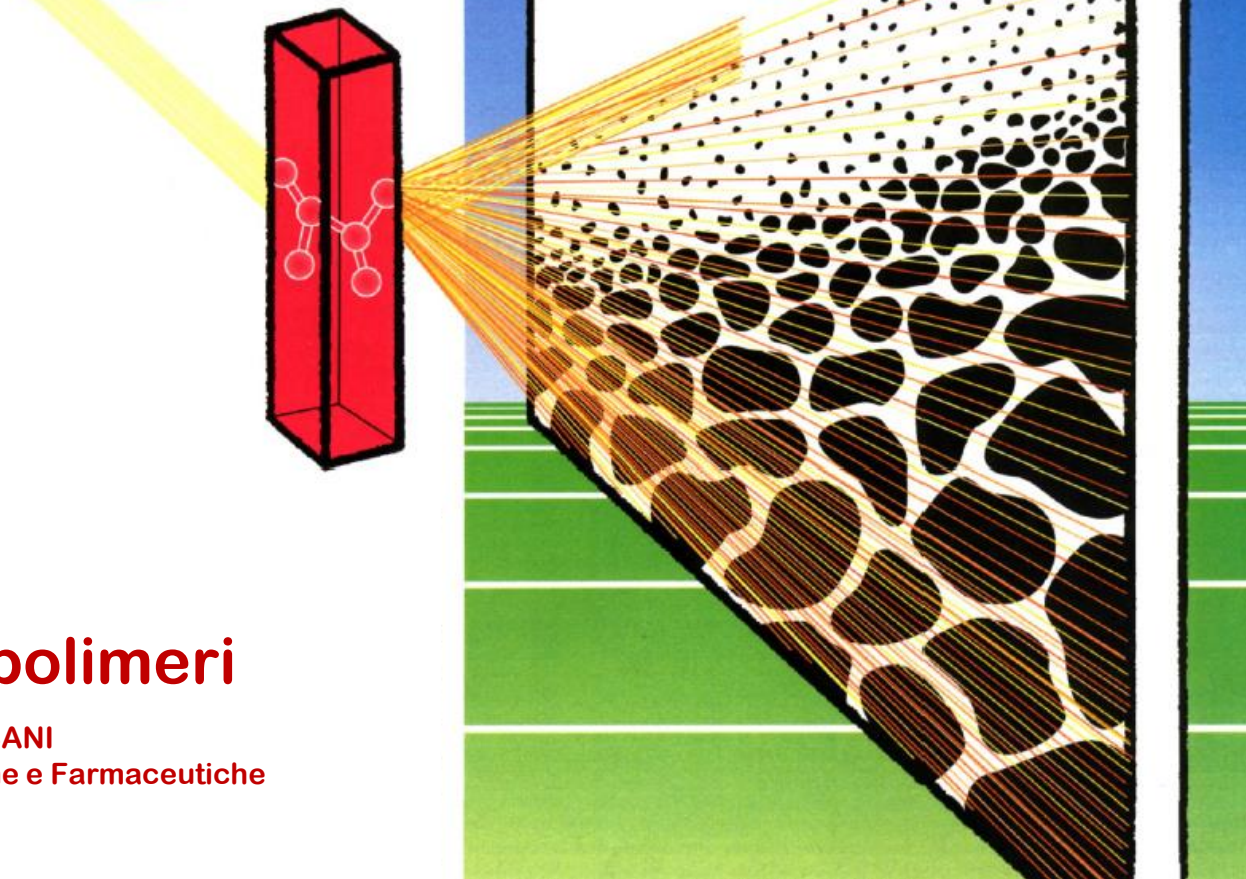


Dynamic Light Scattering (DLS)

Quasielastic Light Scattering



a.a. 2021-2022

Corso di Proprietà di biopolimeri

Prof. Ranieri URBANI
Dipartimento di Scienze Chimiche e Farmaceutiche

Dynamic light scattering (DLS)

Also known as

Quasielastic light scattering (QLS)

or

Photon Correlation Spectroscopy (PCS)

A Technique mainly used to determine the **diffusion coefficient** of macromolecules and colloidal particles in solution.

The dominant practical application is in **particle sizing** (1-1000 nm).

Tecniche per determinare forma e massa delle particelle

Light microscopy

Electron microscopy (SEM, TEM)

Atomic force microscopy (AFM)

Gel electrophoresis, SDS page

Size exclusion chromatography

Mass spectrometry (EI, MALDI)

Osmotic pressure

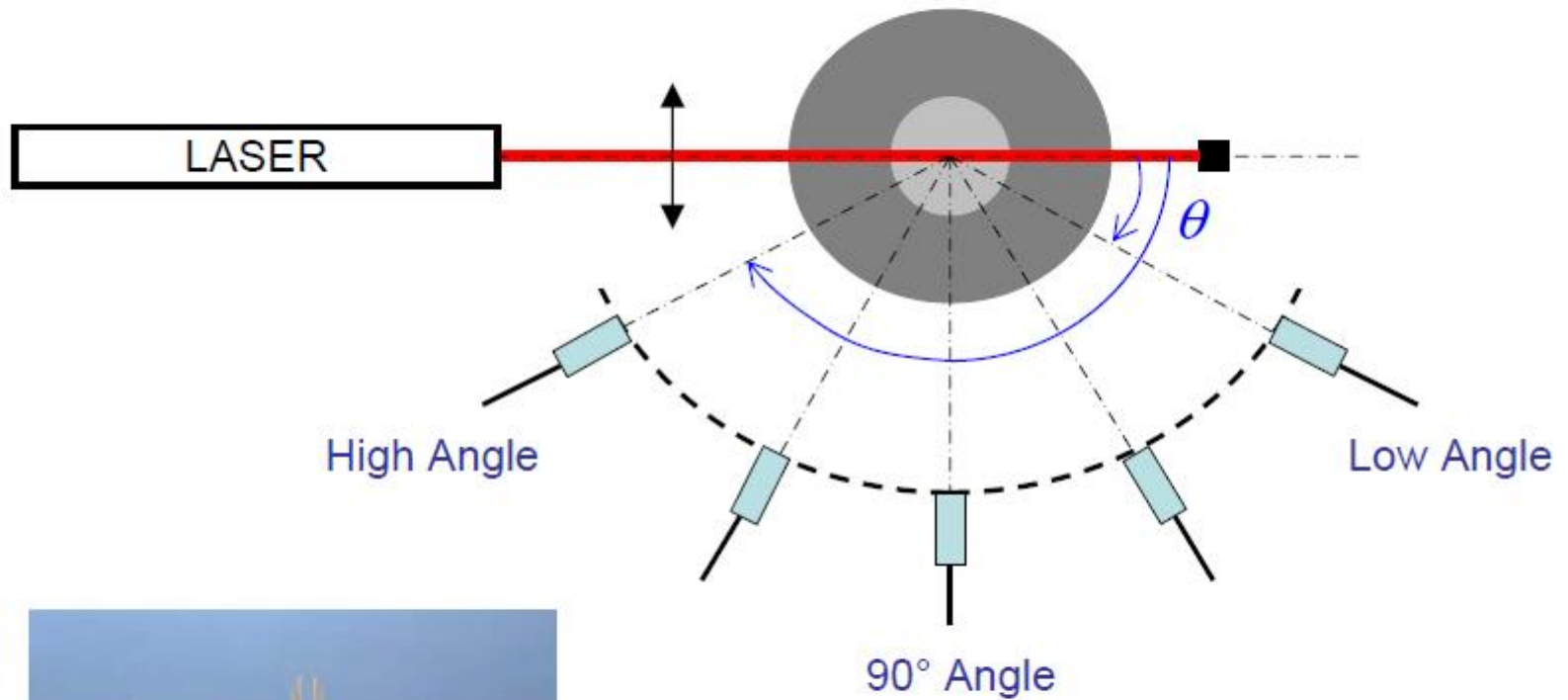
Light, neutron, X-ray scattering

Sedimentation

Viscosity

Diffusion (DLS, NMR PGSE, Interferometry, Taylor dispersion, etc..)

MULTIANGLE SCHEME



DLS

Moto browniano

Con il semplice ausilio di un microscopio ottico si osserva una piccola particella immersa in acqua: questa è tutt'altro che ferma, ma animata da **un movimento perfettamente disordinato**.

Tale fenomeno viene denominato moto browniano, in onore del botanico inglese Robert Brown, che lo osservò chiaramente per la prima volta nel 1827.

Il fenomeno si presenta in tutti i fluidi, con una attività inversamente proporzionale alla viscosità del fluido in questione.

La caratteristica più sorprendente è che **il moto non si arresta mai**, è “eterno e spontaneo”.

Fino alla fine dell'800 le argomentazioni si basavano sull'idea che il moto osservato a «zig-zag» sia dovuto al singolo urto con una singola molecola (e non la risultante di una miriade di urti con altrettante molecole).

L'idea viene elaborata da Gouy e Siedentopf, fino ad arrivare alla teoria quantitativa di Einstein (1905).

Una tale natura del moto browniano fornisce un esempio di moto privo di origini esterne, che si origina dal calore di un ambiente in equilibrio termico.

Le previsioni teoriche di Einstein del moto browniano sono enormi in termini fisici: **la natura atomica della materia e la natura probabilistica delle leggi della termodinamica.**

Jean-Baptiste Perrin confermò le previsioni di Einstein osservando con un microscopio gli spostamenti di circa 200 sferette identiche (ottenute con un procedimento estremamente laborioso).

Misurò la **relazione fra spostamento quadratico medio e tempo** in liquidi con diversa viscosità e a diverse temperature, ricavando con buona approssimazione il numero di Avogadro.

La teoria di Einstein si sviluppa a partire dalla sua tesi di dottorato, discussa il 30 Aprile 1905, in cui presenta un metodo per la determinazione della dimensione molecolari e del numero di Avogadro dal coefficiente di viscosità di soluzioni zuccherine

Per prima cosa Einstein ricava una relazione tra N_A , numero di Avogadro, ed α , il raggio di una particella sferica in sospensione

Ai tempi era ben nota la formula di Stokes per la resistenza di un fluido viscoso al moto di una sfera (forza di attrito viscoso):

$$F = 6\pi\eta a v$$

Inoltre, estendendo la legge della **pressione osmotica di van't Hoff** per le soluzioni al caso di particelle sferiche in sospensione, si può affermare che le particelle diffondono nel liquido dalle regioni ad alta concentrazione a quelle a bassa concentrazione per effetto della pressione osmotica.

Indicando con K la forza agente sulle sferette dovuta al gradiente di concentrazione, Einstein arriva alla **relazione tra la forza per unità di volume e la pressione osmotica**:

$$K \frac{\rho N_A}{m} = \frac{\partial p}{\partial x} = \frac{RT}{m} \frac{\partial \rho}{\partial x}$$

L'intuizione di Einstein consiste **nell'eguagliare la pressione osmotica alla resistenza del solvente al movimento delle sferette**, in condizioni di equilibrio dinamico:

$$6\pi\eta a v \rho = \frac{RT}{N_A} \frac{\partial \rho}{\partial x}$$

La velocità di diffusione:

$$(D\bar{N}_A/m)\partial\rho/\partial x = \text{particelle}/\text{cm}^2\text{s},$$

con D il coefficiente di diffusione. Allora:

$$D = \frac{RT}{N_A} \frac{1}{6\pi\eta a}$$

Ricapitolando, la sua deduzione si basa su:

- l'applicabilità delle leggi di van't Hoff
- la validità della legge di Stokes
- l'equazione di diffusione (in x) : $\frac{\partial\rho}{\partial t} = D \cdot \frac{\partial^2\rho}{\partial x^2}$, con $\rho = \rho(x, t)$

dove $\rho(x, t)$ è la densità di particelle attorno ad x al tempo t.

Applicando quanto trovato al caso del moto browniano:

$$\rho(x, t) = \frac{n}{\sqrt{4\pi Dt}} \exp\left(\frac{-x^2}{4Dt}\right) \quad \text{con} \quad n = \int \rho(x, t) dx$$

lo **spostamento quadratico medio** dall'origine è dato da:

$$\langle x^2 \rangle = \frac{1}{n} \int x^2 \rho(x, t) dx = 2Dt$$

$$\langle x^2 \rangle = \frac{RT}{3\pi N_A a \eta} t$$

Questa equazione è l'equazione fondamentale di Einstein per il moto Browniano: $\langle x^2 \rangle$, η , e t sono misurabili e quindi si può ricavare N_A

DLS

DLS misura il moto browniano e lo mette in relazione con la dimensione delle particelle

Normalmente la DLS si occupa di misurare le particelle sospese in un liquido.

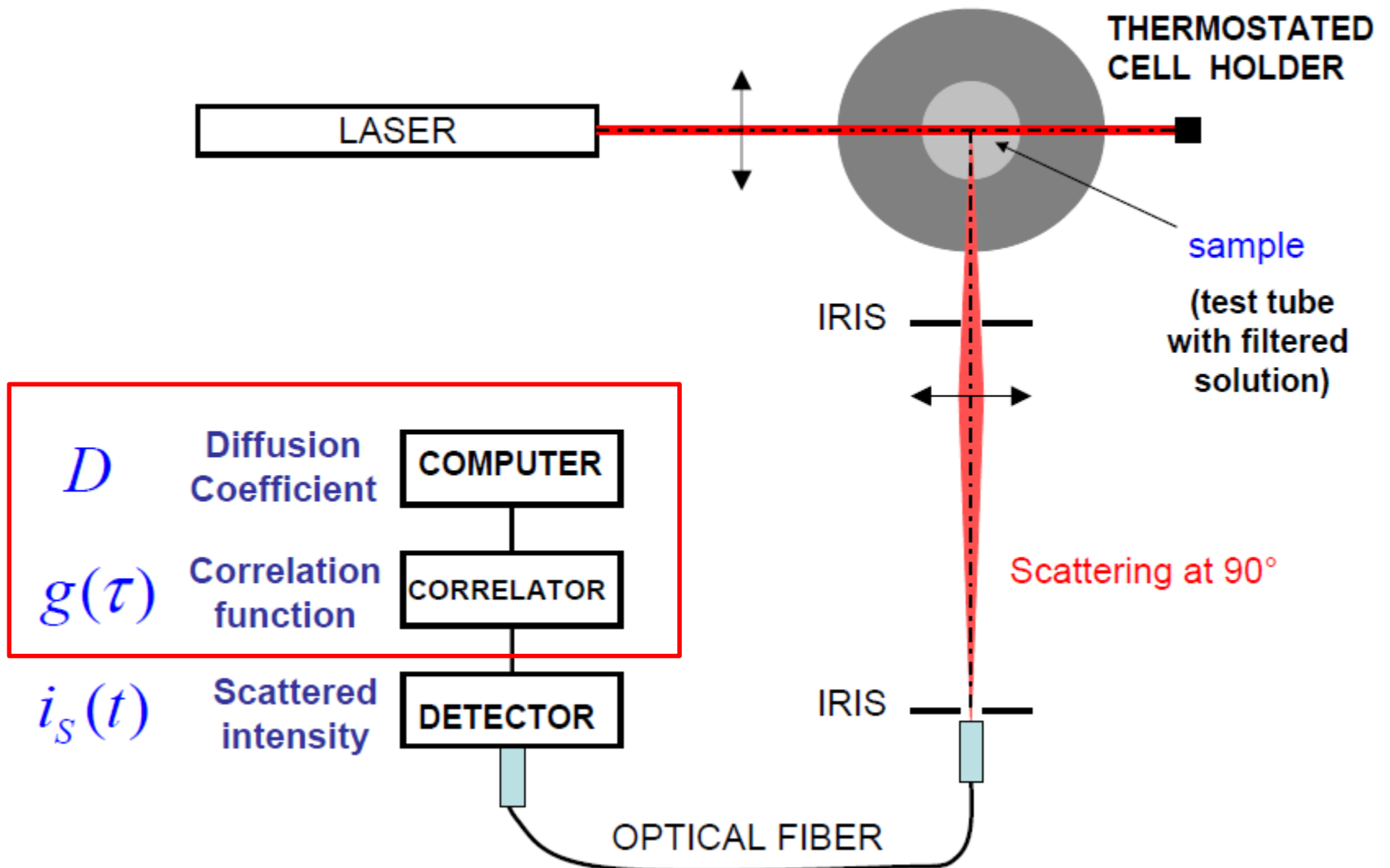
Più grande è la particella, più lento sarà il moto browniano. Le particelle più piccole sono spostate maggiormente dalle molecole del solvente e si muovono più rapidamente.

E' necessaria un **controllo della temperatura** perché la viscosità di un liquido è legata strettamente alla temperatura.

La temperatura deve anche essere **stabile**, altrimenti le correnti di convezione nel campione possono determinare movimenti non casuali che influiscono sulla corretta interpretazione delle dimensioni.

La velocità del moto browniano è definita da una proprietà nota come **coefficiente di diffusione traslazionale** (di solito con il simbolo D).

DLS INSTRUMENT SCHEME



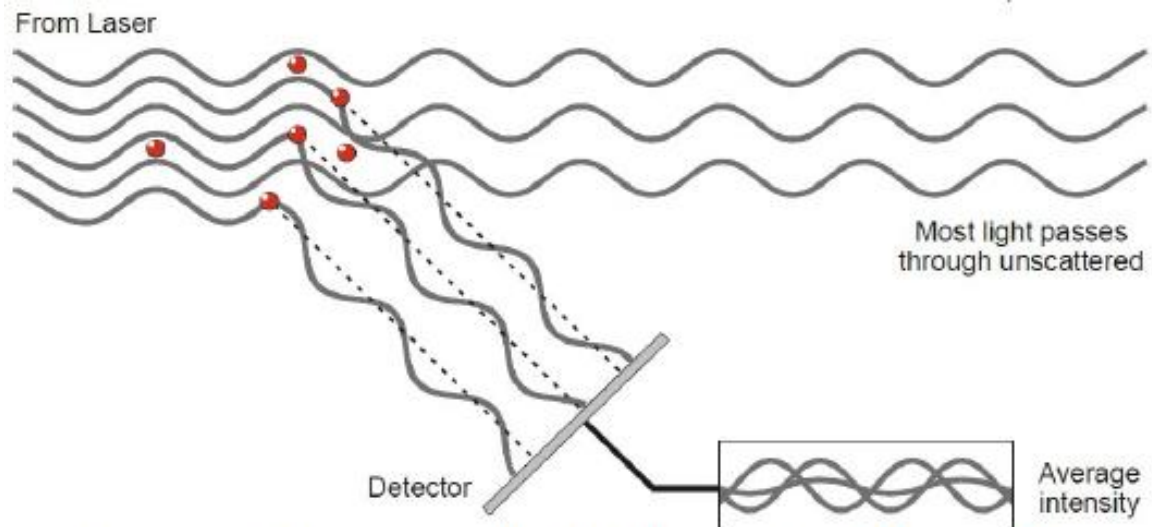
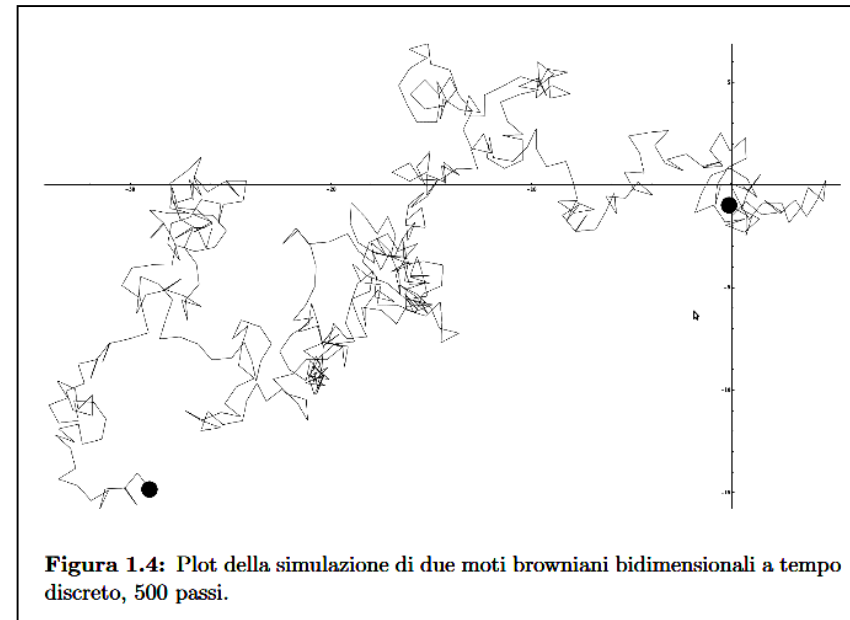
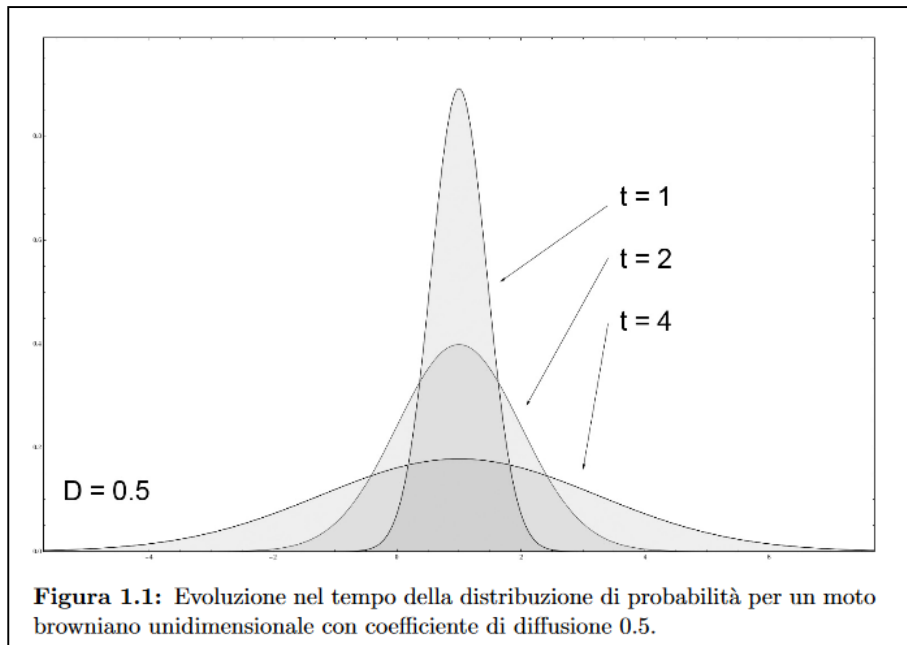


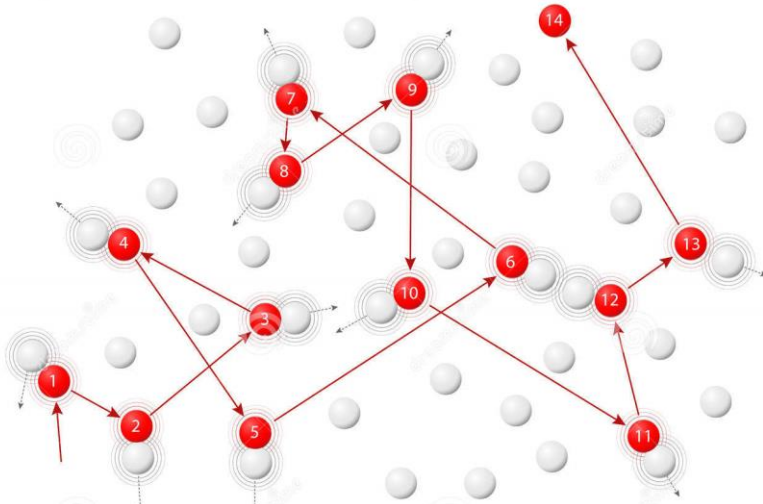
Figure 3: The scattered light falling on the detector [1].

Dall'equazione appare evidente che la probabilità per una particella di trovarsi in un certo punto del liquido è una **gaussiana** che tende a schiacciarsi ed allargarsi al passare del tempo.

$$\rho(x, t) = \frac{N}{\sqrt{4\pi Dt}} e^{-\frac{x^2}{4Dt}}$$



Brownian motion



Download from
Dreamstime.com
This watermarked content may be for previewing purposes only.

67200919

Designua | Dreamstime.com

mediante questa descrizione (1905) Einstein iniziò l'utilizzo dei modelli stocastici in fisica, e fornì un possibile modo di confermare l'esistenza degli atomi, poi verificato sperimentalmente da Perrin, Smoluchowski e molti altri.

Brownian Motion



$$D = \frac{\langle [\vec{r}(\tau) - \vec{r}(0)]^2 \rangle}{6\tau}$$

Il diametro idrodinamico

La dimensione di una particella è calcolata dal coefficiente di diffusione traslazionale utilizzando l'equazione di Stokes-Einstein:

$$d_h = \frac{kT}{3\pi\eta D}$$

dove:

d_h = diametro idrodinamico

D = coefficiente di diffusione traslazionale

k = costante di Boltzmann

T = temperatura assoluta

η = viscosità

Si noti che il diametro che viene misurato in DLS è un valore che si riferisce a come una particella si diffonde all'interno di un fluido, per cui si parla di diametro idrodinamico.

Il diametro che si ottiene con questa tecnica è il diametro di una sfera che ha lo stesso coefficiente di diffusione traslazionale della particella.

Il coefficiente di diffusione traslazionale D dipende non solo dalla dimensione del nucleo della particella, ma anche dalla eventuale **struttura superficiale**, così come dalla concentrazione e dal tipo di ioni nel mezzo.

Gli ioni nel mezzo e la concentrazione ionica totale possono influenzare la velocità di diffusione delle particelle cambiando lo spessore del doppio strato elettrico chiamato **lunghezza di Debye (K^{-1})**.

Così un **mezzo a bassa conducibilità** produrrà un doppio strato esteso di ioni intorno alla particella, riducendo la velocità di diffusione e risultando in un diametro idrodinamico apparente più grande.

Al contrario, **mezzi a più alta conducibilità** sopprimeranno il doppio strato elettrico e il diametro idrodinamico misurato.

NB: Le prestazioni di uno strumento DLS sono normalmente verificate dalla **calibrazione** con un adeguato standard di particelle di lattice di polistirene. La diluizione avviene con un mezzo appropriato.

Lo standard internazionale sulla DLS (ISO13321 Parte 8 1996) stabilisce che la diluizione di qualsiasi standard di polistirene dovrebbe essere fatta in 10mM NaCl. Questa concentrazione di sale sopprime il doppio strato elettrico e garantisce che il diametro idrodinamico misurato sia quello certificato dello standard.

Non-Spherical Particles

Tutte le tecniche di misura delle dimensioni di particelle hanno un problema intrinseco nel descrivere le dimensioni delle particelle non sferiche. La sfera è l'unico oggetto le cui dimensioni possono essere descritte senza ambiguità da una singola grandezza.

Il diametro idrodinamico di una particella non sferica è il diametro di una sfera che ha la stessa velocità di diffusione traslazionale della particella.

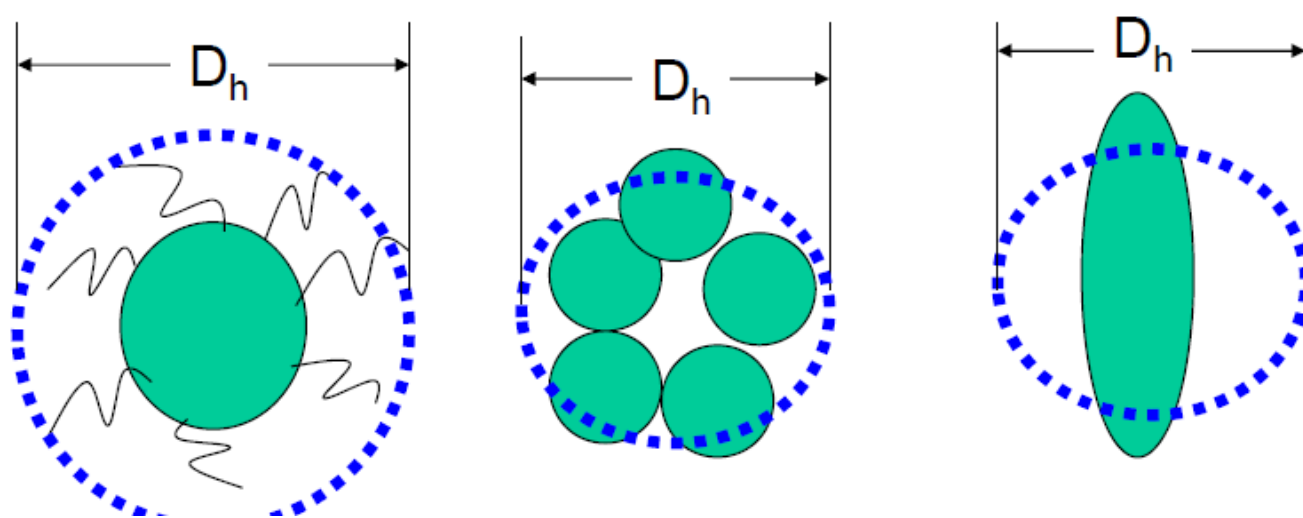
Se la forma di una particella cambia influenzando la velocità di diffusione, allora cambia la dimensione idrodinamica.

Per esempio, piccoli cambiamenti nella **lunghezza** di una particella a forma di bastoncino influenzeranno direttamente la dimensione, mentre i cambiamenti nel diametro difficilmente influiranno sulla velocità di diffusione e saranno difficili da rilevare.

Poiché le **variazioni conformazionali** di solito influenzano la velocità di diffusione, la DLS è una tecnica molto sensibile per rilevare questi cambiamenti.

What is Hydrodynamic Size?

- DLS gives the diameter of a sphere that moves (diffuses) the same way as your sample.



Teoria del Light Scattering

Diffusione di Rayleigh

Se le particelle sono piccole rispetto alla lunghezza d'onda del laser utilizzato (tipicamente meno di $d = \lambda/10$ o circa 60nm per un laser He-Ne), allora la diffusione da una particella illuminata da un laser polarizzato verticalmente sarà essenzialmente **isotropa**, cioè uguale in tutte le direzioni.

L'approssimazione di Rayleigh ci dice che $I \propto d^6$ e anche che $I \propto 1/\lambda^4$, dove I è l'intensità della luce diffusa, d = diametro della particella λ = lunghezza d'onda del laser.

Il termine d^6 ci dice che una particella di 50 nm diffonderà 10^6 volte più luce di una particella di 5 nm.

Questo fattore d^6 significa anche che è difficile con la DLS misurare una miscela di particelle da 1000 nm e 10 nm perché il contributo alla luce totale diffusa dalle particelle piccole sarà estremamente piccolo.

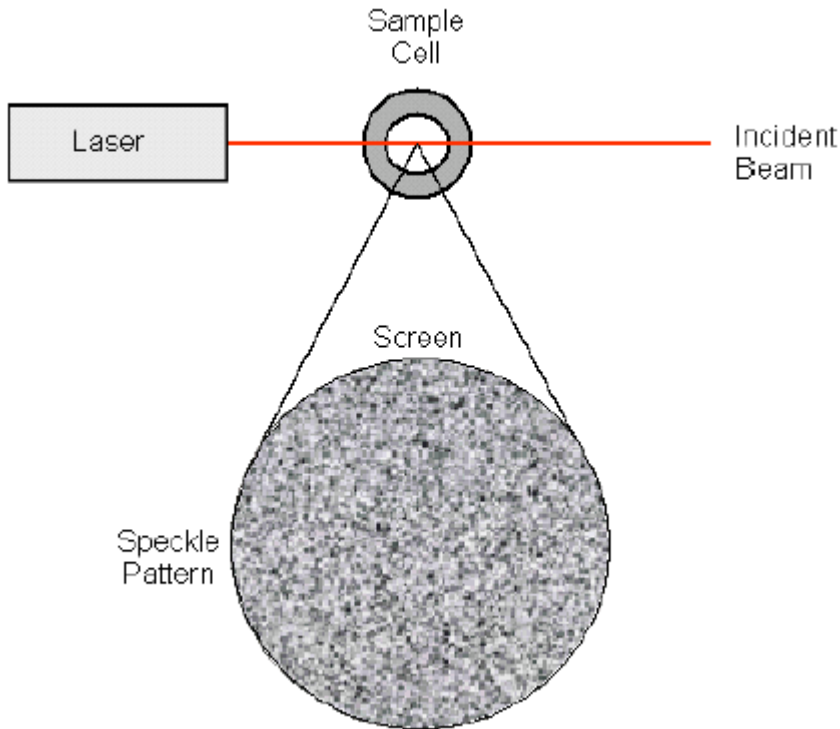
La relazione inversa λ^4 significa che una maggiore intensità di diffusione si ottiene al diminuire della lunghezza d'onda del laser utilizzato.

Come funziona la DLS

Nella diffusione dinamica della luce, si misura la velocità di diffusione delle particelle dovuta al moto browniano.

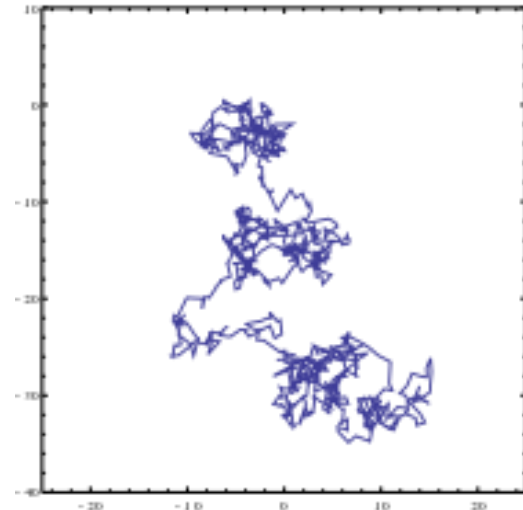
Questo viene fatto misurando la velocità con cui l'intensità della luce diffusa fluttua quando viene rilevata usando una disposizione ottica adatta.

Come influiscono queste fluttuazioni sull'intensità della luce diffusa?



Il segnale osservato dipende dall'addizione in fase della luce diffusa che cade sul rivelatore (**Interferenza costruttiva**)

Per un sistema di particelle in movimento browniano, l'addizione in fase delle intensità della diffusione di particelle in movimento è in costante evoluzione e forma nuove traiettorie.



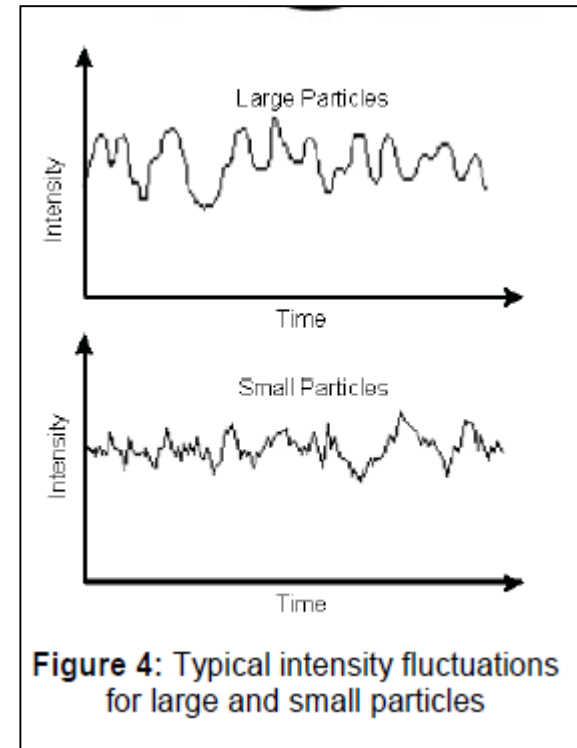
La velocità con cui queste fluttuazioni di intensità si verificano dipenderà dalla dimensione delle particelle.

La figura 4 illustra schematicamente le tipiche fluttuazioni di intensità derivanti da una dispersione di **particelle grandi** e una dispersione di **particelle piccole**.

Le particelle piccole determinano una fluttuazione più rapida di quelle grandi.

È possibile misurare direttamente **lo spettro di frequenze** contenute nelle fluttuazioni di intensità derivanti dal moto browniano delle particelle.

Il modo migliore è quello di utilizzare un dispositivo chiamato **auto-correlatore digitale**.



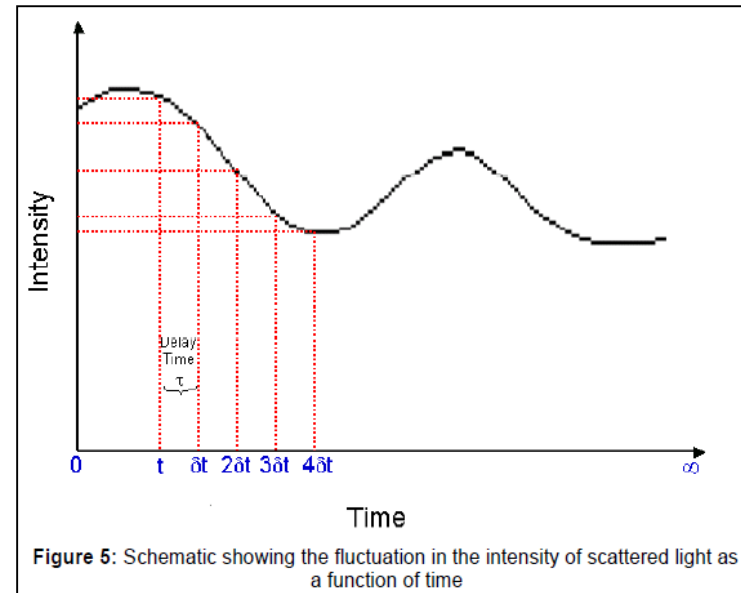
Come funziona un correlatore

Un correlatore è fondamentalmente un **comparatore di segnali**. È progettato per misurare il grado di somiglianza tra due segnali o un segnale con se stesso a intervalli di tempo variabili.

Se l'intensità di un segnale viene confrontata con se stessa in un particolare istante e in un tempo successivo relativamente grande, è ovvio che le intensità non saranno **correlate** in alcun modo, cioè non ci sarà alcuna correlazione tra i due segnali (figura 5).

La conoscenza dell'intensità iniziale del segnale non permetterà di prevedere l'intensità del segnale al tempo $t = \infty$.

Questo sarà vero per qualsiasi processo casuale come la diffusione.



Correlatore

Se l'intensità del segnale al tempo t viene confrontata con l'intensità al tempo molto piccolo successivo ($t+\delta t$), ci sarà una forte relazione o correlazione tra le intensità dei due segnali.

Pertanto, i due segnali sono fortemente (o ben) correlati.

Se il segnale, derivato da un processo casuale, a t viene confrontato con il segnale a $t+2\delta t$, ci sarà ancora un ragionevole confronto o correlazione tra i due segnali, ma **non sarà così buono** come il confronto a t e $t+\delta t$.

Pertanto, la correlazione si riduce con il tempo.

Il periodo di tempo δt è solitamente molto piccolo, picosecondi, o nanosecondi ed è chiamato il **tempo di campionamento del correlatore.**

$t = \infty$ è dell'ordine di un millisecondo o di decine di millisecondi.

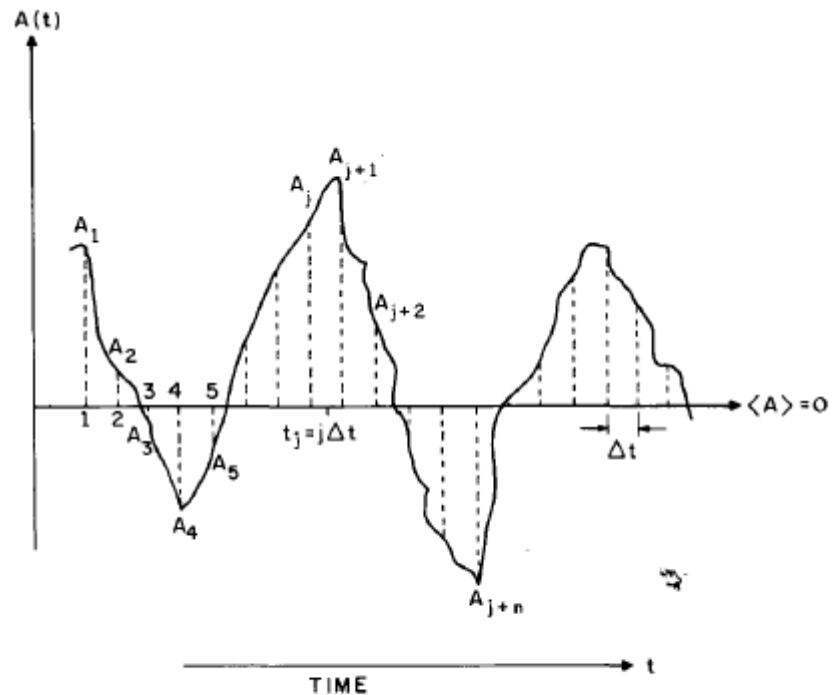
La proprietà termodinamica A di un sistema all'equilibrio è semplicemente la media temporale:

$$\bar{A}(t_0) = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_{t_0}^{t_0+T} dt A(t)$$

con t_0 il tempo iniziale della misura e T l'intervallo di tempo su cui si fa la media ($T \gg \Delta t$ delle fluttuazioni).

Per $T \rightarrow \infty$, la media di A risulta indipendente da t_0 (**proprietà stazionaria**). Pertanto può essere riscritta come:

$$\langle A \rangle = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_0^T dt A(t)$$



The property $A(t)$ fluctuates in time as the molecules move around in the fluid. The time axis is divided into discrete intervals, Δt , and the time average $\langle A \rangle$ is assumed to be zero for convenience.

Per due tempi t e $t+\tau$, con: $A(t+\tau) \neq A(t)$

Diciamo che $A(t+\tau)$ è correlato con $A(t)$ per piccoli valori di τ , ma questa correlazione si perde quando τ diventa grande, in relazione al periodo delle fluttuazioni.

La misura di tale correlazione è la **funzione di auto-correlazione della proprietà A** definita come:

$$\langle A(0)A(\tau) \rangle = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_0^T dt A(t)A(t + \tau)$$

Considerando intervalli di tempo discreti, Δt , per cui:

$$t = j \Delta t$$

$$\tau = n \Delta t$$

$$T = N \Delta t$$

allora: $t + \tau = (j + n) \Delta t$

L'integrale può essere approssimata da:

$$\langle A \rangle \cong \lim_{N \rightarrow \infty} \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N A_j$$

$$\langle A(0)A(\tau) \rangle \cong \lim_{N \rightarrow \infty} \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N A_j A_{j+n}$$

Vogliamo dimostrare come la funzione di correlazione varia con il tempo.

Nella Figura precedente il segnale $A(t)$ ha molti termini nella somma negativi.

Di conseguenza, la somma comporterà una certa cancellazione tra termini positivi e negativi.

Ora consideriamo il caso $\langle A(0)A(0) \rangle$.

La somma che contribuisce a questo caso è $\sum_j \bar{A}_j A_j = \sum_j A_j^2$.

Poiché $A_j^2 \geq 0$ tutti i termini della somma sono positivi e ci aspettiamo che il totale sia grande.

Ciò implica che:

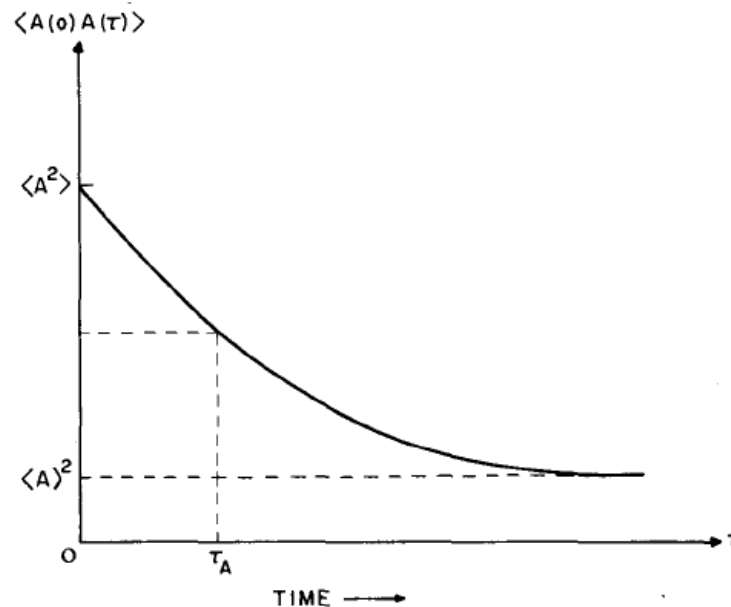
$$\sum_{j=1}^N A_j^2 \geq \sum_{j=1}^N A_j A_{j+n} \quad \text{oppure} \quad \langle A(0)^2 \rangle \geq \langle A(0)A(\tau) \rangle.$$

Così la funzione di autocorrelazione o rimane uguale al suo valore iniziale per tutti i tempi τ , nel qual caso A è una costante del moto (una quantità conservata) oppure **decade** dal suo valore iniziale che è massimo ($\langle A^2 \rangle$).

Per tempi τ grandi rispetto al tempo caratteristico per la fluttuazione di A , $A(t)$ e $A(t+\tau)$ sono **totalmente non correlati**:

$$\lim_{\tau \rightarrow \infty} \langle A(0)A(\tau) \rangle = \langle A(0) \rangle \langle A(\tau) \rangle = \langle A \rangle^2$$

Pertanto la funzione di correlazione decade dal valore $\langle A^2 \rangle$ al valore limite di $\langle A \rangle^2$



The time-correlation function, $\langle A(0)A(\tau) \rangle$. Initially this function is $\langle A^2 \rangle$. For times very long compared to the correlation time, τ_A , the correlation function decays to $\langle A \rangle^2$.

Fluctuations are defined as:

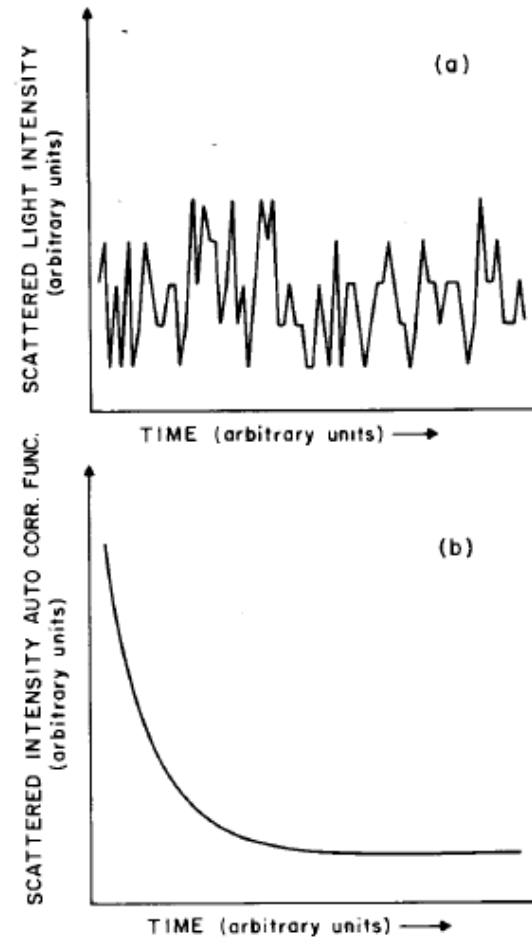
$$\delta A(t) \equiv A(t) - \langle A \rangle$$

In many applications the autocorrelation function decays like a single exponential so that

$$\langle A(0)A(\tau) \rangle = \langle A \rangle^2 + \{ \langle A^2 \rangle - \langle A \rangle^2 \} \exp \frac{-\tau}{\tau_r}$$

where τ_r is called the “relaxation time” or the correlation time of the property. It represents the characteristic decay time of the property. If we define

$$G(\tau) = A[1 + B \exp(-2\Gamma\tau)]$$



(a) Intensity of scattered light (arbitrary units) from an aqueous solution of polystyrene spheres of radius $1.01 \mu\text{m}$ as a function of time (arbitrary units). (b) The time-averaged autocorrelation function of the scattered intensity in (a) as a function of time in arbitrary units.

Correlatore

Per un gran numero di particelle monodisperse in moto browniano, la funzione di correlazione (G) è una funzione esponenziale decrescente del tempo τ del correlatore

$$G(\tau) = A[1 + B e^{-2\Gamma\tau}]$$

$$\Gamma = Dq^2$$

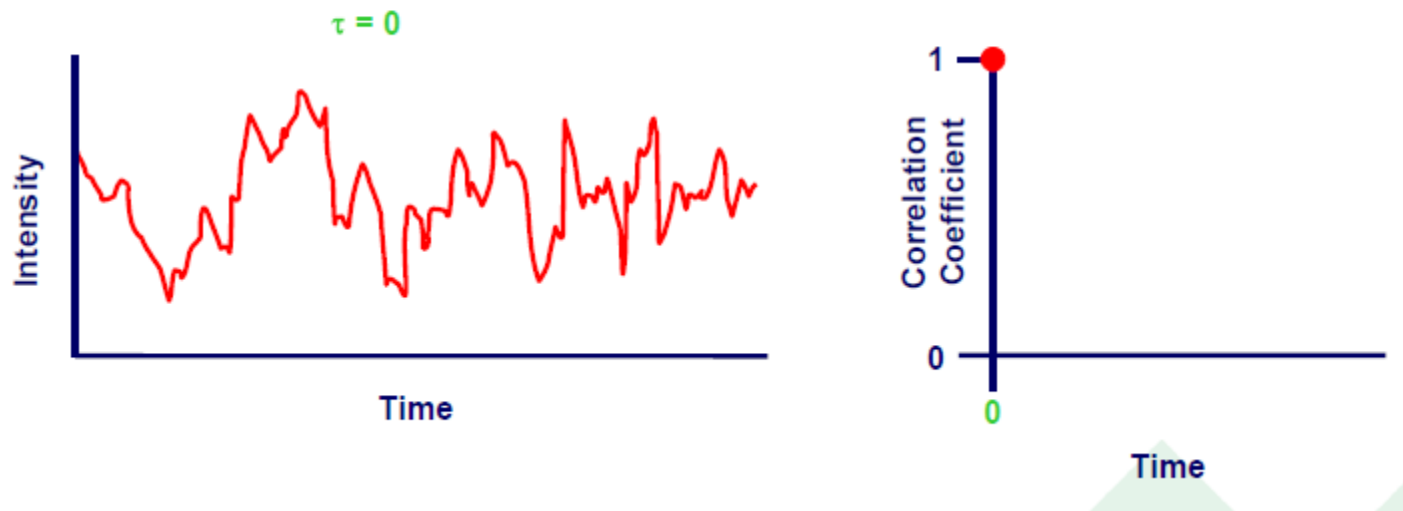
dove D = coefficiente di diffusione traslazionale e q è il vettore di scattering:

$$q = \left(\frac{4\pi n}{\lambda_0}\right) \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)$$

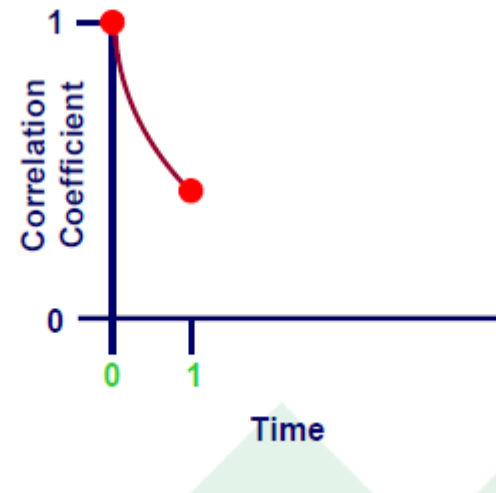
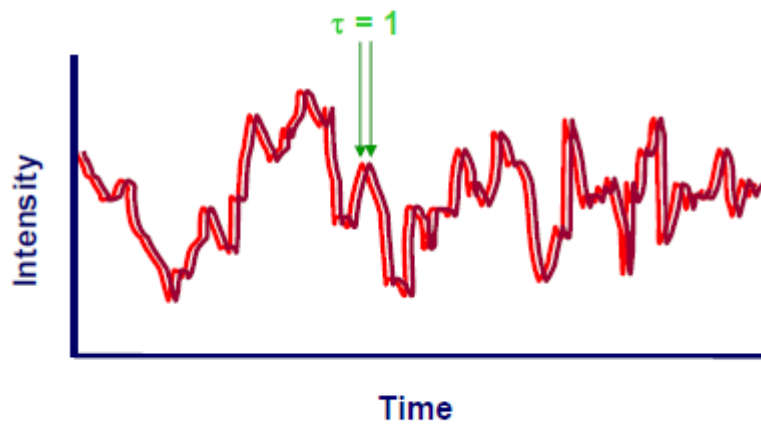
Per campioni polidispersi, la **funzione di autocorrelazione** può essere scritta come una somma di singoli contributi di decadimento G_i :

$$g^1(q; \tau) = \sum_{i=1}^n G_i(\Gamma_i) \exp(-\Gamma_i \tau) = \int G(\Gamma) \exp(-\Gamma \tau) d\Gamma.$$

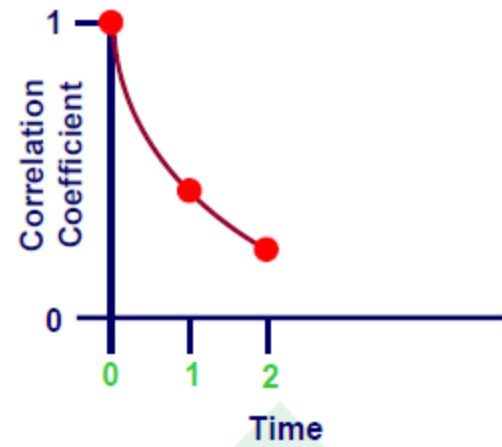
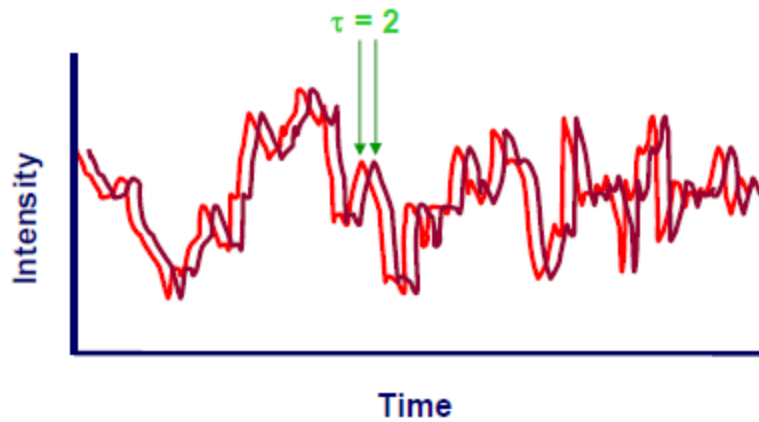
Correlation: Small Particles, Rapid Fluctuations



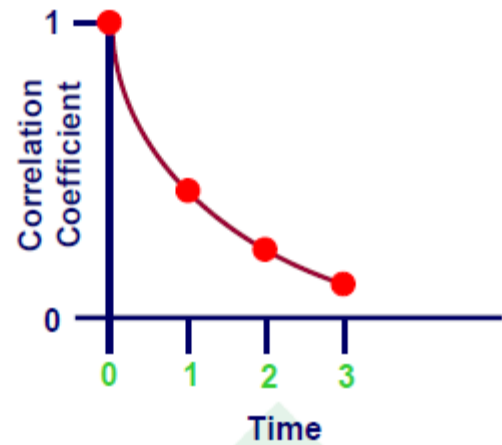
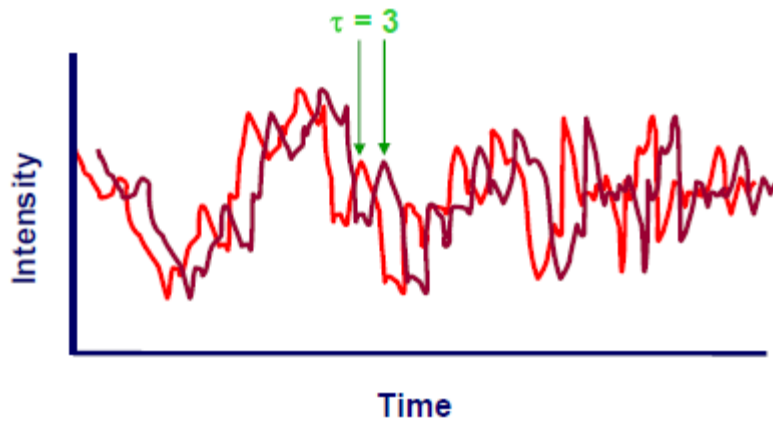
Correlation: Small Particles, Rapid Fluctuations



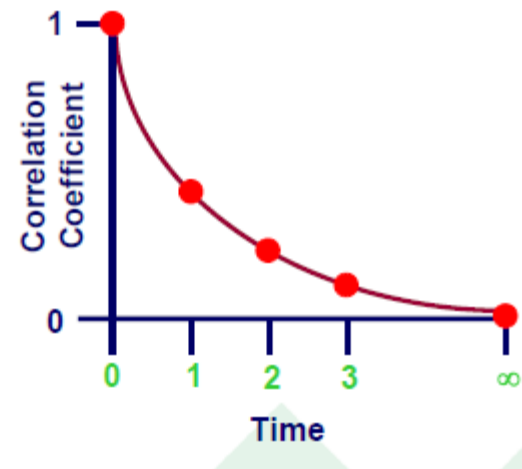
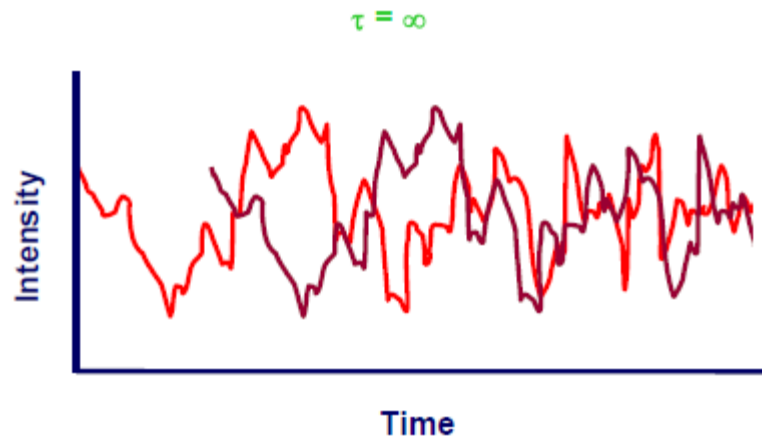
Correlation: Small Particles, Rapid Fluctuations



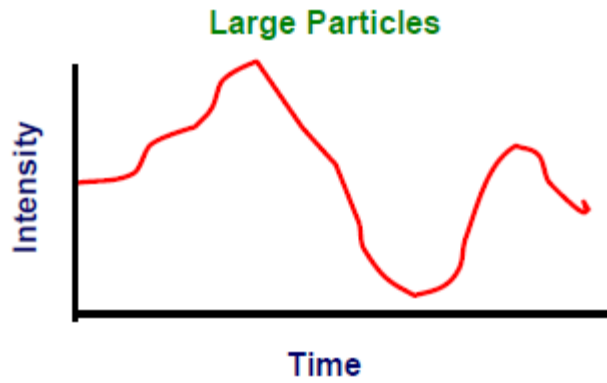
Correlation: Small Particles, Rapid Fluctuations



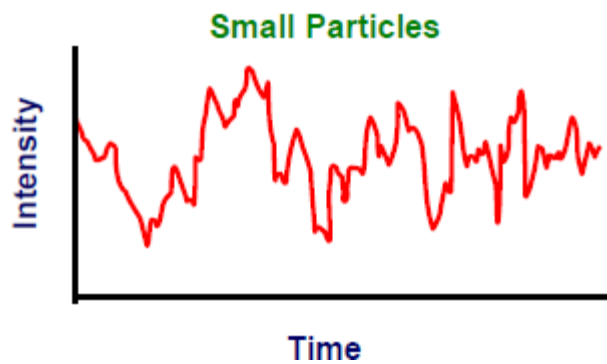
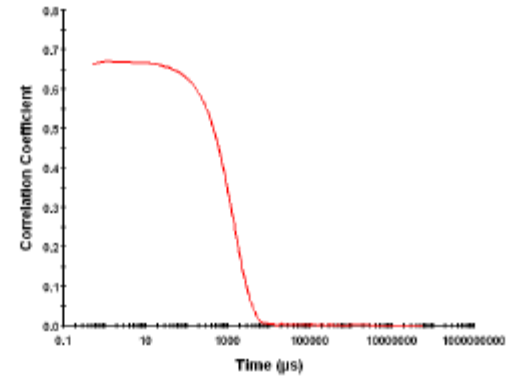
Correlation: Small Particles, Rapid Fluctuations



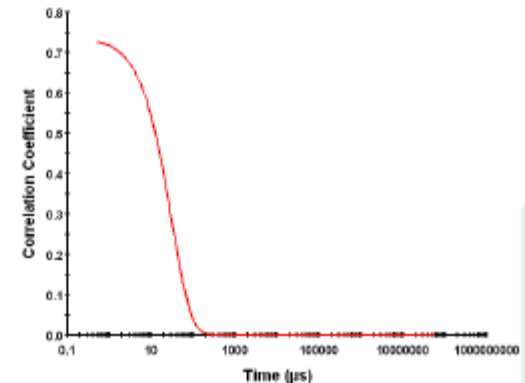
Correlation Functions



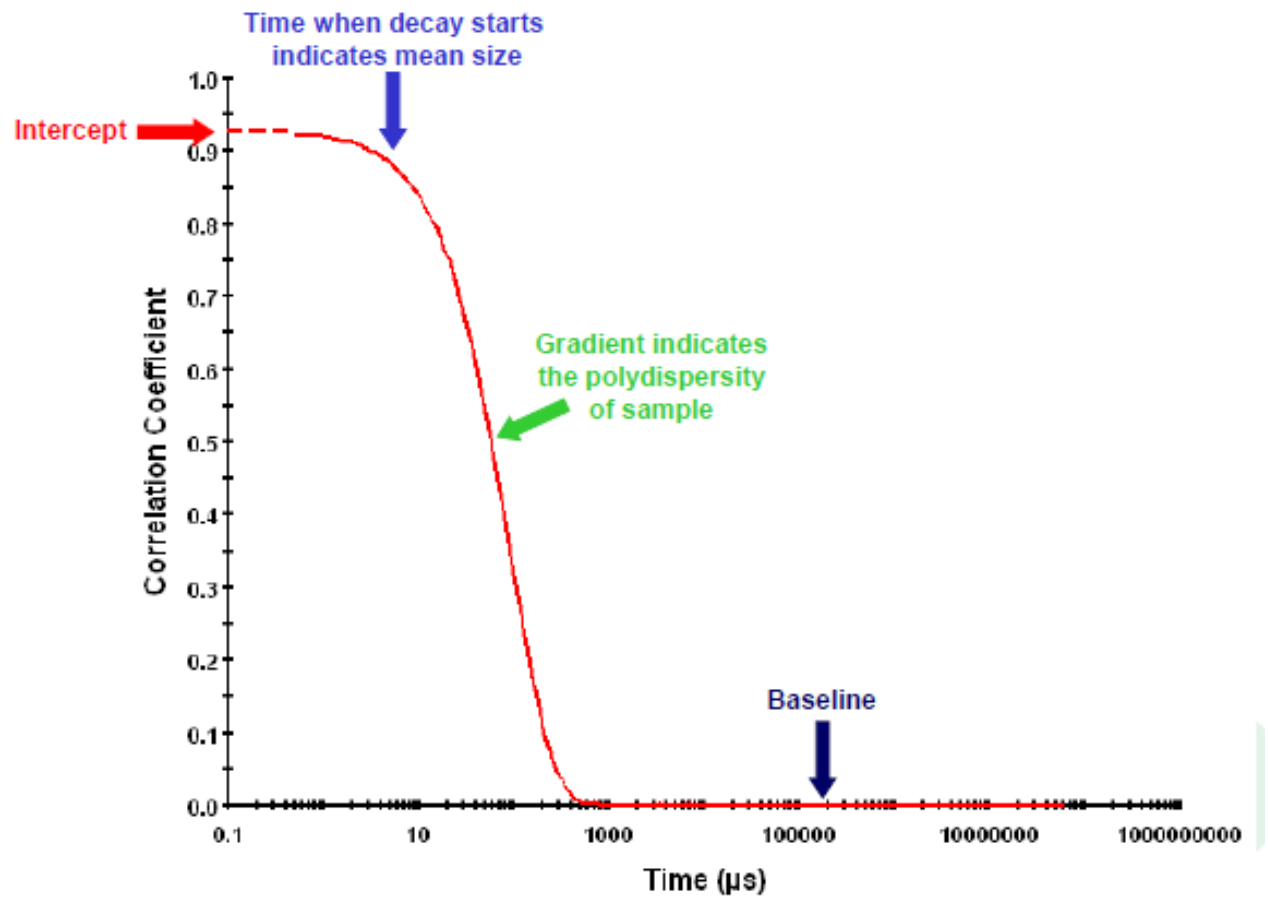
Correlate

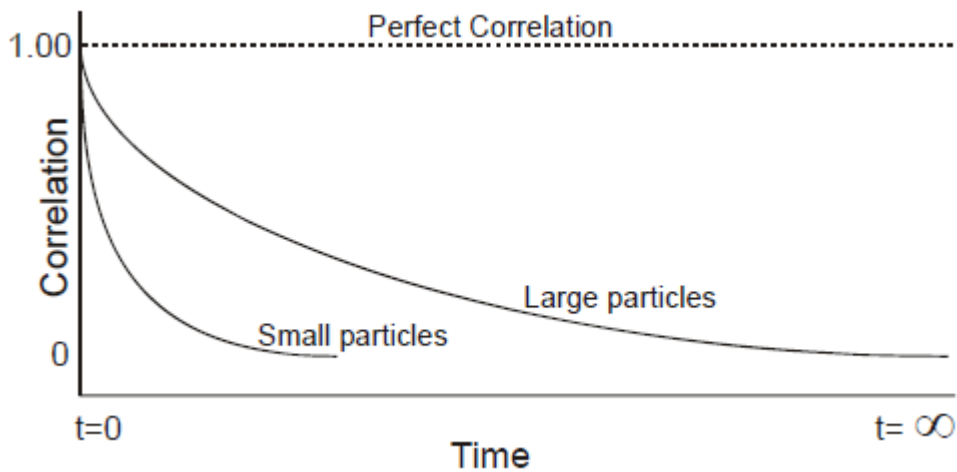


Correlate

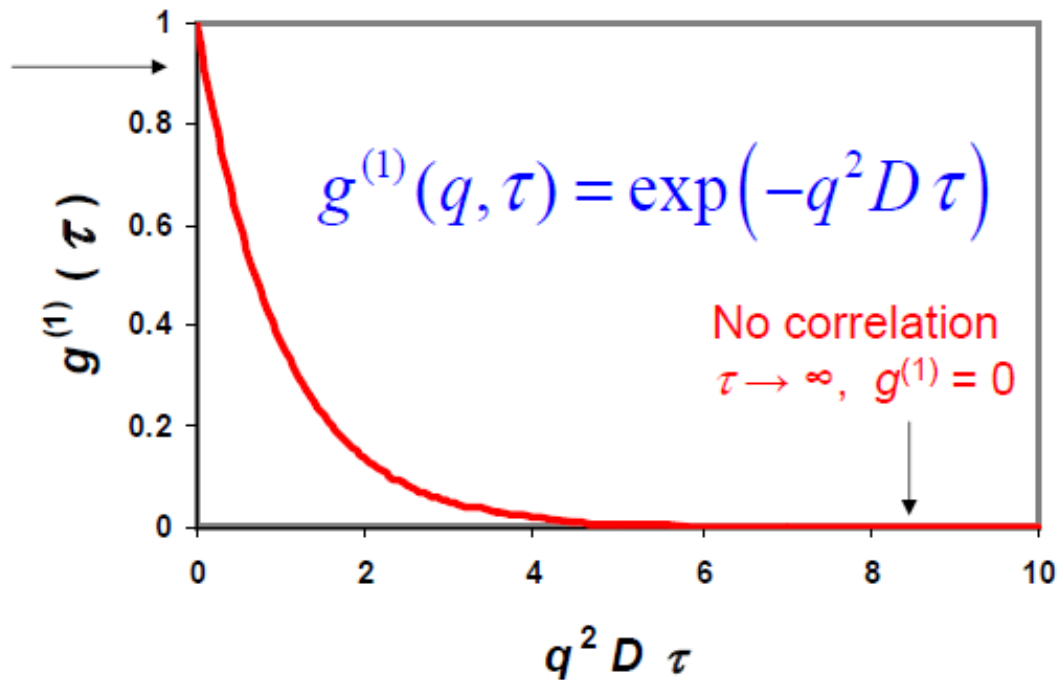


Correlation Functions



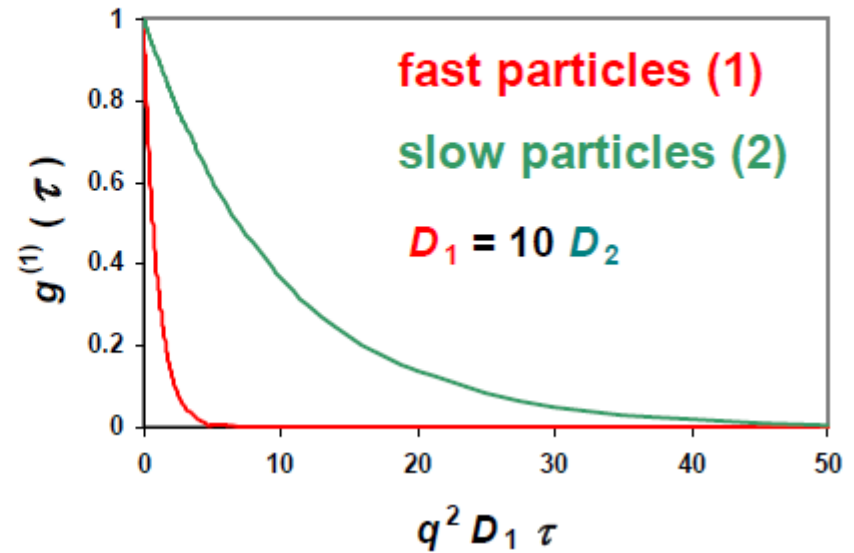


Strong correlation
 $\tau = 0, g^{(1)} = 1$

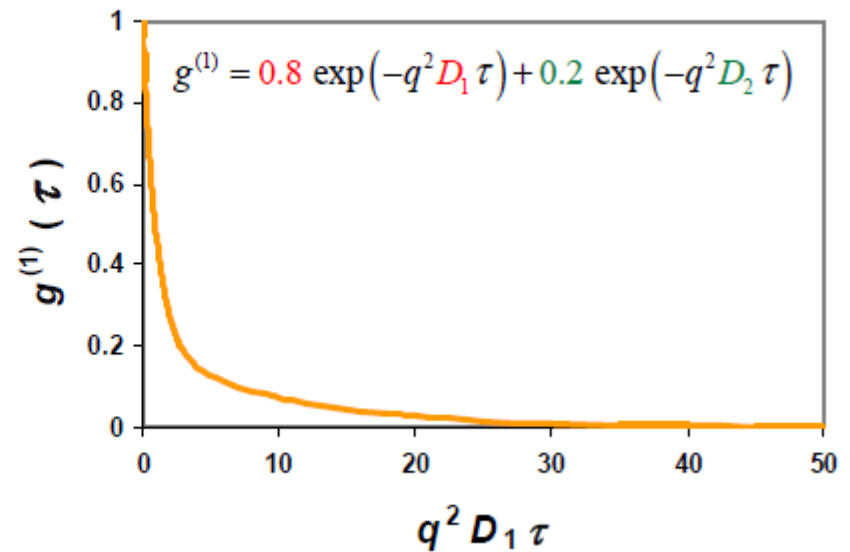


Field autocorrelation function

Particelle veloci o lente
(piccole o grandi)



Miscela di particelle veloci o lente



Se le particelle sono **grandi**, il segnale cambierà lentamente e la correlazione persisterà a lungo.

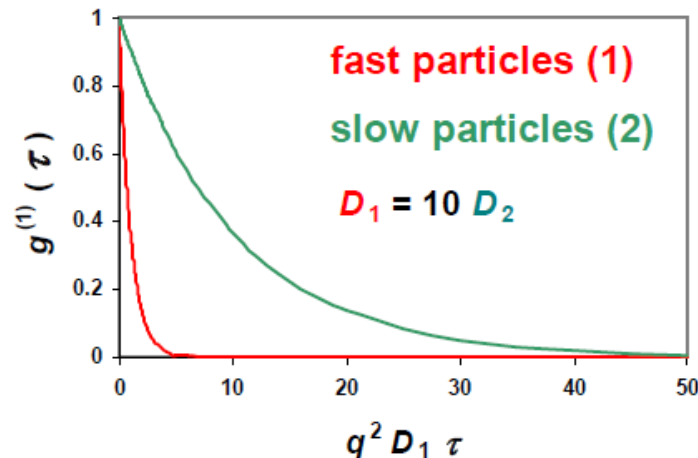
Se le particelle sono **piccole** e si muovono rapidamente, la correlazione decadrà più rapidamente.

Il momento in cui la correlazione inizia a decadere significativamente è indice della dimensione media del campione.

Più la curva è ripida, più il campione è **monodisperso**.

Al contrario, più allargata diventa la curva di decadimento, maggiore è la polidispersità del campione.

Particelle veloci o lente
(piccole o grandi)



Ottenimento delle dimensioni dalla funzione di autocorrelazione

Vengono impiegati algoritmi diversi:

- 1) fitting con una **funzione a singolo esponenziale** per ottenere il **diametro medio z** e per **stimare l'ampiezza della distribuzione** (*indice di polidispersità*) (**Cumulants analysis**)
- 2) Fitting con **una funzione multi-esponenziale** utilizzata per maggiori polidispersità (**CONTIN analysis**).

La distribuzione dimensionale ottenuta è un grafico dell'intensità relativa della luce diffuse da particelle di varie classi dimensionali ed è pertanto una distribuzione delle dimensioni legate all'intensità (**intensity size distribution**).

Algoritmo ANALISI dei CUMULANTI

La funzione di correlazione viene espansa in serie di Taylor in τ

$$\begin{aligned}\ln[g^{(1)}(q, \tau)] &= \sum_{m=1}^{\infty} \frac{k_m}{m!} (-\tau)^m \\ &= -k_1\tau + \frac{k_2}{2}\tau^2 + \dots\end{aligned}$$

che di solito viene troncata al primo termine con $\mathbf{k}_1 = \Gamma = \mathbf{D}q^2$

Algoritmo CONTIN

Un metodo alternativo per l'analisi della funzione di autocorrelazione può essere conseguito attraverso una **trasformata inversa di Laplace** (*vedi appunti*) noto come CONTIN sviluppato da Steven Provencher.

L'analisi CONTIN è ideale per **sistemi multimodali polidispersi** che non possono essere risolti con il metodo cumulante.

Nell'equazione di g_1 $g^{(1)}(q, \tau) = \int_0^\infty d\Gamma G(\Gamma) \exp(-\Gamma\tau),$

$g_1(q, t)$ è la trasformata di Laplace di $G(\Gamma)$, o in forma discreta:

$$g^{(1)}(q, \tau_m) = \sum_{n=1}^N \tilde{G}(\Gamma_n) \exp(-\Gamma_n \tau_m),$$

$$g_m = A_{m,n} \cdot x_n,$$

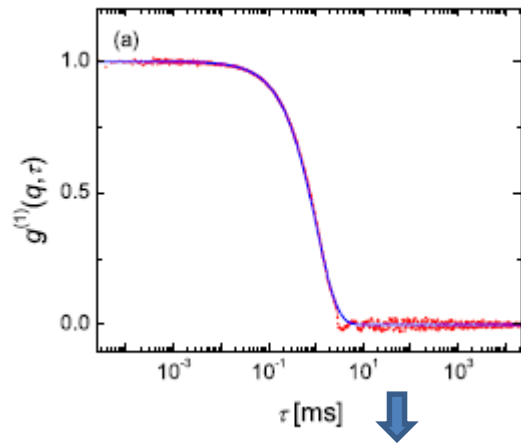
$$x_n = \tilde{G}(\Gamma_n)$$

$$A_{m,n} = \exp(-\Gamma_n \tau_m).$$

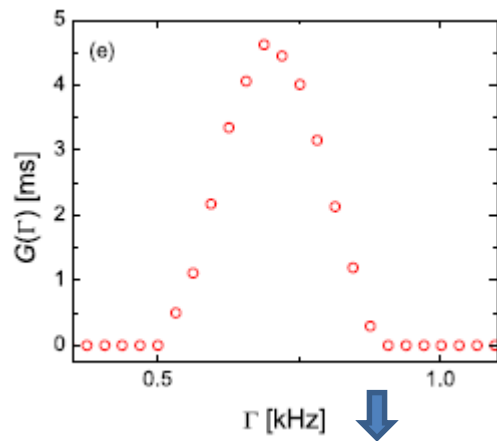
$$U = \|Ax - g\|^2.$$

Minimizzazione dell'eq
Soluzione di un sistema di eq. lineari

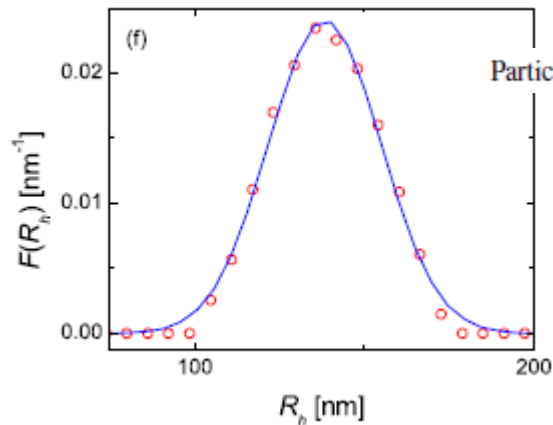
Particelle di poly-(N-isopropylacryl amide) (PNIPAM) sospese in acqua



(a) Field correlation function for sample s1 (red circles) and final CONTIN fit (solid line).



(e) Final decay rate distribution.



Particle hydrodynamic radius distribution (red circles) and a Gaussian fit to the data (blue curve); the fit yields $R_h = (138.3 \pm 0.7)$ nm, $\sigma_R = (16.6 \pm 0.3)$ nm, and $p = (12.0\% \pm 0.5\%)$.

Un modo molto semplice per spiegare la differenza tra le distribuzioni di intensità, di volume e di numero di particelle è quello di considerare 2 popolazioni di particelle sferiche di diametro 5nm e 50nm presenti in numero uguale

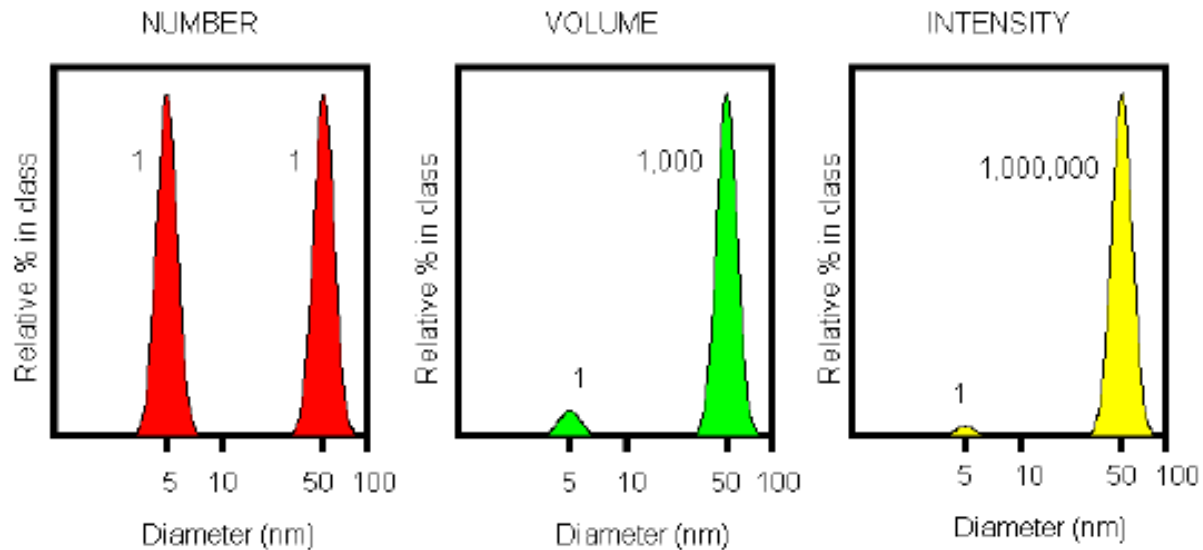


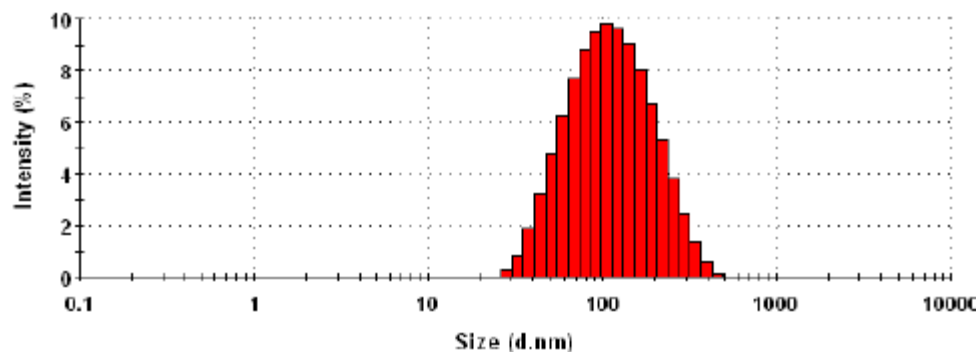
Figure 8: Number, volume and intensity distributions of a bimodal mixture of 5 and 50nm lattices present in equal numbers



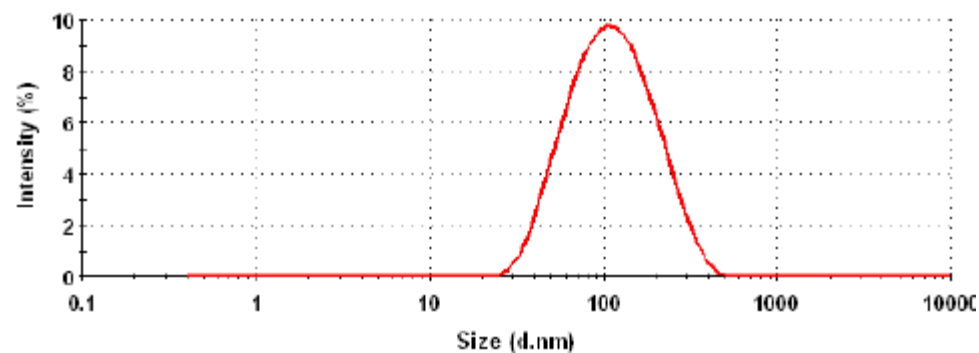
in DLS la distribuzione ottenuta da una misura è basata sulla misura di intensità !!!

Size d.nm	Intensity %	Size d.nm	Intensity %	Size d.nm	Intensity %
0.4000	0.0	13.54	0.0	458.7	5.1
0.4632	0.0	15.69	0.0	531.2	3.1
0.5365	0.0	18.17	0.0	615.1	1.4
0.6213	0.0	21.04	0.0	712.4	0.4
0.7195	0.0	24.36	0.0	825.0	0.0
0.8332	0.0	28.21	0.0	955.4	0.0
0.9649	0.0	32.67	0.0	1106	0.0
1.117	0.0	37.84	0.0	1281	0.0
1.294	0.0	43.82	0.0	1484	0.0
1.499	0.0	50.75	0.0	1718	0.0
1.736	0.0	58.77	0.0	1990	0.0
2.010	0.0	68.06	0.0	2305	0.0
2.328	0.0	78.82	0.1	2669	0.0
2.696	0.0	91.28	1.0	3091	0.0
3.122	0.0	105.7	2.7	3580	0.0
3.615	0.0	122.4	5.1	4145	0.0
4.187	0.0	141.8	7.6	4801	0.0
4.849	0.0	164.2	9.8	5560	0.0
5.615	0.0	190.1	11.4	6439	0.0
6.503	0.0	220.2	12.2	7456	0.0
7.531	0.0	255.0	12.1	8635	0.0
8.721	0.0	295.3	11.2	1.000e4	0.0
10.10	0.0	342.0	9.5		
11.70	0.0	396.1	7.4		

Size Distribution by Intensity

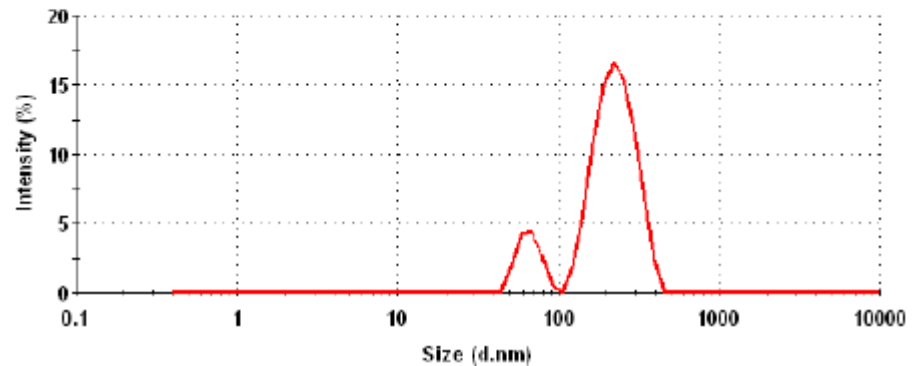


Size Distribution by Intensity



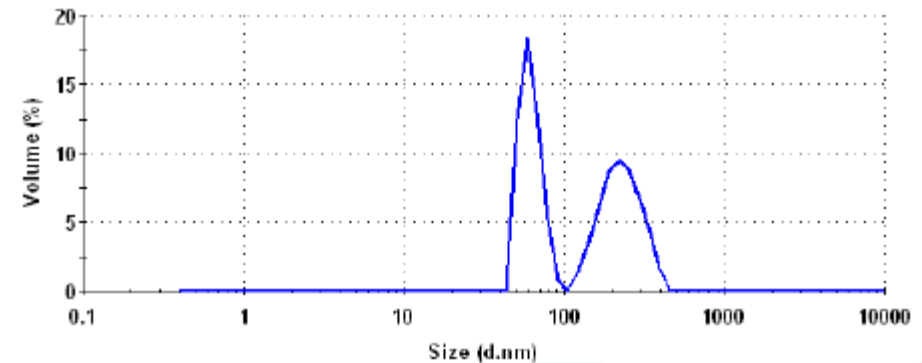
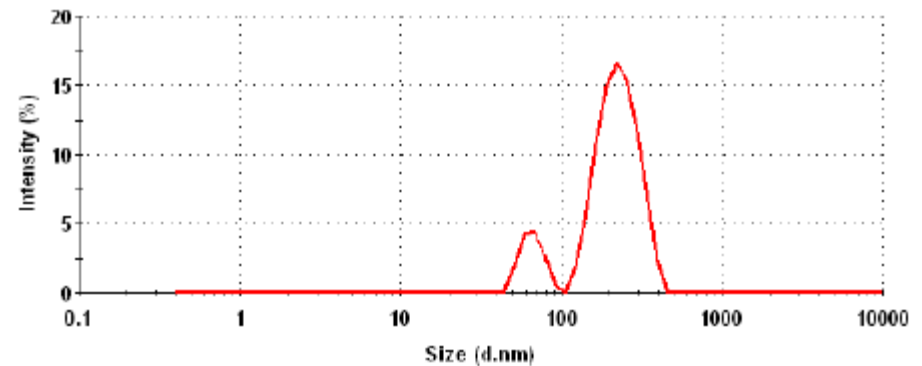
Intensity Size Distributions

- › Primary result obtained from a DLS measurement
- › Based upon the intensity of light scattered by particles
- › Sensitive to the presence of large particles/aggregates /dust
- › The only sample properties required are the dispersant viscosity and refractive index



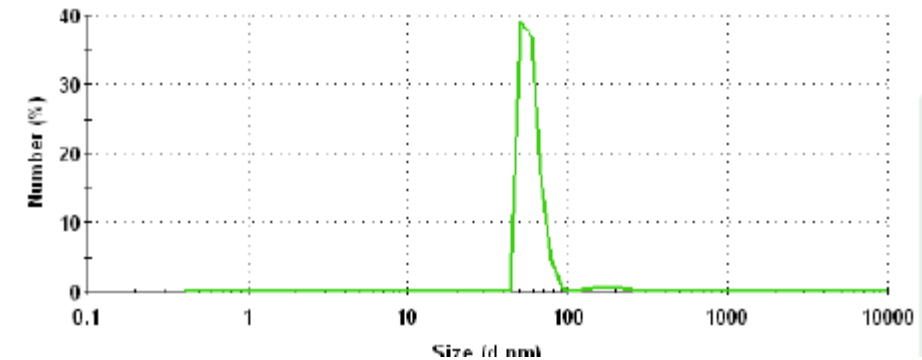
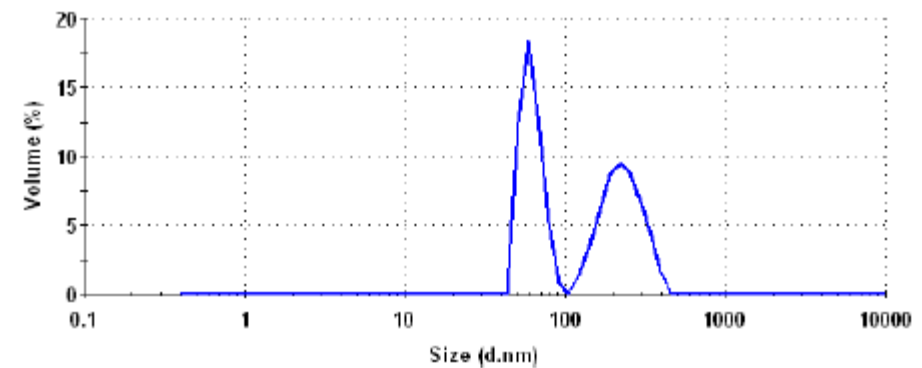
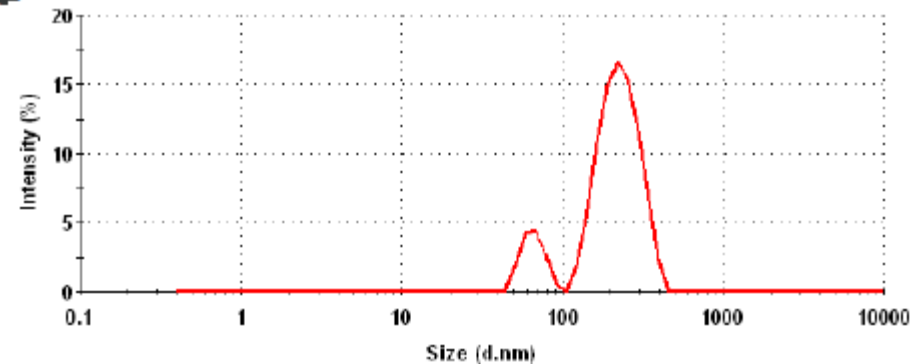
Volume Size Distributions

- Derived from the intensity distribution using Mie theory
- Equivalent to the mass or weight distribution
- The optical properties of the particles are required to make this transformation
 - Particle refractive index
 - Particle absorption



Number Size Distributions

- › Derived from the intensity distribution using Mie theory
- › The optical properties of the particles are required to make this transformation
 - Particle refractive index
 - Particle absorption



Volume/Number Distributions: Recommended Use

- › Use the **Intensity PSD** for reporting the size of each peak in the distribution
- › Use the **Volume** or **Number PSD** for reporting the relative amounts of each peak in the distribution

(Modal Size Report)

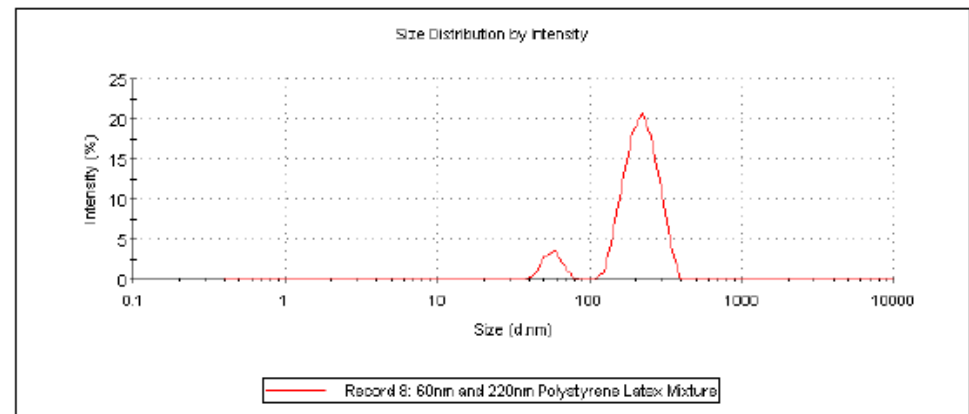
Z-Average (d.nm): 175.1

PdI: 0.191

Intercept: 0.866

Result quality: **Good**

Diam. (nm)	Width (nm)	% Intensity	Volume	Number
Peak 1: 222.8	51.67	90.8	62.3	2.0
Peak 2: 57.07	7.544	9.2	47.7	98.0
Peak 3: 0.000	0.000	0.0	0.0	0.0

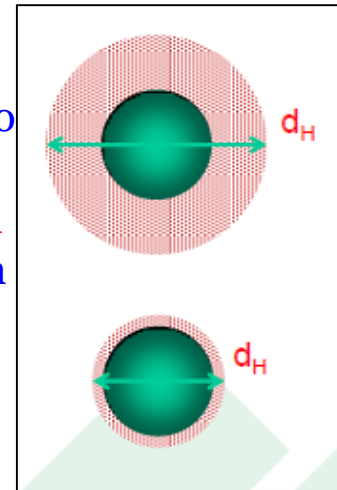


Forza ionica del mezzo

Gli ioni nel mezzo e la concentrazione ionica totale possono influenzare la velocità di diffusione delle particelle cambiando lo spessore del doppio strato elettrico chiamato *lunghezza di Debye*.

Così un mezzo a bassa conducibilità produrrà un doppio strato esteso di ioni intorno alla particella, riducendo la velocità di diffusione e determinando un diametro idrodinamico apparente più grande.

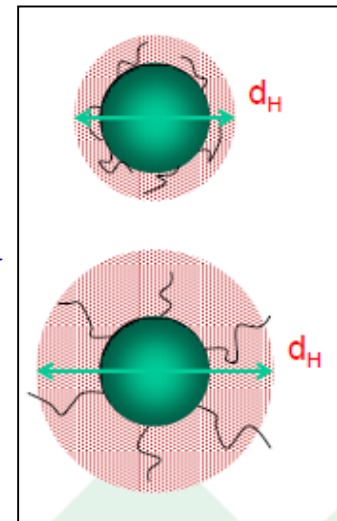
Al contrario, un mezzo a più alta conducibilità sopprimerà il doppio strato elettrico e il diametro idrodinamico



Struttura superficiale

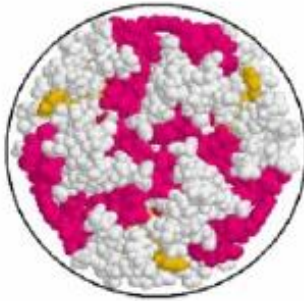
Qualsiasi cambiamento della superficie di una particella che influisce sulla velocità di diffusione cambierà corrispondentemente la dimensione *apparente* della particella.

La natura della superficie e del polimero, così come la concentrazione ionica del mezzo possono influenzare la conformazione del polimero, che a sua volta può cambiare la dimensione apparente di diversi nanometri.

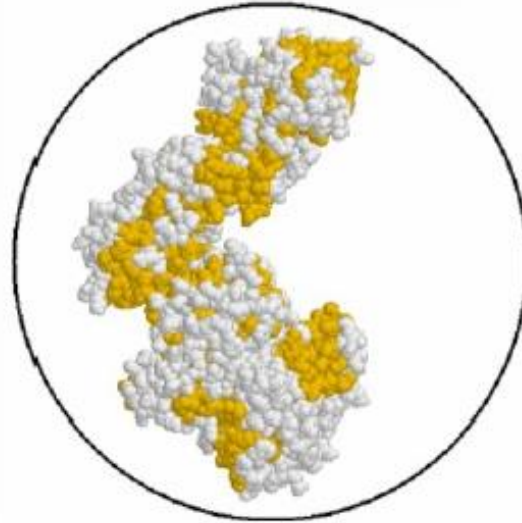


PROTEIN HYDRODYNAMIC SIZES

Hexameric Human Insulin (34.2kDa)
 $R_H = 2.7\text{nm}$



Immunoglobulin G (160kDa)
 $R_H = 7.1\text{nm}$



Hen Lysozyme (14.7kDa)
 $R_H = 1.9\text{nm}$



La conformazione delle proteine dipende molto dalla natura del mezzo solvente ed i cambiamenti conformazionali di solito influenzano la velocità di diffusione.

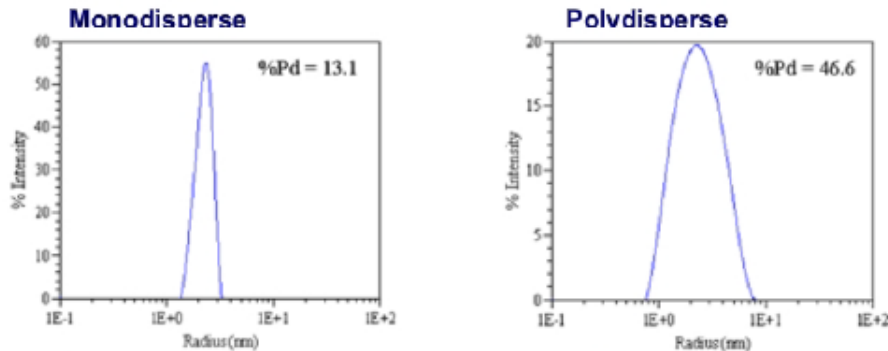
I fattori che influenzano le dimensioni idrodinamiche delle proteine sono il **peso molecolare**, **la forma della struttura** e quindi anche se la proteina è nel suo stato nativo o denaturato.

POLIDISPERSITA'

Nell'analisi dei cumulanti, si considera una singola dimensione delle particelle e si effettua un singolo fit esponenziale della funzione di autocorrelazione.

Se si assume una singola popolazione di dimensioni che segue una distribuzione Gaussiana, allora l'indice di polidispersità è legato alla deviazione standard (σ) dell'ipotetica distribuzione.

$$PdI = \frac{\sigma^2}{Z_D^2}$$



Monodisperse and polydisperse size distribution

Z_D è la dimensione media Z , la dimensione idrodinamica media ponderata ottenuta dall'analisi dei cumulanti.

È molto sensibile alla presenza di aggregati o grandi contaminanti (particelle grandi)

La polidispersità può essere definita nei seguenti termini:

- Polydispersity (**Pd**) = Deviazione Standard (σ)
- Polydispersity Index (**PdI**) = Varianza relativa (σ^2/Z_D^2 , valori tra 0 e 1)
- Valori di **PdI** > 1 indicano che la distribuzione è così polidispersa che il campione potrebbe non essere adatto alla misurazione tramite DLS

Polydispersity Index

Polydispersity Index Value	Comments
<0.05	Only normally encountered with latex standards or particles made to be monodisperse
<0.08	Nearly monodisperse sample. Normally, DLS can only give a monomodal distribution within this range
0.08 to 0.7	Mid-range value of Pdl. It is the range over which the distribution algorithms best operate over
>0.7	Indicates a very broad distribution of particle sizes

CARATTERIZZAZIONE DELLE PROTEINE UTILIZZANDO LA DIFFUSIONE DINAMICA (DLS) E STATICA (SLS) DELLA LUCE LASER

La diffusione della luce è una tecnica **non invasiva** che ha ricevuto un grande successo nell'area della formulazione e caratterizzazione delle proteine.

Le tecniche DLS e di SLS sono molto **sensibili alle variazioni di dimensione** dovute all'aggregazione delle proteine per effetto anche di lievi cambiamenti delle condizioni di soluzione.

L'odierna generazione di strumentazione DLS / SLS comprende **laser ad alta potenza, fibre ottiche, correlatori ad alta velocità e rivelatori per il conteggio dei singoli fotoni** che facilitano la misura di campioni di proteine in un intervallo di dimensioni e di concentrazione che non è mai stato possibile raggiungere prima.

La tecnica **DLS** viene utilizzata per determinare la dimensione idrodinamica R_h di una singola molecola e degli aggregati di proteine in soluzione.

Si usano metodi di analisi standard come quello della funzione a doppioposponenziale, il metodo cumulativo del secondo ordine **CONTIN** per determinare il raggio idrodinamico delle particelle

I dati DLS sono raccolti ad un angolo di diffusione fisso o variabile.

La tecnica **SLS** viene usata per determinare i M_w , A_2 ed i R_g della singola molecola e degli aggregati di proteine.

L'analisi dei dati della SLS è stata fatta usando l'equazione di Zimm:

$$\frac{KC}{\Delta I(\theta)} = \left(\frac{1}{M_w} + 2A_2C \right) \left(1 + \frac{16\pi^2 n_0^2}{3\lambda_0^2} \overline{\langle R_g^2 \rangle}_z \sin^2 \left(\frac{\theta}{2} \right) \right),$$

che mette in relazione l'eccesso di diffusione dalla soluzione di polimero $\Delta I(\theta)$ con la concentrazione del polimero C ed all'angolo di diffusione θ per determinare M_w , R_g e il secondo coefficiente viriale A_2 .

La costante K è il vettore di scattering dove n_0 è l'indice di rifrazione del solvente, λ_0 è la lunghezza d'onda della luce incidente, N_A è il numero di Avogadro, e I_0 è l'intensità della luce laser incidente.

$$K = \frac{4\pi^2 n_0^2}{\lambda_0^4 N_A} \left(\frac{dn}{dC} \right)^2 \frac{I_0 V}{r^2},$$

grafico di Zimm:

$$\frac{1}{M_w} \left(1 + \frac{16\pi^2 n_0^2}{3\lambda_0^2} \overline{\langle R_g^2 \rangle}_z \sin^2 \left(\frac{\theta}{2} \right) \right)$$

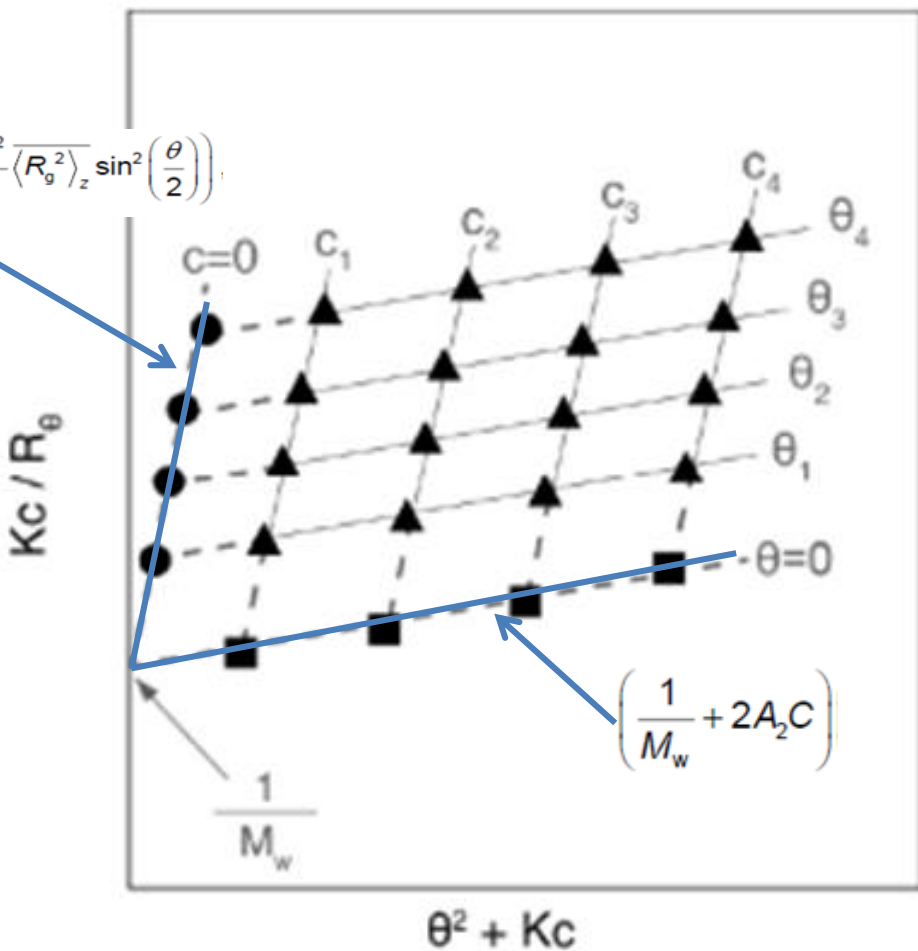
$$\frac{Kc}{\Delta I(\theta)} = \left(\frac{1}{M_w} + 2A_2C \right) \left(1 + \frac{16\pi^2 n_0^2}{3\lambda_0^2} \overline{\langle R_g^2 \rangle}_z \sin^2 \left(\frac{\theta}{2} \right) \right)$$

per $C=0$

per $\theta=0$

$$\left(\frac{1}{M_w} + 2A_2C \right)$$

$$\frac{1}{M_w} \left(1 + \frac{16\pi^2 n_0^2}{3\lambda_0^2} \overline{\langle R_g^2 \rangle}_z \sin^2 \left(\frac{\theta}{2} \right) \right)$$



The Debye plot

$$\frac{KC}{R_\theta} = \left(\frac{1}{M} + 2A_2C \right)$$

per $\theta=0$

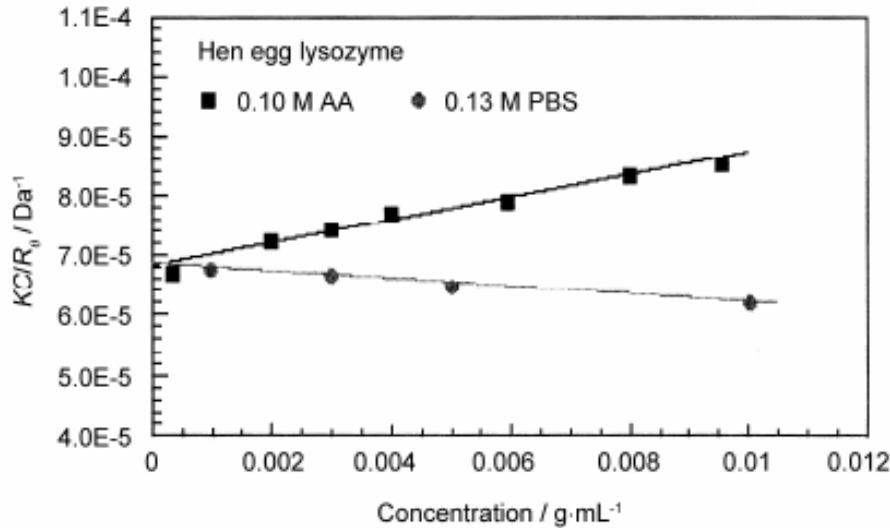


Fig. 5 Debye plots for lysozyme in 0.10 M acetic acid buffer and 0.13 M phosphate buffered saline.

a plot of KC/R_θ vs. C should be linear, with an intercept equivalent to $1/M$ and a slope that is proportional to the 2nd virial coefficient A_2 .

This type of single angle molecular weight analysis is known as a Debye plot.

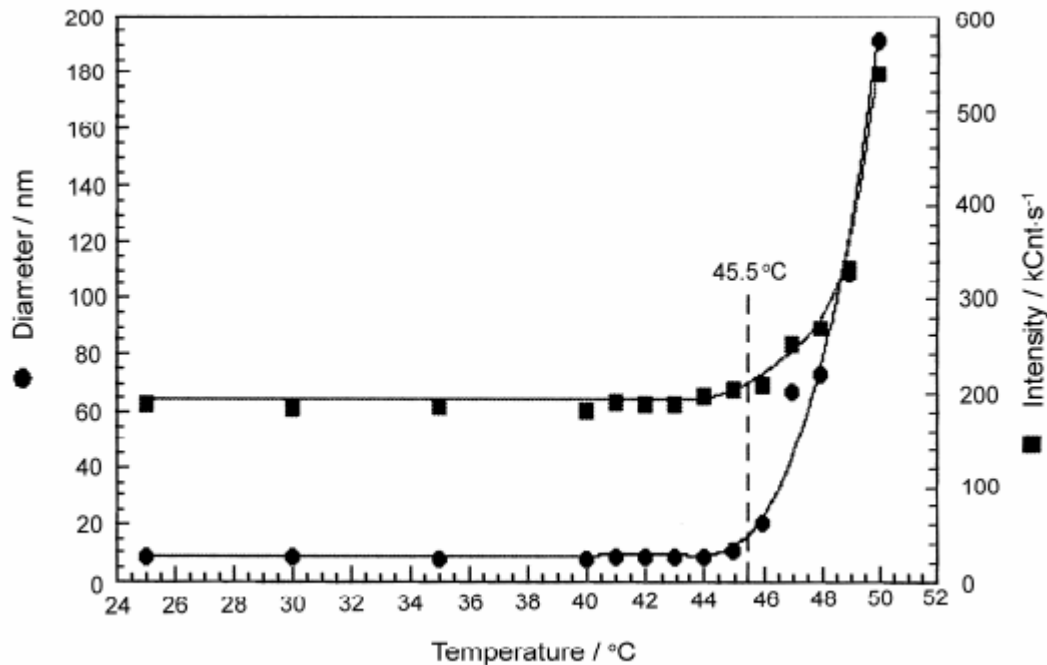
The intercepts in both plots are consistent with the known molecular weight of 14.7 kDa.

However, the 2nd virial coefficients are strongly dependent upon the type of buffer used.

Processi di denaturazione

A causa della dipendenza dal peso molecolare dell'intensità di diffusione, l'aggregazione non-specifica di proteine denaturate è facilmente monitorata con strumentazione DLS/SLS.

La Figura mostra la variazione del R_h con la temperatura per l'**emoglobina bovina** e indica chiaramente un brusco aumento sia delle dimensioni che dell'intensità di diffusione al punto di fusione di 45.5°C.



Caratterizzazione della struttura quaternaria

La precisione nelle misure di DLS è sufficiente per distinguere i cambiamenti nella struttura quaternaria.

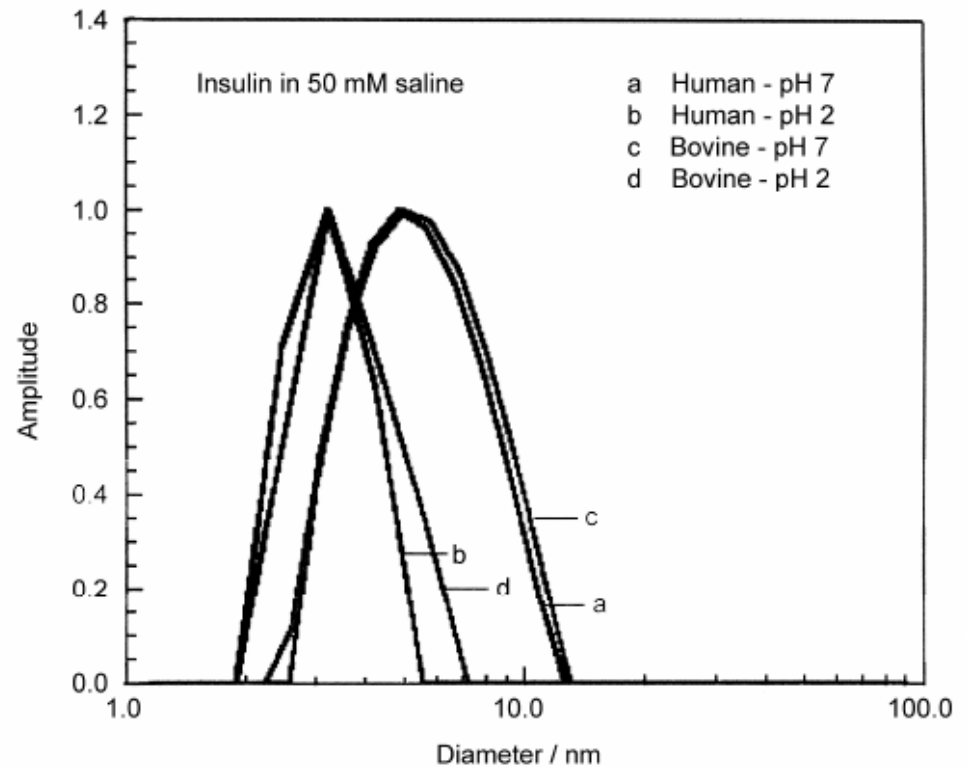
Per esempio, la Figura mostra le distribuzioni delle dimensioni misurate per l'**insulina umana e bovina** a pH 2 e pH7.

A pH 2, i diametri misurati per entrambe le proteine sono coerenti con strutture quaternarie dimeriche, dove il peso molecolare è stimato da relazioni dimensione-massa.

A pH 7, i diametri misurati sono coerenti con le forme esameriche delle proteine a pH fisiologico.

Table 1 Comparison of the pH dependent calculated and known molecular weight values for human and bovine insulin

	pH	Diam / nm	M_{Et} / kDa	M_{Known} / kDa	Form
Human	2	3.30	10.9	11.4	Dimer
	7	5.37	33.9	34.2	Hexamer
Bovine	2	3.47	12.2	-	Dimer
	7	5.33	33.4	-	Hexamer



Valutazione della forma

Nelle misure DLS la dimensione idrodinamica viene calcolata dal coefficiente di diffusione D tramite l'equazione di Stokes-Einstein dove si assume un modello di sfera rigida.

Le deviazioni dalla simmetria sferica si riflettono in un aumento della dimensione idrodinamica rispetto alla dimensione calcolata per una sfera rigida di peso molecolare noto.

Dalla teoria di Perrin, la differenza tra questi due valori, cioè la dimensione idrodinamica e la dimensione della sfera rigida, può essere usata per stimare il **rapporto assiale** per un ellissoide con le stesse proprietà diffusionali.

Esempio: Lisozima

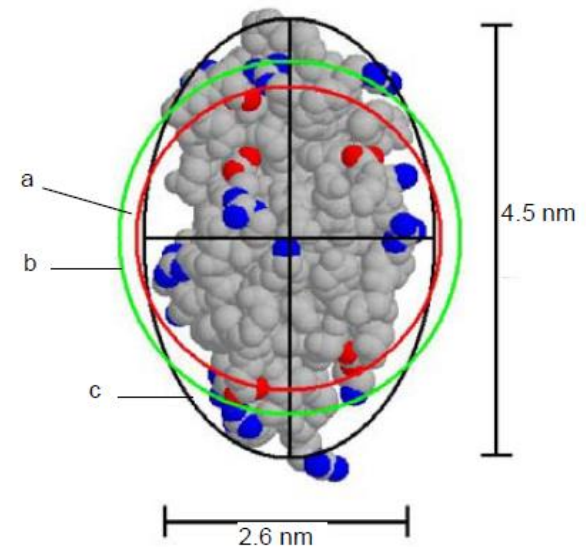
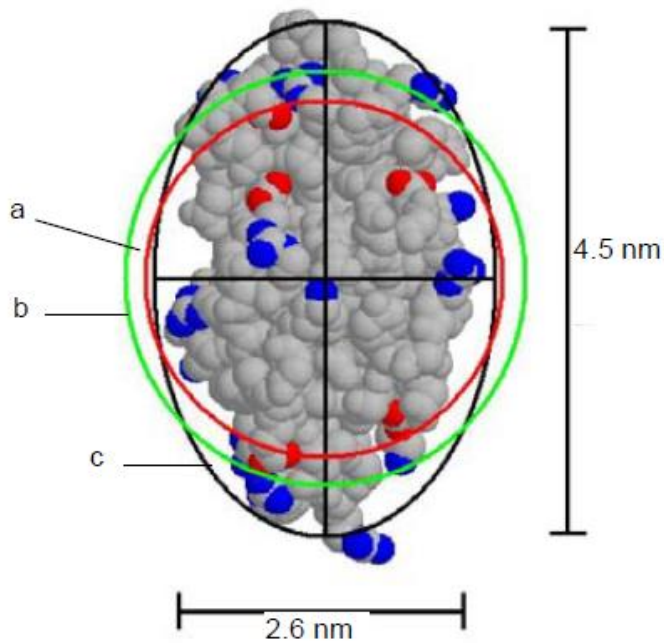


Fig. 6 Representation of lysozyme, showing the geometric axial dimensions, the hard sphere diameter (a), hydrodynamic diameter (b), and an ellipsoid with the same diffusional properties as the protein (c).



Representation of lysozyme, showing the geometric axial dimensions, the hard sphere diameter (a), hydrodynamic diameter (b), and an ellipsoid with the same diffusional properties as the protein (c).

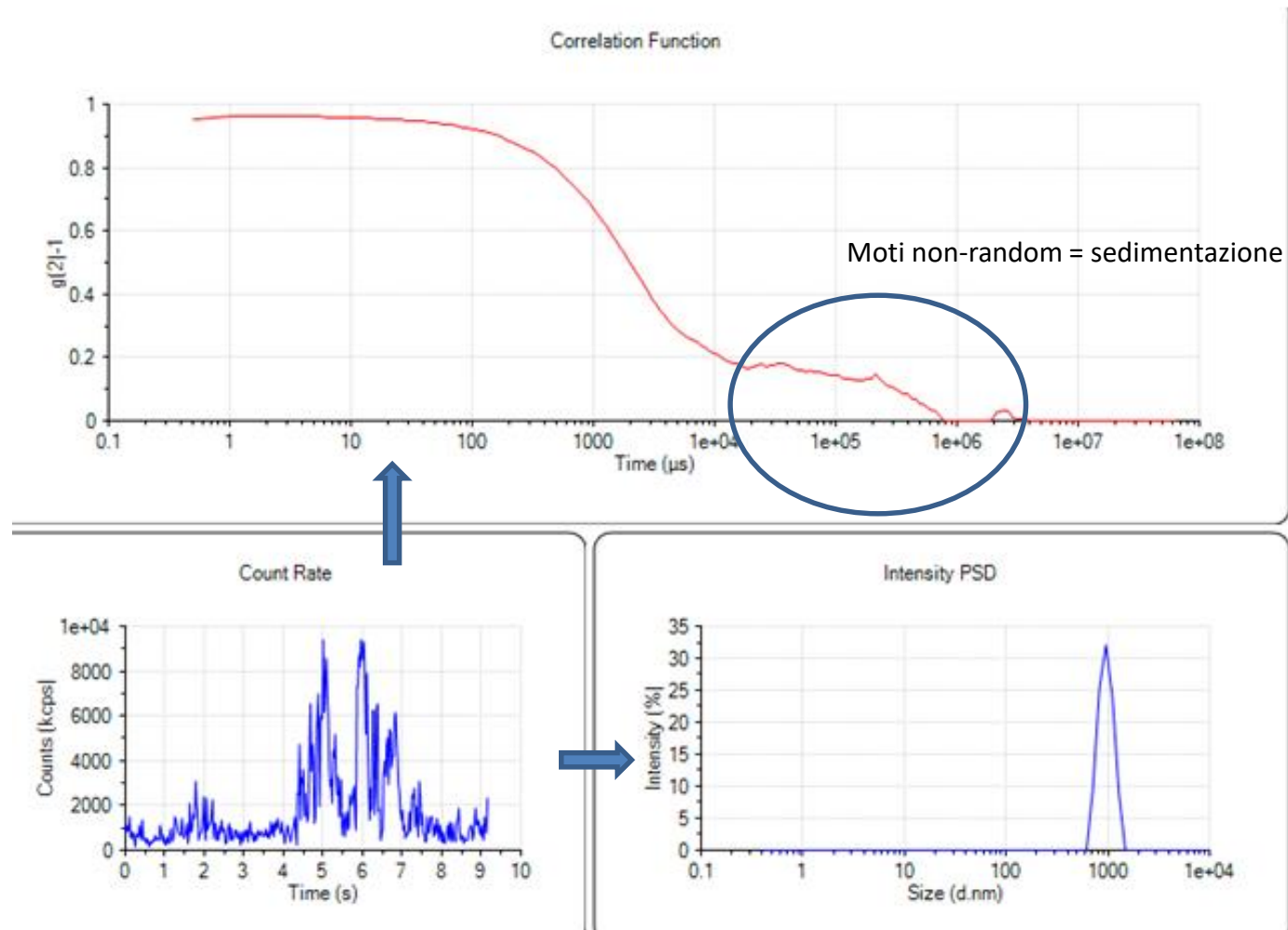
La Figura mostra una rappresentazione della struttura cristallina del lisozima e include le dimensioni geometriche assiali.

Il cerchio **a** rappresenta le dimensioni di un'ipotetica **sfera rigida** per la proteina di 14,7 kDa (volume specifico=0,73 mL.g⁻¹).

Il cerchio **b** rappresenta la dimensione idrodinamica, calcolata dal coefficiente di diffusione.

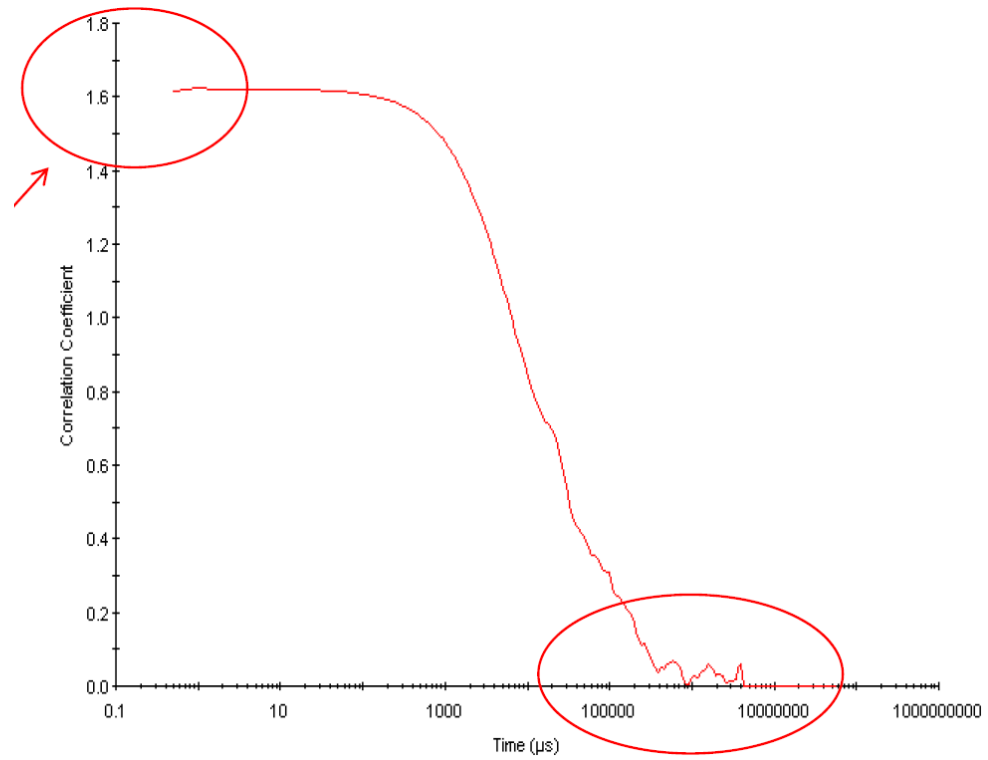
La differenza tra i valori misurati e i valori teorici è coerente con una particella ellissoidale (**c**) con un rapporto assiale di 1,73, identico al rapporto assiale determinato geometricamente.

Proteina **HELP** (Human Elastin-Like Protein)

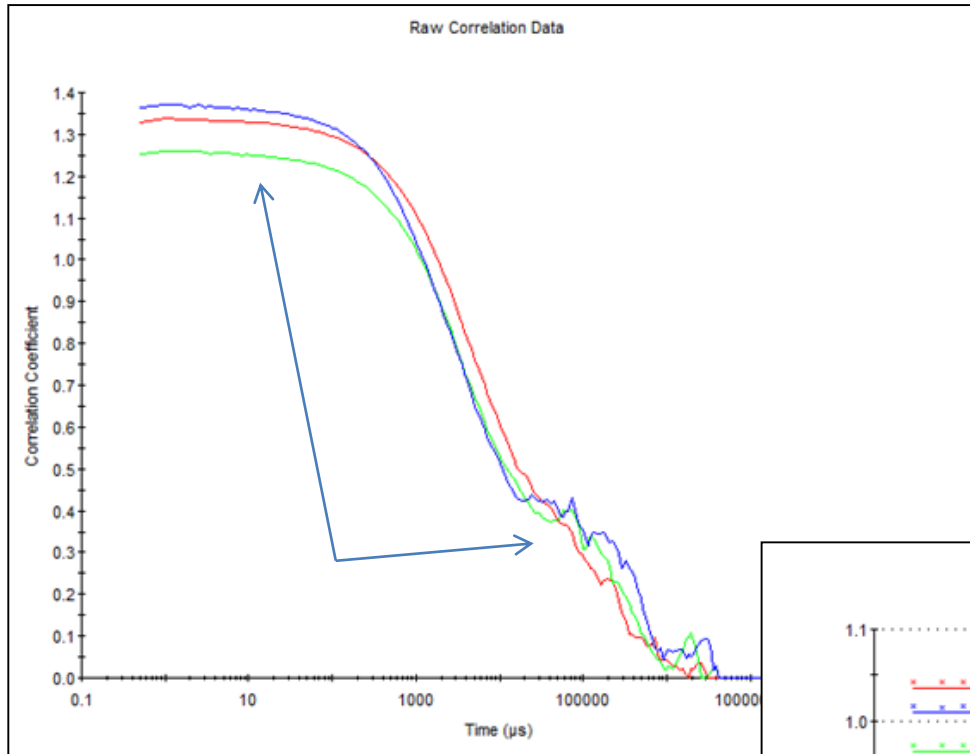


Upper Size Limit of DLS: Number Fluctuations

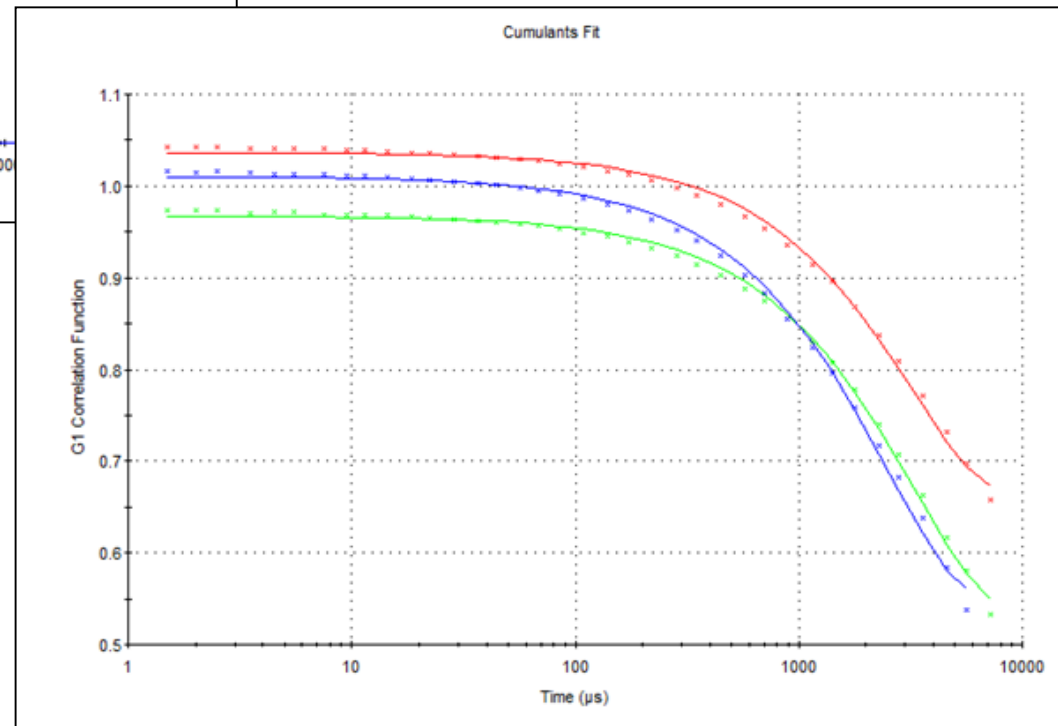
Quando le fluttuazioni sono grandi, è difficile la definizione della linea di base e può portare a valori di intercetta > 1 .



Proteina HELP (Human Elastin-Like Protein)



fitting



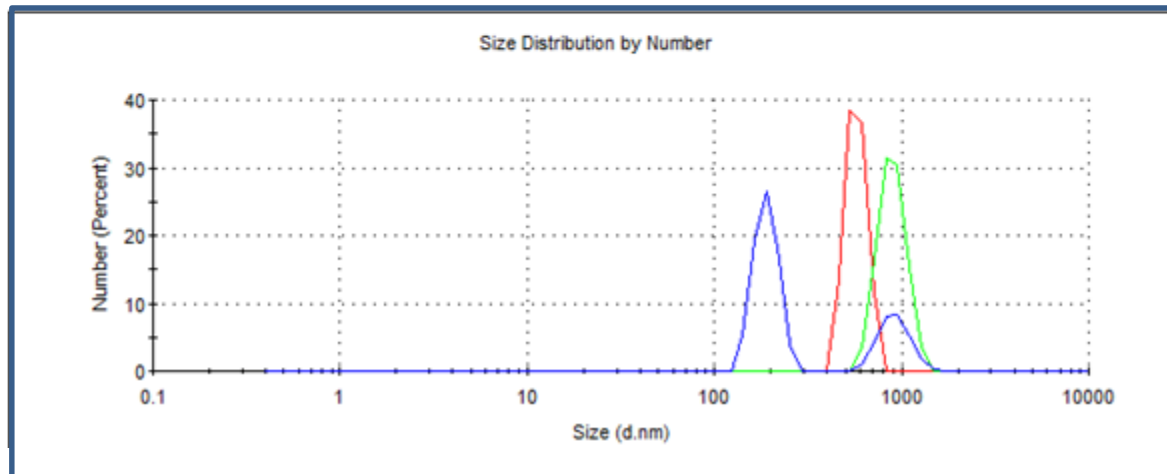
Proteina HELP (Human Elastin-Like Protein)

SOP Name: mansettings.nano
File Name: HELP_2febb21.dts
Record Number: 25
Material RI: 1,45
Material Absorbtion: 0,001
Dispersant Name: Water
Dispersant RI: 1,330
Viscosity (mPa.s): 0,8872
Measurement Date and Time: mercoledì 3 febbraio 2021 10:14

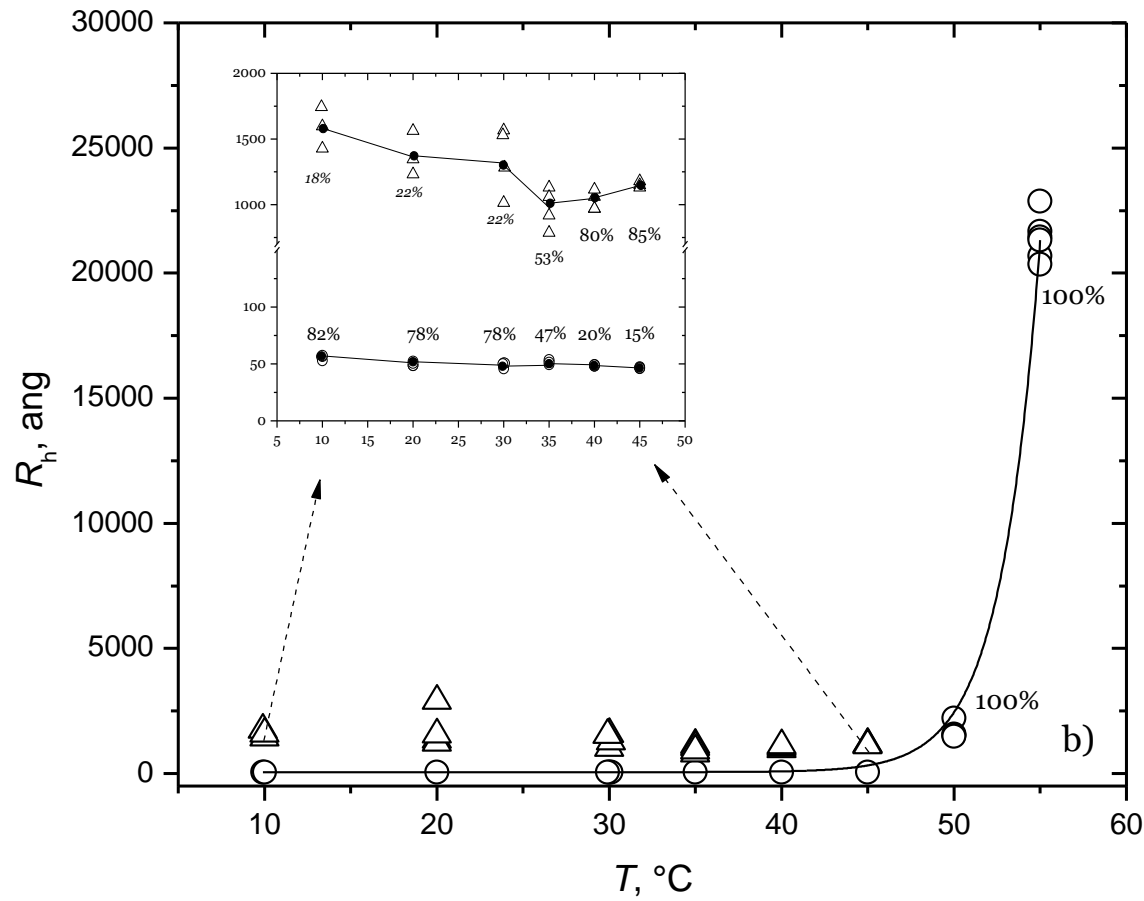
Temperature (°C): 25,0
Count Rate (kcps): 244,7
Cell Description: Low volume glass cuvette (45µL)
Duration Used (s): 30
Measurement Position (mm): 4,20
Attenuator: 11

	Size (d.nm):	% Number:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 1795	Peak 1: 926,4	28,7	172,5
Pdl: 0,844	Peak 2: 190,2	71,3	28,20
Intercept: 1,02	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

Result quality : **Refer to quality report**

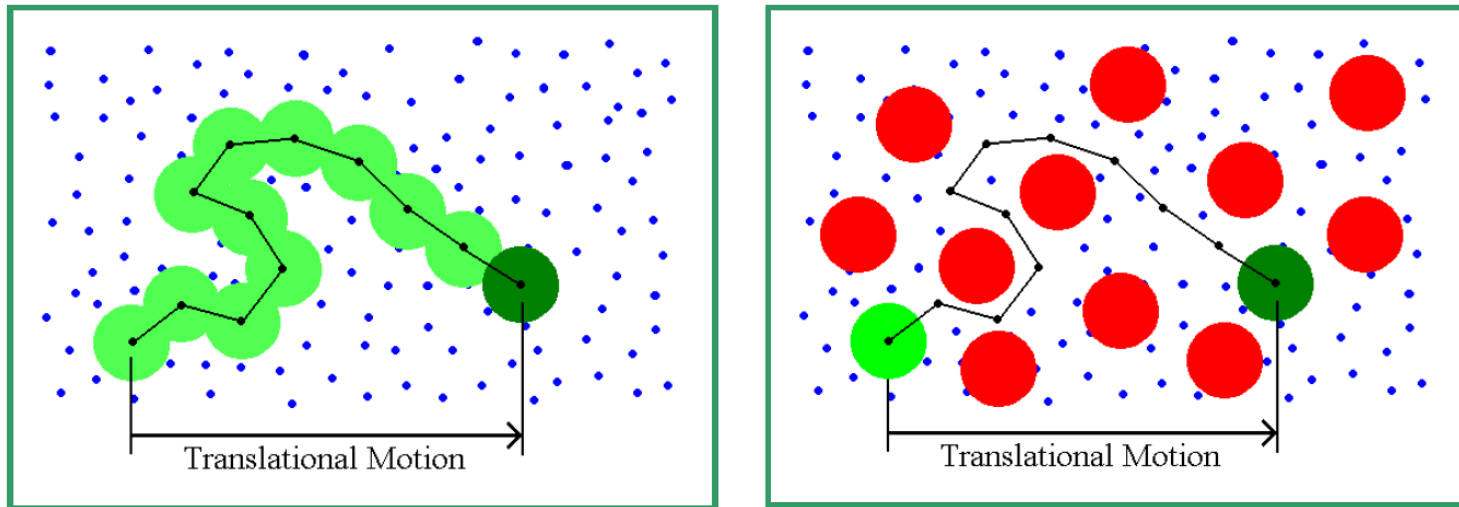


Proteina HELP (Human Elastin-Like Protein)



Limite superiore di concentrazione: Diffusione limitata

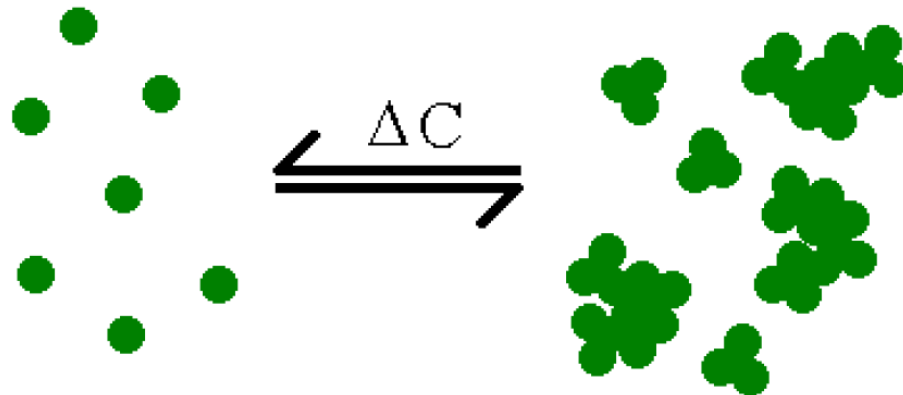
La diffusione limitata descrive il fenomeno in cui la presenza di altre particelle ostacola la diffusione delle particelle libere



Stessa distanza --- tempi più lunghi

Limite superiore di concentrazione: interazioni tra particelle

A concentrazioni più elevate, le interazioni tra particelle possono modificare la diffusione libera delle particelle e questo può portare ad **un'aggregazione non specifica** che modifica la distribuzione delle dimensioni ottenute



Zimm plot dinamico

Es: lisozima

$$D_{\text{ap}} = \frac{\Gamma_{\text{ap}}}{q^2}$$

I coefficienti di diffusione sono messi in grafico in funzione della concentrazione e dell'angolo ($q^2 + kc_p$).

A concentrazione proteica costante, i simboli aperti rappresentano il coefficiente di diffusione estrapolato ad angolo zero.

Ad angolo costante, i simboli aperti rappresentano il coefficiente di diffusione estrapolato a concentrazione proteica zero.

Le due linee estrapolate si intersecano in un punto D_o , che rappresenta il coefficiente di diffusione di una molecola di lisozima in una soluzione proteica infinitamente diluita.

$$D_{\text{ap}}^{\circ} = D_o(1 + \lambda\phi + O(\phi^2))$$

λ =parametro di interazione

Un coefficiente «apparente» di diffusione è qui usato poiché Γ_{ap} è una media ottenuta da intensità misurate di tutte le specie (monomeri, dimeri, ecc.) nella soluzione acquosa della proteina.

J. Phys. Chem. B, Vol. 104, No. 15, 2000 3647

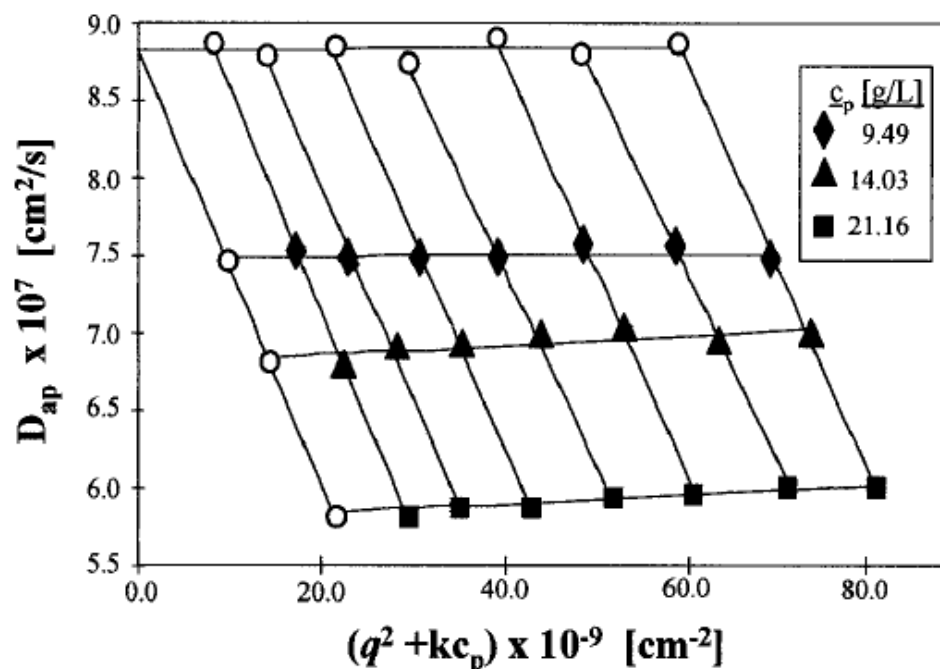


Figure 1. Zimm plot. Dependence of the apparent diffusion coefficient of lysozyme on protein concentration and scattering angle for a MgCl_2 solution at IS 0.80 M, pH 4.0, and 10 °C.

Zetasizer Nano ZS

Lo Zetasizer Nano ZS, come mostrato in Figura, misura la dimensione delle particelle, il potenziale zeta e il peso molecolare.



Fig. 7 Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments Ltd

Malvern Instruments Ltd.
 Zetasizer Nano ZS brochure.
<http://www.Malvern.co.uk>

Table 2 Specifications of Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments Ltd.	
Size, zeta potential and molecular weight, measurement of particles, emulsions and molecules	
<u>Size measurement</u>	
Size range	0.6 nm~6 microns*
Minimum sample volume	12 microlitres
Concentration range	0.1 mg·mL ⁻¹ lysozyme to 40% W/V*
<u>Zeta potential measurement</u>	
Minimum sample volume	0.75 mL
Maximum sample conductivity	200 mS
<u>M_w measurement</u>	
Molecular weight range	1×10 ³ to 2×10 ⁷ Da*
Minimum sample volume	20 microlitres
Minimum sample volume for automated measurement using MPT-2 autotitrator	3 mL
<u>Automated trend measurement</u>	
Standard software	Time and temperature
Using optional MPT-2 autotitrator	pH, conductivity or additive
<u>General specifications</u>	
Temperature control	2°C to 90°C
Condensation control	Purge facility using dry air/nitrogen
Laser	4 mW He-Ne, 633 nm
Product laser class	Class 1 compliant, EN 60825-1:2001 and CDRH
Size	320 mm, 600 mm, 260 mm (W,D,H)
Weight	18 kg

La tecnica DLS ha una serie di vantaggi rispetto ad altri metodi.

E' possibile condurre esperimenti con:

- un'ampia gamma di tamponi
- in un largo intervallo di temperature e concentrazioni.
- è anche una tecnica non invasiva che richiede basse quantità di campione e fornisce stime affidabili della qualità dei preparati

La **verifica dell'omogeneità** delle preparazioni di biopolimeri che è necessaria per varie applicazioni.

La **verifica dell'omogeneità** delle preparazioni di biopolimeri che è necessaria per varie applicazioni.

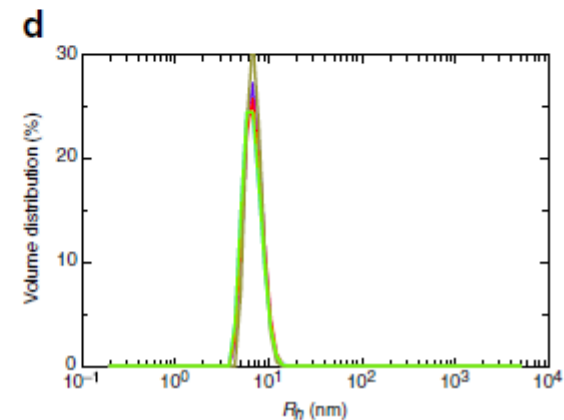
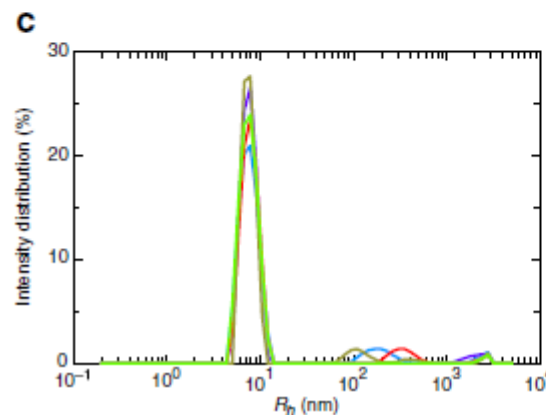
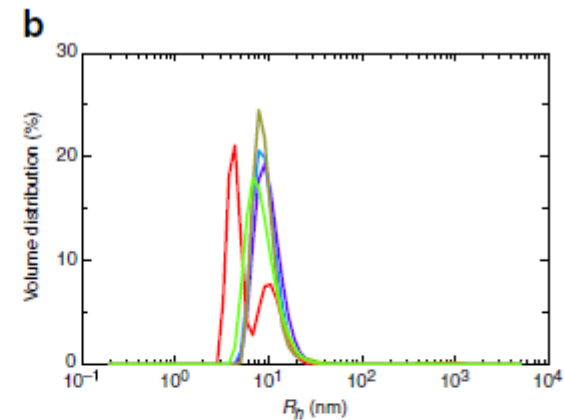
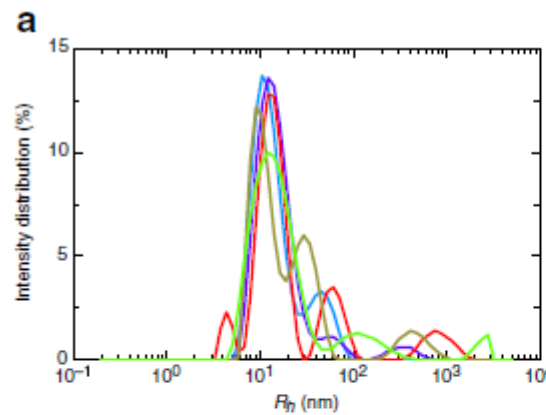
Prendiamo come **esempio** lo studio di una proteina multi-dominio della matrice extracellulare (ECM), **nidogen-1 (ND-1)**

ND-1 (139 kDa) è una proteina chiave della membrana che interagisce principalmente con altre proteine ECM come la laminina, la fibulina e la fibronectina

È un sistema molto difficile da studiare, poiché può subire degradazione proteolitica ed anche formare aggregati.

Per studiare la sua struttura è richiesta una preparazione omogenea **priva di degradazione e aggregazione**.

Prove iniziali hanno prodotto preparati eterogenei come mostrato in Fig. 1a e b; tuttavia, si sono ottenute successive preparazioni senza degradazioni significative e con meno del 5% di PM alti come rilevato dalle intensità (Fig. 1c ed 1d).



Potenziale zeta

Negli ultimi decenni le misure del potenziale zeta sono diventate un importante metodo di caratterizzazione della **funzionalità superficiale** o della **stabilità** delle particelle disperse.

L'obiettivo principale dell'analisi del potenziale zeta è ottenere informazioni sulla **carica superficiale** di un materiale. Il materiale può variare da nanoparticelle colloidali fino a superfici macroscopiche come membrane.

Cos'è il potenziale zeta?

Il potenziale zeta (noto anche come potenziale elettrocinetico) si stabilisce sulla superficie di qualsiasi materiale quando entra in contatto con un mezzo liquido. **È quindi una proprietà interfacciale.** È dato in millivolt.

Quando un materiale entra in contatto con un liquido, i gruppi funzionali sulla sua superficie reagiscono con il mezzo circostante. Questo processo determina una carica superficiale che attira ioni di carica opposta. Questi contro-ioni si dispongono spontaneamente in un cosiddetto **doppio strato elettrochimico.**

Il potenziale zeta è determinato dalla somma della carica superficiale iniziale e del doppio strato.

Il potenziale Zeta e il doppio strato elettrico

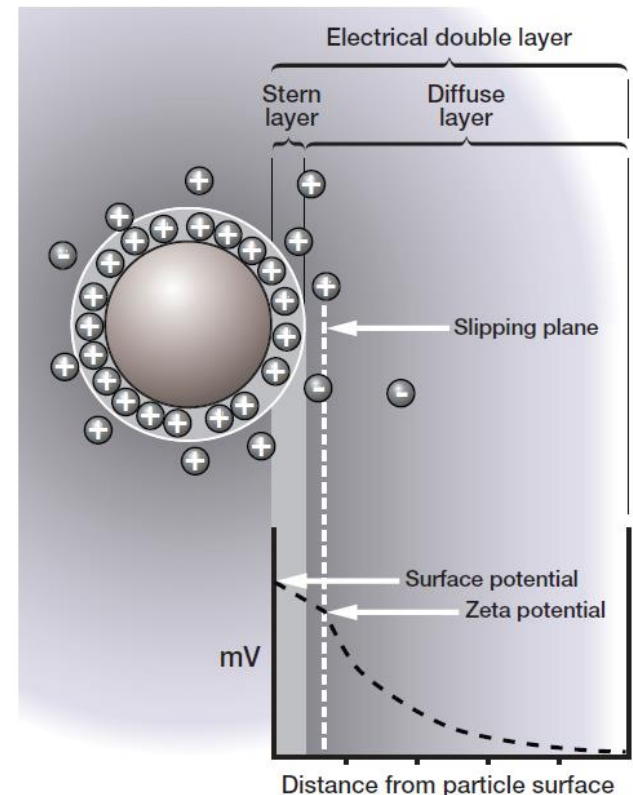
Lo sviluppo di una carica netta sulla superficie delle particelle influenza la distribuzione degli ioni nella regione interfacciale circostante, con conseguente aumento della concentrazione di contro-ioni (ioni di carica opposta a quella della particella) vicino alla superficie.

Lo strato liquido che circonda la particella esiste in due parti: una regione interna, chiamata **strato di Stern**, dove gli ioni sono fortemente legati e una regione esterna, (**strato diffusivo**) dove sono meno saldamente legati;

Quindi esiste un **doppio strato elettrico** intorno ad ogni particella. All'interno dello strato diffusivo c'è un confine fittizio all'interno del quale gli ioni e le particelle formano un'entità stabile.

Quando una particella si muove, ioni all'interno del doppio strato si muovono con esso. Questo confine è chiamato **slipping plane**.

Il potenziale è noto come **potenziale Zeta**



Cos'è il potenziale zeta?

- Il potenziale zeta è presente solo se **un materiale viene a contatto con un liquido**. Rappresenta la carica netta effettiva in questa condizione.
- il potenziale zeta può essere **misurato su superfici macroscopiche** (ad esempio membrane, polimeri...) così come su **particelle disperse in un liquido** (ad esempio colloidi, nanoparticelle, liposomi). Entrambi sono considerati "materiale".
- **Le proprietà del mezzo liquido** giocano un ruolo importante nella formazione del potenziale zeta, che dipende fortemente dal valore del pH o dalla concentrazione del tampone.
- Una carica superficiale può essere osservata per i materiali solidi (**interfaccia solido-liquido**) così come per le gocce liquide (**interfaccia liquido-liquido**).

Perché il potenziale zeta è importante

- La misurazione del potenziale zeta fornisce informazioni sulla **funzionalità della superficie**, la **stabilità** delle particelle disperse e **l'interazione** dei composti disciolti con la superficie solida.
- Il **potenziale zeta delle superfici macroscopiche** è quindi importante per comprendere il comportamento dei materiali solidi in molti processi in cui i sistemi acquosi giocano un ruolo importante, ad esempio le membrane per il trattamento delle acque, i biomateriali a contatto con il sangue, o la lavorazione umida dei wafer di semiconduttori.
- La conoscenza del potenziale zeta di un materiale aiuta a **ottimizzare specifici processi di modifica della superficie** affinché un materiale funzioni al meglio quando viene utilizzato.
- Il potenziale zeta delle particelle è un indicatore chiave della **stabilità di una dispersione colloidale**, come le nanoparticelle o i liposomi, poiché riflette la capacità delle particelle di respingersi elettrostaticamente. Empiricamente, si ritiene che valori assoluti di potenziale zeta **superiori a ± 30 mV** siano indicativi di dispersioni stabili.
- Solo la grandezza del potenziale zeta indica la stabilità del campione, mentre il segno del potenziale zeta mostra se le cariche positive o negative sono dominanti sulla superficie.
- **Al di sotto di ± 30 mV** sono più probabili processi come l'aggregazione, la sedimentazione e/o la flocculazione.

Potenziale zeta e pH

Il fattore più importante che influenza il potenziale zeta è il **pH**.

Un valore di potenziale zeta da solo senza la specificazione del pH è un numero virtualmente privo di significato.

Consideriamo una particella in sospensione con un potenziale zeta negativo.

Se viene aggiunta una base a questa sospensione, le particelle tenderanno ad acquisire una carica più negativa.

Se a questa sospensione viene poi aggiunto dell'acido, si raggiungerà un punto in cui la carica negativa viene neutralizzata.

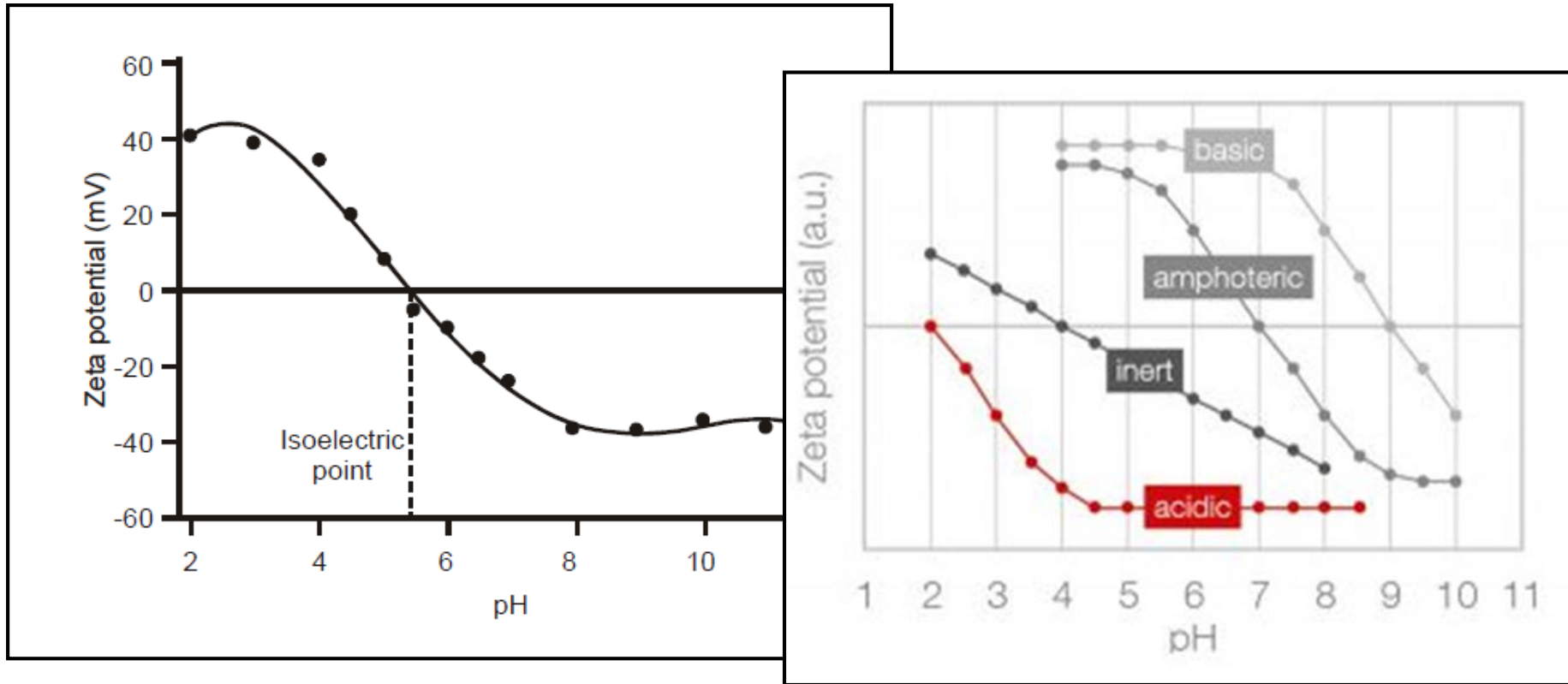
Qualsiasi ulteriore aggiunta di acido può causare un accumulo di carica positiva.

Pertanto, una curva del potenziale zeta rispetto al pH sarà positiva a basso pH e più bassa o negativa a pH più alto.

Il punto in cui il potenziale zeta è zero è chiamato **punto isoelettrico** ed è molto importante in termini pratici: è il punto dove il sistema colloidale è **meno stabile**.

Potenziale Zeta e pH

Un tipico grafico del potenziale zeta in funzione del pH è mostrato qui sotto.



Un'importante conseguenza dell'esistenza di cariche elettriche sulla superficie delle particelle è che esse mostreranno **moti indotti** sotto l'influenza di un campo elettrico applicato (elettroforesi, elettroosmosi).

Questi effetti sono definiti in generale come **effetti elettrocinetici**.

Il valore di pH al quale il potenziale zeta è 0 mV è conosciuto come il punto isoelettrico.

E' usato come indicatore per la **chimica delle superficie** ed è usato per la caratterizzazione di proteine e peptidi per lo sviluppo di nuove formulazioni farmaceutiche.

Il potenziale zeta è sensibile allo strato superficiale più esterno del materiale. È quindi perfettamente adatto per monitorare **i cambiamenti nella carica superficiale durante l'adsorbimento di sostanze disciolte in soluzione.**

La conoscenza della carica superficiale e dei suoi cambiamenti dovuti **all'adsorbimento** della superficie liquido-solido è importante per ottimizzare le proprietà del materiale ed i processi.

Possono essere studiati i cambiamenti delle proprietà superficiali dovuti al trattamento chimico, allo stoccaggio, all'invecchiamento o all'usura durante l'uso.

Lo strumento DLS calcola il potenziale zeta misurando la **mobilità elettroforetica** e applicando poi **l'equazione di Henry**.

La mobilità elettroforetica si ottiene eseguendo un esperimento di elettroforesi sul campione e **misurando la velocità delle particelle**.

Quando viene applicato un campo elettrico in una cella elettrolitica, le particelle cariche sospese nell'elettrolita sono attratte verso l'elettrodo di carica opposta.

Forze viscosse che agiscono sulle particelle tendono ad opporsi a questo movimento.

Quando si raggiunge l'equilibrio tra queste due forze opposte, le particelle si muovono con velocità costante.

La velocità della particella dipende dai seguenti fattori:

- Forza del campo elettrico o gradiente del campo
- La costante dielettrica del mezzo.
- La viscosità del mezzo.
- Il potenziale zeta.

La velocità di una particella in un campo elettrico è definita dalla sua **mobilità elettroforetica**.

Con questi parametri possiamo ottenere il **potenziale zeta** della particella dall'**equazione di Henry**:

$$\mu_E = \frac{2\varepsilon z f(ka)}{3\eta}$$

- z** : potenziale Zeta.
- μ_E** : Mobilità elettroforetica.
- ε** : Costante dielettrica.
- η** : Viscosità.
- $f(Ka)$** : Funzione di Henry.

Due sono i valori generalmente usati come approssimazione per la **$f(Ka)$** , ossia **1.5** oppure **1.0**.

Le determinazioni elettroforetiche del potenziale zeta sono comunemente fatte in mezzi acquosi ed a concentrazione elettrolitica moderata.

$f(Ka)$ in questo caso è **1.5** (**approssimazione di Smoluchowski**).

Pertanto il calcolo del potenziale zeta dalla mobilità è semplice per i sistemi che seguono il modello di Smoluchowski, cioè particelle più grandi di circa **0.2 micron** disperse in elettroliti contenenti più di **10^{-3} M** in sali.

Misurare la mobilità elettroforetica

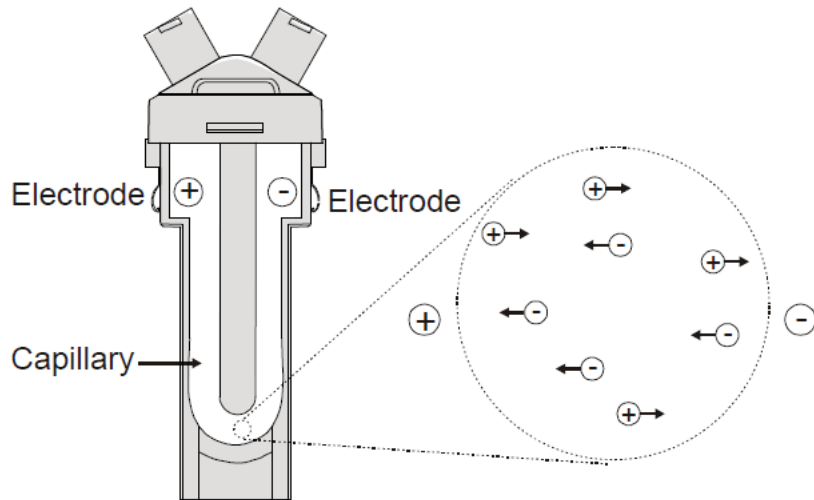
Determiniamo la mobilità elettroforetica direttamente con la conversione in potenziale zeta.

Come viene misurata la mobilità elettroforetica?

Viene utilizzato un classico sistema di **microelettroforesi**, una cella con elettrodi alle due estremità a cui viene applicato un potenziale.

Le particelle si muovono verso l'elettrodo di carica opposta e la loro velocità viene misurata ed espressa in unità di intensità di campo come la loro mobilità.

La tecnica utilizzata per misurare questa velocità è la **Velocimetria Laser Doppler (LDV)**.

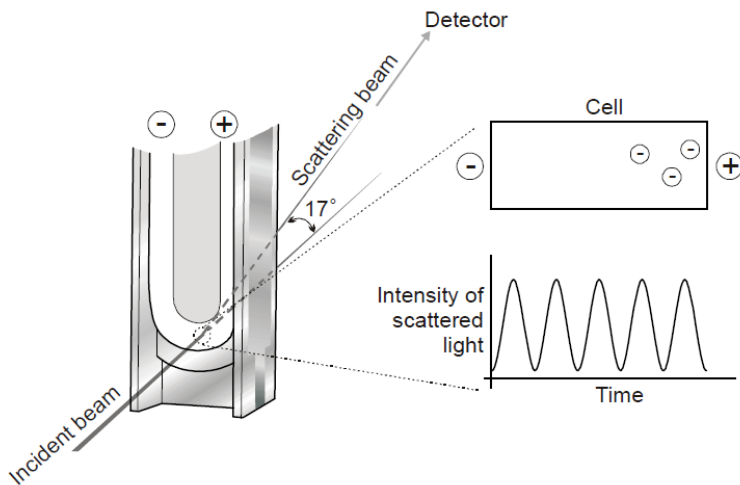


LDV è un'ottima tecnica per misurare la velocità delle particelle che si muovono attraverso un fluido in un esperimento di elettroforesi.

L'ottica è focalizzata in modo da trasmettere lo scattering delle particelle nella cella.

La luce diffusa ad un angolo di 17° viene combinata con il raggio di riferimento. Questo produce un segnale di intensità fluttuante dove la velocità di fluttuazione è proporzionale alla velocità delle particelle.

Un processore di segnale digitale viene utilizzato per estrarre le frequenze caratteristiche nella luce diffusa.



L'effetto elettroosmosi

Le pareti della cella capillare hanno una carica superficiale, quindi l'applicazione del campo elettrico necessario per avere elettroforesi fa sì che il liquido adiacente alle pareti subisce un flusso elettroosmotico.

Le particelle colloidal saranno soggette a questo flusso sovrapposto alla loro mobilità elettroforetica. Tuttavia, in un sistema chiuso il flusso lungo le pareti deve essere compensato da un flusso inverso lungo il centro del capillare

C'è un punto nella cella in cui il flusso elettroosmotico è zero - dove i due flussi di fluido si annullano. Se la misurazione viene eseguita in questo punto, la velocità delle particelle misurata sarà **la vera velocità elettroforetica**. Questo punto è chiamato **strato stazionario**. Il potenziale zeta misurato è quindi privo di errori elettroosmotici

Il tipico sistema DLS per la misura del potenziale zeta comprende sei componenti principali.

Prima di tutto un laser viene utilizzato per fornire una fonte di luce per illuminare le particelle all'interno del campione;

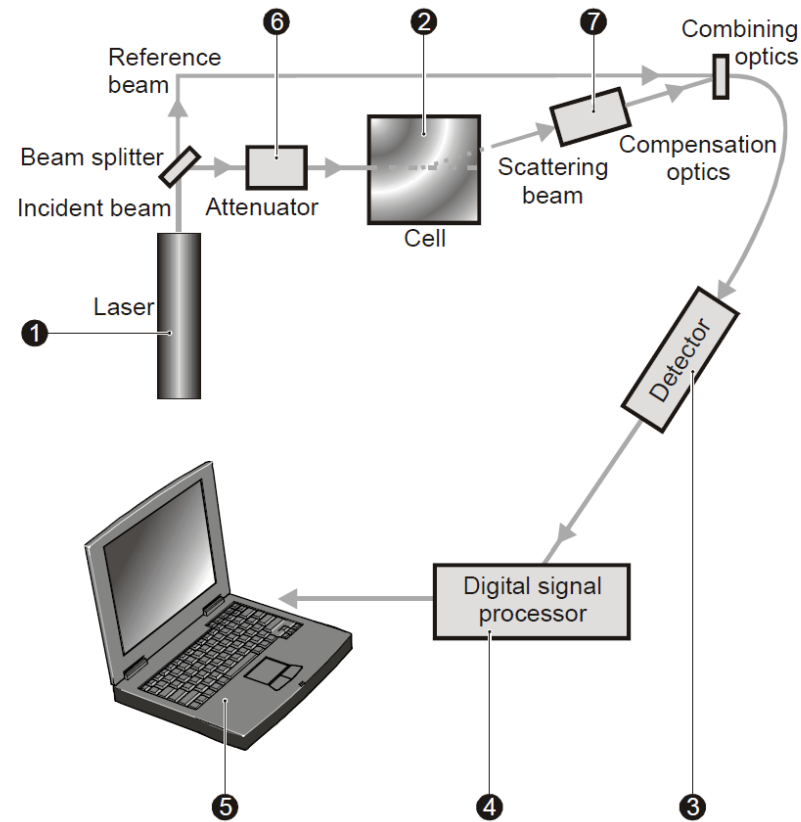
per le misurazioni del potenziale zeta questa fonte di luce viene divisa per fornire un **fascio incidente** ed uno di **riferimento**. Il raggio di riferimento è anche "**modulato**" per fornire l'effetto

Doppler necessario.

Il raggio laser passa attraverso il centro della cella del campione, e viene rilevata la diffusione ad un angolo di 13° .

Quando viene applicato un campo elettrico alla cella, ogni particella in movimento attraverso il volume di misura produrrà una fluttuazione dell'intensità della luce diffusa con una frequenza proporzionale alla velocità delle particelle.

Un rivelatore invia queste informazioni ad un processore di segnali digitali e questo ad un computer, dove il software produce uno spettro di frequenza da cui viene calcolata la mobilità elettroforetica e quindi il potenziale zeta.



APPUNTI: trasformata inversa di Laplace

Sia data una funzione $f(t)$ definita sui **numeri reali**. La sua trasformata di Laplace è la funzione definita sull'insieme continuo s data da

$$\mathcal{L}\{f\}(s) \stackrel{\text{def}}{=} \int_{-\infty}^{+\infty} e^{-st} f(t) dt$$

essendo e il **numero di Nepero** (o Eulero) ed il parametro s un **numero complesso**

$$s \stackrel{\text{def}}{=} \sigma + i\omega$$

con σ e ω numeri reali (i è l'unità immaginaria). Talvolta la trasformata è indicata, meno rigorosamente, nella forma $\mathcal{L}\{f(t)\}$.

L'inversa della trasformata di Laplace è data dall'*integrale di Bromwich*, anche detto *integrale di Fourier-Mellin* o *formula inversa di Mellin*, un integrale **complesso** dato da

$$f(t) = \mathcal{L}^{-1}\{F(s)\} = \frac{1}{2\pi i} \lim_{T \rightarrow +\infty} \int_{\gamma-iT}^{\gamma+iT} e^{st} F(s) ds$$

dove γ è un numero reale tale per cui il contorno del cammino di integrazione sia contenuto nella regione di convergenza di $F(s)$.

Si dimostra che se una funzione $G(s)$ ha la trasformata inversa $g(t)$, ovvero g è una funzione continua a tratti che soddisfa la condizione

$$\mathcal{L}\{g\}(s) = G(s)$$

allora $g(t)$ è univocamente determinata.