

# SAXS – Basi Teoriche

Laurea Magistrale in Biotecnologie Mediche  
Curriculum Nanobiotecnologie

A.A. 2020-21

---

# Diffusione in un mezzo isotropo

La teoria della diffrazione prevede che le molecole siano organizzate in modo regolare e periodico (cristallo).

La natura stessa dei cristalli è responsabile della diffrazione, ovvero dell'osservazione di onde diffuse esclusivamente lungo alcune direzioni, definite dai piani cristallini (equivalenti ai nodi del reticolo reciproco).

Se le molecole sono disciolte in soluzione, l'organizzazione regolare e periodica viene a mancare. **Le molecole sono orientate in tutte le direzioni. Il sistema di molecole in soluzione può quindi essere considerato come un sistema isotropo, cioè indipendente dalla direzione.**

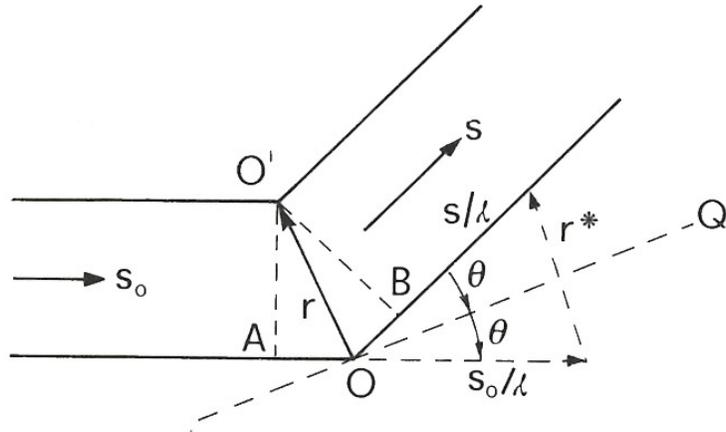
Mancando di un'orientazione definita come nel cristallo, **la densità elettronica di molecole in soluzione potrà essere descritta solo come proprietà media del sistema.**

# Diffusione - richiami

La formula di Thomson per lo scattering di un elettrone ci dice che:

$$I_{eTh} = I_{oi} = \frac{e^4}{m^2 r^2 c^4} [k_1 + k_2 \cos^2(2\theta)]$$

Nel caso di due elettroni, dobbiamo tener conto della possibile interferenza tra le onde diffuse:



L'ampiezza dell'onda diffusa da 2 elettroni sarà:

$$\vec{F}(r^*) = f_e [1 + \exp(2\pi i \vec{r} \cdot \vec{r}^*)]$$

Nel caso di N elettroni abbiamo:

$$\vec{F}(r^*) = \sum_{j=1}^N f_j \exp(2\pi i \vec{r}_j \cdot \vec{r}^*)$$

# Distribuzione Continua

La diffusione dei raggi-X può essere descritta anche per un mezzo continuo:

$$\vec{F}(\vec{r}^*) = \int_V \rho(\vec{r}) \exp(2\pi i \vec{r} \cdot \vec{r}^*) d\vec{r}$$

Se definiamo :

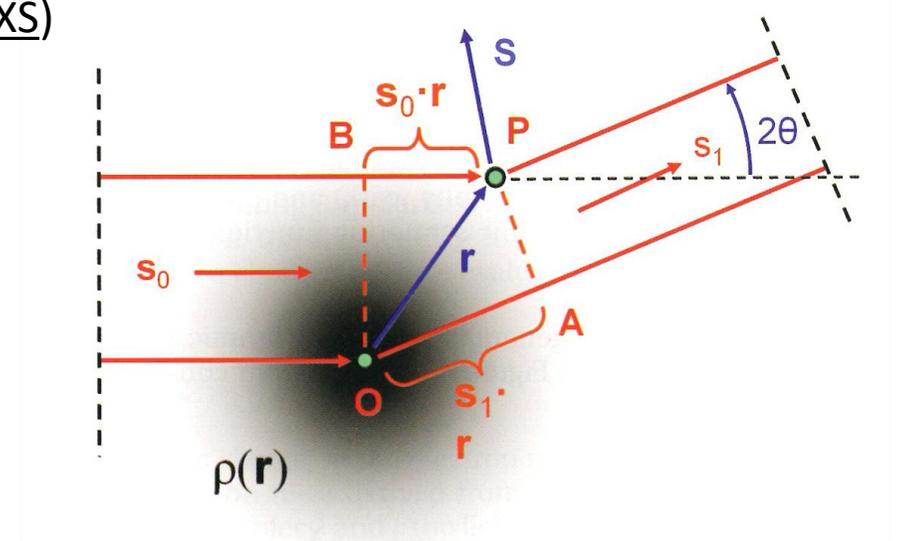
$$\vec{q} = 2\pi \vec{r}^* \quad (\text{Notazione utilizzata nel SAXS})$$

Con modulo:

$$|\vec{q}| = \frac{4\pi \sin\theta}{\lambda} \quad |\vec{r}^*| = \frac{2 \sin\theta}{\lambda}$$

Possiamo scrivere

$$\vec{F}(\vec{q}) = \int_V \rho(\vec{r}) \exp(i\vec{q} \cdot \vec{r}) d\vec{r}$$



# Fattore di scattering

Per un sistema **isotropo** (uguale in tutte le direzioni, quindi di simmetria sferica) quale quello che stiamo considerando (molecole in soluzione, libere di ruotare), il termine esponenziale può essere scritta come:

$$\langle \exp[i \vec{q} \cdot \vec{r}] \rangle = \frac{\sin[q \cdot r]}{q \cdot r}$$

L'integrale è trasformato in:

$$\vec{F}(\vec{q}) = \int_V \rho(\vec{r}) r^2 \frac{\sin(q \cdot r)}{q \cdot r} d\vec{r}$$

Se  $\rho(r)$  è la densità elettronica di un atomo  $F(q)$  non è altro che il fattore atomico di scattering [trasformata di Fourier della  $\rho(\vec{r})$  ]

# Forma del fattore di scattering

# Fattore di scattering molecolare e distanze tra atomi

Riscriviamo il fattore di scattering di una molecola in funzione di  $q$

$$\vec{F}_M(\vec{r}^*) = \sum_{j=1}^N f_j^{at}(\vec{r}^*) \exp(2\pi i \vec{r}_j \cdot \vec{r}^*) = \sum_{j=1}^N f_j^{at}(\vec{q}) \exp(i\vec{q} \cdot \vec{r}_j) = \vec{F}_M(\vec{q})$$

L'intensità diffusa dalla molecola, che è la quantità effettivamente misurata, è data da:

$$I(\vec{q}) = |F(\vec{q})|^2 = F(\vec{q}) \cdot F(\vec{q})^*$$

$$I(\vec{q}) = \left[ \sum_{i=1}^N f_i^{at}(\vec{q}) \exp(i\vec{q} \cdot \vec{r}_i) \right] \cdot \left[ \sum_{j=1}^N f_j^{at}(\vec{q}) \exp(-i\vec{q} \cdot \vec{r}_j) \right]$$

Il segno meno  
poiché è la  
complessa e  
coniugata

$$I(\vec{q}) = \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N f_i^{at}(\vec{q}) f_j^{at}(\vec{q}) \exp[i\vec{q} \cdot (\vec{r}_i - \vec{r}_j)]$$

# La formula di Debye

$$I(\vec{q}) = \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N f_i^{at}(\vec{q}) f_j^{at}(\vec{q}) \exp[i \vec{q} \cdot (r_i - r_j)]$$

Per un sistema isotropo, e mediando su tutte le direzioni ( $\langle f(x) \rangle$  indica il valor medio di  $f(x)$ )

$$\langle \exp[i \vec{q} \cdot (r_i - r_j)] \rangle = \frac{\sin[q \cdot (r_i - r_j)]}{q \cdot (r_i - r_j)}$$

**Formula di Debye**

$$I(q) = \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N f_i^{at}(q) f_j^{at}(q) \frac{\sin[q \cdot (r_i - r_j)]}{q \cdot (r_i - r_j)}$$

# Considerazioni sulla formula di Debye

$$I(q) = \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N f_i(q) f_j(q) \frac{\sin[q \cdot d_{ij}]}{q \cdot d_{ij}}$$

*$f_i$  e  $f_j$  sono fattori atomici di scattering*

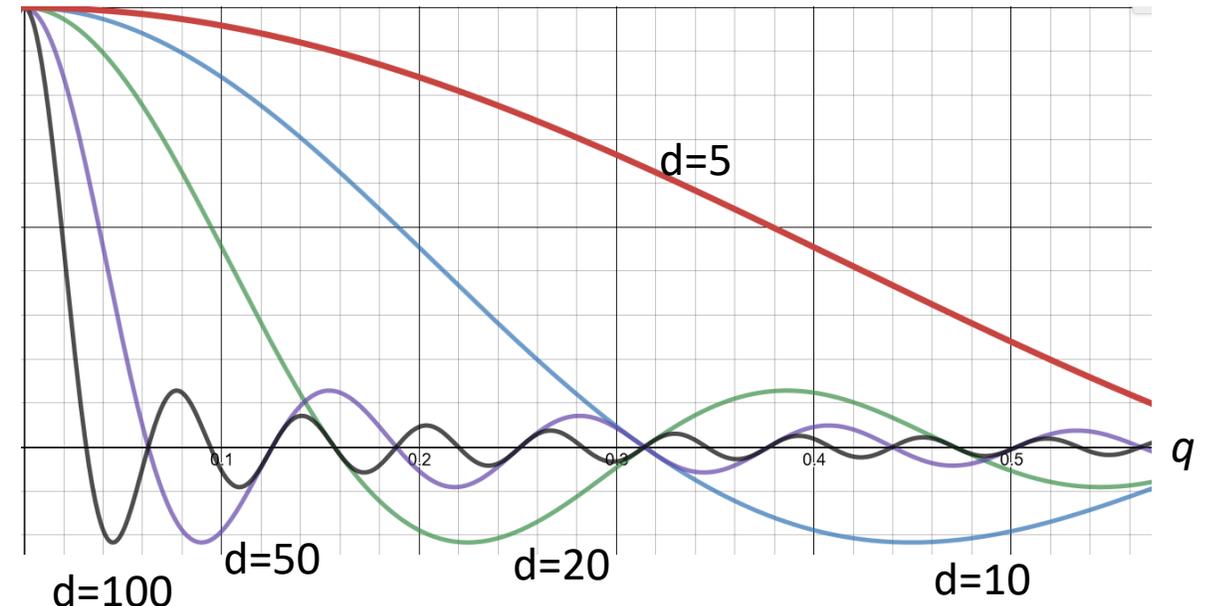
*$d_{ij} = r_i - r_j$*

L'intensità diffusa dipende dalle distanze interatomiche.

Ogni **distanza interatomica**  $d_{ij}$  aggiunge un termine del tipo  $\sin(x)/x$  all'intensità diffusa

I termini con distanze interatomiche piccole, aggiungono componenti  $\sin(x)$  di bassa frequenza e dominano a basso q (**basso angolo  $\vartheta$** ).

I termini con distanze interatomiche elevate, aggiungono componenti  $\sin(x)$  di alta frequenza e dominano ad alto q (**alto angolo  $\vartheta$** ).



# Intensità diffusa e struttura molecolare

# Valor medio della intensità diffusa

Il valore dell'**Intensità diffusa** da una molecola (in generale da una particella), mediata su tutte le direzioni può essere scritta come:

$$I(q) = \langle F(\vec{q})F(\vec{q})^* \rangle$$

Dove  $\langle \dots \rangle$  indica la media su tutte le direzioni possibili di  $\vec{q}$

Ricordando che  $F(\vec{q})$  è la Trasformata di Fourier della densità elettronica  $\rho(\vec{r})$ , possiamo scrivere:

$$I(q) = \langle FT[\rho(\vec{r})]FT[\rho(-\vec{r})] \rangle$$

La trasformata di Fourier di  $f(-x)$  è uguale alla complessa e coniugata della trasformata di Fourier di  $f(x)$  (se  $f(x)$  è una funzione reale) come è  $\rho(r)$

Ma il prodotto delle trasformate di Fourier di due funzioni è uguale alla trasformata di Fourier della convoluzione delle due funzioni, per cui possiamo scrivere  $I(q)$  come:

$$I(q) = \langle FT[\rho(\vec{r}) * \rho(-\vec{r})] \rangle$$

# Autocorrelazione della densità elettronica

$$I(q) = \langle F(\vec{q})F(\vec{q})^* \rangle$$

$$I(q) = \langle FT[\rho(\vec{r}) * \rho(-\vec{r})] \rangle$$

$\rho(\vec{r}) * \rho(-\vec{r})$  è l' **Autocorrelazione** di  $\rho(\vec{r})$  che indicheremo come  $\gamma(\vec{r})$

$$\gamma(\vec{r}) = \rho(\vec{r}) * \rho(-\vec{r})$$

$\gamma(\vec{r})$  è nota anche come **Funzione di Patterson**

L'intensità diffusa da una particella è la trasformata di Fourier, mediata su tutte le direzioni dell'autocorrelazione della densità elettronica della particella.

Dati due oggetti, il valore della funzione  $\gamma(\vec{r})$  calcolata per un dato valore di  $\vec{r}$ , sarà tanto più grande quanto maggiore è la sovrapposizione tra i due oggetti.

Per  $\vec{r}=0$ ,  $\gamma(\vec{r})$  ha il valore massimo.

# Significato dell'autocorrelazione - 1

Ricordiamo che l'autocorrelazione di  $f(t)$  ha la seguente correlazione:

$$a(x) = (f \star f)(x) = \int_{-\infty}^{\infty} \overline{f(t)} f(x+t) dt$$

Cioè è la correlazione di una funzione  $f(t)$  con se stessa

**L'autocorrelazione misura la similitudine di una funzione con se stessa, al variare di una certa variabile (spazio, tempo, per es.)**

L'autocorrelazione è uno strumento molto potente per identificare la ripetizione di una certa funzione

Inoltre, per una funzione reale (vedi slides corso introduttivo)

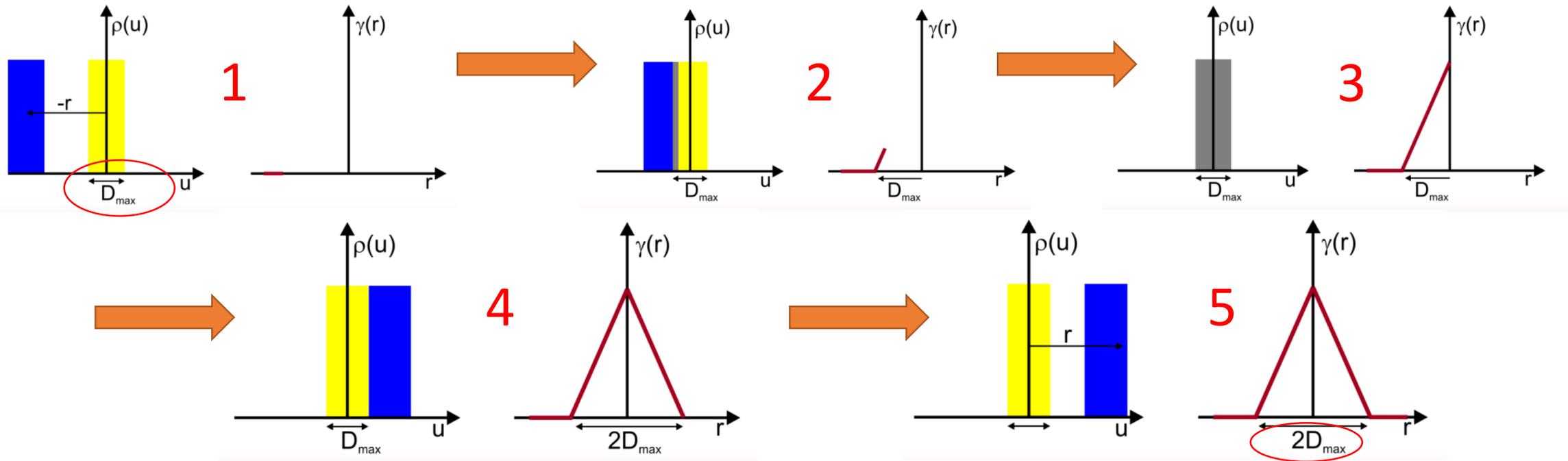
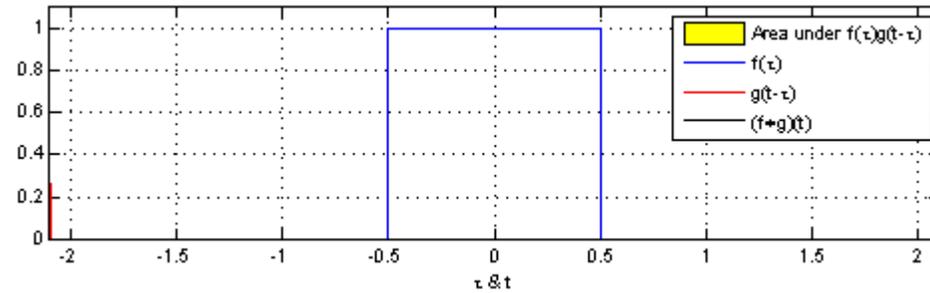
$$f(-t) * f(t) = |FT[f(t)]|^2$$

---

# Significato dell'Autocorrelazione - 2

$$\gamma(\vec{r}) = \rho(\vec{r}) * \rho(-\vec{r}) = \int_{V_u} \rho(r+u)\rho(r)dV_u$$

L'entità della sovrapposizione determina il valore della funzione  $\gamma(x)$  in funzione di  $x$



# Autocorrelazione - sistema omogeneo e isotropo

Se supponiamo che la particella sia omogenea, avremo che:

$$\rho(\vec{r}) \begin{cases} = \rho & \text{se } \vec{r} \text{ è contenuto nel volume } V \text{ della particella} \\ = 0 & \text{se } \vec{r} \text{ non è contenuto nel volume } V \text{ della particella} \end{cases}$$

Se poi il sistema è anche isotropo, ovvero non ha proprietà dipendenti dalla direzione (media su tutte le direzioni)

$$\gamma(r) = \langle \gamma(\vec{r}) \rangle$$

Assumendo queste due ipotesi (omogeneità e isotropia) possiamo scrivere:

$$\gamma(r) = \rho^2 V_{ov}(\vec{r})$$

Per  $\vec{r} = 0$

$$\gamma(0) = \rho^2 V$$



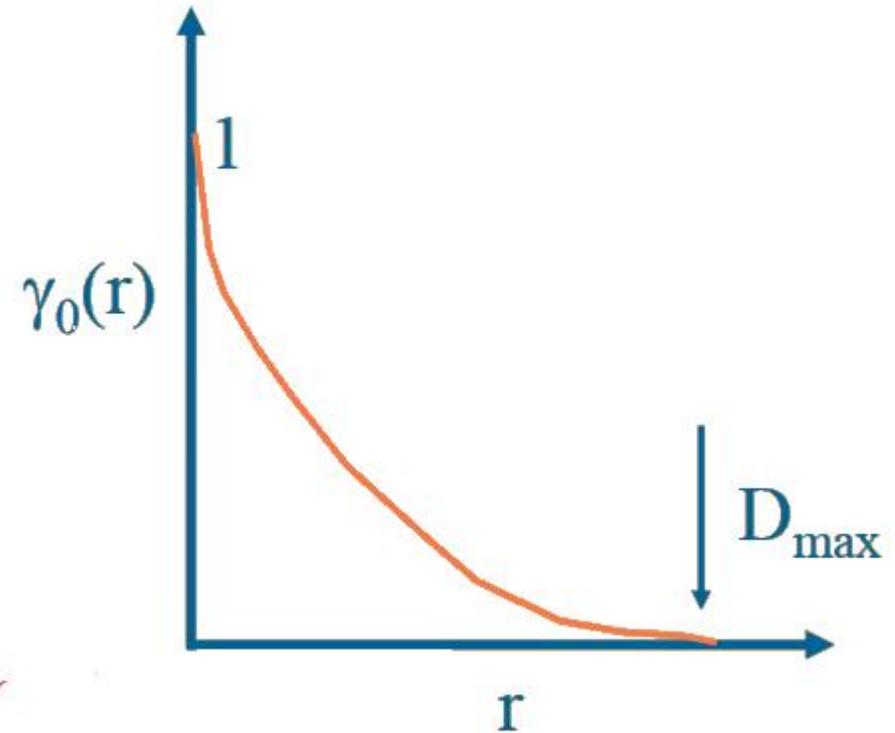
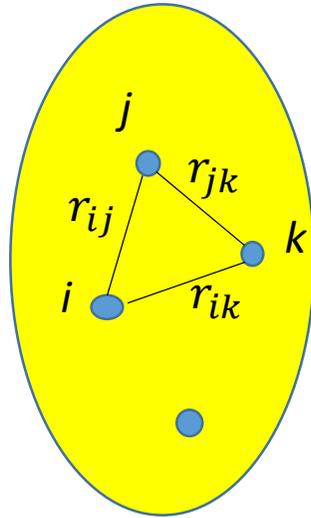
# Funzione caratteristica e suo significato

Definiamo:  $\gamma_0(r) = \frac{\gamma(r)}{\gamma(0)}$

Avremo che

$$\gamma_0(r) = \frac{\gamma(r)}{\rho^2 V}$$

$\gamma_0(r)$  è chiamata **funzione caratteristica**



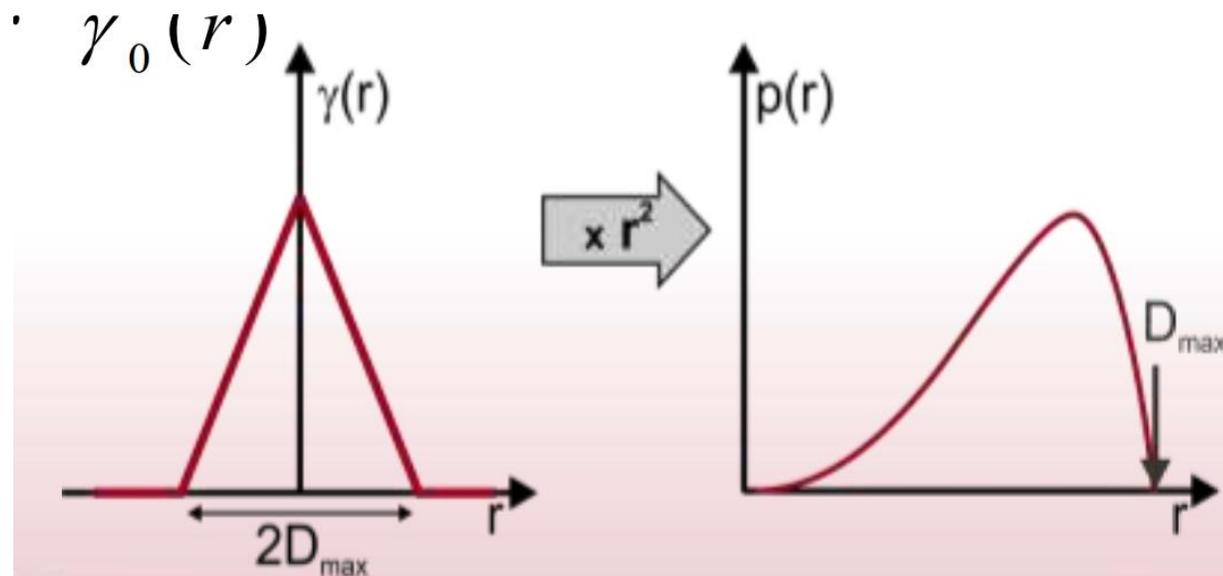
Dati due punti  $i$  e  $j$ ,  $\gamma_0(r)$  definisce **la probabilità di trovare un punto  $j$ , all'interno della particella, ad una distanza  $r_{ij}$  dal punto  $i$**

# Pair distance distribution function – $p(r)$

La **pair distance distribution function**, indicata come  $p(r)$ , rappresenta un **istogramma (distribuzione)** delle distanze tra i punti contenuti nella **particella**. La  $p(r)$  dipende dalla dimensione e dalla forma della particella.

La  $p(r)$  è definita come

$$p(r) = r^2 \gamma(r) = \rho^2 V r^2 \gamma_0(r)$$

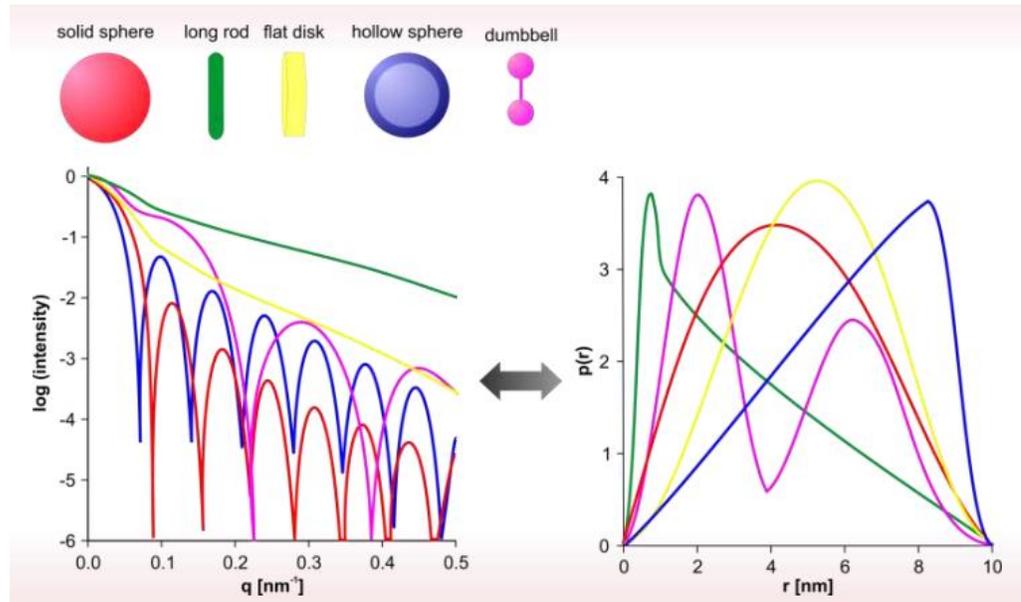


# $p(r)$ e intensità diffusa $I(q)$

La  $p(r)$  è legata direttamente alla intensità diffusa  $I(q)$  dalla relazione:

$$p(r) = 4\pi \int_0^{\infty} I(q) q r \sin(qr) dq$$

**Questo vuol dire che possiamo ottenere l'informazione sulla distribuzione delle distanze e quindi sulla forma e sulle dimensioni della nostra particella, direttamente dalle intensità diffuse.**



**La  $p(r)$  dipende dalla forma e dimensione della particella che diffonde i raggi-X.**

**La curva di scattering avrà quindi un andamento legato alla forma e alla dimensione della particella che diffonde i raggi-X**

# Scattering in soluzione (SAXS)

# Diffusione da particelle in soluzione

Negli studi di diffusione di raggi-X in soluzione si fanno delle assunzioni importanti:

- Che le particelle siano **monodisperse**, cioè tutte uguali e che quindi diffondano i raggi-X tutte allo stesso modo
- Che **le particelle non interagiscano tra di loro**, cioè che non ci sia correlazione tra le particelle.

Date queste due assunzioni, l'intensità dei raggi-X diffusa ad una certa direzione (o angolo  $\vartheta$ ) sarà data dalla relazione

$$I(\mathbf{q}) = Ni(\mathbf{q})$$

Dove  $N$  è il numero di particelle in soluzione e  $i(\mathbf{q})$  è l'intensità diffusa dalla singola particella

# Effetto del solvente

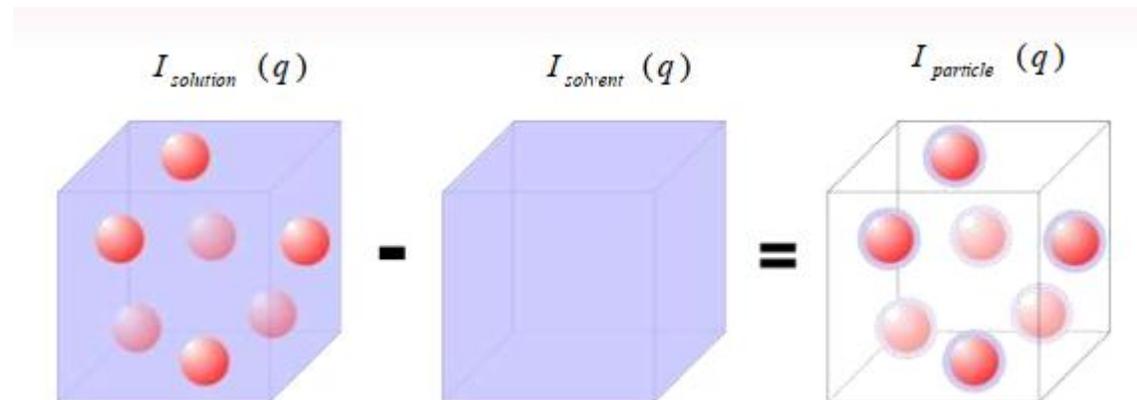
Perché i raggi-X diffusi dalle particelle siano visibili, bisogna sottrarre il contributo del solvente.

Solo quando il contributo alla diffusione dei raggi-X del solvente è stato sottratto, potremo collegare l'intensità diffusa alla densità elettronica delle particelle.

Se la densità elettronica delle particelle è data da  $\rho$  e quella del solvente da  $\rho_s$

$$\Delta\rho = \rho - \rho_s$$

$\Delta\rho$  è il contributo alla diffusione specifico delle particelle in soluzione



# Small Angle X-ray Scattering

L' intensita dello scattering di raggi-X da parte di un sistema di atomi dipende dall'angolo  $\vartheta$  di osservazione (angolo di scattering).

Nel caso di un sistema cristallino, **osservo ordine a lungo raggio (cristallo)**

La struttura cristallina impone una distribuzione regolare di atomi in tutto il cristallo, questo determina un contributo coerente alla diffusione dei raggi-X, da parte di tutti gli atomi e di conseguenza la diffrazione dei raggi-X ad angoli elevati.

**Le molecole in soluzione non sono correlate tra loro, sono orientate in modo statistico.**

La diffusione dei raggi-X sarà quindi piuttosto debole e apprezzabile solo ad angoli piccoli.

**Osservo ordine a corto raggio (molecola)**

Ad angoli più elevati il contributo delle molecole in soluzione è molto simile a quello del solvente.

Per questo motivo la diffusione (scattering) dei raggi-X da parte di molecole in soluzione è osservabile solo ad angoli relativamente piccoli.

