



SAPIENZA  
UNIVERSITÀ DI ROMA

# Spatially offset Raman spectroscopy, principi e applicazioni

Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali  
Corso di Laurea in Fisica

Candidato

Fabrizio Fatelli

Matricola 1798810

Relatore

Prof. Giovanni Batignani

Anno Accademico 2020/2021

Tesi discussa il 22 marzo 2021

di fronte a una commissione esaminatrice composta da:

Prof. Vincenzo Marinari (presidente)

Prof. Enzo Pascale

Prof. Mauro Vignati

Prof. Mauro Raggi

Prof. Ugo Giuseppe Aglietti

Prof. Lorenzo Rovigatti

Prof.ssa Roberta Angelini

---

**Spatially offset Raman spectroscopy, principi e applicazioni**

Tesi di Laurea. Sapienza – Università di Roma

© 2021 Fabrizio Fatelli. Tutti i diritti riservati

Questa tesi è stata composta con  $\text{\LaTeX}$  e la classe Saphthesis.

Versione: 14 marzo 2021

Email dell'autore: [fabrizio.fatelli98@gmail.com](mailto:fabrizio.fatelli98@gmail.com)

## Ringraziamenti

*Il completamento di questa dissertazione, ma soprattutto l'impegnativo percorso di studi che l'hanno preceduta, non sarebbe stato possibile senza l'affetto, la stima e il supporto delle persone che mi circondano.*

*Innanzitutto voglio ringraziare il mio relatore, il prof. Giovanni Batignani, per avermi offerto la sua più completa disponibilità, trasmettendomi sicurezza in ogni ripensamento e in ogni caduta.*

*Non posso poi non menzionare la mia piccola ma grande famiglia: un sentito grazie a nonna Giulia, il cui sorriso e le cui dolci parole mi hanno spesso aiutato ad illuminare giornate grigie e ad irrobustire il mio animo, a zio Gianni che mi ha insegnato a vivere con più spensieratezza e intraprendenza, a mia sorella che rappresenta sempre per me il miglior modello di persona a cui io possa cercare di rassomigliare, e ai miei genitori che con il loro amore mi hanno sempre permesso di coltivare e custodire i miei sogni, donandomi i mezzi e i valori per sostenerli, grazie ai quali io riesco anche ad amare e ringraziare me stesso.*

*Infine un grande ringraziamento di cuore a tutte le amiche e a tutti gli amici che mi sono stati vicini in questi anni, ma soprattutto nell'ultimo. Sono orgoglioso di avere accanto delle persone così speciali, che riescono a tirare fuori il meglio di me e con le quali riesco ad arricchirmi ad ogni confronto: in un momento storico così difficile siete stati la benzina per il mio affaticato motore.*



## Sommario

Lo scattering anelastico dei fotoni che attraversano un campione generato per effetto Raman è un processo che consente di studiare le proprietà chimico-fisiche dei materiali in modo estremamente accurato, sfruttando le interazioni radiazione-materia per ricostruire i modi normali del sistema in esame, estraendo da essi informazioni dettagliate sulla composizione chimica e sulla struttura molecolare. Dimostrato sperimentalmente nel 1928 da Chandrasekhara Venkata Raman, Nel corso degli ultimi decenni sono stati sviluppati numerosi protocolli sperimentali in grado di sfruttare lo scattering Raman come strumento di analisi e caratterizzazione dei materiali, con un uso trasversale dalla chimica alla fisica dello stato solido. Questo lavoro di tesi è incentrato sulla presentazione della tecnica Spatially offset Raman spectroscopy (SORS), un potente strumento spettroscopico di recente introduzione in grado di sfruttare l'effetto Raman per ricostruire la composizione chimica di campioni opachi e stratificati. Il concetto che sta alla base del SORS è introdotto nel primo capitolo e consiste proprio nell'impiego dello scattering Raman. Come termine di paragone, viene introdotto il concetto di microscopio confocale Raman, un dispositivo ottico in grado di sfruttare l'effetto Raman per ricostruire la risposta del campione all'interazione con la radiazione. Nel secondo capitolo vengono quindi discussi i vantaggi e gli svantaggi della tecnica SORS che introduce un offset spaziale tra il punto di illuminazione e quello di ricezione dei fotoni. Dopo aver analizzato le peculiarità della tecnica, discutendo i risultati presentati in un esperimento realizzato dall'inventore della tecnica Pavel Matousek insieme ai suoi collaboratori, nel terzo capitolo viene presentata una simulazione da me implementata numericamente in grado di modellizzare misure SORS. Nel corso di tutto il lavoro vengono inoltre presentati i principali campi di applicazione della tecnica, in relazione alle sue caratteristiche specifiche, che nonostante la sua recente introduzione si estendono dalla biomedicina ai beni culturali, passando per lo sviluppo di nuovi sistemi di sicurezza per l'analisi dei materiali.



# Indice

<b>1</b>	<b>La spettroscopia Raman</b>	<b>1</b>
1.1	Principi fisici . . . . .	1
1.2	Caratteristiche sperimentali . . . . .	4
1.3	Microscopia Raman confocale . . . . .	5
<b>2</b>	<b>La tecnica SORS</b>	<b>7</b>
2.1	Principio di funzionamento . . . . .	7
2.2	Layout sperimentale . . . . .	9
2.3	Micro-SORS nei beni culturali . . . . .	12
<b>3</b>	<b>Modellizzazione numerica del segnale SORS</b>	<b>15</b>
3.1	Il modello . . . . .	15
3.2	SORS ratio . . . . .	17
3.3	Dipendenza del segnale dai parametri fisici . . . . .	18
<b>4</b>	<b>Conclusioni</b>	<b>21</b>
	<b>Appendice</b>	<b>23</b>



## Capitolo 1

# La spettroscopia Raman

### 1.1 Principi fisici

La spettroscopia Raman è una potente tecnica di caratterizzazione dei materiali, basata sull'omonimo fenomeno di scattering osservato per la prima volta dal fisico indiano Chandrasekhara Venkata Raman nel 1928[1]. Quando un campione viene illuminato da una sorgente monocromatica di radiazione elettromagnetica (Raman focalizzò e filtrò la luce solare, mentre oggi viene tipicamente impiegata radiazione laser), i fotoni che attraversano ed interagiscono con la materia possono andare incontro a tre destini: essere assorbiti, essere diffusi conservando la propria energia (scattering elastico o Rayleigh) o infine essere diffusi acquisendo o cedendo energia (scattering anelastico o Raman). Processi di diffusione anaelastica di luce, il cui impulso alla scoperta è stata la ricerca di un'estensione generale dei risultati ottenuti da Compton nello studio dell'interazione dei raggi X con la materia, sono descrivibili anche classicamente in termini di dipolo indotto dalla radiazione nelle molecole e della polarizzabilità di queste ultime.

Considerando una radiazione perfettamente monocromatica con pulsazione  $\omega_0$ , il dipolo indotto  $\vec{\mu}(t)$  da quest'ultima nelle molecole può essere espresso come ([2]):

$$\vec{\mu}(t) = \alpha(t)\vec{E}\cos(\omega_0 t) \quad (1.1)$$

Dove  $\alpha(t)$  indica la polarizzabilità della molecola. Se quest'ultima fosse costante si osserverebbe solo diffusione elastica, ma in generale  $\alpha$  può essere modulata dalla fluttuazione degli atomi rispetto alla loro posizione di equilibrio, e può essere quindi espressa come funzione della distanza lungo i modi normali del sistema ( $\xi$ ), dipendendo pertanto dalle vibrazioni della molecola. Sviluppiamo troncando al primo ordine la polarizzabilità intorno alla posizione di equilibrio durante il moto degli atomi nella molecola, trattando ogni modo vibrazionale, a frequenza  $\omega_{vib}$ , per piccole oscillazioni come un oscillatore armonico ( $\xi = \xi_0 \cdot \cos(\omega_{vib}t)$ ).

$$\alpha(t) = \alpha_{eq} + \left. \frac{\partial \alpha}{\partial \xi} \right|_{eq} \xi + O(\xi^2) \quad (1.2)$$

Inserendo lo sviluppo (1.2) nell'espressione (1.1), si ottiene:

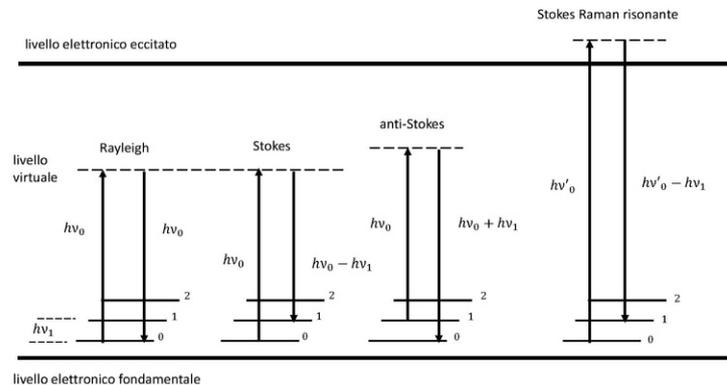
$$\vec{\mu}(t) = \left[ \alpha_{eq} + \left. \frac{\partial \alpha}{\partial \xi} \right|_{eq} \xi_0 \cdot \cos(\omega_{vib}t) \right] \cdot \vec{E} \cos(\omega_0 t)$$

Svolgendo il prodotto e utilizzando le formule di prostaferesi si può riscrivere come:

$$\vec{\mu}(t) = \alpha_{eq} \vec{E} \cos(\omega_0 t) + \frac{1}{2} \left. \frac{\partial \alpha}{\partial \xi} \right|_{eq} \xi_0 \cdot \vec{E} \cos[(\omega_0 - \omega_{vib})t] + \frac{1}{2} \left. \frac{\partial \alpha}{\partial \xi} \right|_{eq} \xi_0 \cdot \vec{E} \cos[(\omega_0 + \omega_{vib})t] \quad (1.3)$$

Il primo termine della (1.3) rappresenta un'emissione da parte del dipolo oscillante indotto alla stessa frequenza della radiazione incidente, quindi l'onda uscente trasporterà la stessa energia (Scattering Rayleigh). Il secondo e il terzo termine invece (rispettivamente denominati Stokes e Anti-Stokes) generano l'emissione a frequenze diverse: questi contributi descrivono quindi i processi di scattering Raman. Di conseguenza affinché un moto vibrazionale  $\omega_j$  possa generare scattering Raman (ovvero affinché sia Raman attivo), è necessario che il dipolo indotto dalla radiazione elettromagnetica vari lungo la proiezione sulla coordinata normale  $\xi_j$ , ovvero  $\frac{\partial \alpha}{\partial \xi_j} \neq 0$ . Un discorso del tutto analogo si può fare analizzando i moti rotazionali delle molecole. Un'osservazione da fare è che se durante un moto vibrazionale gli atomi impiegano un intero periodo per tornare nella stessa configurazione, per una rotazione è sufficiente un semiperiodo. Quindi le pulsazioni in esame saranno due volte quelle rotazionali del sistema. Inoltre la polarizzabilità non deve variare lungo la proiezione sulla coordinata normale, ma il dipolo indotto è invece modulato da un'anisotropia della polarizzabilità ( $\Delta\alpha = \alpha_{\parallel} - \alpha_{\perp} \neq 0$ ), il che è verificato per qualsiasi molecola che non sia assimilabile ad un rotatore sferico. In questo caso, si ha:

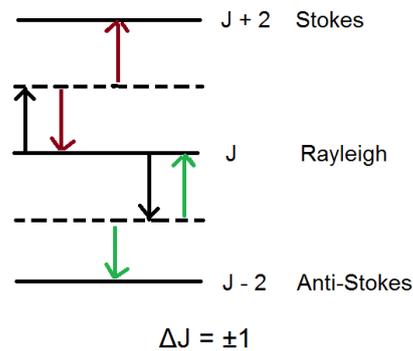
$$\vec{\mu}(t) = \alpha_{eq} \vec{E} \cos(\omega_0 t) + \frac{1}{2} \Delta\alpha \cdot \xi_0 \cdot \vec{E} \cos[(\omega_0 - 2\omega_{rot})t] + \frac{1}{2} \Delta\alpha \cdot \xi_0 \cdot \vec{E} \cos[(\omega_0 + 2\omega_{rot})t]$$



**Figura 1.1.** Schema dei primi due livelli elettronici (fondamentale e primo eccitato) e dei primi tre vibrazionali di una molecola,  $\nu = 0$  (fondamentale),  $\nu = 1$  (primo eccitato),  $\nu = 2$  (secondo eccitato). I primi tre pannelli mostrano le transizioni con appoggio su uno stato virtuale (Rayleigh elastico e Raman sia Stokes che anti-stokes con variazione di energia), l'ultimo invece evidenzia il caso risonante in cui la diffusione Raman avviene in concomitanza con una promozione elettronica. Figura adattata da [https://it.wikipedia.org/wiki/File:Schemalivelli\\_scattering\\_Raman.pdf](https://it.wikipedia.org/wiki/File:Schemalivelli_scattering_Raman.pdf)

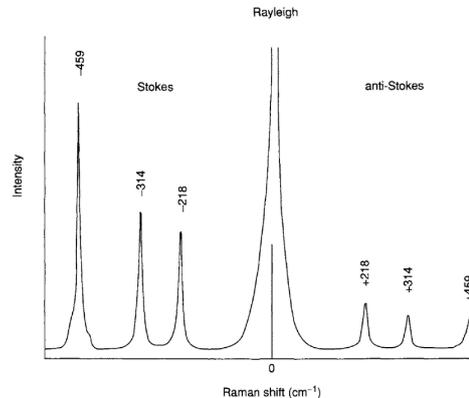
Da un punto di vista classico quindi, in modo intuitivo, lo scattering Raman può essere visto come un battimento tra le oscillazioni del campo introdotto dalla radiazione incidente e quelle proprie della struttura chimica della molecola.

Quantisticamente invece si può descrivere il fenomeno in termini di interazione fra i fotoni e la materia che si scambiano energia attraverso i modi normali. Partendo dal caso vibrazionale (Figura 1.1), ogni fotone della radiazione incidente trasporta un'energia pari a  $\hbar\omega_0$  e può eccitare la molecola portandola in uno stato energetico superiore. Si noti che lo scattering Raman può avvenire sia in materiali che assorbono la radiazione incidente alla frequenza  $\omega_0$ , sia in materiali trasparenti: in quest'ultimo caso il livello di "appoggio" è uno stato virtuale. La molecola poi diseccitandosi può tornare al suo livello vibrazionale ( $\nu$ ) di partenza ( $\Delta\nu = 0$ , Rayleigh), rilassarsi su un livello superiore ( $\Delta\nu = 1$ , Stokes) o inferiore ( $\Delta\nu = -1$ , anti-Stokes).



**Figura 1.2.** Schema delle transizioni virtuali che avvengono nel Raman rotazionale.

Solitamente in condizioni standard le righe Stokes sono significativamente più intense (Figura 1.3) di quelle Anti-Stokes, in quanto, seguendo la distribuzione di Boltzmann, gli stati meno energetici tendono a essere più popolati.



**Figura 1.3.** Lo spettro Raman vibrazionale del  $CCl_4$  in figura riassume quanto visto. Si possono notare le righe simmetriche anti-Stokes e Stokes, con queste ultime che producono un segnale maggiore. Figura adattata da <https://www.researchgate.net/profile/Tuan-Tran-2/publication/320426698/figure/fig21/AS:550312181678080@1508216056001/Raman-spectrum-of-CCl4-4880-nm-excitation-The-full-spectrum-includes-a-Rayleigh.png>.

Per quanto riguarda le rotazioni (Figura 1.2) invece abbiamo sempre due processi virtuali in serie con variazione di numero rotazionale ( $J$ ) che dipende dalle usuali regole di selezione ( $\Delta J = \pm 1$ ). Quindi abbiamo tre possibili situazioni finali:  $\Delta J = 0$  (Rayleigh),  $\Delta J = 2$  (Stokes),  $\Delta J = -2$  (Anti-Stokes).

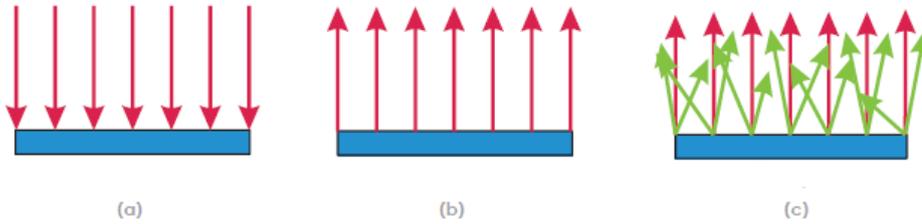
I risultati sono analoghi alla situazione classica e lo spostamento in energia dei fotoni Raman, essendo legato agli stati vibrazionali e rotazionali della molecola, ci fornisce un importante strumento per l'indagine spettroscopica.

## 1.2 Caratteristiche sperimentali

Come accennato nella sezione precedente, lo scattering Raman, e nello specifico la raccolta dei fotoni diffusi a frequenze Stokes o anti-Stokes, costituisce un importante strumento per indagare le proprietà della materia. In particolare la spettroscopia si rivela estremamente versatile in quanto si può utilizzare con sorgenti luminose a qualsiasi frequenza, rendendo di fatto comoda l'analisi per campioni che a priori potrebbero essere trasparenti alla pulsazione della radiazione in oggetto. Inoltre la scelta della lunghezza d'onda della sorgente consente di raccogliere una pluralità di spettri Raman e di selezionarli a seconda delle esigenze: si può optare per una frequenza alla quale il campione è trasparente, per evitare ad esempio che il background di fluorescenza indotto dall'assorbimento possa coprire il debole segnale Raman o per scongiurare il damaging fotoindotto dei campioni, oppure si può pensare di usare proprio una frequenza laser in risonanza con il campione per promuovere una transizione elettronica e amplificare il segnale di alcune molecole (spettroscopia Raman risonante). Infatti, osserviamo che l'intensità del segnale Raman dipende da una variazione della polarizzabilità nella molecola, e una transizione elettronica può generare uno spostamento nella lunghezza di legame che provoca un aumento di differenza di polarizzabilità nei vari modi vibrazionali, intensificando di fatto le linee spettrali. Inoltre la transizione reale e non virtuale aumenta la sezione d'urto dell'evento aumentando il segnale e semplificando lo spettro [2].

Da un punto di vista pratico poi la spettroscopia Raman si adatta bene alle principali applicazioni industriali, ma anche al campo della biochimica e in quello dei beni culturali. Ciò è dovuto alla non distruttività e alla non invasività della maggior parte delle tecniche che sfruttano questo principio. Queste importanti caratteristiche sono garantite dalla mancanza di necessità di alcune procedure tipiche di altre metodologie spettroscopiche come il contatto con il campione, ma soprattutto la preparazione dello stesso, che in molti casi deve essere diluito, riscaldato o pressurizzato per migliorare l'efficienza dell'analisi spettrale. L'assenza di queste procedure abilita quindi l'utilizzo della spettroscopia Raman anche per accertamenti *in situ* o addirittura *in vivo*. Tutta questa serie di vantaggi si è però riflettuta, almeno inizialmente, su alcune difficoltà tecniche. I grandi sviluppi tecnologici a partire dagli anni '50, per quanto concerne gli elementi ottici necessari per realizzare un buon spettrometro Raman, hanno dato grande impulso alla diffusione su larga scala di questa tecnica. In particolare le sorgenti Laser, molto più raffinate del sistema di filtraggio della luce solare impiegato da Raman, consentono l'utilizzo di una radiazione estremamente coerente e considerevole monocromatica, ideale per questo tipo di esperimenti. Inoltre la possibilità di sfruttare detector basati sulle proprietà dei semiconduttori, come fotodiodi e CCD (Charge-Coupled Device), abbinati a strumenti informatici dalla potenza di calcolo sempre più elevata ha perfezionato la strumentazione, che si rivela particolarmente efficace se utilizzata in sinergia con microscopi ottici. A titolo di

esempio, qua analizziamo nel dettaglio l'utilizzo per indagini spettroscopiche Raman di un microscopio confocale.



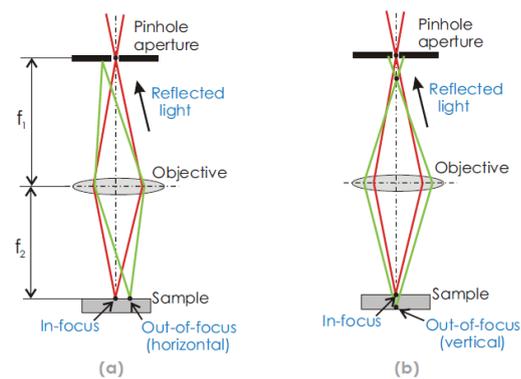
**Figura 1.4.** Illuminazione (a), riflessione ideale (b) e riflessione reale con luce scatterata (c) in un microscopio convenzionale ad illuminazione diffusa.

### 1.3 Microscopia Raman confocale

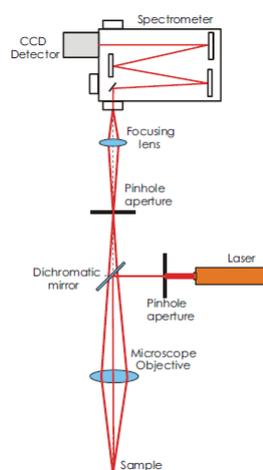
Negli anni '50 le tradizionali tecniche microscopiche non erano in grado di fornire un'immagine nitida dei campioni esaminati. Ciò era essenzialmente dovuto all'illuminazione diffusa di essi che restituiva un'immagine disturbata dai fotoni diffusi dal campione e i cui dettagli erano sfocati a causa dell'interferenza dei fotoni provenienti dai piani fuori fuoco (Figura 1.4). Marvin Minsky nel 1957 per la prima volta brevettò un microscopio che fosse in grado di illuminare un punto alla volta del campione in esame per ottenere un'informazione il più dettagliata e meno disturbata possibile, ricostruendo poi l'immagine. (Le figure e la trattazione sono riprese da [3])

L'illuminazione sul singolo punto del campione è resa possibile dall'utilizzo di una sorgente laser che attraversa un pinhole e viene poi focalizzata. L'eliminazione dei fotoni fuori fuoco è poi realizzata tramite un secondo pinhole posto tra l'obiettivo e il rivelatore (Come mostrato in figura 1.5). L'intero apparato viene poi abbinato a un sistema di rivelazione e di ricostruzione dell'immagine.

Questa tecnica infatti permette di analizzare senza disturbi i punti presenti sullo stesso piano focale (confocali), lo strumento è per questo chiamato microscopio confocale, mappando poi un'immagine tridimensionale sovrapponendo la risposta dei diversi piani confocali. Da un punto di vista sperimentale la mappatura dei punti può essere eseguita, a seconda delle esigenze, spostando il campione o la sorgente. Nel primo caso si garantisce la coerenza del sistema che rimane stabile rispetto all'asse ottico, a discapito però di una bassa frequenza di campionamento (circa 0.1 Hz). Tempi di acquisizione (da 0.01 a 1 ms) molto più rapidi sono garantiti da specchi e deflettori che spostano la sorgente, perdendo



**Figura 1.5.** Il pinhole tra obiettivo e rivelatore elimina i fotoni fuori fuoco sul piano orizzontale (a) e verticale (b).



**Figura 1.6.** Schema di un apparato completo di microscopia Raman confocale: qui abbinato ad uno spettrometro.

però un po' per quanto concerne la coerenza del sistema ottico. La rivelazione è solitamente demandata a un sistema di fotomoltiplicatori o fotodiodi a valanga che raccolgono il segnale per digitalizzarlo dopo che è stato amplificato (il pinhole riduce drasticamente l'intensità luminosa).

Particolarmente efficace e di grande rilevanza sperimentale è il caso in cui un microscopio confocale viene abbinato ad uno spettrometro Raman, ottenuto ad esempio combinando un monocromatore ed una CCD per la detection della luce scatterata (come mostrato in figura 1.6). In questo caso l'informazione sul campione viene arricchita dall'analisi spettrale; quindi oltre all'informazione spaziale tridimensionale, garantita dall'apparato confocale, l'acquisizione delle fingerprint vibrazionali Raman permette di aggiungere una quarta dimensione, associando ad ogni pixel spaziale acquisito il corrispondente spettro Raman.

Unendo quindi i vantaggi della microscopia confocale con quelli della spettroscopia Raman esposti in precedenza, otteniamo uno strumento di imaging e di indagine spettrale molto efficace e potente, soprattutto per lo studio di materiale biologico. Queste qualità hanno reso la microscopia Raman confocale uno degli strumenti più utilizzati per caratterizzare a livello microscopico campioni. Tuttavia questa tecnica si limita ad analizzare, seppur con grande precisione, spessori molto ridotti. Questo è particolarmente evidente quando strati posti in profondità sono oscurati dalla presenza in superficie di uno strato altamente diffusivo, che domina tutto il segnale nella regione di illuminazione del laser. Esemplicativo è il caso, nello studio non invasivo delle ossa, della pelle che non consente di indagare oltre  $100\mu m$  di spessore, oppure quello di pigmenti particolarmente diffusivi nello studio di stratificazioni pittoriche

## Capitolo 2

# La tecnica SORS

In questo capitolo viene presentata una tecnica spettroscopica che riesca a superare alcuni limiti della microscopia Raman confocale. A tal fine si analizzano le implicazioni fisiche dell'introduzione di un offset spaziale fra la regione di illuminazione e il punto di raccolta in un'indagine spettroscopica, caratteristica alla base della SORS (Spatially Offset Raman Spectroscopy). I dettagli tecnici e i vantaggi di quest'ultima vengono messi in luce discutendo due esperimenti: quello in cui la tecnica SORS è stata introdotta [4] e uno relativo ad una sua diretta applicazione nel campo dei beni culturali [5].

### 2.1 Principio di funzionamento

Nel 2005 Pavel Matousek, insieme ai suoi colleghi, introdusse [4] una nuova tecnica spettroscopica, la SORS (Spatially Offset Raman Spectroscopy), in grado di superare quello che fino ad allora era stato un grosso limite per la spettroscopia Raman, ovvero l'incapacità di sondare strati sotto la superficie di materiali altamente diffusivi. In particolare quando si ha a che fare con mezzi eterogenei e torbidi, quindi con un alto potere diffusivo della luce, un microscopio confocale non è in grado di ricevere informazioni e ricostruire immagini al di sotto della lunghezza di trasporto dei fotoni sul punto di illuminazione, ovvero la distanza percorsa prima che essi vengano significativamente deviati dalla loro direzione di propagazione, e quindi non più raccolti dal microscopio (tipicamente, come nei materiali indagati nell'esperimento [4], questa lunghezza è dell'ordine di  $10^{-4}$  m, con un cammino libero medio inferiore di circa un ordine di grandezza). Ciò è particolarmente limitante nell'indagine di campioni stratificati, i cui strati più profondi risultano indistinguibili se non addirittura invisibili nell'analisi.

L'idea di fondo è che fotoni Raman generati negli strati più profondi tenderanno a essere diffusi più lontano dal punto di illuminazione rispetto a quelli generati in superficie. Pertanto traslando spazialmente il detector del microscopio dalla regione d'illuminazione del laser, il segnale proveniente dagli strati superiori tende a diminuire più rapidamente di quello che ha origine più in profondità. Per convincersi di ciò basti pensare al moto dei fotoni Raman dal punto di generazione al detector come ad un random walk, in cui dopo aver percorso una distanza pari al loro libero cammino medio (indicato con  $\lambda$ ), essi vengono deflessi con una direzione casuale a

seguito di ripetuti processi di diffusione elastica.

Supponendo che il fotone compia  $N$  spostamenti di modulo fissato, non correlati fra loro ed indicati con  $\vec{x}_i$ .

$$|\vec{x}_i| = \lambda \quad \langle \vec{x}_i \cdot \vec{x}_j \rangle = 0$$

Si ricava il valore efficace dello spostamento totale, ovvero il suo RMS (Root Mean Square)

$$x_{rms} = \left\langle (\sum_{i=1}^N \vec{x}_i)^2 \right\rangle = \left\langle \sum_{i=1}^N x_i^2 + \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \vec{x}_i \cdot \vec{x}_j \right\rangle \quad (2.1)$$

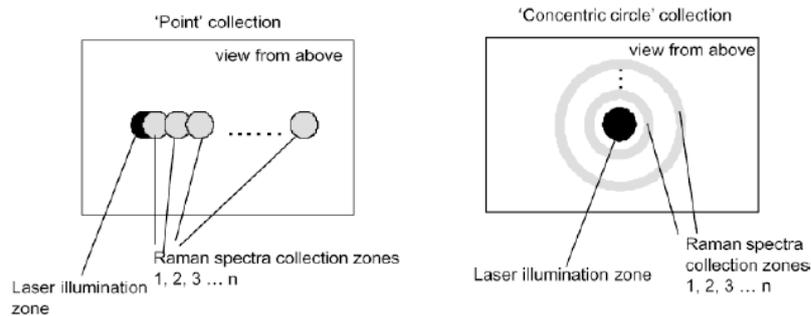
Sfruttando l'additività del valore atteso dalla (2.1) si ottiene

$$x_{rms} = \left\langle \sum_{i=1}^N x_i^2 \right\rangle + \left\langle \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \vec{x}_i \cdot \vec{x}_j \right\rangle = N \cdot |\vec{x}_i|^2 = N \cdot \lambda^2$$

Da questa semplice relazione si nota come la distanza dal punto di generazione del fotone è proporzionale al numero di urti a cui va incontro, quindi tanto più esso proviene da strati profondi, tanto maggiore sarà la sua probabilità di migrare lateralmente rispetto al punto di illuminazione.

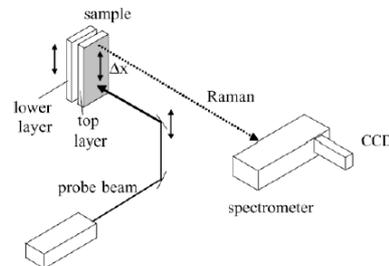
Sulla base di queste considerazioni è quindi possibile determinare il contributo relativo dei vari livelli in funzione dell'offset spaziale e, attraverso un'analisi multivariata della collezione di spettri ottenuti traslando ripetutamente il punto di raccolta dei fotoni, ricostruire la composizione chimica dei diversi strati di cui si compone il campione.

Per quanto riguarda la detection del segnale Raman, Matousek e collaboratori propongono nell'articolo due diverse metodologie (Figura 2.1): La prima tecnica è quella di mantenere una cattura dei fotoni punto per punto e di traslare progressivamente il detector dalla regione di illuminazione introducendo un offset. Un approccio alternativo consiste nel rivelare la radiazione Raman generata nel campione coprendo regioni anulari, di raggio interno ed esterno crescenti ad ogni passo, in modo da avere anche in questo caso un offset progressivo.



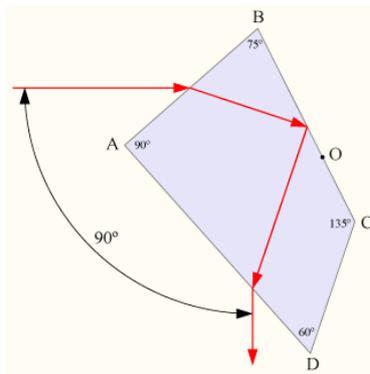
**Figura 2.1.** Rappresentazione delle due metodologie di raccolta, figura adattata da [4].

## 2.2 Layout sperimentale



**Figura 2.2.** Schema del setup sperimentale, figura adattata da [4].

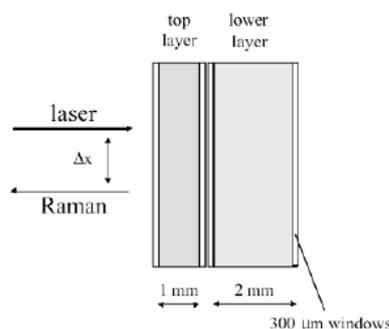
Nello stesso articolo ([4]) al fine di dimostrare la validità e la potenza della metodologia usata, gli autori propongono i risultati di un esperimento. Il setup sperimentale, mostrato in Figura 2.2, è composto da: una sorgente laser CW (continuous wave) a ioni di argon di potenza 12 mW con lunghezza d'onda 514 nm, un prisma di Pellin-Broca (Figura 2.3) per rimuovere le linee spettrali multiple del laser e una lente focale di un metro per ottenere un fascio di diametro pari a 300  $\mu\text{m}$ .



**Figura 2.3.** In un prisma di Pellin-Broca, la luce entra dalla faccia AB, subisce una riflessione interna totale sulla faccia BC, ed esce attraverso la faccia AD. Una sola particolare lunghezza d'onda può essere rifratta esattamente a 90°, venendo di fatto selezionata e separata dalle altre. Figura adattata da [https://it.wikipedia.org/wiki/Prisma\\_di\\_Pellin-Broca#/media/File:Pellin-broca-prism.png](https://it.wikipedia.org/wiki/Prisma_di_Pellin-Broca#/media/File:Pellin-broca-prism.png)

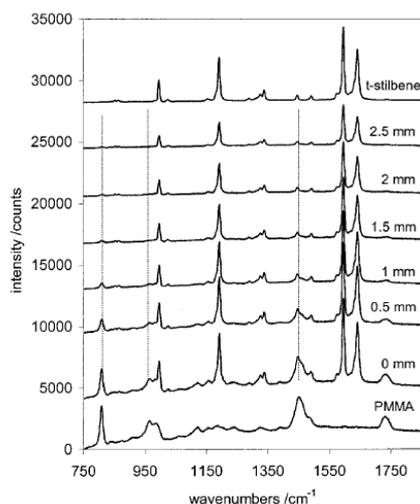
La luce viene poi raccolta da una lente  $f/1$  di 50 mm di diametro, dispersa da uno spettrometro e visualizzata su una camera CCD. Il campione viene posto su uno stage con traslatore micrometrico in grado di muovere verticalmente il campione (come si può osservare in Figura 2.2) mantenendo fisso il punto d'incidenza tramite lo spostamento simultaneo dei prismi riflettenti, così da generare l'offset necessario per l'indagine. In particolare, nel caso presentato il campione era costituito da due strati, contenuti in due cuvette (Figura 2.4) di altezza 4 cm e larghezza 1 cm, con pareti di quarzo fuso di spessore 300  $\mu\text{m}$ : la prima cuvetta aveva un cammino ottico di 1 mm ed era riempita con sfere di PMMA (polimetilmetacrilato) di 20  $\mu\text{m}$  di diametro, mentre la seconda aveva un cammino ottico di 2 mm e conteneva Trans-stilbene in polvere. La raccolta dei dati è stata

portata avanti usando la tecnica della detection dei fotoni punto per punto (pannello a sinistra in Figura 2.1), spostando il punto di raccolta con un offset da 0 a 2.5 mm a passi di 0.5 mm. L'analisi multivariata per recuperare i singoli spettri è stata poi effettuata tramite un algoritmo PCA (Principal Component Analysis), in particolare del tipo BTEM (Band Target Entropy Minimization).



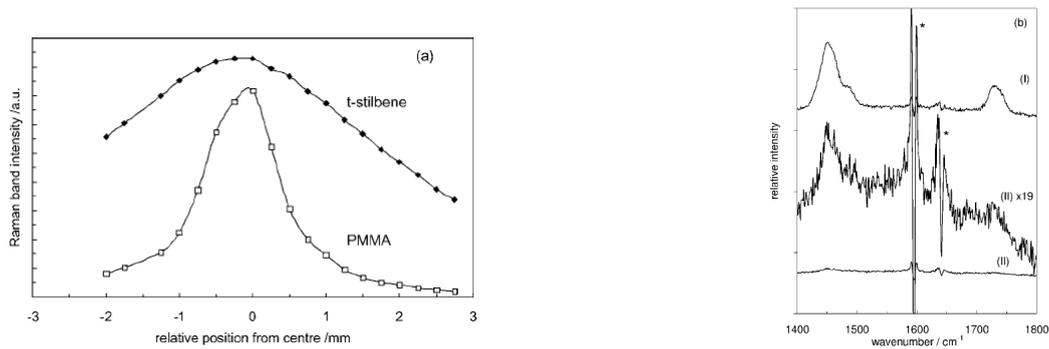
**Figura 2.4.** Disposizione delle cuvette durante l'esperimento, figura adattata da [4].

I dati sperimentali, mostrati in Figura 2.5, sono in accordo con quanto atteso. In particolare, l'analisi degli spettri Raman al variare dell'offset mostra che il contributo del PMMA tende a ridursi molto rapidamente, mentre quello del Trans-stilbene si mantiene approssimativamente costante in una regione abbastanza ampia, per poi decadere più lentamente una volta superati i 2 mm di offset spaziale. Si osserva inoltre che uno spettro ottenuto con un offset sopra il millimetro risulta quasi sovrapponibile a quello del trans-stilbene puro, mentre lo spettro ricavato con un offset nullo, non è paragonabile a quello del PMMA, questo perché il trans-stilbene ha una sezione d'urto Raman molto alta, tale da conferire agli spettri ottenuti sempre un contributo superiore a quello del polimetilmetacrilato.



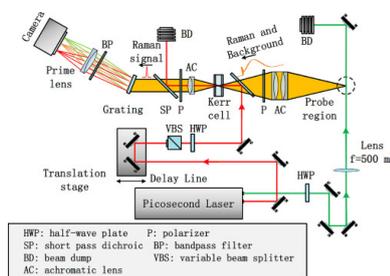
**Figura 2.5.** Spettri ottenuti a diversi offset spaziali, in cima è riportato lo spettro puro del t-stilbene, in fondo quello del PMMA. Figura adattata da [4].

Lo studio prosegue analizzando l'efficacia della ricostruzione dei singoli spettri, e il risultato viene messo a confronto con un altro esperimento compiuto in precedenza ([6],[7]) servendosi di una più complessa tecnica basata sul gating temporale ultraveloce. In particolare si valuta in prima istanza il miglioramento che l'offset spaziale apporta nell'eliminare il contributo dello strato superiore (in questo caso il PMMA) nell'analisi spettrale del livello sottostante (il t-stilbene). A tal fine i ricercatori hanno acquisito uno spettro del campione con un offset di 3.5 mm e l'hanno messo in relazione con quello ottenuto ad offset nullo (Figura 2.6). Dallo studio comparativo dei due campionamenti, si è ottenuto che la SORS realizza un miglioramento nel contrasto di un fattore 19, risultato significativo se si pensa che la tecnica che sfrutta il gating temporale ha 5 come limite massimo, imposto dal rumore insito nella strumentazione. Relativamente a ciò anche il rapporto segnale/rumore risulta migliore nell'approccio SORS con offset spaziale.

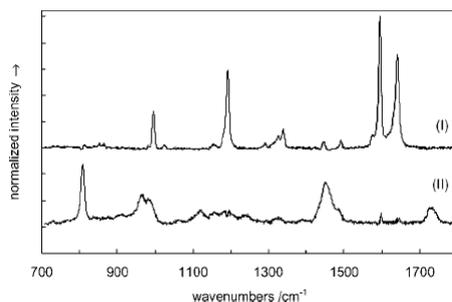


**Figura 2.6.** (a) Andamento dell'intensità del segnale in funzione dell'offset, è possibile notare la simmetria del sistema e che lo strato inferiore (t-stilbene) domina anche ad offset nullo, per poi diminuire il proprio segnale, come ci si aspetta, molto più lentamente del livello superiore (PMMA). (b) Si può apprezzare il miglioramento in contrasto di un fattore 19 dello strato inferiore dall'analisi del segnale residuo del PMMA. (I) è lo spettro ad offset nullo a cui è stato sottratto lo spettro puro dello t-stilbene, mentre (II) è lo stesso con un offset di 3.5 mm. Si nota come il residuo di PMMA (II) amplificato di un fattore 19 è paragonabile a (I). Gli asterischi indicano che è stata effettuata una sottrazione spettrale. Figura adattata da [4].

In secondo luogo si può notare che nell'ottica di un utilizzo della tecnica in ambito medico o artistico, la SORS presenta un notevole vantaggio rispetto alla sua controparte con approccio a offset temporale: quest'ultima infatti lavora con impulsi laser con elevate potenze di picco che possono facilmente superare la soglia consentita per la salute dei tessuti umani, mentre un approccio ad offset spaziale permette di lavorare con laser CW (continuous wave) con potenze ben al di sotto del limite di photo-damaging. C'è da dire comunque che il gating temporale è in grado di eliminare i fotoni di fluorescenza e consente di indagare in modo particolarmente accurato lo strato superficiale, trascurando i fotoni provenienti dai livelli sottostanti, tagliandoli nella raccolta sulla base del loro maggiore ritardo temporale. Ciò viene tuttavia bilanciato anche dal fatto che la strumentazione necessaria a questa metodologia (Figura 2.7) è molto complessa, molto di più rispetto all'arrangiamento necessario per un esperimento SORS.



**Figura 2.7.** Schema del setup sperimentale di un esperimento con gating temporale, si può notare, oltre alla notevole complessità della sorgente laser, la complicazione nell'indirizzamento del segnale, l'uso di una vasta gamma di componenti elettronici come la cella di Kerr che aumenta anche il rumore, e l'uso di una strumentazione più sofisticata come ad esempio il laser ad impulsi. Figura adattata da [8].



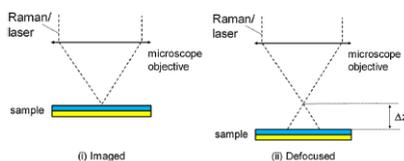
**Figura 2.8.** Decomposizione finale ottenuta usando i dati mostrati in Figura 2.5, da cui è possibile anche operare un confronto con gli spettri puri già noti, qui si ha Trans-stilbene (I), PMMA (II). Figura adattata da [4].

In ultima analisi è possibile osservare il recupero finale degli spettri relativi agli strati dei campioni, ottenuti senza fornire nessuna conoscenza a priori sulla sostanza all'apparato di analisi numerica. Al termine dell'analisi multivariata, utilizzando l'algoritmo BTEM, è stato possibile ottenere il risultato mostrato in Figura 2.8.

In conclusione, la tecnica presentata da Matousek e i suoi colleghi ha avuto grande fortuna e impiego proprio per la sua semplicità di utilizzo e la sua estrema efficacia, mostrata con questo esperimento e, come discuteremo più nel dettaglio nel prossimo capitolo, anche da alcune simulazioni numeriche condotte considerando campioni a 2 o 3 strati [9].

### 2.3 Micro-SORS nei beni culturali

Nel 2015 un gruppo di ricercatori italiani ha presentato un esperimento ([5]) in cui si faceva impiego di una tecnica basata sui principi della SORS, ma che al contempo cercava di superarne alcuni limiti: la micro-SORS. Ad esempio un utilizzo standard della tecnica consente, come si è visto, di recuperare in modo significativo segnale Raman dal fondo di un campione che sarebbe stato altrimenti sommerso da quello superficiale. Di contro quest'approccio è caratterizzato da un basso potere risolutivo, riuscendo a distinguere strati di spessore millimetrico. Il principio di funzionamento della micro-SORS è il medesimo del suo "antenato", ma si serve di un passo per la defocalizzazione nell'ordine dei micrometri, che consente una più accurata ricostruzione spettrale.



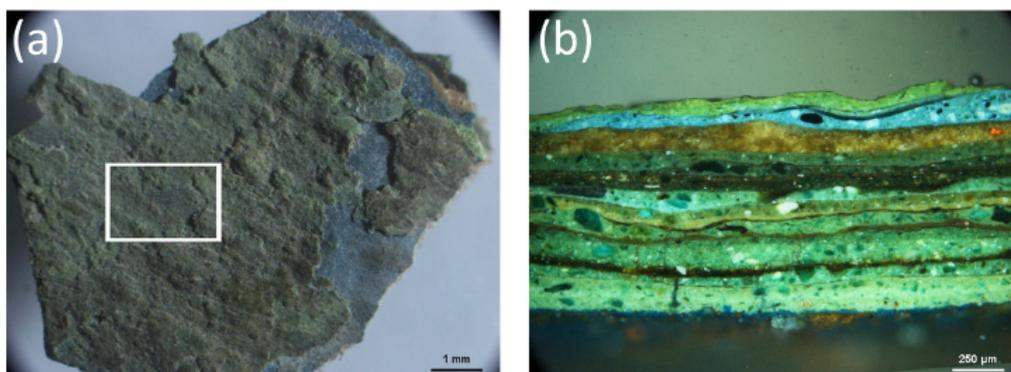
**Figura 2.9.** Schema del setup sperimentale in un'analisi di micro-spatially offset Raman spectroscopy. Le misure sono prese con il campione "a fuoco" (i) e successivamente in posizioni "defocused" (ii). Queste ultime sono realizzate muovendo il campione dalla posizione "a fuoco" rispetto all'obiettivo del microscopio di uno spostamento  $z$  dell'ordine dei  $\mu\text{m}$ . Figura adattata da [5].



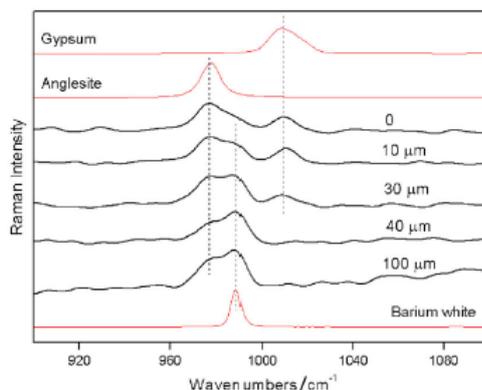
**Figura 2.10.** Fotografia della statua di San Giuseppe custodita presso il Santuario del Sacro Monte di Varallo. Il puntino bianco indica il punto da cui è stato estratto il frammento. Figura adattata da [5].

Come mostrato in Figura 2.9 l'idea rimane quella di introdurre un offset rispetto ad una misura tradizionale di microscopia Raman confocale, in particolare nell'esperimento mostrato ([5]) i ricercatori si sono serviti di un microscopio allontanando il campione dal punto di fuoco. Il campione era costituito da varie statue custodite nei Santuari del Sacro Monte di Ossuccio, Varese e Varallo. Fra le altre analisi è stata compiuta un'indagine su un frammento della veste della statua di San Giuseppe nel Santuario del Sacro Monte di Varallo (Figura 2.10).

In Figura 2.11 si può osservare come si presenta il frammento del campione: molto stratificato (si contano circa 20 strati) e con confini non nettamente delineati. Inoltre la statua presentava già evidenti segni di deterioramento e una notevole varietà di pigmenti impiegati nella pittura. I pigmenti impiegati nel primo strato verde sono blu di Prussia, giallo cromo (cromato di piombo) e bianco bario (solfato di bario). Con una prima analisi di spettroscopia Raman classica si possono in aggiunta individuare sostanze associate all'usura del campione: gesso (solfato di calcio biidrato) e anglesite (solfato di piombo).



**Figura 2.11.** (a) Immagine del frammento (il rettangolo bianco indica l'area analizzata); (b) Immagine ottica della stratigrafia del campione. Figura adattata da [5].



**Figura 2.12.** Spettri in posizione "defocused" con distanza crescente dal piano di fuoco (primo spettro, 0). Le linee tratteggiate enfatizzano l'andamento dei contributi relativi a differenti distanze. Gli spettri di riferimento in rosso sono stati acquisiti tramite un esperimento convenzionale di spettroscopia Raman confocale; Figura adattata da [5].

Un risultato evidente osservabile in Figura 2.12 è la crescita del contributo del bianco bario a discapito di quello del gesso andando più in profondità, il che testimonia come gli strati iniziali del campione fossero più consumati di quelli coperti e protetti dalla superficie. È interessante notare invece come non sia chiarissimo l'andamento del contributo dell'anglesite (che rappresenta sempre un sintomo di deterioramento dell'opera in questione). Infatti esso pare essere soggetto più a fluttuazioni casuali che a una crescita o a una decrescita monotona. Ciò è probabilmente frutto dell'altissima eterogeneità di un campione consumato, come quello in oggetto, e in questo caso la decrescita dovuta alla minore usura degli strati inferiori è stata compensata dall'elevato grado di diffusione dell'anglesite su tutta la superficie del campione, restituendo un contributo maggiore all'aumentare della superficie di illuminazione (dovuto all'incremento del defocusing). Quest'aspetto rappresenta quindi un limite di questa tecnica, che può essere arginato studiando in anticipo il grado di omogeneità del campione con un'analisi approfondita del campione posizionato sul piano di fuoco, comparandolo poi con l'andamento del segnale dei vari componenti in funzione del defocusing.

La tecnica SORS mostra comunque ancora una volta, in una versione più raffinata (Micro-SORS), i suoi vantaggi. Nello specifico essa è particolarmente adatta per le indagini nel campo dei beni culturali, per evincere le tecniche e i pigmenti impiegati nella pittura di un'opera ma anche per valutare lo stato di salute e il grado di deterioramento delle opere stesse senza alterare la situazione, grazie proprio alla sua non-distruttività e non-invasività.

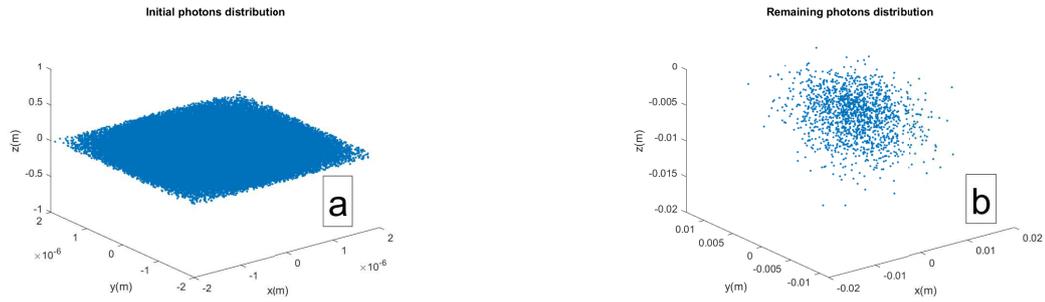
## Capitolo 3

# Modellizzazione numerica del segnale SORS

In questo capitolo viene presentata una simulazione da me realizzata, al fine di studiare quantitativamente le caratteristiche della tecnica SORS. Viene quindi presentato il modello impiegato e vengono discussi i risultati ottenuti variando i parametri computazionali e fisici in gioco.

### 3.1 Il modello

In un altro articolo [9], pubblicato contestualmente al precedente, Matousek e collaboratori presentano delle simulazioni numeriche che permettono di valutare in modo quantitativo le peculiarità del segnale SORS. Ricalcando quanto fatto dall'autore ho personalmente sviluppato un algoritmo (script in Appendice) che fosse in grado di testare l'efficacia di un esperimento SORS, soprattutto per vederne concretamente le caratteristiche e gli aspetti. Per la simulazione ho elaborato uno script su MATLAB che fosse in grado di riprodurre la situazione desiderata. Innanzitutto ho generato una griglia che rappresentasse uno spazio cartesiano tridimensionale ( $-12.5\text{cm} < x, y < 12.5\text{cm}, -25\text{cm} < z < 0$ ) supponendo che il campione occupasse interamente lo spazio. Inoltre per tener conto degli effetti di dimensione finita della radiazione laser ho supposto che il fascio laser che illumina il campione avesse un raggio finito, nello specifico di  $2\mu\text{m}$ , in analogia con quanto fatto in [9]. Il fascio laser è composto da  $N$  fotoni, il cui numero viene incrementato fino a giungere a convergenza (salvo diverse indicazioni, questo valore limite nella simulazioni che seguono sarà settato pari a 100.000 fotoni, numero molto inferiore rispetto alla realtà, ma ciò non influisce visto che diminuisce l'intensità del segnale ma non compromette la dipendenza dello stesso dall'offset), essi illuminano poi il campione. Quest'ultimo nella simulazione si suppone che sia composto da due soli strati che si sviluppano lungo l'asse  $z$ , sempre in analogia a quanto fatto in [9]: uno superiore di spessore 3 mm, e uno inferiore esteso verso il basso fino in fondo, entrambi con le stesse caratteristiche in termini di cammino libero medio dei fotoni al loro interno. A questo punto, coerentemente con l'idea di Matousek, la propagazione dei fotoni viene modellizzata come un random walk in 3 dimensioni.



**Figura 3.1.** (a) Disposizione iniziale dei 100.000 fotoni sulla regione di illuminazione, che corrisponde alla superficie quadrata di lato  $2\mu\text{m}$  centrata nel punto  $(x=0,y=0)$  sul piano  $z=0$ , che divide lo spazio in vuoto ( $z>0$ ) e zona occupata dal campione ( $z<0$ ). A  $z=0$  si suppone posto lo spettrometro che raccoglie i fotoni Raman. (b) Distribuzione finale dei fotoni nello spazio dopo 25cm percorsi, ovvero dopo 1250 passi. Si nota come molti di essi siano stati assorbiti, siano usciti dal campione dopo essere stati diffusi elasticamente, oppure siano stati raccolti dallo spettrometro.

Ogni singolo fotone compie una traiettoria di lunghezza pari a 25 cm, ed è caratterizzato da un cammino libero medio di 0.2 mm.

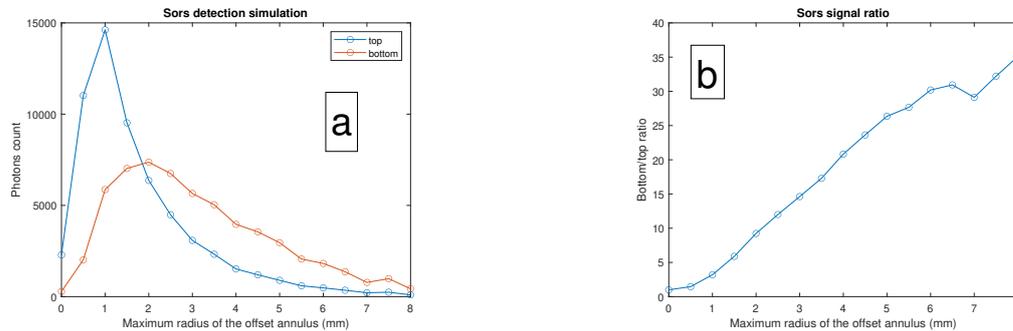
Quindi il percorso di ciascun fotone viene modellizzato all'interno di un ciclo for di 1250 passi all'interno del quale, ad ogni passo, può andare incontro a 3 destini:

- Essere diffuso elasticamente (con una probabilità del 97%, la traiettoria del fotone viene poi modificata casualmente, in modo isotropo).
- Essere diffuso anelasticamente con probabilità 2.9%, in realtà gli eventi Raman sono molto meno comuni, ma una sovrastima è funzionale ad ottenere una statistica adeguata ed una maggiore rapidità computazionale, dal momento che la probabilità di scattering influisce solo sul conteggio dei fotoni ma non sulla dipendenza del segnale dall'offset come vedremo nella sezione 3.3. Anche in questo caso c'è isotropia, e la probabilità viene azzerata dopo il primo evento (vengono quindi trascurati i rari eventi di doppia interazione Raman).
- Essere assorbito (con una probabilità dello 0.1 %).

La propagazione di ogni singolo fotone viene interrotta ogniqualvolta essi vengano assorbiti oppure escano dal campione. Nel caso invece lo facciano dopo essere stati diffusi, essi vengono discriminati sulla base del loro percorso: se non sono mai stati diffusi anelasticamente vengono trascurati, altrimenti vengono conteggiati e suddivisi fra quelli che hanno subito scattering Raman nello strato superficiale ( $0\text{mm} < z < -3\text{mm}$ ) e quelli nello strato sottostante ( $z < -3\text{mm}$ ).

Per la tecnica di raccolta impiegata, ho scelto quella ad anello (si veda Figura 2.1). A tal fine la simulazione è in grado di suddividere il piano  $z=0$  in regioni anulari concentriche e controllare in quale di esse i fotoni Raman siano usciti dal campione. Si analizzano il centro, una regione circolare di raggio 0.5 mm, una anulare con raggio interno 0.5 mm ed esterno 1 mm, e così via, incrementando ogni volta di mezzo millimetro entrambi i raggi, fino a che il raggio esterno non raggiunge gli 8mm.

## 3.2 SORS ratio



**Figura 3.2.** (a) Conteggio dei fotoni provenienti dai due strati in funzione del raggio esterno dell’anello di raccolta. Il livello superiore domina intorno alla regione d’illuminazione, ma tende poi a diminuire il suo segnale molto più rapidamente di quello raccolto dallo strato inferiore. L’iniziale incremento del segnale è dovuto all’aumento della superficie di detection,  $S = \pi(r_{est}^2 - r_{int}^2)$ . (b) La misura del ratio ci mostra chiaramente la decrescita molto più repentina del segnale superficiale.

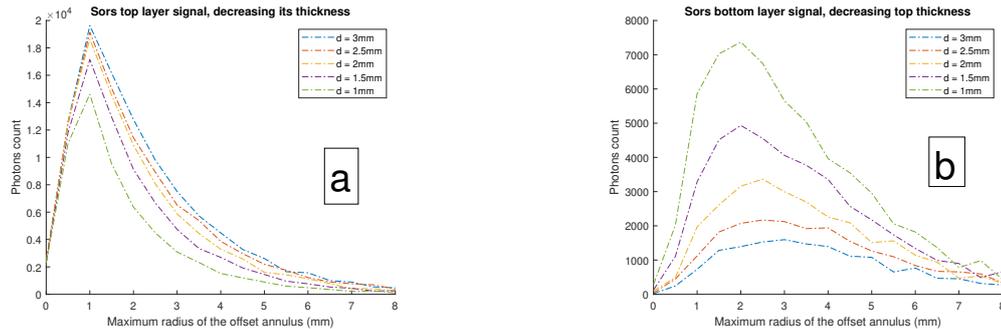
A questo punto è già possibile fare delle prime analisi sulla base del confronto dei fotoni Raman prodotti negli strati superiore e inferiore, e in particolare sul rapporto tra i due conteggi, in modo da verificare l’efficacia della tecnica nel discriminare i due contributi al variare dell’offset spaziale, dal momento che il numero di fotoni provenienti dal livello più basso dovrebbe decrescere molto più lentamente rispetto alla controparte del livello superficiale. A tal fine introduciamo una nuova grandezza: Il SORS Ratio in funzione dell’offset dato dal raggio esterno dell’anello ( $R(r_{est})$ ), dove il numero di fotoni conteggiati viene considerato come l’intensità del segnale.

$$R(r_{est}) = \frac{I_{top}(r_{est})/I_{bottom}(r_{est})}{I_{top}(0)/I_{bottom}(0)}$$

Dove  $r_{est}$  ed  $r_{int}$  indicano rispettivamente il raggio esterno e quello interno dell’anello di raccolta, questa grandezza è mostrata in Figura 3.2. Queste prime osservazioni ci forniscono già una prova evidente del corretto funzionamento del principio ideato da Matousek per quantificare il contributo relativo degli strati in un esperimento di spettroscopia Raman, in modo da decomporli e soprattutto recuperare il segnale degli strati più profondi grazie all’effetto dell’offset spaziale. Ciò generalmente si consegue, come visto nell’esperimento presentato in [4], confrontando due spettri: uno il più vicino possibile alla regione di illuminazione, come si farebbe in un esperimento di microscopia confocale, l’altro il più lontano possibile pur mantenendo un segnale abbastanza intenso da poter essere rivelato. Il grande miglioramento ottenibile con questa tecnica abbinata alla raccolta anulare è evidentemente osservabile dalla Figura 3.2, in relazione anche con quanto visto per la raccolta punto per punto, in Figura 2.6. Difatti un cerchio di raggio 0.5 mm raccoglie circa gli stessi fotoni provenienti dallo strato inferiore di un anello con raggio interno 5 mm ed esterno 5.5 mm, avendo in questo caso però un SORS Ratio prossimo a 30, testimonianza chiara del notevole incremento ottenibile del loro contributo, a parità di segnale prodotto.

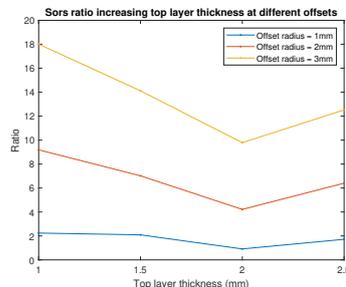
### 3.3 Dipendenza del segnale dai parametri fisici

Dopo aver verificato l'accordo degli andamenti sperimentali con quelli estratti dalla simulazione sviluppata, sono passato a sfruttare il modello numerico per ricavare la dipendenza del segnale SORS dai tipici parametri sperimentali. È stato quindi valutato l'andamento del segnale in funzione dello spessore degli strati, in particolare di quello superiore nel caso di un campione a due livelli, come esplorato in questa simulazione che riprende tutte le assunzioni già fatte in precedenza.

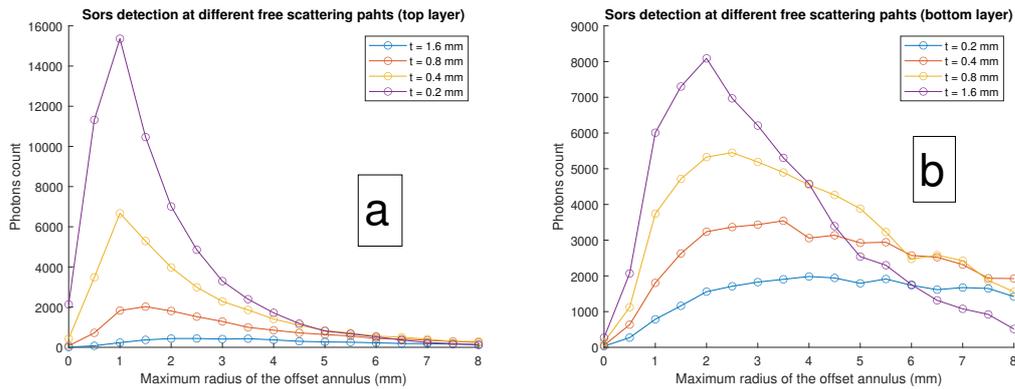


**Figura 3.3.** (a) Variando lo spessore dello strato superiore (indicato con  $d$ ), il numero assoluto di fotoni provenienti da esso subisce un incremento relativamente piccolo e che mantiene l'intensità del segnale approssimativamente sullo stesso livello. (b) Effettuando la stessa variazione, i fotoni raccolti dal livello inferiore sono soggetti ad una diminuzione che rende il segnale sempre più difficile da rivelare.

In Figura 3.3 è mostrato inoltre come, analizzando singolarmente ogni curva, per ogni intervallo di valori dell'offset l'andamento del segnale proveniente dal fondo scali approssimativamente come quello del conteggio di fotoni provenienti dalla superficie. Questo si riflette in una sostanziale indipendenza del rapporto dei due segnali dallo spessore dello strato superiore. Ciò ci consente di sottolineare un importante vantaggio della tecnica SORS: il recupero dello spettro dello strato inferiore dipende solo dalla quantità di segnale che esso emette e non da quanto si trova in profondità. Questa indipendenza, osservabile in Figura 3.4 ci porta a concludere inoltre che non è possibile usare il SORS Ratio per determinare lo spessore dello strato superiore, tuttavia esso si può ottenere analizzando la dipendenza dei segnali dei singoli strati dall'offset.

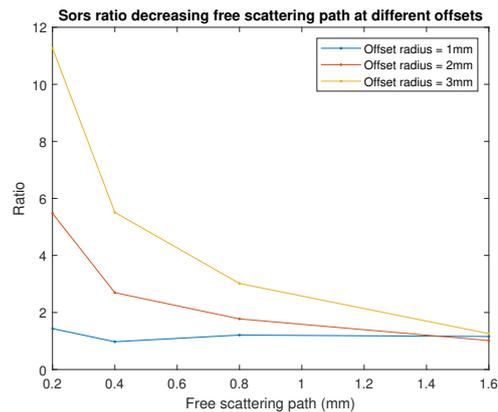


**Figura 3.4.** Il SORS Ratio si mantiene approssimativamente costante per ogni valore dello spessore dello strato superiore, indipendentemente dall'offset scelto.

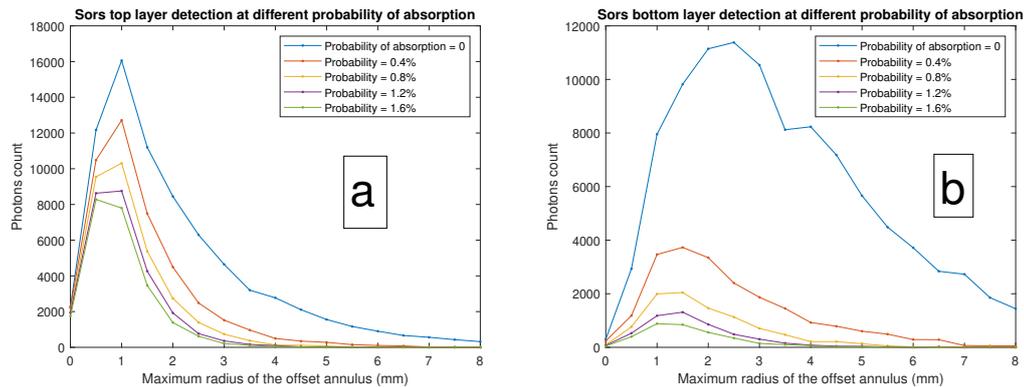


**Figura 3.5.** (a) Aumentando il cammino libero medio (indicato con  $t$ ), i fotoni tendono a penetrare maggiormente in profondità e il segnale dello strato superficiale (ricordiamo che ha uno spessore di 3mm) a diminuire. (b) Analoga è la considerazione per il livello in profondità che di conseguenza tenderà ad incrementare il suo segnale con la crescita di  $t$ .

Nel corso di questa simulazione abbiamo assunto che il cammino libero medio dei fotoni nel campione fosse costante, e che non dipendesse dallo strato in cui essi svolgevano la propria dinamica, cosa che in generale non è vera, dal momento che ogni materiale ha un suo valore specifico in relazione a questa grandezza. Al fine quindi di approfondire nel dettaglio la dipendenza del segnale dal cammino libero medio  $t$ , mostrata in Figura 3.5, poniamo in prima analisi l'attenzione su come varia in funzione di questo parametro, nella situazione ideale considerata in partenza e che fin qui è stata esaminata. Si può osservare dai grafici, in particolare dalla Figura 3.6, che il SORS Ratio tende ad annullarsi per valori alti del cammino libero medio, e in generale ha una forte dipendenza da quest'ultimo. Ciò rende possibile ad esempio valutare la distanza percorsa da un fotone in un determinato mezzo, noto lo spessore del campione.

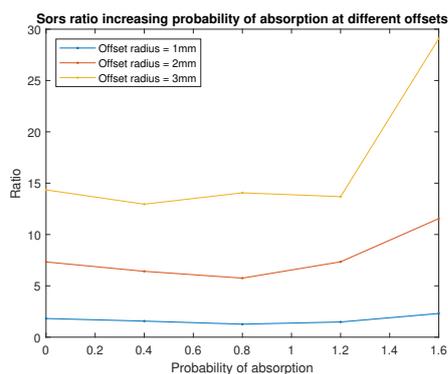


**Figura 3.6.** Il SORS Ratio tende, per ogni valore di offset, a diminuire rapidamente all'aumentare del cammino libero medio. Questa marcata dipendenza consente di ottenere alcuni risultati, come il calcolo stesso della distanza percorsa dai fotoni nei materiali che compongono il materiale.



**Figura 3.7.** (a) Aumentando la probabilità di assorbimento, e quindi fisicamente l'assorbimento o densità ottica, il segnale proveniente dallo strato superiore tende naturalmente a decrescere. (b) Lo stesso vale chiaramente per lo strato inferiore, dal grafico si può valutare l'assorbimento tale per cui il segnale dal fondo risulta ancora significativo (ad esempio con una probabilità d'assorbimento dell'1,6% il segnale è circa il 10% rispetto a quello di un materiale ad assorbimento nulla).

Infine l'ultima analisi effettuata è stata quella sull'andamento del segnale in funzione del contributo dell'assorbimento nella dinamica dei fotoni coinvolti nella simulazione. Con le stesse caratteristiche dei campioni impiegati inizialmente, è stata posta al 3% la probabilità di diffusione Raman, mentre quella di assorbimento a 0, poi a 0.2% e raddoppiata fino ad arrivare all'1.6%. La probabilità di diffusione elastica è il complemento a 100 delle altre due. Le probabilità sono assunte uguali per i due strati, e si può osservare che, come atteso, l'aumento dell'assorbimento deteriora l'intensità del segnale in entrambi i casi, ma fissato un valore della densità ottica, le variazioni di segnale nei due livelli in funzione dell'offset sono paragonabili fra di loro, quindi il SORS Ratio non presenta una particolare dipendenza dall'assorbimento, risultando circa costante con un lieve aumento per alti valori della percentuale d'assorbimento.



**Figura 3.8.** Il SORS Ratio risulta approssimativamente costante, con un lieve incremento per alti assorbimenti, quindi la tecnica, salvo per una decrescita lineare del rapporto segnale rumore, compensabile con un incremento dei tempi di acquisizione, non risente in modo negativo dell'aumento dei fenomeni di scattering.

## Capitolo 4

# Conclusioni

All'interno di questa dissertazione è stata descritta la tecnica di spettroscopia Raman con offset spaziale (SORS). La SORS è uno strumento di indagine recentemente introdotto in grado di caratterizzare campioni eterogenei e stratificati, spesso invisibili alle tradizionali tecniche spettroscopiche, sfruttando la diffusione anelastica della luce e la diversa distribuzione nello spazio dei fotoni provenienti da livelli differenti di uno stesso campione. Dopo aver introdotto i principi fisici su cui si basa, è stato descritto un primo esperimento, realizzato dall'inventore della tecnica (Pavel Matousek) insieme ai suoi collaboratori nel 2005, mettendo in risalto la capacità di indagare la composizione degli strati più profondi in esame, coperti da altri altamente diffusivi, caratteristica molto utile in analisi di tipo medico o relative ai beni culturali. La tecnica SORS, applicata allo studio di campioni a due strati, si è rivelata molto potente nel recuperare il segnale proveniente da quello posto in profondità, garantendo alti livelli di contrasto (di un fattore 19), e nel separare gli spettri dei due materiali che compongono il campione. Per modellizzare in modo quantitativo la dipendenza del segnale SORS dai parametri sperimentali, è stata sviluppata una simulazione numerica in grado di riprodurre la raccolta di fotoni Raman in un esperimento e di tracciare l'andamento del loro conteggio in funzione dei diversi parametri fisici da cui essa dipende, ovvero la posizione all'interno del campione in cui sono generati, lo spessore dei livelli in esame, l'assorbanza e la lunghezza di trasporto dei materiali. A tal fine è stato considerato un sistema a due strati di spessori diversi, utilizzando un setup di detection anulare; quest'ultimo rappresenta lo schema più efficiente e sfrutta una raccolta di fotoni in regioni concentriche di distanza crescente dal punto di illuminazione. In aggiunta è stato possibile mostrare come il rapporto tra il segnale proveniente dal livello più basso e quello in superficie fosse circa pari a 30 in una regione di detection shiftata di  $\approx 5$  mm rispetto al punto di illuminazione, con una raccolta di fotoni di intensità pari al caso senza offset, mostrando ancora una volta la sua efficacia nel recupero del segnale Raman di strati profondi. Infine è stato mostrato come, dall'analisi della simulazione, sia possibile sfruttare la tecnica SORS per ricavare il valore di molte grandezze fisiche in gioco (come la lunghezza di trasporto).



# Appendice

La cartella con le 3 versioni dei codici utilizzate per tutti i plot è disponibile al seguente link:  
<https://www.dropbox.com/sh/s0ndnlmyppbyo71/AAC8vR1Qexe2Lp4dqx2xFHLra?dl=0>

---

```

1  %%  Sors simulation                               %%
   %%  version: August 14, 2020                     %%
3  %%  Fabrizio Fatelli                             %%
   %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
5
7  %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%% Initialization %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
   clear                                           % clear all the variables in the workspace
9  tic                                           % stopwatch start
   close all;                                     % close all the figures
11
   %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%% Physical Parameters %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
13  t=2e-4;                                       %free scattering path
   dis=3e-3;                                     %top layer thickness
15  l=25e-2;                                     %propagation length
   n=100000;                                     %photons number
17
   %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%% Computational Parameters %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
19  m=1000;                                       %simulations number
   x=-1/2:t:1/2;
21  y=-1/2:t:1/2;                               %cartesian geometry grid
   z=0:t:-1;
23  xx=1;
   off=0:0.5:8;
25  cou=1;
   raman=0;
27  pp=0;
   eps=t*0.01;                                  %vectors and counters initialization
29  botlay=0;
   toplay=0;
31  ramantop=[0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0];
   ramanbot=[0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0];
33  ramantopd=[ramantop;ramantop;ramantop;ramantop;ramantop];
   ramanbotd=[ramanbot;ramanbot;ramanbot;ramanbot;ramanbot];
35
   %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%% Photons initial placement %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
37  while dis > 0.9e-3                            %Evaluating different top layer thicknesses
   for nn=1:n

```

```

39     a=rand*eps;
        b=rand*eps;
41     c=rand*eps;
        d=rand*eps;
43
        fx(nn)= a-c;
45     fy(nn)= b-d;
        fz(nn)=-t;
47
        a=0;
49     b=0;
        c=0;
51     d=0;

53 end

55 figure,                                %Initial photons distribution
    plot3(fx,fy,fz, '.');
57 xlabel('x(m)');
    ylabel('y(m)');
59 zlabel('z(m)');
    title('Initial_photons_distribution')
61
    %%%%%%%%%%%%% Photons displacement %%%%%%%%%%%%%
63

65 for i = 1:l/t
    while xx < length(fx)
67     num = rand*100;
        %%%%%%%%%%%%% Elastic scattering %%%%%%%%%%%%%
69     if num > 0 && num < 97                %We assume the phenomena frequency as
        j=0;                                %relative probability to occur
71     k=0;                                %We do not use mathematical calculation of
        w=0;                                %optical densities
73     j = rand*t-rand*t;                    %Elastic scattering is the dominant effect
        k = rand*t-rand*t;
75     w = rand*t-rand*t;
        nor = norm([j k w]);
77     j=(j/nor)*t;
        k=(k/nor)*t;                          %3D Random walk
79     w=(w/nor)*t;
        fx(xx) = fx(xx)+j;
81     fy(xx) = fy(xx)+k;
        fz(xx) = fz(xx)+w;
83     end
        %%%%%%%%%%%%% Photons absorption %%%%%%%%%%%%%
85     if num > 97 && num < 97.1                %Absorption probability is set very low
        fx(xx) = [];                            %In many observations we assume it 0
87     fy(xx) = [];                            %Removing the photon from the vector
        fz(xx) = [];
89     end
        %%%%%%%%%%%%% Raman scattering %%%%%%%%%%%%%
91     if num > 97.1 && num < 100                %Raman scattering probability does not

```

```

j=0; % affect the spatial offset dependence
93 k=0; %It affects only the photons count
w=0;
95 j = rand*t-rand*t;
k = rand*t-rand*t;
97 w = rand*t-rand*t;
nor = norm([j k w]);
99 j=(j/nor)*t;
k=(k/nor)*t;
101 w=(w/nor)*t;
%%%%%% Raman photons counting %%%%%%%%%
103 raman=raman+1;
pp=pp+1;
105 posramanx(pp)= fx(xx);
posramany(pp)= fy(xx); %Labelling the position
107 posramanz(pp)= fz(xx);
fx(xx) = fx(xx)+j;
109 fy(xx) = fy(xx)+k;
fz(xx) = fz(xx)+w;
111 if posramanz(pp) < -dis
botlay(pp)=xx;
113 else
toplay(pp)=xx; %Labelling the layer
115 end
end
117 %%%%%%%%% Raman photons detected location check %%%%%%%%%
for tt = 0:16 %anular offset detection
119 if tt==0
f=0;
121 g=1;
h=0;
123 elseif tt==1
f=1;
125 g=0;
h=0;
127 else
f=0;
129 g=0;
h=1;
131 end
%We start picking the photons from the centre and then we consider
133 %concentric rings increasing the radius by 1 mm at time
if (((fx(xx)^2+fy(xx)^2) < (0.5*(tt*1e-3 + g*0.33e-3))^2) &&
135 ((fx(xx)^2+fy(xx)^2) > (0.5*(h*tt*1e-3 -h*1e-3 + f*0.33e-3))^2) &&
(fz(xx)> eps))
137 for o = 1:length(botlay)
if xx == botlay(o)
139 ramanbot(tt+1) = ramanbot(tt+1)+1; %Photons from the bottom layer
end
141 end
for o = 1:length(toplay)
143 if xx == toplay(o)
ramantop(tt+1) = ramantop(tt+1)+1; %Photons from the top layer

```

```

145     end
      end
147     end
      end
149     %% Out of sample photons elimination and re-initialization %%
151     if fz(xx) > eps
153         fx(xx) = [];
154         fy(xx) = [];
155         fz(xx) = [];
      end
157     xx=xx+1;
159     end
161 xx=1;
      end
163 %%%Plots considering different top layer thicknesses%%
figure(3); hold on
165 plot(off,ramantop,'-.');
title('Sors_top_layer_signal, decreasing its thickness')
167 xlabel('Maximum radius of the offset annulus (mm)')
ylabel('Photons count');
169 if dis==1e-3
legend('d=3mm', 'd=2.5mm', 'd=2mm', 'd=1.5mm', 'd=1mm');
171 end
figure(4); hold on
173 plot(off,ramanbot,'-.');
title('Sors_bottom_layer_signal, decreasing top thickness')
175 xlabel('Maximum radius of the offset annulus (mm)')
ylabel('Photons count');
177 if dis > 1.1e-3
%% Re-initialization of vectors and counters%%
179 raman=0;
pp=0;
181 botlay=0;
toplay=0;
183 ramantopd(cou,:)= ramantop; %Labelling detections at different
ramanbotd(cou,:)= ramanbot; % top layer thicknesses
185 ramantop=[0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0];
ramanbot=[0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0];
187 end
dis=dis-0.5e-3;
189 cou=cou+1;
end
191 legend('d=3mm', 'd=2.5mm', 'd=2mm', 'd=1.5mm', 'd=1mm');

193 %%% Final plots %%%
ratioid=[ramantop;ramantop;ramantop;ramantop];
195 for i=1:4
for j=1:17
197 ratioid(i,j)=(ramanbotd(i,j)/ramantopd(i,j))/

```

---

```

((ramanbotd(i,1)+1)/ramantopd(i,1));
199     end
    end
201
202 ratio1 = [ratioid(1,2),ratioid(2,2),ratioid(3,2),ratioid(4,2)]; %Picking ratios
203 ratio2 = [ratioid(1,4),ratioid(2,4),ratioid(3,4),ratioid(4,4)]; % at fixed offsets
204 ratio3 = [ratioid(1,6),ratioid(2,6),ratioid(3,6),ratioid(4,6)];
205 thick=1:0.5:2.5;
    figure(5),
207 plot(thick,ratio1,'.-')
    hold on
209 plot(thick,ratio2,'.-') %Plotting them as a function of top layer thickness
    hold on
211 plot(thick,ratio3,'.-')
    title('Sors_ratio_increasing_top_layer_thickness_at_different_offsets')
213 xlabel('Top_layer_thickness(mm)')
    ylabel('Ratio');
215 legend('Offset_radius=1mm','Offset_radius=2mm','Offset_radius=3mm')

217 figure, %Remaining photons distribution
    plot3(fx,fy,fz,".");
219 xlabel('x(m)');
    ylabel('y(m)');
221 zlabel('z(m)');
    title('Remaining_photons_distribution')
223 figure,
    plot(off,ramantop,'-o');
225 hold on
    plot(off,ramanbot,'-o');
227 title('Sors_detection_simulation')
    xlabel('Maximum_radius_of_the_offset_annulus(mm)')
229 ylabel('Photons_count');
    legend('top','bottom')
231 figure, %Plotting detection and ratio with top layer thickness = 1mm
    for i=1:17
233 ratio(i)=(ramanbot(i)/ramantop(i))/(ramanbot(1)/ramantop(1));
    end
235 plot(off,ratio,'-o');
    title('Sors_signal_ratio');
237 xlabel('Maximum_radius_of_the_offset_annulus(mm)');
    ylabel('Bottom/top_ratio');
239
    toc

```

---



# Bibliografia

- [1] C.V. Raman, K.S. Krishnan, *A New Type of Secondary Radiation*, Nature, Volume 121, 501-502 (1928).
- [2] D. A. Long, *The Raman Effect: A Unified Treatment of the Theory of Raman Scattering by Molecules*, John Wiley & Sons (2002).
- [3] Princeton Instruments brochure, *Confocal Raman Microscopy General Overview*.
- [4] P. Matousek, I. P. Clark, E. R. C. Draper, M. D. Morris, A. E. Goodship, N. Everall, M. Towrie, W. F. Finney, and A. W. Parker, *Subsurface Probing in Diffusely Scattering Media Using Spatially Offset Raman Spectroscopy*, Applied Spectroscopy, Volume 59, 393-400 (2005).
- [5] C. Conti, C. Colombo, M. Realinia and P. Matousek, *Subsurface analysis of painted sculptures and plasters using micrometre-scale spatially offset Raman spectroscopy (micro-SORS)*, Journal of Raman Spectroscopy, Volume 46, 476-482 (2015).
- [6] N. Everall, T. Hahn, P. Matousek, A. W. Parker, and M. Towrie, *Picosecond Time-Resolved Raman Spectroscopy of Solids: Capabilities and Limitations for Fluorescence Rejection and the Influence of Diffuse Reflectance*, Applied Spectroscopy, Volume 55, 1701-1708 (2001).
- [7] N. Everall, T. Hahn, P. Matousek, A. W. Parker, and M. Towrie, *Photon migration in Raman spectroscopy*, Applied Spectroscopy, Volume 58, 591-597 (2004).
- [8] C. Yang, H. Tang, G. Magnotti, *Picosecond Kerr-gated Raman spectroscopy for measurements in sooty and PAH rich hydrocarbon flames*, Proceedings of The Combustion Institute (2020).
- [9] P. Matousek, M. D. Morris, N. Everall, I. P. Clark, M. Towrie, E. Draper, A. Goodship, and A. W. Parker, *Numerical Simulations of Subsurface Probing in Diffusely Scattering Media Using Spatially Offset Raman Spectroscopy*, Applied Spectroscopy Volume 59, 1485-1492 (2005).