} é o vetor de onda, e ω é a frequência[43].

3.2.2 Espalhamento de luz dinâmico em géis de agarose

O sinal proveniente da amostra é registrado pelo detector como valor quadrático do módulo dos campos elétricos estático e dinâmico, ou seja, a intensidade da luz espalhada dinamicamente segundo a função de correlação da intensidade.

O feixe incidente de luz monocromática laser tem comprimento de onda, frequência, fase e amplitude bem definidos. Depois da incidência da luz sobre a amostra em estudo, ocorrem interferências construtivas e destrutivas que alteram a fase e amplitude das ondas eletromagnéticas iniciais. O feixe de luz espalhada traduz as propriedades do sistema em estudo.

Os movimentos da matriz de agarose, a qual é formada por bastões rígidos, são extremamente lentos quando comparados com o movimento do polímero livre dextrano, que está aprisionado dentro da matriz, sendo considerado que a luz espalhada pela rede é puramente estática, variando sua intensidade de espalhamento conforme a parte da amostra que é observada. A matriz de agarose espalha a luz fortemente sendo, por isso, necessário o uso de um atenuador no caminho óptico do feixe incidente. Se a taxa de contagem recebida pelo detector for muito alta, ocorre saturação da fotomultiplicadora, e os dados de intensidade de luz espalhada perdem sua confiabilidade[51].

A intensidade total da luz dinamicamente espalhada é dada pelas seguintes contribuições:

$$I(t) = [E_S + E_f(t)] \times [E_S^* + E_f^*(t)] \quad (3.35)$$

A parte da amostra selecionada para análise e que é vista pelo detector apresenta um padrão de espalhamento característico com uma amplitude e uma fase de campo elétrico estático E_S constantes. Na equação 3.35, E_S representa o campo elétrico estático, E_f o campo elétrico flutuante do polímero móvel dextrano que está se difundindo dentro da matriz gel de agarose, e o produto $E_S \times E_f$ representa as interferências entre os campos elétricos estático e flutuante, os quais variam no tempo, mas têm intensidade média zero.

Resolvendo os produtos acima e considerando que

$$I_S = |E_S|^2 \quad (3.36)$$

e

$$I_f = |E_f(t)|^2 \quad (3.37)$$

tem-se que

$$I_t = I_S + I_f(t) + E_S \times E_f^*(t) + E_f(t) \times E_S^* \quad (3.38)$$

onde os * indicam o complexo conjugado.

Para um determinado padrão de espalhamento, a intensidade estática I_S da matriz rígida é constante, e a intensidade dinâmica da flutuação da concentração do polímero flexível varia no tempo conforme as excitações ou tensões térmicas modifiquem a distribuição de concentração na amostra.

O sinal que é captado pelo detector é referente ao dextrano, isto é, ao polímero móvel que se difunde dentro da matriz rígida. Porém esse sinal sofre pequenas interferências da matriz. A mistura do campo elétrico estático do oscilador local (matriz rígida) com o campo elétrico flutuante que vem do polímero livre faz com que o sistema deva ser tratado como heteródino. Existe um termo de interferência que flutua no tempo e que tem uma intensidade média zero. Para o sistema ser considerado homódino, a luz espalhada deveria ser totalmente proveniente das flutuações de concentração da solução de dextrano mais água, mas existe um contribuição heteródina da matriz.

Existem variações entre um padrão de espalhamento e outro, o que caracteriza a não ergodicidade da matriz rígida. A solução de dextrano é um sistema completamente ergódico, ou seja, a média das propriedades da luz espalhada em um conjunto estatístico de padrões de espalhamento deve coincidir com os valores médios dessas propriedades tomando as flutuações no tempo de um único padrão de espalhamento. As propriedades da luz espalhada verificadas para um único padrão de espalhamento devem ser representativas de todos os padrões de espalhamento[52].

A contribuição dinâmica da matriz é desprezível quando comparada à contribuição dinâmica da solução de dextrano, pois, na temperatura em que foram feitas as medidas, $25^\circ C$, os movimentos são considerados como que congelados e o que foi medido é então referente à parte móvel, ou seja, à difusão da solução de

dextrano.

O tempo de relaxação característico da função de correlação é obtido da flutuação da intensidade $I_f(t)$ da equação 3.38, levando em conta as equações 3.36 e 3.37:

$$E_f(0) \times E_f^*(\tau) = |E_f(0)|^2 \times g(\tau) \quad (3.39)$$

Para um polímero flexível em regime diluído que segue a equação de difusão de Fick, a função de correlação do campo elétrico flutuante é uma simples exponencial expressa pela equação 3.56[53,54].

A equação 3.56 envolve somente flutuação temporal da concentração. Qualquer flutuação espacial permanente no sistema vai contribuir para o espalhamento estático, não tendo contribuição no espalhamento dinâmico. Num tempo de relaxação inicial $\tau = 0$, a função de correlação tem seu valor máximo $g(\tau) = 1$ e, em um tempo de relaxação muito grande $\tau \rightarrow \infty$, a função de correlação tem seu valor mínimo $g(\tau) \rightarrow 0$.

O coeficiente de difusão do polímero livre (dextrano) pode ser obtido a partir do decaimento inicial da função de correlação através de diferentes tratamentos matemáticos, tais como método dos cumulantes ou decomposição em uma série finita de exponenciais[55]. Nos resultados aqui apresentados e discutidos, o espectro foi decomposto com razoável precisão em uma simples soma de duas ou três exponenciais, conforme a massa molecular do polímero. A distribuição do tempo de relaxação é obtida aplicando-se a inversão do algoritmo de Laplace à respectiva função de correlação que seria uma função δ , mas que sofre um pequeno alargamento devido a certos parâmetros usados na inversão. A altos ângulos, o componente menos rápido observado provém da combinação dos modos internos e da difusão translacional. A dependência linear da taxa de relaxação do componente principal (Γ_{lento}) com o vetor de espalhamento indica que esse modo tem caráter difusivo[54].

A intensidade de luz espalhada pelo sistema dextrano-agarose-água foi analisada, considerando-se que a matriz rígida confere caráter heteródino ao espectro de luz espalhada. Com espalhamento de luz estático constante, o espectro de correlação da intensidade $I(t)$ é

$$\frac{1}{t_E} \int I(t)I(t + \tau)dt = I_S^2 + 2I_S\langle I_f \rangle + \langle I_f \rangle^2[1 + \beta g^2(\tau)] + 2I_S\langle I_f \rangle\beta g(\tau) \quad (3.40)$$

onde os $\langle \rangle$ indicam que os valores foram tomados como um valor médio durante um certo tempo de acumulação t_E . β pode assumir valores menores ou iguais a 1, constituindo-se no fator de coerência do arranjo óptico do equipamento. A função de correlação da intensidade do componente dinâmico, ou seja, referente ao movimento do dextrano, obedece à relação de Siegert

$$\frac{\langle I_f(0)I_f(\tau) \rangle}{\langle I_f \rangle^2} = 1 + \beta g^2(\tau) \quad (3.41)$$

Porém, quando a luz espalhada é proveniente de um gel rígido, é preciso que se considere que o padrão de espalhamento pode evoluir com o tempo e, por esse motivo, a intensidade estática I_S não pode ser vista como um termo realmente constante durante todo o período de acumulação dos dados de intensidade da luz espalhada. Com base nessa constatação as noções de valores médios do *ensemble* e de sistemas não ergódigos foram bastante estudados no passado. Qualquer variação temporal que ocorra na intensidade estática, I_S , causada, por exemplo, por relaxações térmicas da matriz gel, deve ser considerada na equação 3.2.2 para que se obtenha uma correta análise dos dados. Nos dados que aqui estão sendo discutidos e analisados, assumiu-se que essa variação é extremamente lenta para ser distinta das flutuações rápidas em I_f , devidas ao movimento da solução do polímero livre. O trabalho de Sellen[22,56] mostrou que a variação na intensidade estática pode gerar uma segunda função de correlação dada por

$$\langle I_s(0)I_s(\tau) \rangle = \langle I_S \rangle^2 = g_2(\tau) \quad (3.42)$$

Em todos os experimentos que estão aqui sendo apresentados, $g_2(\tau)$ foi suficientemente lento de modo que o decaimento do polímero livre, $g_1(\tau)$, foi completado

antes do último canal do correlador, forçosamente bem antes do “far point” do correlador. O tempo de decaimento do polímero livre é muito menor do que o tempo de decaimento do polímero que está confinado na matriz de agarose. Na equação 3.43, a média temporal de I_S , ou seja, $\langle I_S^2 \rangle$ determina a linha de base efetiva, em relação a qual o espectro de correlação decai, ou seja, o “far point” do correlador é dado por

$$fp = \frac{1}{t_E} \int I(t)I(t+t_\infty)dt = \langle I_S^2 \rangle + 2\langle I_S \rangle \langle I_f \rangle + \langle I_f \rangle^2 \quad (3.43)$$

onde t_∞ é o tempo de retardo do último canal do correlador.

Se o padrão de espalhamento evolui significativamente durante o tempo de acumulação, o valor do “far point” pode assumir valores maiores do que a linha de base do computador, onde a linha de base do computador, dada pelo quadrado da intensidade média

$$\langle I \rangle^2 = \langle I_S + I_f \rangle^2 = \langle I_S \rangle^2 + 2\langle I_S \rangle \langle I_f \rangle + \langle I_f \rangle^2 \quad (3.44)$$

A diferença entre o “far point” e a linha de base, $\langle I_S^2 \rangle - \langle I_S \rangle^2$, é uma propriedade particular de cada padrão de espalhamento. Nos experimentos aqui realizados, o valor da intensidade estática $\langle I_S \rangle$ não foi calculado, mas os valores da $\langle I_f \rangle$ e $g(\tau)$ são de importância fundamental. Para calculá-los, é necessário subtrair o valor do “far point” da função de correlação $g(\tau)$, ou seja, o nível para o qual as flutuações de concentração deveriam relaxar. Uma vez feita a subtração, deve-se dividir o resultado pela linha de base do computador. Assim, a função de correlação de intensidade medida $G(\tau)$ é definida como

$$H(\tau) = G(\tau) - \frac{\langle I_S \rangle^2 + 2\langle I_S \rangle \langle I_f \rangle + \langle I_f \rangle^2}{\langle I \rangle^2} \quad (3.45)$$

$$H(\tau) = \beta[2X(1-X)g(\tau) + X^2g^2(\tau)] \quad (3.46)$$

onde $H(\tau)$ é a nova função que tende a zero para longos tempos τ , e X é a razão da flutuação da intensidade total

$$X = \frac{\langle I_f \rangle}{\langle I_f + I_S \rangle} \quad (3.47)$$

O valor de β é calculado estimando-se a intensidade da função de correlação $G(\tau)$ em $\tau = 0$ para uma suspensão diluída de esferas de látex. Se for assumido que toda a intensidade de luz espalhada é originária somente do componente móvel, ou seja, do meio homódino, então $X = 1$. Em consequência disso, a função de correlação é escrita segundo a equação 3.56, onde para $\tau = 0$, resulta em

$$G(0) = 1 + \beta. \quad (3.48)$$

Para o presente arranjo ótico, $\beta = 0,96$. O arranjo ótico não muda no decorrer do experimento durante a troca das amostras. Nesse caso, a equação 3.43, que é válida para o caso heteródino, é solúvel para X e $g(\tau)$ [57]. A partir do valor de X é possível calcular a flutuação da intensidade por

$$I_f = X \langle I \rangle \quad (3.49)$$

onde $\langle I \rangle = \langle I_f + I_S \rangle$ é a intensidade total média medida sobre tempo experimental de observação t_E .

Como a parte flutuante do sinal vem do sistema ergódico, a solução polimérica de dextrano que está dentro da matriz rígida de agarose, não é necessário calcular um valor médio do deslocamento do padrão de espalhamento[11,15,57,58]. Para obter o valor absoluto da intensidade flutuante, R_θ , foi necessário medir a transmissão Tr das amostras e também a intensidade espalhada $I_S = R_v I_o$ da uma amostra padrão, como, por exemplo, do tolueno. R_v é a razão Rayleigh do padrão, e I_o é a intensidade do feixe incidente. A partir dos dados, chega-se à

$$R_\theta = \frac{R_v X \langle I \rangle}{I_S Tr} \sin \theta \quad (3.50)$$

onde θ é o ângulo de espalhamento. A intensidade incidente do feixe laser I_o foi a mesma para as medidas da amostra e do padrão. Nos hidrogéis de agarose usados nas presentes medidas, os valores de Tr foram sensivelmente menores que 1[29] e

$$Tr = 10^{-d} \quad (3.51)$$

onde d é a densidade óptica das amostras.

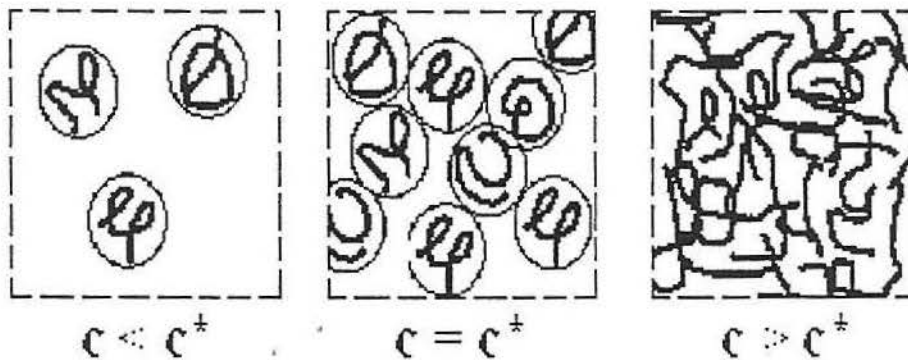


Figura 3.5: Representação esquemática dos regimes de concentração segundo De Gennes.

3.3 Regimes dinâmicos

Podem ser considerados três regimes dinâmicos de concentração para uma solução polimérica: o regime diluído, o regime semidiluído e o regime concentrado. Nos restringiremos a discutir brevemente os regimes diluídos e semidiluído.

3.3.1 Regime diluído

O regime diluído é aquele em que $c < c^*$, ou seja, onde a concentração das cadeias poliméricas é mais baixa que a concentração crítica c^* , que é definida como a concentração na qual os novelos poliméricos começam a se tangenciar, conforme figura 3.5.

De Gennes propôs que a transição do regime diluído para o semidiluído passa por uma região crítica. As moléculas começam uma aproximação extremamente tênue sem que haja, em hipótese alguma, qualquer traço de interpenetração intermolecular, ou seja, $c = c^*$ [3]. O valor de c^* teoricamente é dado por

$$c^* \cong \frac{N}{R^3} = \frac{N}{(aN^\nu)^3} = a^{-3}N^{1-3\nu} \quad (3.52)$$

onde N_p é o grau de polimerização, R é a distância média entre as extremidades da cadeia, a é o comprimento do segmento polimérico, e o valor de ν varia de acordo com a qualidade do solvente, assumindo valor igual a $3/5$ para bom solvente e $1/2$ para solvente θ . Para fins práticos, o valor de c^* é determinado por diferentes formas

segundo as equações abaixo:

$$c^* = 1/\eta \quad (3.53)$$

$$c^* = 3M_w/4\pi N_A R_g^3 \quad (3.54)$$

$$c^* = 1/A_2 M_w \quad (3.55)$$

Das equações 3.53, 3.54 e 3.55 resultam valores para c^* bastante divergentes entre si, uma vez que a transição do regime diluído para o semidiluído não foi definida de forma unívoca por De Gennes[3,49].

No regime diluído a intensidade da luz dinamicamente espalhada depende do ângulo de espalhamento e da massa molecular. Dependendo da escala de comprimento, a qual é expressa através do ângulo de observação, podem ser analisados os seguintes regimes que são: $qR_g \ll 1$, $qR_g \gg 1$ ou $1 \ll qR_g < q$.

No primeiro caso, conforme mostrado esquematicamente na figura ??, $R_g \ll \frac{1}{q}$. Quando a escala de comprimento, $\frac{1}{q}$, for muito maior que R_g , a cadeia polimérica é vista pela fotomultiplicadora como um todo, e o coeficiente de difusão translacional pode ser medido. No segundo e terceiro casos, uma região no interior da molécula é analisada, ou seja, são analisados os modos intramoleculares. As dificuldades de análise são maiores, porque os modos intramoleculares são muito mais rápidos do que os modos referentes ao movimento da molécula como um todo.

A função de correlação decresce de maneira exponencial com um tempo de relaxação $1/Dq^2$

$$g(q, \tau) = e^{-D_t q^2 \tau} \quad (3.56)$$

Para partículas dispersas em um solvente homogêneo, o coeficiente de difusão é dado pela relação de Einstein, equação 3.31[45].

Se considerarmos partículas esféricas com raio hidrodinâmico R_h em um solvente com viscosidade η_S , o coeficiente de fricção entre a molécula e o solvente é dado pela lei de Stokes

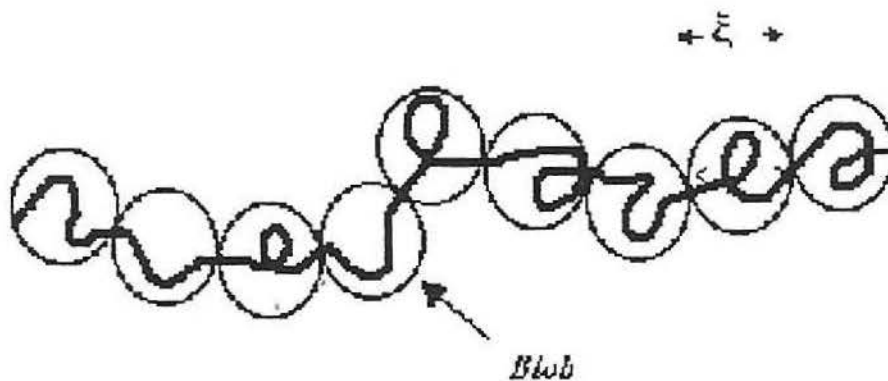


Figura 3.6: Representação esquemática de uma cadeia polimérica no regime semidiluído, onde ξ é o comprimento da correlação.

$$f = 6\pi\eta_S R_h \quad (3.57)$$

Considerando a não existência de interações entre as partículas, o comportamento das soluções poliméricas diluídas pode ser descrito pela equação

$$\frac{\Pi}{RT} = \frac{c}{N} + A_2 c^2 + \dots \quad (3.58)$$

onde Π é a pressão osmótica, R é a constante universal dos gases, e T é a temperatura.

3.3.2 Regime semidiluído ($c > c^*$)

Quando a concentração da solução aumenta, as cadeias poliméricas se aproximam e começam a se entrelaçar ou se interpenetrar. De Gennes desenvolveu o conceito de "blob" para descrever este entrelaçamento que caracteriza o regime semidiluído. Cada cadeia é dividida em "blobs" esféricos, conforme figura 3.6. Dentro de cada uma dessas esferas, o comportamento é considerado comportamento de volume excluído. No interior de cada "blob" os movimentos estão correlacionados, mas um "blob" não se correlaciona com o outro. As flutuações totais da cadeia são devidas a cada "blob" e, fora deste, considera-se não existir nenhum tipo de interação.

O diâmetro de cada “blob” ou esfera é definido como uma grandeza chamada de comprimento de correlação ξ que depende somente da concentração e não do grau de polimerização. O comprimento do “blob” é proporcional à concentração $c^{-\nu}$, sendo que ν é igual a 1 em solvente θ e 3/4 em bom solvente. Quando maior a concentração, menor será o tamanho do “blob” para que se mantenha o princípio de não interação intermolecular.

Para soluções em regime semidiluído, a expansão virial não é mais válida, sendo resumida a

$$\frac{\Pi a^3}{RT} = b\Phi^{9/4} \quad (3.59)$$

onde Φ é a fração em volume que é proporcional a $1/\xi^3$, e b é uma constante.

O Φ não depende da massa molecular, uma vez que somente o que está no interior do *blob* interessa. No regime semidiluído, o *blob* ou esfera se desloca dentro de uma rede onde ξ é o tamanho de cada malha da rede[3,45,59,60].

Capítulo 4

PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4.1 Desafios experimentais

Para a determinação do coeficiente de difusão e da razão Rayleigh da solução de dextrano que se difunde dentro da matriz, é indispensável a abordagem de dois aspectos, que são discutidos a seguir.

Quando a matriz gel e o solvente têm o mesmo índice de refração, o efeito da matriz é anulado e pode-se facilmente medir as propriedades relativas ao polímero livre[21]. Os géis rígidos de moléculas de origem vegetal, incluindo os géis de agarose, formam-se principalmente em água, tornando a adaptação dos índices de refração mais difícil do que quando solventes orgânicos são utilizados.

Ao contrário dos géis de cadeia flexível, a amplitude dos movimentos de géis de cadeias de bastões rígidos é extremamente pequena, sendo que a maior parte da luz espalhada por esses sistemas é de natureza elástica o padrão da luz espalhada pela matriz rígida é, portanto, formado por um arranjo de manchas estáticas. Esse conjunto de manchas, porém, pode evoluir lentamente seja pelas tensões térmicas no gel geradas pelo feixe laser, seja por flutuações de temperatura no sistema. Por consequência, a luz espalhada pela matriz mistura-se ao sinal proveniente do movimento do dextrano (diz-se que o sinal proveniente da matriz heterodina o sinal oriundo do dextrano[11,24,25,55,59,61,62]. É importante que tal sinal proveniente da matriz, independentemente de sua contribuição em termos de movimento, seja considerado na análise dos dados. Se um gel rígido hospeda um polímero flexível, o componente quase-elástico da luz espalhada é praticamente atribuído ao movimento das cadeias

livres dentro da rede. A partir dessa consideração, pode-se, em princípio, medir o coeficiente de difusão e a susceptibilidade osmótica da solução de dextrano dentro da matriz. Nas situações descritas neste trabalho, entretanto, o componente estático pode ser de até três ordens de magnitude mais intenso do que a intensidade do componente flutuante da solução de dextrano. Tal condição determina severos desafios experimentais na determinação do coeficiente de difusão da solução livre dentro da matriz polimérica. A interpretação dos espectros dependerá de certas considerações e, se possível e necessário, da adequada separação entre esses dois componentes. Esses aspectos foram abordados na parte teórica.

4.2 Amostras

Os biopolímeros empregados no trabalho foram o dextrano com massa molecular 70.000, 500.000 e 2.000.000 $g.mol^{-1}$, fornecido pela Sigma, e a agarose com massa molecular 120.000 $g.mol^{-1}$, fornecida pela companhia Hispanagar. A massa molecular da agarose foi determinada por viscosimetria[36,63]. O conteúdo de sulfato é de 0,1% segundo o fabricante, e o de grupos metila, de 0,6%, determinado por ressonância magnética nuclear de prótons. As soluções do polímero flexível dextrano foram preparadas numa faixa de concentração $2g.L^{-1} \leq c \leq 100 g.L^{-1}$, e as do gel rígido de agarose, na faixa $0g.L^{-1} \leq c \leq 40g.L^{-1}$.

4.3 Procedimento

As amostras foram preparadas misturando-se massas previamente determinadas de dextrano e agarose com água deionizada. Essas misturas foram aquecidas em banho termostatizado a $100^{\circ}C$ para garantir a dissolução dos polímeros. Numa etapa seguinte, um volume médio de 2,5 mL de cada solução foi transferido para tubos de vidro cilíndricos de 10 mm de diâmetro externo, sendo esses selados. As amostras foram novamente aquecidas em banho termostatizado a $100^{\circ}C$ e deixadas à temperatura ambiente por 24 horas para depois serem efetuadas as medidas de correlação de fótons. A gelificação da agarose nas amostras começou em temperaturas próximas a $45^{\circ}C$ e as medidas realizadas a $25^{\circ}C$.

As medidas de espalhamento de luz dinâmico foram feitas com um laser Spectra Physics SP 162, com comprimento de onda 488 nm, e um correlador multibit 7032 da companhia Malvern. Todas as medidas foram feitas com os tubos de vidro mergulhados em um banho de decalina mantida a uma temperatura 25°C. O laser e o goniômetro foram fixados sobre uma mesa ótica suportada sobre pneumáticos para evitar vibrações mecânicas, uma vez que qualquer deslocamento na frequência fundamental, da amostra ou da mesa, seria detectado no sinal espalhado. Considerando a sensibilidade dos géis em relação a vibrações mecânicas, entre o ventilador que refrigera o tubo do laser e a estrutura metálica deste tubo, foi colocado um anel de espuma.

Para obter diferentes vetores de onda $q = \frac{4\pi \sin \theta/2}{\lambda}$, as medidas de espalhamento de luz dinâmico, tanto em soluções de dextrano como em géis, foram feitas em ângulos de 60°, 90° e 150°. Em princípio, evitaram-se ângulos menores porque, no caso de espalhamento de luz por géis turvos, podem surgir efeitos de espalhamento múltiplo. Na tentativa de minimizar esses efeitos, por fornecerem valores falsos da intensidade de luz espalhada, selecionou-se esta faixa angular. Entretanto, cabe salientar que, quando o feixe incidente apresenta somente espalhamento de luz polarizado, não se faz necessário seguir rigorosamente essa condição. A intensidade da luz espalhada foi medida em função da concentração c de dextrano, variando do regime diluído ao semidiluído e também em função da concentração c_g do gel de agarose. Cabe salientar que as mudanças na concentração não causam uma significativa variação no índice de refração n . As concentrações críticas para o polímero flexível dextrano so: $M_w = 70.000g.mol^{-1}$, $c^* = 35g.L^{-1}$, $M_w = 500.000g.mol^{-1}$, $c^* = 14g.L^{-1}$ e $M_w = 2.000.000g.mol^{-1}$, $c^* = 7g.L^{-1}$ [36,63].

As mesmas amostras usadas para obter os dados de espalhamento de luz dinâmico também foram submetidas a medidas de transmissão na região do comprimento de onda do laser. Para isso foi utilizado um espectrômetro Kontron Uvikon 810, selecionando o comprimento de onda de 488 nm. Para minimizar o efeito de lente causado pelas paredes cilíndricas das células de espalhamento de luz, elas foram colocadas dentro de cubetas de vidro retangular e o espaço vazio foi preenchido com água, tendo esta a função de adaptar os índices de refração. Em função da

altura dos tubos cilíndricos dentro dos quais estavam as amostras, não foi possível baixar a tampa do espectrometro que evita a entrada de luz do meio ambiente. Para contornar o problema, os tubos, durante cada medida, foram cobertos com tecido preto, garantindo que somente a luz que atravessa o cilindro contendo a amostra fosse detectada.

4.4 O Correlador

O correlador é um dispositivo que processa os sinais da luz espalhada pela amostra. Esses sinais surgem como pulsos eletrônicos lógicos de duração de nano segundos e são detectados pela fotomultiplicadora como fótons individuais. Esse dispositivo pode ser utilizado com duas finalidades. Para a primeira delas, ele funciona como um simples contador de fótons. Neste caso ele é utilizado para contar pulsos por um certo período de tempo, obtendo-se assim a medida da intensidade do sinal, através da qual pode-se determinar o raio de giro, segundo coeficiente virial e a massa molecular. A segunda finalidade do correlador é contar o sinal por um certo período de tempo chamado tempo de amostragem, sendo que cada uma dessas contagens é armazenada em uma memória. A explicação referente a esse processo é dada abaixo[51]. A função de correlação de um sinal elétrico, matematicamente definida como[39]

$$G(\tau) = \lim_{t \rightarrow \infty} \left[\frac{1}{t} \int_{-t}^t I(t)J(t + \tau)dt \right] \quad (4.1)$$

pode ser obtida através dessa ferramenta chamada correlador. Na equação 4.1 $I(t)$ e $J(t)$ são sinais que dependem do tempo. $G(\tau)$ é chamada de função da auto correlação (se $I(t)$ e $J(t)$ referem-se ao mesmo sinal) ou função de correlação cruzada (se $I(t)$ e $J(t)$ referem-se a diferentes sinais). Um diagrama de bloco típico de correlador digital é mostrado na figura 4.1.

O tempo de operação e a própria operação do correlador são controlados por um gerador de tempo de amostragem, o qual divide o tempo em intervalos $\Delta\tau$ de durações iguais. Ao final de cada tempo de amostragem, um registrador de deslocamentos conta o número de pulsos de entrada n_0, n_1, \dots que chegam em A. Isto pode ser visualizado na figura 4.2.

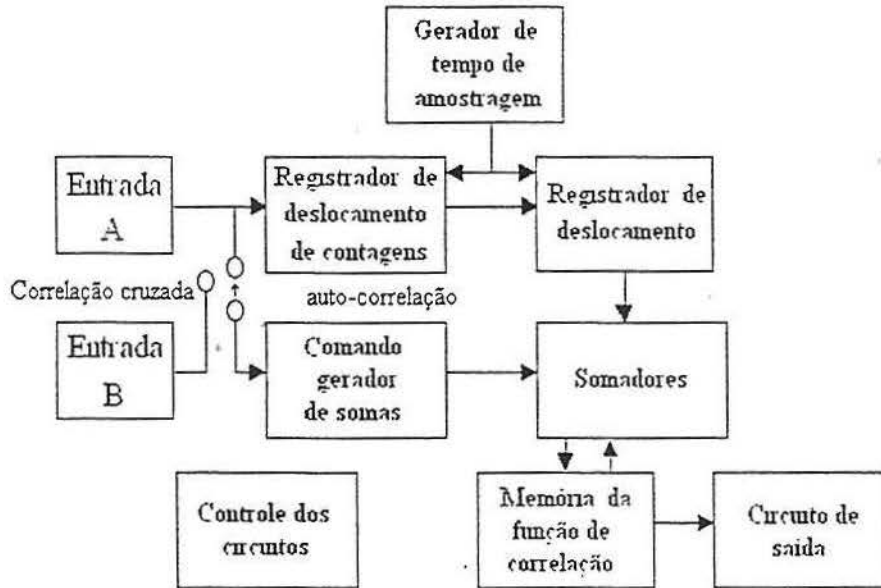


Figura 4.1: Diagrama de blocos de um correlador.

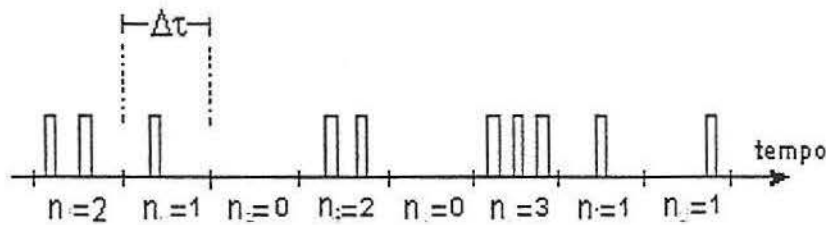


Figura 4.2: Representação esquemática do trem de pulsos processado pelo correlador.

Ao final de cada tempo de amostragem o número de pulsos armazenados no registrador de deslocamento são registrados no primeiro estágio deste registrador. O número que estava no primeiro estágio é deslocado para o segundo, o que estava no segundo estágio é deslocado para o terceiro e assim sucessivamente. Depois de um certo tempo de operação do correlador o primeiro estágio contém $I(t - \Delta\tau)$, o segundo $I(t - 2\Delta\tau)$, o terceiro $I(t - 3\Delta\tau)$ e o $k^{\text{ésimo}}$ estágio conterà $I(t - k\Delta\tau)$.

Durante o tempo de amostragem cada pulso que chega na entrada A (quando no modo de autocorrelação) ou em B (quando no modo de correlação cruzada) é processado por um comando gerador de somas e informa a todos os somadores

do correlador que adicionem cada um dos números armazenados no registrador ao número armazenado no canal associado da memória da função de correlação. Durante uma seqüência de pulsos, na figura acima, para um tempo de amostragem com intervalo 2, o produto $n_2n_3 = 0$ é adicionado à memória da função de correlação do canal 1, o produto $n_2n_4 = 6$ é adicionado ao canal 2, $n_2n_5 = 0$ é adicionado ao canal 3 e assim sucessivamente. Assim, o correlador acumulará, no primeiro canal

$$G(\Delta\tau) = n_0\tilde{n}_1 + n_1\tilde{n}_2 + n_2\tilde{n}_3 + \dots \quad (4.2)$$

ou

$$\sum_{i=0}^{N-1} n_i\tilde{n}_{i+1}. \quad (4.3)$$

Para o segundo canal, teremos

$$G(2\Delta\tau) = n_0\tilde{n}_2 + n_1\tilde{n}_3 + n_2\tilde{n}_4 + \dots \quad (4.4)$$

ou

$$\sum_{i=0}^{N-1} n_i\tilde{n}_{i+2} \quad (4.5)$$

sendo que, de um modo geral, o $k^{\text{ésimo}}$ canal conterà

$$G(k\Delta\tau) = n_0\tilde{n}_k + n_1\tilde{n}_{k+1} + n_2\tilde{n}_{k+2} + \dots \quad (4.6)$$

$$\sum_{i=0}^{N-1} n_k\tilde{n}_{i+k} \quad (4.7)$$

Quando a variação do valor da função de correlação no tempo $\Delta\theta$ é pequena, a equação 4.7 torna-se uma boa aproximação da verdadeira função de correlação. Os números n_i representam o número de vezes que o conteúdo de cada etapa do registrador de deslocamento é adicionado ao seu respectivo canal de memória da função de correlação e os números são armazenados no registrador de deslocamento.

Certas características muito importantes do correlador tais como, eficiência da operação, a capacidade de contar do registrador de deslocamento, a faixa de variação dos tempos de amostragem e número de canais são muito importantes nos experimentos de espalhamento de luz.

A eficiência com a qual o correlador executa o somatório das contagens depende da arquitetura do correlador. Correladores que operam em tempos menores apresentam maior eficiência. A redução na eficiência é particularmente séria quando os experimentos de espalhamento de luz são feitos com baixos níveis de luz e para contornar esse problema a duração da medida pode ser aumentada.

A capacidade de um registrador de deslocamento é medida pelo número de bits que são necessários para representar a intensidade de luz espalhada em cada tempo de amostragem.

Correladores projetados para uso em espectroscopia de flutuação geralmente usam um ou quatro bits. O de um bit ou correlador de corte introduz o número zero no registrador de deslocamento quando o número de fótons detectados durante o tempo de amostragem é menor ou igual a um certo número de fótons presentes (é chamado de nível de corte) e o número um se a contagem de fótons excede o nível de corte. Embora pareça que a função de correlação obtida deste modo tenha pouca relação com a verdadeira função de correlação, é possível mostrar que a função de correlação cortada é proporcional a verdadeira função se o sinal for randômico. É esperado sempre que o sinal que se origina de um grande número de espalhadores independentes é independente da forma da função de correlação. No entanto, se a amostra contém poucos espalhadores ou se estes estiverem acoplados, a função de correlação de corte poderá ser distorcida.

Correladores que têm registrador de 4 bits fornecem uma função de correlação precisa para uma larga faixa de sinais de entrada. No entanto é possível que certas classes de sinais de entrada excedam a faixa de operação do correlador. Para um sinal com intensidades muito diferentes que apresentem pequenas flutuações os resultados produzidos serão errados. Além de permitir uma larga faixa de sinais de entrada, o correlador de 4 bits é fácil de usar porque o ajuste do nível de corte é mais fácil ou desnecessário.

Os tempos de amostragem disponíveis para o usuário são, em princípio ilimitados no que se refere ao seu valor superior. Um tempo de amostragem mais curto é conseqüentemente um fator importante. Para a maioria das aplicações de flutuações espectroscopias um tempo mínimo de amostragem de $100nsec$ é satisfatório e esses

equipamentos são disponíveis no mercado a um preço moderado.

O número de canais necessários depende da natureza da função de correlação a ser estudada. Se a função de correlação é uma única exponencial ou uma distribuição estreita de exponenciais, um equipamento mais simples fornece os detalhes da função de correlação. No entanto, se uma larga faixa de constantes de tempo exponenciais ou se uma função de correlação oscilatória está envolvida, um equipamento mais sofisticado se faz necessário.

Capítulo 5

APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Para determinar a dinâmica das soluções poliméricas de dextrano em uma matriz de gel rígido de agarose, medimos a flutuação da intensidade de luz espalhada pelas amostras de dextrano com massas moleculares $M_w = 70.000g.mol^{-1}$, $M_w = 500.000g.mol^{-1}$ e $M_w = 2.000.000g.mol^{-1}$, utilizando o sistema de correlação de fótons como já descrito em seções anteriores. Os mesmos experimentos forneceram os valores de intensidade necessários para a realização da avaliação via gráficos de Zimm. As funções de correlação de intensidade e de campo elétrico foram estabelecidas tanto para o polímero aprisionado em uma matriz do gel como para a situação em que esse se encontra na forma de uma solução livre.

Nas figuras 5.1, 5.2 e 5.3 são apresentadas as funções de correlação reduzidas. Essas curvas são construídas a partir dos dados de intensidade de luz espalhada armazenados nos 8 correladores (128 canais) e que são aqui designados por dados brutos G_2 . A função de correlação $G(\tau)$ é obtida normalizando os dados experimentais pelo quadrado da intensidade média ou linha de base, ou seja

$$G(\tau) = \frac{G_2}{C_b}. \quad (5.1)$$

A linha de base efetiva, dada pelo último ponto medido pelo correlador ou "far point", é incluída expressando a função de correlação como $G(\tau) - \frac{F_p}{C_b}$. Em um caso ideal (nem sempre perfeitamente reproduzido durante uma medida) F_p e C_b serão estritamente iguais e a relação acima recai simplesmente em $G(\tau) - 1$, forma reduzida

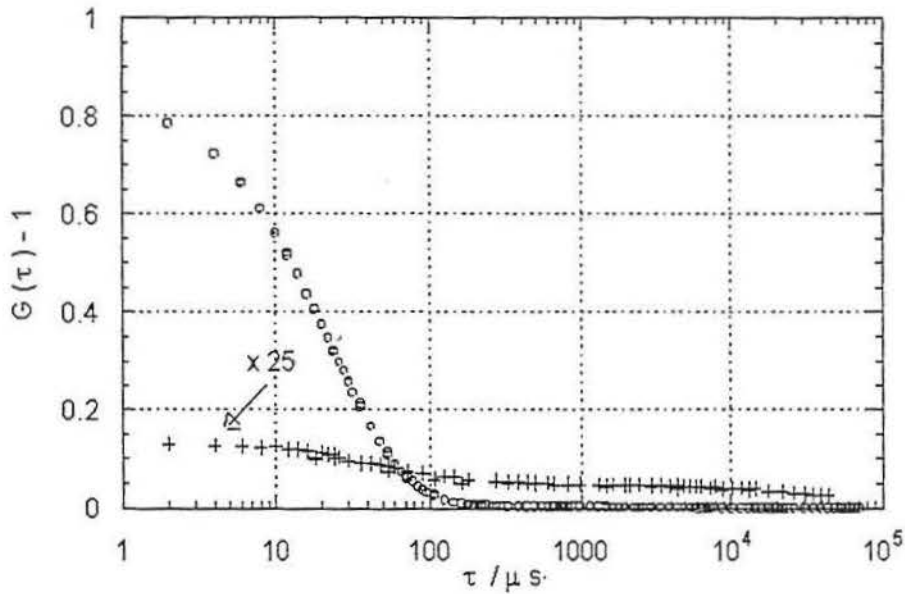


Figura 5.1: Função de correlação de intensidade reduzida $G(\tau) - 1$ para a solução de dextrano ($Mw = 70.000g.mol^{-1}$), $c = 10g.L^{-1}$: (O) para a solução livre e (+) dentro da matriz gel de agarose, $c_g = 30g.L^{-1}$.

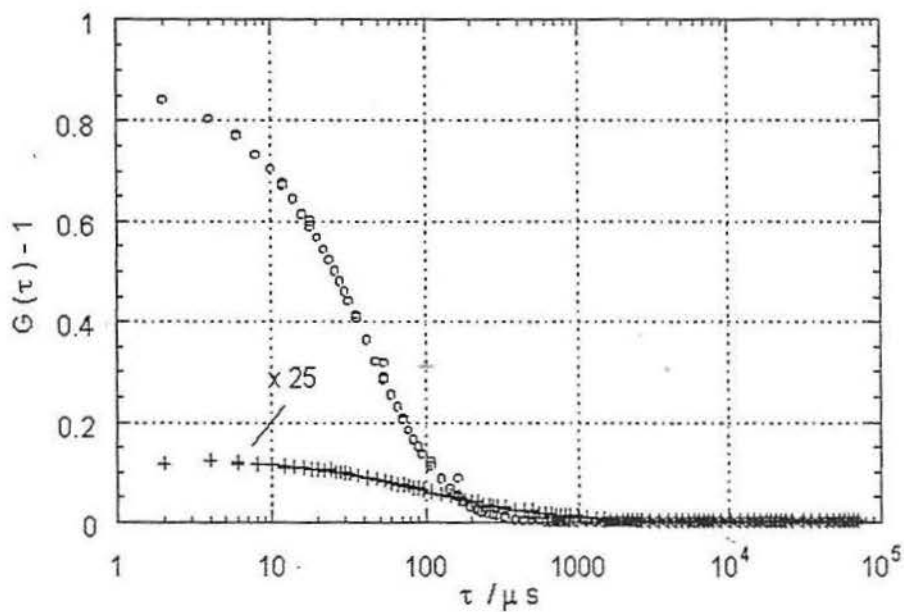


Figura 5.2: Função de correlação de intensidade reduzida $G(\tau) - 1$ para a solução de dextrano ($Mw = 500.000g.mol^{-1}$), $c = 5g.L^{-1}$: (O) para a solução livre e (+) dentro da matriz gel de agarose, $c_g = 30g.L^{-1}$.

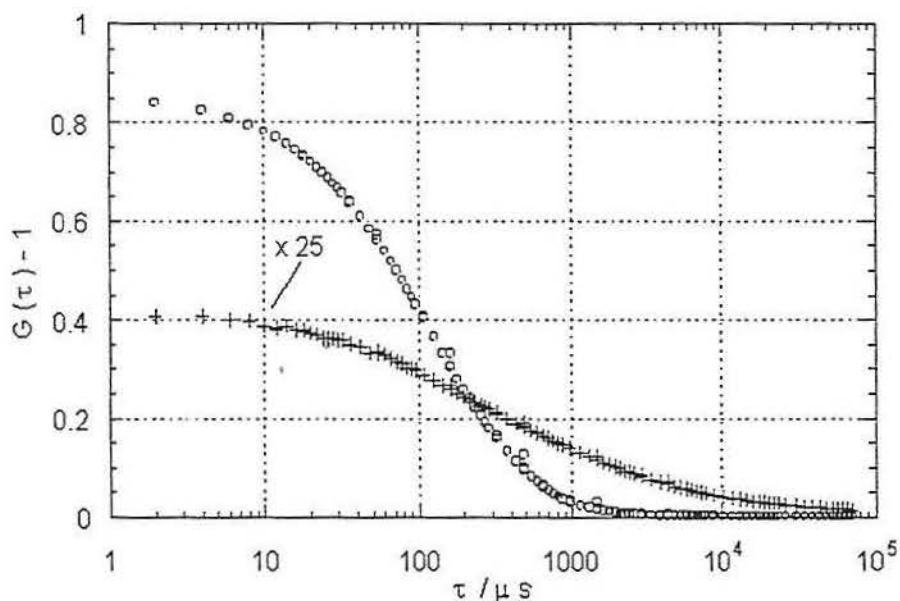


Figura 5.3: Função de correlação de intensidade reduzida $G(\tau) - 1$ para a solução de dextrano ($Mw = 2.000.000g.mol^{-1}$), $c = 2.5g.L^{-1}$: (O) para a solução livre e (+) dentro da matriz gel de agarose, $c_g = 30g.L^{-1}$.

da função de correlação que é utilizada nas figuras.

A figura 5.1 mostra a função de correlação reduzida, obtida a um ângulo de espalhamento de 90° , em amostras de dextrano com $Mw = 70.000g.mol^{-1}$. Nessa figura, os círculos abertos referem-se ao polímero flexível em solução livre e as cruzes ao polímero aprisionado numa matriz de gel rígido de agarose, cuja concentração é $30g.L^{-1}$. Para uma melhor visualização dos dados referentes ao polímero aprisionado, para as três massas moleculares estudadas, a curva foi multiplicada por um fator 25. A concentração de dextrano adotada, nos dois casos, foi de $10g.L^{-1}$. Para a massa molecular $Mw = 70.000g.mol^{-1}$ a concentração crítica c^* , obtida pelo inverso da viscosidade intrínseca, é de $35g.L^{-1}$. Isso garante que o comportamento resumido pela figura 5.1 refere-se ao regime diluído. As funções de correlação para o dextrano com massas $Mw = 500.000g.mol^{-1}$ e $Mw = 2.000.000g.mol^{-1}$ aparecem nas figuras 5.2 e 5.3, respectivamente. Nessas figuras, as concentrações de agarose não foram alteradas ($c_g = 30g.L^{-1}$) de forma a manter uma matriz de confinamento igual para todas as massas moleculares de dextrano estudadas. A concentração do dextrano,

por sua vez, foi reduzida para $5g.L^{-1}$ ($Mw = 500.000g.mol^{-1}$, $c^* = 14g.L^{-1}$) e $2.5g.L^{-1}$ ($Mw = 2.000.000g.mol^{-1}$, $c^* = 7g.L^{-1}$)[63]. Tal procedimento garante que, mesmo para as massas moleculares maiores, a solução do polímero flexível mantém-se sempre no regime diluído, o que além de evitar efeitos egressos de comportamentos coletivos que estão além do escopo desse trabalho, permite estabelecer um quadro comparativo entre as diferentes massas moleculares.

As funções de correlação de intensidade para as soluções aquosas das três massas moleculares de dextrano puro são homódinas. Não existe nada no volume de espalhamento capaz de causar heterogeneidade como, por exemplo, a presença de poeira. A luz que chega na fotomultiplicadora é somente a luz espalhada pela amostra em estudo. A extrapolação da função de correlação reduzida $G(\tau) - 1$ versus $\tau/\mu s$ para o limite $\tau \rightarrow 0$ é um valor próximo a $\beta = 0.96$, fator de arranjo óptico característico do equipamento usado. Tal valor de β é obtido fazendo-se a extrapolação para $\tau \rightarrow 0$ dos valores de $G(\tau) - 1$ de uma suspensão diluída de esferas de látex. A maior discrepância entre β e o valor extrapolado ocorre para a função de correlação reduzida da amostra onde a massa molecular do dextrano é $70.000g.mol^{-1}$. Essa maior discrepância está provavelmente associada à menor relação sinal-ruído presente na medida dessa amostra, e que decorre de sua pequena massa molecular. Como será discutido posteriormente, tal relação sinal ruído impõe limitações na determinação do raio de giro para essa massa molecular. Para as três massas moleculares estudadas, a função de correlação da intensidade para as soluções do dextrano livre decaem completamente até a linha de base.

Quando as soluções de dextrano estão dentro da matriz rígida de agarose, o valor de $G(\tau) - 1$ para $\tau \rightarrow 0$ é cerca de duas ordens de grandeza menor. Como β não muda, quando as amostras de soluções simplesmente são trocadas pelas amostras de gel para uma nova medida, tal redução deve ser atribuída à heterodinagem causada pela luz espalhada pelos pontos oscilantes da matriz de gel rígido. Esse forte caráter heteródino decorre, portanto, dos pontos espalhadores da matriz de agarose, os quais funcionam individualmente como osciladores harmônicos. O grau de heterodinagem, X , foi calculado a partir da equação 3.47, e os valores ficaram na faixa de 10^{-2} a 10^{-3} .

Para géis, via de regra, existe uma diferença entre F_p e C_b . Essa diferença se deve à sensibilidade que os géis apresentam em relação a oscilações como variações de temperatura, transientes gerados pela presença de impurezas na região iluminada da amostra, ruídos eletrônicos, etc. Por esse motivo, nas medidas de intensidade de luz, particularmente em géis, o valor do "far point" deve ser sempre verificado para que eventuais oscilações não se introduzam como erro no tratamento dos dados. No caso de não ser o menor de todos os valores das intensidade medidas, deve ser obrigatoriamente substituído pelo valor conveniente.

Quando a solução está aprisionada dentro do gel de agarose, os movimentos do polímero livre são substancialmente reduzidos. Tal redução dos processos difusivos leva a tempos de relaxação muito superiores àqueles constatados nas soluções. Essa é a razão pela qual, dentro dos limites experimentais em que esse trabalho foi realizado, as funções de correlação não decaem a zero. Assim, a matriz de natureza puramente estática e com entropia configuracional igual a zero, tem a função de reduzir o espaço disponível para as moléculas de dextrano, diminuindo a entropia das mesmas.

As funções de correlação das intensidades reduzidas mostradas nas figuras 5.1, 5.2 e 5.3 são transformadas em funções de correlação de campo elétrico aplicando-se a equação 3.46. Nas figuras 5.4, 5.5 e 5.6, as funções de correlação de campo foram calculadas a partir das intensidades de luz espalhadas em um ângulo de 90° . A partir dessas figuras, vemos que o polímero flexível dextrano numa matriz rígida de agarose apresenta um comportamento semelhante ao dextrano aprisionado em géis de gelatina, estudados por Burne e Sellen [23]. Em ambos os casos, o movimento do polímero aprisionado no gel diminui quando a concentração desse aumenta. Tal limitação dos movimentos do dextrano decorre da redução do espaço livre para difusão imposta pelo aumento da concentração do gel, tal como pode ser visto nas figuras 5.4, 5.5 e 5.6. Para o dextrano com $M_w = 70.000g.mol^{-1}$, quando a concentração do gel aumenta, podemos observar um segundo movimento muito mais lento, cuja amplitude aumenta com o aumento da concentração do gel. Para as massas moleculares maiores, pelo fato dos polímeros estarem bem mais confinados, se esse segundo movimento existir só poderá ser visto pelo detector em tempos de relaxação muito maiores.

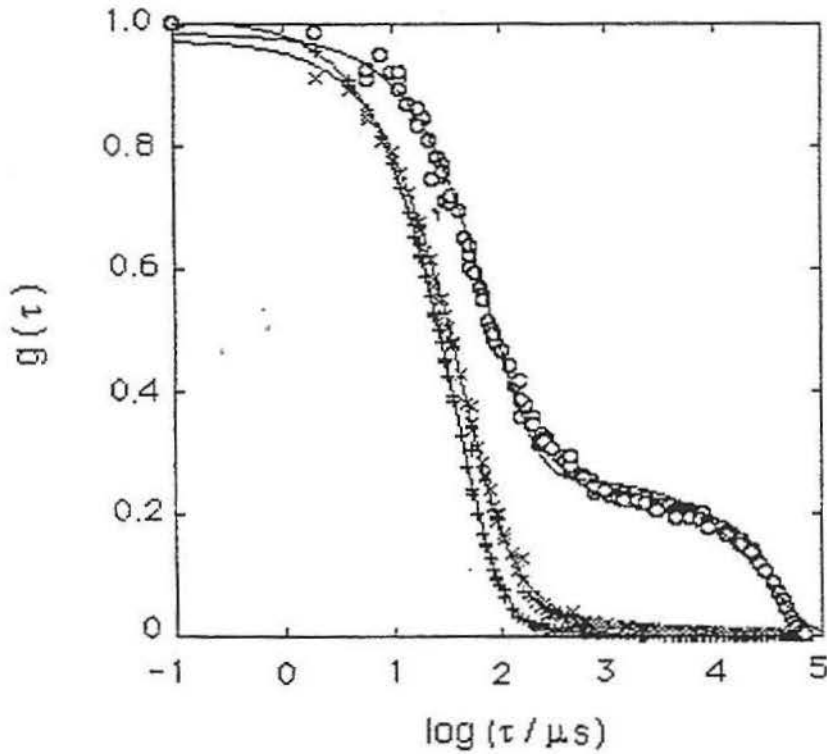


Figura 5.4: Função de correlação do campo $g(\tau)$ para solução de dextrano, $M_w = 70.000g.mol^{-1}$, $c = 10g.L^{-1}$; (+): $c_g = 0g.L^{-1}$ (solução livre); (x): dentro do gel de agarose com $c_g = 5g.L^{-1}$; (o): dentro do gel de agarose com $c_g = 30g.L^{-1}$. Ângulo de espalhamento: 90° . Curvas contínuas são os ajustes do decaimento com duas exponenciais.

O ajuste das curvas com uma dupla exponencial é válido para as massas moleculares 70.000 e $500.000g.mol^{-1}$, tanto para as amostras de dextrano livre como para o dextrano aprisionado no gel. Para a massa molar $2.000.000g.mol^{-1}$, um ajuste com três exponenciais foi adotado, uma vez que se faz necessário uma distribuição mais larga do tempo de relaxação para descrever completamente o movimento no gel mais concentrado.

Na figura 5.7 são mostradas as taxas de relaxação $\Gamma (= \frac{1}{\tau})$ em função do quadrado do vetor de espalhamento q para amostras de dextrano $M_w = 500.000g.mol^{-1}$ de concentração $5g.L^{-1}$. O comportamento de Γ foi analisado em três concentrações diferentes de agarose, a saber, $c_g = 0g.L^{-1}$, $c_g = 5g.L^{-1}$ e $c_g = 30g.L^{-1}$. Para

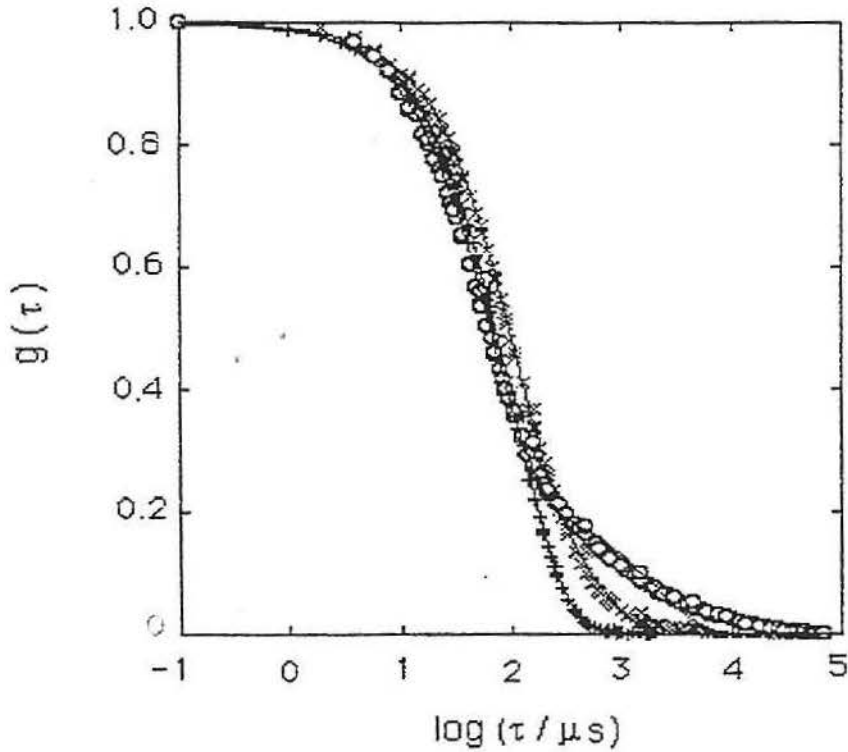


Figura 5.5: Função de correlação do campo $g(\tau)$ para solução de dextrano, $M_w = 500.000 \text{ g.mol}^{-1}$, $c = 5 \text{ g.L}^{-1}$; (+): $c_g = 0 \text{ g.L}^{-1}$ (solução livre); (x): dentro do gel de agarose com $c_g = 5 \text{ g.L}^{-1}$; (o): dentro do gel de agarose com $c_g = 30 \text{ g.L}^{-1}$. Ângulo de espalhamento: 90° . Curvas contínuas são os ajustes do decaimento com duas exponenciais.

as massas moleculares $70.000 \text{ g.mol}^{-1}$ e $500.000 \text{ g.mol}^{-1}$, as taxas de relaxação do movimento rápido, referentes tanto às soluções de dextrano livre quanto ao dextrano aprisionado na matriz gel, resultam em uma linha reta que passa pela origem segundo a equação 3.29, ou seja, têm uma dependência linear em q^2 . Esse comportamento indica a existência de modos difusivos, que correspondem ao coeficiente de difusão da equação 3.29. Para baixas concentrações de dextrano, D_z representa a difusão translacional que está associada à difusão dos centros de massa dos nove-los poliméricos. Em concentrações de dextrano próximas e acima da concentração crítica c^* , é observado um modo de difusão coletivo, no qual as flutuações são referentes ao maior preenchimento dos espaços do gel rígido pela presença do dextrano[3].

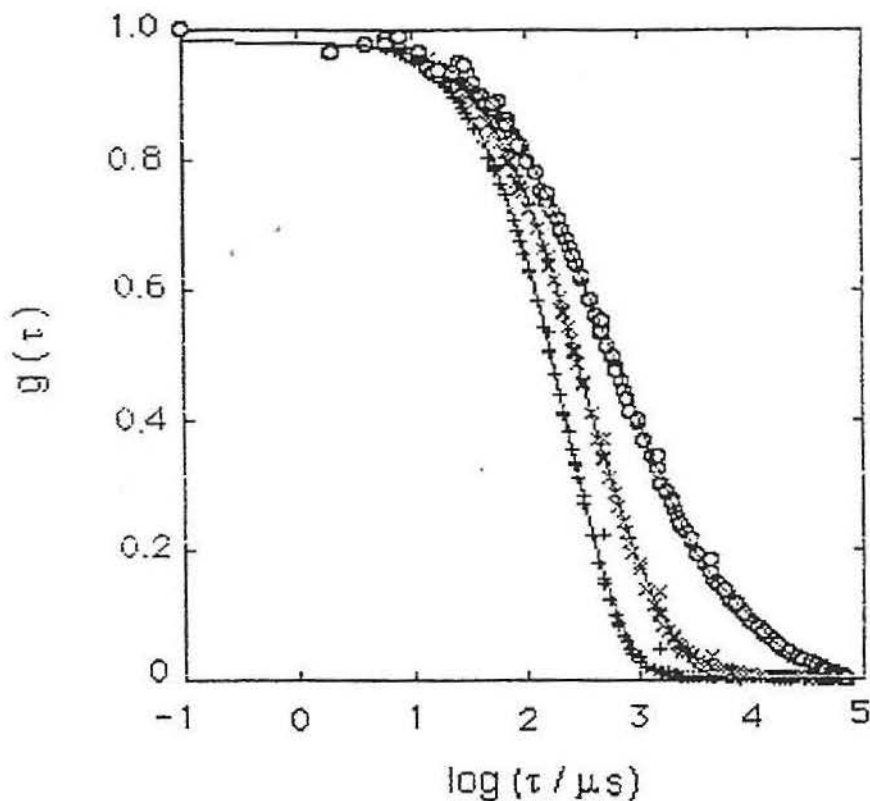


Figura 5.6: Função de correlação do campo $g(\tau)$ para solução de dextrano, $M_w = 2.000.000 \text{ g.mol}^{-1}$, $c = 2.5 \text{ g.L}^{-1}$; (+): $c_g = 0 \text{ g.L}^{-1}$ (solução livre); (x) : dentro do gel de agarose com $c_g = 5 \text{ g.L}^{-1}$; (o): dentro do gel de agarose com $c_g = 30 \text{ g.L}^{-1}$. Ângulo de espalhamento: 90° . Curvas contínuas são os ajustes do decaimento com três exponenciais.

Para as soluções do dextrano livre de massa molecular $2.000.000 \text{ g.mol}^{-1}$ existem evidências da formação de agregados, tal como será posteriormente discutido, o que faz com que a reta no gráfico Γ versus q^2 não passe pela origem, tal como observado na figura 5.8. Porém, à medida que a concentração da matriz gel de agarose aumenta de 5 para 30 g.L^{-1} , o comportamento de Γ torna a se aproximar daquele observado para as massas moleculares 70.000 e $500.000 \text{ g.mol}^{-1}$.

Para o dextrano de $M_w = 2.000.000 \text{ g.mol}^{-1}$ aprisionado na matriz, os agregados

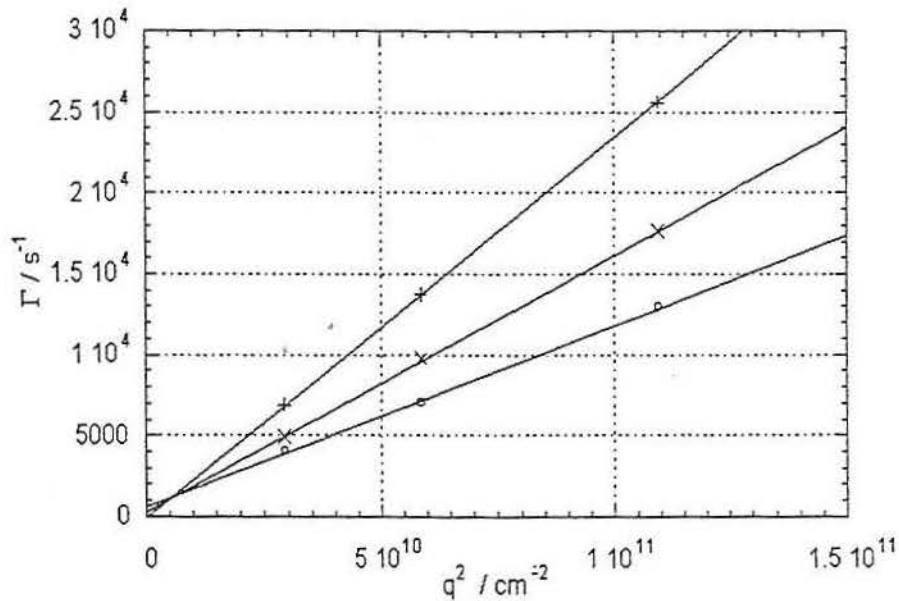


Figura 5.7: Taxa de relaxação Γ do componente rápido de $g(\tau)$ para o dextrano de $Mw = 500.000g.mol^{-1}$ em função de q^2 . (+) $c_g = 0g.L^{-1}$ (solução livre); (x) $c_g = 5g.L^{-1}$; (o): $c_g = 30g.L^{-1}$.

ficam com seus movimentos mais restritos ou limitados, e sua presença é menos evidente, o que explica porque o comportamento de Γ aproxima-se daquele observado nas amostras com massas moleculares menores.

A figura 5.9 mostra que a dependência linear da equação 3.29 é válida para a massa molecular $2.000.000g.mol^{-1}$ quando as soluções estão dentro do gel. A existência de agregados em solução livre para essa massa molecular é confirmada porque a intensidade do espalhamento de luz a baixos ângulos é maior do que aquela medida em ângulo alto. Apesar de uma dependência angular da intensidade de luz espalhada ser esperada para altas massas moleculares o aumento observado é excessivo. Por essa razão, para que fosse possível comparar os valores das medidas de intensidade de luz espalhada pelas amostras em solução e aprisionadas dentro do gel, foram usados os dados referentes ao ângulo de espalhamento de 150° .

O coeficiente de difusão D foi obtido a partir das funções de correlação de campo. De uma maneira geral este pode ser descrito por um decaimento multi-exponencial[64,65], ou

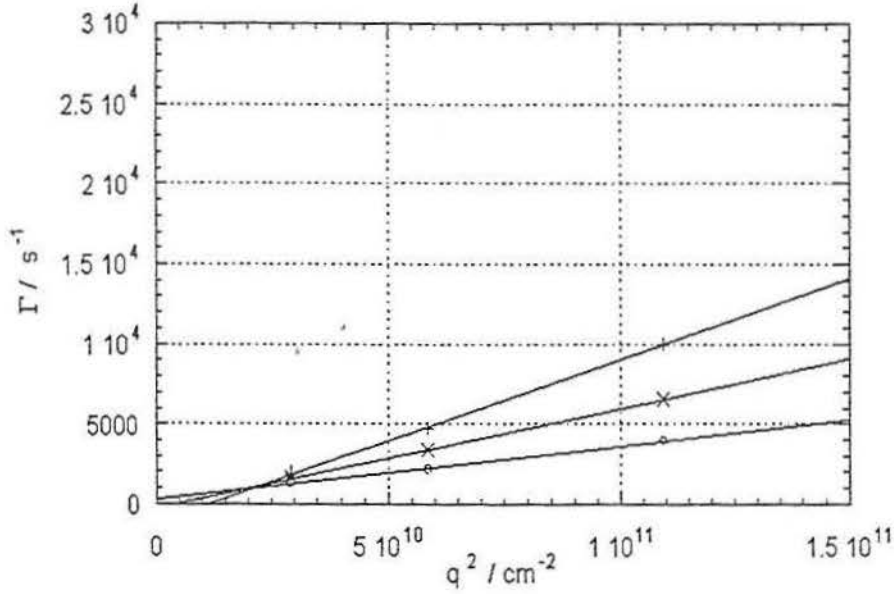


Figura 5.8: Taxa de relaxação Γ do componente rápido de $g(\tau)$ para o dextrano de $Mw = 2.000.000g.mol^{-1}$ em função de q^2 . (+): $c_g = 0g.L^{-1}$ (solução livre); (\times): $c_g = 5g.L^{-1}$; (o): $c_g = 30g.L^{-1}$. A reta assinalada para o símbolo (+) mostra a não linearidade de Γ com q^2 .

$$g(\tau) = \sum_1^N a_n \exp(-D_n q^2 \tau) \quad (5.2)$$

o qual, para uma mesma massa molecular, produz um coeficiente de difusão D_z médio

$$D_z = -\frac{1}{q^2} \frac{\partial \ln(g(\tau))}{\partial \tau}, \quad (5.3)$$

ou seja

$$D_z = \frac{\sum_1^N a_n D_n}{\sum_1^N a_n}. \quad (5.4)$$

O comportamento de D_z para as três massas analisadas, $Mw = 70.000$, 500.000 e $2.000.000g.mol^{-1}$ é mostrado nas figuras 5.10, 5.11 e 5.12.

O coeficiente de difusão D_z das soluções de dextrano varia com a concentração c_g da matriz de agarose. Nos experimentos realizados, as concentrações de agarose ado-

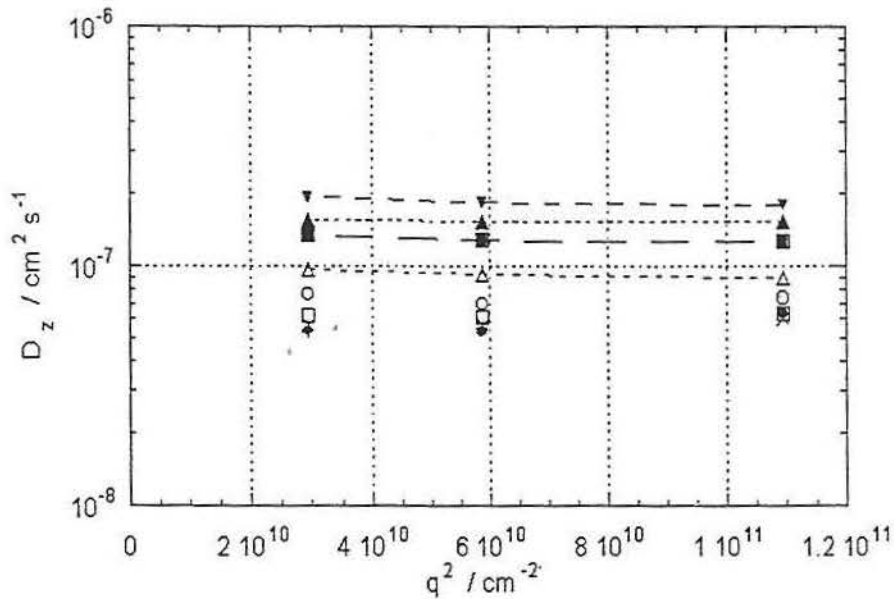


Figura 5.9: Coeficiente de difusão D_z do dextrano $M_w = 2.000.000g.mol^{-1}$ aprisionado no gel de agarose com $c_g = 5g.L^{-1}$; para várias concentrações de polímero flexível: (●) = $0.5g.L^{-1}$; (+) = $1g.L^{-1}$; (×) = $2.5g.L^{-1}$; (□) = $5g.L^{-1}$; (○) = $10g.L^{-1}$; (△) = $15g.L^{-1}$; (◻) = $25g.L^{-1}$; (△) = $30g.L^{-1}$ e (▽) = $35g.L^{-1}$. Nesse caso D_z é independente do vetor de espalhamento q .

tadas foram de $0g.L^{-1}$, $5g.L^{-1}$, $10g.L^{-1}$, $30g.L^{-1}$ e $40g.L^{-1}$, conforme indicado nas figuras 5.10, 5.11 e 5.12. Nas soluções de dextrano puro, D_z varia monotonicamente, sem que nenhum efeito seja observado na região da concentração crítica c^* . Quando a concentração c_g de agarose aumenta, o coeficiente de difusão da solução de dextrano diminui significativamente para baixas concentrações de dextrano. Porém, nestas mesmas condições, quando a concentração de dextrano aumenta, D_z se aproxima dos valores da solução livre. Assim, quando a solução de dextrano no gel aproxima-se da faixa de concentração crítica, ela começa a apresentar um comportamento semelhante àquele que apresenta quando está no estado livre. Quando a concentração de dextrano é aumentada ainda mais, surge outro efeito, a separação de fases. Para as amostras preparadas com concentração acima de c^* , durante a gelificação ocorre separação de fases em escala macroscópica, cujo diagrama é mostrado na figura 5.13.

Como o produto resultante dessa separação de fases é um gel visivelmente turvo,

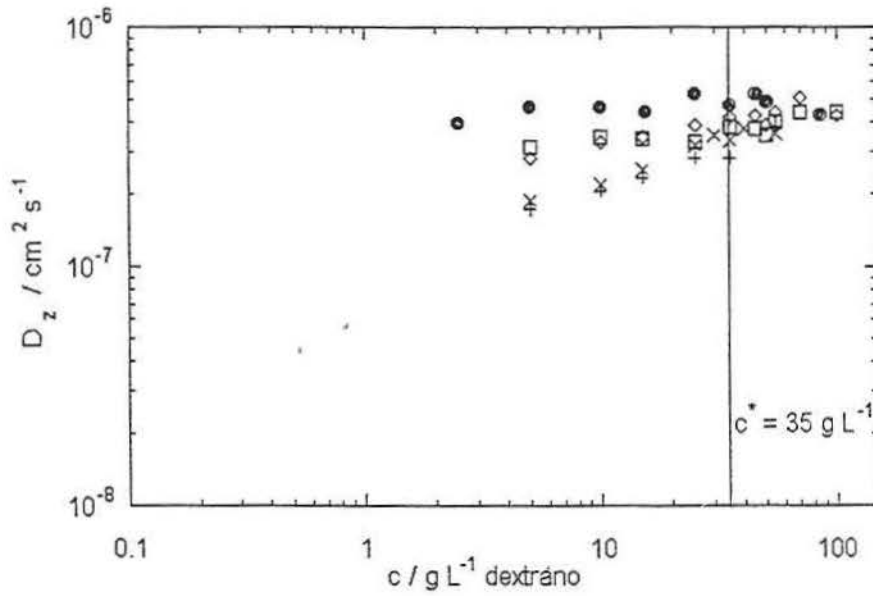


Figura 5.10: Coeficiente de difusão D_z em função da concentração do dextrano c ($M_w = 70.000 \text{ g.mol}^{-1}$) em várias concentrações de agarose: $(\bullet) = 0 \text{ g.L}^{-1}$, $(\square) = 5 \text{ g.L}^{-1}$, $(\diamond) = 10 \text{ g.L}^{-1}$, $(\times) = 30 \text{ g.L}^{-1}$ e $(+) = 40 \text{ g.L}^{-1}$.

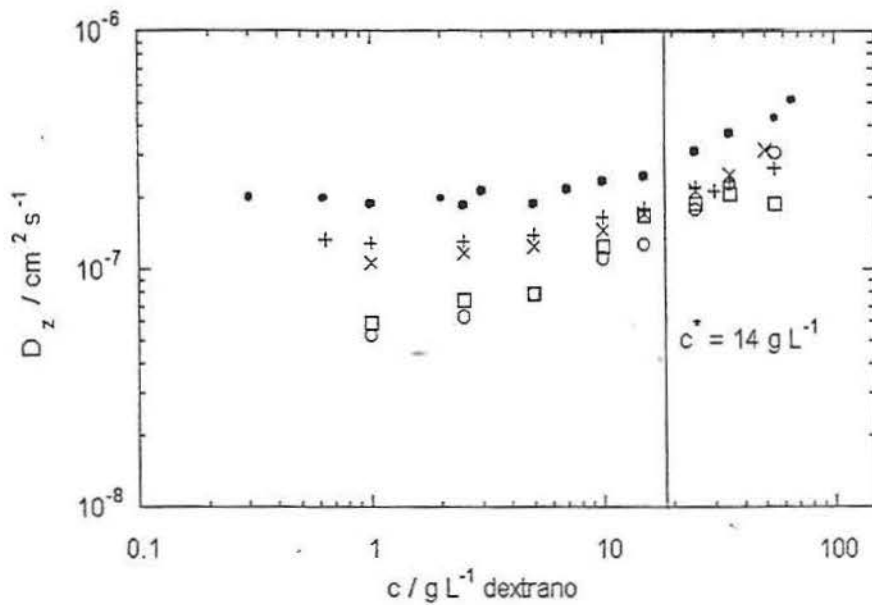


Figura 5.11: Coeficiente de difusão D_z em função da concentração do dextrano c ($M_w = 500.000 \text{ g.mol}^{-1}$) para várias concentrações de agarose: $(\bullet) = 0 \text{ g.L}^{-1}$, $(+) = 5 \text{ g.L}^{-1}$, $(\times) = 10 \text{ g.L}^{-1}$, $(\square) = 30 \text{ g.L}^{-1}$ e $(\circ) = 40 \text{ g.L}^{-1}$.

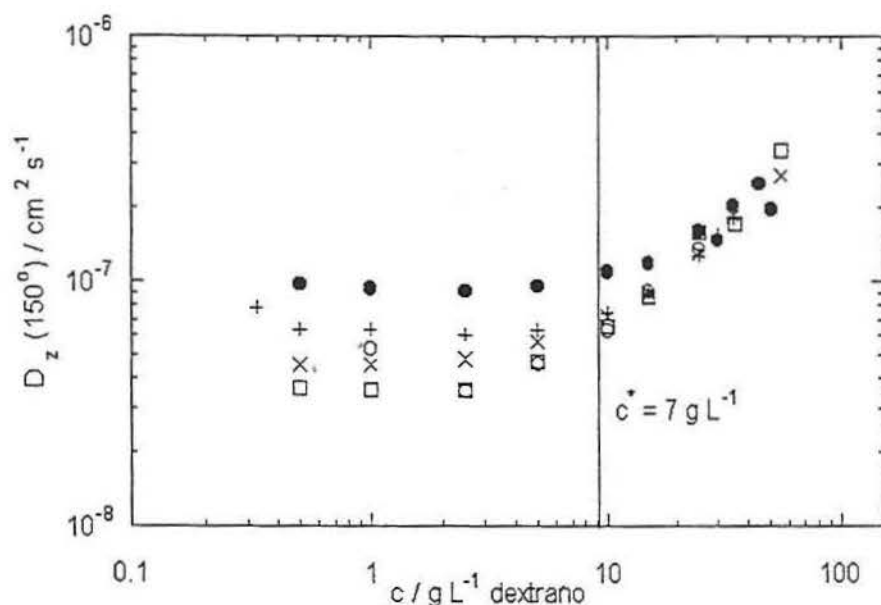


Figura 5.12: Coeficiente de difusão D_z em função da concentração do dextrano c ($M_w = 2.000.000 \text{ g.mol}^{-1}$) para várias concentrações de agarose: (\bullet) = 0 g.L^{-1} , ($+$) = 5 g.L^{-1} , (\times) = 10 g.L^{-1} , (\square) = 30 g.L^{-1} e (\circ) = 40 g.L^{-1} . Ângulo de espalhamento 150° .

e como as taxas de relaxação variam de acordo com a região da amostra que é atingida pelo feixe laser durante a medida de correlação de fótons, restringimo-nos neste trabalho ao estudo na região de miscibilidade. Nessa temos um gel uniforme onde as moléculas de dextrano se encontram aprisionadas dentro do volume da amostra que não é ocupado pela agarose.

Como já discutido no item 3.2.2, a razão Rayleigh é um dado experimental importante que relaciona a intensidade da luz espalhada com a intensidade de luz incidente (equação 3.14). Conforme já abordado na parte teórica, as medidas de espalhamento de luz dinâmico em géis e a análise dos dados assim obtidos são procedimentos complexos, tanto do ponto de vista teórico como experimental. Por isso, em géis, as margens de erro decorrentes são maiores do que aquelas tipicamente presentes nas medidas de espalhamento de luz em soluções, podendo ser de até 20%. Portanto, não consideramos confiável a dedução do fator de estrutura a partir desses dados. No entanto, como pode ser claramente visto a partir das figuras 5.14,

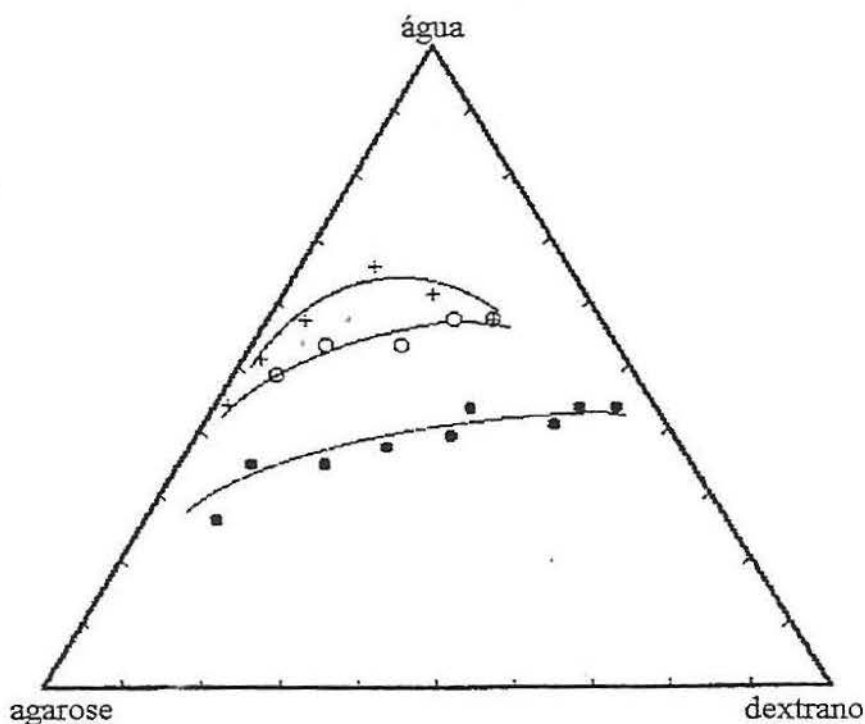


Figura 5.13: Diagrama de fase do sistema agarose-dextrano-água, para as três massas moleculares estudadas. (•): $Mw = 70.000g.mol^{-1}$; (o): $Mw = 500.000g.mol^{-1}$;(+): $Mw = 2.000.000g.mol^{-1}$. A região de separação de fase fica abaixo das curvas indicadas. A escala no diagrama é: agarose 0-10% w/w, dextrano 0-10% w/w, água 90-100% w/w.

5.15 e 5.16 R_{θ} no gel a razão Rayleigh é maior do que na solução livre, confirmando que a matriz rígida contribui de forma heteródina na luz espalhada pelo sistema. Esse comportamento é semelhante para as três massas moleculares.

Na figura 5.17, temos a razão Rayleigh R_{θ} em função de q^2 para as soluções de dextrano com $c = 10g.L^{-1}$, $c = 5g.L^{-1}$ e $c = 2.5g.L^{-1}$ para as três massas moleculares investigadas, $Mw = 70.000 g.mol^{-1}$, $Mw = 500.000 g.mol^{-1}$ e $Mw = 2.000.000 g.mol^{-1}$, respectivamente. A partir dessa figura constata-se que R_{θ} aumenta com a massa molecular do dextrano. Para a massa molecular $Mw = 2000.000 g.mol^{-1}$, ao contrário do que é constatado para as outras massas, R_{θ} apresenta uma nítida variação angular. Esse aumento acentuado na intensidade da luz espalhada a ângulos mais baixos (60° e 90°) é uma evidência da formação

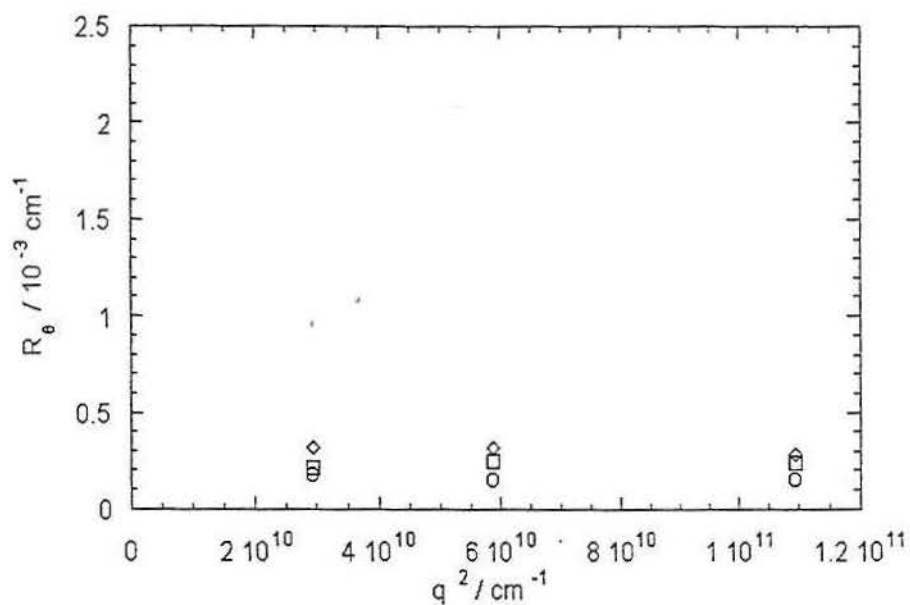


Figura 5.14: Razão Rayleigh R_θ em função de q^2 para o dextrano $M_w = 70.000 \text{g.mol}^{-1}$ e concentração de 10g.L^{-1} . (o): $c_g = 0 \text{g.L}^{-1}$; (\square): $c_g = 5 \text{g.L}^{-1}$; (\diamond): $c_g = 30 \text{g.L}^{-1}$.

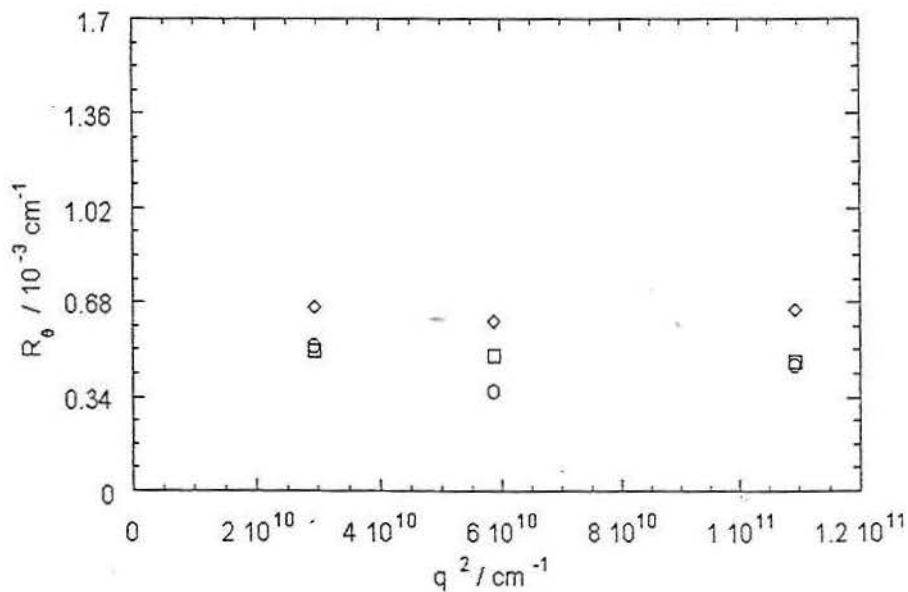


Figura 5.15: Razão Rayleigh R_θ em função de q^2 para o dextrano $M_w = 500.000 \text{g.mol}^{-1}$ e concentração de 5g.L^{-1} . (o): $c_g = 0 \text{g.L}^{-1}$; (\square): $c_g = 5 \text{g.L}^{-1}$; (\diamond): $c_g = 30 \text{g.L}^{-1}$.

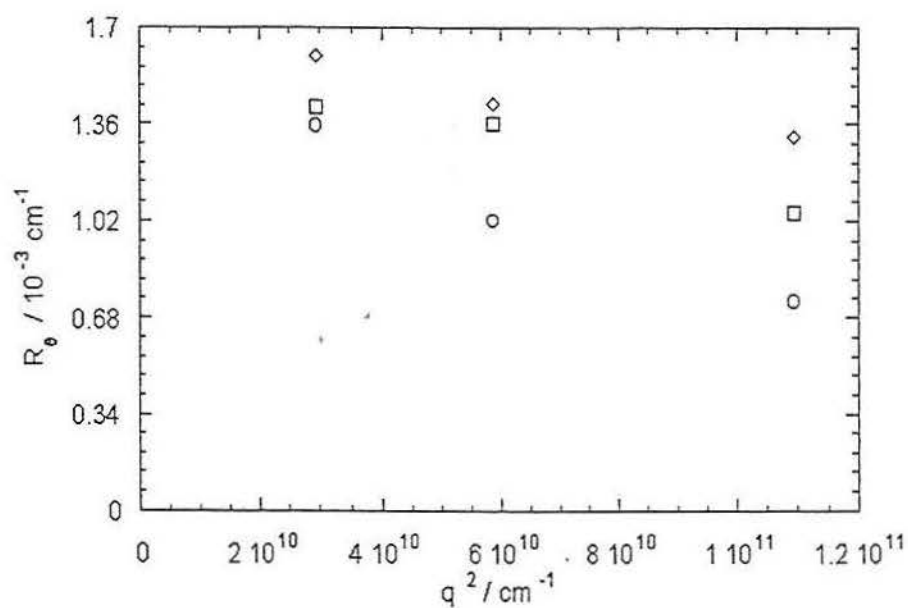


Figura 5.16: Razão Rayleigh R_θ em função de q^2 para o dextrano $Mw = 2.000.000 \text{g.mol}^{-1}$ e concentração de $2,5 \text{g.L}^{-1}$. (o): $c_g = 0 \text{g.L}^{-1}$; (\square): $c_g = 5 \text{g.L}^{-1}$; (\diamond): $c_g = 30 \text{g.L}^{-1}$.

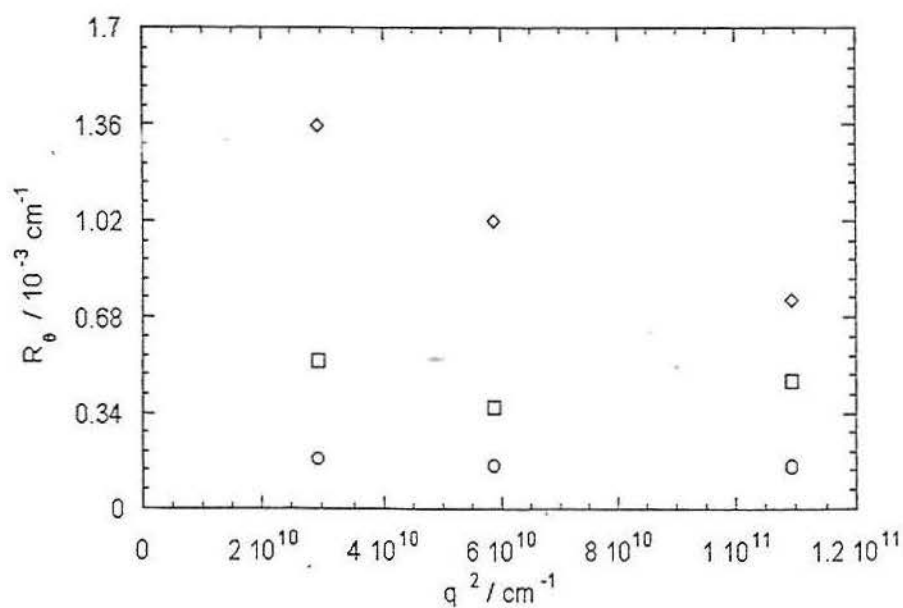


Figura 5.17: Razão Rayleigh R_θ em função de q^2 para o dextrano livre. (o): $Mw = 70.000 \text{g.mol}^{-1}$ com $c = 10 \text{g.L}^{-1}$; (\square): $Mw = 500.000 \text{g.mol}^{-1}$ com $c = 5 \text{g.L}^{-1}$; (\diamond): $Mw = 2000.000 \text{g.mol}^{-1}$ e $c = 2,5 \text{g.L}^{-1}$.

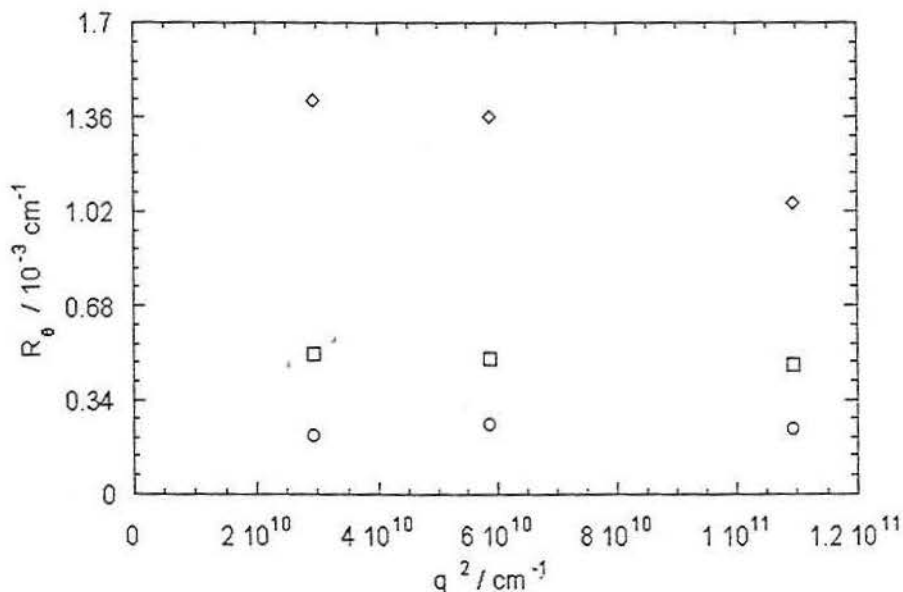


Figura 5.18: Razão Rayleigh R_θ em função de q^2 para o dextrano aprisionado na matriz de agarose, $c_g = 5 \text{g.L}^{-1}$. (\circ): $Mw = 70.000 \text{g.mol}^{-1}$ e $c = 10 \text{g.L}^{-1}$; (\square): $Mw = 500.000 \text{g.mol}^{-1}$ e $c = 5 \text{g.L}^{-1}$; (\diamond): $Mw = 2.000.000 \text{g.mol}^{-1}$ e $c = 2,5 \text{g.L}^{-1}$.

de agregados em solução livre. O efeito da observação de agregados pode ser minimizado quando essa mesma solução de dextrano é aprisionada dentro da matriz, conforme figura 5.18. Neste caso os agregados são praticamente imobilizados pelo gel, reduzindo a dependência angular da razão Rayleigh. Para os dextransos de $Mw = 70.000 \text{g.mol}^{-1}$ e $Mw = 500.000 \text{g.mol}^{-1}$, tanto livre como aprisionado, onde nenhuma variação angular sistemática está presente, fizemos uma média dos valores de R_θ correspondentes aos ângulos de 60° , 90° e 150° . Por outro lado, para $Mw = 2000.000 \text{g.mol}^{-1}$ utilizamos apenas valores a 150° , de forma a minimizar a observação da interação dos agregados na solução. Portanto, nas figuras 5.19 e 5.20, o valor de R_θ é médio. Na figura 5.21, apenas valores obtidos a 150° são mostrados.

Conforme abordado acima, R_θ aumenta com o aumento da massa molecular. Observamos nas figuras 5.19, 5.20 e 5.21 que a intensidade de luz dinamicamente espalhada também aumenta em função da concentração de dextrano para uma mesma massa molecular. A razão Rayleigh, para as três massas moleculares investigadas,

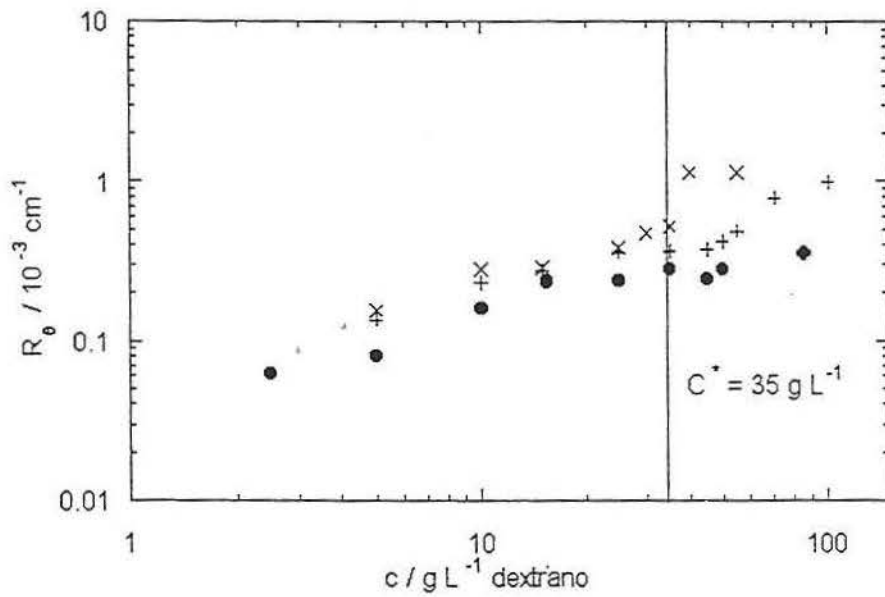


Figura 5.19: Razão Rayleigh R_θ em função da concentração do dextrano c ($M_w = 70.000 \text{ g.mol}^{-1}$) em várias concentrações de agarose. (\bullet): $c_g = 0 \text{ g.L}^{-1}$; ($+$): $c_g = 5 \text{ g.L}^{-1}$; (\times): $c_g = 30 \text{ g.L}^{-1}$.

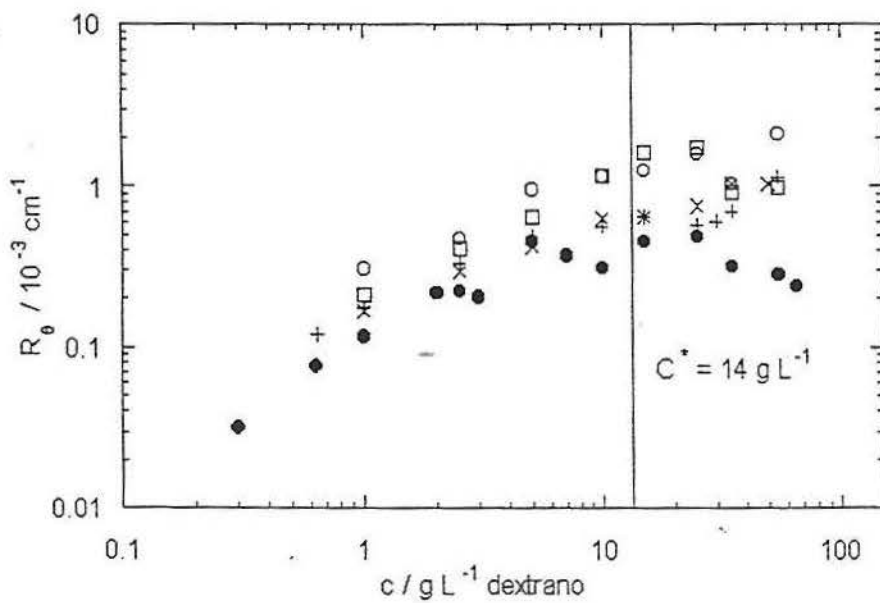


Figura 5.20: Razão Rayleigh R_θ em função da concentração do dextrano c ($M_w = 500.000 \text{ g.mol}^{-1}$) em várias concentrações de agarose. (\bullet): $c_g = 0 \text{ g.L}^{-1}$; ($+$): $c_g = 5 \text{ g.L}^{-1}$; (\times): $c_g = 10 \text{ g.L}^{-1}$; (\square): $c_g = 30 \text{ g.L}^{-1}$ e (\circ): $c_g = 40 \text{ g.L}^{-1}$.

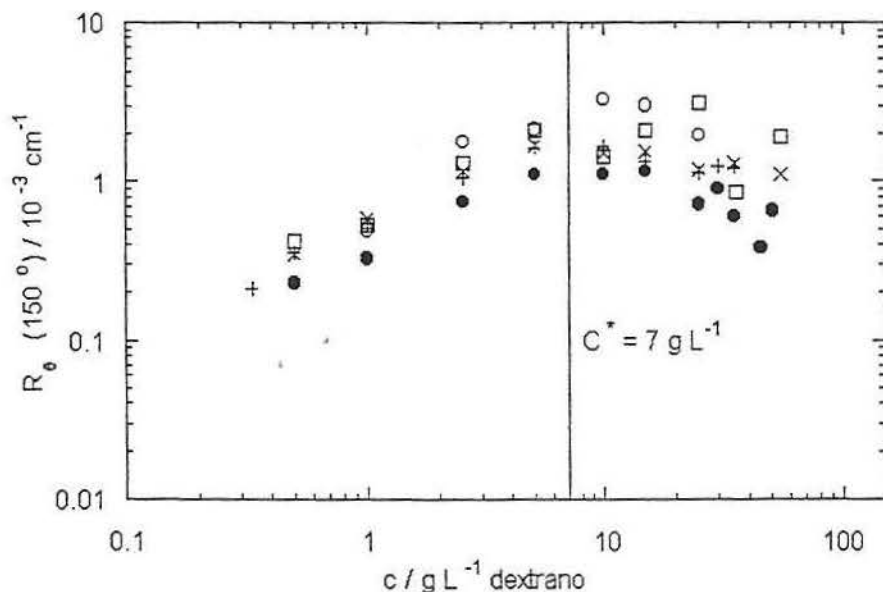


Figura 5.21: Razão Rayleigh R_θ em função da concentração do dextrano c ($Mw = 2.000.000 \text{ g.mol}^{-1}$) em várias concentrações de agarose: (\bullet): $c_g = 0 \text{ g.L}^{-1}$, ($+$): $c_g = 5 \text{ g.L}^{-1}$, (\times): $c_g = 10 \text{ g.L}^{-1}$, (\square): $c_g = 30 \text{ g.L}^{-1}$ e (\circ): $c_g = 40 \text{ g.L}^{-1}$. Ângulo de espalhamento 150° .

apresenta um comportamento similar. Para os três casos, considera-se que a luz espalhada aumenta de forma linear até a concentração crítica. Na figura 5.19, a solução de dextrano livre com $Mw = 70.000 \text{ g.mol}^{-1}$, mostra um patamar como é esperado nas proximidades do máximo em região próxima a c^* . Esse comportamento, que vai sendo modificado à medida que aumenta a massa molecular, possivelmente se deve à importância que as ramificações vão adquirindo à medida que a massa molecular fica maior. Para as três massas moleculares, quando o polímero flexível se encontra aprisionado dentro do gel, temos separação de fases depois da concentração crítica. Nesse caso, onde a amostra não é mais homogênea, a intensidade de luz espalhada depende da região da amostra que está sendo iluminada pelo feixe.

Os resultados obtidos para o coeficiente de difusão D_z e para a razão Rayleigh R_θ , têm comportamentos inversos quando aumenta a concentração do gel. À medida que a concentração do gel aumenta a difusão diminui. Nas mesmas condições, a razão Rayleigh aumenta. Como bem estabelecido [3,66], D_z e R_θ são ambas funções

do módulo osmótico $\frac{\partial c}{\partial \Pi}$:

$$D_z = \frac{\partial \Pi / \partial c}{f} \quad (5.5)$$

$$R_\theta = Kc \frac{kT}{\partial \Pi / \partial c} \quad (5.6)$$

onde Π é a pressão osmótica da solução, c é a concentração, f é o coeficiente de fricção, K é o fator de contraste para o espalhamento de luz[67]. Como as medidas foram realizadas em regime diluído, onde a condição $q.R_g \ll 1$ é válida, considera-se que o coeficiente de fricção é o coeficiente da molécula como um todo. O produto das equações 5.5 e 5.6 resulta em

$$D_z R_\theta = \frac{KkTc}{f} \quad (5.7)$$

que é independente da quantidade termodinâmica Π . No presente trabalho foi assumido explicitamente que a solução de dextrano forma uma única fase dentro da matriz do gel de agarose e, como consequência, as taxas de relaxação lenta e rápida são devidas somente aos movimentos do dextrano. Ou seja, R_θ é quem governa as taxas de relaxação.

As figuras 5.22, 5.23 e 5.24 mostram o comportamento do produto $D_z.R_\theta$ em função da concentração de dextrano para os três grupos de amostras estudadas. Vemos na figura 5.22 que para a menor das três massas moleculares, abaixo de c^* , todos os pontos recaem sobre uma mesma reta. Isso significa que o coeficiente de fricção da molécula de dextrano é o mesmo tanto para a solução livre como para a solução aprisionada na matriz de agarose. A partir dessa constatação, é possível afirmar que o decréscimo no valor do coeficiente de difusão do dextrano dentro do gel, em relação à solução livre, é resultado da diminuição do módulo osmótico, não estando relacionado à fricção com a matriz circundante. A matriz gel é puramente estática, sendo sua entropia configuracional zero. Logo a função da matriz gel é reduzir o espaço disponível para as moléculas de dextrano, diminuindo sua entropia. Situação similar foi observada na diminuição do raio de giro de polímeros aprisionados em

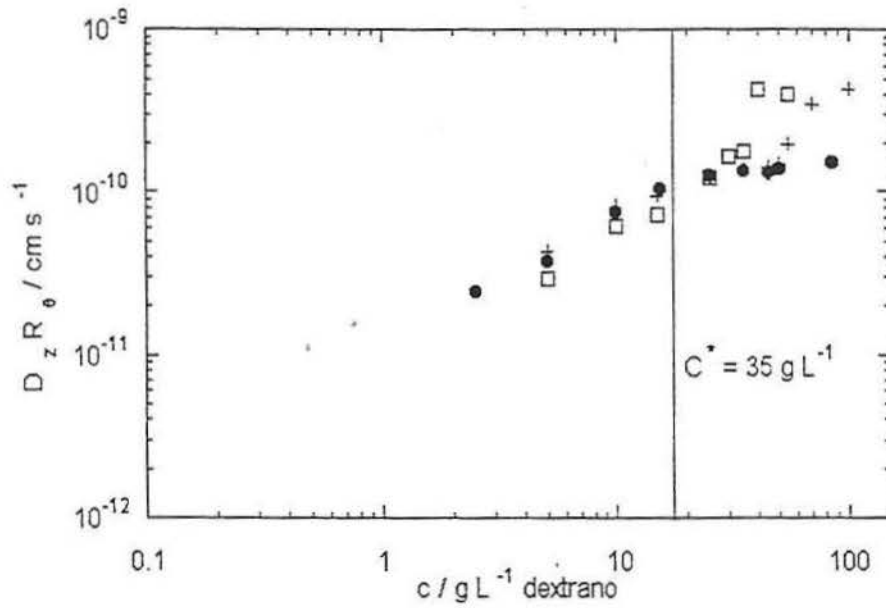


Figura 5.22: $D_z.R_\theta$ em função da concentração do dextrano c ($M_w = 70.000 \text{ g.mol}^{-1}$) em várias concentrações de agarose. (\bullet): $c_g = 0 \text{ g.l}^{-1}$, ($+$): $c_g = 5 \text{ g.l}^{-1}$ e (\square): $c_g = 30 \text{ g.l}^{-1}$.

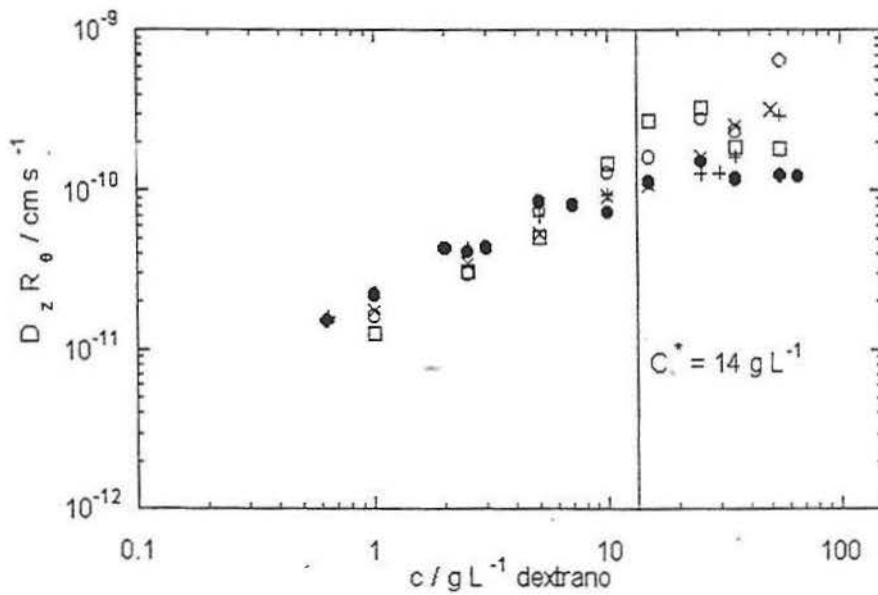


Figura 5.23: $D_z.R_\theta$ em função da concentração do dextrano c ($M_w = 500.000 \text{ g.mol}^{-1}$) em várias concentrações de agarose. (\bullet): $c_g = 0 \text{ g.l}^{-1}$, ($+$): $c_g = 5 \text{ g.l}^{-1}$, (\times): $c_g = 10 \text{ g.l}^{-1}$, (\square) $c_g = 30 \text{ g.l}^{-1}$ e (\circ) $c_g = 40 \text{ g.l}^{-1}$.

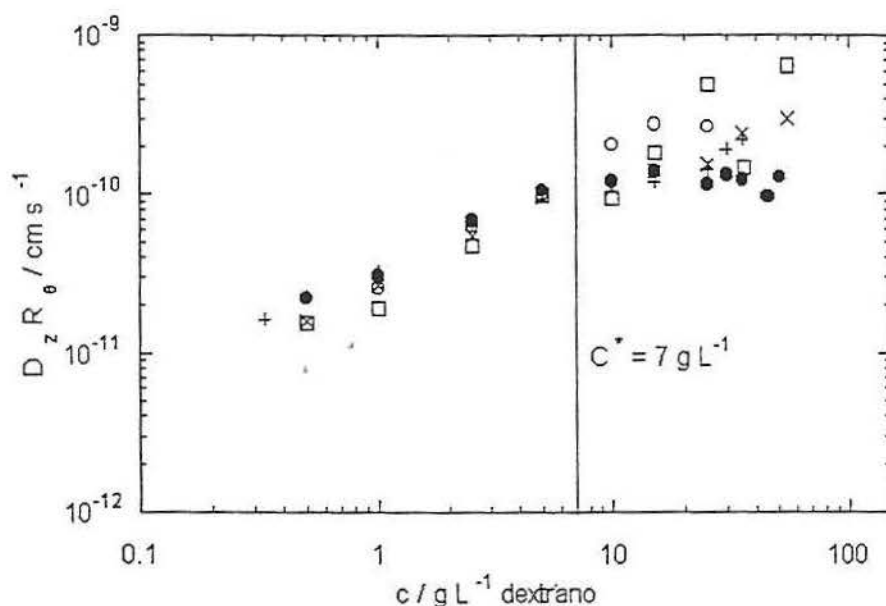


Figura 5.24: $D_z R_\theta$ em função da concentração do dextrano c ($M_w = 2000.000 \text{ g.mol}^{-1}$) em várias concentrações de agarose. (\bullet): $c_g = 0 \text{ g.L}^{-1}$, (+) : $c_g = 5 \text{ g.L}^{-1}$, (\times): $c_g = 10 \text{ g.L}^{-1}$, (\square): $c_g = 30 \text{ g.L}^{-1}$ e (\circ): $c_g = 40 \text{ g.L}^{-1}$.

redes randômicas, onde o fenômeno da reticulação reduziu a entropia configuracional das moléculas aprisionadas [64,65,20].

Ao contrário do que ocorre para a massa molecular menor, para as massas moleculares maiores ($M_w = 500.000$ e $2.000.000 \text{ g.mol}^{-1}$) o aumento de R_θ não é completamente compensado pela respectiva diminuição de D_z . Esse resultado indica a existência de um efeito retardador de origem não termodinâmica que afeta preferencialmente as massas moleculares maiores de dextrano, $M_w = 500.000$ e $2.000.000 \text{ g.mol}^{-1}$. Como as cadeias de dextrano são mais longas, em função da maior massa molecular do polímero flexível, possivelmente essas comecem a se entrelaçar com as cadeias de agarose que formam a matriz rígida. Seguindo esse raciocínio, à medida que a massa molecular aumenta, o processo difusivo ficaria cada vez mais e mais lento. Esse efeito retardador fica mais evidente com o aumento da concentração da agarose, uma vez que esse aumento na concentração da matriz faz com que os poros dentro do gel fiquem cada vez menores [64,65].

Como discutido anteriormente, a dependência angular da intensidade de luz es-

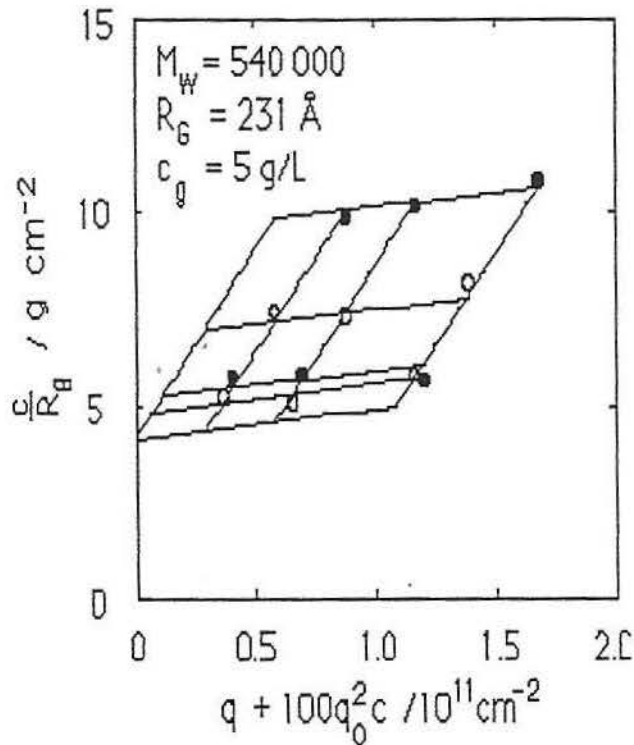


Figura 5.25: Gráfico do tipo Zimm obtido a partir do espalhamento de luz dinâmico do dextrano $M_w = 500.000 \text{ g.mol}^{-1}$ em géis de agarose.

palhada, R_θ , está relacionada à massa molecular M_w do dextrano. Parâmetros, tais como massa molecular M_w e o raio de giro R_g de macromoléculas de dextrano em solução, são determinados classicamente por espalhamento de luz estático[68]. Para se obter os valores de M_w e R_g é necessário que as amostras sejam preparadas em regime diluído, ou seja, que a condição $q.R_g \ll 1$ seja satisfeita. A presença de poeira e associações moleculares também conduzem a valores falsos de massa molecular e raio de giro. No preparo das amostras com esses polissacarídeos, tendo a água como solvente, podem surgir tais dificuldades. A remoção de partículas de poeira e de associações moleculares na presença de solvente aquoso é um processo bastante difícil. Como o presente sistema dextrano-agarose-água envolve a formação de um gel rígido, as partículas de poeira e as associações que atuam como espalhadores de luz espúria ficam imobilizadas pela matriz de agarose. Essa quantidade extra de luz espalhada tem apenas uma contribuição estática, que é somada a luz espalhada

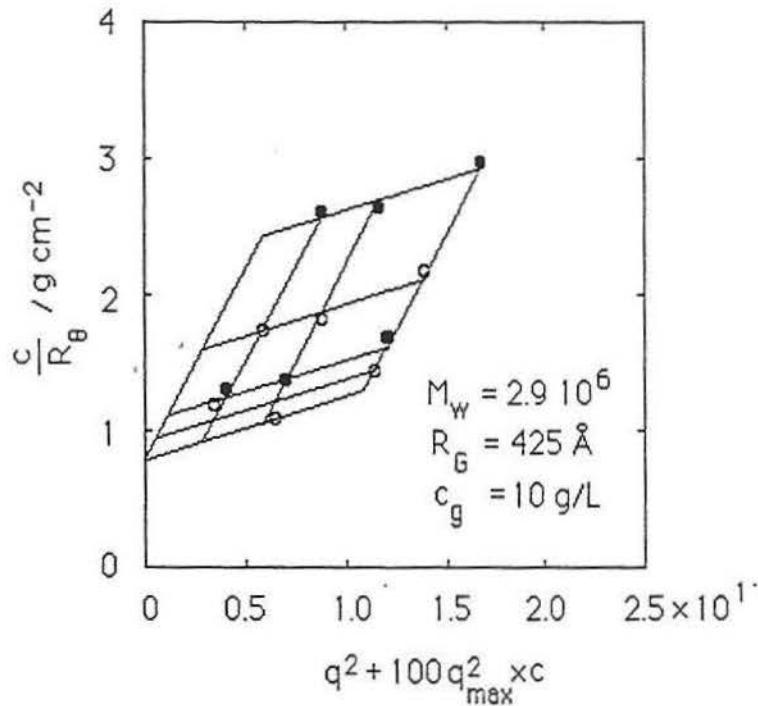


Figura 5.26: Gráfico do tipo Zimm obtido a partir do espalhamento de luz dinâmico do dextrano $M_w = 2000.000 \text{ g.mol}^{-1}$ em géis de agarose.

pela rede estática da agarose. Desta maneira, procurou-se obter informações sobre o comportamento do dextrano dissolvido que se move dentro da matriz rígida através do valor de R_θ .

A partir da intensidade de luz espalhada em função dos três ângulos de espalhamento investigados, foi possível construir um gráfico de Zimm. A partir do gráfico de Zimm determinamos a raio de giro R_g da molécula de dextrano. O valor do raio hidrodinâmico R_h foi calculado conforme 3.31. Os resultados para as massas moleculares $M_w = 500.000$ e $2.000.000 \text{ g.mol}^{-1}$ são mostrados nas figuras 5.25 e 5.26 e resumidos na tabela 5.1. Para a menor das três massa moleculares investigadas, $M_w = 70.000 \text{ g.mol}^{-1}$, o sinal da intensidade de luz espalhada foi muito fraco, e os parâmetros extraídos devem ser avaliados com reservas.

A partir de medidas da intensidade de luz espalhada (espalhamento estático e dinâmico) foi obtido o valor da razão entre o raio de giro e o raio hidrodinâmico $\rho = R_g/R_h$ para a solução de dextrano livre [68]. Este valor de ρ está de acordo com o valor teórico obtido para polímeros lineares em condições θ , ou seja 1.5. Entretanto,

Tabela 5.1: Parâmetros referentes ao polímero flexível dextrano.

$M_{nom}/1000$	$M_w/1000$	R_g/nm	R_h/nm	$\rho = R_g/R_h$	A_2	Obs.
70	64	9.6	6.5	1.48	—	Ref.68 $c_g = 0g.L^{-1}$
500	490	24.4	16	1.53	—	Ref.68 $c_g = 0g.L^{-1}$
2000	1850	42.2	37.8	1.12	—	Ref.68 $c_g = 0g.L^{-1}$
70	—	—	6.2	—	—	Esse Trabalho $c_g = 0g.L^{-1}$
70	—	—	7.8	—	—	Esse Trabalho $c_g = 5g.L^{-1}$
500	540	23.1	18.7	1.24	$2.5 \cdot 10^{-4}$	Esse Trabalho $c_g = 5g.L^{-1}$
2000	3400	59.8	43	1.39	$7.3 \cdot 10^{-5}$	Esse Trabalho $c_g = 5g.L^{-1}$
2000	2900	42.5	55.9	0.76	$7.3 \cdot 10^{-5}$	Esse Trabalho $c_g = 10g.L^{-1}$

para a solução de dextrano com $Mw = 2.000.000g.mol^{-1}$ o valor de ρ é menor do que o valor teórico. A explicação para essa diferença é que o dextrano de mais alta massa molecular não é uma cadeia linear, mas sim um polímero ramificado[69]. Já, os parâmetros por nós obtidos através do espalhamento de luz dinâmico para o dextrano de massa molecular $Mw = 2.000.000g.mol^{-1}$ dependem da concentração de agarose que forma a matriz gel que circunda o polímero flexível.

Para $Mw = 500.000g.mol^{-1}$, o valor do raio de giro do dextrano aprisionado no gel, obtido do gráfico de Zimm dinâmico é muito próximo do valor teórico, mas o valor de ρ é menor que o valor previsto. Isso indica que a cadeia de dextrano com essa massa molecular é ramificada.

Para o $Mw = 2.000.000g.mol^{-1}$, como já mencionado, a variação no valor de ρ obtido a partir do gráfico Zimm depende da concentração da matriz. A medida que a concentração de agarose passa de 5 para $10g.L^{-1}$, o valor da razão ρ diminui praticamente 50%. Na figura 5.27 temos o comportamento de R_g em função da massa molecular. Apesar de considerarmos que os pontos estão sobre uma mesma curva mestra, as discrepâncias visíveis provavelmente são reais. Essas diferenças podem estar indicando um fracionamento do dextrano de massa molecular $Mw = 2.000.000g.mol^{-1}$ quando a concentração da agarose aumenta de 5 para $10g.L^{-1}$. À medida que a concentração de agarose aumenta, o tamanho dos poros por onde circula o dextrano diminui, o que faz com que as frações de massas moleculares maiores sejam imobilizadas. Cabe ainda ressaltar, que para a matriz gel com $c_g = 10g.L^{-1}$, o valor da razão ρ para o dextrano é menor do que o valor para uma esfera rígida impenetrável. Esse resultado aparentemente sem significado físico pode ser explicado através da existência de entrelaçamentos entre as moléculas de dextrano e a matriz. Quando o raio de giro torna-se comparável com o tamanho do poro da matriz, esses entrelaçamentos impedem o movimento do dextrano e esse fato faz com que o valor aparente de R_h torne-se muito alto. Essa conclusão está de acordo com variações anômalas que ocorrem em $D_z.R_\rho$.

O expoente da lei de potência que vemos na figura 5.27, $\nu = 0.43 \pm 0.03$ é significativamente menor do que o esperado para um polímero linear em bom solvente ($\nu = 0.588$), ou mesmo para um solvente teta ($\nu = 0.5$). O segundo coeficiente virial

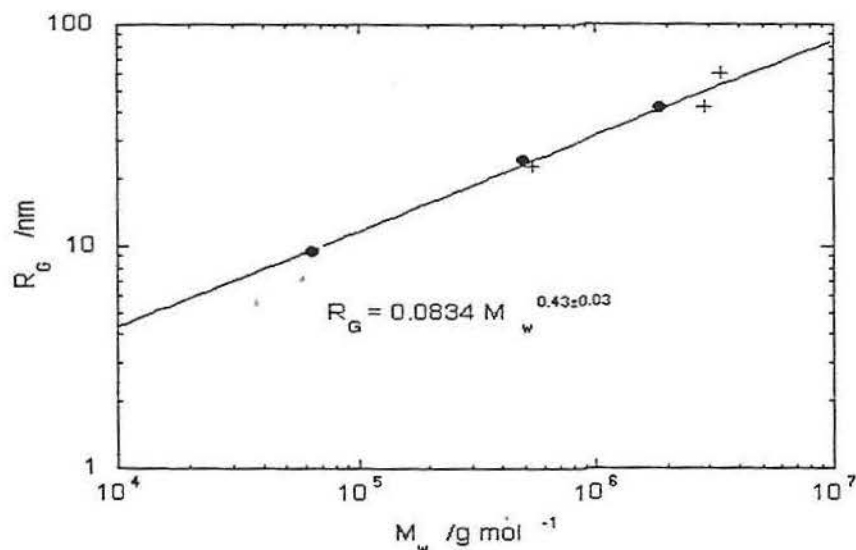


Figura 5.27: Raio de giro R_g em função da massa molecular M_w . (●): Dados do espalhamento de luz estático segundo referência [68]; (+): Dados do espalhamento de luz dinâmico obtidos neste trabalho.

A_2 é pequeno mas, ainda assim, é um valor positivo. De onde conclui-se que a água é um bom solvente, resultado este que está de acordo com a inclinação positiva de $D_z(c)$ visível nas figuras 5.10, 5.11 e 5.12 mas é inconsistente com o solvente em condição teta ou solvente pobre, segundo os valores de ρ . Esses resultados podem ser entendidos se assumirmos que as amostras de dextrano são parcialmente ramificadas.

Na figura 5.28, vê-se a dependência entre o raio hidrodinâmico e a massa molecular, tanto para os valores previstos, como para os obtidos a partir do gráfico Zimm. Nesse gráfico, foram excluídos os dados referentes à amostra $c_g = 10 \text{g.L}^{-1}$, uma vez que nesta amostra existem entrelaçamentos entre o dextrano e a matriz gel. O expoente encontrado para a lei de potência referente a esse comportamento é $\nu = 0.50 \pm 0.03$. Contrastando com o comportamento dos polímeros lineares [70], esse valor é maior que o valor do expoente estático encontrado a partir da equação da reta referente a figura 5.28. Porém, ainda assim esse valor é ainda menor do que aquele para polímeros lineares em um bom solvente. A razão ρ é uma função decrescente da massa molecular. Assim, mais uma vez, podemos concluir que o

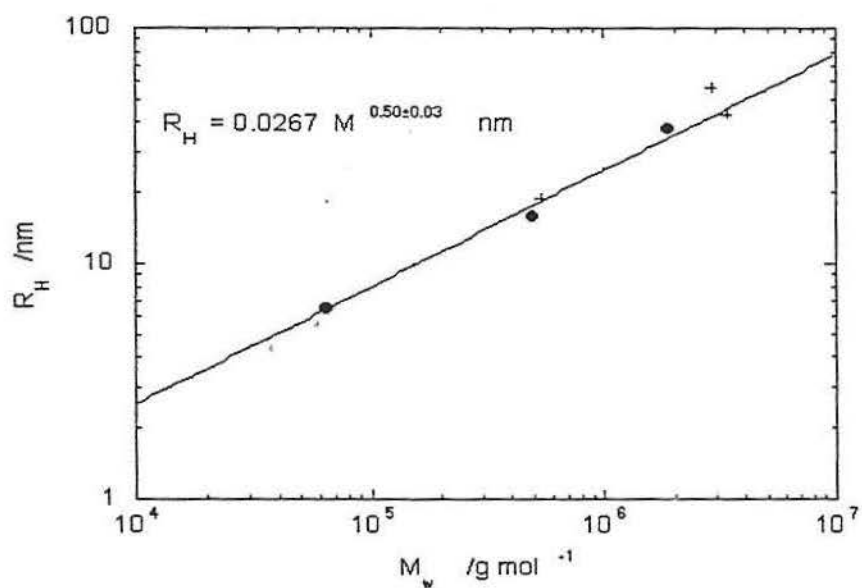


Figura 5.28: Raio hidrodinâmico R_h em função da massa molecular M_w . (●): Dados do espalhamento de luz estático segundo referência [68]; (+): Dados do espalhamento de luz dinâmico obtidos neste trabalho. A linha contínua mostra o melhor ajuste para os pontos experimentais, exceto para aqueles referentes as amostras com concentração de agarose de 10g.L^{-1} .

dextrano tem uma estrutura ramificada.

Capítulo 6

CONCLUSÕES

A intensidade de luz espalhada pelas soluções de dextrano livre é maior do que quando estas encontram-se aprisionadas dentro do hidrogel de agarose. Esse comportamento foi observado para as três massas moleculares em questão e é atribuído à redução do espaço livre que as cadeias de dextrano dispõem para se movimentar. O fato do valor de β diminuir para as mostras de dextrano aprisionadas no gel, decorre da forte contribuição heteródina da matriz estática.

A presença da matriz que enclausura o polímero livre faz com que o coeficiente de difusão diminua, enquanto que a razão Rayleigh, em função do forte caráter heteródino do gel rígido, aumente a medida que a concentração de agarose aumenta.

Os movimentos do dextrano livre para as três massas moleculares são difusionais. A taxa de relaxação de Γ *versus* q^2 para as duas massas menores mostra que a difusão de dextrano é vista como a difusão translacional associada à difusão dos centros de massa de um novelo polimérico. A presença de agregados na solução do dextrano $2.000.000 \text{ g.mol}^{-1}$ faz com que $\Gamma(q^2)$ não seja uma reta que passe pela origem. Porém quando essa solução é aprisionada no gel, os agregados ficam com seus movimentos restritos, fazendo com que o comportamento de Γ aproxime-se daquele observado para massas moleculares menores.

Os resultados de espalhamento de luz dinâmico acima apresentados, mostram que é possível medir as propriedades de grandes moléculas que estejam se movendo dentro de uma matriz rígida que espalha luz muito mais fortemente do que as próprias moléculas. Além de parâmetros dinâmicos podemos obter a partir da avaliação dos

dados de intensidade, parâmetros tradicionalmente obtidos por medidas estáticas tais como M_w , R_g e A_2 . Para a massa molecular $70.000 \text{ g.mol}^{-1}$ não foi possível avaliar esses parâmetros por que quando suas soluções encontram-se aprisionadas na matriz, os sinais das intensidades medidas são muito fracos.

A intensidade da luz dinamicamente espalhada para as massas moleculares $70.000 \text{ g.mol}^{-1}$ e $500.000 \text{ g.mol}^{-1}$ não apresenta variação angular, o que permitiu calcular um valor médio de R_θ para os ângulos de 60° , 90° e 150° . Para as soluções de maior massa molecular, $2.000.000 \text{ g.mol}^{-1}$, apesar de uma dependência angular da intensidade ser esperada quando a massa molecular é elevada, o aumento foi excessivo para baixos ângulos. A explicação para esse fato é a presença de agregados. A observação desses agregados é minimizada a 150° . Quando a solução esta aprisionada no gel, os agregados estão imobilizados e os efeitos de sua presença são minimizados.

O produto de $D_z \times R_\theta$ para a massa molecular menor, $70.000 \text{ g.mol}^{-1}$, é independente da concentração da matriz. A diminuição no coeficiente de difusão é compensada pela aumento na razão Rayleigh. Já para as massas moleculares maiores, não existe tal compensação. Isso leva a conclusão de que cadeias de dextrano mais longas começam a se entrelaçar com as cadeias da agarose. Para o dextrano de massa molecular 70000 g.mol^{-1} o coeficiente de fricção da molécula é o mesmo tanto em solução livre como para a molécula aprisionada no gel. A diminuição do coeficiente de difusão no gel é simplesmente decorrência da diminuição da pressão osmótica e não está relacionado com a fricção na matriz.

A avaliação e comparação dos valores de R_g e A_2 , como já dito, foi possível somente para as massas moleculares $500.000 \text{ g.mol}^{-1}$ e $2.000.000 \text{ g.mol}^{-1}$, para as quais a razão entre o raio de giro e o raio hidrodinâmico é menor do que aquela esperada para polímeros lineares em condição θ . Isso pode ser explicado pela presença de ramificações nas cadeias de dextrano, ramificações essas que adquirem maior importância a medida que a massa molecular aumenta. Conclui-se que para massas moleculares mais elevadas, principalmente para a massa $2.000.000 \text{ g.mol}^{-1}$, a razão ρ tem dependência da concentração da matriz. À medida que a concentração de agarose aumenta o dextrano comporta-se como se estivesse sendo fracionado, ou seja, maiores massas moleculares vão sendo imobilizadas quando o tamanho do poro

da agarose decresce. Um aumento ainda maior na concentração da matriz reduz o valor de ρ a 0.76 para o dextrano de massa $2.000.000 \text{ g.mol}^{-1}$. Isso evidencia a existência de entrelaçamentos das moléculas de dextrano com a agarose. Quando o raio de giro torna-se comparável ao tamanho do poro da matriz, os entrelaçamentos impedem o movimento do dextrano e o valor aparente de R_h torna-se alto. Essa conclusão concorda com a variação anômala vista para $D_z.R_\theta$.

Observamos que o valor de A_2 apesar de pequeno é positivo. De onde se conclui que a água é um bom solvente, resultado que está de acordo com a inclinação positiva de $D_z(c)$. Por outro lado, o valor do expoente para a lei de potência é menor do que o esperado para polímeros lineares em bom solvente ou mesmo em solvente θ . Para explicar esse comportamento, assumimos que as cadeias de dextrano são ramificadas.

Referências

- [1] Pecora, R. *J. Chem. Phys.* 1964, 40, 1604.
- [2] Lindner, J. S.; Huang, S. S. *Modern Methods of Polymer Characterization* Barth, H. G. & Mays, J. W., John Wiley & Sons Inc., New York 1991, Captulo 9.
- [3] de Gennes, P. G. "Scaling Concepts in Polymer Physics"; Cornell: Ithaca, NY, 1979.
- [4] Giglio, M.; Asnaghi, D.; Bossi, A.; Righetti, P. G. *J. Chem. Phys.* 1995, 102, 9736.
- [5] Horkay, F.; Zrinyi, M. *J. Macromol. Sci. Phys.*, B25 1986, 3, 307.
- [6] Hecht, A. M.; Stanley, H. B.; Geissler, E. *Polymer* 1993, 34, 2894.
- [7] Lal, J.; Bastide, J.; Bansil, R.; Boué, F. *Macromolecules* 1993, 26, 6092.
- [8] Horkay, F.; Stanley, H. B.; Geissler, E.; King, S. M. *Macromolecules* 1995, 28, 678.
- [9] Briber, R. M.; Liu, X.; Bauer, B. J. *Science* 1995, 268, 395.
- [10] Adam, M.; Delsanti, M. *Le journal de Physique* 1976, 37, 1045.
- [11] Sellen, D. B. . *J. Polym. Sci.: Part b: Polymer Physics* 1987, 25, 699.
- [12] Tanaka, T.; Hocker, L. O.; Benedek, G. B. *J. Chem. Phys.* 1973, 59, 5151.
- [13] Tanaka, T. em "Dynamic Light Scattering"; Pecora, R., Ed Plenum Press: NY., 1985, Captulo 9.

- [14] Horkay, F.; Hecht, A. M.; Geissler, E. *Macromolecules* 1994, 27, 1795.
- [15] Horkay, F.; Hecht, A. M.; Geissler, E. *J. Polym. Sci.: Part b: Polymer Physics* 1995, 33, 1641.
- [16] Horkay, F.; Burchard, W.; Hecht, A. M.; Geissler, E. *Macromolecules* 1993, 26, 4203.
- [17] Horkay, F.; Burchard, W.; Geissler, E.; Hecht, A. M. *Macromolecules* 1993, 26, 1296.
- [18] Guenet, J. M.; Brûlet, A.; Rochas, C. *Int. J. Biol. Macromol.* 1993, 15, 131.
- [19] Geissler, E.; Horkay, F.; Hecht, A. M.; *Phys. Rev. Lett* 1993, 71, 645.
- [20] Baumgrtner, A.; Muthukumar, M. *J. Chem. Phys.* 1987, 5, 3082.
- [21] v Kuo, C.; Bansil, R.; Konk, C. *Macromolecules* 1995, 28, 768.
- [22] Key, P. Y.; Sellen, D. B. *J. Polym. Sci.: Polymer Physics Edition* 1982, 20, 659.
- [23] Burne, P. M.; Sellen, D.B. *Bio Polymers* 1994, 34, 371.
- [24] Berne, B. J.; Pecora, R. *Dynamic Light Scattering*; Willey: NY, 1976.
- [25] Geissler, E.; Hecht, A. M. *J. Chem. Phys.* 1976, 65, 103.
- [26] Borsali, R.; Duval, M.; Benmouna, M. *Macromolecules* 1989, 22, 816.
- [27] Desbrières, J.; Borsali, R.; Rinaudo, M.; Milas, M. *Macromolecules* 1993, 26, 2592.
- [28] Benmouna, M.; Benoit, H.; Duval, M.; Akcasu, Z. *Macromolecules* 1987, 20, 1107.
- [29] Kloster, C.; Bica, C.; Lartigue, C.; Rochas, C.; Samios, D.; Geissler, E. *Macromolecules* 1998, 31, 7712.

- [30] Spychaj, T.; Bartkowiak, A. *Polymers for Advanced Technologies* 1998, 9, 138.
- [31] *Enciclopedia de Polmeros*, vol. 4, 752.
- [32] Medin, S. A. "Studies on Structure and Properties of Agarose". Uppsala-Sweden, Department of Biochemistry, Uppsala University, 1995. Tese de doutorado.
- [33] Vignon, M. R.; Rochas, C.; Vuong, R.; Tekely, P.; Chanzy, H. *Botanica Marina* 1994, 37, 331.
- [34] Vignon, M. R.; Morgan, E.; Rochas, C. *Botanica Marina* 1994, 37, 325.
- [35] Turquois, T.; Taravel, F. R.; Rochas, C. *Carbohydrate Research* 1993, 238, 27.
- [36] Rochas, C.; Lahaye, M. *Carbohydr. Polymers* 1989, 10, 289.
- [37] Lahaye, M.; Rochas, C. *Hydrobiologia* 1991, 221, 137.
- [38] Zhang, J.; Rochas, C. *Carbohydrate Polymers* 1990, 13, 257.
- [39] Chu, B. "Laser Light Scattering"; Academic Press, San Diego, 1991.
- [40] Daoud, M.; Cotton, J. P.; Farnoux, B.; Jannink, G.; Sarma, G.; Benoit, H.; Duplessix, R.; Picot, C.; De Gennes, P. G. *Macromolecules* 1975, 8, 804.
- [41] Cotton, J. P.; Nierlich, M.; Boué, F.; Daoud, M.; Farnoux, B.; Jannink, G.; Duplessix, R.; Picot, C. *J. Chem. Phys.* 1976, 65, 1101.
- [42] Richtering, W.; Burchard, W. *Progr Colloid & Polymer Sci* 1989, 80, 151.
- [43] Flippen, R. B. "Modern Methods of Polymer Characterization" Barth, H. G. & Mays, J. W., John Wiley & Sons Inc., New York 1991, Captulo 10.
- [44] Tanford, C. *Physical Chemistry of Molecules*, Wiley, New York, 1961.
- [45] Burchard, W. *Makromol. Chem., Makromol. Symp.* 1988, 18, 1.
- [46] Jr.Ford, N. C. em "Dynamic Light Scattering"; Pecora, R., Ed Plenum Press: NY., 1985, Captulo 2

- [47] Pecora, R. *Discuss. Faraday Soc. Revista* .1970, 49.
- [48] Pecora, R. em "Dynamic Light Scattering"; Pecora, R., Ed Plenum Press: NY., 1985, Captulo 1.
- [49] King, A. T.; "Photon Correlation Spectroscopy: Technique and Scope" em *Comprehensive Polymer Science*, 1.ed., vol.1, Ed. Colin Booth & Colin Price, Pergamon Press, Londres, 1989.
- [50] Patterson, G. D.; Jarry, J. P.; Lindsey, C.P. *Macromolecules* 1980, 13, 668.
- [51] SERIES 4700: Instruction Manual. Malvern: Malvern Instruments, 1992.
- [52] Diu, B.; Guthmann, C.; Lederer, D.; Roulet, B. in *Éléments de Physique Statistique*; Ed.: Hermann, Paris, 1995.
- [53] Geissler, E. in *Dynamic Light Scattering*; Brown, W., Ed.:Clarendon Press: Oxford, U. K., 1993; Captulo 11.
- [54] Brown, W.; Nicolai, T. em "Dynamic Light Scattering"; Brown, W., Ed.:Clarendon Press: Oxford, U. K., 1993; Captulo 6.
- [55] Koppel, D. E. *J. Chem. Phys.* 1972, 57, 4814.
- [56] Mackie, W.; Sellen D. B.; Sutcliffe, J. *Polymer* 1978, 19, 9.
- [57] Pusey, P. N; van Megen, W. *Physica A* 1989, 157, 705.
- [58] Kobayasi, S. *Rev.Sci. Instrum.* 1985, 1, 160.
- [59] Nicolai, T; Bronw, W.; Johnsen, R. M.; Stepánek, P. *Macromolecules* 1990, 23, 1165.
- [60] Richtering, W.; Gleim, W.; Burchard, W. *Macromolecules* 1992, 25, 3795.
- [61] Joosten, J. G. H.; McCarthy, J. L.; Pusey, P. N. *Macromolecules* 1991, 24, 6690.

- [62] Pusey, P. N.; Tough, R. J. A. em "Dynamic Light Scattering"; Pecora, R., Ed Plenum Press: NY., 1985, Captulo 4.
- [63] Rochas, C. Comportement des Polyelectrolytes en Solvant Organique Application a la Chromatografie sur Gel. Grenoble, L" Universite Scientifique et Medical de Grenoble, 1978. Tese de doutorado.
- [64] Righetti, P. G.; Brost, B. C. W. : Snyder, R. S. J. *Biochem. Biophys. Methods.* bf 1981, 4, 347.
- [65] Rochas, C. ; Hecht, A . M. ; Geissler, E. *Macromol. Symp.* 1999, 138, 157.
- [66] Landau, L. D. ; Lifschitz, E. M. Fluid Mechanics, Pergamon, Oxford, 1959.
- [67] Horkay, F.; Hecht, A. M.; Stanley, B.; Geissler, E. *Eur. Polym. J.* 1994, 30, 215.
- [68] Roger, P." Comportement Hidrodinamique de l'amylose en Solutions Diluees". Nantes, Faculte des *Sciences* et Techniques, Universite de Nantes, 1993. Tese de doutorado.
- [69] Kuge, T. ; Kobayashi, K. ; Kitamura, S. ; Tanahashi, H. *Carbohydrate Research*, 1987, 160, 205.
- [70] Adam, M. ; Delsanti, M. *Macromolecules*, 1977, 10, 1229.

ANEXO I

Artigo publicado.

Dynamics of a Polymer Solution in a Rigid Matrix

Carmen Kloster, Clara Bica, Colette Lartigue, Cyrille Rochas,
Dimitrios Samios, and Erik Geissler

Laboratoire de Spectrométrie Physique, CNRS UMR 5588, B.P. 87,
38402 St. Martin d'Hères Cedex, France, and Laboratório de
Instrumentação e Dinâmica molecular, Instituto de Química,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre,
Rio Grande do Sul, Brazil

Macromolecules®

Reprinted from
Volume 31, Number 22, Pages 7712-7716

Dynamics of a Polymer Solution in a Rigid Matrix

Carmen Kloster,^{†‡} Clara Bica,[‡] Colette Lartigue,[†] Cyrille Rochas,[†]
Dimitrios Samios,[‡] and Erik Geissler^{*†}

Laboratoire de Spectrométrie Physique, CNRS UMR 5588, B.P. 87, 38402 St. Martin d'Hères Cedex, France, and Laboratório de Instrumentação e Dinâmica molecular, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

Received March 31, 1998; Revised Manuscript Received August 19, 1998

ABSTRACT: We report dynamic light scattering measurements of solutions of a low molecular weight polymer (dextran $M_w = 70\,000$), both in the free state and inside agarose hydrogels of varying concentrations. The light scattered from the rigid agarose matrix strongly heterodynes the signal from the mobile component, thereby allowing measurements both of the diffusion coefficient D_c and of the Rayleigh ratio R_θ of the dextran. For dextran concentrations c less than or equal to the overlap concentration c^* , D_c decreases as the concentration of the gel matrix c_g increases. The product $D_c R_\theta$, which depends only on hydrodynamic factors, is, however, independent of the agarose concentration. It is concluded that the principal influence of the static gel matrix is to reduce the entropy and hence the osmotic pressure of the dextran solution. For concentrations of dextran greater than c^* , the gel structure undergoes a phase separation.

Introduction

Over the past few years, several investigations have been reported into the behavior of free polymer chains inside swollen networks. Measurements of swelling pressure and small-angle X-ray scattering show that free chains inside a gel of the same polymer do not behave like a polymer solution but instead as if they were additional network chains.¹⁻³ Small angle neutron scattering has shown that free chains in a swollen network adopt a collapsed configuration that is smaller than the unperturbed size of the molecule.^{4,5} As predicted by theory,⁶ the reduction in available configuration space in the random network causes the individual polymer coils to shrink as if they were in poor solvent conditions. Apart from swelling pressure measurements,^{1,2} however, little is known about the effect of a gel matrix on the osmotic susceptibility of polymer solutions.

Ternary systems in general have recently become the subject of increased attention. The influence of a dissolved polymer on the formation of polyacrylamide hydrogels has been examined by static light scattering.⁷ In dynamic light scattering investigations into ternary systems, emphasis has in the past been placed more on the measurement of the diffusion coefficient than on the intensity of the scattered light. Particular interest has been paid to cases in which the host matrix has the same refractive index as the solvent,⁸ since this condition allows the movement of the guest polymer to be detected alone. Measurements have also been reported on the dynamics of free chains trapped inside biopolymer hydrogels;^{9,10} here, because of the large difference in refractive index between the solvent and the matrix, index matching techniques are difficult to implement. It is generally found that the diffusion coefficient of the guest polymer is smaller than that in the free solution. To gain access to the thermodynamics of the solution, however, the intensity of the dynamically scattered light must also be measured.

In this article we use quasi-elastic light scattering to investigate the motion of flexible polymer molecules in a rigid gel matrix composed of a different polymer. Unlike gels made of flexible chains, the amplitude of the movements of a rigid-rod network is extremely small. The overwhelming majority of the light scattered by these systems is elastic: the pattern of light scattered by the network alone thus consists of a static array of speckles. This pattern may, however, evolve slowly under the influence of thermal stresses in the gel generated by the laser beam or by overall temperature fluctuations in the system. In principle, therefore, if such gels host a solution containing free polymer molecules, any quasi-elastic component in the scattered light is almost entirely attributable to the movement of the free chains in the network. This consideration enables us in principle to measure both the diffusion coefficient and the osmotic susceptibility of the polymer solution inside the matrix. In the situations described here, however, the static scattering can be as much as 3 orders of magnitude more intense than the fluctuating component of the guest solution. This condition sets a severe experimental challenge in the determination of the diffusion coefficient and the Rayleigh ratio of the solution. As the interpretation of such scattering spectra relies on proper separation between these two components, the theoretical section contains a summary description of the procedure and its underlying assumptions.

Theoretical Section

The question of optical heterodyning in gels has been abundantly treated in the past.¹¹⁻¹⁶ At the temperature of measurement (25 °C), the agarose matrix is practically rigid, generating a static speckle pattern whose intensity $I_s(q)$ and phase depend on the particular speckle observed. The total electric field at the detector is then the sum of the static field and the field $E_f(t)$ from the mobile polymers in the network. The resulting intensity fluctuations yield the field correlation function, $g(t)$, and also the fluctuating intensity, $I_f(t) = |E_f(t)|^2$.

[†] Laboratoire de Spectrométrie Physique.

[‡] Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

For a mobile polymer obeying Fick's equation, the correlation function $g(t)$ is

$$g(t) = \exp(-D_c q^2 t) \quad (1)$$

where D_c is the diffusion coefficient and $q (=4\pi n/\lambda) \sin(\theta/2)$ is the transfer wave vector. At low polymer concentrations, D_c describes the translational diffusion of the individual polymer molecules. Equation 1 involves time fluctuations of the concentration only; permanent spatial fluctuations in the system contribute to the static scattering, but not to the dynamics. The correlation spectrum of the intensity $I(t)$ is then

$$(1/t_E) \int I(t) I(t+\tau) dt = I_s^2 + 2I_s \langle I_f \rangle + \langle I_f \rangle^2 [1 + \beta g^2(\tau)] + 2I_s \langle I_f \rangle \beta g(\tau) \quad (2)$$

where the angular brackets are averages over the experimental accumulation time t_E , and $\beta (\leq 1)$ is the optical coherence factor. Normalizing (2) by the square of the average intensity (computer baseline), i.e.

$$\langle I \rangle^2 = \langle I_s + I_f \rangle^2 = \langle I_s \rangle^2 + 2\langle I_s \rangle \langle I_f \rangle + \langle I_f \rangle^2 \quad (3)$$

yields the total intensity correlation function

$$G(\tau) = \frac{\int I(t) I(t+\tau) dt}{\langle I \rangle^2 t_E} \quad (4)$$

As stated above, however, in most gels the speckle pattern evolves slowly with time, and I_s is not a true constant. This consideration has stimulated investigations into the notion of ensemble averaging and nonergodicity.^{14,15} In the present case, the dissolved polymer molecules are free to overlap and are therefore fully ergodic. Any time dependence of I_s is assumed to be sufficiently slow for it to be distinct from the fast fluctuations in I_f due to the motion of the free polymer. The time average of I_s^2 , namely $\langle I_s^2 \rangle$, determines the effective constant baseline ("far point") to which the correlation spectrum decays, i.e.

$$\text{far point} = (1/t_E) \int I(t) I(t+\tau_\infty) dt = \langle I_s^2 \rangle + 2\langle I_s \rangle \langle I_f \rangle + \langle I_f \rangle^2 \quad (5)$$

where τ_∞ is the extended channel delay. Here we are concerned only with the quantities $\langle I_f \rangle$ and $g(t)$. To obtain these, the far point is subtracted from eq 2, and the result is normalized by the computer baseline. This yields for the dynamic component of the intensity correlation function

$$H(\tau) = G(\tau) - \frac{\langle I_s^2 \rangle + 2\langle I_s \rangle \langle I_f \rangle + \langle I_f \rangle^2}{\langle I \rangle^2} = \beta [2X(1-X)g(\tau) + X^2 g^2(\tau)] \quad (6)$$

where $X = \langle I_f \rangle / \langle I_f + I_s \rangle$ and $H(\tau)$ tends to zero as τ tends to ∞ . β is found by extrapolating $G(\tau)$ to $\tau = 0$ for a dilute suspension of latex beads (for which $X = 1$). In the present optical arrangement, $\beta = 0.96$. Hence, for

the heterodyne case eq 5 is soluble¹⁵ for X and for $g(\tau)$. The required intensity is thus

$$I_f = X \langle I \rangle \quad (7)$$

where $\langle I \rangle = \langle I_f + I_s \rangle$ is the total intensity averaged over the experimental observation time t_E .

For the present system, therefore, it is seen that spatial averaging of the speckle pattern is not necessary to determine I_f . This assumption was confirmed by comparing intensity measurements from several different positions in the sample and for different values of the incident beam attenuator; the resulting variation in I_f was less than 10%. To obtain the absolute value of the fluctuating intensity, R_θ , however, the transmission Tr of the sample must be measured, as well as the intensity $I_{\text{stand}} = R_v I_0$ from a standard sample (toluene), where R_v is the Rayleigh ratio of the standard and I_0 is the intensity of the incident beam. Thus, finally,

$$R_\theta = \frac{R_v X \langle I \rangle \sin \theta}{I_{\text{stand}} \text{Tr}} \quad (8)$$

where θ is the scattering angle and where we assume that the incident laser intensity I_0 is the same for the measurements of the sample and of the standard. In the agarose-water gels used for the present measurements, Tr can be appreciably smaller than unity ($0.25 \leq \text{Tr} \leq 1$).

Sample Preparation

The dextran, of molecular weight $M_w = 70\,000$, was used as supplied by Sigma. The agarose was graciously provided by R. Armisen (Hispanagar, Spain). Its molecular weight, determined by viscometry,¹⁷ is $M_w = 1.2 \times 10^5$. The sulfate content specified by the manufacturer is 0.1%. The methyl content was found by ¹H NMR to be 0.6%. Dextran solutions were investigated in the concentration range $2 \text{ g L}^{-1} \leq c \leq 100 \text{ g L}^{-1}$; the agarose concentration of the host gel was in the range $0 \leq c_g \leq 40 \text{ g L}^{-1}$.

The samples were prepared by mixing the appropriate weights of agarose and dextran in deionized water and heating the mixture to 100 °C. The resulting solutions were stirred until complete dissolution and then transferred to cylindrical glass tubes of 10 mm outer diameter and sealed. The samples were melted again at 100 °C and allowed to cool to room temperature; gelation of the agarose occurred as the temperature fell below 45 °C.

Dynamic light scattering measurements were made with a Spectra Physics SP162 laser working at 488 nm, and a Malvern Instruments 7032 multibit correlator. All measurements were made in a temperature-controlled bath at 25 °C. The laser and goniometer were fixed to an optical table that was isolated from the building by pneumatic supports. Care was taken to eliminate any source of mechanical vibrations from the optical table, since any excitation of the fundamental frequency either of the sample or of the table is detected in the scattered signal.

Measurements of the transmission of the samples were made in the same cells, using a Kontron Uvikon 810 spectrophotometer working at 488 nm. To counter the lens effect of the cylindrical light scattering cells, these were placed in rectangular glass cuvettes containing water in the intervening space. A mask was applied to ensure that only light traversing the cylinder diameter was detected by the spectrophotometer.

Results and Discussion

All the polymer solutions and gels were measured at 60°, 90°, and 150°. This angular range was selected to

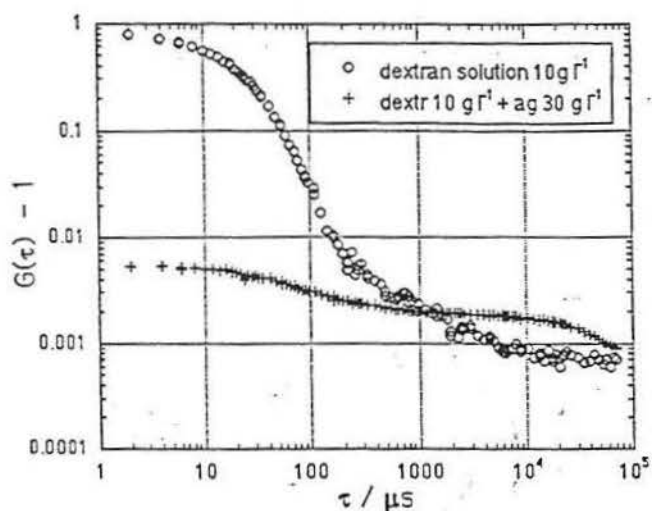


Figure 1. Intensity correlation function of a 10 g/L dextran solution ($M_w = 70\,000$) at 25 °C in the free solution (circles) and in an agarose gel of concentration 30 g/L. Scattering angle 90°.

minimize possible effects of multiple scattering that can arise at small angles in turbid gels; the observed absence of depolarized scattering in the primary beam, however, shows that this condition was in fact unnecessarily strict. Measurements were made as a function of dextran concentration c between the dilute and the semidilute region, and also for various concentrations c_g of the agarose gel. The overlap concentration c^* in aqueous solution for the $M_w = 70\,000$ sample is, from intrinsic viscosity measurements,¹⁷ known to be $c^* = 35$ g/L.

For the pure dextran solutions, the correlation spectra were all found to be purely homodyne, the intercept of the reduced intensity correlation function $G(\tau) - 1$ at $\tau = 0$ being close to the measured value of β for our optical arrangement (Figure 1, circles). Effects of molecular association become visible, however, as the concentration increases, giving rise to a small quasi-static component in the scattered light. In contrast, for the spectra obtained from the dextran solutions in the agarose gels, the value of $G(0) - 1$ is about 2 orders of magnitude smaller (Figure 1, crosses). As changing the sample does not modify the optics, this reduction can be attributed to strong heterodyning by the light scattered from the agarose gel. The degree of heterodyning is found from eq 6; the resulting values of X lie in the range 10^{-2} – 10^{-3} .

In Figure 2 the field correlation functions $g(\tau)$ calculated from the spectra measured at $\theta = 90^\circ$ are shown for samples containing $c = 10$ g/L dextran, both in the free solution (circles) and in agarose gels of two different compositions. As found by Burne and Sellen¹⁰ for dextran in gellan gels, the motion of the polymer inside the gel becomes slower as the gel concentration is increased. It can also be seen that with increasing gel concentration c_g , a second much slower motion appears, whose amplitude becomes increasingly large. The continuous lines shown in this figure are the least-squares fit to a double exponential function. While this fitting function is acceptable for the $c_g = 0$ and 5 g/L samples, a broader distribution of relaxation times is clearly necessary to describe fully the slow motion in the more concentrated gel, $c_g = 30$ g/L.

Figure 3 shows the angular dependence of the fast relaxation component in the dextran spectra found for the three samples of Figure 2. Bearing in mind the

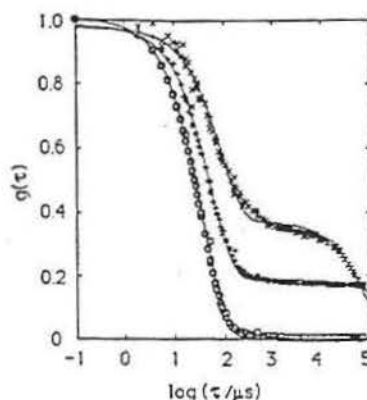


Figure 2. Field correlation function $g(\tau)$ calculated from eq 6 for dextran solutions at $c = 10$ g L⁻¹: (○) $c_g = 0$ (free solution); (+) in agarose gel with $c_g = 5$ g L⁻¹; (×) in agarose gel at $c_g = 30$ g L⁻¹. Scattering angle 90°. The continuous curves are least-squares fits to a two-exponential decay.

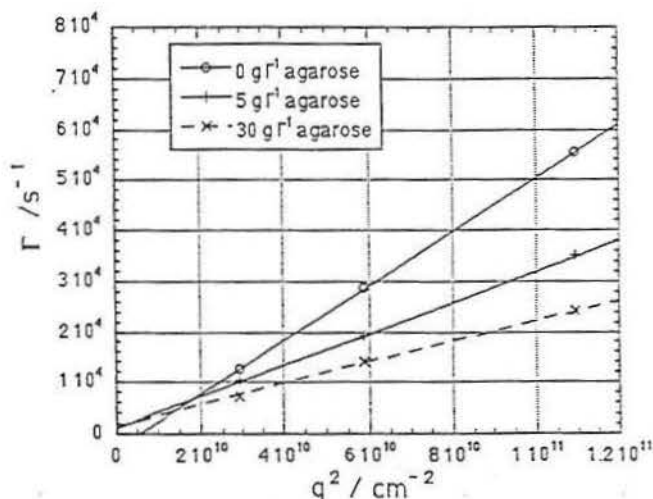


Figure 3. Relaxation rate Γ of the fast component of $g(\tau)$ for the same samples as in Figure 2, plotted as a function of q^2 : (○) $c_g = 0$ (free solution); (+) $c_g = 5$ g L⁻¹; (×) $c_g = 30$ g L⁻¹.

error inherent in decomposing a multiexponential decay, the data in Figure 3 indicate that the fast relaxation rate is proportional to q^2 . This is therefore a diffusive mode, the corresponding diffusion coefficient being denoted D_c . At low concentrations D_c describes the translational diffusion coefficient of the individual polymer coils, while above the overlap concentration c^* , it is a collective mode involving fluctuations of the local swelling of the polymer in the solvent.¹⁸ The slow relaxation mode is less reproducible, making its angular dependence more difficult to determine; within the experimental error, however, the longer relaxation rate also varies as q^2 .

The dependence of D_c upon the dextran concentration c is shown in Figure 4, for agarose concentrations lying between 0 and 40 g/L. In the free solution (circles), D_c increases monotonically, with no noticeable effect occurring at c^* . As the agarose concentration increases, however, the value of D_c for the dilute dextran solutions decreases significantly, but, with increasing dextran concentration, D_c approaches the values of the free solution. Thus, as the overlap concentration c^* is approached, the dextran solution in the gel appears to resemble that in the free state.

As the dextran concentration is further increased, another effect appears: for samples prepared above c^* , phase separation occurs during gelation. The resulting agarose gels become visibly turbid, and the measured

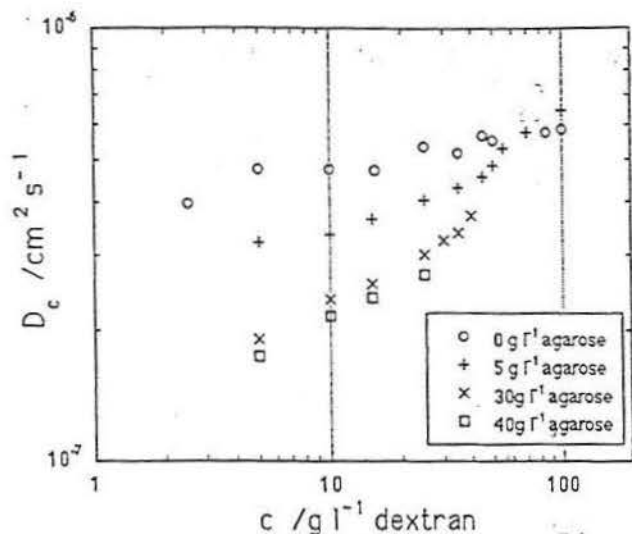


Figure 4. Diffusion coefficient D_c as a function of dextran concentration c in agarose gels of various concentrations c_g : (○) $c_g = 0$ (free solution); (+) $c_g = 5 \text{ g L}^{-1}$; (×) $c_g = 30 \text{ g L}^{-1}$; (□) $c_g = 40 \text{ g L}^{-1}$.

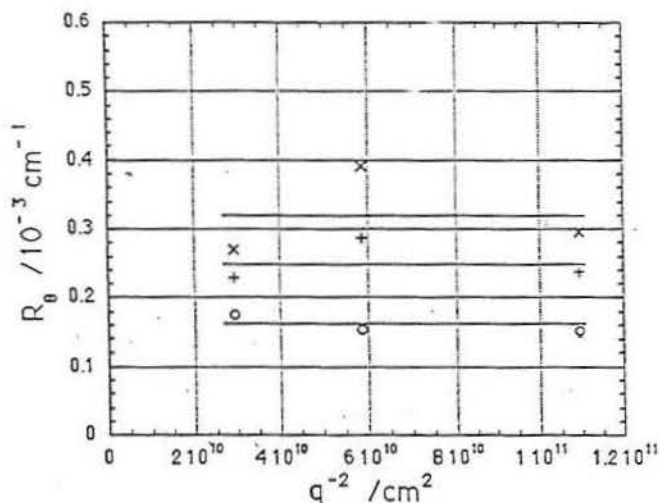


Figure 5. Rayleigh ratio R_θ as a function of q^2 for dextran solutions at $c = 10 \text{ g L}^{-1}$ in agarose gels of differing concentrations c_g : (○) $c_g = 0$ (free solution); (+) $c_g = 5 \text{ g L}^{-1}$; (×) $c_g = 30 \text{ g L}^{-1}$. The dashed horizontal lines are the resulting averaged intensities.

light scattering relaxation rates can depend on the region investigated in the sample.

The total intensity of the dynamically scattered intensity R_θ is shown in Figure 5 as a function of q^2 for dextran solutions at concentration $c = 10 \text{ g/L}$, in gels of different agarose concentrations c_g . Owing to the more complex procedure, the inherent errors in this type of analysis are significantly greater than in standard light scattering: the precision of these measurements is limited to about 20%. It is therefore unjustified to deduce a structure factor from these data, but it is clear that R_θ in the gel is greater than that in the free solution. To reduce the random error in the intensity measurements, an average of the scattering intensity is taken over the measured angles. The results are shown in Figure 6 as a function of dextran concentration, for different gel compositions. Data from the phase-separated samples have been omitted in this figure. It can be seen in this double logarithmic scale that the scattered intensity increases practically linearly with dextran concentration up to c^* . Above this concentration the free solution exhibits a plateau, as

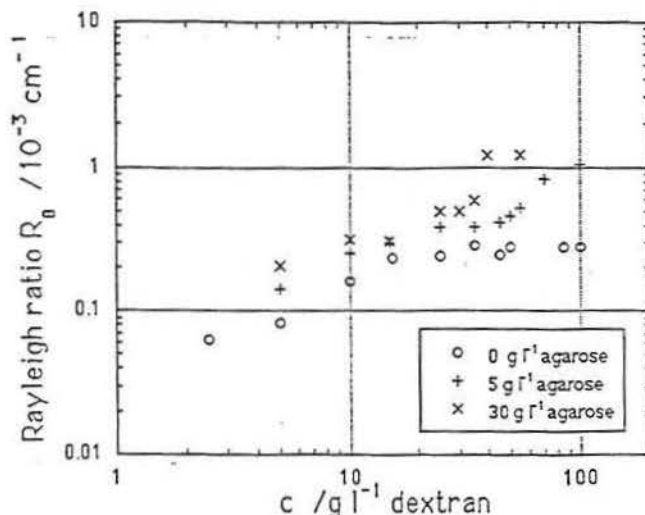


Figure 6. Rayleigh ratio R_θ as a function of dextran concentration c in agarose gels of differing concentrations c_g : (○) $c_g = 0$ (free solution); (+) $c_g = 5 \text{ g L}^{-1}$; (×) $c_g = 30 \text{ g L}^{-1}$.

expected in the vicinity of the maximum in semidilute solutions. For the gels, however, the intensity increases strongly in the semidilute region.

For the dextran sample used here, the radius of gyration R_G , measured by static light scattering, was found to be 9.6 nm. This result is consistent with previous measurements made on this system.¹⁹ For the present observations therefore, $qR_G \ll 1$, and, as far as the individual dextran coils are concerned, the experimental condition is close to the thermodynamic limit $q = 0$. In this approximation, the scattered intensity is given by

$$R_\theta = Kc \frac{kT}{\partial \Pi / \partial c} \quad (9)$$

where Π is the osmotic pressure of the solution and K is the contrast factor for light scattering.

Furthermore, the diffusion coefficient can be expressed as

$$D_c = \frac{\partial \Pi / \partial c}{f} \quad (10)$$

where f is a friction coefficient that contains the hydrodynamic interactions. (Generally, f is understood to be the friction coefficient of the individual monomers, but, provided we restrict ourselves to the dilute regime, it is legitimate to consider f as being that of the whole molecule.) It follows from eqs 9 and 10 that the product

$$D_c R_\theta = KkTc/f \quad (11)$$

contains no thermodynamic information but reflects only the hydrodynamic interactions. In the present case, we make the explicit assumption that the dextran solution forms a single phase within the gel matrix and that R_θ therefore governs both the fast and the slow relaxation rates.

Figure 7 shows the variation of $D_c R_\theta$ as a function of c in different gel environments. Within experimental error, the points fall on a master curve below c^* ; this result means that the friction coefficient f of the dextran molecule is the same whether it is in free solution or in the gel. It follows that the observed decrease in the diffusion coefficient of dextran in the gel with respect to the free solution is a result of a decrease in the

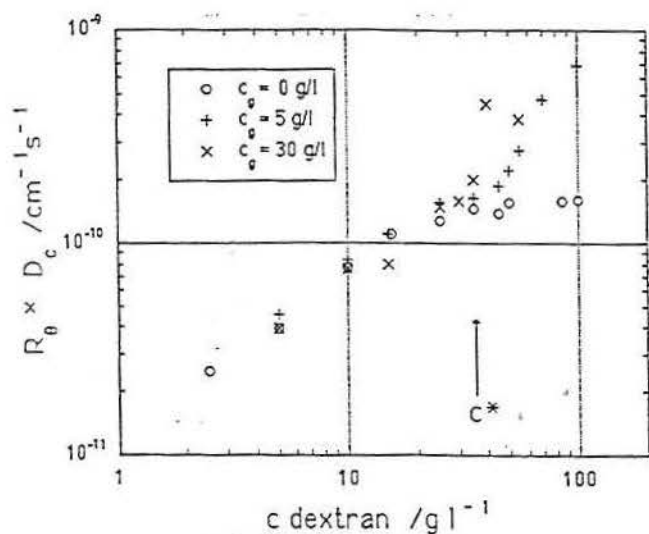


Figure 7. Product $R_{\theta}D_c$ as a function of dextran concentration c with various agarose gel concentrations c_g : (O) $c_g = 0$ (free solution); (+) $c_g = 5 \text{ g L}^{-1}$; (x) $c_g = 30 \text{ g L}^{-1}$.

osmotic modulus and is therefore unrelated to the friction of the surrounding matrix. The gel matrix is, however, purely static, and its configurational entropy is zero; under these conditions, its influence is confined to reducing the free space available to the dextran molecules, thereby decreasing their entropy. This situation is a corollary of the observed reduction in radius of gyration of polymers trapped in random networks, where the cross-links reduce the configuration entropy of the guest molecules.⁴⁻⁶

At concentrations beyond c^* the product D_cR_{θ} in the gel exceeds that of the free solution. The reason for this finding is unclear at present, but it may simply reflect the fact that, owing to the reduced osmotic pressure, the overlap concentration c^* of the dextran in the gel is greater than in the free solution.

Conclusions

Low molecular weight dextran ($M_w = 70\,000$), when dissolved inside agarose hydrogels, exhibits single phase behavior at concentrations $c \leq c^*$, where c^* is the overlap concentration of the dextran. Above c^* , phase separation occurs; this behavior contrasts with that of the free solution, which is continuously soluble in water. For dextran concentrations less than or equal to the

overlap concentration, the diffusion coefficient D_c is reduced and the Rayleigh ratio R_{θ} is enhanced compared to the free solution. In this concentration range, however, the quantity D_cR_{θ} , which depends only on hydrodynamic factors, is found to be independent of the agarose concentration. It is concluded that the rigid gel matrix reduces the osmotic pressure of the dextran solution by reducing the configuration space available to the dextran.

Acknowledgment. Carmen Kloster thanks the CAPES Foundation of the Ministry of Education of Brazil for financial support. We are grateful to R. Armisen of Hispanagar, Spain, for supplying the agarose, and to Redouane Borsali and to Anne-Marie Hecht for enlightening discussions.

References and Notes

- (1) Horkay, F.; Zrinyi, M. *J. Macromol. Sci., Phys.* 1986, **B25**, 307.
- (2) Hecht, A. M.; Horkay, F.; Stanley, H. B.; Zrinyi, M.; Geissler, E. *Polym. Commun.* 1993, **34**, 2894.
- (3) Lal, J.; Bastide, J.; Bansil, R.; Boué, F. *Macromolecules* 1993, **26**, 6092.
- (4) Horkay, F.; Stanley, H. B.; Geissler, E.; King, S. M. *Macromolecules* 1995, **28**, 678.
- (5) Briber, R. M.; Liu, X.; Bauer, B. *J. Science* 1995, **268**, 395.
- (6) Baumgärtner, A.; Muthukumar, M. *J. Chem. Phys.* 1987, **87**, 3082.
- (7) Asnagli, D.; Giglio, M.; Bossi, A.; Righetti, P. G. *J. Chem. Phys.* 1995, **102**, 9736.
- (8) Kuo, C.-S.; Bansil, R.; Koňák, C. *Macromolecules* 1995, **28**, 768.
- (9) Key, P. Y.; Sellen, D. B. *J. Polym. Sci., Polym. Phys. Ed.* 1982, **20**, 659-679.
- (10) Burne, P. M.; Sellen, D. B. *Biopolymers* 1994, **34**, 371.
- (11) Berne, B. J.; Pecora, R. *Dynamic Light Scattering*; Wiley: New York, 1976.
- (12) Geissler, E.; Hecht, A. M. *J. Chem. Phys.* 1976, **65**, 103.
- (13) Sellen, D. B. *J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys.* 1987, **25**, 699.
- (14) Pusey, P. N.; van Megen, W. *Physica A* 1989, **157**, 705.
- (15) Joosten, J. G. H.; McCarthy, J. L.; Pusey, P. *Macromolecules* 1991, **24**, 6691.
- (16) Geissler, E. in *Dynamic Light Scattering*; Brown, W., Ed.; Clarendon Press: Oxford, U.K., 1993; Chapter 11 (see also references therein).
- (17) Ročnas, C.; Lahaye, M. *Carbohydr. Polym.* 1989, **10**, 289.
- (18) de Gennes, P. G. *Scaling Concepts in Polymer Physics*; Cornell: Ithaca, NY, 1979.
- (19) Roger, P. Thesis, University of Nantes, France, 1993.

MA980511U

ANEXO II

Artigo submetido a revista "Macromolecules".

DYNAMICS OF A POLYMER SOLUTION IN A RIGID MATRIX II

Carmen KLOSTER,^{1,2} Clara BICA,² Cyrille ROCHAS¹, Dimitrios SAMIOS,² and Erik GEISLER*¹

¹ Laboratoire de Spectrométrie Physique, UMR 5588,
B.P. 87
38402 St Martin d'Hères Cedex, France

² Laboratório de Instrumentação e Dinâmica molecular,
Instituto de Química,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
Porto Alegre, Bento Gonçalves 9500,
Rio Grande do Sul, Brazil.

keywords: dynamic light scattering, agarose gels, dextran, diffusion coefficient, Rayleigh ratio

ABSTRACT

Dynamic light scattering measurements of the diffusion coefficient D and the Rayleigh ratio R_θ are reported for dextran molecules confined in agarose gel networks of various concentrations. In this condition, the light scattered by the dextran is some two orders of magnitude less intense than that from the agarose. Three molecular weights of dextran were investigated, 7×10^4 , 5×10^5 and 2×10^6 g mol⁻¹. For the lowest molar mass it is confirmed that, below the dextran overlap concentration c^* , the product $D \times R_\theta$ is independent of the agarose concentration, showing that the reduction of the rate of diffusion inside the gel is the result of a decrease in the osmotic pressure in the confined geometry. For the higher molar masses, entanglement effects between the dextran and the network become noticeable in the more highly concentrated gels.

The dynamic light scattering intensity measurements are also found to yield reasonable estimates of the molar mass M_w and radius of gyration R_G of the trapped dextran molecules. The second virial coefficient A_2 is positive, indicating that the agarose-water matrix acts as a good solvent for dextran, but the ratio of R_G to the hydrodynamic radius is less than 1.5. These results are interpreted in terms of branching of the dextran molecule.

INTRODUCTION

Recently we reported dynamic light scattering measurements of the motion of low molar mass dextran solutions ($M_w \approx 70\,000$ g mol⁻¹) trapped inside agarose gels.¹ The two components of this system are miscible over a limited concentration range, above which the gel that is formed displays phase separation on a macroscopic scale. In the range of miscibility the dextran molecules migrate freely throughout the volume of the sample that is not occupied by the agarose and their behaviour is therefore similar to that of a liquid. The light scattered by the gel structure itself was found to be some two or three orders of magnitude more intense than that scattered by the mobile macromolecules, with the result that the latter was strongly heterodyned. In this situation, photon correlation spectroscopy can be used to discriminate between these two components since, in the concentration range of interest, agarose gels are virtually immobile at room temperature. In this system, then, the only dynamic component is that of the mobile guest polymer. Analysis of the resulting intensity correlation functions accordingly yields not only the corresponding diffusion coefficient D but also the Rayleigh ratio R_θ .

The results of reference 1 may be summarized as follows. For concentrations below the overlap concentration c^* , the diffusion coefficient D of the dextran in the gel is depressed with respect to the free solution. Conversely, the intensity R_θ scattered by the trapped molecules is enhanced over that in the free state. The product of these two quantities, $D \times R_\theta$, however, was found to depend only on the dextran concentration c and to be independent of the gel concentration c_g . These results showed that the reduction in diffusion rate is not due to frictional effects but instead comes from a depression of the osmotic pressure due to configurational entropy loss in the confined volume of the gel.

It is natural to try to extend these observations to larger guest molecules in order to explore larger length scales in the gel. For this reason, in this article we report measurements on agarose gels containing dextran solutions of higher molar mass, namely 5×10^5 g mol⁻¹ and 2×10^6 g mol⁻¹, the radii of gyration R_G of which are appreciably larger.

EXPERIMENTAL SECTION

The sample preparation was described in detail in ref.1. Three lots of dextran, of molar mass $M_w = 7 \times 10^4$, 5.0×10^5 and 2.0×10^6 g mol⁻¹ respectively, were used as supplied by Sigma. The molar mass of the

agarose, kindly provided by R. Armisen (Hispanagar, Spain), was $M_w = 1.2 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$ (sulphate content 0.1%, methyl content 0.6%). Previous measurements² of the molar mass of these samples yielded the results displayed in Table I.

The appropriate weights of agarose and dextran were mixed in de-ionized water, and heated to 100°C and stirred to complete dissolution. The solutions were sealed in 10 mm diameter cylindrical glass tubes, then melted again at 100° C and allowed to cool to room temperature. Gelation of the agarose occurred as the temperature fell to 45°C.

Dextran and agarose form uniform gels in water over a limited concentration range, above which macroscopic phase separation occurs. The phase diagram is shown in Figure 1. The experiments described in this article were all conducted in the region of miscibility.

Dynamic light scattering measurements were made with a Spectra Physics SP162 laser working at 488 nm, and a Malvern Instruments 7032 multi-bit correlator. All measurements were made in a temperature controlled bath at 25°C. The laser and goniometer were fixed to an optical table that was isolated from the building by pneumatic supports.

The optical transmission factors T_s of the samples were measured in the same cells, using a Kontron Uvikon 810 spectrophotometer working at 488 nm. To compensate for the lens effect of the cylindrical light scattering tubes, these were placed in rectangular spectrophotometric cells containing water in the intervening space. A mask was applied to ensure that only light traversing the cylinder diameter was detected by the spectrophotometer.

For the free solutions of dextran, the scattered light consists entirely of the fluctuating component, I_f , and dynamic light scattering measurements were made in the usual homodyne condition.³ For solutions trapped in the gels, however, the rigid agarose structure adds a static component of stray light I_s which generates heterodyne mixing at the photomultiplier. The total average scattering intensity is then

$$\langle I \rangle = \langle I_f + I_s \rangle \quad (1)$$

and the resulting normalized intensity correlation function is⁴

$$G(\tau) = G(fp) + \beta [2X(1-X)g(\tau) + X^2g^2(\tau)] \quad (2)$$

In eq. 2, $X = \frac{\langle I_f \rangle}{\langle I \rangle}$ is the fluctuating fraction of the scattered light, β the optical coherence factor of the detection system and $g(\tau)$ is the field correlation function of the fluctuating component. The quantity

$$G(fp) = \frac{\langle I_s^2 \rangle + 2\langle I_s \rangle \langle I_f \rangle + \langle I_f^2 \rangle}{\langle I \rangle^2} \quad (3)$$

is the value of $G(\tau)$ at the far point, generally set to be 2048 times the longest time increment in the correlation window.

As noted by Joosten et al.,⁵ eq. 2 is soluble both for X and for $g(\tau)$, since, by definition, $g(0) = 1$. From these results the Rayleigh ratio of the fluctuating component of the scattered light R_θ can in turn be evaluated, giving¹

$$R_\theta = \frac{R_V X \langle I \rangle \sin \theta}{I_{\text{stand}} T_s} \quad (4)$$

where R_V is the Rayleigh ratio of the toluene standard and I_{stand} the intensity scattered by the standard in the same conditions of incident laser intensity as the sample.

The diffusion coefficient D is obtained from the field correlation function. In general this can be described by a multi-exponential decay

$$g(\tau) = \sum_1^N a_n \exp(-D_n q^2 \tau) \quad (5)$$

which yields the z-average diffusion coefficient

$$D_z = -\frac{1}{q^2} \frac{\partial \ln g(\tau)}{\partial \tau}$$

τ

$$= \frac{1}{N} \frac{\sum a_n D_n}{\sum a_n} \quad (6)$$

For the two lower molar mass samples investigated here (7×10^4 and 5×10^5 g mol⁻¹), satisfactory fits to the results were found for $N=2$ and this analysis was accordingly adopted throughout. The samples of molar mass 2×10^6 g mol⁻¹, however, required 3 components for a satisfactory description.

In spite of the essentially static character of I_s , the correlation functions did sometimes show evidence of residual movement of the speckle pattern, presumably owing to mechanical relaxation of the sample in response to small temperature changes in the thermostated bath. As such changes occur on a much longer time scale than those from the diffusion of the guest polymer, their contribution could be eliminated simply by replacing $G(\tau)$ in eq 2 by the value of $G(\tau)$ in the last correlator channels where the correlation function of the polymer is fully relaxed.

RESULTS AND DISCUSSION

Figure 2 shows examples of the normalized intensity correlation functions measured at a scattering angle of 90° for two samples containing 15 g L^{-1} of dextran of mass 5×10^5 g mol⁻¹, in aqueous solution and inside a hydrogel composed of 30 g L^{-1} agarose. For visibility, the latter has been multiplied by a factor 100. The corresponding field correlation functions $g(\tau)$, calculated from equation 2, are shown in Figure 3, together with the corresponding two-exponential fits through the data points. In Figure 4a the resulting relaxation rates

$$\Gamma = D_z q^2 \quad (7)$$

are shown as a function of q^2 , for a set of samples with dextran concentration $c = 10 \text{ g L}^{-1}$ in three different agarose environments, $c_g = 0, 5$ and 30 g L^{-1} . Each data set gives a straight line through the origin, in agreement with eq 7. This linear behaviour is consistent with that found earlier¹ for dextran of molar mass 7×10^4 g mol⁻¹.

Figure 4b shows that the linear relationship 7 also holds for the 2×10^6 molar mass solutions inside agarose gels. For this high molar mass sample, however, there is evidence of aggregation in the free solution: the scattering intensity displays an increase at low angles that is incompatible with the stated value of the mass. For this reason comparative measurements are made between the free solution and the gels using the data from $\theta = 150^\circ$. The resulting values of $D_z(c)$ are shown in Figure 5 a, b and c as a function of agarose concentration c_g , for the three different molar masses M investigated. The behaviour of each set of samples is similar. At low dextran concentrations c , D_z is depressed by an amount that accentuates with increasing c_g ; at higher c this effect disappears and the $D_z(c)$ curves converge in the vicinity of $c = 40 \text{ g L}^{-1}$.

The Rayleigh ratio R_θ , shown in fig. 6 for the different molar masses investigated, also displays similar behaviour to that of the $M = 7 \times 10^4$ g mol⁻¹ system (Fig. 6a). Contrary to the diffusion coefficient, R_θ is higher inside the gel than in free solution. For $M = 5 \times 10^5$ g mol⁻¹ the angular variation of R_θ is weak and it is reasonable to plot the average value for the three angles as in fig. 6b. For $M = 2 \times 10^6$, to minimise the effects of aggregation in the free solutions, Figure 6c shows the variation of R_{150} only.

It is known from basic physical principles^{6,7} the quantities D_z and R_θ are both functions of the osmotic susceptibility $\partial c / \partial \Pi$:

$$D_z = \frac{\partial \Pi / \partial c}{f} \quad (8)$$

$$R_\theta = Kc \frac{kT}{\partial \Pi / \partial c} \quad (9)$$

where f is a friction coefficient that, in the dilute regime, corresponds to that of the whole molecule. K is the contrast factor for light scattering. From equations 8 and 9 it follows that the product

$$D_z \circ R_G = KkT \circ f \quad (10)$$

is independent of the thermodynamic quantity Π .

Figure 7 shows the product $D_z R_G$ for the three sets of samples. As found previously,¹ the points for the lowest mass fall on a plausible master curve. For the two higher masses, however, the increase in R_G does not completely compensate for the depression in D_z . This result indicates a slowing effect of non-thermodynamic origin that preferentially affects the larger masses. A likely explanation for this slowing is the presence of entanglements between the dextran and the rigid matrix. Such an effect may be expected to be more marked at higher agarose concentrations, where the pore size of the matrix is smaller.^{8,9}

We now turn to the angular dependence of R_G . Traditionally, the molar mass M_w and radius of gyration R_G of molecules in solution are determined by static light scattering. In aqueous solutions such measurements are notoriously difficult owing to the extreme precautions that have to be taken to eliminate dust and molecular associations. In the present case, however, these sources of stray light are immobilised inside the agarose gels, contributing a signal that simply adds to the already strong static light background. It is therefore not unreasonable that the values of R_G obtained by dynamic light scattering should provide valid information on the characteristics of the dissolved dextran molecules. Results for the three angles investigated are illustrated as Zimm plots in Figure 8a and b for $M_w = 5 \times 10^5$ and 2×10^6 g L⁻¹ respectively. For the low molar mass sample the signal to noise ratio was too poor to extract useful information. The resulting molecular parameters are listed in Table I. Figure 9 shows that the values of R_G , plotted as a function of M_w , fall on a straight line that is consistent with previous static light scattering measurements on the same dextran molecules in free solution.²

The light scattering measurements of ref. 2 for dextran in free solution give for the ratio of the radius of gyration to the hydrodynamic radius $\rho = R_G/R_H = 1.5$, the value expected theoretically for a linear polymer at the theta condition. For the highest molar mass sample, however, this ratio is even smaller, a result that could be due to the well established phenomenon of branching in this polymer.¹⁰ For the present measurements of dextran in agarose gels, the dynamic scattering results for the high molar mass sample M_w depend somewhat on the agarose concentration; bearing in mind that these results form a master curve in fig. 9, however, these differences are probably real and may reflect fractionation of the dextran with increasing gel concentration, i.e. larger masses are immobilised as the pore size decreases. For the $c_g = 10$ g L⁻¹ gel, the apparent ratio ρ for the dextran in this sample turns out to be smaller than that of an impenetrable uniform sphere ($\rho_{\text{sphere}} = \sqrt{\frac{3}{5}}$). Such an apparently

unphysical result can be explained by entanglements acting between dextran molecules and the matrix: as the radius of gyration becomes comparable with the pore size of the matrix, entanglements hinder the motion of the dextran and the apparent value of R_H becomes anomalously high. This conclusion is also in agreement with the anomalous variation of $D_z R_G$ mentioned above.

The power law exponent appearing in Figure 9, $\nu = 0.43 \pm 0.03$, is significantly lower than that expected for a linear polymer in a good solvent ($\nu = 0.588$) or even that for a theta solvent ($\nu = 0.5$). From Table I, however, it can be seen that the second virial coefficient A_2 is small but positive. Water is therefore a good solvent, a result that is in agreement with the positive slope of $D_z(c)$ visible in Figure 5, but inconsistent with the theta-like (or poor solvent-like) values of ρ . These results can be understood if it is assumed that the dextran samples exhibit a partially branched character.

Finally, in Figure 10 the molar mass dependence of R_H is plotted together with the results of ref. 2. The least squares fit shown excludes the datum point from the $c_g = 10$ g L⁻¹ sample since it is perturbed by the effect of entanglement. Acceptable agreement is found with a power law fit of exponent $\nu_{\text{dyn}} = 0.50 \pm 0.03$. In contrast to linear polymers,¹¹ this value exceeds that of the static exponent ν , but it is still much lower than that for linear polymers in a good solvent. From figs. 9 & 10 it follows that the ratio ρ is a decreasing function of molar mass. We therefore conclude, once again, that the dextran molecules have a branched structure.

CONCLUSIONS

The dynamic light scattering observations described here show that it is possible to measure the properties of large molecules moving inside a rigid matrix that scatters light much more strongly than the molecules themselves. In particular, measurements can be made not only of the hydrodynamic radius but also of the molar mass and radius of gyration of the dissolved molecules.

The present observations confirm our previous finding that the reduction of the translational diffusion coefficient is caused by a reduction of the osmotic pressure of the dextran inside the restricted geometry of the agarose matrix. For the higher molar masses investigated here, however, an additional slowing effect is observed,

which is attributed to entanglements between the dextran and the agarose network. It is also concluded that the dextran displays a branched structure.

ACKNOWLEDGEMENTS

Carmen Kloster thanks the CAPES Foundation of the Ministry of Education of Brazil for financial support. Financial support from Fapergs and CNPq is also acknowledged. We are grateful to R. Armisen of Hispanagar, Spain, for supplying the agarose, and to Redouane Borsali and to Anne-Marie Hecht for enlightening discussions. This work was performed as part of a sandwich thesis under an agreement between the University Joseph Fourier of Grenoble, France and the Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

Table I

M_{nom}	M_w	I_G	Light scattering parameters for dextran			remarks
			R_H	ρ	A_2	
/1000	/1000	/nm	/nm		$= \frac{R_G}{R_H}$	/cm ³ mol g ⁻²
70	64	9.6	6.5		1.48	-- -- ref 2, $c_g=0$ gL ⁻¹
500	490	24.4	16		1.53	-- -- ref 2, $c_g=0$ gL ⁻¹
2000	1850	42.2	37.8		1.12	-- -- ref 2, $c_g=0$ gL ⁻¹
(fraction from chromatography column)						
70	--	--	6.2		--	-- this work, $c_g=0$ gL ⁻¹
70	--	--	7.8		--	-- this work, $c_g=5$ gL ⁻¹
500	540	23.1	18.7		1.24	2.5 10 ⁻⁴ this work, $c_g=5$ gL ⁻¹
2000	3400	59.8	43	1.39	7.3 10 ⁻⁵	this work, $c_g=5$ gL ⁻¹
2000	2900	42.5	55.9		0.76	7.3 10 ⁻⁵ this work, $c_g=10$ gL ⁻¹

REFERENCES

- 1 Kloster, C.; Bica, C.; Lartigue, C.; Rochas, C.; Samios, D.; Geissler, E. *Macromolecules* 1998, 31, 7712-16.
- 2 Roger, P. Thesis, University of Nantes, France, 1993.
- 3 Berne, B.J.; Pecora, R. *Dynamic Light Scattering* Wiley, New York, 1976.
- 4 Sellen, D.B. *J.Polym.Sci. Part B: Polym. Phys.* 1987, 25, 699.
- 5 Joosten, J.G.H.; McCarthy, J.L.; Pusey, P. *Macromolecules* 1991, 24, 6691.
- 6 Landau, L.D.; Lifschitz, E.M. *Fluid Mechanics*, Pergamon, Oxford, 1959.
- 7 de Gennes, P.G. *Scaling Concepts in Polymer Physics*, Cornell, Ithaca, 1979.
- 8 Righetti, P.G.; Brost, B.C.W.; Snyder, R.S. *J. Biochem. Biophys. Methods* 1981, 4, 347. 9 Rochas, C.; Hecht, A.M.; Geissler, E. *Macromol. Symp.* 1999, 138, 157.
- 10 Kuge, T.; Kobayashi, K.; Kitamura, S.; Tanahashi, H. *Carbohydrate Research*, 1987, 160, 205.
- 11 Adam, M., Delsanti, M. *Macromolecules* 10, 1229 (1977).

FIGURE CAPTIONS

Figure 1. Expanded view of the phase diagram of the agarose-dextran-water system, for the three molar masses studied. Filled circles: $M=7 \times 10^4$ g mol⁻¹; open circles: $M=5 \times 10^5$ g mol⁻¹; crosses: $M=2 \times 10^6$ g mol⁻¹. The phase separated region lies below the curves indicated. The scale in the diagram is agarose: 0-10% w/w, dextran 0-10% w/w, water 90-100% w/w.

Figure 2. Intensity correlation functions $G(\tau)-1$ for a dextran solution ($M=5 \times 10^5$) at $c=15$ g/L at $\theta=90^\circ$ in free solution (open circles) and in a $c_g=30$ g/L agarose gel (crosses). For visibility, the latter is multiplied by a factor 100.

Figure 3. Field correlation functions $g(\tau)$ calculated from Figure 2 using equation 2.

Figure 4a. Relaxation rate Γ of the field correlation function $g(\tau)$ as a function of q^2 for a $c=10$ g L⁻¹ dextran solution of molar mass 5×10^5 g mol⁻¹; crosses: free solution; open circles: inside an agarose gel with $c_g=5$ g L⁻¹; filled circles: inside an agarose gel with $c_g=30$ g L⁻¹.

b. Diffusion coefficient $D_z=\Gamma/q^2$ for the 2×10^6 g mol⁻¹ dextran in an agarose gel with $c_g=5$ g L⁻¹, at various dextran concentrations c between 0.5 g L⁻¹ and 35 g L⁻¹. For these samples, D_z is independent of q .

Figure 5. Diffusion coefficient D_z as a function of dextran concentration c in agarose gels of various concentrations c_g . a: $M=7 \times 10^4$ g mol⁻¹, b: $M=5 \times 10^5$ g mol⁻¹, c: $M=2 \times 10^6$ g mol⁻¹ (measured at $\theta=150^\circ$).

Figure 6. Rayleigh ratio R_θ as a function of dextran concentration c in agarose gels of various concentrations c_g . a: $M=7 \times 10^4$ g mol⁻¹, b: $M=5 \times 10^5$ g mol⁻¹, c: $M=2 \times 10^6$ g mol⁻¹ (measured at $\theta=150^\circ$).

Figure 7. $D_z R_\theta$ as a function of dextran concentration c in agarose gels of various concentrations c_g . a: $M=7 \times 10^4$ g mol⁻¹, b: $M=5 \times 10^5$ g mol⁻¹, c: $M=2 \times 10^6$ g mol⁻¹ (measured at $\theta=150^\circ$).

Figure 8. Zimm plots from the dynamic light scattering of dextran in agarose gels. a) $M=5 \times 10^5$ g mol⁻¹ in a $c_g=5$ g L⁻¹ gel; b) $M=2 \times 10^6$ g mol⁻¹ in a $c_g=10$ g L⁻¹ gel.

Figure 9. Plot of R_G vs M_w . Filled circles: data from static light scattering (ref. 2); crosses: dynamic light scattering (this work). Continuous line shown is the least squares fit through all the data points.

Figure 10. Plot of the hydrodynamic radius R_H vs M_w . Filled circles: data from ref. 2; crosses: this work. Continuous line shown is the least squares fit through all the data points except that from the 10 g L⁻¹ gel (topmost point in the graph), owing to possible entanglement effects.

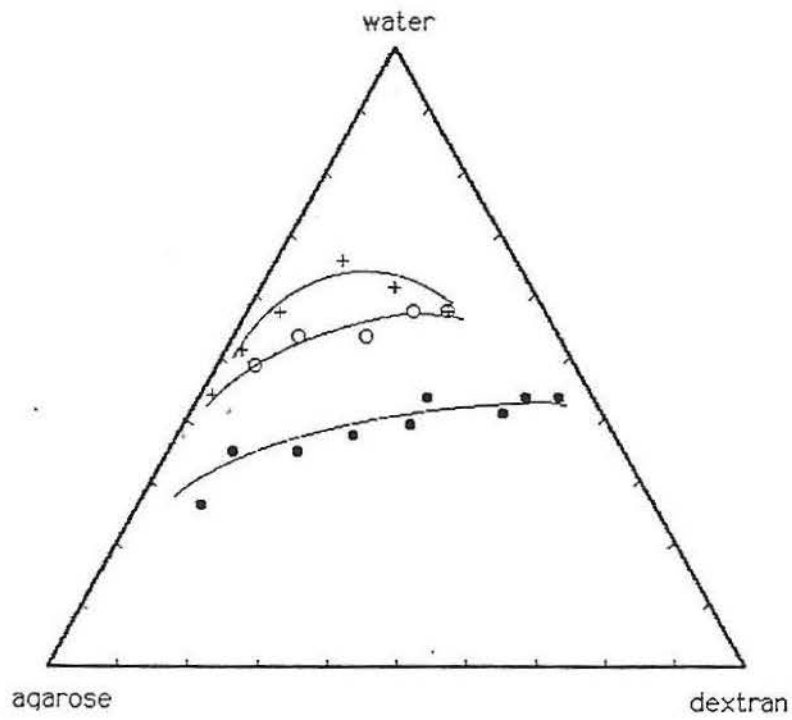


Figure 1

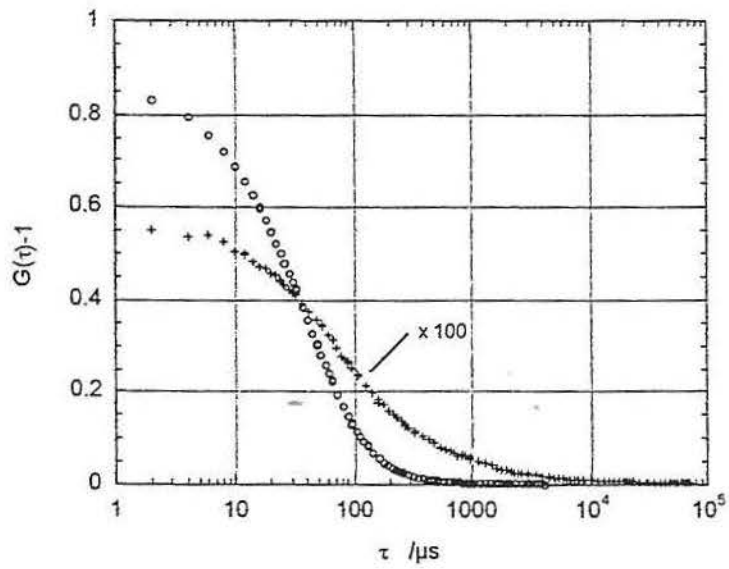


Figure 2

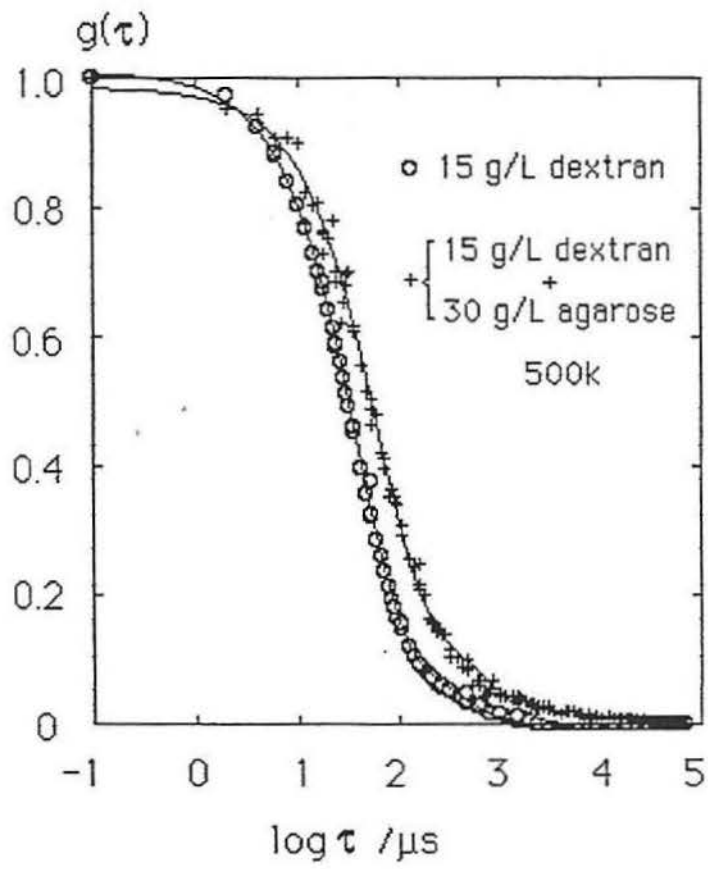


Figure 3

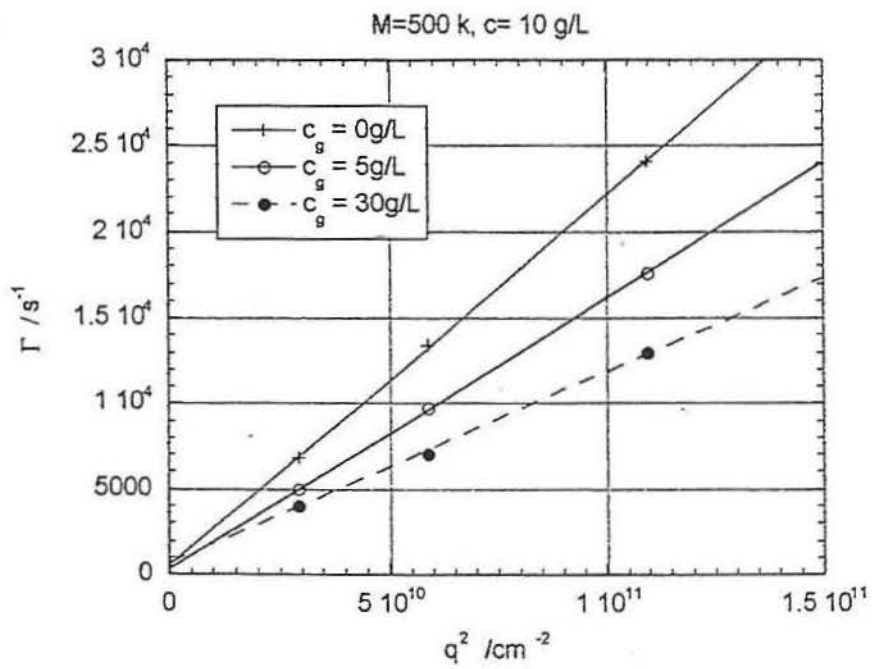


Figure 4a

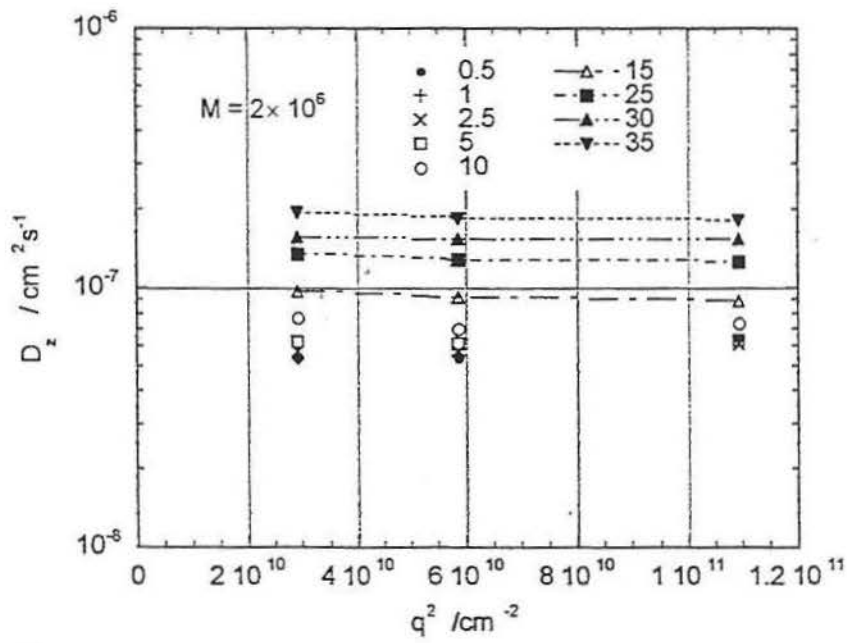


Figure 4b

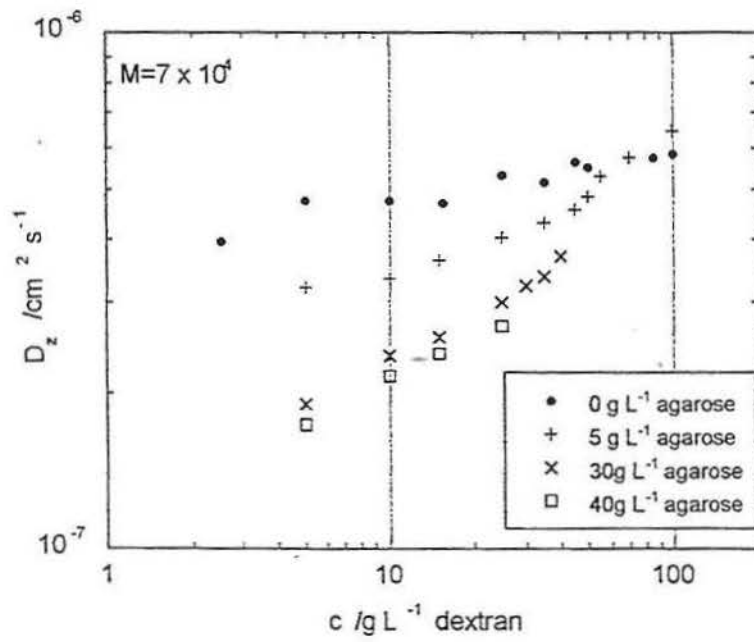


Figure 5a

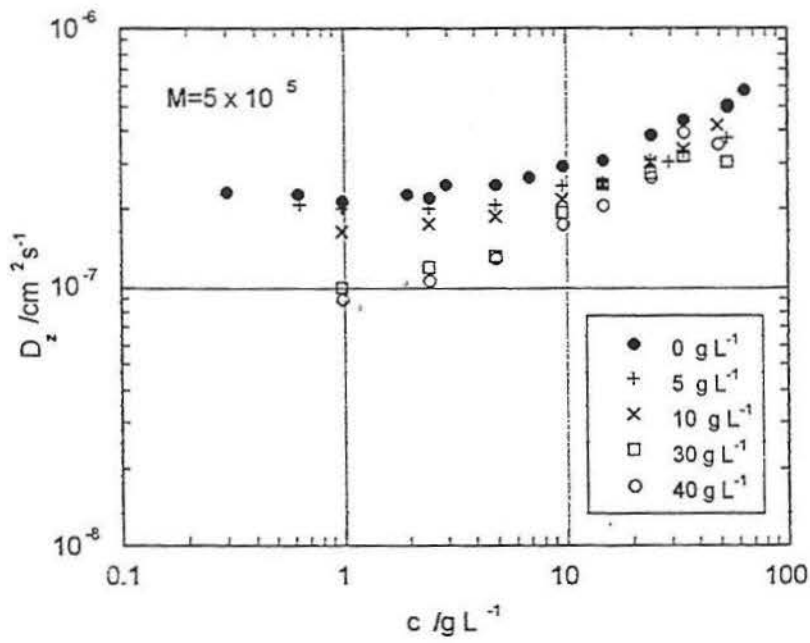


Figure 5b

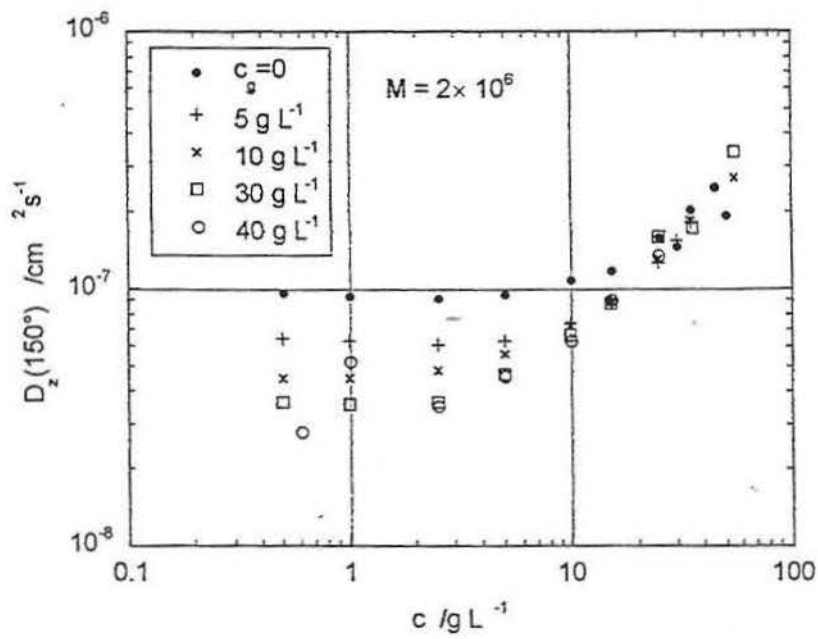


Figure 5c

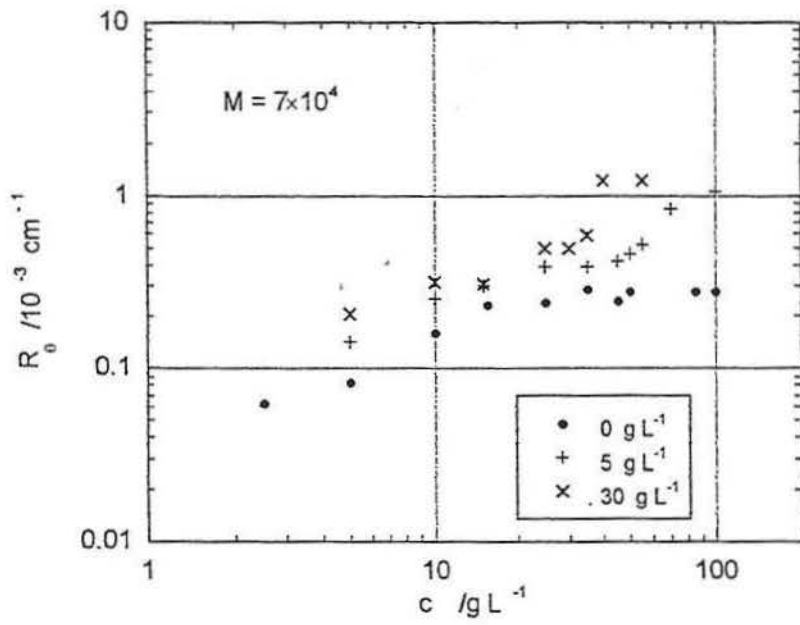


Figure 6a

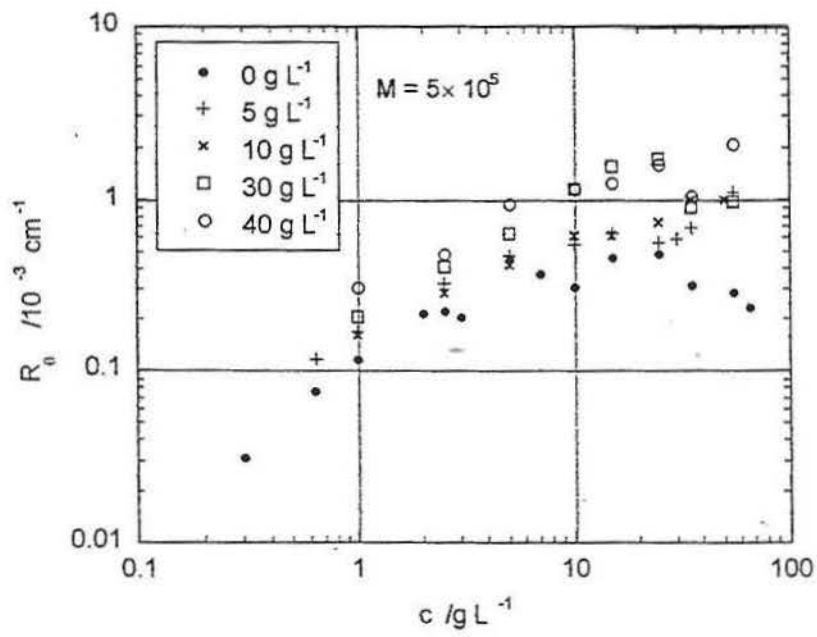


Figure 6b

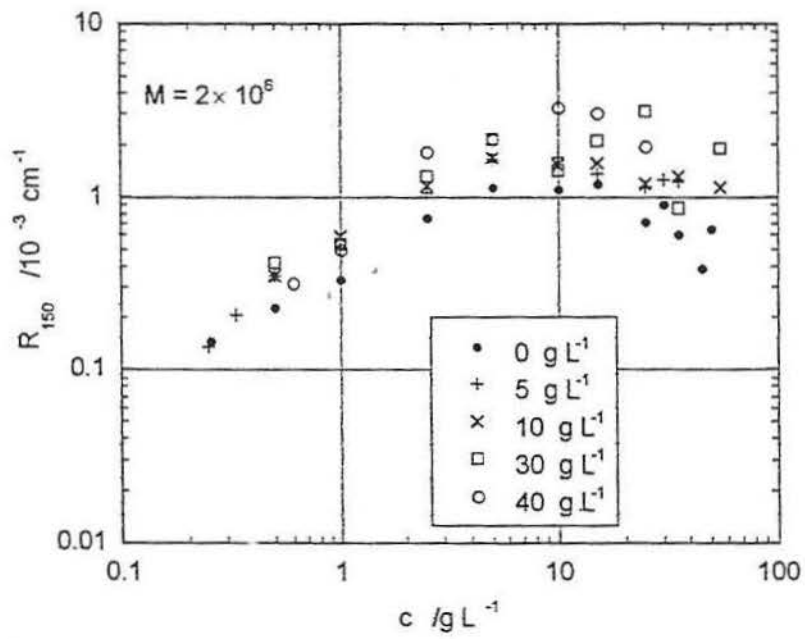


Figure 6c

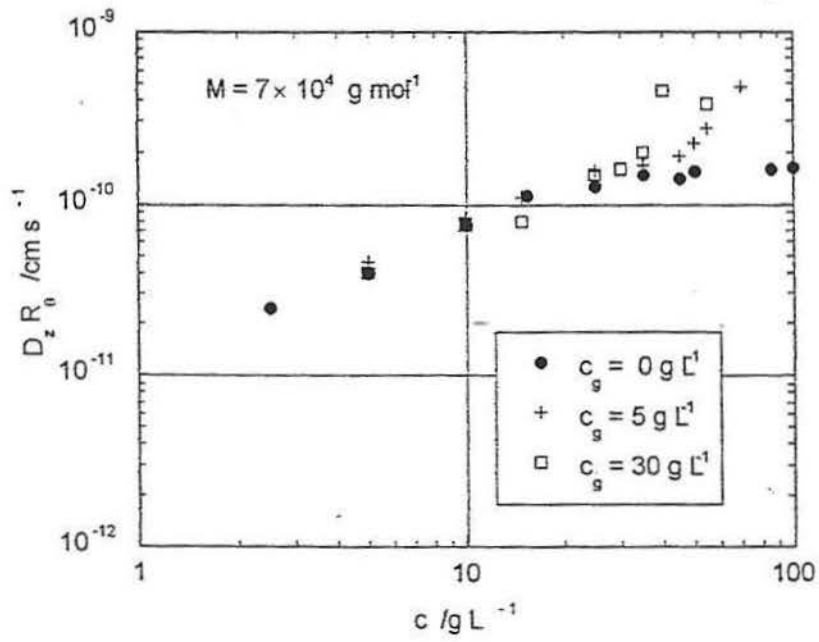


Figure 7a

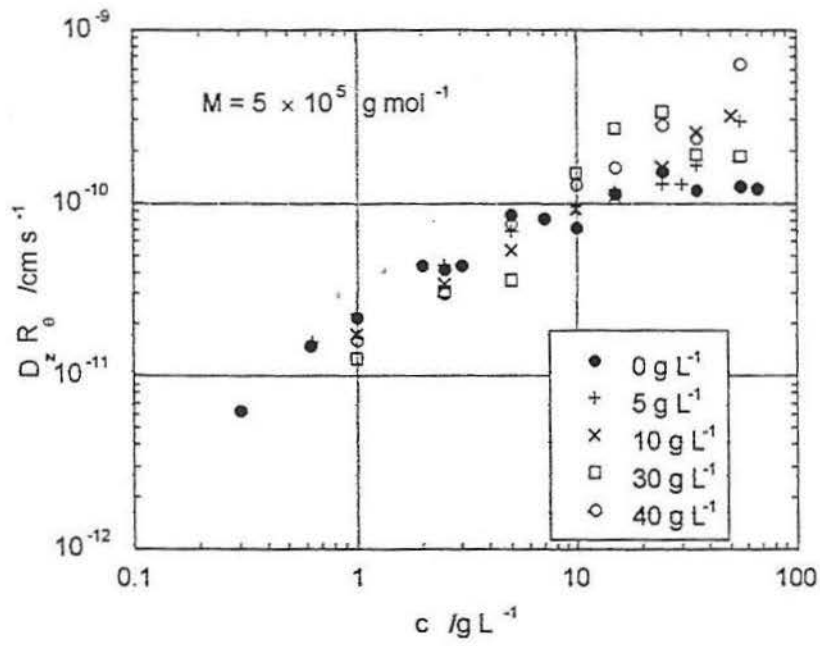


Figure 7b

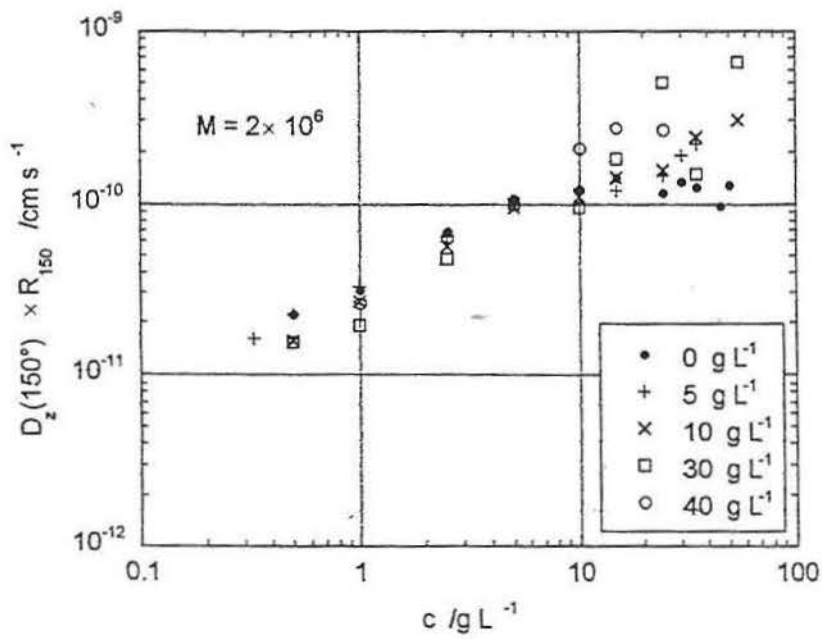


Figure 7c

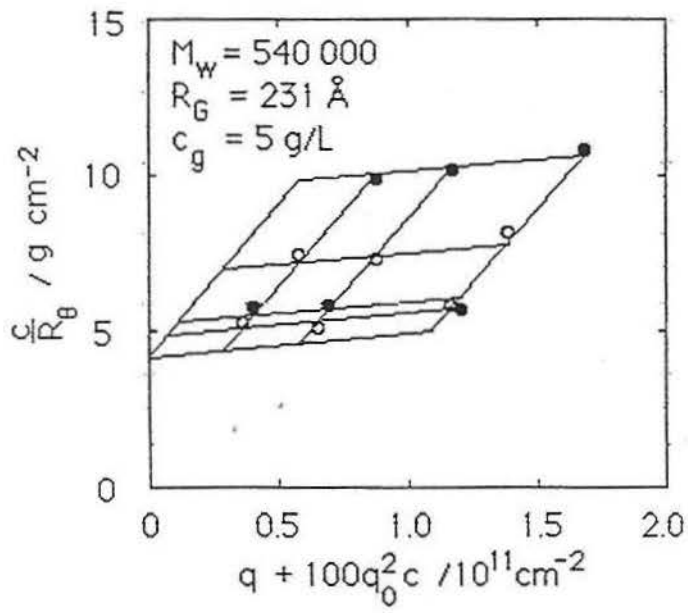


Figure 8a

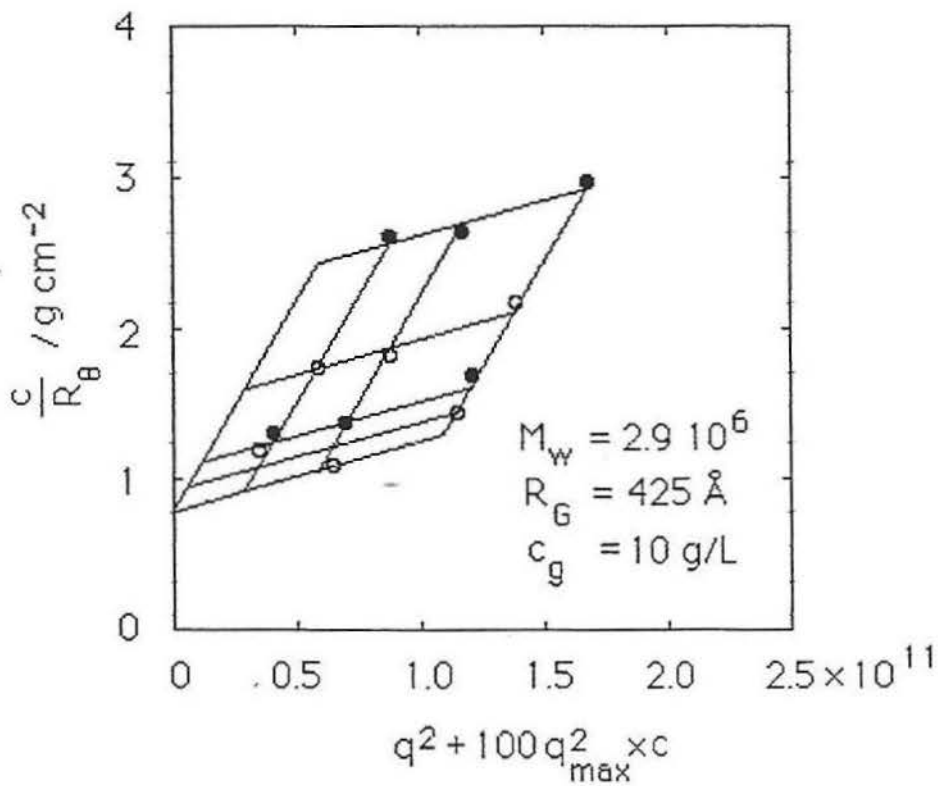


Figure 8b

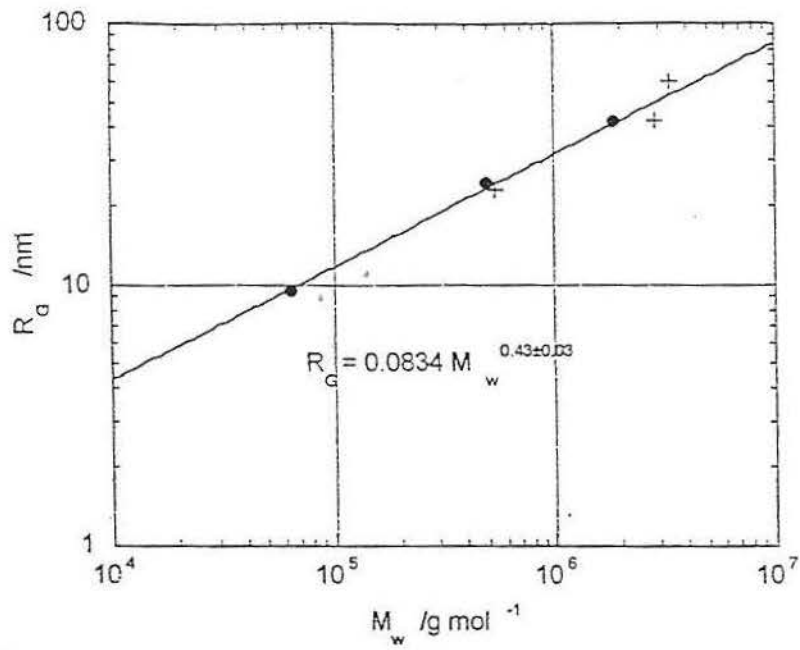


Figure 9

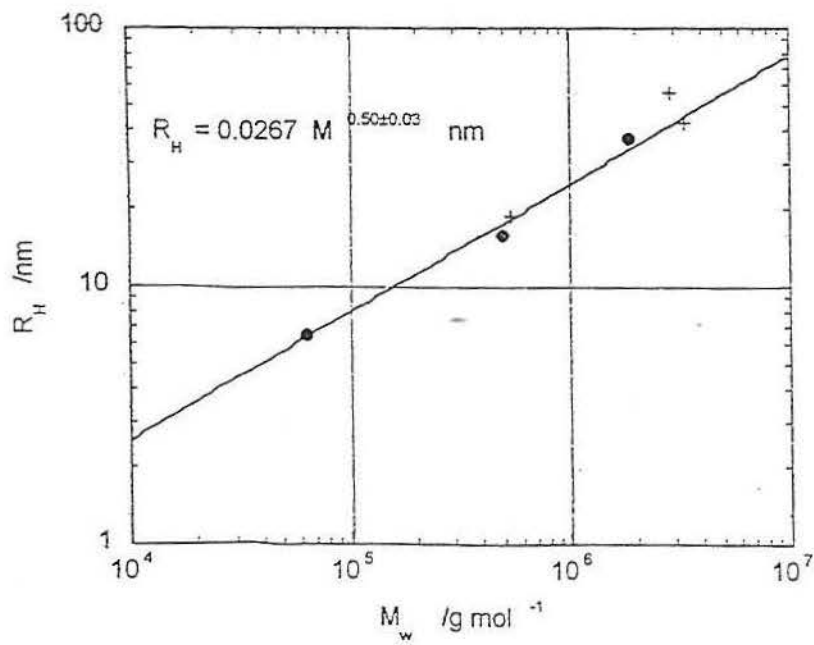


Figure 10