

CAPITOLO 3 Tecniche di analisi

3.1 Laser light scattering (1)

Un esperimento di diffusione di luce può essere schematizzato nel seguente modo:

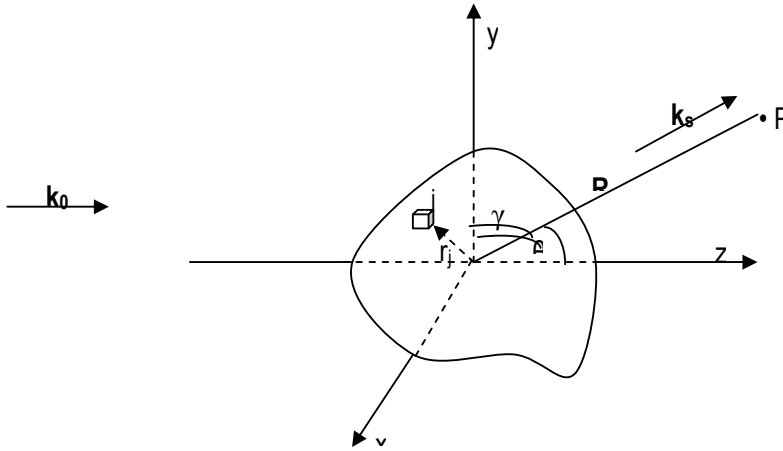


FIG. 1 Schematizzazione di un esperimento di scattering

Un fascio di luce monocromatica polarizzata linearmente (\mathbf{k}_0), incide su un mezzo uniforme. Un rivelatore posto in P ad una distanza \mathbf{R} dall'origine del sistema di riferimento, misura un'intensità di luce che si propaga in una direzione diversa da quella del fascio riflesso o rifratto: questo è ciò che si intende diffusione della luce.

La teoria della diffusione della luce è stata sviluppata da Rayleigh (1871), Mie (1902), Smoluchowski (1908), Einstein (1910), e Debye (1915). Debye e Zimm ne fecero una sintesi e svilupparono la tecnica di diffusione della luce come metodo di studio delle macromolecole in soluzione. L'analisi dell'intensità della luce da esse diffusa permette, infatti di determinarne la massa, la forma e le interazioni.

In un esperimento di light scattering si misurano l'intensità media diffusa $I_s = |E_s|^2$ (con E_s è il campo elettrico diffuso) e lo spettro $S(\omega)$. Per particelle di dimensioni lineari \mathbf{a} tali che \mathbf{a}/λ non sia trascurabile rispetto all'unità, sia I_s che $S(\omega)$ dipendono dall'angolo di scattering.

L'intensità diffusa I_s fornisce le informazioni sulle proprietà statiche del sistema: dimensioni e forma degli elementi diffusori e quantità termodinamiche. Lo spettro $S(\omega)$ riflette la dinamica del mezzo: moti Browniani delle particelle, coefficienti di trasporto, moti interni. Questi movimenti danno luogo ad uno spostamento in frequenza molto debole (da 100 Hz a 10 KHz) rispetto alla luce incidente (10^{14} Hz) per cui si parla di diffusione quasi elastica della luce (QELS Quasi Elastic Light Scattering). Il QELS presenta diversi vantaggi nell'analisi di soluzioni di macromolecole, si tratta infatti di un metodo rapido, facilmente riproducibile e soprattutto non invasivo mediante il quale si possono ottenere informazioni sulla massa, le dimensioni, la forma (etc...) degli oggetti diffusori.

In particolare è divenuto uno strumento indispensabile nello studio delle macromolecole di origine biologica. Mediante misure statiche e dinamiche della luce diffusa, sono stati analizzati nanovettori (liposomi e nanoparticelle) in soluzione.

Una spiegazione intuitiva della diffusione della luce può essere data dal fatto che tutte le molecole polarizzabili, eccitate da un'onda elettromagnetica, irradiano nello spazio un'onda della stessa frequenza del raggio incidente. Se le particelle diffondenti sono presenti in numero elevato si produce un fenomeno di interferenza che, se la polarizzabilità del mezzo è omogenea, cioè $\alpha(\mathbf{r}, t)$ non dipende da \mathbf{r} , si può dimostrare essere distruttivo in tutte le direzioni diverse da quella del raggio rifratto. È, quindi, necessario avere fluttuazioni locali di polarizzabilità per avere diffusione di luce, come nel caso di particelle disperse in un solvente. La polarizzabilità può essere scritta come:

$$\alpha(\mathbf{r}, t) = \langle \alpha \rangle + \delta \alpha(\mathbf{r}, t) \quad 1)$$

dove $\langle \alpha \rangle$ è la parte media, indipendente da \mathbf{r} e da t per un mezzo omogeneo in condizioni stazionarie, e $\delta \alpha(\mathbf{r}, t)$ è la parte fluttuante, a media nulla, che dà origine al fenomeno della diffusione.

Introducendo la costante dielettrica del mezzo:

$$\epsilon = 1 + 4\pi\alpha \quad 2)$$

il campo elettrico nel punto P può essere scritto come:

$$E_s(\mathbf{R}, t) = \frac{\mathbf{k}_s \times (\mathbf{k}_s \times E_0)}{4\pi R \langle \epsilon \rangle} \exp[i(\mathbf{k}_s \cdot \mathbf{R} - \omega_0 t)] \cdot \int_V \delta \epsilon(\mathbf{r}, t) \exp[i\mathbf{k} \cdot \mathbf{r}] d^3 r \quad 3)$$

dove il vettore d'onda \mathbf{k} è definito da:

$$\mathbf{k} = \mathbf{k}_s - \mathbf{k}_0 \quad 4)$$

con \mathbf{k}_s e \mathbf{k}_0 , rispettivamente, vettori d'onda del campo diffuso e incidente.

L'integrale di volume presente nell'equazione 3 ha il significato di una trasformata di Fourier delle fluttuazioni di costante dielettrica $\delta \epsilon(\mathbf{r}, t)$. Ciò significa che, fra tutte le componenti di Fourier delle fluttuazioni spaziali di costante dielettrica, solo quella di vettore d'onda \mathbf{k} (uguale alla differenza tra il vettore d'onda del campo diffuso e incidente), è responsabile della luce diffusa in un punto generico P. Classicamente ciò corrisponde ad una diffrazione alla Bragg da un reticolo sinusoidale con lunghezza d'onda $\lambda = 2\pi/k$, oppure dal punto di vista della meccanica quantistica corrisponde alla conservazione della quantità di moto.

Il campo $E_s(\mathbf{R}, t)$ diffuso è una funzione casuale del tempo perchè riflette la natura statistica delle fluttuazioni di costante dielettrica. Per la maggior parte dei casi, la statistica del campo è gaussiana, perchè il processo di diffusione è determinato da un gran numero di diffusioni indipendenti; questo porta ad una semplificazione della caratterizzazione del campo diffuso. Infatti, è sufficiente definire la funzione di correlazione al primo ordine del campo:

$$G_1(t_1, t_2) = \langle E_s^*(t_1) E_s(t_2) \rangle \quad 5)$$

Ovvero, si misura il segnale al tempo t_1 , lo si moltiplica per quello misurato al tempo t_2 per tutti i valori possibili dei ritardi $t_2 - t_1 = \tau$ e si media, ritardo per ritardo, i prodotti ottenuti su un elevato numero di campionamenti, si ottiene la funzione di correlazione del segnale.

Nel caso particolare in cui $t_1 = t_2$, si ha che :

$$G_1(t_1, t_1) = \langle |E_s(t_1)|^2 \rangle \quad 6)$$

corrispondente all'intensità media della luce diffusa. Nel caso di statistica gaussiana del campo, è possibile scrivere la funzione di correlazione dell'intensità come:

$$G_2(t_1, t_2) = \langle I \rangle^2 (1 + \langle |G_1(t_1, t_2)|^2 \rangle) \quad 7)$$

L'equazione 3) lega direttamente le fluttuazioni di costante dielettrica del mezzo, con il campo elettrico diffuso. La funzione di correlazione del campo dipenderà, quindi, dalla funzione di correlazione delle fluttuazioni di costante dielettrica. Analogamente, è possibile ricavare l'intensità della luce diffusa come:

$$I_s(\mathbf{R}, t_1) = I_0(k_0)^4 \frac{V^2 \sin^2 \gamma}{16\pi^2 R^2} \langle \delta \epsilon^2(\mathbf{k}, t_1) \rangle \quad 8)$$

Per le soluzioni di macromolecole, le fluttuazioni di costante dielettrica provengono da due contributi: il primo dall'intensità diffusa dal solvente (I_w) spesso molto piccola, il secondo è quello che dà informazioni sulle macromolecole (I_s). Dall'equazione 8) si ottiene:

$$I_s(\mathbf{R}) = I_0(k_0)^4 \frac{\sin^2 \gamma}{16\pi^2 R^2} \left(2n \frac{dn}{dc} \right)^2 \cdot \langle |\delta c(\mathbf{k})|^2 \rangle \quad 9)$$

Dove si è introdotto l'indice di rifrazione della soluzione n mediante la relazione $\epsilon = n^2$, e si è esplicitato la fluttuazione di costante dielettrica come:

$$\delta \epsilon(\mathbf{k}) = \left(\frac{\delta \epsilon}{\delta c} \right) \delta c(\mathbf{k}) = 2n \left(\frac{dn}{dc} \right) \delta c(\mathbf{k}) \quad 10)$$

la fluttuazione quadratica media della concentrazione è legata solamente a quantità termodinamiche ed è indipendente da \mathbf{k} se le macromolecole sono piccole ($a < \lambda/40$, con a diametro della macromolecola) e non creano strutture nella soluzione. Per macromolecole non interagenti l'equazione 9) diventa:

$$I_s = I_0(k_0)^4 \frac{\sin^2 \gamma}{16\pi^2 R^2} \frac{V}{N_A} \left(2n \frac{dn}{dc} \right)^2 cM \quad (11)$$

In questo modo è possibile osservare la connessione diretta tra il peso molecolare M , la concentrazione c e l'intensità della luce diffusa.

Nel caso di macromolecole di dimensione maggiore, occorre tenere conto degli effetti d'interferenza della luce diffusa dai vari punti interni della particella stessa. La distribuzione angolare dell'intensità diffusa non sarà più isotropa, ma dipenderà dalla forma della particella. Per la maggior parte dei casi si può usare l'approssimazione di Rayleigh-Debye (anche detto criterio di Rayleigh-Gans) nella quale si trascura l'effetto della presenza delle particelle sul campo elettrico incidente; tale approssimazione vale per:

$$(n_p - n_s)a \ll \lambda/4\pi \quad (12)$$

dove n_p e n_s sono rispettivamente gli indici di rifrazione della particella e del solvente, a è il diametro della particella. L'intensità della luce diffusa dipende, in questo caso, dall'angolo di osservazione attraverso una funzione $P(k)$, detta *fattore di forma*; $P(k) = 1$ per $k = 0$ e nel limite di diffusori puntiformi. Per $k > 0$ si ha che $P(k)$ è sempre minore di 1. Ciò significa che per macromolecole grosse, la luce è diffusa maggiormente in avanti. Vengono riportati, come esempio, i fattori di forma relativi a macromolecole di diverse forme.

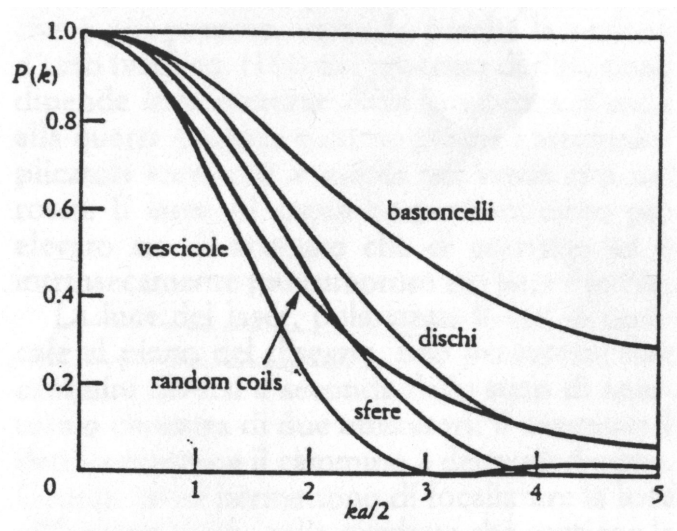


FIG. 2 Andamento di fattori di forma per diverse tipologie di diffusori in soluzione

Nel caso delle macromolecole la parte dinamica della diffusione, cioè quella relativa alla funzione di correlazione, è strettamente collegata alle fluttuazioni temporali della costante dielettrica, ovvero dall'evoluzione temporale delle fluttuazioni spontanee di concentrazione nel mezzo. Per una trattazione semplificata, si può immaginare che una fluttuazione microscopica di concentrazione, obbedisca in media all'equazione macroscopica per la diffusione traslazionale, ovvero la legge di Fick, che prevede un decadimento esponenziale della fluttuazione di concentrazione $\delta c(\mathbf{k},t)$, definita spazialmente dal vettore \mathbf{k} :

$$\delta c(\mathbf{k},t) = \delta c(\mathbf{k},0) \exp(-k^2Dt) \quad (13)$$

dove D è il coefficiente di diffusione traslazionale della macromolecola. In condizioni stazionarie, con $t_2 - t_1 = \tau$, si può ricavare:

$$G_1(\tau) = \langle I_s \rangle \exp(i\omega_0\tau) \exp(-Dk^2\tau) \quad (14)$$

Associata all'informazione sul peso molecolare, dalla misurazione delle fluttuazione temporali del campo elettrico della luce diffusa, si possono ottenere informazioni sul coefficiente di diffusione delle macromolecole in soluzione. La trasformata di Fourier della 14) esprime il fatto che il profilo spettrale della luce diffusa è allargato attorno alla frequenza ottica incidente ω_0 , secondo una lorentziana di larghezza a metà altezza pari a Dk^2 . Questo significa che le macromolecole in moto browniano nella soluzione diffondono luce spostata in frequenza per effetto Doppler, in modo casuale, attorno alla frequenza della luce incidente. In generale, per soluzioni di macromolecole si può scrivere la funzione di correlazione dell'intensità (più facilmente accessibile da un punto di vista sperimentale che quella del campo elettrico) nel seguente modo:

$$G_2(\tau) = \langle I_s(0)I_s(\tau) \rangle = \langle I \rangle^2 (1 + \exp(-2Dk^2\tau)) \quad (15)$$

Il coefficiente di diffusione traslazionale D è connesso al raggio idrodinamico R_H della macromolecola dalla legge di Stokes-Einstein:

$$D = k_B T / 6 \pi \eta R_H \quad (16)$$

Con k_B costante di Boltzman, T temperatura assoluta e η viscosità del solvente. Il raggio idrodinamico è solitamente un po' più grande del raggio geometrico perchè la particella, nel suo moto browniano,

trattiene alcuni strati molecolari del solvente. Per macromolecole non sferiche, R_H è maggiore del raggio della sfera che ha lo stesso volume.

3.2 Potenziale ζ (2,3,4)

Le particelle disperse in soluzione sono spesso caratterizzate da cariche presenti all'interfaccia solido-liquido e il potenziale che queste originano risulta avere un ruolo fondamentale nel governare la stabilità del sistema colloidale.

Gli scienziati Derjaguin, Verwey, Landau e Overbeek, svilupparono una teoria sulla stabilità di un sistema colloidale (DLVO), in cui affermano che la stabilità di una particella in soluzione, dipende da una funzione della propria energia potenziale totale V_T , che a sua volta è determinata da differenti contributi:

$$V_T = V_A + V_R + V_S \quad (17)$$

dove V_S è l'energia potenziale dovuta al solvente, solitamente porta un contributo marginale all'energia potenziale totale e solamente in prossimità della superficie di separazione; più importante è il rapporto tra V_A (contributi attrattivi) e V_R (contributi repulsivi) a cui partecipa il potenziale zeta.

La carica netta alla superficie di una particella in soluzione, determina la distribuzione degli ioni nella regione circostante: infatti aumenta la concentrazione di contro-ioni in prossimità della superficie creando un primo layer fortemente legato alla superficie della particella (layer di Stern) e di un secondo strato di cariche diffuso, composto da co-ioni e contro-ioni, dove l'equilibrio tra le forze elettrostatiche e i moti di agitazione termica ne determinano la distribuzione. Il potenziale in questa regione, quindi, decresce con l'aumento della distanza dalla superficie della particella, fino a giungere al valore del potenziale di bulk, convenzionalmente considerato uguale a zero. In FIG. 3 sono riportate la schematizzazione del doppio layer e il relativo andamento del potenziale in funzione della distanza.

All'interno del layer diffuso è possibile identificare un piano entro cui la particella e gli ioni che la circondano, formano un oggetto stabile; ovvero, quando la particella si muove, gli ioni entro questo piano ideale si muovono insieme a lei come se fossero un tutt'uno. Il potenziale misurato a questo piano ideale (separazione idrodinamica) è il potenziale zeta.

La teoria DLVO afferma che la stabilità di un sistema colloidale è determinata dalla somma delle forze attrattive di van der Waals (V_A) e dalle forze di repulsione del doppio layer circondante la particella (V_R) che diventano importanti all'approssimarsi di due o più particelle a causa del loro moto Browniano. Secondo questa teoria, esiste una barriera di potenziale, risultante dalle forze repulsive, che impedisce a due particelle di aggregare; tuttavia, se l'energia di collisione delle particelle, riesce a

superare la barriera di potenziale, le forze attrattive portano le particelle in contatto in modo indissolubile

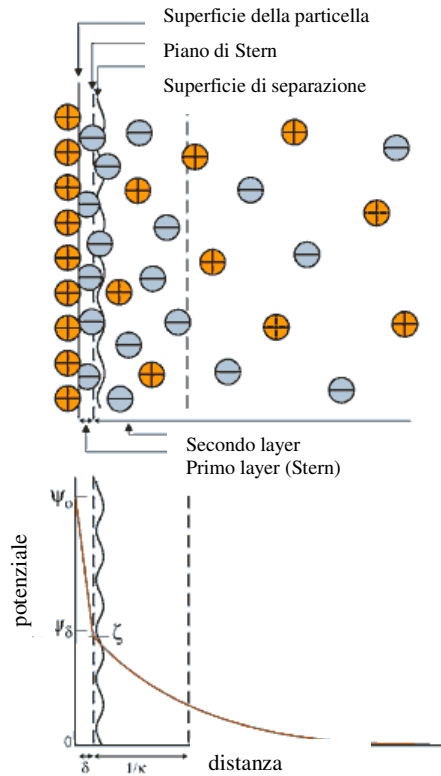


FIG. 3 Il doppio layer e relativi potenziali

Dal punto di vista operativo, esistono due metodi fondamentali per realizzare sistemi colloidali stabili:

- repulsione sterica: vengono utilizzati dei polimeri idrofili adsorbiti o legati covalentemente sulla superficie delle nanoparticelle, in modo tale da prevenire uno stretto contatto. Se viene adsorbito abbastanza polimero, lo spessore del rivestimento è tale da mantenere la separazione tra le particelle per repulsione sterica; in questo caso le forze di van der Waals sono troppo deboli per causare un'aggregazione tra particelle. Questo metodo è semplice, richiede solo l'aggiunta di un opportuno polimero, però presenta anche degli svantaggi: potrebbe essere complicato ottenere una successiva flocculazione, se necessaria; il polimero potrebbe essere costoso e in alcuni casi non desiderabile.
- repulsione elettrostatica, ovvero l'effetto dovuto alla presenza di oggetti con la medesima carica, in soluzione; questo metodo ha il vantaggio di stabilizzare (e eventualmente di far flocculare) un sistema semplicemente variando nel modo opportuno la concentrazione degli ioni nel sistema. È un processo reversibile e poco costoso.

Il valore di potenziale zeta fornisce informazioni sulla stabilità del sistema colloidale: se tutte le particelle in sospensione posseggono un grande potenziale negativo o positivo, allora tendono a respingersi e risulteranno più stabili avendo poca tendenza all'aggregazione. Invece, se le particelle presentano un basso potenziale zeta, allora la flocculazione diventa maggiormente probabile. In generale vengono considerate stabili preparazioni con un valore assoluto del potenziale zeta pari a circa 30mV.

Un'importante conseguenza dell'esistenza di cariche elettriche alla superficie di una particella, è che questa può muoversi sotto l'azione di un campo elettrico (elettroforesi). Per basse intensità del campo elettrico applicato, la velocità media di deriva delle particelle (V_s) sarà data da:

$$V_s = \mu_e E \quad 18)$$

Dove μ_e è la mobilità elettroforetica.

La relazione tra il potenziale zeta e la mobilità elettroforetica dipende dal modello teorico che si utilizza; non esiste il potenziale zeta standard di una sostanza. Classicamente esistono due modelli per calcolare il potenziale zeta dalla mobilità elettroforetica: quello di Smoluchowski e quello di Hückel. Il limite di applicazione tra un modello e l'altro è dato dal valore del prodotto ka : "k", detta lunghezza di Debye, viene misurata in lunghezze reciproche e, spesso, k^{-1} è presa come misura dello spessore del doppio layer di ioni che circonda la particella carica; il parametro "a" si riferisce al raggio della particella, quindi, "ka" misura il rapporto tra il raggio della particella e lo spessore del doppio layer.

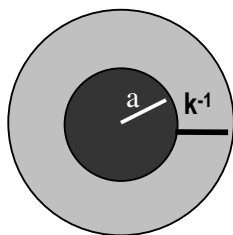
Nel caso in cui $ka \ll 1$ la relazione tra la mobilità elettroforetica e il potenziale zeta è data dal limite di Hückel:

$$\mu_e = (2\varepsilon\zeta)/(3\eta) \quad \text{per } ka \ll 1 \quad 19)$$

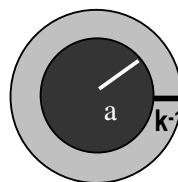
dove μ_e è la mobilità elettroforetica, ζ è il potenziale zeta, ε è la costante dielettrica del mezzo, η è la viscosità del solvente.

Nel limite opposto, ovvero $ka \gg 1$ si utilizza la relazione di Smoluchowski:

$$\mu_e = \varepsilon\zeta/\eta \quad \text{per } ka \gg 1 \quad 20)$$



Approssimazione di Huckel



Approssimazione di Smoluchowski

FIG. 4 Schematizzazione delle approssimazioni di Huckel e Smoluchowski

Solitamente per particelle colloidali preparate in acqua o in solventi polari è quasi impossibile soddisfare il limite di Hückel e ciononostante non è scontato soddisfare completamente il limite di Smoluchowski; comunque, per tipiche preparazioni colloidali è più semplice soddisfare alla condizione $ka > 1$ piuttosto che alla condizione $ka < 1$; nel caso dei colloidali, quindi, viene per lo più utilizzata l'approssimazione di Smoluchowski.

In uno strumento per la determinazione del potenziale zeta, la mobilità elettroforetica è misurata attraverso la tecnica LDV (Laser Doppler Velocimetry) o la tecnica PALS (Phase Analysis Light Scattering), che permette di misurare mobilità elettroforetiche molto basse e di utilizzare bassi campi elettrici evitando il surriscaldamento del campione.

Applicando un campo elettrico ad una soluzione contenente particelle cariche, si crea una migrazione di queste verso il polo positivo o negativo del campo, in dipendenza dalla loro carica superficiale; occorre poter misurare sia la direzione che la velocità del moto delle particelle sotto l'azione di un campo elettrico noto per calcolare la mobilità elettroforetica e, quindi, il potenziale zeta.

La configurazione solitamente adottata per misure di questo tipo, consiste in una cella portacampione in cui vengono posti due elettrodi per produrre un campo elettrico; la luce diffusa da particelle cariche poste in moto dall'azione del campo elettrico, sarà spostata in frequenza a causa dell'effetto Doppler, in modo proporzionale alla velocità delle particelle. Gli spostamenti in frequenza che si realizzano sono dell'ordine dei 100 Hz che, paragonati alla frequenza tipica della radiazione laser (dell'ordine di 10^{14} Hz) risultano impossibili da rilevare. Per ovviare a questo problema viene utilizzata una tecnica eterodina: la radiazione laser viene divisa in due porzioni: una utilizzata come fascio di riferimento, modulata solitamente a 250Hz, e l'altra fatta passare attraverso la cella contenente il campione. In assenza di campo elettrico le due porzioni di fascio, una volta ricombinate, danno origine ad uno spettro di potenza con un picco molto stretto attorno ai 250 Hz; in presenza di campo elettrico, ogni spostamento Doppler in frequenza (come detto in precedenza dell'ordine dei 100 Hz) sarà, ora, facilmente risolvibile. L'elettronica dello strumento è

realizzata in modo tale per cui se lo spostamento in frequenza supera i 250Hz, allora il potenziale zeta ricavato sarà positivo (e vice versa).

3.3 SAXS (*Small Angle X-ray Scattering*) (5,6)

Lo scattering di raggi X a basso angolo (SAXS), è una tecnica consolidata per analizzare la struttura e le fluttuazioni sulla nano scala. La diffusione di raggi X a basso angolo trae origine dalle disuniformità spaziali di densità elettronica all'interno dei materiali. La quantità di informazioni strutturali che si possono ottenere dipende dal grado di ordine sopramolecolare del campione; ad esempio nel caso di soluzioni di macromolecole diluite, si può determinare la forma, il raggio di girazione, mentre nel caso di fibre altamente ordinate si può determinare un modello strutturale per l'organizzazione molecolare. Come altre tecniche di scattering che usano la radiazione visibile o i neutroni, anche lo scattering con i raggi X è una tecnica strutturale non invasiva.

I moderni sincrotroni forniscono un flusso elevato e ben collimato; questo fatto ha portato la tecnica SAXS ad essere unica per l'elevata risoluzione spaziale e temporale e per i volumi ridotti richiesti: si possono effettuare esperimenti su campioni diluiti nella scala temporale dei millisecondi. La tecnica dello scattering non costituisce un metodo diretto di imaging, per ottenere informazioni strutturali occorre una rigorosa analisi basata su metodi di fitting.

Il formalismo di base dello scattering a basso angolo è simile per la luce i raggi X e i neutroni, la differenza importante è nell'interazione tra la differente radiazione e il mezzo: la diffusione della luce ha origine dalla variazione di indice di rifrazione, mentre i neutroni sono diffusi dai nuclei atomici, come accennato, per i raggi X il termine di contrasto è dato dalle fluttuazioni spaziali di densità elettronica all'interno dei materiali.

Il tipico set up sperimentale per un esperimento SAXS è mostrato in FIG. 5:

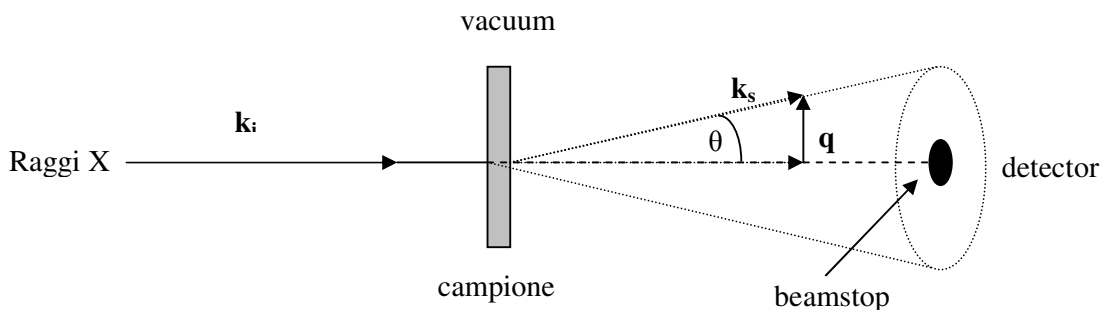


FIG. 5 Rappresentazione schematica per il set up di un tipico esperimento SAXS

Un fascio di raggi X monocromatico e ben collimato, incide su un campione, la radiazione diffusa viene raccolta posteriormente da un detector bidimensionale. Il fascio trasmesso è completamente assorbito dal beamstop, posizionato davanti al detector, l'intero cammino prima e dopo il campione è in vuoto per evitare assorbimento e diffusione da parte dell'aria. Ciò che viene misurato è il numero di fotoni diffusi in funzione dell'angolo. Per un dato campione, la quantità di fotoni dipende dal numero di fotoni incidenti per secondo e per unità di area (flusso di fotoni) e dalla distanza campione-detector. Per i raggi X lo scattering è prodotto dagli elettroni (scattering di Thomson), ed è indipendente dalla lunghezza d'onda dei raggi X, eccetto che in prossimità della soglia di assorbimento del materiale costituente il campione. Lo scattering a basso angolo è elastico, a causa dell'elevata energia della radiazione; l'intensità del vettore di scattering incidente e diffuso sono uguali e pari a: $k_i = k_s = 2\pi/\lambda$. Il momento trasferito o vettore di scattering, $\mathbf{q} = \mathbf{k}_s - \mathbf{k}_i$, è:

$$q = (4\pi/\lambda)\sin(\theta/2) \quad (21)$$

In un esperimento SAXS con luce di sincrotrone, il range di q può estendersi su tre ordini di grandezza, tipicamente $0.006 \text{ nm}^{-1} < q < 6 \text{ nm}^{-1}$, corrispondenti nello spazio reale a dimensioni che vanno da $1 \mu\text{m}$ a 1 nm .

La caratterizzazione strutturale di soluzioni di polimeri, macromolecole e aggregati molecolari è stata facilitata dallo sviluppo di tecniche basate sullo scattering di radiazione elettromagnetica e di particelle (neutroni ed elettroni).

E' necessario introdurre alcuni concetti fondamentali: la *lunghezza di scattering* e la *densità di scattering*.

Quando il fascio incidente di raggi X incontra la nuvola elettronica di un atomo del campione il parametro fisico che si introduce per valutare l'ampiezza di scattering è la **lunghezza di scattering**. Questa grandezza, espressa in cm, "pesa" il contributo all'intensità totale in relazione al tipo di atomo investito dalla radiazione, cioè dal numero Z di elettroni dell'atomo. Quindi, la lunghezza di scattering fornisce una rappresentazione quantitativa dell'intensità dell'interazione della radiazione elettromagnetica con l'elemento diffusore ed è data da

$$b = b_0 Z \quad b_0 = 0.282 \cdot 10^{-12} \text{ cm} \quad (22)$$

b è quindi sempre positivo e si determina in modo molto semplice.

Per lo scattering di neutroni l'interazione è nucleare, comunque si può definire la lunghezza di scattering, il cui valore dipenda dalla natura del nucleo. b in questo caso sarà differente a seconda

dell'isotopo considerato e sarà sensibile allo stato di spin nucleare. Il calcolo teorico di b è un problema ancora aperto, quindi si utilizzano valori sperimentali tabulati.

In un campione con molecole costituite da atomi differenti si può definire una lunghezza di scattering media, che è la combinazione lineare delle lunghezze di scattering dei singoli atomi che compongono la molecola. Agli effetti del calcolo della densità diffusa ciò che è importante è la *densità di lunghezza di scattering*, più comunemente chiamata **densità di scattering**. Tale grandezza è il rapporto fra la somma delle lunghezze di scattering degli atomi che costituiscono la molecola ed il suo volume:

$$\rho_0 = b_{tot} / V_0 \quad 23)$$

Con lo scattering a basso angolo si possono studiare soluzioni con caratteristiche molto varie. Per sistemi diluiti, dove le distanze tra le particelle sono maggiori delle loro dimensioni, è possibile determinare una distribuzione delle misure degli aggregati. Nel caso di sistemi semi-diluiti, il risultato di un esperimento di scattering a basso angolo è influenzato dalla struttura delle particelle e dal loro arrangiamento spaziale. Pertanto la curva di diffusione è il prodotto della funzione di scattering dell'aggregato (fattore di forma $P(q)$) e dalla funzione di interazione tra i vari aggregati (fattore di struttura $S(q)$).

Se il sistema è "denso", cioè la frazione volumica del soluto è dello stesso ordine di grandezza di quella del solvente, è più utile un'analisi di tipo cristallografico.

Per ottenere informazioni sulla struttura e sulle dimensioni degli aggregati è necessario che la lunghezza d'onda della radiazione sia comparabile con le misure di interesse.

Un punto dello spazio può essere individuato da un vettore r , e in questo caso l'onda assume la forma $Ae^{i(k \cdot r + \alpha)}$, dove A è l'ampiezza e α la fase iniziale. E' stata trascurata l'evoluzione temporale, in quanto per l'analisi di effetti di diffrazione è significativo il pattern istantaneo, occorrono solo i mutui cambiamenti di fase prodotti dallo scattering e dall'interferenza, dipendenti dalla geometria delle onde e degli oggetti e costanti nel tempo. Assumiamo che lo scattering sia elastico, pertanto effetti come la polarizzazione e l'assorbimento non hanno importanza fondamentale, anche se comportano correzioni alle formule per l'intensità diffusa.

Un fascio di neutroni o raggi X di intensità I_0 , incidente su una cella contenente il campione di volume V e contenente N particelle in soluzione, viene diffuso in avanti descrivendo un cono, di cui è possibile misurare l'intensità I_s con un detector posto all'angolo θ , che sottende un'area $r^2 d\Omega$, definita dall'angolo solido $d\Omega$ e dalla distanza r del detector dal campione (FIG 5).

La grandezza misurata è il rapporto

$$d\sigma(Q) = \frac{I_s r^2 d\Omega}{I_0} \quad [\text{cm}^2] \quad 24)$$

che ha le dimensioni di un'area ed è chiamata sezione d'urto differenziale.

Si possono presentare i dati anche attraverso la sezione d'urto di scattering per unità di volume:

$$\frac{d\Sigma}{d\Omega}(Q) = \frac{1}{V} \frac{d\sigma}{d\Omega}(Q) \quad 25)$$

che è anche denotata con l'intensità normalizzata $I(Q)$.

La figura di scattering di un sistema bifasico, come un sistema micellare, contiene due contributi: un contributo intraparticellare dovuto all'interferenza di onde sferiche che si originano da atomi uguali o diversi appartenenti allo stesso aggregato, ed un contributo interparticellare dovuto all'interferenza di onde sferiche che si originano da atomi uguali o diversi posti in micelle diverse.

I due contributi vengono separati nella cosiddetta "decoupling approximation" in cui si ipotizza che non ci siano correlazioni tra le dimensioni delle particelle, la loro orientazione e la distanza reciproca.

Questa approssimazione risulta lecita nel caso di particelle cariche che interagiscono mediante un potenziale coulombiano repulsivo, in quanto il contatto tra le particelle è improbabile, risulta invece meno lecita nel caso di particelle prive di carica.

3.4 DSC (Differential Scanning Calorimetry) (7,8)

In uno strumento DSC due celle identiche, una contenente il campione in soluzione e l'altra una soluzione di riferimento (materiale che non presenta transizioni di fase nel range di temperature di interesse), vengono riscaldate con una velocità di scansione programmata. Inizialmente la temperatura di entrambe le celle cresce linearmente col tempo e la differenza di temperatura tra esse è zero. Quando avviene una transizione termica nella soluzione campione, il circuito di controllo rileva la differenza di temperatura tra le due celle e fornisce, o sottrae calore (potenza) alla cella campione per mantenere la sua temperatura uguale a quella del riferimento. Questa differenza in potenza è acquisita come funzione del tempo o della temperatura e fornisce le basi per determinare la temperatura e l'entalpia di transizione e per il calcolo del calore specifico del campione in esame.

Le tecniche calorimetriche hanno trovato ampie applicazioni nello studio delle proprietà dei lipidi organizzati in membrane modello. In particolar modo il calorimetro a scansione differenziale (DSC) è diventato una delle maggiori tecniche utilizzate per lo studio di transizioni indotte termicamente.

Una transizione di fase da gel a fluido è altamente cooperativa. Gli effetti endotermici osservati, attraverso le transizioni di fase, sono causati da cambiamenti di energia interna del sistema come il numero di conformazioni gauche al crescere delle catene aciliche grasse, e dai concomitanti cambiamenti nelle interazioni di Van Der Waals tra le catene e le interazioni polari all'interfaccia lipide-acqua. Il "melting" delle catene aciliche grasse è accompagnato non solo da un assottigliamento del doppio strato lipidico, dovuto all'aumentato numero di conformazioni gauche, ma anche da un aumento del volume totale del bilayer, ed infatti si osserva una significativa diminuzione della densità del sistema. La DSC è divenuta una delle tecniche più usate in campo biologico in quanto fornisce informazioni in termini di energia sulle transizioni indotte nelle membrane, o sullo stato di ordine/disordine del sistema

Parametri fondamentali per lo studio delle transizioni di fase dei lipidi, determinabili attraverso misure DSC sono: la temperatura di melting, ovvero la temperatura a cui avviene la transizione di fase delle parti idrocarburiche, l'entalpia di transizione, ovvero l'energia coinvolta nella transizione, il grado di cooperatività delle molecole durante la transizione di fase da gel a liquido.

In una misura DSC, il calorimetro viene programmato per misurare la potenza da imporre alla cella affinché venga realizzato un profilo di temperatura del tipo:

$$T(t)=T_0 +\beta t \quad (26)$$

dove T_0 è la temperatura iniziale e β è la velocità media di scansione. In tal caso l'equazione del flusso di calore alla cella è :

$$P - P_{loss} = \frac{dH}{dt} + C_0 \frac{dT}{dt} \quad (27)$$

dove P è la potenza fornita alla cella contenente il campione, P_{loss} corrisponde al flusso di calore della cella verso lo schermo ed il bagno termico, $C_0 dT/dt$ è la variazione di entalpia per unità di tempo subita dalla cella di capacità termica C_0 (cella riferimento), dH/dt è la variazione di entalpia per unità di tempo subita dal campione.

Quest'ultima grandezza contiene vari contributi tra cui i processi chimico-fisici che avvengono nel campione e che dipendono unicamente dal tempo ($\partial H/\partial t$) ed il contributo collegato alla capacità termica C_x del campione dovuto alla variazione lineare della temperatura (βC_x). L'equazione (27) diventa:

$$P - P_{loss} = \frac{\partial H}{\partial t} + (C_0 + C_x)\beta \quad (28)$$

Se si esegue una misura della cella riferimento l'equazione (28) si riduce a

$$P_0 - P_{loss} = C_0\beta \quad (29)$$

Per sottrazione dell'equazione (29) dall'equazione (28) e notando che P_{loss} non dipende dal campione ma solo dal profilo di temperatura imposto alla cella si ricava:

$$P - P_0 = \frac{\partial H}{\partial t} + C_x\beta \quad (30)$$

Inoltre osservando che

$$P - P_0 = \frac{dH}{dt} = \frac{dH}{dT} \frac{dT}{dt} \quad (31)$$

si può definire

$$C_{p,app} = \left(\frac{\partial H}{\partial t} \frac{1}{\beta} + C_x \right) = \frac{(P - P_0)}{\beta} \quad (32)$$

La quantità misurata è la potenza P di cella durante due scansioni identiche, effettuate una sulla cella contenente un riferimento inerte adeguato con capacità termica nota (acqua), e l'altra su una cella contenente il campione. Queste due scansioni vengono fatte per eliminare eventuali effetti spuri dovuti alla strumentazione. Ciò che si ottiene è la capacità termica apparente $C_{p,scan}$.

Le misure di calorimetria sono state svolte sui vettori composti da miscele controllate di lipidi puri (fosfolipidi), utilizzati come sistemi modello semplificati dei vettori nanoparticellari ideati per il trasporto di farmaci; lo scopo delle misure è di studiare il miscelamento dei fosfolipidi impiegati nelle miscele e lo stato delle parti lipidiche alle varie temperature, specie vicino alla temperatura fisiologica.

3.5 Cryo-Tem (9)

Il termine cryo-Tem si riferisce a misure di microscopia elettronica in trasmissione su sottili film a base acquosa, vetrificati e mantenuti alla temperatura dell'azoto liquido. Questa tecnica fornisce la possibilità di ottenere immediatamente immagini di strutture formate da molecole anfifiliche in

soluzione: infatti, queste strutture delicate e dinamiche, richiedono un ambiente acquoso per formarsi e mantenersi e mal sopportano le procedure di essiccamento e di staining tipiche della microscopia elettronica convenzionale. Nella tecnica cryo-Tem, la soluzione da analizzare è posta su un layer poroso polimerico, viene rimosso il materiale in eccesso, e in seguito il layer è posto su una normale griglia per la microscopia elettronica; la griglia viene gelata molto velocemente, per vetrificare il campione evitando cristallizzazioni. Le strutture presenti in soluzione restano intrappolate nel film vetrificato e possono essere osservate senza disidratazione.

Il contrasto è un fattore limitante: infatti è prodotto dalla differenza di densità elettronica tra le molecole e il solvente o tra le varie molecole che compongono le strutture in esame; la risoluzione a cui attualmente si può arrivare con questa tecnica è di 4-5 nm, quindi le micelle, per esempio, sono viste solamente come puntini e come informazione non si può ottenere molto di più che le loro dimensioni.

Vi sono anche limitazioni sulle massime dimensioni osservabili, determinate dallo spessore del film acquoso; la massima dimensione permessa è di circa 500nm, altrimenti la diffusione degli elettroni divente troppo grande e il processo di vetrificazione troppo lento. Liposomi e strutture analoghe, sono gli oggetti che meglio si analizzano per questo tipo di tecnica.

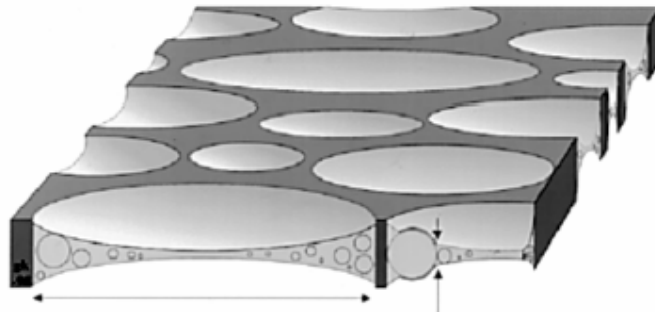


FIG. 6 *Layer poroso polimerico e soluzione acquosa. Sono visibili i menischi che si vengono a creare nei pori*

Lo spessore del film all'interno del layer poroso, varia in dipendenza della posizione rispetto al menisco (FIG.6). La conseguenza della formazione dei menischi all'interno dei pori, è che gli oggetti di dimensione maggiore presenti nella sospensione, si trovano verso i bordi del poro, mentre al centro dei pori si trovano gli oggetti più piccoli. Analogamente anche strutture allungate, al centro dei pori adotteranno una disposizione preferenzialmente parallela alla superficie.

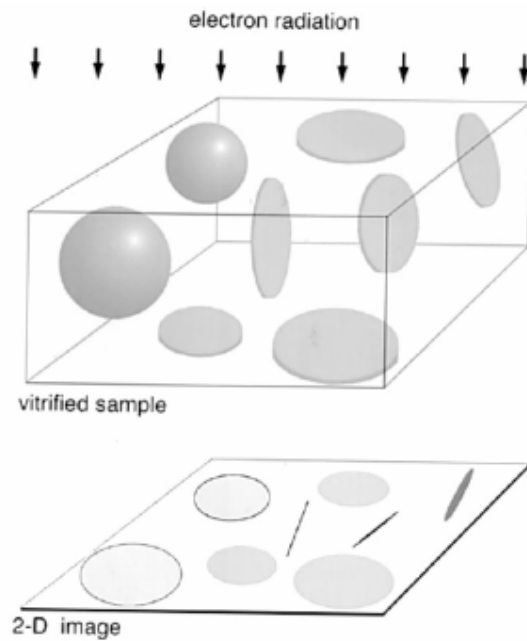


FIG. 7 Esempio di strutture vetrificate in soluzione e corrispondente immagine 2D in trasmissione.

Oggetti di forme differenti (dischi piuttosto che sfere), a parità di dimensione, producono immagini 2D con dei contrasti diversi (FIG.7): infatti lo spessore che il fascio di elettroni si trova ad attraversare, varia in dipendenza della forma dell'oggetto. Così i dischi sono visti con un contrasto uniforme e dipendente dal loro spessore, oggetti sferici, come i liposomi, in 2D sono visibili come cerchi circondati da bordo più scuro. Le moderne tecniche di analisi dell'immagine, presentano ancora dei problemi: la difficoltà maggiore sta nel fatto che il background non presenta sempre la stessa intensità, ma dipende dallo spessore del fil depositato. Una delle tecniche utilizzate per ovviare a questo fatto, sta nel considerare solo immagini raccolte da uno spessore controllato del film. In ogni caso è sempre consigliabile associare altre tecniche di misura, come il light scattering e il SAXS, alle immagini di microscopia, per ottenere informazioni attendibili sulle dimensioni e la morfologia degli oggetti in esame.