

## **Biofisica**

### **Struttura delle membrane**

#### Forze di dispersione (di Van der Waals)

Operano in tutti i gruppi carichi o neutri di una molecola.

La distribuzione di carica elettronica di una molecola A fluttua nel tempo. Per un brevissimo intervallo di tempo si potrà formare un dipolo elettrico in A, che ne indurrà un altro in una molecola B contigua.

#### Legame idrofobico

Le molecole d'acqua, mediante attrazione dipolare (legame elettrostatico) e legami a idrogeno, formano un liquido altamente strutturato. L'inserzione di un soluto in acqua ne rompe la struttura: se il soluto è polare, si formano nuove interazioni dipolari e a idrogeno tra il soluto e l'acqua; *se il soluto è apolare, le molecole d'acqua creano una struttura più ordinata e rigida che nel solvente puro*. Per fare ciò, occorre energia.

Due molecole apolari tendono ad associarsi in acqua. Infatti, la superficie del solido che racchiude le due molecole associate è minore della somma delle superfici che contengono ogni singola molecola. Perciò il numero di molecole d'acqua ordinate attorno alle due molecole associate è minore del numero attorno alle singole molecole. Diminuisce quindi l'energia spesa per formare la struttura rigida dell'acqua quando le molecole si associano.

La *tendenza delle molecole apolari ad associarsi in acqua* è chiamata **legame idrofobico**. Esso, in altri termini, è la tendenza ad avere meno molecole d'acqua possibili intorno alla molecola apolare.

#### Polimorfismo dei lipidi in acqua

In acqua i lipidi si aggregano. Le code apolari sono associate da legami idrofobici e a idrogeno. Le teste polari interagiscono tra loro mediante forze elettrostatiche e legami a idrogeno.

Gli aggregati lipidici possono assumere forme diverse:

1. Forma micellare. E' costituita da sfere, dove i lipidi rivolgono le teste polari verso l'acqua e le code apolari verso l'interno della micella. Al di sopra della CMC (concentrazione micellare critica), i lipidi, dispersi in un mezzo acquoso, formano micelle. Esiste una forma micellare inversa (teste verso l'interno e code verso l'esterno).
2. Forma lamellare. E' costituita da un doppio strato di lipidi (vedi membrane naturali).
3. Forma esagonale. E' costituita da lunghi cilindri di lipidi localizzati ai vertici e al centro di un esagono. Esiste una forma esagonale inversa.

Il principio che regola il tipo di forma assunta dall'aggregato lipidico è il *principio dell'ottimizzazione dell'impaccamento dei lipidi* nell'aggregato. Un aggregato si dispone in forma:

1. Micellare, quando la configurazione dei lipidi è conica;

2. Esagonale, quando essa è conica troncata;
3. Lamellare, quando essa è cilindrica;
4. Esagonale inversa o micellare inversa, quando essa è conica troncata inversa.

Transizione della forma da lamellare a non lamellare si ha ogniqualvolta viene indotta nel fosfolipide una deformazione tale da fargli assumere una configurazione simile a un cono. Ad es., se diminuisce il contenuto d'acqua o se aumenta la temperatura, l'aggregato passerà da lamellare a micellare; se si legano cationi divalenti e ioni idrogeno a certi fosfolipidi negativi, le teste si avvicinano e si passa dalla forma lamellare a quella micellare.

#### Fluidità dei doppi strati

La fluidità della membrana può controllare l'efficacia di molti processi enzimatici. La fluidità è il reciproco della viscosità. I doppi strati devono essere considerati come un insieme di microdomini, ciascuno con una propria viscosità. Infatti, le membrane sono sistemi anisotropi.

#### Organizzazione e mobilità nei doppi strati

Un lipide può assumere due configurazioni, una stabile (*trans*) e una instabile (*gauche*). Esse sono facilissimamente intercambiabili. Quando tutti i gruppi  $-CH_2$  sono nella configurazione *trans*, la catena si estende linearmente. Quando due  $-CH_2$  assumono la configurazione *gauche*, la catena si piega di  $30^\circ$  in corrispondenza del legame C-C. Una transizione *trans-gauche* è stericamente impedita a causa dello stretto impaccamento dei fosfolipidi. La transizione può avvenire solo se la catena adotta un'ulteriore rotazione *trans-gauche* nel gruppo  $-CH_2$  separato dal primo da un legame C-C.

Questi attorcigliamenti *g-t-g* sono chiamati **kinks**. Essi hanno le seguenti proprietà:

1. Aumentano di numero all'aumentare della temperatura.
2. Si formano più facilmente vicino al metile terminale della catena.
3. Possono muoversi rapidamente lungo l'asse molecolare.
4. Accorciano e fanno aumentare di volume la catena.
5. Creano degli intercedimenti tra le code dei lipidi tra i quali possono intrufolarsi molecole d'acqua. Muovendosi lungo tutta la catena, i kinks permettono all'acqua di attraversare la membrana.

Altri moti dei fosfolipidi:

1. Rotazione attorno all'asse molecolare;
2. Diffusione laterale;
3. Fluttuazione verticale della catena;
4. Variazione di inclinazione;
5. Scambio dei fosfolipidi appartenenti a strati opposti (*flip-flop*) (molto lento);
6. Diffusione intermembrana (scambio di un fosfolipide da una membrana a un'altra) (molto lento);
7. Fluttuazione di forma e di spessore dell'intero doppio strato.

#### Diffusione laterale dei fosfolipidi nei doppi strati

Un lipide, su una membrana, si muove di moto browniano (rimbalzando sugli ostacoli). La distanza media  $\langle d \rangle$  tra l'origine e il punto finale raggiunto è

proporzionale a  $\sqrt{t}$  :

Dove D è il **coefficiente di diffusione**, che è dell'ordine di  $10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$  per i fosfolipidi. La diffusione laterale avviene in tempi brevi ( $\mu\text{s}$ ).

#### Separazione laterale di fase

In una membrana si possono creare delle zone in cui un lipide è più concentrato degli altri. Si parla allora di *domini*. I domini di lipidi sono meno fluidi del resto della membrana (**domini quasi-solidi**), perché la concentrazione dei lipidi è maggiore. I fattori che inducono una separazione laterale di fase e l'irrigidimento dei domini sono:

1. Proteine intrinseche ed estrinseche. Impaccano le molecole di un certo lipide.
2. Ioni ( $\text{Ca}^{++}$  e  $\text{H}^+$ ). Segregano un tipo di lipide da un altro, mediante interazioni elettrostatiche.
3. Colesterolo. Induce la formazione di domini ricchi e di domini poveri di colesterolo.

Piccole variazioni di temperatura influenzano la dimensione e la fluidità dei domini quasi-solidi. Siccome l'attività di molti enzimi dipende dalla fluidità del loro microambiente, è possibile regolare, mediante la temperatura, la funzionalità di tali enzimi.

#### Mobilità delle proteine intrinseche nelle membrane naturali

Come i lipidi, anche le proteine possono muoversi nel doppio strato. Tre tipi di moto:

1. *Moto oscillatorio* lungo la direzione normale alla superficie della membrana;
2. *Moto rotazionale*. Le proteine hanno alte velocità rotazionali attorno all'asse normale alla superficie della membrana. I moti paralleli alla membrana sono invece molto piccoli.
3. *Moto di diffusione laterale*. Il coefficiente di diffusione (D) per una proteina del peso molecolare di 100.000 dalton è dell'ordine di  $10^{-10} \text{ cm}^2/\text{s}$ , cioè 100 volte minore del D dei lipidi (perché le proteine sono molto più grosse dei lipidi). Il cammino medio percorso da una proteina si ottiene con la stessa formula che descrive il moto di diffusione laterale dei fosfolipidi:

Tale formula può servire a calcolare la velocità di quelle reazioni metaboliche che dipendono dalla collisione tra le specie reagenti, e quindi dalla loro diffusione.

Esistono dei validi motivi per credere che la velocità di reazione tra proteine aumenta quando esse sono inserite nella membrana:

4. Sulle membrane alcune macro-molecole compartimentalizzano le proteine in aree ben definite. Esse sono perciò limitate negli spostamenti e si scontrano più facilmente.
5. Perché una reazione avvenga, bisogna che i centri reagenti delle proteine vengano a contatto. In acqua, le molecole hanno tre gradi di libertà (x, y, z). Nella membrana solo uno (perpendicolarmente alla membrana). Così nella

membrana le proteine fanno meno fatica a incontrarsi, perché devono ruotare di meno (un solo grado di libertà).

6. Il tempo richiesto per l'incontro di due macromolecole è minore se il mezzo è bidimensionale (l'acqua è tridimensionale).

## **Diffusione e potenziali elettrici di membrana**

### Potenziale elettrochimico

Il **potenziale elettrochimico** è *il lavoro che si deve compiere, a temperatura e pressione costanti, per portare una mole di un composto da una distanza infinita fino all'interno di una fase di composizione chimica costante.*

Dove  $\mu$  è una costante,  $X$  la frazione molare del composto nella fase,  $\psi$  il potenziale elettrico della fase,  $F$  la costante di Faraday (carica di uno ione monovalente) e  $z$  è la valenza del composto. In assenza di forze elettriche, il potenziale elettrochimico si riduce al potenziale chimico:

La differenza di potenziale elettrochimico di un composto tra due fasi è il lavoro che si deve compiere per portarlo da un punto interno della prima fase a un punto interno della seconda:

La velocità di diffusione (flusso  $J$ ) è direttamente proporzionale alla differenza di potenziale elettrochimico.

### Diffusione semplice

Si definisce **flusso  $J$**  *il numero di moli che attraversano un  $\text{cm}^2$  di superficie nell'unità di tempo.*

Il flusso si può scrivere (equazione di Nernst-Planck):

Se non c'è potenziale elettrico, o se le **molecole** che diffondono sono **neutre**, il flusso diventa proporzionale al solo gradiente di concentrazione (**equazione di Fick**):

Diffusione di molecole neutre attraverso la membrana

Vale la legge:

Dove  $P$  è il *coefficiente di permeabilità* e  $\Delta C$  è la differenza di concentrazione;  $k$  è il coefficiente di ripartizione acqua/membrana,  $D$  è il coefficiente di diffusione e  $x$  è lo spessore della membrana;  $[c]_w$  e  $[c]_n$  sono le concentrazioni molari di acqua e soluto.

Si nota che più sottile è la membrana (minore è  $x$ ), più grande è  $P$ .

Diffusione di acqua attraverso la membrana

Quando una membrana semipermeabile (permeabile solo all'acqua e non ai soluti) separa due soluzioni acquose a differente concentrazione di soluti, *l'acqua passa dalla soluzione più diluita a quella più concentrata (osmosi).*

*L'osmosi è la diffusione dell'acqua conseguente a un gradiente di frazione molare di acqua.*

Dove  $X_w$  sono le moli d'acqua.

Se la soluzione è diluita,  $X_w$  è piccola  $\rightarrow X_w \approx 1$ .

Se la soluzione è concentrata,  $X_w$  è grande  $\rightarrow X_w$  è piccola.

La frazione molare dell'acqua ( $X_w$ ) è una quantità poco maneggevole. E' perciò meglio usare l'**osmolarità**, cioè *la somma delle concentrazioni molari di tutti i soluti*.

Si ha:

Dove  $[C_i]_1$  è la concentrazione all'interno e  $[C_i]_2$  è la concentrazione all'esterno;  $P$  è il coefficiente di permeabilità dell'acqua e  $J_w$  è il flusso dell'acqua attraverso la membrana.

Essendo:

Dove  $\Delta \pi$  è la differenza di pressione osmotica,  $R$  è la costante dei gas e  $T$  la temperatura assoluta.

Allora:

Analogamente, il flusso di acqua conseguente ad una differenza di pressione idrostatica  $\Delta P$  si scrive:

### Diffusione facilitata

Mentre nella diffusione semplice la membrana si comporta come un supporto inerte che serve solo a separare due soluzioni e a regolare la velocità del flusso mediante il coefficiente di permeabilità, nella diffusione facilitata la membrana interviene in modo più diretto nel controllare il processo di diffusione. Si riscontra che:

1. Certe molecole, che per le loro caratteristiche chimiche dovrebbero diffondere molto lentamente attraverso la membrana, presentano velocità di diffusione assai elevate.
2. La membrana lascia passare selettivamente certe molecole.
3. Il processo di diffusione viene controllato da altre molecole, che possono competere col flusso, inibirlo o accelerarlo.
4. La velocità di diffusione (flusso) raggiunge un valore massimo  $V_{max}$  (saturazione) non superabile, per quanto si aumenti la differenza di concentrazione delle molecole diffondenti. Nella diffusione semplice, invece, la velocità è proporzionale alla differenza di concentrazione.

Per la diffusione facilitata è necessaria la presenza di un **carrier**, che leghi il substrato e lo trasporti (meccanismo *ferry boat*) o lo faccia passare attraverso di sé (meccanismo *gated pore*), per farlo raggiungere l'interno della cellula.

E' possibile calcolare la **velocità di diffusione facilitata**, partendo da quattro ipotesi:

1. Reazione carrier-substrato (CS) in equilibrio;
2. Costanti di dissociazione uguali ai due lati della membrana;
3. Costanti di diffusione uguali per C e CS;
4. Stato stazionario ( $V_{max}$  = costante).

Dove  $[S]_1$  è la concentrazione del substrato al lato 1 (esterno),  $[S]_2$  è la concentrazione del substrato al lato 2 (interno).

La massima velocità di diffusione si ottiene quando  $[S]_1$  tende a infinito e  $[S]_2 = 0$ .

Quando  $[S] \ll$  , diffusione semplice e diffusione facilitata coincidono. Ciò si verifica quando sono piccole  $[S]$  o l'affinità del *carrier* per il substrato.

Rappresentazione grafica della diffusione semplice e della diffusione facilitata:

Se la diffusione facilitata riguarda ioni, entra in gioco il potenziale elettrico. Ma se la carica netta del complesso *carrier-substrato* è 0, allora vale la regola di prima (processo elettroneutro). Es.: negli eritrociti-> Banda 3 (+) con Cl<sup>-</sup> o HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

### Trasporto attivo

*Il trasporto attivo è la traslocazione di un substrato contro gradiente elettrochimico.* Tale trasporto avviene via carriers. Esso controlla importanti processi:

1. Mantenimento di una composizione stabile di ioni e molecole all'interno della cellula (altrimenti essi diffonderebbero di diffusione semplice secondo il loro gradiente).
2. Formazione di gradienti elettrochimici (modo di immagazzinare energia).
3. Controllo rapido della concentrazione di importanti molecole regolatrici.

Diffusione facilitata -> da alte a basse concentrazioni (potenziali elettrochimici)

Trasporto attivo -> da basse ad alte concentrazioni (potenziali elettrochimici)

### **Trasporto attivo -> trasporto contro gradiente -> richiede energia**

L'energia richiesta può essere calcolata come la differenza di potenziale elettrochimico della sostanza nelle soluzioni ai due lati della membrana. Quest'energia proviene o direttamente da reazioni metaboliche (trasporto attivo primario) o da quella immagazzinata da gradienti ionici (trasporto attivo secondario).

### Trasporto attivo primario

*Il trasporto attivo primario è la traslocazione di substrati contro gradiente mediante un sistema proteico che utilizza l'energia metabolica (pompa).* L'energia è fornita dall'idrolisi di ATP.

Il meccanismo è l'inverso della diffusione facilitata: l'ATP viene impiegato per aumentare l'affinità del *carrier* per il substrato al lato esterno della membrana (lato 2), in cui il substrato è meno concentrato, in modo da permettere la traslocazione del substrato da zone a minore concentrazione a zone a maggiore concentrazione (da 2 a 1 = dall'esterno all'interno).

Si definisce un **rapporto di accumulazione**, che è *la concentrazione massima di substrato che può venir accumulata quando il sistema arriva all'equilibrio*:

Se, per esempio, aumenta di 1000 volte l'affinità del *carrier* per il substrato al lato 2 (esterno), il substrato può venir accumulato 1000 volte di più nella soluzione 1 rispetto alla 2.

### Trasporto attivo secondario

*Nel trasporto attivo secondario i substrati sono traslocati contro gradiente elettrochimico mediante l'accoppiamento con il flusso di certi ioni che diffondono*

*nel verso del loro gradiente elettrochimico.* Tali ioni sono  $\text{Na}^+$  per la maggior parte degli animali.

2 meccanismi:

1. **Carrier symporter:**  $\text{Na}^+$  ed S vengono trasportati nello stesso verso. Nelle cellule epiteliali dell'intestino, ad es., il glucosio passa nel sangue per trasporto attivo secondario, grazie all'energia fornita dalla diffusione semplice (secondo gradiente) dell' $\text{Na}^+$  nella stessa direzione.
2. **Carrier antiporter:**  $\text{Na}^+$  viene traslocato nel senso opposto di S. Un esempio è lo scambio  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , che impedisce al pH citoplasmatico di abbassarsi in seguito a processi metabolici.

### Potenziale di superficie

*Quando due conduttori di elettricità sono posti in reciproco contatto, si instaura una differenza di potenziale elettrico, dovuto al passaggio di cariche tra le fasi.*

Descriviamo quanto avviene all'interfase tra un solido e una soluzione salina acquosa, supponendo che il solido assorba cationi sulla superficie. Gli anioni in soluzione sono attratti dalle cariche positive del solido e si distribuiscono in due zone. Nella prima zona, la **zona di Stern**, gli anioni sono parzialmente desolvatati e non possono muoversi. La quantità di anioni in tale zona è di solito inferiore alla quantità di cationi presenti sul solido. Per elettroneutralità, ci dev'essere un eccesso di anioni in una zona contigua, detta **zona diffusa**. Gli ioni della zona diffusa, a differenza di quelli della zona di Stern, possono muoversi liberamente.

Il potenziale sulla superficie del solido è positivo e viene chiamato **potenziale di superficie  $\Psi_s$** . Il potenziale quindi diminuisce: alla separazione tra la zona di Stern e la zona diffusa prende il nome di **potenziale zeta  $\zeta$** . Infine il potenziale è zero nella soluzione esterna, per il principio di elettroneutralità.

Il potenziale zeta è tanto più elevato, in valore assoluto, quanto maggiore è lo squilibrio di carica tra la zona di Stern e il solido, cioè quanto maggiore è il numero di cariche in eccesso nella zona diffusa. Il potenziale zeta è anche chiamato *potenziale elettrocinetico*.

**Tutte le membrane hanno un  $\Psi_s$** , a causa della presenza di lipidi e/o proteine cariche.

Cariche -  $\rightarrow$  pH più alto del pH della soluzione acquosa

Cariche +  $\rightarrow$  pH più basso del pH della soluzione acquosa

$\Psi_s$  può diventare un **potenziale transmembrana**.

*Se la densità superficiale di carica sulle due superfici della membrana è diversa, sono diversi anche i corrispondenti  $\Psi_s$ , e quindi si forma una differenza di potenziale transmembrana  $\Delta \Psi_m$ .*

Ciò si verifica quando ai lati della membrana è diversa:

1. La distribuzione di proteine o lipidi carichi;
2. La concentrazione di certi ioni che neutralizzano le cariche superficiali.

### Potenziale di superficie ed elettroforesi

Anche particelle solide e biomolecole, sospese in una soluzione, presentano potenziali di superficie. Applicando un campo elettrico (elettroforesi) alla superficie, esse migrano verso il potenziale di segno opposto alla loro carica totale.



La velocità di migrazione è proporzionale alla carica totale e al campo elettrico imposto; inversamente proporzionale alla viscosità della soluzione. La carica totale dipende da  $\zeta$ , infatti gli ioni della zona di Stern sono fissi: è come se facessero parte della biomolecola.

*Elettroforesi -> separa le biomolecole in base alla loro carica*

### Potenziale di equilibrio

Un sistema costituito da una membrana e da un certo numero di ioni che diffondono attraverso la membrana si dice *all'equilibrio quando tutti i flussi sono nulli*.

Consideriamo una membrana che separa due soluzioni contenenti NaCl 1 e 0,1 M. Supponiamo che la membrana sia permeabile solo al  $\text{Na}^+$ . Il  $\text{Na}^+$  comincia a diffondere dalla soluzione 1 (in cui è più concentrato), alla 2. Man mano che il  $\text{Na}^+$  passa si accumulano cariche positive nella soluzione 2, per cui si forma una differenza di potenziale crescente. Quando la forza dovuta al gradiente di concentrazione diventa uguale ed opposta a quella dovuta al gradiente di potenziale elettrico, il flusso di  $\text{Na}^+$  diventa nullo e il sistema arriva all'equilibrio.

Si ha il **potenziale di Nernst-Donnan**:

Per ioni monovalenti (es.,  $\text{Na}^+$ )  $\Delta\Psi=60$  mV. Quindi:

*Per avere una differenza di potenziale Donnan, bisogna che la membrana sia impermeabile ad almeno una specie ionica.*

Nel caso delle cellule, lo ione non permeante è generalmente una proteina carica, troppo grossa per poter passare la membrana. Consideriamo una cellula la cui membrana è permeabile a  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ , ma non a una proteina  $\text{Pr}^-$ . La proteina può essere inserita nella cellula sotto forma di sale di  $\text{Na}^+$ . Essendo la  $[\text{Na}^+]$  interna superiore a quella esterna,  $\text{Na}^+$  esce formando una differenza di potenziale elettrico (negativo all'interno a causa della  $\text{Pr}^-$ ). Avremo quindi:

### Rapporto Donnan

La differenza di potenziale elettrico all'equilibrio regola la distribuzione ai lati della membrana di tutti gli ioni permeanti: cationi a valenza  $Z_c$  e concentrazione  $[C]$  e anioni a valenza  $Z_a$  e concentrazione  $[A]$ . Si ottiene:

$R$  è il **rapporto Donnan**. Esso regola la distribuzione di ioni permeanti attraverso la membrana. Ad es., se la membrana è permeabile agli ioni  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Cl}^-$  e

SO<sub>4</sub><sup>-</sup>, se  $R = 10$ : un catione monovalente è 10 volte più concentrato nella soluzione 1 rispetto alla 2, mentre un catione bivalente vi è concentrato 100 volte di più.

#### Potenziale di equilibrio e pressione osmotica nelle cellule

Siccome il compartimento interno di tutte le cellule contiene macromolecole cariche non permeanti, si instaura un differenza di potenziale Donnan tra interno ed esterno della cellula. Tale differenza di potenziale distribuisce gli ioni permeanti in modo tale che l'osmolarità interna della cellula è sempre maggiore di quella esterna:

Si crea perciò una differenza di pressione osmotica che fa entrare acqua dentro le cellule. Ma perché le cellule non esplodono? Ciò non avviene perché le cellule dispongono di pompe che ridistribuiscono in modo attivo alcuni degli ioni permeanti, in modo tale che la cellula si trovi sempre in condizioni iso-osmotiche. Gli eritrociti, ad es., hanno una pompa che espelle Na<sup>+</sup> e introduce K<sup>+</sup>. Il solo ione che si distribuisce secondo rapporto Donnan è il Cl<sup>-</sup>. Emolisi può essere indotta da avvelenamento della pompa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> o da un aumento della permeabilità della membrana ai cationi (in tal modo la velocità di diffusione diventa maggiore della velocità di funzionamento della pompa).

#### Potenziale di stato stazionario

Un sistema costituito da una membrana e da un certo numero di ioni che diffondono attraverso la membrana si dice *in stato stazionario*, quando i flussi sono costanti nel tempo.

Consideriamo un sistema costituito da una membrana che separa due soluzioni di NaCl 1 e 0,1 M. Supponiamo che la membrana sia permeabile ad entrambi gli ioni Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup>, ma che  $P(\text{Na}^+) > P(\text{Cl}^-)$  (= coefficienti di permeabilità). Inizialmente passa Na<sup>+</sup> con velocità maggiore del Cl<sup>-</sup>, creando una differenza di potenziale elettrico. Il potenziale rallenta il flusso di Na<sup>+</sup> e accelera il flusso di Cl<sup>-</sup>, per cui, in breve tempo, i due flussi diventano costanti nel tempo, cioè il sistema arriva allo stato stazionario. Avremo:

Esso è chiamato **potenziale Goldman**. Quando  $P(\text{Na}^+) \gg P(\text{Cl}^-)$ ,  $\Delta\Psi$  è molto grande e coincide con la differenza di potenziale Donnan calcolata per il Na<sup>+</sup>. Quando  $P(\text{Na}^+) = P(\text{Cl}^-)$ ,  $\Delta\Psi = 0$ . Quando  $P(\text{Cl}^-) \gg P(\text{Na}^+)$ ,  $\Delta\Psi$  è molto piccola e coincide con la differenza di potenziale Donnan calcolata per il Cl<sup>-</sup>.

*Per avere una differenza di potenziale Goldman, bisogna che almeno uno ione abbia un coefficiente di permeabilità diverso da quelli degli altri ioni permeanti.*

## **Spettroscopie, magnetismo e NMR**

### Principi di magnetismo

In natura, elettricità e magnetismo non sono indipendenti. Quando una carica elettrica è in moto, essa genera un campo magnetico.

*Un campo elettrico variabile nel tempo genera un campo magnetico.*

Analogamente, quando un corpo magnetico è in moto, esso genera un campo elettrico.

*Un campo magnetico variabile nel tempo genera un campo elettrico.*

Un corpo magnetizzato possiede due poli magnetici non isolabili, uguali ed opposti. Esso è un dipolo magnetico. Il vettore che lo caratterizza è detto **momento dipolare magnetico**  $m$ . Il dipolo magnetico si comporta in modo analogo al dipolo elettrico:

1. Le linee di forza generate da un dipolo magnetico sono simili a quelle del campo elettrico generate da un dipolo elettrico.
2. L'interazione tra dipolo magnetico e campo magnetico è simile a quella tra dipolo elettrico e campo elettrico.
3. Due dipoli magnetici interagiscono tra loro in modo analogo a due dipoli elettrici.

Quando una carica elettrica entra in moto accelerato, o un dipolo elettrico o magnetico oscilla, si genera un campo magnetico variabile. Esso genera un campo elettrico variabile, che a sua volta genera un campo magnetico variabile, e così via. In tal modo le onde elettromagnetiche si propagano nel vuoto senza bisogno di cariche elettriche alla velocità della luce.

Quando in una spira circolare di un conduttore circola corrente elettrica uniforme, si genera un campo magnetico statico. Siccome il moto orbitale e di spin di un elettrone in un atomo è paragonabile alla circolazione di piccole correnti elettriche uniformi, si può concludere che ad ogni elettrone è associato un dipolo magnetico. Anche i protoni e i neutroni possiedono momenti angolari e di spin: ad ogni nucleone è associato un dipolo magnetico.

Il paramagnetismo elettronico è 1000 volte più grande del magnetismo nucleare.

*In un campo magnetico, la differenza di energia tra due livelli contigui per lo spin elettronico è 1000 volte superiore a quella per lo spin nucleare.* Per questo una radiazione elettromagnetica che genera transizioni di spin elettronico deve avere un'energia - e quindi una frequenza - 1000 volte maggiore di quella che genera transizioni di spin nucleare.

### Livelli di energia e popolazione

Una molecola possiede un'energia totale che è somma dei contributi di varie forme di energia. I valori dei vari tipi di energia esistono come insiemi discreti, cioè *sono possibili solo determinati valori di energia*. Il livello di energia minimo compatibile con una certa temperatura è definito **stato fondamentale**, mentre i livelli a energia maggiore sono definiti **stati eccitati**. Il rapporto tra il numero di molecole che risiedono nello stato fondamentale,  $N_f$ , e in uno stato eccitato,  $N_e$ , è dato dalla **formula di Boltzmann**:

Dove  $\Delta E$  è la differenza di energia tra i due stati,  $K_b$  è la costante di Boltzmann e  $T$  è la temperatura assoluta. Se  $\Delta E \ll K_b T$ , l'esponenziale tende a 1 e i due stati tendono ad essere ugualmente popolati. Se  $\Delta E \gg K_b T$ , l'esponenziale tende a infinito e lo stato fondamentale è molto più popolato dello stato eccitato. *Maggiore è il dislivello di energia tra due stati, maggiore è lo squilibrio di popolazione delle molecole nei due stati.*

### Transizioni tra livelli energetici

Consideriamo un insieme di molecole che possono esistere in due stati 1 e 0, con  $E_1 > E_0$ . Se una radiazione elettromagnetica è inviata a questo sistema, si ottengono transizioni tra i due stati quando la frequenza della radiazione è tale che:

Tale frequenza è detta **frequenza di risonanza**. *La radiazione elettromagnetica, alla frequenza di risonanza, provoca con ugual probabilità sia transizioni  $0 \rightarrow 1$ , che  $1 \rightarrow 0$ .*

Il primo fenomeno si chiama **assorbimento indotto** e provoca un'attenuazione dell'intensità della radiazione che è passata attraverso il sistema, in quanto parte della radiazione viene assorbita.

Il secondo fenomeno si chiama **emissione indotta** e provoca un aumento dell'intensità della radiazione che è passata attraverso il sistema ( $\rightarrow$  laser).

Le transizioni  $1 \rightarrow 0$  e  $0 \rightarrow 1$  sono equiprobabili: inizialmente, la radiazione farà passare un numero maggiore di molecole da 0 a 1 che viceversa, dato che, per la distribuzione di Boltzmann, lo stato 0 a minor energia è più popolato dello stato 1. In breve tempo la popolazione di molecole nei due stati si uguaglia. In questa situazione non sarebbe utilizzabile nessuna spettroscopia, perché non è osservabile nessun assorbimento netto di radiazioni. Esistono però dei meccanismi, detti **meccanismi di rilassamento**, capaci di riportare spontaneamente le molecole dallo stato eccitato allo stato fondamentale. Tali meccanismi sono due:

1. **Emissione spontanea radiativa.** Genera l'emissione di onde elettromagnetiche. Diventa efficace quando la  $\Delta E$  tra i due stati è alta. Quando i due stati hanno un'energia confrontabile, l'emissione spontanea radiativa diventa trascurabile.
2. **Emissione non radiativa indotta dall'ambiente.** Provoca decadimento  $1 \rightarrow 0$  senza emissione di onde elettromagnetiche, mediante l'interazione con l'ambiente. Maggiore è l'interazione con l'ambiente, più rapida è la velocità di decadimento, per cui più breve diventa il tempo in cui le molecole stanno nello stato 1 (eccitato).

### Le spettroscopie

*Le spettroscopie studiano come varia l'assorbimento di un'onda elettromagnetica in un campione al variare della frequenza dell'onda.* Il risultato è un insieme di **bande** di assorbimento centrate alle varie frequenze di risonanza. Tale insieme di bande si chiama **spettro**. Uno spettro contiene informazioni strutturali, dinamiche ed energetiche deducibili da posizione, dimensioni e intensità delle bande.

**Larghezza delle bande.** Nello spettro compare una banda, comprendente un

insieme di frequenze centrate sulla frequenza di risonanza. L'allargamento spettroscopico della banda è dovuto al "lifetime broadening", conseguenza del principio di indeterminazione di Heisenberg (l'energia di uno stato è tanto più indeterminata quanto minore è il tempo in cui il sistema risiede in tale stato). A causa dei meccanismi di rilassamento, una molecola risiede nello stato eccitato per pochissimo tempo e, quindi, la sua energia non è determinata esattamente.

**Intensità delle bande.** Dipende da tre fattori:

1. La concentrazione di molecole che assorbono. L'intensità è proporzionale alla concentrazione.
2. Il rapporto tra le popolazioni di molecole nello stato fondamentale e in quello eccitato. L'intensità è proporzionale al numero di molecole nello stato fondamentale, rispetto a quelle nello stato eccitato.
3. La probabilità di transizione. Le transizioni più probabili danno bande più intense. Le regole che aiutano a predire la probabilità di transizione si chiamano regole di transizione.

Nell'interazione di un'onda elettromagnetica con la materia può essere coinvolto il componente elettrico (assorbimento di luce, raggi X), magnetico (NMR, ESR), o entrambi.

### Transizioni di spin nucleare

*La Nuclear Magnetic Resonance (NMR) studia le transizioni di spin nucleare indotte dall'assorbimento di radioonde.*

Un nucleo avente spin totale  $I$  può assumere  $2I+1$  direzioni ( $\rightarrow$  livelli di energia). In presenza di radioonde, avvengono transizioni di spin: sono permesse solo le transizioni tra due livelli contigui.

Consideriamo il caso più semplice, quello in cui  $I=1/2$ , in cui si hanno solo due livelli di energia ( $2 \cdot 1/2 + 1 = 2$ ). Il momento magnetico di spin nucleare si dispone parallelo alla direzione del campo magnetico, nel livello di energia minore.

Il numero di spin nucleari nello stato fondamentale è in leggero eccesso rispetto a quelli nello stato eccitato ( $\rightarrow$  disposizione di Boltzmann). Tale squilibrio di popolazione conferisce al campione una magnetizzazione  $M$  (è la risultante dei momenti magnetici di tutti gli spin nucleari presenti nel campione), che è un vettore parallelo al campo magnetico  $H$ . Le radioonde inviate nell'NMR variano la magnetizzazione  $M$ ; si accosta una spira; si misura la corrente elettrica; si ottiene lo spettro di assorbimento.

L'assorbimento delle radioonde uguaglia in breve tempo le popolazioni di spin nei due stati. L'emissione non radiativa indotta dall'ambiente riporta molte molecole dallo stato eccitato a quello fondamentale. Maggiore è l'interazione degli spin con l'ambiente, più rapidamente rilassano gli spin, e minore è il tempo in cui gli spin stanno nello stato eccitato. Tale tempo di vita medio viene chiamato **tempo di rilassamento spin-reticolo  $T_1$** .

Spettro NMR  $\rightarrow$  insieme di bande che misurano l'intensità di corrente magnetica in funzione della frequenza della radioonda.

### Intensità delle bande

*L'area della banda è proporzionale al numero di nuclei nel campione la cui transizione di spin dà luogo a quella banda.*

### Posizione delle bande nello spettro

Supponiamo di avere una molecola che possiede tre atomi di H legati a gruppi chimici diversi tra loro. Teoricamente, gli spin nucleari degli H dovrebbero subire la transizione alla medesima frequenza di risonanza, indipendentemente dal gruppo a cui sono legati. Esiste però un fenomeno, chiamato **spostamento chimico**, che rende possibile distinguere il comportamento degli H appartenenti a gruppi diversi: *lo spostamento chimico è lo spostamento di frequenze di una banda in modo dipendente dal gruppo chimico a cui è legato l'atomo in esame.*

Una particella carica (o anche un elettrone), quando entra perpendicolarmente alle linee di forza di un campo magnetico uniforme, è soggetta a una forza che ne deforma il moto facendolo diventare circolare uniforme. Tale moto crea un piccolo campo magnetico  $H'$  di direzione opposta a quello principale  $H^\circ$  e di intensità proporzionale ad esso. Il campo magnetico risultante sarà pertanto:  $H = H^\circ - H'$ . Gli elettroni mascherano parzialmente il campo magnetico  $H^\circ$  risentito dal nucleo: maggiore è la densità elettronica intorno al nucleo, più forte è l'effetto di schermo.

Detto questo, si comprende perché lo stesso elemento, legato a gruppi atomici diversi, dia bande distinte: basta che vari la densità elettronica intorno al nucleo (dipende dalla differenza di elettronegatività); saranno diversi anche H e la frequenza di risonanza.

Consideriamo lo spettro NMR dell'alcol metilico ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ). L'ossigeno è più elettronegativo del carbonio. Ciò comporta che la densità elettronica intorno al nucleo di H è minore nel gruppo OH che nel gruppo  $\text{CH}_3$ . Il nucleo OH risente perciò di un campo magnetico effettivo H maggiore che nel gruppo  $\text{CH}_3$ . Nello spettro compaiono due bande: quella a frequenza maggiore corrisponde alla transizione di spin dell'H del gruppo OH, quella a frequenza minore alla transizione dei tre H del gruppo  $\text{CH}_3$ .

Il campo magnetico effettivo H è proporzionale a  $H^\circ$ . Perciò anche lo spostamento chimico aumenta con l'intensità di  $H^\circ$ .

### Suddivisione di una banda in più bande

Una molecola può possedere più atomi che hanno  $I < 0$ . Ciò comporta che il nucleo in esame risente dei piccoli campi magnetici creati dagli altri atomi. Questa interazione debole è responsabile della suddivisione di una banda in più bande.

*L'interazione spin nucleare-spin nucleare dà luogo alla struttura iperfine.*

Nell'alcol metilico  $\text{CH}_3\text{OH}$ , l'unico elemento con  $I < 0$  è l'H. Quanti sono i possibili campi magnetici creati dagli spin nucleari dei tre H del gruppo  $\text{CH}_3$ ? Ci sono 8 configurazioni possibili. I campi magnetici creati dalle 8 combinazioni si riducono a 4, nella pratica. Ciò comporta che occorrono 4 frequenze di risonanza per ottenere le transizioni dei tre H del gruppo  $\text{CH}_3$ . Si ottengono quattro bande (le due centrali sono più alte (->vedi combinazioni possibili)).

Analogamente, la banda dei tre h del gruppo  $\text{CH}_3$ , per interazione con i due possibili spin dell'H del gruppo OH, si suddivide in due bande di uguale altezza.

### Larghezza di una banda

E' un parametro sensibile allo stato di mobilità in cui sta la molecola.

Bande basse e larghe -> solidi (H varia molto da punto a punto)

Bande alte e strette -> liquidi (H tende ad essere in tutti i punti uguale)

### Applicazioni biologiche

Vantaggi:

- i campi magnetici e le radioonde non perturbano il campione;
- si conosce esattamente, nei casi più semplici, a che gruppi attribuire le bande di assorbimento, per cui è possibile seguire contemporaneamente il comportamento di più gruppi chimici;
- si possono ottenere importanti informazioni strutturali, chimiche, fisiche, dinamiche, ...;

Svantaggi:

- se le macromolecole sono troppo grosse, c'è difficoltà ad attribuire le bande a gruppi chimici definiti (il numero di bande è troppo alto);
- difficoltà a individuare gruppi poco mobili (bande larghe e basse); la mobilità decresce all'aumentare del peso molecolare;
- necessità di usare concentrazioni molari abbastanza grandi (almeno mM)

La sequenza di abbondanza degli elementi nelle molecole biologiche è: H, C, O, N, P, S. C, O, S hanno  $I=0$  (numero pari di nucleoni che si annullano). L'azoto ha  $I=1$ , ma dà bande larghe. I nuclei più studiati sono H e P.

### Applicazioni biomediche

Le applicazioni biomediche della tecnica NMR riguardano soprattutto la **tomografia NMR**. Esiste anche un altro tipo di ricerca, chiamata **Topical NMR**, mediante la quale è possibile, in piccoli volumetti di organo, lo spettro NMR di alcune molecole organiche. Viene generato un campo magnetico fortemente disomogeneo su tutta una certa zona, tranne un piccolo volumetto ( $\text{cm}^2$ ). In un certo intervallo  $\Delta x$  il campo ha intensità costante e la frequenza di risonanza ha un preciso valore. Al di fuori di tale intervallo, i nuclei in esame risentono del campo magnetico disomogeneo. Esso infatti ha un'intensità che varia da punto a punto, per cui le frequenze di risonanza diventano molte e la banda si allarga. Filtrando la parte allargata dello spettro, si ottiene solo il segnale delle molecole contenute nel volumetto.

## **Spettroscopia, assorbimento e fluorescenza**

### Diagramma dell'energia di una molecola biatomica

In una molecola biatomica la distanza di equilibrio dei due atomi è quella che rende minima l'energia potenziale della molecola. Gli atomi oscillano rispetto alla posizione di equilibrio secondo un moto armonico. La curva dell'energia potenziale ha un minimo alla distanza di equilibrio. Se i due atomi si avvicinano, l'energia potenziale aumenta, dato che bisogna spendere lavoro contro la repulsione elettrostatica tra le due nuvole elettroniche e i due nuclei. Se i due atomi si allontanano, l'energia potenziale aumenta, dato che bisogna spendere lavoro contro l'energia di legame.

I livelli vibrazionali degli atomi sono quantizzati: sono permessi solo alcuni livelli, corrispondenti ad una certa energia potenziale.

Nei moti degli atomi, l'energia totale si conserva: c'è un continuo trasformarsi dell'energia cinetica in potenziale, e viceversa.

Normalmente, la stragrande quantità delle molecole risiede nel livello vibrazionale più basso (0).

### **Spettroscopia visibile-ultravioletto - Assorbimento**

*Una radiazione luminosa, quando è assorbita da una molecola, genera transizioni elettroniche di orbitale.* Il gruppo molecolare responsabile dell'assorbimento si chiama **cromoforo**.

Nel diagramma dell'energia potenziale di una molecola biatomica, la transizione elettronica di orbitale fa passare la molecola dal livello vibrazionale di equilibrio dello stato fondamentale a uno dei livelli vibrazionali dello stato eccitato. La transizione viene rappresentata come una linea verticale, in quanto avviene in un tempo così breve rispetto ai moti vibrazionali degli atomi, che la distanza internucleare non varia durante il tempo di transizione (**principio di Franck-Condon**).

La transizione elettronica parte dallo livello 0 (dello stato fondamentale) a uno dei livelli dello stato eccitato (0', 1', 2', ...). Essa porta la molecola in quel livello vibrazionale dello stato eccitato in cui è più grande il quadrato della funzione d'onda.

Le transizioni più probabili sono: 0→0', 0→1', 0→2', ecc. La distanza tra le bande dà una misura della differenza di energia tra i livelli vibrazionali dello stato eccitato.

### **Fotometria quantitativa**

Uno spettrofotometro rivela l'intensità della luce assorbita in funzione della lunghezza d'onda della luce incidente.

Una sorgente S emette un fascio di luce, che viene reso monocromatico da un monocromatore M. Il fascio incidente, con intensità  $I^0$ , passa attraverso la cella C che contiene il campione liquido. Passando attraverso la cella, una parte del fascio viene assorbito, un'altra passa, con intensità  $I < I^0$ . Il fascio trasmesso entra in un fotomoltiplicatore F, che converte l'intensità di luce in intensità di corrente elettrica.

*Uno spettro di assorbimento è un diagramma dell'assorbimento A in funzione della lunghezza d'onda della luce incidente.*

La relazione tra l'assorbimento A, a una certa  $\lambda$ , e la concentrazione di cromofori che assorbono, è la seguente (**legge di Beer-Lambert**):

[C] è la concentrazione del cromoforo ed l la lunghezza della cella campione. Il coefficiente  $\epsilon$  si chiama **coefficiente di estinzione molare** e dipende solo dalla  $\lambda$  della luce incidente. Esso è tipico per ogni cromoforo e dà un'idea della forza con cui assorbe un cromoforo.

*Per ottenere misure di concentrazione accurate, bisogna lavorare con concentrazioni minime non minori di  $10^{-6}$  M.*

Nel caso di un campione contenente n cromofori, vale:



Tale espressione permette, mediante misure di assorbimento, di seguire la cinetica di legame di un cromoforo (substrato) a un enzima, e di calcolare la concentrazione di substrato legato all'equilibrio.

### Spettrofotometria differenziale

Nelle misure di assorbimento con campioni biologici, si incontrano spesso problemi legati alla rivelazione di piccoli segnali. Ciò riguarda i casi in cui:

1. Si vogliano distinguere due bande che differiscono tra loro per variazioni spettrali molto piccole.
2. Si voglia isolare lo spettro di un cromoforo che assorbe debolmente, quando esso è in un solvente che assorbe o diffonde fortemente la luce nella stessa regione spettrale.

*Un metodo per rivelare piccole variazioni spettrali consiste nel fare la differenza tra gli spettri a e b e amplificare lo spettro differenziale.*

La differenza tra gli spettri la si ottiene con uno **spettrofotometro differenziale**: Esistono due tipi di spettrofotometri differenziali:

1. **Split beam.** Un fascio di luce monocromatica viene suddiviso in due, mediante uno specchio semiriflettente e da uno riflettente. Un disco invia alternativamente il fascio di luce in due celle: C (campione), in cui avviene il processo biochimico; R (riferimento), in cui tale processo non avviene. Il fotomoltiplicatore F, che riceve alternativamente la luce trasmessa dalle due celle, è collegato a un amplificatore Am, che trasforma i due segnali nella differenza tra gli assorbimenti.
2. **Double beam.** Ad un'unica cella vengono inviati due fasci di luce monocromatica, uno con  $\lambda_r$  (luce di riferimento con  $\lambda$  fissa), l'altro con  $\lambda_c$  (luce del campione che viene fatta variare). I due fasci passano alternativamente attraverso la cella campione per mezzo di uno specchietto che vibra con frequenza fissa. Il fotomoltiplicatore F, che riceve alternativamente i due segnali luminosi, è collegato all'amplificatore Am, che trasforma i due segnali in differenza di assorbimento.

### Applicazioni

Sotto i 200 nm assorbono praticamente tutte le molecole. Sopra i 200 nm assorbono:

1. Proteine;
2. Basi puriniche e pirimidiniche del DNA;
3. Anello porfirinico dell'eme.

Lo spettro di assorbimento di una proteina non è che la somma degli spettri degli amminoacidi che lo compongono. Ci sono tre classi di cromofori:

1. Gruppo peptidico ( $\sim 200$  nm);
2. Catene laterali di amminoacidi aromatici ( $> 230$  nm);
3. Gruppi prostetici (luce-ultravioletto).

Gli spettri di assorbimento delle proteine consentono di misurarne la concentrazione. E' possibile ottenere anche importanti informazioni, quali:

1. Misure di pKa di gruppi dissociabili degli amminoacidi aromatici;
2. Accessibilità degli amminoacidi aromatici a piccole molecole in soluzione;
3. Variazione del numero di legami idrogeno;
4. Variazioni di conformazione di una proteina.

In particolare, la misura dell'accessibilità degli amminoacidi aromatici a piccole molecole dà informazioni sulla topografia degli stessi nella proteina. Alcune molecole di varia dimensione modificano lo spettro di assorbimento degli amminoacidi aromatici. E' possibile ottenere il grado di esposizione degli amminoacidi in base alle loro modificazioni spettrali: quanto più queste ultime saranno grandi, tanto più l'amminoacido sarà stato esposto e quindi collocato in una zona esterna della proteina.

### **Spettroscopia visibile-ultravioletto - Fluorescenza**

L'assorbimento di luce visibile o ultravioletta provoca in una molecola la transizione di un elettrone da un orbitale a uno con energia maggiore. La **fluorescenza** è il processo inverso: *il decadimento spontaneo dell'elettrone all'orbitale di partenza con emissione di luce visibile o ultravioletta*. Il gruppo responsabile della fluorescenza è il **fluoroforo**.

In seguito all'assorbimento di un quanto di luce, la molecola si porta al livello vibrazionale più probabile dello stato eccitato. Durante questo tempo, la molecola è soggetta a numerose collisioni con altre molecole. Queste collisioni sono responsabili del **rilassamento vibrazionale**, cioè del *decadimento tra i vari livelli vibrazionali dello stato eccitato fino a quello con energia minima compatibile con la temperatura del sistema*. Il rilassamento vibrazionale rappresenta quindi la conversione dell'eccesso di energia vibrazionale, contenuta nella molecola, in energia termica del campione.

Quindi la molecola decade a uno qualsiasi dei livelli vibrazionali dello stato fondamentale, emettendo luce. Infine, per rilassamento vibrazionale, viene raggiunto il livello vibrazionale di energia minima compatibile con la temperatura del sistema.

*Come nell'assorbimento, anche nella fluorescenza lo spin dell'elettrone non deve cambiare nella transizione.*

Due importanti caratteristiche del processo di emissione (fluorescenza):

1. la luce viene emessa non ad un'unica frequenza, ma ad una banda di frequenze.  
Lo spettro di assorbimento consiste in un insieme di bande, dovute alle transizioni ai vari livelli vibrazionali dello stato eccitato. La distanza tra le bande di assorbimento è una misura della differenza di energia tra i livelli vibrazionali dello stato eccitato. Lo spettro di emissione consiste in un insieme di bande, dovute alle transizioni ai vari livelli vibrazionali dello stato fondamentale. La distanza tra le bande di emissione è una misura della differenza di energia tra i livelli vibrazionali dello stato fondamentale.  
Spesso, lo spettro di emissione è l'immagine speculare di quello di assorbimento.
1. A causa del rilassamento vibrazionale, parte dell'energia dello stato eccitato è convertita in energia termica: di conseguenza, *lo spettro della luce emessa è spostato a lunghezze d'onda maggiori rispetto a quello della luce assorbita*

**(legge di Stokes).**Conversione interna e intersystem crossing

I processi più importanti che avvengono in seguito ad assorbimento di luce da parte di una molecola che si trova nello stato fondamentale di singoletto  $S_0$  sono: conversione interna e *intersystem crossing*.

L'assorbimento di un fotone, di energia  $h\nu^\circ$ , porta la molecola ad uno dei possibili stati eccitati per di singoletto, ad es.  $S_2$ . Viene raggiunto quel livello vibrazionale di  $S_2$  la cui energia differisce da quella dello stato fondamentale di una quantità pari a  $h\nu^\circ$ . Mediante rilassamento vibrazionale si arriva quindi a un livello vibrazionale dello stato eccitato  $S_2$  che ha la stessa energia di uno dei livelli vibrazionali dello stato eccitato  $S_1$ . Si ha allora il passaggio detto **conversione interna**, dallo stato  $S_2$  allo stato  $S_1$ . A questo punto sono possibili tre meccanismi di trasformazione:

1. conversione interna allo stato fondamentale senza emissione di luce;
2. fluorescenza. Lo stato eccitato  $S_1$  decade allo stato fondamentale con emissione di luce a frequenza  $\nu_1 < \nu^\circ$ . L'emissione di luce origina quasi sempre dallo stato eccitato a energia minima. Il tempo di vita medio dello stato eccitato è lungo ( $10^{-6}$  s);
3. fosforescenza. Dallo stato eccitato di singoletto  $S_1$  si può passare allo stato eccitato di tripletto  $T_1$  (cambiamento di spin elettronico  $\rightarrow$  spin da opposti a uguali), se l'energia di  $T_1$  è uguale o minore di quella di  $S_1$ . Tale processo si chiama **intersystem crossing**. Il decadimento  $T_1 \rightarrow S_0$  è poco probabile, dato che deve cambiare lo spin. Ciò comporta che il tempo di vita medio di  $T_1$  è molto lungo. La luce emessa nel decadimento  $T_1 \rightarrow S_0$  viene detta fosforescenza.

Resa quantica

Nella fluorescenza l'intensità della luce emessa è dipendente non solo dalla natura chimica del fluoroforo, ma anche dall'intensità della luce incidente. Bisogna definire un parametro che sia indipendente dallo strumento e sia sensibile solo alla natura delle molecole che emettono. Tale parametro si chiama *resa quantica F*. Essa è definita come:

Siccome il numero di fotoni assorbiti corrisponde al numero totale di molecole eccitate, e il numero di fotoni emessi corrisponde al numero di molecole eccitate che fluorescono, *la resa quantica rappresenta la frazione di molecole eccitate che fluorescono*. Essa è indipendente dalla lunghezza d'onda.

L'intensità della luce emessa generalmente è inferiore a quella della luce assorbita. Questo perché le molecole, nel tempo in cui stanno nello stato eccitato, possono tornare allo stato fondamentale senza emettere luce (*quenching* di fluorescenza). In conclusione, la luce viene emessa con energia minore di quella assorbita (a causa del rilassamento vibrazionale) e anche con intensità minore (*quenching* di fluorescenza).

Spettrofluorimetro e spettri

Nello spettrofluorimetro, la luce, proveniente da una sorgente luminosa  $S$ , viene

collimata e resa monocromatica da un monocromatore M1. Essa entra poi nel campione nella cella C, eccitandone le molecole. L'intensità della luce emessa dal campione è misurata a 90° rispetto alla direzione del fascio incidente, per evitare di raccogliere anche la luce trasmessa. La luce emessa passa per un secondo monocromatore M2. L'intensità della luce emessa viene quindi convertita in intensità di corrente elettrica da un fotomoltiplicatore F.

Gli spettri di fluorescenza, ottenuti misurando l'intensità di luce emessa, sono di due tipi.

- di **emissione**, dove si fissa la lunghezza d'onda di eccitazione e si fa variare quella di emissione;
- di **eccitazione**, dove si fissa la lunghezza d'onda di emissione e si fa variare quella di eccitazione.

Gli spettri di eccitazione sono utili quando non è possibile ottenere spettri di assorbimento di un cromoforo, o perché è troppo piccola la sua concentrazione, o perché vi sono altre molecole che assorbono nella stessa regione spettrale.

Gli spettri di eccitazione sono parzialmente deformati per cause strumentali. Perciò, in tutti quei problemi riguardanti l'influenza di fattori esterni sulle proprietà delle molecole fluorescenti, si preferisce usare gli spettri di emissione.

### Fluorimetria quantitativa

Nello spettrofluorimetro si misura l'intensità della corrente sviluppata nel fotomoltiplicatore alla lunghezza d'onda del massimo di emissione, che è proporzionale all'intensità della luce emessa  $I_f$ . Vale la seguente legge:

Al variare della lunghezza d'onda di eccitazione si ottiene uno spettro di eccitazione che è una replica esatta dello spettro di assorbimento.

Il maggior vantaggio della fluorimetria consiste nel fatto che in fluorescenza è possibile ottenere un segnale apprezzabile a concentrazioni di molecole anche 1000 volte inferiori che in assorbimento. *La fluorescenza permette di rivelare fluorofori a concentrazioni dell'ordine di  $10^{-9}$  M.*

### Energy transfer

*Quando una molecola è in stato eccitato, la sua energia può essere trasferita direttamente ad una molecola diversa, che passa allo stato eccitato.*

Le condizioni ottimali per ottenere *energy transfer* sono:

1. Lo spettro di assorbimento del donatore  $A_d$  deve essere separato da quello dell'accettore  $A_a$ , in modo da poter eccitare a  $\lambda^\circ$  solo il donatore.
2. Lo spettro di emissione del donatore  $F_d$  deve sovrapporsi il più possibile allo spettro di assorbimento dell'accettore. L'energia che il donatore può cedere è quella di cui l'accettore necessita per passare allo stato eccitato.
3. Lo spettro di emissione dell'accettore  $F_a$  deve essere separato da quello del donatore  $F_d$ , in modo da poter misurare a  $\lambda_1$  solo la fluorescenza dell'accettore.

*Il processo di energy transfer dipende dalla distanza tra le due molecole.*

### Applicazioni

Mentre gli spettri di assorbimento caratterizzano una molecola che sta nello stato fondamentale, gli spettri di fluorescenza caratterizzano una molecola che sta nello stato eccitato.

Esistono biomolecole con fluorescenza intrinseca. Esse sono le proteine che contengono amminoacidi aromatici, le basi degli acidi nucleici, FAD e NADH. Gli unici gruppi utilizzabili, negli spettri di fluorescenza, sono triptofano e tirosina.

E' possibile rendere fluorescenti, per osservarle meglio, biomolecole che non lo sono. Se si attacca un gruppo fluoroforo ad esse, si potrà seguire la cinetica di una reazione, oppure localizzare la posizione di antigeni su cellule (mettendo i fluorofori sugli anticorpi).

## Microscopia

### Ingrandimento e risoluzione in microscopia

E' sempre possibile ingrandire indefinitamente un oggetto. Quello che è più difficile è mantenere la nitidezza dei dettagli dell'immagine man mano che l'oggetto viene ingrandito. La proprietà che determina quanto un oggetto può essere ingrandito senza che l'immagine perda di struttura fine è il **potere risolutivo** dello strumento ingrandente. Esso è *la minima distanza tra due punti sull'oggetto che possono essere percepiti come distinti sull'immagine*. Esso è quindi dato da  $1/dm$ , dove  $dm$  è la minima distanza risolvibile sull'oggetto.

Tuttavia, due punti dell'oggetto, pur risolvibili, sono osservabili sull'immagine solo se la loro intensità luminosa è diversa da quella dello sfondo. La risoluzione dell'immagine dipende quindi dal **contrasto**, cioè *la differenza relativa di intensità luminosa tra un punto e lo sfondo*.

Purtroppo le condizioni strumentali che tendono ad aumentare il contrasto sono precisamente quelle che tendono a diminuire il potere risolutivo.

Il potere risolutivo dello strumento è condizionato dal fenomeno della **diffrazione**, che avviene quando la luce passa in una stretta fenditura.

*Due punti dell'oggetto, che emettono luce incoerente e di uguale intensità, sono risolti sull'immagine quando la posizione del massimo di intensità luminosa del primo coincide con la posizione del minimo di intensità del secondo.*

Abbe dimostrò che la minima distanza risolvibile sull'oggetto è data da:

Dove  $\theta$  è l'angolo di apertura dell'obiettivo,  $n$  è l'indice di rifrazione del mezzo tra l'oggetto e l'obiettivo, e  $\lambda$  la lunghezza d'onda della radiazione che passa attraverso il microscopio. Questa quantità si chiama **barriera di Abbe**, in quanto afferma che qualsiasi sistema di ingrandimento, che usi fasci di onde, non permette di osservare dettagli sull'oggetto di dimensioni minori di  $\lambda/2$ .

Per aumentare il potere risolutivo di un microscopio si potrebbe:

1. aumentare l'apertura numerica ( $n \sin(\theta)$ ) (portandola da 1 a 1,6-1,7);
2. usare onde a  $\lambda$  piccolissima (raggi X) -> non esistono lenti in grado di

- focalizzarli;  
3. usare un fascio di elettroni;

La soluzione adottata è quest'ultima. Un fascio di elettroni, infatti:

1. si comporta come un'onda;
2. può essere focalizzato da campi magnetici;
3. interagisce fortemente con la materia.

In ultima analisi, è l'intensità del campo elettrico che accelera gli elettroni a determinare il potere risolutivo del microscopio elettronico. Infatti, tanto più grande è il campo elettrico, tanto più grande è la velocità degli elettroni e tanto più piccola è la loro  $\lambda$ .

Il limite della risoluzione è di 1 nm. Tale distanza, per essere percepita dall'occhio, deve essere ingrandita 100.000 volte. Maggiori risoluzioni sono impediti dai difetti delle lenti e dal contrasto.

Nei microscopi ottici la risoluzione massima è 100 nm, corrispondente ad un ingrandimento di 1000 volte.

#### Il microscopio elettronico a trasmissione

1. Elettroni emessi da un filamento incandescente per effetto termoionico
2. elettroni accelerati sotto vuoto da un campo elettrico (~3 MV)
3. elettroni focalizzati sul campione
4. elettroni diffusi in grado diverso dalle diverse parti del campione (> densità e numero atomico atomi presenti nella zona colpita dal fascio, > diffusione)
5. immagine formata dall'obiettivo (lente perfetta)
6. immagine formata dall'obiettivo viene ulteriormente ingrandita da lenti intermedie
7. immagine finale proiettata su uno schermo fluorescente.

Apertura del microscopio elettronico = piccolissima (~ 0)

Ciò comporta:

1. riduzione dell'aberrazione sferica (un punto dell'oggetto viene visto come un dischetto luminoso nell'immagine);
2. aumento della diffrazione;
3. aumento della **profondità di campo** (*la capacità di mettere a fuoco punti dell'oggetto posti a distanza variabile dall'obiettivo*) -> il campione deve perciò essere sottilissimo, per non creare sovrapposizioni nell'immagine.

#### Preparazione del campione biologico

Il materiale biologico non può essere inserito così com'è nel microscopio elettronico, altrimenti:

1. evapora l'acqua;
2. si sciolgono i tessuti;
3. il contrasto è bassissimo.

Ciò avviene a causa del vuoto spinto e dall'interazione del campione con intensi fasci elettronici.

Bisogna quindi:

1. rendere il campione resistente al vuoto e al bombardamento elettronico, mediante fissazione chimica del preparato, disidratazione e sua inclusione in un blocco solido;
2. aumentare il contrasto, aggiungendo dei coloranti (metalli pesanti);
3. rendere il preparato molto sottile per evitare diffusione multipla e sovrapposizione di immagini.

La fissazione chimica serve per ridurre al minimo le variazioni strutturali che possono avvenire nel processo di disidratazione.

L'inclusione in un blocco solido viene ottenuta inserendo nel preparato la forma monomerica di un preparato plastico, che viene poi polimerizzato. Esso deve essere trasparente al fascio di elettroni e non deve modificare il campione.

Se il colorante viene depositato solo su certe parti, si ha la **colorazione positiva** (immagine scura su sfondo chiaro). Se il campione viene immerso in un bagno di colorante e l'acqua viene poi fatta evaporare, si ha la **colorazione negativa** (immagine chiara su sfondo scuro).

### Crioclivaggio

Il crioclivaggio evita gli svantaggi delle due tecniche precedenti, perché non sottopone il materiale biologico alle sollecitazioni precedentemente illustrate.

1. Il campione viene congelato velocemente (per evitare la formazione di cristalli di ghiaccio) a  $-180^{\circ}\text{C}$ .
2. Il preparato viene fratturato. Se sono presenti membrane, il piano di frattura avviene in mezzo ai due strati di fosfolipidi.
3. Si fa evaporare verticalmente il carbonio.
4. Si digerisce il campione (asportazione).
5. Si ottiene così una replica, un calco del campione.
6. Si colora con un metallo pesante la replica del campione.

Il crioclivaggio permette di osservare cosa c'è tra i due strati della membrana e di ottenere sequenze di immagini che sono in grado di fotografare l'evoluzione dinamica di quei riarrangiamenti molecolari che avvengono lentamente rispetto al tempo necessario per congelare il campione. Si congelano infatti in tempi successivi vari campioni tutti uguali tra loro, per studiare il processo biochimico nel suo evolversi.

### Il microscopio elettronico a scansione

Il fascio di elettroni, interagendo con il campione, induce una serie di effetti, ognuno dei quali può essere utilizzato per rivelare la struttura del campione. Tra 5 e 50 nm dalla superficie vengono emessi elettroni secondari a bassa energia. Intorno a  $0,1\ \mu\text{m}$  vengono emessi elettroni ad alta energia diffusi all'indietro. Più in profondità vengono emessi raggi X.

Nel microscopio elettronico a scansione, il fascio elettronico viene fatto spazzare sul campione da un deflettore, mediante corrente elettrica prodotta da un generatore. Un collettore rileva gli **elettroni secondari** a bassa energia emessi dal campione. Questi ultimi vengono convogliati in un tubo catodico, nel quale delle piastre si muovono rapidissimamente per formare un'immagine del campione. Più elettroni entrano, più corrente viene generata da un fotomoltiplicatore, maggiore è l'intensità

luminosa del punto sullo schermo.

Le depressioni della superficie fanno sì che gli elettroni secondari vengano ricatturati dal campione; le protuberanze, invece, trasmettono tutti gli elettroni secondari emessi dal campione. Perciò le depressioni appaiono più scure sull'immagine, mentre le protuberanze più chiare.

Il microscopio elettronico a scansione ha rispetto al microscopio ottico, una profondità di campo molto maggiore. Si possono ottenere infatti foto tridimensionali.

Risoluzione massima = 5 nm.

### Microscopio ad interazione atomica e microscopio *tunneling*

Il problema della risoluzione in microscopia è legato alla barriera di Abbe, cioè al fatto che si devono usare onde per rivelare la struttura del campione.

Questo problema può essere superato mediante l'utilizzo di microscopi che non facciano uso di onde, ma che *sfruttino le proprietà elettriche, magnetiche o termiche del campione, rivelandone la struttura atomica*.

Il microscopio ad interazione atomica può essere impiegato con campioni biologici. Esso effettua una scansione superficiale del campione mediante una sonda costituita da una punta di diamante di dimensioni atomiche, montato su una strisciolina metallica. Tra la nuvola elettronica della punta e quelle degli atomi superficiali del campione vi è repulsione elettrostatica, per cui la punta si alza e si abbassa seguendo le irregolarità del campione a livello atomico. Un fascio laser, riflesso dalla strisciolina, rivela spostamenti minimi mediante una cella fotoelettrica.

Il microscopio *tunneling* sfrutta invece un principio quantistico, chiamato **effetto tunnel**. Un elettrone che non ha energia cinetica sufficiente per superare una certa barriera di potenziale che lo circonda dovrebbe rimanere indefinitamente all'interno di tale barriera. Tuttavia la meccanica quantistica dice che c'è una piccola probabilità che l'elettrone si possa trovare oltre tale barriera (si apre un "tunnel" nella "collina" di energia potenziale apparentemente insuperabile).

Nella microscopia *tunneling* il campione deve condurre elettroni, e quindi essa si applica allo studio di poche molecole di interesse biologico. Anche qui una punta conduttrice di diamante di dimensioni atomiche viene fatta spazzare sulla superficie del campione, mantenuta a distanza fissa dalla superficie. Quando una debole differenza di potenziale è applicata tra la punta e la superficie, gli elettroni escono dalla superficie per effetto tunnel e inducono una corrente elettrica, la cui intensità è estremamente sensibile alla distanza tra punta e atomi del campione.

## **Laser**

### Proprietà delle sorgenti luminose

Supponiamo di avere una sorgente luminosa ideale in cui  $N$  elettroni oscillano con la stessa frequenza, ampiezza e fase. Le oscillazioni danno origine a  $N$  onde elettromagnetiche di ugual frequenza, ampiezza e fase. L'onda risultante ha la stessa frequenza e fase delle onde componenti, mentre l'ampiezza è la somma delle ampiezze delle singole onde componenti. L'intensità di quest'onda risultante è proporzionale a  $N^2 I^0$ .



Supponiamo invece di avere una sorgente luminosa reale formata da  $N$  atomi della stessa specie chimica che, in seguito alla stessa transizione elettronica, emettono luce in modo uno indipendente dall'altro. L'onda risultante ha intensità minore della precedente e non è né coerente, né monocromatica, né sinusoidale. Siccome le onde sono sfasate tra loro, avviene interferenza distruttiva, e l'intensità dell'onda risultante è proporzionale a  $N \cdot I^0$ . Secondo il principio di indeterminazione di Heisenberg, l'energia associata ad un pacchetto d'onda è tanto più indeterminata, quanto più breve è il tempo in cui esso è definito. Quindi non è esattamente determinata nemmeno la sua frequenza: l'onda risultante non è monocromatica.

Fortunatamente, nelle sorgenti luminose reali *l'emissione da parte di atomi contigui non è indipendente, ma tende ad essere accoppiata*. Perciò gli atomi accoppiati emettono in fase e la durata del pacchetto d'onda emesso da tali atomi aumenta, per cui la luce generata in zone limitate della sorgente è più coerente (perché gli atomi emettono in fase) e più monocromatica (perché aumenta la durata del pacchetto d'onda).

Il **Laser** (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation) è uno strumento che, *tramite uno stretto accoppiamento tra atomi emettenti, genera un fascio luminoso di elevata coerenza, monocromaticità, intensità e direzionalità*.

#### Principi di funzionamento del laser

Una radiazione elettromagnetica, alla frequenza di risonanza, provoca in una molecola sia transizioni dallo stato fondamentale a quello eccitato (assorbimento indotto), che viceversa (emissione indotta). Queste transizioni sono equiprobabili. Il numero di molecole che assorbono o emettono al secondo dipende dalla popolazione di molecole nello stato corrispondente. Se due molecole uguali sono nello stato eccitato, la radiazione emessa dalla prima molecola provoca, nella seconda, l'emissione di una radiazione esattamente in fase con la prima.

*Il laser fa uso del fenomeno dell'emissione indotta per accoppiare strettamente tra loro gli atomi che emettono.*

Lo strumento consta di una camera (cavità ottica) contenente un materiale che può assumere diversi stati energetici. Dell'energia (scarica elettrica, reazione chimica, radiazione elettromagnetica) viene inviata al sistema per popolare lo stato eccitato 2 ("pumping"). Da questo, per conversione interna, viene raggiunto lo stato 1. Quando dallo stato 1 si passa, per emissione spontanea, allo stato 0, viene emessa una radiazione di frequenza  $\nu = (E_1 - E_0)/h$ . Questa radiazione, quando colpisce un'altra molecola allo stato eccitato, genera l'emissione indotta di un'altra radiazione, in fase con la radiazione incidente; e così via, in una reazione a cascata. Essendo accoppiate, le radiazioni posseggono un alto grado di monocromaticità e coerenza.

Per avere accoppiamento stretto, è necessario che l'emissione indotta sia dominante rispetto a quella spontanea. Per questo il tempo di vita medio dello stato 1 (stato metastabile) dev'essere lungo, in modo tale che la molecola decada spontaneamente a velocità molto ridotta.

Per assicurare al fascio emesso alta intensità, è necessario che il processo di *pumping* sia più rapido del processo di emissione, spontanea o indotta. Viene così mantenuto un largo eccesso di popolazione di molecole allo stato eccitato. Per aumentare ulteriormente l'intensità del fascio laser, vengono posti all'estremità

della cavità ottica due specchi, uno semiriflettente e l'altro riflettente. Parte del fascio attraversa parecchie volte la cavità ottica continuando a indurre emissione, rafforzando quindi l'intensità del fascio emesso (la lunghezza della camera ottica dev'essere in fase con la  $\lambda$  delle onde emesse; se no interferenza distruttiva). Gli specchi servono anche per collimare il fascio, dato che le radiazioni non parallele escono dalla cavità ottica.

I laser, in base ai materiali attivi utilizzati, possono essere di diversi tipi. Nei laser solidi, l'eccitazione avviene per assorbimento di luce; in quelli a gas, essa avviene per ionizzazione del gas tramite scarica elettrica; in quelli a diodo, essa è dovuta al passaggio di corrente elettrica.

### Applicazioni

Mediante laser ad emissione pulsata ( $10^{-12}$  s) si possono studiare fenomeni molecolari rapidissimi.

Le applicazioni biomediche del laser utilizzano una serie di fenomeni collegati all'interazione con i tessuti dell'intenso fascio di fotoni emesso.

1. Effetto fotochimico;
2. effetto fototermico;
3. effetto di fotoionizzazione;

**Interazioni fotochimiche.** Se la lunghezza d'onda del fascio laser corrisponde a una di quelle della banda di assorbimento del bersaglio, esso assorbe l'intenso fascio e il calore sviluppato distrugge il bersaglio. L'impiego principale riguarda l'oculistica (riattacco retina, retinopatie diabetiche), la fotocoagulazione (sterilizzazione e chiusura di vasi che hanno subito emorragie), l'oncologia (diagnostica -> fa sì che l'ematoporfirina porti l'ossigeno in stato reattivo di singoletto; terapia).

**Effetto di fotoionizzazione.** L'intenso fascio laser, focalizzato in un volumetto di tessuto, provoca un processo di fotoionizzazione, in cui i fotoni strappano elettroni dagli atomi presenti. Gli elettroni formano una nube gassosa (plasma), che, attraverso la cattura dei restanti fotoni, aumenta la sua temperatura. Il plasma si espande rapidamente, generando un'onda d'urto. Quest'onda d'urto viene utilizzata, ad es., per distruggere calcoli o cataratte.

**Interazioni fototermiche.** Esse utilizzano la grande quantità di calore sviluppato da un intenso fascio laser in aree piccole. Si fa ciò in piccole operazioni di microchirurgia. Si usa il laser a CO<sub>2</sub> (10600 nm), che dà una radiazione infrarossa fortemente assorbita dall'acqua. L'acqua tissutale bolle e il tessuto evapora. Il fascio, se spostato, si comporta da bisturi. Inoltre, il calore sigilla i piccoli vasi sanguigni ed ha azione batteriostatica. Le applicazioni riguardano l'otorinolaringoiatria, l'asportazione di tumori e di polipi, la vaporizzazione delle placche aterosclerotiche e dei trombi nelle arterie.

Il fascio laser trasportato tramite **fibre ottiche**, che possono essere inserite nei vasi e nelle cavità. Normalmente le fibre ottiche sono inserite in un **endoscopio**. Esso contiene:

1. il fibroscopio, che possiede due fasci di fibre ottiche: uno porta luce visibile per illuminare la zona su cui operare; l'altro raccoglie la luce riflessa da tale zona per formarne un'immagine;

2. la fibra di potenza, che trasporta la luce laser;
3. i canali ausiliari, che servono per aspirare liquidi o allontanare detriti mediante iniezione di acqua o aria. Essi possono contenere bisturi o pinze;
4. i sensori a fibre ottiche, che analizzano la luce riflessa per ottenere informazioni quali: il flusso ematico (velocimetria laser-Doppler), il contenuto di ossigeno nel sangue, la pressione in vasi e cavità, ecc.;
5. il pH;
6. la presenza di particolari molecole.

## **Tomografie**

Le tomografie sono tecniche di *imaging* che visualizzano sezioni di parti interne di un organismo. Le tomografie più importanti sono:

1. TAC (Tomografia Assiale Computerizzata a raggi X);
2. NMR (Nuclear Magnetic Resonance);
3. Ecografia (tomografia a ultrasuoni);
4. SPECT e PET (tomografie che si servono di radioisotopi).

Le radiazioni visibili, ultraviolette e infrarosse vengono assorbite o riflesse totalmente in spessori di tessuto molto sottili, per cui non sono utilizzabili nelle tomografie.

Le onde ultrasonore, i raggi X e le radioonde sono attenuati solo debolmente. La SPECT e la PET utilizzano il segnale gamma che viene originato dal decadimento di radioisotopi incorporati all'interno dell'organismo.

### **TAC**

I raggi X interagiscono con la materia in due modi:

1. **Effetto fotoelettrico.** L'energia di un fotone X, se maggiore dell'energia di legame di un elettrone interno di un atomo, viene ceduta completamente all'elettrone, che acquisisce sufficiente energia cinetica da sfuggire all'attrazione nucleare. In questo processo viene espulso un elettrone interno e un elettrone esterno va ad occupare il suo posto. Questa transizione genera luce visibile. La probabilità che avvenga un'interazione fotoelettrica è tanto maggiore quanto più grande è il numero atomico dell'atomo coinvolto. Due tessuti, costituiti da atomi con diverso numero atomico, assorbono la radiazione X in modo diverso. *Nella TAC l'effetto fotoelettrico contribuisce al contrasto dell'immagine.*
2. **Effetto Compton.** Parte dell'energia del fotone X viene ceduta ad uno degli elettroni esterni di un atomo. Viene perciò espulso un elettrone esterno. In questo caso, però, il fotone X non viene assorbito completamente, ma solo in parte. Il fotone X uscente diffuso avrà quindi energia minore. Il fotone X diffuso può a sua volta collidere con un altro atomo, dando un'altra interazione Compton. Perciò la radiazione X viene tanto più attenuata quanto più spesso è il materiale. L'interazione Compton dipende dalla densità elettronica del materiale. Siccome i vari tessuti hanno una densità elettronica simile, *l'effetto Compton nella TAC contribuisce poco al contrasto dell'immagine.* Il contrasto è ulteriormente

abbassato in seguito all'aumento del rumore di fondo creato dalla radiazione X diffusa.

Un fascio di raggi X, in conseguenza degli effetti fotoelettrico e Compton, viene attenuato quando attraversa un materiale. La sua intensità decresce esponenzialmente secondo la formula:

Dove  $N^0$  è il numero di fotoni X incidenti e  $N$  è il numero di fotoni X trasmessi dopo che il fascio ha attraversato lo spessore  $x$  del materiale. Il coefficiente  $\mu$  si chiama **coefficiente di attenuazione lineare**.

Nell'attraversare un materiale, vengono assorbite preferenzialmente le radiazioni X con energia minore. Infatti a basse energie prevale l'effetto fotoelettrico, in cui i fotoni X vengono interamente assorbiti, mentre ad alte energie prevale l'effetto Compton, in cui il fotone X incidente perde solo parte della sua energia. La capacità di penetrazione di un fascio di raggi X aumenta con la frequenza del fascio.

Nella TAC si usano fasci di raggi X il più possibile monocromatici. Le immagini ottenute con la TAC sono molto più risolte e contrastate delle immagini ottenute con la tomografia convenzionale. In sintesi, la TAC ottiene, mediante calcoli effettuati da un computer, il coefficiente di attenuazione lineare per ciascuno di tutti i piccoli volumetti che compongono la sezione tomografica da analizzare. L'insieme dei valori dei coefficienti è memorizzato, elaborato e visualizzato in immagine dal calcolatore.

La sezione viene innanzitutto divisa in piccoli elementi volumetrici, detti **voxels** (*volume elements*). Un fascio di raggi X viene finemente collimato, in modo da far corrispondere le proprie dimensioni a quelle di un singolo voxel. Il fascio, passando attraverso la sezione, viene attenuato dalla successione dei singoli voxels, ciascuno con il proprio coefficiente di attenuazione.

L'intensità della radiazione uscente viene misurata da opportuni rivelatori. Il numero di fotoni X misurato dai rivelatori è correlato al coefficiente di attenuazione dall'equazione precedente, dove però  $\mu$  è dato dalla somma dei coefficienti degli  $n$  voxels attraversati.

Per calcolare le  $n$  incognite  $\mu_i$ , è necessario avere  $n$  equazioni. Se si hanno, ad es., quattro voxels, per ottenere le quattro equazioni corrispondenti, si fanno attraversare i quattro voxels da quattro raggi X. Quindi si possono ottenere  $n$  equazioni semplicemente facendo una scansione della sezione con raggi verticali, orizzontali e obliqui.

Negli apparecchi moderni, a sorgente manda un fascio di raggi X a ventaglio, in modo da coprire l'intera sezione; i raggi componenti vengono rivelati da un insieme di rivelatori. Il tempo di scansione è molto ridotto (2-10 s).

Un calcolatore risolve le  $n$  equazioni e attribuisce ad ogni voxel il suo  $\mu$ . Si ottiene quindi una matrice di numeri, i cui valori corrispondono ai valori di  $\mu$  di tutti i voxels della sezione esaminata. I numeri della matrice vengono espressi in unità Hounsfield. Le unità Hounsfield vengono convertite in intensità di grigio in piccole aree di una immagine video, chiamata **pixels** (*picture elements*).

**Risoluzione.** I fattori principali che influiscono sulla risoluzione sono due:

1. La collimazione del fascio di raggi X. Diminuendo la dimensione del fascio mediante i collimatori, diventa più piccola anche la dimensione dei voxels, permettendo un aumento del dettaglio fine. La dimensione di un voxel, in un esame di routine, è 1x1x10 mm. Si possono ottenere anche voxels più piccoli.
2. L'apertura dei rivelatori. L'apertura dev'essere piccola per non ricevere i segnali che provengono da punti a diverso coefficiente di attenuazione.

**Contrasto.** Il contrasto dell'immagine dipende soprattutto da due parametri:

1. L'energia dei fotoni X che attraversano il materiale. Siccome l'effetto fotoelettrico è quello che contribuisce maggiormente al contrasto, predominante a bassa energia, è necessario che la frequenza della radiazione X non sia troppo alta.
2. La quantità di radiazione diffusa dal materiale. Essa infatti provoca nell'immagine un annerimento non collegato con la struttura fine del soggetto. La diffusione di fotoni X è dovuta all'effetto Compton: essa viene diminuita diminuendo lo spessore del materiale in esame.

E' possibile aumentare il contrasto di parti diverse dell'immagine scegliendo il valore minimo e massimo delle unità Hounsfield (finestra) all'interno delle quali si assegna una certa tonalità di grigio. Così tutte le parti con un certo intervallo di unità Hounsfield risalteranno sulle altre.

Alternativamente è possibile iniettare nelle sezioni da esaminare elementi ad alto peso atomico (Ba, I, ecc.), per sfruttare il differente assorbimento delle radiazioni X da parte dei tessuti in esame, dovuto all'effetto fotoelettrico.

### NMR

La tomografia NMR presenta, rispetto alla TAC, due vantaggi importanti:

1. vengono utilizzate radioonde (innocue) e non raggi X (radiazioni ionizzanti);
2. certi particolari sono più facilmente visualizzabili (es., neoplasie allo stadio iniziale).

La spettroscopia NMR è basata sull'assorbimento delle radioonde, che generano nel campione transizioni di spin nucleare. Per ottenere un segnale apprezzabile, deve essere alta la concentrazione di atomi che subiscono transizioni di spin nucleare. Per questo si sceglie il nucleo dell'H delle molecole d'acqua.

*Per ottenere segnali distinti di uno stesso elemento in modo dipendente dalla posizione spaziale, bisogna sottoporre il tessuto ad un campo magnetico non omogeneo.* Se, infatti, i nuclei del tessuto sperimentano un campo magnetico la cui intensità nello spazio varia da punto a punto, la frequenza di risonanza e la posizione delle bande nello spettro diventano dipendenti dalla loro posizione spaziale.

Riassumendo, il paziente viene sottoposto ad un grande campo magnetico omogeneo e a un piccolo campo magnetico che varia linearmente da punto a punto (gradiente di campo magnetico). La posizione della banda nello spettro NMR è dipendente dalla posizione del volumetto d'acqua, mentre l'area della banda dipende dalla densità dell'acqua presente.

**Risoluzione.** Il limite di risoluzione, che è dell'ordine del mm cubo, non deriva

dallo strumento. Mentre infatti si può modulare sempre più finemente il gradiente di campo magnetico, i volumetti di acqua non possono essere diminuiti all'infinito, altrimenti il segnale NMR diventerebbe troppo piccolo per essere percepito dai rivelatori.

**Contrasto.** Il contrasto nell'immagine di due volumetti contigui dipende essenzialmente dall'altezza relativa delle corrispondenti bande di assorbimento, cioè dalla densità delle molecole d'acqua nei rispettivi volumi. Spesso la densità è simile, per cui il contrasto è piccolo. Tuttavia, può avvenire che l'acqua, pur avendo densità simile nei volumetti, sia in uno stato fisico diverso. Un parametro sensibile allo stato fisico dell'acqua è il tempo di rilassamento  $T_1$ . *Il tempo di rilassamento può essere usato come parametro di contrasto.* Il procedimento consiste nel calcolare il tempo di rilassamento nei due volumetti e pesare con esso le due bande di assorbimento corrispondenti. In tal modo si evidenziano parti diverse dello stesso tessuto o parti patologiche (conoscendo i tempi di rilassamento delle corrispondenti parti sane).

Nell'angiografia NMR si evidenzia il flusso sanguigno di grossi vasi, in condizioni normali o patologiche. Uno dei possibili modi di ottenere queste informazioni si basa sulla formazione di una "eco" nel decadimento degli spin dopo l'imposizione di due impulsi consecutivi di radiofrequenze.

### Ecografia

L'ecografia si serve di **ultrasuoni** (onde sonore di frequenza superiore a 20 KHz) per ottenere immagini. Gli ultrasuoni impiegati nell'ecografia hanno frequenza compresa tra 1 e 20 Mhz. L'ecografia rappresenta una tecnica di *imaging* non invasiva, innocua, poco costosa, di semplice e rapido impiego, che dà immagini bidimensionali in tempo reale.

L'ecografia utilizza gli "echi" che l'onda ultrasonora forma quando incontra qualche disomogeneità nel materiale attraversato. Dal punto di vista degli ultrasuoni le disomogeneità sono definite come l'interfaccia tra materiali di impedenza acustica diversa. L'**impedenza acustica  $Z$**  è un parametro caratteristico del materiale, definito come:

Dove  $v$  è la velocità di propagazione dell'onda ultrasonora e  $\rho$  è la densità del materiale attraversato. *La frazione dell'onda riflessa a un'interfaccia tra due materiali è tanto maggiore quanto maggiore è la differenza tra le impedenze acustiche dei due materiali.* L'impedenza acustica differisce da tessuto a tessuto e da tessuto sano a tessuto malato. E' da notare che gli ultrasuoni sono riflessi quasi totalmente passando dall'aria ai tessuti, e viceversa.

Un fascio ultrasonoro, nel passare attraverso un materiale, viene anche parzialmente assorbito e diffuso. Nell'assorbimento, parte dell'energia del fascio viene convertita in calore, dato che le onde sonore mettono in moto le particelle del mezzo, moto cui si oppone un attrito. All'aumentare della frequenza del fascio di ultrasuoni, aumentano la diffusione e l'assorbimento. A causa di questi due fenomeni, il fascio viene progressivamente attenuato lungo il suo percorso.

Le componenti principali dell'ecografo sono il trasduttore e il convertitore di scansione. Il **trasduttore** contiene la sorgente di ultrasuoni, costituita da un insieme di **cristalli piezoelettrici**. *Un cristallo piezoelettrico converte oscillazioni elettriche in oscillazioni meccaniche (modificazioni di spessore), e viceversa*. I cristalli piezoelettrici hanno una propria frequenza di risonanza. Quando un cristallo riceve un breve picco di potenziale, il suo spessore oscilla alla frequenza di risonanza, con ampiezza rapidamente decrescente in seguito a smorzamento meccanico. Viene emesso un treno di ultrasuoni. L'onda ultrasonora non è monocromatica.

L'intervallo delle frequenze emesse è correlato al tempo di smorzamento delle oscillazioni meccaniche. Il parametro che caratterizza questa relazione è chiamato **coefficiente di smorzamento Q**. Cristalli ad alto Q danno onde sonore abbastanza monocromatiche e a lungo smorzamento (lungo treno di onde ultrasonore). Tuttavia, maggiore è Q, minore è la risoluzione nell'ecografia (cristalli ad alto Q vengono usati nelle analisi eco-Doppler). Perciò si usano cristalli a basso Q (treno corto).

Il cristallo piezoelettrico, non solo emette una serie di treni ultrasonori, ma anche riceve quelli che ritornano come eco. La fase di ricezione da parte del cristallo avviene nei tempi morti tra due picchi di potenziale successivi.

Nel trasduttore il retroblocco gommoso smorza il treno di ultrasuoni.

Tra trasduttore e cute non ci deve essere aria, altrimenti tutti i treni d'onda vengono riflessi: si usa perciò un liquido oleoso che non permette all'aria di intrufolarsi.

Il trasduttore viene fatto oscillare in un angolo di scansione compreso tra 30° e 120°. Nella posizione iniziale (linea 1) il cristallo emette un singolo treno di onde ultrasonore. Durante il tempo morto, il treno penetra nel tessuto, dando luogo a una serie di echi, che ritornano al cristallo, dove vengono rivelati. Il tempo di ritardo di ciascuna eco è correlato esattamente alla posizione in cui l'eco si è formata lungo la linea 1. Inoltre, l'intensità dell'eco dà informazioni qualitative sulla natura della superficie riflettente. Ultimato questo ciclo, il cristallo viene spostato lungo la linea immediatamente vicina e ripete la stessa operazione.

Ogni eco è caratterizzata da tre parametri:

1. ampiezza dell'onda ( $>$  differenza di potenziale  $>$  intensità eco)  $\rightarrow$  viene convertita in intensità di grigio sul monitor;
2. tempo di ritardo in una singola linea di scansione (ci dice la profondità dell'eco e quindi del tessuto)  $\rightarrow$  dà la posizione sull'asse delle x;
3. numero della linea di scansione  $\rightarrow$  dà la posizione sull'asse delle y.

E' il **convertitore di scansione** ad utilizzare questi parametri, per costruire l'immagine sullo schermo.

**Profondità di campo.** E' la frequenza di invio dei picchi di potenziale a determinare la profondità di campo dell'ecografo. Normalmente la profondità di campo è di 25 cm. Aumentando la frequenza di emissione dei treni di onde ultrasonore, diminuisce la profondità di campo.

**Risoluzione.** La risoluzione viene definita sia rispetto a due punti posti a profondità diverse lungo l'asse del fascio di ultrasuoni (risoluzione assiale), sia rispetto a due punti adiacenti posti alla stessa profondità (risoluzione laterale).

La **risoluzione assiale** distingue come separati due punti quando la lunghezza del treno di ultrasuoni è minore del doppio della distanza tra i due punti. Minore è  $\lambda$ ,

più corta è la lunghezza del treno, maggiore è la risoluzione assiale. Essa è dell'ordine di  $10^{-4}$  m.

La **risoluzione laterale** distingue come separati due punti quando essi sono rivelati da fasci ultrasonori distinti. Perciò la risoluzione aumenta riducendo la sezione del fascio. La risoluzione laterale è circa 5 volte inferiore a quella assiale.

Sia la risoluzione assiale che quella laterale aumentano all'aumentare della frequenza dell'onda ultrasonora. Ma anche l'attenuazione dell'onda aumenta con l'aumentare delle frequenze. Bisogna trovare un compromesso: per ecografie a piccola profondità si possono ottenere grandi risoluzioni, mentre per ecografie a grande profondità bisogna accontentarsi di piccole risoluzioni.

L'ecografia può essere utilizzata per applicazioni particolari:

1. Ecoguida di un ago sottile. Il tragitto dell'ago è visualizzato in modo preciso e continuo e si evidenziano eventuali complicazioni (es., emorragie).
2. Ecografia via catetere. Il trasduttore viene introdotto nei vasi sanguigni tramite un catetere. Si possono visualizzare e analizzare - ed anche sbriciolare, tramite ultrasuoni ad alta frequenza - placche aterosclerotiche.

Altri utilizzi delle onde ultrasonore sono:

1. Eco-Doppler. Sfrutta la riflessione, da parte degli eritrociti, delle onde ultrasonore inviate contro di loro. *La frequenza del fascio riflesso viene modificata in conseguenza del moto degli eritrociti (effetto Doppler)*. Si possono ottenere così informazioni emodinamiche, quali velocità e viscosità del sangue, diametro e decorso del vaso.
2. Microchirurgia. Gli ultrasuoni non danneggiano i vasi (no emorragie).
3. Pulizia e sterilizzazione di oggetti e mani.
4. Litotripsia (distruzione di materiali solidi, come ad es. calcoli).
5. Distruzione del tartaro.
6. Riabilitazione fisioterapica.

### SPECT E PET

Le tecniche tomografiche a emissione sono due:

1. SPECT ("Single Photon Emission Computerized Tomography");
2. PET ("Positron Emission Tomography").

Queste due tomografie sono tecniche di medicina nucleare che consentono di ottenere immagini di sezioni anatomiche dalla distribuzione di un tracciante radioattivo in un organo. Le immagini tuttavia non sono di alta qualità, in conseguenza della difficoltà di correlare i pochi fotoni emessi dal decadimento radioattivo con la distribuzione del radiotracciante all'interno di un organo.

La SPECT (o scintigrafia) fa uso di radioisotopi che emettono fotoni singoli (raggi  $\gamma$ ), con tempi di dimezzamento dell'ordine di ore o pochi giorni.

Per ottenere l'immagine della sezione di un organo, si misurano i fotoni emessi mediante una serie di gamma-camere, disposte ad anello intorno all'organo in esame. Il numero di fotoni, essendo correlato con la distribuzione spaziale di radioattività all'interno dell'organo, permette la ricostruzione di una sezione dell'organo stesso. La risoluzione è circa di 1 cm.



La SPECT è utilizzata soprattutto nelle patologie cerebrovascolari, in cui si misura la distribuzione dei traccianti nel flusso ematico. In questo modo è possibile, ad es., rivelare ischemia là dove la TAC non ha dato segnale.

Nella PET si impiegano radioisotopi, come  $^{11}\text{C}$ ,  $^{13}\text{N}$  e  $^{15}\text{O}$ , che emettono positroni. Questi radioisotopi hanno vita breve (pochi minuti), per cui possono essere usati in alto dosaggio. Tuttavia la breve vita media richiede che il centro dove vengono formati i radioisotopi non disti troppo dal tomografo.

I radioisotopi che emettono positroni sono ideali perché facilmente incorporabili in qualsiasi biomolecola, senza alterarne le caratteristiche biochimiche. Il vantaggio della PET risiede proprio nel fatto che essa offre una gamma di elementi chimici più vasta e significativa per marcatura che le altre tecniche di medicina nucleare.

Il positrone emesso, dopo pochi mm di cammino nel tessuto, incontra un elettrone ed entrambi si annichilano, emettendo due raggi  $\gamma$  di uguale energia e di direzione opposta. Questi ultimi vengono rivelati da dei sensori posti tutto attorno al paziente. La risoluzione (2-5 mm) dipende dall'apertura dei rivelatori, dalla distanza percorsa dal positrone prima di essere annichilato e dalla non perfetta colinearità dei due fotoni  $\gamma$  emessi.

La PET permette anche di studiare:

1. il flusso ematico cerebrale;
2. il consumo di ossigeno;
3. il metabolismo glicidico;
4. la distribuzione di neurotrasmettitori.