

Scattering

Jan Peter Ebbing, Beatrice Fiumara, Giovanni Laganà

4 Marzo 2024

Indice

1	Introduzione teorica	2
2	Apparato sperimentale	4
2.1	Tubo fotomoltiplicatore	5
3	Procedimento e analisi dati	7
3.1	Nanoparticelle	7
3.1.1	Variazione dell'angolo di rivelazione	7
3.1.2	Variazione dell'apertura dell'iride	11
3.2	Proteine	14
4	Conclusioni	17

Abstract

In questo esperimento sono state effettuate misure di scattering dinamico con l'obiettivo di stimare la dimensione di nanoparticelle di lattice di forma sferica, e della proteina BSA (Bovine Serum Albumin). Per quanto riguarda le nanoparticelle di lattice, il loro raggio è stato stimato al variare di due parametri: l'angolo di rivelazione della luce diffusa e l'apertura dell'iride posta davanti al rivelatore. Invece, per quanto riguarda la proteina BSA, è stato possibile stimarne il raggio idrodinamico a partire dalla funzione di autocorrelazione del segnale diffuso.

1 Introduzione teorica

Lo scattering di luce, o diffusione di luce, è un fenomeno fisico in cui le onde luminose deviano dalla loro direzione originaria a causa dell'interazione con particelle o molecole presenti nel mezzo attraversato. Questo fenomeno è di fondamentale importanza in vari campi della fisica e anche della biologia, dove tecniche come lo *scattering dinamico di luce* (DLS), impiegato in questo esperimento, vengono utilizzate per determinare le dimensioni di nanoparticelle, proteine e altri aggregati molecolari in soluzione.

La peculiarità dello scattering, che lo differenzia da fenomeni come assorbimento e fluorescenza, è che la luce impiegata, che può essere UV-Vis ma anche a raggi X, non è in risonanza con la frequenza di transizione delle molecole con cui interagisce. Per questa ragione, essa non viene assorbita, ma diffusa.

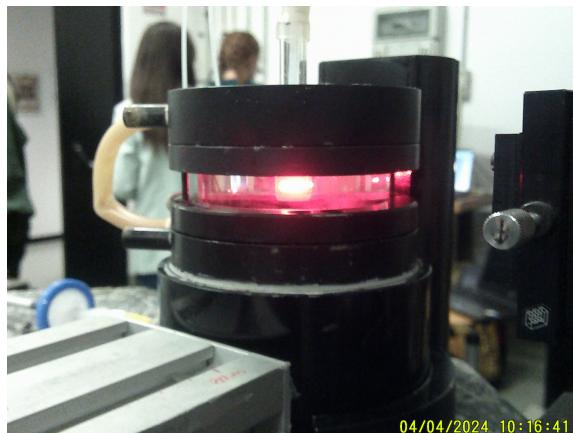


Figura 1. Scattering di luce rossa.

In una qualsiasi misura di scattering dinamico per particelle in soluzione, la fenomenologia è la seguente: l'intensità della luce diffusa, osservata tramite un rivelatore, fluttua nel tempo attorno a un valore medio. Quando la luce incide sulle molecole in soluzione, infatti, esse diventano sorgenti secondarie di onde sferiche, che interferiscono tra loro in maniera costruttiva o distruttiva. Il moto termico delle molecole in soluzione rende tali interferenze variabili nel tempo, rendendo fluttuante il segnale.

Il segnale di intensità è solo in apparenza puro rumore: in realtà, esso contiene informazioni sulle dimensioni delle molecole in soluzione. In particolare, molecole più piccole, che in soluzione si muovono più velocemente, producono fluttuazioni più rapide rispetto a molecole di dimensioni maggiori. Per estrarre informazione dal segnale diffuso si utilizza la **funzione di autocorrelazione**. Essa misura la correlazione di un segnale con lo stesso segnale traslato nel tempo di un certo intervallo, detto *lag time* e indicato con la lettera greca τ . Per il campo elettrico diffuso, \vec{E}_{scat} , la funzione di autocorrelazione è così definita:

$$G_E(\tau) = \frac{\langle E_{scat}(t)E_{scat}^*(t+\tau) \rangle_t}{\langle E_{scat}^2(t) \rangle_t},$$

dove le parentesi uncinate indicano la media temporale del loro argomento.

Ora, luce incidente e luce diffusa sono caratterizzate rispettivamente dai vettori d'onda \vec{k}_{in} e \vec{k}_{out} . Assumendo che lo scattering sia *quasi-elastico*, cioè che l'energia scambiata tra onda e molecola nel processo di diffusione sia trascurabile, il vettore d'onda cambia direzione ma non modulo, il quale è dato da:

$$|\vec{k}_{in}| \approx |\vec{k}_{out}| = \frac{2\pi n}{\lambda} \equiv k_0 \quad (1)$$

Indicato con θ l'angolo formato tra \vec{k}_{in} e \vec{k}_{out} , il vettore d'onda scambiato vale allora, in modulo:

$$|\vec{q}| = |\vec{k}_{out} - \vec{k}_{in}| = 2k_0 \sin \theta/2 \quad (2)$$

Nell'approssimazione quasi-elastica e per molecole debolmente accoppiate, le fluttuazioni del segnale sono dovute unicamente a variazioni di fase del campo elettrico diffuso, dato dalla somma di contributi del tipo:

$$\vec{E}_{scat}(R, t) \sim \alpha(t) e^{i\vec{q} \cdot \vec{r}(t)} \left(\frac{E_0 k_{out}^2 e^{ik_0 R - i\omega t}}{R} \right),$$

dove $\alpha(t)$ è il tensore di polarizzabilità della molecola, dipendente dal tempo poiché la molecola può ruotare e vibrare oltre che traslare; $\vec{r}(t)$ è la posizione della molecola al tempo t ; E_0 l'intensità del campo elettrico e ω la sua pulsazione.

Sostituendo l'espressione del campo all'interno della definizione della funzione di autocorrelazione, si ricava che

$$G_E(\tau) = C_\alpha(\tau) e^{i\omega\tau} e^{-q^2 D\tau},$$

dove D è il *coefficiente di diffusione* degli oggetti diffusori presenti in soluzione, il quale misura la velocità alla quale essi diffondono attraverso la soluzione¹.

Se si approssima la forma di questi ultimi con una sfera, D è legato alle dimensioni delle molecole in soluzione dall'**equazione di Stokes-Einstein**:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R} \quad (3)$$

A parte fattori costanti, tra cui la costante di Boltzmann k_B , il coefficiente di diffusione è direttamente proporzionale alla temperatura T del mezzo nel quale diffondono le molecole. Invece è inversamente proporzionale alla viscosità del mezzo η , così come, tramite R , alla dimensione delle molecole.

Ora, quel che si misura sperimentalmente è l'intensità del campo diffuso, data da

$$I_{scat} = |\vec{E}_{scat}|^2$$

¹Il termine $C_\alpha(\tau)$ invece contiene al suo interno la dipendenza della funzione di autocorrelazione da E_0 , k_0 , α e da R .

Il teorema di Bloch-Siegert fornisce la relazione tra la funzione di autocorrelazione di \vec{E}_{scat} e quella di I_{scat} , definita analogamente², sotto l'ipotesi che il campo diffuso sia dato dalla somma di contributi indipendenti:

$$G_I(\tau) = 1 + |G_E(\tau)|^2 = 1 + |C_\alpha(\tau)|^2 e^{-2q^2 D\tau} \quad (4)$$

Dunque, misurando tramite un autocorrelatore digitale la funzione di autocorrelazione dell'intensità del campo diffuso da molecole in soluzione, ci si aspetta di osservare un andamento esponenziale. In conclusione, a partire da misure di funzioni di autocorrelazione è possibile risalire al coefficiente di diffusione D tramite un fit con la funzione

$$y = ae^{-\gamma x} + b, \quad (5)$$

dove

$$\gamma = 2Dq^2 \quad (6)$$

Dal valore di D trovato si risale al raggio degli oggetti diffusori presenti in soluzione tramite la relazione di Stokes-Einstein.

2 Apparato sperimentale

L'apparato sperimentale utilizzato è costituito da:

- Un laser HeNe che opera a una lunghezza d'onda $\lambda = 633 \text{ nm}$, quindi nel rosso dello spettro visibile.
- Un sistema ottico che collima il fascio laser all'interno di un portacampione.
- Un portacampione costituito da un bagno termostatico contenente una cuvetta. Il bagno termostatico consente di effettuare misure di scattering al variare della temperatura³. Due siringhe permettono di riempire e svuotare la cuvetta⁴.
- Un'iride che regola la quantità di luce diffusa che arriva al tubo fotomoltiplicatore, quindi il cosiddetto *volume di scattering*.
- Un tubo fotomoltiplicatore che lavora in regime di *single photon counting*: ogni fotone produce un segnale TTL (Transistor-Transistor Logic) che viene immagazzinato in una scheda di acquisizione.

² $G_I(\tau) = \frac{\langle \delta I(t+\tau) \delta I(t) \rangle_t}{\langle I^2(t) \rangle_t}$, con $\delta I(t) = I(t) - \langle I \rangle_t$.

³Non è il caso di questo esperimento, in cui la temperatura è stata mantenuta costante al valore ambientale $T_0 = 293 \text{ K}$.

⁴La siringa che riempie la cuvetta è dotata di un filtro caratterizzato da un preciso *cut-off*: in questo modo si riesce a evitare che oggetti di dimensione maggiore del cut-off entrino nella cuvetta, ad esempio aggregati se si vuole che la soluzione sia monodispersa.

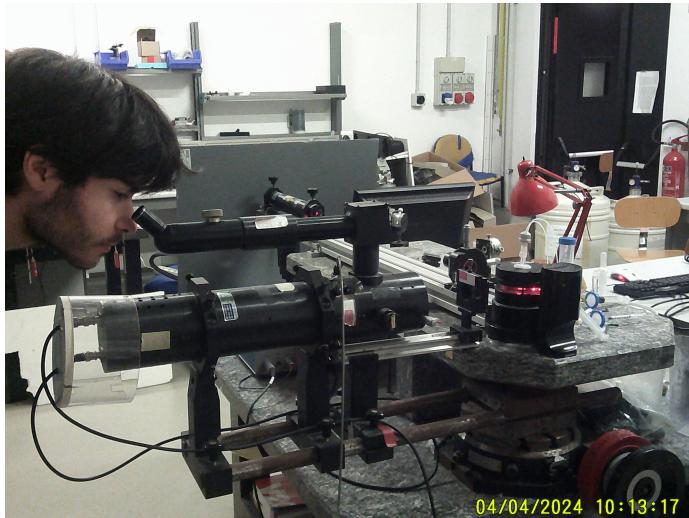


Figura 2. *Setup sperimentale.*

Posto il campione nel bagno termostatico, il fascio che incide su di esso viene diffuso e rivelato dal fototubo. Quest'ultimo è posizionato su un braccio rotante che consente di variare l'angolo di rivelazione θ , misurabile tramite un goniometro montato sul fototubo. Una descrizione più dettagliata del funzionamento del tubo fotomoltiplicatore è contenuta nel paragrafo successivo.

Invece, per quanto riguarda il software di acquisizione del segnale diffuso, i parametri cruciali per un esperimento di scattering sono: il *tempo di acquisizione* e la *frequenza di acquisizione*. In ogni cella della scheda di acquisizione sono memorizzati i conteggi di fotoni in un intervallo di tempo pari all'inverso della frequenza di acquisizione. Il tempo di acquisizione determina invece il lasso temporale sul quale viene effettuata la media per la funzione di acquisizione.

Il valore ottimale per entrambi i parametri dipende dalle particelle in soluzione che diffondono la luce. In particolare, per particelle di grandi dimensioni, quindi più lente, frequenze $\sim 10^4 \text{ Hz}$ sono sufficienti; invece particelle più piccole, dunque più veloci, richiedono di utilizzare frequenze di acquisizione maggiori, $\sim 10^6 \text{ Hz}$, per poter registrare le rapide fluttuazioni del segnale diffuso. A particelle piccole si addicono di conseguenza anche tempi di acquisizione lunghi, essendo le funzioni di autocorrelazione ottenute a partire da segnali meno intensi.

2.1 Tubo fotomoltiplicatore

I tubi fotomoltiplicatori (o *fototubi*) sono rivelatori di luce UV, visibile e NIR estremamente sensibili, capaci di rivelare anche un singolo fotone. Fanno parte della più grande famiglia dei tubi a vuoto e il loro funzionamento si basa essenzialmente su due fenomeni: l'**effetto fotoelettrico** e l'**emissione secondaria**. Una rappresentazione schematica di un fototubo è riportata nell'immagine seguente.

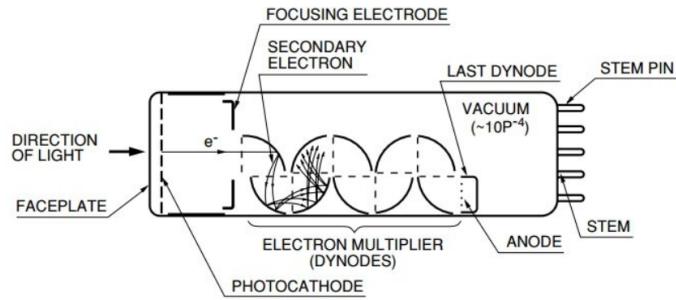


Figura 3. Schema di funzionamento di un fototubo.

Il funzionamento di un generico fototubo è semplice. Tramite una finestra di ingresso i fotoni entrano nel fototubo. Una volta dentro, essi colpiscono un sottile strato conduttore, detto *fotocatodo*, liberando elettroni per effetto fotoelettrico. Gli elettroni liberati vengono quindi indirizzati verso l'*elettromoltiplicatore*, una successione di elettrodi a potenziale via via crescente - detti *dinodi* - che, quando colpiti, liberano per emissione secondaria un numero ancora maggiore di elettroni. Il numero di elettroni aumenta esponenzialmente a ogni passaggio. Alla fine dell'elettromoltiplicatore, l'anodo raccoglie gli elettroni prodotti, generando un impulso elettrico proporzionale all'intensità della luce originale che ha colpito il fotocatodo.

3 Procedimento e analisi dati

3.1 Nanoparticelle

3.1.1 Variazione dell'angolo di rivelazione

Al fine di misurare indirettamente, tramite la relazione [3], il raggio di nanoparticelle di lattice di forma sferica, una soluzione acquosa di queste ultime è stata inserita nella cuvetta del portacampione. Fatto ciò, si sono acquisite le funzioni di autocorrelazione del segnale diffuso al variare dell'angolo di rivelazione θ tra la direzione del fascio incidente e il tubo fotomoltiplicatore. L'angolo θ è stato fatto variare tra 30° e 130° con un passo di 10° . Con l'obiettivo di ridurre l'errore statistico, per ogni valore di θ sono state acquisite dieci funzioni di autocorrelazione $G(\tau)$, per una durata di 30 secondi ciascuna e utilizzando una frequenza di acquisizione pari a 100 kHz. Nel grafico che segue sono visualizzate le funzioni di autocorrelazione medie associate ai diversi angoli di rivelazione. L'asse delle ascisse è in scala logaritmica e a ogni valore di G è stata attribuita la relativa deviazione standard della media come incertezza.

Nel grafico [5] sono riportati anche i segnali di intensità che sono stati autocorrelati dal correlatore digitale a disposizione in laboratorio (*ALV-7002*).

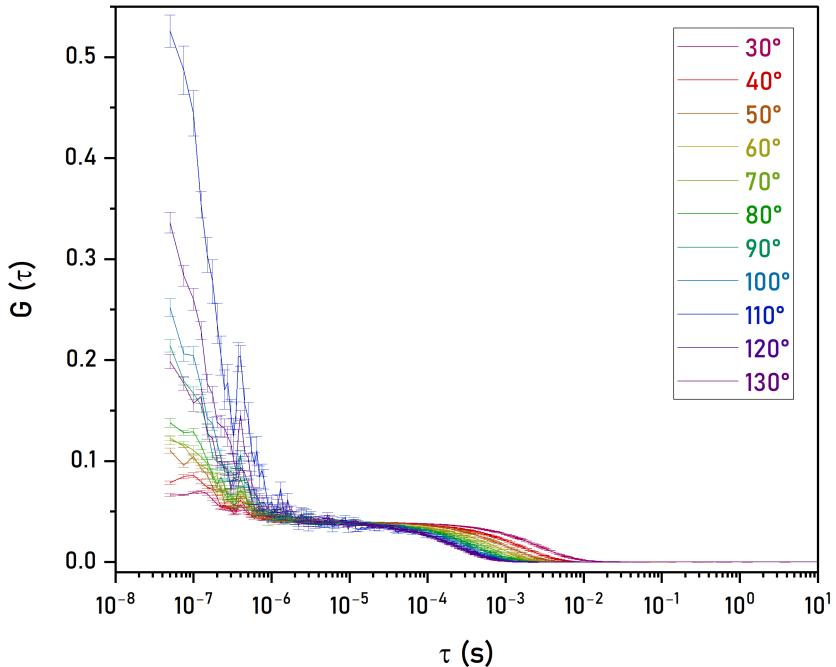


Figura 4. Funzioni di autocorrelazione e angoli di rivelazione: si è studiato l'andamento delle funzioni di autocorrelazione $G(\tau)$ al variare dell'angolo di rivelazione θ tra 30° e 130° con un passo di 10° . Con l'obiettivo di ridurre l'errore statistico, per ogni valore di θ sono state acquisite 10 funzioni di autocorrelazione, ne è stata calcolata la media e a ogni valore di quest'ultima è stata attribuita la relativa deviazione standard della media come incertezza. La scala sull'asse delle ascisse è logaritmica.

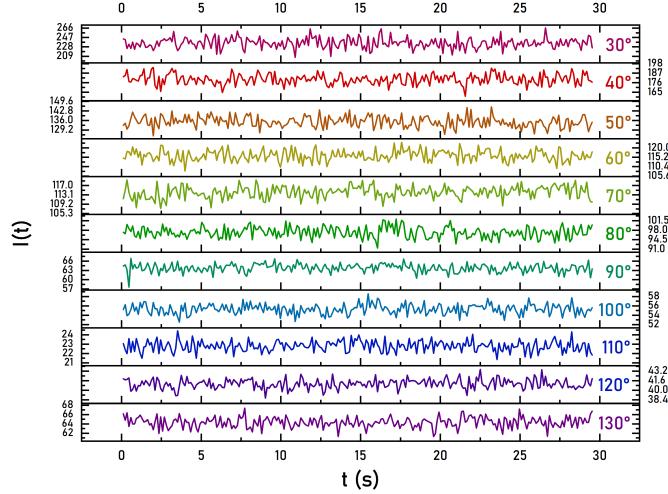


Figura 5. *Segnali di intensità e angoli di rivelazione:* per ogni angolo di rivelazione e per una durata complessiva di 30s, si è acquisita l'intensità del segnale diffuso, rivelato dal tubo fotomoltiplicatore. In tempo reale, il correlatore digitale ALV-7002 a disposizione in laboratorio ha autocorrelato tali segnali (vedi Fig.4).

Qualitativamente, una volta fissato θ , il segnale registrato dal tubo fotomoltiplicatore appare fluttuante attorno a un valore medio; al variare dell'angolo di rivelazione, si osserva che tale valore medio diminuisce tra 30° e 110° , poi aumenta.

Laddove l'intensità media è minore, è minore anche il rapporto segnale-rumore, che è quindi minimo quando l'angolo di rivelazione vale 110° e massimo a 30° . Questo fatto si riscontra nell'andamento delle funzioni di autocorrelazione riportate nel grafico [4], in cui quella relativa a 30° è decisamente meno rumorosa rispetto a quella relativa a 110° .

L'andamento esponenziale caratteristico delle funzioni di autocorrelazione si osserva per tempi di ritardo τ maggiori di $\sim 3 \cdot 10^{-6}s = 3\mu s$. Prima, domina il rumore elettronico del rivelatore. Nel grafico che segue sono rappresentate le funzioni di autocorrelazioni medie nell'intervallo $3\mu s - 1s$. Si sono omesse le barre di errore per non rendere l'immagine troppo caotica.

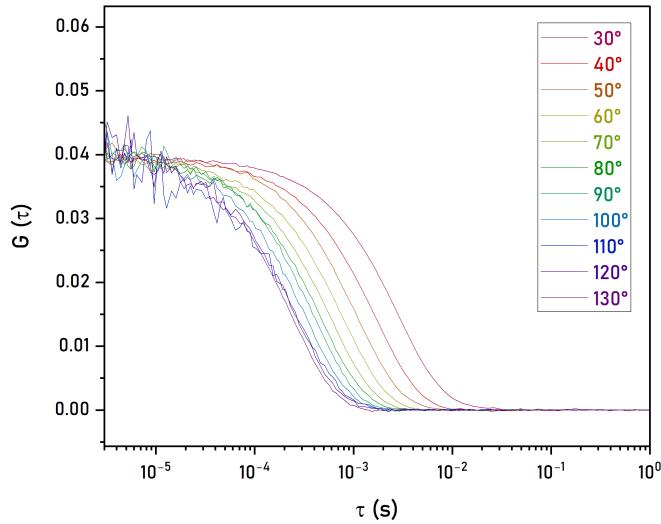


Figura 6. *Andamento esponenziale delle funzioni di autocorrelazione:* per ritardi temporali superiori a $\sim 3\mu s$, le funzioni di autocorrelazione acquisite in laboratorio assumono il caratteristico andamento esponenziale, descritto dalla funzione $y = ae^{-\gamma x} + b$.

Nell'intervallo in cui sono rappresentate, le funzioni di autocorrelazione della figura [6] sono state tutte interpolate con la funzione [5] con l'obiettivo di ricavare il valore di γ relativo a ciascun valore di θ considerato. Ciascun fit è stato condotto trascurando l'errore sui tempi di ritardo e pesando ciascun valore di G con la relativa incertezza.

I parametri a e b non dipendono dall'angolo di rivelazione, a differenza di γ i cui valori, assieme a quelli di $2q^2$, sono riportati nella tabella che segue⁵. Le incertezze sui valori di γ sono quelle restituite dai fit, invece quelle sui valori di $2q^2$ sono state calcolate propagando l'errore su θ , dato dalla sensibilità del goniometro del tubo fotomoltiplicatore, ovvero 0.25° .

⁵Nella formula [2] si sono usati i valori $\lambda = 633 \text{ nm}$ ed $n = 1.33$.

$2q^2(1/m^2)$	$\gamma(1/s)$
$(0.93 \pm 0.02) \cdot 10^{14}$	$(0.3455 \pm 0.0015) \cdot 10^3$
$(1.63 \pm 0.02) \cdot 10^{14}$	$(0.588 \pm 0.002) \cdot 10^3$
$(2.49 \pm 0.02) \cdot 10^{14}$	$(0.932 \pm 0.004) \cdot 10^3$
$(3.49 \pm 0.03) \cdot 10^{14}$	$(1.288 \pm 0.009) \cdot 10^3$
$(4.59 \pm 0.03) \cdot 10^{14}$	$(1.715 \pm 0.015) \cdot 10^3$
$(5.76 \pm 0.03) \cdot 10^{14}$	$(2.16 \pm 0.03) \cdot 10^3$
$(6.97 \pm 0.03) \cdot 10^{14}$	$(2.67 \pm 0.07) \cdot 10^3$
$(8.18 \pm 0.03) \cdot 10^{14}$	$(3.07 \pm 0.08) \cdot 10^3$
$(9.36 \pm 0.03) \cdot 10^{14}$	$(3.41 \pm 0.16) \cdot 10^3$
$(10.46 \pm 0.03) \cdot 10^{14}$	$(3.76 \pm 0.09) \cdot 10^3$
$(11.45 \pm 0.02) \cdot 10^{14}$	$(4.46 \pm 0.14) \cdot 10^3$

Tabella 1. *Misure di $2q^2$ e γ : sono riportati i valori di $2q^2$ calcolati tramite la formula [5] e i valori di γ ricavati dall'interpolazione delle funzioni di autocorrelazione. L'incertezza sui primi è stata calcolata propagando l'errore di 0.25° su θ , sensibilità del goniometro del tubo fotomoltiplicatore, invece quella su γ proviene dall'operazione di fit.*

Al fine di stimare il coefficiente di diffusione D tramite la relazione (6), le misure raccolte nella tabella [1] sono state interpolate con la funzione $y = ax + b$, pesando ciascuna misura con la sua incertezza. Il risultato è rappresentato nel grafico che segue.

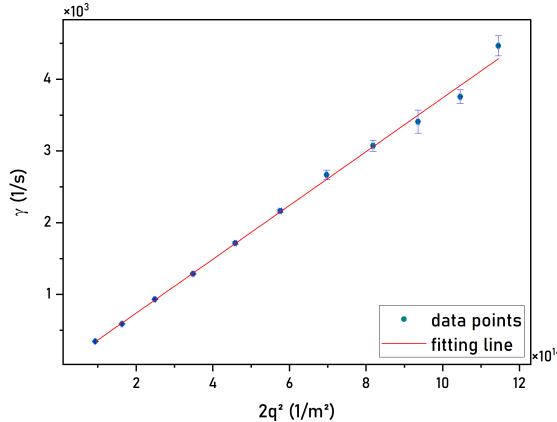


Figura 7. *Fit lineare γ vs $2q^2$: al fine di stimare il coefficiente di diffusione D , le misure raccolte nella tabella [1] sono state interpolate con la funzione lineare $y = a + bx$, ottenendo il seguente risultato: $\tilde{\chi}_o^2 \approx 1.2$.*

La distribuzione dei dati attorno al modello mostra che, come atteso, l'andamento γ vs $2q^2$ è lineare. In termini quantitativi, $p(\tilde{\chi}^2 > \tilde{\chi}_o^2) \approx 29\% > 5\%^6$.

A rigore, per verificare che i dati seguano l'andamento atteso [6] è necessario anche assicurarsi che la stima del parametro a sia compatibile con il suo valore vero, cioè 0. A tal fine è stato eseguito il *t-test*, ottenendo il seguente risultato:

⁶Non avendo trascurato l'errore sulla variabile indipendente, nell'eseguire il test del χ^2 si è utilizzata la formula:

$$\chi_o^2 = \sum_{i=1}^n \left(\frac{y_i - (a + b x_i)}{\sqrt{(b \sigma_{x,i})^2 + \sigma_{y,i}^2}} \right)^2.$$

$$t = \frac{|a - 0|}{\sigma_a} = \frac{3.75 \cdot 10^{-2}}{0.03 \cdot 10^{-12}} \approx 1.36$$

La probabilità di trovare un valore di a che disti da 0 più di t deviazioni standard vale allora

$$\alpha = 1 - \int_{-t}^t \frac{1}{\sqrt{2\pi}} e^{-z^2/2} dz \approx 17\% > 5\%,$$

dunque c'è compatibilità.

A partire dal valore del coefficiente di diffusione restituito dal fit, $D = (3.75 \pm 0.03) \cdot 10^{-12} m^2/s$, tramite la relazione [3] è stato possibile stimare il raggio idrodinamico delle nanoparticelle in soluzione⁷, commettendo un errore inferiore all'1%:

$$R_1 = (57.2 \pm 0.5) \text{ nm}. \quad (7)$$

3.1.2 Variazione dell'apertura dell'iride

Una seconda stima del raggio delle nanoparticelle di lattice è stata fatta variando un altro dei parametri sperimentali a disposizione, ovvero l'apertura dell'iride⁸. L'iride regola la frequenza dei fotoni rivelati dal fototubo: in laboratorio la sua apertura è stata variata 5 volte, da 50 a 150 kHz con un passo di 25 kHz. Come per l'angolo di diffusione, per ridurre l'errore statistico sono state acquisite⁹ 10 funzioni di autocorrelazione $G(\tau)$ per ogni valore di frequenza, ne è stata calcolata la media e a ogni valore di quest'ultima è stata attribuita la relativa deviazione standard della media. Il risultato è riportato nel grafico che segue. Si sono considerati tempi di ritardo superiori a $\sim 10^{-5}$, oltre i quali il caratteristico andamento esponenziale non è più disturbato dal rumore elettronico del rivelatore. L'asse delle ascisse è in scala logaritmica.

⁷Nell'equazione di Stokes-Einstein si sono utilizzati i seguenti valori: $T = 293 \text{ K}$, $\eta = 0.01 \text{ poise}$.

⁸L'angolo di rivelazione θ è stato mantenuto costante a 90° durante l'intero procedimento di misura.

⁹Si è mantenuta la frequenza di acquisizione di 100 kHz.

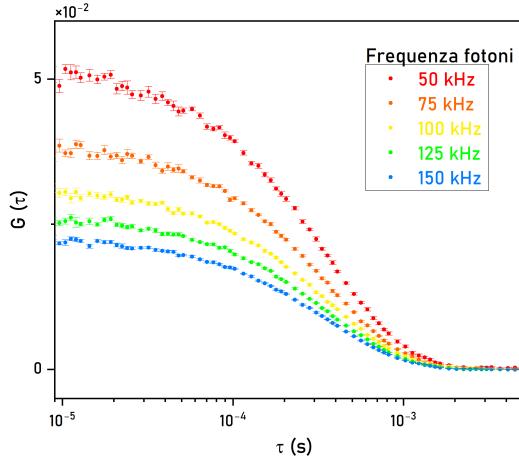


Figura 8. Funzioni di autocorrelazione e apertura dell'iride: si è studiato l'andamento delle funzioni di autocorrelazione $G(\tau)$ al variare della frequenza dei fotoni rivelati dal fototubo. Con l'obiettivo di ridurre l'errore statistico, per ogni valore di frequenza sono state acquisite 10 funzioni di autocorrelazione, ne è stata calcolata la media e a ogni valore di quest'ultima è stata attribuita la relativa deviazione standard della media come incertezza. La scala sull'asse delle ascisse è logaritmica.

I segnali a partire dai quali sono state costruite le funzioni di autocorrelazione sono riportati nella figura [9]. L'intensità del segnale è maggiore in corrispondenza di valori di frequenza maggiori: variare l'apertura dell'iride ha dunque l'effetto di aumentare o diminuire l'intensità del segnale e anche, per quanto riguarda le funzioni di autocorrelazione, di alzare o abbassare l'intercetta con l'asse verticale (vedi Fig.8).

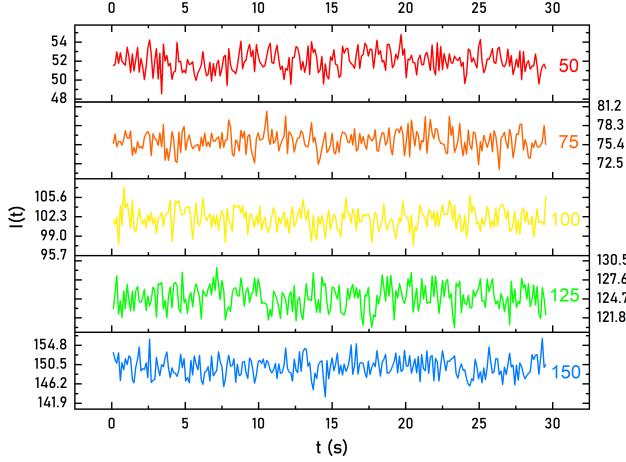


Figura 9. *Segnali di intensità e apertura dell'iride:* per ogni frequenza di fotoni considerata e per una durata complessiva di 30s, si è acquisita l'intensità del segnale diffuso, rivelato dal tubo fotomoltiplicatore. In tempo reale, il correlatore digitale ALV-7002 a disposizione in laboratorio ha autocorrelato tali segnali (vedi Fig.8).

Ciascuna funzione di autocorrelazione è stata interpolata con il suo andamento atteso [5]. Si sono sempre trascurate le incertezze sui tempi di ritardo, mentre a ogni valore di G è stata attribuita come incertezza la relativa deviazione standard della media. Il risultato è riportato nel grafico che segue.

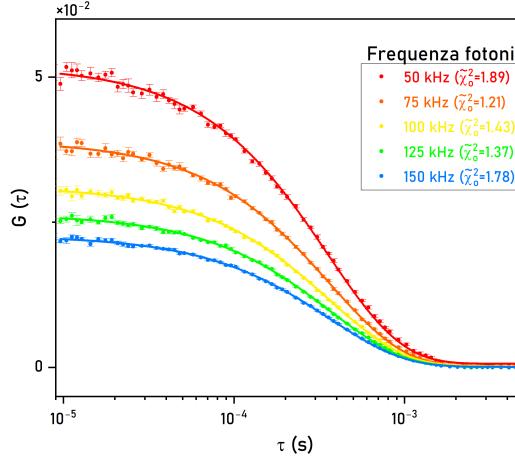


Figura 10. *Fit delle funzioni di autocorrelazione:* le funzioni di autocorrelazione medie sono state interpolate con il loro andamento atteso [5], mostrando un buon accordo.

I valori dei parametri restituiti dal fit sono riportati nella tabella che segue, assieme ai relativi errori standard.

a	σ_a	$\gamma(1/s)$	$\sigma_\gamma(1/s)$	b	σ_b
0.0513	0.0002	2670	20	$2 \cdot 10^{-6}$	$2 \cdot 10^{-6}$
0.0387	0.0001	2670	10	$-8 \cdot 10^{-7}$	$1 \cdot 10^{-6}$
0.03087	0.00008	2660	10	$-1.2 \cdot 10^{-6}$	$0.8 \cdot 10^{-6}$
0.02613	0.00006	2680	9	$-5 \cdot 10^{-6}$	$5 \cdot 10^{-6}$
0.02252	0.00005	2680	9	$-3 \cdot 10^{-7}$	$7 \cdot 10^{-7}$

Tabella 2. *Parametri restituiti dal fit delle funzioni di autocorrelazione acquisite al variare dell'apertura dell'iride.*

Partendo dalle relazioni [3] e [6] è possibile esprimere R in funzione di γ , tramite la formula:

$$R = \frac{16KT}{3\pi\eta\gamma} \left(\frac{\pi n}{\lambda} \sin \frac{\theta}{2} \right)^2$$

Per ciascun γ è stato quindi calcolato il raggio delle nanoparticelle in soluzione e, a partire dalla media dei risultati ottenuti, si è ricavata la seguente stima:

$$R_2 = (56.0 \pm 0.1) \text{ nm} \quad (8)$$

Confronto tra i raggi misurati

Entrambe le procedure sperimentali, quella in cui le funzioni di autocorrelazione sono acquisite al variare dell'angolo di rivelazione e quella in cui si varia l'apertura dell'iride, portano a stime molto precise del raggio delle nanoparticelle.

Per stabilire se i due valori ottenuti siano compatibili, è stato eseguito un test di compatibilità:

$$t = \frac{|R_1 - R_2|}{\sqrt{\sigma_{R_1}^2 + \sigma_{R_2}^2}} \approx 2.38$$

La probabilità di trovare un valore di $\Delta = R_1 - R_2$ che disti da 0 più di t deviazioni standard vale allora

$$\alpha = 1 - \int_{-t}^t \frac{1}{\sqrt{2\pi}} e^{-z^2/2} dz \approx 1.72\% < 5\%,$$

dunque non c'è compatibilità. Infatti, nonostante l'ordine di grandezza sia lo stesso per entrambe le stime, la loro precisione - in particolare di quella ottenuta variando l'apertura dell'iride - fa sì che i due risultati siano incompatibili tra loro¹⁰.

3.2 Proteine

Tramite misure di scattering dinamico, è possibile stimare anche il cosiddetto *raggio idrodinamico* di una proteina¹¹. Esso tiene conto delle molecole di solvente che la proteina, a causa del proprio ingombro sterico, si porta dietro nel suo moto termico all'interno del campione. Le dimensioni caratteristiche di una proteina sono infatti $\sim 1 \text{ nm}$, inferiori quindi a quelle delle nanoparticelle ($\sim 10^2 \text{ nm}$, come stimato).

La misura del raggio idrodinamico di una proteina è più delicata, se paragonata a quella delle nanoparticelle. Come già accennato, infatti, le piccole dimensioni delle proteine rendono più rapide

¹⁰Si noti tuttavia che se si fosse scelta una probabilità di soglia meno rigida, ad esempio 0.3%, le due misure del raggio delle nanoparticelle sarebbero state compatibili tra loro.

¹¹In laboratorio si è preparata una soluzione di proteina BSA (*Bovine Serum Albumine*) e tampone fosfato (PBS).

le fluttuazioni del segnale diffuso, obbligando a utilizzare una frequenza di acquisizione maggiore (750 kHz): il risultato è un segnale più debole, dunque più rumoroso, che si riflette in un minore rapporto segnale-rumore nelle funzioni di autocorrelazione.

Per aggirare questo problema, fissato l'angolo di rivelazione a 90° e modificata l'apertura dell'iride in modo da massimizzare la frequenza di fotoni rivelati, sono state mediate 34 funzioni di autocorrelazione, ottenute a partire da un segnale misurato per 60 s.

L'andamento temporale dell'intensità del segnale diffuso è riportato nell'immagine che segue.

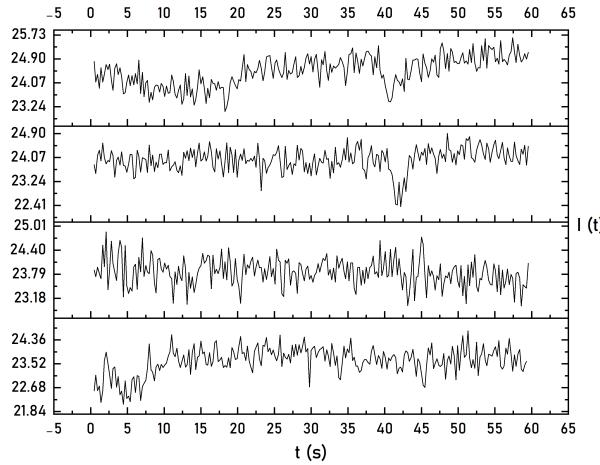


Figura 11. *Intensità del segnale diffuso dalla proteina BSA.*

Come atteso, il valore medio attorno a cui fluttua il segnale è sempre inferiore a quelli osservati quando in soluzione c'erano nanoparticelle. Inoltre, le oscillazioni del segnale appaiono decisamente meno regolari - fatto che si riflette nell'andamento delle funzioni di autocorrelazione ottenute.

Seguendo il procedimento già descritto per le nanoparticelle, la media delle 34 funzioni di autocorrelazione è stata interpolata con il suo andamento teorico, ottenendo il seguente risultato¹².

¹²In realtà, non tutte le funzioni di autocorrelazione sono state considerate nel calcolo della media. L'andamento di alcune, infatti, era a tal punto distante da quello atteso e da quello delle altre funzioni di autocorrelazione acquisite, da renderle inutilizzabili.

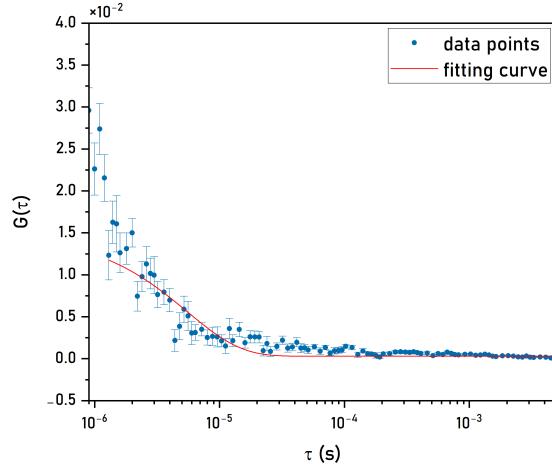


Figura 12. *Andamento sperimentale e teorico:* la media delle funzioni di autocorrelazione acquisite è stata interpolata con il suo andamento atteso [5], ottenendo il seguente risultato: $\tilde{\chi}_o^2 \approx 4.8$.

Come si vede, nei dati sperimentali non è ben riconoscibile il caratteristico andamento esponenziale. In termini quantitativi, $p(\tilde{\chi}^2 > \tilde{\chi}_o^2) \approx 0\% < 5\%$. Nonostante questo, si è comunque utilizzato il valore di γ restituito dal fit per avere, tramite la relazione di Stokes-Einstein, una prima stima del raggio idrodinamico della BSA:

$$R = (0.82 \pm 0.16) \text{ nm.} \quad (9)$$

Una seconda stima è stata fatta utilizzando i dati degli anni passati. La funzione di autocorrelazione media e il suo adattamento al modello sono rappresentati nel grafico seguente.

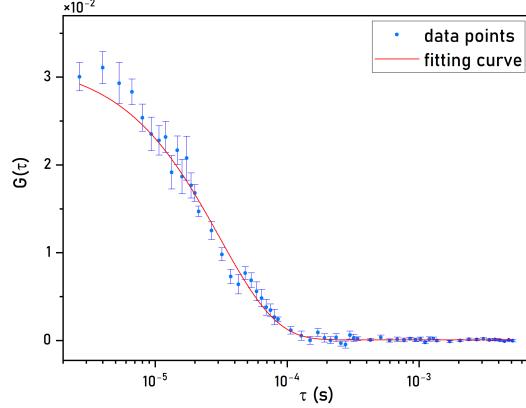


Figura 13. *Andamento sperimentale e teorico, dati degli anni passati:* la media delle funzioni di autocorrelazione acquisite è stata interpolata con il suo andamento atteso [5], ottenendo il seguente risultato: $\tilde{\chi}_o^2 \approx 1.1$.

In questo caso, nei dati sperimentali è ben ravvisabile l'andamento esponenziale. In termini quantitativi, $p(\tilde{\chi}^2 > \tilde{\chi}_o^2) \approx 29\% > 5\%$. Dal parametro γ restituito dal fit è quindi possibile risalire a una stima più accurata¹³ del raggio idrodinamico della BSA:

$$R' = (4.59 \pm 0.13) \text{ nm}. \quad (10)$$

Commento: Nonostante, se si effettua un test di compatibilità, i due valori trovati R ed R' non risultano compatibili tra loro, l'ordine di grandezza è il medesimo, ovvero 1 nm. I dati raccolti in laboratorio, benché decisamente più rumorosi rispetto a quelli degli anni passati, consentono ugualmente di stimare il raggio della proteina BSA, anche se meno accuratamente e meno precisamente.

4 Conclusioni

L'obiettivo di stimare il raggio di nanoparticelle di lattice di forma sferica e della proteina BSA tramite misure di scattering dinamico è stato raggiunto.

Per quanto riguarda le nanoparticelle, i due metodi adottati - variazione dell'angolo di rivelazione e variazione dell'apertura dell'iride - hanno portato alle seguenti stime: $R_{angolo} = (57.2 \pm 0.5) \text{ nm}$ e $R_{iride} = (56.0 \pm 0.1) \text{ nm}$. In entrambi i casi si tratta di stime precise, con incertezza percentuale $\sim 1\%$ per la prima e 0.2% per la seconda. Per questa ragione, esse risultano incompatibili se si effettua un test di compatibilità con valore di soglia pari al 5%, in quanto $\alpha \approx 1.72\%$. Scegliendo la soglia meno rigida dello 0.3%, c'è invece compatibilità.

In ogni caso, entrambe le stime risultano consistenti con le dimensioni tipiche delle nanoparticelle, $\sim 100 \text{ nm}$.

Per quanto riguarda invece la proteina BSA, risalire a una stima del raggio idrodinamico a partire dalla misura delle funzioni di autocorrelazione è stato più complicato. La minore intensità del segnale diffuso, e quindi il maggior contributo del rumore, ha reso inutilizzabili alcune delle 34 funzioni acquisite. Inoltre, anche scartando quelle peggiori, nella funzione di autocorrelazione media è risultato difficilmente riconoscibile l'andamento esponenziale atteso. Per avere una prima stima si è comunque eseguito il fit, ottenendo come risultato $R = (0.82 \pm 0.16) \text{ nm}$.

Una stima più precisa è stata ottenuta a partire da un altro campione, raccolto gli anni passati e meno affetto da rumore: $R' = (4.59 \pm 0.13) \text{ nm}$. Si tratta di un valore più accurato, oltre che più preciso, in quanto in condizioni standard il raggio idrodinamico della BSA è considerato essere circa 3.5-4.0 nm.

Le due stime del raggio idrodinamico della proteina BSA non risultano compatibili tra loro, tuttavia entrambe sono consistenti con le dimensioni caratteristiche di una proteina, $\sim 1 \text{ nm}$.

¹³In condizioni standard, il raggio idrodinamico della BSA è generalmente considerato essere circa 3.5-4.0 nm.