

LA MICROSCOPIA IN FLUORESCENZA

**APPUNTI AD USO DEI MICROSCOPISTI
DILETTANTI**

3[^] Edizione

Marco Brusadin

**ROMA - 2023
– PRO MANUSCRIPTO –**

AVVERTENZE SUL COPYRIGHT



Questi APPUNTI su LA MICROSCOPIA IN FLUORESCENZA sono rivolti ai Microscopisti dilettanti.

Sono stati rilasciati - a titolo completamente gratuito - sotto la Licenza:

Creative Commons Attribuzione-Non commerciale-Non opere derivate 4.0 Internazionale (CC BY 4.0).

Per leggere una copia della licenza visita il sito web <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.it>

L'OPERA È MESSA A DISPOSIZIONE SULLA BASE DEI TERMINI DELLA PRESENTE LICENZA "CREATIVE COMMONS PUBLIC LICENCE" ('CCPL' O 'LICENZA').

L'OPERA È PROTETTA DAL DIRITTO D'AUTORE E/O DALLE ALTRE LEGGI APPLICABILI.

OGNI UTILIZZAZIONE DELL'OPERA CHE NON SIA AUTORIZZATA AI SENSI DELLA PRESENTE LICENZA O DEL DIRITTO D'AUTORE È PROIBITA.

CON IL SEMPLICE ESERCIZIO SULL'OPERA DI UNO QUALUNQUE DEI DIRITTI QUI DI SEGUITO ELENCATI, TU ACCETTI E TI OBBLIGHI A RISPETTARE INTEGRALMENTE I TERMINI DELLA PRESENTE LICENZA

L'AUTORE (CIOÈ IL *LICENZIANTE*) CONCEDE A TE I DIRITTI QUI DI SEGUITO ELENCATI A CONDIZIONE CHE TU ACCETTI DI RISPETTARE I TERMINI E LE CONDIZIONI DI CUI ALLA PRESENTE LICENZA.

Questa pagina è disponibile nelle seguenti lingue:



Deed Creative Commons

Attribuzione 4.0 Internazionale (CC BY 4.0)



This is a human-readable summary of (and not a substitute for) the [license](#).

Tu sei libero di:

Condividere — riprodurre, distribuire, comunicare al pubblico, esporre in pubblico, rappresentare, eseguire e recitare questo materiale con qualsiasi mezzo e formato

Modificare — remixare, trasformare il materiale e basarti su di esso per le tue opere per qualsiasi fine, anche commerciale.

Il licenziante non può revocare questi diritti fintanto che tu rispetti i termini della licenza.



Alle seguenti condizioni:

Attribuzione — Devi riconoscere una menzione di paternità adeguata, fornire un link alla licenza e indicare se sono state effettuate delle modifiche. Puoi fare ciò in qualsiasi maniera ragionevole possibile, ma non con modalità tali da suggerire che il licenziante avalli te o il tuo utilizzo del materiale.

Divieto di restrizioni aggiuntive — Non puoi applicare termini legali o misure tecnologiche che impongano ad altri soggetti dei vincoli giuridici su quanto la licenza consente loro di fare.

Note:

Non sei tenuto a rispettare i termini della licenza per quelle componenti del materiale che siano in pubblico dominio o nei casi in cui il tuo utilizzo sia consentito da una eccezione o limitazione prevista dalla legge.

Non sono fornite garanzie. La licenza può non conferirti tutte le autorizzazioni necessarie per l'utilizzo che ti prefiggi. Ad esempio, diritti di terzi come i diritti all'immagine, alla riservatezza e i diritti morali potrebbero restringere gli usi che ti prefiggi sul materiale.

PREFAZIONE

Questi APPUNTI, giunti alla 3^a edizione riveduta e ampliata, pur non avendo alcuna pretesa di esaustività e neppure la benché minima ambizione di proporsi come un manuale, vogliono presentarsi esclusivamente come un “compagno di viaggio” per i dilettanti che si accostano al meraviglioso mondo della microscopia, con particolare riguardo alle tecniche in fluorescenza più consolidate e alla portata dei non professionisti, omettendo volutamente quelle che richiedono specifiche costosissime apparecchiature.

Il lettore che desiderasse maggiori informazioni o approfondimenti potrà avvalersi della Bibliografia (anch'essa assolutamente non esaustiva) e di Internet per le proprie ricerche.

Ringrazio mia moglie e i miei figli per l'aiuto morale e materiale offertomi nella realizzazione di questo piccolo “sussidio” che, iniziato nel mese di aprile u.s., non avrebbe potuto vedere la luce senza la loro preziosa collaborazione, la loro amabile comprensione e la loro notevole capacità di sopportazione.

Ringrazio, infine, l'amico Alberto Monico per la graditissima, fattiva e puntuale revisione delle bozze.

Roma, 27 settembre 2023

Marco Brusadin

AVVERTENZE

Ogni manipolazione, anche la più semplice, che comporti l'uso di **sostanze chimiche** o di **materiale biologico** è soggetta (oltre alle **specifiche norme di legge**) a **rischi e pericoli** per l'operatore e per gli altri: chi non fosse sufficientemente preparato - *sia a livello di nozioni sia a livello di manualità* - è vivamente sollecitato (e moralmente tenuto) a **farsi aiutare da una persona esperta!**

In particolare, è bene evitare di agire in casa o in luoghi chiusi: si scelgano spazi e/o locali adeguati e, comunque, ben ventilati e sufficientemente illuminati.

Prima anche solo di stappare una bottiglia, è **indispensabile**:

- **accertarsi** - leggendo bene l'**etichetta** - del suo contenuto (che non va "annusato" per nessuna ragione!);
- **prendere visione** dei **simboli di pericolo** (infiammabilità, tossicità, ecc.) riportati sulla confezione;
- **informarsi**, se non si è più che sicuri, tramite Internet o consultando il proprio Farmacista sui **rischi** connessi.

Le "**schede di sicurezza**" delle sostanze (di tutte quelle citate in questo lavoro) sono disponibili su internet, alle rispettive voci; ciascuno provveda da sé.

Inoltre, ricordo che i **prodotti chimici** non vanno assolutamente smaltiti tramite la **rete fognaria** o quella dei **rifiuti domestici**: occorre rivolgersi a **Ditte specializzate** o, se queste non fossero reperibili, al proprio **Farmacista** per avere lumi.

Ritengo assolutamente superfluo ricordare che i materiali biologici sono da considerarsi, sempre, potenzialmente infetti e vanno smaltiti secondo le norme igieniche appropriate: **niente rifiuti urbani**, se non previa sterilizzazione in autoclave o inattivazione a mezzo fiamma.

Ritengo non superfluo ricordare a tutti che è **assolutamente vietato** dalle normative vigenti (oltre che dal buon senso) **usare bottiglie non chiaramente etichettate** o che - addirittura - rechino l'etichetta di altri prodotti, soprattutto se commestibili!

Spero non ci sia bisogno di sensibilizzare tutti sulla necessità che i prodotti chimici, anche quelli apparentemente innocui, siano **tenuti assolutamente fuori della portata dei bambini e degli animali domestici**.

Inoltre, le persone che vivono con noi debbono essere informate sulla natura dei prodotti che deteniamo; anzi, sarebbe bene farne un **elenco** da tenere a disposizione **per ogni caso di emergenza o di necessità**. È bene essere informati sull'ubicazione e

sulla reperibilità telefonica del più vicino **Centro Antiveneni**, a cui ci si dovrà rivolgere in ogni caso di intossicazione, anche lieve o semplicemente sospetta, indicando con la maggior precisione possibile la sostanza a cui si attribuiscono i sintomi.

Consiglio di tenere sempre a portata di mano un **estintore a polvere** (almeno del tipo per autovetture), stracci per asciugare eventuali liquidi (in realtà esistono vari prodotti *ad hoc*, come il **Chemizorb**[®] granulare) e **acqua corrente**.

Il **piano di lavoro** deve essere impermeabile e ininfiammabile: meglio il buon vecchio marmo (che peraltro si corrode e si macchia facilmente) piuttosto che il legno o i laminati plastici. L'ideale sarebbe fabbricarsene uno con maioliche bianche opportunamente cementate o, in caso di uso di materiali biologici, rivestito con appositi polimeri lavabili, sterilizzabili e ignifughi (rivolgersi a Ditte specializzate).

Indispensabili, poi, sono il **kit-lavaocchi**, gli **occhiali protettivi** (meglio la **maschera trasparente** tipo giardinaggio), la **maschera antipolveri** (quelle di carta) [in caso di manipolazione di materiale biologico potenzialmente infetto o infettivo, usare una maschera FFP2 o anche FFP3], i **guanti di lattice** (meglio quelli di **vinile per solventi**, per la loro maggiore resistenza alle sostanze chimiche) e il **camice da laboratorio** (che deve essere sempre mantenuto pulito).

Spero sia superfluo ricordare il **divieto assoluto di fumare e di tenere fiamme libere accese** (a meno di aver adottato le **indispensabili precauzioni**).

Attenzione anche allo stato "di salute" dell'**impianto elettrico** il quale deve essere munito di presa a terra e di **salvavita**: può bastare una scintilla in un ambiente in cui siano presenti vapori di alcol, di etere o di altri infiammabili per innescare un incendio o un'esplosione.

Questi APPUNTI sono rivolti a **dilettanti seri e coscienziosi**, capaci di serenità di giudizio e di quell'umiltà che permette di chiedere lumi ed eventualmente aiuto.

DIFFIDO chiunque dall'usare le tecniche descritte per fini diagnostici: incorrerebbe nel reato di **ESERCIZIO ABUSIVO DELLA PROFESSIONE MEDICA!**

Una raccolta dei **principali segnali di pericolo** relativi ai **prodotti chimici** (e altri) può essere reperita sul sito: <http://chimica.unical.it/sicurezza/segnaletica.html>

In ogni caso, **NON MI ASSUMO ALCUNA RESPONSABILITÀ** per le conseguenze derivate da manipolazioni o realizzazioni chimiche, elettriche o meccaniche che chiunque intendesse compiere a seguito della lettura di questi APPUNTI, soprattutto se effettuate in deroga alle vigenti norme di legge e di prudenza "da buon padre di famiglia" che debbono guidare ogni attività umana.

Buone Osservazioni!

Marco Brusadin

INDICE

Prefazione	pag. 3
Avvertenze	4
<i>LA MICROSCOPIA IN FLUORESCENZA</i>	
<i>Introduzione</i>	11
Dettagli Tecnici	13
<i>LA RADIAZIONE ELETTROMAGNETICA</i>	
INTERAZIONI TRA RADIAZIONI E MATERIA	22
diffusione classica	23
effetto fotoelettrico	24
effetto Compton	25
produzione e annichilazione di coppie	27
BREVI NOTE DI ELETTRODINAMICA QUANTISTICA	
<i>LA FLUORESCENZA</i>	
UN PO' DI FISICA	38
la fluorescenza	40
processo di assorbimento	40
radiazione emessa	43
intensità della fluorescenza e concentrazione di sostanza	44

<i>effetto filtro interno</i>	47
<i>light scattering</i>	47
<i>quenching</i>	48
<i>effetto matrice</i>	49
<i>photobleaching</i>	49
UN PO' DI CHIMICA	50
correlazione tra spettro di eccitazione e spettro di emissione	51
struttura delle molecole organiche fluorescenti	52
influenza del pH sulla fluorescenza	52
influenza della planarità e della rigidità della struttura molecolare sulla fluorescenza	53
FRET (<i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>)	56
alcuni esempi di fluorocromi	59
lunghezze d'onda di eccitazione e di emissione di vari fluorocromi	61
<i>MICROSCOPIA IN RADIAZIONE ULTRAVIOLETTA</i>	65
<i>LA FLUORESCENZA AL MICROSCOPIO OTTICO</i>	65
M ETODI DI OSSERVAZIONE DELLA FLUORESCENZA AL MICROSCOPIO OTTICO	67
fluorescenza in diasopia ad eccitazione assiale	67
fluorescenza in diasopia ad eccitazione radente	68
fluorescenza in diasopia ad eccitazione mista: assiale e radente	68

INDICE

microscopia in contrasto di fase / fluorescenza	69
fluorescenza in episcopia	69
scelta delle ottiche	70
<i>METODI PER LA FLUORESCENZA IN MICROSCOPIA OTTICA</i>	72
rilevamento di singole molecole	78
<i>UN BREVISSIMO EXCURSUS STORICO</i>	80
<i>UN MICROSCOPIO A FLUORESCENZA... FATTO IN CASA</i>	84
<i>AUTOFLUORESCENZA NEI TESSUTI BIOLOGICI</i>	90
<i>FLUORESCENZA SECONDARIA</i>	92
<i>METODI ISTOCITOLOGICI IN FLUORESCENZA</i>	93
<i>ALCUNI METODI USATI NELLA MICROSCOPIA IN FLUORESCENZA</i>	93
dimostrazione degli acidi nucleici	93
dimostrazione delle catecolamine	95
dimostrazione della serotonina	96
colorazione per fluorescenza con acido picrico <i>in vivo</i>	96
fluorescenza in sezioni sottili non decalcificate di tessuto osseo	97
microscopia in fluorescenza nello studio della microbiologia del terreno	98
microscopia in fluorescenza per identificare cellule tumorali nel liquor cerebrospinale	99

INDICE

microscopia in fluorescenza nell'industria alimentare	103
<i>IMMUNOFLUORESCENZA</i>	104
immunofluorescenza diretta	106
immunofluorescenza indiretta	106
<i>ANALISI DI PROTEINE</i>	110
tracciamento di proteine mediante fluorescenza	110
analisi della struttura delle proteine	113
analisi di <i>quenching</i> della fluorescenza	113
<i>METODI PER LA FLUORESCENZA IN MICROSCOPIA OTTICA</i>	115
<i>FLUORESCENZA IN MICROSCOPIA OTTICA</i>	117
<i>METODICHE ANALITICHE</i>	129
REAGENTI	
Tampone Fosfati	130
Tampone Fosfato-Acido Citrico	130
METODI	
metodo per l'evidenziazione della Noradrenalina nella surrenale	131
metodo per l'osservazione delle fibre adrenergiche	131
metodo per l'immunofluorescenza diretta	131
metodo per la localizzazione di antigeni intracellulari o di superficie in colture di cellule	133
metodo per l'immunofluorescenza indiretta	133
derivatizzazione di aminoacidi	135
colorazione con Arancio di Acridina	135
colorazione con Auramina O	136
PREPARAZIONE DI ALCUNI FISSATIVI	138
Fissativo di Carnoy	138
Soluzione salina di formolo al 10%	138

Fissativo di Zenker	138
Formolo calcico di Baker	138
Miscela Cromato-Bicromato di Potassio	139
TERRENI DI COLTURA PER CELLULE	140
PBS (o Terreno di Dulbecco)	140
BSS (o Terreno di Hanks)	140
<i>APPENDICE A - INTERCALAZIONE</i>	141
<i>APPENDICE B - FISH (FLUORESCENT IN SITU HYBRIDIZATION)</i>	143
<i>APPENDICE C - LA MECCANICA QUANTISTICA E LA BIOLOGIA</i>	147
un piccolo richiamo di matematica	149
un po' di Meccanica Quantistica	151
- stato di una particella	151
- il fotone	153
- un po' di storia per capire meglio	154
- l'interpretazione di Born	154
- l'interpretazione di Born della funzione d'onda	155
- la complementarità	156
- le equazioni di Maxwell	158
- l'operatore nabla	161
- breve sintesi sull'operatore nabla	165
- effetto tunnel	169
<i>APPENDICE D - SCHEDE DI SICUREZZA</i>	170
<i>BIBLIOGRAFIA</i>	177
<i>GLOSSARIO</i>	202
<i>BREVE SINTESI SUGLI "OPERATORI" IN MECCANICA QUANTISTICA</i>	206

LA MICROSCOPIA IN FLUORESCENZA

INTRODUZIONE

In alcuni miei precedenti lavori (“I preparati microscopici”, Roma, 2007, “I preparati ematologici”, Roma, 2008, “L’esame microscopico degli organi emopoietici”, Roma, 2009), ho trattato l’allestimento di preparati istologici, citologici, ematologici e microbiologici, descrivendo tecniche e metodiche che fossero accessibili anche ai dilettanti e ai principianti.

Impegno analogo ho profuso nella realizzazione del volumetto “Anatomia microscopica”, Roma, 2016.

Preciso che tutti i miei lavori sono reperibili *anche* sul sito <http://www.funsci.it>

Ora, facendo riferimento al concetto di “studio”^(*), cioè all’apprendimento di nozioni atte ad arricchire il bagaglio culturale personale, traendo inoltre il massimo vantaggio dall’osservazione sperimentale diretta, desidero tentare di fornire (senza alcuna pretesa di esaustività) alcune nozioni basilari utili per il riconoscimento di cellule e di strutture cellulari tramite la microscopia in fluorescenza. Un’ampia parte di questi “Appunti” è dedicata alle nozioni fisico-chimiche necessarie, a mio avviso, per comprendere il fenomeno della fluorescenza. Inoltre, ho inserito anche un breve *excursus* storico, in modo da fornire alcuni punti di riferimento nel seguire passo passo gli studi e le esperienze che hanno portato allo stato attuale delle conoscenze.

Ho introdotto, inoltre, un capitolo dedicato a rudimenti di meccanica quantistica, poiché la biologia è la scienza che studia la vita nella sua varietà e complessità, la fisica cerca le leggi matematiche che spiegano il comportamento della natura stessa e i fenomeni ad essa connessi.

Ovviamente, chi fosse interessato ad ulteriori approfondimenti potrà documentarsi sia consultando i lavori citati nelle note a piè di pagina, sia avvalendosi della bibliografia essenziale (posta in fondo a questo lavoro), o di altre fonti bibliografiche.

(*) - Il termine latino “studium” generalmente viene riferito all’applicazione assidua all’attività rivolta al sapere, vds.: E. GEORGES - F. CALONGHI, *Georges, dizionario enciclopedico della lingua latina*, Rosenberg & Sellier, 2002⁴, Torino, I vol., pagg. 1411ss.: “studium... [studeo], desiderio, amore di qualcosa, ardore, propensione, gusto, passione, zelo, voglia, cura e sim.; ad es.: “(*studium*) *veri reperiendi*, amore della verità (Cic.), ecc. Pertanto, ritenendo che un microscopista (sia pur dilettante) si applichi allo studio nel senso di “passione per la conoscenza” (che conduce alla verità), ho integrato questo lavoro, giunto alla 3^a edizione, con ulteriori informazioni tecnico-scientifiche), arricchendo contemporaneamente l’iconografia e la bibliografia.

Tengo comunque a precisare che le metodiche e le tecniche analitiche descritte, peraltro in uso anche in molti laboratori non dotati di apparecchiature automatiche, tendono esclusivamente a incentivare e ad aiutare il dilettante che voglia cimentarsi nella sperimentazione.

Per quanto riguarda l'approvvigionamento del materiale da esaminare, rinvio a quanto esposto nelle "introduzioni" ai miei lavori sopra citati.

Molti suggerimenti pratici possono essere reperiti, ad esempio, nel lavoro di G. P. SINI, *La Fluorescenza e le sue Applicazioni*, <https://www.funsci.it/files/o11-fluor.html>

A livello di sito vero e proprio, mi permetto di citare **Fun Science Gallery**, raggiungibile agli indirizzi: <http://www.funsci.it> o, anche: <https://www.funsci.it> ove si possono reperire (oltre a numerosi spunti interessanti per realizzare esperienze didattiche e ludiche in vari campi della scienza) veri e propri trattati di microscopia ottica e non solo.

Non posso, poi, omettere i siti: <https://www.myttex.net/forum/>

http://spazioinwind.libero.it/andrea_bosi/index.htm

<https://www.binomania.it/author/andrea-bosi/> anch'essi ricchi di spunti riguardanti, oltre la microscopia, numerose discipline scientifiche.

Altro sito interessantissimo che descrive sia la microscopia in fluorescenza sia altri metodi di osservazione è: <http://www.fluorescencemicroscopy.it/index.html>

Non è possibile, ovviamente, citare tutti... ma credo sia sufficiente un buon motore di ricerca e un po' di pazienza per trovare tutto ciò che può essere necessario a un dilettante.

Il Dottor Giovanni Pietro SINI ci ha lasciati il 19 dicembre 2020: i suoi preziosissimi e imprescindibili manuali e articoli (reperibili al sito <https://www.funsci.it/indice-sini.html>), il suo lavoro anche nella restaurazione di antichi e moderni strumenti, nonché i suoi consigli sempre generosamente elargiti sono indimenticabili;

Andrea BOSI ci ha lasciati nel 2020, all'età di soli 75 anni, ma i suoi notevoli e innumerevoli contributi sia nel campo della microscopia, sia in quello della radioattività (in particolare, nella radiometria), sia in molte altre discipline scientifiche restano attualissimi e intramontabili (possono essere reperiti nei siti sopra citati e in particolare in http://spazioinwind.libero.it/andrea_bosi/index.htm

DETTAGLI TECNICI

Nel presente lavoro le fotografie sono state realizzate per mezzo di una fotocamera digitale con sensore CCD formato APS-C 23,6×15,8 mm da 10,2 Mpixel effettivi. Per le riprese al microscopio (triocolare) la fotocamera è stata munita di un apposito adattatore e di un oculare “fotografico” *ad hoc* (ingrandimento 2,5× o 4×, selezionabile); per le nuove fotografie in fluorescenza, si veda la descrizione dell’apparato alle pagg. 118 ss. Non ho ritenuto utile citare l’ingrandimento (più propriamente: la *magnificazione*) prodotto dalla combinazione dei vari obiettivi con le ottiche da ripresa usate: per ogni fotogramma ho riportato ingrandimento e apertura numerica dell’obiettivo usato, del tempo di esposizione e della sensibilità ISO impostata per il sensore, nonché un riferimento grafico (trattino) alla misura in mm o sottomultipli. L’argomento relativo alla “fotomicrografia al microscopio con fotocamere digitali” è stato trattato magistralmente dal Dott. Giovanni Pietro SINI (http://www.funsci.it/files/microfoto_digitale.pdf) il quale è autore di numerose altre pubblicazioni (anche molto professionali e ponderose) reperibili nel sito: <http://www.funsci.it/indice-sini.html> nella sezione dedicata alla Microscopia Ottica.

Altre informazioni sulla fotomicrografia possono essere reperite nel testo di Paolo CASTANO, *Microscopia ottica e Fotomicrografia*, citato *passim* nel testo e in bibliografia, nonché nella pubblicazione della KODAK, *Photography through the Microscope*, anch’essa citata in Bibliografia.

Gli **obiettivi** utilizzati per le fotomicrografie in banda visibile sono: 4/0,10 plan-acromatico; 10/0,25 plan-acromatico; 20/0,65 apocromatico; 25/0,40 plan-acromatico; 40/0,95 apocromatico; 60/0,85 plan-acromatico; 60/1,40 Plan-apocromatico; 100/1,32 NPL Fluotar semiapocromatico (alla Fluorite); 100/1,32 Plan-apocromatico, a immersione in olio.

I **condensatori** usati per diascopea sono due aplanatico-acromatici (uno con A.N. 1,25 e l’altro con A.N. 1,40 - se immersi in olio - e A.N. 0,95 se usati “a secco”). Il **monitor**, utilizzato per realizzare sia l’elaborazione delle foto sia l’impaginazione, è un TFT antiriflesso settato alla definizione di 1680×1050 pixel, con temperatura di colore di 6 500 Kelvin (*gamma* 2,2), regolato da un “densitometro” digitale che ha la funzione di testare continuamente la luce-ambiente e di adeguarvi lo schermo in modo da poter lavorare praticamente sempre nelle stesse condizioni cromatiche e di luminosità.

Nel convertire le foto dal formato *originale di ripresa NEF* a 36 bit (300 dpi) al *jpeg* per il web (72 dpi), sia la definizione sia la profondità di colore delle immagini sono state inevitabilmente sacrificate.

Per quanto possibile, nella stesura del testo ho cercato di rispettare le prescrizioni del SI sia per le unità di misura, sia per le quantità, sia per i separatori numerici.

LA RADIAZIONE ELETTROMAGNETICA

Un sistema fisico che trasferisce energia all'ambiente circostante è definito *sorgente*. L'energia trasferita all'ambiente circostante da una sorgente è detta *radiazione*⁽¹⁾.

“La generazione dei vari tipi di radiazione può richiedere o no la presenza di un mezzo ma è sempre realizzata attraverso la propagazione di una perturbazione a cui è possibile associare un'onda”⁽²⁾.

È opportuno precisare che si hanno: *radiazioni corpuscolari*, qualora trasportino materia insieme all'energia; *radiazioni non corpuscolari* (dette anche *radiazioni elettromagnetiche*) qualora trasportino esclusivamente energia.

Le *radiazioni* (o *onde*) *elettromagnetiche*, a differenza delle onde sonore (anch'esse trasportanti solo energia), possono propagarsi anche nel vuoto, cioè in assenza di materia. Ciò è dovuto al fatto che le perturbazioni che si propagano sono variazioni (tra loro associate) di intensità dei campi elettrico e magnetico: questo fenomeno giustifica la denominazione di *onde elettromagnetiche*.

Le onde elettromagnetiche, come tutti gli altri fenomeni ondulatori, sono caratterizzate da:

- *lunghezza d'onda* (distanza percorsa dall'onda in un periodo), indicata con λ ed espressa, nel SI, in metri; misurata graficamente come distanza tra le creste di due onde consecutive.
- *frequenza* (numero di oscillazioni nell'unità di tempo), indicata con ν ed espressa, nel SI, in Hertz [Hz] (o, impropriamente, in cicli al secondo [c/s] [kc, Mc]);
- *velocità di propagazione* (velocità con la quale la perturbazione si allontana dalla sorgente), indicata con v ed espressa, nel SI, in metri/secondo [m/s].

La formula $v = \lambda\nu$ mostra chiaramente la correlazione tra queste proprietà.

La velocità di propagazione delle onde elettromagnetiche nel vuoto (che, come sappiamo dalla teoria della relatività, è invariante in tutti i sistemi di riferimento inerziali) è stata misurata con grande precisione; nel 1983 essa era stata determinata come $c = 2,997\ 924\ 58\ (1,2) \times 10^8$ m/s, ove l'errore ($\delta c/c \approx 10^{-9}$) è dovuto quasi esclusivamente all'incertezza della realizzazione del “metro” a partire dalla definizione - adottata nel 1960 in sostituzione della precedente sul “metro campione” che risultava meno accurata per circa un fattore 100 - che dichiarava: “il metro è la lunghezza uguale a 1 650 763,73 lunghezze d'onda nel vuoto della radiazione corrispondente alla transizione fra i livelli $2p_{10}$ e $5d_5$ dell'atomo di Cripton 86”⁽³⁾. Le due cifre scritte tra parentesi subito dopo il valore numerico di c rappresentano l'errore quadratico medio sulle ultime cifre significative.

(1) - Cfr.: P. L. INDOVINA, *Le radiazioni elettromagnetiche e la produzione dei raggi X*, in: R. PASSARIELLO, *Elementi di Tecnica in Radiologia e Diagnostica per Immagini*, Roma, 1990, pag. 3.

(2) - P. L. INDOVINA, *ibidem*.

(3) - E. AMALDI - R. BIZZARRI - G. PIZZELLA, *Fisica Generale - Elettromagnetismo, Relatività, Ottica*, Zanichelli, Bologna, 1986, pag. 7.

Pertanto, il valore di c potrebbe essere scritto anche come: $c = (2,997\,924\,58 \pm 0,000\,000\,012) \times 10^8$ m/s.

Con la nuova definizione di metro, adottata nell'ottobre 1983, secondo la quale "il metro è la lunghezza del tragitto percorso nel vuoto dalla luce in un intervallo di tempo $1/299\,792\,458$ s"⁽⁴⁾, il valore di c risulta fissato esattamente come $c = 2,997\,924\,58 \times 10^8$ m/s⁽⁵⁾. La velocità di propagazione delle onde elettromagnetiche nel vuoto è indipendente dalla frequenza. Ritengo importante ricordare che fu proprio l'osservazione che le onde elettromagnetiche si propagano nel vuoto con la *velocità della luce* a suggerire a MAXWELL l'idea che "la luce visibile sia costituita da onde elettromagnetiche di lunghezza d'onda $\sim 0,39 \mu\text{m} \leq \lambda \leq \sim 0,78 \mu\text{m}$ "⁽⁶⁾.

Il termine "luce", di uso assai comune, può essere equivoco poiché, in realtà, indica una percezione soggettiva piuttosto che una realtà fisica⁽⁷⁾.

Per fugare (spero!) ogni possibile equivoco o fraintendimento, intendo spendere qualche parola chiarificatrice, partendo dalle basi fisiche del fenomeno.

"La luce è costituita da onde elettromagnetiche che il nostro occhio è in grado di osservare con diverso colore quando la loro lunghezza d'onda è compresa fra $\sim 0,39 \mu\text{m}$ e $\sim 0,78 \mu\text{m}$ "⁽⁸⁾. Si tratta, dunque, della *propagazione* di due campi oscillanti: quello elettrico e quello magnetico.

In fisica i *campi* vengono spesso trattati come funzioni continue: si tratta, in realtà, di un'approssimazione (la cosiddetta *approssimazione classica*). Su scala microscopica, tuttavia, è necessario (al fine di rendere ragione di molteplici evidenze sperimentali) ipotizzare anche per i campi una struttura particellare: è la cosiddetta *quantizzazione dei campi*.

Louis-Victor Pierre Raymond DE BROGLIE, nel 1924, associò a ciascuna particella una lunghezza d'onda (*lunghezza d'onda di de Broglie*) descritta dalla relazione: $\lambda = \frac{h}{p}$ (ove $p = \text{impulso}$).

Com'è noto, i *quanti* del campo elettromagnetico sono chiamati *fotoni*.

Va rilevato, tuttavia, che su scala macroscopica la struttura particellare dei campi non è evidenziabile: una descrizione puramente ondulatoria del campo risulta, dunque, perfettamente adeguata⁽⁹⁾.

L'intervallo di frequenza entro il quale vengono studiate le onde elettromagnetiche, è estremamente ampio, estendendosi da un migliaio di Hz a oltre i 10^{35} Hz.

(4) - Vds.: E. AMALDI - R. BIZZARRI - G. PIZZELLA, *cit.*, pag. 7.

(5) - *ibidem*, pag. 8, in accordo con quanto stabilito da: BUREAU INTERNATIONAL DES POIDS ET MESURES, *The International System of Units (SI)*, 2006⁸, pag. 112. Tuttavia, C. MENCUCINI, *cit.*, a pag. 358 afferma che: $c = 299\,792\,456,2 \pm 1,1$ m/s.

Inoltre, secondo le norme stabilite dal SI nel 2006, la velocità di propagazione delle onde elettromagnetiche nel vuoto dovrebbe essere indicata con il simbolo: c_0 ; tuttavia viene ancora accolto il simbolo c .

(6) - Vds.: E. AMALDI - R. BIZZARRI - G. PIZZELLA, *cit.*, pag. 417.

(7) - Cfr.: G. P. SINI, *Anche i pignoli, nel loro piccolo, s'inca...*, 2010, pag. 2.

(8) - C. MENCUCINI - V. SILVESTRINI, *Fisica II - Elettromagnetismo. Ottica*, Liguori, Napoli, 1988, pag. 358.

(9) - Vds.: C. MENCUCINI - V. SILVESTRINI, *ibidem.*, pag. 359.

Le onde elettromagnetiche, prodotte da tipi diversi di sorgenti, hanno frequenze diverse, proprietà diverse, interagiscono con la materia in modi diversi e vengono indicate come:

- a) - **Onde a radiofrequenza** (chiamate anche *onde hertziane*, dal cognome del fisico Heinrich Rudolf HERTZ) (con ν [frequenza] compresa tra poche centinaia di Hz e $\sim 10^9$ Hz; la λ [lunghezza d'onda] corrispettiva è compresa tra alcuni chilometri e alcune frazioni di metro⁽¹⁰⁾). Sono prodotte da dispositivi elettronici, in particolare da circuiti oscillanti accoppiati con opportune antenne e usate nelle telecomunicazioni.
- b) - **Microonde** (con $10^9 \text{ Hz} \leq \nu \leq 10^{11} \text{ Hz}$ e $3 \times 10^{-1} \text{ m} \geq \lambda \geq 10^{-3} \text{ m}$). Sono generate da dispositivi elettronici spesso associati a dispositivi meccanici (cavità risonanti, guide d'onda, ecc.). Vengono usate per la ricerca nel campo delle strutture atomiche e molecolari, ma anche nelle telecomunicazioni, nei RADAR (acronimo di *Radio Detection and Ranging*) nonché per la cottura di cibi (nei "forni a microonde"), ecc.
- c) - **Radiazione infrarossa** (con $\sim 3 \times 10^{11} \text{ Hz} \leq \nu \leq 4 \times 10^{14} \text{ Hz}$ e $10^{-3} \text{ m} > \lambda > 0,78 \mu\text{m}$). Lo spettro delle radiazioni infrarosse (comunemente abbreviato in "spettro infrarosso") viene suddiviso (nel Sistema Ingegneristico) in:
- *vicino infrarosso* (NIR, Near Infrared) ($3 \mu\text{m} > \lambda > 0,78 \mu\text{m}$);
 - *onda corta* (SWIR, Short Wave Infrared) ($3 \mu\text{m} > \lambda > 1,4 \mu\text{m}$);
 - *onda media* (MWIR, Mid Wave Infrared) ($8 \mu\text{m} > \lambda > 3 \mu\text{m}$);
 - *onda lunga* (LWIR, Long Wave Infrared) ($8 \mu\text{m} > \lambda > 15 \mu\text{m}$);
 - *lontano infrarosso* (FIR, Far Infrared) ($10^3 \mu\text{m} > \lambda > 15 \mu\text{m}$);

Nella classificazione "astronomica" SWIR, MWIR e FWIR vengono riunite (con valori di λ leggermente diversi: $25 \mu\text{m} > \lambda > 5 \mu\text{m}$) come *medio infrarosso*.

Nello Standard DIN/CIE l'infrarosso è suddiviso in: IR-A ($1,4 \mu\text{m} > \lambda > 0,7 \mu\text{m}$), IR-B ($3 \mu\text{m} > \lambda > 1,4 \mu\text{m}$), IR-C ($10^3 \mu\text{m} > \lambda > 3 \mu\text{m}$).

La radiazione infrarossa viene emessa spontaneamente da tutti i corpi con temperatura superiore allo zero assoluto.⁽¹¹⁾

- d) - **Radiazione ottica** (detta anche *radiazione visibile* o, più semplicemente, *luce*⁽¹²⁾) (con $\sim 4 \times 10^{14} \text{ Hz} \leq \nu \leq \sim 8 \times 10^{14} \text{ Hz}$ e $0,78 \mu\text{m} > \lambda > 0,38 \mu\text{m}$). Viene emessa

(10) - È opportuno rammentare che la lunghezza d'onda λ è definita come il rapporto tra la velocità di propagazione v e la frequenza ν , secondo la formula: $\lambda = \frac{v}{\nu}$. Quando le onde elettromagnetiche transitano attraverso un materiale, la loro lunghezza d'onda viene ridotta di un fattore pari all'indice di rifrazione n del materiale, mentre la frequenza non subisce variazioni: $\lambda' = \frac{\lambda_0}{n}$ ove λ_0 = lunghezza d'onda nel vuoto. Le lunghezze d'onda della radiazione elettromagnetica sono normalmente riferite al vuoto; pertanto, nota la frequenza, per ottenere la lunghezza d'onda (in m) basterà dividere la velocità della luce c (in m/s) per la frequenza ν (in Hz).

(11) - Lo spettro di radiazione emesso da un *corpo nero* (cosiddetta "radiazione di corpo nero") è descritto dalla legge di Planck; la lunghezza d'onda corrispondente al massimo dello spettro è regolata dalla legge di Wien; l'intensità della radiazione emessa (cioè l'energia irraggiata per unità di tempo e per unità di area) è descritta dalla legge di Stefan-Boltzmann (che stabilisce che la potenza irradiata da un corpo nero "ideale" è proporzionale alla quarta potenza della sua temperatura).

(12) - Vds.: C. MENCUCINI - V. SILVESTRINI, *cit.*, pag. 381.

da atomi e molecole quando i relativi elettroni compiono transizioni da uno stato metastabile o instabile allo stato fondamentale. Le diverse frequenze di “radiazione visibile”, rivelate dall’occhio, vengono tradotte dal cervello umano nella sensazione di colori diversi ⁽¹³⁾. Una radiazione ottica composta da un’unica frequenza viene, per conseguenza, chiamata *monocromatica*. Quando lo spettro di una radiazione ottica contiene - in misura uguale - la “radiazione visibile” delle varie frequenze (il cosiddetto *spettro di intensità piatto*) si parla di *luce bianca* (meglio: *radiazione bianca*) ⁽¹⁴⁾.

e) - **Radiazione ultravioletta** (chiamata anche *raggi ultravioletti*) (con $\sim 8 \times 10^{14} \text{ Hz} \leq \nu \leq \sim 3 \times 10^{17} \text{ Hz}$ e $\sim 3800 \text{ \AA} \geq \lambda \geq \sim 10 \text{ \AA}$ [*Ångstrom*]⁽¹⁵⁾). È prodotta in transizioni fra diversi stati elettronici in atomi e molecole, particolarmente quando avviene una scarica elettrica in un gas.

Lo spettro della radiazione ultravioletta viene suddiviso in:

- *vicino* (o *prossimo*) *ultravioletto* ($3800 \text{ \AA} > \lambda > 2000 \text{ \AA}$) [$380 \text{ nm} > \lambda > 200 \text{ nm}$];
- *medio ultravioletto* ($3150 \text{ \AA} > \lambda > 2800 \text{ \AA}$) [$315 \text{ nm} > \lambda > 280 \text{ nm}$];
- *lontano* (o *remoto*) *ultravioletto* ($2800 \text{ \AA} > \lambda > 1850 \text{ \AA}$) [$280 \text{ nm} > \lambda > 185 \text{ nm}$];
- *estremo ultravioletto* ($1850 \text{ \AA} > \lambda > 136 \text{ \AA}$) [$185 \text{ nm} > \lambda > 136 \text{ nm}$], a sua volta suddiviso in:

- *ultravioletto di Schumann* ($1850 \text{ \AA} > \lambda > 1200 \text{ \AA}$) [$185 \text{ nm} > \lambda > 120 \text{ nm}$];
- *ultravioletto di Lyman* ($1200 \text{ \AA} > \lambda > 500 \text{ \AA}$) [$120 \text{ nm} > \lambda > 50 \text{ nm}$];
- *ultravioletto di Millikan* ($500 \text{ \AA} > \lambda > 136 \text{ \AA}$) [$50 \text{ nm} > \lambda > 13,6 \text{ nm}$].

Va precisato che queste due ultime regioni dello spettro non possono essere studiate nell’aria (troppo assorbente a queste lunghezze d’onda), ma esclusivamente nel vuoto. Va notato che i vetri usati per le ottiche (il *crown* e in particolare il *flint*) sono opachi per l’ultravioletto medio e lontano; il quarzo è trasparente per l’ultravioletto fino alla lunghezza d’onda di $\sim 1850 \text{ \AA}$ e la fluorite (chiamata anche fluorina o spatofluoro) è trasparente per l’ultravioletto fino alla lunghezza d’onda di $\sim 1200 \text{ \AA}$. Inoltre, è ormai entrata in uso la terminologia:

- *Ultravioletto A* (UV-A) ($\sim 3800 \text{ \AA} > \lambda > 3150 \text{ \AA}$) [$380 \text{ nm} > \lambda > 315 \text{ nm}$];
- *Ultravioletto B* (UV-B) ($3150 \text{ \AA} > \lambda > 2800 \text{ \AA}$) [$315 \text{ nm} > \lambda > 280 \text{ nm}$];
- *Ultravioletto C* (UV-C) ($2800 \text{ \AA} > \lambda > 100 \text{ \AA}$) [$280 \text{ nm} > \lambda > 100 \text{ nm}$].

f) - **Raggi X** (chiamati anche Raggi Röntgen, dal cognome dello scienziato loro scopritore) (con $\sim 3 \times 10^{17} \text{ Hz} \leq \nu \leq \sim 5 \times 10^{19} \text{ Hz}$ e $\sim 5 \text{ \AA} \geq \lambda \geq \sim 5 \times 10^{-2} \text{ \AA}$). Sono prodotti soprattutto in processi nei quali le cariche elettriche subiscono una brusca decelerazione, come - ad esempio - quando un fascio di elettroni,

(13) - *Sic*: C. MENCUCINI - V. SILVESTRINI, *cit.*, pag. 381.

(14) - La suddetta terminologia (radiazione monocromatica; radiazione bianca) viene comunemente adottata anche per la radiazione non compresa nel *range* di frequenza corrispondente allo spettro ottico. Vds., in tal senso: C. MENCUCINI - V. SILVESTRINI, *cit.*, pag. 381.

(15) - O, se si preferisce: $380 \text{ nm} > \lambda > 10 \text{ nm}$: l’Å è tuttora “accettato” nel SI; $1 \text{ \AA} = 0,1 \text{ nm}$ [10^{-10} m].

accelerato da una differenza di potenziale di alcune decine di kV (*raggio catodico*) viene fatto collidere con un materiale solido.

Questi elettroni, denominati *elettroni-proiettili*, fuoriescono dal *catodo* e interagiscono - ad esempio - con gli atomi di un metallo pesante (che costituisce l'*anodo*), trasferendo la propria energia cinetica al bersaglio-anodo.

Queste interazioni avvengono, nel bersaglio, con una piccolissima profondità di penetrazione; il loro effetto è la conversione dell'energia cinetica degli elettroni-proiettili in energia termica e in energia elettromagnetica radiante che viene emessa sotto forma di *raggi X*, denominati *caratteristici*⁽¹⁶⁾ (Vds.: fig. 1).

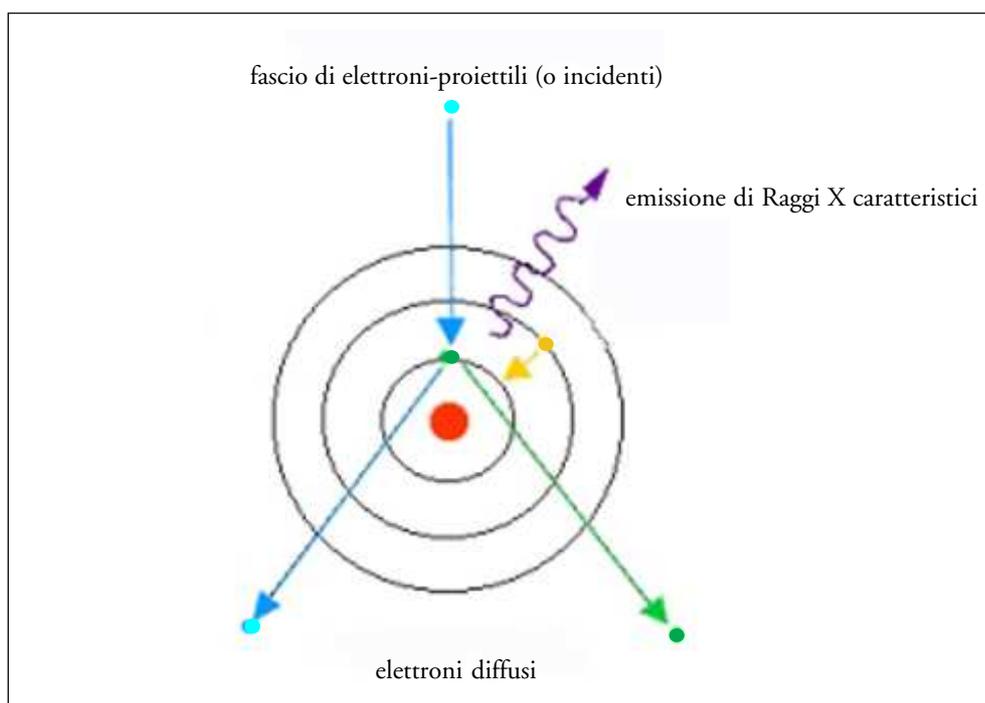


Fig. 1: Produzione di Raggi X caratteristici

Va precisato che la maggior parte dell'energia cinetica degli elettroni incidenti sull'anodo viene trasformata in calore, poiché questi ultimi interagiscono

- (16) - A seguito dell'interazione tra un elettrone incidente e un elettrone orbitale, entrambi gli elettroni vengono diffusi all'esterno dell'atomo: nell'orbitale interessato rimane una lacuna che viene immediatamente ricolmata da uno degli elettroni più esterni; durante quest'ultimo processo avviene l'emissione di radiazione X dotata di un'energia specifica che permette di identificare esattamente la specie atomica di cui è composta il bersaglio. Da ciò origina la denominazione di *radiazione caratteristica* (o *Raggi X caratteristici*). La "profondità di generazione" dei raggi X caratteristici varia secondo il materiale e la sua densità secondo la legge:

$$R_{Kanaya-Ookayama} = \frac{1}{\rho} \cdot \frac{0,0276\text{\AA}}{Z^{0,889}} (E_0^n - E_c^n)$$

ove E_0 = energia dell'elettrone incidente

ρ = densità

E_c = energia critica di ionizzazione.

(eccitandoli) con gli elettroni più esterni degli atomi-bersaglio; quando gli elettroni eccitati tornano al loro stato fondamentale, emettono energia che riscalda l'anodo ⁽¹⁷⁾.

Oltre alla produzione di calore e di raggi X caratteristici, si può verificare un terzo tipo di interazione tra elettroni proiettili e il bersaglio: gli elettroni incidenti, infatti, qualora possiedano una energia superiore a un certo valore-soglia (cui corrisponde una lunghezza d'onda λ_{\min}), possono attraversare gli atomi-bersaglio evitando gli elettroni orbitali e giungere in prossimità dei nuclei, dei quali subiscono la forza attrattiva.

Gli elettroni, interagendo con in campo elettrico generato dal nucleo atomico, subiscono una deviazione dalla loro traiettoria iniziale e una reazione di frenamento (chiamata *bremstrahlung*) con perdita di energia cinetica sotto forma di fotoni (*fotoni X*): si tratta di una distribuzione continua di radiazione (che aumenta d'intensità e di frequenza all'aumentare dell'energia cinetica degli elettroni incidenti; la frequenza massima è determinata dalla formula:

$$v_{\max} = \frac{E}{h}$$

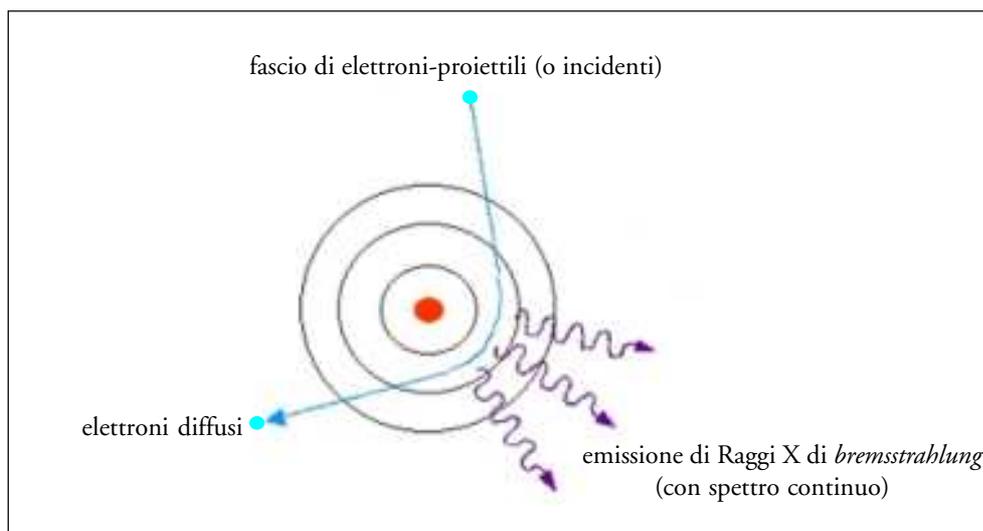


Fig. 2: produzione di Raggi X per bremsstrahlung.

Poiché ogni elettrone incidente può interagire con più atomi dislocati in strati successivi dell'anodo, appare evidente che l'energia ceduta può produrre fotoni di frenamento dotati di livelli diversi di energia.

(17) - Vds.: P. L. INDOVINA, *cit.*, pag. 11.

Ciò, unito al fatto che l'energia acquisita durante l'accelerazione iniziale degli elettroni non è costante (poiché la differenza di potenziale ai capi del campo elettrico non è mai perfettamente costante), viene comunemente ritenuto responsabile dello spettro continuo di *bremsstrahlung* (Vds.: fig. 3).

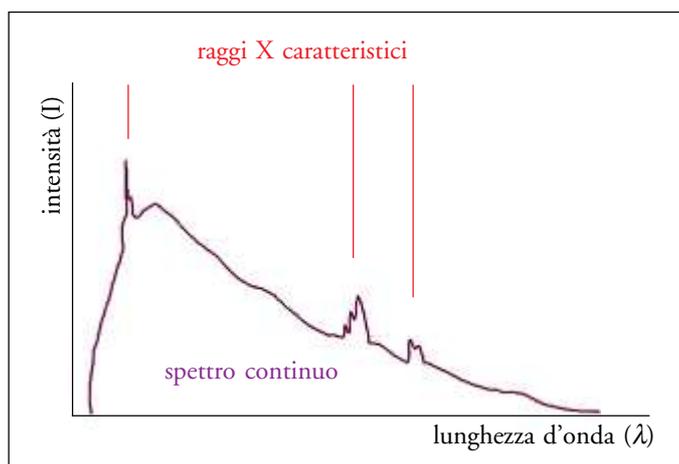


Fig. 3: Spettro dei Raggi X;
la porzione continua dello spettro è dovuta alla *bremsstrahlung*.

I raggi X vengono comunemente suddivisi in:

- *raggi X duri* (con $\lambda < 1 \text{ \AA}$ e *quanto di energia* $> 12\,400 \text{ eV}^{(18)}$);
 - *raggi X molli* (con $\lambda > 1 \text{ \AA}$ e *quanto di energia* $< 12\,400 \text{ eV}^{(19)}$),
- ma in realtà l'appartenenza a fasce diverse di energia è più articolata.

- g) - **Raggi γ** (o fotoni γ) (con $\nu \geq 10^{18} \text{ Hz}$ e $\lambda \leq 10^{-12} \text{ m}$), la cui emissione è prodotta da numerosi processi nucleari. La loro energia varia (in relazione con la frequenza e la lunghezza d'onda) a seconda della loro genesi, potendo oscillare tra $1,237 \times 10^4 \text{ eV}$ (ad esempio, nel decadimento γ del Radio ⁽²⁰⁾) e $1,237 \times 10^8 \text{ eV}$ (ad esempio, le radiazioni prodotte da protosincrotroni o da LINAC [acceleratori lineari] di elevata potenza).

(18) - 1 eV (elettronvolt) è l'energia cinetica acquistata da un elettrone quando è accelerato (nel vuoto) dalla differenza di potenziale di 1 V (volt). Questa unità di misura di per sé non appartiene al SI, ma vi è accettata (al pari di altre, quali l'unità di massa atomica e l'unità astronomica) a causa della maggiore precisione rispetto alle unità del SI ricavate tramite relazioni fisiche che includono costanti non conosciute con sufficiente precisione.

Ad ogni modo, 1 eV equivale, nel SI, a $1,602\,177\,33\,(49) \times 10^{-19} \text{ J}$ (oppure: 96,485 kJ/mol).

(19) - La relazione che lega lunghezza d'onda ed energia è:

$$E = \frac{1,24}{\lambda}, \text{ con } E \text{ espressa in eV e } \lambda \text{ espressa in nm.}$$

(20) - Il decadimento del Radio avviene secondo il seguente processo: ${}^{226}_{88}\text{Ra} + {}^{222}_{86}\text{Rn} + {}^4_2\text{He} + \gamma$

È importante notare che i vari tipi di radiazione non sono tra loro rigidamente separati. Infatti, osservando lo spettro delle radiazioni elettromagnetiche, si notano delle sovrapposizioni, ad esempio tra le regioni di competenza delle radiazioni infrarosse e quelle delle microonde, tra l'ultravioletto e i raggi X e tra questi ultimi e i raggi γ ; benché le proprietà delle radiazioni citate siano differenti tra loro. Ciò sembra giustificare il mantenimento di vecchie terminologie (come, ad esempio, quella di "raggi" ⁽²¹⁾) per indicare radiazioni elettromagnetiche appartenenti a diversi intervalli di frequenza, poiché al variare di quest'ultima cambia molto il loro comportamento nei riguardi della materia ⁽²²⁾.

(21) - Raggio (come anche "fascio") è un concetto geometrico che dovrebbe venire riferito esclusivamente alla direzione di propagazione di una radiazione elettromagnetica. Vds., in merito: G. P. SINI, *Anche i pignoli, ...*, cit., pag. 2.

(22) - Ad esempio, pur non potendosi stabilire, tra le regioni dello spettro, un limite netto di separazione fra la radiazione X e la radiazione UV, la prima può essere nettamente distinta dalla seconda per le diverse caratteristiche di interazione con la materia. Vds.: E. AMALDI - R. BIZZARRI - G. PIZZELLA, cit., pag. 417.

Interazioni tra radiazioni e materia

Il termine *radiazione*, come si è già avuto modo di affermare precedentemente in questo lavoro (vds. pag. 14), viene attribuito a qualsiasi trasporto di energia, sia che esso avvenga tramite particelle, sia che avvenga tramite fotoni.

Le radiazioni elettromagnetiche (che, come precedentemente ricordato, costituiscono un fenomeno ondulatorio, cioè una perturbazione alla quale è associato un trasporto di energia ma non di materia) quando attraversano la materia cedono (parzialmente o totalmente) la loro energia tramite vari meccanismi.

Va ricordato che vengono denominate *radiazioni ionizzanti* quelle che trasportano energia sufficiente a produrre fenomeni di ionizzazione nel materiale attraversato.

Le radiazioni emesse nei processi radioattivi (α , β , γ , neutroni) sono tutte ionizzanti; vengono suddivise in:

- *radiazioni direttamente ionizzanti*: quelle dotate di carica e di massa (ad esempio, le particelle α e β) che producono coppie di ioni a seguito di successive interazioni con gli atomi e con le molecole del materiale attraversato, cedendo via via la loro energia cinetica fino all'arresto totale;

- *radiazioni indirettamente ionizzanti*: (ad esempio, i raggi X e i neutroni) cedono la propria energia in una o poche interazioni, con la produzione intermedia di particelle cariche che risultano essere le vere responsabili della ionizzazione della materia attraversata.

Una particella carica, transitando nella materia, perde energia in seguito agli urti con il mezzo attraversato. Si tratta, generalmente, di interazioni con elettroni di atomi che, in conseguenza, vengono portati all'eccitazione e all'eventuale ionizzazione⁽²³⁾.

Da tali interazioni deriva una perdita di energia descritta dalla formula di Bethe-Bloch:

$$-\frac{dE}{dx} = \frac{4\pi}{mc^2} \frac{nz^2}{\beta^2} \left(\frac{e^2}{4\pi\epsilon_0} \right)^2 \left[\ln \frac{2mec^2\beta^2}{I(1-\beta^2)} - \beta^2 \right]$$

ove: $\beta = \frac{v}{c}$, z = carica della particella, v = velocità della particella, n = densità elettronica, I = potenziale medio di eccitazione degli atomi del mezzo (per nuclei atomici con $Z > 1$, $I = 16 \text{ eV} \times Z^{0,9}$).

La perdita di energia da parte della particella incidente dipende dalla sua carica e dalla sua velocità, ma non dalla sua massa; tuttavia, poiché - come ricordato anche da P. BLACKETT e G. OCCHIALINI (*Some Photographs of the Tracks of Penetrating Radiation*, *PROC. ROY. SOC.*, A139, 1933, pag. 703) - la velocità di una particella dipende dalla sua massa, particelle con massa diversa (a parità di altre condizioni)

(23) - Vds.: B. POVH - K. RITH - C. SCHOLZ - F. ZETSCHKE, *Particelle e Nuclei - Un'introduzione ai concetti fisici*, Bollati Boringhieri, Torino, 1998, pagg. 354-355.

ionizzeranno in maniera diversa.

Elettroni e positroni perdono energia sia per ionizzazione, sia per *bremstrahlung* (reazione di frenamento), con conseguente emissione di fotoni.

Le particelle elettricamente cariche perdono energia - per interazione elettromagnetica - fino al completo assorbimento in maniera graduale, mentre i fotoni perdono energia in modo esponenziale all'aumentare dello spessore l del materiale attraversato, secondo la formula:

$$I = I_0 e^{-\mu l}$$

nella quale il coefficiente di assorbimento μ dipende dall'energia del fotone e dal tipo di materiale.

L'interazione dei fotoni con la materia avviene essenzialmente per:

- diffusione elastica (o classica);
- effetto fotoelettrico;
- effetto Compton;
- produzione di coppie.

Poiché dell'interazione elettroni-materia si è già trattato in occasione della generazione dei raggi X, si esamineranno di seguito (con brevi cenni, perché una trattazione esaustiva esula dagli intenti di questo lavoro) le interazioni tra i raggi X e la materia, con particolare riferimento alla diffusione classica, all'effetto fotoelettrico, all'effetto Compton, alla diffusione di coppie e alla fotodisintegrazione.

diffusione classica

È chiamata anche *diffusione elastica* o *diffusione coerente* ed è quel meccanismo di interazione tra raggi X di bassa energia ($E < 10$ keV) e la materia: i fotoni incidenti subiscono una variazione della loro direzione, senza alcuna perdita di energia cinetica e, dunque, senza alcuna variazione della loro lunghezza d'onda.

Esistono due tipi di diffusione classica (entrambi descrivibili tramite l'interazione onda-particella):

- diffusione Thomson, nella quale un solo elettrone del bersaglio è interessato all'interazione;
- diffusione Rayleigh, nella quale - invece - tutti gli elettroni di un atomo del bersaglio hanno un'interazione cooperativa con il singolo fotone incidente.

Va precisato che solo una piccola parte (inferiore al 5%) della radiazione incidente subisce la diffusione classica.

effetto fotoelettrico

Si tratta di un'interazione radiazione-materia che provoca, a seguito di irradiazione, l'estrazione di elettroni qualora l'energia fornita a questi ultimi dalla radiazione incidente superi la loro energia di legame. Il termine "fotoelettrico" fu coniato, nel 1888, da Augusto RIGHI⁽²⁴⁾.

L'effetto fotoelettrico ha luogo alla superficie di alcune sostanze, in particolare i metalli alcalini, esclusivamente qualora la frequenza ν della radiazione incidente sia maggiore di un valore ν_0 (denominato *soglia fotoelettrica*) caratteristico per ogni sostanza (o metallo). Il numero di elettroni (denominati *fotoelettroni*) emessi è proporzionale all'intensità ma non alla frequenza della radiazione incidente: da quest'ultima, invece, dipende l'energia cinetica dei fotoelettroni.

Infine, essendo istantaneo il trasferimento del quanto di energia $h\nu$, l'emissione dei fotoelettroni è istantanea ($\Delta t < 10^{-9}$ s) in accordo con i risultati di MEYER e GERLACH⁽²⁵⁾. I raggi X con energia dell'ordine delle decine di keV possono estrarre gli elettroni degli orbitali interni (ad esempio, gli orbitali K) dell'atomo bersaglio.

I fotoni incidenti vengono totalmente assorbiti e viene emesso un *fotoelettrone* dotato di una energia cinetica E pari alla differenza tra l'energia del fotone ($h\nu$) e l'energia di legame (E_b) dell'elettrone nella shell di appartenenza, come descritto dalla relazione:

$$E = \frac{1}{2} m v^2 = h\nu - E_b$$

Il fotoelettrone emesso, essendo dotato di carica elettrica e - dunque - di scarso potere penetrante, viene quasi immediatamente assorbito dal mezzo circostante; l'atomo colpito rimane carico positivamente, con una vacanza elettronica che viene colmata da un elettrone proveniente da una *shell* contigua, con conseguente emissione della radiazione caratteristica.

Perché avvenga l'effetto fotoelettrico, occorre che il fotone incidente abbia una energia superiore all'energia di legame degli elettroni nelle singole shell; la probabilità che si verifichi tale effetto è definita dalla formula: $\propto \frac{1}{(h\nu)^3}$ (ove \propto indica proporzionalità) con un massimo quando queste energie hanno all'incirca lo stesso valore.

Inoltre, la probabilità che avvenga l'effetto fotoelettrico cresce rapidamente con il crescere del numero atomico del bersaglio, secondo la relazione: $\propto Z^3$ (ove Z è il numero atomico).

(24) - Sulla priorità della scoperta si accese una disputa tra RIGHI e HALLWACHS (il quale aveva sospettato - ma non accertato - il fenomeno alcuni mesi prima dell'italiano), riportata sulle pagine de *Il Nuovo Cimento*. La comunità scientifica risolve la controversia chiamando il fenomeno *effetto Hertz-Hallwachs*. Einstein, nel 1905, ne diede l'interpretazione corretta, per la quale ricevette il Premio Nobel per la fisica nel 1921.

(25) - E. MEYER - W. GERLACH, *The photoelectrical effect on ultra-microscopic metallic particles*, *ANNALEN DER PHYSIK*, vol. 45 (18), 1914, pagg. 177-236. Vds. anche: D. BARBERO - R. MALVANO, *Introduzione alla Fisica Atomica e Molecolare*, Casa Editrice Ambrosiana, Milano, 1975, pag. 14.

effetto Compton

Fu scoperto dal fisico Arthur Holly COMPTON nel 1923⁽²⁶⁾ e costituisce un ulteriore esempio di interazione radiazione-materia a dimostrazione della natura corpuscolare della radiazione elettromagnetica.

Secondo l'interpretazione einsteiniana⁽²⁷⁾ dell'effetto fotoelettrico, un singolo fotone, comportandosi come una particella, interagisce con un singolo elettrone producendo processi di diffusione nei quali fotone ed elettrone interagiscono come due sfere in un urto elastico.

Si è potuto constatare sperimentalmente che questo urto avviene nel pieno rispetto delle leggi relative alla conservazione dell'energia e della quantità di moto.

Infatti, se radiazioni elettromagnetiche ad alta energia (come, ad esempio, fotoni X o fotoni γ) colpiscono un materiale, si genera una radiazione elettromagnetica diffusa i cui fotoni hanno lunghezza d'onda λ' maggiore (e, dunque, energia minore) della radiazione incidente.

L'incremento della lunghezza d'onda prende il nome di *shift Compton*.

Nei materiali che possiedono elettroni liberi, l'effetto Compton avviene a qualsiasi λ dei fotoni incidenti, mentre per i materiali nei quali gli elettroni sono legati ai rispettivi atomi occorrono fotoni dotati di maggior energia e, dunque, di minore λ .

In particolare, COMPTON scoprì che l'energia posseduta dai fotoni "scatterati" (= "diffusi") era dipendente dall'*angolo di scattering* (= *angolo di diffusione*).

Al sito <http://ww2.unime.it/weblab/ita/compton/compton.htm> è possibile utilizzare una *applet* che consente di simulare l'effetto Compton modificando l'energia iniziale del fotone incidente e il suo *angolo di scattering*.

L'effetto Compton, nel quale ad ogni fotone incidente è associato un fotone diffuso (*scatterato*) e un elettrone di rimbalzo (*elettrone Compton*), può essere espresso quantitativamente mediante la relazione (dovuta a Compton):

$$\Delta\lambda = \lambda' - \lambda = \lambda_0 (1 - \cos \vartheta) \quad \text{nella quale } \lambda_0 = \text{costante (costante o lunghezza d'onda Compton)} = \frac{h}{m_e c} = 0,002\,426 \text{ m (o, se si preferisce: } 2,43 \times 10^{-12} \text{ m);}$$

m_e = massa dell'elettrone (0,510 998 902 \pm 0,000 04 MeV); h = costante di Planck⁽²⁸⁾.

La fisica classica prevedeva che i raggi X si diffondessero in ogni direzione ed in modo coerente e, dunque, non poteva spiegare questo particolare comportamento della radiazione: COMPTON, ricorrendo ad una trattazione relativistica di un urto tra atomi

(26) - A. H. COMPTON, *A General Quantum Theory of the Wavelength of Scattered X-Rays*, *PHYS. REV.*, n. 24, 1924, pagg. 168-176,

(27) - A. EINSTEIN, *Über einen die Erzeugung und Verwandlung des Lichtes betreffenden heuristischen Gesichtspunkt*, *ANNALEN DER PHYSIK*, vol. 17 (6), 1905, pagg. 132-148; in italiano: ID, *La teoria dei quanti di luce*, Newton Compton Italiana, Roma, 1973.

(28) - Il cui valore, secondo CODATA/2006, è: $h = 6,626\,068\,96(33) \times 10^{-34}$ Js. Si noti che la costante di Planck non è altro che un fattore di conversione delle unità di energia in unità di frequenza mentre la relazione di Einstein per l'effetto fotoelettrico è una relazione di conservazione dell'energia.

della grafite e particelle costituenti la radiazione elettromagnetica, ovvero i fotoni, dotate di un proprio impulso ed energia, riuscì a spiegare il fenomeno. La fig. 4 illustra l'effetto Compton ⁽²⁹⁾.

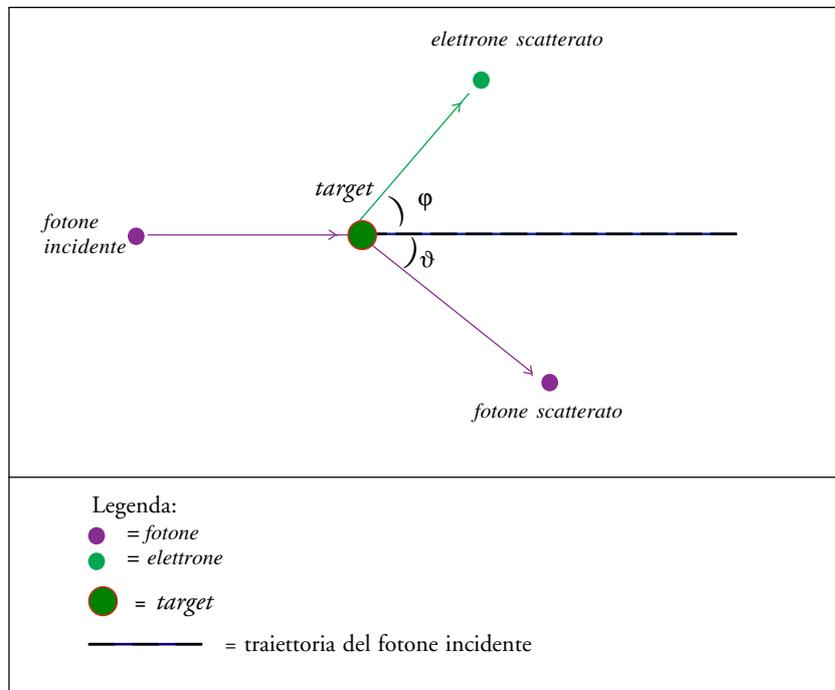


Fig. 4: Effetto Compton.

L'energia dell'elettrone *scatterato* ⁽³⁰⁾ e' è: $E_e = h(\nu - \nu')$, ove ν è la frequenza del fotone incidente, ν' è la frequenza del fotone *scatterato*; tale energia è uguale a zero per $\vartheta = 0$ e massima per $\vartheta = \pi$.

L'emissione dell'elettrone lascia l'atomo nello stato *eccitato*.

L'effetto Compton avviene per energie comprese tra alcune centinaia di keV e qualche MeV.

(29) - La sezione d'urto per lo *scattering* dovuto all'effetto Compton si ricava dalla formula di KLEIN-NISHINA:

$$\frac{d\sigma}{d\Omega} = \frac{r_0^2}{2} \frac{1 + \cos^2\vartheta}{\left\{1 + 2\alpha \sin^2\left(\frac{\vartheta}{2}\right)\right\}^2} \left[1 + \frac{4\alpha^2 \sin^4\left(\frac{\vartheta}{2}\right)}{(1 + \cos^2\vartheta) \left\{1 + 2\alpha \sin^2\left(\frac{\vartheta}{2}\right)\right\}} \right]$$

che predice che, per un dato angolo, la sezione d'urto diminuisce all'aumentare dell'energia del fotone.

Vds., ad es.: W. E. BURCHAM - M. JOBES, *Nuclear and Particle Physics*, Longman, Singapore, 1995, pag. 35.

(30) - Come si ricorderà, il termine *scattering* equivale all'italiano *diffusione*; *scatterato* è un pessimo neologismo, peraltro ormai comunemente accettato e utilizzato dalla comunità scientifica.

produzione e annichilazione di coppie

È il processo più importante dovuto alle interazioni fotone-materia ad alta energia. Nel 1932-33 Carl ANDERSON⁽³¹⁾ (allora dottorando al Caltech sotto la guida di Robert A. MILLIKAN) negli USA e Patrick BLACKETT e Giuseppe OCCHIALINI in Inghilterra, tentando di misurare l'energia dei raggi cosmici secondari (prodotti a seguito di urti con nuclei atomici nell'alta atmosfera) per mezzo di una *camera a nebbia* (*camera di Wilson*), scoprirono tracce di particelle dotate di carica positiva, troppo leggere per essere protoni. ANDERSON chiamò queste particelle *positroni* (per la verità, rinominò anche l'elettrone come *negatrone*, ma tale denominazione non venne adottata).

BLACKETT e OCCHIALINI, lavorando al Cavendish Laboratory di Cambridge, stavano compiendo ricerche analoghe a quelle di ANDERSON, ma utilizzando una camera di WILSON *triggerata* con contatori GEIGER e con un *circuito di coincidenza* sviluppato da Bruno ROSSI a Firenze nel 1930. Tale soluzione permise ai due scienziati di concludere che, poiché gli elettroni positivi (cioè i positroni) non fanno parte della materia ordinaria, essi dovevano essere generati, insieme con gli altri elettroni che colpivano la camera di Wilson, nelle collisioni iniziate da raggi cosmici ad alta energia.

Blackett e Occhialini collegarono queste nuove particelle con la teoria di Paul Adrien Maurice DIRAC⁽³²⁾ e il positrone divenne la prima particella di *antimateria* osservata. Inoltre, nel loro lavoro del 1933⁽³³⁾, i due scienziati di Cambridge si posero il problema del destino dei positroni, giungendo alla conclusione che, in perfetto accordo con la teoria di DIRAC sull'elettrone, essi interagivano con gli elettroni venendo *annichilati* e producendo particelle non-ionizzanti (cioè *fotoni*).

Blackett e OCCHIALINI provarono, dunque, per la prima volta la trasformazione di energia in materia, prevista dalla teoria della relatività di EINSTEIN.

Un fotone, dotato di energia $E > E_s = 2m_e c^2 = 1,02 \text{ MeV}$ (ove E_s = Energia di soglia), interagendo con un nucleo o con un elettrone che generino un campo elettromagnetico può dare origine ad una *coppia di particelle*.

L'energia del fotone incidente viene trasferita alla massa di riposo e all'energia cinetica delle particelle prodotte, nonché all'energia di rinculo del nucleo che genera il campo elettromagnetico, seconda la relazione: $E_\gamma = h\nu = 2m_e c^2 + T_e^- + T_e^+ + E_R$.

Il positrone creato nel processo può *annichilarsi* con un elettrone appartenente all'atomo bersaglio e generare, in tal modo, due fotoni di uguale energia ($E'_\gamma = m_e c^2$) i quali, a causa della conservazione dell'impulso, hanno direzioni opposte.

(31) - C. D. ANDERSON, *Cosmic-Ray positive and negative Electrons*, *PHYS. REV.*, vol. 44, 1933, pagg. 406-416.

(32) - P. A. M. DIRAC, *The Quantum Theory of Electron*, *PROC. ROY. SOC.*, A117, 1928, pagg. 610-624.

(33) - P. M. S. BLACKETT - G. P. S. OCCHIALINI, *Some Photographs of the Tracks of Penetrating Radiation*, *PROC. ROY. SOC.*, A139, 1933, pagg. 699-726.

La sezione d'urto nella creazione di coppie, per energia relativistiche, è proporzionale a $r_0^2 Z^2$ e, nel caso di alte energie ($E_\gamma \gg h\nu \gg 2m_e c^2$), è stata calcolata come:

$$\sigma_p = \frac{e^2}{hc} Z^2 r_0^2 \left[\frac{28}{9} \log \frac{183}{Z^{\frac{1}{3}}} - \frac{2}{27} \right]$$

Il *cammino libero medio* del fotone per la generazione di coppie è: $X_{CP} = \frac{9}{7} X_0$, ove X_0 è la *lunghezza di radiazione*, cioè la lunghezza del percorso che un elettrone deve compiere per ridurre la propria energia di un fattore ; ciò è valido esclusivamente ad alte energie.

La lunghezza di radiazione è dipendente dal materiale.

La fig. 5 illustra il processo di produzione di coppie.

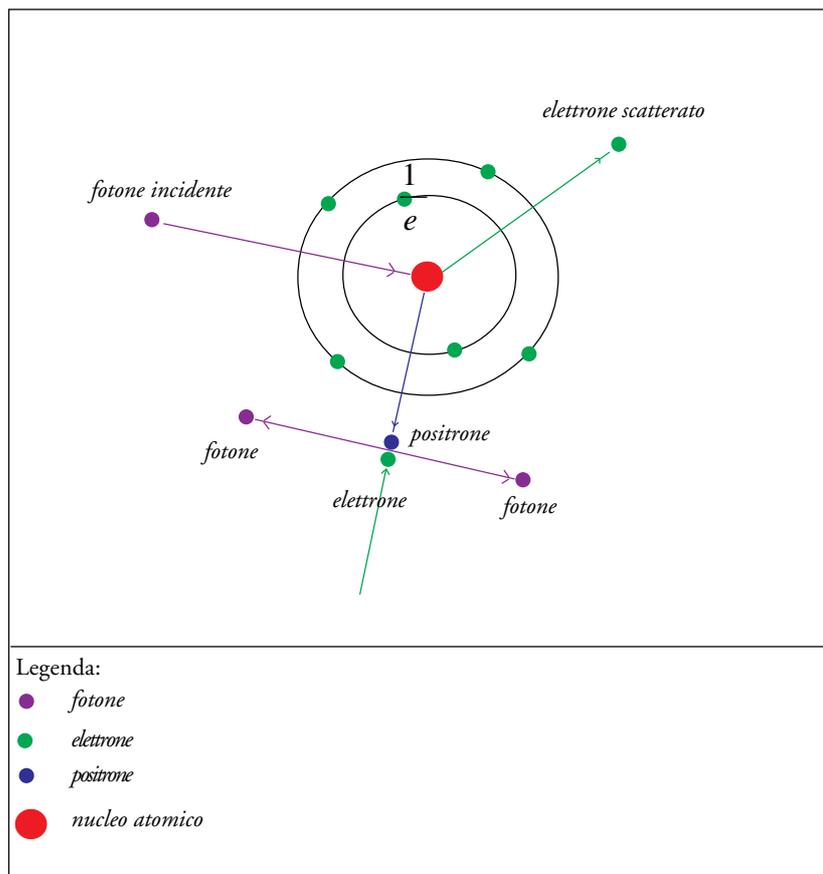


Fig. 5: Produzione di una coppia di fotoni

brevi note di elettrodinamica quantistica (QED = *Quantum Electro-Dynamics*)

Intorno al 1900, per spiegare la costituzione della materia, venne elaborata una teoria, nota come «teoria dell'elettrone». Essa si sviluppò gradualmente fino a ipotizzare che l'atomo fosse formato da un nucleo pesante e dagli elettroni che gli orbitano attorno⁽³⁴⁾. Tuttavia, i tentativi di spiegare - sulla base della meccanica newtoniana - il moto degli elettroni attorno al nucleo esitarono in un completo fallimento. Infine, nel 1926, venne sviluppata una teoria “«priva di buon senso» che spiegava l'«inusitato comportamento»”⁽³⁵⁾ degli elettroni nella materia; tale teoria fu denominata *meccanica quantistica* ed ebbe un enorme successo perché poteva spiegare tutta la chimica e le diverse proprietà della sostanze, benché residuasse ancora il problema dell'interazione della radiazione elettromagnetica con la materia. Nel 1929 alcuni fisici, per descrivere questa interazione, proposero una nuova teoria che “fu battezzata con l'orribile nome di «elettrodinamica quantistica»”⁽³⁶⁾.

La teoria di DIRAC prevede che l'elettrone si comporti come un piccolo magnete, caratterizzato da un momento magnetico che, espresso in certe unità di misura, vale esattamente 1,00. Intorno al 1948 fu scoperto sperimentalmente da SCHWINGER il valore effettivo che è invece prossimo a 1,00118 (con un'incertezza di circa 3 unità sull'ultima cifra). Julian SCHWINGER, Sin-Itiro TOMONAGA e Richard Phillips FEYNMAN risolsero, intorno al 1948, il problema di come calcolare le grandezze fisiche in elettrodinamica quantistica⁽³⁷⁾. Attualmente risulta non esservi *discrepanza significativa* tra i dati sperimentali e la teoria dell'elettrodinamica quantistica: essa, infatti, è in grado di descrivere *tutti* i fenomeni del mondo fisico ad eccezione della forza di gravità e dei fenomeni radioattivi che riguardano i nuclei e le transizioni tra i loro livelli energetici. La maggior parte dei fenomeni a noi noti coinvolge un numero di elettroni tale che risulta difficile orientarsi in questa complessità; tuttavia, se ci si limita a una sperimentazione in laboratorio che coinvolga esclusivamente *un numero limitato* di elettroni, è possibile prevedere con grande accuratezza quanto può accadere, nonché eseguire con grande precisione le relative misure. Ogni volta che sono stati eseguiti esperimenti di questo genere, l'elettrodinamica quantistica ha funzionato perfettamente⁽³⁸⁾.

(34) - Per un *excursus* storico sulla teoria dell'elettrone, si può utilmente consultare, ad esempio, il *Corso di Fondamenti Epistemologici delle Scienze tra Ottocento e Novecento. Lezione 9: dalla scoperta dell'elettrone alla teoria della relatività di Einstein*, Università di Padova, 2007-2008.

(35) - R. P. FEYNMAN, *QED. La strana teoria della luce e della materia*, Adelphi, Milano, 1999⁵, pag. 19.

(36) - R. P. FEYNMAN, *ibidem*, pag. 20.

(37) - Vds., in proposito: F. J. DYSON, *The radiation Theories of Tomonaga, Scwinger, and Feynman*, *PHYS. REV.*, vol. 75 (3), 1949, pagg. 486 - 502.

(38) - Se qualcuno fosse interessato ad approfondire, anche con personale apporto di idee, le tematiche connesse con le tesi di FEYNMAN, DYSON, TOMONAGA, ecc., può utilmente iscriversi - ad esempio - alla sezione “papers by Feynman, Dyson, Tomonaga, etc.” del *Physics Forum*, reperibile all'indirizzo: <http://www.physicsforums.com/showthread.php?t=46378>

L'ipotesi che la radiazione elettromagnetica abbia una natura corpuscolare, pur essendo una logica conseguenza di fenomeni quali l'effetto fotoelettrico, l'effetto Compton e la produzione di coppie, incontra notevolissime difficoltà nell'interpretare fenomeni quali l'interferenza e la diffrazione che, peraltro, costituiscono la base sperimentale della teoria ondulatoria della radiazione, dovuta soprattutto al matematico, astronomo e fisico olandese Christiaan HUYGHENS che la propose nel 1690.

Per quanto riguarda gli elettroni, ad essi fu inizialmente attribuita la natura esclusivamente particellare, mentre solo in un secondo tempo si scoprì il loro aspetto ondulatorio. La "luce", invece (a parte il caso di Isaac NEWTON il quale, per mero errore nel ragionamento che lo aveva condotto a quella conclusione, le attribuiva una natura corpuscolare), venne ritenuta dapprima un fenomeno esclusivamente ondulatorio, mentre solo più tardivamente si scoprirono le sue caratteristiche corpuscolari. In realtà, sia gli elettroni sia la "luce" ⁽³⁹⁾ si comportano un po' come particelle e un po' come onde, tanto che fu coniato il termine *particonda*, peraltro piuttosto desueto a vantaggio del termine *particella* usato normalmente a patto che venga tenuta a mente anche la loro natura ondulatoria ⁽⁴⁰⁾.

Il prezzo da pagare all'elettrodinamica quantistica, unica ad aver risolto il dualismo particella-onda della radiazione elettromagnetica, è il fatto che ormai "la fisica è in grado di calcolare solo la *probabilità*" che un certo fenomeno avvenga: ad esempio, "che un dato fotone colpisca un certo rivelatore, senza offrire un buon modello intuitivo di come ciò avvenga" ⁽⁴¹⁾.

Secondo le più recenti acquisizioni, tutte le particelle esistenti in natura (quark, gluoni, neutrini, ecc.) presentano questo comportamento quanto-meccanico.

I tre eventi elementari di base costituenti tutti i fenomeni in cui intervengono radiazione elettromagnetica ed elettroni, sono:

- un fotone si propaga da un punto a un altro;
- un elettrone si propaga da un punto a un altro;
- un elettrone emette o assorbe un fotone.

Questi eventi non si svolgono solo nello spazio, ma *anche* nel tempo.

Ovviamente, lo spazio è tridimensionale, ma volendo disegnare i grafici relativi a questi fenomeni (i famosi *diagrammi di Feynman*) viene considerata una sola dimensione: la collocazione spaziale di un oggetto verrà riportata sull'asse delle ascisse mentre quella temporale sull'asse delle ordinate.

(39) - Il termine "luce" viene usato da FEYNMAN (e, per conseguenza, anche in questa parte di questi *Appunti* dedicata alla meccanica quantistica) non riferendosi unicamente alla luce visibile, bensì all'intero spettro della radiazione elettromagnetica, come egli stesso precisa. Vds., in proposito: R. P. FEYNMAN, *QED, cit.*, pag. 28.

(40) - "Nell'interpretazione di Einstein, l'aspetto ondulatorio della radiazione luminosa si riferisce al comportamento macroscopico, mentre le particelle (quanti di luce) sono assunte quali costituenti microscopici della luce.".
Sic: N. GUICCIARDINI - G. INTROZZI, *Fisica Quantistica - Una introduzione*, Carocci, Roma, 2007, pag. 63.

(41) - R. P. FEYNMAN, *QED, cit.*, pag. 56.

La scala dei tempi usata nei diagrammi di Feynman è tale che particelle che viaggiano alla velocità della luce sono rappresentate da linee inclinate a 45° nello spazio-tempo. Gli esempi riportati nelle figg. 6 e 7⁽⁴²⁾ spero possano chiarire quanto esposto sopra.

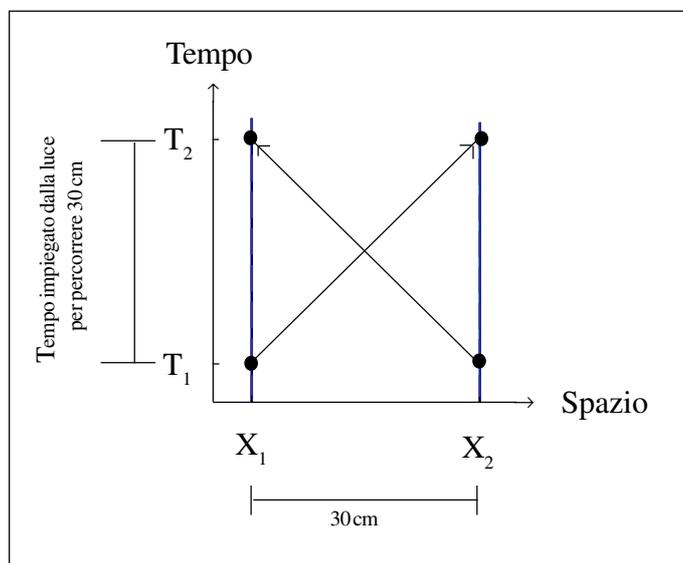


Fig. 6: Grafico spazio-tempo; la scala dei tempi usata in questo e negli altri diagrammi di Feynman è tale che le particelle che viaggiano alla velocità della luce sono indicate da linee inclinate a 45° nello spazio-tempo.

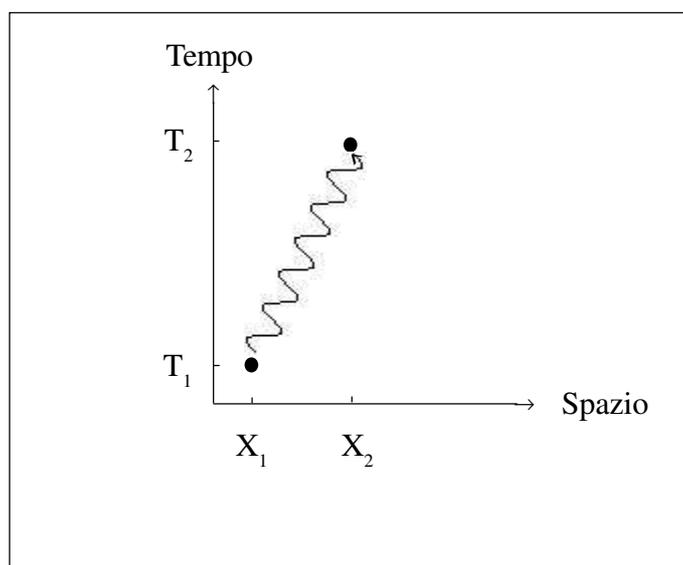


Fig. 7: Grafico spazio-tempo; un fotone, rappresentato dalla linea ondulata, ha un'ampiezza di probabilità per andare dal punto A al punto B espressa da una formula che dipende esclusivamente dalla differenza di posizione $(X_2 - X_1)$ e dalla differenza di tempo $(T_2 - T_1)$ e può essere scritta come $(X_2 - X_1)^2 - (T_2 - T_1)^2$.

(42) - Tratte, con modifiche, da: R. P. FEYNMAN, *QED, cit.*, pag. 112.

Un elettrone (rappresentato nella fig. 8 da un tratto rettilineo) ha una certa *ampiezza di probabilità* per assorbire o emettere un fotone (linea ondulata nel diagramma di fig. 8). Poiché l'ampiezza relativa all'emissione è uguale a quella relativa all'assorbimento, entrambe le situazioni vengono chiamate *accoppiamento*.

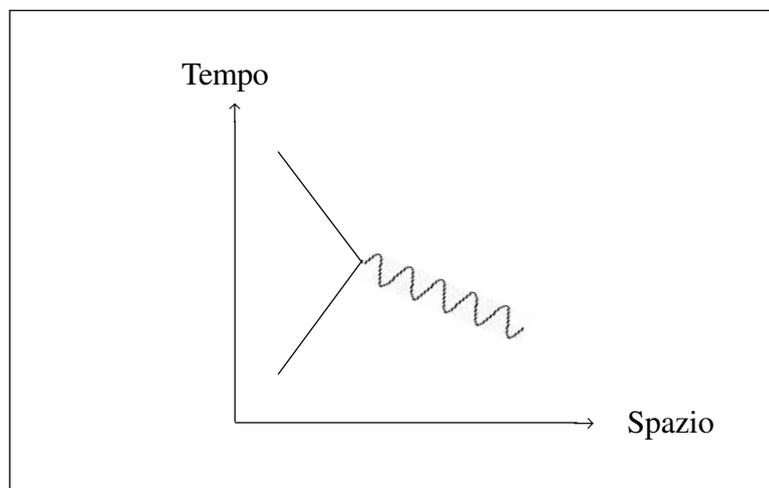


Fig. 8: Diagramma di accoppiamento di un elettrone e di un fotone.

L'ampiezza di accoppiamento è un numero, indicato con la lettera j , che, per l'elettrone, ha un valore di $\sim -0,1$ (equivalente a una contrazione di circa $1/10$ e una rotazione di $1/2$ giro); tale numero è talvolta chiamato "carica" della particella⁽⁴³⁾.

La diffusione della radiazione elettromagnetica consiste nell'assorbimento e nell'emissione di un fotone da parte di un elettrone. Questi due eventi non necessariamente avvengono in questa sequenza (vds. fig. 9 (b)). La fig. 9 (c), poi,

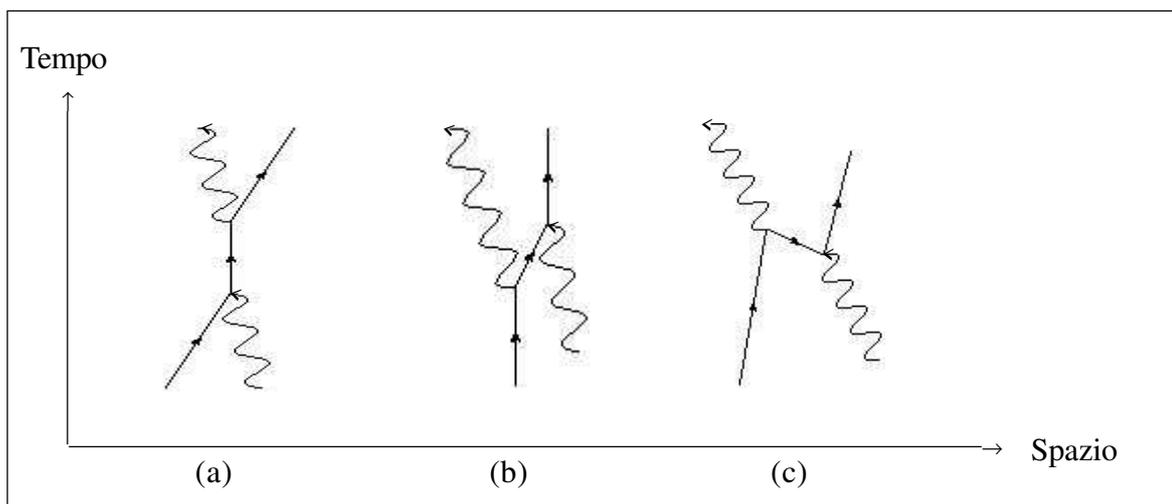


Fig. 9: Possibili diagrammi di diffusione della radiazione elettromagnetica.

(43) - Vds.: R. P. FEYNMAN, *QED*, cit., pag. 118.

mostra una possibilità reale, benché strana: l'elettrone, infatti, emette un fotone, ma poi torna letteralmente indietro nel tempo per assorbire un ulteriore fotone; infine, il nostro elettrone si propaga nuovamente in avanti nel tempo ⁽⁴⁴⁾.

Questa proprietà è generale: ogni particella, infatti, ha un'ampiezza di probabilità per muoversi all'indietro nel tempo e, pertanto, ha una corrispondente antiparticella. Se particella e antiparticella collidono, possono annichilarsi vicendevolmente, dando origine ad altre particelle. Un elettrone e un positrone, dunque, possono annichilarsi producendo, in genere, uno o due fotoni. Per quanto riguarda questi ultimi, poiché appaiono assolutamente identici sia che viaggino in avanti sia che viaggino indietro nel tempo, coincidono con le proprie antiparticelle ⁽⁴⁵⁾.

Finora ci si è occupati degli elettroni "liberi"; per descrivere il comportamento degli elettroni atomici, occorre considerare il nucleo che, per semplicità, in questa breve sintesi verrà considerato *in quiete*, in modo da assimilarne il comportamento a quello di una particella ferma nello spazio ma libera di muoversi nel tempo.

Se, ad esempio, si considera l'atomo di idrogeno (che, com'è noto, è costituito da un protone e da un elettrone), si può constatare che il nucleo trattiene nelle sue vicinanze l'elettrone (che gli "danza" intorno) per mezzo del continuo scambio di fotoni, approssimativamente secondo il diagramma in fig. 10.

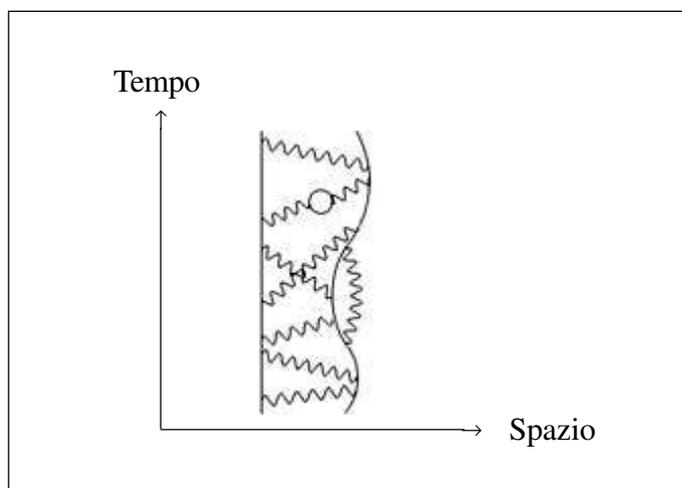


Fig. 10: Il diagramma mostra come, nell'atomo di idrogeno, l'elettrone (linea curva) venga mantenuto ad una certa distanza dal protone del nucleo (linea dritta) attraverso lo scambio continuo di fotoni (linee ondulate). L'ampiezza di accoppiamento protone-fotone è $-j$.

(44) - Vds.: R. P. FEYNMAN, *QED, cit.*, pag. 125.

(45) - Vds.: R. P. FEYNMAN, *ibidem*.

La diffusione (*scattering*) della radiazione elettromagnetica da parte degli elettroni negli atomi è il fenomeno che sta alla base della riflessione parziale della luce in una lamina di vetro; la fig. 11 mostra il diagramma ⁽⁴⁶⁾ di un possibile modo di *scattering* in un atomo di idrogeno.

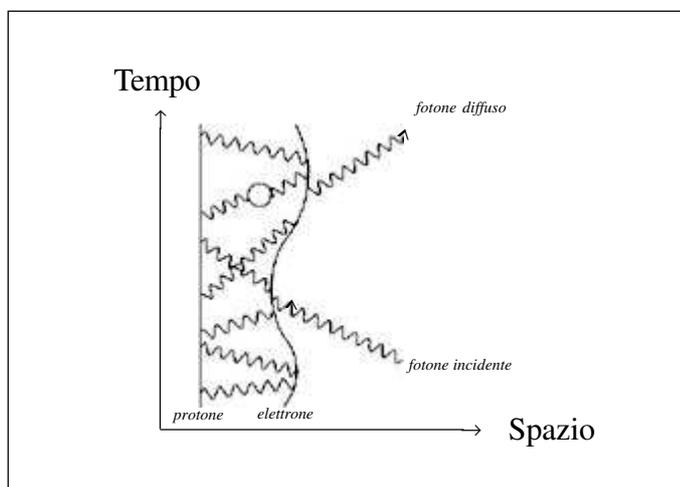


Fig.11: Il diagramma mostra un possibile modo di diffusione della radiazione elettromagnetica nell'atomo di idrogeno. Come si può notare, assorbimento del fotone incidente e rilascio del fotone diffuso (scatterato) non sono contemporanei.

Ometto tutte le possibili varianti al modo in cui due elettroni possono interagire, perché ciò esula dallo scopo di questa breve trattazione.

Un elettrone che si propaga da solo nello spazio vuoto emette e riassorbe continuamente fotoni virtuali. Inoltre, il suo campo elettrico induce nello spazio circostante la creazione di coppie virtuali elettrone-positrone che si annichilano immediatamente.

Se due elettroni, dotati di quantità di moto opposte, collidono, avviene uno *scattering* causato dallo scambio di un fotone virtuale (che è il mediatore della forza elettromagnetica) il quale trasporta la quantità di moto $q = |p_1 - p_1'|$ ⁽⁴⁷⁾.

Lo scattering è definito dall'angolo di scattering θ , come illustrato nella fig. 12.

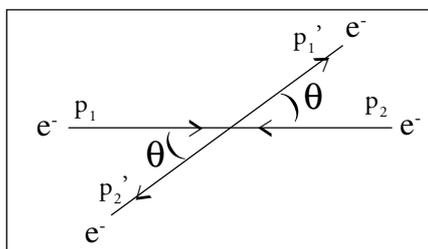


Fig. 12: Collisione tra due elettroni dotati di quantità di moto opposte.

(46) - Tratto da: R. P. FEYNMAN, *QED, cit.*, pagg. 128-129.

(47) - Vds.: E. AMALDI - G. AMALDI - U. AMALDI, *La Fisica per i Licei Scientifici*, Zanichelli, Bologna, vol. 3, 1984³, pag. 62 N.

Il relativo diagramma di Feynman è illustrato dalla fig. 13.

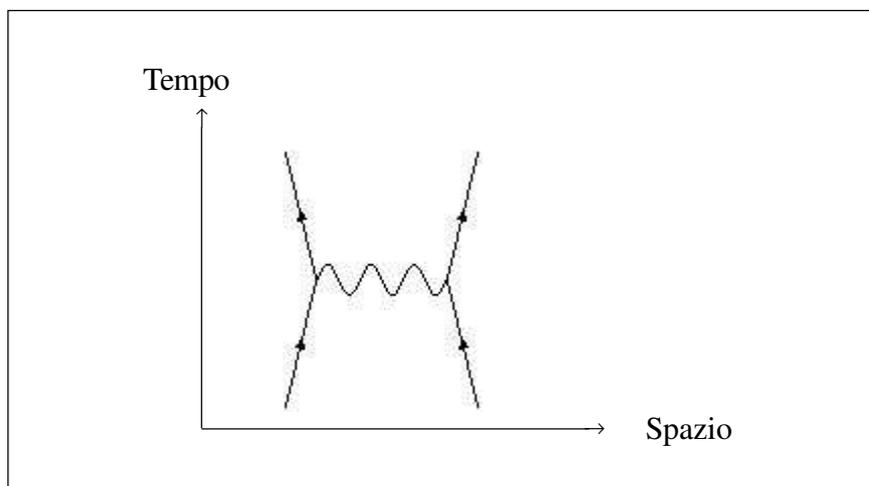


Fig. 13: Diagramma di collisione tra due elettroni con conseguente scattering.

A proposito dell'ipotesi di un elettrone libero, va ricordato che esso non può emettere un fotone (se non virtuale, come esposto alla pagina precedente): infatti, esso non può passare da un certo stato di impulso p_0 ad un altro stato p_f emettendo un fotone di impulso k perché, per un elettrone libero, tale processo è incompatibile con la conservazione dell'energia e dell'impulso ⁽⁴⁸⁾.

Se, al contrario, l'elettrone si muove in un campo di forze esterno, l'impulso non si conserva poiché le forze esterne lo possono cambiare e diviene possibile l'emissione di un fotone, che corrisponde alla radiazione di *bremsstrahlung* da una carica accelerata. La fig. 14 ne mostra il relativo diagramma di Feynman.

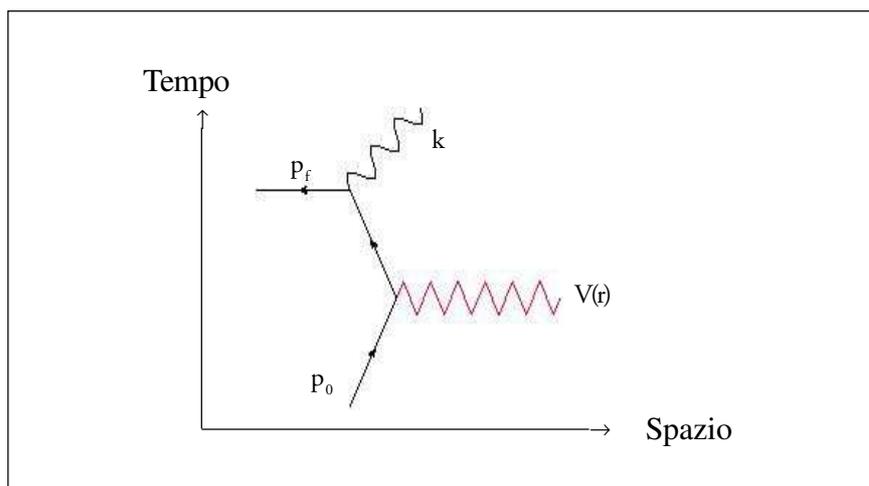


Fig. 14: Un elettrone p_0 , deflesso da un potenziale $V(r)$, emette un fotone k e rimane con un impulso finale p_f .

(48) - Cfr.: G. MORPURGO, *Introduzione alla fisica delle particelle*, Zanichelli, Bologna, 1987, pag. 142.

A conclusione di questo brevissimo *excursus* sulla Elettrodinamica quantistica, riporto sinteticamente i relativi diagrammi (di base) di Feynman (vds.: fig. 15).

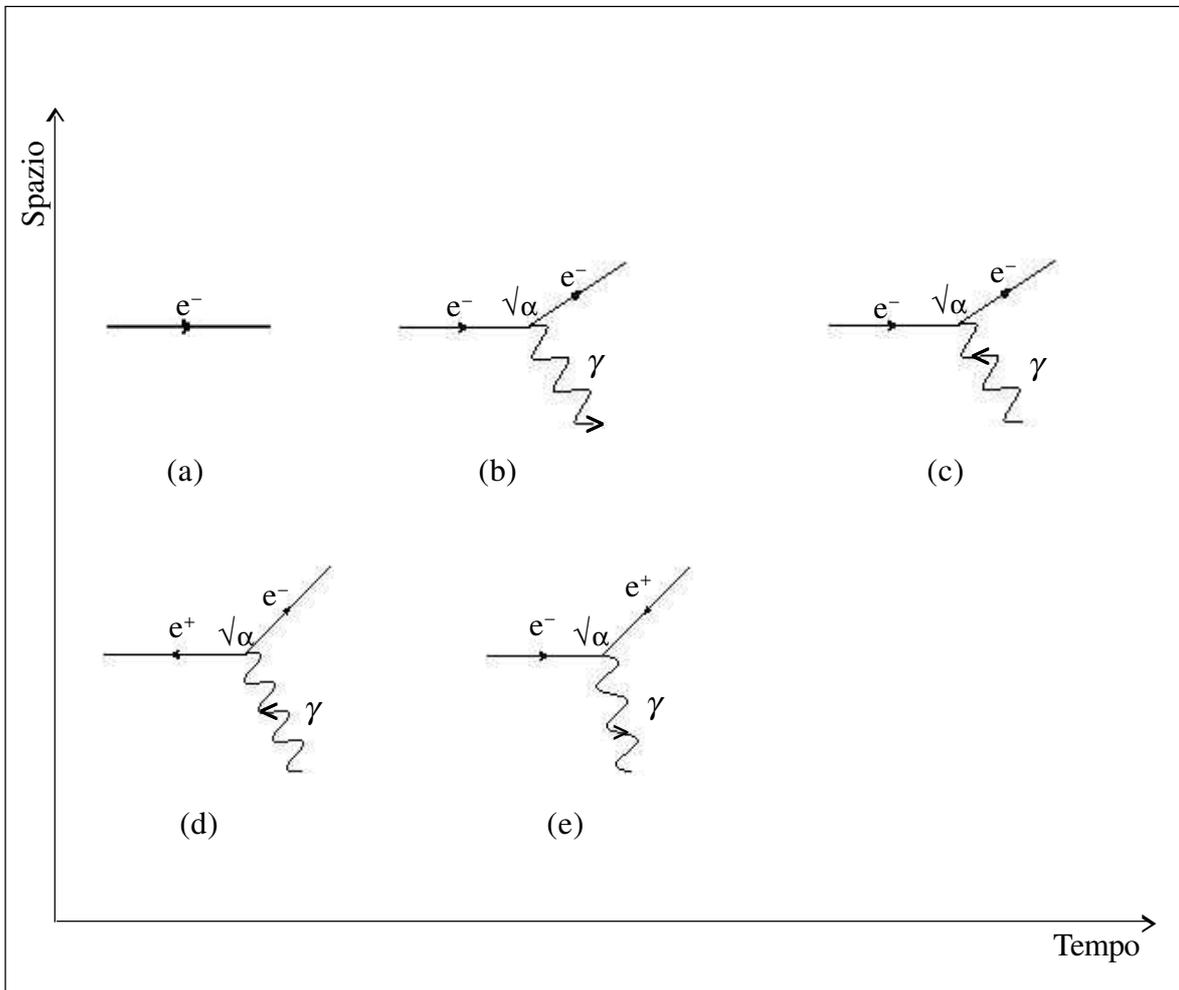


Fig. 15: (a) elettrone libero; (b) emissione di un fotone; (c) assorbimento di un fotone; (d) produzione di una coppia; (e) annichilazione $e^+ e^-$. Si noti che in questo diagramma (tratto da: W. E. BURCHAM - M. JOBES, Nuclear and Particle Physics, prec.cit., con modifiche) la collocazione temporale è sull'asse delle ascisse.

Nei diagrammi di Feynman compare il termine $\sqrt{\alpha}$, ove $\alpha = \frac{e^2}{4\pi\epsilon_0\hbar c} \approx \frac{1}{137}$;

α è la *costante di accoppiamento* (chiamata anche *costante di struttura fine*); è una quantità adimensionale e il suo valore indica l'ampiezza per emissione o assorbimento di un fotone reale da parte di un elettrone reale ⁽⁴⁹⁾.

(49) - Il valore della costante di accoppiamento, determinato sperimentalmente, è $\approx -0,085\ 424\ 55$; i fisici, tuttavia, preferiscono ricordarlo come l'inverso del suo quadrato (che vale 137,035 97 con un'incertezza di ≈ 2 unità sull'ultima cifra).

Va osservato che il valore della costante di struttura fine raccomandato da CODATA (*Committee on Data for Science and Technology*) 2006 è: $\alpha = 7,297\ 352\ 537\ 6\ (50) \times 10^{-3}$, cioè: $\alpha = \frac{1}{137,035\ 999\ 679\ (94)}$

La costante di struttura fine è anche chiamata *costante di Sommerfeld*, dal cognome del fisico Arnold SOMMERFELD che la introdusse, nel 1916, come misura della deviazione relativistica nelle linee spettrali rispetto al modello atomico proposto nel 1913 da Niels Henrik David BOHR⁽⁵⁰⁾. Nel 1922 Otto STERN e Walther GERLACH⁽⁵¹⁾ verificarono sperimentalmente la bontà del modello atomico di BOHR.

Ulteriori convenzioni sulla realizzazione e la lettura dei diagrammi di Feynman possono essere reperite, oltre che nei trattati di fisica atomica, nucleare, delle particelle, ecc., anche nei testi di fisica teorica⁽⁵²⁾.

Non appare opportuno approfondire ulteriormente questa parte dedicata alla QED, perché ciò esulerebbe dalle finalità di questo lavoro: si rimanda, pertanto, ai testi specialistici.

(50) - N. BOHR, *On the Constitution of Atoms and Molecules*, *PHILOS. MAG.*, vol. 26, 1913, pagg. 1-25.

(51) - W. GERLACH - O. STERN, *Das magnetische Moment des Silberatoms*, *ZEITSCHRIFT FÜR PHYSIK*, vol. 9, 1922, pagg. 353-355 .

(52) - Vds., ad es.: A. DI GIACOMO, *Lezioni di fisica teorica*, ETS, Pisa, 1992, pagg. 297 ss.

LA FLUORESCENZA

La *Fluorescenza* è quel fenomeno fisico per cui una molecola, colpita da una radiazione elettromagnetica di una certa lunghezza d'onda (*λ di eccitazione*), emette un'altra radiazione di lunghezza d'onda superiore (*λ di emissione*).

UN PO' DI FISICA

Le sostanze chimiche, indipendentemente dal loro stato fisico, sottoposte ad opportune eccitazioni (temperature elevate, scariche elettriche o assorbimento di radiazioni elettromagnetiche) emettono radiazioni.

L'energia raggianti delle radiazioni prodotte da *incandescenza* ha origine puramente termica.

In tutti gli altri casi di emissione di radiazioni ottiche si parla di *luminescenza*; ne sono esempi le emissioni ottiche che si producono nell'urto di particelle cariche accelerate (ad es.: la radiazione dovuta all' *Effetto ČERENKOV* ⁽⁵³⁾ o quella generata da *archi elettrici*).

Alcuni corpi emettono radiazioni di lunghezza d'onda compresa nella banda ottica dello spettro elettromagnetico quando si trovano ad una temperatura molto al di sotto di quella d'incandescenza: il fenomeno prende il nome di *termoluminescenza* ⁽⁵⁴⁾.

Se l'emissione di radiazione ottica avviene (come, ad es.: in alcuni solfuri alcalino-terrosi) quando la sostanza è sottoposta ad un intenso campo elettrico, il fenomeno prende il nome di *elettroluminescenza* ⁽⁵⁵⁾.

Alcuni corpi, qualora vengano sottoposti a sollecitazioni meccaniche (sfregamento [ad es.: il gesso, lo zucchero, la porcellana, ecc.], sfaldamento [ad es.: la mica]), producono luce per *triboluminescenza* ⁽⁵⁶⁾.

(53) - Consiste nell'emissione di radiazione elettromagnetica da parte di una particella che attraversa un mezzo ad una velocità superiore a quella della luce. Questo "effetto" viene così chiamato in omaggio al fisico sovietico Pavel Alekseevic Čerenkov premio Nobel nel 1958 per gli studi da lui effettuati su questo fenomeno.

L'Effetto Čerenkov è la causa della caratteristica luce di colore azzurro visibile nei reattori nucleari.

(54) - Ad es., se si getta della polvere di gesso (o di fluorina, o di alcune altre sostanze) su una superficie calda, si assiste al fenomeno della *termoluminescenza*.

(55) - Ad es., si producono celle elettroluminescenti con l'uso di piccoli cristalli di ZnS mescolati con tracce di Cu o di Mn, sottoposti a una d.d.p. di 100V AC. I cristalli di cui sopra, infatti, qualora vengano sottoposti a un campo elettrico dell'ordine di 10^6 V/m, emettono una radiazione ottica la cui lunghezza d'onda è dipendente dal metallo estraneo "incluso".

(56) - Dal greco: τριβή [tribè] = raschiare, sfregare, stropicciare. Questo fenomeno fu scoperto accidentalmente alla fine del XVIII secolo: durante la raffinazione dello zucchero, mentre avveniva la frantumazione di grossi cristalli, vennero notate piccole scintille di "luce visibile" [*id est*: radiazione ottica]. Il fenomeno, peraltro,

Altre sostanze, poi, presentano il fenomeno della *chemiluminescenza*. Ne sono un esempio l'emissione di radiazione ottica concomitante con l'ossidazione del Fosforo o con la putrefazione di alcuni tipi di legno umido. Il mare presenta spesso il fenomeno della chemiluminescenza dovuta alla presenza di batteri. Inoltre, anche alcuni animali (ad es.: le lucciole) presentano il fenomeno della chemiluminescenza.

Un esempio di chemiluminescenza prodotta in laboratorio è la cosiddetta "esperienza di Trautz"⁽⁵⁷⁾. Esistono, infine, sostanze che, colpite da una radiazione elettromagnetica monocromatica di opportuna lunghezza d'onda, emettono radiazioni elettromagnetiche di lunghezza d'onda diversa da quella incidente: ciò costituisce i fenomeni della *fluorescenza* e della *fosforescenza*, raggruppati nell'unico termine di *fotoluminescenza*⁽⁵⁸⁾.

era già stato notato in precedenza: la prima registrazione, infatti, è attribuita allo scienziato inglese Francis BACON il quale segnalò, nel 1605, su *The Advancement of Learning*, di avere osservato un "bagliore luminoso" durante la frantumazione di un blocco di zucchero di canna.

Il medesimo fenomeno fu segnalato, nel 1663, anche dal fisico Robert BOYLE.

La triboluminescenza non è ancora stata spiegata completamente: alcune teorie attuali, basandosi sui risultati di alcuni esperimenti nell'ambito della cristallografia e della spettroscopia, ipotizzano che, durante la rottura di materiali asimmetrici, avvenga una *separazione di carica*; quando le cariche, poi, si ricombinano, la scarica elettrica ionizzerebbe l'aria causando il "lambo di luce". Tali teorie, tuttavia, non sono condivise da tutti: infatti, per consentire la separazione della carica, i cristalli che evidenziano questo effetto dovrebbero necessariamente avere difetti di simmetria e, inoltre, dovrebbero essere cattivi conduttori; l'esistenza di sostanze che, pur non possedendo le qualità sopraelencate, sono soggette al fenomeno, sembrerebbe invalidare (almeno parzialmente) l'ipotesi al fondamento delle teorie sopra citate.

(57) - In un pallone di vetro della capacità di 300 ml si introducono le seguenti sostanze:

- Pirogallolo (1,2,3 triidrossibenzene) $[C_6H_3(OH)_3]$: 35 ml;
- Aldeide Formica (metanale) $[CH_2O]$ al 35% in H_2O : 35 ml;
- Carbonato di Potassio $[K_2CO_3]$ al 50% in H_2O : 35 ml.

Mescolare ed aggiungere Acqua Ossigenata (perossido di idrogeno) $[H_2O_2]$ a 100 volumi: 30 ml.

Si osserverà (al buio) una debole luminescenza arancione, nonostante la temperatura della miscela non superi i 50 °C.

(58) - Fosforescenza e fluorescenza differiscono per vari parametri, tra i quali:

- durata dell'effetto luminescente ($<10^{-8}$ s per la fluorescenza; >1 s per la fosforescenza, benché permangono perplessità nella classificazione di fenomeni di durata compresa tra 10^{-5} e 10^{-1} s);
- dipendenza della *costante di tempo q* (che indica la durata media dell'emissione) dalla temperatura: elevata, nel caso della fosforescenza; assai scarsa, nel caso della fluorescenza;
- manifestazione di fluorescenza in cristalli molecolari, come ad es., il Benzene; o anche nei cristalli di composti ionici come i sali di elementi appartenenti alle terre rare o i sali di Uranile $[UO_2^{++}]$;
- manifestazione di fosforescenza in solidi che, allo stato naturale, non presentano tale fenomeno e che hanno bisogno di essere "attivati" da sostanze estranee (dette, appunto, *attivanti*) introdotte in quantità minime.

È opportuno precisare che i criteri sopradescritti non sono da considerarsi "assoluti", poiché si verificano fenomeni di fluorescenza in sostanze o in condizioni che "apparrebbero" alla fosforescenza e viceversa. Un esempio, per tutti: una generica sostanza fluorescente può prolungare notevolmente il suo tempo di emissione (fino a sconfinare in quello tipico degli elementi fosforescenti) al semplice variare della viscosità del solvente.

Appare, inoltre, opportuno ricordare che la misura della durata di emissione di un corpo fotoluminescente può essere effettuata, oltre che con altri metodi, anche con il *fosforoscopio di Becquerel*; in merito

Cfr.:P. FLEURY - J.P. MATHIEU, *La Luce: emissione, assorbimento, propagazione*, in *Trattato di Fisica generale e sperimentale*, Zanichelli, Bologna, 1970², Vol. 5, pagg. 349 ss.



fosforoscopio a ruote dentate di E.BECQUEREL (conservato nel Museo di Fisica dell'Università degli Studi di Torino)

Poiché il fenomeno che interessa questa breve trattazione è la fluorescenza, si omette di approfondire gli altri aspetti della luminescenza.

La Fluorescenza

È comunemente definita come “la capacità di alcune sostanze chimiche di assorbire energia luminosa a bassa lunghezza d’onda (e, dunque, ad alta frequenza) e riemetterla, apparentemente simultaneamente ⁽⁵⁹⁾, a lunghezza d’onda maggiore ⁽⁶⁰⁾”.

Condizione necessaria (e premessa) perché si manifesti la fluorescenza è, dunque, l’assorbimento di radiazioni: ciò può essere considerato un caso particolare della legge di *Grotthus e Draper* ⁽⁶¹⁾. La radiazione elettromagnetica provoca un qualche effetto in un dato sistema solamente quando viene assorbita: occorre, dunque, spiegare (sia pure succintamente) il *processo di assorbimento*.

processo di assorbimento

Il “fenomeno” radiazione va interpretato - a seconda dei casi - come *onda elettromagnetica* oppure come *sequenza di quanti energetici*. In questo secondo caso i quanti posseggono Energia (nel SI espressa in eV):

$$E = h\nu \quad [1]$$

ove h è la costante di Planck (il cui valore è $\cong 6,6 \times 10^{-34}$ J s) e ν è la frequenza di oscillazione [Hz].

Poiché, com’è noto, la frequenza e la lunghezza d’onda (λ) sono legate dalla relazione:

$$\nu\lambda = hc \quad [2]$$

(ove c = velocità della radiazione elettromagnetica nel vuoto = 3×10^8 m/s), la relazione [1] può essere scritta come:

$$E = \frac{hc}{\lambda} \quad [3]$$

Assorbimento o emissione di radiazione elettromagnetica da parte di un sistema materiale significano, pertanto, assorbimento o emissione di energia.

(59) - Cfr.: nota 58.

(60) - “Fluorescence is the ability of certain chemical substances to absorb shortwave light energy and reflect it seemingly simultaneously as longwave light:...”, da: *The Fluorescence Phenomenon*, INNOVATION, n.14, Carl Zeiss, 2004, pag. 4 [sull’uso del termine “luce” (*light*) vds.: nota 7 a pag. 15].

(61) - L’enunciato della quale recita: “quando un fascio di luce incide sui reagenti, solamente le lunghezze d’onda assorbite portano alla reazione chimica”; si noti che, nell’enunciazione di Draper del 1841, si legge “reazione fotochimica”; Cfr.: W. TAUSCH, *Concetti basilari delle misurazioni fluorimetriche*, in *INFORMAZIONI ZEISS*, n. 54, 1964, pag. 111.

È noto dalla fisica atomica che gli atomi (o le molecole) che interagiscono con l'energia di radiazione possono esistere esclusivamente in stati di contenuto energetico ben definiti (e tra loro differenziati); il passaggio da uno stato di minore energia ad uno di maggiore energia (o viceversa) è consentito esclusivamente in via discontinua (ad esempio, tramite assorbimento o emissione di un *quanto* di radiazione la cui energia ([1],[3] pagina precedente) ha il valore sufficiente a raggiungere un altro livello energetico permesso).

A tal proposito, si ricordi che, per il *Principio di indeterminazione di Heisenberg*, gli elettroni non possono cadere sul nucleo irraggiando energia, perché in tal caso (a prescindere da altre motivazioni) essi risulterebbero troppo "localizzati" ⁽⁶²⁾.

Se si considerano gli elettroni come *onde elettroniche stazionarie* che circondano il nucleo atomico, il numero di oscillazioni lungo una circonferenza, consentite dall'*ampiezza di probabilità elettronica* (ψ_e), deve essere intero: pertanto non tutte le orbite elettroniche sono permesse.

Infine, il *Principio di esclusione di Pauli* vieta ad un qualsivoglia elettrone di occupare un orbitale già occupato, a meno che i due elettroni abbiano *spin* opposto ⁽⁶³⁾. L'insieme degli orbitali occupati definiscono, com'è noto, lo *stato dell'atomo*: ad ogni stato corrisponde un'energia complessiva. In conseguenza della natura ondulatoria degli elettroni, le varie energie risultano *quantizzate*.

La transizione di un atomo da un *livello energetico eccitato* al *livello energetico fondamentale* avviene con emissione di un fotone; al contrario, l'assorbimento di un fotone produce la transizione dal livello fondamentale a quello eccitato ⁽⁶⁴⁾. In definitiva, una certa sostanza può assorbire o emettere radiazioni elettromagnetiche di frequenza (e, dunque, lunghezza d'onda) tale che la loro energia corrisponda esattamente alla differenza tra due stati energetici possibili. Si ricordi che queste differenze di livelli energetici sono caratteristiche per le varie specie atomiche o molecolari. È questa la ragione per la quale sostanze diverse assorbono o emettono radiazioni di differente lunghezza d'onda.

Il *termine energetico* di un atomo è determinato dallo stato energetico dei suoi elettroni; nelle molecole, inoltre, va tenuto conto dell'*energia di oscillazione reciproca* dei componenti della molecola e dell'*energia rotazionale* molecolare: alle transizioni tra due stati di oscillazione

(62) - Il *Principio di indeterminazione di Heisenberg* può essere così enunciato: "Dato un corpuscolo in moto, non è possibile misurare contemporaneamente - con precisione grande quanto si vuole - sia la sua posizione sia la sua quantità di moto, perché eseguendo la misura di una delle due grandezze si perturba inevitabilmente il moto del corpuscolo".

(63) - Gli elettroni che occupano lo stesso orbitale, infatti, tenderebbero a respingersi vicendevolmente a causa dell'identità della loro carica elettrica: è proprio lo *spin* opposto che permette l'equilibrio "coabitativo". Quando un elettrone cambia orbitale, il suo *spin* rimane inalterato (a differenza degli altri tre numeri quantici), perché esso costituisce una proprietà intrinseca dell'elettrone e non è collegato alla sua collocazione all'interno dell'atomo.

(64) - *Stato* e *livello energetico* sono, sostanzialmente, sinonimi, benché il primo termine venga usato prevalentemente per evidenziare l'*ampiezza della probabilità*, mentre il secondo termine viene adottato quando ci si voglia riferire alla ben più importante proprietà dello *stato*, cioè alla sua *energia*.

energeticamente vicini corrisponde una ΔE notevolmente minore; le differenze fra stati di rotazione vicini sono ancora inferiori. Gli stati elettronici possibili risultano, pertanto, assai distanti fra loro sulla scala energetica.

Ad ogni stato elettronico corrispondono molteplici stati oscillatori (relativamente vicini tra loro) a ciascuno dei quali competono uno o più stati rotatori (ancor più ravvicinati).

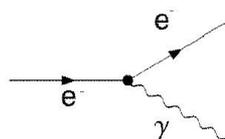
All'atto dell'assorbimento di radiazioni, avviene una (generalmente) contemporanea variazione di tutti e tre gli stati energetici: la ΔE tra lo stato elettronico originario e quello eccitato determina - sulla scala delle lunghezze d'onda - la posizione della banda di assorbimento, mentre la struttura di quest'ultima è determinata dall'eccitazione della radiazione corrispondente alle minori ΔE .

Va ricordato che la *struttura fine* risultante dall'eccitazione rotatoria è sfumata nelle soluzioni a causa delle azioni reciproche fra le molecole assorbenti e quelle contigue⁽⁶⁵⁾. A tal proposito, ritengo opportuno ricordare che l'interazione tra due particelle è proporzionale alla *probabilità di irraggiamento*, cioè alla *costante di accoppiamento dell'interazione elettromagnetica* ($\alpha_{EM} = \frac{e^2}{\hbar c}$ [ove e è il valore della carica della particella, c è la velocità della luce nel vuoto e \hbar è la *costante di Planck ridotta*⁽⁶⁶⁾, detta anche *costante di Dirac*]) chiamata anche *costante di struttura fine* perché essa interviene nella struttura degli spettri di emissione atomici. Infatti, un elettrone isolato che si propaga nel vuoto emette e riassorbe continuamente *fotoni virtuali*⁽⁶⁷⁾: pertanto, non è raro trovare un elettrone accanto a un fotone e la probabilità che ciò avvenga è, appunto, descritta dalla costante di struttura fine il cui valore è $\cong 1/137$, il che vuol dire, in ultima analisi, che ogni 137 elettroni osservati si può osservare un fotone concomitante.

(65) - Cfr.: W. TAUSCH, *cit.*, pag. 112.

(66) - $\hbar = \frac{h}{2\pi} = 1,054\ 571\ 628\ (53) \times 10^{-34}$ J s

(67) - L'emissione di un fotone da parte di un elettrone ($e^- \rightarrow \gamma$) descritta dal sottostante *diagramma di Feynman*



è un processo virtuale poiché l'elettrone, irraggiando l'unica energia disponibile,

cioè l'energia di riposo $m_e c^2 = 0,51$ MeV, violerebbe il principio di conservazione dell'energia: infatti, il fotone emesso avrebbe un'energia $\mathcal{E}_f > 0$, l'elettrone in movimento avrebbe energia $\mathcal{E}_e > 0,51$ MeV e si determinerebbe uno sbilanciamento energetico $\Delta E = \mathcal{E}_f + \mathcal{E}_e - 0,51$ MeV. Il processo di cessione di un fotone da parte di un elettrone può, dunque, avvenire solamente se la durata dell'evento Δt è legata a ΔE

dalla *relazione di indeterminazione di Heisenberg*: $\Delta t = \frac{\hbar}{\Delta E}$.

Per studiare l'intensità delle *transizioni vibroniche*, ovvero i cambiamenti dei livelli energetici vibrazionali ed elettronici che avvengono in modo simultaneo quando una molecola assorbe o emette energia, si ricorre al *Principio di Franck-Condon* che, espresso in termini di fisica classica, afferma che durante una transizione elettronica il moto dei nuclei viene considerato nullo, in quanto le loro posizioni variano molto più lentamente rispetto a quelle degli elettroni, dato che la loro massa è maggiore rispetto quella di questi ultimi.

Il moto dei nuclei diventa quindi trascurabile in confronto a quello degli elettroni. Inoltre, le transizioni favorite sono quelle in cui è più facile che il moto dei nuclei si adatti rapidamente alla nuova configurazione elettronica.

In termini di meccanica quantistica, il principio afferma che, durante una transizione elettronica, il cambiamento da un livello vibrazionale ad un altro avviene più frequentemente se le funzioni d'onda corrispondenti ai due stati coincidono. Infatti, i livelli e le funzioni vibrazionali sono quelle degli oscillatori armonici quantistici (o di approssimazioni più complesse dell'energia potenziale delle molecole, come ad esempio le *funzioni potenziali di Morse* ⁽⁶⁸⁾ ⁽⁶⁹⁾).

radiazione emessa

Per quanto riguarda la lunghezza d'onda della radiazione emessa in fluorescenza, questa è descritta dalla *Legge dello shift di Stokes* ⁽⁷⁰⁾, nota anche semplicemente come *Legge di Stokes*. In base a questa legge, la radiazione di fluorescenza ha quasi sempre lunghezza d'onda maggiore (o al massimo uguale) di quella della radiazione eccitatrice. Esistono, peraltro, eccezioni a questa regola, soprattutto quando si operi a temperature più alte, poiché sia l'assorbimento sia l'emissione iniziano non dagli stati oscillatori fondamentali, bensì da stati già eccitati dalla radiazione termica. In conseguenza di ciò, può accadere che la radiazione di emissione abbia lunghezza d'onda minore della radiazione eccitatrice (*emissione anti-Stokes*) ⁽⁷¹⁾.

(68) - Il *potenziale di Morse* (dal cognome del fisico Philip M. MORSE) è un modello empirico per l'energia potenziale di una molecola biatomica della forma: $V(R) = D_e \{1 - \exp[-\beta(R-R_e)]\}^2$, ove D_e è l'energia di dissociazione della molecola e β è una costante caratteristica che può essere legata alla costante elastica k . Tale modello descrive la *struttura vibrazionale molecolare* con una approssimazione migliore rispetto al modello dell'oscillatore armonico, poiché considera esplicitamente gli effetti della rottura del legame chimico e rende anche ragione dell'*anarmonicità* dei legami reali.

(69) - Per il diagramma che illustra il Principio di Franck-Condon vds., ad es.: D. BARBERO - R. MALVANO, *Introduzione alla fisica atomica e molecolare*, Casa Editrice Ambrosiana, Milano, 1975, pag. 272;

A. RIGAMONTI, *Introduzione alla struttura della materia*, La Goliardica Pavese, Pavia, 1980, pag. 361.

(70) - Prende il nome dal fisico George Gabriel STOKES il quale, nel 1852, descrisse - in un lavoro sul cambiamento di lunghezza d'onda della luce - il fenomeno della fluorescenza osservato nella Fluorite e nel vetro di Uranio.

(71) - Vds. anche: G. P. SINI, *Problemi tecnici della microscopia ottica*, Bologna, 2005, pag. 424.

Faccio solo un accenno alla *Fluorescenza Raman* che avviene con emissione di radiazione infrarossa. Una radiazione incidente su un campione generalmente lo attraversa (senza subire modifiche) o ne viene assorbita: ciò dipende sia dalla lunghezza d'onda della radiazione incidente, sia dalla natura del campione. In genere, meno dell'1% della radiazione incidente subisce uno *scattering elastico* ⁽⁷²⁾, cioè senza variazioni di frequenza (*effetto Rayleigh*). Una quantità ancora minore della radiazione incidente (in genere < 1 ppm) subisce invece uno *scattering anelastico* (*effetto Raman*) che provoca una variazione della frequenza, aumentandola o diminuendola. Poiché la ΔE tra i fotoni incidenti e quelli scatterati anelasticamente corrisponde ai livelli energetici vibrazionali della molecola scatterante, l'analisi spettrale delle righe dovute all'effetto Raman risulta assai utile nel determinare composizione chimica, struttura molecolare e interazioni molecolari del campione in esame.

intensità della fluorescenza e concentrazione di sostanza

Nella fluorescenza, l'emissione di energia elettromagnetica segue l'andamento di una cinetica del primo ordine nella quale la relazione fra l'intensità della radiazione di eccitazione e l'intensità della radiazione emessa segue la *Legge di Bouguer-Lambert-Beer*; pertanto, tale emissione può essere descritta con la formula:

$$I = I_0 e^{-\varepsilon bc} \quad [4]$$

ove I_0 è l'intensità della radiazione di eccitazione, I è l'intensità della radiazione emessa, ε è il coefficiente di assorbimento molare, b è la lunghezza del cammino ottico (espresso in cm), c è la concentrazione della sostanza (in moli/litro).

La quantità di energia assorbita sarà, pertanto:

$$I_a = I_0 - I = I_0 (1 - e^{-\varepsilon bc}) \quad [5]$$

La *resa quantica* (detta anche *efficienza di fluorescenza*) è definita dal rapporto:

$$\Phi_F = \frac{\gamma_{em}}{\gamma_{ass}} = \frac{F_0}{I_a} \quad [6]$$

ove Φ_F è la resa quantica, γ indica il fotone e, pertanto, γ_{em} è in numero di fotoni emessi e γ_{ass} il numero di fotoni assorbiti, F_0 è l'intensità della radiazione emessa e I_a indica la quantità di radiazione assorbita.

Dalle relazioni [4],[5] e [6] si deduce la formula:

$$F = K \Phi_F I_0 (1 - e^{-\varepsilon bc}) \quad [7]$$

nella quale K è una costante che dipende dalla geometria del fluorimetro usato per la misura (nonché da altri parametri strumentali) e il valore di Φ_F è compreso tra 0 e 1.

(72) - Nella terminologia italiana: *diffusione elastica*; cfr. anche pag. 23.

Appare evidente *ictu oculi* che il valore dell'efficienza tende a 1 per sostanze fortemente fluorescenti e a 0 per sostanze poco fluorescenti.

Se l'energia di eccitazione è assorbita per un valore massimo <2% e il termine $\epsilon b c \leq 0,01$ (come avviene, ad esempio, nelle soluzioni molto diluite), l'equazione [7] può essere ridotta (in prima approssimazione) alla seguente:

$$F = K \Phi_F I_0 \epsilon b c \quad [8]$$

dalla quale è facilmente intuibile che, per $\epsilon b c \leq 0,01$, la concentrazione e l'intensità di fluorescenza sono legate da una legge di proporzionalità diretta⁽⁷³⁾ (contrariamente a quanto avviene nella spettrometria di assorbimento, nella quale la concentrazione è proporzionale al logaritmo del rapporto tra il flusso radiante incidente e quello trasmesso).

Per valori del prodotto $\epsilon b c > 0,01$ la correlazione fra la concentrazione e l'intensità di fluorescenza non ha più un andamento lineare: per valori molto alti, infatti, il fattore $e^{-\epsilon b c}$ è trascurabile rispetto a 1. In questo caso, il segnale di fluorescenza dipende non più dalla concentrazione molecolare, bensì esclusivamente dall'intensità della radiazione di eccitazione e dalla resa quantica: l'equazione [7] diventa

$$F = K \Phi_F I_0 \quad [9] .$$

È opportuno rilevare che le tecniche in fluorescenza offrono - rispetto a quelle in spettroscopia di assorbimento - una sensibilità maggiore di un fattore $10^3 - 10^4$ ⁽⁷⁴⁾. È facile dedurre, esaminando l'equazione [8], che - al diminuire della concentrazione della sostanza - un aumento dell'intensità della radiazione eccitatrice (e, dunque, un aumento della potenza della sorgente di eccitazione) produce un miglioramento della sensibilità e della rivelabilità (cosa che, al contrario, non è possibile nella spettrometria di assorbimento). Tale tecnica, però, incontra un limite insormontabile legato alla fotodecomposizione della molecola nonché alla presenza del solvente e di eventuali impurità (che diventano elementi maggiormente interferenti in ragione dalla diminuzione della concentrazione).

Le misure spettrofotometriche sono di tipo "assoluto" poiché determinate (come più sopra si è detto) dal rapporto tra due intensità di radiazione (quella assorbita e quella emessa); la misura dell'intensità della radiazione di fluorescenza, al contrario, è "relativa" poiché dipende da vari fattori (tra i quali l'efficienza, l'intensità della radiazione di eccitazione, l'incapacità di misurare tutta la radiazione emessa, ecc.). Tra i processi che hanno azione competitiva con la fluorescenza, non si può dimenticare che la

(73) - La legge di Lambert-Beer per la spettrometria di assorbimento, al contrario, lega la concentrazione al logaritmo del rapporto tra flusso radiante incidente e flusso radiante trasmesso.

(74) - Vds.: A. BURLINA, *Medicina di Laboratorio*, Tomo I, C.G. Ed. Medico Scientifiche, Torino, 1994, pagg. 182 ss.

molecola da esaminare, una volta eccitata, può perdere energia sotto forma di radiazione termica, di conversione interna, per collisione con altre molecole o anche a causa di transizioni intermedie che producono fotoni non dotati di energia sufficiente ad essere rilevati.

La resa quantica è una misura “assoluta”, trattandosi (come detto) di un rapporto: tuttavia essa risulta “variabile” poiché è in rapporto con il *tempo di vita* del fluoroforo nello stato eccitato (τ), secondo l'equazione: $\Phi_f = \frac{\tau}{\tau_0}$ ove τ_0 è il tempo di vita naturale della molecola nello stato eccitato e τ è il tempo determinato dalle peculiari condizioni sperimentali (normalmente dell'ordine dei nanosecondi).

Il tempo di vita τ può essere calcolato misurando il tempo di decadimento della fluorescenza, sottoponendo il fluoroforo a un impulso elettromagnetico (in genere nella banda ottica oppure nell'UV) che provoca l'eccitazione di un certo numero di molecole; la fluorescenza emessa viene misurata nel tempo e dalla sua riduzione (che avviene con andamento esponenziale) si calcola il τ del fluoroforo tramite l'equazione:

$$I_t = I_0 e^{-t/\tau} \quad [10]$$

ove I_t è l'intensità della fluorescenza al tempo t e I_0 quella al tempo t_0 .

la fluorescenza in radiazione polarizzata

Un breve accenno merita l'esame in *fluorescenza a luce polarizzata*: infatti, se un fluoroforo viene eccitato con radiazione elettromagnetica polarizzata, la radiazione di emissione - qualora il tempo di rilassamento rotazionale sia sufficientemente maggiore del tempo di emissione - sarà anch'essa polarizzata; in caso contrario, la rotazione molecolare produrrà una perdita della polarizzazione di grado più o meno marcato in dipendenza dalla facilità di rotazione molecolare⁽⁷⁵⁾.

Questa tecnica permette, ad esempio, di analizzare le interazioni carboidrati-proteine, antigene-anticorpo, ecc.

Per quanto riguarda l'interferenza del solvente, va ricordato che - a causa della *polarità* di quest'ultimo - possono aversi trasferimenti di elettroni dalla molecola del soluto a quella del solvente stesso con formazione concomitante di *legami idrogeno*.

(75) - Vds.: A. BURLINA, *cit.*, pag. 184.

Appare superfluo ricordare che un incremento della temperatura comporta l'aumento della probabilità di collisione delle molecole, con conseguente emissione di energia attraverso processi non radiativi.

Non è da sottovalutare, poi, il fenomeno di assorbimento nell'UV con emissione fluorescente, riscontrato in alcuni vetri al quarzo e in alcuni materiali plastici che contengono sostanze in grado di generare il fenomeno luminescente ⁽⁷⁶⁾.

Le limitazioni maggiori all'applicazione della fluorescenza (anche in campo fluorimetrico) sono dovute all'*effetto filtro interno*, allo *scattering della luce*, al *quenching*, all'*effetto matrice* e al *photobleaching*; fenomeni sui quali ritengo utile spendere qualche parola.

effetto filtro interno

Con l'incremento della concentrazione delle sostanze in grado di assorbire le radiazioni (fluorescenti o di altro genere), aumenta anche l'assorbimento da parte dei primi strati delle molecole raggiunte dalla radiazione eccitatrice, con l'ovvio decremento di quest'ultima a discapito degli strati molecolari successivi e, di conseguenza, della radiazione di fluorescenza. Insomma, è come se tra sorgente e campione fosse posto un filtro: da ciò deriva il nome dato al fenomeno.

Inoltre, alcune sostanze non fluorescenti possono catturare parte della radiazione fluorescente, comportandosi dunque in maniera analoga a un filtro; il bicromato di potassio ($K_2Cr_2O_7$), in soluzione acquosa contenente carbonato di sodio (Na_2CO_3), - tanto per citare un esempio comune - presenta due picchi di assorbimento rispettivamente a 245 nm e a 348 nm: ebbene, tali picchi si sovrappongono a quelli di eccitazione e di emissione (rispettivamente a 275 nm e a 350 nm) del Triptofano ⁽⁷⁷⁾!

light scattering

Quando avviene una collisione tra una radiazione incidente e la materia, si verifica il fenomeno di diffusione (in inglese: *scattering*); in particolare, si produce il *Rayleigh scattering*, se l'urto avviene con molecole, mentre si produce il *Tyndall scattering* se l'urto interessa particelle ultramicroscopiche.

Poiché la radiazione di emissione viene dispersa in tutte le direzioni, la porzione di essa che colpisce il rivelatore può portare a un innalzamento del livello del rumore di fondo, a scapito del rapporto segnale/rumore e, dunque, con innalzamento del limite di rivelabilità. Qualora allo scattering Rayleigh si associ un assorbimento parziale della radiazione incidente con trasformazione della medesima in energia rotazionale o vibrazionale,

(76) - Cfr.: A. BURLINA, *cit.*, pag. 184.

(77) - Cfr.: A. BURLINA, *ibidem*.

l'energia emessa sarà quantitativamente minore e, dunque, di lunghezza d'onda maggiore: è questo il *Raman scattering*.

L'effetto Raman produce bande di emissione deboli (se confrontate con quelle di fluorescenza) e l'effetto Rayleigh assume importanza quando si lavora con bassi valori di fluorescenza. Entrambi gli effetti, peraltro, possono essere controllati scegliendo opportunamente la lunghezza d'onda di eccitazione⁽⁷⁸⁾.

quenching

Il *quenching* (=attenuazione) è un fenomeno causato da processi di collisione o di complessazione del fluoroforo con il solvente (o con un soluto): ne consegue una riduzione della resa quantica della fluorescenza.

- Si ha il *quenching dinamico* (o *collisionale*) qualora esso derivi dall'interazione di una molecola che - in soluzione - riporti il fluoroforo dallo stato eccitato a quello fondamentale, senza emissione fotonica. L'interazione tra il fluoroforo e la sostanza che ne è la causa (chiamata *quencher*) avviene in un tempo minore del tempo di vita del fluoroforo allo stato eccitato; il tempo di vita decresce linearmente al crescere della concentrazione del *quencher*.

- Il *quenching statico*, invece, avviene quando il *quencher* in soluzione interagisce con il fluoroforo nel suo stato fondamentale; il complesso molecolare che in questo caso si forma ha caratteristiche spettroscopiche che inibiscono l'assorbimento della radiazione incidente da parte del fluoroforo, impedendone così il raggiungimento dello stato eccitato; il tempo di vita dei complessi (formati durante l'interazione) è maggiore di quello del fluoroforo allo stato eccitato ed è indipendente dalla concentrazione del *quencher*⁽⁷⁹⁾.

In generale, la brillantezza di un fluoroforo è proporzionale a: $\epsilon_{\lambda} c l \Phi_f$, ove ϵ_{λ} è il *coefficiente di estinzione molare* del fluoroforo, c la sua concentrazione (espressa in moli/litro), l il cammino ottico (espresso in cm) percorso dalla radiazione e Φ_f la resa quantica. Poichè nel *quenching collisionale* gli urti tra *quencher* e fluoroforo avvengono senza emissione di fotoni, la riduzione dell'intensità della fluorescenza (da F_0 a F) è governata dall'equazione di **Stern-Volmer**:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_{SV}[Q] \quad \text{scritta anche nella forma:} \quad \frac{F_0 - F}{F} = k_{SV}[Q] \quad [11]$$

ove K_{SV} è la pendenza della curva (*Stern-Volmer plot*) che si ottiene graficando la variazione di frequenza F_0/F in funzione della concentrazione del *quencher*[Q].

(78) - Cfr.: A. BURLINA, *cit.*, pag. 185.

(79) - Cfr.: A. BURLINA, *ibidem*.

Vds. anche: M.C. BONACCORSI DI PATTI-R. CONTESTABILE - M.L. DI SALVO, *Metodologie biochimiche*, Zanichelli, Bologna, 2019², pagg. 209 ss.

Il *quenching statico* è governato dall'equazione:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_a[Q] \quad [12]$$

(del tutto analoga a quella che regola il quenching collisionale), nella quale la costante statica K_a ha il medesimo valore della costante di formazione del complesso.

effetto matrice

Si verifica con alcuni campioni di siero o di urina contenenti sostanze per se stesse fluorescenti: queste possono generare un rumore di fondo (*background*), cioè un segnale variabile che può interferire nelle analisi.

photobleaching

In generale, il processo della fluorescenza è ciclico, ad eccezione dei casi nei quali il fluoroforo viene distrutto, cioè alterato irreversibilmente nello stato eccitato: è questo il fenomeno di *photobleaching*.

UN PO' DI CHIMICA (meglio: CHIMICA-FISICA)

Come si è già detto, la fluorescenza è “un fenomeno di emissione di energia nel passaggio da uno stato eccitato (raggiunto per assorbimento di energia radiante) a quello fondamentale”⁽⁸⁰⁾.

Benché normalmente l'energia elettromagnetica assorbita da una molecola venga riemessa sotto forma di energia termica (calore) attraverso processi di collisione, le particolari molecole dette *fluorescenti* emettono solo una parte dell'energia elettromagnetica incidente (soprattutto se di intensità elevata, come accade ad es. per le radiazioni UV) tramite collisioni, e tornano allo stato fondamentale emettendo energia elettromagnetica (sia pure di intensità minore rispetto alla radiazione incidente). Per descrivere la fluorescenza, si può vantaggiosamente ricorrere allo studio dei possibili stati energetici di una molecola.

Com'è noto, in condizioni normali una molecola si trova nel cosiddetto *stato di singoletto* (o *stato fondamentale*); se gli elettroni si trovano in due orbitali diversi, la molecola è nello stato di *tripletto*.

Lo stato di singoletto viene così denominato perché è l'unico possibile per due elettroni che occupino lo stesso orbitale; essi avranno necessariamente *spin* opposto e la notazione adottata è: $\uparrow\downarrow$.

Lo stato di tripletto, invece, ammette tre stati possibili; ciò si verifica se due elettroni si trovano su orbitali diversi; l'orientamento degli spin potrà, dunque, essere: $\downarrow\downarrow$ oppure: $\uparrow\uparrow$ o anche: $\uparrow\downarrow$.

Si può correttamente affermare che “gli stati di singoletto o di tripletto sono indicativi della *molteplicità* della molecola”⁽⁸¹⁾, avendo lo stato di tripletto *molteplicità* = 3.

La formula della molteplicità è: $M=2S + 1$; pertanto, nello stato di singoletto, avendo i due elettroni di valenza spin antiparalleli (di valore +1/2 e -1/2), si avrà: $S= +1/2 - 1/2 = 0$ per cui $M=1$.

L'assorbimento di una certa quantità di radiazione elettromagnetica (di varia lunghezza d'onda) provoca una *transizione elettronica*, cioè il passaggio (che avviene in $\approx 10^{-15}$ s) dallo stato elettronico fondamentale S_0 a uno dei livelli vibrazionali degli stati elettronici eccitati (S_1, S_2, \dots), mantenendo la medesima molteplicità.

Se nella transizione viene coinvolto uno dei sottolivelli S_1 o S_2 , le molecole interessate tenderanno (per mezzo di un processo di *rilassamento vibrazionale* nel quale l'energia in eccesso - prodotta dalle collisioni con le molecole del solvente -

(80) - A. BURLINA, *cit.*, pag. 177.

(81) - A. BURLINA, *ibidem*.

viene dissipata sotto forma di calore⁽⁸²⁾ a portarsi al livello energetico più basso del rispettivo stato eccitato. Una volta raggiunto il sottolivello S_2 più basso, la molecola si porta (con la stessa rapidità e attraverso un processo di conversione in energia vibrazionale che poi viene rilasciata sotto forma di calore) allo stato elettronico S_1 . Questi processi di rilassamento vibrazionale e di conversione interna avvengono in $\approx 10^{-12}$ s, a differenza del processo di conversione interna dal primo stato eccitato a quello fondamentale che invece avviene più lentamente: ciò motiva la competitività dei meccanismi di dissipazione dell'energia interna a mezzo di fotoni, che causano la fluorescenza che si instaura in $\approx 10^{-9} \div 10^{-6}$ s.

correlazione tra spettro di eccitazione e spettro di emissione

L'esperienza dimostra che molte sostanze presentano una stretta correlazione tra lo spettro di eccitazione e quello di emissione: ciò si spiega facilmente per il fatto che, in queste numerose molecole, i vari sottolivelli dello stato eccitato S_1 si trovano a distanze energetiche simili a quelle dei sottolivelli dello stato fondamentale S_0 .

Lo spettro di emissione, dunque, generato dai vari "salti energetici" verso i sottolivelli S_0 , si presenta come immagine speculare dello spettro di eccitazione che, come è noto, è originato dalle transizioni verso i sottolivelli dello stato eccitato S_1 .

In alcuni casi, poi, la transizione $0' \rightarrow 0$ genera una "banda comune" (o "di sovrapposizione": *overlap*) in corrispondenza della maggiore $\lambda_{\text{eccitazione}}$ e della minore $\lambda_{\text{emissione}}$ (vds.: fig. 16).

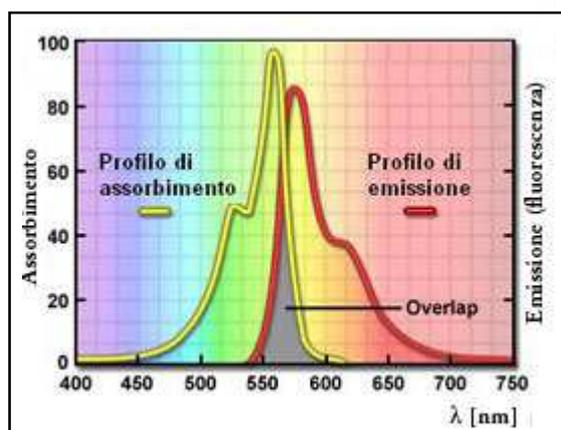


Fig. 16: Spettri di eccitazione e di emissione con overlap.

Un esempio di questo tipo può essere riscontrato con la molecola dell'Antracene, nella quale la $\lambda_{\text{eccitazione}}$ caratteristica della fluorescenza è di 365 nm, la $\lambda_{\text{emissione}}$ è di 400 nm e la transizione $0' \rightarrow 0$ avviene nella banda 365-400 nm.

(82) - Si presti attenzione a non confondere *energia termica* con *calore*: quest'ultimo, infatti, è semplicemente una modalità di trasferimento di energia cinetica molecolare tra due corpi che si trovano a differenti temperature.

struttura delle molecole organiche fluorescenti

In generale, la fluorescenza si manifesta in molecole con struttura contenente un anello aromatico o un sistema di doppi legami coniugati, rammentando però che i gruppi sostituenti possono modificare significativamente la fluorescenza: ne sono un esempio i gruppi donatori di elettroni, i quali delocalizzano gli elettroni π aumentando la fluorescenza, a differenza dei gruppi accettori di elettroni che la diminuiscono ⁽⁸³⁾. In base a quanto sopra esposto, è intuibile che le molecole aromatiche policicliche (e i loro derivati) sono più fluorescenti del Benzene, rispetto al quale possiedono un maggior numero di elettroni π .

Più complesso è il discorso per i composti eterociclici: la Piridina, ad esempio, non è fluorescente, a differenza della 3-idrossipiridina; quest'ultima deve la sua fluorescenza alla presenza del gruppo -OH che, com'è noto, è donatore di elettroni. In definitiva, le molecole eterocicliche presentano (o no) fluorescenza a seconda degli eventuali sostituenti.

Ad esempio,

- i gruppi: -OH, -OCH₃, -OC₂H₅, -COOH, -CH₂-COOH, -NH₂, -NHR, -NR₂, -CN accrescono l'intensità della fluorescenza;
- i gruppi: -SH, -F, -Cl, -BR, -I, -CO, -CHO la diminuiscono.

Particolarmente attivi nel diminuire l'intensità della fluorescenza sono i gruppi: -N(CH₃), -NO₂, -NO.

Azione indifferente sembra doversi riconoscere al gruppo -SO₃H.

influenza del pH sulla fluorescenza

Poiché il pH è indice della ionizzazione di una molecola, è facilmente intuibile il suo influsso sulla fluorescenza qualora si consideri che alcune molecole presentano il fenomeno solo se si trovano allo stato ionizzato mentre altre lo presentano esclusivamente se si trovano allo stato non-ionizzato. Un esempio può essere reperito nel comportamento del Fenolo che allo stato non-ionizzato è fluorescente, mentre non lo è quando si trova allo stato ionizzato.

(83) - Cfr.: A. BURLINA, *cit.*, pag. 180.

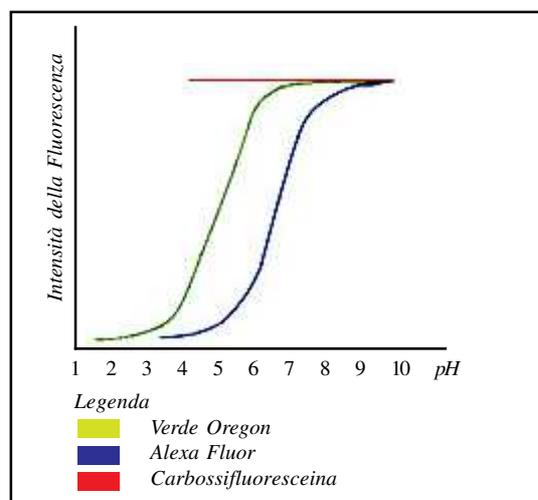


Fig. 17: Esempi di dipendenza dell' emissione fluorescente dal pH.

influenza della planarità e della rigidità della struttura molecolare sulla fluorescenza

Il fenomeno della fluorescenza aumenta in base alla “rigidità” della struttura molecolare e alla sua “planarità”. Ad esempio, il Tetracene (conosciuto anche come 2,3-Benzantracene, $[C_{18}H_{12}]$) ha una resa quantica di 0,60 contro lo 0,11 del Benzene $[C_6H_6]$: ciò è dovuto proprio alla rigidità della molecola tetracenica costituita da 4 anelli aromatici, mentre il Benzene ha un solo anello aromatico.

Altro esempio di particolare interesse è la Fluoresceina, nota molecola fluorescente, nei confronti della Fenolftaleina che non è fluorescente: il diverso comportamento è dovuto alla presenza di un *ponte Ossigeno* tra due anelli benzenici (vds.: fig. 18).

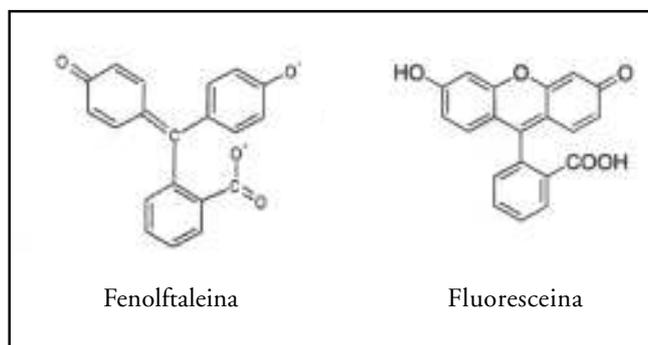


Fig. 18: Confronto tra le strutture molecolari della Fenolftaleina e della Fluoresceina.

È interessante notare che alcune molecole di interesse biochimico che non presentano fluorescenza vengono fatte reagire con opportune sostanze ottenendo in tal modo

prodotti fluorescenti: alcuni steroidi, ad esempio, vengono “resi fluorescenti” per disidratazione con H_2SO_4 .

In altre circostanze, invece, la sostanza non fluorescente viene fatta reagire con un *fluorocromo* opportuno (es. Fluoresceina, Rodamina, ecc.), rendendola in tal modo fluorescente. Questa reazione viene definita *derivatizzazione*.

Nell’analisi biochimica (microscopica o fluorimetrica), ad esempio, gli amminoacidi vengono trattati (cioè derivatizzati) con Ortoftaldialdeide (OPA); gli anticorpi, invece, vengono generalmente trattati con isotiocianato di Fluoresceina (FITC): quest’ultima reagisce con i gruppi amminici liberi delle proteine.

La persistenza dell’emissione fluorescente ha un andamento che è funzione del tempo: può avere, dunque, un andamento costante o presentare un rapido decadimento (vds.: fig. 19).

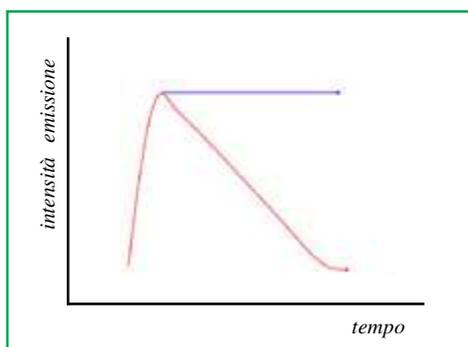


Fig. 19: Andamento dell’emissione fluorescente;
in blu: andamento costante
in rosso: rapido decadimento.

L’intensità di emissione fluorescente è una funzione della cinetica di reazione: da ciò discende che una emissione fotonica costante ha luogo solo qualora la reazione proceda a velocità costante, cioè nel caso di una cinetica di ordine zero.

L’emissione fluorescente, una volta raggiunto il massimo, decade - generalmente - con andamento esponenziale (se ne è già parlato in questi Appunti, alle pagg.48-49).

La seguente tabella 1 ⁽⁸⁴⁾ mostra alcuni esempi di fluorescenza.

Classi di composti	$\lambda_{\text{eccitazione}}$ nm	$\lambda_{\text{emissione}}$ nm	tipo di fluorescenza	
			naturale	con derivatizzazione
Ammine				
Catecolamine	285	325	X	X
Triptamina	285	360	X	X
Purine	285	370	X	X
Coenzimi (ADP, ATP)	272	390	X	X
Amminoacidi				
Fenilalanina	260	282	X	X
Triptofano	287	348	X	X
Tirosina	275	303	X	X
Vitamine				
A	327	510	X	
B ₂	370	455-520	X	X
B ₆	340	400	X	X
B ₁₂	275	305	X	X
C	-	-		X
E	295	340	X	X
Steroidi				
β -Estradiolo	285	330	X	
Colesterolo	-	-		X

Tab. 1: fluorescenza di alcuni composti di interesse biologico.

Ovviamente, sostanze che emettono fluorescenza esclusivamente per derivatizzazione (es.: il Colesterolo) hanno una $\lambda_{\text{eccitazione}}$ e una $\lambda_{\text{emissione}}$ dipendenti dalla sostanza usata come derivatizzante.

Ometto, perché troppo specialistico per gli interessi di queste pagine, i metodi analitici che si basano esclusivamente sulla fluorimetria, sia con metodi immunometrici sia con l'uso della fluorescenza polarizzata: chi fosse interessato, potrà trovare notizie dettagliate, ad esempio, nel prezioso testo di Angelo Burlina, più volte citato, oppure potrà fare ricorso alla bibliografia.

(84) - tratta da: A. BURLINA, *cit.*, pag. 202, modificata.

FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*)

Si tratta di una particolare interazione fra gli stati eccitati di due molecole di fluoroforo consistente in un accoppiamento diretto tra l'emissione da parte di un fluoroforo (denominato *donatore*) e l'eccitazione di un secondo fluoroforo (denominato *accettore*) senza che, peraltro, avvenga l'emissione di fotoni.

Ovviamente, perché ciò possa avvenire occorre che lo spettro di assorbimento dell'accettore sia in buona parte sovrapponibile allo spettro di emissione del donatore. L'area dello spettro in cui avviene la sovrapposizione è denominata *FRET Spectral Overlap Integral* $J(\lambda)$ (Vds: fig. 20)

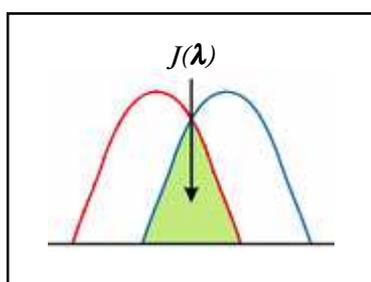


Fig.20: Grafico della FRET.

Attenzione: non si confonda la FRET (dovuta all'interazione tra due fluorofori) con l'*overlap* generato (in alcuni casi) dalla transizione $0' \rightarrow 0$ in un unico fluoroforo (vds. pag. 51 di questo lavoro)!

La distanza a cui, nella FRET, il trasferimento di energia disattiva il 50% dei donatori eccitati (cioè, l'efficienza è del 50%) è denominata *Raggio di Förster* ed è definita dalla formula:

$$R_0 = [8,8 \times 10^{23} k^2 n^4 QY_D J(\lambda)]^{\frac{1}{6}} \text{ \AA} \quad [10]$$

ove:

R_0 = Raggio di Förster

k = fattore di orientamento dei dipoli di transizione (perché avvenga la FRET occorre che i dipoli abbiano orientamento parallelo).

n = indice di rifrazione

QY_D = guadagno quantico del donatore (in assenza dell'accettore)

$J(\lambda)$ = *Spectral Overlap Integral* = $J(\lambda) = \int f_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda$, ove $f_D(\lambda)$ è la funzione dello spettro normalizzato di emissione del donatore e $\epsilon_A(\lambda)$ è il coefficiente di estinzione dell'accettore.

\AA = unità di misura (1 Ångstrom = 10^{-10} m = 0,1 nm), non più usata nel SI, ma ancora in voga in astrofisica.

Dalla [10] si evince facilmente che la FRET, dipendendo dall'inverso della sesta potenza della *separazione intermolecolare*, è particolarmente evidente quando la distanza donatore-accettore è dell'ordine di $10\div 100 \text{ \AA}$.

In fig. 21 è riportato, a mo' d'esempio, un grafico illustrativo della FRET.

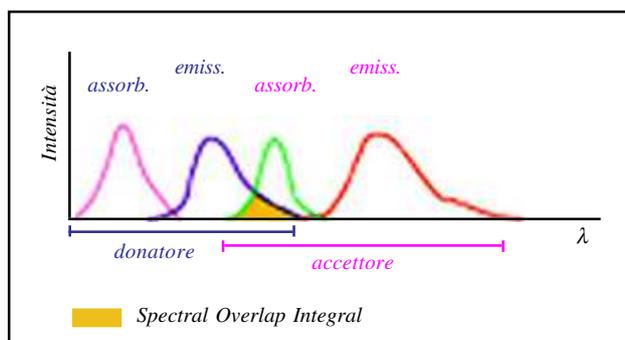


Fig. 21: FRET Spectral Overlap Integral.

La FRET, come è facilmente intuibile, viene usata per studiare processi biologici che avvengono a distanze dell'ordine delle dimensioni delle molecole biologiche, come, ad esempio, le interazioni recettore/ligando, ma trova anche un intenso utilizzo nella determinazione della struttura delle proteine e degli acidi nucleici (soprattutto nel sequenziamento del DNA), nel trasporto e nella distribuzione dei lipidi, nello studio delle membrane, ecc.

Quando donatore e accettore sono costituiti da due fluorocromi diversi, la FRET può essere rivelata dalla graduale scomparsa della fluorescenza del donatore concomitante con la comparsa della fluorescenza dell'accettore: è il caso, ad esempio, della coppia Fluoresceina-Tetrametilrodamina, la FRET della quale ha un Raggio di Förster (R_0) = 55 \AA ; in questa coppia la Fluoresceina funge da donatore.

Quando, invece, donatore e accettore sono costituiti dallo stesso fluorocromo, la FRET viene rilevata dalla depolarizzazione della fluorescenza: è il caso, ad esempio, della coppia Fluoresceina-Fluoresceina, nella quale il Raggio di Förster (R_0) = 44 \AA .

Si faccia attenzione a non confondere la FRET con il *quenching* (vds. pagg. 48-49 di questi "Appunti"): per comodità del lettore, nella tabella 2 sono riportate le principali differenze tra i due fenomeni, rammentando comunque che il *quenching* è causato da processi di collisione o di complessazione del fluorocromo con il solvente (o con un soluto).

<i>QUENCHING</i>	<i>FRET</i>
<ul style="list-style-type: none"> - fenomeno <i>statico</i> - avviene a breve distanza intermolecolare - Raggio di Förster: $(R_0) < 20 \text{ \AA}$ - fortemente dipendente dalla temperatura - comporta un'alterazione dello spettro d'assorbimento del fluorocromo - è dipendente da e^{-R} 	<ul style="list-style-type: none"> - fenomeno <i>dinamico</i> - avviene a grande distanza intermolecolare - Raggio di Förster: $40 < (R_0) < 100 \text{ \AA}$ - indipendente dalla temperatura - non comporta alcuna alterazione dello spettro d'assorbimento del fluorocromo - è dipendente da $\frac{1}{R^6}$

tab. 2.

Ulteriori notizie sulla microscopia FRET possono essere reperite, ad esempio, sul sito:
<http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/fluorescence/fret/fretintro.html>
 oppure:

[http://www.zeiss.com/C1256F8500454979/0/387D4EEC96D646FEC1256F8D0055BFC8/\\$file/bt401zeiss.pdf](http://www.zeiss.com/C1256F8500454979/0/387D4EEC96D646FEC1256F8D0055BFC8/$file/bt401zeiss.pdf)

alcuni esempi di fluorocromi

Alexa Fluor®			
numero	colore di emiss.	λ assorb. nm	λ emiss. nm
350	blu	346	442
405	violetto	401	421
430	verde	434	541
488	ciano-verde	495	519
500	verde	502	525
514	verde	517	542
532	verde	532	554
546	giallo	556	573
555	giallo-verde	555	565
568	arancio	578	603
594	arancio-rosso	590	617
610	rosso	612	628
633	rosso	632	647
647	rosso	650	665
660	rosso	663	690
680	rosso	679	702
700	rosso	702	723
750	rosso	749	775

Tab. 3.

FluoProbes			
numero	colore di emiss.	λ assorb. nm	λ emiss. nm
390	violetto	390	479
488	verde	493	519
532	giallo	532	553
547H	arancio	557	574
594	rosso	601	627
647H	rosso lontano	653	674
682	rosso lontano	690	709
752	IR prossimo	748	772
782	IR prossimo	783	800

Tab. 4.

DyLight			
numero	colore di emiss.	λ assorb. nm	λ emiss. nm
350	violetto	353	432
405	violetto	400	420
488	verde	493	518
549	giallo	562	576
594	arancio	593	618
633	rosso	638	658
649	rosso	654	673
680	rosso lontano	692	712
750	IR-prossimo	752	778
800	IR-prossimo	777	794

Tab. 5.

Cianine			
nome	colore di emiss.	λ assorb. nm	λ emiss. nm
Cy3	verde	550	570
Cy5	arancio-rosso	649	650-670

Tab.6.

Fluoresceina			
nome	colore di emiss.	λ assorb. nm	λ emiss. nm
Fluoresc.	giallo-verde	494	521
FITC	verde	490-495	525

Tab.7.

Rodamina			
nome	colore di emiss.	λ assorb. nm	λ emiss. nm
Rod. B	arancio-rosso	542	625
Rod. 6G	arancio-rosso	526	555
Rod.123	arancio-rosso	511	534
TRITC	arancio-rosso	557	576

Tab. 8.

CHIMICA DELLA FLUORESCENZA

TABELLA ⁽⁸⁵⁾ DELLE LUNGHEZZE D'ONDA DI ECCITAZIONE E DI EMISSIONE DI VARI FLUOROCROMI		
FLUOROCROMO	λ eccitazione	λ emissione
3-Hydroxypyrene 5,8,10-Tri Sulfonic acid	403	513
5-Hydroxy Tryptamine	380-415	520-530
5-Hydroxy Tryptamine (5-HT)	400	530
Acid Fuchsin	540	630
Acridine Orange (bound to DNA)	502	526
Acridine Red	455-600	560-680
Acridine Yellow	470	550
Acriflavin	436	520
AFA (Acriflavin Feulgen SITSA)	355-425	460
Alizarin Complexon	530-560	580
Alizarin Red	530-560	580
Allophycocyanin	650	661
ACMA	430	474
Aminoactinomycin D	555	655
Aminocoumarin	350	445
Anthroyl Stearate	361-381	446
Astrazon Brilliant Red 4G	500	585
Astrazon Orange R	470	540
Astrazon Red 6B	520	595
Astrazon Yellow 7 GLL	450	480
Atabrine	436	490
Auramine	460	550
Aurophosphine	450-490	515
Aurophosphine G	450	580
BAO 9 (Bisaminophenylloxadiazole)	365	395
BCECF	505	530
Berberine Sulphate	430	550
Bisbenzamide	360	600-610
BOBO 1	462	481
Blancophor FFG Solution	390	470
Blancophor SV	370	435
Bodipy Fl	503	512
BOPRO 1	462	481
Brilliant Sulphoflavin FF	430	520
Calcien Blue	370	435
Calcium Green	505	532
Calcofluor RW Solution	370	440
Calcofluor White	440	500-520
Calcophor White ABT Solution	380	475
Calcophor White Standard Solution	365	435
Cascade Blue	400	425
Catecholamine	410	470
Chinacrine	450-490	515
Coriphosphine O	460	575
Coumarin-Phalloidin	387	470
CY3.1 8	554	568
CY5.1 8	649	666
CY7	710	805

(85) - I dati qui tabellati sono stati reperiti presso <http://dbc.bio.uci.edu/OBCresources/fluorophores.pdf>

CHIMICA DELLA FLUORESCENZA

FLUOROCROMO	λ eccitazione	λ emissione
Dans (1-Dimethyl Amino Naphaline 5 Sulphonic Acid)	340	525
Dansa (Diamino Naphtyl Sulphonic Acid)	340-380	430
Dansyl NH-CH ₃ in water	340	578
DAPI	350	470
Diamino Phenyl Oxydiazole (DAO)	280	460
Dimethylamino-5-Sulphonic acid	310-370	520
Diphenyl Brilliant Flavine 7GFF	430	520
Dopamine	340	490-520
Eosin	525	545
Erythrosin ITC	530	558
Ethidium Bromide	510	595
Euchrysin	430	540
FIF (Formaldehyde Induced Fluorescence)	405	435
Flazo Orange	375-530	612
Fluorescein Isothiocyanate (FITC)	490	525
Fluo 3	485	503
Fura-2	340-380	512
Genacryl Brilliant Red B	520	590
Genacryl Brilliant Yellow 10GF	430	485
Genacryl Pink 3G	470	583
Genacryl Yellow 5GF	430	475
Gloxalic Acid	405	460
Granular Blue	355	425
Haematoporphyrin	530-560	580
Hoechst 33258 (bound to DNA)	346	460
Indo-1	350	405-482
Intrawhite Cf Liquid	360	430
Leucophor PAF	370	430
Leucophor SF	380	465
Leucophor WS	395	465
Lissamine Rhodamine B200 (RD200)	575	595
Lucifer Yellow CH	425	528
Lucifer Yellow VS	430	535
Magdala Red	524	600
Maxilon Brilliant Flavin 10 GFF	450	495
Maxilon Brilliant Flavin 8 GFF	460	495
MPS (Methyl Green Pyronine Stilbene)	364	395
Mithramycin	450	570
NBD Amine	450	530
Nile Red	515-530	525-605
Nitrobenzoxadidole	460-470	510-650
Noradrenaline	340	490-520
Nuclear Fast Red	289-530	580
Nuclear Yellow	365	495
Nylosan Brilliant Flavin E8G	460	510

CHIMICA DELLA FLUORESCENZA

FLUOROCROMO	λ eccitazione	λ emissione
Pararosaniline (Feulgen)	570	625
Phorwite AR Solution	360	430
Phorwite BKL	370	430
Phorwite Rev	380	430
Phorwite RPA	375	430
Phosphine 3R	465	565
Phycoerythrin R	480-565	578
Pontochrome Blue Black	535-553	605
Primuline	410	550
Procion Yellow	470	600
Propidium Iodide	536	617
Pyronine	410	540
Pyronine B	540-590	560-650
Pyrozal Brilliant Flavin 7GF	365	495
Quinacrine Mustard	423	503
Rhodamine 123	511	534
Rhodamine 5 GLD	470	565
Rhodamine 6G	526	555
Rhodamine B	540	625
Rhodamine B 200	523-557	595
Rhodamine B Extra	550	605
Rhodamine BB	540	580
Rhodamine BG	540	572
Rhodamine WT	530	555
Rose Bengal	540	550-600
Serotonin	365	520-540
Sevron Brilliant Red 2B	520	595
Sevron Brilliant Red 4G	500	583
Sevron Brilliant Red B	530	590
Sevron Orange	440	530
Sevron Yellow L	430	490
SITS (Primuline)	395-425	450
SITS (Stilbene Isothiosulphonic acid)	365	460
Stilbene	335	440
Snarf 1	563	639
Sulpho Rhodamine B Can C	520	595
Sulpho Rhodamine G Extra	470	570
Tetracycline	390	560
TRITC (Tetramethyl Rhodamine Isothiocyanate)	557	576
Texas Red	596	615
Thiazine Red R	510	580
Thioflavin S	430	550
Thioflavin TCN	350	460
Thioflavin 5	430	550
Thiolyte	370-385	477-484
Thiozol Orange	453	480
Tinopol CBS	390	430
TOTO 1	514	533
TOTO 3	642	661
True Blue	365	420-430

CHIMICA DELLA FLUORESCENZA

FLUOROCROMO	λ eccitazione	λ emissione
Ultralite	656	678
Uranine B	420	520
Uvitex SFC	365	435
Xylene Orange	546	580
XRITC	582	601
YO PRO 1	491	509

Tab. 9

Ulteriori informazioni sui fluorocromi possono essere reperite presso vari siti, tra cui:

<http://www.semrock.com/Catalog/Fluorophores.aspx?SetBasePartID=60>

http://www.biocompare.com/documents/fluor_wavelengths.pdf

<http://www.microscopyu.com/articles/fluorescence/filtercubes/filterindex.html>

MICROSCOPIA IN RADIAZIONE ULTRAVIOLETTA

Dalla formula $A.N. = n \sin \alpha$ (ove n è l'indice di rifrazione del mezzo interposto tra obiettivo e campione e α è il semiangolo dell'apertura angolare) si nota che il potere di risoluzione d di un obiettivo (detto anche "potere separatore") è dipendente dalla sua apertura numerica $A.N.$ (oltre che dall'indice di rifrazione del mezzo, che è $n=1$ per l'aria, $n=1,333$ per l'acqua distillata e $n=1,515$ per l'olio da immersione naturale o sintetico); in pratica, poiché l'apertura angolare massima praticamente utilizzabile è di $134^\circ 10'$ e il semiangolo dell'apertura angolare massima è, dunque, di $71^\circ 48'$, conoscendo $\sin 71^\circ 48' = 0,948$ è facile calcolare che l' $A.N.$ massima per un sistema "a secco" è $1 \times \sin 71^\circ 48' = 0,948$ [=0,95], mentre per un sistema a immersione omogenea in olio è $1,515 \times \sin 71^\circ 48' = 1,4365$ [=1,40]. Qualora l'immersione avvenisse in acqua distillata (con $n=1,333$) (obiettivi indicati con "W", invece che con "Oil" o "HI"), l' $A.N.$ massima sarebbe $1,333 \times \sin 71^\circ 48' = 1,26$.

Si ricordi che qui viene considerato solo l'indice di rifrazione *assoluto*, riferito cioè al rapporto tra la velocità del "raggio di luce" nel vuoto e la velocità quando esso attraversa un qualsiasi altro mezzo! Tale velocità è dipendente anche dalla temperatura del mezzo attraversato: n qui indicato è riferito alla temperatura di 20°C ; esemplificando, si consideri l'indice di rifrazione n dell'acqua distillata a 20°C : la radiazione elettromagnetica (*id est*: "luce"; argomento del quale si è già precedentemente discusso, ad esempio a pag. 15 dei presenti Appunti) nell'acqua distillata "viaggia" alla velocità di $2,25 \times 10^8$ m/s; la sua velocità nel vuoto, invece, è di $3,0 \times 10^8$ m/s .

[per la precisione, V_{luce} nel vuoto = 299792458 m/s; nell'acqua = 225407863 m/s]. Allora, passando ai calcoli:

$$n = \frac{c \text{ (vacuum)}}{v \text{ (water)}} = \left(\frac{3,0 \times 10^8 \text{ m/s}}{2,25 \times 10^8 \text{ m/s}} \right) = 1,33333$$

Bisogna, poi, ricordare che il potere di risoluzione d dipende non solo da n e dall' $A.N.$, ma anche dalla lunghezza d'onda della radiazione utilizzata, secondo la formula.

$$\frac{\lambda}{A.N.} \leq d \leq \frac{\lambda}{2 A.N.}$$

Per un obiettivo apocromatico con $A.N. = 1,40$, dunque, il massimo potere risolutivo d ottenibile con una radiazione elettromagnetica di $\lambda = 546$ nm (verde) oscilla tra $0,39 \mu\text{m}$ e $0,195 \mu\text{m}$ (secondo che si usi $A.N.$ o $2 A.N.$); con $\lambda = 436$ nm (blu) oscilla tra $0,311 \mu\text{m}$ e $0,156 \mu\text{m}$, con $\lambda = 390$ nm (violetto) oscilla tra $0,279 \mu\text{m}$ e $0,139 \mu\text{m}$.

Per aumentare il potere risolutivo d è necessario, dunque, utilizzare radiazione elettromagnetica di $\lambda < 390$ nm (violetto), ricorrere cioè alla radiazione ultravioletta. Infatti, tornando al nostro precedente esempio (obiettivo apocromatico con $A.N. = 1,40$), mentre il massimo potere risolutivo d ottenibile utilizzando la radiazione con $\lambda = 390$ nm (violetto) è $0,139 \mu\text{m}$, se si utilizza la radiazione UV con $\lambda < 355$ nm (UVA) il massimo potere risolutivo d raggiungibile scende a $0,127 \mu\text{m}$; se poi ci si spinge all'UVB, ad esempio a UV con $\lambda < 315$ nm, si può raggiungere un potere risolutivo $d = 0,113 \mu\text{m}$ o addirittura a $d = 0,054 \mu\text{m}$ ricorrendo all'UVC con $\lambda < 150$ nm.

Ritengo utile ricordare che, nella formula relativa al calcolo del potere risolutivo riportata nella pagina precedente, il valore $2A.N.$ viene usato esclusivamente come *limite massimo* raggiungibile da ottiche di altissima precisione: anche tra gli obiettivi planapocromatici di Case differenti possono esserci piccole variazioni nell'indicazione dell'A.N. e, di conseguenza, del potere risolutivo effettivo. Si ricordi, inoltre, che nell'osservazione concorre anche il contrasto dell'immagine: un' $A.N.$ elevata, se accompagnata da un insufficiente contrasto, rende meno di un' $A.N.$ un pochino inferiore ma con un contrasto adeguato!

Inoltre, le varie Case costruttrici spesso hanno progettato ottiche particolarmente indicate per osservazioni in campi diversi: si spiega in tal modo la scelta delle ottiche di questa o quella Casa, secondo l'uso prevalente che se ne fa (ad es.: istologia, citologia, citogenetica, ecc.); non ci si meravigli, dunque, se magnifiche (e costosissime!) ottiche progettate e realizzate da Case diverse (sia pur blasonate) mostrano - a parità di schema ottico - immagini più o meno "morbide" o "incise".

L'uso di radiazione elettromagnetica di corta λ genera vari problemi: ad esempio, l'UV (nelle sue tre sottodivisioni) danneggia i tessuti viventi e in particolare gli occhi dell'osservatore; inoltre, al giorno d'oggi il microscopio elettronico (sia quello a trasmissione [TEM], sia quello a scansione [SEM]) ha sostituito completamente il microscopio ottico nel raggiungere ingrandimenti e risoluzione di gran lunga superiori. La microscopia in radiazione ultravioletta, dunque, non persegue lo scopo di risolvere i minuti particolari ricorrendo a radiazione di λ corta o cortissima, ma sfrutta il principio in base al quale, illuminando con radiazione di λ appropriata (generalmente < 470 nm [blu o violetta] o addirittura < 390 nm [UV]) un preparato - naturalmente, o reso artificialmente, fluorescente - è possibile osservare l'immagine prodotta dalla radiazione da esso emessa nella banda ottica visibile: ciò permette di differenziare le varie strutture.

A tal proposito, la microscopia in fluorescenza può spingersi fino al rilevamento (NON all'osservazione diretta!) di singole molecole, come si vedrà appresso.

LA FLUORESCENZA AL MICROSCOPIO OTTICO

METODI DI OSSERVAZIONE DELLA FLUORESCENZA AL MICROSCOPIO OTTICO

La fluorescenza generata (spontaneamente o tramite opportuni fluorocromi) da cellule o da organelli cellulari può essere osservata al microscopio ottico; le molecole possono venire eccitate sia in diasopia, sia in episcopia⁽⁸⁶⁾.

fluorescenza in diasopia ad eccitazione assiale

È necessario ricorrere a una sorgente luminosa di grande potenza. Tra questa sorgente e il condensatore vanno interposti uno o più *filtri di eccitazione*, possibilmente a banda stretta in modo da trasmettere esclusivamente (o quasi) la radiazione della lunghezza d'onda necessaria all'eccitazione della sostanza (o del fluoroforo).

Ovviamente, qualora fosse necessario operare in banda UV, occorrerà una lampada adatta (a vapori di Mercurio, allo Xeno, alogena o ad arco elettrico⁽⁸⁷⁾)

Dal punto di vista delle ottiche, va ricordato che il comune vetro ottico trasmette male (o addirittura per niente) la radiazione UV. Pertanto, occorrerà utilizzare condensatori costruiti con lenti in quarzo o comunque in vetro UV-permeabile.

Qualora, invece, si utilizzi la radiazione elettromagnetica di lunghezza d'onda compresa tra i 450-495 nm e i 495-570 nm (corrispondenti rispettivamente alla denominazione, imprecisa⁽⁸⁸⁾ ma sovente adottata, di *luce blu* e *luce verde*) - come avviene in molte

(86) - In merito, vds., ad es., l'ottima sintesi di G. P. SINI, *Problemi tecnici...*, cit., pagg. 425-426.

(87) - A tal proposito, ricordo che le "famosse" ed ancor oggi utilzzatissime HBO® (prodotte dalla OSRAM) sono lampade ad arco corto che brucia in atmosfera di Mercurio ad alta pressione. Emettono una radiazione, nella banda degli ultravioletti e del visibile, dotata di uno spettro a più linee. Necessitano, come del resto tutte le lampade a scarica, di un particolare tipo di alimentatore (chiamato: *reattore*, quando è costituito da induttori avvolti su materiale ferromagnetico; *ballast* quando è costituito da circuiti elettronici) perché, per innescare l'arco, è necessaria una alta tensione e bassa intensità di corrente, mentre, una volta a regime, la tensione scenderà (nel giro di pochi secondi) ai valori nominali di esercizio e l'intensità di corrente sarà regolata di conseguenza. Diversamente dalle altre lampade a scarica in gas (ad esempio, quelle allo xeno), le lampade a vapori metallici dopo l'accensione richiedono un certo tempo di avviamento (solitamente 2-15 minuti) perché le sostanze di riempimento evaporino completamente e si possa raggiungere il massimo livello di rendimento luminoso. Mi sia consentito un *richiamo sulla sicurezza*: in ragione della loro elevata luminanza, della radiazione ultravioletta e dell'elevata pressione interna, le lampade HBO® devono essere fatte funzionare solo in apparecchi chiusi e appositamente a ciò predisposti: in caso di rottura, avviene una proiezione di schegge (dovuta all'alta pressione interna) e si libera Mercurio per cui è necessario adottare particolari precauzioni soprattutto nella sostituzione di tali lampade. Documentazione in merito alle lampade HBO® può essere richiesta alla OSRAM (www.osram.com).

(88) - Vds.: G. P. SINI, *Anche i pignoli, nel loro piccolo, s'inca...*, pag. 2, <https://www.funsci.it/indice-sini.html> (A 21).

applicazioni biomediche -, andrà benissimo un normale condensatore, purché di grande apertura numerica (meglio se aplanatico e ad immersione in olio).

Qualora si utilizzi una radiazione di $\lambda < 365$ nm, anche i portaoggetti dovranno essere costruiti in vetro UV-permeabile, per evitare attenuazione (o addirittura soppressione) del fascio di eccitazione.

Non si creda, però, che bastino le lenti dei normali obiettivi ed oculari a sopprimere totalmente la radiazione UV e, poiché questa è dannosissima per l'occhio (può provocare cheratiti e addirittura epitelomi), è indispensabile inserire, tra obiettivo ed oculare, un adatto *filtro soppressore*.

Inoltre, poiché la radiazione eccitatrice (sia ottica, sia UV) molto difficilmente è "pura", è necessario che nel percorso ottico, prima dell'oculare, vengano posti anche uno o più *filtri di sbarramento* che trasmettano esclusivamente la lunghezza d'onda della fluorescenza che si vuole esaminare, eliminando le frequenze spurie.

fluorescenza in diascope ad eccitazione radente

Alcuni costruttori, per limitare la trasmissione della radiazione eccitatrice, in luogo di costosissimi filtri di sbarramento monocromatori utilizzano un condensatore a campo oscuro (ad immersione in olio e realizzato con vetri opportuni) in modo da evitare che la radiazione incidente possa penetrare nell'obiettivo ed eventualmente giungere all'oculare⁽⁸⁹⁾.

Lo svantaggio di tale tecnica è la drastica riduzione della quantità di radiazione totale che raggiunge il preparato, ma il vantaggio di una forte luminosità del campione stesso (caratteristica dell'osservazione in campo oscuro) e di un accentuato contrasto anche con deboli fluorescenze rende questa metodica particolarmente utile in microbiologia e in immunologia, quando, cioè, il campione è costituito da oggetti molto piccoli, al limite della risoluzione ottica (che, come si ricorderà, per la radiazione visibile è di circa 0,2 μm).

fluorescenza in diascope ad eccitazione mista: assiale e radente

Consiste nell'uso contemporaneo di radiazione UV e visibile (eventualmente, opportunamente filtrata). Con questo metodo, l'oggetto viene visualizzato contemporaneamente nelle sue strutture non fluorescenti (come avviene nell'osservazione in campo oscuro) e nelle sue parti "marcate" (o, eventualmente, autofluorescenti), come avviene per l'esame in fluorescenza pura⁽⁹⁰⁾.

(89) - Vds.: G. P. SINI, *Problemi tecnici ...*, cit., pag. 425.

(90) - Vds.: P. CASTANO, *Microscopia Ottica e Fotomicrografia*, Tamburini Editore, Milano, 1975, pagg. 100-101.

microscopia in contrasto di fase / fluorescenza

Questa metodica, con la quale è possibile esaminare contemporaneamente sia le parti fluorescenti del preparato, sia le sue parti incolori, fu introdotta da HASELMANN e WITTEKIND⁽⁹¹⁾ nel 1957 e risulta particolarmente utile in immunologia.

Il condensatore usato è, nelle sue linee essenziali, un condensatore per contrasto di fase secondo ZERNIKE, costituito - però -, in luogo dei diaframmi anulari, da filtri di eccitazione (trasparenti per il solo UV) dotati di anelli circolari trasparenti alla radiazione ottica (calcolati, ovviamente, per l'uso con i rispettivi obiettivi Ph). Tale dispositivo consente di osservare la risultante della sovrapposizione di due immagini: quella a contrasto di fase (positivo o negativo, a seconda delle Case costruttrici) e quella di fluorescenza.

fluorescenza in episcopia

Per questa metodica occorre servirsi di un microscopio dotato di illuminazione episcopica (dal greco: **επι** [epì] = sopra e **σκοπεω** [scopèò] = guardare, osservare), cioè “da sopra”: si tratta di un dispositivo nel quale l'illuminazione non proviene dal basso e non attraversa il preparato (come avviene nella diascopea, dal greco **δια** [dià] = attraverso), ma proviene da un'apposita sorgente che invia il suo fascio illuminante, tramite uno specchio semi-riflettente (*splitter*) posto nella testa del microscopio, direttamente alla lente posteriore dell'obiettivo. Quest'ultimo, fungendo da vero e proprio condensatore, focalizza il fascio illuminante sul preparato e ne riceve quello riflesso che poi, con percorso inverso, invia (tramite lo specchio semiriflettente di cui sopra) agli oculari⁽⁹²⁾.

Nell'illuminazione episcopica per fluorescenza lo specchio semiriflettente non è “neutro”, bensì *dicromatico* cioè è trattato in modo da riflettere verso l'obiettivo la radiazione di eccitazione e da riflettere verso gli oculari la radiazione di fluorescenza; la radiazione di eccitazione eventualmente non assorbita ma riflessa dal preparato giunge, anch'essa, allo specchio semiriflettente e da questo viene convogliata nuovamente verso la sorgente, alleggerendo in tal modo il compito del filtro di sbarramento posto al di sopra dello *splitter*. Si noti che ho usato il termine “specchio” proprio per le caratteristiche di riflessione del dispositivo: altri Autori⁽⁹³⁾ preferiscono (in modo certamente più corretto) il termine “superficie semiriflettente”.

È opportuno rammentare che, poiché l'obiettivo svolge anche il compito di condensatore, è indispensabile usare sistemi ottici dotati di grande apertura numerica;

(91) - H. HASELMANN - D. WITTEKIND, *Phasenkontrast-Fluoreszenz-Mikroskopie*, Z. WISS. MIKROSKOP., vol. 63, 1957, pagg. 216 ss.

(92) - Per maggiori dettagli, vds.: G. P. SINI, *Problemi...*, cit., pag. 405, ss.

(93) - Ad es.: G. P. SINI, *ibidem*, pag. 405.

inoltre, poiché l'oggetto fluorescente diffonde la radiazione di fluorescenza sotto un grandissimo angolo solido, la luminosità dell'immagine in fluorescenza è direttamente proporzionale al quadrato dell'apertura dell'obiettivo sia per la parte illuminante, sia per la parte che attiene alla formazione dell'immagine: in definitiva, la luminosità dell'immagine in fluorescenza è direttamente proporzionale alla quarta potenza dell'apertura numerica dell'obiettivo⁽⁹⁴⁾.

Da quanto sopra esposto, si evince immediatamente che, per obiettivi a piccolo ingrandimento (e, dunque, in generale a piccola Apertura Numerica), la fluorescenza in episcopia è meno efficiente di quella in diascopeia, metodica nella quale il condensatore può avere la massima A.N. indipendentemente dall'obiettivo.

D'altronde, l'illuminazione in episcopia è insostituibile per l'esame di preparati spessi o non trasparenti.

scelta delle ottiche

Il normale vetro ottico è praticamente opaco alle onde con $\lambda < 360$ nm.

In diascopeia, pertanto, sarà necessario, qualora si voglia usare l'UV, dotarsi (oltre che dell'apposito illuminatore) di condensatore e vetrini portaoggetti permeabili all'UV e, dunque, realizzati con quarzo o con fluorite (attenzione: quest'ultima può dare fenomeni di autofluorescenza).

Qualora, invece, si utilizzi la fluorescenza con radiazione di eccitazione di λ 450-495 nm o anche di λ 495-570 nm (meno usata), sarà sufficiente un normale sistema microscopico per diascopeia, purché dotato di sorgente luminosa monocromatica di alta intensità e di filtri di sbarramento anteposti agli oculari.

Il condensatore - meglio se ad immersione - dovrà avere grande apertura numerica, (vds. quanto già descritto alle pagg. 68 e 69 del presente lavoro).

In episcopia, invece, qualora si opti per l'UV occorrerà - oltre a uno strumento attrezzato per illuminazione episcopica munito di apposita sorgente UV e dei relativi filtri di eccitazione, dicromatico e di sbarramento - utilizzare obiettivi di grande apertura e realizzati con ottiche in quarzo o alla fluorite; per gli obiettivi ad immersione, alcuni Autori suggeriscono di usare glicerina con ottiche al quarzo, ritenendo che gli oli da immersione, a seguito di prolungata esposizione all'aria e/o alla radiazione UV, acquisiscano una certa autofluorescenza⁽⁹⁵⁾. Inoltre, sarà necessario utilizzare vetrini coprioggetto trasparenti all'UV.

(94) - Tratto da: G. P. SINI, *Problemi...*, cit., pag. 425.

(95) - Vds., ad es.: P. CASTANO, *cit.*, pag. 100.

Alcuni obiettivi apocromatici sono affetti da autofluorescenza: meglio, dunque, utilizzare dei semplici acromatici, anche in considerazione che il *range* cromatico pertinente a un'immagine fluorescente è notevolmente limitato. Sono sconsigliate le ottiche con correzione planare, perché il maggiore numero di lenti attenua la radiazione fluorescente.

Per quanto attiene agli oculari, sono consigliati quelli di debole potenza e di schema ottico più semplice, al fine di ottenere la massima luminosità e l'interposizione del minor numero di lenti nel percorso ottico.

Analogo discorso vale per eventuali dispositivi variatori d'ingrandimento: se proprio necessari, vanno utilizzati con il fattore d'ingrandimento minimo.

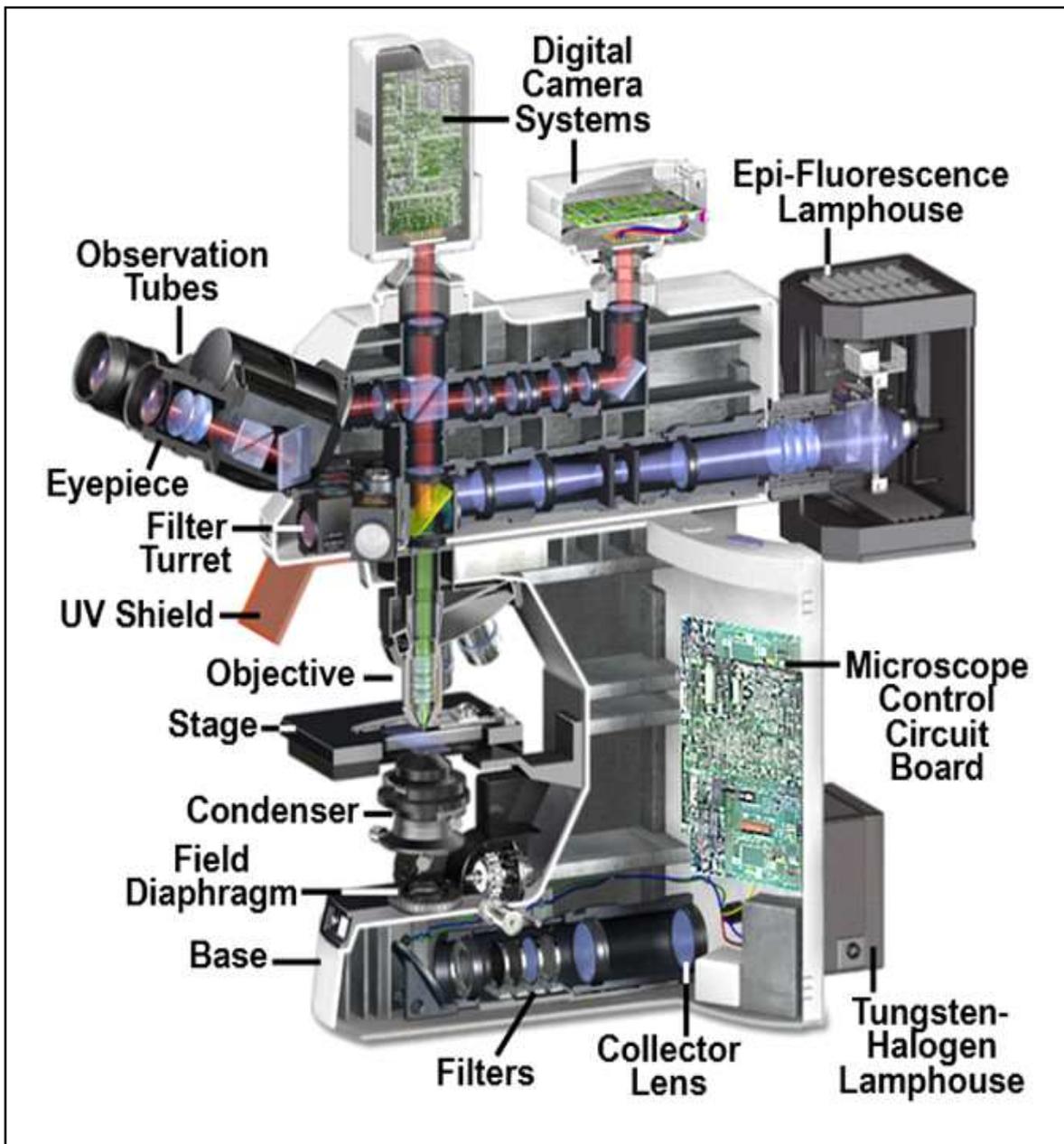
Le principali Case costruttrici forniscono **obiettivi, condensatori ed epiilluminatori** espressamente realizzati per la fluorescenza.

Per quanto riguarda i **filtri** (di eccitazione, di sbarramento, dicroici, ecc.), rinvio ai seguenti siti:

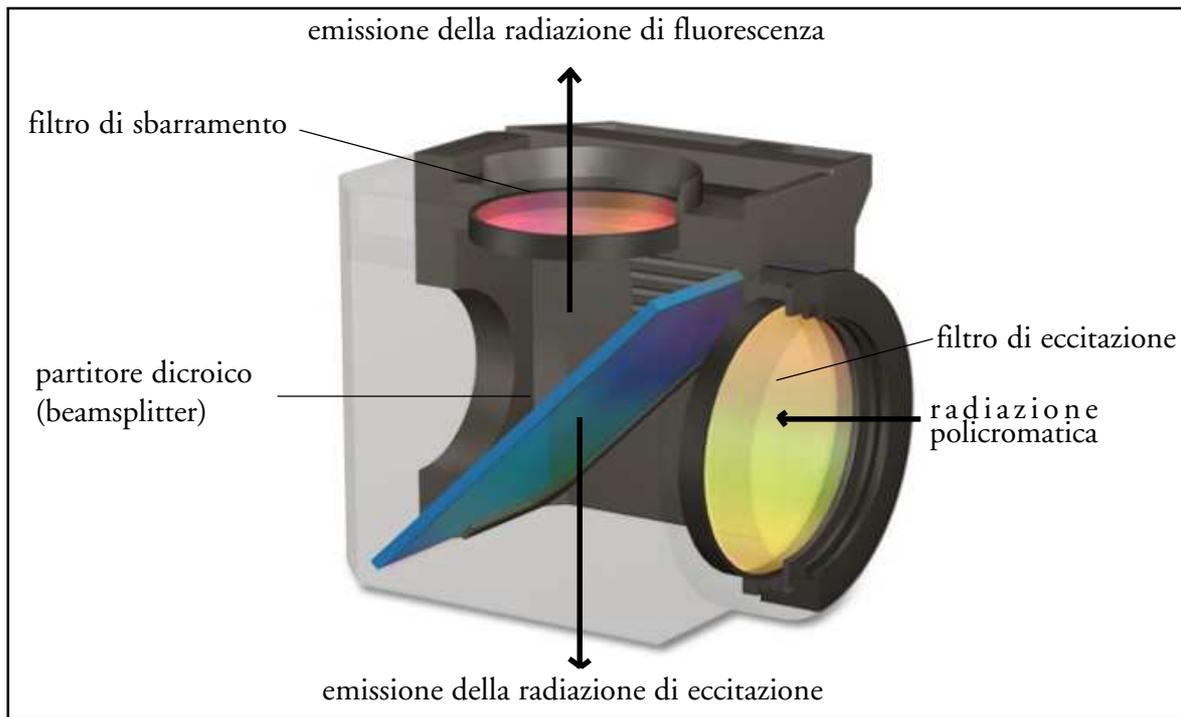
- <http://www.microscopyu.com/articles/fluorescence/filtercubes/red/cy5hyq/cy5hyqindex.html>
- <http://nelsonlab.stanford.edu/lab/axioplan.html>
- https://www.micro-shop.zeiss.com/us/us_en/spektral-info.php
- <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/probes/fpintroduction.html>
- [http://www.zeiss.com/C1256D18002CC306/0/C88EFA2F7A80041FC1256F2F00352AB9/\\$file/46-0007_e.pdf](http://www.zeiss.com/C1256D18002CC306/0/C88EFA2F7A80041FC1256F2F00352AB9/$file/46-0007_e.pdf)
- <http://www.olympusmicro.com/primer/java/fluorescence/matchingfilters/index.html>
- <http://www.olympusfluoview.com/theory/interferencefilters.html>
- <http://www.aic-imagecentral.com/products/pdfs/hdbk4.pdf>

Si consideri, ad ogni modo, che - se non si hanno particolari esigenze - come filtri di eccitazione possono essere vantaggiosamente usati i comuni UG1, BG3, BG12, BG38, ecc. ("a banda larga"), mentre come filtri di sbarramento possono essere impiegati i comuni filtri in vetro (o anche in gellina) "a banda larga" (Kodak, Schott, ecc.): ovviamente, la resa non è quella ottenibile con i ben più costosi filtri "a banda stretta"...

Ulteriori approfondimenti potranno essere reperiti, ad esempio, nell'articolo di Giovanni Pietro SINI, *La Fluorescenza e le sue applicazioni*, <https://www.funsci.it/files/o11-fluor.html>



Schema (tratto da: <https://www.microscopyu.com/techniques/fluorescence/introduction-to-fluorescence-microscopy>) di un moderno microscopio per epi-fluorescenza.



Schema di un "filter cube" alloggiato nell'illuminatore verticale per epi-fluorescenza.

La radiazione di eccitazione (policromatica) - prodotta da un'adeguata lampada (in genere a vapori di Mercurio ad alta pressione e ad arco corto) entra nel cubo attraverso il filtro di eccitazione (il quale permette il passaggio solo alla radiazione di lunghezza d'onda prescelta, ad es.: UV), incontra il partitore dicroico e viene riflessa con un angolo di 45° verso l'obiettivo; quest'ultimo funge anche da condensatore (situazione notevolmente vantaggiosa in quanto condensatore e obiettivo sono perfettamente allineati e hanno la medesima apertura numerica), trasmettendo la radiazione eccitante al campione da osservare. Il campione emette a sua volta la radiazione fluorescente che torna (attraverso l'obiettivo) al partitore dicroico; quest'ultimo ne permette il transito verso gli oculari, riflettendo peraltro a 90° verso il filtro di eccitazione (e la lampada generatrice della radiazione policromatica di eccitazione) la eventuale radiazione di eccitazione residua - che accompagna la radiazione di fluorescenza - (affinché non interferisca con la radiazione di fluorescenza e non colpisca gli occhi dell'osservatore).

Per ulteriori informazioni, si veda il sito <https://www.microscopyu.com/techniques/fluorescence/introduction-to-fluorescence-microscopy> dal quale è stata tratta l'immagine sopra riportata (le indicazioni didascaliche sono state composte da me).

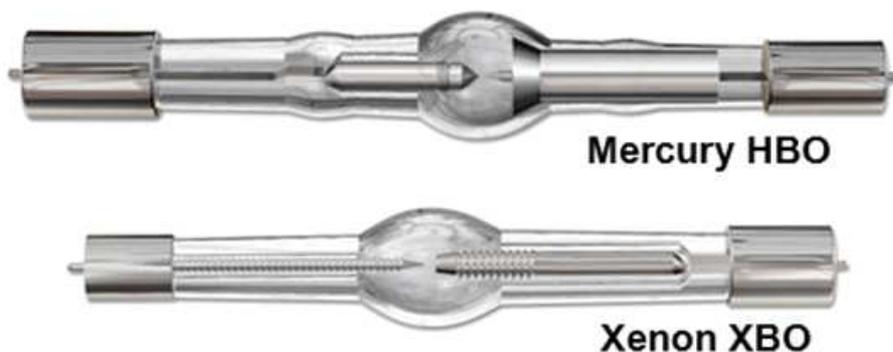
Per quanto riguarda gli illuminatori, le lampade (meglio: i bruciatori) più comunemente usate sono quelle a vapori di Mercurio ad alta pressione e ad arco corto (con potenze comprese tra 50 e 200 Watt) e quelle allo Xeno (con potenze comprese tra 75 e 150 Watt); è opportuno precisare che i bruciatori a Mercurio non forniscono un'intensità uniforme attraverso lo spettro dall'ultravioletto all'infrarosso e che gran parte dell'intensità della radiazione viene emessa nel vicino ultravioletto. Picchi di emissione particolarmente intensi si verificano alle lunghezze d'onda di 313, 334, 365, 406, 435, 546 e 578 nanometri; ad altre lunghezze d'onda nella banda visibile l'intensità di emissione è costante, sebbene di intensità, minore ma comunque sufficiente per la maggior parte delle applicazioni.

Va ricordato che le lampade ad arco perdono gradualmente efficienza e che hanno una vita limitata (in genere 200-300 ore, normalmente conteggiate e indicate su apposito display dal circuito elettronico dell'alimentatore che le gestisce).

Le lampade ad arco sono generalmente alimentate in corrente continua tramite opportuni circuiti esterni che forniscono adeguata potenza per accendere il bruciatore attraverso la ionizzazione del vapore gassoso e per mantenerlo acceso riducendo al minimo lo sfarfallio tipico dell'arco.

Queste lampade necessitano di un certo lasso di tempo (in genere 10-15 minuti) per raggiungere la corretta temperatura di esercizio: in questo tempo è opportuno impedire alla radiazione di eccitazione di raggiungere il preparato, inserendo - nel percorso ottico che precede il partitore dicroico - il filtro opaco appositamente previsto.

Altra considerazione importante è che, nel valutare l'efficienza dell'illuminazione, il parametro principale non è la semplice potenza della lampada: il parametro critico è la *luminanza media* che dipende sia dalla luminosità della sorgente, sia dalla geometria dell'arco generato e sia dalla diffusione angolare dell'emissione.



Qui sopra sono mostrate due tipiche lampade a vapori di Mercurio e di Xeno. Va peraltro ricordato che attualmente diodi LED di potenza e di emissione ad adeguate lunghezze d'onda (compreso l'UV) stanno gradualmente sostituendo le lampade ad arco sia per il minor consumo energetico, sia per la notevolmente maggiore durata (mediamente superiore alle 5.000 ore) e sia per la pericolosità praticamente nulla.

Alcune caratteristiche delle lampade per fluorescenza

Lampada	Corrente (Ampere)	Flusso Luminoso (Lumen)	Densità media di illuminazione (cd/mm ²)	dimensioni arco (HxW) mm
Mercury Arc (100 Watt)	5	2200	1700	0.25 x 0.25
Xenon Arc (75 Watt)	5,4	850	400	0.25 x 0.50
Xenon Arc (500 Watt)	30	9000	3500	0.30 x 0.30
Tungsten Halogen	8	2800	45	4.2 x 2.3

Per valutare i vincoli che si incontrano sia nell'osservazione visiva sia nella produzione di immagini digitali, è opportuno effettuare una stima dei flussi luminosi.

Ad esempio, si può utilizzare una tipica lampada ad arco di Mercurio da 100 Watt, la cui densità media è di 1700 candele (cd) per mm² [si ricordi che nel SI il flusso luminoso si misura in lumen (lm) che è definito come il flusso di luce prodotto da una sorgente che emetta l'intensità luminosa di una *candela* su un angolo solido di uno *steradiano* (lm = cd × sr)]. Se l'emissione della lampada attraversa un filtro interferenziale da 490 nm, caratterizzato da larghezza di banda di 10 nm e trasmissione del 75%, la radiazione emergente avrà una potenza di circa 2 milliWatt. Dopo essere stata riflessa da un partitore dietrico di efficienza pari al 90%, la radiazione che entra nell'obiettivo ha un flusso luminoso di potenza pari a circa 1,8 mW.

Se viene utilizzato un obiettivo 100× con A.N. 1,4, l'area del campione illuminata è di 12x10⁻⁶ cm², assumendo un campo visivo del diametro di circa 40 μm; il *flusso luminoso incidente* sul campione è di circa 150 W/cm², corrispondente a una densità di flusso di 3,6x10²⁰ fotoni/cm². Da ciò risulta che l'intensità di illuminazione del campione è circa 1000 volte quella incidente sulla superficie terrestre in una giornata di sole.

L'emissione di fluorescenza, com'è noto, dipende dalle caratteristiche di assorbimento e di emissione del fluoroforo, dalla sua concentrazione nel campione nonché dalla lunghezza del percorso ottico del campione, come indicato dall'equazione:

$$F = \sigma \times Q \times I \quad [11]$$

nella quale σ è la sezione trasversale di assorbimento molecolare, Q è la resa quantica e I è il flusso luminoso incidente.

Se, ad esempio, viene usato come fluoroforo la Fluoresceina, la sezione trasversale di assorbimento $\sigma = 3 \times 10^{-16} \text{ cm}^2$ per molecola, $Q = 0,99$ ed F assume il valore di 100.000 fotoni al secondo per ogni molecola.

Supponendo una concentrazione del fluoroforo di 1 micromole/litro, distribuita uniformemente in un disco del diametro di $40 \mu\text{m}$ e dello spessore di $10 \mu\text{m}$ (pari a un volume di 12 picolitri), nel percorso ottico ci sono $1,2 \times 10^{-17}$ moli o 7,2 milioni di molecole) di fluoroforo.

Qualora tutte le molecole fossero eccitate simultaneamente, la fluorescenza avrebbe un tasso di emissione di $7,2 \times 10^{11}$ fotoni/secondo.

È necessario, a questo punto, calcolare quanti fotoni emessi verrebbero rilevati e per quanto tempo potrebbe durare questo tasso di emissione.

Poiché l'efficienza di rilevamento è funzione dell'*efficienza di raccolta ottica* e dell'*efficienza quantica* del rivelatore, supponendo di avere un obiettivo con A.N. 1,4 e con trasmissione (ideale) del 100%, la massima efficienza di raccolta ottica verrebbe comunque limitata per circa il 30% dall'angolo di accettazione dell'obiettivo. Supponendo di usare un partitore dicroico con efficienza dell'85% e un filtro di sbarramento con efficienza dell'80%, l'*efficienza di raccolta complessiva* risulta essere circa il 20% (cioè 140 miliardi di fotoni/secondo).

Se il rivelatore è un CCD (*Coupled Charge Device* = dispositivo ad accoppiamento di carica) con efficienza quantica del 50% (il minimo consentito per un buon CCD nella banda visibile) per l'emissione della Fluoresceina (525 nm, colore verde), il segnale rilevato sarebbe costituito da 70 miliardi di fotoni al secondo, cioè circa il 10% del segnale emesso in fluorescenza.

Per quanto riguarda la durata dell'emissione della fluorescenza, per la fluoresceina in soluzione salina ossigenata è stato misurato un tasso di emissione di circa 36.000 fotoni per molecola, prima che questa venga distrutta per *photobleaching*, mentre se la soluzione salina è priva di ossigeno il *photobleaching* risulta essere circa 10 volte minore.

In tali condizioni, la fluorescenza verrebbe emessa solamente per 0,3 - 3 secondi prima della distruzione per *photobleaching* e - nel caso del rilevamento del 10% del flusso fotonico - si avrebbe un segnale di $7,2 \times 10^{10}$ elettroni/secondo.

Supponendo di utilizzare un CCD da 1000×1000 pixel quadrati della dimensione di $9 \mu\text{m}$, questo segnale verrebbe distribuito su 1.000.000 di sensori, con ~ 72.000 elettroni per ciascun sensore. Poiché tale CCD ha una "capacità di memorizzazione completa" (*Full Well Capacity*) di ~ 80.000 elettroni/pixel e un "rumore di lettura" (*Readout Noise*) < 10 elettroni/pixel, il *rapporto segnale-rumore* (determinato dal "rumore statistico" dei fotoni) [uguale alla radice quadrata del segnale] avrebbe il valore di ~ 268 . Tale elevato livello di segnale potrebbe avere una durata brevissima, prima che si verifichi il *photobleaching*.

Negli ultimi anni, poi, in microscopia ottica si è registrato un notevole aumento di applicazioni con luce Laser, in particolare si è accresciuto l'uso di Laser a ioni di Argon e di Argon-Kripton.

Come si ricorderà, **LASER** è l'acronimo dell'inglese *light amplification by stimulated emission of radiation* (in italiano: "amplificazione della luce mediante emissione stimolata della radiazione"); si tratta di un dispositivo optoelettronico in grado di emettere un "fascio di luce" coerente.

Il termine Laser si riferisce sia al dispositivo sia al fenomeno fisico dell'amplificazione per emissione stimolata di un'onda elettromagnetica.

Vale la pena ricordare che il termine *coerenza* si riferisce a due diverse proprietà:

- *coerenza temporale*, cioè le onde conservano - nel tempo - la stessa fase: questa proprietà è correlata alla proprietà dei laser di emettere "fasci di radiazione" in un intervallo spettrale molto ristretto, dunque monocromatici;

- *coerenza spaziale*, cioè la differenza di fase fra punti distinti in una sezione trasversa del fascio è costante e correlata alla possibilità di ottenere "fasci di radiazione" paralleli e collimati.

I Laser sono diventati essenziali nella *microscopia confocale a scansione* che rende le immagini di fluorescenza molto nitide attraverso la rimozione dal piano focale del campione della radiazione non focalizzata.

I microscopi confocali scandiscono punti o linee del campione, ricostruendo poi - attraverso un computer - le sezioni ottiche nell'immagine finale visualizzata sul monitor.

rilevamento di singole molecole

Spesso, operando in condizioni ideali (fondo ottico basso e rumore del rivelatore sufficientemente basso), è possibile rilevare l'emissione di fluorescenza di una singola molecola.

Come dimostrato e discusso nelle pagine precedenti, poichè una singola molecola di Fluoresceina potrebbe emettere fino a 300.000 fotoni prima di subire il *photobleaching* e la conseguente distruzione, supponendo ragionevolmente - come si è visto - un'efficienza di raccolta e rilevamento del 20%, verrebbero rilevati ~60.000 fotoni. Vari ricercatori, utilizzando *fetodiodi a valanga* o *rivelatori CCD moltiplicatori di elettroni* (vedasi, ad esempio: F. STRAFELLA, *Rivelatori di radiazione*, reperibile al sito: http://www.dmf.unisalento.it/~straf/allow_listing/pub/did/Fondamenti_Fisica_Cosmica/Lezioni_parte_II.pdf) sono riusciti a monitorare - per molti secondi e talvolta alcuni minuti - il comportamento di singole molecole.

Uno dei problemi da superare, oltre alla soppressione del rumore ottico di fondo (di cui si è già parlato) è che molti materiali utilizzati nella costruzione di lenti e/o di filtri presentano un certo livello di *autofluorescenza*; il problema (peraltro parzialmente bypassato con innovative tecniche di costruzione) è stato risolto adottando, per la microscopia in fluorescenza, tecniche che utilizzano la *riflessione interna totale* (TIR, *Total Internal Reflection*) che combinano un fondo basso e un flusso luminoso ad alta eccitazione.

La microscopia in fluorescenza a riflessione interna totale (TIRFM, *Total Internal Reflection Fluorescence Microscope*), è un metodo con il quale è possibile osservare una regione di un campione solitamente con una profondità di penetrazione dell'*onda evanescente* (dipendente dall'angolo TIRF utilizzato e dalla lunghezza d'onda di eccitazione) generalmente compreso tra 30 e 300 nm (tipicamente 200 nm).

L'*onda evanescente* si produce quando la radiazione elettromagnetica viene totalmente riflessa all'interno dell'interfaccia tra due mezzi aventi indici di rifrazione dissimili.

In questa tecnica viene solitamente usato un "raggio" LASER espanso, diretto - attraverso un prisma ad alto indice di rifrazione (ad es.: vetro o zaffiro) - contro un mezzo (vetro o soluzione acquosa) con indice di rifrazione inferiore. Il "raggio" Laser, se incide sul prisma con un angolo superiore all'*angolo critico*, viene riflesso totalmente all'interno dell'interfaccia.

L'intensità dell'onda evanescente è sufficientemente elevata da eccitare i fluorofori al suo interno ma, essendo la sua profondità ridotta, il volume di campione eccitato è molto piccolo: ciò causa uno "sfondo" di livello estremamente basso.

La TIRFM può essere realizzata anche con una modifica dell'apparato di epilluminazione utilizzato nelle tecniche a campo largo, adoperando però obiettivi dotati di grande A.N., comunque uguale o superiore a 1,4: molte Case produttrici offrono obiettivi con ingrandimento 60× o 100× e A.N. di 1,45 e di 1,49 (qualcuna dichiara anche 1,60).

Con la metodica episcopica, per raggiungere l'angolo di illuminazione idoneo a produrre la riflessione interna totale è necessario un mezzo di immersione della lente frontale dotato di elevato indice di rifrazione n e il campione deve essere ricoperto con un vetrino coprioggetto; i raggi luminosi che fuoriescono dalla lente frontale dell'obiettivo con un angolo inferiore all'angolo critico vengono deviati lontano dal microscopio.

Altre tecniche molto usate come la FRET (*Förster Resonance Energy Transfer*, talvolta denominata EET *Electronic Energy Transfer*), la FRAP (*Fluorescence Recovery after Photobleaching*) e la spettroscopia vengono spesso abbinate alla TIRF per ottenere informazioni aggiuntive: si tratta di metodologie molto promettenti, tuttora in fase di sviluppo.

UN BREVISSIMO EXCURSUS STORICO

Il fenomeno della fluorescenza fu osservato da David BREWSTER nel 1833; il termine fluorescenza fu proposto, nel 1852, da George Gabriel STOKES in quale, nel 1843, aveva dimostrato che la luminescenza del fluoruro di Calcio era, in realtà, una fluorescenza.

STOKES utilizzò, come *sorgente di eccitazione*, la radiazione solare “filtrata” attraverso una soluzione - di colore blu - di $\text{Cu}(\text{OH})_2$ in NH_4OH e “focalizzata” sul campione da esaminare; la radiazione emessa dal campione, dopo aver attraversato un “filtro di sbarramento” - di colore giallo - (costituito da una soluzione di $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ in H_2O) veniva osservata ad occhio nudo.

Sembra, comunque, che lo spettro UV della radiazione elettromagnetica fosse stato notato già, nel 1801, da Johan William RITTER il quale utilizzò questa radiazione, invisibile all’occhio umano, per annerire sali di cloruro di Argento.

Tra coloro che ampliarono gli studi sulla fluorescenza, non si possono dimenticare: Eugen Cornelius Joseph VON LOMMEL il quale, nel 1875, rilevò che la sostanza doveva assorbire la luce prima di riemetterla come fluorescenza; Alexandre Edmond BECQUEREL (padre del più noto Antoine Henri BECQUEREL, accidentale scopritore della radioattività proprio mentre studiava la fosforescenza dei sali di Uranio: studi che poi approfondì - per saggiare la natura della radioattività - anche sotto la spinta dell’amico Henri POINCARÉ) il quale investigava i fenomeni della fluorescenza e della fosforescenza e inventò uno strumento in grado di misurare con accuratezza i tempi di decadimento della fosforescenza una volta spenta la fonte eccitatrice; Eilhard WIEDEMANN il quale studiò la fluorescenza del Sodio e del Potassio nei gas.

Nel 1903, Robert Williams WOOD⁽⁹⁶⁾ mostrò come isolare la banda della radiazione UV compresa tra 300 e 400 nm tramite un filtro (composto da BaSiO_3 [silicato di Bario] e NiO [ossido di Nichel] al 9%) che assorbe la radiazione ottica e trasmette l’UV.

Sempre nel 1903, August KÖHLER e Moritz VON ROHR costruirono (presso la Ditta Carl ZEISS di Jena) un microscopio che operava con sorgente luminosa a UV e che consentiva lo studio dei tessuti fluorescenti: in realtà si trattava di un microscopio ad assorbimento di UV e fu l’antesignano del microscopio a fluorescenza, anticipando anche l’utilizzazione dei fluorocromi, tecnica che - peraltro - fu introdotta da REICHERT, HEIMSTÄDT e PROWAZEC. In particolare Carl REICHERT, fondatore della famosa omonima Ditta di Vienna (poi fusa con American Optical), costruì, insieme con O. HEIMSTÄDT, il primo microscopio commerciale a fluorescenza che aprì la strada degli studi sulla fluorescenza delle molecole e delle sostanze vegetali.

(96) - R.W. WOOD, *The n-Rays*, *NATURE*, n. 70, 1904, pagg. 530-531.

KÖHLER utilizzò un *obiettivo a quarzo monocromatico ultravioletto*, sviluppato precedentemente dal collega VON ROHR.

Gli studi sulla fluorescenza nel campo della biologia animale tardarono ad essere intrapresi perché le cellule e i tessuti animali hanno una *fluorescenza primaria* assai debole.

Nel 1933 Max HAITINGER, autore nel 1931 di uno studio sulla luminosità del microscopio a fluorescenza⁽⁹⁷⁾, introdusse l'uso della *fluorescenza secondaria* nello studio dei preparati biologici, utilizzando sostanze (i fluorocromi) in grado di suscitare fluorescenza anche a concentrazioni bassissime (nell'ordine di 10⁻⁶ %) e, pertanto, non in grado di danneggiare il preparato: tale caratteristica permise, in seguito, il trattamento *in vivo* dell'animale da esperimento con un fluorocromo e il successivo prelievo tissutale "mirato".

Nel 1937 BARNARD e WELCH⁽⁹⁸⁾ usarono uno speciale condensatore a campo oscuro, progettato da SMILES nel 1933, per studiare alcuni componenti fluorescenti nelle cellule batteriche.

Nel 1940, peraltro, ELLINGER⁽⁹⁹⁾ ritenne che il sistema di illuminazione in campo oscuro fosse obsoleto, data la limitata energia della radiazione eccitatrice, e suggerì la tecnica dell'*epiilluminazione*.

COONS e KAPLAN⁽¹⁰⁰⁾, nel 1950, introdussero la tecnica degli *anticorpi marcati* e si diffuse sempre più l'applicazione dei coloranti fluorescenti come traccianti nelle tecniche istochimiche.

ARMSTRONG⁽¹⁰¹⁾, nel 1956, sfruttando l'affinità dell'Arancio di Acridina (e, in generale, dei composti aminici di Acridina) per gli acidi nucleici, mise a punto una tecnica per l'identificazione di DNA e di RNA nelle cellule dei mammiferi; tale tecnica ha permesso ad ANDERSON, ARMSTRONG e NIVEN⁽¹⁰²⁾, nel 1959, di condurre alcuni studi sulla citopatologia indotta da virus.

La microscopia in fluorescenza indotta con Auramina ha, poi, preso piede come tecnica di routine nella diagnostica della tubercolosi, sostituendosi alla classica colorazione di ZIEHL-NEELSEN per l'identificazione del *Mycobacterium Tuberculosis* nell'espettorato, negli strisci ottenuti da escreti biologici vari e anche nelle sezioni

(97) - M. HAITINGER, *Ein lichtstarkes Fluoreszenzmikroskop*, *MIKROCHEMIE*, vol. 9, n.1, Springer, Wien, 1931, pagg. 430-440.

(98) - J. E. BARNARD - F. K. WELCH, *Fluorescence microscopy with high powers*, *J. ROY. MICR. SOC.*, n. 56, 1936, pagg. 361 ss.

(99) - P. ELLINGER, *Fluorescence microscopy in biology*, *BIOL. REV.*, vol. 15, 1940, pagg. 323-350.

(100) - A. H. COONS - M. H. KAPLAN, *Localization of antigen in tissue cells*, *J. EXP. MED.*, n. 91, 1950, pagg. 1 ss.

(101) - J. A. ARMSTRONG, *Histochemical differentiation of nucleic acids by means of induced fluorescence*, *EXP. CELL RES.*, n.11, 1956, pagg. 640 ss.

(102) - E. S. ANDERSON - J. A. ARMSTRONG, - J. S. F. NIVEN, *Observation of virus growth with aminoacridines*, 9th Symposium of the Society for General Microbiology, Cambridge (University Press), 1959.

istologiche. Tale tecnica, introdotta, nel 1953 da D. M. McCLURE⁽¹⁰³⁾, fu sviluppata, nel 1957, da KELLER.

Infine, le tecniche di microscopia in fluorescenza (introdotte da H.P. FRIEDMANN Jr. nel 1950⁽¹⁰⁴⁾) furono adottate per la citologia esfoliativa e per la citodiagnostica da L. VON BERTALANFFY, F. MASIN e M. MASIN⁽¹⁰⁵⁾ negli anni 1956-1958 e si stanno sempre più affermando anche nella diagnostica oncologica.

Non va dimenticato Johan Sebastiaan PLOEM il quale, intorno al 1962, iniziò a lavorare - in collaborazione con SCHOTT - allo sviluppo di divisori di fascio dicroici per la riflessione della luce blu e verde per la microscopia in fluorescenza utilizzando l'epi-illuminazione. Al momento della sua prima pubblicazione⁽¹⁰⁶⁾ sulla microscopia in fluorescenza utilizzando l'epiilluminazione con luce blu e verde a banda stretta, non era a conoscenza dello sviluppo di un divisore di fascio dicroico per l'eccitazione UV con luce incidente da parte di BRUMBERG e KRYLOVA⁽¹⁰⁷⁾, a causa dell'inaccessibilità della ricerca che si svolgeva in Russia e nella Germania dell'Est in quel tempo.

La possibilità di introdurre l'epi-illuminazione con luce UV, sebbene utile per diverse applicazioni, non era stata motivo di un nuovo sviluppo tecnologico in LEITZ, poiché questa Casa disponeva già di un'eccellente eccitazione UV trasmessa in campo oscuro. Successivamente Leitz sviluppò un nuovo epi-illuminatore a fluorescenza multi-lunghezza d'onda (Leitz PLOEMOPAK) con quattro *beamsplitter* dicroici rotanti rispettivamente per la luce UV, viola, blu e verde. Nelle generazioni successive di illuminatori Leitz (contenenti tre o quattro beamsplitter dicroici) sono stati aggiunti filtri barriera e una torretta rotante per i filtri di eccitazione.

(103) - D. M. McCLURE, *The Development of Fluorescence Microscopy for Tubercle Bacilli and its use as an adjunct to Histological Routine*, *J. CLIN. PATH.*, vol. 6, 1953, pagg. 273-281.

(104) - H.P. FRIEDMANN Jr., *The use of ultraviolet light and fluorescent dyes in the detection of uterine cancer by vaginal smear*, *AM. J. OBSTET. GYNECOL.*, n. 59, 1950, pagg. 852-859.

(105) - L. VON BERTALANFFY - F. MASIN - M. MASIN, *Use of acridine orange fluorescence technique in exfoliative cytology*, *SCIENCE*, n. 124, 1956, pagg. 1024-1025;

L. VON BERTALANFFY - F. MASIN - M. MASIN, *A new and rapid method for diagnosis of vaginal and cervical cancer by fluorescence microscopy*, *CANCER*, n. 11, 1958, pagg. 873-887.

La metodica usata da von Bertalanffy, modificata da Turner e Umiker nel 1959 e, nello stesso anno, da Pickle e Waite, basata sull'uso di solfato di Berberina, Fucsina acida e composti dell'Arancio di Acridina, è descritta da: C. GRUBB - J. G. S. CRABBE, *Fluorescence microscopy in Exfoliative cytology*, *BR. J. CANCER*, vol. 15, 1961, pagg. 483-488.

Ulteriori sviluppi in: C. GRUBB, *The Exfoliative Cytology of Endometrial Cancer with Fluorescence Microscopy*, *BR. J. CANCER*, vol. 20 (1), 1966, pagg. 62-73.

(106) - J.S. PLOEM, *Die Möglichkeit der Aufsichtfluoreszenzmethoden bei Untersuchungen von Zellen in Durchströmungskammern und Leightonröhren*, *Xth SYMPOSIUM D. GESELLSCHAFT F. HISTOCHEMIE*, ACTA HISTOCHEMICA, Supplementband 7, 1967, pagg. 339-343.

J.S. PLOEM, *A study of filters and light sources in immunofluorescence microscopy*, *ANN. N.Y. ACAD. SCI.*, vol. 177, 1971, pagg. 414-429.

(107) - E.M. BRUMBERG - T.N. KRYLOVA, *O fluorescentnykh mikroskopopak*, *ZH. OBSHCH. BIOL.*, vol. 14, 1953, pag. 461.

Infine un elegante epi-illuminatore è stato costruito da KRAFT: contiene più set di combinazioni di un filtro di eccitazione, un beamsplitter dicroico e una barriera o filtro di emissione, montati insieme in un “cubo filtro”, chiamato anche “blocco filtro”.

Poiché questo illuminatore permette di cambiare rapidamente i “cubi filtro” nel percorso ottico della luce, l'illuminazione a più lunghezze d'onda della stessa sezione di tessuto è diventata una normale pratica. È possibile assemblare diversi set di quattro cubi filtro, scelti tra molti “cubi filtro”, contenenti diverse combinazioni di filtri di eccitazione, filtri barriera e divisori di fascio dicroici, sviluppati per diverse applicazioni.

UN MICROSCOPIO A FLUORESCENZA... FATTO IN CASA

Questi brevi “Appunti” sono diretti a microscopisti dilettanti: poiché un microscopio a fluorescenza (con illuminatore epi-) ha costi non sempre accessibili, ho pensato di fornire agli eventuali interessati un metodo... casereccio per poter quantomeno approcciare questa interessante metodica a costi decisamente abbordabili e con un minimo di manualità.

Il concetto di base è quello di realizzare un microscopio a fluorescenza in diascopea a campo chiaro.

Ho utilizzato, a tale scopo, un normale tubo fluorescente a Ultravioletto con Filtro di WOOD da 6 W, reperibile facilmente presso qualsiasi negozio di forniture elettriche. Ovviamente, il tubo fluorescente va alimentato con un opportuno “reattore”: ho utilizzato un *ballast* elettronico da 11 W che ha il vantaggio di accendere il tubo senza lo sfarfallio iniziale dovuto allo *starter*.

L'alloggiamento del tubo fluorescente è stato ricavato da un segmento di canalina per cavi elettrici delle dimensioni di $24 \times 3 \times 2,5$ cm, opportunamente chiuso ai lati con ritagli di plastica e forato al centro per permettere la fuoriuscita della radiazione UV. Per migliorare l'efficienza del tubo fluorescente, ho sottoposto al medesimo una lamina in alluminio lucidata “a specchio” e curvata in modo da circondare la metà inferiore del tubo stesso. La lamina è stata alloggiata sul fondo della canalina a una distanza di circa 2 mm dal tubo.

Il foro di uscita della radiazione è stato adattato al portacondensatore del microscopio con uno spezzone di tubo idraulico in PVC del diametro di 40 mm e dello spessore di 4 mm, opportunamente tornito e sagomato per essere poi incollato al di sopra della feritoia praticata sulla parte superiore della canalina.

L'adattatore cilindrico (di cui sopra) è stato rivestito, nella sua parte interna, con foglio di alluminio al fine di evitare che il fascio UV, colpendo le pareti di plastica, venga inutilmente disperso.

L'alimentatore *ballast* è stato alloggiato in una scatola di materiale plastico isolante, collocata esternamente, in prossimità del microscopio e munita di interruttore di linea e di microspia al neon.

Ovviamente, il dispositivo sopra descritto trova posto in luogo del condensatore del microscopio e deve essere centrato per mezzo delle apposite viti: non ha, invece, grande importanza la focalizzazione, poiché il fascio UV non è collimato (occorrerebbe una lente al quarzo...) e viene pertanto diffuso in tutte le direzioni.

Poiché la canalina ha la possibilità di “sfilare” (ed eventualmente rimuovere) la parte superiore (quella nella quale è stata praticata l'asola di uscita della radiazione), ho sfruttato questa situazione per utilizzare l'illuminazione del microscopio per la

centratura e la focalizzazione previe del preparato, in modo da agevolare le successive operazioni di osservazione.

Per agevolare gli eventuali interessati, riporto qui sotto (vds.: fig. 22) lo schema elettrico dei collegamenti e le foto della realizzazione (vds.: figg. 23 - 31).

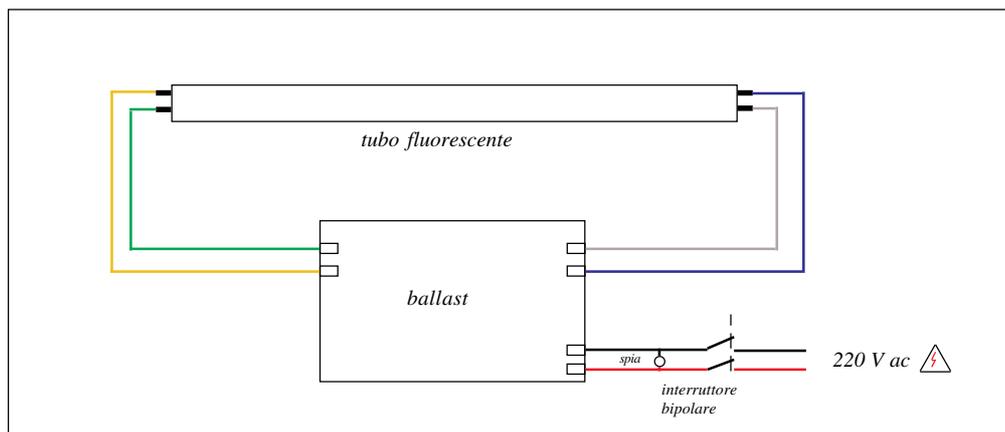


Fig. 22: Schema dei collegamenti elettrici della lampada fluorescente.

ATTENZIONE!

Chiunque voglia realizzare questo circuito elettrico DEVE essere a conoscenza delle nozioni basilari sui collegamenti elettrici (diametro dei fili, saldatura dei medesimi, collegamenti, isolamenti, ecc.). Si tenga sempre, comunque, presente che il dispositivo È COLLEGATO ALLA RETE ELETTRICA e che il tubo fluorescente È ALIMENTATO CON TENSIONI PERICOLOSE!!!

Tutti i fili vanno accuratamente ISOLATI CON TUBO TERMORESTRINGENTE di diametro adeguato (date le basse intensità di corrente in gioco, si possono usare fili di sezione da 0,1 mm² saldati direttamente sui reofori che fuoriescono dal tubo fluorescente; io ho usato un cavo esapolare schermato, lungo 1,5 m, con lo schermo connesso alla presa di terra dell'impianto elettrico; ciascuno dei 6 conduttori ha il diametro di 0,32 mm e la sezione di 0,08 mm²: dimensioni che, per un cavo della lunghezza di 2 m, consentono di alimentare con 250 V AC un carico abbondantemente superiore a quello che ci interessa: alcune tabelle "parlano" addirittura di 500 W a fronte di una caduta di tensione di 1 V; quelli, tuttavia, sono dati riferiti a un cavo unico: qui ci sono ben 6 cavi affiancati e vanno considerati i fattori di mutua induzione, dissipazione del calore, ecc., per cui non mi fiderei troppo ad alimentare carichi maggiori di 100 W⁽¹⁰⁸⁾).

(108) - I dati relativi ai cavi elettrici possono essere ricavati dalle apposite tabelle della AWG (*American Wire Gauge*), reperibili in Rete, come ad es. sui siti: http://www.oppo.biz/calcolo_sezione.php e <http://www.themeter.net/diametri3.htm>



Fig. 23: Il dispositivo di illuminazione per microscopia a UV (Luce di Wood) in diascopea.



Fig. 24: Il dispositivo illuminatore aperto: si nota il tubo fluorescente dotato di filtro di Wood (nero).



Fig. 25: Varie vedute del dispositivo illuminatore per microscopia in diascopea con eccitazione a UV (Luce di Wood).



Fig. 26: Il dispositivo di illuminazione per microscopia in UV con la lampada accesa.



Fig. 27 - a): Alimentatore per il tubo fluorescente; esterno.



Fig. 27 - b): Alimentatore per tubo fluorescente; interno: si nota il ballast con i relativi collegamenti alla lampada, all'interruttore e alla rete.



Fig. 28: Illuminazione standard del microscopio con condensatore per diascopea in campo chiaro.



Fig. 29: Il condensatore del microscopio è stato sostituito dal dispositivo illuminatore a "luce di Wood" (UV).



Fig. 30: L'illuminatore a UV è stato rimosso (per scorrimento): la focalizzazione del preparato avviene tramite illuminazione standard.

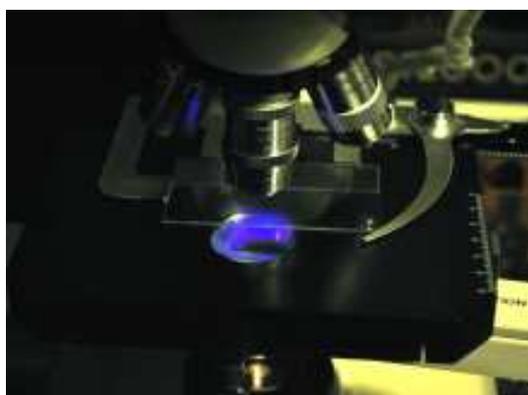


Fig. 31: L'illuminatore per diascopea in radiazione UV in funzione.

L'illuminatore "standard" è costituito da una lampada alogena 12V - 50 W alloggiata in una edicola esterna con raffreddamento ad aria;

l'alimentazione avviene in ac, tramite trasformatore variabile (variac) per regolare la tensione di alimentazione della lampada e, di conseguenza, la temperatura di colore della luce emessa (3400 K a 4,2 A).

Il controllo dell'alimentazione avviene sia in tensione (voltmetro) sia in intensità (amperometro).

Inoltre, per limitare gli effetti (dannosi per il filamento) delle extracorrenti di chiusura e di apertura del circuito, l'alimentazione è pilotata da un circuito elettronico che permette l'accensione e lo spegnimento graduale della lampada.

Infine, nel circuito di alimentazione è inserito un timer di precisione che consente la esatta regolazione dei tempi di accensione della lampada (da 1/10 di secondo a 30 minuti) al fine di realizzare fotomicrografie con fotocamera analogica reflex 34x36 mm usata con la tendina-otturatore aperta (posa B) e specchio deviatore ribaltato: ciò evita le vibrazioni dell'apparato fotomicrografico che possono generare il "micromosso" dell'immagine. Il trascinarsi della pellicola avviene per mezzo di winder elettrico.

Il condensatore è del tipo aplanatico-acromatico, con testa a 3 lenti e lente ausiliaria esterna per bassi ingrandimenti.

Il portacavi che si nota nella foto contiene le connessioni elettriche per l'alimentazione della videocamera installata permanentemente sul tubo fotografico del microscopio e connessa sia con il computer per l'acquisizione delle immagini, sia con un monitor per consentire l'esame diretto a più persone; la videocamera viene rimossa quando si utilizza la fotocamera, montata su apposito micro-intermedio acromatico con potere d'ingrandimento 2,5x e 4x.

In alternativa alla fotocamera reflex analogica, viene talvolta usata una fotocamera reflex digitale montata sul micro-intermedio di cui sopra, con interposto un apposito adattatore munito di lente apocromatica.

Nella pagina seguente sono presentate alcune immagini ottenute con:

- dispositivo per UV equipaggiato con lampada di Wood da 6W (220V);
- filtro di eccitazione: di Wood, integrato nella lampada ($\lambda_{\text{emissione}} = 320 - 400 \text{ nm}$);
- filtro di sbarramento per UV: inserito nella testa del microscopio, nell'alloggiamento previsto per il filtro polarizzatore analizzatore;
- filtro di sbarramento (trasmissione della sola luce di fluorescenza): Wratten n.8, giallo ($\lambda_{\text{trasmissione}} = 470 - 700 \text{ nm}$), alloggiato nella testa trioculare del microscopio;
- fotocamera reflex digitale con CCD da 10,1 Mpixel, montata (previo adattatore dotato di lente apocromatica) su micro-intermedio acromatico (ing. 2,5×);
- sensibilità: 400 - 1600 ISO (indicata nella didascalia delle singole immagini).

Tutti i preparati sono stati colorati con ematossilina-eosina, montati su vetrino portaoggetti di vetro ottico normale (di spessore = 1 mm) e inclusi in balsamo sintetico con coprioggetti di vetro ottico normale (di spessore = 0,17 mm).

ATTENZIONE! Ribadisco l'**ASSOLUTA INDISPENSABILITÀ** - nel percorso ottico al di sopra degli obiettivi - della presenza di un **ADEGUATO FILTRO UV** (consigliarsi con un fornitore di materiale fotografico o meglio di materiale ottico per microscopia!). Uno dei motivi per cui l'illuminazione per fluorescenza in diascopea (chiamata anche "iposcopia") è stata praticamente abbandonata è costituito proprio dalla pericolosità - per la retina e per altre parti dell'occhio umano - della radiazione a bassa lunghezza d'onda e in particolare della radiazione UV, qualora accidentalmente, a causa di manovre non corrette o di rotture del filtro di sbarramento, questa radiazione raggiunga l'occhio.

In ogni caso, ***NON MI ASSUMO ALCUNA RESPONSABILITÀ*** per qualsiasi danno o complicazione, biologica o ambientale, personale o verso terzi, derivante da una realizzazione inadeguata o un uso inappropriato dell'apparato descritto in queste pagine! Ricordo, inoltre, che le caratteristiche/requisiti della ***colpa penale*** sono: **imperizia, imprudenza, negligenza!**

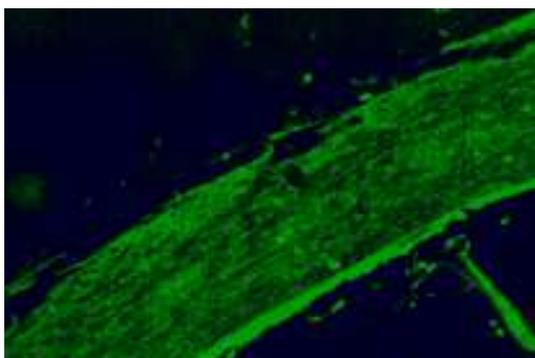


Fig. 32: Sarcoma del bulbo oculare; particolare della parete.
Obiettivo planacromatico 25/0,40; exp.: 1/4" - 400 ISO.

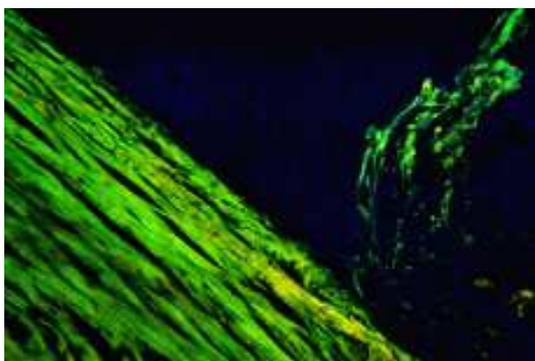


Fig. 33-a: Sarcoma del bulbo oculare; obiettivo apocromatico
40/0,95; exp.: 5" - 1600 ISO.

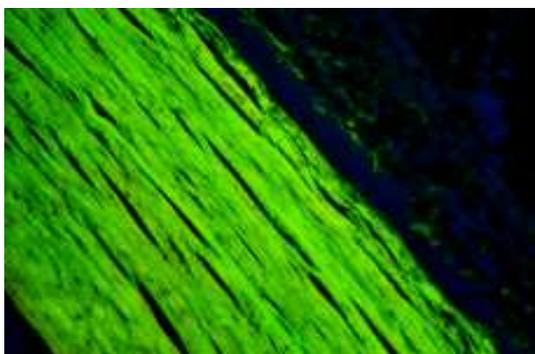


Fig. 33-b: Sarcoma del bulbo oculare (altro campo visivo);
obiettivo apocromatico 40/0,95; exp.: 10" - 1600 ISO.



Fig. 34: Linfonodo; obiettivo acromatico 10/0,25; exp.: 5" - 1600 ISO.

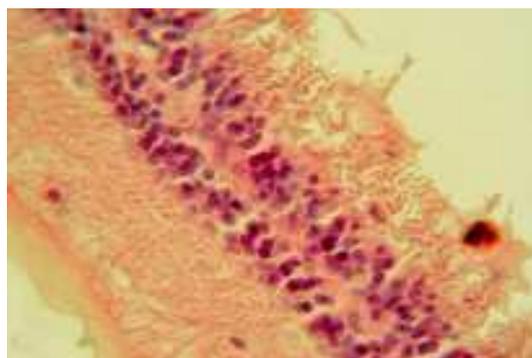


Fig. 35 - a

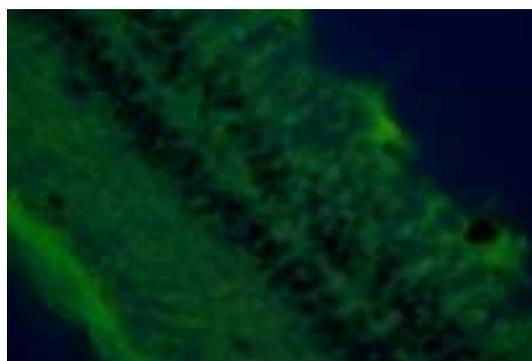


Fig. 35 - b

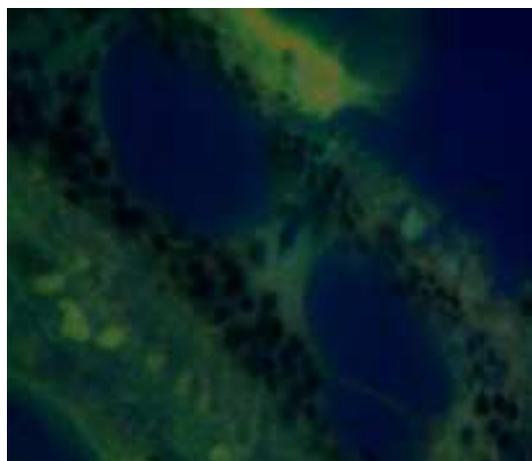


Fig. 35 - c

Fig. 35: Melanoblastoma del bulbo oculare.

a) in diascope a campo chiaro, 3 400 K, obb. apo 40/ 0,95,
cond. apl./acr. 0,95 (a secco); Ematossilina -Eosina
Exp.: 0,5" - 800 ISO.

b) in diascope con illuminazione in UV (lampada di
Wood),
obb. apo 40/ 0,95; Ematossilina -Eosina.
Exp.: 13" - 800 ISO.

c) in diascope con illuminazione in UV (lampada di Wood).
Altro campo dello stesso preparato di a) e b),
obb. apo 40/ 0,95; Ematossilina -Eosina.
Exp.: 10" - 800 ISO.

AUTOFLUORESCENZA NEI TESSUTI BIOLOGICI

La maggior parte dei tessuti biologici, sotto l'effetto di radiazione elettromagnetica di opportuna lunghezza d'onda, presenta un certo grado di fluorescenza spontanea (*autofluorescenza*), generalmente con emissione di radiazione elettromagnetica percipita dall'occhio umano come colore blu, blu-verde, verde oppure anche (sia pure assai più raramente) gialla (ad es.: il ceroide) o addirittura rosa-rossa (es.: la clorofilla e le porfirine). La tabella 10 (tratta dal lavoro di HAMPERL e SCHÜMMELFEDER⁽¹⁰⁹⁾) mostra le caratteristiche dell'autofluorescenza di alcune sostanze di interesse biologico.

Sostanza	colore della fluorescenza	Note
Proteine	bianco-blu	l'intensità dipende dallo spessore della sezione
Ceroide	giallo	/
Lipofuscine	giallo-bruno	/
Carotenoidi	giallo-bruno	l'intensità, sotto UV, si attenua lentamente
Vitamina A	verde-azzurro chiaro	l'intensità, sotto UV, si attenua rapidamente
Porfirine	giallo-verde	/
Riboflavina	rosa-rosso	/
Adrenalina	giallo-verde	
Noradrenalina	verde chiaro	solo in ambiente alcalino
	verde chiaro	solo dopo fissazione con aldeide formica

Tab. 10

L'intensità della fluorescenza varia notevolmente non solo in dipendenza dal tipo di tessuto esaminato, ma anche in funzione del tipo di preparazione⁽¹¹⁰⁾: ad esempio, i tessuti preventivamente fissati e le sezioni di vecchia data mostrano (in genere) una fluorescenza di intensità maggiore rispetto a tessuti non fissati o sezionati più recentemente.

In campo ematologico riveste particolare importanza l'autofluorescenza dovuta alla presenza di ceroide nelle cellule reticolari del midollo e degli altri organi emopoietici, nonché delle lipofuscine (prodotti di lenta ossidazione dei lipidi) spesso contenute nei macrofagi.

(109) - H. HAMPERL - N. SCHÜMMELFEDER, *Über Fluoreszenzmikroskopie*, Ciba Symposium, 1961, vol. 9, pag. 50.

(110) - A. G. E. PEARSE, *Histochemistry, teoretical and applied*, Churchill, Londra, 1968³.

Altrettanto importante è la presenza di porfirine (dimostrata da fluorescenza rosa-rossa) in varie cellule della serie eritroide: tale presenza è stata descritta per la prima volta da BORST e da KÖNIGSDORFER nel 1929⁽¹¹¹⁾ e, in seguito, riconfermata da STICH (nel 1959)⁽¹¹²⁾ nei *porfiroblasti*⁽¹¹³⁾.

Degna di nota è la fluorescenza labile presentata dai *fluoresciti di Seggel*⁽¹¹⁴⁾ che sembrerebbe essere indice della presenza di protoporfirine nelle cellule eritrocitarie in via di maturazione (e rapida rigenerazione) prima che avvenga la sintesi emoglobinica completa.

I tessuti necrotici presentano un'intensità di emissione fluorescente variabile (talvolta maggiore e talvolta minore) rispetto agli omologhi tessuti viventi; ciò può essere parzialmente attribuibile alla presenza di sangue: gli eritrociti contenenti emoglobina, infatti, non fluorescono.

(111) - M. BORST - H. KÖNIGSDÖRFFER, *Untersuchungen über Porphyrie*, Hirzel, Leipzig, 1929.

(112) - W. STICK, *Neue ergebnisse über Porphyrinstoffwechsel und Porphyrikrankheiten*, *KLIN. WSCHR.*, vol. 37, 1959, pagg. 681 ss.

(113) - Si tratta di elementi della serie eritroblastica ricchi di *uro-* e *coproporfirine* di tipo I, riscontrabili - ad es. - nella *porfiria eritropoietica primaria di Günter*: la fluorescenza da essi prodotta è di tipo stabile e tale caratteristica ne permette la diagnosi differenziale nei confronti della fluorescenza labile tipica degli elementi eritroblastici della porfiria cutanea tarda (nei quali, in questa condizione morbosa, non vi è accumulo di protoporfirine).

(114) - Tipo di eritrociti presenti in percentuale di ~ 0,1% nelle anemie acute e croniche di tipo emorragico, nell'anemia perniciosa trattata con vitamina B₁₂ e nell'avvelenamento da Piombo.

FLUORESCENZA SECONDARIA

La fluorescenza secondaria, in biologia, è dovuta alla presenza di un fluorocromo legato a molecole biologiche.

In particolare, si possono avere due tipi principali di modalità applicative:

a) *fluorocromizzazione* (o *colorazione aspecifica*), derivante dalla colorazione - su base non immunologica - di alcune specifiche componenti tissutali con coloranti liberi o con proteine marcate con composti fluorescenti;

b) *colorazione specifica*, dovuta a colorazione - su base immunologica - con proteine coniugate a composti fluorescenti.

Molti fluorocromi sono stati utilizzati come coloranti in campo istologico e citopatologico, ma solo pochi sono risultati utili in quanto capaci di formare legami chimici stabili con le proteine tissutali ⁽¹¹⁵⁾.

C. S. CHADWICK, dapprima, nel 1958 ⁽¹¹⁶⁾ e nel 1960 ⁽¹¹⁷⁾ e PEARSE ⁽¹¹⁸⁾, poi, nel 1968, hanno proposto una serie di requisiti necessari per valutare l'idoneità di un fluorocromo ad essere utilizzato come tracciante fluorescente in ambito biologico.

Qui sotto, tratto da CASTOLDI ⁽¹¹⁹⁾, l'elenco delle proprietà richieste:

il fluorocromo

a) deve possedere gruppi chimici in grado di dare legami covalenti stabili con le proteine tissutali;

b) deve mantenere una intensa fluorescenza anche dopo essersi combinato con le componenti proteiche;

c) il colore della fluorescenza emessa deve essere differente dal colore di fondo del tessuto in esame;

d) la formazione del coniugato con le varie proteine tissutali deve - in condizioni di normale conservazione - essere stabile e non deve differire materialmente, nelle sue proprietà, dalla forma non coniugata;

e) il processo di coniugazione del fluorocromo deve essere il più semplice e il più breve possibile.

Esistono numerosissimi fluorocromi per differenti applicazioni: qui ci si limiterà a descrivere l'uso di alcuni dei più noti.

(115) - Riguardo alla predissociazione di molecole non atte alla fluorescenza, vds.: J. FRANCK - H. LEVI, in *Z. PHYSIK. CHEMIE B.*, n. 27, 1955, pagg. 409 - 420.

(116) - C. S. CHADWICK - M. G. McENTEGART - R.C. NAIRN, *Fluorescent Protein Tracers: A Trial of New Fluorochromes and The Development of an Alternative to Fluorescein*, *IMMUNOLOGY*, vol. 1(4), 1958, pagg. 315 - 317.

(117) - C. S. CHADWICK - R.C. NAIRN, *The Unreacted Fluorescent Material in Fluorescein Conjugates and Studies of Conjugates with other Green Fluorochromes*, *IMMUNOLOGY*, vol. 3(4), 1960, pagg. 363 - 370.

(118) - A. G. E. PEARSE, *cit.*

(119) - G. CASTOLDI, *Microscopia a fluorescenza*, in: P. INTROZZI (diretto da), *Trattato Italiano di Medicina Interna - Parte Terza: Malattie del Sangue e degli Organi Emopoietici - Malattie del Sistema Reticolo-Istiocitario*, Vol. I, *Elementi di metodologia microscopica ematologica*, USES, Firenze, 2^a ed., 1978, pag. 205.

ALCUNI METODI USATI NELLA MICROSCOPIA IN FLUORESCENZA

dimostrazione degli acidi nucleici

I metodi usati nella microscopia in fluorescenza per la dimostrazione degli acidi nucleici si basano sull'uso di vari fluorocromi: Ioduro di Propidio, Bromuro di Etidio, Hoechst 33342 [H342], DAPI, Cromomicina, Quinacrina, ecc.

Qui ci si riferirà a uno dei più noti, l'Arancio di Acridina (*acridine orange*) [3,6-dimetilaminoacridina] che è il principale fluorocromo della famiglia delle aminoacrine (in particolare, delle diamminoacrine); la sua formula di struttura e i suoi spettri di assorbimento ed emissione fluorescente sono illustrati in Fig. 36:

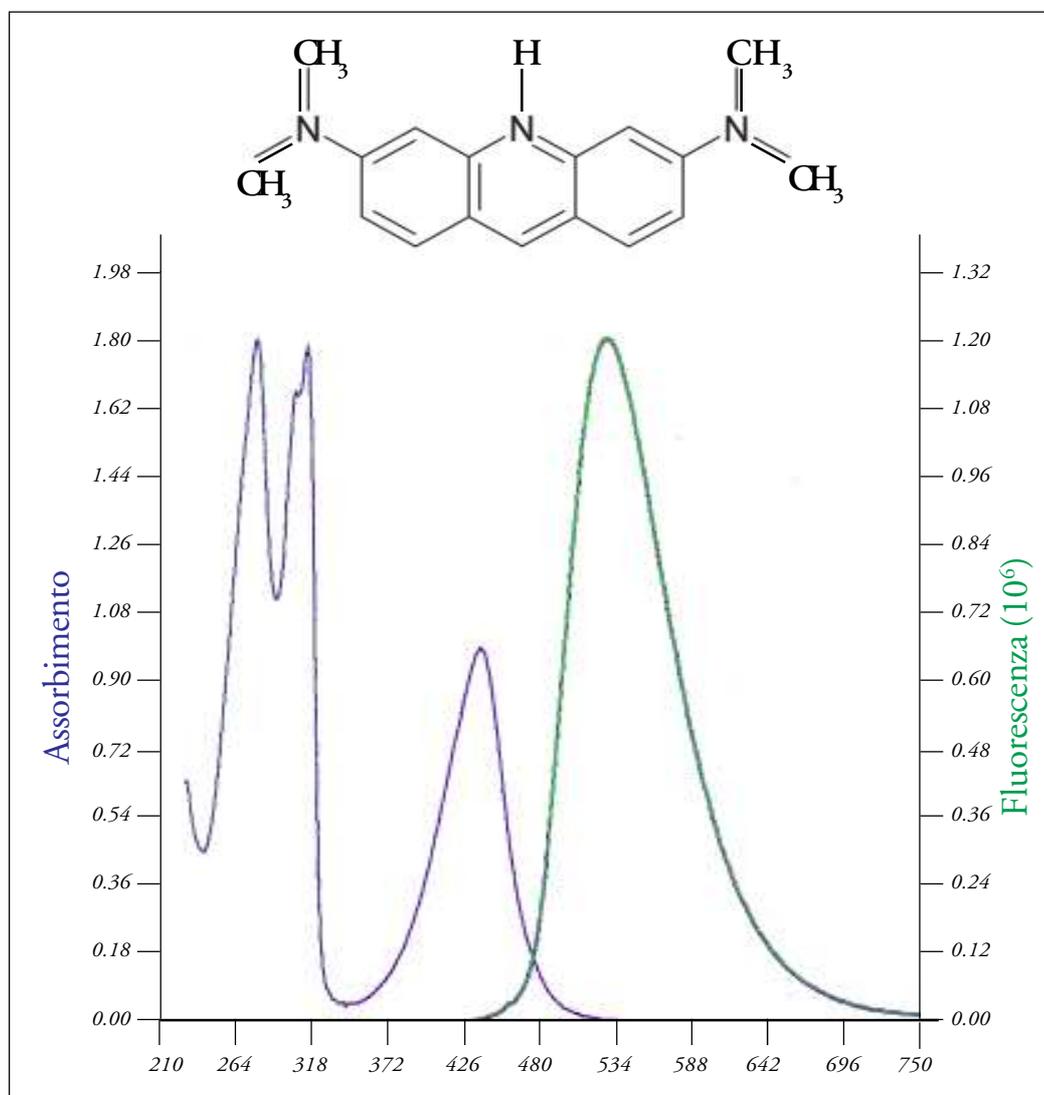


Fig. 36: Formula di struttura e Spettri di assorbimento (violetto) e di emissione fluorescente (verde) dell'Arancio di Acridina

Il pH ottimale dell'Arancio di Acridina è compreso tra 1,5 e 3,5.

Questo fluorocromo ha un diverso comportamento a seconda che reagisca con tessuti freschi o con tessuti fissati: in questi ultimi, infatti, l'acridina conferisce una fluorescenza rossa al nucleo, una debolissima fluorescenza rossa al citoplasma e una debole fluorescenza verde agli organuli cellulari; nei tessuti freschi (o in quelli fissati con Etanolo o con una miscela Etanolo-Acido Acetico) conferisce una fluorescenza verde al nucleo e una fluorescenza rossa al citoplasma.



12 μ

Fig. 37: Due granulociti neutrofilii, trattati con arancio di acridina, in fluorescenza con eccitazione in UV; sono evidenziabili praticamente solo i nuclei. Obb. NPL semi-apocromatico 100/1,32 imm. olio.

Poiché, però, altre sostanze (fibre elastiche, proteoglicani acidi e altri composti anionici) danno, con l'Arancio di Acridina, fluorescenza rossa, occorre verificare la effettiva specificità della colorazione mediante trattamento con ribonucleasi.

È da tener presente che l'Arancio di Acridina, eccitato con radiazione di $\lambda = 455-550$ nm (blu-verde), emette - verosimilmente per reazione metacromatica - una fluorescenza di lunghezza d'onda (e, dunque, di cromaticità) variabile in funzione del pH e della concentrazione della soluzione. Infatti, concentrazioni maggiori di 10^{-3} M producono un viraggio cromatico dal verde al rosso: si ritiene che ciò sia dovuto a un fenomeno di polimerizzazione causato dalle interazioni tra molecole che si legano ai tessuti in posizione contigua tra loro⁽¹²⁰⁾. Questo fenomeno spiega la "colorazione rossa" che presentano sia alcune strutture ricche di radicali acidi (ad es.: le granulazioni delle *mastzellen* che contengono numerosi gruppi solfati acidi; oppure l'RNA, a causa dei suoi gruppi ortofosforici), sia alcuni componenti cellulari nei quali, a causa di variazioni del pH della soluzione fluorocroma, si ha una maggiore esposizione di radicali acidi⁽¹²¹⁾.

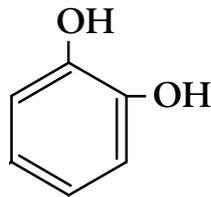
(120) - Vds.: G. CASTOLDI, *cit.*, pag. 205.

(121) - Vds.: L. VON BERTALANFFY, *Principles and theory of growth*. In: W.W. NOWINSKI, (Ed.), *Fundamental Aspects of Normal and Malignant Growth*, Elsevier, Amsterdam, 1960, pagg. 137-259.

dimostrazione delle catecolamine

Le **catecolamine**, il cui nome è dovuto alla loro derivazione dall'*orto-diossibenzolo*, denominato anche *catecolo* (o *pirocatechina*, o *2-idrossifenolo*) [C₆H₆O₂], appartengono a quel gruppo di *amine aromatiche* (a stretta analogia con alcuni aminoacidi dai quali vengono ottenute mediante reazione di decarbossilazione), denominate *amine biogene*.

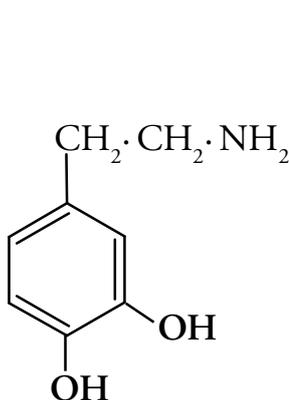
La formula di struttura del Catecolo è:



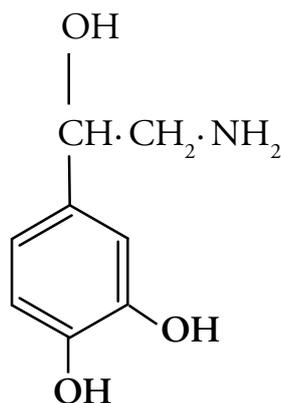
L'esame microscopico in fluorescenza è, attualmente, il metodo di più semplice esecuzione e di maggiore sensibilità.

Il principio su cui si fonda questo metodo è la constatazione che le catecolamine, in ambiente secco e circondate da proteine, formano - con i vapori di Aldeide Formica - composti chimici fluorescenti se eccitati con radiazione UV.

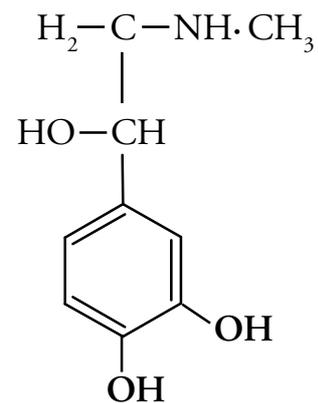
Le catecolamine più attive in questo senso sono la Noradrenalina e la Dopamina, le cui formule di struttura sono:



Dopamina



Noradrenalina



Adrenalina

L'Adrenalina, invece, genera una fluorescenza assai più debole, a sviluppo di gran lunga più lento e richiede temperature più elevate rispetto alle altre catecolamine. Il composto fluorescente (tecnicamente: *fluoroforo*⁽¹²²⁾) responsabile della reazione è la *1,2,3,4-tetraidro-6,7-diidrossi-isochinoleina* prodotta dalla condensazione della catena laterale, sia della Noradrenalina sia della Dopamina, ad opera dell'Aldeide Formica. Da ciò discende immediatamente che le catecolamine dei nervi adrenergici sono di più difficile evidenziazione rispetto a quelle delle ghiandole surrenali, richiedendo spesso la preparazione previa dei tessuti in esame mediante congelamento-essiccamento⁽¹²³⁾.

dimostrazione della serotonina

La Serotonina (chiamata anche *5-idrossitriptamina*), in presenza di Aldeide Formica, forma un composto dotato di fluorescenza color giallo-oro, dovuto alla chiusura della catena laterale della *5-idrossitriptamina* prodotta dall'aldeide.

Questo composto, denominato *β-carbolina*, è fortemente fluorescente, essendo dotato di un nucleo eterociclico (vds. la parte relativa alla fisica-chimica in questo stesso lavoro).

Il metodo, in realtà, non richiede alcun protocollo specifico, essendo sufficiente il fissaggio in Aldeide Formica e l'esame diretto in fluorescenza.

Va detto che questo metodo unisce alla semplicità la specificità, poiché inibisce la fluorescenza della Noradrenalina e della Dopamina; va però precisato che possono ottenersi variazioni cromatiche della fluorescenza, a seconda della localizzazione della *5-idrossitriptamina*⁽¹²⁴⁾.

colorazione per fluorescenza con acido picrico *in vivo*

I cristalli di Acido Picrico ($C_6H_3N_3O_7$ nome IUPAC: 2,4,6-trinitrofenolo) che si formano a temperatura ambiente in una soluzione di Acido Picrico possono essere utilizzati per dimostrare la presenza di anestetici locali in soggetti viventi.

Si utilizzano una soluzione acquosa di Acido Picrico all'1% che viene mescolata (in rapporto 1:1), ad esempio, con una soluzione acquosa all'1% di Procaina.

I cristalli così ottenuti vengono lavati più volte con acqua distillata.

(122) - Non si confondano i termini *fluoroforo* e *fluorocromo*: il primo, infatti, indica il gruppo di atomi o di molecole responsabili della generazione della fluorescenza in una sostanza; il secondo è riferito a una sostanza fluorescente che, legandosi a un composto non fluorescente, ne determina comunque la fluorescenza.

(123) - Vds.: E. BONUCCI, *Manuale di Istochimica*, Lombardo Editore, Roma, 1991, pag. 276.

(124) - Vds.: E. BONUCCI, *ibidem*, pag. 281.

Ad esempio, si inietta in un organo di un soggetto vivente una dose adeguata di una soluzione di Acido Picrico (ad esempio allo 0,3 %) e si lasci incubare per circa 30 minuti; si prelevi, quindi, biotticamente parte del tessuto dall'organo inoculato, lasciandolo poi alla temperatura di -10 °C per 3-6 ore; si eseguano successivamente sezioni istologiche al microtomo congelatore: qualora nell'organo in esame sia presente un anestetico locale (ad esempio Procaina), verranno evidenziati (osservando al microscopio con una combinazione di filtri BG 12/53, ad esempio) cristalli fluorescenti di Acido Picrico delle dimensioni di 4 - 50 µm.

Non entro nei dettagli, perché gli esami su esseri viventi esulano certamente dalle possibilità (anche legali!!!) di un dilettante.

Segnalo solamente che questa metodica può essere utilizzata anche per avere una indicazione circa l'assorbimento, la diffusione e la distribuzione loco-regionale degli anestetici locali in tessuti viventi ⁽¹²⁵⁾.

fluorescenza in sezioni sottili non decalcificate di tessuto osseo

Si utilizza la fluorescenza primaria di colore giallo delle tetracicline che, come si sa, sono antibiotici che mostrano una particolare affinità per il tessuto osseo, in particolare per la zona di mineralizzazione degli orli osteoidali, come dimostrato da RALL e MILCH nel 1957 ^{(126) (127)}.

Tuttavia, nel 1959 EGER e KÄMMERER dimostrarono che, durante i processi degenerativi del tessuto osseo, le tetracicline vengono depositate anche nelle zone di riassorbimento ⁽¹²⁸⁾. RALL e coll., nel 1957, avevano dimostrato l'insorgere e il persistere della fluorescenza in tessuti tumorali dopo somministrazione di Tetraciclina ⁽¹²⁹⁾.

EGER, KÄMMERER e TRAPP hanno pubblicato, inoltre, un interessante articolo sull'esecuzione di esami simultanei in microscopia a fluorescenza e a polarizzazione su sezioni di tessuto osseo ⁽¹³⁰⁾.

(125) - Per ulteriori approfondimenti vds.: H. STRUCK, *Sulla colorazione a fluorescenza con acido picrico in vivo*, in *INFORMAZIONI ZEISS*, n. 65, 1967, pagg. 82-84.

(126) - R. A. MILCH - D. P. RALL - J. E. TOBIE, *Bone localization of the tetracyclines*, *J. NAT. CANCER INST.*, n. 19, 1957, pagg. 87-93.

(127) - R. A. MILCH - J. E. TOBIE - R. A. ROBINSON, *A Microscopic Study of tetracycline localization in Skeletal Neoplasms*, *J. NAT. CANCER INST.*, n. 19, 1959, pagg. 261- 270.

(128) - W. EGER - H. KÄMMERER, *Beiträge zur Regeneration des Knochengewebes nach Tetracyclinmarkierung Callus*, Symposium, Debrecen, 1965.

(129) - RALL D. P. - LOO T. L. - LANE M. - KELLY M. G., *Appearance and Persistence of Fluorescent Material in Tumor Tissue after Tetracycline Administration*, *JOURNAL OF THE NATIONAL CANCER INSTITUTE [J. NAT. CANCER INST.]*, n. 19, 1957, pagg. 79 - 85.

(130) - W. EGER - H. KÄMMERER - L. TRAPP, *Esami simultanei con microscopia a fluorescenza e a polarizzazione di sezioni sottili non decalcificate di tessuto osseo*, *INFORMAZIONI ZEISS*, n. 64, 1967, pagg. 64 - 68.

microscopia in fluorescenza nello studio della microbiologia del terreno

Gli esami microscopici in fluorescenza costituiscono un importante mezzo per la dimostrazione e il conteggio degli organismi nel terreno, nonché per la caratterizzazione dei terreni.

L'Arancio di Acridina si è dimostrato il fluorocromo di elezione per tali esami, come proposto, nel 1943, da ROUSCHAL e STRUGGER⁽¹³¹⁾ i quali dimostrarono che la colorazione con tale sostanza consentiva - rispetto ai metodi precedentemente usati - una migliore differenziazione tra microrganismi e terreno. Il metodo subì ulteriori elaborazioni soprattutto ad opera di BURRICHTER⁽¹³²⁾(1953, 1954, 1955), dapprima, e di LEHNER e NOWAK (1957, 1958⁽¹³³⁾, 1959⁽¹³⁴⁾, 1960), poi.

Tuttavia, questi Autori si limitarono a studiare i microrganismi che si possono reperire nei terreni liberi da radici vegetali; TROLLDENIER e coll.⁽¹³⁵⁾, nel 1965, pubblicarono un articolo sul metodo da loro applicato per lo studio dei microrganismi presenti nella rhizosfera, la varietà e il numero dei quali risultano molto maggiori.

La metodica suggerita prevede l'uso di una lampada HBO 200 con filtro di eccitazione BG 12, filtro di sbarramento OG4 (per l'azzurro), filtro di sbarramento OG5 (per il blu) filtro di sbarramento GG4 (per l'UV).

Il materiale da esaminare è costituito da porzioni di radici fibrose (nel terreno) o da piante crescenti su superficie di agar in provette inclinate.

La colorazione si effettua con Arancio di Acridina in soluzione acquosa 1:15 000. Successivamente, si procede a congelare il materiale colorato e a raschiarlo con un rasoio fino ad ottenere semplici particelle dell'epidermide con peli radicali (in modo da realizzare sezioni molto sottili).

L'inclusione viene effettuata in acqua, prestando attenzione a che quest'ultima rimanga esente da colorante, onde evitare fluorescenza verdastra diffusa che abbassa il contrasto. È opportuno segnalare che anche lo spessore delle sezioni incide sul risultato finale: sezioni troppo spesse, infatti, producono una fluorescenza verdastra diffusa che ostacola notevolmente l'individuazione dei microrganismi resi fluorescenti dall'Acridina.

(131) - C. ROUSCHAL - S. STRUGGER, *Eine neue Methode zur Vitalbeobachtung der Mikroorganismen im Erdboden*, *DIE NATURWISSENSCHAFTEN*, n. 31, 1943, pag. 300.

(132) - E. BURRICHTER, *Beiträge zur Beurteilung von Böden auf Grund fluoreszenzmikroskopischer Untersuchung ihrer Mikroflora*, *Z. PFLANZENERNÄHR.*, n. 63 (108), 1953, pagg. 154 - 171.

(133) - A. LEHNER - W. NOWAK - L. SEIBOLD, *An improved combination-technique for the fluorochromation of soil using acridine orange*, *LANDWIRT. FORSCH.*, vol. 11, 1958, pagg. 121-127.

(134) - A. LEHNER - W. NOWAK, *New results of the direct determination of soil bacteria by a combined growth and fluorochromation technique*, *ZENTRABL. BAKTERIOL. PARASITENK. INFECTIONSKR. HYG. ABT. II*, vol. 113, 1959, pagg. 32 - 34.

(135) - G. TROLLDENIER, *Microscopia a fluorescenza nello studio della Rhizosfera*, *INFORMAZIONI ZEISS*, n. 56, 1965, pagg. 68 - 69.

microscopia in fluorescenza per identificare cellule tumorali nel liquor cerebrospinale

Il *liquor cerebrospinale* (denominato anche *liquor cefalorachidiano*) è un fluido trasparente che permea l'intero sistema nervoso centrale (SNC) e lo mantiene in sospensione proteggendolo, nutrendolo e contribuendo alla regolazione della pressione intracranica. Il tasso di cellularità del *liquor* normale è basso, con un valore di 5-8 cellule/mm³. Tale valore può subire un incremento anche notevole (fino a 1000 cellule/mm³) in presenza di alcune patologie e di alcuni tipi di tumore nei quali si manifesta la cosiddetta *pleocitosi tumorale*, cioè l'incremento del numero delle cellule presenti nel *liquor*, che peraltro, anche in presenza di patologie oncologiche, non supera il valore di 10 - 50 cellule/mm³, rendendo pertanto necessario - per poter procedere allo studio citologico - ricorrere ad uno specifico *arricchimento*.

Non entro nei dettagli di tale tecnica, perché essa esula dalle finalità di questi Appunti. Mi limito a segnalare le difficoltà connesse con la presenza di fenomeni auto ed eterolitici, dovuti al fatto che le cellule presenti nel liquor sono già distaccate dalla propria matrice e si trovano in un liquido acquoso ipoproteico.

La comune colorazione con il metodo di MAY-GRÜNWARD-GIEMSA incontra non di rado difficoltà dovute all'ipercromasia soprattutto delle cellule carcinomatose, per cui - qualora non fosse presente lo specifico polimorfismo - potrebbe risultare oltremodo difficoltoso distinguere, ad esempio, isolati elementi tondeggianti dotati di un più o meno marcato grado di basofilia da grandi linfociti o dalle forme linfocitarie cosiddette "da stimolo".

Inoltre, è opportuno evidenziare la possibilità di incertezze nella differenziazione di elementi cellulari isolati di grandi dimensioni e dotati di abbondante citoplasma: caratteristiche, queste, suggestive di malignità mentre invece ci si può trovare di fronte a semplici degenerazioni epiteliali o a forme plasmocitarie di natura comunque benigna.

Le difficoltà diagnostiche sopracitate sono note da gran tempo⁽¹³⁶⁾.

Il metodo di colorazione di PAPANICOLAU non si presta molto per la diagnosi oncocitologica nel liquor⁽¹³⁷⁾⁽¹³⁸⁾, per cui si è passati alla microscopia a fluorescenza utilizzando l'Arancio di Acridina secondo il metodo suggerito da BERTALANFFY⁽¹³⁹⁾ e coll. nel 1956.

(136) - A. PÉTER, *Liquorzitologische Probleme bei Carcinomen des Zentralnervensystems*, *PSYCHIAT. NEUROL.*, vol. 152, 1966, pagg. 327 - 341.

(137) - J. SAYK, *Cytologie der Cerebrospinalflüssigkeit*, Fischer, Jena, 1960;
J. SAYK - R. M. OLISCHER, *Fortschritte der Liquorcitologie bei der Diagnostik bösartiger Hirngeschwülst*, *PSYCHIAT., NEUROL. U. MED. PSYCHOL.*, vol. 19, 1967, pagg. 88 - 98.

(138) - C. RAVETTO, *Citodiagnostica oncologica*, Piccin, Padova, 1973, pagg. 297-299;
A. I. SPRIGGS - M. M. BODDINGTON, *La Citologia dei Versamenti Pleurico, Pericardico e Peritoneale e del Liquido Cerebrospinale*, Edizioni Mediche Scientifiche Internazionali, Roma, 1973, pagg. 43 - 57.

(139) - L. VON BERTALANFFY - F. MASIN - M. MASIN, *Use of acridine orange fluorescence...*, *cit.*, pagg. 1024 - 1025;
L. VON BERTALANFFY - F. MASIN - M. MASIN, *A new and rapid method for diagnosis...*, *cit.*, pagg. 873 - 887;
L. VON BERTALANFFY - I. BICKIS, *Identification of cytoplasmic basophilia (ribonucleic acid) by fluorescence microscopy*, *J. HISTOCHEM. CYTOCHEM.*, n. 4, 1956, pagg. 481 - 493.

Tale metodo, originariamente proposto per la diagnostica oncologica in ambito ginecologico, si avvale della metacromasia⁽¹⁴⁰⁾ che l'Arancio di Acridina sviluppa nel suo legame con gli acidi nucleici, l'aumento intracellulare dei quali, in particolare dell'RNA - com'è noto -, è indice di aumentata proliferazione cellulare e, in definitiva, di possibile malignità⁽¹⁴¹⁾.

Com'è ovvio, trattandosi di un metodo qualitativo morfocitochimico, il sospetto di malignità andrà confermato con ulteriori indagini specifiche (enzimatiche, immunochimiche, ecc.).

Per inciso, il metodo di BERTALANFFY, qualora venga usato in altri campi citologici, assicura una resa e una precisione del tutto sovrapponibile (quando non addirittura superiore) al classico metodo di PAPANICOLAU, come riconosciuto anche da numerosi Autori⁽¹⁴²⁾.

Va segnalato, peraltro, che non tutti sono pienamente d'accordo sulla specificità del metodo di BERTALANFFY: alcuni Autori, infatti, rilevano la mancanza - in questo metodo - di una assoluta specificità per le cellule tumorali, propria - invece - dei metodi di colorazione *diacromatici*. Tuttavia, a seguito di approfondite verifiche, queste riserve sono state generalmente superate negli anni '60, accettando il metodo anche se esso richiede (come già detto sopra) conferme ulteriori nonché una specifica esperienza morfologica⁽¹⁴³⁾⁽¹⁴⁴⁾.

I principali motivi di perplessità sorsero per il fatto che elementi tipicamente benigni (quali: cellule secernenti provenienti dalla *portio* o dall'endometrio, oppure cellule contenenti mucopolisaccaridi acidi, o eventuali istiociti o anche batteri e *trichomonas*) possono produrre una intensa fluorescenza di colore rosso, tipica delle cellule tumorali maligne.

Nell'esame del *liquor cerebrospinale*, come appare immediatamente ovvio, non vi è possibilità di incorrere nei falsi positivi riferiti sopra, in quanto nel sistema nervoso centrale non esistono elementi (né tessuti) epiteliali secernenti, né cellule dotate di un

(140) - N. SCHÜMMELFEDER, *Zur histochemischen Bedeutung der Fluoreszenzmetachromasie des Akridinorange*, ACTA HISTOCHEM. SUPPL. I, 1958, pagg. 148 - 151;

Id., *Histochemical significance of the polychromatic fluorescence induced in tissues stained with acridina orange*, J. HISTOCHEM. CYTOCHEM., n. 6, 1958, pagg. 392 - 393.

(141) - Vds., ad es.: S. D. GINSBERG - J. E. GALVIN - T.-S. CHIU - V. M.-Y. LEE - E. MASLIAH - J. Q. TROJANOWSKI, *RNA sequestration to pathological lesions of neurodegenerative diseases*, ACTA NEUROPATHOL., vol. 96,(5), 1998, pagg. 487 - 494.

(142) - Vds., ad es.: G. SANI - U. CITTI - G. CARAMAZZA, *La fluorocromizzazione degli strisci vaginali con arancio di acridina nella diagnosi precoce del cancro dell'utero*, MINERVA GINECOL., n. 14, 1962, pagg. 327- 341;
S. L. SCHEINER - R. F. DAVIS, *Fluorescencecytology screening. An aid in the diagnosis of gastric cancer*, ARCH. SURG., n. 85, 1962, pagg. 948 - 954.

(143) - Vds., ad es.: E. BONTKE - G. KERN - N. SCHÜMMELFEDER, *Die Akridinorange-Fluorochromierung in der gynäkologischen Cytodiagnostik*, GEBURTSH. U. FRAUENHEILK., n. 20, 1960, pagg. 21- 34;

(144) - N. SCHÜMMELFEDER - G. KERN - E. KERN-BONTKE, *Die Akridinorange-Fluorochromierung in der gynäkologischen Cytodiagnostik bösartiger Tumoren*, MITTEILUNGSDIENST GES. BEK. KREBSKRANKHEIT., n. 2, 1962, pagg. 482 - 502.

particolare contenuto mucopolisaccaridico; inoltre, poiché il *liquor cerebrospinale* normale è sterile, la eventuale presenza di batteri o di funghi (indice di malattia infettiva dell'encefalo) è accompagnata da numerosi granulociti e/o da cellule infiammatorie mononucleate.

Va inoltre segnalato che, in questi casi di encefaliti infettive, si possono repertare istiociti e/o macrofagi monocitari, dotati di intensa fluorescenza di colore rosso che queste cellule, peraltro, perdono già dopo pochi giorni dall'inizio dell'infezione. Secondo l'esperienza di SPAAR e BAUER ⁽¹⁴⁵⁾, questi tipi di cellule sono gli unici elementi dei quali, usando la colorazione con Arancio di Acridina (e più in generale con fluorocromi), occorre tener conto per la diagnosi differenziale nei confronti delle cellule tumorali maligne eventualmente presenti nel *liquor*.

Va precisato che tale diagnosi differenziale, pur necessitando di conferma ulteriore per mezzo delle colorazioni comunemente usate in ematologia, normalmente è già possibile con il solo esame in fluorescenza.

Non è inopportuno rammentare che le cellule tumorali repertabili nel *liquor cerebrospinale* provengono, generalmente, da neoformazioni con localizzazioni prossime agli spazi contenenti il *liquor*, pur potendosi - più raramente - repertare elementi cellulari provenienti da forme neoplastiche site a maggiore profondità intramidollare. Esula dagli intenti di questi Appunti una elencazione completa degli elementi (normali e patologici) presenti nel *liquor cerebrospinale*, rimandando pertanto alle pubblicazioni specialistiche.

Per quanto riguarda le interazioni tra il DNA e l'Arancio di Acridina, è opportuno ricordare che si tratta di *intercalazioni*, cioè di inclusioni reversibili di una molecola (o di un gruppo di molecole) tra altre due molecole (o gruppi).

Esempi tipici, sono l'intercalazione di piccole molecole tra le basi del DNA e l'intercalazione tra gli strati della grafite. Il termine *intercalazione* fu proposto - agli inizi degli anni '60 - da Leonard LERMAN, a seguito dei suoi studi sulle interazioni di *acridine* (molecole aromatiche planari cationiche) con il DNA: ne trasse la conclusione che queste molecole possono legarsi al DNA mediante un processo reversibile che egli definì *intercalazione* (per approfondimenti, vds.: Appendice A, in questi "Appunti"). Questa scoperta è stata di grande aiuto nella comprensione di come piccole molecole e mutageni possano interagire con il DNA ⁽¹⁴⁶⁾.

(145) - F. W. SPAAR - H. J. BAUER, *Prova di cellule tumorali nel liquor cerebrospinale mediante microscopia a fluorescenza all'arancio di acridina*, INFORMAZIONI ZEISS, vol. 19, n. 77/78, 1971, pagg. 31 - 34.

(146) - L. S. LERMAN, *Structural considerations in the interactions of deoxyribonucleic acid and acridines*, JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, vol. 3 (1), 1961, pagg. 18-30;
ID., *The structure of the DNA-acridine complex*, PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, vol. 49, 1963, pagg. 94-102.
Vds. anche: Appendice A in questi "Appunti".

La colorazione con Arancio di Acridina viene usata in microscopia in fluorescenza per l'osservazione e l'identificazione - sia in tessuti fissati sia in quelli non fissati - di un'ampia gamma di microrganismi; in particolare, data la sua scarsa tossicità, viene usata anche nelle colorazione di preparati vitali. Questa colorazione, oltre che nell'esame dei batteri, dei funghi, degli ascomiceti (lieviti) e dei protozoi, trova applicazione in ambito clinico, ad esempio nella diagnosi delle infezioni vaginali da batteri, miceti e/ o *Trichomonas vaginalis*.

L'Arancio di Acridina viene utilizzato non solo negli studi sulla fertilità, al fine di determinare il numero e il grado di vitalità degli spermatozoi, ma anche per la determinazione della carica batterica nel suolo e nell'acqua.

La versatilità e la semplicità dell'uso di questo fluoroforo ne consentono l'impiego nell'analisi di molteplici materiali, quali strisci ematici, strisci vaginali, sedimenti citologici sia urinari sia bronco-polmonari (da espettorato), agoaspirati vari.

Come già accennato nella pagina precedente, l'Arancio di Acridina si "intercala" selettivamente negli acidi nucleici, presentando un "comportamento metacromatico" a seconda che si leghi al DNA a doppia elica [dsDNA]:

$\lambda_{\text{eccitazione}} = 502\text{nm}$; $\lambda_{\text{emissione}} = 525\text{ nm}$ (fluorescenza di colore verde / giallo-verde),

o all'RNA o al DNA a elica singola (ssDNA):

$\lambda_{\text{eccitazione}} = 460\text{nm}$; $\lambda_{\text{emissione}} = 650\text{ nm}$ (fluorescenza di colore rosso).

Va ricordato che l'Arancio di Acridina, come altri intercalanti, si inserisce fra le singole coppie di basi azotate adiacenti, aumentandone lo spazio a $\sim 0,7\text{ nm}$ e diminuendo il passo dell'elica. Come si ricorderà, gli studi di diffrazione dei raggi X indicano che l'elica del DNA (il cui diametro è di $\sim 2\text{ nm}$) ha un *passo* (cioè compie un giro su se stessa) di $3,4\text{ nm}$; ciò implica che, essendo la distanza tra due nucleotidi adiacenti di $0,34\text{ nm}$, ogni giro di elica contiene 10 nucleotidi⁽¹⁴⁷⁾. È appena il caso di ricordare che le basi hanno struttura piatta e giacciono su un piano perpendicolare all'asse dell'elica orientate verso il suo interno; procedendo lungo l'asse, le basi si sovrappongono l'una all'altra, formando una sorta di "pila di piatti".

Inoltre, le coppie di basi contribuiscono alla stabilità termodinamica della doppia elica sia mediante l'energia che si libera nella formazione delle coppie appaiate e sia mediante l'interazione fra coppie di basi adiacenti.

(147) - Cfr.: B. LEWIN, *Il Gene VI*, Zanichelli, Bologna, tr.ita. 1999, § 31, pag 69.

microscopia in fluorescenza nell'industria alimentare

La microscopia in fluorescenza trova utile impiego nell'analisi della struttura di alcuni alimenti, come ad esempio il burro, la margarina, vari prodotti di panetteria, i gelati, il latte in polvere, ecc.⁽¹⁴⁸⁾

I fluorocromi generalmente usati sono l'Arancio di Acridina per margarina e burro, la Fosfina e la Fucsina basica (rapp. 1 : 1 in soluzione acquosa allo 0,1 %) per la polvere per gelati e per il latte in polvere, la Rodamina B per la struttura delle glutine nei prodotti di panetteria.

Nella tab. 10 sono riportate le caratteristiche di alcuni fluorocromi in unione con grassi, proteine e amido.

Radiazione di eccitazione: $\lambda = 3\ 400 - 5\ 000\ \text{Å}$ (340 - 500 nm)			
Fluorocromi	colori della radiazione di fluorescenza		
	grassi	proteine	amido
Arancio di Acridina	-	giallo-arancio	<i>verde</i>
Auramina	-	giallo	<i>verde</i>
Corifosfina	<i>verde</i>	rosso	<i>grigio-verde</i>
Fucsina basica	-	rosso	-
Fosfina 3 R	verde	-	<i>verde</i>
Rosso neutro	verde	rosso	-
Rodamina B	<i>verde scuro</i>	giallo	-
Primulina	-	giallo-arancio	giallo-verde

Legenda:
 - : fluorescenza assente
grassetto: fluorescenza intensa
 normale: fluorescenza di normale intensità
corsivo: fluorescenza debole

Tab. 11 - Ricordo che il termine "colore" non è propriamente corretto in questo contesto: meglio sarebbe indicare la lunghezza d'onda della radiazione di fluorescenza, essendo il "colore" una percezione soggettiva della radiazione elettromagnetica di una certa lunghezza d'onda (o, se si preferisce: di una certa frequenza).

(148) - Per ulteriori informazioni, vds.: N. KROG, *La microscopia a fluorescenza nell'industria alimentare*, INFORMAZIONI ZEISS, n. 49, 1963, pagg. 86 - 88.

Vds. anche: L. LAPPETITO, *Fluorescenza-Spettroscopia di Fluorescenza*, 2015, in: https://physicsopenlab.org/wp-content/uploads/2015/12/Fluorescenza_ITA.pdf

IMMUNOFLUORESCENZA

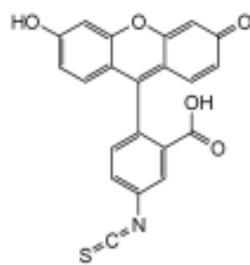
È una tecnica, usata per l'evidenziazione di alcune specifiche componenti tissutali o cellulari, basata sull'uso di fluorocromi coniugati con anticorpi specifici.

COONS⁽¹⁴⁹⁾, nel 1942, e COONS e KAPLAN⁽¹⁵⁰⁾, nel 1950, introdussero la tecnica della marcatura di anticorpi per mezzo dell'Isotiocianato di Fluoresceina (FITC).

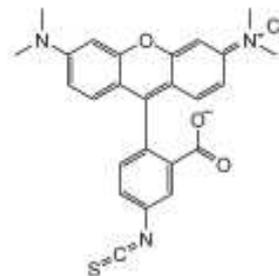
Nel 1958, WOLOCHOW⁽¹⁵¹⁾ aveva già adottato la tecnica di COONS e KAPLAN per identificare i batteri.

Sempre nel 1958, RIGGS⁽¹⁵²⁾ introdusse l'uso della FITC come fluorocromo in grado di facilitare il procedimento di coniugazione con le proteine per formare con esse un legame covalente.

Solo più recentemente è stato adottato l'Isotiocianato di Tetrametilrodamina (TRITC) come colorante di contrasto della FITC, soprattutto nell'osservazione "in radiazione incidente".



FITC



TRITC

Il motivo per cui si usano la FITC e la TRITC è che queste due molecole formano facilmente legami covalenti con i gruppi amminici primari presenti sui residui di Lisina delle molecole di anticorpo; sono, tuttavia, usati anche i derivati con Iodoacetammide della Fluoresceina e della Rodamina: essi sono in grado di coniugarsi tramite gruppi sulfidrilici.

(149) - A. H. COONS - H. J. CREECH - R. N. JONES - E. BERLINER, *The demonstration of pneumococcal antigen in tissues by use of fluorescent antibody*, *J. IMMUNOL.*, n. 45, 1942, pagg. 159 - 170.

(150) - A. H. COONS - M. H. KAPLAN, *cit.*

(151) - H. WOLOCHOW, *Fluorescent Labels for Antibody Proteins. Application to Bacterial Identification*, *J. BACTER.*, Vol. 77, 1958, pagg. 164 - 166.

(152) - J. L. RIGGS, *Isothiocyanate compounds as fluorescent labelling agents for immune serum*, *AM. J. PATH.*, n. 34, 1958, pagg. 1081 ss.

Soprattutto nella citofluorimetria di flusso, vengono usati fluorocromi coniugabili con i gruppi amminici o sulfidrilici quali il *Rosso Texas* (Sulforodamina), l'*AMCA* (7-ammino-4-metilcumarin 3-acetato) e il *BODIPY* (4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene).

La fig. 38 mostra come avviene la coniugazione della FITC, mentre la Fig. 39 mostra la coniugazione del Rosso Texas (chiamato anche TR dalla terminologia inglese *Texas Red*).

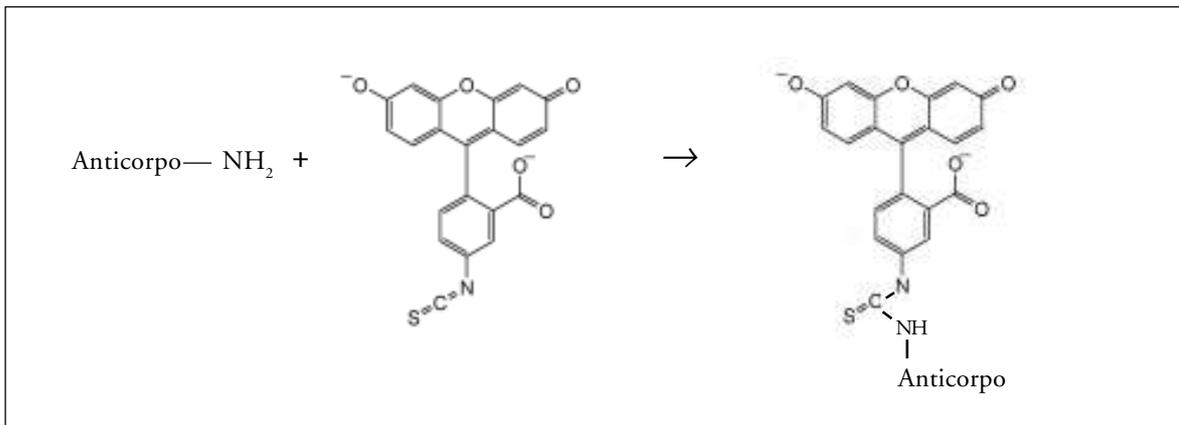


Fig. 38: Coniugazione della FITC con un Anticorpo.

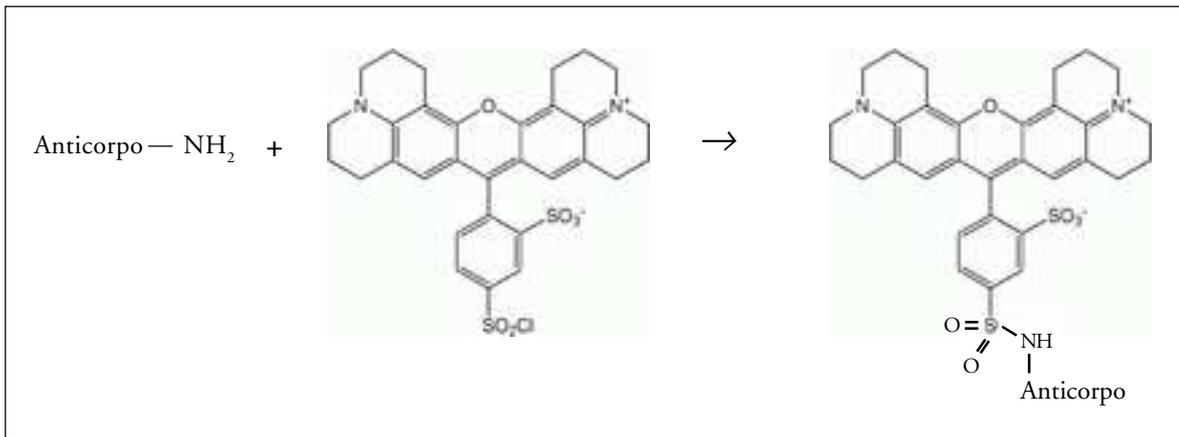


Fig. 39: Coniugazione del TR con un Anticorpo.

immunofluorescenza diretta

È una tecnica, consistente in una sola incubazione dell'antisiero con il materiale in esame (contenente l'antigene), con la quale può essere rivelata la presenza - nei tessuti - di antigeni esogeni quali virus, batteri, ecc.

Occorre, tuttavia, prestare attenzione alle difficoltà di interpretazione connesse con tale metodica, perché può essere presente fluorescenza aspecifica dovuta a impurità contenute nel coniugato, al contenuto proteico (più o meno elevato), alla colorazione di anticorpi coniugati aspecifici, all'autofluorescenza dei tessuti, alla fluorescenza aspecifica dei leucociti eventualmente presenti, ecc. Proprio quest'ultima, indesiderata fluorescenza è causa di particolari difficoltà nell'esame dei materiali che contengono pus. Il muco proveniente dalle vie respiratorie, ad esempio, possiede una radiazione di fluorescenza di $\lambda \approx 560$ nm (percepita come colore giallo-verde) che interferisce con l'esame. Per evitarla, occorre effettuare ripetuti lavaggi in PBS.

immunofluorescenza indiretta

È la tecnica più comunemente utilizzata in campo biomedico; con essa vengono evidenziati anticorpi specifici diretti verso determinati antigeni. Viene utilizzata, ad esempio, per testare la risposta immune (di tipo sia IgG sia IgM) nei confronti di agenti infettivi quali virus, batteri, funghi, protozoi, ma anche per evidenziare - nel corso di malattie autoimmuni - la presenza di autoanticorpi con bersaglio sia tissutale sia cellulare.

Per eseguire questa metodica vengono generalmente utilizzati portaoggetti sui quali viene stratificato il substrato (che può essere costituito da tessuto o da cellule provenienti da coltura).

Le sezioni di tessuto si dimostrano particolarmente utili nella ricerca di anticorpi autoimmuni: esse, infatti, consentono di evidenziare contemporaneamente anche eventuali ulteriori anticorpi diretti verso componenti extracellulari.

Il substrato composto da cellule provenienti da coltura è invece da utilizzare tassativamente per la ricerca di anticorpi diretti contro agenti infettivi esterni. Le cellule in coltura potranno essere infettate o non, oppure potranno essere costituite dall'agente infettivo stesso (come nel caso della Legionella, del Toxoplasma, del Treponema, del Micoplasma, ecc.).

Per evitare che eventuali anticorpi autoimmuni (diretti verso componenti intracellulari) possano interferire con la diagnosi facendo fluorescere sia i componenti intracellulari sia le cellule infette, è necessario che sul portaoggetti siano presenti anche cellule non infette che serviranno come controllo.

Il procedimento è analogo a quello utilizzato per l'immunofluorescenza diretta.

IMMUNOFLUORESCENZA

Nel tentativo di fare maggiore chiarezza, le Figure 40 e 41 illustrano sommariamente i processi di immunofluorescenza diretta e indiretta.

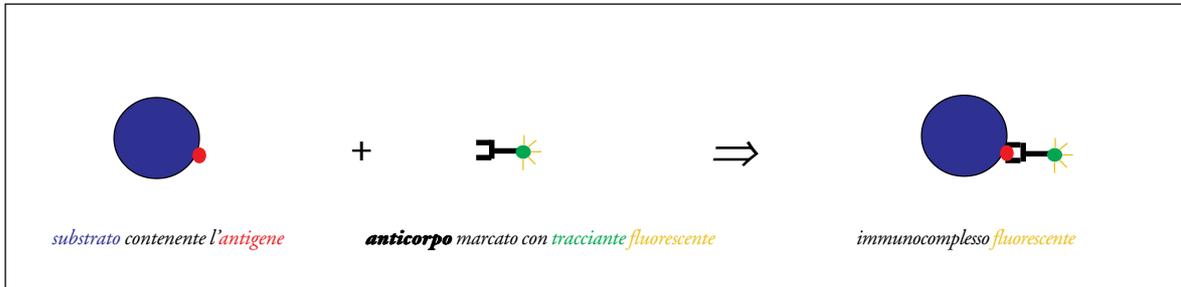


Fig. 40: Immunofluorescenza diretta.

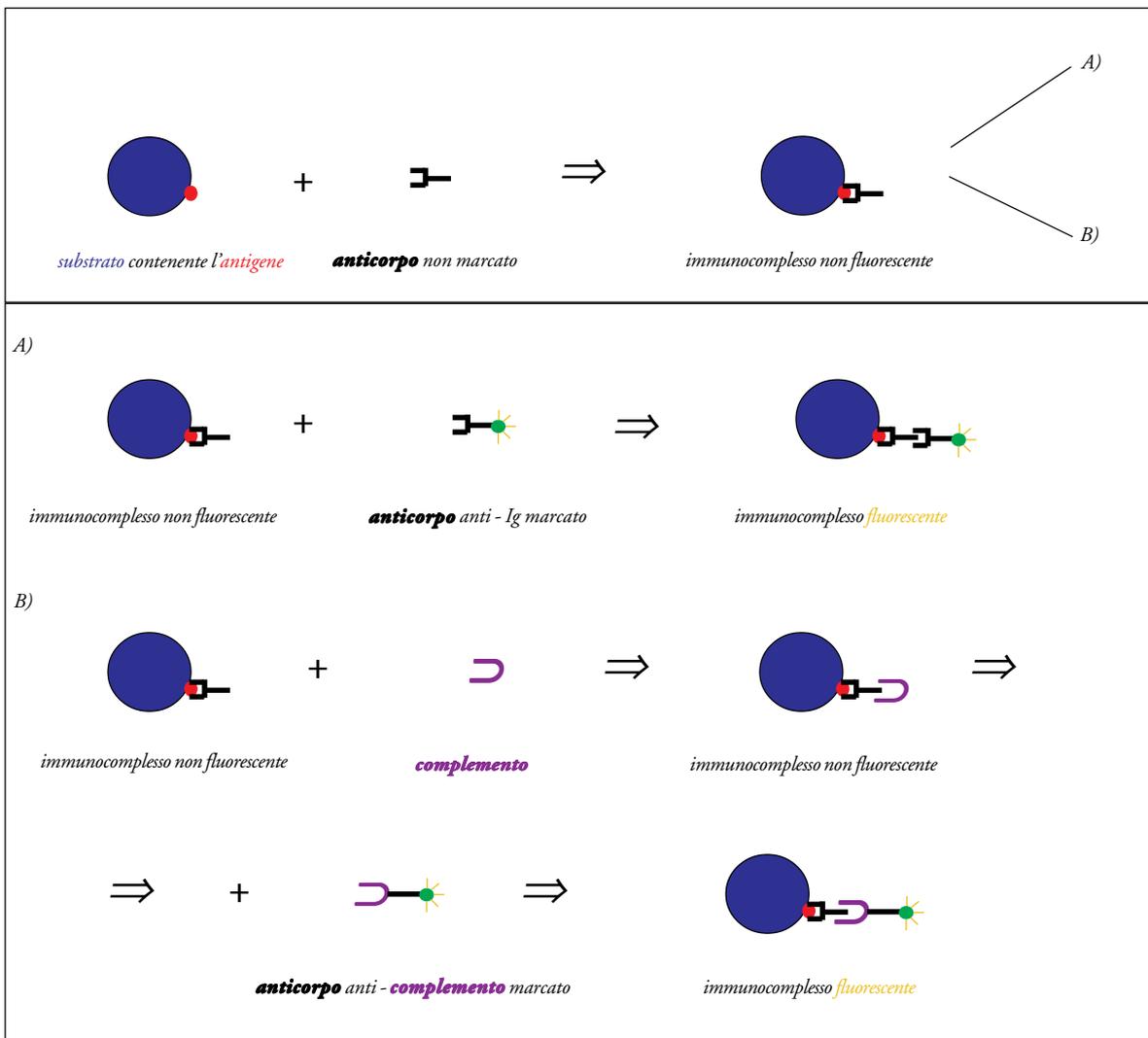


Fig. 41: Immunofluorescenza indiretta.

Per identificare gli anticorpi tissutali, si può usare il cosiddetto *Metodo sandwich*. Esso consiste nel ricoprire il tessuto da esaminare (di cui si vogliono riconoscere gli eventuali anticorpi) con un antigene noto non marcato: esso si applicherà in corrispondenza dei siti contenenti il suo anticorpo specifico formando il complesso antigene-anticorpo.

A questo punto si ricorre il preparato con un antisiero coniugato con FITC (fluorescente) che si legherà nei siti ove si era precedentemente attaccato l'antigene⁽¹⁵³⁾. Vds.: Fig. 42.

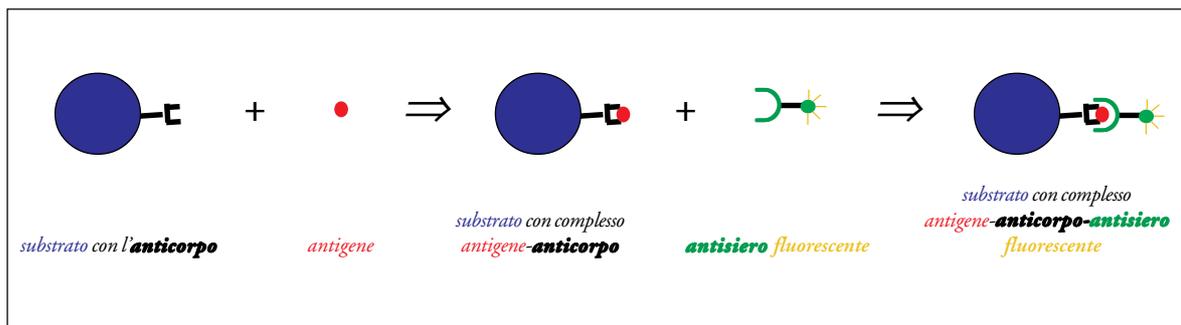


Fig. 42: Metodo di immunofluorescenza "a sandwich"

Il metodo di colorazione del complemento (C'), ideato da GOLWASSER e SHEPARD nel 1958⁽¹⁵⁴⁾, è particolarmente sensibile poiché anche piccole quantità di C', dopo legame con l'antisiero Anti-C' fluorocromizzato, forniscono un'intensa fluorescenza. Non mi dilungo oltre nella descrizione dei metodi di immunofluorescenza (peraltro descritti nella parte di questi "Appunti" dedicata alle metodiche analitiche) perché una trattazione più approfondita esulerebbe dalle finalità di questo lavoro dedicato ai microscopisti dilettanti.

(153) - Vds.: G. CASTOLDI, *Microscopia a fluorescenza, cit.*, pag. 210.

(154) - R. A. GOLDWASSER - CC. SHEPARD, *Staining of complement and modifications of fluorescent antibody procedures*, *J. IMMUNOL.*, n.80, 1958, pagg. 122 ss.

Tra le innumerevoli tecniche di interesse medico-biologico dell'immunofluorescenza, ritengo opportuno ricordare quelle descritte nei lavori di:

J.J. VAN ROOD, A. VAN LEEUWEN, J.S. PLOEM⁽¹⁵⁵⁾; K. HASHIMOTO, K. PARK, T. KAMITANI, e altri⁽¹⁵⁶⁾; K. JARCZOK, J. HOLOWIECKI⁽¹⁵⁷⁾; A.S.TOWNES, A.E. POSTLETHWAITE⁽¹⁵⁸⁾; M. TEODORESCU, E.P. MAYER⁽¹⁵⁹⁾.

In particolare, PLOEM e gli altri, già nel 1976 avevano utilizzato una sorgente monocromatica da 50W (HBO 50 W/a.c.), con una combinazione di filtri LP455 e SP490, uno specchio dicroico FT510 e un filtro barriera LP520, per rendere visibile simultaneamente la fluorescenza (518-530 nm)[verde] dell'isotiocianato (di fluoresceina) e la fluorescenza (527- 596 nm)[rossa] della rodamina (o del bromuro di etidio) (vedi nota 155).

(155) - J.J. VAN ROOD - A. VAN LEEUWEN - J.S. PLOEM, *Simultaneous detection of two cell populations by two-colour fluorescence and application to the recognition of B-cell determinants*, *NATURE*, vol. 262 (5571), 1976, pagg. 795-797.

(156) - K. HASHIMOTO, K. PARK, T. KAMITANI, E ALTRI, *Population of double cell and null cell by the method of simultaneous observation of T and B surface markers*, 1983, *RINSHO BYORI (THE JAPANESE JOURNAL OF CLINICAL PATHOLOGY)*, vol. 31(2), pagg. 189-193.

(157) - K. JARCZOK, J. HOLOWIECKI, *Specificity of the immunofluorescence method for the detection of native membrane immunoglobulins of B lymphocytes*, *POL TYG LEK (POLSKY TYGODNIK LEKARSKI)*, Warszawa, 1984, vol. 39(36), pagg. 1215-1217.

(158) - A.S.TOWNES, A.E. POSTLETHWAITE, *Lymphocyte surface markers in human disease*, *ADVANCES IN INTERNAL MEDICINE*, Springer, 1977, vol. 22, pagg. 97-119.

(159) - M. TEODORESCU, E.P. MAYER, *Surface immunoglobulin in immunoproliferative diseases*, *ANNALS OF CLINICAL & LABORATORY SCIENCE*, The Association of Clinical Scientists, 1978, vol.8(5), pagg. 353-365.

tracciamento delle proteine mediante fluorescenza

Tra le numerose pubblicazioni esistenti, uso normalmente riferirmi a R.C. NAIRN⁽¹⁶⁰⁾, testo che, benché “anzianotto”, è per me tuttora una vera miniera di informazioni che si accompagna (anche completandoli) a testi più recenti ma forse non così omnicomprensivi.

Qui mi limito a segnalare che l'*Isotiocianato di Fluoresceina* (FITC) è il colorante di prima scelta nella maggior parte degli esami in immunofluorescenza, benché la *Lissamina Rodamina B* (RB200), oltre ad essere più economica, presenti una maggiore resistenza al *fading*.

I cromofori principali delle proteine sono il legame peptidico e gli aminoacidi aromatici, questi gruppi di molecole assorbono in banda UV e, pertanto, la maggior parte delle proteine appare incolore all'occhio umano.

In particolare, i legami peptidici presentano due picchi di assorbimento: uno nella regione dello spettro con $210 < \lambda < 220$ nm e l'altro nella regione dello spettro con $190 < \lambda < 210$ nm, con coefficiente di estinzione rispettivamente di $\sim 100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ e $\sim 7000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Ritengo opportuno ricordare che il “coefficiente di estinzione” ϵ è la densità ottica (id est: assorbanza A oppure OD [da *Optical Density*] di cui si è già parlato alla pagina 44 di questi Appunti) di una soluzione a concentrazione unitaria misurata in un cammino ottico di lunghezza $l = 1$ cm. Generalmente si usa ϵ_M (espresso in $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), corrispondente all'assorbimento di una sostanza, in soluzione, alla concentrazione 1M (= 1mole/litro).

Nelle catene laterali degli aminoacidi sono presenti (oltre a transizioni comuni a quelle del legame peptidico) transizioni elettroniche, specifiche dei residui aromatici, che assorbono nella regione dello spettro elettromagnetico di $260 < \lambda < 280$ nm.

Tra gli aminoacidi aromatici, il triptofano è quello che maggiormente contribuisce all'assorbimento a 280 nm da parte delle proteine, poiché la tirosina e la fenilalanina hanno un valore di ϵ notevolmente più basso (benché il loro contributo sia comunque rilevante nelle proteine a basso contenuto di residui triptofanici).

Va ricordato che numerose proteine legano *gruppi prostetici* che conferiscono loro specifiche proprietà spettroscopiche, assorbendo nella regione dello spettro ottico e mostrandosi (all'occhio umano) colorate⁽¹⁶¹⁾.

Esempio classico è l'*eme* (cofattore dell'Emoglobina, alla quale conferisce il tipico colore rosso - come del resto alle altre proteine che legano l'eme) presentando una banda principale di assorbimento a ~ 410 nm ($350 < \lambda < 450$ nm) la cosiddetta

(160) - R.C. NAIRN, *Fluorescent Protein Tracing*, Churchill Livingstone, Edinburg, 1976⁴.

(161) - Vds.: M.C. BONACCORSI DI PATTI - R. CONTESTABILE - M.L. DI SALVO, *Metodologie biochimiche*, Zanichelli, Bologna, 2019², pagg. 194 ss.

“*banda di Soret*” (J.L. SORET, vds.: voce in bibliografia), utilizzata per analizzare varie molecole contenenti l’eme, come i vari *citocromi*), nonché altre bande ~550 nm. Alcuni coenzimi (FAD, FMN, NADH, PLP) assorbono tipicamente in banda ottica o nel vicino UV: ciò li rende assai utili come sonde spettroscopiche nello studio della struttura e della funzione delle proteine.

Per quanto riguarda l’assorbimento in UV degli acidi nucleici, questo è dovuto a transizioni coinvolgenti le basi puriniche e quelle pirimidiniche.

Poiché il legame glicosidico C-N che, negli acidi nucleici, si costituisce con lo zucchero (*desossiribosio* nel DNA e *ribosio* nell’RNA) influisce in maniera significativa nel determinare l’energia dei livelli elettronici, lo spettro di assorbimento degli acidi nucleici è diverso da quello delle loro singole basi, presentando (in entrambi gli acidi) un massimo a ~260 nm.

Il notevole sviluppo delle tecniche negli esami in fluorescenza è dovuto sia al miglioramento della strumentazione disponibile, sia alle tecniche mutagenetiche (che consentono di modificare facilmente la sequenza codificante di una proteina) e sia alla disponibilità di *sonde fluorescenti* atte a “marcare” - per mezzo di numerosi fluorofori oggi disponibili - le singole proteine in qualsiasi punto della loro sequenza aminoacidica.

I *fluorofori di interesse biochimico* vengono catalogati suddividendoli in “intrinseci” (qualora appartengano alle proteine le quali, quindi, fluorescono spontaneamente) e in “estrinseci” (qualora vengano aggiunti al campione in esame al fine di renderlo fluorescente).

È appena opportuno rammentare che, mentre un buon fluoroforo è anche un buon cromoforo, non sempre è vero il contrario (esistono, infatti, cromofori con elevato valore di ϵ ma che non fluorescono in modo significativo).

Come già precedentemente riferito a proposito dell’uso dell’Arancio di acridina, gli acidi nucleici non hanno fluorescenza intrinseca apprezzabile: è necessario “marcarli” con *sonde fluorescenti* (costituite in genere da molecole che si intercalano nella doppia elica; in particolare, per rendere evidenti i nuclei cellulari, si usa il 4’,6-diamino-2-fenilindolo (DAPI), colorante non tossico adatto anche a ricerche *in vivo*).

Le *sonde fluorescenti estrinseche* sono costituite da proteine fluorescenti o da piccole molecole organiche (a cui appartengono - tra numerose altre - la Fluoresceina e la Rodamina B), solitamente modificate coniugandole con gruppi reattivi in grado di unirle - per mezzo di legami covalenti - con residui aminoacidici specifici.

Ad esempio, la *maleimide* reagisce con il gruppo sulfidrilico della cisteina (aminoacido non particolarmente abbondante nelle proteine, per cui viene spesso usata come *ancoraggio* per la proteina in esame).

Qualora la proteina che si vuole studiare sia espressa in forma ricombinante, è possibile sostituire le molecole di cisteina presenti oppure introdurre - in posizioni diverse - nella sequenza codificante (ricorrendo alla mutagenesi sito-specifica, denominata

cysteine scanning mutagenesis) un residuo cisteinico, producendo in tal modo una serie di singoli mutanti.

La marcatura covalente di anticorpi con sonde fluorescenti è ampiamente usata per la rivelazione degli specifici antigeni mediante citofluorimetria o microscopia in immunofluorescenza (vds. pagg. 104 ss. di questi “Appunti”).

Il gruppo di *sonde fluorescenti intrinseche* è costituito da proteine “naturalmente” fluorescenti in banda ottica che trovano il loro impiego come etichetta (*tag*) per produrre *proteine di fusione* (proteine “chimeriche” ottenute - come ibridi - da proteine ricombinanti)⁽¹⁶²⁾.

I *tag proteici* trovano il loro principale impiego nel miglioramento dell’espressione e della solubilità (in definitiva, facilitano la purificazione) delle proteine ricombinanti espresse da batteri.

In genere, questi *tag* - costituiti da proteine dotate di grande solubilità - vengono aggiunti all’estremità N-terminale della proteina da esaminare, in modo da prevenirne sia l’aggregazione sia la formazione di corpi di inclusione insolubili.

Le molecole più comuni usate come *tag proteici* sono la *Glutathione S-transferasi* (GST) e la *Maltose Binding Protein* (MBP).

La *Green Fluorescent Protein* (GFP), estratta dalla medusa *Aequora victoria*, costituisce un caso particolare di *tag proteico*; inizialmente veniva usata come marcatore dell’espressione genica: infatti, il cDNA che codifica per la GFP genera una proteina fluorescente che, dal momento che non necessita di substrati esogeni né di cofattori, trova il suo impiego nel rilevamento dell’espressione genica e nella localizzazione delle proteine chimeriche che la contengono⁽¹⁶³⁾.

Della GFP sono state create numerose varianti, utilizzate per svariati tipi di studi ma precipuamente per individuare la localizzazione subcellulare di una proteina di interesse per mezzo della microscopia in fluorescenza, oppure per valutare interazioni molecolari tramite la FRET (vds. pagg. 56 ss. dei presenti “Appunti”).

(162) - Vds.: M.C. BONACCORSI DI PATTI - R. CONTESTABILE - M.L. DI SALVO, *cit.*, pagg. 90 ss.

(163) - Vds.: M.C. BONACCORSI DI PATTI - R. CONTESTABILE - M.L. DI SALVO, *cit.*, pagg. 93 ss.; in particolare, a pag. 94 è presente un’utile tabella che riassume struttura, utilizzo e localizzazione dei principali *tag peptidici* e *proteici*.

Analisi della struttura delle proteine

L'esame dei processi di denaturazione di una proteina fornisce preziose informazioni sulla sua struttura tramite l'analisi delle variazioni della fluorescenza del triptofano in essa contenuto.

Ad esempio, analizzando una proteina contenente anche un singolo residuo triptofanico nella regione interna maggiormente idrofobica, a seguito di denaturazione si osserva un *red shift* nello spettro di emissione della proteina: ciò è dovuto all'esposizione del triptofano in ambiente acquoso e, dunque, maggiormente polare.

Qualora, invece, si denaturasse una proteina contenente un residuo triptofanico in un solvente acquoso aggiungendovi un tensioattivo, si osserverebbe un *blue shift* nello spettro di emissione.

I dati ricavati dalle variazioni della λ_{\max} forniscono informazioni sulla struttura proteica, dalla risultanza dell'esposizione del triptofano: appare evidente che, qualora la proteina in esame contenga molteplici residui triptofanici (soprattutto se dotati di diversa accessibilità), l'analisi presenterà una maggiore complessità.

Per questo tipo di analisi è necessario scegliere una sonda la cui fluorescenza sia dotata di notevole sensibilità al microambiente in cui andrà ad operare; alternativamente, possono essere inseriti (per mezzo di mutagenesi sito-specifica) residui triptofanici in specifiche posizioni della sequenza della proteina in esame.

Analisi di *quenching* della fluorescenza

L'analisi quantitativa dell'attenuazione (*quenching*, vds. pagg. 48-49 di questi "Appunti") della fluorescenza di un fluoroforo viene usata, tra l'altro, nello studio di macromolecole biologiche, consentendo di valutare l'accessibilità del fluoroforo dovuta alla collocazione dello stesso in una regione esposta al solvente oppure interna.

Per questi studi si utilizza, in genere, un *quencher collisionale* (vedi pag. 48 di questi "Appunti") come, ad esempio, lo *ione ioduro* o l'*acrilamide* (sostanza dotata di cancerogenicità e mutagenicità nei ratti e sospetta nell'essere umano, che si forma negli alimenti contenenti asparagina e glucosio o fruttosio, quanto vengono cotti a temperatura maggiore di 150 °C, a seguito della *reazione di Maillard*).

La molecola di acrilamide è di piccole dimensioni ed elettricamente neutra, in grado di diffondersi anche all'interno delle proteine, producendo il *quenching* dei residui di triptofano, siano essi superficiali o interni (purché raggiungibili per diffusione).

Lo ione ioduro, come si evince dal nome, è elettricamente carico e la sua molecola ha dimensioni maggiori di quella dell'acrilamide: ciò limita la sua azione di *quencher* ai soli residui triptofanici siti sulla superficie delle proteine e in ambiente polare.

Lo studio si fonda sulla registrazione e sulla conseguente analisi degli spettri di emissione della proteina in esame, a seguito di concentrazioni crescenti del *quencher* usato.

Ovviamente, il Triptofano non è l'unica sonda spettroscopica utilizzabile nello studio della fluorescenza proteica: vengono usate, oltre a fluorofori come la Fluoresceina, il Texas Red, la Rodamina B, il Cy3, il Cy5 e il DAPI (già citati con le relative caratteristiche di eccitazione/emissione - insieme con numerosi altri - alle pagg. 59-64 dei presenti "Appunti"), proteine fluorescenti come quelle raccolte nella sottostante tabella:

proteina	λ_{eccit} (nm)	λ_{emiss} (nm)
GFP	395, 475	505
EGFP(F64L, S65T)	488	507
ECFP (F64L,S65T,Y66W, N146I, M153T, V163A)	434, 452	476, 505
YFP (S65G,V68L,S72A, T203Y)	514	527
DsRed	558	583
mCherry (V71,Q66M, M163Q,T195V)	587	610

(tabella 12, tratta, con modifiche, da: M.C. BONACCORSI DI PATTI - R. CONTESTABILE - M.L. DI SALVO, cit., pag. 206).

Per agevolare il lettore meno esperto, associo le sigle qui sopra riportate con le rispettive denominazioni:

GFP: Green Fluorescent Protein;

EGFP: Enhanced Green Fluorescent Protein (mutazione della Serina in posizione 65 - nella GFP - in Treonina)

ECFP: Enhanced Cyan Fluorescent Protein

BFP: Blue Fluorescent Protein (mutazione della Tirosina in posizione 66 in Istidina (Y66H)).

YFP: Yellow Fluorescent Protein

DsRed: Discosoma (dal numer del corallo da cui è espressa) Red

mCherry: Monomeric Cherry (dal colore rosso della radiazione emessa).

Le altre sigle si riferiscono a mutazioni derivate dalla GFP (ad esempio: Y66W, mutazione della Tirosina 66 della EGFP in Triptofano; S65T, mutazione della Serina in posizione 65 in Treonina; ecc.).

Per maggiori informazioni, rinvio a: M.C. BONACCORSI DI PATTI - R. CONTESTABILE - M.L. DI SALVO, cit., pag. 75).

A pagina 89 ho pubblicato alcune foto ottenute con fluorescenza in diasopia tramite illuminazione "home made" (descritta nelle pagine 84-88). Poiché attualmente uso un microscopio dotato di opportuna epi-illuminazione per fluorescenza, nelle pagine seguenti ho raccolto alcune foto realizzate su preparati di mia proprietà e/o realizzazione, al fine di mostrare le differenze nell'uso dei diversi filtri.

L'illuminazione avviene tramite una lampada a vapori di Mercurio ad arco corto HBO-100 W, pilotata dal proprio "ballast" (dotato anche di conta-ore di esercizio sia per non superare le 200 ore previste per la vita operativa della lampada stessa - per la sicurezza nei confronti di sua eventuale esplosione che comporterebbe inquinamento ambientale da vapori di Mercurio - sia per la costanza della resa luminosa,).

La radiazione luminosa emessa viene convogliata, attraverso un opportuno illuminatore per epifluorescenza (inserito tra il revolver portaobiettivi e la testa portaoculari) a uno dei tre partitori dicroici selezionabili tramite apposita leva e inviata all'obiettivo prescelto, attraverso il quale raggiunge il preparato e in esso genera la fluorescenza. Quest'ultima attraversa l'obiettivo (come nella normale osservazione in diasopia), giunge al partitore dicroico e lo attraversa venendo poi intercettata dagli oculari e/o nel canale/oculare per la ripresa fotografica. È opportuno ricordare che, la radiazione incidente sul preparato, può parzialmente "debordare" dal campo di osservazione: è pertanto necessario sottoporre al vetrino portaoggetto un adeguato "pozzetto" opaco e utilizzare lo schermo arancione di cui è dotato il microscopio onde evitare esposizioni accidentali, degli occhi o anche della cute, alla radiazione (soprattutto a quella UV). La porzione di radiazione che viene riflessa - insieme alla radiazione di fluorescenza - verso il partitore dicroico viene da questo deviata verso la sorgente, in modo da non produrre effetti nocivi.

Uso vari tipi di obiettivi, dai semplici acromatici a quelli alla fluorite, ai neofluar, ottenendo - ovviamente - risultati diversi; per la FITC e per la TRITC, uso i seguenti i filtri contenuti nell'opportuno "cubo":

Per la FITC:

eccitazione: K 2 (banda passante 470-490 nm);

splitter: RKP 510;

sbarramento: LP 515.

Per la TRITC:

eccitazione: M 2 (banda passante 546/14 nm);

splitter: RKP 580;

sbarramento: LP 580.

Per l'UV (UV + Violetto):

eccitazione: D (banda passante 355-425 nm);

splitter: RKP 455;

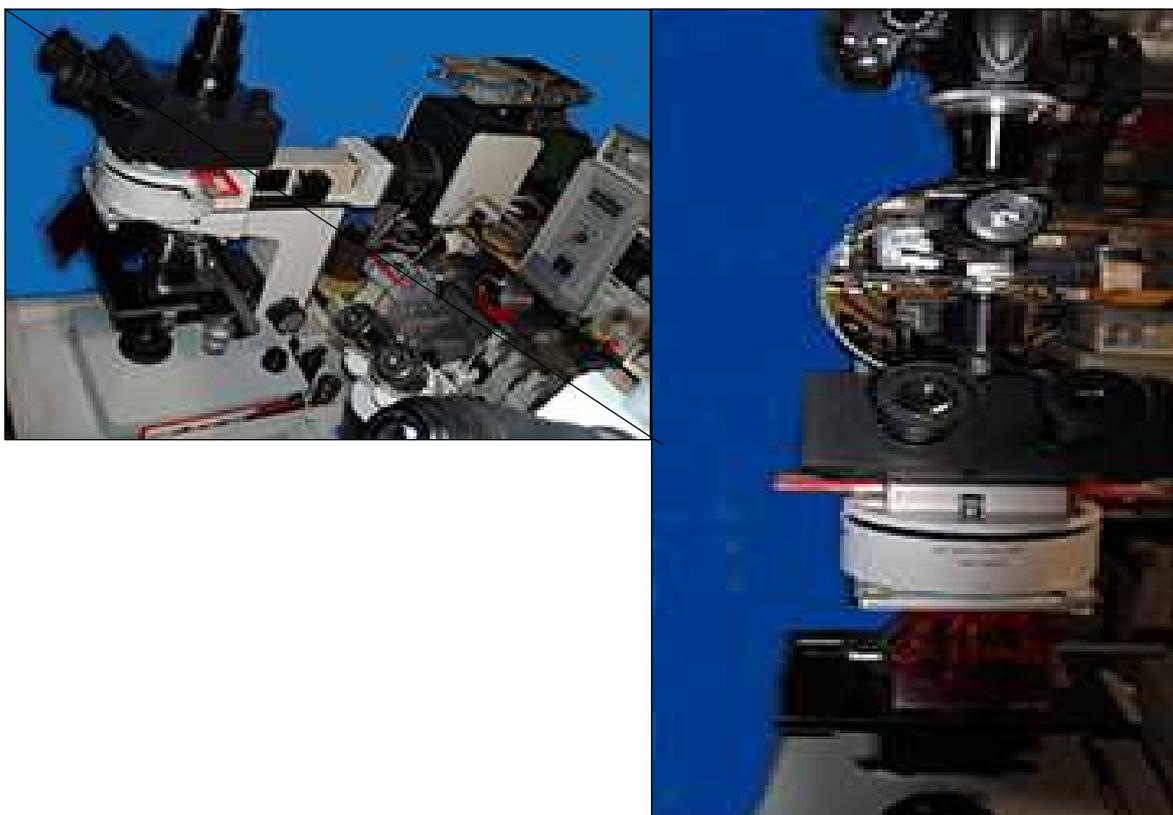
sbarramento: LP 460.

Ovviamente, per l'illuminazione in banda ottica vanno bene tutti i tipi di obiettivo, a differenza dell'UV, per l'uso del quale è preferibile adottare obiettivi alla fluorite o specificamente progettati (e notevolmente costosi!).

Ritengo opportuno ricordare che, a causa del *Quenching* e del *Photobleaching*, il tempo di osservazione della fluorescenza è notevolmente ridotto; pertanto, è opportuno dotarsi di adeguato apparato fotografico e di utilizzare le immagini registrate, limitando l'osservazione diretta a pochi secondi.

È opportuno sottolineare che, data la scarsa luminosità della radiazione di fluorescenza (soprattutto in episcopia), l'apparato di registrazione dell'immagine deve avere una elevatissima sensibilità (800-1600 ISO o superiore) per non dover utilizzare lunghi tempi di esposizione.

Altro consiglio operativo è quello di utilizzare il filtro riduttore della radiazione compresa tra 625 e 740 nm [cosiddetto: "riduttore del rosso"] (sito all'inizio del percorso ottico dell'illuminatore per epifluorescenza) quando si opera alle lunghezze d'onda minori; inoltre è buona norma inserire lo schermo opaco (sito sempre nell'illuminatore per epifluorescenza) per impedire che la radiazione emessa dalla lampada raggiunga il filtro dicroico (chiamato anche *divisore dicroico* o *beam splitter*) e di conseguenza il preparato quando questo non è soggetto all'osservazione/ripresa; tale espediente allunga la "sopravvivenza" della fluorescenza del campione.



Questo è il microscopio che attualmente uso per la microscopia in fluorescenza. Certamente, attrezzare un microscopio per la fluorescenza è costoso, ma su e-bay si trova sempre qualche “occasione” ancora alla portata dei microscopisti dilettanti. Ovviamente, l’illuminatore per epifluorescenza viene realizzato da varie Case produttrici e tutte utilizzano specifiche lunghezze focali e attacchi a coda di rondine diversamente calibrati: per non parlare delle diversità di prezzo... Prima di impegnarsi in una spesa così importante, si valuti bene il tipo, la marca e soprattutto la compatibilità del microscopio che si vuole adattare per l’osservazione in fluorescenza, qualora lo si intendesse dotare di apparato epi-illuminatore di marca diversa.

L’accessorio più costoso, a mio avviso, è costituito dai “cubi” che alloggiavano i vari filtri.

Per l’illuminazione, al momento attuale esistono LED per UV relativamente economici e anche i relativi circuiti alimentatori sono francamente accessibili: un illuminatore a LED costa certamente meno di un bruciatore a vapori di Mercurio o di Xeno (le sole lampade di ricambio spesso costano più di 200 euro) e l’alimentatore “ballast” non è certamente economico... basta dare un’occhiata su internet e ci si potrà facilmente rendere conto che anche sull’usato i costi sono piuttosto elevati.

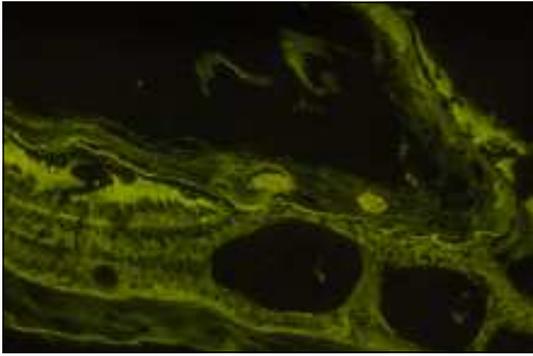
Tra l'altro, esiste anche la possibilità dell'illuminazione del preparato sia in diasopia tramite un condensatore per campo oscuro (che limiterebbe o addirittura escluderebbe la possibilità che la radiazione di eccitazione possa raggiungere l'occhio dell'osservatore, soprattutto se si interpone un adeguato filtro al di sotto degli oculari), sia in episcopia a "luce radente": basta un LED posto di lato al microscopio in modo tale che possa illuminare il campione in esame dall'alto, con un angolo generalmente attorno ai 45°. È importante che il LED abbia una potenza non inferiore a 3 o 5 watt.

A proposito dei LED, non mi sembra inopportuno ricordare che i diodi di potenza hanno bisogno di specifici alimentatori che ne limitino l'intensità di corrente: infatti, i LED, a differenza delle comuni lampade a incandescenza, vendono alimentati in intensità di corrente e non in tensione! Inoltre, ogni casa produttrice stabilisce una "tensione d'innescò" minima per l'accensione del diodo: non ci si può fidare del "sentito dire"! Può essere sufficiente anche un resistore (di opportuno valore ohmico e di adeguata potenza) da porre "in serie" al diodo per limitare la corrente, ma occorre sapere ciò che si fa, pena l'immediata distruzione del LED. In Internet esistono vari siti che forniscono "calcolatori" *on line* per dimensionare correttamente tali resistori. È consigliabile sempre interloquire con il produttore dei diodi stessi e chiedere lumi. Qualora si intendesse realizzare autonomamente anche l'illuminazione in banda visibile per il microscopio, ricordo che esistono LED sia a "luce calda" (*warm*) [con temperatura di colore 2800-3400 K], sia a "luce fredda" (*cold*) [con temperatura di colore di 5000 e fino a 6500 K]. Spesso, il rendimento dei LED a "luce calda" è leggermente inferiore a quello dei LED a "luce fredda", ma ciò viene compensato dalla maggiore sensibilità dell'occhio alla temperatura di colore più calda. Il problema si può porre nella fotografia a colori, ma basta inserire nel percorso ottico un filtro di conversione 80A (o anche 80B, ancora più "freddo") come si faceva nell'uso delle emulsioni fotografiche. E poi, in ultima analisi, ci sono sempre le modifiche dell'immagine in post-produzione... Nel progettare il circuito per il LED, si cerchi di ridurre al minimo lo sfarfallio della radiazione luminosa, fornendo un'intensità di corrente ottimale e una tensione stabilizzata! Nelle pagine seguenti, ho raccolto alcune foto di campioni esaminati e fotografati in fluorescenza.

L'apparato di ripresa è una fotocamera con sensore CCD APS-C 23,6×15,8 mm da 10,2 Mpixel effettivi, munita di accessorio completo di mirino angolare, di otturatore meccanico centrale e di obiettivo fotografico 2,5×.

Gli obiettivi usati per le riprese sono: 4×, 10× e 40× plan-acromatici; 25× NPL; il 100× è un Neofluar a immersione in olio. Dispongo anche di "specifici" obiettivi 10×, 20× e 40× "Fluor", a grande A.N., ma - essendo questi "Appunti" dedicati a dilettanti - ho preferito usare ottiche "accessibili".

FLUORESCENZA IN MICROSCOPIA OTTICA



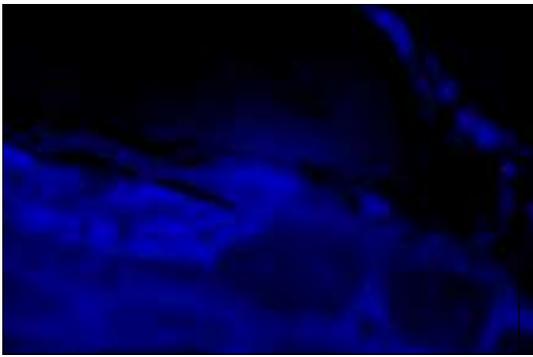
0,1 mm

obiettivo 10× - filtro K (470-490 nm) - 800 ISO - exp 1''



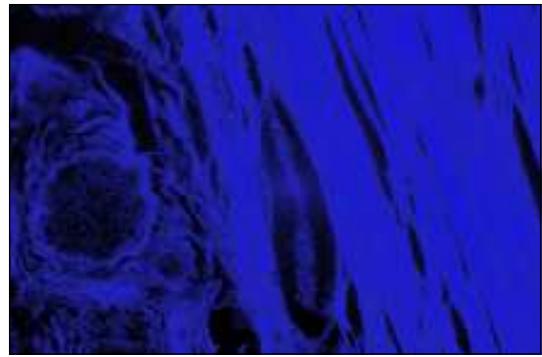
0,1 mm

obiettivo 10× - filtro K (470-490 nm) - 400 ISO - exp 1''



0,1 mm

obiettivo 10× - filtro D (355-425 nm) - 1600 ISO - exp 6''



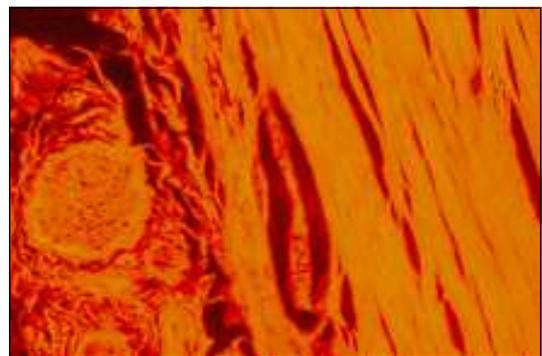
0,1 mm

obiettivo 10× - filtro D (355-425 nm) - 1600 ISO - exp 6''



0,1 mm

obiettivo 10× - filtro M2 (546/14 nm) - 400 ISO - exp 6''



0,1 mm

obiettivo 10× - filtro M2 (546/14 nm) - 400 ISO - exp 6''

Melanoblastoma del bulbo oculare
(Colorazione: Ematossilina-Eosina)

Sarcoma dell'occhio
(Colorazione: Ematossilina-Eosina)

FLUORESCENZA IN MICROSCOPIA OTTICA



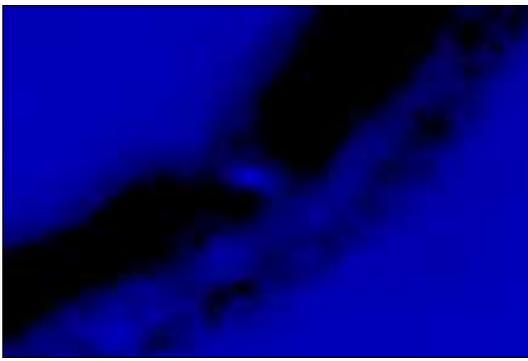
0,02 mm

obiettivo 40× - filtro K (470-490 nm) - 1600 ISO - exp 6"



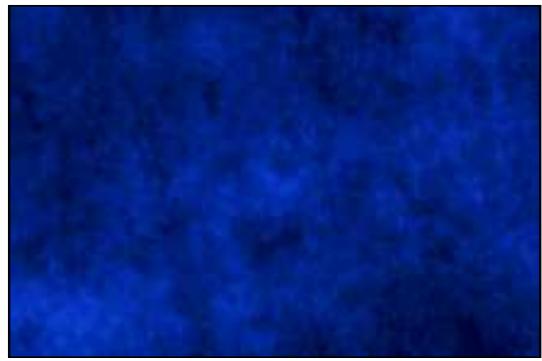
0,02 mm

obiettivo 40× - filtro K (470-490 nm) - 1600 ISO - exp 6"



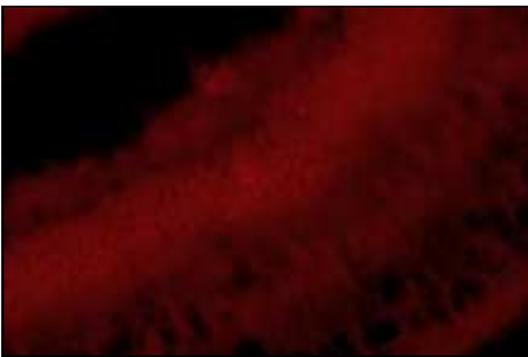
0,02 mm

obiettivo 40× - filtro D (355-425 nm) - 1600 ISO - exp 6"



0,02 mm

obiettivo 40× - filtro D (355-425 nm) - 1600 ISO - exp 6"



0,02 mm

obiettivo 40× - filtro M2 (546/14 nm) - 1600 ISO - exp 1"



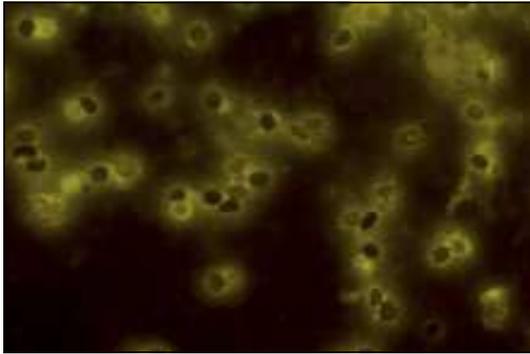
0,02 mm

obiettivo 40× - filtro M2 (546/14 nm) - 400 ISO - exp 6"

Retina di gatto
(Colorazione: Ematossilina-Eosina)

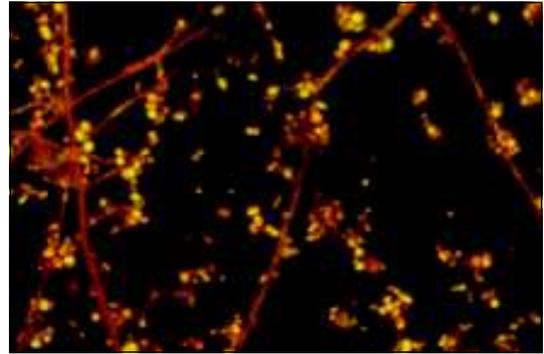
Batteri (in urinocultura)
(Colorazione: Auramina alcolica fenicata)

FLUORESCENZA IN MICROSCOPIA OTTICA



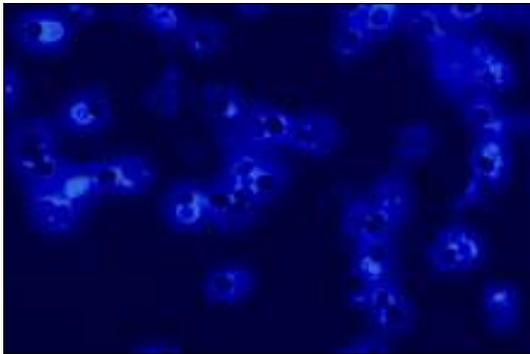
0,02 mm

obiettivo 40× - filtro K (470-490 nm) - 1600 ISO - exp 6"



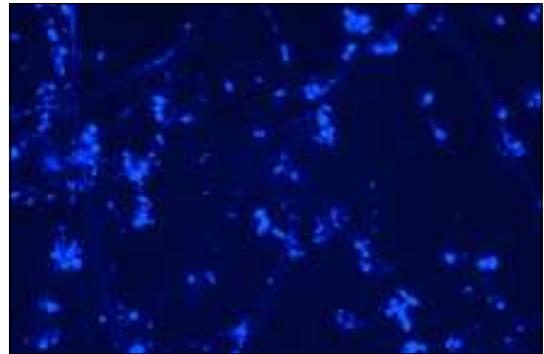
0,02 mm

obiettivo 40× - filtro K (470-490 nm) - 1600 ISO - exp 6"



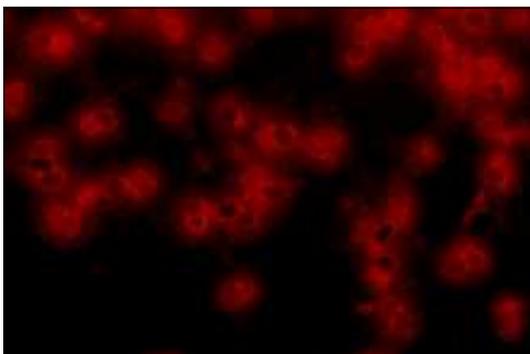
0,02 mm

obiettivo 40× - filtro D (355-425 nm) - 1600 ISO - exp 6"



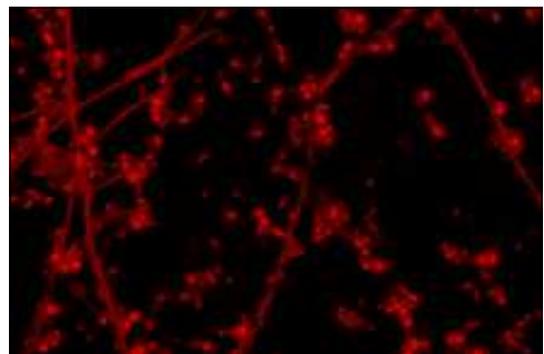
0,02 mm

obiettivo 40× - filtro D (355-425 nm) - 1600 ISO - exp 6"



0,02 mm

obiettivo 40× - filtro M2 (546/14 nm) - 1600 ISO - exp 6"



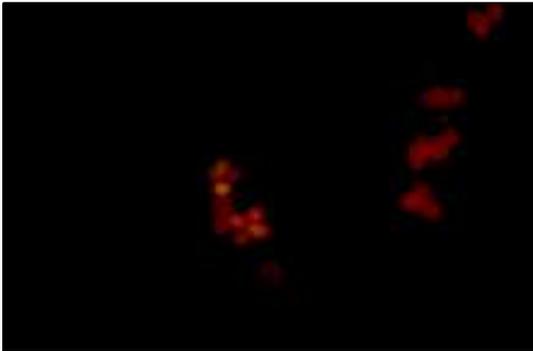
0,02 mm

obiettivo 40× - filtro M2 (546/14 nm) - 1600 ISO - exp 6"

fungo Prataiolo: spore
(Colorazione: Blu di Lattofenolo)

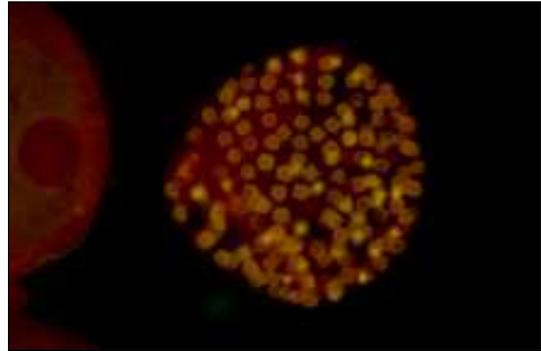
Lievito (coltura con contaminazione fungina)
(Colorazione: Gram)

FLUORESCENZA IN MICROSCOPIA OTTICA



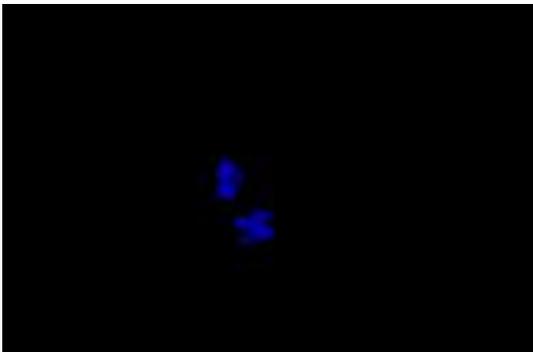
0,01 mm

obiettivo 100× - filtro K (470-490 nm) - 800 ISO - exp 1''



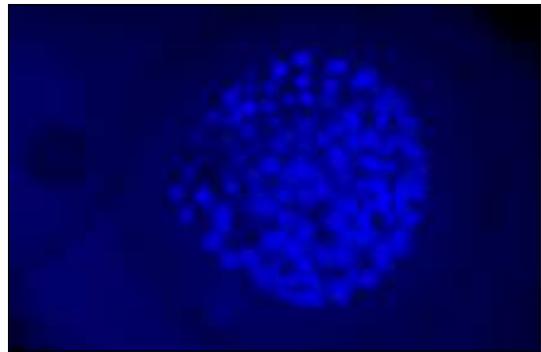
0,1 mm

obiettivo 10× - filtro K (470-490 nm) - 800 ISO - exp 1''



0,01 mm

obiettivo 100× - filtro D(470-490 nm) - 800 ISO - exp 1''



0,1 mm

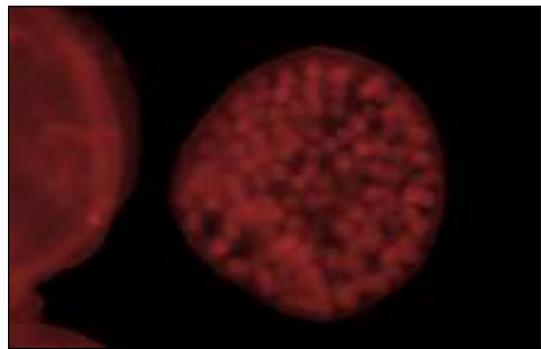
obiettivo 10× - filtro D (355-425 nm) - 1600 ISO - exp 6''



0,01 mm

obiettivo 100× - filtro M2(470-490 nm) - 800 ISO - exp 1''

Saccaromyces
(colorazione: Eosina)

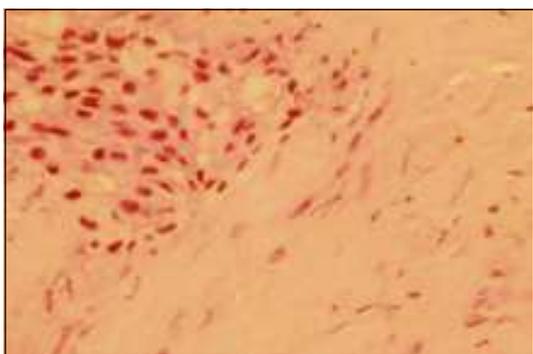


0,1 mm

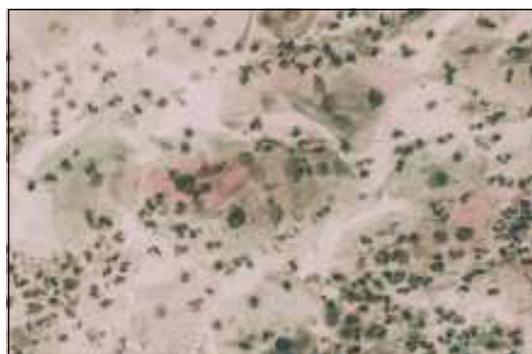
obiettivo 10× - filtro M2 (546/14 nm) - 400 ISO - exp 6''

Volvox
(colorazione: arancio di Acridina-Eosina)

FLUORESCENZA IN MICROSCOPIA OTTICA



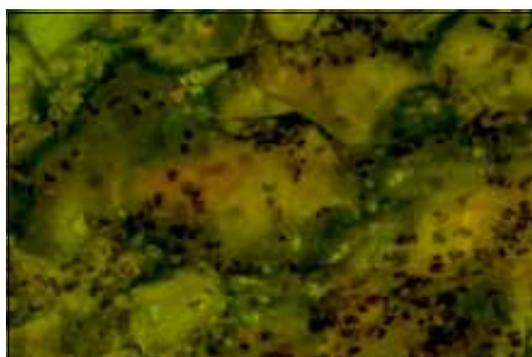
0,05 mm
obiettivo 25x - 2800 K - 800 ISO - exp 0,125" (1/8")



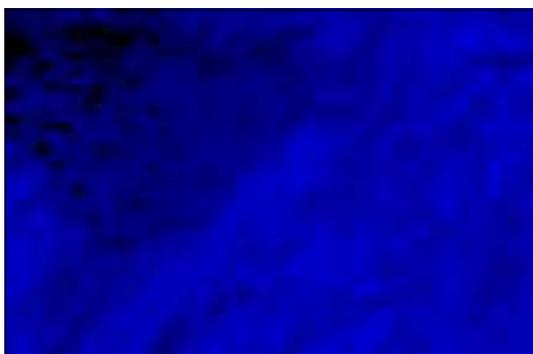
0,05 mm
obiettivo 25x - 2800 K - 800 ISO - exp 1"



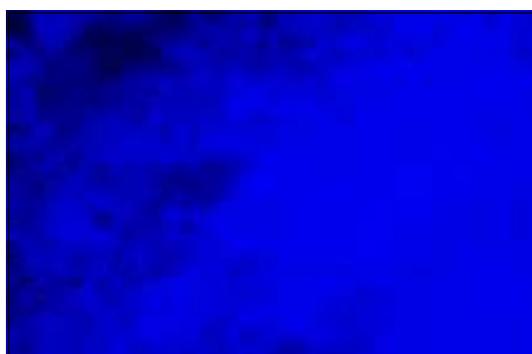
0,05 mm
obiettivo 25x - filtro K (470-490 nm) - 800 ISO - exp 6"



0,05 mm
obiettivo 25x - filtro K (470-490 nm) - 800 ISO - exp 6"



0,05 mm
obiettivo 25x - filtro D (355-425 nm) - 800 ISO - exp 6"



0,05 mm
obiettivo 25x - filtro D (355-425 nm) - 800 ISO - exp 6"



0,05 mm
obiettivo 25x - filtro M2 (546/14 nm) - 800 ISO - exp 1"

Carcinoma gastrico (da biopsia)
(Colorazione Ematossilina-Eosina)



0,05 mm
obiettivo 25x - filtro M2 (546/14 nm) - 800 ISO - exp 0,5" (1/2)

Scraping uterino (Pap-test)
(Colorazione Papanicolaou)

FLUORESCENZA IN MICROSCOPIA OTTICA



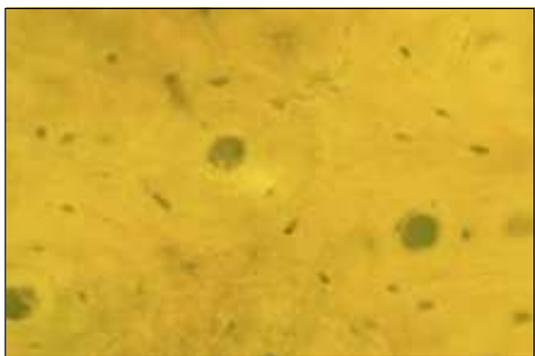
0,05 mm

obiettivo 25× - 2800 K - 1600 ISO - exp 0,03" (1/30")



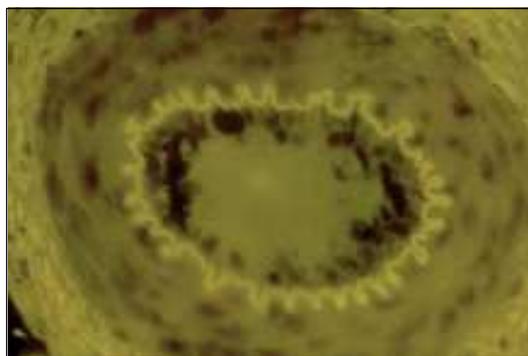
0,02 mm

obiettivo 40× - 2400 K - 800 ISO - exp 0,125" (1/8")



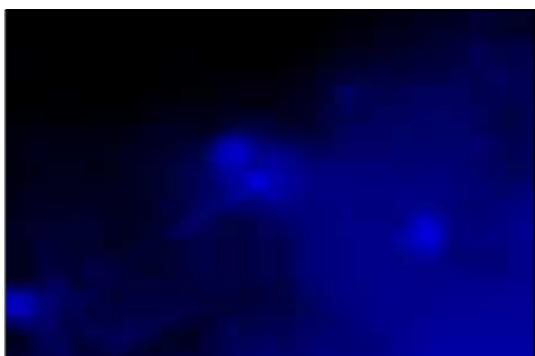
0,05 mm

obiettivo 25× - filtro K (470-490 nm) - 1600 ISO - exp 6"



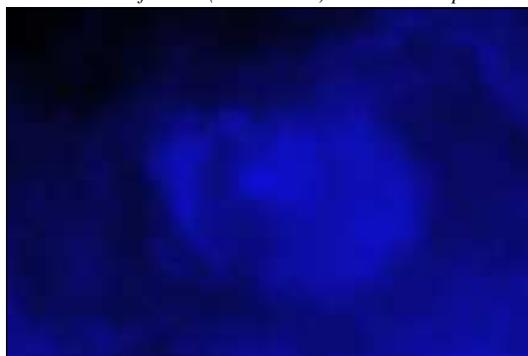
0,02 mm

obiettivo 40× - filtro K (470-490 nm) - 800 ISO - exp 6"



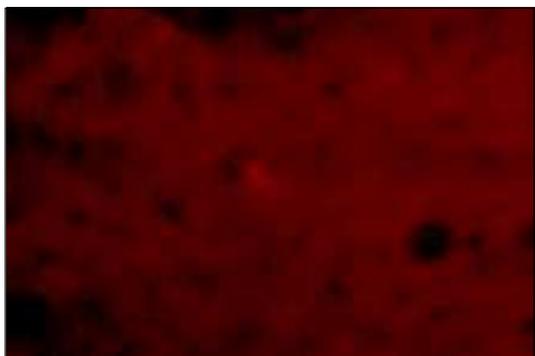
0,05 mm

obiettivo 25× - filtro D (355-425 nm) - 1600 ISO - exp 6"



0,02 mm

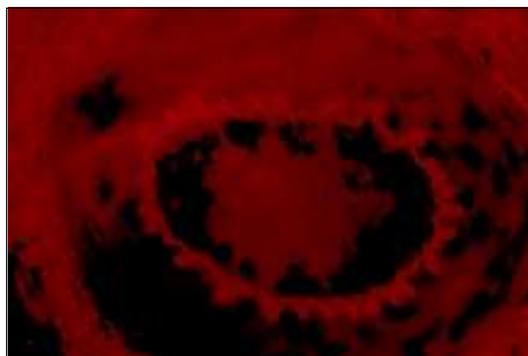
obiettivo 40× - filtro D (355-425 nm) - 800 ISO - exp 6"



0,05 mm

obiettivo 25× - filtro M2 (546/14 nm) - 1600 ISO - exp 0,07" (1/15")

Osso (tessuto osteonico)
(Colorazione: Acido picrico-Eosina)

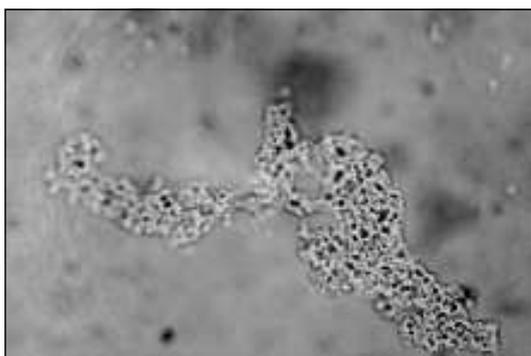


0,02 mm

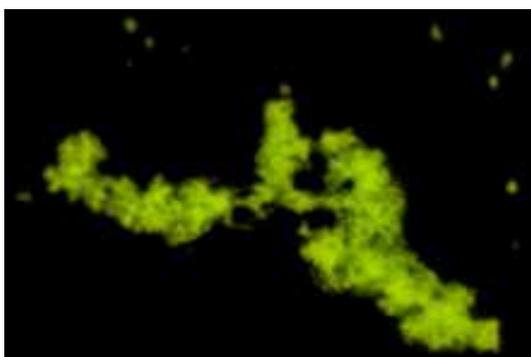
obiettivo 40× - filtro M2 (546/14 nm) - 800 ISO - exp 1"

Arteria
(Colorazione: Ematossilina-Eosina)

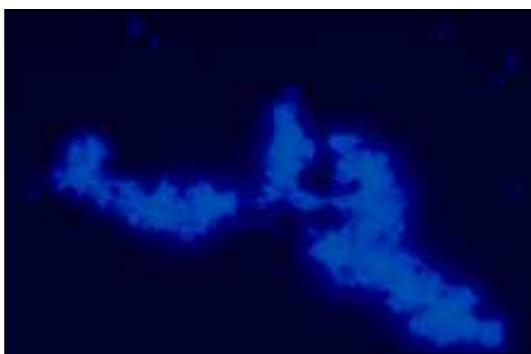
FLUORESCENZA IN MICROSCOPIA OTTICA



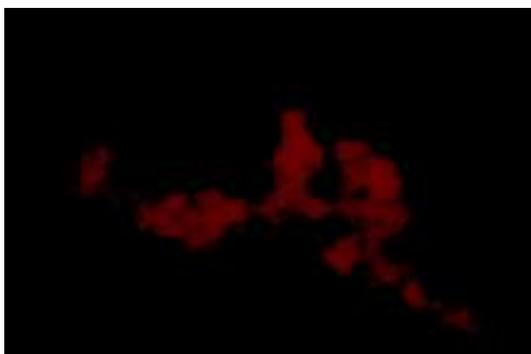
0,02 mm
obiettivo 40x - 2800 K - 1600 ISO - exp 0,07" (1/15")



0,02 mm
obiettivo 40x - filtro K (470-490 nm) - 1600 ISO - exp 6"



0,02 mm
obiettivo 40x - filtro D (355-425 nm) - 1600 ISO - exp 6"



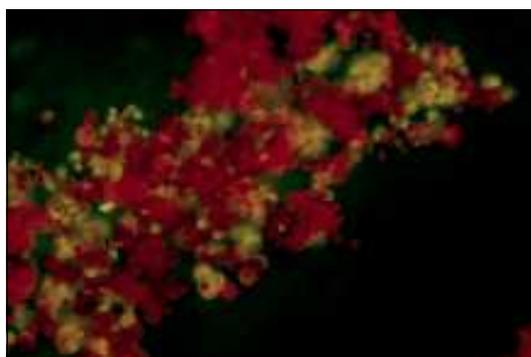
0,02 mm
obiettivo 40x - filtro M2 (546/14 nm) - 1600 ISO - exp 0,07" (1/15")

Muffa (su formaggio)
(Colorazione: Auramina alcolica fenicata)

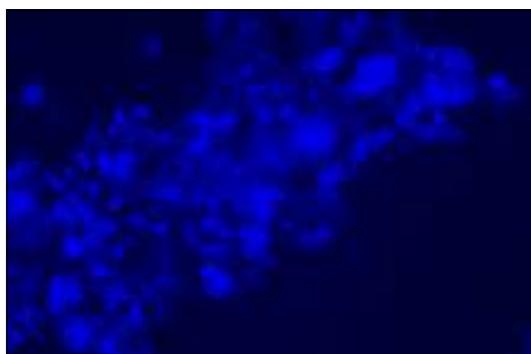
M. Brusadin - MICROSCOPIA IN FLUORESCENZA



0,05 mm
obiettivo 25x - 2800 K - 800 ISO - exp 0,125" (1/8")



0,05 mm
obiettivo 25x - filtro K (470-490 nm) - 800 ISO - exp 6"



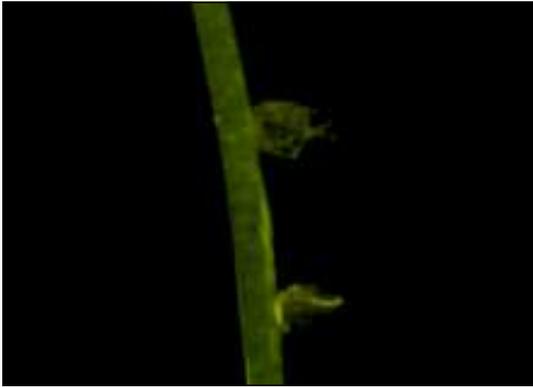
0,05 mm
obiettivo 25x - filtro D (355-425 nm) - 800 ISO - exp 6"



0,05 mm
obiettivo 25x - filtro M2 (546/14 nm) - 800 ISO - exp 1"

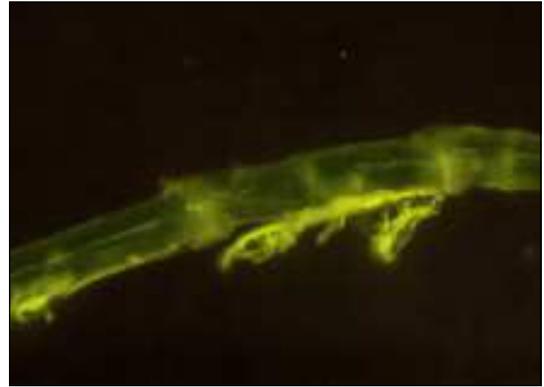
Chlamydomonas
(Colorazione: Verde luce-Eosina)

FLUORESCENZA IN MICROSCOPIA OTTICA



0,05 mm

obiettivo 25× - filtro K (470-490 nm) - 800 ISO - exp 1''



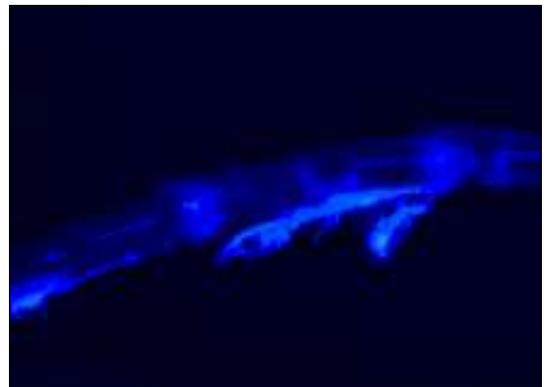
0,05 mm

obiettivo 25× - filtro K (470-490 nm) - 800 ISO - exp 1''



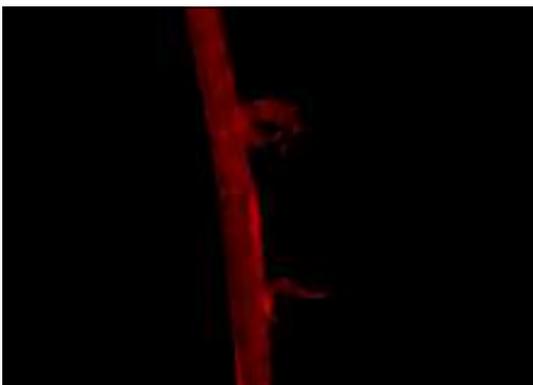
0,05 mm

obiettivo 25× - filtro D (355-425 nm) - 1600 ISO - exp 6''



0,05 mm

obiettivo 25× - filtro D (355-425 nm) - 1600 ISO - exp 6''



0,05 mm

obiettivo 25× - filtro M2 (546/14 nm) - 400 ISO - exp 6''

Lino grezzo
(filo non colorato)

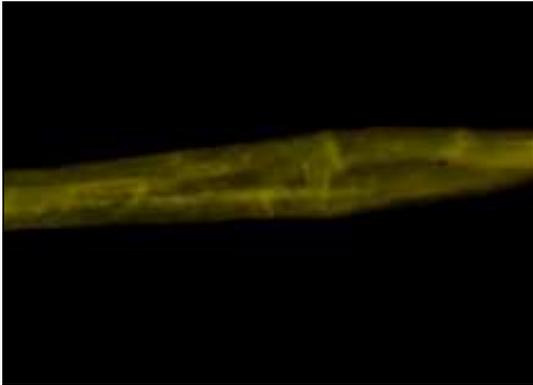


0,05 mm

obiettivo 25× - filtro M2 (546/14 nm) - 400 ISO - exp 6''

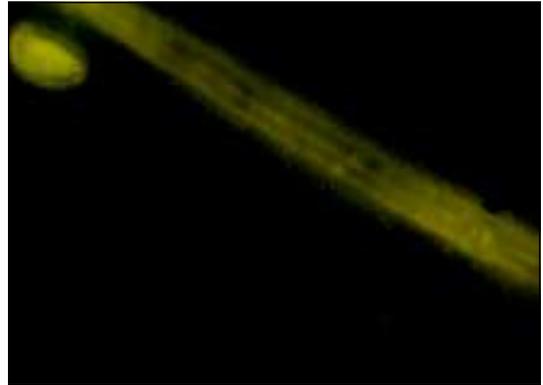
Lino bianco
(filo non colorato)

FLUORESCENZA IN MICROSCOPIA OTTICA



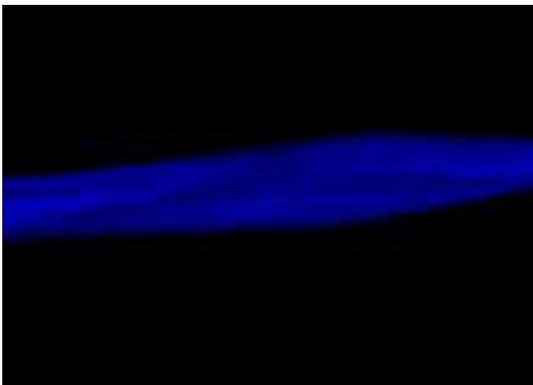
0,02 mm

obiettivo 40× - filtro K (470-490 nm) - 800 ISO - exp 1''



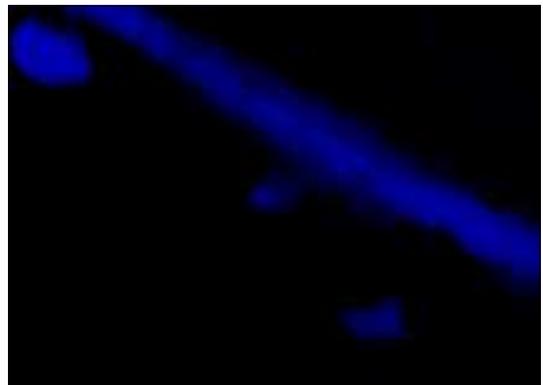
0,02 mm

obiettivo 40× - filtro K (470-490 nm) - 800 ISO - exp 1''



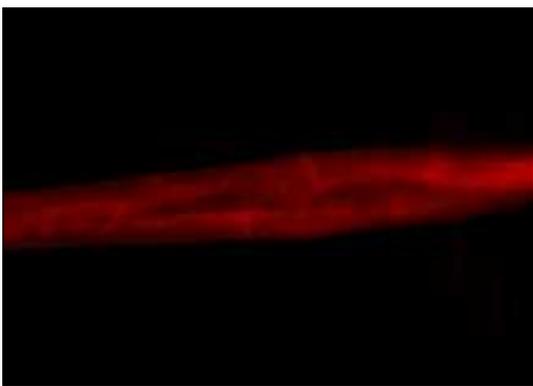
0,02 mm

obiettivo 40× - filtro D (355-425 nm) - 1600 ISO - exp 6''



0,02 mm

obiettivo 40× - filtro D (355-425 nm) - 1600 ISO - exp 6''



0,02 mm

obiettivo 40× - filtro D (355-425 nm) - 1600 ISO - exp 6''

Lino grezzo
(filo in Olio di Cedro)



0,02 mm

obiettivo 40× - filtro D (355-425 nm) - 1600 ISO - exp 6''

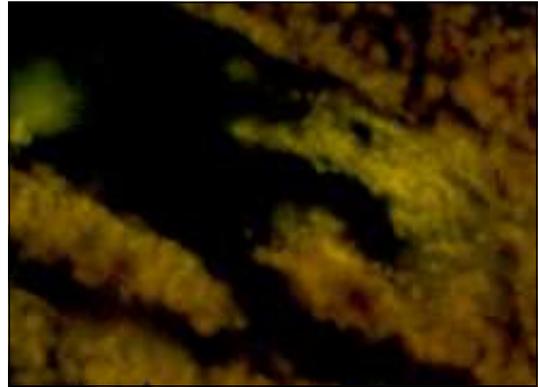
Cotone grezzo
(filo in Olio di Cedro)

FLUORESCENZA IN MICROSCOPIA OTTICA



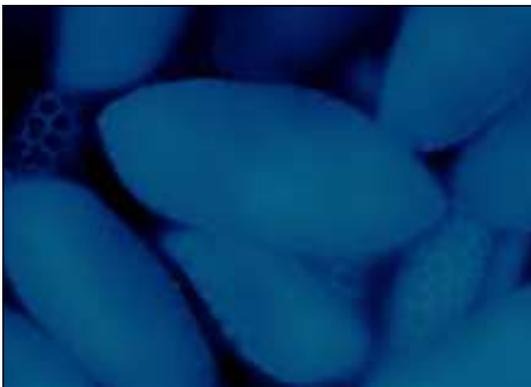
0,02 mm

obiettivo 40x - filtro K (470-490 nm) - 800 ISO - exp 1"



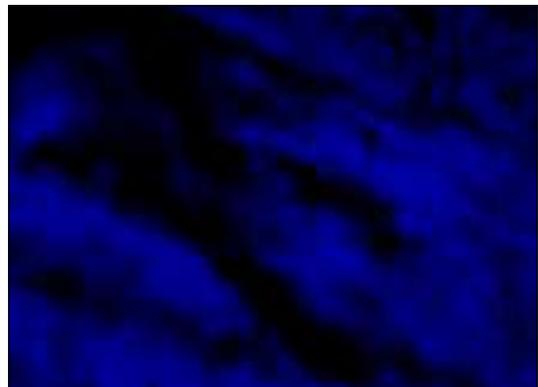
0,02 mm

obiettivo 40x - filtro K (470-490 nm) - 800 ISO - exp 1"



0,02 mm

obiettivo 40x - filtro D (355-425 nm) - 1600 ISO - exp 6"



0,02 mm

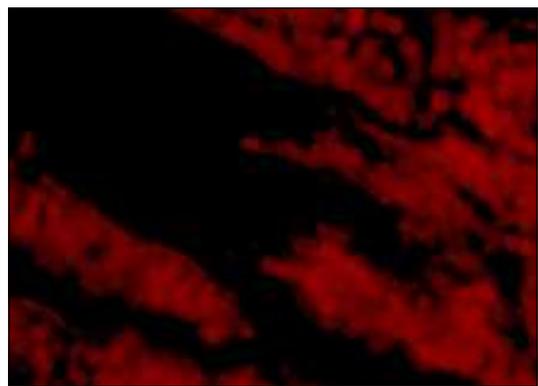
obiettivo 40x - filtro D (355-425 nm) - 1600 ISO - exp 6"



0,02 mm

obiettivo 40x - filtro M2 (546/14 nm) - 400 ISO - exp 6"

Giglio (polline)
(non colorato)



0,02 mm

obiettivo 40x - filtro M2 (546/14 nm) - 400 ISO - exp 6"

Cartilagine di coniugazione
(Alcian-PAS)

METODICHE ANALITICHE

REAGENTI

Tampone Fosfati secondo SØRENSEN, 1909.

Ne esiste più di una variante, ma la formulazione “classica” - riportata da GOMORI, *Methods in Enzymology*, Academic Press Inc., New York, 1955, Vol. 1, pag. 143 - è: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{NaH}_2\text{PO}_4$ (buffer 0,1 M).

(Per chi non si intendesse di chimica, 0,1 M significa: **0,1 molare**, cioè che contiene 0,1 moli in 1000 millilitri *di soluzione*: la mole è la *quantità in grammi di una sostanza, pari al suo peso molecolare*).

ATTENZIONE: per preparare una “soluzione titolata” occorre pesare la quantità di sostanza da disciogliere, porla in un pallone “tarato” e **portare al volume** finale desiderato con acqua distillata (**non** aggiungere direttamente la quantità finale di acqua!). Poiché esistono varie “preparazioni” di Fosfato di Sodio, contenenti più o meno H_2O (come acqua di cristallizzazione), ecco i pesi molecolari (**m.w., molecular weight**) dei prodotti reperibili in commercio:

- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - m.w: 178,05; la soluzione 0,2 M ne contiene 35,61 g che dovranno essere sciolti in H_2O (distillata), portando al volume finale di 1000 ml.
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ - m.w: 358,22; la soluzione 0,2 M ne contiene 71,64 g .
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ - m.w.: 156,03; la soluzione 0,2 M ne contiene 27,6 g .
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - m.w.: 138,0; la soluzione 0,2 M ne contiene 31,21 g.

Si possono ottenere diversi valori di pH, a seconda delle quantità delle soluzioni dei due Sali che si mescolano tra loro; per ottenere **pH 7,0**:

soluzione 0,2 M di Na_2HPO_4 61,0 ml

soluzione 0,2 M di NaH_2PO_4 39,0 ml

mescolare e portare a 200 ml con H_2O (distillata).

Tampone Fosfato-Acido Citrico secondo PEARSE (1980).

Per ottenere **pH 5,4** (necessario per la Colorazione di MOMMSEN⁽¹⁶⁴⁾) occorre:

soluzione 0,2 M di Na_2HPO_4 27,8 ml (vedi qui sopra)

soluzione 0,1 M di Acido Citrico 22,2 ml (21,01 g in 1000 ml H_2O)

mescolare e portare a 100 ml con H_2O (distillata).

Misurare il pH con un pH-metro elettronico (ne esistono di “portatili” il cui costo è di circa 50 euro) ed eventualmente “aggiustare” il valore al pH desiderato aggiungendo – goccia a goccia – **HCl** (0,01 M) o **NaOH** (0,01 M), secondo necessità.

Poiché la preparazione del tampone non è proprio semplicissima, per un principiante, conviene acquistarlo già pronto presso le Ditte di prodotti chimici.

(164) - Vds.: M.BRUSADIN, *I preparati ematologici*, Roma, 2008, pagg. 35, liberamente scaricabile dai siti:
[http:// www.funsci.it](http://www.funsci.it) oppure <http://www.marcobrusadin.it>

METODI

metodo per l'evidenziazione della noradrenalina nella surrenale

Si effettua su frammenti di midollare di surrene di 2-3 mm di spessore.

- 1) Fissazione in formolo calcico (meglio mediante vapori di formolo) (24-48 h).
- 2) Produrre sezioni al microtomo congelatore dello spessore di 25-50 μ .
- 3) Montare le sezioni in Glicerolo.
- 4) Esaminare in UV.

- Le cellule secernenti noradrenalina presentano una fluorescenza giallo-verdastra.

metodo per l'osservazione delle fibre adrenergiche

La preparazione del campione deve essere effettuata secondo la tecnica del *Freeze-drying* (lett.: congelamento-disidratazione)⁽¹⁶⁵⁾; questo metodo non deve essere considerato un metodo di fissazione, poiché in realtà impedisce il verificarsi dei fenomeni autolitici non per mezzo di una modificazione chimica del tessuto, ma esclusivamente a seguito della completa disidratazione.

- 1) Congelamento (a -160 °C) di piccoli frammenti di tessuto (2-3 mm di spessore).
- 2) Disidratazione (sotto vuoto, a -40 °C).
- 3) Esposizione ai vapori (a +80 °C) di Paraformaldeide in polvere (umidità 60-80%) (1 h).
- 4) Inclusione diretta in paraffina a 60 °C (10-15').
- 5) Sezioni di spessore 5-10 μ .
- 6) Porre le sezioni "a secco" direttamente su portaoggetti.
- 7) Riscaldare il vetrino fino alla fusione della paraffina, in modo che la sezione aderisca al portaoggetti.
- 8) Sparaffinare rapidamente in Benzene.
- 9) Montare in paraffina.
- 10) Esaminare in UV.

- Le Catecolamine presentano fluorescenza di colore verde (che si mantiene per 2-3 gg).
- La Serotonina presenta fluorescenza di colore giallo vivo.

(165) - Vds.: E. BONUCCI, *Manuale di Istochimica, cit.*, pagg. 18-21.

Nota: Il metodo del *Freeze-drying* presenta non poche difficoltà operative e le apparecchiature hanno un costo decisamente elevato, certamente non alla portata di un dilettante: può essere vantaggiosamente sostituito dal metodo di *Freeze-substitution* (lett.: congelamento e sostituzione), nel quale la parte di congelamento rimane inalterata rispetto al *Freeze-drying*, mentre la disidratazione avviene immergendo il frammento in Etanolo assoluto a -40 °C (esistono in commercio “congelatori” ancora economicamente alla portata di dilettanti evoluti...).

Ovviamente, con questo metodo si ha la solubilizzazione di alcune sostanze, come ad esempio i lipidi ⁽¹⁶⁶⁾⁽¹⁶⁷⁾⁽¹⁶⁸⁾.

(166) - Per le tecniche di *Freeze-drying* e di *Freeze-substitution* cfr., ad es.:

L. G. E. BELL, *The Application of Freezing and Drying Techniques in Cytology*, INT. REV. CYTOL., vol. 1, 1952, pagg. 35-63.

(167) - N. FEDER - R. L. SIDMAN, *Methods and Principles of Fixation by Freeze-Substitution*, J. BIOPHYS. BIOCHEM. CYTOL., vol. 4, 1958, pagg. 593-600.

(168) - R. J. C. HARRIS, *Biological Applications of Freezing and Drying*, N.Y., Academic Press, 1954.

metodo per l'immunofluorescenza diretta

Il materiale da esaminare viene stratificato sul portaoggetti.

1) Fissazione in Acetone a 4 °C (10').

Il materiale, in questa fase, può essere conservato per 24-48 ore a 4 °C o per qualche giorno a - 40 °C, prima di proseguire.

2) Incubazione in camera umida a 37 °C (30-45') [oppure, a 4 °C (12 h)].

3) Lavaggio (più volte) in Soluzione di DULBECCO (PBS = *Phosphate Buffered Saline*) per rimuovere l'eccesso di coniugato.

4) Deporre una goccia di Glicerolo al 10% in PBS su un coprioggetti.

5) Ricoprire il portaoggetti (contenente il materiale da esaminare trattato come al punto 3) con il coprioggetti preparato al punto 4).

6) Lutare con smalto per unghie (o con vernice alla nitrocellulosa).

Nota: Con tale metodo può essere presente fluorescenza aspecifica dovuta a impurità nel coniugato, al contenuto proteico più o meno elevato, alla colorazione di anticorpi coniugati aspecifici, all'autofluorescenza dei tessuti, alla fluorescenza aspecifica dei leucociti eventualmente presenti, ecc. Vds. pag. 106 di questi "Appunti".

metodo per la localizzazione di antigeni intracellulari o di superficie in colture di cellule

Tale metodo è utile, ad esempio, quando si vogliono effettuare studi sull'effetto citopatico dei virus.

Il prelievo del materiale da esaminare va effettuato da coltura cellulare quando le cellule sono nella fase di semiconfluenza: un eccessivo ammassamento, infatti, renderebbe difficoltosa la lettura del preparato.

1) Stratificare le cellule su un portaoggetti.

2) Lavare ripetutamente in Terreno di HANKS (BSS = *Balanced Salt Solution*) a pH 7,2 (per rimuovere le proteine provenienti dal terreno di coltura delle cellule).

3) Fissazione in Metanolo 100° (10') se si tratta di ricerca per antigeni intracellulari.

3 bis) Fissazione in Paraformaldeide a 4 °C (10-20') se si vogliono evidenziare gli antigeni di superficie.

4) Lavare ripetutamente in PBS a pH 7,2.

5) Allontanare (per semplice colatura) l'eccesso di PBS.

6) Unire al materiale da esaminare l'anticorpo utilizzato, diluito in PBS contenente Albumina bovina (BSA = *Bovine Serum Albumin*) all' 1%.

7) Incubare a 37 °C (30').

8) Lavare in Tampone fosfati a pH 7,2 (15').

- 9) Unire al materiale proveniente dal passaggio precedente il coniugato fluorescente.
- 10) Incubare a 37 °C (30').
- 11) Lavare abbondantemente in PBS.
- 12) Ricoprire il preparato sul portaoggetti con Glicerolo tamponato a pH 7,2 (al 10% in PBS).
- 13) Ricoprire con coprioggetti e lutare con smalto per unghie (o con vernice alla nitrocellulosa).

metodo per l'immunofluorescenza indiretta (IFI)

Prevede una doppia incubazione.

Il siero da esaminare viene diluito in PBS (secondo le specifiche della varie Case produttrici dei kits commerciali) e viene posto a contatto con il substrato (già allestito sul portaoggetti).

- 1) Incubare in camera umida a 37 °C (30') [oppure, a 4 °C (12 h)].
- 2) Lavare ripetutamente (con delicatezza!) in PBS (per immersione).
- 3) Incubare nuovamente a 37 °C (30-45').
- 4) Porre a contatto con il preparato immunoglobuline umane anti-catene H e L, coniugate con FITC e associate a Blue Evans (o a TRITC) con funzioni di colorante di contrasto.
- 5) Lavare abbondantemente in PBS.
- 6) Lavare rapidamente con acqua deionizzata.
- 7) Ricoprire il preparato sul portaoggetti con Glicerolo tamponato a pH 7,2 (al 10% in PBS).
- 8) Ricoprire con coprioggetti e lutare con smalto per unghie (o con vernice alla nitrocellulosa).

derivatizzazione di aminoacidi

- 1) o-Ftalaldeide (OPA) 40 mg
 - 2) Metanolo 1 ml (aggiungere all'OPA)
 - 3) Borace 0,1M 50 ml (diluire l'OPA-metanolo)
 - 4) 2-mercaptoetanol 50 μ l (aggiungere alla soluzione ottenuta al n. 3)
- La soluzione è stabile per 7 giorni se mantenuta a temperatura ambiente e al riparo della luce.
- 5) Trattare 50 μ l del campione aminoacidico con 50 μ l della soluzione di OPA ottenuta al n. 4).
 - 6) Agitare (con Vortex) per 30".

$$\lambda_{\text{eccitazione}} = 335 \text{ nm}$$

$$\lambda_{\text{emissione}} = 440 \text{ nm}$$

colorazione con Arancio di Acridina

- 1) Fissare in Etere etilico-Etanol 1:1 (15').
- 2) Sciacquare brevemente in CH_3COOH [ac. acetico] sol. 1% in H_2O .
- 3) Sciacquare in H_2O (distillata).
- 4) Sciacquare in Tampone Fosfati ⁽¹⁶⁹⁾ 0,1 M a pH 6,0 (2').
- 5) Colorare con Arancio di Acridina⁽¹⁷⁰⁾ (3').
- 6) Allontanare (facendolo defluire) il colorante in eccesso.
- 7) Se necessario, per migliorare l'intensità della fluorescenza dei nuclei differenziare in CaCl_2 sol. 11% in H_2O (10-20")
- 8) Sciacquare in Tampone Fosfati 0,1 M a pH 6,0.
- 9) Montare in Tampone Fosfati (pH 6,0), lutare con smalto incolore e osservare immediatamente al microscopio ($\lambda_{\text{eccitazione}} = 455 - 550 \text{ nm}$ [colore blu-verde]).

Strutture ricche di DNA a doppia elica (dsDNA):

$$\lambda_{\text{eccitazione}} = 502\text{nm}; \lambda_{\text{emissione}} = 525 \text{ nm (fluorescenza di colore verde / giallo-verde).}$$

Strutture ricche di RNA o di DNA a elica singola (ssDNA):

$$\lambda_{\text{eccitazione}} = 460\text{nm}; \lambda_{\text{emissione}} = 650 \text{ nm (fluorescenza di colore rosso).}$$

(169) - Tampone Fosfati 0,1 M a pH 6,0:

- A) KH_2PO_4 (13,61 g in 1000 ml di H_2O).
 - B) $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (17,8 g in 1000 ml di H_2O).
- Mescolare sol. A (8,5 parti) con sol. B (1,5 parti).

(170) - Arancio di Acridina:

- Soluzione madre: Arancio di Acridina Zinco Cloruro sale doppio: 0,1g /100 ml H_2O .
Diluire la sol. madre 1:10 con Tampone Fosfati 0,1 M a pH 6,0 al momento dell'uso.

colorazione con Auramina O

Colorazione specifica per il *Mycobacterium tuberculosis*, usata anche in altri ambiti, ad esempio in campo analitico alimentare. In microbiologia viene usato con il Fenolo come “mordenzante”, per rendere più intensa la colorazione data dall’Auramina O. Di questa colorazione esistono alcune varianti nelle quali il colorante primario è l’Auramina O (che colora in modo specifico i micobatteri, potendo penetrarne la rigida parete cellulare); come colorante secondario possono essere usati il Permanganato di Potassio, la Rodamina, l’Arancio di Acridina (che genera uno sfondo rosso-arancio) o il Rosso tiazina (che garantisce uno sfondo scuro).

Materiali:

- sciogliere 0,1 g di Auramina O in 10 ml di Etanolo 95%;
- sciogliere 3 g di Fenolo (cristalli) in 87 ml H₂O distillata;
- mescolare la soluzione alcolica di Auramina O con la soluzione fenolica acquosa ottenuta;
- diluire 0,5 ml di HCl 37% con 99,5 ml di Etanolo 70%;
- sciogliere 0,5 g di KMnO₄ [Permanganato di Potassio] in 100 ml H₂O distillata.

Procedimento:

- 1) Strisciare, con un’ansa per batteriologia, il materiale da esaminare su un vetrino portaoggetti.
- 2) Fissare alla fiamma e lasciare raffreddare.
- 3) Ricoprire completamente lo striscio con Auramina O alcolica fenicata (di cui sopra).
- 4) NON scaldare alla fiamma (pericolo di incendio!).
- 5) Lasciare agire per 15’.
- 6) Lavare brevemente con un sottile getto di acqua di fonte.
- 7) Decolorare per circa 2’ con la soluzione di alcol cloridrico (di cui sopra).
- 8) Lavare brevemente con un sottile getto di acqua di fonte.
- 9) Ricoprire lo striscio con la soluzione acquosa di permanganato di Potassio (colorante di contrasto) lasciando agire per NON PIU’ di 2’ (onde evitare che il permanganato si leghi all’Auramina, mascherando la eventuale presenza di micobatteri e producendo falsi negativi).
- 10) Lavare delicatamente con acqua di fonte.
- 11) Lasciare asciugare all’aria a temperatura ambiente.
- 12) Esaminare in fluorescenza ($\lambda_{\text{eccitazione}} = 335 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emissione}} = 550 \text{ nm}$; in alternativa: $\lambda_{\text{eccitazione}} = 470/490 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emissione}} = 525 \text{ nm}$): i micobatteri appariranno di colore giallo-dorato, su fondo completamente nero.

È da notare che questa tecnica, utilizzata ad esempio per l'identificazione del *Mycobacterium tuberculosis*, è più sensibile della classica colorazione di Ziehl-Neelsen, benché meno specifica; viene usata per lo screening di campioni in casi sospetti di tubercolosi, specialmente provenienti da sede polmonare o extrapolmonare (e dunque con ridotta presenza di bacilli).

Se si osservano i preparati con radiazione di lunghezza d'onda di 450-470 nm (utilizzando un obiettivo da 25× o meglio da 40×, che evita anche l'applicazione del coprioggetto), i bacilli acido-resistenti (generalmente lunghi 0,5-10 μm) appaiono di colore giallo-verde brillante su sfondo oscuro.

L'uso di un obiettivo da 100× richiede l'immersione in olio (o, se specificamente costruito, in acqua o il glicerina): in tal caso, per evitare possibili contaminazioni con il materiale in esame, appare opportuno ricoprire il preparato con un vetrino coprioggetto, usando un mezzo montante privo di autofluorescenza.

ATTENZIONE! Il *Mycobacterium tuberculosis* è molto infettivo e pericoloso! Chi volesse cimentarsi in questa tecnica con materiale **POTENZIALMENTE INFETTO**, o anche **SOLAMENTE SOSPETTO DEVE ESSERE:**

- perfettamente consapevole dei pericoli connessi;
- esperto nelle tecniche microbiologiche di allestimento dei preparati;
- adeguatamente attrezzato;
- adeguatamente protetto con mezzi sia individuali sia collettivi (se necessario).

È, inoltre, **caldamente raccomandato** l'uso:

- di una cappa per microbiologia a flusso d'aria laminare;
- di guanti monouso in lattice o in nitrile;
- di mascherina FFP3 (o almeno FFP2);
- di ansa monouso per microbiologia (se si usa la classica ansa in Platino, questa va
 - come di consueto - sterilizzata alla fiamma prima e dopo ogni prelievo di materiale).

Si ponga particolare *attenzione nell'uso di fiamme libere* in presenza di etanolo o di altri infiammabili!

Insomma, non è roba per inesperti!

PREPARAZIONE DI ALCUNI FISSATIVI

fissativo di Carnoy

Etanolo 100°	600 ml
Cloroformio	300 ml
Acido Acetico glaciale	100 ml

- Aggiungere i reagenti secondo l'ordine sopra riportato.
- Conservare a temperatura ambiente.

Penetra circa 1mm/h e la fissazione non deve essere prolungata oltre le 24 h.

soluzione salina di formolo al 10%

NaCl	8,5 g
HCHO 40% (formalina)	100 ml
H ₂ O	900 ml

- Sciogliere l'NaCl nell'H₂O e aggiungere la formalina.
- Conservare a temperatura ambiente.

fissativo di Zenker

HgCl ₂	70 g
Na ₂ SO ₄	25 g
H ₂ O	1000 ml

- Sciogliere i sali in H₂O riscaldando.
- Conservare a temperatura ambiente.
- Immediatamente prima dell'uso, aggiungere Acido Acetico glaciale fino ad ottenerne una concentrazione finale del 5%.

formolo calcico di Baker

HCHO 40% (formalina)	10 ml
CaCl ₂	1 g
H ₂ O	90 ml

- Preparare poco prima dell'uso, per evitare un abbassamento del pH a causa dell'acidificazione dovuta alla trasformazione della formalina (Aldeide Formica) in Acido Formico.

miscela Cromato-Bicromato di Potassio

$K_2Cr_2O_7$ (bicromato di Potassio) sol. acquosa al 5%	10 ml
K_2CrO_4 (cromato di Potassio) sol. acquosa al 5%	1 ml

- Mescolare le due soluzioni.

N.B.: Ematossilina (sia nella formulazione di Harris, sia in altre), Eosina, Colorante di May-Grünwald, Colorante di Giemsa ed eventualmente tutti i coloranti per il metodo di Papanicolau possono essere vantaggiosamente acquistati dal commercio. Le loro formulazioni, tuttavia, sono reperibili facilmente anche in un mio precedente lavoro su “I Preparati microscopici”, liberamente scaricabile dai siti: <http://www.marcobrusadin.it> oppure: <http://www.funsci.it>.

TERRENI DI COLTURA PER CELLULE

PBS (o Terreno di DULBECCO)⁽¹⁷¹⁾

NaCl	8,00 g
KCl	0,20 g
CaCl ₂ (anidro)	0,10 g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,10 g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	2,30 g
KH ₂ PO ₄	0,20 g
H ₂ O	1000,00 ml

BSS (o Terreno di HANKS)⁽¹⁷²⁾

NaCl	8,00 g
KCl	0,40 g
CaCl ₂ (anidro)	0,10 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,20 g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	0,12 g
KH ₂ PO ₄	0,06 g
NaHCO ₃	0,35 g
C ₆ H ₁₂ O ₆	1,00 g
H ₂ O	1000,00 ml

Si possono aggiungere 20 mg di Rosso Fenolo come indicatore di pH⁽¹⁷³⁾.

(171) - vds.: L. DE CARLI - F. NUZZO, *Colture Cellulari*, Boringhieri, Torino, 1973, pag. 26.

(172) - vds.: L. DE CARLI - F. NUZZO, *ibidem*.

(173) - vds.: S. LAMBERT GARDINI - G. G. COLAROSI, U. SERGIACOMI, *Atlante di Immunofluorescenza*, Lombardo Editore, Roma, 1990, pag. 7, ove si suggerisce anche una formulazione leggermente differente da quella proposta.

APPENDICE A

Intercalazione

Questo termine (come si è già visto a pag. 93) indica, in Chimica, l'inclusione reversibile di una molecola (o di un gruppo funzionale) fra due altre molecole (o gruppi).

Come è noto, esistono vari modi nei quali le molecole (tecnicamente chiamate *ligandi*) possono interagire con il DNA, ad esempio:

- il legame covalente;
- il legame elettrostatico;
- l'intercalazione.

Più propriamente, si ha intercalazione quando ligandi di dimensioni e natura chimica appropriate sono in grado di inserirsi fra coppie di basi del DNA.

Poiché solitamente i ligandi suddetti sono molecole policicliche, aromatiche e planari, in molti casi essi risultano anche essere dei buoni coloranti fluorescenti per il DNA. Tra i numerosi intercalanti del DNA, quelli maggiormente studiati sono il Bromuro di Etidio, lo Ioduro di Propidio, la Proflavina, la Daunomicina, la Talidomide e l'Arancio di Acridina.

Alcune di queste molecole vengono usate in chemioterapia per inibire la replicazione del DNA nelle cellule tumorali, caratterizzate da rapida crescita; tra esse vanno ricordate la Doxorubicina - conosciuta anche come Adriamicina - e la Daunorubicina (utilizzate per il trattamento del Linfoma di HODGKIN), la Daunomicina (usata nel trattamento del Sarcoma di EWING e del Tumore di WILM), ecc.

modalità di azione degli intercalanti

Una sostanza, per poter collocarsi (ricordo: in modo reversibile!) fra le coppie di basi del DNA, deve letteralmente "aprirsi dinamicamente un varco" tra di esse, mediante un'azione di *svolgimento*⁽¹⁷⁴⁾ della doppia elica; tale svolgimento induce la separazione delle coppie di basi vicine (normalmente distanti tra loro ~0,34 nm), portando in tal modo lo spazio tra loro a ~ 0,7 nm.

Come conseguenza dello "svolgimento" del filamento del DNA si possono avere modificazioni strutturali (un allungamento del filamento stesso oppure un

(174) - il "grado" di svolgimento è una funzione dipendente dalla sostanza intercalante: il catione Etidio (cioè la forma ionica del Bromuro di Etidio in soluzione acquosa), ad esempio, svolge il DNA di $\approx 26^\circ$, mentre la Proflavina solo di $\approx 17^\circ$.

attorcigliamento delle coppie di basi) che possono evitare, poi, in modificazioni funzionali (inibizione della trascrizione, della replicazione o della riparazione del DNA), ovvero in mutagenesi.

Per tale motivo, molecole intercalanti quali gli acridinici (Proflavina, Quinacrina, Arancio di Acridina), il Bromuro di Etidio e altri sono potenziali carcinogeni⁽¹⁷⁵⁾.

Uno dei meccanismi proposti per spiegare l'intercalazione prevede le seguenti quattro fasi:

- 1) l'intercalante cationico, in soluzione acquosa isotonica (NaCl 0,9%), viene "attratto" dal DNA (polianionico);
- 2) il ligando "sposta" un catione Sodio o Magnesio (ioni che sempre circondano la molecola del DNA per equilibrarne la carica elettrica) e forma, con la superficie esterna dell'Acido Desossiribonucleico, un *legame elettrostatico debole*;
- 3) il ligando, che si trova nell'ambiente idrofilico circum-molecolare, tende a migrare verso l'ambiente idrofobico situato fra le coppie di basi;
- 4) le coppie di basi, assorbendo l'energia prodottasi durante le collisioni tra esse e le molecole di solvente, formano aperture transitorie attraverso le quali il ligando può intercalarsi tra le basi stesse.

Sul sito: <http://cmgm.stanford.edu/biochem/biochem201/Slides/DNA%20Topology/073%20EB%20Intercalation.JPG> è possibile trovare uno schema esplicativo dell'intercalazione del Bromuro di Etidio⁽¹⁷⁶⁾.

Quanto alla modalità con cui gli intercalanti causino piccole inserzioni o delezioni, una delle possibilità (nel caso di inserzioni) è che queste molecole, inserendosi tra le basi del filamento che funge da "stampo", inducano l'enzima DNA-polimerasi a inserire un nucleotide aggiuntivo, agganciato alla molecola intercalante.

Come già esposto, l'intercalarsi di una di queste molecole provoca l'aumento (di circa due volte) della distanza intercorrente tra due basi adiacenti.

Nel caso di delezioni, sembrerebbe che la distorsione dello "stampo" causata dall'intercalante induca la DNA-polimerasi a "saltare" un nucleotide⁽¹⁷⁷⁾.

(175) - Sull'interazione delle antracicline con il DNA, vds., ad es.:

V. T. DE VITA - S. HELLMAN - STEVEN A. ROSENBERG, *Cancer. Principles & Practice of Oncology*, Lippincott, Philadelphia, 1985², pagg. 311 ss.;

G. BONADONNA - G. ROBUSTELLI DELLA CUNA, *Medicina Oncologica*, Masson, Milano, 2000⁶, pagg. 597 ss.

(176) - Cfr.: J.D. WATSON - T.A. BAKER e ALTRI, *Biologia molecolare del gene*, Zanichelli, Bologna, ed.ita. 2022⁸, pagg. 102.

(177) - Cfr.: J.D. WATSON - T.A. BAKER e ALTRI, *ibidem*, pagg. 342-343.

APPENDICE B

FISH (*Fluorescent In Situ Hybridization*)

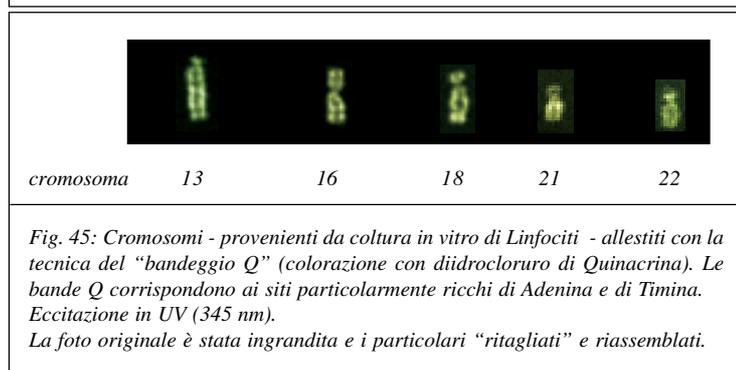
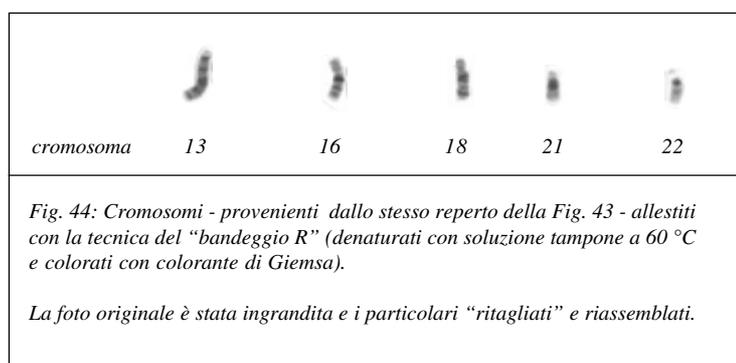
È una tecnica che si avvale, per l'analisi citogenetica, delle sonde nucleotidiche marcate con opportuni fluorocromi per rilevare (e localizzare) la presenza o l'assenza di specifiche sequenze di DNA nei cromosomi.

La FISH è la tecnica attualmente più usata per la diagnosi di aneuploidie su nuclei interfascici di singole cellule, siano esse *Globuli Polari* (PB) o *blastomeri*.

Le cellule da analizzare, una volta prelevate, vengono fissate su vetrini portaoggetti e fatte reagire con un "cocktail" di *sonde di DNA*, marcate con fluorocromi, con sequenza complementare specifica alle regioni cromosomiche da analizzare.

Tali sonde (*DNA probes*) si legano con le regioni cromosomiche per le quali presentano omologia. Quando il campione viene "colpito" da radiazioni elettromagnetiche di frequenza opportuna, i fluorocromi emettono radiazione ottica fluorescente di specifiche lunghezze d'onda: in tal modo è facile riconoscere i singoli cromosomi, in base al diverso segnale di fluorescenza emesso dal fluorocromo con cui è stata marcata ogni singola sonda specifica.

Nella Fig. 43, la sonda marcata per il cromosoma 22 - ad esempio - si ibridizza esclusivamente a livello del centromero di ciascun cromosoma 22 presente, ecc.



Va precisato che la FISH ha una risoluzione limitata e non è facilmente applicabile a un numero elevato di geni.

Il margine di errore della FISH è relativamente elevato: i falsi positivi o negativi incidono per ~ 7%. Le cause più comuni di errore possono essere, oltre alla presenza di colorazione di fondo, la sovrapposizione di segnali di ibridizzazione, la perdita del nucleo cellulare (o di parte di esso) durante il fissaggio, ecc.

Inoltre, qualora l'analisi citogenetica venga eseguita su embrioni, ulteriore causa di errore diagnostico può essere la presenza (relativamente frequente) del *mosaicismo* (cioè di quella situazione per cui cellule provenienti dal medesimo embrione presentano un differente *cariotipo*).

Per quanto riguarda la tecnica del “bandeggio Q”, va precisato che la mostarda di Quinacrina è il fluorocromo che ha dato sinora i migliori risultati ⁽¹⁷⁸⁾, benché si usi con risultati analoghi il diidrocloreuro di Quinacrina [C₂₃H₃₀Cl₅N₃O].

In ginecologia clinica e nella genetica prenatale il diidrocloreuro di Quinacrina viene usato, unitamente alla colorazione di May-Grünwald-Giemsa, per la determinazione del sesso cromatinico: infatti, con questa colorazione si effettua la ricerca e l'evidenziazione del *Corpuscolo di Barr* nei granulociti neutrofili. Tale corpuscolo, indicativo del cromosoma X, può presentarsi con la classica morfologia del *drumstick* (“bacchetta di tamburo”) oppure a forma di gocce o di noduli non peduncolati e la sua presenza in almeno l'1-2% degli elementi cellulari esaminati è considerata caratteristica del sesso femminile. Il diidrocloreuro di Quinacrina fa apparire, invece, il tratto distale del cromosoma Y come un corpo (*Y body*) eteropicnotico fluorescente nel 25-50% dei nuclei cellulari interfasci ⁽¹⁷⁹⁾.

la FISH nella diagnosi oncologica

Per verificare la possibile risposta delle pazienti, affette da cancro della mammella con espressione del gene HER2, alla terapia con *Herceptina*, è stato messo a punto un metodo, chiamato HER2 FISH ⁽¹⁸⁰⁾.

L'espressione del gene HER2 può essere rilevata, a livello proteico, con metodi immunoistochimici (IHC) oppure, a livello del DNA, con l'Ibridizzazione in Situ (ISH).

(178) - Cfr.: T. CASPERSSON - L. ZECH - E. J. MODEST, *Fluorescent Labeling of Chromosomal DNA: Superiority of Quinacrine Mustard to Quinacrine*, *SCIENCE*, vol. 170, 1970, pagg. 762 ss.

(179) - Per approfondimenti vds., ad es.: V. VENTRUTO - G. SACCO - F. LOMBARDO, *Testo-Atlante di Citogenetica Umana*, Springer-Verlag, Milano, 2001;

G. CASTOLDI, *Microscopia a fluorescenza*, cit., pagg. 119-179.

(180) - Vds., ad es.: <http://www.leica-microsystems.com/news-media/press-releases/press-releases-details/article/leica-microsystems-to-develop-an-automated-her2-fish-test/>

breve sintesi sui principali tipi di sonde (*DNA Probes*)

Una *sonda* non è altro che un frammento di DNA (o di RNA) “marcato”, complementare al DNA che si sta cercando ⁽¹⁸¹⁾.

Limitandoci alle sonde utilizzate per la FISH eseguita su cromosomi, abbiamo:

- a) Sonde *locus-specifiche*: sonde di piccole dimensioni che riconoscono corte porzioni del cromosoma. Si utilizzano per evidenziare aberrazioni coinvolgenti un singolo gene o una sua porzione.
- b) Sonde *chromosome painting*: riconoscono specifiche sequenze localizzate lungo l'intero asse di ogni singolo cromosoma. Con questo tipo di sonde il cromosoma appare colorato interamente.
- c) Sonde *centromeriche* (dette anche *Alfoidi*): riconoscono brevi sequenze centromeriche di DNA, altamente ripetitive e specifiche per ogni singolo cromosoma. Il segnale generato da queste sonde è di notevole intensità.
- d) Sonde *telomeriche*: sono usate per identificare traslocazioni a livello delle regioni telomeriche dei cromosomi.

Le Figg. 46 e 47 mostrano un esempio di applicazione della FISH: si tratta del riconoscimento della Traslocazione PML/RAR- α t(15;17) ⁽¹⁸²⁾.

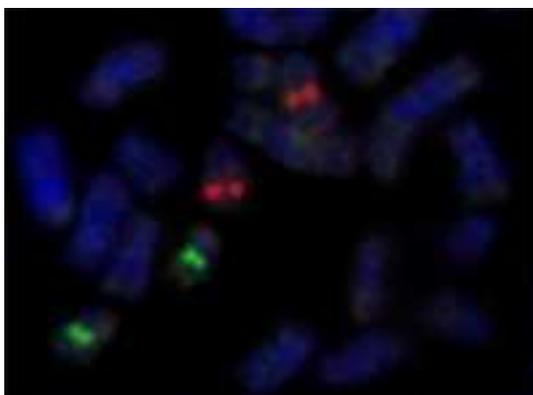


Fig. 46: FISH su Linfociti (coltura).
 Metafase normale: si evidenziano 4 segnali:
 2 verdi corrispondenti al gene RAR α (cromosoma 17)
 2 rossi corrispondenti al gene PML (cromosoma 15)
 Sonda LSI Dual Color per PML-RAR α .

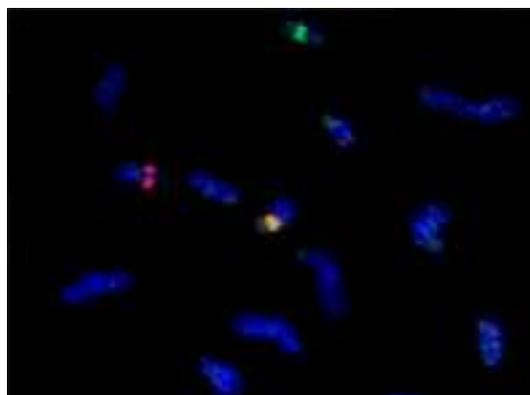


Fig.47: FISH su Linfociti (coltura).
 Metafase con traslocazione (si notano un segnale di colore rosso [PML] e uno di colore verde [RARA] nonché un segnale di colore bianco-giallo indicante la fusione).
 Sonda LSI Dual Color per PML-RAR α .

(181) - Per ulteriori informazioni, vds., ad es.: B. LEWIN, *Il Gene VI*, Zanichelli, Bologna, 1999, pagg. 541 ss.;
 D. L. NELSON - M. M. COX, *I Principi di biochimica di Lehninger*, Zanichelli, Bologna, 2010⁵, pagg. 313 ss. e anche le pagg. 111 ss. di questi Appunti.
 (182) - RAR- α (*Retinoic Acid Receptor Alpha*), denominato RARA nell'essere umano e conosciuto anche come NR1B1 (*Nuclear Receptor Subfamily 1, Group 1, Member 1*), è stato identificato da:
 V. GIGUERE - E. S. ONG - P. SEGUI - R. M. EVANS, *Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid*, *NATURE*, n. 330, 1987, pagg. 624-628.

Nella diagnostica oncologica, il riconoscimento di questa traslocazione permette sia di predire e di monitorare la risposta all'acido tutto-*trans*-retinoico (ATRA, *all-trans-Retinoic acid*) e/o al triossido di Arsenico, sia di accertare eventuali residui minimi della malattia (i cosiddetti MRD, *Minimal Residual Disease*), sia di riconoscere tempestivamente eventuali recidive della Leucemia Acuta Promielocitica (APL, *Acute Promyelocytic Leukemia*).

Questa forma morbosa (conosciuta anche come AML-M3) è un sottotipo della Leucemia Mieloide Acuta (AML, *Acute Myeloid Leukemia*); costituisce circa il 15% delle Leucemie non-Linfoblastiche Acute dell'adulto e, se non viene diagnosticata e curata con tempestività, può condurre all'*exitus*. La terapia con ATRA (chiamato anche *Tretinoina*) si basa sul dato che la Vitamina A (di cui l'ATRA sembra essere la forma attiva in tutti i tessuti tranne la retina) regola la differenziazione delle cellule epiteliali e la loro proliferazione ⁽¹⁸³⁾.

Il gene del recettore alfa dell'acido Retinoico (situato sul cromosoma 17q21) è interessato specificamente in una traslocazione cromosomica, indicata come t(15;17) ⁽¹⁸⁴⁾, con il gene PML (allocato sul cromosoma 15q22) ⁽¹⁸⁵⁾ e ritenuto probabile fattore di trascrizione ⁽¹⁸⁶⁾.

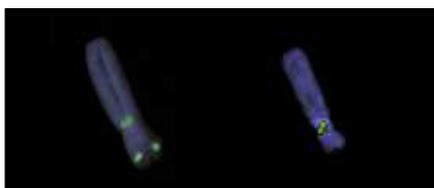


fig. 48: FISH con sonda *locus specifica*.

A Sx, un cromosoma normale: si notano sia il segnale di fluorescenza in area centromerica, relativo alla sonda di repere, sia il segnale di fluorescenza in zona subtelometrica, relativo alla sonda specifica.

A dx, invece, si nota un cromosoma omologo che però ha subito una delezione e, pertanto, mostra esclusivamente - in zona centromerica - il segnale di fluorescenza relativo alla sonda di repere.

L'approfondimento della tecnica e delle applicazioni della FISH, soprattutto in campo oncologico e citogenetico, esula dalle finalità di questi "Appunti" ⁽¹⁸⁷⁾⁽¹⁸⁸⁾.

(183) - Vds.: GOODMAN & GILMAN, *Le Basi Farmacologiche della Terapia*, McGraw-Hill, 2003¹⁰, pagg. 1683 - 1692.

(184) - Vds.: W. HUANG - G-L. SUN - X-S. LI - Q. CAO - Z. CHEN et AL., *Acute Promyelocytic Leukemia: Clinical Relevance of Two Major PML-RAR α Isoforms and Detection of Minimal Residual Disease by Retrotranscriptase/Polimerase Chain Reaction to Predict Relapse*, Blood, vol. 82, 1993, pagg. 1264-1269.

(185) - In realtà, sono stati identificati tre tipi di trascritti di fusione PML/RARA: bcr1, bcr2 e bcr3.

(186) - Ulteriori notizie sul gene PML possono essere reperite, ad esempio, su: *GeneCards, The Human Gene Compendium* edito dal Weitzmann Institute of Science e reperibile al sito: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PML>

(187) - Ulteriori notizie utili possono essere reperite, ad esempio, in:

T. A. BROWN, *Genomes*, Wiley-Liss, Oxford, 2002²;

B. LEWIN, *Il Gene VI*, Zanichelli, Bologna, 1999;

K. WILSON - J. WALKER (a cura di), *Metodologia biochimica*, Raffaello Cortina, Milano, 2001.

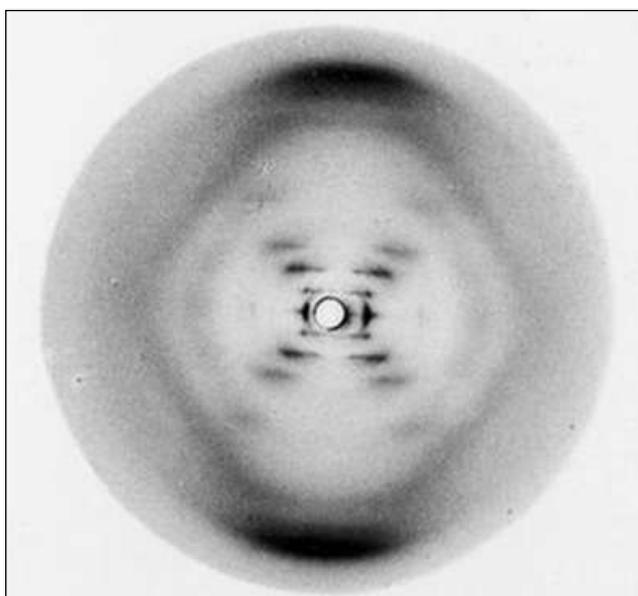
(188) - Informazioni più specifiche sui vari geni e sulla citogenetica possono essere reperite, ad es., in: S. HEIM - F. MITELMAN, *Cancer Cytogenetics: Chromosomal and Molecular Genetic Aberrations of Tumor Cells*, Wiley-Blackwell, 2009³, oppure anche in: *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*, reperibile al sito: <http://atlasgeneticsoncology.org/index.html>

LA MECCANICA QUANTISTICA E LA BIOLOGIA

Ci si potrebbe, a ragione, domandare cosa c'entri la Fisica quantistica (e, in particolare, la Meccanica quantistica) con la Biologia.

La risposta origina dal lavoro di SCHRÖDINGER il quale anticipò di circa 10 anni l'*idea* di un "codice genetico" e la scoperta di James WATSON e Francis CRICK sul DNA.

In merito, non va dimenticata l'opera, altrettanto importante ma troppo spesso ignorata, di Rosalind Elsie FRANKLIN: dalla fotografia [nota come "**photograph 51**"] qui sotto



da lei scattata - utilizzando la diffrazione a raggi X - al King'S College di Londra e mostrata (senza la sua previa autorizzazione) a WATSON, originò l'intuizione decisiva della doppia elica del DNA.

Per amore della verità, segnalo che Matthew COBB e Nathaniel COMFORT hanno pubblicato - il 25 aprile 2023 - l'articolo: *What Rosalind Franklin truly contributed to the discovery of DNA's structure*, NATURE 616, 2023, pagg.657- 660, <https://www.nature.com/articles/d41586-023-01313-5>, in cui spiegano che la versione definitiva della descrizione della struttura del DNA è il frutto del lavoro di tutti i ricercatori coinvolti: cosa che, del resto, CRICK e WATSON avevano già riconosciuto in un documento del 1953 (pubblicato nel 1954), a cui si fa cenno nell'articolo.

Il 25 aprile 1953, del resto, erano stati pubblicati gli articoli:

J.D. WATSON - F.H.C. CRICK, *Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid*, *NATURE* 171, 1953, pagg. 737-738; <https://www.nature.com/articles/171737a0>

M. H. F. WILKINS - A. R. STOKES - H. R. WILSON, *Molecular Structure of Nucleic Acids: Molecular Structure of Deoxypentose Nucleic Acids*, *NATURE* 171, 1953, pagg. 738-740; <https://www.nature.com/articles/171738a0>

Rosalind E. FRANKLIN - R. G. GOSLING, *Molecular Configuration in Sodium Thymonucleate*, *NATURE* 171, 1953, pagg. 740-741; <https://www.nature.com/articles/171740a0>

SCHRÖDINGER con la sua *equazione d'onda* del 1926 (che fornì una formulazione alternativa a quella contemporanea di HEISENBERG) suggerì un modo pratico per descrivere il comportamento di sistemi quantistici (ad esempio, atomi e molecole) all'interno del corpo umano.

SCHRÖDINGER sostenne (come fece anche JORDAN nel 1932) che alcuni fenomeni biologici macroscopici vengono spesso innescati (e sostenuti) dalla dinamica di particelle governate da fenomeni quantistici, come ad esempio l'*incertezza*.

Oggi giorno è generalmente riconosciuto che meccanismi specifici nelle cellule viventi si basano su proprietà della fisica quantistica (ad esempio, la *coerenza quantistica a lungo termine*, la *sovrapposizione di stati*, la *dinamica di spin*, l'*effetto tunnel*, l'*entanglement*, e altri).

Fenomeni come la *stabilità chimica*, la *reattività chimica*, la *chiralità* e la stessa struttura delle cellule viventi vengono attualmente spiegate ricorrendo alle proprietà quantistiche della materia; tuttavia, il ruolo della fisica quantistica in biologia viene spesso limitato principalmente al riconoscimento molecolare, alle reazioni delle proteine, alla sintesi e al mantenimento degli Acidi Nucleici, alle forze di VAN DER VAALS e alla stabilità della materia.

Approfondimenti possono essere reperiti in: P. AMADEO, *Fisica quantistica e Biologia*, Copyright 2021.

Per questi motivi, consapevole delle difficoltà connesse con lo studio della Meccanica quantistica (Niels BOHR giunse ad affermare che “Quelli che non rimangono scioccati la prima volta che si imbattono nella meccanica quantistica, non possono averla compresa”), ho voluto dedicare alcune pagine dei presenti “Appunti” a questa branca della Fisica, non per fornire soluzioni preconfezionate, ma al solo scopo di suscitare nei lettori più curiosi e volenterosi il desiderio di approfondire la materia e la matematica (non facile) che vi è sottesa, ricorrendo a testi specifici (citati sia nelle note a piè di pagina, sia nella Bibliografia).

Per coloro che, invece, desiderassero una conoscenza più... *soft* (priva di formalismi matematici, ma comunque rigorosa nei contenuti), ho aggiunto alla Bibliografia una breve rassegna di testi atti all'uopo.

UN PICCOLO RICHIAMO DI MATEMATICA

Prima di addentrarci (sia pure “a volo d’uccello”) nella Meccanica Quantistica, desidero offrire ai lettori meno esperti un piccolo richiamo di matematica.

In Meccanica Quantistica (e non solo!) si usano sia i *numeri reali* sia i *numeri immaginari*.

I *numeri reali*, a loro volta, comprendono i *numeri razionali* (quelli, cioè, che possono essere scritti come “rapporto tra due numeri interi”) e i numeri *irrazionali* (quelli cioè che non possono essere espressi con un rapporto tra due numeri interi).

Nei *numeri razionali* sono compresi lo zero e i numeri interi (sia positivi sia negativi).

Numeri naturali sono definiti esclusivamente i numeri interi positivi.

Numeri immaginari (volendo adottare una definizione semplice) sono quelli che, moltiplicati per se stessi, producono un numero negativo. Un esempio è l'estrazione di una radice quadrata di un numero negativo: non esiste alcun numero reale che, moltiplicato per se stesso, (e, dunque, elevato al quadrato) fornisca come risultato un numero negativo.

Nel XVII secolo René DESCARTES (conosciuto come “CARTESIO”) chiamò “immaginario” (e, dunque, scritto come i) il numero derivante dall'operazione $\sqrt{-1}$ e lo scrisse come $i = \sqrt{-1}$.

Infine, si definiscono *numeri complessi* quelli formati da una componente immaginaria e da una reale: costituiscono un insieme, che estende l'insieme dei numeri reali, nel quale è possibile (partendo dalla definizione di “immaginario”) estrarre radici ad indice pari di numeri negativi, oltre che risolvere equazioni di secondo grado il cui discriminante sia negativo. Un *numero complesso* si presenta nella forma: $z = a + ib$ ove a e b sono numeri reali, i indica la parte immaginaria.

I numeri complessi agevolano notevolmente la risoluzione di equazioni anche nell'ambito della fisica “classica”; va, peraltro, ricordato che, fino agli inizi del XX secolo, l'uso dei numeri complessi era considerato un “trucco matematico”.

Nella cosiddetta *teoria quantistica standard* lo “stato” di un qualsiasi sistema fisico è rappresentato da un vettore di numeri complessi, denominato “*funzione d'onda*” e le proprietà fisiche sono descritte da tabelle di numeri complessi denominate “*operatori*”. Erwin SCHRÖDINGER, raccogliendo le perplessità proprie e quelle della maggior parte dei fisici suoi contemporanei, il 6 giugno 1926 scrisse una lettera a Hendrik LORENTZ lamentando l'uso dei numeri complessi.

In seguito, alcuni fisici hanno tentato di riscrivere la meccanica quantistica usando esclusivamente i numeri reali, formulando in tal modo quella che viene conosciuta con il nome di “teoria quantistica reale” che, peraltro, risulta ampiamente insoddisfacente.

L'argomento relativo all'uso dei numeri immaginari in fisica quantistica è stato trattato (tra gli altri) da Marc-Olivier RENOU, Antonio ACÌN, Miguel NAVASCUÉS, *Quantum Physics Falls Apart without Imaginary Numbers*, *SCIENTIFIC AMERICAN*, April 2023 (<https://www.scientificamerican.com>) anche nella sua traduzione italiana: ID, *Universo Immaginario*, *LE SCIENZE*, n. 659, luglio 2023, pagg. 44 ss.

Un approfondimento sui numeri complessi, sulle loro forme Algebrica, Trigonometrica ed Esponenziale e sulle relative transizioni dall'una all'altra può essere reperito al sito: <https://www.youmath.it/lezioni/analisi-matematica/numeri-complessi.html>

Qui mi preme ricordare che si definisce *coniugato complesso* di un numero complesso z il numero complesso che si ottiene cambiando il segno alla parte immaginaria di z : ad esempio, dato il numero complesso $z=a+ib$, il suo *coniugato complesso* è $\bar{z} = a - ib$

UN PO' DI MECCANICA QUANTISTICA

Stato di una particella

Nelle pagine 14 -37 di questi “Appunti” ho trattato sommariamente la Radiazione Elettromagnetica e le sue interazioni con la materia.

Ora, rivolgendomi a “dilettanti” appassionati, desidero esporre alcuni principi e deduzioni derivanti dallo stato attuale della ricerca in Meccanica Quantistica.

Con la locuzione “stato di un sistema”, in meccanica classica si intende tutto ciò che, una volta conosciuto, permette di predire il futuro di un sistema, date le forze agenti su di esso; ciò implica conoscere le “posizioni” di tutte le particella del sistema.

Per una particella di massa m , noti la posizione (ad es.: x se la si considera sull’asse x) e il momento ($p = mx$), l’insieme di queste due variabili [del tutto indipendenti, secondo la visione classica] definisce lo “spazio delle fasi” del sistema.

Qualora sia conosciuta anche la forza agente sulla particella in funzione della sua posizione, usando le equazioni di HAMILTON si possono calcolare posizione e momento negli istanti successivi, definendo in tal modo un flusso all’interno dello spazio delle fasi.

Erroneamente, si potrebbe ipotizzare che lo “stato quantistico” di una particella sia prodotto da una base di stati quantistici definiti da posizione e momento, secondo la formula⁽¹⁸⁹⁾: $|\psi\rangle_{x,p}$ per cui la “funzione d’onda” sarebbe una funzione di entrambe le variabili, cioè: $\psi(x,p) = \langle x,p|\psi\rangle$; ciò, evidentemente, confliggerebbe con il Principio di Indeterminazione di HEISENBERG.

Per non appesantire eccessivamente la presente trattazione, ometto gli assiomi che normalmente definiscono lo “spazio vettoriale degli stati” di un sistema quantistico, ad eccezione del seguente: “dato un *ket* $|A\rangle$ e un numero complesso z , moltiplicandoli tra loro si ottiene un nuovo *ket* $|z,A\rangle = z|A\rangle = |B\rangle$ ”.

I numeri complessi hanno la propria versione duale nella forma dei “complessi coniugati”; analogamente, uno spazio vettoriale complesso ha la propria versione duale: lo “spazio vettoriale complesso coniugato”.

Per ogni *ket* $|A\rangle$ esiste, nello spazio duale, un *bra* denotato con il simbolo $\langle A|$.

I *bra* soddisfano i medesimi assiomi dei *ket*, ma con la differenza (ad esempio) che, dato un numero complesso z , il *bra* corrispondente al *ket* $z|A\rangle$ è $\langle A|z^*$, cioè bisogna usare il complesso coniugato e l’asterisco indica che il *bra* in oggetto è rappresentato dal “vettore riga”, i cui elementi sono numeri complessi coniugati.

(189) - In meccanica quantistica, uno “spazio vettoriale” è composto di elementi $|A\rangle$ chiamati *ket*.

Vds.: L. SUSSKIND - A. FRIEDMAN, *Meccanica quantistica*, Raffaello Cortina Editore, Milano, 2015, pagg. 19 ss.

Se, dunque, per ipotesi il *ket* $|A\rangle$ fosse rappresentato dalla colonna:
$$\begin{pmatrix} \alpha_1 \\ \alpha_2 \\ \alpha_3 \\ \alpha_4 \end{pmatrix}$$

il *bra* $\langle A|$ ad esso corrispondente sarebbe rappresentato dal vettore riga $(\alpha_1^* \alpha_2^* \alpha_3^* \alpha_4^*)$ ⁽¹⁹⁰⁾⁽¹⁹¹⁾.

Quanto al simbolo $\psi(x)$, questo definisce una particolare funzione di x , detta “funzione d’onda” perché - nella maggior parte dei casi - ha la forma di un’onda complessa nella variabile da cui dipende⁽¹⁹²⁾.

Va ricordato che $\psi(x)$ descrive l’“ampiezza di probabilità” che un elettrone nello stato ψ sia osservato nella posizione x ; da ciò si potrebbe interpretare il modulo di ψ^2 come la probabilità di trovare un elettrone nella posizione x , in contraddizione con la realtà perché la probabilità di trovare una qualsiasi particella esattamente in un punto dello spazio è nulla.

Tutt’al più, indicando con $prob(x, \Delta x)$ la probabilità di trovare l’elettrone in un piccolo intervallo (opportunamente scelto) Δx in prossimità di x , è possibile ritenere che l’ampiezza $\langle x|\Delta x\rangle$ rappresenti una sorta di “densità di ampiezza” per tutti gli stati di base $|x\rangle$ in una piccola regione di spazio.

Max BORN (a quanto si sa) interpretò la ψ di SCHRÖDINGER come un’ “ampiezza di probabilità”; il quadrato dell’ampiezza (ψ^2) non è la densità di carica, bensì la probabilità, per unità di volume, di trovarvi l’elettrone (ovviamente con la propria carica!). Analogamente, la funzione d’onda di un fotone singolo descrive l’ampiezza per trovare il fotone in una qualche parte di spazio.

Per il fotone, l’equazione è esattamente uguale alle equazioni di MAXWELL per il campo elettromagnetico e la sua funzione d’onda si identifica con il *potenziale vettore* A ⁽¹⁹³⁾.

Per quanto riguarda i fotoni, la fisica quantistica è uguale alla fisica classica, in quanto i fotoni sono “particelle di BOSE”⁽¹⁹⁴⁾ non interagenti: a differenza degli elettroni, più fotoni possono coesistere nel medesimo stato, cioè nella stessa onda elettromagnetica; pertanto, in presenza di un grande numero di fotoni, è possibile misurarne la funzione d’onda (che è il potenziale vettore)⁽¹⁹⁵⁾.

(190) - Vds.: L. SUSSKIND - A. FRIEDMAN, *Meccanica quantistica, cit.*, pagg. 22-23.

(191) - Per inciso, ricordo che l’unione dei termini *bra* e *ket* forma la parola inglese *braket* che significa “parentesi”.

(192) - Cfr.: R. FEYNMAN - R. LEIGHTON - M. SANDS, *La Fisica di Feynman*, Zanichelli, Bologna, ed. Millennium, vol. 3 (Meccanica quantistica), p. 242.

(193) - Nel calcolo vettoriale, il *potenziale vettore* è un campo vettoriale il cui *rotore* è un dato campo vettoriale; generalmente, il potenziale vettore del campo magnetico viene indicato con la lettera A.

(194) - Come si ricorderà, le particelle dotate di *spin intero* sono “particelle di Bose” (o *Bosoni*), mentre quelle con *spin semintero* sono “particelle di Fermi” (o *Fermioni*).

In particolare, poi, i sistemi che contengono N particelle identiche possono essere - nello scambio di ogni coppia - totalmente simmetrici (e allora soddisfano la *statistica di Bose-Einstein* e sono dunque bosoni) oppure totalmente asimmetrici (in questo caso soddisfano la *statistica di Fermi-Dirac* e sono, dunque, fermioni). Cfr.: J.J. SAKURAI, *Meccanica Quantistica Moderna*, Zanichelli, Bologna, tr. Ita. 1990 (rist. ampl. 1996), pagg. 355 ss.

(195) - Vds.: R. FEYNMAN - R. LEIGHTON - M. SANDS, *La Fisica di Feynman, cit.*, pag. 343.

il fotone

L'energia di un'onda elettromagnetica è quantizzata in unità indivisibili di $\frac{2\pi\hbar c}{\lambda}$ denominate *fotoni*.

Poichè sono indivisibili, i fotoni possono essere considerati *particelle elementari* e un'onda eccitata nel suo n -esimo stato quantistico può essere considerata un *insieme di fotoni* ⁽¹⁹⁶⁾.

Di fatto, l'energia di un singolo fotone è quella necessaria per aggiungere all'insieme un'unità, cioè: $E_{(\lambda)} = \frac{2\pi\hbar c}{\lambda}$; da ciò discende che l'energia di un fotone è tanto maggiore quanto minore è la sua lunghezza d'onda.

Ciò implica che, per poter "risolvere" (cioè poter osservare distinti) due oggetti vicini (di una qualsivoglia taglia), è necessario usare onde della medesima taglia, o anche di taglia minore. Per osservare una cellula può essere sufficiente una radiazione ottica (eventualmente di λ prossima a 400 nm o anche minore); per risolvere i costituenti ad esempio di un protone occorre un fotone molto energetico e la radiazione dovrebbe avere $\lambda < 10^{-15}$ m.

Tutto ciò, come afferma SUSSKIND (*cit.*, p.271), in fin dei conti si riconduce all'*oscillatore armonico*.

È opportuno ricordare che i *fotoni* (bosoni di spin $s=1$, privi di carica e di massa) sono i mediatori dell'elettromagnetismo; i *bosoni* (con spin $s=1$) W (con carica = +1 o -1 e con massa a riposo di 81 GeV) e Z (privi di carica e con massa a riposo di 93 GeV) sono i mediatori dell'interazione debole; i *gluoni* (da *glue* = colla) (bosoni con spin $s=1$, anch'essi privi sia di massa sia di carica) sono i mediatori dell'interazione forte; i *gravitoni* (bosoni *ipotetici* [non essendone stata ancora dimostrata l'esistenza] di spin $s=2$, privi sia di massa sia di carica) secondo alcune teorie medierebbero la gravità. Giova ancora ricordare che, in fisica delle particelle, i bosoni vengono distinti in *bosoni di gauge* (mediatori di *forza* ⁽¹⁹⁷⁾ e alla cui categoria appartengono i mediatori delle interazioni fondamentali sopra ricordati) e in *mesoni* (particelle instabili composte da una coppia *quark-antiquark*).

È ancora opportuno ricordare che, tuttora, sono stati osservati unicamente **bosoni scalari** (quelli, cioè, dotati di spin $s=0$) e **bosoni vettoriali** (quelli con spin $s=1$).

La *statistica di Bose-Einstein* prevede, per i bosoni, di potersi trovare numerosi in uno stesso stato quantistico: da ciò derivano fenomeni particolari come la *condensazione di Bose-Einstein* ⁽¹⁹⁸⁾.

(196) - Cfr.: L. SUSSKIND - A. FRIEDMAN, *Meccanica quantistica, cit.*, pagg. 270 ss.

(197) - L'effetto della *forza* viene spiegato come scambio di *bosoni mediatori* fra due corpi. È importante ricordare che i bosoni sono i *quanti* delle interazioni fondamentali che, dunque, avvengono per quantità discrete.

(198) - Si tratta di un particolare stato della materia in cui tutte le particelle sono confinate nello stesso stato quantistico: ciò è responsabile, ad esempio, della superfluidità dell'isotopo ^4He , della conduttività dei superconduttori, ecc.

un po' di storia per capire meglio

L'interpretazione di Born

L'antefatto

L'equazione di NEWTON $\vec{F} = m\vec{a}$, com'è noto, consente di calcolare la traiettoria di una particella classica ad ogni istante di tempo, contrariamente all'equazione dinamica della meccanica quantistica (equazione di SCHRÖDINGER) che non consente di prevedere traiettorie, in quanto ha come argomento la funzione d'onda Ψ e non le variabili spaziali.

La conseguenza immediata è che, nella descrizione (probabilistica) dei fenomeni in meccanica quantistica, il concetto di *traiettoria* non ha "cittadinanza".

Ne consegue che, mentre nella meccanica classica particelle identiche (appartenenti ad un unico insieme) sono sempre distinguibili tra loro (ricorrendo alle informazioni relative alla loro traiettoria, che le caratterizza in modo univoco), nella meccanica quantistica tali particelle risultano del tutto indistinguibili tra loro, perché non più individuabili tramite una traiettoria.

Le particelle classiche obbediscono alla distribuzione statistica di MAXWELL-BOLTZMANN, le particelle quantistiche seguono la distribuzione statistica di BOSE-EINSTEIN (se dotate di spin intero)[bosoni], o quella di FERMI-DIRAC (se dotate di spin semintero) [fermioni]. Ovviamente, mentre il comportamento dei sistemi quantistici (sia che seguano la statistica di BOSE-EINSTEIN sia che seguano quella di FERMI-DIRAC) è definibile esclusivamente in presenza di un adeguato numero di particelle, la caratterizzazione come bosone o fermione è applicabile anche alla singola particella⁽¹⁹⁹⁾⁽²⁰⁰⁾.

Non è possibile, com'è noto, descrivere una particella per mezzo di un'onda monocromatica, poiché un'onda piana non è localizzata nello spazio, ma si propaga indefinitamente.

Se, al contrario, si prende in considerazione un gruppo di onde, la velocità di propagazione dell'intero gruppo, essendo minore di quella della luce (c), può essere identificata con quella di una particella dotata di massa. Inoltre, il "pacchetto di onde" è inizialmente localizzato in uno spazio con volume limitato ed analogo al volume proprio di una singola particella.

Tuttavia, identificando una particella con un pacchetto di onde, ci si imbatte in un serio problema, perché il pacchetto di onde, con il trascorrere del tempo, dal piccolo volume iniziale localizzato in una precisa minuscola regione spaziale si espanderà

(199) - Vds.: N. GUICCIARDINI - G. INTROZZI, *Fisica quantistica*, Carocci, Roma, 2007, pagg.156-158.

(200) - J.M. LÉVY-LEBLOND, *Galilei group and Galilean invariance*, Group Theory and Applications II, Academic Press, 1991, pag. 221, sostiene che è proprio la dualità bosone/fermione a connotare i sistemi quantistici; i sistemi classici sarebbero, invece, caratterizzati dalla dualità onda/particella e giunge a proporre il termine *quantoni* per identificare bosoni e fermioni.

(delocalizzandosi) in una regione spaziale vieppiù maggiore: è il fenomeno definito *dispersione del pacchetto di onde*.

Max BORN, nel 1926, per affrontare il problema sopra accennato, propose l'interpretazione statistica della funzione d'onda; essendo consapevole che la *meccanica matriciale* poteva essere applicata a sistemi chiusi e descritti da moti periodici, ma non era facilmente applicabile a sistemi privi della periodicità del moto (come, ad esempio, la diffusione delle particelle), prendendo le mosse dalla meccanica ondulatoria di SCHRÖDINGER e (almeno all'inizio) da una ipotesi (corpuscolista) di EINSTEIN relativa ai fotoni⁽²⁰¹⁾ ed essendo convinto che le particelle quantistiche fossero corpuscoli (ritenendo in merito prove inconfutabili i risultati visivi di esperimenti eseguiti tramite contatori GEIGER, camere a nebbia di WILSON, o altri dispositivi), trasferì alle particelle massive l'intuizione einsteniana relativa ai fotoni.

In un articolo pubblicato nel 1926, dunque, BORN sostenne che il quadrato del modulo della soluzione dell'equazione di SCHRÖDINGER $|\Psi|^2$ fornisce la densità di probabilità di presenza di particelle.

l'interpretazione di Born della funzione d'onda

Poco dopo la pubblicazione del lavoro di SCHRÖDINGER, avvenuta nel 1926, sorse la questione circa l'interpretazione della funzione d'onda Ψ che denota la relativa equazione. [Alcuni Autori usano la "psi" maiuscola Ψ , altri la minuscola ψ ; alcuni la "phi" maiuscola Φ tonda o minuscola ϕ corsiva. In questa Appendice ho usato le minuscole corsive]. Generalmente, $\psi(\vec{r}, t)$ è una funzione complessa, priva di significato fisico diretto e né essa né la sua complessa coniugata $\psi^*(\vec{r}, t)$ sono rilevanti per la determinazione spazio-temporale del sistema.

Max BORN, nel suo articolo *Zur Quantmechanik der Stossvorgänge*⁽²⁰²⁾, propose di interpretare la funzione d'onda $\psi(\vec{r}, t)$ come onda di probabilità e non come onda materiale (come, peraltro, inizialmente aveva ritenuto lo stesso SCHRÖDINGER), riproponendo, per particelle dotate di massa, l'ipotesi formulata - nel 1917 - da EINSTEIN relativamente ai fotoni.

La densità di probabilità $|\psi^*(\vec{r}, t)|^2$ dell'equazione di SCHRÖDINGER è (generalmente) una funzione del tempo.

L'interpretazione probabilistica di BORN, secondo la quale solo le probabilità quantistiche sono causalmente determinate nel tempo, è essenziale per comprendere il significato

(201) - Einstein riteneva che «fosse possibile interpretare le onde elettromagnetiche come un "campo fantasma" che non trasporta energia. Sarebbe cioè il campo elettromagnetico a determinare la probabilità che un quanto di luce (un fotone, il portatore di energia) "imbecchi un certo cammino"» (sic, N. GUICCIARDINI - G. INTROZZI, *cit.*, pag. 160).

(202) - M. BORN, *Zur Quantmechanik der Stossvorgänge*, *ZEITSCHRIFT FÜR PHYSIK*, n. 36, 1926, pagg. 863-867.

fisico dell'equazione di SCHRÖDINGER: essa, infatti “governa la variazione nel tempo delle probabilità associate al fenomeno fisico, non le vicende temporali del fenomeno stesso”⁽²⁰³⁾. Nella descrizione quantistica la determinazione causale (tipica della meccanica classica) viene meno, potendosi esclusivamente formulare previsioni statistiche circa il comportamento di un sistema quantistico (ricorrendo al calcolo delle probabilità associate alla funzione d'onda del sistema stesso)⁽²⁰⁴⁾.

È chiaro che, secondo questa interpretazione, la meccanica quantistica appare come una teoria intrinsecamente statistica, poiché descrive i processi fisici ricorrendo al calcolo del valore medio assumibile da una quantità fisica (qualora venga misurata nei confronti di un insieme statistico di sistemi fisici identici), ma non è in grado di predire il valore esatto che questa quantità assumerà realmente per un particolare sistema appartenente all'insieme statistico.

È appena il caso di accennare che, nella meccanica quantistica relativistica, l'interpretazione probabilistica risulta meno ovvia rispetto all'equazione di SCHRÖDINGER. Infatti, ad esempio, nell'elaborazione della teoria quantistica relativistica in generale non ha più valore la legge di conservazione del numero di particelle appartenenti a un certo sistema perché, a causa dell'equivalenza relativistica tra massa ed energia [$E_0 = mc^2$], possono verificarsi la creazione o la distruzione di una particella ogni volta che l'energia assorbita o ceduta nell'interazione, risulti \geq dell'energia “a riposo” di quella particolare particella, secondo l'equazione $E_0 = mc^2$.

la complementarità

Questo principio, formulato da BOHR nel 1927 a seguito del proprio convincimento della centralità del Principio di Indeterminazione di HEISENBERG (benché ritenesse l'equazione di SCHRÖDINGER una formalizzazione preferibile a quella di HEISENBERG) e all'accettazione (da parte sua) dell'interpretazione statistica della ψ di Schrödinger, non ha una definizione semplice: lo stesso BOHR ne fornì molteplici versioni. Questo principio diede vita a una complessa interpretazione della meccanica quantistica, nota come *interpretazione di Copenhagen*⁽²⁰⁵⁾ [locuzione introdotta da HEISENBERG nel 1955], accolta favorevolmente anche da BORN e da PAULI.

Contro di essa, peraltro, si schierarono tra gli altri (anche molto vivacemente) EINSTEIN, PLANCK, SCHRÖDINGER, DE BROGLIE e BOHM.

(203) - Sic, N. GUICCIARDINI - G. INTROZZI, *cit.*, pag. 172.

(204) - Vds: *ibidem*.

(205) - Dal nome della Capitale danese nella quale principalmente (ma non esclusivamente) Niels BOHR e Werner HEISENBERG svolsero i propri lavori intorno al 1927.

In particolare, l'interpretazione di Copenhagen venne attaccata dal punto di vista della "completezza"⁽²⁰⁶⁾ soprattutto dall'esperimento mentale noto come *paradosso di EINSTEIN-PODOLSKY-ROSEN* [noto anche come *paradosso EPR*, dalle iniziali dei suoi estensori], con il quale si intendeva dimostrare la necessità dell'esistenza di variabili nascoste per evitare paradossali "istantanei effetti a distanza" che contraddicono il *principio di località*, che gode della medesima inviolabilità del *principio di realtà* (entrambi principi-cardine della fisica classica).

Una *definizione semplice* del principio di complementarità, deriva dalla non- contraddizione - nello studio dei sistemi microfisici - tra concetti ondulatori e concetti corpuscolari: in realtà essi sono complementari tra loro perché, pur escludendosi vicendevolmente⁽²⁰⁷⁾, risultano del tutto necessari per descrivere in modo completo tali sistemi.

BOHR, nel tentativo di spiegare il principio di complementarità, sostiene che ogni sistema quantistico possiede almeno una coppia di proprietà (necessarie per descrivere il sistema stesso), che tuttavia non possono essere conosciute simultaneamente.

Ovviamente, la coppia inevitabilmente presente è quella onda/particella; altre forme di complementarità sono quella posizione/momento, quella delle componenti dello spin di una particella, ecc. Come si ricorderà, l'esatta determinazione della posizione x di una particella preclude la contestuale conoscenza del momento coniugato p_x ⁽²⁰⁸⁾.

Le componenti del momento angolare di spin (s_x, s_y, s_z) di un sistema quantistico sono *osservabili complementari* e, dunque, non sono conoscibili nello stesso momento.

L'enunciazione più ortodossa della complementarità onda/particella afferma che un sistema quantistico minimale (cioè composto da un unico *quantone*⁽²⁰⁹⁾) può comportarsi sia come onda sia come particella, mai però simultaneamente in entrambi i modi.

Peraltro, frequentemente la complementarità onda/particella viene formulata (seguendo il criterio di Pascual JORDAN) attribuendo all'apparato sperimentale la determinazione del sistema quantistico come onda o come particella: praticamente, se lo strumento di osservazione di un sistema quantico è un rivelatore di particelle (ad es.: un contatore), si registrerà un comportamento particellare; se, invece, il sistema viene osservato tramite un rivelatore di onde (ad es.: un interferometro), si registrerà un comportamento ondulatorio⁽²¹⁰⁾.

(206) - Con questo termine, nella *logica matematica*, si indica la proprietà che un insieme di assiomi sia sufficiente a dimostrare tutte le verità di una teoria e, pertanto, a decidere circa la verità o la falsità di qualunque enunciato che sia formulabile nel linguaggio della teoria stessa.

(207) - In realtà questa mutua esclusione viene spesso riferita alle condizioni sperimentali che consentono l'applicazione dei concetti sopra elencati. Cfr.: N. GUICCIARDINI - G. INTROZZI, *cit.*, pag. 174.

(208) - *Ibidem*, pag. 184.

(209) - Termine coniato da Jean-Marc LÉVY-LEBLOND per evitare che, dopo la formulazione originaria di BOHR, venissero usati termini (ad es.: corpuscolo) che connoterebbero il sistema quantistico in modo classico.

(210) - Per approfondimenti in merito e anche per la dualità per una doppia fenditura (esperimento di YOUNG) si rimanda a: N. GUICCIARDINI - G. INTROZZI, *cit.*, pag. 188-194.

Sostanzialmente, fin dall'articolo di EINSTEIN⁽²¹¹⁾(1909) relativo alle fluttuazioni energetiche del corpo nero (che ha introdotto il dualismo onda/particella) ci si è interrogati sia sul significato sia sulle conseguenze di questo concetto così problematico.

Le proposte più note sono dovute a SCHRÖDINGER [solo onde, senza particelle], BORN [solo particelle, senza onde], BOHM [onde e particelle], BOHR e JORDAN [onde e particelle], Heisenberg e JORDAN [né onde, né particelle], LÉVY-LEBLOND [quantoni], LÉVY-LEBLOND [bosoni e fermioni]⁽²¹²⁾⁽²¹³⁾.

BOHR, nel 1935, rispose alle critiche mossegli da EPR sostenendo che “qualsiasi confronto fra la meccanica quantistica e la meccanica statistica ... è essenzialmente irrilevante” in quanto in ogni disposizione sperimentale “idonea per lo studio dei fenomeni quantistici propri” non si riscontra semplicemente “un’ignoranza del valore di certe grandezze fisiche” ma “ l'impossibilità di definire queste grandezze in modo non ambiguo”.

(211) - A. EINSTEIN, *Physikalische Zeitschrift*, 10 (1909), pagg. 185-193- trad. ita.: E. BELLONE (a cura di), *Albert Einstein: opere scelte*, Bollati Boringhieri, Torino, 1988, pagg. 201-220.

(212) - Per una disamina approfondita in merito, vds.: N. GUICCIARDINI - G. INTROZZI, *cit.*, pagg. 196-201.

(213) - Per comprendere le obiezioni che EINSTEIN e SCHRÖDINGER mossero all'interpretazione di Copenhagen, rimando all'opera di N. GUICCIARDINI - G. INTROZZI, *cit.*, pagg. 203 ss.

Le equazioni di Maxwell

Le equazioni conosciute come “equazioni di Maxwell” costituiscono un sistema di quattro equazioni differenziali alle derivate parziali lineari; unitamente alla *forza di LORENTZ*, costituiscono le leggi fondamentali dell’interazione elettromagnetica.

Queste equazioni, raggruppando ed estendendo le leggi dell’elettricità e del magnetismo note nel XIX secolo (tra cui la legge di GAUSS per il campo elettrico e la legge di FARADAY), unitamente alla legge di AMPÈRE (alla quale MAXWELL aggiunse la *corrente di spostamento*), rendono evidente che i campi elettrico e magnetico siano, in realtà, due manifestazioni della stessa realtà: il *campo elettromagnetico*.

James Clerk MAXWELL, inoltre, osservò che le equazioni che portano il suo nome ammettono soluzioni di tipo ondulatorio: ciò, oltre a condurre alla scoperta delle onde elettromagnetiche, spiegò la natura della luce, fino ad allora oggetto di varie teorie e speculazioni.

N.B.: i campi elettromagnetici esistono indipendentemente dalle sorgenti che li generano. Sui libri ad uso dei licei spesso le equazioni di MAXWELL vengono scritte nel seguente modo:

-Teorema di Gauss

$$\phi(\vec{E}) = \frac{q}{\varepsilon_0} \quad [12]$$

- Teorema di Gauss per il magnetismo

$$\phi(\vec{B}) = 0 \quad [13]$$

- Legge di Ampère-Maxwell

$$C(\vec{B}) = \mu_0 \left(i + \varepsilon_0 \frac{\Delta\phi(\vec{E})}{\Delta t} \right) \quad [14]$$

- Legge di Faraday-Neumann

$$C(\vec{E}) = - \frac{\Delta\phi(\vec{B})}{\Delta t} \quad [15]$$

Nella[12], q =somma delle cariche contenute all’interno della superficie da cui esce il flusso. Se si vuole approfondire a un livello superiore, l’approccio matematico (e, dunque, anche simbolico) sarà un po’ diverso. Ad esempio, Ugo AMALDI, *Il nuovo Amaldi per i Licei Scientifici. Blu*, Zanichelli, Bologna, 2020³, usa il simbolo Γ per indicare la circuitazione, qui sopra, invece, rappresentata con C , (in analogia, ad esempio, a FEYNMAN, *La Fisica di - , cit.*, vol.2, pagg. 33, 208, ove Γ è una curva chiusa qualunque e S una qualunque superficie che ammette Γ come contorno).

Nelle equazioni di MAXWELL ci si imbatte in due tipi di campo elettrico: quello *elettrostatico* (generato da una carica elettrica) e quello *indotto* (generato da un campo magnetico variabile).

Le quattro equazioni di MAXWELL possono essere scritte sia in forma *integrale* sia in forma *differenziale*. Per comodità del lettore, verranno scritte in entrambi i modi.

Legge di Gauss per il Campo Elettrico

Forma integrale

$$\oint_s \vec{E} \cdot \hat{n} da = \frac{q_{inc}}{\epsilon_0} \quad [16]$$

ove:

\oint_s = integrale su una superficie chiusa; non di volume né prodotto scalare di linea.

\vec{E} = campo elettrico (espresso in Newton/Coulomb)
il punto al centro indica un prodotto scalare

\hat{n} = versore normale alla superficie

da = incremento di area (m²)

q = quantità di carica (Coulomb)

inc perché contribuisce solo la carica "racchiusa"

ϵ_0 = permittività elettrica del vuoto

Forma differenziale

$$\vec{\nabla} \cdot \vec{E} = \frac{\rho}{\epsilon_0} \quad [17]$$

ove:

$\vec{\nabla} \cdot$ = operatore differenziale "nabla"
il punto al centro indica un prodotto scalare: esso trasforma il nabla nella "divergenza"

\vec{E} = campo elettrico (Newton/Coulomb)

ρ = densità di carica (Coulomb/m³)

ϵ_0 = permittività elettrica del vuoto

La *divergenza* del campo elettrico (generato da una carica puntiforme) $\vec{\nabla} \cdot \vec{E}$ è nulla in tutti i punti, tranne che nell'origine ove è $\vec{\nabla} \cdot \vec{E} = \frac{\rho}{\epsilon_0}$

L'operatore nabla

Si tratta di un *operatore differenziale vettoriale*, il cui simbolo è un delta maiuscolo rovesciato; viene anche chiamato “*del*” e indica che si debbono eseguire le derivate della grandezza su cui l'operatore stesso agisce.

Va precisato che la forma esatta delle derivate di cui si sta parlando dipende dal simbolo che segue il nabla:

$\vec{\nabla} \cdot$ significa divergenza;

$\vec{\nabla} \times$ indica il rotore;

$\vec{\nabla}$ indica il gradiente.

È opportuno un piccolo chiarimento per i meno esperti: un **operatore matematico** (e, dunque anche il nabla) può essere definito come “un'azione in attesa di accadere”, analogamente a quanto indica il simbolo $\sqrt{\quad}$ che “comanda” di prendere la radice quadrata di tutto ciò che appare sotto di esso.

Non mi dilungo oltre: chi fosse interessato può consultare i testi specifici di Analisi matematica e di Fisica.

Per comodità del lettore, comunque, alle pagg. 207-208 (in conclusione del Glossario) ho inserito una breve sintesi sui principali “operatori” in meccanica quantistica.

Legge di Gauss per il campo magnetico

L'equazione in *forma integrale* della legge di Gauss per il campo magnetico è analoga a quella per il campo elettrico:

$$\oint_S \vec{B} \cdot \hat{n} da = 0 \quad [18]$$

ove: \vec{B} è il vettore campo magnetico (espresso in Tesla),
 \hat{n} è il versore normale alla superficie
da indica un incremento dell'area di una superficie (in m²)

In particolare, il flusso magnetico attraverso una superficie chiusa viene rappresentato dall'equazione:

$$\oint_S \vec{B} \cdot \hat{n} da \quad [19]$$

È opportuno ricordare che la *divergenza* di un campo magnetico è nulla in qualsiasi punto, come indica l'equazione:

$$\vec{\nabla} \cdot \vec{B} = 0 \quad [20]$$

Legge di Faraday

In molti testi la legge di Faraday nella sua forma integrale è scritta come:

$$\oint_C \vec{E} \cdot d\vec{l} = - \frac{d}{dt} \int_S \vec{B} \cdot \hat{n} da \quad [21]$$

ove C è un percorso chiuso nella direzione indicata dalla regola della mano destra che, com'è noto, permette di determinare il verso del vettore ottenuto dal prodotto vettoriale di altri due vettori.

Va peraltro ricordato che alcuni Autori ritengono fuorviante questa forma, in quanto riferibile a due distinti fenomeni: l'induzione magnetica (che, com'è noto, coinvolge un campo magnetico variabile) e la forza elettromotrice (*fem*) che, invece, riguarda il moto - attraverso un campo magnetico - di una particella carica; è ben vero che entrambi i fenomeni generano una *fem*, ma solo l'induzione magnetica produce un campo magnetico *circuitante*. Pertanto, secondo i predetti Autori, la forma della legge di Faraday sopra riportata andrebbe modificata nella seguente:

$$\oint_C \vec{E} \cdot d\vec{l} = - \int_S \frac{\partial \vec{B}}{\partial t} \cdot \vec{n} da \quad [22]$$

nella quale la derivata temporale $\frac{\partial}{\partial t}$ si riferisce esclusivamente al campo magnetico e non anche al flusso magnetico.⁽²¹⁴⁾

Nella forma differenziale, la legge di Faraday viene scritta:

$$\vec{\nabla} \times \vec{E} = - \frac{\partial \vec{B}}{\partial t} \quad [23]$$

ove $\frac{\partial \vec{B}}{\partial t}$ indica la variazione del campo magnetico nel tempo;

il segno - indica che la fem si oppone alla variazione di flusso, cioè tende a mantenere il flusso esistente.

(214) - Per approfondimenti sull'integrale di linea, rimando all'opera di D. FLEISCH, *Guida alle Equazioni di Maxwell*, Editori Riuniti University Press, Roma, 2014, pag. 62.

Legge di Ampère-Maxwell

Come certamente è noto, la **legge di Ampère** (che mette in correlazione una corrente elettrica costante con un campo magnetico) a metà dell'800 era stata utilizzata esclusivamente con *correnti stazionarie*; MAXWELL, sperimentando un flusso elettrico variabile, rese la legge di Ampere applicabile anche agli *stati variabili nel tempo*.

Non solo: fu lo studio della variabilità del flusso elettrico a permettere a MAXWELL di comprendere la natura elettromagnetica della "luce" e di sviluppare una teoria completa dell'elettromagnetismo. Ciò spiega perché ho voluto aggiungere questi brevi e incompleti cenni di meccanica quantistica a questi "Appunti" che, a prima vista, potrebbero sembrare diretti a dilettanti dediti alla mera osservazione sperimentale.

La forma integrale della legge di Ampère-Maxwell compare come:

$$\oint_C \vec{B} \cdot d\vec{l} = \mu_0 \left(I_{\text{inc}} + \varepsilon_0 \frac{d}{dt} \int_S \vec{E} \cdot \hat{n} da \right) \quad [24]$$

ove I_{inc} indica la corrente elettrica (in Ampere) concatenata; delle altre variabili si è già detto nelle pagine precedenti.

La forma differenziale viene scritta come:

$$\vec{\nabla} \times \vec{B} = \mu_0 \left(\vec{j} + \varepsilon_0 \frac{\partial \vec{E}}{\partial t} \right) \quad [25]$$

ove \vec{j} è il vettore campo magnetico (in Tesla).

È utile una breve sintesi sull'operatore differenziale **nabla** nell'ambito delle equazioni di Maxwell⁽²¹⁵⁾.

Come precedentemente ricordato, **nabla** è un operatore differenziale polivalente in grado di operare su campi scalari o vettoriali, restituendo risultati scalari o vettoriali:

$$\vec{\nabla} \equiv \hat{i} \frac{\partial}{\partial x} + \hat{j} \frac{\partial}{\partial y} + \hat{k} \frac{\partial}{\partial z} \quad [26]$$

La **Divergenza** opera su un campo vettoriale restituendo un risultato scalare che indica la tendenza del campo a fluire da un punto:

$$\vec{\nabla} \cdot \vec{A} \equiv \hat{i} \frac{\partial A_x}{\partial x} + \hat{j} \frac{\partial A_y}{\partial y} + \hat{k} \frac{\partial A_z}{\partial z} \quad [27]$$

Il **Rotore** opera su un campo vettoriale e restituisce un risultato vettoriale indicante la tendenza del campo a circuitare intorno a un punto, con direzione dell'asse di massima circuitazione:

$$\vec{\nabla} \times \vec{A} \equiv \left(\frac{\partial A_z}{\partial y} - \frac{\partial A_y}{\partial z} \right) \hat{i} + \left(\frac{\partial A_x}{\partial z} - \frac{\partial A_z}{\partial x} \right) \hat{j} + \left(\frac{\partial A_y}{\partial x} - \frac{\partial A_x}{\partial y} \right) \hat{k} \quad [28]$$

Il **Gradiente** opera su un campo scalare restituendo un risultato vettoriale che indica la variazione spaziale del campo in un punto con direzione e verso, partendo da quel punto e fino al più alto incremento:

$$\vec{\nabla} \varphi \equiv \hat{i} \frac{\partial \varphi}{\partial x} + \hat{j} \frac{\partial \varphi}{\partial y} + \hat{k} \frac{\partial \varphi}{\partial z} \quad [29]$$

Si ricordi che \vec{A} è il *potenziale vettore* e che ogni campo magnetico può essere espresso come rotore di un campo ausiliario: $\vec{B} = \vec{\nabla} \times \vec{A}$

Il potenziale vettore, a differenza del campo elettrico e del campo magnetico, non è "reale": è definito unicamente dal fatto che il suo rotore fornisce il campo magnetico.

(215) - Cfr: D. FLEISCH, *cit.*, pag. 119, con modifiche.

Per comprendere in quale modo le equazioni di MAXWELL conducano all'*equazione d'onda* bisogna ricordare che, pur implicando l'uso delle derivate parziali nelle tre direzioni ortogonali (al pari della divergenza e del rotore) il **gradiente** si applica ai campi scalari.

L'intensità del gradiente è indice di quanto velocemente il campo varia nello spazio, la direzione del gradiente indica la direzione in cui il campo varia più rapidamente con la distanza.

Da ciò si evince facilmente che, nonostante il gradiente operi su campi scalari, il risultato è comunque di tipo vettoriale.

In particolare, il gradiente del campo scalare ψ in coordinate cartesiane è:

$$\vec{\nabla}\psi \equiv \hat{i} \frac{\partial\psi}{\partial x} + \hat{j} \frac{\partial\psi}{\partial y} + \hat{k} \frac{\partial\psi}{\partial z} \quad [30]$$

in coordinate cilindriche è:

$$\vec{\nabla}\psi \equiv \hat{r} \frac{\partial\psi}{\partial x} + \hat{\varphi} \frac{\partial\psi}{\partial y} + \hat{z} \frac{\partial\psi}{\partial z} \quad [31]$$

e, in coordinate polari, è:

$$\vec{\nabla}\psi \equiv \hat{r} \frac{\partial\psi}{\partial r} + \hat{\theta} \frac{1}{r} \frac{\partial\psi}{\partial \theta} + \hat{\varphi} \frac{1}{r \sin\theta} \frac{\partial\psi}{\partial \varphi} \quad [32]$$

L'equazione di Schrödinger viene scritta nella forma:

$$i\hbar \frac{\partial\psi_x}{\partial t} = -\frac{\hbar^2}{2m} \frac{\partial^2\psi_x}{\partial x^2} + U(x)\psi(x) \quad [33]$$

che, peraltro, rappresenta un caso particolare dell'equazione di *SCHRÖDINGER generalizzata*, detta anche equazione di Schrödinger dipendente dal tempo:

$$\hbar \frac{\partial|\psi\rangle}{\partial t} = -iH|\psi\rangle \quad [34]$$

H è l'*hamiltoniana*, oggetto matematico che - sia in fisica classica sia in meccanica quantistica - rappresenta l'energia di un sistema; l'hamiltoniana, in pratica, fornisce informazioni circa l'evolversi nel tempo dello stato di un sistema isolato. Ovviamente, si tratta di un vettore (chiamato anche "*ket di Schrödinger*") e l'H viene spesso scritta nella forma \hat{H} per indicare l'*operatore hamiltoniano*.

L'equazione [33] viene generalmente indicata nella forma:

$$i\hbar \frac{\partial\psi(\vec{r}, t)}{\partial t} = \left[\frac{-\hbar^2}{2m} \nabla^2 + V(\vec{r}) \right] \psi(\vec{r}, t) \quad [35]$$

che può essere scritta nella forma compatta:

$$i\hbar \frac{\partial \psi(\vec{r}, t)}{\partial t} = \hat{H} \psi(\vec{r}, t) \quad [36]$$

La *funzione d'onda* $\psi(\vec{r}, t)$ è governata dall'equazione di Schrödinger dipendente dal tempo. Va precisato che, inizialmente (nel 1926), SCHRÖDINGER derivò un'equazione relativistica per particelle prive di spin (oggi nota come equazione di KLEIN-GORDON⁽²¹⁶⁾); ben presto, però, la scartò in quanto non poteva essere applicata agli elettroni (dotati di spin 1/2). Per comodità del lettore, riporto alcune variabili classiche con i relativi operatori quantistici; nel caso di dipendenza dal tempo:

<i>Variabile</i>	<i>Operatore</i>
E	$i\hbar \left(\frac{\partial}{\partial t} \right)$
V	V
p_x	$\hat{p}_x = -i\hbar \left(\frac{\partial}{\partial x} \right)$
p_y	$\hat{p}_y = -i\hbar \left(\frac{\partial}{\partial y} \right)$
p_z	$\hat{p}_z = -i\hbar \left(\frac{\partial}{\partial z} \right)$

Nel caso di indipendenza dal tempo, la *Variabile* classica E avrà come corrispondente l'*Operatore quantistico* \hat{E} ; tuttavia, se una *variabile* è costante e indipendente dal tempo, può non essere necessario introdurre un operatore quantistico "dedicato". Dalla funzione hamiltoniana classica

$$H = \frac{1}{2m} (p_x^2 + p_y^2 + p_z^2) + V(x, y, z) \quad [37]$$

sostituendo alle variabili classiche i relativi operatori quantistici che agiscono sulla funzione d'onda, si ottiene l'operatore Hamiltoniano \hat{H} che consente di scrivere l'equazione di Schrödinger nella formalità:

$$\hat{H}\psi(\vec{r}, t) = E\psi(\vec{r}, t) \quad [38]$$

(216) - l'equazione di Klein-Gordon $\frac{\partial^2}{\partial t^2} \psi(x, t) - \nabla^2 \psi(x, t) = -m^2 \psi(x, t)$ è soddisfatta da ogni funzione d'onda che descrive lo stato di moto di una particella dotata di massa m ; se $m = 0$, l'equazione è soddisfatta sia dal vettore campo elettrico, sia dal vettore campo magnetico (della teoria elettromagnetica). L'equazione di Klein-Gordon differisce da quelle di Maxwell poiché non fornisce il dato relativo alla polarizzazione del fotone, indispensabile per definirne lo stato di moto (unitamente alla quantità di moto e all'energia).

Una piccola precisazione: gli operatori quantistici delle coordinate spaziali x, y, z coincidono con le rispettive variabili classiche; poiché il tempo non è una variabile (cioè una *osservabile*), bensì un parametro, in *meccanica quantistica non relativistica* non esiste l'operatore temporale.

In meccanica quantistica esiste, però, l'**operatore di evoluzione temporale**, che agisce su uno stato del sistema operandone l'evoluzione negli istanti successivi.

Se, ad esempio, si considera un sistema fisico descritto - in un certo istante di tempo t_0 - dal vettore di stato $|\alpha, t_0\rangle$, all'evolversi del tempo lo stato del sistema sarà descritto - a ciascun istante di tempo successivo ($t > t_0$) - dal vettore $|\alpha, t\rangle$.

È possibile definire una relazione tra i due vettori:

$$|\alpha, t\rangle = U(t, t_0) |\alpha, t_0\rangle \quad [39]$$

ove $U(t, t_0)$ è l'*operatore di evoluzione temporale*.

L'*Equazione di Schrödinger* cosiddetta "omogenea", se viene espressa nel *formalismo di Dirac* $H|\psi\rangle = E|\psi\rangle$, viene interpretata come un'equazione agli autovalori, ove H è una matrice di cui si vogliono conoscere gli autovalori e gli autovettori.

Se l'equazione viene rappresentata in funzione delle coordinate $H\psi(x) = E\psi(x)$, genera un'equazione differenziale le cui soluzioni sono gli autostati di H .

Effetto tunnel

È così definito quel fenomeno per cui, in presenza di una *barriera di potenziale* indotta dalle *forze di un campo*, una particella dotata di energia minore di quella della barriera stessa, destinata - per la legge della conservazione dell'energia - a non poterla attraversare ma ad essere da essa riflessa, in alcuni casi può attraversarla: ciò può avvenire esclusivamente in meccanica quantistica.

Si riscontra, per via di calcolo, che la probabilità che si verifichi l'attraversamento di cui sopra aumenta in ragione dell'avvicinamento dell'energia della particella al potenziale della barriera e del diminuire dello spessore della barriera stessa.

Questo effetto quantistico è stato ampiamente dimostrato sia con prove sperimentali, sia con la realizzazione di molti dispositivi elettronici: le giunzioni tunnel a stato solido per elettroni (nelle quali due metalli sono separati da un sottile stato isolante, tipicamente di spessore $1 \div 10$ nm), chiamate MIM; le giunzioni superconduttore-isolante-superconduttore, chiamate SIS; i dispositivi SQUID (*Superconducting Quantum Interference Device*), le MRAM (*Magnetoresistive Random Access Memory*) basate sulle giunzioni ferromagnete-isolante-ferromagnete.

In una giunzione, la *corrente di tunnel* (che dipende sia dalla probabilità di trasmissione sia dalle proprietà fisiche dei materiali) viene usata in *spettroscopia di tunnel* per indagare lo *stato condensato* della materia e delle superfici.

Su questo effetto quantistico si basa la realizzazione del *microscopio a effetto tunnel* (STM, *Scanning Tunneling Microscope*), potente strumento per lo studio delle superfici a livello atomico, dotato di potere risolutivo laterale di 0,1 nm e di profondità di 0,01 nm. In pratica, quando una punta conduttrice è posta molto vicino a una superficie, se si applica una adeguata differenza di potenziale tra la punta e la superficie stessa può accadere che gli elettroni attraversino - per effetto tunnel - il vuoto interposto.

La *corrente di tunneling* che risulta da questo attraversamento è dipendente dalla posizione della punta esaminatrice, dalla differenza di potenziale applicata e dalla densità locale degli stati (LDOS, dall'inglese *Local Density of States*) del campione in esame; misurando la corrente in vari punti della superficie in esame, si ottengono immagini "topografiche" e altre informazioni.

L'effetto tunnel è anche responsabile della *radioattività α* (come ha dimostrato George Antonovic Gamov): in un atomo la barriera di potenziale del nucleo impedisce l'allontanamento di neutroni e protoni; tuttavia in alcuni elementi [instabili] (Uranio, Plutonio, Radio, ecc.) le **particelle α** (chiamate anche *elioni*, in quanto nuclei di Elio [costituiti da 2 protoni e 2 neutroni]) sono in grado di superare questa barriera generando - per *decadimento α* - la omonima *radiazione*.

Non è il caso di addentrarsi in questo campo: esula dagli intenti di questi "Appunti".

APPENDICE D

Per allertare soprattutto i principianti circa la **pericolosità delle sostanze chimiche** di uso comune negli esperimenti di microscopia, nelle pagine seguenti ho riportato alcune “schede” tratte dal sito:

<http://www.sicurezzaincasa.it/schede/solventi.htm>

Ribadisco la **necessità inderogabile di INFORMARSI** - direttamente sul sito delle Ditte produttrici - circa la **pericolosità**, la **tossicità**, l'**infiammabilità** delle *sostanze chimiche* che si intende acquistare, nonché sul **modo di manipolarle**, di **conservarle**, di **smaltirle** e di **prestare l'eventuale primo soccorso**.

PRODOTTO
SOSTANZA E ASPETTO

CHETONE
ACETONE, PROPANONE O
DIMETILKETONE (liquido
chiaro di odore dolciastro)

PERICOLI

ESPLOSIVO
INFIAMMABILE
TOSSICO

VAPORI DEL SOLVENTE CON L'ARIA
ALTAMENTE
Irrita pelle ed occhi, i vapori creano
stati confusionali

CORROSIVO

NO

MISURE DI SICUREZZA

STOCCAGGIO

Tenere in contenitori sigillati in
luogo asciutto, non fumare

AMBIENTE DI LAVORO

Buona ventilazione, non fumare,
NESSUNA FIAMMA LIBERA

MISURE DI PROTEZIONE
IGIENE

Portare guanti ed occhiali
Usare crema protettiva, lavarsi le
mani dopo il lavoro

SMALTIMENTO RIFIUTI

Tramite IMPRESA SPECIALIZZATA

PRONTO SOCCORSO

BRUCIATURE

INALAZIONE

PORTARE ALL'APERTO E RICORRERE AL MEDICO

INGESTIONE

SCIACQUARSI LA BOCCA CON ACQUA E RICORRERE AL MEDICO

OCCHI

LAVARE ABBONDANTEMENTE CON ACQUA

PELLE

LAVARSI CON ACQUA E SAPONE, APPLICARE CREMA

PRODOTTO
SOSTANZA E ASPETTO

ALCOLE
ALCOOL ETILICO O
ETANOLO (liquido incolore di
odore gradevole)

PERICOLI

ESPLOSIVO
INFIAMMABILE
TOSSICO

VAPORI DEL SOLVENTE CON L'ARIA
ALTAMENTE
Irrita pelle ed occhi, i vapori creano stati
confusionali

CORROSIVO

NO

MISURE DI SICUREZZA

STOCCAGGIO

Tenere in contenitori sigillati in
luogo asciutto, non fumare

AMBIENTE DI LAVORO

Buona ventilazione, non fumare,
NESSUNA FIAMMA LIBERA

MISURE DI PROTEZIONE
IGIENE

Portare guanti ed occhiali
Usare crema protettiva, lavarsi le
mani dopo il lavoro

SMALTIMENTO RIFIUTI

Tramite IMPRESA SPECIALIZZATA

PRONTO SOCCORSO

BRUCIATURE
INALAZIONE
INGESTIONE

PORTARE ALL'APERTO E RICORRERE AL MEDICO
SCIACQUARSI LA BOCCA CON ACQUA E RICORRERE AL
MEDICO

OCCHI
PELLE

LAVARE ABBONDANTEMENTE CON ACQUA
LAVARSI CON ACQUA E SAPONE, APPLICARE CREMA

PRODOTTO
SOSTANZA E ASPETTO

OLIO DI PARAFFINA
Liquido oleoso giallastro

PERICOLI

ESPLOSIVO
INFIAMMABILE
TOSSICO

VAPORI DEL SOLVENTE CON L'ARIA

SI

Irrita pelle ed occhi, i vapori creano stati confusionali

CORROSIVO

NO

MISURE DI SICUREZZA

STOCCAGGIO

Tenere in contenitori sigillati in luogo asciutto, non fumare

AMBIENTE DI LAVORO

Buona ventilazione, non fumare, NESSUNA FIAMMA LIBERA

MISURE DI PROTEZIONE
IGIENE

Portare guanti ed occhiali

Usare crema protettiva, lavarsi le mani dopo il lavoro

SMALTIMENTO RIFIUTI

Tramite IMPRESA SPECIALIZZATA

PRONTO SOCCORSO

BRUCIATURE
INALAZIONE
INGESTIONE

PORTARE ALL'APERTO E RICORRERE AL MEDICO

SCIACQUARSI LA BOCCA CON ACQUA E RICORRERE AL MEDICO

OCCHI
PELLE

LAVARE ABBONDANTEMENTE CON ACQUA

LAVARSI CON ACQUA E SAPONE, APPLICARE CREMA

PRODOTTO
SOSTANZA E ASPETTO

XILOLO
XILENE (liquido incolore)

PERICOLI

ESPLOSIVO
INFIAMMABILE
TOSSICO

VAPORI DEL SOLVENTE CON L'ARIA
ALTAMENTE
Irrita pelle ed occhi, i vapori creano
stati confusionali

CORROSIVO

NO

MISURE DI SICUREZZA

STOCCAGGIO

Tenere in contenitori sigillati in
luogo asciutto, non fumare

AMBIENTE DI LAVORO

Buona ventilazione, non fumare,
NESSUNA FIAMMA LIBERA

MISURE DI PROTEZIONE
IGIENE

PORTARE GUANTI ED OCCHIALI
Usare crema protettiva, lavarsi le
mani dopo il lavoro

SMALTIMENTO RIFIUTI

Tramite IMPRESA SPECIALIZZATA

PRONTO SOCCORSO

BRUCIATURE
INALAZIONE
INGESTIONE

PORTARE ALL'APERTO E RICORRERE AL MEDICO
SCIACQUARSI LA BOCCA CON ACQUA E RICORRERE AL
MEDICO

OCCHI
PELLE

LAVARE ABBONDANTEMENTE CON ACQUA
LAVARSI CON ACQUA E SAPONE, APPLICARE CREMA

BIBLIOGRAFIA

AMALDI Edoardo - AMALDI Ginestra - AMALDI Ugo, *La Fisica per i Licei Scientifici*, Zanichelli, Bologna, 5^a ed., 1984.

AMALDI Edoardo - BIZZARRI Romano - PIZZELLA Guido, *Fisica generale - elettromagnetismo, relatività, ottica*, Zanichelli, Bologna, 1986.

AMALDI Ugo, *Il nuovo Amaldi per i Licei Scientifici. Blu*, Zanichelli, Bologna, 3^a ed., 2020.

AMODEO Pietro - VITALE Rosa Maria, *La fluorescenza*, CNR-Istituto di Biochimica molecolare, reperibile al sito:

https://creo.na.cnr.it/wp-content/uploads/2021/10/att579_SchedaLab_Teorica.pdf

ANDERSON E. S. - ARMSTRONG J. A. - NIVEN J. S. F., *Observation of virus growth with aminoacridines*, 9th Symposium of the Society for General Microbiology, Cambridge (University Press), 1959.

ANDERSON Carl D., *Cosmic-Ray positive and negative Electrons*, *PHYSICAL REVIEW [PHYS. REV.]*, vol. 44, 1933, pagg. 406–416, reperibile al sito: http://prola.aps.org/abstract/PR/v44/i5/p406_1

ARMSTRONG J. A., *Histochemical differentiation of nucleic acids by means of induced fluorescence*, *EXPERIMENTAL CELL RESEARCH [EXP. CELL RES.]*, n.11(3), 1956, pagg. 640-643.

ASHCROFT Neil W. - MERMIN N. David, *Solid State Physics*, Saunders College Publishing, USA, 1976.

ATKINS Peter - DE PAULA Julio, *Chimica Fisica*, 4^a ed. it., Zanichelli, Bologna, 2004.

ATKINS Peter - JONES Loretta, *Chimica Generale*, 2^a ed. it. condotta sulla 3^a originale, Zanichelli, Bologna, 1998.

BARBERO Diego - MALVANO Roberto, *Introduzione alla fisica atomica e molecolare*, Casa Editrice Ambrosiana, Milano, 1975.

BARNARD J. E. - WELCH F. K., *Fluorescence microscopy with high powers*, *JOURNAL OF ROYAL SOCIETY OF MICROSCOPY [J. ROY. MICR. SOC.]*, N. 56, 1936, pagg. 361 ss.

BELL L. G. E., *The Application of Freezing and Drying Techniques in Cytology*, *INTERNATIONAL REVIEW OF CYTOLOGY [INT. REV. CYTOL.]*, vol. 1, 1952, pagg. 35-63.

BERTALANFFY Felix D., *Fluorescence microscope method for detection of pulmonary malignancies*, *CANADIAN MEDICAL ASSOCIATION JOURNAL [CAN. MED. ASSOC. J.]*, n. 83, 1960, pagg. 211-212.

BERTALANFFY Felix D., *Fluorescence Microscopy for tile Rapid Diagnosis of Malignant Cells by Exfoliative Cytology*, *MIKROSKOPIE*, vol. 15, 1960, pagg. 67-72.

BERTALANFFY Felix D., *The Fluorescence Microscope Method for Cytodiagnosis of Cancer*. *POSTGRADUATE MEDICINE [POSTGRAD. MED.]*, vol. 28, 1960, pagg. 627-633.

BERTALANFFY Felix D., *Cytodiagnosis of Cancer Using Acridine Orange with Fluorescence Microscopy*, *CA: A CANCER JOURNAL FOR CLINICIANS [CA CANCER J. CLIN.]*, n. 10, 1960, pagg. 118-123, reperibile al sito: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/21/3/422.full.pdf>

BERTALANFFY Felix D., *Evaluation of the Acridine-Orange Fluorescence Microscope Method for Cytodiagnosis of Cancer*, *ANNALS OF THE NEWYORK ACADEMY OF SCIENCES*, vol. 93, 1962, pagg. 717 - 750:
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1749-6632.1962.tb30504.x/abstract>

VON BERTALANFFY Ludwig - BICKIS Ivar, *Identification of cytoplasmic basophilia (ribonucleic acid) by fluorescence microscopy*, *JOURNAL OF HISTOCHEMISTRY AND CYTOCHEMISTRY [J. HISTOCHEM. CYTOCHEM.]*, n. 4, 1956, pagg. 481-493, reperibile al sito: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/21/3/422.full.pdf>

VON BERTALANFFY Ludwig, *Principles and theory of growth*. in: W.W. NOWINSKI, *Fundamental Aspects of Normal and Malignant Growth*, Elsevier, Amsterdam, 1960, pagg. 137-259.

VON BERTALANFFY Ludwig - MASIN Francis - MASIN Marianna, *Use of acridine orange fluorescence technique in exfoliative cytology*, *SCIENCE*, n. 124, 1956, pagg. 1024-1025.

VON BERTALANFFY Ludwig - MASIN Francis - MASIN Marianna, *A new and rapid method for diagnosis of vaginal and cervical cancer by fluorescence microscopy*, *CANCER*, n. 11, 1958, pagg. 873-887.

BLACKETT Patrick M. S. - OCCHIALINI Giuseppe P. S., *Some Photographs of the Tracks of Penetrating Radiation*, *PROCEEDINGS OF THE ROYAL SOCIETY [PROC. ROY. SOC.]*, A139, 1933, pagg. 699-726:
<http://rspa.royalsocietypublishing.org/content/139/839/699.full.pdf+html>

BERNARDINI Carlo - RAGNISCO Orlando - SANTINI Paolo Maria, *Metodi matematici della fisica*, NIS, Roma, 1993.

BOFFI Sigfrido, *Da Laplace a Heisenberg*, La Goliardica pavese, 2^a ed., 1996, reperibile anche al sito: <http://www.pv.infn.it/~boffi/libro.html>

BOHR Niels, *On the Constitution of Atoms and Molecules*, *PHILOSOPHICAL MAGAZINE [PHILOS. MAG.]*, vol. 26, 1913, pagg. 1-25, reperibile al sito: http://www.ffn.ub.es/luisnavarro/nuevo_maletin/Bohr_1913.pdf o anche al sito: http://pdfserve.informaworld.com/388877__910326286.pdf

BOHR Niels, *The Theory of Spectra and Atomic Constitution*, Cambridge University Press, 1922, reperibile al sito: <http://www.archive.org/details/theoryofspectraa00bohr>

BONADONNA Gianni - ROBUSTELLI DELLA CUNA Gioacchino, *Medicina Oncologica*, Masson, Milano, 6^a ed., 2000.

BONTKE Erika - KERN Günther - SCHÜMMELFEDER Norbert, *Die Akridinorange-Fluorochromierung in der gynäkologischen Cytodiagnostik*, *GEBURTSHILFE UND FRAUENHEILKUNDE [GEBURTSH. U. FRAUENHEILK.]*, n. 20, 1960, pagg. 21- 34.

BORN Max, *Zur Quantmechanik der Stossvorgänge*, *ZEITSCHRIFT FÜR PHYSIK*, n. 38, 1926, pagg. 803-827.

BORST Max - KÖNIGSDÖRFFER Hans, *Untersuchungen über Porphyrin*, Hirzel, Leipzig, 1929.

BROWN Terence A., *Genomes*, Wiley-Liss, Oxford, 2^a ed., 2002, reperibile al sito: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21128/>

BURCHAM W. E. - JOBES M., *Nuclear and Particle Physics*, Longman, Singapore, 1995.

BUREAU INTERNATIONAL DES POIDS ET MESURES, *The International System of Units (SI)*, 8^a ed., 2006, reperibile al sito: http://www.bipm.org/utls/common/pdf/si_brochure_8_en.pdf

BURRICHTER Ernst, *Beiträge zur Beurteilung von Böden auf Grund fluoreszenzmikroskopischer Untersuchung ihrer Mikroflora*, *ZEITSCHRIFT FÜR PFLANZENERNÄHRUNG [Z. PFLANZENERNÄHR.]*, Düngung, Bodenkunde, n. 63 (108), 1953, pagg. 154 - 171 reperibile al sito: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jpln.19530630206/pdf>

CASPERSSON T. - ZECH L. - MODEST E. J., *Fluorescent Labeling of Chromosomal DNA: Superiority of Quinacrine Mustard to Quinacrine*, *SCIENCE*, vol. 170, 1970, pagg. 762 ss.

CHADWICK C.S. - McENTEGART M. G. - NAIRN R.C., *Fluorescent Protein Tracers; A Trial of New Fluorochromes and The Development of an Alternative to Fluorescein*, *IMMUNOLOGY*, vol. 1(4), 1958, pagg. 315-327, reperibile al sito: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1423871/pdf/immunology00471-0012.pdf>

CHADWICK C.S. - NAIRN R.C., *The Unreacted Fluorescent Material in Fluorescein Conjugates and Studies of Conjugates with other Green Fluorochromes*, *IMMUNOLOGY*, vol. 3(4), 1960, pagg. 363-370, reperibile al sito: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1424016/pdf/immunology00463-0077.pdf>

CASTOLDI G., *Microscopia a fluorescenza*, in: Paolo INTROZZI (diretto da), *Trattato Italiano di Medicina Interna - Parte Terza: Malattie del Sangue e degli Organi Emopoietici - Malattie del Sistema Reticolo-Istiocitario* (5 voll.), Vol. I, *Elementi di metodologia microscopica ematologica*, USES, Firenze, 2^a ed., 1978.

CERCIGNANI Carlo, *The Boltzmann Equation and Its Applications*, Springer- Verlag, New York, 1988.

COMPTON Arthur Holy, *A General Quantum Theory of the Wavelength of Scattered X-Rays*, *PHYSICAL REVIEW [PHYS. REV.]*, n. 24, 1924, pagg. 168-176, reperibile al sito: http://www.physics.princeton.edu/~mcdonald/examples/QM/compton_pr_24_168_24.pdf

COMPTON Arthur Holy, *BULLETIN OF THE NATIONAL RESEARCH COUNCIL*, n. 20, 1922, pag. 19.

COMPTON Arthur Holy, *PHYSICAL REVIEW [PHYS. REV.]*, n. 21, 1923, pagg. 207 e 483.

COMPTON Arthur Holy, *BULLETIN NAT. RES. COUNCIL*, n. 20, 1923, pag. 16.

COMPTON Arthur Holy, *PHYSICAL REVIEW [PHYS. REV.]*, n. 22, 1923, pag. 409.

COMPTON Arthur Holy, *The Corpuscular Properties of Light*, *PHYSICAL REVIEW SUPPLEMENT*, vol. 1, 1929, pagg. 74-89, reperibile al sito: <http://www.phys.ens.fr/~desbioll/enseignement/ARCHIVES/L3SVP/quantique/suivi/compton.pdf>

COONS Albert H. - CREECH Hugh J. - JONES R. Norman - BERLINER Ernst, *The demonstration of pneumococcal antigen in tissues by use of fluorescent antibody*, *THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY [J. IMMUNOL.]*, n. 45, 1942, pagg. 159-170, reperibile al sito: <http://www.jimmunol.org/cgi>

COONS Albert H. - KAPLAN Melvin H., *Localization of antigen in tissue cells. II. Improvements in a method for the Detection of Antigen by means of Fluorescent Antibody*, *THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE [J. EXP. MED.]*, vol. 91, n. 1, 1950, pagg. 1-13, reperibile al sito: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2136059/pdf/173.pdf>

DARKEN Marjorie A., *Natural and Induced Fluorescence in Microscopic Organism*, *MICROBIOLOGICAL PROCESS REPORT*, vol. 9, 1960, pagg. 354-360, reperibile al sito: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1057740/pdf/applmicro00336-0088.pdf>

DE VITA Vincent T. - HELLMAN Samuel - ROSENBERG Steven A. , *Cancer. Principles & Practice of Oncology*, Lippincott, Philadelphia, 2^a ed., 1985.

DI GIACOMO Adriano , *Lezioni di Fisica Teorica*, Edizioni ETS, Pisa, 1992.

DIRAC Paul Adrienne Maurice, *The Quantum Theory of Electron*, *PROCEEDINGS OF THE ROYAL SOCIETY [PROC. ROY. SOC.]*, A117, 1928, pagg. 610-624, reperibile al sito: <http://rspa.royalsocietypublishing.org/content/117/778/610>

DIRAC Paul Adrienne Maurice, *Quantised Singularities in the Electromagnetic Field*, *PROCEEDINGS OF THE ROYAL SOCIETY [PROC. ROY. SOC.]*, A133, 1931, pagg. 60-72, reperibile al sito: <http://rspa.royalsocietypublishing.org/content/133/821/60>.

DIRAC Paul Adrienne Maurice, *The Principles of Quantum Mechanics*, Clarendon Press, Oxford, 4^a ed., 1958.

DYSON Freeman John, *The radiation Theories of Tomonaga, Scwinger, and Feynman*, *PHYSICAL REVIEW [PHYS. REV.]*, vol. 75 (3), 1949, pagg. 486-502, reperibile al sito: http://satie.if.usp.br/MyPapers/artigos_outros/p486_1.pdf

EGER W. - KÄMMERER H., *Beiträge zur Regeneration des Knochengewebes nach Tetracyclinmarkierung Callus*, Symposium, Debrecen, 1965.

EGER W. - KÄMMERER H., *Beiträge zur Substitution von autologen und heterologen Knochentransplantaten*, *LANGENBECK'S ARCHIVES OF SURGERY*, 1965, vol. 313, n. 1, pagg. 948-955 , reperibile al sito: <https://springerlink3.metapress.com/content/w861226420168257/resource-secured/?target=fulltext.pdf&sid=othqx545qo5gey55qzyoow24&sh=www.springerlink.com>

EGER W. - KÄMMERER H. - TRAPP L., *Esami simultanei con microscopia a fluorescenza e a polarizzazione di sezioni sottili non decalcificate di tessuto osseo*, INFORMAZIONI ZEISS, Carl Zeiss, Oberkochen/Württ., ed. italiana, Carl Zeiss S.r.l., Milano, n. 64, 1967, pagg. 64-68.

EINSTEIN Albert, *Über einen die Erzeugung und Verwandlung des Lichtes betreffenden heuristischen Gesichtspunkt*, ANNALEN DER PHYSIK, vol. 17 (6), 1905, pagg. 132-148, reperibile al sito: http://www.physik.uni-augsburg.de/annalen/history/einstein-papers/1905_17_132-148.pdf oppure al sito <http://gallica.bnf.fr/ark:/12148/bpt6k2094597.image.r=einstein%2C++Über+einen+die+Erzeugung+und+Verwandlung+des+Lichtes+betreffenden+heuristischen+Gesichtspunkt%2C+17%2C+1905.langFR.f137.pagination>

EINSTEIN Albert, *La teoria dei quanti di luce*, Newton Compton Italiana, Roma, 1973.

EINSTEIN Albert, *Opere scelte*, (a cura di BELLONE Enrico), Bollati Boringhieri, Torino, 1988.

ELLINGER P., *Fluorescence microscopy in biology*, BIOLOGY REVUE [BIOL. REV.], Cambridge Philosophical Society, vol. 15, 1940, pagg. 323-350, reperibile al sito: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC506503/pdf/brjopthal00360-0029.pdf>

FEDER Ned - SIDMAN Richard L., *Methods and Principles of Fixation by Freeze-Substitution*, THE JOURNAL OF BIOPHYSICAL AND BIOCHEMICAL CYTOLOGY [J. BIOPHYS. BIOCHEM. CYTOL.], vol. 4, 1958, pagg. 593-600, reperibile al sito: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/572/>.

FEYNMAN Richard Phillips, *QED . La strana teoria della luce e della materia*, Adelphi, Milano, 5^a ed., 1999.

FEYNMAN Richard Phillips - LEIGHTON Robert - SANDS Matthew, *La Fisica di Feynmann*, Zanichelli, Bologna, edizione Millennium, 3 voll., 3^a edz. 2017.

FLEISCH Daniel, *Guida alle Equazioni di Maxwell*, Editori Riuniti University Press, Roma, 2014.

FLEURY P. - MATHIEU J. P. (a cura di), *Trattato di Fisica generale e sperimentale*, Zanichelli, Bologna, 2^a ed., 8 voll., 1970.

FÖRSTER TH., *Fluoreszenz organischer Verbindungen*, Vandenhoeck e Ruprecht, Göttinga, 1951.

FRANCK J. - LEVI H., ZEITSCHRIFT FÜR PHYSIKALISCHE CHEMIE [Z. PHYSIK. CHEMIE], B, n. 27, 1955, pagg. 409-420.

FRANKLIN Rosalind Elsie - GOSLING R.G., *Molecular Configuration in Sodium Thymonucleate*, *NATURE*, n. 171, 1953, pagg. 740-741.

FRIEDMANN Jr. H.P., *The use of ultraviolet light and fluorescent dyes in the detection of uterine cancer by vaginal smear*, *AMERICAN JOURNAL OF OBSTETRICS AND GYNECOLOGY [AM. J. OBSTET. GYNECOL.]*, n. 59, 1950, pagg. 852-859.

GERLACH Walther - STERN Otto, *Der experimentelle Nachweis des magnetischen Moments des Silberatoms*, *ZEITSCHRIFT FÜR PHYSIK*, vol. 8, 1921, pagg. 110-111.

GERLACH Walther - STERN Otto, *Das magnetische Moment des Silberatoms*, *ZEITSCHRIFT FÜR PHYSIK*, vol. 9, n. 1, 1922, pagg. 353-355.

GERLACH Walther - STERN Otto, *Der experimentelle Nachweis der Richtungsquantelung im Magnetfeld*, *ZEITSCHRIFT FÜR PHYSIK*, vol. 9, 1922, pp. 349-352.

GIEMSA Gustav, *Das Wasen der Giemsa-Färbung*, *ZENTRALBLATT FÜR BAKTERIOLOGIE [ZENTRALB F BAKT]*, Zweite Abteilung, Allgemeine, vol. 89, 1922-1923; pagg. 99-106.

GIGUERE V. - ONG E.S. - SEGUI P. - EVANS R.M., *Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid*, *NATURE*, n. 330, 1987, pagg. 624-628.

GINSBERG Stephen D. - CHE Shaoli, *Combined histochemical staining, RNA amplification, regional, and single cell cDNA analysis within the hippocampus*, *LABORATORY INVESTIGATION*, vol. 84, 2004, pagg. 952-962, reperibile al sito: <http://www.nature.com/labinvest/journal/v84/n8/full/3700110a.html>

GINSBERG Stephen D. - GALVIN James E. - CHIU T.-S. - LEE Virginia M.-Y. - MASLIAH Eliezer - TROJANOWSKI John Q., *RNA sequestration to pathological lesions of neurodegenerative diseases*, *ACTA NEUROPATHOLOGICA [ACTA NEUROPATHOL.]*, Springer-Verlag, vol. 96, n.5, 1998, pagg. 487 - 494, reperibile al sito: <http://www.springerlink.com/content/qu19en8dy13pu5l2/fulltext.pdf>

GOODMAN LOUIS S. - GILMAN ALFRED, *Le Basi Farmacologiche della Terapia*, (a cura di HARDMAN Joel G. - LIMBIRD Lee E - GOODMAN GILMAN Alfred), McGraw-Hill, Milano, trad. it sulla 10^a ed. amer. (a cura di SIRTORI Cesare et AL.), 2003.

GOLDWASSER Robert A. - SHEPARD Charles C., *Staining of Complement and Modifications of Fluorescent Antibody Procedures*, *THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY [J. IMMUNOL.]*, n. 80, 1958, pagg. 122-131, reperibile al sito: <http://www.jimmunol.org/cgi/reprint/80/2/122>

GRUBB C. - CRABBE J. G. S., *Fluorescence microscopy in Exfoliative cytology*, *BRITISH JOURNAL OF CANCER [BR. J. CANCER]*, vol. 15, 1961, pp. 483-488, reperibile al sito: <http://www.nature.com/bjc/journal/v15/n3/pdf/bjc196158a.pdf>

GRUBB Chandra, *The Exfoliative Cytology of Endometrial Cancer with Fluorescence Microscopy*, *BRITISH JOURNAL OF CANCER [BR. J. CANCER]*, vol. 20 (1), 1966, pagg. 62 - 73, reperibile al sito: <http://www.nature.com/bjc/journal/v20/n1/pdf/bjc19668a.pdf>

GUICCIARDINI Nicolò - INTROZZI Gianluca, *Fisica Quantistica - Una introduzione*, Carocci, Roma, 2007.

GUPTA Hari S. - DE Deepesh Narayan , *Uptake and accumulation of Acridine Orange by Plant Cells*, *PROCEEDINGS OF THE INDIAN NATIONAL SCIENCE ACADEMY [PROC. INDIAN NATN. SCI. ACAD.]*, B49, N. 6, 1983, pagg. 635-660, reperibile al sito: http://www.new.dli.ernet.in/rawdataupload/upload/insa/INSA_1/20005bbc_653.pdf

HAITINGER M., *Ein lichtstarkes Fluoreszenzmikroskop*, *MIKROCHEMIE*, vol. 9, n,1, Springer, Wien, 1931, pagg. 430-440.

HAMPERL H. - SCHÜMMELFEDER N., *Über Fluoreszenzmikroskopie [Some aspects of fluorescence microscopy]*, *Ciba Symposium*, vol. 9, 1961, pag 50.

HARRIS R. J. C. , *Biological Applications of Freezing and Drying*, N.Y., Academic Press, Inc. Publishers, 1954.

HASELMANN H. - WITTEKIND D. , *Phasenkontrast-Fluoreszenz-Mikroskopie*, *ZEITSCHRIFT FÜR WISSENSCHAFTLICHE MIKROSKOPIE UND MIKROSKOPISCHE TECHNIK [Z. WISS. MIKROSKOP.]*, n. 63, 1957, pagg. 216 ss.

HASHIMOTO K. - PARK K. - KAMITANI T. - TATSUMI Y. - IM T. - TATSUMI N. - OKUDA K., *Population of double cell and null cell by the method of simultaneous observation of T and B surface markers*, 1983, *RINSHO BYORI (THE JAPANESE JOURNAL OF CLINICAL PATHOLOGY)*, vol. 31(2), pagg. 189-193.

HEIMSTÄDT O., *Das Fluoreszenzmikroskop*, ZEITSCHRIFT FÜR WISSENSCHAFTLICHE MIKROSKOPIE UND MIKROSKOPISCHE TECHNIK [Z. WISS. MIKROSK.], n. 28, 1911, pp. 330-337.

HUANG Wei - SUN Guan-Lin - LI Xiou-Shong - CAO Qi - JANG Guo-Sheng - ZHANG Fen-Qin - CHAI Jin-Ren - WANG Zhen-yi - WAXMAN Samuel - CHEN Zhu - CHEN Sai-Juan, *Acute Promyelocytic Leukemia: Clinical Relevance of Two Major PML-RAR α Isoforms and Detection of Minimal Residual Disease by Retrotranscriptase/Polimerase Chain Reaction to Predict Relapse*, BLOOD, vol. 82, 1993, pagg. 1264-1269, reperibile al sito: <http://bloodjournal.hematologylibrary.org/cgi/reprint/82/4/1264.pdf>

JABLONSKI A., *Efficiency of Anti-Stokes Fluorescence in Dyes*, NATURE, n.131,1933, pagg. 839-840.

JARCZOK K. - HOLOWIECKI J., *Specificity of the immunofluorescence method for the detection of native membrane immunoglobulins of B lymphocytes*, POL TYG LEK (POLSKY TYGODNIK LEKARSKI), Warszawa, 1984, vol. 39(36), pagg. 1215-1217.

KERSON Huang, *Meccanica statistica*, Zanichelli, Bologna, 1^a ed. ita sulla 2^a amer.,1997.

KROG Niels, *La microscopia a fluorescenza nell'industria alimentare*, INFORMAZIONI ZEISS, Carl Zeiss, Oberkochen/Württ., ed. italiana, Carl Zeiss S.r.l., Milano, n. 49, 1963, pagg. 86 - 88.

LAMBERT GARDINI Stefano - COLAROSSO Giuseppe Giulio - SERGIACOMI Umberto, *Atlante di Immunofluorescenza*, Lombardo Editore, Roma, 1990.

LANDAU Lev - LIFŠITS Evgenij M., *Meccanica quantistica - Teoria non relativistica*, Editori Riuniti, Roma, 1999³.

LANDAU Lev - LIFŠITS Evgenij M., *Fisica statistica*, Editori Riuniti, Roma, 1999².

LEHNER A. - NOWAK W. - SEIBOLD L., *An improved combination-technique for the fluorochromation of soil using acridine orange*, LANDWIRTSCHAFT FORSCHUNG [LANDWIRT. FORSCH.], vol. 11, 1958, pagg. 121-127.

LEHNER A. - NOWAK W., *New results of the direct determination of soil bacteria by a combined growth and fluorochromation technique*, ZENTRALBLATT FÜR BAKTERIOLOGIE PARASITENKUNDE INFEKTIONSKRANKHEITEN UND HYGIENE, ABTEILUNG II, [ZENTRALBL. BAKTERIOL. PARASITENK. INFEKTIONSKR. HYG.], vol. 113, 1959, pagg. 32-34.

LERMAN Leonard S., *Structural considerations in the interactions of deoxyribonucleic acid and acridines*, *JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY [J. MOL. BIOL.]*, vol. 3 (1), 1961, pagg. 18-30, reperibile al sito: http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6WK7-4XY85D5-4&_user=10&_coverDate=02%2F28%2F1961&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=search&_origin=search&_sort=d&_docanchor=&view=c&_searchStrId=1569090846&_rerunOrigin=google&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=bd2bc50ca2d10c0a12320b4399960e39&searchtype=a

LERMAN Leonard S., *The structure of the DNA-acridine complex*, *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA [PROC. NATL. ACAD. SCI. USA]*, vol. 49, 1963, pagg. 94-102, <http://www.pnas.org/content/49/1/94.full.pdf+html>

LEWIN Benjamin, *Il Gene VI*, Zanichelli, Bologna, 1999.

LILLIE R. D., *Conn's Biological Stains*, Williams & Wilkins Company, Baltimore, 9^a ed., 1977, p. 475.

LUBICZ Vittorio, *Appunti di Meccanica Quantistica*, 2019 - (agg. 2023) <http://webusers.fis.uniroma3.it/~lubicz/Appunti-MQ.pdf>

MALKUSCH Wolf, *Quantitative Measurements of FRET Using Standard Fluorescence Microscopy*, *BIOSCIENCE TECHNOLOGY*, n. 81, 2004, reperibile al sito: <http://www.biosciencetechnology.com/Archive/01/Quantitative-Measurements-Of-FRET-Using-Standard-Fluorescence-Microscopy/>

MANGONI Alessio, *La Matematica per la Meccanica Quantistica*, Amazon, Torino, 2020.

MARTINA Luigi, *Bosoni, Fermioni e...*, *ITHACA: VIAGGIO NELLA SCIENZA III*, 2014, pp. 47-60.

MAXWELL James Clerck, *A dynamic theory of the electromagnetic field*, Royal Society, London, 1865, <https://archive.org/details/dynamicaltheory0000maxw/mode/2up>

MENCUCCINI Corrado - SILVESTRINI Vittorio, *FISICA*, I vol. Meccanica-Termodinamica, II vol. Elettromagnetismo-Ottica, Liguori, Napoli, 1996³.

MAY Richard - GRÜNWARD Ludwig, *Über die Farbung von Feuchtpreparaten mit meiner Azur-Eosine methode*, [*DEUTSCHE MED XCHR*] 1909; vol. 35, pagg. 1751-1752.

MCCLURE D. M., *The Development of Fluorescence Microscopy for Tubercle Bacilli and its use as an adjunct to Histological Routine*, *JOURNAL OF CLINICAL PATHOLOGY [J. CLIN. PATH.]*, vol. 6, 1953, pagg. 273-281, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1023644/>

MEYER Edgar - GERLACH Walther, *The photoelectrical effect on ultra-microscopic metallic particles*, titolo originale: *Über den photoelektrischen Effekt an ultramikroskopischen Metallteilen*, *ANNALEN DER PHYSIK*, vol. 45 (18), 1914, pagg 177-236, reperibile al sito: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/andp.v350:18/issuetoc>

MEYER Edgar - GERLACH Walther, *The dependence of the photoelectric delay time on the gas pressure of metal particles of an ultramicroscopic order of size*, titolo originale: *Über die Abhängigkeit der photoelektrischen Verzögerungszeit vom Gasdruck bei Metallteilen ultramikroskopischer Größenordnung*, *ANNALEN DER PHYSIK*, vol. 47 (10), 1915, pagg. 227-244, reperibile al sito: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/andp.v352:10/issuetoc> oppure al sito <http://gallica.bnf.fr/ark:/12148/bpt6k15350r.image.langFR.f235.pagination>

MILCH Robert Austin - RALL D. P. - TOBIE John E., *Bone localization of the tetracyclines*, *JOURNAL OF THE NATIONAL CANCER INSTITUTE [J. NAT. CANCER INST.]*, n. 19, 1957, pagg. 87-93.

MILCH Robert Austin - TOBIE John E. - ROBINSON Robert A., *A Microscopic Study of tetracycline localization in Skeletal Neoplasms*, *THE JOURNAL OF HISTOCHEMISTRY AND CYTOCHEMISTRY [J. HISTOCHEM. CYTOCHEM.]*, n. 9, 1961, pagg. 261- 270, reperibile al sito: <http://www.jhc.org/cgi/reprint/9/3/261.pdf>

MILCH Robert Austin, *Blood supply and the localization of tetracycline fluorescence in arthritic femoral heads*, *ARTHRITIS & RHEUMATISM*, vol. 6 (4), 1963, pagg. 377-380.

MORPURGO Giacomo, *Introduzione alla fisica delle particelle*, Zanichelli, Bologna, 1987.

MORSE Philip M., *Diatomic Molecules According to the Wave Mechanics. II. Vibrational Levels*, *PHYSICAL REVIEW*, n. 34, 1929, pagg. 57-64, reperibile al sito: <http://prola.aps.org/>

NAIRN R.C., *Fluorescent Protein Tracing*, Churchill Livingstone, Edinburg, 4^a ed., 1976.

NELSON David L. - COX Michael M., *I Principi di biochimica di Lehninger*, Zanichelli, Bologna, 5^a ed. it., 2010.

PASSARIELLO Roberto (e COLL.), *Elementi di Tecnica in Radiologia e Diagnostica per Immagini*, Roma, 1990.

PEARSE Anthony Guy Everson, *Histochemistry, teoretical and applied*, Churchill, Londra, 3^a ed., 1968 (vol. I)-1972(vol. II); tr. ita. (a cura di G. Barbolini): *Istochimica, Teoria e pratica*, Piccin, Padova, 1978 (Vol.I)-1989 (Vol. II)-1990 (aggiornamento).

PÉTER Agnes, *Liquorzitologische Probleme bei Carcinomen des Zentralnervensystems*, *PSYCHIATRIA ET NEUROLOGIA [PSYCHIAT. NEUROL.]*, vol. 152, 1966, pagg. 327-341, reperibile al sito:

<http://content.karger.com/ProdukteDB/produkte.asp?Aktion=ShowAbstract&ArtikelNr=128258&Ausgabe=235315&ProduktNr=223840>

POVH Bogdan - RITH Klaus - SCHOLZ Christoph - ZETSCHKE Frank , *Particelle e Nuclei - Un' introduzione ai concetti fisici*, Bollati Boringhieri, Torino, 1998.

VON PROWAZEK S., *Über Fluoreszenz der Zellen*, *KLEINWELT*, n. 6, 1914, pagg. 30-37.

REICHMAN Jay, *Handbook of Optical Filters for Fluorescence Microscopy*, Chroma Technology Corp., Princeton, 2000, reperibile al sito:

<http://www.aic-imagecentral.com/products/pdfs/hdbk4.pdf>

RALL D. P. - LOO T. L. - LANE M. - KELLY M. G., *Appearance and Persistence of Fluorescent Material in Tumor Tissue after Tetracycline Administration*, *JOURNAL OF THE NATIONAL CANCER INSTITUTE [J. NAT. CANCER INST.]*, n. 19, 1957, pagg. 79-85.

RIGAMONTI Attilio, *Introduzione alla struttura della materia*, La Goliardica Pavese, Pavia, 1980.

ROST F. W. D., *Quantitative fluorescence microscopy*, Cambridge University Press, 1991.

ROST F. W. D., *Fluorescence microscopy*, Cambridge University Press, 1992-1995.

ROUSCHAL Christine - STRUGGER Siegfried, *Eine neue Methode zur Vitalbeobachtung der Mikroorganismen im Erdboden*, *DIE NATURWISSENSCHAFTEN*, n. 31, 1943, pag. 300.

SAKURAI Jun Iohn, *Meccanica Quantistica Moderna*, Zanichelli, Bologna, tr. Ita. 1990 (rist. ampl. 1996)

SAMPEDRO A. - DE LOS TOYOS J. R. - MARTÍNEZ-NISTAL A., *Técnicas de fluorescencia en microscopía y citometría*, Universidad de Oviedo, 1995.

SAYK Johannes, *Cytologie der Cerebrospinalflüssigkeit*, Fischer, Jena, 1960.

SAYK J. - OLISCHER R. M. , *Fortschritte der Liquorcitologie bei der Diagnostik bösartiger Hirngeschwülste*, *PSYCHIATRIE, NEUROLOGIE UND MEDICAL PSYCHOLOGIE*. [PSYCHIAT., NEUROL. U. MED. PSYCHOL.], vol. 19, 1967, pagg. 88 - 98.

SCHÜMMELFEDER Norbert, *Fluorochromization of living, preserved, and dead protoplasm with the basic acridine orange dye, and its relation to the metabolic activity of the cells*, *VIRCHOWS ARCHIV* [VIRCHOWS ARCH.] vol. 318(1), 1950, pagg. 119-154.

SCHÜMMELFEDER Norbert, *Zur histochemischen Bedeutung der Fluoreszenzmetachromasie des Akridinorange*, *ACTA HISTOCHEMICA* [ACTA HISTOCHEM.] SUPPL. I, 1958, pagg. 148-151.

SCHÜMMELFEDER Norbert , *Histochemical significance of the polychromatic fluorescence induced in tissues stained with acridina orange*, *THE JOURNAL OF HISTOCHEMISTRY AND CYTOCHEMISTRY* [J. HISTOCHEM. CYTOCHEM.], n. 6, 1958, pagg. 392-393.

SCHÜMMELFEDER Norbert - KERN Günther - KERN-BONTKE Erika , *Acridine orange-chromium fluoride staining in cytodiagnosis of carcinomata in situ and cervical carcinoma*, *ARCHIV FÜR GYNÄKOLOGIE* [ARCH. GYNAKOL.] n. 196, 1961, pagg. 394-404.

SCHÜMMELFEDER Norbert - KERN Günther - KERN-BONTKE Erika , *Die Akridinorange-Fluorochromierung in der gynäkologischen Cytodiagnostik bösartiger Tumoren*, *MITTEILUNGSDIENST GESELLSCHAFT BEKÄMPFUNG KREBSKRANKHEIT* [MITTEILUNGSDIENST GES. BEK. KREBSKRANKHEIT.], n. 2, 1962, pagg. 482-502.

SINI Giovanni Pietro, *Anche i pignoli, nel loro piccolo, s'inca...*, <http://www.funsci.it/files/A21-Anche-i-pignoli-...pdf> (oppure: <https://www.funsci.it/indice-sini.html> [Art.21])

SINI Giovanni Pietro, *La Fluorescenza e le sue applicazioni*, reperibile al sito <https://www.funsci.it/files/o11-fluor.html>

SLAVÍK Jan, *Fluorescence Microscopy and Fluorescent Probes*, Springer, 1996.

SMITH William F. - HASHEMI Javad, *Scienza e tecnologia dei materiali*, McGraw-Hill, Milano, 2008³.

SORET Jacques-Louis, *Analyse spectrale: Sur le spectre d'absorption du sang dans la partie violette et ultra-violette*, *COMPTES RENDUS DE L'ACADÉMIE DES SCIENCES*, vol. 97, 1883, pagg. 1269–1273. <https://gallica.bnf.fr/ark:/12148/bpt6k3053w/f1269.table>

SPAAR Friedrich Wilhelm - BAUER Helmut J. , *Prova di cellule tumorali nel liquor cerebrospinale mediante microscopia a fluorescenza all'arancione d'acridina*, INFORMAZIONI ZEISS, Carl Zeiss, Oberkochen/Württ., ed. italiana, Carl Zeiss S.r.l., Milano, vol. 19, n. 77/78, 1971, pagg. 31 - 34.

STERN Otto, *Ein Weg zur experimentellen Prüfung der Richtungsquantelung im Magnetfeld*, ZEITSCHRIFT FÜR PHYSIK , vol. 7, 1921, pagg. 249-253.

STICK W., *Neue ergebnisse über Porphyrinstoffwechsel und Porphyrinkrankheiten*, KLINISCHE WOCHENSCHRIFT [KLIN. WSCHR.], vol. 37, 1959, pagg. 681 ss.

STRUCK Hansjürgen, *Sulla colorazione a fluorescenza con acido picrico in vivo*, INFORMAZIONI ZEISS, Oberkochen/ Württ, ed. italiana, Carl Zeiss S.r.l., Milano, n. 65, 1967, pagg. 82-84.

SUSSKIND Leonard - FRIEDMAN Art, *Meccanica quantistica*, Raffaello Cortina Editore, Milano, 2015.

SUSSKIND Leonard - HRABOVSKY George, *Il minimo teorico*, Raffaello Cortina Editore, Milano, 2019.

TAUSCH Walter, *Concetti basilari delle misurazioni fluorimetriche*, in INFORMAZIONI ZEISS, Carl Zeiss, Oberkochen/Württ., ed. italiana, Carl Zeiss S.r.l., Milano, n. 54, 1964, pagg.111-116.

TEODORESCU M. - MAYER E.P., *Surface immunoglobulin in immunoproliferative diseases*, ANNALS OF CLINICAL & LABORATORY SCIENCE, The Association of Clinical Scientists, 1978, vol.8(5), pagg. 353-365.

The Fluorescence Phenomenon, INNOVATION, n.14, Carl Zeiss, 2004, pagg. 4 - 9, reperibile al sito: [http://www.zeiss.com/C125716F004E0776/0/74E9C59C374EFCF2C12571770069E9ED/\\$File/Innovation_14_4.pdf](http://www.zeiss.com/C125716F004E0776/0/74E9C59C374EFCF2C12571770069E9ED/$File/Innovation_14_4.pdf)

TOWNES A.S. - POSTLETHWAITE A.E., *Lymphocyte surface markers in human disease*, ADVANCES IN INTERNAL MEDICINE, Springer, 1977, vol. 22, pagg. 97-119.

TROLLDENIER Günter, *Microscopia a fluorescenza nello studio della Rhizosfera*, INFORMAZIONI ZEISS, Carl Zeiss, Oberkochen/Württ., ed. italiana, Carl Zeiss S.r.l., Milano, n. 56,1965, pagg. 68 - 69.

UDENFRIED S., *Fluorescence Assay in Biology and Medicine*, Academic Press, N.Y. & London, 1962.

VAN ROOD J.J. - VAN LEEUWEN A. - PLOEM J.S., *Simultaneous detection of two cell populations by two-colour fluorescence and application to the recognition of B-cell determinants*, *NATURE*, vol. 262 (5571), 1976, pagg. 795-797.

WATSON James D. - CRICK Francis H.C., *Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid*, *NATURE*, n.171, 1953, pagg. 737-738.

VENTRUTO Valerio - SACCO Gianfranco - LOMBARDO Fortunato, *Testo-Atlante di Citogenetica Umana*, Springer-Verlag Italia, Milano, 2001.

WILKINS M. H. F. - STOKES A. R. - WILSON H. R. , *Molecular Structure of Nucleic Acids: Molecular Structure of Deoxyribose Nucleic Acids*, *NATURE*, n. 171, 1953, pagg. 738-740.

WITTEKIND D., *Die Vitalfärbung des Mäuseasciteskarzinoms mit Acridinorange*, *ZEITSCHRIFT FÜR ZELLFORSCHUNG*, n. 49, 1958, pagg. 58-104, reperibile al sito <http://www.springerlink.com/content/m065v03358634106/>

WITTEKIND D., *Über Entstehung, Morphologie und gegenseitige Beziehungen intraplasmatischer Vacuolenbildungen in lebenden Tumorzellen aus Ergüssen seröser Höhlen*, *VIRCHOWS ARCHIV FÜR PATHOLOGISCHE ANATOMIE UND PHYSIOLOGIE UND FÜR KLINISCHE MEDIZIN [VIRCHOWS ARCH. PATH. ANAT.]* vol. 333, n. 4, 1960, pagg. 311-342, reperibile al sito <http://www.springerlink.com/content/p8n1336uhu7x71q2/fulltext.pdf>

WOLOCHOW H., *Fluorescent Labels for Antibody Proteins. Application to Bacterial Identification*, *THE JOURNAL OF BACTERIOLOGY [J. BACTER.]*, Vol. 77, 1959, pagg. 164-166, reperibile al sito: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC290344/>

WOOD Robert Williams, *The n-Rays*, *NATURE*, n. 70, 1904, pagg. 530-531.

YOUNG M. R., *Principles and Technique of Fluorescence Microscopy*, National Institute for Medical Research, Mill Hill, London, N.W.,1961. (reperibile al sito: <http://jcs.biologists.org/cgi/reprint/s3-102/60/419.pdf>).

Per gli approfondimenti in **anatomia microscopica** (normale e patologica), in **istocitologia** (normale e patologica) e in **ematologia**:

BALBONI Giuseppe Carlo -TEDDE Giovanni, *Anatomia Microscopica*, Società Editrice Universo, Roma, 1977.

BERNARD J. – LEVY J. P. (et AL.), *Ematologia*, Masson, Milano, 1978.

BESSIS Marcel, *Reinterpretazione degli strisci di sangue*, Piccin Editore, Padova, 1978.

DE CARNERI IVO, *Parassitologia Generale e Umana*, Casa Editrice Ambrosiana, Milano, 4^a ed.,1972.

HAM Arthur W., *Istologia*, 2 voll., USES, Firenze, 2^a ed. italiana, 1969.

HAYHOE F.G.J. – FLEMANS R.J., *Atlante di Citologia Ematologica*, E.T.I.M. - Vaduz (FL).

HEIM Sverre - MITELMAN FELIX, *Cancer Cytogenetics: Chromosomal and Molecular Genetic Aberrations of Tumor Cells*, Wiley-Blackwell, 3^a ed., 2009³.

INTROZZI Paolo (diretto da), *Trattato Italiano di Medicina Interna*, Parte terza, *Malattie del Sangue e degli organi Emopoietici – Malattie del Sistema Reticolo-Istiocitario*, 5 voll.,USES, Firenze, 2^a edizione, 1978-1988.

KASTEN Frederick H., *The origins of Modern Fluorescence Microscopy and Fluorescent Probes*, in *Cell Structure and Function by Microspectrofluorometry* (cap.1), Elsevier, 1989.

MANDELLI Franco, *Lezioni di Ematologia*, La Goliardica Editrice, Roma, ristampa 1978.

MCDONALD George A. – DODDS T.C. – CRUIKSHANK Bruce, *Atlante di Ematologia*, Edizioni Mediche Scientifiche Internazionali, Roma, 2^a ed. italiana (trad. dalla 4^a inglese), 1979.

MONESI Valerio, *Istologia*, Piccin, Padova, 2^a edizione, 1980.

MOTTA Pietro, *Anatomia Microscopica*, Vallardi, Milano, 2^a ed., 1977.

RAVETTO Carlo, *Citodiagnostica oncologica*, Piccin, Padova, 1973.

Per la parte più strettamente **analitica**, vedasi:

BONACCORSI DI PATTI Maria Carmela - CONTESTABILE Roberto - DI SALVO Martino Luigi, *Metodologie biochimiche - Espressione, purificazione e caratterizzazione delle proteine*, Zanichelli, Bologna, 2019².

BURLINA Angelo, *Medicina di Laboratorio – Principi di tecnologia*, 2 voll., C.G. Edizioni Scientifiche, Torino, 1994.

INTROZZI Paolo (diretto da), *Trattato Italiano di Medicina Interna - Tecniche e Diagnostica di Laboratorio*, 5 voll., USES, Firenze, 3^a ed., 1978 - 1987.

KARCHER Susan J., *Laboratorio di Biologia Molecolare*, Zanichelli, Bologna, 1998.

LAPPETITO Lodovico, *Fluorescenza-Spettroscopia di Fluorescenza*, 2015, in: https://physicsopenlab.org/wp-content/uploads/2015/12/Fluorescenza_ITA.pdf

MARIOTTINI Gian Luigi - CAPICCHIONI Valter - GUIDA Lucrezia - MATTIOLI Francesca - PENCO Susanna - ROMANO Paola - SCARABELLI Linda, *Introduzione alle colture cellulari - metodiche relative*, Morgan Edizioni Tecniche, Milano, 2003.

MELIS Marco - CARPINO Francesco - DI TONDO Ugo, *Tecniche in Anatomia patologica*, EDI-ERMES, MILANO, rist. AGG. 1992

NAIRN R.C., *Fluorescent Protein Tracing*, Churchill Livingstone, Edinburg, 1976⁴.

PASQUINELLI Filippo, *Manuale per Tecnici di Laboratorio*, 2 voll., Edizioni Rosini, Firenze, 1967.

PASQUINELLI Filippo, *Manuale per Tecnici di Laboratorio*, 4 voll., Edizioni Rosini, Firenze, 1978 (Vol 1- parti 1 e 2), 1981(vol.2), 1988 (vol.3: aggiornamento).

TELÒ Walter, *Esami di Laboratorio*, Minerva Medica, Saluzzo, 2^a ed., 1967.

WILSON Keith - WALKER John (a cura di), *Metodologia biochimica*, Raffaello Cortina, Milano, 2001.

STRAFELLA F., *Rivelatori di radiazione*, reperibile al sito: http://www.dmf.unisalento.it/~straf/allow_listing/pub/did/Fondamenti_Fisica_Cosmica/Lezioni_parte_II.pdf

Per gli approfondimenti in **microscopia ottica**, vedasi:

CASTANO Paolo, *Microscopia Ottica e Fotomicrografia*, Tamburini Editore, Milano, 1975.

DETERMANN Hans - LEPUSCH Friedrich, *Il Microscopio e le sue applicazioni*, Ernst Leitz, Wetzlar, 1969.

KODAK, *Photography through the Microscope*, Eastman Kodak Company, Rochester, 6^a ed., 1974.

MÖLLRING Friedrich Karl, *Nozioni basilari di Microscopia*, Carl Zeiss, Oberkochen/Württ, 1967.

NEUPERT Helmut, *Dispositivo a contrasto d'interferenza secondo Nomarski*, in *INFORMAZIONI ZEISS*, Carl Zeiss, Oberkochen/Württ., ed. italiana, Carl Zeiss S.r.l., Milano, n. 65, 1967, pagg. 96-97.

NIKLOWITZ Werner, *Metodi di preparazione adatti per l'uso della microscopia a contrasto di fase nell'istologia*, in *INFORMAZIONI ZEISS*, Carl Zeiss, Oberkochen/Württ., ed. italiana, Carl Zeiss S.r.l., Milano, n. 64, 1967, pagg. 42-44.

OKENGA Wimke, *Fluorescence in Microscopy*, Leica Microsystems, 2011.

OLYMPUS LIFE SCIENCE, <https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/techniques/fluorescence/fluorhome/>

ROTTENFUSSER Rudi - WILSON Erin E. - DAVIDSON Michael W., *Introduction to Fluorescence Microscopy*, reperibile nel sito <https://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/basics/fluorescence.html>

SINI Giovanni Pietro, *Problemi Tecnici della Microscopia Ottica*, Bologna, 2005, (revisione 2020), reperibile nel sito <http://www.funsci.it/files/microscopia-ottica.pdf>

SPRING Kennet R. - DAVIDSON Michael W., *Introduction to Fluorescence Microscopy*, reperibile nel sito Nikon <https://www.microscopyu.com/techniques/fluorescence>

Per gli approfondimenti in **biochimica**, vedasi:

CAVALLINI D. - ROSSI FANELLI A., *Lezioni di Chimica Biologica*, MARVES, Roma, 1968.

MONTGOMERY Rex - DRYER Robert L. - CONWAY Thomas W. - SPECTOR Arthur A., *Biochimica - aspetti medico-biologici* - 2 voll., Edi.Ermes, Milano, 1976.

MURRAY Robert K. - GRANNER Daryl K. - MAYES Peter A. - RODWELL Victor W., *HARPER Biochimica*, McGraw-Hill, Milano, 2004, 1[^] ed. ital. sulla 26[^] originale.

Per gli approfondimenti in **immunologia**, vedasi:

ABBAS Abul K. - LICHTMAN Andrew H. - PILLAI Shiv, *Immunologia cellulare e molecolare*, Masson, Milano, trad. ital. sulla 6[^] originale, 2009.

CLERICI Enrico - VILLA Maria Luisa, *Immunologia Generale*, UTET/USES, Torino, 1987⁵.

ROITT Ivan M., *Immunologia - fisiologia, patologia e clinica*, Edi-Ermes, Milano, 1990, 1[^] ed. ital. sulla 6[^] originale.

Per gli approfondimenti in **fisiologia umana**, vedasi:

BALDISSERA Fausto - PORRO Carlo Adolfo (a cura di), *Fisiologia e Biofisica Medica*, 2 voll., Poletto, Vermezzo (Milano), 2009⁴.

MARGARIA Rodolfo - DE CARO Luigi, *Fisiologia umana*, 2 voll., Vallardi, Milano, 1967⁴.

Per gli approfondimenti in **biologia della cellula**, vedasi:

POLLARD Thomas D. - EARNSHAW William C., *Biologia Cellulare*, (tr. ita. sulla 2^a ed. originale a cura di S. Beninati et Al.), Elsevier Masson, Milano, 2008².

SHAFFER Lisa G. - MCGOWAN-JORDAN Jean - SCHMID Michael (eds), *ISCN 2013- An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (2013)*, S. Karger (in coll. with Cytogenetic and Genome Research), Basel, 2013.

WATSON James D. - BAKER Tania A. - BELL Stephen P. - GANN Alexander - LEVINE Michael - LOSIK Richard, *Biologia molecolare del gene*, (Edizione italiana a cura di P. Plevani), Zanichelli, Bologna, 2022⁸.

Per gli approfondimenti in **microbiologia**, vedasi:

CIMMINO Aldo, *Lezioni di Microbiologia*, Edizioni Porziuncola, Assisi, 1967-1968.

DAVIS Bernard D. - DULBECCO Renato - EISEN Herman N. - GINSBERG Harold S. - WOOD Barry W. jr., *Microbiologia* (II voll.), (ed. Ita. a cura di F. Dianzani), Il Pensiero Scientifico Editore, Roma, 1971 (e successive ediz. a cura di Altre Case editrici).

LA PLACA Michele, *Principi di Microbiologia Medica*, 12^a edizione, Società Editrice Esculapio, Bologna, 2010.

MADIGAN Michael T. - MARTINKO John M. - BENDER Kelly S. - BUCKLEY Daniel H. - STAHL David A., *BROCK BIOLOGIA DEI MICRORGANISMI, Microbiologia generale, ambientale e industriale*, (ed. Italiana a cura di Branduardi P. et al. sulla 14^a ed. inglese), Pearson Italia, Milano - Torino, 2016.

PRESCOTT Lansing M. - HARLEY John P. - KLEIN Donald A., *Microbiologia*, (ed. Italiana sulla 6^a ed. inglese a cura di P. Ghelardini e L. Paolozzi), McGraw-Hill, Milano, 2006.

Per gli approfondimenti in **tecniche microbiologiche**, vedasi:

BUTTIAUX R. - BEERENS H. - TACQUET A., *Tecniche Batteriologiche*, (1^a ed. Italiana sulla 4^a francese, a cura di Filadoro Francesco), DEMI, Roma, 1975.

VAUGHAN Ann - BUZZINI Pietro - Clementi FRANCESCA, *Laboratorio Didattico di Microbiologia*, Casa Editrice Ambrosiana, Milano, 2008.

Infine, tra i numerosi **testi divulgativi**:

AMADEO Pierpaolo, *Fisica Quantistica per principianti*, Copyright 2021 .

BALBI Amedeo, *Inseguendo un raggio di luce - Alla scoperta della teoria della relatività*, Mondadori Libri (pubblicato per Rizzoli), Milano, 2021.

COX Brian - FORSHAW Jeff, *L'universo quantistico svelato*, Hoepli, Milano, 2021.

GREISON Gabriella, *Guida quantistica per anticonformisti*, Mondadori, Milano, 2021.

HEISENBERG Werner, *Fisica e Filosofia*, Feltrinelli editore - Il Saggiatore, Milano, 2023³.

ZEILINGER Anton, *Il velo di Einstein - Il nuovo mondo della fisica quantistica*, Le Scienze (su licenza Einaudi), Torino, 2008.

Principali Riviste e Pubblicazioni citate ⁽¹⁵⁶⁾:

Acta anatomica [ACTA ANAT.], reperibile al sito:

<http://biomednet.com/library/aan>

Acta Neuropathologica [ACTA NEUROPATHOL.], Springer-Verlag, reperibile al sito:

<http://www.springerlink.com/content/>

American Journal of Anatomy, [AM. J. ANAT.], reperibile al sito:

https://www.researchgate.net/journal/0002-106_American_Journal_of_Anatomy

American Journal of Obstetrics and Gynecology [AM. J. OBSTET. GYNECOL.], reperibile

al sito: <http://www.ajog.org/>

Anatomical Record [ANAT. REC.], reperibile al sito:

<http://www3.interscience.wiley.com/journal/117927936/grouphome/home.html>

Anatomischer Anzeiger (Centralblatt für die Gesamte Wissenschaftliche Anatomie) (Jena, 1886), [ANAT. ANZ. CENT.], il cui *Generalregister* (1886-1912) è reperibile al sito:

<http://www.archive.org/details/anatomischeranze140anat>

Le annate più recenti della Rivista sono reperibili al sito:

<http://www.sciencedirect.com/science/journal/09409602>

Annalen der Physik, reperibile al sito <http://www.physik.uni-augsburg.de/annalen/>

oppure al sito: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/>

Annals of the New York Academy of Sciences, reperibile al sito:

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1749-6632.1962.tb30504.x/abstract>

Archiv für mikroskopische Anatomie [ARCH. MIKR. ANAT.], reperibile al sito:

<http://lane.stanford.edu/online/ejsubjectbrowse.html?m=Anatomy>

(156) - Le principali abbreviazioni riferite a Riviste di carattere Biologico e Scientifico possono essere reperite, ad esempio, presso i siti:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=journals&term=>

http://it.wikipedia.org/wiki/Elenco_di_riviste_scientifiche

<http://library.caltech.edu/reference/abbreviations/>

<http://www.df.unibo.it/library/riso/files/jcr.pdf>

Archivio Italiano di Anatomia ed Embriologia [ARCH. IT. ANAT. EMBRIOL.], reperibile al sito: <http://journalseek.net/cgi-bin/journalseek/journalsearch.cgi?field=issn&query=0004-0223>

Biology Revue [BIOL. REV.], Cambridge Philosophical Society, reperibile al sito: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/>

Blood, reperibile al sito: <http://bloodjournal.hematologylibrary.org/>

British Journal of Cancer [BR. J. CANCER], reperibile al sito: <http://www.nature.com/bjc/index.html>

British Journal of Haematology, [BRIT. J. HAEMATOL.], reperibile al sito: <http://www.wiley.com/bw/journal.asp?ref=0007-1048>

Cancer Growth and Progression, reperibile al sito: <http://www.springer.com/series/5721>

CA: A Cancer Journal for Clinicians [CA CANCER J. CLIN.], reperibile al sito: <http://cancerres.aacrjournals.org/>

Comptes Rendus de l' Association des Anatomistes [C. R. ASSOC. ANAT.]

Corso di Fondamenti Epistemologici delle Scienze tra Ottocento e Novecento. Lezione 9: dalla scoperta dell'elettrone alla teoria della relatività di Einstein, Università di Padova, A.A. 2007-2008, reperibile anche al sito: http://www.scienze.unipd.it/storiascienza/dispense07_08/Lectio9ParteFisXXRelativita.pdf

Experimental and Molecular Pathology [EXP. MOLEC. PATH.], reperibile al sito: <http://www.elsevierdirect.com/index.jsp>

Fluorescenza, (a cura dell'UNIVERSITÀ DI VERONA), reperibile al sito: <https://www.corsi.univr.it/documenti/OccorrenzaIns/matdid/matdid753773.pdf>

Gastroenterology, reperibile al sito: <http://www.gastrojournal.org/>

Immunology, reperibile al sito:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/>

The International System of Units (SI), 8^a ed., 2006, reperibile al sito:

http://www.bipm.org/utils/common/pdf/si_brochure_8_en.pdf

The Journal of Bacteriology [J. BACTER.], reperibile al sito:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/>

The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology [J. BIOPHYS. BIOCHEM. CYTOL.],

reperibile al sito: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/572/>

The Journal of Experimental Medicine [J. EXP. MED.], reperibile al sito:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/>

The Journal of Histochemistry and Cytochemistry [J. HISTOCHEM. CYTOCHEM.], reperibile

al sito: <http://www.jhc.org/cgi/reprint/> o anche al sito: <http://cancerres.aacrjournals.org/>

The Journal of Immunology [J. IMMUNOL.], reperibile al sito:

<http://www.jimmunol.org/cgi>

Journal of Molecular Biology [J. MOL. BIOL.], reperibile al sito:

<http://www.sciencedirect.com/>

Laboratory Investigation, reperibile al sito:

<http://www.nature.com/labinvest/journal/>

Langenbeck's Archives of Surgery, reperibile al sito:

<https://springerlink3.metapress.com/>

Le Scienze (edizione italiana di Scientific American), reperibile al sito:

<https://www.lescienze.it/>

Meccanica Ondulatoria - Corso di Fisica Moderna, reperibile al sito:

<https://www.ge.infn.it/~zanghi/fisicamoderna/NOTE-SLIDE-MO-FM.pdf>

Microbiologia Italia, portale di divulgazione microbiologica, reperibile al sito :

<https://www.microbiologiaitalia.it>

Microbiological Process Report, reperibile al sito:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/>

Nature, reperibile al sito:
<http://www.nature.com/>

Philosophical Magazine [PHILOS. MAG.], reperibile al sito: <http://www.ffn.ub.es/> o anche al sito: http://pdfserve.informaworld.com/388877__910326286.pdf

Physical Review [PHYS. REV.], reperibile al sito:
<http://www.physics.princeton.edu/>

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, [PROC. NATL. ACAD. SCI.], reperibile al sito: <http://www.pnas.org/>

Proceedings of the Royal Society [PROC. ROY. SOC.], reperibile al sito:
<http://rspa.royalsocietypublishing.org/>

Science, reperibile al sito: <https://www.science.org/>

Scientific American, reperibile al sito: <https://www.scientificamerican.com/>

Zeitschrift für Physikalische Chemie [Z. PYSISIK. CHEMIE], reperibile al sito:
<http://www.oldenbourg-verlag.de/wissenschaftsverlag/zeitschrift-physikalische-chemie>

Zeitschrift für Pflanzenernährung [Z. PFLANZENERNÄHR.], Düngung, Bodenkunde, reperibile al sito: <http://onlinelibrary.wiley.com/>

Nota: Ovviamente, non tutti i siti citati mettono a disposizione le loro pubblicazioni *on-line-free*! Inoltre, le pubblicazioni più antiche sono consultabili praticamente solo nelle Biblioteche degli Istituti Universitari.

NOTA

Questa è solo una *bibliografia essenziale* (basata completamente su testi in mio possesso e che ho usato per studio o che ho potuto consultare in Biblioteca) per chi vuole cominciare a interessarsi seriamente alle osservazioni microscopiche in fluorescenza: dovrebbe assolutamente essere arricchita con altri numerosi testi specifici (di istologia, di istochimica, di immunofluorescenza, di istopatologia, di citopatologia, di ematologia, di microscopia ottica, di microscopia elettronica, ecc.).

Ho voluto indicare per esteso il nome (quando ciò è stato possibile, perché spesso i testi e le pubblicazioni riportano solamente l'iniziale) degli Autori, come piccolo segno di gratitudine a Coloro che hanno contribuito, con il loro insegnamento, con le loro ricerche e con le loro opere, alla mia formazione.

Sono perfettamente consapevole che, al giorno d'oggi, sia il modo di citare gli Autori sia la stesura della Bibliografia sono completamente diversi da quelli che ho usato in questi Appunti: il mio lavoro, peraltro, è indirizzato ai dilettanti e ho voluto abbondare per rendere più facili eventuali ricerche anche a non specialisti o a chi abbia minore dimestichezza con le Fonti bibliografiche.

GLOSSARIO

campo: in fisica un campo è un *tensore* che dipende dalle coordinate spazio-temporali.

campo scalare: in fisica viene così denominata una grandezza scalare funzione delle coordinate \mathbf{u} (x, y, z) definita entro una certa regione dello spazio.

campo vettoriale: in fisica viene così denominato un vettore applicato $\bar{\mathbf{v}}$ (x, y, z), funzione delle coordinate spaziali entro una certa regione di spazio.

catastrofe ultravioletta: chiamata anche *catastrofe di Rayleigh-Jeans*, è una teoria degli inizi del XX secolo che sosteneva *l'emissione di radiazione con potenza infinita* da parte di un corpo nero ideale in perfetto equilibrio termico. I dati sperimentali e osservativi dimostrarono la insussistenza di questa teoria; tuttavia, lo studio di questo problema (dal quale erano emersi i primi conflitti con la fisica classica) produsse una forma embrionale di meccanica quantistica. In realtà, benché il concetto di “catastrofe ultravioletta” risalga al 1905, questa terminologia fu introdotta nel 1911 da Paul EHRENFEST il quale adottò il termine “ultravioletta” perché il problema compare nella regione ad alta frequenza (quella appunto dell’Ultravioletto) dello spettro elettromagnetico.

I dati sperimentali, a cui si accennava qui sopra, dimostrarono inconsistente la *teoria classica* secondo la quale, applicando il *teorema della equipartizione dell'energia* della meccanica statistica classica (che non considera il fenomeno della *quantizzazione dell'energia*), elementi oscillanti ad alta frequenza - portati alla temperatura di 20° C - avrebbero dovuto emettere radiazioni UV, gamma e X. Inoltre, per incrementare anche di un solo grado Celsius la propria temperatura, i suddetti elementi oscillanti dovrebbero assorbire una grandissima quantità di energia.

colori spettrali: sono così chiamati i colori (o, meglio, le radiazioni elettromagnetiche) associati a lunghezze d’onda definite.

corpo nero: corpo in perfetto equilibrio termico nel quale l’energia irradiata è uguale all’energia assorbita e non riflette alcuna radiazione; emette la cosiddetta *radiazione di corpo nero* la cui densità (cioè l’intensità di radiazione emessa per ogni lunghezza d’onda) è denominata *spettro di corpo nero*. Il termine “corpo nero” fu introdotto da Gustav Robert KIRCHHOFF nel 1862, ma l’interpretazione corretta dello spettro di corpo nero (secondo la quale la radiazione elettromagnetica può propagarsi esclusivamente in “pacchetti discreti” denominati *quanti*) si deve a Max PLANCK.

costante di Boltzmann (k): fu introdotta da Max PLANCK in onore di Ludwig BOLTZMANN. È data dal rapporto tra la costante universale dei gas (R) e il Numero di AVOGADRO (N_A), secondo la relazione:

$$k = \frac{R}{N_A}; \text{ il valore (secondo CODATA 2002) è: } k=1,380\ 650\ 5(24) \times 10^{-23} \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}.$$

costante di Planck: costante fisica universale (chiamata anche *quanto d'azione*) avente le dimensioni di un'energia per un tempo. Nel sistema di unità di misura delle "Unità atomiche", la costante di PLANCK è l'unità di misura del momento angolare.

Il valore raccomandato da CODATA 2006 per questa costante è:

$$6,626\ 068\ 96(33) \times 10^{-34} \text{ J}\cdot\text{s}.$$

costante di Plack ridotta (o costante di Dirac): è la costante di Planck divisa per 2π . Si indica con \hbar [h tagliata] e il suo valore è $h/2\pi = 1,054\ 571\ 628(53) \times 10^{-34} \text{ J}\cdot\text{s}$.

divergenza: misura della tendenza di un campo vettoriale ad allontanarsi da un punto.

formula di Boltzmann: descrive la probabilità P di uno stato di energia E entro un intervallo dE :

$$P(E)dE = \frac{e^{-\frac{E}{kT}}}{\int_0^{\infty} e^{-\frac{E}{kT}} dE} dE$$

fotone: termine coniato da Gilbert Newton LEWIS (nel 1926) per definire la particella elementare priva di massa a riposo, *quanto* e *mediatrice* dell'interazione elettromagnetica. Il fotone appartiene al gruppo dei *Bosoni di gauge* (famiglia dei Bosoni), ha carica elettrica nulla, spin 1, è stabile e viene indicato con la lettera greca γ . La sua esistenza fu teorizzata da Albert EINSTEIN per spiegare l'*effetto fotoelettrico* le cui osservazioni sperimentali non si accordavano con il modello ondulatorio classico della "luce".

frequenza: numero di oscillazioni nell'unità di tempo; viene indicata con ν ; nel SI viene espressa, in Hertz [Hz].

funzionale lineare: detto anche (soprattutto in geometria) *forma lineare*, in algebra lineare è un'applicazione lineare di uno spazio vettoriale (V,K) nel suo campo scalare, molto usata in meccanica quantistica.

linea di forza (o linea di flusso): linea orientata la cui tangente in ogni punto rappresenta la direzione del vettore \vec{v} nel punto stesso; il verso di tale vettore è quello "marcato" sulla linea.

legge della radiazione di Planck: l'energia associata a una radiazione elettromagnetica viene trasmessa per mezzo di "pacchetti" indivisibili (chiamati *quanti*) associati ciascuno ad un singolo fotone.

legge di Stefan-Boltzmann: è chiamata anche semplicemente *legge di Boltzmann* o anche *legge di Stefan*. Stabilisce che la "potenza" irradiata da un corpo nero è direttamente proporzionale alla quarta potenza della sua temperatura assoluta, secondo la formula: $U = \sigma \cdot T^4$, ove $U =$ *emittanza* (cioè l'energia irradiata dall'unità di superficie del corpo nero nell'unità di tempo), $T =$ temperatura assoluta (in kelvin) e σ (*costante di Stefan-Boltzmann*) = $5,67 \times 10^{-8} \text{ J}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{K}^{-4}\cdot\text{s}^{-1}$ (nel SI).

legge di Wien: legge sperimentale proposta da Wilhelm WIEN nel 1893. Esprime la relazione fra la radiazione emessa da un corpo nero e da una massa generica, la temperatura e la lunghezza d'onda massima, secondo la relazione $T \times \lambda_{max} = b$, ove b (*costante dello spostamento di Wien*) = $2,897\ 768\ 5(51) \times 10^{-3}$ m·K [Valore raccomandato dal CODATA 2002], T = temperatura assoluta (espressa in kelvin) della sorgente (o corpo nero), λ_{max} = lunghezza d'onda (espressa in metri) per la quale la radiazione emessa dal corpo nero risulta massima.

In pratica la legge di Wien (chiamata anche *legge dello spostamento di Wien*) mostra in quale modo la densità di energia - emessa da un corpo nero, ad una certa temperatura, in funzione della frequenza (o della lunghezza d'onda) - presenti un picco che, all'incremento della temperatura, si sposta verso le frequenze più alte. Se ne deduce che, con il variare della temperatura della sorgente, varia anche il "colore" della radiazione emessa (la cosiddetta "temperatura di colore").

luce: viene comunemente così definita la radiazione elettromagnetica che l'occhio umano è in grado di osservare, con diverso colore, quando la sua lunghezza d'onda è compresa fra ~300 nm e ~780 nm. In realtà, tale definizione non è rigorosa, poiché, ad esempio, si parla comunemente di "luce ultravioletta", di "luce di Wood", ecc., dunque anche al di fuori della banda di lunghezze d'onda sopra citata. Inoltre la "luce" è la percezione "soggettiva" sia della radiazione elettromagnetica (di lunghezza d'onda 300 - 780 nm) quando essa interagisce con i coni e i bastoncelli della retina, sia anche di uno stimolo meccanico sul bulbo oculare.

lunghezza d'onda: distanza percorsa dall'onda in un periodo; distanza tra due punti nei quali il campo elettrico o il campo magnetico hanno la stessa ampiezza; viene indicata con λ ; nel SI è espressa in metri.

È il rapporto tra la velocità di propagazione (v) e la frequenza (ν), indicato con la lettera greca λ secondo la relazione: $\lambda = v / \nu$. Quando il mezzo di propagazione di un'onda è il vuoto, la lunghezza d'onda si indica con il simbolo: λ_0 .

lunghezza d'onda di de Broglie: lunghezza d'onda, definita dalla relazione $\lambda = h/v$ [o, se si preferisce: $\lambda = h/(mv)$] associata ad ogni particella dotata di massa m e di velocità v . Nella formula soprariportata h è la *costante di Planck*. il cui valore - secondo le raccomandazioni CODATA 2006 - è: $6,626\ 068\ 96(33) \times 10^{-34}$ J/s.

onda: in fisica è così denominato un movimento (periodico o impulsivo) che si propaga - con una ben definita velocità - in un mezzo (non necessariamente "materiale").

rotore: misura della tendenza, di un campo vettoriale, a ruotare attorno a un punto.
spazio vettoriale duale: è il cosiddetto *spazio duale algebrico di uno spazio vettoriale*; si tratta, cioè, di uno spazio vettoriale i cui elementi costitutivi sono i cosiddetti *funzionali lineari* agenti sullo spazio vettoriale stesso.

tensore: in fisica si identifica con tale nome un oggetto (molto generale), definito a partire da uno spazio vettoriale V (ad es.: lo spazio tridimensionale euclideo oppure

lo spazio-tempo quadridimensionale) e, pertanto, non dipendente da un particolare sistema di riferimento. La nozione fisica di tensore, cioè di un oggetto le cui coordinate sono dipendenti dal sistema di riferimento secondo leggi fissate (denominate *covarianza* e *controvarianza*), viene utilizzata per esprimere numerose leggi fisiche;

in matematica, la nozione di tensore viene definita dall'algebra lineare. In pratica, la definizione matematica di tensore non fa uso di sistemi di riferimento (chiamati *basi*), ma utilizza le nozioni di *applicazione multilineare* e di *spazio vettoriale duale*.

teorema dell'equipartizione dell'energia: teoria della meccanica statistica classica che, non considerando la quantizzazione dell'energia ma fondandosi sulla meccanica newtoniana applicata in particolare alla teoria cinetica dei gas, permette di valutare l'energia interna di un sistema termodinamico. In particolare, questo teorema afferma che, per ogni grado quadratico di libertà, componente il moto complessivo di una qualsivoglia particella, si ha un contributo di energia pari a:

$$\frac{1}{2}kT \quad \text{per mole (ovvero } \frac{1}{2}RT \quad \text{per mole),}$$

ove k è la costante di Boltzmann, R è la costante universale dei gas (il cui valore, secondo la sequenza A070064 dell'OEIS, è: $R= 8,3144472 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$) e T è la temperatura assoluta (espressa in kelvin).

In definitiva, questo teorema afferma che, essendo f i gradi di libertà di una generica molecola, in un sistema macroscopico formato da un insieme di queste molecole (in condizioni di equilibrio alla temperatura T) l'energia media di ciascuna molecola è data dalla relazione:

$$\langle E \rangle = \frac{f}{2}kT$$

tubo di flusso: superficie tubolare che si ottiene considerando tutte le linee di forza di un campo vettoriale passanti per i punti di una linea chiusa.

valore medio di energia contenuto in una lunghezza d'onda: è descritto dalla formula:

$$\langle E \rangle = \frac{\int_0^{\infty} E e^{-\frac{E}{kT}} dE}{\int_0^{\infty} e^{-\frac{E}{kT}} dE}$$

velocità di propagazione: velocità con la quale una perturbazione si allontana dalla sorgente; viene indicata con v ; nel SI viene espressa in metri/secondo [m/s].

velocità di propagazione della luce in alcuni mezzi.

MEZZO	VELOCITÀ DELLE LUCE (m/s)
Vuoto	299792458
Aria	299709000
Acqua (pura)	225407863
Etanolo	220436000
Vetro	197232000
Quarzo (fuso)	205550000
Sodio cloruro	194670000
Diamante	123881000

Per calcolare la velocità della luce in un mezzo si può adoperare la formula:

$$c_m = \frac{1}{\sqrt{\mu_m \epsilon_m}}$$

ove ϵ_m = costante dielettrica del mezzo

μ_m = permeabilità magnetica del mezzo.

Infine, alle pagine seguenti, un piccolo riassunto sui principali “operatori” in meccanica quantistica, come annunciato a pag. 161.

breve sintesi sugli “operatori” in meccanica quantistica

In meccanica quantistica, gli “operatori” (entità matematiche che agiscono sugli stati quantistici, trasformando uno stato in un altro e rappresentando proprietà osservabili del sistema) svolgono un importantissimo ruolo nella descrizione delle osservabili fisiche e nell'evoluzione dei sistemi quantistici.

Il tipo più comune di operatore nella meccanica quantistica è l'*operatore lineare* (generalmente indicato con \hat{L}), che soddisfa il *principio di sovrapposizione*.

Viene generalmente denominato *Principio di Sovrapposizione* il prodotto interno tra due “stati”, cioè l’incapacità di distinguerli con certezza.

Tra i vari operatori usati in meccanica quantistica, i più comuni sono:

- **gli operatori posizione e quantità di moto** : l'operatore posizione (solitamente indicato come \hat{x}) rappresenta la posizione di una particella nello spazio, mentre l'operatore quantità di moto (solitamente indicato come \hat{p}) rappresenta la quantità di moto della particella. Gli operatori posizione e quantità di moto monodimensionali sono definiti come:

$$\hat{x} |\psi\rangle = x |\psi\rangle \quad (\text{dove } x \text{ è l'autovalore dell'operatore di posizione})$$

$$\hat{p} |\psi\rangle = p |\psi\rangle \quad (\text{dove } p \text{ è l'autovalore dell'operatore quantità di moto})$$

- l'**operatore hamiltoniano** (generalmente indicato come \hat{H}) rappresenta l'energia totale di un sistema quantistico. Governa l'evoluzione temporale del sistema attraverso l'equazione di Schrödinger:

$$\hbar \frac{\partial |\Psi\rangle}{\partial t} = -iH|\Psi\rangle$$

- **operatori del momento angolare**: il momento angolare è un vettore che funge da generatore delle rotazioni spaziali; è quantizzato ed è descritto dagli operatori:

$$\hat{L}_x, \hat{L}_y, \hat{L}_z ; \text{ l'operatore del momento angolare totale è rappresentato da } \hat{L}^2 .$$

- **operatori di spin**: sono usati per descrivere il comportamento di particelle con *momento angolare intrinseco (spin)* e sono espressi dall'equazione:

$$\vec{S} \doteq \frac{\hbar}{2} \vec{\sigma}$$

ove $\vec{\sigma}$ rappresenta le matrici di Pauli: $\sigma_x = \begin{pmatrix} 0 & 1 \\ 1 & 0 \end{pmatrix}$, $\sigma_y = \begin{pmatrix} 0 & -i \\ i & 0 \end{pmatrix}$, $\sigma_z = \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ 0 & -1 \end{pmatrix}$

Il simbolo \doteq indica equivalenza tra due entità matematiche.

- **operatore di evoluzione temporale:** l'evoluzione temporale di uno stato quantistico può essere descritta utilizzando l'omonimo operatore, indicato come $\hat{U}(t)$. Questo operatore è correlato all'operatore hamiltoniano; se ne è già parlato a pag 168 di questi "Appunti".

- **osservabili:** qualsiasi quantità fisica suscettibile di essere misurata sperimentalmente è rappresentata da un operatore hermitiano. Gli autovalori dell'osservabile corrispondono ai possibili risultati delle misurazioni e i corrispondenti autovettori rappresentano gli stati quantistici associati a tali risultati.

Una trattazione completa sugli operatori in meccanica quantistica può essere reperita, oltre che in altri testi *passim* citati, in:

LUBICZ Vittorio, *Appunti di Meccanica Quantistica*,
<http://webusers.fis.uniroma3.it/~lubicz/Appunti-MQ.pdf>

Il professore è presente con alcune lezioni anche su You Tube e su Rai Scuola.