

University of Groningen

Unraveling structure and dynamics by confocal microscopy

Manca, Marianna

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2015

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Manca, M. (2015). *Unraveling structure and dynamics by confocal microscopy: From starch to organic semiconductors*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Summary

Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) allows correlating the morphological features with the local optical properties of the sample under investigation. In a relatively simple and fast way the photoluminescence observable can be recorded point-by-point giving not only an intensity map but also detailed energetic and dynamic information. In Chapter 2 we have presented an overview of the basic concepts of Confocal Microscopy and the experimental setup employed in the research work described in this thesis.

Its versatility makes CLSM extremely useful in different field of research. The high contrast imaging and the possibility of optically sectioning the specimen are important characteristics which have strongly contributed to its popularity in biology.

In this thesis we exploited the power of CLSM to understand the properties of two very different systems for which the correlation of morphology and optical properties are extremely relevant: starch granules and organic bulk-heterojunctions.

Starch constitutes one of the major sources of carbohydrates and energy for the human diet and also a raw component for food and non-food industrial products. Native starch from different botanical sources semi-crystallizes in water-insoluble granular structures, consisting mainly of two polymers of D-glucose, amylopectin and amylose, with varying relative ratios. The tendency of amylose chains to generate inclusion complexes in presence of a ligand like iodine or linear alcohols has been object of a wide interest; in particular inclusion complexes between amylose and lipids such as fatty acids and phospholipids have been extensively investigated due to their influences on several characteristics of the food, like the staling, the digestibility and the rheological properties.

Amylose-lipid inclusion complex formation is commonly described with the aliphatic chain of the fatty acid molecule hosted inside the hydrophobic cavity of the amylose helix (the so-called V-amylose), while the polar head including the carboxylic acid remains outside the helix due to electrostatic interactions. The driving forces of this complex formation have been identified as determined by weak intramolecular bonds (van der Waals forces and hydrogen bonds), which take place between the turns of the amylose helix and intermolecular forces to stabilize the complex between the amylose chain and the ligand.

In Chapter 3-5 the structure and the dynamics of inclusion complex formation between fluorescent lipophilic molecules and amylose in starch granules from

different botanical sources and with different content of amylose and amylopectin have been investigated.

In Chapter 3 by studying regular and waxy starch granules (the latter may reach up to 100% amylopectin content), we were able to identify a specific interaction between the peripheral amylose coils and the lipophilic molecules labelled with a dye in order to be detected by confocal microscopy. We could prove that this process is occurring efficiently at temperature below the gelatinization point for low lipid concentration. Furthermore, we showed that long amylopectin chains are also able to form complexes with aliphatic ligands.

By combining Confocal Laser Scanning Microscopy and spatial resolved photoluminescence spectroscopy (the experimental setup has been described in Chapter 2), we were able to discriminate the presence of amylose molecules in the peripheral regions of the starch granules, associating a specific optical fingerprint to the fluorescent lipophilic molecules which experience a different environment.

In particular in the case of the regular potato starch, the aliphatic chains of the lipid is involved in the complex with the amylose chains and the polar head stays outside the coil (Chapter 4). The specific nature of the interaction between amylose and lipophilic molecules has been proved also by performing “washing” experiments. In particular we were able to demonstrate that in case of interaction with amylopectin in waxy starch granules, the lipophilic molecules were easily removed after the washing procedures (Chapter 4).

To investigate the dynamics of inclusion complex formation, real time observations were performed exploiting the time-frame capability of the Confocal Laser Scanning Microscope. With this measurement we were able to infer that the inclusion complex formation occurs within tens of seconds, well below the gelatinization temperature. These results are presented in Chapter 5 of this thesis.

Spatially resolved photoluminescence combined with Confocal Laser Scanning Microscope as a powerful tool to correlate photophysical and morphological features has been exploited also to study prototypical organic bulk heterojunction used as active material for organic solar cells, as presented in Chapter 6. Organic photovoltaic devices based on polymer-fullerene bulk heterojunction have been recently gaining increased attention in the scientific community due to the promising power conversion efficiency. However, several aspects related to organic bulk heterojunctions performance and to the strategies to improve it are nowadays debated. For instance the charge generation process and the nature of the losses are between the most fundamental aspects for the optimization of organic solar cells.

Recently, the formation of *charge transfer states* (CTSs) has been observed in several bulk-heterojunctions. In the CTS state, an intermediate excited state, the electron and the hole are weakly bounded by Coulombic forces and delocalized over nearest molecular sites. To better understand the physics of the CTS in polymer: fullerene blends we investigated blends of poly((2,7-(9,9-(di-n-octyl)fluorene)-alt-5,5-(4',7'-di-thienyl-2',1',3'-benzothiadiazole)), (APFO3, a prototypical conjugated polymer) and different percentages of the fullerene derivative PCBM, prepared with a coarsened morphology in order to spatially resolved different regions of the blend (Chapter 6). By correlating imaging with PL spectra measured in different areas we assign, unambiguously, the CTS emission to microscopical regions in which the intermixing between the two materials is higher, confirming results of previous indirect experiments on different BHJ.

To conclude, with this work we were able to study the morphology, optical fingerprint and the dynamics of different systems, from starch to organic bulk-heterojunction, highlighting the versatility of the experimental technique employed.

Samenvatting

Confocale Laser Scanning Microscopie (CLSM) maakt het mogelijk om morfologie en lokale eigenschappen van een sample met elkaar te correleren. Met een relatief eenvoudige en snelle methode kunnen het sample en de structuur ervan onderzocht worden op een puntsgewijze basis die niet enkel een intensiteit map maar ook gedetailleerde energetische en dynamische informatie teruggeeft.

In hoofdstuk 2 wordt een overzicht gepresenteerd van de basis concepten van confocale microscopie en de experimentele set-up die gebruikt is tijdens het onderzoek beschreven in deze thesis.

De veelzijdigheid van CLSM maakt deze techniek alomtegenwoordig in verschillende onderzoeksgebieden. De hoge contrast afbeeldingen en de mogelijkheid om een specimen optisch op te splitsen, maken deze techniek een uitstekend tool in tal van biologische onderzoeken.

In deze thesis hebben we getracht om de CLSM techniek toe te passen op twee zeer verschillende systemen waarbij de correlatie tussen de morfologie en de optische materiaaleigenschappen extreme belangrijk zijn: zetmeel granulen en organische bulk-heterojuncties.

Zetmeel is het voornaamste bestanddeel van carbohydraten en energie voor het menselijk lichaam en ook een basis bestandsdeel in de voedingsindustrie en daarbuiten. Niet gemodificeerd zetmeel uit natuurlijke producten half-kristalliseert in onoplosbare granulaire structuren die voornamelijk bestaan uit twee polymeren D-glucose, amylopectine en amylose, met verschillende relatieve verhoudingen.

De neiging van amylose ketens om inclusie complexen te vormen in de aanwezigheid van een ligand als iodine of lineaire alcoholen is een onderzoeksvraag waar veel belangstelling voor is; specifiek inclusie complexen tussen amylose en lipiden zoals vetzuren en fosfolipiden worden vaak onderzocht voor de effecten ervan op eigenschappen van voedsel, zoals de houdbaarheid, de verteerbaarheid en reologische kenmerken.

Amylose lipide inclusie complexe formatie wordt vaak beschreven met alifatische vetzuurmolecuulketens bevat in hydrofobe caviteiten de amylose helix (zogenaamde V-amylose), terwijl de polariteit, inclusief de carboxylische zuren buiten de helix blijven omwille van elektrostatische interacties.

De drijvende kracht van deze complexe formatie zijn geïdentificeerd als zwakke intra moleculaire krachten (van der Waals kracht en waterstof), die

plaatsvinden tussen de curves van de amylose helix en intermoleculaire krachten om het complex te stabiliseren tussen de amylose keten en de ligand.

In hoofdstuk 3-5 worden de structuur en dynamica van inclusie complexe formatie tussen fluorescent lipofilische moleculen en amylose in zetmeel granulen van verschillende organische bronnen en met verschillende amylose en amylopectine inhoud onderzocht.

Hoofdstuk 3 bestudeert reguliere en waxy zetmeel granulen (tot 100% amylopectine gebaseerd) en identificeert een specifieke interactie tussen de perifere amylose keten en lipofilische moleculen die gelabeld zijn met een kleurstof om gedetecteerd te kunnen worden door confocale microscopie. Er is aangetoond dat dit proces efficiënt plaatsvindt bij kamertemperaturen onder het gelatinisatiepunt voor lage concentraties lipiden. Verder wordt aangetoond dat lange amylopectine ketens ook in staat zijn om complexen te vormen met alifatische liganden.

Door het combineren van Confocale Laser Scanning Microscopie en hoge ruimtelijke resolutie fotoluminescentie spectroscopie (de experimentele set-up is beschreven in Hoofdstuk 2), is het mogelijk om de aanwezigheid te observeren van amylose moleculen in de periferie van de zetmeel granulen door het toekennen van een specifieke optische fingerprint aan de fluorescente lipofilische moleculen die verschillende condities ondergaan.

Specifiek voor het geval van het reguliere aardappelzetmeel, is de alifatische lipideketen betrokken in het complex met de amylose ketens en de polariteit blijft buiten de helix (Hoofdstuk 4).

De specifieke aard van de interactie tussen amylose en lipofilische moleculen is ook verbeterd door het uitvoeren van “schoonmaak” experimenten. Dit is aangetoond voor het speciale geval van de interactie met amylopectine in waxy zetmeel granulen waar de lipofilische moleculen eenvoudig te verwijderen zijn na de “schoonmaak” procedures (Hoofdstuk 4).

Om de dynamica van inclusie complexe formatie te onderzoeken, zijn realtime observaties uitgevoerd die de tijd-frames capaciteit van de Confocale Laser Scanning Microscoop exploiteren.

Uit deze metingen kunnen we afleiden dat inclusie complexe formatie plaatsvindt binnen een tiental seconden, en ver beneden de gelatinisatietemperatuur. Deze resultaten worden beschreven in Hoofdstuk 5 van deze thesis.

Hoge ruimtelijke resolutie fotoluminescentie gecombineerd met Confocale Laser Scanning Microscopie en gebruikt als tool om foto-fysische eigenschappen en morfologie met elkaar te correleren is hier ook toegepast in

de studie van prototypische organische bulk heterojuncties die dienen als actief materiaal voor organische zonnecellen, zoals gepresenteerd in Hoofdstuk 6.

Organische foto- voltaïsche materialen gebaseerd op polymer:fullerene bulk heterojunctie krijgen recentelijk veel aandacht in wetenschappelijk onderzoek vanwege veelbelovende efficiëntie in vermogensomzettingen.

Verschillende aspecten die gerelateerd zijn aan de prestaties van organische bulk heterojuncties en de mogelijke strategieën om deze te verbeteren zijn zeer actueel. Bijvoorbeeld het genereren van lading en de processen die ladingsverliezen veroorzaken, zijn de meest fundamentele aspecten in de optimalisatie organische zonnecellen.

Recentelijk is de formatie van het charge-transfer complex (CTS) geobserveerd in verschillende bulk-heterojuncties. In de CTS toestand, een overgangstoestand, zijn het elektron en het gat zwak met elkaar gebonden door Coulomb krachten en gedelokaliseerd over de meest naburige moleculaire structuren. Om de fysica van CTS in polymer:fullerene mengsels beter te begrijpen, zijn mengsels onderzocht van APFO3 (een prototypisch geconjugeerd polymeer) en verschillende percentages van de fullerene afgeleide PCBM, geprepareerd met een grovere morfologie om zo de verschillende gebieden van het mengsel met een hoge ruimtelijke resolutie te kunnen onderscheiden.

Door het correleren van afbeeldingen gemaakt met PL-spectra voor verschillende lokale gebieden, kunnen we, eenduidig, de CTS emissie toekennen aan microscopische gebieden waar intermixing tussen de twee materialen hoger is en hierdoor eerder onderzoek bevestigen dat gedaan is op indirecte experimenten met verschillende BHJ.

Samengevat is dit werk een studie van de morfologie, optische fingerprint en dynamica van verschillende systemen, variërend van zetmeel tot organische bulk heterojuncties waarbij de veelzijdigheid benadrukt wordt van de experimentele toegepaste technieken.

