

*Appunti
di
Fisica Medica
e
Ambientale*

di
Barbara Ranghetti

Anno Accademico 2014/2015

Gli appunti si basano sulle lezioni del corso di Fisica Medica e Ambientale, tenuto nell'anno accademico 2014/2015, secondo semestre del terzo anno del CdL di Fisica. La prima parte degli appunti riguarda il corso di Biofisica, tenuto dalla professoressa Laura D'Alfonso, la seconda parte concerne il corso di Protezionistica Ambientale, tenuto dal professor Angelo Nucciotti.

Gli appunti delle lezioni sono integrati con immagini e formule tratte dalle presentazioni fornite dai, motivo per cui potrebbero contenere degli errori di vario tipo.



Parte I

BIOFISICA

Capitolo 1

Lezione 1: 4 marzo 2015

La **biofisica** è una scienza interdisciplinare che utilizza e sviluppa teorie e metodi della fisica per lo studio di sistemi biologici.

I principali protagonisti della biofisica sono le macromolecole e gli acidi nucleici. Le **macromolecole** sono delle strutture flessibili, dell'ordine di $10^3 - 10^{12}$ amu, che dobbiamo sempre pensare in movimento, che interagiscono e spostano con loro l'acqua o il solvente. Queste strutture sono tenute insieme da:

- Interazioni covalenti, dell'ordine di 100 *kCal/mole*, quindi formano un legame stabile a temperatura ambiente (per temperature molto più grandi però potrebbe non esserlo più).
- Interazioni elettrostatiche e di Van der Waals.

La struttura delle proteine, o macromolecole, viene divisa su più livelli, secondo la gerarchia riportata in figura (1.1).

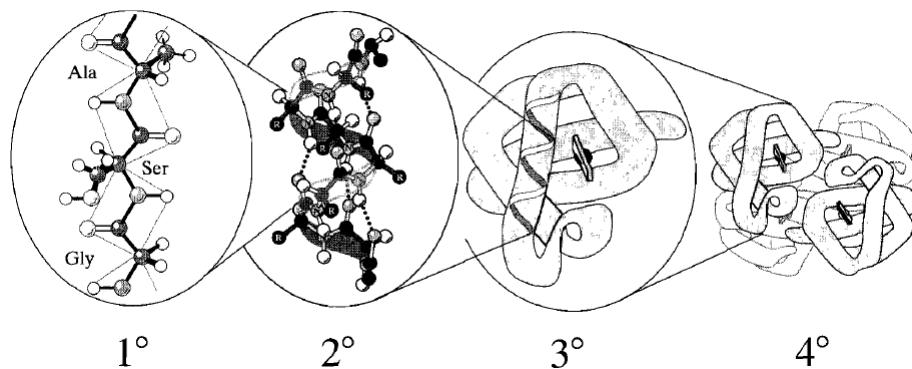


Figura 1.1: *strutture di una macromolecola*

Abbiamo:

Struttura primaria : è la sequenza degli amminoacidi o degli acidi nucleici, disposti in linea retta. È una struttura direzionale: gli estremi della catena sono diversi e il legame, quando avviene, non si forma tra oggetti uguali.

Struttura secondaria : dice come, a piccoli tratti, si ripiega la catena nello spazio.

Struttura terziaria : riguarda la disposizione complessiva di tutte le parti tra di loro.

Struttura quaternaria : mostra le interazioni tra subunità diverse di proteina.

1.1 LE PROTEINE

Una *proteina* è una sequenza di **amminoacidi**, che vengono raggruppati in base al valore della pK e alla carica a pH 7.4 (fisiologico). Gli amminoacidi sono 20, non tutti hanno la stessa frequenza in natura e non è detto che siano tutti e 20 contenuti in una determinata proteina. La presenza di specifici amminoacidi in una proteina dà la funzione di quest'ultima.

Il primo amminoacido che è stato scoperto è stata l'*asparagina*, nel 1806, da Vauquelin e Robiquet.

Dal momento che gli amminoacidi hanno una carica, anche le proteine essendo composte da amminoacidi ne presentano una. La *glicina* è l'amminoacido di base ($N - C - C - O$), infatti è la base di partenza che si ripete in tutti gli amminoacidi che variano poi in funzione delle catene laterali, mentre la *prolina* è l'amminoacido "jolly": può essere sostituito ad altri amminoacidi nella sequenza senza dare problemi. Gli amminoacidi *aromatici* sono quelli che presentano nella loro struttura degli anelli aromatici, che hanno caratteristiche basilari per la spettroscopia nell'UV e nel visibile.

La struttura primaria si forma grazie al **legame peptidico**, il cui funzionamento è riportato in figura (1.2). Nella base di partenza ($N - C - C - O$) il carbonio al centro a cui si collega la catena laterale è detto *carbonio α* . Il legame peptidico avviene con produzione di una molecola di H_2O .

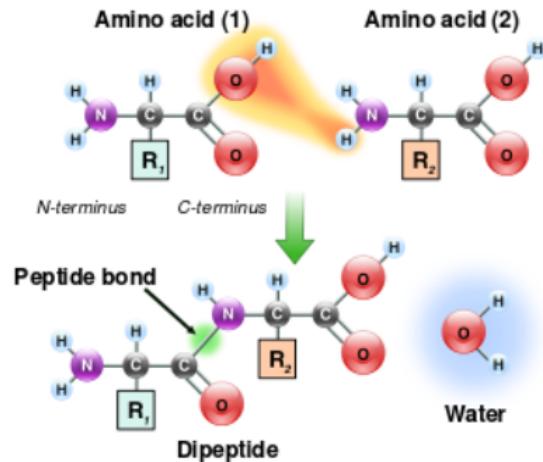


Figura 1.2: *legame peptidico*

Il legame peptidico è molto difficile da spezzare e non si distrugge nemmeno ricorrendo alla denaturazione. Questo legame è planare, con distanze di legame fisse e presenta due configurazioni (figura (1.3)):

- cis: i residui (catene laterali) stanno dallo stesso lato.
- trans: i residui si alternano da una parte e dall'altra rispetto al carbonio. Questa configurazione è favorita in termini di ingombro sterico.

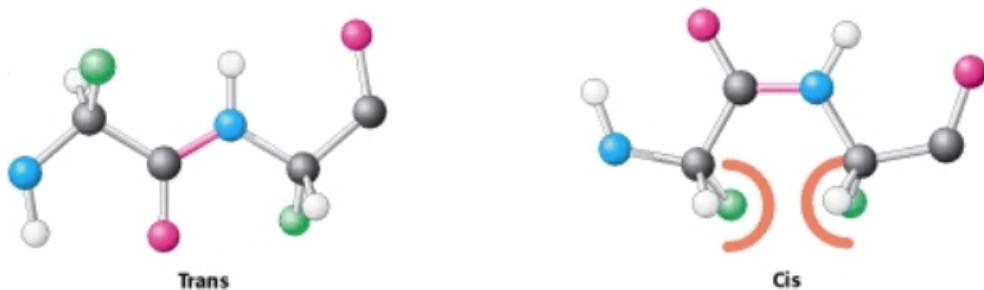


Figura 1.3: *configurazione cis e trans per il legame peptidico*

Molti processi in cui cambia la funzionalità della proteina avvengono passando dalla configurazione cis a quella trans, su tempi molto lunghi questo passaggio può anche avvenire spontaneamente.

Cosa succede se sostituiamo un amminoacido nella proteina? Dipende: in ogni proteina ci sono amminoacidi che possono essere sostituiti senza comportare un cambiamento della forma e funzione della proteina, e altri che invece sono basilari per questi parametri. In generale comunque non possiamo sostituire ogni amminoacido con un altro qualsiasi, infatti la struttura determina la funzione della proteina ed è legata alle interazioni tra amminoacidi.

Per capire perché la proteina agisce in un certo modo si individuano gli amminoacidi fondamentali e si cerca di capire con cosa possono essere sostituiti. Questo aiuta a comprendere il processo dell'evoluzione, per esempio, la *β-lactoglobulina*, proteina che serve per i trasporti di acidi grassi nello stomaco, ha una proteina analoga in molti animali.

Le proteine si ripiegano nello spazio con la tipica forma elicoidale descritta dalle seguenti equazioni:

$$\begin{cases} z_j = j z_0 + \delta_z \\ x_j = r \cos((z_j - \delta_z) \frac{2\pi}{P} + \delta) \\ y_j = r \sin((z_j - \delta_z) \frac{2\pi}{P} + \delta) \end{cases} \quad j = 0, 1, \dots, N$$

Se $P = 2z_0$ si ha una struttura a zig-zag degli amminoacidi, detta *β-sheet*. Esistono due strutture principali:

α-elica : prevede l'interazione tra amminoacidi vicini nella catena, con distanze caratteristiche.

β -sheet : non ha distanze caratteristiche, forma una struttura più avvolgente e solida, con dei pezzi fluttuanti che danno mobilità conformazionale.

Queste due strutture sono riportate in figura (1.4).

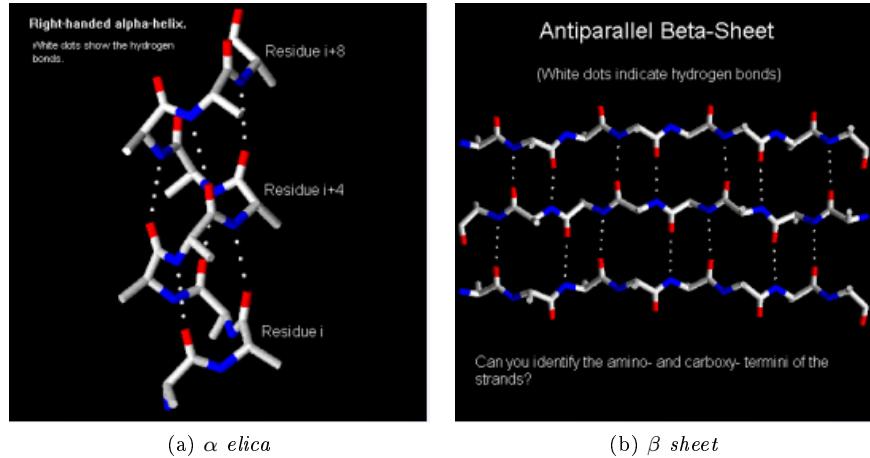


Figura 1.4: struttura secondaria delle proteine

Per quanto riguarda la **struttura quaternaria** la proteina può avere una struttura *rilassata* o *contratta*.

Per gli acidi nucleici vale lo stesso, ma è più semplice perché ci sono quattro basi azotate a cui si collegano i fosfati all'esterno, che danno la struttura dell'elica. Le basi si abbinano come segue: adenina e timina, citosina e guanina. Le basi sono disposte in modo casuale, se riconoscono una base con cui possono legarsi si formano i legami. I piani su cui si formano i legami tra le basi sono perpendicolari alla catena di basi, formando una struttura simile ad una scala, come si può vedere in figura (1.5).

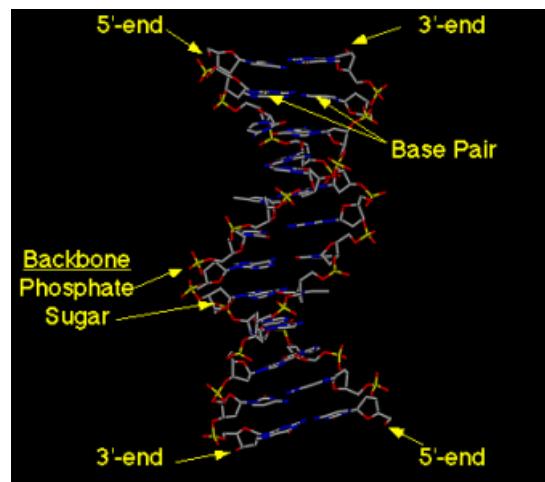


Figura 1.5: struttura a scala degli acidi nucleici

Quando le basi sono appaiate le due catene assumono la forma di un'elica (per gli acidi nucleici non si ha la struttura a β -sheet). Come si può vedere nella figura (1.5) ogni catena di DNA termina con dei fosfati diversi.

Tutto quello che abbiamo visto fino ad ora si trova nella **cellula**: se abbiamo una cellula vitale su un vetrino non si ha una cellula tonda, ma schiacciata e frastagliata, più bassa ai bordi, mentre una cellula tonda è una cellula morta. La cellula e le sue componenti si studiano con le *spettroscopie*, questo perchè bisogna evitare metodi troppo energetici che potrebbero rompere i legami. Si può utilizzare la *diffrazione* a raggi X solo se si riescono ad ottenere dei cristalli. Tuttavia il cristallo è diverso da come è la cellula o la proteina in sè.
In figura (1.6) sono riportate le varie tecniche utilizzate per lo studio di proteine e acidi nucleici.

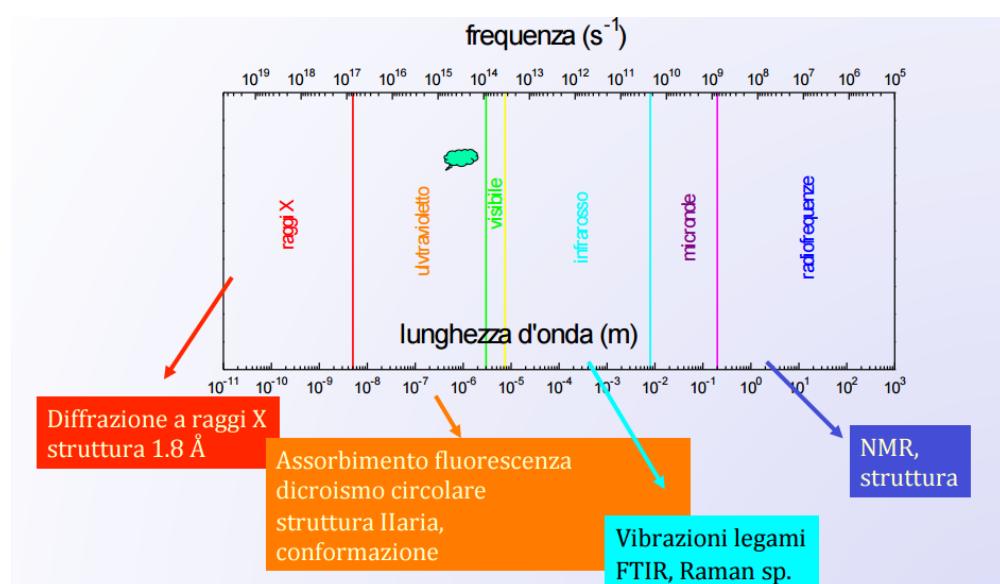


Figura 1.6: *tecniche di indagine per proteine e acidi nucleici*

1.2 RIPASSO DI CHIMICA

Energia e massa costituiscono un sistema, che può essere:

- isolato: non si ha passaggio di energia e di massa.
- chiuso: si ha passaggio solo di energia.
- aperto: si ha passaggio sia di massa che di energia.

Ricordiamo che **adiabatico** chiuso è diverso da chiuso, infatti i sistemi adiabatici chiusi sono un sottoinsieme dei sistemi chiusi, in cui non può esserci scambio di calore.

L'*unità di massa atomica* è definita come l'inverso del numero di Avogadro, in grammi:

$$1\text{ Dalton} = 1D = \frac{1}{N_{AV}} g \cong 1.7 \times 10^{-24} g \quad (1.1)$$

1 mg di proteina ha una concentrazione di circa una decina di μM (micromolare).

In laboratorio lo studio delle proteine avviene tramite l'utilizzo di un solvente che viene unito ad esse. Per i dosaggi si ricorre al **principio di conservazione della massa**:

$$\begin{aligned} MASSA &= V_i C_i = V_f C_f \\ V_f &= V_i + V_{solvente} \end{aligned} \quad (1.2)$$

Una soluzione è caratterizzata da un certo pH , che indica la concentrazione di protoni liberi in soluzione:

$$pH = -\log_{10} ([H_3O^+]) \quad (1.3)$$

Autoionizzazione dell'acqua:



$$K_w = [H_3O^+][HO^-] = [H_2O]^2 = 1.0 \times 10^{-14} M^2 \quad (1.5)$$

Non è detto che tutto ciò che c'è nella cellula o nell'organismo abbia lo stesso pH . I *marcatori FPs* sfruttano il cambiamento di colore delle proteine fluorescenti in base al pH , mentre gli amminoacidi a seconda del pH cambiano la carica elettrica. pH bassi indicano un'alta concentrazione di ioni H^+ , quindi si ha una carica positiva, mentre un pH alto è associato a una carica negativa.

Vediamo ora l'**equilibrio acido-base**: data una reazione di dissociazione possiamo definire la *costante di dissociazione* come:

$$[AH] \xrightarrow{K_d} [A^-] + [H_3O^+] \quad K_d = \frac{[A^-][H_3O^+]}{[AH]} \quad (1.6)$$

Un'altra quantità utile è la pK , che indica quando una delle due specie $[A^-]$ o $[H_3O^+]$ è preponderante:

$$pK = -\log_{10} (K_d) \quad (1.7)$$

Otteniamo quindi:

$$\begin{aligned} pK - pH &= -\log_{10} \left(\frac{[A^-][H_3O^+]}{[AH]} \right) + \log_{10} ([H_3O^+]) = \log_{10} \left(\frac{[AH]}{[A^-]} \right) \\ [AH] + [A^-] &= A_0 \implies pK - pH = \log_{10} \left(\frac{[AH]}{A_0 - [AH]} \right) \\ \implies [AH] &= A_0 \frac{10^{pK-pH}}{1 + 10^{pK-pH}} \end{aligned} \quad (1.8)$$

Capitolo 2

Lezione 2: 11 marzo 2015

Ci occupiamo di applicare i metodi fisici agli organismi umani, e quindi alle **cellule**, che sono costituite fondamentalmente da acqua e da ioni minerali, che possono essere positivi (*cationi*) o negativi (*anioni*). I canali potassio e i canali calcio sono canali che si aprono nella molecola per fare passare questi ioni. Nelle tabelle riportate in figura (2.1) sono elencati gli elementi più comuni e abbondanti negli esseri viventi, e quelli utili, ma non così numerosi.

COMUNI		MENO COMUNI	
Elemento	Simbolo	Elemento	Simbolo
Idrogeno	H	Sodio	Na
Carbonio	C	Magnesio	Mg
Azoto	N	Fosforo	P
Ossigeno	O	Zolfo	S
		Cloro	Cl
		Potassio	K
		Calcio	Ca

(a) elementi comuni

(b) elementi non comuni

Figura 2.1: elementi che costituiscono gli esseri viventi

Quali sono i legami che ci sono tra atomi?

Legame covalente : prevede uno scambio paritario di elettroni che vengono messi in condivisione. In base alla geometria della molecola risultante si può avere:

- molecola polare: c'è una regione preferenziale in cui si ha un eccesso di elettroni.

- molecola apolare: non ci sono zone in cui la probabilità di trovare elettroni è maggiore.

Legame ionico : prevede la cessione definitiva da un atomo all'altro di elettroni. Chi cede e chi acquista è stabilito dall'*elettronegatività*, che è legata alla disposizione degli elementi nella tavola periodica: cresce da sinistra verso destra.

In figura (9.8) sono rappresentati i legami covalente e ionico.

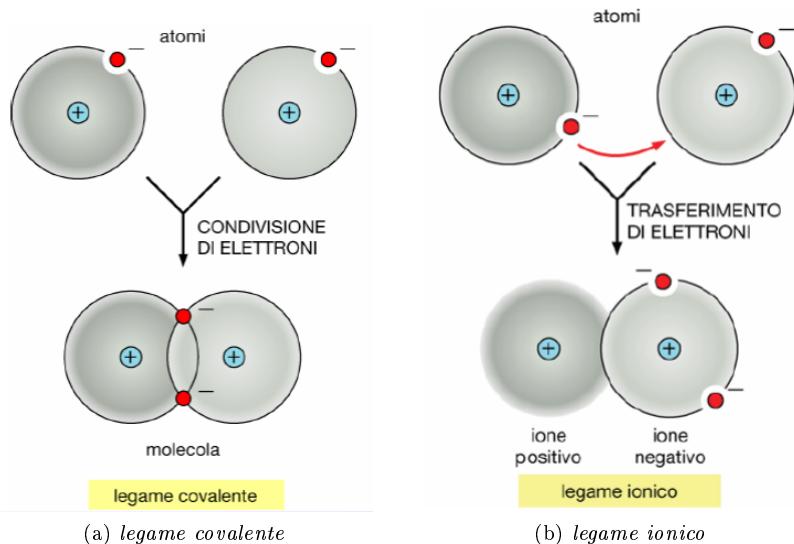


Figura 2.2: *legame covalente e ionico*

L'accettore è l'elemento più elettronegativo tra i due. Tipicamente il legame ionico si forma tra elementi delle prime due colonne e elementi delle ultime.

Legame idrogeno : è il più importante per quanto riguarda la struttura secondaria e le macromolecole. Questo legame si basa sul fatto che l'ossigeno, più elettronegativo dell'idrogeno, attrae l'elettrone. Il legame idrogeno si crea tra due molecole di H_2O vicine, in particolare tra l'ossigeno di una e uno dei due idrogeni dell'altra, come è mostrato in figura (2.3).

Non è un legame forte come quello covalente e non avviene solo tra molecole di acqua: in generale coinvolge un idrogeno e un altro atomo debolmente negativo. È il legame che tiene insieme molecole diverse. Si tratta di un network dinamico: quello che si ottiene non è un solido, ma presenta comunque una struttura ordinata con direzioni preferenziali. Se vengono aggiunti dei sali, questi si separano negli ioni componenti e si posizionano negli spazi vuoti del network.

Il legame idrogeno è responsabile, per esempio, della tensione superficiale dell'acqua.

Il legame covalente tra ossigeno e idrogeno ha una forza di legame pari a 5 eV, mentre il legame idrogeno tra gli stessi atomi ha un'energia di legame pari a 0.2 eV, chiaramente minore.

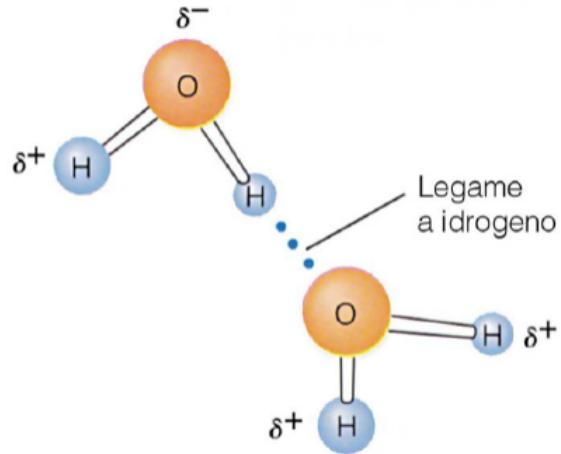


Figura 2.3: legame idrogeno

L'acqua può dissociarsi nel seguente modo:



dove H_3O^+ è lo *ione idronio* e OH^- è lo *ione ossidrile*. Si tratta di una dissociazione spontanea.

Abbiamo a che fare con il legame idrogeno nella stabilizzazione della struttura secondaria delle proteine, in cui si instaura tra l'idrogeno e gli atomi dei diversi amminoacidi, bloccando la struttura, come possiamo vedere in figura (2.4)

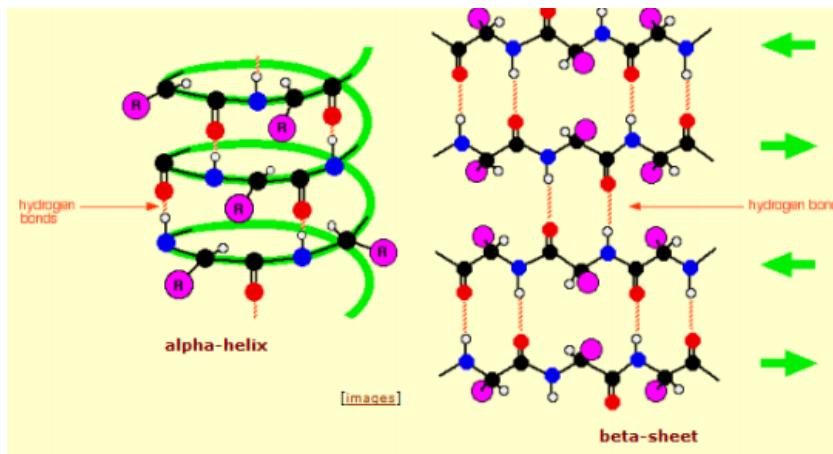


Figura 2.4: legami idrogeno tra le catene di amminoacidi

Interazioni idrofobiche : possiamo distinguere le molecole tra:

- idrofile: molecole che stanno bene in acqua.

- idrofobiche: molecole che preferibilmente non stanno in acqua.

Se mettiamo una molecola di cloruro di sodio ($NaCl$) in acqua, la natura polare dell'acqua fa sì che le molecole di H_2O si riuniscano intorno agli ioni e alle altre molecole polari in modo semplice, come riportato in figura (2.5).

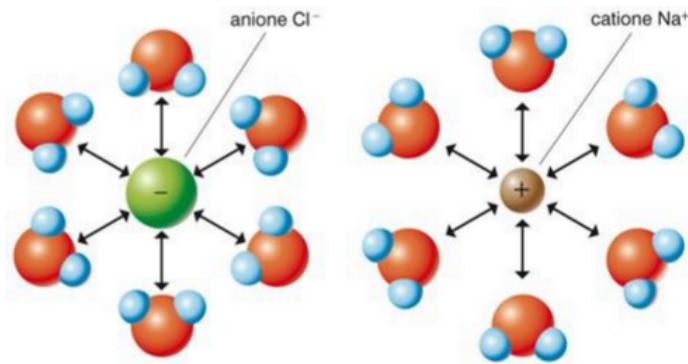


Figura 2.5: molecola di $NaCl$ in acqua

Le molecole non polari invece formano legami tra loro per minimizzare l'esposizione al solvente polare. È sempre una questione di minimizzare l'energia libera, cioè minimizzare le interazioni non preferenziali.

I **composti organici** sono costituiti da carbonio e ossigeno:

Carbonio (C) ha la seguente configurazione elettronica: $1s^22s^22p^2 = 1s^22s^22p_x2p_y$.

Può presentare diversi angoli di formazione del legame a seconda che abbia orbitali molecolari sp^2 o sp^3 . Cambia la geometria della molecola a seconda dell'ibridazione.

Ossigeno (O) ha la seguente configurazione elettronica: $1s^22s^22p_x2p_y(2p_z)^2$.

2.1 TERMODINAMICA CHIMICA

Il parametro fondamentale in termodinamica chimica è l'**energia libera di Gibbs**. Dobbiamo ricordare che il principio di massimizzazione dell'entropia vale solo per un sistema isolato (l'universo). Detta ΔS la variazione di entropia, ΔG la variazione di energia libera e ΔH la variazione di entalpia, si ha:

- $\Delta S \geq 0$ per un sistema isolato.
- $\Delta S = 0$ equilibrio in un sistema isolato (massimizzazione di S all'equilibrio).
- $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ per un sistema aperto.
- $\Delta G = 0$ equilibrio in un sistema aperto (minimizzazione di G all'equilibrio).

In tutti i nostri esperimenti consideriamo il sistema come aperto.

Consideriamo il sistema immerso in un *bagno* e per convenzione pensiamo positivo il calore Q assorbito e negativo quello ceduto, positivo il lavoro W fatto dal sistema e negativo quello subito. La **prima legge della termodinamica** dice che:

$$\delta Q = dE + \delta W \quad \Rightarrow \quad dE = \delta Q - \delta W \quad (2.2)$$

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

Il simbolo δ serve a ricordarci che le variazioni di calore e lavoro dipendono dal cammino che viene seguito, mentre la d indica un differenziale esatto: l'energia è una *funzione di stato*, pertanto ci interessano solo il punto iniziale e quello finale.

La **seconda legge della termodinamica** dice che:

$$\delta Q_{rev} = TdS \quad \delta Q_{irrev} \geq TdS \quad (2.3)$$

che nel caso di espansione reversibile di un gas assume la seguente forma:

$$TdS = dE + pdV \quad (2.4)$$

Per un sistema isolato termicamente e meccanicamente quindi $dS \geq 0$. Se oltre al lavoro di espansione concorrono altri tipi di lavoro bisogna aggiungere un termine $-\delta W$ e la seconda legge diventa:

$$TdS = dE + pdV - \delta W \geq 0 \quad (2.5)$$

All'equilibrio si ha:

$$\delta W = -TdS|_{E,V} \quad (2.6)$$

L'energia libera di Gibbs è una funzione di stato, fondamentale per l'approccio fisico a qualunque problema biologico:

$$G = H - TS = E + pV - TS \quad (2.7)$$

$$dG = dE + pdV + Vdp - TdS - SdT \quad (2.8)$$

$$\begin{aligned} TdS &= dE + pdV - \delta W \\ \Rightarrow dG &= Vdp - SdT + \delta W \end{aligned} \quad (2.9)$$

L'equazione (2.9) mette in evidenza i parametri termodinamici fondamentali: la pressione e la temperatura. Inoltre scritta in questa forma vediamo che se non ci sono lavori esterni, a pressione e temperatura costanti la variazione di energia libera è nulla. Altrimenti, il lavoro fatto sul sistema a temperatura e pressione costanti (che sono le nostre condizioni sperimentali) è:

$$-\delta W = -dG|_{p,T} \quad (2.10)$$

Consideriamo il seguente caso, riportato in figura (2.6), in cui si hanno pressione e temperatura costanti, e la massa del bagno è molto più grande di quella del sistema.

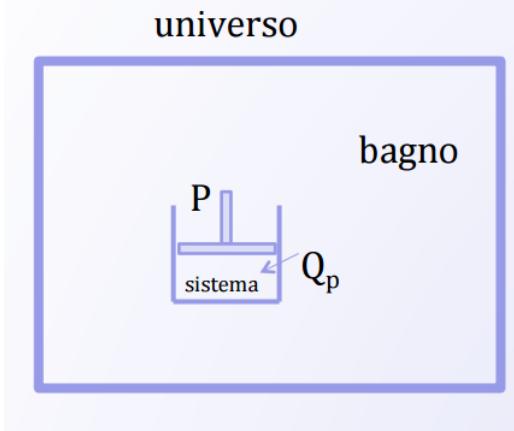


Figura 2.6: *sistema che consideriamo*

Sia Q_p un flusso reversibile (molto lento), allora si ha:

$$dS_{universo} \geq 0 \quad (2.11)$$

$$dS_{bagno} = \frac{\delta Q_{rev}}{T} = -\frac{Q_p}{T} \quad (2.12)$$

Applichiamo il primo principio sul sistema:

$$Q_p = \Delta H_{sis}|_{p=cost} = \Delta E_{sis} + p_{sis}\Delta V \implies dS_{bagno} = \frac{\delta Q_{rev}}{T} = -\frac{\Delta H_{sis}|_p}{T} \quad (2.13)$$

Applichiamo ora il secondo principio sull'universo:

$$\Delta S_{bagno} + \Delta S_{sis} = \Delta S_{sis} - \frac{\Delta H_{sis}|_p}{T} \quad (2.14)$$

Se la temperatura è costante otteniamo il *principio di spontaneità di Gibbs*:

$$T\Delta S_{sis} - \Delta H_{sis}|_p = -\Delta G_{sis}|_{T,p} \geq 0 \quad (2.15)$$

Vediamo un esempio in cui si ha la **temperatura di melting T^*** : il ghiaccio. Se siamo a temperatura e pressione costanti, all'equilibrio si ha $\Delta S = 0$. Per il ghiaccio che sta fondendo:

$$\Delta G|_{T,p} = \Delta H_{fus}|_{T,p} - T^* \Delta S_{fus}|_{T,p} = 0 \quad (2.16)$$

$$\implies T^* = \frac{\Delta H|_{T,p}}{\Delta S|_{T,p}} \quad (2.17)$$

I valori che compaiono nella formula (2.17) sono noti e indipendenti dal tipo del legame. I processi di cambiamento di stato avvengono a temperatura costante. Come possiamo osservare in figura (2.7) il valore della variazione di energia libera di Gibbs passa da un valore positivo a uno negativo.

Quando c'è il passaggio dallo stato A (ghiaccio) allo stato B (acqua liquida) si ha $\Delta G \geq 0$: questo significa che lo stato A è favorito perché ha un'energia libera di Gibbs minore.

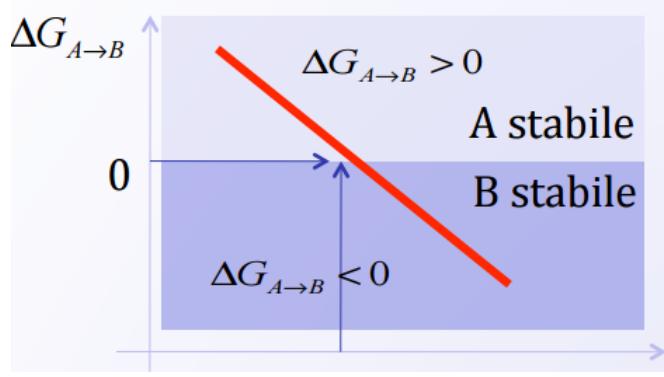


Figura 2.7: *temperatura di melting*

Questo vale anche per il melting del DNA, che può passare dalla doppia elica alle componenti separate. La misura della temperatura di melting viene fatta per capire quanto forti sono i legami tra le basi del DNA.

Per i gas ideali, a temperatura costante, abbiamo:

$$\begin{aligned} dG = Vdp = nRT \frac{dp}{p} \rightarrow \Delta G = nRT \ln\left(\frac{p_f}{p_i}\right) \\ \implies G_i = n_i G_i^0 + \Delta G_i = n_i G_i^0 + n_i RT \ln\left(\frac{p_i}{p^0}\right) \\ \xrightarrow[p^0=1atm]{} G_i = n_i G_i^0 + \Delta G_i = n_i G_i^0 + n_i RT \ln(p_i) \end{aligned} \quad (2.18)$$

Il passaggio intermedio consiste nello scegliere uno stato di riferimento e applicare poi la *legge di Raoult*:

$$p_i = X_i p_i^\bullet \quad (2.19)$$

Otteniamo così:

$$G_i = n_i G_i^\bullet + n_i RT \ln(X_i) \quad (2.20)$$

dove G_i^\bullet è l'energia libera molare del componente puro. Il passaggio dalla frazione molare alla concentrazione è rapido. Per soluzioni diluite si ha:

$$X_B = \frac{n_B}{n_B + n_A} \approx \frac{n_B}{n_A} \quad (2.21)$$

$$C_B = \frac{n_B}{litro \ di \ soluzione} = \frac{n_A}{litro \ di \ soluzione} X_B \quad (2.22)$$

$$\frac{n_A}{litro \ di \ soluzione} = M_{A(puro)} = \frac{\rho_A [g/cm^3]}{M_A [g/mol]} = \frac{\rho_A}{M_A} [mol/cm^3] = \frac{1000 \rho_A}{M_A} [mol/L] \quad (2.23)$$

$$\implies C_B = \frac{1000 \rho_A}{M_A} X_B [mol/L] \quad (2.24)$$

Dove A indica il solvente e M_A è il peso molecolare.

Possiamo sempre scegliere uno stato di riferimento in cui è unitaria la quantità che sta variando.

L'energia libera permette di introdurre il **potenziale chimico** μ : spesso il numero di moli e di molecole in soluzione cambia e questo fa cambiare l'energia interna di ciascuna molecola nel seguente modo:

$$dE = TdS - pdV + \mu dn \quad (2.25)$$

Il potenziale chimico indica la velocità di cambiamento dei potenziali termodinamici con il numero di molecole:

$$\mu = \left. \frac{\partial E}{\partial n} \right|_{S,V} = \left. \frac{\partial G}{\partial n} \right|_{T,p} \quad (2.26)$$

La condizione di equilibrio per i potenziali chimici è data da:

$$dG|_{T,p} = \sum_i \mu_i dn_i = 0 \quad (2.27)$$

Cerchiamo di capire il significato del potenziale chimico e consideriamo due sistemi, come in figura (2.8).

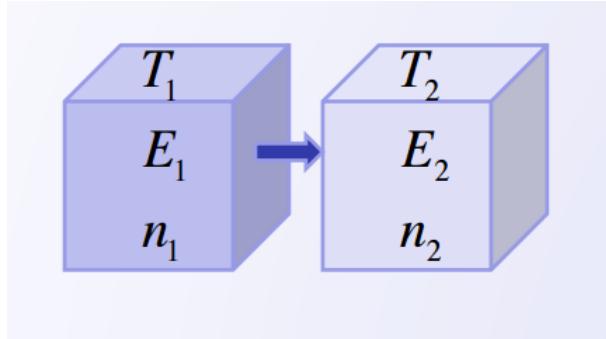


Figura 2.8: *sistemi*

Si ha:

$$dS = \frac{dE}{T} + \frac{p}{T} dV - \frac{\mu}{T} dn \geq 0 \quad (2.28)$$

Il termine contenente il potenziale chimico tiene conto del flusso di materia da un sistema all'altro. Se si ha solo il flusso di molecole, il flusso passa da zone a potenziale chimico maggiore a zone a potenziale chimico minore.

Per un sistema a multicomponenti:

$$\mu_i = \left(\frac{\partial G}{\partial n_i} \right)_{T,p} \quad dG|_{T,p} = \sum_i \mu_i dn_i \quad (2.29)$$

Gibbs e Duhem forniscono la relazione tra il potenziale chimico e il numero di gradi di libertà, che risulta più piccolo del numero delle variabili: questo significa che le variabili devono essere legate.

La **legge di azione di massa** riguarda l'equilibrio tra due stati A e B . Se

si ha l'equilibrio allora:

$$G = n_A \mu_A + n_B \mu_B \quad dG = 0 \quad dn_A = -dn_B$$

$$dG = dn_A(\mu_A - \mu_B) = 0 \implies \mu_A = \mu_B \quad (2.30)$$

$$G = \sum_i \mu_i^\circ n_i + RT \sum_i n_i \ln(C_i) \longrightarrow \mu_A^\circ + RT \ln(C_A) = \mu_B^\circ + RT \ln(C_B)$$

$$\longrightarrow \ln \left(\frac{C_B}{C_A} \right) = -\frac{\mu_B^\circ - \mu_A^\circ}{RT} = -\frac{\Delta G_{B \rightarrow A}^\circ}{RT}$$

$$\implies \frac{C_B}{C_A} = \exp \left(-\frac{\Delta G_{B \rightarrow A}^\circ}{RT} \right) = K_{eq} \quad (2.31)$$

$$\implies \frac{C_B}{C_A} = \exp \left(-\frac{\Delta G_{B \rightarrow A}^\circ}{RT} \right) = K_{eq} \quad (2.32)$$

In generale se si hanno R reagenti e P prodotti otteniamo che:

$$\Delta G_{R \rightarrow P}^\circ = -RT \ln K_{eq} \quad (2.33)$$

Vediamo un esempio importante: la **pressione osmotica**, che è fondamentale per la sopravvivenza delle cellule e dei globuli rossi in eccesso o carenza di soluzione. Consideriamo un capillare con una membrana semi impermeabile che viene inserito nel solvente con già il soluto, come riportato in figura (2.9).

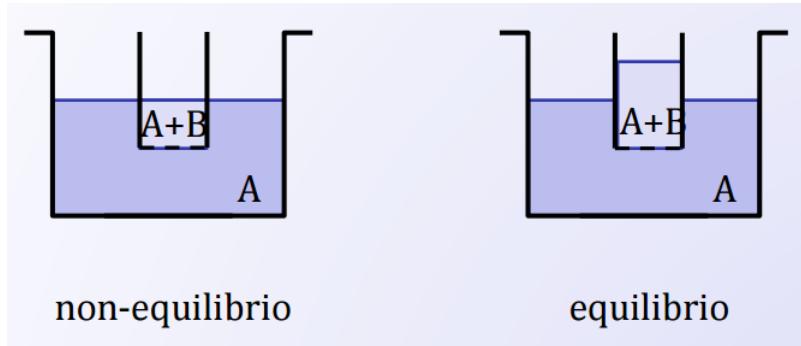


Figura 2.9: membrana semi impermeabile in solvente

Vediamo che il solvente tende ad entrare nel capillare. La pressione osmotica è la pressione necessaria per raggiungere l'equilibrio. Detta h l'altezza del solvente nel capillare rispetto al solvente nel recipiente, si ha:

$$\Pi = \rho g h, \quad \mu_A^{(A)} = \mu_A^0 \longrightarrow \mu_A^{(A+B)} = \mu_A^0 + RT \ln(x_A) + \tilde{V}_A \Pi \quad (2.34)$$

$\tilde{V}_A \Pi$ è il contributo della pressione osmotica. Quindi all'equilibrio si ha:

$$\mu_A^{(A+B)} = \mu_A^{(A)} \quad (2.35)$$

Possiamo legare il volume totale, dato da solvente e soluto, alla pressione osmotica e alle moli di soluto nel seguente modo:

$$\Pi V = n_B R T \quad (2.36)$$

C'è una differenza di pressione tra l'interno della cellula e l'ambiente circostante. Se la pressione all'interno della cellula è molto maggiore allora si formano dei buchi nella membrana e la cellula muore, se invece la pressione interna è troppo più bassa rispetto a quella esterna la cellula può essere schiacciata dall'esterno.

Capitolo 3

Lezione 3: 25 marzo 2015

Abbiamo parlato dell'energia libera di Gibbs come misura della spontaneità di una reazione: spontaneamente i sistemi tendono a provocare una diminuzione dell'energia libera di Gibbs e quindi la reazione è spontanea se l'energia libera dello stato finale è minore dell'energia libera dello stato iniziale. Possiamo descrivere le transizioni utilizzando una coordinata di reazione che ci dice se sta cambiando qualche cosa all'interno del nostro sistema e una scala delle energie che mostra il passaggio da uno stato a energia maggiore a uno a energia minore.

$$\Delta G = G_{fin} - G_{in} \quad \Delta G = \Delta H - T\Delta S \leq 0 \quad (3.1)$$

3.1 TITOLAZIONI ACIDO BASE

Le titolazioni acido base sono importanti perché tutti gli oggetti con cui abbiamo a che fare funzionano perché ci sono transizioni da uno stato acido a uno stato basico che provocano cambiamenti conformazionali.

Nel caso dell'acqua c'è una dissociazione spontanea. Nel caso di un acido cosa è la reazione di *ionizzazione*? È la separazione del complesso nei due ioni corrispondenti: uno ione H^+ positivo e uno ione A^- negativo:



La costante di dissociazione è definita come:

$$K_d = \frac{[H^+] [A^-]}{[AH]} \quad (3.3)$$

Tale costante ha delle unità di misura: $[x] = \text{Moli/litro} \implies$ la costante di dissociazione si misura in Moli/litro .

È comodo definire per gli amminoacidi la seguente grandezza:

$$pK_d = -\log_{10}(K_d) \quad (3.4)$$

che indica sostanzialmente il valore per cui si ha equilibrio tra le due specie. Il legame tra costante di dissociazione e energia libera di Gibbs è dato da:

$$K_d = \frac{x_A x_H}{x_{AH}} \quad \frac{\Delta G_d}{KT} = -\ln(K_d) \quad (3.5)$$
$$x_i = \frac{n_i}{\sum_{k=1}^M n_k}$$

Qui la costante di dissociazione è stata espressa in frazione molare, cioè il numero di moli della specie che mi interessa rispetto al numero di moli totali che abbiamo. Se non fosse espressa in questo modo, ma in termini di concentrazioni molarie, la costante ha una dimensione e allora bisogna convertire dall'espressione in frazione molare a quella in molare, data dalla relazione:

$$x_A = \frac{n_A}{n_{tot}} = \frac{n_A V}{V n_{tot}} = \frac{n_A V N_A V}{N_A V V n_{tot}} = \frac{[A^-]}{[A^-] + [H^+] + [AH]} \quad (3.6)$$

$$\ln \left(\frac{[H^+] [A^-]}{[AH]} \right) = -\frac{\Delta G_d}{KT} + \ln ([A]_{tot}) \implies [A]_{tot} = [A^-] + [H^+]$$

Si sceglie uno stato di riferimento ΔG_0 , che può essere quello relativo alle frazioni molari, ricordando che tra quello relativo alle concentrazioni espresse in molare e quello relativo alle concentrazioni espresse in frazioni molari c'è una costante di conversione. Il classico riferimento è quello rispetto alle frazioni molari.

Quindi otteniamo:

$$K_d = \frac{([A]_{tot} - [AH]) [H^+]}{[AH]} \quad x = [AH]$$

$$\implies \log \left(\frac{x}{[A]_{tot} - x} \right) = pK - pH \quad (3.7)$$

Quindi:

$$x = [AH] = \frac{[A]_{tot}}{1 + 10^{pH-pK}} \quad [A^-] = \frac{[A]_{tot}}{1 + 10^{pK-pH}} \quad (3.8)$$

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

Le curve di protonazione danno informazioni su come cambia la concentrazione di una specie che ha un certo pK al variare del pH . Questo ragionamento si può fare scegliendo come incognita la concentrazione della specie neutra. Tali curve sono riportate in figura (3.1).

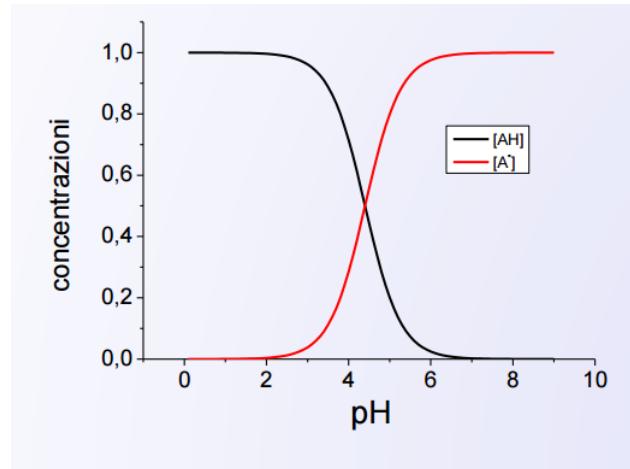


Figura 3.1: *curve di protonazione*

A metà dove le curve si incontrano la concentrazione delle due specie è uguale

ed è uguale alla metà della concentrazione iniziale.

Tipicamente un oggetto che ha un'osservabile che cambia in funzione del *pH* sono le cartine tornasole, in cui l'osservabile è il colore.

Il tipo di andamento delle curve di protonazione è un andamento molto diffuso in biofisica ed è definito *andamento sigmoidale*, perchè ha un andamento che sembra abbastanza una *S*. Questo andamento è definito da due parametri:

- pendenza (*steepness*), che dice quanto la transizione è cooperativa, o tutto o niente, cioè più la curva è ripida, più la transizione è immediata e gli oggetti sono tutti quanti o in uno stato o in un altro.
- punto di mezzo, che dice a che punto avviene la transizione.

Se in generale abbiamo un'osservabile di cui conosciamo i valori negli estremi e sappiamo che cambia secondo un andamento sigmoidale per descrivere completamente la sua variazione è sufficiente conoscere questi due parametri. Chiamiamo *basi* gli oggetti che accettano protoni e *acidi* gli oggetti che cedono protoni. Ricordiamo come si chiamano le varie reazioni:

- condensazione: due oggetti si uniscono con l'eliminazione di una molecola d'acqua (esempio il legame peptidico)
- condensazione inversa: gli oggetti si separano con l'aggiunta di una molecola d'acqua.

3.2 I COMPONENTI DELLA CELLULA

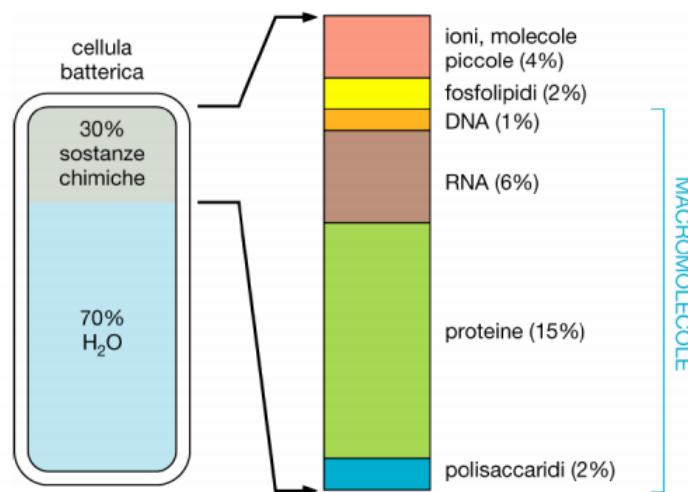


Figura 3.2: *composizione delle cellule*

In generale la composizione delle cellule del corpo umano (riportata in figura (3.2)) è data da macromolecole, tra cui le proteine, RNA e DNA, da polisaccaridi (zuccheri) e fosfolipidi (grassi), ma la maggior parte rimane acqua. In generale nelle cellule troviamo quattro tipi di molecole organiche:

Zuccheri sono noti anche con il nome di *carboidrati*, derivante dal fatto che sono degli oggetti idrati del carbonio, cioè carbonio più acqua. La formula è la ripetizione un certo numero di volte e in una certa distribuzione di termini del tipo: $(CH_2O)_n$. Comprendono composti che contengono nella loro molecola un *gruppo aldeico*, che ha un doppio legame con l'ossigeno e un legame singolo con l'idrogeno, o un *gruppo chetonico*, che ha tre carboni, di cui uno ha un doppio legame con l'ossigeno.

Gli zuccheri hanno le seguenti funzioni (molto simili a quelle dei grassi):

- sono una fonte di energia: danno circa 4 *kCal/mole* di energia.
- sono utilizzati per immagazzinare riserve energetiche, sottoforma di amido o glicogeno, ma l'organismo al massimo può conservarne 500 g.
- forniscono il materiale per la sintesi degli altri componenti cellulari.
- servono per formare oggetti fondamentali come la cellulosa e la chitina per dare il sostegno delle cellule: la cellulosa compone le pareti delle cellule vegetali, mentre la chitina l'oscheletro degli insetti.
- servono per la comunicazione all'interno delle cellule.
- ci sono una serie di proteine che quando si legano con dei glucosi formano glicoproteine, che hanno maggiori funzionalità.

Lo zucchero più importante che noi abbiamo come monosaccaride, cioè come zucchero semplice è il glucosio, che è presente anche all'interno del nostro organismo e che viene prodotto dalle piante per fotosintesi. I polisaccaridi invece sono delle macromolecole, cioè dei polimeri con unità ripetute di zuccheri semplici. Queste catene possono essere lineari e lunghe oppure ramificate a seconda di quale sarà il loro scopo. Tipicamente la cellulosa permette di avere un intreccio ramificato molto resistente.

Servono come riserva di energia per l'organismo: in particolare il glicogeno e l'amido, a seconda che si parli di animali o vegetali. Gli zuccheri forniscono energia più rapidamente dei grassi perché sono già nella fase in cui possono essere utilizzati dall'organismo, cioè non hanno bisogno di essere suddivisi in unità più semplici. Il glicogeno è la riserva energetica da cui l'organismo attinge negli sforzi grandi e che va poi ricaricata.

Lipidi sono insolubili in acqua, cioè idrofobici, quindi in acqua preferiscono disporsi, per questioni di entropia, in celle per minimizzare la propria esposizione e contatto con l'acqua. Quelli più importanti sono:

Acidi grassi : gli acidi grassi più semplici sono catene di idrocarburi, cioè gruppi $COOH$ lineari, caratterizzati da una testa carbossilica idrofilica, polare, e una coda idrocarburica idrofobica, non polare. Questo facilita la formazione delle micelle e delle membrane perché la parte più idrofilica sta preferenzialmente esposta al solvente. A seconda di come è fatta la coda non polare si possono avere strutture rigide (come nel caso dell'acido stearico) oppure può avere un bending (come nel caso dell'acido oleico). L'acido grasso è detto *saturo* quando composto tutto quanto da legami covalenti carbonio-carbonio, *insaturo* quando sono presenti doppi legami carbonio-carbonio, come possiamo osservare nella figura (3.3). Gli acidi grassi si uniscono a formare

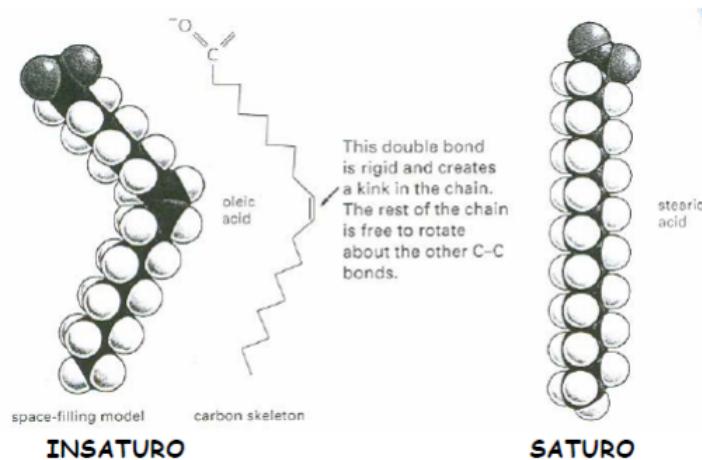


Figura 3.3: strutture degli acidi grassi

le membrane.

Tra la testa e la coda possiamo trovare i gruppi fosfati. Problema dell’impacchettamento: se abbiamo un miscuglio di acidi saturi e insaturi, quelli saturi riescono a fare una membrana dritta e fitta, mentre i ripiegamenti di quelli insaturi provocano delle rotture nella membrana. Questo è fondamentale per l’apertura dei cosiddetti *canali ionici*, che permettono di trasportare gli ioni di calcio, magnesio, ... all’interno delle cellule.

Fosfolipidi

Gliceridi

Steroidi

I lipidi hanno le seguenti funzioni:

- sono una fonte di energia: forniscono circa $9kCal/mole$: più efficienti degli zuccheri in termini di energia immediata.
- costituiscono una riserva energetica senza limiti, in particolare i trigliceridi.
- hanno importanza fondamentale strutturale sia per la formazione delle membrane biologiche, sia nelle membrane nucleari che in quelle della cellula, che per la mielina: è una specie di fibra che ricopre i nervi e aiuta la trasmissione dei segnali nervosi.
- servono per la trasduzione del segnale: per trasmettere segnali sia all’interno della cellula (messaggeri secondari), che tra cellule diverse. Aiutano il passaggio degli ormoni.
- servono per il trasporto e la regolazione della sintesi delle vitamine (A, D, E, K)
- hanno funzione antiossidante
- servono per l’isolamento termico e come protezione dai traumi, nel senso che gli organi interni sono ricoperti da uno strato lipidico.

Amminoacidi esistono 20 amminoacidi fondamentali, tra cui si hanno gli amminoacidi *essenziali*, che non vengono sintetizzati dall'organismo ma sono fondamentali per il suo funzionamento e devono essere assunti dall'organismo attraverso il cibo. Tali amminoacidi essenziali sono: arginina, istidina, isoleucina, treonina, leucina, triptofano, lisina, metionina, valina e fenilalanina.

Le proteine hanno moltissime funzioni diverse:

- danno struttura alle varie componenti del corpo: collagene e cheratina si trovano in pelle, ossa, capelli e unghie.
- servono come catalizzatori perché la maggior parte delle reazioni chimiche all'interno della cellula avviene grazie agli enzimi, che sono proteine.
- servono per il movimento: i muscoli si muovono grazie a miosina e actina, che sono due proteine che scorrono una sopra l'altra.
- servono per il trasporto: l'emoglobina per esempio trasporta l'ossigeno nei polmoni.
- servono come ormoni per l'attivazione di una serie di processi cellulari (esempio insulina, ormone della crescita, ...)
- servono per protezione: ci sono proteine che aiutano a coagulare il sangue e gli anticorpi sono proteine.
- servono come scorte di cibo: la caseina nel latte e l'albumina sono proteine che servono per dare il nutrimento ai neonati.
- come regolazione per l'espressione genica, sono fondamentali per la duplicazione delle cellule.

Tutti quanti gli amminoacidi possono agire da acidi o basi a seconda del valore del *pH*, quindi esistono in soluzione mediamente come ioni bipolari, con una parte positiva e una negativa, quindi in forma *zwitterionica*, e possono accettare o donare protoni a seconda del *pH*.

Tranne la glicina, tutti gli amminoacidi hanno almeno uno *stereocentro*, cioè un centro di simmetria e la maggior parte degli amminoacidi sono **chirali**, cioè sinistrorsi: le immagini speculari non sono sovrapponibili e sono otticamente attivi (quando vengono attraversati da luce polarizzata circolarmente, destrogiro o levogiro, la luce che esce viene ruotata rispetto a quella originaria).

Classicamente gli amminoacidi nella sequenza delle proteine vengono indicati con il codice a tre lettere o quello con una sola lettera (esempio: Alanina Ala A).

Il loro *punto isoelettrico* è il punto in cui la concentrazione dei due stati di carica è uguale. Le proteine non possono essere viste ugualmente da un lato e dall'altro: la catena proteica ha un inizio e una fine diversi tra loro.

La **struttura primaria** delle proteine è la sequenza degli amminoacidi: a partire dai 20 amminoacidi si possono formare una serie di polipeptidi. Se vogliamo una catena di n amminoacidi abbiamo 20^n possibili peptidi che possiamo formare. In realtà alla fine però le proteine non sono così tante: questo perchè per avere una funzione non possono esserci amminoacidi messi a caso. Ci sono però amminoacidi che sono poco influenti

per quella che è l'azione biologica di una proteina: ad esempio l'insulina è costituita da due catene polipeptidiche per un totale di 51 amminoacidi. Esistono quattro diversi tipi di insulina: umana, di mucca, di maiale e di pecora. Nella tabella della figura (3.4) vediamo le uniche differenze che si osservano all'interno delle catene di insulina per questi quattro tipi di animali. Dei 51 amminoacidi, solo 4 possono essere variati, quindi gli altri ci aspettiamo essere fondamentali per la funzione biologica della proteina.

	A Chain positions 8-9-10	B Chain position 30
Human	-Thr-Ser-Ile-	-Thr
Cow	-Ala-Ser-Val-	-Ala
Hog	-Thr-Ser-Ile-	-Ala
Sheep	-Ala-Gly-Val-	-Ala

Figura 3.4: catena amminoacidica dell'insulina

L'insulina è fatta da due catene: non separate e che si uniscono in fase di struttura quaternaria, come avviene per l'emoglobina, ma queste due catene sono tenute insieme da *ponti di solfuro*, cioè una reazione di ossidazione tra due legami di cisteina a formare una cisteina. I legami di solfuro sono essenziali per la struttura terziaria e quaternaria, sono resistenti, e sono i più difficili da rompere in condizioni normali, ma possono essere rotti da oggetti esterni, come il *DTNB*. Altro aspetto importante di questi legami è il fatto che non sono planari.

Altro esempio dell'importanza della sequenza amminoacidica è dato da vasopressina e ossitocina, che possiamo vedere in figura (3.5):

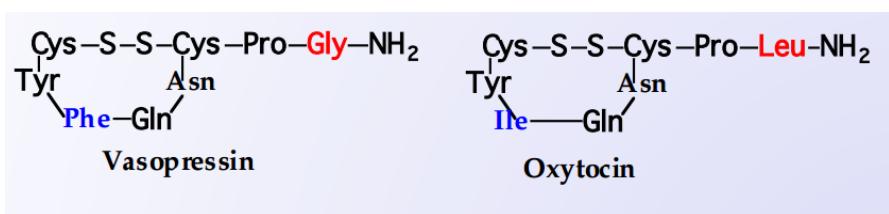


Figura 3.5: catena amminoacidica di vasopressina e ossitocina

Sono due proteine molto piccole, formate da 9 amminoacidi ciascuna, di cui sono 2 differenti, ma hanno funzioni biologiche completamente diverse: l'ossitocina regola le contrazioni e la secrezione del latte al momento del parto, mentre la vasopressina è un ormone che regola la diuresi.

Quanto sono grandi le proteine? Vanno dal citocromo c, che ha un centinaio di residui ed è abbastanza piccola, fino alla titina umana, che è una

proteina che ha 26000 residui ed è a catena unica. La maggior parte delle proteine ha circa 500-600 amminoacidi.

La **struttura secondaria** è data dalla disposizione degli amminoacidi in porzioni, cioè piccole parti della catena polipeptidica. Esistono due tipi fondamentali:

- l' α -elica è tipicamente un'elica destrorsa, cioè il suo avvolgimento segue la regola della mano destra. L'azoto terminale di un amminoacido forma un legame idrogeno con l'ossigeno del gruppo *CO* distante 4 lungo la catena: c'è un legame idrogeno tra azoto e ossigeno ogni 4 amminoacidi. L'interno è vuoto: quindi i residui e le catene laterali si dispongono verso l'esterno. La maggior parte delle eliche sono destrorse (DNA e tutte le proteine), quello che può accadere è che alcuni agglomerati di proteina si dispongano a formare eliche, come nel caso della cheratina e del collagene, che sono sinistrorse (all'interno di ogni proteina però l'elica è destrorsa!)

L' α -elica è caratterizzata dal suo diametro, dal numero di residui per giro e di quanti nanometri per amminoacido sale (il cosiddetto *pitch* per amminoacido) e la distanza tra i legami.

L' α -elica è la più comune, ma esistono altri tipi di elica: l'elica 310 che ha un passo di 3 e l'elica *p* che ha un passo di 5. In generale si può avere la definizione delle eliche come N_m , dove N è il numero di unità per giro ed m il numero di atomi coinvolti dal legame idrogeno.

- i foglietti- β sono due catene che si allineano. Sono strutture molto più estese con legami idrogeno tra amminoacidi distanti lungo la catena. La cosa importante è che possono essere:
 - paralleli: la catena va in un certo senso, fa altri tipi di struttura secondaria, ritorna al punto di partenza e riparte nello stesso senso.
 - antiparalleli: la catena va avanti, torna indietro, ritorna avanti, ... diciamo che la catena scorre in direzioni diverse.

I legami idrogeno che stabilizzano avvengono tra i gruppi *NH* e *CO* di oggetti che sono adiacenti lungo la catena e anche in questo caso i residui non sono tutte disposte verso l'esterno, ma alternativamente verso interno ed esterno, per minimizzare l'ingombro. Tutto questo si può vedere nella figura (3.6):

È importante ricordarsi della mappa riportata nella figura (3.7) perché il fatto che i residui debbano stare all'esterno o alternativamente all'interno e all'esterno fa sì che gli angoli di torsione abbiano valori preferenziali a seconda della struttura secondaria.

La **struttura terziaria** riguarda come viene stabilizzata la conformazione complessiva della proteina. Abbiamo:

- legami covalenti, come i ponti di solfuro
- legami idrogeno, che stabilizzano la maggior parte delle interazioni tra gli amminoacidi
- ponti salini, che si hanno tra i diversi residui o i diversi amminoacidi.

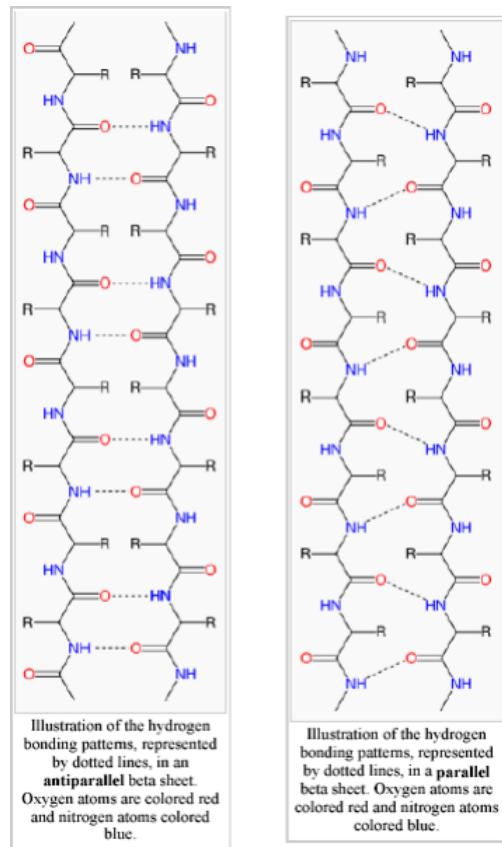


Figura 3.6: *foglietti paralleli e antiparalleli*

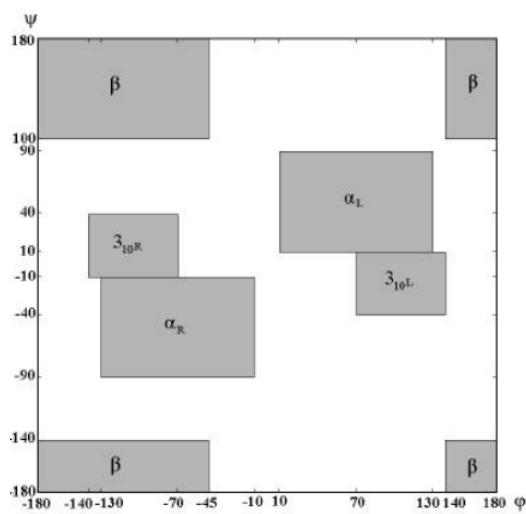


Figura 3.7: *mappa*

- interazioni idrofobiche, alcuni amminoacidi stanno preferenzialmente o meno esposti al solvente esterno o all'interno della proteina.

In figura (3.8) sono riassunte tutte le forme di stabilizzazione della conformazione della proteina.

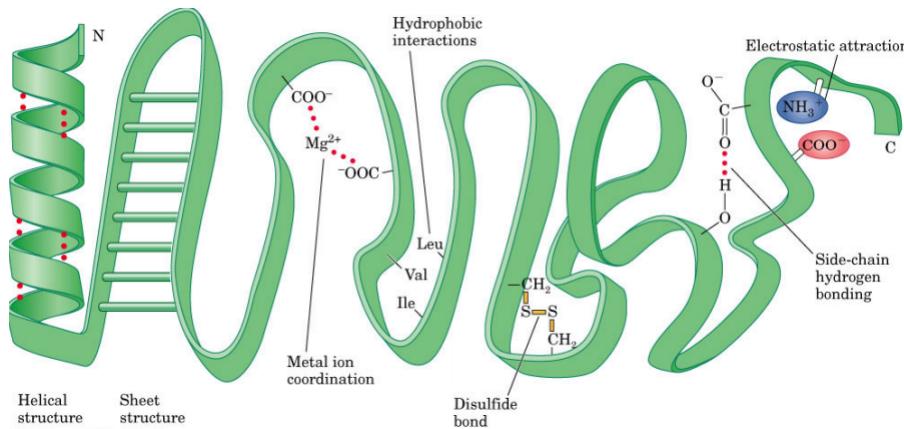


Figura 3.8: *stabilizzazione della proteina*

L'azione di tutte queste forze dà la forma compatta alla proteina. Per poter stare all'interno dell'organismo la conformazione nativa deve essere un insieme di strutture secondarie diverse.

Non tutte le proteine sono attive da sole con una catena, ma devono spesso unirsi più catene per dare la cosiddetta **struttura quaternaria**, che è stabilizzata da legami di tipo non covalente, quindi facilmente distruggibili. Rimangono quindi tutte le interazioni viste per la struttura terziaria ad eccezione del legame covalente.

L'esempio tipico è l'emoglobina, fatta da due catene α e due catene β .

3.3 FOLDING

Il punto è: perché una catena con quegli amminoacidi si ripiega? È il problema del **folding**, ovvero perché la proteina sia biologicamente attiva deve ripiegarsi in una struttura tridimensionale globulare e l'unica sorgente di informazione per il tipo di configurazione che deve assumere è la sequenza di amminoacidi che la compongono. Tipicamente la scaletta di eventi che avvengono per la formazione della struttura della proteina comprende:

1. formazione di alcuni piccoli elementi di struttura secondaria, che si chiamano *foci di nucleazione*
2. interazione tra questi nuclei di struttura a formare dei domini

3. i domini si uniscono tra di loro in quella che spesso non è la configurazione finale, ma è una configurazione parzialmente distorta che prende il nome di *molten globule*: la catena è in uno stato molto più mobile rispetto alla conformazione finale, perché non ha ancora raggiunto la distribuzione ideale degli amminoacidi.
4. le distorsioni vengono aggiustate per raggiungere la configurazione finale.

Questo processo è cruciale: se si sbaglia il folding si possono avere malattie quali: fibrosi cistica, morbo di huntington, scorbuto, alzheimer, ...

In genere è abbastanza assodato che gli elementi cruciali sono i residui che si trovano all'interno della proteina ripiegata, perché sono quelli che saranno idrofobici e l'interazione di tipo idrofobico è facile da ottenere: non è tanto l'interazione con gli altri a formare le strutture secondarie, ma uno schermarsi dal solvente. Non è possibile che la proteina esplori casualmente lo spazio delle configurazioni possibili. Questo fenomeno è noto come **paradosso di Levinthal**: una proteina con n amminoacidi ha 2^n angoli di torsione per ogni amminoacido, e ciascuno di questi ha circa 3 configurazioni stabili. Questo significa $3^{2n} \approx 10^n$ possibili conformazioni. Se supponiamo di passare da una conformazione all'altra ogni 10^{-13} s, che è il tempo di riorientazione del legame da un angolo all'altro, il tempo necessario per esplorare tutte queste conformazioni è dato da:

$$t = \frac{10^n}{10^{13}} \text{ s} \quad (3.9)$$

Se $n = 100$ (numero minimo per fare il DNA di una proteina funzionale, si ha un tempo pari a 10^{87} s, che è molto maggiore dell'età dell'universo, che è dell'ordine di 10^{17} s. Sperimentalmente il folding avviene in pochi secondi e la stabilità conformazionale della proteina aumenta in ogni passaggio di questo processo. Vediamo le tempistiche:

- entro i 5 ms si ha la formazione degli embrioni di elementi di struttura secondaria.
- tra i 5 e i 1000 ms la struttura secondaria si stabilizza e inizia a formarsi la struttura terziaria (subdomini): si ha il collasso idrofobico e si ha il molten globule.
- con calma ci sono le isomerizzazioni cis-trans dei legami, che dal punto di vista energetico cambiano poco o niente. La proteina si impacchetta più compattamente quindi viene espulsa l'acqua rimasta all'interno del core idrofobico.

Alla fine nel folding si passa da uno stato ad alta energia (perchè siamo in una configurazione iniziale che è casuale) e ad alta entropia (perchè ogni amminoacido ha a disposizione qualunque possibile conformazione), a uno stato a bassa energia (perchè è quello che minimizza l'energia e la conformazione stabile) e a bassissima entropia (perchè gli amminoacidi sono fermi e fissi all'interno di una certa conformazione). Questo processo è conosciuto come *funnel* del folding (imbuto), dalla forma del grafico dell'energia e dell'entropia, riportato in figura (3.9):

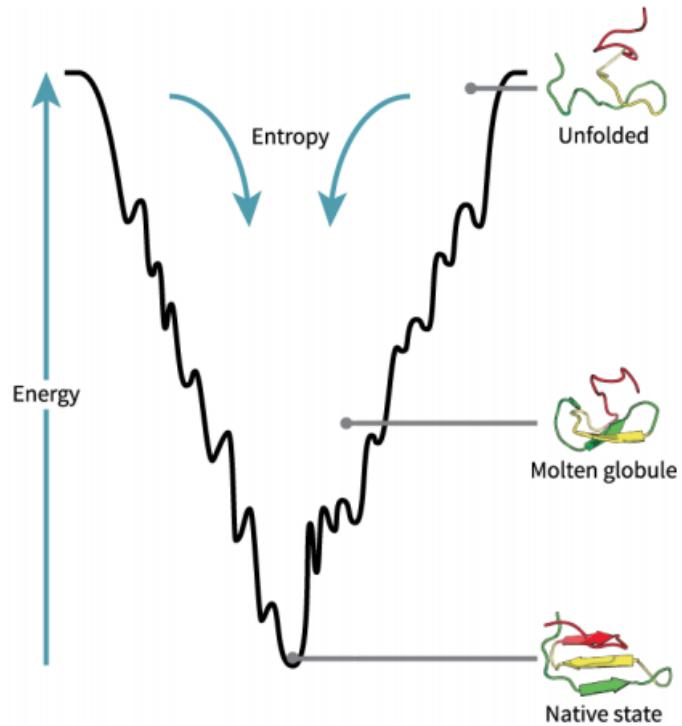


Figura 3.9: *funnel di folding*

La catena svolta ha alta entropia, man mano che si formano i contatti di tipo nativo l'energia diminuisce tantissimo e diminuisce anche l'entropia, anche se tra le due prevale la diminuzione dell'energia. Il diagramma non è liscio: ci sono una serie di minimi secondari in cui la proteina può rimanere intrappolata, le configurazioni hanno sempre più le caratteristiche dello stato nativo ma non sono quelle a energia minima. Hanno delle basse barriere di attivazione, quindi l'energia termica permette di superare queste barriere.

Come si descrive il folding? L'inverso del folding è il **processo di denaturazione**. Il folding è un processo su cui esternamente in laboratorio non possiamo agire, ma possiamo fare il processo opposto: avere una proteina allo stato nativo e causarne la transizione verso lo stato denaturato (unfolded), dove la proteina non è più ripiegata e la struttura diventa casuale. Come si induce il processo di denaturazione? Dobbiamo riscaldarla, oppure cambiare le condizioni al contorno, aggiungere *denaturanti* che si legano preferenzialmente alla proteina e quindi ai diversi amminoacidi, che scelgono di fare legami idrogeno con il denaturante piuttosto che con le altre parti della proteina e quindi si rompe la struttura della proteina, perché è energicamente più favorevole quel tipo di legame. Due denaturanti sono l'urea e il cloruro di guanidinio. La denaturazione può essere ottenuta con mezzi chimici o fisici. Spesso la denaturazione è

un processo reversibile e permette di ritornare nello stato foldato. Altre volte invece si ha un danno permanente: se si scalda troppo potremmo rompere dei ponti di solfuro e a quel punto quando si diminuisce la temperatura i ponti di solfuro si possono formare con altre proteine, ottenendo un grande aggregato di oggetti che gellificano.

Come si descrive questo processo e come lo vogliamo caratterizzare?

modello a due stati: supponiamo che esistano soltanto due possibili stati per la proteina: lo stato nativo N e lo stato denaturato D . La somma della frazione di proteine denaturate e di proteine allo stato nativo è uno. Supponiamo di avere un'osservabile fisica (y) che sia diversa nello stato nativo e nello stato denaturato, il cui valore è dato in ogni momento dalla combinazione lineare dal valore nei due stati, pesati per le rispettive popolazioni.

$$f_N + f_D = 1 \quad (3.10)$$

$$y = y_N f_N + y_D f_D \quad (3.11)$$

Le frazioni possono quindi essere scritte in funzione dell'osservabile. Il rapporto tra le due popolazioni dà la costante di denaturazione (K_D), che è legata al ΔG di denaturazione:

$$\begin{aligned} \frac{f_D}{f_N} &= K_D = e^{\frac{-\Delta G_D}{RT}} = \frac{y - y_N}{y_D - y} \\ f_D &= \frac{y - y_N}{y_D - y_N} \quad f_N = \frac{y - y_D}{y_D - y_N} \end{aligned} \quad (3.12)$$

Supponiamo ora di indurre la denaturazione con agenti chimici, quindi con dei denaturanti. Osservare la denaturazione in diversi istanti significa andare a vedere questa osservabile per diverse concentrazioni del denaturante. Assumiamo il cosiddetto *linear energy model LEM*, cioè assumere una variazione lineare per l'energia libera di denaturazione:

$$\Delta G_D = \Delta G_D^{H_2O} - mC_{denaturante} \quad (3.13)$$

Quando si assume un modello si sceglie quello più semplice che funziona e descrive i dati, per questo va bene la dipendenza lineare. Utilizziamo questa relazione per legare la concentrazione di denaturante alla variazione dell'osservabile. Se questo vale, nel punto di mezzo della transizione, dove la frazione di molecole nello stato denaturato è uguale alla frazione di quelle in stato nativo, il $\Delta G = 0$. Quindi si ha:

$$\Delta G_D^{H_2O} = mC_{midpoint} \quad (3.14)$$

Questa espressione la utilizzo per avere un'espressione dell'osservabile in funzione della concentrazione di denaturante, ottenendo:

$$y = \frac{y_N + y_D e^{\frac{-\Delta G_D}{RT}}}{1 + e^{\frac{-\Delta G_D}{RT}}} = \frac{y_N + y_D e^{\frac{-(\Delta G_D^{H_2O} - mC_{denaturante})}{RT}}}{1 + e^{\frac{-(\Delta G_D^{H_2O} - mC_{denaturante})}{RT}}} \quad (3.15)$$

I due parametri sono m e la concentrazione di midpoint della denaturazione. Se abbiamo come osservabile, come nell'esempio riportato in figura (3.10), la lunghezza d'onda del massimo di fluorescenza, quello che si

ha sono curve di tipo sigmoidale. Quindi l'espressione ottenuta per l'osservabile descrive un andamento di tipo sigmoidale. La m è una misura

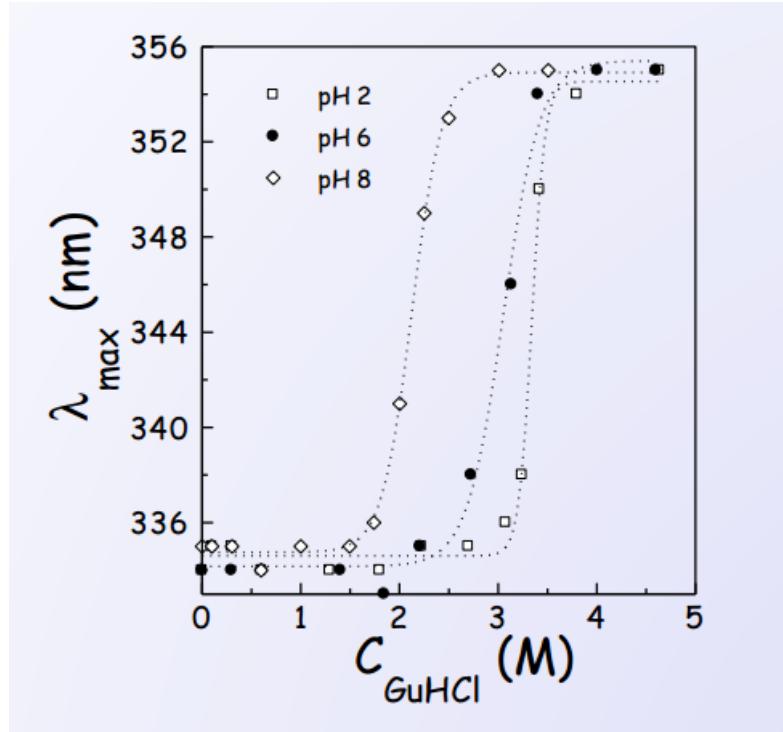


Figura 3.10: *andamento sigmoidale dell'osservabile*

della steepness della curva. Per riuscire a fare questa misura bisogna avere sperimentalmente un certo numero di punti lungo la transizione.

L'altro modo per rappresentare la transizione, che segue sempre un andamento abbastanza sigmoidale consiste nel considerare K la costante di equilibrio tra la transizione tra lo stato nativo e lo stato denaturato, se cerchiamo di avere denaturazione tramite variazione della temperatura, possiamo sfruttare il fatto che l'energia libera sia funzione della temperatura:

$$K = \frac{[denaturato]}{[nativo]} \quad K = \exp\left(\frac{-\Delta G^0}{RT}\right) = \exp\left(\frac{-\Delta H^0 + T\Delta S^0}{RT}\right) \quad (3.16)$$

In generale le variazioni di entalpia e entropia sono tabulati per la maggior parte delle proteine. Solitamente ci si segna la frazione di nativo: cioè la concentrazione di nativo rispetto a quella totale, ottenendo la relazione tra frazione di nativo e temperatura. Il punto di mezzo della transizione è la cosiddetta *temperatura di melting*. In questo caso la steepness della transizione è data dai valori di ΔH^0 e ΔS^0 . *Melting* è il termine che si usa quando si parla di denaturazione indotta dal calore. L'altro contesto in cui si studia il melting è con il DNA, per la separazione delle catene di DNA.

3.4 STABILITÀ DI UNA PROTEINA IN ACQUA

Nello stato nativo gli amminoacidi più idrofobici sono nascosti all'interno della proteina, mentre nello stato denaturato vengono esposti all'acqua (quelli idrofilici carichi sono sempre a contatto con il solvente). Come si fa ad avere la stima del ΔG_D o in generale a capire qual è la stabilità di una proteina in acqua? La stabilità di una proteina in acqua sarà legata al valore del suo ΔG , quindi sarà legata a quelle che sono le sue interazioni preferenziali con il solvente. In sostanza quindi si tratta della misura della polarità o apolarità.

Un modo diretto di misurare la solubilità delle proteine, cioè capire quanto le proteine hanno affinità per lo stare in acqua, è calcolare la differenza tra il cristallo puro e la soluzione. Quello che si fa generalmente però è andare ad osservare la preferenza energetica per stare in due diversi solventi: alcool e acqua. La variazione di energia libera per la solubilità è data da:

$$\Delta\Delta G_{solu} = \Delta G_{solu}(etho) - \Delta G_{solu}(acqua) \quad (3.17)$$

Esistono delle tabelle che forniscono la variazione di energia libera per il trasferimento degli amminoacidi da alcoli all'acqua. Per gli amminoacidi le energie di solubilità sono tutte quante positive, questo significa che sono più idrofilici che idrofobici. Questo è dovuto alla parte del legame peptidico. Il ΔG di solubilità varia tra 0.5 e 3 $kCal/mole$. Per avere un'idea degli ordini di grandezza ricordiamo che:

- legame idrogeno: 1 – 1.5 $kCal/mole$
- RT: 0.6 $kCal/mole$
- legame covalente: 10 $kCal/mole$

Per capire quali sono le proteine che stanno più o meno bene in acqua si può costruire una scala dell'idrofobicità, in due modi:

1. metodo più recente, inventato nel 1967: il parametro di idrofobicità è dato da:

$$H_\Phi = \sum_i \Delta\Delta G_i \chi_i \quad (3.18)$$

Si ottiene un valore medio di circa 1.2 $kCal/mole$.

si può separare i residui carichi, polari, da quelli neutri, apolari, e definire il seguente parametro, che ci dice se abbiamo più residui carichi o neutri:

$$R = \frac{\sum_K \chi_K}{\sum_J \chi_J} = \frac{\text{carichi}}{\text{neutri}} \frac{\text{polari}}{\text{apolari}} \quad (3.19)$$

La scala migliore si ha con una combinazione lineare di R e H_F :

$$Z = -0.345 R + 0.6 H_F \quad (3.20)$$

Capitolo 4

Lezione 4: 1 aprile 2015

Amminoacidi Perchè avvengano interazioni dal punto di vista biologico e biofisico ci devono essere delle interazioni tra le diverse proteine e le macromolecole e queste interazioni avvengono principalmente attraverso dei processi di legame. Questi legami sono di tipo reversibile, quindi ci sono equilibri di tipo chimico che modificano la forma della proteina e fanno sì che si attivi. I legami chimici fanno partire processi fondamentali come il trasporto dell'ossigeno nel sangue. Un altro esempio di processo di risposta immunitaria: ci sono due diversi tipi di risposta immunitaria, le cellule T (risposta immunitaria cellulare) e cellule B (risposta immunitaria umorale). Esse agiscono riconoscendo il virus o quello che è esterno all'organismo perchè non hanno siti di legame per questi oggetti, oppure li hanno modificati. L'altro processo basato sull'interazione tra proteine è il movimento dei muscoli, che avviene grazie a miosina e lactina: i filamenti delle due proteine scivolano l'uno sull'altro.

Acidi nucleici Gli acidi nucleici si uniscono a formare le catene di DNA e RNA. Le caratteristiche fondamentali di una molecola di DNA sono:

- scheletro esterno fatto di fosfati e di zuccheri.
- eliche, che non sono quasi mai perfettamente simmetriche: presentano zone dove ci sono spazi più grandi e spazi più piccoli, in cui molte molecole con effetti cancerogeni e mutagenici vanno ad infilarsi, disturbando il processo di accoppiamento delle basi.
- le basi si accoppiano nel seguente modo: adenina-timina, citosina-guanina.

Il DNA è l'*acido deossiribonucleico* quindi ha un deossiribosio come zucchero fondamentale, mentre l'RNA ha semplicemente il ribosio.

La **struttura primaria** è data dalla sequenza di basi che formano il filamento del DNA, che per formare la doppia elica deve avere la sua sequenza complementare. La **struttura secondaria** riguarda come si dispongono queste basi quando si sono fatti gli accoppiamenti. Per il DNA l'unica struttura secondaria possibile è l'elica, ma ci sono tipi diversi di elica:

- Elica B: è la più comune, ad avvolgimento destrorso, con i seguenti parametri: gradi di cui si sposta ogni coppia di basi (definisce la lun-

ghezza del gradino) 35.9° e il numero di basi per giro (dà la rapidità della scala) 10.5.

- Elica A: è quella tipica dell'RNA, che non esiste sempre come doppia elica. È un'elica di tipo destrorso con i seguenti parametri: 32.7° e 11.

Quello che cambia di più tra le due eliche è l'inclinazione delle coppie di basi rispetto all'asse principale dell'elica, che sono più inclinate nell'elica A.

Esistono oggetti che possono interagire con gli acidi nucleici ed erano usati una volta in laboratorio di biofisica: per studiare il DNA si utilizzava il **benzopirene** e il **bromuro di etidio** (ora vietato perché cancerogeno e mutageno). Sono i due *intercalanti* del DNA. Il benzopirene è contenuto nel fumo (sigarette, legna,...) ed è un agente mutageno!

Mutageno ha un significato diverso da cancerogeno: cancerogeno interviene su replicazione cellulare, mutageno produce variazioni, ma senza una conseguenza per forza grave.

Il bromuro di etidio è un colorante con eccitazione nell'ultravioletto che viene utilizzato normalmente nel campo della biologia molecolare. Un altro colorante che si usa abbastanza per il DNA cellulare è il DAPI.

La differenza tra RNA e DNA è che la base timina, nell'RNA è sostituita dalla base uracile. Esistono 3 diversi tipi di RNA nell'organismo:

- RNA messaggero: presiede alla sintesi delle proteine.
- RNA ribosomiale: interviene nella struttura dei ribosomi.
- RNA di trasporto: trasduce il segnale all'interno dei ribosomi, che attivano la sintesi delle varie proteine all'interno della cellula.

Dal punto di vista fisico la cosa che più ci interessa sono le *proprietà topologiche* del DNA: la maggior parte del DNA nell'organismo è contenuto nel nucleo in forma molto compatta. Spesso si ha la formazione di DNA o chiusi su se stessi o con estremità bloccate, o perchè interagiscono con la proteina o con altri oggetti. In questo caso si possono introdurre oggetti topologici.

Dal punto di vista topologico interessa quale è la struttura del DNA nella cellula, cioè come sono messi i due filamenti del DNA uno rispetto all'altro? Se abbiamo un oggetto chiuso, questo si può richiudere su se stesso facendo una specie di rotaia, oppure può essere fatto a elica che poi si richiude su se stessa, ma questa elica richiudendosi può avvolgersi su se stessa: i due filamenti che lo costituiscono si possono avvolgere un certo numero di volte e questi avvolgimenti possono ulteriormente incrociarsi. Tutti questi meccanismi vengono descritti da due parametri fondamentali, che danno il cosiddetto **numero di linking**, cioè quante volte una superficie chiusa interseca un'ipotetica superficie chiusa interna ad essa. In figura (4.1) sono riportate le varie situazioni possibili. Il numero di linking è un invariante: una volta che il DNA è chiuso su se stesso la forma complessiva non cambia. Per convenzione il numero di linking è espresso come la somma del numero di *twisting*, cioè giri dell'elica su se stessa e del numero di *writhing*, cioè

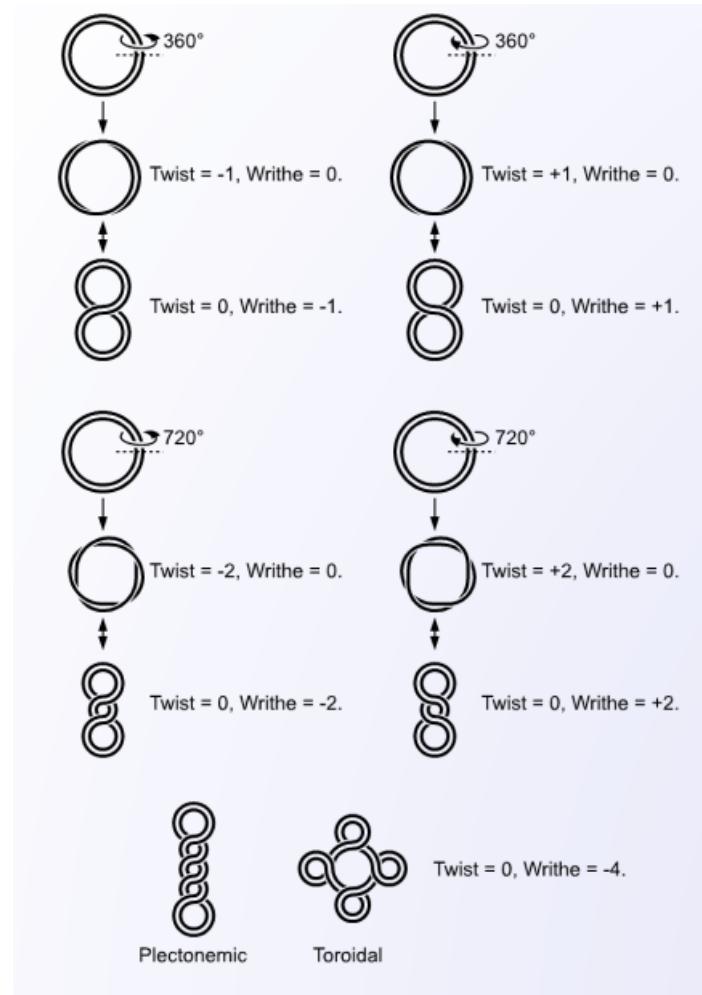


Figura 4.1: possibili avvolgimenti del DNA

attraversamenti (incroci). Questo vale sia per il DNA chiuso su se stesso che per il DNA con estremi fissati:

$$Lk = Tw + Wr \quad (4.1)$$

La struttura non esiste sotto forma di elica perfetta: non sempre i due filamenti si appaiano perfettamente lungo tutta la lunghezza della catena, ma si possono avere molte strutture diverse, con parti a zip aperte, parti a forcina, struttura a croce, ..., come quelle che possiamo vedere riportate in figura (4.2).

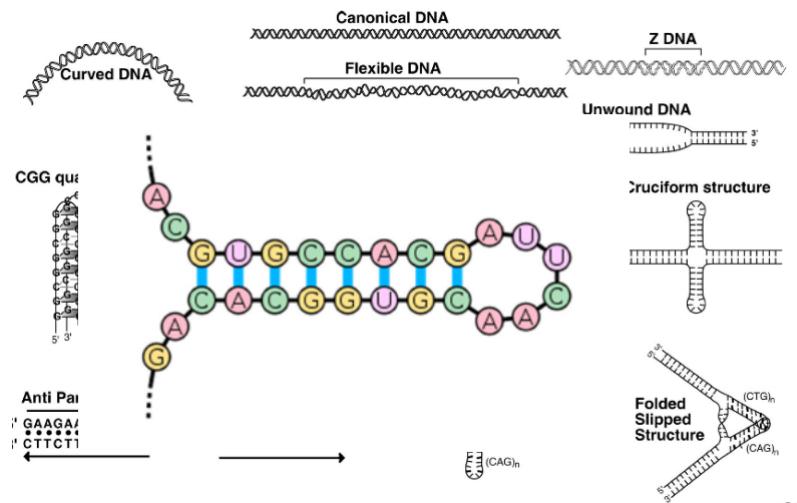


Figura 4.2: varie strutture del DNA

Come si forma una struttura o un'altra e come fa ad avvolgersi su se stesso? Esiste una proteina (enzima), la *topoisomerasi I* che risolve anche i problemi di eccessiva tensione causati dagli attorcigliamenti: si lega attorno a un pezzo di DNA, provoca un taglio in uno dei filamenti, questo permette all'elica di svolgersi, ruotare e raggiungere una configurazione ad energia minore, rilasciando parte della tensione e a quel punto la topoisomerasi ricollega gli strand rotti.

Un'altra forma dell'elica è l'elica Z: è l'unica elica ad avvolgimento sinistro e all'interno dei gradini ha la ripetizione di doppie coppie di basi: il passo fondamentale dell'elica non si dà in termini di singolo accoppiamento, ma in termini di doppi accoppiamenti. Le tre tipologie di eliche sono riportate in figura (4.3).

Alla fine tutto il DNA come si arrotola e a formare le strutture impacchettate? Le proteine fondamentali sono gli **istoni**, che sono degli ottameri, cioè grandi proteine con 8 subunità tutte uguali che si uniscono a formare dei dimeri, che a loro volta si uniscono a formare tetrameri e infine si ha la formazione degli ottameri. non è sequenziale, ma a due a due. Il DNA interagisce con questi istoni legandosi alla superficie esterna della proteina formando una specie di laccio. Gli istoni formano delle strutture ordinate

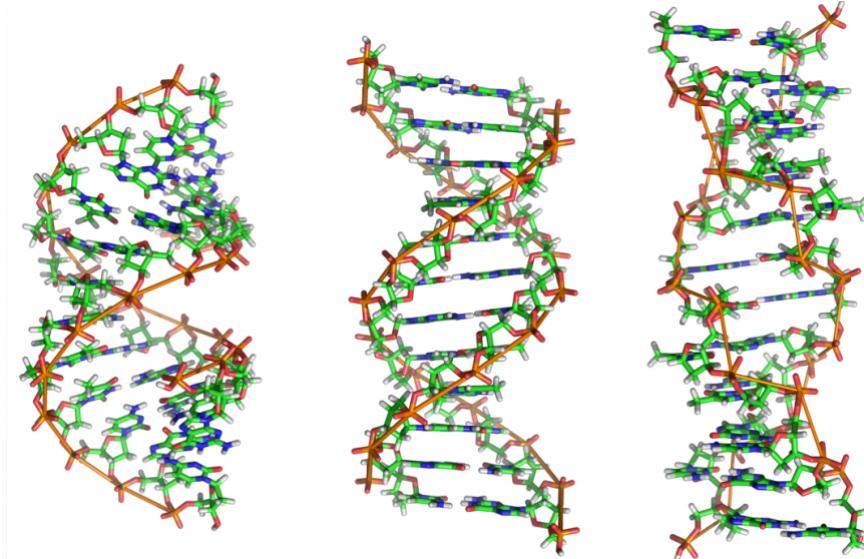


Figura 4.3: nell'ordine: elica A, B e Z

di DNA, chiamate *nucleosomi* e un insieme di nucleosomi si impacchetterà a formare la **cromatina**.

4.1 IL LEGAME

Il problema del legame riguarda l'interazione tra macromolecole (oggetti di grandi dimensioni) che possono legare oggetti più piccoli, chiamati **ligandi** con un equilibrio di tipo fisico: c'è una certa probabilità di avere lo stato legato o lo stato con le due componenti separate, che dipende da delle costanti che dipendono a loro volta dalle condizioni al contorno. La costante di equilibrio di un sistema è data per un processo di associazione:

$$k_{eq} = \frac{k_1}{k_2} = \frac{[ML]}{[M][L]} = K_A \quad (4.2)$$

La costante di dissociazione è legata al processo inverso ed è data da:

$$K_D = \frac{k_2}{k_1} = \frac{[M][L]}{[ML]} = \frac{1}{K_A} \quad (4.3)$$

M indica solo le macromolecole disponibili per il legame, mentre L è il ligando libero in soluzione.

Potendo definire una K , possiamo definire l'energia libera:

$$\Delta G_{leg}^0 = -RT \ln K_D \quad (4.4)$$

La cosa fondamentale è che i ligandi con una K di dissociazione bassa hanno un legame forte, perché hanno una bassa probabilità di separarsi, viceversa i ligandi con una K di dissociazione alta hanno legame debole perché l'equilibrio è spostato verso la dissociazione. Il valore dell'energia libera ha un significato

solo in base allo stato scelto come riferimento, quindi in base a che tipo di unità di misura abbiamo scelto per le concentrazioni. Il parametro fondamentale che si usa descrivendo il legame tra una macromolecola e un ligando è la cosiddetta **saturazione frazionaria**, cioè frazione di macromolecole che hanno un ligando legato rispetto a tutte le macromolecole che si hanno in soluzione:

$$Y = \Theta = \frac{[ML]}{[M_T]} = \frac{[ML]}{[M] + [L]} = \frac{K_A[L]}{1 + K_A[L]} = \frac{[L]}{K_D + [L]} \quad (4.5)$$

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

Le macromolecole totali sono date dalla somma di quelle libere e di quelle legate. È più comodo esprimere la saturazione frazionaria in funzione della costante di dissociazione.

Quando la saturazione frazionaria è uguale a 1/2 si ha in figura (4.4) il grafico per la curva di legame.

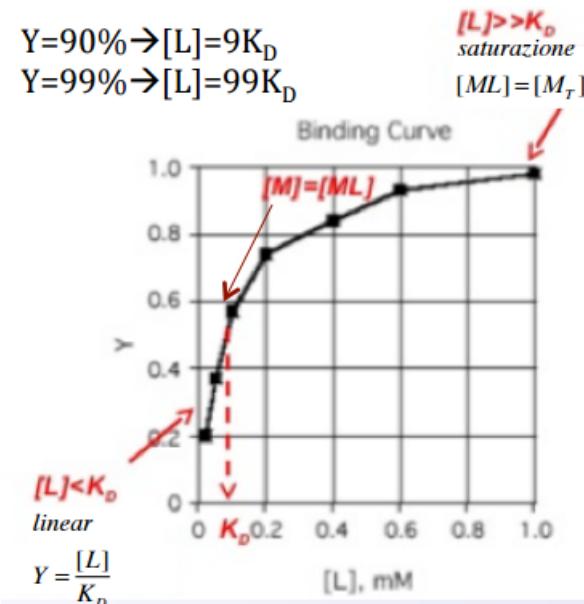


Figura 4.4: *saturazione frazionaria in funzione della concentrazione di ligando libero*

La concentrazione a cui il livello di saturazione è uguale a 1/2 corrisponde alla costante di dissociazione. Guardando dove $Y = 0.5$ trovo K_D . Quando $Y = 1/2$ la concentrazione di macromolecole libere è uguale a quella delle macromolecole con ligando legato. Quando $[L] \ll K_D$ si ha la saturazione minima, al contrario se $[L] \gg K_D$ si raggiunge il valore massimo di saturazione. Possiamo vedere che satura molto lentamente. Questo è un modo per rappresentare il legame con $Y = Y(L)$. Esistono diversi modi per rappresentare il legame:

- concentrazione di ligando legato in funzione della concentrazione del ligando libero, che ha una curva di legame che satura molto lentamente.

Se la esprimo in scala logaritmica ha un andamento sigmoidale: vedo bene la concentrazione di ligando libero esplorabile per studiare il legame e vedo quanto cambiare la concentrazione per ottenere la saturazione. In laboratorio si tiene costante la concentrazione di ligando e si cambia la concentrazione di macromolecola. (Perchè è il modo più efficace???)

- scatchard plot, che dà informazioni sul numero di siti di legame e sulle costanti di legame.
- hill plot, che è legato al problema della cooperatività.

In figura (4.5) sono riportate le curve di legame per i vari metodi.

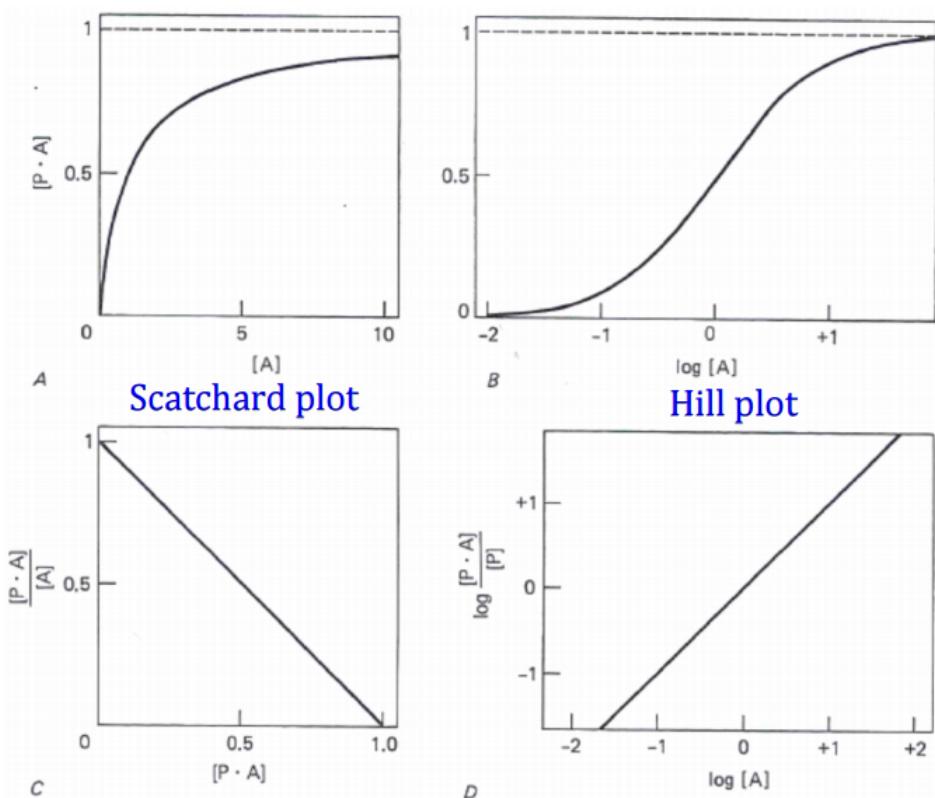


Figura 4.5: *curve di legame*

Tuttavia la situazione è più complicata: non c'è quasi mai solo un sito sulla macromolecola. Il caso più semplice è quello in cui si hanno tanti siti identici e indipendenti, ciascuno con una costante di interazione K . La macromolecola può legare un ligando diventando macromolecola con un oggetto legato, poi può legarne un altro e diventare una macromolecola con due oggetti legati, e così via fino a saturare tutti i siti di legame. Gli M_i sono gli insiemi delle specie microscopiche che hanno i variabile ligandi legati: se abbiamo 4 siti, la specie M_2 è l'insieme delle specie microscopiche che hanno due oggetti legati, che possono essere legati in 6 combinazioni diverse, visto che i siti sono equivalenti. Il numero

di questi oggetti è dato da:

$$\Omega_{n,i} = \frac{n \times (n-1) \times \cdots \times (n-i+1)}{i!} = \frac{n!}{(n-i)!i!} \quad (4.6)$$

Al posto della saturazione frazionaria possiamo considerare il parametro equivalente v :

$$v = \frac{\sum_{i=0}^n i[M_i]}{\sum_{i=0}^n [M_i]} \quad (4.7)$$

che esprime le moli di ligando legato per moli di macromolecola.

Quando però abbiamo a che fare con gli esperimenti, è più comodo esprimere questo oggetto in funzione di $[L]$. Per fare questo differenziamo due costanti:

Costante di associazione macroscopica (K), è quella che ragiona tra specie, cioè è quella associata ai processi visti prima: alla macromolecola senza legami lego un oggetto, ho un equilibrio, poi ne lego un altro e ho un altro equilibrio e così via. Ciascuna delle concentrazioni delle specie con i oggetti legati la possiamo esprimere in funzione della costante di associazione macroscopica relativa a questo legame. Ma si ha ancora una dipendenza da i :

$$[M_i] = \frac{[M_{i-1}][L]}{K_i} = \frac{[M_0][L]^i}{\prod_{j=1}^i K_j} \quad (4.8)$$

Ma K non tiene conto di quale delle configurazioni verrà poi scelta. Va quindi legata alla costante di associazione microscopica.

Costante di associazione microscopica (k), che riguarda riguarda il legame tutte le volte che aggiungo un ligando. Si riferisce all'aggiunta, al legame ulteriore di un singolo ligando, indipendentemente dal tipo di configurazione. Si riferisce al processo di legame.

La relazione tra K e k è data da:

$$K = \frac{\Omega_{n,i-1}}{\Omega_{n,i}} k \quad (4.9)$$

Sostituendo questa relazione nella formula (4.8), otteniamo:

$$[M_i] = [M_{i-1}] \frac{n-i+1}{i} \frac{[L]}{k} = [M_0] \left\{ \prod_{j=1}^i \frac{(n-j+1)}{j} \right\} \left(\frac{[L]}{k} \right)^i \quad (4.10)$$

Possiamo riscrivere il parametro v nel seguente modo, tenendo conto delle seguenti uguaglianze:

$$\begin{aligned}\Omega_{n,i} &= \frac{n!}{(n-i)!i!} = \left\{ \prod_{j=1}^i \frac{(n-j+1)}{j} \right\} \\ 1 + \sum_{i=1}^n \frac{n!}{(n-i)!i!} \left(\frac{[L]}{k} \right)^i &= \left[1 + \frac{[L]}{k} \right]^n \\ n \frac{[L]}{k} \left[1 + \frac{[L]}{k} \right]^{n-1} &= \sum_{i=1}^n i \frac{n!}{(n-i)!i!} \left(\frac{[L]}{k} \right)^i \\ \implies v &= \frac{\sum_{i=1}^n \left\{ \prod_{j=1}^i \frac{(n-j+1)}{j} \right\} \left(\frac{[L]}{k} \right)^i}{1 + \sum_{i=1}^n \left\{ \prod_{j=1}^i \frac{(n-j+1)}{j} \right\} \left(\frac{[L]}{k} \right)^i} = \frac{n \frac{[L]}{k}}{1 + \frac{[L]}{k}} \quad (4.11)\end{aligned}$$

La saturazione frazionaria si può scrivere in funzione della costante microscopica e del numero di siti di legame. La possiamo rappresentare in uno scatchard plot, che rappresenta la frazione di ligandi legati, divisa per la concentrazione di libero: è una retta (riportata in figura (4.6)) in funzione della saturazione:

$$\frac{v}{[L]} = \frac{n}{k} - \frac{v}{k} \quad (4.12)$$

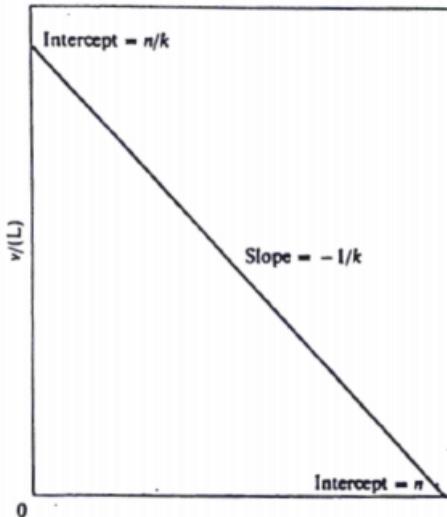


Figure 15-1
Scatchard plot for identical, independent binding sites.

Figura 4.6: scatchard plot

Lo scatchard plot è un modo strano per rappresentare il legame, perché ho un parametro in funzione di se stesso, inoltre richiede una certa elaborazione dei dati, perchè richiede la conoscenza della concentrazione di oggetto libero. O

c'è un modo sperimentale per conoscerla o bisogna fare una serie di assunzioni successive: si può ipotizzare una k e vedere se è la stessa che troviamo nella pendenza e nell'intercetta.

È comunque utile perché se invece di avere solo un tipo di siti di legame, ci sono più classi di siti identici e indipendenti tra di loro, allora possiamo scrivere le stesse equazioni sommando i contributi uguali. La cosa interessante è che il grafico di scatchard non è più una retta ma aumenta la pendenza verso l'alto. È utile per capire qual è la situazione generale sulla macromolecola: ci sono più tipi di legame? In realtà la situazione è più complicata: potrebbero esserci n siti identici, che però interagiscono tra di loro. Questo significa che la costante di associazione è funzione del grado di saturazione: nel legame di un oggetto facilita o inibisce il legame dei successivi.

In questo caso possiamo scrivere:

$$\Delta G^0 = \Delta G_0^0 + RT\phi(v) \implies k(v) = k_0 e^{-\phi(v)} \quad (4.13)$$

La cosa più generale che possiamo dire è che la variazione di energia libera sarà data dal termine che ho quando niente è legato, più un termine lineare con una certa funzione che, quando il grado di saturazione è nullo si annulla: $\phi(v) = 0$ quando $v = 0$. Questo significa prendere un andamento esponenziale per la costante microscopica. Anche in questo caso possiamo fare uno scatchard, dove la k non è più una costante, ma è una quantità che cambia con il grado di saturazione:

$$\frac{v}{[L]} = \frac{n}{k(v)} - \frac{v}{k(v)} \quad (4.14)$$

Quello che si osserva, in figura (4.7) è che se questa funzione è decrescente, l'esponenziale della funzione decrescente è una funzione crescente e questo significa che la costante di dissociazione cresce, quindi il legame è sfavorito man mano che si aumenta: questo ci dà una curvatura verso l'alto. Se troviamo uno scatchard con una curvatura verso l'alto non sappiamo dire se ci sono più siti indipendenti o più siti interagenti con una funzione decrescente.

La cosa che sicuramente possiamo dire però è che se la funzione è crescente e quindi la costante di dissociazione diminuisce con il legame e quindi col procedere del legame aumenta l'affinità per i ligandi, la curva va nell'altro modo. Questo tipo di curva è indicativo del fenomeno della **cooperatività**, fenomeno fondamentale perché ad esempio regola l'associazione dell'ossigeno all'emoglobina. La cooperatività è quel processo per cui il legame di un oggetto facilita il legame dei successivi, l'**inibizione** è il processo inverso.

Cosa si utilizza per descrivere la cooperatività? esiste un modello, chiamato *modello semi-empirico di Hill*, che parte da un'assunzione: in una parte della curva di saturazione, dove c'è il massimo di cooperatività del sistema, posso descrivere l'andamento del legame con delle funzioni simili a quelle ottenute per un sistema *all or none*, cioè un sistema con cooperatività infinita, in cui se si lega un oggetto la costante aumenta talmente tanto che si legano tutti gli altri che si possono legare. Per un sistema all or none non ci sono specie intermedie, si passa da zero oggetti legati a n oggetti legati e quindi la costante ha questa espressione:

$$K^n = \frac{[M_0][L]^n}{[M_n]} \quad (4.15)$$

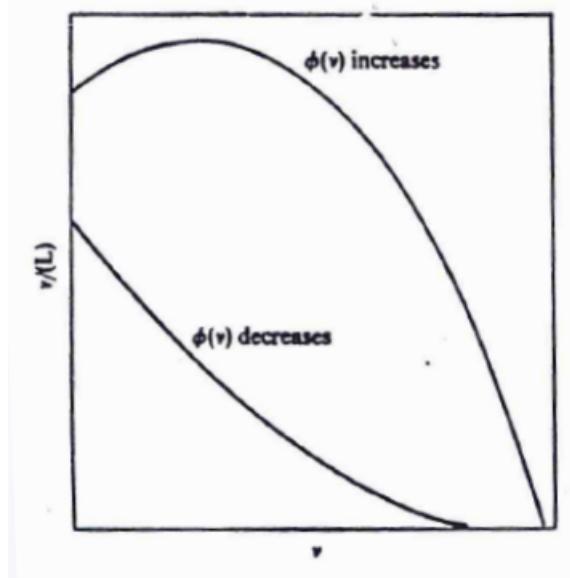


Figura 4.7: cooperatività

Per non avere dipendenza dal numero di siti si definisce la saturazione frazionaria:

$$\bar{y} = \frac{v}{n} = \frac{[L]^n / K^n}{1 + [L]^n / K^n} \quad (4.16)$$

L'assunzione di Hill è dire che in un buon range del legame posso esprimere le moli di ligando legato o la saturazione frazionaria in funzione di un altro coefficiente, con la stessa espressione, dove al posto che n metto il coefficiente di Hill, o costante di Hill α_H , che assume un valore variabile da 1 a n a seconda del grado di cooperatività del sistema. Se $n = 1$ i siti sono tra loro indipendenti, se $\alpha_H = n$ si ha cooperatività infinita. In principio potremmo avere anche degli esponenti negativi, che corrispondono al caso di anticooperatività.

La saturazione frazionaria assume questa forma:

$$\bar{y} = \frac{[L]^{\alpha_H} / K^{\alpha_H}}{1 + [L]^{\alpha_H} / K^{\alpha_H}} \quad (4.17)$$

Nel caso di coefficiente pari a 1 si ha l'andamento iperbolico, man mano che aumenta il valore di α_H , aumenta l'andamento di tipo sigmoidale. La sigmoide è molto caratteristica: significa che non succede nulla per un periodo, poi c'è un intervallo in cui succede tutto, poi nuovamente nulla. L'ampiezza di questo intervallo ci dice il grado di cooperatività del sistema: in un sistema a cooperatività infinita l'intervallo è praticamente nullo. La pendenza della retta è il grado di cooperatività: più è dritta più è alto il grado di cooperatività. Quanto detto è riportato nel grafico in figura (4.8).

Come ricavo il parametro di Hill una volta che abbiamo a disposizione l'espressione analitica della curva?

$$\frac{\bar{y}}{1 - \bar{y}} = \frac{[L]^{\alpha_H}}{K^{\alpha_H}} \implies \alpha_H = \frac{d \{ \ln [\bar{y} / (1 - \bar{y})] \}}{d \{ \ln [L] \}} \quad (4.18)$$

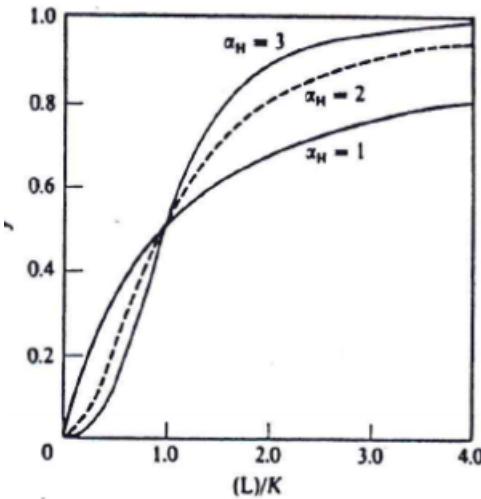


Figura 4.8: *modello di Hill*

Il problema è che l'equazione in generale non fitta i dati in maniera esatta in tutto l'intervallo di legame perché il valore della cooperatività è spesso funzione del grado di saturazione. In generale si definisce il parametro di Hill corrispondente alla concentrazione relativa alla saturazione di $1/2$. La costante di Hill in questo modo si può ricavare direttamente dalla pendenza del grafico, chiamato **plot di Hill**.

$$\frac{\alpha_{H,1/2}}{[L]_{1/2}} = \left. \frac{d\{\bar{y}/(1-\bar{y})\}}{d\{[L]\}} \right|_{\bar{y}=1/2} \quad (4.19)$$

Dalla pendenza ricaviamo la costante di Hill, mentre dall'intercetta la costante di interazione. In generale si ha:

- $[L]$ basso: il sistema non è cooperativo perché quasi tutte le macromolecole non hanno nulla di legato e quindi si può estrapolare la K di legame del primo oggetto legato, perché c'è equilibrio tra $[M_0]$ e $[M_1]$.
- $[L]$ alto: il sistema non è cooperativo perché la concentrazione è spostata tutta dall'altra parte, verso la specie con tutti gli oggetti legati, e quindi si può estrarre la costante di legame dell'ultimo oggetto legato, perché c'è equilibrio tra $[M_{n-1}]$ e $[M_n]$.

Il plot di Hill descrive l'interazione, ma nella parte centrale. Lo scatchard è dato da:

$$\frac{v}{[L]} = \frac{n[L]^{\alpha_H-1}/K^{\alpha_H}}{1 + [L]^{\alpha_H-1}/K^{\alpha_H}} \quad (4.20)$$

$$K^{\alpha_H} = \frac{[L]^{\alpha_H} \{n[M]_0 - [L]_b\}}{[L]_b} \quad (4.21)$$

dove $[L]_b$ è la concentrazione di ligandi già legati. Graficamente lo scatchard è riportato in figura (4.9), in cui possiamo vedere che ha un andamento a cupola: va a zero quando la saturazione è nulla e quando si sono saturati gli n siti

disponibili, ha un massimo, la cui ascissa è legata al valore della costante di Hill. Si può quindi scegliere se plottare la saturazione frazionaria oppure fare il grafico di scatchard.

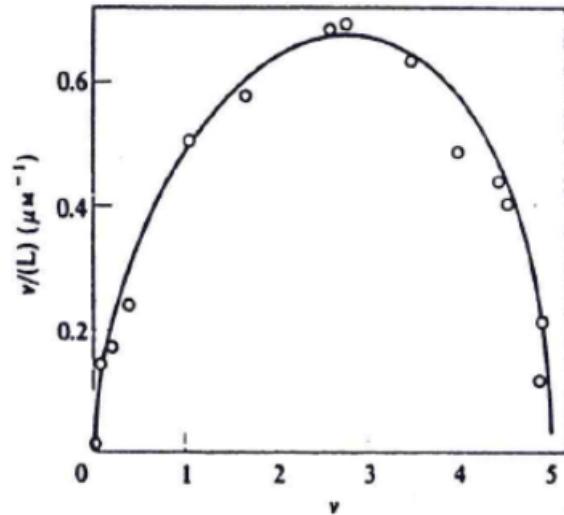


Figura 4.9: *scatchard plot*

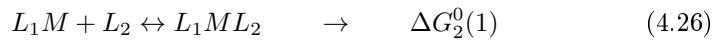
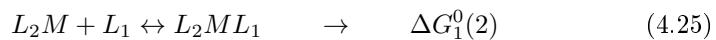
Un altro modo per scrivere sempre le stesse cose:

$$\ln[L] = -\left(\frac{1}{\alpha_H}\right) \ln \left[\left(\frac{n}{v} \right) - 1 \right] + \ln K \quad (4.22)$$

Si ottiene così sempre una retta con pendenza legata al coefficiente di Hill e intercetta $\ln K$.

La cosa importante è che non essendo una saturazione frazionaria, dipende dal numero di siti totali presenti sulla proteina. n è un dato che noi abbiamo estrapolato dall'andamento del grafico di scatchard e quindi associare questo tipo di analisi al grafico di scatchard permette di fare un doppio check!

Dal punto di vista energetico il fatto che esista una cooperatività positiva o negativa significa che c'è interazione tra siti, che altera energia di legame: il legame dei due oggetti separatamente non è la stessa cosa del legame dei due oggetti legati alla proteina. Supponiamo di avere una proteina con due ligandi diversi, L_1 e L_2 , che si possono legare in posti diversi. Ciascun ligando avrà la sua energia libera di legame e si avrà un'energia libera nel legare il ligando L_1 quando L_2 è già legato, e viceversa:



La somma dei due passaggi deve essere uguale, perchè arrivo sempre ad uno stato in cui entrambi i ligandi sono legati:

$$\Delta G_1^0 + \Delta G_2^0(1) = \Delta G_2^0 + \Delta G_1^0(2) = \Delta G^0(1, 2) \quad (4.27)$$

Il fatto di avere un'interazione fa sì che ci sia una differenza di energie libere tra l'energia libera del sistema con entrambi i ligandi legati, e la somma delle energie libere di legame dei due separatamente:

$$\Delta G_{12}^0 = \Delta G^0(1, 2) - \Delta G_1^0 - \Delta G_2^0 \quad (4.28)$$

Se $\Delta G_{12}^0 = 0$ allora siamo in condizione di equilibrio, non c'è interazione: legarli separatamente o legarli quando uno è già legato è la stessa cosa. Se invece $\Delta G_{12}^0 < 0$ il sistema è favorito e c'è cooperatività, se invece $\Delta G_{12}^0 > 0$ il legame è sfavorito. L'energia libera di accoppiamento determina il tipo di interazione tra i siti di una proteina.

Se consideriamo gli equilibri separatamente, per ciascuno possiamo scrivere l'espressione della saturazione frazionaria:

$$\bar{y}_1 = \frac{\{[L_2 M L_1] + [M L_1]\}}{[M]_T} \quad (4.29)$$

$$\bar{y}_2 = \frac{\{[L_2 M L_1] + [L_2 M]\}}{[M]_T} \quad (4.30)$$

$$\bar{y}_{12} = \frac{[L_2 M L_1]}{[M]_T} \quad (4.31)$$

Gli oggetti di tipo 1 legati li posso avere da soli o insieme a L_2 , lo stesso per gli oggetti di tipo 2. Per gli oggetti con legati L_1 e L_2 invece ho una sola configurazione possibile.

Invece di considerare una reazione sequenziale una *reazione di sproporzionamento*: supponiamo di avere le due specie: quella con legato L_1 e quella con legato L_2 e andiamo a valutare l'equilibrio di ogni specie con il sistema in cui si ha la macromolecola da sola e quella con tutti e due gli oggetti legati:



L'energia libera di questo tipo di trasformazione corrisponde all'energia libera di accoppiamento riportata nella formula (4.28). Possiamo definire la costante in questo modo:

$$K_{12} = e^{-\Delta G_{12}^0/RT} = \frac{[M][L_2 M L_1]}{[M L_1][L_2 M]} \quad (4.33)$$

$$y_1 = y_2 = \frac{1}{2} \quad \Rightarrow \quad K_{12} = \frac{\bar{y}_{12}^2}{\left[\frac{1}{2} - \bar{y}_{12}\right]^2} \quad (4.34)$$

Arriviamo quindi a questa espressione per l'energia libera:

$$\Delta G_{12}^0 = -2RT \ln \left(\frac{\bar{y}_{12}^2}{\left[\frac{1}{2} - \bar{y}_{12}\right]^2} \right) \quad (4.35)$$

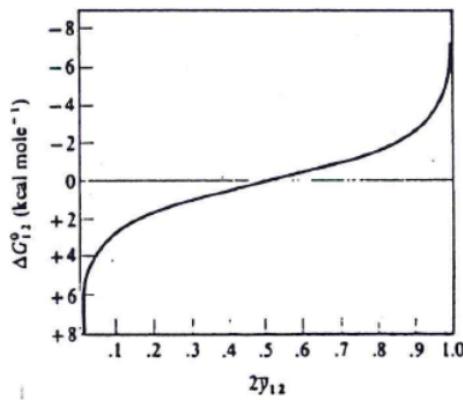


Figura 4.10: *energia libera*

La prima cosa che osserviamo nel grafico in figura (4.10) sono le scale delle energie. Se $2y_{12} = 1$ allora l'unica forma legata è quella che ha due oggetti legati, se $2y_{12} = 0$ esistono solo le forme legate singolarmente. Se $2y_{12} = 0.5$ invece si ha $\Delta G^0 = 0$ e quindi non c'è accoppiamento.

L'altra cosa importante da notare è che queste energie sono molto basse: bastano energie piccole per spostarsi verso il doppio legame.

L'esistenza dell'accoppiamento è alla base del funzionamento delle proteine **allosteriche**: l'effetto allosterico è quando le caratteristiche di legame di un certo oggetto vengono alterate dal legame. L'effetto allosterico può essere:

- omotropico: quando è il legame di un oggetto che cambia l'affinità per il legame di altri oggetti dello stesso tipo.
- eterotropico: il legame cambia l'affinità per altri tipi di legami.

L'effetto allosterico è alla base del funzionamento degli enzimi, che hanno in generale un sito regolatore, dove si lega l'oggetto che dà l'effetto allosterico e un sito catalitico, in cui si lega il ligando primario che fa fare la funzione principale alla proteina. Tipicamente si lega prima un oggetto nel sito regolatore, cambia la conformazione della proteina rendendo più favorevole il legame con il ligando primario, e a quel punto parte l'azione catalitica, perché aumenta l'affinità. Se non c'è però l'oggetto che si lega nel sito regolatore, l'affinità potrebbe essere bassissima e non parte l'attività catalitica. È questo che è alla base della trasmissione del segnale.

Se ci sono più siti di legame in macromolecole dello stesso tipo allora allosterico significa cooperativo: se favorisce si chiama *attivatore*, *inibitore* se inibisce.

In generale vuol dire che c'è un equilibrio tra due tipi di forme della macromolecola:

- T o tesa: ha bassa affinità per il ligando primario.
- R o rilassata: ha alta affinità per il ligando primario.

Quando si hanno più siti di legame non è detto che l'attivazione sia immediata per tutti i siti, ma attivazione può avvenire secondo due modelli:

- Modello di **Monod-Wyman-Changeux** (MWC), prevede una transizione all'unisono: a un certo punto cambia drasticamente il valore della costante, quindi l'equilibrio si sposta in maniera significativa da una forma all'altra.
- Modello di **Koshland** (KFN), prevede una transizione sequenziale: ogni volta che c'è un legame il pezzettino di molecola coinvolta nel legame cambia la sua conformazione.

Capitolo 5

Lezione 5: 14 Aprile 2015

5.1 L'EMOGLOBINA

Riprendiamo dal legame: l'esempio fondamentale per la vita è quello dell'**emoglobina**, la proteina che lega l'ossigeno e lo trasporta e rilascia nell'organismo. Il punto fondamentale dell'emoglobina è l'esistenza dell'anello eterociclico, costituito a sua volta da 4 anelli, al centro del quale si ha l'atomo di ferro in stato di coniugazione. La sua struttura è riportata in figura (5.1).

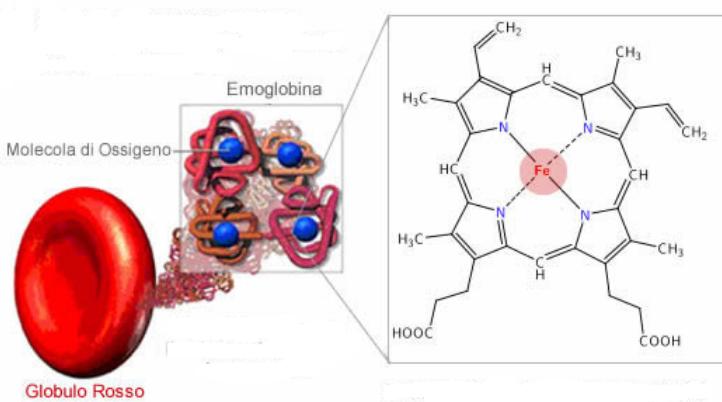


Figura 5.1: struttura dell'emoglobina

Il gruppo eme caratterizza tutte le proteine in grado di trasportare ossigeno: non c'è solo l'emoglobina, ma anche la mioglobina, la differenza fondamentale tra queste proteine è il tipo di legame che hanno con l'ossigeno. Il comportamento dell'emoglobina è di tipo cooperativo (il legame con il primo ossigeno facilita i legami successivi), il comportamento della mioglobina invece non è cooperativo. Il legame di tipo cooperativo dell'emoglobina è molto importante dal punto di vista del funzionamento dell'organismo perché permette di avere un rilascio molto sensibile dei ligandi.

Dal punto di vista strutturale l'emoglobina è tetramerica, cioè formata da 4 catene uguali, e quindi ha 4 siti di legame per l'ossigeno.

Perchè il legame è di tipo cooperativo? Perchè il legame con il ferro provoca un cambiamento conformazionale: c'è uno spostamento di un residuo che è nelle vicinanze del sito di legame, e in questo modo si facilita l'accesso dell'ossigeno al ferro nei siti che non sono occupati e questo aumenta la costante di legame della proteina, cioè aumenta l'affinità. Il legame dell'emoglobina con il ferro è allosterico di tipo omotropico: il legame provoca un cambiamento conformazionale e gli altri legami sono dello stesso tipo.

Per l'interazione allosterica è basilare l'esistenza di due conformazioni in equilibrio tra di loro: una che ha una bassa affinità e una che ha un'alta affinità. Il cambiamento dalla forma che lega meno a quella che lega di più può avvenire all'unisono o in modo sequenziale. Le due conformazioni dell'emoglobina sono l'emoglobina ossigenata e quella deossigenata.

Il piccolo cambiamento del legame cambia molto le caratteristiche spettroscopiche. Lo spettro di assorbimento è anche il modo sperimentale per osservare questa trasformazione. Questo permette di misurare la percentuale di ossigeno nel sangue, cioè il livello di ossigenazione del sangue: uno dei modi per misurarla è usare la spettroscopia e valutare il rapporto tra i picchi di assorbimento dei grafici in figura (5.2).

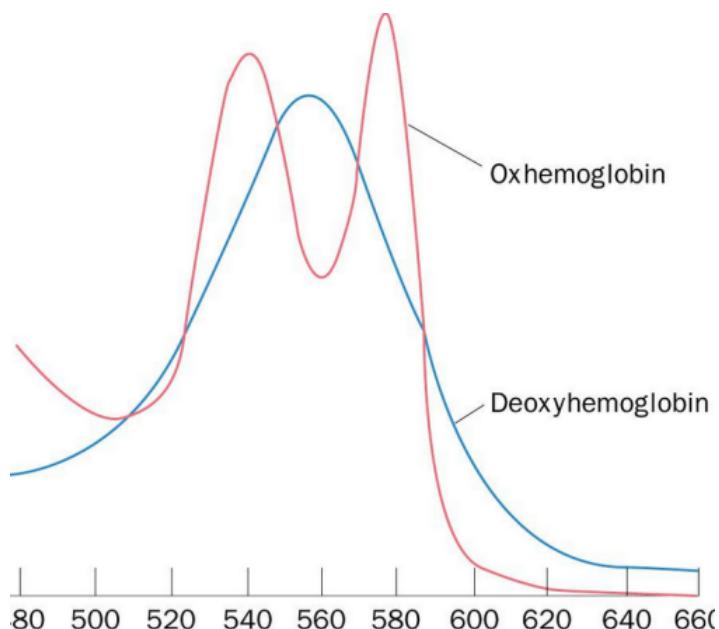


Figura 5.2: spettri di assorbimento di ossiemoglobina e deossiemoglobina

Ci sono delle condizioni esterne, a parte il legame, che favoriscono una conformazione rispetto all'altra. La conformazione R è quella stabilizzata dalla presenza di ossigeno e ha una maggiore affinità con l'ossigeno, mentre la conformazione T ha una bassa affinità con l'ossigeno. Questo significa che quando la proteina è in conformazione R ha le molecole di ossigeno legate, quando è in conformazione T invece l'ossigeno viene rilasciato, quindi ci aspettiamo che nei polmoni dove dobbiamo prendere l'ossigeno, l'emoglobina sia in conformazione R, mentre nei

tessuti devono essere in conformazione T per rilasciare l'ossigeno.

Cosa governa la transizione da uno stato all'altro? Il parametro che più ci interessa è la **pressione dell'ossigeno**. Gli altri parametri e la rappresentazione delle due conformazioni sono riportati in figura (5.3).

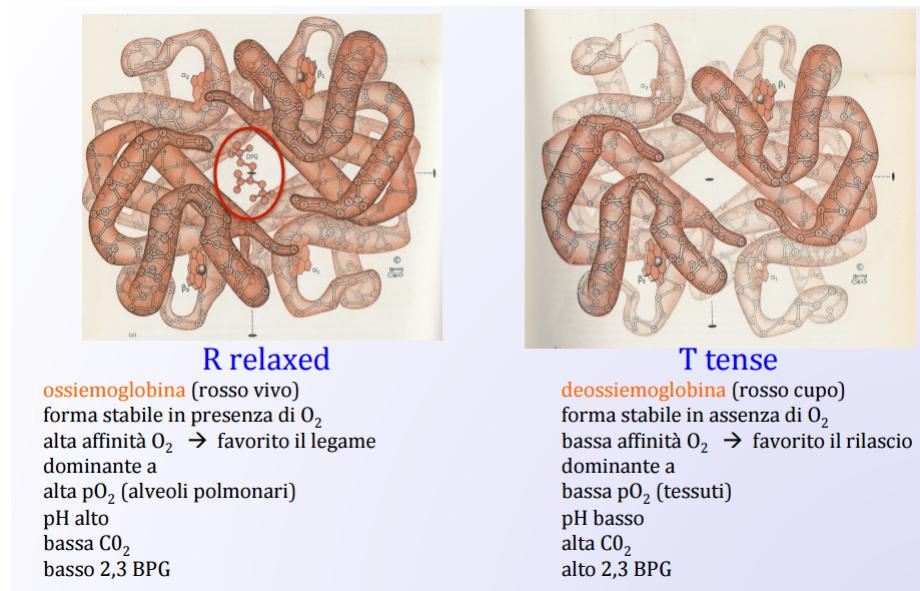


Figura 5.3: parametri che governano la transizione tra le due conformazioni dell'emoglobina

Quando siamo in presenza di alta pressione dell'ossigeno (alveoli polmonari) è favorita la conformazione R, quindi viene catturato l'ossigeno, mentre nei tessuti si ha una bassa pressione relativa dell'ossigeno quindi l'emoglobina è in conformazione T e si ha il rilascio. L'emoglobina che non dobbiamo avere nel sangue è la *metaemoglobina* in cui il ferro si trova nello stato di ossidazione Fe^{3+} , che non lega l'ossigeno: questo è un problema per le persone che sono affette da favismo.

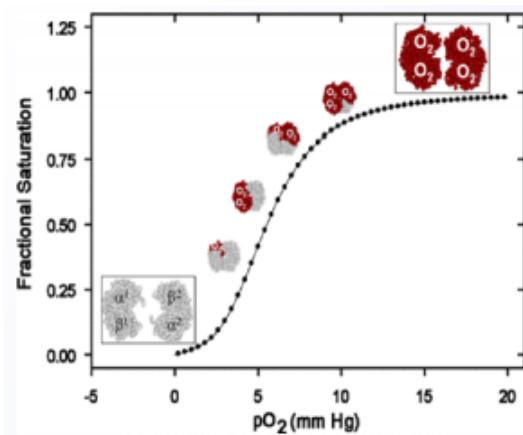


Figura 5.4: curva di rilascio dell'emoglobina

Tutto questo viene rappresentato con una curva di rilascio che riporta la saturazione frazionaria, cioè il numero di siti occupati, in funzione del parametro che stiamo guardando (solitamente la pressione di ossigeno). La curva è riportata in figura (5.4): quando vale 1 tutti e quattro i siti sono occupati. La curva è abbastanza pendente e ad altre pressioni dell'ossigeno va a plateau e ha una graduale diminuzione per pressioni più basse che permette di avere un graduale rilascio di ossigeno nelle varie zone del corpo. La zona ad alto legame è nelle arterie, mentre nelle vene l'affinità per l'ossigeno è più bassa, quindi il sangue arterioso è più ossigenato di quello venoso. Il sangue blu è caratterizzato da emoglobina che non può legare.

Come possiamo vedere in figura (5.5), rispetto alla mioglobina che ha una curva classica, l'emoglobina ha un andamento più sigmoidale e si può caratterizzare con un valore della costante di Hill, basato sull'assunzione che il legame fosse di tipo all or none. Questo però non è vero in tutto l'intervallo della transizione, quindi il valore della costante di Hill non è costante, sempre lo stesso, ma cambia nelle zone dell'intervallo di legame, con l'andamento riportato in figura (5.5). Il valore della costante di Hill si da per valore della saturazione frazionaria uguale a 1/2, e qui la costante vale 2.5: il massimo valore che possiamo aspettarci per l'emoglobina, avendo quattro siti di legame, è 4, quindi 2.5 significa che è più cooperativo che non.

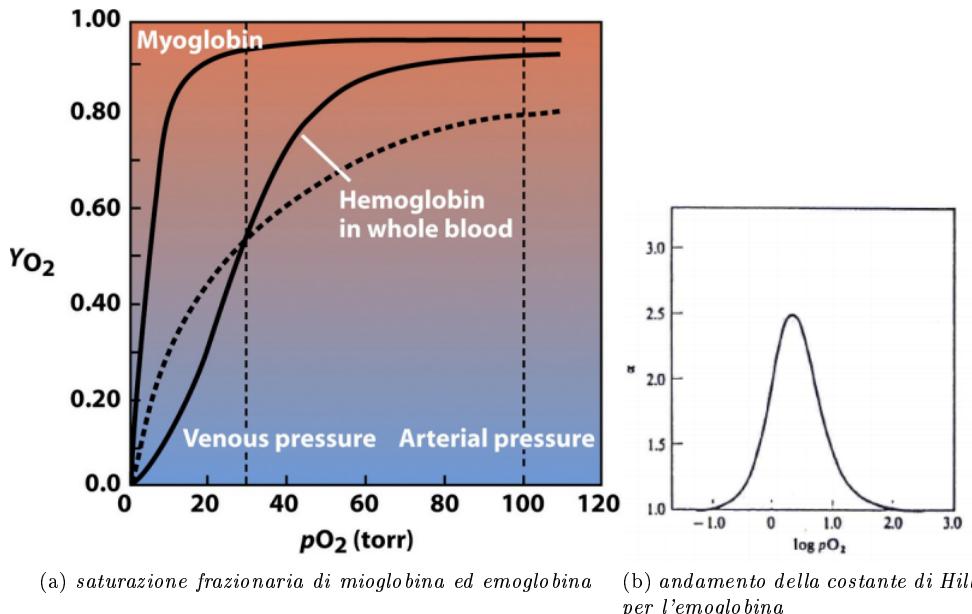


Figura 5.5: andamento dell'emoglobina e costante di Hill

I muscoli hanno delle pressioni parziali di ossigeno che variano tra 20 e 40 mm-Hg a seconda che siano in condizione di riposo o nello stato di lavoro: a riposo l'emoglobina rilascia più ossigeno, mentre la fase di lavoro prevede cattura dell'ossigeno.

Tutti questi fattori che spostano la curva di rilascio dell'emoglobina sono detti **effettori**. In particolare sono effettori positivi quelli che spostano la curva verso sinistra (aumentano la zona di assorbimento dell'ossigeno), negativi quelli che la spostano verso destra. Si ragiona dal punto di vista dell'interazione con l'ossigeno: se ragionassimo dal punto di vista dei tessuti dovremmo invertire i casi. Uno dei due effettori più interessanti è quello legato alla produzione di CO_2 , che diminuisce il pH e quindi rende difficile il legame con ossigeno. Questo implica che sia un effettore negativo. L'altro caso è legato a una molecola che è contenuta nei globuli rossi, il *difosfoglicerato*, legato a quanto siamo ad alta quota: questa molecola ha un legame preferenziale con la forma T delle proteine, sposta la curva verso sinistra. Stando tanto tempo ad alta quota si abituano i muscoli a lavorare in presenza di meno ossigeno, aumentando l'efficienza, all'inizio però la sensazione è quella di mancanza del respiro (ipossia). Il corpo reagisce alla sensazione di ipossia cambiando la concentrazione di difosfoglicerato.

L'emoglobina fetale: l'emoglobina del feto, che acquisisce nutrimento e ossigeno dalla placenta della madre, non può avere la stessa affinità di legame con l'ossigeno di quella della madre: a parità di pressione deve mostrare maggiore affinità di legame.

Vogliamo descrivere dal punto di vista fisico cosa succede al legame dell'emoglobina: se suppongo che i 4 siti siano identici e indipendenti (cioè hanno la stessa costante di interazione microscopica), semplicemente per fattore statistico sul valore delle K macroscopiche troveremmo un effetto di anticooperatività:

$$K_i = \frac{\Omega_{n,i-1}}{\Omega_{n,i}} k \quad (5.1)$$

$$K_1 = \frac{1}{4}k \quad K_2 = \frac{2}{3}k \quad K_3 = \frac{3}{2}k \quad K_4 = 4k \quad (5.2)$$

$$\implies K_1 < K_2 < K_3 < K_4 \quad (5.3)$$

Se la costante microscopica k è sempre la stessa, la K di dissociazione cresce con i legami. Per avere cooperatività bisogna intervenire sulle costanti microscopiche e quindi avere siti non indipendenti, cioè devono mostrare maggiore affinità. Dobbiamo girare la catena intervenendo sulle k microscopiche:

$$4K_1 > \frac{3}{2}K_3 > \frac{2}{3}K_2 > \frac{1}{4}K_1 \quad (5.4)$$

Possiamo definire una variazione intrinseca dell'energia libera dovuta all'effetto statistico e all'effetto di anticooperatività e consideriamo la differenza tra la variazione di energia libera di legame apparente ($\Delta G_i^0 = RT \ln K_i$), che è quella che si osserva dalla K macroscopica, e il contributo dato all'anticooperatività apparente:

$$\Delta \bar{G}_i^0 = RT \ln K_i - RT \ln \frac{\Omega_{n,i-1}}{\Omega_{n,i}} k \quad (5.5)$$

Per capire se un'interazione è cooperativa o meno bisogna vedere quanto è la differenza di energia libera tra il ligando i -esimo e j -esimo, con $j > i$: se negativa significa che il legame del secondo era favorito e quindi il sistema è cooperativo, se è positiva il secondo legame era sfavorito e quindi il legame è anticooperativo. Questa differenza è data da:

$$\Delta G_{I,ij} = \Delta \bar{G}_j^0 - \Delta \bar{G}_i^0 = -RT \ln \frac{K_i}{K_j} + RT \ln \frac{\Omega_{n,i-1}/\Omega_{n,i}}{\Omega_{n,j-1}/\Omega_{n,j}} \quad (5.6)$$

Se la differenza è nulla significa che i due oggetti sono indipendenti. Questo vale solo per situazioni in cui siano presenti più siti di legame. Nel caso dell'emoglobina la variazione di energia libera tra l'energia libera relativa al legame tra il primo ligando e il quarto ligando (le due situazioni estreme) è:

$$\Delta G_{I,14}^{emo} = -2.1 \text{ kCal/(moli - sito)} \quad (5.7)$$

5.2 SPETTROSCOPIA DI ASSORBIMENTO UV-VIS

Parliamo di assorbimento di radiazione nell'intervallo UV-Visibile: andiamo a studiare l'interazione della radiazione elettromagnetica con la materia a seconda dell'energia della radiazione. La luce caratterizzata da **frequenza** e **lunghezza d'onda** (che ci interessa di più dal punto di vista sperimentale). L'intervallo UV-VIS è costituito da: UV (ultravioletto) va dai 150 nm ai 350 nm, il VIS (visibile) 350-700 nm, sopra i 700 nm è vicino infrarosso, sopra i 1000 nm infrarosso.

Il visibile ha un angolo di dispersione, come possiamo vedere in figura (5.6), dovuto al fatto che lunghezze d'onda diverse nel prisma vedono indici di rifrazione diversi e quindi si propagano con velocità diverse.

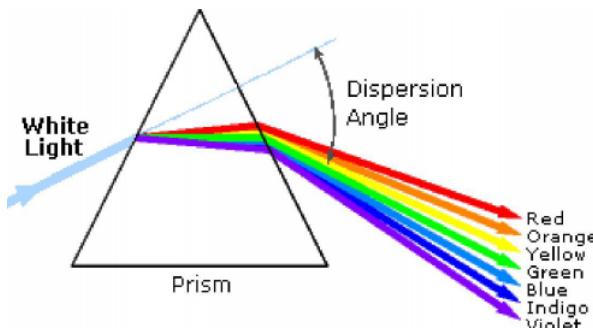


Figura 5.6: *angolo di dispersione*

Fare spettroscopia significa prendere un campione che contiene gli atomi e le molecole che vogliamo misurare e farne lo spettro, cioè misurare l'intensità del parametro (radiazione) assorbita o emessa, in funzione o della frequenza o della lunghezza d'onda. L'oggetto che fa lo spettro si chiama *spettrometro*. Possiamo fare spettroscopia o di assorbimento o di emissione. Esiste anche una spettroscopia che lavora nell'IR.

L'emissione è più interessante: l'assorbimento è un processo semi istantaneo (dell'ordine dei femtosecondi), quindi le molecole sono sostanzialmente immobili, l'emissione invece si basa sulla disegcitazione radiativa dai livelli più alti, ma i livelli più alti vengono occupati per più tempo, in cui possono succedere varie cose che hanno un effetto sull'emissione.

L'interazione radiazione-materia consiste nella radiazione elettromagnetica che interagisce con le cariche che compongono la materia, ma dal momento che le energie in gioco sono diverse si possono trattare separatamente le interazioni ottiche-elettroniche e quelle magnetiche, facendo separatamente *spettroscopia ottica* o magnetica (qui in Bicocca, sperimentalmente, e quindi in questo corso, abbiamo a che fare con spettroscopia ottica).

Ci interessa l'effetto del campo elettrico sulle cariche dell'oggetto: in generale abbiamo l'interazione delle cariche della materia con il campo elettrico, attraverso il momento di dipolo oscillante. Dal momento che le molecole sono fatte da atomi, dobbiamo ricordare che l'atomo è fatto da una parte nucleare e da una elettronica, che hanno masse molto diverse e quindi hanno tempi di risposta e ampiezza di movimento di risposta molto diversi. Procediamo quindi all'approssimazione di Born-Oppenheimer, separando i moti del nucleo dai moti elettronici, e quindi separando la *spettroscopia elettronica* dalla *spettroscopia vibrazionale* dei moti nucleari.

Parlando di molecole abbiamo a che fare con orbitali molecolari, quindi gli elettroni di cui parliamo sono quelli che stanno su questi orbitali. Le vibrazioni e le rotazioni di cui parliamo sono quelli degli atomi che formano le molecole, all'interno della nuvola elettronica degli orbitali molecolari.

Nel **modello classico** si trasferisce energia tramite interazione con il momento di dipolo all'oggetto e questa energia, se non ci sono risonanze, può essere riemessa tale e quale (scattering) oppure viene assorbita e poi, tramite vari processi dissipativi (in modo radiativo, emissione di calore, contatto...) la molecola che ha assorbito energia la dissipa. Se la differenza tra il processo di attenuazione della radiazione è l'assorbimento, la produzione di nuova radiazione è l'emissione.

Quello che a noi interessa di più è il **modello quantistico**: l'energia è quantizzata e in generale il sistema è descritto dall'equazione di Schrödinger:

$$i\hbar \frac{d}{dt} \Psi = \bar{H} \Psi \quad (5.8)$$

dove Ψ è la funzione d'onda. La probabilità di trovare l'elettrone in una certa configurazione, normalizzata, è data da:

$$P = \Psi^* \Psi = |\Psi|^2 \quad (5.9)$$

$$\int P d\tau = \int \Psi^* \Psi d\tau = \langle \Psi | \Psi \rangle \quad (5.10)$$

L'hamiltoniana ha come valore di aspettazione l'energia di un certo sistema e in generale è data dalla somma dell'energia cinetica degli elettroni e da un termine di potenziale che descrive l'interazione:

$$\langle \Psi | \bar{H} | \Psi \rangle = E \quad (5.11)$$

$$\bar{H} = \bar{T} + \bar{V} \quad (5.12)$$

Se l'hamiltoniana è indipendente dal tempo allora una forma della funzione d'onda ha questa espressione:

$$\bar{H}\Psi = E\Psi \quad (5.13)$$

$$i\hbar \frac{d}{dt} \Psi = E\Psi \quad (5.14)$$

Questi sono stati stazionari perché la probabilità è costante nel tempo:

$$\Psi(t) = \Psi(0)e^{-iEt/\hbar} \quad (5.15)$$

$$P = \Psi^*(t)\Psi(t) = |\Psi(0)|^2 \quad (5.16)$$

I vari autostati dell'hamiltoniana sono ortogonali tra di loro:

$$\langle \Psi_1 | \Psi_2 \rangle = \langle \Psi_2 | \Psi_1 \rangle = 0 \iff E_1 \neq E_2 \quad (5.17)$$

Nel caso particolare in cui abbiamo un sistema a due stati, A e B, la funzione d'onda può essere espressa come sovrapposizione delle funzioni d'onda corrispondenti ai due stati, cioè con una composizione lineare delle due autofunzioni. Se le due autofunzioni sono ortogonali, come nel caso di stati stazionari, allora l'integrale di sovrapposizione è nullo e la probabilità di trovare la molecola nello stato A o nello stato B è semplicemente il modulo quadro dei coefficienti che compaiono nella funzione d'onda:

$$\text{Integrale di sovrapposizione} = \langle \Psi_a | \Psi_b \rangle = 0 \quad (5.18)$$

$$\Psi = C_a \Psi_a + C_b \Psi_b \quad (5.19)$$

$$P_a = C_a^* C_a = |C_a|^2 \quad P_b = C_b^* C_b = |C_b|^2 \quad (5.20)$$

In generale abbiamo a che fare con molecole fatte da un elevato numero di atomi: abbiamo visto la soluzione dell'equazione di Schrödinger nel caso dell'atomo di idrogeno o per l'atomo di elio, nel caso di una proteina non possiamo risolverla. Per semplificare le cose usiamo l'approssimazione di Born-Oppenheimer: dividiamo i moti elettronici da quelli nucleari e quindi la funzione d'onda avrà una parte elettronica e una nucleare:

$$\Psi = \Psi_e(r, R)\Phi_N(R) \quad (5.21)$$

Abbiamo che i nuclei, caratterizzati dalla distanza di legame R si muovono all'interno di un potenziale dato dalle posizioni medie degli elettroni, che a loro volta si muovono talmente veloci da vedere i nuclei fermi. Dalla risoluzione di questa equazione in assenza del campo elettromagnetico esterno, possiamo avere i livelli elettronici e la funzione d'onda del sistema imperturbato, stazionaria e risolubile:

$$\bar{H}_{el}\Psi_{el} = E_{el}\Psi_{el} \quad (5.22)$$

Cosa succede quando abbiamo un campo elettromagnetico esterno che va a perturbare il sistema? Cambia la forma dell'operatore hamiltoniano e si può usare la teoria delle perturbazioni indipendenti dal tempo e l'hamiltoniana dello stato imperturbato viene modificata da un termine di potenziale che descrive l'interazione con il campo elettromagnetico:

$$i\hbar \frac{d}{dt} \Psi = \bar{H}'\Psi = (\bar{H} + \bar{V})\Psi \quad (5.23)$$

Come descrivo il campo elettromagnetico? In generale chiamasi **cromoforo** l'oggetto che produce colore, cioè l'oggetto che assorbendo una radiazione risulta essere del colore complementare alla radiazione assorbita. I cromofori hanno dimensioni molto più piccole della radiazione con cui abbiamo a che fare, dal momento che stiamo considerando radiazione UV-VIS. La variazione spaziale del campo elettrico quindi può essere trascurata, perché è come se interagisse con oggetti puntiformi. Il campo elettrico si può descrivere semplicemente come:

$$E(t) = E(0)e^{i\omega t} \quad (5.24)$$

Quello che si ha è che l'espressione scelta per il potenziale determina il tipo di interazione si ha, perchè va a determinare come cambia la funzione d'onda. L'elemento fondamentale quando vado a caratterizzare l'interazione è il valore d'aspettazione del potenziale, tenendo conto che abbiamo uno stato iniziale e uno stato finale. Se so che l'interazione con il campo elettromagnetico modifica lo stato elettronico della molecola, vuol dire che la funzione d'onda cambia da uno stato iniziale a uno stato finale. Quanto è efficiente la trasformazione è dato dal valore di aspettazione:

$$|\langle \Psi | \bar{V} | \Psi \rangle|^2 = |\langle \bar{V} \rangle|^2 = \left| \int \Psi_{fin}^* \bar{V} \Psi_{in} d\tau \right|^2 \quad (5.25)$$

Il caso più semplice per la distribuzione delle cariche che abbiamo all'interno della molecola si ha nell'*approssimazione di dipolo*: l'accoppiamento tra la molecola e il campo elettrico si riduce a un termine di accoppiamento tra l'operatore momento di dipolo elettrico ($\bar{\mu}$) e il campo elettrico:

$$\bar{V} = \bar{\mu} \cdot E(t) = \bar{\mu} \cdot E(0)e^{i\omega t} \quad (5.26)$$

Il dipolo elettrico è dato da:

$$\bar{\mu} = \sum_i e_i \mathbf{r}_i \quad (5.27)$$

Perchè avvenga un trasferimento di energia il momento di dipolo di transizione deve soddisfare la seguente condizione:

$$\begin{aligned} |\langle \Psi_{fin} | \bar{V} | \Psi_{in} \rangle|^2 &= |\langle \bar{V} \rangle|^2 = \left| E(0) \cdot \int \Psi_{fin}^* \bar{\mu} \Psi_{in} d\tau \right|^2 = \\ &= \left| \langle \Psi_{fin} | \bar{\mu} | \Psi_{in} \rangle \cdot E(0) \right|^2 \neq 0 \end{aligned} \quad (5.28)$$

$\langle \Psi_{fin} | \bar{\mu} | \Psi_{in} \rangle$ è il valore di aspettazione del momento di dipolo (di transizione). Questo termine fornisce le regole di selezione che mi dicono in quali casi quel termine è diversa da zero e quindi quando ho transizione. Solo quando il dipolo di transizione è diverso da zero si ha una variazione nello stato del sistema. Le regole di selezione stabiliscono quali sono le coppie di stati iniziali e finali per cui quel termine non è nullo.

Ci sono dei termini che dipendono dalla forma del dipolo e ci sono considerazioni legate alla simmetria degli stati: quello che abbiamo scritto è un integrale su tutto lo spazio. A seconda di come è la parità degli stati iniziali e finali possiamo già dire se la transizione è permessa o no? Se l'integrale è dispari posso già escluderlo.

Dato che di tutta la molecola, quello che interagisce con il campo elettromagnetico è un elettrone, quello più otticamente attivo, di tutta la funzione d'onda a noi interessano solo le parti che cambiano, quindi consideriamo solo i due orbitali interessati dalla transizione.

Possiamo procedere con considerazioni di simmetria: può essere che gli orbitali molecolari in base alla forma siano pari rispetto a un piano e dispari rispetto ad un altro. Bisogna considerare la simmetria per riflessione rispetto ai vari piani possibili. In generale tra le considerazioni di simmetria conviene considerare il momento di dipolo separato nelle tre componenti x, y, z , che hanno ciascuna una certa parità o disparità. La cosa importante è che se l'integrando è una funzione dispari per riflessione anche solo su uno dei piani, tutto l'integrale su tutto lo spazio è nullo.

Siamo nel caso di un sistema a due stati: vediamo i conti che spiegano perché il momento di dipolo deve essere non nullo. Se il sistema è fatto da due stati, se consideriamo l'interazione con il campo elettromagnetico, la parte del campo elettrico è dipendente dal tempo e quindi anche la funzione d'onda dipende dal tempo:

$$\Psi(t) = C_a(t)\Psi_a e^{-iE_a t/\hbar} + C_b(t)\Psi_b e^{-iE_b t/\hbar} \quad (5.29)$$

L'hamiltoniana imperturbata ha come autostati l'energia:

$$\bar{H}\Psi = E\Psi \quad (5.30)$$

Sostituendo le espressioni appena scritte nell'equazione di Schrödinger otteniamo:

$$\begin{aligned} i\hbar \left(\frac{dC_a(t)}{dt} \Psi_a e^{-iE_a t/\hbar} + \frac{dC_b(t)}{dt} \Psi_b e^{-iE_b t/\hbar} \right) &= \\ &= \bar{V} \left(C_a(t)\Psi_a e^{-iE_a t/\hbar} + C_b(t)\Psi_b e^{-iE_b t/\hbar} \right) \end{aligned} \quad (5.31)$$

$$i\hbar \frac{dC_a(t)}{dt} = \langle \Psi_a | \bar{V} | \Psi_a \rangle C_a(t) + \langle \Psi_a | \bar{V} | \Psi_b \rangle C_b(t) e^{-i(E_b - E_a)t/\hbar} \quad (5.32)$$

$$i\hbar \frac{dC_b(t)}{dt} = \langle \Psi_b | \bar{V} | \Psi_a \rangle C_a(t) e^{-i(E_a - E_b)t/\hbar} + \langle \Psi_b | \bar{V} | \Psi_b \rangle C_b(t) \quad (5.33)$$

Tenendo conto del fatto che μ è dispari e $\Psi^*\Psi$ pari:

$$\langle \Psi_a | \bar{V} | \Psi_a \rangle = 0 = \langle \Psi_b | \bar{V} | \Psi_b \rangle \quad (5.34)$$

Le equazioni (5.32) e (5.33) diventano:

$$i\hbar \frac{dC_a(t)}{dt} = C_b(t) \langle \Psi_a | \bar{\mu} | \Psi_b \rangle \cdot E(0) e^{-it(E_b/\hbar - E_a/\hbar - \omega)} \quad (5.35)$$

$$i\hbar \frac{dC_b(t)}{dt} = C_b(t) \langle \Psi_b | \bar{\mu} | \Psi_a \rangle \cdot E(0) e^{-it(E_a/\hbar - E_b/\hbar - \omega)} \quad (5.36)$$

Queste equazioni possono essere risolte tenendo conto di queste due approssimazioni:

$$\langle \Psi_a | \bar{V} | \Psi_b \rangle = \langle \Psi_b | \bar{V} | \Psi_a \rangle \quad (5.37)$$

$$|C_b(0)|^2 = 0 \quad (5.38)$$

L'equazione (5.38) implica la scelta dello stato a come stato fondamentale, cosa che implica che la probabilità di osservare le molecole nello stato b , a tempo zero, è nulla.

La probabilità di trovare le molecole nello stato b al tempo t è data da:

$$P_b = |C_b(t)|^2 = \frac{|\langle \Psi_b | \bar{\mu} | \Psi_a \rangle \cdot E(0)|^2}{\hbar^2} \frac{t^2 \sin^2 [(E_b/\hbar - E_a/\hbar - \omega)t/2]}{2 [(E_b/\hbar - E_a/\hbar - \omega)t/2]^2} \quad (5.39)$$

Vediamo che la probabilità è tanto più alta quanto più alto è il momento di dipolo di transizione e perché la probabilità non sia nulla deve essere diverso da zero (quello che dicevamo prima!). Il denominatore dipende da questa differenza:

$$\hbar\omega = h\nu = E_b - E_a \quad (5.40)$$

che implica che la probabilità di transizione dallo stato b allo stato a è tanto più alta minore è la differenza di energia tra i due stati. È il concetto di **risonanza**: la probabilità va all'infinito quando i due valori sono uguali, quindi la radiazione viene assorbita alla lunghezza d'onda, o alla frequenza, la cui energia corrisponde alla differenza di energia tra i livelli, cioè quando l'energia della radiazione è in risonanza con il gap energetico.

Capitolo 6

Lezione 6: 15 Aprile 2015

Le due cose fondamentali che ci interessano sono:

- Il fatto che per avere la transizione da uno stato a a uno stato b indotta dall'interazione con la radiazione elettromagnetica il momento di dipolo associato alla transizione deve essere diverso da zero.
- Viene assorbita più favorevolmente la radiazione che ha un'energia che corrisponde al salto energetico tra i due livelli.

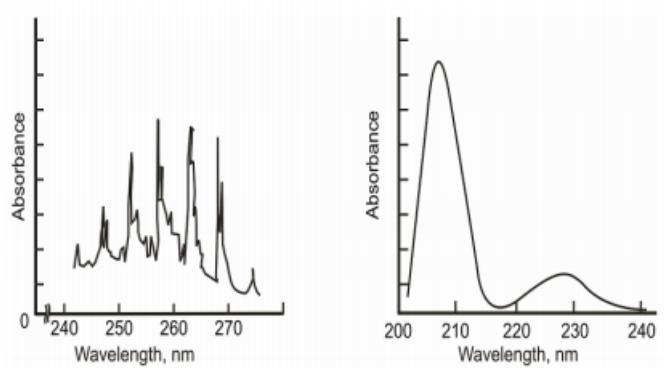


Figura 6.1: *differenza tra lo spettro di assorbimento senza e con il solvente*

Il termine quadratico al denominatore dell'equazione (5.39) fa scendere rapidamente la probabilità di avere la transizione se ci si allontana dalla lunghezza d'onda di risonanza. Quindi ci aspettiamo di avere delle righe spettrali che corrispondono alle differenze energetiche: ma non è quello che si vede sperimentalmente. Questo è dovuto a una serie di motivi:

- Per ora abbiamo considerato soltanto gli stati elettronici, ma in realtà ci sono anche i sottolivelli vibrazionali e rotazionali dovuti alle vibrazioni e rotazioni dei nuclei che danno non solo una singola riga ma un insieme di righe, che se sono abbastanza grandi danno delle bande.
- Ci sono degli allargamenti intrinseci: i livelli energetici non hanno uno spessore infinitesimo, nel senso che l'energia di un livello non è univocamente determinata per l'esistenza del principio di indeterminazione di

Heisenberg. L'unica eccezione è il livello fondamentale, che è univocamente determinato, in cui le molecole possono rimanere all'infinito: $\Delta t = \infty \implies \Delta E = 0$. Tutti gli altri livelli hanno un allargamento legato al fatto che c'è il **tempo di vita** τ , cioè un tempo intrinseco di durata della molecola su uno stato eccitato, che dà una corrispondente incertezza sull'energia.

- Le molecole e gli atomi si muovono, quindi c'è l'allargamento dovuto allo **shift doppler**.

Gli effetti di interazione con il solvente sono visibili in termini di spettri, come notiamo nell'immagine (6.1). I livelli elettronici energetici sono effettivamente fatti come in figura (6.2).

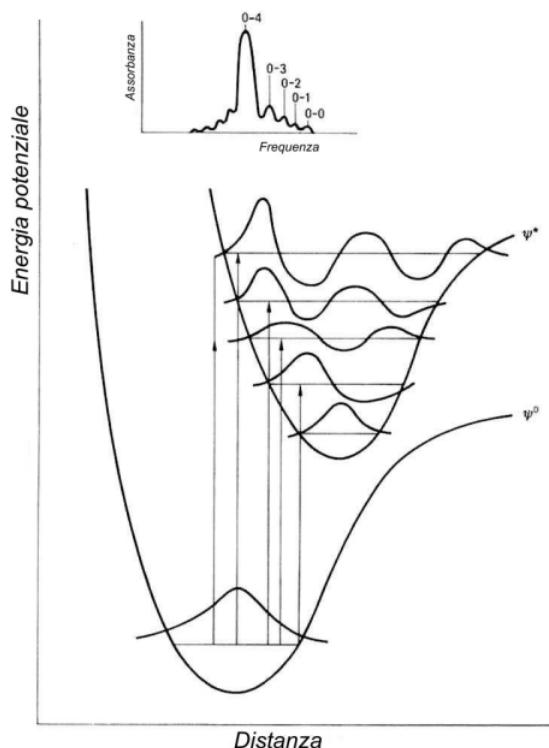


Figura 6.2: *livelli energetici elettronici*

In ognuno dei livelli elettronici ci sono tanti sottolivelli vibrazionali e per ogni sottolivello vibrazionale ci sono poi tanti sottolivelli rotazionali. Le righe dritte rappresentano le transizioni di assorbimento, in ascissa c'è la distanza nucleare reciproca tra gli oggetti che formano una molecola, per il *principio di Franck-Condon* le transizioni avvengono in linea retta perché l'assorbimento è istantaneo e quindi non cambiano le distanze internucleari. Anche il tipo di stati vibrazionali raggiungibili è dettato dalla forma dei livelli energetici. L'immagine (6.3) è più completa perchè mostra, oltre allo stato fondamentale con i suoi livelli vibrazionali, anche lo stato di singoletto eccitato, lo stato di tripletto eccitato (che ha sempre energia minore del corrispondente singoletto) e gli eventuali stati dissociati, in cui non avvengono legami.

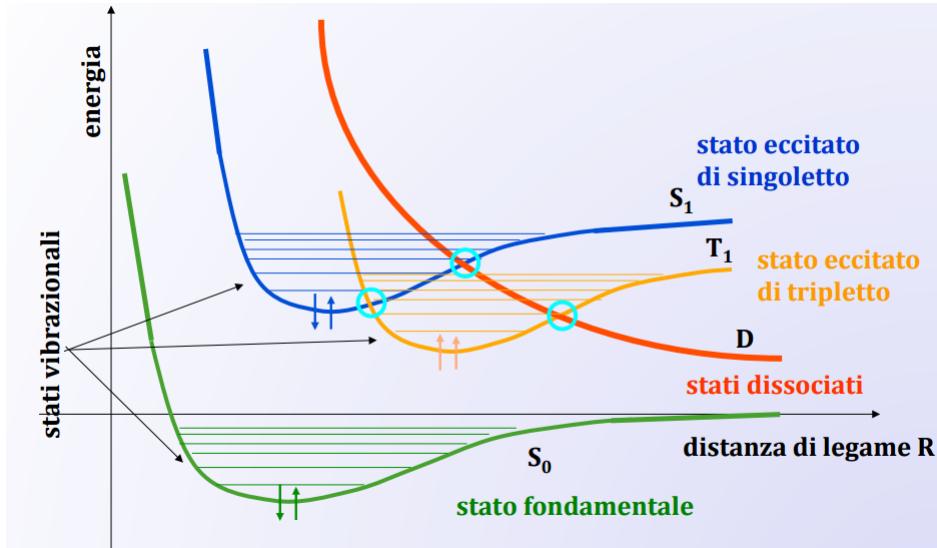


Figura 6.3: *stato fondamentale, singoletto e tripletto eccitati e stati dissociati della molecola*

Le transizioni di cui parliamo sono transizioni di assorbimento di radiazione UV-VIS dallo stato fondamentale al primo stato di singoletto eccitato, le disecitazioni di fluorescenza invece avvengono dallo stato vibazionale fondamentale del primo singoletto eccitato e poi ci sono altri processi di disecitazione quali la fosorescenza. Se ci sono transizioni esclusivamente tra i sottolivelli vibazionali allora l'energia in gioco è più bassa, quindi le lunghezze d'onda sono più alte e si parla di spettro IR. Tutti i processi sono riportati in figura (6.4).

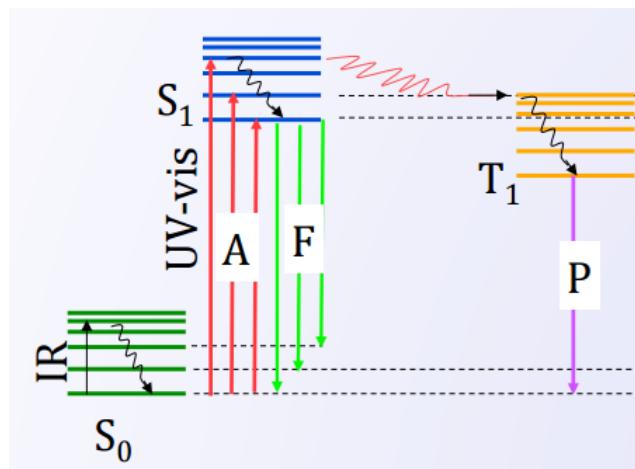


Figura 6.4: *processi di assorbimento e diseccitazione*

Ricapitoliamo di quali energie parliamo:

- i livelli energetici elettronici sono quelli per cui a temperatura ambiente viene occupato solo il livello fondamentale, quando le molecole assorbono radiazione UV-VIS si può avere la transizione elettronica che avviene solo quando viene acquisita energia che ha un valore corrispondente al salto energetico tra il livello fondamentale e uno dei livelli eccitati. Tipicamente, per i primi livelli, questa variazione di energia vale parecchie decine di $kCal/mole$.
- i livelli vibrazionali sono livelli ad energia minore di quelli elettronici, con spaziature piccole (al massimo una decina di $kCal/mole$) e la transizione tra uno e l'altro è indotta da radiazione IR, quindi energia più bassa.
- i livelli energetici rotazionali sono quantizzati e sono gli unici che a temperatura ambiente possono essere anche eccitati. La spaziatura tra i livelli è ancora più piccola di quella dei livelli vibrazionali.

Il salto energetico può essere fatto assorbendo uno o più fotoni di opportuna energia: se ho due fotoni devono avere metà energia di un solo fotone e quindi doppia lunghezza d'onda. Nel primo caso ho un *processo con eccitazione a singolo fotone*, il secondo caso *a doppio fotone*, e così via. Il processo di eccitamento a multi-fotoni è rappresentato in figura (6.5).

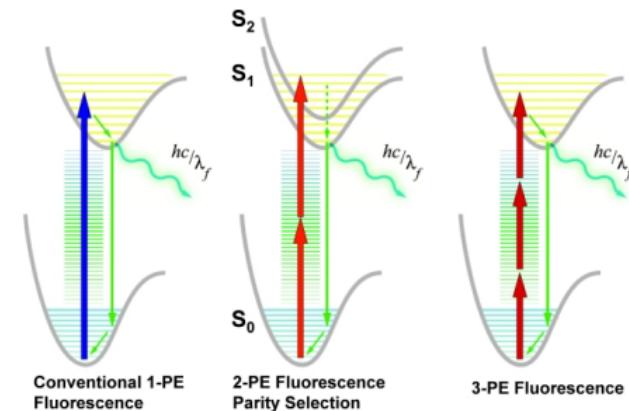


Figura 6.5: *processo di assorbimento a multi-fotoni*

Se penso alla radiazione UV del sole dovrebbero esserci processi di eccitazione di qualunque cosa sempre, in qualunque condizione, dal momento che possono esserci processi di eccitazione a doppio e triplo fotone, anzi già con l'IR emanato dal nostro corpo dovremmo essere in grado di provocare fluorescenza degli oggetti intorno a noi. Il punto però è che questi processi hanno una probabilità di avvenire, quindi una sezione d'urto, estremamente bassa: perché questi processi possano avvenire serve un flusso di fotoni molto elevato e concentrato sia spazialmente che temporalmente. Anche se questi processi sono stati ipotizzati negli anni '30 da *Marie Goeppert-Mayer* nella sua tesi di dottorato, in realtà si sono potuti provare sperimentalmente solo con lo sviluppo dei laser pulsati, che permettono di avere una concentrazione spaziale e temporale di fotoni sufficientemente alta da permettere la transizione in quello stato intermedio metastabile in cui si ferma la molecola per poco tempo. Questo tipo di transizione,

che prevede l'assorbimento di uno solo dei fotoni con energia inferiore al salto energetico, dovrebbe essere proibita, ma la molecola può stare in questo stato metastabile per un tempo molto breve, in cui arriva l'altro fotone che permette poi il passaggio allo stato eccitato della molecola.

Se tipicamente le sezioni d'urto a singolo fotone σ_1 sono dell'ordine di:

$$\sigma_1 \approx 10^{-17} - 10^{-16} \text{ cm}^2 \quad (6.1)$$

la probabilità di avere invece l'eccitazione a doppio fotone è la probabilità che una volta che è stato eccitato da un singolo fotone riceva in un brevissimo intervallo di tempo e di spazio un altro fotone, quindi la sezione d'urto che misura la probabilità di eccitazione per assorbimento a due (o in generale a n fotoni, ha il seguente ordine di grandezza:

$$\sigma_n \div \sigma_1^n \Delta t^{n-1} \quad (6.2)$$

Δt è il tempo di vita dello stato metastabile. L'unità di misura è il Goeppert-Mayer (GM):

$$1 \text{ GM} = 10^{-50} \text{ cm}^4 s \quad (6.3)$$

Mano a mano la probabilità di questi processi diminuisce drasticamente: già l'eccitazione con assorbimento di 3 fotoni è molto meno probabile. In linea teorica si può eccitare anche con due laser differenti, basta che la somma delle due lunghezze d'onda corrisponda al passaggio. Il problema è l'allineamento, visto che si richiede che arrivino con un'incertezza sulla posizione molto bassa: il punto di focalizzazione dei due laser deve essere lo stesso.

Il vantaggio dell'eccitazione a due fotoni è che gli spettri di assorbimento a due fotoni si allargano. In linea di principio ci si aspetta che lo spettro di assorbimento a due fotoni sia la copia, moltiplicata per il fattore 2 di quello a singolo fotone, mentre in realtà poi giocano una serie di interazioni tra i livelli energetici per cui non è vera. Come possiamo vedere in figura (6.6) lo spettro di assorbimento della cumarina, moltiplicato per 2, sta esattamente sopra all'effettivo spettro di assorbimento a due fotoni, mentre nel caso della rodamina non si ha nessuna sovrapposizione.

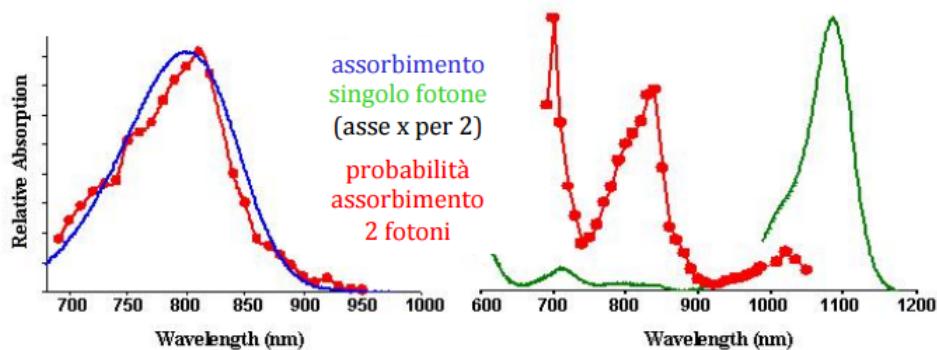


Figura 6.6: spettro di assorbimento a un fotone moltiplicato per 2 e spettro a due fotoni, rispettivamente di cumarina e rodamina

Questo è un vantaggio perché la maggior parte delle sponde ha buone probabilità

di eccitazione su una grande porzione dello spettro: questo significa che possiamo usare una singola lunghezza d'onda per eccitare diversi coloranti. Questo è vantaggioso perché se bisogna fare una misura in cellula o in un qualunque sistema in cui siamo riusciti a colorare con oggetti fluorescenti che emettono a lunghezze d'onda diverse diversi componenti con una stessa lunghezza d'onda riusciamo a illuminarli tutti e a ricevere la fluorescenza di tutti. Riuscendo poi a separare la fluorescenza per i vari colori, si può fare contemporaneamente l'immagine senza cambiare la lunghezza d'onda di eccitazione.

Altro grande vantaggio dell'eccitazione a due fotoni riguarda lo scattering della radiazione, che aumenta come $1/\lambda^4$, quindi lo scattering nella regione dell'infrarosso è molto più basso che quello nel visibile: se penetriamo attraverso un campione opaco (come un tessuto) abbiamo una diffusione molto minore della radiazione IR che riesce a essere focalizzata più in profondità e non viene assorbita dai componenti delle cellule risultando meno dannosa.

Cosa caratterizziamo con la spettroscopia di assorbimento? Ci aspettiamo di vedere delle linee, ma come le misuriamo? In realtà non vediamo delle linee, ma degli spettri, come li misuriamo? Li misuriamo mandando radiazione monocromatica (cioè a una certa lunghezza d'onda) attraverso il campione e misuriamo l'intensità di radiazione che emerge dall'altra parte. Se pensiamo al concetto di sezione d'urto ci chiediamo quanto è la diminuzione di intensità causata dal passaggio attraverso un piccolo spessore di soluzione in cui ci sono oggetti che assorbono, con una certa concentrazione? Consideriamo di essere quindi nel caso riportato in figura (22.2).

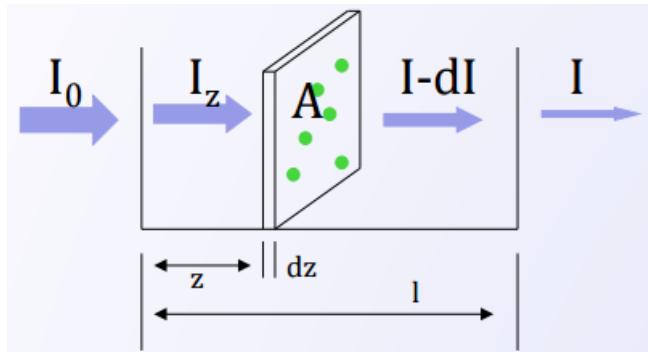


Figura 6.7: *radiazione incidente su un campione di un certo spessore*

Se N è il numero di molecole, cioè il numero di centri, per cm^3 e C la concentrazione degli oggetti in soluzione:

$$N = \frac{CN_{AV}}{1000} \quad (6.4)$$

la *legge dell'attenuazione* dice che:

$$dI = -I_z \sigma N dz \quad (6.5)$$

Se vogliamo vedere la diminuzione percentuale:

$$\frac{dI}{I} = -\sigma N dz \quad (6.6)$$

Integrando, per vedere la variazione di intensità attraversata tutta la soluzione, otteniamo:

$$\ln I - \ln I_0 = -\sigma Nl \quad \rightarrow \quad -\ln \left(\frac{I}{I_0} \right) = \sigma Nl = \sigma \frac{N_{AV}}{1000} Cl \quad (6.7)$$

Parlando di assorbimento però non utilizziamo la sezione d'urto, che ha valori molto bassi, ma usiamo un altro parametro il cui significato fisico è sempre lo stesso (descrive la probabilità di assorbimento), ma è coniugato a una serie di altri valori. Passando dal logaritmo in base naturale a quello in base 10:

$$-\ln \left(\frac{I}{I_0} \right) = -2.303 \log \left(\frac{I}{I_0} \right) \quad (6.8)$$

otteniamo:

$$-\log \left(\frac{I}{I_0} \right) = \sigma \frac{N_{AV}}{1000} \frac{Cl}{2.303} \quad (6.9)$$

Questa grandezza è il nuovo parametro introdotto per l'assorbimento, chiamato **assorbanza**, che dipende dalla concentrazione dell'oggetto in soluzione, della lunghezza del percorso fatto attraverso la soluzione e da un parametro che tiene conto della sezione d'urto, del numero di Avogadro e di tutti i termini numerici, che prende il nome di **coefficiente di estinzione molare**. Otteniamo così la *legge di Beer-Lambert*:

$$-\log \left(\frac{I}{I_0} \right) = A = \varepsilon Cl \quad (6.10)$$

$$\varepsilon = \frac{\sigma}{2.303} \frac{N_{AV}}{1000} \quad (6.11)$$

L'assorbanza è una grandezza adimensionale, quindi il coefficiente di estinzione molare ha le dimensioni di una lunghezza alla meno uno, concentrazione alla meno uno. Tipicamente la lunghezza si misura in centimetri: la soluzione in laboratorio è solitamente messa in cuvette con lato 1 cm, la concentrazione si esprime in molare.

Il rapporto tra l'intensità che raggiunge il campione e l'intensità iniziale si chiama **trasmittanza**, quindi otteniamo per l'assorbanza:

$$A = -\log T = \varepsilon Cl \quad (6.12)$$

Otteniamo così delle limitazioni sperimentali. Il vantaggio del passaggio dalla sezione d'urto al coefficiente di estinzione molare si può vedere dai valori riportati nella tabella in figura (6.8).

Con che velocità passiamo dallo stato fondamentale a quello eccitato? La velocità ci interessa perché ci dà informazioni su quella che è nel tempo la popolazione dello stato fondamentale e di quello eccitato: l'oggetto può eccitarsi e rimane nello eccitato per un tempo pari al tempo di vita dello stato eccitato e poi decade. La situazione che abbiamo è una situazione dinamica: continuiamo a mandare radiazione agli oggetti che si eccitano e che però passato il tempo di vita si diseccitano.

Semplifichiamo la trattazione con il caso dei due stati *a* e *b*: P_b è la probabilità di trovare il sistema nello stato eccitato e noi vogliamo vedere come varia questa grandezza nel tempo:

$$\frac{dP_b}{dt} = \frac{d}{dt} \int d\nu |C_b(t)|^2 = \frac{1}{2\hbar^2} |\langle \Psi_b | \bar{\mu} | \Psi_a \rangle \cdot E(0)|^2 \quad (6.13)$$

	σ (cm ²)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)
assorbimento atomi	10 ⁻¹²	3x10 ⁸
molecole	10 ⁻¹⁶	3x10 ⁴
infrarosso	10 ⁻¹⁹	3x10 ⁰
scattering Raman	10 ⁻²⁹	3x10 ⁹

Figura 6.8: valori della sezione d'urto e del coefficiente di estinzione molare

Integriamo su tutte le frequenze che stiamo mandando. La probabilità di avere la popolazione in uno stato eccitato però possiamo descriverla come un coefficiente per l'intensità di radiazione:

$$\frac{dP_b}{dt} = B_{ab}I(\nu) \quad (6.14)$$

$$I(\nu) = \frac{|E(0)|^2}{4\pi} \quad (6.15)$$

$$\left\langle \left| \langle \Psi_b | \bar{\mu} | \Psi_a \rangle \cdot E(0) \right|^2 \right\rangle_{orientazioni} = \frac{1}{3} |\langle \Psi_b | \bar{\mu} | \Psi_a \rangle|^2 |E(0)|^2 \quad (6.16)$$

$$B_{ab} = \frac{2\pi}{3\hbar} |\langle \Psi_b | \bar{\mu} | \Psi_a \rangle|^2 \quad (6.17)$$

Il coefficiente B_{ab} dà la probabilità di transizione dallo stato a allo stato b ed è chiamato **coefficiente di Einstein**: è il coefficiente per un processo chiamato *assorbimento stimolato*, cioè l'assorbimento di radiazione dovuto all'arrivo di un fotone. Si parla di assorbimento perché sto andando dallo stato a allo stato b . Il termine del momento di dipolo tra a e b però è lo stesso che tra b e a : quindi non ci sono dipendenze dalla direzione del processo e quindi B_{ab} è anche il coefficiente B_{ba} per il processo di emissione stimolata. Il processo di emissione stimolata si riferisce a ciò che accade quando mandiamo un fotone di una certa lunghezza d'onda e questo provoca la diseccitazione, anziché l'eccitazione.

La diminuzione di intensità nel tempo è data da:

$$-\frac{dI(\nu)}{dt} = h\nu(N_a B_{ab} - N_b B_{ba})I(\nu) \quad (6.18)$$

dove N_a e N_b sono rispettivamente il numero di molecole per cm³ negli stati a e b . Ci sono due processi che riportano nello stato fondamentale: l'emissione stimolata e l'emissione spontanea dovuta al tempo di vita.

Come capisco se un oggetto assorbe di più o di meno? facciamo una serie di approssimazioni per valutare l'intensità della banda, che dipende dall'intensità del momento di dipolo, che va collegato a una delle mie osservabili. Supponiamo, come è vero in generale, che in condizioni normali la popolazione dello stato eccitato è trascurabile, allora:

$$-\frac{dI(\nu)}{dt} = h\nu N_a B_{ab} I(\nu) = h\nu \frac{N_{AV} C}{1000} B_{ab} I(\nu) \quad (6.19)$$

Per ottenere la dipendenza dal dl , in modo da confrontarla con quella ottenuta dalla legge di Beer-Lambert, teniamo conto del fatto che la luce si muove a una

certa velocità c e nel tempo dt percorre uno spazio dl :

$$\begin{cases} -dI(\nu) = -\frac{dI(\nu)}{dt} \frac{dl}{c} = h\nu \frac{N_{AV}}{1000c} B_{ab} I(\nu) dl \\ -dI = I\varepsilon C dl \end{cases}$$

Otteniamo quindi, per una concentrazione $C = 1M$, l'espressione del coefficiente di Einstein in funzione del coefficiente di estinzione molare:

$$B_{ab} = \frac{1000c}{hN_{AV}} \int \frac{\varepsilon}{\nu} d\nu \quad (6.20)$$

Possiamo misurare la *forza del dipolo*, che dà l'intensità della transizione, e viene misurata in debye, che tiene conto che i valori con cui abbiamo a che fare per i sistemi molecolari sono molto piccoli ($1\text{debeye} = 3.336 \times 10^{-30} C \cdot m$)

$$D_{ab} = |\langle \Psi_b | \bar{\mu} | \Psi_a \rangle|^2 = 9.180 \times 10^{-3} \int \frac{\varepsilon}{\nu} d\nu \quad (\text{debeye})^2 \quad (6.21)$$

Il coefficiente di estinzione molare dipende dalla frequenza perchè è una sezione d'urto di assorbimento ma non tutte le lunghezze d'onda vengono assorbite allo stesso modo.

6.1 IL LASER

Tutte le grandezze introdotte fino ad ora sono fondamentali per uno degli oggetti fondamentali in laboratorio: il laser, acronimo di light amplification by stimulated emission of radiation: il funzionamento del laser si basa sul fatto che abbiamo un grandissimo numero di fotoni coerenti che si moltiplicano fra loro. Ci sono vari processi, riportati in figura (6.9): assorbimento, emissione spontanea legata al tempo di vita e emissione stimolata, che consegue al passaggio di un fotone.

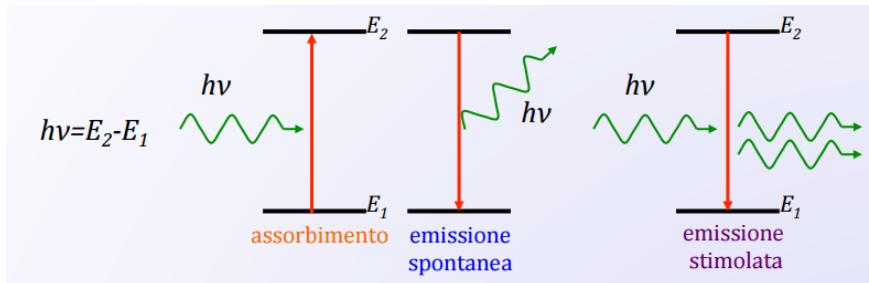


Figura 6.9: processi di assorbimento, emissione spontanea e emissione stimolata

Le popolazioni dei livelli cambiano in base alle probabilità di questi processi e le probabilità sono date dai coefficienti di Einstein: l'emissione spontanea non dipende dalla densità di radiazione.

$$\frac{dN_1}{dt} = -B_{12}N_1\rho(\nu) + A_{21}N_2 + B_{21}N_2\rho(\nu) \quad (6.22)$$

$$\frac{dN_2}{dt} = +B_{12}N_1\rho(\nu) - A_{21}N_2 - B_{21}N_2\rho(\nu) \quad (6.23)$$

All'equilibrio si raggiunge uno stato stazionario e si ha:

$$+B_{12}N_1\rho(\nu) - A_{21}N_2 - B_{21}N_2\rho(\nu) = 0 \quad (6.24)$$

La popolazione dei livelli all'equilibrio ha una certa probabilità che segue la statistica di Boltzmann:

$$N_i = g_i N_0 e^{-E_i/K_B T} \quad (6.25)$$

Sappiamo anche che l'energia ha una distribuzione in frequenza data da:

$$\rho(\nu) = \frac{8\pi h\nu^3}{c^3} \frac{1}{e^{h\nu/KT} - 1} \quad (6.26)$$

Se all'equilibrio deve valere l'equazione (6.24) per ogni frequenza, otteniamo che i due coefficienti sono uguali a meno delle molteplicità delle degenerazioni del sistema e possiamo calcolare il coefficiente di emissione spontanea in funzione di quella stimolata:

$$\frac{B_{21}}{B_{12}} = \frac{g_1}{g_2} \quad (6.27)$$

$$\frac{A_{21}}{B_{21}} = \frac{8\pi h\nu^3}{c^3} \quad (6.28)$$

Processo di emissione stimolata: prima dell'emissione abbiamo l'elettrone eccitato e l'elettrone si dissecchia con l'emissione di due fotoni. Questo comporta che i due fotoni prodotti hanno la stessa lunghezza d'onda, la stessa direzione e sono tra loro coerenti: questi sono i tre vantaggi dell'eccitazione laser rispetto a quella tipica della lampadina.

La cosa fondamentale è che per potere avere emissione laser ci sono due requisiti:

- inversione di popolazione: per avere emissione stimolata bisogna avere popolato il livello da cui avviene, quindi serve che il livello eccitato sia molto popolato. Il sistema non è a riposo ma eccitato variamente.
- lo stato eccitato deve essere uno stato metastabile ed è quello da cui si ha emissione laser: questo stato metastabile ha un tempo di vita lungo quindi si ha accumulo di elettroni e con un opportuno fotone si riesce ad ottenere emissione di fotoni. Dobbiamo avere che l'assorbimento principale sia allo stato più alto e non avvenga allo stesso lunghezza d'onda a cui poi si ha emissione dagli stati metastabili, altrimenti ci sarebbe un ciclo continuo di assorbimento emissione. Il processo con il livello metastabile è rappresentato in figura (6.10).

Si possono avere o laser continui o laser pulsati.

6.2 SPETTROSCOPIA UV-VIS

Della regione UV solitamente prendiamo solo il *near* UV (200-400 nm). Il range del visibile invece è quello in cui si hanno le transizioni elettroniche.

Ci sono sostanzialmente due tipi di **orbitali molecolari**, localizzati σ e delocalizzati π . Ci sono stati di legame quando la distribuzione degli elettroni

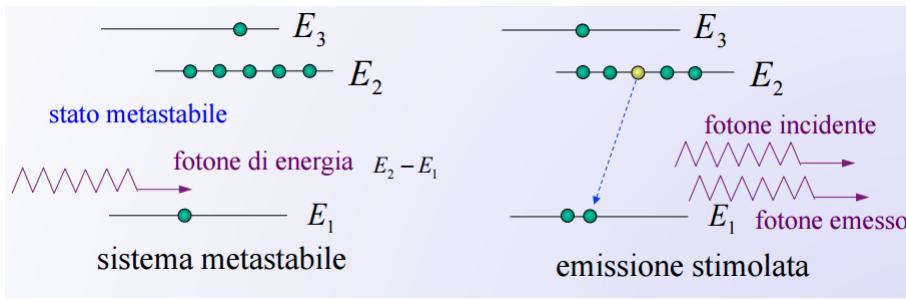


Figura 6.10: *processo di emissione stimolata*

favorisce la vicinanza tra i nuclei che costituiscono la molecola, altrimenti sono stati di antilegame, indicati con un asterisco in apice. Ci sono anche gli stati di non legame. Ogni stato può avere al massimo due elettroni, con spin antiparallelo in accordo con la regola di Hund. In generale viene favorito lo stato che ha massima molteplicità di spin: questo implica che gli stati di singoletto sono meno stabili di quelli di tripletto.

Gli stati di singoletto si trovano in sistemi che contengono carbonio, azoto e ossigeno: gli amminoacidi! Tipicamente gli amminoacidi presentano come stato fondamentale il singoletto. I radicali liberi, che hanno elettroni spaiati, hanno come stato fondamentale un doppietto, mentre se gli elettroni spaiati sono due si ha uno stato fondamentale di tripletto

Le transizioni elettroniche seguono la regola fondamentale per cui avvengono tra stati di uguale molteplicità (deriva dalla parità delle funzioni d'onda): il momento di dipolo della transizione, se cambia la molteplicità di spin, si annulla o diventa molto basso e quindi non si ha transizione. Dal punto di vista elettronico si possono avere 6 diverse transizioni possibili, legate all'energia, come vediamo in figura (6.11).

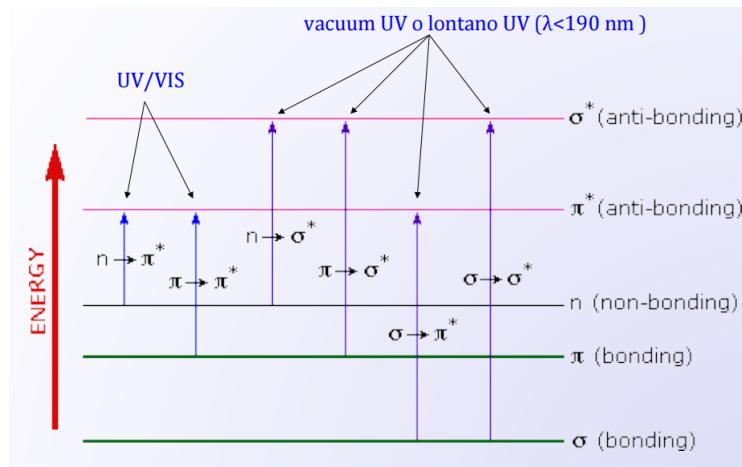


Figura 6.11: *transizioni tra livelli elettronici*

Vediamo nello specifico le 6 transizioni:

Transizione $\sigma \rightarrow \sigma^*$: la transizione dallo stato legante σ a quello corrispettivo antilegante σ^* è quella a energia più alta: significa lunghezza d'onda bassissima (125 nm), quindi non riusciremo ad osservarla.

Transizione $\pi \rightarrow \pi^*$: riguarda composti con legami multipli, come gli aromatici. Regione di assorbimento: 170-205 nm.

Transizione $n \rightarrow \sigma^*$: può interessare ossigeno, azoto e zolfo. Non richiede grande energia: picchi di assorbimento tra 150 e 250 nm.

Transizioni $n \rightarrow \pi^*$: avvengono per energie molto basse (300 nm), riguarda i composti che contengono legami doppi.

Transizioni $\sigma \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \sigma^*$: queste transizioni sono proibite perché hanno momento di dipolo nullo.

Sostanzialmente solo le transizioni $\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$ mostrano picchi decisamente sopra i 200 nm, che sono quelli che interessano a noi.

Come si osservano queste cose? Si osservano tramite oggetti chiamati **spettrofotometri** (la cui struttura semplificata è riportata in figura (6.12)): viene mandata luce a una singola lunghezza d'onda, attraversa la sostanza e raggiunge il detector. Lo spettrofotometro fornisce il valore dell'assorbanza.

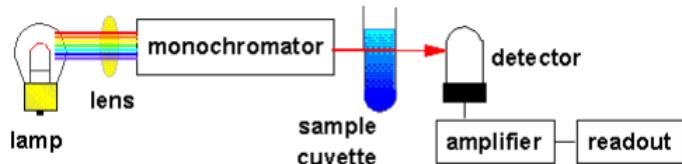


Figura 6.12: spettrofotometro

Ricordando che:

$$A = -\log \left(\frac{I}{I_0} \right) \quad (6.29)$$

un'assorbanza $A = 1$ significa che l'intensità iniziale è 10 volte l'intensità rivelata, cioè è diminuita di un fattore 10; un'assorbanza $A = 2$ significa che l'intensità rivelata è diminuita di un fattore 100 rispetto a quella iniziale, e così via. Per questo motivo non si possono misurare valori arbitrariamente alti di assorbanza, perchè si misura al rivelatore quantità di luce trascurabili. In genere gli strumenti sono affidabili fino a valori di assorbanza $A = 2 - 2.5$.

Questo vuol dire che se l'assorbanza è lineare nella concentrazione, se dimezzo la concentrazione dimezza anche l'assorbanza. Se sono in un regime in cui lo strumento non è più affidabile questa cosa non è più vera.

I due componenti fondamentali dello spettrofotometro sono il *monocromatore* in eccitazione, tipicamente fatto a reticolo con una fenditura che seleziona la lunghezza d'onda, e il *tubo fotomoltiplicatore* in emissione, basato sulla legge di moltiplicazione dei fototubi. Un fototubo è costituito da un catodo fotoemissivo, su cui arriva la radiazione, e da dei diodi che sono delle piccole zone in cui gli elettroni accelerano e in cui si ha un'amplificazione del numero di elettroni perchè sono anch'essi fotoemissivi. Tutti questi elettroni arrivano all'anodo, che

si trova a una certa differenza di potenziale dal catodo; l'anodo amplifica perché è fotoemissivo. Quindi per ogni fotone che entra nel fototubo si ha una notevole amplificazione, che mi permette di leggere una corrente misurabile.

Se $n = 9$ è il numero dei passaggi e ogni passaggio, essendo fatti con lo stesso materiale, ha una certa resa ($r = 4$), cioè 4 elettroni per ogni fotone, il fattore di amplificazione è dato da: 4^9 .

Il **cromoforo** è la parte della molecola responsabile del suo colore mentre la cosa particolarmente utile sono gli **auxocromi**, cioè dei gruppi funzionali che alterano l'emissione del cromoforo in 4 modi:

Effetto batocromatico : consiste nello spostamento del massimo di assorbimento verso lunghezze d'onda verso il rosso, cioè verso lunghezze d'onda maggiori e quindi energia di transizione minore.

Effetto ipsocromatico : spostamento verso il blu e quindi aumento dell'energia di transizione.

Effetto ipercromatico : aumento dell'intensità di assorbimento.

Effetto ipocromatico : diminuzione dell'intensità di assorbimento.

I 4 effetti sono riassunti in figura (6.13).

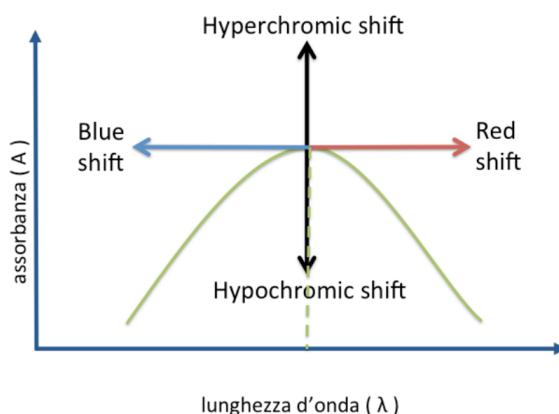


Figura 6.13: *effetti che alterano l'emissione del cromoforo*

Questi effetti sono causati da interazioni o con altre molecole (e quindi auxocromi) o con interazioni con il solvente, che provoca la riorganizzazione degli stati eccitati. Sono dovuti al fatto che ad esempio gli stati π^* indicano stati eccitati più polari rispetto a quelli π e quindi stanno più favorevolmente nei solventi polari: hanno un'energia più bassa nei solventi polari.

Nelle proteine osserviamo l'assorbimento dei seguenti componenti:

- legame peptidico
- gli amminoacidi aromatici: triptofano, fenilalanina, tirosina
- i gruppi cisteina

Negli acidi nucleici assorbono le basi.

Nel legame peptidico abbiamo picchi molto alti a 190 nm e un picco più basso a 210-220 nm. Il problema è che di legami peptidici in una molecola ne abbiamo tantissimi: in una proteina ne abbiamo tanti quanti gli amminoacidi che la costituiscono, meno uno. Se anche il singolo legame peptidico ha un coefficiente di estinzione molare che non è particolarmente elevato, su una proteina con tantissimi amminoacidi dà però un contributo molto alto. Considerando che il massimo valore attendibile di assorbanza è $A = 2$, un valore di ϵ molto alto significa che bisogna usare delle concentrazioni piccolissime, molto difficili da preparare. Quindi la zona attorno a 190 nm non è molto utile dal punto di vista sperimentale: so che c'è il picco della transizione $\pi \rightarrow \pi^*$, ma se devo determinare la concentrazione della proteina guardo in un'altra zona, perchè lì il coefficiente di estinzione molare è troppo alto.

Alcuni residui hanno picchi di assorbimento, ma sono in una regione troppo vicina a quella del legame peptidico, ed essendo pochi in una proteina in confronto al numero di legami peptidici, danno un contributo trascurabile.

Ci vengono in aiuto gli amminoacidi aromatici: hanno dei picchi a lunghezze d'onda superiori ai 230 nm, ben separate dalle transizioni del legame peptidico, e anche se hanno coefficienti di estinzione molare alti, all'interno della proteina sono pochi. Li possiamo sfruttare per la misura della concentrazione della proteina.

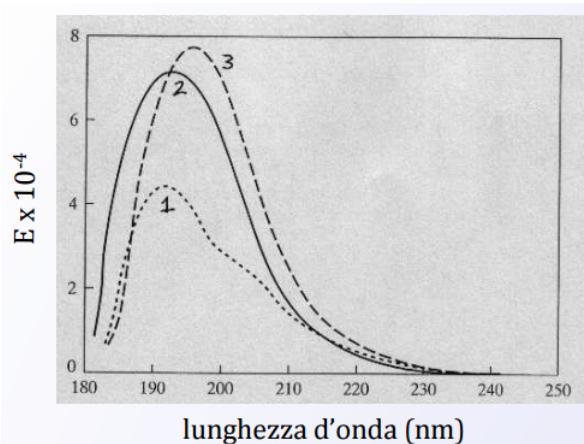


Figura 6.14: strutture diverse a seconda del picco di assorbimento del legame peptidico: 1) α elica, 2) random 3) β sheet

Se riuscissimo a sfruttare il legame peptidico sarebbe anche utile perchè i valori dei coefficienti di estinzione molare sono sensibili alla conformazione della catena polipeptidica: ci dà quindi informazioni sulle strutture che caratterizzano la proteina in base ai differenti picchi degli spettri, come vediamo in figura (6.14). Le catene aromatiche invece hanno dei picchi dove il legame peptidico non assorbe più, come possiamo vedere in figura (6.15).

La scala in ordinata è logaritmica, perchè il coefficiente di estinzione molare cambia tantissimo. Nella tabella in figura (20.5) sono riportate le lunghezze d'onda principale di assorbimento con i relativi coefficienti di estinzione molare.

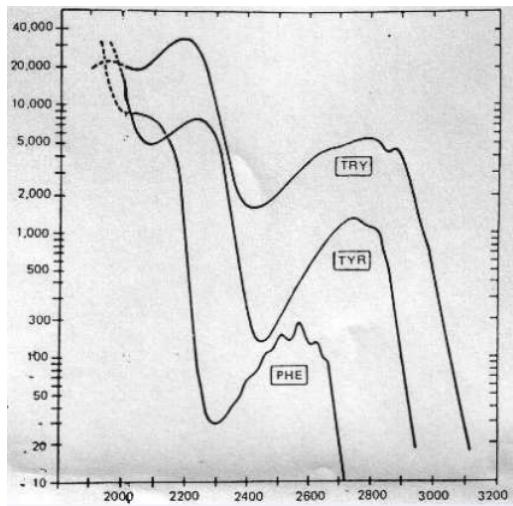


Figura 6.15: picchi di assorbimento delle catene aromatiche (NB: in ascissa sono $nm \times 10^{-1}$)

Aminoacidi	λ (nm)	ϵ ($\times 10^{-3}$) ($cm^{-1} mol^{-1}$)
Triptofano	280, 219	5.6, 47
Tirosina	274, 222, 193	1.4, 8, 48
Fenilalanina	257, 206, 188	0.2, 9.3, 60
Istidina	211	5.9
Cistina	250	0.3

Figura 6.16: lunghezza d'onda di assorbimento e relativo coefficiente di estinzione molare

In alcune proteine sono presenti i **gruppi prostetici**, tipicamente il gruppo eme dell'emoglobina, che hanno legami molto coniugati a lunghezze d'onda del visibile. Questi gruppi sono degli oggetti chimici caratterizzati da un elevato numero di doppi legami, con picchi di assorbimento tipicamente nella regione visibile, e che sono all'origine dell'esistenza dei pigmenti: ciò che assorbe a una certa lunghezza d'onda del visibile viene visto del colore complementare. Tipicamente abbiamo i *carotenoidi*, come il β -carotene, che sono nella zona dell'arancio-giallo, quindi hanno la zona di assorbimento intorno al blu, e l'eme che cade nel rosso, e quindi assorbe intorno al verde. Per conoscere la zona di assorbimento è sufficiente trovare il colore opposto a quello considerato, secondo lo schema della figura (6.17).

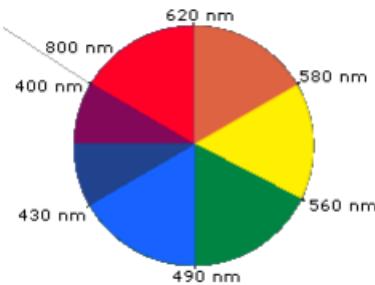


Figura 6.17: schema per capire a che lunghezza d'onda si ha assorbimento

Gli acidi nucleici sono comodi perché le basi assorbono tutte nella stessa zona: il picco di assorbimento è a 200-300 nm, tipicamente il coefficiente di estinzione molare si dà a 260 nm ed è molto sensibile al *pH*. La cosa particolare è che c'è un fortissimo effetto ipocromico: se prendiamo dei nucleotidi liberi questi hanno una certa assorbanza, se prendiamo la stessa concentrazione di nucleotidi liberi e li mettiamo a formare dei filamenti, diminuisce l'assorbanza. Se poi facciamo formare la doppia catena si ha un'ulteriore diminuzione dell'assorbanza. Ogni processo che li porta ad impilarsi in maniera ordinata provoca una diminuzione dell'intensità di assorbimento e questo è particolarmente utile perché permette di osservare tramite misure di assorbimento se l'elica del DNA si è formata aggregata o separata. Il melting del DNA viene osservato proprio facendo misure di assorbimento: quando si ha melting, cioè si rompe la doppia elica e rimangono i singoli filamenti si osserva, per effetto ipocromico, un aumento dell'intensità di assorbimento.

Dalla tabella in figura (6.18) possiamo vedere le lunghezze d'onda di assorbimento principale (tutte in una certa regione) e i rispettivi coefficienti di estinzione molare.

Basi	λ (nm)	$\epsilon \times 10^{-3}$ ($\text{cm}^{-1} \text{mol}^{-1}$)
Adenina	260.5	13.4
Adenosina	259.5	14.9
Guanina	275	8.1
Citosina	267	6.1
Timina	264.5	7.9
Uracile	259.5	8.2
NADH	340,259	6.23, 14.4
NAD+	260	5.9, 18
FAD+	450	incognito

Figura 6.18: lunghezze d'onda di assorbimento e relativi coefficienti di estinzione molare per i nucleotidi

Capitolo 7

Lezione 7: 22 Aprile 2015

7.1 SPETTROSCOPIA DI FLUORESCENZA

Ci occupiamo di capire cosa succede quando le molecole si disecitano tornando allo stato fondamentale con l'emissione di un fotone. La rappresentazione più semplice dei livelli è data dal *diagramma di Jablonski*, che presenta una coordinata cartesiana spaziale e una energetica (figura (7.1)).

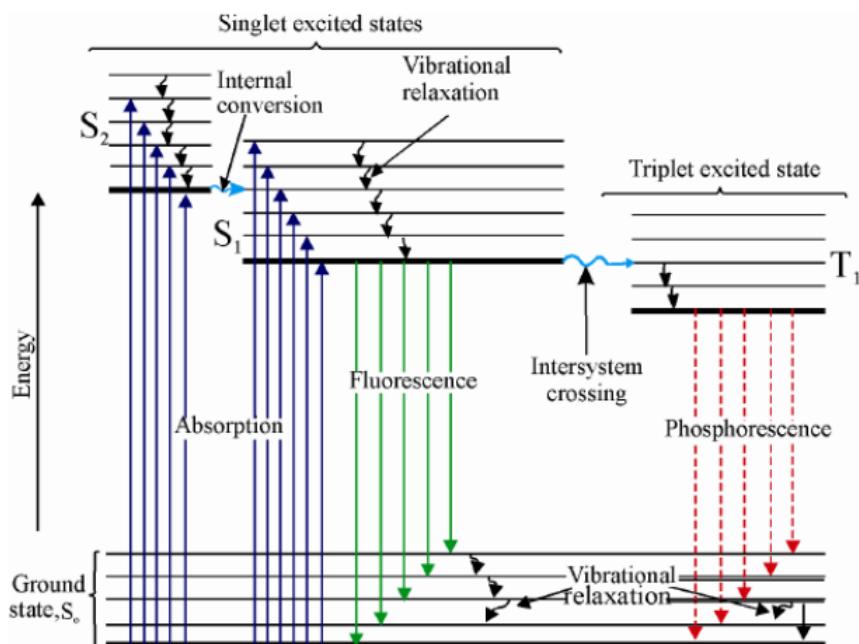


Figura 7.1: *diagramma di Jablonski*

Le transizioni di disecitazione, in cui le molecole perdono energia, assumono nomi diversi a seconda degli stati che sono coinvolti nella transizioni. Vediamo le varie transizioni:

- l'**assorbimento** porta da uno stato vibzionale qualsiasi dello stato fondamentale a uno stato vibzionale qualsiasi di un qualsiasi stato eccitato.
- processi di perdita di energia interna senza emissione di radiazione che possono avvenire:
 - all'interno di stati con la stessa molteplicità (**conversione interna**).
 - con passaggio a stati con molteplicità diversa: passaggio da stati di singoletto a stati di tripletto (**intersystem crossing**).

Questi processi sono molto veloci, avvengono su scale dell'ordine dei femtosecondi. A questo punto una volta arrivati sullo stato vibzionale fondamentale dello stato eccitato, per tornare allo stato fondamentale possiamo avere:

- diseccitazioni di tipo non radiativo, come le collisioni o il trasferimento risonante di energia.
- processi di tipo radiativo:
 - si chiama **fluorescenza** il processo per cui si parte dallo stato vibzionale fondamentale del primo singoletto eccitato.
 - si chiama **fosforescenza** se il processo parte dallo stato di tripletto.

La principale differenza tra fluorescenza e fosforescenza sta nei tempi di questi processi: la fosforescenza è un processo che è vietato dal punto di vista delle regole di selezione, quindi avviene su tempi molto più lunghi, anche centinaia di secondi. Per questo motivo è difficile osservarlo in condizioni normali. Quelli di cui parleremo all'inizio sono dei processi *unimolecolari*, cioè sono processi che riguardano quello che succede alla molecola solo a causa delle interazioni con se stessa, delle sue variazioni: conversione interna e intersystem crossing e i processi di fluorescenza. Poi affronteremo due tipi di processi bimolecolari che coinvolgono processi di diseccitazione dovuti alle interazioni con altre molecole e che sono il quenching collisionale e il FRET.

7.1.1 Processi unimolecolari

L'emissione di fluorescenza è caratterizzata dalla lunghezza d'onda del picco di emissione e dalla resa. Vediamo le caratteristiche generali della fluorescenza:

stokes shift : dal momento che l'emissione di fluorescenza avviene dallo stato vibzionale più basso dello stato eccitato, è in generale un processo a energia più bassa rispetto al processo di assorbimento, quindi si trova a lunghezze d'onda maggiori. Questo comporta che:

- noto il picco di assorbimento, sappiamo esattamente dove cercare la fluorescenza in termini di lunghezza d'onda..
- l'ampiezza dello stokes shift può servire per avere informazioni sulla complessità vibzionale del sistema: uno stokes shift molto alto vuol dire che c'è un grosso spread tra l'energia dei livelli vibzionali della molecola, un piccolo stokes shift invece implica che gli stati vibzionali sono molto simili tra loro.

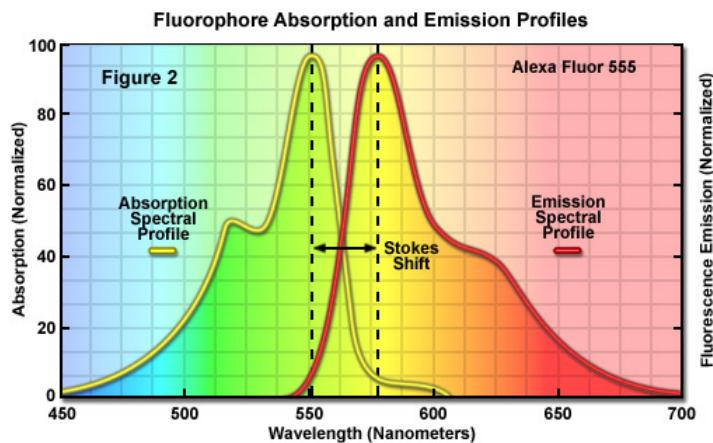


Figura 7.2: *stokes shift*

Lo stokes shift è riportato in figura (7.2).

Ci sono molecole con stokes shift molto diversi: il perilene per esempio ha un picco di assorbimento e di emissione praticamente sovrapposti, questo significa che ha uno spread dei livelli molto piccolo, invece il solfato di chinino, tipicamente usato nell'osservazione della fluorescenza, ha uno spread molto più grande.

mirror rule : la regola dello specchio prevede che lo spettro di emissione è un'immagine speculare dello spettro di assorbimento se la separazione vibrazionale dei livelli energetici S_0 e S_1 è piccola. È interessante per molecole che presentano spettri complessi. Questa caratteristica è riportata in figura (7.3).

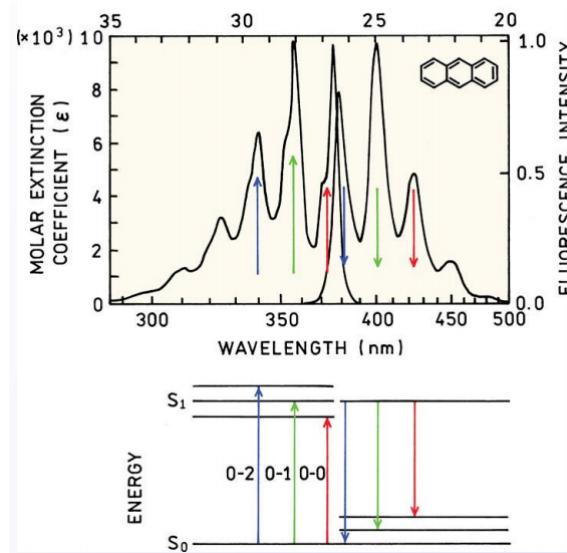


Figura 7.3: *mirror rule*

regola di Kasha : riguarda il fatto che lo spettro di fluorescenza è indipendente, in termini di forma, dalla lunghezza d'onda di eccitazione, in quanto riflette gli stati vibrazionali dello stato fondamentale. Quello che cambia è la probabilità di assorbimento e quindi l'intensità dello spettro. Plotando insieme gli spettri alle varie lunghezze d'onda si vede che il picco si trova a altezze (intensità) diverse.

I parametri che utilizziamo per descrivere la fluorescenza e per quantificarla sono essenzialmente due: la **resa quantica**, che è il parametro statico, e il **tempo di vita**, che ci dà informazioni sulla dinamica del processo.

Ricordiamo che ci sono due tipi di processo: quelli di assorbimento stimolato, e quelli di emissione, stimolata e spontanea. All'equilibrio il numero di molecole che sono in uno stato e transiscono all'altro deve essere uguale al viceversa. La necessità di questo equilibrio aveva portato Einstein a dedurre l'esistenza del processo di emissione spontanea. Dette n_0 e n_1 le popolazioni dei due stati, all'equilibrio si ha:

$$n_0 B_{01} I(\nu) = n_1 B_{10} I(\nu) + A_{10} \quad (7.1)$$

In generale:

$$\frac{n_0}{n_1} = \frac{n_1 B_{10} I(\nu) + A_{10}}{n_0 B_{01} I(\nu)} = 1 + \frac{A_{10}}{n_0 B_{01} I(\nu)} \quad (7.2)$$

$$I(\nu) = \frac{8\pi h\nu^3}{c^3} \frac{1}{e^{h\nu/kT} - 1} \quad (7.3)$$

$$\frac{n_0}{n_1} = e^{-(E_0 - E_1)/kT} = e^{h\nu/kT} \quad (7.4)$$

Per il coefficiente di Einstein dell'emissione spontanea otteniamo:

$$A_{10} \approx 2.88 \times 10^{-9} n^2 \langle \nu^{-3} \rangle^{-1} \int \frac{\varepsilon(\nu) d\nu}{\nu} \quad (7.5)$$

$$A_{10} = \frac{8\pi h\nu^3}{c^3} B_{10} = \frac{32\pi^3 \nu^3}{3c^3 \hbar} D_{10} \quad (7.6)$$

In assenza di perturbazione, cioè se non c'è radiazione esterna, non possono esserci coefficienti di assorbimento stimolato ed emissione stimolata e la popolazione dei livelli eccitati decade nel tempo in base solamente al coefficiente di emissione spontanea:

$$\frac{dn_1}{dt} = -A_{10} n_1 \quad \Rightarrow \quad n_1(t) = n_1(0) e^{-A_{10} t} \quad (7.7)$$

Posso chiamare l'inverso del coefficiente di emissione spontanea (cosa per cui è interessante che si possa calcolare sperimentalmente), *tempo di vita naturale (o radiativo)*: è il tempo che normalmente la molecola resterebbe sullo stato eccitato e dipende dalla sua velocità di emissione spontanea:

$$\tau_R = \frac{1}{A_{10}} \quad (7.8)$$

Supponiamo ora che sul sistema arrivino un certo numero di fotoni al secondo I_0 , allora la popolazione dello stato eccitato S_1 diminuisce nel tempo in un modo che dipende sia dalla parte di emissione radiativa, sia per i processi non radiativi

(internal conversion e intersystem crossing), ma nello stesso tempo aumenta per assorbimento stimolato:

$$\frac{dS_1}{dt} = I_0 - (k_R + k_{NR})S_1 \quad (7.9)$$

$$k_R = A_{10} \quad k_{NR} = k_{ic} + k_{is} + \dots$$

La diseccitazione radiativa è l'emissione spontanea.

In condizioni stazionarie:

$$\frac{dS_1}{dt} = 0 \quad (7.10)$$

Questo ci permette di definire la resa quantica, all'equilibrio, come il rapporto tra i fotoni emessi per fluorescenza, rispetto a tutte le diseccitazioni totali. La resa quantica è quindi la probabilità di una molecola di diseccitarsi per emissione di radiazione:

$$\phi = \frac{k_R S_1}{I_0} = \frac{k_R}{k_R + k_{NR}} = \frac{k_R}{k_R + k_{ic} + k_{is} + k_q(Q)} \quad (7.11)$$

Chiaramente la resa quantica all'equilibrio è un valore compreso tra 0 e 1, ed è esattamente 1 nell'ipotesi di aver inibito tutti i processi di emissione non radiativa.

Viceversa, in condizioni transienti, in cui abbiamo inizialmente una certa intensità che viene data per trasportare le molecole dallo stato fondamentale allo stato eccitato, la popolazione decadrà nel tempo con un coefficiente temporale che dipende sia dalla probabilità di transizione radiativa che da quella non radiativa. C'è un termine, chiamato *tempo di vita di fluorescenza*, che differisce da dal tempo di vita naturale per il fatto che quello naturale è quello che osserveremmo se non ci fosse alcun altro modo di diseccitare la molecola (resa quantica pari a 1), il tempo di vita di fluorescenza invece è quello che si osserva sperimentalmente perché esistono processi non radiativi disponibili per la molecola che fanno sì che non tutte le diseccitazioni avvengano per fluorescenza.

$$S_1(t) = S_1(0)e^{-(k_R + k_{NR})t} = S_1(0)e^{-t/\tau_F} \quad (7.12)$$

$$\tau_F = \frac{1}{k_R + k_{NR}} \quad (7.13)$$

Chiaramente il tempo di vita di fluorescenza è sempre maggiore di quello naturale. La resa quantica può essere vista anche come rapporto dei tempi di vita:

$$\phi = \frac{k_R}{k_R + k_{NR}} = \frac{\tau}{\tau_F} < 1 \quad (7.14)$$

L'altra quantità che misuriamo in condizioni stazionarie è l'**intensità di fluorescenza**, al variare della lunghezza d'onda:

$$F(\lambda) \propto P_{abs} \cdot P_{em} \propto (I_0 - I) \cdot (\phi \cdot f(\lambda_{em}) \cdot d) \quad (7.15)$$

Questa dipende dalla probabilità che la molecola abbia assorbito dei fotoni alla lunghezza d'onda di eccitazione e dalla probabilità che abbia emesso fotoni alla lunghezza d'onda a cui li stiamo osservando. Ma la probabilità di emissione di fotoni a quella lunghezza d'onda dipende dalla probabilità che in generale la diseccitazione avvenga per emissione di fotoni, dalla frazione dei fotoni emessi

per diseccitazione che sono alla lunghezza d'onda che sto osservando, da fattori strumentali. La probabilità di assorbimento dipende dall'intensità di radiazione assorbita a quella lunghezza d'onda. L'intensità di radiazione che viene assorbita è la differenza tra quella incidente e quella trasmessa al rivelatore: la relazione tra le due è di tipo esponenziale:

$$I = I_0 e^{-2.303\varepsilon(\lambda_{abs})Cl} \quad (7.16)$$

Se l'assorbanza $A = \varepsilon Cl$ è abbastanza piccolo (< 0.05), possiamo fare lo sviluppo di Taylor di questa espressione e trovare una relazione tra intensità incidente e intensità trasmessa:

$$I = I_0 [1 - 2.303\varepsilon(\lambda_{abs})Cl] \quad (7.17)$$

$$I_0 - I = 2.303\varepsilon(\lambda_{abs})ClI_0 \quad (7.18)$$

La differenza tra le due dipende dal coefficiente di estinzione molare alla lunghezza d'onda di assorbimento, che dà la sezione d'urto e quindi la probabilità di assorbimento, dalla concentrazione, dalla lunghezza del cammino ottico e dall'intensità incidente.

Quindi per l'intensità di fluorescenza si ha la dipendenza da tre tipi di parametri:

1. parametri che dipendono dal tipo di dye (colorante) che stiamo vedendo: sono la resa quantica, il coefficiente di estinzione molare e la $f(\lambda)$
2. parametri che dipendono da come viene preparato il campione: concentrazione e lunghezza del cammino ottico
3. parametri che derivano dallo strumento: intensità di radiazione incidente e il d , cioè quanto uno strumento è efficiente a vedere radiazione a una lunghezza d'onda.

Mettendo insieme tutti questi termini troviamo che la fluorescenza è data da:

$$F(\lambda) = \varepsilon(\lambda_{abs}) \cdot \phi \cdot f(\lambda_{em}) \cdot C \cdot I_0 \cdot K \quad (7.19)$$

È importante sottolineare che la fluorescenza è lineare nella concentrazione se siamo ad assorbanze (quindi concentrazioni basse), come vediamo in figura (7.4).

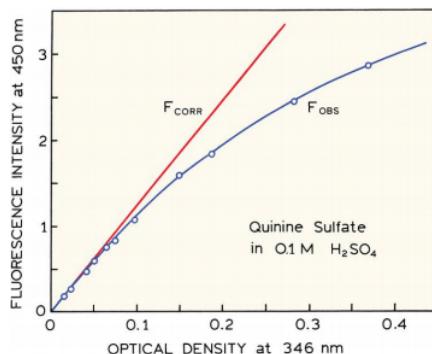


Figura 7.4: dipendenza lineare della fluorescenza dalla concentrazione

La fluorescenza inoltre dipende dal fattore K , che è un parametro strumentale che non è una misura assoluta: dipende dallo strumento con cui stiamo facendo l'esperimento. Questo ci dice che non ha senso confrontare intensità di fluorescenza prese con strumenti diversi. La fluorescenza ha unità arbitrarie. Quello che possiamo fare è confrontare a parità di condizioni sperimentali i risultati ottenuti di intensità, al variare di un certo parametro (pH, concentrazione, denaturante,...). Questo però dipende dai parametri strumentali come la dimensione delle fenditure, la tensione data al fototubo, eccetera.

La fluorescenza è caratterizzata anche da una lunghezza d'onda massima dello spettro, che non dovrebbe dipendere dal fluorimetro su cui si lavora.
A basse assorbanze abbiamo detto che la fluorescenza è lineare nella concentrazione: questo ci permette di non dover ottenere sempre campioni con esattamente la stessa concentrazione, ma è sufficiente rinormalizzare dopo.

Il fattore K è legato a W.W. Webb, che ha lavorato nel campo della fluorescenza, ha provato che in un esperimento fatto con il microscopio, il numero di fotoni che viene raccolto rispetto al numero di fotoni disponibili è circa il 3%. L'effetto dell'*inner filtering* spiega l'effetto di avere concentrazioni tali per cui $\varepsilon Cl > 0.05$: l'intensità utile per l'emissione di fluorescenza ha un picco in corrispondenza del valore 0.05, poi diminuisce. L'effetto quindi è quello di una diminuzione dell'intensità di fluorescenza, come possiamo vedere in figura (7.5).

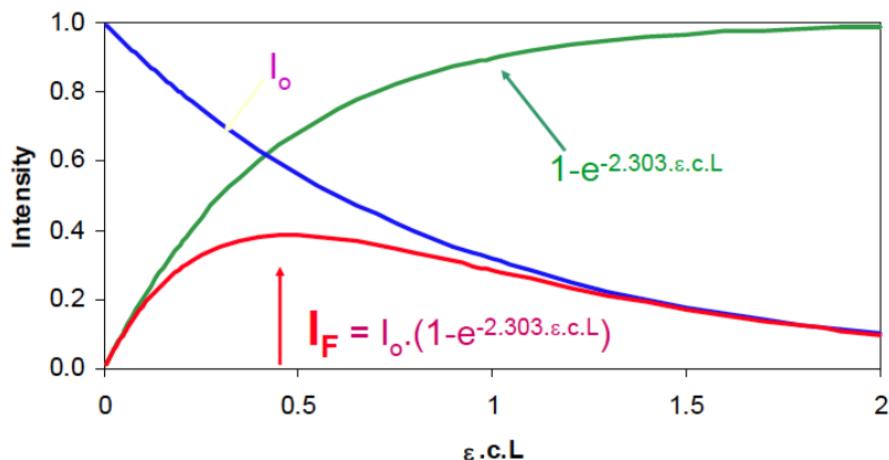


Figura 7.5: effetto dell'*inner filtering*

Un altro problema è quello del **photobleaching**: lo sbiancamento toglie fotoni che emettono per fluorescenza. In generale le molecole fanno un certo numero di cicli eccitazione-emissione, a un certo punto però può accadere che ci sia una transizione allo stato di tripletto e può anche accadere che da questo stato di tripletto le molecole vadano a finire in uno stato *dark* da cui non emettono più. A questo punto le molecole non sono più disponibili all'interno del ciclo eccitazione-emissione e si ha una diminuzione apparente della concentrazione della sostanza in esame. Il photobleaching dà un limite alla quantità di fotoni

ottenibili dalla nostra soluzione nel tempo. Si ha una distruzione irreversibile del fluoroforo, che avviene allo stato eccitato e quindi riguarda una serie di processi di diseccitazione non radiativi che portano la molecola in uno stato buio. Il photobleaching è proporzionale all'intensità di eccitazione integrata nel tempo, cioè quanti fotoni vengono mandati sulla molecola, dipende quindi da quanti cicli eccitazione-emissione sta facendo la molecola.

Per limitare questo effetto si può minimizzare l'intensità di eccitazione, essendo una questione di probabilità di transizione più cicli fa la molecola più rapidamente arriva la probabilità che cada nello stato dark. Contemporaneamente bisogna massimizzare l'efficienza della rivelazione perché con meno molecole eccitate avremo meno luce.

Detta ϕ_B la resa di photobleaching, il rapporto tra la resa di fluorescenza e la resa di bleaching ϕ_F/ϕ_B dà il numero totale di fotoni emessi e quindi il numero di cicli che si possono fare di fluorescenza prima del bleaching. Definiamo i seguenti *rate*:

- rate di eccitazione-rilassamento elettronico: $R = I_0 OD$ ($OD = A$)
- rate limite eccitazione-rilassamento: $R_{max} \div (\varepsilon_\lambda \tau_F)^{-1}$
- rate di fluorescenza (no bleaching): $k_F = \phi_F R$
- rate bleaching: $k_B = \phi_B R$

Se l'effetto del bleaching è quello di diminuire nel tempo la concentrazione disponibile di molecole per fare il ciclo di fluorescenza, in modo esponenziale, con un esponenziale che dipende dalla probabilità che avvenga questo processo:

$$C(t) = C_0 e^{-k_B t} \quad (7.20)$$

(con C_0 concentrazione prima del bleaching) questo vuol dire che semplicemente per effetti di bleaching, la fluorescenza nel tempo diminuirà esponenzialmente

$$F(t) = k_F e^{-k_B t} \quad (7.21)$$

Sostanzialmente ci si accorge che c'è bleaching nel campione perché facendo una misura in stato stazionario e osservando la fluorescenza la vediamo diminuire nel tempo. Ultimamente non succede più molto perché si lavora con fluorimetri che lavorano in maniera pulsata: accendono l'eccitazione soltanto nel momento in cui si fa la misura. I vecchi fluorimetri invece continuavano a mandare fotoni incidenti in modo costante.

La formula (7.21) ci ricorda inoltre che la fluorescenza dipende da: ϕ, ε, C .

Lo strumento per fare esperimenti di fluorescenza è fatto sostanzialmente come quello per l'assorbimento, con due differenze fondamentali:

1. è uno strumento a singolo raggio
2. la fluorescenza, a differenza dell'assorbimento, viene osservata a 90° rispetto all'eccitazione: questo perché la fluorescenza è un fenomeno esotico e i fotoni che vengono emessi sono a uguale probabilità in tutto quanto l'angolo solido e mettendosi a 90° si minimizza la quantità di luce di eccitazione che arriva all'rivelatore.

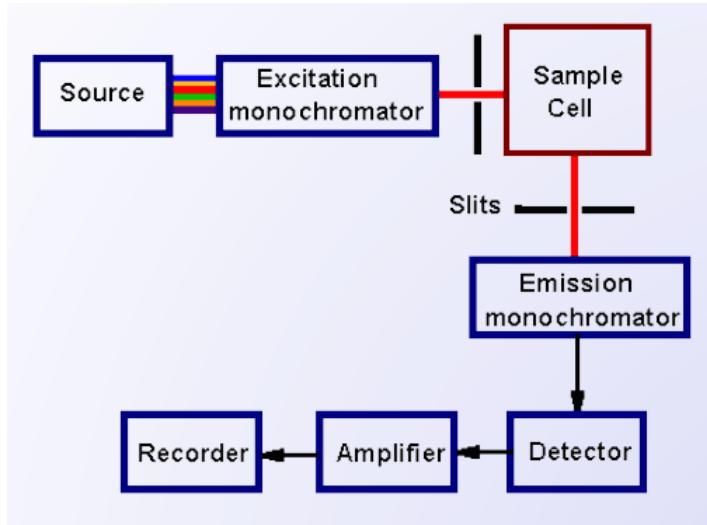


Figura 7.6: schema di funzionamento del fluorimetro

Lo schema di funzionamento del fluorimetro è riportato in figura (7.6). C'è un secondo monocromatore perché viene fatta la scansione. Un tipico fluorimetro può fare due tipi di spettro: di eccitazione e di emissione, che è il più semplice: scelgo una lunghezza d'onda per eccitare il campione e poi cambio lunghezza d'onda per vedere emissione. Gli spettri di assorbimento ed emissione dovrebbero essere abbastanza simili perché la maggiore o minore probabilità di emissione dovrebbe riflettere la maggiore o minore probabilità di assorbimento.

Le componenti fondamentali del fluorimetro quindi sono: la sorgente, i filtri, i monocromatori, i portacampioni e i rivelatori. Esistono tantissime sorgenti diverse, quelle più tipiche sono le lampade allo xeno, perché quelle al mercurio danno molte righe, ma non uno spettro continuo. Altra sorgente è la lampada a tungsteno, ma non è molto usata perché non ha nessuna emissione nell'ultravioletto, oppure ci sono i laser.

La cosa fondamentale sono i filtri, che sono di due tipi:

- filtri di eccitazione: hanno lo scopo di garantire che arrivi al campione soltanto la luce che vogliamo dare per eccitare. La cosa ideale sarebbe che per ciascuna lunghezza d'onda ci sia un *filtro interferenziale* a quella lunghezza d'onda, cioè un filtro che fa passare le lunghezze d'onda in un piccolissimo intervallo di 3-4 nm al massimo. È necessario nel caso di uno strumento non perfettamente sigillato, per cui si ha luce che proviene dall'esterno.
- filtri di emissione: è come minimo un *filtro passa-alto*, cioè un filtro che fa passare le lunghezze d'onda superiori ad una certa lunghezza d'onda, che è quella di eccitazione. Ancora meglio sarebbe avere dei *filtri passabanda*, cioè filtri che fanno passare un grosso intervallo di lunghezze d'onda, che tipicamente si sceglie centrato su quella del massimo di emissione, in modo da evitare la luce rimasta dall'eccitazione. Ricordiamo che se il campione non è perfettamente cristallino o il campione è contaminato si

ha scattering: si ha emissione del fotone alla stessa lunghezza d'onda di quello incidente, anche alle armoniche superiori. Quindi un filtro passa-alto lascia i contributi di scattering delle armoniche superiori, un filtro passa-banda no.

Il fluorimetro che c'è in laboratorio non chiede di mettere i filtri, e la ruota dei filtri del fluorimetro è impostata su *auto*, cioè automaticamente lo strumento sceglie, tra i filtri che ha a disposizione, quelli più adatti all'intervallo di lunghezze d'onda scelti.

I portacampioni sono importanti perchè a seconda del tipo di materiale di cui sono fatti sono più o meno trasparenti alla radiazione che arriva: quelli fatti in quarzo sono trasparenti fino all'UV, quelli in vetro sotto 350 nm non fanno vedere nulla. La cosa fondamentale è che devono avere 4 facce ottiche (cioè trasparenti e non smerigliate) perchè si osserva a 90°. Tipicamente ci sono i portacampioni per assorbimento, che hanno solo 2 facce ottiche, e quelli di emissione, che ne hanno 4.

I fotomoltiplicatori non sono ugualmente efficienti in tutto l'intervallo di lunghezze d'onda, soprattutto superati i 600 nm la loro efficienza crolla. Se il nostro software non corregge automaticamente la probabilità di rivelazione del fotomoltiplicatore vediamo tutti quanti gli spettri spostati verso lunghezze d'onda minori e a questo punto diventa sbagliata la lunghezza d'onda del massimo.

È fondamentale correggere l'eccitazione e l'emissione per lo spettro della lampada (cosa che fanno sicuramente tutti i fluorimetri), perchè altrimenti si avrebbero degli strani picchi di eccitazione dovuti al fatto che la lampada emette di più o di meno a quella lunghezza d'onda, ma non sono dovuti al fatto che il campione ha un diverso coefficiente di estinzione molare.

Nell'emissione questa cosa si vede meno: sarebbe come avere un'intensità di eccitazione più forte che dà un picco più grande.

L'altro parametro che bisogna scegliere in fase sperimentale è l'ampiezza delle fenditure, che nel nostro caso di biomolecole con spettri molto ampi, non ha nessun effetto sulla forma effettiva dello spettro finale. L'ampiezza delle fenditure pari a 10-15 nm non ci dice l'effettiva apertura delle fenditure, ma la risoluzione del monocromatore, cioè quanto integra il monocromatore per ogni lunghezza d'onda. (2 nm per esempio vuol dire che quando misuro 350 nm sto leggendo 350-351: è una media. 10 nm vuol dire che se leggo 350 in realtà sto leggendo la media tra 345 e 355 nm).

Aumentando l'ampiezza delle fenditure viene fatta una media del segnale e se ci sono dei picchi fini questi vanno persi, come possiamo vedere in figura (7.7).

Che informazioni posso trarre dagli spettri di fluorescenza?

- informazioni sull'intorno della molecola, cioè sul suo *circondario*
- informazioni sui tempi di vita, derivanti da misure dinamiche della fluorescenza
- informazioni su come si muovono le molecole (coefficienti di diffusione)
- informazioni su quanto sono distanti le molecole, mettendo insieme più molecole che possono interagire tra di loro.

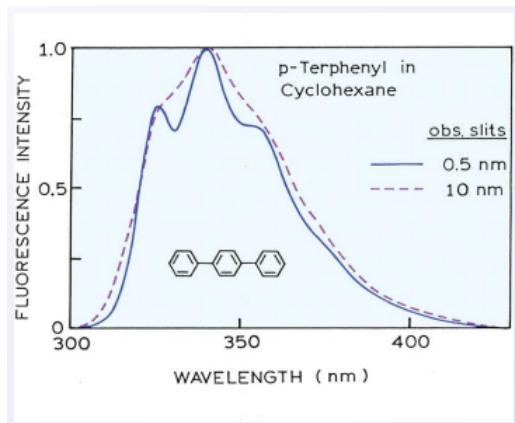


Figura 7.7: differenza di picchi a diverse ampiezze della fenditura

- se invece di osservare gli spettri facciamo delle immagini di fluorescenza possiamo ottenere informazioni sull'oggetto guardando dove sono le componenti fluorescenti (localizzazione della fluorescenza)

Qual è il vantaggio di utilizzare la fluorescenza piuttosto che altre tecniche? Perchè è molto sensibile a basse concentrazioni, è molto sensibile a piccole variazioni di quello che succede attorno al fluoroforo e perchè si ha un numero molto grande di fluorofori sensibili a molte cose diversi dell'ambiente che hanno intorno. Questo significa che si può scegliere un fluoroforo per osservare qualunque parametro.

Dalla forma dello spettro ricaviamo informazioni sull'intorno, soprattutto sulla polarità, mentre dalle rese ricaviamo informazioni sui cambiamenti di natura dell'intorno: il legame.

Esistono fluorofori di vari tipi: *fluorofori intrinseci*, cioè sono dentro la macromolecola e *fluorofori sintetici*, che devono essere aggiunti dall'esterno e di questi ce ne sono di vari tipi. Ci sono quelli aggiunti dall'esterno che formano un legame fisico, cioè si legano con una certa affinità e hanno un equilibrio di legame e quindi sono sempre un po' legati un po' liberi, ci sono quelli che formano legami chimici, che sono quindi legati in modo indissolubile e quindi in soluzione abbiamo solo quelli legati, ci sono addirittura proteine che sono fluorescenti che si possono far esprimere dalle cellule, legate ad altre proteine che ci interessano della cellula.

Il dna non ha fluorofori intrinseci: le basi non fluorescono.

Le proteine hanno come fluorofori intrinseci fenilalanina, tirosina e triptofano. Il triptofano, soprattutto, ha uno spettro che dipende molto dalla polarità dell'ambiente che lo circonda, quindi la lunghezza d'onda dello spettro di triptofano è molto sensibile alla polarità dell'ambiente circostante, ed è usato tipicamente per fare delle misure di denaturazione delle proteine: . quindi usato per misura denaturazione della proteina. Questo comportamento utile del triptofano è osservabile in figura (7.8). Se si vuole eccitare selettivamente il triptofano bisogna ricordare che tirosina e triptofano hanno spettri parzialmente sovrapposti fino a

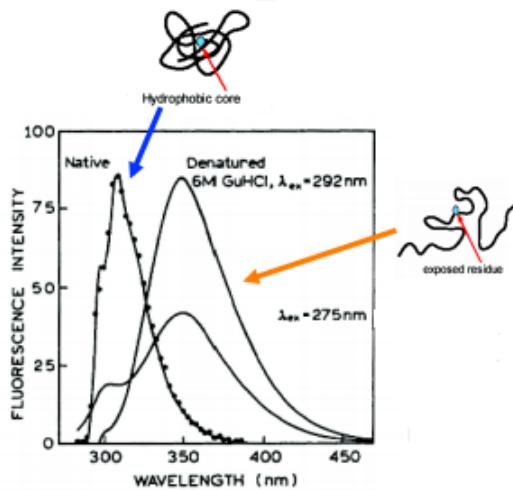


Figura 7.8: diverso spettro del triptofano per proteina nativa e denaturata

290 nm, quindi se si vuole studiare l'emissione del triptofano bisogna eccitare a una lunghezza d'onda a cui siamo sicuri di non eccitare più la tirosina, in genere 295 nm. Il fatto che non eccitiamo il triptofano nel suo massimo (280 nm) non ha nessun effetto sulla forma dello spettro, per la regola di Kasha.

Di fluorofori estrinseci ce ne sono tantissimi, i più classici sono: la fluorescina che emette nel verde, la texas red nel rosso e il DAPI nell'ultravioletto-blu. In figura (7.9) sono riportati i loro spettri di assorbimento e di emissione.

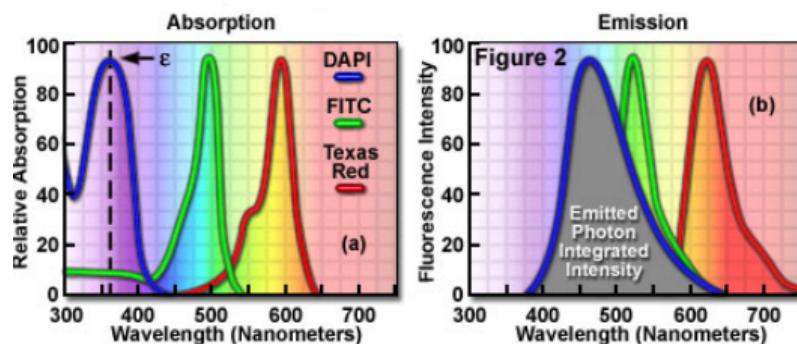


Figura 7.9: spettri di assorbimento e emissione di fluorescina, texas red e DAPI

Questi sono dei fluorofori che si possono guardare da soli o legare in modo covalente o non covalente, non dipendono praticamente per nulla dalla polarità dell'environment (solo la fluorescina ha una dipendenza dal pH). Un fluoroforo molto utile è l'ANS, che invece ha un'elevatissima sensibilità al solvente. Se si studia il legame dell'ANS con una proteina, anche se è un legame di tipo fisico caratterizzato da una costante di associazione, la sua intensità in acqua è pra-

ticamente nulla e si può considerare la specie libera.

Altro fluoroforo con elevata sensibilità al solvente è il PRODAN, che si usa tipicamente per vedere quanto sono permeabili le membrane.

Quelle che ci interessano sono fluorescina e rodamina, che non sono sensibili alla polarità dell'environment, con alte rese quantiche e possono essere usate per fare il *labeling* di anticorpi, cioè vanno a legarsi a anticorpi specifici. Di fluorescina e rodamina sono state fatte una serie di varianti che si differenziano per la posizione del loro spettro di emissione (figura (7.10)), anche se legano la stessa all'interno della cellula. Questo è importante perché negli esperimenti di *imaging*, dove si va a vedere dove sono localizzati i vari oggetti della molecola, è comodo colorare nello stesso momento con colori diversi (cioè diversa lunghezza d'onda di emissione) diverse componenti in modo da avere informazioni su cose diverse contemporaneamente.

Anche per il BODIPY sono state create diverse varianti.

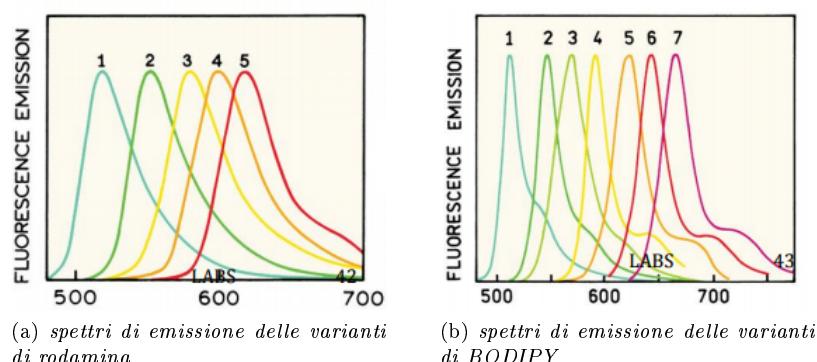
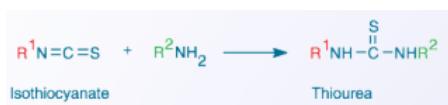


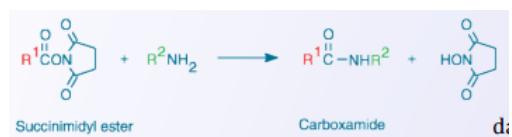
Figura 7.10: varianti di uno stesso fluoroforo

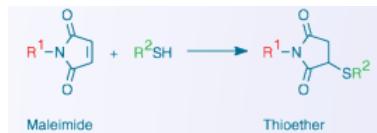
Come si legano questi oggetti fluorescenti a quelli che vogliamo osservare nelle molecole? Ci sono vari tipi di labeling: noi vogliamo un labeling covalente perché ci serve che sia un legame stabile e non di tipo fisico. Ci sono sostanzialmente tre tipi di legame:

amina primaria + isotiocianato :



amina primaria + succinimidilestere :





tiolo + maleimide :

Isotiocianato e succinimidilester reagiscono con le ammine, tra cui sicuramente in ogni proteina c'è quella terminale del gruppo amminico, e poi tutte le ammine dei residui. A seconda del pH si può selezionare il fatto che il legame avvenga solo con l'ammina primaria, cioè quella terminale. Il maleimide si lega i gruppi sulfidrili liberi, quindi servono cisteine spaiate.

Con l'eccitazione a due fotoni, con una sola lunghezza d'onda, possiamo simultaneamente eccitare fluorofori diversi, che emettono in zone relativamente diverse dello spettro. In realtà l'eccitazione simultanea si può avere anche con l'UV.

Tra le sonde ci sono quelle della famiglia ALEXA, che sono fluorofori sintetici il cui nome indica la loro lunghezza d'onda di emissione. È una famiglia numerosissima, come possiamo vedere in figura (7.11).

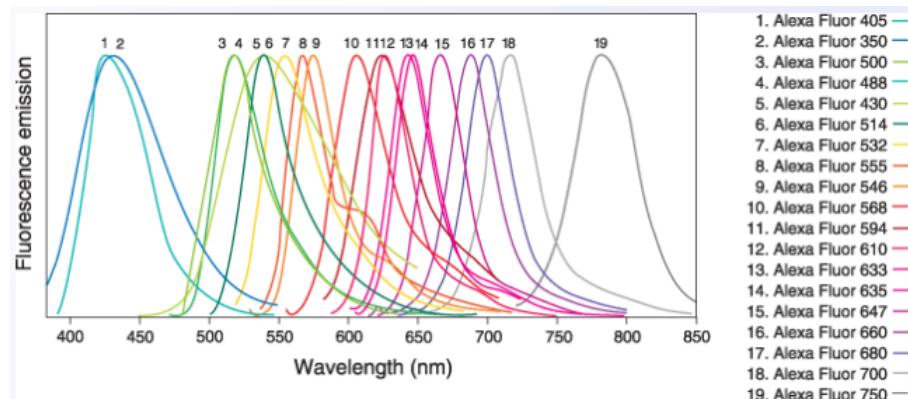


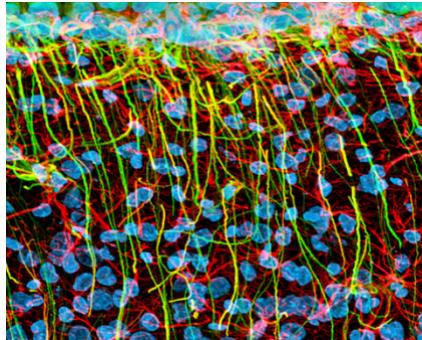
Figura 7.11: varianti di ALEXA

Ci sono fluorofori che ci permettono di vedere qualunque cosa, ad esempio ci sono quelli sensibili al calcio, che come il magnesio, è lo ione più comune e importante per il funzionamento delle cellule. Ci sono molte proteine come la fura red, che sono sensibili alla concentrazione di calcio e aumenta tantissimo l'intensità di fluorescenza all'aumentare della concentrazione.

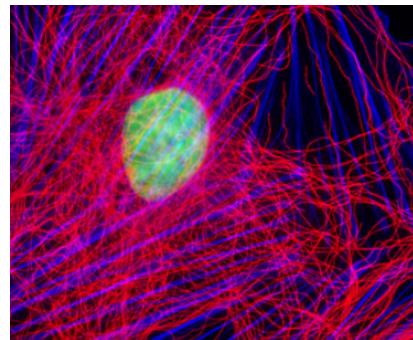
Il punto è che all'interno della cellula si può avere concentrazione del segnale anche per altri motivi, quindi c'è bisogno di avere un altro oggetto fluorescente che sia sensibile a un altro parametro della cellula e che permette di avere informazioni sulla concentrazione delle specie emissive. In questo modo facciamo una *titolazione raziometrica*, cioè il rapporto tra la fluorescenza di una cosa che sappiamo deve aumentare e una che sappiamo rimanere costante.

I fluorofori sono fondamentali anche per lo studio del pH della soluzione: questi fluorofori cambiano colore e intensità a seconda del pH.

Alla fine tutti i fluorofori insieme permettono di fare delle immagini in cui le componenti delle cellule sono evidenziate con colori diversi. Alcuni esempi sono riportati in figura (7.12).



(a) *ippocampo sagittale del cervello di un topo*



(b) *aorta e tessuto muscolare di un topo*

Figura 7.12: *esempi di immagini ottenute con l'utilizzo di vari fluorofori*

Un'altra cosa è prendere le proteine fluorescenti e chiedere che la parte di cellula che siamo interessati a vedere esprima la proteina in coda. Questo si fa per proteine e osservabili tali per cui la proteina ha dimensioni molto ridotte rispetto all'osservabile. La maggior parte delle proteine fluorescenti che abbiamo sono state estratte da una medusa fluorescente, la *aequorea victoria*. La fluorescenza è dovuta a un cromoforo ed è dovuta moltissimo a come è fatto l'intorno del fluoroforo che avvolge il cromoforo. Dalla proteina che in natura è fluorescente verde (chiamata GFP: green fluorescent protein) sono poi state fatte delle variazioni modificando il cromoforo per ottenere vari colori.

Dagli anemoni di mare hanno estratto la DSRED e da questa, modificandola, hanno creato la serie mFRUIT.

Tutto questo riguarda quello che si può fare con i processi unimolecolari.

Capitolo 8

Lezione 8: 29 Aprile 2015

Piccolo chiarimento

I processi di conversione interna, essendo legati ai moti vibrazionali delle molecole, sono legati alla temperatura: più aumenta la temperatura più sono probabili i processi di conversione interna. Quindi la costante di diseccitazione non radiativa aumenta all'aumentare della temperatura. Se questa costante aumenta sicuramente diminuirà la resa quantica di fluorescenza e il tempo di vita. Questo significa che se facciamo degli esperimenti al variare della temperatura si ha una diminuzione intrinseca dell'intensità di fluorescenza dovuta all'aumento dell'agitazione molecolare che favorisce i processi di diseccitazione non radiativi.

Ad esempio abbiamo parlato della denaturazione che espone il triptofano al solvente: se guardiamo la lunghezza d'onda non ci sono problemi perché non è una grandezza che dipende dalla temperatura, se invece si utilizzano delle sonde come l' ANS che cambia moltissimo la fluorescenza quando è esposto all'acqua, allora il parametro che si guarda è sia la lunghezza d'onda che l'intensità di fluorescenza. Se si guarda l'intensità di fluorescenza bisogna tener conto del fatto che c'è una specie di baseline dovuta al cambiamento di temperatura, che è indipendente da quello che è il cambiamento conformazionale della proteina. Osserveremo la variazione dovuta alla transizione sovrapposta a una variazione dovuta intrinsecamente alla temperatura.

L'intensità di fluorescenza in funzione della temperatura diminuisce in modo esponenziale. Tipicamente se la variazione di intensità di fluorescenza è monotona senza nessuno strano comportamento allora non sta succedendo nulla alla proteina, se invece si ha una diminuzione normale, un cambiamento conformazionale e poi nuovamente la diminuzione normale, si vede innestare il cambiamento conformazionale perché ha un comportamento diverso da quello dovuto semplicemente alla temperatura.

8.1 FRET

Il primo dei due processi bimolecolari che vediamo è il **FRET**, che è l'acronimo per *fluorescent resonant energy transfert*, cioè il trasferimento risonante di energia: la molecola quando è nello stato eccitato, al posto che disecxitarsi

emettendo un fotone, una volta raggiunto lo stato vibrazionale fondamentale dello stato eccitato, per vicinanza di un'altra molecola trasferisce la sua eccitazione all'altra molecola che poi si diseccita per fluorescenza, mentre la molecola di partenza decade in modo non radiativo. Tale processo è riportato in figura (8.1).

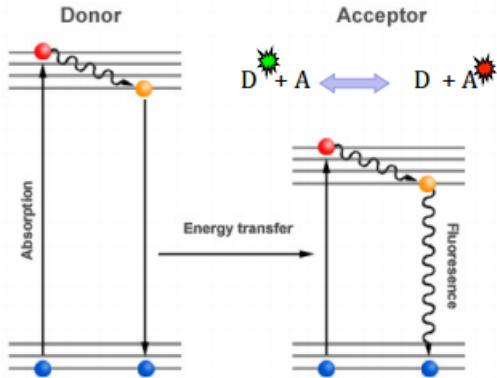


Figura 8.1: *processo di trasferimento risonante di energia*

Sostanzialmente è un trasferimento di energia non radiativo, quello che succede è che si ha un accoppiamento dipolo-dipolo a medio raggio. Il *donore* è la molecola che dona la sua energia, l'*accettore* la molecola che la riceve. L'effetto dello FRET è che diminuisce l'intensità di fluorescenza, perché alcune molecole (donori) si diseccitano in modo non radiativo, poi si apre un percorso di disecitazione non radiativo che fa diminuire il tempo di vita, l'accettore infine fluoresce. Immaginiamo di avere due proteine, *x* e *y*, legate una a un donore, l'altra ad un accettore, quello che succede è che eccitiamo il donore a una certa lunghezza d'onda:

- se accettore e donore sono lontani, non avviene il FRET e osserviamo l'emissione del donore
- se le condizioni sono giuste, cioè sono abbastanza vicini, il donore trasferisce la sua eccitazione all'accettore e osserviamo l'emissione dell'accettore, a un'altra lunghezza d'onda rispetto a quella di emissione che avrebbe avuto il donore.

Normalmente mettendo due molecole insieme in soluzione non si ha in automatico il transfer, ma devono essere rispettate determinate condizioni. La *teoria di Forster* ci dice che questo trasferimento di energia avviene per interazione dipolo-dipolo e quindi l'andamento del fattore di interazione sarà inversamente proporzionale alla distanza alla sesta. La probabilità del processo di transfert è data da:

$$k_{ET} = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{R} \right)^6 \quad (8.1)$$

dove τ_D è il tempo di vita del donore in assenza dell'accettore. Questa dipendenza è ovvia perché la probabilità di un processo che deve avvenire allo stato

eccitato dipende da quanto tempo si trascorre sullo stato eccitato: è più probabile se il tempo di vita è più corto.

L'entità di questa interazione dipende dalla distanza e da un fattore di accoppiamento, cioè da come sono orientati relativamente il dipolo dell'accettore e quello del donore. Questo perché dovendo lavorare in termini di probabilità dobbiamo valutare dei momenti di transizione (dell'accettore e del donore): a seconda di quanto sono simili c'è un fattore che ci dice quanto è probabile la transizione.

R_0 è la distanza caratteristica donore-accettore:

$$R_0^6 = \left\{ \frac{9000(\ln 10)k^2\phi_D}{128\pi^5 N_A n^4} \right\} \int \varepsilon_A(\lambda) f_D(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (8.2)$$

Questa distanza caratteristica dipende da diversi parametri: la resa quantica del donore ϕ_D , cioè la probabilità che il donore emetta radiazione di fluorescenza, un parametro k^2 di orientazione del momento di dipolo dell'emissione, rispetto a quello di assorbimento, l'indice di rifrazione n del mezzo tra accettore e donore e dall'integrale, detto *integrale di sovrapposizione* $J(\lambda)$, che quantifica la sovrapposizione tra lo spettro di assorbimento dell'accettore e quello di emissione del donore, e possiamo vederlo graficamente in figura (8.2).

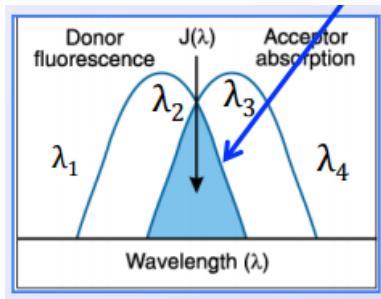


Figura 8.2: *integrale di sovrapposizione*

Se gli oggetti sono disposti in modo casuale la media isotropa del fattore di orientazione è data da:

$$k^2 = \frac{2}{3} \quad (8.3)$$

Il fatto che si abbia sovrapposizione tra gli spettri significa che l'energia che perde il donore è un'energia utile per eccitare l'accettore. Sostanzialmente perchè il processo di FRET avvenga lo spettro di emissione del donore e quello di assorbimento dell'accettore devono sovrapporsi almeno parzialmente. Una volta che si ha sovrapposizione, il fatto di orientazione mi dice che probabilità ho che effettivamente avvenga il passaggio di energia. L'ampiezza della sovrapposizione degli spettri prende il nome di integrale di sovrapposizione e dipende dalla probabilità di assorbimento dell'accettore a quella lunghezza d'onda, dalla frazione di emissione del donore che avviene a quella lunghezza d'onda e dalla lunghezza d'onda.

Vediamo, in modo abbastanza semplice, da dove derivano tutti questi fattori. Abbiamo definito la *regola d'oro di Fermi*:

$$\frac{dP_b}{dt} = \frac{d}{dt} \int d\nu |C_b(t)|^2 = \frac{1}{2\hbar} |\langle \Psi_b | \bar{V} | \Psi_a \rangle \cdot E(0)|^2 \quad (8.4)$$

che ci lega il rate della transizione per una molecola dallo stato a allo stato b al valore del momento di dipolo di transizione. Supponiamo di applicare questo concetto a una coppia donore accettore che passano da uno stato in cui il donore è a uno stato eccitato (Ψ_{Db}) e l'accettore è allo stato fondamentale (Ψ_{Aa}) a quello in cui, viceversa, il donore è nello stato fondamentale (Ψ_{Da}) e l'accettore allo stato eccitato (Ψ_{Ab}).

Per semplicità consideriamo una singola energia emessa dal donore. Il rate della transizione è proporzionale al potenziale di interazione:

$$k_{ET} \propto |\langle \Psi_{Da} \Psi_{Ab} | \bar{V} | \Psi_{Db} \Psi_{Aa} \rangle|^2 \quad (8.5)$$

Il potenziale di interazione è di tipo dipolo-dipolo, possiamo quindi scriverlo come:

$$\bar{V} = \frac{\bar{\mu}_D \cdot \bar{\mu}_A}{R^3} - 3 \frac{(\bar{\mu}_D \cdot R)(R \cdot \bar{\mu}_A)}{R^5} = k \frac{|\bar{\mu}_D| |\bar{\mu}_A|}{R^3} \quad (8.6)$$

Tenendo conto che il potenziale di interazione ha una dipendenza separata dall'accettore e dal donore, otteniamo:

$$k_{ET}(\nu) \propto \frac{k^2}{R^6} |\langle \Psi_{Da} | \bar{\mu}_D | \Psi_{Db} \rangle|^2 |\langle \Psi_{Ab} | \bar{\mu}_A | \Psi_{Aa} \rangle|^2 \quad (8.7)$$

Il momento di dipolo dell'accettore era legato alla forza di transizioone dell'accettore ed era dipendente dal rapporto tra coefficiente molare e frequenza:

$$|\langle \Psi_{Ab} | \bar{\mu} | \Psi_{Aa} \rangle|^2 \propto \frac{\varepsilon_A}{\nu} \quad (8.8)$$

mentre il momento di dipolo del donore risulta proporzionale a:

$$|\langle \Psi_{Da} | \bar{\mu} | \Psi_{Db} \rangle|^2 \propto \nu^{-3} \phi_D \tau_D^{-1} \quad (8.9)$$

Otteniamo la seguente dipendenza per la probabilità di transfer:

$$k_{ET} \propto \frac{k^2 \phi}{R^6 \tau_D} \int \varepsilon_A(\nu) f_D(\nu) \nu^{-4} d\nu \quad (8.10)$$

dove l'integrale è esteso a tutte le frequenze disponibili nella banda del donore. Tutti i parametri derivano da osservazioni sui valori di aspettazione del momento di dipolo. Quanto detto finora vale nel vuoto, se siamo in un mezzo bisogna considerare indice di rifrazione.

Possiamo definire l'*efficienza di transfer E*, cioè la frazione di donori eccitati che decadono attraverso il processo di fret, come:

$$E = \frac{k_{ET}}{k_{ET} + k^D} = \frac{k_{ET}}{k_{ET} + k_F^D + k_{ci}^D + k_{ic}^D} \quad (8.11)$$

L'efficienza di FRET è sostanzialmente la resa quantica del processo di transfert. Possiamo legare l'efficienza alle distanze:

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R^6} \quad (8.12)$$

Questo ci spiega uno degli usi pratici del fenomeno di FRET: conoscendo l'efficienza di FRET e conoscendo la coppia di fluorofori (e quindi la loro distanza

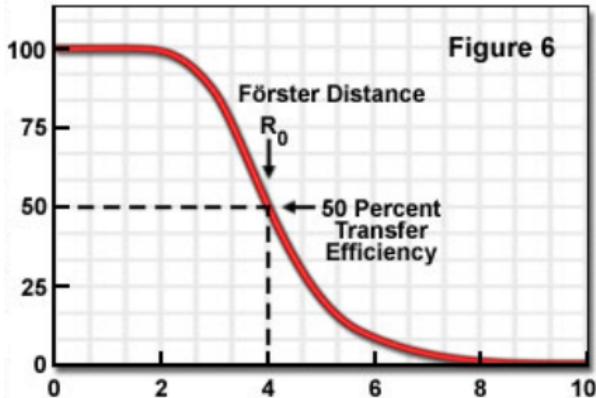


Figura 8.3: efficienza del processo di transfer in funzione della distanza tra donore e accettore

caratteristica), si può calcolare la loro distanza all'interno del sistema.

Come possiamo vedere, quando la distanza tra accettore e donore coincide con la distanza caratteristica si ha un'efficienza del 50%, come possiamo vedere anche dal grafico in figura (8.3).

L'efficienza diminuisce molto rapidamente spostandosi a distanze maggiori di quella caratteristica, ma cresce molto spostandosi a distanze inferiori. Se R_0 è nota, essendo caratteristica per ogni coppia di fluorofori perché ha a che fare con gli spettri, misurando l'efficienza ricavo la loro distanza con la seguente relazione:

$$R = R_0 \left(\frac{1 - E}{E} \right)^{1/6} \quad (8.13)$$

Il processo di FRET è usato come specie di righello molecolare.

L'efficienza si può misurare facendo misure statiche, allo stato stazionario, o con misure dinamiche, dei tempi di vita. Nel caso di misure in stato stazionario si possono fare due cose:

- eccitare il donore a una certa lunghezza d'onda λ_1 e osservarne l'emissione a una lunghezza d'onda λ_2 e guardare il rapporto tra le rese quantiche quando c'è anche l'accettore e quando c'è solo il donore (nel caso di solo donore non ho il termine di transfer):

$$\frac{\phi_{D+A}}{\phi_D} = \frac{k_F^D}{k_F^D + k_{ic}^D + k_{ci}^D + k_{ET}} \cdot \frac{k_F^D + k_{ci}^D + k_{ic}^D + (k_{ET} - k_{ET})}{k_F^D} = 1 - E \quad (8.14)$$

$$\frac{\phi_{D+A}}{\phi_D} = 1 - E = \frac{\tau_{D+A}}{\tau_D} \quad (8.15)$$

- ripetere la stessa cosa per l'accettore, che viene eccitato a λ_1 e emette a λ_4 :

$$\frac{F_{D+A}}{F_A} = \frac{\varepsilon_A C_A \phi_A + \varepsilon_D C_D E \phi_A}{\varepsilon_A C_A \phi_A} = 1 + \frac{\varepsilon_D C_D}{\varepsilon_A C_A} E \quad (8.16)$$

Come si misura esplicitamente la resa? Noi misuriamo l'intensità di fluorescenza, che è proporzionale alla resa, alla concentrazione e a una serie di parametri strumentali, quindi se siamo a parità di parametri strumentali e a parità di concentrazione, il rapporto degli spettri dà direttamente il rapporto delle rese.

Il metodo dinamico prevede di misurare i tempi di vita allo stato eccitato, che è l'inverso della somma di tutti i possibili processi di disecitazione, quindi nel caso in cui sia presente l'accettore comparirà anche l'efficienza di transfer, se c'è solo il donore non compare:

$$\frac{\tau_{D+A}}{\tau_D} = 1 - E \quad (8.17)$$

Una volta nota l'efficienza ci sono molte applicazioni:

- studio dei cambiamenti conformatzionali all'interno della proteina: si mette una coppia FRET legata alla macromolecola in un punto in cui sappiamo che allo stato nativo sono vicine e si prova ad aggiungere altri agenti alla soluzione. Se la conformazione della proteina cambia e gli oggetti si allontanano si ha un'aumento della distanza tra donore e accettore e diminuisce l'efficienza di FRET.
- vedere se degli enzimi provocano la separazione di una macromolecola in diversi componenti: oggetti che inizialmente facevano FRET, a causa dell'idrolisi si sono separati e non lo fanno più.
- vedere se un certo ligando si lega alla proteina e quindi da oggetti separati diventano vicini e aumenta l'efficienza di FRET.
- vedere se c'è una fusione tra molecole (lipidi o vescicole da soli contengono molecole che fanno FRET, quando si fondono con altre componenti smettono di farlo).

Questi quattro impieghi del FRET sono riportati in figura (8.4).

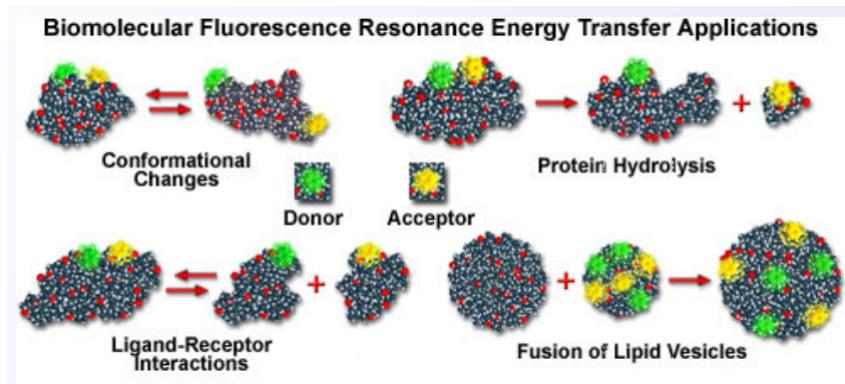


Figura 8.4: vari impieghi del FRET

Possiamo distinguere due tipi di fret:

- FRET intramolecolare: quando leghiamo donore e accettore alla stessa molecola e andiamo a vedere i cambiamenti conformatzionali.

- FRET intermolecolari: aggregazione e legame tra molecole diverse.

In figura (8.5) sono rappresentati i due tipi di FRET.

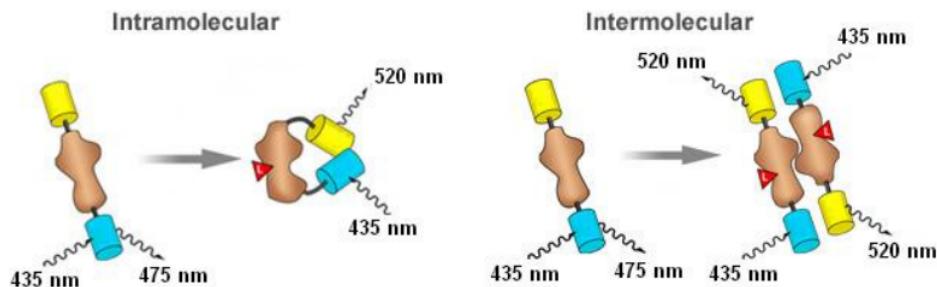


Figura 8.5: Rispettivamente FRET intramolecolare e FRET intermolecolare

Tipicamente tirosina (donore) e triptofano (accettore) fanno FRET, questo è uno dei motivi per cui l'intensità di fluorescenza cambia quando si fa la denaturazione di una proteina, perché cambiando la conformazione tirosina e triptofano si allontanano e quindi le tirosine che prima non emettevano o i triptofani che emettevano per FRET cambiano la loro fluorescenza.

Un'altra coppia donore-accettore sono fluorescina-rodamina.

In tabella (8.1) riportiamo i valori delle distanze donore-accettore e della rispettiva efficienza di FRET:

R_0 (Å)	10	30	40	50	60	70
E	0.99	0.96	0.79	0.50	0.25	0.12

Tabella 8.1: Efficienza di FRET al variare della distanza

Spesso all'interno delle proteine c'è trasferimento di energie risonante da tirosina a triptofano che comporta il cambiamento dell'intensità di fluorescenza del triptofano e cambiamenti anche nello spettro, come possiamo osservare in figura (8.6).

L'applicazione più interessante riguarda lo studio dei cambiamenti conformationali del DNA: ci sono conformazioni particolari del DNA, come la giunzione a 4, dove gli angoli di piegamento dipendono dalla stabilizzazione dei sali che ci sono in soluzione. Nel DNA sono sostanzialmente le catene di fosfati, che tra di loro giocano in interazioni di tipo repulsivo: se aumentiamo la concentrazione di altri ioni presenti in soluzione, questi possono fare un'atmosfera di controioni che si mettono intorno ai fosfati diminuendo le interazioni repulsive e permettendo anche variazioni dei valori degli angoli. Tipicamente si passa da una giunzione quasi a 90° a una giunzione più stretta da una parte, come si osserva nell'immagine in figura (8.7).

Come si studia questo cambiamento dell'apertura angolare? Tipicamente si usa una coppia fluorescina-rodamina, che hanno un buon integrale di sovrapposizione e una certa distanza caratteristica: vengono scelti due lati a cui vengono

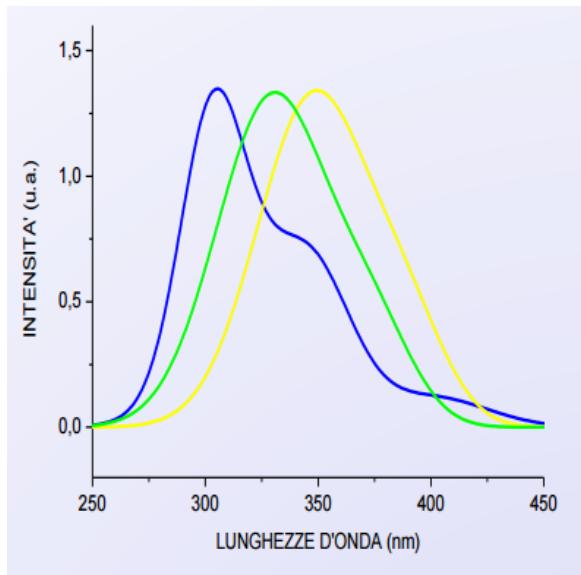


Figura 8.6: la linea gialla rappresenta il triptofano che emette in acqua a 350 nm, se in acqua abbiamo una miscela di tirosina e triptofano 1:18 l'emissione risulta la media pesata delle due emissioni (linea blu), mentre nell'HSA l'emissione della tirosina scompare e lo spettro di emissione del triptofano è spostato verso il blu (linea verde)

connesse. Se sono state posizionate come in figura (8.7) allora se diminuisce l'angolo tra loro si ha un aumento dell'efficienza di fret, altrimenti una diminuzione.

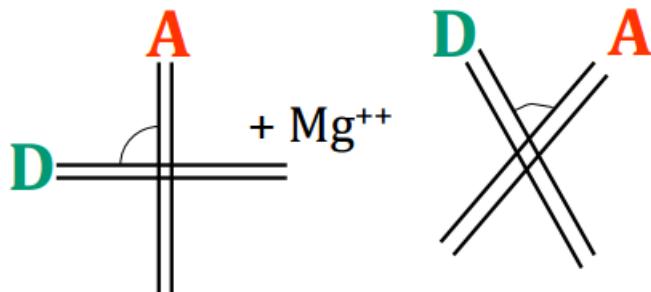


Figura 8.7: cambiamento degli angoli della giunzione a 4 del DNA

Nelle cellule per studiare i meccanismi cellulari si usano proteine fluorescenti che possono essere espresse in coda alle proteine di interesse. Anche queste proteine fluorescenti possono essere usate per fare FRET e la tipica coppia FRET sono CFP e DsRED.

Essendo molto sensibile alla distanza il FRET è usato come *righello spettroscopico*, in quanto ci permette di legare efficienza e distanza. Dal punto di vista sperimentale si osserva in assenza di FRET una forte emissione del donore e

bassissima emissione dell'accettore, mentre in presenza di FRET le due cose si invertono, come si può osservare in figura (8.8).

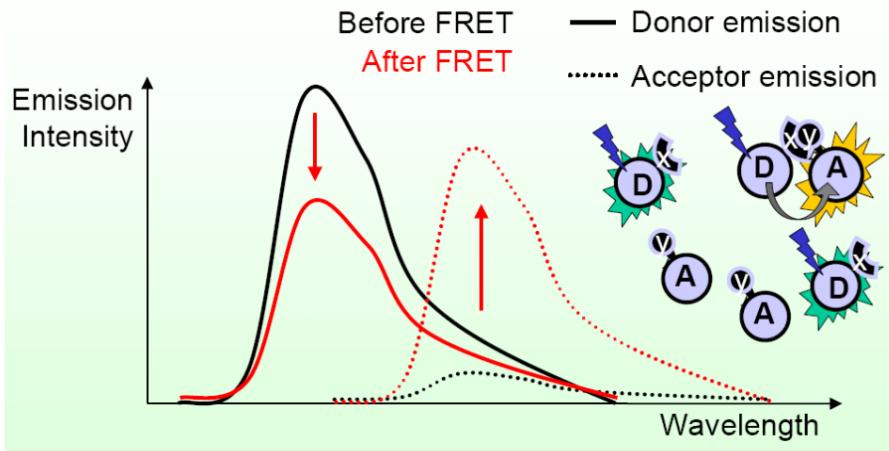


Figura 8.8: spettri di emissione di donore e accettore in presenza o assenza di FRET

Bisogna prestare particolare attenzione quando si raccoglie la fluorescenza, perché se si prende tutta la curva del donore, si considera anche la parte iniziale della curva dell'accettore. Per il donore quindi si tende a selezionare solo un intervallo di lunghezze d'onda in cui l'emissione è dovuta solo al donore. L'accettore invece rappresenta un problema molto più grande perché le bande di fluorescenza sono tipicamente delle bande non simmetriche con code a lunghezze d'onda molto lunghe e c'è una fortissima sovrapposizione della banda del donore con quella dell'accettore.

La misura esatta prende solo la parte dovuta all'accettore, tuttavia la complicazione è data dall'inquinamento dovuto al donore: nel picco dell'accettore passa anche la fluorescenza del donore. Per questo motivo si osserva l'emissione di fluorescenza del donore o ancora meglio il tempo di vita.

Un esempio di sonda FRET, creata da Tsien e collaboratori, è la sonda **Cameleon**, una delle prime sonde fatte con proteine fluorescenti, che misura la concentrazione degli ioni calcio. Aggiungendo calcio il sistema a cui sono attaccate si compatta e le proteine che erano lontane e non facevano FRET si avvicinano e lo fanno. Il nome cameleon è dovuto al fatto che cambia colore e al fatto che le due proteine siano collegate da un breve tratto di calmodulina, che cambia la sua forma in presenza di calcio, quindi al posto che cameleon si è optato per cameleon.

La ciano e la yellow sono una tipica coppia di proteine fluorescenti con cui si sono studiati: interazioni tra proteine diverse, cambiamenti conformazionali, presenza o meno di sali, legame di interazione che cambia conformazione.

8.2 QUENCHING DELLA FLUORESCENZA

È una diminuzione dell'intensità dovuto all'interazione con le altre molecole presenti in soluzione. Il problema per cui si parla del quenching, anche se misura solo l'accessibilità al solvente e quindi agli agenti che fanno quenching del fluoroforo è che il tipico *quencher* è l'ossigeno, quindi moltissima dell'intensità di fluorescenza che noi osserviamo se la osservassimo in condizioni rarefatte di ossigeno (pompando azoto per esempio) sarebbe molto più grande.

Ci possono essere diversi tipi di quenching:

Auto quenching : è un problema di concentrazione: quando siamo a concentrazioni molto alte si osserva una diminuzione dell'intensità di fluorescenza, che devia dalla linearità, perchè c'è un effetto di auto assorbimento per cui i primi strati della soluzione assorbono così tanta intensità di radiazione che mano a mano che si va avanti non c'è più intensità eccitante per i fluorofori: diminuisce fisicamente la quantità di luce che è a disposizione dei vari fluorofori. Si ha una diminuzione dell'intensità di luce incidente I_0 e di conseguenza anche dell'intensità di fluorescenza.

Quenching chimico : è un processo dovuto a interazioni con ioni idrogeno, metalli pesanti, grosse molecole,... Fondamentalmente è un problema di collisioni, passaggio allo stato di tripletto, interazioni con lo stato elettronico. Per esempio la fluorescina viene utilizzata solo in intervalli limitati di pH perchè poi interagisce con gli ioni idrogeno e non emette più fluorescenza.

Quenching dinamico o collisionale : è una diseccitazione dovuta all'interazione con un oggetto. In questo caso l'oggetto che provoca quenching, il quencher, diffonde in soluzione, fa collisione con il fluoroforo e ne provoca una diseccitazione in modo non radiativo.

L'intensità di fluorescenza statica cambia e la sua diminuzione può essere descritta dalla seguente relazione:

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_D[Q] \quad (8.18)$$

dove $[Q]$ è la concentrazione del quencher e K_D è la costante di Stern-Volmer, legate alla costante di quenching dinamico e al tempo di vita dell'oggetto se non ci fosse stato il quenching:

$$K_D = k_q \tau_0 \quad (8.19)$$

Questa cosa apre un nuovo percorso di diseccitazione per la molecola, quindi cambia il tempo di vita e la variazione del tempo di vita può essere scritta come:

$$\frac{\tau_0}{\tau} = 1 + K_D[Q] \quad (8.20)$$

dove:

$$\tau = \frac{1}{k_F + k_q[Q]} \quad \tau_0 = \frac{1}{k_F}$$

La probabilità che avvenga il processo di disecitazione collisionale è funzione di quanto agente quencher è presente in soluzione: più ce n'è più il processo è probabile.

Quenching statico : comporta la creazione di un complesso nello stato eccitato e tale complesso non è fluorescente.

La creazione di un complesso comporta la presenza di una costante di associazione. Nel caso di quenching statico si ha:

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_S [Q] \quad (8.21)$$

$$\frac{\tau_0}{\tau} = 1 \quad (8.22)$$

$$K_S = \frac{[F][Q]}{[F][Q]} \quad (8.23)$$

La cosa importante è che nel caso del quenching dinamico si ha una diminuzione sia dell'intensità statica (perchè siamo scesi allo stato fondamentale), sia della fluorescenza dinamica (cambia il tempo di vita perchè si apre un nuovo processo di disecitazione). Inoltre aumentando la temperatura, aumenta l'agitazione termica e quindi il numero collisioni e aumenta anche l'efficienza di quenching.

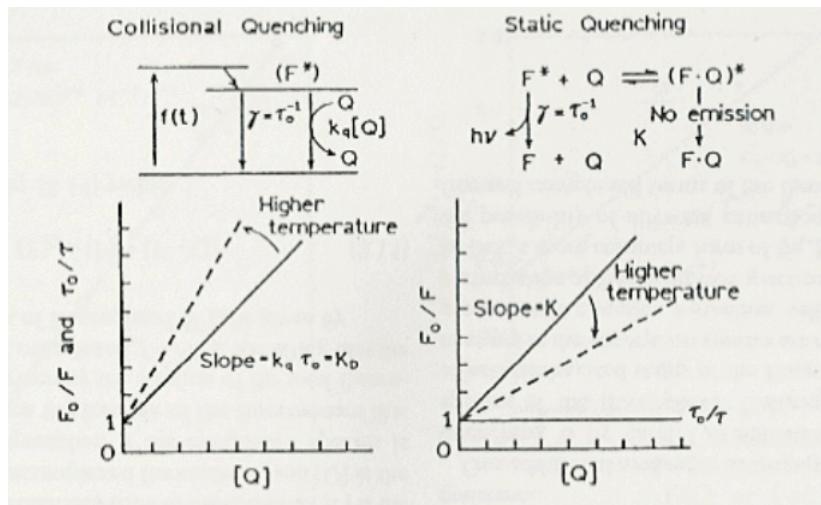


Figura 8.9: confronto tra quenching collisionale e statico

Come si può osservare in figura (8.9) nel caso di quenching collisionale la pendenza della curva che descrive il quenching è legata alla costante di Stern-Volmer e quindi all'efficienza di quenching: se si aumenta la temperatura aumenta la pendenza. Nel caso di quenching statico c'è la formazione di un complesso allo stato eccitato: si ha una reazione di associazione tra il fluoroforo e il quencher che formano un complesso quando il fluoroforo è nello stato eccitato e questo complesso non fluoresce: diminuisce l'intensità statica ma il tempo di vita non cambia perchè le molecole che si disecitano continuano a disecitarsi per fluorescenza. Le molecole che hanno fatto il complesso sono come se fossero scomparse,

l'effetto del quencher è solo una diminuzione di concentrazione dei fluorofori che si dissecitano con la fluorescenza.

La differenza fondamentale è che se si fanno misure di tempi di vita nel caso di quenching statico non si osserva il fenomeno del quenching, per questo un modo per distinguere quenching statico e dinamico è abbinare misure di fluorescenza statica con misure dei tempi di vita: se tutti e due mostrano lo stesso tipo di pendenza sono sicuri di avere quenching per collisione. Se il tempo di vita non cambia so che si sono formati dei complessi.

L'altra differenza è il comportamento al variare della temperatura: all'aumentare della temperatura aumentano le collisioni molecolari ed è meno probabile la formazione di un complesso, quindi l'efficienza del processo di quenching statico diminuisce e come si nota in figura (8.9) la pendenza della retta diminuisce.

Si può avere quenching sia quenching statico che dinamico insieme: in questo caso si osserva una deviazione verso l'alto del grafico che dà la variazione di intensità in funzione della concentrazione del quencher. In questo caso si ha:

$$\frac{I_0}{I} = (1 + K_D[Q])e^{V[Q]} \approx (1 + K_D[Q])(1 + K_S[Q]) \quad (8.24)$$

dove V è l'elemento di volume attivo che circonda il cromoforo.

8.3 DICROISMO CIRCOLARE

È un fenomeno legato all'interazione della materia con la radiazione in fase di assorbimento o eccitazione. Il dicroismo circolare per definizione è la differenza di assorbimento da parte dell'oggetto di luce polarizzata circolarmente destrogira e levogira. Dobbiamo avere un cromoforo chirale otticamente attivo, cioè una molecola che non è perfettamente simmetrica, la cui capacità di assorbire luce polarizzata destrogira o levogira è diversa.

C'è un legame tra luce polarizzata linearmente e luce polarizzata circolarmente. I diversi tipi di polarizzazione della luce sono riportati in figura (8.10).

Possiamo avere:

- Luce non polarizzata: il vettore campo elettrico punta in una direzione qualsiasi;
- Luce polarizzata piana: il vettore campo elettrico giace in un piano che non contiene la direzione di polarizzazione;
- Luce polarizzata circolarmente: il vettore campo elettrico descrive un cerchio se lo si osserva perpendicolarmente alla direzione della polarizzazione.
- Luce polarizzata ellitticamente: il vettore campo elettrico descrive un'ellisse se lo si osserva perpendicolarmente alla direzione della polarizzazione.

Quindi quando si parla di polarizzazione piana, lineare, circolare o ellittica si parla sempre della proiezione del vettore campo elettrico in un piano perpendicolare alla direzione di propagazione.

Nel caso di **polarizzazione lineare** si hanno oscillazioni confinate in un piano

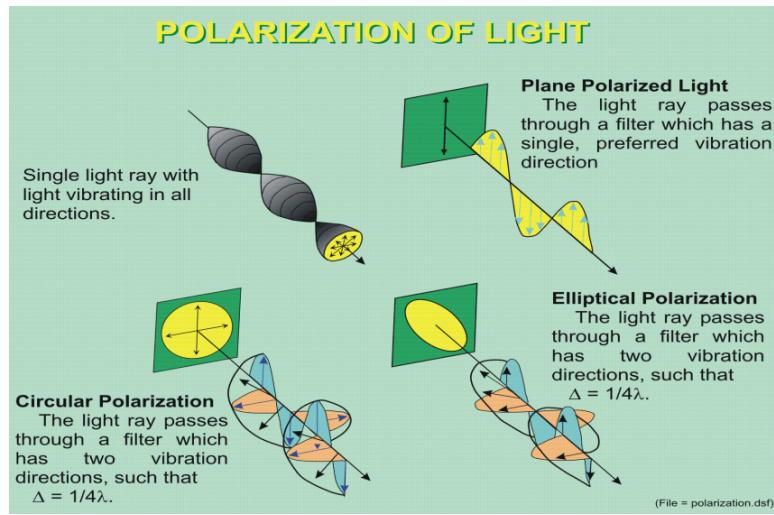
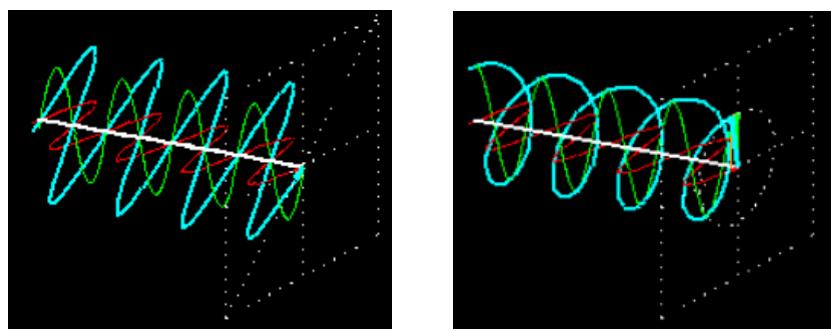


Figura 8.10: rappresentazione di luce polarizzata linearmente, circolarmente e ellitticamente

perpendicolare alla direzione di propagazione. Campo elettrico e campo magnetico sono perpendicolari tra di loro e alla direzione di propagazione. Tutti gli stati di polarizzazione della luce possono essere descritti come somma di due componenti polarizzate linearmente: una verticale e una orizzontale.

Se la luce polarizzata orizzontale e verticale ha la stessa ampiezza ed è in fase, si ottiene, quando si ricombinano, un'onda polarizzata linearmente a 45° rispetto alla direzione di quella verticale e orizzontale, come si vede in figura (8.11a).



(a) la combinazione della componente orizzontale e di quella verticale, entrambe lineari e in fase, dà un'onda lineare inclinata di 45°
(b) la combinazione delle componenti di uguale ampiezza ma sfasate di $\lambda/4$ dà un'onda polarizzata circolarmente

Figura 8.11: combinazione delle componenti verticale e orizzontale

Le proprietà dell'onda risultante dipendono dall'intensità delle due componenti e dalla differenza di fase. Se prendiamo le due componenti di uguale ampiezza ma sfasate di $\lambda/4$, si ottiene luce polarizzata circolarmente, destrogira o levogira, come si osserva in figura (8.11b).

Come si sfasa di $1/4$ d'onda? Si utilizza la lamina a quarto d'onda che ritarda una delle due componenti rispetto all'altra: si ha un cristallo birifrangente con indici di rifrazione diversi lungo i due assi, quindi la luce polarizzata ha velocità diverse lungo i due assi e quando si ricombinano hanno velocità diverse e risultano sfasate.

Viceversa prendendo due onde polarizzate circolarmente levogira e destrogira, di uguale ampiezza e in fase si ottiene un'onda polarizzata linearmente.

Per il dicroismo circolare serve ricordare che un'onda polarizzata linearmente è equivalente alla somma di due onde polarizzate circolarmente, una verso destra e una verso sinistra. Quando una radiazione polarizzata linearmente passa attraverso un mezzo otticamente attivo i fenomeni a cui si assiste sono:

- **Ellitticità:** in uscita il vettore che descrive la massima ampiezza non è confinato in un piano, ma descrive un'ellisse. In questo caso possiamo definire un parametro detto **ellitticità**, come:

$$\vartheta = \operatorname{arcth} \left(\frac{m}{M} \right) \quad (8.25)$$

dove m e M sono gli assi minore e maggiore dell'ellisse.

- **Rotazione ottica:** l'asse maggiore dell'ellisse non coincide con la direzione di polarizzazione della luce incidente, ma viene ruotato di un certo angolo ϕ . Se si considera la dipendenza dalla frequenza si parla di dispersione della rotazione ottica.

Se invece consideriamo la luce nelle due componenti onda circolare polarizzata destrogira e levogira, se il mezzo è otticamente attivo le due componenti vengono assorbite in maniera diversa e in uscita le due radiazioni non hanno la stessa ampiezza. La differenza di assorbimento si chiama **dicroismo circolare**. Quando si ricombinano due componenti che inizialmente avevano la stessa ampiezza si ottiene un'onda polarizzata lineare, se invece si combinano due polarizzazioni con ampiezze diverse quello che si ottiene è una polarizzazione ellittica della luce. Quindi il dicroismo circolare è l'equivalente dell'ellitticità.

L'altra cosa che succede, essendo il mezzo otticamente attivo, le componenti vedono indici di rifrazione diversi, si muovono con velocità diverse con conseguente sfasamento e quando si ricombinano l'asse dell'ellisse è spostato. Questo fenomeno dovuto alla differenza di indici di rifrazione si chiama **birifrangenza circolare** ed è l'equivalente della rotazione ottica.

Concludiamo che i fenomeni a cui assistiamo sono sostanzialmente due: ellitticità e rotazione ottica, che sono causati da dicroismo circolare e birifrangenza circolare. Le relazioni che legano tra loro gli effetti e le cause sono:

$$\phi = \frac{180 \cdot l}{\lambda} (n_L - n_R) \quad (\text{gradi}) \quad (8.26)$$

$$\vartheta = 2.303(A_L - A_R) \frac{180}{4\pi} \quad (\text{gradi}) \quad (8.27)$$

Nel momento in cui si ha a che fare con segnali dovuti a diverse concentrazioni e vogliamo confrontare segnali dovuti a sostanze che contengono concentrazioni

diverse dei nostri oggetti consideriamo le quantità residue:

$$[\phi]_R = \frac{100 \cdot \phi}{C \cdot l} \quad (\text{deg} \cdot M^{-1} \text{cm}^{-1}) \quad (8.28)$$

$$[\vartheta]_R = \frac{100 \cdot \vartheta}{C \cdot l} \quad (\text{deg} \cdot M^{-1} \text{cm}^{-1}) \quad (8.29)$$

In particolare se si ha a che fare con il DNA la normalizzazione alla concentrazione è espressa come molarità di fosfati, mentre per le proteine si ha la normalizzazione alla concentrazione molare per residuo e in decimolare:

$$[\vartheta]_{MR} = \vartheta \frac{M}{C_w \cdot l \cdot N_R} \quad (8.30)$$

$$[\vartheta]_{MRd} = \frac{[\vartheta]_{MR}}{10} \quad (8.31)$$

dove C_w è la concentrazione in peso, l la lunghezza del cammino ottico e N_R il numero di residui, cioè il numero di componenti di amminoacidi presenti nella proteina. La logica è che quando si osserva un segnale dovuto al numero di legami peptidici la normalizzazione viene fatta per il numero di residui meno uno, che è il numero di legami peptidici.

Volendo esprimere in assorbanze possiamo convertire con:

$$[\vartheta]_R = \frac{3298.8(\varepsilon_L - \varepsilon_R)}{N_{red}} \quad (8.32)$$

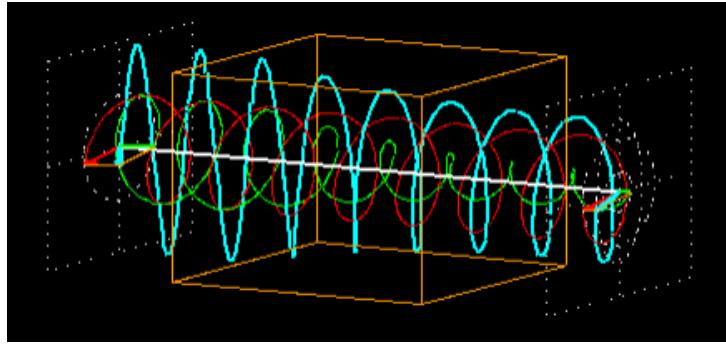


Figura 8.12: *dicroismo circolare dal punto di vista della luce*

Consideriamo la figura (8.12): dal punto di vista della luce si ha luce polarizzata piana (azzurra in figura), che attraversa il mezzo otticamente attivo, in cui le due componenti vengono assorbite in maniera diversa: la componente rossa non viene assorbita, mentre quella verde viene assorbita diminuendo mano a mano l'ampiezza. Quando si ricombinano si ha una luce con polarizzazione ellittica. Di questa luce ellittica la direzione di rotazione è determinata dalla componente circolare più intensa. Il grado di ellitticità dipende da quanto sono assorbite le due componenti.

L'altro effetto che si osserva è quello del rallentamento di una delle due componenti rispetto all'altra perché vedono indici di rifrazione diversi (figura (8.13)).

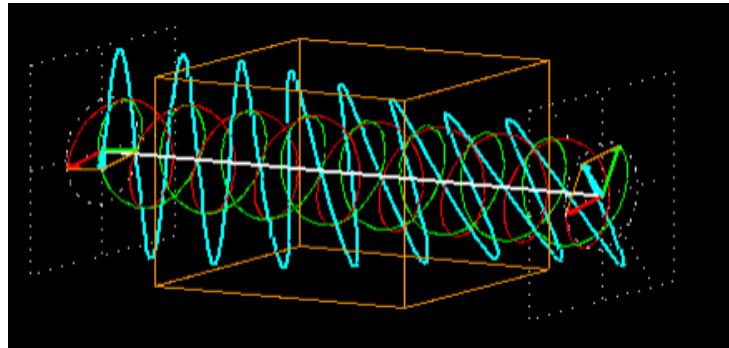


Figura 8.13: *birifrangenza circolare dal punto di vista della luce*

Si ha la luce polarizzata piana (azzurra), la componente circolare rossa che non viene ritardata ($n = 1$), mentre quella verde vede un indice di rifrazione $n = 1.05$ e quindi viene rallentata rispetto all'altra. In uscita si vede che la direzione di polarizzazione è cambiata.

Quello che però succede effettivamente in un mezzo otticamente attivo è che i fenomeni si presentino entrambi, combinandosi tra loro: la luce in uscita è ellittica, con l'asse ruotato (figura (8.14)). Le due quantità misurabili sono l'ellitticità e l'angolo di rotazione, legate alla differenza di assorbimento e alla differenza di indici di rifrazione, causati dall'asimmetria della molecola.

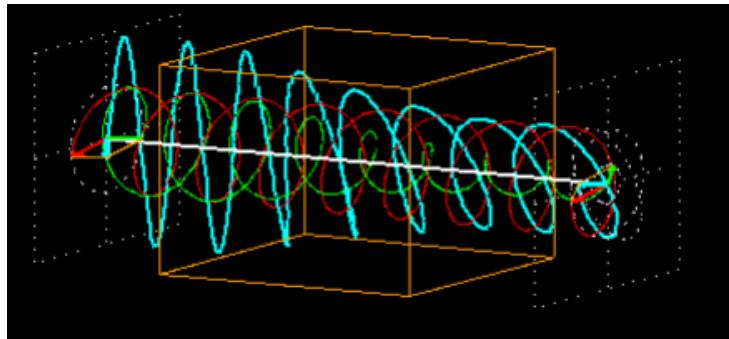


Figura 8.14: *effetto combinato di dicroismo circolare e birifrangenza circolare*

Che cosa si misura? su cosa si basa la scelta di misurare la rotazione ottica, la birifrangenza o il dicroismo e l'ellitticità? Spesso è un problema fisico di oggetti che sono o meno misurabili. Se si ha un campione di $100 \mu M$ (molto concentrato), con un cammino ottico di 1 cm, colpito da una luce con $\lambda = 300 \text{ nm}$ che viene ruotata di 0.01° , allora la differenza di indici di rifrazione è:

$$(n_L - n_R) = \frac{\lambda\phi}{180 \cdot l} = \frac{3 \times 10^{-5} \cdot 0.01}{180} = 1.67 \times 10^{-9}$$

Non è una quantità facilmente misurabile, mentre la rotazione ottica residua presenta valori molto più convenienti:

$$[\phi] = \frac{100\phi}{C \cdot l} = 10^4 \text{ degM}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

La stessa cosa si ha per ellitticità e dicroismo circolare: nelle stesse condizioni sperimentali si ha:

$$\begin{aligned}\tan\left(\frac{m}{M}\right) &\approx \frac{m}{M} = \frac{2\pi}{360}\vartheta = 1.76 \times 10^{-4} \\ (A_L - A_R) &= \frac{4\pi\vartheta}{180 \cdot 2.303} = 3.3 \times 10^{-4} \\ [\vartheta] &= \frac{100\vartheta}{C \cdot l} = 10^4 \text{ degM}^{-1}\text{cm}^{-1}\end{aligned}$$

Dicroismo circolare e rotazione ottica non devono per forza essere misurate entrambe: sono legate tra loro dalle *trasformate di Kronig-Kramers*:

$$[\phi(\lambda)] = \frac{2}{\pi} \int_0^\lambda \frac{[\vartheta(\lambda')] \lambda'}{\lambda^2 - \lambda'^2} d\lambda' \quad (8.33)$$

$$[\vartheta(\lambda)] = -\frac{2\lambda}{\pi} \int_0^\lambda \frac{[\phi(\lambda')] \lambda'}{\lambda^2 - \lambda'^2} d\lambda' \quad (8.34)$$

Essendo il dicroismo dovuto a una differenza di assorbimento, data la banda di assorbimento dell'oggetto, al di fuori di questa non lo si può osservare. La forma della banda di dicroismo è la stessa della banda di assorbimento, con un segno, positivo o negativo, legato alla chiralità della molecola. Questo effetto prende il nome di *effetto Cotton*. Lo spettro di dispersione ottica rotatoria può essere calcolato a partire da quello di dicroismo ed è una specie di derivata dello spettro di dicroismo e ha code molto lunghe, come si vede in figura (8.15).

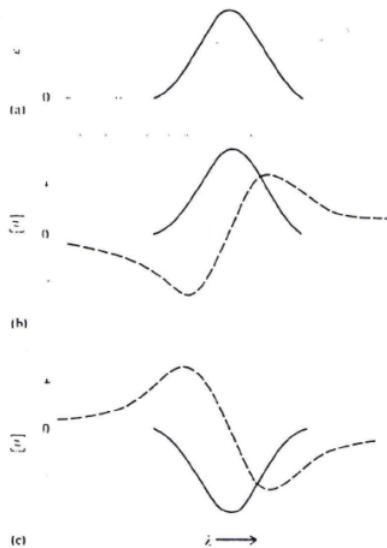


Figura 8.15: *spettro di dicroismo in linea continua e spettro di dispersione ottica in linea tratteggiata*

Il dicroismo, che è la cosa che andiamo a misurare sperimentalmente, non esiste al di fuori della banda di assorbimento, però non è detto che esista sempre: la condizione che l'oggetto assorba è necessaria ma non sufficiente. La probabilità

di dicroismo e la forza della transizione, che dà l'intensità della banda di dicroismo, dipende dalla parte immaginaria del prodotto scalare tra il momento di dipolo elettrico e il momento di dipolo magnetico. Questo perchè fino ad ora abbiamo trascurato la parte magnetica del campo: quello che conta è che l'effetto del dipolo elettrico è l'induzione di un dipolo oscillante e quindi uno spostamento lineare della carica in una certa direzione; l'effetto del momento di dipolo magnetico tipicamente è quello di indurre una circolazione della carica. Perchè il prodotto scalare di questi due non sia nullo ci deve essere una circolazione della carica attorno alla direzione di oscillazione del momento di dipolo, cioè bisogna avere uno spostamento elicoidale della carica (figura (8.16)). Il momento di dipolo magnetico deve avere una componente nella direzione del momento di dipolo elettrico.



Figura 8.16: *combinazione di dipolo elettrico e magnetico*

La circolazione di carica elicoidale viene favorita se ci sono delle asimmetrie nella molecola. Essendo il momento di dipolo magnetico una quantità puramente immaginaria, il prodotto scalare con quello elettrico è ancora una quantità immaginaria e la parte immaginaria di una cosa immaginaria è reale e difatti possiamo osservarlo sperimentalmente. Il momento di dipolo magnetico è legato al momento angolare:

$$\bar{m} = \frac{e}{2mc} \mathbf{r} \times \mathbf{p} = \frac{e}{2mc} \mathbf{L} = \frac{e}{2mc} \mathbf{r} \times \frac{\hbar}{i} \mathbf{V} \quad (8.35)$$

$$R_{ab} = \text{Im} (\langle \Psi_a | \bar{m} | \Psi_b \rangle \cdot \langle \Psi_b | \bar{m} | \Psi_a \rangle) \quad (8.36)$$

Per quanto riguarda la strumentazione, per poter eseguire le misure servono un polarizzatore e un analizzatore, che separano le due componenti. La struttura dello strumento per il dicroismo è riportata in figura (8.17).

Una parte fondamentale dello strumento è il flusso di azoto aperto per rimuovere l'ossigeno, in quanto le misure di CD si fanno nell'ultravioletto e l'ossigeno colpito da radiazione UV produce ozono, inoltre assorbe molta luce dando un fondo molto alto.

Il problema fondamentale del dicroismo è che, essendo legato alla differenza di assorbimento che è piccola, se si ha il contributo del solvente spesso si hanno problemi nell'esperimento: il contributo del solvente satura già il contributo in assorbanze che si può osservare. Quindi ci sono delle lunghezze d'onda limite al di sotto delle quali il solvente assorbe a tal punto che la misura di assorbimento diventa casuale. Più aumentano gli oggetti in soluzione più aumenta questo contributo.

Tipicamente quando si parla di spettri di dicroismo delle proteine la regione che ci interessa maggiormente è quella del lontano e del vicino UV. I segnali che andiamo a vedere sono prodotti dal legame peptidico, dagli amminoacidi

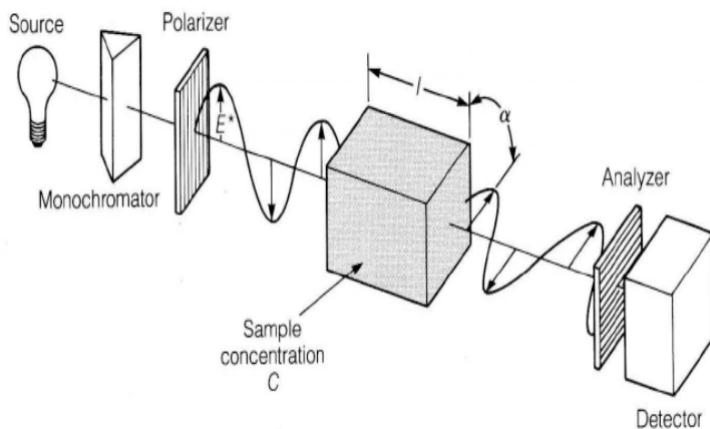


Figura 8.17: strumento per la misura del dicroismo

aromatici (fenilalanina, tirosina, triptofano), cisteine e eventualmente gruppi prostetici: sotto i 250 nm prevale l'assorbimento del legame peptidico, tra 250 e 350 nm si ha il segnale CD degli amminoacidi aromatici, sopra ci sono i gruppi. Quelli che davano il contributo nel far UV, nella regione più lontana, sono le transizioni $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$ del legame peptidico.

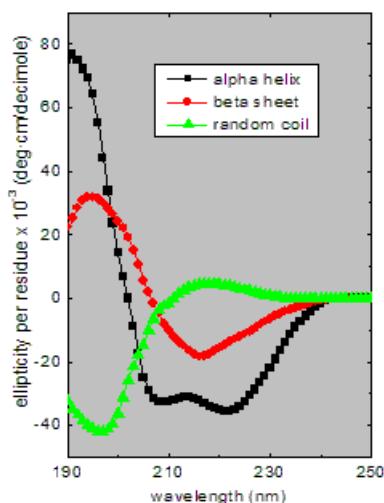


Figura 8.18: spettri di dicroismo tipici della struttura secondaria ad α elica (nero), β sheet (rosso) e random coil (verde)

L'intensità delle transizioni e l'energia precisa delle transizioni dipende dal valore degli angoli diedri, che indicano come è disposto un amminoacido rispetto ad un altro. L'angolo diedro è legato alla struttura secondaria, quindi strutture secondarie diverse hanno intensità di energia delle bande diverse e quindi hanno degli spettri di CD diversi. Ci sono degli spettri di riferimento per i vari tipi di struttura secondaria: α elica, β sheet e random coil, che sono riportati in

figura (8.18).

Gli spettri di DC di β sheet e random coil presentano due picchi relativi alle due transizioni $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$, lo spettro di DC dell' α elica invece presenta 3 picchi: uno positivo e due negativi: questo è dovuto al fatto che c'è un accoppiamento eccitonicco, cioè un accoppiamento dipolo-dipolo che avviene tra molecole allo stato eccitato, che provoca una separazione delle bande energetiche. Quando si hanno per esempio due monomeri che formano un dimero può esserci un accoppiamento eccitonicco. Nel caso dell' α elica si ha accoppiamento tra i residui.

Nell'analisi dei dati sperimentalni si possono utilizzare degli spettri che vengono presi come basi e dividere lo spettro ottenuto sulla base di quelli di riferimento: in questo modo lo spettro della proteina risulta essere una combinazione lineare degli spettri di riferimento, per trovare quale è la proporzione delle tre strutture secondarie all'interno della proteina:

$$\vartheta_T = x_1\vartheta_e + x_2\vartheta_f + x_3\vartheta_c \quad (8.37)$$

Dal momento che ci sono tre incognite in teoria bastano tre lunghezze d'onda, in realtà ne abbiamo a disposizione molte di più.

Il problema è che questa cosa funziona molto bene a lunghezze d'onda molto basse: 190 nm è già al limite, ma in laboratorio sotto 190 nm non si riesce ad andare.

Nella regione del near UV si trovano gli amminoacidi aromatici e il legame di solfuro. Quello che dà il picco di assorbimento migliore è il triptofano, intorno ai 280 nm. Mentre gli spettri nel far UV danno informazioni sulla struttura secondaria, nel near UV si ha il segnale solo se gli amminoacidi sono immobilizzati in una conformazione asimmetrica, quindi otteniamo informazioni sulla rigidità della struttura terziaria. Il segno, l'ampiezza e la lunghezza d'onda delle bande aromatiche non possono essere calcolati a priori perché dipendono dalla struttura nelle immediate vicinanze del cromoforo immobilizzato e dal suo environment elettronico.

Questo implica che lo spettro è molto sensibile al fatto che la proteina sia allo stato nativo o allo stato denaturato: si può osservare l'inizio della denaturazione nel vicino UV quando la proteina perde il suo impacchettamento, poi nel lontano UV si osserva la perdita della struttura secondaria. Il processo di denaturazione si osserva con osservabili diverse: intensità di fluorescenza, lunghezza d'onda di fluorescenza, segnale di dicroismo, . . .

Gli acidi nucleici hanno uno spettro solo nella regione dove assorbono. Diverse eliche del DNA hanno spettri di dicroismo diversi. DNA e RNA hanno spettri di dicroismo molto diversi.

La cosa fondamentale per cui si usa il dicroismo è la determinazione della struttura secondaria e l'osservazione della rigidità della struttura terziaria. Serve per seguire i cambiamenti conformazionali della proteina o per verificare se la proteina che osserviamo ha il folding, cioè la conformazione, che ci aspettiamo rispetto a quella originaria (wild-type). Questo può valere sia nel caso di purificazione della proteina, sia nel caso di sostituzione di amminoacidi con altri.

Capitolo 9

Lezione 9: 6 Maggio 2015

9.1 SPETTROSCOPIA INFRAROSSA

La spettroscopia che abbiamo visto fino ad ora si riferiva ai livelli elettronici, la spettroscopia infrarossa, invece, ha che fare con i livelli vibrazionali. Essendo infrarossa è una spettroscopia che riguarda delle energie più piccole e quindi transizioni tra stati che differiscono per quantità energetiche più piccole.

È un metodo usato principalmente in chimica per determinare quali sono i costituenti di una sostanza incognita in quanto i diversi legami chimici hanno delle frequenze caratteristiche a cui assorbono e quindi permettono di determinare la loro presenza.

Tutta la trattazione della spettroscopia IR si basa fondamentalmente sul fatto che consideriamo il moto nuclei attorno alla loro posizione equilibrio, escludendo i processi di traslazione e di rotazione: consideriamo le molecole come se avessero un baricentro fisso (escludiamo le traslazioni a lungo raggio) e i nuclei supponiamo che si possono muovere solo lungo la direzione del legame. Consideriamo vibrazioni di questo legame.

L'infrarosso è una regione molto vasta, va da $0.75 \mu m$ a $300 \mu m$ (in numeri d'onda va da $40 cm^{-1}$ a $14000 cm^{-1}$). Con la spettroscopia IR non si lavora più in lunghezze d'onda ma in *numeri d'onda*, definiti come il reciproco della lunghezza d'onda:

$$k = \frac{1}{\lambda} \quad (9.1)$$

Numeri d'onda più grandi significano energie più grandi (il contrario di quanto vedevamo negli altri spettri in funzione della lunghezza d'onda).

Anche la regione dell'infrarosso è divisa in sottoregioni:

Regione	Lunghezza d'onda (μm)	Numero d'onda (cm^{-1})
Vicino infrarosso	0.75-2.50	14000-4000
Medio infrarosso	2.5-15	4000-667
Lontano infrarosso	15-300	667-40

Tabella 9.1: *regioni dell'infrarosso*

Vicino, medio e lontano è rispetto al visibile. A seconda delle diverse zone sono diversi i gruppi funzionali che rispondono e sono diversi i tipi di vibrazione che osserviamo, ma in generale le vibrazioni possono essere raggruppate in due gruppi principali: vibrazioni di *stretching* (allungamento) e vibrazioni di *bending* (piegamento).

Come si ottiene la radiazione IR? C'è l'infrarosso naturale che arriva dalla luce solare (più della metà della luce solare è costituita da radiazione IR), mentre quello che poi si usa effettivamente è una specie di emettitore di corpo nero, con una certa efficienza (minore di quella del corpo nero) e uno spettro di emissione che dipende dalla temperatura dell'oggetto, che emette in un intervallo di lunghezze d'onda spostato verso il rosso. La radiazione IR è usata per molte cose, per esempio ci sono molti sensori basati sulle connessioni infrarosse, come i collegamenti IR tra computer. Essendo un tipo di trasmissione facilmente disturbabile richiedeva una certa vicinanza e un preciso posizionamento dei due oggetti che si dovevano parlare.

Dal punto di vista bio la radiazione IR interessa perché permette di determinare esattamente i costituenti e la conformazione degli oggetti in esame.

Principi di funzionamento: nell'approssimazione più grezza abbiamo che all'interno di una molecola gli atomi sono legati da un legame di tipo covalente, che ha una lunghezza media attorno a cui ci sono delle oscillazioni. In generale gli atomi che sono legati da questo tipo di legame risentono della forza del legame, che è di tipo elastico e ha un'intensità diversa a seconda della massa degli oggetti che costituiscono il legame. Questa è la transizione su cui va a incidere la radiazione IR quando viene mandata sulla molecola.

La radiazione IR può essere assorbita dalla molecola se vengono rispettate determinate regole di selezione:

- La frequenza applicata deve corrispondere alle frequenze naturali di vibrazione dell'oggetto: deve risuonare con uno dei modi normali di vibrazione dell'oggetto. (È analogo al fatto che la lunghezza d'onda che mandavamo nel visibile doveva essere quella necessaria per fare il salto elettronico da uno stato all'altro).
- Deve esistere un momento di dipolo elettrico e quindi legame covalente deve essere polare, cioè deve esserci una piccola separazione di carica. Questa cosa funziona soltanto con le molecole asimmetriche, che significa anche non omonucleari.
- In seguito all'assorbimento ci deve essere una variazione del momento di dipolo elettrico.

Vediamo più in dettaglio cosa succede. Abbiamo un legame che vibra (non è una situazione statica) e a causa delle oscillazioni si hanno degli oggetti carichi che generano un campo magnetico variabile e oscillante e quindi si genera un momento di dipolo che cambia perché cambia la distanza tra le cariche. Maggiore è la variazione del momento di dipolo, cioè maggiore è l'ampiezza dell'oscillazione del legame, più intenso è il campo elettromagnetico.

Se mandiamo una radiazione con la stessa frequenza del campo generato dal legame stesso si osserva l'assorbimento di questo tipo di radiazione, quindi si ha

una banda nello spettro di assorbimento. Quello che si ottiene è un accoppiamento tra due onde, che ha un'ampiezza maggiore di quelle di partenza.

Se abbiamo molecole diverse, e quindi gruppi funzionali diversi, avremo frequenze caratteristiche diverse e quindi ciascuno avrà un picco caratteristico che permette di identificarlo. I picchi sono così specifici e caratteristici, e per i legami fondamentali anche abbastanza poco sensibili all'environment, che si può usare lo spettro IR come *impronta digitale* di una certa sostanza chimica. Per scoprire la presenza di tale sostanza chimica all'interno di un complesso più grosso si può vedere lo spettro e cercare i *fingerprint*, cioè i particolari picchi di risposta.

Per modellizzare l'oscillazione la cosa più semplice è ricorrere alla legge di Hooke, che ci dice che la frequenza caratteristica dell'oscillazione dipende dalla costante di forza del legame e dalla massa ridotta del sistema:

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{K}{\mu}} \quad (9.2)$$

dove, nel caso di due atomi che costituiscono una molecola:

$$\mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2} \quad (9.3)$$

Quindi la frequenza dei modi normali di vibrazione della molecola dipende direttamente dalla costante di forza e inversamente dalla massa ridotta. La costante di forza si traduce nel fatto che un legame doppio ha una costante di forza più alta e quindi lo troviamo a frequenze più alte rispetto al singolo.

Se vogliamo vedere più nel dettaglio come avviene tutto questo ricorriamo alla descrizione quantistica, che si basa sull'approssimazione di Born-Oppenheimer (supponiamo che tutti i processi di assorbimento avvengono con i nuclei fermi). Lo spettro energetico di una molecola ha un andamento che può essere approssimato da una parabola in un intorno della posizione di equilibrio (figura (9.1)).

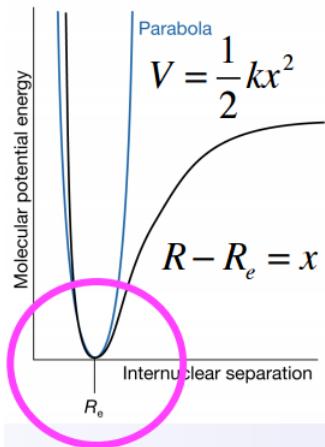


Figura 9.1: *andamento del potenziale*

L'hamiltoniana che descrive il movimento della molecola attorno alla posizione

di equilibrio può essere considerata quella dell'oscillatore armonico:

$$\hat{H}_N = \hat{T}_N + \frac{1}{2}kx^2 \quad (9.4)$$

Tipicamente per l'oscillatore armonico i livelli energetici sono equispaziati, multipli di $\hbar\nu$ e le funzioni d'onda dei polinomi di Hermite:

$$\left(\hat{T}_N + \frac{1}{2}kx^2 \right) \Psi_n(x) = E_n \Psi_n(x) \quad (9.5)$$

$$E_n = \left(\frac{1}{2} + n \right) \hbar\nu \quad (9.6)$$

$$\Psi_n = N_n H_n(y) e^{-y^2/2} \quad y = \left(\frac{\mu w}{\hbar} \right)^{\frac{1}{2}} x \quad (9.7)$$

Come sempre perchè si osservi un picco di assorbimento la quantità che andiamo a vedere è il momento di dipolo associato alla transizione, chè è l'operatore momento di dipolo pesato sulle funzioni d'onda prima e dopo la transizione:

$$\mu_{trans} = \langle \Psi_{n'} | \mu | \Psi_n \rangle \quad (9.8)$$

dove n si riferisce ai vari livelli energetici (figura (9.2)).

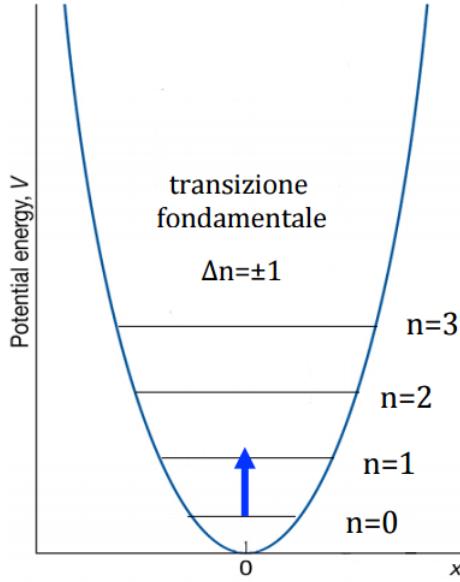


Figura 9.2: *livelli energetici nell'approssimazione dell'oscillatore armonico*

Il momento di dipolo in prima approssimazione possiamo svilupparlo in serie lungo la lunghezza del legame, dal momento che il momento che stiamo considerando avviene lungo la direzione del legame:

$$\mu = \mu_0 + \left(\frac{d\mu}{dx} \right)_0 x + \dots \quad (9.9)$$

Abbiamo quindi:

$$\mu_{trans} = \langle \Psi_{n'} | \mu_0 | \Psi_n \rangle + \left(\frac{d\mu}{dx} \right)_0 \langle \Psi_{n'} | x | \Psi_n \rangle \quad (9.10)$$

Ricordando che:

$$\langle \Psi_{n'} | \mu_0 | \Psi_n \rangle = \mu_0 \langle \Psi_{n'} | \Psi_n \rangle = 0 \quad (9.11)$$

si ottiene che perchè avvenga la transizione non deve essere nulla la seguente quantità:

$$\mu_{trans} = \left(\frac{d\mu}{dx} \right)_0 \langle \Psi_{n'} | x | \Psi_n \rangle \quad (9.12)$$

La condizione $\left(\frac{d\mu}{dx} \right)_0 \neq 0$ significa che il momento di dipolo deve variare con la coordinata della vibrazione, cioè la vibrazione deve comportare una variazione del momento di dipolo. È una condizione generale. La condizione $\langle \Psi_{n'} | x | \Psi_n \rangle \neq 0$ è invece una condizione specifica che dice tra tutte le transizioni dallo stato n allo stato n' quali sono quelle che effettivamente avvengono: in questo caso le uniche transizioni permesse sono quelle tra livelli primi vicini, cioè stati tali per cui $\Delta n = \pm 1$.

Abbiamo fatto un'approssimazione grezza per cui abbiamo un potenziale armonico, cioè un potenziale parabolico, ma in realtà la forma del potenziale è parabolica solo in un piccolo intorno della posizione di equilibrio. Nella forma più generale il potenziale è descritto da questa espressione:

$$V(x) = D_e (1 - e^{-ax})^2 \quad (9.13)$$

dove:

$$a = \left(\frac{k}{2D_e} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (9.14)$$

$$E_n = \left(n + \frac{1}{2} \right) \hbar\omega - \left(n + \frac{1}{2} \right)^2 \hbar\omega b \quad (9.15)$$

$$b = \frac{\hbar a^2}{2\mu\omega} \quad (9.16)$$

$$E_0 = \frac{1}{2} \hbar\omega - \frac{1}{4} \hbar\omega b \quad (9.17)$$

$$E_{dissociazione} = D_e - E_0 \quad (9.18)$$

e D_e è l'energia di punto zero.

Quindi i livelli energetici non dipendono solo da n ma anche da n^2 e non risultano più equidistanti in termini di energia, come vediamo in figura (9.3). Possiamo fare un'approssimazione armonica del potenziale, tenendo conto che dipende dalla posizione. Approssimiamo in serie fermandoci al secondo termine:

$$V = V_0 + \left(\frac{dV}{dx} \right)_0 x + \frac{1}{2} \left(\frac{d^2V}{dx^2} \right)_0 x^2 \quad (9.19)$$

V_0 coincide con l'origine dell'asse dell'energia quindi può essere considerato nullo, mentre $(\frac{dV}{dx})_0 = 0$ in quanto lo valutiamo nel punto di minimo. Otteniamo

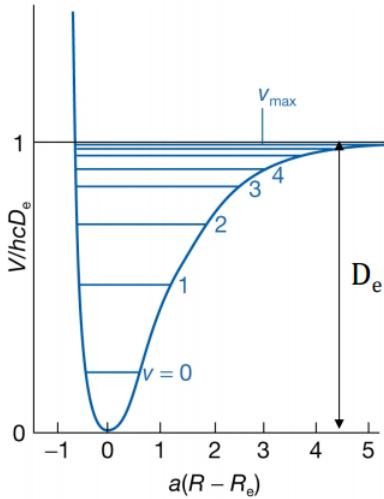


Figura 9.3: *potenziale di Morse*

quindi per il potenziale armonico la seguente forma, nota come *potenziale di Morse*:

$$V = \frac{1}{2} \left(\frac{d^2V}{dx^2} \right)_0 x^2 \quad (9.20)$$

La dipendenza funzionale da x^2 è sempre la stessa, mentre il termine funzionale esatto non è più la k derivante dalla legge di Hooke, ma è un termine più corretto che tiene conto della forma del potenziale.

Fino ad ora siamo in un'approssimazione armonica (cioè ci si ferma al secondo grado del potenziale e al primo del momento di dipolo), in realtà però ci sono dei problemi di anarmonicità:

Anarmonicità meccanica : fermandoci al secondo termine del potenziale armonico abbiamo trascurato il fatto che il termine in più nel potenziale è paragonabile all'avere una perturbazione rispetto a quello che è il potenziale dell'oscillatore armonico:

$$V = \frac{1}{2} \left(\frac{d^2V}{dx^2} \right)_0 x^2 + V = \frac{1}{3!} \left(\frac{d^3V}{dx^3} \right)_0 x^3 \quad (9.21)$$

Questo comporta un mescolamento delle autofunzioni e gli stati del sistema non sono più le autofunzioni dell'oscillatore armonico ma sono una combinazione lineare di queste. L'effetto è il fatto che la forza di richiamo non è proporzionale allo spostamento e la frequenza di oscillazione dipende anche da quanto è ampio il movimento che viene fatto.

Limitarsi al secondo ordine significa trascurare degli effetti di non linearità nello spostamento della forza.

Anarmonicità elettrica : limitarsi al primo ordine del potenziale comporta che la variazione del momento di dipolo non è più proporzionale allo

spostamento dei nuclei, ma ha una dipendenza più complessa:

$$\mu = \mu_0 + \left(\frac{d\mu}{dx} \right)_0 x + \frac{1}{2} \left(\frac{d^2\mu}{dx^2} \right)_0 x^2 \quad (9.22)$$

Questo comporta che il momento di dipolo di transizione ha anche dei termini in cui si mescolano le funzioni d'onda con numeri quantici diversi da quelli visti prima e si possono osservare transizioni che differiscono per più di un livello energetico ($\Delta n = \pm 2, \Delta n = \pm 3, \dots$):

$$\mu_{trans} = \left(\frac{d\mu}{dx} \right)_0 \langle \Psi'' | x | \Psi' \rangle + \frac{1}{2} \left(\frac{d^2\mu}{dx^2} \right)_0 \langle \Psi'' | x^2 | \Psi' \rangle \quad (9.23)$$

In generale comunque la riga più intensa è quella che corrisponde a transizioni $\Delta n = \pm 1$.

L'altra cosa che si osserva sono le armoniche superiori: come a livello elettronico si osservano le transizioni da S_0 a S_2 o S_3 , anche in questo caso si possono osservare le transizioni della molecola oltre che da n_0 a n_1 anche da n_0 a n_2 o n_3 (figura (9.4)), anche se sono più deboli perché meno favorite.

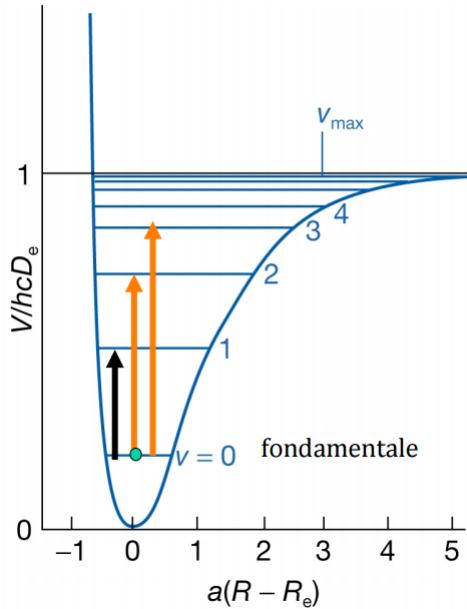


Figura 9.4: potenziale tenendo conto delle armoniche superiori

Che cosa osserviamo? Rispetto alla posizione di equilibrio ci sono diversi tipi di vibrazioni:

- Vibrazioni di stretching, in cui cambia la distanza tra gli atomi, ma rimane invariato l'angolo;
- vibrazioni di bending, in cui quello che cambia è l'angolo di legame.

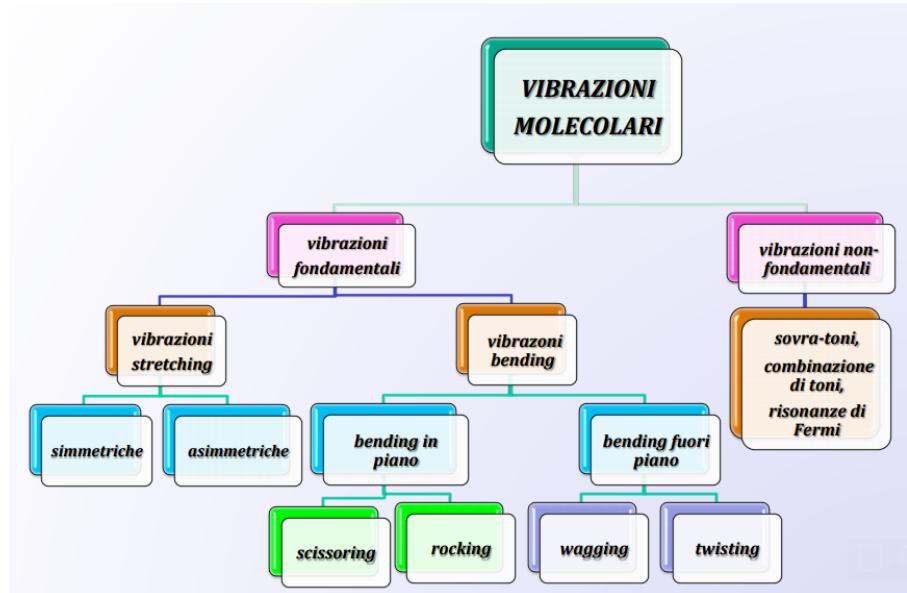


Figura 9.5: schema riassuntivo di tutti i tipi di vibrazione

In figura (9.5) è riportato uno schema riassuntivo di tutti i tipi di vibrazione. I sovra-toni sono le armoniche superiori, la combinazione di toni è dovuta alla combinazione di armoniche sferiche, quindi compare a frequenze che sono somma o differenza delle frequenze fondamentali, le risonanze di Fermi sono interazioni tra la vibrazione fondamentale e i sovra-toni.

Tornando all'approssimazione armonica, i livelli energetici vibrazionali hanno questo andamento:

$$E_{vib} = \left(\frac{1}{2} + n \right) h\nu \quad (9.24)$$

Le molecole più semplici, dove non ci sono effetti anarmonici, vedono solo $\Delta n = \pm 1$, mentre le molecole più complesse per effetto dell'anarmonicità vedono anche transizioni maggiori.

Le transizioni fondamentali sono quelle che partono dal livello vibrazionale fondamentale e transiscono solo al livello più vicino, i sovra-toni sono transizioni dal livello fondamentale a uno dei livelli superiori al primo, mentre le transizioni tra livelli superiori sono chiamate *hot band*. Il nome hot band è legato alla dipendenza di queste transizioni dalla temperatura: se l'occupazione dei diversi livelli scala rispetto a quella che è la legge di Boltzmann, a temperatura ambiente tutte le molecole o quasi sono sullo stato fondamentale e quindi queste transizioni non si osservano, mentre le vediamo quando viene aumentata la temperatura con conseguente aumento della popolazione dei livelli superiori.

Le vibrazioni di stretching sono quelle lungo la direzione del legame, in cui varia la lunghezza del legame e non l'angolo. Si trovano a energie relativamente alte e possono essere di tipo simmetrico o antisimmetrico: nel caso sia simmetrico i due legami aumentano o diminuiscono simultaneamente la loro distanza,

mentre nel caso antisimmetrico i due legami aumentano o diminuiscono la loro distanza in maniera alternata.

Le vibrazioni di bending mantengono rigida la distanza di legame ma cambia l'angolo del legame. Queste vibrazioni avvengono ad energie più basse rispetto alle vibrazioni di stretching. Il bending può avvenire nel piano o perpendicolare al piano della molecola: il bending nel piano può essere di due tipi: lo *scissoring* prevede che i due atomi si avvicinino e si allontanino, mentre il *rocking* prevede che gli atomi mantengano fissa la loro distanza e si muovono nella stessa direzione. Le vibrazioni di bending fuori dal piano sono il *wagging*, per cui gli atomi si muovono simultaneamente dentro e fuori dal piano, e il *twisting* per cui invece si alternano.

Come si fa effettivamente a fare una misura di spettro IR? Il metodo più vecchio e lungo consisteva nell'utilizzare uno spettrometro dispersivo, cioè uno spettrometro IR che sostanzialmente funziona come uno spettrofotometro o uno spettrofluorimetro. Il problema è che l'intervallo di lunghezze d'onda e di numeri d'onda è molto ampio: per fare una scansione completa bisogna andare almeno da 400 a 4000 numeri d'onda.

Per questi problemi questa strumentazione è stata sostituita dagli strumenti che lavorano in trasformata di Fourier (come quello che abbiamo visto in laboratorio): il vantaggio è che l'informazione su tutte le lunghezze d'onda viene raccolta se non simultaneamente, comunque in un brevissimo intervallo di tempo.

L'oggetto fondamentale di uno spettrometro IR è un *interferometro di Michelson*: abbiamo un beam splitter che separa la radiazione, uno specchio fisso e uno specchio che invece si muove.

Supponiamo di mandare la radiazione a una singola lunghezza d'onda, a seconda del posizionamento dello specchietto sarà diverso lo sfasamento tra i due fasci quando si ricombinano e quindi cambia il tipo di figura d'interferenza che si ottiene. Utilizzando una sorgente di infrarossi, che manda tutto un insieme di lunghezze d'onda contemporaneamente, quello che si ottiene in uscita è una figura di interferenza data dalla sovrapposizione di una serie di onde *seno* tutte in diverse posizioni di fase l'una con l'altra. Il vantaggio è che l'interferogramma contiene tutte informazioni sulla lunghezza d'onda e per ogni posizione dello specchio si ha un interferogramma. Nell'interferogramma che formiamo le diverse lunghezze d'onda che formano la luce incidente sul campione avranno diverse ampiezze, perché dipende da come hanno interferito quando si sono ricombinate.

In particolare quelle per cui lo spostamento corrisponde a mezza lunghezza d'onda saranno completamente assenti. Quindi viene mandato l'interferogramma al variare della posizione dello specchietto: quando lo specchietto ha finito tutto il movimento avanti e indietro, la serie di interferogrammi ottenuti, messi insieme, danno l'informazione su tutte le frequenze (cambiando la posizione dello specchietto tutte le lunghezze d'onda sono presenti). A questo punto l'interferogramma, contenente tutte le informazioni, passa attraverso il campione e la luce che viene raccolta è sempre un interferogramma di cui però sarà cambiata la forma. L'interferogramma è un'informazione in posizione dello specchietto e viene trasformata tramite trasformata di Fourier in un'informazione in frequenza ottenendo lo spettro. Il vantaggio è che tutte le lunghezze d'onda vengono scansionate nel tempo in cui lo specchietto va avanti e indietro: con poche po-

sizioni dello specchietto ottengo informazioni su tutte le lunghezze d'onda.

Strumento fondamentale è quindi l'interferometro di Michelson che serve per formare l'interferogramma che poi viene analizzato tramite trasformata di Fourier. Il tempo complessivo di scansione degli specchietti è al massimo di 2 s e il range di movimento dello specchietto è di qualche μm .

In figura (9.6) è riportato uno schema della strumentazione utilizzata in laboratorio.

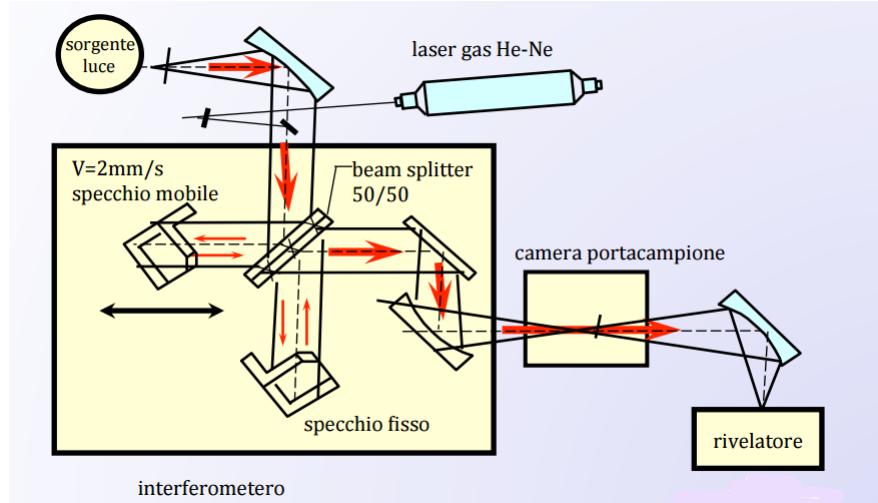


Figura 9.6: strumentazione utilizzata per la spettroscopia infrarossa

Chiaramente bisogna poi normalizzare rispetto alle condizioni del laboratorio, l'efficienza della lampada, ecc. La differenza con l'interferometro a dispersione è che con questo si aveva il reticolo che separava la radiazione e la fenditura che selezionava, con una notevole perdita di luce.

L'interferogramma misurato è una sovrapposizione spettrale delle diverse onde, l'ampiezza che pesa ciascuna delle onde seno e coseno è legata alla probabilità di assorbimento: è nell'ampiezza della parte seno che risiede l'informazione sull'assorbimento. Nel caso di fascio monocromatico:

$$I(\Delta) = \frac{1}{4} I(\bar{\nu}) \left\{ 1 + \cos \left(2\pi \frac{\Delta}{\lambda} \right) \right\} = \frac{1}{4} I(\bar{\nu}) \cos (2\pi \Delta \bar{\nu}) \quad (9.25)$$

$$I(\Delta) = B(\bar{\nu}) \cos(2\pi \Delta \bar{\nu}) = B(\bar{\nu}) \cos(2\pi \bar{\nu} 2Vt) \quad (9.26)$$

dove V è la velocità dello specchietto e Δ la posizione dello specchietto. Nel caso di un fascio policromatico:

$$I(\Delta) = \int_0^{\infty} B(\bar{\nu}) \cos(2\pi \bar{\nu} \Delta) d\bar{\nu} \quad (9.27)$$

$$B(\bar{\nu}) = \int_0^{\Delta_{max}} I(\Delta) \cos(2\pi \bar{\nu} \Delta) d\Delta \quad (9.28)$$

Le componenti fondamentali sono:

- una **sorgente** che sia in grado di emettere radiazione infrarossa (tipicamente è una sorgente di corpo nero): ha il comportamento di un corpo nero con una certa efficienza. In realtà si usano dei materiali riscaldati da una corrente elettrica che emettono radiazione IR nell'intervallo desiderato. Per le lunghezze d'onda più lunghe la sorgente più utilizzata è la *sorgente globar* (cilindro di carbone di silicio), mentre il *filamento di Nerst* viene usato per le lunghezze d'onda più corte ed è costituito da ossidi di terre rare.
- l'**interferometro** di Michelson
- il **campione**
- il **rivelatore**, che non si aspetta di ricevere fotoni ma deve essere in grado di misurare interferogrammi (non è un tubo fotomoltiplicatore!). La maggior parte dei rivelatori è di tipo termico, che misurano l'energia radiante a partire dall'effetto termico. Sono sensibili a un basso intervallo di lunghezze d'onda e i più famosi sono i bolometri, termistori e termocoppie (differenza di potenziale dovuta alla temperatura).
- un **computer** per fare la trasformata di Fourier del segnale per ottenere lo spettro

Il **portacampioni** potrebbe essere una cella come quella usata nello spettrofotometro, tuttavia deve essere trasparente all'IR e resistere ai solventi polari. Quello che si usa più spesso è però la configurazione ATR (riflessione totale interna): invece di far passare la radiazione attraverso il campione, la radiazione viene fatta arrivare sotto una piastra e il materiale che costituisce la cella è tale da fare riflessione totale. Quando si ha riflessione totale si forma sempre un'onda evanescente al confine tra i materiali (portacampione e campione). La caratteristica dell'onda evanescente è quella di avere una bassissima lunghezza di penetrazione, quindi penetra nella parte dove in teoria l'onda non potrebbe andare essendo in riflessione totale, per un percorso che è molto piccolo, dato da:

$$z = \frac{1}{\gamma} = \frac{\lambda_1}{2\pi (\sin^2 \theta - n_{21}^2)^{\frac{1}{2}}} \quad (9.29)$$

L'onda evanescente penetra abbastanza da interagire con i primi strati atomici o molecolari del campione, che possono assorbirla. Questo implica che la radiazione viene riemessa dando l'informazione. Penetrando solo nei primi strati atomici però è come se vedessimo una concentrazione effettiva estremamente bassa, quindi le concentrazioni da usare in esperimenti di FTIR sono molto elevate. La concentrazione complessiva, cioè il numero di centri, potrebbe essere reso uguale se si riuscisse ad abbassare molto lo spessore della sostanza.

Come è fatto un interferogramma? Quale è il suo legame con lo spettro? In figura (9.7) sono riportati alcuni interferogrammi con forme caratteristiche, con i relativi spettri.

Vantaggi della spettroscopia infrarossa:

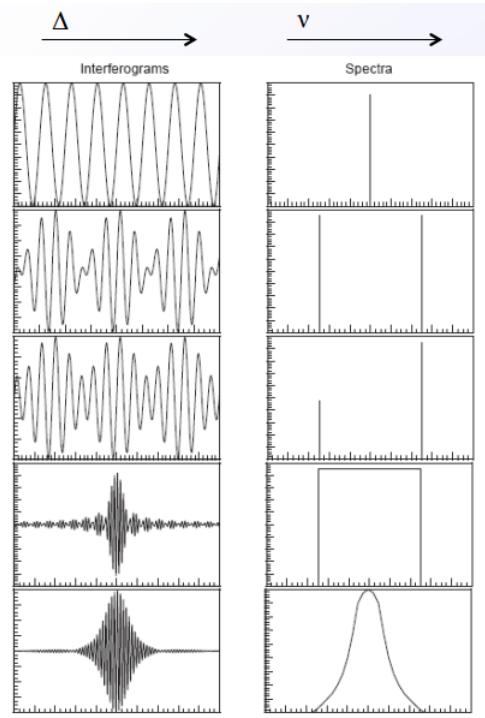


Figura 9.7: esempi di interferogrammi e relativi spettri

- è veloce
- è molto sensibile
- si ottengono informazioni su tutte le frequenze allo stesso tempo
- si possono studiare più composti contemporaneamente
- assenza di luce diffusa
- usando un laser He-Ne come standard interno non c'è bisogno di calibrazioni esterne

Gli spettri IR tipicamente si registrano in percentuali di trasmittanza, cioè un picco di assorbimento è visto come un picco negativo rispetto alla trasmittanza 100%. In assorbimento non ci sono picchi. Molecole diverse hanno combinazioni di picchi univoche in regioni diverse:

- regione dei gruppi funzionali: la frequenza varia da 4000 a 1300 cm^{-1} e la lunghezza d'onda da 2.5 a $8\text{ }\mu\text{m}$.
- regione delle impronte digitali: regioni di assorbimento univoche delle diverse specie chimiche e dei singoli legami.

In figura (9.8) sono riportate le regioni di assorbimento dei vari legami. Di fronte a uno spettro IR è importante sapere quanti tipi di picchi ci stiamo aspettando: se abbiamo una molecola non lineare, fatta da n atomi, questa ha

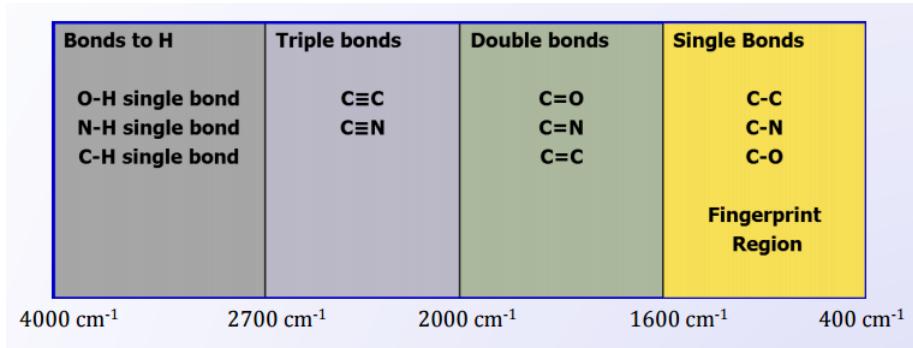


Figura 9.8: *regioni di assorbimenti dei legami*

$3n - 6$ modi vibrazionali fondamentali, cioè modi normali di vibrazione e quindi frequenze che ci aspettiamo di vedere nello spettro IR.

Se parliamo delle proteine i modi di vibrazione sono tantissimi, ma si raggruppano a bande, quindi non si hanno più frequenze caratteristiche ma si osservano delle bande spettrali che prendono vari nomi. Soltanto il legame peptidico genera 9 bande caratteristiche: amide A, B, I, II, ..., VII. Le diverse bande corrispondono a diversi modi di vibrazione dei componenti del legame peptidico. L'amide I è la banda più intensa delle proteine e esprime lo stretching del doppio legame $C = O$. L'amide II esprime il bending nel piano del $N - H$. Quindi per le proteine ci si aspetta la presenza di bande larghe in intervalli di numeri d'onda. Essendo bande caratteristiche del legame peptidico la posizione esatta del picco della banda dipende dalla struttura secondaria, quindi nell'amide I e II principalmente si vedono i contributi dei vari tipi di struttura secondaria.

In realtà non avendo una singola struttura secondaria, ma una combinazione di diverse strutture, quello che si osserva è una banda molto grande con una forma tale da far capire che nascondono delle componenti (figura (9.9)). Il metodo per affrontare questa cosa è fare un fit in gaussiane multiple, per cercare tutti i picchi contenuti nella banda. Dalla posizione del picco si capisce che tipo di struttura secondaria è presente e l'intensità delle bande dà l'informazione su quale è la struttura che prevale.

Lo spettro IR è abbastanza sensibile alla denaturazione della proteina: la banda cambia forma.

9.2 SPETTROSCOPIA RAMAN

La spettroscopia Raman è l'altro metodo utilizzato per studiare le vibrazioni dei livelli molecolari. La differenza fondamentale tra spettroscopia IR e spettroscopia Raman sta nel fatto che la spettroscopia IR è un processo di assorbimento, mentre quella Raman è un processo fuori risonanza.

Nella spettroscopia IR si ha la transizione da uno strato vibrazionale ad un altro, mentre in quella Raman viene mandata radiazione che non corrisponde a nessun salto caratteristico del sistema, quindi mette semplicemente in movimento le cariche (dipolo oscillante) e poi si riosserva emissione del sistema, ma

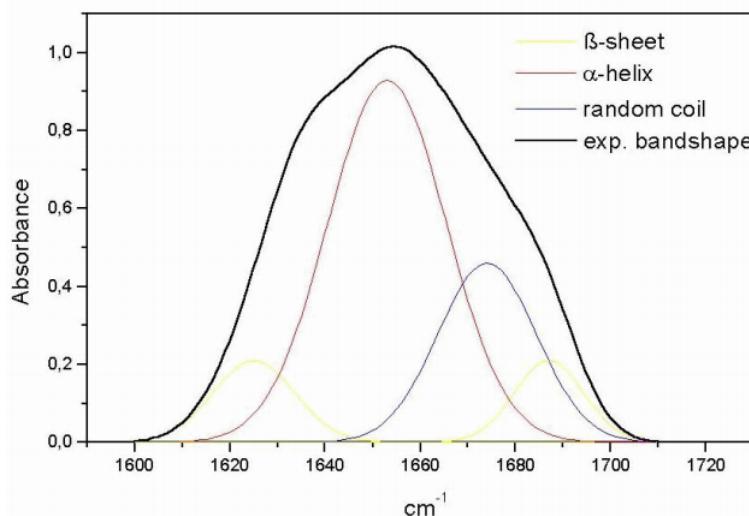


Figura 9.9: banda per diverse strutture secondarie

può succedere che quando si riosserva l'emissione lo stato da cui parte non sia più lo stesso. Osservo l'energia riemessa non esattamente alla stessa lunghezza d'onda di quella di partenza (*scattering Rayleigh*), ma la osservo a frequenze più alte o più basse perché arrivo a uno stato vibrazionale più alto o a uno più basso. Parte dell'energia è utilizzata per cambiare il livello vibrazionale a cui ricade la molecola.

Nella spettroscopia IR inducendo la transizione tra stati vibrazionali ho un picco di assorbimento, mentre il Raman è una **diffusione** della luce inelastica, cioè con una differenza tra frequenza della luce diffusa e frequenza della luce incidente.

9.3 SCATTERING O DIFFUSIONE DI LUCE

Si parla di diffusione elastica, quindi a conservazione della lunghezza d'onda. Ci sono due tipi di diffusione:

- **scattering statico:** prevede la media di tutta la radiazione che arriva nel tempo in una certa posizione, dando informazioni sulle dimensioni molecolari.
- **scattering dinamico:** prevede lo studio delle fluttuazioni di intensità che arrivano in una certa posizione per ottenere informazioni sulla dinamica.

La differenza fondamentale tra la spettroscopia vista fino ad ora e le spettroscopia di scattering è che quando parliamo di scattering parliamo di interazioni fuori risonanza, cioè la radiazione non fa fare una transizione a un certo livello energetico ma porta a un livello virtuale da cui si ha decadimento con emissione di radiazione alla stessa lunghezza d'onda (tralasciamo gli effetti Raman).

Fino ad ora abbiamo osservato radiazione in risonanza: la radiazione incidente

era in risonanza con una delle transizioni della molecola e si osservava l'emissio-ne.

I due approcci per quanto riguarda lo scattering prevedono uno lo studio dell'andamento dell'intensità della luce al variare dei parametri strumentali o del campione e si fa una media temporale, l'altro con la spettroscopia di fotocorrelazione studia le fluttuazioni temporali per ottenere informazioni dinamiche.

Con la diffusione di luce statica misuriamo la media temporale dell'intensità al variare dell'angolo di diffusione o al variare di parametri della soluzione (pH, concentrazione, ...). Lavoriamo sempre nell'approssimazione che il campo incidente sia debole rispetto alle forze caratteristiche della molecola, per cui la risposta della molecola è lineare e in generale consideriamo di avere in prima approssimazione dimensioni della molecola molto piccole, molecole che non interagiscono e osserviamo il segnale nel tempo.

La luce diffusa statica è proporzionale all'intensità della luce diffusa, normalizzata rispetto al volume di eccitazione, alla concentrazione numerica di oggetti in soluzione e al quadrato del peso molecolare:

$$i_s(t) \propto nV_{exc}M^2 \quad (9.30)$$

Questo permette di distinguere molto bene tra monomeri e dimeri: dati due oggetti ciascuno con massa molecolare 1 avremo una certa intensità di luce dif-fusa, se invece abbiamo un dimero (un oggetto con massa molecolare doppia) l'intensità di luce diffusa è molto più alta. L'intensità della luce diffusa è molto sensibile al peso molecolare: esperimenti di aggregazione si seguono bene nello scattering perchè mano a mano che si formano gli aggregati di ordine superiore l'intensità di scattering è sempre di più.

Un'altra cosa tipica per cui si utilizza lo scattering è come selettore di dimen-sioni.

Lo strumento che utilizziamo in laboratorio (riportati in figura (9.10)) si basa su della luce laser, rossa, che arriva sulla cella portacampione e c'è un rivelatore posizionato ad un angolo variabile (possiamo cambiare l'angolo di rivelazione rispetto alla direzione di eccitazione utilizzando un goniometro).

Si utilizza un laser in eccitazione perchè serve una lunghezza d'onda abbastanza monocromatica, il portacampione deve avere un rapporto di indici con il cam-pione il più buono possibile, per questo la cella portacampione contiene l'acqua, altrimenti si creerebbero degli effetti di bordo sulla superficie passando direttamente dall'aria all'oggetto contenente acqua.

C'è una serie di ottiche che servono per selezionare il volume di eccitazione e un rivelatore che è un fototubo. La prima cosa da osservare è che tutto l'ap-parato si trova in un piano orizzontale. Ci sono due metodi per fare esperimenti di scattering: il metodo **omodino** e il metodo **eterodino**. Il metodo omodino prevede che si facciano tutte le analisi partendo esclusivamente dalla luce diffusa che arriva al rivelatore ed è il metodo utilizzato qui in laboratorio. Il metodo eterodino prevede invece che al rivelatore arrivi anche parte della radiazione eccitante.

Ci sono scattering di tantissimi tipi: scattering a raggi X, di neutrini a basso

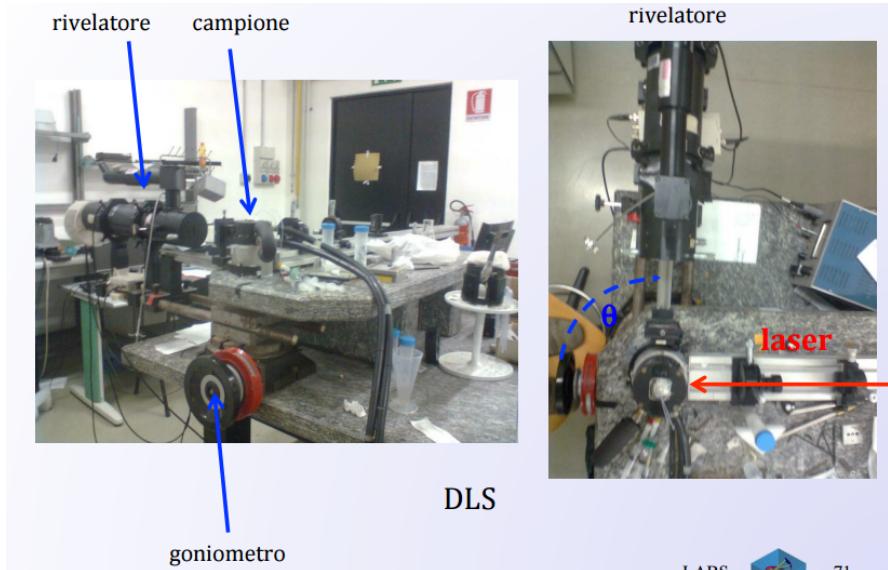


Figura 9.10: *apparato strumentale dello scattering*

angolo (informazioni sulla forma delle molecole), scattering della luce stellare, scattering di molecole. Quello che interessa a noi in generale è lo scattering elastico o quasi elastico: la luce che osserviamo, quella diffusa, ha la stessa lunghezza d'onda della luce eccitante. Il vettore d'onda della luce incidente e quello della luce scatterata hanno sostanzialmente lo stesso modulo:

$$|\vec{k}_{scat}| \cong |\vec{k}_{in}| = \frac{2\pi}{\lambda} \quad (9.31)$$

Definiamo *vettore d'onda scambiato* la differenza tra il vettore d'onda della luce diffusa e di quella incidente:

$$\vec{Q} = \vec{k}_{scat} - \vec{k}_{in} \quad (9.32)$$

L'energia scambiata (quantità scalare) nello scattering quasi elastico è praticamente nulla e quindi trascurabile:

$$\Delta E = \hbar \Delta \omega \quad (9.33)$$

Dal punto di vista classico si ha un campo che esercita una forza sulle cariche che quindi vengono accelerate e irraggiano: si dice che il campo polarizza il mezzo. Dividendo il volume in sottoregioni che hanno la stessa dimensione e vedono lo stesso campo incidente, allora il campo che osserviamo in diffusione è la sovrapposizione dei campi diffusi dalle varie regioni, ottenendo un *campo speckle*.

Se il campione è fatto da oggetti che non si muovono, la sovrapposizione dei campi diffusi nel tempo è sempre la stessa e si ha un campo speckle statico. Se all'interno delle regioni ci sono degli oggetti che diffondono cambia la figura di interferenza che otteniamo e si ha il brulicare del campo speckle (figura (9.11))

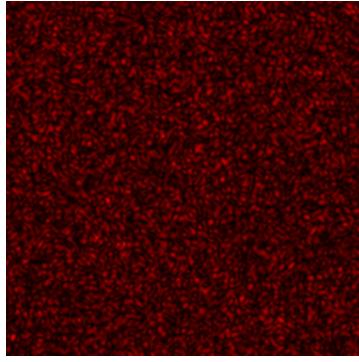


Figura 9.11: *brulicare del campo speckle*

perchè i picchi di massimo e di minimo cambiano posizione nel tempo. Quando si fa un esperimento di scattering per essere sicuri di osservare il campione nell'oculare dobbiamo vedere il brulicare del campo speckle. Se le varie sottoregioni sono tra loro otticamente identiche (in termini di risposta al campo) allora lo scattering si osserva solo in avanti in quanto nell'intero del volume le onde secondarie generate dalle varie onde hanno tutte la stessa ampiezza (per l'equivalenza ottica) e l'effetto è solo di ritardo di fase dovuto ai momenti diversi in cui arriva il fascio e alle differenze di cammino che compie dopo, ma allora si possono sempre prendere regioni corrispondenti in posizioni uguali e opposte, con lo stesso sfasamento, che si annullano mano a mano. L'unica che non si annulla è quella in avanti.

Viceversa le regioni sono diverse l'una dall'altra dal punto di vista ottico, perchè hanno dentro molecole diverse che si muovono e quindi si ha scattering in varie direzioni.

Questa visione è dovuta ad Einstein che nel 1910 sosteneva che la diffusione di luce fosse il risultato delle fluttuazioni della costante dielettrica del mezzo. Dalla teoria cinetica dal punto di vista macroscopico si hanno le molecole che traslano e ruotano, causando fluttuazioni della costante dielettrica o della fluttuazione della regione in cui si muovono e quindi cambiano la configurazione complessiva del campo speckle che per questo brulica.

C'è un ritardo di fase per gli oggetti che arrivano da posizioni diverse, basilare per calcolare l'intensità del campo diffuso scatterato. Siamo in approssimazione quasi elastica (figura (9.12)): il campo che arriva nel punto P_0 arriva ritardato rispetto a quello che arriva in P_1 , di un fattore d_0 in quanto è legato alla differenza di cammino:

$$\varphi_0 = -|k_{in}|d_0 \quad (9.34)$$

Analogamente il campo diffuso, che parte da p_1 è anticipato rispetto a quello che parte da p_0 sempre per la differenza di cammino d_1 :

$$\varphi_1 = -|k_{scat}|d_1 \quad (9.35)$$

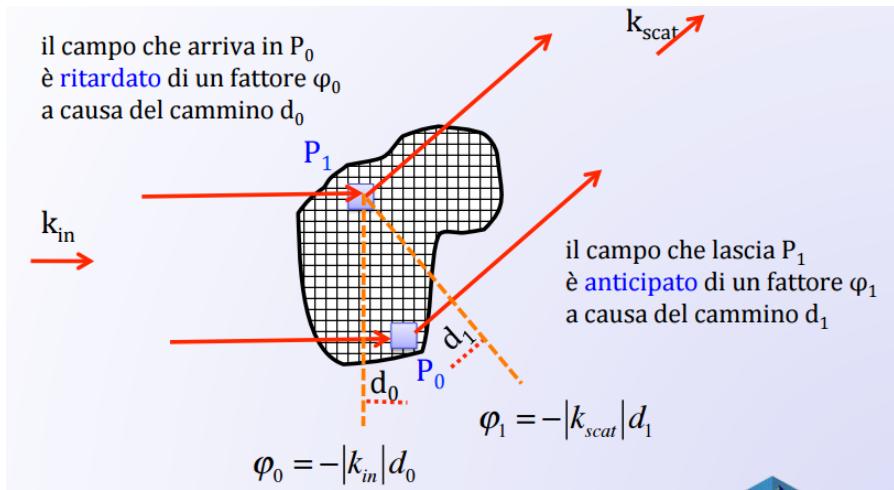


Figura 9.12: spiegazione del ritardo di fase

Il modulo dei vettori d'onda però coincide, quindi lo sfasamento totale del fronte d'onda è dato dalla somma di questi due sfasamenti:

$$\Delta\varphi = (\varphi_1 + \varphi_0) = k_0(d_0 + d_1) \quad (9.36)$$

Detta \vec{R} la distanza tra P_0 e P_1 , lo sfasamento può essere visto come prodotto scalare:

$$\varphi_0 = -\vec{k}_{in} \cdot \vec{R} \quad \varphi_1 = +\vec{k}_{scat} \cdot \vec{R} \quad (9.37)$$

Otteniamo quindi lo sfasamento totale espresso come prodotto scalare:

$$\Delta\varphi = \left[\left(\vec{k}_{scat} - \vec{k}_{in} \right) \cdot \vec{R} \right] = \vec{Q} \cdot \vec{R} \quad (9.38)$$

Consideriamo di essere nella situazione rappresentata in figura (9.13). Vogliamo conoscere il modulo di \vec{Q} .

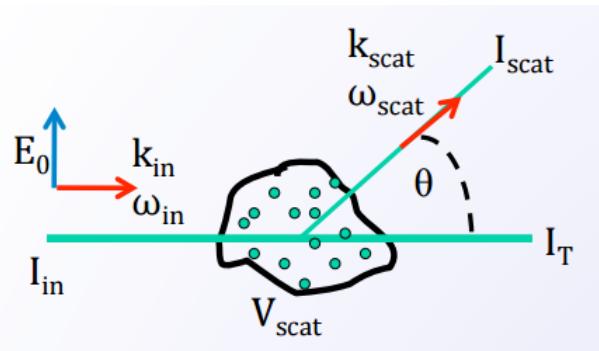


Figura 9.13: situazione sperimentale

$$\left| \vec{k}_{in} - \vec{k}_{scat} \right|^2 = \left| \vec{k}_{in} \right|^2 + \left| \vec{k}_{scat} \right|^2 - 2 \vec{k}_{scat} \cdot \vec{k}_{in} \quad (9.39)$$

$$\left| \vec{k}_{in} \right|^2 \approx \left| \vec{k}_{scat} \right|^2 \approx k_0^2 = \left(\frac{2\pi}{\lambda} n \right)^2 \quad (9.40)$$

$$\Rightarrow Q^2 = 2k_0^2 - 2k_0^2 \cos(\theta) \quad (9.41)$$

$$\Rightarrow Q = 2k_0 \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (9.42)$$

La dipendenza dalla lunghezza d'onda implica che a seconda del tipo di radiazione che stiamo utilizzando si studiano distanze di diversi ordini: utilizzando la luce visibile, per esempio, si studiano distanze dell'ordine dei nanometri.

Definire un angolo di scattering significa definire un valore del vettore d'onda scambiato, che ha come unità di misura l'inverso di una lunghezza. Si può collegare il valore del vettore d'onda scambiato con le distanze caratteristiche che si possono osservare: il vettore d'onda scambiato è inversamente proporzionale alla lunghezza d'onda, quindi a seconda della sorgente che utilizziamo per fare diffusione si ha un intervallo di vettori scambiati accessibile e quindi avremo un intervallo di dimensioni delle molecole che possiamo andare ad esplorare. Ricordiamo che stiamo lavorando nell'approssimazione per cui le dimensioni delle molecole siano molto più piccole delle lunghezze d'onda in gioco.

A seconda che si utilizzino raggi X, neutroni o luce, si ha un diverso intervallo di valori di Q accessibili e quindi dimensioni caratteristiche diverse. Perchè ad ogni lunghezza d'onda non corrisponde un solo Q ? Perchè Q dipende anche da θ .

Se si considera una singola particella l'intensità del campo diffuso dipende dall'intensità del campo incidente, da un termine di fase legato ai parametri del fascio incidente, dall'inverso della distanza R a cui si mette il rivelatore (da questo deduco che è un'onda piana), dal quadrato della lunghezza d'onda di scattering, ma soprattutto dall'interazione con la molecola e quindi dalla polarizzabilità e in particolare dalla componente del tensore polarizzabilità relativa alle direzioni di incidenza e di scattering ($\alpha_{in,scat}$). La molecola avendo un suo momento di dipolo non risponderà a tutte le direzioni del campo esterno nello stesso modo. La polarizzabilità dà un'informazione di ampiezza, che è funzione del tempo in quanto è legata alla posizione del dipolo: la molecola ruota e vibra e quindi cambia la sua direzione e il valore della polarizzabilità.

Abbiamo poi il termine di fase, che è legato al vettore d'onda scambiato e alla posizione della molecola $r(t)$ quando viene osservata. Dal momento che la molecola trasla, la sua posizione cambia nel tempo e quindi abbiamo un termine di fase che cambia nel tempo.

L'andamento temporale del campo diffuso è dato da:

$$\vec{E}_{scat}(R, t) = \frac{E_{in} k_{scat}^2 e^{ik_0 R - i\omega t}}{R} \alpha_{in,scat}(t) e^{i\vec{Q} \cdot \vec{r}(t)} \quad (9.43)$$

Cosa dà una dipendenza dal tempo? Le rotazioni e le vibrazioni nella parte di polarizzabilità e le traslazioni nella parte di fase. Tenendo le informazioni temporali si possono ottenere informazioni su come trasla e come ruota la mole-

cola. Se si fa una media si ottengono solo informazioni statiche (concentrazioni, masse) oppure si può tenere l'informazione del tempo.

Capitolo 10

Lezione 10: 12 Maggio 2015

10.1 SCATTERING O DIFFUSIONE DI LUCE

Il campo incidente esercita una forza sulle cariche, che entrano in oscillazione (dipolo oscillante) e la carica accelerata irraggia. Il campo polarizza il mezzo perché mandando una radiazione polarizzata incidente su un oggetto contenente molecole che hanno un certo dipolo di assorbimento, vengono eccitate in maniera preferenziale le molecole che hanno una componente maggiore nella direzione di polarizzazione della luce. L'interazione viene descritta con un potenziale di interazione dato dal prodotto scalare tra il campo e il momento di dipolo, quindi più sono paralleli maggiore è la probabilità di assorbimento. Viene fatta una *fotoselezione* delle molecole.

Il campo ha una dipendenza sia spaziale che temporale. Se il volume di eccitazione viene diviso in sottoregioni tutte omogenee tra loro, in modo che vedano lo stesso campo incidente (il volume è tale da non risentire della dipendenza spaziale del campo) allora il campo di diffusione si ottiene come sovrapposizione dei campi diffusi in ogni sottoregione. Ciascuno dei volumi diventa un punto di emissione di campi secondari che tra loro interagiscono facendo interferenza in quanto varia la fase con cui arrivano. Quello che si ottiene è il *campo speckle*. Un oggetto che fa scattering che è immobile fa sì che la posizione dei puntini luminosi e di quelli scuri del campo speckle rimanga invariata nel tempo. Se invece gli oggetti in soluzione si muovono, quello che osserviamo è un campo speckle che brulica.

Se tutte le zone sono otticamente identiche, cioè se hanno lo stesso parametro che descrive l'interazione con la luce (costante dielettrica, polarizzazione, indice di rifrazione,...) allora lo scattering lo vediamo soltanto in avanti perché l'intero volume può essere diviso in sottoregioni: se sono tutte otticamente identiche, l'ampiezza del campo diffuso sarà uguale e l'unica cosa diversa è la fase. Si possono trovare regioni in posizioni corrispondenti che danno fasi opposte che si cancellano, lasciando come unico contributo quello dello scattering in avanti.

Non è interessante ottenere informazioni da un campione composto da una serie di cose otticamente identiche, come i cristalli, che infatti vengono studiati con scattering a piccolo angolo in quanto fare scattering solo in avanti è complicato.

Gli angoli molto piccoli sono gli unici dove ci sarà ancora un contributo dello scattering.

Se non sono otticamente identiche ci sono anche le onde secondarie che hanno non solo diversa fase ma anche diversa ampiezza e quindi si ha scattering in tutte le direzioni.

Ricordiamo la forma del campo diffuso:

$$\vec{E}_{scat}(R, t) = \frac{E_{in} k_{scat}^2 e^{ik_0 R - i\omega t}}{R} \alpha_{in, scat}(t) e^{i\vec{Q} \cdot \vec{r}(t)} \quad (10.1)$$

La parte di fase ($e^{i\vec{Q} \cdot \vec{r}(t)}$) è legata al fatto che la stessa molecola si muove nel tempo, variando la sua posizione, quindi il fattore di sfasamento è legato alla traslazione della molecola. Bisogna considerare la combinazione di fasci che provengono da punti diversi a istanti diversi. Il fattore di ampiezza ($\alpha_{in, scat}$) è legato alla polarizzabilità della molecola, ma dal momento che la molecola ruota e vibra, se non è a simmetria sferica per cui la polarizzabilità non dipende dalla particolare direzione di interazione, ma è una molecola complessa, per cui la polarizzabilità è un tensore, allora anche il valore della polarizzabilità rispetto alle direzioni di incidenza e di osservazione cambia nel tempo.

L'interazione con il campo avviene attraverso il momento di dipolo e quindi attraverso il tensore polarizzabilità: vuol dire che si deve fare un prodotto matriciale tra il vettore che descrive la direzione incidente, la matrice polarizzabilità e il vettore che descrive la direzione di diffusione, selezionando una componente del tensore.

Chiaramente non abbiamo una sola molecola libera all'interno del volume di eccitazione quindi il campo è definito come sommatoria sulla componente della polarizzabilità j-esima e sulla sua posizione:

$$\vec{E}_{scat}(R, t) = \frac{E_{in} k_{scat}^2 e^{ik_0 R - i\omega t}}{R} \sum_j \alpha_{in, scat}^j(t) e^{i\vec{Q} \cdot \vec{r}_j(t)} \quad (10.2)$$

Questa somma è fatta solo sulle molecole contenute nel volume di eccitazione. Si suppone che le molecole siano non troppo concentrate e che non siano tra di loro interagenti: il movimento è di tipo casuale e la polarizzabilità non risente della vicinanza delle molecole.

Quello che misuriamo attraverso il rivelatore non è il campo, ma l'intensità, che va come il quadrato del campo. In prima approssimazione quello che ci interessa è che l'intensità di scattering va come l'inverso del quadrato della distanza e dipende dalla quarta potenza del vettore d'onda diffuso:

$$\vec{I}_{scat}(R) = \left| \vec{E}_{scat}(R) \right|^2 \approx \frac{I_{in} k_{scat}^4}{R^2} \approx \frac{I_{in}}{R^2} \cdot \frac{1}{\lambda^4} \quad (10.3)$$

La dipendenza da $1/\lambda^4$ ci dice due cose:

1. spiega il perchè il cielo e il mare sono blu: la luce visibile che ha una lunghezza d'onda più corta e quindi viene diffusa di più è la luce blu.

- spiega perchè non si fa scattering con la radiazione infrarossa ma con radiazione visibile o raggi X (più energetici): l'intensità del segnale aumenta al diminuire della lunghezza d'onda.

In realtà la polarizzabilità può essere vista come dovuta a due componenti separati:

- $\alpha_{in,scat}^j$ (*fissata cfg equilibrio nucleare*): è il termine legato al fatto che la molecola è supposta all'equilibrio e i componenti ruotano tra loro dando una variazione della polarizzabilità, rispetto alla configurazione in cui gli oggetti componenti sono fermi. Questo è quello che dà lo *scattering Rayleigh-Brillouin*, cioè quello che avviene in approssimazione quasi elastica per cui non si hanno variazioni di frequenza, ma solo rotazioni e traslazioni della molecola, che non ne cambiano la polarizzabilità. È scattering dovuto a variazioni di fase.
- $\alpha_{in,scat}^j$ (*lineare spostamenti vibrazionali*): è il termine lineare nello spostamento delle vibrazioni, cioè lineare nello spostamento lungo la direzione del legame. Sono le vibrazioni che si vedono con lo scattering Raman. Quindi in questo contributo si possono osservare piccole variazioni di frequenza tra 100 e 4000 cm^{-1} . In generale abbiamo delle vibrazioni caratteristiche che prendono il nome di *Stokes* o *anti-Stokes* a seconda che ci si trovi a una frequenza pari a quella che stiamo mandando meno quella caratteristica, o più quella caratteristica.

C'è una regola però perchè questa cosa si possa osservare, che deriva dalla regola di selezione Raman:

$$\frac{\delta \alpha_{in,scat}^j}{\delta Q} \neq 0 \quad (10.4)$$

Tutto questo vale nell'approssimazione per cui la dimensione delle molecole è molto più piccola della lunghezza d'onda che stiamo utilizzando. Se questo non è più vero cosa succede? È come se si facesse scattering in un volume che è quasi pari al volume della molecola stessa, quindi si ha sovrapposizione di campi diversi che arrivano da diversi punti della molecola e questo ci permette di avere informazioni sulla forma dell'oggetto, attraverso due parametri:

- fattore di forma: se abbiamo a che fare con una singola molecola di dimensione raggardevole (DNA in soluzione per esempio)
- fattore di struttura: dà l'ordine strutturale del campione. Non abbiamo oggetti dissolti in soluzione ma abbiamo un campione in cui esiste un ordine a più o meno lungo raggio. Tipicamente nei cristalli di proteine (ordine a lungo raggio) oppure nei liquidi (ordine a corto raggio).

Il fattore di forma definisce, a un certo angolo, la luce diffusa che abbiamo quando abbiamo un oggetto complesso rispetto a quello che ci aspetteremmo per un signolo dipolo.

Il campo diffuso di scattering ha lo stesso andamento di prima, però la parte di polarizzabilità è una costante, trattandosi solo di una molecola, e quello che interessa è solo la fase. La somma viene ora fatta sui diversi monomeri che

costituiscono la molecola, che possono essere i vari amminoacidi o i vari domini della molecola, o nel DNA sono blocchi di paia di basi:

$$\vec{E}_{scat}(R, t) \approx \frac{E_{in}}{R} \sum_{k=1}^N e^{i\vec{Q} \cdot \vec{r}_k(t)} \quad (10.5)$$

Se consideriamo la funzione che descrive la probabilità di trovare la molecola in un certo punto $\rho(\vec{r})$, che dà la distribuzione volumetrica della proteina, la sommatoria è equivalente al seguente integrale:

$$\sum_{k=1}^N e^{i\vec{Q} \cdot \vec{r}_k(t)} \implies \int d\vec{r} \rho(\vec{r}) e^{i\vec{Q} \cdot \vec{r}(t)} \quad (10.6)$$

Consideriamo la quantità data dal rapporto tra luce diffusa e luce incidente:

$$P(Q) = \frac{I_{scat}(Q)}{I_0} = \left| \frac{1}{V_m} \int_{V_m} e^{i\vec{Q} \cdot \vec{r}} d\vec{r} \right|^2 = \left| \int \langle \rho(r) \rangle_{rot} e^{i\vec{Q} \cdot \vec{r}} d\vec{r} \right|^2 \quad (10.7)$$

Questo è il fattore di forma: se lo plottiamo al variare di Q si può risolvere l'integrale in trasformata di Fourier e ottenere la forma. Si ottiene un andamento dell'intensità di scattering al variare del vettore d'onda per diversi angoli, e a seconda dell'andamento c'è una corrispondenza con il tipo di forma a grandi linee: sfera, ellissoide, rod con un angolo, rod allungato,...

L'intensità di scattering dipende dalla forma dell'oggetto.

Esempio tipico è quello della β -lactoglobulina che ha forma sferica quanto è un monomero e quando si aggrega a formare un dimero prende la forma di un'ellissoide (figura (10.1)).

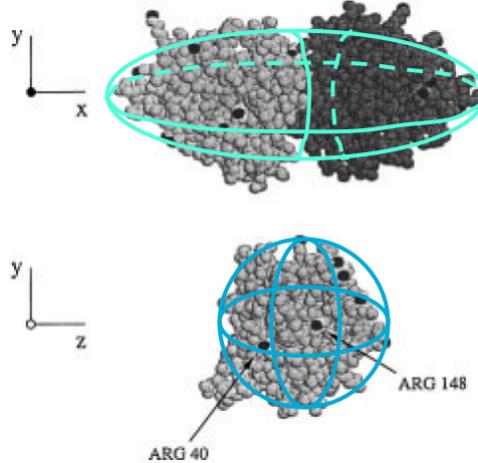


Figura 10.1: *forma della β -lactoglobulina quando si presenta sottoforma di dimero (ellissoide) e di monomero (sfera)*

Da un esperimento di scattering statico otteniamo informazioni su quando avviene la dimerizzazione perché cambia molto l'intensità di scattering perché dipende

dalla forma, ma cambia anche la disposizione spaziale dalla quale arrivano le radiazioni diffuse che interagiscono tra loro e quindi cambia anche l'intensità di Q.

L'altra approssimazione che abbiamo fatto è quella per cui le molecole non sono tra loro interagenti, ma spesso non è vero: se le molecole sono interagenti non si ha più che l'intensità di scattering è lineare nella concentrazione, ma si aggiunge un termine quadratico dovuto all'interazione tra oggetti di uno stesso tipo:

$$\frac{i_{scat}(t)}{V_{exc}} = CM + \alpha C^2 \quad (10.8)$$

dove C è la concentrazione molare.

Può succedere che gli oggetti in soluzione abbiano concentrazioni molto alte o siano molto carichi e quindi ci siano delle interazioni tra tali oggetti. In questo caso questa dipendenza si osserva dal fatto che se si plotta l'andamento dell'intensità al variare della concentrazione non si ottiene un andamento lineare. Come sempre le variazioni dalla linearità significano che sto considerando dei termini di secondo grado.

Fisicamente oltre al coefficiente di diffusione *self*, a diluizione infinita, D_z , che riguarda la molecola da sola, diventa significativo quello che si chiama coefficiente di diffusione *mutuo* D_m , legato alle interazioni degli oggetti che abbiamo in soluzione. Il self è legato semplicemente allo spostamento quadratico medio:

$$2D_z\tau = \left\langle [R(t + \tau) - R(t)]^2 \right\rangle \quad (10.9)$$

Quindi è quello dell'oggetto da solo che farà un certo tipo di moto, tipicamente browniano, ma può anche essere direzionale, quello mutuo invece dipende dalla concentrazione:

$$D_m = \frac{k_B T}{f} [1 + 2AC + \dots] = D_z [1 + 2AC + \dots] \quad (10.10)$$

ed è legato alla presenza di altri oggetti attorno alla molecola. Tipicamente l'effetto è di interazioni cariche, che si sentono a distanze relativamente grandi: per capire se siamo in questo caso bisogna osservare se si ha un cambiamento della **forza ionica**:

$$\mu = \frac{1}{2} \sum_{i=ion} z_i^2 C_i \quad (10.11)$$

dove z è la carica dello ione. Se abbiamo sali che si dissociano uno a uno, come $NaCl$, si hanno due oggetti in rapporto 1 : 1 e con concentrazione uguale:

$$\begin{aligned} C_{Na} &= [NaCl] & C_{Cl} &= [NaCl] \\ z_{Na} &= -z_{Cl} = +1 \\ \Rightarrow \mu &= \frac{1}{2} ([NaCl] + [NaCl]) = [NaCl] \end{aligned} \quad (10.12)$$

Qual è l'effetto di mettere degli ioni in soluzione? È quello di fare una specie di schermo attorno alle parti ioniche della proteina, perché se abbiamo un sale che si dissocia significa che ci sono ioni positivi e negativi in soluzione, gli ioni negativi andranno attorno alla parte positiva della proteina, mentre quelli negativi viceversa. Questo implica che le interazioni eletrostatiche a lungo raggio

che la proteina sentiva non saranno più così efficaci perché ci sono oggetti che ne schermano l'efficacia. Come conseguenza dovrebbe cambiare anche il grafico che descrive l'intensità in funzione della concentrazione.

Il coefficiente di diffusione mutuo dovrebbe diminuire all'aumentare della forza ionica.

L'effetto è quello di far decadere il campo eletrostatico più rapidamente, attraverso un parametro chiamato *parametro di screening* (χ):

$$E \approx \frac{e^{-r\chi}}{r} \quad (10.13)$$

Cosa succede se invece di considerare il segnale nel tempo studiamo le **fluttuazioni**? Cerchiamo di ottenere delle informazioni dalle fluttuazioni dell'intensità. Tipicamente le fluttuazioni vengono descritte da quella che si chiama *funzione di correlazione*. Fare una funzione di correlazione significa prendere il valore del segnale a un certo tempo e lo stesso segnale ad un certo tempo di ritardo, cioè dopo un certo intervallo di tempo τ e fare la media di questa quantità normalizzata. La funzione di correlazione ci dice quanto rapidamente cambia il segnale.

Se i due campi sono molto simili tra loro si ha un picco. Chiamiamo $G_E(t)$ la funzione di correlazione del campo:

$$G_E(t) = \frac{\langle E_{scat}(t)E_{scat}^*(t + \tau) \rangle_t}{\langle E_{scat}^2(t) \rangle_t} = g^1(t) \quad (10.14)$$

Si ha che:

$$E_{scat}(t) = \sum_{i=1}^N E_{scat}(Qr_i, t) \quad (10.15)$$

$$E_{scat}(t) \propto e^{i\vec{Q} \cdot \vec{r}(t)} \quad (10.16)$$

$$E_{scat}(t)E_{scat}^*(t + \delta t) \propto e^{i\vec{Q} \cdot \Delta\vec{r}(t)} \quad (10.17)$$

Il modello di Einstein per la descrizione del moto browniano dice che lo spostamento quadratico medio è legato al coefficiente di diffusione browniano (D), quindi possiamo definire un tempo caratteristico:

$$Q^2|\Delta r(t)|^2 \cong \pi^2 \quad (10.18)$$

$$|\Delta r(t)|^2 \cong 6D\delta t \quad (10.19)$$

$$\Rightarrow \delta t \cong \frac{1}{DQ^2} \quad (10.20)$$

Questo è il tempo caratteristico associato a un oggetto che diffonde con moto browniano con un certo coefficiente di diffusione.

Se osserviamo la funzione di correlazione a tempi che sono più grandi del tempo delle fluttuazioni, i due campi osservati non hanno alcuna correlazione tra di loro, se invece si osserva su tempi molto piccoli rispetto ai tempi delle fluttuazioni avranno un valore simile e daranno un picco, come si osserva in figura (10.2).

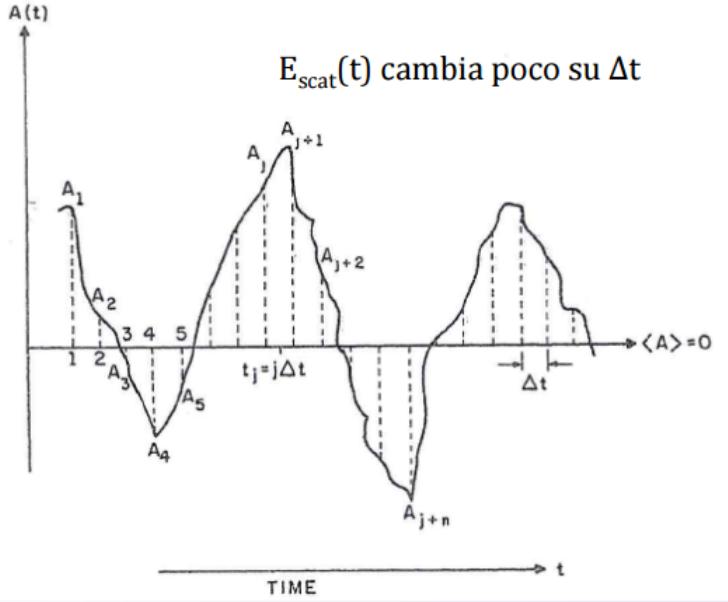


Figura 10.2: Correlazione nel caso in cui il campo cambia poco nell'intervallo di tempo

Definite le seguenti medie:

$$\langle E_{scat}(0) \rangle = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_0^T E_{scat}(t) dt = \lim_{N \rightarrow \infty} \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N E_{scat,j} \quad (10.21)$$

$$\langle E_{scat}(0) E_{scat}^*(\tau) \rangle_t = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_0^T E_{scat}(t) E_{scat}(t + \tau) dt = \lim_{N \rightarrow \infty} \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N E_{scat,j} E_{scat,j+n} \quad (10.22)$$

quello che ci interessa dal punto di vista fisico è che:

$$\langle E_{scat}^2(0) \rangle \geq \langle E_{scat}(0) E_{scat}(\tau) \rangle \quad (10.23)$$

Questo significa che la correlazione parte da un massimo e diminuisce nel tempo. Al tempo di ritardo $\tau = 0$ l'oggetto per definizione è correlato con se stesso, aumentando i tempi di ritardo viene persa la correlazione, come si può osservare in figura (10.3).

Se definiamo le fluttuazioni del campo come:

$$\delta E_{scat}(t) = E_{scat}(t) - \langle E_{scat}(t) \rangle \quad (10.24)$$

allora possiamo definire un tempo caratteristico, detto *tempo di correlazione*, in questo modo:

$$\tau_C = \int_0^\infty \frac{\langle \delta E_{scat}(0) \delta E_{scat}(\tau) \rangle}{\langle \delta E_{scat}^2(t) \rangle} d\tau \quad (10.25)$$

Il tempo di correlazione è il tempo in cui la funzione di correlazione decade.

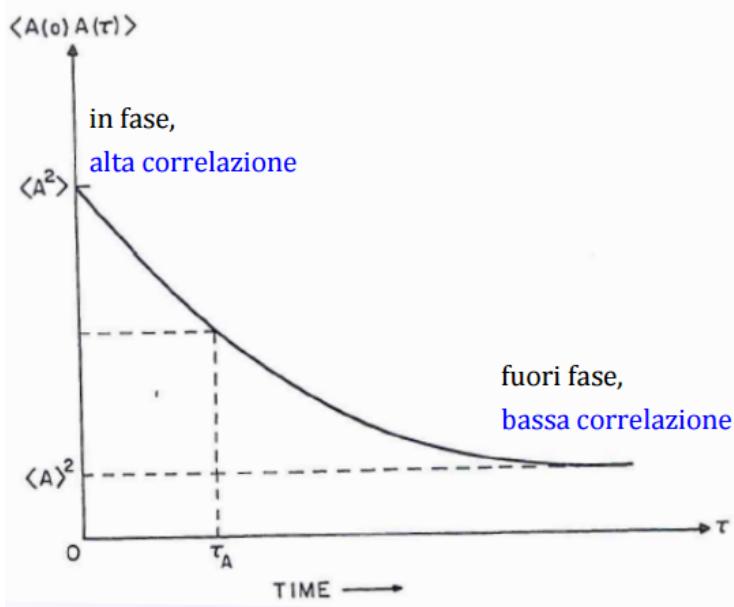


Figura 10.3: andamento della funzione di correlazione all'aumentare dei tempi di ritardo (supponiamo $A = E$)

Vediamo quali sono le differenze tra la teoria appena vista e quanto osservato in laboratorio: qui vediamo solo funzioni di correlazione, che decadono al quadrato del valore di aspettazione. Quella che usiamo in laboratorio è una funzione che decade a zero.

Il nostro campo ha delle fluttuazioni di fase e quindi si hanno poi delle fluttuazioni di intensità. Il campo scatterato che si osserva è una sommatoria data su tutte le molecole in soluzione ed è una somma coerente:

$$E_{scat}(t) = \sum_{i=1}^N E_{scat}(Qr_i, t) \quad (10.26)$$

Dal momento che il campo è gaussiano, a media nulla, possiamo calcolare la funzione di correlazione dell'intensità:

$$G_1(\tau) = g^2(\tau) = \frac{\left\langle E_{scat}(t) E_{scat}^*(t + \tau) E_{scat}^*(t + \tau) E_{scat}(t + \tau) \right\rangle_t}{\langle I^2(t) \rangle_t} \quad (10.27)$$

Il *teorema di Bloch-Siegert* ci dice che se il campo è gaussiano a media nulla, possiamo legare la funzione di correlazione dell'intensità alla funzione di correlazione del campo in questo modo:

$$g^2(\tau) = 1 + |g^1(\tau)|^2 \quad (10.28)$$

La funzione di correlazione dell'intensità è quello che effettivamente misuriamo, mentre la funzione di correlazione del campo è quella su cui facciamo predizioni

perchè descriviamo le fluttuazioni del campo andando a descrivere l'andamento delle varie molecole. In pratica prendiamo un modello che descrive come si muovono le molecole e quindi che sfasamenti avranno, e questo viene usato per fare il fit della funzione di correlazione dell'intensità.

L'informazione rilevante è che ci sono delle fluttuazioni perchè ci sono degli oggetti che si muovono: faccio un modello per descrivere il moto di questi oggetti, calcolo la funzione di correlazione che avrei in base a questo modello e la confronto con quella che misuro.

Ricordando l'espressione (10.1) per il campo diffuso, la sua funzione di correlazione è una parte di correlazione dell'ampiezza e una parte di correlazione della fase:

$$g^1(\tau) = e^{i\omega t} \frac{\langle \alpha(0)\alpha^*(\tau) \rangle_t}{\langle \alpha^2(0) \rangle_t} \left\langle e^{-i\vec{Q} \cdot (\vec{r}(t) - \vec{r}(0))} \right\rangle = e^{i\omega t} C_\alpha(\tau) C_\phi(\tau) \quad (10.29)$$

L'ampiezza cambia se ci sono rotazioni o vibrazioni, mentre la fase cambia perchè cambia la posizione e quindi ci dà informazioni traslazionali. Se che le particelle sono molto piccole rispetto all'inverso del vettore d'onda scambiato, si può dimostrare che se si va a fare la correlazione dell'ampiezza, questa ha un valore costante a circa 1:

$$\frac{\langle \alpha(0)\alpha^*(\tau) \rangle_t}{\langle \alpha^2(0) \rangle_t} \approx 1 \quad (10.30)$$

In che modo ottengo informazioni sulle traslazioni? Fare la funzione di correlazione del campo significa andare a calcolare il seguente integrale:

$$C_\phi(\tau) = \left\langle e^{-i\vec{Q} \cdot (\vec{r}(t) - \vec{r}(0))} \right\rangle = \int G_S(R, \tau) e^{-i\vec{Q} \cdot \vec{R}} d^3 R \quad (10.31)$$

dove $G_S(R, \tau)$ è la soluzione dell'*equazione di diffusione di Fick*, che ci dice come si muovono gli oggetti in soluzione:

$$\frac{\delta}{\delta t} G_S(R, t) = D \nabla^2 G_S(R, t) \quad (10.32)$$

$$G_S(R, 0) = \delta(R) \quad (10.33)$$

e ci dà la probabilità di trovare in R al tempo $t = \tau$ una particella che era nella posizione 0 al tempo $t = 0$. È la funzione che descrive il moto della particella. Si ottiene che la soluzione dell'equazione di Fick è data da:

$$G_S(R, \tau) = (4\pi D\tau)^{-3/2} e^{-R^2/4D\tau} \quad (10.34)$$

Sostanzialmente è una gaussiana in R , che dipende dal coefficiente di diffusione. La soluzione dell'integrale nell'equazione (10.31) è del tipo:

$$C_\phi(\tau) = e^{-Q^2 D \tau} \quad (10.35)$$

$$\Rightarrow g^2(\tau) = 1 + |C_\alpha(\tau)|^2 e^{-2Q^2 D \tau} \quad (10.36)$$

Si ottiene che la fase ha un andamento che dipende dal coefficiente di diffusione.

Quando abbiamo oggetti molto estesi si ha che:

$$|C_\alpha(\tau)| \neq 1 \quad \tau_D = \frac{1}{Q^2 D} \quad (10.37)$$

Che espressione ha il coefficiente di diffusione? Secondo la teoria di Einstein, a cui si aggiunge l'approssimazione di Stokes per cui l'oggetto non si muove libero nel mezzo ma si trascina intorno le molecole del mezzo, si ha:

$$D = \frac{k_B T}{f} = \frac{k_B T}{6\pi\eta a} \quad (10.38)$$

dove a è il raggio della molecola, nell'approssimazione sferica.

Uno dei problemi che si possono avere è la *polidispersità*: in soluzione si possono avere più oggetti che hanno dimensioni diversi, quindi ci sarà una distribuzione di raggi più o meno ampia. Questo lo capisco dal fatto che la funzione non è più fittata bene con un singolo esponenziale, come si osserva in figura (10.4).

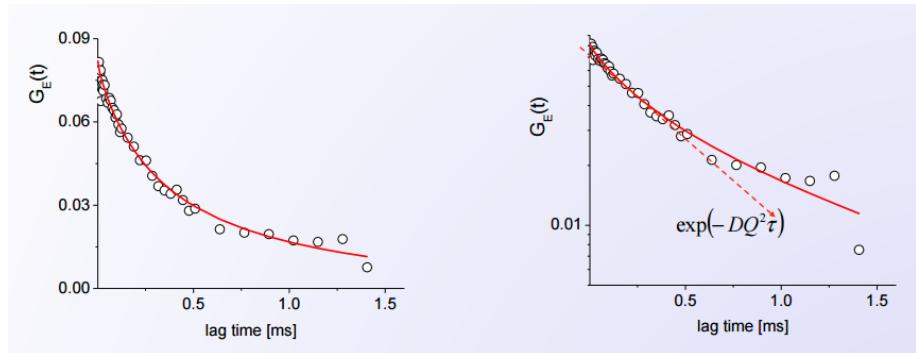


Figura 10.4: *deviazione dall'andamento atteso dovuta a polidispersità*

Un metodo è quello di utilizzare un algoritmo, chiamato *metodo di massima entropia*, che ci restituisce la probabilità di osservare oggetti con un certo raggio. Le proteine singole sono quelle che hanno un raggio idrodinamico più piccolo, gli aggregati più grande, come si vede nel grafico in figura (10.5).

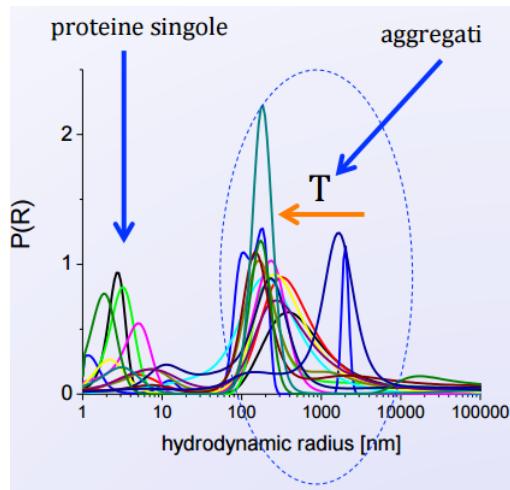


Figura 10.5: *i picchi in corrispondenza di un determinato raggio dinamico danno la probabilità di osservare oggetti con tale raggio*

L'altro metodo è il cosiddetto *metodo dei cumulanti* per cui invece che studiare la funzione di correlazione del campo se ne studia il logaritmo, che può essere legato al tempo di ritardo da un'espressione di questo tipo:

$$\ln(g^1(\tau)) = -D_z Q^2 \tau + \frac{\mu_2}{2} \tau^2 = k_1 \tau + k_2 \tau^2 \quad (10.39)$$

Dove il primo cumulante è una somma pesata dei vari coefficienti di diffusione pesati sulla loro massa e sulla loro concentrazione:

$$D_z = \frac{\sum D_i M_i C_i P_i(Q)}{\sum M_i C_i P_i(Q)} \quad (10.40)$$

mentre il secondo cumulante k_2 è la varianza di D , cioè è legato all'ampiezza della disposizione di oggetti. Il valore relativo dei due cumulanti dà una misura della polidispersità, cioè il *fattore di qualità* k_2/k_1^2 : più è piccolo k_2 minore è la polidispersità perché più piccola è la varianza.

Cosa succede se oltre alle traslazioni abbiamo anche le rotazioni? L'effetto di una rotazione è quello di cambiare l'orientazione del dipolo intrinseco della molecola. Se eccitiamo in maniera preferenziale le molecole che hanno una componente del momento di dipolo vicina a quella della radiazione di polarizzazione. Se osserviamo in una direzione che non è quella di polarizzazione dovremmo osservare un'intensità sempre più bassa più ci mettiamo perpendicolari a tale direzione. Se il dipolo ruota però aumenta la componente che osserviamo in direzione perpendicolare.

Definiamo *scattering polarizzato* quello per cui l'eccitazione e l'osservazione avvengono nella stessa direzione e l'intensità che si osserva si indica con I_{VV} perchè l'eccitazione si suppone sempre che avvenga polarizzata verticalmente e quindi si assume poi che anche l'osservazione sia verticale. Lo *scattering depolarizzato* è lo scattering a 90° per cui l'intensità del segnale si indica con I_{VH} : l'eccitazione è in verticale, l'osservazione in orizzontale. Depolarizzato significa che la molecola ruotando perde la memoria della polarizzazione eccitante.

Lo scattering depolarizzato è legato allo sfasamento, ma ha una parte di ampiezza che è legata alla variazione della polarizzabilità perchè la molecola ruota. Lo campo polarizzato è esattamente come quello che si osserva in assenza di polarizzazione, quindi si ha dipendenza solo dal coefficiente di diffusione traslazionale D , pesato per un fattore α detto *parte isotropa*, che è una somma normalizzata della polarizzabilità parallela e perpendicolare al campo incidente:

$$g_{VV}(\tau) \propto \alpha^2 e^{-Q^2 D \tau} \quad (10.41)$$

$$\alpha = \frac{1}{3} (\alpha_{\parallel} + 2\alpha_{\perp}) \quad (10.42)$$

Il campo depolarizzato è pesato per un termine dato dalla differenza di polarizzabilità del termine parallelo e di quello perpendicolare, ed è chiamato *anisotropia ottica* β : per esempio per una sfera osservarla in parallelo o in perpendicolare non cambia nulla e quindi $\beta = 0$. All'esponenziale compare un termine che dipende esclusivamente dal coefficiente di diffusione rotazionale Θ che è legato

alla soluzione dell'equazione di Fick:

$$g_{VH}(\tau) \propto \beta^2 e^{-(Q^2 D + 6\Theta)\tau} \quad (10.43)$$

$$\beta = (\alpha_{\parallel} - \alpha_{\perp}) = 10^{-4}\alpha \quad (10.44)$$

Nell'approssimazione di Stokes-Einstein i coefficienti di diffusione hanno le seguenti forme:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R} \quad (10.45)$$

$$\Theta = \frac{k_B T}{8\pi\eta R^3} \quad (10.46)$$

Dal momento che Θ varia come l'inverso di un volume risulta molto più sensibile a processi come la dimerizzazione.

Se le molecole non sono sferiche esistono dei modellini:

- **Rod** (Kirkwood-Riseman): molecole a forma di bastoncini allungati, caratterizzati da una lunghezza L e un diametro d . In questo caso le espressioni per i coefficienti di diffusione sono:

$$D = k_B T \ln \left(\frac{L/d}{3\pi\eta L} \right) \quad \Theta = 3k_B T \ln \left(\frac{L/d}{\pi\eta L^3} \right) \quad (10.47)$$

Notiamo che dipendono dal rapporto assiale lunghezza-diametro, e mantengono la stessa dipendenza da $1/L$ e $1/L^3$.

- **Ellissoidi** (Perrin): molecole con asse maggiore a e asse minore b . I coefficienti di diffusione hanno la stessa forma delle equazioni (10.45) e (10.46), pesate però per delle espressioni che dipendono da un parametro ρ , che è il rapporto assiale. Si ha quindi:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R} f(\rho) \quad \Theta = \frac{k_B T}{8\pi\eta R^3} \left\{ \frac{3}{2} \left[\frac{(2 - \rho^2) f(\rho) - 1}{(1 - \rho^4)} \right] \right\} \quad (10.48)$$

A seconda del valore di ρ distinguiamo le molecole in:

- prolati: sono gli ellissoidi allungati in verticale, per cui si ha:

$$\rho = \frac{b}{a} < 1 \quad (10.49)$$

$$f(\rho) = \frac{1}{\sqrt{1 - \rho^2}} \ln \left[\frac{1 + \sqrt{1 - \rho^2}}{\rho} \right] \quad (10.50)$$

- oblati: sono gli ellissoidi allungati in orizzontale, per cui si ha:

$$\rho = \frac{a}{b} > 1 \quad (10.51)$$

$$f(\rho) = \frac{1}{\sqrt{\rho^2 - 1}} \arctan \left(\sqrt{\rho^2 - 1} \right) \quad (10.52)$$

10.2 NANOPARTICELLE METALLICHE

La coppa di Licurgo, risalente al IV secolo d.C. conteneva 40 parti per milione di oro e 300 di argento e questo le permetteva di avere una luce diversa a seconda che venisse illuminata da fuori o da dentro: da fuori, per cui la vediamo attraverso la luce diffusa dalla coppa, la vediamo di colore verde, se la illuminiamo da dentro, vedendo la luce trasmessa, la vediamo di colore rosso.

Nel medioevo le nanoparticelle, d'oro in particolare, erano usate per ottenere il pigmento color rubino per le vetrature delle chiese.

Le nanoparticelle, come suggerisce il nome, hanno dimensioni che si collocano tra le proteine più semplici e le macromolecole più grandi: hanno dimensioni molto più piccole di quelle delle cellule e dei macrofagi.

I materiali di dimensioni nanoscopiche, rispetto a quelli di dimensioni macroscopiche (bulk), sono interessanti perché cambiano le proprietà elettriche, ottiche e termiche, passando dall'oggetto macroscopico alle nanoparticelle dello stesso elemento. Il motivo è che cambia il rapporto superficie-volume, che rende fondamentali gli effetti di superficie che originano i cambiamenti delle proprietà.

Le nanoparticelle *d'oro* sono utilizzate soprattutto perché sono inerti, resistono all'ossidazione ma sono molto reattive ai gruppi tiolici (SH): questo è comodo perché significa che non si danneggiano da sole e possono essere funzionalizzate tramite i gruppi tiolici secondo l'interesse (oggetti fluorescenti, anticorpi, . . .). Per eliminarle bisogna utilizzare l'acqua regia, che è una miscela di acido nitrico e acido cloridrico. I nanomateriali acquistano nuove proprietà dovute al fatto che gli elettroni sono confinati in spazi molto piccoli e vengono usati per scopi biologici sia per l'imaging che per il rilascio controllato di farmaci, sia per fare terapia fototerapica (assorbono radiazione che poi rilasciano sotto forma di calore).

Un esempio interessante di proprietà che cambiano a seconda delle dimensioni è dato dalla temperatura di melting:

- passaggio da bulk a 20 nm: $\Delta T_m = 5^\circ$
- passaggio da 20 nm a 5 nm: $\Delta T_m = 400^\circ$

Capitolo 11

Lezione 11: 20 Maggio 2015

11.1 NANOPARTICELLE METALLICHE

Recentemente si è iniziato ad utilizzare le nanoparticelle metalliche (d'oro in particolare) per le loro caratteristiche spettroscopiche, cioè di utilizzarle per indagini spettroscopiche legate alla fisica biologica e alla fisica medica.

La caratteristica principale delle nanoparticelle è l'esistenza della **risonanza plasmonica di superficie**.

Ricordiamo che la differenza fondamentale tra metalli, non metalli e semiconduttori è la distanza tra la banda di conduzione e la banda di valenza. Utilizzando i metalli, che sono conduttori, la separazione tra le bande è piccola o inesistente. In base alle geometrie i livelli energetici non sono costanti ma cambiano in base alla posizione rispetto alla coordinata di Brillouin.

Le risonanze plasmoniche di superficie sono delle risonanze elettromagnetiche, cioè delle lunghezze d'onda particolari che inducono delle oscillazioni coerenti collettive degli elettroni di conduzione attorno alla posizione di equilibrio.

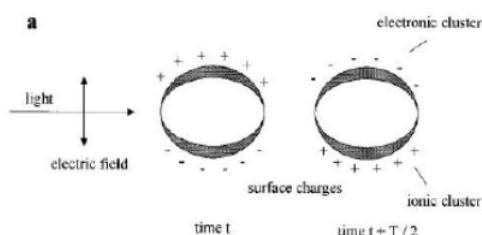


Figura 11.1: *formazione di cluster elettronici (eccesso di carica negativa) e ionici (eccesso di carica positiva) a seguito dello spostamento dell'elettrone*

Uno dei modi per descrivere i metalli è considerare una struttura di bulk (complessiva), circondata da elettroni semiliberi, che sono gli elettroni di conduzione e che si possono muovere all'interno della zona di Brillouin e passare da banda di conduzione a banda di valenza, eccetera. Alcune lunghezze d'onda particolari possono provocare, in presenza di un campo elettromagnetico

oscillante, delle oscillazioni degli elettroni attorno alle loro posizioni di equilibrio. In teoria dovrebbe avvenire anche un'analoga oscillazione della parte ionica positiva, che però essendo molto più pesante compie delle oscillazioni più piccole e risulta trascurabile.

Quello che si hanno sono dei cluster che sono determinati solo da dove si sposta l'elettrone: dove va l'elettrone si ha un eccesso di carica negativa, mentre dalla parte opposta si avrà un eccesso di carica positiva (figura (11.1)).

Si crea un dipolo oscillante per cui, tra le altre cose, ci aspettiamo delle riemissioni. Questa cosa non succede a tutte le lunghezze d'onda, ma ci sono delle lunghezze d'onda caratteristiche, che si chiamano *plasmoni*: a queste lunghezze d'onda succede che la sezione d'urto ottica della nanoparticella invece di coincidere con la sezione d'urto geometrica, è molto più grande (figura (11.2)) quindi la nanoparticella è capace di interagire con campo a distanze molto più grandi e si crea un'accumulazione delle linee di campo e un aumento del campo elettrico, quindi un aumento delle oscillazioni che poi provoca una riemissione visibile.

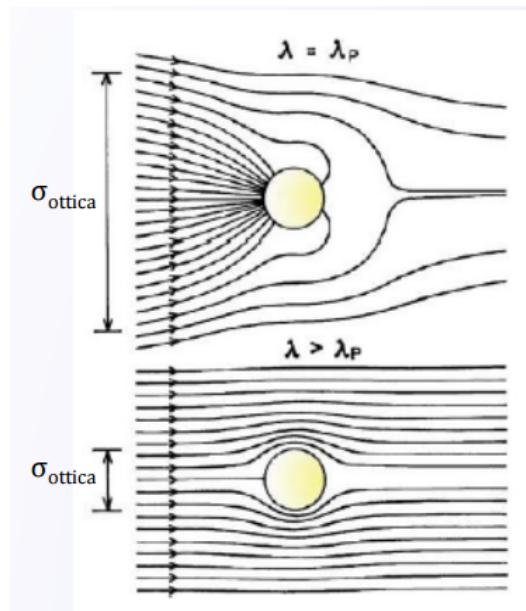


Figura 11.2: sezione d'urto ottica e geometrica per nanoparticelle d'oro

Il valore dei plasmoni dipende da una serie di parametri geometrici legati a:

- dimensione delle nanoparticelle;
- forma delle nanoparticelle (sferiche, allungate, a stella...);
- composizione chimica;
- effetti di polarizzazione: se le nanoparticelle sono asimmetriche hanno i dipoli orientati in un certo modo, quindi rispondono in maniera diversa alla luce polarizzata in vari modi;

- ambiente circostante: le nanoparticelle interagiscono cambiando gli stati elettronici.

Nel grafico in figura (11.3) è riportato un esempio di picchi di assorbimento plasmonico per nanoparticelle sferiche. La dimensione che compare si riferisce al diametro e non al raggio.

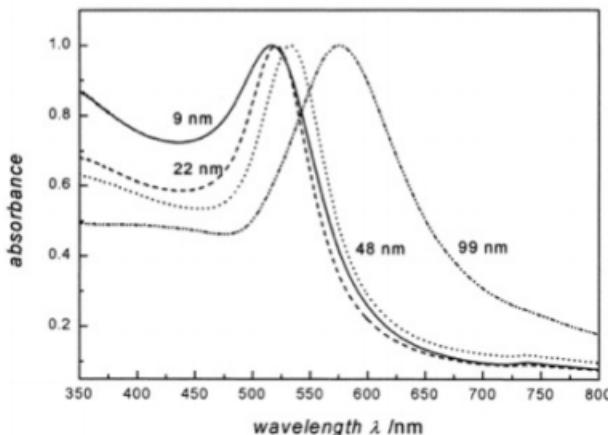


Figura 11.3: *picchi di assorbimento plasmonico per nanoparticelle sferiche*

Possiamo osservare che l'effetto dell'aumento delle dimensioni delle particelle in parte sposta il picco, ma causa delle deformazioni nello spettro. In generale nel range da 2 a 100 nm la banda di assorbimento sta nel visibile e quindi le nanoparticelle assorbendo radiazione visibile sono colorate. Hanno coefficienti di estinzione molare particolarmente elevati rispetto a quelli normali di un cromoforo:

$$\varepsilon_{20nm} \approx 10^9 M^{-1} cm^{-1} \quad (11.1)$$

$$\varepsilon_{np} \approx 10^5 - 10^6 \varepsilon_{cromofori} \quad (11.2)$$

perchè hanno tantissimi elettroni coinvolti: riguardano tutti gli elettroni di superficie della nanoparticella.

Studiamo le nanoparticelle perchè in opportune condizioni sono molto fotosabili e hanno un'efficiente e veloce conversione della luce in calore: uno dei principali utilizzi dal punto di vista biologico non è solo come report colorato, ma è il dovuto al fatto che quando assorbono radiazione uno dei meccanismi per dissecitarsi è produrre calore e quindi riscaldano l'ambiente circostante.

Possiamo distinguere due tipi di processi di morte della cellula:

- apoptosis: processi che avvengono attorno a 42°. Si tratta di una morte cellulare di tipo programmato con meccanismi di normale eliminazione delle cellule morte.
- necrosi: processi che avvengono a temperature più alte, rischiando di danneggiare le cellule vicine.

Che origine hanno le risonanze plasmoniche? I fenomeni di assorbimento e scattering o diffusione di luce possono essere spiegati rifacendoci alle equazioni di Maxwell con delle opportune condizioni al contorno: in questo caso abbiamo una sorgente, che supponiamo armonica nel tempo, che irraggia attraverso un mezzo che ha una certa costante dielettrica e una certa permeabilità magnetica.

$$k = \omega^2 \epsilon \mu \quad (11.3)$$

$$\nabla^2 E + k^2 E = 0 \quad (11.4)$$

$$[E_2(x) - E_1(x)] \times \hat{n} = 0 \quad (11.5)$$

$$\nabla^2 H + k^2 H = 0 \quad (11.6)$$

$$[H_2(x) - H_1(x)] \times \hat{n} = 0 \quad (11.7)$$

L'irraggiamento arriva alla nanoparticella di raggio R , che a sua volta ha una certa costante dielettrica e permeabilità magnetica, il campo ne induce uno all'interno della nanoparticella che di conseguenza irraggia e l'interazione tra il campo irraggiato e il campo incidente crea un campo esterno.

Le equazioni di Maxwell per questo problema sono state risolte da Mie (1908) nel caso di particelle sferiche. Il punto cruciale della teoria di Mie è che la sezione d'urto di estinzione, legata al coefficiente di estinzione molare e quindi allo spettro di assorbimento misurato sperimentalmente, nasce da due contributi: uno di assorbimento vero e proprio e uno di scattering:

$$\sigma_{ext} = \sigma_{ass} + \sigma_{scat} \quad (11.8)$$

Mie ha sviluppato nella sua teoria un'espressione per la sezione d'urto di assorbimento per differenza:

$$\sigma_{ass} = \sigma_{ext} - \sigma_{scat} \quad (11.9)$$

Queste due sezioni d'urto hanno espressioni complesse, che fondamentalmente sono sommatorie:

$$\sigma_{scat} = \frac{2\pi}{k^2} \sum_{n=1}^{\infty} (2n+1) (|a_n|^2 + |b_n|^2) \quad (11.10)$$

$$\sigma_{ext} = \frac{2\pi}{k^2} Re(a_n + b_n) \quad (11.11)$$

dove a_n e b_n sono combinazioni lineari delle funzioni di Riccati-Bessel ψ e ξ , che dipendono da:

- un parametro dimensionale legato al prodotto del numero d'onda e della dimensione particelle (capiamo che la dimensione della particella gioca un ruolo fondamentale nell'assorbimento);
- l'ordine n , che è l'ordine di multipolo dell'interazione (in alcuni casi l'interazione è dipolo-dipolo, altre volte diventa di quadrupolo);
- il parametro m definito come il rapporto tra la costante dielettrica della particella e del mezzo:

$$m = \sqrt{\frac{\epsilon_p}{\epsilon_m}} \quad (11.12)$$

a_n e b_n sono definiti come:

$$a_n = \frac{m\psi_n(mx)\psi'_n(x) - \psi_n(x)\psi'_n(xm)}{m\psi_n(mx)\xi'_n(x) - \xi_n(x)\psi'_n(xm)} \quad (11.13)$$

$$b_n = \frac{\psi_n(mx)\psi'_n(x) - m\psi_n(x)\psi'_n(xm)}{\psi_n(mx)\xi'_n(x) - m\xi_n(x)\psi'_n(xm)} \quad (11.14)$$

Dalle dipendenze ricaviamo due cose:

- deve esserci un effetto della dimensione: se il raggio è molto minore della lunghezza d'onda, $x \ll 1$ e il regime è *quasi statico o dipolare* perché ci si ferma all'ordine di dipolo (consideriamo il campo costante nella particella). Se la dimensione è confrontabile, $x \approx 1$, non si trascurano ordini superiori si parla di regime *dinamico o multipolare* (si hanno variazioni del campo nella particella).
- mentre la costante dielettrica del metallo è nota e tabulata, abbiamo bisogno di un modello che descriva la costante dielettrica della nanoparticella, in quanto passando dalle dimensioni macroscopiche alle dimensioni nanoscopiche cambiano le proprietà ottiche e di interazione con la luce: la nanoparticella d'oro non ha la stessa costante dielettrica dell'oro.

Per descrivere la nanoparticella normalmente si usa il **modello di Drude-Sommerfeld**, secondo cui gli elettroni sono degli oscillatori armonici che entrano in movimento sotto l'azione del campo elettrico, quindi si ha un gas di elettroni liberi che si muovono tra i centri di collisione (ioni che sono ai vertici del reticolo del metallo, i fononi, cioè le vibrazioni della parte ionica del metallo, i difetti presenti nel metallo, ecc.). Il rate dei processi, cioè la probabilità di questi processi, è inversamente proporzionale al tempo di vita degli elettroni:

$$\gamma_0 = \frac{1}{\tau} \quad (11.15)$$

Trovano questa espressione per la costante dielettrica della particella $\epsilon_p(\omega)$:

$$\epsilon_p(\omega) = \epsilon_\infty - \frac{\omega_p^2}{\omega(\omega + i\gamma_0)} \approx \epsilon_\infty - \frac{\omega_p^2}{\omega^2} + i \frac{\gamma_0 \omega_p^2}{\omega^3} \quad (11.16)$$

La costante dielettrica della particella, secondo Drude-Sommerfeld, dipende da un valore che è quello degli elettroni legati, non liberi in soluzione (ϵ_∞) e dalla somma di due termini, una parte reale e una immaginaria, dal parametro γ_0 e dalla frequenza di plasma (ω_p) definita come:

$$\omega_p = \sqrt{\frac{ne^2}{\epsilon_0 m^*}} \quad (11.17)$$

dove ne è la densità di elettroni di conduzione e alla massa efficacie (m^*). Quello che ci interessa è il fatto che ci sia un contributo dovuto agli elettroni legati e dei termini che dipendono dagli elettroni di conduzione.

Il modello di Drude-Sommerfeld non è perfetto, ma ci sono delle deviazioni, come si osserva nei grafici in figura (11.4).

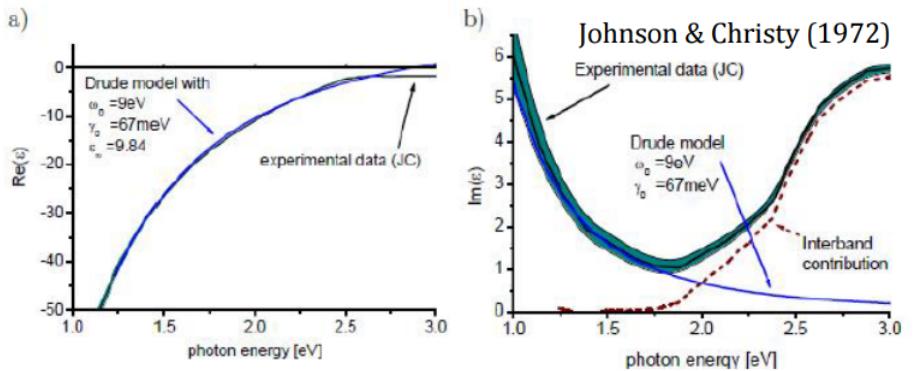


Figura 11.4: deviazione dei dati sperimentali dal modello di Drude-Sommerfeld

I dati sperimentali riguardano misure fatte da Johnson e Christy su film metallici ad alto vuoto, per cui riuscivano ad arrivare a energie alte, senza effetti dell'interazione dell'atmosfera circostante. Sia nella descrizione della parte reale che di quella immaginaria il modello fallisce ad alte energie dei fotoni, perché:

- se si dà energia molto alta ci possono essere eccitazioni da bande più profonde, per cui non si fa direttamente la transizione dalla banda di valenza alla banda di conduzione. Questo fenomeno è chiamato *eccitazione inerbanda*, il cui contributo è riportato nel grafico.
- il modello di Drude-Sommerfeld assume una forma della banda di conduzione parabolica rispetto alla coordinata di Brillouin, ma in realtà non è esattamente così.

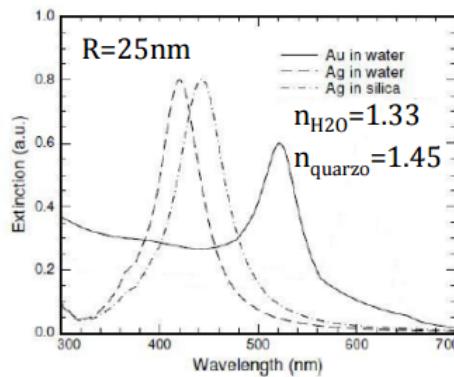


Figura 11.5: spettro di assorbimento per nanoparticelle d'oro e d'argento

Con questo modello però si riesce a spiegare una serie di effetti: per esempio nel caso di nanoparticelle con raggio di 25 nm, d'oro e di argento (grafico in figura (11.5)), si osserva che lo spettro di assorbimento, a parità di ambiente circostante, è diverso a seconda del metallo (cosa ben spiegata dal modello). Il modello tiene anche conto della diversa risposta in risonanza se cambia l'ambiente circostante per una stessa nanoparticella: l'effetto del quarzo è quello di

schermare le cariche, diminuendo la forza di richiamo e quindi la frequenza, e in conseguenza aumentando la lunghezza d'onda del picco di assorbimento.

Avendo una descrizione per la costante dielettrica della particella, Mie ha ottenuto una serie di risultati, tra cui l'effetto che ha osservato sulle dimensioni. C'è un effetto estrinseco dovuto alla forma delle sezioni d'urto che aveva scritto: ipotizziamo un regime quasi statico quando le dimensioni sono molto più piccole della lunghezza d'onda della luce incidente. Il contributo significativo è solo quello delle oscillazioni di dipolo, i cambiamenti del campo avvengono su tempi più brevi rispetto alle oscillazioni degli elettroni, quindi possiamo considerare il campo costante. In approssimazione di dipolo allora la sezione d'urto di estinzione, che è quella di Mie si può scrivere come:

$$\sigma_{exc}(\omega) = 9 \frac{\omega}{c} \sqrt{\epsilon_m^3} V \frac{\epsilon_2(\omega)}{[\epsilon_1(\omega) + 2\epsilon_m]^2 + (\epsilon_2(\omega))^2} \quad (11.18)$$

Fermandosi al termine di dipolo e considerando ϵ_1 per la parte reale e ϵ_2 per quella immaginaria, allora si ha risonanza il denominatore tende a zero. Dal momento che il denominatore è la somma di quadrati, non si può annullare, ma almeno la prima parte si può mandare a zero imponendo che:

$$\epsilon_1(\omega) = -2\epsilon_m \quad (11.19)$$

Visto che spesso la parte immaginaria è piccola o dipende poco dalla frequenza della radiazione incidente, si ha una piccola dipendenza dalle dimensioni, cioè il posizionamento del picco di risonanza è univocamente determinato e non dipende dalle dimensioni.

Dall'altro lato dell'approssimazione, per cui le dimensioni sono confrontabili con la lunghezza d'onda, non vale più l'approssimazione del campo costante all'interno della particella, la risonanza deve dipendere esplicitamente dalle dimensioni, la polarizzazione non è omogenea perché cambia il campo e diventano importanti i modi superiori.

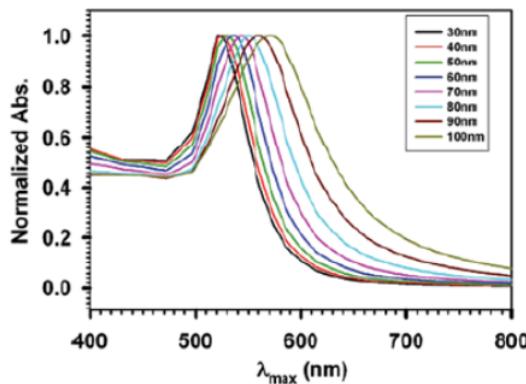


Figura 11.6: banda di assorbimento al variare della dimensione

Nel grafico in figura (11.6) possiamo osservare che al crescere della dimensione

della nanoparticella la banda di assorbimento si sposta verso il rosso e aumenta l'ampiezza della banda, in quanto pesano sempre più i modi superiori. I modi che si creano sono a energia minore, quindi spostamento verso il rosso.

Se le nanoparticelle sono molto piccole c'è anche un effetto intrinseco della dimensione perchè nel suo complesso la sezione d'urto di assorbimento viene a dipendere esplicitamente dalla dimensione: quello che si osserva (grafici in figura (11.7)) un red shift della banda di assorbimento all'aumentare dal diametro in modo più marcato di quanto previsto dalla teoria di Mie

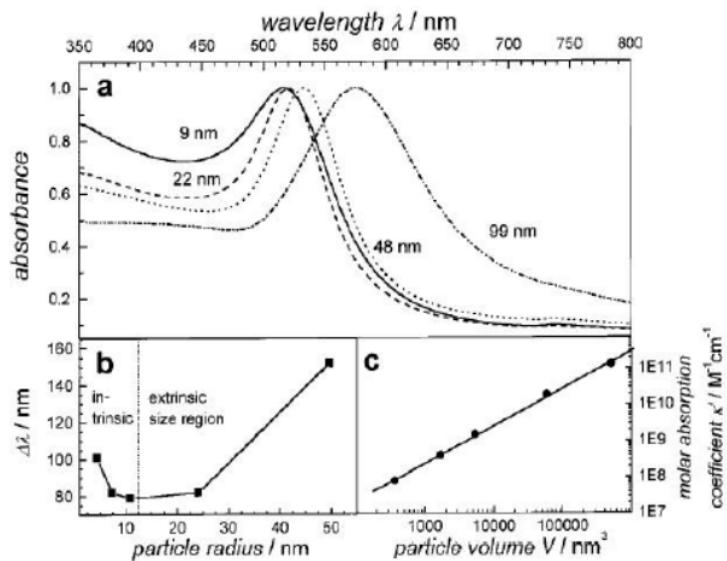


Figura 11.7: banda di assorbimento al variare della dimensione per nanoparticelle molto piccole

La cosa strana che si osserva è che l'ampiezza della banda non cambia in maniera omogenea all'aumentare della dimensione della particella, ma c'è un minimo raggiunto nel caso dell'oro a un raggio di circa 15 nm. Nella teoria di Mie non era prevista la condizione di minimo. Si osserva inoltre che il coefficiente di estinzione molare complessivo aumenta all'aumentare del volume perchè la sezione d'urto dipende esplicitamente da V .

Mentre l'effetto estrinseco veniva spiegato dalla teoria di interazione del campo elettromagnetico, l'effetto intrinseco si può spiegare solo supponendo una dipendenza esplicita dalla dimensione della costante dielettrica della particella: $\epsilon_p = \epsilon_p(\omega, R)$

Nel caso di metalli nobili la costante dielettrica ϵ_∞ , che dà il contributo degli elettroni non di conduzione, contiene il contributo degli elettroni della banda d e della banda s :

$$\epsilon_\infty(\omega) = 1 + \chi_s(\omega) + \chi_d(\omega) \quad (11.20)$$

Il modello di Drude-Sommerfeld per la banda s prevede un andamento reale più immaginario, in cui compare la frequenza di smorzamento dell'oscillazione degli

elettroni nel metallo di bulk: ci sono degli urti di elettroni con elettroni, fononi e difetti che provocano uno smorzamento:

$$\chi_s(\omega) = -\frac{\omega_p^2}{\omega^2 + \Gamma_\infty^2} + i \frac{\omega_p^2 \Gamma_\infty}{\omega(\omega^2 + \Gamma_\infty^2)} \quad (11.21)$$

La conseguenza dello smorzamento è che l'interazione con il campo elettrico viene modificata: la risposta al campo elettrico si descrive con la costante dielettrica. Complessivamente: a causa delle interazioni e degli urti tra elettroni, fononi e difetti, si va a modificare la risposta al campo. Quello che si vede è che per nanoparticelle molto piccole (della dimensione del libero cammino medio degli elettroni, definito come la distanza percorsa prima di un urto) allora gli effetti di superficie e legati alle dimensioni delle particelle contano, perché hanno la una certa probabilità di compiere urti mentre oscillano da una parte all'altra della particella.

L'effetto si modellizza con un parametro che dipende dalla dimensione della particella, dalla frequenza di smorzamento, da un parametro adimensionale A e dalla velocità degli elettroni quando hanno energia di fermi

$$\Gamma(r) = \Gamma_\infty + A \frac{v_F}{r} \quad (11.22)$$

Se le dimensioni piccole allora gli smorzamenti dovuti a urti con elettroni, fononi e difetti non si modellizzano pensando al metallo di bulk ma bisogna utilizzare un modello che tiene conto della dimensione. Otteniamo una nuova espressione per la costante dielettrica della particella:

$$\begin{aligned} \epsilon_p(\omega, r) = \epsilon_\infty(\omega) &+ \left[\omega_p^2 \left(\frac{1}{\omega^2 + \Gamma_\infty^2} - \frac{1}{\omega^2 + (\Gamma(r))^2} \right) \right] + \\ &+ i \left[\frac{\omega_p^2}{\omega} \left(\frac{\Gamma(r)}{\omega^2 + (\Gamma(r))^2} - \frac{\Gamma_\infty}{\omega^2 + \Gamma_\infty^2} \right) \right] \end{aligned} \quad (11.23)$$

In questo modo si ha una dipendenza esplicita dalla dimensione. I termini in cui non compare la dipendenza dalla dimensione sono i termini di bulk, mentre i termini in cui si ha $\Gamma(r)$ sono i termini in cui si osserva l'effetto delle dimensioni (di superficie). Utilizzando questa espressione della costante dielettrica si riesce a descrivere l'andamento come $1/r$ dell'ampiezza di banda.

Ci sono altri fattori che influenzano l'assorbimento plasmonico di superficie:

- se il materiale è troppo cristallino ci sono effetti di scattering sul confine del cristallo e si ha un aumento della frequenza di smorzamento e della larghezza delle bande.
- c'è l'effetto della temperatura: aumentandola si ha un lieve allargamento delle bande, perché aumenta la probabilità di urti elettrone-elettrone.
- ad alte concentrazioni cambia la costante dielettrica e se si hanno degli aggregati cambia la forma della banda.
- se si mette sulla superficie delle nanoparticelle delle sostanze che possono essere *chemiassorbite*, cioè viene fatto un legame chimico, o *fisioassorbite*,

con un legame di tipo fisico, allora le sostanze possono aprire nuovi percorsi di rilassamento per i fononi e per gli elettroni e quindi cambiano le bande e cambia la posizione della banda plasmonica.

Questo riguardava le dimensioni, tuttavia le nanoparticelle possono avere forme diverse e quindi direzioni di oscillazione diverse degli elettroni. Tipicamente se abbiamo degli ellisoidi possiamo identificare una banda trasversale se oscillano lungo l'asse minore e una banda longitudinale se oscillano lungo quello maggiore. Sono delle oscillazioni con ampiezze diverse, che avranno risonanze a lunghezze d'onda diverse. In generale si ha che la banda di assorbimento si separa in due componenti (grafico in figura (11.8)) all'aumentare del rapporto tra asse maggiore e asse minore (lunghezza altezza). La separazione tra le bande aumenta tanto più sono allungate.

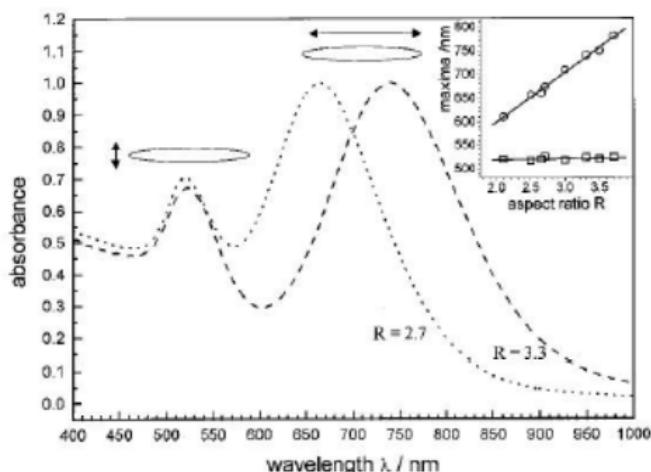


Figura 11.8: *separazione delle bande per nanoparticelle di forma ellissoidale*

La prima banda rimane sempre nella stessa posizione perché coincide con il plasmone delle corrispondenti nanoparticelle sferiche: corrisponde all'oscillazione lungo l'asse più corto, mentre quella che corrisponde alle oscillazioni lungo l'asse lungo si sposta a lunghezze d'onda maggiori. Il fatto di modificare la banda lavorando sulle lunghezze è basilare. Il plasmone relativo all'oscillazione lungo l'asse minore coincide con quello delle nanoparticelle sferiche perché per ottenere le nanoparticelle ellissoidali si parte da un *seed*, un seme di partenza, che sono le nanoparticelle sferiche, che poi vengono fatte crescere solo lungo determinate direzioni.

Si può estendere la teoria di Mie per avere un'espressione esatta della sezione d'urto per oggetti ellissoidali. Solitamente abbiamo a che fare con oggetti ellissoidali, chiamati *nanorod*, che hanno due assi uguali e uno diverso. Quello che si osserva è che all'aumentare dell'*aspect ratio* (R), cioè del rapporto lunghezza-altezza, la prima banda è costante mentre la seconda si sposta, poi la posizione del massimo è lineare sia nell'aspect ratio che nella costante dielettrica del mezzo. Per nanoparticelle d'oro infatti vale questa relazione (nel caso

di altri materiali cambiano i coefficienti numerici):

$$\lambda_{max} = (33.34R - 46.31)\epsilon_m + 472.31 \quad (11.24)$$

Quanto detto si può osservare nel grafico in figura (11.9).

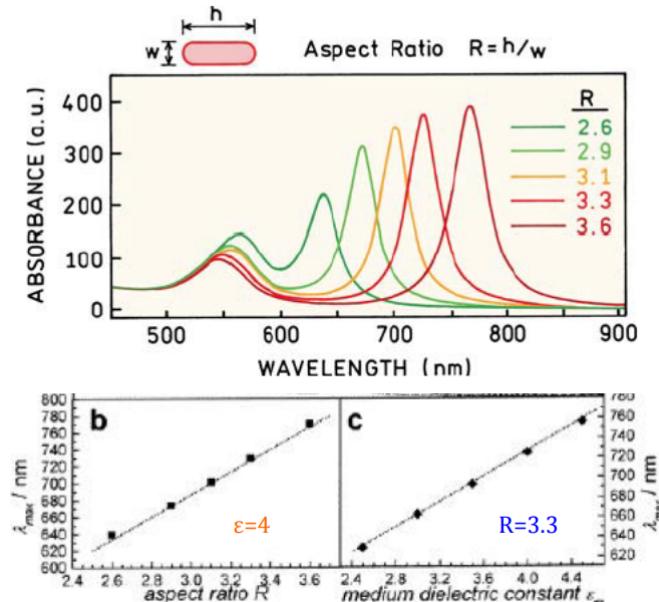


Figura 11.9: andamenti per nanoparticelle ellisoidali

Le nanorods d'oro sono particolarmente interessanti nelle applicazioni biofisiche perchè:

- la sintesi di nanoparticelle con aspect ratio diverso è facile;
- hanno dimensioni ideali perchè sono abbastanza piccole da entrare nelle cellule, ma abbastanza grandi per legare a loro dei farmaci senza alterarne le proprietà di trasporto;
- l'oro ha una bassissima tossicità per l'organismo;
- sono fotoassorbitori di radiazione infrarossa, cosa che dà dei vantaggi:
 - rilasciano poi calore e quindi sono utili per la terapia fototerapica per le cellule cancerogene o in generale per malattie legate a un accumulo di cellule che vanno uccise;
 - lavorando nella regione spettrale del vicino infrarosso siamo nella regione chiamata *optical window* dei tessuti biologici, cioè la zona dove l'assorbimento del tessuto è molto basso e facilita la penetrazione della radiazione nel tessuto (a più di 300 μm). Sono quindi ideali per fare trattamenti imaging e trattamenti *in vivo* su tessuti biologici;
 - il fatto di avere un'alta sezione d'urto di assorbimento in questa zona permette di usare potenze molto basse rispetto a quelle che potrebbero essere dannose per il tessuto;

- hanno un'emissione che può essere separata spettralmente dalla fluorescenza dei tessuti.
- sono luminescenti, cioè emettono radiazione luminosa.

La **fotoluminescenza** è una caratteristica in teoria anche del metallo di bulk, che però ha una resa quantica molto bassa. Anche solo per effetto punta, cioè accumulazione delle linee di campo, aumenta la resa di fotoluminescenza. Se consideriamo nanoparticelle di forma allungata, l'effetto punta è molto notevole con un rendimento quantico osservabile. Questa cosa vale molto poco per nanoparticelle sferiche: la fotoluminescenza si osserva solo in nanoparticelle anisotrope.

Le nanorods rispetto al bulk hanno un fattore 10^6 della resa quantica del processo di luminescenza. Si tratta di un processo che aumenta molto in efficienza se viene promosso a lunghezze d'onda che sono quelle della risonanza plasmonica ed è dovuto a un processo di ricombinazione radiativa di una coppia elettrone-lacuna. Gli elettroni della banda d vengono eccitati in banda di conduzione, e quindi si crea una lacuna in una certa posizione della zona di Brillouin, che corrisponde a una vacanza nella banda di conduzione. I processi di scattering intrabanda, fondamentali per avere ricombinazione radiativa, muovono la lacuna in corrispondenza della coordinata di Brillouin che corrisponde al livello di Fermi: a questo punto avviene la ricombinazione elettrone-lacuna, per emissione di luminescenza o per effetti non radiativi.

Otteniamo degli spettri molto ampi, che occupano tutto il visibile, come si osserva nel grafico in figura (11.10).

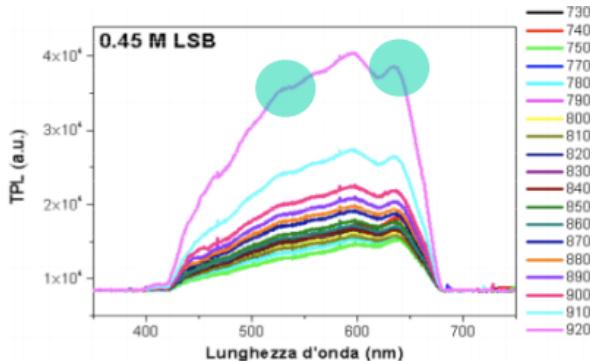


Figura 11.10: *fotoluminescenza delle nanorods*

Le due punte cerchiate in azzurro corrispondono a ricombinazioni nella zona di Brillouin, che avvengono in un range di energie alto: si ha luminescenza sostanzialmente in tutto il visibile.

La luminescenza può essere indotta in vari modi: sfruttando la banda che le nanorods hanno nel visibile (banda trasversale) oppure più spesso si utilizza la banda a lunghezze d'onda più alte, facendo luminescenza a due fotoni: non è chiaro se sia un processo fatto da due processi successivi di assorbimento di singolo fotone, oppure effettivamente un processo di assorbimento di una coppia

di fotoni in contemporanea. Questi due processi hanno comportamenti diversi rispetto alla polarizzazione del campo incidente: nel caso di assorbimento a singolo fotone la probabilità va come il coseno al quadrato, mentre nel processo a due fotoni diventa un coseno alla quarta.

In teoria studiando la dipendenza dell'emissione dalla polarizzazione si dovrebbe essere in grado di distinguere.

Nel caso di due assorbimenti consecutivi di singolo fotone (2 OPE) un fotone esce da un elettrone all'interno della banda di conduzione, quindi da sotto l'energia di Fermi a sopra l'energia di Fermi, lasciando una lacuna nella banda di conduzione. Il secondo fotone esce da un elettrone dalla banda d a quella di conduzione, dove si ricombina con la lacuna. La restante lacuna sulla banda d scompare o per ricombinazione radiativa o in modo non radiativo. La ricombinazione è sempre un processo interbanda, mentre qui abbiamo un processo interbanda e uno intrabanda.

Nel caso di assorbimento di due fotoni in una sola volta si ha che gli elettronni della banda d passano nella banda di conduzione per assorbimento simultaneo di due fotoni.

I due processi sono riportati in figura (11.11).

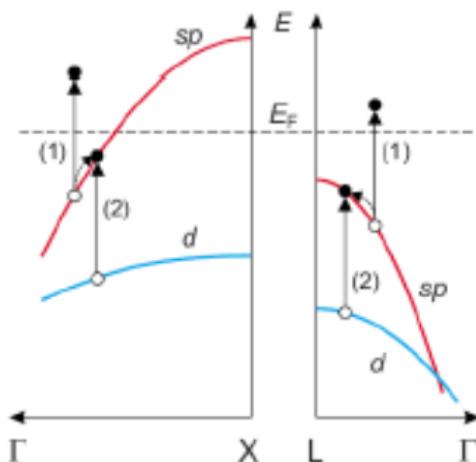


Figura 11.11: *processo di assorbimento a due fotoni nel caso di assorbimenti consecutivi di singolo fotone (sinistra) e assorbimento simultaneo di due fotoni (destra)*

L'energia dei fotoni emessi dipende dalla separazione tra le bande, perché il processo di ricombinazione radiativa è sempre un processo interbanda. La separazione non è costante perché dipende dalla posizione della coordinata di Brillouin e quindi quello che si vede è una banda molto ampia di energie, per cui abbiamo uno spettro molto ampio.

Riassumendo abbiamo: la risonanza plasmonica, un processo di scattering e quindi di riemissione alla stessa lunghezza d'onda, oppure processi di ricombinazione elettrone-lacuna se la radiazione invece di essere scatterata viene assorbita, dando luogo a fotoluminescenza, oppure emissione di calore da parte delle

nanoparticelle. Tutti questi processi sono rappresentati nella figura (11.12).

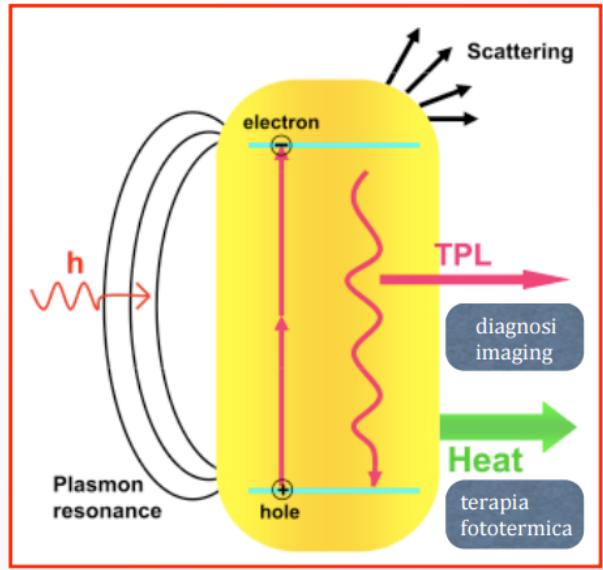


Figura 11.12: processi di riemissione della nanoparticella

L'**emissione di calore** è dovuta all'accoppiamento tra i fononi del reticolo dell'oggetto e i fononi del mezzo circostante e questo produce riscaldamento del solvente, o della cellula o dell'environment in cui si trova la nanoparticella. Il rilassamento per scattering avviene in un delay trascurabile, mentre l'accoppiamento elettrone-fonone avviene su tempi più lenti e mette in eccitazione i fononi del reticolo che poi possono interagire con i fononi del mezzo esterno e in questo modo indurre vibrazioni e quindi riscaldamento del mezzo circostante.

Questo significa che il calore che le nanoparticelle irraggiano è una propagazione di eccitazione e quindi una propagazione di modi di vibrazione. Questo ci fa capire che l'accoppiamento elettrone-fonone si riduce mano a mano che ci si allontana dall'oggetto da cui parte la propagazione e l'effetto di riscaldamento cambia a seconda dell'environment.

La velocità di emissione del calore è legata a quella che è la differenza tra la temperatura raggiunta dal reticolo (riscaldamento della nanoparticella) e la temperatura dell'acqua, del mezzo o della cellula all'interfaccia, poi dipende da quanto è elevata la superficie della nanoparticelle (A) e quindi da quante sono le regioni di contatto e dalla conduttanza dell'interfaccia (G):

$$\dot{Q}_{H_2O} = AG(T_r - T_{H_2O,s}) \quad (11.25)$$

In figura (11.13) è riportata la scala temporale dei processi di rilassamento della nanoparticella.

Sperimentalmente si ha un picco di aumento di temperatura della nanoparticella, che raggiunge temperature elevatissime, e poi diminuisce perché la nanoparticella cede il calore all'ambiente circostante. Se si aumenta troppo l'energia del laser sulle nanoparticelle, la temperatura che raggiungono è talmente alta da rompere i legami del reticolo.

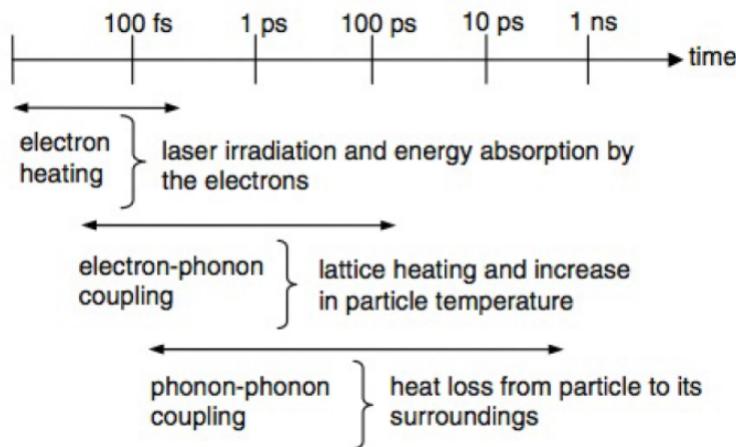


Figura 11.13: *scala temporale dei processi legati alla nanoparticella*

Uno degli effetti interessanti delle nanoparticelle è che non solo hanno degli effetti di luminescenza e riscaldamento, ma possono influire anche sulle proprietà radiative di fluorofori posizionati più o meno lontani dal metallo. Il campo elettrico sentito dal fluoroforo viene modificato dalle interazioni con la superficie metallica della nanoparticella. Che avvenga un effetto di quenching o enhancement dipende solamente dalla distanza tra il metallo e il fluoroforo e dalla geometria del sistema. In figura (11.14) sono riportati gli effetti in funzione della distanza del fluoroforo dalla nanoparticella.

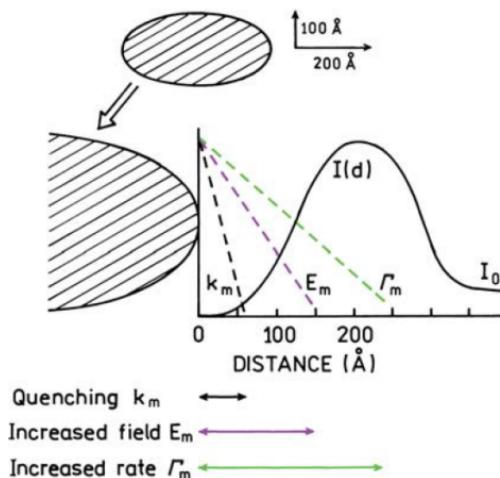


Figura 11.14: *effetti sul fluoroforo dovuti alla distanza dalla nanoparticella metallica*

La cosa particolare è che questo è uno dei pochissimi modi con cui si può aumentare la resa quantica di un oggetto. Gli effetti che può avere il metallo sono principalmente 3:

1. effetto di quenching per energy transfer, dipende dall'inverso della distanza al cubo. Smorza le oscillazioni di dipolo del fluoroforo e quindi provoca una diminuzione del campo. Vale a corto range.
2. effetto di amplificazione del campo incidente: aumenta l'intensità del campo sentita dal fluoroforo, dovuta sostanzialmente all'effetto punta.
3. aumento del rate di decadimento radiativo del fluoroforo: aumenta la sua velocità di decadimento radiativo e quindi si ha anche un effetto sulla resa quantica.

In presenza del metallo è come se ci fossero delle vie che aumentano la probabilità di eccitazione, perché aumenta il campo, cioè è come se aumentasse il numero di fotoni che arriva, e poi rispetto ai processi radiativi o non radiativi che si avevano prima, ci sono dei processi di decadimento per energy transfer che sono negativi dal punto di vista dell'emissione radiativa e un aumento però del decay radiativo (figura (11.15)).

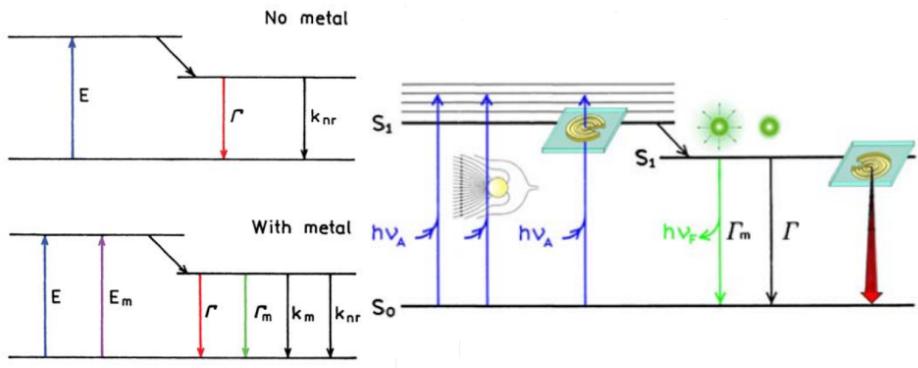


Figura 11.15: apertura di nuovi percorsi di diseccitazione dovuta alla vicinanza del metallo

Questo fa sì che cresca anche la resa quantica:

$$Q_m = \frac{\Gamma + \Gamma_m}{\Gamma + \Gamma_m + k_{nr}} \quad (11.26)$$

Il termine Γ_m compare sia al numeratore che al denominatore della resa quantica, e quindi aumenta.

Dipende tantissimo dalla distanza dal metallo: se mettiamo un fluoroforo su un metallo l'unico effetto è quello di quenching. Per ottenere un effetto di enhancement bisogna posizionarlo a una certa distanza. Si riesce a modificare il rate di decadimento radiativo a seconda della distanza tra metallo e fluoroforo.

Questo effetto di aumento della resa quantica e quindi diminuzione del tempo di vita si chiama **metal enhanced fluorescence** (MEF): aumenta l'intensità di fluorescenza e aumenta anche la fotostabilità, perché riducendo il tempo nello stato eccitato si riduce anche la probabilità di quenching. Se abbiamo un fluoroforo che ha una resa quantica che è già quasi 1, questo effetto non si osserva; se invece la resa di partenza è bassa, servono valori di Γ_m/Γ più alti, perché

significa che la costante non radiativa è più grande (grafico in figura (11.16)).

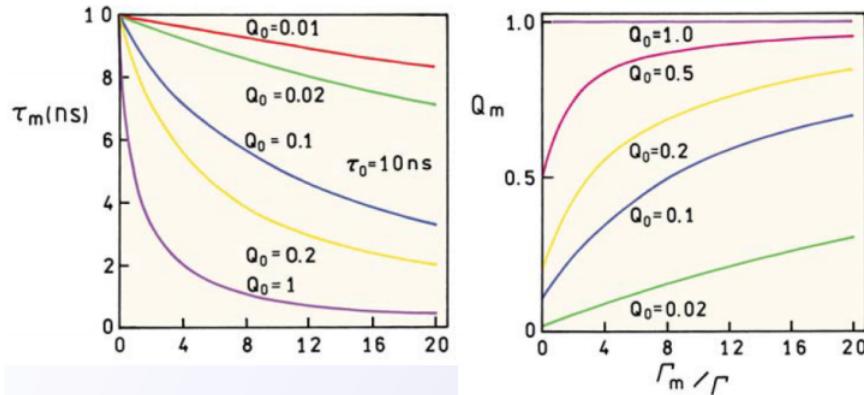


Figura 11.16: andamento del tempo di vita e della resa quantica al variare del rapporto Γ_m/Γ : si osserva che più grande è il rapporto, più alta è la resa quantica ottenibile.

Quindi se ha resa quantica elevata l'effetto principale che si osserva è quello di quenching, perchè non si può aumentare ulteriormente la fluorescenza, se si ha una resa quantica bassa invece si può aumentare il rendimento di fluorescenza: le nanoparticelle metalliche fanno da *antenne*, producendo un irraggiamento più velocemente della costante non radiativa.

A singolo fotone quello che succede è che delle due componenti dell'estinzione (assorbimento e scattering), quella di assorbimento è quella che dà il calore (sono i plasmoni che non possono irraggiare e quindi dissipano energia sottoforma di calore), mentre la componente di scattering sono i plasmoni che irraggiano e sono responsabili della MEF e che vanno a interagire con il dipolo del fluoroforo. La cosa strana è che l'assorbimento non risulta in luminescenza, ma è lo scattering a dare tale contributo.

Vediamo un esempio sul tempo di vita: consideriamo un oggetto di fronte a uno specchio di argento piazzato: a seconda della distanza tra il campione e lo specchio cambia la fase tra il campo incidente e il campo riflesso dallo specchio. Cambia il tempo di vita che misuriamo dell'oggetto perchè a seconda della fase del campione interagisce in modi diversi con il campo normalmente riemesso in fluorescenza dall'oggetto:

- quando sono in fase è favorito il decadimento e quindi diminuisce il tempo di vita;
- quando sono fuori fase aumenta il tempo di vita.

Come vengono fatte le nanoparticelle? Si parte da sali di cloruro di oro, a cui si aggiungono dei *surfattanti*, come il CTAB. Questo forma il seed, il seme, cioè la nanoparticella di base, da cui poi procede la sintesi dell'oggetto. Il CTAB è molto tossico quindi va rimosso se si vogliono fare applicazioni biologiche.

Al seed si aggiunge acido ascorbico ($C_6H_8O_6$) e ioni di argento, che sono fondamentali come catalizzatori della reazione, e si iniziano ad avere delle soluzioni di crescita. Per fare le nanorods, aggiungendo il CTAB in proporzioni opportune, riusciamo a farlo legare sulle pareti lunghe. La sintesi delle nanorods è riassunta in figura (11.17).

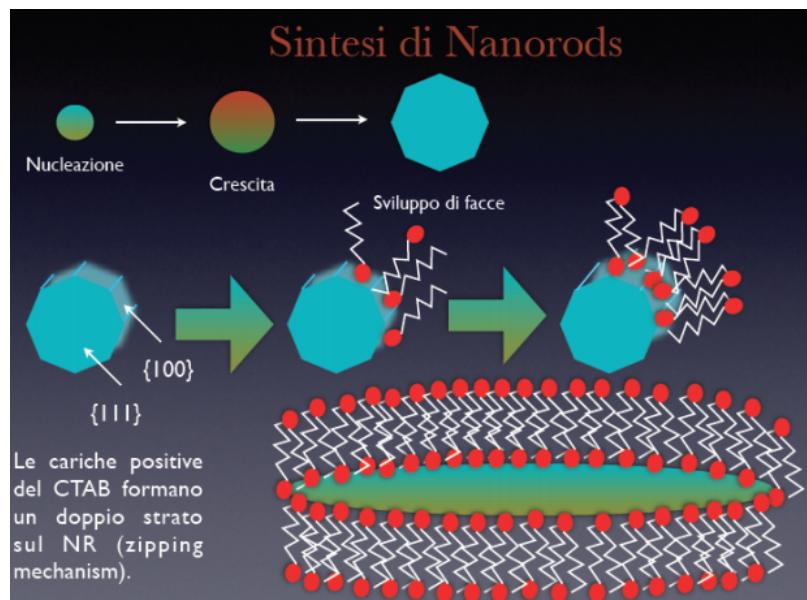


Figura 11.17: *sintesi delle nanorods*

Abbiamo la nucleazione, da cui otteniamo un seed sferico, che viene fatto crescere con sviluppo delle facce, a questo punto le cariche del CTAB si legano sulle facce in una certa direzione e quindi la nanoparticella può crescere solo nella direzione in cui non si sono legate le molecole di CTAB. Fermando la reazione si ferma il processo di crescita, permettendo di scegliere le dimensioni delle nanorods.

Un'altra geometria tipica delle nanoparticelle è quella delle star. In questo caso cambia il surfattante: al posto del CTAB viene utilizzato l'LSB, che si lega in posizioni diverse permettendo la crescita in direzioni diverse a partire dal seed centrale. La differenza è che CTAB copre in toto una sezione, invece LSB copre solo determinate zone.

A seconda della concentrazione di surfattante si riesce a calcolare la lunghezza e la dimensione dei rami.

Come si caratterizzano le nanoparticelle? Si fanno:

- lo spettro di assorbimento per vedere le lunghezze d'onda dei plasmoni;
- delle misure con il microscopio elettronico a trasmissione che permette di avere immagini ad altissima risoluzione;
- delle misure di light scattering dinamico, per determinare la concentrazione delle soluzioni ottenute;

- delle misure di ζ -potential, che danno la carica presente sulla superficie.

Mentre i nanorods hanno due picchi di assorbimento, le nanostar hanno spettri di assorbimento più complessi, perché se abbiamo dei rami di lunghezza diversa avremo plasmoni a lunghezze d'onda diverse, che corrispondono alle lunghezze caratteristiche dell'oggetto.

Gli spettri di emissione non hanno differenze particolari tra nanorod e nanostar.

Un'applicazione interessante è utilizzare le nanoparticelle per fare dei **sensori di concentrazione**: in questo caso si è partiti da nanoparticelle d'oro di dimensioni diverse funzionalizzate con le streptavidine, che sono delle proteine che hanno altissima affinità per un'altra molecola chiamata biotina. Le biotine vengono colorate con la fluorescina per renderle fluorescenti e un anticorpo anti-p53 (la p53 è una proteina legata ai processi di apoptosi cellulare) funzionalizzato con la biotina. Tutti questi componenti si mescolano in soluzione e quello che si ottiene è un composto in cui si è riusciti tramite il legame streptavidina-biotina, che è un legame fortissimo, a legare la nanoparticella d'oro, la fluorescina e l'anticorpo.

L'idea è che quando l'anticorpo riconosce la proteina e vi si lega, cambiando le dimensioni complessive dell'oggetto cambiano i plasmoni e quindi cambia il loro effetto sulla fluorescina. Andando a guardare la fluorescenza della fluorescina si capisce quando si è legata la proteina p53.

Quello che misuriamo in laboratorio è la funzione di correlazione, quindi i segnali nel tempo, e quello che si osserva è che cambiano i segnali a seconda del tipo di costrutto. Significa che siamo in grado di rivelare quando la p53 si lega al suo anticorpo.

L'altro utilizzo interessante delle nanoparticelle è per la **terapia fototertermica**: lo scopo è fare terapia fototertermica in cellula, quindi le nanoparticelle vengono funzionalizzate con un anticorpo specifico per la cellula in modo che raggiunga la cellula siano internalizzate. A questo punto si procede all'irraggiamento in modo che tramite emissione di calore portino alla morte della cellula.

Il problema è andare a studiare la temperatura, perché è importante distinguere tra effetti di apoptosis e effetti di necrosi.

Sfruttando l'interazione tra plasmoni e molecole fluorescenti, si è ricoperto un angolo della nanoparticella con una molecola di rodamina-B, che ha emissione di fluorescenza sensibile alla temperatura: in pratica si è costruita una sonda che risponde in fluorescenza alla temperatura.

Sostanzialmente è una sonda che permette di misurare la variazione di temperatura all'aumentare della potenza con cui viene irraggiata.

Parte II

**PROTEZIONISTICA
AMBIENTALE**

Capitolo 12

Lezione 1: 3 marzo 2015

La protezionistica si occupa di problemi legati all'esposizione degli esseri umani ad **agenti inquinanti**, che possono essere sia chimici che fisici.

Gli agenti inquinanti presenti nell'ambiente sono:

- RADIAZIONI IONIZZANTI (RI): le particelle vengono emesse durante il decadimento radioattivo, ma non solo. Hanno un effetto chiaro quando interagiscono con i tessuti biologici.
- RADIAZIONI ELETTROMAGNETICHE NON IONIZZANTI (NIR): per esempio quelle emesse dai telefoni.
- RADIAZIONE ULTRAVIOLETTA (UV): è una radiazione composta da fotoni ed è l'estremo più energetico della radiazione visibile. È una radiazione ionizzante.
- RUMORE ACUSTICO

Scopo della protezionistica è studiare l'agente inquinante, caratterizzandolo dal punto di vista fisico, stabilire le sorgenti, trovare le quantità misurabili associate e le unità di misura e le sue interazioni con la materia e l'organismo. Si cercano:

- fonti di esposizione
- effetti biologici e sanitari *sulla popolazione*

Vengono poi fatte delle leggi per stabilire i limiti di base e i livelli di riferimento, ed è necessaria una certa strumentazione per studiarli. Se l'agente inquinante non si può eliminare bisogna studiare i metodi per minimizzare l'esposizione, quindi si cercano criteri e metodi di protezione. Esistono normative tecniche e leggi riguardo alla dose di esposizione: la sorgente radioattiva per esempio può essere schermata con il piombo.

La *radioprotezione* è basata su:

- giustificazione della pratica
- ottimizzazione della protezione

- limiti alla dose individuale e al rischio

⇒ Se si trova che c'è un'attività che porta in contatto con un agente inquinante è giusto portare avanti questa attività? Bisogna individuare i rischi chiedendosi: dove ci sono sorgenti? Quali attività portano a contatto con l'agente?

Esempio: consideriamo una miniera di uranio. I minatori sono a rischio esposizione, quindi potranno stare in miniera solo un certo numero di ore.

Esempio: le macchine radiogene (raggi X) interagiscono con medico, paziente ed altri pazienti in sala d'attesa. Le tre categorie devono avere un trattamento diverso.

Dopo aver individuato i rischi di esposizione si individuano le protezioni agendo sulle pratiche che causano l'esposizione e con interventi che la riducono. Nel caso della macchina a raggi X non è giusto esporre il paziente in sala d'attesa, quindi si minimizza la sua esposizione. Il paziente invece non rispetta i limiti perché deve essere curato. Spetta al medico nucleare fare una valutazione dei rischi e dei benefici.

Il nesso di causa effetto tra radiazione e danno biologico è difficile da quantificare e ci sono interessi dietro al suo uso. C'è una connessione tra ricerca (fisici, medici, biologi, ...) e legislazione. Il ruolo di partenza è quello dei **ricercatori**, che devono stabilire se ci sia un nesso di causa effetto tra l'agente inquinante e i danni subiti, e quantificarne il rapporto.

I ricercatori studiano gli effetti tramite:

- analisi epidemiologiche
- studio dei meccanismi di produzione ed esposizione

I ricercatori fanno studi e pubblicano ricerche (anche con risultati non coerenti).

Le **commissioni internazionali** fanno un'analisi critica della letteratura su un problema, selezionano come attendibili o meno le pubblicazioni e fanno considerazioni generali. Stabiliscono una linea guida per gestire la questione, tale linea non ha scopo legislativo, ma di formazione del sapere. Queste linee guida vengono passate ai governi nazionali o internazionali.

Esempio: ICRP → produce studi sulla radiazione ionizzante, che vengono passati alla commissione europea.

IARC → ricerca sul cancro. È l'entità che stabilisce cosa è cancerogeno o no.

I **governi** fanno una valutazione del costo-beneficio (meglio spendere in spesa sanitaria poi o in prevenzione prima?). Per verificare che le leggi vengono rispettate c'è la *sorveglianza* sulla popolazione. In ultima analisi sono i governi a dover finanziare la ricerca.

Quando non si sa cosa fare si applica il *principio di precauzione*.

12.1 EFFETTI BIOLOGICI E SANITARI

Si ha insorgenza di patologie (che possono essere reversibili o irreversibili) in vari livelli dell'organismo:

- tessuto = pezzo di organo
- organo = insieme di tessuti
- apparato = insieme di organi

Esempio: rumore acustico come la musica troppo alta. L'effetto è una sordità temporanea (inizialmente reversibile) ma se si insiste con la musica alta prolungata può diventare irreversibile. La sordità temporanea è un processo di protezione a livello di organo.

Qualunque effetto dell'esposizione può essere eliminato o mitigato da processi di riparazione e protezione, che possono verificarsi a livello molecolare, cellulare, di organo o di intero organismo.

Gli effetti biologici e sanitari possono essere il risultato di due tipi di processi:

1. processo deterministico
2. processo stocastico

Nei **processi deterministic**i si ha un rapporto diretto di causa effetto. Tale tipo di processo dà effetti la cui entità è legata all'esposizione e per cui si definisce una *soglia*.

Esempio: considero l'esposizione ai raggi X: l'effetto deterministico è tanto maggiore e più grave quanto maggiore è l'esposizione, ma sotto una certa soglia non succede nulla.

Considero l'esposizione al sole per 10 minuti: nessun effetto; se invece ci si espone al sole per un'ora, ad alta quota si hanno ustioni da UV (le cellule muoiono).

Gli effetti deterministici vengono anche detti *graduati* e sono gli effetti più facili da studiare.

I **processi stocastici** danno effetti in cui non c'è una soglia e non si ha gradualità né una scala di gravità. → o tutto o niente. Si può solo parlare di probabilità di accadimento di un effetto, legata all'esposizione. La gravità dell'effetto non è legata all'esposizione.

Un esempio di effetto stocastico sono i *tumori*: l'esposizione continuata a dosi di radiazioni ionizzanti (RI) sotto soglia aumenta la probabilità di avere un tumore. In generale l'esposizione prolungata ad un agente inquinante fa sì che la probabilità di un effetto patologico aumenti.

La cosa che complica la situazione è che l'effetto stocastico arriva anche dopo molti anni e bisogna risalire a cause avvenute nel passato. Mentre per alte dosi di esposizione è evidente l'insorgenza di tumori, nessuno sa cosa succeda esattamente per basse dosi.

L'*ormesi* è una teoria per cui se esposto a piccole dosi di agente inquinante l'organismo aumenta la propria capacità di difendersi (non è scientificamente

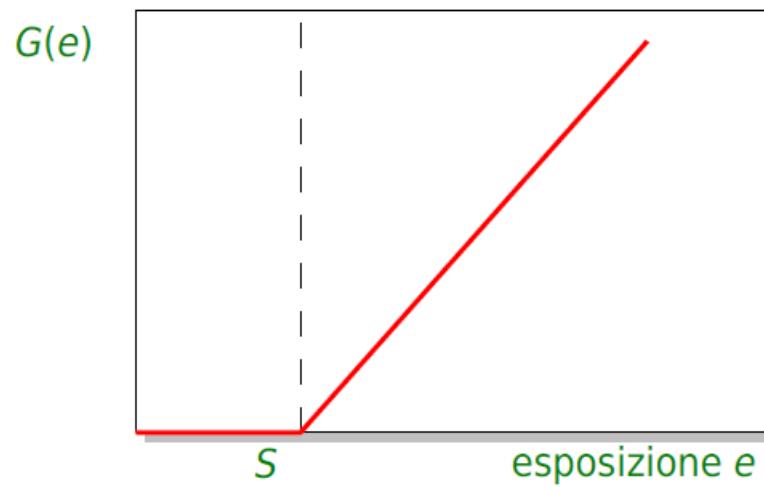


Figura 12.1: probabilità dell'effetto deterministico in funzione dell'esposizione

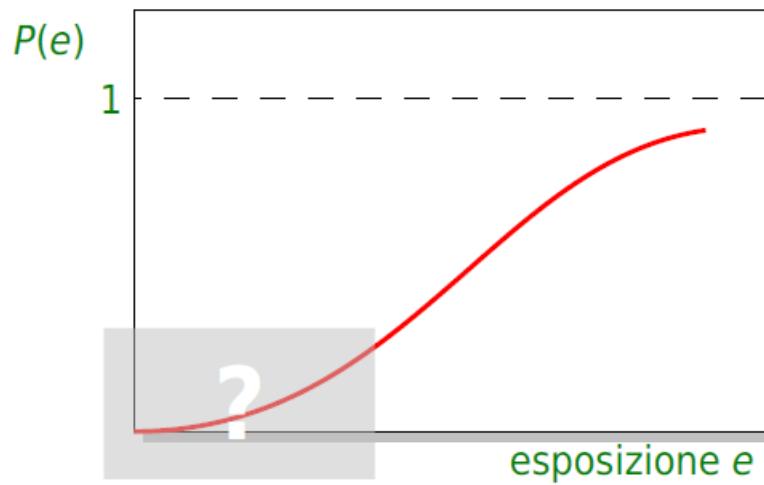


Figura 12.2: probabilità dell'effetto stocastico in funzione dell'esposizione

provato).

Gli effetti stocastici si distinguono in:

- **somatici**: coinvolgono direttamente l'individuo esposto, e sono:

- tumori
- teratogenici = aumento dei casi di malformazione

Comprende anche il caso di madre già incinta sottoposta a radiazione.

- **genetici**: viene coinvolta la progenie, cioè c'è una modifica genetica che passa alle cellule uovo. gli effetti stocastici genetici non sono mai stati dimostrati.

Per individuare questi effetti vengono fatti studi su:

- umani: bisogna basarsi su casi di esposizioni basse e prolungate (Chernobyl, Hiroshima, Nagasaki), ma sono dati ristretti
- animali: su di essi sono stati dimostrati gli effetti genetici

problematiche dei danni stocastici:

1. mancanza di dati
2. ritardo: ci vuole tempo perché si manifestino
3. spontaneità: possono verificarsi anche spontaneamente (non esistono tumori tipici dell'esposizione a radiazione).

L'esposizione può essere:

- acuta = intensa ma breve:
 - se è sopra la soglia si ha effetto deterministico
 - se è sotto la soglia si ha eventualmente effetto deterministico
- cronica = esposizione costante all'agente inquinante con intensità bassa, che può portare ad effetti stocastici

Gli effetti deterministici si individuano facilmente e si studiano nell'individuo con la *diagnosi della malattia* costituita da analisi del sangue, eritemi, analisi dei sintomi come nausea e stanchezza). L'ipotesi di effetti stocastici sul singolo individuo, invece, prevede la diagnosi della malattia e cerca di rispondere alla domanda: quando e come è stato esposto l'individuo alla radiazione?

⇒ Si fa un confronto tra la probabilità di insorgenza in funzione della dose e la probabilità di insorgenza spontanea. Lo studio degli effetti stocastici è uno studio *statistico sulle popolazioni*.

Per comprendere l'incidenza degli effetti stocastici in una popolazione si procede nel seguente modo:

- individuazione del tipo di patologia (effetto)
- individuazione della grandezza fisica biologicamente efficace (esposizione → dose → causa)

- verifica della durata ed intensità dell'esposizione (dose) in una popolazione campione.
 - studio dei meccanismi biologici e biochimici di base per individuare la grandezza fisica biologicamente efficace
 - analisi epidemiologica sull'incidenza di tale patologia epidemiologia molecolare (uso dei biomarkers)

Gli **studi epidemiologici** possono essere:

studio di coorte Studio su lunghi periodi su una popolazione campione inizialmente sana. Viene fatta un'analisi dell'incidenza patologica in funzione dell'esposizione e si valuta l'incidenza attesa in assenza di esposizione. Si procede poi al confronto tra le due.

popolazione esposta: effetto (*A*) - non effetto (*B*)

popolazione (equivalente) non esposta: effetto (*C*) - non effetto (*D*)

$$P_e = \frac{A}{A+B} \quad P_{ne} = \frac{C}{C+D} \quad (12.1)$$

Rischio relativo (RR):

$$RR = \frac{P_e}{P_{ne}} \quad (12.2)$$

MA: la popolazione non esposta deve essere *simile* a quella esposta. Inoltre ci sono agenti chimici che possono determinare la stessa patologia, quindi bisogna riuscire a separare i casi dovuti a due diversi agenti inquinanti.

É lo studio migliore che si possa fare, ma è comunque incompleto.

studio di caso-controllo Consiste nel confronto tra una popolazione campione malata (caso) e una sana (controllo). Bisogna ricostruire le possibili esposizioni nel tempo.

popolazione esposta: caso (*A*) - controllo (*B*)

popolazione non esposta: caso (*C*) - controllo (*D*)

Odd ratio (OR):

$$OR = \frac{A/B}{C/D} = \frac{AD}{BC} \quad (12.3)$$

Se $A \ll B$ e $C \ll D \implies OR \rightarrow RR$

É un metodo più veloce e meno costoso, ma ci sono più *bias*: c'è la tendenza a trovare la colpa in quello che si ipotizza essere la colpa.

A parte lo studio di causa effetto ci sono studi che vengono fatti in laboratorio che dimostrano l'esistenza di effetti stocastici:

- esperimenti su animali
- studi in vitro: studi meccanicistici individuano come l'esposizione aumenta i rischi di effetti stocastici.

Gli effetti deterministicici si possono vedere con studi di laboratorio, quelli stocastici con analisi epidemiologiche e estrapolazione di osservazioni compiute su animali o in vitro. Dopo gli studi pratici vengono scelti gli articoli scientifici e i rapporti scientifici e tecnici. Infine si fa una valutazione complessiva cercando di comprendere se esiste un rapporto causa effetto accertato.

12.2 CLASSIFICAZIONE IARC DEGLI AGENTI CANCEROGENI

gruppo 1 agenti cancerogeni per gli esseri umani. Ad esempio:

- radiazioni UV
- particelle cariche (direttamente ionizzanti)
- raggi X, raggi γ , neutroni (indirettamente ionizzanti)

gruppo 2A agenti *probabilmente* cancerogeni per gli esseri umani

gruppo 2B agenti *forse* cancerogeni per gli esseri umani. Ad esempio:

- campi magnetici ELF
- RF-EMF

gruppo 3 agenti non classificabili riguardo alla cancerogenicità per gli esseri umani. Ad esempio:

- campi magnetici statici
- campi elettrici statici

gruppo 4 agenti probabilmente non cancerogeni per gli esseri umani

Ci sono situazioni (2A, 2B, 3) in cui ci sono effetti potenzialmente individuati, ma per cui scientificamente non è stato trovato un rapporto di causa effetto e per cui non si è riusciti a determinare il rischio (ad esempio il telefonino). In questi casi l'approccio che si usa è quello di una *minimizzazione a priori*.

Principio di precauzione è legato a implicazioni sociali, politiche ed economiche. Il ricorso al principio di precauzione è una decisione politica: viene proposta dagli enti (come IARC) ma viene applicato dal governo.

L'applicazione del principio di precauzione deve essere:

- proporzionale = non esagerata, proporzionale al rischio
- non discriminatoria
- consistente = applicato una volta deve essere applicato sempre

Un esempio di non applicazione del principio di precauzione con conseguenze devastanti è stata l'esposizione all'amiante: c'erano già stati segnali che fosse un problema ma per motivi economici non gli si è dato peso.

principio ALARA ha lo stesso scopo del principio di precauzione: nel dubbio che possa esserci il rischio cerco di mantenere l'esposizione il più basso possibile. Questo principio è la base della protezionistica.

Capitolo 13

Lezione 2: 10 marzo 2015

Il primo scopo che ci proponiamo è quello di studiare le diverse sorgenti di radiazione.

Cominciamo con i **nuclidi radioattivi**: i nuclidi sono composti da Z protoni e N neutroni (Z è anche il numero di elettroni se l'atomo è neutro).

$$N + Z = A \quad (13.1)$$

Gli *isotopi* hanno lo stesso numero di protoni Z , ma un numero di elettroni diversi dall'atomo neutro. L'unione di protoni e neutroni costituisce il *nucleo*: se il nucleo è stabile ha massa finale minore della somma delle masse dei singoli componenti.

L'*energia di legame* E_B è data da:

$$E_B = Z_{m_p} + N_{m_n} + Z_{m_e} - M(A, Z) \frac{E_B}{A} \approx 8 \frac{\text{MeV}}{\text{nucleone}} \quad (13.2)$$

Caratterizziamo i componenti dell'atomo con massa, spin e carica:

protone $m_p = 938.3 \text{ MeV}$ $\text{spin} = 1/2$ $q = 1$

neutron $m_n = 939.6 \text{ MeV}$ $\text{spin} = 1/2$ $q = 0$

elettrone $m_e = 511 \text{ keV}$ $\text{spin} = 1/2$ $q = -1$

L'energia di legame è sempre positiva e a parte il primo tratto poi risulta circa costante, come si può osservare nella figura (13.1). Il massimo viene raggiunto per ferro e nichel, che sono i più stabili.

L'instabilità si basa sul fenomeno per cui l'atomo decadendo in diverse componenti quadagna energia:

$$A + B \longrightarrow C + D \quad Q = M(A) + M(B) - M(C) - M(D) > 0 \quad (13.3)$$

Ad esempio l'uranio ha un guadagno di energia perchè l'energia di legame delle componenti è maggiore di quella del nucleone. Questo è alla base del principio della *fissione*, che viene usata per produrre energia (100 Mev per ogni fissione) e avviene per atomi a destra del picco della figura 13.1.

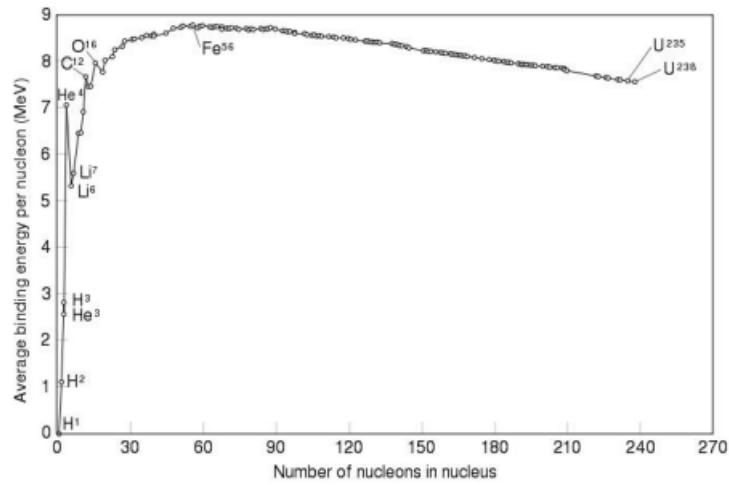


Figura 13.1: *Andamento dell'energia di legame*

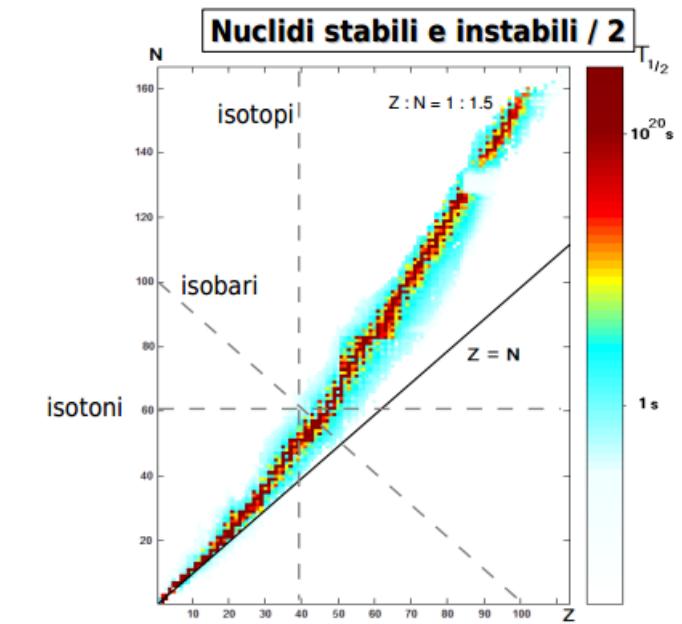


Figura 13.2: *Vita media degli atomi che decadono*

A sinistra del picco invece il guadagno di energia avviene tramite *fusione*.

Tutto si basa sull'equazione $E = mc^2$: la massa che si perde va tutta in energia.

Plotando in un grafico N in funzione di Z, possiamo vedere l'andamento della vita media dell'atomo che decade guardando al colore: più sono rossi più sono stabili (vedere figura 13.2). Possiamo vedere che per $Z = N$ non si hanno nuclei stabili. I nuclei stabili si dispongono su una curva tale per cui:

$$Z : N = 1 : 1.5 \quad (13.4)$$

Si ha stabilità quando il numero di neutroni è maggiore del numero di protoni, questo perchè sono tenuti insieme dalla forza nucleare (forte per distanze piccole), ma bisogna ricordare che c'è anche la forza elettromagnetica che fa respingere i protoni. Quindi maggiore è il numero di neutroni rispetto a quello di protoni, maggiore è la forza che li tiene insieme senza aumentare la repulsione coulombiana.

Gli isotopi hanno un punto di stabilità nel mezzo.

Esistono diversi tipi di decadimento radioattivo:

- beta
 - beta-
 - beta+ e cattura elettronica
- alfa
- gamma
 - transizioni isomeriche
- fissione spontanea
- emissione di protoni e neutroni
- cascate

Se ho un isotopo instabile esiste una legge che determina la frequenza con cui avviene il decadimento, nota come la *legge del decadimento radioattivo*:

$$dN = -\lambda N dt \implies N(t) = N_0 e^{-\lambda t} \quad (13.5)$$

Dove: λ è la probabilità di decadimento per unità di tempo. È una costante, quindi non dipende dallo stato chimico o fisico del nuclide, non dipende da temperatura o pressione e soprattutto non dipende dall'età del nucleo. N è il numero di nuclei radioattivi, dN è il numero di nuclei che decadrono nel tempo dt . N_0 è il numero di nuclei presenti inizialmente ($t = 0$) e N è il numero di nuclei rimasti al tempo t .

Esistono due importanti quantità legate al decadimento radioattivo:

tempo di dimezzamento è il tempo richiesto perché da N_0 si passi a $N_0/2$, cioè il tempo perché si dimezzino i nuclei iniziali.

$$\begin{aligned} N_{\tau_{1/2}} &= \frac{N_0}{2} \longrightarrow e^{-\lambda\tau_{1/2}} = \frac{1}{2} \\ \tau_{1/2} &= \frac{\ln 2}{\lambda} = \frac{0.693}{\lambda} \\ N(t) &= N_0 e^{-\ln 2/\tau_{1/2}} = N_0 2^{-t/\tau_{1/2}} \end{aligned} \quad (13.6)$$

vita media è il tempo che vive in media un nucleo prima di decadere. Tra t e $t + dt$ decadono $\lambda N(t)dt$ nuclei, che hanno vissuto un tempo pari a:

$$\tau = \langle t \rangle = \frac{1}{N_0} \int_0^\infty t \lambda N(t) dt = \frac{1}{N_0} \int_0^\infty t \lambda N_0 e^{-\lambda t} dt = \frac{1}{\lambda} \quad (13.7)$$

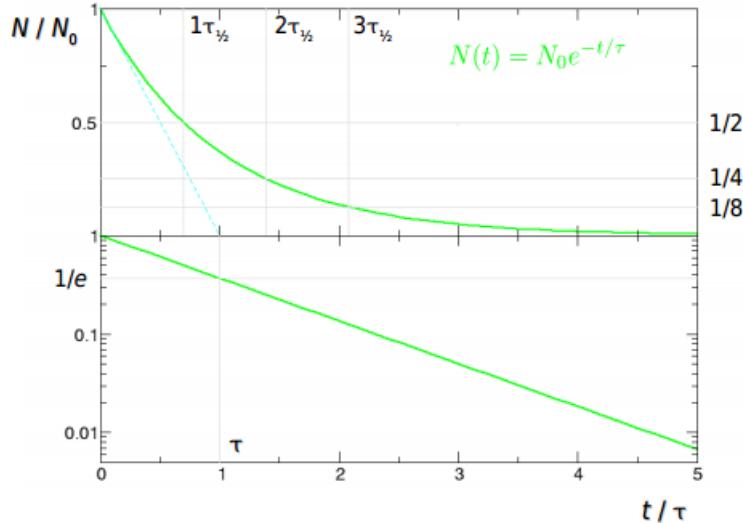


Figura 13.3: legge del decadimento radioattivo

Possiamo osservare queste due quantità nei grafici della figura 13.3.

Noi siamo interessati all'**attività**, cioè al numero di decadimento per unità di tempo:

$$A(t) = \left| \frac{dN}{dT} \right| = \lambda N \quad (13.8)$$

L'attività dipende da N che decade esponenzialmente, quindi anche $A(t)$ avrà un decadimento esponenziale. Nel sistema internazionale l'attività si misura in *Bequerel* (Bq) o in alternativa il *curie* (Ci):

$$1 \text{ Bq} = 1 \text{ decadimento/s}, \quad 1 \text{ Ci} = 3.7 \times 10^{10} \text{ decadimenti/s} \quad (13.9)$$

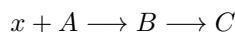
l'attività si ottiene dal numero di decadimenti ΔN in un intervallo temporale Δt solo se l'intervallo di tempo è molto più piccolo della vita media.

Un nucleo normalmente ha più modi per decadere e ogni modo di decadimento ha una probabilità di decadimento. Ci sarà quindi una λ diversa per ogni canale di decadimento. Il *branching ratio*, cioè il rapporto di diramazione, per i canali di decadimento diversi, mi dice la probabilità di decadimento nel modo i , ed è dato da:

$$B.R.(i) = \frac{\lambda_i}{\lambda_{tot}} \quad (13.10)$$

Vediamo ora delle situazioni particolari che ci interessano:

1. Reazioni nucleari in cui si ha produzione di nuclei radioattivi. Sia A un nucleo stabile persagliato con x (ad esempio neutroni), si ottiene un nucleo B radioattivo che decade in C :



Supponiamo di avere N_0 nuclei bersaglio A . Sia σ la *sezione d'urto*, S la superficie esposta al fascio di x particelle. Sia infine l il flusso di x particelle per unità di superficie. Il numero di particelle che per secondo raggiungono la superficie S è dato da $(l \times S)$. Definita $\Sigma = N_0 x \sigma$, abbiamo due quantità: la *probabilità di reazione* Σ/S (cioè la probabilità che il bersaglio venga colpito) e il *tasso di reazione* $l \times S \times \Sigma/S$.

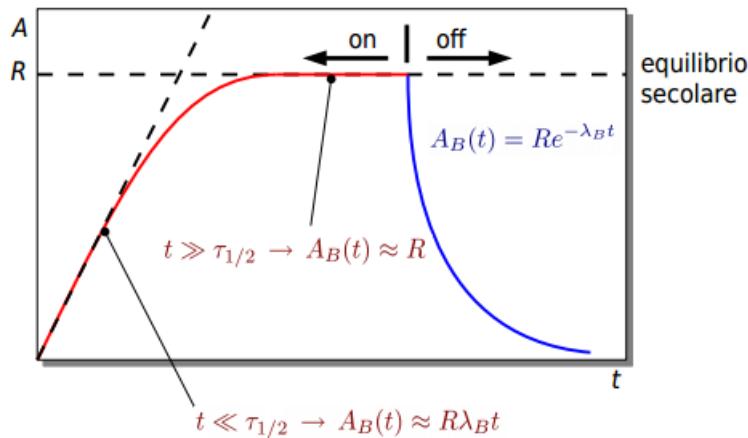


Figura 13.4: produzione di isotopi radioattivi

È una sottoclassificazione di soluzioni dell'equazione dell'equilibrio secolare. Succede che si ha una catena di decadimenti in nuclei a loro volta instabili. Possiamo chiederci come va nel tempo l'attività dei figli? E se ci sono già i figli, come evolve nel tempo?

Le attività dei singoli isotopi vengono studiate impostando equazioni differenziali:

$$\frac{dN_i}{dt} = \lambda_{i-1} N_{i-1} - \lambda_i N_i \longrightarrow \frac{dA_i}{dt} = \lambda_i (A_{i-1} - A_i) \longrightarrow \frac{dA_i}{dt} = 0 \iff A_{i-1} = A_i$$

Ottieniamo quindi che l'attività del padre è uguale all'attività del figlio.

2. catena di due radioisotopi e il terzo nucleide è stabile. Per i due radioisotopi si ha:

$$A_1(t) = A_0 e^{-\lambda_1 t} \quad A_2(t) = N_0 \frac{\lambda_1 \lambda_2}{\lambda_1 - \lambda_2} (e^{-\lambda_1 t} - e^{-\lambda_2 t})$$

Vediamo tre esempi:

Esempio 1: $\lambda_1 \ll \lambda_2$

Il primo isotopo vive molto più a lungo del secondo:

$$t \gg \frac{1}{\lambda_2} \quad \frac{A_2(t)}{A_1(t)} = \frac{\lambda_2 N_2(t)}{\lambda_1 N_1(t)} \approx 1$$

All'equilibrio secolare le attività di tutti gli isotopi sono circa uguali. Come

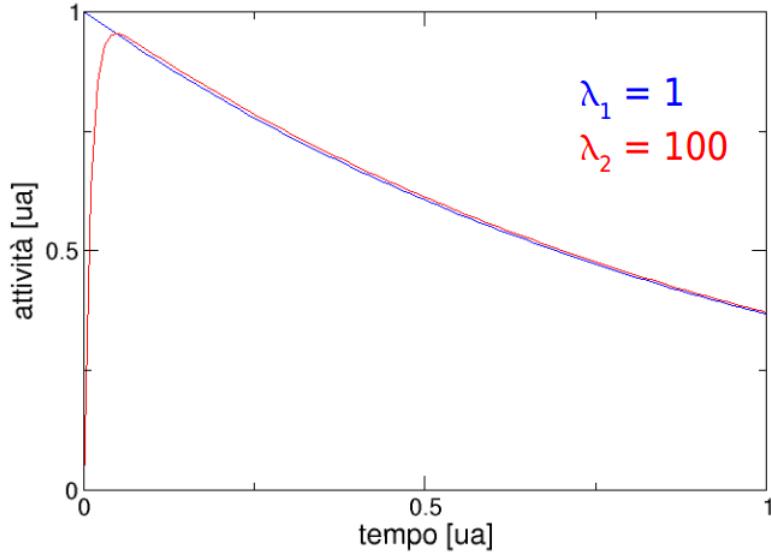


Figura 13.5: decadimento dei due isotopi radioattivi

si può vedere nel grafico della figura (13.5) $A_2(t)$ cresce velocemente con una sua costante, poi decade con una costante circa uguale a quella di $A_1(t)$.

Esempio 2: $\lambda_1 < \lambda_2$, ma paragonabili. $A_2(t)$ ha il massimo nel punto in cui le due attività sono uguali, il decadimento avviene con la stessa costante ma l'attività del figlio sta costantemente sopra quella del padre, come possiamo vedere nel grafico della figura (13.6).

$$\frac{A_2(t)}{A_1(t)} = \frac{\lambda_2 N_2(t)}{\lambda_1 N_1(t)} = \frac{\lambda_2}{\lambda_2 - \lambda_1} \left(1 - e^{-(\lambda_2 - \lambda_1)t} \right) \quad (13.11)$$

$$t \gg \frac{1}{\lambda_2} \implies \frac{A_2(t)}{A_1(t)} \approx \frac{\lambda_2}{\lambda_2 - \lambda_1} \quad (13.12)$$

Si ha un equilibrio simile a quello secolare, chiamato *equilibrio transiente*.

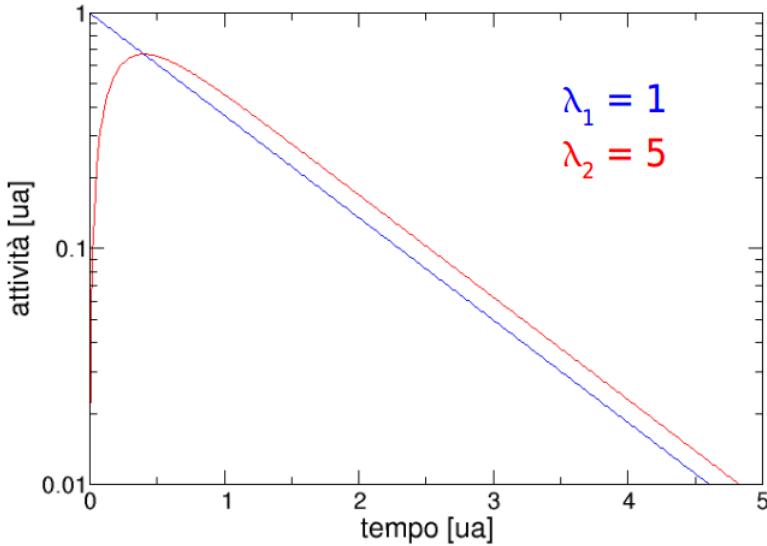


Figura 13.6: decadimento dei due isotopi radioattivi

Esempio 3: $\lambda_1 > \lambda_2$: il numero di nuclei del padre diminuisce velocemente fino a sparire, mentre quelli del figlio aumentano, con la costante di decadimento del padre, fino ad un massimo (dove l'attività coincide con quella del padre) e decade poi con una costante di decadimento propria, come vediamo in figura (13.7).

$$t \gg \frac{1}{\lambda_1} \implies N_1(t) \rightarrow 0 \implies N_2(t) \approx N_0 \frac{\lambda_1}{\lambda_1 - \lambda_2} e^{-\lambda_2 t} \quad (13.13)$$

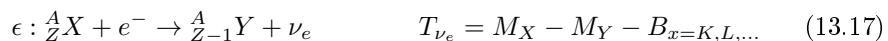
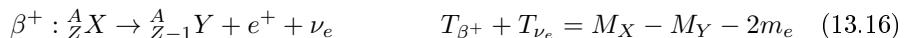
3. Equilibrio secolare con tanti nuclei. La soluzione generale è del tipo:

$$N_k(t) = \sum_{i=1}^n c_{ki} e^{-\lambda_i t} \quad (13.14)$$

In natura spesso avvengono con una λ del padre molto più piccola di quella dei figli e ogni isotopo ha poi la stessa attività.

13.1 DECADIMENTO β

Le interazioni nel nucleo sono dovute alla forza debole che fa passare protone in neutrone e viceversa, con emissione di elettroni e neutrini. Abbiamo:



Il decadimento β è un decadimento a tre corpi e presenta uno spettro energetico continuo. In figura (13.8) è riportato il diagramma di Feynmann che rappresenta l'interazione tra protone e neutrone. I due processi possibili sono:

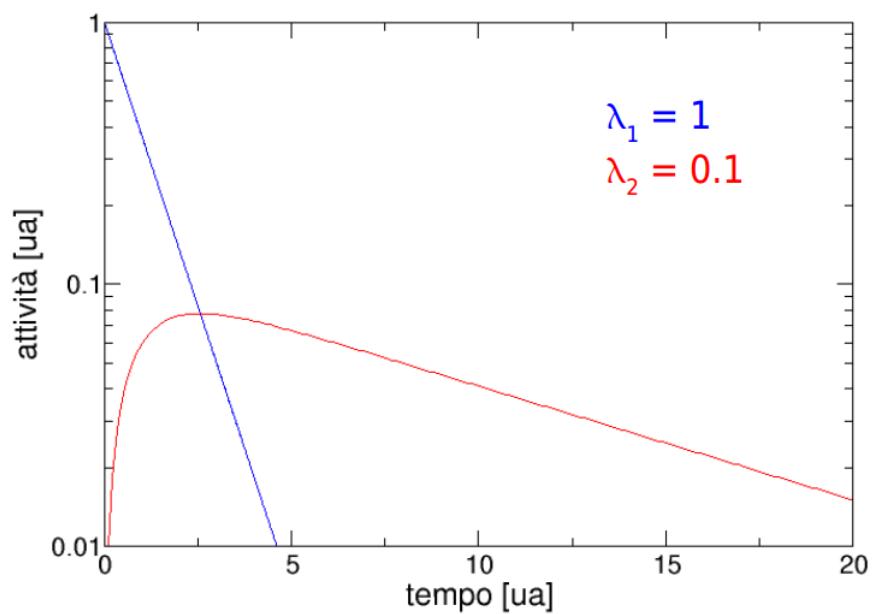


Figura 13.7: decadimento dei due isotopi radioattivi

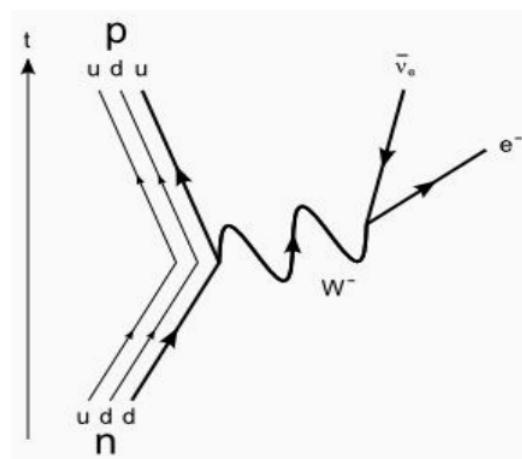


Figura 13.8: decadimento β

$$n \rightarrow p + e^- + \bar{\nu}_e \quad (13.18)$$

$$p \rightarrow n + e^+ + \nu_e \quad (13.19)$$

In entrambi i casi possiamo osservare la conservazione della carica: neutra nel primo caso e data da protone ed elettrone, positiva nel secondo grazie al positrone. Si ha un guadagno di energia perchè la massa del figlio è minore di quella del padre.

L'energia positiva a disposizione viene data all'elettrone e/o al neutrino: l'energia dell'elettrone varia tra 0 (tutta l'energia è andata al neutrino) e $M_X - M_y$ (tutta l'energia va all'elettrone).

Il decadimento ϵ prevede l'acquisizione di un elettrone, quindi il protone diventa un neutrone. È un processo di cattura elettronica, in competizione con il decadimento β^+ . Ha a disposizione un'energia maggiore perchè lo spazio delle fasi è più alto, ma la funzione d'onda dell'elettrone atomico deve sovrapporsi al nucleo. La cattura elettronica crea una lacuna nell'atomo e si hanno transizioni di elettroni dalle shell più esterne, con produzione di raggi X.

Il decadimento β^- ha basse energie, mentre β^+ va a zero per basse energie. L'isotopo che decade β^- decade sullo stato eccitato del nucleo dei figli, ma ci sono diversi livelli quindi avremo una *branching ratio*. Ogni decadimento ha a disposizione meno energia, infatti bisogna sottrarre l'energia di eccitazione del figlio, quindi si ha una massa più alta.

Gli spettri dei decadimenti β sono la sovrapposizione di tante curve che hanno massimi diversi, ma quello che conta è l'energia media emessa.

13.2 DECADIMENTO α

Questo decadimento è dovuto all'interazione forte tra nucleoni, a cui si aggiungono i contributi elettromagnetici. Nel nucleo si forma un nucleo di elio (He), cioè una particella α che è ionizzata due volte, che è molto stabile e viene espulso dal nucleo:

$$_Z^AX \rightarrow _{Z-2}^{A-4}Y + {}_2^4He^{2+} \quad (13.20)$$

$$Q = M_X - (M_Y + M_\alpha) \quad (13.21)$$

$$T_\alpha = \frac{M_Y}{M_\alpha + M_Y} Q \quad (13.22)$$

La particella α prende quasi tutta l'energia a disposizione, che è circa 3 – 10 MeV. È un decadimento che interessa solo i nuclei pesanti ($A > 150$), come ad esempio ${}^{238}U$ e ${}^{210}Po$.

Con questo decadimento non tutti i figli vanno sullo stato fondamentale, ma possono andare anche sui primi due stati eccitati. Lo spettro energetico è quindi composto da un picco più alto, che indica il decadimento sullo stato fondamentale, più picchi più bassi a sinistra, per i decadimenti sugli stati eccitati.

13.3 DECADIMENTO γ

Quando avviene un decadimento su uno stato eccitato del nucleo, questo può dissecitarsi. I raggi γ sono fotoni emessi nella transizione nucleare da un livello eccitato a uno meno eccitato: abbiamo quindi che la transizione è mediata da interazioni elettromagnetiche. Possiamo trovarci su un livello eccitato del nucleo in seguito a:

- assorbimento di fotoni o neutroni;
- decadimento α o β ;
- eccitazione coulombiana da parte di particelle caricate.

Questo decadimento è descritto da:



dove X^* e X sono lo stesso nucleo con diverse distribuzioni di carica.

A volte capita che il nucleo su uno stato eccitato, per dissecitarsi non emetta un fotone, ma un elettrone, che ha a disposizione un'energia cinetica pari all'energia che avrebbe avuto il fotone: è l'energia di legame. Se si ha l'emissione totale di elettroni segue la produzione di raggi X, a causa delle lacune atomiche lasciate dagli elettroni in una delle shell atomiche (K,L,M, \dots). Abbiamo quindi una **conversione interna**, con coefficiente dato da:

$$\alpha_i = \frac{I_{ei}}{I_\gamma} \quad (13.24)$$

Lo spettro energetico di questo tipo di processo è riportato in figura (13.9).

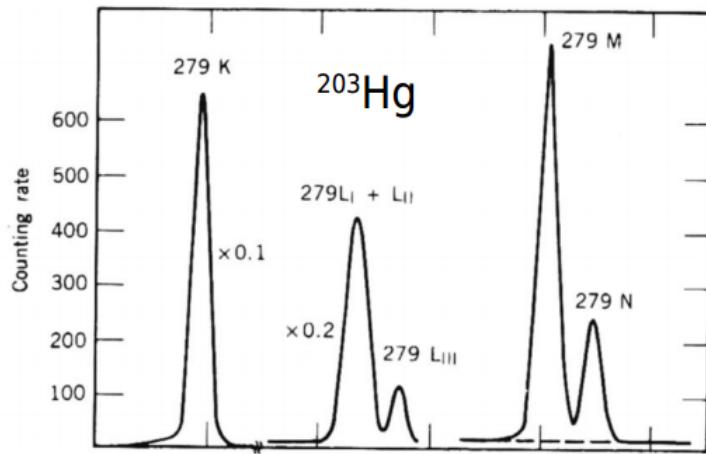


Figura 13.9: spettro energetico per il decadimento γ

13.4 FISSIONE SPONTANEA

Nel processo di fissione spontanea il nucleo si divide in due nuclei più piccoli, con rilascio di energia dell'ordine dei 100 MeV , che andrebbe ai due prodotti di fissione, sotto forma di energia cinetica.

È un processo legato all'interazione forte e interessa i nuclei più pesanti. A questo processo però si accompagna sempre emissione di neutroni: questo avviene perché il nucleo molto pesante ha più neutroni del numero di protoni, mentre decadendo si ottengono nuclei che hanno bisogno di meno neutroni. Per far sì che non ci siano neutroni in eccesso alcuni vengono emessi durante la fissione (vengono detti *neutroni pronti* e sono circa 4-6 a fissione), mentre quelli in eccesso nei due nuclei più piccoli vengono convertiti in protoni tramite decadimento β^+ .

Il nucleo fissile non si spezza in due parti uguali, come possiamo osservare nel grafico in figura (13.10).

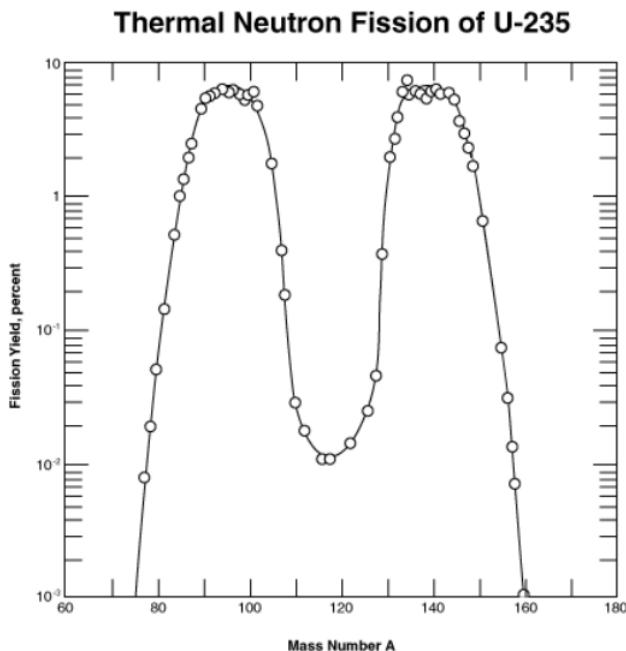


Figura 13.10: *processo di fissione*

La fissione produce due nuclei più neutroni, e i nuclei a loro volta fanno decadimenti β e γ emettendo a loro volta altri neutroni: concludiamo quindi che la fissione è una forte sorgente di radiazione.

13.5 DISECCITAZIONE ATOMICA

Si ha una cascata di transizioni atomiche per riempire le lacune che si creano nelle shell atomiche in seguito a:

- cattura elettronica
- conversione interna

Questo processo a cascata può avvenire con produzione di:

Transizioni radiative : vengono emessi raggi X.

Transizioni non radiative : tra queste ricordiamo:

- elettroni auger: riempio la lacuna creandone una a un livello più lontano dal nucleo, emettendo un elettrone. È un processo che si ha negli atomi più leggeri.
- transizioni di Koster-Cronig.

Capitolo 14

Lezione 3: 17 marzo 2015

Abbiamo a che fare con diversi radiazioni che hanno origini diverse:

Radiazione di origine cosmica : esistono raggi cosmici primari e secondari e si parla di attività cosmo-genica.

Radiazione di origine terrestre : parliamo di radioisotopi naturali (capostipiti) e dei loro figli, come il radon.

Radioattività artificiale : si tratta di radioisotopi artificiali o delle radiazioni prodotte dalle macchine radiogene.

14.1 RAGGI COSMICI

Le particelle provenienti dal cosmo e che colpiscono l'atmosfera terrestre, per unità di area e di tempo sono circa 10^{-2} s^{-1} . La maggior parte di questa radiazione è costituita da protoni (90%), il resto da elio (9%) e da nuclei pesanti (1%). La maggior parte di queste particelle sono relativistiche, cioè hanno energia:

$$E \gg mc^2 \quad (14.1)$$

e hanno uno spettro continuo fino a 10^{20} eV.

Queste particelle relativistiche hanno origine solare (brillamenti solari), galattica ed extragalattica (supernovae, ...), che vengono accelerate dai campi magnetici e si tratta di radiazioni primarie (provenienti dall'universo: protoni) o secondarie, dovute all'interazione della radiazione primaria con il mezzo interstellare e con i nuclei dell'atmosfera. Le radiazioni primarie si fermano ai primi strati dell'atmosfera e sotto i 3000 m si hanno solo radiazioni secondarie.

I raggi cosmici provengono da tutte le direzioni e il flusso non è costante né nel tempo né nello spazio: dipende dall'attività solare e dal campo magnetico terrestre.

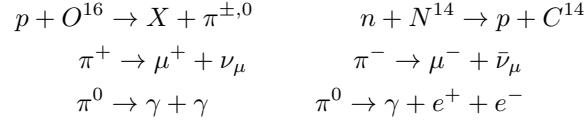
Per descrivere l'atmosfera si ricorre al concetto di **spessore massico**: $X = x\rho$, $[X] = \text{g/cm}^2$. Il 90% dell'atmosfera sta sotto i 16 km e ha uno spessore pari a $X_0 = 1030 \text{ g/cm}^2$.

Lo spessore massico dell'atmosfera ha andamento esponenziale:

$$X_v = X_0 e^{-h/h_0} \quad (14.2)$$

Consideriamo ora un protone in arrivo dall'esterno dell'atmosfera, che urta contro un nucleo: in questo urto il nucleo esplode e si ottengono nuclei e particelle più piccole, come π^- (che a sua volta decadre) e nucleoni. Quello che accade è che si creano sciami e cascate di due tipi:

Sciami adronici : protoni, neutroni, pioni,... derivanti da interazioni forti.
Questi sciami prevedono i seguenti decadimenti:



Queste particelle hanno le seguenti vite medie:

$$\tau_{\pi^\pm} = 2.6 \times 10^{-8} \text{ s} \quad \tau_{\pi^0} = 8.3 \times 10^{-17} \text{ s}$$

Sciami elettromagnetici : elettroni, muoni, fotoni, derivanti da interazioni elettromagnetiche.

Questo processo a cascate è rappresentato nella figura (14.1).

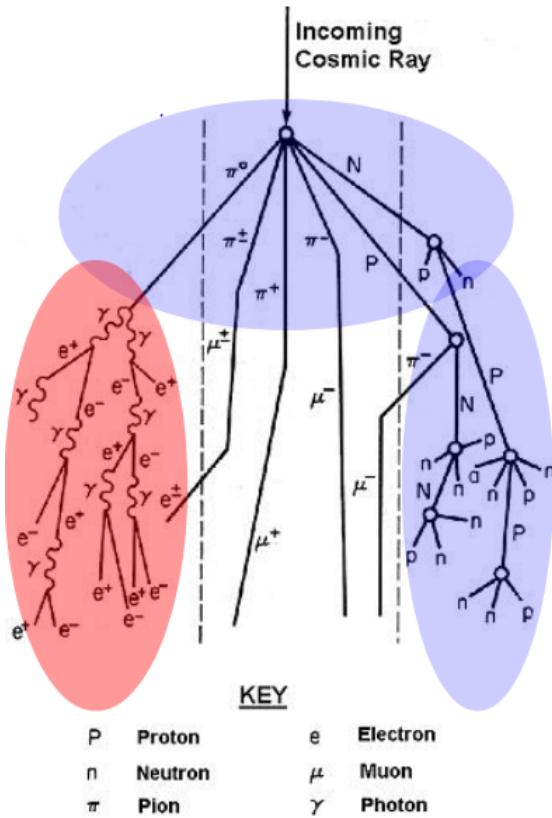


Figura 14.1: processo a cascata dei raggi cosmici

Gli sciami elettronici derivano dalla produzione di elettroni e fotoni, derivanti

dal decadimento dei pioni, poi gli elettroni a loro volta perdono energia emettendo un fotone, che fa produzione di coppie elettrone positrone.

La cascata di elettroni e fotoni raggiunge una distanza dalla terra pari a 10 km. Questo processo si ripete in 40 g/cm^2 . L'energia iniziale viene dispersa e elettroni e fotoni non arrivano a terra, ma producono luce (per cui sono stati installati dei rivelatori in montagna).

I raggi primari interagiscono con i nuclei degli elementi stabili dell'atmosfera e producono isotopi radioattivi che sono detti **cosmogenici**, come il trizio (3H) e il carbonio-14. Vediamo nel dettaglio il trizio:



$$\tau_{1/2} = 12.3y \quad Q = 18.6 \text{ keV} \quad (14.5)$$

Il trizio decade ma viene anche continuamente prodotto, si trova quindi in una condizione di equilibrio. Viene utilizzato per la fusione nucleare, una volta era utilizzato per attivare la vernice fosforescente delle lancette degli orologi. Ha un'energia di decadimento basso, ma come l'idrogeno lega facilmente e quindi se ingerito può dare problemi.

Consideriamo ora il carbonio-14:



$$\tau_{1/2} = 5730y \quad Q = 156 \text{ keV} \quad (14.8)$$

Viene utilizzato principalmente nel processo di datazione, in quanto è presente in tutti gli esseri viventi e nei combustibili fossili. La presenza di ${}^{14}C$ è rimasta costante fino al 1952, quindi per 15000 anni si ha avuto abbondanza di isotopo naturale in equilibrio secolare.

14.2 ISOTOPI NATURALI

Le serie radioattive naturali sono dovute a decadimenti α e β . L'unità di massa atomica varia di 4 unità solo per il decadimento *alpha*:

- serie del torio (4n): ${}^{232}Th \rightarrow {}^{208}Pb$

Il torio ha una vita di 14 miliardi di anni e la serie si conclude con il piombo-208, che è un isotopo stabile. Ad oggi il torio ha abbondanza isotopica del 100%.

- serie del nettunio (4n+1): ${}^{237}Np \rightarrow {}^{209}Bi$

Il nettunio ha una vita di 2.14×10^6 anni, quindi la sua serie è estinta.

- serie dell'uranio (4n+2): ${}^{238}U \rightarrow {}^{206}Pb$

Ha tempo di vita di 4.47×10^9 anni, e ad oggi l'abbondanza isotopica è pari al 99.28%.

- serie dell'attinio (4n+3): ${}^{237}U \rightarrow {}^{207}Pb$

Ha tempo di vita pari a 7.04×10^8 anni e ad oggi l'abbondanza isotopica è pari a 0.72%.

Ci sono dei nuclei che fanno fissione spontanea, poi ci sono gli isotopi fissili che quando catturano un neutrone fanno fissione (esempio ^{235}U). Ci sono poi gli isotopi fertili, che non sono fissili, ma attraverso catture e decadimenti possono diventare fissili.

Esistono delle serie naturali che cominciano dall' ^{238}U e che contengono tutti i suoi figli, ad esempio il granito: contiene l'uranio e i suoi figli in equilibrio secolare. Le catene possono rompersi spontaneamente in corrispondenza di nuclidi di vita lunga di elementi volatili (ad esempio il radon, gas nobile) o elementi molto reattivi (come il radio).

Un kg di terra contiene:

- 370 Bq di ^{40}K ;
- 25 Bq di ^{238}U ;
- 25 Bq di ^{232}Th .

Questo comporta che ci sono molti materiali per le costruzioni che contengono questi isotopi. Alcuni isotopi naturalmente radioattivi sono presenti anche nei cibi.

14.3 RADIO-NUCLIDI ARTIFICIALI

Ci sono dei rilasci di radionuclidi artificiali a seguito di:

- attività che coinvolgono radionuclidi artificiali a scopo medico (rilascio controllato);
- incidenti durante attività industriali e di ricerca;
- attività militari;
- attività criminali;
- attività minerarie o industriali (rilascio di radionuclidi naturali).

Oltre ai radionuclidi rilasciati nelle attività mediche, industriali e di ricerca, si ha produzione di radionuclidi nei reattori nucleari e nelle esplosioni termonucleari. Qui il nucleo fissile più usato è quello di ^{235}U , che emette neutroni prompt e ritardati il cui numero aumenta esponenzialmente. Se viene raggiunto il valore di *massa critica* di uranio si ha un'esplosione.

Nei reattori i neutroni vengono in parte assorbiti tramite barre immerse in acqua. Tra i prodotti di fissione abbiamo quelli:

- a vita breve (giorni)
- a vita media (anni): sono gli isotopi visibili ancora oggi.

Capitolo 15

Lezione 4: 24 Marzo 2015

15.1 PRODOTTI FISSILI

La fissione provoca un'esplosione nucleare. Un tempo venivano fatti dei test nell'atmosfera, che oggi non dovrebbero essere più consentiti, ma che hanno lasciato numerose tracce. Questi test sono stati fatti tra il 1940 e il 1950, provocando diversi problemi in Nevada e in Russia.

Ci sono stati anche incidenti nel mondo, che hanno provocato la distruzione di interi atolli nel pacifico.

L'effetto dell'esplosione della bomba nucleare è diverso da quello del reattore: nella bombe (come quelle di Hiroshima e Nagasaki) ci sono inizialmente due pezzi di ^{238}U e ^{235}U arricchiti di plutonio (esplosivo), che sono messi insieme a formare la massa critica, cioè la massa per cui si innesca una reazione a catena autosostenuta. Nell'esplosione viene coinvolto solo il 20% dell'uraio, mentre il resto viene sparso ovunque.

Questo significa che la bomba nucleare sparge avanzi di composti non combusti. Per migliorare da questo punto di vista si stanno facendo esperimenti con trizio e deuterio, in modo da aumentare l'efficienza, cioè la quantità di prodotto che viene effettivamente utilizzato e non disperso.

La bomba termonucleare invece può essere ottenuta o per fissione o per fusione utilizzando trizio o litio: un getto di raggi X comprime il materiale fissile provocando l'esplosione.

I prodotti principali delle bombe sono i frammenti di fissione (comuni anche al reattore nucleare), che sono isotopi, più i prodotti caratteristici delle bombe.

15.2 INTERAZIONE RADIAZIONE-MATERIA

Cosa succede quando la radiazione emessa dagli isotopi interagisce con la materia in generale?

Abbiamo bisogno di una grandezza che quantifichi gli effetti biologici: per quanto riguarda la radiazione questa quantità è la **dose assorbita**. Abbiamo un campo di radiazione, cioè della radiazione emessa da una sorgente e che determina il campo, che potrebbe essere una radiazione secondaria.

La dose è l'energia impartita alla materia dalla radiazione in un certo volume:

$$D = \frac{dE}{dm} \quad (15.1)$$

È la quantità di energia che rimane nella materia dopo essere stata attraversata dalla radiazione.

$$dE = \Sigma E_{in} - \Sigma E_{out} + \Sigma Q \quad (15.2)$$

Il termine ΣQ tiene conto del fatto che nella materia ci sono trasformazioni di massa in energia. E_{in} è l'energia radiante che entra in dm , E_{out} quella uscente. Con energia radiante si indica l'energia cinetica delle particelle.

Per la protezionistica l'aspetto dell'interazione della radiazione con la materia è cruciale, cerchiamo di capire cosa succede a livello microscopico.

15.2.1 INTERAZIONE CON PARTICELLE CARICHE (pesanti)

La particella carica penetra nella materia e la attraversa. La particella genera un certo campo elettrico \vec{E} e vede nella materia degli atomi, che sono costituiti da nuclei ed elettroni. A una certa distanza appaiono tutti neutri, ma avvicinandosi la particella interagisce con nuclei ed elettroni.

L'interazione avviene tramite scattering coulombiano: in generale i nuclei sono massivi e hanno una massa che solitamente è molto più grande di quella della particella, quindi non partecipano alla perdita di energia della particella, ma gli fanno semplicemente cambiare traiettoria.

Le interazioni che fanno perdere energia alla particella sono quelle con gli elettroni: nell'urto l'elettrone acquista l'energia sottratta alla particella incidente.

La perdita di energia nel mezzo è un processo continuo, il campo elettrico ha raggio infinito, per cui si ha interazione con tutti gli elettroni, anche se si hanno delle differenze nelle interazioni con elettroni vicini e lontani.

A seconda dell'energia trasferita nell'urto si può avere:

- ionizzazione dell'atomo se $E_{tr} > 10\text{eV}$ (otteniamo una particella ionizzante secondaria)
- eccitazione dell'atomo se $E_{tr} < 10\text{eV}$

L'energia trasferita dipende dal parametro d'impatto $\langle b \rangle$. Definiamo **potere frenante** o ionizzazione specifica la quantità di energia che viene persa nel percorso nel mezzo:

$$S_{coll} = \frac{dE}{dx} \quad (15.3)$$

Attraversando il mezzo la particella vede una densità di elettroni ρ : maggiore è la densità di elettroni, maggiore è l'energia che viene persa dalla particella.

La teoria della perdita di energia per collisioni viene modellizzata nella formula di Bethe-Block, che esprime il potere frenante come riportato in figura (15.1). È importante notare che l'energia ceduta dalla particella carica passando vicino

$$S_{coll} = \frac{dE}{dx} \propto \frac{Z}{A} \rho N_A \frac{z^2 e^4}{8\pi \epsilon_0^2 m_e} \frac{1}{v^2} \ln\left(\frac{E_{min}}{E_{max}}\right)$$

densità di elettroni nel mezzo

$$\Delta E = \frac{\Delta p^2}{2m_e} \propto \frac{F^2 \Delta t^2}{m_e}$$

- Z, A mezzo
- z particella incidente

dall'integrazione sul
parametro di impatto b $b \propto \frac{1}{\sqrt{\Delta E}}$
(distanza dell'urto)

Figura 15.1: formula di Bethe-Block per il potere frenante

a un elettrone è proporzionale a z^2 , $1/v^2$ e Z .

La dipendenza dal mezzo nella formula appare nel termine:

$$\frac{Z}{A} \rho \quad (15.4)$$

dove Z/A è una costante per ogni elemento e si trova nella tavola periodica, mentre ρ indica la dipendenza dallo spessore massico. Se plottiamo il potere frenante in funzione dell'energia cinetica otteniamo il grafico in figura (15.2).

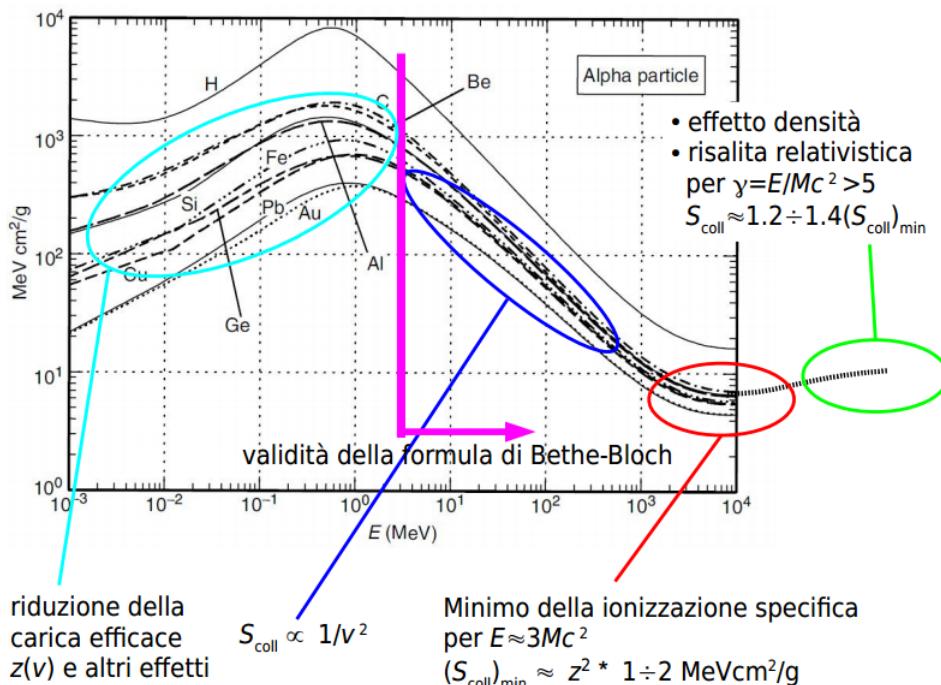


Figura 15.2: andamento del potere frenante

Il primo tratto (azzurro) descrive la diminuzione della carica efficace, che non

viene descritta dalla Bethe-Block, e che ha un massimo. La Bethe-Block descrive bene dal massimo in poi.

Dal punto di vista del potere frenante il discorso è simile anche per particelle leggere, la vera differenza è la *massa*: nella formula di Bethe-Block non compare l'energia della particella, ma la sua velocità.

Le curve sono uguali ma sono spostate verso destra all'aumentare della massa.

Le interazioni da vicino e da lontano sono basilari in protezionistica: quando la particella carica passa vicino all'elettrone atomico l'energia ceduta all'elettrone è maggiore che quando passa lontano. Possiamo scegliere come riferimento per l'energia trasferita il seguente valore:

$$E_m = 2I \quad (15.5)$$

dove I è l'energia media di ionizzazione ed eccitazione ($I \sim 10Z$). Si ha che:

$$S_{coll}^{far} = \frac{S_{coll}}{2} \quad (15.6)$$

cioè l'energia persa per collisione va metà in collisioni lontane e metà in collisioni vicine. Significa che da vicino il massimo di energia che può perdere la particella è metà dell'energia, in un urto head-on con un elettrone atomico.

Cosa succede all'energia persa? Quando la particella attraversa il mezzo 30% – 50% dell'energia totale va in ionizzazione del mezzo, di cui il 30% va in ionizzazione primaria e 70% in ionizzazione secondaria. Ricordiamo che prima o poi anche l'energia di ionizzazione diventa calore. Il resto dell'energia totale va in eccitazione dell'atomo e l'energia della disecitazione diventa calore.

Il numero di coppie elettrone-ione medio che viene prodotto dalla radiazione incidente è:

$$\langle N \rangle = \frac{E}{W_0} \quad (15.7)$$

dove E è l'energia depositata, W_0 è un valore che si calcola per ogni materiale e vale circa 20 – 30 eV, e $\langle N \rangle$ è maggiore dell'energia che serve per la sola ionizzazione.

Uno dei primi metodi, che è tuttora il metodo primario, per la misura della dose è la *calorimetria*.

Esempio: consideriamo 1 g di acqua isolato termicamente, cioè 1 cm^3 . Se passa da 25°C a 50°C allora l'energia depositata è $E_{deposita} = 100\text{J}$. Se ho una sorgente da 1 MeV si fermano tutti gli elettroni in 0.5 cm^3 . Se metto la sorgente al centro del cubo allora l'energia arriva in tutto il cubo: servono 6.3×10^{14} decadimenti. Il danno della radiazione non è dovuto al calore: per scaldare 1 g di acqua ci vogliono 3 ore!

Le particelle primarie (pesanti) viaggiano diritte e scambiano energia solo con gli elettroni, che sono troppo leggeri per deviare la loro traiettoria. Le particelle secondarie (leggere), cioè gli elettroni, non procedono dritti. Le particelle secondarie sono molto importanti perché depongono energia lontano dalla traiettoria di quelle primarie.

In protezionistica si ricorre al potere frenante ristretto (LET), che viene definito con lo scopo di distinguere l'energia deposta localmente (dalle particelle primarie) da quella deposta non localmente:

$$LET = \frac{dE_L}{dx} \quad (15.8)$$

Localmente indica la distanza massima della traiettoria, ovvero la massima energia impartita. Normalmente si considera il LET per collisioni distanti:

$$LET_{E_m} \sim \frac{S_{coll}}{2} \quad (15.9)$$

Più è concentrata la perdita di energia nello spazio, maggiore è il danno, quindi a LET maggiore corrisponde danno maggiore.

Vediamo le differenze tra elettroni e particelle pesanti:

- a parità di energia:

$$LET_{e^-} \ll Let_{part} \quad (15.10)$$

questo è dovuto alla dipendenza del potere frenante dall'inverso del quadrato della velocità. L'elettrone è definito una *particella penetrante*.

- gli elettroni fanno scattering elastico sui nuclei e sugli elettroni, mentre le particelle pesanti seguito di questi urti hanno solo lievi deviazioni. Questo comporta il fatto che gli elettroni seguano una traiettoria più complessa, dovuta a tanti urti con conseguenti cambi di direzione, che provocano la sua accelerazione e quindi l'irraggiamento da parte dell'elettrone (effetto di **bremmsstrahlung**).

Il percorso degli elettroni è più lungo, ma la penetrazione effettiva poi non è molta.

Perdita di energia per irraggiamento:

$$\frac{dE}{pdx} = -\frac{E}{X_0} \quad (15.11)$$

$$\frac{1}{X_0} = 4r_0 \propto \frac{N_{Av}}{A} Z(Z+1) \ln \frac{183}{\sqrt[3]{Z}} \quad (15.12)$$

Si tratta di una legge esponenziale nello spazio, dove X_0 rappresenta il tasso delle perdite di energia. La quantità di fotoni emessi è proporzionale all'energia della particella incidente.

L'effetto globale è che il potere frenante ha una prima decrescita proporzionale a $1/v^2$ dovuta alle collisioni (Bethe-Block), mentre poi diventa proporzionale all'irraggiamento, come si osserva nel grafico in figura (15.3).

Ricordiamo che se l'elettrone perde energia in fotoni non si ha una perdita di energia locale.

Gli elettroni possono anche uscire dal mezzo per il fenomeno del *back scattering*. In figura (15.4) è riportato un modello delle traiettorie che un elettrone

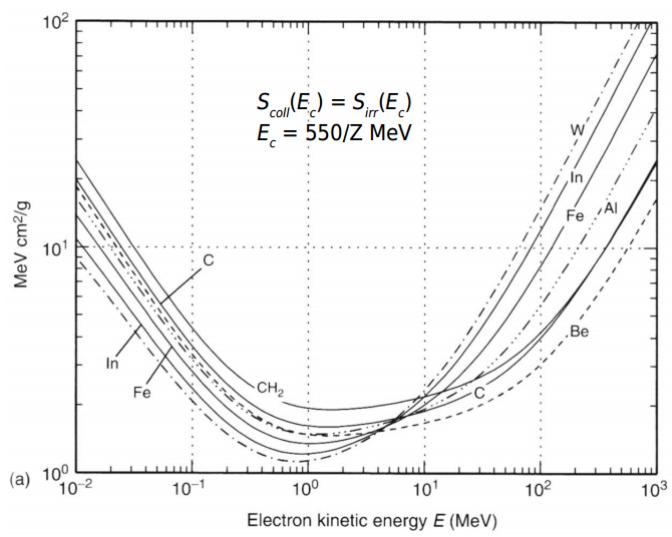


Figura 15.3: *andamento del potere frenante prima dovuto alle collisioni e poi all'irraggiamento*

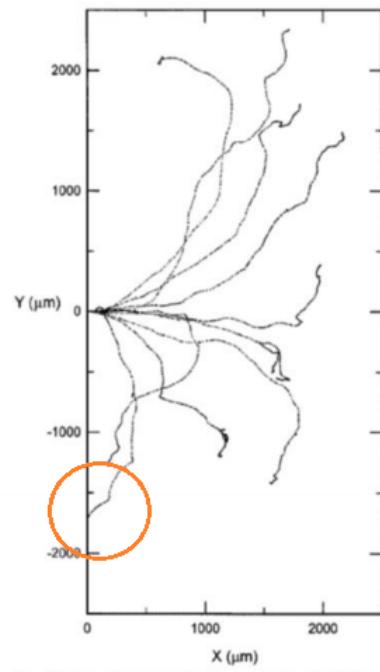


Figura 15.4: *traiettorie possibili per l'elettrone nel mezzo*

può seguire all'interno del mezzo: come si nota l'elettrone può anche tornare indietro e uscire.

Ci domandiamo quanto sia lo spessore attraversato dall'elettrone. Il *percorso* è la distanza che la particella percorre fino all'esaurimento della sua energia. La lunghezza totale del percorso calcolata in base al potere frenante totale medio è detta percorso R_{CSDA} (Continous Slowing Down Approximation):

$$R_{CSDA} = \int \left(\frac{dE}{\rho dx} \right)^{-1} dE \quad (15.13)$$

Per le particelle α e per i protoni R_{CSDA} coincide con la distanza effettiva a cui si fermano, mentre per gli elettroni no.

La distribuzione delle profondità z a cui si fermano gli elettroni è detta percorso R_{mf} (Mean Forward Range):

$$R_{mf} = \frac{\int z r_{mf}(z) dz}{\int r_{mf}(z) dz} \quad (15.14)$$

Dalla distribuzione:

$$N = \int_z^\infty r_{mf}(z') dz' \quad (15.15)$$

si può ricavare il percorso estrapolato R_{ex} , che però è più lungo di z .

Definiamo il **detour factor** come:

$$\frac{R_{mf}}{R_{CSDA}} < 1 \quad (15.16)$$

Teniamo presente che il corpo ha uno strato 70 μm di pelle morta, quindi se la particella viene assorbita non succede nulla, a differenza del caso in cui le particelle vengano ingoiate.

Una particella α in aria ha un percorso in cm con valore simile al numero corrispondente alla sua energia in MeV, mentre in acqua dividere per un fattore 1000.

Capitolo 16

Lezione 5: 31 marzo 2015

L'elettrone è una particella direttamente ionizzante e leggera. Possiamo vedere il percorso seguito da particelle pesanti, come il protone e la particella α in acqua, come si vede nella figura (16.1).

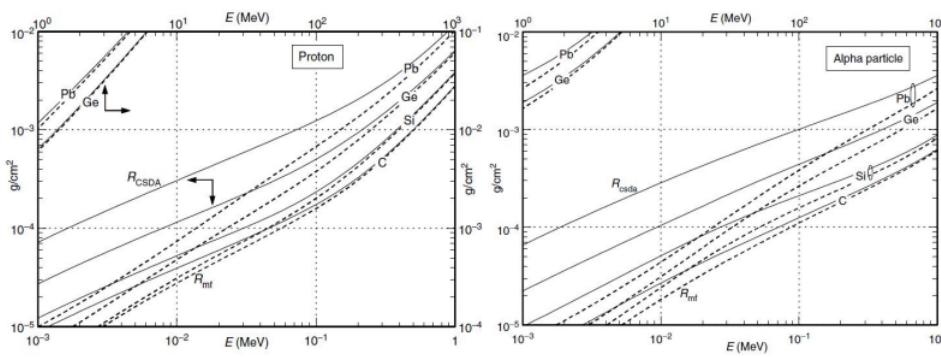


Figura 16.1: particelle pesanti in acqua

La particella α ha un potere frenante molto alto: a parità di energia va più lenta perché è più massiva. Un elettrone in urto testa a testa con un'altra particella può cedere fino a 500 MeV, la particella α invece penetra di meno e produce raggi δ di energia minore. Le particelle α depositano l'energia nel mezzo con densità molto più elevata, quindi sono più pericolose per l'organismo.

Quando la particella penetra nella materia rilascia quasi tutta la sua energia in un punto preciso, in corrispondenza del *picco di Bragg*. Nella figura (16.2) viene plottato dE/dx , il percorso totale è di $10^{-6}m$. La particella entra nell'acqua, rallenta e quindi il suo *stopping power* aumenta fino a un massimo (il picco di Bragg) per poi andare rapidamente a zero. È la funzione di Bethe Bloch al contrario. L'asse delle ascisse dà il range percorso dalla particella, mentre l'asse delle ordinate riporta l'andamento dell'energia deposta in funzione del percorso. Questa curva dice che se ho fascio di particelle (α , protoni, gli elettroni invece hanno una curva diversa), con la stessa energia, queste hanno circa lo stesso percorso con lo stesso picco, l'elettrone invece non ha un percorso definito. Questa curva è alla base del trattamento medico con radiazione per curare i tumori:

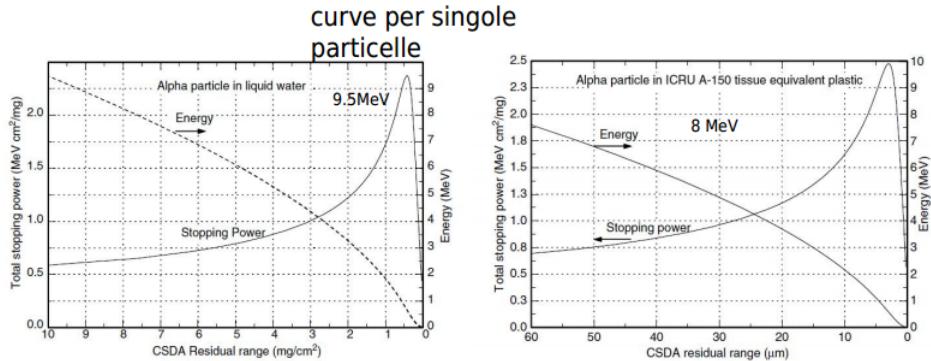


Figura 16.2: picchi di Bragg per singola particella

supponiamo di avere degli ioni pesanti (carbonio, protoni), allora si può calibrare il picco (di massimo danno) in modo che sia localizzato dove noi vogliamo colpire il tumore. Anche cambiando l'angolo di arrivo il picco rimane sempre concentrato nello stesso punto.

16.1 I FOTONI

Le particelle neutre non ionizzano direttamente ma mettono in moto particelle cariche pesanti o leggere che poi a loro volta ionizzano. Quando un fotone attraversa un mezzo materiale, essendo neutro non interagisce costantemente, ma ogni tanto interagisce con *un* elettrone del mezzo (cioè cede energia cinetica), e così viene messo in moto uno o più elettroni che poi essendo direttamente ionizzanti, vanno a depositare energia nel mezzo. Siccome non è un processo continuo come quello delle particelle cariche, l'interazione dei fotoni non viene descritta guardando all'andamento di dE/dx in funzione del percorso, ma è descritta da una sezione d'urto, che rappresenta la probabilità di interazione.

La sezione d'urto *atomica* è la probabilità che fotone interagisca con atomo:

$$\sigma(cm^2/g) = 10^{-24} \frac{N_A}{A} (barn/atom) = \frac{\mu_0}{\rho} (cm^2/g) \quad (16.1)$$

Nel mezzo abbiamo una certa densità di atomi (bersagli). μ_0 è il coefficiente di assorbimento.

Definiamo alcune grandezze:

- sezione d'urto atomica: $\sigma_{at}(cm^2/atomo)$.
Dati n_B atomi per cm^3 :

$$\sigma = n_B \sigma_{at} = \frac{1}{\mu_0} \qquad n_B = \frac{\rho N_A}{A} \quad (16.2)$$

- libero cammino medio: è il percorso che il fotone percorre prima di avere un'interazione.

$$\lambda(g/cm^2) = \frac{\rho}{\mu_0} = \frac{1}{[\sigma(cm^2/g)]} \quad (16.3)$$

Dati n_B atomi per cm^3 :

$$\lambda(cm) = \frac{1}{\mu_0} \quad (16.4)$$

- coefficiente di assorbimento massico: considero n_B/ρ atomi per g :

$$\sigma = \frac{n_B \sigma_{at}}{\rho} = \mu \quad (16.5)$$

Otteniamo così:

$$\begin{aligned} \rightarrow \mu &= \mu_0/\rho \\ \rightarrow \mu &= \sigma_{at} N_A / A \\ \rightarrow 1/\mu &= \lambda(g/cm^2) \end{aligned}$$

Se ho un fascio di particelle con flusso per unità di superficie e unità di tempo I_0 , quando mi sposto nel mezzo che attraversa, l'esponenziale dà il flusso di particelle che non hanno interagito, mentre la sezione d'urto mi dà la probabilità che ci sia interazione:

$$I_{unscattered}(E, x) = I_0 \exp[-\mu(cm^2/g)x\rho] \quad (16.6)$$

Questa espressione non mi dice cosa ne è stato delle altre particelle: il fascio viene rimpiazzato da un flusso di particelle degradate, di tipo diverso con direzioni diverse. Quello che non ha interagito ha avuto scattering. È utile tenere conto di questo effetto quando si ha a che fare con il problema della schermatura.

Un fotone può interagire in 3 modi diversi con la materia, che sono legati al mezzo e all'energia del fotone:

ASSORBIMENTO FOTOELETTRICO : riguarda i fotoni a energia più bassa ed è anche noto come scattering fotoelettrico, cioè un processo in cui un fotone cede energia ad un elettrone atomico. È permesso solo su elettroni legati (atomici), per conservazione di momento ed energia. Tanto più è legato l'elettrone, tante più sono le configurazioni finali, cioè tanto più alta è la probabilità che avvenga il processo. Il fotone sceglie l'elettrone nelle shell più interne a condizione che il fotone abbia energia maggiore a quella di legame dell'elettrone.

Esempio: consideriamo un fotone da 100 keV. La sezione fotoelettrica per Z bassi è ancora dominante. In aria o in acqua l'ossigeno ha una sezione d'urto più alta.

Il fotone fa scattering fotoelettrico sulla shell più interna dell'ossigeno: l'elettrone atomico acquista energia e viene liberato con energia pari a $E = E_\gamma - E_b$, cioè pari alla differenza tra l'energia del fotone e l'energia di legame. Nel nostro caso sarà poco meno di 100 keV. a questo punto l'elettrone viaggia nel mezzo depositando energia secondo la Bethe Bloch. L'assorbimento fotoelettrico dipende molto strettamente da Z del mezzo:

$$\begin{aligned} \sigma_f^K &\propto \frac{Z^n}{E^m} \\ n \approx 4 \div 5, \quad m \approx 2.7 \div 3.5 \end{aligned} \quad (16.7)$$

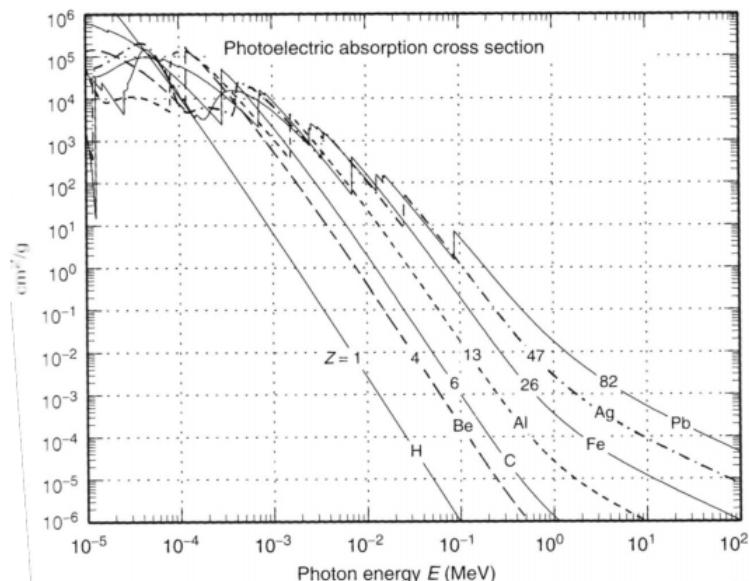


Figura 16.3: sezione d’urto in funzione dell’energia del fotone

Nel grafico della figura (16.3) vediamo dei *gradini* nella sezione d’urto: sono gli **spigoli di assorbimento**. Consideriamo il piombo: la sezione d’urto per energie più grandi di 80 keV è la probabilità della shell K, perché l’energia del fotone è ancora sufficiente per interagire con un elettrone che si trova su tale shell; quando l’energia non è più sufficiente si passa alla shell L, che è meno legata e quindi ha probabilità di interazione più bassa. Ogni volta che una shell interna diventa inutilizzabile la sezione d’urto ha un salto verso il basso.

Il piombo è un buon materiale per la schermatura da sorgente γ : se abbiamo una sorgente da 100 keV e facciamo scattering fotoelettrico sulla shell K del piombo si ha che esce un elettrone con energia di circa 20 keV che procede pochi millimetri e si ferma. Non stiamo però considerando che rimane una buca nella shell che, quando viene riempita produce un raggio γ da 80 keV, che viaggia di più! Questo effetto non emerge dalla formula del coefficiente di assorbimento!

DIFFUSIONE : è il fenomeno per cui un fotone viene diffuso da un elettrone atomico. Una cosa interessante è che esistono due tipi di diffusione: una sull’elettrone singolo: il fotone incide e cambia angolo avendo ceduto parte di energia (*diffusione compton/thomson*), oppure *diffusione coerente di Rayleigh*: è un processo simile all’altro ma al posto che avvenire sul singolo elettrone atomico avviene su tutto l’atomo, che viene visto come una carica elettrica totale che diffonde il fotone. Tutto l’atomo rincula e quindi l’energia ceduta all’atomo è insignificante. Essendo un processo coerente la sua probabilità è proporzionale a Z^2 ed è più probabile per energie tali per cui lunghezza d’onda del fotone incidente è comparabile con le dimensioni dell’atomo: il fotone in queste condizioni non vede caratteristiche dell’atomo.

La diffusione è importante nei processi di schermatura: non bisogna considerare come assorbito un fotone che ha solo cambiato direzione.

$$\sigma_R \approx \frac{8\pi}{2} r_0 Z^2 \quad (16.8)$$

Il processo che ci interessa di più è lo scattering Compton, cioè la diffusio-

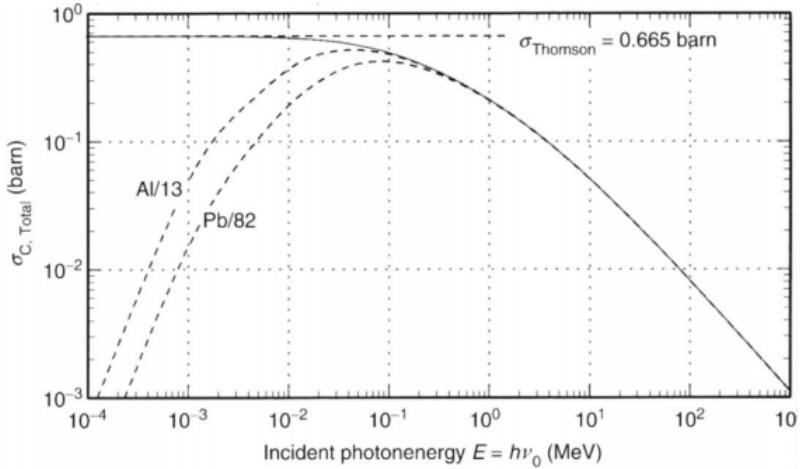


Figura 16.4: sezione d'urto Compton di Klein Nishina per un atomo libero

ne anelastica e incoerente sul singolo elettrone atomico, che avviene indifferentemente su tutti gli elettroni (non serve più che per la conservazione dell'energia l'elettrone sia legato). Nel grafico in figura (16.4) è riportata la sezione d'urto Compton di Klein Nishina. Nella realtà la sezione d'urto reale va a zero per energie che tendono a zero. Ad alta energia le curve sono uguali. La curva ha un massimo al centro, intorno ai 100 keV. La sezione d'urto Compton, a differenza di quella Rayleigh, è proporzionale a Z .

L'energia trasferita al singolo elettrone è data da:

$$E_e = E_\gamma \left[\frac{\epsilon(1 - \cos \theta)}{1 + \epsilon(1 - \cos \theta)} \right] \quad \epsilon = \frac{E_\gamma}{m_e c^2} \quad E_{gamma} = h\nu \quad (16.9)$$

L'energia ceduta dipende dall'angolo con cui fotone viene scatterato. La distribuzione segue approssimativamente la curva *continuo del compton* riportata nella figura (16.5). Questo spettro continuo di elettroni emessi ha un minimo per angolo pari a zero (il fotone procede e l'elettrone non acquista energia) e un massimo per back scattering. L'energia massima è data da:

$$E_e^{max} = E_\gamma \frac{2\epsilon}{1 + 2\epsilon} \quad (16.10)$$

Per energia sufficientemente grande il gap tra energia del fotone ed energia massima elettrone è la metà della massa dell'elettrone:

$$E_c = E_\gamma - E_e^{max} \rightarrow \frac{m_e c^2}{2} \quad (16.11)$$

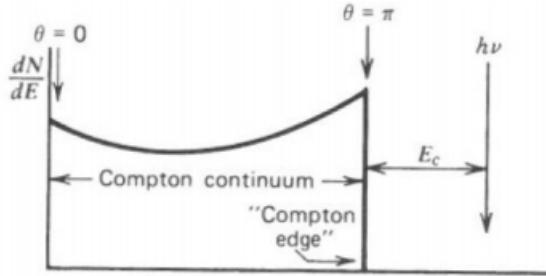


Figura 16.5: *Energia ceduta dal fotone*

L'effetto Compton prevede due particelle finali: il fotone scatterato e l'elettrone strappato dall'atomo dopo aver acquistato energia. È difficile che l'elettrone venga strappato dalle shell più interne con lo scattering Compton.

PRODUZIONE DI COPPIE (aumentiamo l'energia): L'energia del fotone deve essere maggiore dell'energia dovuta alla massa di positrone e elettrone. La produzione di coppie non può avvenire nel vuoto, ma deve avvenire nel campo elettrico di un nucleo (serve materia) o raramente nel campo elettrico di un elettrone. Se avviene nel campo elettrico del nucleo, il nucleo partecipa da spettatore, solo per avere conservazione dell'energia, ma non ne acquista. Se, invece, avviene nel campo elettrico generato dall'elettrone atomico, il nucleo partecipa e si hanno non più 2 elettroni emessi, ma 3: 2 elettroni e un positrone. Elettroni e positroni poi perderanno energia e il positrone si annichilirà con l'elettrone atomico emettendo due fotoni da 511 keV. Questi due fotoni costituiscono una radiazione secondaria che interagirà con il mezzo.

La sezione d'urto va come Z^2 : parte da zero, sale e si stabilizza ad una sezione d'urto limite:

$$\sigma_0 = 5.795 \times 10^{-4} Z^2 \text{ barn} \quad (16.12)$$

$$I = I_0 \exp\left(-\frac{N_A}{A} \rho \sigma_{pp}^{nucl} x\right) = I_0 \exp\left(-\frac{7}{9} \frac{x \rho}{X_0}\right) \quad (16.13)$$

$$X_0 \approx 170 \frac{A}{Z^2} \text{ g/cm}^2 \quad (16.14)$$

X_0 è la *lunghezza di radiazione*.

La bremsstrahlung e la produzione di coppie sono governate da questo X_0 , perché sono descritte dalle stesse formule dell'elettrodinamica. Questi due processi sono i principali che avvengono per elettroni ad alta energia.

Nella figura (16.6) possiamo vedere la combinazione dei processi per piombo e ossigeno: o domina la produzione di coppie o domina l'effetto fotoelettrico.

I tessuti organici sono costituiti per la maggior parte da acqua, e quindi da ossigeno, per questo è utile guardare l'ossigeno. I tessuti organici sono rappresentati bene anche dall'aria (in cui c'è ossigeno). Nella figura (16.7) possiamo

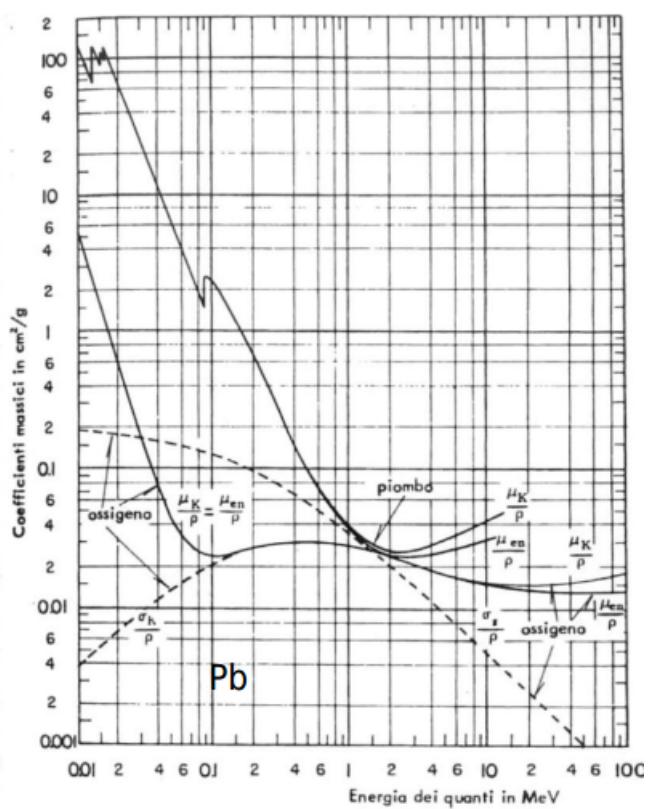


Figura 9.22. Coefficienti massici di trasferimento e di assorbimento di energia in ossigeno e piombo. Le curve tratteggiate rappresentano i coefficienti di diffusione σ_h / ρ e di trasferimento dell'effetto Compton in ossigeno.

Figura 16.6

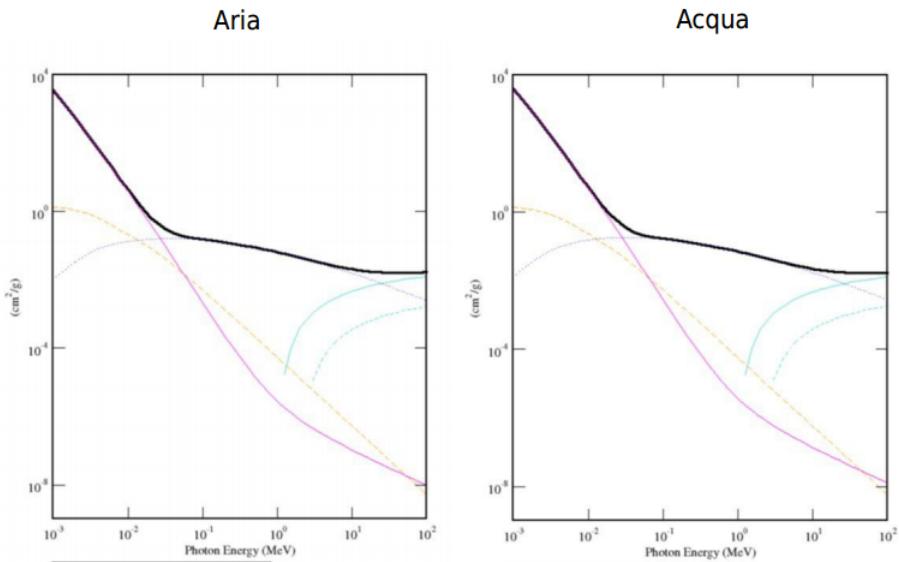


Figura 16.7

vedere, in scuro, l'attenuazione totale della sezione d'urto con scattering coerente.

I rivelatori di particelle (dosimetri) funzionano con l'aria!

A noi interessa:

- l'interazione delle particelle cariche con il tessuto organico per valutare il danno biologico
- l'interazione con i materiali per la produzione di schermature. A tal proposito possiamo concludere che:
 - relativamente all'effetto fotoelettrico, i materiali a basso Z diffondono maggiormente di quelli a alto Z
 - legno, plastica, pazienti, ... diffondono i raggi X
 - idrogeno: il Compton domina tra 3 keV e 70 MeV
 - carbonio: il Compton domina tra 25 keV e 25 MeV
 - i materiali a basso Z diffondono più che assorbire

In figura (16.8) viene plottato il rapporto tra sezione urto data dall'effetto Compton e effetto Rayleigh e la sezione d'urto totale: le curve dicono quale materiale è il più adatto per schermature (è quello con rapporto più basso).

16.2 I NEUTRONI

I **neutroni** insieme ai protoni costituiscono il nucleo, sono particelle neutre e pesanti, instabili se liberi (hanno una vita media di 15 minuti poi fanno un decadimento β debole). Non partecipano nelle interazioni elettromagnetiche,

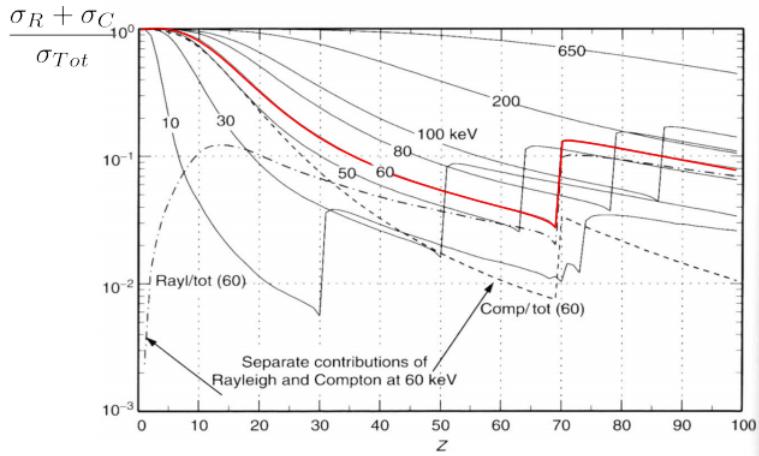


FIGURE 2.37 The ratio of scattering cross section (Rayleigh + Compton) to total cross section in all elements at selected energies. The ratio is a measure of the importance of scattering (a photon exits the interaction) to attenuation. At 60 keV, the separate contributions of Rayleigh/total and Compton/total are shown. The discontinuities in the curves are due to passing over the K edge of the corresponding element. The best x-ray shield at, say, 30 keV, that minimizes scattering for given attenuation is one made of elements $Z \sim 45\text{--}50$. Lead is best near 100 keV.

Figura 16.8

interagiscono solo fortemente, cioè solo con i nuclei (non con elettroni atomici come fanno le particelle direttamente ionizzanti e i fotoni). I neutroni possono solo cozzare contro i nuclei ed essendo neutri mentre il nucleo è carico, non si ha repulsione coulombiana.

I neutroni possono avere tre tipi di interazioni con i nuclei:

DIFFUSIONE elastica (n,n) o anelastica ($n,n\gamma$), (n,np), ($n,2n$), dots

CATTURA il neutrone viene assorbito dal nucleo che si eccita rilasciando eccitazione sotto forma di fotone (radiativa) o particella α o protone (non radiativa)

FISSIONE il neutrone incide sul nucleo che si rompe con produzione di altri neutroni e due frammenti nucleari

Le energie dei neutroni vengono catalogate con dei nomi:

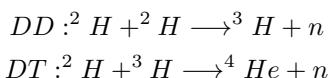
- neutroni *veloci* se hanno più di 0,5 eV
- sotto 0,5 eV distinguiamo i neutroni *lenti* in:
 - epitermici
 - termici : sono fondamentali per la protezionistica: nella diffusione elastica, che è il processo più comune, il neutrone rallenta fino a che l'energia termica (agitazione termica = energia cinetica) del mezzo che attraversa è confrontabile con la sua energia cinetica, quindi si ha scambio di energia tra i due! Il neutrone comincia a comportarsi come un gas in equilibrio termico con il materiale in cui si trova.

L'energia del neutrone non può mai essere inferiore all'energia termica del mezzo che attraversa, quindi ha un'energia minima che coincide con quella termica. I neutroni termici hanno energia uguale a quella dell'ambiente.

Cosa possiamo dire riguardo alla produzione di neutroni? Sono difficili da produrre, da fermare, da misurare, da capire. Che interazione fanno? sono dannosi: *brutta bestia!*. I neutroni termici sono praticamente un gas: la loro schermatura è quasi impossibile.

Esistono sorgenti di diverso tipo:

- fissione spontanea (californio): però ci sono i frammenti di fissione di cui tenere conto! Inoltre non è una sorgente monocromatica quindi si ha una distribuzione maxwelliana dell'energia dei neutroni.
- sorgenti composite basate sulla reazione nucleare: il nucleo viene bombardato. Per esempio il berillio (9Be) bombardato con particelle α carbonio(^{12}C) emettendo un neutrone. Il bello è che questa sorgente si accende e si spegne!
Si tratta di reazioni endotermiche, che si possono fare anche con berillio- γ o idrogeno- γ : sono quelle che si hanno in laboratorio.
- reattori nucleari: flussi molto elevati: $\approx 6 \times 10^{13}$ neutroni per secondo per kW.
- reazioni di fusione:



Generatori di neutroni portatili con trizio o deuterio in idruri metallici.

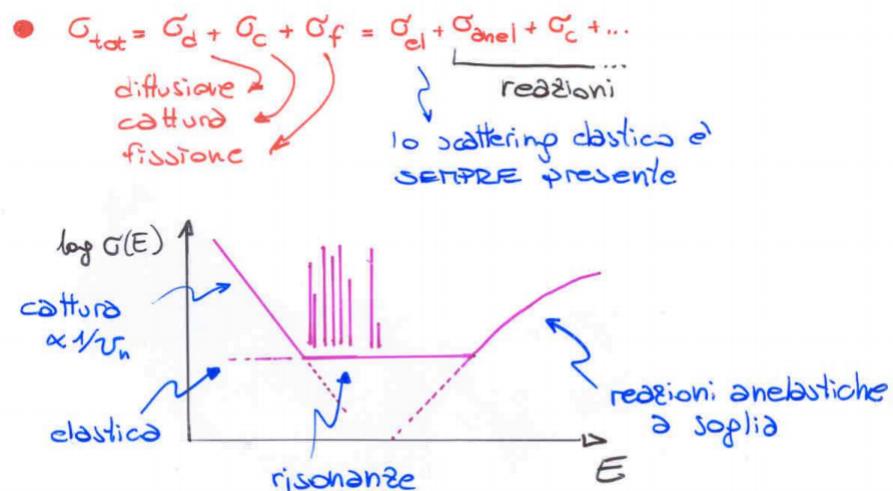


Figura 16.9: sezione d'urto totale per i neutroni

I neutroni come i fotoni interagiscono con una singola interazione e le interazioni si valutano in termini di sezione d'urto come per i fotoni. Il problema è che contrariamente ai fotoni in cui i termini della sezione d'urto totale sono ben parametrizzati, per i neutroni la situazione è meno chiara, come si può vedere nella figura (16.9). Le risonanze sono la caratteristica peculiare delle interazioni con i neutroni e sono individuali di ogni nucleo. Bisogna tener conto anche degli isotopi. Queste risonanze non sono calcolabili ma vanno misurate; esse si combinano in modo costruttivo e distruttivo.

La **risonanza** è un' amplificazione di una delle 3 sezioni d'urto già note, non è una quarta, diversa, sezione d'urto.

Esiste una costante di diffusione elastica. Diffusione e cattura possono essere descritti come se il nucleo fosse un atomo: quando arriva il neutrone si eccita e poi si dissecchia con riemissione di neutrone o emissione γ : questo spiega risonanza intesa come aumento della probabilità di questi processi quando il nucleo composto ha un' energia che corrisponde a quella di uno dei suoi livelli eccitati. Il nucleo quando aggiunge un neutrone cambia configurazione energetica: l'energia di eccitazione dipende da quella del neutrone incidente. Se l'energia di eccitazione coincide con uno dei livelli quantizzati eccitati del nucleo, si ha risonanza!

Il neutrone termico dà minimo contributo all'energia del nucleo.

Nel grafico della figura (16.10) possiamo osservare che il fatto che l'intera-

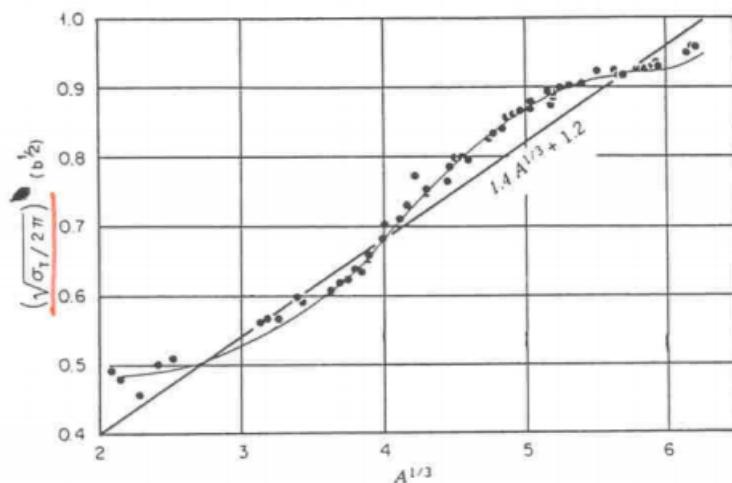


Figure 16.10 Total cross section for 14-MeV neutrons, plotted against $A^{1/3}$. The straight line represents $R + \lambda = 1.4A^{1/3} + 1.2$ fm, and it fits the data reasonably well. The curve through the data points is an improved calculation using the optical model. From G. R. Satchler, *Introduction to Nuclear Reactions* (Halstead: New York, 1980).

Figura 16.10

zione nucleo-neutrone sia assimilabile a due bocce che si scontrano dà senso a una sezione d'urto geometrica.

Le risonanze sono dei picchi lorentziani.

Capitolo 17

Lezione 6: 21 Aprile 2015

17.1 NEUTRONI

Quando i neutroni hanno energie dell'ordine del Mev (come nei reattori nucleari) in generale vengono diffusi elasticamente dai nuclei: la diffusione elastica ha una sezione d'urto molto maggiore di quella della cattura. I neutroni viaggiano in un mezzo, urtano i nuclei e ad ogni urto perdono energia fino a che la probabilità di cattura è molto elevata. L'altra possibilità è quella di decadere. Il processo di perdita di energia tramite urti è detto **moderazione o termalizzazione** e porta ad avere un *elettrone termico*: se non viene catturato l'energia non scende più perché è in equilibrio termico con il mezzo in cui si trova e ha energia media uguale a quella termica del mezzo. Si ottiene (tramite calcoli che non facciamo):

$$E'_n \approx E_n \frac{A^2 + 1 + 2A \cos \theta}{(1 + A)^2} \quad (17.1)$$

L'energia dipende dall'angolo con cui l'elettrone viene scatterato. Conviene introdurre il rapporto di energia in entrata e energia in uscita dato da:

$$\frac{E'_n}{E_n} \geq \frac{(A - 1)^2}{(A + 1)^2} = \alpha \quad (17.2)$$

cioè dal rapporto delle masse atomiche, indicato con α .

Sotto i 10 MeV lo scattering ha simmetria sferica nel centro di massa e la probabilità dP di diffusione in un angolo solido $d\Omega$ è proporzionale a $d\Omega$:

$$dP = \frac{d\Omega}{4\pi} = \frac{2\pi \sin \theta d\theta}{4\pi} = \frac{-d(\cos \theta)}{2} \quad (17.3)$$

La probabilità in funzione dell'energia è data da:

$$\frac{dP}{dE_n} = \frac{(1 + A)^2}{4AE_n} = \frac{1}{(1 - \alpha)E_n} \quad (17.4)$$

Il neutrone avrà un'energia compresa tra quella con cui entra nella materia e α volte quella incidente, come possiamo vedere in figura (17.1).

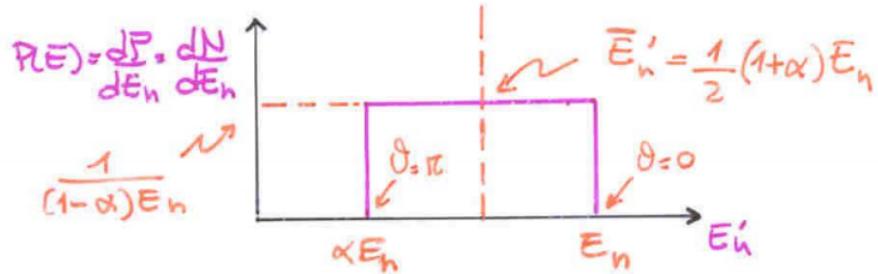


Figura 17.1: *energia del neutrone*

Ci interessa l'energia media del neutrone dopo lo scattering, data da:

$$\bar{E}'_n = \frac{1}{2}(1 + \alpha)E_n \quad (17.5)$$

L'energia trasferita al nucleo è data da:

$$E_A = \Delta E_n = E_n - E'_n = E_n \frac{2A}{(1+A)^2} (1 - \cos \theta) = E_n \frac{4A \sin^2(\frac{\theta}{2})}{(1+A)^2} \quad (17.6)$$

Vediamo che dipende dall'angolo di scattering. Definiamo la perdita di energia frazionaria come:

$$\frac{\Delta E_n}{E_n} = \frac{4A}{(1+A^2)} \sin^2\left(\frac{\theta}{2}\right) = f_E \quad (17.7)$$

Quando $\theta = \pi/2$ l'energia frazionaria media è:

$$\bar{f}_E = \frac{2A}{(1+A)^2} \quad (17.8)$$

L'idrogeno che è un atomo leggero ($A=1$) perde metà della sua energia, mentre il piombo (atomo pesante) ne perde solo l' 1%. Questo significa che quando un neutrone si sta termalizzando, cioè sta facendo scattering elastico in un mezzo, se il materiale è fatto di nuclei con A piccolo, la termalizzazione è rapida, se A è grande impiegherà molto più tempo. I mezzi con A piccolo (acqua o composti organici come polietilene) sono dei buoni moderatori, mentre i mezzi con A elevato non sono buoni moderatori. Nei reattori nucleari per innescare una reazione a catena e mantenerla servono neutroni termici, il moderatore che si usa è o l'acqua o il carbonio (grafite).

In un urto, se l'energia iniziale è E_0 , l'energia media del neutrone uscente dopo un urto è data da:

$$\langle E_1 \rangle = \frac{1}{2}(1 + \alpha)E_0 \quad (17.9)$$

Notiamo che la frazione media di energia che resta al neutrone dopo l'urto non dipende da E_0 :

$$\frac{\langle E_1 \rangle}{E_0} = \frac{1 + \alpha}{2} \quad (17.10)$$

Dopo due urti l'energia media del neutrone uscente è:

$$\langle E_2 \rangle = \frac{1 + \alpha}{2} \langle E_1 \rangle = \frac{1 + \alpha}{2} \frac{1 + \alpha}{2} E_0 = E_0 \left(\frac{\langle E_1 \rangle}{E_0} \right)^2 \quad (17.11)$$

Dopo n urti:

$$\langle E_n \rangle = E_0 \left(\frac{1 + \alpha}{2} \right) = E_0 \left(\frac{\langle E_1 \rangle}{E_0} \right)^n \quad (17.12)$$

Nel caso dell'idrogeno ($\alpha = 0$) l'energia media dopo n urti è:

$$\langle E_n \rangle = E_0 \frac{1}{2^n} \quad (17.13)$$

Questa trattazione semplicistica non va molto bene perché la distribuzione dell'energia ha una coda molto marcata, quindi si passa ai logaritmi dell'energia:

$$\xi = \langle \ln \frac{E_0}{E_1} \rangle = \ln E_0 - \langle \ln E_1 \rangle = \int_{\alpha E_0}^{E_0} \ln \left(\frac{E_0}{E_1} \right) P(E_1) dE_1 \quad (17.14)$$

$$P(E_1) = \frac{1}{(1 - \alpha) E_0} \quad (17.15)$$

Tramite dei calcoli alla fine si trova:

$$\xi = \langle \ln \frac{E_0}{E_1} \rangle = 1 + \frac{1}{1 - \alpha} \ln \alpha = 1 + \frac{(A - 1)^2}{2A} \ln \left(\frac{A - 1}{A + 1} \right) \approx \frac{2}{A} - \frac{3}{4A} + \dots \quad (17.16)$$

Per i principali elementi possiamo riassumere quanto trovato nella tabella in figura (17.2).

■ $E_0 = 1 \text{ MeV}$

A	1	2	12	14	56	207	238
Z	1	0.75	0.158	0.136	0.0353	0.0083	0.0023
n	17.5	24.1	111	129	496	1817	2082
H	D	C	N	Fe	Rb	U	

Figura 17.2: valori di A , ξ e n per i principali elementi

Dalla tabella ricaviamo la dimostrazione numerica del fatto che un materiale ad alto A ha bisogno di un numero molto elevato di urti per termalizzare il neutrone. Se vogliamo schermare i neutroni, quindi, non useremo un materiale ad alto Z, ma un materiale a basso Z come il polietilene o l'acqua (meno pratica), in cui i neutroni vengono rallentati fino a essere termici. Si miscela ad un materiale ad alto contenuto di idrogeno un materiale ad alta probabilità di cattura (come il boro). Nel reattore nucleare si ha acqua e calcestruzzo intorno.

Un altro fenomeno interessante per i neutroni è l'**interferenza e diffrazione** di neutroni (nella materia cristallina, come i fotoni). Anche al neutrone è associata una lunghezza d'onda di De Broglie, paragonabile alle distanze interne dei cristalli. Questo fenomeno è usato per fare monocromatori di neutroni, che selezionano neutroni con un'energia definita. Nel reattore si ha un flusso di neutroni termici in un canale e si utilizza un cristallo per selezionare quelli con una determinata energia.

17.2 NASCITA DELLA RADIOPROTEZIONE E EFFETTI BIOLOGICI DELLE RADIAZIONI IONIZZANTI

Velocissima carrellata storica della radioprotezione:

- 1895: scoperta raggi X da parte di Röntgen
- 1896: Becquerel scopre la naturale radioattività dell'uranio
- 1896: prime lesioni alla cute causate dai raggi X
- 1897: Becquerel scopre che i raggi X hanno degli effetti sull'organismo: dermatite da esposizione a radioattività.
- fine 1800: Curie capisce che si può produrre un eritema utile dal punto di vista terapeutico
- 1902: si osserva la degenerazione della dermatite da raggi X in carcinoma cutaneo
- 1903: Si riconosce che l'esposizione a raggi X causa sterilità negli animali e pochi anni dopo si osserva che gli embrioni di uova di rospo fertilizzate con sperma irradiato con raggi X presentano anomalie.
- 1904: vengono segnalate le prime anemie e leucopenie da raggi X
- intorno al 1920:
 - si manifestano necrosi e tumori ossei alla mandibola in operai addetti a dipingere le lancette di orologi luminescenti con vernici contenenti sali di radio (utilizzavano pennellini appuntiti che entravano in contatto con le labbra)
 - si nota che i minatori che lavorano nelle miniere di cobalto e pecten blenda, entrambe contenenti grosse percentuali di uranio soffrivano di tumore ai polmoni con una percentuale 30 volte superiore al resto della popolazione. Oggi sappiamo che erano vittime dell'esposizione interna al gas radon e ai suoi figli, prodotti dal decadimento dell'uranio.
- 1927: Müller mostra che l'esposizione a raggi X provoca alterazioni genetiche e mutazioni cromosomiche nel moscerino dell'aceto, trasmesse ai discendenti secondo le leggi dell'eredità biologica.
- 1940-1950: le ricerche a fini bellici, industriali ed energetici fanno emergere nuove patologie come le sindromi acute localizzate e quelle da panirradiazione.
- 1955: alla *International conference of pacific uses of atomic energy* di Ginevra viene riportata la notizia che fra i sopravvissuti di Hiroshima e Nagasaki si sono verificati 200 casi di leucemia, molti più del numero atteso in base alle caratteristiche endemiche della malattia

In conseguenza di tutte queste osservazioni vengono creati i primi enti internazionali per la radioprotezione: serviva un'unità di misura per quantificare radiazione e la prima introdotta è stata la dose da eritema. Nel 1925 nasce l'IICRU (International Commission on Radiation Units and Measurements), in cui si adotta il Roentgen. Nel 1928 nasce l'IRCP (International Commission on Radiological Protection).

La radioprotezione (o protezione sanitaria contro le radiazioni ionizzanti) è una disciplina a forte contenuto biologico, fisico, tecnico e naturalistico, che si è sviluppata durante il Novecento, dapprima con lentezza, poi con crescente rapidità. Essa ha l'obiettivo di preservare lo stato di salute e di benessere dei lavoratori, degli individui componenti la popolazione, della popolazione nel suo insieme, riducendo i rischi da R.I. nella realizzazione di attività umane che siano giustificate dai benefici che ne derivano alla società e ai suoi membri. In funzione del suo obiettivo, essa provvede inoltre alla tutela dell'ambiente.

Alla base della radioprotezione c'è una quantità biologicamente rilevante (cioè correlabile con gli effetti biologici): la **dose assorbita**, cioè l'energia assorbita per unità di massa:

$$D = \frac{dE}{dm} \quad (17.17)$$

dove dE è l'energia media ceduta dalle radiazioni ionizzanti alla materia in un elemento volumetrico e dm è la massa contenuta in tale elemento volumetrico. Si misura in J/kg, che prende il nome di *gray*. Siccome quello che interessa per calcolare la dose è la quantità di energia depositata in volume infinitesimo, l'energia media va valutata a partire dall'energia depositata localmente dalle particelle. Le particelle indirettamente ionizzanti depongono energia tramite quelle ionizzanti (elettroni, nuclei che rinculano, particelle α , protoni..), che vengono messe in moto da loro. L'energia viene *impartita* localmente da una particella carica. Entra quindi in gioco il LET (trasferimento lineare di energia), cioè la perdita di energia che dà un contributo locale. In pedice si indica l'energia massima trasferibile:

$$LET_{\Delta} = \left(\frac{dE}{dl} \right)_{\Delta} \quad (17.18)$$

Se $\Delta = 100$ LET_{100} indica le perdite di energia inferiori a 100 eV.

La tabella in figura (17.3) riassume i LET di diverse particelle.

Bisogna fare una distinzione tra alto e basso LET in quanto danno effetti diversi. Dalla tabella in figura (17.3) vediamo che in generale gli elettroni sono quasi sempre a basso LET: questo perché gli elettroni hanno un dE/dx più basso. Dal momento che i fotoni interagiscono con la materia tramite gli elettroni, anche loro sono a basso LET. Viceversa i protoni (che sono inizialmente a basso LET, ma appena perdono energia diventano ad alto LET) e le particelle α (alto LET per qualsiasi energia) sono particelle ad alto LET. I neutroni (non direttamente ionizzanti) tendono ad avere alto LET e trasferiscono energia a particelle ad alto LET.

A livello biologico quando la radiazione interagisce con i tessuti biologici, bisogna distinguere i vari livelli:

- singola cellula

TABLE 17-1
LET of Ionizing Particles of Radiobiological Interest

Particle	Charge	Energy (MeV)	LET (keV/ μm)
Electron	-1	0.001	12.3
		0.010	2.30
		0.100	0.42
		1.00	0.25
		200 kV _p x rays	0.4-36
		cobalt 60 γ rays	0.2-2
Proton	+1	small	92
		2	16
		5	8
		10	4
Alpha	+2	small	260
		5	95
Neutron	0	2.5	15-80 (peak at 20)
		14.1	3-30 (peak at 7)

Figura 17.3: *LET di diverse particelle*

- popolazione di cellule
- organi, tessuti, ... organismo
- popolazione (è l'effetto statistico epidemiologico quello che poi interessa alla radioprotezione).

Della **cellula** ci interessa quello che c'è all'interno del nucleo, cioè il patrimonio genetico organizzato in cromosomi (DNA arrotolato). L'oggetto su cui la radiazione agisce è il DNA. La cellula è fatta per lo più di acqua, quindi si ha l'interazione di fotone sull'acqua. Quando c'è l'interazione di una particella incidente sull'acqua abbiamo il trasferimento di energia a molecola d'acqua e si può avere ionizzazione o eccitazione della molecola. Il trasferimento di energia alla molecola d'acqua avviene in 10^{-15} secondi e si innescano processi della chimica dell'acqua che portano alla formazione dei radicali liberi. Se abbiamo ionizzazione abbiamo un elettrone libero, che può esserci anche nell'altro caso, e questo elettrone si lega all'acqua formando H_2O^- . Il radicale libero è l'idrogeno, cioè un atomo neutro con numero dispari di elettroni. Se invece la molecola eccitata non emette l'elettrone, si separa nei due radicali liberi H e OH . Un'altra cosa che succede è che quando si forma elettrone resta H_2O^+ , che porta alla produzione di radicali liberi con prodotto H_3O^+ .

Queste sostanze interagiscono con le molecole organiche presenti nella cellula: indicando con RH la generica molecola organica con un idrogeno, si ha:



dove R^\bullet è il radicale libero organico. La molecola in questione potrebbe essere un pezzo di DNA: avviene uno scambio per cui si riforma H_2 o H_2O e il radicale libero ritorna radicale libero organico: se è filamento di DNA si rompe! Il DNA può subire due danni:

- diretto: l'elettrone viene buttato fuori da molecola d'acqua e va a rompere direttamente il DNA;

- indiretto: si ha la formazione di un radicale libero su tempi molto più lunghi, che rompe la molecola di DNA.

Quindi i fotoni interagiscono in modo indiretto con il DNA o mettono in moto la particella carica che poi interviene direttamente. Particelle a basso LET causano un danno indiretto, quelle ad alto LET un danno diretto.

Il DNA è in grado di autoripararsi se si rompe solo una delle catene: sono danni relativamente poco gravi. Il danno grave è quello da doppia rottura: vengono rotti entrambi i filamenti e si ha la rottura della catena.

La particella a LET alto, avendo densità di ionizzazione più alta ha densità di danni più alta e quindi ha probabilità di provocare una doppia rottura nel DNA più elevata. Anche la particella a basso LET fa un danno doppio, se la dose è elevata.

Le cellule e il DNA sono più vulnerabili in certi periodi della loro esistenza: la cellula ha lo scopo di riprodursi raddoppiando quanto ha all'interno e nel ciclo vitale della cellula il momento di maggiore radiosensibilità è la mitosi, quando le cellule si separano e non hanno la capacità di rimarginare i danni.

C'è comunque una serie di fattori che determinano la capacità di fare danno della radiazione sulla cellula: effetti che dipendono sia dall'organismo che dal tipo di radiazione:

- dose assorbita e suscettibilità individuale: una caratteristica dell'esposizione a radiazione è che la soglia di effetto deterministico non è uguale per tutti (cellule e organismo).
- natura della radiazione: quando studiamo gli effetti della radiazione sulla popolazione della cellula ci si chiede quante cellule sopravvivono alla radiazione: quelle con danno doppio al DNA di solito muoiono. La differenza tra particella a alto o basso let, alta o bassa dose si vede nella frazione di sopravvivenza nella coltura di cellule. Sotto una certa soglia la sopravvivenza è quasi totale: la radiazione a basso LET, per dosi basse fa solo danni singoli, aumentando la dose totale aumenta la probabilità di fare due danni contemporaneamente. Per particelle ad alto LET non c'è una soglia: per qualsiasi dose c'è un minimo di mortalità che aumenta con la dose in modo esponenziale.

Non necessariamente tutte le particelle provocano rotture nel DNA contemporaneamente. Una dose elevata in un tempo più breve a una particella a basso LET la rende simile a una particella ad alto LET, come si osserva nel grafico (17.4).

Se la dose totale viene data con rate minori il danno è minore su cellule sane e maggiore su quelle tumorali. Il *frzionamento della dose* dà una maggiore efficienza.

- agenti chimici: le cellule tumorali tra una dose e l'altra si riossigenano, l'ossigeno influenza l'effetto della radiazione sulle cellule. Ci sono sostanze chimiche che facilitano in presenza di radiazione il danno al DNA e altre che le proteggono (sostanze radiosensibilizzanti o radioprotettive). L'ossigeno è radiosensibilizzante perché favorisce la formazione dei radicali liberi.

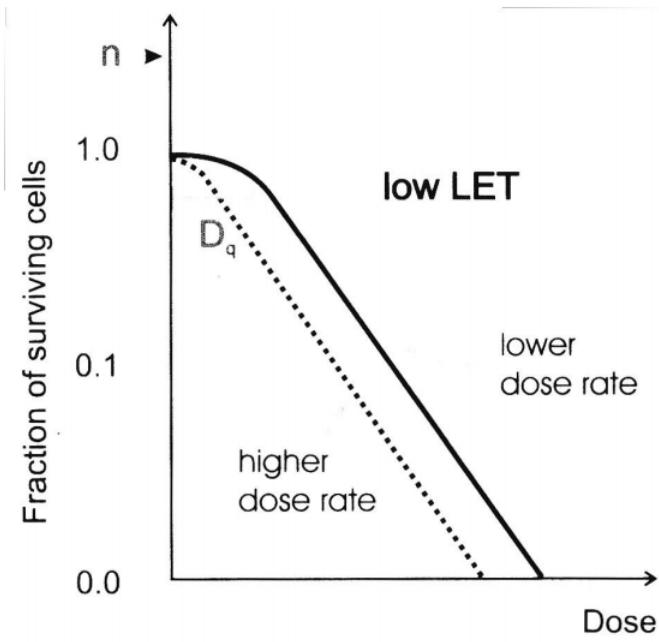


Figura 17.4: *frazione di cellule che sopravvivono in funzione della dose, per basso LET*

Classificazione degli effetti biologici

Nella figura (17.5) è riportata una schematizzazione degli effetti biologici della radiazione.

Se la cellula muore di solito è un danno deterministico immediato, se cellula non muore ma presenta un difetto al DNA che non viene corretto e viene trasferito ad altre cellule figlie si ha un danno stocastico.

I danni deterministici sono somatici, cioè riguardano l'individuo esposto, hanno una soglia e hanno le caratteristiche riportate nello schema in figura (17.6).

Le sorgenti γ irraggiano tutto il corpo e ogni organo avrà una certa dose. Nella tabella in figura (17.7) sono riportati gli effetti dell'esposizione a radiazione.

Nel caso di esposizione totale, per dosi di qualche Gy, si presentano problemi gravi: DL 50/60 è la dose per cui metà delle persone irradiate muoiono in 60 giorni. Nel caso di DL 100 la prima cosa che smette di funzionare è l'intestino, se la soglia supera il 15% il danno maggiore è al sistema nervoso centrale. Le dosi letali sono calcolate per persone che non vengono curate: con le cure si possono diminuire i danni e sopravvivere. Normalmente gli effetti deterministici si manifestano subito.

I danni stocastici hanno latenza lunga e le loro caratteristiche sono riportate nello schema in figura (17.8).

Anche per dosi basse non c'è una soglia e questi danni sono governati da una probabilità che aumenta con la dose. La relazione tra probabilità e dose a basse dosi è lineare. È difficile trovare una correlazione causa effetto, perché questi

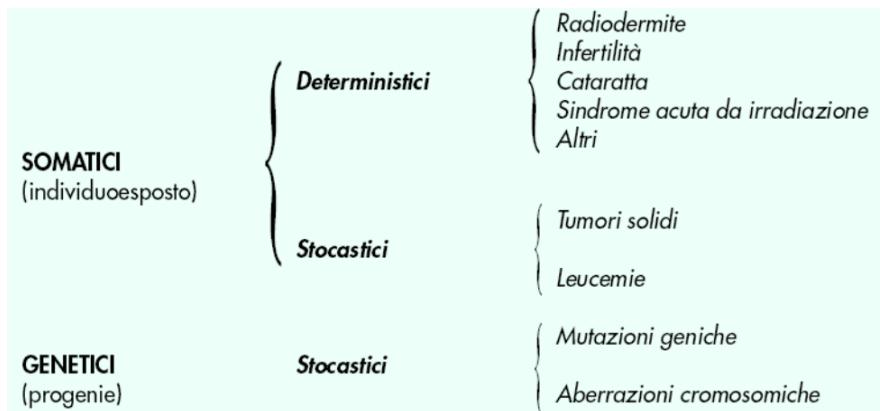


Figura 17.5: *classificazione degli effetti biologici prodotti dalla radiazione*

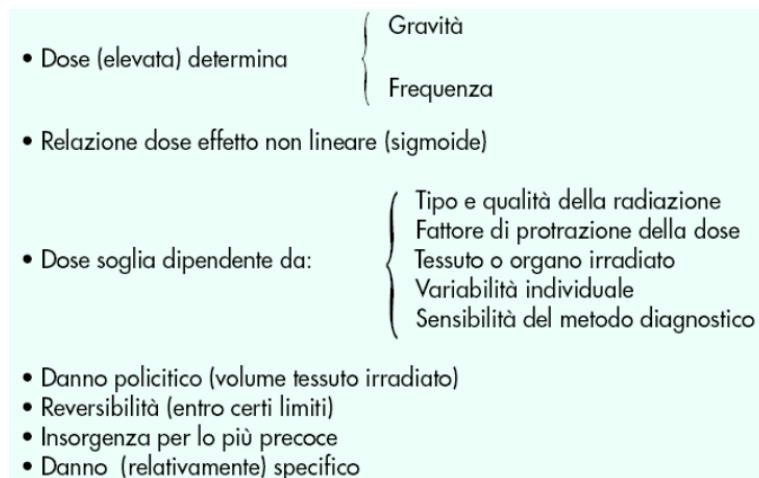


Figura 17.6: *caratteristiche dei danni deterministici*

EFFETTO	Dose soglia (Gy)
- Sterilità temporanea nel maschio per esposizione acuta	0.15
- Sterilità permanente nel maschio per esposizione acuta	3.5 - 6
- Sterilità permanente nella donna per esposizione acuta	2.5 - 6
- Opacità del cristallino (basso LET)	2 - 10
- Opacità del cristallino (alto LET)	1 - 3
- Depressione midollare	0.5
- DL 50/60	3 - 5
- DL 100	5 - 15 (10-20 giorni): sindrome G.I. > 15 (entro 5 giorni): sistema nervoso centrale

Figura 17.7: effetti dell'esposizione a radiazione

- Dose (anche molto bassa) $\left\{ \begin{array}{l} \text{Non determina la gravità (legge del "tutto o nulla")} \\ \text{Determina la probabilità di comparsa} \end{array} \right.$
- Relazione dose-effetto lineare passante per l'origine.
- Dose soglia supposta assente per i fini della radioprotezione.
- Danno monocitico.
- Latenza lunga o molto lunga.
- Assenza di reversibilità.
- Danno aspecifico.

Figura 17.8: caratteristiche dei danni stocastici

danni non sono causati solo dalla radiazione. Non è facile avere dati su cui lavorare: le fonti di dati sperimentali sono:

- Life Span Study: studi epidemiologici sui sopravvissuti ai bombardamenti di Hiroshima e Nagasaki
- Incidenti (reattori nucleari, sorgenti industriali)
- Studi su animali
- Esposizione a radiazione per scopi medici (anni 1930-1950)
- Radium dial painters
- Minatori in miniere di uranio: esposizione al radon come causa dell'elevato tasso di insorgenza di tumori polmonari

La fonte principale sono i LSS (life span study) sui sopravvissuti ai bombardamenti, che però presentano una difficoltà intrinseca: bisogna riuscire a stimare quanto è stata irraggiata la popolazione. Con tecniche montecarlo si è riusciti a ricostruire l'esposizione delle singole persone, sono anche migliorati i modelli per capire cosa è successo alla bomba quando è esplosa: una bomba significa alte dosi e alte rate di dosi.

In figura (17.9) è riportato il grafico che descrive la probabilità di danni in funzione della dose.

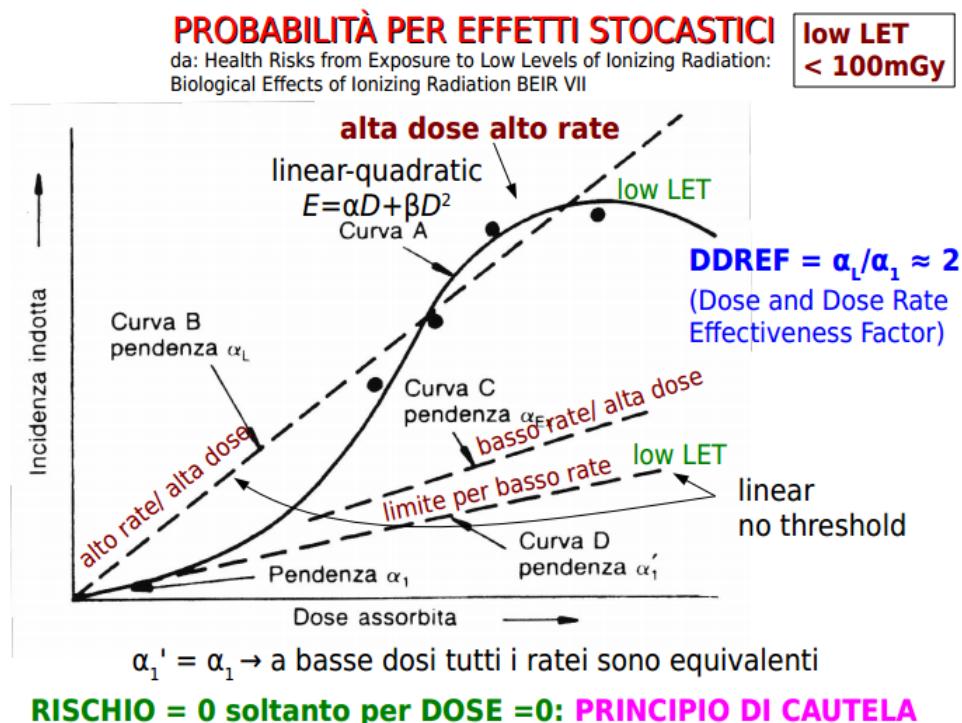


Figura 17.9: probabilità in funzione della dose assorbita

Dal grafico possiamo capire come si traducono i danni in qualcosa di quantificabile sui rischi della popolazione, soprattutto per i danni stocastici. La dose è in ascissa, mentre la probabilità di incidenza del danno stocastico è in ordinata. Ci si focalizza sulle particelle a basso LET e meno di 0.1 Gy.

Vogliamo stabilire i limiti per sicurezza che stanno nella regione a basse dosi. Il modello che ci serve deve dire come reagiscono dal punto di vista biologico il DNA e le altre componenti dell'organismo. Il modello che si ritiene più adeguato è quello *lineare quadratiko* in cui la componente lineare indica l'effetto della singola rottura del DNA, mentre la componente quadratica l'effetto della doppia rottura: all'aumento della dose la parte quadratica diventa dominante fino a saturazione. A basse dosi tende a dominare il termine lineare, il problema è che i dati che abbiamo stanno nello dosi alte, con alto tasso di irraggiamento! La curva lineare dipende dal tasso di dose. Quello che si può fare è interpolare i dati con una retta che passa per l'origine, con pendenza α_L : i dati per alta dose vengono estrapolati a bassa dose. A noi interessa il limite a bassa dose, che è l'asintoto per la curva ad alta dose (linea continua). Si calcola un termine DDREF che dice quanto la pendenza va ridotta per tener conto del fatto che ci interessano gli effetti per ratei di dose bassa:

$$DDREF = \frac{\alpha_L}{\alpha_1} \approx 2 \quad (17.21)$$

Ci sono termini correttivi empirici per correggere l'errore per eccesso che è stato fatto con l'estrapolazione. Questo fattore cambia negli anni ed è il termine alla base dei limiti legislativi per le basse dosi.

Altro aspetto fondamentale è che sono estrapolazioni lineari senza soglie: si assume che la curva passi nello zero, che significa che non ho rischio solo se non ho dose. Questo è alla base del principio di cautela: non sapendo se c'è una soglia facciamo che non c'è soglia e che passa per lo zero. I limiti di legge sono dell'ordine dei mGy.

A partire da tutti questi dati sono state sviluppate commissioni che vogliono stabilire dei limiti: si passa dalle curve di probabilità ad una stima della relazione tra esposizione e tumore, alla stima costi/benefici, ecc. La stima del fattore di detramento consiste nel quantificare la probabilità di sviluppare un tumore in funzione dell'esposizione: i dati sono riportati nella tabella in figura (17.10). I lavoratori adulti si differenziano da popolazione per la fascia di età: hanno diverse distribuzioni di età! Questi documenti si occupano di stabilire il giusto rischio. Negli anni si passa dalla mortalità per tumore all'incidenza e non si considera più solo il tumore, ma anche gli effetti ereditari (rischio basato su statistiche su animali ma mai osservato nell'uomo).

**COEFFICIENTI NOMINALI DI PROBABILITÀ PER EFFETTI
STOCASTICI (ICRP 60, 1990)**

POPOLAZIONE	Detrimento (10^{-2} Sv^{-1})			
	Tumori letali	Tumori non letali	Effetti ereditari gravi	Totale
LAVORATORI ADULTI	4.0	0.8	0.8	5.6
POPOLAZIONE GENERALE	5.0	1.0	1.3	7.3

N.B.: i coefficienti per i lavoratori sono di circa il 40% inferiori a quelli per la popolazione in generale in considerazione della diversa distribuzione delle età

Figura 17.10: coefficienti di probabilità di detrimento per effetti stocastici

Capitolo 18

Lezione 7: 28 Aprile 2015

18.1 INTRODUZIONE ALLA DOSIMETRIA

ICRU E ICRP sono enti preposti a stabilire le normative, le linee guida e le grandezze da utilizzare in radioprotezione. Esiste una gerarchia di grandezze:

- Le grandezze radiometriche descrivono un campo di radiazioni, cioè ci sono sorgenti radioattive che emettono radiazioni nello spazio secondo una distribuzione spaziale.
- Le grandezze dosimetriche mi dicono come le radiazioni trasferiscono energia al mezzo in cui passano.
- Le grandezze protezionistiche si usano per stabilire limiti di legge.
- Le grandezze operative verificano il fatto che le grandezze protezionistiche siano rispettate.

18.1.1 Grandezze radiometriche

Grandezze radiometriche:

- attività (A):

$$A = \lambda N = \frac{dN}{dt} \quad (18.1)$$
$$\lambda = \frac{\ln 2}{\tau_{1/2}} \quad N(t) = N_0 e^{-\lambda t}$$

- fluenza delle particelle (flusso per unità di superficie):

$$\Phi = \frac{dN}{da} \quad [m^{-2}] \quad (18.2)$$

- intensità di fluenza delle particelle (flusso):

$$\dot{\Phi} = \frac{d\Phi}{dt} = \frac{d^2N}{da \cdot dt} \quad [m^{-2}s^{-1}] \quad (18.3)$$

- fluenza di energia (energia trasportata dalle particelle per unità di superficie):

$$\Psi = \frac{dE}{da} \quad [Jm^{-2}] \quad (18.4)$$

- intensità di fluenza dell'energia:

$$\dot{\Psi} = \frac{d\Psi}{dt} = \frac{d^E}{da \cdot dt} \quad [Jm^{-2}s^{-1}] = [Wm^{-2}] \quad (18.5)$$

18.1.2 Grandezze dosimetriche

Quantificano la cessione di energia al mezzo: la cessione avviene in diversi step. La particella neutra passa nel mezzo, interagisce con il nucleo o con l'elettrone e passa energia alla particella direttamente ionizzante, come possiamo vedere nel grafico in figura (18.1).

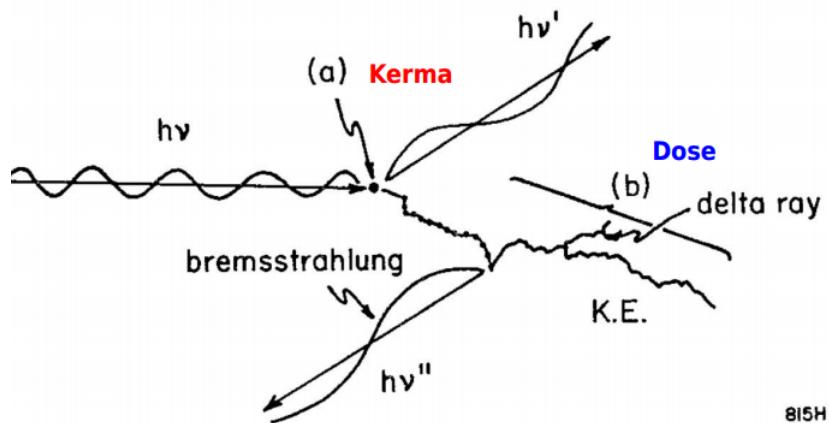


Figura 18.1: cessione di energia al mezzo da parte di una particella neutra

Il mezzo di cui parliamo è il tessuto biologico.

La quantità che descrive in maniera stocastica la cessione di energia dal fotone alla particella direttamente ionizzante è il **kerma**, mentre la quantità di energia poi depositata dalla particella direttamente ionizzante è la **dose**. Nel deporre energia lungo il percorso l'energia può sfuggire senza contribuire alla dose (processo di bremsstrahlung).

Sono quantità fisiche definite in un punto e non sono utili per la protezionistica, ma permettono di stabilire standard di calibrazione dello strumento di rivelazione della radiazione.

Ora limitiamo il discorso al fotone, ma lo stesso ragionamento va bene anche per elettrone. Se definiamo volume un intorno all'interazione per descrivere i vari processi, questo volume nel campo di radiazione ha un'energia radiante che entra e una che esce (per particelle neutre e per particelle caricate). Il nostro obiettivo è quello di misurare dose. La dose deposta in un certo volume è la differenza, in un certo senso, di quello che entra e di quello che esce.

Definiamo:

- Energia impartita:

$$\varepsilon = R_{in} - R_{out} + \Sigma Q = (R_{in})_u - (R_{out})_u + (R_{in})_c - (R_{out})_c + \Sigma Q \quad (18.6)$$

Dove u indica la particella neutra (uncharged) e c la particella carica (charged). ΣQ è l'energia netta spesa per aumento della massa a riposo (questo perchè nel volumetto possono esserci delle conversioni di energia dalla massa all'energia del fotone per decadimento del nucleo).

È una quantità legata alla dose.

- Energia trasferita:

$$\varepsilon_{tr} = (R_{in})_u - (R_{out})_u^{non-r} + \Sigma Q \quad (18.7)$$

È una quantità legata al kerma. Si riferisce alle particelle neutre. Dove $(R_{out})_u^{non-r}$ è l'energia delle particelle neutre uscente dal volume eccetto perdite radiative.

- Energia netta trasferita (al netto delle perdite radiative):

$$\begin{aligned} \varepsilon_{tr}^n &= (R_{in})_u - (R_{out})_u^{non-r} - R_u^r + \Sigma Q = \\ &= \varepsilon_{tr} - R_u^r \rightarrow (R_{in})_u - (R_{out})_u \quad (V \rightarrow 0) \end{aligned} \quad (18.8)$$

Le particelle neutre che possono uscire sono uno fotone degradato dall'interazione l'altro un fotone di bremsstrahlung (fotone radiativo), che non vogliamo contare perchè è già incluso nell'energia trasferita dal fotone entrante. È l'energia trasferita all'elettrone esclusa quella persa poi in modo radiativo dall'elettrone (non solo nel volume).

Capiamo il senso di ΣQ : supponiamo che nucleo decada emettendo un fotone $h\nu_1$. Se calcolo l'energia impartita non considerando ΣQ ho che l'energia nel volume diminuisce, il che non ha senso. Se considero ΣQ ho un bilancio:

$$\varepsilon = 0 - h\nu_1 + \Sigma Q = 0 \quad (18.9)$$

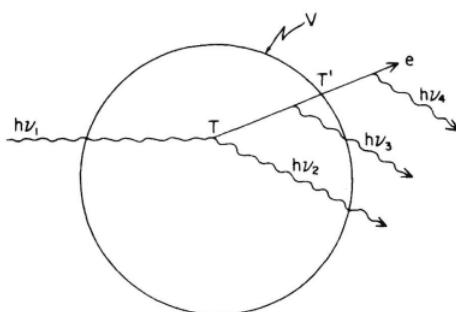


FIGURE 2.1a. Illustration of the concepts of energy imparted, energy transferred, and net energy transferred for the case of a Compton interaction followed by bremsstrahlung emission (Atlas, 1983).

Figura 18.2: fotone che penetra nel mezzo e fa scattering Compton

Un altro esempio: abbiamo un fotone ($h\nu_1$) che entra nel volumetto, fa scattering

Compton e il fotone scatterato di energia $h\nu_2$ esce. Nel punto di scattering l'energia vale T . Per bremsstrahlung viene emesso un fotone $h\nu_3$. Nel punto di uscita l'energia cinetica che è rimasta all'elettrone è T' . L'elettrone uscito dal volumetto emette un fotone $h\nu_4$. (figura (18.2)).

Otteniamo:

$$\varepsilon = h\nu_1 - (h\nu_2 + h\nu_3 + T') + 0 \quad (18.10)$$

$$\varepsilon_{tr} = h\nu_1 - h\nu_2 + 0 = T \quad (18.11)$$

$$\varepsilon_{tr}^n = h\nu_1 - h\nu_2 - (h\nu_3 + h\nu_4) + 0 = T - (h\nu_3 + h\nu_4) \quad (18.12)$$

Altro caso (figura (18.3)): il nucleo decade nel volume e produce un fotone che fa produzione di coppie elettrone-positrone e poi il positrone si annichila. Si hanno solo particelle neutre che escono dal volume.

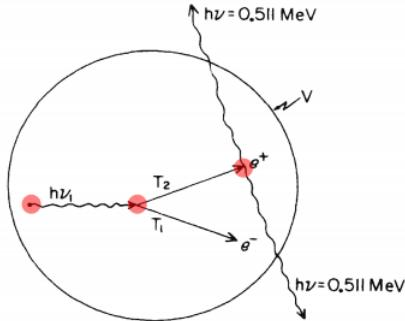


FIGURE 2.1b. Example involving γ -ray emission, pair production, and positron annihilation (Attix, 1983).

Figura 18.3: decadimento del nucleo nel volumetto di tessuto biologico

A differenza del caso precedente, il fotone emesso nel volume trasferisce energia sempre nel volume. T_1 e T_2 sono le energie cinetiche di elettrone e positrone. -1.022 MeV è l'energia che se ne va per annichilazione dell'elettrone, tramite i fotoni che escono. Otteniamo:

$$\varepsilon = \varepsilon_{tr} = \varepsilon_{tr}^n = 0 - 1.022 \text{ MeV} + \Sigma Q = h\nu_1 - 1.022 \text{ MeV} \quad (18.13)$$

$$\Sigma Q = h\nu_1 - 2m_0 c^2 + 2m_0 c^2 = h\nu_1 \quad (18.14)$$

$$\varepsilon = \varepsilon_{tr} = \varepsilon_{tr}^n = h\nu_1 - 1.022 \text{ MeV} = T_1 + T_2 \quad (18.15)$$

Nel caso di annichilazione in volo (il positrone ha ancora energia cinetica T_3) si ha un'altra perdita radiativa:

$$\varepsilon = 0 - (1.022 \text{ MeV} + T_3) + h\nu_1 = T_1 + T_2 - T_3 \quad (18.16)$$

$$\varepsilon_{tr} = 0 - 1.022 \text{ MeV} + h\nu_1 = T_1 + T_2 \quad (18.17)$$

$$\varepsilon_{tr}^n = 0 - (1.022 \text{ MeV} + T_3) + h\nu_1 = T_1 + T_2 - T_3 \quad (18.18)$$

Il **Kerma** è l'energia cinetica rilasciata nella materia, ed è definito come l'energia trasferita alle particelle cariche per unità di massa nel punto di interesse, includendo le perdite radiative. È definito come differenziale dell'energia trasferita

su un elemento infinitesimo di massa:

$$K = \frac{d\varepsilon_{tr}}{dm} \quad [J/kg] \quad (18.19)$$

Incluse anche quelle che le particelle cariche perderanno in modo radiativo. È una grandezza non stocastica, con un valore di aspettazione e una fluttuazione statistica. È una quantità interessante perché è calcolabile sfruttando quanto visto per le interazioni di fotoni. Come si calcola?

Ricordiamo le interazioni dei fotoni con la materia: ci sono tre processi che danno un'attenuazione esponenziale del fascio:

$$\frac{I}{I_0} = e^{-\mu x} \quad (18.20)$$

dove il coefficiente di attenuazione è dato dalla somma dei coefficienti dei tre processi:

$$\mu = \tau + \sigma + \kappa \quad (18.21)$$

Possiamo definire:

- Libero cammino medio:

$$\lambda = \frac{1}{\mu} \quad [cm] \quad (18.22)$$

- Coefficiente massico di attenuazione:

$$\mu' = \frac{\mu}{\rho} \quad [cm^2/g] \quad \Rightarrow x' = x\rho \quad [g/cm^2] \quad (18.23)$$

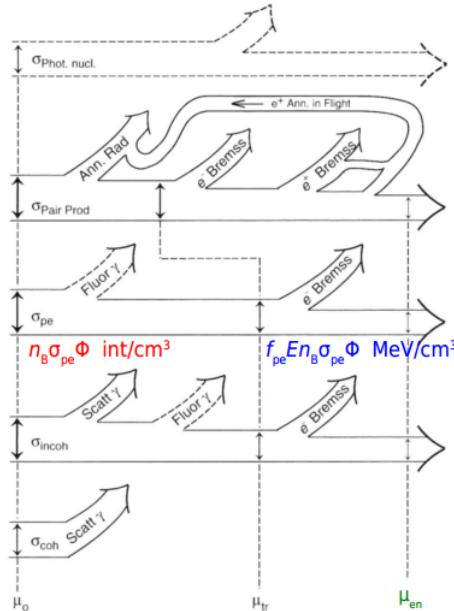


Figura 18.4: *interazione dei fotoni con la materia*

Dalla figura (18.4) ricaviamo che quando abbiamo una fluenza di fotoni che attraversa la materia di spessore dx , si ha che:

$$\frac{d\Phi}{dx} = -\mu_0 \Phi \quad (18.24)$$

Questo diagramma mostra il flusso di fotoni che possono interagire con la materia in varie maniere. La sezione d'urto del processo fotoelettrico dà la probabilità di interazione, cioè il numero di interazioni per centimetro cubo:

$$\frac{N}{cm^3} = n_B \sigma_{pe} \Phi \quad (18.25)$$

Il fotone che interagisce con la materia non deposita tutta l'energia negli elettroni (l'energia di legame va in altri modi in fotoni). Il kerma è l'energia del fotone o l'energia di legame dell'elettrone. Quanto è la frazione di energia trasferita agli elettroni per unità di spessore x ?

$$\frac{d\Psi}{dx} = -\mu_{tr} \Psi \quad \Rightarrow \quad \Psi(x) = \Psi_0 e^{-\mu_{tr} x} \quad (18.26)$$

Si ha un trasferimento esponenziale di energia nel mezzo. Nel caso di effetto fotoelettrico, la sezione d'urto è:

$$\tau = \tau_K + \tau_L + \dots \quad (18.27)$$

Dove K e L indicano le varie shell.

La frazione di energia emessa come radiazione caratteristica nell'effetto fotoelettrico è data da:

$$\frac{\tau_K}{\tau} \frac{E_K}{h\nu} \omega_K + \frac{\tau_L}{\tau} \frac{E_L}{h\nu} \omega_L + \dots = \frac{\delta}{h\nu} \quad (18.28)$$

dove δ è l'energia media emessa come fluorescenza per ogni fotone assorbito: è quindi una quantità di energia che non va in radiazione.

La stessa cosa si ha anche per effetto Compton.

Coefficiente massico di attenuazione totale:

$$\frac{\mu}{\rho} = \frac{\tau}{\rho} + \frac{\sigma}{\rho} + \frac{\kappa}{\rho} \quad (18.29)$$

Coefficiente massico di trasferimento di energia:

$$\frac{\mu_{tr}}{\rho} = \frac{\tau}{\rho} \left(1 - \frac{\delta}{h\nu} \right) + \frac{\sigma}{\rho} \left(\frac{T_{avg}}{h\nu} \right) + \frac{\kappa}{\rho} \left(1 - \frac{2m_e c^2}{h\nu} \right) \quad (18.30)$$

Il kerma è l'energia cinetica trasferita all'elettrone nell'interazione, ma parte di questa energia va in perdite radiative. Possiamo dividere il kerma in due termini:

$$K = K_{coll} + K_{rad} \quad (18.31)$$

dove $coll$ indica collisione. K_{coll} è l'energia trasferita alle particelle cariche per unità di massa nel punto di interesse, escludendo le parti radiative:

$$K_{coll} = \frac{d\varepsilon_{tr}^n}{dm} \quad [J/kg] \quad (18.32)$$

Coefficiente massico di energia di assorbimento di energia:

$$\frac{\mu_{en}}{\rho} = \frac{\mu_{tr}}{\rho} (1 - g) \quad (18.33)$$

dove g è la frazione di energia dissipata in radiazione di frenamento, cioè in funzione dell'energia degli elettroni persa in bremsstrahlung.

Riassumendo:

- μ_{tr} determina l'energia ceduta dai quanti alla radiazione corpuscolare associata
- μ_{en} determina l'energia che la radiazione corpuscolare dissipata in collisioni quindi:

$$\mu_{en} < \mu_{tr} \quad (18.34)$$

Come è legato μ_{tr} al kerma? Supponiamo di avere uno spessore x di materiale e un fascio uniforme parallelo monoenergetico di fotoni che incide: i fotoni che attraversano, si fermano, scatteranno. Il fascio è caratterizzato, per unità di tempo, da fluenza e fluenza di energia. Il flusso nello spessore si attenua con una legge esponenziale in cui compare il coefficiente di assorbimento standard:

$$\dot{\Phi} = \dot{\Phi}_0 e^{-\mu x} \quad (18.35)$$

$$\dot{\Psi}_0 = \dot{\Phi}_0 h\nu \quad (18.36)$$

L'elettrone a cui viene ceduta energia ne può perdere in bremsstrahlung e quindi usiamo μ_{en} :

$$\dot{\Psi} = \dot{\Psi}_0 e^{-\mu_{en}x} \quad (18.37)$$

Se lo spessore è piccolo $\mu_{en}x \ll 1$, approssimo con lo sviluppo di Taylor:

$$\dot{\Psi} \approx \dot{\Psi}_0 (1 - \mu_{en}x) \quad (18.38)$$

Consideriamo ora la superficie A dello spessore, irraggiata con un fascio parallelo. A copre un volume Ax , che ha massa $m = Ax\rho$. quando Ψ varia da Ψ_0 a Ψ su questa area, il tasso di assorbimento di energia è:

$$(\dot{\Psi}_0 - \dot{\Psi})A \approx \dot{\Psi}_0 \mu_{en} x A \quad (18.39)$$

mentre il tasso di assorbimento per unità di massa è:

$$\frac{\dot{\Psi}_0 \mu_{en} x A}{\rho A x} = \dot{\Psi}_0 \frac{\mu_{en}}{\rho} = \dot{K}_{coll} \quad (18.40)$$

Quindi la relazione tra kerma e fluenza è data da:

$$K = \Phi \cdot E \left(\frac{\mu_{tr}}{\rho} \right)_{E,Z} \quad (18.41)$$

La relazione tra kerma e fluenza di energia è:

$$K = \Psi \left(\frac{\mu_{tr}}{\rho} \right)_{E,Z} \quad (18.42)$$

Escludendo le perdite radiative otteniamo K_{coll} :

$$K_{coll} = \Psi \left(\frac{\mu_{en}}{\rho} \right)_{E,Z} \quad (18.43)$$

Il kerma è una quantità determinabile a partire da processi fisici di base come l'interazione fotone-elettroni atomici.

Materiali interessanti in protezionistica sono: muscolo, osso, grasso, aria e acqua. Il μ_{tr} di aria, acqua e muscolo sono molto simili, mentre μ_{tr} di muscolo, osso e grasso sono molto diversi a bassa energia, come si osserva nei grafici in figura (18.5).

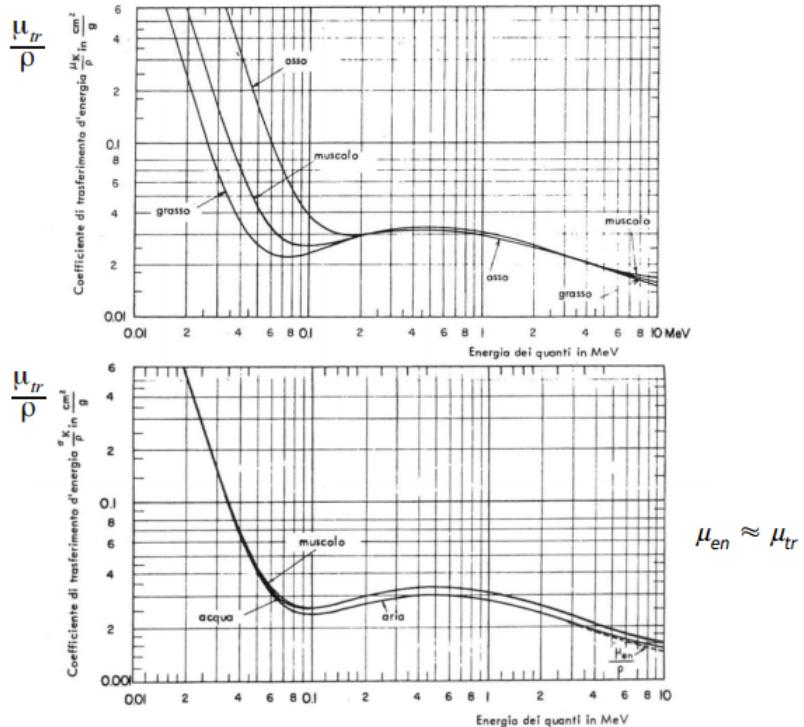


Figura 18.5: μ_{tr} di vari materiali di interesse in radioprotezione

Esposizione

L'esposizione è una quantità strettamente correlata al kerma e di discreta utilità pratica. È la prima quantità dosimetrica introdotta per descrivere quanti raggi X sono in grado di ionizzare un mezzo, ed è specializzata nella ionizzazione di fotoni in aria.

$$X = \frac{dQ}{dm} [\text{C/kg}] \quad (18.44)$$

È l'energia trasferita da un campo di fotoni a un campo di elettroni. La dose di esposizione permette la realizzazione di strumenti in grado di essere usati come standard di calibrazione primari, che calibrano altri strumenti.

L'esposizione è una carica per unità di volume: dQ è il valore assoluto della carica totale dovuta agli ioni di un segno prodotta quando tutti gli elettroni e i positroni liberati dai fotoni in una massa dm d'aria sono completamente fermati dall'aria (non si considerano le perdite per radiazione di frenamento). In pratica il volume contenente dm di aria è esposto al campo di fotoni: i fotoni che interagiscono in dm cedono energia agli elettroni e essendo l'aria un materiale a bassa densità, gli elettroni messi in moto in dm si spargono ovunque e depongono energia in un volume molto più grande. Quando l'elettrone messo in moto dal fotone perde energia, parte va in produzione di coppie distribuite lungo tutto il percorso dell'elettrone. dQ è il totale di tutta la carica prodotta dagli elettroni **messi in moto in dm** , finché gli elettroni non si fermano! È la carica anche fuori da dm !!!

L'esposizione è in pratica l'equivalente del K_{coll} per X e γ in aria.

Relazione tra esposizione e kerma:

$$X = \frac{dQ}{dm} = \Phi \cdot E_\gamma \left(\frac{\mu_{en}}{\rho} \right)_{E, \text{aria}} \cdot \frac{1}{W_{\text{aria}}} e \quad (18.45)$$

dove W è l'energia media per creare una coppia. Si ottiene:

$$X = 1.8 \times 10^{-8} \Phi E_\gamma \left(\frac{\mu_{en}}{\rho} \right)_{E, \text{aria}} \quad (18.46)$$

L'esposizione ci interessa perché la sua misura in aria ci dà il kerma per collisione nel tessuto biologico su un range di energie utile. Il kerma in aria e l'esposizione in aria sono circa uguali, sono quantità equivalenti. Come possiamo vedere nel grafico in figura (18.6), il rapporto tra i kerma si riduce al rapporto tra i μ_{en} .

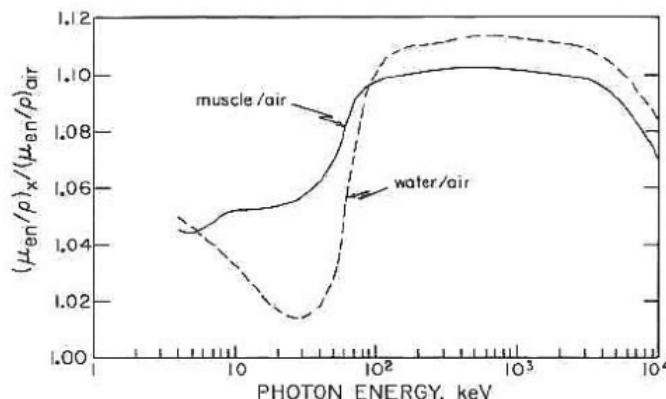


FIGURE 2.2a. Ratio of mass energy-absorption coefficients for muscle and water relative to air. [Based on data of Hubble, as given by Evans (1968) for $h\nu > 0.15$ MeV, and by Greening, (1972) for $h\nu \leq 0.15$ MeV.]

Figura 18.6: rapporto tra i μ_{en}

Capitolo 19

Lezione 8: 5 Maggio 2015

19.1 INTRODUZIONE ALLA DOSIMETRIA

Ci resta da capire come collegare il Kerma alla dose. La dose viene rilasciata nel mezzo dalle particelle direttamente o indirettamente ionizzanti. È definita su un volume che tende a zero quindi ad un certo punto la traccia della particella direttamente ionizzante uscirà da questo volume e quindi l'energia non verrà tutta depositata all'interno di quel volume. Il kerma invece è una quantità puntuale, cioè guardo cosa succede in quel punto.

C'è un trucco: la *dose assorbita* è l'energia impartita per unità di massa del mezzo irradiato:

$$D = \frac{d\varepsilon}{dm} \quad (19.1)$$

Vale per qualsiasi tipo di radiazione ionizzante. Il nostro obiettivo è il calcolo della dose assorbita in un certo mezzo. Si può anche definire la dose rispetto al tempo:

$$\dot{D} = \frac{dD}{dt} \quad (19.2)$$

La dose e il kerma sono collegati quando si verifica la condizione di *equilibrio delle particelle cariche* (CPE). Cioè: preso un volumetto che tende a 0 di massa dm , la condizione di CPE si verifica quando la quantità di energia che entra nel volumetto dm è uguale alla quantità di energia che esce dal volumetto ed è trasportata da particelle cariche. Se per tanti elettroni che entrano tanti ne escono e ho l'equilibrio vale la formula dell'energia impartita che è uguale all'energia trasferita e il K_{coll} è uguale alla dose:

$$\varepsilon = R_{in} - R_{out} + \Sigma Q = (R_{in})_U - (R_{out})_U + (R_{in})_C - (R_{out})_C + \Sigma Q \quad (19.3)$$

In condizioni di equilibrio delle particelle cariche si ha che:

$$(R_{in})_C = (R_{out})_C \quad (19.4)$$

Quindi possiamo dire che l'energia impartita è uguale all'energia trasferita netta:

$$\varepsilon = \varepsilon_{tr}^n \quad (19.5)$$

quindi:

$$D = K_{coll} \quad (19.6)$$

Il CPE si ha sotto determinate condizioni:

- il volumetto dm immerso in una porzione di materia di dimensioni almeno uguali al percorso massimo degli elettroni messi in moto dal campo di radiazione
- il flusso della radiazione primaria non varia apprezzabilmente su distante che sono dell'ordine di grandezza di questo percorso massimo

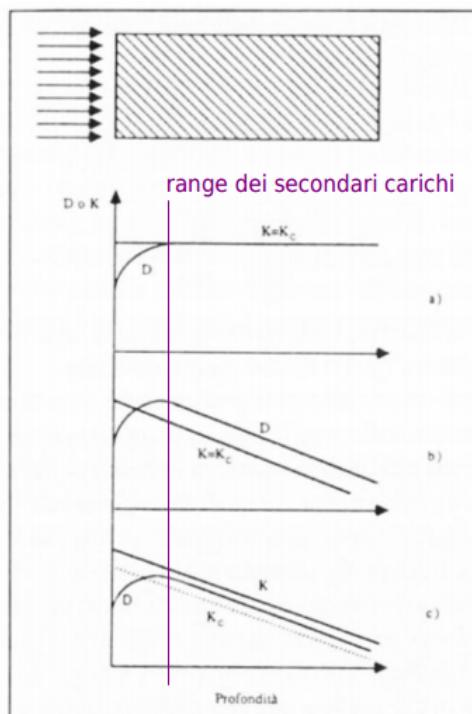


Figura 19.1: *Grafici di esempio*

Nel grafico a) in figura (19.1) non ho assorbimento all'interno del mezzo. Quando i fotoni entrano fanno diversi effetti come fotoelettrico, compton ecc, e ho un certo kerma. Il kerma è l'energia trasferita agli elettroni secondari. L'elettrone secondario emesso nel volumetto A attraversa una serie di volumetti fino a fermarsi. Per ogni volumetto la quantità di elettroni messi in moto non cambia. All'inizio avrò solo elettroni messi in moto che escono e man mano che vado avanti si accumuleranno. Nei vari volumetti avrò quelli in movimento che escono e vengono rimpiazzati da quelli che entrano messi in moto nel volume precedente. Per questo il volumetto deve essere immerso in un volume più grande. Partendo dalla profondità a cui arrivano gli elettroni secondari potrò instaurare l'equilibrio. Il kerma è uguale in ogni volume. La dose comincia da zero e sale fino ad un valore costante e all'equilibrio sarà uguale al kerma.

Se ci fosse assorbimento di fotoni nel mezzo il kerma diminuisce mentre la dose resta un attimo più alta come nel grafico b) in figura (19.1) essendo data dalle particelle interagenti nel volumetto precedente e quindi data da un flusso maggiore.

Possiamo riscrivere tutti questi passaggi in questo modo:

$$\varepsilon = R_{in} - R_{out} + \Sigma Q = (R_{in})_U - (R_{out})_U + (R_{in})_C - (R_{out})_C + \Sigma Q \quad (19.7)$$

Se siamo in CPE avremo che:

$$(R_{in})_C = (R_{out})_C \quad (19.8)$$

quindi

$$\varepsilon = R_{in} - R_{out} + \Sigma Q = (R_{in})_U - (R_{out})_U + \Sigma Q \quad (19.9)$$

L'energia trasferita sarà:

$$\varepsilon_{tr} = (R_{in})_U - (R_{out})_U^{non-r} + \Sigma Q \quad (19.10)$$

Se il volumetto scelto $V \rightarrow 0$ allora:

$$(R_{out})_U^r = (R_{out})_U - (R_{out})_U^{non-r} = R_U^r \quad (19.11)$$

Quindi possiamo riscrivere l'energia trasferita netta come:

$$\varepsilon_{tr}^n = (R_{in})_U - (R_{out})_U^{non-r} - R_U^r + \Sigma Q = (R_{in})_U - (R_{out})_U + \Sigma Q \quad (19.12)$$

e quindi arriviamo a dire che:

$$\varepsilon = \varepsilon_{tr}^n \quad (19.13)$$

Alla fine se siamo in CPE possiamo calcolare il kerma:

$$D = K_{coll} \quad (19.14)$$

Possiamo anche relazionare la dose assorbita e la fluenza di energia:

$$D = \left(\frac{\mu_{en}}{\rho} \right) \Psi \quad (19.15)$$

In particolare in aria vale che:

$$D_{aria} = \frac{W_{aria}}{e} X \quad (19.16)$$

Se ho due mezzi con stesso flusso di particelle per unità di superficie e unità di tempo con la stessa energia:

$$D_1 = \left(\frac{\mu_{en}}{\rho} \right)_1 \Phi E_\gamma \quad (19.17)$$

e

$$D_2 = \left(\frac{\mu_{en}}{\rho} \right)_2 \Phi E_\gamma \quad (19.18)$$

Possiamo legare i due mezzi come:

$$D_2 = D_1 \frac{(\mu_{en}/\rho)_2}{(\mu_{en}/\rho)_1} \quad (19.19)$$

Questo è utile perchè posso sostituire i tessuti biologici umani con un corpo finto fatto di altri materiali. Posso anche misurare l'esposizione in aria, la dose in aria e usando quella relazione conoscerò la dose nel corpo.

L'esposizione è anche collegabile a K_{coll} :

$$D_M = K_{aria} \frac{(\mu_{en}/\rho)_M}{(\mu_{tr}/\rho)_{aria}} \quad (19.20)$$

Se μ_{en} nel mezzo e μ_{tr} fossero simili per un intervallo di energie il calcolo verrebbe semplificato. Il loro rapporto tenderebbe a uno e quindi le due quantità sarebbero molto simili.

19.2 RADIOPROTEZIONE e GRANDEZZE RADIODIOPROTEZIONISTICHE

Passiamo alle quantità radioprotezionistiche.

Definiamo delle quantità utili per la protezione e quindi biologicamente rilevanti. Ci servono per stabilire i limiti a cui bisogna stare per evitare i danni. L'interazione di particelle con i tessuti biologici ha vari stadi. Siamo allo stadio in cui la particella entra e cede energia ionizzando o eccitando. Ci possono essere danni al DNA ecc..

Gli scopi della radioprotezione sono:

- prevenzione: degli effetti dannosi non stocastici o deterministici
- ridurre la probabilità di accadimento di effetti stocastici

19.2.1 Principi cardine della radio protezione

Lo scopo è quello di permettere l'uso di sorgenti radioattive minimizzando i danni stocastici ed evitando che ci siano danni deterministici.

Il cardine è la valutazione del rischio associato ad una certa esposizione. Si dovrà fare una stima per calcolare il nesso tra rischio e danno e dall'altra il costo del danno detto *detrimento sanitario* cioè perdita di qualità della vita. Ci sono tre principi fondamentali:

- **giustificazione:** tutte le attività pacifche che comportano l'esposizione dell'uomo alle radiazioni ionizzanti devono essere preventivamente giustificate dai loro vantaggi economici, sociali o di altro tipo rispetto al detramento sanitario che ne può derivare e periodicamente riconsiderate alla luce dei benefici che da esse derivano.

- **ottimizzazione:** qualsiasi pratica giustificata deve essere svolta in modo da mantenere l'esposizione al livello più basso ragionevolmente ottenibile tenendo conto dei fattori economici e sociali
- **limitazione della dose e del rischio:** la limitazione delle dosi derivanti da tutti i tipi di pratiche non deve superare i limiti di dose stabiliti per i lavoratori esposti, gli apprendisti, gli studenti e gli individui della popolazione.

Il principio di ottimizzazione è basato sul principio ALARA. Si deve ridurre l'esposizione o la dose al minimo possibile. Se proprio mi serve dovrò comunque valutare i vantaggi e gli svantaggi.

Consideriamo la dose assorbita media $D_{T,R}$

È la dose assorbita media all'interno di un organo o tessuto T data da una radiazione R.

$$\overline{D}_T = \frac{\int_T D(x, y, z) \rho(x, y, z) dV}{\int_T \rho(x, y, z) dV} \quad (19.21)$$

Si misura in *gray (Gy)*. Se ho una sorgente radioattiva di fotoni e voglio sapere la dose assorbita media nel fegato dovrò calcolare il valore della dose punto per punto che varierà visto che cambia la densità. La distribuzione non è uniforme. Dalla dose in ogni punto calcolo quella media. Ma questa quantità non è misurabile.

Dose equivalente H_T : È la dose assorbita media in un tessuto o in un organo T, ponderata in base al tipo e alla qualità della radiazione R. Non si misura in gray, ma *sievert (Sv)* perché ho un coefficiente w adimensionale che moltiplica la dose media.

$$H_T = D_{T,R} \times w_R \quad (19.22)$$

Ci sono radiazioni che hanno un effetto biologico più elevato o viceversa. ascolta. Questa diversa capacità di fare danno a parità di dose si chiama *fattore di ponderazione* per la radiazione ed è w_R .

I valori di w_R sono stabiliti sulla base dei risultati sperimentali di misura dell'efficacia biologica relativa, cioè l'efficacia di una certa radiazione nel produrre il danno biologico.

Efficacia biologica relativa (**RBE**): È data dal rapporto tra le dosi del campo 1 di riferimento con la dose di un altro campo:

$$RBE = \frac{D_1}{D_2} \quad (19.23)$$

Questa è l'efficacia biologica relativa del campo 2 rispetto al campo 1 nell'indurre il medesimo effetto biologico in condizioni identiche di irradiazione. In base al valore del rapporto delle due dosi riesco a capire l'efficacia della radiazione. Solitamente come radiazione di riferimento di sceglie una radiazione a basso LET.

Come passo dalla dose puntuale alla dose media? Modelli matematici con simulazione montecarlo. Costruisco un modello di essere umano, come quelli riportati in figura (19.2)

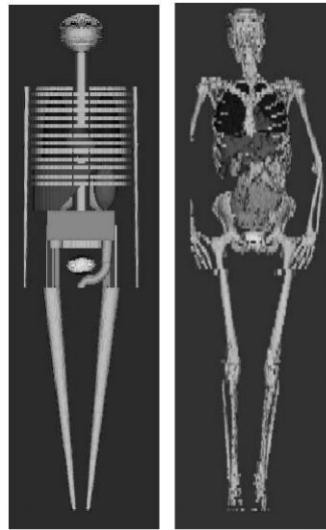


Figura 19.2: Scheletri di esempio

Prendo una sorgente esterna di fotoni che genera un campo di radiazione. Misuro la radiazione in un punto in aria e misuro la dose. Uso il finto essere umano per sapere qual è la dose media per ogni organo di interesse, ottenendo grafici come quelli riportati in figura (19.3)

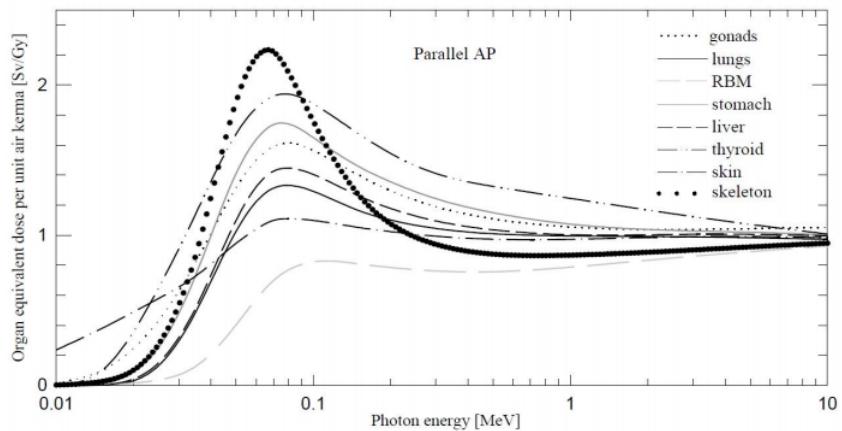


Figura 19.3: Grafici ottenuti con finti esseri umani

Avendo ottenuto la dose equivalente ponderata per la radiazione nei vari tessuti possiamo calcolare la dose efficace che è la somma di tutte le dosi equivalenti nei vari tessuti. Devo tenere conto del peso di ogni organo nel corpo.

Consideriamo ora la dose efficace: è la somma delle dosi equivalenti H_T ponderate nei tessuti e organi del corpo, causate da irradiazioni interne ed esterne ed è data da:

$$E = \sum_T w_T H_T = \sum_T w_T \times \sum_R w_R D_{T,R} \quad (19.24)$$

L'**Esposizione interna** è l'esposizione a sorgenti assunte tramite cibi o via aerea. Si parla di:

- *dose impegnata*: dose totale che si prevede ricevuta da un organo o da un tessuto, in un determinato periodo di tempo, in seguito all'incorporazione di radionuclidi.
- *dose equivalente impegnata*: integrale rispetto al tempo dell'intensità di dose equivalente in un tessuto o un organo T, che sarà ricevuta, in quel tessuto o in quell'organo T, in seguito all'introduzione di uno o più radio-nuclidi; essa è definita da:

$$H_T(t) = \int_t H_T(\tau) d\tau \quad (19.25)$$

In generale se t non è specificato si considera 50 anni per adulti e 70 per i bambini.

- *dose efficace impegnata $E(t)$* : è la somma delle dosi equivalenti impegnate nei diversi organi o tessuti $H_T(t)$ risultanti dall'introduzione di uno o più radionuclidi, ciascuna moltiplicata per il fattore di ponderazione del tessuto w_T ed è definita da:

$$E(t) = \sum_T w_T H_T(t) \quad (19.26)$$

Tramite i metodi montecarlo vengono calcolati i coefficienti di dose impegnata per vari radionuclidi in vari organi e tessuti e a seconda del tipo di introduzione nel corpo umano. In figura (19.4) è riportato uno schema riassuntivo.

Vediamo quali sono le applicazioni della dose efficace:

- assolve allo scopo di mettere in relazione il rischio derivante dall'esposizione a radiazione ionizzante con una singola grandezza
- fornisce un messo per dimostrare la conformità don i limiti di dose
- non va utilizzata per reazioni tissutali
- non va utilizzata per analisi epidemiologiche
- non è misurabile

Quindi dobbiamo introdurre altre quantità: le **grandezze operative**. Confronto la dose efficace con il limite di legge. Servono per il monitoraggio delle esposizioni, si applicano alle esposizioni esterne e danno una stima conservativa o un limite superiore per la dose efficace. Chi è esposto deve seguire dei protocolli perché l'esposizione sia entro i limiti. Uso la dose efficace che non è misurabile, ma è calcolabile. Poi devo monitorare. Si usano dei badge dosimetrici oppure strumenti per un dosaggio ambientale da mettere nella sala d'attesa. Così posso valutare la dose alla quale sono stati sottoposti i pazienti in attesa.

Siccome la dose efficace non è misurabile come faccio?

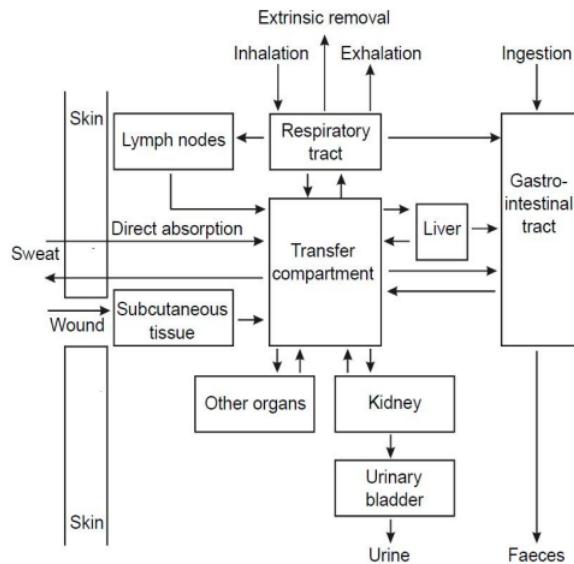


Figura 19.4: *schema riassuntivo*

Si definiscono le grandezze operative che servono proprio per il monitoraggio (individuale o ambientale). Servono per esposizioni esterne non interne. Si monitora per eccesso la dose efficace.

È necessario per queste grandezze che:

- siano puntuali
- nel monitoraggio ambientale il valore della grandezza dosimetrica non dovrebbe dipendere dalla distribuzione direzionale della radiazione incidente
- gli strumenti per il monitoraggio devono poter essere tarati in termini di grandezze fisiche per le quali esistono standard di riferimento

Le grandezze protezionistiche stabiliscono i limiti di legge, le grandezze operative verificano e monitorano.

Ci sono 4 quantità che si dividono in due tipi: monitoraggio ambientale e individuale

Si distingue anche tra radiazione *non penetrante* (la dose alla pelle è 10 volte la dose efficace totale) e *penetrante*.

Le grandezze operative sono:

- Equivalente di dose:

$$H = QD \quad (19.27)$$

dove Q è il fattore di qualità di radiazione e dipende dal LET e D è la dose assorbita in un punto; è una grandezza puntuale a differenza della dose equivalente.

- equivalente di dose efficace:

Ci focalizziamo sulla quantità $H^*(d)$ che è una quantità operativa per la misura in ambiente della radiazione penetrante. Quantità che si visualizza direttamente sugli strumenti. È una quantità fittizia che viene costruita a partire da una definizione fatta in modo tale che sia additiva, puntuale, non dipenda dalla direzione della radiazione ecc..

$H^*(d)$ si calcola con un corpo finto: sfera di 3cm di diametro così non ho dipendenza dalla direzione di materiale equivalente al tessuto umano. *sfera icru* composta da: 76,2% di ossigeno, 11,1% di carbonio, 10,1% di idrogeno e 2,4% di azoto per riprodurre la composizione del corpo umano.

Suppongo di avere un punto P in cui valuto il campo di radiazione. La quantità fittizia si calcola prendendo il punto P e andando ad espanderlo, come fatto in figura (19.5).

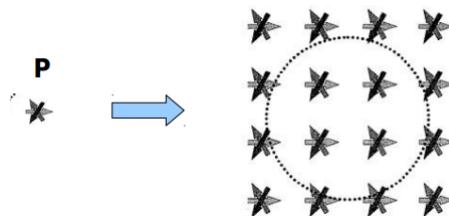


Figura 19.5: Esempio per creare il campo espanso

Prendo quello che ho misurato in quel punto e lo riconduco a quello della sfera. Ottengo un *campo espanso*, cioè un campo di radiazioni in cui la fluenza e la distribuzione d'energia sono uguali a quelle del campo espanso, ma la fluenza è unidirezionale. Poi lo allineo e prendo il flusso in tutte le direzioni e lo sommo su un'unica direzione. Ottengo un campo allineato e uniforme che colpisce la sfera. È tutto fittizio. Misurerò poi la dose equivalente ad una certa profondità di solito circa 10cm. Otterrò una quantità sempre superiore alla dose efficace vera.

Equivalent di dose ambientale $H^*(d)$: è l'equivalente di dose in un punto di un campo di radiazioni che sarebbe prodotto dal corrispondente campo espanso unidirezionale nella sfera icru a una profondità d , sul raggio opposto alla direzione del campo unidirezionale.

Si fanno cose simili per l'individuale e per la radiazione non penetrante in cui definisco un $H'(d, \Omega)$.

Equivalent di dose direzionale $H'(d, \Omega)$: è l'equivalente di dose in un punto di un campo di radiazioni che sarebbe prodotto dal corrispondente campo espanso, nella sfera ICRU a una certa profondità d , su un raggio di una determinata direzione.

Equivalent di dose personale $H_p(d)$: è l'equivalente di dose nel tessuto molle, a una profondità appropriata d , al di sotto di un determinato punto detto posizione dosimetrica del corpo.

Possono esserci anche fenomeni di back scattering. In base a dove metto il rivelatore sul corpo si fanno diversi modelli (dito, collo, polso ecc..).

Capitolo 20

Lezione 9: 13 Maggio 2015

20.1 LA RADIOPROTEZIONE DEI LAVORATORI E DELLA POPOLAZIONE

Ci sono laboratori specializzati con sorgenti collimate di raggi γ : nel fascio mettono uno strumento calibrato da un laboratorio che ha a disposizione strumenti primari e questo strumento misura il flusso o il kerma. Al posto dello strumento primario viene messo il nostro strumento che fa la stessa misura della quantità fisica primaria ottenendo il fattore di calibrazione.

Esiste una normativa che stabilisce i limiti di esposizione per pubblico e popolazione. I principi cardine della radioprotezione sono:

- principio di giustificazione di una pratica
- principio di ottimizzazione della protezione
- principio di limitazione della dose e del rischio

La normativa risponde al terzo punto. L'esposizione esterna e interna per il lavoratore e per il pubblico utilizzata per legge è data da questa formula:

$$E \cong H_p(10) + E(50) \quad (20.1)$$

dove $E(50)$ riguarda la parte interna.

Le grandezze operative sono misurabili e danno un limite inferiore: la dose vera è sicuramente più grande.

20.1.1 Limiti di dose

La legislazione vigente (direttive della comunità europea e ICRP) hanno lo scopo di stilare i limiti massimi per varie classi di lavoratori. Sono direttive annuali. Vediamo le categorie in cui viene suddivisa la popolazione dal punto di vista protezionistico:

Lavoratori esposti : non tutti i lavoratori sono esposti e i lavoratori che non sono considerati esposti fanno parte del pubblico. Se una persona è potenzialmente esposta a una dose maggiore di quella fissata per il pubblico allora è un lavoratore esposto.

Ci sono due categorie per i lavoratori esposti: A e B. la categoria A ha dei limiti un po' più alti del pubblico, gli altri che stanno tra A e pubblico sono di categoria B. La legge parla di studenti e apprendisti (come noi): se negli studi si usano sorgenti radioattive si viene classificati come categoria A o B, se minorenni come pubblico.

Pubblico : comprende tutti tranne lavoratori esposti, studenti o apprendisti. Altra categoria esclusa dal pubblico sono gli individui che devono essere esposti a radiazione per motivi medici (attenzione: in sala d'attesa abbiamo il diritto a non superare le dosi del pubblico). È legato alla giustificazione rischi-benefici.

I limiti di dose considerati dalla legge riguardano la dose efficace e le dosi parziali agli organi come la pelle (radiazione non penetrante, particelle α o β), mani, piedi, avambracci e le estremità in generale. La dose efficacie è definita per la radiazione penetrante. Nella tabella in figura (20.1) sono riportati i limiti di dose annui per categoria.

LIMITI DI DOSE (mSv in un anno solare)

Categoria	Dose efficace	Cristallino	Pelle (dose media su una qualsiasi superficie di 1 cm²)	Mani, avambracci, piedi e caviglie
Lav. exp.	20	150	500	500
Lav. exp. A	6	50	150	150
Persone del pubblico e lav. nonexp.	1	15	50	50

Figura 20.1: *limiti di dose annui per categoria di popolazione*

La prima colonna (dose efficace) dice che pubblico in un anno può ricevere al massimo 1 mSv. I lavoratori esposti di categoria A possono potenzialmente superare 6 mSv, quelli di categoria B tra 6 e 1 mSv e in generale il limite assoluto per i lavoratori è 20 mSv.

L'esperto qualificato è la persona che si occupa della radioprotezione dei lavoratori, è registrato a un albo professionale (unico a cui possono accedere i fisici che si sono specializzati in fisica sanitaria). È colui che fa valutazioni

di radioprotezione: valuta se una sorgente di radiazione sta entro i limiti, dà istruzioni, fa corsi di aggiornamento,...

Ci sono 3 gradi di esperti qualificati:

- 1° grado: si occupano ci apparecchi radiologici che accelerano elettroni con tensione massima applicata al tubo minore di 400 kV.
- 2° grado: si occupano di macchine radiogene con energia degli elettroni compresa tra 400 keV e 10 MeV, o di materie radioattive.
- 3° grado: si occupano di impianti nucleari e di sorgenti diverse da quelle previste nei primi due gradi.

Per proteggersi da una sorgente bisogna in generale tenerla distante, esporsi il più breve tempo possibile, usare delle schermature, occhiali, ecc.

Esposizione al fondo naturale e a sorgenti artificiali: il fondo a cui siamo esposti naturalmente è dato da una media mondiale per individuo, ed è costituito come mostrano i grafici in figura (20.2) e (20.3).

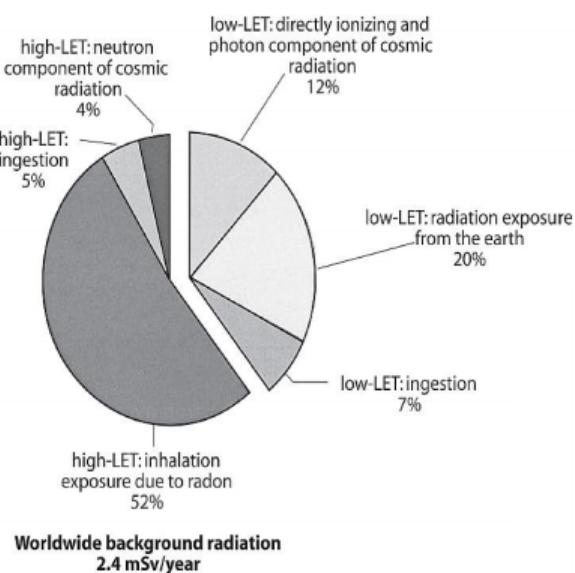


Figura 20.2: media mondiale della radiazione di fondo

Vediamo che in media per anno sono 2.4 mSv. Il limite di legge ovviamente non include la radioattività ambientale, di fondo. Qualunque posto che utilizza sorgenti radioattive che vengono a contatto con il pubblico deve tener conto che il massimo è 1 mSv, che poi si somma a quello di fondo.

Il radon costituisce il 52% della dose annuale (2.4 mSv) ed è correlato al tumore al polmone (anche per quelli che non fumano!). Lo stato può lavorare perché nelle case ci sia meno radon del fondo naturale. Noi in quanto studenti abbiamo una legge che stabilisce il limite di esposizione al radon.

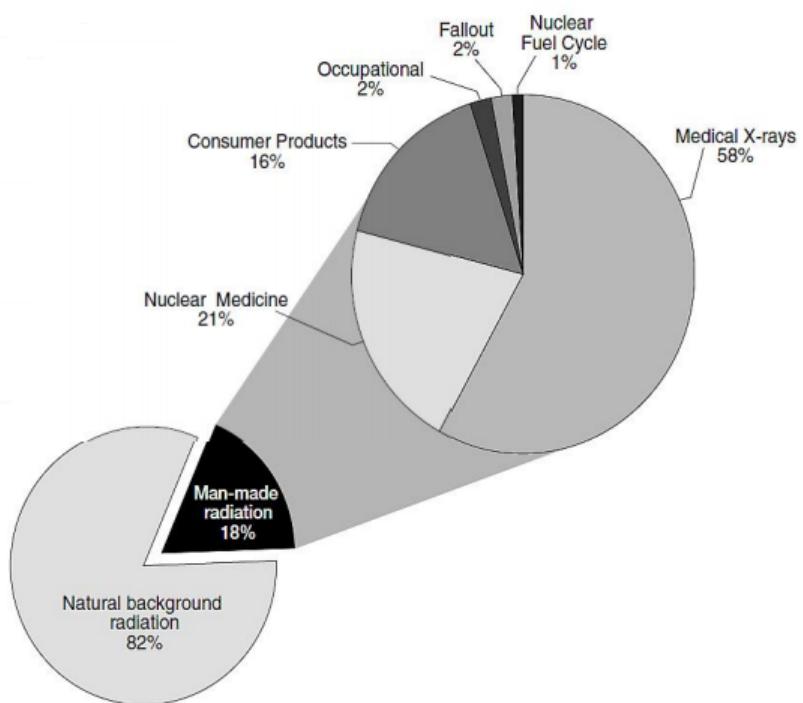


Figura 20.3: fondo prodotto dall'uomo

Della dose che prendiamo, l'82% è la dose naturale, a cui si aggiunge la dose dovuta ad analisi mediche, dovuta alle cose che compriamo, al fall out di incidenti nucleari di anni fa ancora nell'atmosfera. Il range tipico per la radioattività naturale è tra 1 e 10 mSv.

20.2 CALCOLI DI DOSE

20.2.1 Irradiazione esterna

- primo caso, supponiamo di avere una sorgente γ e di calcolare la dose a cui si è sottoposti standogli vicini. In aria la dose, in condizioni di equilibrio, è data da:

$$D = \left(\frac{\mu_{en}}{\rho} \right) \Phi E_\gamma \quad (20.2)$$

cioè è legata all'energia dei fotoni e al μ_{en} dell'aria. Se la sorgente ha un'attività A e emette fotoni con energia E_γ , il flusso è dato da:

$$\dot{D} = \frac{A \cdot E_\gamma}{4\pi r^2} \cdot \frac{\mu_{en}}{\rho} \quad (20.3)$$

In un intervallo tra 60 keV e 2 MeV, il rateo è dato da:

$$\dot{D} = 1.24 \times 10^{-7} \frac{A \cdot E}{r^2} \quad [Gy/h] \quad (20.4)$$

Se all'aria si sostituisce il corpo bisogna moltiplicare per un fattore 1.12. Se poi i fotoni hanno energie diverse si procede alla somma pesata sui diversi branching ratio.

- secondo caso, supponiamo di avere una sorgente β o una sorgente direttamente ionizzante (figura (20.4)): per prima cosa bisogna capire quanto si attenua l'energia delle particelle prima di arrivare al tessuto. A questo punto vogliamo sapere quanta è la dose deposta nel volume $A \cdot t$.

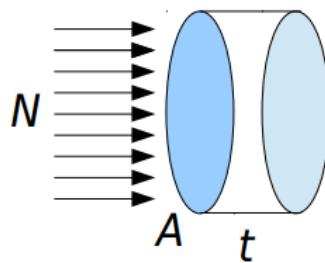


Figura 20.4: schema della situazione di irraggiamento con particelle direttamente ionizzanti

Otteniamo che la dose è circa:

$$D \approx N \frac{\frac{dE}{pdx} \cdot \rho t}{At\rho} = \Phi \frac{\frac{dE}{pdx} \cdot \rho t}{\rho t} = \Phi \cdot \frac{dE}{pdx} \quad (20.5)$$

Se lo spessore è sufficientemente piccolo dE/dx è costante e si ha equilibrio elettronico perché la perdita di energia è trascurabile. La cosa però non è così semplice: le particelle pesanti hanno una distribuzione di profondità diversa da quella degli elettroni. Le particelle α in radiazione esterna non penetrano oltre gli strati morti della pelle.

- terzo caso, consideriamo elettroni in radiazione esterna: dal momento che hanno curve di distribuzione simili a quelle dei fotoni empiricamente li si tratta in maniera simile.

20.2.2 Irradiation all'interno di un mezzo

- nel caso di particelle α o β che supponiamo rimangano fisse in un organo, quanto è dose che depositano?

$$\dot{D} = A\bar{E} \cdot 1.6 \times 10^{-13} \times 10^3 \quad (20.6)$$

Quindi il rateo di dose è dato dall'attività specifica per grammo, dall'energia media emessa dall'isotopo, moltiplicati per un termine di conversione da MeV a joule e un termine per passare da grammo a chilogrammo.

- nel caso in cui la sorgente incorporata sia di tipo γ , la frazione di energia è minore e alla formula precedente si aggiunge la frazione assorbita:

$$AF \simeq 1 - e^{-\mu_{en}d} \quad (20.7)$$

dove d è la distanza media dalla superficie del mezzo.

Quello che deve passare è come si fa un conto approssimativo a partire da dati facilmente reperibili. Se in lab sorgente ho del cobalto-60 con una sorgente a 30 cm (lunghezza dell'avambraccio) la dose è 3-4 $\mu\text{Sv}/\text{h}$.

20.3 MISURA DELLA DOSE

La misura della dose è basata su una teoria: la **teoria della cavità**.

Supponiamo di avere un campo di fotoni e della materia (muscolo) attraversata dal flusso fotoni che sarà necessariamente accompagnato da un flusso di elettroni (a causa di effetto fotoelettrico, compton, produzione di coppie), quindi al campo di fotoni è associato un campo di elettroni.

La dose nel mezzo è deposta da questi elettroni. L'energia trasferita è data da:

$$K_{coll} = \left(\frac{\mu_{en}}{\rho} \right) \Psi_\gamma \quad (20.8)$$

dove Ψ_γ è la fluenza di energia dei fotoni. Se c'è equilibrio delle particelle cariche la dose nel mezzo M risulta:

$$D^M = \left(\frac{\mu_{en}}{\rho} \right)^M \cdot \Psi_\gamma = K_{coll} \quad (20.9)$$

Gli elettroni messi in moto non li conosco molto: hanno un'energia che dipende dallo scattering con i fotoni e da come hanno perso energia. Gli elettroni

depositano una dose secondo questa relazione:

$$D^M = \left(\frac{S_{coll}}{\rho} \right) \cdot \Phi_e \quad (20.10)$$

valida nel caso in cui gli elettroni depositano energia localmente (CSDA).

Altra cosa da fare per calcolare la dose è usare l'esposizione X (equivalente del kerma in aria). In equilibrio elettronico si ha:

$$X = (K_{coll})_{aria} = D^{aria} \quad (20.11)$$

$$\frac{D^M}{34 \cdot X} = \frac{(K_{coll})_M}{(k_{coll})_{aria}} = \frac{(\mu_{en}/\rho)^M}{(\mu_{en}/\rho)_{aria}} \quad (20.12)$$

Possiamo riassumere quanto detto nello schema in figura (20.5).

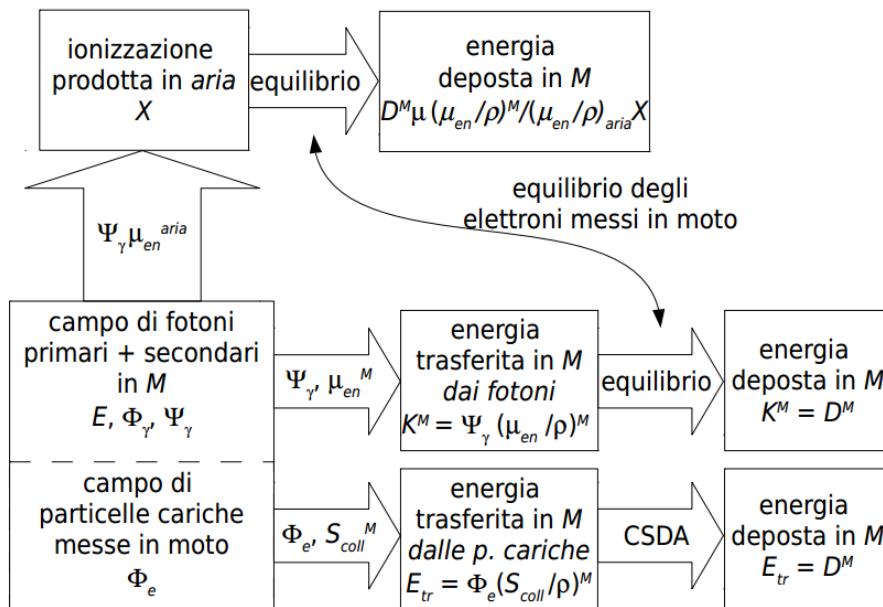


Figura 20.5: schema riassuntivo per la misura della dose

20.3.1 Teoria della cavità di Bragg-Gray

Supponiamo di voler misurare la dose in un materiale (muscolo o fantoccio, cioè una struttura che fa finta di essere un corpo umano, pieno d'acqua, in cui si mette una sonda per misurare dose). Lo strumento sensibile può essere una bolla di aria, piccola, come quella riportata in figura (20.6).

La cavità deve essere sufficientemente piccola tanto da non alterare il flusso degli elettroni: l'elettrone entra nella sferetta e ne esce con una perdita di energia trascurabile. Nel gas la dose è data da:

$$D^G = \left(\frac{S_{coll}}{\rho} \right)^G \cdot \Phi_e \quad (20.13)$$

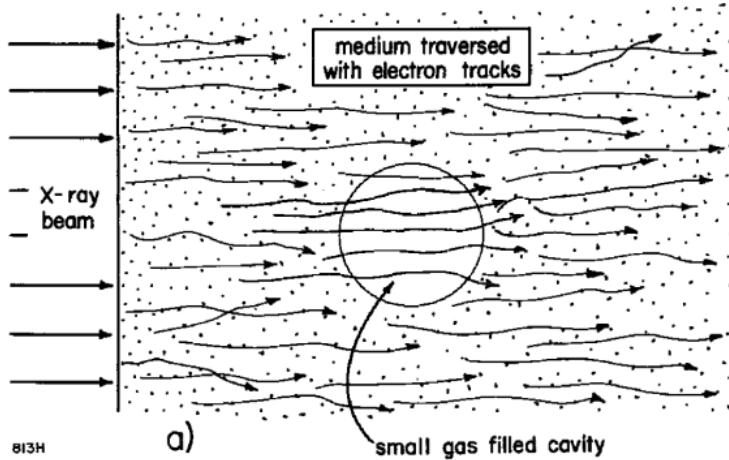


Figura 20.6: *schematizzazione della cavità*

Siccome il flusso e non è alterato dalla sferetta, se togliessimo la bolla d'aria possiamo ricavare la dose sia nel mezzo gassoso che nel mezzo di interesse. La dose depositata nel gas è misurabile, per sapere quanto sarebbe stata la dose nel mezzo nello stesso punto basta fare il rapporto:

$$D^M = \frac{(S_{coll}/\rho)^M}{(S_{coll}/\rho)^G} \cdot D^G \quad (20.14)$$

che è la *relazione di Bragg-Gray per cavità piccole*, che vale solo se:

- la cavità è tanto piccola che gli elettroni secondari perdono un'energia trascurabile nell'attraversarla;
- la dose assorbita nella cavità dovuta a all'interazione dei fotoni nel gas è trascurabile rispetto a quella impartita dagli elettroni secondari prodotti nel materiale circostante;
- il flusso degli elettroni secondari è costante nel volume della cavità;
- deve valere l'ipotesi del rallentamento continuo (CSDA) in cui gli elettroni depositano energia localmente.

S_{coll} ha una dipendenza dal mezzo molto limitata e va come il rapporto Z/A :

$$s = \frac{(S_{coll}/\rho)^M}{(S_{coll}/\rho)^G} \approx \frac{(Z/A)^M}{(Z/A)^G} \quad (20.15)$$

Detto \bar{s} il rapporto medio, scriveremo pertanto:

$$D^M = \bar{s} D^G \quad (20.16)$$

In realtà però bisogna fare delle integrazioni e si danno valori di s mediati sugli spettri energetici (esistono tabelle date per questi calcoli). Sostituiamo quindi al valore \bar{s} il valore integrato e mediato sugli spettri \bar{s}

Dosimetria con cavità piccola: normalmente i rivelatori misurano la carica prodotta al loro interno. Se la bolla di gas la rendiamo uno strumento (mettiamo un elettrodo di raccolta) possiamo misurare la carica raccolta nella bolla. Definiamo J^G la ionizzazione specifica, cioè il numero di coppie di ioni per unità di massa, e w^G l'energia media per produzione di coppia. Si ha:

$$D^G = q_e w^G J^G \quad (20.17)$$

Dal momento che la dose è in joule, si moltiplica per la carica dell'elettrone. La relazione di Bragg-Gray per una cavità piccola diventa:

$$D^M = q_e \bar{s} \cdot w^G J^G \quad (20.18)$$

Nel caso di cavità grandi: gli elettroni del campo secondario messi in moto entrano ma non riescono ad attraversare la cavità. I fotoni del campo invece interagiscono anche all'interno della cavità e gli elettroni messi in moto dai fotoni restano nella cavità. La dose è quindi depositata dal campo di fotoni. Mediamente il numero di elettroni che entrano e che escono è uguale quindi siamo all'equilibrio. La dose nel mezzo e nel gas è data da:

$$D^G = \left(\frac{\mu_{en}}{\rho} \right)^G \cdot \Psi_\gamma \quad D^M = \left(\frac{\mu_{en}}{\rho} \right)^M \cdot \Psi_\gamma \quad (20.19)$$

$$\Rightarrow D^M = \frac{(\mu_{en}/\rho)^M}{(\mu_{en}/\rho)^G} D^G \quad (20.20)$$

Anche in questo caso bisogna mediare e tenere conto degli spettri.

Una cavità intermedia è una combinazione lineare dei due casi estremi.

Supponiamo di avere un rivelatore reale fatto con gas aria: ha un suo contenitore. Se metto il rivelatore in un punto del mezzo ho una cavità piccola con il gas e il tutto è contenuto nelle pareti non sottilissime del rivelatore. Possiamo considerare la bolla di gas come una cavità piccola non nel mezzo ma nella parete che a sua volta è una cavità grande nel mezzo (ha densità elevata). Il tutto è rappresentato in figura (20.7).

Nella bolla d'aria posso misurare la quantità di carica prodotta. Per la cavità, essendo piccola, vale la relazione di Bragg-Gray e ottengo:

$$D^W = \bar{s}_G^W D^G = \bar{s}_G^W q_e \cdot w^G J^G \quad (20.21)$$

Se lo spessore delle pareti è maggiore del percorso degli elettroni messi in moto all'interno, dentro si instaura equilibrio elettronico, quindi la bolla d'aria è in equilibrio elettronico. Il rivelatore è una cavità grande immersa nel mezzo, quindi D^W si può mettere in relazione alla dose nel mezzo con la teoria della cavità grande:

$$D^M = \frac{(\mu_{en}/\rho)^M}{(\mu_{en}/\rho)^W} D^W = \frac{(\mu_{en}/\rho)^M}{(\mu_{en}/\rho)^W} \cdot \bar{s}_G^W q_e \cdot w^G J^G \quad (20.22)$$

È utile utilizzare cavità omogenee: perché avere cavità in plexiglass e non in ferro o rame? Perchè vogliamo delle cavità fatte con materiali che hanno una composizione chimica equivalente a quella del mezzo in cui sono ricavate. Questo

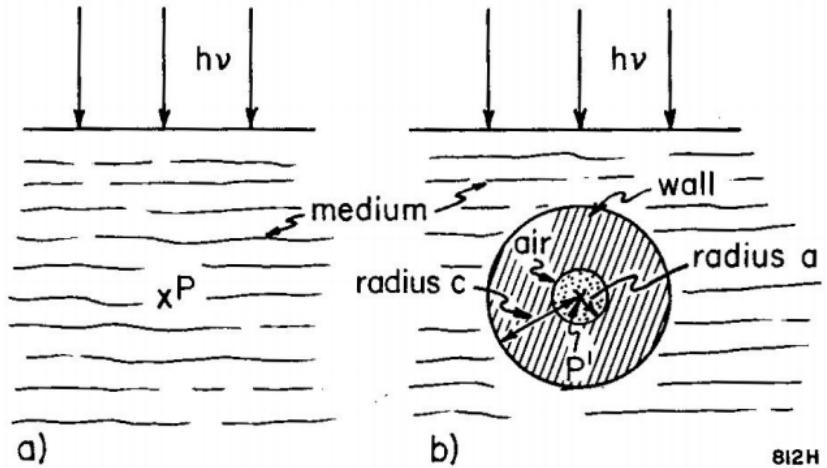


Figura 20.7: rivelatore con cavità

perchè c'è sempre una dipendenza dall'energia: se gli Z sono uguali si ottiene ancora prima di procedere alle medie:

$$\bar{S}_G^M = 1 \quad \frac{(\mu_{en}/\rho)^M}{(\mu_{en}/\rho)^G} = 1 \quad (20.23)$$

$$\implies D^M = D^G \quad (20.24)$$

Il **teorema di Fano** afferma la non dipendenza dalla densità:

- materiale più denso: vengono messi in moto più elettroni che però hanno un percorso più breve
- materiale meno denso: vengono messi in moto meno elettroni, che però hanno percorso più lungo

Significa che Φ_e è lo stesso.

In figura (20.8) è riportato uno schema riassuntivo.

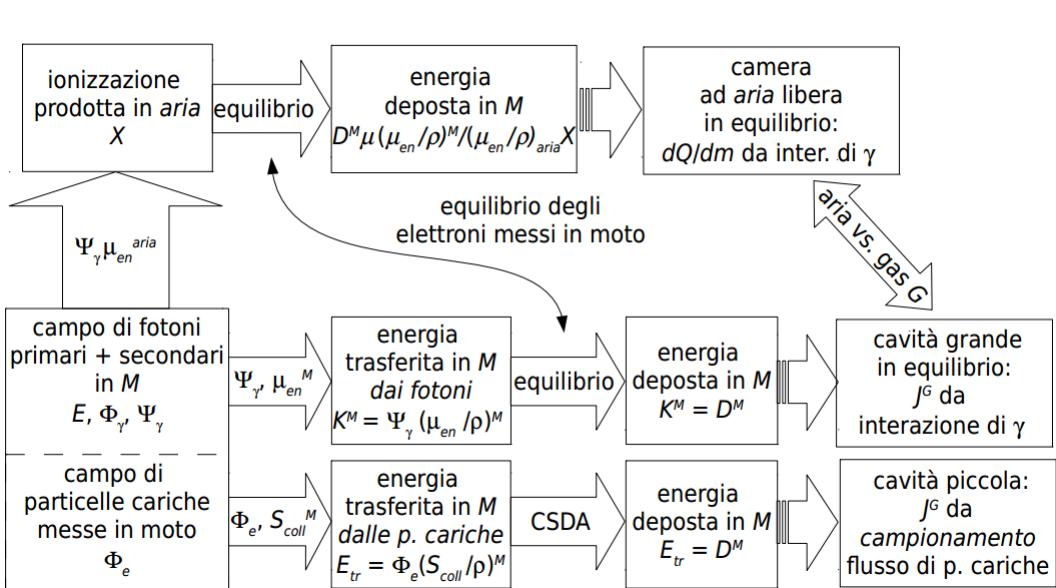


Figura 20.8: riassunto

Capitolo 21

Lezione 10: 19 Maggio 2015

21.1 CAMERA A IONIZZAZIONE IN ARIA LIBERA

Abbiamo parlato di esposizione e cavità: l'esposizione è la misura della quantità di carica prodotta in aria da radiazione γ o X: prendo un volume dm di aria, lo irraggi con fotoni che mettono in moto tramite scattering gli elettroni degli atomi dell'aria e questi si muovono anche fuori da dm perdendo energia tramite produzione di coppie.

L'esposizione è importante perché è misurabile con uno strumento che è uno standard primario, utile per calibrare altri strumenti. Questo strumento è la **camera a ionizzazione** in aria libera per misure dell'esposizione. È una camera a ionizzazione, quindi è costituita da due elettrodi con una certa differenza di potenziale, in cui la carica prodotta si muove per il campo elettrico dovuto alla differenza di potenziale. Questa camera misura o gli impulsi o il rateo di carica prodotta, cioè la corrente collegata alla carica prodotta nell'unità di tempo.

Come possiamo vedere in figura (21.1), la camera a ionizzazione è un contenitore pieno di aria a pressione atmosferica, collegato con l'aria all'esterno, con due elettrodi tra cui c'è una differenza di potenziale. Dobbiamo identificare un volume dm in cui produrre la carica: questo volume è individuato lungo l'asse attraverso la collimazione della radiazione, per cui abbiamo un *diaframma* che definisce un cilindro/cono di radiazione che attraversa la camera. Per prendere solo un pezzo di questo cono si usa un *elettrodo segmentato*, che ha anelli di guardia che fanno sì che il campo elettrico sia limitato alla zona scelta. L'intersezione tra il fascio della radiazione e il campo elettrico determina il volume specifico.

Il problema è che c'è un fascio di fotoni che entra e interagisce, ma bisogna contare la carica depositata anche fuori da dm : l'elettrone essendo in aria a pressione atmosferica ha un cammino lungo (un fotone da 100 keV fa compton e a seconda dell'angolo perde energia tra 0 a poco meno di 100 keV, che viene data all'elettrone, se invece il fotone fa fotoelettrico dà all'elettrone esattamente 100 keV - energia di ricambio dell'elettrone - l'elettrone con circa 100 keV

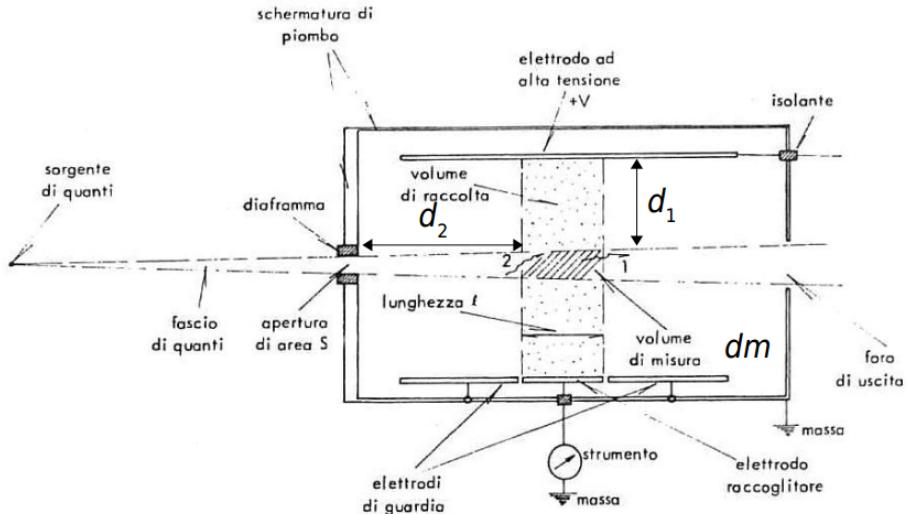


Figura 21.1: struttura della camera a ionizzazione in aria libera

percorre diverse decine di centimetri), quindi è molto probabile che l'elettrone messo in moto nel volume esca ma dal momento che fuori dal volume non c'è campo elettrico non si raccoglie carica.

Ma c'è un *principio di compensazione*: se c'è abbastanza aria davanti al volume, la carica che entra da un lato è compensata con quella che esce dall'altro. Quindi la camera deve essere abbastanza grande da avere equilibrio elettronico: deve avere dimensioni pari o superiori al cammino dell'elettrone. Se il percorso dell'elettrone è 50 cm allora la camera non esposta al campo elettrico deve essere di almeno 50 cm. Questa è la condizione che bisogna rispettare nella direzione di collimazione.

Se la carica colpisce l'elettrodo prima di aver prodotto tutta la carica possibile, non ha completato la sua disecitazione e quindi serve che anche gli elettrodi siano sufficientemente lontani dal volume.

Questi due ragionamenti fissano le dimensioni della camera d_1 e d_2 , maggiori del percorso massimo dell'elettrone. Così la camera si compensa e possiamo misurare l'esposizione applicandone la definizione.

Già per energie di 300 keV la camera è grande più di 1m in larghezza, per energie superiori bisogna pensare qualcosa d'altro: un metodo per aumentare il campo di utilizzo per continuare ad applicare la definizione è aumentare pressione. Attenzione però: se aumento troppo la pressione l'aria diventa solida e quello che otteniamo è una camera di ionizzazione *a pareti di aria*.

Questo implica che se il volume intorno a dm che serve per avere equilibrio di carica lo faccio con un materiale simile all'aria, ma solido (omogeneo, con composizione chimica equivalente a aria), lo spessore si riduce perché è solido e ha densità superiore e l'equilibrio delle particelle caricate si stabilisce in uno spessore 1000 volte più piccolo.

Quello che stiamo facendo è trasformare uno strumento base in un oggetto che è un semplice rivelatore: il contenitore con le sue pareti stabilisce l'equilibrio delle particelle cariche per il volume interno di aria, in cui si crea una quantità di carica che dà la misura dell'esposizione in aria.

L'equilibrio è raggiunto quando il kerma uguaglia la dose.

Nella pratica questi oggetti sono delle capsule, in cui l'elettrodo centrale viene caricato e la carica prodotta nel gas annulla quella dell'elettrodo (figura (21.2)).

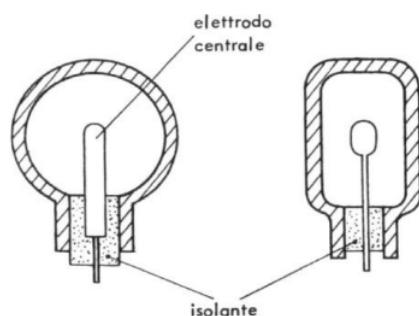


Figura 21.2: *camere a ionizzazione nella pratica*

Un rivelatore classico per dosimetria è la **camera a ditale di tipo Farmer** (figura (21.3)): può essere messo in un fantoccio per studiare i piani di trattamento in ospedale e permette di studiare l'esposizione. Le pareti sono fatte di un materiale equivalente all'aria (grafite anche conduttrice che fa anche da elettrodo) con un elettrodo centrale in alluminio.

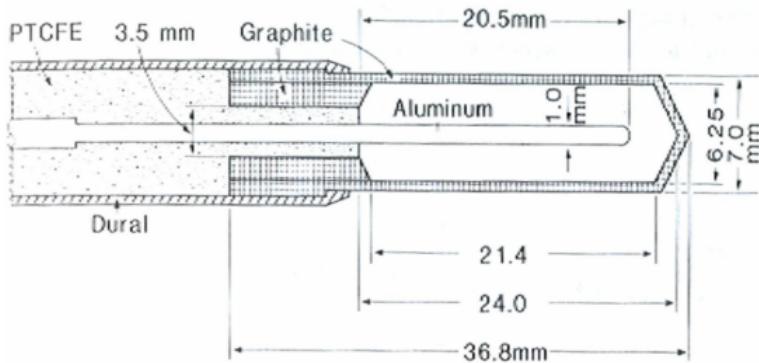


Figura 21.3: *camera a ditale di tipo Farmer*

Questa camera non è più standard primario. Misuriamo carica e corrente e con fattore di calibrazione otteniamo l'esposizione:

$$X = N_X M \quad (21.1)$$

Dipende dallo spessore delle pareti: se si mette nel fantoccio non serve uno spessore grande perchè il fantoccio fa equilibrio, se lo uso in aria ci sono dei cappucci di materiali opportuni equivalenti all'aria, che permettono di avere equilibrio anche per energie maggiori.

Siccome la camera non è ideale, il fattore di calibrazione è abbastanza costante in energia per un intervallo grande (grafico in figura (21.4)).

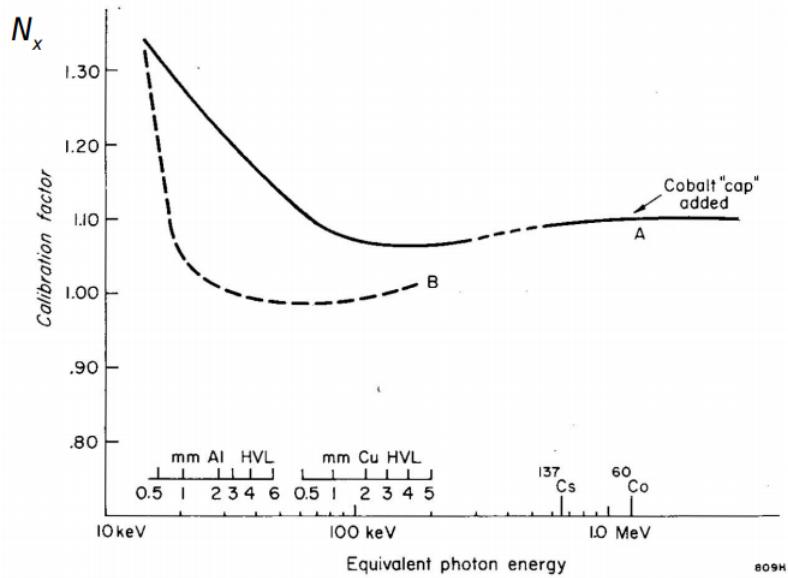


Figura 21.4: fattore di calibrazione in funzione dell'energia dei fotoni

L'esposizione è traducibile in kerma in aria e la misura del kerma è traducibile in misura della dose.

Per fare una misura di dose in aria si procede per passaggi, come mostrato in figura (21.5).

Nel punto P metto un rivelatore che dà l'esposizione, che viene tradotta in kerma in aria. Assumendo di avere attorno al punto una certa massa, il kerma nel dm di materiale che ci interessa si ottiene dal rapporto:

$$K_{\Delta m(M)} = K^{air} \cdot \frac{(\mu_{en}/\rho)_M}{(\mu_{en}/\rho)_{air}} \quad (21.2)$$

Per passare dal kerma alla dose serve l'equilibrio delle cariche: bisogna immaginare che intorno al punto ci sia un volume di raggio R che determina l'equilibrio. Allora il kerma nel dm è uguale alla dose nel mezzo a meno di correzioni di autoassorbimento:

$$K_{\Delta m(M)} = D^M = M \cdot N_X \cdot 34 \cdot \frac{(\mu_{en}/\rho)_M}{(\mu_{en}/\rho)_{air}} \quad (21.3)$$

La stessa cosa vale con un fantoccio contenente acqua.

Camera a ionizzazione per monitoraggi ambientale: serve un volume maggiore per avere un segnale di carica più alto e le pareti sono in grafite per

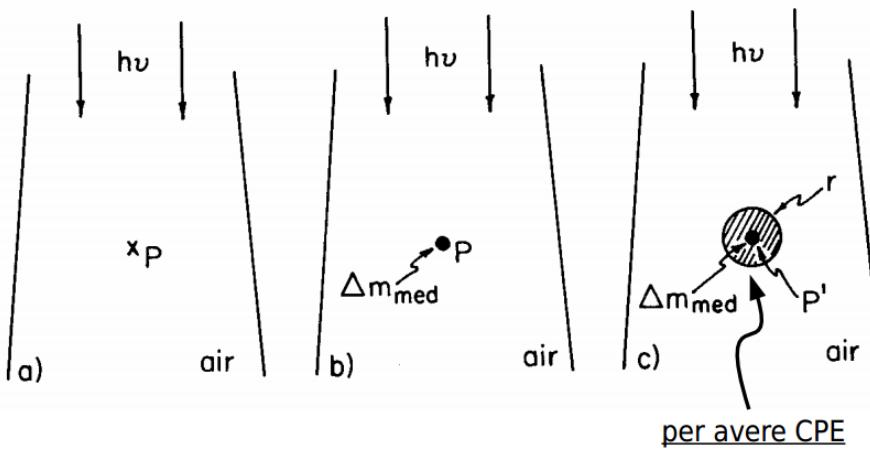


Figura 21.5: passaggi per misura la dose in aria

avere equilibrio di cariche. Il volume è all'interno della cavità piccola e la forma fa sì che la risposta non dipenda dall'angolo.

21.2 RIVELATORI DI PARTICELLE IN RADIO-PROTEZIONE

Oltre alla radiazione γ vista fino ad ora ci sono anche altri tipi di radiazione: β o α , che hanno percorsi diversi dalla particella γ .

I **contatori Geiger-Mueller** danno un tic a ogni passaggio della particella, ma non guardano alla sua energia, che è basilare per la dose. Se invece della corrente guardiamo il tasso di conteggio per cui la dose aumenta all'aumentare della probabilità di interagire, allora il numero di conteggi riesce a dare qualche informazione più utile.

Esistono dei **dosimetri personali** come:

- la camera a ionizzazione, che danno informazioni sulla dose ricevuta da una persona in un periodo di tempo
- dosimetri direct ion storage (DIS)
- film badge, cioè delle pellicole fatte con sali di argento o con materiali termoluminescenti, cioè materiali in cui la radiazione incidente colpendoli eccita gli elettroni in banda di conduzione che tornano in banda di valenza. Tuttavia alcuni elettroni rimangono intrappolati nel gap: tante più trappole cariche ci sono, tanto più è stato esposto il materiale. Riscaldando il materiale gli elettroni tornano in conduzione emettendo luminescenza, che è correlata alla dose assorbita.

21.3 DOSIMETRIA DI NEUTRONI

i discorsi fatti per le particelle cariche valgono ancora. L'equilibrio delle particelle cariche è delicato: deve essere ottenuto per particelle che hanno percorsi più piccoli e che si comportano in modo diverso.

Il kerma viene definito attraverso la definizione di energia trasferita, che si semplifica e diventa una differenza tra energia radiante che entra e che esce delle particelle neutre. Non ci sono perdite radiative e il termine ΣQ va tenuto perché con le reazioni nucleari possiamo avere conversione di massa in energia:

$$\epsilon_{tr} = (R_{in})_u - (R_{out})_u + \Sigma Q \quad (21.4)$$

Come per i fotoni possiamo definire μ_{en} e μ_{tr} e il kerma è dato da:

$$K = \Phi_n \left(\frac{\mu_{tr}}{\rho} \right) \cdot E \quad (21.5)$$

dove Φ_n è la fluenza di neutroni per unità di area e E la loro energia.
Come per fotoni si ha che:

$$\frac{\mu}{\rho} = \frac{\sigma N_A}{A} \quad (21.6)$$

$$\frac{\mu_{tr}}{\rho} = \frac{\sigma N_A}{A} \frac{\bar{E}_{tr}}{E_n} \quad (21.7)$$

Il kerma e la dose non si studiano solo per i tessuti biologici, ma anche per esempio per il silicio.

Quando abbiamo a che fare con un flusso di neutroni è importante conoscere la composizione dei tessuti in quanto l'interazione dei neutroni dipende dal nucleo con cui ha a che fare. Quando abbiamo neutroni termici si hanno interazioni di cattura e in ogni cattura si libera una certa energia che poi viene distribuita nelle particelle cariche che si creano. Se la particella creata è un protone ($n - p$) l'energia trasferita coincide con la carica Q delle particelle che si creano, nella cattura $n - \gamma$ invece la carica non coincide con l'energia trasferita.

Aumentando l'energia si ha scattering elastico per neutroni veloci.

Il kerma per unità di flusso per neutroni termici è:

$$K = \Phi_n \left(\frac{\mu_{tr}}{\rho} \right) E_n = \Phi_n \sigma E_{tr} N_{target} m^{-1} = \Phi_n \sigma E_{tr} N_g \quad (21.8)$$

dove $N_g \sim N_A/A$.

Associato al flusso di neutroni termici c'è un flusso di fotoni. Qualunque cosa che contiene idrogeno esposta a un flusso di neutroni termici diventa sorgente uniforme di un flusso di fotoni da 2.2 MeV. I fotoni sono responsabili dell'88% della dose che riceviamo a seguito di neutroni termici.

I fotoni a parità di energia a 10 keV depositano più energia, aumentando l'energia dei neutroni aumenta la dose dei neutroni, in Gy. tutto va moltiplicato per fattore di ponderazione (alcuni esempi in figura (??)).

Fattore di ponderazione per i Neutroni

E_n		
< 10 keV		$w_R = 5$
10 keV - 100 keV		$w_R = 10$
100 keV - 2 MeV		$w_R = 20$
2 MeV - 20 MeV		$w_R = 10$
> 20 MeV		$w_R = 5$

Figura 21.6: fattore di ponderazione per i neutroni

Come si misura la dose da neutroni? Oltre ad avere una sezione d'urto dipendente dal nucleo, sono anche difficili da rilevare: la spettroscopia di neutroni è difficile. I neutroni termici però si possono contare grazie alle reazioni esotermiche.

Esistono dei rivelatori di neutroni per dosimetria: i neutroni veloci entrano in una sfera contenente il rivelatore: alcuni termalizzano e arrivano al rivelatore, che è un contatore a gas. Questo permette di contare anche i neutroni veloci. Al variare delle dimensioni della sfera si ha efficienza maggiore a energie più alte. Una sfera di 12 pollici ha una curva di efficienza che ha la stessa forma in energia della dose.

C'è una relazione di proporzionalità:

$$\eta(E) \propto \frac{K|_E}{\Phi_n} \quad \eta(E) \propto \frac{H^*(10)|_E}{\Phi_n} \quad (21.9)$$

Se una sfera di 12 pollici di polietilene con un contatore in mezzo di neutroni termici viene esposta a un flusso di neutroni, si ha che il numero di conteggi è proporzionale a $H^*(10)$.

La dosimetri per neutroni si fa con le **sfere di Bonner**, cioè sfere di polietilene con dentro un rivelatore.

Questi rivelatori sono quasi insensibili alla parte fotonica.

I **dosimetri a bolle** funzionano in modo che quando arriva neutrone si sviluppa una bolla e dal conteggio delle bolle si risale alla dose a cui è stato esposto il materiale.

Il **dosimetro ad albedo**, utilizza litio e fluoruro di litio. con il litio-6 si utilizza per i neutroni.

Capitolo 22

Lezione 11: 20 Maggio 2015

22.1 SCHERMATURE PER APPARECCHIATURA RADIogene E SORGENTI RADIOATTIVE

Le macchine che producono raggi X sono usate per fare radiografie anche delle saldature dei metalli. Sono macchine molto potenti, quindi il problema dell'esposizione ai raggi X non c'è solo negli ospedali/laboratori ma anche nelle industrie.

Le sorgenti radioattive vengono usate in tante occasioni, il modo per evitare che chi si trova nelle vicinanze riceva una dose eccessiva è ridurre il tempo di esposizione, aumentare la distanza e introdurre delle barriere.

La schermatura dipende dalla sorgente: che particelle emette e che energia hanno? Se sono particelle cariche direttamente ionizzanti pesanti è più semplice: producono poco bremsstrahlung e sapendo che hanno un percorso diritto definito e che perdono energia tutte nella stessa maniera in base alla posizione si pone un blocco di materiale di spessore superiore al percorso della particella. Se abbiamo una sorgente α non c'è solo l'attenuazione dovuta alla distanza, ma in aria si ha attenuazione anche perché perde energia.

Per particelle leggere come gli elettroni più complesso: non hanno un percorso stabilito, in questo caso si prende il raggio massimo che contenga il percorso. Oltre a non perdere energia tutti nella stessa maniera nelle varie posizioni, emettono anche per bremsstrahlung. Non basta avere uno spessore uguale al raggio del percorso, bisogna considerare anche i fotoni emessi e quanto si spostano. Nel caso di elettroni è meglio usare un materiale a basso Z dove viene emessa meno bremsstrahlung. Per gli elettroni la formula di attenuazione:

$$I = I_0 e^{-(\mu/\rho)x\rho} \quad (22.1)$$

dove:

$$\frac{\mu}{\rho} = \frac{17}{E^{1.14} \max} \quad (22.2)$$

Vediamo che il percorso massimo dipende dall'energia e dalla densità del mezzo:

$$R_{\max} \cdot \rho = \frac{E}{2} \quad (22.3)$$

La schermatura dei fotoni è la più complessa: sono le particelle più penetranti. Data la sezione d'urto totale di un fotone a una certa energia possiamo usare la legge di assorbimento esponenziale per calcolare il flusso dopo un certo spessore. È il numero di fotoni che dopo uno spessore x non hanno interagito:

$$I = I_0 e^{-\mu x} \quad (22.4)$$

In protezionistica si usano l' *spessore emivalente* (HVL), cioè lo spessore richiesto per dimezzare I_0 e lo *spessore decivalente* (TVL) per ridurre di 10 volte I_0 :

$$HVL = \frac{\ln 2}{\mu} \quad TVL = \frac{\ln 10}{\mu} \quad (22.5)$$

La legge esponenziale è valida nella *buona geometria* per cui la sorgente è collimata, c'è la schermatura e la misura viene fatta dal rivelatore anch'esso collimato (figura (22.1)).

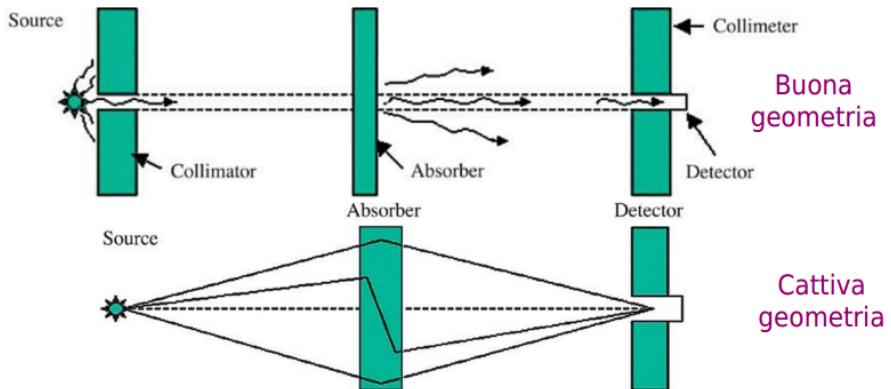


Figura 22.1: *buona geometria e cattiva geometria della sorgente*

I fotoni che hanno interagito nella barriera non hanno la stessa direzione di quello incidente e quindi non vengono conteggiati dal rivelatore. Nel mondo reale la buona geometria è difficile da ottenere e si ha *geometria cattiva*: la sorgente non è collimata e il rivelatore può contare anche i fotoni provenienti da altre direzioni. Questo implica che al rivelatore arrivano più fotoni di quelli previsti dalla formula.

Bisogna aggiungere un termine di *buildup*, che dipende dall'energia del fotone incidente e dallo spessore attraversato, maggiore di 1. Questo termine o si misura o si calcola con metodi montecarlo:

$$I = I_0 B(E, \mu x) e^{-\mu x} \quad (22.6)$$

Le tabelle vengono date in termini di quantità utili per la protezionistica, come la fluenza di energia (mi dà intensità e distribuzione di energia), perché servono per calcolare lo spessore della barriera al fine di diminuire la dose. La formula dell'intensità invece non dice nulla sull'energia dei fotoni.

Siccome B dipende da μ e che a priori non so, bisognerebbe procedere per

approssimazioni successive. Esistono tabelle che si usano utilizzando questa formula:

$$f_G = \frac{G'}{G_m/d^2} \cdot \frac{1}{UT} = \frac{G'd^2}{G_mUT} \quad (22.7)$$

dove f_G è il **fattore di barriera**: il primo termine è il fattore di attenuazione della grandezza protezionistica. G' è una grandezza protezionistica qualsiasi ed è assunto come obiettivo di progetto: la schermatura in un punto riceve un certo rateo di quella quantità. G_m è il rateo di quantità calcolato a 1 m in assenza di schermatura, d è la distanza della barriera dalla sorgente. Se divido G_m per d^2 ottengo il rateo di grandezza a distanza d .

Altro termine protezionistico è U , che è il **fattore d'uso** che dice per quale frazione di tempo la sorgente produce radiazione che colpisce qualcuno. T è il **fattore di occupazione**, ovvero la probabilità di permanenza nel punto di interesse.

Per facilitare il compito del protezionista esistono tabelle con delle costanti Γ , che si possono calcolare per ogni sorgente, e ci danno il rateo di esposizione a distanza 1 m per unità di radioattività:

$$\Gamma = \frac{d^2}{A} \cdot \dot{X} \quad (22.8)$$

Più recentemente Γ è stata sostituita dalla costante di intensità del kerma in aria Γ_δ :

$$\Gamma_\delta = \frac{d^2}{A} \cdot \dot{K}_\delta \quad (22.9)$$

dove δ è il valore per la soglia dell'energia dei fotoni emessi.

Barriere per sorgenti γ : dati il carico di lavoro con la sorgente in h/sett (W') e il massimo rateo di dose efficace a valle (d) della barriera (P), vogliamo conoscere il rateo di dose efficace inferiore a un certo P . A 1 metro dalla sorgente il rateo di kerma è G_m :

$$G_m = \Gamma \cdot A \cdot W' \quad (22.10)$$

e il **fattore di trasmissione** è dato da:

$$f_\gamma = \frac{Pd^2}{\Gamma AW'T} \quad (22.11)$$

Utilizzando i grafici che riportano il fattore di trasmissione in funzione dello spessore vediamo quale è lo spessore richiesto (grafici in figura (22.2)).

Schermatura per raggi X: una sorgente di raggi X ha una barriera primaria, ma il paziente colpito emette raggi X secondari e quindi servono barriere secondarie. È una cosa complessa. Formule, grafici e tabelle sono basati non sull'attività della sorgente ma sui parametri del tubo a raggi X.

22.2 IL RADON E LA RADIAZIONE COSMI-CA

Il radon ^{222}Ra è una delle fonti principali di radiazione naturale. Fa parte della catena dell'uranio, è un gas nobile radioattivo, non si lega chimicamente con al-

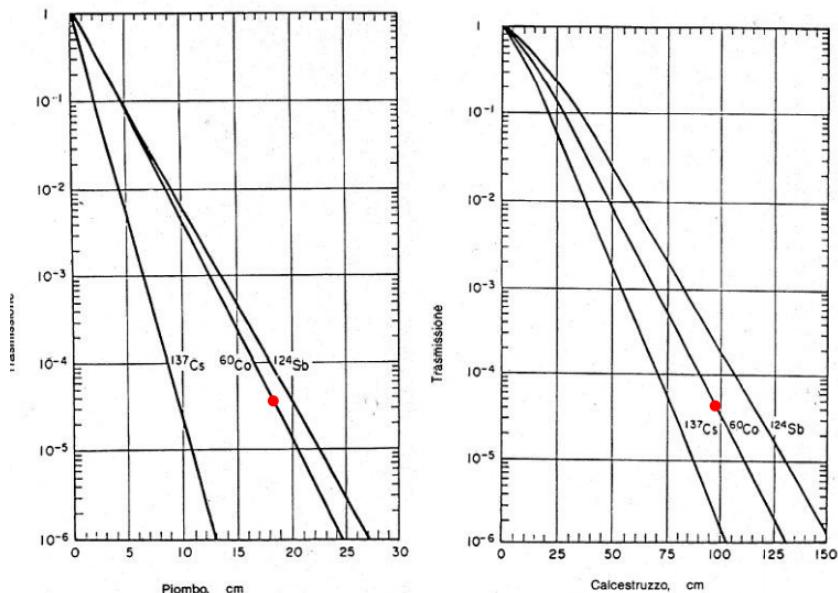


Figura 22.2: fattore di trasmissione in funzione dello spessore

tri elementi, si scioglie in acqua e filtra attraverso i materiali, da cui può uscire perché non crea legami. Decade α e ha vita media di circa 3.8 giorni. In aria aperta a livello del suolo la sua concentrazione è di $0.6 \div 28 \text{ Bq}/\text{m}^3$. Al chiuso, se la ventilazione è scarsa (seminterrato, cantina) si possono raggiungere concentrazioni molto elevate (problema del *radon indoor*).

Una dose di radon elevata comporta un aumento del rischio di cancro polmonare. Il radon è la seconda causa di tumore ai polmoni dopo il fumo, e c'è una correlazione positiva tra fumo e radon: chi fuma non solo aumenta il rischio tumori per danno chimico ma aumenta anche la dose di radon perché sulle foglie di tabacco si deposita radon.

Non è il radon il problema: è un gas nobile! Se lo inspiro lo butto anche fuori visto che non lega e decade dopo 3 giorni. Dal momento che ha vita media breve è in equilibrio secolare con i figli che sono dei metalli: questi formano un particolato carico e radioattivo: se respiriamo aria con dentro radon, respiriamo aria con radon in equilibrio con i figli, che rimangono dentro di noi!!! Sono i figli con cui è in equilibrio che determinano la dose nei polmoni.

Il decadimento del radon, con i rispettivi tempi di vita, è riportato in figura (22.3).

La catena finisce al polonio-210 che decadrebbe α sul piombo-210, ma ci impiega 22 anni. È come se il polonio-210 fosse stabile: in realtà depositandosi determina un'attività di fondo in certi materiali.

Di queste radiazioni emesse (α , β e γ), il danno al polmone non è fatto sicuramente dalla radiazione γ , che relativamente si può trascurare perché esce. Restano α e β .

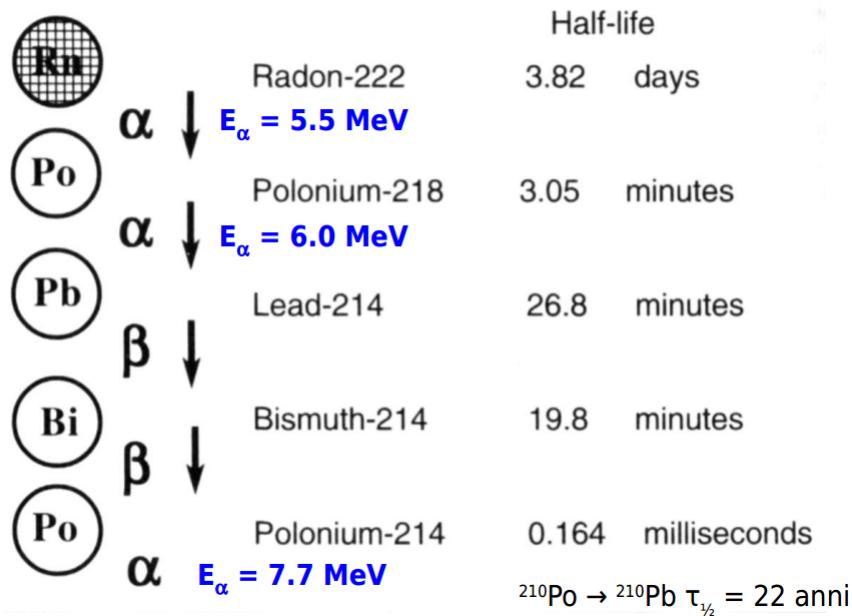


Figura 22.3: decadimento del radon

Consideriamo una particella carica con su i figli del radon appiccicata a un alveolo polmonare: il percorso dei β da massimo 3 MeV è circa 1 cm nel tessuto dei polmoni, per gli α da A 6 MeV 60 μm . Le radiazioni α sono quelle che determinano un danno peggiore perché hanno LET più alto, cioè la densità di energia depositata è maggiore: la dose depositata da un α è 20 volte quella di un β .

Quantifichiamo la dose efficace utilizzando la tabella in figura (22.4).

Nuclide	MeV/t	$T_{1/2}$	Atoms in 100 pCi	α energy per atom (MeV)	Total energy (MeV/100 pCi)	Fraction of total α energy
^{222}Rn	5.5	3.82 d	1.77×10^6	Excluded	None	None
^{218}Po (RaA)	6	3.11 min	996	13.69	1.36×10^4	0.11
^{214}Pb (RaB)	0 ^[a]	26.8 min	8583	7.69	6.60×10^4	0.51
^{214}Bi (RaC)	0 ^[a]	19.9 min	6374	7.69	4.90×10^4	0.38
^{214}Po (RaC')	7.69	164 μs	0.0008	7.69	0	0
Total: 1.3×10^5						

Figura 22.4: tabella con i dati protezionistici relativi al radon e ai suoi figli

L'attività del radon vale 100 pCu (working level per radon-222) in equilibrio secolare con i figli: di ognuno degli isotopi della catena possiamo calcolare il numero di atomi, che hanno tutti la stessa attività. Il numero di nuclei è dato

da:

$$N_{at} = \frac{AT_{1/2}}{\ln 2} \quad (22.12)$$

Se inspiro 100 pCu si hanno tutti questi nuclei nel volume inspirato. Quanta energia rilasciano quando decadono? In 3.8 giorni il volume decade e l'energia totale emessa non comprende quella del radon, perché viene anche espirato e non contribuisce alla dose effettiva. L'energia totale vale 1.3×10^5 MeV.

Supponiamo di vivere in 3.7 Bq/m³ di radon-222 in equilibrio: quanta dose viene assorbita in un anno dai polmoni? Noi siamo un filtro che trattiene il 25% del radon più figli in aria, quindi abbiamo deposizione e ritenzione pari a 25%, la massa dei polmoni è 1000 g e l'inalazione 23 m³/d. Otteniamo:

$$E = 23 \times 0.25 \times 365 \times 1.3 \times 10^5 = 2.7 \times 10^8 \text{ MeV}/y \quad (22.13)$$

$$D = 2.7 \times 10^8 \times \frac{1}{1000} \times 1.6 \times 10^{-10} = 0.044 \text{ mGy}/y \quad (22.14)$$

$$D_{efficace} = E = D \cdot w_R \cdot w_T = D \times 20 \times 0.12 = 0.1 \text{ mSv}/y \quad (22.15)$$

Per ottenere la dose efficace moltiplico per 20 che è il peso dei nuclei e per 0.12 che è il peso dell'organo. La scoperta della pericolosità del radon è avvenuta in relazione ai minatori delle miniere di uranio dove la concentrazione era 3.7 Bq/litro!

In Italia non c'è una normativa specifica. La normativa europea dice che nelle abitazioni la concentrazione di radon deve essere minore a 400 Bq/m³. Ci sono però leggi per i lavoratori che stabiliscono 500 Bq/m³ come massimo. Negli anni '90 sono stati fatti degli studi sulla concentrazione di radon nelle abitazioni.

Come si misura la concentrazione di radon? Varia con le condizioni meteo, non è costante. Si fa una misura integrata su 6 mesi utilizzando rivelatori di tipo passivo e si assume che il **fattore convenzionale di conversione** sia:

$$\frac{X}{D} = 3 \times 10^{-9} \text{ Sv/Bq hm}^{-3} \quad (22.16)$$

Come si può vedere in figura (22.5) il radon passa attraverso l'acqua, dai materiali di costruzione, dalle fondamenta (terreno, materiali di riporto). Il problema principale è dove la ventilazione è più bassa. Una soluzione è mettere dei fogli isolanti intorno alla casa e dei sistemi che pompano da sotto e mandano fuori l'aria.

Misure della presenza di radon vengono fatte con il rivelatore CR-39, costituito da un barattolo di plastica con un tappo munito di filtro: quando il radon entra decade e se i figli si depositano sulla plastica provocano deterioramenti sul foglio di plastica: tolto il foglio viene messo in un bagno chimico e si contano quanti punti sono stati danneggiati.

La dose annuale media di origine naturale data alla popolazione italiana è riportata nella tabella in figura (22.6).

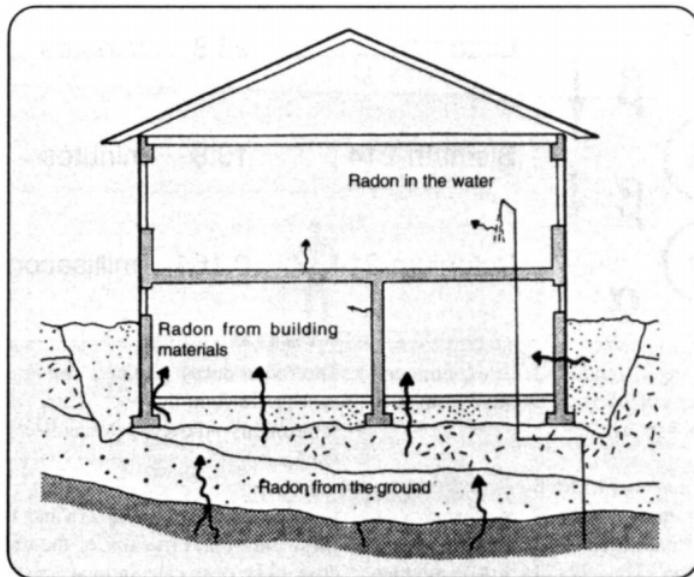


Figura 22.5: *vie possibili di entrata del radon nelle abitazioni*

SORGENTE	Dose efficace media (μSv)
Inalazione (radon e prodotti di decadimento)	1000 - 2000
Radiazione di origine terrestre	300 - 500
Radiazione cosmica	270
Radioattività cosmogenica	10
TOTALE	1600 - 2800

Figura 22.6: *dose annuale media naturale ricevuta dalla popolazione italiana*

È stata fatta una campagna di misura tra il 1990 e il 1996, i cui risultati sono stati pubblicati nel 2005, riportando le concentrazioni medie nelle regioni. I risultati sono stati riportati nella cartina in figura (22.7). Il valore medio è di $70 \text{ Bq/m}^3 = 1.8 \text{ mSv/year}$.

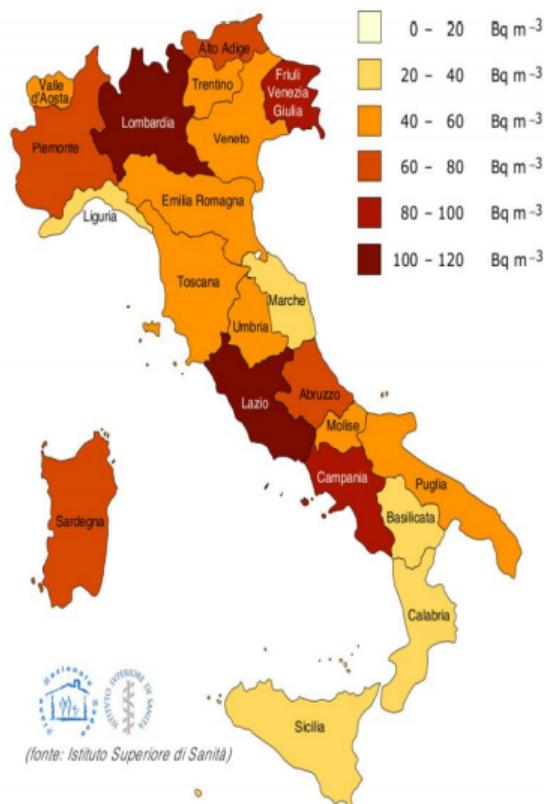


Figura 22.7: valori delle concentrazioni di radon per regione italiana

22.3 CALCOLO DELLA DOSE DA POTASSIO-40

Il potassio-40 è un isotopo naturale che ha decadimento in due possibilità: decadimento β^+ e cattura elettronica (raggi X) e decadimento β^- . I due possibili decadimenti sono riportati in figura (22.8).

Se decade sull'argon, a sua volta decade γ nel 100% dei casi. L'energia di decadimento dell'argon è 1460 keV, del β^+ 240 keV, β^- 560 keV. Il decadimento β^+ poi si annichilla e forma due fotoni da 511 keV.

Nel corpo abbiamo una massa di circa 70 kg e l'attività media in corpo umano di ${}^{40}\text{K}$ è di 4.4 kBq che corrisponde a 140 g di potassio naturale.

Per calcolare la dose applichiamo la formula:

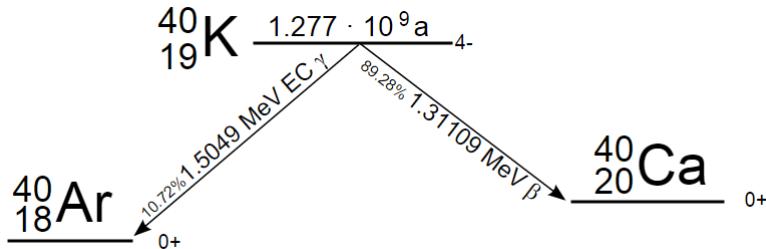


Figura 22.8: decadimento del potassio-40

Dose = Energia * fattore di conversione ai joule * attività * 1 su massa * branching ratio

- decadimento β^- : la dose si calcola sapendo che il potassio è distribuito uniformemente e tutto quello emesso con β^- è assorbito tutto.

$$D = 5.6 \times 10^5 \text{ eV} \cdot 1.6 \times 10^{-19} \frac{\text{J}}{\text{eV}} \cdot 4.4 \times 10^3 \frac{1}{\text{s}} \cdot 3.14 \times 10^7 \frac{\text{s}}{\text{y}} \frac{1}{70\text{kg}} \cdot 0.9 = \\ = 0.16 \frac{\text{mGy}}{\text{y}} \quad (22.17)$$

- decadimento β^+ :

$$D = 2.4 \times 10^5 \text{ eV} \cdot 1.6 \times 10^{-19} \frac{\text{J}}{\text{eV}} \cdot 4.4 \times 10^3 \frac{1}{\text{s}} \cdot 3.14 \times 10^7 \frac{\text{s}}{\text{y}} \frac{1}{70\text{kg}} \cdot 0.01 = \\ = 8 \frac{\mu\text{Gy}}{\text{y}} \quad (22.18)$$

- decadimento γ : AF(tb->tb): la frazione dell'energia emessa nel corpo che si ferma effettivamente nel corpo. è 0.34.

$$D = 2 \cdot 5.11 \times 10^5 \text{ eV} \cdot 1.6 \times 10^{-19} \frac{\text{J}}{\text{eV}} \cdot 4.4 \times 10^3 \frac{1}{\text{s}} \cdot 3.14 \times 10^7 \frac{\text{s}}{\text{y}} \frac{1}{70\text{kg}} \cdot 0.01 \cdot 0.34 = \\ = 1.1 \frac{\mu\text{Gy}}{\text{y}} \quad (22.19)$$

- decadimento γ 1460: AF = 0.3

$$D = 1.46 \times 10^6 \text{ eV} \cdot 1.6 \times 10^{-19} \frac{\text{J}}{\text{eV}} \cdot 4.4 \times 10^3 \frac{1}{\text{s}} \cdot 3.14 \times 10^7 \frac{\text{s}}{\text{y}} \frac{1}{70\text{kg}} \cdot 0.1 \cdot 0.3 = \\ = 15 \frac{\mu\text{Gy}}{\text{y}} \quad (22.20)$$

- Cattura elettronica: prende un elettrone dalla shell K, che si riempie. Ha energia di legame di 3.2 keV: quando la shell K si riempie, la cascata totale riemette 3.2 keV. Queste emissioni vengono tutte riassorbite e hanno peso

1: AF =1.

$$\begin{aligned} D &= 3.2 \times 10^3 eV \cdot 1.6 \times 10^{-19} \frac{J}{eV} \cdot 4.4 \times 10^3 \frac{1}{s} \cdot 3.14 \times 10^7 \frac{s}{y} \frac{1}{70kg} \cdot 0.1 \cdot 1 = \\ &= 0.1 \frac{\mu Gy}{y} \quad (22.21) \end{aligned}$$

Abbiamo le dosi principali che corrispondono a circa 0.200 mGy all'anno.
Ovviamente non tutti gli organi fissano il potassio nella stessa maniera, per il conto corretto non si guarda il TB (total body), ma come si distribuisce la dose in tutti gli organi pesando per il peso per ogni organo.