

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI “FEDERICO II”

FACOLTÀ DI INGEGNERIA

DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DEI MATERIALI

E DELLA PRODUZIONE



DOTTORATO DI RICERCA IN INGEGNERIA CHIMICA

DEI MATERIALI E DELLA PRODUZIONE

XVIII° CICLO

Microreologia di fluidi macromolecolari complessi per applicazioni biomedicali

Coordinatore:

CH.^{MO} PROF. N. GRIZZUTI

Tutor:

CH.^{MO} PROF. P.A. NETTI

Candidato:

ING. FUSCO SABATO

TRIENNIO ACCADEMICO 2002/2005

Indice	2
Capitolo 1: Introduzione	4
1.1 I biomateriali	4
1.1.1 I polimeri biocompatibili	4
1.1.2 Progettazione di biopolimeri: tecniche di ingegnerizzazione macromolecolare	6
1.2 La microreologia come strumento di studio dei biomateriali	7
1.3 Microreologia di biomateriali: vantaggi	8
1.4 Metodi di indagine microreologica attiva	9
1.4.1 Tecniche di manipolazione magnetica	9
1.4.2 Pinzette ottiche	9
1.4.3 Microscopia a forza atomica	10
1.5 Metodi d'indagine microreologica passiva	10
1.5.1 Particle tracking	10
1.6 Misure di diffusività	11
1.6.1 Nuove tecniche di misure di diffusività	11
Capitolo 2: Metodo di analisi	13
2.1 La scelta del metodo d'indagine microreologica	13
2.2 Le pinzette ottiche	14
2.2.1 Moto Browniano di una particella libera e intrappolata otticamente	15
2.2.2 Densità di potenza spettrale (PSD) e analisi numerica	19
2.2.3 Microreologia con pinzette ottiche	21
2.3 Pinzette ottiche: apparato strumentale	23
2.3.1 Le sorgenti laser	24
2.3.2 Microscopio composto	26
2.3.3 Apertura numerica	27
2.3.4 Iniezione del fascio laser nell'obiettivo	28
2.3.5 La telecamera e la scheda video	28
2.3.6 Sensore di posizione	28
2.3.7 Oscilloscopio digitale e analizzatore di spettro (FFT analyzer)	30
2.3.8 Traslatore motorizzato e cella di misura	30
2.4 La scelta del metodo d'indagine diffusiva: la FRAP	31
2.4.1 Principio di funzionamento	32
2.4.2 Sistemi di rilevazione e metodo di analisi dell'immagine	33
2.5 FRAP: apparato strumentale	36

Capitolo 3: Calibrazione della pinzetta ottica	40
3.1 Calcolo della costante elastica k della pinzetta	40
3.1.1 Calibrazione mediante forza di Stokes	40
3.1.2 Calibrazione mediante il teorema di equipartizione	41
3.1.3 Calibrazione mediante la statistica di Boltzmann	42
3.1.4 Calibrazione mediante funzione di autocorrelazione	43
3.1.5 Calibrazione mediante spettro di potenza	43
3.2 Calibrazione del fotodiodo a quadranti	43
3.2.1 Metodo dello spettro di potenza	44
3.2.3 Metodo incrociato Boltzmann e PSD	45
3.2.4 Metodo incrociato Equipartizione e PSD	46
3.2.5 Metodo di Stokes	46
Capitolo 4: Misure microreologiche	52
4.1 Viscosità locale dell'acqua mediante l'analisi del moto Browniano	52
4.2 Viscosità locale di una soluzione di acqua e glicerina	57
4.3 Determinazione dei moduli G' e G'' per una soluzione acquosa	58
4.4 Risultati sperimentali preliminari per una soluzione di acqua e HA	59
Capitolo 5: Meccanismi di gelazione di copolimeri a base di PEO-PPO	65
5.1 Introduzione ai copolimeri a base di PEO-PPO	65
5.2 La micellizzazione e la transizione sol-gel	66
5.2.1 Proprietà chimico-fisiche	66
5.2.2 Fattori che influenzano la formazione delle micelle	67
5.2.3 Aspetti termodinamici della micellizzazione	68
5.2.4 Tecniche per la rilevazione della transizione sol-gel e della morfologia	69
5.3 Pluronic F127 e F127 modificato	69
5.4 Parte sperimentale	70
5.4.1 Caratterizzazione macroreologica di soluzioni acquose a base di F127	71
5.4.2 Analisi diffusiva di soluzioni a base di F127	76
5.4.3 Modelli diffusivi e considerazioni morfologiche	82
Appendice	87
Bibliografia	96

Capitolo 1

Introduzione

1.1 I biomateriali

Si definisce biomateriale un materiale concepito per interfacciarsi con i sistemi biologici al fine di dare supporto o sostituire un qualsiasi tessuto, organo o funzione del corpo (II International Consensus Conference on Biomaterials, Chester, Gran Bretagna, 1991).

I biomateriali hanno risposto al bisogno dell'uomo di sostituire od integrare tessuti ed organi, non più attivi dal punto di vista funzionale o metabolico, danneggiati da eventi patologici o traumatici, ed hanno coronato di successo una lunga serie di tentativi che risalgono agli albori della medicina. Il numero delle loro applicazioni è cresciuto notevolmente in questi ultimi anni e la portata delle innovazioni terapeutiche ha consentito ad un numero elevatissimo di pazienti la sopravvivenza o la restituzione di funzionalità a parti compromesse dell'organismo. I biomateriali possono essere utilizzati sia in impianti permanenti o protesi, sia in dispositivi che sono a contatto con il corpo umano per un periodo di tempo limitato (ad esempio: i dispositivi monouso utilizzati durante gli interventi chirurgici). Alcuni dispositivi medici possono essere utilizzati identicamente per qualsiasi paziente ne abbia necessità, altri invece devono essere realizzati per il singolo caso clinico, con forma, dimensioni e caratteristiche individuali; questo aumenta la difficoltà della progettazione e della scelta dei materiali. Le prestazioni dei materiali impiegati in campo medico sono valutate in base alla loro biofunzionalità e biocompatibilità. La biofunzionalità si riferisce alle proprietà che un dispositivo deve avere per riprodurre una determinata funzione dal punto di vista fisico e meccanico; la biocompatibilità, invece, alla capacità del dispositivo di continuare a svolgere quella determinata funzione durante tutta la vita utile dell'impianto ed è strettamente connessa, quindi, alle interazioni tra i biomateriali ed i tessuti con cui vengono a contatto.

1.1.1 I polimeri biocompatibili

I polimeri costituiscono la classe di materiali più versatile, in quanto sono largamente applicati in medicina e in ogni sorta di biotecnologie, così come nell'industria alimentare e di cosmetici. Le applicazioni includono apparecchi chirurgici, materiali per impianto e per supporto (ad esempio organi artificiali, protesi, ecc.), sistemi a rilascio controllato, vettori di enzimi e cellule, biosensori, componenti per apparecchiature diagnostiche, bioadesivi, dispositivi oculari e materiali per applicazioni ortopediche. I polimeri utilizzati come biomateriali possono essere sintetizzati per avere caratteristiche chimiche, fisiche, interfacciali e biomimetiche che ne permettono specifiche applicazioni. A confronto con altri tipi di biomateriali, come metalli e ceramici, i polimeri offrono il vantaggio di poter essere preparati in differenti composizioni con ampie varietà di strutture e proprietà.

Gli approcci più recenti alla tecnologia dei biomateriali macromolecolari sono basati sulla combinazione di differenti professionalità per ottenere polimeri con strutture ben definite e

proprietà chimiche, fisio-chimiche, meccaniche e biologiche specifiche. Un'altra tendenza nello sviluppo dei biomateriali è l'ingegneria macromolecolare, che comprende la valutazione di procedure ottimizzate e versatili per l'ottenimento di nuove strutture polimeriche a basso costo e per uso commerciale.

I polimeri utilizzati come biomateriali possono essere di origine naturale, sintetica o una combinazione dei due. I polimeri di origine naturale sono abbondanti e generalmente biodegradabili. Il loro principale svantaggio è costituito dallo sviluppo di metodi riproducibili di preparazione, in quanto la loro complessità strutturale rende difficoltose le operazioni di modificazione e purificazione. I polimeri sintetici sono disponibili in grandi varietà di composizioni con proprietà già selezionate ed adattate. I processi di copolimerizzazione e miscelazione (blending) offrono concrete possibilità di ottimizzare le caratteristiche meccaniche del polimero insieme alle proprietà diffusive e biologiche. Una delle maggiori difficoltà nell'utilizzo di questi materiali è l'assenza di biocompatibilità, sebbene, ad esempio, il polietilenoossido (PEO) è una nota eccezione. I polimeri sintetici sono, dunque, spesso accompagnati da reazioni infiammatorie che limita il loro utilizzo.

La biocompatibilità dei polimeri è riferita al materiale con sangue e tessuti, a seconda dell'ambiente e dello scopo di utilizzo. La risposta nell'organismo ospite è di solito sfavorevole se non accompagnata da vascolarizzazione a supporto delle cellule viventi. Per applicazioni a contatto con il sangue, la biocompatibilità è soprattutto determinata dalle specifiche interazioni con esso e con i suoi componenti. Per applicazioni che non prevedono contatto col sangue (ad esempio, i lavori dentali) la scelta del materiale, generalmente, dipende dalla biocompatibilità tessutale. Pertanto, un materiale può risultare biocompatibile in alcune applicazioni ed incompatibile in altre.

I polimeri utilizzati per la produzione di bioimpianti, di apparecchiature per la tissue engineering e di organi artificiali sono selezionati in modo da poter modificare chimicamente la loro superficie e ottimizzare le interazioni cellule-polimero. La distribuzione di gruppi funzionali sulla superficie del biomateriale, e, dunque, la microstruttura macromolecolare, è uno dei fattori chiave nella determinazione delle interazioni con il mezzo circostante. Le proprietà fisiche (permeabilità, conducibilità, ecc.) e la degradabilità possono influenzare la biocompatibilità. Il materiale non dovrebbe essere tossico per ogni componente biologico e dovrebbe essere stabile.

La morfologia di bulk del materiale deve essere altresì considerata in quanto influenza le proprietà fisiche del biomateriale. La resistenza meccanica, la densità, l'elasticità, l'invecchiamento e la resistenza al creep giocano un ruolo importante nella scelta del polimero in applicazioni quali, ad esempio, la tissue engineering. Ciò deriva dal rispetto di precisi requisiti che devono essere considerati nello sviluppo di un materiale adeguato. La morfologia del materiale determina, inoltre, la permeabilità a gas o sostanze acquose. La permeabilità ed il trasporto di massa regolano la scelta delle matrici polimeriche utilizzate nell'immobilizzazione di cellule.

Un'attenta progettazione delle proprietà strutturali ed interfacciali della matrice, della micromorfologia e della dimensione dei pori risulta particolarmente importante per biomateriali utilizzati come scaffolds per la crescita di cellule, come organi artificiali e come supporti di biomolecole immobilizzate.

Una grande quantità di polimeri naturali e sintetici sono stati utilizzati per la produzione di matrici per tissue engineering (per scopi quali il rilascio in siti specifici, supporto meccanico, pelle e cartilagine artificiale, ricostruzione di tessuto nervoso). I polimeri sintetici sono diventati più attraenti grazie alla possibilità di controllare le loro proprietà intervenendo sulla microstruttura. L'uso di polimeri sintetici, ingegnerizzati chimicamente, permette precise manipolazioni delle caratteristiche fisiche e delle proprietà meccaniche del materiale, della porosità e del tempo di degradazione. La scelta del materiale dipende fortemente dal tipo di utilizzo. Ad esempio, modificando il tempo di degradazione è possibile migliorare la durabilità del materiale.

L'uso di polimeri sintetici biodegradabili come biomateriali è particolarmente funzionale perchè le loro proprietà chimiche e fisiche possono essere prontamente adeguate variando le tecniche di

preparazione e la struttura molecolare. Polimeri biodegradabili contenenti nelle macromolecole gruppi idrolizzabili, soggetti a biodegradazione in prodotti non tossici a bassi pesi molecolari, sono stati utilizzati in sistemi a rilascio controllato di farmaci. Poliesteri, polianidridi, poliammidi, polimeri naturali come networks, copolimeri, blend e microcapsule basate su questi polimeri sono state ampiamente utilizzati come matrici per il rilascio di agenti bioattivi.

Come detto precedentemente, la progettazione di biomateriali é strettamente legata al tipo di applicazione, essendo di fondamentale importanza la comprensione delle caratteristiche funzionali richieste dal biodispositivo.

Alcuni criteri fondamentali vanno considerati per ogni biomateriale polimerico. Le caratteristiche superficiali possono influire sul rendimento dell'apparecchiatura, per questo motivo é utile intervenire dall'esterno sulle proprietà interfacciali. Per molte applicazioni il funzionamento chimico degli apparati biomedicali dipende dall'identificazione e dalla modificazione controllata delle proprietà superficiali chiave. Le caratteristiche essenziali sono rappresentate dall'idrofilicità o idrofobicità, dalla lubrificazione, dalla ruvidità e dalla tensione superficiale. L'idrofilicità ed il carico superficiale, ad esempio, possono enormemente influenzare il comportamento del biodispositivo e le sue interazioni con l'organismo ospite. La composizione e la morfologia dell'interfaccia possono essere progettate per modulare o sopprimere interazioni specifiche. Esistono numerose applicazioni dove i materiali polimerici interagiscono con i componenti biologici come cellule, tessuti e fluidi extrabiologici. Tali interazioni sono dipendenti dalla natura e dalla morfologia della superficie.

Al fine di razionalizzare un materiale per specifiche applicazioni devono essere considerate anche le proprietà di bulk quali la permeabilità, le caratteristiche diffusive e il grado di degradazione. Materiali per applicazioni a lungo termine (come impianti ortopedici o dentali) devono essere repellenti all'acqua per evitare ogni processo di degradazione o erosione che porterebbe a cambiamenti della durezza e alla perdita di resistenza meccanica. La permeabilità del materiale deve essere considerata nell'ottica della sua capacità di solubilizzare e di rigonfiare. Un'elevata capacità di assorbimento di acqua corrisponde ad un'elevata permeabilità idraulica e idrofilicità; quest'ultima non é solo collegata alla biocompatibilità e alla resa funzionale del dispositivo, ma determina altre proprietà come l'adesione, la capacità di risposta ambientale a stimoli esterni, il grado di degradazione.

1.1.2 Progettazione di biomateriali: tecniche di ingegnerizzazione macromolecolare

L'ottimizzazione delle proprietà rappresenta l'aspetto principale della progettazione di un materiale. L'abilità di produrre determinate strutture macromolecolari e morfologie del materiale per soddisfare un dato set di criteri fisico-chimici e biologici rappresenta il successo più influente nel campo dei biomateriali. Materiali polimerici, già esistenti e utilizzati con successo in applicazioni chimiche, necessitano di miglioramenti al fine di ottenere un definitivo successo in campo biomedico. La biocompatibilità, per esempio, non é ottimale in molti dispositivi e procedure chirurgiche, soprattutto per quanto riguarda trattamenti di immunorepressione. Fino ad ora, la maggior parte dei polimeri é stata ingegnerizzata per soddisfare i criteri fondamentali per le applicazioni biomediche ed esibiscono reazioni biologiche non specifiche. I bisogni futuri comprendono l'ottimizzazione dell'ingegnerizzazione e della progettazione di processi che permetteranno ai biomateriali con precise architetture di bulk e superficiali di mostrare precisi riconoscimenti biologici e specifiche bioreazioni *in vivo*. In questa direzione, vari approcci e tecniche (dalla chimica, dalla biologia molecolare, dalla scienza dei materiali, ecc.) sono state applicate per la sintesi e l'analisi di una nuova generazione di biomateriali polimerici ingegnerizzati.

Esistono diversi approcci per la modificazione superficiale. Generalmente, le modificazioni fisiche della superficie polimerica possono significativamente aumentare la biocompatibilità. La polimerizzazione o l'aggraffaggio di polimeri solubili in acqua sulla superficie del polimero

possono ridurre l'assorbimento di proteine e l'adesione di cellule, modificando le caratteristiche idrofile o idrofobe della superficie polimerica. I copolimeri di PEO, ad esempio, sono largamente utilizzati a tale scopo. Altri approcci per incrementare le interazioni corpo-materiale sono basate sulla minimizzazione o eliminazione della trombogenicità del biomateriale a contatto col sangue. Modificazioni biologiche mediante l'incorporazione di molecole biologicamente attive possono essere considerate, inoltre, un mezzo per aumentare la biocompatibilità. Ad esempio, composti bioattivi come enzimi, farmaci, proteine, sequenze peptidiche, antigeni e cellule sono state incorporate in materiali polimerici al fine di aumentarne la biofunzionalità.

Lo sviluppo dei biomateriali polimerici può anche essere basato sull'ottimizzazione strutturale del polimero attraverso la sintesi di nuove composizioni polimeriche con stabilità e attività migliorate. Dato che la struttura di bulk del polimero governa le sue proprietà (meccaniche, fisico-chimiche, ecc.) la progettazione microstrutturale e la composizione chimica possono essere utilizzate per adattare le relazioni struttura-proprietà-applicazioni e costruire biomateriali migliori. Architetture polimeriche differenti (lineari, ramificate, a stella e combinate) e combinazioni di specie polimeriche, miscelate fisicamente (blend) o legate chimicamente (copolimeri), sono di straordinario interesse per i biomateriali. Per alcuni tipi di applicazioni biomediche e farmaceutiche (impianti, matrici temporanee e dispositivi a rilascio controllato di farmaci), i polimeri biodegradabili risultano molto adatti. Una grande varietà di polimeri biodegradabili sono stati sintetizzati ed usati per fabbricare biomateriali per elementi strutturali in scaffolds o per veicolare il rilascio di sostanze. La biodegradabilità può essere regolata attraverso la variazione della struttura polimerica. L'uso di diverse architetture polimeriche tramite l'incorporazione di gruppi labili nello scheletro del polimero o l'aggraffaggio di gruppi laterali con differente grado di idrofilicità e cristallinità può influenzare le cinetiche di biodegradazione, così come le proprietà fisiche e meccaniche (Angelova et al. 1999).

Nuovi biomateriali, con aumentate e specifiche azioni biologiche (ad esempio, la veicolazione di sostanze farmacologiche in siti specifici o il rilascio di agenti fisiologici instabili), sono stati sviluppati utilizzando polimeri sensibili agli stimoli ambientali. Tali polimeri possono essere sintetizzati in modo da poter rispondere a segnali di tipo chimico, fisico o biologico come pH, temperatura, campi elettrici e ottici, metaboliti.

I polimeri termoreversibili sono sintetizzati a partire da polimeri con diversi gradi di idrofilicità. I copolimeri di PEO-PPO, ad esempio subiscono transizioni di fase in dipendenza della concentrazione e della temperatura. Durante la transizione di fase si passa da macromolecole libere in soluzione alla formazione di aggregati (micelle) dovute all'aumento dell'idrofobicità del PPO con la temperatura.

Parte dello studio di questo lavoro sarà dedicato all'investigazione dei comportamenti di tali tipi di materiali attraverso l'utilizzo di metodi sperimentali che permettono la caratterizzazione microstrutturale dei polimeri considerati: la microreologia con pinzette ottiche e lo studio delle caratteristiche diffusive con tecnica FRAP.

1.2 La microreologia come strumento di studio dei biomateriali

La reologia è lo studio della deformazione e dello scorrimento dei materiali in risposta ad uno sforzo applicato. Uno dei metodi per caratterizzare la risposta reologica di un materiale è quello di misurarne il modulo di taglio in funzione della frequenza. Tale tipo di misurazione avviene, infatti, applicando, al materiale posto all'interno di un reometro, una deformazione di taglio oscillante con piccola ampiezza e misurando lo sforzo di taglio risultante. Quest'ultimo è caratterizzato da due componenti: $G'(\omega)$ che è la risposta in fase con la deformazione applicata, chiamata modulo elastico, e $G''(\omega)$ che è la risposta in quadratura di fase con la deformazione applicata, chiamata modulo viscoso. Essi rappresentano l'energia immagazzinata e dissipata dal materiale, rispettivamente. Tale tipo di misurazioni risulta particolarmente preziosa nella caratterizzazione di materiali soffici o di fluidi complessi, come sospensioni colloidali, soluzioni polimeriche e gel,

emulsioni, e miscele surfattanti (Ferry 1980, Macosko 1994, Larson 1999). Tuttavia, le convenzionali tecniche meccaniche di misurazione non sempre sono adatte a tutti i sistemi. Tipicamente, infatti, alcuni millilitri di materiale sono necessari per le misurazioni, precludendo in tal modo lo studio di materiali rari o preziosi, quali ad esempio i campioni biologici, che sono difficili da ottenere in grandi quantitativi. Inoltre, i reometri convenzionali forniscono una misurazione media della risposta di bulk, non permettendo l'apprezzamento dei valori locali nei materiali più disomogenei. Per ovviare a tali problematiche, una nuova classe di tecniche di misurazione è stata sviluppata negli ultimi anni. Tali tecniche sono state denominate metodi microreologici in quanto vanno a sondare la risposta del materiale su scale micrometriche, utilizzando, in tal modo, pochi microlitri di campione. I metodi microreologici usano sonde di dimensioni microscopiche al fine di deformare localmente il materiale da caratterizzare. Esistono due classi principali di tecniche microreologiche: quelle che prevedono l'attiva manipolazione delle sonde attraverso l'applicazione locale di sforzi (tecniche d'indagine attiva) e quelle che misurano il moto passivo delle particelle dovuto alle fluttuazioni termiche o Browniane (tecniche d'indagine passiva). In entrambi i casi, quando le particelle utilizzate come sonda hanno dimensioni maggiori di ogni unità costitutiva del materiale il loro movimento serve a misurare il rilassamento degli sforzi a livello macroscopico; particelle di dimensioni confrontabili con le dimensioni delle strutture microscopiche del materiale, invece, riescono a misurare le risposte meccaniche locali ed in più riescono a sondare gli effetti sterici. L'uso di piccole particelle colloidali, inoltre, estende il range delle frequenze accessibili traslando l'inizio degli effetti d'inerzia nel range dei MHz. Molti materiali biologici, inoltre, sono altamente disomogenei, rendendo la misurazione delle loro proprietà reologiche molto difficile. L'utilizzo di particelle micrometriche come sonde permette di superare queste difficoltà, rendendo la microreologia il metodo più adatto e promettente per lo studio di questi materiali.

1.3 Microreologia di biomateriali: vantaggi

L'obiettivo che ci si pone in questo lavoro di dottorato di ricerca riguarda lo sviluppo di uno studio approfondito di materiali polimerici e colloidali attraverso una scala gerarchica, collegando le nano e micro-interazioni alla microstruttura, alla meccanica, alla dinamica ed infine alle proprietà macroscopiche di tali materiali. La fase iniziale del progetto riguarda la messa a punto del sistema d'indagine: le pinzette ottiche (la cui scelta tra le tecniche d'indagine verrà spiegata nel relativo capitolo) combinate con tecniche di acquisizione delle immagini permetteranno di determinare direttamente le interazioni su scala nano e micrometrica, la microstruttura e i riarrangiamenti delle particelle per arrivare ad una conoscenza approfondita dei meccanismi che regolano l'elasticità ed, in generale, il comportamento meccanico dei materiali. La microreologia permette, infatti, di sondare le eterogeneità nelle strutture e nelle meccaniche che possono essere alla base di comportamenti non lineari dei materiali. La fase successiva prevede l'utilizzo di tale tecnica per la determinazione della viscosità locale e dei moduli viscoelastici di fluidi omogenei e complessi. Questo lavoro potrà fornire importanti informazioni su questioni aperte di grande importanza per la comprensione dei meccanismi di base dei processi diffusivi in fluidi complessi (short e long time diffusion) e per le numerose applicazioni connesse ai nuovi materiali oggi impiegati nel campo dei biomateriali. Ad esempio si potrà meglio comprendere le discrepanze che esistono tra misure di viscosità di bulk (ricavate con i viscosimetri tradizionali) e quella determinata su scala microscopica. In studi di sospensioni colloidali, soluzioni polimeriche e biologia cellulare, ad esempio, è spesso desiderabile ottenere un'osservazione dei cambiamenti nella viscosità locale che interessano le dinamiche di componenti quali le particelle colloidali, le macromolecole e gli organelli cellulari. Più nello specifico, in biologia cellulare lo studio della comunicazione intercellulare sta avanzando velocemente. La funzione tissutale dipende fortemente dalla capacità delle cellule vicine di comunicare. Le cellule comunicano soprattutto mediante la secrezione di citochine, che sono proteine solubili che diffondono attraverso il mezzo ed infine si legano ai

ricettori cellulari circostanti trasportando così il segnale. Questi segnali modulano le attività funzionali delle cellule e del tessuto. La diffusione di tali molecole è governata dai gradienti di concentrazione e viscosità nel mezzo intercellulare. Pertanto, riuscire a tracciare la viscosità in tale mezzo è, quindi, di fondamentale importanza per capire i processi addetti alla comunicazione.

Le proprietà reologiche, inoltre, cambiano spesso di molti ordini di grandezza quando si verifica un cambiamento di fase o quando accadono altri mutamenti strutturali come la transizione sol-gel. Ciò rende la microreologia un candidato ideale non soltanto per la caratterizzazione delle proprietà meccaniche, ma anche per il monitoraggio di altri fenomeni che direttamente sono correlati con la reologia, quali il cambiamento di fase e la gelazione dei materiali.

1.4 Metodi di indagine microreologica attiva

Esistono, come detto in precedenza, varie tecniche d'indagine microreologica. Tra queste vale la pena citare quelle che hanno avuto maggiore applicazione in campo di ricerca interdisciplinare: tecniche di manipolazione magnetica (pinzette magnetiche), pinzette ottiche, tecnica della microscopia a forza atomica, particle tracking.

Esse vengono passate in rassegna mettendo in evidenza i principi di funzionamento e i maggiori campi di applicazione.

1.4.1 *Tecniche di manipolazione magnetica*

Una delle tecniche microreologiche più vecchie prevede la manipolazione di particelle magnetiche o di limature di ferro, che vengono intrappolate all'interno del materiale da caratterizzare attraverso un campo magnetico esterno. Questo metodo fu scoperto nei primi anni '20 ed è stato utilizzato per la misurazione delle proprietà meccaniche della gelatina, del citoplasma cellulare e del muco (Freundlich e Seifriz 1922, Heilbronn 1922, Crick e Hughes 1950, Yagi 1961, Himamoto 1969, King e Mackllem 1977). L'osservazione del movimento delle particelle forniva una misura qualitativa del coefficiente di diffusione, ma l'irregolarità di forma delle particelle magnetiche e la semplicità degli schemi di acquisizione delle immagini e dei dati non permettevano una misurazione precisa delle proprietà meccaniche. Più recentemente, i progressi dell'ingegneria colloidale, della videomicroscopia, e dei sensori di posizione hanno permesso enormi miglioramenti nell'applicazione di tali tecniche.

Un metodo chiamato "microreometria con particelle magnetiche" o "pinzette magnetiche" combina l'uso di forti magneti, per la manipolazione di particelle superparamagnetiche, con la videomicroscopia che viene usata per la determinazione dello spostamento delle particelle sottoposte all'applicazione di forze costanti (Ziemann et al. 1994, Amblard et al. 1996, Schimdt et al. 1996). In questo caso, sono necessari forti campi magnetici, per indurre un dipolo magnetico nelle particelle superparamagnetiche, ed un gradiente di campo magnetico, per produrre una forza. Lo spostamento risultante della particella misura la risposta reologica del materiale circostante. La tecnica delle pinzette magnetiche è stata usata per sondare le dinamiche microscopiche di un interessante numero di materiali di non facile caratterizzazione tramite i metodi tradizionali, come networks di filamenti di actina (Ziemann et al. 1994, Amblard et al. 1996, Schimdt et al. 1996, Keller et al. 2001), fibroblasti viventi, macrofagi ed endotelio (Baush et al. 1998, 1999, 2001) e cellule di dictiostelio (Freneberg et al. 2001).

1.4.2 *Pinzette ottiche*

Un'altra delle tecniche microreologiche attualmente in uso si avvale delle pinzette ottiche, anche chiamate trappole ottiche o pinzette laser, che utilizzano fasci di luce altamente focalizzati per catturare e manipolare piccole particelle dielettriche (Ashkin 1992, Block 1992, Ashkin 1997,

1998). A differenza delle pinzette magnetiche, quelle ottiche riescono ad applicare le forze in modo locale e queste ultime sono generalmente limitate al range dei pN. Le due forze principali applicate sulle particelle illuminate sono quella di scattering, o pressione di radiazione, che agisce lungo l'asse di propagazione del fascio, e il gradiente di forza, che nasce dalle interazioni tra i dipoli indotti con il gradiente del campo elettrico e tende a tirare le particelle verso il punto di focale (Ashkin 1992, Ashkin 1997, Nemoto e Togo 1998, Neto e Nussenzveig 2000). Un gradiente del campo elettrico molto spinto può essere creato utilizzando un obiettivo con lente ad alta apertura numerica per focalizzare il fascio sul campione. Ciò permette al gradiente di forza di prevalere sulla pressione di radiazione formando in tal modo una trappola tridimensionale molto stabile.

Tale tecnica trova applicazione in svariati campi di indagine e, soprattutto, in quello biologico e dei biomateriali, come lo studio della membrana delle cellule del sangue (Hénon et al. 1999, Sleep et al. 1999), dei gel di collagene (Velegol e Lanni 2001), e dei polimeri HEUR (Hough e Ou-Yang 1999), solo per citare qualche esempio.

1.4.3 Microscopia a forza atomica

Un'ulteriore tecnica è quella che impiega l'uso di forze micromeccaniche create attraverso un microscopio a forza atomica. Il microscopio a forza atomica, inventato nel 1986 (Binnig et al. 1986), è stato usato ampiamente per studiare la struttura dei materiali soffici, e materiali biologici in particolare, con risoluzione sub-nanometrica (Drake et al. 1989, Henderson et al. 1992, Radmacher et al. 1992, Bottomley et al. 1996, Kasas et al. 1997). Oltre alle informazioni visuali sulla struttura e la topologia della superficie, il microscopio a forza atomica è sensibile alle forze necessarie ad intaccare una superficie ed è stato utilizzato per misurare l'elasticità e la viscoelasticità di campioni sottili, come osso e midollo osseo (Tao et al. 1992), gelatina (Redmache et al. 1995, Domke e Radmacher 1998), gel di poliacrilammide (Mahaffy et al. 2000), piastrine (Radmacher et al. 1996), e cellule viventi (Hoh e Schoenenberger 1994, Putman et al. 1994, Shroff et al. 1995, Goldmann ed Ezzell 1996, Rotsch et al. 1997, A-Hassan et al. 1998, Mahaffy et al. 2000). Le immagini topografiche sono ottenute simultaneamente con la risposta meccanica, permettendo di correlare l'elasticità con la struttura locale indagata (Radmacher et al. 1994). Le misurazioni dell'elasticità locale forniscono inoltre informazioni sui mutamenti meccanici che accompagnano i processi dinamici come divisione cellulare (Dvorak e Nagao 1998), attivazione di piastrine (Radmacher et al. 1996), exocitosi (Schneider et al. 1997), e variazioni farmaco-indotte nel citoscheletro di cellule viventi (Rotsch e Radmacher 2000).

1.5 Metodi d'indagine micromeccanica passiva

1.5.1 Particle tracking

Una differente classe di tecniche micromeccaniche usa le dinamiche Browniane delle particelle per misurare le proprietà reologiche e la struttura dei materiali. La differenza fondamentale con le tecniche già menzionate, nelle quali viene misurata la risposta della sonda all'applicazione di una forza esterna, è che tale classe utilizza solo l'energia termica delle particelle, determinata da $k_B T$. Per questo tipo di misurazioni i materiali devono essere particolarmente soffici in modo da permettere un movimento delle particelle, dovuto all'energia termica, apprezzabile. Per capire come l'energia termica stocastica di particelle micrometriche sia utilizzata per sondare le proprietà reologiche del mezzo circostante è utile considerare il moto di una sfera in un fluido viscoso. Sfere micrometriche in un mezzo puramente viscoso sono animate da solo moto Browniano. Le dinamiche del loro moto possono essere descritte da una funzione di correlazione che lega la posizione col tempo. Tale funzione di correlazione è altresì conosciuta come spostamento quadratico medio. Quest'ultimo può essere calcolato con metodi che determinano direttamente la posizione della particella come funzione del tempo. I metodi di particle tracking sono stati

sviluppati per riportare direttamente l'immagine della posizione della particella come funzione del tempo. I metodi di particle tracking differiscono per la risoluzione spaziale e temporale dell'acquisizione della traiettoria. La risoluzione temporale è determinata dalla frequenza alla quale le posizioni della particella possono essere acquisite. La risoluzione spaziale da quanto precisamente si riesce a misurare le differenze tra le posizioni della particella. Applicazioni di tale tecnica sono state lo studio dei networks di F-Actina (Gittes et al. 1997, McGrath et al. 2000, Tseng e Wirtz 2001) e delle cellule viventi (Yamada et al. 2000).

1.6 Misure di diffusività

Lo studio e la comprensione dei meccanismi di trasporto in sistemi polimerici rappresentano, sia nell'ambito della ricerca industriale che in quella di base, tematiche di grande importanza. Riuscire a caratterizzare le proprietà di diffusione permette, infatti, di venire in possesso di importanti strumenti di controllo nella progettazione e realizzazione dei materiali. Tali strumenti sono, ad esempio, utilizzabili per investigare proprietà strutturali, la cinetica di reazione o il processo di solidificazione di gel. In un sistema polimerico i principali parametri del fenomeno di trasporto diffusivo sono i coefficienti di mutua ed auto-diffusione: il coefficiente di mutua-diffusione D_M , anche detto di interdizione o di diffusione collettiva, si ottiene da misure della variazione di concentrazione di una specie nel tempo; quello di auto-diffusione D_A , da misure della variazione nel tempo della posizione della molecola di polimero nel materiale (Koros et al. 1989, Binder et al. 1989, Brochard-Wyart et al. 1991, Wool et al. 1995). Per la determinazione sperimentale del coefficiente di diffusione D , si utilizza tradizionalmente il permeabilmetro. Esso è costituito da due serbatoi, contenenti soluzioni a diversa concentrazione di diffondente, separati da una cella circolare, nella quale è alloggiata una membrana permeabile. Tramite la misurazione continua della quantità di diffondente che permea attraverso la membrana dalla soluzione a concentrazione maggiore a quella minore è possibile stimare il coefficiente di diffusione. Per fare ciò, però, è necessario conoscere la concentrazione del diffondente sia all'esterno che all'interno della membrana. Tale tecnica, ormai alquanto obsoleta, presenta alcuni forti svantaggi. Essa, infatti, permette di calcolare solo il coefficiente di mutua diffusione, funzione della coppia (specie diffondente-mezzo) e del gradiente di concentrazione imposto, e questo non sempre consente di risalire a quello di autodiffusione. Inoltre, i maggiori limiti di questa tecnica sono: i lunghi tempi di rilevazione, che, per sostanze caratterizzate da bassi coefficienti di diffusione, possono prolungarsi anche per giorni; i problemi derivanti da una determinazione sperimentale della concentrazione, difficilmente precisa, sia all'esterno della membrana sia, soprattutto, al suo interno.

1.6.1 Nuove tecniche di misure di diffusività

Per superare i limiti descritti, recentemente, sono state sviluppate un discreto numero di nuove tecniche che permettano di risalire in maniera più rapida e precisa al valore del coefficiente di diffusione. In Tabella 1.1 sono riportate alcune tra quelle più comunemente utilizzate nella caratterizzazione di materiali polimerici. Insieme alle tecniche sono riportati il tipo di coefficiente di diffusione che tali tecniche sono in grado di misurare e la relativa risoluzione.

Tra queste, per la caratterizzazione diffusiva dei materiali presi in considerazione in questo lavoro, è stato deciso di utilizzare la tecnica di fluorescence recovery after photo-bleaching (FRAP) che grazie alla sua flessibilità permette di misurare il coefficiente di autodiffusione per svariate tipologie di soluzioni polimeriche.

Tabella 1.1 - Tecniche per la determinazione del coefficiente di diffusione

Tecniche	D	Range, Risoluzione
Infrared micro-densitometry Scanning infrared microscopy	D_M	$10^{-5} - 10^{-10} \text{ cm}^2/\text{s}$, 10 – 100 μm
Dynamic Light Scattering Optical Schlieren technique	D_M	$\sim 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$; $10^{-6} - 10^{-12} \text{ cm}^2/\text{s}$
Small Angle Neutron Scattering (SANS) Neutron Reflection Spectroscopy (NRS)	D_M	$\sim 10^{-20} \text{ cm}^2/\text{s}$, 1 nm – 1 mm
Attenuate Total Reflectance spectroscopy (ATR) External reflecton infrared spectroscopy	D_M	$10^{-10} - 10^{-17} \text{ cm}^2/\text{s}$, 500 nm
Fluorescence Recovery After Photo-bleaching	D_A	$>10^{-14} \text{ cm}^2/\text{s}$, 20 – 30 μm
Nuclear Reaction Analysis (NRA)	D_M	10 nm

Capitolo 2

Metodi di analisi

2.1 La scelta del metodo d'indagine microreologica

Tra le tecniche microreologiche descritte nel precedente capitolo, si è ritenuto opportuno utilizzare e sviluppare ulteriormente quella che fa uso delle pinzette ottiche. Esse costituiscono un potente strumento per la manipolazione di particelle micrometriche con l'utilizzo di un fascio laser fortemente focalizzato. La trappola ottica è stata ampiamente utilizzata negli ultimi vent'anni in numerosi tipi di sperimentazioni come la determinazione delle proprietà reologiche nella scienza dei materiali, in motori molecolari in biologia o nella movimentazione di condensati di Bose – Einstein in fisica. Negli ultimi anni le possibilità di una singola pinzetta ottica sono state ampiamente estese grazie allo sviluppo tecnico relativo ai laser e alla creazione di apparati che consentono la creazione simultanea di più trappole ottiche. A differenza delle altre tecniche descritte, le pinzette permettono l'applicazione di forze localizzate in un volume realmente piccolo in modo tale da intrappolare e manipolare particelle di dimensioni confrontabili con le strutture dei materiali da analizzare. Per questo motivo esse costituiscono uno strumento veramente efficace nell'analisi reologica locale dei materiali e non solo. Basta, infatti, pensare alle ulteriori applicazioni, soprattutto in campo biologico, considerando le caratteristiche principali delle pinzette: l'effettiva localizzazione degli sforzi e la non invasività. Fu A. Ashkin a proporre nel 1969 un primo schema di trappola puramente ottica, basata su un singolo fascio laser fortemente focalizzato e fu Ashkin stesso nel 1985 a realizzare la prima trappola ottica da lui battezzata come "pinzetta ottica" (optical tweezers), intendendo la possibilità di creare una vera e propria pinza ottica capace, oltre che di intrappolare particelle, anche di spostarle, trascinarle e manipolarle in svariati modi. Il potenziale ottico che si genera con una trappola ottica è di tipo armonico e quindi, in un piccolo intorno della posizione di equilibrio, la particella intrappolata è sottoposta ad una forza di tipo elastico $F = -kx$, dove k è la cosiddetta "stiffness" della trappola. Una pinzetta ottica è in grado di intrappolare particelle le cui dimensioni variano tra poche decine di nanometri fino ad alcune centinaia di micron; questo intervallo copre molto bene le tipiche dimensioni di numerosi organismi biologici ed è per questo che le pinzette hanno avuto un grande sviluppo nelle scienze biologiche. Un grande vantaggio risiede nel fatto che un oggetto biologico può essere manipolato senza alcun contatto meccanico; inoltre, scegliendo opportunamente la lunghezza d'onda del laser nella regione del medio infrarosso dove l'assorbimento ottico dell'acqua presenta un minimo, gli effetti di riscaldamento, e quindi di danneggiamento, sono enormemente ridotti. Oltre alle applicazioni in campo biologico, negli ultimi tempi, le pinzette ottiche si sono rivelate un utile ed interessante strumento per lo studio della materia "soft". In particolare, le proprietà reologiche della materia possono essere ben investigate utilizzando piccole sferette intrappolate che fungono da sonda nel fluido in cui esse sono immerse. Infatti, una sferetta intrappolata continua ad essere animata di moto Browniano nel piccolo volume (1 femtolitro) della trappola. Monitorando questo movimento ed analizzando i segnali stocastici che ne derivano è possibile ottenere la risposta viscoelastica del fluido. Esistono diversi vantaggi di questo nuovo approccio rispetto alle tecniche convenzionali impiegate in reologia: un reometro tradizionale, infatti, analizza campioni assai più consistenti e per un fluido complesso ne fornisce una media di "ensemble"; una pinzetta ottica, invece, è in grado di mettere in evidenza le eterogeneità del fluido investigato ed esplorare diverse scale della sua struttura a seconda della sferetta utilizzata. In altre parole una pinzetta è in grado di misurare localmente le proprietà reologiche di un fluido; da qui il termine di microreologia. Un considerevole vantaggio consiste nel poter far uso di assai modeste quantità del campione da investigare. Ciò rende possibile lo studio

delle proprietà reologiche all'interno di cellule durante fasi di transizione di processi bio-chimici. Inoltre, una pinzetta ottica fornisce una risposta in frequenza che può arrivare anche a qualche decina di kHz, mentre le tipiche risposte in frequenza di un reometro convenzionale non superano le poche decine di Hz. Le pinzette ottiche offrono, inoltre, un meccanismo di manipolazione delle particelle altamente controllabile annullando ogni contatto fisico con l'ambiente circostante. Ciò è particolarmente importante quando si lavora con campioni biologici in quanto i tradizionali micromanipolatori possono ostacolare, contaminare o anche reagire col sistema in esame. È per questo motivo che le pinzette ottiche hanno avuto ed avranno in futuro un grandissimo impatto in discipline come la biologia o lo studio dei biomateriali.

Non è possibile citare una completa bibliografia delle applicazioni delle pinzette ottiche in campo molecolare, ma vale la pena citare alcuni dei risultati più significativi. I recenti studi su chinesina (Kuo e Sheetz 1994, Coppin et al. 1996, Svoboda et al. 1993, Svoboda e Block 1994), miosina (Finer et al. 1994, Molloy et al. 1995, Shepherd et al. 1990, Finer et al. 1995), dienina citoplasmatica (Wang et al. 1995), e RNA polimerase (Yin et al. 1995) sono solo alcuni esempi. Altre applicazioni delle Pinzette ottiche in sistemi ricostituiti sono la rotazione del motore flagellare batterico (Block et al. 1989, Berry et al. 1997), di filamenti di DNA di nucleosomi (Bennink et al. 2001) e l'importazione di molecole di Dna attraverso membrane nucleari ricostituite (Salman et al. 2001). Sebbene gli studi originari abbiano dimostrato il carattere non invasivo delle pinzette per elementi subcellulari (Ashkin e Dziedzic 1989) in questo campo gli studi non sono stati altrettanto prolifici. Altro campo di vaste applicazioni è lo studio della superficie cellulare di ricettori (Kucik et al. 1991, Schimdt et al. 1993, Thompson et al. 1996, Forscher et al. 1992).

2.2 Le pinzette ottiche

L'idea di base delle pinzette ottiche è stata originariamente proposta e dimostrata da Ashkin nel 1986 (Ashkin et al. 1986) e da allora un impressionante numero di sperimentazioni è stato eseguito in molti campi di ricerca (Block et al. 1989, Metha et al. 1999, Gustavson et al. 2002, McCann et al. 1999, Faucheux et al. 1995, Friesse et al. 1996). Allo stesso tempo sono stati sviluppati diversi modelli matematici al fine di fornire metodi analitici o numerici di calcolo delle forze fotoniche (Harada e Asakura 1996, Ashkin 1992, Ren et al. 1996, Wohlan et al. 1996, Maheu et al. 1988, Gouesbet et al. 1988, Rohrbach e Stelzer 2002).

L'efficacia del laser nell'intrappolare oggetti di piccole dimensioni (per lo più dielettrici, cioè sostanze con una conducibilità minore di un milionesimo di Siemens, che si polarizzano se investiti da un'onda elettromagnetica) risiede nella generazione di forze a partire dall'interazione tra fotoni e materia.

La luce è una radiazione elettromagnetica. La seguente espressione descrive il rapporto fra la velocità della luce c , la lunghezza d'onda λ e la frequenza ν :

$$c = \lambda \nu \quad (1)$$

La luce può essere considerata come un flusso di particelle (fotoni). L'energia di ogni singolo fotone è data da

$$E = h \nu \quad (2)$$

dove h è la costante di Plank. I fotoni trasportano una quantità di moto (classicamente la quantità di moto di un oggetto è il prodotto del relativo vettore di velocità e della massa; anche se, dalla teoria della relatività, la massa di fotoni "a riposo" è zero, essi trasportano la quantità di moto – dalla teoria dei quanti elettrodinamici). La quantità di moto di singolo fotone è pari a:

$$p = \frac{h\nu}{\lambda} \quad (3)$$

La direzione della quantità di moto di un fotone è la stessa di quella di propagazione della luce. Il cambiamento di quantità di moto è sempre una conseguenza dell'insorgere di un certo genere di forza. La quantità di moto della luce cambia se varia la sua intensità (ad esempio per fenomeni di assorbimento) o se varia la direzione di propagazione della luce (per riflessione o rifrazione). In

questi processi la luce esercita una forza sull'oggetto che l'assorbe, riflette o rifrange. In particolare, al momento dell'interazione tra l'onda laser e un oggetto c'è naturalmente scambio di energia, legato al momento posseduto dai fotoni, che genera una "radiation pressure" sulla particella colpita. In altre parole, quando un'onda elettromagnetica è assorbita, rifratta o riflessa da un oggetto c'è una variazione nel momento dei fotoni della luce. La conservazione del momento richiede necessariamente che si generi una pressione e quindi una forza sulla particella in questione. Di seguito saranno discusse le forze che agiscono su una particella sferica omogenea non assorbente di raggio a ed indice di rifrazione n_1 , immersa in un mezzo di indice di rifrazione n_2 , quando viene investita da un fascio gaussiano, fortemente focalizzato, nel modo fondamentale TEM_{00} , di lunghezza d'onda λ e potenza P . Una particella molto piccola posta in un fascio laser strettamente focalizzato è sottoposta a due forze differenti: la forza di scattering spinge la particella lungo la direzione di propagazione del fascio e il gradiente di forza tira la particella (con indice di rifrazione maggiore di quello del mezzo circostante) nel punto in cui l'intensità del campo è massima e quindi rappresenta una forza di richiamo verso la focale del sistema di lenti. La particella è confinata nella trappola ottica se le seguenti condizioni sono verificate: il gradiente di forza è maggiore della forza di scattering; l'indice di rifrazione della particella è più alto di quello del mezzo circostante; l'energia cinetica della particella è minore di quella della buca di potenziale creata dalla trappola (Figura 2.1). Sebbene il comportamento di una trappola ottica sia macroscopicamente lo stesso, dal punto di vista ottico-geometrico il problema dell'interazione onda-particella si differenzia in tre diversi casi a seconda che il raggio della sferetta a confronto con la lunghezza d'onda del fascio laser sia molto minore (regime di Rayleigh), molto maggiore (regime di ottica geometrica o di Mie) o dello stesso ordine di grandezza (regime di Lorentz-Mie). Per approfondimenti si rimanda all'appendice.

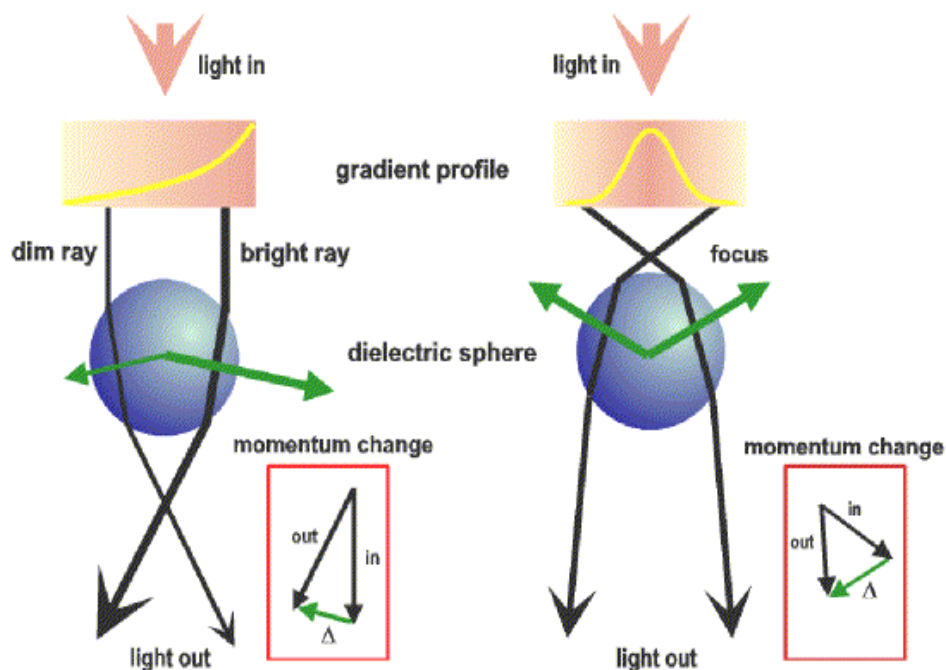


Figura 2.1 – Composizione del gradiente di forza (in) e della forza di scattering (out) nei casi di fascio laser poco (sinistra) e molto (destra) focalizzato.

2.2.1 Moto Browniano di una particella libera e intrappolata otticamente

Il moto Browniano costituisce uno dei paradigmi della fisica statistica classica. Già Lucrezio ne descriveva il fenomeno in un passo del *De Rerum Natura*. Per comprendere come una particella si muove in un liquido soggetta alle forze ottiche della trappola è opportuno innanzitutto discutere il

caso di moto termico o moto Browniano libero. La trattazione riportata di seguito è stata formulata nel 1908 da Pierre Langevin, sebbene la prima spiegazione quantitativa fosse di Einstein nel 1905. Una particella di massa m e raggio a immersa in un liquido, a causa delle continue collisioni con le molecole del liquido circostante, risulta agitata da un moto termico casuale. L'equazione seguente di Langevin descrive allora il moto della particella:

$$m \frac{d^2 r}{dt^2} = -\gamma \frac{dr}{dt} + F(t) \quad (4)$$

dove m è la massa della particella, r lo spostamento del suo centro di massa, γv la forza di Stockes, con $\gamma = 6\pi\eta a$ chiamato coefficiente idrodinamico. $F(t)$ rappresenta la forza termica casuale, mediamente nulla, dovuta all'interazione tra particella e molecole del liquido circostante. La casualità di questa forza è espressa dal fatto che se mediamo su più particelle o su differenti istanti iniziali abbiamo $\langle F \rangle = 0$ così come $\langle r \cdot F \rangle = 0$. L'effetto di una forza stocastica agente su un sistema può essere sostituita da forze random agenti su più sistemi. L'assunzione che questi due approcci conducano allo stesso risultato è nota come ipotesi periodica. Ritornando all'equazione di Langevin, moltiplicando scalarmente ambo i membri per r , utilizzando le seguenti identità:

$$\frac{dr^2}{dt^2} = 2r \frac{dr}{dt} \quad (5)$$

$$\frac{d^2 r^2}{dt^2} = 2r \frac{d^2 r}{dt^2} + 2\dot{r}^2 \quad (6)$$

e mediando nel tempo si ottiene:

$$m \ddot{s} + \gamma \dot{s} = 2nk_B T \quad (7)$$

dove si è fatto uso del teorema di equipartizione $\left\langle \frac{1}{2} m \left(\frac{dx}{dt} \right)^2 \right\rangle = \frac{1}{2} k_B T$ (8)

e si è posto $\langle r^2 \rangle = s$; inoltre n rappresenta il numero di dimensioni spaziali. L'equazione (8) può essere risolta fissando le condizioni al contorno $s(t) = 0$ e $\dot{s}(t) = 0$:

$$\langle x^2 \rangle = s(t) = \frac{2k_B T}{\gamma} \left[t + \frac{m}{\gamma} (e^{-\gamma t/m} - 1) \right] \quad (9)$$

L'andamento dello scarto quadratico medio (espresso in unità arbitrarie) in funzione del tempo è riportato in Figura 2.2.

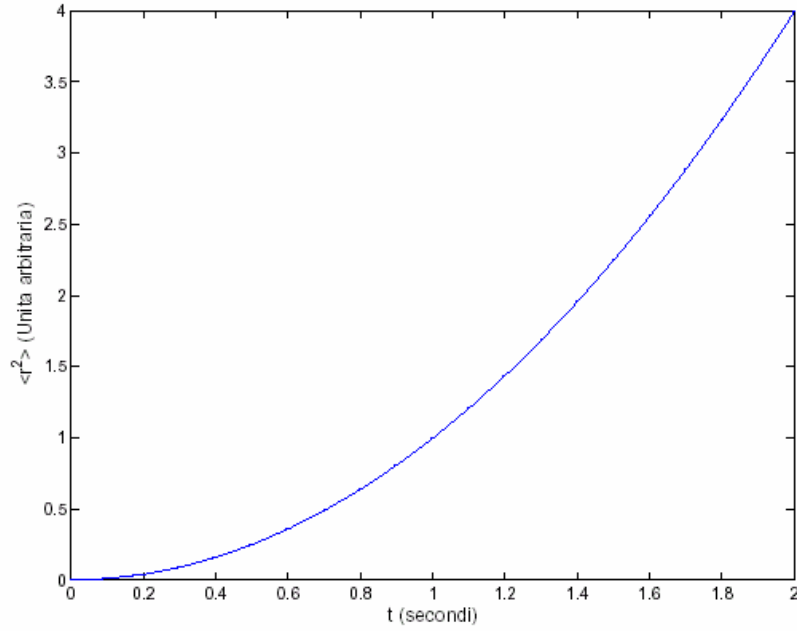


Figura 2.2 - Scarto quadratico medio di una particella che si muove di moto browniano all'interno di un fluido.

Per tempi brevi, lo spostamento quadratico medio, espandendo in serie di Taylor l'esponenziale della (9), assume un andamento parabolico con il tempo (regime balistico) ovvero:

$$\text{per } \left(t \ll \frac{m}{\gamma} \right) \quad s(t) = \langle r^2 \rangle \approx \frac{k_B T}{m} t^2. \quad (10)$$

Per tempi lunghi, l'esponenziale della (9) diviene trascurabile ottenendo, per lo scarto quadratico medio della particella, un andamento lineare col tempo ovvero:

$$\text{per } \left(t \gg \frac{m}{\gamma} \right) \quad s(t) \approx \frac{k_B T}{\gamma} t = 2nDt \quad (11)$$

dove $D = k_B T / \gamma$ è il coefficiente di diffusione. La (11) rappresenta la ben nota equazione di Stokes-Einstein.

Per avere un'idea dell'ordine di grandezza dei tempi e del significato delle approssimazioni fatte calcoliamo il valore del tempo caratteristico. Considerando una sferetta di polistirene di diametro $d = 1 \mu\text{m}$ e massa $m = 5 \times 10^{-12} \text{ g}$, posta in acqua distillata (viscosità $= 10^{-2} \text{ Poise}$) si ottiene:

$\frac{m}{\gamma} \approx 2 \times 10^{-7} \text{ s}$. Questo semplice esempio mostra che per osservare il moto balistico occorre

campionare il raggio quadratico medio su scale inferiori al microsecondo. In termini di D ogni coordinata $x(t)$ della particella che si diffonde è descritta da:

$$\text{Var}[x] = \overline{x^2} - \bar{x}^2 \quad (12)$$

L'escursione random della particella dal suo punto di partenza diventa sempre più grande col passar del tempo e ciò dipende oltre che dalla temperatura anche dal fattore idrodinamico del mezzo. Tali risultati valgono per una particella libera di muoversi nel liquido è soggetta solamente alle collisioni con le molecole del fluido circostante.

Diversi sono i risultati, invece, qualora la particella sia intrappolata otticamente con un fascio laser fortemente focalizzato. La particella continuerà ad essere animata da moto browniano, ma nell'equazione del moto (4) comparirà anche la forza dovuta al gradiente del campo ottico che da origine alla trappola. Quest'ultima, per piccoli spostamenti ed in una sola dimensione, può dunque essere riscritta come:

$$m \frac{d^2 x}{dt^2} + \gamma \frac{dx}{dt} + kx = F(t) \quad (13)$$

dove kx rappresenta proprio il termine di richiamo elastico della trappola ottica.

La soluzione di questa nuova equazione si ottiene in modo analogo all'equazione della diffusione libera, ottenendo il seguente risultato:

$$\langle x^2 \rangle = s(t) = \frac{nk_B T}{k} \left(1 - \frac{\mu_2 e^{-\mu_1 t} - \mu_1 e^{-\mu_2 t}}{\mu_2 - \mu_1} \right) \quad (14)$$

con $\mu_{1,2} = \frac{\gamma}{2m} \left(1 \pm \sqrt{1 - \frac{8km}{\gamma^2}} \right)$. L'andamento è riportato in Figura 2.3.

Come si può notare dalla (Figura 2.3) la soluzione per tempi lunghi tende a $k_B T / k$, mentre per tempi brevi $\left(t \ll \frac{1}{\mu_2} \right)$ si può dimostrare che assume il seguente valore:

$$s(t) \approx \frac{nk_B T \mu_1 \mu_2}{2k} t^2 = \frac{k_B T}{m} t^2 \quad (15)$$

essendo $\mu_1 \mu_2 = \frac{2k}{m}$, e infine per tempi intermedi varia linearmente con il tempo.

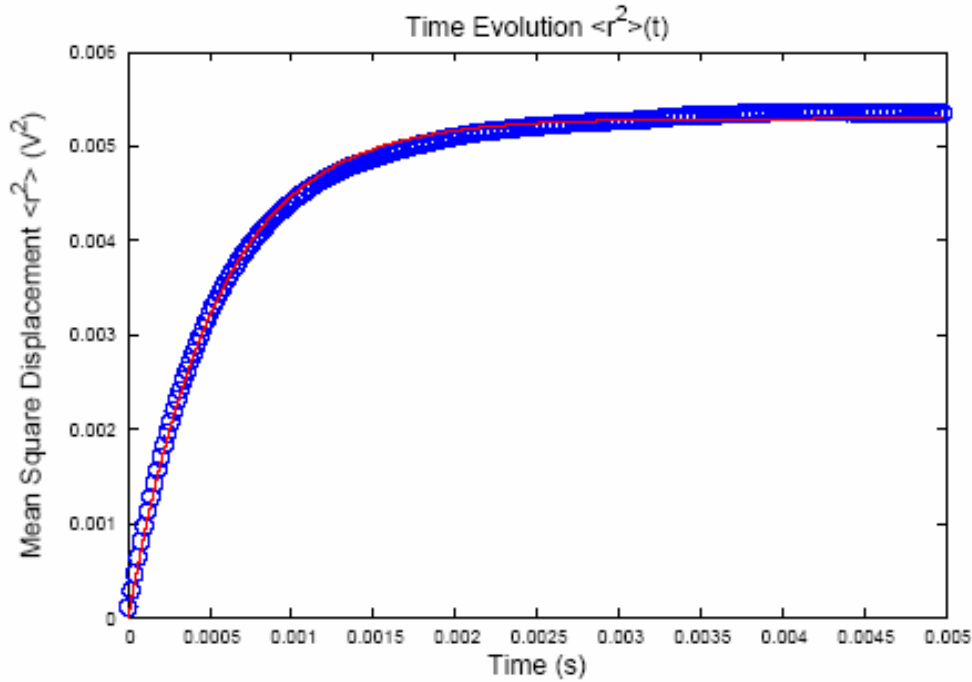


Figura 2.3 - Andamento dello spostamento quadratico medio di una microsfere di polistirene di raggio 628nm intrappolata otticamente.

2.2.2 Densità di potenza spettrale (PSD) e analisi numerica

L'analisi del moto Browniano di una particella intrappolata in un liquido viscoso ci permette di conoscere l'evoluzione temporale dello scarto quadratico medio della sua posizione. Ulteriori e preziose informazioni possono essere ricavate dalla decomposizione spettrale della varianza del moto Browniano. Partendo dall'equazione di Langevin monodimensionale, nella quale trascuriamo il termine inerziale essendo la massa della particella molto piccola ($m \ll 10^{-12} \text{ kg}$), si ha

$$\gamma \frac{dx}{dt} + kx = F(t) \quad (16)$$

Eseguendo la trasformata di Fourier si ottiene allora:

$$2\pi\gamma(f_c - if)\tilde{x}(f) = \tilde{F}(f) \quad (17)$$

dove $\tilde{x}(f)$ e $\tilde{F}(f)$ sono rispettivamente le trasformate di Fourier nello spazio delle frequenze di $x(t)$ e $F(t)$ e la quantità $f_c = \frac{k}{2\gamma\pi}$ è la frequenza caratteristica della trappola. Eseguendo inoltre il modulo quadro di entrambi i membri della (17) e ponendo $S_x(f) = |\tilde{x}(f)|^2$ si ha che lo spettro di potenza di una particella intrappolata otticamente è la lorentziana

$$S_x(f) = \frac{k_B T}{\gamma\pi^2(f_c^2 + f^2)} \quad (18)$$

essendo $|\tilde{F}(f)|^2 = 4\gamma k_B T$. La funzione $S_x(f)$ per il caso statico ($f = 0$) diventa

$$S_x(0) = \frac{k_B T}{\gamma\pi^2 f_c^2} \quad (19)$$

mentre per frequenze elevate si approssima con

$$S_x(f) = \frac{k_B T}{\gamma\pi^2 f^2} \quad (20)$$

Ciò mostra che la densità di potenza spettrale (PSD) di una particella intrappolata otticamente in un fluido esclusivamente viscoso e che si muove di moto Browniano è una curva Lorentziana caratterizzata da una semilarghezza a mezza altezza f_c e da un'ampiezza $S_x(0)$.

In figura 2.4 viene mostrato il tipico andamento della PSD di una particella intrappolata otticamente. Come si può notare l'andamento è diviso in due regioni dalla frequenza caratteristica. La regione dove l'andamento è costante, per basse frequenze (tempi lunghi) riflette il fatto che la sferetta è confinata nella trappola, mentre per alte frequenze (tempi brevi) lo spettro decresce con il quadrato della frequenza (pendenza caratteristica della diffusione libera), riflettendo il fatto che la sferetta non risente del confinamento.

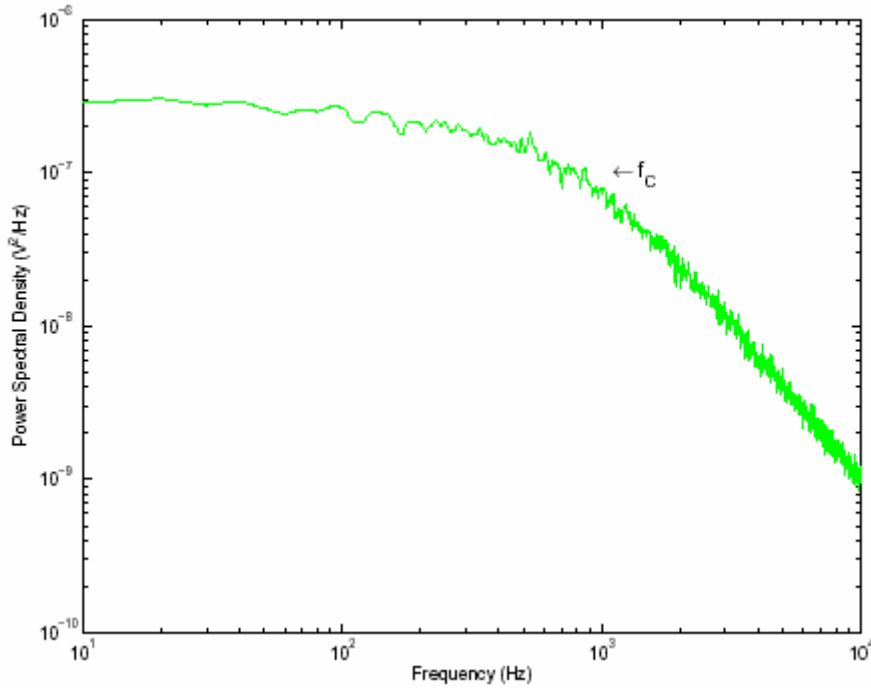


Figura 2.4 - Densità di potenza spettrale per una particella di polistirene di 1.25 μm immersa in acqua bidistillata.

La PSD è valida per un segnale $x(t)$ continuo. Per un set di N dati sperimentali $x_1, x_2, \dots, x_n$, acquisiti con risoluzione temporale $dt = \frac{1}{f_s}$ (f_s , frequenza di campionamento), la trasformata di Fourier è il numero complesso

$$\tilde{x}(f_m) = \sum_{n=1}^N x_n e^{\frac{i2\pi mn}{N}} \quad (21)$$

con $f_m = mdf$, $-\frac{N}{2} \leq m \leq \frac{N}{2}$ e $df = \frac{1}{Ndt}$. Affinché la (21) soddisfi la (18) è necessario imporre le seguenti condizioni:

1. Le frequenze di lavoro non devono essere maggiori di $f_s / 2$ (Gittes and Schimdt, 1998)
2. Occorre eseguire il “windowing” dei dati (Wright et al., 1993).

La prima condizione stabilisce che non è possibile riprodurre fedelmente il segnale qualora si lavori a frequenze maggiori di $f_s/2$ nota come frequenza di Nyquist. Infatti, se il campionamento non risponde a questo requisito potrebbero nascere fenomeni di “aliasing”. La seconda condizione si riferisce alla “finestratura” dei dati. In pratica la (18) tratta gli N dati acquisiti in un tempo finito T come una funzione di periodo T che può dar luogo a discontinuità e shift di fase che comprometterebbero la PSD. Definendo allora una funzione $g(n)$ che abbia la proprietà di azzerarsi all'estremità del set di dati si evita che lo spettro di potenza presenti oscillazioni artificiali generate dalla (21). Alla luce di queste condizioni è possibile calcolare la PSD sperimentale per frequenze positive cioè la densità di potenza spettrale unilatera. Scegliendo, dunque, $0 < m < N/2$ si ha:

$$S(f_m) = \frac{2}{N^2 df} |\tilde{x}(f_m)|^2 \quad (22)$$

e, inoltre

$$S(f_0 = 0) = \frac{1}{N^2 df} |\tilde{x}(0)|^2, \quad (23)$$

$$S(f_{N/2}) = \frac{1}{N^2 df} |\tilde{x}(f_{N/2})|^2. \quad (24)$$

Lo spettro di potenza si presenta quindi come un insieme di $N/2$ numeri indipendenti. Ciò indica che nel processo di calcolo della PSD si è perso metà del segnale originale costituito da N dati. Dall'equazione (18) e (24) si ottiene

$$S(0)df = \bar{x}^2 \quad (25)$$

e

$$\sum_{m=0}^{N/2} S(f_m)df = \langle x^2 \rangle \quad (26)$$

da cui

$$\sum_{m=1}^{N/2} S(f_m)df = \langle x^2 \rangle - \bar{x}^2 = Var(x) \quad (27)$$

Tale equazione mostra il legame tra la varianza del moto Browniano e la PSD che risulterà particolarmente utile, come si vedrà in seguito, nelle procedure di calcolo.

2.2.3 Microreologia con pinzette ottiche

Monitorando le fluttuazioni browniane della particella sonda si ottengono informazioni sulle proprietà meccaniche del mezzo in cui la particella si muove. Se il fluido è Newtoniano e la particella sonda è sferica, è possibile determinare la viscosità del mezzo misurando il coefficiente di diffusione D ed utilizzando la relazione di Stokes-Einstein:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta a} \quad (28)$$

Se invece, il mezzo è un fluido viscoelastico più complesso, ad esempio una soluzione polimerica, e la particella sonda è ancora una sferetta, la risposta è data dalla relazione di Stokes-Einstein generalizzata:

$$\tilde{G}(s) = \frac{k_B T}{\pi a s \langle \Delta \tilde{r}^2(s) \rangle} \quad (29)$$

con $s = i\omega$, la quale consente di determinare il modulo complesso di viscoelasticità.

Sia $F(t)$ la forza che agisce su una sferetta di raggio a e $x(t)$ il suo spostamento. La funzione risposta lineare $\alpha(f)$ della sferetta

$$\alpha(f) = \alpha'(f) + \alpha''(f) \quad (30)$$

fornisce il legame tra le trasformate di Fourier della forza $F(t)$ agente sulla particella e del suo spostamento $x(t)$ secondo la seguente espressione:

$$\tilde{x}(f) = \alpha(f) \tilde{F}(f) \quad (31)$$

Come si vede dalla (30) la funzione risposta risulta scritta come somma di una parte reale e di una parte immaginaria legate tra loro dalle relazioni integrali di Kramers-Kronig (Landau, 1980):

$$\alpha'(f) = \frac{2}{\pi} P \int_0^\infty \frac{\zeta \alpha''(\zeta)}{\zeta^2 - f^2} d\zeta \quad (32)$$

$$\alpha''(f) = -\frac{2}{\pi} P \int_0^\infty \frac{\alpha'(\zeta)}{\zeta^2 - f^2} d\zeta \quad (33)$$

dove P rappresenta il valore principale di Cauchy (ossia nel limite $\varepsilon \rightarrow 0$ si ha la somma di due integrali in ζ da 0 a $(f - \varepsilon)$ e da $(f + \varepsilon)$ a 1). L'importanza e l'utilità di queste formule è evidente: conoscendo la parte reale della funzione risposta si ottiene per integrazione la parte complessa e viceversa. Sebbene tali integrali siano dotati di soluzione analitica, il nostro lavoro ha richiesto una loro risoluzione numerica che si è presentata piuttosto laboriosa a causa della presenza di poli che rendono la funzione integranda non analitica nel piano complesso. Per ovviare a tale problema la (32) e la (33) vengono riscritte in termini differenti. Partiamo dalla trasformata di Fourier di $\alpha(f)$ nella quale per comodità si è scelto di usare la pulsazione ω anziché la frequenza:

$$\alpha'(\omega) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{+\infty} g(t) \vartheta(t) e^{i\omega t} dt \quad (34)$$

dove la funzione gradino $\vartheta(t)$ è tale che

$$g(t) \vartheta(t) = \begin{cases} 1 & \text{se } t \geq 0 \\ 0 & \text{se } t < 0 \end{cases}$$

Considerando la sola parte reale della (34) si scrive

$$\begin{aligned} g(t) \vartheta(t) &= \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \operatorname{Re} \left[\int_{-\infty}^{+\infty} \alpha(\omega) e^{i\omega t} d\omega \right] = \\ &= \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{+\infty} [\alpha'(\omega) \cos(\omega t) + \alpha''(\omega) \sin(\omega t)] d\omega \end{aligned} \quad (35)$$

e, poiché $g(-t) = 0$ per ogni $t \geq 0$, sostituendo $-t$ a t nella precedente equazione si ottiene

$$\frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{+\infty} [\alpha'(\omega) \cos(\omega t) - \alpha''(\omega) \sin(\omega t)] d\omega = 0 \quad (36)$$

con $t > 0$. Combinando allora la (36) con la (35) e sfruttando la parità della funzione $\alpha''(\omega)\sin(\omega t)$ si ottiene per $t > 0$:

$$g(t) = \frac{4}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{+\infty} \alpha''(\omega) \sin(\omega t) d\omega \quad (37)$$

Infine scrivendo

$$\alpha'(\omega) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{+\infty} g(t) \cos(\omega t) dt \quad (38)$$

e sostituendo in essa $g(t)$ con l'espressione (35) si ha

$$\alpha'(\omega) = \frac{2}{\pi} \int_0^{\infty} \cos(\omega t) dt \int_0^{\infty} \alpha''(\omega') \sin(\omega' t) d\omega' \quad (39)$$

si ottiene un'equazione che non contiene più singolarità e di più agevole risoluzione rispetto alla (34). Se adesso cerchiamo una relazione tra la fluttuazione della particella e la funzione risposta ci giunge in aiuto il teorema di fluttuazione-dissipazione scritto nel dominio delle frequenze:

$$\alpha''(f) = \frac{\pi}{2K_B T} f S(f) \quad (40)$$

L'equazione (40) fornisce il legame tra la PSD unilatera e la parte immaginaria della funzione risposta. Calcolando, dunque, la funzione $\alpha(\omega)$ è possibile risalire a $G(\omega)$ mediante la seguente relazione:

$$\alpha(\omega) = \frac{1}{6\pi G(\omega) a} \quad (41)$$

2.3 Pinzette ottiche: apparato strumentale

In questo lavoro di tesi è stato realizzato un sistema di pinzette ottiche per l'intrappolamento di particelle dielettriche. Uno schema dell'intero apparato sperimentale è mostrato in figura 2.5. La pinzetta ottica consta di:

- Una sorgente laser
- Un microscopio composto
- Un sistema di osservazione delle immagini
- Un sistema di rivelazione di posizione

Nel seguito daremo una descrizione generale del funzionamento dell'intero apparato, mentre, i dettagli sulla strumentazione più significativa utilizzata saranno forniti nei paragrafi successivi.

Il fascio laser, opportunamente collimato, passa attraverso una coppia di prismi anamorfici che servono a correggere la sua forma ellittica. Il fascio così collimato e approssimativamente circolare, viene riflesso da un sistema di specchi S_1 , S_2 e S_3 per essere iniettato nel microscopio invertito

Olympus IX70 attraverso una delle aperture di accesso, e più precisamente, in quella predisposta per la fotocamera. Lungo questo percorso ci sono una serie di elementi ottici necessari alla formazione delle immagini per la fotocamera, che sono stati rimossi perché inutili ai nostri scopi. Gli unici elementi che rimangono sono un cubo *beam splitter*, che viene utilizzato per iniettare il fascio laser nell'obiettivo, e la lente L_2 che serve a raccogliere l'immagine formata dall'obiettivo corretto all'infinito. Abbiamo trovato che la lente L_2 ha una focale uguale a $f \sim 175\text{mm}$. La lente L_1 ($f=250\text{mm}$), esterna al microscopio e montata su un traslatore X-Y-Z, è stata posizionata in maniera tale da formare un telescopio con la suddetta lente L_2 . In questo modo il fascio esce collimato dal telescopio L_1 - L_2 e viene focalizzato da un obiettivo, ad elevata apertura numerica, nel piano del campione per realizzare una trappola ottica, come sarà meglio chiarito nei prossimi paragrafi. Il campione viene illuminato da una lampada a mercurio la cui luce è convogliata su di esso dal condensatore. Le immagini prodotte dall'obiettivo vengono raccolte e ingrandite ulteriormente da un oculare (10x) e vengono osservate tramite una telecamera CCD sul monitor di un computer dotato di un'opportuna scheda di acquisizione video. Abbiamo utilizzato dei filtri IR tra il cubo e l'oculare per tagliare gran parte della luce laser diffusa dall'oggetto intrappolato che altrimenti raggiungerebbe la telecamera facendo perdere nitidezza alle immagini. Inoltre, il tavolino portacampione del microscopio è stato sostituito con un carrellino motorizzato della Marzhauser che oltre a svolgere la funzione di portacampione consente di spostare, a velocità controllate, il campione in direzione trasversa rispetto all'asse di propagazione del fascio laser. Sempre in figura 2.5, viene mostrato lo specchio dicroico per mezzo del quale si raccoglie la luce laser diffusa in avanti dall'oggetto intrappolato e la si convoglia su un fotodiodo a quadranti posizionato dopo il fuoco posteriore del condensatore del microscopio. I segnali forniti da tale fotodiodo passano prima attraverso un circuito di amplificazione e poi vengono registrati tramite un oscilloscopio e/o un analizzatore di spettro il quale fornisce direttamente la densità di potenza spettrale (PSD). L'oscilloscopio e l'analizzatore di spettro sono collegati tramite porta seriale ad un computer, dotato di una scheda per l'acquisizione dei dati, così che è possibile trasferire ed elaborare i dati in tempo reale. Nei prossimi paragrafi descriveremo più in dettaglio gli elementi che costituiscono il suddetto apparato sperimentale ed in particolare le caratteristiche utili alla realizzazione di una pinzetta ottica.

2.3.1 Le sorgenti laser

Le sorgenti laser utilizzate per la realizzazione della pinzetta ottica sono:

- un laser Ne-YAG con radiazione a 1064 nm e potenza massima di 3 W;
- un diodo laser a semiconduttore che emette radiazione a 830 nm con una potenza massima di circa 80 mW.

La scelta del laser per creare la trappola ottica deve essere dettata all'applicazione dello strumento. Nel nostro caso a 1064nm e a 830nm (per il laser a diodo) i campioni biologici o semplicemente soluzioni acquose non rischiano di essere riscaldate in quanto, come si vede nel grafico 2.6, l'acqua a tale frequenza presenta un minimo del coefficiente di assorbimento; si evita così un indesiderato riscaldamento del campione. Per quantificare la potenza persa si può considerare il seguente esempio: a 1064 nm l'acqua ha un coefficiente di assorbimento $\alpha \sim 0.6 \text{ cm}^{-1}$ ed essendo il campione spesso $L = 50 \text{ }\mu\text{m}$ e la potenza incidente $P = 10 \text{ mW}$ la potenza assorbita $\Delta P = \alpha LP$ risulta di circa 0.06 mW; va comunque detto che un'altra frazione della potenza viene persa a causa dell'assorbimento delle lenti e di tutta l'ottica necessaria per realizzare il nostro apparato.

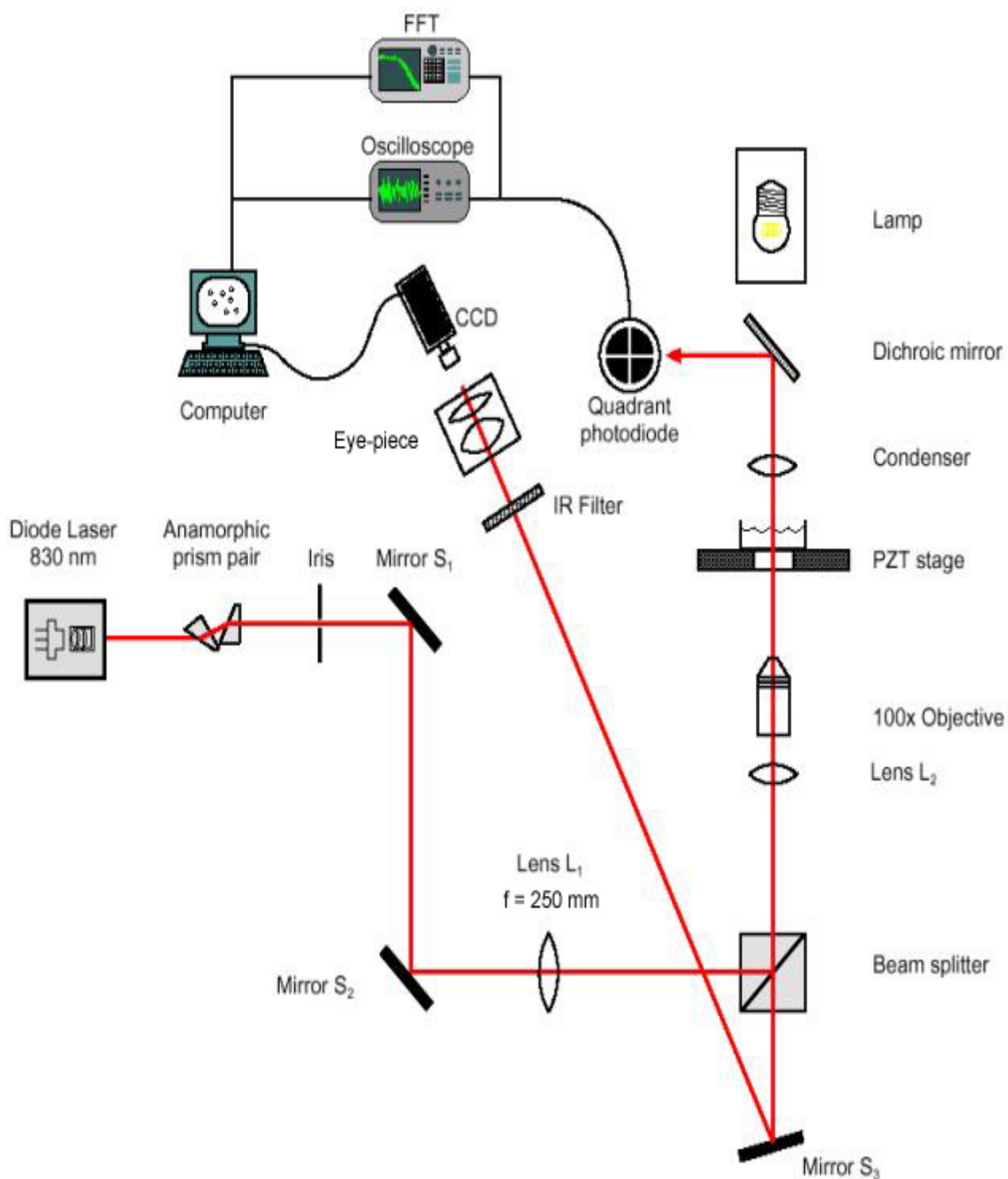


Figura 2.5 – Schema dell'apparato sperimentale: Pinzette Ottiche.

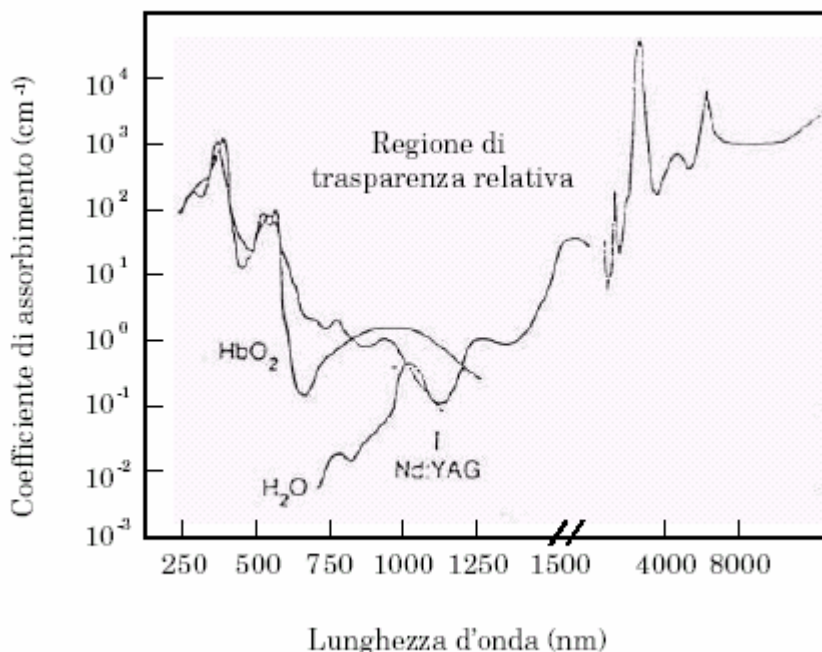


Figura 2.6 – Spettro di assorbimento dell'acqua.

Le caratteristiche e le specifiche tecniche del laser Nd-Yag sono riportate in Tabella 2.1. Il laser (Laser Quantum, modello Ventus) con un picco in potenza di 3W è pompato tramite diodi laser e presenta in uscita uno spot di 2.5 mm; emette nel vicino infrarosso e precisamente ad una lunghezza d'onda di 1064nm. L'altra sorgente utilizzata in questo lavoro è un laser a diodo singolo modo SDL-5311-G1 (Spectra Diode Labs) che emette nel vicino infrarosso alla lunghezza d'onda di 830 nm. Il fascio ha una forma ellittica e nel nostro caso, in base a quanto rivelato da una cartina IR, le dimensioni dei due assi sono ~3mm per quello minore e ~10mm per quello maggiore. E' stata utilizzata una coppia di prismi anamorfici orientati rispetto al fascio incidente in modo da ingrandire di un fattore tre l'asse minore. In questo modo otteniamo un fascio approssimativamente circolare di diametro circa 10 mm.

Tabella 2.1 – Specifiche tecniche del laser nd-yag.

Potenza	1.5W,3W
Lunghezza d'onda	1064nm
Spot	2.5mm
Modo trasverso	TEM_{00}
Larghezza di banda	$< 80GHz$
Divergenza	$< 1.2mrad$
Stabilità potenza	$< 1.0\%$
Rumore(1Hz – 100MHz)	$< 1.5\%$
Polarizzazione	Verticale
Rapporto di polarizzazione	$> 200 : 1$

2.3.2 Microscopio composto

Un microscopio in configurazione invertita insieme ad obiettivi corretti all'infinito, per la realizzazione di una pinzetta ottica, offrono alcuni vantaggi. Poiché il fascio laser si propaga dal

basso verso l'alto, lungo l'asse ottico z , la forza di scattering assiale che spinge la particella nella direzione di propagazione del fascio, è opposta alla forza di gravità ed inoltre spingendo la particella verso l'alto sfavorisce l'adesione di quest'ultima sul fondo del vetrino. Inoltre, gli obiettivi di cui è corredato tale microscopio sono progettati per lavorare in configurazione invertita per cui sono corretti dalle aberrazioni in prossimità del fondo del vetrino purché si utilizzino vetrini con uno spessore non superiore a 0.17 mm. Il microscopio utilizzato è un Olympus IX70 (Figura 2.7).

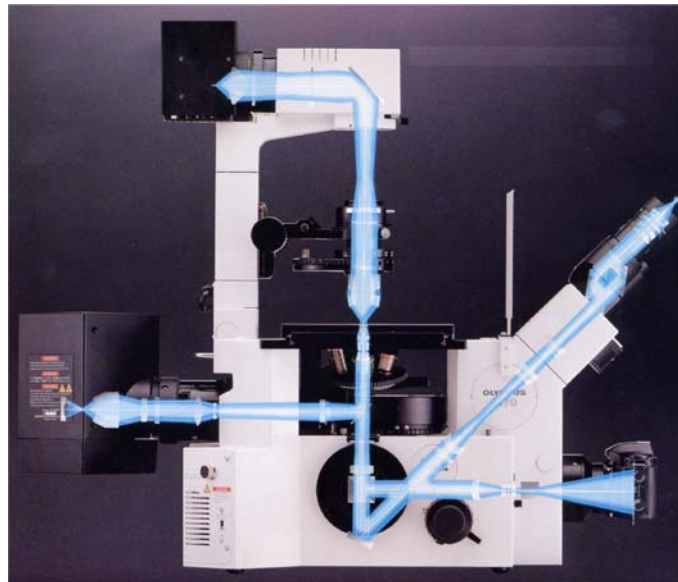


Figura 2.7 - Microscopio Olympus IX70 e possibili percorsi della luce

2.3.3 Apertura numerica NA

Una caratteristica importante di un obiettivo è la sua apertura numerica NA che è definita come il prodotto tra l'indice di rifrazione n del mezzo in cui è immerso l'obiettivo (aria, acqua, olio, glicerina etc.) e il seno del semiangolo θ_{max} del cono di luce dei raggi emessi da un oggetto puntiforme assiale e raccolti dall'obiettivo:

$$NA = n \sin \theta_{max} \quad (42)$$

Tale grandezza fornisce una stima della quantità di luce che l'obiettivo è in grado di raccogliere ed è strettamente legata al potere risolutivo dell'obiettivo stesso, ossia alla sua capacità di distinguere due punti oggetto. Il potere risolutivo, infatti, è proporzionale alla lunghezza d'onda λ e inversamente proporzionale all'apertura numerica NA . Si capisce, quindi, che maggiore è l'apertura numerica di un obiettivo e migliori sono le sue prestazioni in termini di risoluzione dell'immagine. Dalla relazione (42) è evidente che un obiettivo a secco, cioè immerso in aria ($n=1$), ha un'apertura numerica sempre inferiore all'unità. Per avere elevate aperture numeriche (>1) si scelgono obiettivi ad immersione ad acqua ($n=1.333$), o ad olio ($n=1.515$). Quando si realizza una pinzetta ottica, come già osservato nel capitolo 1, è necessario utilizzare un obiettivo con elevata apertura numerica in quanto la forza di gradiente, quella utile ai fini dell'intrappolamento, è prodotta dai raggi che incidono sull'oggetto con elevati angoli di incidenza.

2.3.4 Iniezione del fascio laser nell'obiettivo

Gli obiettivi utilizzati sono quelli della Olympus Planapo 100x e 60x rispettivamente ad olio (NA=1.4) e acqua (NA=1.2) entrambi corretti all'infinito. Si discute, in questo paragrafo, di come sia possibile realizzare l'intrappolamento approssimativamente nello stesso piano del campione, in modo da poterlo osservare ed intrappolare con un unico obiettivo. A tale scopo occorre che il fascio laser percorra a ritroso il percorso ottico nel microscopio per la formazione delle immagini. Quindi, se si utilizza un obiettivo che forma la prima immagine dell'oggetto ad una distanza di 160 mm dalla sua apertura di ingresso, è necessario che il fascio laser focalizzi in corrispondenza del suddetto piano immagine così che esso rifocalizzerà nel piano oggetto, realizzando qui la trappola ottica. Quando, invece, si utilizza un obiettivo corretto all'infinito, come nel nostro sistema, tale condizione si realizza semplicemente iniettando il fascio laser nell'obiettivo collimato. Per questo motivo, è stata introdotta, lungo il cammino ottico del fascio laser, la lente L_1 la quale è stata posizionata in modo da formare un telescopio con le lente L_2 . Inoltre, la lunghezza focale della lente L_1 è stata scelta in modo da soddisfare anche un'altra condizione fondamentale per la realizzazione di una buona trappola ottica, detta condizione di *overfilling*, e cioè di avere un fascio laser che illumini uniformemente l'apertura d'ingresso dell'obiettivo per sfruttare al massimo la sua apertura numerica e produrre così raggi molto convergenti. Questo dipende sia dalla dimensione D_{in} del fascio in ingresso alla lente sia dalla focale f di quest'ultima. Nel nostro caso, la dimensione del fascio all'ingresso del telescopio è $D_{in} \sim 10\text{mm}$, ottenuta dall'ingrandimento dei prismi anamorfici; abbiamo scelto, dunque, una lente L_1 con focale $f=20\text{mm}$ in modo tale da avere all'uscita del telescopio un fascio di dimensioni $D_{out} = 8.7\text{ mm}$. Poiché le dimensioni di ingresso della lente dell'obiettivo 100x da noi utilizzato sono di $\sim 7\text{mm}$, abbiamo così realizzato la condizione di *overfilling*.

2.3.5 La telecamera e la scheda video

Le immagini del campione prodotte dal microscopio vengono raccolte da una telecamera CCD (Securit TMO 500) e visualizzate su un PC tramite una scheda grafica (Studio PCTV RAVE) con input video.

2.3.6 Sensore di posizione

Per monitorare gli spostamenti della particella intrappolata abbiamo utilizzato un fotodiodo a quadranti QD50-0-SD (Centrovion Silicon Quadrant Photodiode with position sensing circuitry). Il diametro della sua area attiva è 7.98 mm, mentre la separazione tra i quadranti è di 0.2 mm. Nella Figura 2.8 ne è riportata una foto, mentre nella Figura 2.9 è riportato il suo circuito di amplificazione.



Figura 2.8 - Foto del fotodiodo a quadranti QD50-0-SD

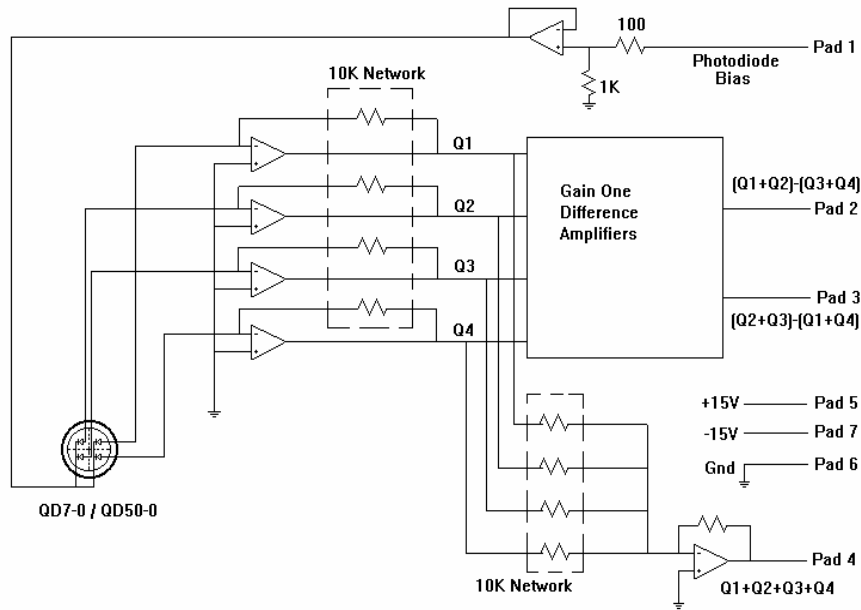


Figura 2.9 - Circuito di amplificazione del fotodiodo qd50-0-sd.

Il fotodiodo a quadranti è uno strumento in grado di fornire sia gli spostamenti assiali che quelli laterali di una sferetta con risoluzione nanometrica. Infatti, il fascio incidente con una fissata intensità genera quattro segnali S_1 , S_2 , S_3 e S_4 che con degli amplificatori operazionali vengono sommati e sottratti per generare i seguenti segnali:

$$S_x = \frac{(S_1 + S_2) - (S_3 + S_4)}{S_0} \quad (43)$$

$$S_y = \frac{(S_1 + S_4) - (S_2 + S_3)}{S_0} \quad (44)$$

$$S_z = \frac{S_1 + S_2 + S_3 + S_4}{S_0} \quad (45)$$

Gli S_i con $i = x, y, z$ sono i segnali relativi allo spostamento della sferetta lungo le direzioni x, y, z , mentre S_0 è il segnale di normalizzazione che si ottiene quando non è presente alcun oggetto nella

trappola. Per la descrizione dettagliata del principio di funzionamento di un fotodiodo a quadranti posto nel piano focale posteriore del condensatore come mostrato in Figura 2.10 si rimanda agli articoli di Pralle (Pralle et al., 1999) e all'articolo di Rohrbach (Rohrbach et al., 2002) dove sono analizzati rispettivamente il caso di una particella di dimensioni molto piccole e quello di dimensioni arbitrarie. In entrambi i casi si dimostra che il segnale del fotodiodo a quadranti è dato dall'interferenza tra la luce diffusa dalla sferetta e quella non diffusa.

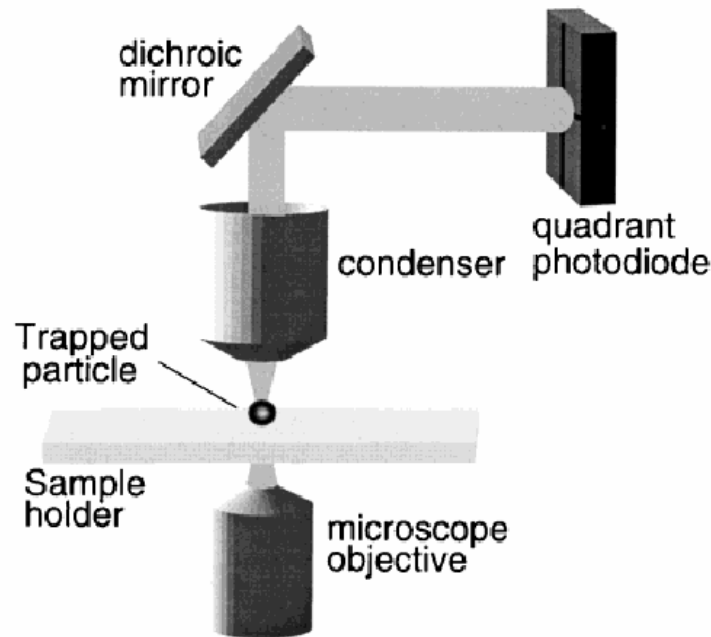


Figura 2.10 - Schema di un fotodiodo a quadranti posto nel piano posteriore di un condensatore.

2.3.7 Oscilloscopio digitale e analizzatore di spettro (FFT analyzer)

I segnali elettrici legati al moto della nostra particella sono visualizzati su un oscilloscopio digitale a quattro canali (Tektronix) TDS5034B con banda passante di 350MHz. Inoltre grazie ad un analizzatore di spettro, MODEL SR760 FFT spectrum analyzer otteniamo un profilo della densità di potenza spettrale in tempi molto brevi rispetto alle nostre routine in ambiente Matlab. Un particolare settaggio di questo apparecchio ci consente di acquisire 1000 PSD e visualizzare poi la loro media; ciò risulta utile per rendere la PSD molto regolare. L'intervallo delle frequenze di lavoro è compreso tra 0 e 12 kHz.

2.3.8 Traslatore motorizzato e cella di misura

Per calibrare il nostro sistema di pinzette ottiche, come detto in precedenza, abbiamo bisogno di spostare il campione con velocità costanti note (da 0 a qualche centinaia di $\mu\text{m/s}$) nella direzione trasversale rispetto all'asse ottico del sistema. Per fare questo, abbiamo utilizzato un tavolino portacampione motorizzato della Marzhauser (Precision positioning systems LPTEP/ECO-STEP). Questo consente di impostare velocità controllate nell'intervallo 10 $\mu\text{m/s}$, 1 mm/s.

Tutte le celle di misura sono state realizzate mediante la seguente procedura. Abbiamo disposto sul vetrino coprioggetto due striscioline di mylar di spessore 50 μm come distanziatori, e dopo avervi

adagiato il vetrino coprioggetto, abbiamo sigillato i due vetrini, con dello smalto per unghie, lungo i lati paralleli al mylar. In questo modo si è realizzata una cella di circa 1 cm^2 per $50\text{ }\mu\text{m}$, chiusa su due lati dallo smalto e aperta sugli altri due. La soluzione contenente le sferette di polistirene è stata inserita all'interno della cella per capillarità mediante una pipetta Pasteur; una volta riempita la cella abbiamo chiuso con lo smalto anche gli altri due lati per evitare l'evaporazione della soluzione. Nella figura 2.11 è riportata una sezione della cella di misura.

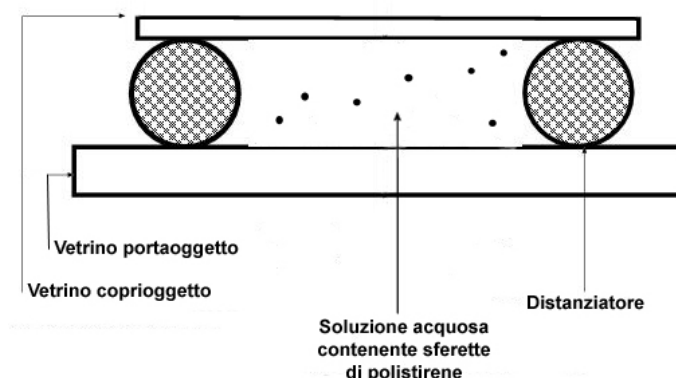


Figura 2.11 - La cella di misura

Inoltre, sono stati realizzati anche dei campioni di spessore $15\text{ }\mu\text{m}$, utilizzando una procedura simile a quella appena descritta. In particolare, non è stato utilizzato il mylar, bensì una soluzione contenente sia le sferette sonda, che delle sferette di diametro maggiore che fungessero da distanziatori. In tal caso, si è depositata una goccia di soluzione sul vetrino coprioggetto e si è adagiato sopra il coprioggetto. Dopo avere coperto il vetrino coprioggetto con una cartina ottica, si è esercitata una lieve pressione su quest'ultimo affinché le sferette distanziatrici fossero ben a contatto con i due vetrini. Infine, la cella è stata chiusa con lo smalto su tutti i lati.

2.4 La scelta del metodo d'indagine diffusiva: la FRAP

La tecnica FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*) consente la determinazione del coefficiente di diffusione di macromolecole in fusi polimerici, in soluzione o in membrane polimeriche sfruttando l'analisi di misure di fluorescenza eseguite su una piccola porzione di campione sottoposta a fotoestinzione. La versatilità appena descritta consente misurazioni di diffusività anche in campioni sottoposti a modificazioni di tipo morfologico, il che suggerisce questa tecnica come tra le più adatte ad investigare sui meccanismi di gelazione di idrogeli (Fang et al., 1991). Uno dei maggiori pregi della tecnica FRAP è la non invasività. Ciò rappresenta un aspetto fondamentale nel caso in cui lo studio delle proprietà diffusive sia rivolto ad applicazioni di tipo biomedico, poiché ne consente l'impiego in campi di ricerca quali, ad esempio, l'ingegnerizzazione di macromolecole per un più efficace *drug delivery* o la comprensione dei meccanismi di trasporto delle proteine all'interno di un essere vivente. Sempre tenendo conto di applicazioni in campo biomedico e biofisico, è altrettanto apprezzabile il fatto che i test sono effettuati su parti ridottissime di campione (intorno ai $20\text{-}30\text{ }\mu\text{m}$), permettendo un risparmio di materiali particolarmente rari o preziosi, quali ad esempio i campioni biologici. Data la ridotta zona di osservazione del campione ne consegue, inoltre, che la durata dell'esperimento è significativamente minore rispetto a quella delle tecniche classiche ed è inoltre possibile indagare eventuali effetti di non omogeneità o anisotropia del mezzo (Kao et al. 1996).

2.4.1 Principio di funzionamento

La tecnica FRAP si basa sullo studio della ricombinazione delle macromolecole fluorescenti di una sostanza in esame, condotto analizzando misure di fluorescenza eseguite su una ben definita regione del campione, preventivamente sottoposta ad estinzione della fluorescenza (Peters et al. 1974, Axelrod et al. 1976, Jacobson et al. 1976, Edidin et al. 1976).

La condizione iniziale dell'esperimento, in cui il campione è all'equilibrio, è un sistema uniformemente fluorescente, vale a dire con una concentrazione spaziale uniforme di fluorofori "accesi". Una piccola e ben definita regione del campione viene poi esposta, per un opportuno intervallo di tempo (1 ms – 200 ms), ad una radiazione laser di opportuna lunghezza d'onda ed intensità (in genere Argon ad una potenza massima di 0.5 W), che spegne la fluorescenza in quella regione, generando, in un'area con fluorescenza inizialmente uniforme, una regione (*spot*) caratterizzata da una scarsa intensità di fluorescenza. Tale fenomeno, detto *photobleaching* (biancheggiamento o candeggiamento), si determina a seguito dell'eccitazione di fluorofori con elevata intensità di radiazione (Benson et al. 1985, Song et al. 1995). Gli elettroni delle molecole fluorescenti presenti nell'area colpita dal laser assorbono un'elevata energia e raggiungono livelli energetici di eccitazione caratterizzati da canali di decadimento che non producono fluorescenza e che escludono la possibilità che l'elettrone torni allo stato di pre-fluorescenza (Figura 2.12).

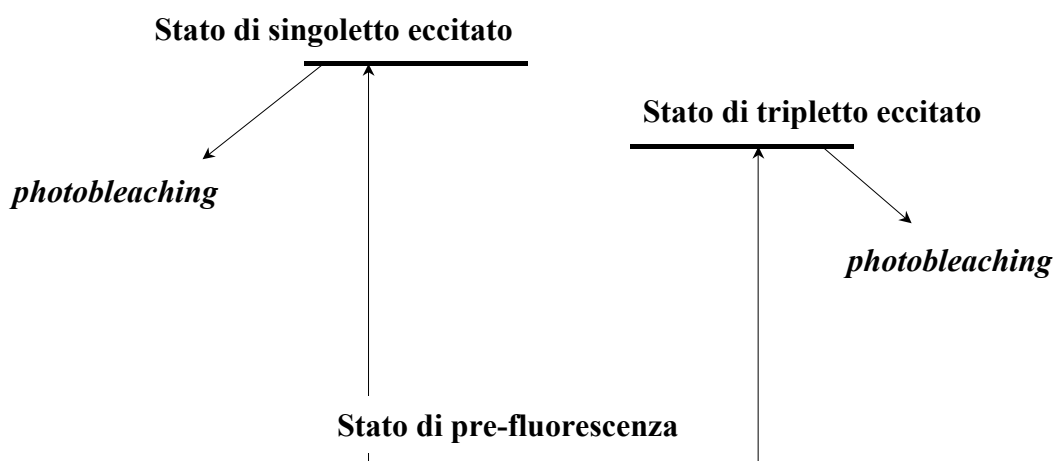


Figura 2.12 - Decadimenti non caratterizzati da fluorescenza (effetto di *photobleaching*).

La regione colpita, in cui la concentrazione di fluorofori "accesi" è nulla, è detta regione di *bleaching* ed è caratterizzata da una distribuzione gaussiana di intensità di fluorescenza, essendo stata generata da un raggio laser con le stesse caratteristiche. In quest'area la fluorescenza tende a ricostituirsi gradualmente col passare del tempo, fino ad uniformarsi nuovamente in tutto il campione grazie ai fenomeni di trasporto dei fluorofori accesi dalla regione ad alta a quella a bassa fluorescenza. Tale processo di ridistribuzione dei fluorofori "spenti" e "accesi" è effetto di un moto statistico, essendo le due regioni, otticamente diverse per fluorescenza, ma completamente indistinguibili dal punto di vista sia chimico sia fisico.

Dal punto di vista teorico, il trasporto dei fluorofori può essere solo diffusivo, solo convettivo o dovuto ad entrambi i meccanismi e la velocità di ricombinazione della fluorescenza è funzione dei parametri di trasporto del sistema, quindi, trattandosi di un processo macroscopico di autodiffusione, descritto dalle leggi di Fick (Equazione 46), confrontando la soluzione di quest'equazione col profilo temporale dell'intensità di fluorescenza del campione, è possibile valutare il valore del coefficiente di diffusione e/o della velocità di convezione del sistema. Il fenomeno realizzato con la FRAP e i dati relativi all'intensità di fluorescenza con essa rilevati nei

vari istanti hanno un andamento del tipo visualizzato in Figura 2.13. Tale andamento mostra che le molecole fluorescenti del campione, eccitate dalla lampada al mercurio, inizialmente emettono fluorescenza uniforme (A), poi una piccola regione del campione viene fotoestinta dal raggio laser (B) e i moti browniani delle molecole disperdono la fluorescenza candeggiata generando un progressivo recupero dell'uniformità di intensità luminosa nel campione (C, D, E).

L'andamento nel tempo dell'intensità di fluorescenza, essendo la concentrazione dei fluorofori accesi proporzionale a tale intensità, permette, quindi, di risalire ai parametri di trasporto delle molecole del sistema esaminato.

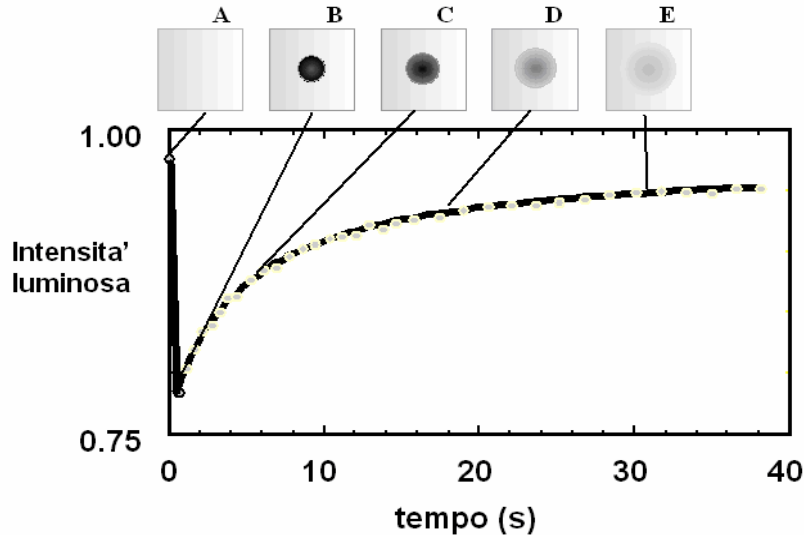


Figura 2.13 - Andamento nel tempo dell'intensità di fluorescenza.

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \cdot \nabla^2 c \quad (46)$$

2.4.2 Sistemi di rilevazione e metodo di analisi delle immagini

Alla luce di quanto detto, risulta di fondamentale importanza la determinazione della variazione nel tempo dell'intensità di fluorescenza e quindi la scelta del sistema di rilevazione. Tradizionalmente tale misura veniva eseguita tramite un fotomoltiplicatore (PMT), in sostanza una cellula fotoelettrica molto sensibile in grado di fornire il valore dei fotoni emessi dai fluorofori accesi presenti nella zona di *bleaching*. Nel caso gli esperimenti vengano condotti con questo strumento, giacché il PMT può rilevare solo l'intensità totale della radiazione incidente sulla propria area di rilevazione, si dispone solo di valori integrati che costituiscono informazioni esclusivamente temporali riguardo al processo fisico in esame. Inoltre, la notevole sensibilità dello strumento, essendo il rilevatore basato sull'amplificazione del segnale in ingresso, determina dei margini di tolleranza al disturbo relativamente bassi.

In alternativa all'uso del fotomoltiplicatore è possibile impiegare una telecamera CCD (Charge Coupled Device), che permette di avere anche informazioni spaziali sul processo studiato (Chan et al. 1996). Adoperando la telecamera, i vantaggi, sia nell'analisi della diffusione isotropa che in quella anisotropa, sono notevoli perché, registrando ad intervalli di tempo regolari immagini della regione di interesse del campione, subito dopo il biancheggiamento, si dispone della distribuzione bidimensionale nel tempo dell'intensità di fluorescenza lungo il piano focale, per cui è possibile un'analisi spaziale del fenomeno, oltre che temporale.

Un altro evidente vantaggio garantito dall'uso della telecamera è che essa consente di ottenere, direttamente dai dati misurati, i profili di concentrazione delle sonde fluorescenti, piuttosto che il valore di una concentrazione media, frutto dell'integrale della stessa sull'area di interesse. La possibilità di costruire più curve di recupero della fluorescenza da ogni esperimento FRAP, permette di ottenere più valori di D che, mediati opportunamente, forniscono un valore più attendibile del coefficiente di diffusione.

Un altro aspetto di cui è molto importante tener conto per l'applicazione della tecnica FRAP è la scelta del metodo di analisi delle immagini acquisite. La metodologia usualmente adottata è l'analisi fotometrica diretta, che consiste nel seguire e studiare nello spazio l'andamento temporale dell'intensità di fluorescenza, limitatamente alla regione del photobleaching (Jain et al. 1990). Si ipotizza che il fascio laser abbia un profilo spaziale gaussiano, per cui si assume che il profilo spaziale dell'intensità del candeggiamento sia gaussiano. In questa ipotesi, nel caso di diffusione isotropa, i dati sperimentali relativi all'intensità di fluorescenza rilevata, vengono interpolati (*fitting*) con l'equazione che descrive l'evoluzione nel tempo della concentrazione dei fluorofori accesi, il cui andamento è noto nelle ipotesi fatte, e ciò consente di valutare il coefficiente di diffusione del tracciante nel mezzo in esame.

Tale tipo di analisi risulta notevolmente influenzata dall'effettiva forma dello spot di biancheggiamento, ovvero del fascio laser, che in un apparato come quello della FRAP, purtroppo, non è possibile controllare così bene da garantire che il suo profilo sia perfettamente gaussiano, come il metodo ipotizza. Inoltre è noto che le immagini ottenute tramite la microscopia di fluorescenza sono contaminate dalla luce dei piani non di fuoco, il cui contributo, nella determinazione del coefficiente di diffusione, diventa tanto più rilevante quanto più il campione è spesso. Per superare tali limiti è possibile analizzare le immagini di fluorescenza, relative alla regione di *bleaching*, nello spazio di Fourier, procedendo con la Spatial Fourier Analysis (SFA) (Tsai et al. 1991).

Assumendo trascurabile il gradiente di concentrazione dei fluorofori accesi lungo l'asse ottico, il cui contributo è sempre molto inferiore a quelli del piano focale, è possibile descrivere con un'equazione di diffusione bidimensionale la variazione di concentrazione degli stessi nella regione di fotoestinzione.

In un mezzo isotropo tale processo è descritto dall'equazione (1):

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \cdot \nabla^2 c \quad (47)$$

dove D è il coefficiente di autodiffusione e $c(x, y, t)$ è la concentrazione dei fluorofori accesi.

La soluzione analitica del problema in esame nello spazio (x, y, t) può essere anche molto complessa e la trasformata bidimensionale di Fourier offre uno strumento efficace di risoluzione dell'equazione (47) per un'arbitraria condizione iniziale e condizioni al contorno del tipo:

$$x \rightarrow +\infty, y \rightarrow +\infty \quad c(x, y, 0) = \text{cost}$$

che possono essere ragionevolmente assunte vere per lo *spot* di *bleaching* qualora questo sia abbastanza piccolo rispetto all'area totale.

Se consideriamo $c(x, y, t)$ una funzione periodica di periodo L_x lungo x e L_y lungo y , possiamo eseguire la trasformata di Fourier della (47) ottenendo:

$$\frac{\partial}{\partial t} C(u, v, t) = -4\pi^2(u^2 + v^2)D \cdot C(u, v, t) \quad (48)$$

con $C(u, v, t)$ trasformata di Fourier bidimensionale di $c(x, y, t)$, rispetto a x e y , e u e v frequenze spaziali. La soluzione diventa così un semplice esponenziale:

$$C(u, v, t) = C(u, v, 0) \exp[-4\pi^2(u^2 + v^2)D \cdot t] \quad (49)$$

dove $C(u, v, 0)$ è il valore della trasformata al tempo $t=0$; essendo la concentrazione di fluorofori proporzionale all'intensità di fluorescenza, questo andamento è proprio quello della trasformata spaziale della luminosità misurata.

Dalla teoria che descrive la formazione delle immagini possiamo spiegare perchè la concentrazione di fluorofori è proporzionale all'intensità del segnale di fluorescenza (che è la grandezza misurata). Sappiamo, infatti, che le ottiche del microscopio possono essere considerate un sistema di traslazione lineare invariante, caratterizzato dalla point-spread function (PSF) (Castelmann et al. 1979) che descrive l'immagine creata quando una sorgente di luce puntiforme è osservata attraverso il microscopio. Questa funzione, descrivendo le distorsioni causate all'immagine dalle proprietà di light scattering ed assorbimento del campione stesso, permette di assumere che, nell'ipotesi che la concentrazione di fluorofori non sia tanto alta da causare *self-bleaching*, la fluorescenza emessa dal sistema esaminato sia proporzionale a tale concentrazione. Questa relazione, che si conserva per la natura della PSF anche nello spazio di Fourier, permette di scrivere:

$$I(u, v, t) = C(u, v, t) \cdot OTF(u, v) \quad (50)$$

dove OTF è la trasformata nello spazio di Fourier della PSF (Berck et al. 1993).

Nello spazio di Fourier risulta quindi che

$$\frac{I}{I_0} = \frac{C}{C_0} = \exp[-4\pi^2 q^2 D \cdot t] \quad (51)$$

dove $I_0 = I(u, v, 0)$, $C_0 = C(u, v, 0)$ e $q^2 = u^2 + v^2$.

Con questa tecnica, dalle misure di fluorescenza, per ogni frequenza spaziale, è possibile calcolare un coefficiente di diffusione D senza determinare la vera distribuzione di concentrazione dei fluorofori nel campione. Naturalmente, essendo impiegata su dati sperimentali, questa procedura non può che essere discreta e quindi applicata ad un numero *fre* di frequenze prescelte, le cui componenti sono:

$$u_i = \frac{2\pi \cdot i}{L_x} \quad v_i = \frac{2\pi \cdot i}{L_y}$$

dove $i \in [1, fre]$.

In questo modo, però, si hanno valori di D diversi in corrispondenza dei diversi $q_i = u_i + v_i$; infatti, alle alte frequenze, il decadimento è più rapido che alle basse e i risultati relativi alle basse frequenze sono più soggetti agli effetti del rumore. Per ottenere un valore attendibile di D , è necessario che le frequenze a cui calcolare i diversi D vengano scelte opportunamente e che, per eseguire la media, si tenga conto della validità di ogni valore definendo degli anelli nello spazio di Fourier, secondo lo studio condotto da Tsay e Jacobson (Tsai et al. 1991). In ogni caso, però, lo spettro della trasformata di cui si viene a disporre, essendo ottenuto da valori discreti, non può essere molto

accurato ed inoltre il fenomeno di Gibbs, secondo il quale si hanno delle distorsioni alle alte frequenze, lo altera ulteriormente.

Un'altra possibile causa di errore associata all'utilizzo della trasformata di Fourier è dovuta al fatto che la funzione alla quale va applicata la trasformazione non è periodica, come richiesto anche dalla procedura discreta. Problema che è possibile superare adottando un particolare metodo di correzione denominato *padding* e *windowing* (Berck et al. 1993).

La sensibilità ed i limiti di applicabilità di questo metodo di analisi è stata valutata utilizzando un programma di simulazione appositamente realizzato presso il Dipartimento di Ingegneria dei Materiali e della Produzione (Capone 2000). Tale programma, simulando un esperimento di FRAP completo, consente di valutare l'attendibilità dei risultati ottenibili anche in condizioni sperimentali non ottimali, come la presenza di rumore di fondo, e di suggerire, a seconda delle condizioni sperimentali, accorgimenti da adottare riguardo alla dimensione dello *spot* e alla modalità di analisi delle immagini.

2.5 FRAP: apparato strumentale

Un apparato sperimentale di FRAP, in genere, è costituito da una sorgente luminosa in grado di eccitare i fluorofori del campione affinché emettano una fluorescenza continua, un laser monolinea con cui poter compiere il photobleaching in una piccola regione del campione, un microscopio adatto ad osservazioni in fluorescenza e un rilevatore collegato ad un computer per acquisire ed analizzare le immagini. Presso il laboratorio di Ingegneria Molecolare e Cellulare del Dipartimento di Ingegneria dei Materiali e della Produzione, al fine di ottenere maggiori potenzialità di sperimentazione, si è deciso di non ricorrere ad uno strumento reperibile in commercio, ma di realizzarne uno attraverso la scelta di componenti che permettessero un'elevata flessibilità di applicazione. In Figura 2.14 ne è riportato lo schema di funzionamento. Come sorgente luminosa è stata utilizzata una lampada a mercurio da 100 W (USHIO, modello USH-02D), il cui spettro di emissione è riportato in Figura 2.15. Affinché la luce sia in grado di eccitare i fluorofori presenti nel campione, sul percorso della luce trasmessa è stato posto un filtro, in grado di isolare solo le radiazioni di lunghezza d'onda compresa tra 470nm e 490nm, che è la banda spettrale di assorbimento della fluoresceina, scelta come marker per le sonde utilizzate.

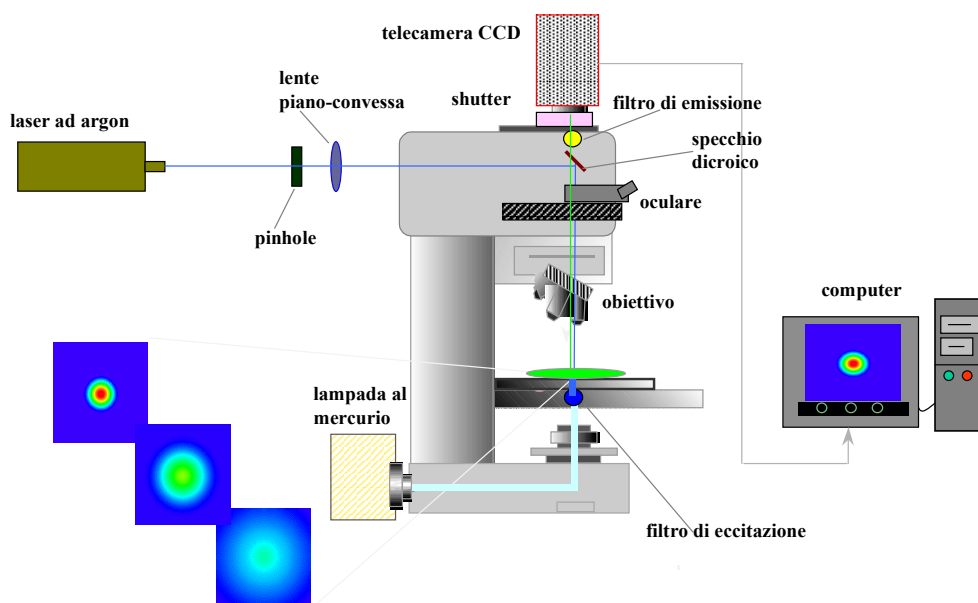


Figura 2.14 - Schema dell'apparecchiatura sperimentale di FRAP

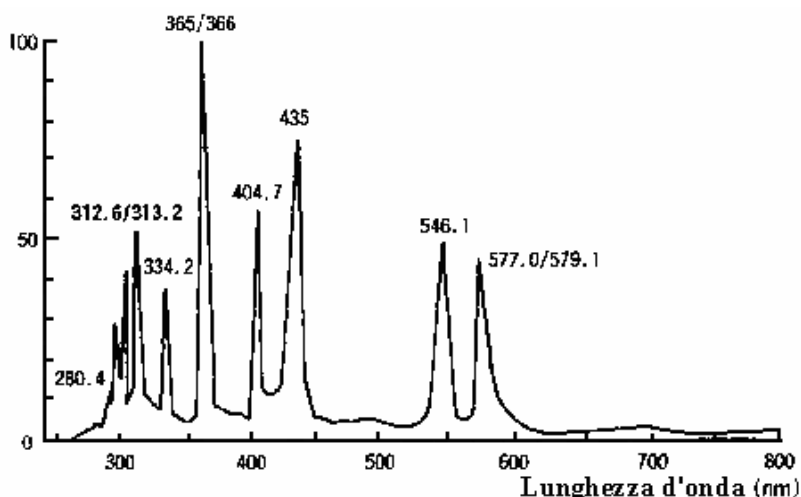


Figura 2.15 - Spettro di emissione della lampada a mercurio.

Per indurre il photobleaching si è scelto di utilizzare un laser a ioni di Argon (Coherent, Modello Innova 90-2). Grazie al suo ampio spettro di emissione dall'ultravioletto al visibile (350-530nm), può essere impiegato con i più diffusi fluorofori e marcatori fluorescenti, e grazie alla possibilità di essere usato in regime di singola linea (oltre che di multilinea, avendo due picchi di emissione a 488nm e 514nm) risulta particolarmente indicato per eccitare o spegnere la fluoresceina. Per controllare la durata dell'esposizione del campione al raggio laser è stato impiegato un otturatore meccanico (*shutter*) gestito dal computer e posto all'uscita del laser. Il microscopio utilizzato è un Olympus AX60 adatto a misure di fluorescenza in geometria di riflessione. Esso è corredato di un modulo di raccolta della luce retroriflessa che permette di osservare il campione, oltre che con oculari, anche con la telecamera. Questa è munita di uno shutter di protezione, la cui apertura e chiusura, grazie ad un apposito circuito, è opportunamente sfasata rispetto a quella dello *shutter* posto all'uscita del laser, al fine di evitare che la luce molto intensa del laser possa raggiungere il sensore della telecamera. La CCD impiegata per rilevare l'intensità della fluorescenza emessa dal campione durante l'esperimento di FRAP è di tipo digitale, ad alta velocità di acquisizione e intensificata (Princeton Instruments, modello Pentamax). Le caratteristiche sono indicate in Tabella 2.2.

Tabella 2.2 – Caratteristiche CCD Pentamax

<i>Velocità massima di trasferimento</i>	5 Mbit/s
<i>Dimensione CCD</i>	512×512
<i>Tipo di digitalizzazione</i>	12bit
Controllo Intensificazione	IIC200-GenIV
<i>Controllo temperatura</i>	MO3000311
Tempo di lettura del CCD (512×512)	0.07s @ 5MHz

Tutti gli elementi del sistema sono stati posizionati su un banco ottico antivibrazioni (Mellet-Griot, modello 07OTI035), ad eccezione del laser. Questo è stato collocato sotto il banco ed il suo raggio, tramite una serie di 5 specchi orientabili posizionati a 45°, è indirizzato nel microscopio in modo

che l'asse di propagazione della radiazione laser risulti perfettamente coincidente col percorso ottico del microscopio (Figura 2.16).

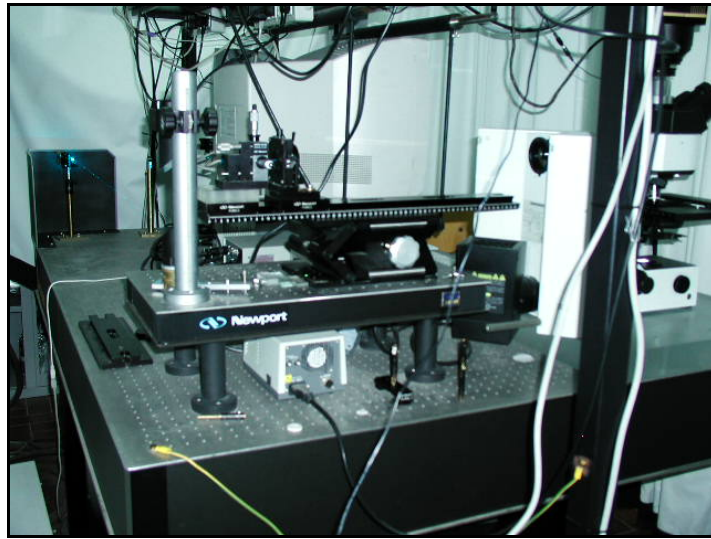


Figura 2.16 - Foto dell'apparato di FRAP realizzato presso il laboratorio di Ingegneria Molecolare e Cellulare del DIMP.

Al fine di realizzare tramite *photobleaching* uno *spot* piccolo e definito, che permetta di ottenere immagini nitide e quindi stime accurate del coefficiente di diffusione, è necessario che il percorso ottico del laser sia controllato opportunamente. Per raggiungere questo obiettivo, lungo il percorso ottico (Figura 2.17), sono stati sistemati una lamina $\lambda/2$, in grado di ruotare la polarizzazione del raggio di 90° , e un filtro spaziale (*pinhole*) di $25\mu\text{m}$ di diametro (Newport, modello M-900), per eliminare le eventuali disomogeneità spaziali del fascio. Tale *pinhole* è equipaggiato con un obiettivo 10X (Newport, modello M-10X), che lo precede focalizzando in esso il raggio, e una lente piano-convessa (Newport, modello SPX016AR14), posta ad una distanza dal pinhole pari alla sua distanza focale, che assicura che il fascio esca nuovamente collimato.

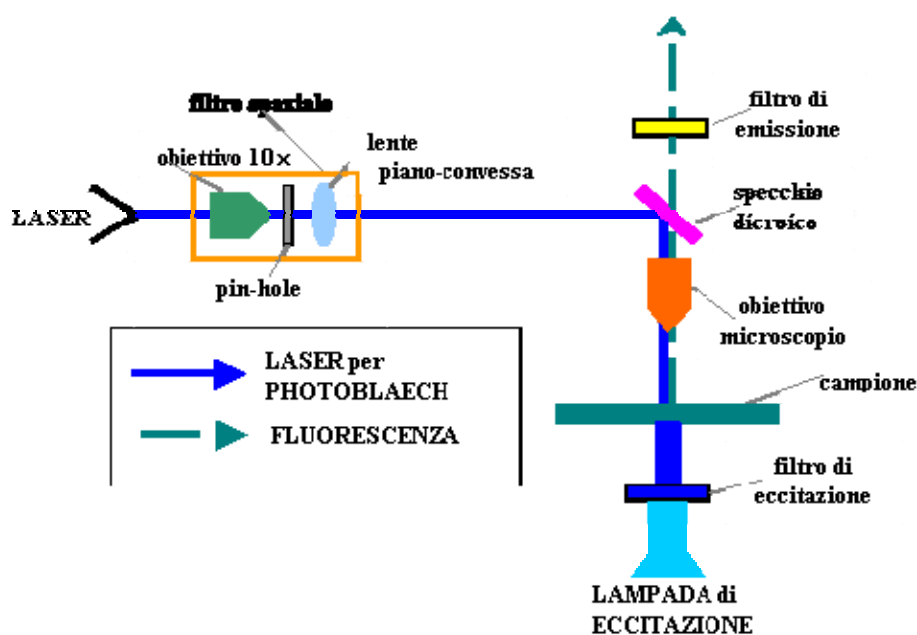


Figura 2.17 - Cammino ottico del laser, della fluorescenza emessa dal campione e della luce della lampada.

Nel microscopio è posto uno specchio dicroico sensibile alla polarizzazione del raggio, posizionato a 45° rispetto all'asse di propagazione della radiazione laser, il quale riflette quest'ultima e trasmette alla telecamera quella emessa dai fluorofori, caratterizzate da lunghezza d'onda maggiore (Figura 2.18).

In tale configurazione assume notevole importanza la scelta delle caratteristiche della lente piano-convessa, della posizione di tutti gli elementi e della loro orientazione rispetto all'asse di propagazione della radiazione, dovendo il percorso ottico del laser e del microscopio coincidere perfettamente, e le sorgenti luminose (laser, lampada al mercurio e campione fluorescente) avere i rispettivi fuochi nel fuoco dell'obiettivo.

Affinché le varie fasi dell'esperimento di FRAP fossero opportunamente eseguite e registrate, è stato necessario, inoltre, sviluppare un procedura automatizzata, eseguita tramite un programma home made, che ha reso possibile la sincronizzazione delle fasi di bleaching del laser e di acquisizioni di immagini della telecamera, in modo da disporre, al termine di ogni test, di tutti i dati necessari per valutare il coefficiente di diffusione.

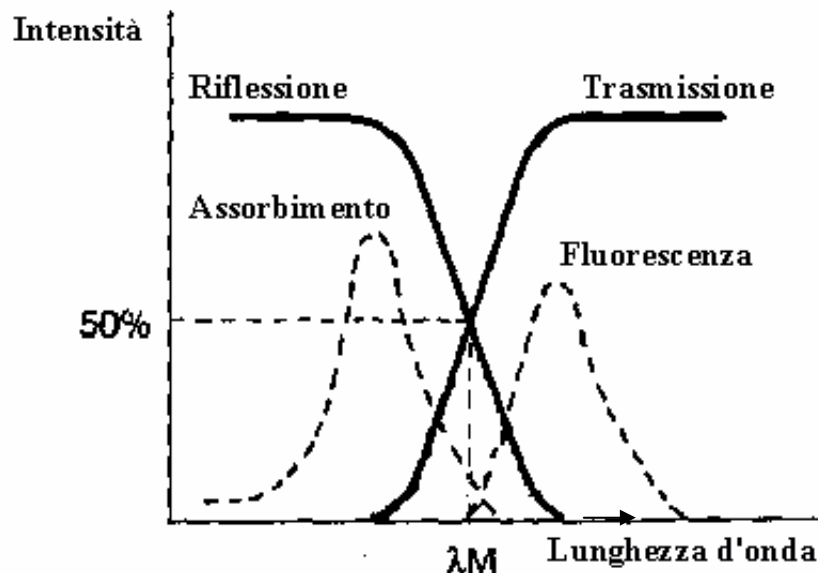


Figura 2.18 - Caratteristica spettrale di un filtro dicroico posizionato a 45° rispetto all'asse di propagazione della radiazione.

Capitolo 3

Calibrazione della pinzetta ottica

La pinzetta può essere vista come un trasduttore di forza in tempo reale. Come visto in precedenza la forza agente su una particella intrappolata otticamente può essere considerata elastica ($F = -kx$) per piccoli spostamenti x dalla sua posizione di equilibrio. Calibrare la pinzetta significa stimare la costante elastica k della trappola (stiffness) e misurare lo spostamento x che essa subisce. In questo capitolo sono riportati alcuni dei metodi di misurazione della costante elastica k e, in seguito, i metodi di messi a punto per la calibrazione del fotodiodo a quadranti. I metodi riguardanti la misurazione della stiffness sono basati sul presupposto di poter misurare con minimo errore la posizione della particella intrappolata. Come vedremo nella seconda parte di questo capitolo, una soddisfacente calibrazione del fotodiodo a quadranti risulta uno dei limiti maggiori incontrati in questo lavoro di tesi.

3.1 Calcolo della costante elastica della pinzetta

3.1.1 Calibrazione mediante forza di Stokes

Un metodo semplice e tra i più ricorrenti in letteratura per la calibrazione della pinzetta è quello basato sulla legge di Stokes in base alla quale una sfera che si muove di moto relativo in un fluido Newtoniano infinitamente esteso è sottoposta ad una forza di smorzamento viscoso

$$F = 6\pi\eta a v \quad (1)$$

dove η è la viscosità del mezzo, a il raggio della sferetta e v la velocità del suo centro di massa. Questa relazione resta valida anche quando il fluido risulta finito purché il rapporto tra il raggio a della sferetta e la distanza T di quest'ultima dalla superficie delimitante sia molto minore di uno. Qualora questa condizione non risulti verificata la (1) va moltiplicata per un fattore di correzione dipendente da T e a . Come mostrato in Figura 3.1 traslando la celletta portacampione a velocità costante v la particella risentirà la forza viscosa del fluido espressa dalla (1) e si disporrà in una nuova posizione x_1 rispetto a quella di equilibrio x_0 . Sapendo che per piccoli spostamenti la forza risulta di tipo elastico si ha:

$$6\pi\eta a v = k(x_1 - x_0) = k\Delta x \quad (2)$$

cioè la particella si disporrà in una nuova posizione, laddove la forza elastica uguaglia quella viscosa. Dalla misura dello spostamento Δx e dalla conoscenza della viscosità del mezzo si ottiene:

$$k = \frac{6\pi\eta a v}{\Delta x} \quad (3)$$

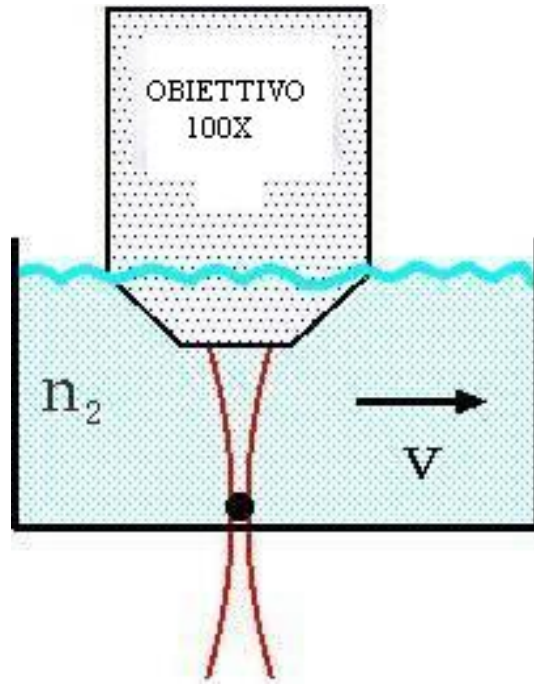


Figura 3.1 - Nella figura è schematicamente mostrato il moto relativo della cella di misura e la sferetta intrappolata nel *tweezers*.

3.1.2 Calibrazione mediante il teorema di equipartizione

Uno dei metodi più semplici per la determinazione della *stiffness* consiste nel misurare le fluttuazioni termiche nella posizione della particella intrappolata. Assumendo che, per piccoli spostamenti dal centro della trappola, la particella si muove in un potenziale armonico, è possibile determinare la *stiffness* utilizzando il teorema di equipartizione:

$$\frac{1}{2} k_B T = \frac{1}{2} k \langle x^2 \rangle \quad (4)$$

dove x è la posizione della particella. Da essa si ottiene che

$$k = \frac{K_B T}{\langle x^2 \rangle} \quad (5)$$

Tale equazione mostra che per calibrare il campo di forza di una pinzetta ottica attraverso il teorema dell'equipartizione, non occorre conoscere alcun parametro come la viscosità o il raggio della sferetta intrappolata ma è sufficiente la temperatura T e l'aver calibrato il sensore di posizione. In realtà, come vedremo, la calibrazione del sensore dipende proprio da parametri come la viscosità e la dimensione della sferetta, rendendo questo metodo per quanto apparentemente semplice comunque molto laborioso.

3.1.3 Calibrazione mediante la statistica di Boltzmann

La probabilità di trovare una particella intrappolata in una determinata posizione x è ben descritta dalla statistica di Boltzmann

$$p(x)dx = p_0 e^{-\frac{U(x)}{k_B T}} \quad (6)$$

dove $p(x)dx$ rappresenta la probabilità di trovare la particella in un volume dx in un potenziale $U(x)$, alla temperatura fissata T e p_0 è il parametro di normalizzazione definito dalla seguente relazione:

$$\int p(x)dx = 1 \quad (7)$$

dove l'integrale è esteso su tutto il volume interessato. Eseguendo il logaritmo di ambo i membri della (6) si ha:

$$U(x) = -k_B T \ln p(x) + k_B T \ln p_0 \quad (8)$$

Trascurando il secondo termine che rappresenta solo un offset per il potenziale, la (8) mostra che nota la densità di probabilità $p(x)$ e la temperatura T è possibile risalire al potenziale agente sulla particella a patto di aver precedentemente calibrato il sensore di posizione (vedi calibrazione del fotodiode a quadranti). E' da notare che non è stata fatta alcuna ipotesi sulla natura del potenziale. Tuttavia poiché in prossimità del minimo di energia il potenziale è di tipo armonico ($U(x) = 1/2 kx^2$) grazie ad un fit parabolico è possibile stimare la stiffness k , quindi calibrare il campo di forza della pinzetta (Figura 3.2).

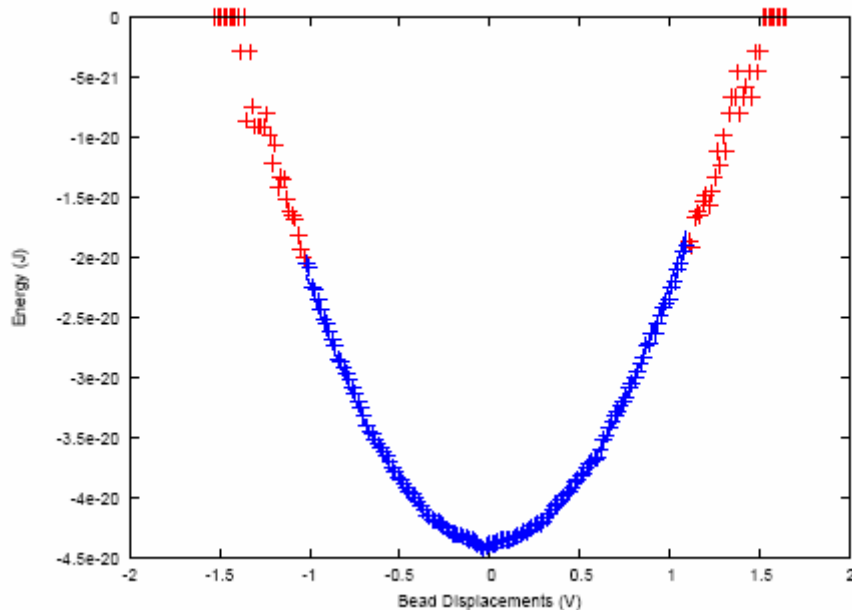


Figura 3.2 - Best fit parabolico del potenziale ottico della trappola.

3.1.4 Calibrazione mediante funzione di autocorrelazione

La funzione di autocorrelazione relativa alla varianza della posizione di una particella che si muove di moto Browniano, scritta per la sola coordinata x , è data da:

$$g_x(t) = \langle x(t)x(t+\tau) \rangle = \langle x^2 \rangle e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (9)$$

dove $\tau = k/\gamma$ è il tempo di autocorrelazione. Eseguendo allora un fit esponenziale dei dati sperimentali è possibile ottenere una stima di τ , per cui nota la viscosità della soluzione in cui la particella è intrappolata si risale al valore della stiffness k .

3.1.5 Calibrazione mediante lo spettro di potenza

Si è visto in precedenza come la decomposizione spettrale della varianza di una coordinata del moto Browniano di una particella intrappolata otticamente in fluido viscoso ha l'andamento di una curva di tipo lorentziano:

$$S_x(f) = \frac{k_B T}{\gamma \pi^2 (f_c^2 + f^2)} \quad (10)$$

Pertanto, eseguendo il fit lorentziano dei dati sperimentali è possibile stimare la frequenza di taglio f_c e l'ampiezza $S_x(0) = K_B T / \gamma \pi^2$. La funzione $S_x(f)$ per il caso statico ($f = 0$) diventa

$$S_x(0) = \frac{k_B T}{\gamma \pi^2 f_c^2} \quad (11)$$

mentre per frequenze elevate si approssima con

$$S_x(f) = \frac{k_B T}{\gamma \pi^2 f^2} \quad (12)$$

Poiché $k = 2\gamma \pi f_c$, in pratica si può calibrare il campo di forza della pinzetta ottica a partire dalla stima della frequenza di taglio f_c . Ciò è possibile se si conosce il fattore idrodinamico $\gamma = 6\pi\eta a$ cioè la viscosità η del campione che si sta utilizzando. Qualora invece si vuole una stima diretta del fattore idrodinamico, dalla (11) si ha:

$$\gamma = \frac{K_B T}{S_x(0) \pi^2 f_c^2} \quad (13)$$

Ciò mostra che nota la temperatura di lavoro T e i parametri $S_x(0)$, f_c e a si ottiene immediatamente la viscosità della soluzione in cui la particella è intrappolata.

4.2 Calibrazione del fotodiodo a quadranti

Come visto nei precedenti capitoli il fotodiodo a quadranti, opportunamente alimentato e amplificato, fornisce segnali elettrici in tensione legati alla posizione x , y e z della sferetta

intrappolata. Calibrare il fotodiodo significa determinare le funzioni di trasferimento che relazionano i segnali in tensione alle lunghezze assolute, ovvero:

$$\begin{aligned}x &= f(V_x) \\ y &= f(V_y) \\ z &= f(V_z)\end{aligned}$$

La conoscenza di queste funzioni è possibile attraverso l'ausilio dei metodi che saranno discussi nei successivi paragrafi. Descriveremo allora le procedure per la calibrazione del sensore riferendoci per semplicità solo all'asse x visto che nelle altre due direzioni le argomentazioni sono esattamente le stesse. I dati che forniamo nel prosieguo di questo capitolo si riferiscono ad una particella di polistirene di diametro pari a $1.25 \pm 0.01 \mu\text{m}$ intrappolata in una soluzione di acqua bidistillata.

4.2.1 Metodo dello spettro di potenza

È stato dimostrato che il modulo quadro della decomposizione spettrale della varianza della posizione di una particella che si muove di moto Browniano in una trappola ottica sia una curva di tipo lorentziano nell'ipotesi che il mezzo, in cui si realizza la trappola, sia esclusivamente viscoso:

$$S_x(f) = \frac{k_B T}{\gamma \pi^2 (f_c^2 + f^2)} \quad (14)$$

Bisogna, però, tener presente che la posizione della particella è monitorata dal fotodiodo a quadranti il quale fornisce un segnale in tensione. Una misura di posizione in unità di lunghezza, come già detto, è ottenuta attraverso una procedura di calibrazione del sensore di posizione. La risposta del fotodiodo a quadranti utilizzato nella configurazione da noi messa a punto è lineare per piccoli spostamenti, ovvero: $x = \beta V$, con β detto parametro di calibrazione tensione-spostamento. Pertanto la densità di potenza spettrale riferita ai segnali in volt è data da:

$$S_V(f) = \frac{k_B T}{\beta^2 \gamma \pi^2 (f_c^2 + f^2)} = \frac{A}{f_c^2 + f^2} \quad (15)$$

con frequenza di taglio f_c e ampiezza

$$A = \frac{k_B T}{6 \beta^2 \pi^3 \eta a} \quad (16)$$

Dalla (16) si ottiene:

$$\beta = \sqrt{\frac{k_B T}{6 A \pi^3 \eta a}} \quad (17)$$

Dal punto di vista sperimentale A e f_c sono parametri che si possono stimare da un opportuno fit. In pratica nota la temperatura e la viscosità della soluzione campione, è possibile stimare il fattore di calibrazione β . L'errore statistico su questa stima è dato da:

$$\sigma_\beta = \left\{ \frac{1}{4} \left(\frac{k_B T}{6 \pi^3 \eta a} \right)^{-1} \left[\left(\frac{k_B \sigma_T}{6 \pi^3 \eta a} \right)^2 + \left(\frac{k_B T \sigma_A}{6 \pi^3 \eta A^2 a} \right)^2 + \left(\frac{k_B T \sigma_a}{6 \pi^3 \eta a^2} \right)^2 \right] \right\}^{\frac{1}{2}} \quad (18)$$

dove σ_A è l'incertezza su A data dal best fit, σ_a quella sul raggio della particella fornita dalla casa costruttrice e σ_T è l'incertezza sulla temperatura T . Per ottenere la PSD abbiamo proceduto intrappolando con il laser a diodo una sferetta di polistirene di raggio pari a $1.25 \mu\text{m}$, a $10 \mu\text{m}$ dal fondo del vetrino portacampione ed utilizzando un obiettivo ad acqua 60x. La potenza sul campione risulta di 12 mW . Acquisendo con l'analizzatore di spettro mille registrazioni di PSD di cui consideriamo il valor medio ed eseguendo il fit dei dati sperimentali, abbiamo stimato il valore dell'ampiezza A che risulta:

$$A = (18.7 \pm 0.06) \text{ V}^2 / \text{s} \quad (19),$$

la temperatura registrata è

$$T = (25.2 \pm 0.1)^\circ \text{C}$$

alla quale corrisponde una viscosità dell'acqua pari a

$$\eta = (8.8 \times 10^{-4} \text{ Pa} \cdot \text{s})$$

grazie, dunque alla (17) e al valore di A ottenuto dalla (18) si è ricavato un valore del coefficiente di calibrazione pari a

$$\beta = (46.2 \pm 0.5) \text{ nm} / \text{V} \quad (20)$$

4.2.2 Metodo incrociato Boltzmann e PSD

Un altro metodo utile per la stima del fattore di calibrazione combina il metodo di Boltzmann con quello della PSD. In pratica, poiché in prossimità del minimo d'energia del sistema radiazione-sferetta il potenziale è di tipo armonico, utilizzando la (8), un fit parabolico ci fornisce:

$$E(V) = \frac{C}{2} V^2 \quad (21)$$

con

$$C = k\beta^2 \quad (22)$$

Essendo

$$k = 2\gamma\pi f_c \quad (23)$$

nota la viscosità del campione e la frequenza caratteristica della trappola, combinando la (22) e la (23) si ottiene per il fattore di calibrazione β del fotodiodo a quadranti

$$\beta = \left(\frac{k\beta^2}{k} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (24)$$

mentre la sua incertezza è data da:

$$\sigma_{\beta} = \left\{ \frac{1}{4} \left(\frac{k\beta^2}{6\pi^2 \eta a f_c} \right)^{-1} \left[\left(\frac{\sigma_{k\beta^2}}{6\pi^2 \eta a f_c} \right)^2 + \left(\frac{k\beta^2 \sigma_d}{6\pi^2 \eta a^2 f_c} \right)^2 + \left(\frac{k\beta^2 \sigma_{f_c}}{6\pi^2 \eta a f_c^2} \right)^2 \right] \right\}^{\frac{1}{2}} \quad (25)$$

dove $\sigma_{k\beta^2}$ è l'incertezza su $k\beta^2$ fornita dal best fit parabolico, mentre σ_{f_c} è l'incertezza relativa alla frequenza caratteristica fornita dal best fit lorentziano. Nelle stesse condizioni sperimentali descritte nel paragrafo precedente, abbiamo stimato i valori relativi al parametro C e alla frequenza di taglio f_c ottenendo i seguenti risultati:

$$C = k\beta^2 = (4.38 \pm 0.03) * 10^{-20} J / V^2$$

mentre dal fit lorentziano si è ottenuto che la frequenza caratteristica è

$$f_c = (646 \pm 2) Hz$$

Quindi facendo ricorso alle espressioni appena descritte si è ottenuto per il fattore di calibrazione il seguente valore

$$\beta = (32.1 \pm 0.5) nm / V$$

diverso da quello trovato nel precedente paragrafo sfruttando la sola PSD. Sebbene questa discrepanza sia ancora oggetto del nostro studio, i motivi per cui ciò si verifica sono da ricercarsi probabilmente sia nelle fluttuazioni della PSD a basse frequenze (rumore meccanico) che sovrastimano l'ampiezza A della lorentziana, sia nella mancanza di un fattore 2 nella espressione dell'ampiezza della PSD. Nel testo di Kubo (Kubo et al., 2003) si dimostra, infatti, che:

$$|F(f)|^2 = 2K_B T \gamma \quad (26)$$

e non $4\gamma K_B T$, come di solito viene riportato in letteratura per lo spettro di potenza della forza termica casuale. Infatti, dal teorema di Wiener-Khintchine si dimostra che esiste la seguente relazione tra lo spettro di potenza $S_x(f)$ e la funzione di autocorrelazione $g_x(t)$:

$$g_x(t) = \int_{-\infty}^{+\infty} S_x(f) e^{i2\pi f t} df \quad (27)$$

Sostituendo nella (3.22) l'espressione

$$S_x(f) = \frac{|F(f)|^2}{4\pi^2\gamma^2(f^2 + f_c^2)} \quad (28)$$

e calcolando la funzione di autocorrelazione negli istanti t_1 e t_2

$$\langle x(t_1)x(t_2) \rangle = \frac{|F(f)|^2}{4\pi\gamma^2 f_c} e^{-2\pi f_c |t_1 - t_2|} \quad (29)$$

Scegliendo $t_1 = t_2$ si ha

$$\langle x^2 \rangle = \frac{|F(f)|^2}{4\pi\gamma^2 f_c} \quad (30)$$

mentre dal teorema di equipartizione

$$\langle x^2 \rangle = \frac{K_B T}{k} = \frac{K_B T}{2\pi\gamma f_c} \quad (31)$$

Eguagliando la (30) con la (31) risulta quindi dimostrata la (26) la quale conduce ad un fattore 2 al denominatore dell'ampiezza A della PSD e quindi ad un fattore $\sqrt{2}$ nella formula (17) per β . Con l'ausilio di questa trattazione il valore di (20) ricavato con il metodo della PSD diventa consistente con quello ricavato in questo paragrafo. Si ha, infatti

$$\beta = (32.7 \pm 0.5) \text{ nm/V}$$

4.2.3 Metodo incrociato Equipartizione e PSD

Se anziché utilizzare la statistica di Boltzmann, utilizziamo il teorema dell'equipartizione il parametro $C = k\beta^2$ del precedente paragrafo assume la seguente forma:

$$C = \frac{K_B T}{\langle V^2 \rangle} \quad (32)$$

Il valore di β ottenuto con questo metodo risulta essere consistente con le stime ricavate nei paragrafi precedenti.

3.2.4 Metodo di Stokes

Analizzando nello specifico i metodi di calibrazione del sensore di posizione fin qui citati, si evince che tutti necessitano della conoscenza di un parametro fisico del materiale, in cui si trova intrappolata la sferetta, quale la viscosità. Poiché, come si è detto in precedenza, uno degli scopi di questo lavoro di tesi è stato utilizzare la pinzetta ottica come strumento microrologico, si capisce come tali metodi risultino penalizzanti sotto tale punto di vista. Per questo motivo è stato sviluppato un nuovo metodo per la calibrazione del sensore di posizione basato sull'acquisizione simultanea

del segnale elettrico all'uscita del fotodiodo a quadranti e dell'immagine della particella intrappolata grazie ad una telecamera CCD. Esso consiste nel far traslare a velocità note, inferiori alla velocità di fuga, il carrellino su cui è montato il campione in modo che la sferetta intrappolata otticamente si sposti in una nuova posizione di equilibrio (Figura 3.3). In questo modo sulla particella intrappolata si genererà una forza viscosa opposta a quella di trascinamento.

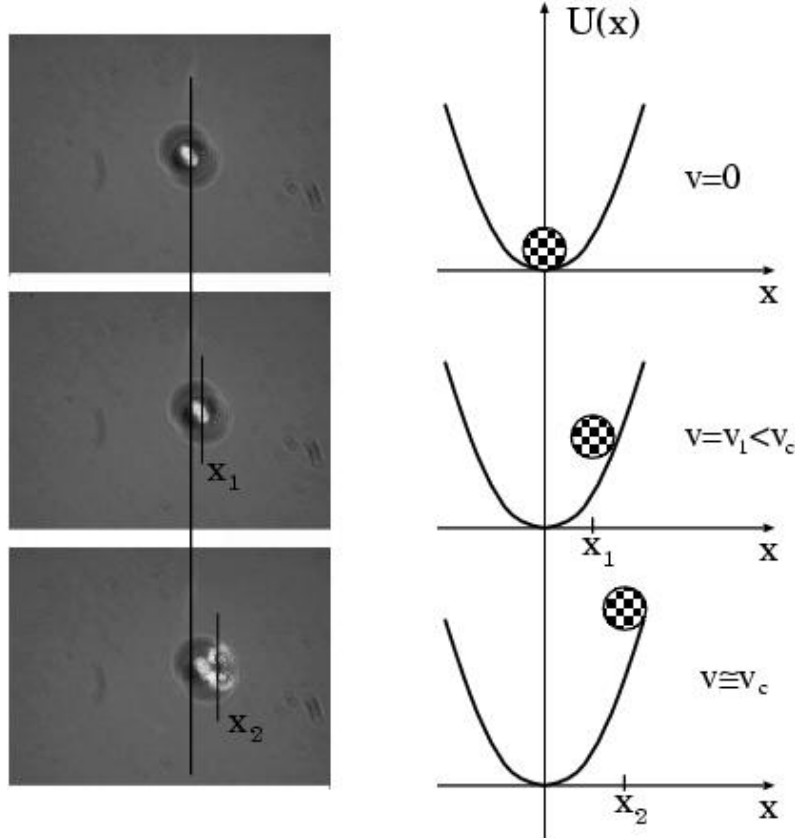


Figura 3.3 - Posizione della sferetta intrappolata all'interno della buca di potenziale per diverse velocità di trascinamento del liquido.

Se la posizione occupata all'equilibrio ha coordinata $x = 0$, la nuova posizione x_1 in cui si disporrà la particella è tale che:

$$F_{ott} = kx_1 = 3\pi\eta v \quad (33)$$

dove v è la velocità con la quale si muove il carrellino portacampione. Per conoscere la posizione della particella oltre che in tensione (risposta del fotodiodo) anche in unità di lunghezza si utilizzano le immagini acquisite dalla telecamera durante il trascinamento. Per fare ciò è necessario calibrare la telecamera attraverso la stima del parametro β_{ccd} definito secondo la seguente relazione:

$$x = \beta_{ccd} \cdot pixel \quad (34)$$

I metodi per il calcolo del coefficiente β_{ccd} sono due:

- il primo consiste nell'analisi dell'immagine di un righello graduato con un programma sviluppato per determinare le posizioni in pixel dei baricentri delle tacche. Determinate tali posizioni, nota la distanza tra le tacche ($2 \mu\text{m}$), è possibile determinare il fattore di conversione pixel/micron. Il risultato ottenuto è:

$$\beta_{CCD} = (8.5 \pm 0.2) \text{ nm} / \text{pixel} ;$$

- il secondo metodo consiste nel mettere a fuoco un punto sul vetrino e registrare i suoi spostamenti (passo pari a $0.5 \mu\text{m}$) generati tramite il carrellino portacampione. Acquisendo, con un apposito programma, gli spostamenti in pixel del punto ed eseguendo un best fit di tali spostamenti in funzione di quelli in micron imposti dal carrellino portacampione si è ottenuto:

$$\beta_{CCD} = (8.7 \pm 0.2) \text{ nm} / \text{pixel}$$

Come si nota dai risultati, i valori ottenuti con entrambi i metodi, risultano tra loro consistenti. Ottenuta la calibrazione della telecamera si è proceduto con intrappolare una sferetta di polistirene di $1.25 \mu\text{m}$ a $10 \mu\text{m}$ dal fondo del vetrino e il carrellino è stato fatto muovere lungo l'asse x avanti e indietro a velocità comprese tra $140 \mu\text{m/s}$ e $260 \mu\text{m/s}$ con passo di $40 \mu\text{m/s}$ in 4 step successivi. I filmati relativi allo spostamento della sferetta intrappolata, acquisiti tramite CCD, sono stati scomposti in frame e digitalizzati in una matrice quadrata M_{ij} il cui range di valori varia da 0 a 255. Al valore 0 è associato il colore nero che sfuma gradualmente in varie tonalità sino al colore bianco che corrisponde al valore 255 (Figura 3.4).

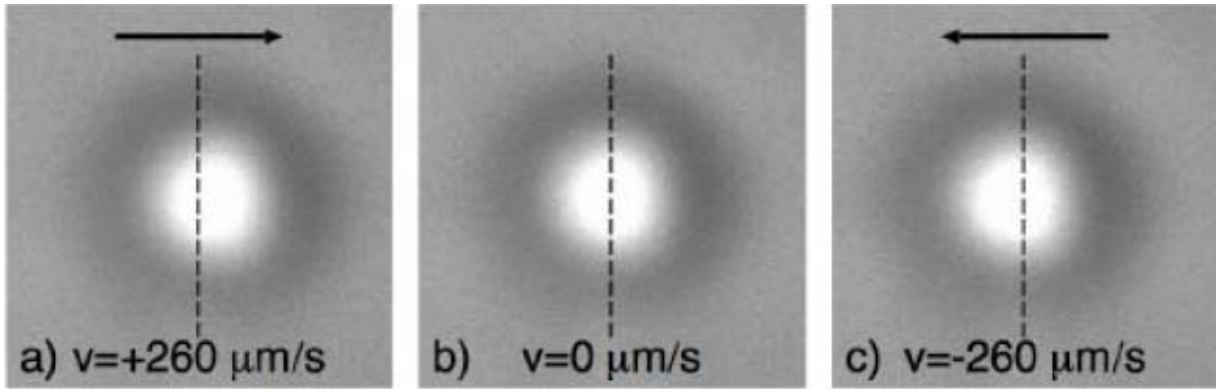


Figura 3.4 - Immagine dello spostamento una particella di polistirene di $1.25 \mu\text{m}$ intrappolata in acqua: la linea tratteggiata indica la posizione di equilibrio, mentre le frecce indicano il verso della forza viscosa.

Le immagini, inoltre, sono state filtrate grazie alla seguente relazione:

$$I_{ij} = b \cdot c - \frac{(b - M_{ij}) + |b - M_{ij}|}{2} \quad (35)$$

dove b è il valore di soglia che può assumere valori compresi tra 0 e 255, mentre c è la funzione step:

$$\begin{cases} c = 1 & \text{se } b \geq M_{ij} \\ c = 0 & \text{se } b < M_{ij} \end{cases}$$

Convertendo in uno stack di immagini successive lo spostamento della particella intrappolata e filtrando tali immagini con gli algoritmi descritti è possibile ottenere lo spostamento in pixel associato agli spostamenti:

$$pixel = \frac{\sum_{ij} iI_{ij}}{\sum_{ij} I_{ij}} \quad (36)$$

Lo spostamento in unità di lunghezza si ottiene utilizzando la (34). In Figura 3.5 sono mostrati i monitoraggi della posizione della sferetta tramite filmato acquisito con CCD e tramite fotodiode a quadranti.

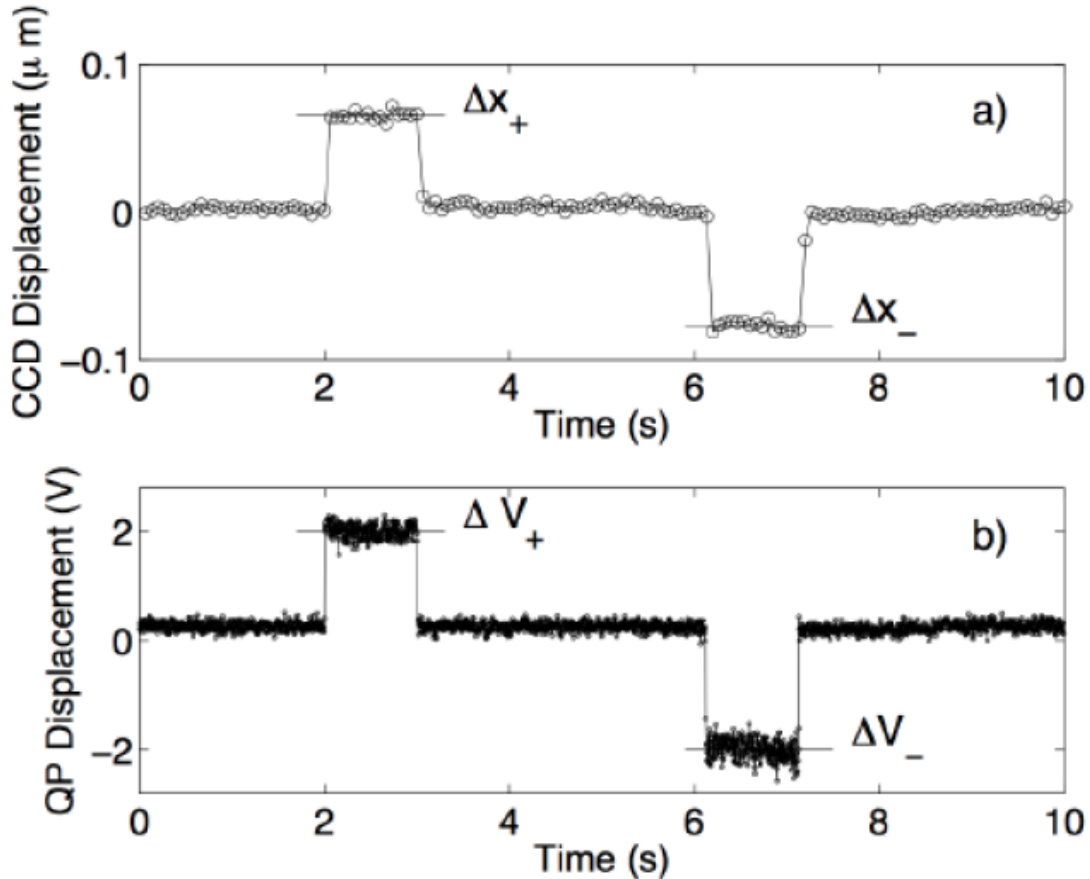


Figura 3.5 – Posizione di una biglia intrappolata durante il movimento dello stage portacampione misurata tramite ripresa con CCD (a) e fotodiode a quadranti (b).

Infine riportando sullo stesso grafico in ascissa la risposta del fotodiode a quadranti (in Volt) e in ordinata lo spostamento misurato con la telecamera (in nanometri), è possibile, attraverso un best fit lineare dei dati sperimentali, ricavare il coefficiente di calibrazione per entrambi i versi dello spostamento β_+ e β_- (Figura 3.7):

$$\beta_+ = (32 \pm 3) nm / V$$

$$\beta_- = (33 \pm 5) nm / V$$

che, nel limite dell'errore sperimentale, risultano consistenti tra loro e con i valori ottenuti utilizzando altri metodi. La riproducibilità del coefficiente di calibrazione è stata stimata ripetendo più di venti volte l'intera procedura: l'incertezza è risultata essere di circa il 4%.

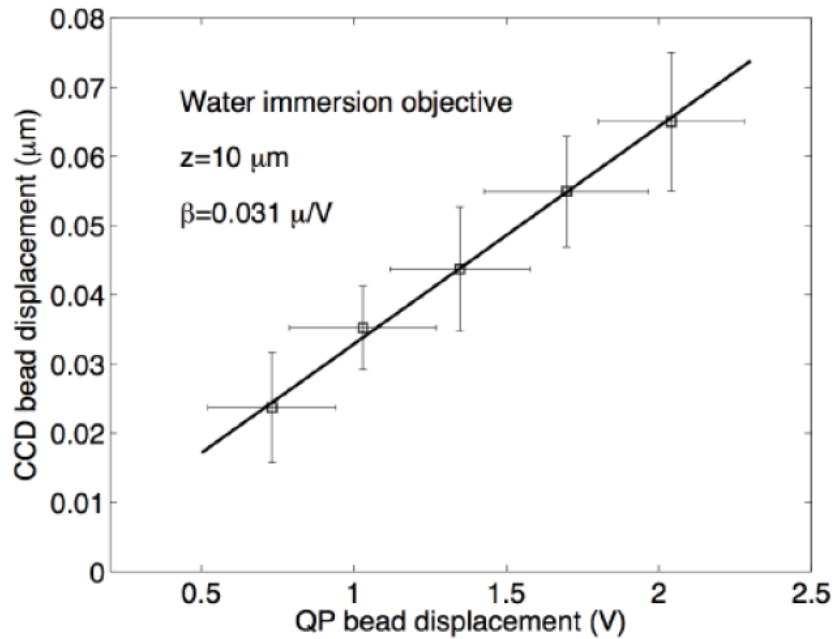


Figura 3.6 - Esempio di fit lineare degli spostamenti della sferetta misurati tramite acquisizione video e fotodiodo a quadranti. Le barre di errore rappresentano l'ampiezza dei moti Browniani della sfera intrappolata nella buca di potenziale ottico.

Il fattore di calibrazione è stato calcolato a diverse distanze dal vetrino fino a 16 μm , dove le condizioni d'intrappolamento diventano molto critiche. La posizione della sfera lungo l'asse z è stata misurata utilizzando il micrometro del microscopio. Va sottolineato, inoltre, che tutte le misure sono state effettuate ad una distanza dal vetrino molto maggiore del raggio del provino in modo da ridurre al minimo gli effetti di bordo. I risultati ottenuti utilizzando l'obiettivo 100x ad immersione ad olio sono mostrati in Figura 3.7a. La ragione per cui il fattore di calibrazione diminuisce man mano che il piano focale penetra all'interno del provino è dovuto principalmente alle aberrazioni sferiche causate da un non ottimale accoppiamento degli indici di rifrazione. La dipendenza da z di β può essere causa di elevata incertezza nella determinazione delle proprietà viscoelastiche. Per questo motivo è stato utilizzato un obiettivo ad acqua che, come mostrato in Figura 3.7b, presenta due notevoli vantaggi: il fattore di calibrazione sembra essere indipendente dall'altezza del piano focale e è possibile realizzare le condizioni di intrappolamento per altezze del piano focale molto superiori a quelle consentite da un obiettivo ad olio (noi abbiamo misurato fino a 50 μm). Ciò è dovuto al fatto che, con un obiettivo ad immersione ad acqua, si riesce a migliorare notevolmente l'accoppiamento degli indici di rifrazione preservando in questo modo la forma del fascio laser.

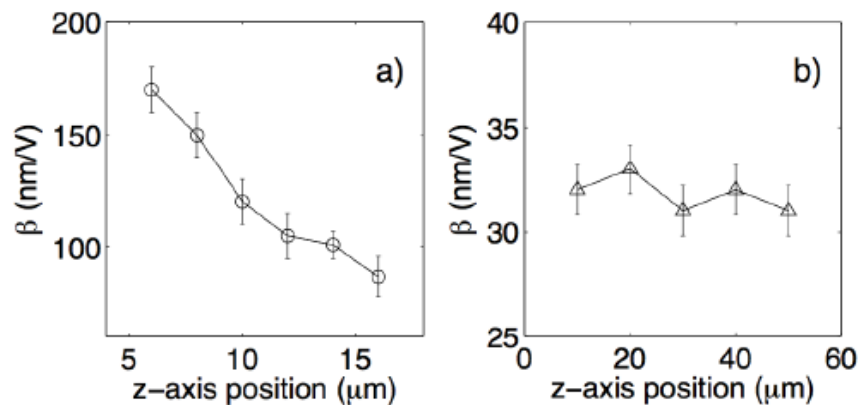


Figura 3.7 – Andamento del fattore di calibrazione β in funzione della distanza dal vetrino nel caso di obiettivo ad immersione ad olio (a) e ad acqua (b).

Capitolo 4

Misure microreologiche

Al fine di testare l'attendibilità della pinzetta ottica quale strumento microreologico sono state effettuate una serie di misurazioni di viscosità su acqua e soluzioni di acqua e glicerina. La scelta su tali tipi di materiali è dovuta a due motivi fondamentali:

- acqua e soluzioni di acqua e glicerina risultano essere omogenei e quindi la viscosità locale risulta in via di principio la stessa di quella misurata macroscopicamente;
- i liquidi considerati sono Newtoniani, e quindi la viscosità risulta essere indipendente dalla velocità di deformazione (shear rate).

4.1 Viscosità locale dell'acqua mediante l'analisi del moto Browniano

Come ampiamente discusso nel secondo capitolo, la densità di potenza spettrale di una particella micrometrica confinata otticamente che si muove di moto Browniano in un liquido puramente viscoso è una curva lorentziana caratterizzata da una frequenza di taglio f_c ed un'ampiezza A . In Figura 4.1 si mostra il segnale stocastico riferito al movimento Browniano lungo l'asse x di una sferetta intrappolata, rivelato dal nostro fotodiodo a quadranti in un intervallo di 5s. Nella Figura 4.2 si mostra invece il moto visto nel piano x - y ortogonale all'asse ottico a diversi istanti dall'inizio del fenomeno. Si osserva che all'aumentare dei punti acquisiti la particella resta confinata in una zona limitata di spazio riflettendo la presenza della trappola ottica. Ricordando la relazione $k = 6\pi^2\eta df_c$ che lega la costante elastica della trappola alla frequenza f_c , e moltiplicando ambo i membri per un fattore β^2 , si ottiene la seguente espressione per la viscosità:

$$\eta = \frac{k\beta^2}{6\pi^2 df_c \beta^2} = \frac{C}{6\pi^2 df_c \beta^2} \quad (1)$$

La (1) mostra che misurando i parametri C , β e f_c si risale alla viscosità del liquido in cui si trova la particella. L'incertezza sulla stima di η è data dalle usuali regole di propagazione degli errori secondo cui:

$$\sigma_\eta = (6\pi^2 df_c \beta^2) \cdot \left[\sigma_C^2 + \frac{C^2}{d^2} \sigma_d^2 + \frac{C^2}{f_c^2} \sigma_{f_c}^2 + \frac{C^2}{\beta^2} \sigma_\beta^2 \right]^{\frac{1}{2}} \quad (2)$$

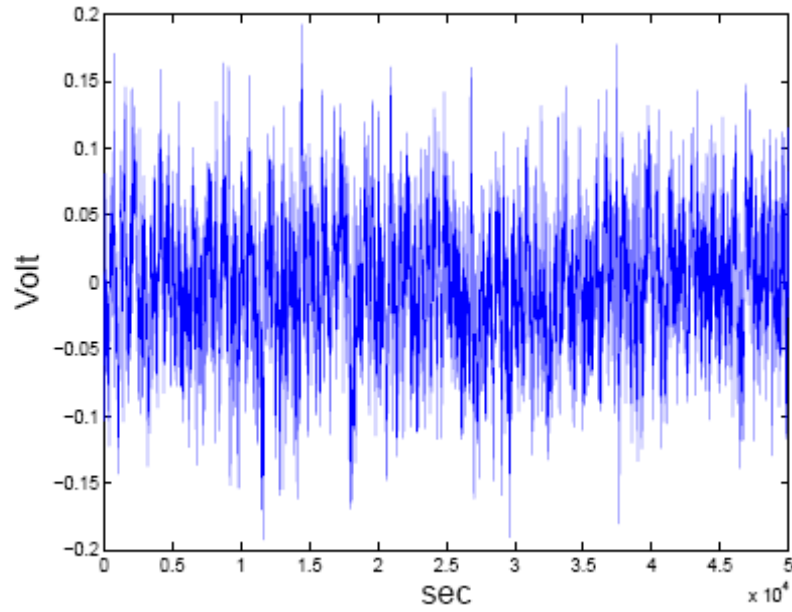


Figura 4.1 – Segnale stocastico del moto Browniano di una particella intrappolata otticamente.

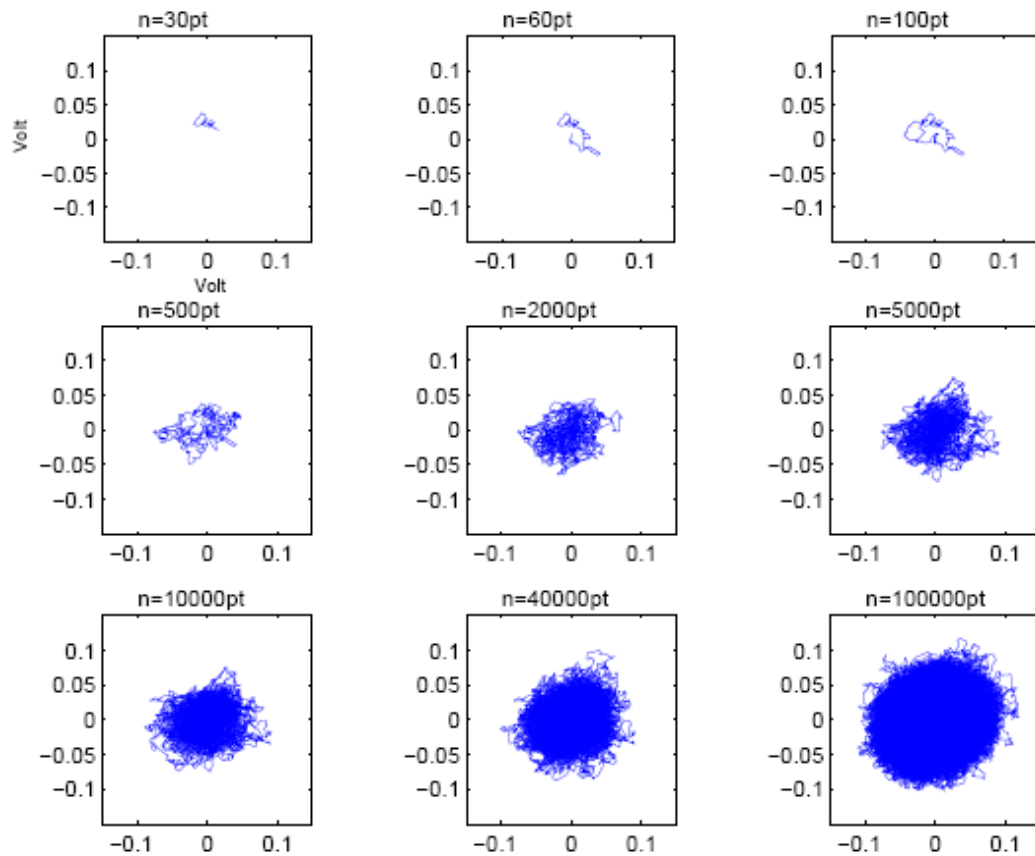


Figura 4.2 - Evoluzione temporale del moto Browniano di una pallina di polistirene di $1.25 \mu\text{m}$ in soluzione di acqua e glicerina (10% in volume) campionato a 250khz.

Il procedimento sperimentale che abbiamo seguito è riassunto nei seguenti punti:

- È stato preparato il campione di acqua bidistillata nella quale abbiamo fortemente diluito particelle di polistirene di diametro 1.25 μm .
- Una sferetta è stata intrappolata a 10 μm dal fondo del vetrino portacampione.
- Si è proceduto alla calibrazione del sensore di posizione con il metodo di Stokes acquisendo 5 set di misura, ottenendo valori di β (vedi tabella 4.1) riferiti alla direzione positiva e negativa dell'asse x. La stima di β e della sua incertezza sono date dalla media e dalla deviazione standard dei precedenti valori.

Tabella 4.1 – Valori di β_+ e β_- calcolati col metodo di Stokes

	<i>Set 1</i>	<i>Set 2</i>	<i>Set 3</i>	<i>Set 4</i>	<i>Set 5</i>
$\beta_+ \text{ (nm/V)}$	33 ± 3	34 ± 2	33 ± 4	32 ± 3	35 ± 3
$\beta_- \text{ (nm/V)}$	33 ± 5	32 ± 2	34 ± 4	30 ± 1	32 ± 4

Si è ottenuto un valore medio del coefficiente di calibrazione pari a

$$\langle \beta \rangle = 33 \pm 2 \text{ nm/V}$$

- Abbiamo stimato C per 10 set di misure con il metodo di Boltzmann eseguendo un fit parabolico del potenziale ottico calcolato per 2 milioni di punti acquisiti in 10 secondi. La stima di C e la sua incertezza sono dati dalla media e dalla deviazione standard dei valori mostrati in tabella 4.2. Il valore medio ottenuto per il parametro C è pari a

$$\langle C \rangle = 4.14 \pm 0.04 \cdot 10^{-20} \text{ J/V}^2$$

In Figura 4.3 è mostrato l'istogramma relativo alla traccia Browniana da cui abbiamo ricavato sia per l'asse x che y i rispettivi potenziali ottici.

Tabella 4.2 – Parametro C e frequenza di taglio f_c calcolati, rispettivamente, tramite il metodo di Boltzmann e il metodo della PSD

$C \text{ (} 10^{-20} \text{ J/V}^2 \text{)}$	$f_c \text{ (Hz)}$
4.16 ± 0.02	615 ± 2
4.21 ± 0.04	621 ± 2
4.12 ± 0.03	610 ± 2
4.10 ± 0.03	628 ± 2
4.19 ± 0.05	618 ± 2
4.11 ± 0.03	625 ± 2
4.16 ± 0.02	614 ± 2
4.14 ± 0.02	624 ± 2
4.12 ± 0.03	615 ± 2
4.10 ± 0.05	620 ± 2

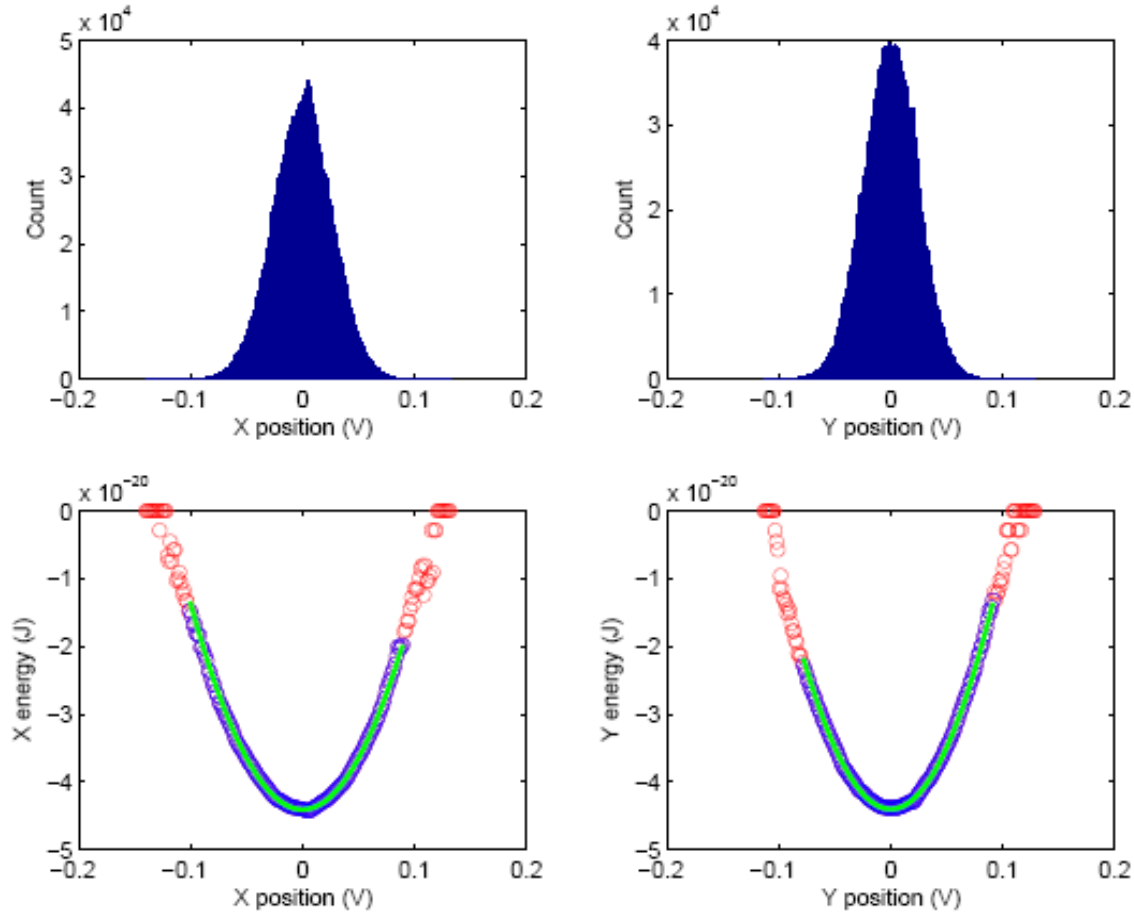


Figura 4.3 - Istogramma del moto Browniano e relativi andamenti dell'energia della sferetta in funzione della sua posizione, calcolati dagli istogrammi per l'asse x e y.

- È stata stimata la frequenza caratteristica f_c grazie ad un fit lorentziano della PSD ottenuta mediante l'analizzatore di spettro, per 10 set di misure. La stima e l'incertezza su f_c sono fornite dalla media e dalla deviazione standard dei valori mostrati in tabella 4.2. Il valore medio ottenuto è pari a

$$\langle f_c \rangle = 619 \pm 5 \text{ Hz}$$

Calcolati i diversi parametri, è stato possibile attraverso la (4.1) e la (4.2) ricavare come stima della viscosità dell'acqua il seguente valore:

$$\eta = 8.8 \pm 1.2 \cdot 10^{-4} \text{ Pa} \cdot \text{s}$$

che risulta consistente con il valore atteso per la temperatura media alla quale si trovava il campione durante le misure:

$$\eta(23.9^\circ\text{C}) = 9.1 \cdot 10^{-4} \text{ Pa} \cdot \text{s}$$

Come mostrato in Figura 4.4 la viscosità dell'acqua è una funzione fortemente dipendente dalla temperatura. Pertanto, al fine di verificare la nostra procedura sperimentale è stata stimata la viscosità dell'acqua a due differenti temperature come mostrato in tabella 4.3:

Tabella 4.3 – Misure di viscosità dell'acqua

T (°C)	23.6	25
$\eta_{\text{misurato}} (10^{-4} \text{ Pas})$	9.1 ± 1.4	8.9 ± 1.6
$\eta_{\text{atteso}} (10^{-4} \text{ Pas})$	9.2	8.9

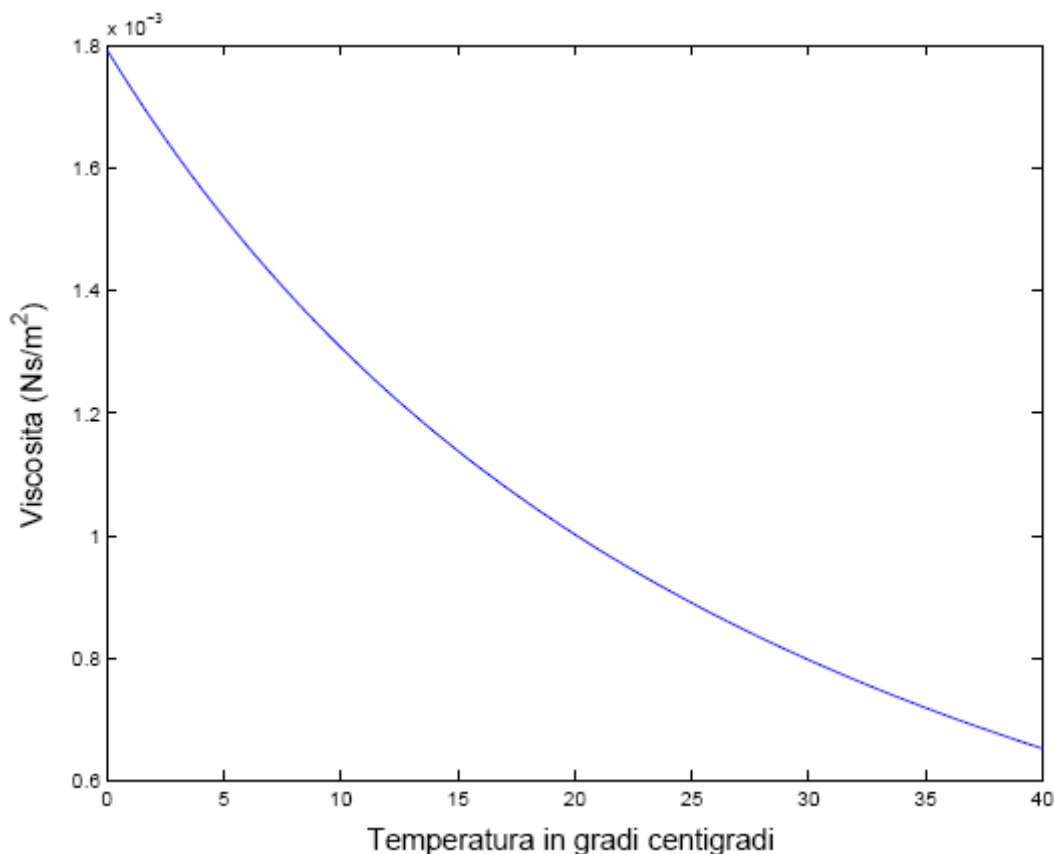


Figura 4.4 - Andamento della viscosità dell'acqua al variare della temperatura.

Come si osserva dalla tabella 4.3 i valori misurati di η risultano consistenti con quelli attesi e sono noti con un'incertezza del 15% e del 18% rispettivamente. A questo punto analizziamo le incertezze percentuali sui parametri che, attraverso la 4.1, ci conducono alla stima della viscosità:

- incertezza sul parametro C : 1%
- incertezza sul parametro f_c : 1%
- incertezza sul fattore di calibrazione β : 9%

Risulta allora evidente che un'incertezza del 9% su β , cioè del 18% su β^2 è la principale causa dell'incertezza su η . Nella Figura 4.5 confrontiamo l'andamento delle nostre misure ripetute di viscosità (triangoli) con quelle attese teoricamente (cerchi) a differenti temperature; inoltre, nella parte inferiore della stessa figura, sono mostrati i rispettivi rapporti ($\eta_{\text{exp}} = \eta_{\text{theo}}$) e come si può notare lo scarto delle misure dai valori attesi non supera il 5%.

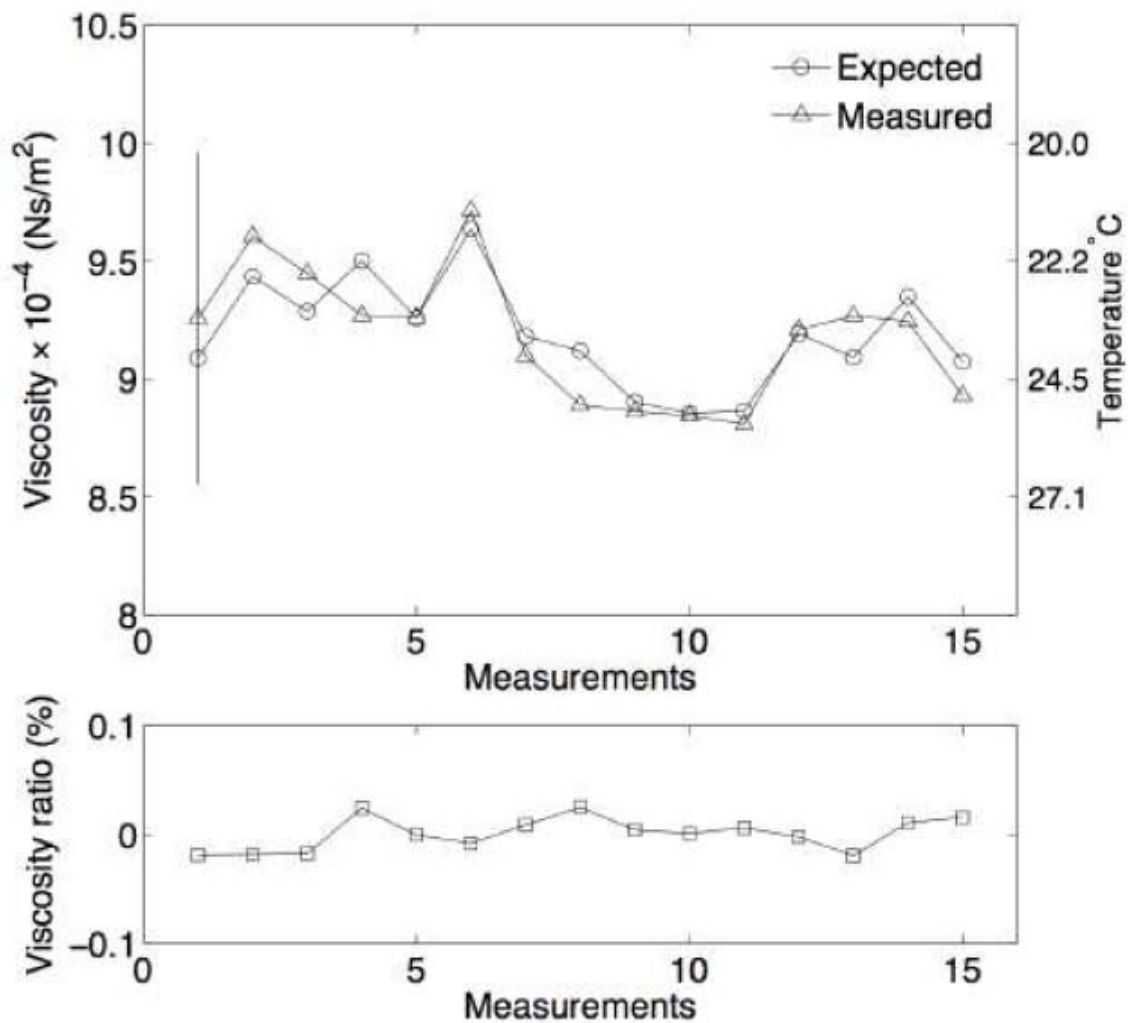


Figura 4.5 - Confronto e rapporto tra la viscosità misurata e quella attesa a diverse temperature.

4.2 Viscosità locale di una soluzione di acqua e glicerina

Al fine di ottenere una completa calibrazione della pinzetta ottica si è proceduto con la misurazione della viscosità di una soluzione di acqua e glicerina. Si è presa in considerazione la glicerina in quanto risulta un fluido a comportamento puramente Newtoniano e forma con l'acqua soluzioni perfettamente omogenee. La viscosità di tali soluzioni può essere modulata variando la concentrazione di glicerina. Utilizzando la stessa procedura di misurazione descritta nel paragrafo precedente, sono stati effettuati test su una soluzione di acqua e glicerina al 40% in volume. I risultati sono riportati in tabella 4.4.

Tabella 4.4 - Viscosità ottenuta per una soluzione di acqua e glicerina (40% in volume) alla temperatura di 30°C

Set	$\eta_{\text{misurato}} (10^{-4} \text{ Pas})$	$\eta_{\text{atteso}} (10^{-4} \text{ Pas})$
1	23 ± 4	27
2	25 ± 4	
3	24 ± 4	

I valori ottenuti sono tra loro consistenti e noti con un'incertezza di circa il 16%.

4.3 Determinazione dei moduli G' e G'' per una soluzione acquosa

Come precedentemente descritto, le proprietà reologiche di un liquido possono essere ricavate a partire dalla conoscenza dello spettro di potenza (Power Spectral Density, PSD) del segnale stocastico generato dal moto Browniano di una sferetta intrappolata e dalle relazioni di Kramers-Kronig che collegano tra loro la parte reale e immaginaria della funzione risposta. Procedendo in questa direzione si risale alla completa conoscenza della parte reale ed immaginaria del modulo di viscoelasticità $G^* = G' + iG''$ che caratterizza il nostro fluido.

Prima di addentrarci nelle misure sperimentali forniamo una breve descrizione della routine in ambiente Matlab che ci ha permesso di risolvere numericamente gli integrali di Kramers-Kronig riscritti nel modo seguente:

$$\alpha'(\omega) = \frac{2}{\pi} \int_0^\infty \cos(\omega t) dt \int_0^\infty \alpha''(z) \sin(zt) dz \quad (3)$$

Tale integrale doppio può essere risolto separatamente considerando prima l'integrale in dz che ci fornisce la funzione:

$$F(t) = \int_0^\infty \alpha''(z) \sin(zt) dz \quad (4)$$

la quale moltiplicata poi per $\cos(\omega t)$ genera l'integrando del secondo integrale in dt . Sebbene l'integrale (4) vada da zero all'infinito, per ottenere la funzione $F(t)$ è sufficiente fermare l'integrazione ad un valore di $z = z_{max}$ (100kHz) legato alla frequenza di acquisizione. Se adesso consideriamo la funzione

$$\alpha''(f) = \frac{\pi}{2K_B T} f S(f) \quad (5)$$

notiamo che è data dal prodotto di una lorentziana, funzione della frequenza, per la frequenza stessa e risulta regolare; ma moltiplicata per $\sin(zt)$ diventa una funzione oscillante. Il prodotto di queste due funzioni genera una funzione che per t crescente fornisce un contributo all'integrale sempre più trascurabile. Infine, ottenuta la $F(t)$ si può procedere al calcolo del secondo integrale fissando i valori di ω per i quali vogliamo il risultato finale.

Per testare la correttezza di questa routine abbiamo dapprima considerato un semplice campione di acqua distillata. Si è, dunque, intrappolata una particella di polistirene di diametro 1.25 μm in soluzione acquosa alla distanza di 10 μm dal fondo del vetrino portacampione grazie al laser Nd-Yag. A partire dalla PSD del moto Browniano della particella e grazie alle equazioni (3) e (5) ricaviamo la parte reale e immaginaria della funzione risposta la quale risulta collegata al modulo complesso di viscoelasticità grazie all'equazione generalizzata di Stokes-Einstein:

$$G(f) = \frac{1}{6\pi a \alpha(f)} \quad (6)$$

Dalla (4.6) si ha infine

$$G' = \frac{1}{6\pi a}; \quad G'' = 2\pi\eta f \quad (7)$$

come mostrato in Figura 4.6.

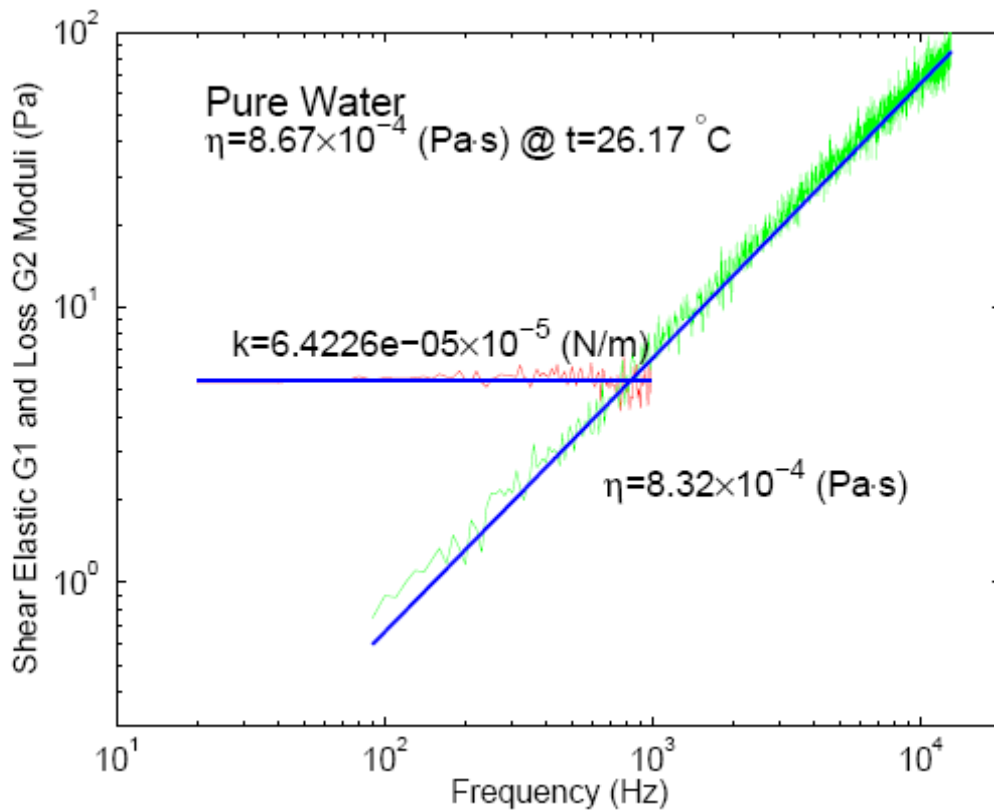


Figura 4.6 - Andamento del modulo elastico G' e del modulo viscoso G'' in funzione della frequenza per una soluzione di acqua distillata.

Come previsto, essendo l'acqua un liquido puramente viscoso, il modulo elastico $G'(f)$ è una funzione costante. In pratica il modulo elastico ricavato è dato dal confinamento armonico generato dalla trappola ottica stessa. Mediante un best fit dei punti sperimentali abbiamo stimato la costante elastica della trappola e la viscosità del campione, rispettivamente. In Figura 4.6 sono mostrate le rette di best fit e il valore di viscosità atteso e misurato alla temperatura di lavoro e la costante elastica misurata, ovvero $\eta = 8.32 \cdot 10^{-4} \text{ Pa} \cdot \text{s}$ e $k = 6.4226 \cdot 10^{-5} \text{ N/m}$. Come si osserva i dati di viscosità sono consistenti entro l'errore sperimentale con quelli riportati in letteratura.

4.4 Risultati sperimentali preliminari per soluzioni di acqua e HA

Per estendere le misure microreologiche a fluidi macromolecolari complessi sono state preparate soluzioni di acqua e acido ialuronico con peso molecolare di 150 kDa. In tali soluzioni si è intrappolata una particella di polistirene e si è proceduto con l'analisi del segnale Browniano fornitoci dal fotodiodo a quadranti. La presenza di una sostanza con proprietà elastiche fa sì che la particella durante il suo moto urti con le macromolecole del soluto risentendo appunto della loro elasticità. A questo punto possiamo fare alcune considerazioni. Partendo dal presupposto che la varianza dello spostamento di una particella intrappolata è pari all'integrale della curva dello spettro di potenza, si è visto che il solo variare della viscosità del sistema non cambia la varianza e, quindi, l'integrale della PSD, ma solamente la sua forma. La curva rimane ancora una lorentziana, ma con differente frequenza di taglio f_c . Aggiungendo un polimero viscoelastico alla soluzione si possono notare due effetti. Il modulo complesso G^* generalmente aumenta così come le curve dello spettro di potenza aumentano la loro ampiezza. Inoltre, aggiungendo una sostanza viscoelastica che mostri una dipendenza dalla frequenza per i moduli elastico e viscoso (G' , e G''), la forma funzionale della PSD cambia, e non risulta più essere approssimabile da una lorentziana.

In queste condizioni il segnale stocastico della particella mostrato in Figura 4.7 risulta piuttosto differente rispetto a quello mostrato in Figura 4.1 per un liquido esclusivamente viscoso (acqua).

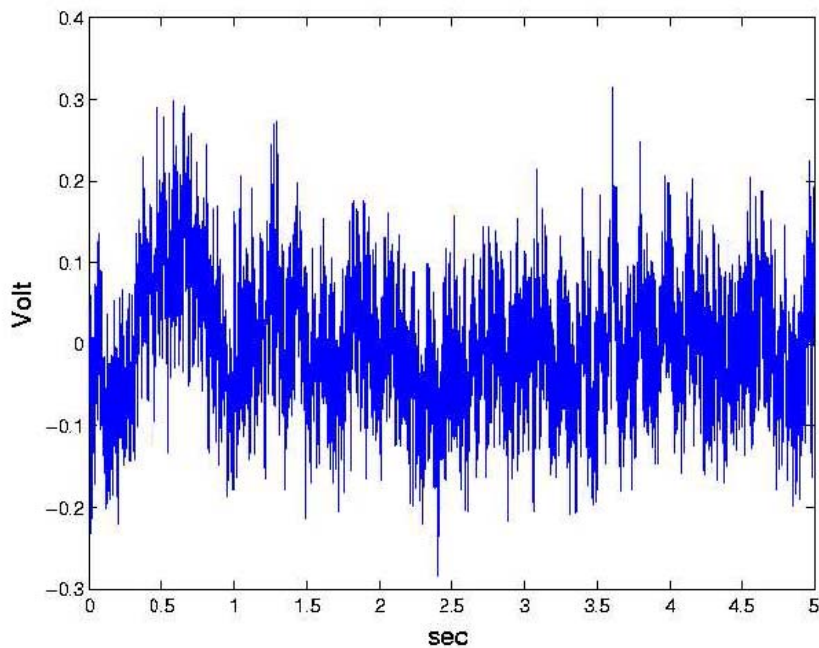


Figura 4.7 - Segnale del moto Browniano di una particella intrappolata in una soluzione di acqua e acido ialuronico (0.1 mg/ml).

Inoltre, in Figura 4.8 si mostra come nel caso dell'acido ialuronico una curva lorentziana non sia più in grado di prevedere con buona approssimazione le curve sperimentali. In pratica, mentre nel caso dell'acqua la parte retta del fit ha pendenza -2, nel caso della nostra soluzione viscoelastica tale pendenza diminuisce apprezzabilmente.

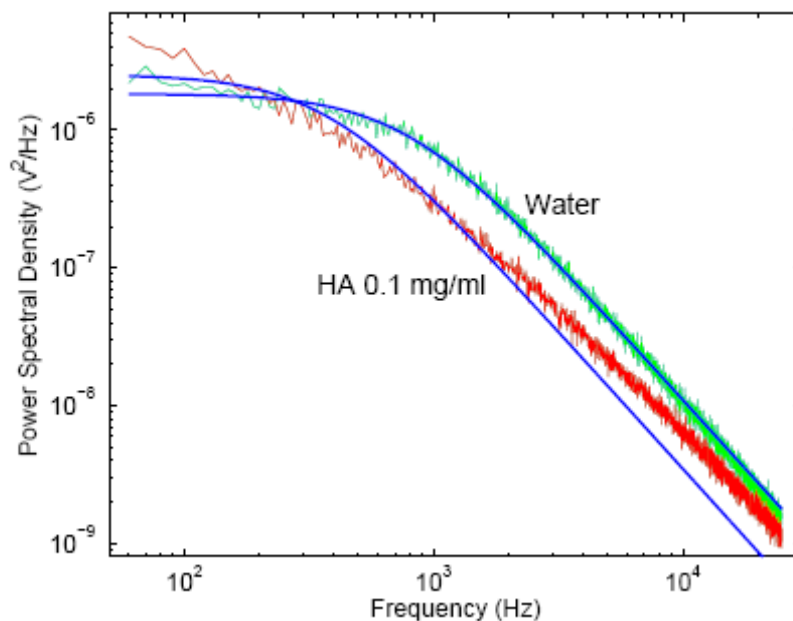


Figura 4.8 - Best fit lorentziano per lo spettro di potenza di una soluzione acquosa e di una di acqua e acido ialuronico (0.1 mg/ml).

In realtà la forma della PSD cambia gradualmente con l'aumentare della concentrazione: inizialmente si ha una diminuzione dell'ampiezza ed in seguito, alle concentrazioni più elevate, si verifica una deviazione della pendenza della curva ad alte frequenze dal valore -2 tipico di una lorentziana. La frequenza di taglio prima si sposta verso bassi valori per poi scomparire definitivamente all'aumentare della concentrazione (Figura 4.9).

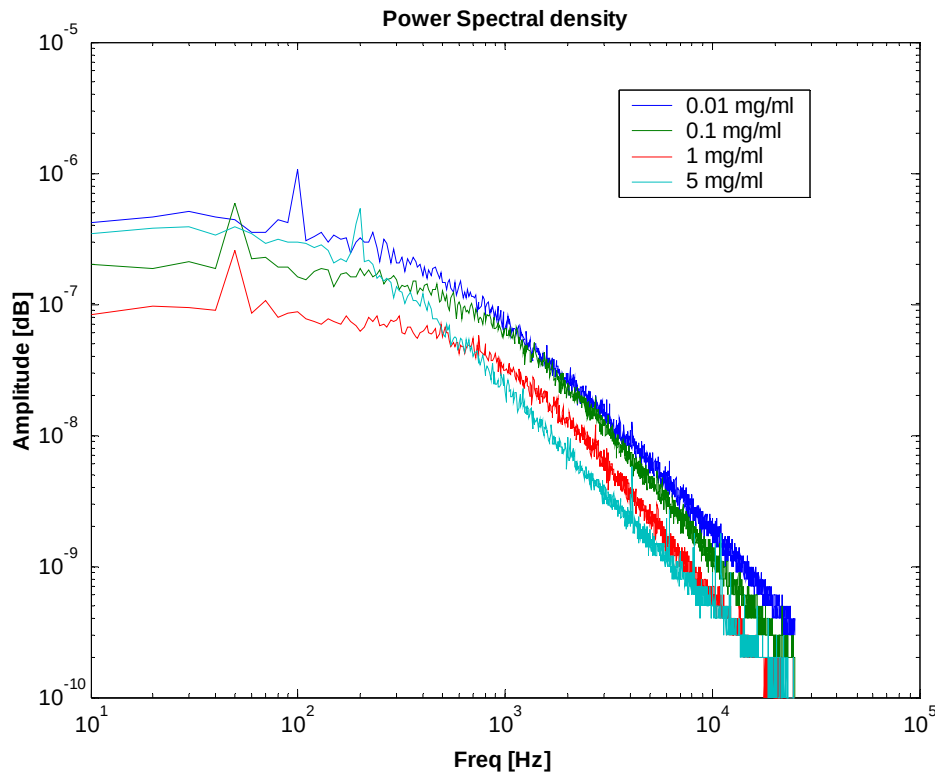


Figura 4.9 – Spettro di potenza per soluzioni acquose di acido ialuronico a diverse concentrazioni.

Di seguito, nelle Figure 4.10-11, sono riportati gli spettri meccanici ottenuti tramite l'analisi del moto Browniano di una sonda microscopica intrappolata otticamente, per due soluzioni acquose di acido ialuronico. Tali soluzioni rappresentano dei fluidi complessi grazie alla presenza delle macromolecole di acido ialuronico che ne aumento la risposta elastica. In definitiva, si può affermare che l'aggiunta di macromolecole complesse in un fluido puramente viscoso come l'acqua va ad aumentare la componente elastica della risposta meccanica in misura direttamente proporzionale alla concentrazione. Considerando le figure relative agli spettri meccanici è possibile ricavare alcune considerazioni. Per concentrazioni molto basse, quali quelle da noi considerate (0.01 e 0.1 mg/ml), un'analisi di tipo macroscopico, quale un test dinamico-meccanico ad un normale reometro, rivelerebbe un comportamento di natura prevalentemente viscosa, con un modulo dinamico viscoso G'' sempre superiore rispetto a quello elastico G' . Le analisi ricavate tramite pinzetta ottica non confermano quelle macroscopiche, se pur per range di frequenze che sono solo minimamente sovrapponibili (intorno ai 10 Hz). Come si vede dai grafici, per entrambe le soluzioni è possibile individuare una frequenza di crossover intorno ai 1000 Hz, indice di uno switch tra un comportamento prevalentemente elastico, per frequenze inferiori, e prevalentemente viscoso per frequenze superiori.

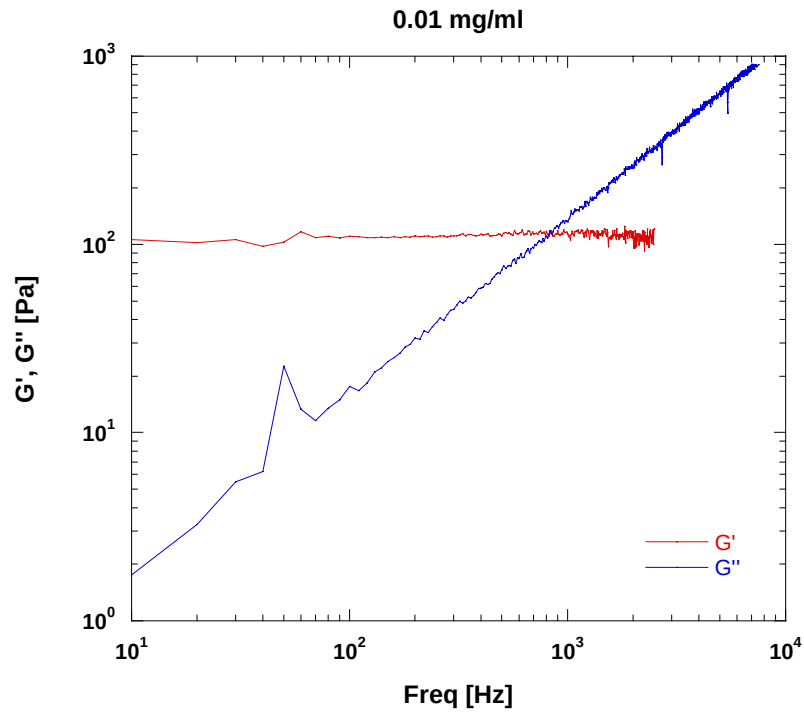


Figura 4.10 – Spettro meccanico per una soluzione di acqua e acido ialuronico (0.01 mg/ml) ottenuta tramite l'analisi del moto browniano della particella intrappolata otticamente.

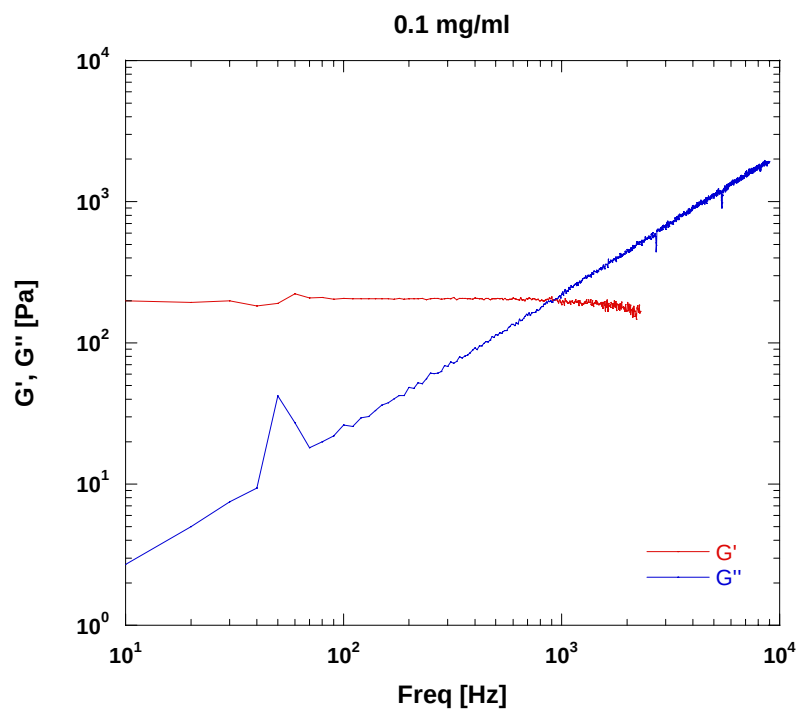


Figura 4.11 – Spettro meccanico per una soluzione di acqua e acido ialuronico (0.1 mg/ml) ottenuta tramite l'analisi del moto browniano della particella intrappolata otticamente.

Nelle Figure 4.12 e 4.13 sono riportati i moduli dinamici delle soluzioni considerate ottenute tramite test con un reometro rotazionale tradizionale (Bohlin Gemini) e con la pinzetta ottica. Non è stato possibile ottenere una perfetta sovrapposizione dei punti sperimentali a causa dei limiti di misurazione delle due tecnologie utilizzate. Il reometro rotazionale, sebbene in teoria sia in grado di arrivare fino a valori di 150Hz, nella pratica mostra dei chiari limiti nell'acquisizione dei punti già oltre il valore di 1 Hz. Discorso opposto per la pinzetta ottica: risulta molto difficile acquisire delle popolazioni di dati a frequenze inferiori a qualche decina di Hz, considerando il fatto che proprio a queste frequenze si sovrappongono una serie di fattori (vibrazioni, oscillazioni sismiche, ecc.) di difficile eliminazione e che contribuiscono ad abbattere bruscamente il rapporto segnale-rumore. Nonostante tali limiti, le curve relative ai moduli delle due soluzioni sembrano raccordarsi con una discreta approssimazione, soprattutto per quanto riguarda il modulo viscoso G'' . Le equazioni delle rette di best fitting riportate nelle figure, ci dicono che entrambi gli strumenti misurano per il modulo viscoso con una dipendenza lineare con la frequenza. Gli esponenti delle due curve, infatti, sono molto vicini all'unità.

Per quanto riguarda G' , in entrambi i grafici è possibile notare un profondo scostamento tra i comportamenti rilevati dai due strumenti. Per spiegare questi comportamenti vanno fatte alcune considerazioni. Materiali prevalentemente viscosi, come le soluzioni acquose, dovrebbero mostrare un modulo elastico praticamente nullo. Come riportato in Figura 4.6, dai dati sperimentali della PSD è stato ricavato un G' il cui andamento risulta essere indipendente dalla frequenza e il cui modulo, direttamente proporzionale alla potenza del laser. Tali moduli apparenti sono dovuti al confinamento armonico della sfera nella trappola ottica. In un campione viscoelastico, quale le soluzioni considerate in questo lavoro, tale modulo apparente si somma a quello reale senza influenzarne il modulo viscoso. Al fine di ottenere il reale modulo elastico, il valore ricavato da i dati della PSD devono essere corretti dall'effetto della stiffness k della trappola secondo la seguente equazione:

$$G'_{reale} = G'_{misurato} - \frac{k}{6\pi a} \quad (8)$$

Seppure corretti, i valori dei moduli elastici ottenuti con la pinzetta ottica non si raccordano con quelli ottenuti tramite reometria classica. Tali risultati potrebbero essere dovuti alla natura della tecnica utilizzata. La sonda micrometrica, intrappolata non più in un liquido puramente viscoso, ma in una soluzione viscoelastica, potrebbe avvertire la presenza delle macromolecole di acido ialuronico. Il comportamento prevalentemente elastico mostrato dalle soluzioni sarebbe da attribuire ad una diversa risposta del materiale su scala micrometrica. In tal modo, dunque, si potrebbe affermare che i metodi microreologici possono sentire il sistema in maniera differente da quelli macroscopici, permettendo la caratterizzazione del materiale "dall'interno". Ulteriori investigazioni devono essere effettuate in tale direzione: in questo lavoro di tesi parte rilevante del lavoro è stato speso per la progettazione e la realizzazione di un pinzetta ottica home made. Pertanto, come sviluppi futuri, si prevede la caratterizzazione di un serie di fluidi macromolecolari complessi che permetteranno l'ulteriore messa a punto e adattamento del sistema a tali tipi di materiali.

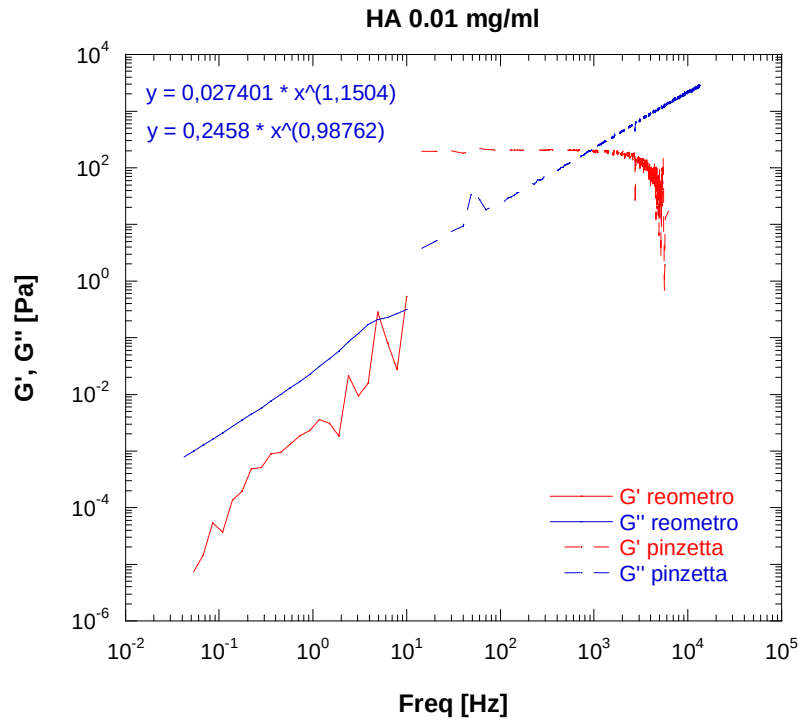


Figura 4.12 – Spettro meccanico per una soluzione di acqua e acido ialuronico (0.01 mg/ml) ottenuta con reometro convenzionale (linee continue) e pinzetta ottica (linee tratteggiate).

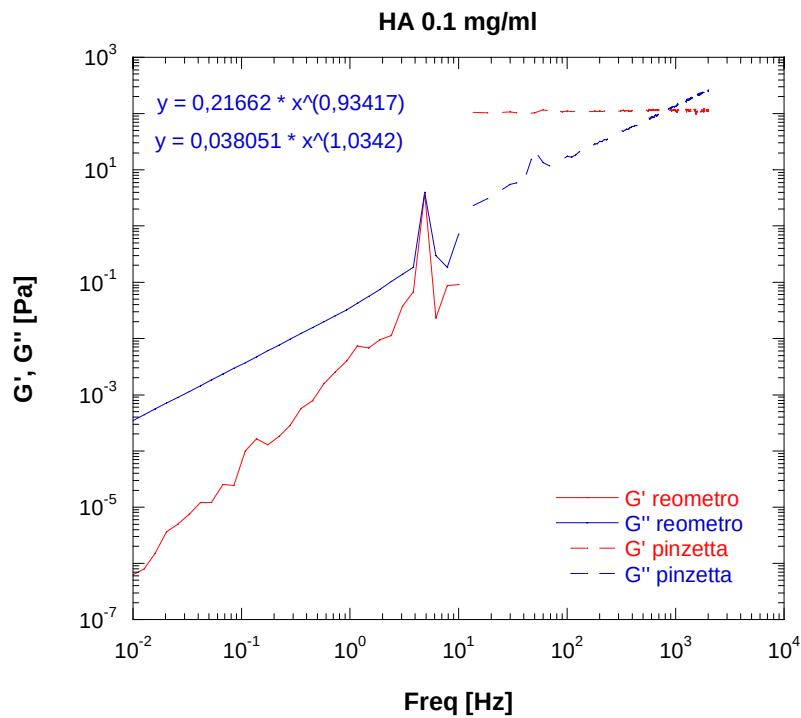


Figura 4.13 – Spettro meccanico per una soluzione di acqua e acido ialuronico (0.1 mg/ml) ottenuta con reometro convenzionale (linee continue) e pinzetta ottica (linee tratteggiate).

Meccanismi di gelazione di copolimeri a base di PEO-PPO

5.1 Introduzione ai polimeri di PEO-PPO

Le soluzioni acquose di polimeri auto-assemblanti sono state estensivamente studiate negli ultimi decenni (McCormick 2000, Shalaby et al. 1991, Annable, T et al. 1993, Yekta, A. et al. 1995). Tali sistemi polimerici sono basati su macromolecole amfifiliche costituite da una parte idrofila, che assicura la solubilità in acqua, e da una parte idrofoba che conferisce il comportamento di tipo associativo. Alcuni di tali sistemi mostrano una transizione sol-gel termoreversibile, ovvero un comportamento "termoindurente". Questo fenomeno, che consiste nell'auto-assemblaggio delle macromolecole, superate alcune condizioni (di temperatura o concentrazione), è l'opposto del classico fenomeno di gelazione per raffreddamento. Tra i sistemi termoreversibili, quelli che mostrano una transizione sol-gel intorno alla temperatura corporea sono oggetto di interesse di studio per le loro potenziali applicazioni in campo biomedico, considerando l'ulteriore vantaggio che durante la gelazione di tali materiali non intervengono né solventi né agenti crosslinkanti (Malmsten, M et al. 1992, Mingvanish, W. et al. 1999, Jeong, B. et al. 1999, 2000, 2001, 2002, Gutowska, A. et al 2001, Chung, Y. et al. 2002, Kurisawa, M et al. 2000, Yoshioka, H. et al. 1998). Il sistema polimerico termoreversibile più studiato è il polietilenossido-polipropilenossido-polietilenossido ($\text{PEO}_n\text{-PPO}_m\text{-PEO}_n$), conosciuto commercialmente come Pluronic. Quando i blocchi di PEO e PPO sono combinati in una singola catena polimerica, le molecole mostrano caratteristiche amfifiliche che dipendono sia dall'architettura molecolare che da parametri termodinamici, quali temperatura e pressione. I sistemi Pluronic sono capaci di autoassemblarsi in diverse strutture come micelle sferiche o lamellari e in fluidi complessi strutturati simili alle microemulsioni bicontinue (Coppola L. et al 2000, Wanka G. et al. 1994, Mortensen K. et al. 1995). I parametri critici, CMC (Concentrazione Critica di Micellizzazione) e CMT (Temperatura Critica di Micellizzazione), concentrazione e temperatura ai quali si verifica la formazione di micelle, variano a seconda dei parametri chimico-fisici. La modifica della composizione dei blocchi (il rapporto PEO/PPO) e del peso molecolare la lunghezza dei blocchi di PEO e PPO), produce, quindi, materiali le cui proprietà finali possono risultare idonee per un ampio range di applicazioni. In particolare, i copolimeri di PEO-PPO rappresentano un'importantissima classe di materiali per applicazioni biomediche come il rilascio controllato di farmaci e le terapie geniche. La possibilità di variare il peso molecolare ed il rapporto tra i blocchi di PEO idrofilo e i blocchi di PPO idrofobo permette la formazione di copolimeri con proprietà adattabili a vari tipi di applicazioni. Infatti, i copolimeri di acido pluronico vengono utilizzati come detergenti, schiumanti, emulsificanti, nella separazione e solubilizzazione di materiali organici in soluzioni acquose, a protezione di microrganismi in processi biologici, per la solubilizzazione di medicinali e il rilascio controllato di sostanze. Le soluzioni acquose di tali copolimeri sono state, infatti, ampiamente studiate. In particolare molta attenzione è stata dedicata alle cinetiche e alla termodinamica di micellizzazione, includendo gli effetti della temperatura e della composizione del sistema sulla struttura delle micelle. A tal fine, sono stati utilizzati molti e diversi metodi d'indagine. In questo capitolo si vuole proporre lo studio di un particolare elemento della famiglia dell'acido pluronico, il F127, tramite l'utilizzo di tecniche particolarmente nuove ed innovative quali la pinzetta ottica e la FRAP. Inoltre, si prenderà in considerazione un particolare derivato del Pluronic F127, come copolimero

chimicamente modificato e funzionalizzato studiandone la micellizzazione e mettendone in evidenza le eventuali analogie e differenze con il copolimero di partenza.

5.2 La micellizzazione e la transizione sol-gel

5.2.1 Proprietà chimico-fisiche

I copolimeri Pluronic sono costituiti da blocchi di PEO e di PPO arrangiati in una struttura tipo A-B-A:



L'arrangiamento risultante è un copolimero amfifilico nel quale il numero di unità idrofobe (PEO) ed idrofobe (PPO) può essere modificato per variare la grandezza, l'idrofilicità, l'idrofobicità, anche chiamata lipofilicità, del sistema. La formula di struttura dei Pluronic a blocchi è mostrata in Figura 5.1 e le loro principali caratteristiche fisico-chimiche, come il punto di fusione, il cloud point, l'HLB, sono riportate in Tabella 5.1.

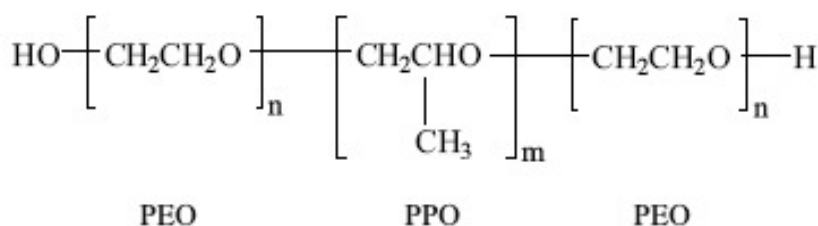


Figura 5.1 – Formula di struttura dei copolimeri a blocchi a base di PEO- PPO.

Nel processo di micellizzazione un ruolo chiave viene rivestito dall'idrofobicità del sistema. Per caratterizzare questo aspetto viene utilizzato come parametro l'HLB (hydrophilic-lipophilic balance), espresso dalla seguente equazione empirica:

$$HLB = -36 \frac{m}{2n + m} + 33 \quad (5.1)$$

Copolimeri con diversi valori di m e n sono caratterizzati da valori differenti di HLB, che può variare da 1 a 30. I sistemi caratterizzati da alti valori di HLB mostrano micellizzazione. Il cloud point (letteralmente, punto d'intorbidamento) rappresenta la temperatura alla quale avviene la separazione di fase tra il polimero e l'acqua. Esso varia da circa 10 a oltre 100°C, a seconda del contenuto di PEO. I copolimeri a blocchi che contengono una più alta percentuale in peso di blocchi di PEO esibiscono, generalmente, un cloud point più alto.

Tabella 5.1 – Proprietà chimico-fisiche dei copolimeri a blocchi Pluronic

Approximate formula	Name of copolymer	Average molecular weight	PEO % wt	Melting/pour point (°C)	Cloud point in 1% aqueous solution (°C)	HLB
PEO ₁₁ PPO ₁₆ PEO ₁₁	L35	1900	50	7	73	19
PEO ₄₃ PPO ₁₆ PEO ₄₃	F38	4700	80	48	>100	31
PEO ₄ PPO ₂₂ PEO ₄	L42	1630	20	-26	37	8
PEO ₆ PPO ₂₂ PEO ₆	L43	1850	30	-1	42	12
PEO ₁₀ PPO ₂₃ PEO ₁₀	L44	2200	40	16	65	16
PEO ₆ PPO ₃₄ PEO ₆	L62	2500	20	-4	32	7
PEO ₉ PPO ₃₂ PEO ₉	L63	2650	30	10	34	11
PEO ₁₃ PPO ₃₀ PEO ₁₃	L64	2900	40	16	58	15
PEO ₁₉ PPO ₂₉ PEO ₁₉	P65	3400	50	27	82	17
PEO ₇₆ PPO ₂₉ PEO ₇₆	F68	8400	80	52	>100	29
PEO ₆ PPO ₃₈ PEO ₆	L72	2750	20	-7	25	7
PEO ₂₄ PPO ₃₆ PEO ₂₄	P75	4150	50	27	82	17
PEO ₅₃ PPO ₃₄ PEO ₅₃	F77	6600	70	48	>100	25
PEO ₁₉ PPO ₄₃ PEO ₁₉	P84	4200	40	34	74	14
PEO ₂₆ PPO ₄₀ PEO ₂₆	P85	4600	50	34	85	16
PEO ₆₁ PPO ₄₀ PEO ₆₁	F87	7700	70	49	>100	24
PEO ₁₀₄ PPO ₃₉ PEO ₁₀₄	F88	11400	80	54	>100	28
PEO ₁₁₈ PPO ₄₅ PEO ₁₁₈	F98	13000	80	58	>100	28
PEO ₁₇ PPO ₆₀ PEO ₁₇	P103	4950	30	30	86	9
PEO ₂₇ PPO ₆₁ PEO ₂₇	P104	5900	40	32	81	13
PEO ₃₇ PPO ₅₆ PEO ₃₇	P105	6500	50	35	91	15
PEO ₁₃₃ PPO ₅₀ PEO ₁₃₃	F108	14600	80	57	>100	27
PEO ₁₃ PPO ₆₉ PEO ₁₃	L122	5000	20	20	19	4
PEO ₂₀ PPO ₆₉ PEO ₂₀	P123	5750	30	31	90	8
PEO ₁₀₀ PPO ₆₅ PEO ₁₀₀	F127	12600	70	56	>100	22

5.2.2 Fattori che influenzano la formazione delle micelle

I sistemi di PEO-PPO mostrano una buona idrofilicità a temperatura ambiente grazie all'alto contenuto di PEO e di conseguenza non formano micelle. Con l'aumentare della temperatura, l'acqua diventa un cattivo solvente per entrambi i segmenti di PEO e PPO portando alla formazione di micelle. Diversi ricercatori hanno concentrato i loro studi sui parametri CMT e CMC e sulla loro dipendenza da proprietà chimico-fisiche dei sistemi di PEO-PPO quali il peso molecolare, ed il rapporto PEO/PPO. È stato riportato che, fissando la temperatura e il peso molecolare dei blocchi di PEO, la CMC diminuisce con l'aumento delle unità di PPO (Alexandridis P. et al. 1994). Allo

stesso modo, fissando la concentrazione, anche la CMT si abbassa all'aumentare del numero di unità di PPO. I risultati, inoltre, indicano che i polimeri con parte idrofila predominante formano micelle a concentrazioni e temperature più basse. D'altro canto, mantenendo costante la lunghezza dei blocchi idrofobi e aumentando le unità idrofile dei sistemi di PEO-PPO sono stati osservati piccoli incrementi delle CMC e CMT. Di conseguenza si può affermare che la dinamica di formazione delle micelle è influenzata più dai gruppi idrofobi che da quelli idrofili (Alexandridis P. et al. 1995).

5.2.3 Aspetti termodinamici della micellizzazione

La conformazione spaziale che una macromolecola assume in una soluzione è direttamente correlata alle interazioni dinamiche tra i segmenti di polimero ed il solvente. Per un copolimero a blocchi come il PEO-PPO, tali interazioni sono più complesse da determinare: i due diversi blocchi che lo costituiscono si comportano in maniera differente in un solvente come l'acqua, che risulta un buon solvente per una dei gruppi costitutivi del copolimero e povero per l'altro. Questa situazione conduce ad un comportamento amfifilico, quindi, ad una tendenza del copolimero ad autorganizzarsi in strutture come le micelle che sono più convenienti dal punto di vista energetico. Esistono due approcci termodinamici principali per lo studio del processo di micellizzazione: il modello della separazione di fase, che considera le micelle come una fase che si separa alla CMC, e il mass-action model, secondo il quale le micelle e gli unimeri dissociati sono in continuo equilibrio associazione-dissociazione (Alexandridis P. et al. 1995). Assumendo che la concentrazione di unimeri in presenza di micelle sia costante ed uguale al valore di CMC, in entrambi gli approcci, l'energia libera di micellizzazione è data da (Attwood D. et al. 1983, Hunter R. et al. 1987):

$$\Delta G^\circ = RT \ln(X_{CMC}) \quad (1)$$

dove R è la costante dei gas ideali, T la temperatura assoluta, e X_{CMC} è la concentrazione critica di micellizzazione espressa come frazione molare. È possibile esprimere l'entalpia di micellizzazione, applicando l'equazione di Gibbs-Helmoltz (Attwood D. et al. 1983, Hunter R. et al. 1987):

$$\Delta H^\circ = -RT^2 \left[\partial \ln(X_{CMC}) / \partial T \right]_P = R \left[\partial \ln(X_{CMC}) / \partial (1/T) \right]_P \quad (2)$$

Utilizzando i risultati ottenuti da Yu et al. (Yu et al. 1992), per i copolimeri a blocchi abbiamo

$$\partial \ln(X_{CMC}) / \partial (1/T) = \partial \ln(X) / \partial (1/T_{CMT}) \quad (4)$$

e l'equazione (2) può essere riscritta come

$$\Delta H^\circ = R \left[\partial \ln(X) / \partial (1/T_{CMT}) \right] \quad (5)$$

dove X è la concentrazione espressa come frazione molare e T_{CMT} è la temperatura critica di micellizzazione. L'equazione (5), dunque, può essere utilizzata per calcolare il ΔH° di micellizzazione dall'inverso della pendenza del fit lineare del grafico $1/T_{CMT}$ vs. $\ln(X)$. È stato trovato che l'entalpia di micellizzazione è positiva, il che suggerisce il trasferimento di unimeri dalla soluzione alle micelle sia un processo endotermico. L'energia libera ΔG° è negativa in quanto le micelle si formano spontaneamente. Di conseguenza, risulta chiaro che il contributo entropico è la forza che conduce alla formazione di micelle nei copolimeri a blocchi. Tale fenomeno è principalmente la conseguenza delle interazioni idrofobe e delle modificazioni strutturali dell'acqua in prossimità delle catene di polimero.

Un altro metodo per calcolare l'entalpia di micellizzazione è usare la calorimetria a scansione differenziata (DSC). Utilizzando questa tecnica è stato messo in evidenza il ruolo dominante delle unità di PPO nel processo di formazione e aggregazione di micelle (Alexandridis P. et al. 1994). Non esiste proporzionalità tra l'entalpia misurata al DSC e la dimensione dei blocchi di PEO, mentre tale proporzionalità, anche se in prima approssimazione, è stata riscontrata con il numero di segmenti di PPO.

5.2.4 *Tecniche per la rilevazione della transizione sol-gel e della morfologia*

Un'ampia varietà di tecniche è stata utilizzata per studiare il comportamento termoreversibile dei sistemi di PEO-PPO. Tecniche ottiche, quali dynamic light scattering (DLS) e metodi spettroscopici, sono stati usati per osservare la formazione delle micelle e per determinare la CMC e la CMT. Al DLS, lo scattering della luce laser subisce un brusco incremento d'intensità, segnalando in tal modo la presenza di particelle micellari. La CMC può essere definita come la concentrazione alla quale l'intensità di scattering della luce laser si scosta significativamente dalla linea di base, dovuta alla sola presenza di unimeri. Per il P85 (PEO₂₆-PPO₄₀-PEO₂₆), ad esempio, è stata trovata la coesistenza tra unimeri, micelle e aggregati micellari. La formazione di micelle inizia a 30 °C e la loro crescita continua con l'aumento della temperatura (Brown W. et al. 1991).

La transizione del PEO-PPO è stata studiata utilizzando anche studi di tipo reologico e diffusivo. Prud'Homme et al. (Prud'Homme et al. 1996), attraverso misurazioni reologiche sul sistema chiamato F127 (PEO₁₀₀-PPO₆₈-PEO₁₀₀), ha trovato che, a bassi regimi di concentrazione, le micelle sono separate e il sistema ha il comportamento di un fluido Newtoniano. Ciò si verifica quando la concentrazione è inferiore al 12.5% oppure, ad alte concentrazioni, quando la temperatura è bassa. Contrariamente, ad alte concentrazioni o alte temperature, la frazione volumetrica delle micelle si avvicina al massimo impacchettamento. Ho et al. (Ho et al. 2001) hanno studiato la diffusione di proteine flessibili fluorescenti in una soluzione di copolimero Pluronic-PAA utilizzando la tecnica della fluorescence recovery after photobleaching (FRAP). Il coefficiente di diffusione ottenuto dipendeva dalla grandezza, idrofobicità e dalla conformazione del diffondente.

Lo studio della morfologia dei sistemi di PEO-PPO è stato eseguito utilizzando principalmente due tecniche: small angle X-ray scattering (SAXS) and small angle neutron scattering (SANS). Esistono discrepanze tra i risultati presentati da differenti gruppi di ricerca. Mortensen (Mortensen K. 1996) attraverso uno studio microstrutturale su F127 eseguito combinando le tecniche di Crio-Tem and SANS arriva alla conclusione che i cristalli colloidali formano un reticolo cubico a corpo centrato. Prud'homme et al. (Prud'Homme et al. 1996) attraverso studi simili sullo stesso materiale asseriscono che la fase micellari presenti una simmetria cubica semplice. Tramite la combinazione di SANS and SAXS, Wu et al. (Wu et al. 1997) riportano che la struttura del gel sia cubica a facce centrate.

5.3 **Pluronic F127 e F127 modificato**

Nell'ambito di questo lavoro di tesi è stato preso in considerazione, tra la famiglia di copolimeri a base di PEO-PPO, il Pluronic F127. Tale copolimero è caratterizzato da una struttura del tipo:



Come è possibile vedere nella griglia riportata in Figura 5.2, l' F127 è tra i Pluronic che mostrano una tendenza più spiccata verso la transizione sol-gel. Tale tendenza si accentua con l'aumentare del contenuto di unità idrofile nel copolimero.

Tale copolimero è stato oggetto di ampi studi in letteratura. Per concentrazioni di F127 inferiori al 12.5% in peso le soluzioni si comportano come liquidi Newtoniani. Per concentrazioni maggiori, le soluzioni diventano non Newtoniane in un range di temperature intermedio che diventa più ampio

con l'aumentare della concentrazione del copolimero. I campioni con concentrazione al 15% in peso, ad esempio, sono Newtoniani per temperature inferiori a 30°C o superiori a 50°C e non Newtoniani per temperature comprese tra 30 e 50 °C, raggiungendo la massima viscosità a ~40°C. Quando la concentrazione supera il 17% in peso oltre una data temperatura è possibile osservare la formazione del gel, grazie alla strutturazione delle micelle. Le maggiori caratteristiche reologiche del gel a base di F127 sono il basso yield stress, una viscosità a zero shear bassissima e shear-thinning. Lo yield stress è dovuto alle interazioni repulsive delle catene di PEO sovrapposte nella struttura micellare.

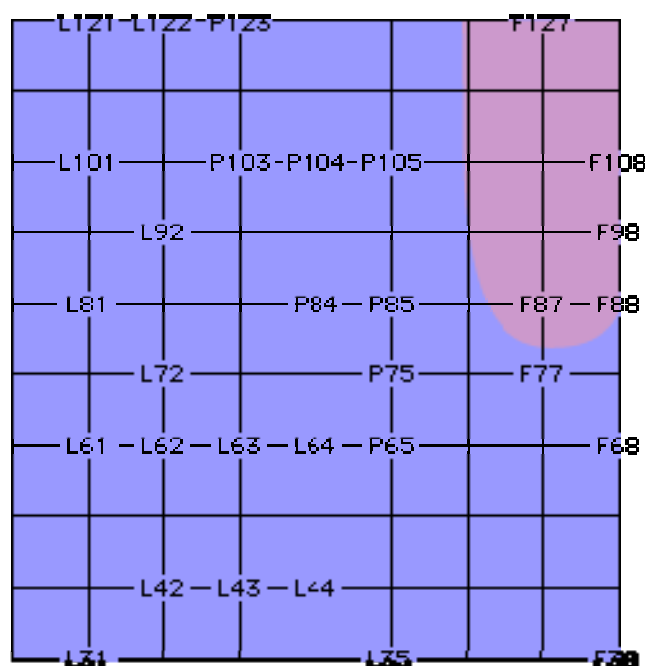


Figura 5.2 – Griglia base dei copolimeri Pluronic: la parte in rosa indica i copolimeri con maggiore tendenza alla gelificazione.

I copolimeri a base di PEO-PPO hanno trovato utilizzo in un ampio range di applicazioni. In particolare, come detto in precedenza, quelli che mostrano una transizione sol-gel intorno alla temperatura corporea sono oggetto di interesse di studio per le loro potenziali applicazioni in campo biomedico, considerando l'ulteriore vantaggio che durante la gelazione non intervengono né solventi né agenti crosslinkanti che ne potrebbero compromettere la biocompatibilità. Sfortunatamente, una serie di problematiche ne limita l'utilizzo in molti tipi di applicazioni biologiche:

- le alte concentrazioni richieste per la formazione del gel.
- quando iniettati nell'organismo, la struttura del gel viene degradata in unimeri solubili nel giro di un giorno.
- il non troppo elevato livello di proprietà meccaniche (quali moduli dinamici e viscosità) raggiunto.

Per questo motivo in collaborazione con il Prof. Cohn è stato deciso di sviluppare una nuova generazione di sistemi polimerici termoreversibili, a base di Pluronic F127, in grado di ovviare a tali problematiche (Cohn et al. 2003). Tali nuovi polimeri anfifilici sono stati realizzati polimerizzando il copolimero a base di PEO-PPO con esametilene diisocianato (HDI) come

estensore delle catene. Uno schema della polimerizzazione è mostrato in Figura 5.3. In tal modo vengono generati, grazie a vincoli di vicinanza, orientazioni spaziali e mobilità ristrette che conferiscono al materiale proprietà diverse da quello di partenza.

Nei paragrafi seguenti, attraverso investigazioni di tipo reologico e diffusivo vengono analizzate le differenze di comportamento dei due tipi di materiali, indicando per brevità l'F127 con estensioni di catena come F127 modificato.

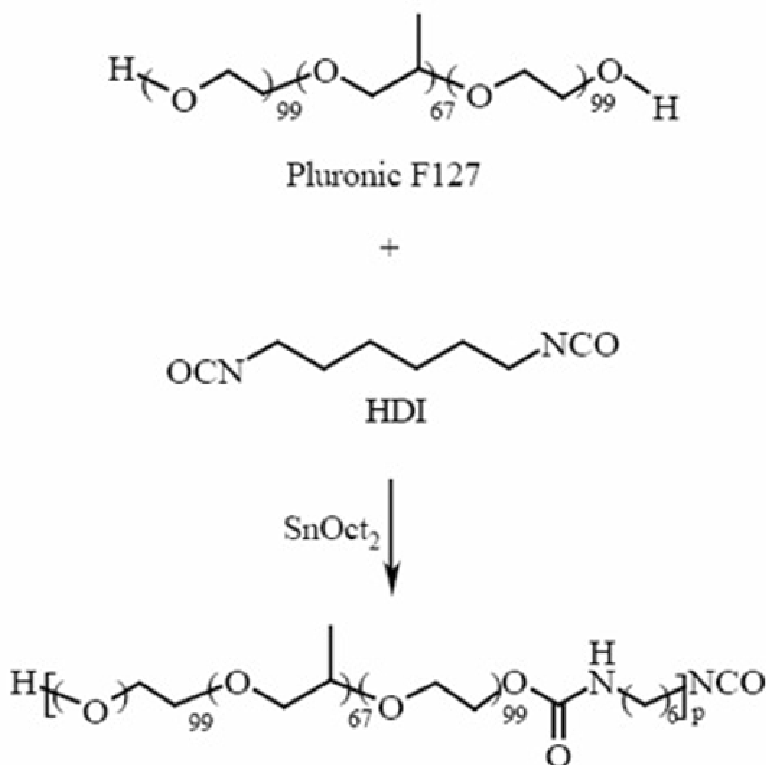


Figura 5.3 – Estensione di catena tramite reazione di polimerizzazione tra catene di Plutonio F127 ed esametilene diisocianato (HDI). P = grado di polimerizzazione.

5.4 Parte sperimentale

5.4.1 Caratterizzazione macroreologica di soluzioni acquose a base di F127

Nel seguito vengono riportate le prove reologiche effettuate sui materiali in esame: soluzioni acquose al 20% in peso di F127 e F127 modificato. Data la natura termo-reversibile dei materiali considerati è stato necessario fare ricorso a diversi tools geometrici. Per temperature al disotto della CMT si è utilizzato una geometria “cup and bob” più adatta a materiali allo stato liquido e alla misurazione di bassi valori di viscosità. Per temperature al disopra della CMT si è fatto ricorso alla più classica geometria piatto-piatto (15 mm di diametro).

I test dimostrano che le proprietà reologiche del F127 aumentano drasticamente con la temperatura. Tale aumento coincide con la formazione di fasi cristalline liotropiche: gli aggregati micellari creano delle intergiunzioni tra i blocchi di PEO-PPO e la soluzione si trasforma da un liquido Newtoniano ad un gel solido. La temperatura limite di gelazione è intorno ai 20 °C. La Figura 5.4 mostra l'andamento delle viscosità per entrambi i materiali al variare della temperatura. Tali valori, nel range investigato (5-50 °C), sono stati ottenuti attraverso test in flusso eseguiti con un reometro rotazionale utilizzando valori dello shear rate pari a quelli più bassi consentiti dallo strumento. Ulteriori valori di viscosità, mostrati in Figura 5.5, sono stati calcolati utilizzando test di creep.

Attraverso misure di creep, infatti, lo shear rate può essere esteso a valori estremamente più bassi. La compliance $J(t)$ calcolata in un test di creep può essere correlata alla viscosità del sistema da

$$J(t) = \gamma^\circ / \tau = J^\circ(t) + t / \eta_0 \quad (1)$$

Dove $J^\circ(t)$ è la shear compliance in stazionario, γ° , τ e η_0 sono la deformazione, lo sforzo e la viscosità, rispettivamente. I valori misurati attraverso le due differenti tecniche mostrano un buon accordo sperimentale in tutto il range di temperature.

Il comportamento dei due materiali mostra una serie di analogie e differenze, quest'ultime dovute alle modificazioni di catena. Entrambi i materiali subiscono un forte salto di viscosità (circa 5-6 ordini di grandezza) ad indicazione dell'avvenuta transizione di fase. L'F127 mostra una transizione sol-gel molto brusca dopo i 20 °C: la viscosità mostra un salto tra due valori costanti. Per il Pluronic modificato la transizione risulta più graduale. Le estensioni di catena influiscono sul comportamento reologico del F127 modificato: a basse temperature la viscosità è circa una decade più alta di quello non modificato. La transizione sol-gel non è brusca e confinata in pochi gradi centigradi (20-30 °C) come nel materiale non modificato, ma sembra essere più graduale essendo caratterizzata da valori di viscosità che aumentano continuamente nel range di temperature investigato. Le estensioni di catena dell'F127 sembrano dunque creare quella serie di vincoli di vicinanza che aumentano i tempi di strutturazione e organizzazione delle micelle in domini ordinati. Si conclude, quindi, che la modificazione della lunghezza delle catene di F127 permette di modificare la morfologia delle micelle impacchettate e, in tal modo, le proprietà meccaniche.

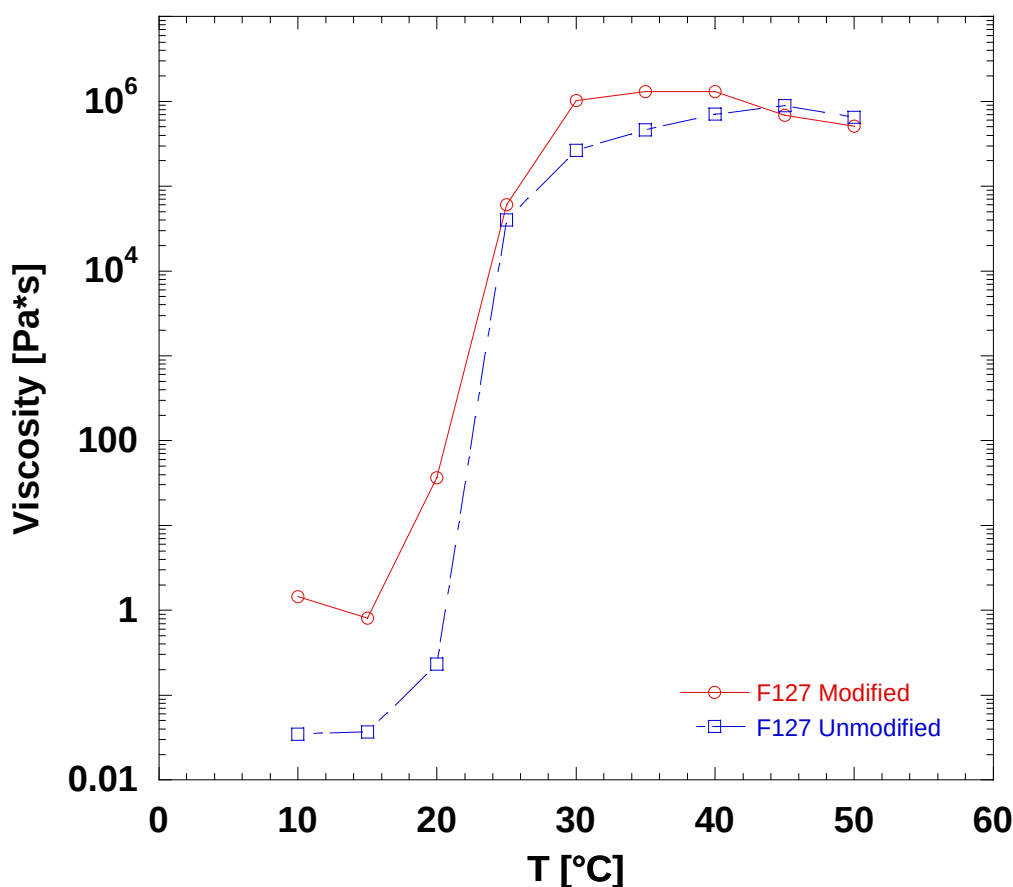


Figura 5.4 – Prove in flusso: andamento viscosità-temperatura per F127 e F127 modificato.

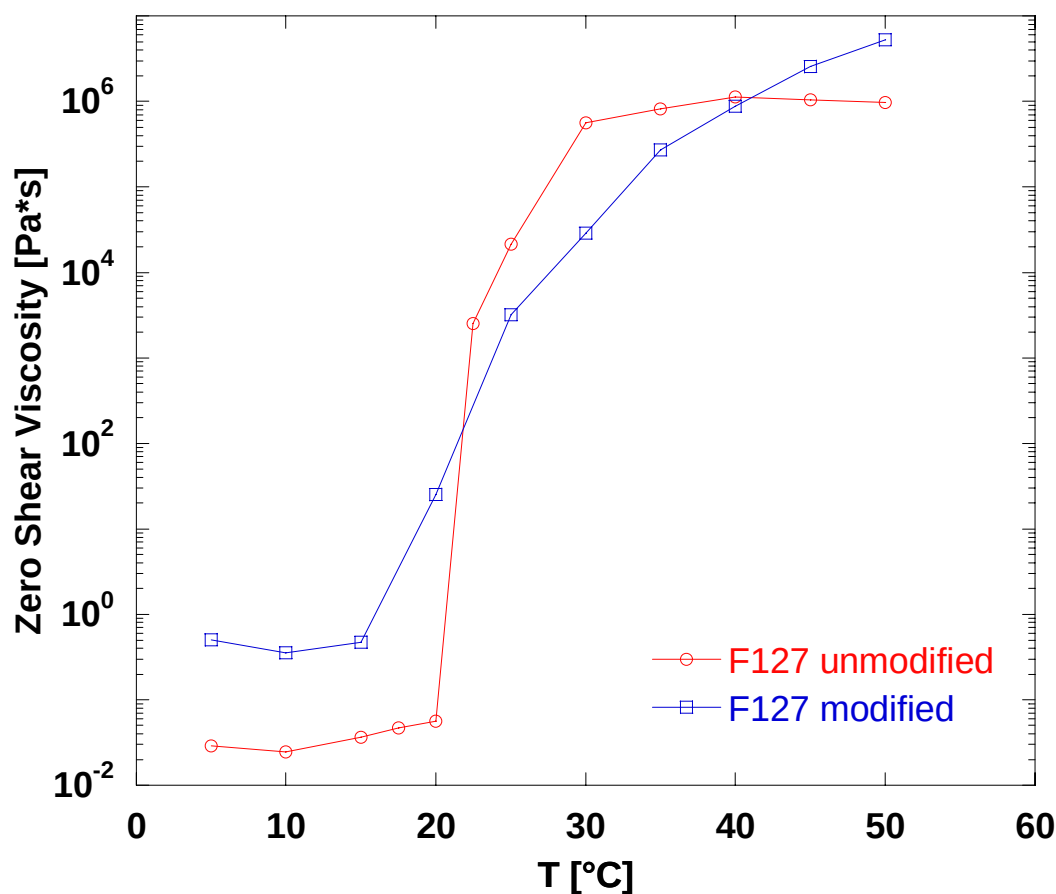


Figura 5.5 – Test di creep: andamento viscosità-temperatura per F127 e F127 modificato

Di seguito vengono riportati i grafici relativi a prove dinamico-meccaniche effettuate sui materiali in esame.

Nelle Figure 5.6 e 5.7 sono riportati i moduli dinamici elastico e viscoso (G' e G'') in funzione della temperatura per soluzioni acquose al 20% in peso di F127 e F127 modificato. Dagli andamenti dei moduli è possibile definire la temperatura critica di micellizzazione (CMT) come il valore della temperatura alla quale si verifica l'inversione tra un comportamento viscoso ed elastico. Per entrambi le soluzioni analizzate il valore di CMT risulta essere intorno ai 23°C. questo ci permette di dire che il processo di micellizzazione rimane lo stesso anche per il materiale con estensioni di catene e, cioè, che sia dovuto ad un abbassamento dell'entropia del sistema costituito da acqua e polimero. Pertanto, da un'analisi dei risultati, è possibile dire che per temperature minori della CMT il materiale presenta il modulo dinamico viscoso molto maggiore del modulo dinamico elastico, dimostrando un classico comportamento da liquido viscoso. Per temperature superiori alla CMT il comportamento di entrambi i materiali cambia drasticamente a seguito dell'avvenuta gelificazione. Il modulo elastico G' risulta essere sempre maggiore di quello viscoso G'' mostrando, entrambi, una dipendenza dalla frequenza trascurabile. Quanto detto risulta maggiormente evidente dalle Figure 5.8-5.9 dove viene mostrato l'andamento del modulo complesso G^* in funzione della frequenza a diverse temperature, per entrambe le soluzioni. Se si considerano, i valori di best fit dei valori sperimentali, si evince come le soluzioni passino da un comportamento puramente viscoso, caratterizzato da un andamento del modulo complesso che va con esponente unitario rispetto alla frequenza, ad un comportamento prevalentemente elastico, con esponente del modulo rispetto alla frequenza quasi nullo.

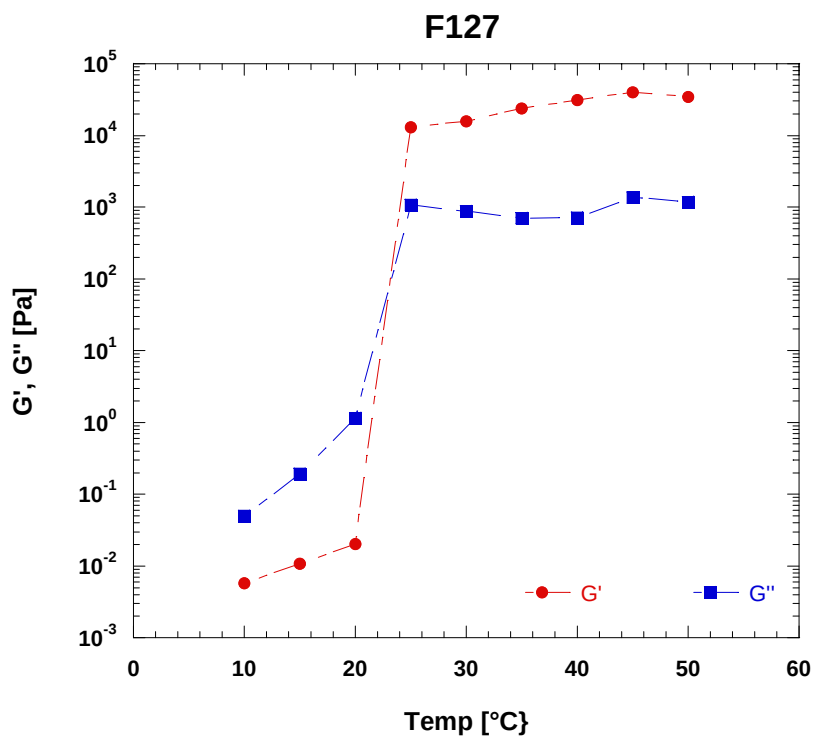


Figura 5.7 – G' , G'' in funzione della temperatura alla frequenza di 1 Hz per F127

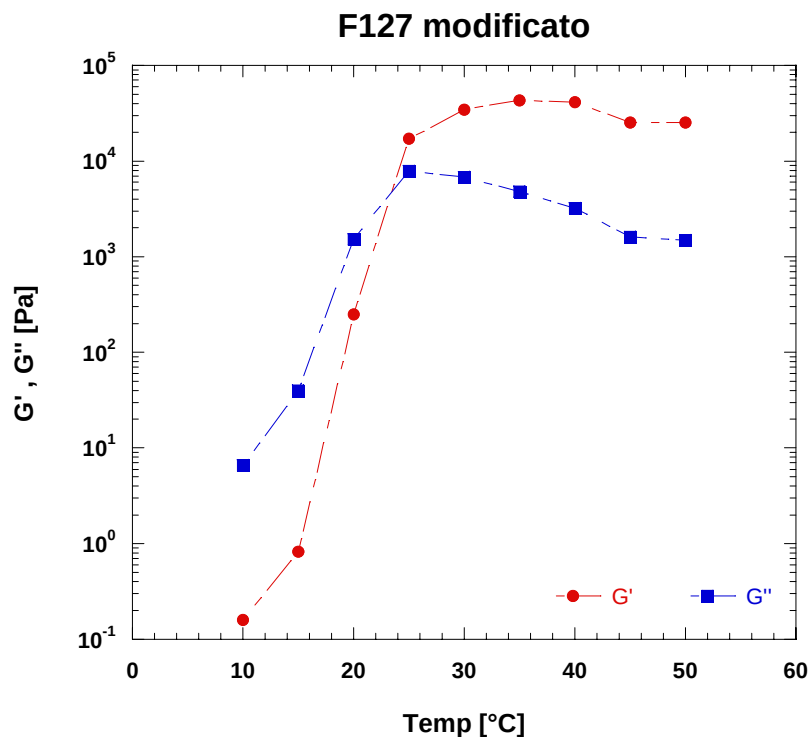
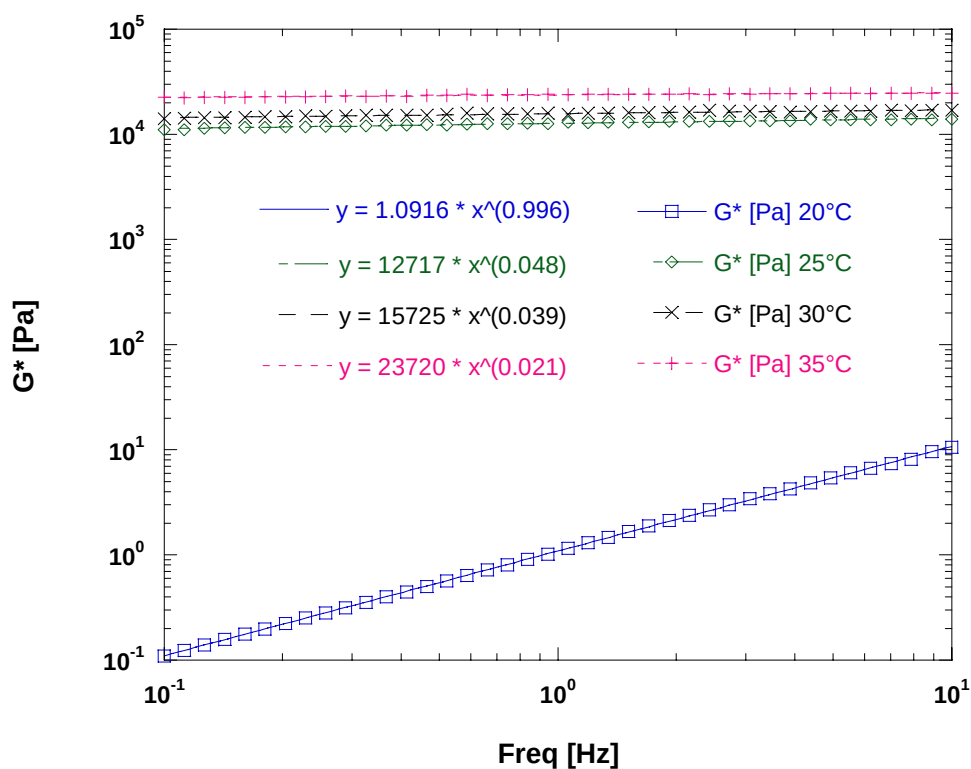
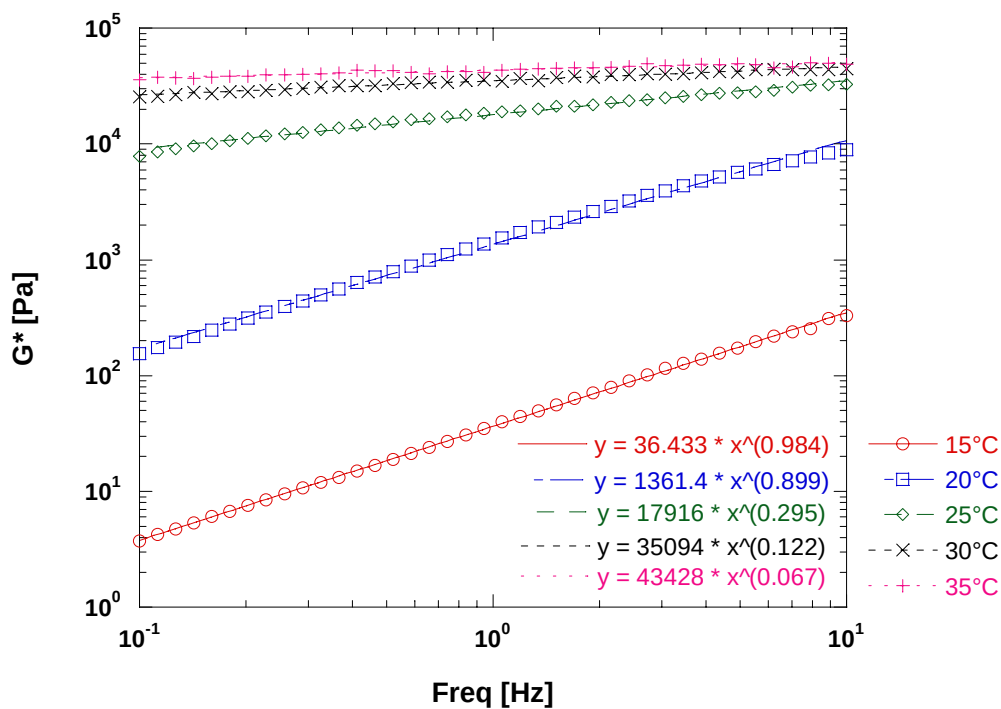


Figura 5.8 – G' , G'' in funzione della temperatura alla frequenza di 1 Hz per F127 modificato.


 Figura 5.8 - $G^*(\omega)$ a differenti temperature per una soluzione acquosa al 20% in peso di F127.

 Figura 5.9 - $G^*(\omega)$ a differenti temperature per una soluzione acquosa al 20% in peso di F127 modificato.

Gli spettri meccanici ottenuti sono in completo accordo con le misurazioni di viscosità. I valori sperimentali ottenuti per i moduli dinamico e viscoso risultano essere più elevati per le soluzioni a base di F127 modificato. Inoltre, se si considerano le Figure 5.8-5.9, è possibile notare come la transizione sol-gel attraverso il processo di formazione e impacchettamento delle micelle risulti diverso per i due materiali considerati. Ancora una volta i risultati sperimentali suggeriscono che tale transizione risulti essere molto veloce e repentina per le soluzioni a base di F127, mentre appare più graduale quella che si ottiene per soluzioni a base di F127 modificato. Tali osservazioni portano ad una considerazione di tipo fisico: le estensioni di catena effettuate su F127 portano ad un rallentamento della cinetica di formazione e di strutturazione delle micelle.

5.4.2 Analisi diffusiva di soluzioni a base di F127

Attraverso l'utilizzo della tecnica FRAP è stato possibile studiare le proprietà di diffusione dei materiali considerati. Attraverso tali esperimenti si è verificato se il passaggio sol-gel potesse essere investigato attraverso i cambiamenti delle proprietà diffusive dei materiali. Come primo tipo di sonde nanometriche fluorescenti sono stati utilizzati destrani labellati con FITC a due diversi pesi molecolari: 10 kDa e 2000 kDa. In Figura 5.10 sono riportati i coefficienti di diffusione in acqua dei due destrani al variare della temperatura. I dati nel grafico mostrano una diversa dipendenza del coefficiente di diffusione con la temperatura. I destrani a 2000 kDa mostrano una pendenza della retta di fitting dei dati sperimentali più bassa dovuta ad un peso molecolare maggiore, e, di conseguenza un raggio idrodinamico maggiore. In effetti, i raggi idrodinamici, ricavati per i destrani a 10 kDa e 2000 kDa attraverso l'applicazione della Stokes-Einstein, sono risultati, rispettivamente, ~ 3 nm e ~ 19 nm.

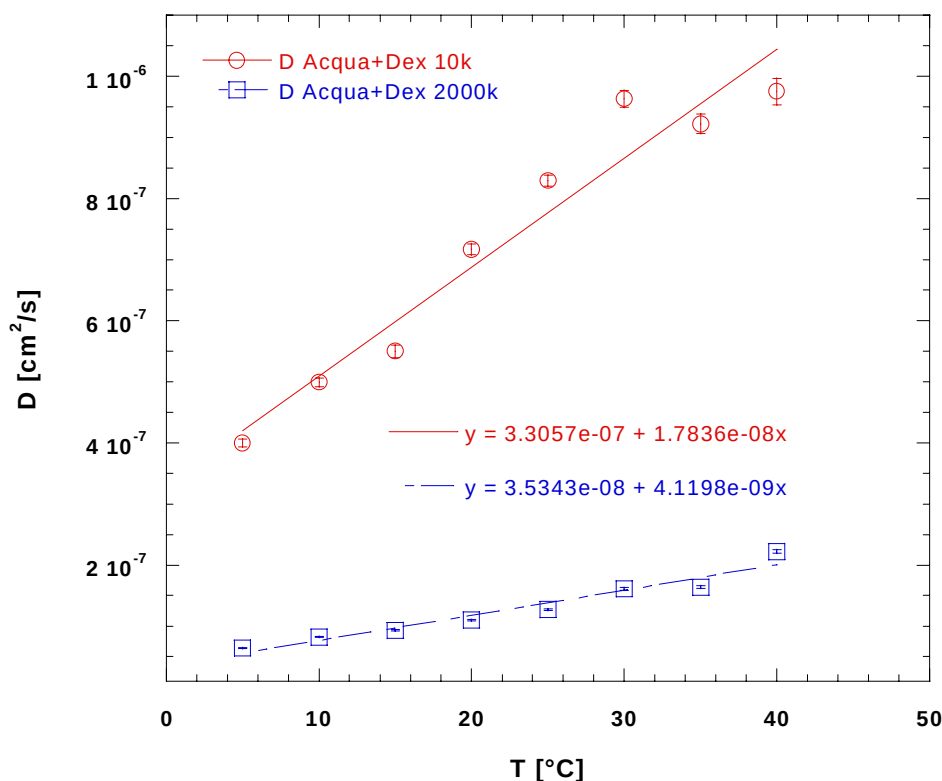


Figura 5.10– Coefficienti di diffusione di destrani 10 kDa e 2000 kDa in acqua al variare della temperatura.

In Figura 5.11 sono mostrati i coefficienti di diffusione dei destrani a 10 kDa in soluzioni acquose al 20% in peso a base di F127 e F127 modificato. Il grafico mostra un andamento lineare del coefficiente di diffusione con la temperatura. Confrontando tale andamento con quello ottenuto in acqua è possibile verificare che la dipendenza con la temperatura si abbassa di circa un ordine di grandezza passando dal solo solvente (acqua) alle soluzioni a base di Pluronic F127. Per questo motivo i dati sono stati normalizzati rispetto ai valori in acqua al fine di annullare il fenomeno diffusivo dei probe nel solo solvente e i risultati ottenuti sono riportati in Figura 5.12. Dal grafico emerge che i destrani a 10 kDa hanno un andamento differente a seconda della soluzione in cui diffondono. Per le soluzioni a base di F127 le sonde sembrano non accorgersi della gelificazione, risultando la dipendenza di D lineare con T . Risultato differente si ottiene per le soluzioni a base di F127 modificato: il coefficiente di diffusione cresce nel range 5-15°C, per effetto della temperatura, per poi stabilizzarsi su valori relativamente costanti. In questo caso la sonda diffondente sembra avvertire il cambiamento di fase del materiale nel quale diffonde.

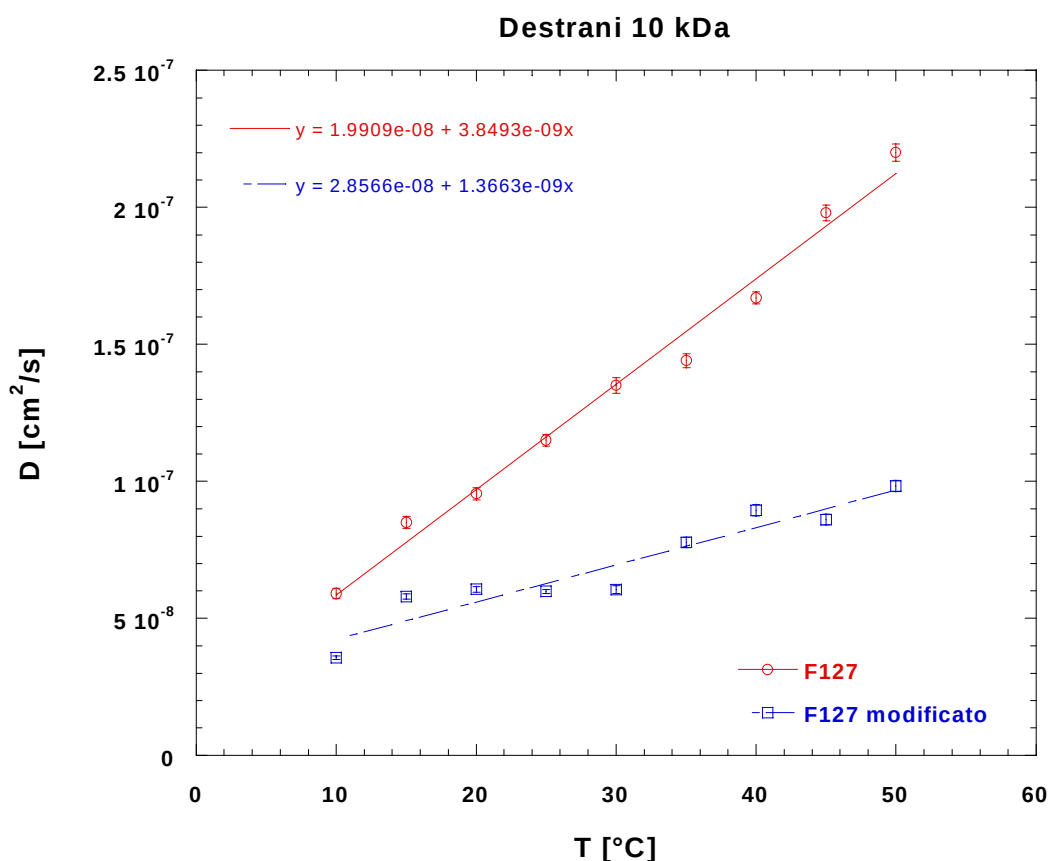


Figura 5.11 – Coefficienti di diffusione in funzione della temperatura di destrani a 10 kDa per F127 e F127 modificato

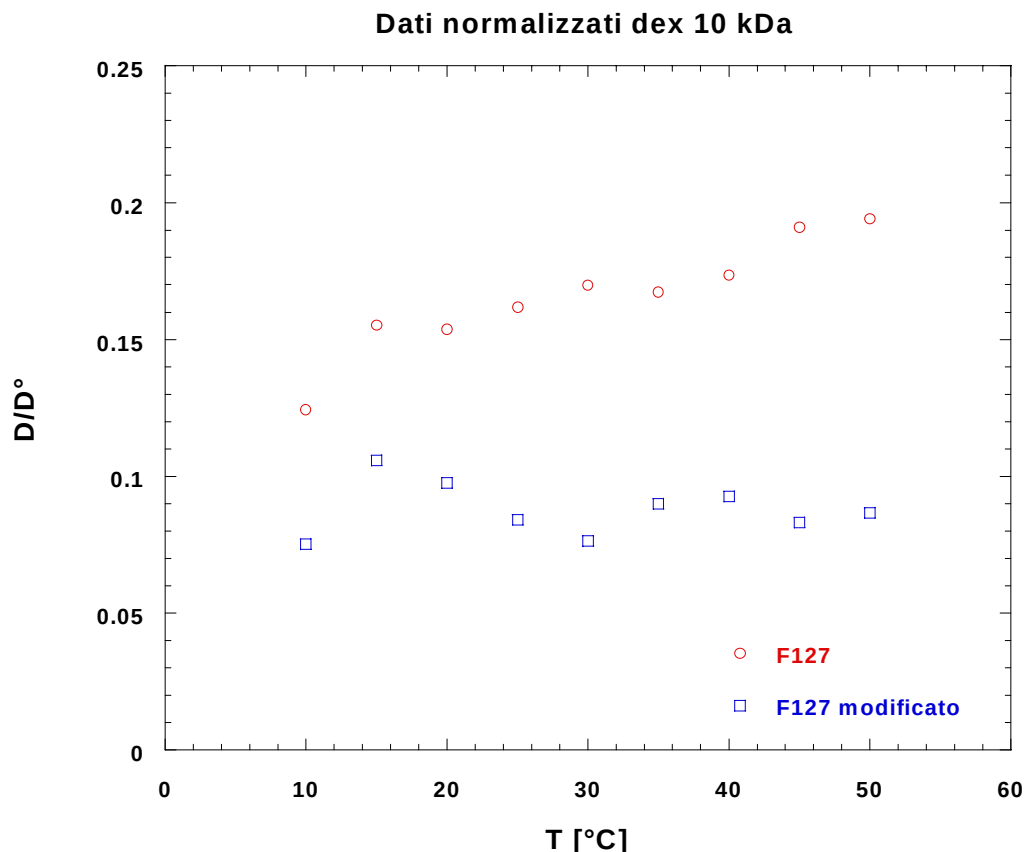


Figura 5.12 – Coefficienti di diffusione in funzione della temperatura, normalizzati rispetto ai dati in acqua, di destrani a 10 kDa per F127 e F127 modificato

In Figura 5.13 sono mostrati i coefficienti di diffusione dei destrani a 2000 kDa in soluzioni acquose al 20% in peso a base di F127 e F127 modificato. A differenza dei destrani a più basso peso molecolare, caratterizzati da un raggio idrodinamico molto piccolo, i risultati relativi ai 2000 kDa suggeriscono che la transizione di fase sia avvertita per entrambi i tipi di soluzione. I coefficienti di diffusione risultano essere più alti nelle soluzioni a base di F127. I dati normalizzati per entrambi i tipi di soluzione presentano un andamento crescente del coefficiente di diffusione fino a 25°C per le soluzioni a base di F127 e fino a 20°C per le soluzioni a base di copolimero modificato, ad indicare che i meccanismi di micellizzazione e gelazione avvengano in anticipo per le soluzioni di F127 modificato. Superate tali temperature i coefficienti di diffusione normalizzati diminuiscono linearmente con la temperatura.

Purtroppo i dati ottenuti non appaiono particolarmente significativi e indicativi per estrapolarne indicazioni sui cambiamenti di fase dei materiali. Il cattivo esito dei test è attribuibile al tipo di sonda utilizzata: i destrani, essendo delle macromolecole, oltre a diffondere mostrano una certa tendenza a reptare. Dunque, per evitare qualsiasi tipo di inquinamento dei risultati dei test diffusivi si è sostituito le sonde fluorescenti con sferette rigide fluorescenti. Quest'ultime permettono di estrapolare, infatti, soprattutto in un sistema polimerico, un profilo diffusivo più corretto rispetto a molecole flessibili come i destrani, in quanto il loro diametro è indipendente dalla temperatura e non risente della presenza del network polimerico. Alcuni movimenti diffusionali possono essere provocati da fluttuazioni temporali del network polimerico a topologia costante, mentre altri possono essere provocati dalle dinamiche della matrice polimeriche che frapponendo ostacoli topologici al movimento possono ostacolare la diffusione.

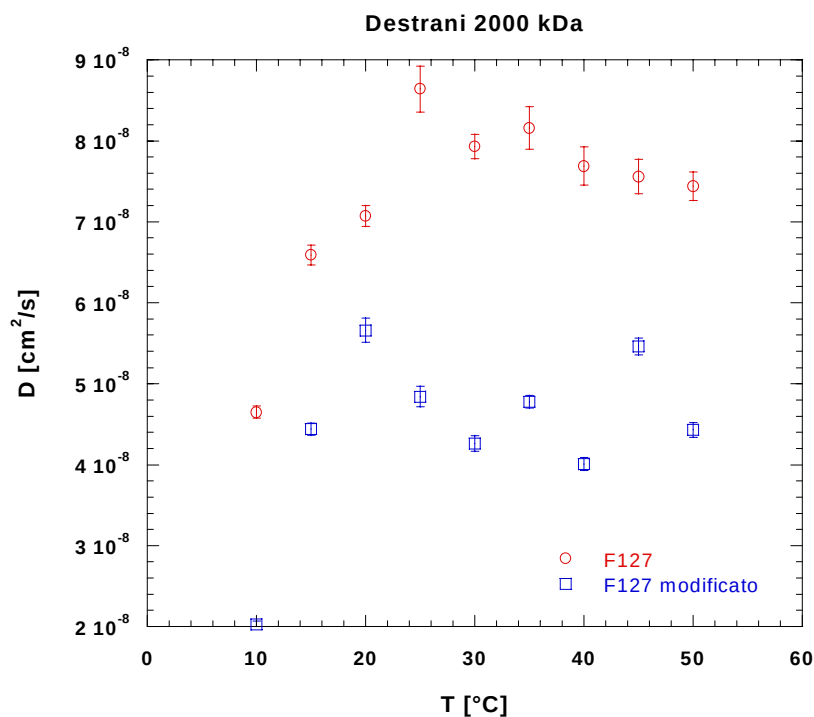


Figura 5.13 – Coefficienti di diffusione in funzione della temperatura di destrani a 2000 kDa per F127 e F127 modificato

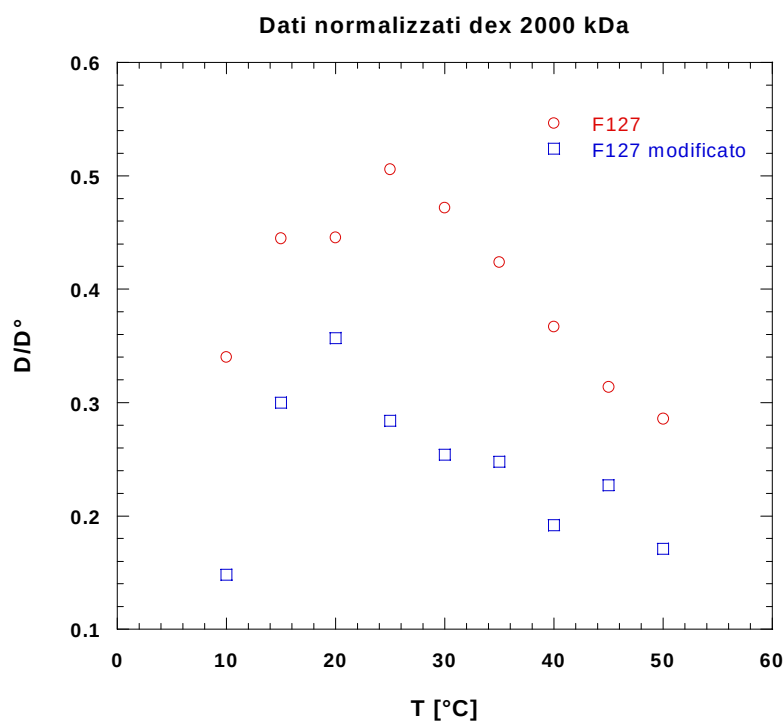


Figura 5.14 – Coefficienti di diffusione in funzione della temperatura normalizzati rispetto ai dati in acqua, di destrani a 2000 kDa per F127 e F127 modificato

Per evitare tali tipi di problematiche si è deciso di ricorrere all'utilizzo di sonde fluorescenti non macromolecolari ma rigide.

Come test preliminari, sono stati eseguiti misurazioni dei diametri delle sfere per investigare la formazione di eventuali aggregati attraverso DLS e monitorando il coefficiente di diffusione delle biglie in acqua ed estrapolando il diametro in accordo con l'equazione di Stokes-Einstein

$$R_{beads} = \frac{KT}{6\pi\eta D} \quad (5)$$

dove K è la costante di Boltzmann, T la temperatura assoluta, η è la viscosità locale della soluzione e D è il coefficiente di diffusione misurato. I risultati sono riportati in Tabella 5.2

Tabella 5.2 – Misura del diametro delle sfere mediante DLS e FRAP

	Nominal d [nm]	d DLS [nm]	d FRAP [nm]
Duke Scientific	26.0 ± 10%	26.6 ± 2.4%	22.3 ± 14.1%
Molecular Probes	24.0 ± 10%	28.9 ± 20.4%	37.4 ± 55.7%

I dati riportati in tabella mostrano che è possibile misurare correttamente il diametro delle sfere della Duke Scientific, mentre i diametri, calcolati attraverso esperimenti con DLS e FRAP, delle sfere della Molecular Probes sono affetti da errori piuttosto consistenti. Ciò suggerisce la formazione di aggregati per quest'ultimo tipo di sfere. In Figura 5.15 sono riportati i profili di diffusione, con le relative barre di errore, per i due tipi di sfera. I valori più bassi ottenuti per le sonde della Molecular Probes sono in pieno accordo con l'ipotesi, precedentemente formulata, di formazione di aggregati.

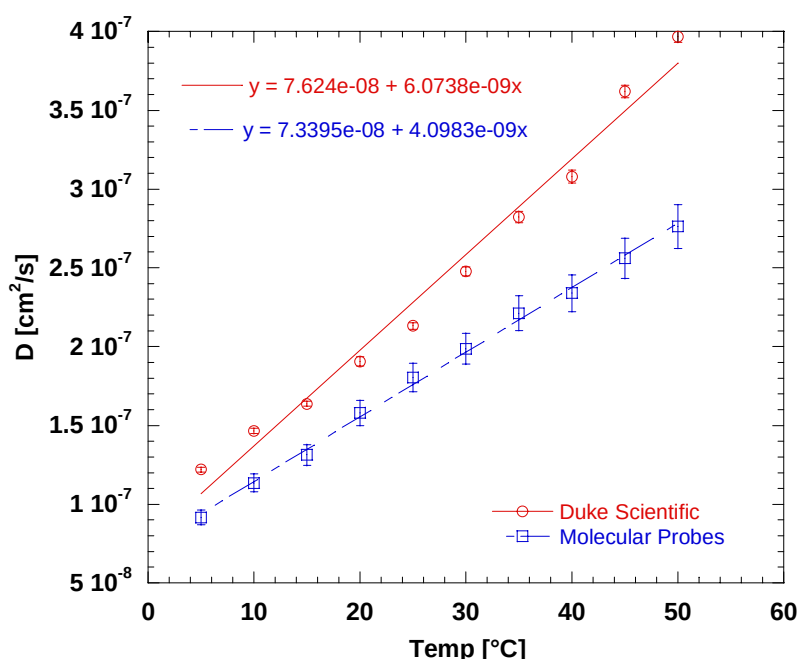


Figure 5.15 – Profili di diffusione in acqua di sonde Duke Scientific e Molecular Probes.

Il profilo di diffusione in temperatura per le sfere di 26 nm di diametro della Duke Scientific è stato determinato nel range 5-50°C. L'effetto della temperatura sul coefficiente di diffusione è mostrato in Figura 5.16. I valori di diffusione per il Plutonico F127 modificato e non modificato sono stati normalizzati rispetto ai valori ottenuti in acqua in modo da disaccoppiare l'effetto della diffusione delle sfere nel solo solvente (acqua) della soluzione (Figura 5.17).

Le curve mostrano un brusco abbassamento della diffusione per entrambi i materiali. Il coefficiente di diffusione per il Plutonico F127 non modificato si abbatte nel range 5-15 °C per poi raggiungere un plateau fino a 50 °C. Per quello modificato la transizione nel profilo di diffusione è visibile nel range 5-10 °C. Sebbene, come già mostrato dai test reologici, la transizione sol-gel sia traslata di qualche grado centigrado il comportamento diffusivo ottenuto dalle misure di recupero della fluorescenza non è in perfetto accordo con i risultati reologici. La CMT sembra verificarsi a temperature più basse, ad indicare che un'analisi su scala microscopica, quale la FRAP, sia in grado di "sentire" il sistema in maniera differente rispetto a tecniche d'indagine macroscopiche.

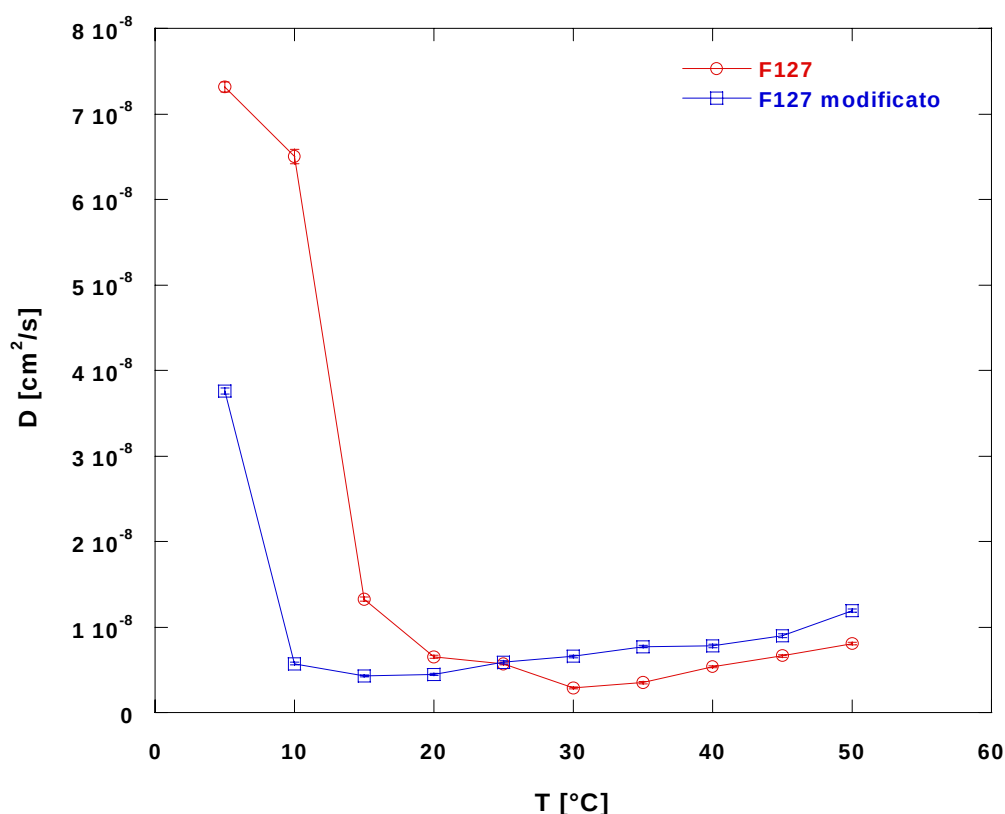


Figure 5.16 – Dipendenza dalla temperatura del coefficiente di diffusione di sfere di 26 nm in una soluzione 20% w/v di F127 modificato e non modificato.

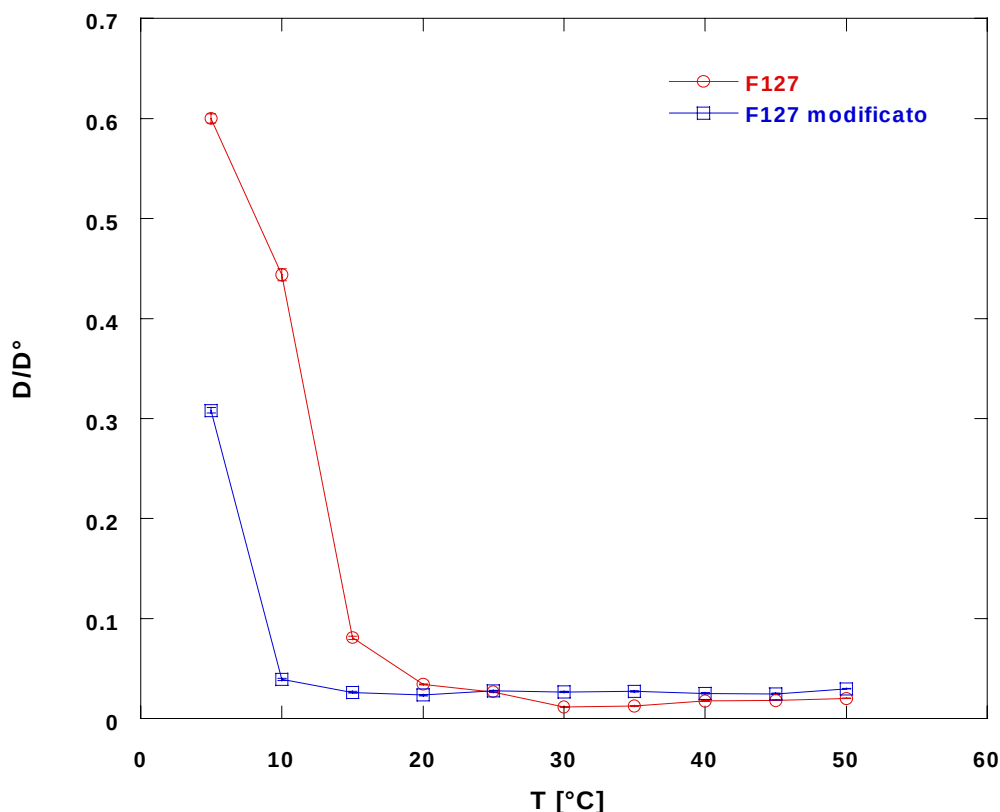


Figure 5.17 –Coefficienti di diffusione normalizzati di sfere di 26 nm in una soluzione 20% w/v di F127 modificato e non modificato.

Come già mostrato in letteratura (Wanka et al. 1994), aumentando la temperatura il sistema PEO-PPO-PEO e acqua, al fine di minimizzare l'energia superficiale, forma unimeri (la singola macromolecola si riorganizza nello spazio in modo da circondare il blocco idrofobo di PPO con quelli idrofili di PEO). Quando la temperatura raggiunge la CMT gli unimeri, a loro volta, per minimizzare la superficie idrofoba esposta all'acqua, tendono ad aggregarsi formando micelle. A questo punto, l'energia del sistema viene ulteriormente abbassata quando le micelle si assemblano a formare strutture cristalline ordinate. Le differenze tra la CMT estrapolata con metodi macroscopici e microscopici è, quindi, probabilmente dovuta al differente modo di sentire il sistema. La formazione degli unimeri avviene nel range di temperature 5-15 °C: i risultati reologici mostrano in tale zona un comportamento dei materiali di tipo Newtoniano, con valori di viscosità relativamente bassi. I coefficienti di diffusione, misurati tramite la diffusione di sonde nanometriche, sono in grado di individuare la presenza degli unimeri e la diffusione misurata ne è direttamente influenzata. Le misurazioni di viscosità non danno informazioni sulla formazione e sulla presenza degli unimeri in quanto essi sono in grado di fluire con attrito non misurabile dalla sensibilità dello strumento.

5.4.3 Modelli diffusivi e considerazioni morfologiche

I modelli basati sulla teoria dell'ostruzione si fondano sull'ipotesi che la presenza di catene polimeriche impenetrabili causino un aumento della lunghezza del percorso del diffondente. Le catene polimeriche agiscono come setacci, permettendo il passaggio di un soluto solo se riesce a passare tra di esse. Considerato il fascino concettuale di tale teoria, un numero cospicuo di modelli teorici sono stati sviluppati a partire da essa. In questo lavoro si prenderanno in considerazione il

modello sviluppato da Ogston e collaboratori (Ogston et al., 1973) e quello che su di esso si fonda, espandendone l'approccio, sviluppato da Johansson e collaboratori (Johansson et al., 1991).

Il modello di Ogston si fonda sull'ipotesi che la diffusione di un soluto in un idrogel avvenga attraverso una successione di passi in direzione casuale e che il singolo passo non avvenga se il soluto incontra lungo il suo percorso una catena polimerica. Il polimero viene considerato come un network casuale costituito da fibre lunghe e dritte di spessore trascurabile, mentre il soluto come una sfera rigida. Il passo unitario è considerato essere pari alla radice quadrata del diametro medio dello spazio sferico residuo tra le fibre del network. Partendo da tale ipotesi è possibile esprimere il rapporto tra il coefficiente di diffusione nel gel e quello in acqua ad infinita diluizione come:

$$\frac{D}{D_0} = \exp\left[-\frac{r_s + r_c}{r_c} \sqrt{\phi}\right] \quad (7)$$

con r_s raggio del soluto, r_c raggio della fibra polimerica e con ϕ frazione volumetrica del network. Partendo dal modello di Ogston, Johansson e collaboratori hanno sviluppato un nuovo modello partendo dalle ipotesi che

- il gel può essere visto come costituito da un numero infinito di filetti polimerici centrati all'interno di un cilindro di solvente con specifico diametro;
- l'ingombro sterico è la causa della diminuzione della diffusione del soluto, e le interazioni idrodinamiche sono trascurabili sia nel polimero che nel gel;
- l'ingombro sterico è dovuto dal network statico e non dalle interazioni tra le specie diffondenti.

L'ostruzione causata dalle catene polimeriche viene considerata dipendente non solo dalla grandezza del diffondente e dalla quantità di polimero, ma anche dalle proprietà delle catene polimeriche, quali il loro spessore e la loro rigidità. Alla fine di quantificare l'ostruzione delle catene polimeriche, gli autori hanno calcolato, tramite l'ausilio di modelli computazionali, la minima distanza (R) tra i punti delle fibre e del network. In accordo con tali modelli, il coefficiente di diffusione è dato da

$$\frac{D}{D_0} = e^{-\alpha} + \alpha^2 e^{\alpha} E_1(2\alpha) \quad (7)$$

dove

$$\alpha = \phi \left(\frac{r_s + r_c}{r_c} \right) \quad (8)$$

ed E_1 è l'integrale esponenziale

$$E_1(x) = \int_x^{\infty} \frac{e^{-u}}{u} du \quad (9)$$

La simulazione del moto Browniano di un soluto tra un network di catene polimeriche viene predetta bene dalla seguente equazione:

$$\frac{D}{D_0} = e^{-0.84 \cdot \alpha^{1.09}} \quad (10)$$

Una volta definito, il modello di ostruzione di Johansson è applicato ai coefficienti di diffusione ricavati per le soluzioni a base di Plutonico F127 e F127 modificato al fine di ottenere informazioni di tipo morfologico. Come è stato più volte detto, tali soluzioni presentano una transizione sol-gel caratterizzata dalla formazione di micelle e dalla loro organizzazione in strutture ordinate. Esistono discrepanze tra i risultati presentati in letteratura. Mortensen (Mortensen K. 1996) arriva alla conclusione che i cristalli colloidali formano un reticolo cubico a corpo centrato. Prud'homme et al. (Prud'homme et al. 1996) asseriscono che la fase micellari presenti una simmetria cubica semplice. Wu et al. (Wu et al. 1997) riportano che la struttura del gel sia cubica a facce centrate. Partendo da questi tre risultati e schematizzando le micelle come sfere rigide il cui raggio sia pari esclusivamente a quello del nucleo di PPO, si è considerata la frazione volumetrica del polimero in soluzione pari al fattore d'impacchettamento relativo ai tre tipi di reticolo. In definitiva si ha:

Tabella 5.2 – Frazione volumetrica di polimero in relazione alle strutture liotropiche ipotizzate

Cubica semplice (SC)	Cubica a corpo centrato (BCC)	Cubica a facce centrate (FCC)
$\phi = 0.32$	$\phi = 0.68$	$\phi = 0.74$

Il valore numerico del fattore α è stato ricavato applicando l'equazione (10) ai risultati di diffusione normalizzata riportati nel paragrafo precedente per sfere rigide di polistirene diffondenti nelle soluzione acquose di F127. A questo punto conoscendo il raggio delle sfere diffondenti (26 nm) e applicando l'equazione (8) è stato possibile ottenere una stima del raggio micellare per i tre tipi di reticoli ipotizzati. I risultati per le soluzioni a base di F127 e F127 modificato sono riportati, rispettivamente, in Figura 5.18 e 5.19.

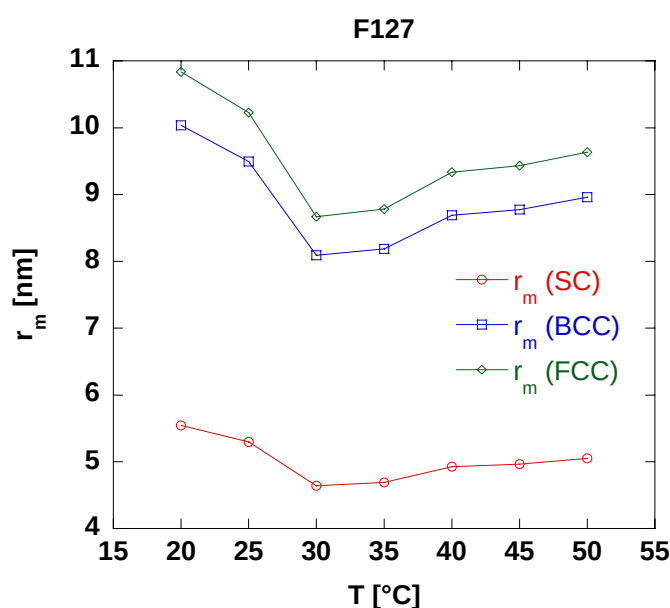


Figura 5.18 – Andamento della dimensione strutturale con la temperatura per una soluzione a base di F127.

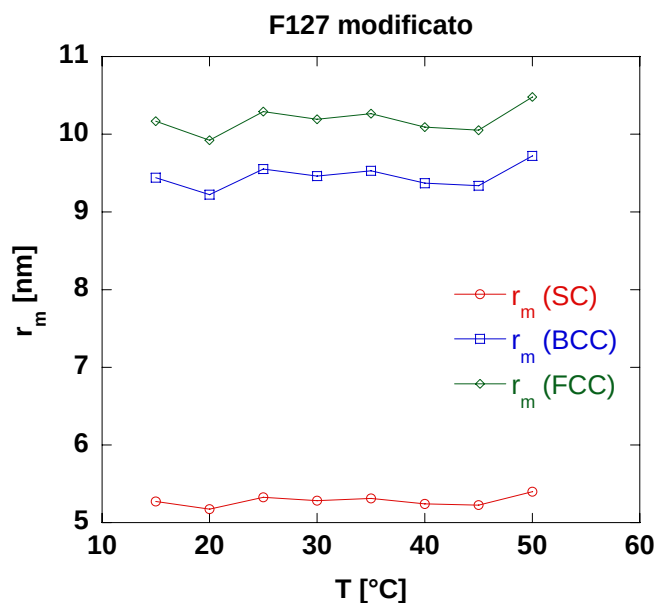


Figura 5.18 – Andamento della dimensione strutturale con la temperatura per una soluzione a base di F127 modificato.

I risultati forniti dall'applicazione della teoria dell'ostruzione sono stati utilizzati per il calcolo della costante reticolare lungo il piano diagonale [110]. Le relazioni che legano, a seconda della geometria considerata, tale costante alla dimensione del raggio micellare sono riportate in Figura 5.19. Dalla letteratura è noto che tale costante reticolare, misurata attraverso misure di rifrazione, è pari a 28 nm (Mortensen et al., 1995). Pertanto confrontando questo valore con quello ottenuto indirettamente dalle misure di diffusione è stato possibile ricavare informazioni sulla morfologia delle soluzioni considerate. In tabella 5.3 sono riepilogati i valori calcolati.

Tabella 5.3 – Parametri strutturali ricavati dall'applicazione della teoria dell'ostruzione

		$\langle r_m \rangle$ [nm]	a (110) [nm]	$a_{\text{misurato}} (110)^*$ [nm]
F127	SC	5.02	$a = 2 \cdot r = 10.04$	28
	BCC	8.90	$a = \frac{4}{\sqrt{3}} \cdot r = 20.55$	
	FCC	9.56	$a = \frac{4}{\sqrt{2}} \cdot r = 27.04$	
F127 modificato	SC	5.33	$a = 2 \cdot r = 10.66$	n. d.
	BCC	9.56	$a = \frac{4}{\sqrt{3}} \cdot r = 22.08$	
	FCC	10.30	$a = \frac{4}{\sqrt{2}} \cdot r = 29.13$	

*Mortensen et al., Macromolecules, 28, 8829, (1995).

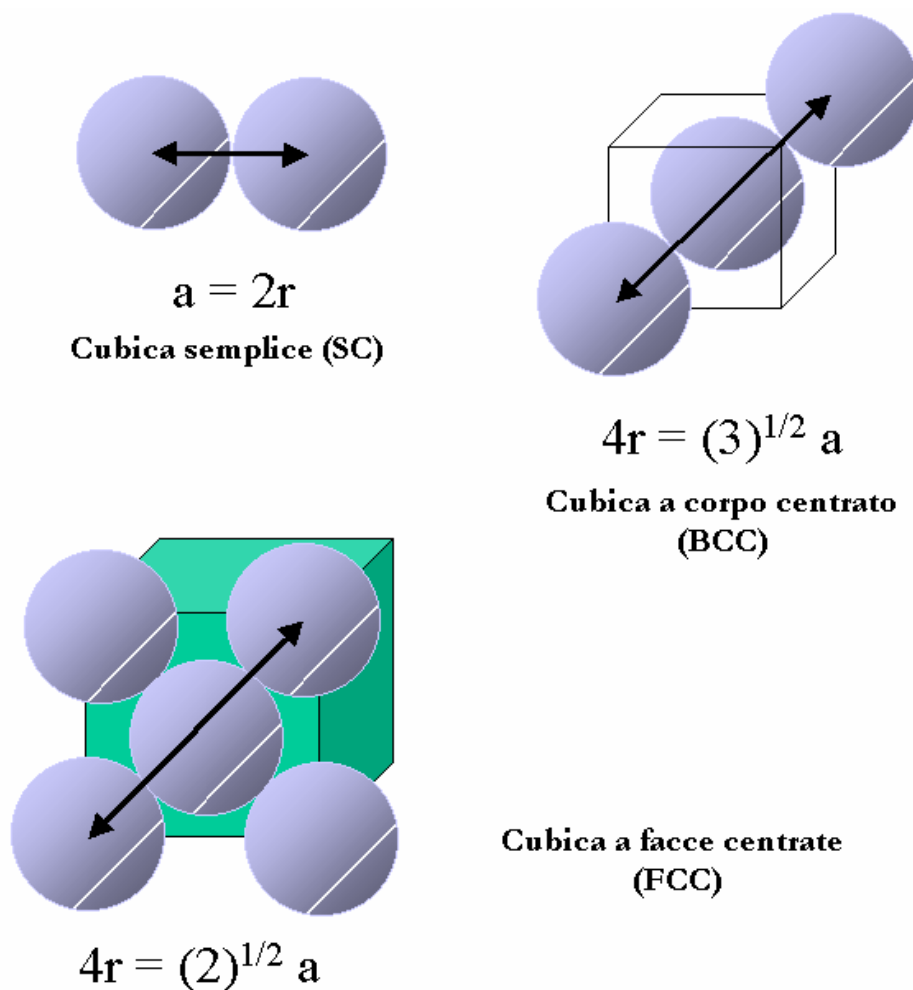


Figura 5.19 – Reticoli strutturali e relative equazioni di correlazione tra raggio micellare e lunghezza caratteristica del piano diagonale (110).

Dai dati in Tabella 5.3 si evince che la struttura più probabile per le soluzioni acquose a base di F127 risulta essere quella cubica a facce centrate, con una dimensione della micella pari a 9.56 nm. Non è stato possibile effettuare analoghe considerazioni per le soluzioni a base di F127 modificato. Dai dati ricavati si evidenzia solo che il raggio micellare per questo tipo di soluzioni risulta essere leggermente superiori rispetto a quello ricavato per le soluzioni a base di F127. Le estensioni di catena, quindi, sembrano influenzare anche la morfologia finale delle micelle.

1.1 Efficienza di intrappolamento

Un modo per definire quantitativamente l'efficienza di intrappolamento di un fascio laser focalizzato avente potenza P è tramite il parametro adimensionale Q definito come il rapporto la forza gradiente esercitata sulla sfera e la quantità di moto che nell'unità di tempo la luce laser trasporta sulla medesima sfera:

$$\vec{Q} = \frac{c\vec{F}_{gra}}{n_2 P} \quad (1.1)$$

dove c è la velocità della luce.

Spesso in letteratura il parametro Q viene usato anche per descrivere la forza di scattering e quella totale data dalla somma vettoriale di questa ultima con quella gradiente, ovvero

$$\vec{Q}_{sca} = \frac{\vec{F}_{sca} c}{mP} \quad (1.2)$$

$$Q_{TOT} = \sqrt{Q_{sca}^2 + Q^2} \quad (1.3)$$

1.2 Regime di Rayleigh ($a \ll \lambda$)

Una particella di dimensioni molto minori di λ , investita da un'onda elettromagnetica, può essere trattata come un dipolo indotto localizzato nel suo centro. La forza della radiazione esercitata su di essa può essere scomposta in due componenti: quella di scattering dovuta alla variazione del momento dell'onda elettromagnetica per effetto dello scattering del dipolo, e quella di gradiente dovuta invece alla forza di Lorentz che agisce sul dipolo indotto. Dato che le dimensioni della particella sferica sono molto piccole, il campo elettrico istantaneo associato all'onda elettromagnetica può essere considerato uniforme. Esso induce un dipolo pari a $\vec{P}(\vec{r}, t) = \alpha \vec{E}$ dove α è la polarizzabilità della sfera ed è, sotto l'ipotesi di non assorbimento della sfera, uno scalare. E' possibile dimostrare che il momento di una sfera omogenea e isotropa in un campo uniforme nell'unità MKS è dato da:

$$\vec{P}(\vec{r}, t) = 4\pi m_2^2 \varepsilon_0 a^3 \frac{m^2 + 1}{m^2 + 2} \vec{E}(\vec{r}, t) \quad (1.4)$$

dove $m = n_1 / n_2$ è l'indice di rifrazione relativo.

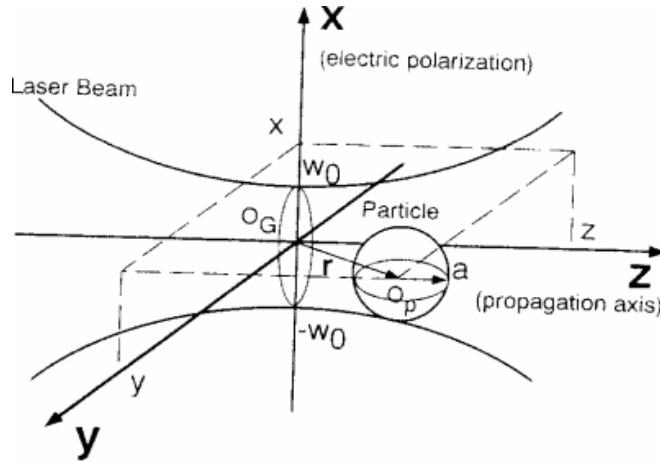


Fig. 1. Schematic of geometry.

Figura 1.1 - Geometria della sfera e del fascio nel regime di Rayleigh

Dalla teoria dello scattering si ottiene che la forza di scattering di un'onda nella direzione $\hat{z}$ è

$$\vec{F}_{sca}(\vec{r}, t) = \hat{z} \frac{n_2}{c} C_{pr} I(\vec{r}) \quad (1.5)$$

dove C_{pr} è la sezione d'urto dovuta alla pressione di radiazione, $I(\vec{r})$ è l'intensità del fascio (Figura 1.1). Nel caso di particelle dielettriche nel regime di Rayleigh dove la particella diffonde isotropicamente, C_{pr} è uguale alla sezione d'urto di scattering C_{sca} che è data da

$$C_{pr} = C_{sca} = \frac{8}{3} \pi \left(\frac{2\pi}{\lambda} \right)^4 a^6 \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right)^2 I(\vec{r}) \quad (1.6)$$

Pertanto combinando la (5) con la (6) si ottiene che

$$\vec{F}_{sca}(\vec{r}) = \hat{z} \frac{n_2}{c} \frac{8}{3} \pi \left(\frac{2\pi}{\lambda} \right)^4 a^6 \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right)^2 I(\vec{r}) \quad (1.7)$$

Per un fascio gaussiano nel modo fondamentale l'intensità nella posizione $\vec{r} = (x, y, z)$ è :

$$I(\vec{r}) = \frac{2P}{\pi \omega_0} \frac{1}{1 + (2\tilde{z})^2} e^{-\left[\frac{2(\tilde{x}^2 + \tilde{y}^2)}{1 + (2\tilde{z})^2} \right]} \quad (1.8)$$

dove $P = \frac{\pi}{4} \omega_0^2 \epsilon_0 n_2 c E_0^2$ è la potenza del fascio, ω_0 è il raggio del fascio nella posizione del waist,

e $\tilde{x}, \tilde{y}, \tilde{z}$ rappresentano le coordinate spaziali normalizzate così definite : $(\tilde{x}, \tilde{y}, \tilde{z}) = \left(\frac{x}{\omega_0}, \frac{y}{\omega_0}, \frac{\lambda z}{2\pi \omega_0^2} \right)$.

In definitiva si ha che la forza di scattering è pari a:

$$\vec{F}_{sca}(\vec{r}) = \hat{z} \frac{n_2}{c} \frac{8}{3} \pi \left(\frac{2\pi}{\lambda} \right)^4 a^6 \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right)^2 \frac{2P}{\pi \omega_0^2 (1 + (2\tilde{z})^2)} e^{-\left[\frac{2(\tilde{x}^2 + \tilde{y}^2)}{1 + (2\tilde{z})^2} \right]} \quad (1.9)$$

Da questa ultima espressione si evince che la forza di scattering è proporzionale alla potenza del fascio e alla sesta potenza del raggio della sferetta. Inoltre essa è sempre diretta lungo la direzione $+z$, indipendentemente dal rapporto $m = \frac{n_1}{n_2}$.

La forza di gradiente istantanea invece può essere ricavata utilizzando il momento di dipolo elettrico come l'analogo elettrostatico del campo elettromagnetico e quindi si ha che :

$$\vec{F}_{gra}(\vec{r}, t) = [\vec{p}(\vec{r}, t) \cdot \vec{\nabla}] \vec{E}(\vec{r}, t) = 4\pi m_2^2 a^3 \frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \frac{1}{2} \vec{\nabla} E^2(\vec{r}, t) \quad (1.10)$$

Dove si è utilizzata l'identità vettoriale $\vec{\nabla} E^2 = 2(\vec{E} \cdot \vec{\nabla}) \vec{E} + 2\vec{E} \times (\vec{\nabla} \times \vec{E})$ con $\vec{\nabla} \times \vec{E} = 0$ come risulta dalle equazioni di Maxwell dell'elettrostatica.

Facendo poi la media temporale della (10) e usando le seguenti relazioni

$$\langle E^2(\vec{r}, t) \rangle = \frac{1}{2} |\vec{E}(\vec{r})|^2; \quad \bar{I}(\vec{r}) = \frac{1}{2} n_2 \varepsilon_0 c |\vec{E}(\vec{r})|^2$$

si ha che

$$\vec{F}_{gra}(\vec{r}) = \langle \vec{F}_{gra}(\vec{r}, t) \rangle = \frac{2\pi m_2 a^3}{c} \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right) \vec{\nabla} I(\vec{r}) \quad (1.11)$$

Adesso se calcoliamo il gradiente dell'intensità otteniamo :

$$F_{gra,i} = -\hat{i} \frac{2\pi m_2 a^3}{c} \frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \frac{4\hat{i} / \omega_0}{1 + (2\tilde{z})^2} \frac{2P}{\pi \omega_0^2} e^{\frac{2(\tilde{x}^2 + \tilde{y}^2)}{1 + (2\tilde{z})^2}} \quad i = x, y \quad (1.12)$$

$$F_{gra,z} = -\hat{z} \frac{2\pi m_2 a^3}{c} \left[1 - \frac{2(\tilde{x}^2 + \tilde{y}^2)}{1 + (2\tilde{z})^2} \right] \frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \frac{8\lambda \hat{z}}{2\pi \omega_0^2} \frac{2P}{\pi \omega_0^2} e^{\frac{2(\tilde{x}^2 + \tilde{y}^2)}{1 + (2\tilde{z})^2}} \quad (1.13)$$

Quindi, a differenza della forza di scattering, la forza gradiente è costituita da tre componenti che agiscono come forze di richiamo verso il centro del beam waist nel caso in cui $m > 1$. Nel caso in cui $m < 1$ invece queste tendono ad allontanare la particella dal fuoco. Inoltre $\vec{F}_{gra}$ dipende dalla terza potenza del raggio e le sue componenti hanno dei massimi nei punti $(\pm \omega_0 / 2, 0, 0)$ per quella di x , $(0, \pm \omega_0 / 2, 0)$ per quella di y e $(0, 0, \frac{\pi \omega_0^2}{\lambda \sqrt{3}})$ per quella di z .

Per avere una trappola stabile assialmente quindi deve risultare che la componente lungo z nel suo punto di massimo sia maggiore della forza di scattering calcolata sempre in questo punto ovvero :

$$\frac{\left| F_{gra,z} \left(0, 0, \frac{\pi \omega_0^2}{\lambda \sqrt{3}} \right) \right|}{F_{sca} \left(0, 0, \frac{\pi \omega_0^2}{\lambda \sqrt{3}} \right)} \geq 1 \quad (1.14)$$

Si può verificare che il regime di Rayleigh si applica per particelle il cui diametro soddisfi la relazione $a < \frac{\lambda}{20}$

1.3 Regime di ottica geometrica o di Mie ($a \gg \lambda$)

In questo regime, una pinzetta ottica può essere descritta in termini di ottica geometrica. Infatti, essendo la particella molto grande rispetto alla lunghezza d'onda della radiazione laser possiamo considerare il fascio laser incidente sulla sferetta, trascurando gli effetti della diffrazione, come un insieme di raggi luminosi, ognuno con una certa potenza, direzione e stato di polarizzazione, che obbediscono alle usuali formule di Fresnel ogni volta che incontrano l'interfaccia mezzo-sfera. Nell'ambito dell'ottica geometrica è possibile dare una descrizione qualitativa del funzionamento di una pinzetta ottica per evidenziare l'esistenza di una forza attrattiva verso il fuoco del fascio laser. Consideriamo un singolo raggio luminoso di momento q_{in} che incide su una sferetta dielettrica supposta non assorbente anche non riflettente.

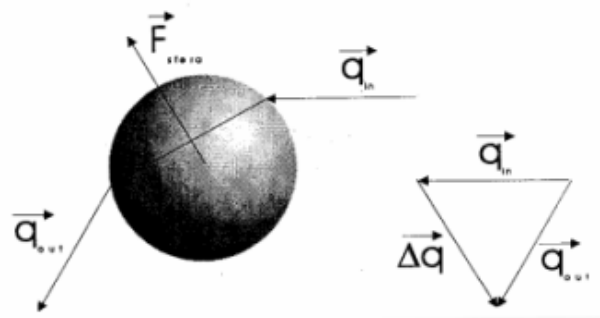


Figura 1.2 - Calcolo della forza, dovuta ad un singolo raggio, agente su una sfera non riflettente nel regime di ottica geometrica

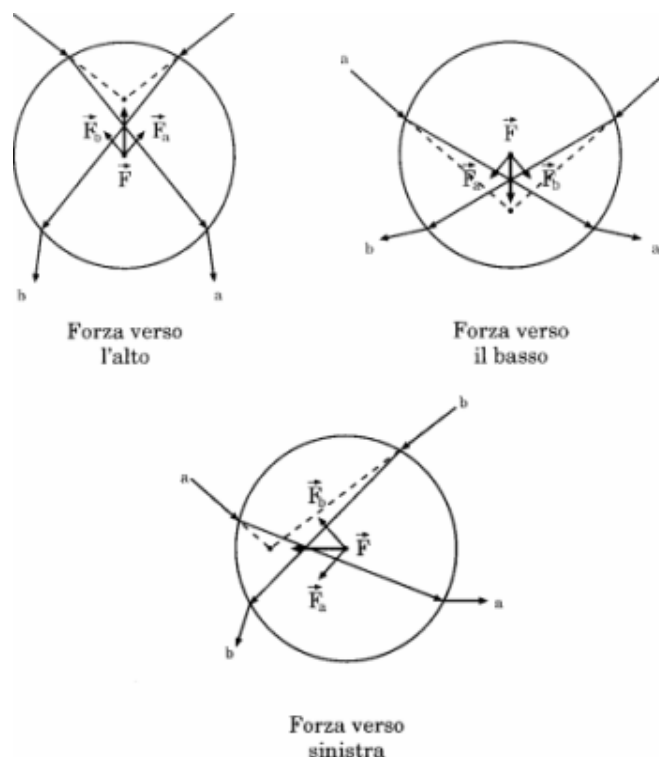


Figura 1.3 - Descrizione qualitativa dell'intrappolamento di sfere dielettriche.

Il raggio per effetto della rifrazione cambia la sua direzione variando quindi la sua quantità di moto (Figura 1.2). Per la legge di conservazione della quantità di moto, questo si traduce in una variazione uguale ed opposta della quantità di moto della sfera che risente di una forza che la spinge in una determinata direzione : $\vec{F}_{sfera} = -\frac{\Delta \vec{q}}{dt}$. Consideriamo ora l'effetto di una coppia di raggi a e b, così come riportati in figura 1.3. Come si può facilmente vedere la forza vettoriale data dalla somma vettoriale delle forze dovute ai due raggi incidenti è sempre diretta verso il centro della sfera.

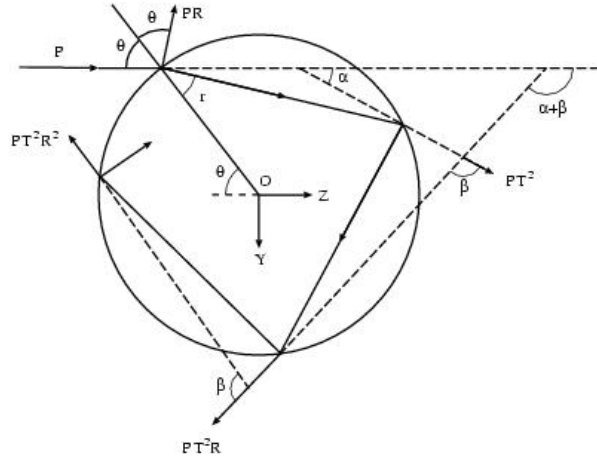


Figura 1.4 - Geometria per calcolare la forza agente sulla sfera dielettrica dovuta ad un singolo raggio incidente di potenza P.

Per determinare in modo quantitativo le forze che agiscono sulla sferetta da intrappolare si seguirà il percorso di singolo raggio di potenza P che incide sulla sferetta con un angolo θ (Figura 1.4). Come si vede dalla figura il raggio di potenza P che incide sulla sfera in parte viene riflesso e in parte viene trasmesso. Quest'ultima parte viaggia all'interno della sfera e ogni volta che incontra la superficie sferica, viene in parte riflessa e in parte trasmessa. Quindi la forza che agisce sulla sfera è data dalla somma dei contributi dovuti al raggio riflesso di potenza PR e agli infiniti raggi rifratti emergenti di potenza sempre più decrescente $PT^2, PT^2R, \dots, PT^2R^n$, dove T ed R sono i coefficienti di Fresnel di trasmissione e di riflessione. Come si può vedere in figura questi raggi formano, relativamente alla direzione del raggio incidente, degli angoli pari a : $\pi + 2\theta, \alpha, \alpha + \beta, \dots, \alpha + n\beta$ rispettivamente. Dunque la forza totale nella direzione z sarà data dalla variazione di momento per unità di tempo in detta direzione per effetto di tutti i raggi riflessi e trasmessi :

$$F_z = \frac{n_1 P}{c} - \left[\frac{n_1 PR}{c} \cos(\pi + 2\theta) + \sum_{n=0}^{\infty} \frac{n_1 P}{c} T^2 R^n \cos(\alpha + n\beta) \right] \quad (1.15)$$

dove $n_1 P / c$ è il momento incidente per unità di tempo nella direzione z.

Analogamente nella direzione y, dove il momento incidente per unità di tempo è nullo, si ha :

$$F_y = 0 - \left[\frac{n_1 PR}{c} \sin(\pi + 2\theta) + \sum_{n=0}^{\infty} \frac{n_1 P}{c} T^2 R^n \sin(\alpha + n\beta) \right] \quad (1.16)$$

Come descritto nel rif. 2 è possibile descrivere queste due forze nel piano complesso, ovvero si ha che $F_{tot} = F_z + iF_y$ e quindi

$$F_{tot} = \frac{n_1 P}{c} [1 + R \cos(2\theta)] + i \frac{n_1 P}{c} R \sin(2\theta) - \frac{n_1 P}{c} T^2 \sum_{n=0}^{\infty} R^n e^{i(\alpha + n\beta)} \quad (1.17)$$

La somma sull'indice n è una serie geometrica, pertanto

$$F_{tot} = \frac{n_1 P}{c} [1 + R \cos(2\theta)] + i \frac{n_1 P}{c} R \sin(2\theta) - \frac{n_1 P}{c} T^2 e^{i\alpha} \frac{1}{1 - \text{Re}^{i\beta}} \quad (1.18)$$

Razionalizzando il denominatore, considerando la parte reale e immaginaria della (1.18) e utilizzando le relazioni geometriche $\alpha = 2\theta - 2r$ e $\beta = \pi - 2r$ (r è l'angolo di rifrazione del raggio incidente) si ha :

$$F_z = F_{sca} = \frac{n_1 P}{c} \left\{ 1 + R \cos(2\theta) - \frac{T^2 [\cos(2\theta - r) + R \cos(2\theta)]}{1 + R^2 + 2R \cos(2r)} \right\} \quad (1.19)$$

$$F_y = F_{gra} = \frac{n_1 P}{c} \left\{ R \cos(2\theta) - \frac{T^2 [\sin(2\theta - r) + R \sin(2\theta)]}{1 + R^2 + 2R \cos(2r)} \right\} \quad (1.20)$$

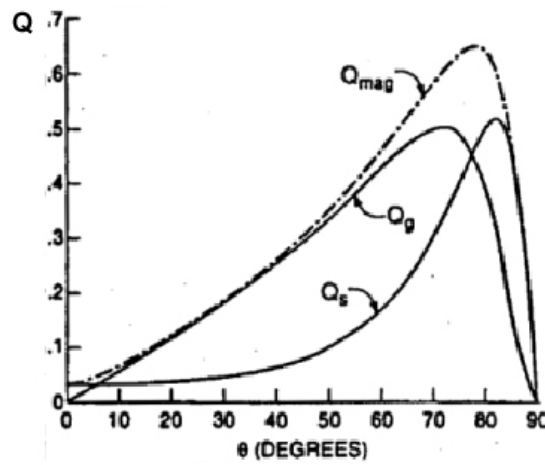


Figura 1.5 - Andamento della forza di scattering, di gradiente e di quella totale per un singolo raggio che investe la sfera dielettrica di indice di rifrazione $n = 1.2$ in funzione dell'angolo di incidenza.

Tabella 1.1

m	Q_{gmax}	Q_s	θ_{gmax}
1.1	-0.429	0.262	79°
1.2	-0.506	0.341	72°
1.4	-0.566	0.448	64°
1.6	-0.570	0.535	60°
1.8	-0.547	0.625	59°
2.0	-0.510	0.698	59°
2.5	-0.405	0.837	64°

La prima cosa da notare nelle equazioni è che esse sono indipendenti dal raggio della sferetta e sono proporzionali alla potenza del raggio luminoso incidente. In figura 1.5 è mostrato l'andamento della forza di scattering, di gradiente e di quella totale, rappresentate rispettivamente dai parametri Q_s, Q_g, Q_{mag} precedentemente definiti, al variare dell'angolo di incidenza θ di un singolo raggio polarizzato circolarmente su una sfera di polistirene immersa in acqua il cui indice di rifrazione

relativo è $m = \frac{n_1}{n_2} = 1.24$. Invece nella tabella 1.1 viene mostrato l'effetto, sempre per un singolo raggio, dell'indice di rifrazione relativo sul valore massimo della forza totale e di quella di scattering in corrispondenza dell'angolo $\theta_{g,max}$. La cosa importante da evidenziare dalla figura 1.5 e dalla tabella 1.1 è che per ottenere l'intrappolamento ottico è necessario che i raggi della luce laser incidano con grandi angoli di incidenza e che l'indice di rifrazione relativo non sia troppo elevato. Infatti come si può notare dalla Figura 1.5 la massima forza gradiente, utile all'intrappolamento, è quella prodotta con raggi la cui incidenza sia di $\approx 70^\circ$. Mentre dalla tabella 1.1 si vede che all'aumentare dell'indice di rifrazione relativo la forza di scattering comincia a essere, in modulo, maggiore della massima forza gradiente.

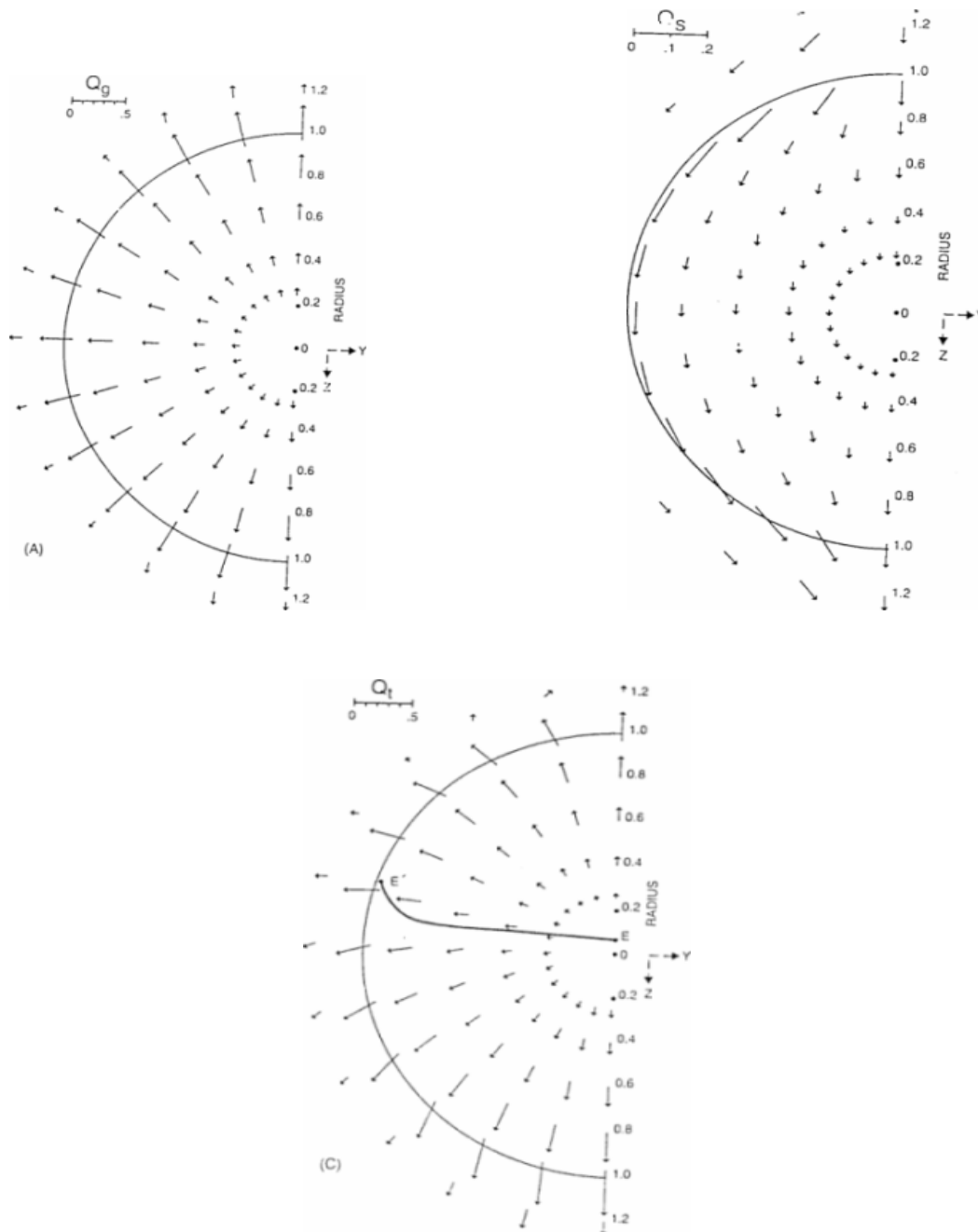


Figura 1.6 - Modulo e direzione dei vettori efficienza calcolati per un fascio polarizzato circolarmente.

Le caratteristiche sopra esposte per un singolo raggio si estendono anche per un fascio laser con un assegnato profilo spaziale. In questo caso non è possibile avere una soluzione analitica ma occorre ricorrere ad un approccio numerico per tener conto del contributo di tutti i singoli raggi che formano il fascio. In figura 1.6, è riportato il risultato ottenuto da Ashkin, in termini dei parametri Q (definiti come vettori), per un fascio laser polarizzato circolarmente focalizzato in un punto qualunque nel piano z - y nelle immediate vicinanze della sfera.

Nella figura A si nota che la forza gradiente risulta esattamente radiale lungo gli assi z e y , mentre nella figura B la forza di scattering risulta essere più piccola e assiale solo lungo gli assi z e y e rimane prevalentemente assiale ovunque eccetto nelle regioni lontane dagli assi. Infine nella figura C si evidenzia l'andamento prevalentemente radiale della forza totale, essendo dominante la forza gradiente su quella di scattering.

1.4 Regime di Lorentz-Mie

Quando le dimensioni della sferetta sono confrontabili con la lunghezza d'onda ($\lambda/20 < a < 3\lambda$) non è possibile usare alcuna approssimazione e pertanto per calcolare le forze agenti sulla sferetta bisogna utilizzare la teoria elettromagnetica completa. Per i calcoli dettagliati di questa teoria si rimanda agli lavori di Wright e collaboratori (Wright et al., 1993, 1994). Qui ci si limita a riportare solamente i risultati numerici ottenuti (Figure 1.7, 1.8, 1.9). Nelle figure viene mostrato come varia la forza esercitata dalla trappola (in termini di Q) al variare rispettivamente del raggio, dell'indice di rifrazione della sferetta e delle dimensioni del waist del fascio. Come si può notare Q aumenta al diminuire delle dimensioni del waist del fascio e all'aumentare dell'indice di rifrazione e delle dimensioni della sferetta.

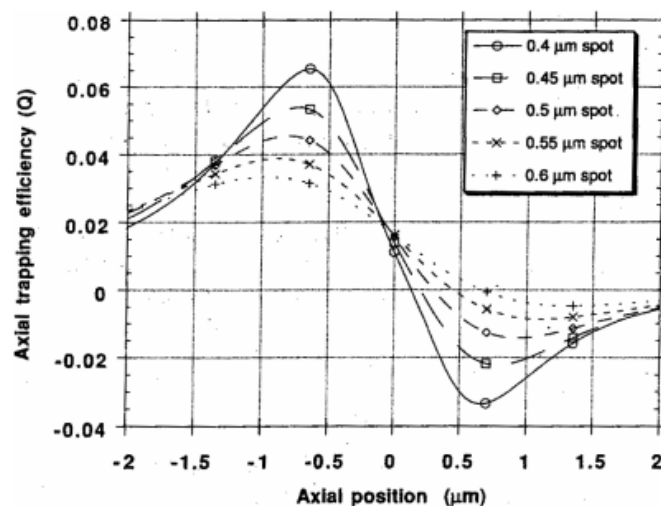


Figura 1.7 - Efficienza di intrappolamento assiale Q calcolata come funzione della posizione lungo l'asse con origine il fuoco dell'obiettivo per differenti dimensioni dello spot nel caso di una sferetta di silicio amorfo sospesa in acqua e intrappolata ad una lunghezza d'onda di 1064nm.

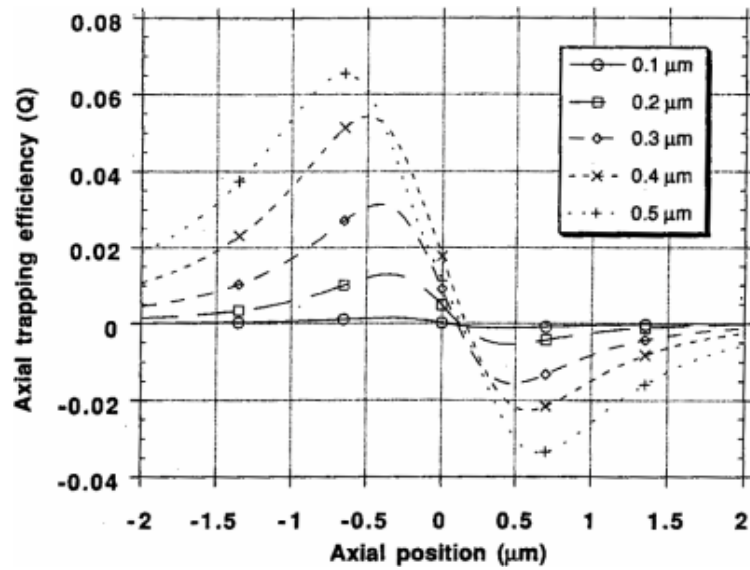


Figura 1.8 - Efficienza di intrappolamento assiale Q calcolata come funzione della posizione lungo l'asse con origine il fuoco dell'obiettivo per differenti raggi della sferetta sospesa in acqua e intrappolata ad una lunghezza d'onda di 1064nm con uno spot di 400nm.

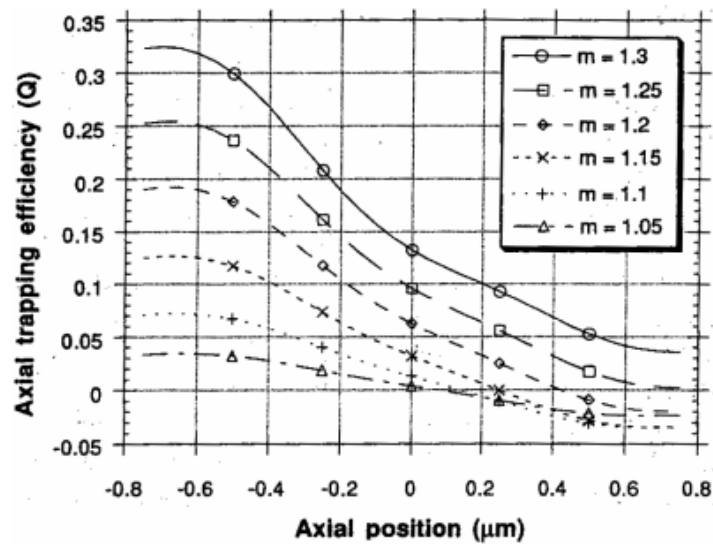


Figura 1.9 - Efficienza d'intrappolamento assiale Q calcolata come funzione della posizione lungo l'asse con origine il fuoco dell'obiettivo per differenti valori dell'indice di rifrazione relativo nel caso di una sferetta sospesa in acqua e intrappolata ad una lunghezza d'onda di 1064nm.

Bibliografia

A-Hassan E, Heinz WF, Antonik MD, D'Costa NP, Nageswaran S : Relative microelastic mapping of living cells by atomic force microscopy, *Biophysical Journal* 74, 1564-1578 (1998).

Al-Saden A A, Whateley T L, Florence AT, J. *Colloid Interface Sci.*, 90, 303 (1982).

Alexandridis, P. And Hatton, A. T., Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) block copolymer surfactants in aqueous solutions and at interfaces: thermodynamics, structure, dynamics, and modelling, *Colloids and Surface A*, 96, 1-46, (1995).

Alexandridis, P., Holzwarth, J. F. and Hatton, A. T., Micellization of Poly(ethylene oxide)-Poly(propylene oxide)-Poly(ethylene oxide) Triblock Copolymers in Aqueous Solutions: Thermodynamics of Copolymer Association, *Macromolecules*, 27, 2414-2425, (1994).

Allersma M, Gittes F, De Castro M J, Stewart R J and Schmidt CF: *Biophys. J.*, 74, 1074-1085 (1998).

Amblard F, Maggs AC, Yurke B, Pargellis AN, Leibler S : Subdiffusion and anomalous local viscoelasticity in actin networks, *Physical Review Letters* 77, 4470-4473 (1996).

Amblard F, Yurke B, Pargellis A, Leibler S (1996) A magnetic manipulator for studying local rheology and micromechanical properties of biological systems, *Review of Scientific Instruments* 67, 818-827 (1996).

Angelova N, Hunkeler D, Rationalizing the design of polymeric biomaterials, *Tibtech* 17, 409-421 (1999).

Annable, T., Buscall, R., Ettelaie, R. and Whittlestone, D, The rheology of solutions of associating polymers: Comparison of experimental behavior with transient network theory, *J. of Rheology*, 37, 695, (1993).

Ashkin A : Forces of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime, *Methods in Cell Biology* 55, 1-27 (1998).

Ashkin A : Optical trapping and manipulation of neutral particles using lasers, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 4853-4860 (1997).

Ashkin A and Dziedzic J M : Internal cell manipulation using infrared laser traps, *Proc Natl Acad USA* 86, 7914-7918 (1989).

Ashkin A, Dziedzic JM, Bjorkholm JE, Chu S: *Opt. Lett.* 11, 288-290 (1986).

Ashkin A: *Biophys. Journ.* 61, 569-582 (1992).

Attwood, D. And Florence, A. T., *Surfactants systems: their chemistry, pharmacy and biology*, Chapman and Hall, London, (1983).

- Axelrod D, Koppel D E, Schlessinger J, Elson E, Web W W: Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics, *Biophys. J.* 16, pp.1055-1069 (1976).
- Bausch AR, Hellerer U, Essler M, Aepfelbacher M, Sackmann E : Rapid stiffening of integrin receptor-actin linkages in endothelial cells stimulated with thrombin: A magnetic bead microrheometry study, *Biophysical Journal* 80, 2649-2657 (2001).
- Bausch AR, Möller W, Sackmann E : Measurement of local viscoelasticity and forces in living cells by magnetic tweezers, *Biophysical Journal* 76, 573-579 (1999).
- Bausch AR, Ziemann F, Boulbitch AA, Jacobson K, Sackmann E : Local measurements of viscoelastic parameters of adherent cell surfaces by magnetic bead microrheometry, *Biophysical Journal* 75, 2038-2049 (1998).
- Bennink R M, Leuba S H, Leno G H, Zlatanova J, De Grooth B G, Greve J: Unfolding individual nucleosomes by stretching single chromatin fibers with optical tweezers, *Nat Struct Biol* 8, 606-610 (2001).
- Benson D M et al., Digital Imaging Fluorescence Microscopy: Spatial Heterogeneity of Photobleaching Rate Constants in Individual Cells, *J Cell Biol* 100, 1309 (1985).
- Berk D A, Yuan F, Leunig M, Jain R K, Fluorescence photobleaching with spatial Fourier analysis: measurement of diffusion in light scattering media, *Biphys.J.* 65, 2428-2436 (1993).
- Berry R M and Berg H C: Absence of a barrier to backwards rotation of the bacterial flagellar motor demonstrated with optical tweezers, *Proc Natl Acad USA* 94, 14433-14437 (1997).
- Binder K, Sillescu H: Diffusion polymer-polymer, *Encyclopedia of Polymers Sciences and Engineering*, 2nd edition, H.F. Mark, N.M. Bikales, C.G.Overberger, G.Menges, Editors, John Wiley and Sons, New York, Supplement Volume, 297-315,1989.
- Binning G, Quate CF, Gerber C : Atomic Force Microscope. *Physical Review Letters* 56, 930-933 (1986).
- Block S M, Blair D F and Berg HC: *Nature* 338, 514-518 (1989).
- Block s M, Blair D F, Berg H C: Compliance of bacteria flagella measured with optical rweezers, *Nature* 338, 514-518 (1989).
- Block S M, Goldstein L S, Schnapp B J: Bead movement by singlr kinesin moleciles studied with optical tweezers, *Nature* 348. 348-352 (1990).
- Brochard F and de Gennes P G: *Macromolecules* (1977).
- Brochard-Wyart F: *Fundamentals of Adesion*, Edited by Lieng-Huang Lee, Plenum Press, New York, 181-206 (1991).
- Brown W, Schillen K, Hvidt S, *J. Phys. Chem.*, 96, 6038 (1992).
- Brown, W., Scillen, K., Almegren, M., Hivdt, S. and Bahadur, P., *J. Phys. Chem.*, 95, 1850, (1991).

- Capone C, La tecnica FRAP per la determinazione della diffusività di macromolecole in mezzi light scattering, Tesi di laurea, Napoli, (2000).
- Capitanio M, Romano G, Ballerini R, Giuntini M, Pavone F S, Dunlap D and Finzi L: *Rev.Scient.Instr.* 73, 1687-1696 (2002).
- Castelmann K R, *Digital image processing*, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ (1979).
- Chan V, Graves D J, Fortina P, McKenzie S E, Adsorption and surface diffusion of DNA oligonucleotides at liquid/solid interfaces, *Langumir* (1996).
- Chen P Y and Keh H J: *J.Chin.Inst.Chem.Engrs.* 34, 123-133 (2003).
- Chung, Y., Simmons, L., Gutowska, A. And Jeong, B., Sol-gel transition of PLGA-g-Peg aqueous solutions, *Biomacromolecules*, 3, 511-516, (2002).
- Cohn D, Sosnik A, Levy A, Improved reverse thermo-responsive polymeric systems, *Biomaterials* 24, 3707-3714 (2003).
- Coppin C M, Finer J T, Spudich J A, Vale R D: Detection of sub-8-nm movements of kinesin by high resolution optical-trap microscopy, *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 1913-1917 (1996).
- Coppola, L., Oliviero, C., Pogliani, Ranieri, G. A. and Terenzi, M., A self-diffusion study in aqueous solution and lyotropic mesophases of amphiphilic block copolymers, *Colloid, Polym. Sci.*, 278, 434-442, (2000).
- Crick F, Hughes A : The physical properties of the cytoplasm, *Experimental Cell Research* 1, 37-80 (1950).
- Dasgupta B R, Tee S Y, Crocker J C, Frisken B J and Weitz D A: *Phys. Rev.E* 65, 051505-1 (2002).
- Denk W and Webb W W: *Appl. Opt.* 29, 2382-2391 (1990).
- Drake B, Prater CB, Weisenhorn AL, Gould SAC, Albrecht TR, Quate CF, Channell DS, Hansma HG, Hansma PK : Imaging crystals, polymers, and biological processes in water with AFM, *Science* 243, 1586-1589 (1989).
- Dvorak JA, Nagao E : Kinetic analysis of the mitotic cycle of living vertebrate cells by atomic force microscopy, *Experimental Cell Research* 242, 69-74 (1998).
- Edidin M, Zagyansku Y, Lardener T, Measurement of membrane protein lateral diffusion in single cells, *Science* 191, 466-468 (1976).
- Fang L, Brown W, Konak C: Dynamic Light Scattering Study of sol-gel Transition, *Macromolecules* 24, 6839-6842 (1991).
- Faucheux L P, Bourdieu L S, Kaplan P D and Libchaber A J: *Phys. Rev. Lett.* 74, 1504-1507 (1995).
- Felgner H, Muller O, Schliwa M: *Appl. Opt.* 34, 977-982 (1995).

- Feneberg W, Westphal M, Sackmann E : Dictyostelium cells' cytoplasm as an active viscoplastic body, *European Biophysical Journal* 30, 284-294 (2001).
- Ferry J : *Viscoelastic properties of polymers*, Wiley, New York (1980).
- Finer J T, Mehta A D, Spudis J A: Characterization of single actin-myosin interactions, *Biophys J* 68, (4 Suppl.) 291S-296S, Discussion 296S-297S (1995).
- Finer J T, Simmons R M and Spudich J A: *Nature* 368, 113-118 (1994).
- Finer J T, Simmons R M, Spudich J A: Single myosin molecule mechanism: piconewton forces and nanometre steps, *Nature* 368, 113-119 (1994).
- Florin E L, Horber J H K and Stelzer E H K: *Appl. Phys. Lett.* 69, 446-448 (1996).
- Florin E L, Pralle A, Stelzer E H K and Horber J K H: *Appl. Phys. A* 66, 75-78 (1998).
- Forscher P, Lin C H, Thompson C : Novel form of growth cone mobility involving site-directed actin filament assembly, *Nature* 357, 515-518 (1992).
- Freundlich H, Seifriz W Ueber die elastizität von solen und gelen, *Zeitschrift für physikalische chemie* 104, 233 (1922).
- Friese M E, Enger J, Rubinsztein-Dunlop H and Heckenberg N R: *Phys. Rev. A* 54, 1593-1596 (1996).
- Ghislain L P and Webb W W: *Opt. Lett.* 18, 1678-1681 (1993).
- Gittes F and Schmidt C F, *Signals and Noise in Micromechanical Measurements*, *Methods in Cell Biology* 55, 129 (1998).
- Gittes F, Schnurr B, Olmsted P D, MacKintosh F C, Schmidt C F : Microscopic viscoelasticity: shear moduli of soft materials determined from thermal fluctuations, *Physical Review Letters* 79, 3286-3289 (1997).
- Goldman W H, Ezzell R M : Viscoelasticity in wild-type and vinculin-deficient mouse F9 embryonic carcinoma cells examined by atomic force microscopy, *Experimental Cell Research* 226, 234-237 (1996).
- Gouesbet G, Maheu B and Grehan G: *J. Opt. Soc. Am A* 5, 1427-1443 (1988).
- Gustavson T L, Chikkatur A P, Leanhardt A E, Gorlitz A, Gupta S, Pritchard D E, and Ketterle W: *Phys. Rev. Lett.* 88, 20401 (2002).
- Gutowska, A., Jeong, B. and Jasionowski, M., *Injectable gels for tissue engineering*, *The Anatomical Record*, 263, 342-349, (2001).
- Happel J and Brenner H: *Low Reynolds Number Hydrodynamics*, Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ 1965.

- Harada Y and Asakura T: Opt. Commun.124, 529-541 (1996).
- Heilbronn A : Eine neue methode zur bestimmung der viskosität lebender protoplasten, Jahrbuch der Wissenschaftlichen Botanik 61, 284-338 (1922).
- Henderson E, Haydon PG, Sakaguchi DS : Actin filament dynamics in living glial cells imaged by atomic force microcopy, Science 257, 1944-1946 (1992).
- Hénon S, Lenormand G, Richert A, Gallet F : A new determination of the shear modulus of the human erythrocyte membrane using optical tweezers, Biophysical Journal 76, 1145-1151 (1999).
- Hiramoto Y : Mechanical properties of the protoplasm of the sea urchin egg, Experimental Cell Research 56, 201-218 (1969).
- Hvidt S, Jørgensen E B, Brown W, Schillén K, J. Phys. Chem., 98, 12320 (1994).
- Ho, A. K., Bromberg, L. E., O'Connor, A. J., Perera, J. M., Stevens, G. W. and Hatton, T. A., Solute Diffusion in Associative Copolymer Solutions, Langmuir, 17, 3538-3544, (2001).
- Hoh JH, Schoenenberger CA : Surface morphology and mechanical properties of MDCK monolayers by atomic force microscopy, Journal of Cell Science 107, 1105-1114 (1994).
- Hough LA, Ou-Yang HD : A new probe for mechanical testing of nanostructures in soft materials, Journal of Nanoparticle Research 1, 495-499 (1999).
- Hunter, R. J., Foundations of colloidal science, Vol. I, Oxford University Press, New York, (1987).
- Kao H P, Verkman A S: Construction and performance of a photobleaching recovery apparatus with microsecond time resolution, Biophys. Chem. 59, pp.203-210 (1996).
- Kubo R, Toda M, Hashitsume N, Statistical Physics, Vol. 2, Springer-Verlag, New York (2003)
- Jacobson K A, Derzko Z, Wu E S, Hou Y, Poste G: Measurement of lateral mobility of cell surface component in single, living cells by fluorescence recovery after photobleaching, J.Supramol.Struct. 5, pp.565-576 (1976).
- Jain R K, Stock R J, Chary S R, Reuter M, Convention and diffusion measurements using fluorescence recovery after photobleaching and video image analysis: in vitro calibration and assessment, Microvasc.Res. 39, 77-93 (1990).
- Jeong, B., Bae, Y. H. and Kim, S. W., Drug release from biodegradable injectable thermosensitive hydrogel of PEG–PLGA–PEG triblock copolymers , J. Controlled Release, 63, 155-163, (2000).
- Jeong, B., Bae, Y. H.and Kim, S. W., Thermoreversible Gelation of PEG-PLGA-PEG Triblock Copolymer Aqueous Solutions, Macromolecules, 32, 7064-7069, (1999).
- Jeong, B., Kibbey, M. R., Birnbaum, J. C., Won, Y. Y. and Gutowska, A., Thermogelling Biodegradable Polymers with Hydrophilic Backbones: PEG-g-PLGA, Macromolecules, 33, 8317-8322, (2000).
- Jeong, B., Kim, S. W. and Bae, Y.H., Thermosensitive sol–gel reversible hydrogels, Adv Drug

Delivery Rev, 54, 37–51, (2002).

Jeong, B., Wang, L. Q. and Gutowska, A., Biodegradable thermoreversible gelling PLGA-g-PEG copolymers, Chem. Commun., 16, 1516-1517, (2001).

Johansson L, Skantze U, Löfroth JE., Macromolecules, 24, 6019 (1991).

Keller M, Schilling J, Sackmann E : Oscillatory magnetic bead rheometer for complex fluid microrheometry, Review of Scientific Instruments 72, 3626-3624 (2001).

King M, Macklem PT : Rheological properties of microliter quantities of normal mucus, Journal of Applied Physiology 42, 797-802 (1977).

Koros W J, Hellums M W: Transport proprieties, Encyclopedia of Polymers Sciences and Engineering, 2nd edition, H.F. Mark, N.M. Bikales, C.G.Overberger, G.Menges, Editors, John Wiley and Sons, New York, Supplement Volume,724-802,1989.

Kucik D F, Kuo S C, Elson E L, Sheetz M P : Preferential attachment of membrane glycoproteins to the cytoskeleton at the leading edge of lamella, J Cell Biol 114, 1029-1036 (1991).

Kuo S C and Sheetz M P: Force of single kinesin molecules measured with optical tweezers, Science 260, 232-234 (1994).

Kurisawa, M., Yokoyama, M. and Okano, T., Transfection efficiency increases by incorporating hydrophobic monomer units into polymeric gene carriers. J. Controlled Release, 68, 1–8, (2000).
Landau L D, Lifshitz E M and Pitaevskii: Statistical Physics, (Pergamon Press, New York, 1980).

Larson RG : The structure and rheology of complex fluids, Oxford University Press, New York (1999).

Liu Y C, Chen S H, Huang J S, Macromolecules, 31, 2236 (1998).

Macosko CW : Rheology: principles, measurements, and applications, VCH, New York (1994).

Mahaffy RE, Shih CK, MacKintosh FC, Käs J : Scanning probe-based frequency dependent microrheology of polymer gels and biological cells, Physical Review Letters 85, 880-883 (2000).

Maheu B, Gouesbet G and Grehan G: J. Optics (Paris) 19, 59-67(1988).

Malagnino N, Pesce G, Sasso A and Arimondo E: Opt. Commun. 214, 15-24 (2002).

Malmsten, M. and Lindman, B., Self-assembly in aqueous block copolymer solutions, Macromolecules, 25, 5440-5446, (1992).

Mason T G, Ganesan K, van Zanten J H, Wirtz D and Kuo S C: Particle Tracking Microrheology of Complex Fluids, Phys. Rev. Lett. 79, 3282-3285 (1997).

McCann L I, Dykman M and Golding B: Nature 402, 785-787 (1999).

McCormick, C.L., Stimuli-Responsive Water Soluble and Amphiphilic Polymers, ACS Symposium Series, American Chemical Society: Washington, DC, (2000)

- Mehta A P, Rief M, Spudich J A, Smith D A and Simmons R M: Science 283, 1689-1695 (1999).
- Mingvanish, W., Mai, S. M., Heatley, F., Booth, C. and Attwood, C., Association properties of diblock copolymers of ethylene oxide and 1,2-butylene oxide in aqueous solution. Copolymers with oxyethylene-block lengths in the range 100-400 chain units, J. Phys. Chem. B, 103, 11269-11274, (1999).
- Molloy J E, Burns J E, Kendrik-Jones J, Tregear R T, White D C: Movement and force produced by a single myosin head, Nature 378, 209-212 (1995).
- Molloy J E, Burns J E, Sparrow J C, Tregear R T, Kendrik-Jones J, White D C: Single-molecule mechanism of heavy meromyosin and S1 interacting with rabbit or Drosophila actins using optical tweezers, Biophys J 68, (4 Suppl.) 298S-303S, 303S-305S (1995).
- Mortensen K., Structural studies of aqueous solutions of PEO - PPO - PEO triblock copolymers, their micellar aggregates and mesophases; a small-angle neutron scattering study, J. Phys.: Condens. Matter, 8, A103-A124, (1996).
- Mortensen K, Brown W, Macromolecules, 26, 4128-4135 (1993).
- Mortensen K, Brown W, Norden B, Phys. Rev. Lett., 68, 2340 (1992).
- Mortensen K, Europhys. Lett., 19, 599 (1992).
- Mortensen K, Pedersen J S, Macromolecules, 26, 805 (1993).
- Mortensen K. and Talmon Y., Cryo-TEM and SANS Microstructural Study of Pluronic Polymer Solutions, Macromolecules, 28, 8829-8834, (1995).
- Ogston AG, Preston BN, Wells JD. Proc. R Soc., London A, 333, 297 (1973).
- Palmer A, Mason T, Kuo S, Wirtz D.: Diffusing Wave Spectroscopy Microrheology of Actin Filament Networks, Biophys J. 76, 1063-1071 (1999).
- Peters R, Peters J, Tews K H, Bahr W: A microfluorimetric study of translational diffusion in erythrocyte membranes", Biochim. Biophys. Acta 367, pp.282-294 (1974).
- Pine D J, Weitz D A, Chaikin P M and Herbolzheimer E: Phys. Rev. Lett. 60, 1134-113 (1988).
- Pralle A, Florin E L, Stelzer E H K and Horber J K H: Appl. Phys. A 66, S71-S73 (1998).
- Pralle A, Prummer M, Florin E L, Stelzer E H K and Horber J K H: Microscopy Research And Technique 44, 378-386 (1999).
- Prud'homme, R. K., Wu, G. and Schneider, D. K., Structure and Rheology Studies of Poly(oxyethylene-oxypropylene-oxyethylene) Aqueous Solution, Langmuir, 12, 1651-4659, (1996).
- Putman CA, Werf KOVD, Grooth BGD, Hulst NFV, Greve J : Viscoelasticity of living cells allows high resolution imaging by tapping mode atomic force microscopy, Biophysical Journal 67, 1749-1753 (1994).

- Radmacher M, Fritz M, Kasher CM, Cleveland JP, Hansma PK : Measuring the viscoelastic properties of human platelets with the atomic force microscope, *Biophysical Journal* 70, 556-567 (1996).
- Ren K F, Gréhan G and Gouesbet G: *Appl. Opt.* 35, 2702-2710 (1996).
- Rohrbach A and Stelzer E H K: *Appl. Opt.* 41, 2494-2507 (2002).
- Rohrbach A and Stelzer E H K: *J. Appl. Phys.* 91, 5474-5488 (2002).
- Rotsch C, Braet F, Wisse E, Radmacher M : AFM imaging and elasticity measurements of living rat liver macrophages, *Cell Biology International* 21, 685-696 (1997).
- Rotsch C, Radmacher M : Drug-induced changes of cytoskeletal structure and mechanics in fibroblasts: an atomic force microscopy study, *Biophysical Journal* 78, 520-535 (2000).
- Salaman H, Zbaida D, Rabin Y, Chatenay D, Elbaum M : Kinetics and mechanism of DNA uptake into the cell nucleus, *Proc Natl Acad USA* 98, 7247-7252 (2001).
- Schmidt C E, Hoewitz A F, Lauffenburger D A, Sheetz M P : Integrin-cytoskeletal interactions in migrating fibroblasts are dynamic, asymmetric and regulated, *J Cell Biol* 123, 977-991 (1993).
- Schmidt FG, Hinner B, Sackmann E, Tang JX : Viscoelastic properties of semiflexible filamentous bacteriophage fd, *Physical Review E* 62, 5509-5517 (2000).
- Schneider SW, Sritharan SW, Geibel JP, Oberleithner H, Jena B : Surface dynamics in living acinar cells imaged by atomic force microscopy: identification of plasma membrane structures involved in exocytosis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 316-321 (1997).
- Shalaby, S.W., McCormick, C.L., Butler, G.G, *Water-Soluble Polymers, Synthesis, Solution Properties and Applications*, ACS Symposium Series 467; American Chemical Society: Washington, DC, (1991).
- Sheperd G M, Corey D P, Block S M: Actin cores of hair-cell stereocilia support myosin mobility, *Proc Natl Acad USA* 87, 8627-8631 (1990).
- Shroff SG, Saner DR, Lal R : Dynamic micromechanical properties of cultured rat atrial myocytes measured by atomic force microscopy, *American Journal of Physiology* 269, C286-C289 (1995).
- Sleep J, Wilson D, Simmons R, Gratzer W : Elasticity of the red cell membrane and its relation to hemolytic disorders: an optical tweezers study, *Biophysical Journal* 77, 3085-3095 (1999).
- Song L et al, Photobleaching kinetics of fluorescein in quantitative fluorescence microscopy, *Biophys. J.* 68, 2588 (1995).
- Svoboda K and Block S M: Force and velocity measured for single kinesin molecules, *Cell* 77, 773-784 (1994).
- Svoboda K, Mitra P P, Block S M: Fluctuation analysis of motor protein movement and single enzyme kinetics, *Proc Natl Acad USA* 91, 11782-11786 (1994).

Svoboda K, Scimdt C F, Schnapp B J, Block S M: Direct observation of kinesin stepping by optical trapping interferometry, *Nature* 365, 721-727 (1993).

Svoboda K. and Block S B: *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 23, 247-285 (1994).

Thompson C, Lin C H, Forscher P : An Aplysia cell adhesion molecule associated with site-directed actin filament assembly in neuronal growth cones, *J Cell Biol* 109, 2843-2854 (1996).

Tsai T T, Jacobson K A, Spatial Fourier analysis of video photobleaching measurements: principles and optimization, *Biophys.J.* 60, 360-368 (1991).

Tseng Y, Wirtz D : Mechanics and multiple particle tracking microheterogeneity of a-actinin-crosslinked actin filament networks, *Biophysical Journal* 81, 1643-1656 (2001).

Valentine M T, Dewalt L E and Ou-Yang H D: *J.Phys.: Condens. Matter* 8, 9477-9482 (1996).

Velegol D, Lanni F : Cell Traction Forces on Soft Biomaterials. I. Microrheology of Type I Collagen Gels, *Biophysical Journal* 81, 1786-1792 (2001).

Wang Z, Khan S, Sheetz M P: Single cytoplasmic dynein molecule movements characterization and comparison with kinesin, *Biophys J* 69, 2011-2023 (1995).

Wanka, G., Hoffmann, H. and Ulbricht, W., Phase Diagrams and Aggregation Behaviour of Poly (oxyethylene)-Poly (oxypropylene) -Poly(oxyethylene) Triblock Copolymers in Aqueous Solutions, *Macromolecules*, 27, 15, 4145 – 4159, (1994).

Wohland T, Rosin A and Stelzer E H K: *Optik* 102, 181-190 (1996).

Wool R P: *Polymer Interfaces-Structure and Strenght*, Hanser Publishers (1995).

Wright W. H., Sonek G. J., Berns M. W., Radiation trapping forces on microspheres with optical tweezers, *Appl. Phys. Lett.* 63, 715-717, (1993).

Wright W. H., Sonek G. J., and Berns M. W., Parametric study of the forces on microspheres held by optical tweezers, *Appl. Opt.* 33, 1735-1748 (1994).

Wu, C., Liu, T., Chu, B., Schneider, D. K. and Graziano, V., Characterization of the PEO-PPO-PEO Triblock Copolymer and Its Application as a Separation Medium in Capillary Electrophoresis, *Macromolecules*, 30, 4574-4583, (1997).

Yagi K : The mechanical and colloidal properties of Amoeba protoplasm and the irrelations to the mechanism of amoeboid movement, *Comparative Biochemistry and Physiology* 3, 73-91 (1961).

Yamada S, Wirtz D, Kuo SC : Mechanics of living cells measured by laser tracking microrheology, *Biophysical Journal* 78, 1736-1747 (2000).

Yang L, Alexandridis P, *Langmuir*, 16, 4819 (2000).

Yekta, A., Xu, B., Duhamel, J., Adiwidjaja, H. and Winnik, M.A., Fluorescence studies of associating polymers in water: determination of the chain end aggregation, number and a model for

the association process, *Macromolecules*, 28, 956-966, (1995).

Yin H, Wang M D, Svoboda K, Landrick R, Block S M, Gelles J: Transcription against an applied force, *Science* 270, 1653-1657 (1995).

Yoshioka, H., Mori, Y., Tsukikawa, S. and Kubota, S., Thermoreversible gelation on cooling and on heating of aqueous gelatin poly(Nisopropylacrylamide) conjugate, *Polym Adv Technol*, 9, 155–8, (1998).

Yu, G. E., Deng, Y., Dalton, S., Wang, D., Attwood, C., Price, C. And Booth, C., Micellisation and gelation of triblock copoly(oxyethylene/oxypropylene/oxyethylene), F127, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, 88, 2537-2544, (1992).

Zhou Z, Chu B, J. *Colloid Interface Sci.*, 126, 171 (1988).

Ziemann F, Rädler J, Sackmann E : Local measurements of viscoelastic moduli of entangled actin networks using an oscillating magnetic bead micro-rheometer, *Biophysical Journal* 66, 2210-2216 (1994).