

La via semplice alla fluorescenza

Parlare di **fluorescenza** significa trattare argomenti come la *spettroscopia* e, più in generale, l'**interazione della materia con la radiazione elettromagnetica** (la “luce”, volendosi limitare alla parte di spettro visibile all’occhio umano), che è stato uno degli argomenti che, come le osservazioni astronomiche e le esperienze di Galileo e altri scienziati dell’epoca avevano messo in crisi il sistema tolemaico, hanno contribuito alla crisi della fisica “classica” ed all’affermazione della **teoria quantistica** a cavallo del 1900.

Ora, la fisica quantistica, per quanto di gran moda in questo periodo, è sicuramente una materia di difficile comprensione anche per molti addetti ai lavori e per certi versi è anche complessa da spiegare e semplificare senza correre il rischio di esagerare nella semplificazione e fornirne un’immagine errata. Prima ancora della sua interazione con la materia, già la **luce** da sola è diventata un oggetto misterioso, con la sua **doppia natura di onda o particella**. Come accade con i supereroi come Hulk, che si trasformano in base allo stato d’animo e alle condizioni in cui si trovano, la natura della luce che si manifesta nei vari esperimenti dipende da cosa le facciamo fare o da quale delle sue molteplici proprietà andiamo ad osservare.

Esistono, comunque, tanti sistemi relativamente semplici ed esempi abbastanza intuitivi per introdurre gli elementi principali della fisica quantistica e del modello di atomo che da essa è derivato, basati su corde che vibrano, particelle (o anche gatti!!!) in una scatola e altri sistemi più o meno elementari. Nel nostro caso, poiché ci interessa più che altro la **quantizzazione dei livelli energetici** di un **atomo** o una **molecola** (cioè il fatto che gli **elettroni** che orbitano attorno ai **nuclei** in atomi o molecole non possano possedere energie variabili con continuità, ma solo **determinati valori di energia** caratteristici di tutti gli atomi e tutte le molecole di un certo tipo), useremo un sistema di riferimento ancora più semplice: i **soldi**. In realtà, per semplificare ancora, consideriamo solo le **banconote**, che esistono nei tagli 5, 10, 20, 50, 100 €.

Se immaginiamo un **distributore** che accetti solo banconote, questo permetterà solo pagamenti che siano multipli di 5 €, per cui sarà possibile introdurre, ad esempio, 30, 45 o 135 €, ma non 12, 29 o 47 €. Se immaginiamo che il **distributore sia un atomo e le banconote siano le “particelle di luce”**, note ai fisici come “**fotoni**”, che interagiscono con l’atomo, allora possiamo dire che l’interazione potrà avvenire solo se le particelle possiederanno il giusto valore (l’equivalente dei 30, 45 o 135 €) di energia.

Per continuare con il paragone, se cambiamo idea e premiamo il **pulsante di annullamento**, il distributore ci restituirà l’importo che abbiamo introdotto, ma se invece scegliamo un prodotto di un certo valore, il distributore ci restituirà solo il **resto** (insieme al prodotto). Tornando all’**atomo**, nei casi in cui gli **elettroni dell’atomo interagiscano con un fotone dell’energia giusta**, lo **assorbiranno e guadagneranno la sua energia**. A questo punto potranno **riperdere tutta l’energia di colpo emettendo un altro fotone** che avrà quindi la **stessa energia di quello “incassato”**, come nel caso dell’**annullamento** per il distributore. In questo caso parleremo di **assorbimento e riemissione di luce**. Se però l’**atomo o la molecola** che ha assorbito il fotone **perdono una parte di quella energia** urtando altri atomi o molecole o facendo muovere parte della molecola o con altri meccanismi più complicati di cui non parleremo ora, **prima di emettere il fotone**, quando lo faranno, **produrranno un fotone “di resto” con meno energia di quello “incassato”**... diciamo che abbiamo usato un distributore “ladro” che ha preso i soldi, dato il resto, ma non ha erogato il prodotto!!! In questo caso, **all’assorbimento seguirà non una normale emissione, ma la cosiddetta “fluorescenza”**, cioè l’**emissione di un fotone meno energetico di quello assorbito....** Ma, att!, un attimo, e questo cosa c’entra con quello che abbiamo osservato in **laboratorio**, con **luci di vario colore**?

Ecco, in realtà, c'è un altro non tanto piccolo (anzi enorme) **risultato della meccanica quantistica e della natura doppia della luce**, un po' onda e un po' particella: **come particella ha un'energia**, ma **come onda a ogni valore di energia si assocerà una diversa frequenza** (numero di sequenze di "creste" e "valli" dell'onda al secondo) e di conseguenza, una **diversa lunghezza d'onda** (la distanza tra due creste o due valli dell'onda, che è inversamente proporzionale alla frequenza). Ma nel caso dell'**onda elettromagnetica associata alla luce**, la **lunghezza d'onda è legata direttamente al colore della luce** associata a quell'onda. In particolare, **a lunghezze d'onda maggiori corrisponde un'energia minore e un colore che nello spettro dell'arcobaleno è più spostato verso il rosso**, viceversa a lunghezze d'onda minori corrispondono energie maggiori e colori spostati verso il violetto. Per lunghezze d'onda maggiori di quelle del rosso la luce diviene **invisibile** (zona dello **spettro infrarosso**, che possiamo percepire come **calore**), cosa che succede anche per lunghezze d'onda minori del violetto, dove invece finiamo nello **spettro ultravioletto** (diminuendo ancora la lunghezza d'onda, aumenta sempre di più l'energia e abbiamo il "**lontano ultravioletto**" da cui dobbiamo difenderci per evitare le scottature solari, e poi i terribili ma utili **raggi X** e ancor più terribili ed energetici **raggi gamma**) (Figure 1 e 2).

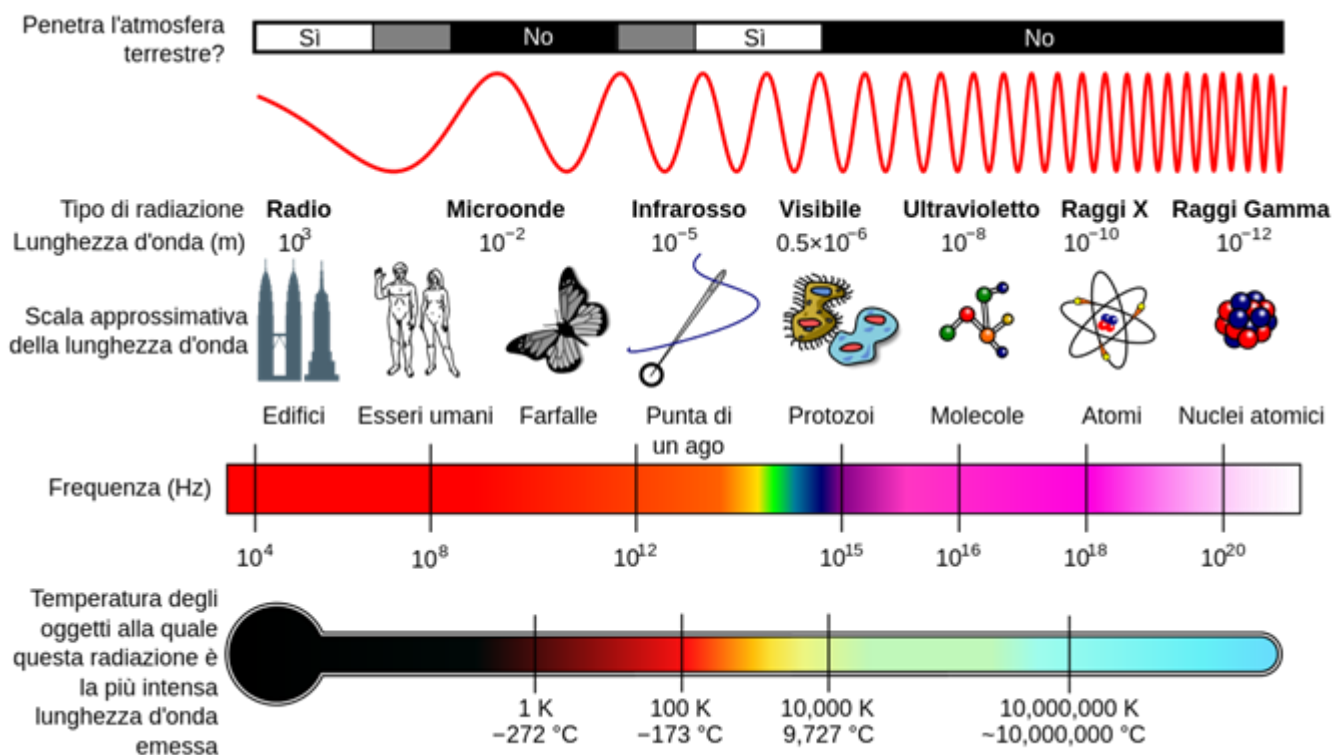


Figura 1 Caratteristiche principali dello spettro elettromagnetico

Pertanto, quando vediamo che una **sostanza**, illuminata con **luce ultravioletta (UV per gli amici)**, **riemette una luce azzurra, verde, gialla o rossa**, sapremo che il "**distributore**" associato alla sostanza ha **incassato la banconota da 100 € della luce UV** e ci ha **restituito solo rispettivamente 80, 75, 70 o 60 € di luce via via meno energetica dal blu al rosso**. Quindi, se immaginiamo le **molecole** che compongono le diverse sostanze come dei "**microscopici distributori**", possiamo descrivere la **fluorescenza** come una **proprietà di alcune molecole di assorbire la luce ad una certa lunghezza d'onda e di restituirla dopo un certo intervallo di tempo, necessario a trasferire energia all'interno della molecola o scambiandola con altre molecole, con lunghezza d'onda maggiore, corrispondente ad un'energia minore rispetto a quella assorbita** (esattamente pari alla differenza tra energia assorbita e quella dissipata prima di rimettere luce).

Se l'**intervallo di tempo non è breve** (tipicamente dai millesimi di miliardesimo di secondo ai miliardesimi di secondo tipici della fluorescenza), ma arriva addirittura ai **secondi, minuti o ore**, la luce emessa potrà essere osservata anche dopo aver spento la sorgente luminosa utilizzata per produrre l'assorbimento iniziale, e osserveremo che il campione continuerà a emettere luce con intensità più o meno velocemente decrescente per un po' di tempo. In questo caso il fenomeno prenderà il nome di "**fosforescenza**".

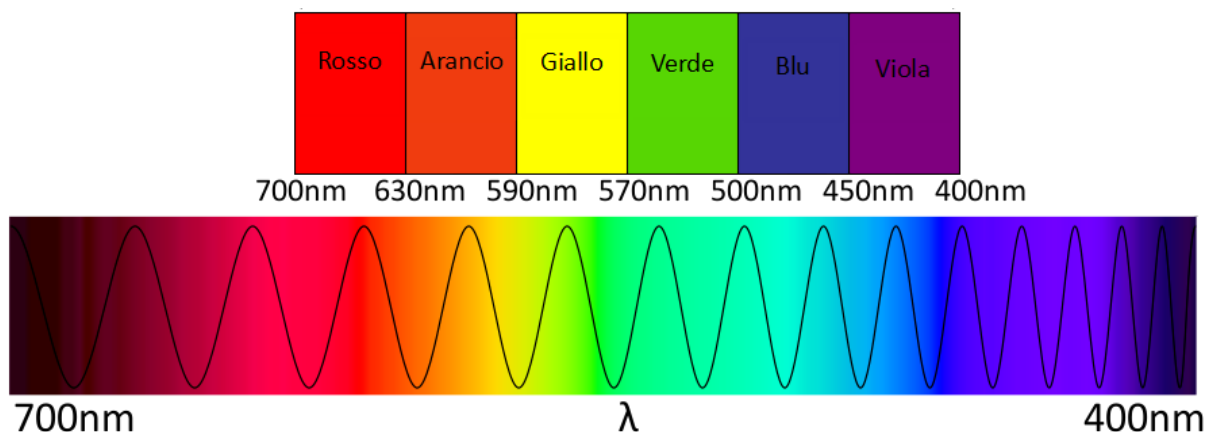


Figura 2 Spettro visibile con dettaglio schematico dei principali colori (in scala non lineare di λ)

Le **sostanze** che danno luogo al fenomeno di **fluorescenza o fosforescenza** si chiamano "**fluorofori**", cioè "**portatori di fluorescenza**". In alcune condizioni però può succedere che **non riusciamo ad osservare la fluorescenza** perché l'**energia assorbita** durante l'esposizione alla luce **viene dissipata completamente da urti e scambi con altre molecole** (di solvente o altri fluorofori). In questi casi si parla di "**quenching**", ovvero di **spegnimento del segnale di fluorescenza**. Se le molecole che spengono il segnale sono **le stesse molecole di fluoroforo che lo generano**, si parlerà di "**self-quenching**". In questo caso, si osserverà un **comportamento apparentemente paradossale: aumentando la concentrazione** (ovvero quanto prodotto sciogliamo in una quantità fissa di solvente) della sostanza fluorescente, **la fluorescenza aumenterà inizialmente, poi comincerà a diminuire progressivamente, fino anche a "spegnersi" del tutto o a essere osservabile solo sulla superficie del contenitore (sapete spiegare il perché?)**. In alcuni casi, poi, l'**interazione tra due fluorofori** produrrà una **modifica nei loro "livelli energetici"** (nell'esempio utilizzato sopra, **cambieranno le "banconote accettate"** dal distributore), per cui l'**energia del fotone riemesso**, e quindi **la lunghezza d'onda associata, saranno diverse da quelle che avrebbero emesso i due fluorofori separati**, quindi invece di osservare il colore di uno di essi o la semplice combinazione dei loro colori, **si produrrà un colore diverso**, corrispondente alla nuova distribuzione dei livelli energetici del fluoroforo.

Gli **esperimenti** mostrano come **sostanze diverse** abbiano **colori ed intensità di fluorescenza diverse** e che saranno **sensibili in modo differente a diversi solventi, altri fluorofori o nuovi composti aggiunti**. Quindi, sulla base del colore, dell'intensità e dell'effetto della concentrazione, della scelta del solvente e dell'eventuale aggiunta di sostanze è **possibile identificare quale fluoroforo sia presente**. Ma le **informazioni fornite dalla fluorescenza non finiscono qui**. Poiché gli **effetti di quenching e di cambiamento di colore per interazione tra fluorofori dipende dalla distanza tra i fluorofori e le altre molecole con cui interagiscono** e dalla **possibilità che il fluoroforo possa venire a contatto con il solvente** o piuttosto risulti nascosto ad esso (ad esempio infilato in una "tasca" interna di una grande molecola come una proteina), la **fluorescenza fornisce informazioni preziose**, in particolare su sistemi complessi quali organelli cellulari, cellule intere, colture cellulari, tessuti, fino a interi organismi, **riguardanti la vicinanza di molecole fluorescenti** (o a cui sia stata legata chimicamente un "**etichetta**" fluorescente) **tra loro e con il solvente o altre molecole in grado di modificare la fluorescenza**. L'estrema sensibilità e la possibilità di ottenere

immagini dei sistemi molto chiare e risolte rende la fluorescenza uno **strumento molto potente in campo biomedico**.

La **sensibilità delle misure di fluorescenza** dipende dal fatto che, anche se in teoria **solo alcune delle molecole che assorbono la luce la riemettono come fluorescenza** (cioè con un colore diverso da quello assorbito), è però **molto più facile e preciso misurare luce di un colore diverso da quello usato per illuminare il campione** rispetto a misurare quanta della luce usata per illuminare (generalmente con una forte intensità) è stata assorbita. Infatti anche se la **variazione assoluta** (quantità di luce assorbita) è **grande**, quella **relativa** (la quantità assorbita diviso l'intensità di partenza) lo sarà **molto meno**, ed è proprio questa che si misura in un esperimento in cui si misuri la luce di un unico colore prima e dopo l'assorbimento. Un **esempio visivo** di ciò si può avere considerando gli **spettatori allo stadio** (prima del COVID...) e fotografando gli spalti dove siedono i tifosi di una squadra, **tutti con la maglia rossa**, e poi ripetendo la fotografia **dopo che o sette tifosi sono andati via** (corrisponde ad un assorbimento di 7 unità di intensità) o, invece, **uno solo ha tolto la maglia rossa rimanendo in camicia blu** (corrisponde all'emissione di un'unità di intensità in fluorescenza) (**Figura 3**).

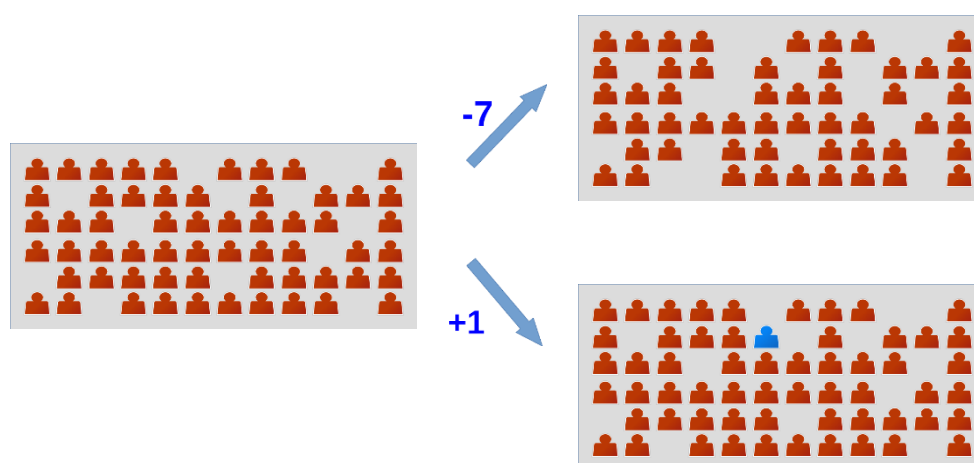


Figura 3. Quale cambiamento si osserva meglio?

Lo studio dell'evoluzione dei processi fisiologici, la **visualizzazione della localizzazione delle proteine** e la **rilevazione dell'espressione transgenica in vivo**, sono possibili grazie alla **fusione della proteina di interesse con una proteina fluorescente verde (GFP)** estratta dalla **medusa *Aequorea victoria*** (**Figura 4**).

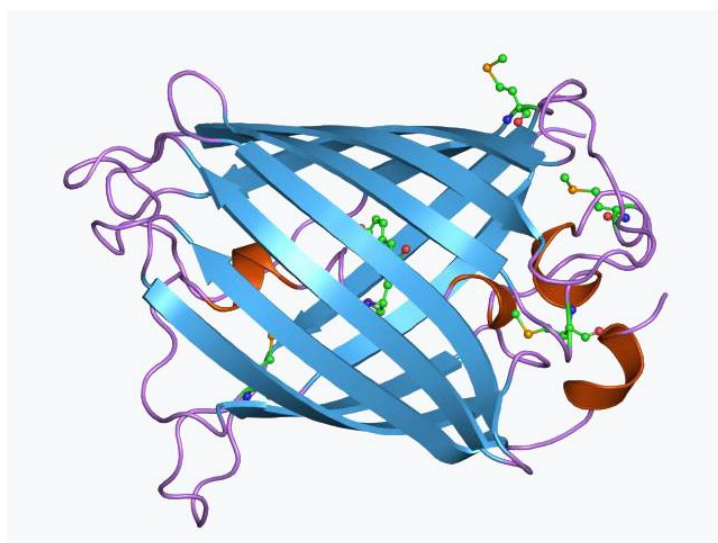


Figura 4 In alto: vista schematica della struttura 3D (PDB:1ema) della proteina GFP (green fluorescent protein). In basso: la medusa *Aequorea victoria* (foto di Sierra Blakely, Attribution, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=4091901>)

Grazie a tutti gli **aspetti** e le **potenzialità** finora descritti, il fenomeno della **fluorescenza** trova numerose **applicazioni** sia in **campo medico** che nella **ricerca scientifica**, per **rendere visibili** zone del **corpo umano** interessate da **infezioni o malattie** oppure per evidenziare **particolari proteine associate a malattie** o altre **alterazioni in tessuti o cellule** (Figura 5), fino a **piccoli organismi** (Figura 6), mostrando anche le loro **interazioni**.

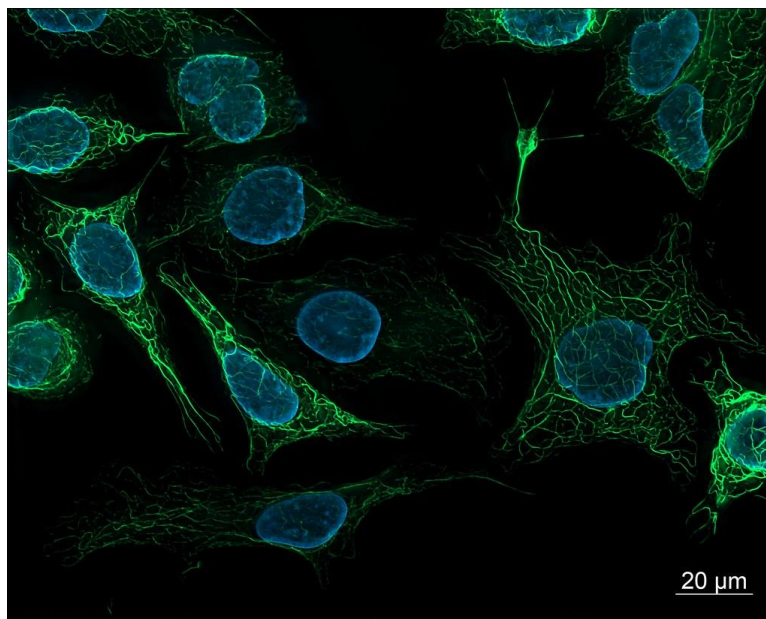


Figura 5 Applicazione della fluorescenza in microscopia per lo studio di cellule (SK8_18-2)

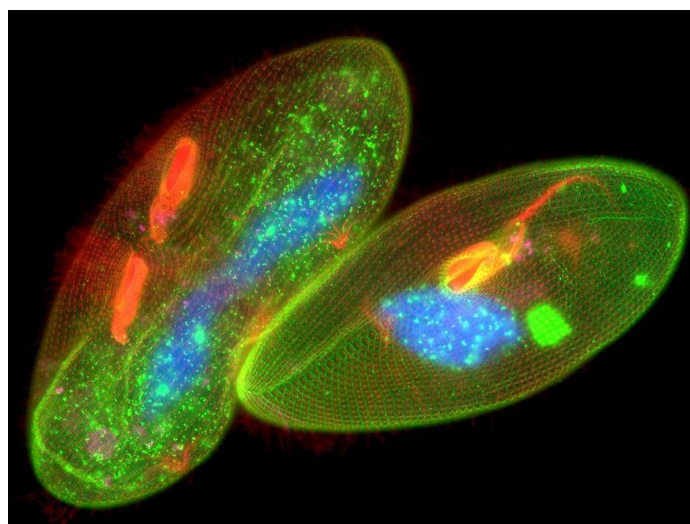


Figura 6 Applicazione della fluorescenza in microscopia per lo studio di organismi (parameci)