

# Appunti di Elementi di Biofotonica I

Botta Francesca,  
Carra Chiara,  
Fendillo Alessandro,  
Frosio Dylan,  
Ghittori Davide,

18/01/2017

Corso tenuto dalla professoressa Laura D'Alfonso nel primo semestre del terzo anno della laurea in Fisica, Università di Milano Bicocca.

Il presente documento sarà diviso in 4 volumi, per questioni di allocamento della memoria dell'editor di testo. Per la trattazione completa si rimanda pertanto ai volumi successivi

# Indice

<b>1 STRUTTURA DELLE MACROMOLECOLE</b>	<b>5</b>
1.1 Introduzione alle molecole biologiche: la struttura . . . . .	5
1.2 Le proteine . . . . .	6
1.2.1 Composizione chimica e legame peptidico . . . . .	6
1.2.2 Struttura primaria delle proteine . . . . .	8
1.2.3 Struttura secondaria delle proteine . . . . .	9
1.2.4 Struttura terziaria delle proteine . . . . .	10
1.2.5 Struttura quaternaria delle proteine . . . . .	12
1.2.6 Folding e paradosso di Levinthal . . . . .	12
1.2.7 Funzione delle proteine . . . . .	15
1.3 Gli acidi nucleici . . . . .	18
1.3.1 Costituenti fondamentali e strutture . . . . .	18
1.3.2 DNA: le strutture . . . . .	19
<b>2 ELEMENTI DI CHIMICA PER LA BIOLOGIA</b>	<b>22</b>
2.1 Introduzione ai concetti e nozioni base . . . . .	22
2.2 Termodinamica Chimica . . . . .	24
2.2.1 Energia libera di Gibbs . . . . .	25
2.2.2 Potenziale chimico . . . . .	28
2.2.3 Equilibrio acido-base . . . . .	31
2.2.4 Pressione osmotica . . . . .	32
2.3 Unfolding delle macromolecole . . . . .	33
2.4 Che solventi usare? . . . . .	35
2.5 I legami . . . . .	35
2.5.1 Il legame covalente . . . . .	36
2.5.2 Il legame ionico . . . . .	37
2.5.3 Legame idrogeno . . . . .	37
2.5.4 Interazioni idrofobiche . . . . .	39
2.5.5 Reazione di condensazione . . . . .	40
2.6 I componenti chimici della cellula . . . . .	41
2.6.1 Carboidrati . . . . .	42
2.6.2 I lipidi . . . . .	44
<b>3 RICONOSCIMENTO MOLECOLARE</b>	<b>47</b>
3.1 I ligandi . . . . .	47
3.2 Il modello semi-empirico di Hill . . . . .	55
3.3 Proteine allosteriche: l'emoglobina . . . . .	58
3.3.1 Equilibri di associazione tra ossigeno e HB. Trattazione MWC . .	62

3.4 Note sulla mioglobina . . . . .	63
-------------------------------------	----

# Capitolo 1

## STRUTTURA DELLE MACROMOLECOLE

### 1.1 Introduzione alle molecole biologiche: la struttura

La biofisica, anche detta *fisica biologica*, è una scienza interdisciplinare che fa uso e sviluppo di teorie e metodi fondati su un approccio tipicamente scientifico, al fine di indagare struttura e proprietà di sistemi biologici. Appare pertanto chiara la necessità di approcciarsi, almeno inizialmente, a questa materia partendo dalla struttura delle macromolecole. A livello nominale, per "*macromolecola*", si intende in genere una molecola di dimensioni molto grandi e peso molecolare molto elevato, nell'ordine delle  $10^3 - 10^{12}$  **unità di massa atomica (u.m.a.)**. Si caratterizzano per i **grandi spostamenti di materia solvente** (in genere acqua) che provocano spostandosi, e per la loro **flessibilità**, necessaria per garantirne il movimento. La struttura è in genere garantita da forze di vario tipo:

- **legami a idrogeno:** poiché nella maggior parte dei casi il solvente è acqua, sono particolarmente diffusi; si tratta di legami intermolecolari moderatamente deboli essendo la loro energia di legame circa  $6\text{kcal/mol}$  ( $10RT$ ) e si formano tra un atomo di idrogeno della molecola di acqua e un atomo di un elemento fortemente negativo del soluto.
- **interazioni covalenti:** si tratta di legami ad alta energia, nell'ordine di  $100\text{kcal/mol}$  ( $60RT$ ).
- **interazioni non leganti:** le interazioni elettromagnetiche mediate dai ponti salini o da forze intermolecolari note come *Forze di Van der Waals*, quali ad esempio i legami dipolo-dipolo o le forze di London.
- **interazioni idrofobiche:** si tratta di un particolare effetto del solvente e posa il suo funzionamento sul principio che l'atomo tende a contrarre un legame per allontanarsi il più possibile dall'acqua.

Pertanto risulta evidente come la stabilità di una generica macromolecola sia dovuta al contributo di diverse interazioni, tra le quali si distinguono fondamentalmente due componenti: una più forte, nell'ordine di  $10^2\text{kcal/mol}$ , caratterizzata dai legami covalenti, e una più debole, caratterizzata da un ordine di grandezza in meno nelle energie coinvolte.

Come suggerisce l'intuizione, l'indagine biofisica della materia - che si poggia principalmente sull'uso della spettroscopia e sull'utilizzo di tecniche fotoniche - si ottiene alterando le condizioni al contorno di modo da disturbare le interazioni deboli; questo **per una duplice ragione**. La prima è che in tal modo la maggior parte delle energie coinvolte cade nello spettro del visibile (ricorda infatti che  $E = h\nu$  e che il visibile si estende da 428-749 THz e che  $h \sim 10^{-34}$ ); la seconda è invece dovuta al fatto che utilizzando energie troppo alte la struttura verrebbe danneggiata in modo permanente e verrebbe meno lo scopo dell'indagine.

Concludiamo la parte introduttiva ricordando che *ogni biopolimero è dotato di 4 strutture*:

1. una struttura primaria, che evidenza la sequenza delle componenti elementari;
2. una struttura secondaria, in cui si mette in luce come effettivamente sono disposti i componenti primari;
3. una struttura terziaria, che descrive come le parti si ripiegano e come interagiscono;
4. una struttura quaternaria, complessiva e che segna l'unione e il formarsi della macromolecola.

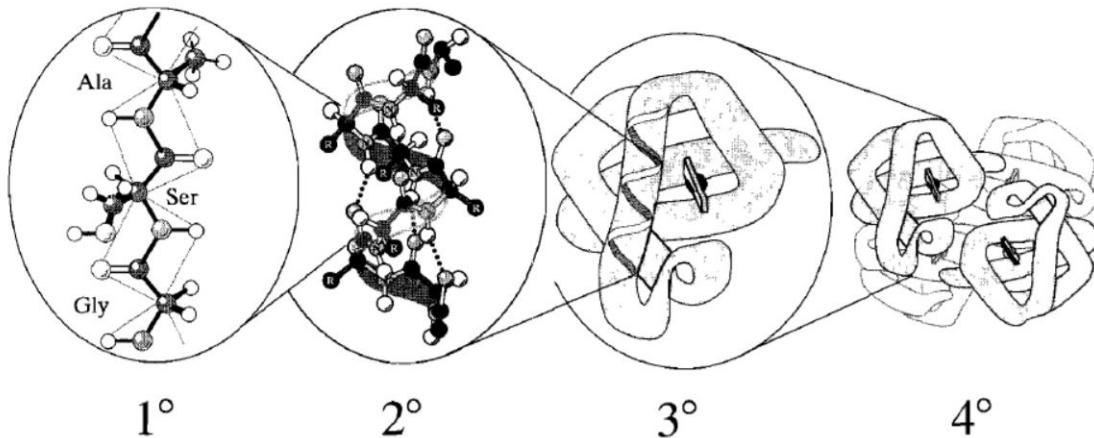


Figura 1.1: Le 4 strutture dei biopolimeri

Esempi tipici di questa struttura sono i **virus**, le proteine, il DNA.

## 1.2 Le proteine

### 1.2.1 Composizione chimica e legame peptidico

Le unità fondamentali delle proteine sono 20  $\alpha$ -amminoacidi, ciascuno dei quali è codificato da un'abbreviazione di tre lettere (o una lettera sola nella forma più compatta) latine. Si tratta di oggetti elementari, costituiti da atomi di carbonio (C), azoto (N), ossigeno (O), idrogeno (H) e localmente zolfo (S).<sup>1</sup> In base al pK e al valore della carica rilevata a pH=7.4,

<sup>1</sup>Storicamente il primo amminoacido scoperto fu, nel 1806, l'*asparagina*, contenuta all'interno degli asparagi.

ovvero guardando alla natura neutra, acida, basica, apolare o polare del gruppo R legato al C- $\alpha$  (vedere oltre per la struttura degli amminoacidi) gli  $\alpha$ -amminoacidi si classificano in cinque diversi gruppi:

- 1) NEUTRI, 2) ACIDI, 3) BASICI, 4) ALIFATICI, 5) AROMATICI

A questa suddivisione si affianca la denominazione di **essenziali** a quei 10 amminoacidi che non possono essere sintetizzati dall'organismo e che pertanto devono essere introdotti per poter essere utilizzati. Da un punto di vista prettamente chimico, la struttura di un  $\alpha$ -amminoacido si compone di:

- un atomo di carbonio centrale, detto **carbonio- $\alpha$**
- un gruppo carbossile  $COO^-$
- un gruppo amminico  $H_3N^+$
- una catena laterale, formata dagli atomi costituenti, e legata al carbonio- $\alpha$ , generalmente indicata con **R**.

Si tratta, secondo il modello VSEPR, di strutture tetraedriche: tutti e 20, ad eccezione della glicina, hanno uno **stereocentro**  $C_\alpha$  (ovvero l'atomo di carbonio centrale è legato a quattro atomi diversi tra loro) e sono **chirali** (ovvero non sovrapponibili alle loro immagini speculari in tre dimensioni).

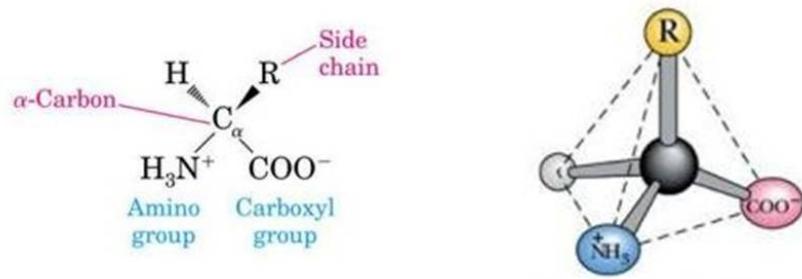


Figura 1.2: Strutture 3-D di un amminoacido

Infine, si possono presentare in due diverse configurazioni:

1. **non-ionica**: in cui la molecola è neutra senza cariche localizzate e può agire da acido o da base
2. **zwitterionica**: in cui la molecola è elettricamente neutra nel suo complesso ma presenta cariche sia positive, sia negative, localizzate. In questa forma, che esiste in soluzione, può giocare il ruolo di uno ione dipolare e quindi di accettore o donore di protoni.

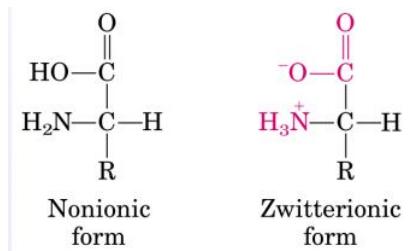


Figura 1.3: Forme elettroniche a confronto

Quanto detto sin qui termina la descrizione dei costituenti elementari. Andiamo quindi a vedere come effettivamente si formano le proteine a partire da essi. Di fondamentale importanza è quanto segue:

***Le proteine sono polimeri di amminoacidi uniti da legami peptidici***

Nello specifico, un legame peptidico avviene tra il -COOH di un amminoacido e il -NH<sub>2</sub> del successivo, con eliminazione di una molecola d'acqua (*condensazione*).

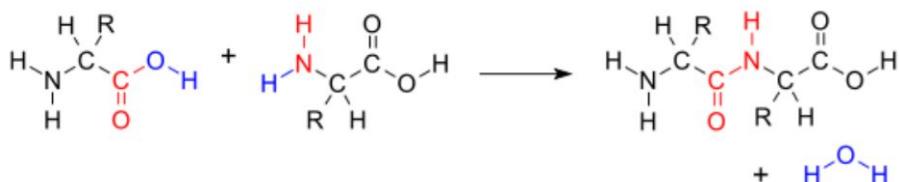


Figura 1.4: Formula di struttura di legame peptidico

Si tratta di un legame **planare**, ovvero tale per cui gli atomi contraenti giacciono sullo stesso piano spaziale; le lunghezze di legame sono dell'ordine dell'**ångström** mentre le catene laterali possono disporsi o entrambe nel medesimo emispazio individuato dal piano di legame (configurazione **cis**) oppure ciascuno in un emispazio diverso (configurazione **trans**). Il passaggio da una configurazione all'altra è detto **isomerizzazione cis-trans**<sup>2</sup> e consiste nella rotazione di una catena di 180°; solitamente si verifica per favorire e minimizzare l'ingombro sterico. Data la struttura tridimensionale del legame è poi evidente che gli angoli tra i singoli componenti contraenti, a legame avvenuto, non sono fissi; a livello nominale esistono due angoli specifici, definiti nel dominio [0,180]°:

- $\phi$ : definito tra il C- $\alpha$  e N
- $\psi$ : definito tra il C- $\alpha$  e il carbonio del CO

La disposizione finale è quella corrispondente al minor ingombro per la struttura nel suo complesso.

### 1.2.2 Struttura primaria delle proteine

La struttura primaria delle proteine consiste nella sequenza lineare e ordinata dei singoli amminoacidi che formano l'intera proteina. Si noti sin da subito che una catena formata

<sup>2</sup>Si tratta di uno dei processi più lenti nell'ambito della formazione delle proteine, nell'ordine di 10<sup>-4</sup>s

da un numero  $n$  di amminoacidi può essere ottenuta con  $20^n$  diverse configurazioni. Il numero di peptidi che è possibile costruire a partire da 20 aa è pertanto enorme. Ogni sequenza ordinata definisce in modo univoco una proteina; tuttavia, visto l'enorme numero di disposizioni possibili si potrebbe pensare di formare un numero pressoché infinito di proteine. Eppure le sequenze che si trovano in natura non sono generate casualmente ma sono figlie di selezioni evolutive. Alcune sottosequenze si ritrovano infatti con maggiore frequenza di altre; per determinarle sperimentalmente si interviene in genere con la biologia molecolare invasiva. Ribadiamo tuttavia l'estrema importanza dell'ordine della sequenza: vasopressina e ossitocina, ad esempio, differiscono per un solo aa, ma svolgono funzioni fortemente diverse, dal momento che la prima è un ormone antidiuretico e il secondo regola le contrazioni dell'utero in fase di parto e la secrezione del latte. Appare quindi evidente l'importanza della struttura secondaria delle proteine.

### 1.2.3 Struttura secondaria delle proteine

La struttura secondaria delle proteine descrive la disposizione degli amminoacidi in porzioni localizzate di una catena polipeptidica. I due tipi più comuni sono:

- $\alpha$ -elica: la catena si avvolge a spirale, in genere in modo destrorso
- $\beta$ -foglietto (o  $\beta$ -sheet): due catene polipeptidiche o sezioni della stessa catena polipeptidica si allineano parallelamente

La struttura ad  **$\alpha$ -elica** è la più diffusa delle due: è delimitata da un atomo di carbonio in basso (*C-terminale*) e da un atomo di azoto in alto (*N-terminale*): essa è tenuta insieme dal fatto che, per ogni aa della sequenza, l'atomo di azoto dona un protone per il legame a idrogeno ad un ossigeno del gruppo CO. L'elica è vuota al centro, è larga 0.54 nm, ha un passo di 0.15nm per aa e la distanza di legame è 2.8 Å. Le catene laterali sono disposte verso l'esterno e per ogni giro di elica sono presenti, in media, 3,6 aa. Si può affermare che tutte le  $\alpha$ -eliche sono destrorse (orientate in senso antiorario), ma esistono alcuni complessi sopramolecolari, ovvero strutture esterne, per cui le eliche sono sinistrorse (ad esempio la cheratina e il collagene). A livello di nomenclatura, un  $\alpha$ -elica si caratterizza con

$$N_m$$

dove N indica il numero di unità per giro e m il numero di atomi nel sistema ciclico del legame H. Si presentano come strutture **robuste**, **insolubili** e di **varia flessibilità**.

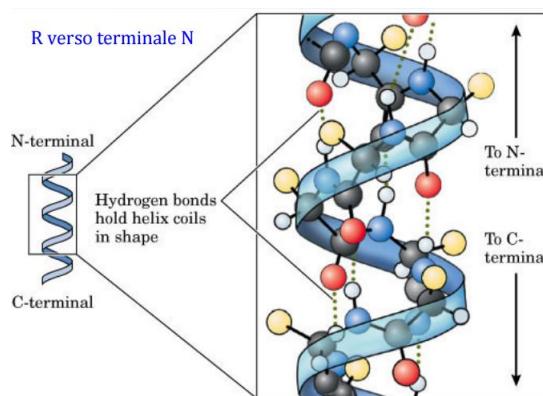


Figura 1.5: Forma e composizione di una  $\alpha$ -elica

La struttura a  **$\beta$ -sheets** è invece più estesa, ed è supportata dai legami a idrogeno che avvengono tra aa distanti<sup>3</sup> lungo la catena. Due catene adiacenti possono correre parallele o antiparallele

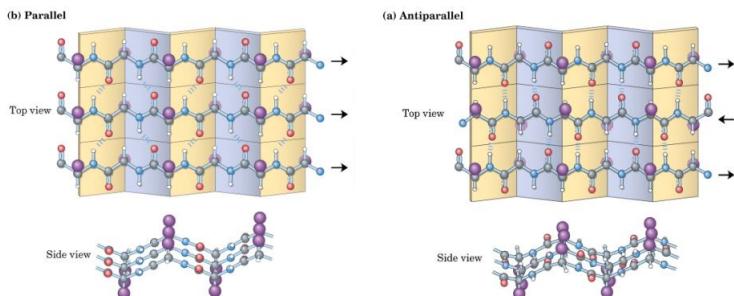


Figura 1.6: Forma e composizione di un  $\beta$ -foglietto

A livello strutturale, i gruppi C=O e N-H di legami peptidici appartenenti a catene (o parti di esse) adiacenti puntano l'uno verso l'altro, in modo da agevolare la formazione del legame a idrogeno. Tutti i gruppi laterali su ciascuna catena si dispongono alternativamente sopra e sotto il piano del foglietto.

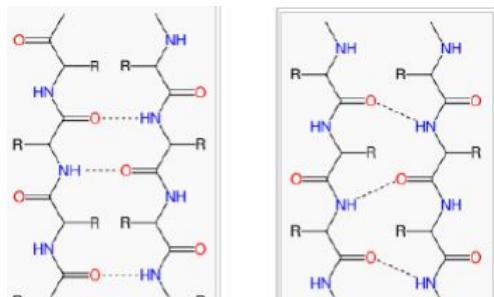


Figura 1.7: Legame a idrogeno in *beta*-foglietti paralleli e antiparalleli

Rispetto alle  $\alpha$ -eliche sono più **morbidi** e **flessibili**.

#### 1.2.4 Struttura terziaria delle proteine

Corrisponde alla conformazione tridimensionale complessiva dell'intera catena polipeptidica ed è definita dai legami e dalle interazioni tra i gruppi -R (che qui saranno indicati con "residui") degli aa. Le interazioni tra residui sono dette "a lunga distanza" poiché avvengono tra gruppi -R di amminoacidi molto lontani lungo la catena, il che favorisce il processo di avvolgimento, noto come *riplegamento proteico* e la formazione di quello che è chiamato lo *stato nativo della proteina*. L'alta flessibilità della struttura terziaria garantisce la formazione di interazioni intermolecolari anche deboli. Infatti esistono quattro modi per stabilizzarla:

1. tramite **legami covalenti**, come ponti disolfuro tra i residui di cisteina;

<sup>3</sup>Tra una giro e l'altro la catena può fare altri tipi di struttura o avvolgimenti casuali. Queste sezioni vengono dette **bend**.

2. tramite **legame a idrogeno**, tra i gruppi polari dei residui, ad esempio tra i gruppi -OH di serina e treonina;
3. tramite **ponti salini** tra gruppi  $\text{-NH}_3^+$  e gruppi  $\text{-COO}^-$ ;
4. tramite **interazioni idrofobiche**, tra residui non polari.

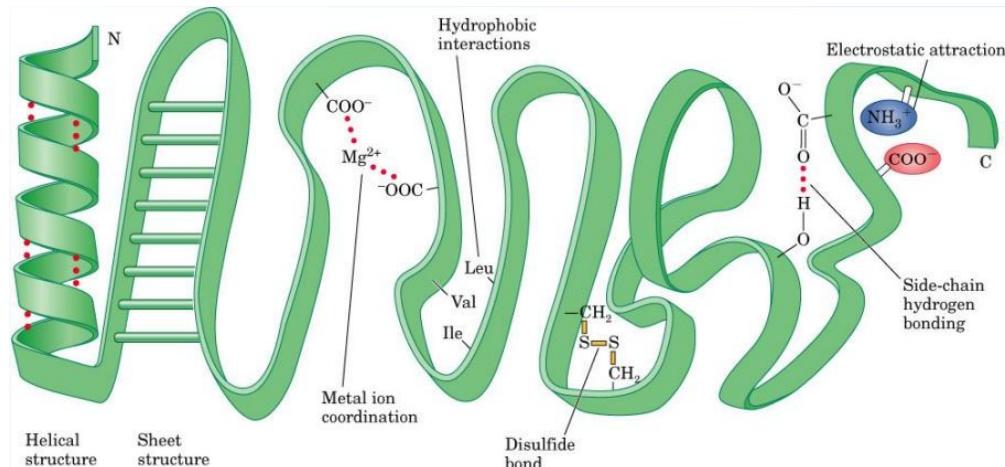


Figura 1.8: Interazioni di struttura terziaria

La forma tridimensionale e più **compatta** delle proteine è invece ottenuta da ulteriori legami, folding ("ripiegamenti") e interazioni tra residui quali legami disolfuri tra cisteine, legami dipolo-dipolo tra gruppi polari e legami idrogeno tra gruppi -R. Da segnalare la notevole limitatezza di estensione di quest'ultima struttura se comparata alle due secondarie:

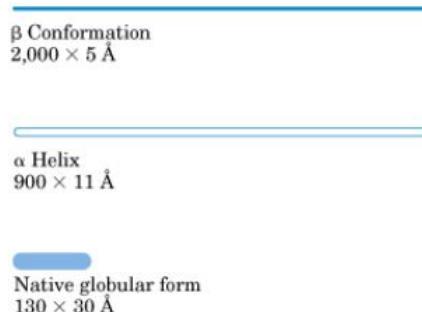


Figura 1.9: Confronto estensioni tra diverse strutture

Concludiamo il paragrafo facendo notare che spesso, all'interno della struttura terziaria, sono presenti componenti chimici *non proteici*, detti **gruppi prostetici**, che tuttavia si associano alla macromolecola tramite legame covalente o legame di coordinazione, affinchè la proteina riesca a svolgere una determinata attività. Vedremo, nella discussione della struttura quaternaria, l'importanza del gruppo prostetico **eme** nella molecola di emoglobina e mioglobina.

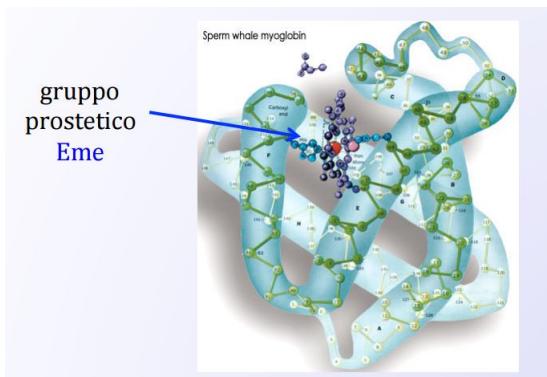


Figura 1.10: Mioglobina con il gruppo prostetico della Porfirina (Fe)

### 1.2.5 Struttura quaternaria delle proteine

Consiste nella disposizione di catene polipeptidiche in aggregati legati in modo non covalente. In particolare si tratta dell'organizzazione spaziale di più molecole proteiche, ciascuna nella propria forma terziaria, in seguito a interazione deboli tra di esse. Le singole catene sono tenute insieme da legami idrogeno, ponti salini e interazioni idrofobiche. Di particolare importanza si ricorda la molecola dell'emoglobina, formata da quattro sub-unità dotate di struttura terziaria e nello specifico da due catene di 141 aa ciascuna e altre due catene da 146 aa ognuna. Ciascuna catena circonda un gruppo eme contenente il ferro. Il cofattore eme deve la sua importanza al fatto che, grazie alla presenza del ferro, può legare l'ossigeno, sia in forma molecolare ( $O_2$ ) sia in altri composti quali ( $CO_2$ ,  $CO$ ,  $H_2O$ ).

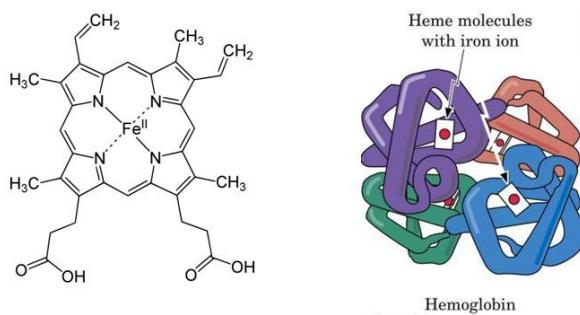


Figura 1.11: Gruppo Eme a sinistra e emoglobina a destra

Un altro esempio di struttura quaternaria interessante è quella del **collagene**, composto da tre catene avvolte strettamente (grazie alla glicina) in una tripla elica, che costituisce circa un quarto di tutte le proteine presenti nell'organismo. Esso forma tendini, legamenti, cornee, cartilagini, fa da tessuto connettivo di supporto per la pelle e gli organi interni, le ossa e i denti. Una carenza di vitamina C può rallentare la produzione di collagene, portando a malattie dei tessuti come lo scorbuto.

### 1.2.6 Folding e paradosso di Levinthal

Nei pragrafi precedenti abbiamo spesso parlato della struttura tridimensionale delle proteine e abbiamo assunto che essa si formi banalmente per interazioni intermolecolari tra gruppi residui di diversi aminoacidi. In realtà il processo di *ripiegamento delle proteine*,

altresì noto come **folding** è un processo particolarmente delicato.

Infatti la proteina deve potersi ripiegare in una struttura tridimensionale che sia **biologicamente attiva** e le informazioni perché ciò avvenga sono contenute nella sequenza di amminoacidi della struttura primaria. Quando una proteina si dispone nella configurazione tridimensionale esatta perché svolga la funzione a cui è predisposta si dice che essa si trova nel suo stato *nativo*. Il procedimento per ottenerlo è però tutt'altro che lineare. Il processo del folding comporta fenomeni di **nucleazione**, ovvero di accrescimento della proteina con formazione di strutture secondarie; formazione di **domini** a seguito dell'interazione tra nuclei; l'unione di domini in una struttura distorta detta **molten globule** o **globulo fuso**<sup>4</sup> e nella sistemazione delle **distorsioni**, fase in cui vengono eliminate molecole d'acqua e la struttura si finalizza, compattandosi.

Appare dunque evidente l'estrema importanza del folding e del fatto che esso avvenga correttamente. È infatti sperimentalmente provato che qualsiasi errore nel processo di avvolgimento può portare a malattie. Le conseguenze dirette a livello molecolare sono infatti di tre diversi tipi: l'incapacità delle proteine ad andare incontro a folding, la formazione di strutture steriche tossiche e, infine, la sbagliata localizzazione intracellulare delle proteine dovuta a folding errato. Nell'organismo il tutto si ripercuote in patologie come fibrosi cistica, scorbuto, huntington, alzheimer. Il delicato ruolo è mediato dai residui che si trovano all'interno della proteina nel suo stato ripiegato. A questo punto ci si potrebbe interrogare sul modo in cui effettivamente la proteina occupa lo spazio tridimensionale a mano a mano che si ripiega. Relativamente a questo aspetto è storicamente noto un enigma noto sotto il nome di *Paradosso di Levinthal*. I termini del problema sono i seguenti: a priori si potrebbe pensare che una proteina si ripieghi nella sua conformazione nativa esplorando casualmente tutte le possibili conformazioni sino a che trovi quella correttamente funzionante. Abbiamo visto nella discussione della isomerizzazione cis-trans che per ogni amminoacido, il corrispettivo residuo possiede due gradi di libertà angolari  $\phi$  e  $\psi$ . Se supponiamo ora che una proteina contenga  $n$  amminoacidi, e quindi  $n$  residui, i gradi di libertà angolari di torsione (tenendo conto della sola sequenza di aa) sono  $2^n$ . Osservando inoltre che la proteina si ripiega nello spazio, ogni angolo di torsione possiede 3 conformazioni stabili: se ne conclude che per la proteina esistono:

$$3^{2n} \simeq 10^n$$

configurazioni. Stimando ora che i singoli legami si orientino con una frequenza di 1 conformazione ogni  $10^{-13}$ s è triviale dedurre che una proteina può esplorare una configurazione ogni  $10^{-13}$  secondi. Il tempo necessario affinché la proteina esplori tutte le disposizioni possibili sarà pertanto

$$t = \frac{10^n}{10^{13}} s = 10^{n-13} s$$

Per una proteina relativamente piccola contenente 100 residui si perviene ad un intervallo temporale di  $10^{87}$  secondi, che non è minimamente confrontabile persino con l'età dell'Universo (stimata essere  $4.3 \times 10^{17}$  s). Tuttavia, l'evidenza sperimentale ci dice che molte proteine si ripiegano nella loro conformazione nativa in meno di pochi secondi. La soluzione al paradosso si trova quindi chiedendo necessariamente che:

---

<sup>4</sup>con quest'ultimo si intende una proteina in uno stato stabile di parziale avvolgimento che si verifica in condizioni di basso pH (generalmente pH=2), struttura secondaria simile a quella della proteina nativa ed una struttura terziaria poco compatta, mancante di rigidità e pertanto particolarmente dinamica come se si trovasse allo stato liquido

- debba esistere un percorso abbastanza preciso e diretto di ripiegamento;
- durante il corretto avvolgimento, la stabilità della struttura proteica aumenti rapidamente rendendo il processo sostanzialmente irreversibile.

Si deve pertanto accettare che il folding sia un processo *cooperativo* e *gerarchico*: alcuni elementi di struttura si formano per primi e quelli che via via si formano guidano il resto della catena polipeptidica nell'assumere la conformazione nativa. Vediamo dunque nel dettaglio **come avviene il folding**:

1. entro 5ms: avviene la nucleazione, ovvero la formazione di segmenti ad  $\alpha$ -elica e  $\beta$ -foglietto.
2. 5-100 ms: prevede la stabilizzazione della struttura secondaria e l'inizio di formazione di quella terziaria: il primo parziale ripiegamento porta con sé il collasso idrofobico, la formazione del globulo fuso e la formazione di sottodomini tra cui il core idrofobico.
3. 100-1000 ms: avviene il consolidamento della struttura terziaria, con l'inizio dell'attività enzimatica e ancora alcuni allineamenti scorretti (distorsioni).
4. nei successivi e eventuali pochi secondi si assiste a riarrangiamenti conformazionali, all'impacchettamento stabile dei residui interni e all'espulsione di molecole d'acqua dal core idrofobico (interno della proteina) e formazione di tutti i legami a idrogeno.

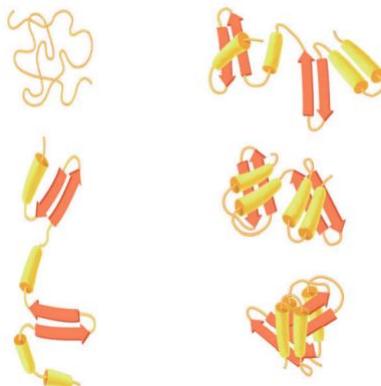


Figura 1.12: Fasi successive dell'avvolgimento (seguire in colonna)

Abbiamo dunque detto che il processo di folding avviene per vie dirette, in tempi brevi e con una stabilità strutturale via via crescente. Quest'ultimo punto significa fisicamente che durante il processo lo stato della proteina passa da una fase iniziale ad alta energia e ad alta entropia, ad una finale a bassa energia e entropia, passando attraverso stati con scale decrescenti di questi due parametri. Questo perché un sistema defoldato ha un numero molto alto di conformazioni possibili (e quindi alta entropia) e ripiegandosi diminuisce gradualmente il numero delle possibili soluzioni per diventare nativa, riducendo progressivamente l'entropia:

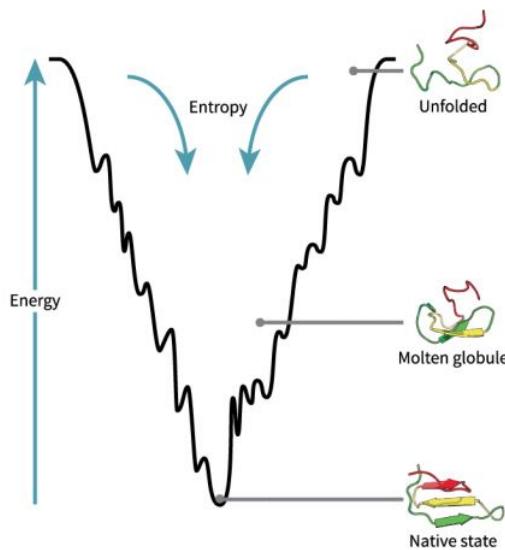


Figura 1.13: Andamento energia del sistema nel processo di avvolgimento

Si noti che il diagramma energia-entropia non è una valle liscia ma presenta un profilo frastagliato. I vari minimi secondari rappresentano configurazioni in cui la proteina può essere temporaneamente intrappolata finché, per attivazione termica casuale, viene superata la barriera di energia libera e procede verso una conformazione a energia minore.

### 1.2.7 Funzione delle proteine

Le proteine vantano un vasto numero di funzioni all'interno di un organismo vivente:

- Strutturale: alcune proteine partecipano alla costruzione della struttura degli esseri viventi. Per esempio, la **cheratina** costituisce la struttura dei capelli e delle unghie.
- Enzimatica: un particolare tipo di proteine sono gli enzimi che svolgono l'importante ruolo di catalizzatori biologici, abbassando l'energia necessaria di una reazione velocizzandone il processo.
- Trasporto: alcune proteine si legano alle sostanze per consentirne il corretto trasporto nell'organismo. Un esempio è l'**emoglobina**, responsabile del trasporto dell'ossigeno dai polmoni alle cellule.
- Immunitaria: la coagulazione del sangue avviene attraverso una proteina chiamata **fibrinogeno**, le interazioni complementari tra proteine e ligandi sono alla base del sistema di riconoscimento self vs non-self del sistema immunitario.
- Contrattile: grazie ad interazioni specifiche tra proteine modulate da energia chimica permettono la contrazione dei muscoli (**actina** e **miosina**).
- Ormonale: molti ormoni, tra cui l'insulina, l'ossitocina e l'ormone della crescita sono proteine.
- Scorta: determinate proteine sono essenziali per l'immagazzinazione di sostanze nutritive, in particolare per i neonati. La ferritina, responsabile dell'immagazzinamento del ferro nel fegato, è un altro importante esempio.

In particolare le proteine con la funzione di trasporto, immunitaria e quelle necessarie al movimento sono accomunate dalla capacità di poter interagire irreversibilmente con altre molecole, e grazie a questa loro capacità riescono a svolgere un ruolo di vitale importanza all'interno del nostro organismo.

La funzione di trasporto delle proteine permette che determinate sostanze possano muoversi con facilità all'interno dell'organismo e possano, per esempio, essere trasportate all'interno della membrana cellulare. Un esempio rilevante di una proteina atta al trasporto di sostanze vitali per il funzionamento dell'organismo è l'**emoglobina**. Come tutte le proteine che legano la molecola O<sub>2</sub> presenta il gruppo prostetico **eme** costituito dallo ione centrale Fe<sup>++</sup> e da un anello eterociclico contenente 4 anelli pirrolo. Di fondamentale importanza è la presenza dell'amminoacido istidina prossimale, essenziale per la traduzione dell'evento di legame: rappresenta il punto di collegamento tra il gruppo eme ed il residuo proteico. La struttura trimidensonale dell'emoglobina (in un essere umano adulto) è composta da 4 sub-unità: due catene  $\alpha$  e due catene  $\beta$  (vedi Figura 1.14).

**NDF:** Per la parte commentata (se la lascio come commento nessuno se ne accorge, LOL): Luca dice che togliendo [H] la referenza va a posto - non è vero ma ok.

e grazie al gruppo eme di ciascuna di esse è in grado di legare quattro molecole O<sub>2</sub>.

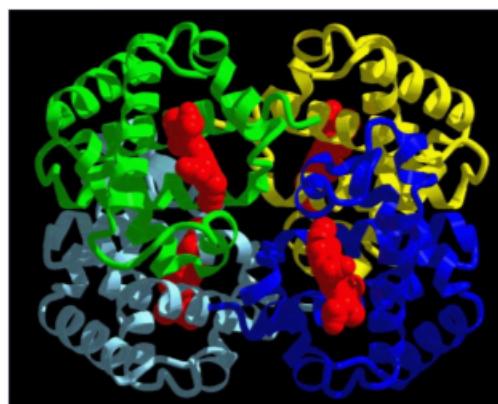


Figura 1.14: Struttura a 4 sub-unità dell'emoglobina

Il legame tra la molecola di O<sub>2</sub> e il Fe provoca lo spostamento dell'**istidina prossimale** e dell'elica a cui appartiene (F). A causa di questo spostamento la configurazione della proteina viene modificata inducendo il movimento della sub-unita  $\beta$  alterando così la conformazione del ferro nei siti non occupati:

Un altro esempio di proteine interagenti con altre molecole sono quelle con funzionalità immunitaria, che permettono all'organismo di rispondere rapidamente e reversibilmente a variazioni ambientali e metaboliche. Questa risposta immunitaria è mediata da proteine che distinguono tra self e non-self permettendo l'attivazione di una diversa risposta:

- Risposta immunitaria **cellulare**: vede l'intervento di **cellule T** che distruggono le cellule ospiti infette da virus;
- Risposta immunitaria **umorale**: le **cellule B** stimolano la produzione di proteine con funzione immunitaria come le immunoglobuline per neutralizzare molecole esterne, virus o batteri.

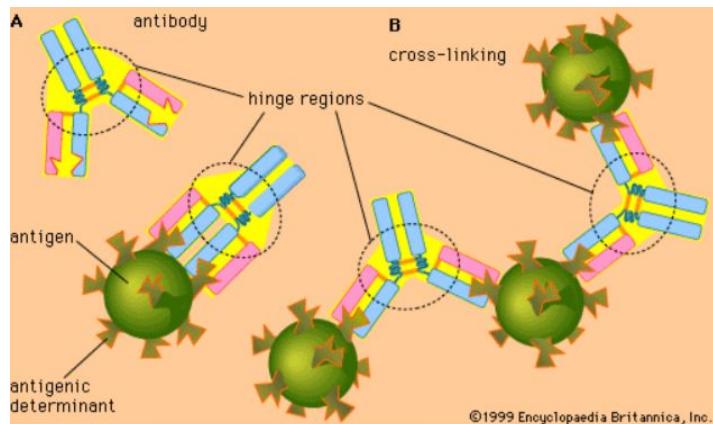


Figura 1.15: Esempio dell'azioni degli anticorpi

L'interazione con altre molecole gioca un ruolo fondamentale anche per quanto riguarda il movimento: la contrazione muscolare è il risultato di una serie di **modificazioni intracellulari coordinate da proteine** che porta al movimento del muscolo stesso. Tale meccanismo si attiva grazie all'interazione del calcio presente nel sangue con l'**actina** delle fibre muscolari. La contrazione è data dallo scorrimento di **filamenti spessi (miosina)** e **sottili (actina)** l'uno sull'altro.

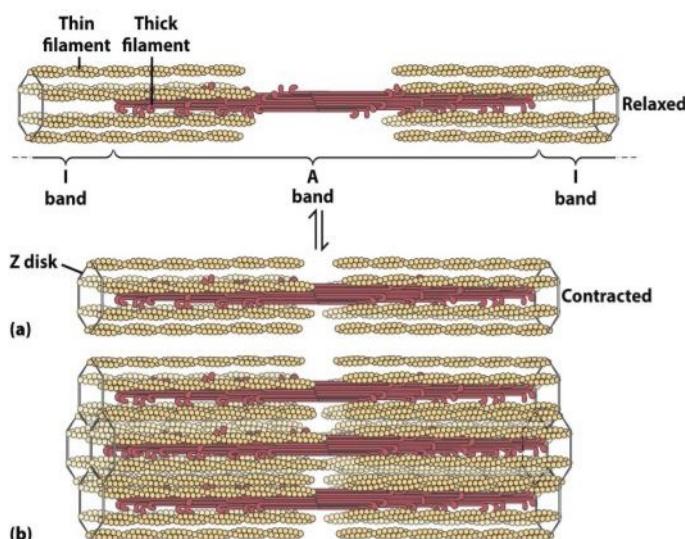


Figura 1.16: Movimento relativo fra i fasci di miosina e actina

Tali movimenti sono dovuti a cambiamenti conformazionali nella testa della miosina a causa dell'idrolisi dell'ATP. Come si può vedere in figura, l'ATP, dopo essersi dissociata dall'actina, interagirà con la miosina. A causa della dissociazione, l'ATP andrà incontro ad un processo di idrolisi, scindendosi in ADP e P<sub>i</sub> e rimarrà associata alla miosina. L'interazione fra le due proteine causerà il rilascio del P<sub>i</sub> che determinerà un movimento relativo fra i due filamenti. Durante questo processo viene rilasciata ADP precedentemente immagazzinata.

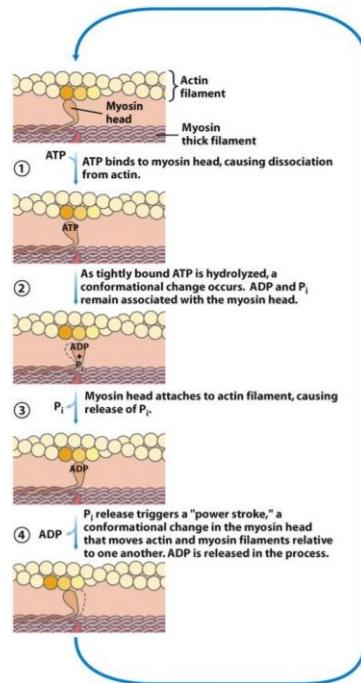


Figura 1.17: Processo di interazioni tra la Miosina e l'ATP

### 1.3 Gli acidi nucleici

#### 1.3.1 Costituenti fondamentali e strutture

Accanto alle proteine, l'altra categoria di biopolimeri che interessa alla biofisica e che storicamente ne ha segnato la nascita sono gli acidi nucleici. Si tratta di macromolecole lineari, i cui costituenti fondamentali sono i **nucleotidi**. Ciascuno di essi è formato da tre gruppi:

- una base azotata purina (adenina o guanina) o pirimidina (citosina, timina o, nel caso dell'RNA, uracile);
- uno zucchero pentoso (a cinque atomi di carbonio), che può essere *ribosio* nell'RNA e *desossiribosio* nel DNA;
- un gruppo fosfato.

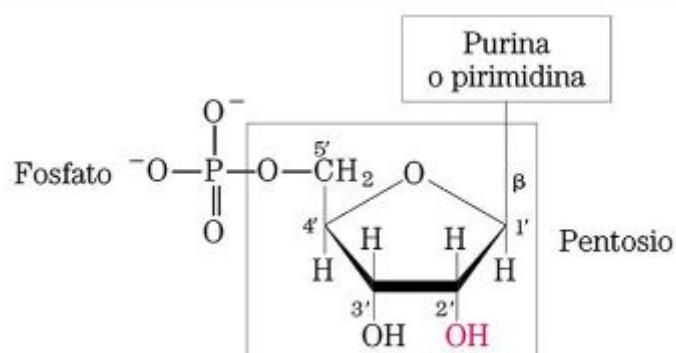


Figura 1.18: Struttura di un nucleotide

Come già visto per gli aminoacidi, ogni nucleotide è individuabile tramite una sigla di tre lettere. Ciò che davvero ci interessa è però il modo in cui si forma un acido nucleico a partire da una base di nucleotidi. Il legame coinvolto in questo processo è chiamato **legame fosfodiesterico**: si tratta di un legame covalente mediato dal gruppo fosfato che collega l'atomo di carbonio in posizione 3' dello zucchero di un nucleotide con il carbonio in 5' del nucleotide successivo.

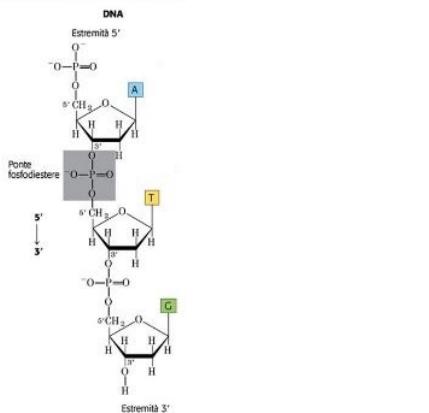


Figura 1.19: Ponte fosfodiesterico per il DNA

### 1.3.2 DNA: le strutture

Quanto detto nel paragrafo precedente esaurisce ciò che si intende per **struttura primaria** di un acido nucleico. Essa coincide con la formula di struttura del polimero ed è univocamente identificata dalla successione delle basi azotate. Nel caso particolare del DNA si ottiene pertanto:

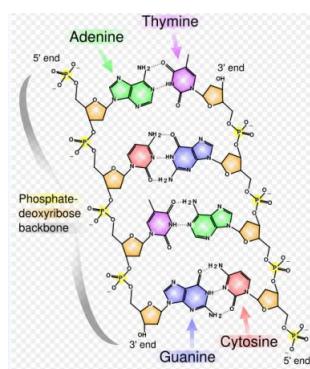


Figura 1.20: Struttura primaria per il DNA

La struttura primaria mette bene in evidenza la presenza di un doppio filamento: i filamenti polinucleotidici sono antiparalleli per consentire alle basi azotate di affrontarsi l'una all'altra. Il filamento con successione di legame 5-3 viene detto **filamento principale**, mentre il filamento complementare con successione di legame 3-5 viene detto **filamento secondario**.

Le basi azotate che si affrontano al centro della doppia elica si legano tra loro con legami ad idrogeno tra basi puriniche e basi pirimidiniche. Per motivi stereochimici la base **adenina** può legarsi solo alla **timina** e la **citosina** solo alla **guanina**. Inoltre nella coppia

A-T si formano 2 legami ad idrogeno, mentre nella coppia C-G se ne formano 3. Analogamente a come fatto per le proteine, la **struttura secondaria** di un acido nucleico si caratterizza per il fatto di mostrare come si dispongono i vari nucleotidi nel legame: ne risulta una doppia elica. Questa particolare struttura consente di mantenere dei parametri costanti. L'appaiamento obbligatorio delle basi azotate A-T e C-G consente di mantenere un diametro di 2 nm della doppia elica. Esso inoltre rende i due filamenti complementari. La distanza tra due basi successive in un singolo filamento è di 0.33 nm e vi sono 10 basi per ciascun giro dell'elica: per cui il passo del DNA è di 3.3 nm

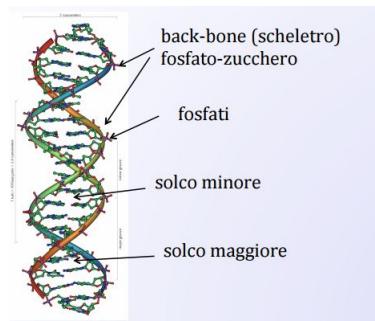


Figura 1.21: Struttura secondaria per il DNA

L'elica B, in Figura 1.21, è tipica del DNA e presenta un solco minore e un solco maggiore alternati, mentre per l'RNA si ha solitamente un'elica A, che parte in doppia elica e termina a filamento singolo. Strutturalmente esistono tre configurazioni possibili per le due eliche:

1. due  **$\beta$ -eliche** destrorse, sicuramente le più diffuse, con 10.5 base-pairs (bp)<sup>5</sup> per giro;
2. una doppia  **$\alpha$ -elica** destrorsa similmente a quanto succede nell'RNA, con 11 bp per giro;
3. una doppia **Z-elica**, con 12 bp per giro, di cui 2 ripetute.

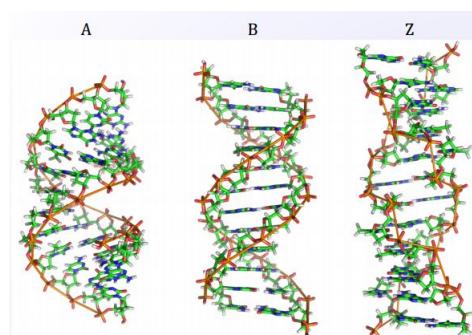


Figura 1.22: Confronto tra le tre strutture secondarie

<sup>5</sup>Le coppie di basi o paia di basi (abbreviate come pb o, dall'inglese base pair, bp o bps) sono comunemente utilizzate come misura della lunghezza fisica di sequenze di acidi nucleici a doppio filamento. Il numero di paia di basi rappresenta il numero di coppie di basi azotate che contiene il filamento in analisi.

La **struttura terziaria** manifesta la solita distribuzione ripiegata nello spazio tridimensionale.

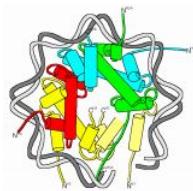


Figura 1.23: Struttura terziaria del DNA

Quando non deve essere utilizzato, il DNA si avvolge su proteine basiche cariche positivamente dette **istonni**. Le unità strutturali così formate si chiamano **nucleosomi**, principali componenti della **cromatina**.

Le interazioni dell'elica con se stessa (linking) possono presentarsi sotto forma di torsioni (twist) o di incroci (writhe). Formalmente ciò obbedisce alla relazione:

$$Lk = Tw + Wr$$

Lo studio spettroscopico del DNA è complicato dal fatto che molte delle molecole intercalanti sono cancerogene, poiché disturbano la riproduzione della catena.

## Capitolo 2

# ELEMENTI DI CHIMICA PER LA BIOLOGIA

### 2.1 Introduzione ai concetti e nozioni base

Per avere un'idea delle grandezze in gioco e del tipo di grandezze che andremo a trattare iniziamo dando le seguenti definizioni:

**Definizione 2.1.0.1.** Si definisce **unità di massa atomica** o **Dalton**, la dodicesima parte della massa di un atomo di  $^{12}C$ .

$$1D = \frac{1}{N_{Av}} g = 1,7 * 10^{-24} g$$

Le proteine in genere sono dell'ordine delle migliaia di Dalton, il DNA è nell'ordine del milione di Dalton, mentre strutture sopramolecolari ne superano il miliardo.

**Definizione 2.1.0.2.** Detto  $M_w$  il peso molecolare di una sostanza, definiamo come una concentrazione **1 molare**:

$$1M = M_w \frac{g}{L}$$

dove con  $L$  si intende un litro di soluzione, da non confondere con la **molalità** che invece considera un litro di solvente.

**Definizione 2.1.0.3.** Il **pH di una soluzione** indica se può essere considerata un **acido** oppure una **base**. Si definisce:

$$pH = -\log_{10}([H_3^+O])$$

Dato un composto  $AH$  che si dissocia in soluzione in  $A^-$  e  $H^+$ , definiamo **costante di dissociazione**:

$$K_d = \frac{[H^+][A^-]}{[AH]}$$

e

$$pK_a = -\log_{10}(K_d)$$

Prima di procedere ricordiamo che in accordo con la teoria di Lewis si classificano:

- *acidi*, le sostanze accettori di coppie elettroniche, e quindi *donatori di protoni*  $H^+$ ;
- *basi*, le sostanze donatori di coppie elettroniche, e quindi *accettori di protoni*  $H^+$ ;
- *l'acqua*, in quanto tale, mostra una lieve tendenza all'autoionizzazione, agendo sia da acido sia da base.

Se dunque ora consideriamo una reazione di ionizzazione,



all'equilibrio chimico e acido-base (ovvero a reazione avvenuta e ad un livello di acidità tale da permettere il normale svolgimento delle attività metaboliche), si introduce la **costante di equilibrio**, definita come il rapporto tra le concentrazioni molari dei prodotti e dei reagenti:

$$K_d = \frac{[A^-][H_3O^+]}{[AH]}$$

dove le concentrazioni sono quelle finali, a equilibrio raggiunto. Sia pertanto  $A_0$  la concentrazione iniziale  $[AH] + [A^-]$ . Si trova

$$\begin{cases} pH = -\log_{10}([H_3O^+]) \\ pK = -\log_{10}(K_d) \end{cases} \implies pK - pH = \log_{10}\left(\frac{[AH]}{[A^-]}\right) = \log_{10}\left(\frac{[AH]}{A_0 - [AH]}\right)$$

da cui:

$$\begin{aligned} &\implies 10^{(pK-pH)}(A_0 - [AH]) = [AH] \iff \\ &\iff [AH] = A_0 \frac{10^{(pK-pH)}}{1 + 10^{(pK-pH)}} \end{aligned}$$

Quella trovata è l'**equazione di Henderson-Hasselbach**, che viene utilizzata principalmente per la costruzione di sistemi tampone che regolino il corretto livello di acidità e basicità nella varie regioni dell'organismo e dell'attività biologica. Se si plotta il pH in ascissa e  $[AH]/A_0$  o  $[A^-]/A_0$  in ordinata si trova un andamento *sigmoidale*.

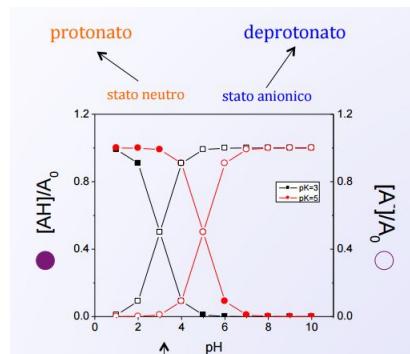


Figura 2.1: Andamento sigmoidale dell'equazione di H-H

Questo fatto è di particolare interesse per la biofisica poiché, come vederemo più avanti, l'indagine spettroscopica si basa sulle proprietà di luminescenza (F-escenza o P-escenza) della materia, e in particolare la fluorescenza di una sostanza dipende dal pH: sia la lunghezza d'onda che l'intensità dell'emissione saranno probabilmente diverse per la forma ionizzata e non ionizzata del composto. I cambiamenti sono dovuti al numero diverso delle specie risonanti associate con le forme acide o basiche delle molecole. A tal proposito va ricordato l'uso sperimentale della GFP (Green Fluorescent Protein), una proteina che, se sottoposta ad assorbimento di luce blu-ultravioletta, risponde con emissione di radiazione verde ed è comunemente usata come sonda biologica. Avere proteine che fluorescono diversamente in base al pH consente di mappare la distribuzione di pH nelle cellule.

In una soluzione neutra, ogni amminoacido che ha un gruppo carbossile ( $COO^-$ ) si comporta da acido e quello che ha un gruppo amminico ( $NH_3^+$ ) si comporta invece da base. In soluzioni a pH basso, però, è possibile che il gruppo carbossile si protonizzi, mentre in soluzioni a pH alto che il gruppo amminico si deprotonizzi. Ciò va a modificare la distribuzione di carica elettrica dell'amminoacido. Anche alcuni residui contengono gruppi ionizzabili che si comportano da acidi o da basi, come la **lisina** o l'**aspartato**. Si definisce perciò per ogni amminoacido il **punto isoelettrico** (pI), ovvero il valore di pH al quale l'amminoacido è globalmente (ma non localmente!) neutro. Per la maggior parte degli amminoacidi questo valore è compreso tra 5 e 7.

## 2.2 Termodinamica Chimica

Iniziamo con una definizione:

**Definizione 2.2.0.1.** *Si chiama **potenziale termodinamico** una grandezza che consente la descrizione delle condizioni di equilibrio di un sistema sottoposto a vincoli.*

Da quanto appena enunciato è chiaro che per diversi sistemi esistono diversi potenziali termodinamici. Vediamo i più importanti:

- Per un sistema isolato (ovvero che non scambi né energia né materia con l'ambiente), a p e V fissate (cioè a energia fissata), il potenziale termodinamico è l'**entropia**. In particolare per tale sistema vale:

$$\Delta S \geq 0$$

e la condizione di equilibrio è quella che massimizza la stessa entropia:  $\Delta S = 0$ .

- Per un sistema aperto (ovvero che scambi sia energia sia materia con l'ambiente), a p e T fissate, il potenziale termodinamico è l'**energia libera di Gibbs**. Per tale sistema essa obbedisce a:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \leq 0$$

dove  $H = E + pV$  è l'entalpia, e la condizione di equilibrio coincide a una minimizzazione dell'energia di Gibbs:  $\Delta G = 0$ .

Ricordiamo ora, prima di procedere, uno degli assunti fondamentali di questa teoria, vale a dire **il primo principio della termodinamica**, secondo cui *dati due stati A e B,*

la variazione di energia interna  $\Delta U = U(B) - U(A)$  è pari alla differenza del calore assorbito  $Q > 0$  e del lavoro compiuto  $W > 0$  dal sistema durante la trasformazione. Per trasformazioni infinitesime si scrive:

$$\delta Q = dE + \delta W \implies dE = \delta Q - \delta W$$

L'energia è cioè un differenziale esatto e vale quindi la sua conservazione, qualsiasi sia il percorso che collega gli stati A e B, anche se irreversibile:

$$\int_A^B (\delta Q - \delta W) = \int_A^B dE = E_B - E_A$$

Al primo principio si affianca il **secondo principio della termodinamica** secondo cui è *impossibile realizzare una trasformazione il cui unico risultato sia trasformare in lavoro tutto il calore assorbito da una sorgente omogenea*. Formalmente si scrive:

$$dS = \frac{\delta Q_{rev}}{T} > \frac{\delta Q_{irr}}{T}$$

Per un gas in espansione reversibile quindi, facendo uso del primo principio, il secondo diventa:

$$TdS = \delta Q = dE + \delta W = dE + pdV$$

da cui si trova subito che per un sistema isolato termicamente e meccanicamente:

$$TdS = dE + pdV \implies dS \geq 0$$

Nel caso in cui sia presente lavoro **non** di espansione svolto o subito dal sistema, ai contributi dovuti al primo principio andrà aggiunto un termine  $-\delta W$  dove con il segno meno si indica il lavoro compiuto dal sistema.

La seconda legge diventa così:

$$TdS = dE + pdV - \delta W \geq 0 \implies \delta W = -TdS|_{E,V}$$

### 2.2.1 Energia libera di Gibbs

Abbiamo dunque ottenuto un'espressione per questo lavoro non espansivo nelle stesse condizioni al contorno in cui l'energia libera di Gibbs G gioca il ruolo di potenziale termodinamico. Notiamo innanzitutto che, per sua definizione,

$$G = H - TS = E + pV - TS$$

ovvero G è scritta in funzione di soli differenziali esatti, il che la rende una **funzione di stato**. Faccendo uso del secondo principio possiamo ora ottenerne:

$$\begin{aligned} dG &= dE + pdV + Vdp - TdS - SdT \\ &= dE + pdV + Vdp - dE - pdV + \delta W - SdT \\ &= Vdp - SdT + \delta W \\ \implies \delta W &= dG|_{p,T} \end{aligned}$$

L'equazione trovata esprime il fatto che, all'equilibrio, un lavoro SUL sistema aumenta G, mentre un lavoro DEL sistema fa diminuire G.

**Esempio 1.** Consideriamo un sistema  $S$  immerso in un ambiente  $B$  contenuto nell'universo  $U$  e supponiamo che essa assorba un calore  $Q_P$  in modo reversibile. Vale sempre che  $dS_u \geq 0$  e che  $dS_B = \frac{\delta Q_{rev}}{T} = -\frac{Q_P}{T}$ . Usando il primo principio sul sistema troviamo che  $Q_P = \Delta E_s + p_s \Delta V = \Delta H_s|_p$ .

Se ora applichiamo il secondo principio sull'universo troviamo

$$\Delta S_B + \Delta S_s = \Delta S_s - \frac{\Delta H_s|_p}{T} \geq 0$$

Ma se, oltre a  $p$ , anche  $T$  è costante, dal lato destro di quanto scritto troviamo:

$$T \Delta S_s - \Delta H_s|_p = -\Delta G_s|_{p,T} \geq 0$$

Quanto appena trovato esprime che, durante una trasformazione, l'energia di Gibbs diminuisce, essendo il differenziale negativo. Questo si traduce fisicamente e chimicamente nella **spontaneità** del processo. Se ora aggiungiamo un lavoro non espansivo:

$$-\Delta G|_{p,T} + W_{ext} \geq 0 \implies W_{ext} \geq \Delta G|_{p,T} \xrightarrow{\text{equilibrio}} W_{ext,max} = \Delta G|_{p,T}$$

Visto lo spessore teorico che lo attorna, è lecito aspettarsi che il potenziale di Gibbs giochi ruoli tanto importanti quanto utili in termochimica. Infatti:

1. L'energia libera di Gibbs è ad esempio importante per calcolare la temperatura  $\mathcal{T}$  di fusione o **melting** di una sostanza (ghiaccio, DNA, ecc...): preso un sistema all'equilibrio, con pressioni e temperature costanti e in assenza di lavori esterni si trova

$$\Delta G|_{p,T} = \Delta H_{fus}|_{p,T} - \mathcal{T} \Delta S_{fus}|_{p,T} = 0$$

da cui:

$$\mathcal{T}^* = \frac{\Delta H|_{p,T}}{\Delta S|_{p,T}}$$

Il sistema passa dunque da uno stato stabile solido, in cui l'energia di Gibbs è positiva, a uno stato liquido stabile, con energia di Gibbs negativa. Alla temperatura trovata avviene il passaggio di stato, con energia di Gibbs nulla, il che corrisponde all'assenza del calore latente del processo (che infatti avviene a temperatura costante). Il differenziale  $\Delta G$  dipende dalla temperatura: quando  $T > T^*$  il processo è spontaneo ed entropicamente favorito.

2. Un'altra importante applicazione dei risultati trovati riguarda l'**energia libera nei gas ideali**, che sono supposti a temperatura fissata. Per essi l'espressione del potenziale termodinamico diventa:

$$dG = VdP - SdT = Vdp = nRT \frac{dp}{p}$$

che integrata su entrambi i domini dà

$$\Delta G = nRT \log \frac{p_f}{p_i}$$

Spesso conviene esprimere non la variazione dell'energia libera, quanto piuttosto direttamente l'energia  $G$ . Per arrivare a ciò l'energia libera deve essere espressa

come differenza rispetto ad uno *stato standard*, con pressione, temperatura e concentrazione fissate a priori.

Se  $G_i^o$  è l'energia libera per mole alla pressione dello stato standard  $P^o = 1 \text{ atm}$ , allora l'energia libera di un gas ideale indicizzato con  $i$  alla pressione *parziale* di  $P_i$ , con  $P$  misurata in atmosfere e  $\Delta G$  espressa come appena visto, è:

$$\begin{aligned} G_i &= n_i G_i^o + \Delta G_i \\ &= n_i G_i^o + n_i R T \log \frac{P_i}{P^o} \end{aligned}$$

Chiamando ora  $P_T = \sum_i P_i$  la pressione totale di tutti i gas che compongono un eventuale sistema misto, e detta, secondo la **legge di Raoult**<sup>1</sup>  $X_i = n_i / \sum n_i = P_i / P_T$  la **frazione molare** del gas  $i$ -esimo, si trova che l'energia libera necessaria diluire un gas dalla pressione  $p_T$  alla pressione  $p_i$  è  $\Delta G = nRT \log X_i$

3. In modo analogo a quanto fatto per sistemi gassosi discutiamo ora **l'energia libera per soluzioni ideali**. Se in un gas ideale si suppongono trascurabili le forze intermolecolari, in una soluzione ideale si fa l'ipotesi che tutte le forze coinvolte (tra molecole di soluto e tra soluto e solvente) siano uniformi e uguali tra loro. Rispetto al caso del gas ideale quindi, l'energia libera vede ogni termine  $G_i^o$  sostituito con un termine  $i$ -esimo, corrispondente all'energia libera molare del componente  $i$  puro, ovvero non miscelato e considerato nella stato con frazione molare unitaria ( $X^{\bullet}1$ ). Si troverà pertanto, procedendo come sopra che, per soluzioni ideali:

$$\begin{aligned} G_i &= n_i G_i^{\bullet} + \Delta G_i \\ &= n_i G_i^{\bullet} + n_i R T \log \frac{X_i}{X^{\bullet}} \\ &= n_i G_i^{\bullet} + n_i R T \log X_i \end{aligned} \tag{2.1}$$

Concludiamo il paragrafo sulle soluzioni con un occhio alle concentrazioni in gioco. se consideriamo infatti una soluzione diluita, fatta di un solvente A e di un soluto B, la frazione molare del soluto sarà

$$X_B = \frac{n_B}{(n_A + n_B)} \simeq \frac{n_B}{n_A}$$

mentre la concentrazione molare sarà espressa dal numero di moli di soluto diviso i litri di soluzione, ovvero

$$C_B = \frac{n_B}{\text{litro soluzione}} = \frac{n_A}{\text{litro soluzione}} X_B$$

Se la soluzione è diluita, si possono approssimare i litri di soluzione con quelli di solvente, trovando:

$$C_B = \frac{n_A}{\text{litro solvente}} X_B = \frac{m_A / M_A}{m_A / (1000 \rho_A)} X_B = \frac{1000 \rho_A}{M_A} X_B [\text{mol/L}]$$

---

<sup>1</sup>"Ogni gas componente esercita una pressione parziale, proporzionalmente al numero di moli che lo compongono =  $p_i = x_i p_T$ "

Questo ci consente di riscrivere la 2.1 sostituendo la frazione molare con la concentrazione molare proporzionale come:

$$\begin{aligned} G_i &= n_i G_i^{\circ} + n_i RT \log \frac{C_i}{C^{\circ}} \\ &= n_i G_i^{\circ} + n_i RT \log C_i \end{aligned} \quad (2.2)$$

che mette direttamente in luce la dipendenza tra energia libera e concentrazione del soluto in una **soluzione ideale diluita**.

## 2.2.2 Potenziale chimico

Consideriamo un sistema aperto, che possa scambiare sia termicamente che meccanicamente. L'equilibrio per scambio di energia è definito come uguaglianza tra temperature. L'equilibrio per scambio di particelle corrisponde invece all'uguaglianza di una nuova grandezza che qui introduciamo, ovvero il *potenziale chimico*. Diamone subito una definizione:

**Definizione 2.2.2.1.** Si chiama **potenziale chimico** la grandezza intensiva che descrive la velocità di cambiamento dei potenziali termodinamici (solitamente estensivi), con il numero di molecole:

$$\mu = \left. \frac{\partial E}{\partial n} \right|_{S,V}$$

La sua importanza nel descrivere condizioni di equilibrio è evidente se si considera banalmente quanto segue: immaginiamo di avere una soluzione fisica all'equilibrio, a melting avvenuto. Se cambio il numero di molecole o moli di soluzione, quando un nuovo equilibrio sarà stato raggiunto sarà cambiata l'energia interna di ogni molecola. Il potenziale chimico può quindi essere interpretato come *l'energia interna di una singola particella*. Il primo principio della termodinamica si scriverà allora:

$$dE = TdS - pdV + \mu dn \quad (2.3)$$

Dalla definizione di energia libera di Gibbs si può poi dedurre:

$$dG = -SdT + Vdp + \mu dn \xrightarrow[\text{con } dE]{\text{analogia}} \mu = \left. \frac{\partial G}{\partial n} \right|_{p,T}$$

Si può dimostrare, analogamente a quanto fatto nel paragrafo precedente, che valgono:

$$\left\{ \begin{array}{ll} \mu_i = \mu_i^{\circ} + RT \log P_i & \text{per gas ideali} \\ \mu_i = \mu_i^{\bullet} + RT \log X_i & \text{per soluzioni ideali} \\ \mu_i = \mu_i^{\bullet} + RT \log C_i & \text{per soluzioni ideali diluite} \end{array} \right.$$

**Esempio 2.** Abbiamo detto in apertura che l'equilibrio per un sistema aperto è espresso dalla relazione  $\Delta G = 0$ , vale a dire:

$$dG|_{p,T} = \sum_i \mu_i dn_i = 0$$

Se consideriamo dunque l'equilibrio tra un soluto  $A$  e un solvente  $A^*$ , a pressioni e temperatura fissate, possiamo scrivere.

$$G = \mu_A n_A + \mu_{A^*} n_{A^*}$$

Ora, il numero complessivo di moli è  $n = n_A + n_{A^*}$  e ovviamente si conserva, ragion per cui

$$dn = dn_A + dn_{A^*} = 0 \implies dn_A = -dn_{A^*}$$

Ma allora,

$$dG = dn_A(\mu_A - \mu_{A^*}) = 0 \xrightarrow{\text{equilibrio}} \boxed{\mu_A = \mu_{A^*}}$$

Procediamo e capiamo il vero **significato fisico** del potenziale chimico. Dalla 2.3 otteniamo l'espressione per l'entropia e imponiamo la condizione del secondo principio:

$$dS = \frac{dE}{T} + \frac{p}{T}dV - \frac{\mu}{T}dn \geq 0 \quad (2.4)$$

Notiamo che:

- se  $dE_i \neq 0$  e  $dn=dV=0$ , la 2.4 produce, essendo  $dE_{tot} = dE_1 + dE_2 = 0$

$$dS_{tot} = \sum_i \frac{dE_i}{T_i} = \frac{dE_1}{T_1} + \frac{dE_2}{T_2} = dE_1 \left( \frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right)$$

$$dS_{tot} \geq 0 \implies T_1 < T_2$$

ovvero lo scambio di energia avviene spontaneamente dal sistema a temperatura maggiore a quella a temperatura minore, come ovvio.

- se  $dE_i = dV = 0$  e  $dn_i \neq 0$ , la 2.4 esprime invece:

$$dS_{tot} = - \sum_i \mu_i \frac{dn_i}{T_i} = -\frac{1}{T} (\mu_1 dn_1 + \mu_2 dn_2) = \frac{dn_1}{T} (\mu_2 - \mu_1)$$

$$dS_{tot} \geq 0 \implies \mu_1 < \mu_2$$

che ci dice che **lo scambio di particelle avviene dal sistema con potenziale chimico maggiore a quello con potenziale chimico minore** (ricorda infatti la diretta proporzionalità tra potenziale chimico e energia libera).

Se si ha a che fare con un sistema a multicomponenti, (in genere si tratta di una soluzione, che per semplicità di trattazione considereremo diluita e ideale) occorre tener conto dell'energia libera di singola particella per ciascuna delle componenti quindi l'energia di Gibbs assume la forma:

$$dG = VdP - SdT + \sum_i \mu_i dn_i \implies dG|_{p,T} = \sum_i \mu_i dn_i = \sum_i \left( \frac{\partial G}{\partial n_i} \right)_{p,T} dn_i$$

e integrando su entrambi i domini<sup>2</sup>.

$$\sum_i \mu_i n_i = G = E + pV - TS$$

---

<sup>2</sup>Il fatto che  $G = \sum \mu_i n_i$  implica che il differenziale sia  $dG = \sum d\mu_i n_i + \sum \mu_i dn_i$ . Tuttavia la prima somma è nulla poiché vale l'**equazione di Gibbs-Duhem** secondo cui  $\sum N_i d\mu_i = -SdT + Vdp$ . Pertanto, date le ipotesi del problema è corretto integrare solo una componente del differenziale

La 2.2 si può così riscrivere:

$$\begin{aligned} G &= \sum_i n_i G_i^o + \sum_i n_i RT \log C_i \\ &= \sum_i \mu_i^o n_i + RT \sum_i n_i \log C_i \end{aligned} \quad (2.5)$$

Sappiamo che la condizione di equilibrio si ottiene imponendo nullo il differenziale dell'energia, pertanto si semplifica il problema a due soli sistemi

$$\begin{aligned} G &= n_A \mu_A + n_B \mu_B \\ dG = 0 &\implies dn_A (\mu_A - \mu_B) = 0 \implies \boxed{\mu_A = \mu_B} \end{aligned}$$

il che conferma quanto avevamo già visto nell'esempio con il solvente e il soluto.

Chiedendo l'equilibrio utilizzando la forma 2.5 dell'energia libera troviamo (normalizzando le moli per comodità):

$$\begin{aligned} \mu_A^o + RT \log C_A &= \mu_B^o + RT \log C_B \\ \implies \log \left( \frac{C_B}{C_A} \right) &= -\frac{\mu_B^o - \mu_A^o}{RT} = -\frac{\Delta G_{B \rightarrow A}^o}{RT} \\ \implies \left( \frac{C_B}{C_A} \right) &= \exp \left[ -\frac{\Delta G_{B \rightarrow A}^o}{RT} \right] = K_{eq} \end{aligned} \quad (2.6)$$

in cui abbiamo pertanto definito la **costante di equilibrio**.

In condizioni standard troviamo quindi:

$$\Delta G_{B \rightarrow A}^o = -RT \log K_{eq}$$

e

$$pK_{eq} = -\log_{10} K_{eq} = -\frac{\log \left[ -\frac{\Delta G_{B \rightarrow A}^o}{RT} \right]}{\log 10} = \frac{\Delta G_{B \rightarrow A}^o}{2.3RT}$$

Generalizziamo ora al caso di una reazione chimica con un numero arbitrario di reagenti e conseguentemente di prodotti. La condizione di equilibrio chimico-fisica sarà quindi rappresentabile come, indicando R e P, rispettivamente, *reagenti* e *prodotti* della reazione:

$$\sum_{i=1}^R \nu_i r_i \iff \sum_{i=R+1}^{R+P} \nu_i p_i$$

Al solito vale

$$\begin{cases} dn &= dn_r + dn_p = 0 \\ dn_i &= -\nu_i dn & i = 1, \dots, R \\ dn_i &= +\nu_i dn & i = R+1, \dots, R+P \end{cases}$$

e quindi procedendo identicamente al caso a due sistemi, sempre in ipotesi di soluzione ideale diluita:

$$dG = dn \left( \sum_{i=1}^R \nu_i \mu_i \right) - dn \left( \sum_{i=1+R}^{R+P} +P \nu_i \mu_i \right) = 0 \quad (2.7)$$

da cui si calcola, avanzando come in 2.7

$$\log \left( \frac{C_{1+R}, \dots, C_{R+P}}{C_1, \dots, C_R} \right) = -\frac{\sum_{i=1}^R \nu_i \mu_i^o - \sum_{i=1+R}^{R+P} \nu_i \mu_i^o}{RT} = -\frac{\Delta G_{R \rightarrow P}^o}{RT} \quad (2.8)$$

che ci porta alla relazione fondamentale

$$\boxed{\Delta G_{R \rightarrow P}^o = -RT \log K_{eq}} \quad (2.9)$$

La relazione logaritmica tra l'energia libera e la costante di equilibrio ci mostra che **un piccolo cambiamento** (rispetto a RT) **di  $\Delta G^o$  a seguito di una reazione, influenza in maniera enormemente apprezzabile la posizione dell'equilibrio.**

Si osservi che *anche pH e pK sono funzioni logaritmiche*. Trattando soluzioni ideali, ci si potrebbe allora chiedere **quale relazione esista tra  $K_d$  ed energia libera di Gibbs**. Definiamo:

$$x_i = \frac{n_i}{\sum_{k=1}^M n_k}$$

in cui n sono il numero di moli per ogni specie e M il numero di specie diverse in soluzione. Con ciò, se  $K_d = \frac{x_A x_H}{x_A H}$ , si ha immediatamente:

$$\frac{\Delta G_d}{KT} = -\log(K_d)$$

N.D.D.: Qua ci ha posto il problema di  $K_d$  che, non essendo una quantità adimensionale, non ha molto senso come argomento di un logaritmo. Era la fine dell'ora e a noi ce ne fregava proprio zero, quindi ha liquidato quella slide dicendo che era colpa di un termine costante che viene trascurato usando le concentrazioni.

### 2.2.3 Equilibrio acido-base

Un acido o una base deboli non si dissociano completamente in soluzione, quindi abbiamo un equilibrio tra la specie dissociata della molecola ( $A^-$ ) e quella non dissociata (AH). Si definisce dunque **costante di dissociazione  $K_d$**  il rapporto:

$$K_d = \frac{[H^+][A^-]}{[AH]}$$

Ma quando si prepara una soluzione si ha controllo solo sulla concentrazione di sostanza totale  $[A]_t = [A^-] + [AH]$ , quindi è bene esprimere la concentrazione dei due stati possibili della molecola in funzione di quantità tabulate o misurabili. Sostituiamo dunque:

$$pK_d = -\log_{10} K_d = -\log_{10} \frac{[H^+](A_t - [AH])}{[AH]}$$

Invertiamo il logaritmo ed estraiamo il pH:

$$pK_d = \log_{10} \frac{[AH]}{[A]_t - [AH]} + pH$$

otteniamo infine un'espressione di [AH] in funzione di  $[A]_t$ , pH e  $pK_d$ :

$$[AH] = \frac{[A]_t}{1 + 10^{pH-pK_d}}$$

da cui si ricava anche

$$[A^-] = \frac{[A]_t}{1 + 10^{pK_d-pH}}$$

### 2.2.4 Pressione osmotica

La concentrazione di sali è di vitale importanza per i materiali biologici: una differenza di concentrazione induce una pressione osmotica sulle membrane semipermeabili; vediamo come. Consideriamo il sistema costituito da due soluzioni (A e A+B) all'equilibrio, con concentrazioni diverse dei componenti A (solvente) e B (soltu). Supponiamo più precisamente che la soluzione A sia costituita da solvente puro (A). Le due soluzioni sono separate da una membrana permeabile dal solo componente A.

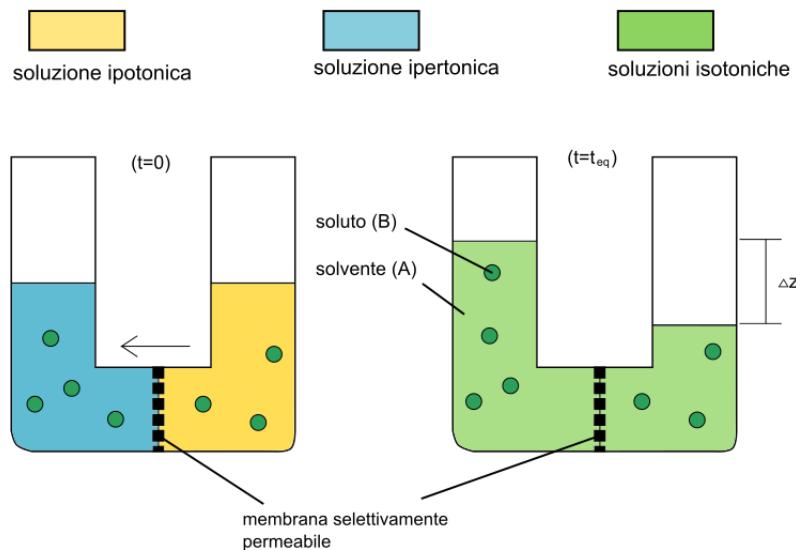


Figura 2.2: Esempi di soluzioni in equilibrio.

Essendo le due soluzioni a contatto tramite la membrana, all'equilibrio avremo l'u-gaglianza dei potenziali chimici del componente A nelle due soluzioni, ovvero:

$$\mu_a^{(A+B)} = \mu_A^o + RT \log(x_a) + V_a \rho g h$$

dove  $V_a$  è il volume occupato da 1 mole di solvente, mentre definiamo **pressione osmotica**  $\pi$  la quantità  $\rho g h$ . Siccome  $\mu_a^{(A)} = \mu_A^o$ , possiamo scrivere

$$RT \log(x_a) + V_a \pi = 0$$

Con una serie di approssimazioni, valide se il solvente è presente in quantità molto maggiore del soluto

$$V \simeq n_a V_a \simeq n_{tot} V_a$$

e

$$RT \log(1 - x_b) \simeq -RT x_b$$

otteniamo dunque

$$\frac{V}{n_{tot}} \pi = RT \frac{n_b}{n_{tot}}$$

$$\pi V = n_b R T$$

si può quindi dire che un sale in soluzione esercita una pressione osmotica alle pareti pari a

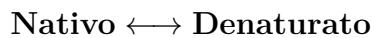
$$\pi = C_b RT$$

pertanto una cellula immersa in una soluzione ipertonica (tanto soluto) tenderà a rilasciare acqua e raggrinzirsi, mentre in una soluzione ipotonica (poco soluto) assorbirà acqua fino ad **esplosione**.

**DAVIDE HELP US: SLIDES DA 57 A 59 LEZIONI 041016**

### 2.3 Unfolding delle macromolecole

Si tratta di un processo di denaturazione delle macromolecole biologiche, a seguito del quale un sistema biofisico si ritrova in uno stato diverso da quello nativo e non più biologicamente attivo. La trasformazione che andremo a studiare sarà quindi del tipo:



La costante di equilibrio per questa reazione è quindi

$$K = \frac{\text{concentrazione denturato}}{\text{concentrazione nativo}} = \frac{C_D}{C_N}$$

In genere, i processi di denaturazione comportano una forte variazione di entalpia e di conseguenza l'espressione della costante di equilibrio inizia a dipendere fortemente dalla temperatura, secondo relazioni non sempre ottenibili esattamente. Se tuttavia si fa l'ipotesi di poter trascurare questa dipendenza dalla temperatura, possiamo scrivere

$$K = \exp\left(\frac{-\Delta G^\circ}{RT}\right) = \exp\left(\frac{-\Delta H^\circ + T\Delta S^\circ}{RT}\right) \quad (2.10)$$

con  $\Delta H^\circ$  e  $\Delta S^\circ$  tabulati a seconda del tipo di macromolecola che si considera. Sia  $\theta$  la frazione di molecole nella forma nativa:

$$\theta = \frac{C_N}{C_D + C_N} = \frac{C_N}{KC_N + C_N} = \frac{1}{1 + K(T)}$$

ove la dipendenza dalla temperatura di  $K$  è immediata da 2.10.

Il risultato, se graficato, è quello mostrato nella figura 2.3

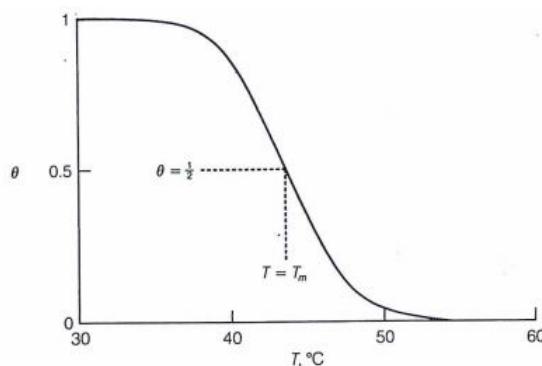


Figura 2.3: Curva di denaturazione per chimotripsina, a pH=2. La temperatura di melting è 43.7 °C. A questa temperatura la molecola ha la stessa probabilità di essere nello stato nativo o denaturato.

Il processo di denaturazione è spesso detto **cooperativo**; per capirne il motivo si consideri quanto segue. Ciascuno dei molti legami non covalenti che stabilizzano la struttura foldata di una macromolecola contribuiscono soltanto in minima parte in termini di energia o entalpia nel corso del processo di folding, ma il loro numero è molto elevato. In questo modo se tutti *cooperano* tra di loro rompendosi insieme, i singoli piccoli contributi si sommano in un effetto ben più importante ed evidente, come messo in luce dal grafico appena discusso. La denaturazione segue pertanto un percorso mediato da agenti chimici e/o fisici. Tra i principali fattori responsabili del fenomeno si annoverano il calore, acidi, basi, detergenti, sali terziari, agenti riducenti, metalli pesanti e alcol che vanno ad alterare principalmente i ponti disolfuro, le regioni idrofobiche e i legami a idrogeno.

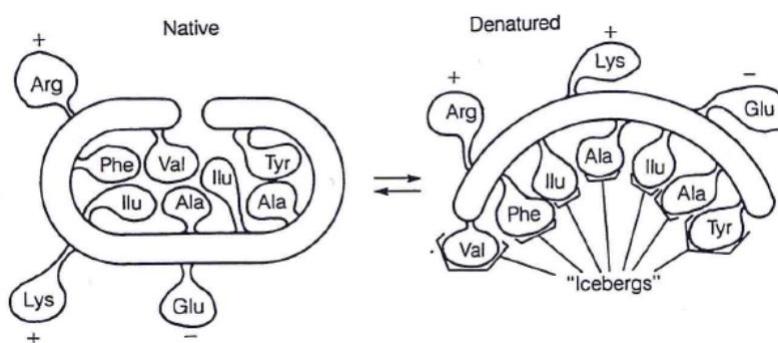


Figura 2.4: Denaturazione di una proteina. Le parti non polari delle catene all'interno sono esposte ai solventi acquosi. È comunque importante notare che le molecole d'acqua tendono a disporsi in maniera più ordinata attorno alle componenti non polari (*i tipici "icebergs"*) dando un contributo negativo (e quindi non spontaneo) alla variazione di entropia del sistema nel corso della trasformazione.

Come conseguenza dell'alta variabilità di processi possibili, alcune denaturazioni sono **reversibili** (*unfolding*), altre **danneggiano** la macromolecola in modo **permanente** (*misfolding*).

Vediamo quindi di fornire un modello matematico a quanto si sta dicendo. Cerchiamo il minor numero possibile di ipotesi che soddisfano i dati sperimentali. Il modello più semplice è quello a due stati, nativo e denaturato:  $f_N \leftrightarrow f_D$ . Ad ogni stato sarà ragionevolmente associata un'osservabile ( $y_N, y_D$ ):

$$\begin{cases} f_N, f_D : f_N + f_D = 1 \wedge f_D = C_D, f_N = C_N \\ y, y_N, y_D : y = y_N f_N + y_D f_D \end{cases}$$

Riprendendo la 2.10 possiamo scrivere<sup>3</sup>:

$$\frac{f_D}{f_N} = K_D = e^{-\Delta G_D / RT} = \frac{(y - y_N)}{(y_D - y)} \quad (2.11)$$

con

$$f_D = \frac{y - y_N}{y_D - y_N}; \quad f_N = \frac{y - y_D}{y_N - y_D}$$

<sup>3</sup>Vale infatti che  $\frac{y - y_N}{y_D - y} = \frac{y_N f_N + y_D f_D - y_N}{y_D - y_N f_N + y_D f_D} = \frac{y_N(f_N - 1) + y_D f_D}{y_D(1 - f_D) - y_N f_N} = \frac{y_N(f_N + f_D - f_D) + y_D f_D}{y_D(f_N + f_D - f_D) - y_N f_N} = \frac{f_D(y_D - y_N)}{f_N(y_D - y_N)}$

Aggiungendo dall'esterno un agente denaturante, possiamo supporre che esso agisca sulla  $\Delta G_d$  del processo il modo lineare<sup>4</sup>, favorendo lo stato denaturato

$$\Delta G_D = \Delta G_D^{H_2O} - mC_{denaturante}$$

e, quando  $\Delta G_d = 0$

$$\Delta G_D^{H_2O} = m \cdot C_{mid}$$

risolvedo per la variabile y:

$$y = \frac{y_N + y_D e^{-\Delta G_D/RT}}{1 + e^{-\Delta G_D/RT}} = \frac{y_N + y_D e^{-(\Delta G_D^{H_2O} - mC_{denaturante})/RT}}{1 + e^{-(\Delta G_D^{H_2O} - mC_{denaturante})/RT}}$$

Da 3 ipotesi ottengo dunque delle curve di denaturazione.  $y_n$  e  $y_d$  sono noti dai massimi delle curve e abbiamo  $C_{mid}$ . Resta solo da determinare m (con un fit).

## 2.4 Che solventi usare?

Come spesso accade in chimica, vale la regola "simile scioglie simile". Ciò significa che una sostanza polare si scioglie più facilmente in un solvente polare, come l'acqua, mentre sostanze apolari preferiranno un solvente apolare, come l'etanolo.

È dunque possibile misurare indirettamente la polarità di una molecola con una misura di solubilità/solvatazione. La solubilità in soluzione può essere misurata dalla differenza in energia libera di Gibbs fra cristallo puro e soluzione. Una misura simile è però poco pratica, quindi in genere si misura la preferenza tra due solventi. Infatti si può vedere che

$$\Delta\Delta G_{solu} = \Delta G_{solu}(eth) - \Delta G_{solu}(acqua) - (\Delta G_{solu}(acqua) + \Delta G_{solu}(eth)) = \Delta G_{solu}(eth) - \Delta G_{solu}(acqua)$$

Valori di  $\Delta\Delta G$  positivi indicano una preferenza per i solventi polari, tratto mostrato dalla maggior parte degli amminoacidi singoli. Le catene laterali preferiscono in genere un ambiente apolare.

Sebbene sia in teoria possibile stimare quanto una proteina preferisca un particolare solvente, i metodi per ricavare questa informazione sono approssimativi e pieni di eccezioni. Uno di questi metodi consiste nella sommatoria della  $\Delta\Delta G$  di ogni aa, pesato con la probabilità di trovarlo nella proteina. Un secondo metodo prevede di fare il rapporto tra gli aa polari e quelli apolari che contiene la proteina. I risultati migliori si ottengono da una combinazione lineare dei due metodi.

## 2.5 I legami

Molte delle strutture finora studiate fanno riferimento a elementi più piccoli che si combinano mediante un legame stabile per formare nuove sostanze. Esistono più tipi di legami che variano in base alle particelle partecipanti al legame, i principali sono:

- Il legame covalente
- Il legame ionico
- Il legame idrogeno

Esistono altri tipi di legami, ma fondamentalmente quelli a noi necessari sono questi.

---

<sup>4</sup>Questo modello è appunto detto LEM: linear energy module.

### 2.5.1 Il legame covalente

Si basa sullo **scambio "paritario"** di una o più coppie elettroniche dette **coppie leganti**. È un legame che si forma fra due atomi non metallici, la cui differenza di elettronegatività è compresa fra **0 e 1,7**.

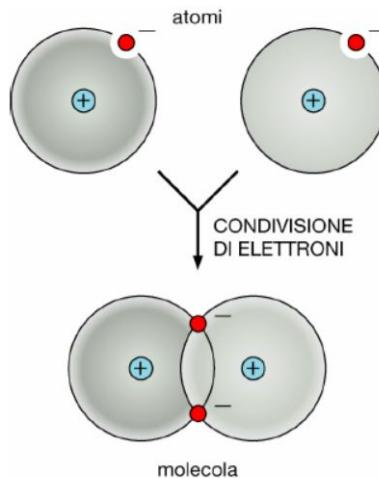


Figura 2.5: Esempio di un legame covalente

Il legame covalente si suddivide a sua volta in altri due tipi di legame:

- Il legame covalente apolare
- Il legame covalente polare

Ciò che differenzia i due legami è la differenza di elettronegatività fra i due atomi partecipanti al legame. **Il legame apolare** chiamato anche legame covalente puro o omopolare è quello che generalmente si instaura tra due atomi dello stesso elemento (ossigeno, idrogeno, azoto atmosferico) o fra atomi la cui differenza di elettronegatività è inferiore a 0,4. La principale causa di una differenza così bassa è che la nube elettronica risulta distribuita simmetricamente nello spazio per cui il legame, come si evince dal nome, non risulta polarizzato.

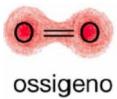
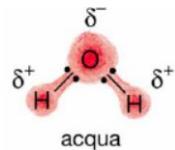


Figura 2.6: Legame puro O<sub>2</sub>

**Il legame covalente polare** invece vede coinvolti nell'interazione due atomi la cui differenza di elettronegatività è compresa fra **0,4 e 1,7**. Essendoci uno squilibrio maggiore la coppia legante risulterà più attratta da uno dei due atomi partecipanti al legame (l'atomo più elettronegativo). Questo romperà la simmetria elettronica prima descritta e farà sì che la nube elettronica sia orientata in un verso piuttosto che essere distribuita in modo simmetrico. Ognuno degli atomi coinvolti nel legame presenterà un carica parziale  $\delta^\pm$  (negativa per l'atomo più elettronegativo e viceversa). Se la geometria della molecola non è tale da annullare queste cariche parziali allora si dice che la molecola è **polare**.

Figura 2.7: Legame della molecola polare  $\text{H}_2\text{O}$ 

### 2.5.2 Il legame ionico

È il più semplice legame descrivibile e vede come partecipanti atomi la cui differenza di elettronegatività è maggiore di 1,7. I due atomi in questione reagiranno e l'atomo più elettronegativo strapperà un elettrone all'altro diventando così uno ione negativo (**anione**). L'atomo privato di un elettrone presenterà uno squilibrio di carica positiva e diventerà uno ione positivo (**catione**). I due ioni, di segno opposto, si legheranno grazie all'interazione elettrostatica delle due cariche. Tali legami vengono rotti durante l'interazione fra soluto e solvente.

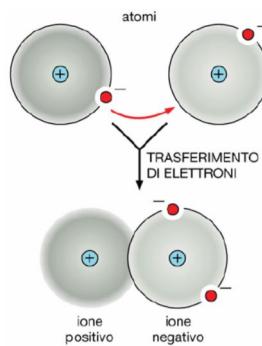
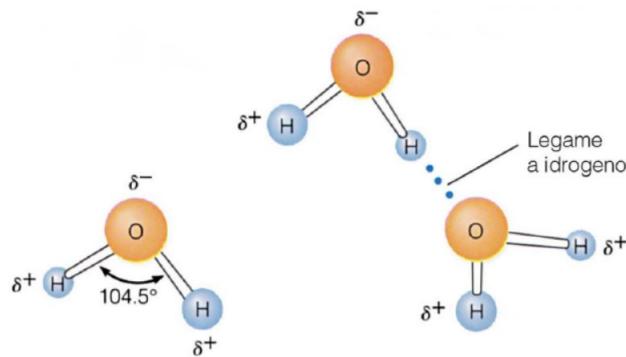


Figura 2.8: Legame ionico

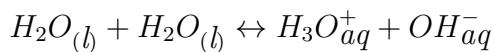
### 2.5.3 Legame idrogeno

A differenza dei legami appena destritti questo legame è di tipo **intermolecolare**, cioè è presente nell'interazione fra molecole e non fra atomi come i precedenti. Tale legame si forma quando un atomo di H legato covalentemente con un elemento fortemente elettronegativo (quindi da un legame covalente fortemente polare) incontra un altro atomo altrettanto elettronegativo. Partecipando ad un legame covalente polare, l'idrogeno vedrà la coppia legante allontanarsi dal proprio nucleo lasciando su di esso una carica parziale positiva  $\delta^+$ . Questa carica reagirà con un doppietto di un atomo fortemente elettronegativo dando vita ad una attrazione elettrostatica fra i due atomi. Un'importante osservazione è che esso è un legame su base elettrostatica ma **altamente direzionale**: ad esempio nell'acqua l'atomo di ossigeno, l'idrogeno, il doppietto elettronico e l'altro ossigeno di un'altra molecola d'acqua devono essere allineati lungo lo stesso asse per massimizzare la forza del legame, altrimenti daranno luogo a un legame di forza inferiore. Ciò può risultare di cruciale importanza nel **DNA**, in cui vi sono moltissimi legami idrogeno tra gli acidi nucleici, o nel **ripiegamento di proteine** dove la diversa intensità di queste interazioni dà forma a una precisa conformazione della proteina, quella in grado di renderla funzionale.

Figura 2.9: Legame idrogeno fra molecole di  $\text{H}_2\text{O}$ 

Come si può vedere dalla figura 2.9 l'acqua è in grado di instaurare legami ad idrogeno con altre molecole di  $\text{H}_2\text{O}$ , è infatti noto che essa in fase liquida sia costituita da un cosiddetto "**network di legami ad idrogeno**". Grazie al legame fortemente polare tra H e O e alla sua forma tridimensionale la molecola d'acqua risulta essere a sua volta polare ed è proprio per questo che in fase liquida più molecole si congiungono a formare un **reticolo di legami idrogeno**. Questa natura coesiva dell'acqua è responsabile di molte delle sue proprietà quali l'elevata tensione superficiale, l'alto calore specifico e il considerevole calore di vaporizzazione.

**Esempio 3. Autodissociazione dell'acqua.** Come si può notare la caratteristica fortemente polare dell'acqua e la capacità di formare un reticolo di legami ad idrogeno con altre molecole d'acqua le garantiscono svariate proprietà. Una di queste è la possibilità di andare incontro ad un processo di **autodissociazione**. In questa reazione chimica due molecole d'acqua reagiscono dando origine a un catione **idrossonio** ( $\text{H}_3\text{O}^+$ ) e un anione **idrossido** ( $\text{OH}^-$ ):



È nota anche come **autoionizzazione** dell'acqua ed è un esempio di autoprotolisi, motivo per cui l'acqua è considerata una sostanza **anfotera**. La reazione presenta una costante di equilibrio:

$$K = \frac{[\text{H}_3\text{O}^+][\text{OH}^-]}{[\text{H}_2\text{O}]^2}$$

Dato che per le reazioni acquose all'equilibrio la frazione d'acqua dissociata è piccolissima, possiamo considerare costante il denominatore e moltiplicare per esso da entrambe le parte per ottenere così una nuova costante di equilibrio:

$$K_w = [\text{H}_3\text{O}^+][\text{OH}^-]$$

Con:

- $K_w = K[\text{H}_2\text{O}]^2$
- $\text{H}_3\text{O}^+ = \text{molarità dello ione idronio}$
- $\text{HO}^- = \text{molarità ione idrossido}$

L'acqua distillata dissocia in quantità eguali i due ioni cosicchè  $[H_3O^+] = [OH^-]$ , inoltre in condizioni standard  $K_w = 10^{-14} M^2$ . Appare ovvio quindi che essendo le due concentrazioni uguali, dovranno essere entrambe pari a  $10^{-7} M$ . Per definizione il pH è  $pH = -\log_{10}([H_3O^+])$  e applicando l'uguaglianza appena descritta si ricava che in condizioni di equilibrio un soluzione acquosa ha  $pH = -\log_{10}(10^{-7}) = 7$

#### 2.5.4 Interazioni idrofobiche

La natura polare e la capacità di dare origine a legami idrogeno rende l'acqua in grado di interagire in maniera diversa a seconda del tipo di sostanza. Le molecole d'acqua tenderanno a riunirsi attorno a ioni o ad altre molecole polari. Tutte le sostanze capaci di partecipare a strutture caratterizzate da legami idrogeno con l'acqua sono, di conseguenza, **idrofile** e relativamente **idrosolubili**.

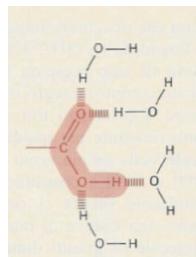


Figura 2.10: Sostanza idrofila

Al contrario le molecole polari che non sono in grado di reagire attraverso legami idrogeno interrompono la trama di legami tipica dell'acqua. Le molecole che tendono a interagire poco con le molecole di  $H_2O$  sono dette **idrofobe** e sono del tutto **insolubili**.

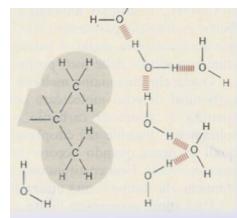


Figura 2.11: Composto idrofobo

Oltre alla proprietà di solubilità in acqua, questa particolare caratteristica di interazione dà origine ad un altro fenomeno degno di nota: se due o più gruppi idrofobi sono circondati d'acqua, essi tenderanno ad aggregarsi in modo tale da rendere minore l'effetto perturbativo sulla struttura di legami idrogeno del liquido e al contempo allontanarsi il più possibile da esso. Queste interazioni prendono il nome di **interazioni idrofobiche**.

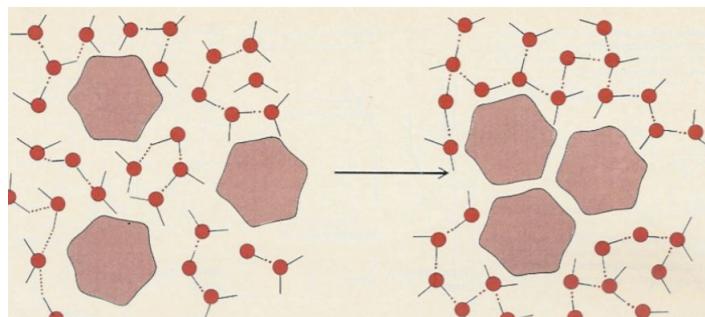


Figura 2.12: Aggregazione molecole a causa d'interazioni idrofobiche

### 2.5.5 Reazione di condensazione

Come abbiamo visto le particolari caratteristiche dell'acqua garantiscono svariate proprietà e rendono questa molecola, di fatto, di fondamentale importanza. Un altro esempio in cui svolge un ruolo essenziale è la formazione del **legami peptidico** mediante l'eliminazione di una molecola d'acqua nel processo chiamato *condensazione*. Più genericamente in una reazione di condensazione intermolecolare due molecole si combinano tra loro per dare una molecola con un maggior peso molecolare ed eliminazione di un'altra molecola a basso peso molecolare come  $\text{NH}_3$ ,  $\text{HCl}$  o  $\text{H}_2\text{O}$  (in quest'ultimo caso la reazione viene anche detta di disidratazione). Nel nostro caso dall'unione di due amminoacidi si ottiene un peptide, formato dalla reazione del gruppo carbossilico di un amminoacido con il gruppo amminico del secondo amminoacido con formazione di un legame peptidico e espulsione di una molecola di acqua.<sup>5</sup>

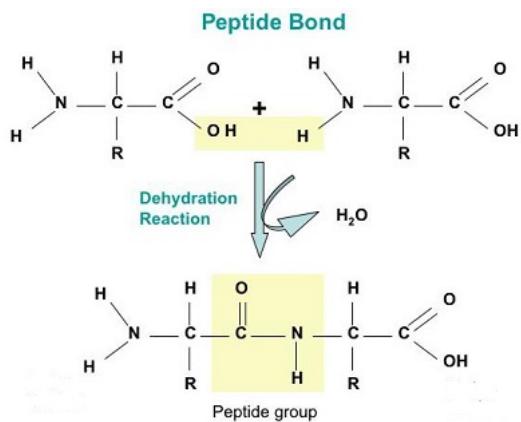


Figura 2.13: Formazione di un legame peptidico per mezzo della condensazione

È ben noto, però, che è possibile svolgere anche l'operazione contraria. L'idrolisi enzimatica ne è un esempio, ed è la reazione più semplice per rompere un legame peptidico. Essa consiste nella reazione inversa alla condensazione: con l'aggiunta di acqua e l'azione di un enzima si passa dai prodotti ai reagenti, quindi, nel caso di un dipeptide, ai due amminoacidi separati.

<sup>5</sup>Un altro esempio di formazione di un legame per mezzo di una reazione di condensazione è il legame fosfodiesterico: si tratta di un particolare legame covalente in cui un atomo di fosforo è collegato ad altre due molecole tramite due legami esteri.

## 2.6 I componenti chimici della cellula

Nella cellula si trovano circa trenta elementi chimici che compongono tutta la materia vivente. Sette di questi: ossigeno (O), carbonio (C), idrogeno (H), azoto (N), calcio (Ca), fosforo (P) e zolfo (S), costituiscono oltre il 99% della massa cellulare, mentre gli altri sono presenti in quantità minori o minime, ma comunque necessarie allo svolgimento delle funzioni della cellula. L'ossigeno e l'idrogeno sono in massima parte legati nella molecola dell'acqua ( $H_2O$ ), che infatti è la sostanza che più abbonda nella cellula: costituisce circa il 70% del suo peso ed è il mezzo in cui avvengono la maggior parte delle reazioni chimiche. Alcuni elementi sono presenti come costituenti di sali minerali (cationi e ioni). I più importanti sono i cationi:  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{++}$ ,  $Mg^{++}$  e gli anioni  $Cl^-$ ,  $SO_4^{--}$ ,  $PO_4^{--}$ ,  $CO_3^-$ . Elementi normalmente comuni come sodio, magnesio o silicio sono rari o addirittura assenti nella cellula. Questi rappresentano i principali componenti inorganici della cellula, ma la sua struttura è caratterizzata dalla presenza di sostanze dalla natura organica: le piccole molecole organiche e le macromolecole (si differenziano per la dimensione). Le piccole molecole organiche prendono il nome di monomeri e tipici esempi di tali sostanze sono i carboidrati (zuccheri) semplici, i lipidi (grassi), gli aminoacidi, i nucleotidi. Quando più monomeri si legano fra loro mediante un legame stabile, il legame covalente, formano le cosiddette macromolecole o polimeri. Principali esempi di tali composti sono i carboidrati complessi (glicogeno), le proteine e gli acidi nucleici (DNA, RNA).

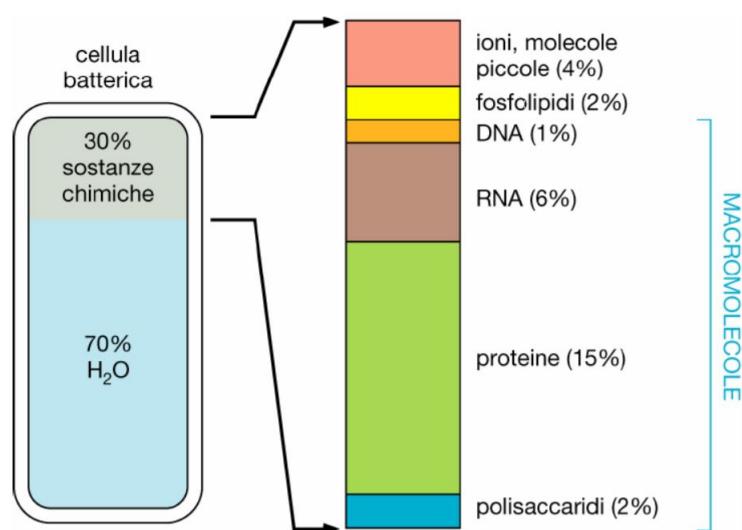


Figura 2.14: Esempio della struttura di una cellula batterica

Come si può notare la gran parte della cellula è costituita per l'appunto da acqua mentre le restanti componenti rappresentano solo il 30%. Oltre per la presenza di  $H_2O$  e di sali minerali, possiamo suddividere le componenti organiche in 4 classi fondamentali (che rappresentano le molecole più diffuse) non solo come monomeri, ma anche come polimeri.

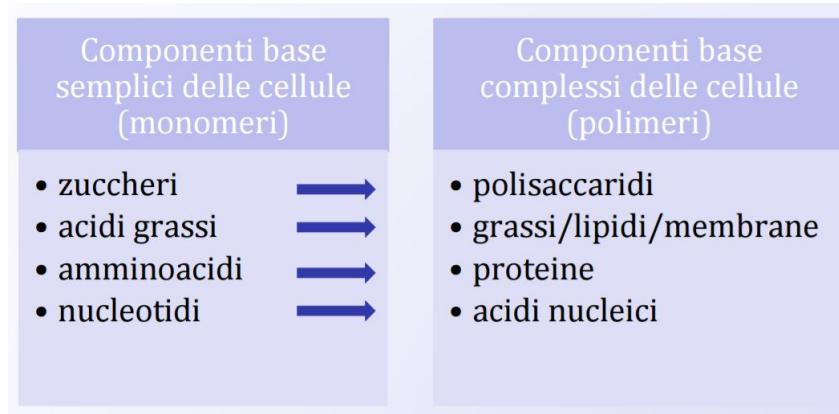


Figura 2.15: Principali componenti organiche

Gli amminoacidi e i nucleotidi (monomeri) e le loro aggregazioni, le proteine e gli acidi nucleici (polimeri) sono già stati trattati in precedenza, quindi ci soffermeremo sulle restanti: gli zuccheri e gli acidi grassi e i relativi polimeri.

### 2.6.1 Carboidrati

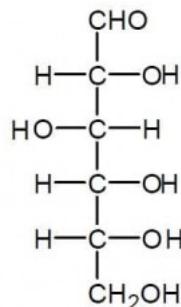
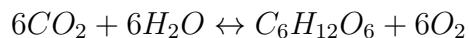
La prima delle classi da analizzare è quella degli zuccheri chiamati anche glucidi saccaridi o **carboidrati**. Sono dei composti chimici organici formati da atomi di carbonio, idrogeno e ossigeno e la loro formula bruta è:  $(CH_2O)_n$  da cui deriva il nome "carboidrati" ossia idrati del carbonio. Dal punto di vista chimico, i glucidi comprendono composti che contengono un gruppo aldeidico o chetonico ai quali sono stati aggiunti vari gruppi ossidrilici (per esempio i gruppi alcolici OH), solitamente uno per ogni atomo di carbonio che non fa parte del gruppo funzionale aldeidico o chetonico. I glucidi si distinguono inoltre in:

- carboidrati semplici: **monosaccaridi**, tra questi si annoverano il **glucosio**, il **galattosio** e il **fruttosio** e oligosaccaridi;
- carboidrati complessi: **polisaccaridi**;

Le sottoclassi si distinguono fra loro principalmente per il numero di unità ripetitive che li compongono, e possono presentare pesi molecolari e funzioni biologiche molto diverse. I carboidrati sono la più comune **fonte di energia** negli organismi viventi e sono in grado di liberare  $4 \frac{Kcal}{Mol}$ , la loro digestione richiede meno acqua di quella delle proteine o dei grassi ragion per cui sono di gran lunga la fonte energetica più utilizzata. In particolare i monosaccaridi sono la più grande risorsa per il metabolismo. Quando non è richiesto immediato utilizzo spesso vengono convertiti in forme più vantaggiose per lo spazio, come i polysaccaridi. In molti animali, compresi gli umani, questa **forma di deposito** è il **glicogeno**. Le loro funzioni non si limitano a quelle energetiche ma possono svolgere anche un ruolo di **sostegno tissutale** (la chitina concorre alla formazione dell'uloscheletro degli artropodi svolgendo invece una funzione strutturale; la cellulosa invece svolge un ruolo strutturale nelle pareti cellulari), oppure partecipare alla **sintesi di altre sostanze** (DNA, RNA) o ancora dare vita a **forme più complesse** ampliando le funzionalità di altre molecole organiche. Un particolare esempio sono le glicoproteine, ossia una proteina che contiene carboidrati legati covalentemente alla catena peptidica, tra cui si annoverano non solo importanti anticorpi come le immunoglobuline ma varie proteine di membrana con funzione di recettori e antigeni.

### Il glucosio e i polisacaridi

Il **glucosio** è un monosaccaride aldeidico ed è il composto organico più diffuso in natura, nonché il più presente nelle cellule del nostro organismo. È uno degli zuccheri più importanti ed è usato come fonte di energia sia dagli animali sia dalle piante e infatti il principale prodotto della fotosintesi ed è il combustibile della respirazione. Ha formula bruta  $C_6H_{12}O_6$  e la reazione che vede la sua sintesi è:



formula di struttura

Figura 2.16: Formula di struttura del glucosio

Questo monosaccaride svolge un ruolo di fondamentale importanza dal punto di vista energetico, a tal punto che in caso di carenza è possibile produrlo partendo da altri composti organici. È il processo metabolico della **gluconeogenesi** o **neoglucogenesi** dove un composto non glucidico viene convertito in glucosio. Questo meccanismo è necessario per garantire sempre una quantità adeguata del monosaccaride in modo tale che l'organismo non ne rimanga privo. Se il glucosio rappresenta un esempio di glucide semplice, la sua controparte macromolecolare è rappresentata dai **polisaccaridi**. Come spiegato in precedenza è un polimero da unità ripetute di zuccheri semplici come il glucosio. Si parte da **catene lineari** di circa 20 unità ripetitive dando forma così ad un **polisaccaride lineare** fino ad arrivare a strutture più complesse nei **polisaccaridi ramificati**, di cui un noto esempio è il **glicogeno**.

Questi polimeri svolgono principalmente il ruolo di riserva energetica, il glicogeno (cellule animali) e l'amido (cellule vegetali), infatti, sono una sorta di scorte energetiche. Qualora l'organismo ne avesse bisogno essi possono essere demoliti per la sintesi del glucosio. È interessante notare come questo processo possa essere applicato anche nel verso opposto, di fatto il glicogeno non svolge solo un ruolo di scorta ma è anche il protagonista di un processo di regolazione della quantità di glucosio: un eventuale eccesso di questo monosaccaride verrà regolato convertendolo in glicogeno. Le funzioni dei polisaccaridi non si limitano a quelle di "magazzino" energetico ma possono svolgere anche un ruolo di sostegno come costituenti per la struttura dei tessuti animali (**chitina**) e soprattutto vegetali (**cellulosa**) o per la matrice extracellulare. Principalmente i polisaccaridi sono formati da catene di glucosio ma il modo in cui si legano può rendere molto differente il loro comportamento. L'amido, il glicogeno e la cellulosa hanno in comune i monomeri da cui sono costituiti ma i loro legami sono diversi, in particolare i primi due differiscono significativamente dall'ultimo. Questa differenza porta ad una curiosa conclusione:

l'amido e il glicogeno, che presentano legami  $\alpha$  tra le unità di glicogeno, possono essere idrolizzati dagli stessi enzimi ed il corpo umano è in grado di scomporle; ma la cellulosa, che al contrario presenta legami  $\beta$ , non riesce ad essere metabolizzata dal corpo umano.

### 2.6.2 I lipidi

I **lipidi**, o **grassi** sono molecole organiche largamente diffuse appartenenti ad una delle quattro principali classi di composti organici di interesse biologico. Vengono identificati sulla base delle loro proprietà comuni di solubilità: sono infatti insolubili in acqua, motivo per cui vengono chiamati idrofobi. Questa classe si suddivide a sua volta in altre due sottoclassi:

- Lipidi semplici: acidi grassi o grassi neutri;
- Lipidi complessi: fosfolipidi, fosfogliceridi, steroidi;

Dal punto di vista strutturale i lipidi sono costituiti prevalentemente da atomi di carbonio e di idrogeno uniti tra loro con legami covalenti scarsamente polari (caratteristica che conferisce il comportamento idrofobo) e disposti simmetricamente. Tuttavia esistono delle eccezioni, esistono infatti lipidi i cui legami sono polari (i fosfolipidi ad esempio) mostrando la capacità di interagire sia con l'acqua che con altri solventi organici. Similmente ai carboidrati, anche i lipidi possono svolgere una **funzione energetica** (9 Kal/Mol), un ruolo di **scorta** (svolta dai trigliceridi) e strutturale (i fosfolipidi sono componenti fondamentali della membrana cellulare). I lipidi sono importanti per svariate altre funzioni:

- **Funzione antiossidante**: i fosfolipidi ed altre molecole di natura lipidica proteggono il nostro corpo dalle aggressioni dei radicali liberi;
- **Messaggeri chimici**: i lipidi sono piccole molecole insolubili in acqua, sono ottimi candidati per la segnalazione potendosi infiltrare nelle membrane cellulari;
- **Mantenimento della temperatura e protezione da traumi**: il grasso interviene nei processi di termoregolazione corporea fungendo da vero e proprio isolante e protegge articolazioni ed organi vitali da possibili traumi;
- **Trasporto, regolazione e sintesi di vitamine**: i grassi fungono da trasportatori per le vitamine liposolubili (A, D, E e K) e il colesterolo ne favorisce l'assorbimento;

### Acidi grassi

Sono lunghe catene non ramificate di idrocarburi contenenti un numero pari di atomi di C e presentando all'estremità il gruppo carbossilico COOH. È possibile fare un ulteriore distinzione:

- Grassi saturi: se sono presenti solo legami covalenti singoli -C-C-,
- Grassi insaturi: presenza di doppi legami -C=C-

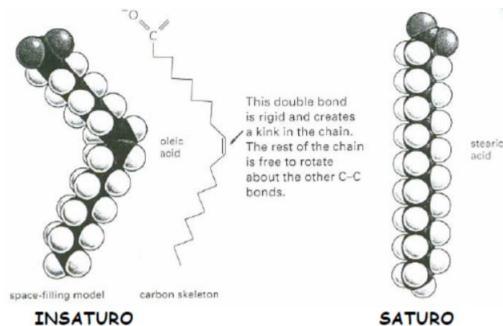


Figura 2.17: Differenze fra grassi sauturi e non

Presentano simultaneamente caratteristiche idrofobe e idrofile a causa della loro struttura: una testa polare, che interagisce bene con l'acqua, ed una coda non polare idrofoba. Molecole con queste caratteristiche vengono dette **anfipatiche**.

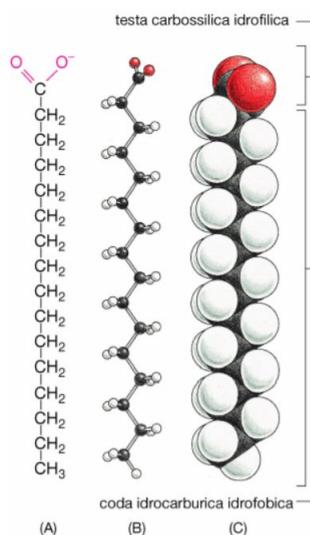


Figura 2.18: Struttura di un acido grasso

## Fosfolipidi

Sono particolari lipidi costituiti da una testa polare idrofila unita ad un gruppo fosfato e da una coda apolare idrofoba (generalmente un acido grasso), legate mediante il glicerolo. Possiamo classificare diversi fosfolipidi in base al gruppo polare presente:

Gruppo polare	Fosfolipide
colina	fosfatidicolina
etalonamina	fosfatidiletalonamina
serina	fosfatidilserina
inositolo	fostatidilinositolo

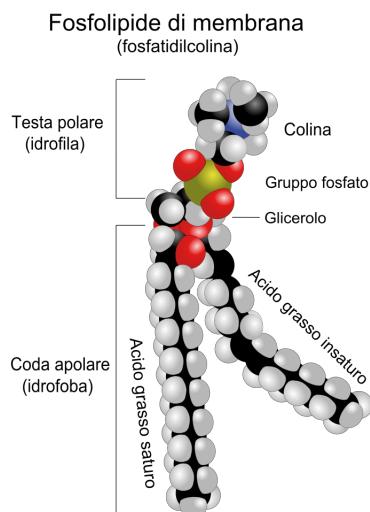


Figura 2.19: Fosfolipide di membrana

I fosfolipidi, come già accennato, svolgono, insieme al colesterolo e ai glicolipidi, uno ruolo fondamentale nella composizione della struttura della membrana cellulare: costituiscono l'impalcatura fondamentale della membrana. A causa della natura anfipatica, i fosfolipidi (e i glicolipidi) in ciascun monostrato si allineano tra loro, con le teste polari dirette all'esterno verso l'ambiente acquoso, e con le code idrofobiche rivolte verso l'interno del doppio strato. L'associazione tra le molecole lipidiche è sostenuta da legami elettrostatici (dipolari e idrogeno) tra le teste e da deboli legami tra le catene degli acidi grassi. Il risultato di questo impacchettamento è una barriera semipermeabile, che si lascia attraversare liberamente solo dalle molecole liposolubili, ma risulta impenetrabile da quelle idrosolubili.

# Capitolo 3

## RICONOSCIMENTO MOLECOLARE

### 3.1 I ligandi

Inziamo dando una definizione:

**Definizione 3.1.0.1.** In biochimica si definisce **ligando** una molecola capace di legare una biomolecola e formare un complesso in grado di svolgere o indurre una funzione biologica.

In senso stretto, si tratta solitamente di una molecola effettrice in grado di legarsi ad una proteina bersaglio attraverso una interazione debole come un legame ionico, un legame idrogeno o una interazione di Van der Waals. Tale biomolecola bersaglio è il più delle volte un recettore. È evidente il livello di specificità che accompagna la formazione di questi legami. Le interazioni possibili sono solo alcune e ben specifiche, tanto che nominalmente, viene spesso data l'apposizione *key* al ligando e *lock* al recettore, il quale è posto in un *sito di legame*, e si tende a parlare di **complementarità molecolare**.

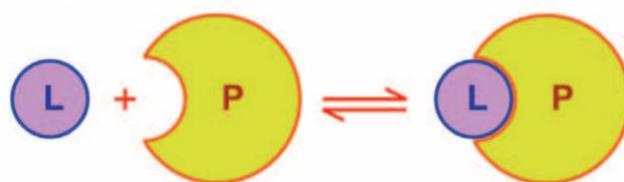
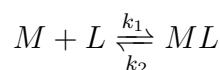


Figura 3.1: Ligando e Sito di legame

Pertanto, data una macromolecola M ed un ligando L, il processo che determina la formazione della macromolecola è descritta dalla reazione:



A reazione avvenuta, la costante di equilibrio sarà definita come visto in 2.1:

$$k_{eq} = \frac{k_1}{k_2} = \frac{[ML]}{[M][L]} = K_A \quad (3.1)$$

dove con  $K_A$  si intende la *costante di associazione*, il cui reciproco è la *costante di dissociazione*  $K_D$ :

$$K_D = \frac{k_2}{k_1} = \frac{[M][L]}{[ML]}$$

Diamo un'altra definizione per richiamare i concetti del capitolo 2:

**Definizione 3.1.0.2.** Si chiama **energia libera di Gibbs standard di formazione**,  $\Delta G_{leg}^o$ , la variazione di energia libera di Gibbs associata al processo di sintesi di una specie chimica partendo dagli elementi che la costituiscono, nel loro stato di riferimento  $\Delta G^\bullet$ .

Servendosi della 2.8 si trova che l'energia di questo legame speciale è esprimibile come:

$$\Delta G_{leg}^o = -RT \log K_A = -RT \log \frac{1}{K_D} = RT \log K_D$$

ovvero, essa dipende logaritmicamente, dal valore, in modulo, della costante di dissociazione della reazione. Questo implica che:

- ligandi con  $K_D$  bassa hanno **legami forti**;
- ligandi con  $K_D$  alta hanno **legami deboli**;
- più la costante di dissociazione è bassa e più il legame è forte.

Si presti attenzione al fatto che *il valore dell'energia libera di legame dipende dallo stato standard scelto come riferimento*, ovvero dalle unità di misura e dalle condizioni al contorno di riferimento! [In genere pressione e mole unitarie] Data la sua importanza, vediamo dunque di capire il significato fisico di questa costante:

**Definizione 3.1.0.3.** Definiamo **saturazione frazionaria**  $Y(\theta)$  per un solo sito di legame la frazione di macromolecole con un solo ligando legato:

$$Y = \theta = \left( \frac{[ML]}{[M]_{TOT}} \right)_{eq}$$

Trattandosi di una grandezza definita all'equilibrio, le variabili che in essa compaiono saranno, nello specifico, le stesse che compaiono nell'espressione della costante  $k_{eq} = K_A$  3.1. Ma allora:

$$\begin{aligned} Y &= \frac{K_A[M][L]}{[M] + K_A[M][L]} = \frac{[M](K_A[L])}{[M](1 + K_A[L])} = \frac{K_A[L]}{1 + K_A[L]} \\ &= \frac{\frac{[L]}{K_D}}{1 + \frac{[L]}{K_D}} = \frac{[L]}{K_D + [L]} \end{aligned} \tag{3.2}$$

Risolvendo ora la 3.2 rispetto a  $K_D$  si perviene a:

$$K_D Y + Y[L] = [L] \implies K_D = \frac{1 - Y}{Y}[L] \tag{3.3}$$

In 3.3 l'uguaglianza tra la costante e la concentrazione del ligando è identicamente soddisfatta quando  $Y = 1/2$ . Fisicamente ciò significa che

$$\frac{1}{2} = \frac{[L]_{1/2}}{K_D + [L]_{1/2}} \tag{3.4}$$

il che mostra palesemente che **la costante di dissociazione è la concentrazione di semisaturazione di [L] libero**. In corrispondenza di  $[L] = K_D$ , cioè  $[M]=[ML]$ , ovvero esattamente metà delle macromolecole hanno un ligando associato (per un solo sito di legame!) La frazione di saturazione  $Y$  varia quindi al variare di  $[L]$ . Guardando 3.2 si evince che l'andamento della curva è un'iperbole equilatera:

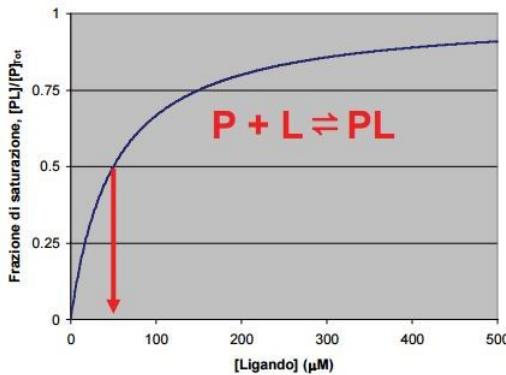


Figura 3.2: Curva di saturazione di una macromolecola con il suo ligando; il valore indicato dalla freccia corrisponde a  $K_D$  sulle ascisse e a  $[M]=[ML]$  sulle ordinate

Esistono poi diversi studi sull'*associazione recettiva* tra ligando e corrispondente macromolecola. Di questi ricordiamo i più importanti:

1. **Scatchard plot:** è un grafico che mostra in ordinata il rapporto tra la concentrazione di ligandi associati (*bounded*) e la concentrazione di ligandi non associati (*unbounded*), e in ascissa la concentrazione dei ligandi.

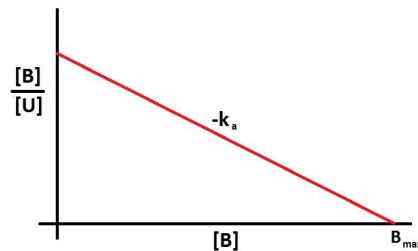


Figura 3.3: Scatchard plot

La pendenza della retta è  $-K_A$ , dove quest'ultima indica la costante di associazione. (Può capitare che sperimentalmente i dati non si dispongano esattamente lungo una retta, a causa di condizioni di legame che impediscono il raggiungimento lineare dell'equilibrio, come ad esempio la presenza di più liganti sulla stessa macromolecola).

2. **Hill plot:** riporta sull'asse verticale la concentrazione  $[ML_n]/[M_{TOT}]$  (dove  $ML$  denota uno stato associato) e sull'asse delle ascisse la frazione tra  $[L]_{1/2}$  (ovvero la concentrazione di ligandi producenti un'occupazione di metà delle macromolecole) e la concentrazione dei ligandi non associati  $[L]$ .

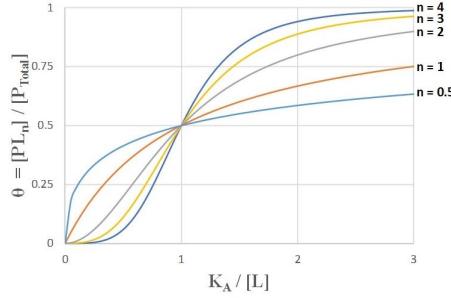


Figura 3.4: Hill plot

Un valore numerico  $n$  (*coefficiente di Hill*) maggiore di 1 denota un legame ligando-macromolecola cooperativo costruttivo, un numero minore di 1 indica invece una cooperazione distruttiva. Si osserva che per  $[L]=1$ , a  $K_A$  corrisponde in ordinata la situazione in cui esattamente metà delle macromolecole totali sono associate.

Abbiamo sin qui trattato il caso di un unico sito di legame. Tuttavia, data la complessità dei sistemi biologici, è lecito aspettarsi che i siti di legame su una stessa macromolecola siano molteplici. Procediamo dunque per ordine:

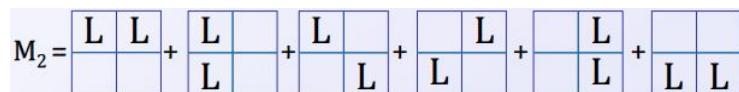
- **Caso di  $n$  siti identici e indipendenti.**

Sia  $n$  il numero di siti di legame disponibili sulla macromolecola  $M$  e sia  $i$  il numero di ligandi che si associano ad essa.

Indichiamo con  $M_i$  l'insieme di tutte le possibili specie macroscopiche che è possibile ottenere con  $n$  fissato e un numero  $i$  di ligandi legati. Per questi insiemi vale in particolare la seguente relazione ricorsiva:

$$\begin{aligned} M_0 + L &\xrightarrow[l'insieme]{\text{genera}} M_1 \\ M_1 + L &\xrightarrow[l'insieme]{\text{genera}} M_2 \\ &\dots \\ M_{i-1} + L &\xrightarrow[l'insieme]{\text{genera}} M_i \end{aligned} \tag{3.5}$$

con  $i$  che ovviamente può correre tra  $0 \leq i \leq n$

Figura 3.5: Esempio per capire: rappresentazione di  $M_2$  con  $n=4$ 

La molteplicità di ogni insieme  $i$ -esimo si trova ragionando come segue: si associa il primo ligando, potendo scegliere tra  $n$  siti di legame possibili, il successivo ligando avrà  $(n-1)$  siti a disposizione e così via. Questo numero va partizionato in tutte le possibili permutazioni tra ligandi, supposti identici tra loro. Essa è pertanto data dalla relazione:

$$\Omega_{n,i} = \frac{n \times (n-1) \times \dots \times (n-i+1)}{i!} = \frac{n!}{(n-i)! i!} \tag{3.6}$$

Possiamo ora introdurre come grandezza **il grado di associazione**  $v$

$$v = \frac{\sum_{i=0}^n i[M_i]}{\sum_{i=0}^n [M_i]}$$

che rappresenta il numero di moli di ligando legato per mole di macromolecola. Proponiamoci di trovare la relazione tra  $v$  e  $[L]$ .

Accanto alla costante di dissociazione MICROSCOPICA  $k$ , già introdotta in apertura di paragrafo, definiamo la *costante di dissociazione MACROSCOPICA*  $\mathcal{K}$  seconda la 3.5:

$$\mathcal{K}_i = \frac{[M_{i-1}][L]}{[M_i]} \quad (3.7)$$

Notiamo innanzitutto che, le costanti macro- e micro-scopiche sono legate tra loro dalla relazione:

$$\mathcal{K}_i = \frac{\Omega_{n,i-1}}{\Omega_{n,i}} k = \frac{(n-i)! i(i-1)!}{(n-i+1)(n-i)!(i-1)!} k_i = \frac{i}{n-i+1} k \quad (3.8)$$

Possiamo poi massaggiare la 3.7 trovando:

$$[M_i] = \frac{[M_{i-1}][L]}{\mathcal{K}_i} = \frac{[M_0][L]^i}{\prod_{j=1}^i \mathcal{K}_j} \quad (3.9)$$

Usando la 3.8 sul lato destro della prima uguaglianza in 3.9

$$[M_i] = [M_{i-1}] \frac{n-i+1}{i} \frac{[L]}{k} \quad (3.10)$$

e usando di nuovo il lato destro della seconda uguaglianza in 3.9 sulla 3.10

$$[M_i] = [M_0] \left( \prod_{j=1}^i \frac{n-j+1}{j} \right) \left( \frac{[L]}{k} \right)^i$$

Possiamo quindi finalmente trovare la relazione tr  $v$  e  $[L]$ :

$$\begin{aligned} v &= \frac{\sum_{i=1}^n i \left( \prod_{j=1}^i \frac{n-j+1}{j} \right) \left( \frac{[L]}{k} \right)^i}{1 + \sum_{i=1}^n \left( \prod_{j=1}^i \frac{n-j+1}{j} \right) \left( \frac{[L]}{k} \right)^i} \\ &= \frac{\sum_{i=1}^n i \left( \frac{n!}{(n-i)!i!} \right) \left( \frac{[L]}{k} \right)^i}{1 + \sum_{i=1}^n \left( \frac{n!}{(n-i)!i!} \right) \left( \frac{[L]}{k} \right)^i} \\ &= \frac{n \frac{[L]}{k} \left[ 1 + \frac{[L]}{k} \right]^{n-1}}{\left[ 1 + \frac{[L]}{k} \right]^n} \\ &= \frac{n[L]/k}{1 + [L]/k} \end{aligned} \quad (3.11)$$

che risolta per  $\frac{v}{[L]}$  produce:

$$vk + [L]v = n[L] \implies \boxed{\frac{v}{[L]} = \frac{n}{k} - \frac{v}{k}} \quad (3.12)$$

Quella trovata è l'**equazione di Rosenthal-Scatchard** il cui plot - ottenuto ponendo  $[L]$  in ascissa e  $v$  in ordinata - è quello mostrato in precedenza. Le *condizioni di legame a cui si faceva cenno sono quelle appena discusse nelle equazioni soprastanti, in ipotesi di siti di legame identici e indipendenti*. Si tratta comunque di un modello altamente apprezzabile dal momento che consente di descrivere con una relazione lineare le interazioni tra polimero e ligando.

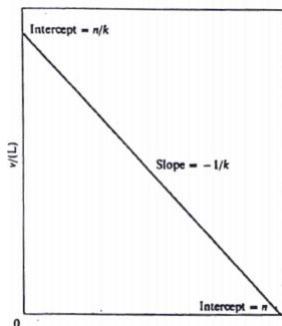


Figura 3.6:

- **Caso con classi multiple di  $n_i$  siti identici e indipendenti.**

A livello computazionale (ovvero di costruzione del modello) si procede come nel caso precedente. Ancora una volta definiamo una frazione che rappresenta il numero di moli di ligando legato per mole di macromolecola, questa volta però tenendo conto delle varie classi presenti. Massaggiando come prima le equazioni, troviamo un sistema di equazioni di Rosenthal-Scatchard, una per classe secondo la relazione analoga a 3.11

$$v = \frac{\sum_i n_i [L]/k_i}{1 + [L]/k_i}$$

che porta ad un sistema di simile a 3.14:

$$\frac{v}{[L]} = \sum_i \frac{n_i/k_i}{1 + [L]/k_i} \quad (3.13)$$

Il plot della famiglia ha come soluzione massimale:

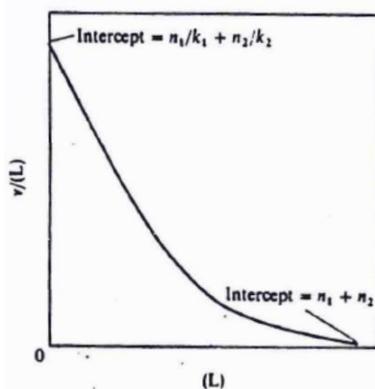


Figura 3.7:

- **Caso con n siti identici ed interagenti: cooperatività.**

Se si fa ora l'ipotesi che i vari siti di legame non siano più indipendenti, ma interagiscano tra di loro, il processo di legame M+L sarà ancora funzione del numero di molecole legate, ma si dovrà tener conto anche di un effetto comune dovuto alla presenza degli altri siti. Fondamentalmente, *tanto maggiore è il numero di molecole, tanto maggiore è la probabilità che queste interagiscano tra di loro*. Il legame di un ligando può influenzare l'affinità della macromolecola con il successivo.

È quindi necessario supporre che la differenza di energia libera di Gibbs coinvolta nel processo venga a dipendere in qualche maniera dall'occupazione degli altri siti. Si introduce pertanto una **funzione di ricoprimento**  $\phi(v)$  :  $\phi(0) = 0$ , con le dimensioni di un numero puro, tale per cui l'energia in gioco sarà:

$$\Delta G^o = \Delta G_o^o + RT\phi(v) \quad (3.14)$$

Servendosi di 2.9 possiamo quindi scrivere che  $\Delta G_0^0 = -RT \log k_o$  con  $k_o$  costante di dissociazione microscopica per  $v = 0$ , mentre la 3.14 diviene:

$$\begin{aligned} -RT \log k(v) &= -RT \log nk_o + RT\phi(v) \\ \implies \log \left( \frac{k(v)}{k_o} \right) &= -\phi(v) \\ \implies k(v) &= k_o e^{-\phi(v)} \end{aligned} \quad (3.15)$$

Scopriamo dunque che la costante di dissociazione del problema globale viene a dipendere dal parametro  $v$ , che ricordiamo essere il numero di moli di ligando legati per mole di macromolecola. L'ormai solito riarrangiamento delle equazioni genera una formula di Rosenthal-Scatchard del tipo:

$$\begin{aligned} \frac{v}{[L]} &= \frac{n}{k(v)} - \frac{v}{k(v)} \\ \frac{v}{[L]} &= \frac{n}{k_o e^{-\phi(v)}} - \frac{v}{k_o e^{-\phi(v)}} \end{aligned} \quad (3.16)$$

in cui è manifesto il fatto che al crescere della funzione di ricoprimento  $\phi(v)$ , diminuisce  $k(v)$ . Di conseguenza, poiché più la costante di dissociazione è bassa e più il legame è forte, evinciamo che, col procedere del legame, i ligandi sono legati da interazione maggiore.

A tal riguardo è importante introdurre il concetto di **cooperatività** molecolare.

**Definizione 3.1.0.4.** *In biochimica si definisce **cooperatività** il processo per cui il legame di ligando ad un polimero aumenta o diminuisce l'affinità di legame di altri ligandi.*

Il fatto che i singoli siti di legami non siano indipendenti tra di loro fa sì che possano influenzarsi secondo due percorsi distinti: la *cooperazione* che ne deriva può infatti essere *costruttiva* o *distruttiva*. A costo di correre il rischio di essere ripetitivi, formalmente si può modellizzare questo fatto come segue:

- La costante di equilibrio del processo di associazione è funzione del grado di associazione  $v$ .

- Se la funzione di ricoprimento è  $\phi(v) > 0$  siamo nel caso di **cooperatività positiva**: come effetto si ha infatti che  $k(v)$  diminuisce e che quindi l'energia di legame aumenta.
- Se la funzione di ricoprimento è  $\phi(v) < 0$  siamo nel caso di **anticooperatività**, in cui  $k(v)$  tende ad aumentare, riducendo logaritmicamente l'energia coinvolta nel processo ligando-polimero.

Graficamente si può riaffermare nel grafico seguente:

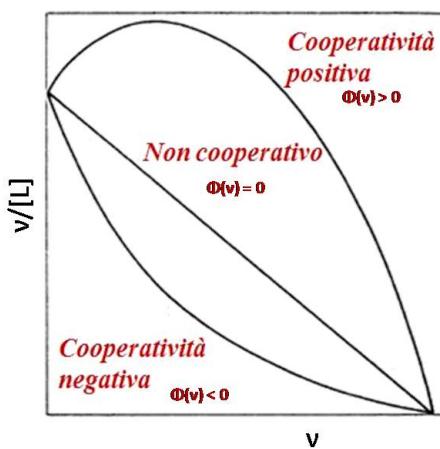


Figura 3.8: Cooperatività positiva e anticooperatività, dipendenti dal segno della funzione di ricoprimento

#### Esempio 4. Proteine e gruppo eme nella molecola di emoglobina

Uno degli esempi più semplici, nonché importanti per la funzione svolta, di interazione ligando-macromolecola, riguarda il gruppo prosterico eme, che come abbiamo già avuto modo di vedere, permette alle proteine di legare ossigeno.

Il gruppo eme è formato da un anello eterociclico contenente quattro anelli pirrolo (detta **porfirina**) e da un atomo centrale di  $Fe^{2+}$ , in stato di ossidazione normale.

Il punto di collegamento tra l'intero gruppo eme e il residuo proteico dell'emoglobina è invece rappresentato dalla **istidina prossimale**, che è appunto fondamentale nella trasduzione dell'evento di legame alla proteina.

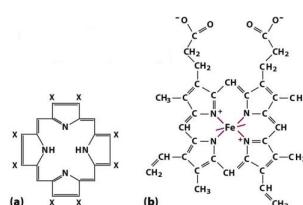


Figura 3.9: Porfirina e Emoglobina

Nell'emoglobina, il ligando è il gruppo della porfirina, che coopera con lo ione  $Fe^{2+}$ . Vediamo di capirne il funzionamento.

L'emoglobina è tetramerica, ovvero formata da quattro sub-unità: due di esse sono catene  $\alpha$ , le rimanenti due sono catene  $\beta$ . Grazie al ligando può legare quattro

molecole di ossigeno e trasportarlo ai polmoni e ai tessuti tramite il sangue. La cooperatività qui riguarda il legame tra lo ione ferro e l'ossigeno. Nello specifico:

1. Quando  $O_2$  si lega al Fe nel primo dei quattro siti disponibili, trova difficoltà per la presenza di ponti salini tra le varie eliche. Tuttavia dopo il legame il ferro entra nel piano dell'eme, provocando lo spostamento dell'istidina prossimale e della elica F cui esso è legato tramite l'istidina.
2. L'elica F modifica la conformazione, rompendo i ponti salini e inducendo il movimento di una subunità  $\beta$ .
3. In questo modo si altera la conformazione del Fe nei siti non occupati, favorendo l'ingresso di altro  $O_2$  nei restanti tre siti

## 3.2 Il modello semi-empirico di Hill

Analogamente a come per il processo di legame ligando-sito n-esimo esiste un modello matematico incoronato dall'equazione di Rosenthal-Scatchard, anche per il fenomeno di cooperatività venne proposta un'implementazione teorica. Si tratta di quello che è noto come *Modello semiempirico di Hill* e che fu elaborato in principio come descrizione della contrazione muscolare, segnando l'inzio della biochimica applicata a sistemi fisici. Come dice l'appellativo stesso si tratta di una teoria che si appoggia a evidenze sperimentali per giungere a completezza. Una descrizione globale della cognizione molecolare terrà dunque conto tanto del modello di Scatchard quanto di quello di Hill.

Esso si fonda sul seguente assunto:

**Lemma 3.2.0.1.** *Il legame può essere descritto in parte dell'intervallo di saturazione da equazioni simili a quelle ottenute per un sistema con cooperatività infinita, dove per questa si intende che il legame M-L avviene in una sola tappa (principio **all-or-none** dei muscoli, secondo cui un muscolo si contrae indipendentemente dalla forza dello stimolo che lo raggiunge)*

Recuperando le convenzioni di 3.5 e 3.7 e la definizione di grado di associazione trovata in 3.11, possiamo scrivere per un generico polimero:

$$M_0 + nL \leftrightarrow M_n \quad K^n = \frac{[M_0][L]^n}{[M^n]}$$

$$v = \frac{n[M_n]}{[M_n] + [M_0]} = \frac{n[L]^n/K^n}{1 + [L]^n/K^n}$$

Per la definizione 3.1.0.3 troviamo la *saturazione frazionaria* in funzione delle variabili sin qui usate:

$$\bar{y} = \frac{v}{n} = \frac{[L]^n/K^n}{1 + [L]^n/K^n} \tag{3.17}$$

Introduciamo dunque:

**Definizione 3.2.0.2.** *Si chiama **coefficiente di Hill** il numero  $\alpha_H$  che indica il grado di cooperatività di una proteina. Esso può variare tra  $1 \leq \alpha_H \leq n$*

Con questo parametro in gioco, il grado di associazione e la saturazione frazionaria diventano:

$$v = \frac{n[L]^{\alpha_H}/K^{\alpha_H}}{1 + [L]^{\alpha_H}/K^{\alpha_H}} \quad (3.18)$$

$$\boxed{\bar{y} = \frac{[L]^{\alpha_H}/K^{\alpha_H}}{1 + [L]^{\alpha_H}/K^{\alpha_H}}} \quad (3.19)$$

Il plot della 3.19, detta **equazione di Hill** è riporato di seguito, in cui si sceglie come variabile L/K:

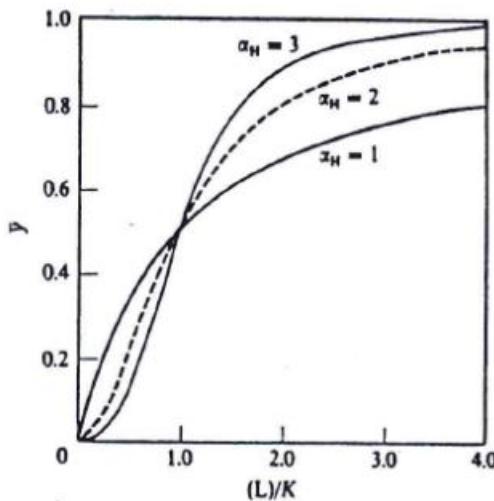


Figura 3.10: Hill Plot

Da quanto la figura 3.8 ci insegnava, il grafico trovato è di semplice interpretazione: per  $\alpha_H = 1$  troviamo un'iperbole, il che ci riporta al caso di siti indipendenti, ovvero di cooperazione nulla. Per  $\alpha = n$  ritrovo sostanzialmente una retta verticale, che è il caso di cooperazione infinita. Per valori compresi tra i due estremi la cooperazione è crescente. Valori minori di 1 del coefficiente di Hill corrisponderebbero a stati di anticooperazione.

Come possiamo estrarre  $\alpha_H$  da questo plot?

Da 3.19, risolvendo per L/K, si ha:

$$\begin{aligned} \frac{\bar{y}}{1 - \bar{y}} &= \frac{[L]^{\alpha_H}}{K^{\alpha_H}} \implies \left(\frac{[L]}{K}\right)^{\alpha_H} = \frac{\bar{y}}{1 - \bar{y}} \\ &\implies \alpha_H = \log_{[L]/K} \left( \frac{\bar{y}}{1 - \bar{y}} \right) \\ &\implies \alpha_H = \frac{\log(\bar{y}/(1 - \bar{y}))}{\log[L] - \log K} \\ &\implies \log(\bar{y}/(1 - \bar{y})) = \alpha_H \log[L] - \alpha_H \log K \end{aligned} \quad (3.20)$$

Troviamo così una dipendenza *lineare* tra i due logaritmi, che ci consente di ricavare:

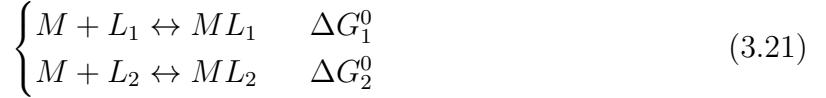
- $\alpha_H$  dalla pendenza della retta;
- K dalla intercetta con l'asse delle ascisse.

Ad un risultato analogo si perviene, anziché partendo direttamente dall'equazione di Hill, calcolando:

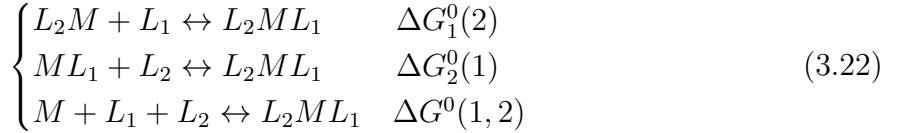
$$\frac{v}{[L]} = \frac{n[L]^{\alpha_H-1}/K^{\alpha_H}}{1+[L]^{\alpha_H}/K^{\alpha_H}} \implies \ln[L] = -(1/\alpha_H) \log \left[ \left( \frac{n}{v} \right) - 1 \right] + \log K$$

che restituisce ancora una retta, questa volta con coefficiente angolare  $-1/\alpha_H$  e intercetta con le ascisse in  $\log(K)$ . Questa ultima forma mette in evidenza il grado di cooperatività con il valore di  $n$ , che giocava un ruolo centrale nell'equazione di legame di Scatchard. Questo conferma quanto si era detto in apertura di paragrafo: una modellizzazione completa dell'interazione ligando-macromolecola deve tener conto sia dell'equazione di Scatchard che dell'equazione di Hill, fornendo un confronto critico tra le due.

Infine, guardiamo al problema sul **piano delle energie**. Per ragioni di semplicità consideriamo una macromolecola dotata di due siti di legame, che nel caso generale potranno interagire tra loro. A ciascuno dei due processi di legame è associata una determinata energia libera:



a cui andranno affiancati i termini, eventuali, di interazione tra siti:



Definiamo dunque:

- $\Delta G_1^0(2) - \Delta G_1^0 = \Delta G_2^0(1) - \Delta G_2^0 = \Delta G_{1,2}^0$
- $\Delta G_1^0 + \Delta G_2^0(1) = \Delta G_2^0 + \Delta G_1^0(2) = \Delta G^0(1, 2)$

Grazie a cui si trova:

$$\boxed{\Delta G_{1,2}^0 = \Delta G^0(1, 2) - \Delta G_1^0 - \Delta G_2^0} \quad (3.23)$$

Sul piano delle energie è il lato sinistro appena trovato a determinare il comportamento della cooperatività:

1.  $\Delta G_{1,2}^0 = 0$  : no interazione
2.  $\Delta G_{1,2}^0 < 0$  : cooperatività
3.  $\Delta G_{1,2}^0 > 0$  : antagonismo

Dato un numero finito di siti di legame, è quindi evidente l'esistenza di una **gerarchia di energie**, in relazione alla quale si avranno più o meno associazioni ligando-polimero. Come pura informazione riportiamo le principali forme energetiche coinvolte nelle associazioni che qui abbiamo discusso:

- Perdita dei gradi di libertà rotazionali e traslazionali
- restrizioni alle rotazioni interne

- Effetti idrofobici
- Interazioni tra gruppi funzionali (legame H, dipolo-dipolo, forze di Van Der Walls)
- Interazioni elettrostatiche
- Rilascio di molecole di solvente dalla sfera di idratazione

Per vedere se  $\Delta G_{1,2}^0$  è positivo o negativo devo studiare

$$K_{12} = e^{-\frac{\Delta G_{1,2}^0}{RT}} = \frac{[M][L_1ML_2]}{[L_1M][ML_2]}$$

Ed utilizzando le frazioni di ligando legato

$$\begin{cases} y_1 = \frac{[L_1ML_2] + [L_1M]}{[M]} \\ y_2 = \frac{[L_1ML_2] + [ML_2]}{[M]} \\ y_{12} = \frac{[L_1ML_2]}{[M]} \end{cases} \quad (3.24)$$

È possibile scrivere  $K_{12}$  come

$$K_{12} = \frac{y_{12}}{(y_1 - y_{12})(y_2 - y_{12})}$$

A metà della reazione, quando  $y_1 = y_2 = \frac{1}{2}$  otteniamo

$$K_{12} = \frac{y_{12}}{(\frac{1}{2} - y_{12})^2}$$

e, ritornando a  $\Delta G_{1,2}^0$

$$\Delta G_{1,2}^0 = -2RT \log \frac{2y_{12}}{1 - 2y_{12}}$$

quindi possiamo vedere che più  $2y_{12}$  si avvicina a 1 più sarà favorita la doppia saturazione. Se lo stesso valore è vicino a 0 è invece favorito il legame singolo, mentre se  $2y_{12} = 0.5$  e  $\Delta G_{1,2}^0$  è nullo e non c'è interazione tra i siti di legame.

### 3.3 Proteine allosteriche: l'emoglobina

**Definizione 3.3.0.1.** In biofisica si verificano **effetti allosterici** quando le caratteristiche di legame di una macromolecola sono alterate dal legame con un ligando. L'alterazione può riguardare il legame di altri ligandi uguali a primo (e in questo caso si parla di effetto allosterico OMOTROPICO) o ligandi diversi (e in questo caso si parla di allosteria ETEROTROPICA).

Nel primo caso l'effetto riguarda macromolecole con più siti di legame per lo stesso ligando e in tal caso l'allosteria può ripercuotersi, principalmente, sotto forma di una cooperatività o di un antagonismo. Il secondo tipo di effetti è invece fondamentale per la regolazione delle reazioni enzimatiche. Le macromolecole sottoposte a regolazione allosterica presentano solitamente una struttura quaternaria e presentano un sito allosterico su ogni subunità. Il legame del ligando presso tali siti è in grado di modificare leggermente la struttura terziaria dell'enzima consentendo di incrementare o di ridurre l'attività

catalitica a seconda delle esigenze della cellula. Si distinguono tra i ligandi gli **attivatori allosterici**, che aumentano l'attività, e gli **inibitori allosterici** che la riducono.

Senza entrare nel dettaglio della questione, è comunque rilevante ricordare che gli effetti allosterici richiedono l'esistenza di due forme della molecola:

- **T o tesa**, con bassa affinità per il ligando primario. Si tratta della forma meno attiva e favorita da effettori (ligandi) negativi;
- **R o rilassata**, con alta affinità per il ligando primario. Si tratta della configurazione più attiva della molecola e pertanto sarà favorita da un effettore (ligando) positivo.

Quando la molecola è stabile, i due stati T e R sono in equilibrio tra loro e l'equilibrio è spostato dal legame del primo ligando, inibitore o attivatore a seconda delle circostanze. Il cambiamento da R a T può avvenire secondo due diversi modi:

1. **all'unisono**, secondo il modello di *Monod-Wyman-Changeux (MWC)*

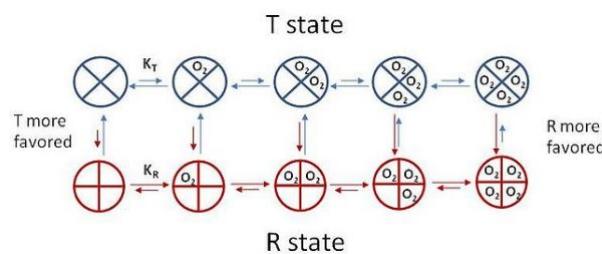


Figura 3.11: MWC per molecola di emoglobina

2. **in maniera sequenziale**, secondo il modello di *Koshland (KNF)*

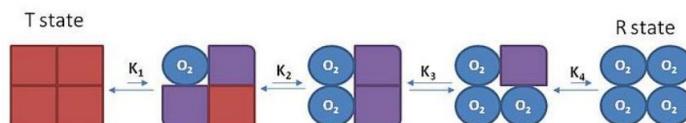


Figura 3.12: KNF per molecola di emoglobina

Vediamo dunque un'applicazione pratica su una macromolecola che già spesso abbiamo incontrato, l'emoglobina (da ora in poi indicata, se non ove esplicitamente necessario, con HB). Si tratta di una proteina che ritroviamo nei globuli rossi del sangue, oligomerica e costituita da 4 sub-unità, raggruppate in due dimeri  $\alpha\beta$ . Le subunità  $\alpha$  sono costituite da 141 aa mentre le  $\beta$  ne conteggiano 146; ciascuna di esse è composta da 7 ( $\alpha$ ) o 8 ( $\beta$ ) eliche e diversi bend e loop ripiegati. Il peso molecolare è di circa  $M_w = 64500D$ ;

HB ammette l'esistenza delle due forme T e R, consente di conseguenza la presenza di effetti allosterici. È interessante confrontare le due forme:

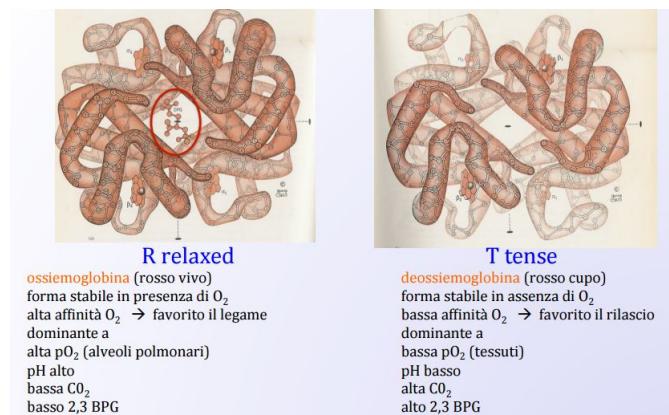


Figura 3.13: Confronto a specchio tra forma rilassata e tesa. BPG è il bifosfoglicerato, presente nei globuli rossi nella stessa concentrazione dell'HB. Si lega con la deossiHB in proporzione 1:1 stabilizzandone la struttura interna e riducendo l'affinità con l'ossigeno. Si rammenta che accanto a queste due forme ne esiste una terza, la **metaemoglobina**, che si ottiene quando nel gruppo eme il ferro si trova nello stato di ossidazione  $Fe^{3+}$  e che NON lega  $O_2$

Da un punto di vista prettamente sperimentale e biofisico, le due forme si riconoscono e individuano grazie allo spettro di assorbanza: la forma ossigenata presenta un doppio picco secondario, mentre la forma deossigenata manifesta un solo massimo secondario.

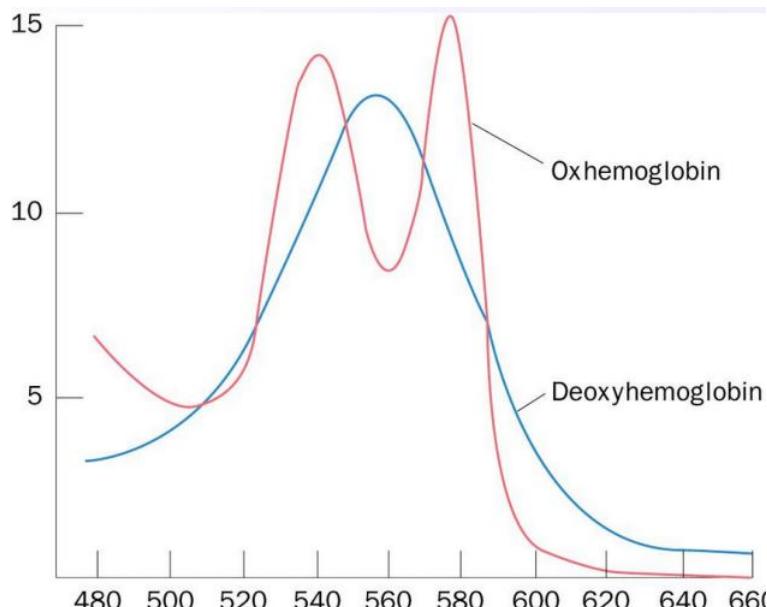


Figura 3.14: Spettro di assorbanza per le forme ossigenata e deossigenata. In figura è mostrato solo il picco secondario, attorno ai 550 nm. Il picco principale è attorno ai 400 nm e si discosta poco da una forma all'altra

Passiamo pertanto all'analisi delle allosterie che caratterizzano HB. Per quanto riguarda gli effetti *omotropici* ne abbiamo già discusso nel paragrafo precedente, relativamente al ruolo della porfirina, cui si rimanda (Esempio 4). Tra le allosterie *eterotropiche* più interessanti si annovera invece la **regolazione del rilascio di ossigeno da emoglobina**. Si individuano diversi responsabili, o *effettori*.

**1. Effetto Bohr:**

Nelle condizioni di pH relativamente basso e di elevata concentrazione di  $CO_2$  presenti nei tessuti periferici, l'affinità dell'emoglobina per l'ossigeno diminuisce. Pertanto se per effetto del metabolismo cellulare si legano ioni  $H^+$ (a basso pH) e si produce  $CO_2$ , l'equilibrio della forma viene spostato verso T, favorendo in tal modo il rilascio di ossigeno.

**2. 2,3-Bifosfoglicerato (BPG):**

Il rilascio o meno di ossigeno per effetto di questo effettore è legato alla pressione di ossigeno  $O_2$  nel sangue. Ad alta quota, dove è bassa la pressione di ossigeno, succede che, quando l'emoglobina raggiunge i tessuti, le catene  $\beta$  sono le prime a cedere l'ossigeno e tale perdita comporta uno spostamento dei monomeri dal centro. Appena la cavità idrofila si apre il BPG entra e si lega al tetramero. La struttura così stabilizzata può rilasciare anche l'ossigeno delle due catene  $\alpha$ . Questo effettore entra in gioco efficacemente in caso di **ipossia**, ovvero di carenza di ossigeno nell'intero organismo. Come risposta a ciò viene aumentata la concentrazione di BPG consentendo un recupero dei corretti valori biologici.

Tra le cause di ipossia si registra il possibile eccesso (principalmente per inalazione) di **carbossiemoglobina**, **COHB**. L'emoglobina ha infatti un coefficiente di affinità per il monossido di carbonio 250 volte maggiore di quello per l'ossigeno. In presenza di sovraquantità di CO, HB tende a legarsi più stabilmente con esso, che quindi spiazza l'ossigeno stesso. HB in tal modo non è più in grado di trasportare  $O_2$ .

**3. Temperatura:** un aumento di temperatura fa spostare la curva verso destra, una diminuzione verso sinistra.

Quanto discusso è riassunto nell'immagine seguente. In ascissa si trova la pressione parziale dell'ossigeno, che sappiamo essere direttamente proporzionale alla concentrazione di quest'ultimo **dalla legge di Henry**. La curva di dissociazione che segue è pertanto un *plot di Hill* per l'emoglobina. L'andamento suggerisce un coefficiente di Hill  $\alpha_H > 1$ , in accordo con la cooperatività positiva che caratterizza la proteina in esame.

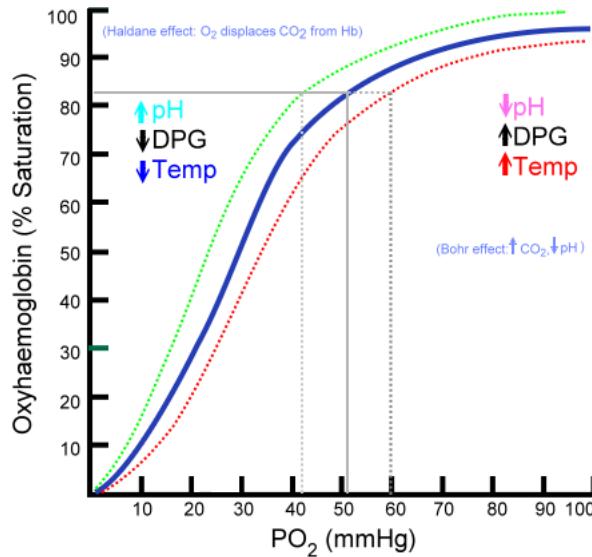


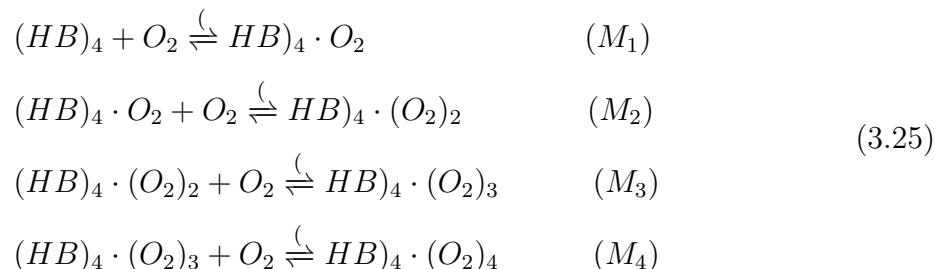
Figura 3.15: Curva di dissociazione dell’emoglobina. Gli effettori positivi spostano la curva verso sinistra (cioè aumenta l’affinità con l’ossigeno e quindi la tendenza a legarlo), gli effettori negativi verso destra (effetto opposto). Si noti l’andamento sigmoidale per cui una piccola variazione della pressione di ossigeno si ripercuote in una grande variazione della saturazione.

Un caso notevole è l'**emoglobina fetale** che ha 2 catene  $\alpha$  e due catene  $\gamma$ , uguali al 72% a quelle  $\beta$ . Ha un’affinità di legame per 2,3-BPG molto inferiore, che corrisponde a una capacità di saturazione di  $O_2$  maggiore. La relativa curva di dissociazione è dunque più spostata verso sinistra, per garantire un trasferimento efficiente dell’ossigeno da madre a feto.

### 3.3.1 Equilibri di associazione tra ossigeno e HB. Trattazione MWC

Concludiamo il capitolo della ricognizione molecolare fornendo un esempio di **trattazione puramente statistica** di un effetto allosterico.

Modellizziamo l’emoglobina come una macromolecola dotata di quattro siti di legame, identici e indipendenti. Secondo la convenzione 3.5, fisseremo pertanto  $n=4$ ,  $M_0 = (HB)_4$ ,  $L = O_2$



che nel caso di binding non cooperativo (ovvero trascurando l’interazione tra siti, che tuttavia esiste come abbiamo già notato in precedenza) introduce le seguenti quattro

costanti di dissociazione macroscopica:

$$\begin{aligned}\mathcal{K}_1 &= \frac{1}{4-1+1}k = \frac{1}{4}k \\ \mathcal{K}_2 &= \frac{2}{4-2+1}k = \frac{2}{3}k \\ \mathcal{K}_3 &= \frac{3}{4-3+1}k = \frac{3}{2}k \\ \mathcal{K}_4 &= \frac{4}{4-4+1}k = 4k\end{aligned}\tag{3.26}$$

dove  $\mathcal{K}_i = \frac{\Omega_{n,i-1}}{\Omega_{n,i}}k = \frac{i}{n-i+1}$ . Se ora teniamo conto di cosa succede realmente, senza entrare nei dettagli, deduciamo intuitivamente che, poiché l'energia del legame ligando-HB diminuisce con il crescere della costante di dissociazione (microscopica o macroscopica) è immediato scrivere le condizioni di cooperatività e anticooperatività:

- $\mathcal{K}_1 < \mathcal{K}_2 < \mathcal{K}_3 < \mathcal{K}_4$  : **anticooperatività**
- $\mathcal{K}_1 > \mathcal{K}_2 < \mathcal{K}_3 > \mathcal{K}_4$  : **cooperatività**

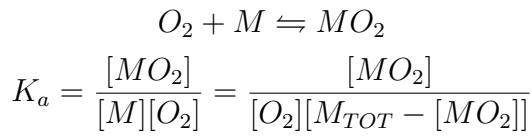
Dal punto di vista energetico, si trova, come già visto per il modello semiempirico di Hill

$$\begin{aligned}\Delta G_i^o &= RT \log \mathcal{K}_i \\ \Delta \bar{G}_i^o &= RT \log \mathcal{K}_i - RT \log \frac{\Omega_{n,i-1}}{\Omega_{n,i}} \\ \Delta G_{I,ij} &= \Delta \bar{G}_j^o - \Delta \bar{G}_i^o = -RT \log \frac{\mathcal{K}_i}{\mathcal{K}_j} + RT \log \frac{\Omega_{n,i-1}/\Omega_{n,i}}{\Omega_{n,j-1}/\Omega_{n,j}}\end{aligned}$$

Per HB sperimentalmente risulta un  $\Delta G_{I,14} \simeq -2.1 \text{ kcal}/(\text{mol } \text{sito})$  negativo, che indica cooperatività come ci dice 3.23 e come era lecito aspettarsi.

### 3.4 Note sulla mioglobina

La mioglobina è una proteina che lega l'ossigeno la cui funzione è il trasporto di grosse quantità di ossigeno in cellule specializzate per il corretto funzionamento della catena respiratoria e della contrazione muscolare. La sua struttura è simile a quelle delle subunità dell'emoglobina: contiene il gruppo eme con il ferro nello stato  $Fe^{2+}$  ed è una singola catena polipeptidica con 8 eliche  $\alpha$ , a differenza dell'emoglobina che è invece tetramerică. In confronto all'HB presenta un'affinità per l'ossigeno sei volte superiore, quindi la sua curva di dissociazione è marcatamente spostata verso sinistra ed è un ramo di iperbole. La costante di associazione per la mioglobina è definita dalla reazione all'equilibrio:



da cui si trova un'espressione equipollente all'equazione di Hill, per la mioglobina:

$$\frac{[MO_2]}{M_{TOT}} = \frac{K_a[O_2]}{1 + K_a[O_2]}\tag{3.27}$$

il cui grafico è un *plot di Hill* per la mioglobina, ovvero la sua curva di dissociazione. Trattandosi dell'equazione di un'iperbole troviamo che *il coefficiente di Hill*  $\alpha_H$  associato è 1 e pertanto **la mioglobina non mostra legame cooperativo, né allosterico**.

# **Appunti di Elementi di Biofotonica**

## **II**

Botta Francesca,  
Carra Chiara,  
Fendillo Alessandro,  
Frosio Dylan,  
Ghittori Davide

18/01/2017

Corso tenuto dalla professoressa Laura D'Alfonso nel primo semestre del terzo anno della laurea in Fisica, Università di Milano Bicocca.

Il presente documento sarà diviso in 4 volumi, per questioni di allocamento della memoria dell'editor di testo. Per la trattazione completa si rimanda pertanto ai volumi successivi

# Indice

<b>4 SPETTROSCOPIA DI ASSORBIMENTO UV-VIS</b>	<b>65</b>
4.1 Spettro elettromagnetico . . . . .	65
4.1.1 Spettro del visibile . . . . .	66
4.2 Principi della spettroscopia . . . . .	67
4.3 Il modello classico della spettroscopia di assorbimento . . . . .	68
4.4 Il modello quantistico della spettroscopia di assorbimento . . . . .	68
4.4.1 Le linee spettrali . . . . .	70
4.4.2 Diversi livelli energetici di transizione . . . . .	71
4.5 Assorbanza . . . . .	73
4.6 Velocità di transizione tra livelli . . . . .	75
4.7 Laser . . . . .	77
4.8 Tipi di stati elettronici . . . . .	79
4.9 Strumentazione ed evidenze sperimentali . . . . .	81
4.10 Responsabili nelle macromolecole dell'assorbimento . . . . .	83
<b>5 DICROISMO CIRCOLARE</b>	<b>86</b>
5.1 Polarizzazione della radiazione elettromagnetica . . . . .	87
5.2 Attività ottica . . . . .	89
5.2.1 Esempi grafici di attività ottica. Note di sperimentazione . . . . .	92
5.3 Effetto Cotton e modello quantistico del DC . . . . .	93
5.4 Strumentazione . . . . .	96
5.5 Proteine e CD . . . . .	98
5.5.1 Lontano UV . . . . .	98
5.5.2 Vicino UV . . . . .	101
5.5.3 Utilizzo del CD . . . . .	103
<b>6 SPETTROSCOPIA DI FLUORESCENZA</b>	<b>105</b>
6.1 Principi base della fluorescenza . . . . .	105
6.2 Le "regole" della fluorescenza . . . . .	109
6.3 Resa quantica e tempi di vita . . . . .	111
6.4 Photobleaching . . . . .	116
6.5 Strumentazione. Note di sperimentazione . . . . .	117
6.6 Fluorofori . . . . .	120
6.6.1 Intrinseci . . . . .	121
6.6.2 Estrinseci . . . . .	122
6.6.3 Utilizzi . . . . .	123
6.6.4 Proteine fluorescenti . . . . .	124

# Capitolo 4

## SPETTROSCOPIA DI ASSORBIMENTO UV-VIS

### 4.1 Spettro elettromagnetico

Ogni sostanza biochimica assorbe la radiazione a cui è sottoposta a una determinata lunghezza d'onda. Tale parametro può dipendere da diverse proprietà dell'oggetto quali il suo stato di aggregazione, la natura del solvente, il pH della soluzione. Lo studio delle lunghezze d'onda e degli spettri energetici equivale a leggere un'impronta digitale di quella sostanza, che può essere identificata univocamente e fornire ulteriori informazioni. L'indagine spettroscopica è perciò una della fondamenta della biofisica.

**Definizione 4.1.0.1.** *La spettroscopia è il ramo della scienza che si occupa dello studio dell'interazione della materia con la radiazione elettromagnetica, e viceversa.*

La luce è una forma di radiazione elettromagnetica, sommatoriamente descrivibile come un insieme di pacchetti discreti di energia e costituita dall'insieme di un campo elettrico e di un campo magnetico oscillanti, vale a dire variabili nel tempo, che si propagano nel vuoto alla velocità di  $c = 2.99 \times 10^8 \text{ m/s}$ . Il campo elettrico  $\bar{E}$  oscilla nel piano che contiene la direzione di propagazione, mentre  $\bar{B}$  appartiene al piano perpendicolare ad esso. La descrizione delle radiazioni è dunque quella ondulatoria, che fa uso dei parametri:

- **frequenza  $\nu$  (Hz):** esprime il numero di oscillazioni di  $\bar{E}$  nell'unità di tempo;
- **lunghezza d'onda  $\lambda$  (nm):** esprime la distanza minima tra due parti in fase dell'onda. Essa dipende dal mezzo di dispersione: detta  $\lambda$  il valore nel vuoto e  $n$  il numero di rifrazione del mezzo, vale  $\lambda^i = \lambda/n$ ;
- le due grandezze sono legate dalla **relazione di dispersione**  $\lambda\nu = c$ , mentre l'energia trasportata è espressa dalla **relazione di Planck**  $E = h\nu = hc/\lambda$ , con  $h = 6.63 \times 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$  detta *costante di Planck*.

A seconda del range di frequenze (o di lunghezze d'onda) che caratterizza la radiazione si definisce uno **spettro elettromagnetico**, ovvero l'insieme di tutte le possibili frequenze.

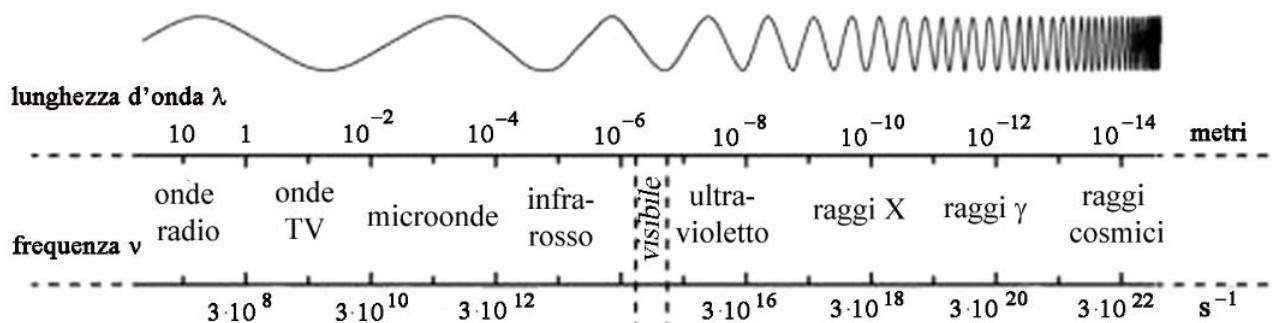


Figura 4.1: Spettro della radiazione elettromagnetica

In base alla regione di spettro con cui ci si trova a lavorare, esistono diversi **tecniche spettroscopiche di indagine**, con esiti e risultati ottenibili rispettivamente diversi:

1. Nella regione delle *onde radio* si fa uso della **spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (NMR)** che si basa sulle proprietà magnetiche dei nuclei di alcuni atomi e isotopi facendo uso dell'effetto Zeeman. Consente di ricavare informazioni sulla **struttura** dell'oggetto in esame.
2. Nel campo dell'*infrarosso* sono invece diffusi gli utilizzi della **Spettroscopia IR in Trasformata di Fourier (FTIR)** e della **Spettroscopia di scattering Raman**, utilizzate come forma di analisi delle vibrazioni dei legami interni di un polimero.
3. Nel range di *visibile* e *ultravioletto* è invece si usa la **spettroscopia di fluorescenza** e il **dicroismo circolare** al fine di ottenere informazioni sulla struttura secondaria e sulla conformazione della macromolecola biologica.
4. Per i *raggi X* la tecnica principale è quella della **diffrazione a raggi X**, che permette di risalire alle strutture interne di cristalli e condensati con una risoluzione (e quindi una  $\lambda$  di indagine) che può arrivare a 1.8 Å.

#### 4.1.1 Spettro del visibile

La regione di spettro che intendiamo come *luce visibile* si estende per un range di lunghezze d'onda molto ristretto. In particolare si estende da circa 700 nm del rosso (al confine con la luce infrarossa) a circa 400 nm del viola (al confine con la luce ultravioletta). L'energia media è di circa  $3.32 \times 10^{-19}$ .

È possibile ottenere l'intero spettro visibile dalla **dispersione**<sup>1</sup> di una raggio di luce bianca che attacca un prisma triangolare. Il raggio entrante si separa nelle componenti spettrali con diversa lunghezza d'onda, per via della dipendenza della velocità dell'onda dalla lunghezza d'onda secondo la relazione:

$$\lambda\nu = c \implies \frac{\lambda_0}{n}\nu = c$$

I diversi raggi colorati escono ciascuno con un angolo diverso, noto come **angolo di dispersione**.

<sup>1</sup>Dipendenza dell'indice di rifrazione dalla lunghezza d'onda, secondo la legge di Cauchy  $n(\lambda) = A + \frac{B}{\lambda^2}$



Figura 4.2: Dispersione con prisma triangolare. Dettaglio delle lunghezze d'onda dei singoli componenti.

## 4.2 Principi della spettroscopia

La spettroscopia si basa sulla misurazione, per mezzo di uno *spettrometro*, di uno spettro di una sostanza contenente atomi e molecole, che interagiscono in maniera differente con la luce. Definiamo prima di tutto:

**Definizione 4.2.0.1.** *Si chiama spettro il grafico dell'intensità della radiazione, assorbita o emessa dal campione, in funzione della frequenza  $\nu$  o della lunghezza d'onda  $\lambda$ .*

Come si intuisce dalla definizione appena data la spettroscopia si avvale di due strade di indagine:

- spettroscopia di **assorbimento**: ovvero una tecnica analitica che riguarda la misurazione dell'assorbimento della radiazione elettromagnetica (ovvero la transizione di un elettrone da un livello energetico ad uno con energia maggiore) (e.g. spettroscopia UV [185-400 nm] / Visibile [400-800 nm]/ IR [0.76-15  $\mu\text{m}$ ]).
- spettroscopia di **emissione**: ovvero una tecnica analitica in cui l'emissione (di una particella o di radiazione, da energia maggiore a energia minore) è dispersa e viene misurata l'entità della dispersione (e.g. fluorescenza).

Vediamo dunque di capire come effettivamente la materia interagisce con la luce, in che percentuale e perché solo alcune lunghezze d'onda modificano lo stato della molecola.

Partiamo dal presupposto che *qualsiasi corpo è costituito da cariche elettriche in movimento*. Un'onda elettromagnetica incidente tende quindi a modificare la posizione relativa delle cariche compiendo sul sistema un *lavoro* e interagendo col sistema molecolare attraverso la sua parte magnetica ed elettrica. Come si capisce quindi, le energie in gioco sono diverse, e conseguentemente anche i metodi spettroscopici lo saranno (ricorda infatti che vale sempre  $E = h\nu$ ).<sup>2</sup> Considereremo nel seguito il caso della spettroscopia **ottica**, che si interessa delle proprietà elettroniche coinvolte nell'interazione con la radiazione. A tal proposito preoccupiamoci di indagare l'interazione tra il campo elettrico e la distribuzione molecolare di carica, la quale può essere approssimata da un dipolo elettrico oscillante<sup>3</sup>.

Abbiamo detto che la radiazione genera un moto di cariche nella molecola. A livello atomico succede che, **essendo la massa degli elettroni molto minore della massa dei**

<sup>2</sup>La spettroscopia si divide principalmente in spettroscopia ottica e spettroscopia magnetica come già accennato nell'enumerazione delle diverse tecniche in apertura di paragrafo.

<sup>3</sup>Tramite sviluppo in multipoli.

**nuclei**, gli elettroni si spostano molto più rapidamente di quanto non facciano i nuclei. Una conseguenza di questo fatto è che quando i nuclei cambiano posizione, gli elettroni rispondono immediatamente a questa variazione, *transendo da un livello a un altro* e riportandosi nel loro nuovo stato stabile, prima che i nuclei possano muoversi una seconda volta. Globalmente (e non localmente!) è come se le cariche negative permanessero sempre nel loro stesso stato elettronico. Geralmente, gli *elettroni seguono ADIABATICAMENTE il moto dei nuclei*, motivo per cui *non c'è scambio di energia tra nuclei e elettroni*. Questa approssimazione energetica del modello atomico, detta **approssimazione di Born-Oppenheimer**, ci consente di **separare i moti nucleari da quelli elettronici**. Ricordato che i primi sono oggetto delle *spettroscopie vibrazionali* mentre i secondi delle *spettroscopie elettroniche*, concentriamo la nostra attenzione proprio sul comportamento elettronico.

### 4.3 Il modello classico della spettroscopia di assorbimento

Una prima spiegazione del comportamento in risposta di un sistema interessato da un campo elettrico incidente può essere data in maniera essenziale ma comunque introduttiva.

La soluzione in particolare è la seguente:

1. L'energia è trasferita dal campo al sistema senza soluzione di continuità; essa può essere restituita se non sono presenti risonanze (scattering), oppure in presenza di risonanze viene assorbita.
2. Successivamente l'energia assorbita viene degradata per la presenza di processi dissipativi.
3. In tal modo la radiazione viene attenuata, appunto perché assorbita, e rende possibile lo sviluppo di studi di **spettroscopia di assorbimento**.
4. Non è poi da escludere che una nuova radiazione venga prodotta dal sistema, consentendo quindi un'eventuale indagine in **spettroscopia di emissione**.

### 4.4 Il modello quantistico della spettroscopia di assorbimento

Naturalmente il modello classico non può esaurire e nemmeno sperare di descrivere in maniera sufficientemente regolare cosa succede davvero. L'inadeguatezza della fisica classica rispetto ai modelli quantistici non è certo argomento di questo testo, anche se in quanto segue richiamiamo brevemente i punti principali della Meccanica Quantistica:

- L'energia non è più una grandezza continua, ma varia discretamente per quantità finite chiamate **quanti** ( $h\nu$ ).
- Il concetto di traiettoria perde completamente di consistenza e si rende necessario l'uso di una **funzione d'onda**  $\psi$ , con interpretazione probabilistica, al fine di descrivere uno **stato** (atomo, molecola, sistema, ecc...). L'evoluzione temporale di questo stato è regolata dall'**equazione di Schrödinger**:

$$\boxed{i\hbar \frac{\partial \psi}{\partial t} = \hat{H}\psi} \quad (4.1)$$

che supporremo separabile nelle variabili temporale e spaziale (potenziale stazionario). La soluzione della parte spaziale (equazione secolare) rappresenta la base di autostati ortonormali nella quale ogni stato fisico può essere espanso. In genere quindi

$$\Psi(x, t) = \Psi(x, 0)e^{-iEt/\hbar} = \sum_n c_n \psi(x)_n e^{-iEt/\hbar} \quad (4.2)$$

dove compaiono i coefficienti  $c_n$ , la cui norma quadra rappresenta la probabilità di ottenere la misura dell'autovalore associato all'n-esimo autostato.

- Dato un sistema a due stati  $\psi = c_a \psi_a + c_b \psi_b$ , ad esempio due nuclei atomici, si definisce **integrale di sovrapposizione** o di **overlap**  $\langle \psi_a | \psi_b \rangle$ , evidentemente nullo se ortogonali.

Facciamo dunque ritorno al problema iniziale. Il sistema che stiamo considerando è eccessivamente complicato per sperare di risolvere esattamente l'equazione di Schrödinger. Andiamo pertanto a separare, ove possibile, i singoli contributi e a valutare singole equazioni,  $(\hat{H}_1 + \hat{H}_2 + \dots)\Psi = (E_1 + E_2 + \dots)\Psi$  avvalendoci di semplificazioni matematiche. L'approssimazione di Born-Oppenheimer in cui stiamo lavorando si traduce quantisticamente nella fattorizzazione della funzione d'onda complessiva in una componente nucleare e in una elettronica<sup>4</sup>.

$$\Psi = \Psi_{el}(r, R)\Phi_N(R)$$

Si può dimostrare riscrivendo l'hamiltoniana che le condizioni al contorno in cui stiamo procedendo sono dunque che *i nuclei (R) si muovono all'interno di un potenziale determinato dalle posizioni medie (non istantanee) degli elettroni (r), che invece vedono i nuclei fermi, ragion per cui non c'è interazione tra nucleo ed elettrone*. Poiché la parte nucleare è descritta dall'evolvere della situazione degli elettroni, concentriamoci unicamente sull'equazione elettronica.

Consideriamo dapprima il caso in cui il campo elettrico è spento. L'equazione di Schrödinger elettronica si riduce alla sola equazione agli autovalori:

$$\hat{H}_{el}\Psi_{el} = E_{el}^0\Psi_{el} \quad (4.3)$$

che produce, sotto forma di autovalori discreti, i livelli elettronici  $E_i^0$  del **sistema imperturbato**.

Ora accendiamo il campo elettrico: esso può essere trattato come una **perturbazione**  $\bar{W} = \lambda W$ , per cui la 4.1 vede modificato l'operatore hamiltoniano di un termine W:

$$i\hbar \frac{\partial \Psi}{\partial t} = \hat{H}'\Psi = (\hat{H} + \hat{W})\Psi \quad (4.4)$$

Poiché, nel modello di come funziona la spettroscopia, siamo interessati alle bande spettrali e poiché il colore di queste ultime - e di conseguenza l'intero spettro finale - è determinato da particolari gruppi di atomi chiamati **cromofori**, le cui dimensioni sono *molto minori della lunghezza d'onda della radiazione di campo elettrico*, possiamo **trascurare la dipendenza spaziale del campo**  $\bar{E}$  e trattare l'effetto del campo servendoci della **teoria delle perturbazioni dipendenti dal tempo**. Diamo un volto formale alla questione. Il campo si scrive

$$E(t) = E(0)e^{i\omega t}$$

---

<sup>4</sup>Non esplicheremo per ora le componenti di spin delle cariche in gioco

Inoltre una banda spettrale corrisponde ad una transizione elettronica tra due livelli elettronici definiti dalla 4.3. La probabilità di questa transizione sarà quindi data dalla norma quadra di:

$$c_{fin}(t) = \frac{\lambda}{i\hbar} \int_0^T dt e^{i(E_{fin}^0 - E_{in}^0)t} \langle \Psi_{fin} | W | \Psi_{in} \rangle \quad (4.5)$$

Come già detto la distribuzione molecolare di carica può essere espansa in serie di multi-poli, il cui termine dominante è il dipolo elettrico. Il termine che regola l'accoppiamento tra onda elettromagnetica e sistema molecolare è quindi:

$$\bar{V} = \bar{\mu} \cdot E(t) = \bar{\mu} \cdot E(0)e^{i\omega t} = \sum_i e_i \bar{r}_i E(0)e^{i\omega t}$$

dove con  $\bar{\mu}$  si è indicato l'operatore quantistico momento di dipolo elettrico di transizione. Sostituendo questo in 4.5 troviamo che affinché avvenga la transizione vi sia trasferimento di energia, e quindi comparsa di una banda.

$$|c_{fin}(t)|^2 \propto |\langle \Psi_{fin} | \bar{\mu} | \Psi_{in} \rangle \cdot E(0)|^2 \neq 0 \quad (4.6)$$

Ovvero la probabilità di transizione tra livelli non deve essere nulla. Quella espressa in 4.6 è detta una generica **regola di selezione**. Queste ultime regolano l'esistenza del fenomeno spettrometrico e in particolare possono essere:

- **specifiche**, nel caso in cui dipendano dal tipo di momento di transizione;
- **di simmetria**, quando l'elemento di transizione è invariante rispetto a qualsiasi operazione di simmetria del sistema.

È più semplice dedurre l'esistenza o meno della transizione restringendosi sulla simmetria degli stati coinvolti nel processo, quando possibile.

Riassumendo: **per avere la transizione in assorbimento** è necessario che  $\langle \Psi_{fin} | \bar{\mu} | \Psi_{in} \rangle \neq 0$  dal momento che, poiché la transizione riguarda il moto di un solo elettrone, ha senso considerare soltanto due funzioni d'onda. Per ragioni di simmetria troviamo una condizione **necessaria** per l'esistenza delle linee spettrali: *se l'integrando è una funzione dispari per riflessione su uno qualsiasi dei piani, l'integrale su tutto lo spazio di 4.6 è nullo.*

#### 4.4.1 Le linee spettrali

Sperimentalmente si osserva che la spettroscopia di assorbimento su molecole genera spettri in cui le linee non sono segmenti ma presentano una certa ampiezza e si preferisce per questo parlare di *bande*. Questo è giustificabile tenendo conto di più fattori:

1. Il modello che abbiamo elaborato tiene conto dell'approssimazione di Oppenheimer, in cui i **moti vibrazionali** dei nuclei vengono completamente trascurati. Esso è un modello esatto per singolo atomo, il cui spettro di assorbimento è effettivamente filiforme, entro limiti intrinseci (vedi punti successivi). Per le molecole, se si tiene conto di questa ulteriore correzione e delle eventuali interazioni con il solvente, invece di una sola riga, lo spettro ne presenta in numero maggiore, molto ravvicinate ma distinguibili.

2. **Il tempo di vita** della molecola; una molecola trascorre solo un breve periodo di tempo nello stato eccitato, pari al tempo di vita dello stato eccitato,  $\tau$ . Se una molecola cambia stato alla frequenza di  $1/\tau$ , allora i livelli energetici si allargano e il corrispondente allargamento in energia del livello attorno a  $E$  è dato dalla disuguaglianza energia-tempo:  $\delta E = \frac{\hbar}{\tau}$ .
3. **L'effetto Doppler termico**, causato dal moto termico degli atomi. Quelli che si muovono<sup>5</sup> verso il rivelatore con velocità  $v$  avranno frequenze di transizione che differiscono da quelle degli atomi a riposo per un fattore

$$\Delta\omega_{Doppler} = \frac{2\omega_0}{c\sqrt{2\log 2\frac{kT}{m_0}}} \quad \begin{cases} \omega_0 & = \text{frequenza atomi a riposo} \\ m_0 & = \text{massa atomica} \end{cases}$$

#### 4.4.2 Diversi livelli energetici di transizione

Da quanto appena discusso per le linee è evidente che, detto che il modello quantistico serve capire cosa succede con buona approssimazione, all'atto pratico occorre tener conto anche delle energie vibrazionali e rotazionali accanto a quelle elettroniche. Si distinguerà pertanto tra:

- Livelli **elettronici**: a temperatura ambiente le molecole occupano il livello energetico più basso  $E_0$ . Quando le molecole assorbono radiazione ultravioletta o visibile (UV-VIS) uno degli elettroni più esterni, o l'elettrone spaiato nel caso ci sia, viene promosso a un livello più elevato  $E_1, E_2, \dots, E_n$  secondo un processo detto *transizione elettronica* e descritto dalla relazione di Planck  $\Delta E = h\nu = E_n - E_0 \sim 35-80$  kcal/mol.
- Livelli **vibrazionali**: se al posto dei singoli atomi si considerano molecole, il numero di gradi di libertà del sistema cresce e anche la variazione della sua geometria interna può influire sulla risposta del sistema ad assorbimento/emissione di luce. L'interazione della luce con la molecola provoca una serie di vibrazioni dei nuclei, ciascuna delle quali è idealmente modellizzabile con un oscillatore armonico. I singoli modi normali di ciascun oscillatore si chiamano *livelli vibrazionali*. In genere ce ne sono più di uno per ogni livello elettronico. Quantitativamente sono livelli la cui differenza in energia è minore rispetto a quella dei livelli elettronici. La spaziatura tra i livelli energetici è relativamente piccola, estendendosi da 0.01 a 10 kcal/mol.

In particolare quando viene assorbita radiazione IR le molecole vengono eccitate da un livello vibzionale a un altro o aumenta l'ampiezza delle vibrazioni sullo stesso livello. A tal proposito vale il **principio di Frank-Condon** secondo il quale le transizioni avvengono tra stati vibzionali le cui funzioni d'onda hanno massimi nella stessa posizione.

---

<sup>5</sup>La distribuzione delle velocità si assume essere idealmente Maxwelliana.

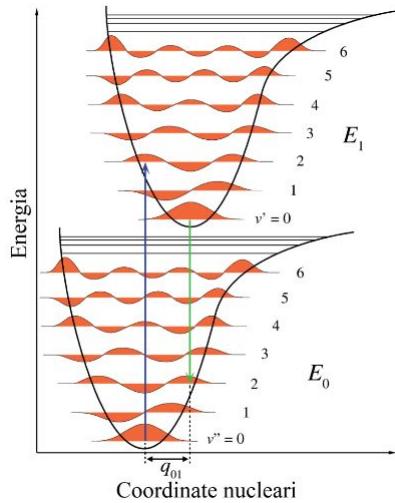


Figura 4.3: Diagramma di energia che illustra il principio di Franck-Condon.  $E_0$  e  $E_1$  sono due livelli elettronici. Le transizioni sono indicate dalle frecce blu e verde; gli stati vibrazionali sono indicati da  $\nu$ .

- **Livelli rotazionali:** corrispondono ai modi normali dei moti di rotazione a cui va incontro la molecola sottoposta a luce incidente. Sono quantizzati e discreti e la spaziatura tra livelli diversi è minore di quella presente tra livelli vibrazionali. Nel seguito verranno generalmente trascurati.

Si verifica che  $\Delta E_{\text{rotazionale}} < \Delta E_{\text{vibrazionale}} < \Delta E_{\text{elettronico}}$ .

Per tutti vale che una molecola può assorbire una radiazione  $\lambda$  solo se nella molecola esiste una transizione di corrispondente energia  $E = h\nu = \frac{hc}{\lambda}$ . Per completezza si fa notare, in ultimo, il ruolo che le proprietà di spin degli atomi hanno nelle regole di selezione. Si può dimostrare che la struttura elettronica di una molecola semplice (approssimando un sistema a due nuclei) è ben descritta dal seguente grafo di energia potenziale, in cui le diverse curve corrispondono ai diversi stati di spin, di singoletto e di tripletto:

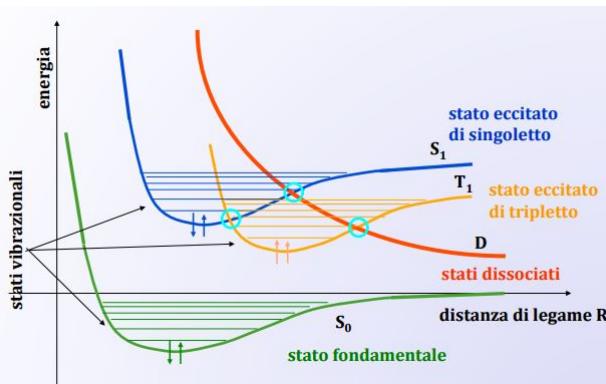


Figura 4.4: Energia potenziale di legame tenendo anche delle diverse funzioni d'onda di spin di uno stato

In genere, quando avviene una transizione elettronica c'è bassissima probabilità che cambi lo spin degli elettroni. Pertanto se gli elettroni eccitati dalla radiazione incidente hanno come stato eccitato di arrivo uno stato di tripletto, trascorre in genere molto tempo (se

confrontato con la scala temporale media di diseccitamento) prima che ricadano sullo stato fondamentale.

Di discreto interesse è infine il caso dell'**assorbimento a due fotoni**: esiste infatti la probabilità che due fotoni a bassa energia vengano assorbiti sequenzialmente e facciano avvenire una transizione più energetica. Il primo fotone porta l'elettrone a metà della distanza energetica. Il problema principale consiste nel fatto che l'elettrone deve ricevere il secondo fotone entro il tempo di vita dello stato metastabile nel quale viene a trovarsi dopo la prima eccitazione. Per studiare questo fatto assegniamo all'elettrone una sezione d'urto piccolissima<sup>6</sup>, dell'ordine di  $10^{-50} \text{ cm}^4 \text{s}$ . Per quanto possa apparire controintuitivo, la correzione energetica di un fotone per mezzo di un secondo fotone avviene abbastanza spesso da poter essere utilizzato in applicazioni di laboratorio. Molti coloranti possono venire eccitati da un ampio spettro di lunghezze d'onda, e quindi è possibile utilizzare uno stesso laser (in genere monocromatico) per eccitarli tutti e poi filtrarli per gli spettri prodotti singolarmente.

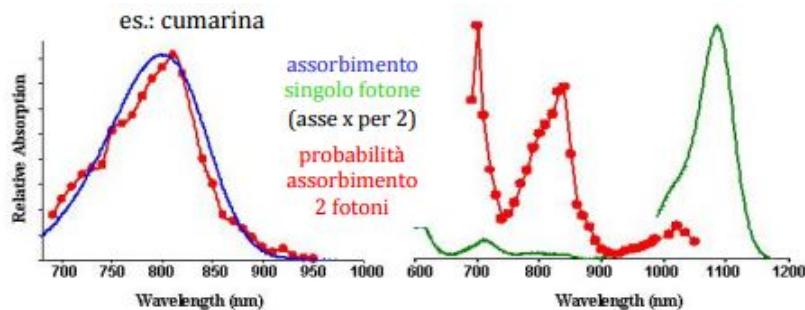


Figura 4.5: A sinistra lo spettro della cumarina, a destra quello della rodamina. Il picco di assorbimento si trova spesso ad una  $\lambda$  doppia rispetto al picco a singolo fotone (cumarina), che altrettanto spesso non si verifica (rodamina).

## 4.5 Assorbanza

Supponiamo di effettuare una misura dell'assorbimento di una radiazione. La luce incidente ha intensità  $I_0$  e una lunghezza d'onda  $\lambda$ . Essa urta contro un campione di una soluzione di molecole assorbenti di concentrazione molare  $C$  e lo attraversa per un cammino ottico di lunghezza  $l$  cm. La luce che non è assorbita dal campione riemerge dalla parte opposta con intensità  $I$ .

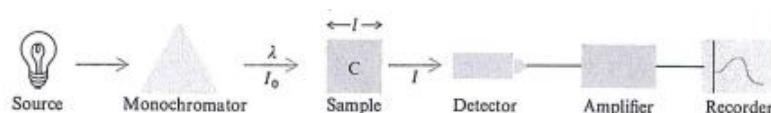


Figura 4.6: Apparato sperimentale per la misura di assorbimento

Consideriamo le molecole contenute in uno strato del campione perpendicolare alla direzione di propagazione della radiazione e sufficientemente sottile (sia  $dz$  il suo spessore)

<sup>6</sup>Un parametro che definisce la probabilità di un processo.

cosicché l'intensità della luce all'interno di questo strato si possa considerare costante. Ora, la frazione di luce assorbita è banalmente proporzionale al numero di molecole assorbenti incontrate: introdotti la densità di molecole  $N = CN_{AV}/1000 = \text{molecole}/\text{cm}^3$  e la sezione d'urto  $\sigma$ , ne risulta:

$$-\frac{dI}{I} = \sigma N dz \quad (4.7)$$

e integrando su entrambi i domini separabili, il lato sinistro dall'intensità iniziale  $I_0$  a quella finale I, il lato sinistro da 0 a l:

$$\begin{aligned} \log\left(\frac{I}{I_0}\right) &= -\sigma N l \\ \implies -\log\left(\frac{I}{I_0}\right) &= \sigma N l = \sigma \frac{N_{AV}}{1000} C l \\ \implies -2.303 \log_{10}\left(\frac{I}{I_0}\right) &= \sigma \frac{N_{AV}}{1000} C l \\ \implies -\log_{10}\left(\frac{I}{I_0}\right) &= \sigma \frac{N_{AV}}{1000} \frac{C l}{2.303} \end{aligned} \quad (4.8)$$

e chiamato **coefficiente di assorbimento molare** o **coefficiente di estinzione molare** la quantità

$$\epsilon = \frac{\sigma}{2.303} \frac{N_{AV}}{1000} \quad [\epsilon] = \left[ \frac{m^2}{mol} \right]$$

troviamo la **legge di Lambert-Beer** che *correla la quantità di luce assorbita alla concentrazione della sostanza* mettendo in mostra di quanto viene attenuata la luce per via dell'assorbimento:

$$-\log_{10}\left(\frac{I}{I_0}\right) = \epsilon C l = A$$

(4.9)

La quantità A è chiamata **assorbanza** o **densità ottica**. In fase di misurazione la quantità a cui si è realmente interessati è il coefficiente di estinzione molare  $\epsilon$ .

Sempre nominalmente definiamo **trasmittanza** la quantità

$$T = \frac{I}{I_0}$$

cosicché la legge di Lambert-Beer possa anche essere scritta

$$A = -\log_{10}(T) = \epsilon C l$$

L'adattamento della legge ai dati sperimentali è buona, ma può essere disturbato dall'intervento di alcui fattori tra cui:

- la variazione dei coefficienti di assorbimento ad alte concentrazioni ( $> 10\text{mM}$ ) a causa delle interazioni elettrostatiche tra molecole vicine;
- lo scattering della luce, sotto forma di torbidità o particelle in sospensione;
- contributi di fluorescenza o fosforescenza;
- variazioni di indice di rifrazione (e di conseguenza della lunghezza d'onda secondo la  $\lambda = \lambda_0/n$ ) ad alta concentrazione;

- lo spostamento degli equilibri chimici in funzione della concentrazione;
- contributi di non monocromaticità e luce di fondo.

L'assorbanza è il parametro che usualmente viene posto in ordinata, rispetto alla lunghezza d'onda in ascissa, per plottare gli **spettri di assorbimento**. Un esempio è fornito di seguito.

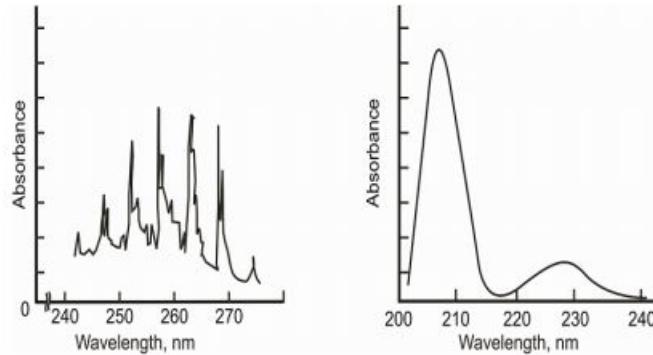


Figura 4.7: Spettro di assorbimento, rispettivamente per un vapore e per una soluzione

## 4.6 Velocità di transizione tra livelli

Il coefficiente di estinzione molecolare può rivelarsi molto utile nel calcolo di alcune proprietà molecolari. Consideriamo quindi ancora l'esperimento con il campione ( $l$ ,  $C$ ,  $dz$ ). Al fine di dare un'interpretazione il più completa possibile delle righe spettrali dobbiamo conoscere la velocità con cui una molecola in uno stato iniziale  $a$  è trasformata in una molecola in uno stato finale  $b$  per via dell'interazione con la luce. La risposta a questo problema è fornita dal tasso di rapidità con cui varia  $|c_b(t)|^2 = P_b$ , vale a dire la probabilità che la transazione avvenga. Se la radiazione che interagisce ha come frequenza media  $\nu$  e valgono le ipotesi che la distribuzione delle frequenze sia stretta, che la luce sia polarizzata e che le molecole siano orientate si può dimostrare che vale:

$$\frac{dP_b}{dt} = \frac{d}{dt} \int d\nu |c_b(t)|^2 = \frac{1}{2\hbar^2} |\langle \Psi_b | \bar{\mu} | \Psi_a \rangle \cdot E(0)|^2 \quad (4.10)$$

Se ora introduciamo:

- $B_{ab}$ : tasso di transizione per unità di densità di energia della radiazione
- $I(\nu) = \frac{|E(0)|^2}{4\pi}$ : densità di energia incidente con frequenza media  $\nu$

La 4.10 può essere riscritta fattorizzando il lato destro come prodotto di queste due nuove grandezze.

$$\frac{dP_b}{dt} = B_{ab} I(\nu) \quad (4.11)$$

Poiché stiamo lavorando con molecole orientate, per le quali vale la definizione di  $I(\nu)$  data, la soluzione più generale alla 4.10 si trova mediando su tutte le possibili orientazioni. Il valor medio di  $|\langle \Psi_b | \bar{\mu} | \Psi_a \rangle \cdot E(0)|^2$  è

$$\frac{1}{3} |\langle \Psi_b | \bar{\mu} | \Psi_a \rangle|^2 |E(0)|^2$$

in cui si è semplicemente mediato spazialmente  $\cos^2\theta$ , ove  $\theta$  era l'angolo del prodotto scalare tra  $\bar{\mu}$  e  $\bar{E}(0)$ . Da 4.10 e 4.11 si ricava la seguente espressione per la variabile  $B_{ab}$ :

$$B_{ab} = \frac{2}{3} \frac{\pi}{\hbar^2} |\langle \Psi_b | \bar{\mu} | \Psi_a \rangle|^2 \quad (4.12)$$

detto **coefficiente di Einstein** per assorbimento stimolato per transizioni  $a \rightarrow b$ . Nota che per come è espresso in 4.12 vale che  $B_{ab} = B_{ba}$  dove quest'ultimo<sup>7</sup> si riferisce ai processi di emissione nelle transizioni  $b \rightarrow a$ . Con il coefficiente di Einstein si ricava la velocità con cui la luce è sottratta durante il processo di assorbimento e questo dipenderà dal numero di transizioni  $a \leftrightarrow b$  implicate dalla radiazione e dal salto energetico  $E_b - E_a = h\nu$ . Dette  $N_a$  e  $N_b$  il numero di molecole per cm<sup>3</sup> presenti negli stati a e b,

$$-\frac{dI(\nu)}{dt} = h\nu(N_a B_{ab} - N_b B_{ba}) I(\nu) \quad (4.13)$$

In tutti i comuni campioni molecolari, il termine  $N_b$  è trascurabile. Supponendo che il campione sia una soluzione di concentrazione uno-molare ( $C = 1M$ ), la 4.13 diviene:

$$-\frac{dI(\nu)}{dt} = h\nu \left( \frac{N_{AV}}{1000} \right) B_{ab} I(\nu) \quad (4.14)$$

Poiché la luce viaggia a velocità c, la perdita di intensità su un tratto lungo  $dl$  sarà

$$-dI(\nu) = -\frac{1}{c} \left[ \frac{dI(\nu)}{dt} \right] dl = h\nu \left( \frac{N_{AV}}{1000c} \right) B_{ab} I(\nu) dl \quad (4.15)$$

La 4.15 ci permette di legare  $B_{ab}$  al coefficiente di estinzione molare  $\epsilon$ , confrontandola con la 4.7 per C=1M:

$$\begin{cases} -dI(\nu) = h\nu \left( \frac{N_{AV}}{1000c} \right) B_{ab} I(\nu) dl \\ -dI(\nu) = I\epsilon C dl \end{cases} \implies B_{ab} = \frac{1000c}{N_{AV}h} \int \frac{\epsilon}{\nu} d\nu$$

dove per trovare il coefficiente di Einstein si è dovuto integrare su tutta la banda, poiché il coefficiente fa riferimento a solo due stati separati da un'unica frequenza  $\nu$ . Dalla 4.12 e da quanto appena trovato, si trova che:

$$D_{ab} \equiv |\langle \Psi_b | \bar{\mu} | \Psi_a \rangle|^2 = 9.180 \times 10^{-3} \int \frac{\epsilon}{\nu} d\nu \quad (4.16)$$

$$(debye)^2 = (3.336 \times 10^{-30} C \cdot m)^2$$

in cui  $D_{ab}$  è la **forza di dipolo**: sperimentalmente essa può chiaramente essere determinata dall'area sottesa dalla banda di assorbimento. Conoscendo la forza di dipolo si può calcolare la **lunghezza di dipolo**  $|\bar{\mu}_{ba}| = |\langle \Psi_b | \bar{\mu} | \Psi_a \rangle|$ , ma **non** la direzione.

Infine, un altro parametro interessante è la **forza di oscillazione**  $f_{ab}$  che confronta l'intensità di assorbimento con quanto atteso da un oscillatore armonico tridimensionale:

$$f_{ab} = \frac{8\pi^2 m_{ec}}{3h\nu} D_{ab} = 4.315 \times 10^{-9} \int \epsilon(\nu) d\nu \quad (4.17)$$

Per una transizione fortemente permessa, il valore di questa forza è dell'ordine di (0.1-1).

---

<sup>7</sup>Per tale ragione assorbimento ed emissione hanno la stessa probabilità di avvenire e quello che determina quale dei due avvenga è il numero di atomi in uno dei due stati.

## 4.7 Laser

Introduciamo in questa sezione uno strumento fondamentale per le analisi spettroscopiche: il laser (light amplification by stimulated emission of radiation). Questo strumento sfrutta la natura bosonica dei fotoni (hanno spin 1) per produrre una sorgente di luce **monocromatica, coerente e direzionale**.

È possibile stimolare l'emissione di un fotone: se un fotone di energia appropriata ( $h\nu = E_2 - E_1$ ) collide con un elettrone in uno stato eccitato. L'elettrone decadrà nel suo stato fondamentale emettendo un nuovo fotone. Il fotone emesso in questo caso avrà la stessa lunghezza d'onda e fase del fotone incidente (**emissione stimolata, responsabile della coerenza dei laser**<sup>8</sup>)

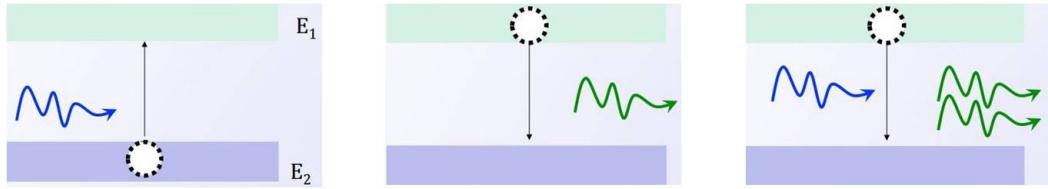


Figura 4.8: Immagine chiarificatrice. Nell'ordine: assorbimento, emissione spontanea, emissione stimolata. In tutte le immagini si ha  $E_1 > E_2$ .

Per la trattazione matematica del fenomeno sono necessarie le seguenti definizioni:

$$\left\{ \begin{array}{l} N_1 = \text{popolazione dello stato a riposo} \\ N_2 = \text{popolazione dello stato eccitato} \\ N_i = g_i N_0 e^{\frac{-E_i}{kT}} \quad \text{distr. Boltzmann} \\ A = \text{coefficiente di emissione spontanea} \\ B_{21} = \text{coefficiente di emissione stimolata} \\ B_{12} = \text{coefficiente di assorbimento} \\ \nu_{12} = \frac{E_2 - E_1}{h} \\ \rho(\nu_{12}) = \frac{8\pi h \nu_{12}^3}{c^3} \frac{1}{e^{\frac{h\nu_{12}}{kT}} - 1} \end{array} \right.$$

L'evoluzione temporale del sistema si può scrivere:

$$\frac{dN_1}{dt} = -\frac{dN_2}{dt} = -B_{12}N_1\rho(\nu_{12}) + AN_2 + B_{21}N_2\rho(\nu_{12})$$

e all'equilibrio

$$\begin{aligned} B_{12}N_1\rho(\nu_{12}) - AN_2 - B_{21}N_2\rho(\nu_{12}) &= 0 \\ \implies \rho(\nu_{12}) &= \frac{AN_2}{B_{12}N_1 - B_{21}N_2} \end{aligned}$$

ora raccogliamo  $B_{21}N_2$  sopra e sotto la frazione

$$\rho(\nu_{12}) = \frac{\frac{A}{B_{21}}}{\frac{B_{12}N_1}{B_{21}N_2} - 1} = \frac{8\pi h \nu_{12}^3}{c^3} \frac{1}{e^{\frac{h\nu_{12}}{kT}} - 1}$$

<sup>8</sup>Il tempo di coerenza è l'intervallo medio di tempo nel quale l'onda oscilla senza cambiare fase. Il prodotto tra il tempo di coerenza e la velocità della luce è detto lunghezza di coerenza. A differenza di altre sorgenti alcuni laser arrivano a qualche decina di chilometri.

siccome  $\frac{N_1}{N_2} = \frac{g_1}{g_2} e^{\frac{h\nu_{12}}{kT}}$  possiamo concludere che:

$$\frac{B_{21}}{B_{12}} = \frac{g_2}{g_1} \quad \frac{A_{21}}{B_{21}} = \frac{8\pi h\nu_{12}^3}{c^3} \quad (4.18)$$

Possiamo così vedere che se si riesce a raggiungere una condizione di non equilibrio per cui c'è un'inversione di popolazione, cioè una situazione in cui le popolazioni dei due livelli soddisfano la condizione  $N_2 > N_1$ , che è l'inversa di quella dell'equilibrio termodinamico, è possibile amplificare l'emissione luminosa di frequenza  $\nu_{12}$ .

Nello specifico esistono due condizioni particolari che devono essere soddisfatte per ottenere luce coerente dall'emmissione stimolata.

1. Gli atomi/molecole devono essere eccitati ad un livello energetico più alto, ovvero è necessaria una **inversione di popolazione** in cui, come già spiegato, nel livello superiore si trovano più atomi/molecole che nel livello inferiore, in modo che il processo di emissione sia **dominante** su quello di assorbimento;

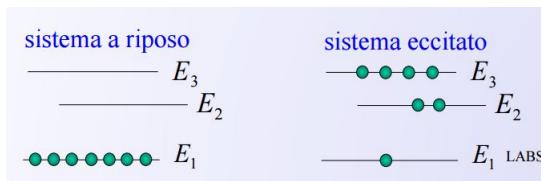


Figura 4.9:

2. Lo stato superiore deve essere uno **stato metastabile**, ovvero uno stato in cui gli elettroni restano più a lungo del solito, in modo che la transizione allo stato inferiore avvenga per emissione stimolata piuttosto che spontaneamente.

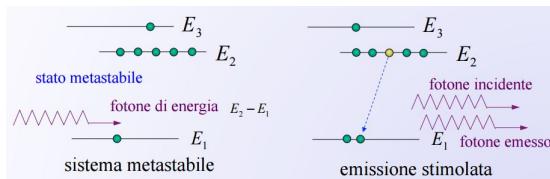


Figura 4.10:

Operativamente, un laser si caratterizza per:

- **potenza (W)**, idealmente costante nel tempo;
- **energia (J)**, che caratterizza l'emissione ed ha la caratteristica di essere *pulsata*, ovvero emessa sempre con la medesima energia ad intervalli regolari di tempo;
- **radianza ( $W/m^2$ )**, vale a dire la potenza per unità di area.

La caratteristica pulsata dell'energia (il cui grafico in funzione del tempo sarà pertanto un insieme di segmenti verticali paralleli) è particolarmente utile per alcune applicazioni soprattutto in campo medico-fisioterapistico, come nel caso della *laser terapia*, in cui l'intervallo di tempo tra impulsi consente ai tessuti che ne sono bersaglio di rilassarsi completamente prima di essere colpiti di nuovo, rendendo quindi ottimale l'effetto del laser.

## 4.8 Tipi di stati elettronici

Sino ad ora abbiamo visto il fenomeno dell'assorbimento dal punto di vista della spettroscopia che si colloca nella regione ultravioletta e visibile. Ricordiamo, per avere idea delle lunghezze d'onda di cui si discute, che il visibile si estende circa da 400 a 800 nm, mentre l'ultravioletto si divide in **UV lontano** (10-200 nm) e **UV vicino** (200-400 nm). Questo tipo di radiazione è capace di produrre transizioni degli elettroni esterni delle molecole. L'effetto spettroscopico quindi è dovuto fortemente alle transizioni elettroniche (per maggior completezza rivedere il paragrafo 4.4.2), che dipendono direttamente dalla configurazione delle cariche attorno ai nuclei nelle strutture molecolari, ovvero dagli **stati elettronici**.

Essi sono determinati dal tipo di legame in cui due o più atomi sono coinvolti. Generalmente si distingue in:

- **legami  $\sigma$** , in cui gli elettroni coinvolti sono *localizzati*, ovvero legati a gruppi nucleari ben precisi nella molecola;
- **legami  $\pi$** , in cui gli elettroni sono *delocalizzati*, ovvero non strettamente vincolati ai nuclei legati che li coinvolgono, ma sono relativamente liberi di muoversi (e.g. *mare elettronico nei metalli*).

In particolare, seguendo la teoria del legame molecolare MO-LCAO della chimica, il legame si forma quando due nuclei sono sufficientemente vicini. Tuttavia data l'elevata mobilità degli elettroni e il loro moto caotico si possono verificare situazioni opposte. Quando gli elettroni soggiornano a lungo nello spazio tra i due nuclei schermano a vicenda la repulsione dei due nuclei che in tal modo possono avvicinarsi e il legame ha la massima probabilità di formarsi: si parla di **stati di legame o legante**. Nel caso contrario, in cui gli elettroni permangono nella regione esterna ai due nuclei prevalgono le forze repulsive nucleari e il legame ha la minima probabilità di realizzarsi: si parla di **stati di antilegame o antilegante** (e vengono distinti dai primi per apposizione del simbolo \*<sup>9</sup>); esistono poi anche casi di **stati di non-legame**, cui si assegna il label *n*. Se si tiene conto delle proprietà quantistiche degli elettroni e li si considera particelle identiche, occorre tener conto del principio di esclusione di Pauli, cosicché *ogni orbitale può contenere al massimo due elettroni con spin antiparallelo*. Inoltre, seguendo nuovamente il MO-LCAO e applicando la regola di Hund, *a parità di energia è più stabile lo stato a massima molteplicità di spin*, dove questa è  $g_s = (2s + 1)$ , con  $s$  a indicare il momento angolare intrinseco del sistema. Pertanto dato un sistema a due stati e due elettroni, sarà preferibile la configurazione con un elettrone per ogni stato a spin paralleli, piuttosto che quella con due elettroni antiparalleli sullo stesso stato.

### Esempio 1.

- *in sistemi contenenti solamente atomi di C,N,O lo stato elettronico fondamentale è quasi sempre di singoletto (S) (tutti gli orbitali sono occupati da coppie di elettroni),  $s = 0$ ,  $g_s = 1$ .*

---

<sup>9</sup>Ad ogni legante corrisponde un antilegante, poiché si può dimostrare che essi si ottengono rispettivamente sottraendo e sommando le due soluzioni delle equazioni di Schrödinger associate agli orbitali vuoti. Come conseguenza l'antilegante ha sempre energia maggiore del legante.

- nel caso di singoli elettroni spaiati (radicali) lo stato fondamentale è un doppietto ( $D$ ),  $s = 1/2$ ,  $g_s = 2$ .
- nel caso di due elettroni spaiati lo stato fondamentale è uno stato di tripletto ( $T$ ),  $s = 1$ ,  $g_s = 3$ .
- si fa presente che in presenza di ioni metallici il numero di elettroni spaiati può essere ancora più alto. Ad oggi il massimo valore di  $s$  esistente noto è  $11/2$ , con molteplicità 12.

Si può dimostrare che le **transizioni elettroniche avvengono fra stati di ugual molteplicità**. La dimostrazione consiste formalmente nel calcolare il valore della regola di selezione 4.6 con argomenti di simmetria per il momento di dipolo di transizione e la forma dei legami.

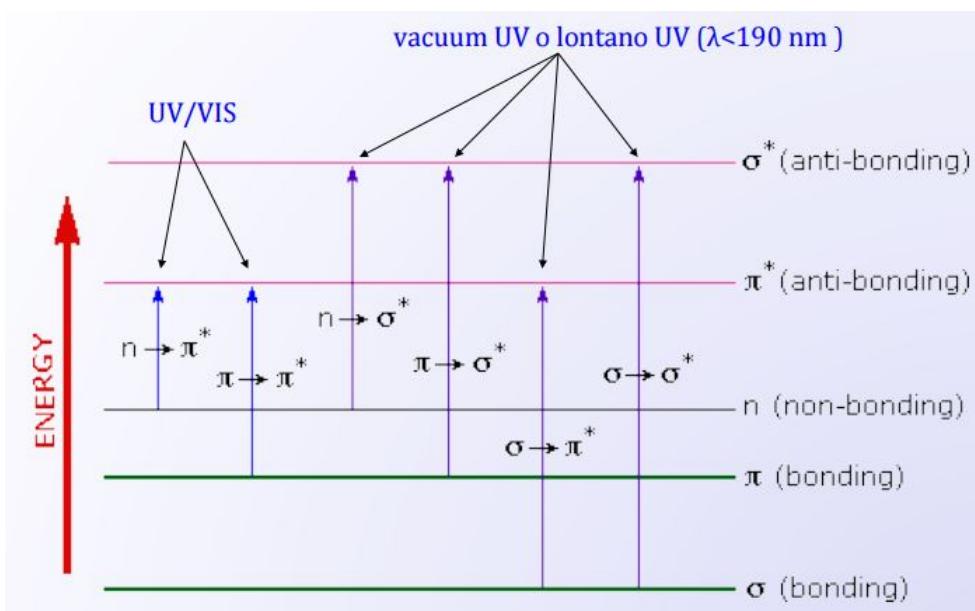


Figura 4.11: Tutte e sole le possibili transizioni elettroniche. Di seguito viene data una trattazione specifica per ciascuno di essi.

1. **transizione  $\sigma \rightarrow \sigma^*$ :** un elettrone da un orbitale legante viene eccitato al corrispondente orbitale antilegante. Questa transizione richiede un'energia *molto elevata* (e.g  $CH_4$ ). Hanno un massimo di assorbimento attorno ai 125 nm.
2. **transizione  $\pi \rightarrow \pi^*$ :** la dinamica è identica a quello  $\sigma \rightarrow \sigma^*$  e riguarda composti che contengono legami multipli, come carbonili e composti aromatici (contiene l'esanello base del benzene). Assorbono nella regione da 170 a 205 nm.
3. **transizioni  $n \rightarrow \sigma^*$ :** riguarda composti saturi contenenti atomi con elettroni spaiati (ovvero non leganti), come O, N, S e gli alogeni. Rispetto alle transizioni  $\sigma \rightarrow \sigma^*$  richiedono meno energia e spettroscopicamente sono pochi i gruppi funzionali che offrono picchi di assorbimento nella regione UV, in genere tra 150-250 nm.
4. **transizioni  $n \rightarrow \pi^*$ :** interessa composti che contengono doppi legami cui partecipano etero atomi ( $C=O$ ,  $C\equiv N$ ,  $N=O$ ). Richiedono energie molto basse e mostrano picchi di assorbimento a lunghezze d'onda più lunghe, attorno a 300 nm.

5. **transizioni**  $\sigma \rightarrow \pi^*$  e **transizioni**  $\pi \rightarrow \sigma^*$ : si tratta di processi **proibite** e sono possibili solo dal punto di vista teorico. Pertanto solo le transizioni  $n \rightarrow \pi^*$  e  $\pi \rightarrow \pi^*$  mostrano picchi di assorbimento nella regione sopra 200 nm, accessibile agli spettrofotometri UV-VIS.

Osserva che la  $\lambda$  necessaria per la transizione è tanto maggiore quanto minore è il dislivello energetico.

## 4.9 Strumentazione ed evidenze sperimentali

Gli strumenti che sfruttano i principi esposti sono **spettrofotometri** e **colorimetri**. La differenza principale tra i due strumenti consiste nel fatto che i secondi hanno una maggiore ampiezza di banda passante, ovvero lasciano passare radiazione con un range di lunghezze d'onda maggiore. Nel seguito tratteremo sinteticamente i più comuni e diffusi spettrofotometri e spettrofluorimetri.

Dal punto di vista concettuale uno spettrofotometro è composto da:

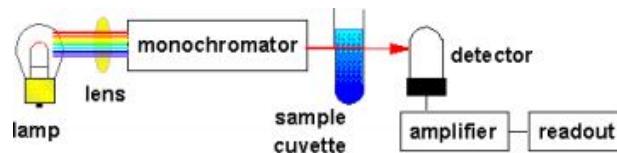


Figura 4.12: Struttura schematica di uno spettrofotometro

- una **sorgente di radiazione**: deve emettere le  $\lambda$  che in seguito si vorranno osservare. Sono in genere lampade a incandescenza (a filamento di *tungsteno*) per la regione del visibile, lampade a scarica in un gas (Argon, Xeno, Deuterio) per la regione UV. In genere gli strumenti contengono due lampade, di modo che ricoprono l'intero range 90-800 nm;
- una **lente** o una **fenditura in ingresso**, utile per rendere paralleli i raggi ed evitare luce diffusa nello strumento;
- un **monocromatore**: ovvero il sistema ottico usato per disperdere la luce polimorifica in bande monocromatiche, che vengono inviate in successione sul campione. Possono essere filtri assorbenti o elementi disperdenti quali prismi e reticolari. Svolge quindi il ruolo di *selezionatore di lunghezze d'onda*;
- una **cella** o **cuvette**, destinata a contenere il campione da esaminare, generalmente in soluzione. Sono fatti generalmente di quarzo o materiali plastici;
- un **rivelatore**, capace di produrre un segnale elettrico che dipende dall'energia delle radiazioni incidente e successivamente rielaborato. Si tratta in genere di tubi fotomoltiplicatori;
- un **amplificatore** e un **amperometro** che ne rivela l'intensità. Il **lettore** consente quindi di applicare la legge di Lambert-Beer 4.9 per ricavare l'assorbanza o la trasmittanza.

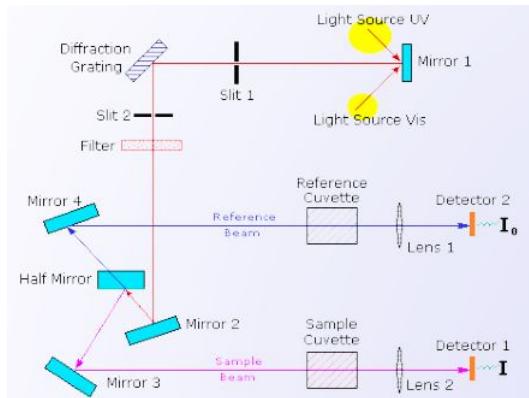


Figura 4.13: Rappresentazione dettagliata di spettrofotometro a due lenti; è dotato di uno specchio di splitting che invia due raggi, identici per frequenza e intensità, uno attraverso il campione e l'altro attraverso il bianco, per cui si ha un confronto continuo tra l'assorbimento del campione (da  $I$ ) e quella del bianco (da  $I_0$ ). Un valore di assorbimento superiore a 2 è il massimo accettato, oltre tale valore i fotoni raccolti sono troppo pochi per essere significativi; sarà quindi necessario variare i parametri dell'apparato per migliorarlo.

All'atto pratico sono poi diversi gli effetti che si possono effettivamente osservare sperimentando, tolto le spettro di assorbimento di cui abbiamo già discusso nel modello teorico.

È prima di tutto necessario dare le seguenti due definizioni

**Definizione 4.9.0.1.** Si chiama **cromoforo** la parte di una molecola responsabile del suo colore. È composto dal gruppo di atomi responsabili della transizione elettronica resa possibile da assorbimento di  $\lambda$  UV-VIS ( $>200\text{nm}$ ), e quindi  $\pi \rightarrow \pi^*$ ,  $n \rightarrow \pi^*$ .

**Definizione 4.9.0.2.** Si definisce **auxocromo** l'insieme dei gruppi funzionali con elettroni delocalizzati che non assorbono radiazioni nella regione del vicino UV ma che, se legati ad un cromoforo, ne modificano l'abilità di assorbire radiazione alterando la lunghezza d'onda o l'intensità dell'assorbimento.

Proprio lo spostamento della lunghezza d'onda di assorbimento per via di questi agenti costituisce uno degli effetti a cui si faceva riferimento poco sopra. Vediamoli dunque in dettaglio:

- **Spostamento batocromico o verso il rosso (Red Shift):**  
il massimo di assorbimento  $\lambda_{max}$  di un composto si sposta verso lunghezze d'onda maggiori. L'effetto, come si diceva, è dovuto all'effetto di un auxocromo o al cambiamento di solvente; in quest'ultimo caso solvente e soluto possono interagire di modo che la conseguente delocalizzazione degli elettroni diminuisca l'energia richiesta per la transizione.
- **Spostamento ipsocromico o verso il blu (Blue Shift):**  
Il massimo di assorbimento di un composto si sposta verso lunghezze d'onda più corte. Le cause sono analoghe a quelle della batocromia.

- **Effetto o spostamento ipercromico:**

Consiste nell'aumento di luminosità  $\epsilon$  di un composto, per via del legame di cromoforo e auxocromo, si verifica un aumento della probabilità di transizione e della superficie interessata, cioè del numero di molecole che possono assorbire.

- **Effetto o spostamento ipocromico:**

Si verifica quando la luminosità  $\epsilon$  di un campione tende a diminuire. Le cause sono quelle opposte dell'effetto ipercromico.

- **Effetto di solvente:**

Non si tratta di un vero e proprio effetto spettroscopico; ad essi vengono in genere attribuite le ragioni degli effetti soprastanti. In particolare, transizioni  $\pi \rightarrow \pi^*$  portano a stati eccitati più polari ( $\pi^*$ ), che sono più facilmente stabilizzati da associazioni con solventi polari (legame H): passando da un solvente non polare ad uno polare si ha quindi effetto batocromico (diminuisce  $\Delta E$  e aumenta  $\lambda_{max}$ ). Nelle transizioni  $n \rightarrow \pi^*$  è lo stato n che è più facilmente stabilizzato in solventi polari, quindi passando da un solvente non polare ad uno polare si ha effetto ipsocromico (aumenta  $\Delta E$  e diminuisce  $\lambda_{max}$ ).

Si può piacevolmente riassumere quanto appena discusso nella seguente rappresentazione:

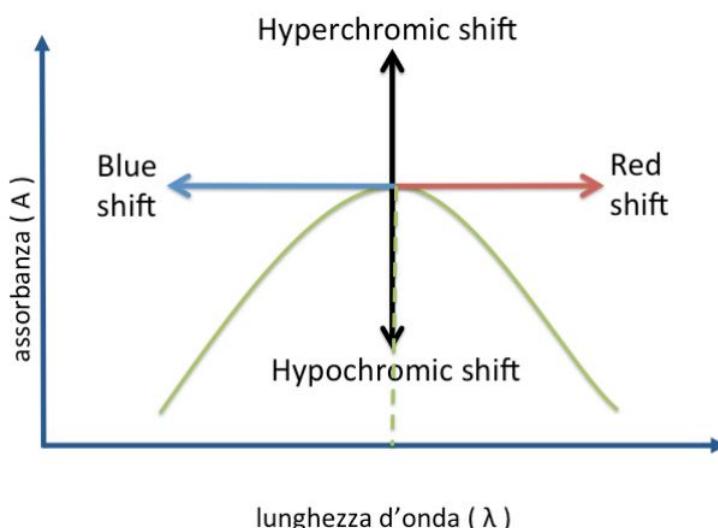


Figura 4.14: Sintesi grafica dei quattro effetti auxocromi descritti

## 4.10 Responsabili nelle macromolecole dell'assorbimento

Abbiamo iniziato il corso dicendo che le macromolecole più importanti e diffuse, nonché di maggior interesse per noi, sono proteine e acidi nucleici. Poiché l'attività spettroscopica descritta in questo capitolo riguarda essenzialmente questi due tipi di polimeri andiamo a vedere più da vicino quali sono le parti atomiche che determinano l'assorbimento:

1. Nelle **proteine** i principali gruppi cromofori sono i legami peptidici ( $\epsilon \sim 10 - 50 \times 10^{-3} cm^{-1} mol^{-1}$ ) e le catene laterali degli amminoacidi, per via degli elettroni  $\pi$  delocalizzati tra atomi di C, N, O.

Per quel che riguarda i legami peptidici le transizioni  $n \rightarrow \pi^*$  avvengono tipicamente

a 210-220 nm e sono in genere deboli ( $\epsilon \sim 100$ ) mentre quelle principali  $\pi \rightarrow \pi^*$  si osservano a 190 nm ( $\epsilon \sim 7000$ ). I residui invece assorbono a 210-230 nm, fornendo contributi schermati da quelli del legame peptidico o comunque deboli.

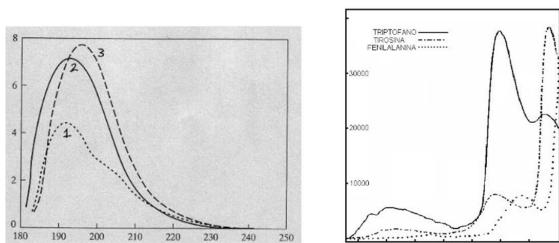


Figura 4.15: Spettro di assorbimento di legame peptidico (SX) e catene aromatiche (DX). Questi ultimi sono spesso usati per misurare le concentrazioni proteiche

Inoltre, le proteine che contengono gruppi prostetici (e.g. eme) hanno forti bande di assorbimento nella regione vicino UV-VIS. È il caso ad esempio dei **pigmenti naturali**, di cui ricordiamo i carotenoidi con i loro numerosi doppi legami responsabili di transizioni  $\pi \rightarrow \pi^*$ .

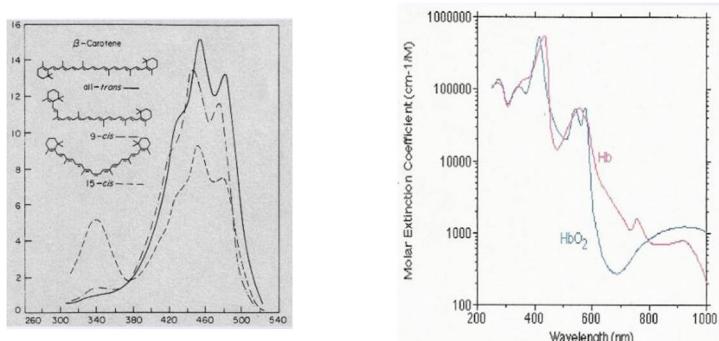


Figura 4.16: Spettro di assorbimento di carotenoidi (DX: tre massimi nello spettro del visibile) e dell'emoglobina (SX). In quest'ultimo caso La delocalizzazione si estende lungo il tetra pirrolo ciclico della profirina (vedere Capitolo 3) e dà luogo a un' intensa banda attorno ai 400 nm (blu), chiamata **banda di Soret** dovuta al salto  $\pi \rightarrow \pi^*$ . Lo studio di queste può fornire informazioni utili sul rapporto funzione-struttura delle emo-proteine.

- Negli **acidi nucleici** e derivati i cromofori si trovano nelle basi purina e pirimidina ( $\epsilon \sim 10 \times 10^{-3} \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ). Lo spettro di queste basi azotate cade tra 200 e 300 nm, è sensibile al pH e contiene contributi da diverse transizioni elettroniche, fondamentalmente  $n \rightarrow \pi^*$  e  $\pi \rightarrow \pi^*$ .

Quando le basi sono aggregate in acidi nucleici, lo spettro di assorbimento che producono è fortemente influenzato dalle interazioni elettroniche tra basi. In particolare si assiste ad un marcato **effetto ipocromico**. Consideriamo una soluzione di nucleotidi di concentrazione fissata, i nucleotidi liberi hanno un'assorbanza a 260 nm che è superiore a quella di una identica concentrazione assemblata a formare un singolo filamento, che a sua volta ha un'assorbanza maggiore del corrispondente doppio filamento che si può ottenere da due di essi. Ecco quindi che a mano a mano che si legano in strutture il valore  $\epsilon$  che si misura dall'assorbanza diminuisce

progressivamente. Questo è in realtà un vantaggio per gli sperimentatori: monitorando l'assorbanza è infatti possibile **evidenziare facilmente in che condizione si formano le varie strutture o oltre quale limite l'acido si denatura.**

# Capitolo 5

## DICROISMO CIRCOLARE

Il **dicroismo circolare** (CD dall’inglese *circular dichroism*) è un fenomeno fisico legato all’assorbimento di luce polarizzata circolarmente da parte delle molecole chirali (solitamente si definisce con lo stesso nome anche la spettroscopia basata su questo principio). Con questo termine si indicano le molecole, o gruppi di esse, che non presentano un centro o piano di simmetria e non possiedono un asse proprio. In conclusione possiamo definire chirali, o **otticamente attive**, le molecole che non possono essere sovrapposte alla loro immagine riflessa (quasi tutte quelle sintetizzate dagli organismi viventi presentano questa caratteristica). A causa di questa proprietà queste classi di molecole assorbirà diversamente la luce polarizzata circolarmente destrogira e levogira: questa differenza di assorbimento dell’onda elettromagnetica prende il nome di **dicroismo circolare**.

$$CD = \Delta A(\lambda) = A(\lambda_R) - A(\lambda_L)$$

Questo accade grazie alla presenza di uno o più cromofori, ossia raggruppamenti di atomi responsabili dell’assorbimento della radiazione elettromagnetica nella zone del visibile o dell’ultravioletto. Il principale vantaggio che deriva dall’uso del dicroismo in spettroscopia è la *possibilità di indagare le strutture interne delle molecole senza ricorrere ai raggi X.*

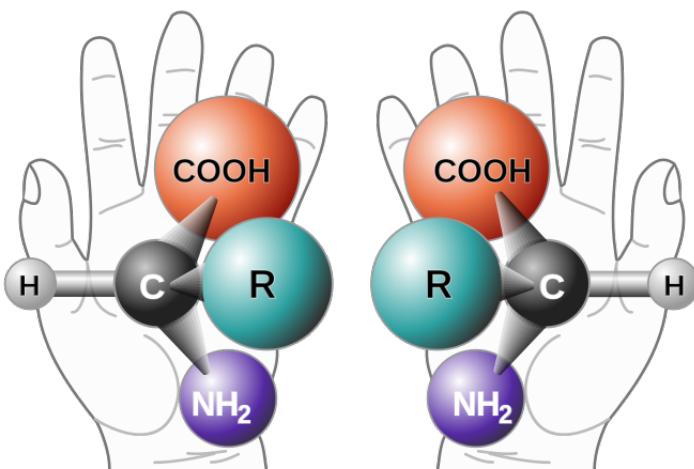


Figura 5.1: Modelli molecolari di due enantiomeri di un generico amminoacido. Si apprezzi la chiralità.

## 5.1 Polarizzazione della radiazione elettromagnetica

In questa sezione analizzeremo i tipi di polarizzazione che può avere la luce, soffermandoci su quella più importante, ossia quella circolare. Per spiegare cosa si intende con polarizzazione della luce bisogna tenere conto che il campo elettromagnetico, la cui variazione nel tempo e nello spazio provoca le onde elettromagnetiche, è un vettore pertanto ha sempre modulo, direzione e verso. Per convenzione viene definita **"direzione di polarizzazione"** la direzione lungo la quale oscilla il campo elettrico (che come già sappiamo giace sempre in un piano perpendicolare alla direzione di propagazione, detto piano di vibrazione). Si definisce luce polarizzata una radiazione luminosa in cui la direzione di oscillazione del campo elettrico può essere espressa mediante una funzione  $F(x,t)$ . In natura è frequente osservare luce non polarizzata, in quanto le varie sorgenti emetteranno radiazioni la cui sovrapposizione avrà direzione di polarizzazione che varia casualmente, perciò la luce polarizzata in un determinato verso si otterrà agendo su quest'ultima.

Quando la luce ordinaria (non polarizzata) passa attraverso particolari filtri, detti polarizzatori, che sono in grado di far passare solo le onde che oscillano su di un piano ben preciso (filtri polarizzatori Polaroid usati in fotografia per eliminare i riflessi), la luce emergente è polarizzata.

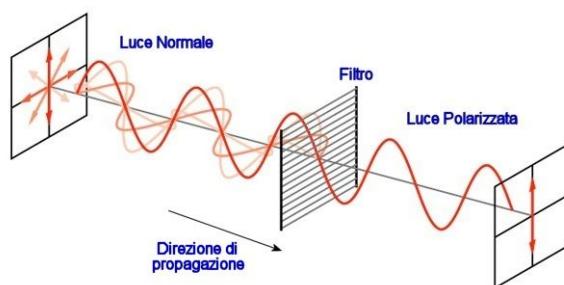


Figura 5.2: Esempio di luce polarizzata linearmente mediante l'uso di un filtro

Come detto in precedenza esistono diversi tipi di polarizzazione che dipendono da come varia la direzione del campo elettrico  $\vec{E}$ , le principali e più importanti per la nostra trattazione sono:

- Polarizzazione **lineare**;
- Polarizzazione **circolare**;

### Polarizzazione lineare

È il tipo più semplice di polarizzazione: in questo caso il campo elettrico oscilla lungo una sola direzione (ovvero in un unico piano), ortogonale all'oscillazione del campo magnetico e alla direzione di propagazione dell'onda e costante nel tempo. Tale polarizzazione si suddivide in due sottoclassi: quella orizzontale e verticale. È importante notare che mediante una sovrapposizione di queste due classi con diversa ampiezza e fase è possibile descrivere tutti gli stati di polarizzazione della luce.

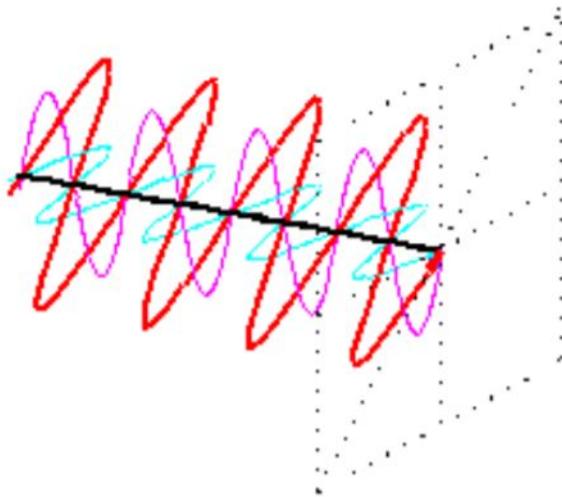


Figura 5.3: Onda polarizzata linearmente a  $45^\circ$

Se le due onde non hanno la stessa fase e la stessa ampiezza otterò un'onda con polarizzazioni differente, in particolare le onde polarizzate **circolarmente** sono una particolare sovrapposizione di quelle appena descritte.

### Polarizzazione circolare

La polarizzazione circolare, a differenza di quella lineare, non ha direzione costante nel tempo, ossia il vettore direzione di  $\bar{E}$  non giace sempre nello stesso piano. Il cambio di direzione di questo vettore forma un profilo ad elica: è possibile ottenere questa configurazione sovrapponendo due onde polarizzate linearmente, una verticale e l'altra orizzontale sfasate di  $\lambda/4$  (ma con la stessa ampiezza, il vettore cambia direzione ma non il modulo).

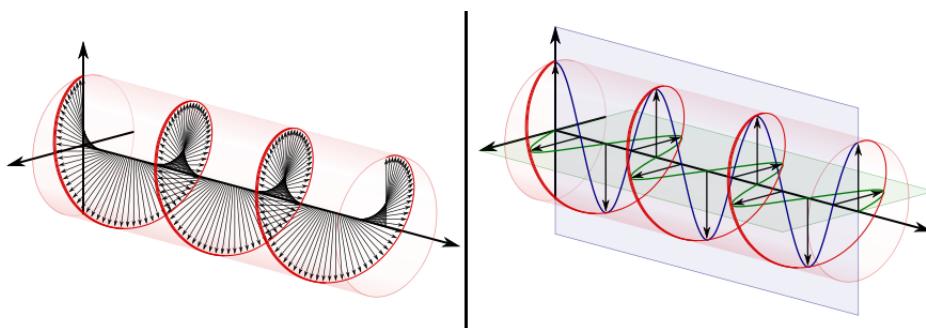


Figura 5.4: Polarizzazione circolare data da due onde con polarizzazione lineare

Anche in questo caso esistono due sottoclassi: polarizzazione circolare **destrogiro** (circonferenza descritta dal campo elettrico e magnetico in senso **orario**) e **levogiro** (**antiorario**). Un caso particolare di questa polarizzazione è quella **ellittica**, ossia una sovrapposizione di polarizzazioni lineari verticali e orizzontali con sfasamento di  $\lambda/4$  ma con ampiezza diversa: si ottiene così un'onda in cui il vettore  $\bar{E}$  cambia sia direzione che modulo. Abbiamo visto come ottenere una polarizzazione circolare partendo da quella lineare, ma è

possibile fare anche l'opposto: sovrapponendo due onde polarizzate circolarmente, una destrogira e una levogira con stessa ampiezza e lunghezza d'onda si ottiene un'onda polarizzata linearmente. In termini più generali, è possibile passare tra le due polarizzazioni appena descritte mediante uno strumento chiamato **Lamina quarto D'onda**. Come si può evincere dal nome è un particolare filtro che serve a "rallentare" una delle componenti dell'onda rispetto all'altra sfasandole di  $\lambda/4$ . Queste lamine funzionano solo in una parte dello spettro, dato che lo sfasamento dipende dalla lunghezza dell'onda incidente.

## 5.2 Attività ottica

Grazie al fatto che le onde con polarizzazione circolare hanno 2 diversi versi di "rotazione" esistono principalmente quattro fenomeni fisici legati al loro assorbimento, rifrazione o comunque una diversa interazione con le due sottoclassi e che possono così alterare le proprietà di un fascio trasmesso. Primo fra tutti è proprio il **dicroismo circolare** citato in precedenza che determina una differenza  $\Delta A$  (con  $A$  assorbanza) dell'onda assorbita (destrogira e levogira) espressa anche in **ellitticità** (in gradi), ma esistono altri fenomeni sempre basati su questa caratteristica, come per esempio l'effetto della **rotazione ottica**, cioè la proprietà di ruotare il piano di vibrazione della luce polarizzata posseduta dai sostanze chirali, che altro non è, dal punto di vista ottico, che un effetto particolare della **birifrangenza**. Questa particolare proprietà è legata al diverso indice di rifrazione che alcune sostanze presentano in base alla polarizzazione dell'onda incidente; la conseguenza è che ad esempio luce polarizzata circolarmente destrogira e levogira vengono riferatte diversamente: la differenza si ripercuote sulla velocità di propagazione e le onde vengono sfasate.

Ora che abbiamo elencato i diversi fenomeni legati alle caratteristiche di polarizzazione della luce procediamo con una loro analisi più formale. Tutti questi 4 effetti (ellitticità, rotazione ottica, dicroismo circolare, birifrangenza circolare) sono una misura dell'attività ottica di un campione otticamente attivo, in particolare l'interazione determinerà una modifica di alcuni parametri della funzione d'onda: la misura di queste differenze ci darà proprio un indizio sull'attività ottica. Le differenze che possiamo misurare con queste interazioni sono quelle legate alla polarizzazione, la fase o la rotazione del piano di vibrazione. Date queste premesse possiamo analizzare separatamente questi fenomeni per poter concludere che non sono affatto slegati fra di loro.

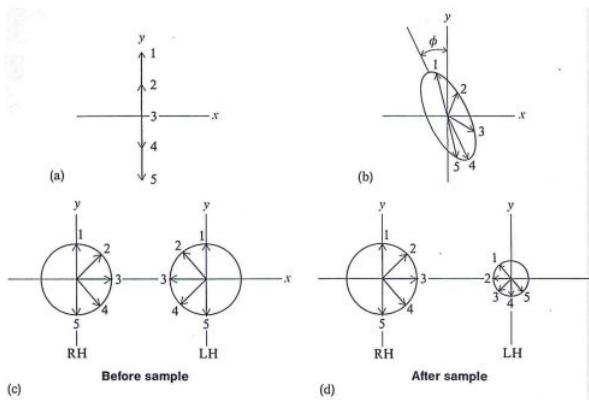


Figura 5.5: Effetti dell'interazione con un campione otticamente attivo

Immaginiamo ora un'onda piana (polarizzazione lineare) della forma  $\bar{E} = \hat{i}E_0 \sin \omega t$  ( $\hat{i}$  versore della direzione di propagazione) [Fig.5.5(a)] e facciamola interagire con un campione otticamente attivo. Quello che possiamo osservare è che l'onda ha subito due modifiche: la traiettoria che segue il vettore del  $\bar{E}$  non è più confinata in un piano ma "disegna" un profilo ad ellisse. L'**ellitticità** di tale figura è una delle misure dell'attività ottica. Geometricamente sappiamo che questo parametro è calcolabile come  $\arctan(m/M)$  dove  $m$  e  $M$  sono rispettivamente l'asse minore e maggiore dell'ellisse. L'orientamento dell'ellisse è il secondo aspetto che viene modificato. Come si può notare dall'immagine Fig.5.5(b) l'asse dell'ellisse forma un angolo  $\Phi$  con la direzione di polarizzazione: non solo ho avuto una modifica della polarizzazione, da lineare ad ellittica, ma il piano di polarizzazione stesso è stato ruotato. Questo è l'effetto della **rotazione ottica**. Nominalmente, la rotazione ottica come funzione della lunghezza d'onda,  $\theta(\lambda)$ , è chiamata *dispersione da rotazione ottica* o *ORD*.

Per procedere con ulteriori analisi conviene scrivere l'onda in questione in una forma più comoda: come già sappiamo possiamo scrivere un'onda polarizzata linearmente come due onde circolari R e L (Fig.5.5 c).

$$\bar{E}_R = \left( \frac{\hat{i}E_0 \sin \omega t}{2} + \frac{\hat{j}E_0 \cos \omega t}{2} \right)$$

$$\bar{E}_L = \left( \frac{\hat{i}E_0 \sin \omega t}{2} - \frac{\hat{j}E_0 \cos \omega t}{2} \right)$$

con  $\hat{j}$  versore lungo la direzione  $y$  come indicato in figura. Facciamo dunque collidere l'onda piana con un campione e analizziamo l'effetto dell'assorbimento sulle due componenti separatamente: come ci potevamo aspettare dalla Fig.5.5(b, d) si nota che l'effetto di assorbimento è stato diverso sulle due componenti  $A_R \neq A_L$ . In particolare notiamo che la polarizzazione delle due componenti è rimasta inalterata (infatti è ancora circolare) ma, al contrario, il raggio della componente L risulta ridotto: è questo effetto a prendere il nome di **dicroismo circolare**. Risulta così evidente che, non avendo più la stessa ampiezza [Fig. 5.5 (d)] la sovrapposizione delle due componenti non darà più una polarizzazione lineare ma ellittica, fenomeno che invece è l'**ellitticità**  $\theta$ : DC e  $\theta$  sono quindi correlati, equivalendosi tra di loro!

Per analogia cerchiamo di trovare un collegamento anche fra gli altri due fenomeni. Osservando 5.5(b) possiamo notare il quarto e ultimo effetto: se le due onde vengono assorbite diversamente a *qualsiasi* lunghezza d'onda  $\lambda$ , significa che il materiale in questione deve avere un indice di rifrazione differente per le due onde  $n_R \neq n_L$  virtualmente per *tutte* le lunghezze d'onda. Ne consegue che le due onde si propagheranno con velocità diverse e quindi subiranno uno sfasamento, proporzionalmente alla differenza degli indici  $n_R - n_L$  che globalmente si manifesta come spostamento dell'asse di polarizzazione. Questo è la **bifrangenza circolare**. Come prima, se ricombiniamo le due componenti, la differenza di fase prodotta si manifesterà come una rotazione permanente dell'asse maggiore dell'ellisse, vale a dire come **rotazione ottica**  $\Phi$ . Così facendo abbiamo mostrato che, come in precedenza, i due effetti si equivalgono. In conclusione, nonostante avessimo quattro possibili modi per misurare l'*attività ottica*, questi in realtà non sono indipendenti. Fisicamente DC e  $\theta$  e bifrangenza e  $\Phi$  sono legate dalla relazioni seguenti (la lunghezza del

campione):

$$\boxed{\Phi = \frac{180l(n_L - n_R)}{\lambda} \text{ (gradi)}} \quad (5.1)$$

$$\boxed{\theta = 2.303(A_L - A_R) \cdot \frac{180}{4\pi} \text{ (gradi)}}$$

Sperimentalmente soltanto due di queste grandezze vengono rilevate. La birifrangenza circolare è in genere molto piccola, ragion per cui si preferisce misurare  $\Phi$ , in genere dell'ordine di 0.01-0.1 gradi per centimetro di campione.

DC è facilmente misurabile semplicemente esponendo il campione, con l'uso di filtri, alternativamente a luce polarizzata circolarmente R e L e misurando di volta in volta l'assorbanza (La differenza  $\Delta A$  risulta di solito essere 0.03-0.3 dell'assorbanza totale). L'ellitticità al contrario è difficile da rilevare per via dei suoi valori molto piccoli. È però conveniente esprimere i risultati di una misura di DC- $\theta$  in termini di quest'ultima invertendo la 5.1. Ciò è particolarmente comodo poiché  $\Phi$  e  $\theta$  hanno entrambi la medesima unità di misura, il grado, e consentono un confronto più agevole tra coppie di parametri dell'attività ottica.

Per confrontare poi misure fatte su set di campioni diversi è necessario esprimere i risultati in funzione delle concentrazioni molari degli oggetti via via esaminati e si ricorre quindi alle formule:

$$\begin{cases} [\Phi]_M = \frac{\phi}{C \cdot l} \text{ (deg} \cdot M^{-1} \cdot cm^{-1}) \\ [\theta]_M = \frac{\theta}{C \cdot l} \text{ (deg} \cdot M^{-1} \cdot cm^{-1}) \end{cases} \quad (5.2)$$

Posso poi pensare di confrontare tra loro molecole completamente diverse, non solo per spessore  $l$  e concentrazione molare ma anche per numero di residui chirali. Per fare ciò devo però prima introdurre delle **unità di misura normalizzate**. Per ottenerle chiamiamo  $N_R$  il numero di residui e  $C_w$  le concentrazioni in peso: le espressioni normalizzate di ellitticità e rotazione ottica saranno corrette con, ad esempio, (per  $\theta$ ):

- per il DNA una normalizzazione alla concentrazione espressa come molarità di fosfati

$$[\theta]_{MR} = \frac{[\theta]_M}{N_R} = \theta \frac{M}{C_w \cdot l \cdot N_R} \quad (deg \cdot \frac{g}{mol} \frac{dm^3}{cm \cdot residuo} \frac{1}{cm \cdot residuo})$$

- per le proteine una normalizzazione alla concentrazione molare per residuo e in decimolare<sup>1</sup>

$$[\theta]_{MRd} = [\theta]_{MR} \quad (deg \cdot \frac{g}{dmol} \frac{dm^3}{cm \cdot residuo} \frac{1}{cm \cdot residuo})$$

che massaggiata prima con la 5.1 e poi con la legge di Lambert-Beer diventa,

$$\begin{aligned} [\theta]_{MRd} &= \frac{100 \cdot \theta}{C \cdot l \cdot N_R} = \\ &= \frac{100 \cdot 2.303(\epsilon_L - \epsilon_R) \cdot C \cdot l \cdot 180}{4\pi \cdot C \cdot l \cdot N_R} = \\ &= \boxed{\frac{3298.8 \cdot \epsilon_L - \epsilon_R}{N_R} \quad (deg \cdot cm^2 \cdot dmol^{-1})} \end{aligned} \quad (5.3)$$

<sup>1</sup>Convenzione sperimentale perversa.

È importante far notare che si sono utilizzate le concentrazioni *minime* per poter far risaltare al meglio l'assorbanza. Delle concentrazioni troppo alte avrebbero potuto portare fattori di disturbo nella misurazione.

### 5.2.1 Esempi grafici di attività ottica. Note di sperimentazione

Questa sottosezione è dedicata ad un rapido recap e corroborazione grafica degli aspetti ottici appena discussi. Ha il solo scopo di rendere più concreto ciò che si è discusso sin qui.

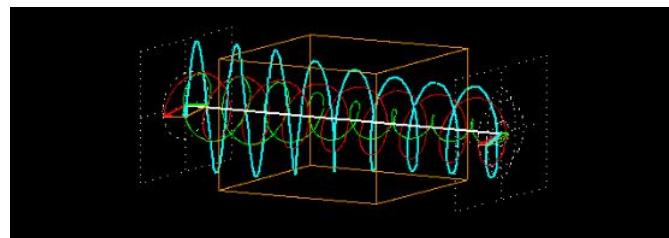
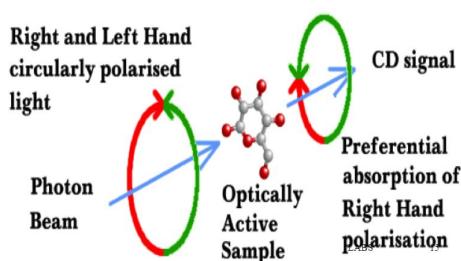
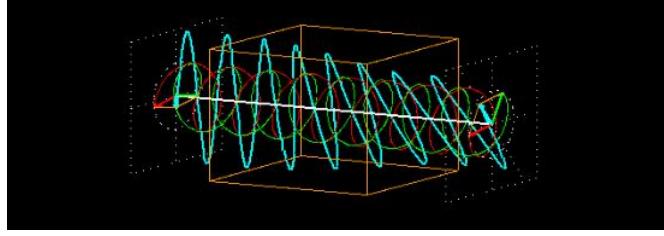


Figura 5.6: **Dicroismo circolare:** La luce polarizzata (blu) attraversa un mezzo otticamente attivo che non assorbe per nulla la componente polarizzata circolarmente sinistra (rossa) della luce, mentre ha un elevato assorbimento della componente polarizzata circolarmente destra (verde). L'intensità della componente verde diminuisce rispetto alla rossa. Dopo l'attraversamento il vettore del campo ruota lungo un ellisse e la direzione di rotazione è determinata dalla componente di rotazione che risulta predominante dopo l'assorbimento. I materiali reali in genere assorbono entrambe le componenti, ma in maniera diversa. Il grado di **ellitticità**  $\theta$  è dovuta alla differenza di assorbimento delle due componenti.





**Figura 5.7: Birifrangenza circolare:** la luce polarizzata piana (blu) attraversa un mezzo che non rallenta per nulla la componente polarizzata circolarmenente sinistra (rossa), mentre rallenta quella polarizzata verso destra (verde). L'effetto è poco marcato perché la differenza tra i due indici di rifrazione è 1.05. In uscita dal mezzo la sovrapposizione delle due componenti a polarizzazione circolare, risulta in un'onda a polarizzazione piana il cui piano di polarizzazione è ruotato rispetto al piano della luce in entrata. L'angolo di rotazione **rotazione ottica**  $\Phi$  di questo piano è proporzionale alla differenza degli indici di rotazione.

Cogliamo l'occasione per mettere in luce la differenza tra i concetti di *assorbimento della luce* (CD e  $\theta$ ) e *rallentamento* della luce ( $n_l - n_r$  e  $\Phi$ ).

La presenza di CD o  $\Phi$  evidenzia in genere una **asimmetria** della struttura molecolare della materia, cosicché *l'attività ottica sia un ottimo indice di indagine per le proprietà strutturali delle macromolecole*.

A tal proposito guardiamo più da vicino come considerare gli esiti di una misura. Abbiamo già detto che delle coppie CD- $\theta$  e  $(n_L - n_R) - \Phi$  misurano la differenza di assorbanza e l'angolo di rotazione planare. Tuttavia:

- nella coppia CD- $\theta$ , DC è la grandezza *intensiva* mentre  $\theta$  è quella *estensiva*. Si misura l'intensiva;
- nella coppia  $(n_L - n_R) - \Phi$ ,  $n_L - n_R$  è la grandezza intensiva,  $\Phi$  quella estensiva. Si misura l'estensiva.

**Esempio 2.** Sia dato un campione con  $C=10^{-4}M$ ,  $l=0.1\text{cm}$ ,  $\lambda = 300\text{nm}$ ,  $\theta = 0.01 \text{ deg}$  Applicando 5.1 e 5.2 si trova

$$\begin{cases} (n_L - n_R) = 1.67 \times 10^{-9} \\ [\Phi] = 10^4 \text{deg} M^{-1} \text{cm}^{-1} \end{cases} \quad \begin{cases} (A_L - A_R) = 3.3 \times 10^{-4} \\ [\theta] = 10^4 \text{deg} M^{-1} \text{cm}^{-1} \end{cases} \quad (5.4)$$

Si vede l'immisurabilità della birifrangenza, come già anticipato, e la possibilità di rilevare DC, seppur molto piccola ma comunque entro i limiti di sensibilità strumentale. I valori molari trovati sono tipici (per avere un'idea degli ordini di grandezza).

### 5.3 Effetto Cotton e modello quantistico del DC

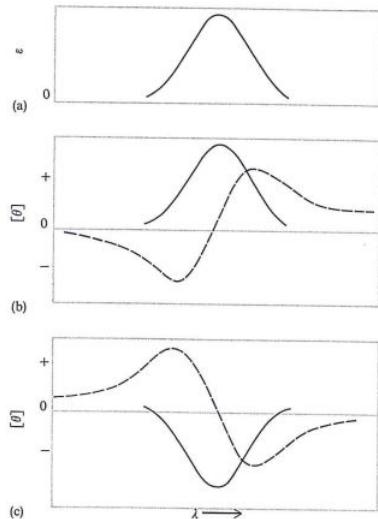
Delle quattro manifestazioni di attività ottica abbiamo già ridotto a due il nostro interesse, vale a dire a  $[\theta]$  e  $[\Phi]$ . Si può dimostrare che neppure queste due quantità sono del tutto indipendenti tra di loro. Esse sono infatti vincolate da un insieme di integrali noti come **trasformazioni di Kronig-Kramers**. Questi integrali esprimono in via del tutto generale la risposta di un sistema ad una perturbazione, come può essere la luce nel caso che stiamo trattando. Non ci soffermiamo sulla dimostrazione:

$$[\Phi(\lambda)] = \frac{2}{\pi} \int_0^\lambda \frac{[\theta(\lambda')] \lambda'}{\lambda^2 - \lambda'^2} d\lambda' \quad (5.5)$$

$$[\theta(\lambda)] = -\frac{2}{\pi} \int_0^\lambda \frac{[\Phi(\lambda')]}{\lambda^2 - \lambda'^2} d\lambda' \quad (5.6)$$

Queste equazioni implicano quindi che conoscendo ORD (rotazione  $\Phi$ ) per *tutte* le lunghezze d'onda coinvolte, allora è possibile calcolare esattamente il valore di ellitticità DC che ci si aspetterebbe da un esperimento, in modo da avere un parametro di confronto per gli scarti normalizzati o per settare la strumentazione in un determinato modo a seconda di cosa si vuole ottenere. Anche nelle situazioni in cui una delle due grandezze non sia nota per ogni  $\lambda$  ma solo per un determinato range di esse è possibile approssimare gli integrali, commettendo un errore del tutto confrontabile con quello che si otterrebbe durante un esperimento.

ORD e DC dipendono fortemente dalla lunghezza d'onda utilizzata per eseguire una misura. Per campioni assorbenti, ad esempio, è consuetudine misurare ORD e DC nello stesso range di lunghezze d'onda per le quali si è ottenuto lo spettro di assorbimento. Lo spettro che si ottiene dalla rilevazione dell'attività ottica è chiamato **spettro di ORD o DC**. Nel caso in cui il campione contenga soltanto transizioni elettroniche fortemente permesse (in genere  $\pi \rightarrow \pi^*$ ), lo spettro di DC è correlato a quello di assorbimento secondo quello che è chiamato **effetto Cotton**. Discutiamo ad esempio il caso di  $[\theta]$ .



**Figure 8-2**  
Schematic spectra for an allowed transition. (a) Absorption spectrum.  
(b) CD (solid line) and ORD (dashed line) spectra for a positive Cotton effect.  
(c) CD and ORD spectra for a negative Cotton effect.

Figura 5.8: Effetto Cotton. Dall'alto verso il basso: spettro di assorbimento, effetto Cotton positivo per CD (continua) e ORD (tratteggiata), effetto Cotton negativo per CD (continua) e ORD (tratteggiata)

Si vede che dove l'assorbimento è nullo lo è anche  $[\theta]$ , come c'è da attendersi poiché secondo 5.1  $[\theta] \propto (A_L - A_R)$  che sono entrambi nulli in assenza di assorbimento. Nel range di lunghezze d'onda di assorbimento, invece,  $[\theta]$  ha la stessa forma dello spettro di assorbimento. Tuttavia può avere un segno positivo o negativo, a seconda del verso di rotazione del fascio all'uscita dal campione che ne ha evidenziato il dicroismo. (*Fig 5.8, linea tratteggiata in (b) e (c)*). Si noti inoltre che lo spettro ORD sembrerebbe essere la funzione derivata dello spettro DC: esiste infatti un punto di minima rotazione ottica (l'intersezione della linea tratteggiata con l'asse orizzontale) in corrispondenza del valore

massimo (in modulo) del dicroismo (linea continua). Tuttavia agli estremi il comportamento si discosta da quello di un rapporto incrementale puro e segue un **modello di Drude** in passato utilizzato per fissare dati figli di strumenti poco performanti.

Chiediamoci, piuttosto, l'**origine fisica** dell'effetto Cotton.

Supponiamo che lo spettro di assorbimento di una molecola sia noto. Dal momento che in genere spettro di assorbimento e spettro DC sono pressoché identici, si può pensare di ottenere informazioni sullo spettro DC calcolando l'area sottesa dalla banda di assorbimento e assegnandole un segno. Questa coppia di parametri sono definite come **forza rotazionale**  $R_{0a}$ , della transizione  $0 \rightarrow a$ , indice della rilevanza dell'attività ottica. Per analogia con la 4.16 che definiva la forza di dipolo elettrico nelle transizioni di assorbimento, ricaviamo:

$$R_{0a} = \frac{3hc}{8\pi^3 N} \int \frac{[\theta(\lambda)]}{\lambda} d\lambda \quad (5.7)$$

dove  $c$  è la velocità della luce e si è integrato solo sulle lunghezze d'onda del DC prodotte dalle transizioni da uno stato 0 a uno stato a. Rosenfeld fu il primo a dimostrare, nel 1928, che la forza rotazionale potesse essere ricondotta a principi quantistici e calcolata conoscendo le funzioni d'onda degli stati  $\Psi_0$  e  $\Psi_a$ . Il risultato che tovò fu:

$$R_{0a} = \text{Im}(\langle \Psi_0 | \bar{\mu} | \Psi_a \rangle) \cdot (\langle \Psi_a | \bar{m} | \Psi_0 \rangle) \quad (5.8)$$

in cui  $\bar{\mu}$  è un operatore di dipolo elettrico e  $\bar{m}$  un operatore di dipolo magnetico e "Im" indica di considerare la componente immaginaria della parentesi che segue. Per ogni elettrone vale che

$$\bar{m} = \frac{e}{2mc} (\bar{r} \times \bar{p}) = \frac{e}{2mc} (\bar{r} \times \frac{\hbar}{i} \bar{\nabla}) = \frac{e}{2mc} \bar{L} \quad (5.9)$$

Fisicamente quindi il dipolo magnetico di transizione  $\langle \Psi_a | \bar{m} | \Psi_0 \rangle$  può essere interpretato come un circuito di corrente indotta dalla radiazione elettromagnetica, così come il dipolo elettrico di transizione determina lo spostamento di un elettrone in linea retta da un livello al successivo. La combinazione dei due come mostrata in 5.8 è uno spostamento di corrente a elica, che corrisponde all'effetto microscopico dell'*attività ottica*.

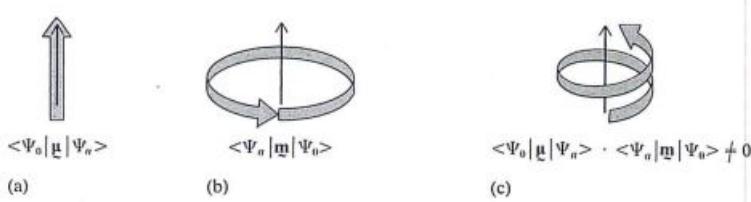


Figura 5.9: Diversi effetti dei momenti di dipolo di transizione. Nell'ordine: elettrico (spostamento lineare di carica), magnetico (spostamento circolare di carica), prodotto scalare alla Rosenfeld (spostamento elicoidale di corrente con stessa direzione a tempi diversi)

Dalla seconda uguaglianza di 5.9 si vede che l'operatore dipolo magnetico è puramente immaginario. Poiché la 5.8 tiene a sua volta conto solo della parte immaginaria ne risulta che la forza di rotazione  $R_{0a}$  è puramente reale, come è coerente per un'osservabile fisica. Richiamando per la seconda volta la remota 4.16 possiamo riscrivere la forza di dipolo elettrico di transizione come:

$$D_{0a} = \langle \Psi_0 | \bar{\mu} | \Psi_a \rangle \cdot \langle \Psi_a | \bar{\mu} | \Psi_0 \rangle \quad (5.10)$$

Guardiamo cosa abbiamo scritto e capiamo come tutto ciò possa spiegare l'attività ottica e gli spettri DC-ORD.

La 5.10 afferma che l'assorbimento è proporzionale al quadrato del dipolo elettrico di transizione indotto dal fascio incidente. Rispetto essa nella 5.8 un elemento di matrice è stato sostituito con il dipolo magnetico di transizione indotto, ma la forza  $R_{0a}$  è comunque una funzione di  $\langle \Psi_0 | \bar{\mu} | \Psi_a \rangle$  esattamente come lo è  $D_{0a}$ . Ecco allora che dove non c'è assorbimento,  $D_{0a} = 0 \implies \langle \Psi_0 | \bar{\mu} | \Psi_a \rangle = 0$  e con esso si annulla anche la forza di rotazione e di conseguenza lo spettro DC. La dipendenza delle due forze dal medesimo parametro può poi suggerire intuitivamente il motivo della somiglianza dei due spettri, tenendo anche conto del fatto che gli effetti elettrici indotti da un'onda luminosa sono di gran lunga dominanti su quelli magnetici e che l'assorbimento è governato principalmente dagli elettrici (*l'attività ottica dipende da entrambi gli effetti ma visibilmente tende a vincere lo stesso che determina l'assorbimento, ergo i due spettri sia assomigliano*). Tuttavia l'attività ottica tiene conto sia dei contributi elettrici che dei contributi magnetici e questi due effetti sono fortemente vincolati tra di loro dal prodotto scalare che compare nella ormai solita 5.8. Questo prodotto scalare ci dice che affinché una molecola manifesti attività ottica,  $\langle \Psi_0 | \bar{\mu} | \Psi_a \rangle$  deve avere una componente parallela a  $\langle \Psi_0 | \bar{m} | \Psi_a \rangle$ . Perché ciò avvenga la luce deve, in qualche modo, indurre una circolazione di carica elicoidale attorno alla direzione di  $\langle \Psi_0 | \bar{\mu} | \Psi_a \rangle$ . Questa situazione si verifica solo se la **molecola è antisimmetrica**. In caso contrario infatti l'elica risultante non potrebbe, a priori, avere una direzione privilegiata. È da questa particolare richiesta di natura prettamente quantistica che nasce l'attività ottica nelle molecole chirali (*che sono per natura asimmetriche*) e pertanto la richiesta di queste ultime per gli esperimenti di dicroismo. Questa osservazione spiega anche perché molte molecole con struttura elicoidale manifestano una intensa attività ottica: la struttura stessa infatti favorisce l'induzione di uno spostamento elicoidale delle cariche molecolari.

#### 5.4 Strumentazione

In questa sezione ci occuperemo di analizzare la strumentazione e il metodo di raccolta dei dati per l'effetto del dicroismo circolare. Lo strumento utilizzato per la misura della differenza di assorbanza di un campione chirale è detto **dicrografo** o **spettropolarimetro CD** e si compone di:

- Una sorgente luminosa non polarizzata;
- Un sistema che selezioni la lunghezza d'onda incidente (monocromatore);
- Un polarizzatore;
- Un PEM, ossia un modulatore fotoelastico;
- Una cuvetta di quarzo che contiene il campione da analizzare (sciolto in un solvente);
- Un rilevatore;
- Un amplificatore;
- Un registratore.

Gli ultimi 3 strumenti sono necessari per la raccolta e l'elaborazione dei dati e non fanno parte della nostra fascia d'interesse: pertanto ci soffermeremo sul funzionamento delle restanti apparecchiature e di come permettano di effettuare la misura. La luce emessa dalla nostra sorgente conterrà tutte le lunghezze d'onda e in particolare non sarà polarizzata, quindi prima di effettuare la misura dovremo agire su di essa per ottenere un'onda con le condizioni giuste. Prima di tutto è necessario estrarre una singola lunghezza d'onda  $\lambda$  per mezzo del **monocromatore**, dopodiché il **filtro polarizzante** selezionerà solo le onde polarizzate linearmente. Abbiamo ora tutto il necessario per effettuare la misura, infatti, come ben sappiamo, le onde polarizzate linearmente possono essere scomposte in onde circolari destrogiro e levogiro. Per misurare l'effettiva differenza di assorbanza abbiamo bisogno di alternare queste ultime in modo da poter osservare separatamente l'interazione: il **PEM** serve a questo scopo, esso modulerà l'onda incidente in modo da emettere in modo alternato onde circolari L e R. Così facendo esse incideranno sul nostro campione e potremo misurare  $\Delta A = A_L - A_R$ .

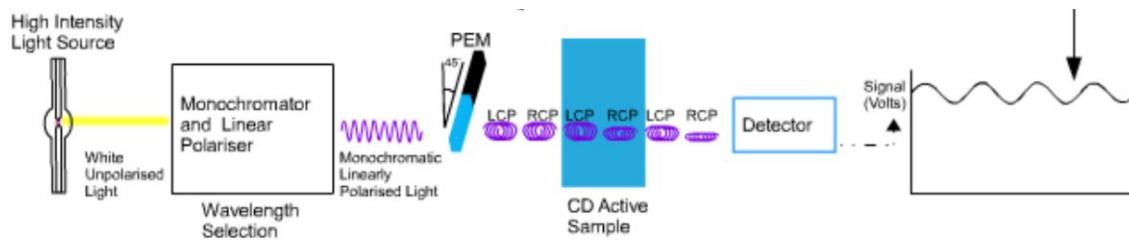


Figura 5.10: Esempio di spettropolarimetro

Ora che abbiamo spiegato come viene effettuata la misura è importante precisare alcuni accorgimenti necessari per avere le condizioni di misura ideali. Primo fra tutti è la **rimozione dell'ossigeno** dall'alloggiamento della sorgente, dal monocromatore e dal portacampioni flussando l'apparato con l'azoto. È importante effettuare questa operazione perché l' $O_2$  ha un duplice effetto negativo:

1. Quando colpito dalla radiazione UV rilascia ozono che rischia di danneggiare l'ottica;
2. È in grado di assorbire la radiazione UV diminuendone l'intensità;

Oltre al disturbo dovuto all'ossigeno bisogna anche tenere conto dell'effetto dato dal campione, per questo motivo ci sono determinate condizioni da rispettare: è necessario evitare che l'assorbimento da parte del campione sia troppo elevato perciò è consigliato usare sostanze che non assorbano nella regione della radiazione utilizzata (in genere 350-190 nm). Nel caso il campione sia costituito da una soluzione proteica è necessario che contenga solo le sostanze chimiche necessarie per mantenerne la stabilità, alla **minima concentrazione** possibile. Come ultima preparazione bisogna determinare i parametri sperimentali più adatti alla misura effettuando **esperimenti preliminari** (Il rapporto segnale/rumore migliore si ottiene per assorbanza della molecola otticamente attiva  $\sim 1$ ).

<b>Water</b>	<185
<b>Trifluoroethanol</b>	<185
<b>Hexafluoroisopropanol</b>	<185
<b>Acetonitrile</b>	185
<b>Methanol</b>	195
<b>Ethanol</b>	196
<b>2-Propanol</b>	196
<b>Cyclohexane</b>	<185
<b>Dimethylsulfoxide</b>	251
<b>Dioxane</b>	232
<b>(NH4)2SO4 0.15 M</b>	191
<b>NaCl 0.15 M</b>	196
<b>NaClO4 0.15 M</b>	<185
<b>NaN03 0.15 M</b>	245
<b>Phosphate 100 mM</b>	<185
<b>Tris 100 mM</b>	195
<b>Pipes 100 mM</b>	215
<b>Mes 100 mM</b>	205
<b>GdnHCl 4 M</b>	210
<b>Urea 4 M</b>	210

Figura 5.11: Tabella delle lunghezze d'onda  $\lambda$  limite

## 5.5 Proteine e CD

Il fenomeno del dicroismo circolare può essere utilizzato per analizzare la struttura delle proteine. In particolare è noto che per queste macromolecole la zona di interesse è data dal **lontano UV** ( $180\text{nm} < \lambda < 250\text{nm}$ ) e **vicino UV** ( $250\text{nm} < \lambda < 350\text{nm}$ ). Le componenti cromoforiche che rendono le proteine otticamente attive sono: legame peptidico, catene laterali amminoacidi (Phe, Tyr, Trp, Cys) e gruppi prostetici.

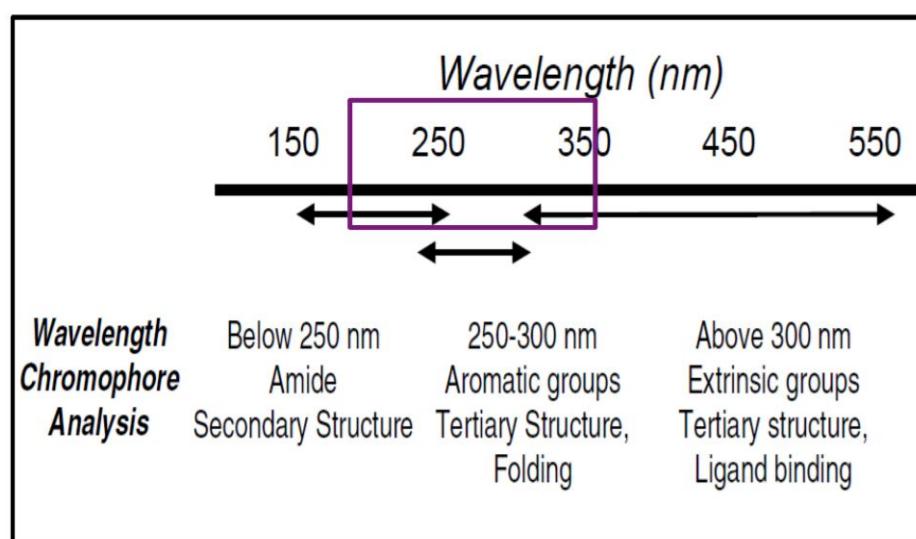


Figura 5.12: In base alla zona in cui ci troviamo cambiano i cromofori e di conseguenza l'analisi che otteniamo

### 5.5.1 Lontano UV

Abbiamo già analizzato quali sono le transizioni possibili per una radiazione appartenente all'ultravioletto. In particolare nel nostro caso otteniamo un picco per le transizioni:

- $n \rightarrow \pi^*$  : presenta un doppio picco per  $208\text{-}210\text{ nm}$  e  $191\text{-}193\text{ nm}$  con  $\epsilon \sim 100$ , a causa degli elettronni non leganti di O e del carbonile;
- $\pi \rightarrow \pi^*$  : picco a circa  $190\text{ nm}$ ,  $\epsilon \sim 7000$  interessa gli elettronni  $\pi$  del carbonile;

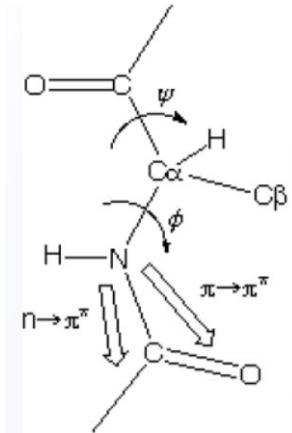


Figura 5.13:

L'intensità e l'energia della transizione sono legati agli angoli  $\phi, \psi$  che sono a loro volta legati alla **struttura secondaria** della molecola. Così lo spettro tra  $180$  e  $250\text{ nm}$  dipende direttamente dalla struttura secondaria, quindi analizzandolo possiamo avere informazioni su quest'ultima, in particolare possiamo studiare il contenuto delle **eliche**, **foglietti** e **coin**. L'accuratezza di tale descrizione dipende dal tipo stesso in considerazione:  $0.97$  per le  $\alpha$ -eliche,  $0.75$  per i foglietti  $\beta$ ,  $0.50$  per i turn e  $0.89$  per altri tipi di struttura.

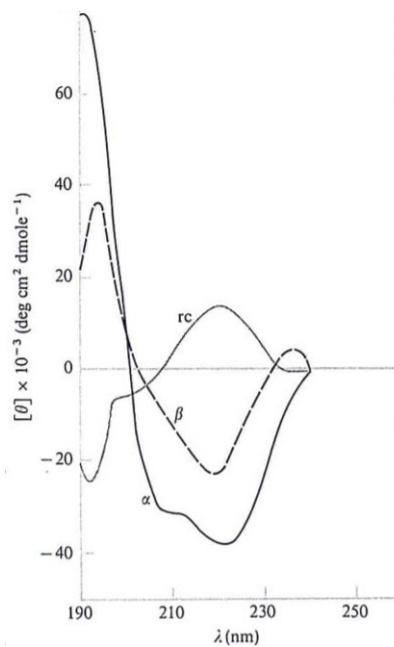


Figura 5.14: Spettri CD delle varie strutture a confronto

Come possiamo notare dalla Figura 5.14, i vari spettri presentano dei picchi (massimi o minimi) in corrispondenza di determinati valori di  $\lambda$  a causa delle transizioni: l'intensità del picco denoterà la tendenza ad effettuare quella transizione.

- **Random Coil:** Lo spettro di questa struttura presenta solo due bande di assorbimento, una di debole intensità a **212 nm** che corrisponde alla transizione  $\pi \rightarrow \pi^*$  e un picco negativo più intenso in corrispondenza della transizione  $n \rightarrow \pi^*$  a **195 nm**;
- **Foglietti  $\beta$ :** Le misure CD di polipeptidi con struttura secondaria di tipo  $\beta$  sono complicate dalla scarsa solubilità del peptide stesso nel solvente solitamente utilizzato per la misura e dalla possibilità che esistano catene parallele o anti-parallele. In genere lo spettro CD mostra due assorbimenti, uno positivo a **196 nm** dovuto alla transizione  $\pi \rightarrow \pi^*$  e uno negativo a **218 nm** per la transizione dovuta alla transizione  $n \rightarrow \pi^*$ , di comparabile intensità;
- **$\alpha$ -elica:** La conformazione ad  $\alpha$ -elica è la più comune in molte proteine soprattutto quelle globulari. Uno spettro CD di un polipeptide ad  $\alpha$ -elica è tipicamente caratterizzato da una banda negativa a **222 nm** dovuta alla transizione  $n \rightarrow \pi^*$  e da una negativa a **209 nm** e una positiva a **198 nm** relative all'**accoppiamento eccitonico** (interazione dipolo-dipolo tra monomeri in un dimero), rispettivamente parallelo e perpendicolare, delle transizioni  $\pi \rightarrow \pi^*$  del peptide;

Una nota di particolare importanza è che in queste condizioni, ossia di lontano UV, ci troviamo in una zona vicina a quella dell'assorbimento del legame peptidico, quindi ottengo un'assorbanza molto più elevata. Per correggere questo problema va regolata la concentrazione e lo spessore del campione in modo da bilanciarne l'effetto. Dalla 5.14 possiamo vedere come ogni struttura secondaria fondamentale abbia il suo spettro caratteristico, quindi lo spettro CD di una proteina potrà essere visto come combinazione lineare degli effetti dovuti alle strutture fondamentali secondarie.

$$\vartheta_T = \alpha_1 \vartheta_E + \alpha_2 \vartheta_F + \alpha_3 \vartheta_{RC}$$

Così facendo però ottengo un'equazione in 3 incognite che mi impone che le  $\lambda$  siano almeno 3. Avendo noi a che fare con uno spettro continuo è statisticamente più rilevante analizzare un set più elevato al fine di calcolarne lo scarto quadratico:

$$srs = \sum_{i=1}^{\lambda} (\alpha_1 \vartheta_{Ei} + \alpha_2 \vartheta_{Fi} + \alpha_3 \vartheta_{RCi} - \vartheta_{Ti})^2$$

da cui è possibile ricavare la frazione di ogni struttura rispetto all'intera struttura secondaria. Per ottenere questi dati si utilizzano dei modelli standard per le strutture fondamentali e applicando alcuni modelli (ad esempio il modello *Greenfield and Fasman* per la stima dell'  $\alpha$ -elica e random-coil) si confronta lo spettro CD ottenuto con quelli sperimentali e dal fit si possono ottenere le percentuali delle varie strutture.

Method	Structure	Protein			
		Carboxypeptidase	$\alpha$ -Chymotrypsin	Myoglobin	Lysozyme
X-ray structure	$\alpha$ Helix	23	8	~68	28
	$\beta$ Sheet	18	22	0	10
	Random plus other	59	70	~32	62
CD calculation from poly-L-lysine basis set	$\alpha$ Helix	13	12	68	29
	$\beta$ Sheet	31	23	5	11
	Random	56	65	27	60
CD calculation from protein basis set	$\alpha$ Helix	26	20	— <sup>§</sup>	— <sup>§</sup>
	$\beta$ Sheet	18	20	— <sup>§</sup>	— <sup>§</sup>
	Random	56	60	— <sup>§</sup>	— <sup>§</sup>

Figura 5.15: Esempi di proteine e relative percentuali di strutture fondamentali

**Esempio 3. Esempio di fitting:** Supponiamo di voler conoscere la struttura di una proteina sconosciuta. Come prima cosa dovremo ottenere il suo spettro CD, dopodiché fittarlo come combinazione di curve standard di cui è possibile variare i parametri per adattarli al meglio (di fatto questi parametri sono i coefficienti della combinazione lineare, e la loro migliore stima può essere ricavata usando metodi statistici per il confronto fra grafici). Un tipico esempio è la mioglobina. In questo caso cercheremo di fissare usando:  $\vartheta_T = \alpha_1 \vartheta_E + \alpha_2 \vartheta_F + \alpha_3 \vartheta_{RC}$

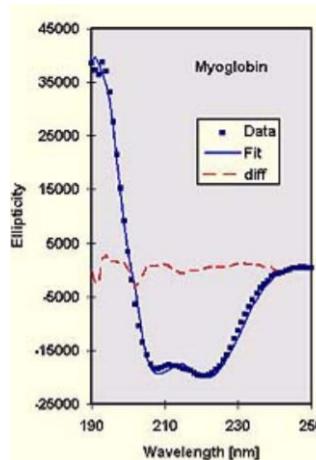


Figura 5.16:

Il fitting migliore si ottiene per  $\alpha_1 = 80\%$ ,  $\alpha_3 = 20\%$  e  $\alpha_2 = 0$  che è in buon accordo con l'effettiva configurazione di 78% per  $\alpha$ -elica e 22% per random-coil.

### 5.5.2 Vicino UV

L'assorbimento in questo caso non è più determinato dai legami peptidici ma è dominato dalle catene laterali. Lo spettro CD nel vicino UV fornisce informazioni sulla forma tridimensionale della molecola quindi della sua **struttura terziaria**.

FENILALANINE	TIROSINE	TRIPTOFANI	LEGAMI S-S
piccolo coefficiente di estinzione dovuto all'alta simmetria.	bassa simmetria, intense bande assorbimento.	ha la banda di assorbimento più intensa.	ha una banda molto ampia.
massimi di assorbimento a 254, 256, 262 e 267 nm.	massimo di assorbimento a 276 nm; legame idrogeno al gruppo -OH porta a spostamenti verso il rosso fino a 4nm.	massimo di assorbimento a 282 nm.	massimo di assorbimento varia da 250 a 300 nm.

Figura 5.17:

Ci sono determinate condizioni per ottenere un segnale dai residui aromatici apprezzabile, e quindi poter osservare l'effetto CD: la proteina deve essere ripiegata in modo tale che gli amminoacidi aromatici siano immobilizzati in un *environment* asimmetrico. Da questo si ottiene che il *segno*, l'*ampiezza* e la *lunghezza d'onda* delle bande aromatiche non possono essere calcolate a priori perché dipendono dalla struttura nelle immediate vicinanze del cromoforo immobilizzato. Questo spettro mostra un elevata sensibilità allo stato nativo della proteina, pertanto può essere utilizzato per riconoscere il corretto ripiegamento (folding) di una conformazione.

### I gruppi prostetici: CD nel visibile

Anche se di minor importanza è possibile ottenere altre informazioni dall'applicazione del dicroismo circolare alle proteine, infatti se consideriamo una radiazione elettromagnetica nello spettro del visibile (800-350 nm) l'effetto cromoforico è dato dai **gruppi prostetici** da cui è possibile ricavare dettagli sull'interazione gruppo prostetico e la catena polipeptidica e sulla struttura terziaria intorno ad essa. Questi cromofori si comportano in modo differente da quelli visti in precedenza, infatti danno origine ad un effetto CD particolare, chiamato effetto **CD indotto**.

### CD Acidi nucleici

In questo caso i cromofori sono le basi (la catena principale, infatti, assorbe solo sotto i 150 nm) e l'assorbimento, di conseguenza anche lo spettro CD, dipende non solo dalla conformazione ma anche dalla sequenza. Viene utilizzato per seguire cambiamenti conformazionali come la denaturazione o processi di associazione.

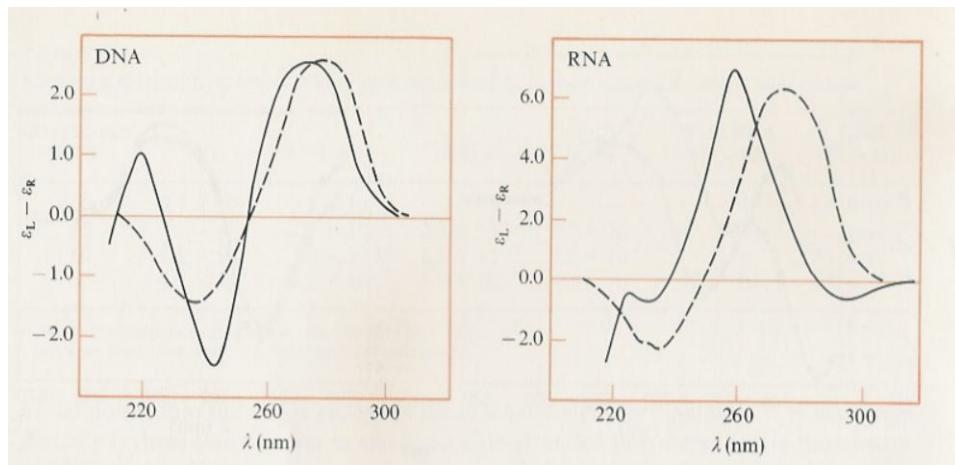


Figura 5.18: Dicroismo circolare del B-DNA e dell'RNA

### 5.5.3 Utilizzo del CD

Nell'esempio precedente abbiamo mostrato come funziona la scomposizione dello spettro CD negli spettri caratteristici delle strutture fondamentali, ma va sottolineato che il processo non è semplicemente "somma delle parti" ma è fondamentalmente legato alla struttura della macromolecola in questione. Per questo motivo il dicroismo circolare è utilizzato principalmente per ottenere informazioni sulla **struttura 3D** e sulla **rigidità** di quest'ultima. Un vantaggio legato al fatto che ogni struttura ha il proprio spettro caratteristico è, nel caso delle proteine, la possibilità di identificare gli elementi strutturali per seguire **cambiamenti dinamici della struttura** a causa di variazioni di temperatura, pH, legame con ligandi, denaturazione, ecc. È estremamente utile anche per seguire la cinetica di processo di refolding di una proteina indotto dalla variazione di concentrazione dell'agente denaturante, e la denaturazione termica di proteine o acidi nucleici. Sempre nel campo della **cinetica del folding** viene utilizzato per verificare:

- Il corretto folding di una proteina purificata;
- Il corretto folding di un mutante rispetto al wild-type;
- Il corretto folding di un prodotto biofarmaceutico, per verificare che sia mantenuta la struttura biologicamente attiva.

Un altro utilizzo degno di nota è il **confronto fra le strutture** di due macromolecole diverse, o la stessa presa in condizioni differenti, al fine di controllarne l'affinità e le similitudini. Tutti questi processi possono essere riassunti in 4 punti:

1. Stima della **conformazione** di una macromolecola (proteina/acidi nucleici);
2. Determinazione di **cambiamenti conformazionali** dovuti a interazioni fra molecole asimmetriche (tra proteine, DNA, ligandi);
3. Determinazione della **termodinamica** e della **cinetica** di folding unfolding;
4. Determinazione delle **costanti di legame**.

Ora che abbiamo descritto le possibili applicazioni è bene fare presente quali sono i vantaggi e gli svantaggi legati all'utilizzo del dicroismo ai fini pratici.

- **Vantaggi:** è un processo non invasivo sul campione (importante in quanto permette di evitare eventuali modifiche inaspettate) e necessita di una quantità ridotta di campione ( $300\text{-}1500\mu\text{l}$  di soluzioni  $0.5\text{-}0.8\text{ mg/ml}$ ). La possibilità di un'osservazione accurata dei cambiamenti relativi dovuti agli effetti dell'ambiente (pH, denaturanti, temperatura) rappresenta un punto a favore di questo metodo di analisi;
- **Svantaggi:** il principale svantaggio consiste nell'interferenza data dal campione nella regione UV (pochissimi tamponi molto diluiti permettono studi sotto i 200 nm). Anche l'accuratezza della misura rappresenta un grande scoglio per questo metodo d'indagine, infatti le misure sono spesso affette da numerosi errori sperimentali che portano l'accuratezza media dei fit a  $\sim 10\%$ . Ultimo, ma non meno importante, è il problema legato al costo delle apparecchiature, dato che questo processo richiede un apparato strumentale relativamente costoso.

**Esempio 4.** • *Confronto fra la struttura di un enzima e una proteina nel lontano UV: la forma ricombinante di un enzima, come si evidenzia dal grafico, non ha la stessa struttura secondaria della proteina naturale. Questo ci porta a dire che non è propriamente foldata (figura a).*

- *Analisi della **stabilità termica** di una proteina: analizzando lo spettro CD di una proteina in 3 diverse soluzioni tampone possiamo notare che, anche se l'unfolding è reversibile in tutte e 3 i casi, ci sono evidenze significative dovute alla diversa temperatura che ci danno indizi sulla stabilità termica (figura b).*
- *Calcolo della temperatura di melting: attraverso il fit di uno spettro CD è possibile ricavare di melting di una sostanza. Nel caso in questione si può notare che tale costante è  $47.3 \pm 0.1^\circ\text{C}$ . L'ampiezza della regione di transizione è legata all'entalpia di denaturazione, che dal fit è  $52 \pm 2\text{ kcal/mol}$  (figura c).*

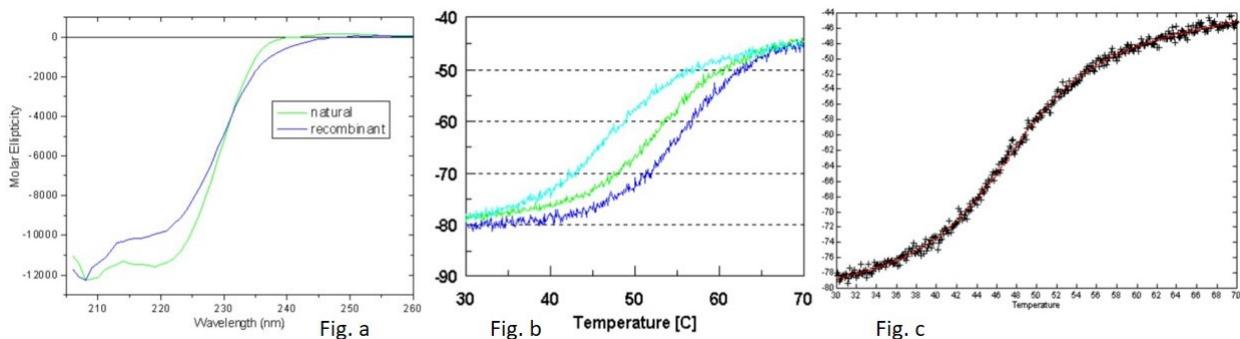


Figura 5.19:

# Capitolo 6

## SPETTROSCOPIA DI FLUORESCENZA

L'emissione di luce può rivelare proprietà delle molecole biologiche apprezzabilmente differenti da quelle messe in mostra dai processi di assorbimento sin qui discussi. Il fenomeno di emissione avviene su una scala temporale molto più lenta, consentendo, tra le altre cose, ad un range più ampio di interazioni e perturbazioni di influenzare lo spettro di un campione

### 6.1 Principi base della fluorescenza

Consideriamo un sistema elementare composto da due livelli energetici  $S_a$  e  $S_b$ , con  $S_b > S_a$ . Sappiamo, dalla modellizzazione dell'assorbanza, che un fascio di luce con densità di intensità  $I(\nu)$ , induce una transizione da  $S_a$  a  $S_b$  con un tasso di successo pari a  $B_{ab}$ . Il processo inverso di emissione  $S_b \rightarrow S_a$  avviene con lo stesso tasso  $B_{ba} = B_{ab}$ . Se inizialmente il livello  $S_a$  contiene  $n_a$  molecole e  $S_b$  ne contiene  $n_b$ , all'equilibrio deve verificarsi:

$$n_a B_{ab} I(\nu) = n_b B_{ba} I(\nu) \implies n_a = n_b$$

il che sarebbe assurdo perché esprime una condizione di equilibrio indipendente dalla luce, ma senza luce tutte le particelle dovrebbero stare nello stato a energia minima  $S_a$ . Questo ci dice che occorre andare ad un livello più profondo della questione.

Dalla meccanica statistica si può dimostrare che l'occupazione media dei livelli obbedisce alla distribuzione di Boltzmann:

$$\frac{n_a}{n_b} = e^{-(E_a - E_b)/kT} = e^{+h\nu/kT}$$

Albert Einstein fu il primo, con la proposta della teoria dell'effetto fotoelettrico, che ipotizzò che per risolvere questa discrepanza di popolazione dei livelli (affinché si possa arrivare all'equilibrio), fosse necessario ipotizzare **un tasso di emissione spontanea di un fotone dallo stato  $S_b$ .**

Tralasciando la trattazione formale iniziamo a dare qualche definizione.

**Definizione 6.1.0.1.** *Si chiama **fotoluminescenza** l'emissione di radiazioni luminose di un corpo conseguente a transizioni di elettroni da un livello energetico superiore a un livello di energia più bassa, per effetto di interazione fotonica.*

**Definizione 6.1.0.2.** Si chiama **fluorescenza** il processo di emissione immediata di luce a seguito del rilassamento di uno stato eccitato dopo un assorbimento.

Le due definizioni potrebbero sembrare pressoché equivalenti; è tuttavia necessario precisare che la fotoluminescenza si divide in *fluorescenza*, nella quale l'emissione termina quando la stimolazione che la provoca viene meno, e in *fosforescenza* nella quale il processo di emissione può durare a lungo anche dopo la fine dell'assorbimento. Approfondiremo nel seguito tale questione.

Iniziamo dunque a considerare più da vicino che cosa succede nella molecola, considerando un elettrone posto nello stato a energia più bassa:

- Durante la fase di assorbimento, l'elettrone viene promosso ad uno stato vibrazionale a più alta energia. Le transizioni maggiormente coinvolte sono quelle del tipo  $\pi \rightarrow \pi^*$  e  $n \rightarrow \pi^*$ .
- Esso perde energia fino ad arrivare allo stato vibrazionale a energia minima, attraverso una serie di processi di rilassamento vibrazionali e rotazionali che non provocano emissione di luce.
- Lo stato in cui viene a trovarsi è però instabile, il che costringe la carica a decadere fino a tornare nel suo livello fondamentale di partenza. Durante quest'ultima transizione potrà<sup>1</sup> essere emessa luce blu se il salto è elevato, luce rossa o verde se il salto è più limitato. Dalla relazione di Planck è infatti noto che maggiore è la differenza energetica tra i livelli di transizione, maggiore sarà la frequenza dei fotoni emessi e minore la lunghezza d'onda che si rende visibile.
- Si intuisce che l'energia emessa è sempre minore di quella assorbita per via del processo di rilassamento con il primo stato vibrazionale come stato di arrivo. Pertanto la lunghezza d'onda che fluoresce sarà in genere maggiore di quella che viene assorbita. Questo rende necessario l'utilizzo, per la fase di assorbimento, di luce ultravioletta, che avendo  $\lambda$  di poco inferiori a quelle del visibile, rende la fluorescenza più facilmente osservabile.

Quanto detto ci mostra che anche eccitando l'elettrone con una frequenza di ingresso arbitrariamente alta, l'emissione che ottengo sarà sempre determinata dalla differenza energetica tra lo stato fondamentale di partenza e lo stato vibrazionale più basso. Prima di procedere è necessario precisare quale modello della struttura elettronica molecolare è bene tenere a mente per capire con esattezza cosa succede. Nel seguito chiameremo  $S_0$  lo stato fondamentale, stabile a energia minima assoluta. Con le lettere  $S_i$  e  $T_i$ ,  $i > 0$  si indicheranno via via tutti gli **stati** molecolari eccitati, rispettivamente singoletto e tripletto, a seconda della disposizione degli elettroni e dunque della molteplicità di spin  $2s + 1$  che li caratterizza. Ciascuno di questi stati contiene dei **livelli vibrazionali**, in genere più di uno per stato, e con energie man mano crescente. L'immagine seguente ci permette di fare qualche ulteriore osservazione

---

<sup>1</sup>Virtualmente tutte le molecole possono manifestare fluorescenza. Tuttavia in alcune di esse l'effetto è particolarmente debole per via del prevalere degli effetti di rilassamento vibrazionale (si veda poco sotto).

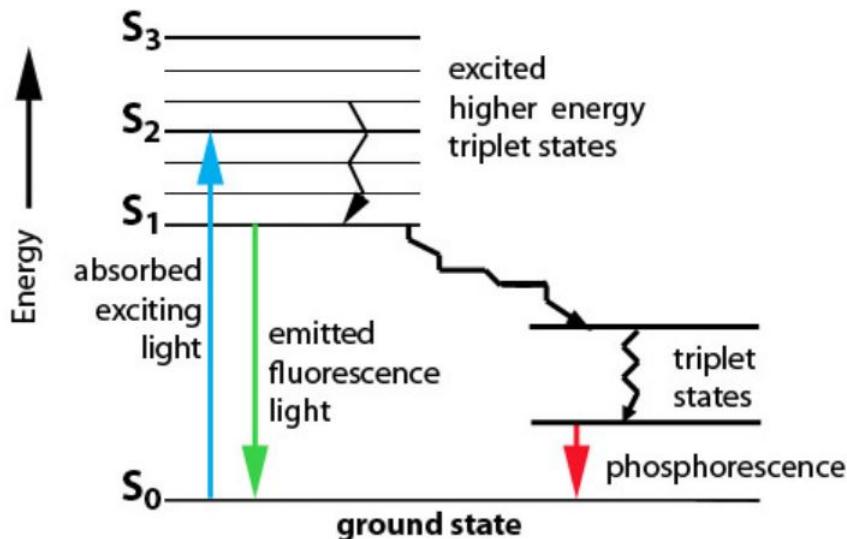


Figura 6.1: Rappresentazione schematica dei processi di assorbimento (blu), fluorescenza (verde), processi vibrazionali dissipativi (spezzata nera), fosforescenza (rosso)

Si vede chiaramente ciò che si è ribadito sopra: l'emissione di fluorescenza avviene sempre dallo stato di "singoletto" eccitato a energia più bassa, indipendentemente dal livello di energia a cui lo porta l'assorbimento. A tale livello minimo arriva dopo una serie di processi che consistono fondamentalmente in:

1. emissioni di energia **non radiativa**, durante le quali la molecola cambia stato quantico senza emettere radiazione luminosa. In genere sono coadiuvate da fattori esterni *ambientali*, come ad esempio oggetti contenuti nel solvente. Non trasformandosi in luce l'energia può essere convertita mediante:
  - **conversione interna (IC):** Avviene tra uno stato elettronico e un altro a energia minore con conservazione della molteplicità di spin, quindi da singoletto a singoletto, da tripletto a tripletto, ecc... In particolare l'emissione parte dal livello vibrazionale fondamentale di uno stato elettronico eccitato  $S_n$  e arriva in un livello vibrazionale eccitato dello stato elettronico eccitato sottostante  $S_{n-1}$ . Da qui la molecola è rapidamente portata al livello fondamentale dello stato  $S_{n-1}$  dal rilassamento vibrazionale dissipativo. Il processo poi si ripete fino al raggiungimento dello stato fondamentale dello stato vibrazionale a energia più bassa  $S_1$  da cui può aver luogo la fluorescenza, come già visto.
  - **intersystem crossing (ISC):** Avviene tra uno stato elettronico e un altro avente diversa molteplicità di spin, in genere da singoletto a tripletto. La transizione della molecola va da un livello vibrazionale n-esimo di uno stato eccitato di singoletto (ad esempio  $S_1$ ) ad un livello vibrazionale dello stato di tripletto ( $T_1$ ), che si trova generalmente a minor energia rispetto a quello di singoletto e a distanze di equilibrio maggiori. La molecola perde poi il suo eccesso di energia vibrazionale e si colloca nel livello vibrazionale più basso dello stato di tripletto. Da questo stato può poi emettere per **fosforescenza** o compiere un altro ISC ( $T_1 \rightarrow S_0$ ) non radiativo.
2. **processi di quenching (Q)** in cui l'eccitazione è trasferita ad altre molecole che sono in grado di interagire con la molecola eccitata tramite reazioni bi- e tri-

molecolari. Il fenomeno è tutt'altro che semplice e verrà pertanto trattato nel capitolo successivo, a cui si rimanda.

3. **processi di trasferimenti energetici per risonanza (FRET)** in cui è coinvolta una interazione tra più *fluorofori*, dove con questi si intendono le molecole che a seguito di assorbimento manifestano fluorescenza.

Si tende inoltre a classificare i processi del punto 1. in *processi unimolecolari* e ai fenomeni dei punti 2. e 3. in *processi bimolecolari*, come è palese, in base al numero di molecole coinvolte per singola transizione.

Diamo la seguente definizione puramente didascalica:

**Definizione 6.1.0.3.** Si chiama **Diagramma di Jablonski** il grafico che riassume le trasformazioni energetiche che si verificano in una molecola per effetto di assorbimento di una radiazione di sufficiente energia.

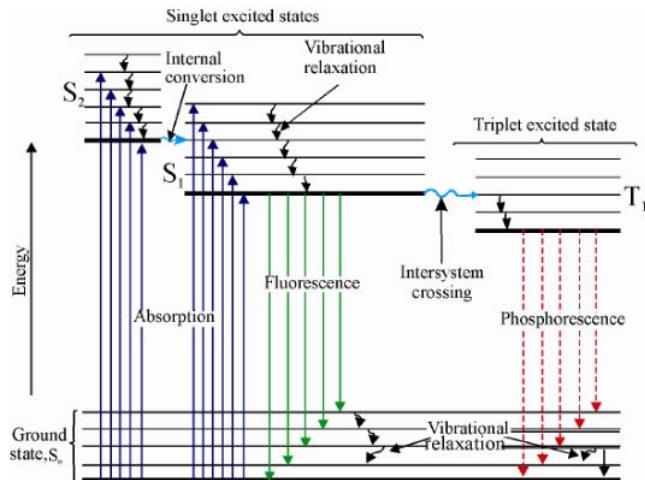


Figura 6.2: Diagramma di Jablonski. Sintesi dei processi: cronologicamente si ha 1) assorbimento, 2) emissioni non radiative 3) fluorescenza e/o fosforescenza

#### Nota Bene 6.1.0.4. Fosforescenza

La fosforescenza non verrà trattata in dettaglio in questo capitolo, ma cogliamo comunque l'occasione per far notare la sua principale caratteristica fotonica. Come discusso nei ISC, la fosforescenza, se avviene, si presenta su scale temporali molto più lunghe di quelle della fluorescenza. Per avere idea delle grandezze in gioco si tenga conto dello specchietto che segue.

assorbimento :	$10^{-15} \text{ s}$
fluorescenza :	$10^{-12} - 10^{-7} \text{ s}$
fosforescenza :	$10^{-2} - 10^1 \text{ s}$

La marcata lentezza che caratterizza la fosforescenza è dovuta al fatto che la transizione singoletto  $\rightarrow$  tripletto che la caratterizza è teoricamente proibita dalle regole di selezione di spin  $\Delta s = 0$ . Questa apparente contraddizione è risolta da effetti di accoppiamento vibronico, di trattazione prettamente quantistica, quali, ad esempio, lo spin-orbita. Lo stato

*di tripletto di arrivo del primo ISC risulta così essere uno stato metastabile, il che ritarda l'effettiva emissione di fosforescenza. (Detto in altri termini la transizione  $S_i \rightarrow T_i$  ha scarsissime probabilità di avvenire, quindi il processo sarà lento). L'emissione si prolungherà pertanto ben oltre la fine del processo di assorbimento (sempre se comparato con le scale dei fenomeni coinvolti).*

*Proprio la scarsa probabilità di transizione rende però la fosforescenza difficile da osservare. Spettroscopicamente si preferisce quindi concentrare gli sforzi sulla fluorescenza, per quanto più breve essa sia.*

## 6.2 Le "regole" della fluorescenza

Riportiamo di seguito quelli che sono i quattro principi o *regole* comuni a tutti i fenomeni di fluorescenza che è possibile osservare:

1. **Principio di Franck-Condon:** durante una transizione elettronica il moto dei nuclei viene considerato nullo secondo l'approssimazione di Born-Oppenheimer. Con questa convenzione la geometria molecolare viene assunta praticamente invariata: questo fa sì che i modi normali di oscillazione dei singoli livelli vibrazionali siano fermi e non oscillino. Un'importante implicazione di questo fatto è che le transizioni elettroniche tra livelli vibrazionali avvengono secondo una regola fissa durante l'intero processo e cioè, quantomeccanicamente, una transizione elettronica da un livello vibzionale a un altro è tanto più probabile quanto più le corrispettive funzioni d'onda (che ricordiamo non evolvere nel tempo essendo ferme per ipotesi B-O) sono sovrapposte.

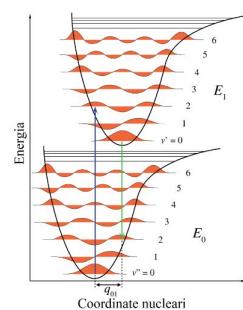


Figura 6.3: Grafico già visto nel capitolo dell'assorbimento: principio di Franck-Condon

2. **Stokes shift:** a causa del rilassamento nucleare nello stato eccitato (IC, ISC, Q, FRET), l'emissione ha sempre energia più bassa della luce assorbita. Pertanto, dato un genrico stato fondamentale  $S_0$  da cui parte e arriva l'elettrone assorbito e emesso, la luce emessa per fluorescenza avrà frequenza minore e quindi lunghezza d'onda maggiore rispetto a quella assorbita. Lo spostamento di Stokes è la differenza, in unità di lunghezze d'onda, tra lo spostamento dei massimi degli spettri di assorbimento e di emissione della stessa transizione elettronica.

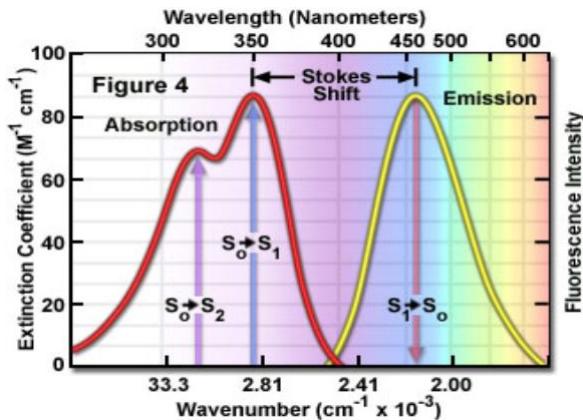


Figura 6.4: Stokes Shift

3. **Regola dello specchio:** lo spettro di emissione è un'immagine speculare dello spettro di assorbimento. La spiegazione di ciò è piuttosto semplice. Innanzitutto va notato che per effetto dello shift di Stokes lo spettro di emissione si trova in una *posizione* speculare a quello di assorbimento, essendoci un asse di simmetria virtuale passante per il punto medio delle ascisse dei due picchi. In secondo luogo la *forma* speculare deriva dal fatto che, con riferimento alla figura, i livelli  $S_0$  e  $S_1$  presentano strutture vibrazionali simili. Questo fa sì che, esattamente come quando eccito un elettrone nella fase di assorbimento questo può raggiungere uno degli elevati stati vibrazionali possibili, così nella fase di emissione esistono pressoché lo stesso grande numero di stati di arrivo in cui l'elettrone può venirsi a trovare a fluorescenza terminata. Dalla somiglianza delle strutture vibrazionali deriva la specularità degli spettri.

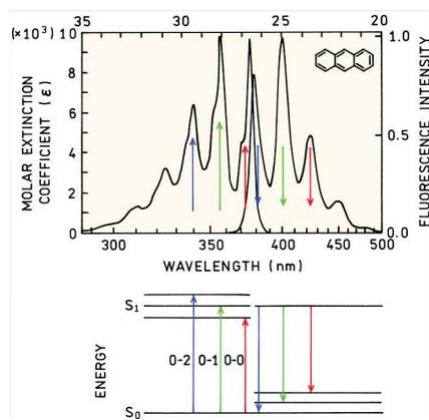


Figura 6.5: Regola dello specchio

4. **Regola di Kasha:** lo spettro di fluorescenza è indipendente dalla lunghezza d'onda di eccitazione. Abbiamo infatti già ampiamente discusso di come i vari IC, ISC, Q e FRET siano tutti processi di rilassamento che fanno sì che l'emissione avvenga *sempre* dal livello vibrazionale fondamentale del primo stato eccitato di singoletto allo stato fondamentale del sistema. L'ennesima messa in mostra di ciò è nell'immagine seguente:

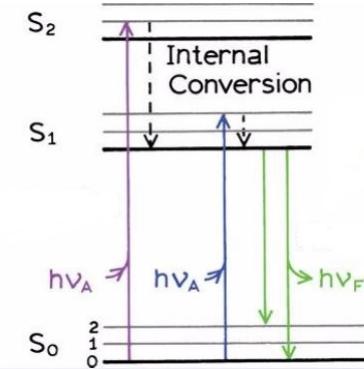
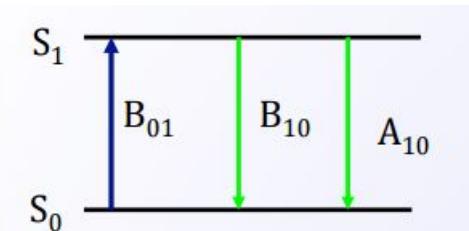


Figura 6.6: Regola di Kasha. Il label A indica l'assorbimento, F la fluorescenza.  $S_1$  è il primo stato eccitato ed è ben evidente che l'emissione parte dal livello vibrazionale a energia minima. Il livello vibrazionale di arrivo non è fisso ma fissa sarà sicuramente la  $\lambda$  del massimo dello spettro, il che lo rende indipendente dalla luce eccitante

### 6.3 Resa quantica e tempi di vita

Questa sezione è dedicata alla formalizzazione e spiegazione matematica del fenomeno della fluorescenza sin qui analizzato. Per realizzabilità di trattazione semplificheremo fortemente la struttura elettronica considerando soltanto i livelli di singoletto fondamentale e primo eccitato. Saranno trascurate, almeno per il momento, i gradi di libertà vibrazionali molecolari.

Facciamo ritorno all'apertura del capitolo, considerando nuovamente il sistema a due stati  $S_0$  e  $S_1$



Richiamiamo brevemente cosa avevamo già visto. Con  $n_0$  e  $n_1$  si indicano le occupazioni (mediate secondo la distribuzione di Boltzmann) dei due livelli energetici ( $n_0/n_1 = e^{(hv)/kT}$ ), con  $B_{01} = B_{10}$  i coefficienti di Einstein, tasso di transizione rispettivamente di  $0 \rightarrow 1$  e  $1 \rightarrow 0$  e con  $A_{10}$  il coefficiente di emissione spontanea che era stato *necessario* introdurre per evitare un assurdo all'equilibrio. Supporremo che esso non debba dipendere dalla luce incidente. Chiamiamo dunque con  $I(\nu)$  la densità di corrente incidente, centrata attorno alla frequenza  $\nu$ . La nuova condizione di equilibrio (dopo la fluorescenza) si ottiene uguagliando le popolazioni dei due livelli in funzione dei tassi<sup>2</sup> di transizione  $0 \rightarrow 1$  e  $1 \rightarrow 0$  e ricordando che  $B_{01} = B_{10}$

$$\frac{n_0}{n_1} = \frac{B_{10}I(\nu) + A_{10}}{B_{01}I(\nu)} = \frac{B_{10}I(\nu) + A_{10}}{B_{10}I(\nu)} = 1 + \frac{A_{10}}{B_{10}I(\nu)} \quad (6.1)$$

<sup>2</sup>Si calcolano come prodotto del coefficiente di Einstein e della densità di intensità secondo le 4.11 e 4.13

Uguagliando 6.1 con la definizione statistica della popolazione dei livelli

$$\frac{n_0}{n_1} = e^{\frac{h\nu}{kT}}$$

è possibile trovare un'espressione per il coefficiente A. Per fare ciò è però prima necessario sostituire esplicitamente  $I(\nu)$ . Poiché stiamo considerando un sistema all'equilibrio, la densità di assorbimento e la densità di emissione *devono* essere uguali. Per un oggetto in equilibrio termico, la densità di radiazione perché ciò avvenga è quella di corpo nero secondo il modello di Planck:

$$I(\nu) = \frac{8\pi h\nu^3}{c^3} \frac{1}{e^{(h\nu)/(kT)} - 1} \quad (6.2)$$

Quindi, sostituiamo l'espressione appena trovata di I e uguagliamo le due espressioni per le popolazioni. Troviamo:

$$\begin{aligned} 1 + \frac{A_{10}c^3(e^{h\nu/kT} - 1)}{B_{10}8\pi h\nu^3} &= e^{h\nu/kT} && \iff \\ B_{10}(8\pi h\nu^3) + A_{10}c^3(e^{h\nu/kT} - 1) &= B_{10}(8\pi h\nu^3)e^{h\nu/kT} && \iff \\ B_{10}(8\pi h\nu^3)(1 - e^{h\nu/kT}) &= A_{10}c^3(1 - e^{h\nu/kT}) \end{aligned} \quad (6.3)$$

che restituisce così

$$A_{10} = \boxed{\frac{8\pi h\nu^3}{c^3} B_{10}} \quad (6.4)$$

Nota che il coefficiente di emissione dipende dal cubo della frequenza, il che significa che **per lunghezze d'onda piccole  $A_{10}$  è molto maggiore di  $B_{10}$** . Ovvero, data la scala nanometrica delle lunghezze d'onda, **tutte le emissioni sono spontanee**.

Dalla 4.12 e 4.16 si trova poi il legame tra il coefficiente di emissione e la forza del dipolo di transizione elettrica:

$$A_{10} = \frac{32\pi^3 \nu^3}{3\hbar c^3} D_{01} \quad (6.5)$$

La relazione trovata ha grande rilevanza poiché, ricordando che la forza di dipolo  $D_{01}$  e la frequenza  $\nu$  possono in genere essere misurati direttamente dallo spettro di assorbimento integrando l'estinzione molare sull'intera banda (come visto nel Capitolo 4), il coefficiente di emissione spontanea può essere determinato anche senza compiere nessuna misura di fluorescenza. Vale infatti

$$A_{10} \simeq 2.88 \times 10^{-9} n^2 \langle \nu^{-3} \rangle^{-1} \int \frac{\epsilon(\nu)}{\nu} d\nu \quad (6.6)$$

In assenza di radiazione (o comunque di una qualsiasi perturbazione o interazione),  $B_{10} = B_{01}$  e il tasso di diseccitazione delle molecole inizialmente nello stato  $S_1$  (vale a dire la rapidità con cui avviene l'emissione) è:

$$\frac{dn_1}{dt} = -A_{10}n_1 \implies n_1(t) = n_1(0)e^{-A_{10}t} \quad (6.7)$$

dove  $n_1(0)$  indica la concentrazione di molecole eccitate al tempo zero. Possiamo definire dall'esponente della 6.7 **il tempo di vita naturale o radiativo** dello stato  $S_1$  come

$$\boxed{\tau_R = \frac{1}{A_{10}}} \quad (6.8)$$

Si presti attenzione al fatto che tutto il modello elaborato sin qui vale solo se il livello che assorbe il fotone è lo stesso che poi lo riemette. Abbiamo visto che questo non accade praticamente mai nella realtà per via dei rilassamenti vibrazionali, ragion per cui il tempo di radiazione espresso nella 6.8 non è esattamente coincidente con quello sperimentale. Supponiamo ora di accendere la radiazione e chiamiamo  $I_0$  il numero di fotoni assorbiti dal sistema per secondo. Dalla discussione precedente si evince che la *costante cinetica* della fluorescenza<sup>3</sup> è

$$k_F = A_{10} = \frac{1}{\tau_R}$$

I processi non radiativi che si manifestano insieme alla fluorescenza avranno invece una costante cinetica che sarà data dal contributo della conversione interna, dell'intersystem crossing, dei quenching e delle risonanze FRET, ragion per cui è possibile introdurre una costante cinetica non-radiativa

$$k_{NR} = k_{ic} + k_{isc} + k_Q + k_{FRET}$$

che descrive a sua volta la depopolazione del singoletto eccitato. L'equazione cinetica 6.7 diventa così

$$\frac{dn_1}{dt} = I_0 - (k_F + k_{NR})n_1 \quad (6.9)$$

Si noti che a seconda del fenomeno che sto osservando  $k_F = A_{10}$  resterà invariato, per l'indipendenza dei coefficienti di emissione dall'intensità incidente, mentre gli altri parametri dipenderanno dalle particolari condizioni al contorno (geometria molecolare, ambiente, effetti di solvente).

Possiamo ora finalmente introdurre il concetto di *resa quantica*.

- Iniziamo dal caso stazionario  $dn_1/dt = 0$ , in cui l'eccitazione è costante nel tempo per via di una radiazione  $I_0$ . In questo caso la 6.9 mi restituisce la frazione di molecole eccitate che tornano al loro stato dissecitato per mezzo della fluorescenza  $\phi_F$  :

$$\phi_F = \frac{k_F n_1}{I_0} = \frac{k_F}{k_{ic} + k_{isc} + k_Q + k_{FRET}} \quad (6.10)$$

- Se consideriamo invece il caso transiente (in cui l'illuminazione avviene per spot di durata trascurabile) in cui  $I_0 = 0$  e  $t > 0$ , ovvero se teniamo conto, ad assorbimento avvenuto, dei vari processi di rilassamento, l'equazione cinetica ha la forma della 6.9 in cui pongo  $I_0 = 0$ . La soluzione si trova immediatamente:

$$n_1(t) = n_1(0)e^{-(k_F + k_{NR})t} = n_1(0)e^{-t/\tau_F} \quad (6.11)$$

dove la costante di tempo  $\tau_F$  è stata rinominata come

$$\tau_F = \frac{1}{k_F + k_{NR}}$$

(6.12)

cui si dà il nome di **tempo di fluorescenza**.

---

<sup>3</sup>Si sta infatti supponendo trascurabile un'eventuale presenza di emissione stimolata.

Ora, in definitiva, il numero di molecole che si dissecitano in modo radiativo fratto il numero il molecole assorbite, prende il nome di **resa quantica**, indica quanto i processi non radiativi influiscono sulla fluorescenza e si può scrivere in forma compatta:

$$\boxed{\phi = \frac{k_F}{k_F + k_{NR}} = \frac{\tau_F}{\tau_R} < 1} \quad (6.13)$$

Ribadiamo che l'estrema semplicità delle formule conclusive è legato al fatto che stiamo completamente ignorando la struttura vibronica della molecola, limitandoci a due stati di singoletto successivi, puramente elettronici.

Tuttavia, nella spettroscopia di fluorescenza, uno dei parametri che sperimentalmente è interessante misurare, è proprio la resa quantica di un sistema. Dal momento però che una misura diretta di  $\phi_F$  è abbastanza difficile da ottenere, si preferisce misurare direttamente l'intensità di emissione, e da lì ricavare *a posteriori* il valore della resa. Vediamo dunque come fare.

Il numero di molecole eccitate dal fascio di luce incidente di intensità  $I_0$  è proporzionale al numero di fotoni eccitanti<sup>4</sup> contenuti in esso. Questa quantità può essere misurata ad una lunghezza d'onda fissata  $\lambda_e = \lambda_{assorbimento}$  dall'attenuazione dell'intensità secondo quanto espresso dalla legge di Lambert-Beer (4.9)

$$I = I_0 e^{-2.303\epsilon(\lambda_{abs})Cl} \quad (6.14)$$

in cui, come già visto nel Capitolo 4,  $\epsilon(\lambda_{abs})$  è il coefficiente di estinzione alla lunghezza d'onda di eccitazione, C è la concentrazione di molecole assorbenti e l è il cammino ottico della luce incidente. Negli esperimenti di fluorescenza l'assorbanza coinvolta è in genere molto piccola ( $A = \epsilon Cl < 0.05$ ), il che ci permette di sviluppare la 6.14 in serie di McLaurin e riscrivere

$$I = I_0[1 - 2.303\epsilon(\lambda_{abs})Cl] \implies I_0 - I = 2.303\epsilon(\lambda_{abs})Cl \quad (6.15)$$

che esprime l'intensità assorbita a una determinata lunghezza d'onda.

L'intensità di emissione di una molecola ad una particolare lunghezza d'onda  $\lambda_{em}$ , invece, è governata dal prodotto di tre termini  $\boxed{\phi_F f(\lambda_{em})d}$  dei quali  $\phi_F$  è la resa quantica;  $f(\lambda_{em})$  è l'emissione che avviene a quella data lunghezza d'onda fratto l'emissione totale; d è la frazione di radiazione emessa a  $\lambda$  è effettivamente misurata dallo strumento di rilevazione.

L'intensità di emissione osservata all'atto pratico (**Intensità di Fluorescenza**) sarà quindi il prodotto tra le probabilità di assorbimento ed emissione

$$\begin{aligned} F(\lambda) &= 2.303\epsilon(\lambda_{abs})ClI_0\phi_F f(\lambda_{em})d \\ &= \epsilon(\lambda_{abs})\phi_F f(\lambda_{em})CI_0k \end{aligned} \quad (6.16)$$

espressione nella quale C e l sono parametri noti dal campione e  $I_0$  e k dalla strumentazione. Misurando  $F(\lambda)$  si ricava la resa quantica come desiderato. L'Intensità di Fluorescenza è la variabile che compare in ordinata, rispetto alle lunghezze d'onda in ascissa, negli spettri di emissione.

<sup>4</sup>Di frequenza pari al salto energetico tra lo stato di singoletto fondamentale e il primo singoletto eccitato, o maggiore, ovvero responsabili di un assorbimento.

In realtà una misura precisa di questi quattro parametri ( $C$ ,  $I$ ,  $I_0$ ,  $k$ ) non è semplice come sembra e si preferisce pertanto rinunciare a fare *misure assolute* di  $\phi_F$  limitandosi a ottenere *rese quantiche relative*. Lo strumento è in genere calibrato con una sostanza di resa quantica nota (ad esempio una soluzione di NaOH con concentrazione 0.1 N ("normalità" = 0.1 mol/m<sup>3</sup>) ha  $\phi_F = 0.93$ ). Il valore della 6.16 viene misurato sia per il campione, sia per la sostanza di riferimento e si confrontano questi due numeri, dopo aver tarato le concentrazioni di modo che  $\epsilon C$  abbia lo stesso valore per entrambi. Per avere idea di cosa si ottiene, si mostra il plot della fluorescenza 6.16 rispetto alla densità di corrente incidente:

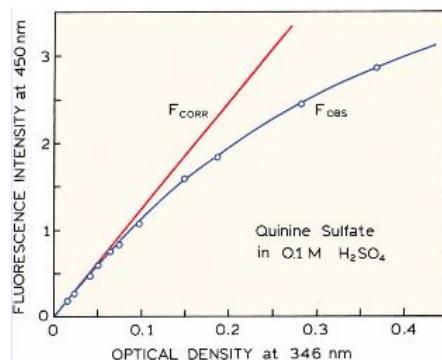


Figura 6.7: Si noti la linearità nella concentrazione. In questo caso il riferimento è  $H_2SO_4$  0.1M. In rosso la previsione teorica, mentre in blu la misurazione effettiva. All'aumentare dell'intensità di corrente aumenta anche l'influenza delle interazioni non radiative, che non possono più essere trascurate, come invece in tutto il nostro modello.

Oltre agli effetti vibrazionali che causano comunque un disturbo minimo, l'andamento descritto dalla 6.16 è pesantemente disturbato all'aumentare di molto della concentrazione anche da un secondo effetto legato all'intensità incidente: più il campione è concentrato infatti, e più l'intensità luminosa, a mano a mano che si addentra nel campione perde in modulo, diminuendo. Come conseguenza di questo l'intensità di fluorescenza cala drasticamente oltre una determinata soglia, che idealmente corrisponde a  $C > \epsilon Cl$  (Infatti quello era il limite per lo sviluppo *lineare* dell'intensità!)

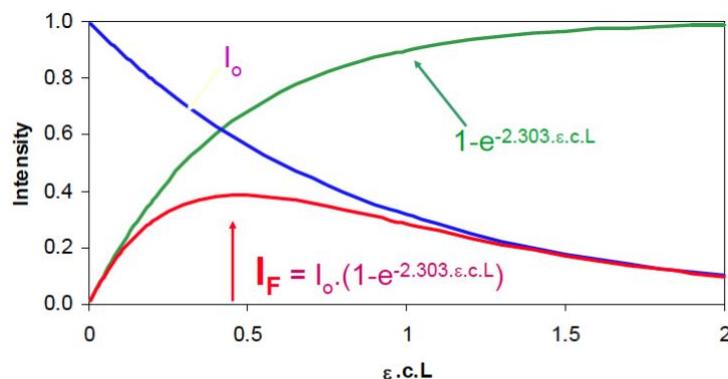


Figura 6.8: Simulazione grafica dell'effetto di un filtro interno che aumenta progressivamente la concentrazione del campione. In blu l'intensità incidente in funzione della concentrazione. In rosso l'intensità di fluorescenza

## 6.4 Photobleaching

Fino a questo momento abbiamo descritto come e perché un polimero interagente con una sorgente di luce risponde emettendo fluorescenza. Tuttavia non ci siamo ancora posti il domanda di quale parte delle macromolecole generi effettivamente fluorescenza. Iniziamo quindi questo nuovo paragrafo dando una definizione:

**Definizione 6.4.0.1.** *Si chiamano **fluorofori** o **fluorocromi** le molecole che, dopo aver assorbito un fotone ad una determinata lunghezza d'onda, esibiscono fluorescenza.*

Un punto da precisare prima di proseguire è che una volta che il fluoroforo eccitato fa ritorno allo stato fondamentale fluorescendo, se la radiazione incidente continua ad arrivare sul campione, lo stesso fluoroforo può essere assorbito di nuovo e ripetere in tal modo un *ciclo*. Se la realtà fosse ideale, la fluorescenza si manifesterebbe sempre per un tempo dato dalla 6.12 per singolo fluoroforo e questo potrebbe ripetere il ciclo virtualmente all'infinito, fintanto che la sorgente invia radiazione. Tuttavia può succedere che un fluoroforo allo stato eccitato perda in maniera irreversibile la propria capacità di fluorescere per via di danni a livello chimico indotti da fotoni o per modifiche nei legami covalenti. A questo fenomeno si dà il nome di **photobleaching** o più semplicemente *bleaching*. Le cause principali dell'insorgere di un tale fenomeno vanno ricercate nelle eventuali transizioni *proibite* da singoletto a tripletto a cui la molecola eccitata può andare incontro. Poiché lo stato di tripletto eccitato vive mediamente più a lungo rispetto ad un singoletto (essendo a sua volta proibita la transizione tripletto eccitato - singoletto fondamentale), la molecola che vi viene a trovarsi ha maggiori probabilità di interagire con l'ambiente e quindi di subire di conseguenza delle modifiche irreparabili alle proprie strutture covalenti. Il numero di cicli assorbimento-emissione dopo il quale un fluoroforo si "decolora permanentemente" (*bleach*) dipende dalle strutture delle singole molecole e dalle condizioni dell'ambiente (solvente utilizzato per il campione, temperatura).

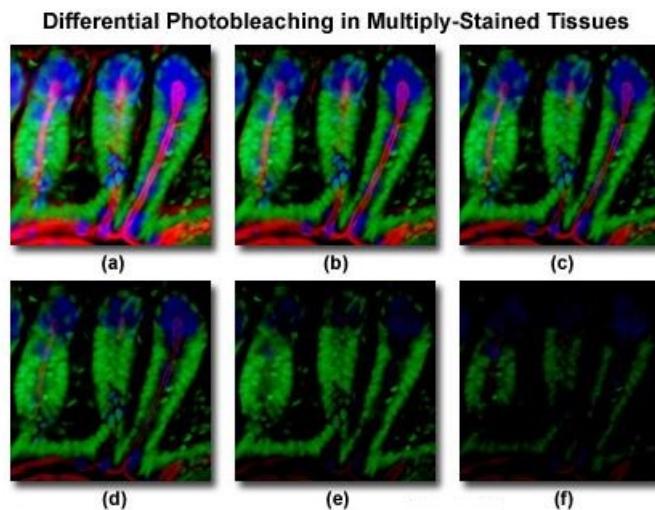


Figura 6.9: Serie di immagini di intestino di topo riprese a distanza di due minuti l'una dall'altra in presenza di tre fluorofori (responsabili del verde, blu e rosso). Si noti l'effetto marcato del photobleaching già dopo 6 minuti (d) e 10 (f).

Sperimentalmente l'effetto è proporzionale all'intensità di eccitazione integrata nel tempo. Una buona strategia per ridurre o evitare photobleaching è quindi quella di minimizza-

re l'intensità incidente, ridurre i tempi di esposizione dei fluorofori o ancora aggiungere nella soluzione del campione dei reagenti **antifade** reperibili in commercio che riducono ulteriormente la probabilità di transizione proibita  $S_1 \rightarrow T_1$ .

Il photobleaching però può rappresentare anche un vantaggio a volte, permettendo di indagare su proprietà altrimenti inosservabili. Un esempio è la FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) che consente di studiare la cinetica di alcune molecole e la diffusione laterale su film bidimensionali (tessuti o cellule). Senza approfondire nei dettagli, si utilizza un campione di cui si salva un'immagine prima del bleaching che farà da sfondo. In seguito si illumina una parte visibile del campione con la sorgente settata ad alta intensità di modo che i fluorofori di quella regione perdano velocemente la capacità di fluorire. A questo punto si vedrà un'immagine uniforme (lo sfondo creato inizialmente) con uno spot scuro (la regione di fluorofori decolorati). Tuttavia la fluorescenza del campione procede per via dei fluorofori non denaturati e questi, man mano che si disecctano, si renderanno nello spot scuro permettendo di studiarne in dettaglio la cinetica e la diffusione. È quindi importante anche avere un modello matematico che descriva il bleaching, per adattare i dati alle previsioni.

Chiamiamo dunque:

$\Phi_B$	resa di photobleaching
$\Phi_F/\Phi_B$	numero fotoni emessi per molecola
$R = I_0 OD$	= numero cicli di fluorescenza prima del bleaching ( $\sim 30000$ per fluorescina)
$R_{max} \propto (\epsilon_F \tau_F)^{-1}$	rate eccitazione-rilassamento elettronico
$k_F = \Phi_F R$	rate limite eccitazione-rilassamento
$k_B$	costante cinetica di fluorescenza (no bleaching)
	costante cinetica bleaching

Detta  $I_0$  l'intensità incidente ( $\text{W/m}^2$ ), OD l'assorbanza A a fissata  $\lambda$  e  $l = \epsilon_\Lambda c_0$  e  $c_0$  la concentrazione del campione prima del bleaching, si può dimostrare che

$$c(t) = c_0 e^{-k_B t}$$

e che conseguentemente l'Intensità di Fluorescenza in funzione del tempo tenuto conto del bleaching diminuisce progressivamente secondo:

$$F(t) = k_F e^{-k_B t} \quad (6.17)$$

## 6.5 Strumentazione. Note di sperimentazione

Lo strumento utilizzato per le misure di fluorescenza è chiamato **fluorimetro** o **spettrofluorimetro**; a seconda di quali parametri sperimentali si desidera misurare setta lo strumento in maniera diversa. Si distingue infatti tra:

- fluorimetri *statici*, in cui la sorgente utilizzata e servono per misurare la resa quantica  $\phi_F$  e gli spettri di emissione;
- fluorimetri *dinamici*, nei quali la sorgente è pulsata (si tratta generalmente di un laser) e si utilizzano per ottenere i tempi di vita di fluorescenza, che sono appunto stati definiti solo in condizioni transienti.

I fluoriemetri non si classificano soltanto in base al tipo di dati che sanno produrre, ma anche in base al loro *schema ottico*. Esistono infatti strumenti con geometria:

- **a L**, nei quali, come vedremo, la sorgente è posta ad angolo retto rispetto al rivelatore. Approfittiamo per dire subito che questo accorgimento viene preso per evitare che, essendo la luce incidente sempre di intensità maggiore di quella di fluorescenza (Stokes shift), essa possa in qualche modo interferire o portare disturbo ottico nella misurazione.
- **a T e a 0°**, che servono per altre letture e per i quali non entreremo nei particolari. Vediamo dunque quali sono i componenti principali dello strumento.

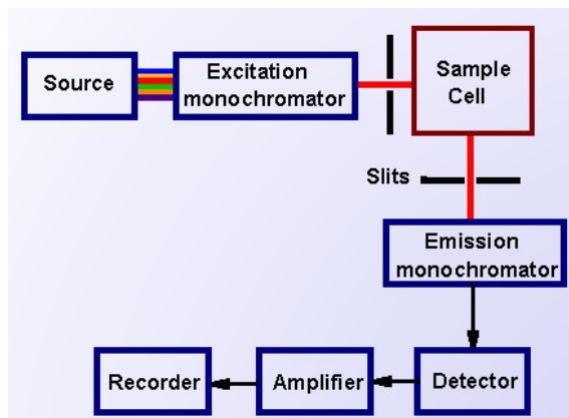


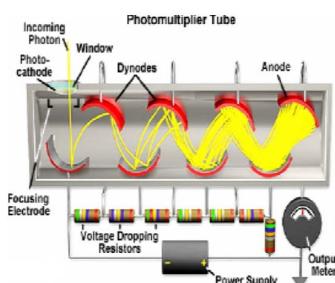
Figura 6.10: Schema di un fluorimetro statico con geometria a L

1. una **sorgente di radiazione**: possono essere di quattro tipi diverse:
  - lampada a mercurio**: è caratterizzata da linee spettrali molto intense sopra i 350 nm. Se *Hg* è ad alta pressione queste si ritrovano a 366, 405, 436, 546, 577, 691, 734 nm consentendo quindi una comoda indagine nel range del visibile. Se invece il mercurio è a basse pressioni, oltre alle linee nel visibile se ne aggiunge una a 254 nm;
  - lampada alla xenon**: come la lampada a mercurio è una *lampada a scarica* e forma una radiazione intensa per passaggio di corrente in atmosfera di xenon. Lo spettro è continuo e l'intensità del picco è a 470 nm;
  - lampada a tungsteno** è una lampada a bassa intensità ed emette soltanto nell'regione del visibile, non presentando righe nell'ultravioletto;
  - laser tunabili**<sup>5</sup>: tra i più diffusi troviamo il laser a azoto pulsato che produce radiazione tra i 360 e i 650 nm.
2. una set di **filtri**: in genere se ne usano di due tipi in due posizioni diverse dello strumento, per limitare gli effetti di rumore in ingresso e in uscita. I filtri *primari* assorbono radiazione visibile e trasmettono quella UV. Proprio perché rendono il fascio luminoso meno intenso sono posti tra la sorgente e il campione. I filtri *secondari* svolgono invece il ruolo opposto, bloccando le radiazioni UV e trasmettendo quelle visibili; per questo sono posti tra il campione e il rivelatore, di modo che a questo giungano radiazioni visibili e non disturbate da ulteriori energie.

<sup>5</sup>Di cui cioè posso controllare la lunghezza d'onda di emissione.

3. dei **monocromatori**: analogamente a quello che si fa con i filtri se ne utilizzano di due generi. I *monocromatori di eccitazione* isolano solo la radiazione che viene assorbita dalla molecola, mentre i *monocromatori di emissione* isolano solo la radiazione emessa dalla molecola. Oltre alla loro azione di selezionatori, grazie alla forma a fenditura che li caratterizza contribuiscono a rendere i raggi paralleli e a minimizzare gli effetti di dispersione all'interno dello strumento. In particolare il monocromatore di emissione, dal momento che la luce fluoresce radialmente in tutte le direzioni ha il compito di indirizzare l'emissione verso il rivelatore.
4. un **portacampione**: come nella maggior parte degli esperimenti di spettroscopia i campioni sono in soluzione contenute in *cuvette* cilindriche o rettangolari in vetro o quarzo. Il cammino ottico è tipicamente 10mm o 1 cm e tutte le superfici utilizzate sono ottiche, ovvero tali da non produrre rifrazione.
5. un **rivelatore**: possono essere:
  - (a) **celle fotovoltaiche**
  - (b) **fototubi**
  - (c) **tubi fotomoltiplicatori**

Tutti questi dispositivi forniscono in uscita un segnale avente un'intensità di corrente o una differenza di potenziale proporzionale all'intensità della radiazione rivelata. Il fotomoltiplicatore è particolarmente utile in quanto consente di incrementare il segnale di uscita. Un *fotomoltiplicatore* infatti è costituito da un tubo in vetro al cui interno è stato praticato il vuoto e in cui è presente un photocatodo, diversi dinodi e un anodo. Quando un fotone entra nel tubo colpisce il photocatodo, una superficie ricoperta di un materiale che favorisce l'effetto fotoelettrico e quindi con basso lavoro di estrazione. Gli elettroni che vengono emessi sono focalizzati da un elettrodo verso lo stato di *emissione secondaria* o elettromoltiplicazione. Il primo elettrone emesso per effetto fotoelettrico subisce una accelerazione a causa del campo elettrico e acquista energia cinetica. Quando l'elettrone colpisce il primo elettrodo del dinodo provoca l'emissione secondaria di diversi elettroni di minore energia. Ciascuno di questi elettroni accelererà per via del campo e ripeterà poi lo stesso gioco del primo con l'elettrodo del dinodo successivo e così via ottenendo di fatto un fenomeno a cascata per cui un singolo fotone che entra nel tubo provoca una corrente di moltissimi elettroni (fotomoltiplicatore). Perché ciò avvenga ciascun catodo (nei diodi) viene mantenuto ad un potenziale di 75-100 W maggiore del precedente. In tal modo si raggiungono amplificazioni di  $10^6$  rendendo misurabili impulsi di singolo fotone



Come avevamo detto a seguito della 6.16 buona parte delle misure dipende dal setting degli strumenti e del campione, i cosiddetti **parametri sperimentali**. È pressoché ovvio che la lampada della sorgente debba essere adeguata all'intervallo di lunghezze d'onda di interesse. Riguardo a questo si ricorda che in genere è necessario apportare una correzione allo spettro di assorbimento dovendo tener conto dei picchi di emissione della lampada stessa, dal momento che questa non è ideale. Un altro aspetto importante è l'ampiezza delle fenditure del monocromatore e la scelta dei filtri a seconda dei campioni in gioco, in base ai quali dipende la risoluzione spettrale e quindi la quantità di informazioni fruibili dall'esperimento.

La fluorescenza ha campi di applicazione piuttosto vasti. Basti ricordare che essa permette di misurare proprietà come:

- spettri;
- tempo di vita nello stato eccitato;
- polarizzazione delle molecole: se infatti la molecola presenta momenti di dipolo, è possibile eccitarli con luce polarizzata linearmente in direzioni diverse e osservare la risposta ad angoli diversi. Ciò consente di capire dinamica e orientazione molecolare;
- trasferimento dell'eccitazione, misurando le distanze di equilibrio. Questo particolare punto è legato al FRET che come abbiamo già avuto modo di accennare è uno dei processi di rilassamento nucleare che porta l'elettrone eccitato al primo singoletto non fondamentale. (Per ulteriori informazioni sul fenomeno si rimanda all'apposito Capitolo 7);
- localizzazione della fluorescenza, consentendo, ad esempio con le Green Fluorescent Protein (GFP) di localizzare e identificare le proteine (che fluorescono se illuminate) a livello subcellulare.

La grande quantità di misurabili è accompagnata da un'altrettanto vasto range di informazioni non ottenibili da altre tecniche, le quali rendono la fluorimetria una tecnica parecchio vantaggiosa. Ricordiamo solo che essa offre *sensibilità a basse concentrazioni* (anche dell'ordine del micromolare), *sensibilità a variazioni dell'environment*, e la possibilità di *individuare e scegliere i fluorofori*. Misurando l'intensità di fluorescenza a una data lunghezza d'onda  $\lambda$  dello spettro è infine possibile tracciare proprietà di polarità del solvente (dalla forma dello spettro), tipo di ambiente e distanze molecolari (dalla misura di FRET).

## 6.6 Fluorofori

Parliamo in questa sezione dei fluorofori principali che si utilizzano in laboratorio. Studiando proteine i fluorofori possono essere **intrinseci**, ovvero già presenti nella struttura, oppure **estrinseci**, se aggiunti dal ricercatore.

### 6.6.1 Intrinsici

Gli aa fluorescenti sono quelli che presentano anelli aromatici, come la Fenilalanina, la Tirosina e il **Triptofano** (trp). Quest'ultimo in particolare è molto importante perché ha un ampio spettro di emissione e un'alta resa quantica.

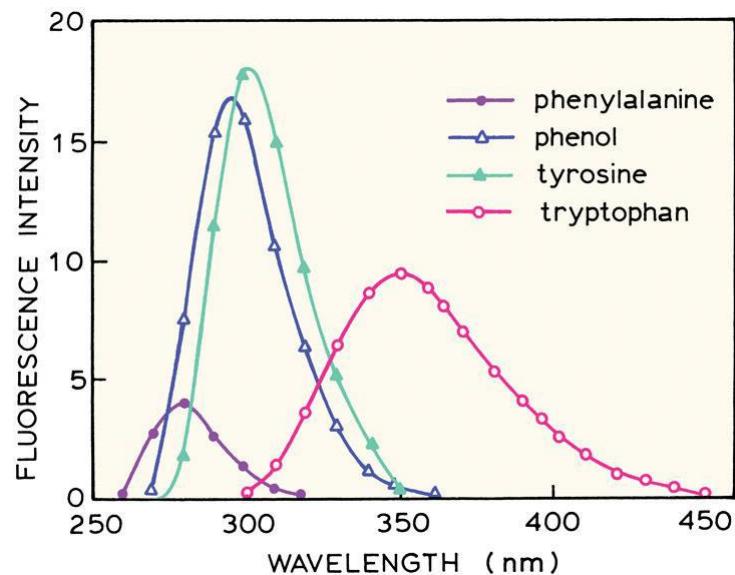


Figura 6.11: Spettri di emissione di alcuni fluorofori intrinseci.

Il picco di emissione di questi fluorofori dipende dall'intorno: in un ambiente non polare il Trp ha una resa maggiore e un picco attorno ai 310 nm, mentre in un ambiente polare ha una resa minore e il picco attorno ai 350 nm. Dalla posizione del picco è dunque possibile sapere se il Trp che compone la proteina è schermato o esposto al solvente. Questo offre un grande aiuto nello studio del **folding**. Ovviamente la presenza di multipli triptofani in condizioni diverse rende l'accertamento difficile.

Si è soliti eccitare un fluoroforo lontano dal suo picco per evitare di eccitare altri fluorofori il cui spettro si sovrappone al picco. Ciò lascia invariata la forma dello spettro di emissione, sebbene ne diminuisca l'intensità.

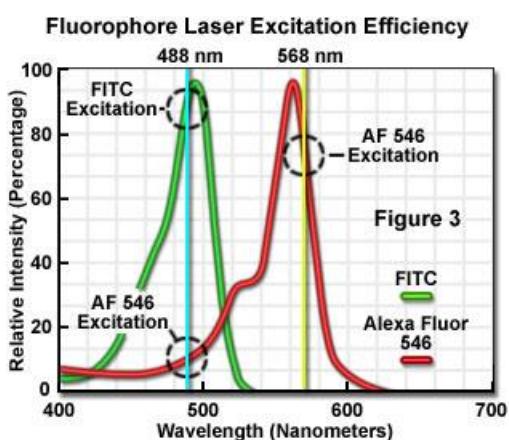


Figura 6.12: Un esempio di eccitazione con laser.

È altresì possibile che l'emissione di un fluoroforo possa eccitare fluorofori vicini che assorbono in quel range<sup>6</sup>: ciò accade ad esempio con la tirosina, che emette ad una lunghezza d'onda in cui il trp assorbe.

Se di sua natura la proteina non possiede trp è possibile sottoporla a mutazione. Il processo è tutt'altro che indolare per la proteina: si rischia di danneggiarne il funzionamento in modo irreparabile. Si ottiene in genere più successo sostituendo altri aa che possiedono gruppi aromatici. Per quantificare quanto una mutazione danneggia una proteina si studia l'energia libera di denaturazione, poiché questo processo viene favorito da una sostituzione dolorosa.

### 6.6.2 Estrinseci

In laboratorio è possibile produrre fluorofori con qualsiasi caratteristica desiderata. Uno di essi, l'ANS, ha un'elevatissima sensibilità al solvente e praticamente non emette in ambiente polare. Viene quindi spesso usato per studiare la posizione degli aa nella proteina. Messo in soluzione si lega alla proteina e, per assicurarsi di eccitare solo l'ANS legato, si eccita indirettamente sfruttando i fluorofori intrinseci. Non avendo idea della concentrazione delle singole specie in soluzione diventa necessario rinormalizzare i grafici secondo intensità di emissione: ciò si può fare osservando il **punto isosbestico**, in cui il valore dell'assorbanza o dell'estinzione molare non dipende dal valore della concentrazione delle singole specie, ma dalla somma di queste.

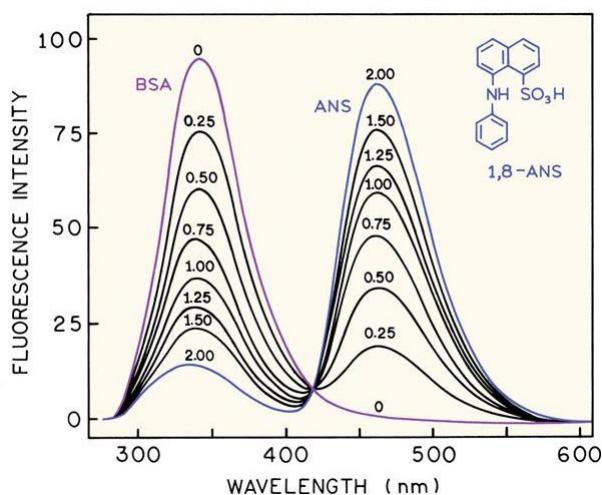


Figura 6.13: Spettri di Bovine Serum Albumin e ANS: il punto isosbestico è all'intersezione.

Tra i marker, il **Prodan** è altamente sensibile al solvente: la lunghezza d'onda del suo picco varia dai 380 ai 525 nm. Viene spesso utilizzato per studiare strutture a strati, come le vescicole o le lamelle.

Al contrario, fluorofori come la **Fluorescina** e la **Rodamina** non sono sensibili all'environment e sono quindi perfetti per seguire lo spostamento dell'oggetto legato. Possono

<sup>6</sup>Solitamente picchi a  $\lambda$  minore possono essere assorbiti da fluorofori che emettono a  $\lambda$  maggiore, non il contrario.

essere modificate per legarsi in modo covalente a qualsiasi molecola. Soffrono però a variazioni di pH.

La famiglia **BODIPY** resiste sia alle variazioni di polarità che di pH e ne esistono di numerosi colori. Lo svantaggio sta nel loro spettro di emissione: hanno tutti una "coda" verso il rosso e stokes shift molto piccolo, per cui il loro segnale rischia di confondersi se ne vengono usati multipli.

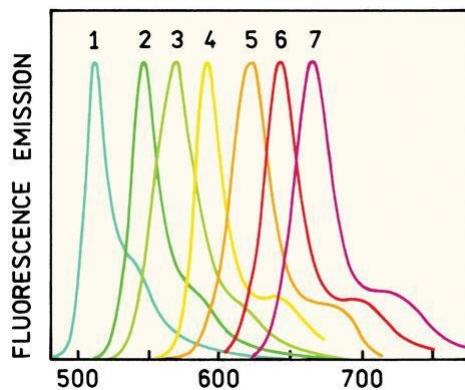


Figura 6.14: La famiglia BODIPY. Si noti la caratteristica gobba nello spettro.

I marker estrinseci devono venire legati alla proteina di interesse. Per farlo è preferibile far formare un legame covalente, in modo da eliminare la dipendenza dalla concentrazione e da altri fattori fisici. Se il fluoroforo è molto ingombrante sarà più difficile legarlo in punti interessanti della proteina; da marker legati agli estremi di una catena si ottengono poche informazioni sulla struttura. Uno dei migliori legami lo forma la maleimide con un gruppo libero tiolo (SH), di cui in genere ve n'è uno solo nelle proteine, se presente. È così possibile individuare esattamente la posizione del legame nella catena.

### 6.6.3 Utilizzi

Per facilitare i legami si può cercare di denaturare debolmente la proteina, in modo che la sua struttura si rilassi, per poi farla tornare nella configurazione naturale a legame effettuato.

Risulta conveniente eccitare con lo stesso laser marker differenti, quindi si cerca di usare oggetti fluorescenti il cui spettro di assorbimento si sovrappone. Con laser pulsati e molto focalizzati è possibile eccitare a 2 fotoni, facendo degradare molto meno l'oggetto (bleaching) e raggiungendo un numero maggiore di lunghezze d'onda.

Alcuni marker sono sensibili alla **concentrazione** di determinate sostanze. Per una misura di titolazione è necessario utilizzare due fluorofori accoppiati, uno la cui resa aumenti con l'aumento della concentrazione della sostanza di interesse, l'altro che faccia l'opposto. In tal modo è possibile normalizzare gli spettri di emissione, sempre servendosi del punto isosbestico.

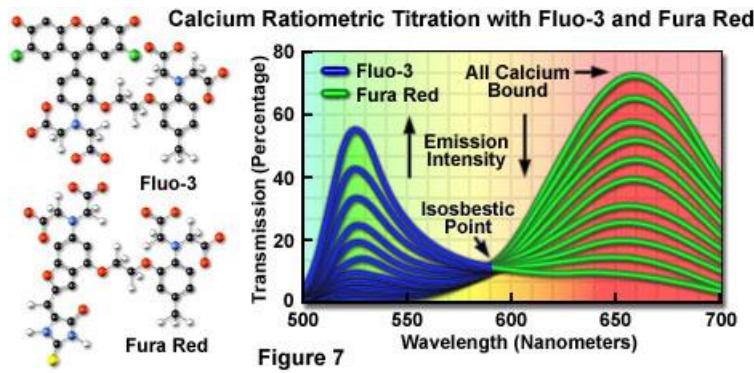


Figura 6.15: Titolazione raziometrica del calcio.

Oltre alle concentrazioni, è possibile utilizzare la fluorescenza per mappare il **pH** di un campione.

I campioni statici sono molto più facili da mappare di quelli dinamici, per i quali tutte le informazioni luminose devono essere ricevute contemporaneamente.

#### 6.6.4 Proteine fluorescenti

Esistono. Forse la più famosa è la **Green Fluorescent Protein** (GFP), estratta dalla medusa "Acquorea Victoria". In seguito è stata modificata in laboratorio per emettere a frequenze diverse (E sta per Enhanced).

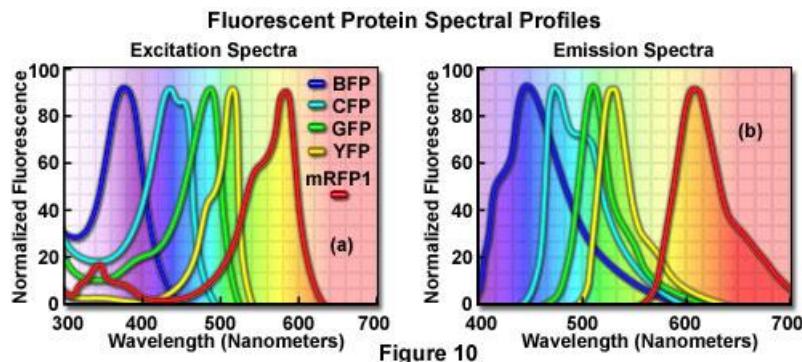


Figura 6.16: Si noti l'elevato Stokes Shift.

Altre proteine fluorescenti sono state estratte dai coralli e sono stati dati loro nomi di frutti (serie mFRUIT).

Il vantaggio principale nell'usare delle proteine come marker sta nella sicurezza del legame, lo svantaggio è che sono molto grosse e difficilmente possono essere usate per scopi delicati come studi di folding.

# **Appunti di Elementi di Biofotonica**

## **III**

Botta Francesca,  
Carra Chiara,  
Fendillo Alessandro,  
Frosio Dylan,  
Ghittori Davide

18/01/2017

Corso tenuto dalla professoressa Laura D'Alfonso nel primo semestre del terzo anno della laurea in Fisica, Università di Milano Bicocca.

Il presente documento sarà diviso in 4 volumi, per questioni di allocamento della memoria dell'editor di testo. Per la trattazione completa si rimanda pertanto ai volumi successivi

# Indice

<b>7 EFFETTI DI SOLVENTE, FRET, QUENCHING</b>	<b>125</b>
7.1 Effetti di solvente nella fluorescenza . . . . .	125
7.1.1 Polarità del solvente . . . . .	126
7.1.2 Altri meccanismi di shift dello spettro . . . . .	127
7.1.3 L'equazione di Lippert-Mataga . . . . .	127
7.1.4 Derivazione dell'equazione di Lipper-Mataga . . . . .	129
7.1.5 Effetti di solvente specifici . . . . .	131
7.2 Förster Resonance Energy Transfer (FRET) . . . . .	136
7.2.1 Condizioni necessarie per la FRET . . . . .	139
7.2.2 Efficienza di transfer . . . . .	140
7.2.3 Applicazioni della FRET alle macromolecole . . . . .	143
7.3 Quenching della fluorescenza . . . . .	149
7.3.1 Quenchers e tipi di quenching . . . . .	151
7.3.2 Teoria del quenching dinamico o collisionale . . . . .	152
7.3.3 Teoria del quenching statico . . . . .	156
7.3.4 Quenching combinato: statico e dinamico . . . . .	157
7.3.5 Meccanismi di quenching . . . . .	159
7.3.6 Effetti transienti nel quenching . . . . .	160
<b>8 SPETTROSCOPIA INFRAROSSA IR E FT-IR</b>	<b>163</b>
8.1 La radiazione infrarossa . . . . .	164
8.2 I principi dell'assorbimento IR . . . . .	165
8.2.1 Trattazione classica del modello . . . . .	166
8.3 La descrizione quantistica dell'assorbimento IR . . . . .	167
8.4 Tipi di vibrazioni . . . . .	172
8.5 Strumentazione . . . . .	174
8.5.1 Spettrometro IR a dispersione . . . . .	175
8.5.2 Spettrometro IR a Trasformata di Fourier (FTIR) . . . . .	176
8.6 Analisi degli spettri IR nelle regioni principali . . . . .	180
8.7 Note sulla spettroscopia di Raman . . . . .	183

# Capitolo 7

## EFFETTI DI SOLVENTE, FRET, QUENCHING

### 7.1 Effetti di solvente nella fluorescenza

Come ben sappiamo gli effetti di fluorescenza di una sostanza sono dovuti alla presenza di flourofori, ossia atomi che reagiscono alla radiazione luminosa emettendola a loro volta. Più volte è stato fatto notare come tutti i processi di rilassamento che avvengono a causa dell'interazione con i fotoni siano legati a condizioni *ambientali* e in particolare al solvente in cui la sostanza si trova. Questi effetti non solo entrano in gioco in questi processi di rilassamento ma influenzano in maniera significativa anche le proprietà di emissione dei flourofori. Una delle prime osservazioni in cui è possibile riscontrare tali effetti è proprio lo **Spostamento di Stokes**, ma trovano moltissime altre applicazioni. Infatti, influenzando direttamente le proprietà di emissione, possono essere sfruttati per ricavare informazioni sulle attività stesse che hanno causato questa variazione nello spettro di fluorescenza (per esempio si possono analizzare le caratteristiche di un legame che portano ad uno shift nello spettro). Le proprietà che determinano queste interazioni e caratterizzano l'influenza sulla capacità di emissione dei flourofori e la loro *resa quantica* sono molteplici. Le più comuni sono:

- Polarità e viscosità del solvente;
- Velocità di rilassamento del solvente;
- Cambiamenti conformazionali della sonda;
- Rigidità dell'ambiente locale;
- Trasferimenti interni di carica;
- Trasferimento protonico e reazioni allo stato eccitato;
- Interazioni sonda-sonda;
- Cambiamenti di  $k_R$  e  $k_{NR}$ ;

Tutti questi effetti possono essere raggruppati in due sottoclassi:

1. **Interazioni specifiche** → effetti diretti del solvente sulla molecola (legami idrogeno, denaturazione ecc...).

2. **Interazioni non specifiche** → ri-orientamento o spostamento della nuvola elettronica di una molecola nel solvente.

È evidente notare, quindi, che lo studio degli spettri di fluorescenza nei solventi possa dare risultati diversi da quelli reali a causa di numerose perturbazioni. È importante perciò sapere tenere conto di quanto effettivamente queste proprietà influenzino i nostri risultati e quindi avere un modello che possa permetterci di studiarle.

### 7.1.1 Polarità del solvente

Una caratteristica comune, che però ha una notevole influenza sui flourofori, è la **polarità del solvente**. Il principale effetto di quest'interazione è l'allargamento delle bande di emissione dovuto ad un abbassamento energetico dei livelli vibrazionali eccitati. Sappiamo infatti che quando viene assorbito un fotone, la lunghezza d'onda della radiazione emessa è generalmente maggiore. Questa perdita energetica è dovuta in primo luogo ai processi di rilassamento che seguono l'assorbimento della luce ma anche per un'interazione con il solvente. Tipicamente il fluoroforo ha un momento di dipolo nello stato eccitato ( $\mu_E$ ) maggiore di quello nello stato fondamentale ( $\mu_G$ ). Dopo l'interazione con il fascio luminoso i dipoli presenti nel solvente interagiranno con quelli del fluoroforo rilassandosi<sup>1</sup> o riorientandosi attorno a  $\mu_E$  diminuendo l'energia dello stato eccitato. Questo effetto sarà quanto più marcato quanto è maggiore la polarità del solvente o della molecola stessa, portando così ad uno spostamento verso il rosso dello spettro di fluorescenza. Come si può notare dall'immagine lo spettro di emissione può subire uno shift anche notevole a causa di queste interazioni fra i dipoli.

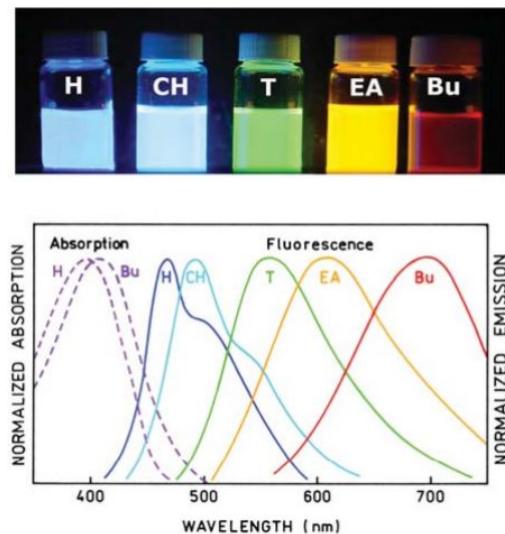


Figura 7.1: Esempio dello spettro di emissione del DNS (*4-dimethylamino-4'-nitrostilbene*) in solventi di polarità sempre crescente.

Si può notare come lo spettro di assorbimento sia praticamente inalterato. La poca sensibilità è dovuta alla differenza di durata dei due effetti: il tempo che è necessario

<sup>1</sup>Per rilassamento di un solvente si intende il processo tale per cui, dopo essere stato eccitato da un fascio luminoso, i dipoli del solvente tendono a dissecitarsi e a riorientarsi per tornare allo stato più stabile. Nel nostro caso anche i dipoli della molecola sono coinvolti in questo processo, ed è il motivo per cui si ottiene un abbassamento energetico.

perché i dipoli del solvente reagiscano e quindi si rilassino è di circa  $\sim 10\text{-}100\text{ps}$  mentre la durata media della fluorescenza è  $\sim 1\text{-}10\text{ns}$ . Al contrario l'assorbimento ha una durata di  $\sim 10^{-15}\text{s}$ , un tempo troppo breve perché i dipoli della molecola e del solvente possano interagire.

### 7.1.2 Altri meccanismi di shift dello spettro

Analizzato da questo punto di vista, il meccanismo alla base dello shift dello spettro può sembrare semplice, al contrario è un argomento molto complesso, dovuto alla vasta gamma di interazioni che possono determinarlo. Se prendiamo in considerazione solo le interazioni solvente-fluoroforo, l'effetto può essere interpretato mediante **l'equazione di Lippert** che descrive lo *spostamento di Stokes* in termini di cambiamenti del momento di dipolo legati all'eccitazione da parte dei fotoni. Questo modello descrive una classe generale di interazioni con il solvente che avvengono indipendentemente dalle proprietà chimiche del fluoroforo e del solvente stesso. Sfortunatamente esistono un gran numero di altre interazioni che possono causare effetti comparabili a quelli precedentemente descritti, motivo per cui una teoria che generalizza solo gli effetti del solvente-fluoroforo è inadeguata a modellizzarci ciò che realmente accade. Per esempio, esperimenti che vedono coinvolti solventi non polari come il cicloesano, hanno mostrato che con l'aggiunta di una piccola quantità di etanolo, insufficiente per modificare in modo rilevante la polarità, presentavano comunque uno spostamento nello spettro. Tale effetto è dovuto all'interazione con i legami idrogeno dell'etanolo. È evidente, quindi, che anche queste interazioni specifiche vanno prese in considerazione per poter avere una descrizione corretta. In aggiunta a queste interazioni con il solvente sono presenti altri affetti che possono portare ad un cambiamento del comportamento del fluoroforo (transizioni di carica interna per esempio): il parametro influenzato da tali cambiamenti è la resa quantica  $K_{nr}$  e può essere tale da far perdere la capacità di fluorescere.

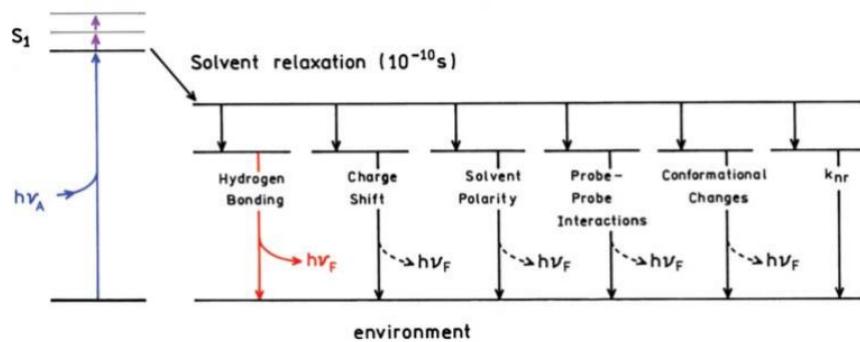


Figura 7.2: Esempi di effetti che influenzano l'emissione e la resa quantica (le frecce tratteggiate indicano la possibilità che il fluoroforo perda la sua caratteristica peculiare in certi stati).

### 7.1.3 L'equazione di Lippert-Mataga

Ricordiamo che questa descrizione tiene conto degli effetti non-specifici e non include alcuna reazione chimica o altri effetti precedentemente elencati, che per essere discussi dovranno essere trattati come deviazione da essa. Nonostante questo limite, questo

modello è molto utile per poter analizzare nel dettaglio lo shift dello spettro e ricavare informazioni. Il fluoroforo viene rappresentato come un dipolo (la polarizzazione del fluoroforo dipende unicamente dal campo elettrico  $\bar{E}$  della luce incidente) immerso in un mezzo continuo di costante dielettrica uniforme  $\varepsilon$ .

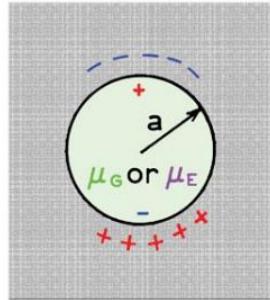


Figura 7.3:

L’interazione con il solvente determinerà un abbassamento dell’energia dello stato eccitato. In prima approssimazione la differenza di energia fra lo stato fondamentale e quello eccitato sarà considerata come funzione della costante dielettrica  $\varepsilon$  e dell’indice di rifrazione  $n$  del solvente. Tale differenza di energia (rappresentata in numeri d’onda  $\rightarrow cm^{-1}$ ) è data dall’**equazione di Lippert-Mataga**:

$$\boxed{\bar{\nu}_A - \bar{\nu}_F = \frac{2}{hc} \left( \frac{\varepsilon - 1}{2\varepsilon + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n + 1} \right) \frac{(\mu_E - \mu_G)^2}{a^3} + cost} \quad (7.1)$$

dove  $h = 6.626 \times 10^{-34} J \cdot s$  è la costante di Planck,  $c = 2.99 \times 10^{10} cm/s$  la velocità della luce,  $a$  è il raggio della cavità in cui consideriamo il fluoroforo ed infine  $\nu_A, \nu_F$  sono, rispettivamente, i numeri d’onda associati all’assorbimento e all’emissione. Quest’equazione è solo un’approssimazione, infatti non è stata considerata la polarizzabilità del fluoroforo e tutti i termini di ordine superiore come il momento indotto sul solvente. Sono state inoltre trascurate eventuali interazioni chimiche, la carica e altri legami come per esempio il legame idrogeno (motivo per cui questa equazione **non è valida** nei solventi protici). Nonostante tali approssimazioni quest’equazione è in grado di dare una spiegazione allo **Spostamento di Stokes** e alla sua dipendenza da  $n$  e  $\varepsilon$ : all’aumentare di  $n$  la variazione di energia diminuisce, e di conseguenza anche l’effetto dello spostamento di Stokes, al contrario all’aumentare di  $\varepsilon$  il  $\Delta E$  aumenta, rendendolo più marcato.

È importante sottolineare che l’indice di rifrazione  $n$  è legato all’effetto, durante la fase di assorbimento, di risposta ad **alta frequenza** degli elettroni e dal loro movimento, che risulta essenzialmente istantaneo. Al contrario  $\varepsilon$  è una proprietà statica (**bassa frequenza**), dipende dal moto elettronico e molecolare legato al rilassamento del solvente che è relativamente lento (legata al tempo di riorientamento delle molecole del solvente) e da parametri come la viscosità del solvente e la temperatura. Un aumento dell’indice di rifrazione  $n$  determinerà istantaneamente la riorientazione degli elettroni portando alla stabilità sia lo stato fondamentale sia quello eccitato. L’effetto osservabile è quello di uno spostamento verso lunghezze d’onde maggiori dello spettro. Anche per la costante dielettrica si otterà una stabilizzazione degli stati, ma questo avverrà solo dopo il riorientamento dei dipoli. Richiedendo il movimento di intere molecole e non solo degli elettroni

tal stabilità è **dipendente dal tempo**. Otterremo uno shift energetico in scale di tempo paragonabili a quelle di rilassamento del solvente. La differenza all'interno delle parentesi di 7.1 viene chiamata **polarizzabilità di orientamento**  $\Delta f$  e dipende da due termini separati:

- $\frac{\varepsilon-1}{2\varepsilon+1}$  : si riferisce al riorientamento dei dipoli;
- $\frac{n^2-1}{2n+1}$  : è dovuto alla sola ridistribuzione degli elettronni;

La ridistribuzione degli elettroni avviene istantaneamente, portando così lo stato fondamentale e quello eccitato alla stabilità, e per questo motivo questa componente influisce in maniera minore sullo *spostamento di Stokes*.

**Esempio 1. Entità dell'effetto:** vediamo ora qualche calcolo per osservare l'entità di questo effetto. Ricordando che  $1\text{Debye} = 10^{-18}\text{esu} \cdot \text{cm}^2$ . Considerando ora il caso di  $\mu_G = 6D$ ,  $\mu_E = 20D$  e  $a = 4$

A

	$H_2O$	$ETOH$	etere	esano
$\varepsilon$	78.3	24.3	4.35	1.89
$n$	1.33	1.35	1.35	1.37
$\Delta f$	0.32	0.30	0.17	0.001

Nota: si sta usando l'esano non polare, quindi nessun momento di dipolo e riorientazione

#### 7.1.4 Derivazione dell'equazione di Lipper-Mataga

L'equazione 7.1 è ricavata considerando l'interazione tra fluoroforo e solvente e la scala temporale in cui avviene. Bisogna richiamare il principio di Franck-Condon che afferma che i nuclei sono fermi durante una transizione elettronica ( $\sim 10^{-15}s$ ). Al contrario gli elettroni delle molecole del solvente possono ridistribuirsi intorno ai dipoli dello stato eccitato, e considerando la relativa lunghezza di vita di quest'ultimo ( $\sim 10^{-8}s$ ) le molecole del solvente riescono a riorientarsi prima dell'emissione. Cominciamo considerando un dipolo (il fluoroforo) in un mezzo continuo, la sua energia sarà:

$$E_{dipolo} = -\mu R$$

dove  $R$  è il campo elettrico indotto dal fluoroforo nel solvente e il segno "-" è riferito al fatto che il campo elettrico è antiparallelo al momento di dipolo  $\mu$ . Il campo elettrico sarà proporzionale al momento di dipolo che l'ha indotto:

$$R = \frac{2\mu}{a^3} f$$

Con  $f$  polarizzabilità e  $a$  il raggio della cavità. Come discusso in precedenza  $f$  sarà attribuibile sia alla ridistribuzione degli elettroni  $\rightarrow f(n)$  (polarizzabilità ad alta frequenza) sia al riorientamento dei dipoli delle molecole del solvente  $\rightarrow f(\varepsilon)$  (polarizzabilità a basse frequenze). Queste due funzioni hanno una dipendenza temporale differente.

$$f(n) = \frac{n^2 - 1}{2n + 1} \quad f(\varepsilon) = \frac{\varepsilon - 1}{2\varepsilon + 1}$$

---

<sup>2</sup>Debye: è l'unità di misura del momento di dipolo elettrico. È stato originariamente definito come il momento di dipolo elettrico di due cariche opposte di  $10^{-10}$  esu a distanza di 1 angstrom.

La cui differenza è la polarizzabilità di orientamento:

$$\Delta f = \left( \frac{\varepsilon - 1}{2\varepsilon + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n + 1} \right)$$

Se la molecola non presenta alcun momento di dipolo permanente allora  $\Delta f = 0$ . L'interazione con il solvente può essere descritta attraverso i momenti di dipolo dello stato fondamentale  $\mu_G$  e quello dello stato eccitato  $\mu_E$  che determineranno un campo elettrico nelle vicinanze del dipolo. Sapendo che le interazioni saranno divise in movimento degli elettronni e riorientazioni è utile scrivere i campi elettrici separati:

$$R_{el}^G = \frac{2\mu_G}{a^3} f(n) \quad R_{el}^E = \frac{2\mu_E}{a^3} f(n)$$

$$R_{or}^G = \frac{2\mu_G}{a^3} \Delta f \quad R_{or}^E = \frac{2\mu_E}{a^3} \Delta f$$

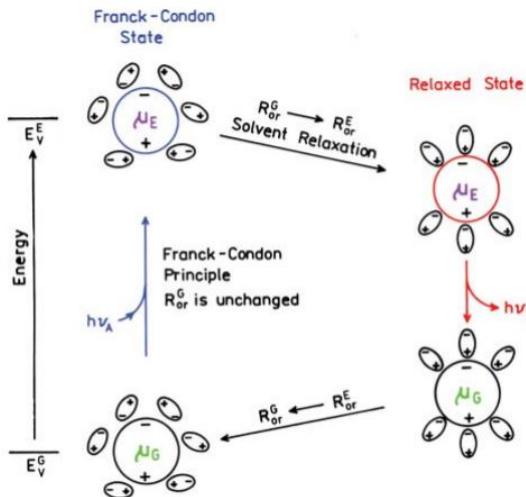


Figura 7.4: Esempio dell'effetto dell'orientamento elettronico e del campo elettrico di reazione sull'energia del dipolo

$R_{el}^G$  e  $R_{el}^E$  sono i campi elettrici del dipolo  $\mu_G$  e  $\mu_E$  riferiti al movimento degli elettronni mentre  $R_{or}^G$  e  $R_{or}^E$  sono quelli che causano il riorientamento delle molecole. Per l'assorbimento energetico da parte della luce, l'energia dello stato fondamentale e quella dello stato eccitato sono:

$$E_n^E(\text{assorbimento}) = E_V^E - \mu_E R_{or}^G - \mu_E R_{el}^E$$

$$E_n^G(\text{assorbimento}) = E_V^G - \mu_G R_{or}^G - \mu_G R_{el}^G$$

Con  $E_V^G$ ,  $E_V^E$  rispettivamente l'energia dello stato fondamentale e dello stato eccitato del fluoroforo nella fase di vapore, imperturbato dal solvente. Ricordando la relazione  $\bar{\nu} = \Delta E / hc$  ( $\bar{\nu}$  numero d'onda) si ottiene:

$$hc\bar{\nu}_A = E_n^E(\text{abs}) - E_n^G(\text{abs}) = E_V^E - E_V^G - \mu_E R_{or}^G + \mu_G R_{or}^G - \mu_E R_{el}^E + \mu_G R_{el}^G \\ = hc(\bar{\nu}_A)_V - (\mu_E - \mu_G) R_{or}^G - \mu_E R_{el}^E + \mu_G R_{el}^G \quad (7.2)$$

Dove  $(\bar{\nu}_A)_V$  è la differenza di energia in fase di vapore senza la perturbazione del solvente. Analogamente si può ricavare l'energia per l'emissione:

$$E_n^E(\text{emissione}) = E_V^E - \mu_E R_{or}^E - \mu_E R_{el}^E$$

$$E_n^G(\text{emissione}) = E_V^G - \mu_G R_{or}^E - \mu_G R_{el}^G$$

Per ricavare queste due energie si è assunto che il solvente si rilassi velocemente rispetto alla durata dello stato eccitato cosicché il campo iniziale  $R_{or}^G$  potesse cambiare in  $R_{or}^E$  prima dell'emissione. Come in precedenza possiamo ricavare:

$$\begin{aligned} hc\bar{\nu}_F &= E_n^E(em) - E_n^G(em) = E_V^E - E_V^G - \mu_E R_{or}^E - \mu_E R_{el}^E + \mu_G R_{or}^E + \mu_G R_{el}^G \\ &= hc(\bar{\nu}_A)_V - (\mu_E - \mu_G)R_{or}^E - \mu_E R_{el}^E + \mu_G R_{el}^G \end{aligned} \quad (7.3)$$

Facendo la differenza fra 7.2 e 7.3 otteniamo:

$$\bar{\nu}_A - \bar{\nu}_F = \frac{1}{hc}(\mu_E - \mu_G)(R_{or}^E - R_{or}^G) + cost$$

In cui sostituendo le equazioni per  $R_{or}^E$  e  $R_{or}^G$ :

$$\begin{aligned} \bar{\nu}_A - \bar{\nu}_F &= \frac{1}{hc}(\mu_E - \mu_G)\left(\frac{2\mu_E}{a^3}\Delta f - \frac{2\mu_G}{a^3}\Delta f\right) + cost \\ &= \frac{2}{hc}\left(\frac{\varepsilon - 1}{2\varepsilon + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n + 1}\right)\frac{(\mu_E - \mu_G)^2}{a^3} + cost \end{aligned}$$

### 7.1.5 Effetti di solvente specifici

Come sappiamo l'equazione 7.1 è valida solo per un ristretto numero di casi e in particolare serve per descrivere solo gli effetti d'interazione dovuti al movimento degli elettroni e al riorientamento delle molecole (a cui abbiamo legato l'indice di rifrazione  $n$  e la costante dielettrica  $\varepsilon$ ). Al contrario le **interazioni specifiche** sono determinate da una o un numero ristretto di molecole e sono dovute a precise proprietà chimiche del fluoroforo e del solvente. Alcuni esempi sono: legami idrogeno, trasferimenti di carica interna, interazioni acidi-basi. Risulta quindi di estrema importanza riconoscere a cosa sono dovuti gli effetti di shift sullo spettro per poter ricavare informazioni dal suo studio. È importante distinguere due casi particolari:

- Interazioni specifiche nello **stato fondamentale**: influenzano solo lo spettro di **assorbimento**, causando variazioni minime in quello di emissione;
- Interazioni specifiche nello **stato eccitato**: avranno effetto solo sullo spettro di **emissione** lasciando praticamente inalterato lo spettro di assorbimento;

Queste informazioni possono essere usate per capire quale stato viene influenzato dalle interazioni e avere informazioni su di esse.

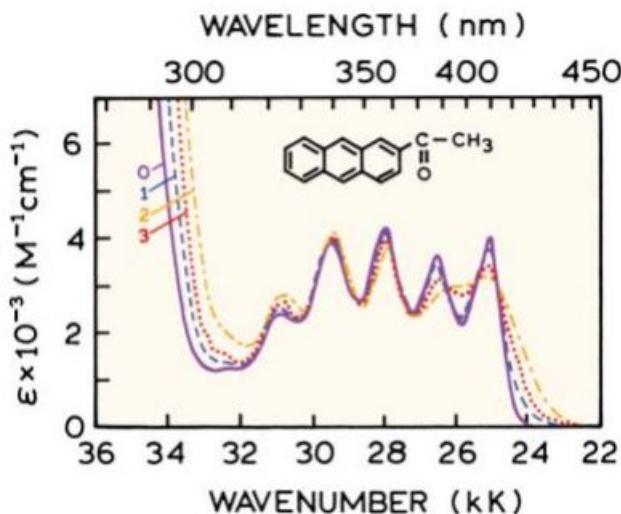


Figura 7.5: Spettro di assorbimento del 2-ACETYLANTRACENE in esano (0) e in una soluzione di metanolo e esano

Come si può vedere in figura, lo spettro di assorbimento mostra perdita della struttura vibrazionale e uno spostamento verso lunghezze d'onda maggiori(?????). Questo suggerisce che vi siano interazioni specifiche nello stato fondamentale, e che quindi 2-AA e alcol siano già legati con legami idrogeno. Uno spettro di assorbimento inalterato avrebbe indicato assenza di legami nello stato fondamentale.(?????????)

**CHIEDI A DAVIDE**

### Effetti di temperatura

In precedenza abbiamo assunto che il rilassamento del solvente avvenisse prima dell'emissione. Questo è vero per fluidi la cui viscosità è relativamente bassa, ma accade spesso che tale proprietà sia legata alla temperatura. Variandola è possibile ottenere fluidi in cui il tempo di rilassamento aumenta considerevolmente fino al punto di essere più lento dell'emissione. Sia detto  $K_s$  la costante di tempo ( $s^{-1}$ ) che caratterizza il tempo di rilassamento e sia  $\gamma = 1/\tau$  il tasso di decadimento relativo allo stato eccitato. Immediatamente dopo l'eccitazione il fluoroforo sarà nello stato F (Franck-Condon state), se  $K_s \ll \gamma = 1/\tau$  mi aspetterò di vedere lo spettro di emissione dello stato F. Al contrario, se il rilassamento avviene con velocità maggiore ( $K_s \gg \gamma = 1/\tau$ ), allora prima che l'emissione avvenga lo stato sarà cambiato da F a R (stato rilassato). Di conseguenza osserveremo lo spettro di emissione di quest'ultimo stato. A temperature tali per cui  $K_s \sim \gamma = 1/\tau$  osserveremo emissione intermedia: se si prova a pensare nell'ottica di probabilità di emissione, ci troviamo in uno stato in cui la probabilità che ci sia emissione da F o da R è, per entrambi, diversa da 0.

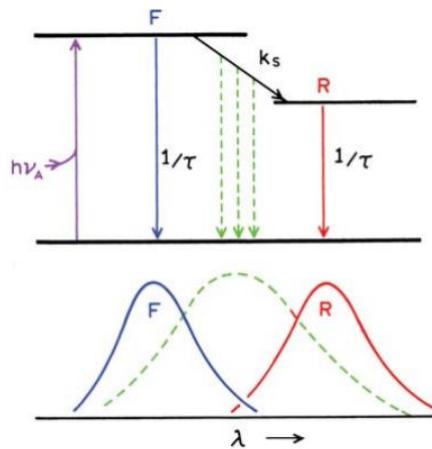


Figura 7.6: Diagramma di Jablonski per il rilassamento di un solvente

### Transizione di fase in membrane: derivati del Prodan

Sin dal loro utilizzo come sonde, il prodan e i suoi derivati sono diventati di estrema importanza per la classificazione delle biomolecole. Grazie alla loro sensibilità al solvente sono particolarmente usati come sonde per lo studio delle membrane. Quando reagiscono con le vescicole di DPPC (dipalmitoilfosfatidilcolina) il massimo di emissione passa da 425 a 485 nm. Grazie ad un così grande shift, il prodan e i suoi derivati sono utilizzati per lo studio di strutture stratificate, come vescicole e lamelle. Considerando la difficoltà nel registrare un intero spettro di emissione per ogni punto dell'immagine è stato necessario trovare una soluzione alternativa. Per evitare tale problema si fa uso di un parametro, similmente alla *polarizzazione nella fluorescenza*, che rappresenta lo spettro di emissione. Questo parametro viene chiamato **polarizzazione generalizzata (GP)**:

$$GP = \frac{I_B - I_R}{I_B + I_R}$$

Dove  $I_B$  e  $I_R$  sono rispettivamente le intensità degli stati stazionari, a luce blu e luce rossa.

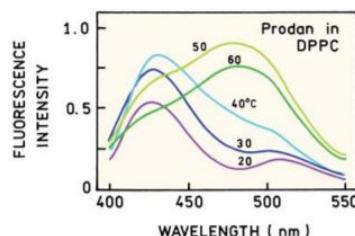


Figura 7.7: Esempio di interazione con le vescicole DPPC in funzione della temperatura: trasizione di fase a 37°.

### Cambiamenti di $K_F$ , $K_{NR}$ : miscele di solventi

Precedentemente abbiamo descritto come gli effetti del solvente potessero influire notevolmente sullo spettro di emissione, in particolare abbiamo descritto come una piccola

variazione nel solvente (aggiunta di un solvente differente per esempio) potesse dare un effetto notevole. Questo tipo di effetti suggerisce una distribuzione di fluorofori tale da reagire con il solvente per determinare un'intensità di emissione coerente con le evidenze sperimentali.

### Dinamica del rilassamento spettrale

Abbiamo già visto come il tempo di rilassamento e quello di vita dello stato eccitato possano influire sullo spettro di emissione. In particolare è la differenza fra il tempo di vita dello stato eccitato e il tempo di emissione che determinano da quale stato misureremo la radiazione luminosa. Questo processo di rilassamento che descrive il cambiamento dello spettro nel tempo è rappresentato principalmente da due modelli: uno **continuo** (CR continuous spectral relaxation) e uno a **due-stati** (ESR, excited-state reaction). Il primo è più appropriato per gli effetti non specifici del solvente e fa riferimento ad un cambiamento continuo, quindi con emissione tra tutti gli stati da quello iniziale e quello rilassato. Il risultato è uno spettro che si sposta, mantenendo inalterata la propria forma, in relazione alla costante di rilassamento del solvente  $k_S$  (o dal tempo di rilassamento  $\tau_S = k_S^{-1}$ ). Inizialmente il fluoroforo si troverà nello stato di Franck-Condon (F) o in un generico stato non rilassato e successivamente all'eccitazione i dipoli del solvente cominceranno a riorientarsi. Se il tempo di rilassamento del solvente è più breve di quello di vita dello stato F ( $\tau_S \ll \tau$ ) allora l'emissione avverrà dallo stato R, al contrario nel caso in cui  $\tau_S \gg \tau$ , allora osserveremo lo spettro dello stato F (generalmente accade a temperature basse). A temperature intermedie, cioè quando  $\tau_S \sim \tau$ , l'emissione accadrà durante il processo di rilassamento e quindi osserveremo uno spettro intermedio fra F e R che rappresenta una media pesata dello spettro di emissione in ogni istante del processo di rilassamento. L'emissione generalmente avviene dallo stesso stato perciò i tempi di emissione sono uguali, come si può vedere in figura:

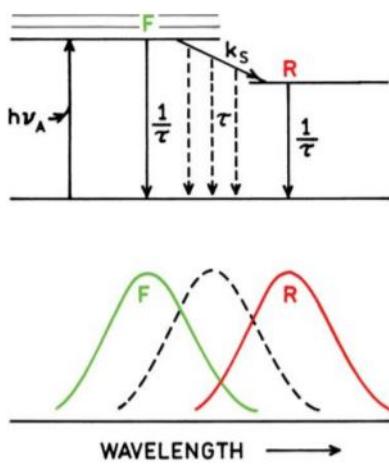
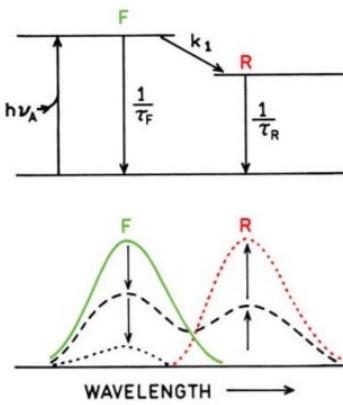


Figura 7.8: E

Al contrario il secondo modello è caratterizzato da soli due stati senza alcuna fase intermedia: quello iniziale (F) e quello finale (R). In questo caso si osserva lo spettro di emissione del fluoroforo in due forme differenti, solitamente legate ad un effetto di trasferimento di carica interna (ITC) o a reazioni di stato eccitato. I tempi di vita dei due stati, in questo caso, sono diversi perché riferiti a due forme differenti del fluoroforo. Ad esempio in uno

stato eccitato ionizzato lo stato fine R sarà quello ionizzato, avremo quindi emissione dallo stato iniziale e dallo stato ionizzato che rappresentano due configurazioni differenti della molecola. I due stati sono legati da una costante,  $K_1$ , che è una costante chimica che determina il passaggio fra i due stati ed è determinata dalla struttura chimica della molecola o dal suo stato elettronico e dalla composizione del solvente. Se questa costante è molto piccola rispetto al tasso di decadimento dello stato F ( $\tau_F^{-1}$ ) allora osserveremo emissione da quest'ultimo stato, al contrario per  $K_1 > \tau_F^{-1}$  avremo emissione dallo stato R. Nel caso intermedio in cui le due costanti sono comparabili allora avremo emissione da entrambi gli stati. Nel caso in cui **R** e **F** siano sufficientemente separati, allora vedremo due componenti distinte nello spettro di emissione.



È possibile rappresentare i due differenti modelli in un grafico che rappresenta le coordinate di reazione (RC). La posizione delle curve su questo grafico dipenderà dalle costanti in gioco ( $K_S$ ,  $\tau$  per il modello **CR** e  $K_1$  e  $\tau$  per **ES**):

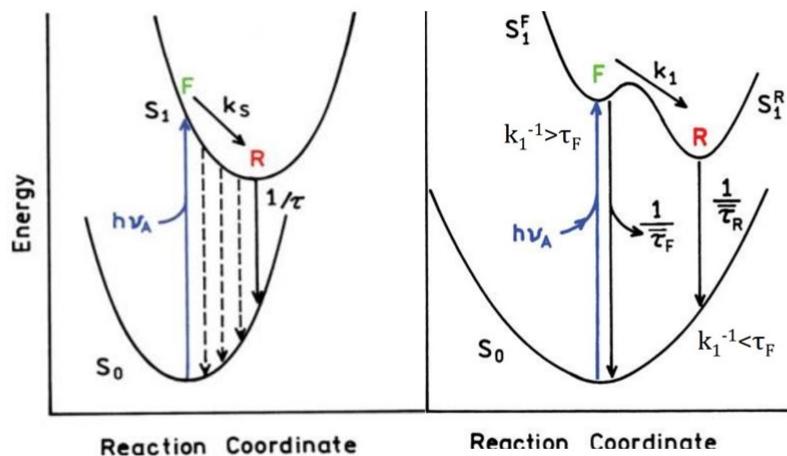


Figura 7.9: Grafico RC-energia per il modello continuo (a sinistra) e quello a due stati (a destra)

### TRES: time resolved emission spectra

Reazioni di stato eccitato, oppure trasferimenti di carica interna possono determinare una complessa dipendenza temporale nel processo di decadimento. L'intensità del decadimento dipenderà dalla lunghezza d'onda d'osservazione, a causa del tempo di transizione fra gli stati F e R. Il motivo di questa dipendenza dalla lunghezza d'onda è legato al fatto che l'emissione, di fatto, è un fenomeno casuale. Alcuni fluorofori emetteranno luce prima e altri dopo. La media di questi eventi è il tasso di decadimento. I fluorofori che emettono prima di quanto descritto da questa costante tendono ad emettere luce con lunghezza d'onda piccola, al contrario quelli che emettono dopo tendono a farlo con luce di lunghezza d'onda maggiore. Per il modello continuo ci si aspetta che la forma dello spettro rimanga la stessa, al contrario ci si aspetta un cambiamento nel modello a due stati. Come già detto, infatti, per tempi brevi osserveremmo le lunghezze d'onda provenienti dallo stato F, per tempi maggiori quelle provenienti dallo stato R e per tempi intermedi invece osserveremmo luce proveniente da entrambi (motivo per cui in genere è di maggiore intensità). Questi spettri di emissione che rappresentano un dipendenza discreta dal tempo vengono chiamati **TRES** o **time-resolved emission spectra**.

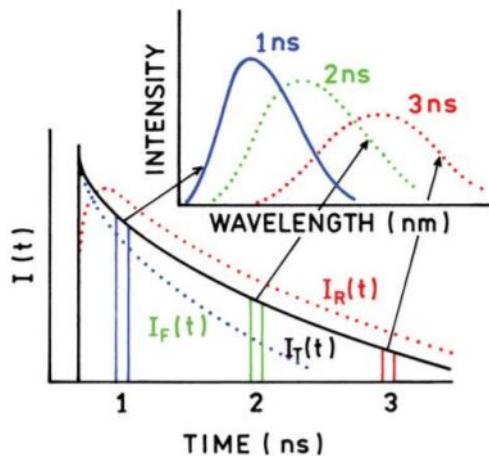


Figura 7.10: Il grafico in basso rappresenta le differenti intensità di emissioni:  $I_T(t)$  rappresenta l'emissione totale,  $I_F(t)$  e  $I_R(t)$  invece rappresentano l'emissione dello stato F (in verde) e dello stato R (in rosso). Nell'immagine superiore si può osservare lo spettro di emissione a tempi differenti.

## 7.2 Förster Resonance Energy Transfer (FRET)

In genere la fluorescenza è molto più sensibile alle condizioni di environment dei cromofori di quanto invece lo sia l'assorbimento. Come conseguenza di ciò la fluorescenza è una tecnica molto più efficace di altre per indagare sulle condizioni al contorno di un'esperienza. L'alta sensibilità della fluorescenza è da ricercare soprattutto nelle scale temporali che la caratterizzano. Mentre infatti i processi di assorbimento avvengono entro  $10^{-15} s$ , un singoletto eccitato resta tale per almeno  $10^{-9} - 10^{-8} s$  durante i quali qualsiasi tipo di interazione con l'ambiente può avere luogo. Una delle interazioni più interessanti rese possibili da questo genere di scale temporali riguarda lo scambio di eccitazione tra due molecole vicine. Vediamo di abbozzarne *il concetto generale..*

Consideriamo per comodità di trattazione un sistema formato da due sole molecole, che

supporremo essere fluorofori. Verso il primo dei due fluorofori viene diretta un'onda luminosa ad una lunghezza d'onda  $\lambda$  ben precisa, supponiamo prossima al suo picco di assorbimento. Da quanto sappiamo fino ad ora, il fluoroforo eccitato può manifestare fluorescenza secondo la forma tipica del suo spettro di emissione (che, ricordiamo, dipende con proporzionalità diretta dalla resa quantica). Se tuttavia lo spettro di emissione del primo fluoroforo si sovrappone in modo consistente allo spettro di assorbimento del secondo fluoroforo, il fluoroforo eccitato non emette luce ma "passa" in maniera risonante la sua eccitazione alla seconda molecola che in tal modo emetterà un fotone alla sua lunghezza d'onda di emissione caratteristica.

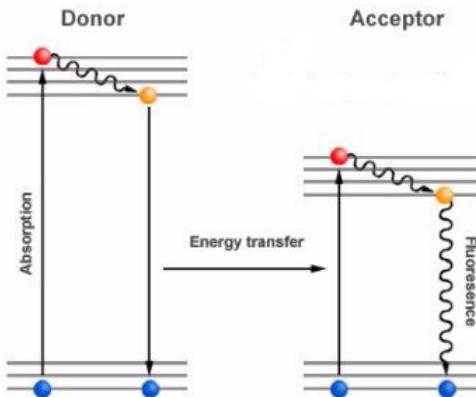


Figura 7.11: Rappresentazione schematica della FRET. L'elettrone eccitato della prima molecola (donore) non emette fluorescenza ma l'eccitamento viene trasferito in modo non radiativo alla seconda molecola (accettore) che in tal modo fluoresce. Il termine **risonante** indica che nel processo l'energia persa dal donore eccitato deve essere esattamente uguale a quella acquistata dall'accettore.

Come già avevamo detto nel Capitolo 6 (SPETTROSCOPIA DI FLUORESCENZA) discutendo dei processi di rilassamento vibrazionale, la FRET si annovera tra i **processi bimolecolari**. Possiamo quindi dare la seguente definizione:

**Definizione 7.2.0.1.** *In spettroscopia di fluorescenza si definisce **trasferimento di energia per risonanza** il fenomeno per il quale una molecola donore trasferisce in modo non radiativo la sua energia ad una molecola accettore non eccitata, mediante accoppiamento dipolare risonante a lungo raggio.*

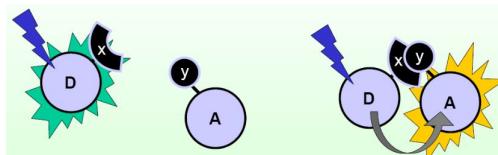
Questo paragrafo sarà pertanto dedicato allo studio e alla modellizzazione di questo processo.

Possiamo subito elencare i primi e più evidenti effetti della FRET. Come è facile intuire, in seguito al passaggio di energia, il donore vede diminuire la propria intensità e tempo di vita radiativo, mentre l'accettore si manifesterà improvvisamente fluorescente, secondo la sua resa quantica.

La FRET, rispetto alle altre tecniche sin qui viste consente di ottenere informazioni con estrema precisione. Essa è utilizzata principalmente per stimare la distanza tra donore e accettore con grande sensibilità all'interno di macromolecole e conseguentemente per reperire informazioni sulle interazioni di legame proteina-proteina, lipide-proteina, DNA-proteina. In particolare per quel che riguarda le proteine, si osserva che:

- Se due proteine sono separate ed eccito il donore di una delle due, si vede la fluorescenza del donore della prima proteina;
- Se due proteine sono legate ed eccito il donore di una delle due, si assiste alla fluorescenza dell'accettore della seconda proteina.

Ciò consente di risalire alla distanza donore-accettore nei sistemi di proteine legate.



Iniziamo a dare un volto più formale alla questione, limitandoci per ora ancora al modello con soli due fluorofori.

Diciamo che, per evidenza sperimentale, due fluorofori (che a volte chiameremo cromofori con ugual significato) possono interagire tra di loro finché non raggiungono una distanza limite, tale per cui non sono comunque più in grado di influenzare la forma dei corrispettivi spettri di assorbimento/emissione. Questa distanza è chiamato il *limite di accoppiamento molto debole*. Sia inoltre D un donore e A l'accettore.

Nel corso dell'intera trattazione terremo in considerazione soltanto lo stato di singoletto fondamentale ( $D_a, A_a$ ) e il primo stato di singoletto eccitato ( $D_b, A_b$ ). Supponiamo che il donore sia eccitato. Esso farà rapidamente ritorno tramite conversione interna al primo stato eccitato di singoletto  $D_b$ . *Se le energie di emissione del donore sono coincidenti con le energie di assorbimento dell'accettore*, l'accoppiamento molto debole permette la formazione del seguente equilibrio:



dove  $k_{ET}$  è il tasso di energia trasferita da donore ad accettore.

L'avverarsi o meno del FRET dipende fortemente dalla distanza tra donore e accettore. La *Teoria di Theodore Förster* in merito a questo processo si basa infatti sull'interazione dipolo-dipolo dipendente dalla distanza D-A e dall'orientazione relativa del dipolo di emissione del donore e quello di assorbimento dell'accettore. Fu lo stesso Förster a calcolare che il tasso di energia trasferita è esprimibile come:

$$k_{ET} = \frac{1}{\tau_D} \left( \frac{R_0}{R} \right)^6 \quad (7.5)$$

secondo quella che è chiamata **equazione di Förster** dove  $R$  è la distanza effettiva tra i due fluorofori,  $\tau_D$  è il tempo di vita radiativo del donore in assenza dell'accettore e la potenza sesta che compare viene dal quadrato dell'accoppiamento dipolo-dipolo tra dipoli delle due molecole che ricordiamo dipendere da  $R^{-3}$ .  $R_0$  è invece chiamata la **distanza caratteristica di trasferimento** e rappresenta la probabilità intrinseca, quindi specifica di ogni coppia A-D che avvenga la FRET ed è definita come:

$$R_0^6 = \left\{ \frac{9000 (\log 10) \mathcal{K}^2 \phi_D}{128\pi^5 N_{AV} n^4} \right\} \int \epsilon_A(\lambda) f_D(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (7.6)$$

nella quale  $J(\lambda) = \int \epsilon_A(\lambda)f_D(\lambda)\lambda^4 d\lambda$  è una misura della **sovraposizione**<sup>3</sup> dello spettro di emissione del donore e dello spettro di assorbimento dell'accettore;  $f_D(\lambda)$  è la fluorescenza normalizzata come definita in 6.16;  $n$  è l'indice di rifrazione del mezzo tra donore e accettore;  $\phi_D$  è la resa quantica del donore in assenza dell'accettore; e  $K^2$  è un **fattore di orientazione**, di natura geometrica, che dipende dalla orientazione del dipolo di emissione del donore e del dipolo di assorbimento dell'accettore. Se sia il donore che l'accettore sono liberi di muoversi rapidamente rispetto alla scala dei tempi di emissione fluorescente, si raggiunge una condizione media isotropia, in cui il fattore assume un valore limite

$$K^2 = \frac{2}{3}$$

In particolare  $K^2$  descrive efficacemente il FRET per fluorofori in soluzione dove c'è grande mobilità delle molecole. Nei solidi e nei liquidi invece va stabilito più dettagliatamente.

### 7.2.1 Condizioni necessarie per la FRET

La FRET è un fenomeno molto particolare che tuttavia richiede siano soddisfatte alcune condizioni al contorno, perché possa eventualmente manifestarsi. Quelle che seguono sono pertanto condizioni **necessarie** e non sufficienti.

1. Deve esistere una condizione di risonanza: *l'integrale di sovrapposizione  $J(\lambda)$  cioè deve essere diverso da zero*. In caso contrario sarebbe nulla la probabilità di sovrapposizione dei due spettri e quindi si sarebbe superato il limite di accoppiamento molto debole.

$$J(\lambda) = \int \epsilon_A(\lambda)f_D(\lambda)\lambda^4 d\lambda \neq 0$$

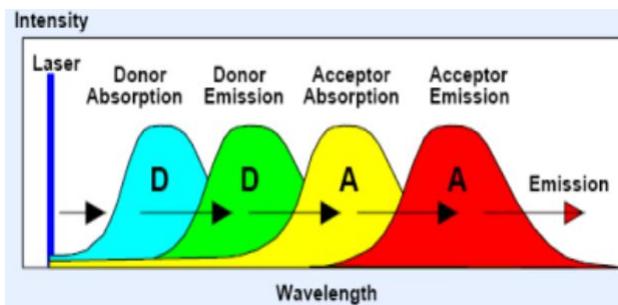


Figura 7.12: Lo spettro di emissione del donore (verde) e lo spettro di emissione dell'accettore (giallo) si sovrappongono. Potrebbe esserci FRET.

2. *Il donore e l'accettore devono essere sufficientemente vicini: (1-10 nm).* Sono in tal modo favorite le interazioni dipolo-dipolo a corto raggio. Come vedremo discutendo dell'*efficienza* della trasmissione energetica per risonanza, il processo si verifica a partire da metà della distanza caratteristica di trasferimento  $R_0$ . A livello di dato si sappia che, ad esempio, tra il donore fluorescina e l'accettore TM-rodamina la distanza di FRET è 55 Å, tra il donore IAEDANS e l'accettore fluorescina la FRET avviene quando questi sono a 46 Å l'uno dall'altro.

<sup>3</sup>È una condizione ESSENZIALE per il FRET che ci sia sovrapposizione almeno parziale tra i due spettri. In caso contrario il trasferimento di energia per risonanza ha probabilità nulla di avvenire!

3. *L'orientazione dei dipoli deve essere favorevole:* questo parametro, regolato dal valore di  $\mathcal{K}^2$  come abbiamo visto, è particolarmente importante da controllare nel caso delle molecole rigide o comunque allo stato condensato, in cui solo alcune determinate configurazioni (da imporre) soddisfano la condizione di corretta interazione dipolo-dipolo. Al contrario, in molecole non rigide, i dipoli si orientano convenientemente in modo spontaneo e pertanto l'impostazione di tale parametro diventa meno severa.

Pur non volendoci addentrare troppo nella questione, vale come regola generale che più è alto il valore di  $\mathcal{K}^2$  migliore è l'orientazione per la FRET. In particolare vediamo che vale:

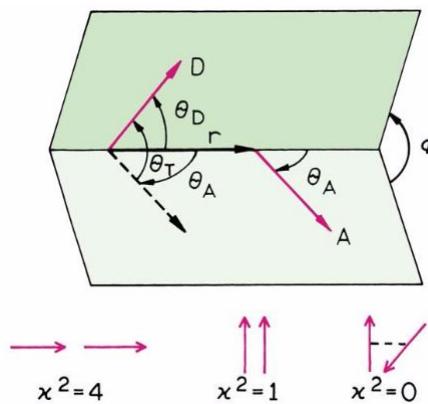


Figura 7.13: Le due frecce rosse indicano i dipoli dei due fluorofori protagonisti della FRET.

Il parametro è infatti definito dalle due relazioni equivalenti:

$$\begin{aligned}\mathcal{K}^2 &= (\cos \theta_T - 3 \cos \theta_D \cos \theta_A)^2 \\ \mathcal{K}^2 &= (\sin \theta_D \sin \theta_A \cos \phi - 2 \cos \theta_D \cos \theta_A)^2\end{aligned}$$

È pertanto facile notare che il valore massimo lo si trova quando i due dipoli sono sulla stessa retta ( $\theta_D = \theta_A = \theta_T = \phi = 0$ ), un valore comunque accettabile lo si ha per dipoli paralleli ( $\theta_D = \theta_T = \phi = 0 \wedge \theta_A = \pi/2$ ), mentre per dipoli ortogonali o sghembi la costante è nulla, come del resto l'interazione elettrica tra i due.

### 7.2.2 Efficienza di transfer

Sin qui abbiamo visto che la FRET può avvenire tra fluorofori che non devono appartenere necessariamente alla stessa molecola, a patto che la concentrazione del campione sia sufficientemente alta da portare la distanza intramolecolare media a circa 50 Å. Abbiamo anche visto che il trasferimento di energia da singoletto eccitato a singoletto eccitato può avvenire sotto determinate condizioni. Tuttavia il parametro che determina l'effettivo verificarsi o meno del fenomeno è **l'efficienza di transfer E**, definita come la **frazione di donori che decadono attraverso il processo di FRET**:

$$E = \frac{k_{ET}}{k_{ET} + k^D} = \frac{k_{ET}}{k_{ET} + k_F^D + k_{ic}^D + k_{isc}^D} \quad (7.7)$$

nella quale  $k_{ET}$  è il tasso di energia trasferita secondo quanto definito in 7.5 e tutti gli altri termini fanno riferimento al donore. La definizione è quindi analoga a quella della resa quantica vista in 6.10, con l'unica differenza che qui si guarda la resa del trasferimento del donore anziché quella di fluorescenza di un elettrone eccitato.

Come può essere chiaro dalle discussioni precedenti l'efficienza dipende in maniera significativa dalla distanza tra donore e accettore, come mostriamo di seguito.

Abbiamo già definito  $1/\tau_D$  il tempo di vita radiativo del donore in assenza dell'accettore. Per analogia con (6.12) esso sarà della forma

$$\tau_D = \frac{1}{k_F^D + k_{ic}^D + k_{isc}^D} \quad (7.8)$$

il che ci consente di scrivere, ricordando l'espressione per il tasso di energia trasferita, che

$$E = \frac{k_{ET}}{k_{ET} + \frac{1}{\tau_D}} = \frac{\frac{1}{\tau_D} \left( \frac{R_0}{R} \right)^6}{\frac{1}{\tau_D} \left( \frac{R_0}{R} \right)^6 + \frac{1}{\tau_D}} = \frac{R^6 \left( \frac{R_0^6}{R^6} \right)}{R_0^6 + R^6}$$

che produce infine:

$$\boxed{E = \frac{R_0^6}{R^6 + R_0^6}} \quad \Leftrightarrow \quad \boxed{R = R_0 \left( \frac{1 - E}{E} \right)} \quad (7.9)$$

La prima della 7.9 mostra la dipendenza dell'efficienza di transfer dalla distanza tra donore e accettore:

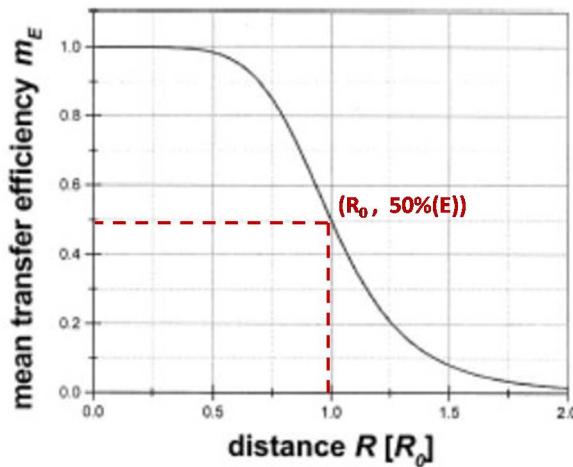


Figura 7.14: Alla distanza  $R = R_0$  corrisponde il 50% dell'efficienza massima ottenibile. Il processo di FRET è quindi apprezzabile (efficiente) per distanze A-D minori o uguali a  $R_0$ . Come ovvio che sia quindi, **l'ampiezza dell'intervallo di efficienza di FRET aumenta con  $R_0$** .

Da questo grafico è anche evidente un'altra cosa: se riesco a misurare l'efficienza dalla raccolta dati sperimentale, riesco a determinare dal fit (per  $R_0$ ) e dalla 7.9, il valore della distanza tra le due molecole! Per sapere in che modo ricavare l'efficienza è però d'uopo studiare prima come la *FRET influisce sulla fluorescenza*.

Nel capitolo 6 abbiamo definito la resa quantica e il tempo di fluorescenza di un elettrone

eccitato. In presenza di FRET però la fluorescenza viene a dipendere dallo stato di eccitazione dell'accettore e quindi dalla resa quantica del donore. Le variabili in gioco cambiano dunque: la resa quantica fluorescente del donore e il suo tempo di fluorescenza in assenza dell'accettore (*label D*) si trasformano in analoghe grandezze che tengono conto della presenza dell'accettore (*label DA*):

$$\left\{ \begin{array}{l} \phi_F^D = \frac{k_F^D}{k_F^D + k_{NR}^D} \longrightarrow \phi_F^{DA} = \frac{k_F^D}{k_F^D + k_{NR}^D + k_{ET}} \\ \tau_F^D = \frac{1}{k_F^D + k_{NR}^D} \longrightarrow \tau_F^{DA} = \frac{1}{k_F^D + k_{NR}^D + k_{ET}} \\ k_{NR}^D = k_{ic}^D + k_{isc}^D \end{array} \right. \quad (7.10)$$

Le 7.10 consentono di ricavare E da una misura di fluorescenza. Si preparano campioni che dovranno essere il più simili possibile tra di loro (affinché gli spettri di emissione e assorbimento si sovrappongano come visto) e saranno tali che il primo contenga sia il donore che l'accettore (e obbedirà quindi al lato destro delle frecce nel sistema) e il secondo contenga soltanto il donore (obbedendo in tal modo al lato sinistro delle frecce). La misura di E - per confronto della fluorescenza dei due campioni - potrà ora essere fatta in tre diversi modi. Con riferimento alla figura Fig. 7.15

1. Fluorescenza nello stato stazionario - Primo modo (GUARDO SOLO DONORE):

Se il sistema è eccitato con un fotone di lunghezza d'onda  $\lambda_1$  ed emette a  $\lambda_2$ , viene osservata solo l'emissione da parte del donore. In tal modo, eseguendo l'esperimento con i due campioni e misurando<sup>4</sup> le due  $\phi$ , posso confrontare la resa quantica del donore, in presenza o in assenza dell'accettore, trovando per confronto:

$$\frac{\phi_F^{DA}}{\phi_F^D} = \frac{k_F^D}{k_F^D + k_{ic}^D + k_{isc}^D + k_{ET}} \cdot \frac{k_F^D + k_{ic}^D + k_{isc}^D}{k_F^D} = 1 - E \quad (7.11)$$

2. Fluorescenza nello stato stazionario - Secondo modo (GUARDO SOLO ACCETTORE):

Qui il secondo campione, anziché contenere solo un donore dovrà contenere solo l'accettore. Sarà presto chiaro il motivo.

In questo caso si decide di osservare solo l'emissione rimanendo fissi con lo strumento a  $\lambda_4$  e di far variare la lunghezza d'onda di eccitazione da  $\lambda_3$  a  $\lambda_1$ . Se il sistema contiene solo l'accettore, lo spettro di emissione sarà speculare al suo spettro di assorbimento secondo la consueta regola dello specchio in fluorescenza. Se tuttavia il sistema contiene anche un donore, lo spettro di emissione rilevato avrà anche un secondo picco corrispondente, specularmente, al massimo di assorbimento  $\lambda_1$  del donore. L'intensità di questo picco secondario dipenderà dall'assorbanza relativa tra donore e accettore nella regione di  $\lambda_1$  e dall'efficienza di transfer E. Se quindi il primo modo osserva lo spettro solo del donore, qui si osserva solo lo spettro dell'accettore a  $\lambda_4$ . Seguendo la 6.16, l'intensità di fluorescenza sarà proporzionale a:

$$\left\{ \begin{array}{ll} F_A(\lambda) \propto \epsilon_A C_A \phi_F^A & \text{campione con solo accettore exc}(\lambda_1), \text{em}(\lambda_4) \\ F_{DA}(\lambda) \propto \epsilon_A C_A \phi_F^A + \epsilon_D C_D \phi_F^D & \text{campione con sia accettore che donore} \end{array} \right. \quad (7.12)$$

<sup>4</sup>Come si misura una resa quantica è stato discusso nel Capitolo 6: Spettroscopia di Fluorescenza.

La quantità  $\epsilon_D C_D$  è proporzionale al numero di donori eccitati e sarà la frazione di donori eccitati che trasferiscono energia eccitando accettori. Ma allora confrontando le intensità di fluorescenza del campione che contiene solo l'accettore e del campione che contiene sia il donore che l'accettore troviamo di nuovo E:

$$\frac{F_{DA}}{F_A} = 1 + \left( \frac{\epsilon_D C_D}{\epsilon_A C_A} \right) \left( \frac{\phi_F^D}{\phi_F^A} \right) = 1 + \left( \frac{\epsilon_D C_D}{\epsilon_A C_A} \right) E \quad (7.13)$$

### 3. Fluorescenza risolta nel tempo:

È sufficiente confrontare il tempo di fluorescenza del donore in assenza e in presenza dell'accettore. Vale infatti la relazione:

$$\frac{\tau_{DA}}{\tau_D} = \frac{k_F^D + k_{NR}^D}{k_F^D + k_{NR}^D + k_{ET}} = \frac{k_{ET} + k_F^D + k_{NR}^D - k_{ET}}{k_F^D + k_{NR}^D + k_{ET}} = 1 - E \quad (7.14)$$

Quest'ultimo metodo è senza dubbio il più semplice poiché consente di calcolare E direttamente dai dati di laboratorio, senza bisogno di calcolare prima rese quantiche o intensità di fluorescenza che introducono inevitabilmente incertezza.

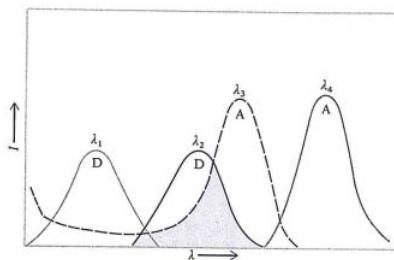


Figura 7.15:  $\lambda_1$  è il picco di assorbimento del donore,  $\lambda_2$  quello di emissione del donore,  $\lambda_3$  quello di assorbimento dell'accettore e  $\lambda_4$  quello di emissione dell'accettore.

In sintesi:

$$E = 1 - \phi_{DA}/\phi_D$$

$$E = 1 - \tau_{DA}/\tau_D$$

(7.15)

### 7.2.3 Applicazioni della FRET alle macromolecole

Il trasferimento di energia di fluorescenza per risonanza si presta ad una larga gamma di applicazioni, che possono spaziare dal cambiamento di conformazione delle molecole, all'idrolisi delle proteine, piuttosto che all'interazione tra ligando e molecole o ancora alla fusione di singoli fosfolipidi in vescicole lipidiche.

In particolare la relazione tra efficienza di FRET e distanza permette di misurare distanze molecolari e fa di questo fenomeno una specie di "righello" spettroscopico. La spiccata specificità del metodo, inoltre, consente di assistere a interazioni molecolari e cambiamenti di conformazione con elevata risoluzione spaziale (1-10 nm) e temporale (< 1ns). Infine il raggio di azione dell'interazione dipolo-dipolo è particolarmente utile in biofisica poiché, essendo dell'ordine di 10-100 Å, esso corrisponde perfettamente alle comuni scale spaziali coinvolte nelle macromolecole biologiche.

### Conformational Change

Particolarmente diffuso è lo studio del cambio di conformazione (*conformational change*) nelle proteine per mezzo di FRET. Ad esempio, si etichetta una proteina con due fluorofori, dei quali il donatore assorbe a 435 nm ed emette a 475 nm. Quando l'accettore si avvicina a causa di un cambiamento strutturale, l'emissione del donatore si attenua e compare una emissione a lunghezza d'onda più elevata, propria dell'accettore. Dai cambiamenti dello spettro quindi si risale a come cambia nel tempo la proteina.

### Tirosina e Triptofano

Un esempio classico di FRET è il trasferimento di energia tra i residui di tirosina e triptofano (due amminoacidi, la prima non essenziale, il secondo essenziale), purché siano presenti, nella stessa proteina, ad una distanza non molto diversa da  $R_0$  che ricordiamo essere 9-18 Å per la coppia Tyr-Trp. L'eccitazione a 280 nm determina l'assorbimento di radiazione sia da parte della tirosina che dal triptofano. Tuttavia c'è parziale sovrapposizione tra lo spettro di emissione della tirosina e quello di assorbimento del triptofano, e, se i due residui si trovano alla distanza e con l'orientazioni opportune, avviene il trasferimento di energia da Tyr a Trp. Ne consegue che la fluorescenza del donatore si attenua fino a scomparire e quindi, anche eccitando entrambe, si osserva solo la fluorescenza del triptofano.

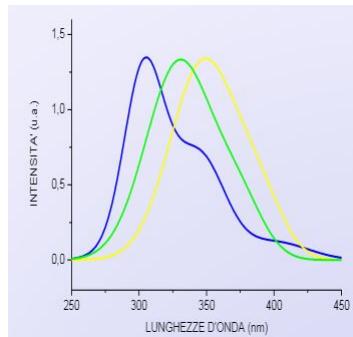


Figura 7.16: La linea gialla è l'emissione del triptofano libero in acqua. La linea blu indica invece il risultato del FRET in una miscela 18:1 di tirosina e triptofano in acqua: lo spettro è la somma pesata delle due emissioni separate. In ultime viene fatto notare che nell'albumina di siero umano, l'emissione del donatore Tyr scompare del tutto e lo spettro del Trp si sposta verso sinistra.

### Stima dell'angolo di piegamento di una giunzione di DNA

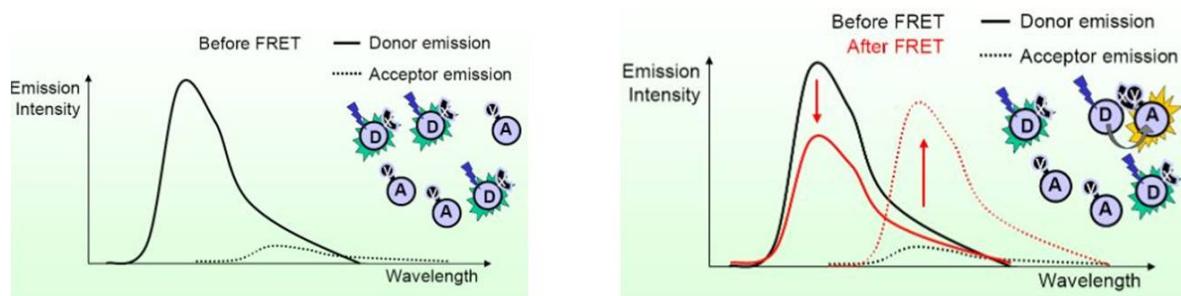
Per determinare questo parametro si considera in genere una giunzione di Holliday (struttura mobile a croce composta da quattro filamenti di DNA) e si posizionano un donore (**fluorescina**) e un accettore (**rodamina**) ai capi di due terminazioni consecutive e si misura l'efficienza di transfer di questo sistema. Se ora vengono cambiate le condizioni ambientali e si pone il campione in un soluzione di magnesio ionizzato ( $Mg^{++}$ ) si potrà apprezzare una variazione nell'efficienza di transfer; questa osservazione suggerisce informazioni su quanto si siano avvicinati o allontanati i cromofori legati al DNA fornendo dunque informazioni sull'angolo di cui la giunzione si è ripiegata. ( $R_0 = 55 \text{ \AA}$ )

### Clorifille in un fotosistema

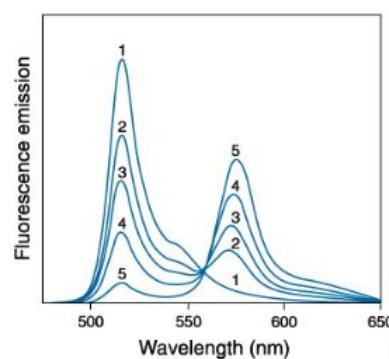
Un altro esempio noto di FRET si ha tra le molecole antenna (clorofille appunto o altri pigmenti accessori come i carotenoidi) di un fotosistema. L'energia di eccitazione in questo caso viene trasferita in modo casuale da una molecola antenna all'altra, finché non raggiunge la clorofilla nel centro di reazione. L'ambiente leggermente diverso di questo fa sì che il livello energetico del suo stato eccitato, dopo rilassamento vibrazionale, sia un po' più basso delle altre, cosicché il centro di reazione intrappola l'eccitazione. Qui, poi, l'energia di eccitazione viene persa mediante *reazioni di trasferimento elettronico* che danno inizio a processi fotosintetici veri e propri.

### Metodo raziometrico. Punto isosbestico

Abbiamo già ribadito che una proprietà tipica del fenomeno di FRET è la diminuzione dell'intensità di fluorescenza del donore e la comparsa invece di uno spettro di emissione per l'accettore. La stima dell'effetto di FRET facendo il rapporto tra l'intensità di emissione del donore e quella dell'accettore in assenza o in presenza del fenomeno è detto **metodo raziometrico**. Una banale stima visiva è riportata di seguito:



Una proprietà interessante del FRET si basa sul punto di intersezione di spettri di emissione provenienti dallo stesso campione valutato a concentrazioni differenti. In particolare si chiama *punto isosbestico* il punto dello spettro la cui intensità di fluorescenza non dipende dal pH della soluzione che si sta considerando. Limitandoci ad una valutazione grafica della faccenda, se consideriamo il FRET tra BODIPY 500-510 C<sub>12</sub>-HPC (con picco a 516 nm) e BODIPY 558/568 C<sub>12</sub> (con picco a 572 nm) in doppi strati fosfolipidici con eccitazione a 475 nm si ottiene il grafico seguente:



Si nota che a seconda del pH della soluzione in cui si trova diluito il campione, cambia l'ampiezza dei picchi di donatore (a sinistra) e accettore (a destra). La presenza di un punto per cui passano tutti gli spettri indipendentemente dalla concentrazione o pH è

particolarmente utile per stimare l'evoluzione del FRET in base alle diverse soluzioni che si possono pensare di mettere nel portacampioni e scegliere in tal modo quello con l'efficienza migliore per le misurazioni.

### Misure di distanze

La più importante delle applicazioni del FRET in ambito biofisico è senza dubbio la misura di distanze molecolari dagli spettri di emissione, secondo i metodi che già abbiamo discusso più sopra. Consideriamo ad esempio il caso del *folding* proteico. Etichettando una singola proteina a entrambi i capi, da un lato con un donore a fluorescenza verde, dall'altro con un accettore a fluorescenza rossa, è possibile monitorare, in base agli spettri di emissione, la transizione del ripiegamento e il raggiungimento finale dell'equilibrio. Intuitivamente si ricordi che quando la proteina è unfolded si il donore che l'accettore fluorescono se illuminati; a ripiegamento avvenuto invece, i due fluorofori dovrebbero essere a una distanza tale tra loro da consentire un trasferimento risonante di energia favorendo la fluorescenza del solo accettore.

Sperimentalmente si effettuano misure di fluorescenza risolta nel tempo andando a rilevare, direttamente dallo spettrofluorimetro, i valori di corrente restituiti dal rivelatore. Trattandosi di una misura dinamica (dal momento che la distanza tra donore e accettore cambia nel tempo dovendosi la proteina ripiegare) i dati ottenuti andranno fittati con appositi modelli basati, come già visto nel Capitolo 6, sulla legge di Lambert-Beer, che prevedono una decrescenza esponenziale dell'intensità di corrente incidente. Nel caso particolare che stiamo trattando a questo tipo di decrescenza va aggiunta quella derivante dal termine di FRET che rende la distribuzione complessiva a decrescenza *multiesponenziale*<sup>5</sup>.

$$I_{DA}(R, t) = I_D^0 \exp\left[-\frac{t}{\tau_D} - k_{ET(R)t}\right]$$

La distanza tra molecole non è nota ma obbedisce a una **distribuzione statistica**, simile all'evoluzione temporale di un pacchetto gaussiano. Questo fa sì che i fit debbano tener conto di questo tipo di gradi di libertà per poter sperare di estrarre una buona stima dei tempi di vita e da qui dell'efficienza di transfer che sappiamo essere legata alla distanza R cercata. Una tipica funzione di interpolazione sarà quindi del tipo:

$$I_{DA}(t) = \int_0^\infty P(R) I_{DA}(R, t) dR \quad \text{con} \quad P(R) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} e^{-\frac{(R-\bar{R})^2}{2\sigma^2}}$$

Concludiamo facendo notare soltanto che quando la proteina è denaturata, non essendo fissa la distanza tra donore e accettore, i fit hanno un cattivo accordo con i dati sperimentali. Anche solo un valore di chi-quadro può quindi suggerire uno stato folded piuttosto che unfolded.

### Sonde intermolecolari

La possibilità straordinaria di "comunicazione" tra cromofori resa possibile dal transfer di energia in risonanza ha applicazioni anche per quel che riguarda il progetto di indicatori o *sonde* pensate per indagare la composizione interna delle cellule. Una delle più ricordate

---

<sup>5</sup> Alcuni fluorofori manifestano un andamento multiesponenziale anche in assenza di accettori e risultano poco utili per misurare il FRET (e.g. tritofani).

è la sonda FRET per  $Ca^{2+}$  detta *cameleon*. Questi tipi di oggetti basano il loro funzionamento sul FRET tra due proteine fluorescenti, delle quali solo la prima viene eccitata per radiazione, collegate da un breve tratto di calmodulina, una proteina che cambia la sua forma e estensione in funzione delle concentrazioni di calcio che la circondano. A seconda che il calcio venga rilasciato o liberato la calmodulina si estende o si ritrae dando l'effetto di una lunga lingua camaleontica. Inoltre per via di queste variazioni della coda, le due proteine possono avvicinarsi o allontanarsi. In particolare si verifica che quando la soluzione vede l'aggiunta di 4 ioni calcio  $2+$ , la calmodulina si contrae, avvicinando le due proteine al punto da favorire il FRET. A questo punto, nonostante l'eccitazione riguardi sempre la prima delle due, l'emissione che si osserva è quella della seconda. Quando quindi si osserva una variazione di lunghezze d'onda dallo spettro di emissione si può dedurre circa la concentrazione del calcio in quella regione della cellula.

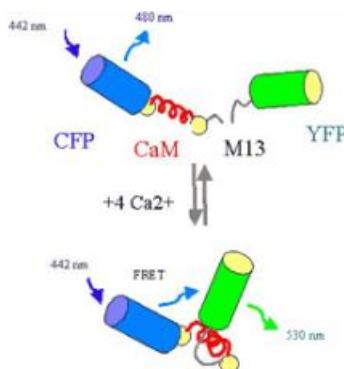


Figura 7.17: Sonda cameleon per il  $Ca^{2+}$ . la prima proteina assorbe a 442nm ed emette a 480 nm. La seconda emette a 530 nm.

### Metodo diretto

Il metodo diretto per una misura di FRET consiste nel preparare due campioni, uno con solo il donore e l'altro con donore e accettore. Viene inizialmente misurata l'intensità del donore ( $I_0^D$ ), poi, detta E l'efficienza di transfer si può esprimere l'intensità del secondo campione come

$$I^D = (1 - E)I_0^D$$

$$I^A = EI_0^D$$

se per D e A sono uguali resa quantica e concentrazione e in assenza di termini correttivi (ovvero non c'è eccitazione diretta dell'accettore). Dal rapporto delle intensità si ricava dunque

$$\frac{I^D}{I^A} = \frac{E}{1 - E}$$

Queste formule si possono applicare con moderato successo alle proteine fluorescenti.

### Spectral bleedthrough

Sappiamo che una delle condizioni necessarie al trasferimento di energie di fluorescenza per risonanza è che lo spettro di emissione del donore si sovrapponga con lo spettro

di assorbimento dell'accettore in maniera sufficiente. Tuttavia, quando l'overlap diventa eccessivo<sup>6</sup> subentra un nuovo problema, noto come **bleedthrough dello spettro** o **crossover**. Questo fenomeno consiste nel fatto che parte dello spettro di assorbimento del donore viene a sovrapporsi allo spettro di assorbimento dell'accettore (*Acceptor Signal Bleed Through*) e parte dello spettro di emissione del donore con quello di emissione dell'accettore (*Donor Signal Bleed Through*). Conseguentemente si forma un rumore di fondo (*background*) che occorre eliminare al fine di ottimizzare la resa grafica degli spettri per ottenere informazioni sui sistemi in esame con la maggior precisione possibile.

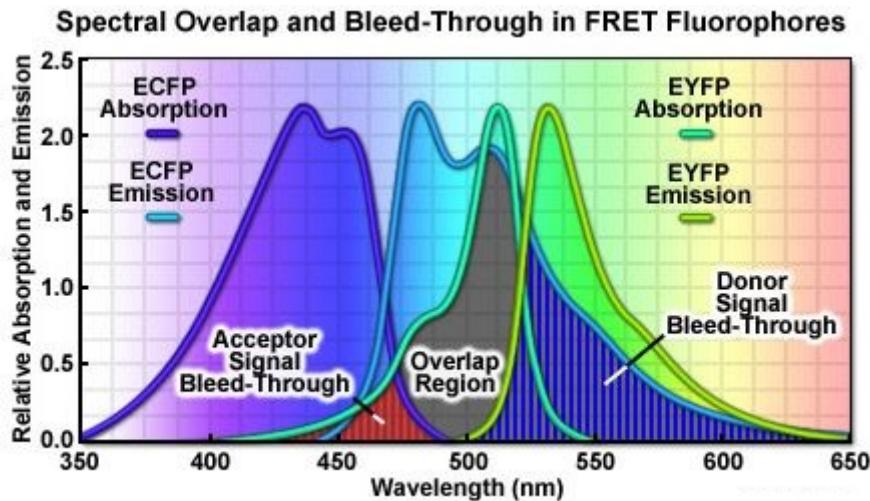


Figura 7.18: Nell'ordine, spettro di assorbimento del donore, emissione del donore, assorbimento dell'accettore, emissione dell'accettore.

La correzione opportuna viene fatta utilizzando una serie di **sette immagini**. Si considerano separatamente:

- Per il campione contenente sia il donore che l'accettore:
  1. lo spettro di assorbimento del donore alla  $\lambda$  di emissione del donore;
  2. lo spettro di assorbimento del donore alla  $\lambda$  di emissione dell'accettore;
  3. lo spettro di assorbimento dell'accettore alla  $\lambda$  di emissione dell'accettore;
- Per il campione contenente solo il donore:
  4. lo spettro di assorbimento del donore alla  $\lambda$  di emissione del donore;
  5. lo spettro di assorbimento del donore alla  $\lambda$  di emissione del donore;
- Per il campione contenente solo l'accettore:
  6. lo spettro di assorbimento del donore alla  $\lambda$  di emissione dell'accettore;
  7. lo spettro di assorbimento dell'accettore alla  $\lambda$  di emissione dell'accettore.

<sup>6</sup>Solitamente questa situazione si verifica quando il ruolo di donori è svolto da più fluorofori. Come conseguenza di ciò le bande di emissione e assorbimento sono più larghe

## NDF: RAGAZZI QUESTO ELENCO PUNTATO NON HA SENSO

La correzione consiste pertanto nell'andare a selezionare le parti di spettro che vengono disturbate in presenza del rumore di fondo nel dettaglio e sovrapporre poi le immagini per ottenere una maggior risoluzione globale.

### Studio dei tempi di vita

In presenza di FRET il tempo di vita dello stato eccitato diminuisce. Per un oggetto che decade in un tempo  $\tau$  l'osservazione deve durare almeno  $3\tau$  ed il tempo utile per l'acquisizione, usando un laser ad impulsi, è quello tra due impulsi successivi (4 ns per un laser in lab). Per raccogliere informazioni su decadimenti più lenti è necessario usare cose che blocchino gli impulsi.

L'acquisizione di un pixel viene effettuata in tempi macroscopici; l'evoluzione del sistema dovrebbe essere rappresentata da due esponenziali: quella del decadimento standard e quella più ripida della coppia donore-accettore. Si possono creare istogrammi della frequenza dei tempi di vita per determinare il tempo medio di decadimento. L'efficienza di transfer viene data dall'equazione

$$E = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D}$$

### Folding di singola proteina

Gli studi di folding su singole proteine sono abbastanza rari. È necessario puntare il laser su un volumetto di soluzione estremamente diluita; le tracce raccolte saranno **picchi** quando la proteina attraversa il volumetto muovendosi casualmente nel campione. L'altezza dei picchi dipende dal punto del fascio in cui passa la proteina: più è vicina al fuoco del fascio maggiore sarà l'intensità della radiazione che colpisce il fluoroforo, che quindi emette maggiormente.

Ripetendo l'osservazione variando la concentrazione di agente denaturante dovrei osservare una riduzione nell'efficienza di FRET

$$E = \frac{I_A}{I_A + I_D}$$

Questo metodo viene usato, ad esempio, per studiare quanto tempo passa il DNA nelle sue diverse conformazioni.

## 7.3 Quenching della fluorescenza

Con il termine *quenching* della fluorescenza ci si riferisce a qualunque processo che diminuisca l'intensità di fluorescenza di un campione. In questo tipo di fenomeni sono inclusi reazioni degli stati eccitati, riarrangiamenti delle molecole, trasferimenti di energia (e.g. FRET), formazioni di complessi nello stato fondamentale e, in senso più generale, interazioni con i costituenti della soluzione. Il quenching infatti avviene quando piccole molecole cariche o neutre (i cosiddetti *smorzatori* o *quenchers*), dissecitano in maniera non radiativa i fluorofori presenti in soluzione.

Le applicazioni biochimiche del quenching sono enormi e sono legate principalmente al ruolo intrinseco che in esso hanno le interazioni tra molecole. Qualsiasi sia il quenching

che stiamo trattando vale che, al termine del processo, né la molecola bersaglio né il quencher vedono alterate la loro natura chimica. Tuttavia è una condizione necessaria perché avvenga che fluoroforo e smorzatore siano in contatto tra loro. Quest'ultimo fatto ci suggerisce come il quenching possa essere utilizzato per rivelare l'accessibilità di un fluoroforo a un quencher. Consideriamo ad esempio un fluoroforo legato ad una proteina o a una membrana. Se questa proteina o membrana è impermeabile al quencher e il fluoroforo è localizzato all'interno della macromolecola, allora non ci sarà modo che fluoroforo e quencher entrino in contatto. L'assenza o la presenza di quenching è quindi un buon indicatore per sondare la localizzazione e l'accessibilità dei fluorofori in alcune zone della macromolecola.

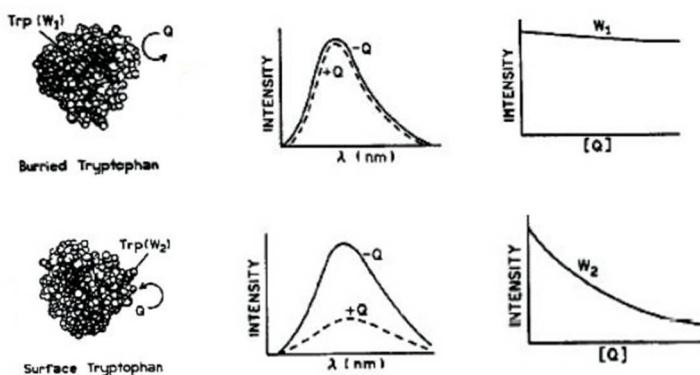


Figura 7.19: Comportamento del triptofano a seconda della sua posizione nella molecola. Quando il quencher viene respinto dalla membrana esterna (riga in alto) non si verifica il fenomeno. Contrariamente nella riga sotto, dove è evidente il quenching, sia dallo spettro di emissione che dal segnale del rivelatore.

Sempre nell'ottica di tracciare un quadro generale (approfondiremo in seguito i singoli aspetti), il contatto tra cromoforo e smorzatore può avvenire in maniera statica o dinamica. Nel caso statico si assiste alla formazione di un complesso non fluorescente tra fluoroforo e quencher. Nel caso dinamico invece, un quencher colpisce, per diffusione, un fluoroforo eccitato determinandone il ritorno allo stato fondamentale senza emissione di radiazione e riducendo quindi la fluorescenza globale (osservata su più cicli). È importante che sia chiaro sin da ora che il fenomeno del quenching dinamico risulta, spettroscopicamente, non nel decadimento del fluoroforo, ma nell'espansione del volume e delle distanze che caratterizzano le osservabili sperimentali all'interno della soluzione. La diffusione del quencher deve avvenire entro il tempo di vita dello stato eccitato del fluoroforo. Se quindi indichiamo con  $\sqrt{\Delta\bar{x}^2}$  lo scarto quadratico medio della distanza entro cui il quencher può diffondere con coefficiente di diffusione D, e con  $\tau$  il tempo di vita dello stato eccitato del cromoforo, affinché ci si contatto tra smorzatore e fluoroforo eccitato dovrà valere:

$$\sqrt{\Delta\bar{x}^2} = \sqrt{2D\tau}$$

Consideriamo ad esempio come smorzatore una molecola di ossigeno in acqua a 25°; il suo coefficiente di diffusione vale  $2.5 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ . In un tipico intervallo di tempo di vita di fluorescenza di 4ns, l'ossigeno può diffondere per 44 Å. Se il tempo di vita è più lungo, le distanze di diffusione possono venire osservate sulle scale delle macromolecole. Infine concludiamo questa introduzione sottolineando che il photobleaching non è pro-

piamente un quenching, dal momento che non si tratta di un processo bimolecolare ma di un contatto fotone-fluoroforo.

### 7.3.1 Quenchers e tipi di quenching

Esiste una vasta gamma di sostanze che agiscono come smorzatori della fluorescenza. Uno dei più diffusi, in grado di interagire con pressoché qualsiasi fluoroforo è l'**ossigeno molecolare**. Sul come esso provochi l'effetto, si ipotizza che il paramagnetismo dell'ossigeno<sup>7</sup> induca il fluoroforo ad andare, tramite intersystem crossing, nello stato di tripletto. Dati i lunghi tempi di vita del tripletto il quenching ha tutto il tempo di agire smorzando completamente la molecola e annullando di fatto la fluorescenza.

Altri quenchers tipici sono l'**acrilmide** (che agisce con il triptofano come cromoforo) e le **ammime**, che causano quenching tramite trasferimenti elettronici. Ancora si ricordano gli alogeni pesanti come **iodio** ( $I^-$ ) o **bromo** ( $BrO_4^-$ ), che, per accoppiamento spin-orbita con il fluoroforo eccitato, favoriscono una transizione singoletto-tripletto del cromoforo che viene così smorzato come già discusso. Anche **atomi pesanti** come  $Cu^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  e  $Mn^{2+}$ , manifestano quenching, probabilmente per donazione di un elettrone da parte del fluoroforo al quencher che fa da accettore.

Per via della varietà di sostanze che possono giocare il ruolo di smorzatori spesso si possono selezionare le coppie fluorofori-quencher in base agli scopi per cui si è pensato un esperimento. È però altresì importante notare che non tutti fluorofori possono essere smorzati da tutte le sostanze qui elencate. L'accoppiamento cromoforo-quencher dipende infatti dalle proprietà biochimiche e covalenti di entrambe e dal particolare ambiente in cui essi si trovano e l'argomento è di particolare complessità ed esula dagli obiettivi di questa trattazione. Basterà sapere che esso dipende da concentrazione, pH, pressione parziale di sostanze chimiche, viscosità, temperatura.

L'alto numero di quenchers ci suggerisce anche che il processo di smorzamento non è unico. Si distinguono infatti tra **quattro tipi di quenching**:

1. autoquenching;
2. quenching chimico;
3. quenching statico;
4. quenching dinamico o collisionale.

Discutiamo qui di seguito brevemente i primi due effetti mentre dedicheremo due sezioni separate agli ultimi due.

Riguardo all'**autoquenching** si già discusso a pagina 53-54 del Volume II, con particolare riferimento alle figure 6.7 e 6.8. Se infatti a basse concentrazioni la dipendenza che lega l'intensità di fluorescenza alla concentrazione della soluzione è lineare secondo le previsioni della 6.16, lo stesso non si può dire ad alte concentrazioni. Il grafico presenta infatti uno scostamento importante dalla retta delle basse concentrazioni. Questo si è già spiegato essere causato dal fatto che ad alte concentrazioni, a mano a mano che l'intensità incidente penetra nel campione, perde progressivamente intensità, riducendo di conseguenza anche l'intensità dello spettro di emissione (Fig 6.8). Se dunque il campione è troppo denso

---

<sup>7</sup>Per via dei suoi due elettroni spaiati a spin parallelo.

appare un effetto schermo sulle molecole della parte più interna del campione. A questo effetto di dà appunto il nome di autoquenching o auto-assorbimento

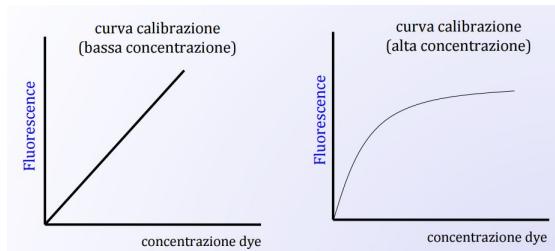


Figura 7.20: Autoquenching dovuto all'alta concnetrazione, a destra

Relativamente al **quenching chimico** sottolineiamo, senza entrare nei dettagli, che in questo caso l'interazione tra cromoforo e smorzatore avviene per contatto di natura chimica o comunque interessando le strutture e i livelli di legame elettronico. Abbiamo già visto, nella discussione dei diversi tipi di quenchers, come sia possibile favorire smorzamento a seguito di interazioni di spin-orbit o trasferimento di elettrone tra le due molecole contraenti. Ricapitoliamo brevemente le cause e gli effetti:

- una *variazione di pH*: ad esempio l'anilina (ammina, aromatico) a pH compresi tra 5 e 13 emette fluorescenza ma per valori di pH minori di 5 o maggiori di 13 non mostra emissione;
- la *presenza di quenchers come ossigeno o alogen*: avendo già discusso del paramagnetismo dell' $O_2$ , ci limitiamo a dire che alogen come cloruro, bromuro, ioduro, o gruppi accettori di elettroni come  $NO_2$  e  $COOH$ , possono smorzare l'eccitazione del fluoroforo per trasferimento di cariche quenchers-fluoroforo ;
- la *presenza di metalli pesanti* che possono indurre quenching a seguito di collisioni di stato fondamentale di tripletto.

### 7.3.2 Teoria del quenching dinamico o collisionale

Il quenching collisionale della fluorescenza è descritto dall'*equazione di Stern e Volmer* che esprime una proporzionalità diretta tra il rapporto delle intensità di fluorescenza in assenza o in presenza di quencher, e la concentrazione di smorzatori presenti nella soluzione. Vediamo dunque di ricavarla presentando l'ormai solito modello matematico. Il label 0 (zero) sarà assegnato alle grandezze in assenza di quencher.

È cosa nota che l'intensità di fluorescenza osservata per un fluoroforo è proporzionale alla sua concentrazione nello stato eccitato, concentrazione che indicheremo con  $[F^*]$ . Sotto l'azione di un'illuminazione costante da parte della sorgente, viene stabilita una popolazione di fluorofori costante nel livello eccitato ragion per cui

$$\frac{d[F^*]}{dt} = 0 \quad (7.16)$$

In assenza di quenchers, l'equazione differenziale 7.16 può essere riscritta come:

$$\frac{d[F^*]}{dt} = f(t) - (k_F + k_{NR})[F^*]_0 = f(t) - \gamma[F^*]_0 = 0 \quad (7.17)$$

mentre in presenza di quenchers diventa

$$\frac{d[F^*]}{dt} = f(t) - (k_F + k_{NR} + k_q[Q])[F^*] = f(t) - (\gamma + k_q[Q])[F^*] = 0 \quad (7.18)$$

nelle quali  $f(t)$  rappresenta la funzione di eccitamento costante e  $\gamma$  è, come si vede,  $\gamma = \tau_0^{-1}$ , vale a dire il tasso di decadimento del fluoroforo in assenza del quencher (è una frequenza, inverso del tempo di vita).

Pertanto, in assenza del quencher il tasso di decadimento *dello stato eccitato* è  $\gamma = (\Gamma + k_{NR})$  dove  $\Gamma = k_F$  è il tasso di decadimento radiativo e  $k_{NR}$  il tasso di decadimento non radiativo. In presenza del quencher c'è un tasso di decadimento aggiuntivo,  $k_q[Q]$ . Se pertanto l'eccitazione proveniente dalla sorgente è continua nel tempo, la 7.16 vale tanto in presenza quanto in assenza di quencher e pertanto, dividendo la 7.18 per la 7.17 si trova

$$\begin{cases} f(t) = \gamma[F^*]_0 \\ f(t) = (\gamma + k_q[Q])[F^*] \end{cases} \implies 1 = \left( \frac{\gamma + k_q[Q]}{\gamma} \right) \frac{[F^*]}{[F^*]_0} = \left( \frac{k_F + k_{NR} + k_q[Q]}{k_F + k_{NR}} \right) \frac{[F^*]}{[F^*]_0} \quad (7.19)$$

da cui troviamo l'**equazione di Stern e Volmer**

$$\boxed{\frac{[F^*]_0}{[F^*]} = \frac{F_0}{F} = 1 + k_q[Q]\tau_0} \quad (7.20)$$

nella quale  $F$  e  $F_0$  sono rispettivamente le intensità di fluorescenza in presenza e assenza del quencher e  $k_q$  è il tasso di decadimento, detto **costante di quenching bimolecolare**. Moltiplicato per il tempo di vita di riferimento è  $\tau_0 k_q[Q]$  che è la costante di Stern e Volmer, indicata compattamente con  $K_D[Q]$  nel caso si sappia per certo che il quenching è dinamico.

Alla stessa equazione si può arrivare anche considerando la frazione di fluorofori eccitati (rispetto al totale) che decadono per fluorescenza. Questa frazione ( $F/F_0$ ) è data dal rapporto tra il tasso di decadimento in assenza di quencher e il tasso in presenza di esso. Il che produce:

$$\frac{F}{F_0} = \frac{\gamma}{\gamma + k_q[Q]} = \frac{1}{1 + \tau_0 k_q[Q]} = \frac{1}{1 + K_D[Q]} \quad (7.21)$$

che è di nuovo l'**equazione di Stern e Volmer**.

Dal momento che il quenching collisionale è un processo che depopola gli stati eccitati, soprattutto per quel che riguarda la misurazione sperimentale, è bene riscrivere l'equazione 7.21 in funzione dei **tempi di vita** osservabili. Avremo dunque che:

$$\begin{aligned} \tau_0 &= \frac{1}{k_F + k_{NR}} \\ \tau &= \frac{1}{k_F + k_{NR} + k_q[Q]} \end{aligned} \implies \frac{\tau_0}{\tau} = 1 + k_q\tau_0[Q] \quad (7.22)$$

e per confronto con la 7.19, si trova

$$\boxed{\frac{\tau_0}{\tau} = \frac{F_0}{F}} \quad (7.23)$$

Si vede così un'importante proprietà del quenching dinamico, e cioè che *esiste una diminuzione equivalente dell'intensità di fluorescenza e del tempo di vita*<sup>8</sup>.

Questo ci dice che l'equazione stessa di Stern e Volmer può essere riscritto sostituendo il lato sinistro con la 7.23. In virtù di questa cosa, i dati sperimentali di misure di quenching vengono sempre riportati in grafici eventi in ordinata  $F_0/F$  o equivalentemente  $\tau_0/\tau$  e in ascissa la concentrazione di quencher  $[Q]$ . La ragione di questa scelta è che ci si attende una dipendenza temporale che intersechi le ordinate in 1 e abbia pendenza data da  $K_D$ , rendendo agevole il confronto tra esperienza e teoria.

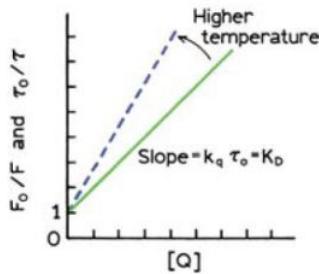


Figura 7.21: Stern-Volmer plot. All'aumentare delle temperatura il quenching dinamico aumenta a sua volta. Questo si spiega pensando che al crescere di T, aumenta anche l'energia cinetica media e quindi il numero di possibili urti tra fluoroforo e quencher. Vedremo che nel caso statico la risposta alla temperatura è opposta.

Un andamento perfettamente lineare è in genere sintomo di una sola classe di quencher, e tutti in grado di arrivare a contatto con il fluoroforo. Nel caso invece in cui i tipi di quencher siano ad esempio due e il fluoroforo sia impermeabile rispetto a uno di questi, il grafico devia dall'andamento rettilineo schiacciandosi verso l'asse delle x.

Infine si vuole ricordare che un andamento lineare del plot  $F_0/F$  (o  $\tau_0/\tau$ ) vs  $[Q]$  lineare *non implica automaticamente che si tratti di quenching dinamico*. Vedremo infatti che anche il quenching statico ha un andamento lineare in questo stesso plot, ma presenterà un comportamento opposto alle variazioni di temperatura.

Riassumendo brevemente quindi, nel quenching dinamico si ha la diffusione di un quencher che collide con un fluoroforo eccitato e lo dissecchia in maniera non radiativa. Sperimentalmente dunque si misurano le intensità del rivelatore e i tempi di vita degli stati eccitati, i quali consentono di trovare due stime della costante di Stern-Volmer e dunque di stimare il quenching. Come già visto per il FRET, la misurazione può essere fatta in condizioni di:

- intensità stazionaria:  $\frac{I_0}{I} = 1 + K_D[Q]$
- intensità risolta nel tempo :  $\frac{\tau_0}{\tau} = 1 + K_D[Q]$

Il legame con il mondo microscopico della materia è invece rappresentato dalla costante  $k_q[Q]$ , **costante di quenching dinamico** che è stata introdotta nel modello come tasso di decadimento aggiuntivo dovuto al quenching e che svolge un ruolo determinante nell'equazione di Stern-Volmer, dal momento che definisce la pendenza della retta nei plot.

<sup>8</sup>Pensandoci bene questa uguaglianza è giustificabile dal fatto che il quenching è per sua definizione un processo di depopolamento dei livelli eccitati (quindi il tempo di vita diminuisce) non radiativo (quindi l'intensità di fluorescenza diminuisce).

Vediamo dunque di darne un'interpretazione più precisa.

Ricordiamo innanzitutto che la diffusione è descritta matematicamente da un sistema di equazioni differenziali che descrivono la variazione di concentrazione nei materiali interessati da diffusione, sul piano spaziale (prima legge) e sul piano temporale (seconda legge). Le equazioni sono note come **leggi di Fick** e legano il flusso  $J, [L^{-2}, T^{-1}]$  e la diffusività  $D, [L^2, T^{-1}]$  con la concentrazione della specie diffondente  $\phi, [L^{-3}]$

$$\begin{aligned} J_{D,\alpha} &= -D_\alpha \frac{dc_\alpha}{dx} && (\text{I legge}) \\ \frac{dc_\alpha}{dt} &= D_\alpha \frac{d^2 c_\alpha}{dx^2} && (\text{II legge}) \end{aligned}$$

Il valore tipico della costante è dell'ordine di  $1 \times 10^{10} M^{-1}s^{-1}$  e il suo significato può essere capito in termini della frequenza di collisioni tra particelle che diffondono liberamente. La frequenza  $Z$  di collisione tra un fluoroforo e un quencher è data da

$$Z = \kappa[Q]$$

dove  $\kappa$  è la costante di reazione bimolecolare guidata per il processo di collisione. Questa costante può essere calcolata dall' **equazione di diffusione di Smoluchowski**<sup>9</sup>, che altro non è che un'equazione di Fick con un termine di smorzamento da attrito viscoso. Ciò che si ottiene è:

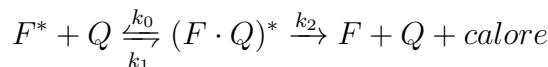
$$\kappa = \frac{4\pi N_{AV} R D}{1000} = \frac{4\pi N_{AV} (R_f + R_q)(D_f + D_q)}{1000}$$

dove  $R$  indica il raggio di collisione che è la somma dei raggi molecolari di fluoroforo  $R_f$  e quencher  $R_q$  e  $D$  la somma dei coefficienti di diffusione dei fluoroforo  $D_f$  e di quencher  $D_q$ .<sup>10</sup>

*La frequenza di collisione  $Z$  è legata alla costante di quenching dinamico dalla efficienza di quenching  $f_Q$ :*

$$k_q[Q] = f_Q \cdot \kappa$$

Il parametro  $f_Q$  indica pertanto quante delle collisioni producono poi effettivamente quenching. Esso viene quindi utilizzato come metro per l'accessibilità dei fluorofori al quencher. Un modo per stimarlo consiste nel studiare il quencher in solventi di viscosità nota. Le reazioni a cui si assisterà saranno la collisione del quencher, la depopolazione del livello eccitato per effetto del quencher e il ritorno non radiativo allo stato fondamentale.



Se:

- $k_2 \gg k_0$ , l'equilibrio è spostato a destra e si parla di quenching molto efficiente;
- $k_2 \ll k_0$ , si parla di bassa efficienza del quenching o di *schermo sterico* del fluoroforo;
- $k_2 \simeq k_1$ ; in questo caso si ha  $f_Q \frac{k_2}{k_1 + k_2 + \gamma}$  il che ci suggerisce che l'efficienza di quenching aumenta nelle soluzioni più viscose, dal momento che in queste la dissociazione tra  $F$  e  $Q$  è più lenta.

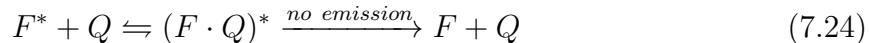
---

<sup>9</sup>L'equazione descrive il flusso diffusivo di una molecola avente coefficiente di diffusione  $D$  attraverso una sfera di raggio  $R$ .

<sup>10</sup>Le due grandezze sono ottenibili dalla legge di Stokes-Einstein  $D = kT/6\pi\eta R$ .

### 7.3.3 Teoria del quenching statico

Nel paragrafo precedente abbiamo discusso degli effetti del quenching sui tempi di vita dei fluorofori per via di fenomeni diffusivi. In questo caso si tratta di processi dipendenti dal tempo. Come però già anticipato il quenching può manifestarsi anche per formazione di un complesso non fluorescente tra il fluoroforo e il quencher. Analogamente a quello che succede per il quenching dinamico, esiste una relazione tra l'intensità di fluorescenza valutata in assenza e presenza del fenomeno e la concentrazione di quencher. Tale legge è facilmente ricavabile se consideriamo la costante di associazione per la formazione del complesso. Ricordando infatti



la costante di associazione è

$$K_S = \frac{[F \cdot Q]}{[F][Q]} \quad (7.25)$$

nella quale  $[F \cdot Q]$  è la concentrazione del complesso,  $[F]$  la concentrazione del fluoroforo non complessato e  $[Q]$  la concentrazione del quencher. Se il complesso che si forma non è fluorescente, allora l'intensità di fluorescenza che rimane visibile è data dalla frazione dei fluorofori non complessati (a reazione avvenuta, all'equilibrio) con il numero totale di fluorofori  $F_0$ ,  $F/F_0$ .

Rammentando che la concentrazione totale di fluorofori è la somma della concentrazione di fluorofori non complessati e di fluorofori complessati, cioè che

$$[F_0] = [F] + [F \cdot Q]$$

la 7.25 diventa

$$\begin{aligned} K_S \frac{[F_0] - [F]}{[F][Q]} &= \frac{[F_0]}{[F][Q]} - \frac{1}{[Q]} \\ \Rightarrow [F_0] - [F] &= [F]K_S[Q] \\ \Rightarrow [F_0] &= [F](1 + [Q]K_S) \end{aligned} \quad (7.26)$$

Sostituendo le concentrazioni di fluorofori con le intensità di fluorescenza in nome della 6.16, si trova

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_S[Q]$$

(7.27)

che a meno del significato della costante è identica nella forma alla 7.21! I plot della legge saranno pertanto ancora rette, con le medesime caratteristiche già discusse sopra: punto di taglio in  $y=1$  e pendenza data dalla costante.

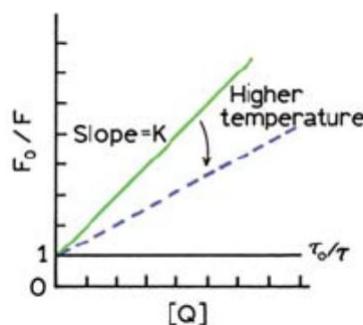


Figura 7.22:

Esattamente come per il quenching dinamico, i dati si ricavano a parte dal segnale di intensità di corrente fornito dal fluorimetro e l'approccio sperimentale potrà essere:

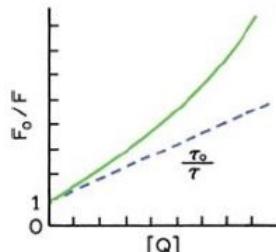
- per intensità stazionaria :  $\frac{I_0}{I} = 1 + K_S[Q]$ ;
- per intensità risolta nel tempo:  $\frac{\tau_0}{\tau} = 1$ . Quest'ultima uguaglianza si spiega considerando che quando si forma il complesso non fluorescente, fuori da questo complesso rimane una parte di fluorofori che sono del tutto imperturbati dalla presenza del quencher e che quindi continuano a fluorescere con il loro tempo di vita che già li caratterizzava in assenza del quencher.

da quanto detto sin qui appare dunque che per distinguere, dai dati sperimentali, se si è in presenza di quenching statico o di quenching dinamico non basta una misura di intensità stazionaria. Dalle correnti si ottiene infatti lo stesso andamento sperimentale in entrambi i casi. I modi per distinguere le situazioni tuttavia esistono e i più usati sono i seguenti tre:

1. Misure di intensità risolte nel tempo. Abbiamo già spiegato le ragioni per cui nel caso statico  $\tau_0/\tau = 1$  mentre in quello dinamico  $\tau_0/\tau = F_0/F$
2. Ripetendo misure stazionarie variando la temperatura si osserva come cambia la pendenza della retta. Se infatti abbiamo detto che per il quenching dinamico la pendenza aumenta all'aumentare di T per il crescere della probabilità di collisioni, nel caso statico l'effetto è l'esatto opposto (Fig. 7.22), poiché un incremento di temperatura determina una denaturazione del complesso e una costante di associazione più debole.
3. Tramite un attento esame dello spettro di assorbimento del fluoroforo. Il quenching dinamico influenza infatti solo gli stati eccitati del fluoroforo e non ci si aspetta nessuna variazione nello spettro di assorbimento in assenza o presenza del quencher. Al contrario, la formazione del complesso non fluorescente nello stato fondamentale apparirà spesso come una perturbazione dello spettro di assorbimento del cromoforo smorzato.

#### 7.3.4 Quenching combinato: statico e dinamico

In molti casi il fluoroforo può essere smorzato dalla collisione e dalla formazione di un complesso con lo stesso quencher. L'aspetto caratteristico del plot di Stern-Volmer per il sistema in queste circostanze è una curvatura verso l'alto, convessa verso l'asse delle y.



In questo caso la frazione di fluorescenza rimanente -  $F/F_0$  - è data dal prodotto tra la frazione di fluorofori non complessati,  $f$ , e dalla frazione di fluorofori non smorzati dalla

collisione. In altri termini, l'equazione che descrive il processo è il prodotto dell'equazione di Stern e Volmer per il contributo dinamico e della 7.27 per quel che riguarda il contributo statico.

$$\frac{F_0}{F} = f \cdot \frac{k_F + k_{NR}}{k_F + k_{NR} + k_q[Q]}$$

$$\boxed{\frac{F_0}{F} = (1 + K_S[Q])(1 + K_D[Q])}$$
(7.28)

Questa equazione modificata di Stern e Volmer è di secondo grado in  $[Q]$ , il che giustifica l'andamento convesso del plot in Fig.7.3.4.

Al fine di poter misurare separatamente i parametri dinamici e i parametri statici, si massaggia la 7.28 di modo da consentire una stima separata dei due contributi almeno a livello grafico. Svolgendo il prodotto delle due parentesi:

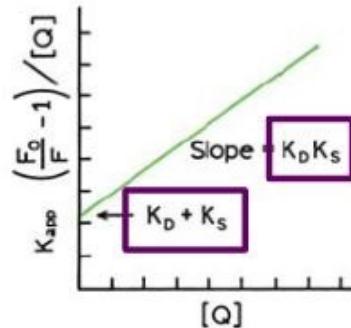
$$\frac{F_0}{F} = 1 + (K_D + K_S)[Q] + K_D K_S [Q]^2$$

$$= 1 + K_{app}[Q]$$
(7.29)

dove abbiamo rinominato

$$K_{app} = \left( \frac{F_0}{F} - 1 \right) \frac{1}{[Q]} = K_D + K_S + K_D K_S [Q]$$
(7.30)

**la costante di quenching apparente.** La costante apparente va ricalcolata ad ogni diversa concentrazione del quencher. Tuttavia essa permette di ritornare ad avere una dipendenza lineare da  $[Q]$  e di trovare  $K_D + K_S$  dall'intercetta e  $K_D K_S$  dal coefficiente angolare:



Il modello di quenching misto è particolarmente utile quindi per approcciarsi a tutte quelle raccolte dati in cui il plot di Stern-Volmer manifesta convessità. Questo succede quando, al di sopra di una concentrazione limite, una parte dei quencher si trova talmente vicino ai fluorofori da avere il 100% di probabilità di quenching.

Un caso interessante che vale la pena di affrontare è quello del quenching subito dalla NATA (N-Acetyl\_Triptofano) per mezzo di acrilamide. La curvatura verso l'alto del plot (Fig. 7.23) potrebbe essere studiata in termine di  $K_D$  e  $K_S$  secondo quanto appena spiegato. Questa analisi conduce ad un valore della costante di associazione  $K_S = 2.8 M^{-1}$ . Tuttavia, un valore tanto piccolo della costante di associazione suggerisce che i fluorofori e i quenchers non formano davvero un complesso nello stato fondamentale. Invece, sembra che la componente statica apparente sia dovuta al fatto che il quencher si trova adiacente

al fluoroforo nel momento dell'eccitazione. Queste coppie fluoroforo-quencher particolarmente vicine sono immediatamente smorzate e di fatto il fluoroforo non è osservabile. Questo tipo di quenching statico apparente è solitamente interpretato in termini di un **volumen attivo** che circonda il cromoforo ed entro il quale la probabilità che avvenga il quenching è 1. L'equazione di Stern e Volmer si modifica dunque in

$$\frac{F_0}{F} = (1 + K_D[Q])e^{V[Q]} \quad (7.31)$$

con  $V[Q]$  il volume attivo. Questa forma dell'equazione è stata derivata calcolando la frazione di fluorofori che non contengono un quencher ad una distanza compresa nella sfera di volume attivo che li circonda. Soltanto i fluorofori che non hanno un quencher adiacente infatti sono osservabili e possono fornire un dato per il grafico.

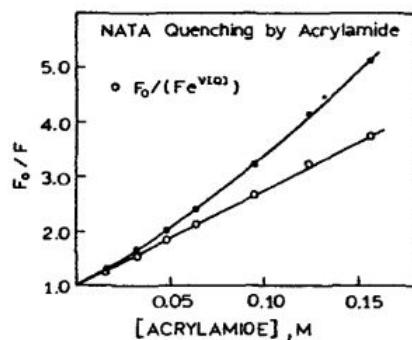


Figura 7.23:

In queste condizioni di stretto contatto tra quencher e fluorofori andrà considerato uno scambio elettronico tra i due come vedremo nel paragrafo successivo. Si tratta fondamentalmente di un effetto puramente quantistico, che richiede la sovrapposizione delle due funzioni d'onda ed è regolato da un rate di trasferimento elettronico esprimibile come

$$k_{scambio\ el}(r) = k_{scambio\ el}(0)e^{-\beta(r-r_c)}$$

dove  $k_{se}(0)$  è il rate alla "distanza di contatto"  $r_c$ , pari alla distanza tra i centri, e  $\beta$  è un opportuno parametro di attenuazione (di solito  $1/\beta = 1\text{\AA}$ )

### 7.3.5 Meccanismi di quenching

Dedichiamo questa sezione d analizzare più nel dettaglio il modo in cui avviene lo smorzamento della fluorescenza. Abbiamo già visto, approssimativamente, come i vari quencher agiscano sui fluorofori eccitati. Nello specifico si distinguono tre meccanismi attraverso i quali avviene quenching:

1. **Intersystem crossing**: soprattutto in presenza di alogenuri pesanti o ossigeno, la collisione di un quencher con il fluoroforo nello stato di singoletto eccitato fa in modo che il cromoforo venga condotto in uno stato di tripletto tramite intersystem crossing per effetto dell'accoppiamento spin-orbita del fluoroforo con l'atomo. L'intervallo temporale per cui vive il tripletto facilita lo smorzamento del fluoroforo, che in tal modo non fluoresce.

2. **Scambio elettronico di Dexter:** un elettrone è trasferito da una molecola donore (fluoroforo) una molecola accettore (quencher) per via non radiativa. Come succede nel FRET, il donore eccitato nello stato LUMO (Lowest Unoccupied Molecular Orbital) passa la sua eccitazione all'accettore, trasferendo però qui direttamente gli elettroni. Da parte sua l'accettore ne rimanda uno al donore dall'HOMO (Highest Occupied Molecular Orbital). In tal modo il donore è completamente non radiativo. Questo è quindi esattamente la fonte del quenching. La condizione necessaria è che donore e accettore siano **molto** vicini e che ci sia sovrapposizione tra gli spettri come nel trasferimento risonante.

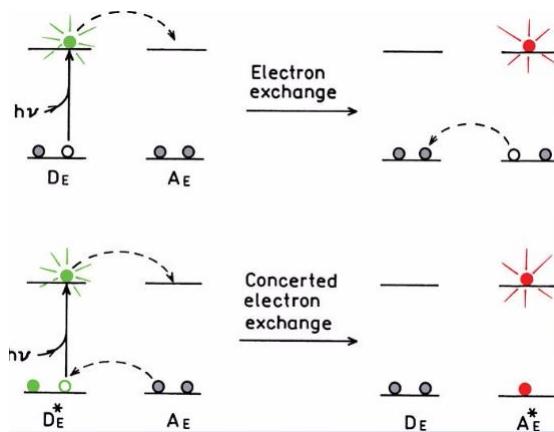


Figura 7.24: Rappresentazione schematica dell'interazione di DExter. In alto il processo è sequenziale, in basso è contemporaneo

3. **Scambio elettronico fotoindotto (PET):** in questo caso, i quencher coinvolti sono molecole che non interagiscono significativamente nel loro stato fondamentale ma che possono legarsi al fluoroforo solo se questo è nel suo stato eccitato (per questo l'effetto si dice *fotoindotto*). In particolare il responsabile di questo comportamento è la formazione del complesso che i quencher determinano: tale complesso tra donore e accettore rende energeticamente sfavorevole la permanenza nello stato fondamentale, così che la diseccitazione tenda a non avvenire. In tal modo non vi è mai emissione fotonica e quindi fluorescenza (quenching).

### 7.3.6 Effetti transienti nel quenching

Nella discussione del quenching collisionale abbiamo assunto che la legge di decadimento dallo stato eccitato a quello fondamentale non venisse modificata dallo smorzamento fluorescente. Pertanto se il decadimento era descritto da un singolo esponenziale in assenza del quenching, anche in presenza di esso rimaneva un singolo esponenziale, ma con un tempo di vita minore. In realtà tutti i decadimenti diventano non esponenziali in presenza di quenchers, dove con non esponenziale si intende non esprimibile come somma di esponenziali. Questo effetto è dovuto a quello che viene chiamato **effetto transiente nel quenching**, tanto più marcato quanto più grande è la concentrazione  $[Q]$ . Smulochowski fu il primo a mostrare che il tasso costante per le reazioni tra due particelle dipendeva dal tempo secondo

$$k(t) = 4\pi RN'D(1 + R/\sqrt{\pi Dt})$$

con  $N' = 6.022 \times 10^{20}$

La dipendenza temporale sorge a causa della distribuzione casuale dei quenchers attorno al fluoroforo al momento dell'eccitazione. Alcune coppie fluoroforo-quencher saranno molto prossime spazialmente, mentre altri saranno distanti tra loro. I fluorofori che hanno un quencher adiacente saranno smorzati immediatamente. Al contrario, a mano a mano che trascorre il tempo da quando avviene l'eccitazione, il sistema di fluorofori evolve e quelli di essi che rimangono nello stato eccitato per più tempo sono quelli che al momento dell'eccitazione si trovavano più lontani dal quencher loro accoppiato. Questo fa sì che per essi sia possibile manifestare quenching collisionale e l'intensità di fluorescenza obbedirà alla legge ottenuta a partire da  $k(t)$ :

$$I(t) = I_0 \exp[(-t/\tau) - 2b\sqrt{t}]$$

dove

$$\frac{1}{\tau} = \frac{1}{\tau_0} + k_q[Q]$$

e

$$b = 4R^2 N' (\pi D)^{1/2} [Q]$$

Per quanto queste equazioni possano sembrare complicate, la situazione effettiva è ancora più complessa. Il modello di Smoluchowski infatti presenta un difetto di realismo non trascurabile. Esso assume che il fluoroforo venga *istantaneamente* disattivato nel momento in cui entra in contatto con il quencher. Questo implicherebbe un gradiente di concentrazione  $[Q]$  infinito intorno al fluoroforo, il che non è realistico.

Come soluzione a ciò vennero proposti due altri modelli, che oltre ad assegnare una dipendenza temporale alla costante di reazione, affiancarono una dipendenza spaziale:  $k = k(r,t)$ .

1. RBC (Radiation Boundary Condition) che assume che il quenching avvenga con un rate  $k$  finito anziché infinito quando cromoforo e smorzatore entrano in contatto. La parte spaziale della costante è dunque

$$k(r) = \kappa \delta(r - a)$$

dove  $a$  è la distanza di massimo avvicinamento tra fluoroforo e quencher e  $\kappa$  è al solito la costante di reazione bimolecolare.

2. DDQ (Distance-Dependent Quenching), modello che assume che il rate di smorzamento dipenda dalla distanza F-Q e per cui la dipendenza spaziale del rate di quenching è

$$k(r) = k_a \exp\left(-\frac{r-a}{r_e}\right)$$

dove  $k_a$  è il rate di reazione alla distanza  $a$  e  $r_e$  è una distanza caratteristica.

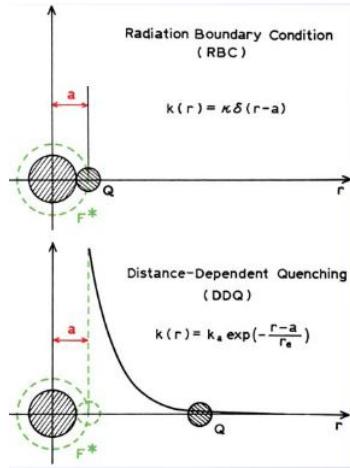


Figura 7.25: Modelli RBC e DDQ

Per entrambi i modelli vale che

$$k(t) = \frac{4\pi}{C_q^0} \int_0^\infty r^2 k(r) C_q(r, t) dr$$

$$I(t) = I_0 \exp(-t/\tau_0) \exp \left[ -[Q] \int_0^t k(t) dt \right]$$

Ribadiamo che si tratta comunque di approssimazioni che vanno ben oltre il primo e il second'ordine e che vengono utilizzate per ottenere alte precisioni su misurazioni fortemente specifiche.

# Capitolo 8

## SPETTROSCOPIA INFRAROSSA IR E FT-IR

La spettroscopia infrarossa è una tecnica di spettroscopia di assorbimento, scoperta nel 1800 da William Herschel e che descrive i *moti vibrazionali delle molecole*.

Come abbiamo già avuto modo di dire nei capitoli precedenti infatti, quando si passa dalla scala atomica a quella molecolare è necessario tener conto di un numero maggiore di gradi di libertà. Ciò fa sì che l'energia di una molecola sia globalmente descritta da tre contributi.

$$\text{energia molecola} = \text{energia elettronica} + \text{energia vibrazionale} + \text{energia rotazionale}$$

Mentre abbiamo visto che la spettroscopia UV-VIS riguarda principalmente transizioni tra stati elettronici, la spettroscopia infrarossa, anche in virtù della minor energia che la caratterizza ( $\nu_{IR} < \nu_{UV}$ ), si occupa di studiare come l'assorbimento di radiazione induca transizioni tra un livello vibzionale fondamentale e un livello vibzionale a energia più alta di uno stesso stato elettronico (in genere dello stato elettronico fondamentale, data la minor richiesta energetica e i tempi di vita più lunghi). La spettroscopia IR è pertanto spesso definita come una **spettroscopia vibzionale**.

In queste circostanze le vibrazioni potranno essere di due tipi: possono riguardare uno stiramento del legame chimico (*stretching: movimento ritmico lungo l'asse internucleare*) oppure una deformazione dell'angolo di legame (*bending*).

Pertanto la principale applicazione di questa spettroscopia riguarda la determinazione dei gruppi funzionali di una molecola: ogni legame infatti ha una frequenza propria e studiando come interagisce con la radiazione IR si può risalire a che tipo di legame e quindi di che tipo di gruppo funzionale si tratta. Vedremo comunque meglio questo aspetto in seguito.

Per questioni di semplicità assumiamo che le vibrazioni siano dovute unicamente al moto dei nuclei. Escluderemo pertanto i moti di traslazione e rotazione della molecola sotto le ipotesi che:

- il baricentro sia fisso, ovvero mi pongo nel sistema con origine il centro di massa. (il che annulla il contributo della traslazione);
- i nuclei sono in moto solo lungo l'asse internucleare (approssimazione con cui annullo le componenti rotazionali).

## 8.1 La radiazione infrarossa

Nello spettro elettromagnetico la radiazione infrarossa si estende lungo un intervallo di lunghezze d'onda che parte da 700 nm (limite con il visibile) e arriva a 1mm (limite con le microonde). Data la vastità di questa estensione l'ampio numero di applicazioni disparate di questa microscopia, convenzionalmente si suddivide ulteriormente la banda IR in tre regioni:

1. la regione del **vicino infrarosso**, con lunghezze d'onda  $0.7 - 2.5 \mu m$  e numero d'onda<sup>1</sup>  $14000 - 4000 cm^{-1}$
2. la regione del **medio infrarosso**, con lunghezze d'onda nel range  $2.5 - 15 \mu m$  e numero d'onda in  $4000 - 667 cm^{-1}$
3. la regione del **lontano infrarosso**, con lunghezza d'onda in  $15 - 300 \mu m$  e numero d'onda compreso tra  $667 - 40 cm^{-1}$

Le bande di assorbimento delle molecole organiche si collocano nella regione medio-lontana, ragion per cui quest'ultima viene di nuovo distinta in

- **regione dei gruppi funzionali (FG)** ( $4000-1400 cm^{-1}$ ) e comprende vibrazioni di stretching (stiramento del legame)
- **regione delle impronte digitali o fingerprint (FP)** ( $1400-40 cm^{-1}$ ) che deve il suo nome alla presenza di bande caratteristiche di ogni molecola perché generate da vibrazioni dell'intero scheletro molecolare e quindi da bending (deformazione del legame).

La radiazione IR ha, in natura, un gran numero di sorgenti. Basti pensare che circa il 52.7% dello spettro della luce solare è composto da radiazione infrarossa (44.5% VIS e 3.2% UV). In linea di principio, il modello di Planck ci insegna che qualsiasi corpo nero (core stellare) a una determinata temperatura è un emettitore di raggi infrarossi. Abbassandoci ai livelli della vita terrestre, anche se con una forte approssimazione, qualunque corpo avente una determinata temperatura che consenta l'emissione di radiazione alle frequenze dell'IR è una potenziale sorgente. Proprio su questo principio si basano le più disparate applicazione della spettroscopia infrarossa. Qualunque sistema che coinvolga variazioni di temperatura o calore rispetto all'ambiente è individuabile in tal modo. Questo è il motivo per cui la spettroscopia IR la ritroviamo:

1. nei telescopi e nei satelliti per osservare stelle e pianeti;
2. per trovare le perdite di calore negli edifici;
3. per individuare esseri viventi;
4. per determinare variazioni di flusso sanguigno;
5. per osservare surriscaldamento di apparati elettrici;

---

<sup>1</sup>Il numero d'onda  $\bar{\nu}$  è il numero di oscillazioni di un'onda nell'unità di lunghezza ed è definito come il reciproco della lunghezza d'onda. Viene spesso utilizzata in spettroscopia IR come parametro alternativo a  $\lambda$ .

6. negli strumenti di visione notturna, nei sensori di temperatura a lungo raggio, nelle comunicazioni senza fili a corto raggio;
7. nella spettroscopia analitica (ogni sostanza assorbe a una determinata  $\lambda$ , ragion per cui il suo spettro di assorbimento funge da carta di identità di essa).

A queste fanno poi da contorno le innumerevoli applicazioni in campo biomedico tra le quali ricordiamo la determinazione qualitativa e quantitativa dei componenti di una sostanza, le analisi strutturali con individuazione dei gruppi funzionali presenti, la rivelazione di impurezze, isometrie geometriche cis-trans e acqua.

## 8.2 I principi dell'assorbimento IR

Il sostrato teorico su cui si mantiene la spettroscopia vibrazionale è sostanzialmente lo stesso di quello visto nel Capitolo 4 dedicato all'assorbimento UV-VIS. L'assorbanza è ancora determinata dalla legge di Lambert-Beer, l'intensità di assorbimento sarà invece espressa dalla forza del dipolo di transizione, mentre sarà possibile osservare dicroismo circolare illuminando campioni orientati con luce polarizzata. Ci si potrebbe quindi aspettare che i risultati prodotti da questa spettroscopia siano abbastanza simili a quelli ottenibili dall'analisi nelle regioni UV-VIS. Tuttavia l'utilizzo degli infrarossi è più limitato di questi ultimi. Le ragioni di questo vanno ricercate nel fatto che, poiché le energie coinvolte sono più basse di quelle ultraviolette, anche le intensità degli spettri lo saranno. Inoltre l'acqua, principale solvente per preparare i campioni, assorbe fortemente nella regione IR in cui assorbono anche proteine e acidi nucleici, disturbando di molto le informazioni ottenibili dagli spettri e rendendo meno sensibili la strumentazione coinvolta. Nonostante questo è comunque una tecnica che ha dei vantaggi e che quindi merita di essere approfondita.

Qui e nel seguito useremo il seguente modello approssimativo: *in ogni molecola, atomi o gruppi di atomi sono connessi da legami covalenti simili a molle vibranti e di natura non rigida, a lunghezza media. Ogni oscillazione riguarderà pertanto una coppia di atomi; in particolare gli atomi legati sentono forze diverse perché hanno masse diverse. La costante sarà l'accelerazione a cui i due atomi sono sottoposti. La scomposizione dell'oscillazione nei suoi due modi normali, mostrerà che gli atomi meno massivi tenderanno quindi ad oscillare con frequenza maggiore.*

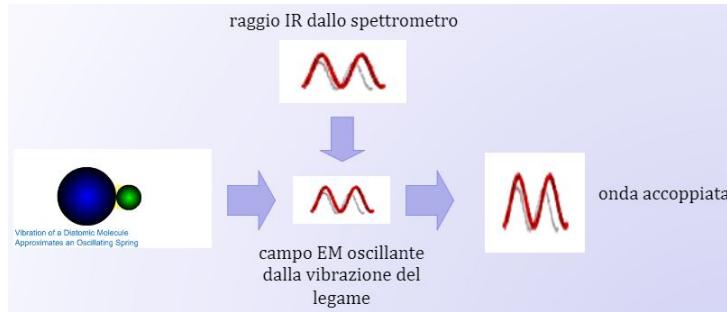
Iniziamo chiedendoci come si formano i picchi nello spettro di assorbimento.

Le condizioni affinché una radiazione a frequenze infrarosse provochi delle transizioni vibrazionali all'interno della molecola sono infatti tre:

1. deve essere soddisfatta la **regola di selezione IR**: il momento di dipolo della molecola deve cambiare in seguito all'assorbimento;
2. la frequenza infrarossa applicata deve essere **uguale** alla frequenza naturale della vibrazione
3. i legami covalenti tra atomi devono essere di natura **polare** di modo che vi sia una debole; separazione di cariche e alla molecola sia associato un dipolo elettrico (non va quindi bene un legame ionico). Sono pertanto favorite le **molecole asimmetriche**.

Andando più nel dettaglio, quando un legame covalente viene messo in vibrazione (qui approssimata ad un'oscillazione armonica), a causa delle oscillazioni del dipolo della molecola  $\bar{\mu} = \sum_i e_i \mathbf{r}_i$ , viene prodotto un campo elettromagnetico variabile (oscillante nel

tempo). Maggiore è la variazione del momento di dipolo durante la vibrazione e più intenso sarà il campo elettromagnetico generato. Ora, se la radiazione IR applicata ha la stessa frequenza del campo elettromagnetico oscillante generato dal dipolo oscillante, le due onde si sommano in fase costruttivamente e si ottiene un'oscillazione sola ma di ampiezza raddoppiata. Ciò determina la comparsa di un picco nello spettro di assorbimento.



Si può dunque capire come effettivamente funziona la spettroscopia IR. Gruppi funzionali diversi hanno momenti di dipolo diversi e pertanto assorbono meglio frequenze IR caratteristiche. Dall'analisi delle lunghezze d'onda dei picchi di assorbimento si può risalire a quale gruppo funzionale lo ha prodotto. In questo senso *lo spettro IR di una sostanza chimica è la sua impronta digitale, per la sua univoca identificazione*.

### 8.2.1 Trattazione classica del modello

Un primo approccio in grado di fornire una stima della posizione delle bande consiste nel considerare un sistema di due atomi legati come un molla *classica*. Essa obbedirà pertanto alla **legge di Hooke**  $\bar{F} = -k\bar{x}$  dove la costante elastica gioca qui il ruolo di approssimare la forza di legame. In particolare ricordiamo che l'espressione di  $k$  può essere ottenuta risolvendo il moto armonico (tralascieremo il segno di vettore per semplicità di scrittura):

$$\begin{aligned} F = ma &\implies -kx = m \frac{d^2x}{dt^2} \\ &\implies \frac{d^2x}{dt^2} = -\frac{k}{m}x \\ &\implies x(t) = Ae^{i\sqrt{\frac{k}{m}}t} + Be^{-i\sqrt{\frac{k}{m}}t} \\ &\implies x(t) = C \sin\left(\sqrt{\frac{k}{m}}t\right) = C \sin(\omega t) \end{aligned}$$

da cui si ha la costante in funzione della *pulsazione* dell'oscillazione:

$$\omega = \sqrt{\frac{k}{m}} \iff k = m\omega^2 \quad (8.1)$$

Le grandezze a cui siamo interessati per descrivere la vibrazione di una molecola a seguito di un raggio IR incidente sono la frequenza e la massa degli atomi coinvolti. Cambiando sistema di riferimento e ponendoci nel centro di massa, il problema a due corpi dei due atomi può essere ricondotto a un problema a un solo corpo, descritto dall'unica coordinata

relativa. Introduciamo dunque la *massa ridotta* del sistema

$$\mu = \frac{m_1 \cdot m_2}{m_1 + m_2} \quad (8.2)$$

La frequenza del sistema sarà pertanto ora univoca, non dipendendo più dalle masse dei singoli atomi e verrà quindi espressa da

$$\nu = \frac{\omega}{2\pi} = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (8.3)$$

in cui  $k$  è appunto la **costante di forza** espressa in (dyne/cm).

La 8.3 consente di individuare approssimativamente la posizione dei picchi di assorbimento, dal momento che essa fornisce la frequenza del campo prodotto dal dipolo. Si osservi che la frequenza così trovata dipende:

- **inversamente** dalla massa ridotta;
- **direttamente** dalla costante di forza: questo significa che atomi legati da legami multipli assorbono a frequenza più alta di atomi legati da legami semplici;
- dalla **geometria della molecola**. Stando alle prime due affermazioni infatti si potrebbe pensare che tra i due oscillatori C-H e F-H, la frequenza di assorbimento di F-H sia minore di quella di C-H in nome della maggior massa ridotta dei primi. Tuttavia nella tavola periodica  $k$  aumenta da sinistra a destra nelle righe e l'effetto dell'incremento di  $k$  è più importante di quello della massa. Per questa ragione F-H assorbe comunque a frequenza maggiori di C-H.

La posizione del picco nello spettro è naturalmente individuata dalla relazione di dispersione  $\lambda = c/\nu$ . Data però la natura della trattazione fortemente basata sulle frequenze coinvolte, si preferisce spesso far uso, negli spettri, del numero d'onda  $1/\lambda$  come appunto già osservato.

La limitatezza del modello classico è evidente. Stiamo infatti trattando una generica vibrazione, ovvero una qualunque variazione di forma nella molecola, semplicemente con una molla classica. Il modello in particolare non tiene conto del fatto che le singole coppie di atomi sono circondate da altri oscillatori e che la vibrazione di una delle molle induce una ulteriore vibrazione anche nelle molle vicine.

### 8.3 La descrizione quantistica dell'assorbimento IR

Un livello decisamente più approfondito e che tenga conto delle scale microscopiche dei legami di cui stiamo parlando è fornito, al solito, dalla meccanica quantistica.

Consideriamo di nuovo l'interazione tra due nuclei, divisi da una distanza  $r$ . Il potenziale che descrive la loro interazione è raffigurato nel grafico che segue:

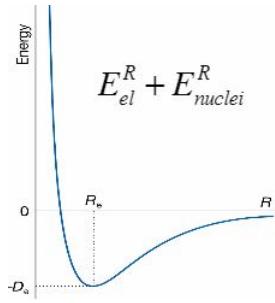
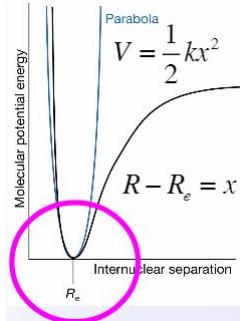


Figura 8.1:  $R_0$  indica la distanza tra i due atomi tale per cui sia nulla la forza di interazione tra di essi: la molecola è in equilibrio.

In un intorno del minimo di questo potenziale, la curva è approssimabile a un ramo di parabola, vale dire da un potenziale puramente armonico. Per piccole vibrazioni vale l'approssimazione del potenziale con quello di un oscillatore armonico quantistico, ragion per cui ha senso modellizzare il legame tra i due atomi con un oscillatore armonico, pur sempre se limitato a quell'intorno:



L'hamiltoniana dell' $N$ -esimo sistema a due atomi sarà pertanto del tipo

$$\hat{H}_N = \hat{T}_N + \frac{1}{2}kx^2$$

mentre l'equazione di Schrödinger sarà risolta nello spazio dall'equazione gli autovalori

$$\left( \hat{T}_N + \frac{1}{2}kx^2 \right) \psi_n(x) = E_n \psi_n(x)$$

dove le energie  $E_n$  tengono conto sia delle energie elettroniche che di quelle nucleari, così come le autofunzioni soluzione sono funzioni sia della posizione degli elettroni che di quella dei nuclei:  $E_n = (E_r + E_R)_n$  e  $\psi_n = \psi(r, R)_n$ . Dalla trattazione quantistica dell'oscillatore armonico sappiamo che i livelli di energia sono discreti ed obbediscono alla legge

$$E_n = \hbar\omega \left( n + \frac{1}{2} \right) = h\nu \left( n + \frac{1}{2} \right) \quad (8.4)$$

mentre gli autostati si trovano nella forma

$$\psi_n = \left( \frac{\mu\omega}{\hbar\pi} \right)^{\frac{1}{4}} \frac{H_n \left( \sqrt{\frac{\mu\omega}{\hbar}} x \right)}{\sqrt{2^n n!}} e^{-\frac{\mu\omega}{2\hbar} x^2} \quad (8.5)$$

nella quale  $H_n$  indica l' $n$ -esimo polinomio di Hermite.

Come già fatto per il caso dell'assorbimento ultravioletto e visibile, supponiamo valida

l'approssimazione di Born-Oppenheimer, che consente la separazione del moto dei nuclei (label R) da quello degli elettroni (label r). In tal maniera possiamo riscrivere l'autostato come prodotto<sup>2</sup> dell'autostato riferito al moto nucleare e dell'autostato riferito al moto elettronico  $\psi_n = \psi_0(r, R)\phi_\nu(R)$ , dove con  $\phi_0(r, R)$  si indica la funzione d'onda dello stato elettronico fondamentale e  $\phi_\nu(R)$  è il livello vibrazionale che oscilla con frequenza  $\nu$  per via dei gradi di libertà nucleari. Una generica transizione tra livelli vibrazionali dello stato elettronico fondamentale, provocata dall'assorbimento, sarà quindi esprimibile come

$$\psi_0(r, R)\phi_\nu(R) \rightarrow \psi_0(r, R)\phi_{\nu'}(R)$$

Ancora una volta, come nel caso UV-VIS, la transizione è regolata dall'operatore dipolo elettrico  $\bar{\mu}$ .

Se i nuclei sono statici, il dipolo elettrico è funzione solo delle coordinate degli elettroni e si ha che il dipolo di transizione è:

$$\mu_{trans} = \langle \psi_0 \phi_\nu | \bar{\mu} | \psi_0 \phi_{\nu'} \rangle = \langle \psi_0 | \bar{\mu} | \psi_0 \rangle \cdot \langle \phi_\nu | \phi_{\nu'} \rangle = 0 \quad (8.6)$$

dove l'ultima uguaglianza è dovuta all'ortonormalità delle funzioni d'onda di due livelli vibrazionali diversi.

Se i nuclei sono in moto attorno alla posizione di equilibrio  $R_0$ , allora il dipolo elettrico dipende implicitamente dalla coordinata R, poiché la posizione degli elettroni cambia al cambiare di R. In questo caso l'operatore  $\bar{\mu}(r)$  può essere espanso in serie di Taylor attorno alla posizione di equilibrio dei nuclei  $R_0$ :

$$\bar{\mu}(r, R) = \bar{\mu}(r, R_0) + \left( \frac{\partial \bar{\mu}(r)}{\partial R} \right) \Big|_{R_0} (R - R_0) + o(R - R_0)^2 \quad (8.7)$$

di modo che il dipolo di transizione diventa

$$\begin{aligned} \mu_{trans} &= \langle \psi_0 \phi_\nu | \bar{\mu} | \psi_0 \phi_{\nu'} \rangle \\ &= \langle \psi_0 \phi_\nu | \bar{\mu}_0 | \psi_0 \phi_{\nu'} \rangle + \langle \psi_0 \phi_\nu | [\partial \bar{\mu} / \partial R]_{R_0} (R - R_0) | \psi_0 \phi_{\nu'} \rangle \end{aligned} \quad (8.8)$$

Nella 8.8 il primo termine è nullo per quanto dimostrato nel caso in cui i nuclei sono statici. Inoltre la derivata parziale è valutata in un punto, cosicché una volta sostituita la coordinata  $R_0$  essa è funzione solo della posizione degli elettroni. Come conseguenza di ciò la 8.8 può essere fattorizzata in due termini: un integrale elettronico e un integrale vibrazionale:

$$\mu_{trans} = \langle \psi_0 | [\partial \bar{\mu} / \partial R]_{R_0} | \psi_0 \rangle \cdot \langle \phi_\nu | R - R_0 | \phi_{\nu'} \rangle \quad (8.9)$$

che valutata nel punto restituisce la **regola di selezione** per la transizione vibrazionale:

$$\mu_{trans} = \left( \frac{\partial \bar{\mu}}{\partial R} \right) \Big|_{R_0} \langle \phi_\nu | R - R_0 | \phi_{\nu'} \rangle \quad (8.10)$$

o in modo del tutto equivalente compattando  $R - R_0 = x$  e unendo le scritture delle due funzioni d'onda vista l'influenza finale della funzione d'onda elettronica

$$\mu_{trans} = \left( \frac{\partial \bar{\mu}}{\partial x} \right) \Big|_0 \langle \psi_n | x | \psi_{n'} \rangle$$

(8.11)

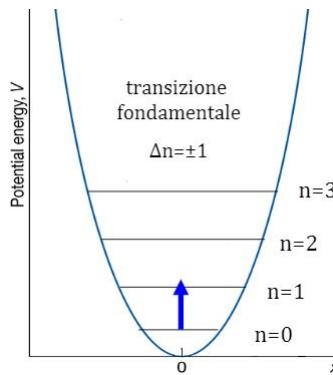
Ne ricaviamo dunque due regole di selezione:

---

<sup>2</sup>Per maggior chiarezza vedere la trattazione del Capitolo 4, sezione 4.4.

1. una **generale**:  $\left(\frac{\partial \bar{\mu}}{\partial x}\right) \Big|_0 \neq 0$  che ci dice che il momento di dipolo deve variare con la coordinata vibrazionale affinché avvenga una transizione (in caso contrario ricadiamo nel caso di nuclei statici dove abbiamo mostrato che la probabilità di transire è nulla);
2. una **specificia**:  $\langle \psi_n | x | \psi_{n'} \rangle \neq 0$  che ci dice che le transizioni avvengono solo tra stati con  $\Delta n = \pm 1$ .

Questo si capisce infatti se riscriviamo la variabile  $x$  in termine degli operatori di creazione e distruzione dell'oscillatore armonico  $a$  e  $a^+$ . Non svolgiamo i calcoli per l'ovvietà della questione.

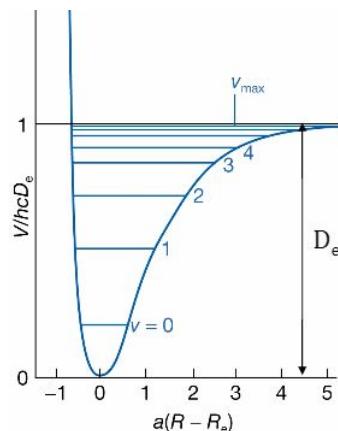


L'approssimazione armonica utilizzata fin qui vale soltanto nell'intorno del punto di equilibrio dove il potenziale di interazione è effettivamente sovrappponibile a una parabola. Tuttavia, se si vuole offrire un descrizione più completa delle transizioni vibrazionali, occorre tener conto di un range più ampio di distanze tra i due nuclei, allontanandosi quindi dal punto di equilibrio. Il potenziale che a questo punto si utilizzerà per la trattazione non sarà più una parabola, bensì un **potenziale di Morse**, che assume una forma più verosimile a quello reale:

$$V(x) = D_e(1 - e^{-ax})^2 \quad (8.12)$$

con  $D_e$  profondità della buca<sup>3</sup> e

$$a = \left(\frac{k}{2D_e}\right)^{\frac{1}{2}}$$



<sup>3</sup>In termini energetici è la differenza tra il livello di energia dello stato fondamentale e l'energia di disassociazione.

Si può dimostrare che in questo caso i livelli energetici sono nella forma

$$\begin{aligned} E_n &= \left(n + \frac{1}{2}\right) \hbar\omega - \left(n + \frac{1}{2}\right)^2 \hbar\omega b \\ b &= \frac{\hbar a^2}{2\mu\omega} \end{aligned} \quad (8.13)$$

con  $b$  **costante di anarmonicità**. Avendo cambiato il potenziale ci aspettiamo che siano cambiate anche le regole di selezione. Per vedere questo cerchiamo una *approssimazione armonica* di questo nuovo potenziale sviluppandolo attorno al punto di minimo:

$$V = V_0 + \left(\frac{dV}{dx}\right)\Big|_0 x + \frac{1}{2} \left(\frac{d^2V}{dx^2}\right)\Big|_0 x^2 + \frac{1}{3!} \left(\frac{d^3V}{dx^3}\right)\Big|_0 x^3 + \dots \quad (8.14)$$

I primi due termini dello sviluppo sono nulli: il primo perché  $V_0$  è il potenziale nell'origine degli assi (vedi figura), mentre il secondo perché  $x = 0$  è un punto di minimo e quindi ha derivata prima nulla. Il terzo termine è invece proporzionale a un termine quadratico in  $x$ , quindi ad un potenziale armonico. Pertanto il potenziale di Morse può essere approssimato con un potenziale armonico del tipo

$$V = \frac{1}{2} \left(\frac{d^2V}{dx^2}\right)\Big|_0 x^2 \quad (8.15)$$

Il quarto termine nello sviluppo della 8.14 esprime invece l'**anarmonicità meccanica** ed è una perturbazione che mescola le autofunzioni dell'oscillatore armonico, rendendo la forza di richiamo non più proporzionale allo spostamento e la frequenza non indipendente dall'ampiezza.

Se il potenziale è anarmonico, saranno anarmoniche anche le funzioni d'onda soluzioni dell'equazione di Schrödinger e pertanto anche i dipoli elettrici. Se infatti pensiamo di sviluppare il dipolo elettrico analogamente a come fatto in 8.7, è necessario andare oltre il primo ordine per poter mettere in luce gli effetti di anarmonicità del potenziale di Morse (che devono essere considerati perché stiamo cercando un modello il più veritiero possibile!). Avremo quindi

$$\bar{\mu} = \bar{\mu}_0 + \left(\frac{d\bar{\mu}}{dx}\right)\Big|_0 x + \left(\frac{d^2\bar{\mu}}{dx^2}\right)\Big|_0 x^2 \quad (8.16)$$

dove il terzo termine, detto di **anarmonicità elettrica**, mette in luce che *la variazione del momento di dipolo non è più proporzionale allo spostamento del nucleo*. Questo contributo di anarmonicità serve anche a giustificare la non perfetta equispaziatura tra i livelli vibrazionali di uno stato elettronico.

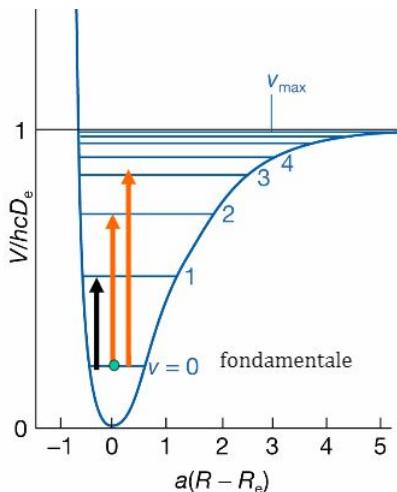
Se questo è l'operatore dipolo elettrico, allora il dipolo di transizione diventerà

$$\mu_{trans} = \left(\frac{d\mu}{dx}\right)\Big|_0 \langle \Psi'' | x | \Psi' \rangle + \frac{1}{2} \left(\frac{d^2\mu}{dx^2}\right)\Big|_0 \langle \Psi'' | x^2 | \Psi' \rangle \quad (8.17)$$

in cui le  $\Psi$  che compaiono sono le soluzioni dell'equazione agli autovalori ottenuta con l'hamiltoniana scritta in termini del potenziale di Morse e non più di quello quantistico. Non sappiamo che forma esplicita hanno; basti sapere che esse sono un mescolamento delle funzioni d'onda di oscillatore armonico, con diverse componenti associate a diversi numeri

quantici. Si può inoltre dimostrare che *la bra-ket contenente il termine quadratico non si annulla per  $\Delta n = \pm 2, 3, \dots$* , il che ci dice che, con il potenziale di Morse, sono possibili le transizioni  $n = 0 \rightarrow n = 2$ ,  $n = 0 \rightarrow n = 3$ , ...

La 8.17 può dunque essere interpretata come la vera regola di selezione per le transizioni vibrazionali a seguito di assorbimento IR. Le anarmonicità meccanica e elettrica rendono possibili, seppur debolmente, le transizioni proibite dal modello classico  $\Delta n > \pm 1$ .



Le transizioni dall'armonica fondamentale alle armoniche superiori sono "debolmente permettute" e sperimentalmente si vedono più deboli della fondamentale.

Se il potenziale fosse armonico esse avrebbero frequenza doppia, tripla, multipla intera. L'anarmonicità elettrica garantisce invece una distribuzione irregolare dei livelli vibrazionali, cosicché confrontando i dati sperimentali con le frequenze o lunghezze d'onda che ci si attenderebbero dal modello armonico si può stimare la perturbazione anarmonica del potenziale.

#### 8.4 Tipi di vibrazioni

Abbiamo già detto che le possibili vibrazioni possono essere distinte in stretching e in bending. È però possibile andare più a fondo in questa classificazione e in particolare:

- le vibrazioni di tipo *stretching*, che ricordiamo essere uno stiramento della molecola lungo l'asse del legame che lascia invariato l'angolo di legame e ne modifica invece la distanza, si manifestano ad alte energie ( $4000\text{-}1250\text{ cm}^{-1}$ ) si dividono in
  1. **stretching simmetrico** se nello stiramento i due atomi si spostano della stessa quantità: la lunghezza dei due legami aumenta o diminuisce simultaneamente;
  2. **stretching asimmetrico** se nello stiramento i due atomi si spostano di quantità diverse: in particolare la lunghezza di un legame aumenta mentre l'altro diminuisce.
- le vibrazioni di tipo *bending*, che non sono lungo la direzione del legame, causando così la deformazione della molecola, determinano la variazione dell'angolo di legame lasciando invariata la distanza tra gli atomi, si manifestano a bassa energia ( $1250\text{-}667\text{ cm}^{-1}$ ) si differenziano tra:

1. bending in piano, ulteriormente divise in:
  - (a) **scissoring** se il bending è in direzioni opposte: due atomi si avvicinano, gli angoli di legame diminuiscono;
  - (b) **rocking** se il bending è nella stessa direzione: gli atomi mantengono la distanza e si muovono nella stessa direzione.
2. bending fuori piano, distinguibile in:
  - (a) **wagging**, se escono dal piano nello stesso verso: i due atomi si muovono simultaneamente al di sopra e al di sotto del piano;
  - (b) **twisting**, se escono dal piano con versi opposti: un atomo si muove al di sopra del piano mentre l'altro si muove al di sotto del piano e viceversa.

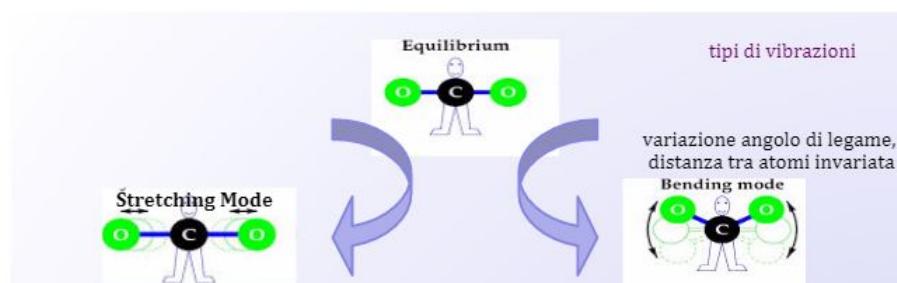


Figura 8.2: Rappresentazione schematica dei due tipi di vibrazioni. Le singole sottodivisioni sono animate su Wikipedia.

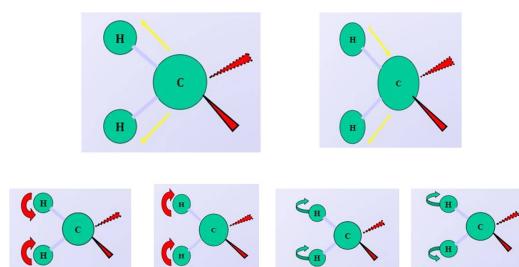
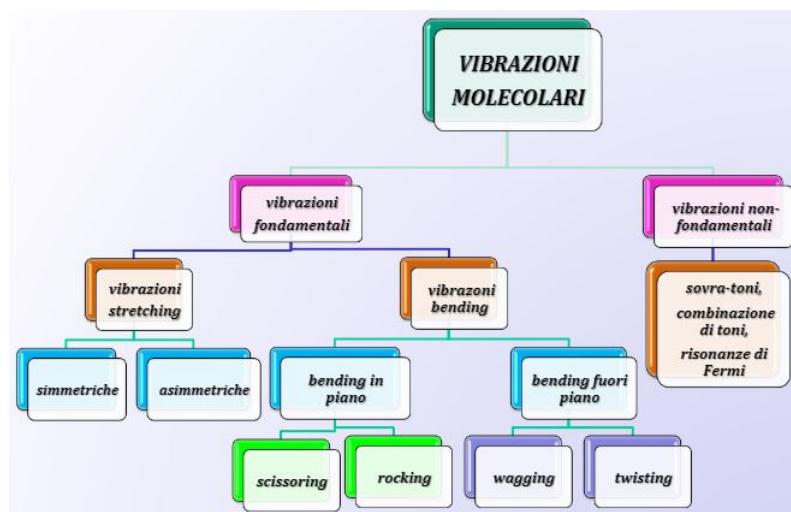


Figura 8.3: Rappresentazione schematica delle sottoclassi di vibrazioni fondamentali. In alto per lo stretching (nell'ordine, simmetrico e asimmetrico), in basso per il bending (nell'ordine, scissoring, rocking, wagging, twisting).

Una trattazione più generale possibile sarà però ancora più specifica. Le molecole sono sistemi particolarmente complessi, formati da un numero elevatissimo di oscillatori anarmonici atomo-atomo, che per altro si influenzano tra loro se sono adiacenti. Le vibrazioni possibili sono quindi di vario tipo e la classificazione che se ne fa è comunque sempre un'approssimazione da leggere come tentativo di dare un quadro e un ordine a un fenomeno che di per sé è solo che caotico. Diciamo dunque che le vibrazioni molecolari possono essere divisi in due grandi sottoclassi, vale a dire in **vibrazioni fondamentali** e in **vibrazioni non-fondamentali**. Le fondamentali si dividono poi in bending e stretching e da qui ulteriormente come appena visto. Le non-fondamentali si classificano invece in

- **sovra-toni:** si osservano ad una frequenza doppia rispetto a quella di una banda di assorbimento forte;
- **combinazioni di toni:** si tratta di bande deboli che compaiono occasionalmente a frequenze che sono la somma o la differenza di due o più bande fondamentali;
- **risonanze di Fermi:** risultano dall'interazione tra la vibrazione fondamentale e sovra-toni o combinazioni di toni.

Non approfondiremo oltre su questi tre punti. Basti solo sapere che le transizioni  $n = 0 \rightarrow n = 1$  sono caratterizzate da vibrazioni fondamentali; transizioni  $n = 0 \rightarrow n = 2$  sono caratterizzate da sovra-toni; transizioni  $n = 1 \rightarrow n = 2$  genereranno invece "hot-band", ovvero una banda di assorbimento le cui proprietà dipenderanno dalla temperatura a cui si trovano i livelli vibrazionali. Per consolidare questa suddivisione rimandiamo all'immagine che segue:



## 8.5 Strumentazione

I dispositivi strumentali oggi a nostra disposizione per ottenere spettri nel medio e lontano IR (lo studio e le applicazioni del vicino infrarosso sono relativamente recenti) sono sostanzialmente di due tipi:

- spettrometri a dispersione;
- spettrometri a interferenza.

I primi sono senz'altro quelli maggiormente diffusi nei moderni laboratori, soprattutto per motivi di costo; i secondi offrono invece prestazioni senz'altro superiori ma i costi sono decisamente più elevati. L'intervallo di lunghezze d'onda coperto dagli strumenti è generalmente compreso tra 4000 e 625 cm<sup>-1</sup>, corrispondente al medio IR, ma sono anche molto diffusi quelli con intervallo spettrale esteso verso  $\lambda$  più elevate, fino a 400 e 200 cm<sup>-1</sup>, che include anche il lontano IR.

### 8.5.1 Spettrometro IR a dispersione

Gli spettrometri a dispersione vennero utilizzati sin dagli anni '40 e rappresentano lo strumento che storicamente ha rappresentato l'avanzare degli esperimenti di assorbimento infrarosso.

Ne esistono di due tipi: quelli con sorgente a un raggio e quelli con sorgente a doppio raggio. È per di più diffusa la versione a doppio raggio: un dispositivo (chopper) ripartisce la radiazione continua emessa dalla sorgente in due fasci di uguale intensità. Uno dei fasci viene fatto passare attraverso il campione, l'altro serve come riferimento ed attraversa di solito l'aria e, nel caso di soluzioni, una cella contenente il solvente puro. Dopo di che i due fasci sono nuovamente riuniti.

L'elemento disperdente, che in passato era un monocromatore a prisma, è stato sostituito da un monocromatore a reticolo; questo perché, alle frequenze dell'IR, l'indice di rifrazione del prisma determinava una dispersione troppo piccola, non consentendo una corretta selezione delle lunghezze d'onda, cosa invece possibile con la diffrazione prodotta da un reticolo.

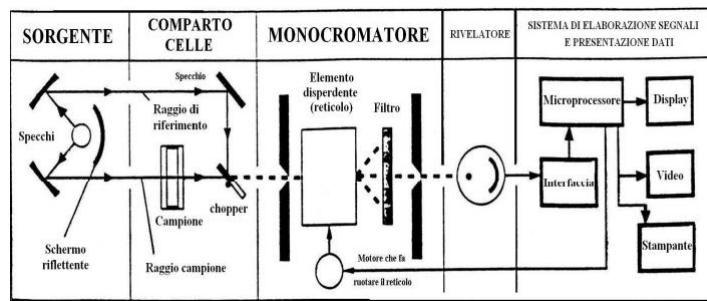


Figura 8.4: Spettrometro IR a dispersione

**Approfondimento 8.5.1.1.** *La registrazione dello spettro avviene come segue: il chopper indirizza sul rivelatore il raggio campione ed il raggio di riferimento in maniera alternata (ciò permette di effettuare un confronto continuo fra l'intensità dei due raggi). Fin-tantoché tali intensità si mantengono uguali (cioè il campione non assorbe) il rivelatore e il registratore rimangono in equilibrio. Quando invece l'intensità del raggio campione diminuisce (a seguito del fenomeno di assorbimento) il segnale elettrico generato dal rivelatore, e opportunamente elaborato, muove un motore che insinua un cuneo ottico sul cammino del raggio di riferimento. L'ampiezza dell'attenuazione operata dal cuneo per equalizzare le intensità dei due raggi è direttamente proporzionale alla variazione di intensità del raggio campione. L'intensità residua del raggio dopo la variazione viene espressa come percentuale rispetto all'intensità iniziale e rappresenta la **trasmittanza percentuale %T** del campione. Tale parametro è utilizzato in ordinata per tracciare gli spettri di assorbimento.*

Non aggiungiamo dettagli anche perché questo tipo di strumenti presentano un gran numero di svantaggi, legati in particolare ai monocromatori che presentano fenditure sottili che limitano il numero d'onda della radiazione. Tra i principali difetti ricordiamo:

- la presenza di parti in movimento (motore) che possono causare problemi meccanici;

- la lenta risoluzione di scansione (servono tempi dell'ordine dei minuti per singolo spettro);
- le basse risoluzione, accuratezza e sensibilità;
- le perdite di frequenze di eccitazione causa delle fenditure strette dei reticolati;
- lo stretto intervallo di frequenze analizzabile;
- la raccolta di luce trasmessa;
- l'assorbimento di CO e acqua nelle soluzioni che contengono i campioni e che pertanto possono produrre disturbi di background.

Quanto appena detto fa preferire decisamente lo spettrometro a interferenza a quello dispersivo. Dedichiamo il prossimo sottoparagrafo a questo secondo strumento,

### 8.5.2 Spettrometro IR a Trasformata di Fourier (FTIR)

Il suo principio di base è rappresentato dalla possibilità di raccogliere contemporaneamente tutte le lunghezze dello spettro IR nel rilevatore, il che rende superflua la scansione della lunghezza d'onda, che tanto rappresentava un problema sullo strumento a dispersione. Questo è possibile trasformando, per mezzo di un interferometro, la radiazione IR policromatica emessa dalla sorgente (istante per istante con la medesima intensità) in un interferogramma, dove l'assorbimento non è più funzione della frequenza, ma del tempo (cioè si passa da dominio delle frequenze a dominio dei tempi). Contrariamente agli spettrofotometri tradizionali, quindi, in questa apparecchiatura non si ha un monocromatore a dispersione, ma viene utilizzato l'interferometro di Michelson, il quale produce nel corso di una speciale scansione l'interferogramma della sostanza in esame. Dopo il passaggio della radiazione così "trattata" attraverso il campione, l'interferogramma viene trasformato dal calcolatore collegato allo strumento in un tradizionale spettro infrarosso mediante un'operazione matematica, la cosiddetta trasformata di Fourier. In questa maniera si passa perciò dall'interferogramma, un grafico dello spazio o del tempo, a uno spettro comune, che rappresenta però la variazione dell'intensità del segnale in funzione del numero d'onda (o della lunghezza d'onda) della radiazione.

Vediamo dunque di analizzarlo più in dettaglio.

- L'**interferometro** è uno strumento che utilizza l'interferenza tra due o più onde luminose per rivelare le differenze tra di esse. Nello specifico lo spettrometro FTIR utilizza un **interferometro di Michelson**. Esso è costruito attorno al portacampione. Un *beam-splitter* riceve la radiazione IR dalla sorgente e ne riflette metà verso uno specchio fisso e metà verso un specchio rotante, in moto continuo. I due raggi si ricombinano poi sempre grazie al beam splitter e sono diretti verso il campione. Avendo percorso tragitti diversi, differiscono per il cammino ottico e formano quindi una figura di interferenza che passa attraverso il campione e raggiunge il rivelatore. Una singola scansione dura in genere 2 secondi.
- Al rivelatore l'interferenza arriva sotto forma di un **interferogramma**, in cui ogni punto mostra l'intensità della radiazione in funzione della posizione dello specchio mobile e contiene informazioni su tutte le lunghezze d'onda dello spettro IR. Per

normalizzare il grafico rispetto alle fluttuazioni termiche e alle vibrazioni del laboratorio, viene fatta passare nell'interferometro anche la radiazione emessa da un laser elio-neon, il cui interferogramma è usato come riferimento. Questo perché il laser emette alle frequenze UV-VIS e garantisce quindi un interferogramma non disturbato dall'assorbimento e in grado di mostrare con estrema precisione la effettiva posizione dello specchio rotante a ogni istante (in base al numero di frange di interferenza del laser). Come principio base, se la differenza di cammino ottico è  $\Delta = 0$ , allora vi è intensità massima delle frange. Se invece  $\Delta = \lambda/2$  c'è interferenza distruttiva.

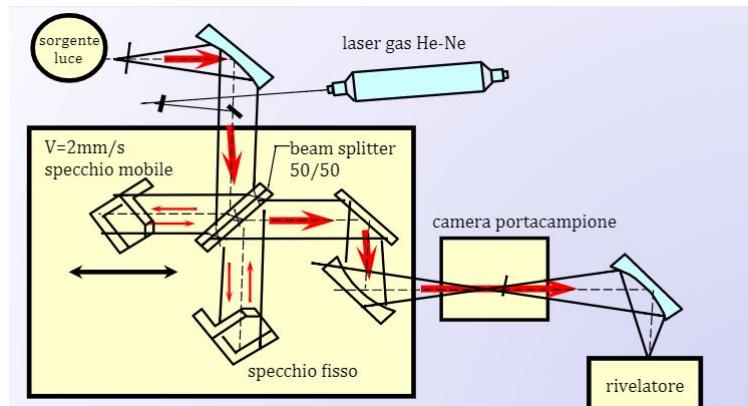


Figura 8.5: Schema dell'interferometro TFIR

- L'interferogramma prodotto dalla sorgente policromatica è dunque la somma di tutte le possibili lunghezze d'onda dello spettro IR. A questo punto viene fatta la **trasformata di Fourier** per passare dal dominio dei tempi a quello delle frequenze. Essendo l'interferogramma una funzione pari rispetto all'asse delle ordinate, come base di Fourier si sceglie la base dei coseni.

Per il fascio monocromatico del laser ho solo un termine perché il laser è monocromatico e quindi l'interferogramma contiene informazioni solo relative a quella lunghezza d'onda:

$$\begin{aligned} I(\Delta) &= \frac{1}{4} I(\bar{\nu}) \left\{ 1 + \cos 2\pi \frac{\Delta}{\lambda} \right\} = \frac{1}{4} I(\bar{\nu}) \{ 1 + \cos 2\pi \Delta \bar{\nu} \} \\ &= B(\bar{\nu}) \cos(2\pi \bar{\nu} \Delta) = B(\bar{\nu}) \cos(2\pi \bar{\nu} 2\mathcal{V}t) \end{aligned} \quad (8.18)$$

Per il fascio policromatico dovrò invece sommare su tutte le possibili infinite lunghezze d'onda, vale a dire scrivere la trasformata di Fourier in forma integrale:

$$\begin{aligned} I(\Delta) &= \int_0^\infty B(\bar{\nu}) \cos(2\pi \bar{\nu} \Delta) d\bar{\nu} \\ B(\bar{\nu}) &= \int_{-\infty}^\infty I(\Delta) \cos(2\pi \bar{\nu} \Delta) d\Delta \end{aligned} \quad (8.19)$$

nelle quali  $B(\bar{\nu})$  è la **trasmittanza** nel dominio delle frequenze<sup>4</sup> e  $\mathcal{V}$  è la velocità angolare dello specchio rotante.

Delle varie informazioni ottenibili dalle 8.18e 8.9 il parametro di reale interesse è solo

<sup>4</sup>Vale a dire la frazione di luce che arriva al rivelatore rispetto a quella emessa.

$B(\bar{\nu})$ , che si trova antitrasformando l'intensità nel dominio dei tempi. Da essa è infatti possibile trarre informazioni sul reale effetto dell'assorbimento vibrazionale.



Come si vede dall'immagine le principali componenti dello spettrometro, tolto l'interferometro di cui abbiamo già sufficientemente discusso, sono quindi

1. una **sorgente di corpo nero**: idealmente essa obbedisce alla legge di Wien per cui sappiamo che l'energia emessa è espressa da

$$E_\lambda d\lambda = \epsilon \frac{c_1}{\lambda^5 e^{-c_2/\lambda}} \quad c_1 = 2\pi c^2 h \quad c_2 = ch/k_B$$

e tale per cui

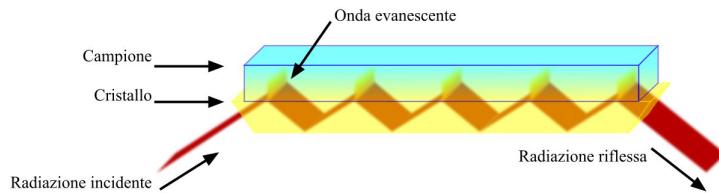
$$\lambda_{max} = \frac{b}{T} = \frac{2.8978 \cdot 10^{-3}}{T}$$

Nella pratica si utilizzano materiali solidi riscaldati da corrente elettrica. Tra i più diffusi la **sorgente globar**, consistente in un cilindro di carburo di silicio a 1300°C e utile per lunghezze d'onda più elevate (1-40 micron); e il **filamento di Nernst**, una bacchetta di ossidi di terre rare (ittrio, torio e zincornio) a 1550°C, usata per lunghezze d'onda più corte (0.4-20 micron);

2. un **portacampioni** che riceve l'interferogramma e trasmette o riflette sulla superficie la radiazione. In particolare specifiche lunghezze d'onda caratteristiche del campione vengono assorbite.

Possono essere **celle a trasmissione** ovvero di finestre trasparenti ai raggi IR e resistenti ai solventi polari ( $\text{CaF}_2$ ,  $\text{BaF}_2$ ). Il problema maggiore di questo apparato è che vetro e quarzo, solitamente usati per la cuvette, tagliano la radiazione IR non consentendo uno studio corretto. Come espediente a ciò si lavora con la tecnica dell' **ATR** (*Riflettanza totale attenuata*) che sfrutta la **riflessione totale interna** del raggio che attraversa il campione, utilizzando dei *cristalli trasparenti all'IR*. In particolare il cristallo, ad alto indice di rifrazione, è posto a stretto contatto con il campione, di modo che il raggio IR attraversi prima il cristallo e poi il campione. Quando l'angolo di incidenza è tale da determinare riflessione totale ( $\sin \theta > n_2/n_1$ ), il raggio riflesso, arrivando sulla superficie del campione che costituisce l'interfaccia,

può penetrare fino a uno spessore di  $2 \mu\text{m}$  del materiale meno rifrangente. In tal modo forma un' **onda evanescente**, che dopo essere stata assorbita dal campione rende possibile registrare lo spettro ATR.

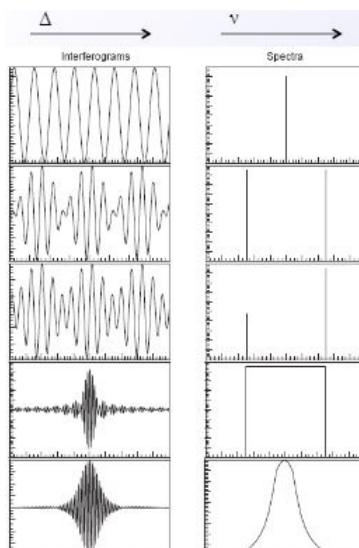


Sono spesso utilizzati cristalli a riflessioni multiple, con 5-15 riflessioni interne, come in figura, per consentire di ottenere un calo significativo dell'intensità di riflessione, che è in tal modo individuabile con maggior precisione.

3. un **rivelatore**, progettato per misurare interferogrammi e possono essere **termici** se misurano l'energia radiante dal suo effetto termico, coprendo in tal modo un vasto range di lunghezze d'onda, usabili a temperatura ambiente con bassi tempi di risposta ma soprattutto con bassa sensibilità. In alternativa sono **selettivi** e servono a studiare  $\lambda$  particolari.

In genere consistono in *bolometri*, *celle di golay*, *termistori* e *termocoppie*, ovvero giunzioni di metalli diversi ai cui capi si crea una differenza di potenziale quando cambia temperatura delle due metà; *materiali piroelettrici* in cui si forma un temporaneo accumulo di carica elettrica di segno opposto su facce opposte in risposta ad un cambiamento di temperatura (con risposta entro  $10^{-3}\text{-}10^{-6}$  s); *rivelatori fotoconduttori* in cui cambia la conducibilità se parte della radiazione viene assorbita; *materiali fotovoltaici* che colpiti da radiazione generano una differenza di potenziale che viene misurata;

4. un **computer**, in cui il segnale, digitalizzato, è elaborato in trasformata di Fourier, fornendo uno spettro. Lo spettro prodotto dalla sorgente policromatica va poi confrontato con lo spettro del laser, supposto una sorgente ideale. Per avere un'idea di come cambia l'interferogramma in seguito all'elaborazione con Fourier si veda l'immagine seguente:



Concludiamo la discussione dello spettrometro FT-IR analizzando i principali vantaggi che apporta se confrontato con il modello dispersivo:

- è più **veloce**: consente misurazioni in pochi secondi poiché tutte le lunghezze d'onda sono misurate contemporaneamente. A questa caratteristica si dà il nome di **vantaggio di Felgett** (nel dispersivo per uno spettro completo servivano minuti!);
- è più **sensibile** avendo un segnale ottico più intenso (**vantaggio di Jacquinot**) e un effetto di rumore molto attenuato grazie alla possibilità di sovrapporre più scansioni nell'arco di poche decine di secondi e ottenere così una media del segnale, con rumore al minimo;
- è un progetto **meccanicamente semplice**, avendo una sola parte in movimento (specchio rotante) con basse probabilità di rottura;
- c'è **assenza di luce diffusa**;
- il laser consente una **calibrazione interna** per la lunghezza d'onda.

## 8.6 Analisi degli spettri IR nelle regioni principali

Apriamo il paragrafo dando una definizione:

**Definizione 8.6.0.1.** In ottica e spettroscopia si chiama **trasmittanza** il rapporto percentuale tra l'intensità della luce che attraversa un campione e quella che ne emerge.

La trasmittanza percentuale è il parametro che compare in ordinata negli spettri di assorbimento infrarosso, in funzione della frequenza o del numero d'onda.

Cio che tipicamente si ottiene è mostrato di seguito:

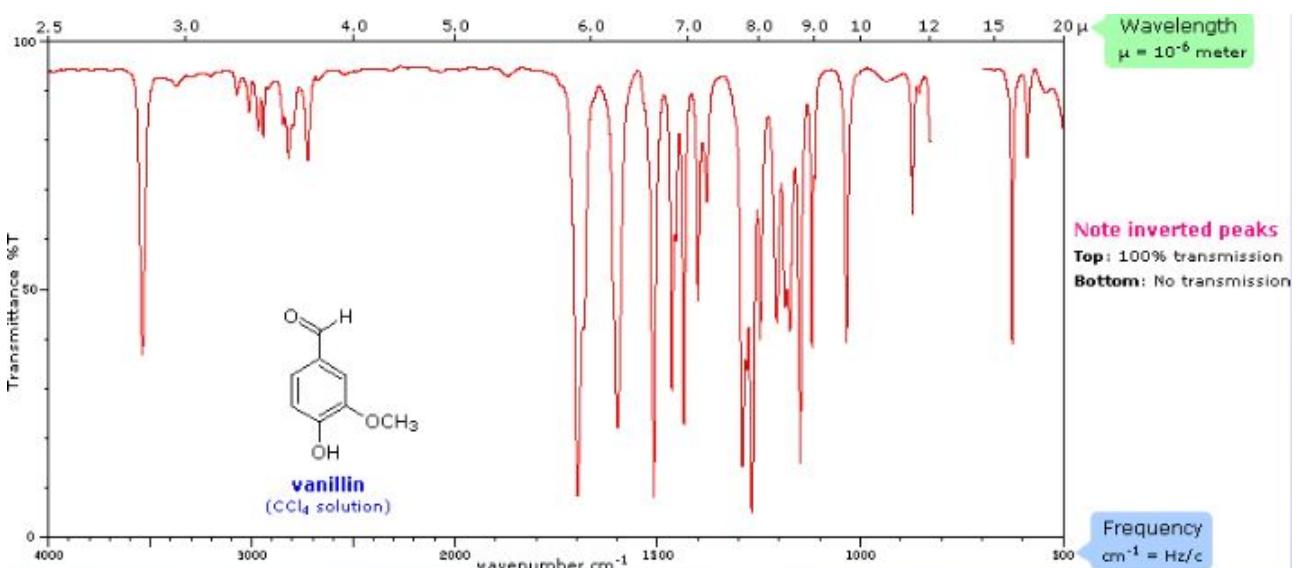


Figura 8.6: Si noti come i picchi siano all'ingiù rispetto a quelli osservati nel Capitolo 4; questo perché il parametro in ordinata non è più l'assorbanza (difficile da misurare su queste scake energetiche) ma la trasmittanza. A una trasmittanza del 100% corrisponde assorbimento nullo, a una trasmittanza nulla corrisponde assorbimento massimo.

L'evidente complessità dello spettro IR è dovuta al fatto che ogni legame della molecola ha una propria  $\lambda$  di assorbimento. Ciò è però un rande vantaggio per lo spettroscopista. Molecola diverse, infatti, avendo combinazione di atomi diverse, hanno spettri diversi. Lo spettro consente quindi di individuare *qualitativamente una sostanza!*

Di seguito ci occuperemo quindi di interpretare gli spettri di assorbimento che è possibile ottenere nelle due regioni di maggiore interesse per le sostanza organiche, che ricordiamo essere:

- la regione dei gruppi funzionali, che occupa un range di numeri d'onda 4000-1300  $\text{cm}^{-1}$  e di lunghezze d'onda 2.5-8  $\mu \text{m}$  e che permette di ottenere informazioni circa i gruppo di atomi che formano la molecola;
- la regione delle impronte digitali, che si estende in 1300-650  $\text{cm}^{-1}$  e in 8-15.4  $\mu \text{m}$ , e che offre le bande di assorbimento dei singoli legami e quindi univoche per ogni singola molecola.

Dell'intero intervallo infrarosso (lontano, medio, vicino) in laboratorio si utilizza soltanto la fascia 500-4000  $\text{cm}^{-1}$ , e le informazioni fruibili sono ripartite in:

- da 4000 a 2700  $\text{cm}^{-1}$  si individuano i legami a idrogeno;
- da 2700 a 2000  $\text{cm}^{-1}$  si individuano i tripli legami;
- da 2000 a 1300  $\text{cm}^{-1}$  si individuano i legami doppi;
- da 1300 a 650  $\text{cm}^{-1}$  si individuano i legami singoli (*fingerprint region*).

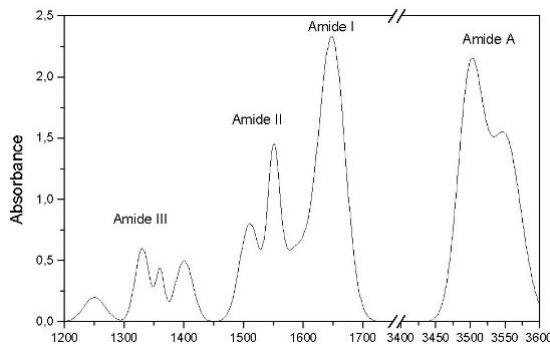
Innanzitutto va detto che per una molecola contenente  $n$  atomi, i gradi di libertà vibrazionali sono  $3n - 6$ , o almeno,  $3n - 5$  nel caso di una molecola lineare. Come conseguenza di ciò i gradi di libertà di una molecola sono dell'ordine delle migliaia e gli spettri non avranno linee ma **bande**.

La prima distinzione che si fa quando ci si propone di interpretare uno spettro infrarosso è quella tra vibrazioni di stretching e vibrazioni di bending. Per fare questo si fa riferimento alla divisione dello spettro infrarosso rispetto al tipo di legami possibili, che viene assunto come un riferimento tabulato. Confrontando la posizione della banda osservata nello spettro con quella indicata dalla tabella, si riesce grossolanamente a risalire al tipo di vibrazione che si sta osservando.

Numeri d'onda ( $\text{cm}^{-1}$ )	Tipo di assorbimento	Nome della regione
3400-2800	stretching O-H, N-H, C-H	
2250-2100	stretching C≡N, C≡C	gruppi funzionali
1850-1600	stretching C=O, C=N, C=C	
1600-1000	stretching C-C, C-O, C-N vari tipi di bending	impronta digitale
1000-600	bending C-H	bending C-H

Ulteriori informazioni le troviamo guardando di norma l'intensità e la forma della banda: più una banda è larga e più e interazioni del gruppo funzionale sono forti. Una banda stretta indicherà invece un gruppo isolato.

Passiamo ad analizzare un'applicazione concreta nel caso delle proteine. Il gruppo peptidico, che è alla base della formazione delle proteine, genera 9 bande caratteristiche rinominate *amide A, amide B, amide I, amide II, ..., amide VII*.



Vediamo più in dettaglio.

1. L'**amide A** è dovuta per più del 95% allo stretching di N-H. Non dipende dalla struttura secondaria ma è fortemente sensibile alla forza dei legami idrogeno. Questo si intuisce anche guardando la posizione della banda, che si colloca oltre i 3000  $cm^{-1}$ .
2. L'**amide I** si individua a 1600-1700  $cm^{-1}$  è la banda di assorbimento più intensa delle proteine, associata allo stretching dello C=O (70-85 %), allo stretching dello C=N (10-20 %) e al bending di N-H. La posizione esatta dipende dalla struttura secondaria della proteina a cui appartiene e dalla disposizione dei legami a idrogeno.
3. L'**amide II** si pone tra 1540 e 1580  $cm^{-1}$ , è più complessa ed è associata al bending del N-H (40-60 %), allo stretching del C-N (18-40 %) e del C-C (10%). Anch'esso è sensibile alla conformazione proteica.
4. L'**amide III, IV** si ritrovano nel range di numeri d'onda 1200-1350  $cm^{-1}$  e sono prodotte dalla composizione di diverse vibrazioni. Sono dunque bande particolarmente complesse e che dipendono dal campo di forze dei legami, dalla sequenza degli amminoacidi e dalla disposizione dei legami a idrogeno.
5. L'**amide V, VI, VII** sono dovute a vibrazioni fuori dal piano.

Dallo studio degli spettri si può poi pensare non solo di individuare i gruppi funzionali e le forze dei legami all'interno di essi, ma persino di individuare la struttura secondaria della proteina-campione. Questo è stato reso possibile soprattutto dall'avvento degli spettrometri FT-IR e dal loro basso errore di rumore. Poiché i campioni sono generalmente contenuti nelle cuvette in forma di soluzione, succede che nel momento in cui si va a trasformare con Fourier il segnale, lo spettro che si ottiene non sia puro della proteina. Come conseguenza di ciò le bande che si osservano in relazione alle diverse amidi sono in realtà una sovrapposizione degli sviluppi di Fourier della proteina pura e dell'acqua solvente. Questo fa sì che:

- per l'amide I la banda, per quanto intensa, è sovrapposta al bending dell'acqua (a 1645  $cm^{-1}$ ) che è circa 10 volte maggiore e i picchi non sono risolti, avendo larghezza maggiore alla separazione tra le varie strutture secondarie ( $\alpha$ -eliche,  $\beta$ -foglietti, eventuali radicali) ;
- per l'amide II la banda è disturbata dalle vibrazioni delle catene laterali, quindi non contengono informazioni solo sulla struttura secondaria;

- per l'amide III, il problema maggiore è la scarsa intensità.

Il problema viene soddisfacentemente risolto con un processo di fit computerizzato basato sulla deconvoluzione di Fourier e volto a stimare l'area sottesa da ogni componente rappresentante una particolare struttura secondaria. Il risultato è mostrato di seguito:

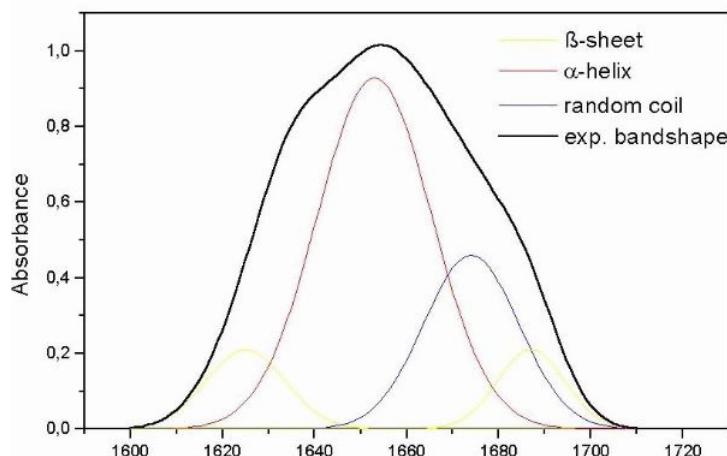


Figura 8.7: Fit di deconvoluzione grafica per l'amide I. In nero è la forma della banda che si trova sperimentalmente. Nei vari i colori le curve restituite dal fit

Il fit viene fatto assumendo a priori che la forma dei vari contributi di struttura secondaria sia a **gaussiana**.

Un'analisi ancora più approfondita è possibile se si calcola la **derivata seconda dello spettro**<sup>5</sup>. La derivata seconda di una banda è in grado di restituire tre parametri circa ogni struttura secondaria "nascosta" nella banda dello spettro. Si può risalire alla **posizione, larghezza e massima intensità di assorbimento**. Quanto questi parametri siano verosimili viene purtroppo messo in ombra dalla presenza di disturbi di rumore. Nonostante ciò essi possono essere dei validi valori da assegnare alle funzioni di fit computerizzato per poter ottenere ulteriori informazioni dalla deconvoluzione.

Resta inteso che rispetto alla quantità di informazioni cariabili dalla semplice banda, qui si è a livelli molto più specifici e copiosi.

## 8.7 Note sulla spettroscopia di Raman

In un esperimento di scattering Raman il campione da analizzare viene colpito da una radiazione elettromagnetica monocromatica proveniente da una **sorgente laser**. La radiazione elettromagnetica interagendo con gli elettroni delle molecole induce su di esse un dipolo elettrico oscillante responsabile del processo di **diffusione** della radiazione incidente. Per via dei moti vibrazionali e rotazionali delle molecole questa diffusione sarà anelastica, ovvero avverrà con frequenza maggiore o minore di quella originaria. Analizzando la radiazione diffusa si possono distinguere componenti con diverse energie. Infatti lo spostamento delle righe che è possibile osservare è proporzionale alla differenza di energia tra i fotoni incidenti e quelli diffusi anelasticamente che corrisponde ai livelli vibrazionali delle molecole.

<sup>5</sup>Non della gaussiana! La derivata seconda è della linea nera nel grafico sopra.

La spettroscopia di Raman nasce come sottoprodotto della fluorescenza e si pone in genere come complemento della spettroscopia vibrazionale IR, pur **non essendo una forma di assorbimento**. Tuttavia essa si caratterizza per il fatto che la distanza del picco di intensità massima nello spettro dista dal picco di radiazione incidente di una quantità costante, *indipendentemente dalla radiazione di eccitazione*. Ciò è dovuto a rilassamenti intrinseci delle molecole (*urti quasi elastici*). Inoltre, capita spesso che la radiazione che diffonde venga emessa da uno stato energetico diverso da quello in ricezione quindi è più probabile che il decadimento si fermi a un livello vibrazionale che non è il ground state e di conseguenza la remissione è meno energetica di quanto ci si aspetterebbe.

# **Appunti di Elementi di Biofotonica**

## **IV**

Botta Francesca,  
Carra Chiara,  
Fendillo Alessandro,  
Frosio Dylan,  
Ghittori Davide

18/01/2017

Corso tenuto dalla professoressa Laura D'Alfonso nel primo semestre del terzo anno della laurea in Fisica, Università di Milano Bicocca.

Il presente documento sarà diviso in 4 volumi, per questioni di allocamento della memoria dell'editor di testo. Per la trattazione completa si rimanda pertanto ai volumi precedenti.

# Indice

<b>9 LA DIFFUSIONE OTTICA O SCATTERING</b>	<b>185</b>
9.1 Sinossi . . . . .	185
9.2 Legge sperimentale e strumentazione . . . . .	186
9.3 Teoria dello scattering quasi-elastico . . . . .	188
9.4 Deviazioni dal modello quasi-elastico . . . . .	193
9.4.1 Dimensioni delle molecole . . . . .	193
9.4.2 Molecole interagenti . . . . .	195
9.5 Fluttuazioni del segnale . . . . .	196
9.6 Note di sperimentazione . . . . .	201
<b>10 LE NANOPARTICELLE</b>	<b>203</b>
10.1 Proprietà generali . . . . .	203
10.1.1 Risonanza plasmotica superficiale . . . . .	205
10.1.2 Origine delle risonanze plasmoniche superficiali . . . . .	206
10.2 Approssimazione teoria di Mie . . . . .	208
10.2.1 Teoria di Gans: effetto della forma . . . . .	211
10.2.2 I nanorods d'oro . . . . .	212
<b>11 MICROSCOPIA STED E SPETTROSCOPIA FCS</b>	<b>220</b>
11.1 La microscopia STED . . . . .	220
11.1.1 Diffrazione e limite di risoluzione . . . . .	220
11.1.2 Microscopia confocale e uso della PSF . . . . .	222
11.1.3 Stimulated Emission Deplation microscopy (STED) . . . . .	224
11.1.4 Applicazioni della STED a biosistemi. Fluorofori tipici . . . . .	226
11.2 Spettroscopia di correlazione di fluorescenza (FCS) . . . . .	228
11.2.1 Uso della funzione di autocorrelazione . . . . .	230
11.2.2 Fluttuazioni di brillanza . . . . .	234
11.2.3 Uso dell'istogramma di conteggio dei fotoni . . . . .	236
<b>12 NOTE SUL TRASPORTO CELLULARE</b>	<b>240</b>
12.1 La membrana cellulare . . . . .	240
12.1.1 La struttura della membrana cellulare . . . . .	240
12.1.2 La composizione della membrana cellulare . . . . .	243
12.1.3 Permeabilità e trasporto attraverso la membrana . . . . .	245
12.2 Trasporto passivo . . . . .	246
12.2.1 Diffusione . . . . .	247
12.2.2 Diffusione facilitata . . . . .	249
12.2.3 Osmosi . . . . .	250

12.3 Trasporto attivo . . . . .	252
12.3.1 Proteine Trasportatrici . . . . .	252
12.3.2 Endocitosi . . . . .	252
12.3.3 Esocitosi . . . . .	253
12.3.4 Pompe cellulari . . . . .	254
12.3.5 Note sul trasporto attivo . . . . .	256
<b>A DERIVAZIONE SEMICLASSICA DEL DIPOLO DI TRANSIZIONE</b>	<b>257</b>
<b>B REGOLE DI SELEZIONE E COEFFICIENTE DI EINSTEIN</b>	<b>261</b>
B.1 Regole di selezione per l'atomo di idrogeno . . . . .	261
B.2 Derivazione del coefficiente di Einstein . . . . .	263
B.3 Note sul coefficiente di emissione spontanea . . . . .	267
<b>C Appunti personali</b>	<b>269</b>

# Capitolo 9

## LA DIFFUSIONE OTTICA O SCATTERING

### 9.1 Sinossi

L'interazione della luce con la materia può determinare effetti diversi, in base alla lunghezza d'onda, al tipo di campione, all'ambiente in cui il fenomeno si pone. Abbiamo pertanto visto come la spettroscopia si differenzi per tener conto e studiare ciascuna di queste risposte. Fondamentalmente è però possibile riassumere tutti i vari tipi di interazione luce-materia in due macro-classi: le **interazioni in risonanza**, tali per cui la luce incidente ha una frequenza coincidente, secondo la legge di Planck, con la differenza di due livelli energetici del campione, e le **interazioni fuori risonanza**, in cui la frequenza d'onda della luce è lontana da qualsiasi transizione possibile del campione. Nel caso della prima macro-classe, la luce in uscita dal campione ha energia minore rispetto al fascio incidente e gli effetti a cui si assiste sono l'assorbimento e la fluorescenza a cui sono stati dedicati i Capitoli 4, 5, 6, 7 e 8 di questo documento. Nel caso della seconda macro classe invece l'effetto è quello che comunemente viene chiamato **diffusione o scattering**: la luce in uscita avrà lunghezza d'onda uguale a quella in ingresso ma traiettoria diversa. A grandi linee, succede quanto segue.

Partiamo dal presupposto che le molecole sono polarizzabili; quando una luce incide su un campione, la distribuzione degli elettroni, in nome della polarità delle molecole, viene disturbata dal campo elettrico della radiazione. Poiché la radiazione elettromagnetica varia sinusoidalmente anche all'interno del campione, come abbiamo già avuto modo di vedere, nel caso essa non venga assorbita produce un'oscillazione degli elettroni della molecola: gli atomi della molecola cioè assumono un momento di dipolo, che a sua volta fa disperdere, o gergalmente *diffonde*, la luce in direzioni diverse da quella della radiazione incidente.

Spettroscopicamente lo scattering solleva forte interesse dal momento che esso è un processo per cui non ha senso definire un tempo di vita. Infatti per mezzo di una diffusione non viene raggiunto uno stato eccitato e l'effetto è immediato. L'utilità biofisica dello scattering si fonda proprio su questo. Questa tecnica è infatti estremamente sensibile agli scostamenti, anche minimi, dal valor medio del segnale, e consente un'osservazione *in real time*.

È possibile distinguere tra due tipi di scattering:

1. **scattering statico** che consiste nello studio dell'andamento dell'intensità della luce al variare dell'angolo di diffusione e della concentrazione del campione, producendo

medie temporali di modo che il segnale possa essere considerato statico;

2. **scattering dinamico o di fotocorrelazione**, che si occupa invece delle *fluttuazioni* temporali del segnale attorno al valor medio.

## 9.2 Legge sperimentale e strumentazione

In un esperimento di scattering ottico, un fascio di luce monocromatica, generalmente ottenuta con un laser, urta contro un campione e viene diffuso verso un rivelatore posto ad un angolo  $\theta$  dalla direzione di propagazione incidente.

**Definizione 9.2.0.1.** *L'intersezione tra il fascio incidente e il fascio diffuso, individua un volume  $\mathcal{V}$ , chiamato **volume di scattering** o **volume illuminato**.*

Nell'ipotesi che l'esperimento sia ideale, il fascio incidente è un'onda elettromagnetica piana

$$\bar{E}_i(r, t) = \bar{n}_i E_0 e^{i[\bar{k}_i \cdot \bar{r} - \omega t]}$$

in cui  $\bar{n}$  indica la polarizzazione,  $\bar{k}_i = 2\pi\bar{\nu}$  il vettore d'onda,  $E_0$  l'ampiezza.

Quando le molecole nel volume illuminato sono soggette a questo campo incidente, le loro cariche interne acquistano un'accelerazione. Poiché cariche accelerate emettono radiazione, il campo elettrico diffuso sarà la somma (sovraposizione) di tutti i campi scatterati da tutte le cariche contenute nel volume illuminato. Per via del campo incidente le molecole sono continuamente coinvolte in moti traslatori, rotatori e vibrazionali mediati da energia termica. Come conseguenza di ciò, le cariche cambieranno continuamente posizione. Il fascio diffuso rivelato mostrerà quindi una fluttuazione nel tempo. Implicite in queste fluttuazioni ci sono importanti informazioni riguardo alla struttura e all'orientamento delle molecole.<sup>1</sup>

Diamo una trattazione un po' più formale alla questione.

Supponiamo, come accade normalmente, che il campo della luce incidente sia *debole*, di modo che il sistema possa rispondere *linearmente* alla perturbazione. Introduciamo inoltre l'approssimazione per cui le dimensioni delle molecole sono molto minori della lunghezza d'onda di incidenza: questa ipotesi permette di considerare non interagenti le molecole. La relazione fondamentale del processo lega l'intensità del fascio diffuso alla concentrazione numerica e al peso molecolare dei singoli costituenti del campione. Vale infatti che

$$\frac{i_s(t)}{V_{EXC}} \doteq nM^2$$

(9.1)

dove  $n$  è la concentrazione molare delle molecole e  $M$  il peso molecolare.

Dalla 9.1 si può dedurre subito una proprietà interessante:

- Consideriamo ad esempio un campione descritto dai parametri  $n=2$ ,  $M=1$ . Per esso il valor medio della luce scatterata vale  $\langle i_s \rangle \simeq nM^2 = 2$ .
- consideriamo ora invece un campione con  $n=1$  e  $M=2$ . In questo caso avremo  $\langle i_s \rangle = nM^2 = 4$ .

---

<sup>1</sup>Per via del moto random delle molecole in eccitazione termica, il segnale effettivamente misurato dal rivelatore nella realtà è pesantemente affetto da rumore. Tuttavia la trattazione di questo particolare disturbo esula dallo scopo di questo documento.

Se ne conclude che l'intensità della luce diffusa aumenta con il peso molecolare. In virtù della dipendenza quadratica dal peso molecolare, lo scattering facilita l'osservazione dei processi di aggregazione e separazione delle molecole.

In particolare lo strumento utilizzato prende il nome di **selettori di dimensioni** e consente, in base all'intensità di luce scatterata rilevata di distinguere la presenza all'interno del campione di forme polimeriche o monomeriche. Per questo esso trova ampio utilizzo in campo farmaceutico per distinguere molecole sintetizzate da quelle ancora monomeriche. L'apparato consiste in una sorgente laser, un portacampioni, un **goniometro** che consente di misurare l'angolo di scattering, un **analizzatore** che rivela eventuali variazioni del vettore d'onda e un **fotomoltiplicatore** che intensifica la radiazione diffusa<sup>2</sup>. L'intera misurazione si svolge sul piano orizzontale:

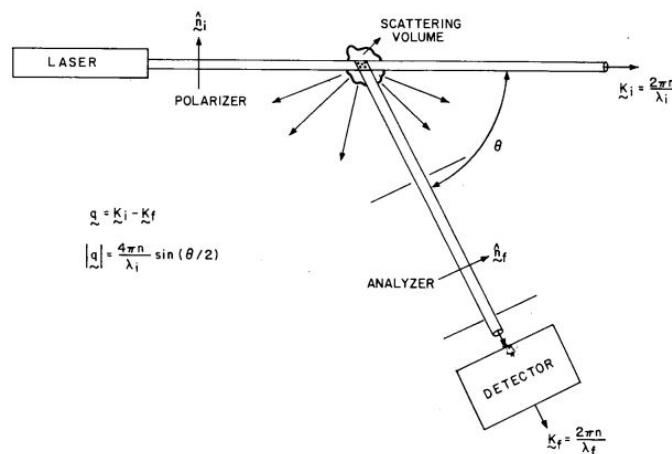


Figura 9.1: Il fotomoltiplicatore (PMT) è posto subito dopo l'analizzatore e prima del rivelatore.

Il parametro oggetto della misurazione è la variazione del vettore d'onda, tra onda incidente e onda diffusa. Vedremo meglio questo aspetto nella sezione dedicata allo scattering quasi-elastico. La misura può avvenire secondo tre modi diversi:

1. i **metodi di filtraggio**, nei quali la luce scatterata viene fatta transitare attraverso un reticolo o un interferometro prima di raggiungere il fotomoltiplicatore;
2. i **metodi omodino** nei quali solo la luce diffusa arriva al fotocatodo;
3. i **metodi eterodino** nei quali una porzione di luce non diffusa, ovvero di quella eccitante, si mescola con la luce diffusa in un unico fascio che raggiunge poi il fotocatodo.

<sup>2</sup>Sul funzionamento del fotomoltiplicatore si rimanda al Capitolo 6, SPETTROSCOPIA DELLA FLUORESCENZA.

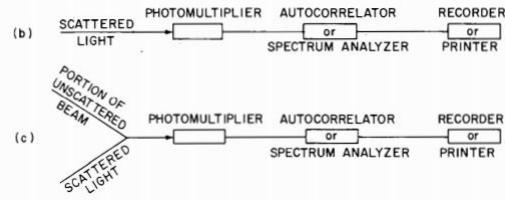


Figura 9.2: Rappresentazione schematica dei due tipi di misura più diffusa. Omodino (b) e Eterodino (c)

Deve essere chiaro sin da ora che la teoria che stiamo discutendo ha carattere del tutto generale. I fenomeni di diffusione ottica sono quanto mai diffusi. Si parla infatti di scattering di

- raggi X e neutroni a basso angolo di soluzione al fine di individuare la forma delle molecole;
- di micro-onde da pioggia, neve, grandine;
- di luce stellare dall'atmosfera terrestre;
- di molecole per misurare il peso e la diffusione molecolare che determina trasporto di massa nella cellula.

### 9.3 Teoria dello scattering quasi-elastico

Con il termine *scattering quasi-elastico* si fa riferimento a quel processo in cui la luce attraversa il campione senza rilevanti cessioni o guadagni di energia. Sostanzialmente, tutto lo scattering discussso sin qui obbedisce a questa ipotesi, che ricordiamo dipendere dall'assunzione che le lunghezze d'onda coinvolte siano molto più grandi delle dimensioni molecolari. In queste circostanze vale che la lunghezza d'onda del raggio diffuso è analoga a quella del raggio incidente. Indicato quindi con  $\bar{k}_i$  il vettore d'onda della luce incidente e con  $\bar{k}_{scat}$  il vettore d'onda del raggio diffuso, è possibile scrivere l'ipotesi fondamentale della teoria:

$$|\bar{k}_{scat}| \simeq |\bar{k}_i| = \frac{2\pi}{\lambda} \quad (9.2)$$

La diffusione pertanto non varia il modulo del vettore d'onda del campo elettrico, ma **soltanto la direzione**.

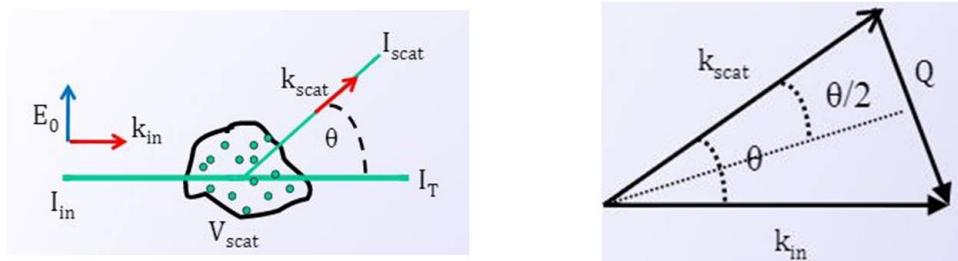


Figura 9.3: L'unica variazione riguarda le direzioni ed è stimabile tramite il vettore differenza  $\bar{Q}$ .

I potenziali parametri sono dunque:

## 1. l'energia scambiata

$$\Delta E = \hbar \Delta \omega$$

Nelle nostre ipotesi essa è trascurabile in quanto praticamente nulla;

## 2. il vettore d'onda scambiato o vettore di scattering

$$\bar{Q} = \bar{k}_{in} - \bar{k}_{scat}$$

Supponiamo che il campo in ingresso sia polarizzato verticalmente (ovvero, dati i piano ortogonali la cui intersezione è la direzione di propagazione, il campo oscilla nel piano verticale). Come abbiamo già detto il campo esercita una forza sulle cariche nel volume di scattering, che in tal modo vengono accelerate e irraggiano; questo significa che il **campo incidente polarizza il mezzo**.

Quando il campione viene illuminato, gli atomi in una subregione del volume di scattering, dove questa regione è piccola se comparata al cubo della lunghezza d'onda del campo incidente, vedono essenzialmente lo stesso campo elettrico. Dividiamo pertanto il volume di scattering in subregioni nelle quali il campo sia lo stesso per ogni atomo. Distinguiamo ora due casi:

1. Se le subregioni sono **otticamente identiche**, ovvero se hanno la stessa costante dielettrica o polarizzazione o indice di rifrazione, allora lo scattering è prodotto solo in avanti. Questo è dovuto al fatto che le onde secondarie (*ondine*) diffuse dalle singole subregioni sono identiche tra loro eccetto per un fattore di fase che dipende dalla distanza relativa tra le varie subregioni. Per un mezzo sufficientemente largo infatti, ogni sottoregione può essere accoppiata ad un'altra, il cui campo scatterato è identico in ampiezza ma opposto in fase e di conseguenza i due contributi si cancellano lasciando in vita soltanto la componente parallela alla direzione di incidenza.
2. Se le subregioni sono **otticamente diverse**, ovvero se hanno diversa costante dielettrica o polarizzazione o indice di rifrazione, allora le ampiezze dei campo scatterati dalle singole subregioni non saranno più uguali e quindi non si annulleranno più completamente a due a due. Lo scattering riguarderà pertanto tutte le direzioni. Nell'ipotesi che il campione non sia perfettamente liscio, in questo caso le onde diffuse da subregioni diverse formano un pattern di interferenza che consiste di spot scuri e luminosi, o, gergalmente, di tipo **speckle**.

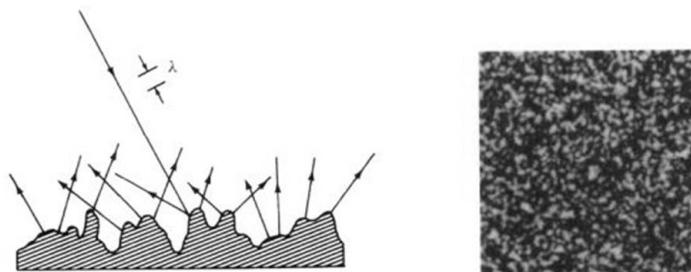


Figura 9.4: Scattering nel caso di subregioni otticamente diverse (sx). Pattern di campo speckle (dx).

Nella visione semimacroscopica introdotta per la prima volta da Einstein nel 1910, lo scattering della luce è il risultato di fluttuazioni locali della costante dielettrica del mezzo. È facile capire da dove provengano queste fluttuazioni, sappiamo infatti dalla teoria cinetica che le molecole sono costantemente coinvolte in moti traslatori e rotazionali così che il valore istantaneo della costante dielettrica di una data subregione (valore che dipende dalla posizione e dall'orientamento delle molecole in quella subregione) fluttuerà nel tempo, dando origine alla diffusione.

Introduciamo ora un'altra grandezza tipica del fenomeno di diffusione, vale a dire il **ritardo di fase**. Abbiamo detto che le differenze di fase tra i campi diffusi da subregioni diverse sono legate alla posizione di esse. Vediamo dunque da più vicino questa cosa:

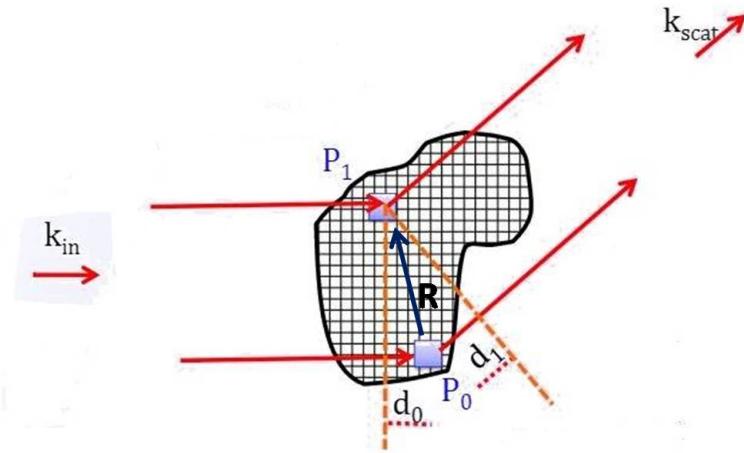


Figura 9.5: Ritardo di fase.

Ricordiamo che stiamo lavorando nelle ipotesi di  $|k_{in}| = |k_{scat}| = k_0 = 2\pi n/\lambda$ . Consideriamo il volume di scattering nella figura 9.5. Il campo che arriva in  $P_0$  è **ritardato** di un fattore

$$\phi_0 = (|k_{in}|r - \omega t)_{P1} - (|k_{in}|(r + d_0) - \omega t)_{P0} = -|k_i|d_0$$

a causa del cammino  $d_0$  che deve compiere in più rispetto al campo che arriva in  $P_1$ . Analogamente, il campo che lascia  $P_1$  è **anticipato** di un fattore

$$\phi_1 = (|k_{scat}|(r - d_1))_{P1} - \omega t - (|k_{scat}|(r) - \omega t)_{P0} = -|k_{scat}|d_1$$

a causa del cammino  $d_1$ . Lo sfasamento complessivo del campo nel fronte d'onda diffusa sarà pertanto la somma di questi due contributi di fase:

$$\Delta\phi = (\phi_0 + \phi_1) = -k_0(d_0 + d_1) \quad (9.3)$$

Se oltre alle relazioni tra i moduli guardiamo anche quelle vettoriali, riusciamo a legare il ritardo di fase al vettore d'onda scambiato  $\bar{Q}$ . Se indichiamo infatti con  $\bar{R}$  il vettore distanza tra le due subregioni, si può verificare che

$$\begin{cases} \phi_0 = \bar{k}_{in} \cdot \bar{R} \\ \phi_1 = +\bar{k}_{scat} \cdot \bar{R} \end{cases} \quad (9.4)$$

Ricordando che per definizione il vettore d'onda scambiato è la differenza vettoriale tra il vettore d'onda incidente e quello scatterato, troviamo che il ritardo di fase è esprimibile come prodotto scalare di  $\bar{Q}$  e  $\bar{R}$ :

$$\Delta\phi = \phi_0 + \phi_1 = (\bar{k}_{scat} - \bar{k}_{in}) \cdot \bar{R} = \bar{Q} \cdot \bar{R} \quad (9.5)$$

Il modulo di  $\bar{Q}$  si trova invece a partire dalla sua stessa definizione. Indichiamo con  $\theta$  l'angolo tra le direzione dei due vettori d'onda. Nominalmente si definisce  $\theta$  **angolo di scattering**. Possiamo quindi scrivere il modulo del vettore d'onda scambiato:

$$|\bar{Q}|^2 = |\bar{k}_{in} - \bar{k}_{scat}|^2 = |\bar{k}_{in}|^2 + |\bar{k}_{scat}|^2 - 2\bar{k}_{in} \cdot \bar{k}_{scat} \quad (9.6)$$

e per le ipotesi di scattering quasi-elastico secondo le quali

$$|\bar{k}_{in}|^2 \approx |\bar{k}_{scat}|^2 \approx k_0^2 = \left(\frac{2\pi}{\lambda}n\right)^2$$

con  $n$  indice di rifrazione del mezzo di diffusione, applicando la legge dei coseni per la quale

$$\cos 2x = 1 - 2\sin^2 x \implies 1 - \cos x = 2\sin^2 \frac{\theta}{2}$$

si trova finalmente

$$|\bar{Q}|^2 = 2k_0^2 - 2k_0^2 \cos \theta = 2k_0^2(1 - \cos \theta) = 4k_0^2 \sin^2 \frac{\theta}{2} \quad (9.7)$$

ovvero

$$Q = 2k_0 \sin \frac{\theta}{2} = \left(\frac{2\pi n}{\lambda}\right) \sin \frac{\theta}{2} \quad (9.8)$$

Valori di  $Q$  compresi tra 1 e  $10^{-2}$  nm sono utilizzati principalmente per l'individuazione delle dimensioni delle proteine. Valori più piccoli, compresi in  $10^{-2} - 10^{-4}$  nm permettono invece di risalire alle strutture secondarie delle proteine.

Poiché la raccolta sperimentale riguarda dati provenienti dal fascio scatterato, il modello matematico che stiamo trattando ha come obiettivo principale quello di arrivare a scrivere un'espressione per il campo elettrico diffuso. In particolare per fare ciò è necessario rendere esplicita la dipendenza delle fluttuazioni della costante dielettrica dalle proprietà molecolari. Dato però l'alto numero di gradi di libertà di un qualunque composto molecolare sarà necessario introdurre qualche forma di approssimazione. Iniziamo quindi con il considerare una singola molecola, dotata di una polarizzabilità<sup>3</sup> anisotropa descritta da un *tensore di polarizzabilità molecolare*  $\alpha$ . Quando un fascio di luce monocromatico urta la molecola, esso induce in essa un momento di dipolo variabile nel tempo

$$\bar{\mu}(t) = \alpha \cdot \bar{E}(t)$$

Senza entrare nei dettagli, si può dimostrare con qualche calcolo e un po' di elettromagnetismo che il campo elettrico diffuso rilevato dal rivelatore con polarizzazione  $n_{scat}$ , posto ad una distanza  $R$  dalla molecola, è proporzionale a

$$\alpha_{if}(t) e^{iQ \cdot r(t)}$$

---

<sup>3</sup>Si intende la tendenza di una distribuzione elettrica a modificare la sua posizione originaria per effetto di un campo elettromagnetico.

dove  $\alpha_{if} = n_i \cdot \boldsymbol{\alpha}(t) \cdot n_f$  è la componente del tensore di polarizzabilità molecolare diretta lungo  $n_{in}$  e  $n_f = n_{scat}$ ,  $r(t)$  è la posizione del centro di massa della molecola al tempo t e  $\bar{Q}$  il consueto vettore d'onda scambiato. In particolare il fattore modulante  $\alpha_{if}(t)$  varia nel tempo perché le molecole ruotano e vibrano, mentre il fattore di fase  $e^{i\bar{Q} \cdot \bar{r}(t)}$  varia nel tempo per via dei moti traslatori delle molecole. L'espressione finale del campo *per singola molecola* è, nell'approssimazione  $R \gg r$ :

$$\bar{E}_{scat}(R, t) \simeq \frac{E_{in} k_{scat}^2 e^{ik_0 R - i\omega t}}{R} \alpha_{in, scat}(t) e^{i\bar{Q} \cdot \bar{r}(t)} \quad (9.9)$$

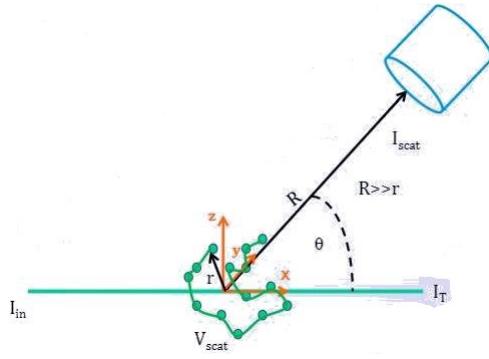


Figura 9.6: Calcolo del campo elettrico di diffusione per singola molecola

Se ora generalizziamo e passiamo da una singola molecola al caso di più molecole, possiamo supporre che il nuovo volume di scattering sia ad esempio un *fluido*. In un fluido, infatti, se le molecole sono accoppiate debolmente, vale a dire se gli stati elettronici delle singole molecole non sono perturbati significativamente dalle configurazioni elettroniche che le circondano, è ragionevole pensare che la luce scatterata dall'insieme di tutte le molecole contenute nel volume illuminato sarà una sovrapposizione delle ampiezze (data dal fattore modulante  $\alpha_{in, scat}$ ) scatterate da ciascuna molecola. Pertanto il campo diffuso sarà una somma di termini:

$$\bar{E}_{scat}(R, t) \simeq \frac{E_{in} k_{scat}^2 e^{ik_0 R - i\omega t}}{R} \sum_j \alpha_{in, scat}^j(t) e^{i\bar{Q} \cdot \bar{r}_j(t)} \quad (9.10)$$

Ciò conduce ad un pattern di interferenza modulato dai moti molecolari.

Infine, sapendo che l'intensità di corrente è il modulo quadro del vettore campo elettrico, troviamo il valore di corrente che ci aspettiamo di rivelare con il fotomoltiplicatore:

$$I_{scat}(R) = |\bar{E}_{scat}(R)|^2 \simeq \frac{I_{in} k_{scat}^4}{R^2} \quad (9.11)$$

Quanto trovato è coerente con quanto ci si aspetterebbe. Innanzitutto il denominatore rispecchia le attese del fatto che la luce diffusa è scatterata in tutte le direzioni e si comporta quindi, in prima approssimazione, come un'onda sferica. In secondo luogo, la potenza quarta del numero d'onda di scattering a numeratore, indica che la diffusione dipende da  $1/\lambda^4$ , il che implica che la luce blu viene diffusa molto di più della luce rossa e con maggior intensità. Da ciò dipende il fatto che gli esperimenti di scattering vengono fatti con luce UV-VIS e non con IR. Inoltre questo è il principale motivo per cui vediamo

il cielo azzurro.<sup>4</sup>. Una conseguenza di ciò è che vediamo il Sole giallognolo, ovvero di un colore bianco privato del solo azzurro. Sempre per lo stesso motivo all'alba e al tramonto le nuvole e gli oggetti assumono un colore rossastro; in queste condizioni infatti i raggi solari attraversano uno spessore maggiore dell'atmosfera terrestre, incontrando un maggior volume di scattering, maggiori recettori e quindi anche altre lunghezze d'onda vengono diffuse, seppur con intensità minore dell'azzurro.

Nonostante il fatto che il modello sia in linea con le previsioni, è evidente che si tratta di un'approssimazione. In generale quando due molecole collidono subiscono delle perturbazioni ai loro stati elettronici. Tali distorsioni persistono per tutto l'intervallo temporale che è richiesto alla molecola per superare la barriera di potenziale di interazione intermolecolare, tempo che è dell'ordine dei  $10^{-13}$ s. Le espressioni 9.10 e 9.11 non tengono quindi in considerazione i fenomeni che avvengono su corta scala temporale, per un approfondimento dei quali si rimanda alla *teoria dello scattering ottico indotto da urti*.

Per completezza consideriamo, in conclusione, il termine  $\alpha_{in,scat}^j$  del tensore di polarizzabilità molecolare. Esso può essere inteso come la somma di due termini: la polarizzabilità della molecola fissata nella sua configurazione di equilibrio nucleare e la polarizzabilità lineare con gli spostamenti vibrazionali.

$$\alpha_{in,scat}^j = \alpha_{in,scat}^j(\text{cfg fissata in eq. nucleare}) + \alpha_{in,scat}^j(\text{lineare moti vibraz.})$$

La prima componente tiene conto dei moti di pura rotazione e di pura traslazione della molecola. Essa si adatta pertanto bene alla teoria classica quasi-elastica che abbiamo qui esposto e considera trascurabili le variazioni di frequenza causate dall'accoppiamento debole tra le molecole. Di questa parte della polarizzabilità si occupa lo **scattering "Rayleigh-Brillouin"**.

La seconda componente descrive invece gli adattamenti della molecola ai moti vibrazionali causati dall'interazione intermolecolare. A ciascuna di queste oscillazioni si assegna una frequenza  $\Omega$ . Vale che, in queste circostanze,  $Q(t) \sim \cos(\Omega t)$ . Questi termini di polarizzabilità danno quindi luogo a variazioni della frequenza dei modi di vibrazioni della molecola nel tempo. Di esse si occupa lo **scattering "Raman"**. Gli shift in frequenza si ritrovano, nello spettro che se ne può ottenere, essere pari a  $\Omega$  (*banda Stokes*) e a  $-\Omega$  (*banda anti-Stokes*). La regola di selezione per tali bande è  $\delta\alpha_{in,scat}^j/\delta Q \neq 0$ . Le variazioni di frequenza dei modi normali si collocano in genere tra 100 e 4000 cm<sup>-1</sup>. Non approfondiremo oltre la scattering Raman.

## 9.4 Deviazioni dal modello quasi-elastico

### 9.4.1 Dimensioni delle molecole

Nel paragrafo precedente abbiamo assunto valida l'ipotesi che le dimensioni delle molecole fossero molto più piccole delle lunghezze d'onda coinvolte. Se consideriamo però che sperimentalmente lo scattering è applicato a macromolecole, che possono raggiungere dimensioni dell'ordine di  $10^{-9}$ m, ecco che l'ipotesi cessa di essere valida. Ciò nonostante il modello può essere adattato a questa situazione e consente di ottenere informazioni sulla forma e sulle dimensioni di una molecola dall'andamento della luce diffusa al variare dell'angolo di scattering. Nello specifico si fa riferimento a due parametri:

---

<sup>4</sup>Si potrebbe pensare che, stando così le cose, dovremmo vedere il cielo viola. Una risposta a ciò è che l'occhio umano è dotato di fotorecettori molto più sensibili al blu e all'azzurro che non al viola.

1. un **fattore di forma**, che consente di ottenere informazioni generali sulle dimensioni e sulla forma appunto della molecola;
2. un **fattore di struttura** che fornisce informazioni sull'ordine strutturale del campione, vale a dire sull'entità del raggio entro cui posso considerare la molecola ordinata. Fenomenologicamente si parla di *corto range* per i liquidi (se isotropi il fattore dipende unicamente da  $Q$ ) e di *long range* per i cristalli.

Analizziamo in che modo sia possibile ottenere informazioni sulla forma delle molecole analizzate, ove queste abbiano una dimensione dello stesso ordine delle lunghezze d'onda coinvolte. Per fare ciò si ricorre in genere a due tecniche: la prima indicata con **SAXS (Small Angle X-ray Scattering)** consiste nello studio della diffusione di raggi X ( $\lambda = 0.1 - 0.2\text{nm}$ ) da parte di un campione che presenta disomogeneità nell'ordine dei nanometri, raccolta a basso angolo (tipicamente  $0.1-10^\circ$ ). La seconda consiste invece nella **SLS (Static Light Scattering)** che consente di ottenere il peso molecolare medio in base all'intensità rilevata dopo la diffusione.

Nel SAXS, l'evidenza sperimentale che fa intuire la presenza di un fattore di forma è il fatto che si trovi l'angolo di diffusione ad una ampiezza maggiore rispetto a quella attesa per un singolo dipolo. Per cercare di capire di più circa tale parametro utilizzando l'unico modello in nostro possesso, si tenta di riscrivere il campo scatterato, non più sommando sulle singole molecole (dal momento che ne stiamo illuminando una sola!), ma bensì sommando sui singoli monomeri costituenti

$$\begin{aligned} \bar{E}_{scat}(R, t) &\simeq \frac{E_{in}}{R} \sum_{k=1}^N e^{i\bar{Q}\cdot\bar{r}_k(t)} \\ \implies I_{scat}(Q) &= \langle |E_{scat}(Q, t)|^2 \rangle \end{aligned} \quad (9.12)$$

Tuttavia, per tener conto della continuità dei costituenti della molecola si preferisce sostituire la somma teoria sui singoli monomeri con la trasformata spaziale di Fourier del **numero di densità microscopica**  $\rho$

$$\rho = \sum_{j=i}^N \delta(r - r_j(t))$$

che esprime il numero di particelle in un intorno di  $r_j$  al tempo  $t$ . Esso pertanto è un parametro significativo sulla forma delle molecole. Come conseguenza di ciò il campo elettrico viene scritto

$$\bar{E}_{scat}(R, t) \simeq \frac{E_{in}}{R} \int d\bar{r} \rho(\bar{r}) e^{i\bar{Q}\cdot\bar{r}_k(t)} \quad (9.13)$$

Come si vede è ancora presente uno shift di fase; tuttavia questa volta esso non è più attribuibile allo spostamento delle molecole, quanto piuttosto alla forma e alla dimensione della singola macromolecola che stiamo analizzando. A questo punto si calcola il parametro che indica il rapporto tra l'intensità di scattering misurata a diversi angoli, espressa in funzione del vettore d'onda scambiato  $Q$ , e l'intensità incidente settata al laser:

$$\mathcal{P}(Q) = \frac{I_{scat}(Q)}{I_0} = \left| \frac{1}{V_m} \int_{V_m} e^{i\bar{Q}\cdot\bar{r}} d\bar{r} \right|^2 = \left| \int \langle \rho(r) \rangle_{rot} e^{i\bar{Q}\cdot\bar{r}} dr \right|^2 \quad (9.14)$$

dove l'integrale è normalizzato su tutto il volume eccitato (prima uguaglianza). Il secondo passaggio si spiega con il fatto che per via dell'alto numero di configurazioni possibili,

è necessario mediare spazialmente su tutte le disposizioni rotazionali possibili, perdenendo inevitabilmente informazioni. Il plot di  $\mathcal{P}(Q)$  in funzione di  $Q$ , è chiamato **Guinier Plot**: l'intercetta restituisce il *raggio di girazione*, significativo delle dimensioni molecolari, mentre la pendenza restituiscono l'intensità diffusa con angolo di scattering nullo, il che è legato alla massa molecolare del campione.

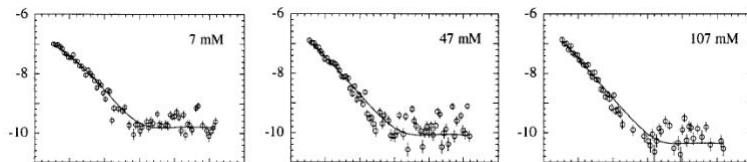


Figura 9.7: Esempi di plot di Guinier.

Per dare un'idea un po' più concreta, per quanto semplice e stereotipata, si modellizza in genere una molecola con un modello sferico, in base al quale si stendono le previsioni delle intensità di scattering in base ai vari angoli di diffusione e quindi in funzione del valore di  $Q$ . Quando la raccolta dati mostra una deviazione dalla previsione, allora è possibile concludere che la molecola non è perfettamente sferica. Dall'andamento dei Guinier Plot si può risalire alla dimensione e occupazione spaziale *media* della molecola.

#### 9.4.2 Molecole interagenti

La tecnica dello Static Light Scattering permette invece di avanzare studi sul peso molecolare delle sostanze in esame. In particolare si raccolgono i dati sulla intensità di scattering per campioni di uguale natura ma diversa concentrazione. Ricordando la relazione fondamentale 9.1, ci si aspetterebbe una proporzionalità diretta tra l'intensità misurata e la concentrazione del campione dal momento che

$$\frac{I_{scat}}{V_{EXC}} = nM^2 = (nM)M = CM$$

dove  $C$  è la concentrazione in soluzione del campione.<sup>5</sup>

Tuttavia il grafico che si ottiene sperimentalmente risulta come quello che segue:

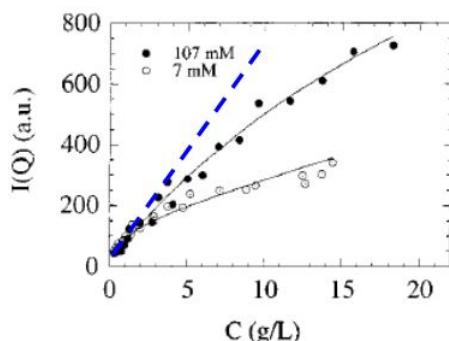


Figura 9.8: La non linearità dell'intensità di diffusione con la concentrazione di proteina è dovuta all'interazione proteina-proteina.

<sup>5</sup>Dimensionalmente si ha  $nM = C \iff [mol/L][g/mol] = [g/L]$ .

Si osserva che l'andamento della intensità diffusa non è più lineare con la concentrazione e la deviazione è tanto maggiore quanto minore è la concentrazione molare che si sta considerando. Tale andamento viene fittato con una nuova relazione di scattering, espressa come

$$\frac{I_{scat}}{V_{EXC}} = CM + \alpha C^2 \quad (9.15)$$

dove il termine quadratico nella concentrazione in soluzione è un fattore correttivo all'andamento teorico, che tiene conto dell'effetto delle interazioni, dovuto alla carica superficiale e dipendente dal pH e dalla forza ionica della soluzione. La **forza ionica** in particolare gioca un ruolo di "schermo" sull'interazione tra proteine. Ricordiamo infatti che per forza ionica si intende l'intensità del campo elettrico generato dalle cariche presenti in una soluzione ed è definita come

$$I_{ionica} = \frac{1}{2} \sum_{i=ioni} z_i^2 C_i \quad (9.16)$$

dove  $C_i$  esprime la concentrazione della specie ionica i-esima e  $z_i$  la sua carica. Per un elettrolita (sostanza che allo stato fuso subisce la suddivisione in ioni delle sue molecole) che si dissocia 1:1, come nel caso di sali semplici quali NaCl e KCl, la forza ionica coincide con la concentrazione di uno dei due ioni dal momento che, ad esempio nel caso del cloruro di sodio

$$I_{ionica} = \frac{1}{2} \left\{ z_{Na}^2 [Na] + z_{Cl}^2 [Cl] \right\} = \frac{1}{2} \left\{ (1)^2 [NaCl] + (-1)^2 [NaCl] \right\} = [NaCl]$$

In tal caso il disturbo è minimo perché l'effetto si risolve entro il limite lineare della concentrazione. Quando invece gli ioni in soluzione sono polivalenti, la forza ionica è più grande della concentrazione. Come principale conseguenza il campo elettrostatico generato dalla proteina è decade più velocemente del modello coulombiano a causa dello **schermo ionico**

$$E \sim \frac{e^{(-r\chi)}}{r}$$

dove  $\chi$  è il **parametro di screening** che dipende dalla forza ionica e serve a stimare questo effetto.

## 9.5 Fluttuazioni del segnale

Negli esperimenti di scattering ottico, il campo di luce incidente è sufficientemente debole da permettere di assumere che il campione risponda linearmente ad esso. Il problema che si pone in questi casi è quello di tracciare un modello teorico che sia in grado di descrivere come varia nel tempo il campo che interagisce debolmente con il campione in equilibrio. Supponendo quindi che luce incidente e materia siano debolmente accoppiati, basta conoscere come entrambi i sistemi si comportano in assenza dell'accoppiamento, per poter descrivere in che modo uno risponde all'interazione con l'altro (*Teoria della risposta lineare*).

L'agitazione termica delle molecole di un sistema colpito da un'onda elettromagnetica provoca delle fluttuazioni nel tempo del campo elettrico diffuso; tali fluttuazioni sono significative dell'interazione e quindi di come cambia il campo dopo la diffusione e sono ben descritte dalle **funzioni di correlazione temporale**, che esprimono quanto sono correlate due grandezze per un periodo di tempo. Vediamo dunque più in dettaglio la

questione.

Iniziamo considerando il campo elettrico di scattering come definito in 9.10

$$E_{scat}(t) = \sum_{i=1}^N E_{scat}(Qr_i, t)$$

dove si mette in luce la dipendenza da tutti i punti dello spazio e dal tempo; esso pertanto cambierà evolvendo. Per tale motivo, ogni misura fatta sul campione in equilibrio sarà una media sul tempo  $T$ , dove  $T$  indica l'intervallo temporale durante il quale si esegue la misura che supponiamo iniziare ad un tempo  $t_0 = 0$

$$\langle E_{scat}(0) \rangle = \frac{1}{T} \int_0^T E_{scat}(t) dt$$

La media ha significato solo se il tempo  $T$  su cui è fatta è apprezzabilmente grande rispetto al periodo delle fluttuazioni. Un esperimento ideale sarebbe dunque quello in cui si media su un tempo infinito. La grandezza con cui tratteremo le fluttuazioni del segnale sarà pertanto:

$$\langle E_{scat}(0) \rangle = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_0^T E_{scat}(t) dt \quad (9.17)$$

Poiché il campo tiene conto dell'agitazione termica, il suo valore, valutato in due tempi diversi,  $t$  e  $t+\tau$ , sarà in generale diverso, cosicché  $E_{scat}(t+\tau) \neq E_{scat}(t)$ . Tuttavia, quando  $\tau$  è molto piccolo se confrontato con il tempo di fluttuazione del campo, allora il valore di  $E_{scat}(t + \tau)$  sarà molto prossimo a quello di  $E_{scat}(t)$ , tanto da permetterci di scrivere  $E_{scat}(t + \tau) \sim E_{scat}(t)$ . All'aumentare di  $\tau$ , il campo valutato in  $t + \tau$  si discosterà sempre di più dal valore in  $t$ . Questo ci permette di dire che il valore  $E_{scat}(t + \tau)$  è correlato a quello di  $E_{scat}(t)$  quando  $\tau$  è piccolo, ma che questa correlazione viene meno nel momento in cui  $\tau$  è più grande del periodo di fluttuazione del segnale. Una misura di questa correlazione è espressa dalla **funzione di autocorrelazione parziale del campo scatterato** definita da

$$\langle E_{scat}(0) E_{scat}^*(\tau) \rangle_t = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_0^\infty E_{scat}(t) E_{scat}^*(t + \tau) dt \quad (9.18)$$

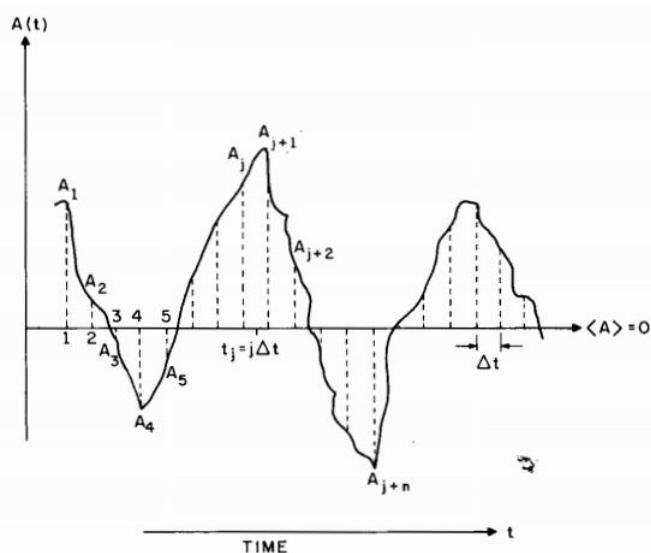


Figura 9.9: Fluttuazioni nel tempo del segnale di una generica grandezza  $A(t)$  dipendente dalle posizioni e dai momenti (Nel nostro caso  $A$  è il campo elettrico diffuso).

Supponiamo ora che l'asse dei tempi (si veda Fig. 9.9) sia diviso in  $N$  intervalli discreti  $\Delta t$  tali per cui  $t = j\Delta t$ ,  $\tau = n\Delta t$ ,  $T = N\Delta t$  e  $t + \tau = (j + n)\Delta t$  e supponiamo inoltre che il campo  $E_{scat}$  vari molto poco sull'intervallo  $\Delta t$ . È allora possibile approssimare le 9.17 e 9.18 come

$$\begin{cases} \langle E_{scat}(0) \rangle = \lim_{N \rightarrow \infty} \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N E_{scat,j} \\ \langle E_{scat}(0) E_{scat}^*(\tau) \rangle_t = \lim_{N \rightarrow \infty} \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N E_{scat,j} E_{scat,j+n}^* \end{cases} \quad (9.19)$$

nelle quali  $E_{scat,j}$  è il valore del campo diffuso all'inizio del  $j$ -esimo intervallo.

Nello specifico abbiamo introdotto la discretizzazione perché vogliamo dimostrare come varia la funzione di correlazione temporale con il tempo. Appare chiaro dalla figura Fig. 9.9 che alcuni contributi della sommatoria sono a ordinata negativa e tenderanno quindi ad eliminarsi con i corrispettivi valori positivi. Consideriamo ora invece il caso  $\langle E_{scat}(0) E_{scat}^*(0) \rangle$ . Il contributo della somma per questo termine è  $\sum_j E_{scat,j} E_{scat,j}^* = \sum_j E_{scat,j}^2 \geq 0$ . Poiché in questo caso tutti i termini della somma sono positivi ci aspettiamo che in generale valga la diseguaglianza

$$\sum_{j=1}^N E_{scat,j}^2 \geq \sum_{j=1}^N E_{scat,j} E_{scat,j+n}^* \quad (9.20)$$

la quale si traduce nella ben più interessante

$$\langle E_{scat}^2(0) \rangle \geq \langle E_{scat}(0) E_{scat}^*(\tau) \rangle \quad (9.21)$$

Quanto trovato ci dice che  $\langle E_{scat}^2(0) \rangle$  è il valore massimo che la funzione di correlazione temporale può assumere, e pertanto, il valore da cui essa decade nel tempo. Sappiamo infatti che quando il parametro di tempo  $\tau$  tende a diventare molto più grande del periodo di fluttuazione, i campi di diffusione valutati a un tempo  $t$  e  $t + \tau$  sono supposti essere totalmente scorrelati; deve valere che:

$$\lim_{\tau \rightarrow \infty} \langle E_{scat}(0) E_{scat}^*(\tau) \rangle = \langle E_{scat}(0) \rangle \langle E_{scat}(\tau) \rangle = \langle E_{scat} \rangle^2 \quad (9.22)$$

Concludiamo così che qualunque generica funzione di correlazione associata al campo diffuso (ma il discorso è generale, per un qualunque grandezza che dipenda da tutte le posizioni e i momenti del sistema) decade da un valore massimo  $\langle E^2 \rangle$  a un valore minimo  $\langle E \rangle^2$ .

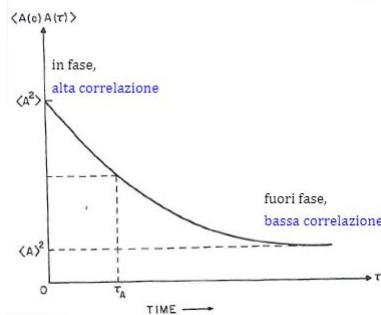


Figura 9.10: Andamento temporale di una funzione di correlazione con decadimento esponenziale.

Se ora definiamo

$$\delta E_{scat}(t) \equiv E_{scat}(t) - \langle E_{scat}(t) \rangle$$

che esprime la **fluttuazione del campo diffuso**, ovvero la deviazione istantanea del campo dal suo valor medio, si può dimostrare che la funzione di correlazione della fluttuazione è:

$$\langle \delta E_{scat}(0) \delta E_{scat}^*(\tau) \rangle = \langle E_{scat}(0) E_{scat}^*(\tau) \rangle - \langle E_{scat} \rangle^2$$

e che

$$\langle \delta E_{scat}^2(t) \rangle = \langle \delta E_{scat}(0) \delta E_{scat}^*(0) \rangle = [\langle E_{scat}^2 \rangle - \langle E_{scat} \rangle^2]$$

Queste variabili ci consentono di definire un parametro temporale che caratterizzi la scala temporale per la decrescenza della funzione di correlazione temporale. Introduciamo pertanto il **tempo di correlazione**

$$\boxed{\tau_C \equiv \int_0^\infty \frac{\langle \delta E_{scat}(0) \delta E_{scat}^*(\tau) \rangle}{\langle \delta E_{scat}^2(t) \rangle} dt} \quad (9.23)$$

In generale il tempo di correlazione avrà una forma complessa, che tiene conto di tutti i processi di rilassamento che contribuiscono al decadimento di  $\delta E_{scat}$ . Riassumendo quindi

- le funzioni di autocorrelazione temporale sono una misura di quanto due segnali  $E_{scat}(t)$  e  $E_{scat}(t + \tau)$  sono simili.
- quando  $\tau = 0$  i due segnali sono completamente in fase e  $\langle E_{scat}(0) E_{scat}^*(\tau) \rangle$  assume grandi valori, denotando forte correlazione. (Si veda il grafico in Fig.9.9).
- quando  $\tau$  aumenta,  $E_{scat}(t)$  e  $E_{scat}(t + \tau)$  sono fuori fase e la funzione di autocorrelazione è piccola (di nuovo, Fig. 9.9).

Lo studio delle fluttuazioni del segnale naturalmente non è fine a se stesso. Questo tipo di studio viene fatto nello scattering statico per risalire, ad esempio al vettore d'onda scambiato  $Q$  che abbiamo visto essere fondamentale per la stima del fattore di forma nel SAXS, oppure al coefficiente di diffusione  $D$  del campione. Vale infatti che:

$$\begin{aligned} E_{scat}(t) &\doteq e^{i\bar{Q}\cdot\bar{r}(t)} & (a) \\ E_{scat}(t)E_{scat}^*(t + \tau) &\doteq e^{-\bar{Q}\cdot\Delta\bar{r}(t)} & (b) \end{aligned} \quad (9.24)$$

Il massimo sfasamento, nella funzione di correlazione (b) si ha quando la differenza di fase è di  $\pi$ , ovvero quando vale

$$Q^2 |\Delta(r)(t)|^2 \simeq \pi^2$$

Dal modello di Einstein del moto browniano si può esprimere la fluttuazione della posizione in funzione del coefficiente di diffusione e il ritardo di fase  $\tau$

$$|\Delta r(t)|^2 \simeq 6D\tau$$

Ma allora è possibile ricavare l'espressione di  $\tau$  in funzione dei due parametri che ci interessano misurare per ottenere informazioni molecolari, valendo che

$$\tau \simeq \frac{\pi^2}{DQ^2}$$

Ricavando pertanto  $\tau$  dallo studio delle funzioni di correlazione temporale, si può concludere circa i fattori di forma di una molecola.

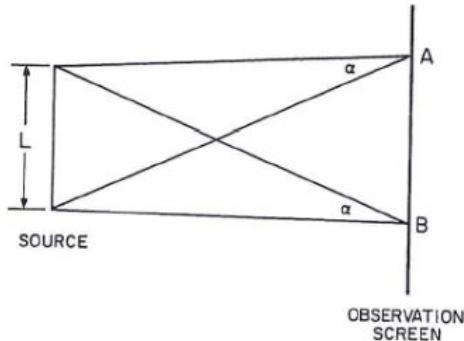
Naturalmente, sebbene il modello sia basato sulle funzioni di autocorrelazione e sulle fluttuazioni del campo elettrico, ciò che sperimentalmente si misura è al solito l'intensità di corrente che arriva all'anodo del fotomoltiplicatore. Possiamo dire che le fluttuazioni causate dalle variazioni del campo diffuso **inducono fluttuazioni nell'intensità diffusa**. Sapendo infatti che l'intensità di corrente è il modulo quadro del campo elettrico e che

$$E_{scat}(t) = \sum_{i=1}^N E_{scat}(Qr_i, t)$$

si trova

$$I_{scat}(t) = \left| \sum_{i=1}^N E_{scat}(Qr_i, t) \right|^2 \quad (9.25)$$

Si presta però bene attenzione al fatto che la somma che compare nell'espressione 9.25 dell'intensità di corrente è in realtà una **somma coerente**, ovvero una somma fatta solamente sui centri scatteratori per cui la correlazione dei campi elettrici non decade prima che venga osservata. Consideriamo, per semplicità di discussione la situazione seguente:



Sia  $L$  l'estensione della sorgente (volume di scattering) da cui proviene la luce; essa raggiunge poi uno schermo (fotocatodo) in diversi punti. Supponiamo che ogni punto della sorgente emetta in modo incoerente, vale a dire con fase randomica, come appunto nel caso di una molecola in moto termico. Consideriamo il punto A dello schermo. In questo punto l'intensità misurata sarà la sovrapposizione di tutte le onde prodotte dal volume illuminato. Lo stesso discorso vale per il punto B. Se ora i punti A e B sono molto vicini tra loro, le due intensità misurate nei due punti saranno pressoché uguali e *coerenti* tra di loro. Ci si può ora domandare cosa significhi molto vicini in questo caso, ovvero, quale sia la distanza tra A e B oltre la quale sparisce la coerenza. A tal proposito di definisce **distanza di coerenza**  $l_c$  la distanza entro la quale la **funzione di correlazione spaziale** dei campi elettrici nei due punti A e B è significativamente diversa da zero e, ovviamente, oltre la quale  $\langle E(A)E(B) \rangle$  è sufficientemente decresciuta. Calcolando esplicitamente la funzione di correlazione spaziale è possibile dimostrare che in un modello 1D, tale distanza è pari a

$$l_c = \frac{\lambda}{\alpha}$$

dove  $\alpha$  è l'angolo sotteso dallo schermo alla sorgente (si veda la Fig. 9.5) e  $\lambda$  la lunghezza d'onda media della radiazione diffusa.

Nel caso più realistico in cui invece la sorgente sia tridimensionale e lo schermo sia una superficie piatta come può essere il catodo di un fotomoltiplicatore, è possibile definire un'area attorno al punto A tale per cui tutti i segnali di campi nei punti di questa area sono soddisfacentemente coerente con quello del punto A. Questa area viene chiamata **area di coerenza** e viene stimata con buona approssimazione dalla relazione

$$A_{coh} \simeq \frac{\lambda^2}{\Omega}$$

dove  $\Omega$  è l'angolo solido sotteso dalla sorgente al fotocatodo. Più piccolo è l'angolo solido, maggiore l'area di coerenza.

## 9.6 Note di sperimentazione

Sin qui abbiamo discusso su come interpretare matematicamente le fluttuazioni del segnale e sul tratteggiare come esse possano fornire informazioni su dimensioni e natura delle molecole illuminate. Questa sezione si propone di impartire ulteriori nozioni su come trattare i dati sperimentali.

Una buona approssimazione per il campo diffuso è quella di **gaussiana a media nulla**. Viene infatti spontaneo considerarlo una somma di variabili indipendenti e casuali, quindi

$$\langle E_{scat} \rangle = 0$$

$$\langle E_{scat,j} E_{scat,k} \rangle = \delta_{j,k} \sigma^2$$

Il prodotto è **per particella**: particelle diverse sono per forza scorrelate.

Non è possibile misurare direttamente il campo; la misura è quindi della sua **intensità**, che è il suo modulo quadro. La funzione di correlazione del campo misurata deve dunque essere fittata con il quadrato di quella teorica

$$g_2(\tau) = 1 + |g_1(\tau)|^2$$

a questo punto risulta più comodo fare la radice della misura se ho molti oggetti in soluzione e lavorare direttamente sul campo.  $E_{scat}$  ha la forma:

$$E_{scat}(R, t) = \frac{E_{in} k_{scat}^2 e^{ik_0 R - iwt}}{R} \alpha_{in, scat}(t) e^{Q \cdot r(t)}$$

a noi interessa la seconda parte dell'equazione, dopo la frazione:  $g_1$  diventa quindi

$$g_1(\tau) = e^{iwt} \frac{\langle \alpha(0) \alpha^*(\tau) \rangle_t}{\langle \alpha(0)^2 \rangle_t} \langle e^{-iQ(r(t) - r(0))} \rangle = e^{iwt} C_\alpha(\tau) C_\phi(\tau)$$

dove  $C_\alpha$  contiene la parte rotazionale e vibrazionale (trascurabili se le particelle sono piccole rispetto a  $Q^{-1}$ ), mentre  $C_\phi$  è la **funzione di decadimento del campo** e contiene informazioni sulla parte traslazionale. In particolare

$$C_\phi(\tau) = \int G_s(R, \tau) e^{-iQ \cdot R} d^3 R$$

dove  $G_s(R, \tau)$  è la probabilità di trovare in R a  $\tau$  una particella che era in 0 a  $t = 0$ . Se consideriamo un moto Browniano ha come espressione

$$G_s(R, \tau) = (4\pi D\tau)^{-\frac{3}{2}} e^{-\frac{R^2}{4D\tau}}$$

Si noti come, nel caso  $\tau$  tenda a 0, la funzione tenda a  $\delta(R)$ .

**Mi arrendo su slide 36, che dovrebbe concludere il discorso. Magari Francesca ha appunti comprensibili. Davide**

Pure i miei appunti fanno schifo T\_T -F.

### Polidispersità

Se il campione contiene una sola specie in soluzione è sufficiente fare il fit con un'esponenziale, che praticamente ignora se sia stato misurato un campo o un'intensità. Dalla misura della dispersione è possibile ricavare il **raggio** delle molecole grazie all'equazione

$$D = \frac{K_b T}{6\pi\eta R}$$

basata sul modello di Einstein e approssimata con Stokes.

Se invece sono presenti specie con diversa massa e coefficienti di dispersione è necessario utilizzare un altro metodo: il metodo di **massima entropia**. Per quanto ci riguarda basta sapere che, una volta dati in pasto al programma i dati, questo ci restituisce i picchi dei raggi idrodinamici. Ricorda che l'intensità ha una dipendenza **quadratica** dalla massa degli aggregati, mentre è lineare nelle concentrazioni. I picchi devono essere normalizzati secondo queste caratteristiche.

Un metodo più grezzo, ma utile per una stima, è quello dei cumulanti: prendendo il logaritmo di  $g_1(\tau)$

$$\log(g_1(\tau)) = -D_z Q^2 \tau + \frac{\mu_2}{2} \tau^2 = k_1 \tau + k_2 \tau^2$$

trovo un coefficiente di diffusione  $D_z$  che è la media pesata degli oggetti in soluzione

$$D_z = \frac{\sum D_i M_i C_i P_i(Q)}{\sum M_i C_i P_i(Q)}$$

in cui  $P_i$  è il fattore di forma.  $k_2$  è invece la varianza di D. Il rapporto  $\frac{k_1}{k_2}$  è detto **fattore di qualità** e, nel caso sia abbastanza piccolo ( $< 0.02$ ) è una buona indicazione che il campione è **monodisperso**. Si può in tal caso fare il fit con un solo esponenziale.

# Capitolo 10

## LE NANOPARTICELLE

### 10.1 Proprietà generali

Le nanoparticelle sono dei materiali con una microstruttura la cui scala caratteristica ha una dimensione dell'ordine dei nanometri: dai 100 nanometri fino a qualche nanometro. Le caratteristiche di gran parte dei materiali convenzionali cambiano quando in forma di nanoparticella: questo tipicamente è dovuto ad una maggiore superficie attiva per unità di peso rispetto alle particelle più grandi rendendole più reattive alle molecole. Le nanoparticelle sono spesso disperse in una soluzione colloidale. Un colloide è una sostanza che si trova in uno stato finemente disperso, intermedio tra la soluzione omogenea e la dispersione eterogenea, consiste cioè di una sostanza di dimensioni microscopiche (diametro da 1 nm a 1000 nm) dispersa in una fase continua. Esistono diversi tipi di nanoparticelle e le loro funzionalità e struttura cambiano radicalmente da un tipo ad un altro. Le nanoparticelle possono essere organiche, metalliche, inorganiche o anche ibride. Storicamente le prime nanoparticelle utilizzate dall'uomo sono quelle metalliche, in particolare quelle d'oro e d'argento per le loro proprietà ottiche. Possono, infatti, far assumere una colorazione differente in base alla luce a cui esposte come è possibile vedere nella figura sottostante.



Figura 10.1: Vaso di Licurgo (400 DC). La coppa da verde assume colorazione rosso-arancio se attraversata dalla luce grazie alle nanoparticelle d'oro e d'argento di 30-70 nanometri all'interno del vetro.

Quando la nanoparticella viene colpita da una radiazione elettromagnetica (come può essere una radiazione luminosa), gli elettroni di conduzione iniziano ad oscillare, com-

portandosi come oscillatori forzati accoppiati. La frequenza di oscillazione collettiva di questi elettroni è responsabile della colorazione caratteristica delle nanoparticelle. Modulandone la forma, ad esempio da sferica a cilindrica, è possibile cambiare la frequenza di risonanza, ottenendo così nanoparticelle d'oro da più svariati colori, dal blu, fino al rosso. Tali fenomeni sono tipici delle nanoparticelle metalliche. Le proprietà elettriche, ottiche e termiche cambiano drasticamente passando dalle dimensioni di bulk a piccoli aggregati di atomi. Una sospensione di nanoparticelle d'oro in acqua, non assume come ci si aspetterebbe un colore giallo, ma assumerà una colorazione arancio-rossa. Hanno svariate applicazioni in moltissimi campi:

- Trovano impiego nella **chimica** come catalizzatori data la loro **resistenza all'ossidazione** e al fatto di essere per la maggior parte **inerti** e possono essere smaltiti senza problemi. Inoltre hanno una grande affinità con il gruppo **tiolo** ( $\text{SH}$ ) mediante il quale possono poi legarsi a molte altre particelle e sono solubili in soluzioni di  $\text{CN}^-$  e in acqua regia (acido nitrico+acido cloridrico 1:3).
- Hanno guadagnato sempre più impiego nella **biologia** a scopo medico. Vengono usate per l'imaging e per il rilascio controllato di farmaci e in terapie di nuova generazione. Una di questa è la **terapia fototermica** per la cura dei tumori. Questa tecnica consiste nell'introdurre nanoparticelle funzionalizzate per il riconoscimento delle cellule tumorali. Una volta assorbite da quest'ultime sono in grado di scaldarsi, se eccitate con una determinata lunghezza d'onda, distruggendo la cellula dall'interno.
- Le nanoparticelle metalliche, in particolare quelle d'oro, hanno **proprietà ottiche** molto particolari, che non sono riscontrabili nei metalli massivi. Trattandosi di un metallo, gli elettroni sono liberi di spostarsi. Quando la luce incidente ha lunghezza d'onda maggiore rispetto alla grandezza della nanoparticella, si creano forti interazioni sulla superficie che portano a condizioni di risonanza. In particolare, succede che la luce incidente può essere assorbita provocando l'oscillazione collettiva degli elettroni liberi nel metallo e determinando un intenso colore rosso delle nanoparticelle. Poiché questo effetto è di superficie, si parla di **risonanza plasmonica di superficie**. Al cambiare della forma e della grandezza della particella, anche la geometria della superficie cambia e di conseguenza cambia anche la frequenza di oscillazione degli elettroni e quindi si ha una variazione delle proprietà ottiche del materiale.
- Le caratteristiche **fisiche** di un materiale nella forma nanoparticellare risultano differenti a causa della dimensione. Le nano particelle, infatti, hanno dimensioni tali da poter confinare gli elettroni (confinamento quantistico) dando così al materiale in questione proprietà che normalmente non avrebbe. Similmente ad una particella in una scatola la distanza fra i vari livelli energetici aumenta con il diminuire della grandezza della scatola stessa. Il carbonio è un esempio di questa caratteristica. È un non metallo e in condizioni generiche non è un ottimo conduttore, ma quando viene utilizzato sotto forma di nanotubi acquista proprietà conduttrici o semiconduttrici a seconda delle caratteristiche della struttura (come chiralità e diametro).

Di particolare importanza, per la semplicità di sintesi e le caratteristiche mostrate, sono le nanoparticelle d'oro. Le proprietà ottiche, termiche e elettriche di questo metallo

cambiano drasticamente passando da bulk a dimensioni nanometriche. Ad esempio per effetto delle vibrazioni degli elettroni di superficie che entrano in risonanza con luce di lunghezza d'onda che va dal verde all'infrarosso, le nanoparticelle d'oro sono in grado di **assorbire o diffondere** questa luce. È possibile osservare altri cambiamenti delle caratteristiche fisiche di questo metallo come la variazione della **Temperatura di melting**. Otteniamo una variazione di  $\Delta T_m = 50^\circ$  da bulk ad una dimensione di 20nm, e una variazione di ben  $\Delta T_m = 400^\circ$  passando da 20nm a 5nm. Tale cambiamento è dovuto al rapporto superficie/volume che permette una dispersione più efficiente del calore lungo tutto il volume, evitando così lo scioglimento della superficie. L'**elevato rapporto superficie volume** è, inoltre, responsabile dell'aumento della conducibilità termica del metallo. In particolari condizioni è possibile osservare anche il fenomeno della **fluorescenza**: quando le dimensioni in gioco diventano comparabili con la lunghezza d'onda di De Broglie dell'elettrone (ad energia dello stato fondamentale) si ottengono transizioni elettroniche fra stati discreti che causano emissione luminosa. Le nanoparticelle d'oro sono state studiate per molto tempo e il loro utilizzo risale a molti anni fa. Molti sono coloro che hanno studiato le caratteristiche di questo materiale, ma i principali sono:

- **Paracelso, XVI sec**: farmaci contenenti oro (cuore), prime sintesi;
- **A.Neri, 1612**: trattato sui vetri color rubino;
- **J.Kunckel, 1615**: "Ars Vitraria Experimentalis";
- **A.Cassius, 1685**: "De Auro", precipitazione oro;
- **M.Faraday, 1850**: studio scientiKico nanoparticelle, colloid;
- **G.Mie, 1908**: proprietà ottiche nanoparticelle,  $A=A(d)$  "d" dimensione;
- **R.A.Zsigmondy, 1925**: sintesi colloidali, stato di carica;
- **J.Turkevich, 1948**: reazione con citrato di sodio;
- **G.Frens, 1970**: migliora reazione di sintesi, controllo dimensioni prodotti;
- **M.Burst, 1994**: funzionalizzazione tiolica superficie nanoparticelle;

### 10.1.1 Risonanza plasmotica superficiale

In un metallo gli elettroni sono liberi di muoversi formando a tutti gli effetti una nube elettronica che può essere influenzata da campi elettromagnetici esterni. Presa in considerazione la nube sulla superficie del materiale, definiamo **plasmone di superficie** l'eccitazione collettiva a cui questo insieme di elettroni va incontro. Viene anche definito come *i modi normali di oscillazione superficiali della nube elettronica*. Quando queste oscillazioni coerenti e collettive sono indotte dal campo elettromagnetico di un onda luminosa allora si parla di **risonanza plasmonica superficiale**. Le condizioni per poter ottenere questa risonanza sono fortemente influenzate dalle caratteristiche della particella. La banda di **assorbimento plasmonico superficiale** dipende dalla lunghezza d'onda incidente. Introdotta la grandezza  $\sigma_{ottica}$ , *sezione d'urto ottica*, definita come la probabilità di interagire con la radiazione (o l'area entro la quale il campo viene disturbato dalla presenza della nanoparticella), possiamo osservare come tali grandezza cambi quando utilizzo un'onda con lunghezza d'onda appropriata  $\lambda_P$ .

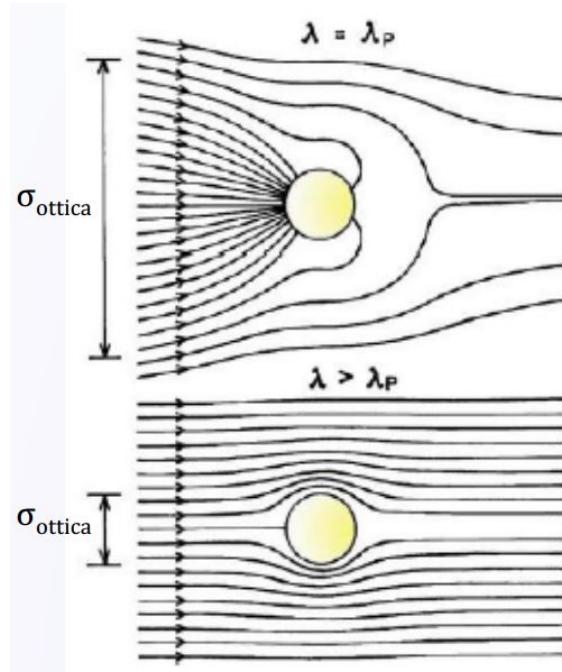


Figura 10.2: Esempio di come varia la sezione d'urto ottica.

La lunghezza d'onda necessaria per ottenere questa risonanza varia al variare delle caratteristiche della nanoparticella e dell'ambiente in cui essa si trova.  $\lambda$  dipende infatti dalla *dimensione, forma, composizione, orientazione e dall'ambiente circostante*.

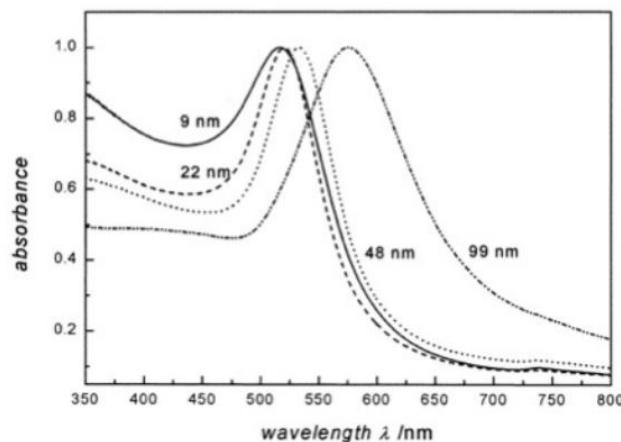


Figura 10.3: Variazione dell'assorbanza in funzione della dimensione.

### cose sul coefficienti di estinzione

#### 10.1.2 Origine delle risonanze plasmoniche superficiali

Sappiamo che i plasmoni di superficie sono dovuti all'interazione con il campo elettrico dell'onda luminosa incidente. Tale campo fa oscillare la nube elettronica con un periodo  $T$  creando per l'appunto un'oscillazione collettiva e coerente.

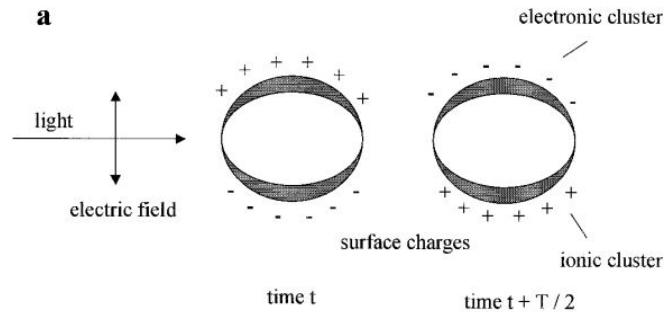


Figura 10.4:

Per poter descrivere l'interazione con l'onda luminosa è possibile immaginare la nanoparticella come una sfera di raggio  $R$  dotata di permeabilità magnetica  $\mu$  e costante dielettrica  $\epsilon$ . Possiamo quindi impostare il problema utilizzando le equazioni di Maxwell con particolari condizioni al contorno che si adattano al nostro caso. Nel 1908 Mie fu il primo a risolvere tali equazioni:

$$\begin{cases} \nabla^2 E + k^2 E = 0 & [E_2(x) - E_1(x)] \times \hat{n} \\ \nabla^2 H + k^2 H = 0 & [H_2(x) - H_1(x)] \times \hat{n} \end{cases}$$

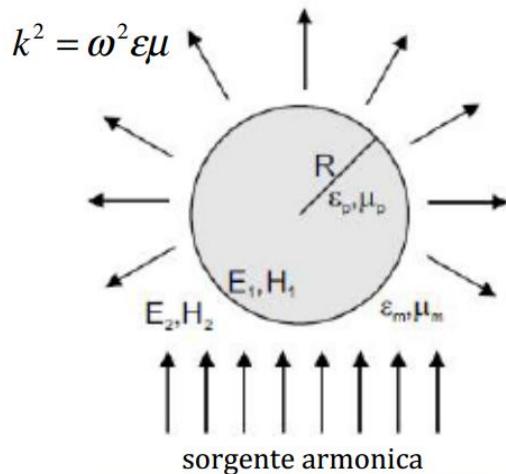


Figura 10.5:

La soluzione a queste equazioni porta ad una serie di oscillazioni di multipoli della sezione d'urto d'estinzione ( $\sigma_{est}$ ) che opportunamente sviluppata dà:

$$\begin{aligned} \sigma_{est} &= \frac{2\pi}{|k|^2} \sum_{L=1}^{\infty} Re(a_L + b_L) \\ \sigma_{scat} &= \frac{2\pi}{|k|^2} \sum_{L=1}^{\infty} (|a_L|^2 + |b_L|^2) \end{aligned}$$

Con  $\sigma_i$  sezione d'urto definita come  $\frac{P_i}{I_{inc}}$ . È inoltre valida la seguente relazione:

$$\sigma_{est} = \sigma_{abs} + \sigma_{scat}$$

Dove  $\sigma_{abs}$ ,  $\sigma_{scat}$  sono rispettivamente la sezione d'urto di assorbimento e di scattering. I coefficienti a e b hanno la seguente forma:

$$a_n = \frac{m\psi_L(mx)\psi'_L(x) - \psi'_L(mx)\psi_L(x)}{m\psi_L(mx)\eta'_L(x) - \psi'_L(mx)\eta_L(x)} \quad b_n = \frac{\psi_L(mx)\psi'_L(x) - m\psi'_L(mx)\psi_L(x)}{\psi_L(mx)\eta'_L(x) - m\psi'_L(mx)\eta_L(x)}$$

Con  $\mathbf{m}=\mathbf{n}/n_m$  oppure ( $m = \sqrt[2]{\varepsilon_p/\varepsilon_m}$ ), con  $\mathbf{n}$  indice di rifrazione complesso della particella e  $n_m$  l'indice di rifrazione reale del mezzo circostante.  $\mathbf{k}$  è il numero d'onda e  $\mathbf{x}=|\mathbf{k}|\mathbf{R}$  e  $\psi_L$ ,  $\eta_L$  sono le funzioni cilindriche di **Riccati-Bessel** (possono essere viste come particolari armoniche sferiche). L è l'ordine dello sviluppo di multipolo:  $L=1$  si riferisce all'oscillazione del dipolo,  $L=2$  al quadripolo e così via. Appare evidente come sia necessario ricavare una nuova espressione per  $\varepsilon_p$  per sostituire quella della finora utilizzata (calcolata sul materiale in versione bulk e non in dimensioni nanometriche). Vediamo che le soluzioni dipendono da un parametro dimensionale (x o R) da cui possiamo estrarre un **effetto estrinseco** legato alla dimensione:

- $R \ll \lambda$  ossia  $x \ll 1 \rightarrow$  regime quasi-statico (dipolare);
- $R \sim \lambda$ ,  $x \sim 1 \rightarrow$  regime dinamico (multipolare);

### Modello di Drude-Sommerfeld per i metalli

Una piccola digressione sul modello che permette di ricavare la costante dielettrica per materiali in forma nanoparticellare (valido per basse energie). Sostanzialmente consiste nel considerare gli elettroni come oscillatori armonici sotto l'azione di un campo elettromagnetico che collidono con centri di collisione (ioni del reticolo, fononi, difetti, altri elettroni) con tasso  $\gamma_0 = 1/\tau$ . Si ricava:

$$\varepsilon_p = \varepsilon_\infty - \frac{\omega_p^2}{\omega(\omega + i\gamma_0)} \sim \varepsilon_\infty - \frac{\omega_p^2}{\omega^2} + i \frac{\omega_p^2 \gamma_0}{\omega^3}$$

Con  $\omega_p = \sqrt[2]{ne^2/\varepsilon_0 m^{**}}$  detta **frequenza di plasma**.  $\varepsilon_\infty$  = contributi di  $e^-$  legati, n densità  $e^-$  conduzione e  $m^{**}$  massa efficace degli  $e^-$  di conduzione. **NON HO CAPITO A COSA SERVE LA SLIDE 9 PROBABILMENTE A NULLA -F.**

## 10.2 Approssimazione teoria di Mie

Se prendiamo il caso di nanoparticelle **piccole** e quindi ci mettiamo nel caso  $\mathbf{R} \gg \lambda$  ossia nel regime quasi-statico (dipolare o limite di Rayleigh) otteniamo che solo l'oscillazione dei dipoli influisce significativamente sul valore della sezione d'urto d'estinzione. Ottieniamo quindi che il campo elettromagnetico risulta costante su tutta la superficie della nanoparticella e che i cambiamenti su quest'ultimo si propagano in tempi più brevi rispetto all'oscillazione. Possiamo quindi arrestarci al primo ordine della sommatoria e scrivere:

$$\sigma_{est}(\omega) = 9 \frac{\omega}{c} \varepsilon_m^{3/2} V \frac{\varepsilon_2(\omega)}{[\varepsilon_1(\omega) + 2\varepsilon_m]}$$

Si è effettuata la sostituzione  $\varepsilon_p(\omega) = \varepsilon_1(\omega) + i\varepsilon_2(\omega)$ .  $V$  è il volume della nanoparticella,  $\omega$  la frequenza dell'onda incidente e  $c$  è la velocità della luce. La condizione di

risonanza diventa  $\varepsilon_1(\omega) = -2\varepsilon_m$  con  $\varepsilon_2(\omega)$  piccolo si ottiene indipendenza dalle dimensioni della nanoparticella. Di conseguenza la posizione del picco di assorbanza rimane costante. Consideriamo ora una nanoparticella d'oro con  $R \gg 10\text{nm}$  e una lunghezza d'onda incidente tale per cui possiamo usare l'approssimazione dinamica (multipolare)  $R \sim \lambda$ . In questo caso  $x = x(R)$  quindi la risonanza plasmatica dipende dalle dimensioni della particella. In aggiunta otteniamo che il campo elettromagnetico non è più costante sulla superficie e di conseguenza la polarizzazione risulta disomogenea: diventa rilevante il contributo dei multipoli di ordine superiore al primo (sempre maggiori al crescere di  $x$ ). La banda di assorbimento plasmotica si sposta verso il rosso man mano che la dimensione cresce con un aumento dell'ampiezza. Questo è dovuto ad un maggior numero di modi di oscillazione ma ad energia minore.

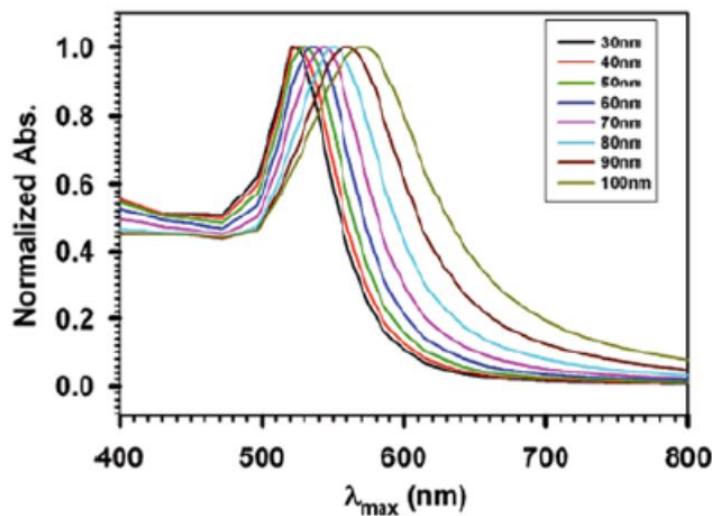


Figura 10.6:

Per quanto riguarda le piccole particelle, come abbiamo visto in precedenza, essendo valida l'approssimazione dipolare si ottiene un'indipendenza dalle dimensioni della particella stessa. Sperimentalmente però si è osservato che riducendo le dimensioni fino a qualche nanometro si ha una grossa influenza sull'assorbimento (per  $R < 2\text{nm}$  scompare l'effetto di assorbimento plasmonico). Questo significa che oltre all'effetto **estrinseco** prima descritto ci deve essere un altro effetto, **intrinseco**, che causa la dipendenza dalle dimensioni (per l'oro  $R < 10\text{nm}$ ). La causa di questa variazione nella sezione d'urto è dovuta ad una dipendenza dal raggio che modifica il valore della costante dielettrica  $\varepsilon_p(\omega) \rightarrow \varepsilon_p(R, \omega)$ . Questa dipendenza dal raggio si presenta quando le dimensioni della particella sono talmente piccole da influire sul libero cammino medio degli elettroni di conduzione. Quando il diametro risulta minore del libero cammino medio ( $2R < R_M$ ,  $R_M$  = libero cammino medio) gli elettroni vedono il loro moto ostacolato e urtano in modo elastico la superficie. Queste collisioni, elastiche e casuali, fanno perdere la coerenza delle oscillazioni della nube elettronica e di conseguenza hanno effetto sull'assorbimento. Possiamo quindi riassumere due effetti che concorrono nel modello che abbiamo utilizzato:

- **Estrinseco:** dato dall'interazione con le onde elettromagnetiche. Si divide a sua volta in due sottoclassi in base alla dimensione della particella in relazione alla lunghezza d'onda incidente (approssimazione **dipolare** e **multipolare**);

- **Intrinseco:** è un effetto che non era stato preso in considerazione e si presenta quando le dimensioni sono talmente piccole da poter influire sul libero cammino medio degli elettroni. Si manifesta come una dipendenza radiale per  $\varepsilon_p$ .

Quest'ultimo effetto dovuto alla dimensione può essere analizzato più nel dettaglio prendendo in considerazione i metalli nobili, più precisamente nanoparticelle d'oro. Vogliamo arrivare a scrivere la forma di  $\varepsilon_p$  dipendente dalle dimensioni della particella. Sappiamo che utilizzando il modello di Drude-Sommerfeld possiamo scrivere la costante dielettrica in questo modo:

$$\varepsilon_p = \varepsilon_\infty - \frac{\omega_p^2}{\omega(\omega + i\gamma_0)} \sim \varepsilon_\infty - \frac{\omega_p^2}{\omega^2} + i \frac{\omega_p^2 \gamma_0}{\omega^3}$$

In cui  $\gamma$  è legata al libero cammino medio. Per potere esprimere più nel dettaglio tale dipendenza analizziamo  $\varepsilon_\infty$ . Per questo particolare metallo possiamo scrivere:

$$\varepsilon_\infty(\omega) = 1 + \chi_d(\omega) + \chi_s(\omega)$$

Con  $\chi_d$  e  $\chi_s$  i contributi, rispettivamente, degli elettroni legati e degli elettroni di conduzione. Utilizzando il modello Drude-Sommerfeld si ricava:

$$\chi_s(\omega) = -\frac{\omega_p^2}{\omega^2 + \Gamma_\infty^2} + i \frac{\omega_p^2 \Gamma_\infty}{\omega(\omega^2 + \Gamma_\infty^2)}$$

$\omega_p$  rappresenta la frequenza di smorzamento degli elettroni in un metallo (in forma bulk). È possibile sviluppare gamma come somma dei vari contributi seguendo al regola di Matthiesen (a differenza di  $\gamma_0$  che comprendeva solo il tempo medio). I contribuiti di cui tenere conto sono gli urti tra elettroni (e-e), tra elettroni e fononi<sup>1</sup>(e-f) e con la superficie (e-d).

$$\Gamma_\infty = \frac{1}{\tau_{e-e}} + \frac{1}{\tau_{e-f}} + \frac{1}{\tau_{e-d}}$$

Per il caso in questione, ossia le nanoparticelle d'oro, gli effetti di superficie descritti in precedenza si presentano per  $R \sim 45\text{nm}$ . A queste dimensioni le collisioni con la superficie influiscono notevolmente e quindi la costante legata al cammino medio degli elettroni prende la forma di:

$$\Gamma(R) = \Gamma_\infty + A \frac{v_f}{R}$$

Con  $v_f$  velocità degli elettroni nello stato fondamentale (**??? non so cos'è E\_F**), A invece è un parametro adimensionale che descrive l'ampiezza della banda di assorbimento. Si noti che la dipendenza è di  $1/R$  in accordo con le verifiche sperimentali. Combinando tutto ciò che abbiamo appena descritto si può arrivare ad una forma di  $\varepsilon_p$  che metta in evidenza la dipendenza dimensionale:

$$\varepsilon(\omega, R)_p = \varepsilon(\omega)_\infty + \left[ \omega_p^2 \left( \frac{1}{\omega^2 + \Gamma_\infty^2} + \frac{1}{\omega^2 + \Gamma^2(R)} \right) \right] + i \left[ \frac{\omega_p^2}{\omega} \left( \frac{\Gamma(R)}{\omega^2 + \Gamma(R)^2} - \frac{\Gamma_\infty}{\omega^2 + \Gamma_\infty^2} \right) \right]$$

Si noti che le frazioni contenenti  $\Gamma(R)$  fanno riferimento all'effetto di superficie mentre quelle con  $\Gamma_\infty$  sono una costante riferita alla forma bulk.

---

<sup>1</sup>In fisica il fonone è una quasiparticella che descrive un quanto di vibrazione in un reticolo cristallino rigido.

### Altri fattori che influenzano l'assorbimento

Ci sono altre caratteristiche, legate a proprietà del materiale stesso, che possono influire sull'assorbimento oltre alla dimensione:

- **Materiale policristallino:** lo scattering sulla superficie influisce sulla frequenza di smorzamento, aumentandola, e incrementando la larghezza delle bande di assorbimento;
- **Temperatura:** in relazione all'incremento di temperatura e quindi di energia si ha un piccolo allargamento delle bande  $\rightarrow \frac{1}{\tau_{e-e}} \propto (E - E_F)^2$ ;
- **Concentrazione:** in casi di concentrazioni molto alte si ha un cambiamento di  $\varepsilon$  del mezzo che comporta un red-shift e in alcuni casi particolari la presenza di un secondo picco d'assorbimento. In presenza di aggregazioni o piccole distanze inter-particellari, il campo creato per eccitazione dalla **risonanza plasmonica superficiale** influenza le particelle circostanti;
- **Chemical interface damping (CID):** in presenza di sostanze assorbite sulla superficie si ottiene un red-shift ed un allargamento della banda di assorbimento (chemiassorbite -tioli- o fisioassorbite -citrato-). Tali sostante permettono ai fononi e  $e^-$  di avere altri percorsi di rilassamento.

#### 10.2.1 Teoria di Gans: effetto della forma

Nonostante l'importanza data dagli effetti della dimensione della particella, analizzati precedentemente, ancora più pronunciate sono le conseguenze dovute alla forma. La banda di assorbimento dello spettro si splitta in due bande differenti quando la particella diventa più allungata lungo il proprio asse. Il parametro a cui viene ricollegata la modifica dello spettro è chiamato **aspect ratio** (AR) ossia il rapporto fra i due assi della particella (lunghezza/larghezza). Al crescere di tale parametro crescerà anche la separazione fra le due bande. Queste due divisioni sono dovute a due oscillazioni differenti che possono essere distinte:

- La banda ad alta energia corrisponde all'oscillazione degli elettroni perpendicolarmente all'asse maggiore è riferita all'assorbimento plasmonico **trasversale**;
- La banda ad energia minore è causata dall'oscillazione degli elettroni lungo l'asse maggiore, motivo per si riferisce all'assorbimento plasmonico **longitudinale**.

Oltre al verso dell'oscillazione presentano altre differenze legate alla sensibilità a variazioni dell'**AR**. La banda trasversale, infatti, è poco sensibili a variazioni dell'aspect ratio e spettralmente coincide con le oscillazioni dei plasmoni di superficie. La banda longitudinale, al contrario, è fortemente dipendente da variazioni dell'aspect ratio che è direttamente proporzionale al red shift dello spettro. Se ora esaminassimo il caso di un certo numero di nanoparticelle d'oro orientate casualmente, tale sistema non può essere modellizzato con la precedente teoria di Mie, ma bisogna usare un'estensione. Con un'approssimazione dipolare si ottiene come soluzione:

$$\sigma_{est}(\omega) = \frac{2\pi NV\varepsilon_m^{3/2}}{3\lambda} \sum_j V \frac{\varepsilon_2(\omega)/P_j^2}{\left[\varepsilon_1 + \varepsilon_m \frac{1-P_j}{P_j}\right] + \varepsilon_2}$$

Dove  $P_J$  è il cosiddetto fattore di depolarizzazione. I fattori di depolarizzazione corrispondono all'esistenza di assi di simmetria distinguibili. Scegliendo gli assi della nanoparticella (A,B,C) con A>B=C:

$$P_A = \frac{1-e^2}{e^2} \left[ \frac{1}{2e} \ln \left( \frac{1+e}{1-e} \right) - 1 \right]$$

$$P_B = P_C = \frac{1-P_A}{2}$$

Da cui si ricava:

$$e = \sqrt[2]{1 - \left( \frac{d}{L} \right)} = \sqrt[2]{1 - \frac{1}{AC^2}}$$

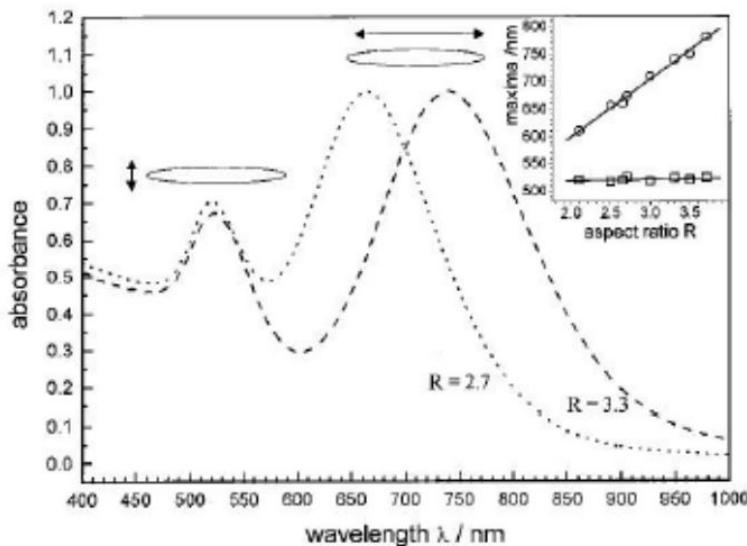


Figura 10.7: Esempio dello spettro di nanoparticelle d'oro a differenti valori di AR (R=2.7, R=3.3).

### 10.2.2 I nanorods d'oro

Perché usiamo proprio i nanorods d'oro? Questo particolare tipo di nanoparticella offre numerosi vantaggi:

- **Facile sintesi:** risulta abbastanza semplice creare nanorods con l'AR desiderato<sup>2</sup>;
- **Dimensioni:** sono ottimi per il trasporto dei farmaci;
- **Bassa tossicità:** l'oro interagisce chimicamente molto poco con i tessuti biologici, quindi è basso il rischio di danneggiare involontariamente l'ospite;
- **Assorbimento NIR:** i tessuti biologici hanno un minimo di assorbimento nel NIR (670-900 nm), dove assorbono le particelle d'oro<sup>3</sup>. Ciò facilita la penetrazione e la precisione dell'irraggiamento;

<sup>2</sup>"È più facile che fare una torta" (cit.)

<sup>3</sup>La cosa che assorbe di più nel NIR del nostro corpo sono i peli.

- **Elevata sezione d'urto:** è così possibile irraggiarli a bassa potenza, riducendo il rischio di danni ai tessuti;

### Luminescenza

L'oro mostra forti interazioni con oggetti fluorescenti, smorzando la fluorescenza di fluorofori legati o vicini. Esso stesso mostra una debole fotoemissione, dovuta a transizioni interbanda; i cristalli sono composti da unità primitive che si ripetono e i loro elettroni hanno energia diversa a seconda della loro posizione nel reticolo. Queste bande non sono "dritte" ed è abbastanza facile passare dalla banda di valenza a quella di conduzione: l'elettrone cambia banda creando una lacuna, entrambe si muovono e poi avviene la ricombinazione, con emissione luminosa. Nei nanorods la fotoemissione è **molto** più intensa che nel metallo di bulk ( $\Phi(\text{bulk}) = 10^{-10} \ll \Phi(\text{nanorod}) = 10^{-4}$ ) a causa dell'effetto punta<sup>4</sup>.

Per parlare della luminescenza a due fotoni (TPL), un processo con cui avviene la luminescenza delle nanoparticelle, servirebbe il corso di struttura della materia. Non sapendo di cosa si tratti, i dettagli sono inutili. Anche adesso che l'abbiamo quasi finito, i dettagli rimangono inutili.

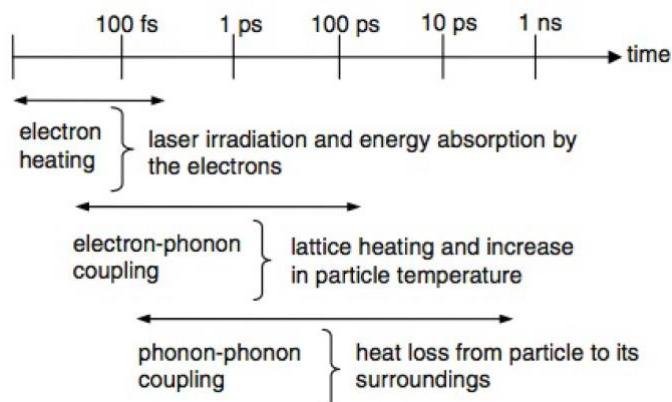
### Effetto termico

I nanorods d'oro vengono usati anche per distruggere cellule tumorali grazie alla loro elevata capacità di trasmettere calore. La velocità di trasmissione termica è data da

$$\frac{dQ_{H_2O}}{dt} = AG(T_r - T_{H_2O})$$

dove **A** è la superficie di **contatto**, **G** è la conduttanza dell'interfaccia NP-solvente,  $T_r$  è la temperatura del reticolo e  $T_{H_2O}$  quella dell'acqua all'interfaccia.

Il processo è molto rapido. Gli elettroni liberi del metallo assorbono inizialmente i fotoni, si rilassano poi per scattering (10-50 fs). In un intervallo compreso tra 50 fs - 100 ps avviene l'accoppiamento tra elettroni e **fononi** (modi normali di oscillazione dei nuclei attorno ai loro centri di equilibrio). Infine tra i 100 ps e 1 ns i fononi del reticolo si accoppiano a quelli del solvente, che si riscalda.



<sup>4</sup>In prossimità di punte si addensano le linee di campo.

Guardiamo con più attenzione quello che succede all'energia.

$$E_{estinzione} = E_{assorbita} + E_{diffusa} = \eta E_{estinzione} + E_{diffusa}$$

Definiamo  $\eta$  il coefficiente di conversione fototermica. Il calore assorbito verrà in parte trasferito all'esterno, in parte innalzerà la temperatura

$$Q_{assorbito} = \sum m_i C_{P,i} \frac{dT}{dt} + Q_{trasferito}$$

Tutto il calore deriva dal raggio laser, secondo l'assorbanza ( $A$ ) tramite la formula:

$$Q_{assorbito} = I\eta(1 - 10^{-A\lambda})$$

mentre il calore trasferito all'ambiente seguirà

$$Q_{trasferito} = hS(T - T_0) = hsT^*$$

dove definiamo  $\mathbf{h}$  il coefficiente di trasferimento termico,  $\mathbf{S}$  la sezione ortogonale al laser e  $T_0$  è la temperatura dell'ambiente. Appare così evidente che la variazione di temperatura nel tempo è del tipo

$$\begin{aligned} \frac{dT^*}{dt} &= a - bT^* \\ T(t) &= T_0 + \frac{a}{b}(1 - e^{-bt}) \end{aligned}$$

a questo punto possiamo effettuare una misura scaldando il sistema e poi lasciandolo raffreddare a laser spento. Dal fit ottengo i coefficienti  $a$  e  $b$ , grazie ai quali posso ricavare i coefficienti teorici  $\eta$  e  $h$ :

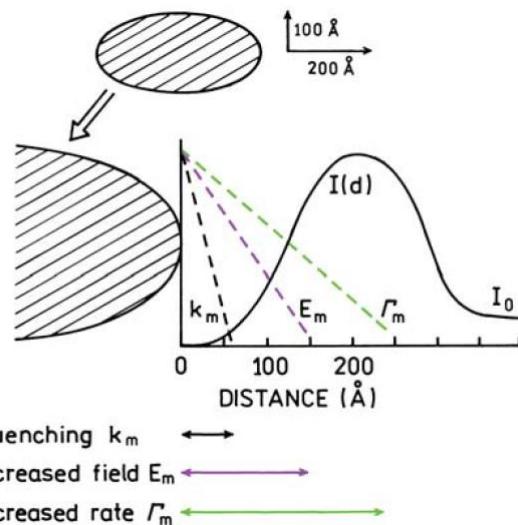
$$\eta = \frac{a \sum m_i C_{P,i}}{I(1 - 10^{-A\lambda})}$$

$$h = \frac{ab \sum m_i C_{P,i}}{S}$$

Poter controllare la temperatura delle cellule è molto importante: nell'ucciderle vogliamo essere certi che si inneschi il meccanismo di **apoptosi**, grazie al quale la cellula morta viene smaltita senza causare danni all'organismo. Vogliamo dunque raggiungere una temperatura di 43°-45°. Superando i 50° invece la cellula va in **necrosi** e diventa nociva. Inoltre se la temperatura dell'ambiente è troppo alta corriamo il rischio che la particella si fonda o che si formino bolle in soluzione.

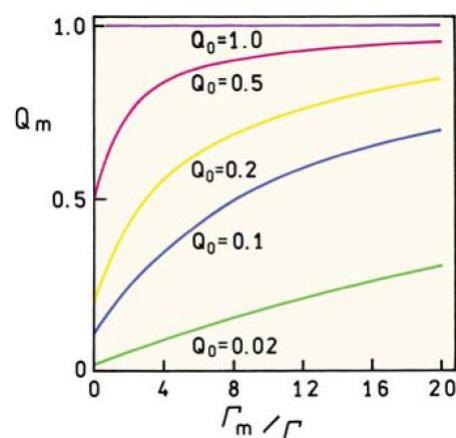
## Radiative decay engineering

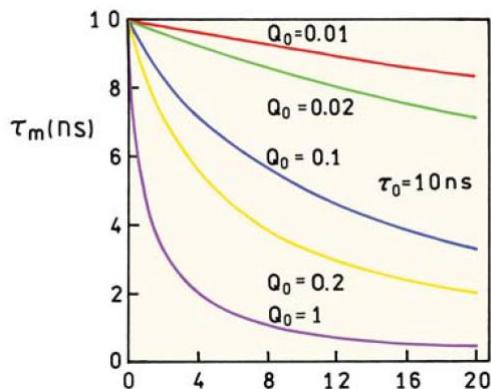
La presenza di nanoparticelle metalliche modifica le proprietà dei fluorofori. Il campo elettrico sentito dal fluoroforo è modificato dall'interazione della luce incidente e del dipolo con la superficie metallica. Le caratteristiche modificate sono la resa quantica e il tempo di vita; l'effetto può essere positivo o negativo a seconda della distanza e della geometria del sistema.



L'effetto di quenching a distanze brevi è dovuto allo smorzamento delle oscillazioni del dipolo; l'effetto punta causa un aumento significativo del campo elettrico ad una distanza di 100-200 armstrong. Un ulteriore effetto è l'aumento del rate di decadimento radiativo del fluoroforo (e quindi della resa quantica). A distanze più elevate si ha un ritorno alle caratteristiche normali del fluoroforo, poiché non risente più del metallo.

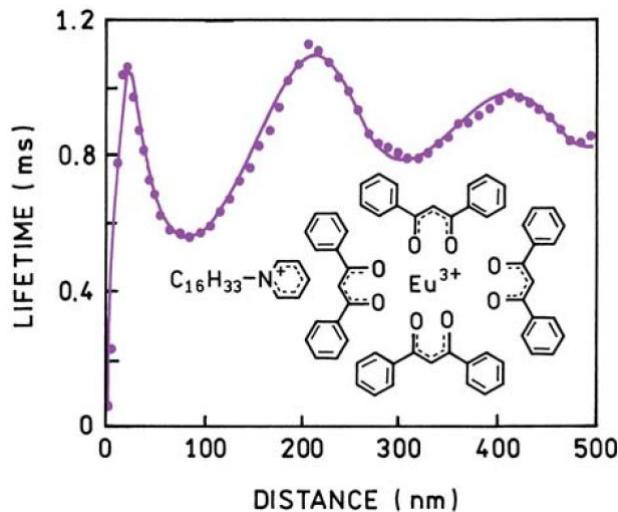
Ricordiamo che la resa quantica è data dal rapporto tra i decadimenti radiativi e quelli totali a disposizione del fluoroforo. Ciò che fa il metallo è aggiungere  $\Gamma_m$  come possibilità di decadimento radiativo, per cui per variare sensibilmente la resa quantica di un fluoroforo con una  $k_{nr}$  alta serviranno valori di  $\Gamma_m$  elevati. D'altra parte se la resa di un fluoroforo è già prossima a 1 risentirà meno sotto questo aspetto. Il tempo di vita invece diminuisce sempre perché dipende dalla quantità totale dei possibili percorsi di diseccitazione.





Per avere controllo su che effetto osservare, se di quenching o di enhancement, è possibile creare un legame tilico della lunghezza desiderata tra metallo e macromolecola.

Ma cosa succede al singolo fotone? Secondo la teoria di Mie della sezione d'urto di assorbimento, la componente di assorbimento è dovuta ai plasmoni che non possono irraggiare e che quindi dissipano l'energia sotto forma di calore, mentre la componente di scattering è dovuta all'irraggiamento dei plasmoni indotti dalla luce incidente, che induce oscillazioni degli elettroni nel metallo (dipoli). Questi plasmoni possono così irraggiare. La Metal Enhanced Fluorescence (MEF) può avvenire solo se la banda di assorbimento/emissione del fluoroforo si sovrappone alla lunghezza d'onda di scattering del metallo.

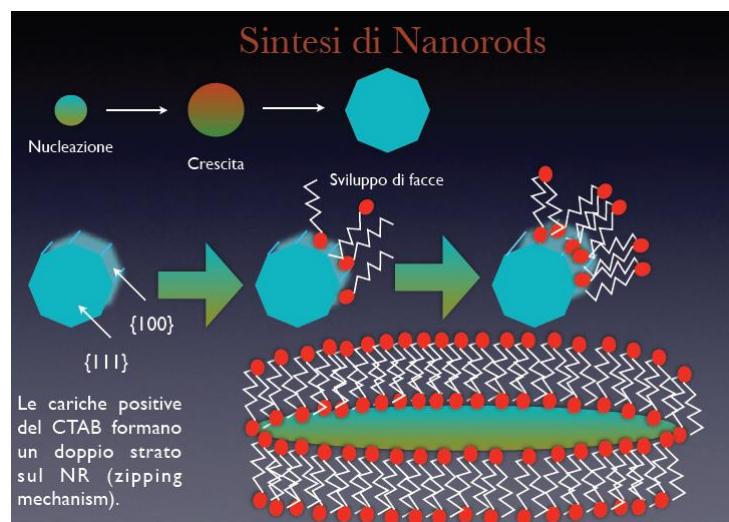


### Effetti di superficie metallica sulla fluorescenza

Usando uno specchio metallico piano è possibile osservare un andamento oscillante della durata dei tempi di vita del fluoroforo a distanze inferiori ai 20 nm abbiamo un forte effetto di quenching, dovuto all'accoppiamento del dipolo con le oscillazioni superficiali del metallo, dette risonanze plasmoniche superficiali (SPR). Allontanando il metallo otteniamo una diminuzione dei tempi di vita quando il campo riflesso è in fase con il dipolo, mentre i tempi di vita aumentano se il campo riflesso è fuori fase. Con l'aumentare della distanza diminuisce l'ampiezza delle oscillazioni.

## Sintesi di nanorods

Come si coltivano i nanorods d'oro? Si parte da particelle d'oro in soluzione con acido ascorbico e ioni d'argento, che impediscono la completa precipitazione del sistema. Si induce in seguito l'aggregazione lungo direzioni preferenziali: man mano che il centro si ingrandisce avviene la formazione di sfaccettature sulla loro superficie. Una volta che il centro ha raggiunto la dimensione desiderata si aggiunge CTAB (cetyltrimethylammonium bromide), un filamento con un'estremità positiva, che si lega a doppio strato alle facce laterali della NP e forza l'aggregazione in una singola direzione.



Il CTAB in soluzione è tossico per le cellule, quindi prima dell'utilizzo deve essere diluita. Gli stessi nanorod possono risultare tossici per le cellule a causa della loro carica superficiale debolmente positiva, quindi devono essere usati in scarse concentrazioni. Hanno il grosso vantaggio di crescere in modo omologo e regolare rispetto ad altri tipi di nanoparticelle

## Stelline

Un'altra forma possibile per le NP sono le cosiddette "stelline", forme planari con 3 o 4 rami, hanno una dimensione media di 30 nm e una carica superficiale debolmente negativa. Hanno il vantaggio di non necessitare CTAB per crescere ma il grande svantaggio di avere dimensioni variabili nello stesso batch, il che ci costringe a ragionare in termini di media per le quantità che si vanno ad indagare. Grazie all'elevata anisotropicità, hanno molti picchi diversi in assorbimento ed emissione. Avendone molte e diverse in soluzione, si ottiene un'emissione simile su tutta la banda.

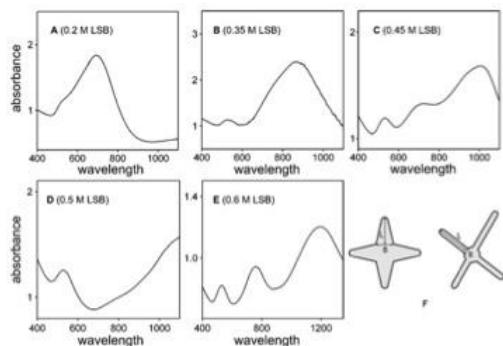


Figura 10.8: Esempi di picchi casuali dovuti all'anisotropicità.

### Misure di concentrazione

Le nanoparticelle possono essere usate come sensori di concentrazione. Prendiamo ad esempio la proteina p53, di cui supponiamo voler verificare la presenza poiché un aumento di p53 è indice di processi infiammativi legati all'insorgenza tumorale. Possiamo prendere delle particelle d'oro funzionalizzate con **streptavidine**, a cui è possibile legare delle **biotine**. Ad alcune biotine viene legato l'anticorpo anti-p53 (che speriamo si leghi alla proteina), mentre ad altre attacchiamo **fluorescina**. La resa quantica o il tempo di vita della fluorescenza vengono modificate quando la proteina si lega all'anticorpo ed è così possibile ottenere una misura di concentrazione.

La misura è una di fluttuazione di fluorescenza, ovvero è il passaggio di molecole nel volume di eccitazione per moto browniano a dare una fluttuazione del segnale. Le aggregazioni più massive danno origine a picchi più alti.

### Terapia fototerapica

Funzionalizzando le NP con anticorpi specifici, è possibile far sì che si leghino a cellule specifiche che vogliamo distruggere (come quelle tumorali). Irraggiando l'area interessata con radiazione IR si scaldano le cellule a contatto con le NP e si mandano in apoptosi. Per evitare di scaldare troppo ed indurre necrosi o altri effetti indesiderati, è necessario **monitorare** la temperatura superficiale delle nanoparticelle. Per tarare il sistema, è sufficiente effettuare una misura dei tempi di vita monitorando al contempo la temperatura con una termocamera. Ricordiamo che una termocamera è in grado di rilevare le radiazioni IR, ma che queste vengono pressoché totalmente schermate dal vetro e dalla plastica, quindi bisogna prestare particolare attenzione in laboratorio! Durante la taratura si raccolgono informazioni sul tempo di vita della **Rodamina B**, un colorante che ha un tempo di vita estremamente sensibile alla temperatura ed è quindi possibile usare come sonda; per evitare effetti di quenching rivestiamo la NP con strati alterni di sostanze di carica parzialmente positiva e negativa. Una volta effettuata la taratura, sapremo la temperatura locale della NP in funzione del tempo

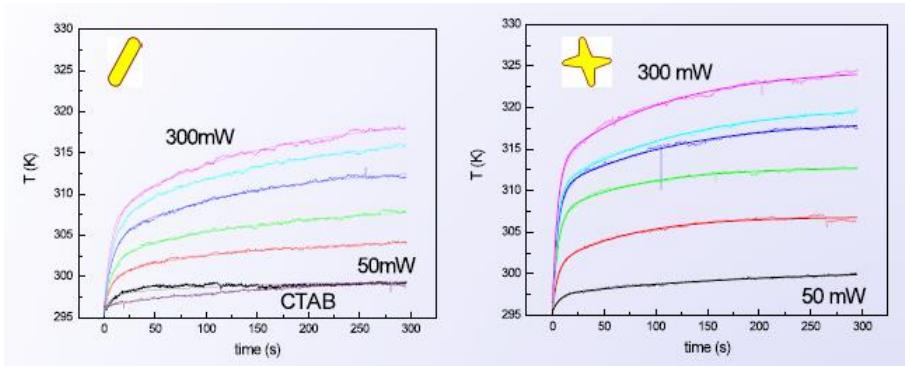


Figura 10.9: Le stelline sono più efficienti per la loro elevata anisotropicità.

In genere nelle curve vi è una doppia dipendenza, poiché l'oro si scalda molto più rapidamente della soluzione.

# Capitolo 11

## MICROSCOPIA STED E SPETTROSCOPIA FCS

Il recente progresso scientifico (anni 1990-2000) ha permesso lo sviluppo di varie tecnologie che consentono di indagare, con estrema risoluzione spaziale e temporale, circa la dinamica delle macromolecole all'interno delle cellule. Uno di questi approcci consiste nella combinazione della super-risoluzione in regime di campo lontano ottenuto grazie alla microscopia STED (STimulated Emission Depletion microscopy) con la precisione statistica della FCS (Fluorescence Correlation Spectroscopy) per determinare la dinamica di *singole* molecole, entro un'ordine di velocità sub-millesimali.

### 11.1 La microscopia STED

Per comprendere al meglio come funziona e in che modo consente di attingere conoscenza, la tecnica dello STED è necessaria un'introduzione alle nozioni base della microscopia.

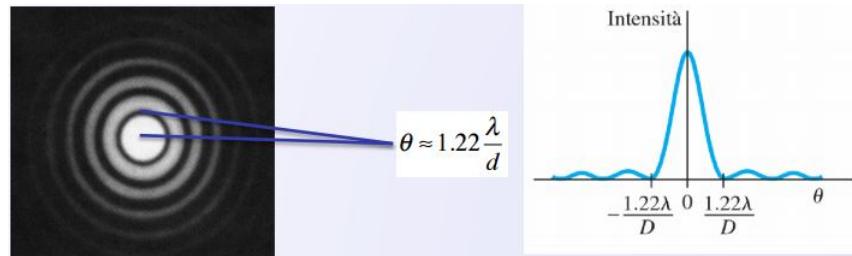
#### 11.1.1 Diffrazione e limite di risoluzione

Consideriamo un'onda piana di lunghezza d'onda  $\lambda$  con fronte d'onda parallelo a un piano in cui sia stata praticata una singola fenditura circolare. Se la larghezza della fenditura è molto maggiore della lunghezza d'onda, il fascio luminoso non risentirà di alcun effetto e produrrà sullo schermo di raccolta del segnale una figura luminosa coincidente con la forma e le dimensioni dell'apertura. Tuttavia, quanto più le dimensioni della fenditura si avvicinano a quelle della lunghezza d'onda o diventano persino più piccole, tanto più è accentuato un fenomeno noto come **diffrazione ottica**, che altro non è che un effetto di interferenza della luce. Ogni elemento della superficie d'onda che incontra la fenditura svolge il ruolo di sorgente di onde sferiche e la perturbazione prodotta in un punto dello schermo risulta la sovrapposizione degli effetti di tutte le onde sferiche così prodotte (*Principio di Huygens-Fresnel*). A causa della natura ondulatoria della luce pertanto, quando la luce attraversa una fenditura circolare, l'immagine che vedremo attraverso una lente non sarà un punto, bensì una immagine di interferenza caratterizzata da un disco luminoso centrale (*massimo*) circondato da una serie di corone circolari alternativamente scure e chiare (*frange*). Chiamiamo  $\theta$  l'angolo rispetto alla normale alla fenditura con cui escono i raggi. Si trova allora che l'angolo a cui cade il primo minimo di intensità,

corrispondente al bordo del disco centrale della figura di diffrazione è dato da

$$\sin \theta = 1.22 \frac{\lambda}{D} \quad (11.1)$$

dove il fattore 1.22 è il risultato del principio di Huygens-Fresnel e  $D$  rappresenta il diametro del foro circolare. Questi si risultati si applicano chiaramente ad una lente di apertura  $D$ , per cui l'immagine di una sorgente puntiforme molto lontana è data, nel piano focale<sup>1</sup> di una lente convergente, da un piccolo disco luminoso le cui dimensioni sono determinate dal rapporto  $f/D$  tra distanza focale<sup>2</sup> e apertura della lente.



Consideriamo ora il caso di due sorgenti puntiformi incoerenti  $S_1$  e  $S_2$  molto lontane, viste dalla lente sotto un angolo  $\alpha$  piccolo. Il fatto che l'immagine di un punto sia un dischetto diventa rilevante quando ci si propone di poter distinguere due oggetti puntiformi attraverso una lente. In particolare, se  $\alpha \gg \theta = 1.22\lambda/D$ , non c'è sovrapposizione tra i due dischetti che rappresentano le immagini di  $S_1$  e  $S_2$  e quindi le due sorgenti appaiono distinte o, gergalmente, *risolte*. Al diminuire di  $\alpha$  le due figure di diffrazione cominciano a sovrapporsi e ad un certo punto diventa impossibile distinguerle.

Pertanto, quando  $S_1$  e  $S_2$  sono viste dalla lente sotto un angolo

$$\alpha_R = 1.22 \frac{\lambda}{D} \quad (11.2)$$

il primo minimo della figura di diffrazione di una sorgente coincide con il centro del massimo dell'altra sorgente e si dice che le due sorgenti sono *appena risolte*. Questo criterio di distinzione è noto come **criterio di Rayleigh**. A tal proposito possiamo dare le seguenti definizioni.

**Definizione 11.1.1.1.** Si chiama **angolo minimo risolvibile** o **risoluzione angolare** il minimo angolo che un sistema ottico è in grado di distinguere senza che il fenomeno della diffrazione confonda le immagini. Nella nostra trattazione è indicato con  $\alpha_R$ .

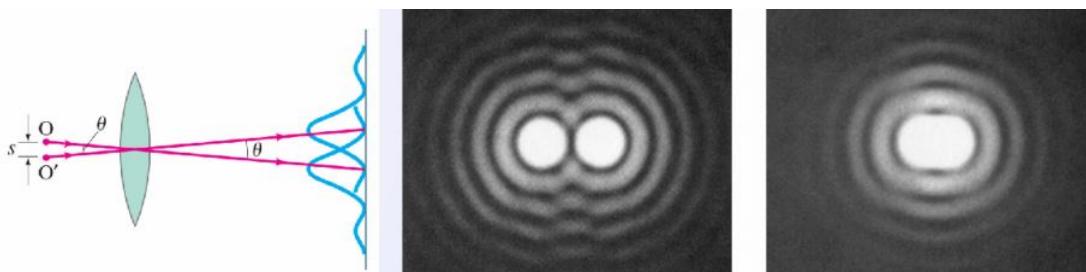


Figura 11.1: Nell'ordine: formazione dell'immagine di due sorgenti sulla lente; immagine risoluta con  $\alpha > 1.22\lambda/D$ ; immagine appena risoluta con  $\alpha \sim 1.22\lambda/D$ .

<sup>1</sup>Piano su cui si crea l'immagine.

<sup>2</sup>È definita come la distanza tra il centro ottico della lente e il piano focale.

**Definizione 11.1.1.2.** Si chiama **potere risolutivo o potere separatore** di una lente l'inverso dell'angolo minimo risolvibile. Esso indica la capacità di un sistema ottico di distinguere due punti oggetto in base alla loro distanza lineare.

Nel caso della microscopia, anziché l'angolo minimo, si specifica la distanza minima  $\Delta r_{x,y}$  tra due punti distinguibili, nota come **limite della diffrazione**. Essa risulta essere pari a

$$\Delta r_{x,y} = f\alpha_R = 1.22\lambda \frac{f}{D} \quad (11.3)$$

Questa relazione viene in genere scritta in funzione dell'**angolo di accettanza** dell'obiettivo, definito da  $\sin \phi = R/f$  con  $R$  raggio dell'obiettivo, da cui

$$\Delta r_{x,y} = \frac{0.61\lambda}{\sin \phi} = \frac{0.61\lambda_0}{n \sin \phi} \quad (11.4)$$

dove l'ultimo passaggio tiene conto<sup>3</sup> del fatto che l'oggetto e la parte frontale dello strumento siano immersi in un mezzo con indice di rifrazione  $n$ ;  $\lambda$  sarà la lunghezza d'onda in questo mezzo e  $\lambda_0$  quella riferita al vuoto. Il prodotto  $n \sin \phi$  si chiama *apertura numerica NA* dello strumento. In tal modo il potere risolutivo del microscopio è, in definitiva:

$$\rho_l = \frac{1}{s} = \frac{NA}{0.61\lambda_0} \quad (11.5)$$

La microscopia basata sull'ottica classica deve pertanto obbedire al limite di diffrazione. Per via della natura ondulatoria della luce, un strumento classico non è in grado di ottenere una risoluzione oltre il suo potere separatore, limitando quindi, e non di poco, la scala microscopica sin dove è possibile ottenere informazione.

### 11.1.2 Microscopia confocale e uso della PSF

Una tecnica microscopica che consente di accrescere sensibilmente la risoluzione spaziale del campione è la **microscopia confocale**. Lo strumento è schematicamente costituito da un normale microscopio a trasmissione a cui viene sovrapposto un apparato che si occupa di illuminare e rilevare l'immagine di un campione con una scansione punto a punto.

Essa è principalmente utilizzata per lo studio tridimensionale di strutture biologiche isolate. Il sezionamento ottico di un sistema biologico consiste nella raccolta di una serie di immagini di piani paralleli, spostando il fuoco dell'obiettivo lungo un asse che generalmente coincide con l'asse di propagazione della luce. Per ottenere una perfetta rappresentazione di un singolo piano del campione, si dovrebbe idealmente raccogliere soltanto la luce proveniente da quel particolare piano; poiché tuttavia, anche i piani sovrastanti e sottostanti emettono luce, vi è una perdita di nitidezza dell'immagine. La chiave del successo della tecnica confocale consiste nella rimozione delle interferenze provenienti dai piani adiacenti a quello ove si è focalizzati, mediante l'uso del cosiddetto pinhole.

La microscopia confocale usa, per eccitare le molecole, una sorgente luminosa molto intensa, il laser. La luce emessa dai fluorocromi eccitati dal laser viene catturata dalle

---

<sup>3</sup>In microscopia ad alta definizione si tende a lavorare in immersione per evitare di dover tener conto dello spessore dell'aria che contribuisce in genere a ridurre la definizione.

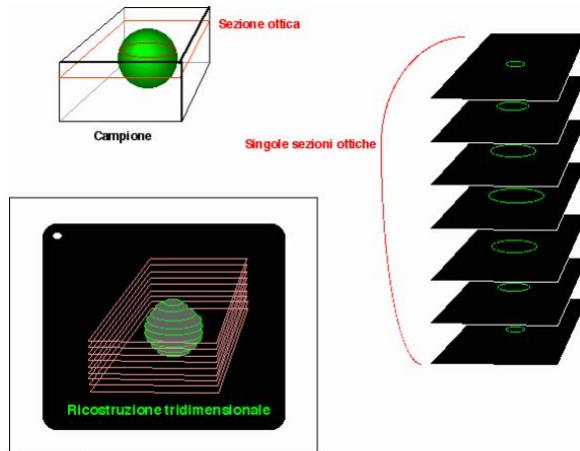
lenti dell'obiettivo, e raggiunge il fotomoltiplicatore, che trasforma l'intensità luminosa in un segnale elettrico di intensità proporzionale. Tra lo specchio dell'obiettivo ed il fotomoltiplicatore, il fascio luminoso attraversa un diaframma, o **pinhole**, che impedisce alla luce proveniente dalle zone fuori fuoco di raggiungere il fotomoltiplicatore. In questo modo solo il segnale luminoso relativo al piano di fuoco viene registrato e utilizzato nella formazione dell'immagine finale. Il risultato è un'immagine poco disturbata dalla diffusione della luce delle zone non a fuoco. Di fatto, oltre al pinhole per la luce emessa, viene utilizzato anche un pinhole per la luce di eccitamento, in modo da illuminare solo una porzione microscopica del campione, aumentando il contrasto.



Figura 11.2: Struttura schematica di un microscopio confocale.

Per ottenere la rappresentazione non di una porzione microscopica del campione ma di un intero piano, si muove il fascio di luce lungo il campione di punto in punto, in modo che tutto il piano situato alla profondità voluta venga illuminata dal fascio di luce secondo una precisa sequenza. Questo processo viene detto **scansione**. Il segnale elettrico in uscita dal fotomoltiplicatore viene quindi digitalizzato ed inviato ad un computer che registra i valori di intensità misurati per ogni punto. Questi valori vengono utilizzati per ricostruire l'immagine: ogni punto corrisponde ad un pixel dello schermo, e l'intensità luminosa del punto verrà rappresentata da una corrispondente tonalità di grigio, (secondo l'applicazione di una **funzione di diffusione del punto (PSF)**<sup>4</sup>). L'accostamento di tutti i singoli pixel corrispondenti a punti scanditi dal fascio laser nel campione darà così l'immagine finale. Spostando lungo l'asse verticale il campione dopo ogni scansione, è possibile eseguire una serie di scansioni successive corrispondenti ai piani focali via via più profondi all'interno del campione. Queste scansioni prendono il nome di **sezioni ottiche** e la loro sovrapposizione ordinata, eseguita via software, consente di ricostruire un'immagine complessiva dell'intero volume scandito, in cui tutti i piani sono contemporaneamente a fuoco. L'archiviazione su computer di tutti i dati corrispondenti ai pixel delle singole sezioni ottiche consente di eseguire elaborazioni delle immagini, quali la visualizzazione tridimensionale dell'oggetto.

<sup>4</sup>Con il termine PSF ci si riferisce, grezzamente alla forma ellisoidale che una sorgente puntiforme assume sullo schermo per effetto della diffrazione. Tuttavia matematicamente si tratta di una vera e propria funzione descritta per ogni punto e che descrive in che modo il singolo punto emette o assorbe la luce nella regione che lo circonda. In questo senso viene utilizzata dai software per rielaborare l'immagine.



I programmi per l’elaborazione di immagini non registrano, quindi, soltanto la luminosità di ciascun punto, ma anche la sua localizzazione nel campione, cioè la sua posizione in un piano e la sua profondità: i punti definiti dalle tre coordinate,  $(x, y, z)$ , detti **voxel**, costituiscono l’equivalente tridimensionale dei pixel di un’immagine bidimensionale. I programmi per l’elaborazione delle immagini possono combinare i voxel per produrre ricostruzioni tridimensionali di oggetti microscopici e possono manipolarli per ruotare le immagini ricostruite lungo un asse e vederle da una prospettiva più favorevole.

Questa tecnica di superisoluzione microscopica consente quindi, minimizzando i disturbi da diffusione laterale, di abbassare il limite della rifrazione incrementando, e notevolmente, il potere risolutivo dello strumento. Sperimentalmente si trova infatti che, rispetto ai normali microscopi, la tecnica confocale riduce il limite di diffrazione circa di un fattore  $\sqrt{2}$ . Pertanto la minima distanza distinguibile diventa, secondo la 11.5

$$\Delta r_{x,y} \approx 0.44 \frac{\lambda}{NA} \quad (11.6)$$

Tuttavia la risoluzione spaziale dello strumento resta ancora vincolata al limite della diffrazione e pertanto la scale microscopica rimane limitata, seppur da un estremo inferiore più piccolo. Per avere un’idea quantitativa delle distanza di cui si sta parlando, se  $\lambda = 500\text{nm}$  e  $NA = 1.3$ , la minima distanza distinguibile è  $\Delta r_{x,y} = 165\text{nm}$ , che corrisponde a circa le dimensioni dei cromosomi. Si noti che, per via della 11.6 si prediligono sorgenti con lunghezze d’onda basse, in genere ultravioletti. Il valore dell’apertura numerica assegnato è tipico.

### 11.1.3 Stimulated Emission Deplation microscopy (STED)

Nonostante i grandi risultati della microscopia confocale, la strada che si cercò di percorrere negli ultimi decenni del secolo scorso fu quella che portasse a **rompere la barriera della diffrazione**, di modo da ottenere una microscopia con potere risolutivo teoricamente infinito. La strada portò con successo ad un traguardo negli anni ’90 con lo sviluppo e la successiva affermazione della microscopia STED. La geniale innovazione portata da questa microscopia consiste nell’aver trovato il modo di neutralizzare il limite di diffrazione sfruttando particolari transizioni. Vediamo meglio questa cosa.

Partiamo dal presupposto che l’immagine che si vuole osservare altro non è che il segnale emesso per fluorescenza da un gruppo di fluorofori eccitato dalla luce della sorgente. È peraltro triviale che la maniera più lineare per evidenziare (nel senso di mettere a fuoco

nella miglior maniera possibile) uno spot fluorescente consiste nell'inibire selettivamente la fluorescenza emessa dalla parti esterne del gruppo che fluoresce. Se infatti esistesse un modo di adempiere a ciò si otterebbe come risultato un'immagine sempre meno disturbata ai margini e pertanto una maggior definizione. Appare dunque che una possibile strada per abbassare la barriera della diffrazione sia quella di ridurre lo spot fluorescente guadagnando in risoluzione spaziale. La STED basa il suo principio di funzionamento esattamente su questa idea e utilizza come metodo di inibizione della fluorescenza l'emissione stimolata. Sappiamo infatti dal Capitolo 6 che la fluorescenza molecolare è una forma di emissione spontanea; se pertanto si interviene sul sistema bloccando l'emissione spontanea a favore di quella stimolata, il risultato che si ottiene è una diminuzione dello spot fluorescente.

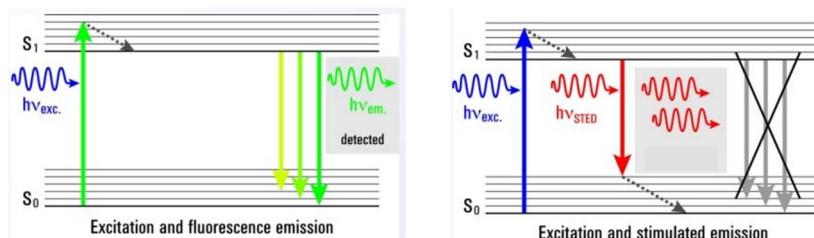


Figura 11.3: Confronto tra l'emissione spontanea (fluorescenza) e l'emissione stimolata.

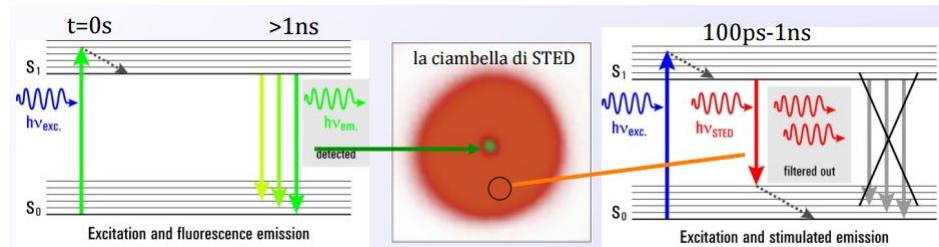
Prima di approfondire va però sottolineato ciò che il lettore attento potrebbe obiettare sin da subito: la STED di per sé non può rompere davvero il limite di diffrazione dal momento che il fascio in emissione stimolata che viene prodotto è a sua volta limitato dalla diffrazione. Vedremo in ciò che segue che il reale ingrediente fisico per rompere la barriera sarà la *saturazione* dell'inibizione della fluorescenza come avremo modo di specificare qui sotto.

L'apparato sperimentale si basa su una coppia di laser sincronizzati e ad emissione pulsata<sup>5</sup>: un laser interno a gas Argon (488, 514 nm) usato per l'**eccitazione**, e un laser esterno visibile in fibra (592 nm) usato per lo **svuotamento**. L'eccitamento dei fluorofori viene eseguita dal primo laser, che emette con impulsi distanziati di subpicosecondi e allineato in frequenza con lo spettro di assorbimento del cromoforo (di modo da illuminare con un fotone di energia pari a un salto elettronico verso l'alto del campione). L'impulso raggiunge quindi il campione producendo il consueto spot da fluorescenza di molecole eccitate, limitato dalla diffrazione. L'impulso del laser di eccitazione è immediatamente seguito, con un **ritardo di 100 ps 1ns** da un impulso di **svuotamento**, chiamato *impulso-STED*. L'impulso STED è spostato verso il rosso (rispetto allo spettro di emissione del fluoroforo), di modo da evitare ri-eccitazione: questo infatti fa sì che i fotoni meno energetici dell'impulso-STED agiscano - idealmente - unicamente sulle molecole eccitate del fluoroforo, dissecandole nello stato fondamentale per via di emissione stimolata. L'effetto netto dell'impulso STED è che le molecole eccitate interessate da esso non possono fluorescere dal momento che la loro energia viene dispersa per emissione stimolata, in cui, ricordiamo, il fotone emesso ha la stessa direzione di quello che urta la molecola eccitata e uguale lunghezza d'onda  $\lambda = 592\text{nm}$ .

Disponendo, all'interno del microscopio, l'impulso-STED a forma di ciambella, solo le molecole che si trovano sul margine esterno dello spot sono smorzate. Nel centro del-

<sup>5</sup>Si ricorda paragrafo 4.7 Capitolo 4

la ciambella, dove invece l'impulso-STED tende a svanire la fluorescenza del fluoroforo rimane pressoché imperturbata.



Ed e qui che appare il reale vantaggio della microscopia STED sulle tecniche convenzionali. Incrementando l'intensità dell'impulso STED infatti, lo svuotamento (*depletion*, riferito al livello eccitato, senza che ci sia emissione fluorescente) diventa completo al margine esterno dello spot e diventa sempre più efficace sul disco centrale. Ricordando che tuttavia, nel buco della ciambella la fluorescenza non è (idealmente) perturbata, è possibile, aumentando progressivamente l'intensità dell'impulso-STED, restringere sempre più lo spot fluorescente, anche fino alle dimensioni di una singola molecola. È in questo senso che la microscopia STED **infrange il limite di diffrazione**, svuotando la fluorescenza in ogni punto del campione, tranne che in quello che interessa mettere a fuoco!

Concludiamo chiarendo il punto su cui avevamo posto l'attenzione poco prima. Il reale ingrediente fisico che determina la caduta del limite di diffrazione non è di per sé l'inibizione della fluorescenza perché l'impulso-STED è a sua volta limitato dalla diffrazione. Il punto fondamentale è invece la **saturazione** della fluorescenza. Con ciò si intende che poiché la fluorescenza al centro dello spot è imperturbata, essa è sempre completamente fermata, o saturata, entro il margine dello spot. Restrингendo questo quindi si può ottenere risoluzione arbitraria su uno spot che rappresenta perfettamente e senza disturbi il punto di campione che interessa.

La risoluzione radiale della microscopia STED è infatti espressa da

$$\Delta r_{x,y} \approx \frac{\lambda}{NA} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{I_{sted}}{I_{sat}}}} \quad (11.7)$$

per il quale è evidente ciò che si diceva, ovvero:

$$\lim_{I_{sted} \rightarrow \infty} \Delta r_{x,y_{sted}} = 0 \quad (11.8)$$

#### 11.1.4 Applicazioni della STED a biosistemi. Fluorofori tipici

Presentiamo quindi qualche esempio per far capire il reale passo in vanti della microscopi STED nei confronti della tecnica confocale.

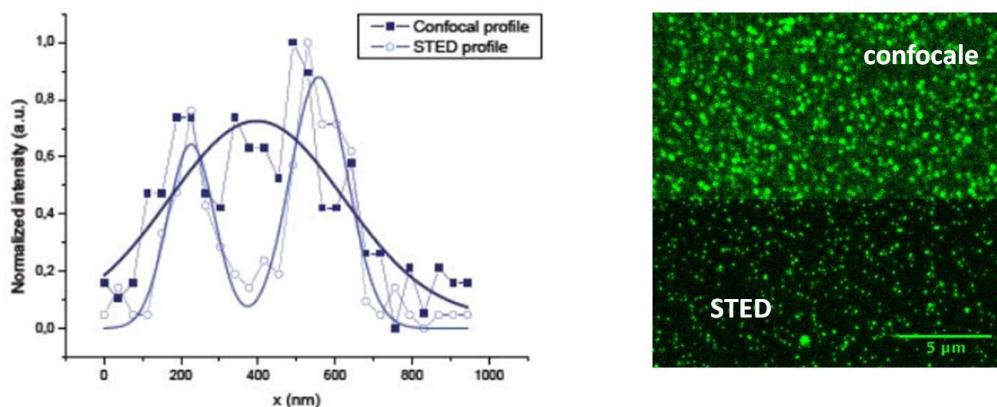


Figura 11.4: Nel grafico a sinistra è mostrato il plot delle intensità rilevabili con le due microscopie. Si noti la miglior risoluzione resa possibile dai picchi STED. A destra il risultato visibile al microscopio per sfere di 80 nm ricoperte di Chromeo 488.

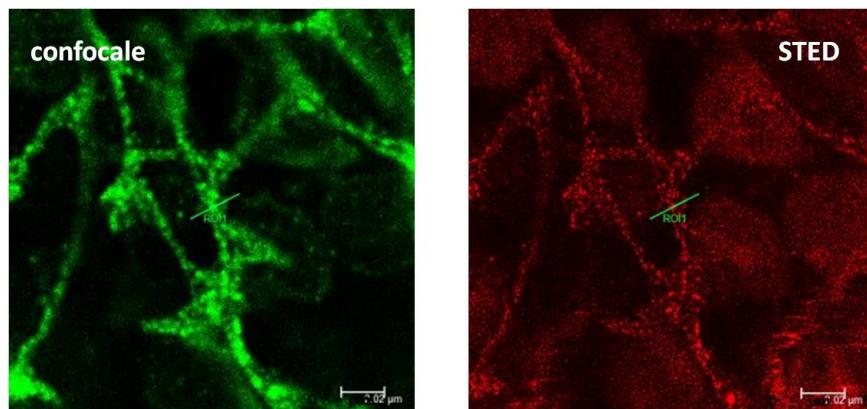


Figura 11.5: Confronto tra fette marcate con Alexa488 di milza murina, vista con le due tecniche.

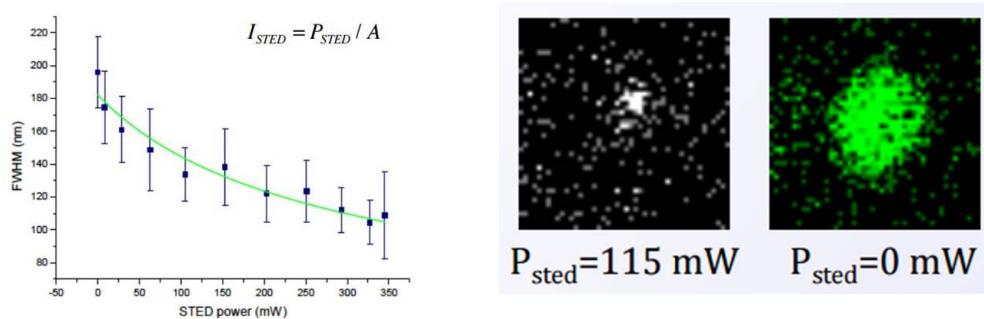


Figura 11.6: Il grafico a sinistra mostra la larghezza a metà altezza del picco centrale di intensità (*Full Width at Half Maximum*, *FWHM*) in funzione della potenza dell'impulso-STED. Il valore in ascissa è un parametro alla pari della distanza tra i primi due minimi secondari, della larghezza dello spot centrale, e quindi della risoluzione ottica secondo quanto discusso: all'aumentare della potenza dell'intensità di STED aumenta anche la risoluzione possibile. A destra l'applicazione concreta di ciò, su una **singola molecola**.

Per via di queste sue potenzialità la microscopia STED trova ampia applicazione su vari biosistemi. È infatti possibile studiare recettori di membrana, la localizzazione di proteine attorno ai nuclei cellulari EYFP (Enhanced Yellow Fluorescent Protein) in citoplasma neuronale dei mammiferi, lo studio di singole molecole di DNA, l'individuazione dei fattori di trascrizione di DNA nella rete mitocondriale dei fibroblasti umani.

I fluorofori più usati sono riportati nella seguente tabella, che riporta, oltre alla lunghezza d'onda di assorbimento, la massima risoluzione che effettivamente risulta operabile (la realtà non è ideale!)

Dye name (Manufacturer / Distributor)	Exc. Wavelength	STED Wavelength	Spatial Resol. (direction)
ATTO 425	400	532	70 - 80 nm (xy)
Abberior STAR 440SX	400	590	
Mn doped ZnSe Qdots	400	676	45 nm (xy)
GFP	490	575	~ 70 nm (xy)
Citrine	490	598	48 nm (xy)
YFP	490	598	~ 70 nm (xy)

Dye name (Manufacturer / Distributor)	Exc. Wavelength	STED Wavelength	Spatial Resol. (direction)
Alexa Fluor 488	488	592	< 60 nm (xy)
Chromoe 488	488	592	< 60 nm (xy)
Oregon Green 488	488	592	< 60 nm (xy)
FITC	488	592	< 60 nm (xy)
DY-495	488	592	< 60 nm (xy)
Citrine	488	592	~ 60 nm (xy)

## 11.2 Spettroscopia di correlazione di fluorescenza (FCS)

La spettroscopia di correlazione di fluorescenza nasce come tecnica per lo studio della rapida diffusione delle molecole e delle eventuali interazioni intramolecolari nel corso del processo. Essa permette quindi di esprimere un'analisi sulla dinamica delle macromolecole, consentendo però, allo stesso tempo, di ottenere informazioni anche riguardo i coefficienti di diffusione, la concentrazione e la massa della particella, la viscosità della soluzione e le costanti di reazione.

Il metodo basa il suo funzionamento sulla raccolta e misurazione delle **fluttuazioni temporali dell'intensità di fluorescenza** che avvengono a causa del passaggio di poche molecole attraverso un volume di eccitazione. Illuminando i fluorofori con laser a alta intensità si rendono fluorescenti le molecole contenute nel volume di interesse; tale luce viene poi convogliata, attraverso un pinhole, ad un rilevatore. A livello di misurazione si fa in genere uso della microscopia confocale, già descritta nel paragrafo precedente, che, nonostante il limite di diffrazione, offre comunque una scala di investigazione dell'ordine della singola molecola.

Affinché sia possibile condurre un'analisi delle fluttuazioni è necessario che nel volume di eccitazione siano contenuti pochi oggetti: ciò fa sì che per le applicazioni della FCS si prediligano volumi dell'ordine del micrometro cubo ( $\mu\text{m}^3$ ) e a basse concentrazioni ( $\approx nM$ ). Iniziamo considerando l'espressione dell'intensità di fluorescenza, seconda la definizione data con la 6.16 nel Capitolo 6:

$$F \simeq C\varepsilon(\lambda_{exc})k \quad (11.9)$$

dove  $C$  è la concentrazione della soluzione,  $\varepsilon \approx I_0^n \sigma_n(\lambda_{exc})\phi$  è la brillanza molecolare mentre  $k$  è un parametro che rappresenta l'efficienza della raccolta. Le fluttuazioni della fluorescenza saranno dunque esprimibili nella forma, già vista nel Capitolo 9,

$$\delta F(t) = \underbrace{\delta C(t)\varepsilon(\lambda_{exc})}_{\text{fluttuazioni di concentrazione}} + \overbrace{C\delta\varepsilon\lambda_{exc}(t)k}^{\text{fluttuazioni di brillanza}} \quad (11.10)$$

Esse appaiono dunque come la *somma di due possibili contributi*: possono infatti essere dovute al moto diffusivo delle molecole che entrano e o escono dal volume di eccitazione, o da transizioni chimiche tra stati fluorescenti e stati non fluorescenti che conducono a un temporaneo spegnimento della loro fluorescenza. Nel primo caso si parla di **fluttuazioni di concentrazione**, dovute alla variazione nel tempo del numero di molecole nel volume per effetto della diffusione, e si fa riferimento al primo addendo della 11.10; nel secondo caso si tratta invece di **fluttuazioni di brillanza**, dovute al bleaching o, più frequentemente alla fotodinamica, e obbediscono invece al secondo termine della fluttuazione  $\delta F$ . In entrambe le situazioni si utilizzano volumi *piccoli* e *poco concentrati*. Chiariamone subito la ragione. Dovendo misurare le fluttuazioni dell'intensità la condizione ideale di sperimentazione è quella che offre un segnale medio e delle ampie oscillazioni. Questo fa sì che:

- una concentrazione troppo alta limita notevolmente il numero delle fluttuazioni rendendo poco applicabile la tecnica;
- una concentrazione troppo bassa è tale per cui per la maggior parte del tempo di osservazione nessuna molecola attraversa il volume o va incontro a fotodinamica, rendendo in tal modo il segnale un *evento raro*;
- si verifica inoltre che l'altezza del segnale (in frequenze) aumenta in modo direttamente proporzionale con l'aumentare della concentrazione. Tendenzialmente quindi, si favoriscono concentrazioni che offrono una buona distribuzione delle fluttuazioni, garantendo comunque un numero basso di molecole, di modo da poter studiare le dinamiche di singoli oggetti potendo trascurare gli effetti di interazione circostanti.

Come già anticipato si usano pertanto soluzioni con concentrazioni dell'ordine del nanomolare o delle centinaia di picomolare.

L'interpretazione dei dati viene fatta seguendo due differenti strade.

1. utilizzando funzioni di **autocorrelazione**, che permettono di modellizzare le fluttuazioni della fluorescenza e da qui trarre conclusioni sui tempi di diffusione e il numero di oggetti contenuti in soluzione;
2. utilizzando un **istogramma del conteggio dei fotoni (PCH)** e che consente di risalire al numero e alla brillanza degli oggetti, che qui e nel seguito saranno indicate con N&B.

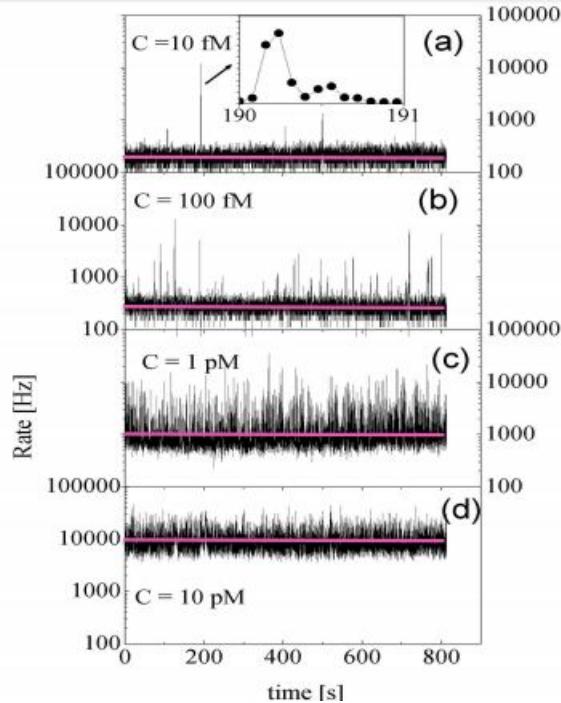


Figura 11.7: Delle quattro soluzioni proposte la prima (a) è troppo diluita e le fluttuazioni sono eccessivamente separate temporalmente. La quarta (d) è eccessivamente concentrata e le fluttuazioni sono rese mute. Le due soluzioni centrali sono invece possibili set di misura, con preferenza per la (b) per la nitidezza dei picchi.

Dedichiamo pertanto le successive due sezioni all'analisi dettagliata di ciascuno dei due possibili approcci all'interpretazione dei risultati.

### 11.2.1 Uso della funzione di autocorrelazione

Riprendendo al sintassi del paragrafo 9.5 del Capitolo 9 dedicato allo scattering, dovendo stimare delle grandezze oscillanti nel tempo, baseremo il nostro modello su grandezze mediate nel tempo. Definita pertanto con

$$\langle F(t) \rangle$$

la fluorescenza media e con

$$\delta F = F(t) - \langle F(t) \rangle$$

la fluttuazione della fluorescenza, affrontiamo separatamente il caso delle fluttuazioni di concentrazione e delle fluttuazioni di brillanza.

### Fluttuazioni di concentrazione

Trascuriamo il contributo dovuto alla variazione temporale della brillanza. In questo caso la funzione di autocorrelazione<sup>6</sup> del segnale di fluorescenza è espressa da

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \quad (11.11)$$

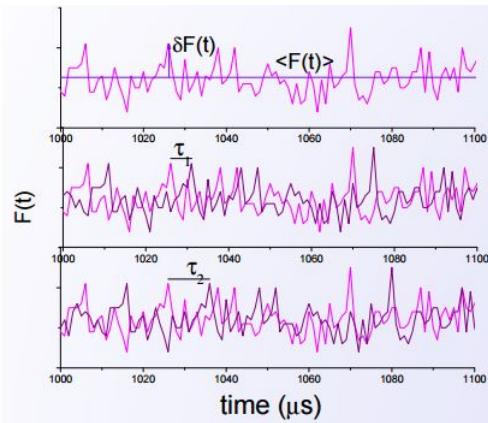


Figura 11.8: Rappresentazione delle fluttuazioni. La funzione di autocorrelazione si occupa di descrivere come varia il valore dell'intensità in funzione del tempo e del grado di perturbazione della soluzione.

Analizziamo termine a termine l'equazione 11.11.

**Il valore medio della fluorescenza** non può ovviamente essere calcolato come valore di aspettazione di una popolazione di misure, data la difficoltà stessa della campionatura. Per questo essa è generalmente elaborata in funzione del set sperimentale che si ha a disposizione. Nel caso delle applicazioni FCS essa è espressa come valor medio analitico della funzione integrale

$$F(t) = k\varepsilon \int d\bar{r} W(\bar{r}) C(\bar{r}, t) \quad (11.12)$$

nella quale

- $C(\bar{r}, t)$  si ottiene dalla soluzione dell'equazione di diffusione per la concentrazione del fluoroforo, che ricordiamo essere, secondo la prima legge di Fick

$$\frac{\partial C(\bar{r}, t)}{\partial t} - D \Delta C(\bar{r}, t) = \delta(\bar{r} - \bar{r}_0) \delta(t - t_0)$$

con  $D$  coefficiente di diffusione assegnato dall'equazione di Stokes-Einstein  $D = kT/6\pi\eta r$

- $W(\bar{r})$  descrive il profilo del volume di eccitazione. Questo parametro dipende in via diretta dalla forma del fascio, dal momento che questo impone la sezione che verrà

---

<sup>6</sup>A scanso di pericolose confusioni, facciamo notare che la funzione di autocorrelazione definita nel Capitolo 9 è diversa ed è considerata *parziale* poiché si limita alla correlazione della dipendenza lineare delle variabili intermedie. In questo caso si usa invece la definizione esatta di autocorrelazione, che tiene conto dell'effetto globalmente, grazie all'azione del denominatore. Non approfondiamo i dettagli e/o motivi di ciò.

illuminata. Nello specifico, ricordiamo, per gusto del rigore, che questi parametri sono formalizzabili come

$$V_{exc} = \frac{\pi\omega_0^4}{\lambda_{exc}}$$

con  $\omega_0$  ad esprimere la risoluzione ottica (ovvero angolo minimo sotto cui due sorgenti puntiformi di campo lontano sono distinguibili) che in questo caso coincide con l'ampiezza minima visibile e  $\lambda$  la lunghezza d'onda media del laser che fa da sorgente, e

$$\begin{aligned} W(\rho, z) &= |E(\rho, z)|^2 = \frac{\omega_0^2}{\omega^2(z)} \exp \left[ -\frac{2\rho^2}{\omega^2(z)} \right] \\ &\quad \rho^2 x^2 + y^2 \\ \omega^2(z) &= \omega_0^2 \left[ 1 + \left( \frac{z}{z_R} \right)^2 \right] \quad (\text{lorentziana}) \\ z_R &= \frac{\sqrt{2}\pi\omega_0^2}{\lambda_{exc}} \quad (\omega_0^2)_{min} = \frac{0.61\lambda_{exc}}{NA} \end{aligned}$$

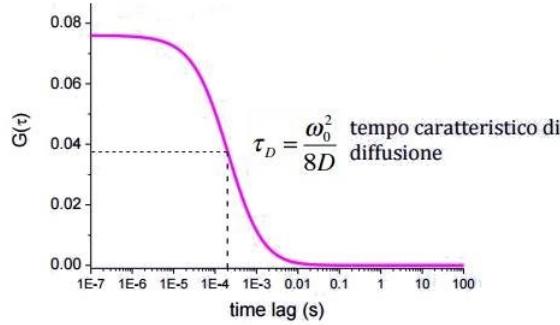
dove si è supposto che il volume avesse un profilo gaussiano nel piano [x,z] e un profilo lorentziano nel piano [y,z].

Pertanto, se la funzione  $F(t)$  ha la forma mostrata in 11.12, la funzione di autocorrelazione delle fluttuazioni del suo valor medio sarà espressa da

$$G(\tau) = G(0) \frac{1}{1 + \frac{8D\tau}{\omega_0^2}} \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{4D\lambda_{exc}^2\tau}{\omega_0^4}}} \quad (11.13)$$

nella quale  $G(0)$  è la *correlazione intrinseca*  $G(0) = \frac{\gamma}{\langle N \rangle} = \frac{0.076}{\langle N \rangle}$  che dipende inversamente dal numero medio di molecole nel volume di eccitazione e la costante  $\gamma$  è definita per il caso dell'eccitazione a due fotoni

La relazione 11.14 consente già di trarre qualche risultato dalla FCS. Se infatti si plotta la funzione di autocorrelazione in funzione del tempo di ritardo dei due segnali correlati (vale a dire il tempo  $\tau$  indicato nella Fig-11.2.1 e usato nel Capitolo 9), si trova quanto segue:



Per il valore di  $\tau$  che corrisponde ad un dimezzamento dell'autocorrelazione, si trova il **tempo caratteristico di diffusione** definito come

$$\tau_D = \frac{\omega_0^2}{8D} \quad (11.14)$$

da cui si possono determinare il **coefficiente di diffusione** e l'**ampiezza minima** del segnale  $\omega_0$ . Comprensibilmente è difficile, e comunque impossibile entro alcuni limiti di precisione di risultati, determinare entrambi i parametri da una sola curva. Per ovviare a ciò, spesso si rinuncia a determinare sperimentalmente entrambi i parametri a favore di uno solo; e quello che si fa è effettuare misure utilizzando soluzioni con sciolti coloranti (fluorofori) a coefficiente D noto a priori. In tal modo, la misura del tempo caratteristico permette di trovare, entro i limiti dell'errore statistico, il valore di  $\omega_0$ . A tal proposito facciamo osservare che sperimentalmente si verifica che, utilizzando un fascio più largo si riesce ad ottenere un angolo di risoluzione ottica minore. Vale infatti il seguente andamento sperimentale:

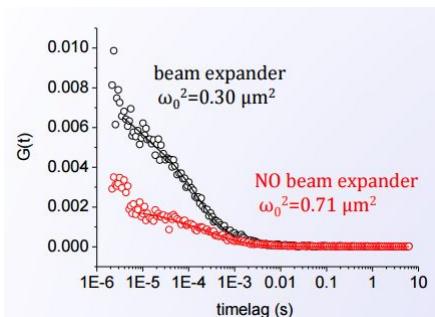


Figura 11.9: Funzione di autocorrelazione di fluorescenza in funzione del ritardo temporale. La soluzione contiene Rodamina per la quale  $D \approx 300 \mu\text{m}^2/\text{s}$ .

Si vede che l'applicazione di un *beam expander*, ovvero uno strumento ottico che dopo essere attraversato da un fascio collimato lo espande in larghezza, si riesce ad ottenere non solo una risoluzione migliore ( $\omega_0^2$ ) ma anche una stima più precisa de tempo di semicorrelazione (300-120  $\mu\text{s}$ )! Riducendo l'ampiezza minima il volume di eccitazione diminuisce di un fattore 5 (andando direttamente come  $\omega^4$  secondo la definizione data qui sopra) e permette quindi di focalizzarsi con più precisione sui singoli picchi.

Sempre dal plot dell'autocorrelazione è possibile estrapolare il valore di  $G(0)$ , ovvero della correlazione intrinseca quando il ritardo di tempo è  $\tau = 0$ . Stando alla definizione datone nella 11.12, il valore di  $G(0)$  è inversamente proporzionale all'occupazione media del volume; conoscendo dal fit l'autocorrelazione intrinseca si conosce così anche la concentrazione del fluoroforo. In particolare, data la relazione di proporzionalità inversa, più basso è lungo l'asse delle ordinate il punto di partenza della funzione di correlazione e maggiore sarà la **concentrazione del fluoroforo** in soluzione.

Infine, sempre dal tempo di diffusione si può risalire alle **dimensioni del fluoroforo**. Infatti la diffusione è più o meno lenta a seconda delle molecole che vede coinvolte. Nello specifico vale che più il coefficiente di diffusione è alto e più la diffusione è rapida e, allo stesso tempo, più la molecola è voluminosa, più lentamente diffonderà.

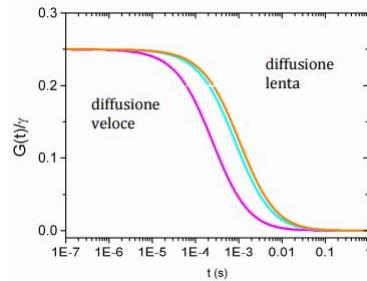


Figura 11.10: In colori diversi diversi coefficienti di diffusione. In viola  $D = 300 \mu\text{m}^2/\text{s}$ , in azzurro  $D = 90 \mu\text{m}^2/\text{s}$ , in arancione  $D = 71 \mu\text{m}^2/\text{s}$ .

Dall'equazione di Stokes-Einstein si può infatti mostrare che

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R} \propto \frac{1}{V^{\frac{1}{3}}} \quad (11.15)$$

Ciò risulta particolarmente utile anche nella **distinzione di un monomero da un dimero** grazie alla FCS. In questa circostanza infatti il coefficiente di diffusione cambierà di un fattore  $2^{\frac{1}{3}} \sim 1.26$ .

### SLIDE 32 E 33 CHE MI DICONO?. DF

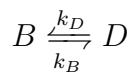
#### 11.2.2 Fluttuazioni di brillanza

Passiamo dunque a considerare il secondo tipo di fluttuazioni, le cui cause abbiamo detto devono essere ricercate all'interno della fotodinamica. Rispetto ai processi di diffusione, dove abbiamo visto che le scale temporali sono dell'ordine di  $10^2 \mu\text{s}$ , qui si ha a che fare con transizioni tra stati di fluorescenza e di spegnimento su scale molto più brevi, dell'ordine dei  $10 \mu\text{s}$ . Ciò ci consente, per la stesura del modello, di trascurare, questa volta, le fluttuazioni della concentrazione.

Più in particolare chiamiamo

- D uno stato buio, dove D sta per *darkness*;
- B uno stato brillante che fluoresce, dove B sta per *bright*.

Dovendo studiare le fluttuazioni della brillanza, ovvero del flusso di energie emesso per unità di superficie (*radianza*), il modello più semplice è quello basato sulle costanti cinetiche della reazione all'equilibrio



La funzione di autocorrelazione per le fluttuazioni della brillanza dovrà tener conto dei brevi tempi di vita dei singoli stati di equilibrio e ci si aspetta pertanto che obbedisca ad una legge di decrescita esponenziale

$$\chi_{fot}(\tau) = 1 + \frac{A}{1-A} \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_{fot}}\right) \quad (11.16)$$

nella quale

- $\tau_{fot}$  rappresenta il tempo caratteristico e coincide come nel caso delle concentrazioni con il tempo di semicorrelazione. Si può mostrare che è definito come

$$\tau_{fot} = \frac{1}{k_B + k_D} \quad (11.17)$$

- il parametro A invece è ottenibile dall'intercetta a tempo di ritardo nullo ed è esprimibile come la frazione di molecole nello stato D

$$A = \frac{k_D}{k_B + k_D} \quad (11.18)$$

In virtù della 11.14 e della discussione nel precedente paragrafo sulle fluttuazioni di concentrazione si potrebbe pensare di misurare, da una curva di plot di  $\chi_{fot}$ , i due parametri caratterizzanti e da questi ricavare i valori delle costanti.

Visti però i tempi coinvolti nella misura di  $\tau_{fot}$  e A, per evitare che le richieste temporali di sensibilità dello strumento non permettano più di trascurare le fluttuazioni di concentrazione, si procede nel modo seguente. Si prendono dati su tempi lunghi, quindi dell'ordine della diffusione e di si fitta la  $G(\tau)$  espressa dalla 11.11. Da questo fit si estra-  
polano, come abbiamo visto i valori di  $G(0)$  e  $D$ . A questo punto, si scrive la funzione di autocorrelazione complessiva, che tenga conto dell'intera fluttuazione di fluorescenza, quindi tanto della diffusione quanto della fotodinamica:

$$G(\tau) = G_{diff}(\tau) \cdot \chi_{fot}(\tau) \quad (11.19)$$

e si fitta l'intera raccolta dati una seconda volta passando come parametri alla funzione di interpolazione i valori  $G(0)$  e D appena trovati. In tal modo è possibile risalire con soddisfacente precisione anche ai parametri dei tempi corti:

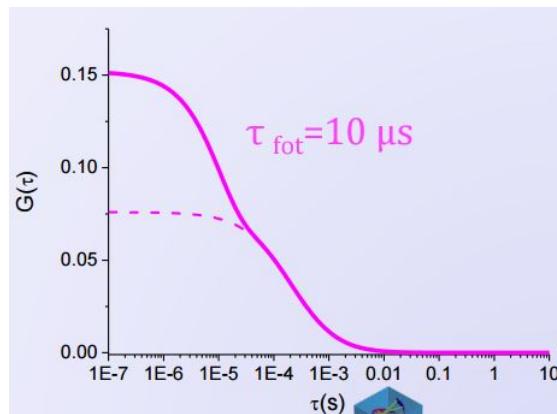


Figura 11.11: Funzione di autocorrelazione complessiva. Si noti, attorno ai  $10^{-5}\mu\text{s}$  il raccordo tra le due curve  $G_{diff}(\tau)$  (completata in tratteggio) e  $\chi_{fot}(\tau)$ .

Applicazioni tipiche del metodo riguardano le Green Fluorescent Proteins (GFP) che consentono, in base a uno studio sull'equilibrio degli stati bright (stato deprotonato) e dark (stato protonato) di risalire ad esempio al valore di pH della soluzione.

Altra applicazione classica è quella che coinvolge le nanostar (nanoparticle a forma di stella) d'oro. È cosa nota che *se gli oggetti ruotano, la loro fluorescenza ne è modificata*:

la rotazione dei dipoli di transizione modula infatti l'emissione. Generalmente il fenomeno di fluttuazione causato da rotazione avviene troppo velocemente per essere estratto dalle curva di correlazione, assestandosi sui nanosecondi. Tuttavia le nanostar, che ricordiamo avere un diametro di 200-300 nm e un numero di punte variabile tra 7 e 10, sono relativamente grandi, asimmetriche e con tempi di rotazione sulla scala dei microsecondi. Questo fa sì che l'effetto sia visibile nel plot della funzione di autocorrelazione completa, seppur nella primissima parte della curva dove i tempi sono ancora molto piccoli.

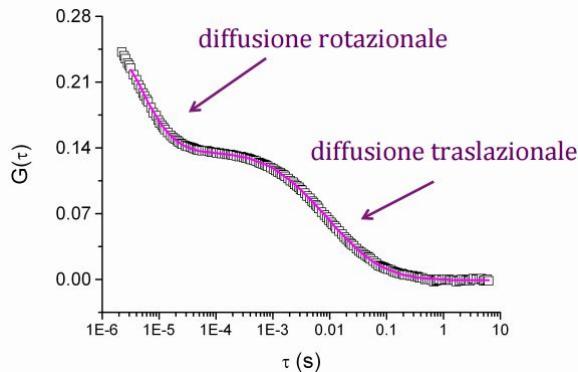


Figura 11.12: Dai tempi caratteristici si estrarranno poi i coefficienti di diffusione *rotazionale*,  $D_{rot} = kT/8\pi\eta R^3$  per tempi corti e di diffusione *traslazionale*,  $D_{tras} = kT/6\pi\eta R$  per i tempi più lunghi.

### 11.2.3 Uso dell'istogramma di conteggio dei fotoni

Una stima delle fluttuazioni può essere data anche senza ricorrere a una funzione matematica che le descriva esplicitamente. L'emissione di fluorescenza di un fluoroforo eccitato da una fascio laser infatti non si verifica ad un tempo fissato. Al contrario, se si raccolgono in un istogramma il numero di fotoni osservati in funzione del tempo d'osservazione, ciò che si otterrà sarà una curva a decrescenza esponenziale. Il tempo di decadimento della fluorescenza è proprio di ogni fluoroforo e può cambiare in funzione del microambiente e dello stato conformazionale.

Lo strumento di modellizzazione che si utilizza in questi casi è un **istogramma di conteggio di singolo fotone**, (PCH). Ogni fotone rilevato genera un impulso elettrico che viene mandato ad un sistema di immagazzinamento dei dati. In tal modo l'intensità di fluorescenza che raggiunge il rivelatore viene convertita in un **numero** di fotoni. Definiamo pertanto con  $\langle k \rangle$  il numero medio di conteggi per intervallo di tempo e  $I_D$  l'intensità misurata. Verrà la relazione

$$\langle k \rangle = \eta I_D$$

dove  $\eta$  è semplicemente una costante di proporzionalità.

Se la l'intensità di fluorescenza è, in media, costante, la distribuzione dei conteggi dei fotoni è ben descritta da una curva poissoniana. Le fluttuazioni della fluorescenza deformano la forma classica della poissoniana che ci si attenderebbe in base al valore medio di  $I_D$ : proprio dallo studio di queste variazioni si possono determinare parametri di dinamica e conformazione molecolare. L'apparato sperimentale consta solitamente di un microscopio confocale che permette di concentrarsi su un piccolo volume di eccitazione. Ovviamente le misurazioni sono affette dalla funzione di densità di punto (PFS) dello strumento per via del limite di diffrazione che permane in questo caso; la forma specifica

della PFS influenza in qualche modo il conteggio dei fotonii.

Consideriamo innanzitutto il caso in cui un volume di eccitazione  $V_0$  contenga un solo fluoroforo. Allora si può dimostrare che la distribuzione dei conteggi dei fotonii è esprimibile come

$$\begin{aligned} p^{(1)}(k, V_0, \varepsilon) &= \int Poi[k, \varepsilon P\bar{SF}(\bar{r})] \rho(\bar{r}) d\bar{r} \\ &= \frac{1}{V_0} \int_{V_0} Poi[k, \varepsilon P\bar{SF}(\bar{r})] d\bar{r} \end{aligned} \quad (11.20)$$

con  $\rho(\bar{r})$  a indicare la probabilità di trovare la particella nel punto indivisuale dal raggio vettore  $\bar{r}$  nel volume di eccitazione. Da questo discende che il numero medio di conteggio di fotonii sarà esprimibile come

$$\langle k \rangle = \frac{\varepsilon}{V_0} \int_{V_0} P\bar{SF}(\bar{r}) d\bar{r} = \varepsilon \frac{V_{PSF}}{V_0} \quad (11.21)$$

ovvero il numero medio di fotonii contato è dato dal *prodotto tra  $\varepsilon$  e la probabilità di trovare la particella all'interno del volume della PSF*. In nome di ciò il parametro  $\varepsilon$  esprime la **brillanza** del fluoroforo, che esprime il numero medio di fotonii che vengono registrati durante l'intervallo di tempo di osservazione del volume  $V_{PSF}$ .

Consideriamo ora il caso generale in cui il volume  $V_0$  contiene un numero  $N$  di fluorofori indipendenti. Per ogni singola molecola vale il discorso appena fatto. Se ne evince che il corrispettivo istogramma di raccolta PCH  $p^{(N)}(k, V_0, \varepsilon)$  sarà dato dal prodotto tensoriale degli istogrammi di singola particella  $p^{(1)}(k, V_0, \varepsilon)$ :

$$p^{(N)}(k, V_0, \varepsilon) = \underbrace{(p^{(1)} \otimes \dots \otimes p^{(1)})}_{N \text{ volte}}(k, V_0, \varepsilon) \quad (11.22)$$

Sin ad ora abbiamo considerato il sistema [volume di eccitazione - fluoroforo] sostanzialmente come un sistema chiuso che consentisse lo scambio di energia (fluorescenza) con l'osservatore ma non di materia. Ora, affinché il nostro modello sia il più realistico possibile è necessario aggiungere a quanto già posto l'ipotesi che il volume sia in realtà un sistema aperto. Da ora in avanti ci concentreremo pertanto su di un piccolo subvolume (coincidente con il volume descritto dalla PFS), da cui i coloranti sono liberi di entrare e uscire. Il subvolume è naturalmente a contatto con il suo volume complementare molto più largo (gergalmente, *reservoir*) e la distribuzione di particelle presenti all'interno del subvolume è data da una funzione di Poisson

$$\#_{subvol} = Poi(N, \bar{N})$$

dove  $\bar{N}$  esprime il numero medio di particelle all'interno del volume di contenimento complessivo  $V_0$ . Naturalmente a questa va aggiunta l'ipotesi più banale, per la quale, se nel subvolume non sono presenti particelle, non viene generato nessun conteggio di fotonii e definiamo di conseguenza l'istogramma PHC come

$$p^{(0)}(k, V_{PFS}, \varepsilon) = \delta(k) \quad \text{con} \quad \delta k = \begin{cases} 1 & \text{se } k = 0 \\ 0 & \text{se } k > 0 \end{cases} \quad (11.23)$$

Possiamo finalmente esprimere la forma  $\hat{p}(k, V_{PFS}, \varepsilon)$  dell'istogramma di conteggio di fotonii per un sistema aperto come il valore di aspettazione dell'istogramma per  $N$  particelle  $p^{(N)}(k, V_0, \varepsilon)$  secondo la pdf poissoniana:

$$PHC = \hat{p}(k, V_{PFS}, \varepsilon) = \langle p^{(N)}(k, V_{PFS}, \varepsilon) \rangle_{N_{PFS}}$$

(11.24)

La 11.23 è la forma definitiva dell'istogramma e descrive la probabilità di osservare un numero  $k$  di conteggi di fotoni durante il tempo di osservazione per un sistema aperto con una media di  $N$  particelle disposte nell'intero volume di riferimento  $V_0$ . Tralasceremo altri formalismi. Basti sapere che dalla 11.23 si può calcolare il numero medio di conteggi e questa quantità risulta esprimibile come prodotto della brillanza molecolare  $\varepsilon$  e del numero medio di particelle  $\bar{N}_{PFS}$  contenute all'interno del volume di osservazione:

$$\langle k \rangle = \varepsilon \bar{N}_{PFS} \quad (11.25)$$

Si può inoltre dimostrare che

$$\frac{\langle k^2 \rangle - \langle k \rangle^2}{\langle k \rangle} = \frac{\sigma^2}{\langle k \rangle} = \gamma \varepsilon + 1 \quad (11.26)$$

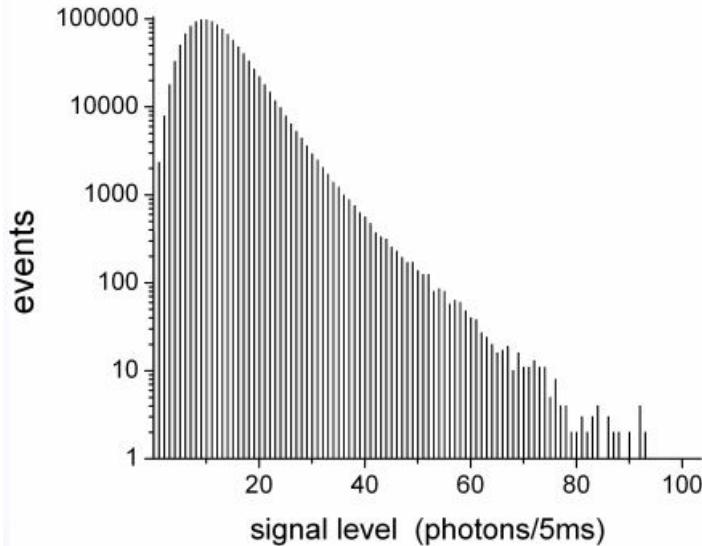


Figura 11.13: Istogramma di conteggio. Si apprezzi la caratteristica forma poissoniana.

Dai parametri della curva (media e deviazione standard) si possono pertanto estrapolare i parametri di numero e brillanza del volume.

Concludiamo il paragrafo facendo notare che, in fase effettiva di raccolta dati, i parametri che si ottengono sono sempre solo *apparenti* e non coincidenti esattamente con quelli reali. Si parlerà pertanto di brillanza apparente  $B$  e di numero apparente  $n$ . Questo per via di disturbi da rumore e di offset che inevitabilmente affliggono gli strumenti di misura, ovviamente non ideali. La relazione tra le grandezze apparenti e grandezze reali è mostrata nelle equazioni che seguono:

$$B = \frac{\sigma^2 - \sigma_0^2}{\langle k \rangle - \text{offset}} S(\varepsilon + 1) \quad (11.27)$$

$$n = \frac{(\langle k \rangle - \text{offset})^2}{\sigma^2 - \sigma_0^2} = \frac{\varepsilon N}{\varepsilon + 1}$$

nelle quali  $s$  è il parametro dell'elettronica analogica  $i\omega$  prodotto dalla trasformata di Laplace delle derivate temporali nello spazio delle pulsazioni. Il valore dell'offset di cui

tener conto nelle 11.27 sono stimabili fittando ad esempio il picco della poissoniana con una gaussiana. I valori di  $S$  si possono invece ottenere dalla misura di un campione costante (tale cioè da non avere fluttuazioni) a diverse potenze di illuminazione.

# Capitolo 12

## NOTE SUL TRASPORTO CELLULARE

### 12.1 La membrana cellulare

Ogni cellula possiede una membrana cellulare, e in genere un esteso sistema di membrane intracellulari, che la separa dall'ambiente esterno. Questa membrana, chiamata anche membrana plasmatica, è un sottile rivestimento (spessore  $\sim 10\text{nm}$ ) con lo scopo di separare la cellula da ciò che a circonda e regolare lo scambio di sostanze nutritive di estrema importanza per la vita della cellula. Lasciano entra acqua, alcuni ioni e substrati ed espellono le sostanze di rifiuto al fine di mantenere un bilancio interno detto **omeostasi**. Senza questo sistema protettivo il contenuto della cellula si diffonderebbe nell'ambiente circostante, le molecole contenente le informazioni andrebbero perse e molti percorsi metabolici smetterebbero di funzionare portando all'inevitabile morte della cellula.

#### Omeostasi

Il processo dell'**omeostasi** non si applica solo alla cellula ma è un processo più generale applicabile anche a sistemi più complessi : è la tendenza al mantenimento di un equilibrio interno delle caratteristiche chimico-fisiche in opposizioni a variazioni dell'ambiente esterno. Le cellule lo attuano mediante il trasporto attraverso la membrana per eliminare le sostanze di scarto ma abbiamo anche numerosi esempi di organismi e sistemi più complessi :

- Regolazione della temperatura attraverso il sudore;
- Gestione del pH mediante l'utilizzo di tamponi;
- Il processo di regolazione del livello di zucchero nel sangue e la relativa pressione;
- Equilibrio fra i livelli di  $O_2$  e  $CO_2$  dato dallo scambio di gas attraverso il sistema respiratorio;
- Eliminazione dei prodotti di scarto attraverso il sistema urinario;

#### 12.1.1 La struttura della membrana cellulare

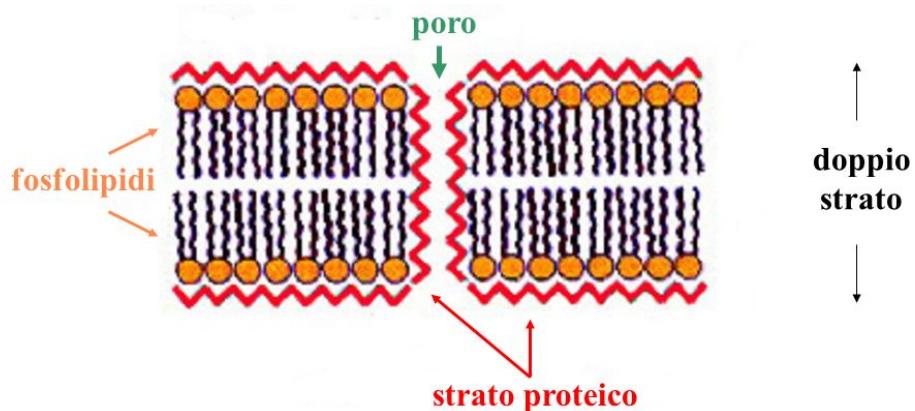
La cellula è organizzata in unità funzionali chiamate **organelli**. Tali strutture sono per la maggior parte delimitate da una o più membrane. Per poter svolgere le proprie funzioni

specifiche, ogni organello dovrà possedere una membrana *specializzata*, cioè che contiene proteine e componenti lipidiche che le permettono di svolgere un particolare ruolo. Risulta quindi evidente come ci siano più tipi di membrana a seconda della funzione svolta dall'unità rivestita. Nonostante la fondamentale importanza di questo rivestimento, attualmente non conosciamo ancora con precisione la sua struttura. Esistono più modelli che cercano di dare una spiegazione.

### Modello di Danielli e Davson

Nel 1953 Danielli e Davson studiarono il comportamento dei doppi strati lipidici nei trigliceridi su superfici acquose scoprendo che si disponevano in un particolare modo: le teste polari erano sempre dirette verso l'esterno formando delle piccole gocce determinando una tensione superficiale molto più elevata di quella cellulare. Questo modello viene anche chiamato *modello a sandwich* o *modello di unità di membrana*.

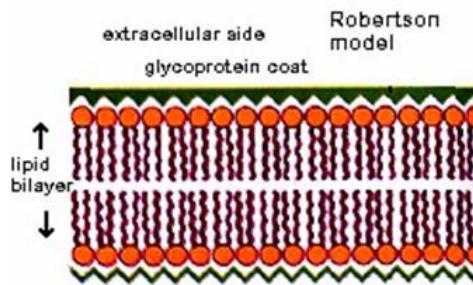
### MODELLO DI DAVSON E DANIELLI (modello a sandwich)



Il modello di Danielli-Davson verrà ripreso da Roberston nel suo modello.

### Modello di Robertson

Nel 1965, Robertson analizzò la struttura delle membrane osservate al microscopio elettronico e non trovò spazio per i pori che erano stati teorizzati dal modello precedente. Ipotizzò, quindi, che l'aspetto simile a rotaie fosse dovuto ad un altro fattore che identificò con il legame del tetrossido di osmio alle proteine e ai gruppi polari dei lipidi, proponendo così l'**ipotesi di membrana unitaria**.



### Modello a mosaico fluido

Secondo S.J.Singer e G.Nicolson nel 1972, le membrane biologiche possono essere considerate come liquidi bidimensionali nei quali tutte le molecole lipidiche e proteiche diffondono più o meno liberamente. Singer studiò il comportamento dei doppi strati lipidici e scoprì che possono formare superfici piatte in acqua senza alcun bisogno di rivestimento proteico come invece era stato ipotizzato. Proprio per questo motivo risulta essere il modello più ampiamente accettato e prevede che i lipidi si dispongano con la parte idrofila verso l'esterno e quella idrofobica verso l'interno. Le proteine che si trovano all'interno di questo doppio strato sono libere di muoversi o di ruotare. Grazie alla presenza di particolari molecole trasportatrici è possibile assorbire dall'esterno elementi importanti per al via della cellula utilizzando l'energia fornita dalla cellula e le proteine che si trovano all'interno del doppio strato lipidico. In conclusione questo modello vede la membrana come un mosaico (una miscela) di diverse molecole proteiche che fluttuano in un doppio strato (bilayer o double layer) fosfolipidico. Ogni fosfolipide, infatti, ha una testa idrofila (gruppo fosfato) e una coda idrofobica (acidi grassi) e grazie a questa caratteristica i doppi strati si formano spontaneamente.

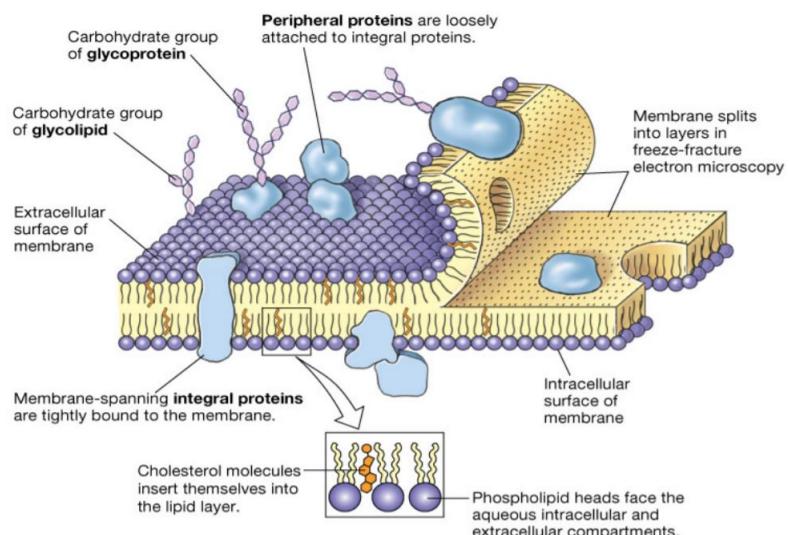


Figura 12.1:

Come si può vedere in figura le membrane presentano dei pori grazie ai quali è possibile scambiare sostanze con l'ambiente esterno. Non tutto però può entrare, infatti questi pori sono **selettivamente permeabili**, e grazie al contributo della struttura della membrana, selezionano solo le particelle di cui la cellula ha bisogno.

### Funzioni della membrana cellulare

Abbiamo visto l'importanza della membrana cellulare come rivestimento protettivo con lo scopo di separare la cellula e il suo contenuto dall'ambiente esterno e come mediatrice degli scambi di sostane. Possiede, però, altre funzioni da sottolineare:

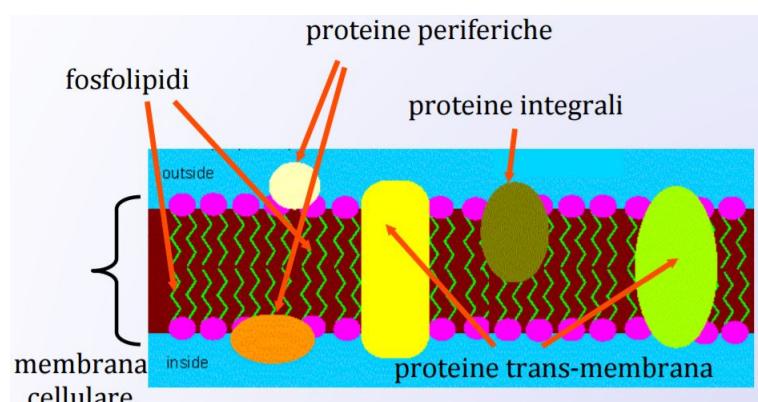
- Alcune elementi importanti per la cellula si possono legare alle proteine che "ribaltandosi" permettono il loro assorbimento all'interno della membrana;
- Alcune proteine formano un "foro" attraverso il quale alcune molecole possono passare;
- Il movimento delle componenti fosfolipidiche e proteiche permette alla membrana di cambiare forma. Questo processo prende il nome di fluidità.
- La relativa flessibilità di questa struttura è fondamentale per i diversi tipi di cellule;

Di fatto la membrana cellulare è l'unica cosa che permette l'esistenza di condizioni differente tra l'interno e l'esterno. Non solo garantisce questa separazione con l'ambiente ma garantisce anche la suddivisione della cellula in scompartimenti con differenti caratteristiche interne. È importante citare anche la possibilità di rilasciare sostanze mediante la fusione di vescicole con la membrana esterna, garantendo così un equilibrio ed eliminando le sostanze nocive.

#### 12.1.2 La composizione della membrana cellulare

La membrana cellulare è essenzialmente composta da proteine e fosfolipidi con diverse funzionalità:

- Lipidi organizzati in un doppio strato;
- Proteine **trans-membrana** immerse in uno strato lipidico;
- Proteine fluttuanti in un mare lipidico (proteine **integrali**);
- Proteine associate all'esterno del doppio-strato lipidico (proteine **periferiche**);



Sono presenti anche altre sostanze come il colesterolo, altri lipidi, come glicolipidi, e glicoproteine.

## Fosfolipidi

Sono i costituenti principali della membrana costituendone ben il 75% della superficie. Sono anfifatici, presentando una testa idrofilica (polare) e una coda idrofobica (non polare). Grazie a questa proprietà, trovandosi in soluzione acquosa si orienteranno in modo tale da posizionare la coda più lontana possibile dalle molecole d'acqua. Proprio per questo motivo il doppio strato fosfolipidico si forma spontaneamente in ambiente acquoso come il fluido extracellulare e il citosol. Sono selettivamente permeabili permettendo il passaggio di piccole molecole e molecole solubili. In forma di membrana non permettono il passaggio a sostanze idrofliche (che per passare devono usare canali o pori di membrana).

## Colesterolo

È uno steroide che costituisce fino al 20% delle membrane animali e negli essersi umani è presente in quantità pari ai fosfolipidi. Essendo anfifatico è in grado di insinuarsi tra i fosfolipidi che formano il doppio strato. La sua presenza è di estrema importanza perché conferisce rigidità alla membrana impedendole di diventare troppo fluida e rompersi. Ha anche un ruolo fondamentale per la stabilità meccanica. Il fatto che abbia zone idrofobiche impedisce il passaggio di ioni e molecole polari, aspetto particolarmente importante per i neuroni.

## Glicolipidi

Il 5% dei lipidi di membrana presentano corte catene di carboidrati formando così i **glicolipidi**. Si trovano sulla superficie esterna delle membrane e servono principalmente come marker: riconoscono determinate sostanze chimiche aiutando a mantenere l'equilibrio della cellula. Esistono anche gli **sfigolipidi**. **non so perchè lo scriva**

## Proteine

Le membrane sono costituite per circa i 50% da proteine di diverso tipo e funzionalità. Fondamentalmente possono essere divise in *ectoproteine* e *endoproteine*. Generalmente le proteine contenute nelle membrane sono strutturali, di trasporto o enzimi. In alcuni casi svolgono anche il ruolo di recettori. Come si è già esposto, hanno una vasta gamma di funzionalità, principalmente svolgono un ruolo di **trasporto** (il trasporto attivo ne è un esempio) o di **catalizzatori**. Un esempio è la ATPase<sup>1</sup> nelle membrane mitocondriali, le membrane dei cloroplasti, le cellule delle pareti intestinali (per l'idrolisi dei disaccaridi). Più nello specifico, le varie funzioni delle proteine possono essere riassunte in:

- Funzione di **struttura** data dalle proteine integrali. Esse costituiscono il 70% delle proteine di membrana e sono una parte della struttura vera e propria della membrana;
- **Pompe cellulari**: servono per trasferire sostanze contro gradiente di concentrazione o gradiente elettrico;

---

<sup>1</sup>L'ATPasi è una classe di enzimi che catalizza una specifica reazione grazie all'energia ricavata dall'idrolisi di ATP in ADP e P.

- Possono funzionare da **gate** (proteine canali) rimanendo "aperte" o "chiuse" in base alla situazione;
- Proteine coinvolte nel **trasporto** di sostanze;
- **Enzimi**: catalizzatori per le reazioni nella membrana;
- **Recettori**: hanno siti designati per il riconoscimento di specifici ligandi;

C'è poi una classe particolare di proteine, che similmente ai lipidi, presentano una catena di carboidrati legata ad esse: le **glicoproteine**.

### Glicoproteine

Gran parte delle proteine di membrana presentano piccole molecole di carboidrati che grazie al legame idrogeno con l'acqua aiutano a rendere più stabile la struttura della membrana. Sono importanti come recettori per ormoni e neurotrasmettitori. Ad esempio gli antigeni sono particolari glicoproteine che aiutano le cellule a riconoscersi tra loro: ogni cellula ha il suo particolare antigene. Anche le proteine trans-membrana che attraversano l'intero rivestimento sono glicoproteine. Oltre alla funzione di recettori possono essere impiegate in altri campi, similmente alle proteine più semplici:

- Agiscono da **canali**: pompe  $Na^+/K^+$  per mantenere la concentrazione ionica da entrambi i lati della membrana;
- **trasporto**: alcune glicoproteine sono in grado di riconoscere e legare sostanze specifiche come agenti nutritivi, neurotrasmettitori e facilitarne il trasporto;
- **Recettori**: come già accennato in precedenza, sono in grado di riconoscere specifiche sostanze (gli ormoni per esempio);
- **Enzimi**: l'ATPase è una glicoproteina;

### Membrane intracellulari

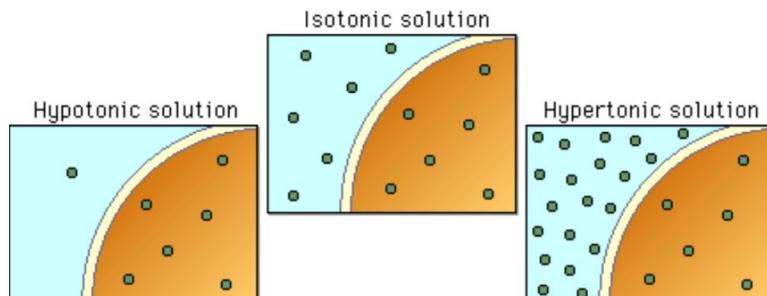
Abbiamo citato in precedenza l'esistenza di queste particolari membrane cellulari. Esse sono presenti all'interno della cellula e rivestono le unità funzionali che la costituiscono. Nonostante abbiano strutture molto simili, i due tipi di membrane sono, dal punto di vista della composizione, molto diverse. Sappiamo, infatti, che le membrane intracellulari avranno una composizione differente a seconda del ruolo che l'organello in questione deve svolgere. Ad esempio le membrane dei cloroplasti contengono piccole quantità di carboidrati, non necessari alle loro funzioni. Considerando che la maggior parte dei processi intracellulari coinvolge le membrane è facile capire come fondamentalmente non ne esista un solo tipo ma ogni unità avrà il suo rivestimento caratteristico: non è possibile quindi determinare una composizione generica per questi rivestimenti.

#### 12.1.3 Permeabilità e trasporto attraverso la membrana

Abbiamo già parlato dell'importantissima proprietà della membrana di essere selettivamente permeabile, ma non abbiamo specificato quali sostanze può far passare e quali no. Generalmente riescono a passare solo le piccole molecole non cariche (glicerolo, etanolo)

oppure piccole molecole idrofobiche (*ossigeno*  $O_2 \rightarrow$  *poco polare diffonde molto velocemente*, *biossido di carbonio*  $CO_2 \rightarrow$  *è polare ma essendo molto piccola riesce a diffondere abbastanza velocemente*). Ci sono, però, molecole necessarie alla vita della cellula che sfortunatamente non riescono a passare liberamente attraverso la membrana. Per poter assorbire queste sostanze sarà quindi necessario trasportarle all'interno della cellula mediante differenti metodi di trasporto cellulare. Alcuni esempi sono certe macromolecole come proteine e zuccheri, di vitale importanza per il corretto funzionamento della cellula, particelle cariche come alcuni ioni ( $H^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{++}$ ,  $Cl^-$ ) e la comunissima molecola d'acqua. Essendo fortemente polare non riesce a passare spontaneamente, ma solo attraverso la *diffusione semplice* o, più comunemente, l'**osmosi** che fanno parte dei trasporti cellulari passivi, ossia che non richiedono un dispendio energetico perché eseguiti secondo gradiente di concentrazione. Prima di procere con l'introduzione dei trasporti attraverso la membrana, è bene approfondire il ruolo della concentrazione. Il "gradiente di concentrazione" citato poco fa è, per l'appunto, il gradiente della differenza di concentrazione fra due volumi adiacenti. Nel nostro specifico caso è riferito alla differenza di concentrazione di una sostanza fra l'interno e l'esterno della cellula. È importante tenerne conto perché il metodo di trasporto cambia radicalmente se segue la direzione del gradiente (da concentrazione maggiore a concentrazione minore) o meno. È possibile distinguere 3 tipologie di soluzione a seconda della differenza di concentrazione di solvente:

- **Isotonica:** le due concentrazioni sono uguali;
- **Ipotonica:** la concentrazione dell'ambiente esterno è maggiore di quella interna;
- **Ipertonica:** la concentrazione interna supera quella esterna;



Dedichiamo le due sezioni seguenti alla trattazione dettagliata dei due tipi di trasporto con i quali una cellula è in grado di permettere l'attraversamento delle proprie membrane a molecole esterne

## 12.2 Trasporto passivo

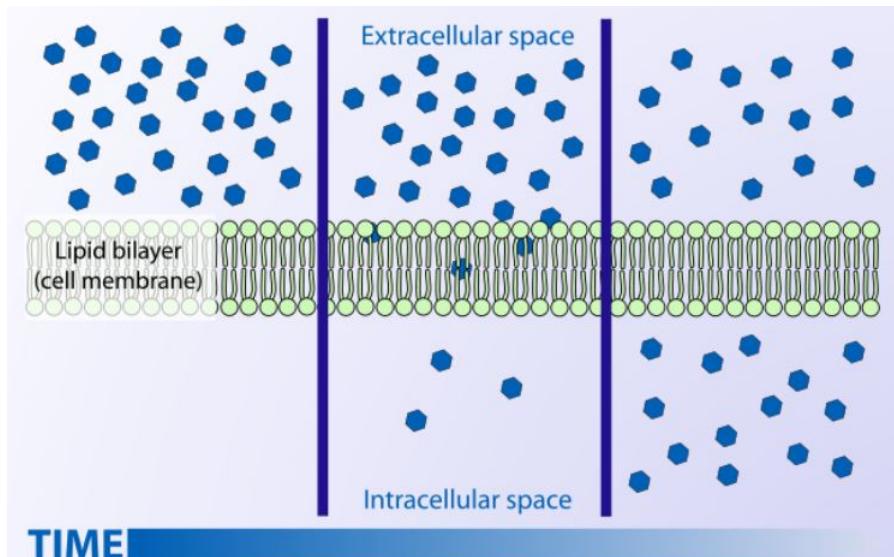
il trasporto passivo consiste nel passaggio di molecole secondo gradiente. Per questo tipo di passaggio non è richiesta alcun dispendio di energia da parte della cellula (da cui la denominazione di *passivo*) e dipende **solo** dal valore di concentrazione delle regioni di partenza (alta concentrazione) e di arrivo (bassa concentrazione). Essa è fondamentalmente dovuta al moto termico **casuale** delle molecole.

Nello specifico si distingueono tre diversi tipi di trasporto passivo:

1. la **diffusione**: consiste nel semplice movimento passivo e casuale di piccole molecole da regioni a concentrazione maggiore verso regioni a concentrazione minore. Essa prosegue fino a quando tutte le molecole (l'insieme delle due regioni) sono caratterizzate da una distribuzione uniforme, situazione a cui si dà il nome di *equilibrio*. Dopo la fine della diffusione le molecole continuano amuoversi liberamente di moto termico caotico, ma rimanendo distribuite con omogeneità.
2. **diffusione facilitata**: il processo è identico a quello della diffusione, ma in questo caso particolare il passaggio viene aiutato dall'azione di proteine trasportatrici.
3. **osmosi**: è il caso specifico della diffusione di molecole d'acqua attraverso una membrana semipermeabile

Discutiamo dunque meglio nel dettaglio ciascuna delle tre modalità.

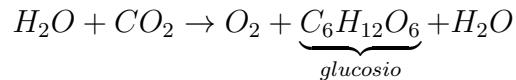
### 12.2.1 Diffusione



Oltre a quello che si è già detto nell'introduzione sopra, sottolineiamo alcune caratteristiche del fenomeno:

- la diffusione è in genere accompagnata dall'aumento della pressione aquosa dovuto al moto delle molecole di  $H_2O$  per diminuire la differenza di concentrazione tra le due regioni.
- anche un gas può diffondere attraverso la membrana, a condizione che prima sia stato dissolto in un liquido tramite *flottazione*
- un esempio classico è quello dell'**ossigeno** nelle cellule animali; tali cellule consumano infatti  $O_2$  per garantirsi il sostentamento. In tal modo tuttavia l'ossigeno risulta meno concentrato all'interno che all'esterno. Come conseguenza si assiste al trasporto passivo dell'ossigeno all'interno della cellula, il che ne garantisce il corretto funzionamento. Al contrario il **biossalido di carbonio** ( $CO_2$ ) è prodotto dalle stesse cellule animali quindi tende ad essere più concentrato all'interno che all'esterno del sistema. Ciò ne determina la spontanea diffusione verso l'esterno.

- la diffusione gioca un ruolo interessante anche nei processi di **fotosintesi**. Ricordando infatti che la reazione che avviene nelle foglie e con cui vengono prodotte sostanze organiche a partire dall'anidride carbonica è



affinchè avvenga la fotosintesi è necessario che il biossido di carbonio entri nella foglie; questo succede per diffusione verso l'interno attraverso gli stomi, mentre allo stesso tempo, per garantire equilibrio dinamico, vapore acqueo e ossigeno diffondono verso l'esterno.

- la **velocità di diffusione** di una singola molecola è influenzata da diversi parametri:

1. *le dimensioni molecolari*: più una molecola è piccola e più veloce sarà la sua diffusione
2. *la temperatura*: maggiore è la temperatura dell'ambiente, maggiore sarà il moto caotico molecolare e di conseguenza più veloce la diffusione
3. *il gradiente di concentrazione*: banalmente più la differenza di concentrazioni tra le regioni partenza e arrivo è marcata, e più il trasporto sarà marcato e rapido
4. *lo stato fisico*: la diffusione è più veloce nei gas rispetto ai liquidi, i quali a loro volta ospitano una diffusione più lesta rispetto a quella nei solidi. la ragione di ciò va ovviamente cercata nella mobilità di cui le molecole possono godere.
5. *l'area della superficie di membrana disponibile*: più questa è estesa, più sarà facile e veloce raggiungere l'equilibrio dal momento che il processo coinvolge più molecole alla volta.
6. *lo spessore della superficie di scambio*: più sottile è e più veloce diffonderanno le molecole
7. *la distanza*: più la distanza da percorre è breve e più si ottiene un equilibrio rapido per il gradiente. Per avere un'idea delle grandezza di cui stiamo parlando si consideri che in genere avviene su tragitti minori o uguali a 125 micron.
8. *polarità*: le molecole non polari diffondono più facilmente delle molecole polari perché solubili nelle code fosfolipidiche idrofobiche

- la diffusione obbedisce matematicamente alla **legge di Fick**:

$$\frac{dM_{(1)}}{dt} = \frac{D \cdot S \cdot \Delta C}{h} \quad (12.1)$$

valida ad una temperatura fissata, in approssimazione isoterma e nella quale  $D$  è il coefficiente di diffusione,  $S$  è la superficie di membrana interessata al processo,  $\Delta C = C_2 - C_1$  è il gradiente di concentrazione e  $h$  lo spessore della membrana.  $M_{(1)}$  indica invece la massa della sostanza che diffonde a partire dall'ambiente etichettato con 1. La 12.1 trova applicazione fondamentalmente nella farmaco-cinetica che si occupa della velocità con cui i farmaci vengono assorbiti nelle cellule. Nella pratica quindi il lato sinistro della legge di Fick esprime la variazione nel tempo della

quantità di farmaco nella regione di partenza. E' triviale che nel caso in cui  $C_2 > C_1$  la farmacocinetica avvenga nel verso opposto e che quindi  $M$  assume un pedice (2) anzichè (1)

### 12.2.2 Diffusione facilitata

Se confrontata con la diffusione appena discussa, il trasporto facilitato interessa molecole più grandi o cariche attraverso la membrana cellulare. Perchè ciò sia effettivamente possibile è necessario che queste siano aiutate da selettive proteine trasportatrici che formano dei canali di accesso.

Analogamente a quanto succede nella diffusione il movimento avviene ancora secondo il gradiente decrescente di concentrazione; inoltre ciascuna proteine trasportatrice è in grado di trasportare solo un tipo di molecola, il che fa della diffusione facilitata un processo fortemente specializzato. Un esempio di cosa succede è dato dalla **diffusione del glucosio** di cui si dà un tratteggio grafico in ciò che segue:

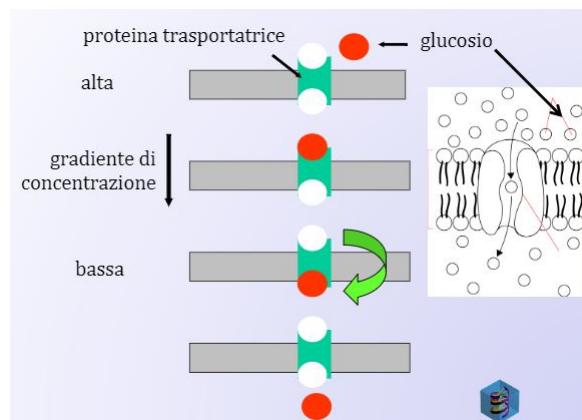


Figura 12.2: Diffusione facilitata del glucosio. Si noti come la proteina trasportatrice apra un vero e proprio canale (in verde) tra gli strati della membrana cellulare

La proteina trasportatrice in questo caso si trova nella membrana cellulare e dispone di due siti di legame, uno esterno ad essa e uno interno. Il glucosio (rappresentato da una sfera rossa) si lega alla proteina trasportatrice (in verde con due siti di legame disponibili (in bianco)) grazie al sito esterno alla membrana. La proteina a questo punto si ribalta e rilascia il glucosio verso l'interno della cellula, secondo il gradiente di concentrazione. A seconda dello spessore della membrana il processo si ripeterà più volte consecutivamente. Vediamo pertanto più da vicino queste **proteine trasportatrici**. Esse, dette anche *carrier*, si caratterizzano per il fatto di far muovere più velocemente il soluto attarverso la membrana, soluto a cui si legano tramite siti di riconoscimento altamente specifici. Una volta che la molecola da trasportare ha raggiunto l'interno della cellula il canale che esse arono attraverso la membrana viene richiuso. La forte specializzazione dei siti di riconoscimento ha però come conseguenza anche il fatto che esse possano essere *inibite da appositi farmaci*, che in tal modo sono in grado di bloccare il canale. Come vedremo nella sezione successiva esse sono coinvolte anche nel processo di trasporto attivo.

Un caso particolare di proteine trasportatrici è quello dei cosiddetti **canali ionici**: essi trasportano ioni, attraverso canali *gated*, ovvero in grado di cambiare forma e chiudersi a seconda di ciò che le circostanze richiedono (proprietà di *cancello*), e sono fondamentali per la comunicazione cellulare.

### 12.2.3 Osmosi

Mentre la diffusione riguardava il trasporto di molecole piccole e tendenzialmente idrofobiche e la diffusione facilitata interessava qualsiasi molecola per cui esistesse una specifica proteina, l'osmosi si differenzia dalle prime due dal momento che essa è la **diffusione dell'acqua**. In particolare consiste nel trasporto passivo delle molecole d'acqua da una regione ad alta concentrazione di acqua ad una a bassa concentrazione di  $H_2O$  attarverso una membrana semipermeabile.

Ricordiamo infatti che le cellule sono circondate da una membrana cellulare che separa il contenuto dall'ambiente esterno. Il doppio strato fosfolipidico ha dei piccoli canali che permettono il passaggio di piccole molecole, ma non di molecole più grosse; in questo senso essa si definisce **semipermeabile**. Come conseguenza di questo fatto, l'osmosi si evidenzia per essere un processo diffusivo che coinvolge una solo sostanza. Abbiamo visto infatti, ad esempio nel caso della diffusione di ossigeno nelle molecole animali, che all'ingresso di ossigeno corrisponde uscita di  $CO_2$ . Con l'osmosi invece solo l'acqua può spostarsi per via delle semipermeabilità che blocca il soluto nell'ambiente a concentrazione di acqua minore.

La caratteristica principale dell'osmosi, che di fatto la distingue in maniera netta dagli altri due trasporti attivi, è la direzione di attraversamento della membrana. L'osmosi infatti, essendo un processo passivo, avviene ancora da concentrazioni maggiori a concentrazioni minori, ma il gradiente questa volta è riferito alle molecole di acqua e non più di soluto. Pertanto, mentre i primi due trasporti avvengono verso concentrazioni minori di soluto, l'osmosi è **verso concentrazioni maggiori di soluto**.

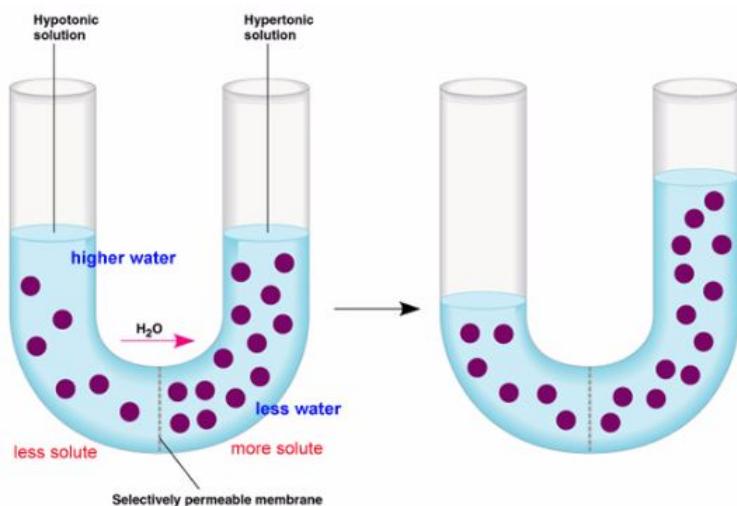


Figura 12.3: Osmosi: diffusione di molecole d'acqua verso concentrazioni minori di acqua. Si noti come la quantità di soluto non è cambiata; le molecole viola sono troppo grandi per attraversare i pori della membrana

a proposito dell'osmosi va sottolineato che a livello cellulare, le molecole di acqua sono così piccole e numerose che la cellula non può controllarne il movimento attraverso la membrana cellulare. A seconda del tipo di soluzione (ipo-iper-iso tonica) in cui si trova immersa la cellula l'osmosi porta a diverse conseguenze.

1. nel caso di una **soluzione ipotonica** si ha una concentrazione di soluto minore e una concentrazione di acqua maggiore rispetto all'interno della cellula. Pertanto,

per osmosi, l'acqua si muove verso l'interno della cellula, che in tal modo si gonfia fino a scoppiare (**citolisi**). Nel caso delle cellule del sangue, ed nello specifico, di globuli rossi, quando queste vengono messe a contatto con dell'acqua distillata, l'acqua tende a entrare nel globulo rosso per cercare di ristabilire il suo equilibrio mentre i sali tendono a uscire. Di conseguenza il globulo rosso scoppia per eccessive sollecitazioni sulle proprie pareti. Questo fenomeno, noto come **emolisi** avviene principalmente all'interno della milza ed è necessario che succeda per garantire il rinnovamento dei globuli rossi che in genere hanno un tempo di vita di 120 giorni

2. nel caso di una **soluzione ipertonica** si ha invece una concentrazione di soluto maggiore e una concentrazione di acqua minore rispetto all'interno della cellula. L'osmosi in questo caso porta le molecole d'acqua a spostarsi verso l'esterno della cellula. Questa fa sì che la cellula perda di rigidità (tecnicamente *turgore*) e sia in tal modo condotta alla morte, secondo il processo di **plasmolisi**. Sempre nel caso delle molecole del sangue, e sempre parlando di globuli rossi nello specifico, questo fenomeno si manifesta quando l'eritrocita è posto in contatto con una soluzione ad alta concentrazione di sale.
3. infine nel caso di una **soluzione isotonica** si a una concentrazione di soluto e di acqua uguale rispetto all'interno della cellula. Come effetto di ciò l'acqua si muove omogeneamente in entrambe le direzioni e la cellula rimane della stessa dimensione. Si dice che in questo caso è in **equilibrio dinamico**

Concludiamo la discussione sul trasporto passivo mostrando come gli organismi viventi gestiscono l'osmosi, per ovviare a citolisi e plasmolisi:

- nelle *piante e batteri*, le cellule sono dotate di **pareti cellulari** che impediscono l'eccessiva espansione o restringimento della cellula. In acqua distillata al cellula diventa **turgida**, mentre in soluzione a d alta concnetrazione di sali diventa **plasmotica**
- un organismo protista come il *paramecio*, ha dei **vacuoli** contrattili che raccolgono l'acqua che fluisce all'interno e la pompano verso l'esterno per evitare la loro eccessiva espansione
- i *pesci d'acqua salata* pompano sale verso l'esterno con speciali **branchie** per evitare la disidratazione
- le *cellule animali* sono bagnate dal sangue. I **reni** svolgono il compito fondamentale di mantenere il sangue isotopico rimuovendo acqua e sali in eccesso

**Nota Bene 12.2.3.1.** *Si fa presente che esiste anche un quarto tipo di trasporto passivo, noto come **filtrazione** e consistente in un modo di separazione di un solido dal liquido in cui è disperso. Tuttavia non ci interessa ai fini di questa trattazione.*

### 12.3 Trasporto attivo

Contrariamente al precedente meccanismo il trasporto attivo richiede l'utilizzo di **energia** da parte della cellula, tipicamente sottoforma di ATP, per il trasporto di sostanza attraverso la membrana. Ciò è necessario perché questo trasporto avviene contro gradiente di concentrazione cioè da concentrazioni minori a concentrazioni maggiori, in genere con l'ausilio di proteine. Si possono delineare 3 meccanismi principali:

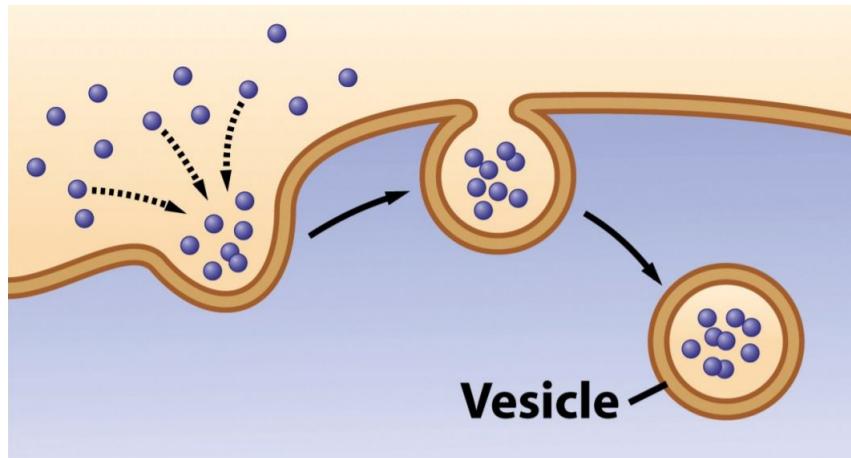
1. Trasporto per mezzo di **proteine trasportatrici** (pompa sodio-potassio per esempio);
2. **Endocitosi**: attraverso la modifica di forma della membrana le molecole vengono racchiuse in vescicole e poi inglobate per essere trasportate all'interno;
3. **Esocitosi**: è simile all'endocitosi con la differenza che ha lo scopo di portare sostanze **fuori** dalla cellula;

#### 12.3.1 Proteine Trasportatrici

Con questo meccanismo di trasporto le sostanze vengono mosse molecola per molecola grazie all'intervento di proteine atte al loro riconoscimento e che sono in grado di legarsi a tali molecole. È un processo molto simile alla diffusione facilitata con la differenza che avviene contro il gradiente di concentrazione della sostanza in questione richiedendo l'utilizzo di energia. Principalmente è utilizzato per lo spostamento di ioni ( $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{++}$ ,  $Cl^-$ ), amminoacidi, nucleotidi e molecole di grandi dimensioni non idrofobiche che non possono diffondere attraverso la membrana. La proteina trasportatrice riconoscerà la molecola da trasportare, ad esempio uno ione salino, la legherà e grazie all'afflusso di ATP, da parte della cellula, si capovolgerà permettendo l'attraversamento della membrana.

#### 12.3.2 Endocitosi

L'endocitosi, o internalizzazione assistita dalla membrana, è un altro processo che permette lo spostamento, grazie all'utilizzo di energia, contro gradiente di concentrazione. Diversamente dal precedente è utilizzato per trasportare contemporaneamente molte molecole di grosse dimensioni (proteine, cibi, fluidi) attraverso la membrana utilizzando delle vescicole. Trasporta macromolecole e particelle all'interno della membrana grazie alle proprietà strutturali della stessa. Parte del rivestimento, infatti, è in grado di ripiegarsi verso l'interno circondando e in seguito inglobando il materiale da trasportare. Il ripiegamento della membrana che circonda il materiale, chiamato vescicola, si stacca e rilascia il contenuto nel citoplasma all'interno della cellula completando il trasferimento.



Questo processo può essere differente a seconda del materiale trasportato:

1. Fagocitosi: nel caso di materiale solido (usato da amebe per nutrirsi e dai globuli bianchi per eliminare i batteri);
2. Pinocitosi: se trasporta materiale liquido (gocce di fluidi);

### Fagocitosi e Pinocitosi

La **fagocitosi** è un particolare tipo di endocitosi che prevede l'internalizzazione vescicolare di particelle solide. Tali vescicole prendono il nome di **fagosoma** o **vacuoli del cibo**. In modo più pratico può essere descritto come l'azione di "mangiare" da parte della cellula (di fatto la cellula assimila materiale solido come noi ingeriamo il cibo). Dopo l'assorbimento nella membrana, il fagosoma, viene portato ad un organello, chiamato lisosoma, che si occupa della separazione dei componenti cellulari fondendosi con esso. Il contenuto del vacuolo viene quindi degradato (grazie alla presenza di enzimi) e in seguito rilasciato all'esterno della cellula (processo di esocitosi) o all'interno per essere ulteriormente processato. La fagocitosi è spesso coinvolta nei processi di acquisizione delle sostanze nutritive per determinate cellule e gioca un ruolo fondamentale nel sistema immunitario per la rimozione di agenti patogeni o resti cellulari. Oggetti come batteri, cellule tissutali morte e piccole particelle minerali sono tipici esempi di materiale fagocitato.

Similmente al processo appena descritto, la **pinocitosi** è un particolare tipo di endocitosi atta all'inglobazioni di materiale liquido. Il meccanismo con cui avviene è del tutto identico al quello della fagocitosi, sfuggendo il ripiegamento della membrana e la formazione di una vescicola.

### 12.3.3 Esocitosi

L'esocitosi è il processo cellulare con il quale la cellula riversa al suo esterno (ovvero nel liquido extracellulare) delle molecole accumulate all'interno di una vescicola, tramite la fusione di quest'ultima con la membrana plasmatica. Tale vescicola è limitata da una membrana e originata dall'apparato di Golgi per vescicolazione. Il suo contenuto può essere costituito da proteine e la fusione con il rivestimento esterno aumenta la quantità di membrana della cellula. È importante perché permette alla cellula di secernere materiali

di scarto, mantenendo così la stabilità, e elementi necessari all'organismo come l'insulina o i nurotrasmettitori.

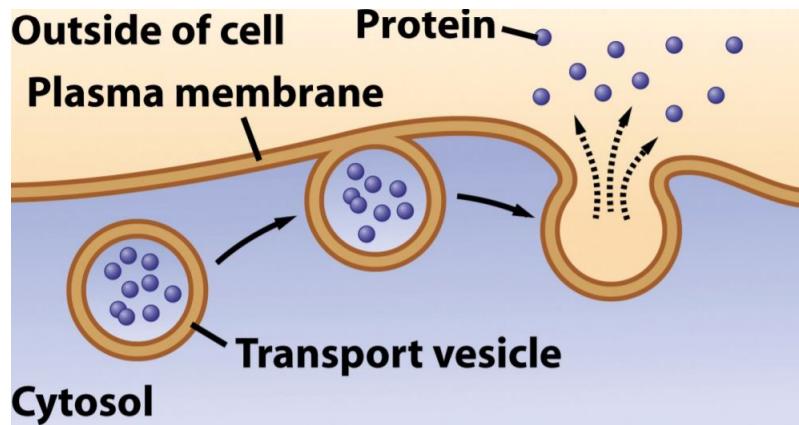


Figura 12.4: Esempio di funzionamento dell'esocitosi

#### 12.3.4 Pompe cellulari

Prima di discutere riguardo queste proteine trasportatrici è bene sottolinearne la differenza con i **canali ionici** già descritti in precedenza. Il trasferimento attraverso *canali ionici* è rapido grazie al fatto che non deve avvenire nessun cambiamento conformazionale per il passaggio della particella. Sono infatti dei canali, specifici a seconda dello ione in considerazione, controllati da dei "gate" che permettono il massaggio di determinate sostanze. Tale comportamento, però, può essere influenzato da tossine e farmaci come tetrodotossina, saxitossina (fibrosi cistica). Al contrario le **pompe cellulari** sono proteine in grado di riconoscere particelle specifiche, legarle e grazie all'afflusso di ATP spostarle all'interno della cellula (o all'esterno a seconda dei casi). Tale spostamento avviene mediante un cambiamento conformazionale della proteina stessa e quindi risulta più lento del precedente. Una delle pompe cellulari più importanti, e che tratteremo principalmente, è quella **sodio/potassio** che resetta gli ioni Na e K dopo la risposta nervosa. Ci sono anche altri esempi degni di nota per la loro importanza, come la pompa per il trasferimento del calcio, fondamentale per la contrazione muscolare, e la pompa idrogeno/potassio, posizionate sulla membrana gastrintestinale che è il principale responsabile dell'acidità dei contenuti dello stomaco.

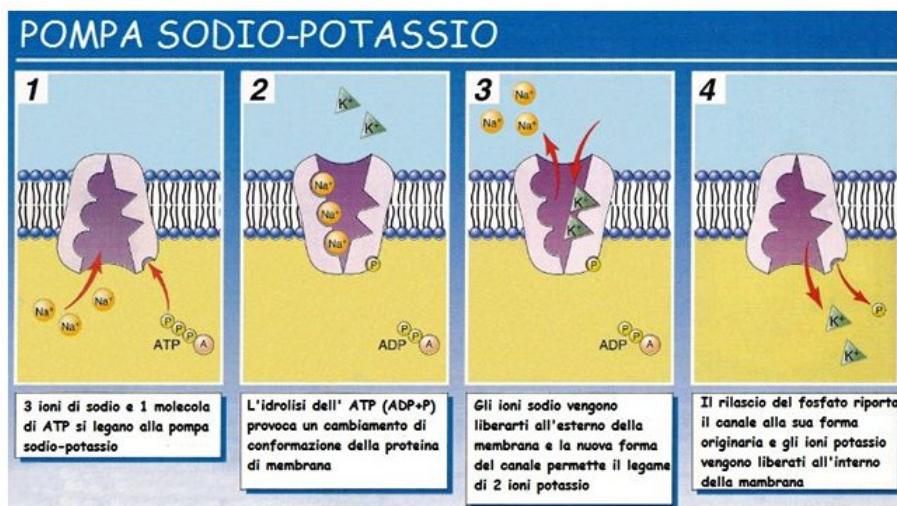
#### Pompa sodio/potassio

Sostanzialmente il processo trasporto di queste particelle avviene in due parti: la **prima** in cui si lega e viene rilasciato il sodio e la **seconda** in cui è il potassio ad andare incontro allo stesso processo.

- **Parte I:** 3 ioni  $Na^+$  si legano nella regione interna della proteina (interno della cellula), che a causa del legame andrà incontro alla fosforilazione (aggiunta di un fosfato):  $ATP \rightarrow ADP + P$ . Questo processo induce un cambiamento conformazionale nella proteina e il sito di legame si sposta rivolgendosi verso l'esterno rilasciando i  $3Na^+$ ;

- **Parte II:** Ora che è avvenuto il legame con il sodio, 2 ioni  $K^+$  sono in grado di legarsi a loro volta con la proteina provocando la de-fosforilazione della stessa e causando un nuovo cambiamento conformazionale. I due ioni vengono quindi esposti all'interno e rilasciati nella cellula;

Questo ciclo usa l'ATP per guidare i trasporti degli ioni  $Na^+$ ,  $K^+$  contro gradiente di concentrazione. Riassumendo possiamo dire che per riuscire a pompare tre ioni sodio verso l'esterno e due ioni potassio verso l'interno, la proteina deve ridurre l'ATP in ADP. Viene causata quindi la fosforilazione della proteina stessa mentre viene legato il sodio e successivamente la de-fosforilazione quando viene legato il potassio. La respirazione cellulare deve avvenire per poter aggiungere un nuovo fosfato all'ADP restaurando l'ATP e chiudendo il ciclo.



Di fatto questo processo è di estrema importanza per il reset delle concentrazioni di sodio e potassio in seguito al passaggio di un segnale nervoso. Nelle cellule nervose, infatti,  $Na^+$  è mantenuto a bassa concentrazione all'interno, al contrario di  $K^+$  che si trova a concentrazioni più elevate. Quando un messaggio nervoso propaga, li ioni attraversano la membrana per spedire il messaggio. Dopo il suo passaggio, quindi, gli ioni dovranno essere attivamente trasportati alle loro posizioni iniziali. Circa un terzo dell'ATP utilizzata da un animale a riposo è dovuta a questo processo.

**Esempio 1. Esempi di quando viene utilizzato il trasporto attivo:** le cellule delle radici delle piante assorbono minerali dall'esterno, ma quando si trovano in una situazione in cui la concentrazione di queste sostanze risulta essere minore di quella interna, allora devono ricorrere al trasporto attivo per poter assorbire ulteriore nutrimento dal terreno.

*La diffusione degli elementi nutritivi nel sangue dall'intestino è generalmente spontanea ma quando siamo in una situazione in cui ho una concentrazione maggiore nel sangue, allora le cellule dei villi sfrutteranno il trasporto attivo per continuare questo trasferimento (per esempio avviene con il glucosio).*

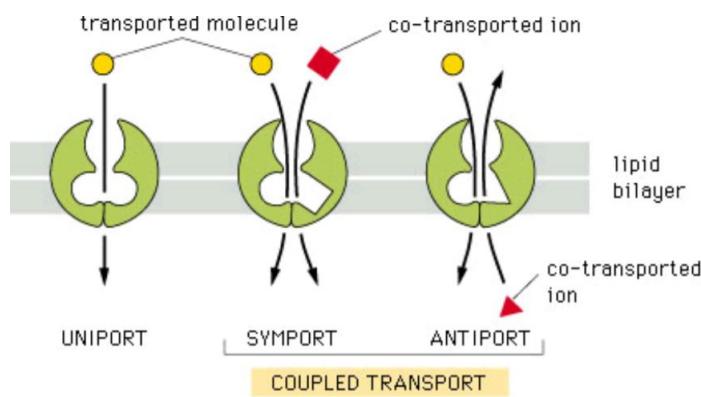
### 12.3.5 Note sul trasporto attivo

#### Cotrasporto

È possibile fare una distinzione ulteriore per quanto riguarda il trasporto attivo. Abbiamo visto, infatti, l'effetto delle pompe, ossia un trasporto contro gradiente mediante l'uso indiretto di ATP. Tale processo può essere diviso in due forme:

- **Uniporto:** trasporto di un unico soluto per volta (Pompe protoniche<sup>2</sup>);
- **Cotrasporto:** è riferito al trasporto contemporaneo di una o più specie di soluti o ioni (pompa Na/K). Esso può essere a sua volta suddiviso in due sottocategorie:
  - **Antiporto:** trasporta due specie di soluto differenti ma in direzione opposta, uno in entrata e l'altro in uscita;
  - **Symporto:** trasporto di due specie di soluto ma nella stessa direzione (entrambi in entrata o in uscita);

Ecco un esempio delle varie forme:



#### Fibrosi cistica

È una mutazione genetica che modifica la proteina di membrana che controlla gli scambi di  $Cl^-$  che viene quindi trattenuto all'interno della cellula insieme all'acqua. Di conseguenza viene secreto un muco più denso e viscoso. L'effetto principale è l'ostruzione delle vie respiratorie causando varie infezioni e dando problemi al pancreas (digestione, crescita scarsa). Generalmente fatale entro i 20-40 anni, viene trattata con antibiotici, terapia fisica, dieta e trapianti.

#### Endocitosi mediata dai recettori

Avviene quando il materiale da inglobare si lega a specifiche molecole nella membrana. Questi recettori aiutano l'inglobazione del materiale: i recettori si legano con le macromolecole per poi riunirsi alla cellula per endocitosi. Dopo che la vescicola si è fusa con il lisosoma e il contenuto è stato degradato, tornerà, insieme al recettore, a far parte della membrana.

<sup>2</sup> operano sia nelle membrane mitocondriali interne nel sistema di trasporto degli elettroni della respirazione cellulare, che nelle membrane dei cloroplasti durante la fotosintesi.

# Appendice A

## DERIVAZIONE SEMICLASSICA DEL DIPOLO DI TRANSIZIONE

L'interazione luce materia può essere descritta secondo un metodo prettamente quantistico oppure seguendo una strada semiclassica. Questa sezione è dedicata alla descrizione di quest'ultimo approccio.

L'hamiltoniana che descrive il sistema sarà la somma di una funzione del sistema materiale imperturbato, di cui è nota esattamente la soluzione del problema secolare, e di un termine perturbante dipendente dal tempo:

$$\hat{H} = \hat{H}_0 + \hat{H}_I(t)$$

Nel caso particolare della spettroscopia le perturbazioni descrivono la transizione tra livelli elettronici o vibrazionali; in tal caso si preferisce pertanto utilizzare come forma per l'hamiltoniana di interazione una funzione armonica, o *periodica*, nella variabile temporale:

$$\hat{H}_I(t) = \hat{V}e^{i\omega t} + \hat{V}e^{-i\omega t}$$

dove  $V$  è una funzione a priori non dipendente dal tempo e caratteristica degli stati di transizione.

Utilizzando la teoria delle perturbazioni dipendenti dal tempo, di dimostra che la probabilità con la quale il sistema transisce, per effetto della perturbazione, da uno stato iniziale  $|i\rangle$  e uno stato finale  $|f\rangle$  è il modulo quadro di

$$c_f = \frac{\lambda}{i\hbar} \langle f | V | i \rangle \left[ \int_0^t dt' e^{i(\omega_{fi})t'} e^{i\omega t'} + \int_0^t dt' e^{i(\omega_{fi})t'} e^{-i\omega t'} \right]$$

dove  $\omega_{fi} = \frac{E_f - E_i}{\hbar}$ .

Calcolando l'integrale appena scritto troviamo

$$\int_0^t dt' e^{i(\omega_{fi})t'} e^{\pm i\omega t'} = \frac{e^{i(\omega_{fi} \pm \omega)t} - 1}{i(\omega_{fi} \pm \omega)} = e^{i(\omega_{fi} \pm \omega)t/2} \frac{\sin((\omega_{fi} \pm \omega)t/2)}{(\omega_{fi} \pm \omega)/2}$$

il cui modulo quadro restituisce la probabilità di transizione. Ponendo ora  $\Delta = (\omega_{fi} \pm \omega)$  si può riscrivere il modulo quadro della densità di probabilità di transizione  $c_f$  come una funzione

$$F(t) = \frac{4}{\Delta^2} \sin^2 t \frac{\Delta t}{2}$$

Se introduciamo ora una funzione sufficientemente regolare nella variabile  $\Delta$ ,  $f(\Delta)$ , si trova che, *per tempi molto grandi*,

$$\begin{aligned} \int_{-\infty}^{\infty} f(\Delta) \frac{4}{\Delta^2} \sin^2 \frac{\Delta t}{2} d\Delta &\simeq f(0) \int_{-\infty}^{\infty} d\Delta \frac{4}{\Delta^2} \sin^2 \frac{\Delta t}{2} \\ &= 2t f(0) \int_{-\infty}^{\infty} dy \frac{\sin^2 y}{y^2} \\ &= 2\pi t f(0) \\ &= 2\pi t \int_{-\infty}^{\infty} f(\Delta) \delta(\Delta) d\Delta \end{aligned}$$

da cui si trova che per tempi sufficientemente grandi (tali cioè da escludere gli effetti di transiente), *la probabilità dipende linearmente dal tempo*. Possiamo allora concludere che per tempi  $t > \tau$ , con  $\tau$  tempo di transiente, esiste un rate di transizione dallo stato iniziale allo stato finale, per unità di tempo:

$$\frac{dP_{i \rightarrow f}}{dt} = R_{i \rightarrow f} = \frac{2\pi}{\hbar^2} |\langle f | \hat{V} | i \rangle|^2 \delta(\omega - \omega_{fi}) \quad (\text{A.1})$$

Applichiamo la teoria quantomeccanica qui discussa al caso delle spettroscopie discusse nei capitoli precedenti.

Iniziamo concentrandoci sulle **transizioni di assorbimento per l'atomo di idrogeno**. L'hamiltoniana complessiva del sistema si ottiene per sostituzione minimale nella forma:

$$\hat{H} = \frac{1}{2m} (\bar{p} + e_0 \bar{A})^2 - e_0 \varphi - \frac{e_0^2}{4\pi\epsilon_0 r} \quad (\text{A.2})$$

nella quale  $\bar{A}$  e  $\varphi$  sono rispettivamente i potenziali vettore e scalare,  $e_0$  è la carica dell'elettrone presa con segno negativo, mentre il terzo termine esprime il potenziale di interazione tra gli elettroni e i nuclei.

In struttura della materia è particolarmente comodo fare uso del *gauge di Coulomb*, secondo il quale

$$\varphi = 0 \quad \bar{\nabla} \cdot \bar{A} = 0$$

Svolgendo la A.2, e tenendo conto del gauge di Coulomb si perviene a

$$\begin{aligned} \bar{H} &= \frac{\bar{p}^2}{2m} + \frac{e_0^2}{2m} \bar{A}^2 + \frac{e_0 \bar{p} \bar{A}}{2m} + \frac{e_0 \bar{A} \bar{p}}{2m} + \frac{e_0 \bar{A} \bar{p}}{2m} - e_0 \varphi + V_{el-N} \\ &= \frac{\bar{p}}{2m} + \frac{e_0 \bar{A}^2}{2m} + \frac{e_0 \bar{A} \bar{p}}{m} + V_{el-N} \\ &= \hat{H}_0 + \frac{e_0 \bar{A}^2}{2m} + \frac{e_0 \bar{A} \bar{p}}{m} \end{aligned}$$

In prima approssimazione possiamo trascurare il termine di secondo grado, perché meno significativo rispetto a quello lineare. Il termine perturbativo è allora:

$$\hat{H}_I(t) = \frac{e_0}{m} \bar{A} \cdot \bar{p} = \hat{V} e^{i\omega t} + \hat{V} e^{-i\omega t} \quad (\text{A.3})$$

Il potenziale vettore che compare nell'interazione armonica è funzione sia dello spazio che del tempo; esplicitando la dipendenza temporale si può scrivere:

$$\bar{A}(x, t) = \bar{A}_0 (e^{i(\bar{k} \cdot \bar{x} - \omega t)} + e^{-i(\bar{k} \cdot \bar{x} - \omega t)}) \quad (\text{A.4})$$

Per confronto tra le A.3 e A.4 si trova che

$$\hat{V} = \frac{e_0}{m} e^{i\bar{k}\cdot\bar{x}} \bar{A}_0 \cdot \bar{p} \quad (\text{A.5})$$

Abbiamo così ottenuto un'espressione dell'elemento di matrice che compare nella formula del rate di transizione per unità di tempo. Consideriamone il termine di fase: esso dipende dal numero d'onda  $k$ , che, come è noto è  $2\pi/\lambda$ .

Ora, se consideriamo la transizione più semplice e frequente nell'atomo di idrogeno,  $1s \rightarrow 2p$ , possiamo stimare la lunghezza d'onda a cui essa avviene ricordando la *relazione di Rydberg* per cui:

$$E_f - E_i \approx R_y \left( \frac{1}{n_i^2} - \frac{1}{n_f^2} \right) \quad R_y \sim 13.6 \text{ eV}$$

Nel caso di transizioni di assorbimento da  $1s$  a  $2p$ , la lunghezza d'onda coinvolta è

$$\begin{aligned} \Delta E &= \hbar\nu = 13.6 \cdot \frac{3}{4} \text{ eV} \\ &= \hbar \frac{c}{\lambda} = 10.2 \text{ eV} \\ \implies \lambda &\sim \frac{4\hbar c}{3R_y} \sim 150 \text{ nm} \end{aligned}$$

Troviamo in tal modo un valore di lunghezza d'onda tre ordini di grandezza al di sopra delle dimensioni dell'atomo, che ricordiamo essere dell'ordine dell'armstrong ( $10^{-10} \text{ m}$ ). Questo implica che l'elemento di matrice

$$\frac{e_0}{m} \langle f | e^{i\frac{2\pi\bar{k}\cdot\bar{x}}{\lambda}} \bar{A}_0 \cdot \bar{p} | i \rangle$$

sia non nullo solo sulle scale dimensionali dell'atomo e che quindi, nel caso della  $1s \rightarrow 2p$  esso si annulli. Ma allora, *se trascuriamo il fattore di fase*, l'atomo vede un **campo uniforme, indipendente dalla posizione**.

Possiamo finalmente dimostrare che, nel gauge di Coulomb, con approssimazione di campo uniforme e trascurando la componente quadratica della perturbazione, il termine di interazione tra il mezzo materiale e la luce è descrivibile con un dipolo elettrico

$$\hat{H}_I(t) = \frac{e_0 \bar{A}}{m} \cdot \bar{p} = e_0 \cdot \bar{x} \cdot \bar{E}(t) = -\bar{d} \cdot \bar{E}(t)$$

*Dimostrazione.* Facciamo uso delle trasformazioni di Gauge:

$$\begin{cases} \bar{A}' = \bar{A} + \bar{\nabla}f(x, t) \\ \varphi' = \varphi - \frac{\partial f}{\partial t}(x, t) \end{cases} \quad (\text{A.6})$$

Nelle nostre ipotesi  $\bar{A}$  non dipende dalla posizione e  $\varphi = 0$ . Se supponiamo di scegliere  $f = -\bar{x} \cdot \bar{A}$ , dalla A.6 troviamo:

$$\begin{aligned} \bar{A}' &= \bar{A} + \bar{\nabla}(-\bar{x} \cdot \bar{A}) = \bar{A} - \bar{A} = 0 \\ \varphi' &= 0 - \frac{\partial}{\partial t}(-\bar{x} \cdot \bar{A}) = \bar{x} \frac{\partial \bar{A}}{\partial t} = -\bar{x} \cdot \bar{E} \end{aligned}$$

L'hamiltoniana scritta in principio in A.2 diventa, tenendo conto delle trasformazioni fatte,

$$\begin{aligned}\hat{H} &= \frac{(\bar{p} + e_0 \bar{A}')^2}{2m} - e_0 \varphi' + V_{el-N} = \frac{\bar{p}^2}{2m} + e_0 \cdot \bar{x} \cdot \bar{E}(t) + V_{el-N} \\ &= \hat{H}_0 + \underbrace{e_0 \cdot \bar{x} \cdot \bar{E}(t)}_{\hat{H}_I(t)}\end{aligned}$$

Il che conclude la dimostrazione che l'hamiltoniana di interazione sia effettivamente esprimibile in forma di dipolo elettrico.

Aggiungendo un po' di belletto alla dipendenza temporale, troviamo l'espressione esatta da sostituire nell'elemento di matrice del rate di transizione A.1

$$\begin{aligned}\hat{H}_I(t) &= e_0 \cdot \bar{x} \cdot \bar{E}_0 (e^{i\omega t} + e^{-i\omega t}) = \hat{V} (e^{i\omega t} + e^{-i\omega t}) \\ \implies \hat{V} &= e_0 \cdot \bar{x} \cdot \bar{E}_0\end{aligned}$$

La A.1 diventa infine

$$\begin{aligned}R_{i \rightarrow f} &= \frac{2\pi}{\hbar^2} |\langle f | e_0 \bar{x} \cdot \bar{E}_0 | i \rangle|^2 \delta(\omega - \omega_{fi}) \\ &= \frac{2\pi}{\hbar^2} e_0^2 |\langle f | \bar{x} \cdot \bar{E}_0 | i \rangle|^2\end{aligned}\tag{A.7}$$

La quantità  $\langle f | \bar{x} \cdot \bar{E}_0 | i \rangle$  è il **dipolo di transizione**, che è una proprietà del mezzo materiale e che è stato tante volte incontrato in questo volume.

# Appendice B

## REGOLE DI SELEZIONE E COEFFICIENTE DI EINSTEIN

### B.1 Regole di selezione per l'atomo di idrogeno

Nel caso dell'atomo di idrogeno, che è ad alta simmetria, esistono delle regole di selezione, che determinano quando una transizione  $i \rightarrow f$  è permessa o meno. Lavoriamo in approssimazione di dipolo elettrico e supponiamo che il campo elettrico sia diretto lungo la direzione z: con questa ipotesi, l'elemento di matrice perturbante si riduce a  $\langle |z| \rangle$ . Una **regola di selezione** ci dice quando l'elemento

$$\langle n'l'm'_l m'_s | z | nlm_l m_s \rangle$$

è diverso da zero. È possibile ricavare tre diverse regole, associate ad altrettanti numeri quantici.

#### 1. per il numero quantico di spin:

La coordinata z non dipende dallo spin, ragion per la quale, l'elemento di matrice è diverso da zero solo se  $\Delta m_s = 0$ . Ciò ci dice che in approssimazione di dipolo non è previsto lo *spin-flip*.

$$\boxed{\Delta m_s = 0}$$

#### 2. per il numero quantico magnetico:

Trascuriamo la componente di spin dello stato e guardiamo solo la parte spaziale  $|nlm_l\rangle = |nlm\rangle$ . Riscriviamo l'elemento di matrice passando dalla notazione di Dirac al formalismo consueto della Meccanica Quantistica. Trattandosi di un atomo di idrogeno gli stati saranno formati da una parte radiale ed a una angolare (armonica sferica) e useremo pertanto la simmetria naturale del sistema, vale a dire le coordinate sferiche. La coordinata z sarà pertanto  $z = r \cos \theta$ . Troviamo:

$$\begin{aligned} \langle n'l'm' | z | nlm \rangle &= \\ &= \int_0^{2\pi} d\varphi \int_0^\pi d\theta \sin \theta \int_0^\infty dr r^2 R_{n'l'}(\theta) \Theta_{l'|m'|}(\theta) e^{-im'\varphi} \cdot r \cos \theta \cdot R_{nl}(r) \Theta_{l|m|}(\theta) e^{im\varphi} \end{aligned}$$

L'integrale ottenuto soddisfa a Fubini-Tonelli e possiamo pertanto studiare separatamente i contributi delle tre coordinate.

Per la parte in  $\varphi$ ,

$$\int_0^{2\pi} d\varphi e^{i\varphi(m-m')} \neq 0 \iff m - m' = 0$$

ovvero

$$\boxed{\Delta m = 0}$$

La regola trovata vale se il campo elettrico è diretto lungo l'asse delle z. Nel caso in cui invece sia  $\bar{E}_0//x$  o  $\bar{E}_0//y$ , l'integrale in  $\varphi$  contempla anche un termine aggiuntivo dovuto al fatto che in coordinate sferiche si ha

$$\begin{aligned} x &= r \sin \theta \cos \varphi = 2r \sin \theta (e^{i\varphi} + e^{-i\varphi}) \\ y &= r \sin \theta \sin \varphi = 2ir \sin \theta (e^{i\varphi} - e^{-i\varphi}) \end{aligned}$$

In virtù di questo, la parte in  $\varphi$  diventa

$$\begin{aligned} &\int_0^{2\pi} d\varphi \left[ e^{i\varphi(m-m')} e^{i\varphi} \pm e^{i\varphi(m-m')} e^{-i\varphi} \right] \\ &= \int_0^{2\pi} [e^{i(m-m'+1)} \pm e^{i(m-m'-1)}] \\ &\neq 0 \iff m - m' \pm 1 = 0 \end{aligned}$$

vale a dire

$$\boxed{\Delta m = \pm 1}$$

### 3. per il numero quantico angolare:

Riprendiamo l'integrale scritto per derivare la seconda regola di selezione e teniamo conto della parte in  $\theta$  che ancora non abbiamo analizzato:

$$\int_0^\infty \Theta_{l'|m'}(\theta) \Theta_{l|m|}(\theta) \cos \theta$$

La trattazione diretta di questo integrale è complessa dal momento che essa tiene conto dei polinomi dei Legendre, particolarmente complicati da inserire in un processo di calcolo. Basti sapere che si può dimostrare che l'integrale in  $\theta$  è non nullo solo se

$$\boxed{\Delta l = \pm 1}$$

Ma allora, riassumendo, **per l'atomo di idrogeno**, le regole di selezione per transizioni elettroniche sono

$$\boxed{\begin{aligned} \Delta m_s &= 0 \\ \Delta m &= 0, \pm 1 \\ \Delta l &= \pm 1 \end{aligned}}$$

Si noti il fatto che la terza legge sui numeri quantici angolari determina quali transizioni sono permesse e quali sono *proibite*: nel caso dell'idrogeno, ad esempio,  $1s \rightarrow 2p$  sarà permessa, a differenza di  $1s \rightarrow 2s$ . Naturalmente con il termine *proibita* si intende non permessa in approssimazione di dipolo elettrico. Si ricordi infatti che abbiamo aperto il capitolo scegliendo questa come ipotesi di lavoro. In realtà stiamo trascurando i contributi quadratici dell'hamiltoniana di perturbazione e stiamo supponendo uniforme il campo. Difatti, le transizioni escluse da queste ipotesi sono comunque molto poco probabili e riguardano interazioni con il campo mediate dal **dipolo magnetico** esprimibile come  $\bar{\mu} \cdot \bar{B}(t)$ ; esso è responsabile dei processi di spin-flip e quindi dei fenomeni di fosforescenza e quenching statico nei quali sono coinvolte transizioni singoletto-tripletto. Si tenga comunque conto del fatto che gli elementi di matrice  $\langle f | \bar{\mu} \cdot \bar{B}(t) | i \rangle$  sono più piccoli di

$\langle f | \bar{x} \cdot \bar{E}_0 | i \rangle$  di un fattore  $\alpha^2$ , ove  $\alpha$  è la costante di struttura fina. Le transizioni di dipolo magnetico sono quindi estremamente meno probabili di quelle di dipolo elettrico.

Sin qui abbiamo parlato del solo atomo di idrogeno, che per semplicità e simmetria rendeva computabile la discussione delle regole di selezione.

È altresì possibile ricavare regole di accoppiamento tra elettrone e campi esterni in approssimazione di dipolo elettrico anche per *atomi plurielettronici idrogenoidi*. Per fare ciò è necessario passare alla base del momento angolare totale

$$|\{n_i, l_i\} LSJM_J\rangle$$

Si può mostrare che in questo caso le regole di transizione si esprimono come

$\Delta L = \pm 1$
$\Delta S = 0$
$\Delta J = 0, \pm 1 \quad \wedge \quad J' = 0 \Rightarrow J = 0$

## B.2 Derivazione del coefficiente di Einstein

Il rate ricavato in A.1 si riferisce all'emissione stimolata in seguito all'interazione del mezzo materiale con un onda elettromagnetica *monocromatica*; tuttavia, in genere, si ha a che fare con un pacchetto di onde caratterizzate da  $\lambda$  diverse. Il campo elettrico è dato dal contributo di ogni onda monocromatica all'interno del pacchetto. In ragion di ciò, l'ampiezza del campo sarà esprimibile come:

$$E_0^2 \propto u$$

ove  $u$  indica la *densità di energia dell'onda, per unità di volume del mezzo materiale*. Ad essa contribuirà un termine di campo elettrico ed un termine di campo magnetico. In ipotesi di campo magnetico uniforme, come quella in cui si è scelto di lavorare, il contributo del campo magnetico coincide con quello del campo elettrico, ragion per cui è possibile scrivere

$$u = \underbrace{\frac{1}{2} \overline{\varepsilon_0 \bar{E}^2}}_{\text{campo elettrico}} + \underbrace{\frac{1}{2} \overline{\varepsilon_0 \bar{E}^2}}_{\text{campo magnetico}} = \overline{\varepsilon_0 \bar{E}^2}$$

nella quale con la barra orizzontale si intende la media nel tempo. Ora, ricordato che la perturbazione nel tempo altro non è che

$$E(t) = E_0(e^{i\omega t} + e^{-i\omega t}) = 2E_0 \cos(\omega t)$$

si trova subito che la densità di energia è espressa da

$$\begin{aligned} u &= \overline{\varepsilon_0 \bar{E}^2} = \overline{\varepsilon_0 4E_0^2 \cos^2(\omega t)} = 2\varepsilon_0 E_0^2 \\ &\implies E_0^2 = \frac{u}{2\varepsilon_0} \end{aligned}$$

Ma allora la A.7 diventa

$$R_{i \rightarrow f} = \frac{2\pi}{\hbar^2} \frac{u}{2\varepsilon_0} e_0^2 |\langle f | z | i \rangle|^2 \delta(\omega - \omega_{fi}) \quad (\text{B.1})$$

Il fatto che le onde del pacchetto siano incoerenti ci permette di scrivere la probabilità *totale* di osservare la transizione come *somma delle probabilità*<sup>1</sup>.

In questo modo abbiamo decritto l'onda interagente non più come una sola, ma bensì come una perturbazione distribuita su un *continuo di frequenze*. Allo stesso modo  $u$  andrà interpretato non come la densità di energia di una sola onda elettromagnetica, ma come una densità di energia per frequenza:

$$u \longrightarrow \rho(\omega)d\omega = \frac{[E]}{[V][\omega]}$$

Nella B.1, il termine di densità energetica si traduce in una somma sulle infinite frequenze infinitesime, vale a dire

$$R_{i \rightarrow f} = \int_0^\infty \frac{2\pi}{\hbar^2} \frac{e_0^2}{2\varepsilon_0} |\langle f|z|i\rangle|^2 \rho(\omega) \delta(\omega - \omega_{fi}) d\omega \quad (\text{B.2})$$

e risolvendo l'integrale in termini della delta di Dirac, si perviene alla **regola d'oro di Fermi**:

$$R_{i \rightarrow f} = \frac{2\pi}{\hbar^2} \frac{e_0^2}{2\varepsilon_0} |\langle f|z|i\rangle|^2 \rho(\omega_{fi}) \quad (\text{B.3})$$

nella quale l'elemento di matrice è ancora il dipolo di transizione e  $\rho(\omega_{fi})$  è la densità di energia per intervallo di frequenza alla **frequenza di risonanza**.

Storicamente, si raggruppano tutti i termini che fanno riferimento al mezzo materiale in un coefficiente  $B$  cui si dà il nome di **coefficiente di Einstein**:

$$B = \frac{2\pi}{\hbar^2} \frac{e_0^2}{2\varepsilon_0} |\langle f|z|i\rangle|^2 \quad (\text{B.4})$$

Con questa notazione il rate di emissione stimolata assume la forma compatta

$$R_{i \rightarrow f}^{stim.} = B \rho(\omega_{fi}) \quad (\text{B.5})$$

Prima di procedere scegliamo un infelice cambio di notazione e indichiamo con  $E_a$  e  $E_b$  rispettivamente i livelli a energia più bassa e più alta. Dalla lunga discussione semiclassica affrontata in questa e nella precedente sezione siamo giunti a scrivere che per l'emissione stimolata vale  $R_{b \rightarrow a} = B \rho(\omega_{ab})$  così come per l'assorbimento si ha  $R_{a \rightarrow b} = B \rho(\omega_{ab})$ . Einstein suppose che fosse necessario ammettere l'esistenza di un terzo coefficiente, indicato con  $A$ , per l'*emissione spontanea*.

$$R_{b \rightarrow a}^{spont.} = A = \frac{1}{[t]}$$

Dedichiamo le righe seguenti alla sua derivazione semiclassica.

Supponiamo di avere una cavità in equilibrio termico, ovvero un oggetto cavo mantenuto a temperatura costante le cui pareti emettono e assorbono continuamente radiazioni su tutte le possibili lunghezze d'onda dello spettro elettromagnetico. Consideriamo poi un mezzo materiale all'interno della cavità, che sia in equilibrio termico. Indicati con  $N_a$  e

---

<sup>1</sup>L'incoerenza delle singole componenti mi assicura che non ci sia alcun termine di interferenza

$N_b$  le densità d popolazione dei due livelli energetici, sappiamo che essi obbediscono alla distribuzione di Boltzmann<sup>2</sup> per cui

$$\frac{N_b}{N_a} = e^{-(E_b - E_a)/kT} = e^{-\beta(E_b - E_a)}$$

Il sistema è supposto essere in uno *stato stazionario* e in **equilibrio dinamico**.

Scriviamo ora l'equazione cinetica che dica come varia nel tempo il numero di atomi sul livello  $b$ . Avendo supposto la condizione di equilibrio avremo sicuramente  $dN_b/dt = 0$ . Inoltre:

$$0 = \frac{dN_b}{dt} = \underbrace{R_{a \rightarrow b} N_a}_{ass. energia} - \underbrace{R_{b \rightarrow a} N_b}_{em. stimolata} - \underbrace{A N_b}_{em. spontanea}$$

I due segni meno davanti a termini di emissione sono dovuti al fatto che essi contribuiscono a diminuire la popolazione del livello  $b$  che si sta considerando.

Poichè inoltre, essendo il rate proporzionale a una norma quadra,  $R_{a \rightarrow b} = R_{b \rightarrow a}$ , troviamo:

$$R_{a \rightarrow b}(N_a - N_b) = A N_b \implies R_{a \rightarrow b} \left( \frac{N_a - N_b}{N_b} \right) = A$$

Riprendendo il formalismo compatto della B.5 si può scrivere

$$B\rho(\omega_{ab}) \left( \frac{N_a}{N_b} - 1 \right) = A \implies B\rho(\omega_{ab}) \left( e^{+\beta(E_b - E_a)} - 1 \right) = A$$

e quindi

$$B\rho(\omega_{ab}) \left( e^{\beta\hbar\omega_{ab}} - 1 \right) = A \quad (\text{B.6})$$

dove, al solito,  $\omega_{ab}$  indica la frequenza di risonanza.

Per procedere è ora necessario richiamare la trattazione fatta per un corpo nero, che di fatto coincide, a livello di modello, con la cavità che stiamo considerando. All'interno della cavità si considerano in genere dei modi normali di oscillazione della radiazione, vincolati dalle condizioni al contorno di *annullamento ai bordi*. Nel caso in cui la cavità è molto grande, invece delle condizioni di annullamento impongo delle *condizioni di periodicità*<sup>3</sup>. I modi della cavità sono onde piane della forma

$$e^{i\bar{k}\cdot\bar{x}}$$

A ogni modo corrisponde una frequenza  $\omega = kc$ . L'energia totale del campo all'interno della cavità, sarà, per unità di volume,  $\frac{1}{V} \sum \hbar\omega(\bar{k})$ . I valori di  $\bar{k}$  sono assegnati dalle condizioni di periodicità nella scatola:

$$\bar{k} = \frac{2\pi}{L}(n_x, n_y, n_z)$$

Se la scatola è molto grande, la spaziatura tra i livelli è molto piccola e la somma sui vari modi tende a un integrale sugli stessi infinitesimi. Pertanto, l'energia nella cavità,

---

<sup>2</sup>Essa esprime la funzione di distribuzione per la frazione di particelle  $N_i/N$  che occupa uno stato i-esimo e energia  $E_i$ :  $\frac{N_i}{N} = \frac{g_i e^{-\beta E_i}}{Z(T)}$ .

<sup>3</sup>Ricorda la teoria delle repliche utilizzata per la normalizzazione di un'onda piana in Meccanica Quantistica

**nel caso di un solo quanto  $h\nu$  del campo**, sarà esprimibile come somma su tutti i possibili modi:

$$\frac{1}{V} \sum_{\bar{k}} \hbar\omega(\bar{k}) \rightarrow \frac{1}{V} \int \frac{d^3\bar{k}}{(2\pi)^3} \hbar\omega(\bar{k}) = \int \frac{d^3\bar{k}}{(2\pi)^3} \hbar\omega(\bar{k})$$

L'energia complessiva del modo è data dal prodotto tra l'energia del quanto e del numero di eccitazioni di quel modo, dove quest'ultimo è dato dalla distribuzione di Planck:

$$\frac{1}{V} \sum_{\bar{k}} \hbar\omega(\bar{k}) \cdot \frac{1}{e^{\beta\hbar\omega(\bar{k})} - 1} = \int \frac{d^3\bar{k}}{(2\pi)^3} \cdot \frac{\hbar\omega(\bar{k})}{e^{\beta\hbar\omega(\bar{k})} - 1}$$

Possiamo ora ricavare l'espressione esplicita per il coefficiente di emissione spontanea A. Ricordando che  $\omega = kc$  e trasformando l'integrale in *coordinate sferiche* si perviene a

$$\frac{E^{TOT}}{V} \simeq \int d\Omega \int \frac{dk \cdot k^2}{(2\pi)^3} \hbar\omega(\bar{k}) \cdot \frac{1}{e^{\beta\hbar\omega(\bar{k})} - 1}$$

Il fatto che l'uguaglianza sia solo approssimativa è dovuto al fatto che per ogni onda piana esistono due modi di polarizzazione del campo, a  $\bar{k}$  fissato. L'espressione corretta dell'energia si ottiene dunque moltiplicando per due l'equazione appena trovata

$$\begin{aligned} \frac{E^{TOT}}{V} &= \int d\Omega \int \frac{dk \cdot k^2}{(2\pi)^3} \hbar\omega(\bar{k}) \cdot \frac{1}{e^{\beta\hbar\omega(\bar{k})} - 1} \\ &= 2 \cdot 4\pi \frac{1}{(2\pi)^3} \int \frac{d\omega \cdot \omega^2}{c^3} \hbar\omega \cdot \frac{1}{e^{\beta\hbar\omega(\bar{k})} - 1} \\ &= \int d\omega \rho(\omega) \end{aligned}$$

Questo ci consente di esplicitare la densità di energia per frequenze come

$$\rho(\omega) = \frac{8\pi}{8\pi^3} \frac{h}{2\pi} \frac{1}{c^3} \overbrace{\frac{\omega^3}{(2\pi)^3 \nu^3}}^{\omega^3} \frac{1}{e^{\beta\hbar\omega} - 1} = \frac{4h\nu^3}{c^3(e^{\beta\hbar\omega} - 1)} \quad (\text{B.7})$$

Infine, sostituendo la B.7 nella B.6 si ha

$$B \frac{4h\nu^3}{c^3} \frac{e^{\beta\hbar\omega} - 1}{e^{\beta\hbar\omega} - 1} = A \quad (\text{B.8})$$

e, in conclusione,

$B \propto  \langle i \bar{x} \cdot \bar{\epsilon} f\rangle ^2$ $A = B \frac{4h\nu^3}{c^3}$
--

*COEFFICIENTI DI EINSTEIN  
per emissione stimolata (B)  
e spontanea (A)*

Nella derivazione dei coefficienti abbiamo considerato *tutti* i modi normali della cavità; come conseguenza di ciò, il coefficiente di Einstein B non è il B per un particolare stato di polarizzazione della luce, ma va piuttosto inteso come il valor medio di tutti i possibili stati di polarizzazione spaziale. Si può infatti dimostrare che

$$B \propto \frac{1}{3} |\langle i|\bar{x}|f\rangle|^2 = \frac{1}{3} (|\langle i|x|f\rangle|^2 + |\langle i|y|f\rangle|^2 + |\langle i|z|f\rangle|^2)$$

### B.3 Note sul coefficiente di emissione spontanea

Siano ora  $a$  e  $b$  due stati dell'atomo di idrogeno  $H_2$ , e siano, nello specifico, i livelli  $1s$  e  $2p$ . Ora, il livello  $1s$  stazionario, ma  $2p$  non lo è dal momento che esso si ritrova ad irradiare energia nel processo di emissione. In particolare, affinché non si assista ad uno svuotamento del ground state a seguito di assorbimento, lo stato  $2p$  deve essere non stazionario ed è quindi **necessario** introdurre un coefficiente  $A$  di emissione stimolata. L'equazione cinetica per la popolazione del livello eccitato, *in assenza di campo magnetico*, obbedirà quindi a

$$\begin{aligned} \frac{dN_b}{dt} &= -AN_b \\ \implies N_b(t) &= N_b(0)e^{-tA} = N_b(0)e^{-t/T} \\ \frac{1}{\tau} &= A \end{aligned}$$

La quantità  $\tau$  si chiama **tempo di vita media** dello stato eccitato ed indica per quanto tempo si ha occupazione del livello eccitato. Nel transire da  $2p$  a  $1s$  non esiste un unico rate di emissione spontanea, ma bensì tanti quanti sono i livelli vibrazionali del livello  $1s$  in ognuno dei quali l'elettrone dissecitato può venirsi a trovare a processo ultimato. Possiamo pertanto definire un rate di emissione spontanea totale come

$$A_{TOT} = \sum_i A_i = \sum_i \frac{1}{\tau_i} = \frac{1}{\tau}$$

Si noti inoltre che per sua definizione,  $A \propto B\nu^3$ ; questo ha un'implicazione di discreto interesse. Richiamando la relazione di Planck  $E = h\nu$  si deduce che maggiore è l'energia di eccitazione, maggiore è il modulo del coefficiente di emissione spontanea e quindi minore il tempo di vita: più lo stato è eccitato e meno tempo vive. Per aver un'idea quantitativa di ciò che si sta dicendo, nel caso dell'atomo di idrogeno, la vita media del livello  $2p$  è approssimativamente di  $\tau = 1\text{ ns}$ .

Da un punto di vista della Meccanica Quantistica il fatto che lo stato  $2p$  non sia propriamente stazionario ha un'importante implicazione persino sull'intero modello che fin qui abbiamo espresso per l'emissione stimolata. La relazione A.1 con cui abbiamo aperto tutto quanto è stata infatti ricavata applicando la teoria delle perturbazioni dipendenti dal tempo sotto le ipotesi che gli stati iniziali e finali fossero stazionari! Ora, se  $2p$  non è stazionario sarà necessario appaortare due principali cambiamenti. Innanzitutto la funzione d'onda dello stato non è più semplicemente  $\Psi(x, t) = u_{2p}e^{-iE_pt/\hbar}$  ma si arricchisce di un *termine di decadimento temporale* che è necessario introdurre, nello stesso modo in cui è stato d'uopo supporre l'esistenza di  $A$ . Avremo pertanto

$$\begin{aligned} \Psi(x, t) &= u_{2p} \cdot e^{-iE_pt/\hbar} \cdot \underbrace{e^{\frac{-t}{\tau}}}_{\text{termine decad. temp.}} \\ |\Psi(x, t)|^2 &= |u_{2p}e^{-iE_pt/\hbar}|^2 e^{-t/\tau} \end{aligned}$$

La seconda variazione importante riguarda invece la forma della regola d'oro di Fermi. Si può infatti dimostrare che invece della  $\delta(\omega - \omega_{fi})$  si ottiene una **lorentziana**:

$$\delta(\omega - \omega_{fi}) \longrightarrow \frac{1}{(\omega - \omega_{fi})^2 + \left(\frac{1}{2\tau}\right)} \left(\frac{1}{2\pi\tau}\right)$$

ragion per cui la regola d'oro di Fermi diventa

$$R_{i \rightarrow f} \propto |\langle i | \bar{x} \cdot \bar{\varepsilon} | f \rangle|^2 \frac{1}{(\omega - \omega_{fi})^2 + \left(\frac{1}{2\tau}\right)} \left( \frac{1}{2\pi\tau} \right) \quad (\text{B.9})$$

La curva lorentziana disegna il tipico profilo a campana centrata su  $\omega = \omega_{fi}$  ed è caratterizzata dal parametro FWHM (*Full Width at Half Maximum*), la larghezza a metà altezza,  $\Delta\omega = \frac{1}{\tau}$ .

Da un punto di vista puramente fisico il fatto che la probabilità di transizione abbia una larghezza esprime proprio il fatto che lo stato eccitato non è stazionario; l'energia coinvolta nel processo non sarà quindi assegnata ma avrà una data incertezza:

$$\hbar\Delta\omega = \Delta E \implies \frac{\hbar}{\tau} = \Delta E$$

la quale si traduce nel noto principio di indeterminazione tempo-energia:

$$\boxed{\Delta E \cdot \tau = \hbar}$$

che lega l'incertezza dell'energia sullo stato legato con la vita media dello stato eccitato. La larghezza della lorentziana è detta LARGHEZZA NATURALE DELLA RIGA e coincide con la width con la quale l'atomo emette nel sistema di riferimento in cui l'atomo stesso è fermo. È bene sottolineare che questa larghezza è una width minima, sotto la quale non è possibile andare. Esistono svariati fattori che possono renderla più grande, come ad esempio l'effetto Doppler dovuto ad un incremento di temperatura, o ancora l'emissione dell'atomo nell'istante stesso in cui esso collide con un secondo atomo. Tuttavia la larghezza naturale della riga è un limite intrinseco, inferiore e assoluto. Essa, per quanto detto, sarà apprezzabilmente osservabile a *basse temperature* (per minimizzare il Doppler) e a *basse densità* (per minimizzare l'effetto delle collisioni). Numericamente, per l'ormai cara  $1s \rightarrow 2p$ , l'incertezza tradotta in energia è

$$\Delta E = \frac{\hbar}{\tau} \sim 1\text{meV}$$

mentre il valore medio della Lorentziana, sempre tradotto in energia, è, seguendo la serie di Rayleigh,

$$\bar{E} = \left(1 - \frac{1}{4}\right) R_y \sim \frac{3}{4} 13.6\text{eV} \sim 9 - 10\text{eV}$$

## Appendice C

# Appunti personali