

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA TRE

SCUOLA DOTTORALE IN SCIENZE MATEMATICHE E FISICHE

**Studio su scala atomica di soluzioni
acquose attraverso NDIS combinata con
simulazioni EPSR.**

Autore:
Laura Maugeri

Relatore:
Fabio Bruni

Coordinatore:
Roberto Raimondi

Tesi sottoposta per il titolo di *Philosophiae Doctor* in Fisica

nel

Gruppo di Ricerca *Liquids Group*
Dipartimento di Scienze

3 febbraio 2016

Dichiarazione

Io sottoscritta, Laura Maugeri , dichiaro che la seguente tesi dal titolo “Studio su scala atomica di soluzioni acquose attraverso NDIS combinata con simulazioni EPSR.” e che il lavoro presentato all’interno della tesi siano esclusivamente personali.

Firma:

Data:

Indice

Dichiarazione	i
Indice	iii
1 Introduzione	1
2 La diffrazione neutronica e l'indagine della struttura di liquidi su scala atomica	5
2.1 Diffrazione neutronica	5
2.1.1 Interazione dei neutroni con la materia	6
2.2 Sezione d'urto differenziale in un esperimento di diffrazione neutronica	9
2.3 Dalla sezione d'urto al fattore di struttura	10
2.3.1 Approssimazione statica	15
2.4 Funzioni di correlazione	18
2.5 Il caso di un sistema a molte componenti	22
2.6 La sostituzione isotopica	24
2.7 L'apparato sperimentale	26
2.7.1 La sorgente di neutroni	26
2.7.2 Moderazione e <i>Letargia</i>	29
2.8 Il diffrattometro SANDALS	32
2.8.1 La cella portacampione	36
2.9 La sezione d'urto sperimentale	39
2.10 Dall'esperimento ai dati corretti	42
2.10.1 La diffusione anelastica	45
2.10.2 Procedura di correzione dei dati TDCS	48
3 Le simulazioni EPSR	49
3.1 Principi dell'EPSR	49
3.2 Fondamenti teorici di una simulazione EPSR	50
3.3 Calcolo delle RDF e dei numeri di coordinazione	52
3.3.1 L'EPSR e le funzioni di distribuzione radiale sito-sito	55
3.4 Un caso studio: soluzione di glucosio in acqua	57
3.4.1 Costruzione di una scatola	57
3.4.2 Il fit	59
3.5 Funzioni di densità spaziale (SDF)	61

3.6	Dall'EPSR ad ANGULA	63
4	Studio della struttura dell'acqua	65
4.1	Introduzione	65
4.1.1	Anomalie nella compressibilità isoterma	67
4.2	Caratteristiche strutturali dell'acqua e funzioni di distribuzione radiali	68
4.3	Risultati	70
4.3.1	Dettagli Sperimentali	70
4.3.2	Funzioni di distribuzione radiale	70
4.3.3	Funzioni di densità spaziale SDF	74
4.3.4	Funzione di distribuzione dell'angolo $Ow\widehat{Ow}Ow$	76
4.4	Discussione	77
4.5	Conclusioni	80
5	Studio dell'idratazione del glucosio	81
5.1	Introduzione	81
5.2	Struttura del glucosio e disaccaridi del glucosio	83
5.2.1	Il "triangolo del dolce" : una chiave per interpretare il meccanismo di percezione del gusto	84
5.3	Studio dell'idratazione del Glucosio: risultati sperimentali	87
5.3.1	Materiali	87
5.3.2	Funzioni di distribuzione radiale dell'acqua-solvente del glucosio	93
5.3.3	Idratazione dei gruppi -OH e CH ₂ OH	95
5.3.4	Idratazione intorno all'ossigeno dell'anello	103
5.4	Discussione	104
5.4.1	Confronto con il cellobiosio	105
5.4.2	Confronto con il trealosio	110
5.4.3	Profili di idratazione del glucosio, trealosio e cellobiosio	117
5.5	Conclusioni	119
6	Idratazione ed aggregazione della glicina	121
6.1	Introduzione	121
6.2	Dettagli sperimentali	125
6.3	Risultati sperimentali	129
6.3.1	Effetto della concentrazione sulla struttura dell'acqua	129
6.3.2	Idratazione gruppi -CO ₂ ⁻ ed -NH ₃ ⁺	131
6.3.3	Legami idrogeno	136
6.3.4	RDF glicina-glicina	138
6.3.5	Distribuzione dei legami idrogeno con l'acqua e dei legami glicina-glicina	139
6.3.6	Dimensioni dei cluster	141
6.4	Discussione	142
6.4.1	Effetti perturbativi sulla struttura dell'acqua	142
6.4.2	Studio dell'idratazione della glicina	144
6.4.3	Formazione di aggregati	147
6.5	Conclusioni	151
7	Osservazioni	153

7.1 Osservazioni	153
Bibliografia	157

Capitolo 1

Introduzione

Uno dei principali problemi nello studio della struttura dei liquidi ed in particolare di soluzioni acquose riguarda la ricostruzione della funzione di distribuzione radiale delle coppie di atomi che costituiscono il sistema. Tale funzione definita come $g_{\alpha,\beta}(r)$, esprime la probabilità di individuare un atomo β , ad una certa distanza r rispetto ad un atomo α posto al centro del sistema di riferimento e rappresenta il mezzo attraverso il quale è possibile descrivere la struttura di un liquido a livello atomico. Le tecniche ad oggi disponibili, che consentono una descrizione a livello atomico della struttura di fluidi, vetri o altri materiali amorfi, si basano principalmente sull'impiego di raggi X e di neutroni [1, 2]. Si tratta di tecniche complementari in quanto i meccanismi di interazione dei raggi X e dei neutroni con la materia sono diversi. Il principale vantaggio nell'impiego dei neutroni, proviene dal fatto che essi interagiscono direttamente con i nuclei atomici presenti in una molecola, tramite interazioni forti ed isotrope. In aggiunta, la sezione d'urto di scattering varia irregolarmente con il numero atomico, a differenza dei raggi X in cui essa aumenta con il numero atomico Z . Nello studio di soluzioni acquose, tale aspetto è di particolare rilievo nel senso che l'impiego dei neutroni, al contrario dei raggi X, consente di localizzare atomi leggeri come l'idrogeno, componente principale nelle soluzioni acquose e nelle biomolecole. Oltre alle tecniche sopra menzionate anche la risonanza magnetica nucleare (NMR) viene largamente impiegata per lo studio della struttura di sistemi complessi quali, per l'appunto, soluzioni acquose di biomolecole. A differenza delle precedenti, tale tecnica si basa sull'interazione dei singoli nuclei atomici magneticamente attivi (come ad esempio ^1H) con il campo magnetico esterno e con i campi magnetici dei nuclei adiacenti. Per la descrizione delle proprietà strutturali di

soluzioni acquose sono stati utilizzati anche approcci computazionali basati sull'impiego di simulazioni di dinamica molecolare classica (MD) o *ab initio* [3, 4]. La dinamica molecolare è stata infatti utilizzata insieme ai dati sperimentali derivanti dalla diffrazione neutronica, come nel caso dei lavori di Mason et al. [3, 4]. L'approccio basato sull'impiego della dinamica molecolare è stato utilizzato per studiare numerosi sistemi come soluzioni acquose di zuccheri [3, 5, 6] e altre soluzioni biologiche e, insieme ad esperimenti di scattering neutronico a piccolo angolo [7], è stato utile per studiare soluzioni di aggregati in sospensione. Gli studi di dinamica molecolare come le simulazioni MD consentono di modellizzare le proprietà di sistemi molecolari. Le simulazioni MD sono state ampiamente impiegate per lo studio di molecole biologiche [8–10] e liquidi [11, 12], per soluzioni acquose [13–15]. Tali simulazioni hanno esaminato la struttura risolta spazialmente nei liquidi [16, 17] e nelle soluzioni di biomolecole [13], fornendo un'immagine diretta della distribuzione non uniforme delle molecole in tre dimensioni, e la collocazione preferenziale delle molecole del solvente nella prima shell di coordinazione.

L'approccio introdotto da Soper [18, 19] e utilizzato in questa tesi, nasce dalla necessità di unire due approcci indipendenti ovvero quello teorico delle simulazioni e quello sperimentale di un tipico esperimento di diffrazione neutronica o raggi X. L'idea di base è quella di utilizzare i dati di diffrazione neutronica o da raggi X, come vincolo per le simulazioni; in tal modo i parametri fisici come il potenziale che, nelle simulazioni classiche viene calcolato solo in via teorica, può essere ottenuto e modificato sulla base di un confronto, tra i dati teorici e quelli sperimentali. La tecnica di diffrazione neutronica con sostituzione isotopica NDIS (dall'inglese Neutron Diffraction Isotopic Substitution), combinata con le simulazioni basate su un potenziale empirico EPSR (Empirical Potential Structure Refinement) sviluppata da Soper, diventa così uno strumento potente per indagare la struttura di liquidi semplici e di soluzioni acquose. Negli ultimi anni, essa ha infatti consentito di superare le limitazioni tecniche che impedivano la ricostruzione delle funzioni di distribuzione radiale delle coppie di atomi per un liquido complesso ovvero formato da un grande numero di molecole ed atomi. Un approccio basato sulla combinazione della diffrazione neutronica NDIS con le simulazioni EPSR è piuttosto articolato in quanto avviene in tappe diverse. La sostituzione isotopica rappresenta il mezzo attraverso il quale poter ottenere dei "contrast" ovvero, dei campioni equivalenti dal punto di vista strutturale ma diversi dal punto di vista delle proprietà di scattering. L'assunzione secondo cui campioni isotopicamente sostituiti siano equivalenti dal punto

di vista strutturale ma differiscano per le proprietà di scattering consente di poter realizzare esperimenti sui campioni isotopicamente sostituiti ed impiegare i dati risultanti da ciascuno di questi come vincoli da usare in contemporanea per le simulazioni. Nel caso specifico dell'acqua o di soluzioni acquose, così come negli esperimenti realizzati durante il mio dottorato, l'idrogeno rappresenta l'atomo che viene sostituito con il suo isotopo deuterio (sostituzione H/D).

In questa tesi, riporto tre casi studio che rispondono alla problematica della ricostruzione delle caratteristiche strutturali di soluzioni a partire dalla combinazione della diffrazione neutronica con sostituzione H/D con le simulazioni EPSR; nel primo caso ci spieghiamo come una descrizione della struttura a livello atomico possa aiutare nella caratterizzazione di un sistema semplice come l'acqua, nel secondo in che modo una descrizione dell'idratazione dei carboidrati, a livello atomico, possa spiegare alcune funzioni dei carboidrati, infine in che modo sia possibile ricavare proprietà di aggregazione di un amminoacido (la glicina) in soluzione acquosa. Nello specifico nel corso del mio dottorato mi sono occupata di studiare:

- la struttura dell' acqua a temperatura $T=353$ K;
- l'idratazione di soluzioni di glucosio in acqua a temperatura ambiente ed a due differenti concentrazioni di soluto/solvente (1:12.5, 1:50);
- l'idratazione e l' aggregazione di molecole di glicina in soluzioni di glicina in acqua a due differenti concentrazioni (1:17, 1:30) e temperature ($T=300$ K e $T=353$ K).

Lo studio della struttura microscopica dell' acqua a $T=353$ K nasce dalla volontà di comprendere l'effetto della temperatura sulla struttura dell'acqua. Come ben noto infatti, la compressibilità isoterma presenta un minimo in corrispondenza di $T=319$ K pertanto lo studio dell'acqua a $T=353$ K ed il confronto con $T=300$ K consente di verificare se ed in che modo l' anomalia nella compressibilità isoterma possa lasciare una "traccia" sulla struttura microscopica dell'acqua. In aggiunta, la stessa temperatura rappresenta la temperatura in cui alcune biomolecole come la caffeina, risultano solubili. Un ulteriore studio riguarda invece soluzioni di glucosio ed acqua a temperatura ambiente ed a due differenti concentrazioni di soluto/solvente. Nell'ambito di tale lavoro l'impiego di uno studio a livello atomico dell'idratazione del glucosio è risultato rilevante per spiegare la funzione svolta dall'idratazione nel meccanismo di percezione del gusto dolce. Infine

lo studio di soluzioni di glicina ed acqua per due differenti valori di concentrazione e temperatura consente di ottenere informazioni riguardanti l'idratazione della glicina e la formazione di aggregati. Lo studio di soluzioni acquose di acqua e biomolecole ha consentito inoltre, di ottenere informazioni sulla perturbazione indotta da soluti alla struttura dell'acqua. Nel corso di questa tesi affronterò quindi diverse tematiche con lo stesso approccio. L'intento è quello di dimostrare quanto una descrizione a livello atomico della struttura di una soluzione biologica, sia rilevante per la comprensione di alcune funzioni e proprietà di biomolecole, presenti nella soluzione quali zuccheri e amminoacidi. La tesi è organizzata nel seguente modo: nei primi due capitoli descriverò alcune caratteristiche relative alla tecnica della diffrazione neutronica combinata con la sostituzione isotopica ed all'analisi dati mentre negli ultimi tre capitoli affronterò le tre differenti tematiche per quanto riguarda l'acqua, soluzioni di acqua e glucosio e soluzioni di acqua e glicina.

Capitolo 2

La diffrazione neutronica e l'indagine della struttura di liquidi su scala atomica

2.1 Diffrazione neutronica

Le moderne tecniche di diffrazione neutronica sono ad oggi uno degli strumenti più efficaci per lo studio della struttura di molecole, e come nel caso di questa tesi, di biomolecole in soluzione acquosa. L'applicazione della diffrazione neutronica per lo studio della struttura della materia consente, a differenza della diffrazione X, di localizzare atomi leggeri e di evitare il problema del danneggiamento indotto dai raggi X, per effetto del cambiamento dello stato di ossidazione dei metalli che, nei campioni biologici, comporta una conseguente perdita di idrogeno [20]. Per comprendere i vantaggi derivanti dall'impiego dei neutroni come sonda per lo studio della struttura della materia condensata, in particolare per quanto riguarda la struttura dei liquidi, è fondamentale descrivere le caratteristiche dei neutroni ed il loro ruolo nelle potenzialità della tecnica. A tal proposito, in questo capitolo, viene riportata una descrizione del meccanismo di interazione tra i neutroni e la materia. Successivamente verrà spiegato in che modo è possibile ricavare le informazioni sulla struttura di un liquido dal fattore di struttura statico, ottenuto attraverso una misura della sezione d'urto in un processo di scattering. Negli ultimi paragrafi del capitolo, riporterò invece una descrizione del set-up sperimentale relativo

ad un esperimento di diffrazione neutronica su SANDALS, il diffrattometro per liquidi ed amorfi ubicato presso la sorgente a spallazione di neutroni ISIS [21, 22].

2.1.1 Interazione dei neutroni con la materia

Negli esperimenti di scattering neutronico vengono generalmente impiegati neutroni termici (con $E \sim 25$ meV) ed epitermici (con $E \sim 1$ eV). Esistono numerosi vantaggi derivanti dall'impiego dei neutroni per lo studio della materia condensata e tali vantaggi sono una conseguenza delle caratteristiche dei neutroni. Come ben noto, il neutrone è una particella elementare, subatomica e neutra presente in tutti i nuclei ad eccezione del dell' ^1H . La sua massa, pari a 939.57 MeV/ c^2 , è confrontabile con quella del protone; esso inoltre possiede spin pari ad $1/2$ e momento di dipolo magnetico μ_n pari a -1.9132 magnetoni nucleari. Tali caratteristiche rendono l'interazione dei neutroni con la materia differente da quella dei raggi X. In *primis* il neutrone si presenta come una particella neutra, pertanto esso può penetrare nel campione, ed in tutto ciò che riguarda direttamente l'esperimento. In aggiunta, i neutroni vengono scatterati da forze nucleari generando una sezione d'urto di scattering che non è correlata al numero atomico (Figura 2.1). Tale dipendenza consente di distinguere elementi leggeri (come l'idrogeno), generalmente trasparenti alla radiazione dei raggi X. Allo stesso modo, elementi vicini nella tavola periodica possono essere rilevati in quanto, le loro sezioni d'urto di scattering sono generalmente molto diverse. In aggiunta, dal momento che il potere di diffusione dipende dalle caratteristiche del nucleo, e non dal numero di elettroni, anche isotopi dello stesso elemento presentano differenti lunghezze di scattering, risultando quindi, facilmente identificabili. Di qui, la scelta della diffrazione neutronica come strumento d'indagine per sondare la struttura di soluzioni acquose di natura biologica.

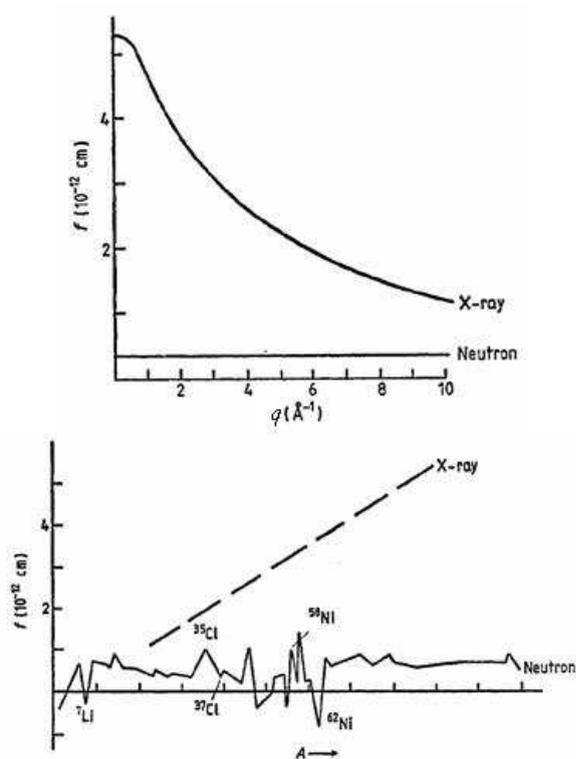


Figura 2.1 – Dipendenza della lunghezza di scattering coerente f in funzione del vettore d'onda q (in alto) ed in funzione del numero atomico A (in basso). Il parametro f esprime l'intensità di interazione sonda-bersaglio. Nelle figure viene riportato un confronto tra il caso in cui la sonda sia rappresentata dai raggi X ed il caso in cui la sonda siano i neutroni.

Il valore della massa dei neutroni termici (la cui energia è confrontabile con il valore di $k_B T$ a temperatura ambiente) corrisponde ad una lunghezza d'onda di De Broglie definita come

$$\lambda = \frac{h}{\sqrt{2m_n k_B T}} = \frac{2\pi}{\sqrt{2m_n E}} \quad (2.1)$$

dove m_n indica la massa del neutrone $k_B = 8.6173324 \cdot 10^{-5} \text{ eV} \cdot \text{K}^{-1}$ è la costante di Boltzmann ed $h = 4.1356692 \cdot 10^{-15} \text{ eV} \cdot \text{s}$ la costante di Planck, confrontabile con le distanze interatomiche nei solidi e liquidi. Basti pensare che neutroni con energia termica pari a $E = 0.025 \text{ eV}$ possiedono una lunghezza di De Broglie pari a $\sim 1.8 \cdot 10^{-10} \text{ m}$ e che tale valore sia proprio confrontabile con le tipiche distanze interatomiche nella materia condensata. Altro aspetto importante riguarda l'ordine di grandezza dell'energia dei neutroni termici, che risulta confrontabile con quello delle eccitazioni della materia condensata. Nello specifico, nello scattering inelastico del neutrone si ha una variazione di energia del neutrone; tale variazione rappresenta una frazione significativa dell'energia iniziale. È per questo motivo che, misurando le energie del neutrone, è possibile ottenere informazioni accurate sulle energie di eccitazione e sulle forze interatomiche. Il neutrone possiede inoltre, un momento magnetico il che significa che esso interagisce con gli elettroni spaiati presenti in atomi magnetici. Tale caratteristica consente di poter studiare in parallelo proprietà magnetiche e nucleari. In conclusione, l'impiego dei neutroni come sonda risulta particolarmente vantaggioso per lo studio della struttura di soluzioni acquose. Le caratteristiche intrinseche del neutrone consentono infatti di ottenere informazioni strutturali non ottenibili attraverso l'impiego dei raggi X; in aggiunta recenti sviluppi delle tecniche computazionali, hanno consentito di oltrepassare dei limiti imposti dal gran numero di gradi di libertà tipico di sistemi particolarmente complessi. Nei paragrafi successivi, riporto alcuni principi fondamentali su cui si basa la spettroscopia neutronica. L'intento è quello di individuare le quantità misurate in un tipico esperimento di diffrazione neutronica e la loro derivazione formale a partire dalla teoria dello scattering.

2.2 Sezione d'urto differenziale in un esperimento di diffrazione neutronica

In un tipico esperimento di scattering di neutroni ciò che viene misurata è la sezione d'urto di scattering. Tale grandezza descrive il processo di interazione tra neutrone e bersaglio quando un fascio di neutroni di energia E viene fatto incidere su un bersaglio. Nella Figura 2.2 viene riportata la geometria di un esperimento di scattering: in seguito all'urto con il campione, i neutroni vengono diffusi in differenti direzioni ed un detector misura il numero di neutroni diffusi in una determinata direzione, in funzione della loro energia finale E' . In genere, le distanze tra il rivelatore ed il bersaglio ed il bersaglio e la sorgente di neutroni sono di gran lunga superiori rispetto alle dimensioni stesse della sorgente, del bersaglio e del rivelatore; questo garantisce che l'angolo solido $d\Omega$ sotteso dal rivelatore, a partire dal bersaglio, risulti ben definito. Il processo di diffusione viene schematizzato per mezzo di coordinate polari (r, θ, ϕ) , valutate rispetto all'asse z , che individua la direzione dei neutroni incidenti.

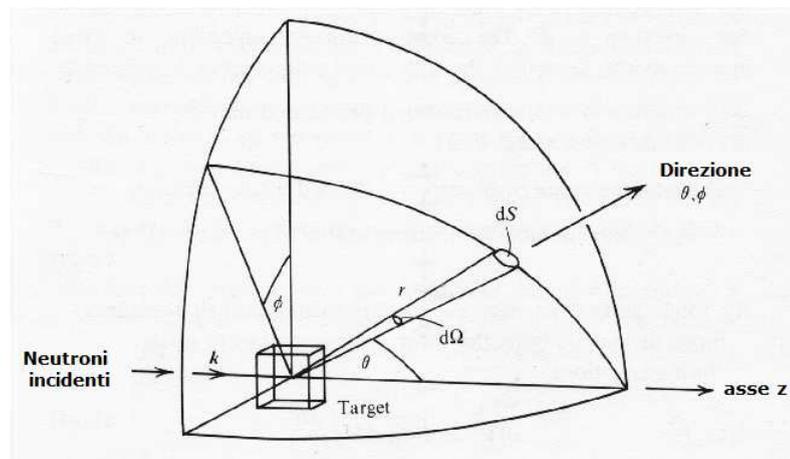


Figura 2.2 – Geometria di un esperimento di scattering [23].

La sezione d'urto differenziale parziale, misurata in un esperimento è definita come il numero di neutroni diffusi al secondo, in una particolare direzione, nell'angolo solido $d\Omega(\theta, \phi)$, con energia compresa tra E' ed $E' + dE'$ e normalizzata per il flusso incidente Φ . L'espressione della sezione d'urto doppio differenziale risulta dunque la seguente:

$$\frac{d^2\sigma}{d\Omega dE'} = \frac{\text{(neutroni diffusi nell'angolo solido } d\Omega \text{ intorno ad } \Omega)}{\text{tempo } \Phi dE'}, \quad (2.2)$$

dove $d\Omega$ rappresenta l'angolo solido sotteso dal rivelatore e ben definito nell'ipotesi che la distanza $\vec{r} = \vec{r}(\theta, \phi)$ detector-campione sia grande; Φ rappresenta il flusso di neutroni incidenti (numero di neutroni $\cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) ed è definito come:

$$\Phi = \frac{\text{numero di neutroni}}{\text{area} \cdot \text{tempo}} = \frac{\text{numero di particelle}}{\text{volume}} \cdot \text{velocità}. \quad (2.3)$$

La sezione d'urto così definita tiene conto della possibilità che il rivelatore possa risolvere anche in energia. Nel caso in cui non volessimo analizzare in energia, la sezione d'urto corrispondente viene definita *sezione d'urto differenziale* (DCS) e si ottiene a partire dall'equazione 2.2 integrando in dE' :

$$\frac{d\sigma}{d\Omega} = \int \frac{d^2\sigma}{d\Omega dE'} dE'. \quad (2.4)$$

Ne consegue che la DCS misurata sperimentalmente non è altro che un conteggio del numero di neutroni rispetto all'angolo solido mentre integrando su tutte le direzioni, si ottiene il numero totale dei neutroni diffusi al secondo dal campione ovvero la sezione d'urto totale di scattering indicata con σ_{tot} e definita da:

$$\sigma_{tot} = \int \frac{d^2\sigma}{d\Omega dE'} d\Omega dE'. \quad (2.5)$$

Le espressioni così ottenute descrivono in modo qualitativo, le grandezze che vengono misurate in un esperimento di scattering neutronico. Nei paragrafi successivi vengono introdotti dei formalismi, che permettano di esplicitare la sezione d'urto in termini di grandezze rilevanti, in particolare del fattore di struttura statico, per la descrizione della struttura microscopica di un sistema-bersaglio.

2.3 Dalla sezione d'urto al fattore di struttura

Nel caso di neutroni, la sezione d'urto differenziale può essere calcolata in approssimazione di Born, in quanto ciascun evento di scattering non perturba significativamente il fascio incidente. Sotto tale approssimazione, la funzione d'onda che descrive l'interazione tra nucleo e neutrone, può essere espressa con il prodotto di due funzioni, che

rappresentano le componenti imperturbate del sistema. Per descrivere la sezione d'urto in termini del fattore di struttura, nel caso di scattering da parte di un singolo nucleo fissato, rappresentiamo il neutrone incidente mediante la funzione d'onda di particella libera ovvero il flusso monocromatico può essere descritto da un'onda piana secondo:

$$\psi_{\mathbf{k}} = \exp(i\mathbf{k} \cdot \mathbf{r}), \quad (2.6)$$

dove \mathbf{k} è il vettore d'onda che definisce la direzione di propagazione ed \mathbf{r} è la posizione. Nell'espressione il prodotto scalare indica che punto per punto si va a vedere la proiezione dello spostamento lungo una direzione di propagazione ovvero lungo un piano. In seguito al fenomeno di scattering con il campione, l'onda diffusa sarà semplicemente un'onda sferica centrata in \mathbf{r}' la cui ampiezza di scattering è f ed è definita nel seguente modo:

$$\psi_{\mathbf{k}'} = f \left(\frac{\exp[i\mathbf{k}' \cdot (\mathbf{r} - \mathbf{r}')] }{|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|} \right) = f \left(\frac{\exp[i\mathbf{k}' \cdot \mathbf{R}]}{R} \right), \quad (2.7)$$

dove $\mathbf{R} = \mathbf{r} - \mathbf{r}'$ indica la posizione dell'atomo diffusore. Il flusso incidente in un volume V , di N neutroni per unità di area e nell'unità di tempo risulta pari a $\hbar\mathbf{k}N/Vm_n$, mentre il flusso scatterato possiede una densità pari a $|\psi_{\mathbf{k}'}|^2 = \frac{f^2}{R^2}$ ed una velocità pari a $\hbar\mathbf{k}'/m_n$. La sezione d'urto differenziale è data dal rapporto tra flusso scatterato ed incidente per unità di area $R^2 d\Omega$ secondo l'espressione:

$$\frac{d\sigma}{d\Omega} = \frac{k'}{k} |f|^2. \quad (2.8)$$

La teoria dello scattering così proposta richiede due osservazioni. La prima riguarda il fatto che il singolo nucleo possa essere considerato come un centro diffusore puntuale nei confronti di un fascio di neutroni. La seconda è inerente all'ampiezza di scattering f di un singolo nucleo posto nell'origine del sistema di riferimento; dal momento che, l'intervallo della forza di interazione tra il neutrone ed i nuclei dell'atomo è dell'ordine di $10^{-15}m$ e dunque di 5 ordini di grandezza inferiore rispetto alla lunghezza d'onda dei neutroni termici, l'ampiezza di scattering f risulta indipendente dall'angolo di scattering. Supponiamo di descrivere lo stato del neutrone attraverso il suo momento e dunque il suo vettore d'onda e attraverso lo spin. Sia λ il numero quantico che descrive lo stato del sistema, N il numero di nuclei appartenenti al sistema coinvolto nel processo di diffusione

ed \mathbf{R}_i con $i = 1, \dots, N$ il vettore posizione del i -esimo nucleo ed \mathbf{r} quella del neutrone. La sezione d'urto differenziale rappresenta la somma di tutti i processi in cui lo stato del bersaglio passa da $|\lambda\rangle$ a $|\lambda'\rangle$ e lo stato del neutrone da $|\mathbf{k}\mathbf{s}\rangle$ a $|\mathbf{k}'\mathbf{s}'\rangle$ ovvero può essere espressa secondo:

$$\frac{d\sigma}{d\Omega} = \frac{1}{\Phi} \frac{1}{d\Omega} \sum_{\mathbf{k}' \text{ in } d\Omega} W_{\mathbf{k}\mathbf{s}\lambda \rightarrow \mathbf{k}'\mathbf{s}'\lambda'}, \quad (2.9)$$

dove $W_{\mathbf{k}\mathbf{s}\lambda \rightarrow \mathbf{k}'\mathbf{s}'\lambda'}$ rappresenta la probabilità di transizione da uno stato iniziale $|\mathbf{k}\mathbf{s}\rangle |\lambda\rangle$ ad uno stato finale $|\mathbf{k}'\mathbf{s}'\rangle |\lambda'\rangle$. Sfruttando la regola d'oro di Fermi, è possibile esprimere tale espressione in funzione di $\rho_{\mathbf{k}'}$ ovvero della densità degli stati di momento \mathbf{k}' in $d\Omega$ accessibili al neutrone durante la transizione dallo stato $|\mathbf{k}\mathbf{s}\rangle$ allo stato $|\mathbf{k}'\mathbf{s}'\rangle$. In particolare risulta che trascurando lo stato di spin, vale:

$$\sum_{\mathbf{k}' \text{ in } d\Omega} W_{\mathbf{k}\lambda \rightarrow \mathbf{k}'\lambda'} = \frac{2\pi}{\hbar} \rho_{\mathbf{k}'} |\langle \mathbf{k}'\lambda' | \hat{U} | \mathbf{k}\lambda \rangle|^2. \quad (2.10)$$

L'elemento di matrice $\langle \mathbf{k}'\lambda' | \hat{U} | \mathbf{k}\lambda \rangle$ che compare nella 2.10, può essere espresso esplicitamente come:

$$\langle \mathbf{k}'\lambda' | \hat{U} | \mathbf{k}\lambda \rangle = \int \psi_{\mathbf{k}'}^* \chi_{\lambda'}^* \hat{U} \psi_{\mathbf{k}} \chi_{\lambda} d\mathbf{R} d\mathbf{r}, \quad (2.11)$$

con $d\mathbf{R} = d\mathbf{R}_1 d\mathbf{R}_2 \dots d\mathbf{R}_N$ dove $d\mathbf{R}_i$ e $d\mathbf{r}$ sono gli elementi di volume infinitesimi centrati rispettivamente intorno all' i -esimo nucleo ed al neutrone. Definendo il volume di normalizzazione come quello di un cubo di lato L , possiamo calcolare l'espressione per la densità degli stati $\rho_{\mathbf{k}'}$ ed esplicitare le costanti di normalizzazione delle funzioni d'onda del neutrone. Nel calcolo della densità degli stati, dobbiamo tenere conto che gli unici stati permessi al neutrone sono quelli per cui, la lunghezza d'onda di De Broglie sia periodica nella scatola. I vettori d'onda di tali stati formano un reticolo nello spazio \mathbf{k} ed il volume della cella elementare di tale reticolo è pari a $v_k = \frac{(2\pi)^3}{L^3}$ mentre l'energia finale del neutrone è pari a $E' = \frac{\hbar^2}{2m} k'^2$ da cui $dE' = \frac{\hbar^2}{m} k' dk'$. Il numero degli stati, nell'angolo solido infinitesimo $d\Omega$ di energia compresa tra E' ed $E' + dE'$, risulta:

$$\rho_{\mathbf{k}'} dE' = \frac{1}{v_k} k'^2 dk' d\Omega. \quad (2.12)$$

e dunque sostituendo le espressioni per v_k , dE' nella 2.12, si ottiene che:

$$\rho_{k'} = \frac{L^3}{(2\pi)^3} k' \frac{m}{\hbar^2} d\Omega. \quad (2.13)$$

Tale relazione consente di calcolare la costante di normalizzazione per la funzione d'onda; considerando che in ogni volume L^3 ci sia un solo neutrone e che la densità dei neutroni sia pari a $1/L^3$ la funzione d'onda normalizzata risulta:

$$\psi_k = \frac{1}{\sqrt{L^3}} \exp(i\mathbf{k} \cdot \mathbf{r}). \quad (2.14)$$

L'elemento di matrice definito nell'equazione 2.11 diventa:

$$\langle \mathbf{k}' \lambda' | \widehat{U} | \mathbf{k} \lambda \rangle = \frac{1}{L^3} \int \exp(-i\mathbf{k}' \cdot \mathbf{r}) \chi_{\lambda'}^* \widehat{U} \exp(i\mathbf{k} \cdot \mathbf{r}) \chi_{\lambda} d\mathbf{R} d\mathbf{r}. \quad (2.15)$$

Il flusso dei neutroni incidenti definito dall'equazione 2.3 è esprimibile come:

$$\Phi = \frac{1}{(L^3)} \frac{\hbar}{m} k. \quad (2.16)$$

Inserendo l'equazione 2.10, l'equazione 2.16 nella 2.9 si ricava che:

$$\left(\frac{d\sigma}{d\Omega} \right)_{\lambda \rightarrow \lambda'} = \frac{k'}{k} \left(\frac{m}{2\pi\hbar^2} \right)^2 |\langle \mathbf{k}' \lambda' | \widehat{U} | \mathbf{k} \lambda \rangle|^2, \quad (2.17)$$

dove i termini L^3 sono stati omissi in quanto, il volume della scatola è arbitrario e può essere posto pari ad 1. L'espressione così ottenuta indica la sezione d'urto per i neutroni scatterati nell'angolo solido $d\Omega$ nella direzione \mathbf{k}' . Fissati \mathbf{k} , λ e λ' , i neutroni scatterati hanno tutti la stessa energia. La legge di conservazione che rispettano può essere espressa nel seguente modo:

$$E + E_{\lambda} = E' + E_{\lambda'}, \quad (2.18)$$

in cui E ed E' , E_{λ} e $E_{\lambda'}$ sono rispettivamente, le energie iniziale e finale del neutrone e del sistema bersaglio. La funzione di distribuzione delle energie dei neutroni scatterati è

in termini matematici, una funzione δ di Dirac pertanto la sezione d'urto parziale può essere espressa nel seguente modo:

$$\left(\frac{d^2\sigma}{d\Omega dE'} \right)_{\lambda \rightarrow \lambda'} = \frac{k'}{k} \left(\frac{m}{2\pi\hbar^2} \right)^2 |\langle \mathbf{k}'\lambda' | \widehat{U} | \mathbf{k}\lambda \rangle|^2 \delta(E_\lambda - E_{\lambda'} + E - E'). \quad (2.19)$$

Nell' equazione 2.19 vengono considerati solo determinati stati iniziali e finali del sistema; dal momento che si vuole rappresentare il comportamento complessivo occorre, sommare su tutti gli stati inizialmente accessibili ciascuno dei quali pesato con una certa probabilità di occupazione p_λ . Per quanto riguarda i pesi vale la regola di somma

$$\sum_{\lambda} p_\lambda = 1. \quad (2.20)$$

Essi possono essere rappresentati con un fattore termodinamico $\exp(-E_\lambda/k_B T)$ dove T è temperatura del campione, moltiplicati per un opportuno fattore di degenerazione. Consideriamo a questo punto lo stato di spin, finora trascurato ed indichiamolo con $|\sigma\rangle$. Dal momento che lo spin è indipendente dalle coordinate del sistema, è possibile riscrivere lo stato completo attraverso il prodotto delle funzioni, che portano separatamente, informazioni sullo stato di spin e sulle coordinate: tale prodotto sarà $|\psi_k, \chi_\lambda\rangle |\psi_\sigma\rangle$ per lo stato iniziale e $|\psi_{k'}, \chi_{\lambda'}\rangle |\psi_{\sigma'}\rangle$ per lo stato finale. Tenendo conto anche dei pesi p_σ per lo stato di spin, l'equazione 2.19 può essere riscritta nel seguente modo:

$$\left(\frac{d^2\sigma}{d\Omega dE'} \right)_{\lambda \rightarrow \lambda'} = \frac{k'}{k} \left(\frac{m}{2\pi\hbar^2} \right)^2 \sum_{\lambda, \sigma} p_\lambda p_\sigma \sum_{\lambda', \sigma'} |\langle \mathbf{k}'\lambda'\sigma' | \widehat{U} | \mathbf{k}\lambda\sigma \rangle|^2 \times \delta(E_\lambda - E_{\lambda'} + E - E'). \quad (2.21)$$

A questo punto inseriamo nell'equazione 2.21 una funzione esplicita per il potenziale di interazione $U(\mathbf{r})$ che dipenda dalla posizione reciproca neutrone-nucleo. Il potenziale impiegato è il ben noto *pseudo-potenziale di Fermi* e, considerando un bersaglio composto da N nuclei scatteratori nel sistema di riferimento precedentemente definito, ha la seguente forma:

$$U(\mathbf{r}) = \frac{2\pi\hbar^2}{m} \sum_{i=1}^N b_i \delta(\mathbf{r} - \mathbf{R}_i) \quad (2.22)$$

dove b_i è la lunghezza di scattering dell' i -esimo nucleo. Tale potenziale, sebbene diverga per $\mathbf{r} = \mathbf{R}_i$ e dunque non utilizzabile in una trattazione basata sulla teoria delle perturbazioni, viene impiegato in quanto, quando inserito nella regola d'ora di Fermi, fornisce il risultato richiesto di scattering isotropo per un singolo nucleo fisso, ovvero riproduce correttamente quanto avviene in un processo di diffusione da sole onde s [24, 25]. Inserendo il potenziale definito nell'equazione 2.22, nell'espressione della sezione d'urto parziale (equazione 2.21) ed usando la rappresentazione integrale della δ di Dirac, si ottiene

$$\left(\frac{d^2\sigma}{d\Omega dE'} \right) = \frac{k'}{k} \frac{1}{2\pi\hbar} \sum_{i,i'} p_i \left[\sum_{\sigma} p_{\sigma} \langle \sigma | b_i^* b_i | \sigma \rangle \right] \times \quad (2.23)$$

$$\times \int_{-\infty}^{\infty} \langle \exp[-i\mathbf{K} \cdot \mathbf{R}_{i'}(0)] \exp[i\mathbf{K} \cdot \mathbf{R}_i(t)] \rangle \exp(-i\omega t) dt,$$

dove b_i sono le lunghezze di scattering variabili per isotopi diversi e per diverse configurazioni di spin.

L'equazione appena presentata descrive la sezione d'urto parziale di scattering nel caso più generale ovvero considerando uno stato del neutrone dipendente sia dal vettore d'onda che dallo spin. Nella successiva sezione riporto una semplificazione del problema considerando l'*approssimazione statica*. Sotto tale approssimazione verrà calcolata la sezione d'urto e le grandezze rilevanti per lo studio della materia condensata.

2.3.1 Approssimazione statica

Quando si parla di approssimazione statica, i neutroni incidenti e quelli diffusi presentano la stessa energia, pertanto $k = k'$ ed $\hbar\omega \ll E$. In altri termini, in un processo di scattering, l'energia dei neutroni incidenti E risulta molto maggiore dello scambio energetico $\hbar\omega$ tra i neutroni. Il termine statico deriva dal fatto che nella finestra temporale in cui si ha l'evento di scattering, ovvero, nell'intervallo di tempo in cui il neutrone percorre una distanza interatomica, la struttura del campione stesso non subisce variazioni. Di fatto, è come se si ottenesse un'istantanea della struttura locale del campione in quanto i tempi di rilassamento o l'ordine di grandezza delle vibrazioni atomiche sono dell'ordine di $t \sim 10^{-13} - 10^{-12}$ s e dunque di gran lunga superiori rispetto ai tipici tempi di un evento di scattering neutronico. A partire da tale approssimazione, è possibile ricavare la sezione d'urto differenziale, integrando in $d\omega$ l'equazione 2.23 secondo

$$\frac{d\sigma}{d\Omega} = \int_{-\infty}^{+\infty} \left(\frac{d^2\sigma}{d\Omega dE'} \right) dE' = \hbar \int_{-\infty}^{+\infty} \left(\frac{d^2\sigma}{d\Omega dE'} \right) d\omega. \quad (2.24)$$

L'integrazione in $d\omega$ su tutti i cammini γ a K costante consente di scrivere:

$$\frac{1}{2\pi} \int_{\gamma} d\omega \int \exp(-i\omega t) \langle \dots \rangle dt = \int \delta(t) \langle \dots \rangle dt \quad (2.25)$$

e considerando che il termine all'interno delle parentesi quadre, nell'equazione 2.23, può assumere due valori:

$$\sum_{\sigma} p_{\sigma} \langle \sigma | b_i^* b_i | \sigma \rangle = \langle b \rangle^2 \sum_{\sigma} p_{\sigma} = \langle b \rangle^2 \quad \text{per } i \neq i' \quad (2.26)$$

e

$$\sum_{\sigma} p_{\sigma} \langle \sigma | b_i^* b_i | \sigma \rangle = \langle b \rangle^2 \sum_{\sigma} p_{\sigma} = \langle b \rangle^2 \quad \text{per } i = i', \quad (2.27)$$

si ottiene che la sezione d'urto differenziale può essere espressa in funzione delle lunghezze medie di scattering e della media della lunghezza di scattering; vale quindi che, separando la $\sum_{i,i'}$ nei due termini definiti dalle equazioni 2.26 e 2.27 la sezione d'urto differenziale diventa:

$$\frac{d\sigma}{d\Omega} = \sum_i \langle b_i^2 \rangle + \sum_{i,i'} (1 - \delta_{i,i'}) \langle b_{i'} \rangle \langle b_i \rangle \langle \exp[-i\mathbf{K} \cdot \mathbf{R}_{i'}(0)] \exp[i\mathbf{K} \cdot \mathbf{R}_i(0)] \rangle \quad (2.28)$$

Nel caso di un sistema monoatomico l'equazione 2.28 può essere riscritta come:

$$\frac{d\sigma}{d\Omega} = N \langle b^2 \rangle + \sum_{i,i'} (1 - \delta_{i,i'}) \langle b \rangle^2 \langle \exp[-i\mathbf{K} \cdot \mathbf{R}_{i'}(0)] \exp[i\mathbf{K} \cdot \mathbf{R}_i(0)] \rangle, \quad (2.29)$$

da cui aggiungendo e sottraendo $N \langle b \rangle^2$, si ottiene

$$\frac{d\sigma}{d\Omega} = N(\langle b^2 \rangle - \langle b \rangle^2) + \langle b \rangle^2 \sum_{i,i'} (1 - \delta_{i,i'}) \langle \exp[-i\mathbf{K} \cdot \mathbf{R}_{i'}(0)] \exp[i\mathbf{K} \cdot \mathbf{R}_i(0)] \rangle. \quad (2.30)$$

A questo punto introduciamo la sezione d'urto di scattering coerente σ_{coe} ed incoerente σ_{inc} definite da

$$\sigma_{coe} = 4\pi \langle b \rangle^2, \quad (2.31)$$

e

$$\sigma_{inc} = 4\pi[\langle b^2 \rangle - \langle b \rangle^2] \quad (2.32)$$

La loro introduzione consente di riscrivere la sezione d'urto differenziale (equazione 2.30) come:

$$\frac{d\sigma}{d\Omega} = N \left[\frac{\sigma_{inc}}{4\pi} + \frac{\sigma_{coe}}{4\pi} \sum_{i,i'} (1 - \delta_{i,i'}) \langle \exp[-i\mathbf{K} \cdot \mathbf{R}_{i'}(0)] \exp[i\mathbf{K} \cdot \mathbf{R}_i(0)] \rangle \right]. \quad (2.33)$$

L'equazione 2.33 ci dice che la sezione d'urto differenziale di un processo di scattering dipende da un contributo coerente e da uno incoerente. Il primo termine descrive i fenomeni di interferenza tra le onde diffuse da nuclei differenti, o dallo stesso nucleo, in corrispondenza di istanti temporali diversi, in quanto dipende dalla correlazione tra le posizioni dello stesso nucleo in tempi differenti e dalla correlazione tra le posizioni di nuclei diversi in tempi diversi. Per tale motivo, il termine coerente contiene informazioni relative alla struttura del sistema ed alla sua dinamica collettiva. Dal punto di vista fisico, la sezione d'urto di scattering coerente rappresenta il contributo allo scattering di un sistema in cui tutte le lunghezze di scattering relative a ciascun nucleo risultano pari a $\langle b \rangle$. La sezione d'urto di scattering incoerente dipende solo dalla correlazione tra le posizioni dello stesso nucleo in tempi diversi pertanto, non fornisce alcuna informazione sugli effetti di interferenza. Dal punto di vista fisico, tale termine rappresenta la distribuzione casuale delle deviazioni delle lunghezze di scattering dal loro valor medio,

ovvero le interferenze tra le onde scatterate da uno stesso nucleo in punti diversi della sua traiettoria e fornisce quindi solo informazioni sulla dinamica di singola particella. Sulla base di tali considerazioni risulta che la sezione d'urto differenziale risulta modulata da un background costante ed il grado delle informazioni strutturali che possono essere ricavate, dipende dal rapporto $\sigma_{coe}/\sigma_{inc}$. La sezione d'urto differenziale (DCS) può ancora essere espressa come:

$$\frac{d\sigma}{d\Omega} = N \left[\frac{\sigma_{inc}}{4\pi} + \frac{\sigma_{coe}}{4\pi} S(\mathbf{K}) \right], \quad (2.34)$$

dove $S(\mathbf{K})$ rappresenta il fattore di struttura statico (SSF) del campione ed è definito come:

$$S(\mathbf{K}) = \frac{1}{N} \sum_{i,i'} \langle \exp[-i\mathbf{K} \cdot (\mathbf{R}_{i'}(0) - \mathbf{R}_i(0))] \rangle. \quad (2.35)$$

Quando $i = i'$ $S(\mathbf{K}) = 1$ ed $S(0) = N$ pertanto è possibile scrivere l'equazione 2.35 nella seguente forma:

$$S(\mathbf{K}) = 1 + \frac{1}{N} \sum_{i \neq i'} \langle \exp[-i\mathbf{K} \cdot (\mathbf{R}_{i'}(0) - \mathbf{R}_i(0))] \rangle - N\delta(\mathbf{K}) \quad (2.36)$$

dove l'ultimo termine rappresenta lo scattering in avanti. In sintesi, nel paragrafo appena descritto, è stata proposta una rappresentazione della sezione d'urto differenziale di scattering in termini dei parametri fisici rilevanti per la descrizione di un sistema di scattering. Nel paragrafo successivo, verranno proposti dei passaggi matematici che servono a legare l'espressione della sezione d'urto di scattering alle proprietà strutturali del sistema-bersaglio.

2.4 Funzioni di correlazione

Nel seguente paragrafo viene proposta sinteticamente, la formulazione di Van Hove [26] che mette in relazione le sezioni d'urto di scattering dei neutroni con le proprietà strutturali del sistema oggetto di studio. Le quantità che esprimono le proprietà strutturali sono delle funzioni di correlazione e rappresentano delle medie termiche di operatori che

descrivono il sistema. Introduciamo inizialmente, *la funzione intermedia di scattering* (ISF) ed indichiamola con $I(\mathbf{K}, t)$

$$I(\mathbf{K}, t) = \frac{1}{N} \sum_{i, i'} \langle \exp -i\mathbf{K} \cdot [\mathbf{R}_{i'}(0) - \mathbf{R}_i(t)] \rangle, \quad (2.37)$$

dove N è il numero di nuclei scatteratori appartenenti al bersaglio, \mathbf{K} è il vettore d'onda scambiato e t il tempo. La sua trasformata di Fourier $G(\mathbf{r}, t)$

$$G(\mathbf{r}, t) = \frac{1}{(2\pi)^3} \int_{-\infty}^{+\infty} I(\mathbf{K}, t) \exp [-i\mathbf{K} \cdot \mathbf{r}] d\mathbf{K}, \quad (2.38)$$

è nota come la funzione di correlazione di coppia dipendente dal tempo o funzione di *Van Hove*. Indichiamo con $S(\mathbf{K}, \omega)$ la trasformata di Fourier temporale della $I(\mathbf{K}, t)$ ovvero

$$S(\mathbf{K}, \omega) = \frac{1}{(2\pi\hbar)} \int_{-\infty}^{+\infty} I(\mathbf{K}, t) \exp -(i\omega t) dt. \quad (2.39)$$

La funzione $S(\mathbf{K}, \omega)$ nota come *Funzione di Scattering* del sistema, può essere espressa in funzione della $G(\mathbf{r}, t)$ considerando le anti-trasformate di Fourier, si ottiene infatti che

$$I(\mathbf{K}, t) = \int_{-\infty}^{+\infty} G(\mathbf{r}, t) \exp (i\mathbf{K} \cdot \mathbf{r}) d\mathbf{r} \quad (2.40)$$

e che

$$I(\mathbf{K}, t) = \hbar \int_{-\infty}^{+\infty} S(\mathbf{K}, \omega) \exp i\omega t d\omega. \quad (2.41)$$

Sostituendo la 2.41 nell'espressione della $G(\mathbf{r}, t)$ (2.38) e della $S(\mathbf{K}, \omega)$ (2.39) si ottengono le seguenti relazioni:

$$G(\mathbf{r}, t) = \frac{\hbar}{(2\pi)^3} \int_{-\infty}^{+\infty} S(\mathbf{K}, \omega) \exp [-i(\mathbf{K} \cdot \mathbf{r} - \omega t)] d\mathbf{K} d\omega; \quad (2.42)$$

$$S(\mathbf{K}, \omega) = \frac{1}{2\pi\hbar} \int_{-\infty}^{+\infty} G(\mathbf{r}, t) \exp [i(\mathbf{K} \cdot \mathbf{r} - \omega t)] d\mathbf{r} dt. \quad (2.43)$$

Consideriamo a questo punto un contributo *self* della funzione di scattering intermedia e sia $I_s(\mathbf{K}, t)$; esso rappresenta solo il contributo allo scattering dovuto allo stesso nucleo in corrispondenza di tempi diversi ed è definito come

$$I_s(\mathbf{K}, t) = \frac{1}{N} \sum_i \langle \exp[-i\mathbf{K} \cdot \mathbf{R}_i(0)] \exp[i\mathbf{K} \cdot \mathbf{R}_i(t)] \rangle. \quad (2.44)$$

Analogamente definiamo la funzione di correlazione di coppia *self*

$$G_s(\mathbf{r}, t) = \frac{1}{(2\pi)^3} \int_{-\infty}^{+\infty} I_s(\mathbf{K}, t) \exp[-i(\mathbf{K} \cdot \mathbf{r})] d\mathbf{K} \quad (2.45)$$

ed il fattore di struttura incoerente

$$S_i(\mathbf{K}, \omega) = \frac{1}{2\pi\hbar} \int_{-\infty}^{+\infty} I_s(\mathbf{K}, t) \exp[(-i\omega t)] dt. \quad (2.46)$$

La sezione d'urto doppio differenziale riportata nell'equazione 2.23 e, semplificata attraverso le equazioni 2.31 ed 2.32, consente di identificare due contributi dal significato fisico differente, per la sezione d'urto doppio differenziale ovvero:

$$\left(\frac{d^2\sigma}{d\Omega dE'} \right)_{coe} = \frac{\sigma_{coe}}{4\pi} \frac{k'}{k} \frac{1}{2\pi\hbar} \sum_{i,i'} p_i \int_{-\infty}^{+\infty} \langle \exp[-i\mathbf{K} \cdot \mathbf{R}_{i'}(0)] \exp[i\mathbf{K} \cdot \mathbf{R}_i(t)] \rangle \times \quad (2.47)$$

$$\times \exp(-i\omega t) dt$$

ed il termine

$$\left(\frac{d^2\sigma}{d\Omega dE'} \right)_{inc} = \frac{\sigma_{inc}}{4\pi} \frac{k'}{k} N S_i(\mathbf{K}, \omega) \quad (2.48)$$

Le equazioni 2.47, 2.48 spiegano in breve, il significato fisico della sezione d'urto doppio differenziale misurata sperimentalmente, in termini di caratteristiche statiche e la dinamiche di un sistema oggetto di studio. Combinando le equazioni 2.37, 2.38, 2.44, 2.45 è possibile ottenere delle espressioni formali per $G(\mathbf{r}, t)$ e $G_s(\mathbf{r}, t)$ ovvero:

$$G(\mathbf{r}, t) = \frac{1}{N} \sum_{i, i'} \int_{-\infty}^{+\infty} \langle \delta[\mathbf{r}' - \mathbf{R}_{i'}(0)] \delta[\mathbf{r}' + \mathbf{r} - \mathbf{R}_i(t)] \rangle d\mathbf{r}' \quad (2.49)$$

$$G_s(\mathbf{r}, t) = \frac{1}{N} \sum_i \int_{-\infty}^{+\infty} \langle \delta[\mathbf{r}' - \mathbf{R}_i(0)] \delta[\mathbf{r}' + \mathbf{r} - \mathbf{R}_i(t)] \rangle d\mathbf{r}' \quad (2.50)$$

Nell'ipotesi in cui tutti i nuclei siano equivalenti, è possibile omettere un indice moltiplicando la $G(\mathbf{r}, t)$ per N . Nell'istante $t = 0$ i termini $\mathbf{R}_{i'}(0) = \mathbf{R}_{i'}$ e $\mathbf{R}_i(0) = \mathbf{R}_i$ commutano pertanto si ottiene che, nel caso di un liquido

$$G(\mathbf{r}, 0) = \sum_i \langle \delta(\mathbf{r} - \mathbf{R}_i + \mathbf{R}_0) \rangle = \delta(\mathbf{r}) + \rho g(\mathbf{r}) \quad (2.51)$$

e

$$G_s(\mathbf{r}, 0) = \delta(\mathbf{r}). \quad (2.52)$$

Nell'espressione 2.51, ρ rappresenta la densità ovvero il numero di particelle per unità di volume, uniforme nel caso di un liquido, $g(\mathbf{r})$ rappresenta la funzione di distribuzione statica di coppia del campione; essa fornisce la densità media delle particelle intorno ad una posta nell'origine ed è la funzione su cui si focalizzerà principalmente l'attenzione per lo studio delle proprietà statiche di un sistema disordinato. Nel caso di un liquido, la $g(\mathbf{r})$ dipende solo da $|\mathbf{r}|$ e può essere messa in relazione con il fattore di struttura statico del sistema considerando che, esso è definito come il momento dell'energia di ordine zero del fattore di struttura $S(\mathbf{K}, \omega)$

$$S_0(\mathbf{K}) = S(\mathbf{K}) = \int_{-\infty}^{+\infty} S(\mathbf{K}, \omega) d(\hbar\omega). \quad (2.53)$$

Combinando le equazioni 2.36 ed 2.51 e sottraendo il contributo allo scattering in avanti dalla 2.36, si ottiene l'equazione che lega il fattore di struttura statico alla funzione di distribuzione statica di coppia $g(r)$

$$S(\mathbf{K}) = 1 + \rho \int_{-\infty}^{+\infty} [g(r) - 1] \exp(i\mathbf{K} \cdot \mathbf{r}) d(\mathbf{r}). \quad (2.54)$$

Per grandi valori del momento scambiato K tali che $Ka \gg 1$ dove a indica la distanza atomica media, la $S(K) \rightarrow S(\infty) \rightarrow 1$ mentre nel limite in cui $K \rightarrow 0$, il fattore di struttura statico è legato alle fluttuazioni di densità del liquido e dunque alla compressibilità isoterma χ_T e quindi

$$S(0) = \frac{\langle (\Delta n)^2 \rangle}{\langle n \rangle} = \rho \chi_T k_B T. \quad (2.55)$$

Nell'espressione 2.55, $\langle n \rangle = \rho \langle V \rangle$ rappresenta il numero medio di nuclei in un volume V mentre, $\Delta n = n - \langle n \rangle$ la dispersione intorno a questo valore. Si può osservare che per un gas perfetto $S(0) = 1$ mentre per un liquido $S(0) \ll 1$. In generale la forma della $S(K)$ per valori di K compresi tra 0 al primo massimo, è influenzata dalla parte attrattiva del potenziale di interazione e dalle interazioni a molti-corpi. L'intensità di scattering per $K \rightarrow 0$ dipende dalla compressibilità ed essendo molto piccolo nel caso dei liquidi, risulta di difficile determinazione. Per grandi valori di K , la $S(K)$ dipende solo dalle interazioni repulsive a corto raggio in particolare l'ampiezza delle oscillazioni è legata alla ripidità del potenziale mentre il periodo dipende dalla distanza σ in cui il potenziale d'interazione tende ad annullarsi. Le diverse derivazioni ottenute per il fattore di struttura statico del sistema permettono di riscrivere la sezione d'urto differenziale per un sistema isotropo

$$\frac{d\sigma}{d\Omega} = N \frac{\sigma_{sc}}{4\pi} + \frac{\sigma_{coe}}{4\pi} \rho \int_{-\infty}^{+\infty} \exp(i\mathbf{K} \cdot \mathbf{r}) [g(r) - 1] d^3r, \quad (2.56)$$

dove $g(r)$ rappresenta la funzione di distribuzione radiale di coppia ottenuta mediando su un volume sferico compreso tra r ed $r + dr$, ρ rappresenta la densità del sistema e $\sigma_{sc} = \sigma_{inc} + \sigma_{coe}$.

2.5 Il caso di un sistema a molte componenti

Finora abbiamo derivato la teoria dello scattering neutronico nel caso di un fluido monoatomico; sotto tale condizione tutti i centri diffusori sono caratterizzati dalla stessa lunghezza di scattering. Nel seguente paragrafo riporto il caso più generale di un fluido formato da un numero pari a ν di differenti specie atomiche, ciascuna delle quali possiede un diverso valore della lunghezza di scattering (b). L'espressione generalizzata della

sezione d'urto differenziale incoerente e coerente, che tenga conto delle differenti specie atomiche diventa

$$\left(\frac{d\sigma}{d\Omega}\right)_{inc} = \sum_{\gamma=1}^{\nu} \sum_{i=1}^{N_{\nu}} (\langle b_{\gamma}^2 \rangle - \langle b_{\gamma} \rangle^2) = N \sum_{\gamma=1}^{\nu} x_{\gamma} (\langle b_{\gamma}^2 \rangle - \langle b_{\gamma} \rangle^2), \quad (2.57)$$

$$\begin{aligned} \left(\frac{d\sigma}{d\Omega}\right)_{coe} &= \sum_{\gamma=1}^{\nu} \sum_{i=1}^{N_{\nu}} \sum_{\eta=1}^{\nu} \sum_{j=1}^{N_{\eta}} (\langle b_{\gamma} \rangle \langle b_{\eta} \rangle) \langle \exp [i\mathbf{K} \cdot (\mathbf{r}_{i\gamma} - \mathbf{r}_{j\eta})] \rangle = \\ &= \sum_{\gamma\eta} \langle b_{\gamma} \rangle \langle b_{\eta} \rangle \left\langle \sum_{i,j} \exp [i\mathbf{K} \cdot (\mathbf{r}_{i\gamma} - \mathbf{r}_{j\eta})] \right\rangle. \end{aligned} \quad (2.58)$$

Nelle espressioni 2.57, 2.58 x_{γ} rappresenta la concentrazione della specie γ . Per un liquido a molte componenti, è possibile scrivere una funzione di correlazione radiale $g(r)$ come combinazione lineare di funzioni di correlazione sito-sito parziali tra atomi di specie diversa o della stessa specie

$$g(r) = \sum_{\gamma\eta} \langle b_{\gamma} \rangle \langle b_{\eta} \rangle g_{\gamma\eta}(r). \quad (2.59)$$

Allo stesso modo, il fattore di struttura statico totale può essere espresso come somma di fattori di struttura parziali

$$S_{\gamma\eta}(\mathbf{K}) = \frac{1}{N^2} \sum_{i,j} \langle \exp [i\mathbf{K} \cdot (\mathbf{r}_{i\gamma} - \mathbf{r}_{j\eta})] \rangle \quad (2.60)$$

come

$$S(\mathbf{K}) = \sum_{\gamma,\eta} x_{\gamma} x_{\eta} \langle b_{\gamma} \rangle \langle b_{\eta} \rangle S_{\gamma\eta}(\mathbf{K}), \quad (2.61)$$

La sezione d'urto coerente generalizzata al caso di un sistema a molte componenti, in funzione dei fattori di struttura parziali (2.60) diventa

$$\left(\frac{d\sigma}{d\Omega}\right)_{coe} = N \sum_{\gamma\eta} x_{\gamma} x_{\eta} \langle b_{\gamma} \rangle \langle b_{\eta} \rangle S_{\gamma\eta}(\mathbf{K}) = NS(\mathbf{K}). \quad (2.62)$$

Il fattore di struttura statico e la sezione d'urto differenziale generalizzati al caso di un sistema multi-atomico e definito nell'equazione 2.61, possono essere espressi come somma di contributi parziali di fattori di struttura statici, pesati per la concentrazione della specie atomica e per le relative lunghezze di scattering. La sezione d'urto differenziale ottenuta in un esperimento di diffrazione neutronica, contiene in sintesi tutte le informazioni strutturali relative a tutte le possibili coppie di atomi presenti nel sistema. La complessità dell'espressione della sezione d'urto sperimentale fa capire quanto sia praticamente impossibile estrapolare informazioni strutturali per un sistema caratterizzato da un gran numero di gradi di libertà, utilizzando solo i dati provenienti da un singolo esperimento di diffrazione neutronica. Per questo motivo, negli ultimi anni, è stato introdotto il metodo della sostituzione isotopica [27, 28]; il vantaggio della sua applicazione consiste nella possibilità di aumentare il numero di parametri che descrivono lo stesso sistema fisico, consentendo in tal modo la risoluzione del complesso problema di estrazione delle informazioni strutturali, nel caso di un sistema formato da atomi diversi.

2.6 La sostituzione isotopica

La sostituzione di atomi all'interno di un sistema da analizzare, con i relativi isotopi, comporta delle variazioni nella sezione d'urto sperimentale lasciando inalterate le proprietà fisiche del campione. Questo è il principio su cui si basa la sostituzione isotopica e, nel corso di questa tesi, farò principalmente riferimento alla sostituzione isotopica di atomi di idrogeno con quelli di deuterio (sostituzione H/D) in quanto, i sistemi di cui mi sono occupata sono essenzialmente delle soluzioni acquose e dunque, ad elevato contenuto di idrogeno. La sostituzione degli atomi di idrogeno con quelli di deuterio in un sistema formato da idrogeno, consente di ottenere grandi differenze nelle sezioni d'urto sperimentali. Tali differenze hanno origine dal diverso valore della lunghezza di scattering per il deuterio (6.67 fm) e per l'idrogeno (-3.74 fm). La tecnica può essere applicata a tutti i sistemi in cui gli atomi ed i relativi isotopi presentino differenti lunghezze di scattering purchè valga l'ipotesi secondo cui qualsiasi sostituzione isotopica all'interno di una molecola, non ne alteri le proprietà strutturali. In tal modo, i fattori di struttura parziali descritti nell'equazione 2.60 restano invariati, mentre cambia il peso con cui vengono sommati per ottenere il fattore di struttura totale. Ricordiamo che il fattore di struttura totale $S(\mathbf{K})$ può essere espresso in termini dei fattori di struttura parziali

$$S(\mathbf{K}) = \sum_{\alpha\beta\geq\alpha} (2 - \delta_{\alpha\beta}) c_{\alpha} c_{\beta} b_{\alpha} b_{\beta} (S_{\alpha\beta}(\mathbf{K}) - 1), \quad (2.63)$$

dove c_{α} , c_{β} indicano le frazioni atomiche e b_{α} , b_{β} le lunghezze di scattering coerente degli isotopi α e β . \mathbf{K} indica la variazione del vettore d'onda per effetto dello scattering dei neutroni e vale che $K = 4\pi \sin\theta/\lambda$, dove θ rappresenta l'angolo di scattering e λ la lunghezza d'onda della radiazione diffusa. Per risolvere esattamente gli N fattori di struttura parziali dove con N viene indicato il numero di coppie, occorrerebbe misurare la sezione d'urto di N campioni isotopicamente sostituiti. In tal modo si avrebbero N equazioni ed N incognite ed il sistema 2.63 potrebbe essere facilmente risolto. Il problema è che spesso, il numero delle coppie è troppo elevato (ricordiamo infatti che per un sistema formato da ν specie atomiche differenti, il numero di coppie $N = \nu(\nu+1)/2$ e dunque per un sistema formato da un grande numero di atomi, il numero di sostituzioni isotopiche richiesto per risolvere completamente la 2.63 e dunque per ricostruire tutti i fattori di struttura parziali risulterebbe incompatibile con i tempi tecnici e con la fattibilità di un esperimento. Tuttavia, come nel caso degli esperimenti di cui parlerò in seguito, sebbene le sostituzioni isotopiche effettuate non consentano di risolvere esattamente il sistema, comunque esse sono dei vincoli forti per le fasi successive di analisi, quali le simulazioni al computer. Sia $X = O, X_1, X_2, \dots$ ciascun elemento non sostituito isotopicamente, si può esprimere il fattore di struttura $S_{XX}(\mathbf{K})$ come combinazione lineare di tutti i fattori di struttura, relativi alle possibili coppie di atomi non sostituiti $S_{OO}(\mathbf{K})$, $S_{OX_1}(\mathbf{K})$, $S_{OX_2}(\mathbf{K})$ etc., ciascuno pesato con le concentrazioni c_i e le lunghezze di scattering $\langle b_i \rangle$ delle singole specie. In modo analogo è possibile definire $S_{XH}(\mathbf{K})$ come combinazione lineare di $S_{OH}(\mathbf{K})$, $S_{X_1H}(\mathbf{K})$, $S_{X_2H}(\mathbf{K})$ etc., mentre $S_{HH}(\mathbf{K})$ è il fattore di struttura parziale idrogeno-idrogeno dell'acqua. Secondo queste assunzioni, i fattori di struttura misurati per i tre campioni di acqua leggera, acqua deuterata ed una miscela costituita in parte da acqua leggera (sia c_H la frazione di acqua leggera) e per il resto da acqua deuterata ($c_D = 1 - c_H$), possono essere scritti come:

$$\begin{cases} S_{H_2O-X_i}(\mathbf{K}) = c_H^2 \langle b_H \rangle^2 S_{HH}(\mathbf{K}) + c_X^2 \langle b_X \rangle^2 S_{XX}(\mathbf{K}) + 2c_H c_X \langle b_H \rangle \langle b_X \rangle S_{XH}(\mathbf{K}) \\ S_{D_2O-X_i}(\mathbf{K}) = c_D^2 \langle b_D \rangle^2 S_{HH}(\mathbf{K}) + c_X^2 \langle b_X \rangle^2 S_{XX}(\mathbf{K}) + 2c_D c_X \langle b_D \rangle \langle b_X \rangle S_{XH}(\mathbf{K}) \\ S_{HDO-X_i}(\mathbf{K}) = \langle b_{HD} \rangle^2 S_{HH}(\mathbf{K}) + c_X^2 \langle b_X \rangle^2 S_{XX}(\mathbf{K}) + 2c_X \langle b_{HD} \rangle \langle b_X \rangle S_{XH}(\mathbf{K}), \end{cases} \quad (2.64)$$

dove $\langle b_{HD} \rangle = c_H \langle b_H \rangle + (1 - c_H) \langle b_D \rangle = c_H \langle b_H \rangle + c_D \langle b_D \rangle$. Le equazioni così scritte, tengono conto dell'ipotesi su cui si basa la sostituzione isotopica e quindi che $S_{DD}(\mathbf{K}) = S_{HH}(\mathbf{K})$, $S_{DX}(\mathbf{K}) = S_{HX}(\mathbf{K})$.

Scegliendo opportunamente la percentuale di idrogeno, è possibile realizzare una miscela “nulla” ovvero una miscela la cui lunghezza di scattering $\langle b_{HD} \rangle = 0$. Dal momento che $\langle b_H \rangle = -3.74$ fm e $\langle b_D \rangle = 6.67$ fm, la percentuale di idrogeno per ottenere la miscela nulla è pari al 64%. È dunque evidente che per campioni idrogenati, la sostituzione isotopica risulta particolarmente efficace in quanto i valori di $\langle b_H \rangle$ e $\langle b_D \rangle$ risultano non solo diversi in modulo, ma anche opposti in segno.

2.7 L'apparato sperimentale

2.7.1 La sorgente di neutroni

La produzione di foto-neutroni a partire da elettroni, la fissione e la spallazione sono i tre principali meccanismi su cui si basano le sorgenti neutroniche. Nel primo caso i neutroni derivano dalla diseccitazione di nuclei pesanti che hanno interagito con la radiazione di *bremstrahlung* emessa da elettroni ad alta energia; in seguito a tale interazione i neutroni prodotti vengono decelerati a causa dell'interazione con il campo elettromagnetico dei nuclei. I fasci di neutroni le cui intensità si prestano ad un esperimento di *scattering*, vengono attualmente prodotti dai reattori nucleari o da sorgenti pulsate. In un reattore, i neutroni vengono prodotti per mezzo di reazioni di fissione dei nuclei dell'Uranio; nelle sorgenti a spallazione invece, le particelle subatomiche (ad esempio protoni) accelerate tramite acceleratori, colpiscono un bersaglio di metallo pesante; ne consegue che i neutroni vengono espulsi dal nucleo del bersaglio. La sorgente pulsata ISIS presso cui sono state realizzate le misure analizzate per questa tesi, è un esempio di sorgente a spallazione. In essa un fascio di ioni H^- incidente viene prodotto da idrogeno gassoso ed accelerato tramite un LINAC (raggiungendo energie pari a 70 MeV). Il passaggio degli ioni attraverso una lamina di alluminio comporta l'estrazione degli elettroni e dunque la produzione di protoni; tali protoni vengono dunque convogliati verso un sincrotrone

dal diametro di 52 m dove vengono accelerati fino a raggiungere energie pari ad 800 MeV ed una frequenza pari a 50 Hz per essere poi convogliati verso il bersaglio di un metallo pesante ad esempio nel caso di ISIS, verso il tantalio. L'urto tra i protoni ed il tantalio comporta un' eccitazione dei nuclei stessi di tantalio, a cui segue un processo di diseccitazione. Quest'ultimo avviene in due fasi: una prima definita "cascata" in cui vengono emessi neutroni ad alta energia e una fase successiva prevede un processo di evaporazione e la formazione di altre particelle quali neutrini, pioni, protoni e neutroni di energia minore.

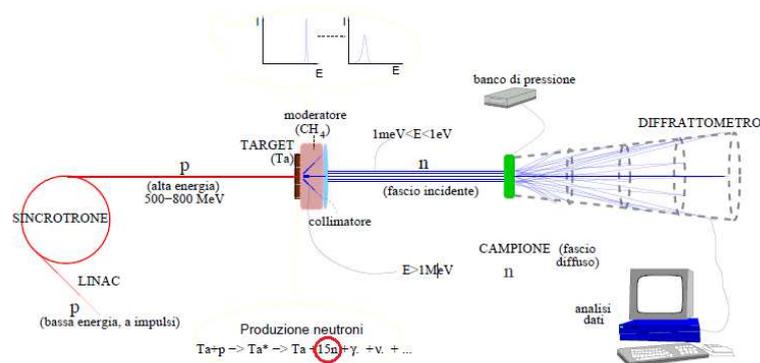


Figura 2.3 – Schema di produzione di neutroni tramite una sorgente a spallazione

Le energie dei neutroni prodotti tramite la spallazione, sono dell'ordine dei MeV e quindi troppo elevate ai fini dello studio della struttura nella materia condensata. Le energie che vengono utilizzate per lo studio della struttura nella materia condensata sono infatti, tali che la lunghezza d'onda λ sia confrontabile con le distanze interatomiche ($\sim 1\text{\AA}$). A tal proposito, si rende necessario un processo di moderazione in cui i neutroni vengono rallentati e portati ad energie dell'ordine dei meV. Il processo di moderazione permette di ottenere neutroni termici ed avviene per mezzo di acqua o di altri materiali contenenti idrogeno. La presenza dell'idrogeno nei moderatori garantisce infatti la perdita di energia dei neutroni nelle collisioni anelastiche con i nuclei stessi dell'idrogeno. La scelta del moderatore dipende essenzialmente dal tipo di sorgente neutronica e dallo spettrometro utilizzato. Ad ISIS ad esempio, sono installati tre moderatori ad idrogeno ($T=20\text{ K}$), a metano ($T=100\text{ K}$) e ad acqua liquida ($T=316\text{ K}$). In Figura 2.4 viene riportato un confronto tra il flusso di neutroni ottenuto tramite una sorgente pulsata e quello emesso da un reattore. Dal confronto si osserva che, nel primo caso, la distribuzione energetica si estende per vari ordini di grandezza al contrario di quanto accade nel caso di un

reattore. Le caratteristiche del moderatore, in particolare il suo spessore ΔS e la densità di nuclei leggeri al suo interno, devono essere scelte come giusto equilibrio tra la necessità di rallentare i neutroni del fascio e quella di dover evitare il problema del "frame overlap" ovvero della sovrapposizione degli impulsi, conseguenza dell'allargamento temporale degli impulsi. Supponendo che tutti i neutroni arrivino contemporaneamente al moderatore, essi ne escono comunque con un certo ritardo. Nella regione epitermica, l'allargamento temporale degli impulsi è una funzione lineare di λ [29] secondo

$$\Delta t(\lambda) = \frac{\lambda m \Delta S}{h}. \quad (2.65)$$

dove m è la massa del neutrone ed h costante di Planck. Questa relazione consente di valutare lo spessore massimo di un moderatore, generalmente dell'ordine di qualche decina di millimetri [24]. Il fascio di neutroni emesso dal moderatore presso ISIS, distribuisce impulsi di durata inferiore ad $1\mu s$, contenenti ciascuno $3 \cdot 10^{16}$ neutroni, su 18 apparati strumentali tra cui SANDALS, il diffrattometro per liquidi ed amorfi presso cui ho realizzato gli esperimenti nel corso del mio dottorato. Il fascio viene focalizzato sulla posizione di ciascun campione per mezzo di 18 collimatori; la presenza di una giusta collimazione garantisce un'adeguata risoluzione angolare mentre la presenza di un'adeguata larghezza del fascio permette di ottenere una statistica significativa. Lungo tutta una linea di neutroni ed in particolare vicino ai moderatori, sono presenti dei riflettori, fatti da materiali come il berillio, che consentono di scatterare indietro i neutroni che deviano dalla direzione del fascio. In tal modo vengono rimandati indietro anche i neutroni veloci che non sono stati termalizzati.

Ogni protone di alta energia produce, in seguito all'urto con il bersaglio, 15 neutroni [30]. Una sorgente a spallazione presenta diversi vantaggi rispetto ad altre sorgenti, basti pensare ad esempio che il calore dissipato nel processo di produzione è di circa 55 MeV. In un reattore invece l'energia dissipata per un singolo processo di fissione è pari a 180 MeV; in aggiunta la potenza media dissipata in una sorgente a spallazione è di circa 160 kW contro le decine di MW dei reattori nucleari. Oltre ad avere un buon rapporto costo-prestazione, le sorgenti a spallazione producono un flusso di energia molto più esteso rispetto alle sorgenti a reattore. La disponibilità delle sorgenti pulsate ha permesso di sviluppare al meglio le tecniche sperimentali basate sul tempo di volo, ovvero quelle tecniche in cui è possibile determinare l'energia di un neutrone prima e dopo un evento

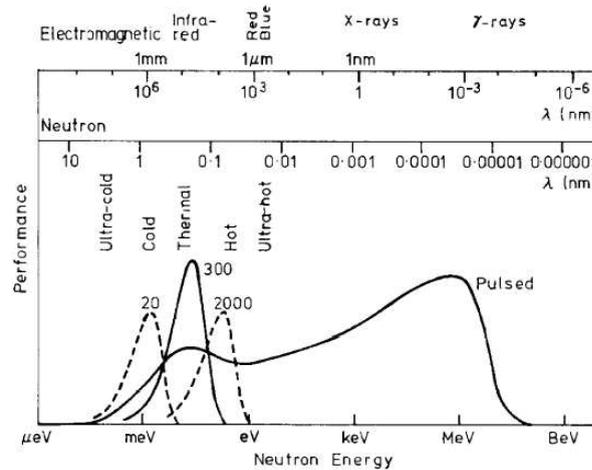


Figura 2.4 – Confronto tra lo spettro energetico dei neutroni con quello elettromagnetico. L'andamento del flusso di neutroni emesso da una sorgente pulsata in funzione dell'energia si estende per vari ordini di grandezza, al contrario di quanto accade per lo spettro emesso da un reattore (curva "300" indica il flusso uscente da un moderatore a 300 K). Dalla figura (curva "20", "2000") si osserva che è possibile spostare il centro della distribuzione in energia dei neutroni emessi da un reattore, variando la temperatura del moderatore.

di scattering, sfruttando semplicemente le relazioni cinematiche tra il tempo di volo del neutrone entro una certa distanza (nota) L e la sua velocità v . L'equazione del tempo di volo può essere espressa come

$$\lambda = \frac{h}{mv} = \frac{ht}{mL}. \quad (2.66)$$

dove h è la costante di Planck ed m la massa del neutrone. Tale relazione consente di analizzare le singole lunghezze d'onda presenti nello spettro emesso da una sorgente pulsata attraverso una misura dei tempi impiegati dai neutroni a differenti energie per percorrere la stessa distanza, evitando in tal modo l'impiego dei monocromatori che comportano generalmente una perdita del 95% di neutroni prodotti. In aggiunta, la misura con la tecnica del tempo di volo consente di analizzare un ampio intervallo di momenti trasferiti utilizzando un solo rivelatore per ogni angolo di diffrazione.

2.7.2 Moderazione e *Letargia*

Nel processo di rallentamento dei neutroni per mezzo dell'idrogeno, il numero di collisioni per secondo e per unità di volume del materiale (ovvero la "densità di collisione") cresce al diminuire dell'energia dei neutroni; basti pensare che neutroni da 1eV hanno un *rate* di collisione di circa 10^6 volte più grande rispetto ai neutroni da 1 MeV. A tal proposito,

viene introdotta un'altra grandezza in sostituzione all'energia, la letargia, che consente di descrivere la densità di collisione dei neutroni. Supponiamo di avere un sistema di neutroni con energia massima E_{max} e di volerli rallentare fino ad una certa energia E , si definisce *letargia* la grandezza

$$u = \left\langle \ln \frac{E_{max}}{E} \right\rangle_{d\Omega} \quad (2.67)$$

ovvero il logaritmo naturale del rapporto tra l'energia massima e quella finale che ci si propone di raggiungere attraverso il rallentamento; la scelta dell'energia massima E_{max} dei neutroni presenti nel sistema serve per garantire che tale grandezza risulti sempre positiva. Il passaggio dalla variabile *energia* alla *letargia* avviene a partire dall'equazione 2.67

$$du = -\frac{dE}{E} \quad (2.68)$$

ed ha il vantaggio che, nel caso di rallentamento da parte dell'idrogeno, la densità di collisione è costante per unità di letargia. La diminuzione di energia prodotta in un urto elastico diventa a questo punto una variazione (aumento) di letargia prodotta da un urto prendendo come riferimento l'energia E prima dell'urto ed E' dopo l'urto ovvero:

$$\Delta u = \ln \frac{E_{max}}{E'} - \ln \frac{E_{max}}{E} = \ln \frac{E}{E'} \quad (2.69)$$

L'incremento medio di letargia ξ viene calcolato considerando la probabilità $p(E \rightarrow E')$ dE che il neutrone venga scatterato da E ad E' ed è pari a:

$$\langle \Delta u \rangle = \xi = \left\langle \ln \frac{E}{E'} \right\rangle = \int_{\alpha E}^E \ln \left(\frac{E}{E'} \right) p(E \rightarrow E') dE' = 1 + \frac{\alpha}{(1-\alpha)} \ln \alpha = 1 + \frac{(A-1)^2}{2A} \ln \frac{A-1}{A+1} \quad (2.70)$$

dove $\alpha = \left(\frac{A-1}{A+1}\right)^2$ con A numero di massa. Inoltre a partire dall'equazione è possibile calcolare l'energia media con cui emerge un neutrone dopo una collisione in quanto

$$\xi = \left\langle \ln \frac{E}{E'} \right\rangle = \ln E - \langle \ln E' \rangle \approx \ln E - \ln \langle E' \rangle \quad (2.71)$$

e l'energia media con cui emerge un neutrone dopo una collisione risulta pari a

$$\langle E' \rangle = E \exp(-\xi) \quad (2.72)$$

e dopo n collisioni risulta pari a

$$\langle E \rangle = E_0 \exp(-n\xi) \quad (2.73)$$

A partire dall'equazione 2.73 è possibile calcolare il numero medio di urti affinché l'energia del neutrone passi da E ad E' ovvero

$$\langle n \rangle = \frac{\ln E/E'}{\xi} \quad (2.74)$$

ed il numero medio di collisioni necessario affinché i neutroni raggiungano un'energia pari ad E' , è distribuito, intorno ad $\langle n \rangle$, in modo gaussiano per grandi valori di n secondo la relazione

$$p(E')dE' \approx \exp\left(\frac{-6(u - n\xi)^2}{4n\xi^2}\right)dE' \quad (2.75)$$

dove $p(E')dE'$ indica la probabilità di trovare un neutrone dopo lo scattering con energia compresa tra E' ed $E' + dE'$. La diffusione con i materiali idrogenati, comporta una variazione di letargia $\xi = \left\langle \ln \frac{E}{E'} \right\rangle_{d\Omega} = 1 + \frac{(A-1)^2}{2A} \ln \frac{A-1}{A+1}$ per ciascuna collisione, ad un angolo di scattering ϑ . La letargia dipende da E ovvero dall'energia di riferimento generalmente pari a 10MeV, da E ovvero l'energia posseduta dal neutrone e dal numero di massa A . Nel processo di rallentamento, la letargia tende ad aumentare ed in particolare essendo $E' = E \exp(-\xi)$, il picco della distribuzione energetica si sposta verso energie più basse.

2.8 Il diffrattometro SANDALS

Il diffrattometro SANDALS (Small Angles Diffractometer for Amorphous and Liquid Samples) ad ISIS, è un diffrattometro a tempo di volo impiegato principalmente per lo studio di liquidi ed amorfi. Il vantaggio di SANDALS nello studio dei liquidi risiede non solo nella possibilità di misurare il fattore di struttura statico $S(\mathbf{K})$ in un ampio intervallo del momento scambiato ($0.05 < K < 50 \text{ \AA}^{-1}$) ma anche e soprattutto nella presenza di un gran numero di rivelatori a piccolo angolo che consentono di limitare il problema dello scattering anelastico, causato dalla presenza di atomi leggeri quali l'idrogeno ed il deuterio. Il diffrattometro è formato da un gran numero di detector (circa 660 suddivisi in 18 banchi); ciascun rivelatore appartenente ad un banco è posto ad un certo angolo di rivelazione θ compreso nell'intervallo $3.8^\circ < \theta < 39^\circ$. La sua geometria è quindi ottimale per quanto riguarda la minimizzazione dei contributi anelastici. In Figura 2.5 viene riportato uno schema del diffrattometro SANDALS: i neutroni provenienti dal moderatore a metano vengono collimati e dunque convogliati verso il campione, attraverso un tubo di collimazione composto da materiale assorbente (acciaio e B_4C). La cella portacampione è collocata in una "camicia" in cui viene realizzata una condizione di vuoto ($\sim 10^{-5}$ mbar) allo scopo di ridurre il background causato dalla diffusione dei neutroni da parte dell'aria. L'intensità del fascio incidente e trasmesso vengono rilevate per mezzo di due monitor collocati subito prima e subito dopo il campione. Tali informazioni sono di fondamentale importanza nel corso dell'analisi dati, come vedremo in seguito. I neutroni scatterati dal campione vengono infine raccolti dai rivelatori di solfuro di zinco disposti intorno alla direzione del fascio in modo tale da determinare differenti angoli di diffusione. Come anticipato precedentemente, il diffrattometro SANDALS sfrutta il tempo di volo nel senso che l'intensità dei neutroni diffratti viene misurata in funzione del tempo di volo t senza che venga realizzata alcuna analisi in energia. In tal modo l'angolo di scattering 2θ che determina il vettore d'onda scambiato nel processo di scattering, resta fisso.

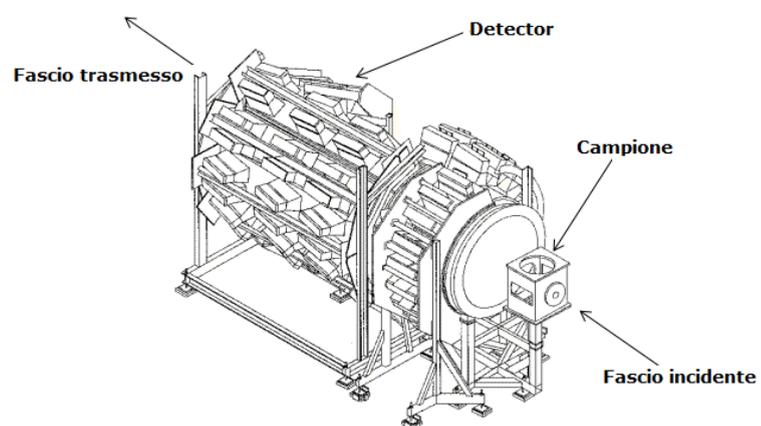


Figura 2.5 – Diffrattometro SANDALS.

Nella misura della sezione d'urto di scattering per mezzo del tempo di volo si assume che l'energia del neutrone sia invariata in quanto non è possibile determinare l'energia iniziale e finale dei neutroni. È possibile misurare invece, la velocità del neutrone scatterato elasticamente; essa risulta pari a:

$$v_e = \frac{(L_0 + L_1)}{t}, \quad (2.76)$$

dove $L_0=11$ m ed $0.75 < L_1 < 4$ m rappresentano i cammini di volo primario e secondario e si riferiscono rispettivamente, alla distanza moderatore-campione ed alla distanza variabile a seconda del banco di rivelazione, campione-rivelatore. La lunghezza d'onda λ_e associata ai neutroni di massa m , la cui velocità sia v_e , è pari a $\lambda_e = h/mv_e$ ed il vettore d'onda scambiato $K_e = ht/m(L_0 + L_1)$, dove L_0 , L_1 rappresentano rispettivamente la distanza tra il moderatore ed il campione e la distanza tra il campione ed il rivelatore (Figura 2.6) e t il tempo di volo.

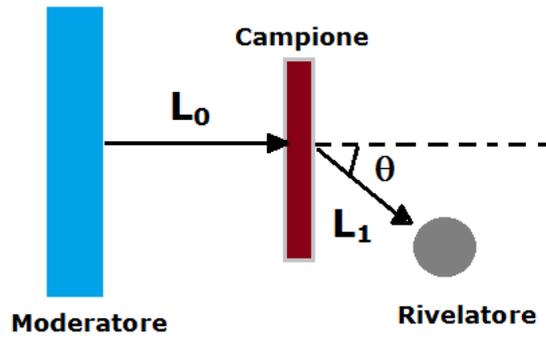


Figura 2.6 – Schema per la misura del tempo di volo presso il diffrattometro SANDALS.

A partire dall'intensità dei neutroni diffratti misurata $I(t, \theta)$ è possibile ottenere una misura della sezione d'urto differenziale sperimentale, che indichiamo con $\Sigma(K)$. La sezione d'urto ottenuta in seguito ad un esperimento di diffrazione è operativamente una sezione d'urto differenziale a tempo di volo ovvero una *Time of Flight Differential Cross Section* (TDCS) ed è data da:

$$\Sigma(K_e, \theta) = \int \frac{k'}{k} S(K_e, \omega) \frac{\Phi(k)}{\Phi(k_e)} \left(\frac{\delta k}{\delta k_e} \right) \frac{\epsilon(k')}{\epsilon(k_e)} d\omega, \quad (2.77)$$

dove $\Phi(k)$ indica il flusso di neutroni incidenti in funzione del vettore d'onda dei neutroni incidenti k , $\epsilon(k')$ indica l'efficienza del detector in corrispondenza del vettore d'onda finale dei neutroni k' e del vettore d'onda k_e , nel caso di scattering elastico infine, $K_e = 2k_e \sin \theta$

indica il momento scambiato in corrispondenza dello scattering elastico. La dipendenza della $\Sigma(K_e, \theta)$ da θ dimostra che per un certo valore la TDCS è ancora una funzione dell'angolo di scattering. La quantità $\left(\frac{\delta k}{\delta k_e}\right)$ viene invece calcolata considerando che

$$\frac{L_0}{k} + \frac{L_1}{k'} = \frac{(L_0 + L_1)}{k_e}, \quad (2.78)$$

e che

$$K^2 = k^2 + k'^2 - 2kk' \cos 2\theta. \quad (2.79)$$

Essa risulta quindi pari a:

$$\left(\frac{\delta k}{\delta k_e}\right) = \frac{(1 + R)k^2}{k_e^2} + \frac{Rk^3}{k'^3}, \quad (2.80)$$

dove $R = L_1/L_0$ ed è stato definito da Egelstaff [31] come "sampling factor", in quanto controlla il campionamento del fattore di struttura $S(K, \omega)$. La TDCS differisce dalla sezione d'urto differenziale teorica per la presenza di un cammino di volo finale finito; le due sezioni d'urto diventano uguali solo nel limite in cui R tende a zero. Il denominatore dell'equazione 2.77 indica che i dati misurati sono stati normalizzati al fascio incidente ed alle efficienze del detector in corrispondenza dell'energia di scattering elastico. Dal punto di vista sperimentale questo equivale a dividere i dati derivanti dalla misura con il tempo di volo, per lo scattering derivante da un campione standard, generalmente il vanadio, il cui scattering è prevalentemente incoerente. Placzek [32] ha dimostrato che la differenza tra $S(K)$ e $\Sigma(K, \theta)$ è in molti casi ridotta e che per tale motivo possa essere stimata

$$P(K, \theta) = S(K) - \Sigma(K, \theta), \quad (2.81)$$

Il termine $P(K, \theta)$ rappresenta appunto la correzione Placzek. Ulteriori dettagli sulle correzioni Placzek, verranno riportati nei paragrafi successivi. Le distorsioni anelastiche nella funzione sperimentale $\Sigma(K)$ sono una conseguenza del fatto che, nella misura del tempo di volo, il vettore d'onda scambiato non è determinato dalla posizione angolare dei detector ma per l'appunto, dal tempo di volo del neutrone.

2.8.1 La cella portacampione

Le celle portacampione che vengono utilizzate in un esperimento di neutroni, sono realizzate in modo tale da resistere alle sollecitazioni esterne quali ad esempio, pressione e temperatura. In un esperimento di diffusione, occorre considerare che anche il materiale che compone la cella contribuisce alla sezione d'urto; per questo motivo è necessario impiegare del materiale che presenti una sezione d'urto completamente incoerente in modo tale da non introdurre delle strutture dovute alla cella nel fattore di struttura statico $S(\mathbf{K})$. Le celle portacampione presso il diffrattometro SANDALS, sono state realizzate con una lega di Ti-Zr, scelte nelle percentuali di 68% e 32% rispettivamente, in modo da garantire che la lunghezza di scattering coerente, e dunque il contributo coerente alla sezione d'urto sia nullo. In aggiunta, la densità della lega così ottenuta, pari a 0.0542 atomi/Å³ è tale da minimizzare gli effetti di attenuazione. La geometria delle celle è planare in modo tale che venga massimizzata la superficie illuminata dal fascio di neutroni, mentre lo spessore della cella pari a ~ 1 mm, è tale da minimizzare gli effetti dovuti all'assorbimento ed ai cammini di scattering multiplo, trascurati nella derivazione della sezione d'urto teorica. Le celle vengono montate su un apposito portacampione ed il numero massimo di campioni che può essere ospitato, pari a 15, consente di effettuare le misure su differenti campioni in modo ciclico. Nella figura 2.7 viene riportata un'immagine del portacampione utilizzato su SANDALS.



Figura 2.7 – Portacampioni utilizzato su SANDALS. Le celle di Ti-Zr vengono montate negli spazi vuoti numerati: in tal modo è possibile identificare la posizione del campione.

Il portacampioni è collegato ad un bagno termico (JULABO FP50 in cui circolano 8 litri di una miscela al 50% di acqua-glicolo) che può raggiungere una temperatura compresa tra $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $110\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Figura 2.8). Tale sistema consente di mantenere costante la temperatura del campione.



Figura 2.8 – Il portacampioni è collegato ad un bagno d’acqua che consente di mantenere costante la temperatura del campione.

2.9 La sezione d'urto sperimentale

In questo paragrafo riporto la relazione tra i conteggi registrati da ciascun detector appartenente all'apparato di rivelazione di un diffrattometro a tempo di volo, e la sezione d'urto di un campione. Sia L_0 la distanza tra il moderatore di area A_m ed il campione, di area A_c , il numero di neutroni che arriva sul campione per unità di tempo e di lunghezza d'onda risulta pari a:

$$\frac{\Phi(\lambda)A_m}{4\pi} \frac{A_c}{4\pi L_0^2}, \quad (2.82)$$

dove $\Phi(\lambda)$ rappresenta il flusso uscente dal moderatore.

Il numero di neutroni, di lunghezza d'onda compresa tra λ e $\lambda+d\lambda$, che vengono scatterati nell'unità di tempo dal campione formato da N atomi di sezione d'urto σ risulta

$$\Phi(t) = \frac{\Phi(\lambda)\delta\lambda}{(4\pi L_0)^2} A_m N \sigma, \quad (2.83)$$

e può essere riscritta sinteticamente come

$$\Phi(t) = I_0(t) N \sigma, \quad (2.84)$$

dove $I_0(t)$ rappresenta il numero di neutroni incidenti sul campione per unità di tempo e unità di superficie ed è proporzionale all'area del moderatore. Un detector di area A_d , posto ad una distanza L_1 dal campione, sottende un angolo solido

$$\Delta\Omega_d = \frac{A_d}{L_1^2} \quad (2.85)$$

e viene raggiunto da un numero di neutroni per unità di tempo pari a

$$\Phi_d(t) = \frac{d\Phi(t)}{d\Omega} \Delta\Omega_d = I_0(t) N \frac{d\sigma}{d\Omega} \Delta\Omega_d. \quad (2.86)$$

Il numero di conteggi N_d di un detector con efficienza ϵ_d , in funzione del tempo è legato alla sezione d'urto del campione tramite la relazione:

$$\frac{dN_d(t)}{dt} = \dot{N}_d(t) = \epsilon_d(t)\Phi_d(t) = \epsilon_d(t)I_0(t)N \frac{d\sigma}{d\Omega} \Delta\Omega_d \quad (2.87)$$

con un cambio di variabili è possibile esprimere $N_d(t)$ in funzione del numero d'onda dei neutroni ovvero

$$\dot{N}_d(t) = \dot{N}_d(k) \frac{dk}{dt} = \epsilon_d(k)I_0(k)N \Delta\Omega_d \frac{d\sigma}{d\Omega} \frac{dk}{dt}. \quad (2.88)$$

Come anticipato, il sistema di rivelazione usato si basa sulla tecnica del tempo di volo pertanto si vuole legare il tempo di volo t , che un neutrone impiega a percorrere il cammino $L = L_0 + L_1$ dal moderatore al detector, con la sua velocità. Nel caso di scattering elastico già discusso nel paragrafo precedente, la velocità del neutrone resta costante lungo tutto il percorso L , e $k = k' = k_e$; il tempo di volo può essere quindi, espresso come

$$t = \frac{L}{v_e} = \frac{m}{\hbar k_e} L. \quad (2.89)$$

Quando si ha a che fare con un evento di scattering anelastico, la velocità finale del neutrone differisce da quella iniziale perchè subisce variazioni a causa dell'interazione con il campione; in tal caso il tempo di volo può essere espresso come

$$t = t_0 + t_1 = \frac{L_0}{v} + \frac{L_1}{v'} = \frac{m}{\hbar} \left(\frac{L_0}{k} + \frac{L_1}{k'} \right) \quad (2.90)$$

dove v' è la velocità associata a k' del neutrone in seguito all'urto anelastico con il campione. Uguagliando le due espressioni riferite allo stesso tempo di volo, ottenuto considerando l'urto elastico ed anelastico 2.89, 2.90 si ottiene la relazione 2.78 tra tutti i valori dei momenti k e k' che il neutrone può assumere prima e dopo un evento di scattering anelastico. Il sistema di acquisizione DAE individua il detector che registra l'arrivo di un neutrone, quindi il valore di L , e misura il tempo di volo t . In tal modo viene generato un istogramma di eventi in cui l'intensità viene acquisita in funzione del tempo, senza alcuna analisi in energia. Questo equivale a dire che i neutroni che colpiscono il rivelatore, posto ad un angolo di diffusione θ all'istante t , vengono diffusi elasticamente. La sezione d'urto che viene misurata in approssimazione elastica non è la sezione d'urto

differenziale che compare nella 2.88 ma una sezione d'urto differenziale a tempo di volo (TDCS) e viene indicata con $\Sigma(K_e, \theta)$ dove $K_e = 2k_e \sin \theta$. In analogia con la 2.88 si può scrivere la relazione tra i conteggi del detector e la TDCS nel seguente modo

$$\dot{N}_d(t) = \dot{N}_d(k_e) \frac{dk_e}{dt} = \epsilon_d(k_e) I_0(k) N \Sigma(K_e, \theta) \Delta \Omega_d \frac{dk_e}{dt}. \quad (2.91)$$

dove

$$\begin{aligned} \dot{N}_d(t) &= \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{d\dot{N}_d(t)}{d\omega} d\omega = \\ \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{d\dot{N}_d(k')}{d\omega} \frac{dk'}{dt} d\omega &= \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{d^2 \dot{N}_d(k')}{d\omega d\Omega} \Delta \Omega_d \frac{dk'}{dt} d\omega = \\ &= \int_{-\infty}^{+\infty} \epsilon_d(k') I_0(k') N \frac{d^2 \sigma}{d\omega d\Omega} \Delta \Omega_d \frac{dk'}{dt} d\omega. \end{aligned} \quad (2.92)$$

Dal confronto tra l'equazione 2.91 e la 2.92, si può ricavare la TDCS

$$\Sigma(K_e, \theta) = \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{I_0(k')}{I_0(k_e)} \frac{dk'}{dk_e} \frac{d^2 \sigma}{d\omega d\Omega} \frac{\epsilon_d(k')}{\epsilon_d(k_e)} d\omega. \quad (2.93)$$

La TDCS ottenuta nell'equazione 2.93 può essere espressa attraverso un cambio di variabili, in funzione del numero d'onda del neutrone incidente ovvero k ; ne risulta che

$$\begin{aligned} \Sigma(K_e, \theta) &= \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{I_0(k)}{I_0(k_e)} \frac{dk}{dk_e} \frac{d^2 \sigma}{d\omega d\Omega} \frac{\epsilon_d(k)}{\epsilon_d(k_e)} d\omega = \\ &= \int_{-\infty}^{+\infty} W(k, k_e, \epsilon_d, I_0) \frac{d^2 \sigma}{d\omega d\Omega} d\omega, \end{aligned} \quad (2.94)$$

dove $W(k, k_e, \epsilon_d, I_0)$ viene definita funzione di campionamento in quanto contiene tutte le informazioni legate al diffrattometro ed al flusso dei neutroni. L'espressione così ottenuta rappresenta la sezione d'urto sperimentale misurata in un esperimento di diffrazione neutronica. Prima di poter procedere alle fasi più raffinate di elaborazione che consentono di ricavare le informazioni strutturali del sistema, occorre realizzare delle correzioni ai dati. Nel seguente paragrafo riporto una sintesi delle principali fonti di errore, degli effetti di cui bisogna tener conto nei dati e di come tali errori possano essere minimizzati sia durante l'esperimento, che nella fase successiva all'acquisizione dei dati.

2.10 Dall'esperimento ai dati corretti

Lo scopo di un esperimento di diffrazione presso SANDALS è quello di ottenere la TDCS del campione. Tant

Ciò che viene misurato direttamente in un esperimento di diffrazione neutronica è l'intensità di scattering in funzione del tempo di volo e dunque del vettore d'onda. Nell'ipotesi in cui il campione sia piccolo, è possibile trascurare gli effetti di attenuazione e di scattering multiplo; ne risulta che il numero di neutroni contati dal detector risulta proporzionale al flusso incidente $\Phi(k_e)$, alla TDCS del campione ($\Sigma(K_e)$), all'angolo solido del detector $\Delta\Omega$ ed all'efficienza del detector $\epsilon_d(k_e)$ in corrispondenza dell'energia del neutrone scatterato

$$I(k_e) = \Phi(k_e)N\Sigma(K_e)\epsilon_d(k_e)\Delta\Omega, \quad (2.95)$$

dove N indica il numero di centri di scattering e $K_e = 2k_e \sin(\theta)$. Il flusso incidente e l'efficienza del rivelatore vengono rappresentate in questa formulazione, come funzioni di k_e allo scopo di enfatizzare che esse non dipendono dall'angolo di scattering del detector. L'equazione 2.95 rappresenta l'intensità di scattering nel caso ideale. In realtà, per ottenere la TDCS occorre realizzare una serie di correzioni dovute a diverse sorgenti di errore quali ad esempio, effetti di scattering multiplo e di assorbimento da parte del campione e delle celle e presenza di contributi inelastici allo scattering. La procedura di correzione dei dati avviene per mezzo di alcuni programmi disponibili presso ISIS. Riporto qui di seguito, una breve descrizione delle tappe seguite per la correzione dei dati [33]

- Controllo dell'efficienza dei detector che ha lo scopo di eliminare gli spettri che vengono registrati da quei detector che risultano particolarmente rumorosi o instabili. Durante l'esperimento il numero di neutroni che vengono registrati da un singolo detector, deve essere compreso tra $\langle n \rangle \pm \sigma_n$, dove $\langle n \rangle$ e σ_n rappresentano rispettivamente il valor medio e la varianza della distribuzione gaussiana di conteggi di ciascun banco di rivelazione. Nel caso in cui tale condizione non venga rispettata, ovvero se i detector rivelano un numero di neutroni differente da quello imposto dalla condizione, essi vengono esclusi dall'analisi dei dati.

- Normalizzazione al flusso incidente: ciascuna intensità misurata viene normalizzata al flusso incidente Φ misurato attraverso un monitor ovvero un detector a bassa efficienza (nota), collocato subito dopo il moderatore.
- Calibrazione allo spettro del vanadio. Una volta eliminati i picchi di Bragg ed il rumore dallo spettro del vanadio, esso viene impiegato per il calcolo di una funzione di calibrazione. Come ben noto lo scattering derivante dal vanadio è prevalentemente incoerente, pertanto la sezione d'urto che ne deriva dipende solo dalla densità del policristallo. Questo consente di calibrare le intensità diffratte dalla cella portacampione vuota (I_C) e dal campione nella cella (I_{SC}), in unità assolute ($\text{barn sr}^{-1}\text{atomi}^{-1}$), senza che i nostri dati vengano alterati. Lo scattering incoerente del vanadio non comporta infatti alcuna perturbazione ai nostri dati, dal momento che siamo interessati solo al contributo coerente della sezione d'urto.
- Sottrazione dei contributi di scattering multiplo. La funzione che descrive lo scattering multiplo diminuisce per grandi valori dell'angolo ed aumenta con l'aumentare della sezione d'urto di scattering. Essa può essere calcolata a partire dalla forma esplicita del fattore di struttura del campione mentre le correzioni vengono calcolate sfruttando l'algoritmo di Monte Carlo [34] e trascurando il contributo proveniente dallo scattering anelastico.
- Correzioni per l'assorbimento. Le intensità di scattering presentano un'attenuazione causata dagli eventi di assorbimento; la rimozione di tale attenuazione avviene attraverso un algoritmo introdotto da Paalman e Pings [35] e basato sul calcolo dei coefficienti di attenuazione e dipendente solo dalla forma dello scatteratore e dalla sezione d'urto (media) totale.
- Sottrazione del contributo proveniente dalle celle (nel nostro caso celle Ti-Zr) e dal *background*. Dopo aver determinato le intensità I_C ed I_{SC} e dopo averle corrette opportunamente, per l'assorbimento e per lo scattering multiplo, è possibile sottrarre il contributo allo scattering proveniente dalle singole celle e dunque ottenere la sezione d'urto sperimentale $\Sigma(K)$.

I passaggi appena descritti possono essere formalizzati nel seguente modo:

$$\Sigma(k_e, \theta_d) = \frac{\left(\frac{I_{SC}-I_B}{I_V} - M_{SC}\right)A_{C,C} - \left(\frac{I_C-I_B}{I_V} - M_C\right)A_{C,SC}}{NA_{S,SC}A_{C,C}}, \quad (2.96)$$

dove M rappresenta il contributo dovuto allo scattering multiplo del campione M_{SC} o della cella vuota M_C , $A_{C,SC}$ misura l'attenuazione dell'intensità dovuta all'assorbimento della cella che contiene il campione, $A_{S,SC}$ tiene conto dell'attenuazione dell'intensità diffusa dovuta all'assorbimento da parte del campione contenuto nella cella ed infine $A_{C,C}$ è il coefficiente di attenuazione relativo alla sola cella vuota. L'espressione 2.96 descrive, per ogni campione, la sezione d'urto sperimentale di scattering, per unità di centro diffusore ed ha una dipendenza esplicita dall'angolo di scattering. Questo garantisce la possibilità di tenere separati i dati provenienti dai vari banchi di rivelazione.

2.10.1 La diffusione anelastica

La sezione d'urto sperimentale di cui si è ampiamente discusso, è stata ottenuta assumendo che i neutroni scatterati dai campioni siano così energetici che sia possibile trascurare l'acquisto o la perdita di energia conseguente ad un evento di scattering (approssimazione "statica"). In un esperimento reale tale approssimazione non è sempre valida. Non lo è soprattutto nel caso di campioni formati da atomi leggeri come l'idrogeno e dunque nel caso di soluzioni acquose. In questi casi, la componente anelastica dell'urto con il neutrone è tutt'altro che trascurabile; nel caso dell'idrogeno l'anelasticità e dunque la grande energia di scambio tra neutrone-nucleo, è una conseguenza delle masse confrontabili tra il nucleo di scattering ed il neutrone. In pratica, in un processo di urto tra i neutroni ed i protoni, i protoni del bersaglio rinculano e perdono energia. Nelle sezioni d'urto sperimentali, il contributo dell'anelastico è visibile soprattutto in corrispondenza di bassi valori del momento trasferito ovvero per grandi valori dell'angolo di scattering θ . Il problema della diffusione anelastica nelle TDCS è legato al fatto che essa viene ricavata integrando a θ costante e che ad ogni singolo valore di θ , corrispondono diversi valori di k mentre nell'esperimento si è in grado di effettuare solo la corrispondenza $\theta \rightarrow k_e$. Il primo a studiare la problematica fu Placzek nel 1952 [32]. Egli prevedeva di arginare il problema espandendo in serie di Taylor il fattore di struttura dinamico $S(K, \omega)$, intorno al suo valore elastico

$$S(K, \omega) = S(K_e, \omega) + \left(\frac{\partial S}{\partial K^2} \right)_{K=K_e} (K^2 - K_e^2) + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial^2 S}{\partial^2 K^2} \right)_{K=K_e} (K^2 - K_e^2)^2 + \dots, \quad (2.97)$$

e di poter stimare il fattore di struttura statico $S(K)$ a meno di termini noti successivi. I termini noti successivi erano per l'appunto, rappresentati dallo sviluppo di $S(K, \omega)$ in serie di potenze di $(K^2 - K_e^2)$, intorno al valore K_e del momento trasferito come previsto dall'equazione 2.97. Le quantità $(K^2 - K_e^2)$ possono essere espresse in funzione di una variabile dipendente dall'energia del neutrone incidente ed, integrando rispetto ad ω i termini dello sviluppo successivi al primo, è possibile ottenere espressioni che dipendano solo dalla massa nucleare, dalla temperatura del campione, dalla geometria e dall'efficienza del detector. Tale approssimazione non funziona però nel caso di atomi leggeri

e ad oggi non esiste un modo esatto per la rimozione completa degli effetti anelastici. L'essenza del lavoro di Placzek era dimostrare che gli effetti anelastici contribuiscono principalmente lo scattering *self* mentre lo scattering distinto ne risulta solo debolmente influenzato. Egli giunse a tale conclusione considerando che la sezione d'urto doppio differenziale potesse essere espressa in funzione di due contributi: un termine *self* $S_\alpha(K, \epsilon)$ ed un termine di interferenza $H_{\alpha\beta}$ e che, tali contributi fossero separabili tramite opportune regole di selezione. Dal calcolo successivo dei momenti primi del fattore di struttura dinamico, egli dimostrò che l'unico termine che contribuisce all'anelastico è il contributo *self* dello scattering.

In dettaglio, la sezione d'urto doppio differenziale per unità di angolo solido, e per unità di energia trasferita, è pari a $b^2 \frac{k'}{k} S(K, \epsilon)$, dove $S(K, \epsilon)$ è il fattore di scattering dinamico, ϵ è la variazione energetica del neutrone dopo l'evento di scattering ed infine b la lunghezza di scattering dell'atomo. Per un sistema a molte componenti il fattore di struttura totale risulta pari a

$$S(K) = \sum_{\alpha} c_{\alpha} \langle b_{\alpha}^2 \rangle + \sum_{\alpha\beta \geq \alpha} (2 - \delta_{\alpha\beta}) c_{\alpha} c_{\beta} \langle b_{\alpha} \rangle \langle b_{\beta} \rangle [\delta(K) + H_{\alpha\beta}(K)] \quad (2.98)$$

è possibile separare il termine *self* $S_\alpha(K, \epsilon)$ da quello di interferenza $H_{\alpha\beta}$ attraverso le regole di selezione:

$$\int_{-\infty, K_{const}}^{\infty} S_{\alpha}(K, \epsilon) d\epsilon = 1.0, \quad (2.99)$$

$$\int_{-\infty, K_{const}}^{\infty} H_{\alpha\beta}(K, \epsilon) d\epsilon = H_{\alpha\beta}(K) \quad (2.100)$$

Il momento primo relativo a ciascun contributo (*self* e *distinct*) del fattore di struttura dinamico è pari a

$$\int_{-\infty, K_{const}}^{\infty} \epsilon S_{\alpha}(K, \epsilon) d\epsilon = \frac{\hbar^2 K^2}{2M_{\alpha}} = E_{R,\alpha} \quad (2.101)$$

$$\int_{-\infty, K_{const}}^{\infty} \epsilon H_{\alpha\beta}(K, \epsilon) d\epsilon = 0 \quad (2.102)$$

dove M_α è la massa dell'atomo coinvolto nel processo di scattering ed $E_{R,\alpha}$ indica l'energia di rinculo dell'atomo α . Tali equazioni dimostrano che, mentre per il contributo *self* dello scattering il trasferimento di energia è finito ed aumenta parabolicamente con Q , l'energia trasferita per lo scattering distinto è mediamente nulla per valori finiti di energia trasferita, ma questo significa che vi saranno contributi positivi e negativi allo scattering distinto con l'aumento dell'energia trasferita, contribuendo con un trasferimento totale nullo.

In sintesi la sezione d'urto sperimentale può essere riscritta considerando i due contributi *self* e *distinct*

$$\Sigma(K_e, \theta) = \Sigma^{(s)}(K_e, \theta) + S(K_e), \quad (2.103)$$

dove $\Sigma^{(s)}(K_e, \theta)$ rappresenta il contributo *self* o incoerente alla sezione d'urto ed $S(K_e)$ rappresenta il contributo *distinct* e descrive l'interferenza tra i neutroni che vengono diffusi dai differenti nuclei presenti nel campione. La parte *self* rappresenta principalmente la fonte di anelastico e dipende da θ in quanto il rinculo varia per diversi angoli di scattering. Essa può essere stimata come [36] come

$$\Sigma^{(s)}(K_e, \theta) = \int_\gamma f(K, \theta, \omega) \Sigma^{(s)}(K_e, \theta, \omega) d\omega, \quad (2.104)$$

dove γ è il cammino di integrazione a K_e fissato ed il fattore $f(K, \theta, \omega)$ è una funzione del fascio di neutroni incidente (I_0), dell'efficienza dei rivelatori ($\epsilon_d(k)$) e della geometria dell'apparato sperimentale ($a = L_0/L_1$) secondo

$$f(K, \theta, \omega) = \frac{I_0(k)}{I_0(k_e)} \frac{\epsilon_d(k)}{\epsilon_d(k_e)} \frac{k'}{k} \frac{a+1}{a + \left(\frac{k'}{k}\right)^3}. \quad (2.105)$$

La relazione 2.105 spiega anche in che modo sia possibile ottimizzare i valori di a e θ affinché i contributi anelastici vengano ridotti. Per piccoli valori dell'angolo θ , il valore del vettore d'onda scambiato è vicino a K_e , anche nel caso in cui il valore di a superi 1 ($a=1$ corrisponde al caso più favorevole). Nel caso di SANDALS gli effetti anelastici sono quindi, ridotti in quanto il valore di a è compreso tra 2.8 e 14.7 e θ varia tra 3.8° e 36.5°. La conclusione che gli effetti anelastici coinvolgessero principalmente lo scattering *self*

venne fuori da alcune analisi di Soper [37], anche quando il campione risultava composto da atomi leggeri quale l'idrogeno. Questo indica che l'anelastico apporta alla sezione d'urto di scattering differenziale, un background di scattering *self* dipendente da K e non comporta invece un impatto significativo sul fattore *distinct* dello scattering che viene investigato. Per i casi in cui l'espansione in serie di Placzek non funziona viene utilizzato generalmente un metodo *ad hoc* basato sull'uso di polinomi per rimuovere lo scattering anelastico. Per tale motivo la sottrazione del background richiede una certa attenzione.

2.10.2 Procedura di correzione dei dati TDCS

Per correggere i dati TDCS ottenuti tramite la misura del tempo di volo viene impiegato un programma GUDRUN [33] disponibile presso i laboratori RAL di ISIS. Le routine di tale programma sono state studiate *ad hoc* e riproducono i passaggi necessari per rendere i dati normalizzati e puliti da eventuali contributi anelastici, in modo da poter essere impiegati per l'analisi successiva ovvero, per le simulazioni. Il programma GUDRUN prevede la possibilità di normalizzazione ovvero la possibilità di inserire i dati su una scala assoluta della sezione d'urto per unità di angolo solido. Questo è possibile perché il campione di vanadio usato possiede la stessa geometria del campione, ed una sezione d'urto differenziale completamente incoerente. Il programma consente di isolare i contributi del background di normalizzazione e del background del campione in quanto, il primo si riferisce generalmente al fondo in assenza di alcun elemento nel percorso del fascio mentre nel secondo caso possono essere inclusi i background provenienti ad esempio, dal criostato o da altri elementi che circondano il campione. Il controllo del campione avviene fondamentalmente sulla base di una serie di parametri quale ad esempio: il “*tweak factor*” che indica il reciproco della frazione di impaccettamento (“*packing fraction*”) e viene generalmente utilizzato per correggere la densità del campione dividendo la densità per il fattore stesso. Il valore di tale densità modificata, verrà dunque utilizzata per calcolare l'attenuazione e le correzioni per lo scattering multiplo, il numero di atomi nel fascio per la normalizzazione finale della sezione d'urto in barn sr^{-1} atomo.

Capitolo 3

Le simulazioni EPSR

Non una via
Un labirinto di strade
Per arrivare ad una verità.
E così ciascun automa-
mosso dalla propria legge interiore-
non raggiunge altro che una chimera
se non medita ed osserva
Le infinite strade altrui. . . [L. M.]

3.1 Principi dell'EPSR

Il metodo EPSR (Empirical Potential Structure Refinement) [19] è stato introdotto da A. K. Soper nel 1996. Esso viene impiegato per ricostruire la struttura microscopica di un campione soprattutto nel caso in cui esso risulti composto da molti atomi. Tale approccio consente di determinare le funzioni di correlazione sito-sito $g(r)$, a partire dai fattori di struttura parziali. L'EPSR è in sostanza una simulazione Monte Carlo Metropolis [38] del sistema che si vuole studiare in cui un *set* di prescrizioni consente di variare le configurazioni in modo da minimizzare l'energia intermolecolare. Si parte dall'assunzione che in un *ensemble* canonico le funzioni termodinamiche (energia, pressione etc.) di un sistema omogeneo classico, dipendano solo dalla $g(r)$; in tal modo un sistema formato da molte particelle può esser descritto tramite un potenziale di interazione efficace $\phi(r)$ [19].

Lo scopo della simulazione è quello di portare il sistema in differenti stati configurazionali e ciò avviene per mezzo di alcune mosse fondamentali ovvero:

- traslazione di una molecola;
- rotazione di una molecola;
- rotazione di gruppi atomici all'interno della molecola;
- movimenti di singoli atomi all'interno della molecola.

3.2 Fondamenti teorici di una simulazione EPSR

La fase iniziale di una simulazione EPSR consiste dunque, nella realizzazione di una simulazione Monte Carlo classica in un *ensemble* canonico NVT (in cui il numero di particelle, il volume e la temperatura sono costanti). Viene quindi costruita una scatola di simulazione di lato L e densità $\rho_{exp} = N/L^3$ di N molecole contenute nella scatola. Il valore della densità è quello sperimentale pertanto, noto il numero di molecole e la densità, il programma determina il lato della scatola di simulazione. Le molecole vengono costruite inizialmente in modo rigido e, sia le distanze che gli angoli vengono stabiliti dall'utente. Nel passo successivo viene introdotto un certo grado di indeterminazione statistica nelle distanze intramolecolari attraverso un potenziale armonico tra gli atomi di ciascuna molecola. Tale potenziale può essere espresso come

$$U_{intra}(r_{\alpha_i\beta_i}) = C \sum_i \sum_{\alpha \neq \beta} \frac{(r_{\alpha_i\beta_i} - d_{\alpha\beta})^2}{2w_{\alpha\beta}^2}, \quad (3.1)$$

dove $r_{\alpha_i\beta_i}$ è la distanza vera tra gli atomi α e β nella molecola i -esima e $d_{\alpha\beta}$ rappresenta la distanza di equilibrio definita inizialmente tra gli atomi α e β . La quantità $w_{\alpha\beta}^2 = d_{\alpha\beta}/\sqrt{\mu_{\alpha\beta}}$ dipende dalla massa ridotta della coppia di atomi $\mu_{\alpha\beta} = M_\alpha M_\beta / (M_\alpha + M_\beta)$, espressa in unità di massa atomica (u.m.a.), C è una costante determinata dal confronto per grandi valori di K , tra i fattori di struttura simulati con quelli sperimentali. L'impiego della funzione $w_{\alpha\beta}$ consente di evitare la necessità di definire e rifinire i fattori di Debye-Waller relativi a ciascuna distanza intramolecolare [19]. Il contributo intermolecolare al potenziale di riferimento si basa su forme note presenti in letteratura; nel nostro caso

tale interazione può essere espressa come somma di un potenziale di Lennard-Jones ed un potenziale elettrostatico coulombiano

$$U_{inter}(r_{\alpha_i\beta_i}) = \frac{1}{2} \sum_i \sum_{j \neq i} \sum_{\alpha\beta} \left\{ 4\epsilon_{\alpha\beta} \left[\left(\frac{\sigma_{\alpha\beta}}{r_{\alpha_i\beta_i}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{\alpha\beta}}{r_{\alpha_i\beta_i}} \right)^6 \right] + \frac{q_\alpha q_\beta}{4\pi\epsilon_0 r_{\alpha_i\beta_i}} \right\}. \quad (3.2)$$

Nell'equazione così descritta, $\epsilon_{\alpha\beta}$ rappresenta la profondità della buca di potenziale, $\sigma_{\alpha\beta}$ la distanza di minimo avvicinamento tra l'atomo α e β ; entrambe vengono stimate attraverso le regole di Lorentz-Berthelot [39, 40] secondo cui:

$$\epsilon_{\alpha\beta} = (\epsilon_\alpha \epsilon_\beta)^{1/2}, \quad \sigma_{\alpha\beta} = \frac{1}{2}(\sigma_\alpha + \sigma_\beta). \quad (3.3)$$

Attraverso tali regole, è possibile ricavare i valori delle costanti ϵ e σ relative ai singoli atomi, considerando che $\epsilon_\alpha = \epsilon_{\alpha\alpha}$. I valori del potenziale intermolecolare vengono generalmente forniti in letteratura; ai fini della simulazione EPSR sono concesse piccole variazioni a tali potenziali in quanto essi rappresentano solo il punto di partenza della simulazione. L'introduzione del potenziale empirico comporta infatti, come vedremo, una perturbazione al sistema che può "guidare" la simulazione anche lontano dai valori iniziali del potenziale. Il potenziale empirico come anticipato, consiste in una perturbazione che viene apportata al sistema inizialmente in equilibrio, per mezzo di una simulazione Monte Carlo. La forma attualmente impiegata come potenziale empirico [19] è una serie di funzioni dipendenti da r ovvero

$$U_{ep}(r) = k_B T \sum_i C_i p_{n_i}(r, \sigma), \quad (3.4)$$

dove C_i sono dei coefficienti reali (positivi e negativi) e ciascuna delle $p_n(r, \sigma)$ è definita come:

$$p_n(r, \sigma) = \frac{1}{4\pi\rho\sigma^3(n+2)!} \left(\frac{r}{\sigma} \right)^n \exp\left(-\frac{r}{\sigma}\right), \quad (3.5)$$

con ρ densità totale del sistema espressa in atomi/Å³ e σ è una funzione peso che viene scelta dall'utente. Una cosa interessante da osservare è che il momento primo della

$p_n(r, \sigma)$ è pari a $(n + 1)\sigma$ mentre il momento secondo risulta pari a $(n + 1)\sigma^2$, questo significa che $p_n(r, \sigma)$ possiede un picco in corrispondenza di $r \sim n\sigma$ per grandi valori di n , con un peso che cresce gradualmente con l'aumentare dell'indice di somma n . La forma del potenziale empirico espressa in funzione di $p_n(r, \sigma)$, rappresenta un potenziale intermolecolare, che varia rapidamente con r per brevi distanze e più lentamente per distanze maggiori. I polinomi 3.5 sono caratterizzati dal fatto che possiedono una trasformata di Fourier esatta ovvero:

$$P_n(K, \sigma) = 4\pi\rho \int p_n(r, \sigma) \exp(i\mathbf{K} \cdot \mathbf{r}) d\mathbf{r} = \frac{1}{(n+2)(\sqrt{1+K^2\sigma^2})^{(n+4)}} \left[2 \cos(n\alpha) + \frac{(1-K^2\sigma^2)}{K\sigma} \sin \alpha \right], \quad (3.6)$$

dove $\alpha = \arctan(K\sigma)$. I coefficienti C_i vengono quindi determinati durante la procedura, fittando la differenza tra i fattori di struttura parziali misurati e quelli simulati con la funzione

$$U_{ep}(K) = k_B T \sum_i C_i P_{n_i}(K, \sigma_{K_i}). \quad (3.7)$$

Attraverso questa procedura si evita di trasformare nello spazio reale il residuo dei fattori di struttura evitando quindi gli errori di troncamento e conseguentemente, l'insorgere di strutture non fisiche.

3.3 Calcolo delle RDF e dei numeri di coordinazione

La simulazione è lo strumento attraverso cui vogliamo ricavare le funzioni di distribuzione radiale sito-sito definite appunto come $g_{\alpha\beta}(r)$. Esse indicano la probabilità di trovare un atomo β ad una certa distanza r da un atomo α posto al centro del sistema di riferimento del laboratorio. Tali funzioni vengono ottenute a partire dai fattori di struttura parziali $S_{\alpha\beta}(K)$ secondo la seguente relazione

$$g_{\alpha\beta}(r) = 1 + \frac{1}{2\pi^2\rho} \int_0^\infty K^2 dK (S_{\alpha\beta}(K) - 1) \frac{\sin(Kr)}{Kr} \quad (3.8)$$

In generale, la funzione di distribuzione radiale consente di visualizzare le correlazioni tra gli atomi per tutti gli stati della materia; nel caso dei sistemi diluiti essa permette inoltre, di stimare il range del potenziale interatomico. La forma tipica della $g(r)$ nel caso di un liquido atomico, è riportata in Figura 3.1. L'andamento della $g(r)$ ci dice che la probabilità di trovare coppie di particelle molto vicine tra loro è nulla, a causa dell'aumento della forza di interazione repulsiva tra le particelle e dunque del volume escluso. In corrispondenza della distanza σ , la probabilità di trovare un primo vicino è massima; si tratta della situazione in cui il potenziale di interazione tra gli atomi è minimo. La struttura dei liquidi è dunque, determinata da una parte repulsiva del potenziale, che impone un vincolo sulla distanza minima tra gli atomi. La funzione di distribuzione di coppia può essere quindi predetta considerando che gli atomi come sfere dure impenetrabili, di diametro σ . Nel limite di grandi distanze, la funzione $g(r) \rightarrow 1$ in quanto il potenziale di interazione tende a zero

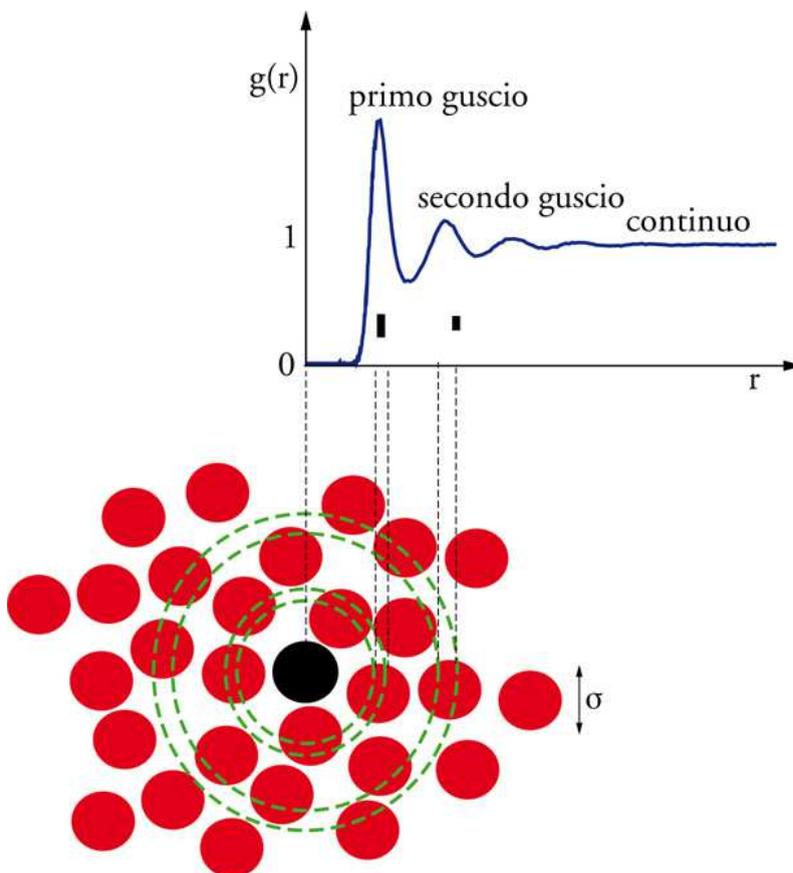


Figura 3.1 – Funzione di distribuzione radiale per i liquidi. Tale distribuzione rappresenta la probabilità di trovare un qualsiasi altro atomo ad una distanza compresa tra r ed $r + dr$ da un atomo posto nell'origine del sistema di riferimento.

La conoscenza di un liquido è possibile anche attraverso il calcolo dei numeri di coordinazione definito come

$$n(r) = 4\pi\rho \int_0^r g_{\alpha\beta}(r')r'^2 dr' \quad (3.9)$$

che consente di calcolare, per ogni distanza r , il numero di atomi della specie β che si trovano entro una sfera di raggio r tracciata a partire da un atomo della specie α posto nell'origine. Il metodo EPSR sviluppato da Soper [19] consente di ricavare sia le funzioni di distribuzioni radiali sito-sito che i numeri di coordinazione. Nel paragrafo successivo riporto una descrizione della procedura teorica su cui si basa una simulazione EPSR e come la stessa, consenta di ricavare le RDF ed i numeri di coordinazione.

3.3.1 L'EPSR e le funzioni di distribuzione radiale sito-sito

L'equazione 3.8 riportata nel paragrafo precedente, descrive in che modo è possibile ottenere le funzioni di distribuzione radiali di coppia, a partire dai fattori di struttura parziali. L'equazione ci assicura che una volta nota la $S_{\alpha\beta}(K)$, è possibile ottenere la funzione di distribuzione radiale sito-sito attraverso un'operazione matematica. La determinazione delle $S_{\alpha\beta}(K)$ per un sistema formato da un gran numero di atomi N è però piuttosto complessa perchè come anticipato, il numero di coppie è pari a $N(N+1)/2$ e dunque il numero di sostituzioni isotopiche necessario per determinare tutte le $S_{\alpha\beta}(K)$ in un esperimento di diffrazione neutronica risulterebbe eccessivo ed il più delle volte irrealizzabile. Le simulazioni hanno proprio lo scopo di superare questo limite. Le simulazioni EPSR hanno un vantaggio superiore: dal confronto tra fattori di struttura teorici e sperimentali, è possibile modificare iterativamente il potenziale di riferimento fintanto che la differenza tra dati teorici e sperimentali non sia trascurabile. Una delle approssimazioni fondamentali che è stata considerata da Soper per lo sviluppo del metodo EPSR è che per un gas molto diluito, la funzione di distribuzione radiale della coppie che indichiamo con $g_{\alpha\beta}$ possa essere espressa come

$$g_{\alpha\beta}(r) = \exp[-\beta U_{\alpha\beta}(r)] \quad (3.10)$$

dove $\beta = 1/k_B T$ con k_B la costante di Boltzmann e T la temperatura. Introducendo un potenziale di forza media che indichiamo con $\psi_{\alpha\beta}(r)$, l'equazione 3.10 può essere estesa ad un sistema di densità qualunque e diventa

$$g_{\alpha\beta}(r) = \exp[-\beta\psi_{\alpha\beta}(r)]. \quad (3.11)$$

Lo scopo della simulazione è dunque quello di ricavare le giuste correzioni empiriche al potenziale di riferimento, in modo iterativo secondo

$$U_{\alpha\beta}^{new}(r) = U_{\alpha\beta}^{old}(r) + [\psi_{\alpha\beta}^d(r) - \psi_{\alpha\beta}^s(r)] = U_{\alpha\beta}^{old}(r) + k_B T \ln \left[\frac{g_{\alpha\beta}^s(r)}{g_{\alpha\beta}^d(r)} \right], \quad (3.12)$$

dove $g_{\alpha\beta}^d(r)$ rappresenta la trasformata di Fourier dei dati sperimentali e la $g_{\alpha\beta}^s(r)$ è la funzione simulata, al primo passo dell'interazione, mediante il solo potenziale di riferimento. Il nuovo potenziale $U_{\alpha\beta}^{new}(r)$ verrà utilizzato nel passo successivo dell'algoritmo, come $U_{\alpha\beta}^{old}(r)$ e consentirà di ricavare la nuova $g_{\alpha\beta}^s(r)$, e così via, iterando il ciclo fin quando non vale che

$$U_{\alpha\beta}^s(r) = U_{\alpha\beta}^{new}(r) \simeq U_{\alpha\beta}^{old}(r). \quad (3.13)$$

Alla fine di ogni ciclo di simulazione, si ottiene uno dei tanti potenziali tramite il quale, l'EPSR produce delle configurazioni consistenti con i dati sperimentali. È stato infatti dimostrato che l'algoritmo converge e la qualità del fit non cambia pur impiegando potenziali di riferimento molto diversi e dunque potenziali empirici differenti. Tali risultati sono stati ottenuti da Soper su campioni di acqua liquida [18, 41]. Quando la differenza tra la $g_{\alpha\beta}^d(r)$ sperimentale e quella calcolata $g_{\alpha\beta}^s(r)$ è piccola, è possibile sviluppare in serie di Taylor il termine $\ln \left[\frac{g_{\alpha\beta}^s(r)}{g_{\alpha\beta}^d(r)} \right]$ dell'equazione 3.12 nel seguente modo

$$\ln \left[\frac{g_{\alpha\beta}^s(r)}{g_{\alpha\beta}^d(r)} \right] = \ln \left(1 + \frac{g_{\alpha\beta}^d(r) - g_{\alpha\beta}^s(r)}{g_{\alpha\beta}^s(r)} \right) \sim \frac{g_{\alpha\beta}^d(r) - g_{\alpha\beta}^s(r)}{g_{\alpha\beta}^s(r)}. \quad (3.14)$$

In tal modo le correzioni al potenziale di riferimento $U_{ep}(r)$ diventano

$$U_{ep}(r) = \beta \frac{g_{\alpha\beta}^d(r) - g_{\alpha\beta}^s(r)}{g_{\alpha\beta}^s(r)}. \quad (3.15)$$

Tali correzioni vengono iterativamente apportate al sistema, fino al raggiungimento di un accordo tra i dati teorici ed i dati sperimentali. L'equazione 3.15 stabilisce per l'appunto, che le correzioni si riducono quanto più la funzione di distribuzione radiale sperimentale si avvicini a quella calcolata ($g_{\alpha\beta}^d(r) \rightarrow g_{\alpha\beta}^s(r)$).

3.4 Un caso studio: soluzione di glucosio in acqua

3.4.1 Costruzione di una scatola

Il primo passo per la realizzazione di una simulazione, consiste nella costruzione di una scatola di simulazione. Essa deve contenere tutte le informazioni relative al campione di cui si vuole studiare la struttura dunque densità, numero di atomi, distanze ed angoli tra gli atomi e potenziale di interazione. All'interno della scatola ciascun atomo viene identificato attraverso un'etichetta e la procedura con cui ciò avviene può essere anche tutt'altro che banale, nel caso in cui si ha a che fare con un sistema complesso ovvero formato da più molecole ed atomi diversi. In generale vengono etichettati differientemente atomi diversi oppure atomi uguali ma con un differente intorno chimico e dunque con differenti caratteristiche di interazione con i vicini. La scelta delle etichette in generale non è unica in quanto, oltre a dipendere dalle caratteristiche del sistema, può essere condizionata dall'interesse specifico per un determinato aspetto piuttosto che un altro della struttura. Nel caso di un sistema di acqua e glucosio ad esempio, la scelta delle etichette è stata realizzata considerando che in soluzione, esso è presente in due forme note come α -D-glucopiranosio e β -D-glucopiranosio [42]. La differenza tra le due configurazioni è stata modellizzata scegliendo differenti etichette per gli atomi del gruppo -OH appartenenti all'anello e differientemente collocati a seconda della forma α -D-glucopiranosio e β -D-glucopiranosio. Nella Figura 5.1 viene riportato lo schema delle etichette utilizzate per differenziare gli atomi nel glucosio. In particolare si osserva che gli atomi di ossigeno con lo stesso intorno chimico ed appartenenti ai gruppi -OH vengono indicati con O. Gli atomi di ossigeno che appartengono al gruppo CH₂OH vengono differenziati così come quelli che appartengono al gruppo -OH che distingue la conformazione α -D-glucopiranosio da quella β -D-glucopiranosio. In quest'ultimo caso essi vengono indicati rispettivamente con O3a e con O3. Allo stesso modo vengono differenziati gli idrogeni appartenenti al gruppo -OH che distingue le due forme. In particolare con H _{α} viene indicato l'idrogeno appartenente all' α -D-glucopiranosio e con H _{β} il corrispondente appartenente al β -D-glucopiranosio.

Nel caso della soluzione di acqua e glucosio, la scelta delle etichette è stata pensata in modo tale da riprodurre le caratteristiche fisico-chimiche reali del campione, con il minor numero di etichette possibili. Ad esempio, non sono stati differenziati quegli atomi che

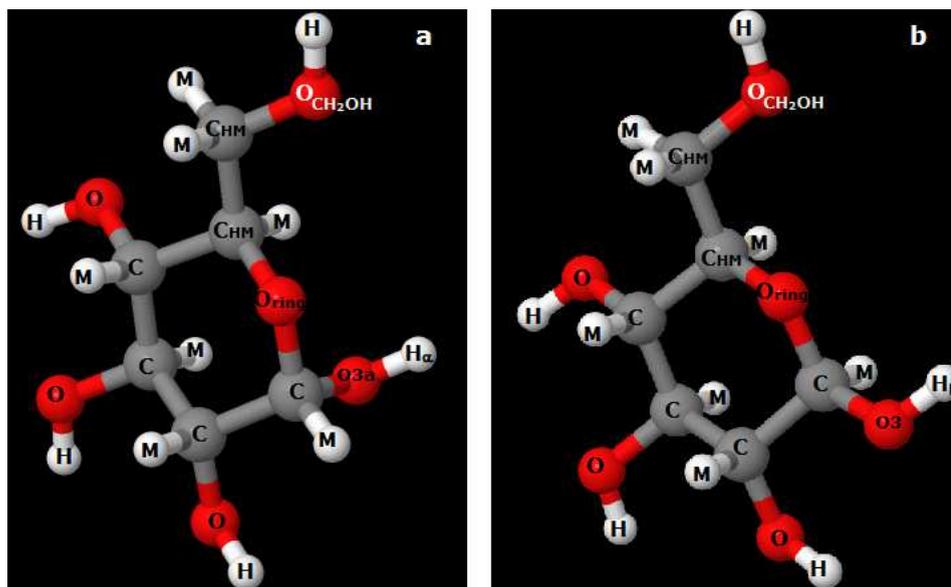


Figura 3.2 – Schema delle etichette utilizzate per differenziare gli atomi dell' α -D-glucopiranosio e del β -D-glucopiranosio, nella simulazione EPSR.

pur appartenendo alle due differenti conformazioni di glucosio (α -D-glucopiranosio, β -D-glucopiranosio), di fatto occupano lo stesso posto sull'anello. Il passo successivo consiste nell'attribuzione dei potenziali di interazione. Generalmente nel caso di liquidi, vengono utilizzati potenziali OPLS (Optimized Potential for Liquid Simulations) disponibili in letteratura [43]. Si tratta essenzialmente di potenziali di Lennard-Jones e carica che verranno utilizzati come punto di partenza per la simulazione. Come si può notare, la scelta del potenziale è uno dei criteri su cui basare la scelta delle etichette. Atomi che presentano differenti parametri di interazione sono di fatto differenti, pertanto necessitano di una differenziazione nella simulazione.

3.4.2 Il fit

Una volta costruita la scatola di simulazione ed i pesi relativi a ciascun campione isotopicamente sostituito, la simulazione può iniziare. Il passo iniziale consiste nel portare il sistema all'equilibrio pertanto inizialmente, viene realizzata una simulazione Monte Carlo con il solo potenziale di riferimento. Successivamente viene acceso il potenziale empirico ovvero viene introdotto un potenziale empirico che perturbi il potenziale di riferimento iterativamente, confrontando i fattori di struttura parziali simulati e sperimentali. Quando si osserva che il fit riproduce adeguatamente i dati sperimentali, la simulazione viene fermata e vengono fatte acquisire delle configurazioni. Lo scopo di questa procedura è quello di aumentare la statistica della simulazione quindi, delle grandezze ricavate (ad esempio delle funzioni di correlazione). In Figura 3.3 vengono riportati dei confronti tra i fattori di struttura calcolati e quelli sperimentali ottenuti con diverse soluzioni di glucosio in acqua alla concentrazione di 4.4 M, ovvero per una concentrazione ideale di 1:12.5 glucosio:acqua. Nella figura 3.3 vengono riportati i dati calcolati (linea continua), i dati sperimentali (simboli) e lo scarto tra i due (tratteggio). Dal confronto si osserva che, la qualità del fit è buona per alti valori del momento trasferito, mentre le piccole divergenze in corrispondenza di bassi valori di Q , sono una conseguenza del contributo anelastico residuo presente nei dati sperimentali.

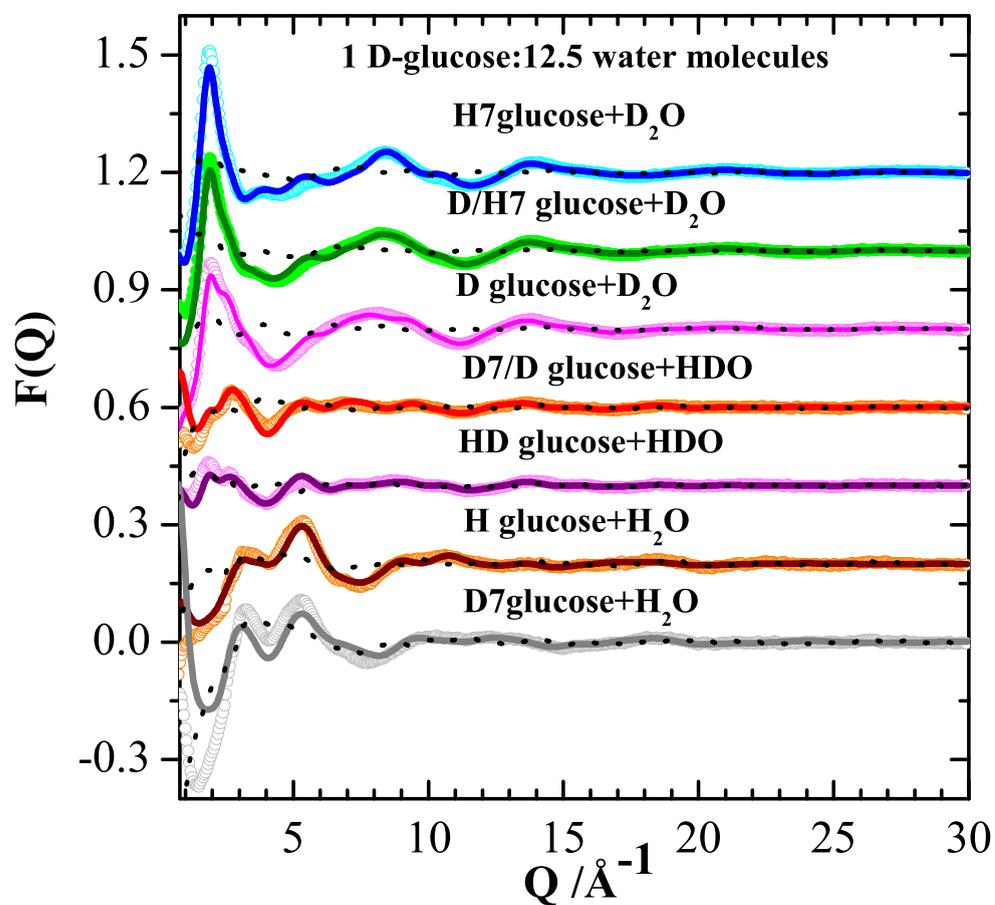


Figura 3.3 – Fattori di struttura totali ottenuti per campioni di D-glucosio-acqua alla concentrazione di 4.4 M, a temperatura ambiente ed a pressione atmosferica. I simboli rappresentano il dato sperimentale, la linea continua il dato teorico mentre i punti lo scarto tra il dato calcolato e quello sperimentale.

3.5 Funzioni di densità spaziale (SDF)

Le funzioni di distribuzione radiale delle coppie (Radial Distribution Function, RDF), di cui si è discusso nel paragrafo precedente, consentono di ottenere informazioni sulla probabilità di osservare un atomo ad una certa distanza r rispetto ad un altro, scelto come riferimento. L'informazione che si ottiene attraverso le RDF non è però completa ai fini della conoscenza di un sistema liquido: le funzioni di distribuzione radiale non forniscono infatti, alcuna indicazione sulle correlazioni relative all'orientazione, tra le molecole del fluido studiato, a causa della sola dipendenza da r . Per rispondere alla necessità di conoscere la disposizione reciproca di atomi o gruppi di atomi presenti nel sistema, sono state introdotte le SDF ovvero le funzioni di densità spaziale che indicheremo con $g(\mathbf{r}, \Omega_1, \Omega_2)$. La funzione $g(\mathbf{r}, \Omega_1, \Omega_2)$ indica la probabilità di trovare una molecola ad una distanza $\mathbf{r} = (r, \Theta_L, \Phi_L)$ con orientazione $\Omega_2 = (\phi_2, \theta_2, \chi_2)$ rispetto ad una molecola, posta al centro del sistema di riferimento del laboratorio e con orientazione $\Omega_1 = (\phi_1, \theta_1, \chi_1)$. Gli angoli (ϕ, θ, χ) vengono definiti angoli di Eulero e sono rappresentati in Figura 3.4.

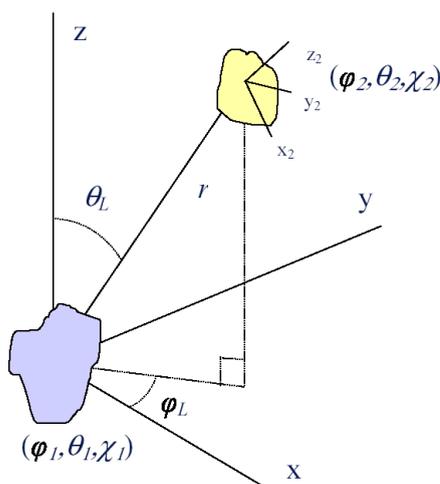


Figura 3.4 – Angoli di Eulero che definiscono l'orientazione delle molecole per il calcolo delle SDF nell'EPSR.

Le funzioni così definite, descrivono come è distribuita una molecola, rispetto ad un'altra posta all'origine, distante da questa \mathbf{r} ed orientata secondo Ω_2 . Il calcolo della $g(\mathbf{r}, \Omega_1, \Omega_2)$ avviene attraverso uno sviluppo in serie di armoniche sferiche secondo la :

$$g(\mathbf{r}, \Omega_1, \Omega_2) = \sum_{l_1 l_2 l} \sum_{m_1 m_2 m} \sum_{n_1 n_2} g(l_1, l_2, l; n_1, n_2; r) C(l_1, l_2, l; m_1 m_2 m) \times D_{m_1 n_1}^{(l_1)}(\Omega_1) * D_{m_2 n_2}^{(l_2)}(\Omega_2) * D_{m_0}^{(l)}(\phi_L, \theta_L, 0) \quad (3.16)$$

dove $C(l_1, l_2, l; m_1, m_2, m)$ sono i coefficienti di Clebsch-Gordan (con $m = m_1 + m_2$); $g(l_1, l_2, l; n_1, n_2; r)$ i coefficienti della serie a cui siamo interessati e gli elementi di matrice $D_{mn}^{(l)}(\Omega)$ rappresentano le armoniche sferiche generalizzate e vengono determinate secondo la seguente espressione:

$$D_{mn}^{(l)}(\Omega) = \exp(-im\phi)d_{mn}^{(l)}(\theta)\exp(-in\chi), \quad (3.17)$$

dove

$$d_{mn}^{(l)}(\theta) = [(l+m)!(l-m)!(l+n)!]^{(1/2)} \times \\ \times \sum_k (-1)^k \frac{\cos(\theta/2)^{2l+m-n-2k} (\sin(\theta/2))^{2k-m+n}}{(l+m-k)!(l-n-k)!k!(k-m+n)!}. \quad (3.18)$$

Le armoniche sferiche vengono quindi ricavate secondo la seguente espressione:

$$g(l_1, l_2, l; n_1, n_2; r) = \frac{(2l_1+1)(2l_2+1)}{4\pi(8\pi^2)^2} \int d\Omega_1 \int d\Omega_2 \int d\Omega \sum_{m_1 m_2 m} g(\mathbf{r}, \Omega_1, \Omega_2) \times \\ \times C(l_1, l_2, l; m_1 m_2 m) \times \\ \times D_{m_1 n_1}^{(l_1)}(\Omega_1)^* D_{m_2 n_2}^{(l_2)}(\Omega_2)^* D_{m 0}^{(l)}(\phi_L, \theta_L, 0) \quad (3.19)$$

dove gli integrali si riferiscono alle medie su tutte le coppie di molecole all'interno della scatola. Per semplificare il calcolo, viene fatto coincidere il sistema di riferimento della prima molecola con quello del laboratorio; in tal caso $D_{mn}^l(0, 0, 0) = \delta_{mn}$

e l'espansione della $g(\mathbf{r}, \Omega)$ diventa:

$$g(\mathbf{r}, \Omega) = \sum l_1 l_2 l \sum m_1 m_2 m \sum n_1 n_2 g(l_1, l_2, l; n_1, n_2; r) C(l_1, l_2, l; m_1 m_2 m) \times \\ \times D_{m_2 n_2}^{(l_2)}(\Omega_2)^* D_{m 0}^{(l)}(\Omega_L). \quad (3.20)$$

Generalmente per un sistema acquoso, $l_{max} = 4$ e ciò corrisponde al calcolo di 158 coefficienti.

3.6 Dall'EPSR ad ANGULA

Nello studio dell'idratazione di una biomolecola o nello studio delle proprietà di aggregazione di una molecola può essere interessante osservare la distribuzione in 3D delle molecole (d'acqua nel caso dell'idratazione) intorno ad una molecola fissa. Il software ANGULA [44] nato inizialmente in un contesto di MD è stato introdotto proprio a tal proposito. Esso permette di ricostruire delle mappe di densità spaziale (SDM) in 3D delle molecole intorno ad una molecola presa come riferimento, partendo da configurazioni molecolari che descrivono microscopicamente il sistema. Il software ANGULA [44] consente di estrarre la posizione e l'orientazione di molecole rispetto ad altre prese come riferimento. Il primo passo consiste nel ricavare delle configurazioni molecolari che descrivono microscopicamente il sistema. Tali configurazioni possono essere ottenute a partire dalle simulazioni di MD classica basate su parametri che riproducono le proprietà macroscopiche compatibili con i dati sperimentali oppure impiegando metodi inversi come ad esempio il Reverse Monte Carlo o come nel caso di questa tesi, l'Empirical Potential Structure Refinement. Supponiamo di considerare due corpi: ciascuno di questi può essere identificato attraverso dei gradi di libertà, di cui tre sono orientazionali e tre di posizione. La struttura viene descritta attraverso una funzione di densità di probabilità ($g(r, \theta_{pos}, \psi_{pos}, \theta_{ori}, \psi_{ori}, \phi_{ori})$) dove $r, \theta_{pos}, \psi_{pos}$ determinano la posizione della molecola in coordinate sferiche e $\theta_{ori}, \psi_{ori}, \phi_{ori}$ l'orientazione della molecola descritta in termini di angoli di Eulero. Il programma suddivide inizialmente le molecole sulla base della distanza da una molecola di riferimento, posta al centro, ed intorno alla quale si vuole calcolare la distribuzione; successivamente per il calcolo dei primi vicini, sceglie la prima molecola come riferimento. Una volta individuate le molecole, è possibile visualizzare la loro probabilità di collocazione, in termini di una mappa, tridimensionale (SDM) o in termini di proiezioni bidimensionali a seguito dell'integrazione in r . Il metodo è applicabile sia al caso di molecole di piccola dimensione ma anche al caso di molecole di dimensioni maggiori (es. proteine). In Figura 3.5 viene riportato un esempio di mappe di densità spaziale ottenute tramite il software ANGULA per molecole di prolina.

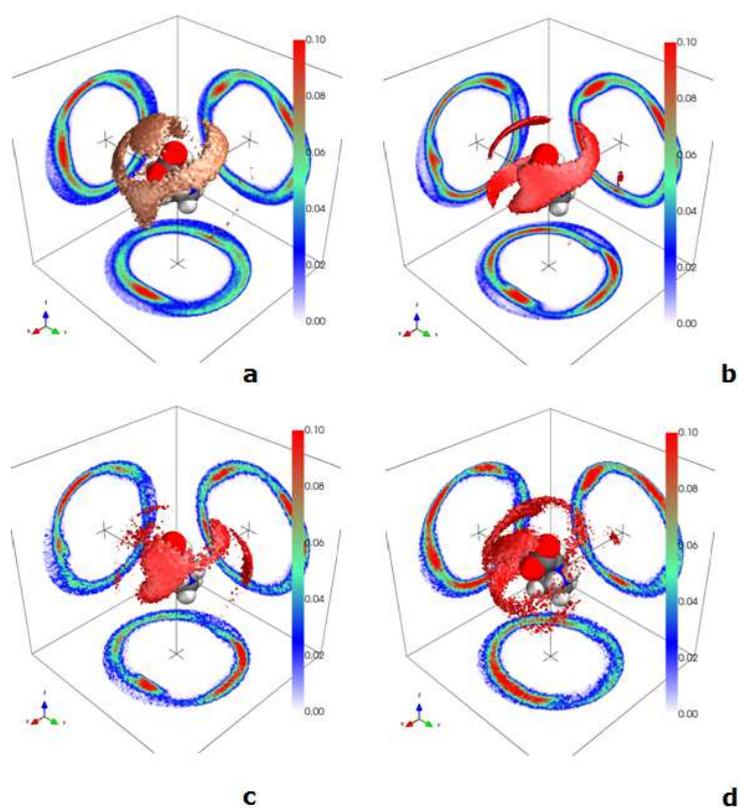


Figura 3.5 – Mappe di densità spaziale (SDM) che indicano la collocazione più probabile di molecole di prolina intorno ad una centrale (intervallo delle distanze 0-7.2 Å) per un sistema 1:5 prolina:acqua [45]. Le SDM sono state estratte dalle configurazioni ottenute con le simulazioni EPSR (a), CHARMM (b), CHARMM-flex (c), AMOEBA (d).

Capitolo 4

Studio della struttura dell'acqua

Ma a volte vorresti mangiarla o sentirtici dentro,
un sasso che l'apre, che affonda e sparisce e non sente,
vorresti scavarla, afferrarla, lo senti che è il centro
di questo ingranaggio continuo, confuso e vivente...

Acque, Francesco Guccini.

4.1 Introduzione

La conoscenza delle proprietà strutturali dell'acqua è cruciale in molti campi di ricerca: dalla meccanica statistica alla biologia, alle scienze ambientali ed industriali. Nel caso della biologia ad esempio, la presenza di acqua si rende necessaria affinché le molecole biologiche possano esplicare le proprie funzioni. Inoltre, le proprietà stesse delle biomolecole sono sensibili ai dettagli della struttura del solvente [4]. È per questo motivo che lo studio di biomolecole in soluzione acquosa (oggetto del mio progetto di tesi) non può prescindere da uno studio preliminare del solvente in cui vengono disciolte. Numerosi studi sono stati effettuati allo scopo di indagare sulle anomalie che caratterizzano l'acqua [46–48] e sul loro impatto nella regolazione dei processi biologici [49–53]. Tra le tante anomalie vi è ad esempio il comportamento della compressibilità isoterma dell'acqua che, a differenza degli altri liquidi, presenta un minimo intorno a $T=319$ K a pressione atmosferica [54]. Solo di recente, è stato proposto uno studio sulla struttura dell'acqua nell'intorno del minimo di compressibilità [55] tramite studi di diffrazione X ad alta energia. Lo scopo dello studio descritto in questo capitolo è, dunque, quello di

indagare su cosa accade alla struttura dell'acqua a temperature a destra ed a sinistra del minimo di compressibilità ed in particolare a $T=300$ K ed a $T=353$ K. Esiste una vasta letteratura che riguarda lo studio della struttura dell'acqua soprattutto a temperatura ambiente, e nella fase sottoraffreddata dove sono evidenti le anomalie dinamiche e strutturali dell'acqua [47]. Gli studi ad oggi disponibili per quanto riguarda la struttura e la dinamica dell'acqua, sono stati possibili per mezzo delle moderne tecniche sperimentali che sfruttano come sonde neutroni o raggi X [54, 56–66]. Soper [67] ha riportato diversi risultati ottenuti attraverso esperimenti di scattering di neutroni in combinazione con dati di diffrazione di raggi X, su campioni di ghiaccio ed acqua, nel range di temperature ($220 \div 365$) K ed a pressione atmosferica. Gli stessi risultati erano stati ottenuti da Narten et al. tramite diffrazione X [68]. Ulteriori misure realizzate su campioni di acqua a $T=283$ K ed a $T=363$ K da Nilsson et al., hanno dimostrato che l'acqua è formata da due specie distinte ed inconvertibili dal punto di vista strutturale e, che il rapporto tra le due specie dipende dalla temperatura [62]. Altri studi [69, 70] hanno confermato l'esistenza di una distorsione della rete del legame idrogeno quando sull'acqua viene applicata una pressione esterna.

Lo scopo dello studio descritto in questo capitolo è quello di indagare la struttura microscopica dell'acqua nell'intorno del minimo della compressibilità isoterma, tramite diffrazione neutronica combinata con la sostituzione H/D e le simulazioni EPSR. Verranno quindi discussi i risultati riguardanti la struttura dell'acqua a temperatura $T=353$ K ed a pressione atmosferica e confrontati con il comportamento dell'acqua pura a $T=300$ K. I dati di NDIS e la relativa analisi EPSR per l'acqua a $T=300$ K sono stati presi in letteratura [71]. Lo studio della struttura dell'acqua a $T=353$ K è interessante perchè alcune sostanze, come la caffeina, diventano più solubili in corrispondenza di tale temperatura. Pochi studi sono stati infatti effettuati nel range di temperature in cui l'acqua è un buon solvente per alcuni composti la cui idrofilicità risulta invece bassa a temperatura ambiente. Nel caso della caffeina ad esempio è stato osservato un aumento della solubilità in acqua di circa un ordine di grandezza quando, la temperatura del solvente passa da $T=300$ K a $T=353$ K [72]. Sulla base dei risultati ottenuti in questo lavoro, ci si chiede se eventuali variazioni strutturali presenti nell'acqua a $T=353$ K possano in qualche modo influire sull'aumento di solubilità di soluti insolubili a temperatura ambiente. Nei paragrafi successivi presenterò una breve descrizione del comportamento anomalo della compressibilità isoterma nell'acqua; successivamente riporterò i risultati sperimentali e il loro significato.

4.1.1 Anomalie nella compressibilità isoterma

In un liquido ideale la compressibilità isoterma diminuisce quando la struttura tende a diventare più compatta; questo accade generalmente raffreddando il liquido. Al contrario nell'acqua la riduzione della temperatura vicino ai 4 °C comporta l'insorgere di una struttura più ordinata ed "aperta"; di conseguenza, la compressibilità isoterma tende ad aumentare. In Figura 4.1 si osserva che la compressibilità isoterma dell'acqua presenta un minimo in corrispondenza di $T \sim 319$ K (~ 46.5 °C) e che in corrispondenza del massimo di densità ovvero a $T = 277$ K (4 °C), la compressibilità isoterma ed adiabatica si sovrappongono.

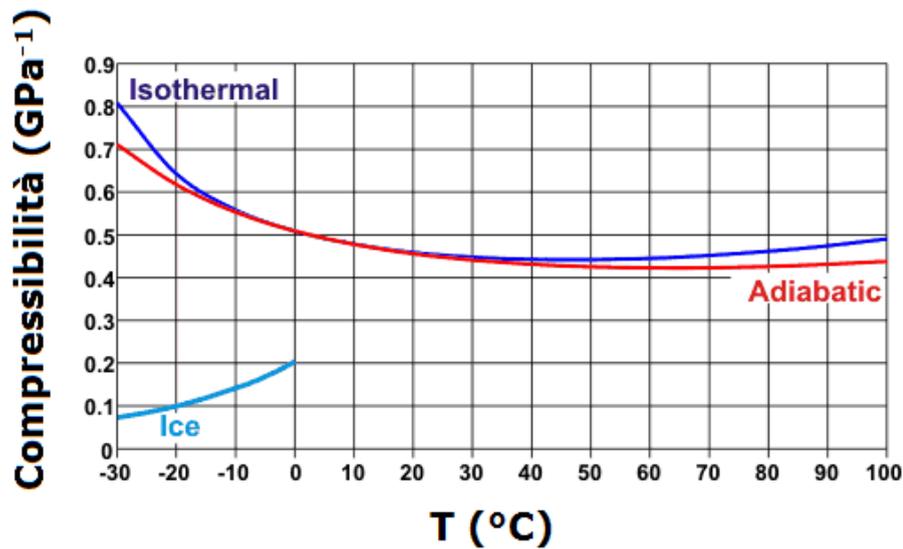


Figura 4.1 – Compressibilità isoterma ed adiabatica per l'acqua. Le due curve si sovrappongono in corrispondenza del massimo di densità.

Il comportamento anomalo della compressibilità isoterma non dipende semplicemente dalla densità ma da una serie di fattori concomitanti quali ad esempio le fluttuazioni del volume specifico o della densità stessa. Essa può essere espressa come [54, 73]:

$$\kappa_T = -\frac{1}{V} \left[\frac{\partial V}{\partial P} \right]_T = \left[\frac{\partial \ln \rho}{\partial \ln P} \right]_T = \frac{1}{\rho} \left[\frac{\partial \rho}{\partial P} \right]_T = \frac{1}{k_B T V} \langle (\Delta V)^2 \rangle_{TPN} \quad (4.1)$$

dove ρ indica la densità, k_B la costante di Boltzmann, V il volume e P la pressione. L'equazione per κ_T dipende espressamente dalle fluttuazioni del volume specifico (o dalla densità) che aumentano quando le molecole d'acqua fluttuano tra stati in cui si ha una differente configurazione del network dei legami idrogeno ed in corrispondenza delle differenti aree all'interno dei cluster d'acqua [74]. A pressioni più elevate (ad esempio a

~ 200 MPa), l'anomalia della compressibilità isoterma risulta meno evidente [75], nonostante sia collocata intorno a $T \sim 315$ K. In corrispondenza di tale temperatura, tutte le curve di espansione in funzione della temperatura, estratte per pressioni crescenti, si intersecano.

4.2 Caratteristiche strutturali dell'acqua e funzioni di distribuzione radiali

Le funzioni di distribuzione radiale delle coppie ossigeno-ossigeno, ossigeno-idrogeno, idrogeno-idrogeno ed indicate con g_{OO} , g_{OH} , g_{HH} che esprimono la probabilità di trovare un atomo di ossigeno o di idrogeno ad una certa distanza rispetto ad un altro (ossigeno o idrogeno) dell'acqua, posto all'origine, sono uno strumento insostituibile per lo studio della struttura microscopica dell'acqua ed in particolare per la verifica dell'esistenza dei legami idrogeno [67, 68]. La distanza \overline{OH} caratteristica del legame idrogeno è di circa 1.80 \AA ed a tale valore corrisponde la posizione del primo picco intermolecolare della g_{OH} mentre, in corrispondenza di 3.3 \AA vi è un secondo picco che descrive la struttura tetraedrica locale. La posizione del primo picco della g_{OO} intorno a $\sim 2.8 \text{ \AA}$ è una prova della direzionalità del legame idrogeno in quanto, tale valore non differisce da 2.85 \AA ovvero la distanza calcolata considerando che, nel legame $\text{O-H} \cdots \text{O}$, O-H rappresenta la distanza intramolecolare ed è pari ad 1 \AA mentre $\text{H} \cdots \text{O}$ rappresenta la distanza intermolecolare pari a 1.85 \AA . Infine, la presenza di un picco intorno a 4.5 \AA nella g_{OO} conferma l'esistenza della struttura tetraedrica dell'acqua. Lo spostamento di tale picco, indicativo della distorsione della rete di legame idrogeno è stato osservato sia per acqua sotto pressione [69, 70] o riscaldata a pressione atmosferica [67]. È stato osservato che anche l'inserimento di soluti in acqua [76] ne altera le proprietà strutturali. In Figura 4.2 viene rappresentata la struttura molecolare dell'acqua con le distanze tipiche intra ed intermolecolari. Nello specifico, le linee in nero indicano le distanze intermolecolari (di prima e seconda shell) tra due ossigeni dell'acqua (a), in rosso le distanze intermolecolari (di prima e seconda shell) tra ossigeno ed idrogeno dell'acqua (b) ed infine in blu le distanze intermolecolari (di prima e seconda shell) tra gli idrogeni dell'acqua.

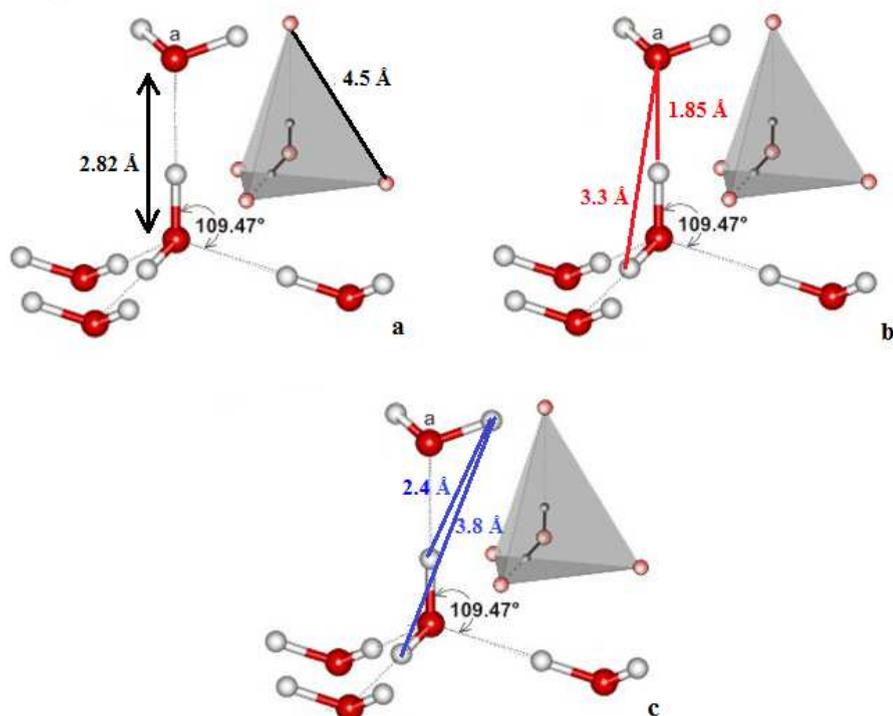


Figura 4.2 – Struttura tetraedrica dell'acqua. Le linee in nero indicano le distanze di legame tra gli ossigeni di molecole d'acqua adiacenti (a), in rosso viene indicata la lunghezza del legame idrogeno intermolecolare (b) infine, le linee in blu le distanze di legame intermolecolari tra gli idrogeni (c).

4.3 Risultati

Nel seguente paragrafo vengono riportati i risultati della struttura dell'acqua a $T=353$ K ottenuti combinando diffrazione neutronica con sostituzione H/D (NDIS) con le simulazioni EPSR. Tali risultati verranno quindi confrontati con quanto ottenuto per $T=300$ K. I dati di diffrazione neutronica e le relative analisi EPSR per l'acqua a temperatura ambiente sono stati presi in letteratura [71]. In tal modo verrà confrontato il comportamento strutturale dell'acqua nella regione termica al di sotto ed al di sopra del minimo di compressibilità collocato intorno a $T=320$ K.

4.3.1 Dettagli Sperimentali

Le misure di diffrazione neutronica sono state raccolte su SANDALS il diffrattometro per amorfi e liquidi di ISIS (UK). I dati di diffrazione neutronica sono stati raccolti per ciascuno dei tre campioni (H_2O , D_2O ed una miscela equimolare dei due precedenti ovvero HDO). Sia H_2O che D_2O sono stati acquistati presso Sigma Aldrich. I dati dei fattori di struttura totale, dopo essere stati corretti per la presenza del contributo anelastico e per assorbimento, vengono rielaborati tramite la tecnica computazionale del potenziale empirico (EPSR) descritta nel capitolo precedente. Per quanto riguarda la simulazione, è stata realizzata una scatola contenente 3500 molecole d'acqua ed il cui valore di densità (pari a 0.0971 atomi/Å³) è stato ottenuto tramite un densimetro Anton-Paar presso i laboratori RAL di ISIS; la dimensione della scatola è pari a $L=47.64$ Å. Il potenziale scelto per la simulazione è un potenziale di tipo SPC/E [77, 77]. A partire da tale configurazione, è stato realizzato un fit sui dati sperimentali ovvero sui fattori di struttura totali ottenuti dall'esperimento, il che ha permesso di ottenere le funzioni di distribuzione radiale di coppia secondo le modalità descritte nel Capitolo 2.

4.3.2 Funzioni di distribuzione radiale

Come già discusso la RDF Ow-Ow descrive la probabilità di trovare un atomo di ossigeno ad una distanza r rispetto ad un altro ossigeno dell'acqua, posto all'origine del sistema di riferimento. Nella Figura 4.3 viene riportato il confronto della funzione di distribuzione radiale di coppia ottenuta tramite diffrazione neutronica a $T=300$ K ed a $T=353$ K ed a pressione atmosferica.

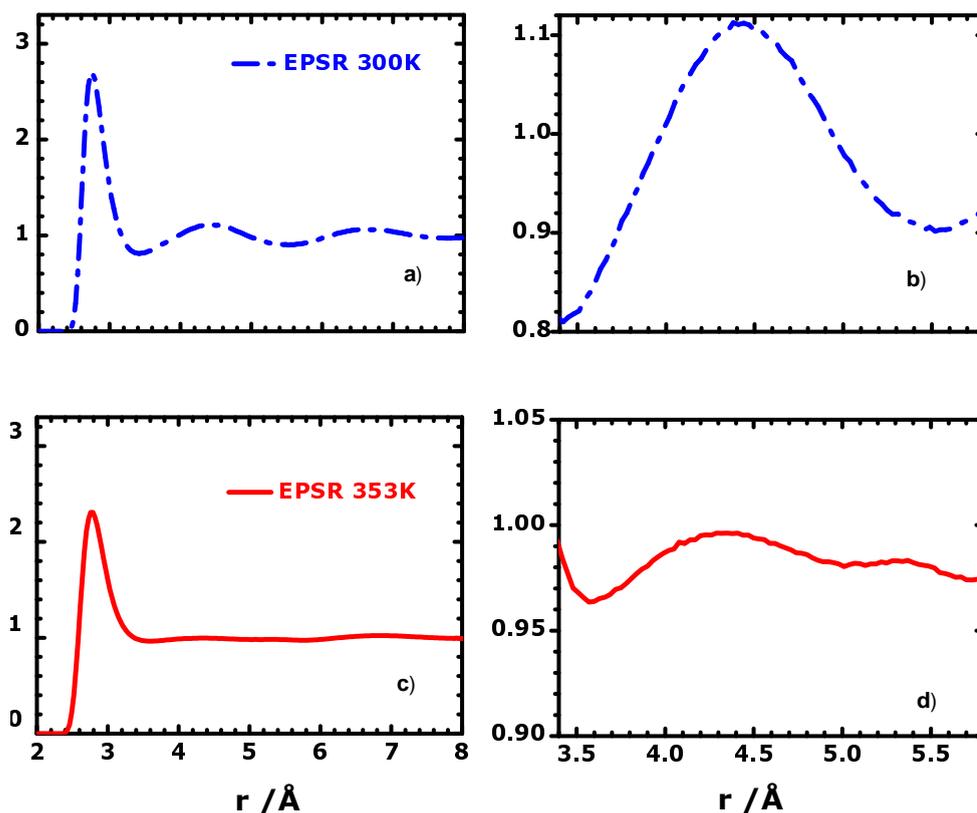


Figura 4.3 – RDF Ow-Ow ottenute tramite diffrazione neutronica combinata con simulazioni EPSR. La curva tratteggiata in blu si riferisce all'acqua pura a $T=300$ K (in alto) mentre la curva continua in rosso si riferisce all'acqua pura a $T=353$ K (in basso). In (a) e (c) vengono riportate la $g_{O_w-O_w}$ nell'intervallo di $1 \text{ \AA} < r < 8 \text{ \AA}$ mentre in (b) e (d) viene riportato un ingrandimento della seconda shell, per ciascuna delle $g_{O_w-O_w}$, rispettivamente per $T=300$ K e $T=353$ K.

Dal confronto si osserva che la posizione del primo picco della RDF Ow-Ow risulta invariata per effetto della temperatura e pari a $\sim 2.80 \text{ \AA}$, mentre si osservano differenze significative per quanto riguarda la posizione e la forma del secondo picco. Tale picco, collocato intorno a $\sim 4.5 \text{ \AA}$ per quanto riguarda l'acqua a $T=300$ K presenta invece una doppia struttura per $T=353$ K con un massimo collocato intorno a 4.33 \AA ed una spalla a 5.4 \AA (Figura 4.3 d). Nella Figura 4.4 viene riportato il confronto tra la RDF Ow-Hw dell'acqua pura per $T=300$ K in (a) e $T=353$ K in (b). La posizione del primo picco non subisce variazioni significative con l'aumento della temperatura ed è pari a $\sim 1.80 \text{ \AA}$. L'assenza di una variazione nella posizione del primo picco della RDF Ow-Hw indica che la lunghezza del legame idrogeno intermolecolare tra l'ossigeno e idrogeno dell'acqua resta invariata. Si osserva inoltre che l'aumento della temperatura da $T=300$ K a $T=353$ K comporta una riduzione dell'intensità dei picchi, compatibilmente con quanto ci si aspetta.

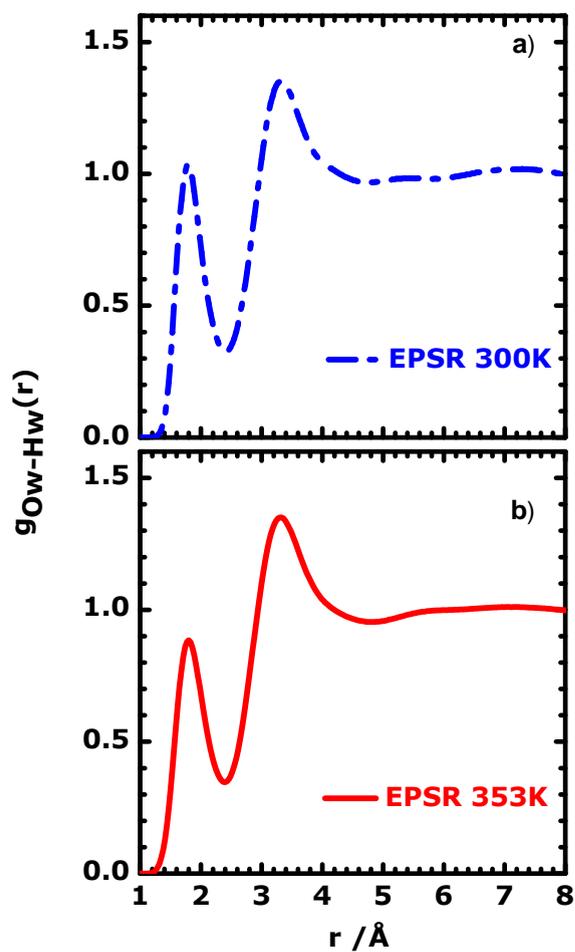


Figura 4.4 – RDF Ow-Hw per l'acqua pura a $T=300$ K (curva tratteggiata in blu) in (a) e $T=353$ K (curva continua in rosso) in (b) a pressione atmosferica ottenute tramite diffrazione neutronica e combinata con simulazioni EPSR.

In Figura 4.5 vengono riportate le RDF Hw-Hw dell'acqua a $T=300$ K ed a $T=353$ K. Anche in tal caso, non si notano variazioni significative per effetto della temperatura in quanto per entrambe, la posizione del primo picco è intorno a ~ 2.40 Å.

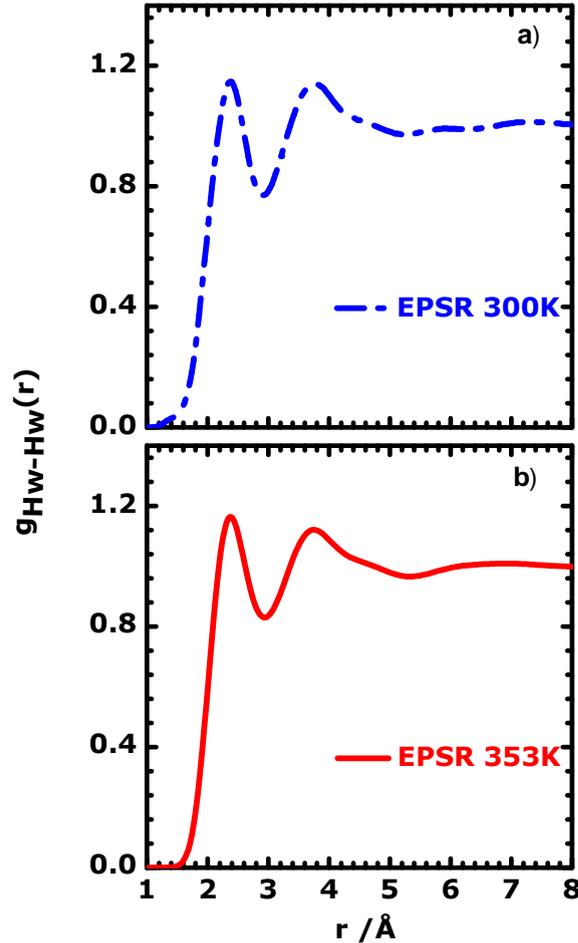


Figura 4.5 – RDF Hw-Hw risultanti dalla diffrazione neutronica combinata con simulazioni EPSR su acqua pura a $T=300$ K (curva tratteggiata in blu) in (a) e $T=353$ K (curva continua in rosso) in (b) a pressione atmosferica

Ulteriori informazioni sulla struttura dell'acqua possono essere ottenute dai numeri di coordinazione. In particolare $N_{O_w-O_w}$ rappresenta il numero di molecole d'acqua intorno a ciascuna molecola d'acqua, mentre $N_{O_w-H_w}$ rappresenta il numero medio di legami idrogeno dell'acqua. Tali numeri sono stati calcolati per l'acqua pura a $T=300$ K e $T=353$ K, integrando le RDF Ow-Ow nell'intervallo di $1 \text{ \AA} < r < 3.4 \text{ \AA}$ e le RDF Ow-Hw nell'intervallo $1 \text{ \AA} < r < 2.4 \text{ \AA}$. I valori di $N_{O_w-O_w}$ ed $N_{O_w-H_w}$, vengono riportati in Tabella 4.1. Si osserva che per $T=353$ K, i numeri di coordinazione $N_{O_w-O_w}$ ed $N_{O_w-H_w}$ risultano più piccoli rispetto a quelli ottenuti per l'acqua a temperatura ambiente.

Tabella 4.1 – Numeri di coordinazione per N_{Ow-Ow} ed N_{Ow-Hw} calcolati rispettivamente nell'intervallo di r $1 \text{ \AA} < r < 3.4 \text{ \AA}$ ed $1 \text{ \AA} < r < 2.4 \text{ \AA}$.

Campione	N_{Ow-Ow}	N_{Ow-Hw}
	$1 \text{ \AA} < r < 3.4 \text{ \AA}$	$1 \text{ \AA} < r < 2.4 \text{ \AA}$
acqua $T=300 \text{ K}$	4.80 ± 1.10	1.85 ± 0.68
acqua $T=353 \text{ K}$	4.70 ± 1.16	1.69 ± 0.70

4.3.3 Funzioni di densità spaziale SDF

Dalle $g(r)$ viste precedentemente, è ragionevole affermare che la prima shell non è diversa da quella dell' H_2O a temperatura ambiente. Per comprendere al meglio la struttura della seconda shell di coordinazione, è stata calcolata la Funzione di Distribuzione Spaziale in 3D delle molecole d'acqua intorno ad una molecola centrale. In Figura 4.6 vengono rappresentate solo le molecole d'acqua appartenenti alla seconda shell di coordinazione rispetto ad una molecola d'acqua posta all'origine. L'area intorno alla molecola centrale e rappresentata in giallo, corrisponde alla regione in cui la probabilità di individuare una molecola in seconda coordinazione supera il 25%. Nella Figura 4.6 (a) viene riportata la seconda shell di coordinazione che si estende da $\sim 3.4 \div 5.5 \text{ \AA}$, per l'acqua a temperatura ambiente; come è possibile notare, le molecole di acqua tendono ad occupare preferenzialmente un volume con una evidente simmetria tetraedrica. Questo significa che le molecole d'acqua collocate in prima shell formano legami idrogeno con quelle collocate in seconda shell. La stessa simmetria viene conservata per l'acqua a $T=353 \text{ K}$, solo se si considerano quelle molecole d'acqua nell'intervallo delle distanze $3.4 \text{ \AA} < r < 5 \text{ \AA}$ (Figura 4.6) (b). In Figura 4.6 (c) viene riportata la SDF della seconda shell dell'acqua a $T=353 \text{ K}$ considerando la sua estensione da $\sim 3.5 \div 5.7 \text{ \AA}$. In tal caso si osserva che ci sono delle aree in cui le molecole d'acqua non formano legami idrogeno con la prima shell. Tali molecole si collocano ad una maggior distanza e possiedono un'orientazione relativa che non descrive affatto un network di molecole legate per mezzo di legami idrogeno.

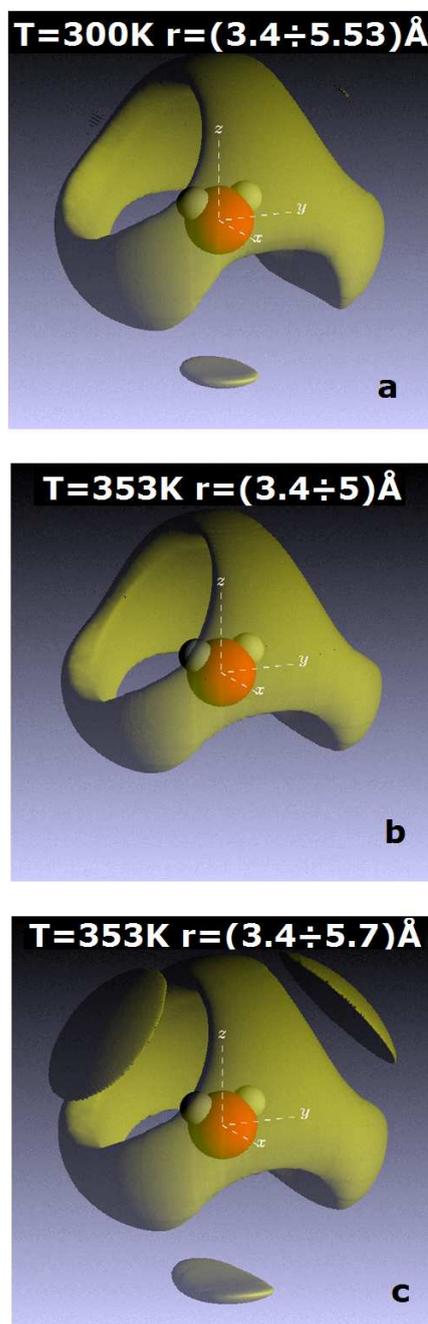


Figura 4.6 – Funzioni di Distribuzione Spaziale 3D (SDF) delle molecole d’acqua intorno ad una molecola centrale. Nelle mappe vengono considerate solo le molecole d’acqua collocate nella seconda shell di coordinazione, intorno ad una molecola centrale posta all’origine. In (a) viene presentata la distribuzione delle molecole d’acqua a temperatura ambiente, considerando un range di estensione della shell pari a $\sim (3.4 \div 5.5) \text{ \AA}$. Tale distribuzione evidenzia chiaramente che le molecole d’acqua tendono a distribuirsi secondo una simmetria tetraedrica. In (b, c) viene presentata la SDF di molecole d’acqua, intorno ad una centrale, a $T=353 \text{ K}$ e per un intervallo di estensione della shell pari a $\sim (3.4 \div 5) \text{ \AA}$ (b) e $\sim (3.4 \div 5.7) \text{ \AA}$ (c). Quando si considera la shell più piccola, ovvero considerando le molecole d’acqua collocate nell’intervallo $\sim (3.4 \div 5) \text{ \AA}$, la simmetria tetraedrica risulta conservata. Nel caso in cui si considerano le molecole d’acqua collocate nell’intervallo $\sim (3.4 \div 5.7) \text{ \AA}$, le molecole d’acqua tendono a riempire regioni inoccupate, senza però formare legami idrogeno con la molecola centrale appartenente alla prima shell di coordinazione.

4.3.4 Funzione di distribuzione dell'angolo \widehat{OwOwOw}

Ulteriori informazioni sulla struttura microscopica dell'acqua vengono fornite dalla funzione di distribuzione degli angoli di legame \widehat{OwOwOw} che rappresenta la probabilità di trovare $3Ow$ ad un certo angolo. In Figura 4.7 viene riportato il confronto tra le due distribuzioni \widehat{OwOwOw} a $T=300$ K ed a $T=353$ K. Le distribuzioni sono state ottenute scegliendo come massima distanza tra gli atomi di ossigeno 3.4 \AA , che corrisponde all'estensione della prima shell di coordinazione individuata prendendo il primo minimo della g_{Ow-Ow} . Si osserva che la distribuzione presenta due picchi in corrispondenza degli angoli di $\sim 55^\circ$ e $\sim 100^\circ$ e tale posizione non subisce variazione per effetto della temperatura. Si osserva invece che, il secondo picco diventa leggermente meno intenso e più largo per $T=353$ K rispetto a $T=300$ K, il che indica che la struttura tetraedrica dell'acqua sta subendo una distorsione. In aggiunta, anche il primo picco diventa meno intenso. Tale comportamento al variare della temperatura, è stato già osservato da Soper [67] e descrive una variazione del network dei legami idrogeno dell'acqua, come verrà spiegato più diffusamente nel prossimo paragrafo.

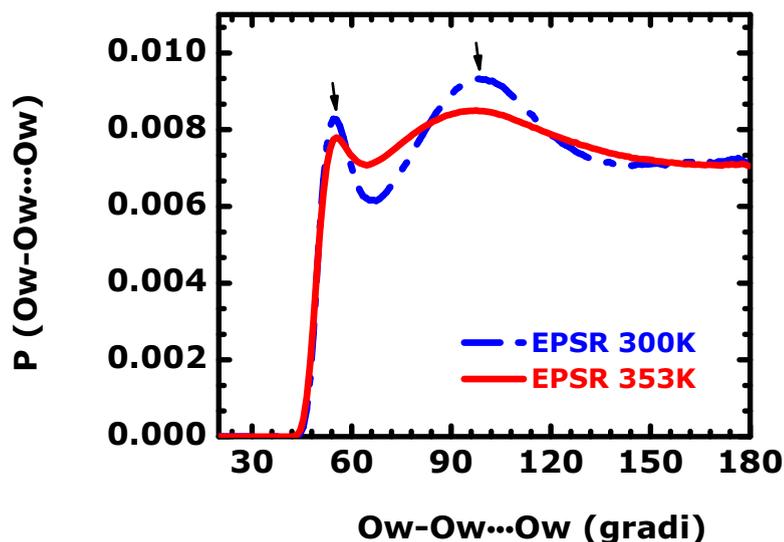


Figura 4.7 – Funzioni di Distribuzione dell'angolo \widehat{OwOwOw} per l'acqua a $T=300$ K (linea tratteggiata in blu) e $T=353$ K (tratto continuo in rosso) ottenute tramite EPSR. Le distribuzioni sono normalizzate per il $\sin \theta$ dove θ rappresenta l'angolo compreso tra i tre atomi di ossigeno dell'acqua.

4.4 Discussione

Lo scopo dello studio descritto in questo capitolo è di verificare se l'aumento di temperatura, al di sopra del punto di minimo della compressibilità isoterma, possa incidere sulla struttura dell'acqua. A tal proposito, è stato effettuato un confronto tra la struttura dell'acqua a $T=300$ K e $T=353$ K, studiata per mezzo di un esperimento di diffrazione neutronica combinato con le simulazioni al computer. Dalle RDF Ow-Ow è stato osservato che l'aumento di temperatura non comporta alcuna variazione sulla posizione del primo picco, mentre variazioni significative sono state individuate in corrispondenza del secondo picco. Per $T=353$ K si osserva una variazione significativa della struttura dell'acqua, rispetto a quanto osservato a $T=300$ K; tale variazione è dovuta alla presenza di un massimo collocato a 4.33 \AA e di una spalla collocata a 5.4 \AA . Non si osservano invece, variazioni significative nella lunghezza del legame idrogeno come visto dalla posizione del primo picco della RDF Ow-Hw, invariata rispetto a $T=300$ K.

Studi sulla struttura del ghiaccio e dell'acqua in un vasto intervallo delle temperature $200 \text{ K} \div 365 \text{ K}$, sono stati realizzati da Soper [67], presso il diffrattometro NIMROD di ISIS. Questi dati di diffrazione neutronica sono stati analizzati insieme ai dati di diffrazione di raggi X su H_2O , utilizzando una procedura EPSR molto simile a quella effettuata in questo lavoro. In tal caso, è stato però osservato che, il primo picco della RDF O-O si sposta

verso valori più grandi di r con l'aumento della temperatura. Il secondo picco mostra invece, una spalla significativa nel ghiaccio a 220 K non presente nelle RDF dell'acqua, dove il picco perde di intensità con l'aumento della temperatura e, l'avvallamento tra il primo ed il secondo picco si riempie come nel caso dei nostri dati. In corrispondenza del secondo picco delle RDF dell'acqua liquida, Soper non individua alcuna struttura nel secondo picco nelle RDF dell'acqua liquida anche se la scala non è confrontabile con quella utilizzata per i nostri dati, in Figura 4.3.

Skinner et al. [55] ha riportato misure di diffrazione da raggi X ad alta energia (HEXRD) realizzati su soluzioni di acqua in funzione della temperatura e fino a 366 K. Le RDF O-O risultanti mostrano uno shift graduale dei massimi in corrispondenza del primo e del secondo picco, verso valori crescenti di r , quando la temperatura viene aumentata. In particolare, al di sopra della temperatura del minimo di compressibilità isoterma ($T=320$ K), la posizione del secondo picco della RDF O-O tende a subire uno spostamento verso distanze maggiori, nonostante il numero di coordinazione resti costante mentre, al di sotto di 319 K il sistema tende a diventare più ordinato mantenendo per l'appunto una struttura tetraedrica. Al di sopra del minimo di compressibilità a 320 K lo shift del secondo picco diventa più rapido e la forma stessa del secondo picco tende a diventare più asimmetrica con un' intensità maggiore in corrispondenza di più alti valori di r nonostante non ci sia alcuna evidenza di una doppia struttura. Nel lavoro di Fu et al. [78], è stata osservata una doppia struttura nel secondo picco della RDF molecolare. Gli autori mostrano che la visibilità di questa doppia struttura dipende dal range di Q studiato. E' importante notare come la presente discussione si basi sul raffronto della forma di un picco di diffrazione, ovvero una quantità delicata da trattare in fase di analisi dati, in quanto potenzialmente dipendente dalle procedure per la stessa analisi e dalla presenza di residui di errori sistematici. Come nota ad esempio lo stesso Soper [67] il quale puntualizza che ci sono diversi motivi per i quali vi possano essere delle discrepanze tra il fit realizzato per mezzo dell'EPSR ed i dati NDIS ovvero:

- correzioni inadeguate dei dati per assorbimento, scattering multiplo, scattering del background, della cella e inelasticità;
- errori nelle trasformate di Fourier dei fit ottenuti con il metodo EPSR;
- differenze quantistiche nella struttura microscopica di H₂O e del D₂O [79, 80].

Ci si aspetta però che, le correzioni inelastiche aumentino con la temperatura [36] e che le differenze quantistiche diminuiscano significativamente. Per ottenere le RDF O-O a partire dai dati ottenuti con HEXRD, occorre invece sottrarre lo scattering di Compton, sottrarre i contributi provenienti da O-H ed H-H che comportano un certo grado di incertezza nella struttura elettronica; in aggiunta, la presenza di un range di Q piuttosto limitato può incidere sulle trasformate di Fourier la cui risoluzione dipende da Q . Recentemente, Brooks e Head Gordon [81] hanno dimostrato che in un tipico esperimento di diffrazione da raggi X, la consistenza tra l'intensità di scattering elastico ed una famiglia di distribuzioni radiali ossigeno-ossigeno è fortemente dipendente dal modello impiegato per la densità elettronica. Ogni metodo comporta un'incertezza nella forma ottenuta per i picchi. Il metodo da noi utilizzato, per quanto non scevro da potenziale errore, ha il vantaggio della consistenza. Innanzitutto è stato utilizzato per un gran numero di stati termodinamici dell'acqua. Inoltre il risultato ottenuto e la sua interpretazione in termini di struttura dei legami a idrogeno è consistente con le altre quantità da noi calcolate, quali la distribuzione angolare \widehat{OwOwOw} e la funzione di densità spaziale SDF. Per studiare più nel dettaglio la struttura della seconda shell di coordinazione abbiamo confrontato in Figura 4.6 le Funzioni di Distribuzione Spaziale tridimensionale (SDF) delle molecole d'acqua intorno ad una molecola centrale, ottenute tramite il metodo EPSR [19]. Sono state considerate solo le molecole d'acqua nella seconda shell di coordinazione di una molecola d'acqua posta all'origine del sistema di riferimento e la regione di spazio intorno alla molecola centrale ed evidenziata in giallo corrisponde alla regione in cui la probabilità di trovare una molecola seconda vicina supera il 25%. Il pannello (a) mostra la seconda shell di coordinazione a temperatura ambiente: la shell si estende da 3.4 Å fino a 5.5 Å, e le molecole occupano preferenzialmente un volume con una evidente simmetria tetraedrica. Questo implica che le molecole in seconda coordinazione formano legami idrogeno con quelle della prima shell. A $T=353$ K la stessa simmetria viene mantenuta se si considerano solo le molecole d'acqua che si trovano ad una distanza compresa tra 3.5 Å e 5 Å (pannello b). In questo caso, comunque, il secondo picco della RDF Ow-Ow si estende fino a 5.7 Å, a causa della presenza di un picco secondario o meglio di una spalla. Quando si considerano tutte le molecole fino ad una distanza di 5.7 Å, si osserva che le regioni non occupate iniziano a riempirsi. A differenza delle molecole d'acqua che si trovano nella regione compresa tra 3.5÷5 Å, quelle collocate ad una distanza compresa tra 5÷5.7 Å rispetto ad una molecola centrale, non riescono a formare legami idrogeno con le molecole d'acqua nella prima shell di coordinazione di una molecola centrale, a

causa sia della loro distanza (maggiore) che della loro orientazione relativa. Questo prova ulteriormente che il network di molecole d'acqua legate per mezzo di legami idrogeno risulta distorto. Tale distorsione può essere interpretata come una conseguenza del collasso della terza shell sulla seconda o dovuta alla presenza di due network indipendenti ed interpenetrati di molecole d'acqua legate per mezzo di legami idrogeno [67].

4.5 Conclusioni

Sulla base di quanto ottenuto da un esperimento NDIS combinato con l'analisi EPSR, abbiamo mostrato che la struttura dell'acqua a 353 K differisce da quella dell'acqua a temperatura ambiente e che tali differenze riguardano la seconda shell di coordinazione. I nostri risultati mostrano che l'acqua a $T=353$ K forma un network tetraedrico distorto di molecole legate per mezzo di legami idrogeno, come evidenziato dallo shift del secondo picco della RDF O-O verso distanze più corte, rispetto a quanto osservato a temperatura ambiente. Allo stesso tempo, il numero medio dei legami idrogeno diminuisce leggermente e la seconda shell di coordinazione tende ad assumere una simmetria sferica, a causa del collasso della terza shell sulla seconda.

All'inizio di questo studio ci si era proposti di provare a individuare una connessione tra l'aumento di solubilità in acqua di alcune sostanze, quale la caffeina, poco solubile al di sotto di $T=353$ K [72], a temperature superiori alla temperatura ambiente ed eventuali variazioni nella struttura dell'acqua a tale temperatura. I risultati ottenuti consentono di formulare delle ipotesi al riguardo, ad esempio, la distorsione del network di legami idrogeno e la riduzione del numero di legami idrogeno intatti osservata nei numeri di coordinazione $N_{O_w-H_w}$, nel caso dell'acqua a $T=353$ K, potrebbero favorire l'idratazione di alcuni soluti ed il legame di alcuni siti specifici con l'acqua. Lo studio dell'acqua a $T=353$ K si è rivelato utile in questo progetto di dottorato anche per lo studio di soluzioni di acqua e glicina a $T=353$ K.

Lo studio viene descritto nel Capitolo 5 ed ha essenzialmente lo scopo di evidenziare la presenza di aggregati di glicina in soluzione acquosa al variare della concentrazione e della temperatura.

Capitolo 5

Studio dell'idratazione del glucosio

5.1 Introduzione

Lo scopo dello studio descritto in questo capitolo è di mostrare in che modo alcune funzioni specifiche dei carboidrati possano essere spiegate a partire da una descrizione della loro idratazione, a livello atomico. La scelta dei carboidrati come oggetto di studio, nasce dal fatto che essi presentano proprietà interessanti dal punto di vista biologico; basti pensare al loro ruolo nel meccanismo di riconoscimento del gusto dolce (glucosio), nella bio-protezione (trealosio) e nella formazione di fibre (cellobiosio). Il mio contributo in questo lavoro vuole essere quello di fornire uno studio dell'idratazione del glucosio a livello atomico, con l'impiego di una tecnica di diffrazione neutronica, combinata con le simulazioni al computer. Esiste una vasta letteratura sull'idratazione del glucosio sia a livello non atomico [82–88] che a livello atomico [3, 5, 89]. Gli studi di dinamica molecolare [89–93], o gli esperimenti di spettroscopia Raman [83, 86, 87, 94], spettroscopia infrarossa [91], scattering inelastico di neutroni [91], spettroscopia di rilassamento dielettrico [95], risonanza magnetica nucleare [96] e misure di viscosità [85] formulano delle ipotesi per quanto riguarda la capacità di idratazione degli zuccheri e l'effetto di destrutturazione dell'acqua che essi comportano. Lee et al., propone una simulazione di dinamica molecolare [89] su soluzioni di acqua e glucosio, trealosio e saccarosio a temperatura ambiente, suggerendo che i tre carboidrati distruggono la struttura microscopica dell'acqua ed in particolare la disposizione tetraedrica delle molecole d'acqua prossimali, riducendone la mobilità traslazionale e rotazionale. Secondo gli autori, gli effetti di destrutturazione sarebbero una conseguenza del vincolo sterico del carboidrato mentre la presenza di una

dinamica rallentata dell'acqua solvente del carboidrato, deriverebbe dall'abilità dei carboidrati di formare legami idrogeno stabili con l'acqua. Altri studi hanno invece suggerito che l'effetto perturbativo indotto dal glucosio e da alcuni disaccaridi sulla struttura dell'acqua è relativamente piccolo [82]. Lo stesso risultato è stato ottenuto tramite misure di struttura a mezzo di diffrazione neutronica, realizzati da Mason et al. [5]; in tali studi l'assenza di uno spostamento significativo nella posizione del secondo picco della funzione di distribuzione radiale degli ossigeni dell'acqua $g_{Ow-Ow}(r)$, è indicativa del fatto che la presenza del glucosio alteri poco la struttura dell'acqua. Ricordiamo infatti che la $g_{Ow-Ow}(r)$ indica la probabilità di individuare un atomo di ossigeno dell'acqua ad una distanza r da un altro atomo di ossigeno posto al centro del sistema di riferimento; il secondo massimo di tale funzione è collocato nel caso dell'acqua pura, intorno a 4.5 Å, ed è una firma della struttura tetraedrica. Eventuali spostamenti di tale picco vengono utilizzati come marcatori della distorsione della rete di legami idrogeno dell'acqua. Anche gli spettri IR di soluzioni di acqua e glucosio [91], non presentano alcuna variazione rispetto agli spettri di acqua pura, dimostrando per l'appunto, che l'acqua può tranquillamente ospitare lo zucchero senza che la struttura ne venga perturbata. Gli stessi studi combinati con simulazioni di dinamica molecolare su soluzioni acquose di D-glucosio, hanno dimostrato che le molecole di glucosio non tendono a formare aggregati se non per alte concentrazioni di soluto e per effetto dei legami idrogeno tra i gruppi idrossilici del glucosio, in competizione con le molecole d'acqua, in corrispondenza degli stessi siti del legame idrogeno [3]. In nessuno di tali studi però, viene proposta un'interpretazione dell'idratazione a livello atomico come la chiave per la comprensione delle funzioni specifiche dei carboidrati. Lo scopo dello studio proposto in questo capitolo è quello di indagare sul ruolo del legame idrogeno tra glucosio ed acqua nel riconoscimento del gusto dolce. Un approccio di questo tipo ha senso se si pensa che già nelle prime e nelle successive teorie riguardanti il meccanismo di riconoscimento del gusto [97–101] si parla spesso di legame idrogeno tra recettore e zucchero. Per individuare il ruolo della struttura dell'acqua nelle proprietà dei carboidrati sono stati realizzati studi sperimentali [102, 103] e di dinamica molecolare [104] su soluzioni acquose di disaccaridi, . Tali studi si basano sulla considerazione che esistano alcuni parametri rilevanti come il tempo di vita media dei legami idrogeno o la mobilità delle molecole d'acqua intorno alla molecola. Lo scopo del lavoro presentato è dunque, quello di comprendere se il legame idrogeno, così importante nel riconoscimento del gusto dolce, sia o meno mediato dall'acqua. In letteratura sono già presenti informazioni sull'idratazione a livello atomico, di campioni di trealosio [105]

e cellobiosio [106], disaccaridi del glucosio con differente struttura chimica e differenti funzioni. Per tale motivo, uno studio dell'idratazione a livello atomico del glucosio, non ancora disponibile in letteratura, si rivela utile proprio al fine di un confronto diretto con i dati già disponibili dei campioni di trealosio e di cellobiosio. Eventuali differenze nell'idratazione dei tre carboidrati risulteranno indicative non solo per la comprensione del meccanismo di percezione del gusto ma anche per la comprensione delle loro funzioni specifiche. Nella prima parte del capitolo verranno presentate alcune caratteristiche del glucosio ed alcuni cenni sulle teorie fondamentali che riguardano la percezione del gusto. Nella seconda parte verranno quindi presentati i risultati sperimentali e confrontati sia con quanto ottenuto in altri lavori [3], che con quanto ottenuto, impiegando il medesimo approccio, per soluzioni di cellobiosio e di trealosio. Si vedrà che le differenze individuate nell'idratazione dei tre campioni sono significative e di supporto per comprendere il ruolo dell'idratazione nella funzione specifica di ciascun carboidrato.

5.2 Struttura del glucosio e disaccaridi del glucosio

Il glucosio è un monosaccaride la cui formula chimica è $C_6H_{12}O_6$. In soluzione acquosa esso tende ad assumere una configurazione ad anello a 6 atomi (1 atomo di ossigeno e 5 atomi di carbonio) per mezzo di un legame semiacetalico tra un alcol ed un' aldeide (rispettivamente (ROH, R'CHO dove R, R' sono i residui) [42]. Tale configurazione energeticamente favorita, prende il nome di piranosio. Una soluzione di acqua e glucosio presenta all'equilibrio, il 36 % di α -D-glucopiranosio, lo 0.02 % di monomeri lineari di glucosio ed il 64 % di β -D-glucopiranosio. Le due configurazioni α -D-glucopiranosio e β -D-glucopiranosio, differiscono semplicemente per la differente collocazione del gruppo anomero -OH rispetto al piano dell'anello (Figura 5.1).

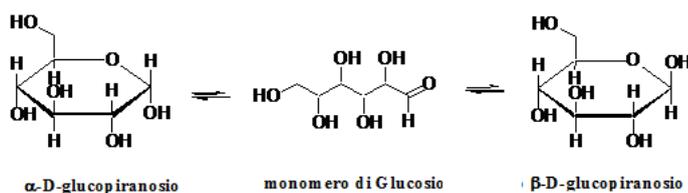


Figura 5.1 – Conformazioni α -D-glucopiranosio, catena aperta e β -D-glucopiranosio presenti rispettivamente nelle percentuali 36 %, 0.02 % e 64 % quando il glucosio è in soluzione acquosa.

Il glucosio rappresenta l'unità componente di molti disaccaridi naturali. Tali composti presentano la stessa formula chimica ($C_{12}H_{22}O_{11}$) ma differiscono per la posizione

reciproca dei due anomeri di glucosio, ovvero per il legame intramolecolare (legame glicosidico). Il legame glicosidico può essere di tipo “ α ” o “ β ”, a seconda della collocazione dell'ossidrilico legato al carbonio 1 (anomerico) coinvolto nel legame (vedi Figura 5.2). Il legame è di tipo α quando collocato sul piano opposto rispetto all'unità ossidrilica -OH mentre è definito di tipo β quando si trova sullo stesso piano (Figura 5.2). Esso risulta di fondamentale importanza in quanto influisce sulle funzioni svolte dai disaccaridi stessi.

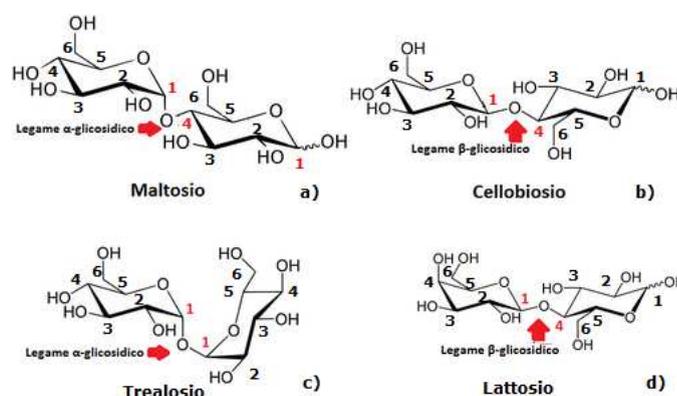


Figura 5.2 – Classe di disaccaridi caratterizzati da legami α -D-glicosidici e β -D-glicosidici.

Esempi di disaccaridi del glucosio dal differente legame intramolecolare sono il maltosio, il cellobiosio ed il trealosio. Nei primi due il legame tra il carbonio 1-4 (Figura 5.2 a), b)) è del tipo α -glicosidico o β -glicosidico mentre il trealosio è l'unico esempio di legame α -glicosidico tra gli atomi di carbonio 1-1 degli anelli [42]. È ragionevole supporre che le differenze nella struttura dei carboidrati influiscono sulle loro funzioni biologiche. Il glucosio è infatti noto come zucchero, il trealosio come un bio-protettore [107, 108] ed il cellobiosio come componente di fibre [109, 110]. Dal momento che siamo interessati a comprendere il ruolo dell'idratazione e dunque del legame idrogeno nel meccanismo di percezione del gusto dolce di zuccheri, propongo nel paragrafo successivo, una breve descrizione delle teorie che riguardano il meccanismo di riconoscimento del gusto dolce.

5.2.1 Il “triangolo del dolce” : una chiave per interpretare il meccanismo di percezione del gusto

Il primo tentativo di descrivere il meccanismo della percezione del gusto, venne realizzato nel 1967 da Shallenberger ed Acree [98]. La loro teoria prevedeva che tutti gli zuccheri presentassero una struttura del tipo AH-B, dove A e B rappresentano atomi elettronegativi e separati da una distanza superiore a 2.5 Å ed inferiore a 4 Å. Secondo il modello,

AH agisce come un donore del legame idrogeno mentre B come un accettore del legame idrogeno. Nel caso dei carboidrati, A corrisponde all'atomo di ossigeno O di un gruppo -OH dell'anello mentre B all'atomo di ossigeno appartenente al gruppo -OH del metilene CH₂OH [98].

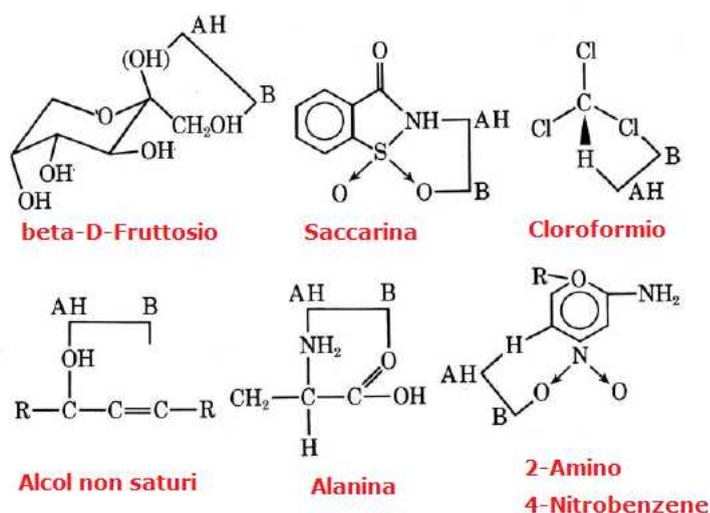


Figura 5.3 – Modello AH-B di Shallenberger ed Acree [98] per diversi composti.

Secondo la teoria, anche il sito del recettore si presenta come un'unità bi-funzionale caratterizzata dalla stessa struttura B-AH del composto dolce. L'interazione tra il sito del recettore ed il composto dolce, avviene solo per mezzo di legami idrogeno e la distanza tra i siti A e B deve essere pari a $\sim 3 \text{ \AA}$ (Figura 5.4).

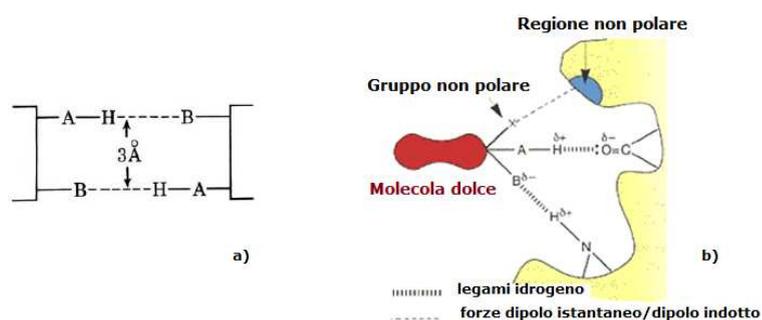


Figura 5.4 – Modello di interazione tra il sito del recettore ed un composto dolce.

La teoria sopra descritta è stata successivamente modificata con l'introduzione di un sito aggiuntivo X idrofobico [99]. Tale sito sembra essere essenziale per definire la qualità del gusto nelle sostanze ad elevato potere dolcificante [99]. Successive modifiche della teoria prevedevano ad esempio, l'introduzione di parametri indicativi di una distanza minima, ottimale e massima tra il centro idrofobico e l'unità AH-B in una serie di dolcificanti [100], l'aggiunta di barriere collocate a varie distanze dai siti esistenti [111] o ancora ulteriori siti

in aggiunta ai tre siti AH-B-X [101] allo scopo di spiegare il comportamento di sostanze dolci che non fossero carboidrati. A partire dal 1980, alcuni studi di elettrofisiologia e biochimici [112–114] hanno dimostrato che esiste un' unica classe di recettori coinvolta nella percezione del gusto. Tali recettori risultano composti da dimeri di proteine G, e proprio da tali dimeri, dipende la percezione del gusto. I meccanismi biochimici che regolano la percezione del gusto sia a livello cellulare che molecolare, sono molteplici e non sono ad oggi, completamente chiari [115]. Tuttavia, il modello di Kier [99] nonostante sembri troppo semplice per poter descrivere il meccanismo di percezione del gusto, risulta utile come ipotesi di lavoro per quanto riguarda l'identificazione di una relazione tra struttura ed attività ed è quindi di supporto per gli studi di modellizzazione molecolare. Un primo approccio in tal senso è stato realizzato da Lichtenthaler e Immel, i quali hanno impiegato simulazioni al computer per riprodurre l'interazione recettore-saccarosio [116]. Nella Figura 5.5 viene riportata una rappresentazione dell'interazione tra saccarosio e recettore, risultante dalla loro modellizzazione.

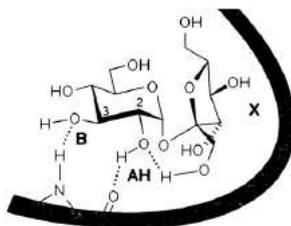


Figura 5.5 – Modello di interazione tra il sito del recettore e saccarosio risultante dalle simulazioni al computer di Lichtenthaler e Immel [116].

5.3 Studio dell'idratazione del Glucosio: risultati sperimentali

In questo paragrafo viene descritto uno studio di diffrazione neutronica con sostituzione H/D su campioni di glucosio in soluzione acquosa a due concentrazioni soluto/solvente (1.1 M e 4.4 M). Il supporto delle simulazioni EPSR (Capitolo 3) permette di ottenere, informazioni sulla struttura atomica del sistema ed in particolare sull'idratazione dei siti del glucosio. L'impiego successivo della routine ANGULA permetterà invece di descrivere la distribuzione delle molecole d'acqua in 3D intorno ad una molecola di glucosio. Tali risultati verranno quindi confrontati successivamente con quanto ottenuto allo stesso modo, per soluzioni acquose di trealosio [105] e cellobiosio [106].

5.3.1 Materiali

L'esperimento di diffrazione neutronica con sostituzione H/D è stato realizzato su due campioni di acqua e glucosio a due differenti concentrazioni ovvero una concentrazione di 1 glucosio e 12.5 molecole d'acqua (4.4 M) e di 1 glucosio e 50 molecole d'acqua (1.1 M) a temperatura ambiente ed a pressione atmosferica. Come descritto nel Capitolo 2, per un sistema formato da tanti atomi il numero di sostituzioni isotopiche necessario per risolvere tutte le coppie di fattori di struttura parziali e dunque le funzioni di distribuzione delle coppie, risulta elevato. Nel caso di una soluzione di glucosio ed acqua, tale numero è pari a: $N(N+1)/2=26(27)/2=351$ dove N è il numero totale di atomi nel campione. Si tratta chiaramente di un numero enorme e dal momento che è difficile sostituire isotopicamente tutti gli atomi del glucosio, si è scelto un numero di contrasti tale da assicurare un vincolo sufficiente per la simulazione. Nel nostro caso sono state realizzate sette sostituzioni isotopiche che riguardano principalmente i gruppi a cui siamo interessati ovvero i gruppi idrossilici ed il gruppo idrossimetilico del glucosio, verosimilmente coinvolti nel legame idrogeno con l'acqua. In aggiunta, sono state realizzate sostituzioni H/D anche sul solvente. Tali contrasti sono dunque sufficienti a risolvere la struttura soprattutto se si pensa che ciò a cui siamo interessati è l'interazione del glucosio con l'acqua e che tale interazione avvenga principalmente per mezzo dei legami idrogeno tra gruppi idrossilici, ed idrossi-metilico i cui idrogeni sono stati per l'appunto, sostituiti isotopicamente. Il

glucosio in polvere è stato acquistato da Sigma Aldrich e poi disciolto in acqua. In particolare sono stati acquistati i campioni di glucosio dalle formule $C_6H_{12}O_6$ ed il $C_6D_7H_5O_6$ dove nel secondo sono deuterati solo gli idrogeni che non scambiano con l'acqua. Tutti gli altri campioni di glucosio sono stati ottenuti a partire da questi, sciogliendo in H_2O o in D_2O e liofilizzando. I cicli di solvatazione e liofilizzazione sono stati effettuati per quattro volte in modo tale da assicurare che lo scambio avvenga effettivamente. Un esempio è il campione $C_6H_7D_5O_6$ ottenuto sciogliendo il campione completamente idrogenato in D_2O in modo tale che gli unici H che scambiano con l'acqua e diventano D sono gli idrogeni legati ai gruppi -OH. Nella Figura 5.6 vengono riportati in I) i campioni ottenuti semplicemente sciogliendo il glucosio in H_2O o D_2O mentre in II) le miscele equimolari ottenute dalle diverse combinazioni dei campioni in I). In totale sono stati ottenuti 7 contrasti per ciascuna concentrazione (Figura 5.6) sciogliendo in H_2O il campione completamente idrogenato (a), in D_2O il campione completamente deuterato (b), una miscela equi-molare dei due precedenti (c), il campione parzialmente idrogenato ($C_6D_7H_5O_6$) disciolto in H_2O (d) il campione ottenuto sciogliendo $C_6H_7D_5O_6$ in D_2O (e); gli ultimi due campioni sono infine miscele equimolari di (I b) e (I d) (II f, b, e) (II g).

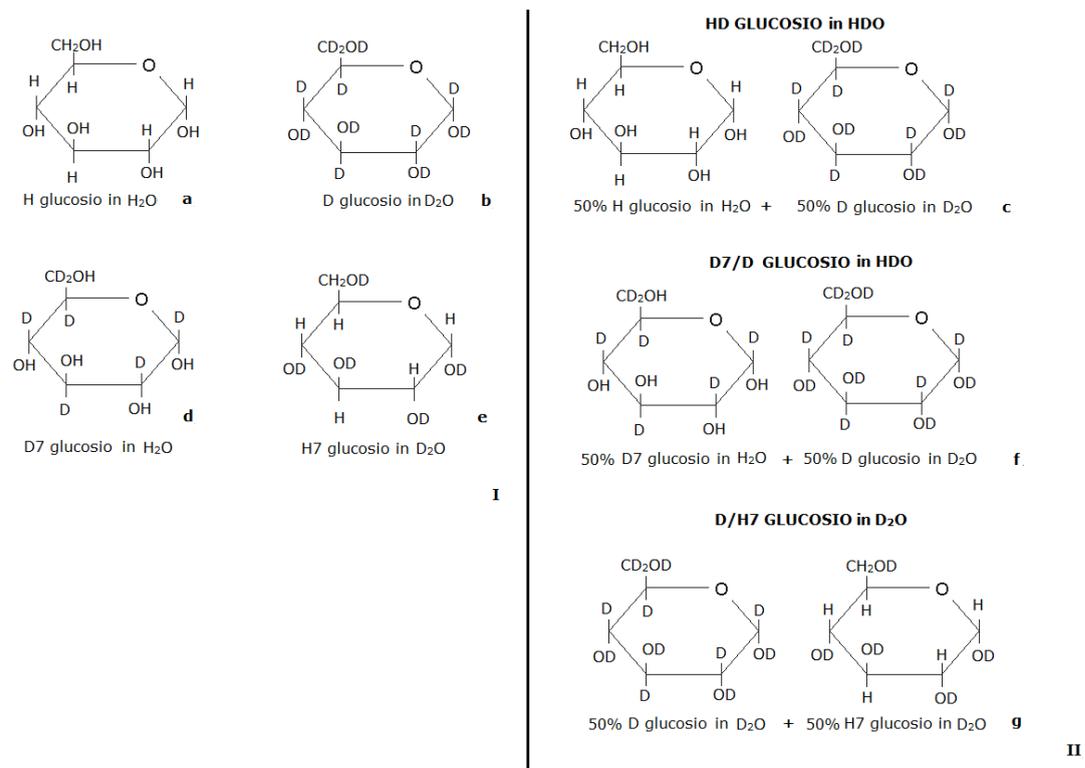


Figura 5.6 – Campioni realizzati per ciascuna concentrazione di glucosio:acqua, tramite sostituzione H/D. In II vengono descritti i campioni ottenuti tramite miscele equimolari a partire dai campioni I.

Le misure di diffrazione neutronica sono state realizzate presso il diffrattometro per liquidi SANDALS ubicato presso la sorgente a spallazione di neutroni ISIS (UK). A partire dalle misure del fattore di struttura statico totale (riportate nel Capitolo 3) sono state realizzate le simulazioni EPSR che, come anticipato permettono di ottenere informazioni sulla struttura del campione a livello atomico. Sono state costruite due scatole di simulazione (una per ogni concentrazione soluto/solvente) che riproducessero al meglio le caratteristiche del glucosio in soluzione acquosa. In particolare, tengono conto del rapporto tra le popolazioni α e β del glucosio quando in soluzione acquosa (1:2 α -D-glucopiranosio: β -D-glucopiranosio), delle concentrazioni di glucosio:acqua (1:12.5 ed 1:50) e dunque dei valori di densità misurati sperimentalmente (rispettivamente 0.108 atomi/Å³, 0.105 atomi/Å³). La scatola di simulazione per il sistema con una concentrazione pari a 1:50 presenta un numero totale di molecole pari a 1071 mentre il sistema a maggior concentrazione di glucosio (glucosio:acqua 1:12.5) è formato da un numero totale di molecole uguale a 567. In Figura 5.7 vengono riportate le etichette utilizzate per gli atomi del β -D-glucosio, le stesse etichette sono state impiegate per la specie α -D-glucosio ad eccezione degli atomi di ossigeno ed idrogeno del gruppo -OH (indicizzati rispettivamente con O3(a) ed H $_{\alpha}$), che ne determinano la specie. Per quanto riguarda l'acqua gli atomi di ossigeno e di idrogeno vengono indicati con Ow ed Hw rispettivamente e dunque differenziati rispetto a quelli del glucosio. Tale indicizzazione è fondamentale dal punto di vista della simulazione perchè garantisce la possibilità di ottenere informazioni specifiche sull'idratazione di ciascun sito del glucosio.

Nella Tabella 5.1 vengono riportati i parametri dei potenziali (Lennard-Jones e carica) impiegati come potenziali di riferimento per le simulazioni EPSR. Per quanto riguarda il glucosio, sono stati impiegati potenziali OPLS presenti in letteratura per i carboidrati [43]. In aggiunta, la carica sui diversi atomi è stata ridistribuita in modo tale da garantire l'elettro-neutralità della molecola. La molecola d'acqua è stata invece modellizzata tramite un potenziale di riferimento del tipo SPC/E [77, 77].

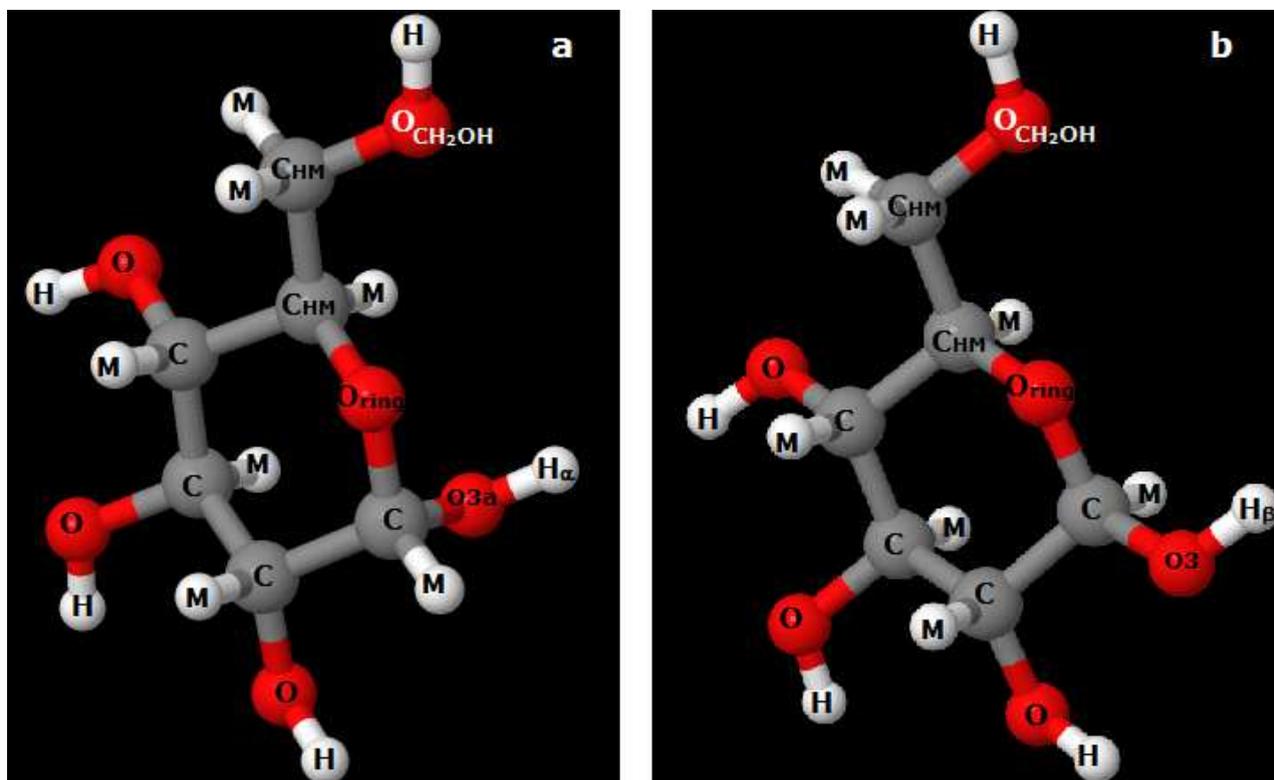


Figura 5.7 – Etichette utilizzate per differenziare gli atomi del β -D-glucosio nella simulazione del sistema glucosio-acqua. È possibile osservare che gli idrogeni che non scambiano (M) sono stati differenziati da quelli che scambiano (H, H_{β} , H_{α}) con l'acqua. Atomi equivalenti e con un intorno chimico simile sono stati etichettati allo stesso modo. La specie α -D-glucosio presenta le stesse etichette del β -D-glucosio ad eccezione del gruppo -OH che differisce nelle due specie. In tal caso O3 è stato indicizzato con O3(a) ed H_{β} con H_{α} .

Tabella 5.1 – Parametri del potenziale di Lennard Jones e carica frazionaria impiegati come riferimento per le simulazioni EPSR

atomo	ϵ (kJ/mol)	σ (Å)	Q (e)
C	0.27614	3.50	0.2244
CHM	0.27614	3.50	0.147
O	0.71128	3.07	-0.70
O_{ring}	0.58576	2.90	-0.36
O_{CH_2OH}	0.71128	3.07	-0.6834
O3(a)	0.71128	3.07	-0.6534
M	0.12552	2.50	0.0608
H	0.0	0.0	0.4356
H_β	0.0	0.0	0.4356
H_α	0.0	0.0	0.4356
Ow	0.65	3.16	-0.8476
Hw	0.0	0.0	0.4238

Nel paragrafo successivo, vengono riportati i risultati della simulazione ottenuti per le due concentrazioni di glucosio in acqua a temperatura ambiente ed a pressione atmosferica. In particolare verranno riportate le funzioni di distribuzione radiale tra le coppie di atomi, i numeri di coordinazione e le funzioni di densità spaziale.

5.3.2 Funzioni di distribuzione radiale dell'acqua-solvente del glucosio

In questo paragrafo riporto le RDF ed i numeri di coordinazione relativi all'acqua quando solvente del glucosio, per le due concentrazioni esaminate. Tali risultati verranno confrontati con i dati dell'acqua pura alle stesse condizioni ovvero temperatura ambiente e pressione atmosferica. Nella Figura 5.8 viene riportata la funzione di distribuzione radiale tra gli ossigeni dell'acqua quando solvente del glucosio. In particolare in a) viene riportata la RDF Ow-Ow per il range di $2 \text{ \AA} < r < 8 \text{ \AA}$ mentre in (b) viene riportato un ingrandimento della seconda shell. Le RDF Ow-Ow ottenute per le soluzioni di glucosio in acqua alle due concentrazioni di 1.1 M e di 4.4 M sono state confrontate con la RDF ottenuta per acqua pura a temperatura ambiente ed a pressione atmosferica. Come si nota, la posizione del primo picco resta invariata per entrambe le concentrazioni e collocata intorno a 2.73 \AA ed invariata rispetto alla RDF Ow-Ow ottenuta per l'acqua pura. L'aumento della concentrazione comporta invece, uno spostamento della posizione del secondo picco: esso risulta collocato intorno a 4.33 \AA per quanto riguarda la concentrazione più bassa di soluto in acqua ($\sim 1.1 \text{ M}$) ed intorno a 4.12 \AA per quanto riguarda la concentrazione maggiore ($\sim 4.4 \text{ M}$). In entrambi i casi, si nota uno spostamento della posizione di tale picco rispetto alle RDF Ow-Ow dell'acqua pura, situato a 4.5 \AA . Il significato di tale spostamento verrà descritto nel paragrafo successivo.

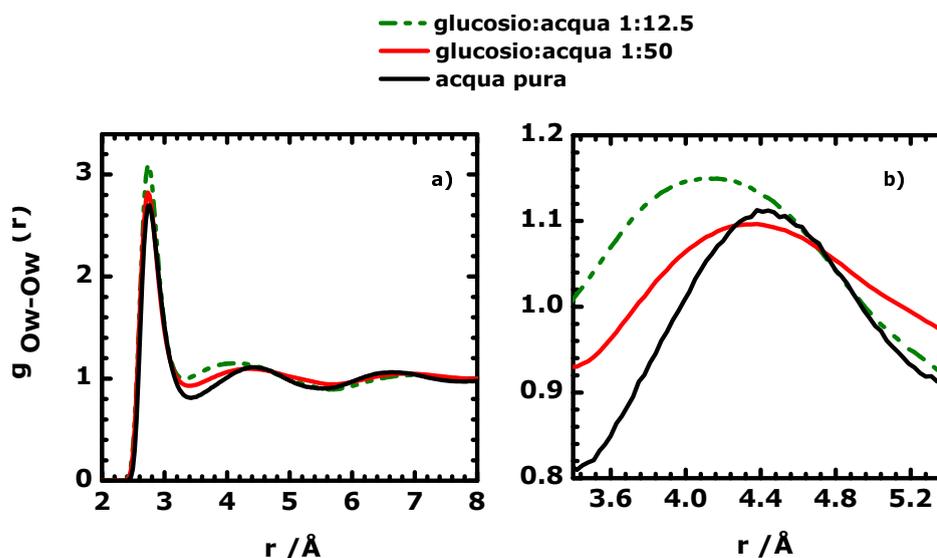


Figura 5.8 – Funzioni di distribuzione radiale degli ossigeni dell'acqua. La curva tratteggiata in verde si riferisce alla concentrazione glucosio:acqua 1:12.5 mentre la curva in rosso alla concentrazione glucosio:acqua 1:50. La curva continua in nero rappresenta invece la RDF ottenuta per l'acqua pura. In (a) viene riportata la RDF nell'intervallo delle distanze $2 \div 8 \text{ \AA}$ mentre in (b) viene riportato un ingrandimento della seconda shell.

Nella Figura 5.9 viene riportata la RDF Hw-Hw sempre relativa alle due soluzioni e confrontata con l'acqua pura. In questo caso non si osservano variazioni delle posizioni dei due picchi tra le due concentrazioni e rispetto all'acqua pura. Le uniche variazioni che si osservano riguardo le intensità dei picchi, sono una conseguenza della differente densità dei campioni esaminati.

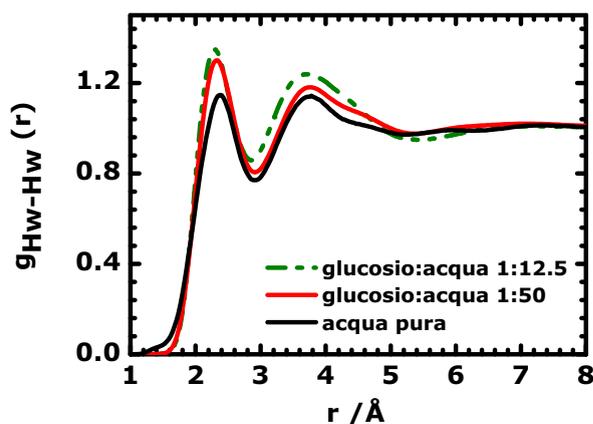


Figura 5.9 – Funzioni di distribuzione radiale tra gli idrogeni dell'acqua. La curva tratteggiata in verde si riferisce alle misure sulla concentrazione glucosio:acqua 1:12.5 mentre la curva in rosso alla concentrazione glucosio:acqua 1:50. La curva continua in nero rappresenta invece la RDF ottenuta per l'acqua pura.

Dalla Figura 5.10 si osserva che non ci sono variazioni nelle posizioni dei picchi delle RDF Ow-Hw per le due concentrazioni. Il primo picco collocato intorno ad 1.78 Å per entrambe le concentrazioni, non differisce da quanto individuato per l'acqua pura.

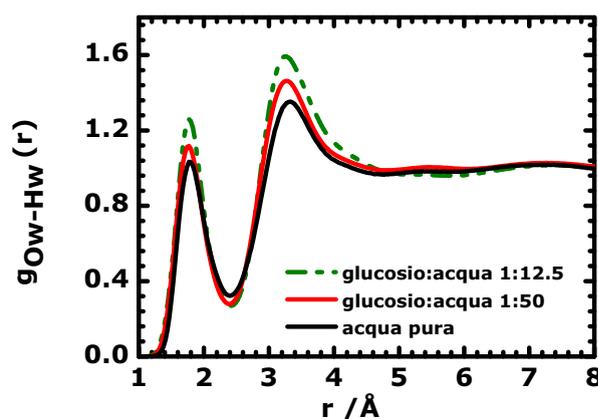


Figura 5.10 – Funzioni di distribuzione radiale tra l'ossigeno e l'idrogeno dell'acqua. La curva tratteggiata in verde si riferisce alle misure sulla concentrazione glucosio:acqua 1:12.5 mentre la curva in rosso alla concentrazione glucosio:acqua 1:50

Nella Tabella 5.2 vengono riportati i numeri di coordinazione N_{Ow-Ow} ed N_{Ow-Hw} ottenuti a partire dalle funzioni di distribuzione radiale e calcolati rispettivamente negli intervalli delle distanze $1 \div 3.4 \text{ \AA}$ ed $1 \div 2.4 \text{ \AA}$. Tali intervalli corrispondono all'estensione della prima shell e vengono valutati a partire dalle relative RDF. Si osserva che l'aumento della concentrazione comporta una diminuzione dei numeri di coordinazione, concordemente con il fatto che aumenta il numero di gruppi idrossilici -OH competitivi nel legame idrogeno con l'acqua.

Tabella 5.2 – Numeri di coordinazione N_{Ow-Ow} e N_{Ow-Hw} per l'acqua quando solvente del glucosio

Campione	$N_{Ow-Ow} \ 1 \text{ \AA} < r < 3.4 \text{ \AA}$	$N_{Ow-Hw} \ 1 \text{ \AA} < r < 2.4 \text{ \AA}$
glucosio:acqua 1:12.5	3.57 ± 1.01	1.36 ± 0.63
glucosio:acqua 1:50	4.59 ± 1.02	1.70 ± 0.67

L'effetto dell'aumento della concentrazione è dunque, quello di ridurre i numeri di coordinazione del solvente acqua. Lo stesso effetto insieme al maggior spostamento del secondo picco della RDF Ow-Ow nel campione glucosio:acqua 1:12.5, rispetto al campione 1:50, descrivono l'aumento della perturbazione del solvente indotto dal soluto, quando aumenta la concentrazione soluto/solvente.

5.3.3 Idratazione dei gruppi -OH e CH_2OH

Nella Figura 5.11 vengono riportate le funzioni di distribuzione radiale RDF tra gli ossigeni dei gruppi ossidrilici (-OH) e l'ossigeno dell'acqua (a, b, c, d). In particolare con $\text{O}_{\text{CH}_2\text{OH}}$ si indica l'ossigeno del gruppo idrossimetilico (CH_2OH), con O3 ed O3a vengono indicati gli ossigeni del gruppo -OH che distingue il β -D-glucosio dall' α -D-glucosio; infine con O tutti gli ossigeni degli altri gruppi idrossilici collocati sull'anello. In rosso vengono presentati gli andamenti delle RDF per la soluzione glucosio:acqua 1:50, mentre in verde la soluzione glucosio:acqua 1:12.5. Come è possibile osservare, le RDF delle coppie degli ossigeni dei gruppi idrossilici (ed idrossimetilico) e l'ossigeno dell'acqua presentano un primo picco intorno a $\sim 2.76 \text{ \AA}$. In aggiunta si osserva che, tale posizione non varia al variare della concentrazione del glucosio in soluzione.

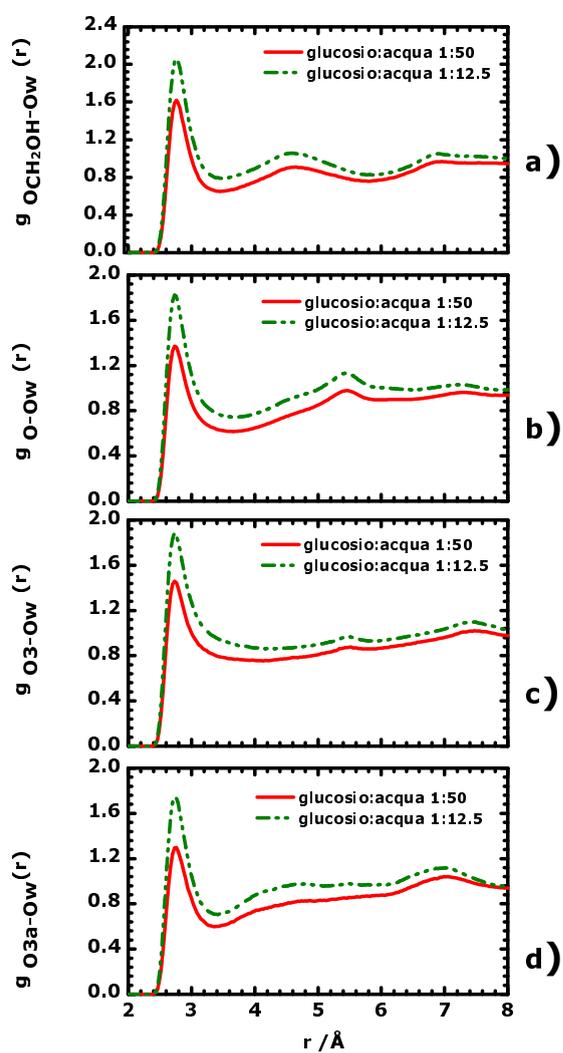


Figura 5.11 – Funzioni di distribuzione radiale tra gli ossigeni dei gruppi CH_2OH ed $-\text{OH}$ del glucosio e l'ossigeno dell'acqua. La curva tratteggiata in verde si riferisce al campione concentrato glucosio:acqua 1:12.5 mentre la curva in rosso al campione glucosio:acqua 1:50.

Nella Tabella 5.3 vengono riportati i numeri di coordinazione N_{O-Ow} , $N_{O_{CH_2OH}-Ow}$, N_{O3-Ow} , N_{O3a-Ow} ottenuti integrando rispettivamente le RDF O-Ow, $O_{CH_2OH} - Ow$, O3-Ow, O3a-Ow nell'intervallo di $1 \text{ \AA} < r < 3.4 \text{ \AA}$. Tale numeri indicano quante acque sono vicine a ciascun ossigeno appartenente al gruppo idrossimetilico o idrossilico. Si osserva che il gruppo idrossimetilico presenta un numero di coordinazione $N_{O_{CH_2OH}-Ow}$ più grande rispetto agli altri. Al contrario, il valore di $N_{O3a-Ow} \sim 2$ con O3a appartiene alla specie α -D-glucosio, risulta il più basso in assoluto. L'effetto della concentrazione è quello di aumentare di $\sim 7\%$, i numeri di coordinazione tra gli ossigeni dei gruppi idrossilici, idrossimetilici con gli ossigeni dell'acqua.

Tabella 5.3 – Numeri di coordinazione tra tra gli ossigeni dei gruppi idrossimetilici o idrossilici del glucosio e gli ossigeni dell'acqua calcolati nell'intervallo 1-3.4 \AA

Campione	$N_{O_{CH_2OH}-Ow}$	N_{O3-Ow}	N_{O3a-Ow}	N_{O-Ow}
	$1 \text{ \AA} < r < 3.4 \text{ \AA}$	$1 \text{ \AA} < r < 3.4 \text{ \AA}$	$1 \text{ \AA} < r < 3.4 \text{ \AA}$	$1 \text{ \AA} < r < 3.4 \text{ \AA}$
glucosio:acqua 1:12.5	2.85 ± 1.01	2.64 ± 1.02	2.00 ± 1.01	2.43 ± 1.06
glucosio:acqua 1:50	2.74 ± 1.02	3.02 ± 1.01	2.27 ± 1.02	2.52 ± 1.02

In Figura 5.12 vengono riportate le RDF tra gli ossigeni dei gruppi idrossimetilico (a) ed idrossilici -OH (b, c, d) del glucosio e l'idrogeno dell'acqua. La posizione del primo picco risulta in tal caso uguale per tutte le coppie ed intorno a $\sim 1.83 \text{ \AA}$ mentre piccole variazioni si riscontrano per la coppia O-Hw per la quale la collocazione del primo picco nella RDF risulta intorno a $\sim 1.8 \text{ \AA}$.

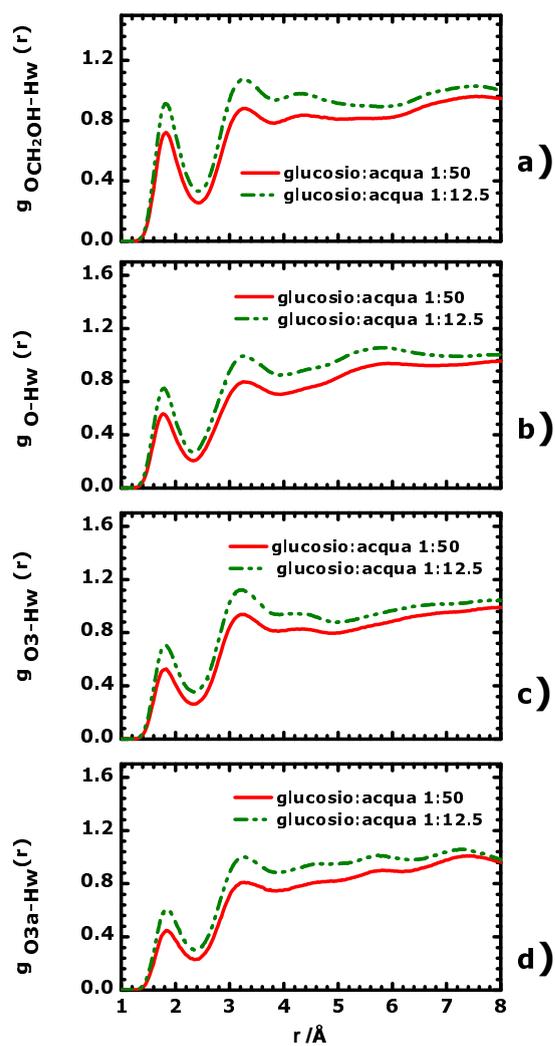


Figura 5.12 – Funzioni di distribuzione radiale tra gli ossigeni dei gruppi CH_2OH ed $-\text{OH}$ del glucosio e l'idrogeno dell'acqua. La curva tratteggiata in verde si riferisce alle misure sulla concentrazione glucosio:acqua 1:12.5 mentre la curva in rosso alla concentrazione glucosio:acqua 1:50

I numeri di coordinazione tra gli ossigeni dei gruppi idrossilici o idrossimetilici del glucosio e l'idrogeno dell'acqua, ottenuti integrando le RDF relative, nell'intervallo $1 \text{ \AA} < r < 2.4 \text{ \AA}$ e riportati in Tabella 5.4, non presentano variazioni significative. Nello specifico, si osserva che l'ossigeno appartenente al gruppo idrossimetilico del glucosio (O_{CH_2OH}) presenta un numero di coordinazione con l'idrogeno dell'acqua leggermente superiore rispetto a quello ottenuto per gli ossigeni dei gruppi idrossilici del glucosio. Il che suggerisce una maggior tendenza di tale gruppo, rispetto agli altri, di formare legami idrogeno con l'acqua. Piccole differenze si osservano nei numeri di coordinazione tra gli ossigeni che distinguono la conformazione α -D-glucosio da quella β -D-glucosio e l'idrogeno dell'acqua. Il numero di legami idrogeno risulta infatti di poco inferiore nel caso della conformazione α -D-glucosio (~ 0.72 per il campione piú concentrato) rispetto alla conformazione β -D-glucosio (~ 0.84 per il campione 1:12.5).

Tabella 5.4 – Numeri di coordinazione N_{O-Hw} calcolati nell'intervallo 1-2.4 \AA

Campione	$N_{O_{CH_2OH}-Hw}$	N_{O3-Hw}	N_{O3a-Hw}	N_{O-Hw}
	$1 \text{ \AA} < r < 2.4 \text{ \AA}$	$1 \text{ \AA} < r < 2.4 \text{ \AA}$	$1 \text{ \AA} < r < 2.4 \text{ \AA}$	$1 \text{ \AA} < r < 2.4 \text{ \AA}$
glucosio:acqua 1:12.5	1.27 ± 0.60	0.84 ± 0.63	0.72 ± 0.63	0.93 ± 0.60
glucosio:acqua 1:50	1.31 ± 0.61	1.01 ± 0.62	0.82 ± 0.61	0.91 ± 0.61

In Figura 5.13 vengono riportate le RDF tra gli idrogeni dei gruppi idrossilici; con H_α , H_β vengono indicati rispettivamente gli idrogeni appartenenti ai gruppi idrossilici che distinguono la configurazione α -D-glucosio dalla configurazione β -D-glucosio. La posizione del primo picco, risulta in tal caso intorno a $\sim 1.76 \text{ \AA}$, indipendentemente da quale idrogeno del glucosio si stia guardando. Tale posizione risulta inalterata al variare della concentrazione di soluto in soluzione.

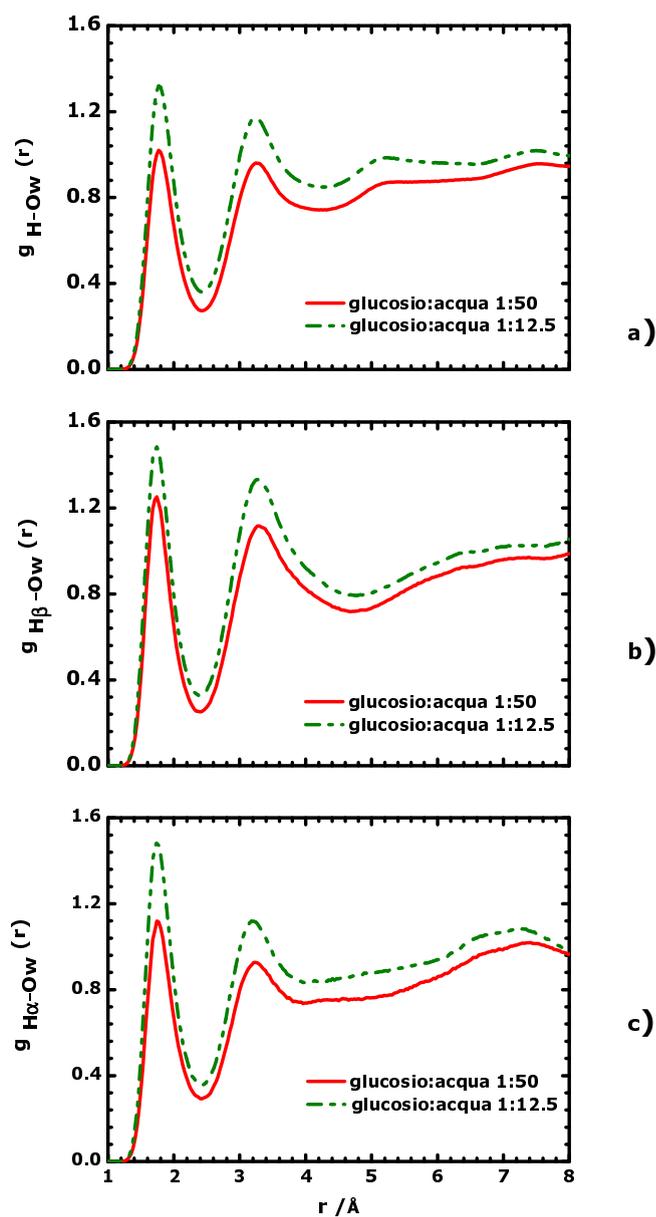


Figura 5.13 – Funzioni di distribuzione radiale tra gli idrogeni dei gruppi -OH del glucosio e l'ossigeno dell'acqua. In (b) e (c) vengono rappresentate le RDF tra gli idrogeni distinti dei due differenti anomeri (rispettivamente H_β ed H_α), presenti nella soluzione e l'ossigeno dell'acqua. La curva tratteggiata in verde si riferisce alle misure sulla concentrazione glucosio:acqua 1:12.5 mentre la curva in rosso alla concentrazione glucosio:acqua 1:50.

Nella Tabella 5.5 vengono riportati i numeri di coordinazione calcolati per gli idrogeni dei gruppi idrossilici e idrossimetilico nell'intervallo 1-2.4 Å che corrisponde al minimo della RDF tra l' idrogeno dei gruppi -OH e del gruppo -OH appartenente al CH₂OH e l' ossigeno dell'acqua. L'effetto della concentrazione è anche in tal caso, quello di ridurre leggermente (~ 10%) il numero dei legami idrogeno del soluto con l'acqua compatibilmente con quanto ci si aspetta.

Tabella 5.5 – Numeri di coordinazione per $N_{H_\alpha-Ow}$, $N_{H_\beta-Ow}$ e N_{H-Ow} calcolati nell'intervallo 1-2.4 Å

Campione	$N_{H_\alpha-Ow}$	$N_{H_\beta-Ow}$	N_{H-Ow}
	1 Å < r < 2.4 Å	1 Å < r < 2.4 Å	1 Å < r < 2.4 Å
glucosio:acqua 1:12.5	0.71±0.40	0.82±0.41	0.75±0.40
glucosio:acqua 1:50	0.80±0.46	0.80±0.46	0.81±0.39

Per ottenere informazioni sulla direzionalità del legame idrogeno tra i gruppi idrossilici e idrossimetilico del glucosio con l'acqua, è stata calcolata la funzione di densità spaziale (SDF) delle molecole d'acqua intorno ai gruppi OH del glucosio. Come descritto nel Capitolo 2, essa rappresenta la probabilità di avere una molecola (in questo caso d'acqua) ad una certa distanza intorno ad un atomo posto nell'origine del sistema di riferimento (in questo caso l'ossigeno dei gruppi idrossilici o idrossimetilici) ed al di sopra di un certo valore di soglia definito contrasto. In Figura 5.14 viene rappresentata la SDF delle molecole d'acqua intorno al gruppo idrossimetilico (a) ed intorno ai diversi gruppi idrossilici del glucosio (b, c, d). La sfera in rosso indica l'ossigeno del gruppo idrossilico (o idrossimetilico) del glucosio posto nell'origine, la sfera in nero indica il carbonio ed in grigio l'idrogeno; le aree in giallo rappresentano le regioni in cui la probabilità di trovare una molecola d'acqua intorno all'ossigeno superi una certa soglia (scelta pari a 0.3). Tale probabilità è stata calcolata nella prima shell di coordinazione che si estende da 1 Å a 3.5 Å, e scelta prendendo il minimo della RDF tra ossigeno del glucosio ed ossigeno dell'acqua. Nella figura vengono riportate le SDF ottenute per il sistema a concentrazione più bassa, non si osserva alcuna variazione dovuta alla concentrazione (i dati non vengono mostrati). Confrontando i risultati ottenuti per i diversi gruppi idrossilici collocati sull'anello e per il gruppo idrossimetilico del glucosio, non si osservano differenze significative; in tutte le SDF si nota che il legame idrogeno è fortemente direzionale e che le molecole d'acqua sono collocate tutte alla stessa distanza, rispetto all'ossigeno centrale del gruppo idrossilico (o idrossimetilico) del glucosio.

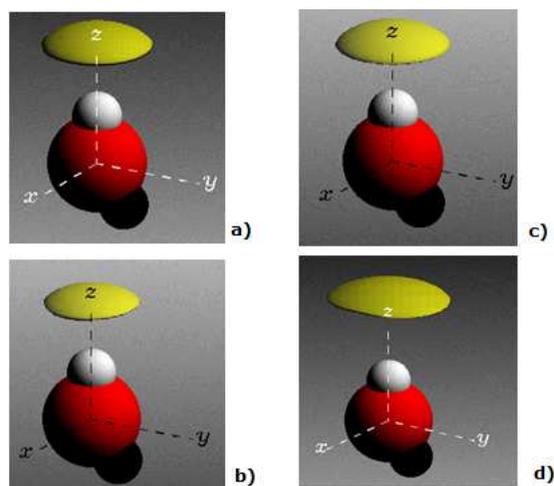


Figura 5.14 – Funzioni di densità spaziale (SDF) delle molecole d’acqua intorno ai gruppi idrossimetilico (a) ed idrossilici (b, c, d) ed per la soluzione glucosio:acqua 1:50. Il contrasto ovvero il valore di soglia per la distribuzione di probabilità, è pari a 0.3 mentre la distanza, scelta sulla base del minimo della RDF ossigeno del gruppo idrossilico o idrossimetilico del glucosio e l’ossigeno dell’acqua è pari a $1-3.5 \text{ \AA}$.

5.3.4 Idratazione intorno all'ossigeno dell'anello

Nella seguente sezione, riporto le RDF tra l'ossigeno collocato sull'anello (O_{ring}) del glucosio e l'ossigeno e l'idrogeno dell'acqua. Lo scopo è quello di verificare se tale ossigeno forma dei legami idrogeno con l'acqua. Nella Figura 5.15 viene riportata la RDF tra l'ossigeno collocato sull'anello e l'ossigeno o l'idrogeno dell'acqua rispettivamente in (a) e (b). Nella Figura (a) si nota che la posizione del primo picco risulta collocata intorno a ~ 2.94 Å nella RDF O_{ring} -Ow mentre, in corrispondenza di ~ 1.98 Å (b) si osserva un picco poco pronunciato per la RDF O_{ring} -Hw. Anche in tal caso il comportamento è indipendente dalla concentrazione del glucosio.

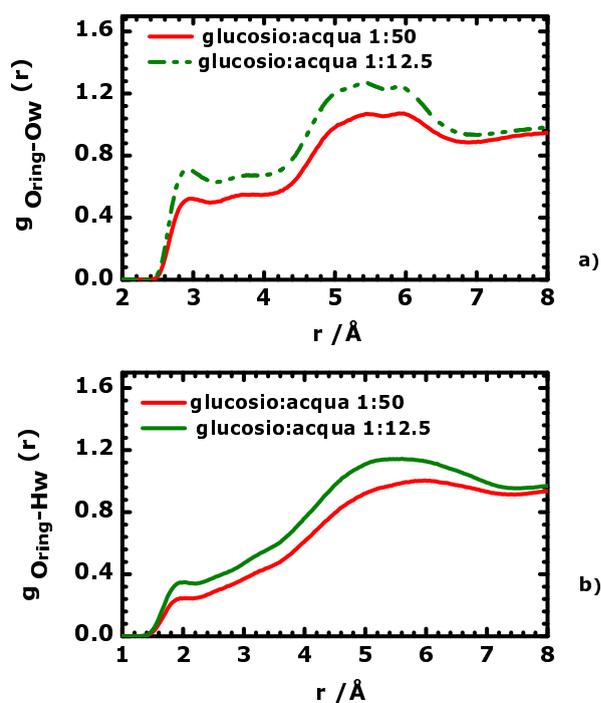


Figura 5.15 – Funzioni di distribuzione radiale tra l'ossigeno collocato sull'anello del glucosio e ossigeno, l'idrogeno dell'acqua rispettivamente in (a) e (b). La curva tratteggiata in verde si riferisce alle misure sulla concentrazione glucosio:acqua 1:12.5 mentre la curva in rosso alla concentrazione glucosio:acqua 1:50.

5.4 Discussione

Da quanto osservato precedentemente si nota che il glucosio apporta una modesta perturbazione alla struttura dell'acqua e tale perturbazione aumenta con l'aumento della concentrazione. Tale conclusione può essere dedotta sia sulla base della posizione del secondo picco nella RDF Ow-Ow dell'acqua solvente, che risulta collocata intorno a 4.33 Å per il campione glucosio:acqua 1:50 e collocato intorno a 4.12 Å per il campione glucosio:acqua 1:12.5, ma anche sulla base dei numeri di coordinazione N_{Ow-Ow} che diminuiscono con l'aumento della concentrazione (da 4.59 per il campione glucosio acqua 1:50 a 3.57 per il campione glucosio:acqua 1:12.5). La posizione del secondo picco della RDF Ow-Ow subisce degli spostamenti, rispetto alla posizione di 4.5 Å, osservata nel caso dell'acqua pura alle stesse condizioni sperimentali (T=300 K e p=1 atm). Come ben noto nel caso dell'acqua pura, tale picco rappresenta una firma della struttura tetraedrica dell'acqua. Lo spostamento del secondo picco delle RDF Ow-Ow rispetto a 4.5 Å nel caso dell'acqua solvente, può essere quantificato in termini di una pressione equivalente conseguenza del fatto che, la presenza di un soluto in acqua apporta una perturbazione sull'acqua confrontabile con quella indotta sull'acqua pura, da una pressione esterna (“*pressure like*”) [117]. Nel caso delle soluzioni di glucosio:acqua gli spostamenti del secondo picco della g_{Ow-Ow} rispetto a 4.5 Å, corrispondono ad una pressione equivalente di ~150-200 MPa [117]. La presenza del glucosio in acqua comporta dunque una destrutturazione dell'acqua non diverso da quello indotto sull'acqua pura da una pressione pari a ~150-200 MPa. Tale effetto perturbativo è minore rispetto a quanto è stato osservato per le soluzioni elettrolitiche per le quali la pressione equivalente è di circa quattro volte superiore rispetto a quanto ottenuto nel caso del glucosio [117]. Per quanto riguarda l'idratazione del glucosio, il numero di acque nell'intorno dei gruppi idrossilici non differisce significativamente da quanto individuato da Mason et al. [3]. In tal caso è stato individuato un numero totale di legami idrogeno del glucosio con l'acqua pari a 10.8 per la concentrazione 1 M; tale valore non subisce variazioni significative con l'aumento di concentrazione di soluto in soluzione. Nel nostro caso risulta che il numero totale di legami idrogeno tra glucosio ed acqua, tramite i gruppi -OH collocati sull'anello, risulta pari a 10.15 e che l'effetto della concentrazione non è significativo. In aggiunta anche nel nostro caso è stata individuata una lieve differenza nell'idratazione dei gruppi idrossilici che distinguono la conformazione α -D-glucosio dalla β -D-glucosio; la seconda sembra possedere una maggior tendenza a formare legami idrogeno come si evince dai

numeri di coordinazione $N_{H\beta-Ow}=0.82$ ed $N_{O3-Hw}=0.84$ leggermente più grandi rispetto rispetto a $N_{H\alpha-Ow}=0.71$ ed $N_{O3\alpha-Hw}=0.72$. I risultati riguardo l'idratazione del glucosio riproducono bene quanto ottenuto con tecniche di dinamica molecolare confrontate con l'esperimento di NDIS [3] ovvero: il numero di legami idrogeno dei gruppi idrossilici con l'acqua è di ~ 10 , l'effetto indotto dall'aumento della concentrazione non è significativo, e che l'anomero β -D-glucosio presenta un leggera maggior tendenza all'idratazione rispetto all'anomero α -D-glucosio. A partire da tali risultati, vogliamo confrontare il comportamento del glucosio con quello del cellobiosio e trealosio, disaccaridi formati da glucosio. Il confronto viene effettuato con campioni di cellobiosio la cui concentrazione sia tale da assicurare lo stesso numero di anelli di glucosio ed anche se sembra apparentemente insensato, in quanto si confronta un disaccaride con un monosaccaride, in realtà vedremo risulta utile per poter comprendere il ruolo dell'idratazione nelle proprietà specifiche di ciascun carboidrato. Nello specifico, tale approccio permette di comprendere se il legame idrogeno, fondamentale nel meccanismo di riconoscimento del dolce sia o meno mediato dall'acqua. Il confronto verrà dunque realizzato con il cellobiosio e nel paragrafo successivo con il trealosio che presenta elevate capacità in termini di bio-protettore e di cui si sa poco in termini di potere dolcificante.

5.4.1 Confronto con il cellobiosio

Come anticipato precedentemente, si vuole realizzare un confronto tra soluzioni di glucosio ed acqua e cellobiosio ed acqua considerando concentrazioni equivalenti di anomeri di glucosio. Pertanto riporterò dei confronti tra cellobiosio:acqua 1:100 e glucosio:acqua 1:50. I dati del cellobiosio:acqua 1:100 sono il risultato di un recente lavoro di O'Dell et al. e sono disponibili in letteratura [106]. Lo scopo di tale confronto è quello di comprendere se esistano eventuali differenze di idratazione tra i due campioni a parità del numero di anelli del glucosio, ed in che modo tali differenze possano giustificare la differente risposta alla percezione del gusto dolce.

Nella Figura 5.16 viene riportato un confronto tra le RDF Ow-Ow per l'acqua solvente di glucosio e cellobiosio. Dal confronto si osserva che il secondo picco risulta spostato verso distanze più corte per quanto riguarda il campione cellobiosio ed acqua rispetto al campione glucosio ed acqua. Nel primo caso risulta infatti collocato intorno a ~ 4.19 Å mentre nel secondo caso, intorno a ~ 4.33 Å. L'effetto perturbativo che il cellobiosio

apporta alla struttura dell'acqua è quindi superiore rispetto alla perturbazione indotta dal glucosio.

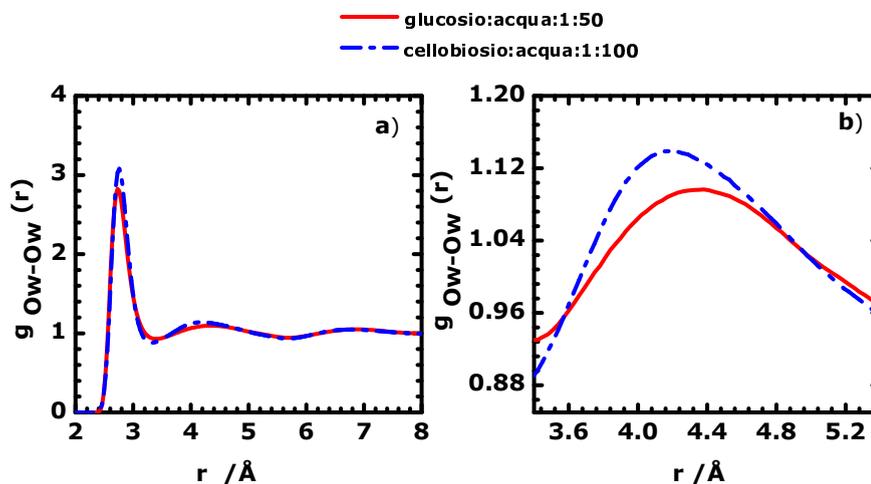


Figura 5.16 – Confronto tra le RDF Ow-Ow per i campioni glucosio-acqua 1:50 (in rosso) e cellobiosio-acqua 1:100 (linea tratteggiata in blu) [106]. In (b) viene riportato un ingrandimento della seconda shell.

La presenza di un maggior spostamento del secondo picco nel caso della soluzione con il cellobiosio dipende dal volume maggiore occupato da tale soluto. Il cellobiosio è infatti formato da due anelli di glucosio tra i quali esiste un forte legame intramolecolare, come dimostrato in Figura 5.17; tale legame impedisce alla molecola di ripiegarsi in quanto le conferisce una minor flessibilità e dunque, il suo maggior effetto perturbativo è una conseguenza del maggior volume occupato.

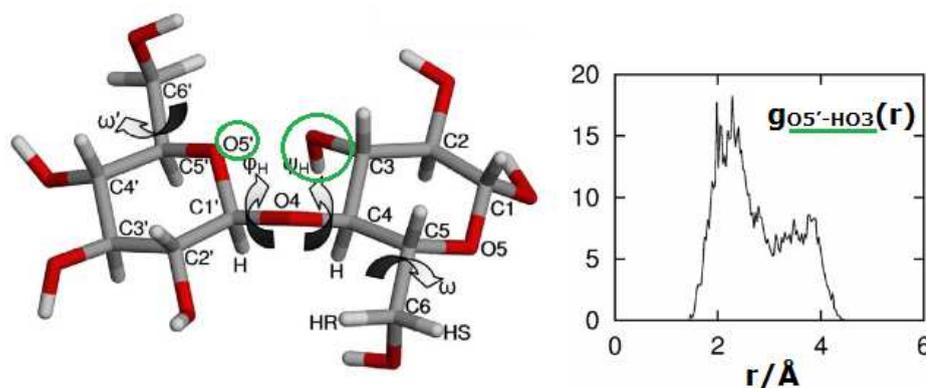


Figura 5.17 – Legame intramolecolare nel cellobiosio riportato nel lavoro di O'Dell et al. su soluzioni di cellobiosio:acqua [106].

In Figura 5.18 riporto invece un confronto tra le RDF O-Ow a) ed O-Hw b) dove O rappresenta l'ossigeno del gruppo idrossilico dei due saccaridi. Si nota che la posizione dei picchi resta invariata nelle RDF il che è indicativo del fatto che i gruppi idrossilici del cellobiosio si comportano esattamente allo stesso modo del glucosio. Entrambi infatti formano un legame idrogeno con l'acqua.

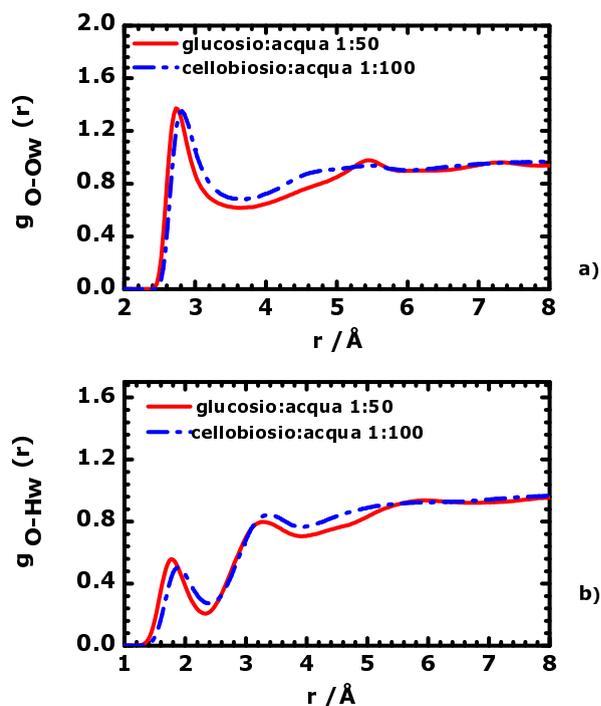


Figura 5.18 – Confronto tra le RDF O-Ow (a) ed O-Hw (b) del glucosio e del cellobiosio [106]

La conferma del simile comportamento dei gruppi idrossilici nei campioni di glucosio ed acqua e cellobiosio ed acqua, ci viene fornita anche dalle RDF H-Ow dove H rappresenta l'idrogeno dei gruppi idrossilici collocati sull'anello (Figura 5.19). Si nota infatti che non vi è alcuna differenza significativa nella posizione del primo picco e dunque sulla lunghezza del legame idrogeno, mentre delle differenze sono visibili in corrispondenza del secondo picco in cui si osserva che la seconda shell della RDF H-Ow, nel caso del campione glucosio:acqua 1:50 è più vicina alla prima, rispetto al campione cellobiosio:acqua 1:100.

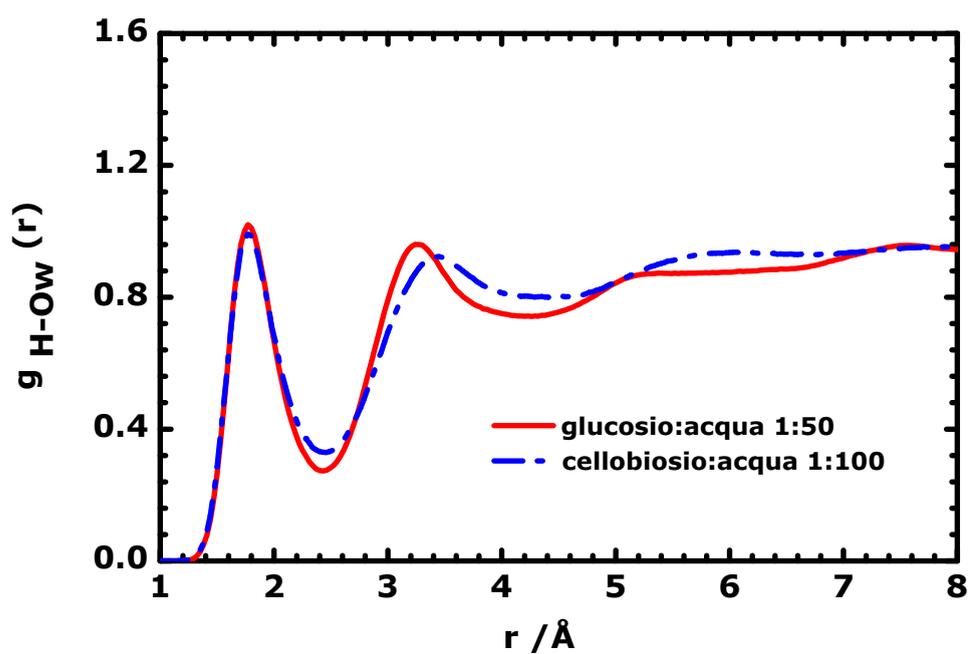


Figura 5.19 – Confronto tra le RDF H-Ow ottenuta per il campione del glucosio:acqua 1:50 (in rosso) ed il campione cellobiosio:acqua 1:100 [106] (tratteggio in blu)

Differenze si osservano invece, per quanto riguarda la posizione dei picchi nelle RDF $O_{ring-Ow}$ ed $O_{ring-Hw}$ (Figura 5.20 a, b). Nel caso del cellobiosio, sono stati differenziati gli ossigeni collocati sui due anelli ed indicati con O1, O1p. Il legame $O_{ring-Hw}$ risulta, più corto nel caso del campione cellobiosio:acqua 1:100 rispetto al campione glucosio:acqua 1:50, indicando la presenza di un forte legame idrogeno con l'acqua per l'ossigeno collocato sull'anello nel cellobiosio rispetto al glucosio.

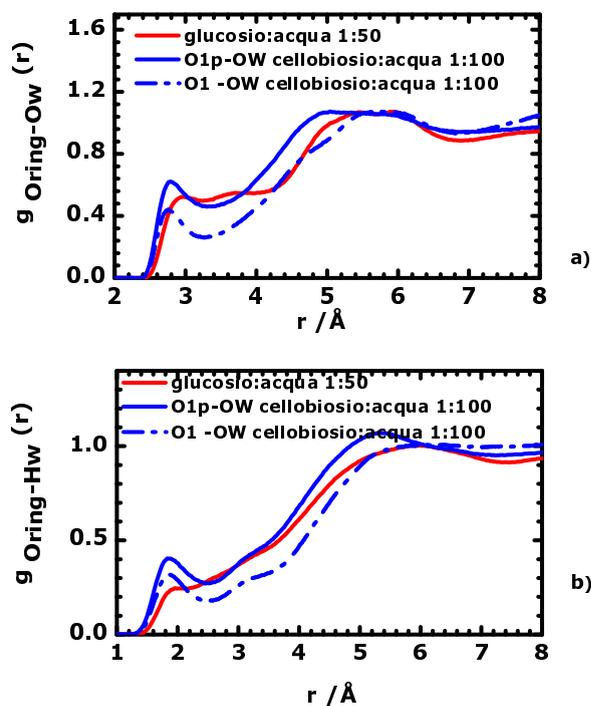


Figura 5.20 – Confronto tra le RDF $O_{ring-Ow}$ (a) ed $O_{ring-Hw}$ (b) del campione glucosio:acqua 1:50 e del cellobiosio:acqua 1:100 [106]

Si può dunque concludere che vi siano delle differenze tra soluzioni acquose di glucosio e cellobiosio e tali differenze riguardano sia la perturbazione apportata alla struttura dell'acqua che l'idratazione dei gruppi idrossilici. Partendo da tali considerazioni, vogliamo effettuare lo stesso confronto con il trealosio, ugualmente disaccaride del glucosio, ma differente dal cellobiosio per la presenza di un legame glicosidico intramolecolare 1-1 α . Anche in tal caso il confronto con il glucosio verrà effettuato considerando un numero equivalente di anelli di glucosio.

5.4.2 Confronto con il trealosio

Nel paragrafo precedente, abbiamo visto che cellobiosio e glucosio perturbano poco la struttura dell'acqua e che i gruppi idrossilici si idratano allo stesso modo. In questa sezione voglio proporre lo stesso confronto con un altro carboidrato ovvero il trealosio i cui dati sono disponibili in letteratura [105]. Le caratteristiche strutturali del trealosio sono differenti dal cellobiosio in termini di legame intramolecolare tra gli anelli di glucosio: il trealosio presenta infatti un legame 1-1 α glicosidico a differenza del cellobiosio che presenta un legame 1-4 β glicosidico tra gli anelli di glucosio. In Figura 5.21 viene riportato il confronto tra le RDF Ow-Ow dell'acqua solvente per trealosio (in nero) e glucosio. Confrontando la concentrazione 1:12.5 di glucosio in acqua con quella 1:25 di trealosio in acqua, si osserva che l'effetto perturbativo indotto dal glucosio è di poco superiore rispetto al trealosio essendo nel primo caso la posizione del secondo picco della RDF Ow-Ow collocata a ~ 4.12 Å e nel secondo caso a ~ 4.33 Å. Anche in tal caso, l'effetto perturbativo è una conseguenza della diversa geometria e del volume del trealosio rispetto al glucosio. La maggiore flessibilità nel trealosio dovuta alla presenza di un legame 1-1 α glicosidico, può essere tra le cause principali di tale comportamento.

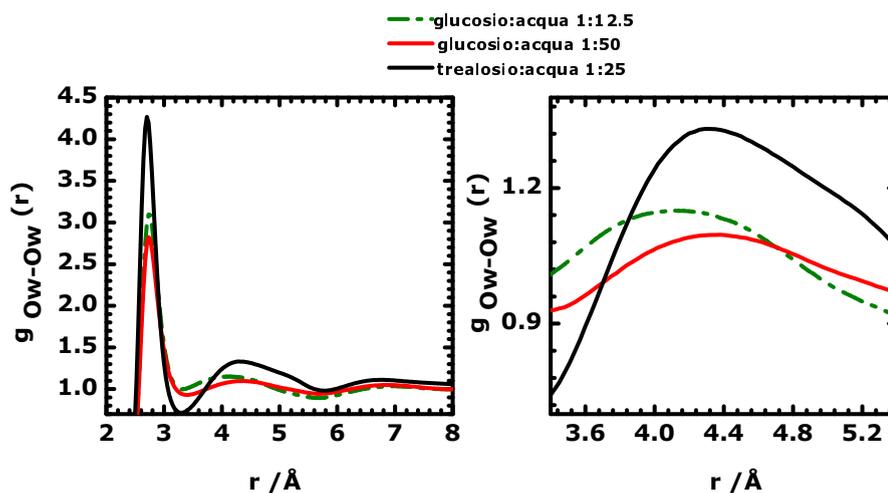


Figura 5.21 – Confronto tra le RDF Ow-Ow ottenute per il campione glucosio ed acqua a due concentrazioni 1:12.5 (tratteggio verde), 1:50 (rosso) e per il sistema trealosio ed acqua 1:25 [105].

In Figura 5.22 viene riportato un confronto tra le RDF O-Ow, O-Hw ottenute per soluzioni di glucosio (1:12.5) e trealosio (1:25) ed acqua, dove O indica l'ossigeno dei gruppi idrossilici del glucosio o del trealosio. Si osserva che il primo picco della RDF O-Ow nel caso del campione trealosio:acqua risulta spostato verso r maggiori (~ 3.1 Å) rispetto a quanto osservato per il campione glucosio:acqua (~ 2.73 Å). Le RDF O-Hw del trealosio presentano delle differenze rispetto a quelle del glucosio; entrambe presentano un primo picco in corrispondenza di una distanza di ~ 1.93 Å ma l'intensità nel caso del campione di trealosio:acqua risulta inferiore rispetto a quanto ottenuto per il campione di glucosio:acqua. Il comportamento del gruppo idrossimetilico risulta invariato rispetto a quanto descritto per i gruppi idrossilici. Al contrario, nel caso del trealosio, gli unici ossigeni che formano legami idrogeno con l'acqua sono quelli appartenenti all'anello (Figura 5.23).

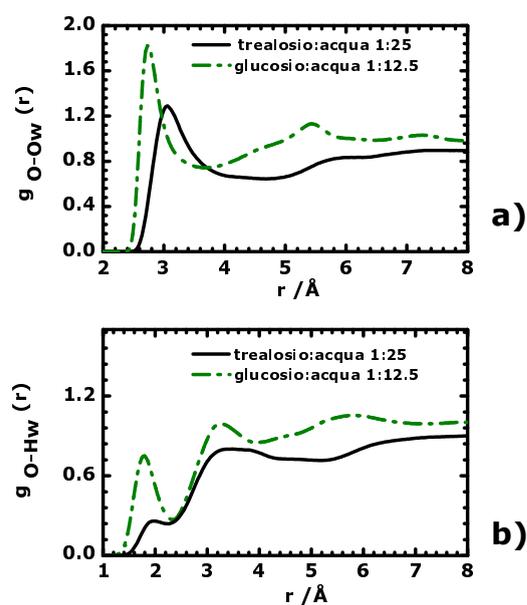


Figura 5.22 – Confronto tra le RDF O-Ow (a) ed O-Hw (b) ottenute per la soluzione glucosio:acqua 1:12.5 (linea verde tratteggiata) e trealoso:acqua 1:25 (nero) [105]

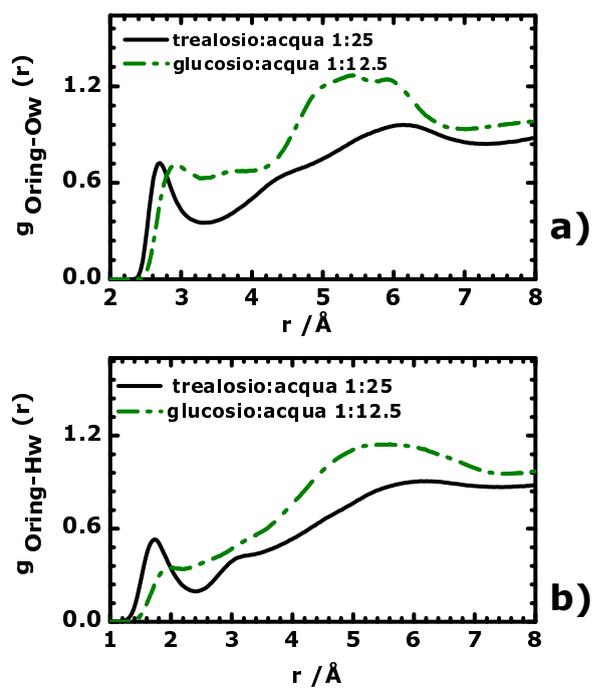


Figura 5.23 – Confronto tra le RDF $O_{ring}\text{-Ow}$ a) ed $O_{ring}\text{-Hw}$ b) del glucosio e del trealosio

In Figura 5.24 viene presentata la RDF H-Ow per i due campioni, dove H rappresenta l'idrogeno dei gruppi idrossilici. Anche in tal caso si osserva una differenza nelle shell di idratazione dei gruppi idrossilici del glucosio e trealosio. La posizione del primo picco risulta infatti, intorno a $\sim 1.8 \text{ \AA}$ nel caso del campione glucosio:acqua 1:12.5 ed è inferiore rispetto al valore di $\sim 2.2 \text{ \AA}$ osservato nel campione trealosio:acqua 1:25; il che indica che il legame idrogeno, tra l'idrogeno dei gruppi idrossilici o idrossimetilici (appartenenti sia al glucosio che al trealosio) con l'ossigeno dell'acqua, risulta più forte nel glucosio rispetto al trealosio. La posizione del secondo picco della RDF H-Ow è invece collocata intorno a 3.3 \AA sia nel caso del campione glucosio:acqua 1:12.5 che nel caso del campione trealosio:acqua 1:25.

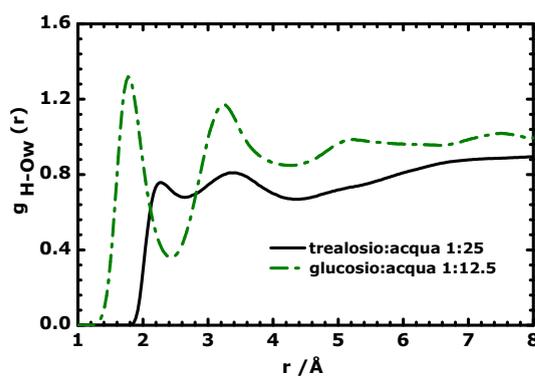


Figura 5.24 – Confronto tra le RDF H-Ow ottenute per le soluzioni di glucosio :acqua 1:12.5 (linea verde tratteggiata) e trealosio:acqua 1:25 (linea in nero).

Da quanto osservato finora, è chiaro che l'idratazione dei gruppi idrossilici del glucosio è completamente differente da quella del trealosio: mentre nel caso del glucosio formano legami idrogeno con l'acqua, nel trealosio questo non avviene o avviene a distanze maggiori formando quindi, legami idrogeno più deboli. In aggiunta si nota che nel caso del trealosio, gli unici ossigeni che partecipano alla formazione di legami idrogeno con l'acqua sono quelli definiti "interni" [105] ovvero l'ossigeno appartenente all'anello e quello del legame intramolecolare. È inoltre interessante osservare che le SDF calcolate intorno ai gruppi idrossilici e idrossimetilici del trealosio e riportate in Figura 5.25 sono differenti rispetto a quelle osservate per gli stessi gruppi nel campione glucosio-acqua e riportati nel paragrafo precedente. Dal confronto si osserva infatti che il legame idrogeno fortemente direzionale nel caso del glucosio, non lo è affatto nel caso del trealosio come evidenziato dalla presenza di una più uniforme distribuzione dell'acqua intorno ai siti idrossilici o idrossimetilico. Si nota anche che le molecole d'acqua con cui legano i gruppi idrossilici-idrossimetilici sono, nel caso del trealosio, collocate a distanze maggiori rispetto al glucosio. Lo stesso risultato è in accordo con quanto osservato nelle RDF H-Ow (Figura 5.24) e già discusso precedentemente.

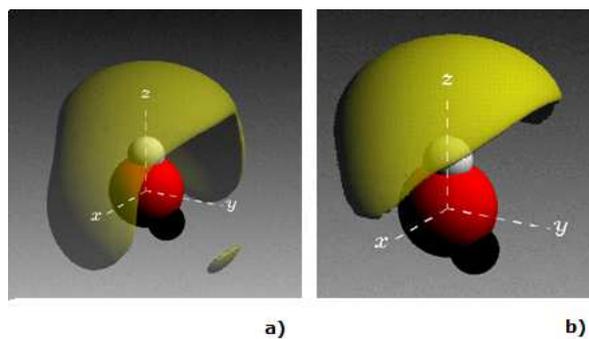


Figura 5.25 – SDF delle molecole d’acqua intorno ai gruppi idrossimetilico a) ed idrossilico del trealosio b) [105]. Le aree in giallo rappresentano la probabilità di avere una molecola d’acqua alla distanza di 0-4 Å, intorno ad un atomo di ossigeno posto (in rosso) posto nell’origine del sistema di riferimento. Le sfere in grigio ed in nero indicano rispettivamente l’ossigeno, l’idrogeno ed il carbonio. Il grafico è stato realizzato scegliendo un contrasto pari a 0.3 e l’intervallo delle distanze corrisponde alla prima shell nella RDF $O_{CH_2OH}-O_w$ ed $O-O_w$

5.4.3 Profili di idratazione del glucosio, trealosio e cellobiosio

Come visto nel paragrafo precedente, esistono delle differenze significative per quanto riguarda l'idratazione dei gruppi -OH tra glucosio o cellobiosio e trealosio. Tali differenze vengono ancor più evidenziate dalle SDF ovvero dalle funzioni di densità spaziale dell'acqua nell'intorno dei gruppi -OH. I risultati confermano la presenza di legami idrogeno tra gli ossidrili del glucosio e l'acqua piuttosto direzionali; al contrario, il trealosio forma legami idrogeno meno direzionali e dunque probabilmente più disordinati ed a distanze maggiori. Le informazioni derivanti dalle funzioni di distribuzione radiali o tramite le SDF sono un potente strumento per comprendere l'idratazione dei gruppi specifici di un soluto ovvero forniscono una descrizione a livello atomico dell'idratazione del soluto (in particolare sulla presenza, sulla direzionalità e sui numeri di coordinazione del legame idrogeno). Tuttavia non descrivono globalmente l'interazione soluto-solvente. Un supporto valido in tal senso proviene dalle mappe di distribuzione spaziale (SDM) ottenute tramite il programma Angula (Capitolo 3) e riportate qui di seguito. Attraverso le SDM è possibile ottenere informazioni sul pattern d' idratazione [118] nell'intorno dell'intera molecola ovvero di ottenere configurazioni molecolari che descrivano microscopicamente il campione. In Figura 5.26 vengono riportate le diverse mappe di densità spaziale che indicano la densità di probabilità in 3D di trovare l'acqua nell'intorno del glucosio, del cellobiosio e del trealosio. Le tre SDM sono state calcolate per i tre campioni considerando un intervallo di distanze pari a 0-3.5 Å e permettono di ottenere informazioni sulla probabilità e sull'orientazione delle molecole d'acqua prime vicine, per i 3 soluti. Dalla Figura 5.26 si evince che i profili di idratazione del glucosio (a) e del cellobiosio (b) sono simili e che entrambi differiscono significativamente da quello del trealosio (c). Dalle mappe è evidente che si ha una maggior probabilità di trovare le molecole d'acqua prime vicine nell'intorno dei gruppi idrossilici ed idrossimetilici del glucosio e del cellobiosio mentre il sito dell'ossigeno dell'anello sembra idrofobico. Differenze sostanziali sono presenti nelle mappe SDM del trealosio in cui si osserva che le molecole d'acqua si distribuiscono in corrispondenza del legame glicosidico ($1-1\alpha$) tra i due anelli di glucosio. Gli altri siti si presentano invece, apparentemente idrofobici; in realtà la giusta interpretazione sta nel considerare che l'acqua lega con gli altri siti sede dei gruppi -OH, tramite legami idrogeno, solo a distanze superiori.

Tali risultati in combinazione con quanto discusso nei paragrafi precedenti, risultano utili

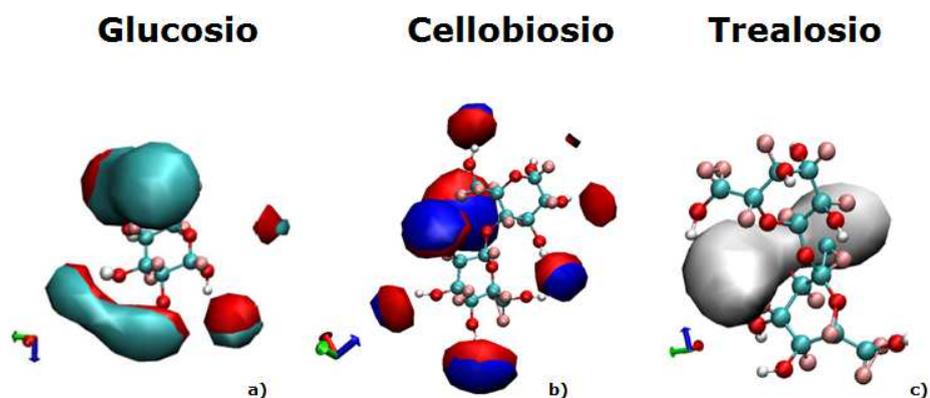


Figura 5.26 – Mappe di densità spaziale (SDM) dell’acqua intorno al glucosio (a) cellobiosio (b) e trealosio (c) ottenute tramite il programma ANGULA [118]

per comprendere il ruolo specifico di ciascun carboidrato. In particolare è possibile osservare che sia il glucosio che il cellobiosio presentano lo stesso profilo di idratazione e che tale profilo sembra riprodurre il modello AH-B-X descritto nella teoria di Kier [99]. La presenza di legami idrogeno fortemente direzionali nel glucosio garantisce l’interazione tra glucosio e l’eventuale recettore (ugualmente caratterizzato dalla struttura B-AH-X) coinvolto nel meccanismo di percezione del gusto dolce dello zucchero. Alla luce di tali considerazioni il glucosio risulta un dolcificante perchè, il suo profilo di idratazione riproduce esattamente il modello AH-B-X e perchè rispetta le condizioni ed i vincoli imposti dalla teorie relative alla percezione del gusto ovvero la presenza di legami idrogeno direzionali dei gruppi idrossilici o idrossimetilico e la configurazione di singolo anello che si adattano perfettamente alla “tasca” del recettore [116]. Al contrario, sebbene il cellobiosio presenti un profilo di idratazione molto simile a quello del glucosio, di fatto la presenza di un forte legame intramolecolare tra gli anelli di glucosio [106] riduce la flessibilità della molecola. Di conseguenza, la riduzione della flessibilità del cellobiosio, potrebbe essere il motivo per cui il cellobiosio stesso non riesca ad adattarsi alla tasca del recettore. Le caratteristiche di rigidità lo rendono invece, un buon candidato per la formazione di fibre della cellulosa. Nel caso del trealosio, si osserva invece che, le molecole di acqua si concentrano nell’intorno del legame intramolecolare. A differenza del glucosio e del cellobiosio il profilo di idratazione del trealosio non riproduce il modello AH-B-X in quanto le molecole d’acqua si dispongono principalmente intorno al legame glicosidico. Il legame idrogeno in corrispondenza dei gruppi idrossilici idrossimetilico determinante nel meccanismo di riconoscimento del gusto, risulta inoltre, al contrario del glucosio, poco direzionale. Tali caratteristiche permettono di definire il trealosio non dolce ed allo stesso tempo, potrebbero essere di supporto nella comprensione del meccanismo della bio-protezione di cui

è il principale responsabile. E' stato osservato infatti che alcuni microorganismi quali lieviti, tardigradi, funghi o alcune piante (*Selaginella lepidophylla*) che sopravvivono in condizioni di siccità, presentano una concentrazione significativa di trealosio [119]. Il confronto tra glucosio e trealosio ha dimostrato che, l'effetto perturbativo apportato dal trealosio alla struttura dell'acqua non è affatto significativo; ne consegue che l'ipotesi secondo cui la bio-protezione sia un meccanismo di compensazione conseguente alla distruzione della struttura tetraedrica dell'acqua non trova riscontro nei nostri risultati. Al contrario, l'assenza di legami idrogeno tra i gruppi idrossilici ed idrossimetilico del trealosio con l'acqua, permetterebbe loro di essere liberi di legare con eventuali altre molecole quale ad esempio il trealosio stesso. Tale comportamento permetterebbe così la formazione di eventuali matrici vetrose [120] in cui altre molecole (ad esempio proteine o molecole d'acqua) restano intrappolate. I vetri infatti, possiedono generalmente valori di viscosità piuttosto grandi pertanto eventuali molecole "incapsulate" nella matrice vetrosa, risultano immobilizzate e dunque stabili quando esposte a condizioni di stress [120–122] (disidratazione).

5.5 Conclusioni

L'impiego di una tecnica basata sulla combinazione di diffrazione neutronica con simulazioni EPSR e l'analisi successiva a mezzo di ANGULA, ha permesso di studiare a livello atomico, l'idratazione di alcuni gruppi specifici di glucosio, cellobiosio e trealosio. In particolare mi sono occupata dello studio dell'idratazione del glucosio (alle concentrazioni di ~ 1.1 M e ~ 4.4 M) a livello atomico. Tale studio ha rivelato che la struttura dell'acqua non è disturbata significativamente dalla presenza del glucosio e che il numero di molecole d'acqua che formano legami idrogeno con i gruppi idrossilici è di circa ~ 10 concordemente con studi di dinamica molecolare [3, 5]. Lo studio dell'idratazione del glucosio a livello atomico è risultato di notevole interesse dal momento che è stato possibile confrontare i risultati ottenuti con le soluzioni equivalenti (in termini di numero di anelli di glucosio) di cellobiosio-acqua e trealosio-acqua. Tale confronto sia a livello atomico che a livello molecolare, ha permesso di identificare il ruolo dell'acqua nelle proprietà specifiche dei carboidrati. In particolare la presenza di una struttura AH-B-X nelle mappe SDM combinata con la presenza di legami idrogeno fortemente direzionali tra i gruppi idrossilici, idrossimetilici e l'acqua corripondono esattamente a quanto previsto

dal modello di Kier [99] per quanto riguarda la percezione del gusto dolce del glucosio; la ridotta flessibilità del cellobiosio [106] è il motivo per cui tale carboidrato risulta poco dolce [123] nonostante il suo pattern di idratazione sia uguale a quello del glucosio. Infine la presenza di un'idratazione completamente diversa del trealosio permette di affermare che, considerando valida la teoria di Kier [99], tale carboidrato non può essere considerato dolce. Le proprietà di idratazione del trealosio possono però essere collegate alle sue elevate proprietà di bio-protezione. Concludendo, è possibile affermare che uno studio a livello atomico dell'idratazione dei carboidrati è risultato rilevante per la comprensione dei meccanismi legati alla percezione del gusto ed alla bioprotezione. In particolare è stato osservato che il legame idrogeno fondamentale nel meccanismo di interazione tra zucchero e recettore per il gusto dolce, potrebbe essere mediato dall'acqua, come risultante dalle SDM; pertanto a partire dalle caratteristiche di idratazione, è possibile prevedere la risposta al dolce per quanto riguarda i carboidrati. La bassa affinità del trealosio per l'acqua comporterebbe una maggiore interazione trealosio-trealosio consentendo la formazione di una matrice a basso contenuto di acqua, che potrebbe spiegare la capacità del trealosio stesso di formare fasi vetrose con una temperatura di transizione vetrosa più alta rispetto a quella degli altri zuccheri [120]. Le proprietà di bioprotezione del trealosio potrebbero quindi derivare dall'intrappolamento non solo delle molecole d'acqua ma anche di biomolecole come proteine [120]. All'interno della matrice vetrosa, biomolecole ed acqua intrappolate, si trovano in una condizione di stabilità e questo garantirebbe alla proteina di mantenere attiva la propria funzione, anche in condizioni di disidratazione [120]. Allo stesso tempo i risultati ottenuti permettono di escludere una delle ipotesi avanzate inizialmente sulla bio-protezione come conseguenza del riarrangiamento delle molecole d'acqua conseguente alla destrutturazione indotta dal soluto. Come è stato osservato e discusso, l'acqua come solvente del trealosio è perturbata allo stesso modo dell'acqua quando solvente del glucosio. Pertanto l'ipotesi del meccanismo di riarrangiamento delle molecole d'acqua in seguito alla destrutturazione dell'acqua stessa non può sicuramente descrivere in modo univoco, le proprietà di bio-protezione del trealosio.

Capitolo 6

Idratazione ed aggregazione della glicina

6.1 Introduzione

In questo capitolo viene proposto uno studio della struttura a livello atomico di soluzioni acquose di glicina tramite una combinazione della tecnica di diffrazione neutronica con sostituzione H/D con le simulazioni EPSR. Lo scopo di questo lavoro è quello di dimostrare in che modo un approccio su scala atomica possa essere utile per rispondere a domande che riguardano l'idratazione della glicina e le sue proprietà di aggregazione in soluzione. Lo studio dell'idratazione delle biomolecole è di fondamentale importanza in quanto le molecole d'acqua che si trovano vicino alla superficie di una biomolecola possono avere un ruolo centrale nelle modalità in cui le biomolecole stesse esplicano le proprie funzioni. L'acqua non rappresenta infatti, semplicemente un solvente indispensabile per la vita, ma è anche una matrice attiva che intrappola le biomolecole ed interagisce con esse in modo piuttosto complesso [124]. Basti pensare che molte proteine risultano attive solo quando le loro superfici sono coperte da almeno uno strato di molecole d'acqua [125]; di conseguenza è facile intuire quanto sia determinante il ruolo svolto sia dalla dinamica che dalla struttura degli strati d'acqua immediatamente vicini alla proteina. Altro aspetto interessante riguarda il ruolo dell'acqua nel determinare le proprietà di aggregazione degli amminoacidi [126]. Pertanto lo studio dell'idratazione di amminoacidi può essere utile per comprendere quale sia il ruolo dell'acqua nella formazione di aggregati. In un

recente esperimento [127] realizzato su una soluzione di glicina:acqua alla concentrazione 1:30 è stata osservata una temperatura di crossover, $T^*=333$ K, nell'ampiezza dei picchi di Brillouin. Lo stesso comportamento era stato osservato nella dipendenza dalla temperatura della posizione del picco relativo alla banda dello stretching del gruppo $-\text{CH}_2$ della glicina; di conseguenza gli autori avevano ipotizzato che le molecole d'acqua formano una shell d'idratazione stabile intorno alla glicina, in corrispondenza di temperature inferiori rispetto a $T^*=333$ K e che la stessa shell di idratazione viene distrutta non appena la temperatura supera la temperatura di crossover. Lo scopo del lavoro riportato in questo capitolo è quello di studiare l'effetto indotto dal soluto alla struttura dell'acqua e di verificare se quanto individuato [127], attraverso misure di spettroscopia IUVS e Raman su soluzioni di glicina:acqua alla concentrazione 1:30, sia osservabile attraverso uno studio a livello atomico dell'idratazione, tramite misure di diffrazione neutronica con sostituzione H/D combinate con le simulazioni EPSR. A tal proposito sono state studiate soluzioni di glicina:acqua alla concentrazione 1:30 ed a due temperature $T=298$ K ed a $T=353$ K. In particolare, si vuole verificare se la shell d'idratazione della glicina a $T>T^*=333$ K differisca dalla shell d'idratazione della glicina a $T<T^*$. La glicina è uno degli amminoacidi polari più piccoli esistente in natura, generalmente presente nelle proteine, ed è formata da due gruppi idrofilici, ovvero un gruppo amminico NH_2 , un gruppo carbossilico ($-\text{COOH}$) ed un gruppo idrofobico ovvero il metilene CH_2 [128–133]. Essa rappresenta uno degli amminoacidi più studiati perchè di ampio impiego nell'industria farmaceutica e perchè quando in soluzione acquosa, si presenta principalmente in forma zwitterionica [134] con la conseguenza che i gruppi funzionali $-\text{CO}_2^-$ ed $-\text{NH}_3^+$ possono essere coinvolti nella formazione di legami idrogeno ionici, più stabili rispetto a quelli non ionici [127, 135]. È stato osservato che in soluzione acquosa la glicina si presenta in diversi stati di protonazione e che per un valore di $4<\text{pH}<9$ lo stato predominante sia quella zwitterionica ($^+\text{H}_3\text{NCH}_2\text{CO}_2^-$) [134, 136–140]. Nella Figura 6.1 viene riportata la composizione della glicina in soluzione acquosa, al variare del pH a $T=300$ K. I grafici sono il risultato di un lavoro di NMR di Huang et al. [134] e si riferiscono ad una soluzione di glicina:acqua alla concentrazione di 3.33 mol/Kg. Dalla figura si nota che, per $3<\text{pH}<9$, esiste una certa probabilità che si formino dimeri di molecole di glicina in forma zwitterionica. Tale possibilità è garantita dalla presenza dei gruppi $-\text{NH}_3^+$ e $-\text{CO}_2^-$ e dunque dalla possibilità di formazione di un legame idrogeno tra un idrogeno del gruppo $-\text{NH}_3^+$ e un ossigeno del gruppo $-\text{CO}_2^-$.

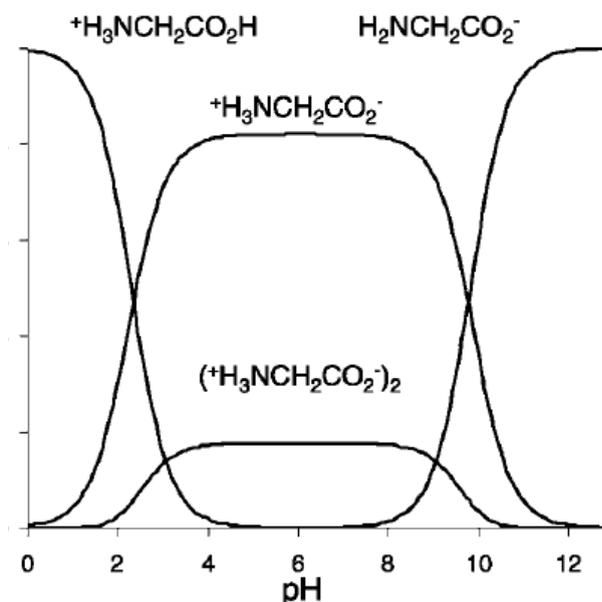


Figura 6.1 – Dipendenza dal pH dello stato di protonazione della glicina in una soluzione di H_2O , per una concentrazione di 3.33 mol/Kg ed a $T = 25^\circ\text{C}$ ottenuta attraverso uno studio NMR, realizzato da Huang et al. [134]. È possibile osservare che, con l'aumentare del pH la glicina ha una percentuale pari al 17 % di dimeri e che tale percentuale resti costante nel range di pH 4-8.

Esiste una vasta letteratura che riporta risultati sperimentali e teorici [134, 141–147] riguardante l'idratazione della glicina [142–145] e la sua tendenza a formare degli aggregati [127, 146, 147]. I primi esperimenti sullo stato di aggregazione di molecole di glicina in soluzione, risalgono intorno al 1930 [141]; in tale lavoro, Anslow et al. attribuisce la presenza della depressione del punto di congelamento dell'acqua all'esistenza di aggregazione nella soluzione. Successivi esperimenti di permittività dielettrica realizzati da Sato et al. [142], per concentrazioni molari di glicina in acqua pari a $0 \text{ M} \leq c \leq 2.6 \text{ M}$, hanno dimostrato che quattro molecole d'acqua legano con la glicina e che la formazione di aggregati di glicina è piuttosto trascurabile. In uno studio di dinamica molecolare *ab initio* realizzato da Leung e Rempe [145] nel 2005, è stato osservato che la glicina è circondata da circa 8 molecole di acqua di cui 4.7 sono collocate nell'intorno dei gruppi carbossilici e circa 3 nell'intorno del gruppo amminico. Tali risultati sono parzialmente confermati dalle misure di diffrazione neutronica realizzate da Kameda et al. [143] e Motoya et al. [144] secondo cui 3 molecole d'acqua circondano il gruppo $-\text{NH}_3^+$ e 2 molecole d'acqua il gruppo $-\text{CO}_2^-$. In un recente lavoro di dinamica molecolare classica [146], è stato studiato il comportamento della glicina zwitterionica in soluzione acquosa, per due valori di concentrazione di glicina:acqua ovvero 1:300 ed 1:35. Lo studio aveva lo scopo di evidenziare l'effetto perturbativo della glicina sulla struttura dell'acqua,

al variare della concentrazione di soluto/solvente ma anche, l'interazione glicina-glicina. Per quanto riguarda l'ultimo punto, sono stati ipotizzati differenti modelli di interazione glicina-glicina sulla base dei risultati delle funzioni di distribuzione radiale tra i gruppi amminici e carbossilici; tali modelli prevedono la formazione di aggregati mediati da una molecola d'acqua o in alcuni casi solo dall'idrogeno della molecola d'acqua. Un altro problema nello studio della glicina, tuttora oggetto di ricerca, riguarda la possibilità di definire la geometria specifica degli aggregati di glicina in soluzione. L'interesse da parte della comunità scientifica di individuare la geometria specifica degli aggregati di glicina nasce dalla volontà di validare l'esistenza di una correlazione tra la cristallizzazione della glicina in una determinata struttura, e la presenza di aggregati molecolari in fase liquida, la cui struttura si avvicini a quella del cristallo stesso. Alcuni studi sembrano validare l'esistenza di un "principio generale di selettività polimorfica" [148]. Ad esempio la predominanza di dimeri ciclici ovvero dimeri formati da un doppio legame idrogeno, potrebbe giustificare la predominanza della specie α della glicina quando cristallizzata. È ben noto che essa si presenti infatti in almeno tre forme cristalline differenti (α , β e γ) [149] e che ciascuna popolazione sia presente in differente misura al variare della temperatura [150–153]. La selezione di una specifica forma cristallina rappresenta una delle richieste fondamentali per la realizzazione di farmaci in quanto, differenti polimorfi presentano differenti proprietà fisico-chimiche [154]. Ad oggi, esistono risultati contrastanti riguardo le proprietà di aggregazione e la struttura degli aggregati di glicina in soluzione acquosa. Alcuni studi ad esempio [147, 155–157], si propongono di individuare l'eventuale presenza di dimeri ciclici di glicina in soluzione acquosa. Nel dimero ciclico riportato in Figura 6.2, due molecole di glicina si legherebbero tra loro per mezzo di un doppio legame idrogeno, tra i gruppi terminali NH_3^+ e $-\text{CO}_2^-$. Secondo i risultati di una simulazione di MD realizzato da Hamad et al. [147], l'interazione tra glicine differenti è governata da un singolo legame idrogeno $\text{N-H}\cdots\text{O-C}$; gli autori escludono quindi, la possibilità che la specie predominante in soluzione acquosa possa essere il dimero ciclico.

Proprio a causa dei differenti risultati riportati in letteratura, lo scopo di questo lavoro è anche quello di verificare se la glicina in soluzione acquosa, esista solo come monomeri o anche come dimeri come discusso recentemente a seguito di alcune misure riguardanti la depressione del punto di congelamento ed il coefficiente di diffusione [134]. La diffrazione neutronica è già stata impiegata per lo studio delle proprietà di idratazione della glicina in soluzione acquosa [143, 144]. Tali studi non si soffermano però sulle proprietà

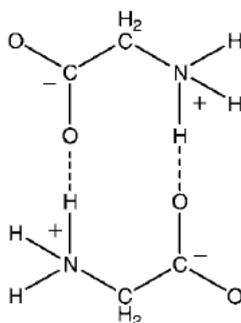


Figura 6.2 – Dimero ciclico di glicina caratterizzato da un doppio legame idrogeno tra i gruppi terminali di due molecole differenti di glicina.

di aggregazione della glicina, al variare della temperatura e della concentrazione. A tal proposito sono state realizzate anche misure per concentrazioni maggiori (1:17). In tal modo sarà possibile verificare l'effetto della temperatura e della concentrazione sull'eventuale formazione di aggregati. Lo studio della struttura di soluzioni di glicina:acqua a due concentrazioni (1:17, 1:30) ed a due temperature consente, per la prima volta, di verificare l'esistenza di cluster di glicina in soluzione attraverso NDIS con sostituzione H/D combinata con le simulazioni EPSR. Nei paragrafi successivi riporto una breve descrizione dei campioni ottenuti con il metodo della sostituzione isotopica, i risultati sperimentali ottenuti combinando la diffrazione neutronica con le simulazioni EPSR, la discussione dei risultati ed infine le conclusioni.

6.2 Dettagli sperimentali

Come anticipato la tecnica impiegata è la diffrazione neutronica con sostituzione H/D descritta nel Capitolo 2 combinata con le simulazioni EPSR (Capitolo 3). Per la realizzazione dell'esperimento di NDIS, sono stati preparati 5 campioni (soluzioni acquose) con diverse sostituzioni isotopiche H/D, riguardanti sia gli idrogeni della glicina che quelli dell'acqua. Le misure realizzate su tali campioni rappresentano, come discusso nel Capitolo 3, vincoli per le simulazioni EPSR. Il numero di contrasti ottenuto attraverso tale procedura, è sufficiente per risolvere sia l'interazione soluto-soluto, che l'interazione soluto-solvente in quanto il numero di atomi isotopicamente sostituiti rappresenta solo il 5-8 % del numero totale di atomi. Questo ci consente di ottenere informazioni attendibili sia sull'idratazione della glicina che sulla sua aggregazione. Nella Figura 6.3 viene riportato uno schema dei diversi contrasti. Come descritto nel Capitolo 2, i fattori di

struttura totali ottenuti da tali contrasti per mezzo della diffrazione neutronica, vengono utilizzati come vincoli per le simulazioni EPSR.

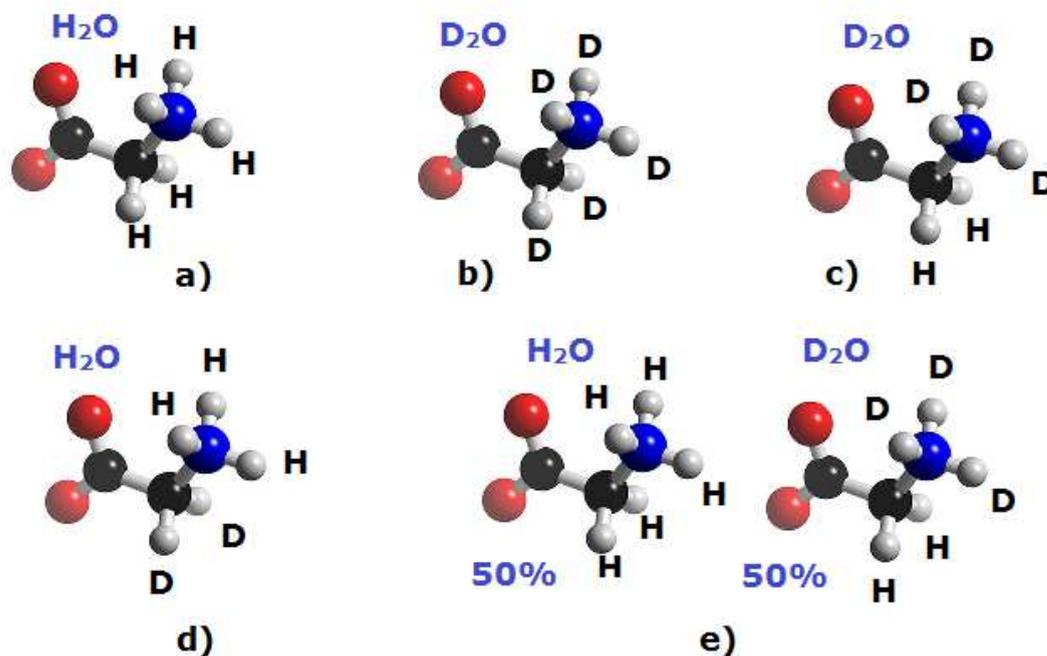


Figura 6.3 – Campioni ottenuti con il metodo della sostituzione isotopica H/D: in (a) campione completamente idrogenato, (b) campione completamente deuterato, (c) campione in cui vengono isotopicamente sostituiti solo gli idrogeni della glicina che scambiano con l'acqua; la glicina così ottenuta viene posta in D₂O (d) campione in cui vengono deuterati solo gli idrogeni della glicina che non scambiano con l'acqua; la glicina così ottenuta viene posta in soluzione di H₂O (e) miscela al 50% di (a) e (b).

Per la realizzazione delle simulazioni, sono state costruite delle scatole di simulazione di lato L che riproducessero le caratteristiche dei campioni su cui è stato realizzato l'esperimento di NDIS con sostituzione H/D. Il campione alla concentrazione di glicina:acqua alla concentrazione 1:30 è stato quindi riprodotto con una scatola di simulazione formata da 20 molecole di glicina e 600 di acqua, mentre il campione di glicina:acqua 1:17 è stato simulato attraverso una scatola di simulazione formata da 40 molecole di glicina e 680 molecole d'acqua. Nella Tabella 6.1 è riportato uno schema dei parametri della scatola di simulazione. I valori delle densità ρ sono reali e misurati sui campioni, per mezzo di un densimetro collocato nei laboratori RAL ad ISIS.

Tabella 6.1 – Parametri della scatola di simulazione

Campione	Numero molecole glicina	Numero molecole H ₂ O	ρ (atomi/ Å ³)	L(Å)
glicina:acqua 1:30 T=298 K	20	600	0.1024	26.929
glicina:acqua 1:30 T=353 K	20	600	0.0987	27.255
glicina:acqua 1:17 T=298 K	40	680	0.1040	28.623

Nella Figura 6.4 viene riportata una rappresentazione della molecola di glicina zwitterionica. Le etichette sugli atomi servono come discusso nel Capitolo 3, a distinguere gli atomi all'interno della simulazione EPSR. I potenziali e le cariche di riferimento per la simulazione, vengono riportati in Tabella 6.2 e sono, per quanto riguarda la molecola di glicina, i parametri ottimizzati per le simulazioni di proteine nei liquidi (OPLS) [158], mentre per quanto riguarda la molecola d'acqua, viene utilizzato un modello di potenziale SPC/E [77]. La scelta delle cariche è tale da assicurare elettroneutralità della molecola.

Tabella 6.2 – Parametri del Potenziale di Lennard-Jones e cariche frazionarie usati come punto di partenza per la simulazione EPSR.

atomo	ϵ (kJ/mol)	σ (Å)	Q (e)
Co	0.43932	3.75	0.7000
Ch	0.41420	3.80	0.2600
O	0.87864	2.96	-0.8250
M	0	0	0
H	0	0	0.3300
Ow	0.65	3.16	-0.8476
Hw	0.0	0.0	0.4238

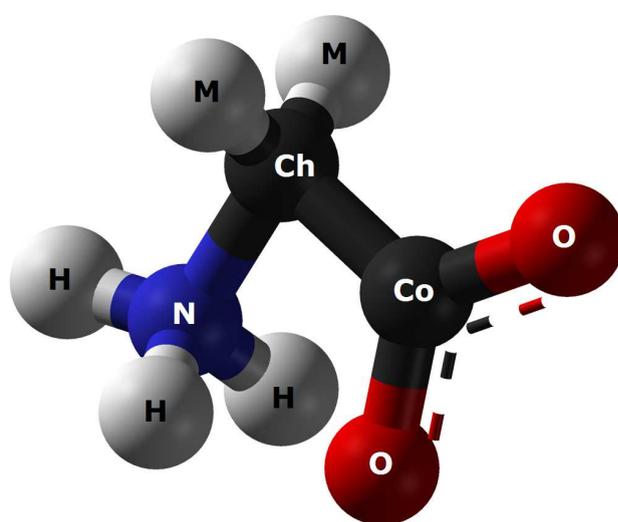


Figura 6.4 – Etichette usate nella simulazione

6.3 Risultati sperimentali

6.3.1 Effetto della concentrazione sulla struttura dell'acqua

Nella Figura 6.5 riporto le RDF Ow-Ow dell'acqua quando solvente della glicina, al variare della concentrazione (in a e b) di glicina in acqua e della temperatura (c e d). Le RDF vengono confrontate con i risultati ottenuti per l'acqua pura a $T=298$ K ed a $T=353$ K. In (a) e (c) si osserva che, la posizione del primo picco della RDF Ow-Ow resta invariata al variare della concentrazione e della temperatura e rispetto all'acqua pura. Differenze significative sono invece osservabili per quanto riguarda la posizione e la forma del secondo picco al variare della concentrazione di glicina in acqua e della temperatura quando la concentrazione è fissa e pari a 1:30 glicina:acqua. In (b) e (d) viene riportato un ingrandimento del secondo picco delle RDF Ow-Ow. Nello specifico, in (b) viene riportato un confronto tra i risultati ottenuti per i due campioni a differente concentrazione di glicina in acqua a $T=298$ K (1:30, 1:17) con quelli dall'acqua pura a $T=300$ K, mentre in (d) viene riportato un confronto tra il campione di glicina acqua meno concentrato (1:30) a $T=353$ K e l'acqua pura alla stessa temperatura. Si nota che l'aumento della concentrazione per $T=298$ K comporta uno spostamento del secondo picco della RDF verso distanze più piccole. In particolare, si osserva che per il campione di glicina:acqua 1:30 tale picco è collocato intorno a 4.20 Å mentre, per il campione di glicina:acqua 1:17, è collocato intorno a 4.13 Å. In aggiunta, in corrispondenza del campione meno concentrato (1:30), il secondo picco presenta una spalla in corrispondenza di 5.26 Å. In entrambi i casi, il secondo picco subisce uno spostamento rispetto a 4.5 Å che rappresenta la posizione del secondo picco della RDF Ow-Ow dell'acqua pura. In (d) viene riportato il confronto tra il sistema più diluito di glicina in acqua a $T=353$ K e l'acqua pura alla medesima temperatura. In tal caso si osserva la presenza di un doppio picco in corrispondenza della seconda shell, compatibile con quanto osservato per l'acqua pura a $T=353$ K (Capitolo 4). Tali picchi si presentano a distanze di 4.04 Å e 5.33 Å rispetto all'ossigeno dell'acqua solvente della glicina e posto nell'origine del sistema di riferimento; dal confronto con l'acqua pura alla stessa temperatura, si osserva che il picco a 5.33 Å resta invariato per forma e posizione mentre sono presenti variazioni significative nella posizione e nella forma del picco a 4.04 Å rispetto all'acqua pura. Per l'acqua pura a $T=353$ K tale picco risulta infatti collocato intorno a 4.32 Å.

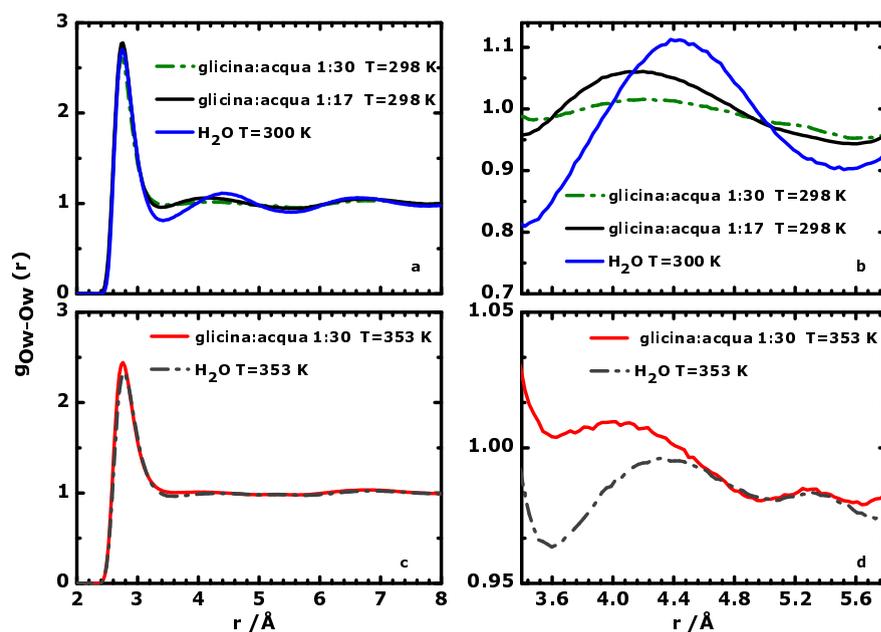


Figura 6.5 – RDF Ow-Ow ottenute per campioni di glicina in acqua per concentrazioni glicina:acqua pari a 1:17 e 1:30 a $T=298$ K (a) e (b) ed a $T=353$ K (c) e (d). Le RDF vengono confrontate con l'acqua pura a $T=300$ K (a, b) e $T=353$ K (c, d). In (a, c) vengono riportate le RDF Ow-Ow nell'intervallo $2 \text{ \AA} < r < 8 \text{ \AA}$, mentre in (b, d) vengono riportati solo ingrandimenti della seconda shell di coordinazione.

Nella Tabella 6.3 vengono riportati i numeri di coordinazione N_{Ow-Ow} , N_{Hw-Ow} ed N_{Ow-Hw} , calcolati negli intervalli $1 \text{ \AA} < r < 3.4 \text{ \AA}$, $1 \text{ \AA} < r < 2.4 \text{ \AA}$ e $1 \text{ \AA} < r < 2.4 \text{ \AA}$. Tali intervalli corrispondono all'estensione della prima shell definita prendendo rispettivamente il primo minimo della RDF Ow-Ow, Hw-Ow ed Ow-Hw. Si osserva che l'aumento della concentrazione di glicina in acqua comporta solo piccole variazioni nel numero di coordinazione Ow-Ow, mentre il numero di legami idrogeno resta invariato. L'aumento della temperatura, a parità di concentrazione, apporta invece una piccola variazione non solo nel numero di coordinazione Ow-Ow ma anche nel numero di legami idrogeno.

Tabella 6.3 – Numeri di coordinazione N_{Ow-Ow} , N_{Hw-Ow} , N_{Ow-Hw} , calcolati negli intervalli di r rispettivamente di $1 \text{ \AA} < r < 3.4 \text{ \AA}$, $1 \text{ \AA} < r < 2.4 \text{ \AA}$ ed $1 \text{ \AA} < r < 2.4 \text{ \AA}$.

Campione	N_{Ow-Ow}	N_{Hw-Ow}	N_{Ow-Hw}
	$1 \text{ \AA} < r < 3.4 \text{ \AA}$	$1 \text{ \AA} < r < 2.4 \text{ \AA}$	$1 \text{ \AA} < r < 2.4 \text{ \AA}$
glicina:acqua 1:30 T=298 K	4.52 ± 1.17	0.81 ± 0.44	1.62 ± 0.72
glicina:acqua 1:30 T=353 K	4.41 ± 1.22	0.78 ± 0.46	1.56 ± 0.74
glicina:acqua 1:17 T=298 K	4.42 ± 1.23	0.81 ± 0.44	1.62 ± 0.74

6.3.2 Idratazione gruppi $-\text{CO}_2^-$ ed $-\text{NH}_3^+$

Come anticipato, lo scopo del lavoro è quello di comprendere se le molecole di glicina formano degli aggregati, l'effetto della concentrazione e della temperatura sulla loro formazione e se il processo sia o meno mediato dalle molecole d'acqua. A tal proposito, è interessante vedere cosa accade ai gruppi $-\text{CO}_2^-$ ed NH_3^+ che rappresentano i gruppi terminali coinvolti nel legame idrogeno con l'acqua ed eventualmente con altre molecole di glicina. Nella Figura 6.6 riporto le RDF N-Ow (a) ed N-Hw (in b) per i tre campioni analizzati. Si nota che l'aumento della concentrazione (linea in nero) così come l'aumento della temperatura (linea in rosso) rispetto al campione alla concentrazione 1:30 glicina:acqua, non comporti alcuna variazione nella posizione dei picchi. In particolare si osserva che, la posizione del primo picco della RDF N-Ow risulta pari a 2.74 \AA mentre un secondo picco più largo e meno definito, è collocato intorno a 5.2 \AA . La RDF N-Hw presenta invece un primo picco intenso intorno a 3 \AA . Questa posizione non varia al variare della concentrazione o della temperatura.

In Figura 6.7 vengono riportate le SDF che indicano la distribuzione più probabile del 40% delle molecole d'acqua collocate intorno al gruppo $-\text{NH}_3^+$ della glicina (zone in giallo), nella prima shell di coordinazione N-Ow ($1-3.3 \text{ \AA}$). L'azoto del gruppo $-\text{NH}_3^+$ è

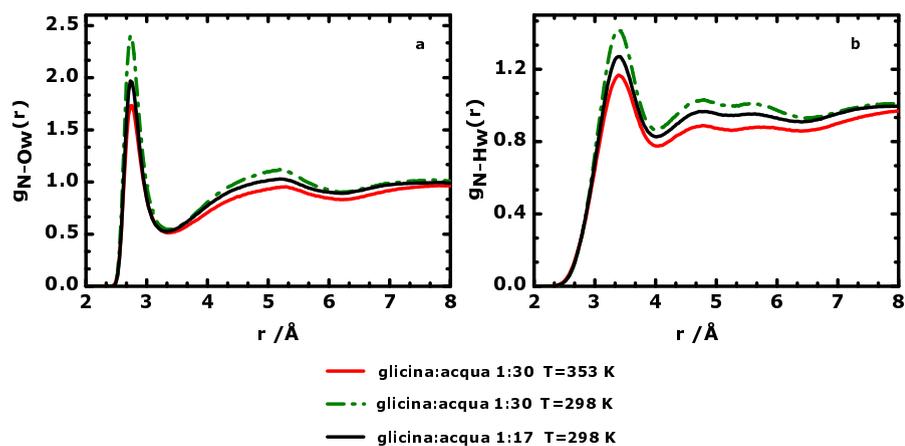


Figura 6.6 – RDF N-Ow (a) ed N-Hw (b) ottenute per campioni di glicina in acqua al variare della concentrazione soluto /solvente e della temperatura. La curva in rosso si riferisce al campione alla concentrazione glicina:acqua 1:30 a T=353 K, la curva tratteggiata in verde al campione glicina:acqua alla concentrazione 1:30 a T=298 K mentre la curva in nero alla concentrazione 1:17 a T=298 K.

posto all'origine e la prima shell di coordinazione con l'acqua è stata scelta prendendo il primo minimo della RDF N-Ow (Figura 6.6). Confrontando le tre SDF, si osserva che il campione meno concentrato ed a T=298 K (in a) presenta una leggera differenza nella distribuzione delle molecole d'acqua rispetto al campione più concentrato. L'effetto dell'aumento della concentrazione (b) è quello di rendere il legame idrogeno tra gruppo NH_3^+ con l'acqua, meno direzionale. Tale comportamento si osserva anche aumentando la temperatura e mantenendo la concentrazione costante (c).

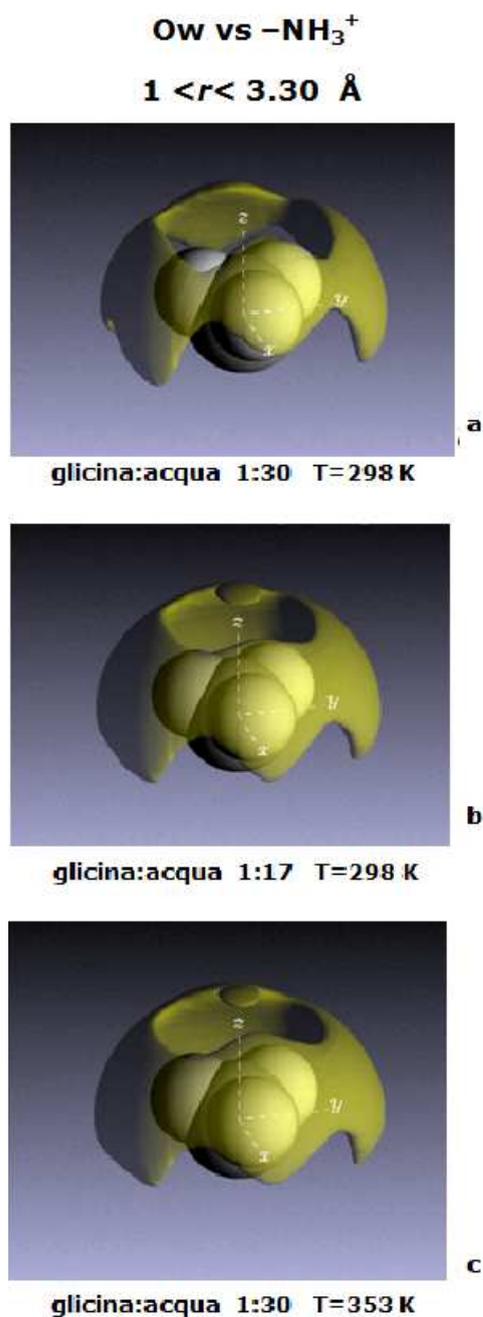


Figura 6.7 – Distribuzione spaziale delle molecole d'acqua intorno al gruppo $-\text{NH}_3^+$ nei tre campioni analizzati. Nella distribuzione vengono considerate solo le molecole d'acqua appartenenti alla prima shell di coordinazione calcolata prendendo il minimo della RDF N-Ow. Per i tre sistemi il contrasto ovvero il valore di soglia per la distribuzione di probabilità, è stato posto pari a 0.6.

In Figura 6.8 vengono riportate le RDF Co-Ow e Co-Hw dove Co è il carbonio appartenente al $-\text{CO}_2^-$ della glicina. Si osserva che la RDF Co-Ow presenta un primo picco intorno a 3.5 Å e che tale posizione non subisce variazioni per effetto della concentrazione e temperatura; lo stesso effetto si osserva per la posizione del primo picco della RDF Co-Hw, collocato intorno a 2.5 Å.

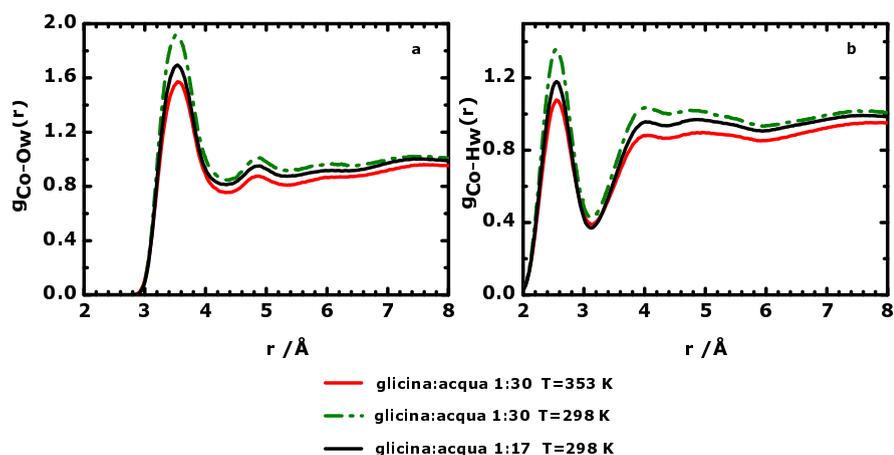


Figura 6.8 – RDF Co-Ow (a) e Co-Hw (b) ottenute per i campioni di glicina in acqua al variare della concentrazione e della temperatura. La curva in rosso si riferisce al campione glicina:acqua 1:30 a T=353 K, la curva tratteggiata in verde al campione:glicina:acqua 1:30 a T=298 K, infine la curva in nero alla concentrazione glicina:acqua 1:17 a T=298 K.

In Figura 6.9 vengono riportate le funzioni di densità spaziale (SDF) dell'acqua intorno al gruppo $-\text{CO}_2^-$ della glicina. Nelle tre figure (a), (b) e (c), l'atomo di carbonio è indicato con la sfera grigia ed è collocato all'origine mentre gli atomi di ossigeno, sfere in rosso, sono collocati nel piano zy; le zone in giallo indicano la collocazione più probabile del 65% (contrasto 0.35) delle molecole d'acqua ad una distanza pari a 2-4.27 Å, valutata prendendo il primo minimo della RDF Co-Ow, intorno ad un gruppo $-\text{CO}_2^-$. Le SDF presentano lo stesso comportamento al variare della concentrazione e della temperatura. Si osserva in tutti i casi che le molecole d'acqua tendono a collocarsi in modo preferenziale, in una regione di $z > 0$, e nelle direzioni $+y$ e $-y$ rispetto all'asse x.

Calcolando i numeri di coordinazione $N_{\text{Co-Ow}}$, $N_{\text{Co-Hw}}$, $N_{\text{N-Ow}}$ ed $N_{\text{N-Hw}}$ relativi alla prima shell di coordinazione, si osserva che il rapporto $N_{\text{N-Ow}} / N_{\text{Co-Hw}} = 0.67$ e che lo stesso valore si ottiene per $N_{\text{Co-Ow}} / N_{\text{N-Hw}}$. Questo significa che il numero di molecole d'acqua nella shell di idratazione dall'atomo di carbonio del gruppo $-\text{CO}_2^-$ e dell'atomo di azoto del gruppo $-\text{NH}_3^+$ è lo stesso.

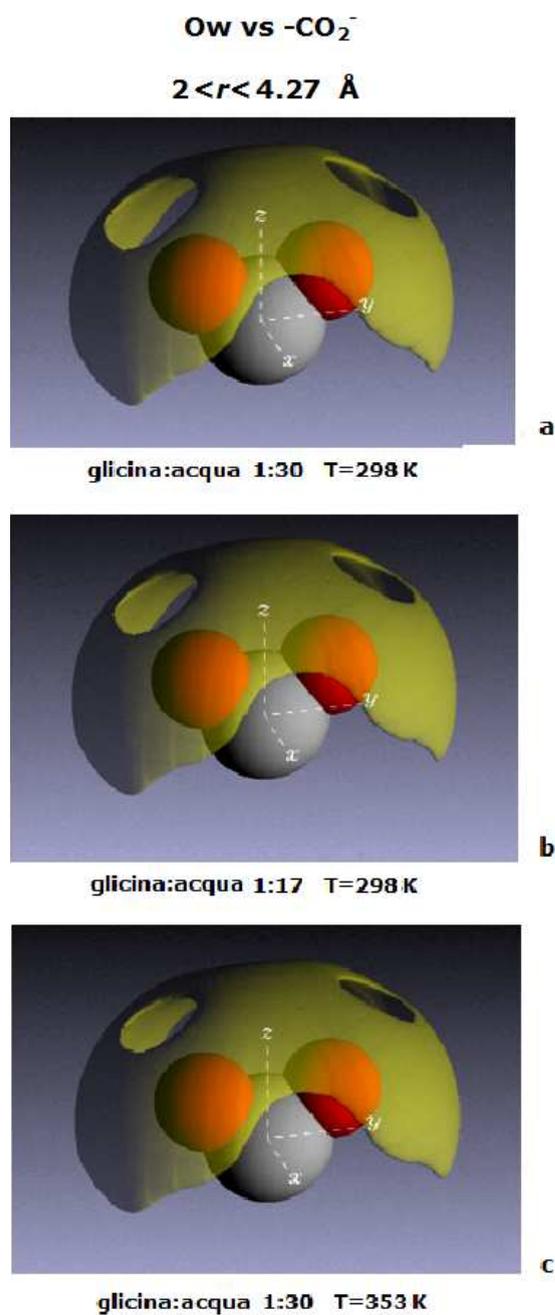


Figura 6.9 – Distribuzione spaziale delle molecole d'acqua intorno al gruppo $-\text{CO}_2^-$ nei tre campioni analizzati. Nella distribuzione vengono considerate solo le molecole d'acqua appartenenti alla prima shell di coordinazione, calcolata prendendo il minimo della RDF Co-Ow. Il contrasto, ovvero il valore di soglia per la distribuzione di probabilità, è stato posto pari a 0.35.

6.3.3 Legami idrogeno

Come descritto precedentemente, i gruppi della glicina coinvolti nella formazione dei legami idrogeno con l'acqua o altre molecole di glicina sono i gruppi terminali $-\text{CO}_2^-$ ed $-\text{NH}_3^+$. Nel paragrafo precedente ho riportato solo le RDF relative all'azoto ed al carbonio di tali gruppi, con l'ossigeno e l'idrogeno dell'acqua, e le SDF ottenute considerando le distanze di prima shell definite dalla RDF N-Ow e Co-Ow. In questo paragrafo riporto le RDF O-Ow, O-Hw, H-Ow, H-Hw dove H sono gli idrogeni del gruppo $-\text{NH}_3^+$ ed O gli ossigeni del gruppo $-\text{CO}_2^-$. In Figura 6.10 vengono riportate le funzioni di distribuzione radiali tra l'Ossigeno del gruppo $-\text{CO}_2^-$ della glicina e l'ossigeno (a) e l'idrogeno dell'acqua (b). Si osserva che il primo picco della RDF O-Ow è collocato intorno a 2.65 Å e che tale posizione non varia al variare della concentrazione della glicina in acqua e della temperatura della soluzione. Picchi successivi e meno intensi sono collocati a 4.39 Å ed a 5.34 Å ed anche in tal caso non subiscono variazioni per effetto dell'aumento della concentrazione e della temperatura. La RDF O-Hw presenta un picco intorno a ~ 1.67 Å e tale posizione non varia con la concentrazione o con la temperatura. La collocazione del picco suggerisce la presenza di un legame idrogeno tra l'ossigeno del $-\text{CO}_2^-$ e l'acqua. Il numero di legami idrogeno è stato calcolato per i tre campioni investigati ed è stato osservato che l'aumento di concentrazione e temperatura comporta una diminuzione del numero di coordinazione N_{O-Ow} ed N_{O-Hw} .

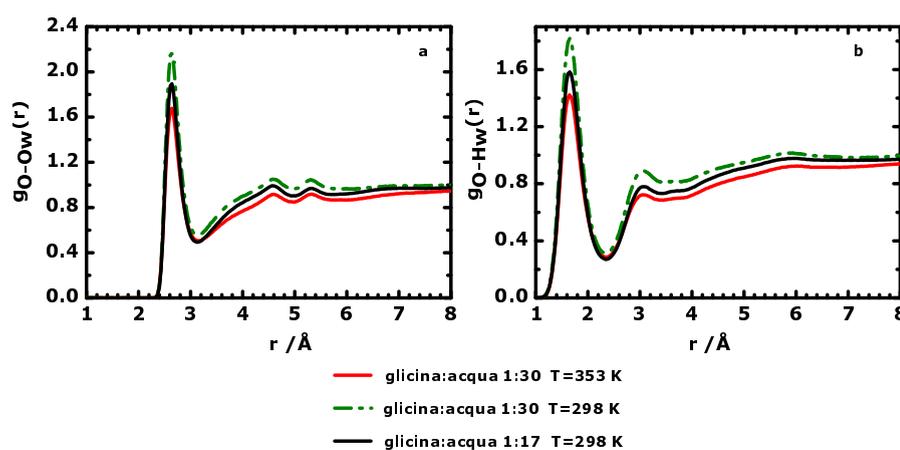


Figura 6.10 – RDF O-Ow (a) ed O-Hw (b) ottenute per soluzioni di glicina in acqua al variare della concentrazione soluto /solvente e della temperatura. La curva in rosso si riferisce al campione di glicina:acqua 1:30 a $T=353$ K, la curva tratteggiata in verde al campione glicina:acqua 1:30 a $T=298$ K mentre la curva in nero si riferisce al campione glicina:acqua 1:17 a $T=298$ K.

In Figura 6.11 vengono riportate le RDF H-Ow ed H-Hw, con H idrogeno del gruppo $-\text{NH}_3^+$ ed Ow, Hw rispettivamente l'ossigeno e l'idrogeno dell'acqua. Si nota che la RDF H-Ow presenta un primo picco collocato intorno a 1.80 Å. Anche in questo caso la posizione resta invariata con l'aumento della temperatura e della concentrazione mentre si osserva una variazione dei numeri di coordinazione come in Tabella 6.4. L' aumento della concentrazione e della temperatura, comporta una diminuzione del numero di coordinazione H-Ow calcolato integrando le RDF H-Ow nell'intervallo di $1 \text{ \AA} < r < 2.4 \text{ \AA}$. Tale numero non rappresenta altro che il numero dei legami idrogeno che l'idrogeno del gruppo amminico forma con l'acqua nella prima shell di coordinazione.

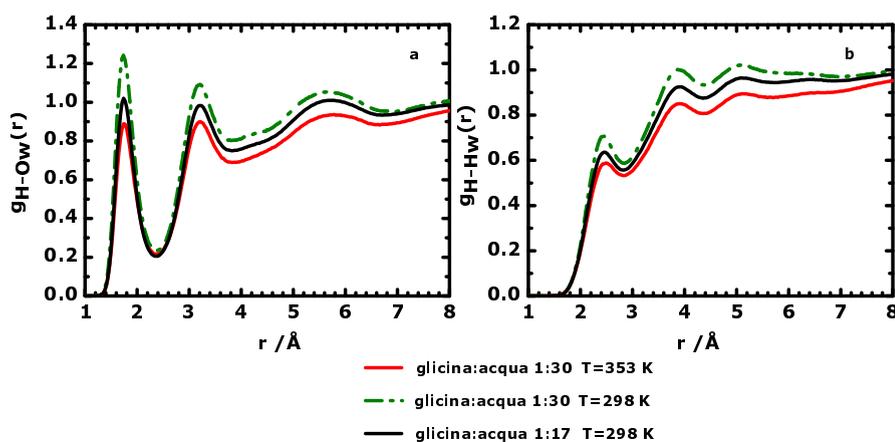


Figura 6.11 – RDF H-Ow (a) ed H-Hw (b) ottenute per campioni di glicina in acqua al variare della concentrazione e della temperatura. La curva in rosso si riferisce al campione di glicina:acqua 1:30 a $T=353 \text{ K}$, la curva tratteggiata in verde al campione di glicina:acqua 1:30 a $T=298 \text{ K}$ mentre la curva in nero al campione glicina:acqua 1:17 a $T=298 \text{ K}$.

Tabella 6.4 – Numeri di coordinazione N_{O-Ow} , N_{H-Ow} , N_{O-Hw} .

Campione	N_{O-Ow} $1 \text{ \AA} < r < 3.07 \text{ \AA}$	N_{H-Ow} $1 \text{ \AA} < r < 2.4 \text{ \AA}$	N_{O-Hw} $1 \text{ \AA} < r < 2.35 \text{ \AA}$
glicina:acqua 1:30 $T=298 \text{ K}$	2.15 ± 0.91	0.77 ± 0.50	2.18 ± 0.94
glicina:acqua 1:30 $T=353 \text{ K}$	2.04 ± 0.95	0.71 ± 0.53	2.06 ± 0.98
glicina:acqua 1:17 $T=298 \text{ K}$	1.94 ± 0.95	0.67 ± 0.53	1.93 ± 0.97

6.3.4 RDF glicina-glicina

Le posizioni dei picchi nelle RDF H-O ed N-Co riportate in Figura 6.12 dimostrano che la glicina tende a formare aggregati. In (a) la RDF H-O indica la probabilità di trovare, ad una certa distanza r da un idrogeno del gruppo $-\text{NH}_3^+$ della glicina, un atomo di ossigeno appartenente al gruppo $-\text{CO}_2^-$ di un'altra glicina. La posizione del primo picco è intorno a 1.65 Å mentre un secondo picco è collocato intorno a 3.1 Å; tali posizioni non risentono della variazione di concentrazione di glicina:acqua (1:30, 1:17) e dell'aumento di temperatura ($T=298$ K, $T=353$ K).

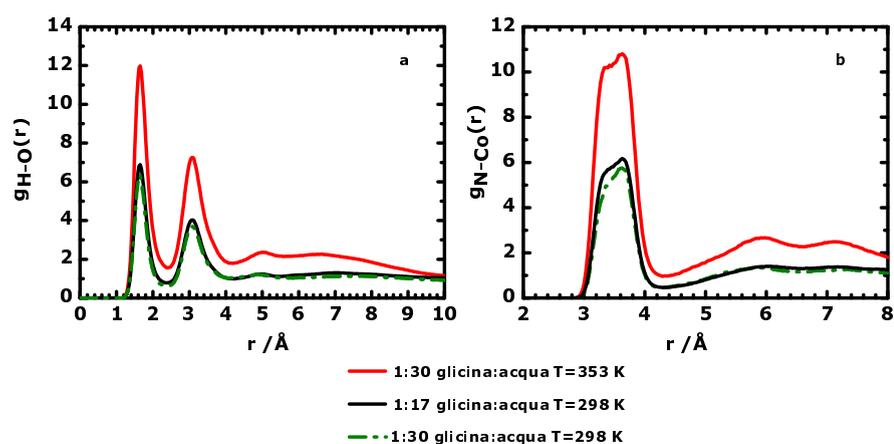


Figura 6.12 – RDF H-O (a) e N-Co (b) ottenute per campioni di glicina in acqua al variare della concentrazione soluto/solvente e della temperatura. La curva in rosso si riferisce al campione di glicina:acqua 1:30 misurato a $T=353$ K, la curva tratteggiata in verde al campione di glicina:acqua 1:30 studiato a $T=298$ K mentre la curva in nero al campione glicina:acqua 1:17 studiato a $T=298$ K.

Dai numeri di coordinazione (in Tabella 6.5), calcolati integrando le RDF nell'intervallo di $1 \text{ \AA} < r < 2.4 \text{ \AA}$, si nota che il campione con maggiore concentrazione di glicina in acqua (glicina:acqua 1:17) ed il campione di glicina:acqua alla concentrazione 1:30 misurato a $T=353$ K, presentano un maggior numero di contatti diretti H-O rispetto a quanto individuato per il campione glicina:acqua 1:30 a $T=298$ K. Nella Figura 6.12 (b) viene invece riportata la RDF relativa alla coppia N-Co per i tre campioni. La funzione presenta una doppia struttura in corrispondenza di $\sim 3.65 \text{ \AA}$ e di $\sim 3.39 \text{ \AA}$. Il significato di tale struttura verrà discusso in seguito.

Tabella 6.5 – Numeri di coordinazione N_{H-O} calcolati nell'intervallo di $1 \text{ \AA} < r < 2.4 \text{ \AA}$

Campione	$N_{H-O} (1 \text{ \AA} < r < 2.4 \text{ \AA})$
1:30:glicina:acqua T=298 K	0.30 ± 0.25
1:30:glicina:acqua T=353 K	0.34 ± 0.29
1:17:glicina:acqua T=298 K	0.38 ± 0.30

6.3.5 Distribuzione dei legami idrogeno con l'acqua e dei legami glicina-glicina

Nella Figura 6.13 vengono riportate le distribuzioni dei legami idrogeno glicina-glicina (I) e glicina-acqua (II, III) per i tre campioni studiati a T=298 K (a), a T=353 K (b), ed a T=298 K (c). Le distribuzioni H-O ed H-Ow presentano una doppia popolazione di cui una ha il massimo in corrispondenza di zero e l'altra in corrispondenza di 1; al variare della temperatura e della concentrazione, cambia il rapporto tra le due popolazioni. In particolare con l'aumento della temperatura da T=298 K a T=353 K (Figura 6.13 (Ib)) aumenta nel campione 1:30 glicina acqua, la popolazione con il numero di contatti H-O centrato in 1. Al contrario, diminuisce la popolazione con il numero di contatti H-Ow centrato in 1. Questo significa che, l'aumento della temperatura comporta un aumento dei contatti H-O ed una diminuzione del numero dei legami idrogeno della glicina con l'acqua. Lo stesso effetto è presente in misura maggiore, nel campione più concentrato (Figura 6.13 (I,II c)) ad un aumento della popolazione con massimo della distribuzione in 1 per il numero di contatti H-O, corrisponde una diminuzione del numero di legami idrogeno tra l'idrogeno della glicina e l'ossigeno dell'acqua. In Figura 6.13 (III) viene riportata la distribuzione dei legami idrogeno tra l'ossigeno della glicina e l'idrogeno dell'acqua. Anche in tal caso si osserva un diverso bilanciamento per effetto della temperatura e concentrazione.

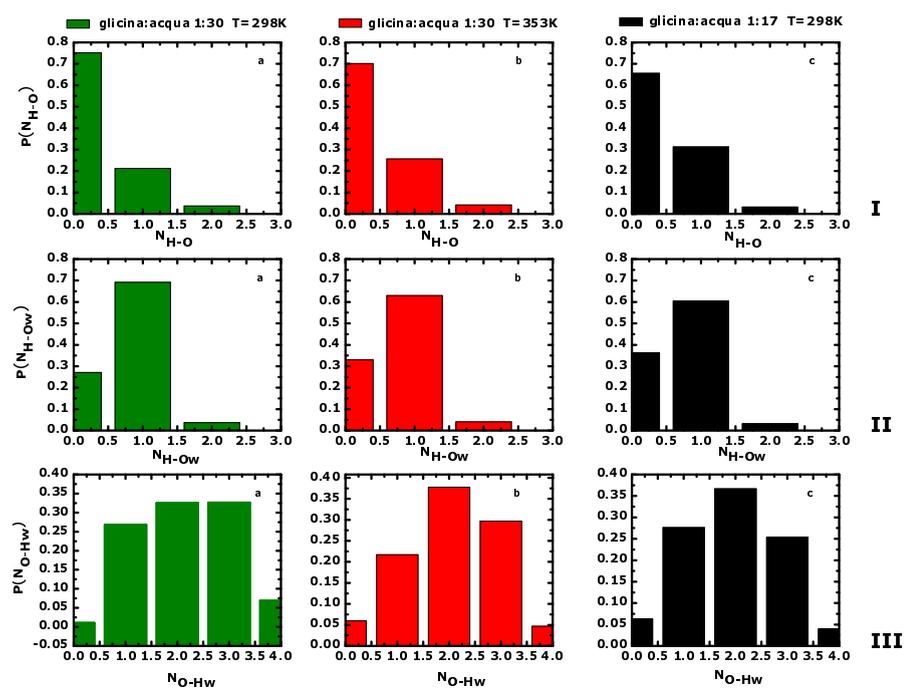


Figura 6.13 – Istogrammi relativi ai numeri di coordinazione N_{H-O} , N_{H-Ow} ed N_{O-Hw} calcolati integrando le rispettive RDF nell'intervallo $1 \text{ \AA} < r < 2.4 \text{ \AA}$.

6.3.6 Dimensioni dei cluster

La formazione degli aggregati può essere monitorata, attraverso una funzione di distribuzione che definiamo $P(\text{cluster})$. Tale funzione esprime la distribuzione della dimensione dei cluster in funzione della dimensione dei cluster (n_{dim}) quando le molecole si trovano ad una distanza specifica. È importante sottolineare che $n_{dim}=1$ corrisponde alla molecola singola, ovvero il monomero. In Figura 6.14 vengono riportate le funzioni $P(\text{cluster})$ in funzione di n_{dim} , calcolate per i tre campioni, relative ai contatti diretti H-O (in a) tra l'idrogeno del gruppo amminico e l'ossigeno del gruppo carbossilico della glicina. La distanza intermolecolare H...O è stata scelta prendendo il primo minimo della RDF H-O. Dal grafico, si può notare che la specie predominante in soluzione è il monomero.

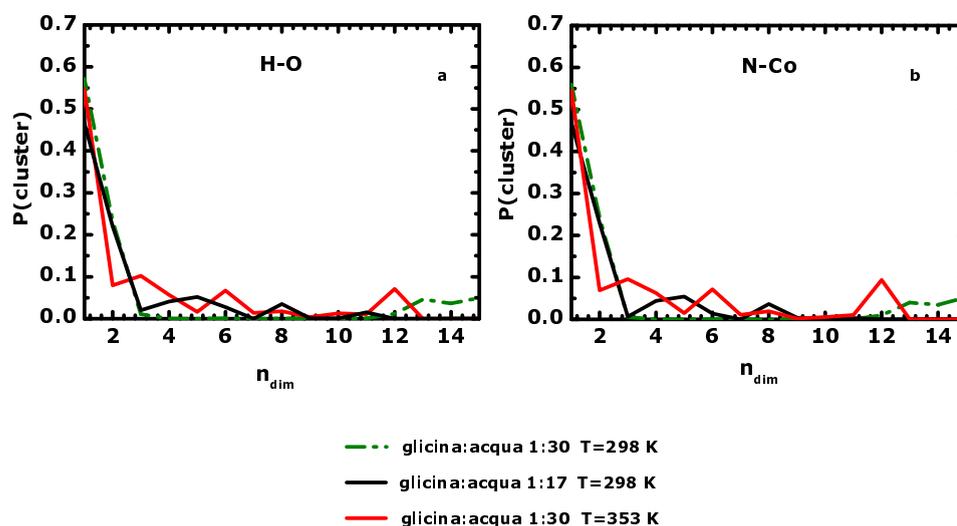


Figura 6.14 – Probabilità di cluster in funzione della dimensione del cluster. La probabilità di cluster è normalizzata rispetto a ciascun tipo di cluster.

6.4 Discussione

6.4.1 Effetti perturbativi sulla struttura dell'acqua

Come è stato già osservato nel Capitolo 5 ed in altri lavori [76, 117], la presenza di un soluto in acqua può apportare una perturbazione alla struttura stessa dell'acqua. A tal proposito si vuole mostrare in che modo l'effetto perturbativo apportato alla struttura dell'acqua risenta della concentrazione del soluto e della temperatura della soluzione. Le RDF Ow-Ow presentate nel paragrafo 6.3.1, permettono di osservare che, aumentando la concentrazione e mantenendo la temperatura costante a $T=298$ K, non si nota alcuno spostamento del primo picco collocato intorno a 2.74 Å, rispetto al caso di una soluzione di acqua pura alla stessa temperatura. Un simile risultato è stato ottenuto da Campo [146] il quale individua la posizione del primo picco della RDF Ow-Ow, per i sistemi di glicina:acqua 1:300 ed 1:35, in corrispondenza di $r \sim 2.7$ Å. Al contrario, l'aumento di concentrazione comporta uno spostamento del secondo picco verso distanze minori; come è stato già discusso e riportato in Figura 6.5. Il secondo picco della RDF Ow-Ow risulta collocato intorno a 4.14 Å per il campione glicina acqua 1:17 ed intorno a 4.23 Å per il campione glicina:acqua 1:30. Un simile andamento è presente anche nel lavoro di Campo [146], nonostante le variazioni tra il sistema glicina:acqua 1:35 e glicina acqua 1:30 risultino meno significative rispetto a quanto osservato nei nostri dati. Come osservato in precedenza, si ha una diminuzione del numero di coordinazione N_{Ow-Ow} con l'aumento della concentrazione, tale valore risulta pari a 4.52 per il campione glicina:acqua 1:30 e 4.38 per il campione glicina acqua 1:17, entrambi misurati a $T=298$ K. La diminuzione del numero di coordinazione N_{Ow-Ow} e lo spostamento del secondo picco della RDF Ow-Ow, suggeriscono per l'appunto che, l'inserimento di una quantità superiore di soluto in acqua apporti una maggiore perturbazione sulla rete di legami idrogeno dell'acqua, solvente della glicina. Altro aspetto interessante riguarda l'effetto dell'aumento della temperatura sulla struttura dell'acqua, in una soluzione di glicina:acqua 1:30. Abbiamo potuto osservare che, l'aumento della temperatura su una soluzione di glicina:acqua 1:30 comporta una variazione della struttura dell'acqua. Tali variazioni sono dimostrate dalla presenza di una doppia struttura della seconda shell di coordinazione, della RDF Ow-Ow. In particolare, si osserva che, la spalla in corrispondenza di 5.30 Å, nella RDF Ow-Ow di una soluzione di glicina:acqua 1:30 studiata a $T=353$ K, si sovrappone perfettamente alla stessa spalla individuata in una soluzione di acqua pura studiata (Capitolo 4), alla

stessa temperatura. Al contrario, il picco della doppia struttura localizzato nella RDF Ow-Ow dell'acqua pura a $T=353$ K intorno a 4.34 \AA (Capitolo 4), si sposta a 4.08 \AA per il campione glicina:acqua 1:30, misurato a $T=353$ K. Tale posizione risulta inoltre, inferiore rispetto a quella (4.24 \AA) individuata nella stessa soluzione misurata a $T=298$ K. L'aumento della temperatura comporta quindi, due tipi di perturbazione sulla struttura dell'acqua:

- Un effetto perturbativo dovuto al solvente. Sia la RDF Ow-Ow dell'acqua pura a $T=353$ K che quella della soluzione glicina:acqua 1:30 a $T=353$ K, presentano una doppia struttura della seconda shell.
- Un effetto perturbativo indotto dalla presenza del soluto nella soluzione. La prova di questo effetto proviene dal fatto che il primo picco della doppia struttura, collocato per l'acqua pura (a $T=353$ K) intorno a 4.34 \AA , risulta collocato per l'acqua solvente della soluzione glicina:acqua 1:30, a $T=353$ K, intorno a 4.08 \AA . Tale posizione è comunque inferiore rispetto a 4.24 \AA , osservata nel caso della soluzione glicina:acqua 1:30 a $T=298$ K.

L'aumento della temperatura in una soluzione glicina:acqua 1:30, comporta una serie di variazioni anche per quanto riguarda i numeri di coordinazione. I valori di N_{Ow-Ow} , N_{Ow-Hw} , individuati nel caso della soluzione glicina:acqua 1:30 a $T=353$ K risultano pari a 4.39 e 1.56. Tali valori risultano non solo inferiori rispetto a quelli ottenuti per il campione glicina:acqua 1:30 misurato a $T=298$ K ($N_{Ow-Ow}=4.52$, $N_{Ow-Hw}=1.62$) ma anche inferiori rispetto a quelli ricavati per l'acqua pura alla stessa temperatura (4.7, 1.70). Si osserva inoltre che l'effetto della concentrazione e della temperatura sembrano apparentemente confrontabili per quanto riguarda i numeri di coordinazione. Nel senso che sia l'aumento della temperatura che della concentrazione, rispetto ad una soluzione glicina:acqua 1:30 $T=298$ K, comportano una diminuzione confrontabile del valore di N_{Ow-Ow} . Tali risultati potrebbero far ipotizzare che l'aumento della temperatura possa comportare un aumento di idrofilicità della glicina. Tale ipotesi non può essere supportata in quanto, quando un sistema diventa mediamente più idrofilico, anche il numero dei legami idrogeno con l'acqua dovrebbe aumentare diminuendo in tal modo la coordinazione acqua-acqua. Abbiamo visto però precedentemente che il numero di legami idrogeno tra glicina ed acqua tende a diminuire con l'aumento della temperatura, conseguentemente alla formazione di aggregati. Pertanto, l'aumento di idrofilicità della glicina

non può spiegare da sola, il comportamento osservato. Un'ipotesi potrebbe essere che la formazione di aggregati possa essere una delle cause per cui la struttura dell'acqua venga modificata. L'aumento della clusterizzazione comporterebbe un aumento del volume escluso alle molecole d'acqua, il che giustificherebbe la diminuzione della coordinazione dell'acqua.

6.4.2 Studio dell'idratazione della glicina

Lo studio di NDIS, combinato con le simulazioni EPSR, su soluzioni acquose di glicina, ci consente di convalidare quanto già osservato in altri studi riguardo il comportamento idrofilico della glicina, garantito dalla presenza dei gruppi $-\text{NH}_3^+$ e $-\text{CO}_2^-$ [131, 133, 142, 145, 146, 159–161]. Per valutare l'idratazione della glicina ci si è concentrati principalmente sull'idratazione dei gruppi $-\text{NH}_3^+$ e $-\text{CO}_2^-$ in quanto coinvolti, il primo attraverso l'idrogeno, il secondo attraverso l'ossigeno, nel legame idrogeno con l'ossigeno e l'idrogeno dell'acqua; la stessa procedura è stata impiegata da Leung et al. [145] in uno studio *ab initio* realizzato su sistemi di glicina:acqua 1:52 a $T=300$ K. Nel nostro lavoro, è stato possibile monitorare l'idratazione della glicina al variare della temperatura ($T=300$ K, $T=353$ K) e della concentrazione (1:30, 1:17). In letteratura vengono riportati diversi risultati riguardo i numeri di idratazione della glicina; molto spesso tali differenze sono dovute alle concentrazioni studiate, alla maggiore o minore sensibilità della tecnica impiegata, nei confronti della struttura dell'acqua [162]; pertanto il confronto va fatto con le dovute attenzioni. Alagona et al. [159] individua tramite uno studio MD, circa 5.3 molecole d'acqua intorno al gruppo $-\text{CO}_2^-$ e circa 2.3 intorno al gruppo $-\text{NH}_3^+$. Studi di diffrazione neutronica con sostituzione H/D realizzati da Kamada et al. [143] e Motoya et al. [144] hanno indicato che ci sono 3 molecole d'acqua intorno al gruppo $-\text{CO}_2^-$ e due intorno al gruppo $-\text{NH}_3^+$. Leung e Rampe [145] utilizzando metodi *ab initio* su un sistema di glicina:acqua 1:52, hanno ottenuto 4.7 molecole d'acqua intorno al gruppo CO_2^- e 3 molecole d'acqua intorno al gruppo NH_3^+ . Campo [146] individua un numero di idratazione totale per gli atomi di ossigeno del CO_2^- pari a 5.4 per un sistema glicina acqua 1:300 mentre per un sistema glicina:acqua 1:35, tale numero risulta pari a 4.5. A questo punto, confrontiamo i nostri risultati ottenuti per il campione glicina:acqua 1:30, misurato a $T=298$ K, con quanto ottenuto nel lavoro di dinamica molecolare [146] per una soluzione di glicina:acqua 1:35 a $T=300$ K. Il numero di legami idrogeno tra l'ossigeno del gruppo $-\text{CO}_2^-$ e l'idrogeno dell'acqua risulta pari a

2.18; nel lavoro di dinamica molecolare [146] viene individuato un numero di coordinazione pari a 2.91 per un sistema glicina:acqua alla concentrazione 1:35 ed a $T=300$ K. Il numero di legami idrogeno tra l'idrogeno del gruppo $-\text{NH}_3^+$ e l'ossigeno dell'acqua nella soluzione glicina:acqua 1:30 a $T=298$ K risulta pari a 0.77, ed è di poco inferiore rispetto a 0.90 individuato tramite dinamica molecolare [146] per un sistema glicina:acqua 1:35. Le differenze individuate possono essere una conseguenza della differente concentrazione e della differente tecnica utilizzata. Una volta verificato il comportamento idrofilico dei gruppi $-\text{CO}_2^-$ e $-\text{NH}_3^+$ della glicina e dopo aver confrontato i numeri di idratazione con i risultati ottenuti attraverso altre tecniche, è possibile concentrarsi sull'effetto della temperatura sull'idratazione della glicina ed in particolare sui gruppi $-\text{CO}_2^-$ e $-\text{NH}_3^+$. Lo scopo di questo lavoro è infatti quello di verificare se per $T > T^*=333$ K sia presente una variazione della shell d'idratazione della glicina su un campione di glicina:acqua alla concentrazione 1:30. In un recente lavoro di spettroscopia IUVS (scattering inelastico UV) [127] realizzato su una soluzione di glicina:acqua alla concentrazione 1:30, al variare della temperatura ($278 \div 363$ K), è stato osservato che la larghezza di riga di Brillouin Γ presenta una temperatura di crossover in corrispondenza di $T^*=333$ K. Nel lavoro gli autori spiegano l'importanza della spettroscopia IUVS nello studio di soluzioni acquose in quanto essa consente di accedere ad un intervallo di frequenze confrontabile con l'inverso del tempo di vita media dei legami idrogeno nell'acqua τ_α [163]. L'andamento della larghezza di riga di Brillouin $\Gamma \propto \tau_\alpha Q^2$ in funzione della temperatura non segue in tal caso, una legge strettamente Arrhenius, ed esiste una temperatura di transizione, pari a $T^*=333$ K, osservata anche nel caso dell'acqua pura, che separa due andamenti Arrhenius. Ne risultano due differenti energie di attivazione (relative alla formazione dei legami idrogeno) per $T > T^*$ e per $T < T^*$. Nello stesso lavoro gli autori riportano misure di UV Raman attraverso le quali viene misurato il tempo di correlazione τ_c di uno specifico legame molecolare. Tale quantità è legata al tempo di vita medio di una perturbazione esterna casuale che produce uno sfasamento vibrazionale e, nel caso di liquidi formati da legami idrogeno, è connessa al tempo di rilassamento del legame idrogeno [164, 165]. Pertanto se un dato atomo di una molecola (in soluzione acquosa) forma dei legami idrogeno con molecole circostanti, τ_c rappresenta il tempo di vita media del rispettivo legame idrogeno. Gli autori individuano la stessa discontinuità individuata nelle misure IUVS, nella misura del τ_c relativo al modo bending del gruppo $-\text{CH}_2$, in funzione della temperatura e la attribuiscono alle differenti collisioni tra i gruppi $-\text{CH}_2$ e le molecole d'acqua circostanti conseguenti alla rottura della shell di idratazione. T^* è

dunque considerata come la temperatura di crossover al di sopra della quale la shell di idratazione della glicina viene distrutta. Tale osservazione deriva dal calcolo dell'energia di attivazione ovvero l'energia necessaria perchè si formino legami idrogeno tra le molecole d'acqua coinvolte nella formazione della shell d'idratazione: per $T < T^*$ gli autori individuano infatti un'energia di attivazione maggiore rispetto a $T > T^*$. Di conseguenza la shell di idratazione per $T < T^*$ risulta più stabile rispetto a $T > T^*$. Nel lavoro, gli autori spiegano anche che uno dei motivi per cui sia stata scelta la glicina è il fatto che quando in soluzione acquosa, più del 99% delle molecole di glicina risultano zwitterioni pertanto i gruppi funzionali $-\text{CO}_2^-$ ed $-\text{NH}_3^+$ possono portare a legami idrogeno ionici che sono più stabili rispetto a quelli non ionici. In aggiunta l'impiego della glicina consente di ottenere spettri Raman e IUVS con un elevato rapporto segnale rumore in quanto gli zwitterioni di glicina presentano una grande sezione d'urto di scattering conseguenza dell'elevata polarizzabilità ed del basso assorbimento UV, che garantisce un grande volume di scattering. Dall'osservazione dei nostri dati ed in particolare dalle RDF Co-Ow, Co-Hw, O-Hw, H-Ow e dalle SDF delle molecole d'acqua intorno ai gruppi $-\text{CO}_2^-$ e $-\text{NH}_3^+$ riportate precedentemente, per $T=298$ K e per $T=353$ K e dunque al di sopra ed al di sotto della temperatura di crossover $T^*=333$ K [127], si nota che non ci sono variazioni significative che possano far ipotizzare la presenza di una shell di idratazione più stabile per $T > T^*$. È stato osservato infatti che la posizione dei picchi delle RDF Co-Ow, Co-Hw, O-Hw, H-Ow resta invariata per il campione glicina:acqua alla concentrazione 1:30, quando si passa da $T=298$ K a $T=353$ K. Allo stesso modo non si osservano variazioni significative nella distribuzione spaziale delle molecole d'acqua intorno ai gruppi $-\text{CO}_2^-$ e $-\text{NH}_3^+$ per il campione glicina:acqua alla concentrazione 1:30 a $T=298$ K e per quello alla medesima concentrazione a $T=353$ K. Osservando le RDF O-Hw con O ossigeno del gruppo $-\text{CO}_2^-$ è stato osservato che il primo picco è collocato intorno a 1.67 Å, mentre nelle RDF H-Ow dove H rappresenta l'idrogeno del gruppo $-\text{NH}_3^+$ il primo picco è collocato intorno a 1.80 Å. Tali differenze indicano una differente forza dei legami idrogeno che i due gruppi formano con l'acqua. Il legame idrogeno formato dal gruppo $-\text{CO}_2^-$ con l'acqua risulta quindi più forte rispetto al legame idrogeno del gruppo $-\text{NH}_3^+$ con l'acqua. Il fatto che non ci sia traccia della rottura della shell di idratazione per $T=353$ K nei nostri dati, può derivare dal fatto che le informazioni che si ricavano sono difficilmente confrontabili. La diffrazione neutronica consente infatti di ottenere informazioni strutturali mediate in un arco di tempo lungo, se confrontato con la scala temporale delle spettroscopie Raman e IUVS (0.1-10 ps); questo implica che se anche ci dovessero essere

variazioni significative nella formazione dei legami idrogeno, esse risulterebbero mediate in un tempo lungo, rendendone il contributo globalmente trascurabile.

6.4.3 Formazione di aggregati

Come anticipato, lo studio di soluzioni di glicina, per concentrazioni sufficientemente grandi di glicina:acqua, consente di verificare l'esistenza di aggregati ed eventualmente il ruolo dell'acqua nella formazione degli aggregati stessi. Nel nostro studio ci si è concentrati su campioni di glicina:acqua alle concentrazioni 1:30 (a $T=298$ K ed a $T=353$ K) ed 1:17. Pertanto lo scopo è quello di verificare non solo se la glicina forma aggregati ma anche se le proprietà di aggregazione dipendono dalla concentrazione e dalla temperatura. La prima traccia della formazione degli aggregati, nei nostri dati, proviene dalle RDF H-O: è possibile osservare che esse (Figura 6.12) presentano un primo picco intorno a 1.65 Å. Tale valore indica la distanza più probabile di collocazione dell'ossigeno di una molecola di glicina rispetto ad un atomo di idrogeno di una prima vicina e risulta inferiore rispetto al valore ottenuto prendendo il massimo della RDF H-Ow ovvero 1.80 Å mentre risulta confrontabile con la posizione del primo picco della RDF O-Hw (1.67 Å). Questo indica che il legame idrogeno che si forma tra l'atomo di idrogeno del gruppo $-NH_3^+$ e l'ossigeno dell'acqua risulta più debole rispetto al legame idrogeno tra l'idrogeno del gruppo $-NH_3^+$ e l'ossigeno del gruppo carbossilico di una glicina prima vicina. Il fatto che il legame idrogeno tra le glicine sia più forte rispetto a quello glicina-acqua, potrebbe essere uno dei motivi per cui eventuali aggregati siano stabili in soluzione acquosa, anche nel caso in cui si aumenta la temperatura. La stessa posizione dei picchi nelle RDF H-O, ci permette di comprendere che gli aggregati che si formano nella prima shell di coordinazione dell'idrogeno sono contatti diretti, ovvero non mediati dalle molecole d'acqua, contrariamente rispetto a quanto individuato in un lavoro di simulazione MD su campioni di glicina:acqua alla concentrazione 1:35 [146]. I nostri dati sono solo in parte in accordo con i risultati proposti nello stesso lavoro in quanto vi sono delle differenze sostanziali che riguardano sia la posizione che l'intensità dei picchi delle RDF glicina-glicina. In aggiunta, dai nostri dati, non è possibile dire con esattezza in che modo gli aggregati di glicina possano essere mediati dalle molecole d'acqua. Le SDF riportate in Figura 6.9 indicano che la distribuzione di probabilità delle molecole d'acqua nell'intorno del gruppo $-CO_2^-$ è piuttosto uniforme ad eccezione di alcune zone in cui si osservano delle aree vuote. Tali zone rappresentano le aree in cui gli atomi di idrogeno di un'altra

glicina si legano agli ossigeni del $-\text{CO}_2^-$ formando dei legami fortemente direzionali come è possibile osservare nella Figura 6.15 riportata in seguito. Le aree in giallo rappresentano nella figura la distribuzione degli idrogeni appartenenti al gruppo amminico, rispetto al gruppo carbossilico di una glicina prima vicina, calcolata nell'intervallo di $1.23 \text{ \AA} < r < 3.08 \text{ \AA}$, che definisce la prima shell di coordinazione tra il carbonio del gruppo carbossilico e l'idrogeno del gruppo amminico e valutata prendendo il minimo della RDF H-Co riportata in Figura 6.15 (b).

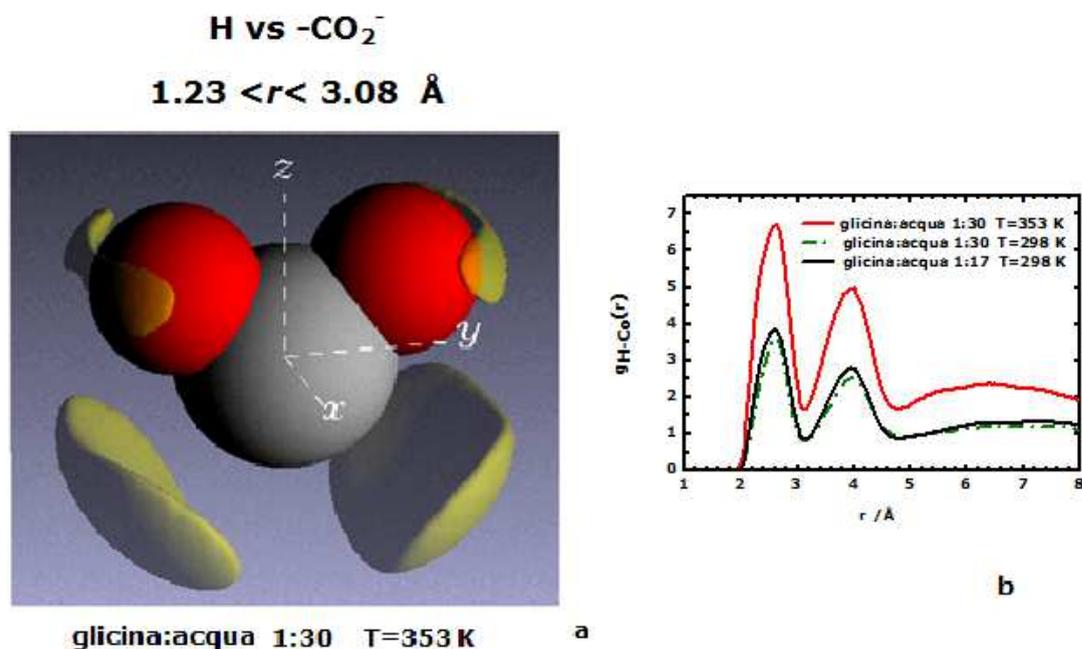


Figura 6.15 – In **a** funzione di distribuzione spaziale del 30% degli idrogeni del gruppo amminico intorno ai gruppi carbossilici della glicina, nell'intervallo $1.23 \text{ \AA} < r < 3.08 \text{ \AA}$ che corrisponde alla prima shell di coordinazione della RDF H-Co del campione glicina:acqua 1:30 misurato a $T=353 \text{ K}$ (**b**). Le aree in giallo rappresentano la distribuzione degli idrogeni del gruppo amminico rispetto al gruppo $-\text{CO}_2^-$ il cui carbonio (in grigio) è collocato nell'origine del sistema di riferimento mentre gli ossigeni (in rosso) sono collocati nel piano zy .

Altra informazione che può essere dedotta, riguarda la percentuale di aggregati che si formano nella prima shell di coordinazione dell'idrogeno. Dal calcolo dei numeri di coordinazione, era stato ottenuto che $N_{H-O_w} \sim 0.77$ ed $N_{H-O} \sim 0.30$ per il campione glicina:acqua alla concentrazione 1:30 ed a $T=298 \text{ K}$; di conseguenza $N_{H-O_w} + N_{H-O} \sim 1$. Questo indica che $\sim 30\%$ degli idrogeni appartenenti al gruppo amminico della glicina forma un legame idrogeno con un'altra glicina mentre $\sim 70\%$ forma dei legami idrogeno con l'acqua. I nostri risultati sono leggermente diversi da quelli discussi nel lavoro di Huang et al [134] su un campione di glicina in soluzione acquosa alla concentrazione di

3.33 mol/kg di H₂O ed a temperatura ambiente, in cui era stato individuato che circa il 20% di molecole di glicina in soluzione formavano aggregati (dimeri) mentre il resto erano monomeri. In alcuni lavori [142, 166, 167] è stato osservato che l'aumento della concentrazione comporta una diminuzione del numero dei legami idrogeno che gli ossigeni dei gruppi carbossilici formano con gli atomi di idrogeno dell'acqua nella prima shell di idratazione e, secondo alcuni autori, tale risultato è compatibile con la presenza di interazioni soluto-soluto. Tale osservazione è in accordo con i nostri dati: in corrispondenza della concentrazione glicina:acqua 1:17, il numero di coordinazione N_{H-O_w} risulta pari a 0.67 mentre $N_{H-O} \sim 0.38$. Questo permette di ipotizzare che l'aumento della concentrazione comporta una tendenza ad un aumento dei contatti glicina-glicina ed una tendenza ad una diminuzione nel numero di legami idrogeno con l'acqua. In questo caso è importante sottolineare che si può parlare di una tendenza alla variazione del numero di legami a idrogeno tra la glicina e l'acqua e di contatti diretti tra molecole diverse di glicina in quanto il numero di coordinazione presenta un'elevato errore. E' inoltre fondamentale chiarire che tale errore non e' semplicemente una deviazione statistica, che diminuisce all'aumentare del numero di misure (ovvero configurazioni raccolte). Al contrario, e' una variabilita' intrinseca al disordine del sistema in esame e che pertanto nemmeno se si acquisisse un numero infinito di configurazioni (o un campione di dimensioni infinite) non si ridurrebbe. Un simile risultato è stato osservato nei nostri dati, con l'aumento della temperatura. Nel campione glicina:acqua 1:30 il numero di legami idrogeno che l'ossigeno del gruppo carbossilico forma con l'acqua è pari a 2.18 quando la temperatura è T=298 K e 2.06 per una temperatura pari a T=353 K. Lo stesso avviene per quanto riguarda il legame idrogeno tra gli idrogeni dei gruppi del gruppo -NH₃⁺ e gli ossigeni dell'acqua; in tal caso il numero di legami idrogeno è pari a 0.77 per il campione glicina:acqua 1:30 studiato a T=300 K e pari a 0.71 per lo stesso campione studiato a T=353 K. In altre parole, esiste una competizione tra il legame idrogeno della glicina con l'acqua ed il legame idrogeno che si forma tra molecole di glicina e più nello specifico, tra l'idrogeno del gruppo -NH₃⁺ e l'ossigeno del gruppo CO₂⁻. Dal calcolo della distribuzione di probabilità della dimensione dei cluster in funzione della dimensione (Figura 6.14) è stato osservato un picco in corrispondenza di $n_{dim}=1$. Tale picco indica chiaramente che la specie predominante in soluzione è il monomero e tale risultato è in accordo con quanto riportato in letteratura [134, 147]. Dai nostri risultati non si ha alcuna traccia di dimerizzazione, contrariamente rispetto a quanto individuato, tramite misure di NMR [134] e studi di dinamica molecolare [147]. La formazione di aggregati perlopiù di piccole dimensioni è

stata osservata anche per dipeptidi formati da glicina ed alanina, o da glicina e prolina in soluzione acquosa [168]. In tal caso è stato osservato infatti che sia la posizione che l'intensità dei picchi nella RDF H-O corrispondono a quanto individuato per il campione di glicina in acqua. La probabilità di aggregazione ovvero la probabilità che si formino aggregati di glicina con almeno due glicine è stata calcolata per i tre campioni misurati ed è stato osservato che essa aumenta con l'aumento della temperatura e della concentrazione di glicina in acqua. Tale probabilità è risultata pari a 0.78 per il campione 1:30 a T=298 K, 0.89 per la stessa soluzione misurata a T=353 K e 0.92 per il campione 1:17 a T=298K. Tale risultato è in accordo con quanto ottenuto dal calcolo dei numeri di coordinazione N_{H-O} ; in tal caso era stato infatti osservato non solo un aumento del numero di coordinazione N_{H-O} , ma anche una diminuzione del numero di legami idrogeno tra l'idrogeno del gruppo amminico e l'ossigeno dell'acqua conseguente all'aumento della temperatura e concentrazione. Quindi si può concludere che l'effetto della temperatura e della concentrazione è quello di aumentare la probabilità di aggregazione; tuttavia non è possibile definire, a partire dai nostri dati, quale sia la specie dominante di aggregati in soluzione (dimeri, trimeri etc.), contrariamente rispetto a quanto riportato in letteratura [134].

6.5 Conclusioni

Nello studio riportato, è stata studiata la struttura a livello atomico di soluzioni acquose di glicina per tre differenti campioni ovvero soluzioni di glicina:acqua 1:30 a $T=298$ K, $T=353$ K e soluzioni di glicina:acqua 1:17 a $T=298$ K. L'impiego della diffrazione neutronica combinata con la sostituzione isotopica H/D e con le simulazioni EPSR hanno consentito di affrontare una serie di problematiche ovvero:

- Lo studio dell'idratazione a livello atomico della glicina, intorno ai diversi siti della biomolecola. Tale studio è stato realizzato al variare della temperatura e della concentrazione di glicina in acqua. Lo studio della struttura del campione di glicina:acqua alla concentrazione 1:30 ed a due temperature, al di sopra ed al di sotto della $T^*=333$ K, ovvero a $T=298$ K ed a $T=353$ K ha permesso di dedurre che l'aumento della temperatura non comporta variazioni significative delle shell di idratazione intorno alla glicina.
- Lo studio a livello atomico dell'aggregazione delle molecole di glicina al variare della temperatura e della concentrazione di glicina in acqua. Tale studio ha consentito di verificare che le molecole di glicina tendono a formare degli aggregati e che la probabilità di aggregazione aumenta con la temperatura e con la concentrazione.
- Uno studio della perturbazione apportata dalle molecole di glicina sulla struttura dell'acqua. Anche in questo caso lo studio è stato realizzato al variare della concentrazione di glicina in acqua e della temperatura della soluzione.

Per quanto riguarda il primo punto è stato dimostrato che l'aumento della temperatura e della concentrazione di glicina in acqua comporta una diminuzione nel numero di legami idrogeno che la glicina forma con l'acqua. Tale risultato è compatibile con il secondo punto ovvero con il fatto che la diminuzione dei legami idrogeno della glicina con l'acqua è una conseguenza dell'aumento nel numero di contatti tra le glicine nella prima shell di coordinazione. Il processo di aggregazione è stato osservato in tutti i campioni studiati ma aumenta con l'aumento della concentrazione di glicina in acqua e con la temperatura. Nel lavoro non è stata fornita una risposta alla problematica relativa alla dimensione degli aggregati ed alla disposizione geometrica delle glicine aggregate nello spazio. A tal proposito, un tentativo potrebbe essere quello di costruire una scatola di simulazione più

grande; ciò comporterebbe un aumento della statistica della funzione $P(\text{cluster})$ e dunque una riduzione del rumore che rende complicata l'identificazione delle specie secondarie. In aggiunta, etichette differenti sugli idrogeni del gruppo amminico, e sugli ossigeni del gruppo carbossilico consentirebbero di distinguere tutti gli atomi responsabili dell'interazione glicina-glicina fornendo un valido aiuto ai fini di comprendere la disposizione geometrica delle glicine interagenti.

Capitolo 7

Osservazioni

7.1 Osservazioni

L'impiego della tecnica di diffrazione neutronica combinata con la sostituzione isotopica e le simulazioni EPSR è stata un valido supporto per lo studio di differenti problematiche. Nel Capitolo 4 è stata studiata la struttura dell'acqua a $T=353$ K ovvero una temperatura per la quale si hanno pochi dati in letteratura ma che di fatto risulta interessante sia perchè al di sopra della temperatura del minimo di compressibilità isoterma, sia perchè in corrispondenza di tale temperatura, molte biomolecole (ad esempio la caffeina) diventano solubili o ancora la temperatura per la quale alcune proteine denaturano. Quindi lo studio della struttura dell'acqua ha un ruolo fondamentale nel momento in cui si va a studiare la struttura di soluzioni acquose di biomolecole in soluzione come nel caso di questa tesi, in cui lo studio della struttura dell'acqua è stata un valido supporto per lo studio della struttura di soluzioni acquose di glicina a livello atomico. In tal caso, l'impiego della tecnica ha consentito invece di rispondere ad alcune domande riguardanti l'aggregazione della glicina in soluzioni acquose, in differenti condizioni sperimentali. Nel quinto capitolo è stato dimostrato in che modo uno studio dell'idratazione a livello atomico di soluzioni di acqua e glucosio potesse essere un valido supporto per la comprensione di alcuni meccanismi alla base della percezione del gusto dolce o comunque un mezzo attraverso cui poter dare una spiegazione alle differenti funzioni svolte dai carboidrati. A partire da tali lavori è possibile inoltre giungere ad alcune conclusioni generali:

- L'effetto perturbativo apportato da soluti carichi alla struttura dell'acqua è maggiore rispetto all'effetto perturbativo apportato su di essa, da soluti neutri. Nello specifico, in questo lavoro è stato studiato l'effetto perturbativo della glicina e del glucosio alla struttura dell'acqua.
- L'effetto perturbativo apportato dai soluti alla struttura dell'acqua dipende dal volume e dalla concentrazione dei soluti stessi.
- L'idratazione di siti con identica struttura chimica presenti in differenti biomolecole varia a seconda della biomolecola a cui appartengono i siti stessi. Tale aspetto è stato osservato nel caso dell'idratazione dei gruppi idrossilici o idrossimetilici collocati nel glucosio e nel trealosio. In tal caso, il differente pattern d'idratazione è stato correlato alla funzione specifica assolta dai carboidrati. Lo stesso confronto può essere effettuato considerando considerando le SDF delle molecole d'acqua intorno ai gruppi $-\text{CO}_2^-$ appartenenti all'acido glutammico ed alla glicina nel glutatione, tripeptide formato da acido glutammico, glicina e cisteina [169] con quelle ottenute per la sola glicina e riportate nel Capitolo 6 di questa tesi Figura 7.1. Dal confronto si osserva chiaramente che l'idratazione differisce per i tre gruppi $-\text{CO}_2^-$ chimicamente equivalenti. Nel pannello B della Figura 7.1, viene mostrata la distribuzione delle molecole d'acqua intorno ai gruppi $-\text{CO}_2^-$ della glicina componente del glutatione, mentre nel pannello C, viene mostrata l'idratazione intorno allo stesso sito $-\text{CO}_2^-$, collocato sulla sola glicina. Si osserva che le SDF nei due casi differiscono significativamente.
- Esiste una relazione tra l'idratazione delle biomolecole e l'attività svolta dalle biomolecole stesse. Lo studio dell'idratazione dei carboidrati ha dimostrato ad esempio che differenti profili di idratazione dei carboidrati possono spiegare le loro differenti funzionalità. Nel caso della glicina, è stato osservato che gruppi funzionali che presentano la stessa chimica presentano differente idratazione a seconda della loro collocazione. Tale fenomeno potrebbe spiegare alcuni aspetti come ad esempio il differente meccanismo di riconoscimento dell'acqua da parte dei siti attivi e dunque la differente permeabilità dei gruppi funzionali nelle proteine.
- Gli amminoacidi non sono un buon modello per descrivere le proteine in quanto, come visto per la glicina, la specie predominante in soluzione è il monomero

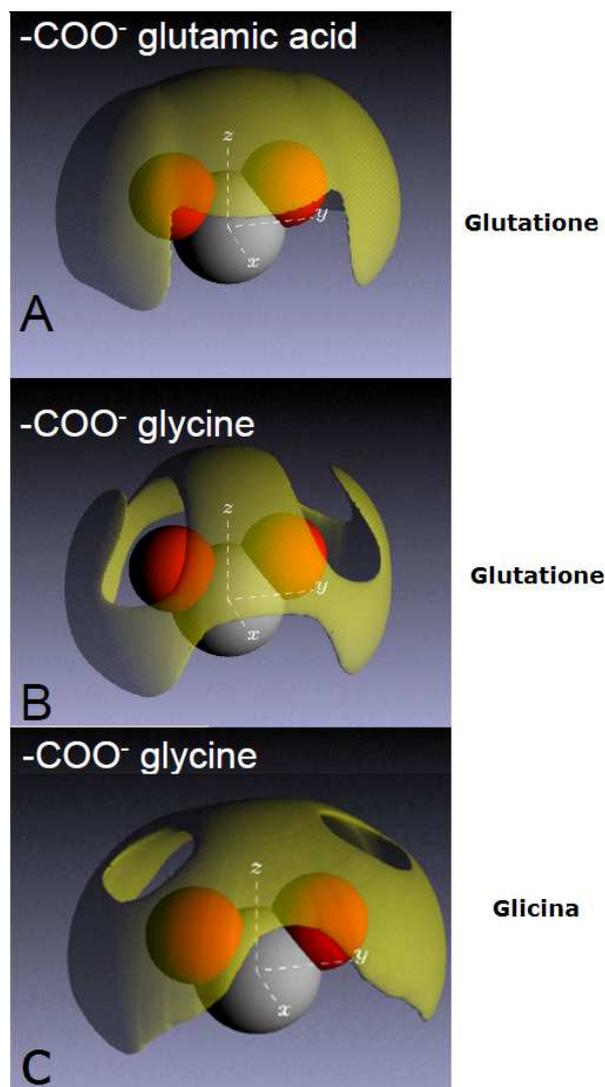


Figura 7.1 – Distribuzione del 65 % delle molecole d’acqua (aree in giallo) intorno ai siti $-\text{CO}_2^-$ dell’acido glutammico (A) e della glicina (B) appartenenti al peptide glutatione [169] e dell’amminoacido glicina (C). Il confronto è stato effettuato prendendo per tutti i casi la prima shell di coordinazione nell’intervallo 2-4.47 Å (A), 2-4.26 (B,C) Å che corrisponde al minimo della RDF C-Ow.

mentre è ben noto che, perchè si possa parlare di proteina, occorrono almeno 50 amminoacidi legati attraverso un legame peptidico.

Quindi si può concludere che lo studio di soluzioni acquose delle biomolecole, tramite la combinazione della tecnica della diffrazione neutronica con sostituzione H/D e le simulazioni EPSR, ha consentito una descrizione a livello atomico, sia dell’idratazione delle biomolecole in soluzione che le loro proprietà di aggregazione. La stessa descrizione in questo lavoro, ha consentito di spiegare il ruolo dell’idratazione nelle funzioni specifiche

svolte dai carboidrati, ha permesso di studiare l'effetto della temperatura sulle shell d'idratazione della glicina e il ruolo dell'acqua nella formazione degli aggregati di molecole di glicina. Per quanto riguarda l'ultimo punto, restano aperti ancora dei problemi: sarebbe, ad esempio, interessante capire la disposizione geometrica delle molecole di glicina quando si formano gli aggregati. Come anticipato nel Capitolo 6, la conoscenza della forma specifica di aggregazione in soluzione, potrebbe spiegare la stabilità di una determinata forma cristallina rispetto ad un'altra e con differenti caratteristiche chimico-fisiche come ad esempio la solubilità. La possibilità di controllare la cristallizzazione della glicina può avere importanza nel campo dell'industria farmaceutica e dunque nella realizzazione di farmaci. Ulteriore problematica non di poco rilievo riguarda la struttura dell'acqua. Il nostro studio sulla struttura dell'acqua (Capitolo 4) ha dimostrato una differenza tra $T=353$ K e $T=300$ K per la presenza di una doppia struttura nel secondo picco della RDF Ow-Ow. La stessa struttura non è stata però osservata attraverso altre tecniche di diffrazione X e non vi sono tracce significative in altre misure di NDIS per $T < 353$ K. I risultati contrastanti riportati in letteratura richiedono dunque un'ulteriore verifica sperimentale.

Bibliografia

- [1] M. C. Wilding and C. J. Benmore. *Rev. Mineral Geochem.*, 63:275–311, 2006.
- [2] D. C. Cole, K. W. Herwig, E. Mamontov, and J. Z. Laresé. *Rev. Mineral Geochem.*, 63:313–362, 2006.
- [3] P. E. Mason, G. W. Neilson, J. E. Enderby, M.-L. Saboungi, and J. W. Brady. *J. Chem. Phys. B*, 109:13104–13111, 2005.
- [4] P.E. Mason, G.W. Neilson, M.-L. Saboungi D. Price, and J.W. Brady. *Food Biophys.*, 6:210–216, 2011.
- [5] P. E. Mason, G. W. Neilson, A. C. Barnes, J. E. Enderby, J. W. Brady, and M.-L. Saboungi. *J. Chem. Phys.*, 119:3347, 2003.
- [6] P. E. Mason, G. W. Neilson, E. Enderby, M. L. Saboungi, and J. W. Brady. *J. Phys. Chem. B*, 110:2981–2983, 2006.
- [7] P. E. Mason, C. E. Dempsey, G.W. Neilson, S.R. Kline, and J.W. Brady. *J. Am. Chem. Soc.*, 131:16689–16696, 2009.
- [8] Y. Dual and P. A. Kollman. *Science*, 282:740–744, 1998.
- [9] D. J. Tobias, J. E. Mertz, and C. L. Brooks. *Biochemistry*, 30:6054–6058, 1991.
- [10] G. Hummer, S. Garde, A. E. Garcia, and M. E. Paulaitis. *Pratt LR. Proc Natl Acad Sci USA*, 95:1552–1555, 1998.
- [11] J. P. Hansen and J. R. McDonald. *Theory of simple liquids*. Academic; London, 1976.
- [12] M. P. Allen and D. J. Tildesley. *Computer simulation of liquids*. Clarendon; Oxford, 1987.

-
- [13] R. K. Schmidt, M. Karplus, and J. W. Brady. *J Am Chem Soc.*, 118:541–546, 1996.
- [14] H. Resat and M. Mezei. *Biophys J.*, 71:1179–1190, 1996.
- [15] P. J. Rossky and M. Karplus. *J. Am. Chem. Soc.*, 101:1913–1937, 1979.
- [16] I. M. Svishchev and P.G. Kusalik. *J. Am. Chem. Soc.*, 115:8270–8274, 1993.
- [17] P.G. Kusalik and I. M. Svishchev. *Science*, 265:1219–1221, 1994.
- [18] A. K. Soper. *Molecular Simulation*, 38:1171–1185, 2012.
- [19] A. K. Soper. Empirical Potential Structure Refinement - EPSRshell: a user's guide. RAL Technical Report, RAL-TR-2011-012, 2011.
- [20] J. Fitter, T. Gutberlet, and J. Katsaras. *Neutron Scattering in Biology*. Springer, 2006.
- [21] C. J. Benmore and A. K. Soper. *The SANDALS Manual : a Guide to Performing Experiments on the Small Angle Neutron Diffractometer for Amorphous and Liquid Samples at ISIS. Version 1.0*, RAL Technical Reports RAL-TR-1998-006, 1998.
- [22] A. K. Soper, W. S. Howells, A. C. Hannon, J. Z. Turner, and D. T. Bowron. *ATLAS 2.0 Analysis of Time-of-flight diffractometer data from liquid and Amorphous Samples*, 2000.
- [23] G.L. Squires. *Introduction to the theory of thermal Neutron Scattering*, Cambridge: University Press:88, 1978.
- [24] S.W. Lovesey. *Theory of Neutron Scattering from Condensed Matter*, Oxford, 1986.
- [25] E. Nowak. *Z. Phys.*, B45:265, 1982.
- [26] L. Van Hove. *Phys. Rev.*, 95:249, 1954.
- [27] P. A. Egelstaff. *An introduction to the liquid state*. Oxford:Science Publications, 1994.
- [28] A. K. Soper and M. G. Phillips. *Chem. Phys.*, 107:47, 1986.
- [29] C. Windsor. *Pulsed Neutron Scattering*, Tylor and Francis LTD, 1981.
- [30] URL <http://www.isis.stfc.ac.uk/about/characteristics-of-a-pulsed-source3864.html>.
-

-
- [31] P. A. Egelstaff. *Neutron Scattering*, Ed. D.L. Price and Sköld, (Academic Press, New York, N.Y., 1988), Chapt.14, 1987.
- [32] G. Placzek. *Phys. Rev.*, 86:377, 1952.
- [33] A. K. Soper. *GudrunN and GudrunX—programs for correcting raw neutron and x-ray diffraction data to differential scattering cross section. RAL Technical Report, (July), RAL-TR-2011-013*. URL <https://epubs.stfc.ac.uk/>.
- [34] V. F. Sears. *Adv. Phys.*, 24:1, 1975.
- [35] H. H. Paalman and C. J. Pings. *J. Appl. Phys.*, 33:2635, 1962.
- [36] P. Postorino, M. Nardone, M. A. Ricci, and M. Rovere. *J. Mol. Phys.*, 64:221–240, 1995.
- [37] A. K. Soper. *Molecular Physics*, 107:1667–1684, 2009.
- [38] R. L. McGreevy and L. Pusztai. *Mol. Sim.*, 1:359, 1993.
- [39] H. A. Lorentz. *Annalen der Physik*, 248:127–136, 1881.
- [40] D. Berthelot. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences*, 126:1703–1855, 1898.
- [41] A. K. Soper. *Chem. Phys.*, 99:1503, 2001.
- [42] L. Stryer. *Biochemistry*. Freeman, 1988.
- [43] W. Damm, A. Frontera, J. Tirado Rives, and W.L. Jorgensen. *J. Comp. Chem.*, 18:1955–70, 1997.
- [44] L. C. Pardo. URL <https://gcm.upc.edu/en/members/luis-carlos/angula/ANGULA>.
- [45] S. Busch, C. D. Lorenz, J. Taylor, L. C. Pardo, and S. E. McLain. *J. Phys. Chem. B*, 118:14267–14277, 2014.
- [46] R.J. Speedy. *J. Phys. Chem.*, 86:982, 1982.
- [47] P. H. Poole, F. Sciortino, U. Essmann, and H. E. Stanley. *Nature*, 360:324–28, 1992.

-
- [48] S. Sastry, P. Debenedetti, F. Sciortino, and H. E. Stanley. *Phys. Rev. E*, 53:6144, 1996.
- [49] S.-H. Chen, L. Liu, E. Fratini, P. Baglioni, A. Faraone, and E. Mamontov. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 103:9012, 2006.
- [50] P. Kumar, G. Franzese, S. V. Buldyrev, and H. E. Stanley. Aspects of physical biology: Biological water, protein solutions, transport and replication. *Lect. Notes Phys.*, 752, 2008.
- [51] Y. Zhang, M. Lagi, Dazhi Liu, F. Mallamace, E. Fratini, P. Baglioni, E. Mamontov, M. Hagen, and S.-H. Chen. *J. Chem. Phys.*, 130:135101, 2009.
- [52] F. Mallamace, C. Corsaro, D. Mallamace, S. Vasi, C. Vasi, and G. Dugo. *Comput Struct Biotechnol J.*, 13:33–37, 2015.
- [53] R. B. Gregory. “protein solvent interaction”. *Marcel Dekker, New York*, 1995.
- [54] G. S. Kell. *J. Chem. Eng. Data*, 20:97–105, 1975.
- [55] L. B. Skinner, C. J. Benmore, J. C. Neufeind, and J. B. Parise. *J. Chem. Phys.*, 141:214507, 2014.
- [56] J. D. Bernal and R. H. Fowler. *J. Chem. Phys.*, 1:515, 1933.
- [57] H. E. Stanley, S. V. Buldyrev, M. Canpolat, M. Meyer, O. Mishima, M.R. Sadr-Lahijany, A. Scala, and F. W. Starr. *Physica A*, 257:213–32, 1998.
- [58] T. Head-Gordon and G. Hura. *Chem. Rev.*, 102:2651–69, 2002.
- [59] P.G. Debenedetti. *J. Phys.: Condens. Matter*, 15:R1669–R1726, 2003.
- [60] J. D. Smith, C. D. Cappa, K. R. Wilson, B. M. Messer, R. C. Cohen, and R.J. Saykally. *Science*, 306:851–53, 2004.
- [61] A.K. Soper. *J. Phys. Chem. B.*, 115:14014–022, 2011.
- [62] A. Nilsson and L. G. M. Pettersson. *Chem. Phys.*, 389:1–34, 2011.
- [63] T. A. Kesselring, G. Franzese, S. V. Buldyrev, H. J. Herrmann, and H. E. Stanley. *Sci. Rep.*, 2:474, 2012.

- [64] J. Neufeind, C. J. Benmore, J. K. R. Weber, and D. Paschek. *Mol. Phys.*, 109: 279–88, 2011.
- [65] C. J. Benmore, R. T. Hart, Q. Mei, D. L. Price, J. Yarger, C. A. Tulk, and D.D. Klug. *Phys. Rev. B*, 72:132201, 2005.
- [66] L. B. Skinner, C. Huang, D. Schlesinger, L. G. M. Pettersson, A. Nilsson, , and C.J. Benmore. *J. Chem. Phys.*, 138:074506, 2013.
- [67] A. K. Soper. *Proceedings International School of Physics "Enrico Fermi"*, Course 187:151–71, 2013.
- [68] A. H. Narten and H. A. Levy. *J.Chem.Phys.*, 55:2263, 1971.
- [69] A. K. Soper. *Chem.Phys.*, 258:121, 2000.
- [70] A. K. Soper and M. A. Ricci. *Phys. Rev. Lett.*, 84:2881, 2000.
- [71] A. K. Soper. *ISRN Physical Chemistry*, Article ID 279463:67 pages, 2013. URL <http://dx.doi.org/10.1155/2013/279463>.
- [72] Y. A. O. Zhengli. "*Method for making coffee beverage.*". U.S. Patent No. 8,703,222, 2014.
- [73] Robert G. Mortimer. *Physical Chemistry*. Elsevier, 2008.
- [74] A. Nilsson, C. Huang, and L. G. M. Pettersson. *J. Mol. Liq.*, 176:2–16, 2012.
- [75] H. Kanno and C. A. Angell. *J. Chem. Phys.*, 70:4008–16, 1979.
- [76] A. Botti, F. Bruni, S. Imberti, M. A. Ricci, and A. K. Soper. *J.Chem. Phys.*, 120: 10154–62, 2004.
- [77] H. J. C. Berendsen, J. R. Grigera, and T. P. Straatsma. *Journal of Physical Chemistry*, 91:6269–6271, 1987.
- [78] L. Fu, A. Bienenstock, and S. Brennan. *J. Chem. Phys*, 131:234702, 2009.
- [79] B. Tomberli, C. J. Benmore, P. A. Egelsta, J. Neufeind, and V. Honkimaki. *J. Phys.: Condens. Matter*, 12:2597, 2000.
- [80] Y. S. Badyal, D. L. Price, M.-L. Saboungi, D. R. Haefner, and S. D. Shastri. *J. Chem. Phys.*, 116:10833, 2002.

- [81] D. H Brooks and T. Head-Gordon. *J. Phys. Chem. Lett.*, 6:2938–2943, 2015.
- [82] K. Shiraga, T. Suzuki, N. Kondo, J. De Baerdemaeker, and Y. Ogawa. *Carbohydrate Research*, 406:46–54, 2015.
- [83] C. Branca, S. Magazù, G. Maisano, P. Migliardo, and E. Tettamanti. *J. Mol. Struct.*, 133:480–81, 1999.
- [84] C. Branca, S. Magazù, G. Maisano, and P. Migliardo. *J. Chem. Phys.*, 111:281, 1999.
- [85] C. Branca, S. Magazù, G. Maisano, F. Migliardo, P. Migliardo, and G. Romeo. *J. Phys. Chem. B*, 105:10140–45, 2001.
- [86] C. Branca, S. Magazù, F. Migliardo, and P. Migliardo. *Physica A*, 304:314–8, 2002.
- [87] M. Paolantoni, P. Sassi, A. Morresi, and S. Santini. *J. Chem. Phys.*, 127:1–9, 2007.
- [88] L. Lupi, L. Comez, M. Paolantoni, S. Perticaroli, P. Sassi, A. Morresi, B. M. Ladanyi, and D. Fioretto. *J. Phys. Chem. B*, 116:14760–67, 2012.
- [89] Sau Lawrence Lee, P. G. Debenedetti, and J. R. Errington. *J. Chem. Phys.*, 122:204511, 2005.
- [90] J.W. Brady. *J. Am. Chem. Soc.*, 111:5155–65, 1989.
- [91] P. Bordat, A. Lerbret, J. P. Demaret, F. Affouard, and M. Descamps. *Europhys. Lett.*, 65:41–7, 2004.
- [92] C. J. Roberts and P. G. Debenedetti. *J. Phys. Chem. B*, 103:7308–18, 1999.
- [93] M. H. H. H. Pomata, M.T. Sonoda, M.S. Skaf, and M.D. Elola. *J. Phys. Chem. B*, 113:12999–3006, 2009.
- [94] A. Lerbret, P. Bordat, F. Affouard, M. Descamps, and F. Migliardo. *J. Phys. Chem. B*, 109:11046–57, 2005.
- [95] K. Fuchs and U. Kaatzke. *J. Chem. Phys.*, 116:7137–44, 2002.
- [96] L. R. Winther, J. Qvist, and B. Halle. *J. Phys. Chem. B*, 116:9196–207, 2012.
- [97] R. S. Shallenberger. *J. Food Sci.*, 28:584–9, 1963.
- [98] R. S. Shallenberger and T. E. Acree. *Nature*, 216:480–2, 1967.

- [99] L. B. Kier. *J. Pharm. Sci.*, 61:1394–7, 1972.
- [100] A. van der Heijden, H. van der Wel, and H.G. Peer. *Chem. Senses.*, 10:57–72, 1985.
- [101] J.-M. Tinti C. Nofre. *Food Chem.*, 56:263–274, 1996.
- [102] G. G. Birch, R. Karim, A. L. Chavez, and G. Morini. *Elsevier A S (London)*, pages 127–140, 1993.
- [103] G. G. Birch, S. Parke, R. Siertsema, and J. Westwell. *Fd. Chem.*, 56:223–30, 1996.
- [104] T. Astley, G.G. Birch, M. G. B. Drew, P. M. Rodger, and G. R. H. Wilden. *Fd. Chem.*, 56:231–40, 1996.
- [105] S. E. Pagnotta, S. E. McLain, A. K. Soper, F. Bruni, and M.A. Ricci. *J. Phys. Chem. B.*, 114:4904–908, 2010.
- [106] W.B.l O’ Dell, D. C. Baker, and S. E. McLain. Structural evidence for inter-residue hydrogen bonding observed for cellobiose in aqueous solution. *PLOS ONE*, 7:e45311, 2012.
- [107] R. P. Adams, E. Kendall, and K. K. Kartha. *Bio-chem. Syst. Ecol.*, 18:107–110, 1990.
- [108] J. H. Crowe, L. M. Crowe, and S. A. Jackson. *Arch. Biochem. Biophys.*, 220: 477–484, 1983.
- [109] T. Itoh and S. Kimura. *J. Plant Res.*, 114:483, 2001.
- [110] R. M. Jr. Brown. *Macromol. Sci. Pure Appl. Chem.*, A33:1345, 1996.
- [111] R. S. Shallenberger, T. E. Acree, and C. K. Lee. Sweet taste of d- and l-sugars and amino acids and the steric nature of their chemo-receptor site. *Nature*, 221:555–6, 1969.
- [112] G. Nelson, M. A. Hoon, J. Chandrashekar, Y. Zhang, N. J. P. Ryba, and C. S. Zuker. *Cell*, 106:381–90, 2001.
- [113] X. Li, L. Staszewski, H. Xu, K. Durick, M. Zoller, and E. Adler. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99:4692–96, 2002.
- [114] G. E. DuBois. *PNAS*, 101:13972–73, 2004.

-
- [115] M. S. Herness and T. A. Gilbertson. *A. Rev of Physiology*, 61:873–900, 1999.
- [116] S. Immel. Sucrose, sucralose and fructose: Correlation between hydrophobicity potential profiles and ah-b-x assignments. *Ph.D. Thesis*, Capitolo 2:17–44, 1995.
- [117] R. Mancinelli, A. Botti, F. Bruni, M. A. Ricci, and A.K. Soper. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 9:2959–67, 2007.
- [118] L. C. Pardo, A. Henao, and A. Vispa. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 407: 220–227, 2015.
- [119] C. H. Robinson. *New Phytol.*, 151:341–353, 2001.
- [120] J. L. Green and C. A. Angell. *J. Phys. Chem.*, 93:2880, 1989.
- [121] J. H. Crowe, J. F. Carpenter, and L. M. Crowe. *A. Rev. Physiol.*, 60:73–103, 1998.
- [122] N. K. Jain and I. Roy. *Protein Sci.*, 18:24–36, 2009.
- [123] URL <http://www.matsutani.co.jp/english/products/cellobi.html>.
- [124] P. Ball. *Chem. Phys. Chem.*, 9:2677, 2008.
- [125] J. A. Rupley and G. Careri. *Adv. Protein Chem.*, 41:37, 1991.
- [126] S. Busch, C. D. Bruce, C. Redfield, C.D. Lorenz, and S.E. McLain. *Angew. Chem., Int.Ed.*, 52:13091–13095, 2013.
- [127] F. D’Amico, F. Bencivenga, G. Camisasca, A. Gessini, E. Principi, R. Cucini, and C. Masciovecchio. *J. Chem. Phys.*, 139:015101, 2013.
- [128] A. Pullmann and B. Pullmann. *Q. Rev. Biophys.*, 7:4, 1975.
- [129] L. Carozzo, G. Corongiu, C. Petrongolo, and E. Clementi. *J. Chem. Phys.*, 68:787, 1978.
- [130] F. H. Stillinger and C. W. David. *J. Chem. Phys.*, 69:1473, 1978.
- [131] S. Romano and E. Clementi. *Int. J. Quantum Chem.*, 14:839, 1978.
- [132] W. Forner, P. Otto, J. Bernhart, and J. Ladik. *Theor. Chim. Acta*, 60:269, 1981.
- [133] M. Mezei, P. K. Mehrotra, and D. L. Beveridge. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 2:1, 1984.

- [134] J. Huang, C. T. Stringfellow, and L. Yu. *J. AM. CHEM. SOC.*, 130:13973–80, 2008.
- [135] M. J. Calhorda. *Chem. Commun.*, pages 801–809, 2000.
- [136] G. Albrecht and R.B. Corey. *J. Am. Chem. Soc.*, 61:1087, 1939.
- [137] P. G. Jonsson and A. Kvik. *Acta Crystallogr. B*, 28:1827, 1972.
- [138] J.-J. Max and C. J. Chapados. *Phys. Chem. A*, 108:3324–3337, 2004.
- [139] F. Tortonda, J. Pascual-Ahuir, E. Silla, and I. Tunon. *Chem. Phys. Lett.*, 260: 21–26, 1996.
- [140] F. Tortonda, J. Pascual-Ahuir, E. Silla, and I. Tunon. *J. Chem. Phys.*, 109:592, 1998.
- [141] G. A. Anslow, M. L. Foster, and C. Klingler. *J. Biol. Chem.*, 103:81–92, 1933.
- [142] T. Sato, R. Buchner, S. Fernandez, A. Chiba, and W. Kunz. *J. Mol. Liq.*, 117: 93–98, 2005.
- [143] Y. Kameda, H. Ebata, T. Usuki, O. Uemura, and M. Misawa. *Bull. Chem.Soc. Jpn.*, 67:3159, 1994.
- [144] S. Motoya, Y. Kameda, M. Yaegashi, and T. Usuki. *Bull. Chem.Soc. Jpn.*, 76: 2293, 2003.
- [145] K. Leung and S. B. Rempe. *J. Chem. Phys.*, 122:1845060, 2005.
- [146] M. Campo. *J. Chem. Phys.*, 125:114511, 2006.
- [147] S. Hamad, C. E. Hughes, C. R. A. Catlow, and K. D. M. Harris. *J. Chem. Phys. B*, 112:7280–88, 2008.
- [148] D. Erdemir, Soma Chattopadhyay, L. Guo, J. Ilavsky, H. Amenitsch, C. U. Segre, and A. S. Myerson. *PRL*, 99:115702, 2007.
- [149] G. L. Perlovich, L. K. Hansen, and A. Bauer-Brandl. *J. Therm. Anal. Cal.*, 66: 699–715, 2001.
- [150] Y. Iitaka. *Proc. Jap. Acad.*, 30:109, 1954.
- [151] Y. Iitaka. *Acta Cryst.*, 11:225, 1958.

- [152] Y. Iitaka. *Acta Cryst.*, 14:1, 1961.
- [153] M. J. Akers, N. Milton, S. R. Byrn, and S. L. Nail. *Pharm. Res.*, 10:1457–61, 1995.
- [154] Dang Le Tri Nguyen and K.-J. Kim. *BIWIC 2014: 21 International Workshop on Industrial Crystallization*, page 279, 2014.
- [155] D. Gidalevitz, R. Feidenhans' l, and L. Leiserowitz. *Angew. Chem.*, 36:959, 1997.
- [156] D. Gidalevitz, R. Feidenhans' l, S. Matlis, D. F. Similgies, M. J. Christensen, and L. Leiserowitz. *Angew. Chem.*, 36:955, 1997.
- [157] A. S. Myerson and P. Y. Lo. *J. Cryst. Growth*, 26:110, 1991.
- [158] J. Tirado-Rives W. L. Jorgensen. *J. Am. Chem. Soc.*, 110:1657–1666, 1988.
- [159] G. Alagona, C. Ghio, and P. A. Kollman. *J. Mol. Struct.: THEOCHEM*, 166:385, 1988.
- [160] G. Alagona and C. Ghio. *J. Mol. Liq.*, 47:139, 1990.
- [161] T. Watanabe, K. Hashimoto, and H. Takase. *J. Mol. Struct.*, 397:113, 1997.
- [162] G. S. Del Buono, P. Rossky, and J. J. Schitker. *Chem. Phys.*, 95:3728, 1991.
- [163] C. Masciovecchio, S. C. Santucci, A. Gessini, S. Di Fonzo, G. Ruocco, and F. Sette. *Phys. Rev. Lett.*, 92:255507, 2004.
- [164] W. G. Johnson and D. J. Oxtoby. *Chem. Phys.*, 87:781–790, 1987.
- [165] G. Robertson and J. Yarwood. *Chem. Phys.*, 32:267–282, 1978.
- [166] R. Buchner, G. T. Hefter, and P. M. May. *J. Phys. Chem. A*, 103:1, 1999.
- [167] R. Buchner, S. G. Capewell, G. T. Hefter, and P. M. May. *J. Phys. Chem. B*, 103:1185, 1999.
- [168] S. E. McLain, A. K. Soper, I. Daidone, J. C. Smith, and A. Watts. *Angew. Chem.*, 47:9059–62, 2008.
- [169] E. Scoppola, A. Sodo, S. E. McLain, M. A. Ricci, and F. Bruni. *Biophys. J.*, 106(8):1701–1709, 2014.