

LA MICROSCOPIA IN FLUORESCENZA

**APPUNTI AD USO DEI MICROSCOPISTI
DILETTANTI**

Marco Brusadin

**ROMA - 2010
– *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 2.5 Italia.

Per leggere una copia della licenza visita il sito web <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/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 AI SENSI DEL PUNTO 8.f.

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.



Creative Commons License Deed

Attribuzione - Non commerciale - Non opere derivate 2.5 Italia

Tu sei libero:

- di riprodurre, distribuire, comunicare al pubblico, esporre in pubblico, rappresentare, eseguire e recitare quest'opera



Alle seguenti condizioni:

Attribuzione. Devi attribuire la paternità dell'opera nei modi indicati dall'autore o da chi ti ha dato l'opera in licenza e in modo tale da non suggerire che essi avallino te o il modo in cui tu usi l'opera.

Non commerciale. Non puoi usare quest'opera per fini commerciali.

Non opere derivate. Non puoi alterare o trasformare quest'opera, né usarla per crearne un'altra.

- Ogni volta che usi o distribuisi quest'opera, devi farlo secondo i termini di questa licenza, che va comunicata con chiarezza.
- In ogni caso, puoi concordare col titolare dei diritti utilizzi di quest'opera non consentiti da questa licenza.
- Questa licenza lascia impregiudicati i diritti morali.

Le utilizzazioni consentite dalla legge sul diritto d'autore e gli altri diritti non sono in alcun modo limitati da quanto sopra.

Questo è un riassunto in linguaggio accessibile a tutti del [Codice Legale \(la licenza integrale\)](#).

PREFAZIONE

Questi APPUNTI, 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 giugno u.s., non avrebbe potuto vedere la luce senza la loro preziosa collaborazione, la loro amabile comprensione e la loro notevole capacità di sopportazione.

Roma, 20 dicembre 2010

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 necessità**. È bene essere informati sull'ubicazione e sulla reperibilità telefonica del più vicino **Centro Antiveleni**, 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), 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 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. 4
Avvertenze	5
<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	29
<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>	46
<i>light scattering</i>	46
<i>quenching</i>	47
<i>effetto matrice</i>	47
<i>photobleaching</i>	47
UN PO' DI CHIMICA	48
correlazione tra spettro di eccitazione e spettro di emissione	49
struttura delle molecole organiche fluorescenti	50
influenza del pH sulla fluorescenza	50
influenza della planarità e della rigidità della struttura molecolare sulla fluorescenza	51
FRET (<i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>)	54
alcuni esempi di fluorocromi	57
lunghezze d'onda di eccitazione e di emissione di vari fluorocromi	59

LA FLUORESCENZA AL MICROSCOPIO OTTICO

METODI DI OSSERVAZIONE DELLA FLUORESCENZA AL MICROSCOPIO OTTICO	63
fluorescenza in diascopeia ad eccitazione assiale	63
fluorescenza in diascopeia ad eccitazione radente	64
fluorescenza in diascopeia ad eccitazione mista: assiale e radente	64
microscopia in contrasto di fase / fluorescenza	65

INDICE

fluorescenza in episcopia	65
scelta delle ottiche	66
UN BREVISSIMO <i>EXCURSUS</i> STORICO	68
<i>UN MICROSCOPIO A FLUORESCENZA... FATTO IN CASA</i>	71
<i>AUTOFLUORESCENZA NEI TESSUTI BIOLOGICI</i>	77
<i>FLUORESCENZA SECONDARIA</i>	79
<i>ALCUNI METODI USATI NELLA MICROSCOPIA IN FLUORESCENZA</i>	80
dimostrazione degli acidi nucleici	80
dimostrazione delle catecolamine	82
dimostrazione della serotonina	83
colorazione a fluorescenza con acido picrico <i>in vivo</i>	83
fluorescenza in sezioni sottili non decalcificate di tessuto osseo	84
microscopia a fluorescenza nello studio della microbiologia del terreno	85
microscopia a fluorescenza per identificare cellule tumorali nel liquor cerebrospinale	86
microscopia a fluorescenza nell'industria alimentare	89
<i>IMMUNOFLUORESCENZA</i>	90
immunofluorescenza diretta	92
immunofluorescenza indiretta	92

METODICHE ANALITICHE

REAGENTI

Tampone Fosfati	96
Tampone Fosfato-Acido Citrico	96

METODI

metodo per l'evidenziazione della Noradrenalina nella surrenale	97
metodo per l'osservazione delle fibre adrenergiche	97
metodo per l'immunofluorescenza diretta	99
metodo per la localizzazione di antigeni intracellulari o di superficie in colture di cellule	99
metodo per l'immunofluorescenza indiretta	100
derivatizzazione di aminoacidi	101
colorazione con Arancio di Acridina	101

PREPARAZIONE DI ALCUNI FISSATIVI

Fissativo di Carnoy	102
Soluzione salina di formolo al 10%	102
Fissativo di Zenker	102
Formolo calcico di Baker	102
Miscela Cromato-Bicromato di Potassio	103

TERRENI DI COLTURA PER CELLULE

PBS (o Terreno di Dulbecco)	104
BSS (o Terreno di Hanks)	104

APPENDICE A - INTERCALAZIONE 105

APPENDICE B - FISH (FLUORESCENT IN SITU HYBRIDIZATION) 107

APPENDICE C - SCHEDE DI SICUREZZA 111

BIBLIOGRAFIA 116

GLOSSARIO 139

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) [reperibili anche sul sito <http://www.funsci.com>], ho trattato l’allestimento di preparati istologici, citologici, ematologici e microbiologici, descrivendo tecniche e metodiche che fossero accessibili anche ai dilettanti e ai principianti.

Ora, facendo riferimento al concetto di “**studio**” (che ritengo opportuno applicare anche ai microscopisti non professionisti), 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 per mezzo della 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. Ovviamente, chi fosse interessato ad ulteriori approfondimenti potrà documentarsi sia consultando i lavori citati nelle note a piè di pagina, sia con l’uso della bibliografia essenziale che ho posto in fondo a questo mio lavoro, sia consultando Internet o altre fonti bibliografiche.

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*, http://www.funsci.com/fun3_it/sini/eo/o11-fluor.pdf.

Tra i vari siti e gruppi di microscopia ai quali rivolgersi per avere riferimenti e consigli in merito, ritengo opportuno segnalare http://tech.groups.yahoo.com/group/microcosmo_italia/: si tratta di una *mailing-list* e posso garantire che l'accoglienza è delle migliori e la qualità dei suoi componenti veramente rimarchevole.

A livello di sito vero e proprio, mi permetto di citare <http://www.funsci.com> nel quale si trovano (oltre a numerosi spunti interessanti per realizzare esperienze didattiche e ludiche in vari campi della scienza) veri e propri trattati di microscopia ottica.

Non posso, poi, omettere il sito http://spazioinwind.libero.it/andrea_bosi/index.htm anch'esso ricco di spunti riguardanti, oltre la microscopia, numerose discipline scientifiche.

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.

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 (tricolare) la fotocamera è stata munita di un apposito adattatore (dotato di lente acromatica) montato su un oculare “fotografico” *ad hoc* (ingrandimento 2,5× o 4×, selezionabile). Non ho ritenuto utile citare l’ingrandimento (più propriamente: la *magnificazione*) prodotto dalla combinazione dei vari obiettivi con le ottiche da ripresa usate, perché è difficoltoso quantificarne il reale valore: per ogni fotogramma (ove ritenuto necessario) ho riportato ingrandimento e apertura numerica dell’obiettivo usato, del tempo di esposizione e della sensibilità ISO impostata per il sensore.

L’argomento relativo alla “fotomicrografia al microscopio con fotocamere digitali” è stato trattato magistralmente dal Dott. Giovanni Pietro SINI (http://www.funsci.com/fun3_it/sini/mo/microfoto_digitale.pdf) il quale è autore di numerose altre pubblicazioni (anche molto professionali e ponderose) reperibili nel sito: <http://www.funsci.com> 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 sono: 4/0,10 plan-acromatico; 10/0,25 plan-acromatico; 10/0,25 epi-plan; 20/0,30 acromatico; 25/0,40 plan-acromatico; 40/0,95 apocromatico; 60/0,85 plan-acromatico; 100/1,32 NPL Fluotar semiapocromatico (alla Fluorite) a immersione in olio.

Il **condensatore** per diascopea è aplanatico-acromatico (con A.N. 1,25 se immerso in olio e A.N. 0,95 se usato “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, analogamente a 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. Può essere anche misurata graficamente come distanza tra due creste di onde consecutive.
- *frequenza* (numero di oscillazioni nell'unità di tempo), indicata con ν ed espressa, nel SI, in Hertz [Hz];
- *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

(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.

l'errore quadratico medio sulle ultime cifre significative. 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 = **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⁾.

(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, *cit.*, pag. 359.

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

Le onde elettromagnetiche, a seconda della loro frequenza, sono prodotte da tipi di sorgenti diverse, hanno proprietà diverse, interagiscono in modi diversi con la materia e vengono indicate con nomi diversi.

In particolare abbiamo:

- a) - **Onde a radiofrequenza** (chiamate anche *onde hertziane*, dal cognome del fisico Hertz) (con ν [frequenza] compresa tra poche centinaia di Hz e $\sim 10^9$ Hz; la λ [lunghezza d'onda] relativa 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. Vengono 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 cosiddetti “forni a microonde”), ecc.
- c) - **Radiazione infrarossa** (con $\sim 5 \times 10^{11} \text{ Hz} \leq \nu \leq 4 \times 10^{14} \text{ Hz}$ e $10^{-3} \text{ m} > \lambda > 0,78 \mu\text{m}$). Lo spettro delle radiazioni infrarosse (comunemente abbreviato in “spettro infrarosso”) viene suddiviso in:
 - *lontano infrarosso* ($10^{-3} \text{ m} > \lambda > 3 \times 10^{-5} \text{ m}$);
 - *medio infrarosso* ($3 \times 10^{-5} \text{ m} > \lambda > 3 \times 10^{-6} \text{ m}$);
 - *vicino infrarosso* ($3 \mu\text{m} > \lambda > 0,78 \mu\text{m}$).

La radiazione infrarossa viene emessa spontaneamente dai corpi caldi⁽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 irradiata 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, *ibidem*, 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 $\sim 3800 \text{ \AA} \geq \lambda \geq \sim 10 \text{ \AA}$)⁽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* ($3800 \text{ \AA} > \lambda > 2000 \text{ \AA}$);
- *medio ultravioletto* ($3150 \text{ \AA} > \lambda > 2800 \text{ \AA}$);
- *lontano* (o *remoto*) *ultravioletto* ($2800 \text{ \AA} > \lambda > 1850 \text{ \AA}$);
- *estremo ultravioletto* ($1850 \text{ \AA} > \lambda > 136 \text{ \AA}$), a sua volta suddiviso in:
 - *ultravioletto di Schumann* ($1850 \text{ \AA} > \lambda > 1200 \text{ \AA}$);
 - *ultravioletto di Lyman* ($1200 \text{ \AA} > \lambda > 500 \text{ \AA}$);
 - *ultravioletto di Millikan* ($500 \text{ \AA} > \lambda > 136 \text{ \AA}$).

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) ($\sim 3800 \text{ \AA} > \lambda > 3150 \text{ \AA}$);
- *Ultravioletto B* (UV-B) ($3150 \text{ \AA} > \lambda > 2800 \text{ \AA}$);
- *Ultravioletto C* (UV-C) ($2800 \text{ \AA} > \lambda > 100 \text{ \AA}$).

- 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: $380 \text{ nm} > \lambda > 6 \text{ nm}$, ricordando che l’ $\text{\AA}$ è “accettato” nel SI e che $1 \text{ \AA} = 0,1 \text{ nm}$ [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).

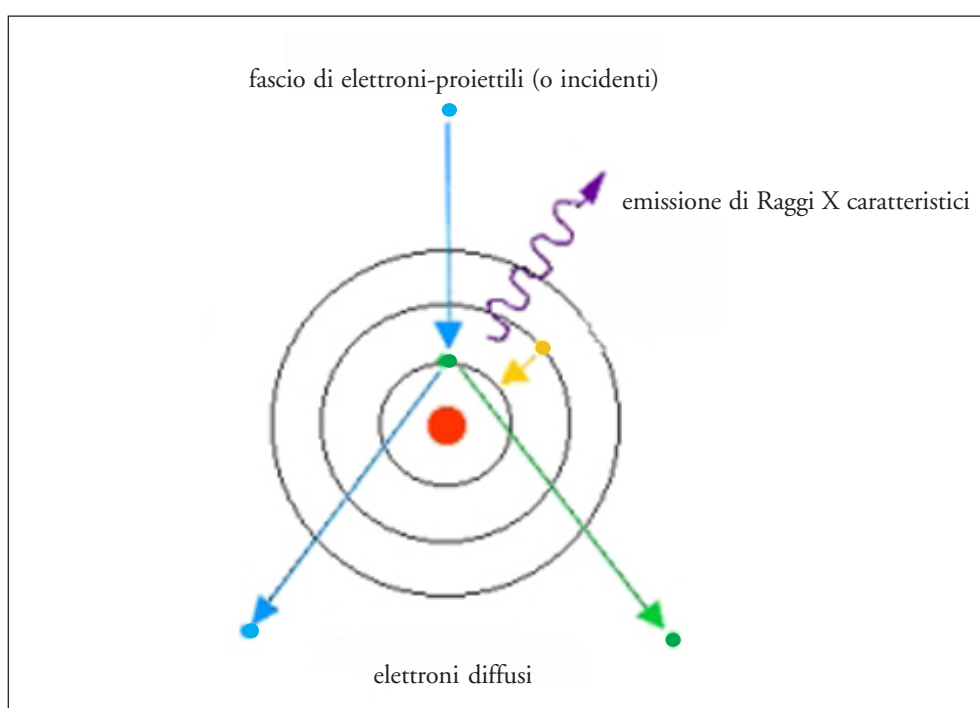


Fig. 1: Produzione di Raggi X caratteristici

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:

$$R_{Kanaya-Okayama} = \frac{1}{\rho} \cdot \frac{0,0276A}{Z^{0,889}} (E_0^m - E_c^m)$$

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 $\lambda_{\min}$), 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: $\nu_{\max} = E$) (Vds.: fig. 2).

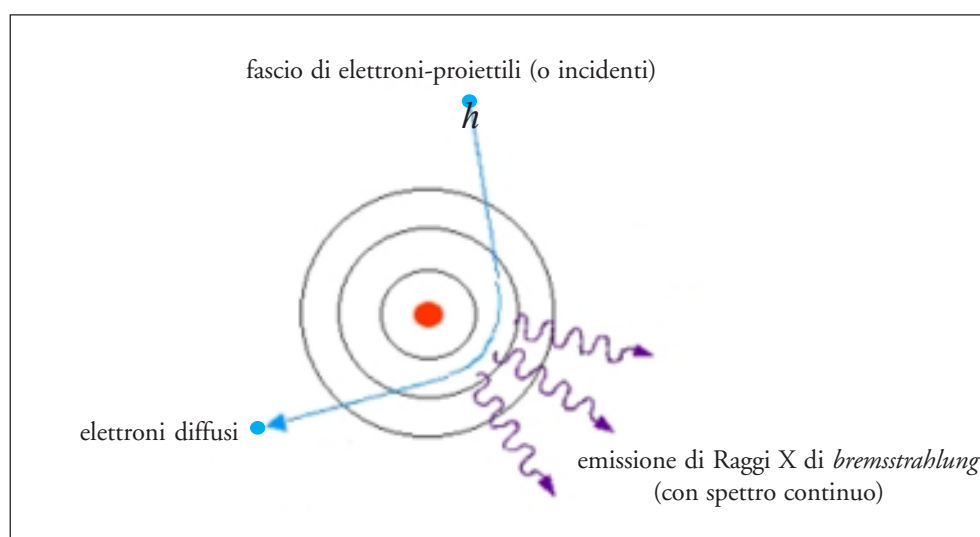


Fig. 2: produzione di Raggi X per *bremstrahlung*.

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).

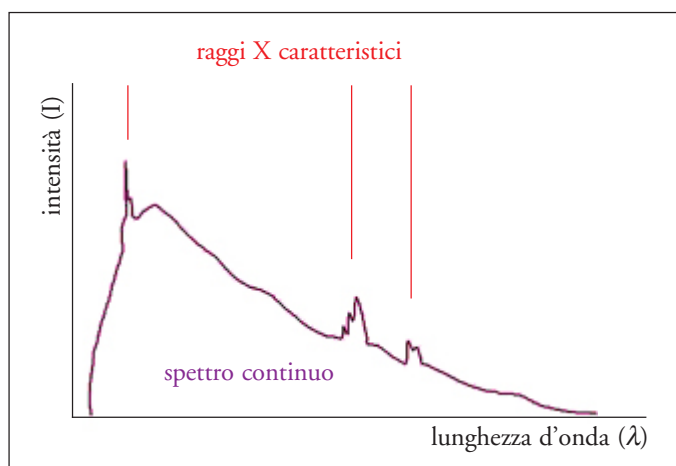


Fig. 3: Spettro dei Raggi X;
la porzione continua dello spettro è dovuta alla *bremsstrahlung*.

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:

$$-\frac{dE}{dx} = \frac{4\pi}{m_e c^2} \frac{n z^2}{\beta^2} \left(\frac{e^2}{4\pi\epsilon_0} \right)^2 \left[\ln \frac{2m_e c^2 \beta^2}{I(1-\beta^2)} - \beta^2 \right]$$

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 $Z > 1$, $I = 16 \text{ eV} \times Z^{0.9}$).

(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.

La perdita di energia da parte della particella incidente dipende dalla sua carica e dalla sua velocità, ma non dalla sua massa.

Elettroni e positroni perdono energia sia per ionizzazione, sia per *bremsstrahlung* (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 risolse 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 ($0,510\,998\,902 \pm 0,000\,04 \text{ MeV}$); 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

(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: $h = 6,626\,068\,96 (33) \times 10^{-34} \text{ Js}$. 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.

atomi 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⁾.

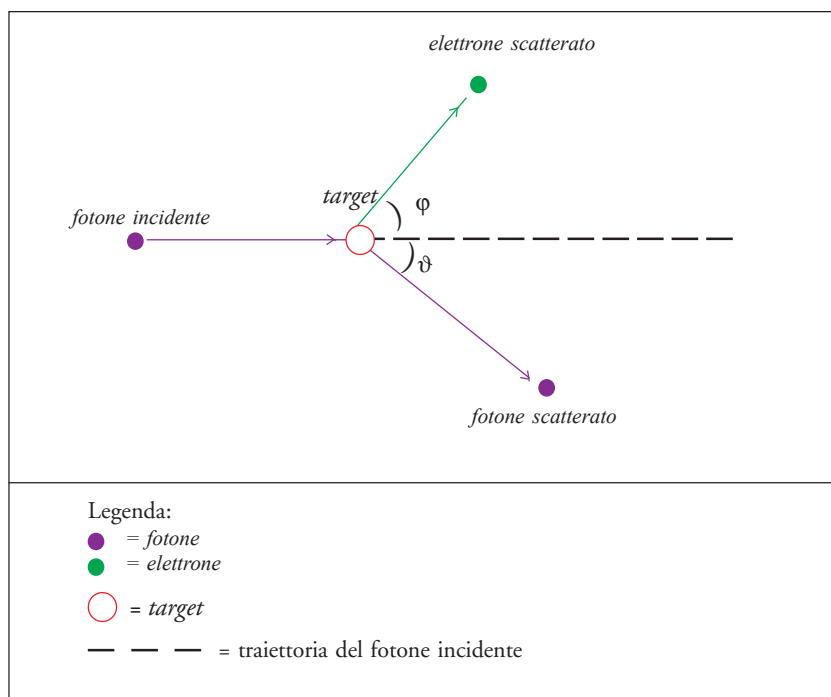


Fig. 4: Effetto Compton.

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 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 Blachett 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).

Blachett 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.

Blachett 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 (cioè *fotoni*).

Blachett 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. BLACHETT - 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 $\frac{1}{e}$; 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.

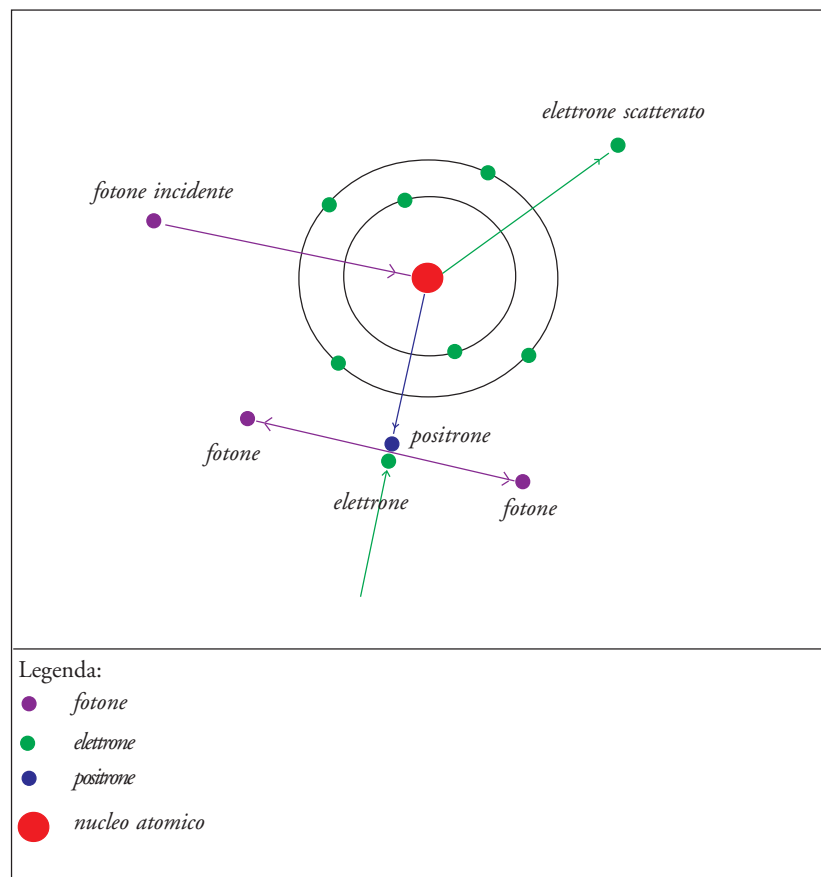


Fig. 5: Produzione di una coppia di fotoni

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 che il valore effettivo è invece prossimo a 1,001 18 (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* 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 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.

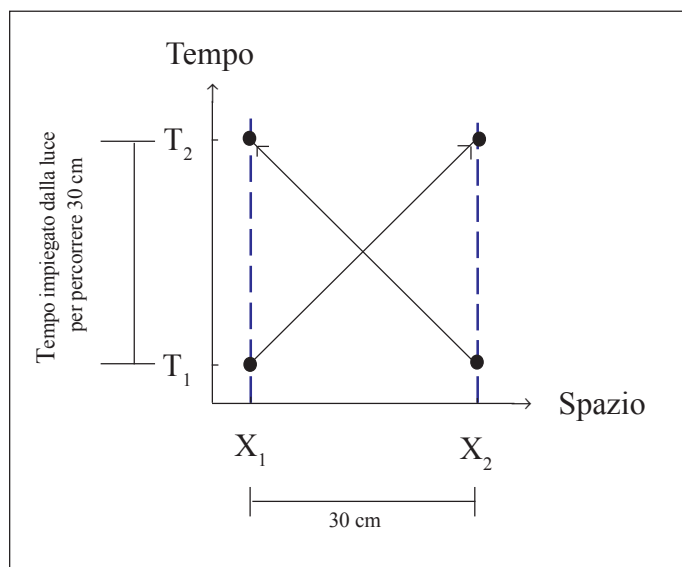


Fig. 6: Grafico spazio-tempo; la scala dei tempi usata in questo e negli altri diagrammi di Feynman è tale che le particelle che viaggiano alla velocità della luce sono indicate da linee inclinate a 45° nello spazio-tempo.

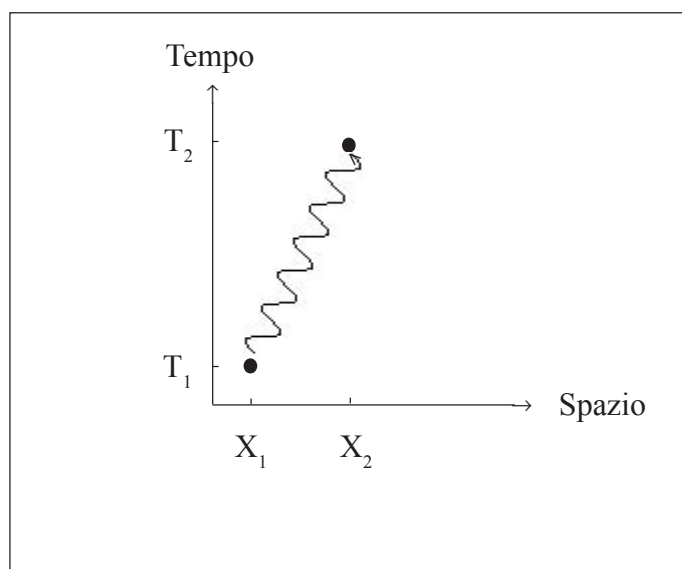


Fig. 7: Grafico spazio-tempo; un fotone, rappresentato dalla linea ondulata, ha un'ampiezza di probabilità per andare dal punto A al punto B espressa da una formula che dipende esclusivamente dalla differenza di posizione $(X_2 - X_1)$ e dalla differenza di tempo $(T_2 - T_1)$ e può essere scritta come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

(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*.

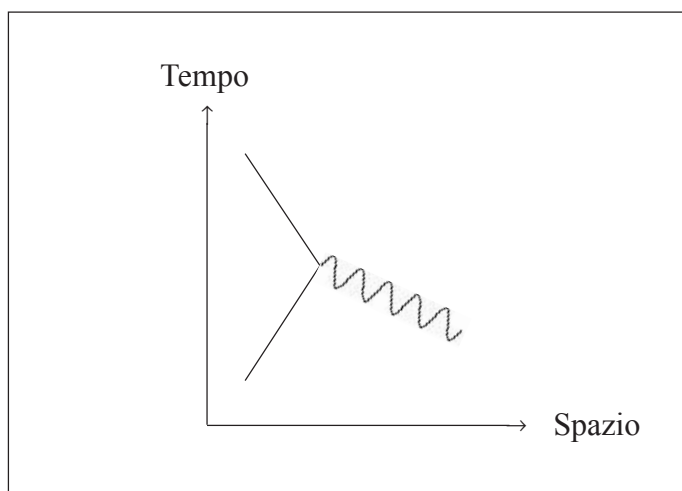


Fig. 8: Diagramma di accoppiamento di un elettrone e di un fotone.

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,

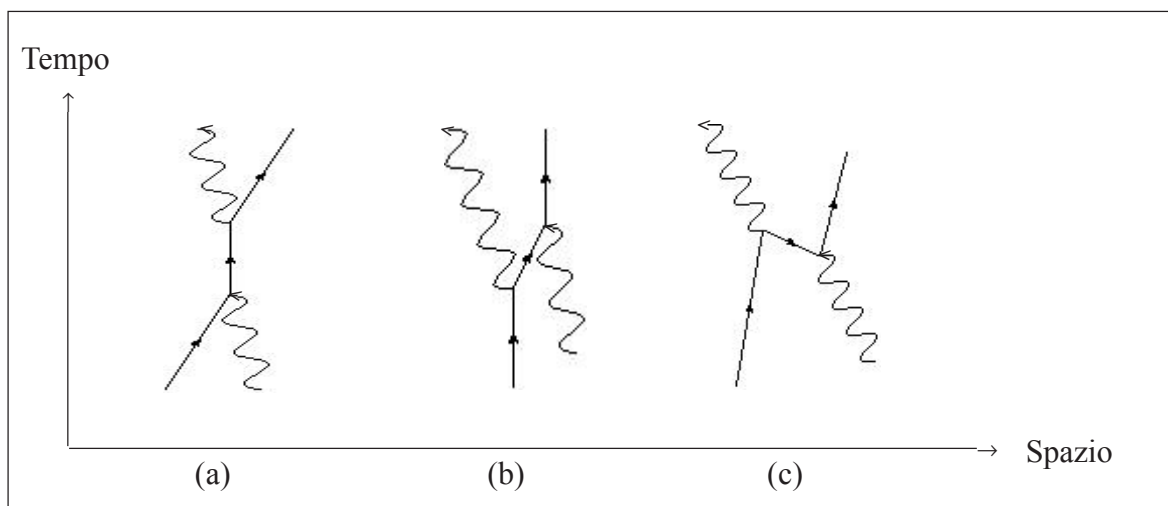


Fig. 9: Possibili diagrammi di diffusione della radiazione elettromagnetica.

(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.

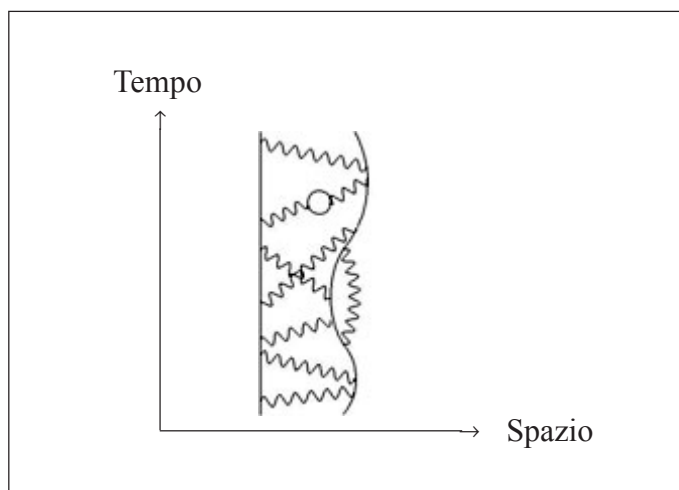


Fig. 10: Il diagramma mostra come, nell'atomo di idrogeno, l'elettrone (linea curva) venga mantenuto ad una certa distanza dal protone del nucleo (linea dritta) attraverso lo scambio continuo di fotoni (linee ondulate). L'ampiezza di accoppiamento protone-fotone è $-j$.

(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.

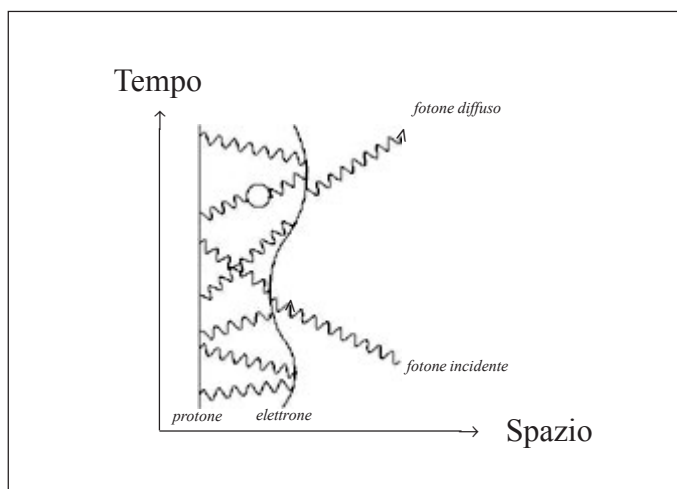


Fig.11: Il diagramma mostra un possibile modo di diffusione della radiazione elettromagnetica nell'atomo di idrogeno. Come si può notare, assorbimento del fotone incidente e rilascio del fotone diffuso (scatterato) non sono contemporanei.

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.

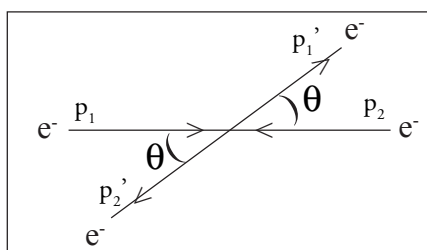


Fig. 12: Collisione tra due elettroni dotati di quantità di moto opposte.

(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.

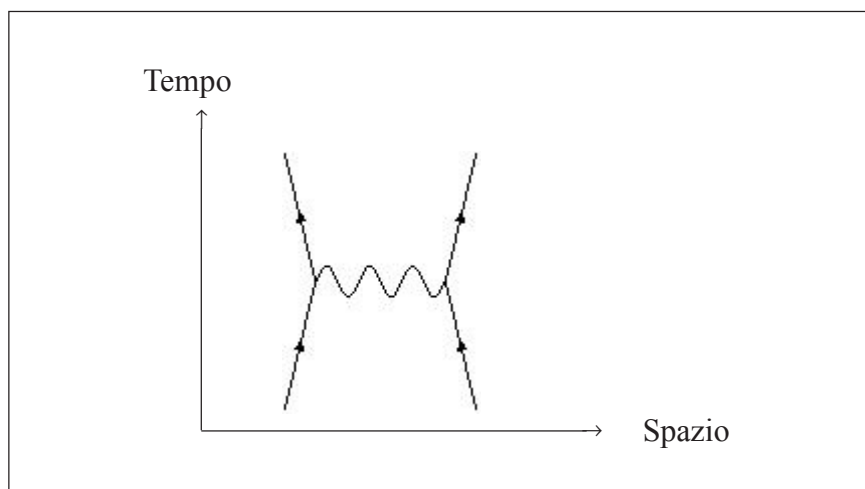


Fig. 13: Diagramma di collisione tra due elettroni con conseguente scattering.

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 *bremstrahlung* da una carica accelerata. La fig. 14 ne mostra il relativo diagramma di Feynman.

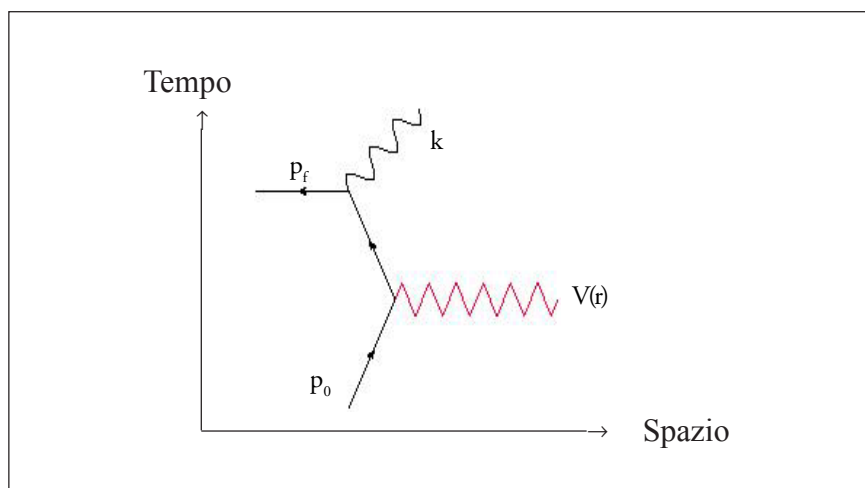


Fig. 14: Un elettrone p_0 , deflesso da un potenziale $V(r)$, emette un fotone k e rimane con un impulso finale p_f .

(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).

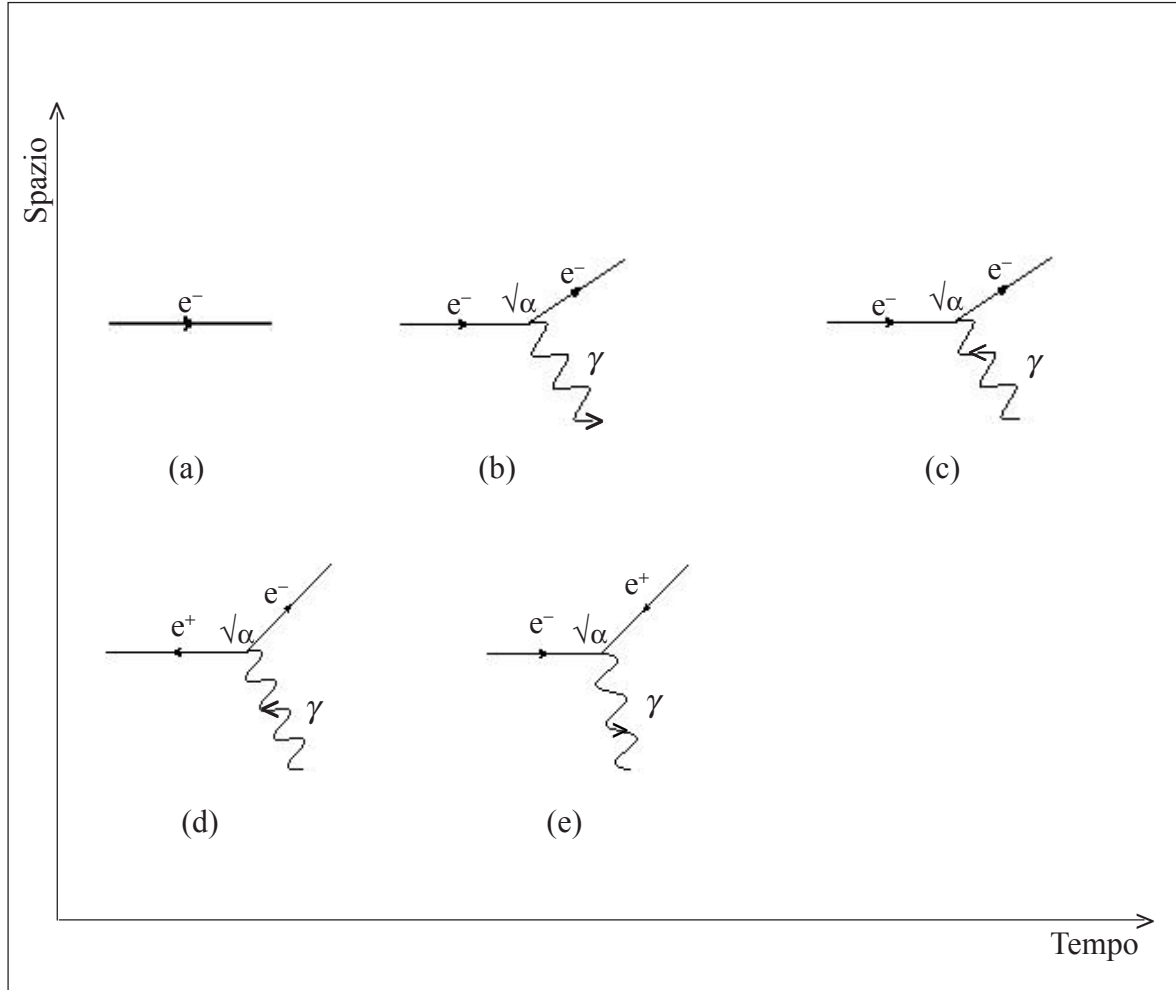


Fig. 15: (a) elettrone libero; (b) emissione di un fotone; (c) assorbimento di un fotone; (d) produzione di una coppia; (e) annichilazione e^+e^- . Si noti che in questo diagramma (tratto da: W. E. BURCHAM - M. JOBES, Nuclear and Particle Physics, prec. cit., con modifiche) la collocazione temporale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

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⁾.

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 “lampo di luce”. Tali teorie, tuttavia, non sono da tutti condivise: 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 su 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 permangano perplessità nella classificazione di fenomeni di durata compresa tra 10^{-5} e 10^{-1} s);
- dipendenza della *costante di tempo τ* (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*. 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.

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 rimetterla, 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 *Grottus 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.

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

(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.

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] 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 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: al variare dell'energia degli elettroni (*eccitazione elettronica*) varia anche il contenuto energetico molecolare, tenendo presente che alle transizioni tra due stati di oscillazione energeticamente

(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*.

prossimi corrisponde una ΔE notevolmente minore e che 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⁾.

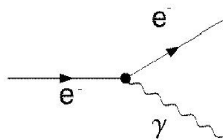
A tal proposito, ritengo opportuno ricordare che l'interazione tra due particelle è proporzionale alla probabilità di irraggiamento, cioè alla *costante di accoppiamento dell'interazione elettromagnetica* ($\alpha_{EM} = \frac{e^2}{\hbar c}$ [ove e è il valore della carica della

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

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



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

cioè l'energia di riposo $m_e c^2 = 0,51 \text{ MeV}$, violerebbe il principio di conservazione dell'energia: infatti, il fotone emesso avrebbe un'energia $\mathcal{E}_\gamma > 0$, l'elettrone in movimento avrebbe energia $\mathcal{E}_e > 0,51 \text{ MeV}$ e si determinerebbe uno sbilanciamento energetico $\Delta E = \mathcal{E}_\gamma + \mathcal{E}_e - 0,51 \text{ MeV}$. 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 a 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 nell'infrarosso. 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:

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

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:

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

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:

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

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 $< 2\%$ e il termine $\varepsilon b c \leq 0,01$ (come avviene, ad esempio, nelle soluzioni molto diluite), l'equazione [7] può essere ridotta (in prima approssimazione) alla seguente:

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

dalla quale è facilmente intuibile che, per $\varepsilon b c \leq 0,01$, la concentrazione e l'intensità di fluorescenza sono legate da una legge di proporzionalità diretta⁽⁷³⁾.

Per valori del prodotto $\varepsilon b c > 0,01$ la correlazione fra la concentrazione e l'intensità di fluorescenza non ha più un andamento lineare: per valori molto alti, infatti, il fattore $e^{-\varepsilon b c}$ 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).

Un breve accenno merita l'esame in *fluorescenza a luce polarizzata*: infatti, se un fluoroforo viene eccitato con luce 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⁾.

(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. Edizioni Medico Scientifiche, Torino, 1994, pagg. 182 ss.

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

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*.

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 una parte della radiazione fluorescente, comportandosi dunque in maniera analoga ad 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 e 348 nm: ebbene, tali picchi si sovrappongono a quelli di eccitazione e di emissione (rispettivamente 275 e 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 particolare, si produce il *Rayleigh scattering*, se l'urto avviene con molecole, mentre si produce il *Tyndall scattering* se l'urto interessa particelle ultramicroscopiche.

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

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

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, 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.

- *Attenuazione per collisione*: 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*.

- *Attenuazione per complessazione*: 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⁾.

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*.

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

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

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, dunque, 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 , ...), 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).

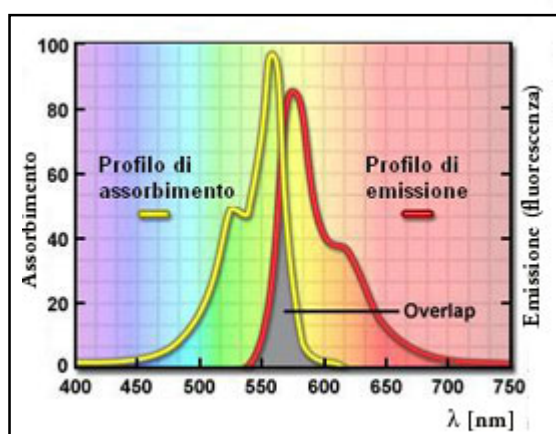


Fig. 16: Spettri di eccitazione e di emissione con overlap.

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.

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

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.

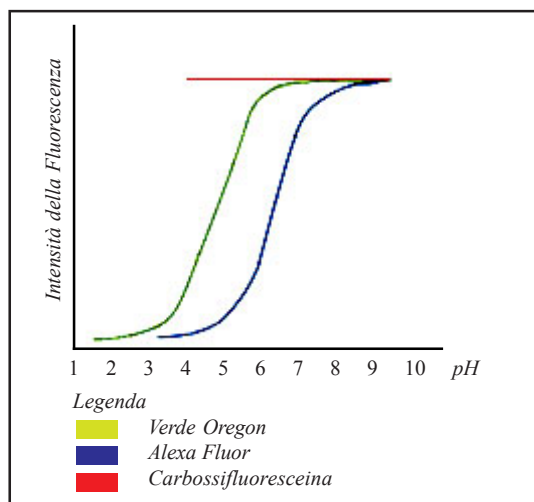


Fig. 17: Esempi di dipendenza dell'emissione fluorescente dal pH.

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 Fenoltaleina che non è fluorescente: il diverso comportamento è dovuto alla presenza di un *ponte Ossigeno* tra due anelli benzenici (vds.: fig. 18).

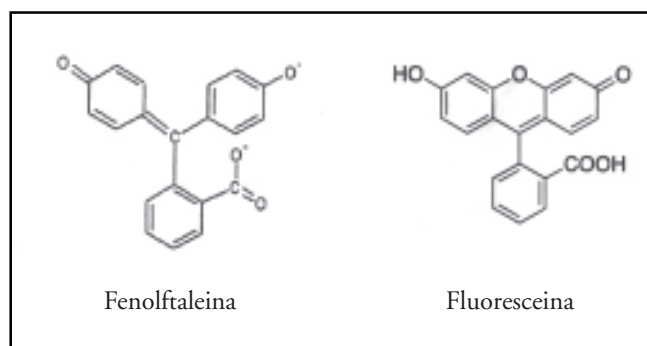


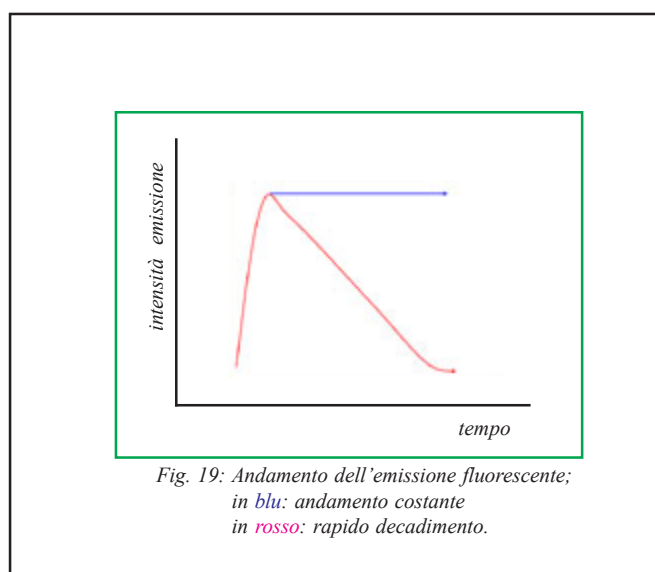
Fig. 18: Confronto tra le strutture molecolari della Fenoltaleina e della Fluoresceina.

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 fluorimetria), 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).



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.

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)

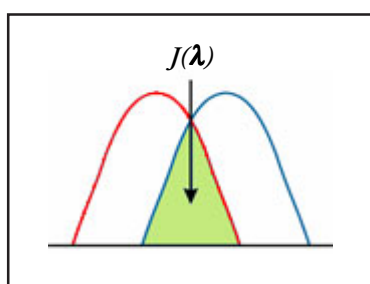


Fig.20: Grafico della FRET.

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. 49 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:

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

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

$\text{\AA}$ = unità di misura (1 Ångstrom = 10^{-10} m = 0,1 nm).

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.

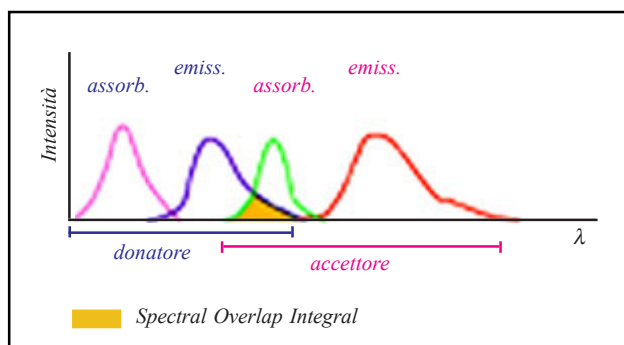


Fig. 21: FRET Spectral Overlap Integral.

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) = $55 \text{ \AA}$; 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) = $44 \text{ \AA}$.

Si faccia attenzione a non confondere la **FRET** con il *quenching* (vds. p. 47 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>
- 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}	- 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.

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 (Bisaminophenyloxadiazole)	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>

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

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>

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 applicazioni biomediche -, andrà benissimo un normale

(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 utilizzatissime 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, http://www.funsci.com/fun3_it/sini/mo/mo.htm

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: **ἐπι** [epì] = sopra e **σκοπεῖν** [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 diascopea, 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 diascopea, 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 diascopea, 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. 29 e 30 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/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 gelatina) "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*, http://www.funsci.com/fun3_it/sini/eo/o11-fluor.pdf

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 aveva utilizzato, come sorgente di eccitazione, la radiazione solare filtrata attraverso una soluzione acquosa (contenente NH_3 [Ammoniaca]) di $\text{Cu}(\text{OH})_2$ [idrossido di Rame (*id est*: rameico)] (che presenta un colore blu) e focalizzata sul campione da esaminare; la radiazione emessa veniva, poi, filtrata per mezzo di una soluzione acquosa di $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ [dicromato (*id est*: bicromato) di Potassio] (che presenta un colore giallo) e 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⁾ dimostrò come isolare la banda della radiazione UV compresa tra 300 e 400 nm tramite un filtro (composto da silicato di Bario e 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 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'*epilluminazione*.

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 amminici 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.

(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.

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 diasopia 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).

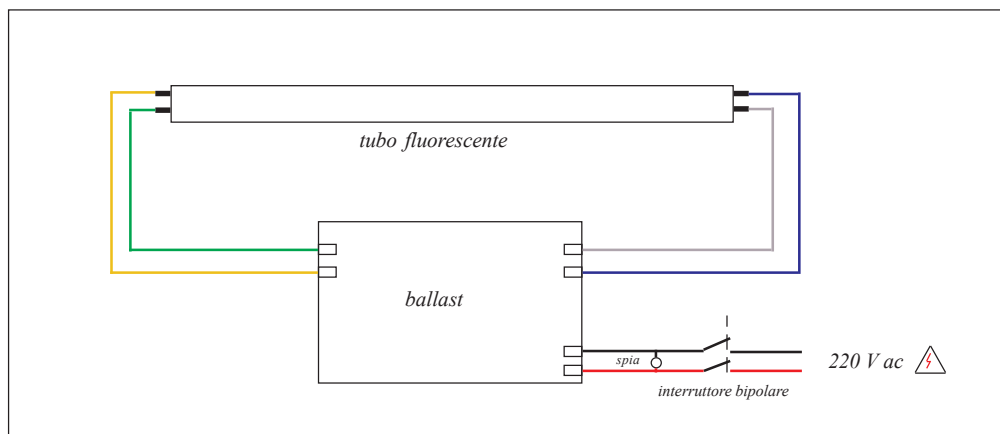


Fig. 22: Schema dei collegamenti elettrici della lampada fluorescente.

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⁽¹⁰⁶⁾).

(106) - 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).

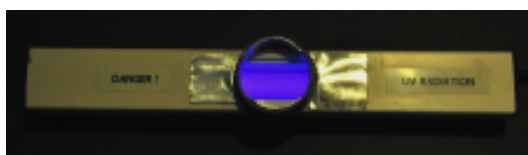


Fig. 26: Il dispositivo di illuminazione per microscopia in UV con la lampada accesa.



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.

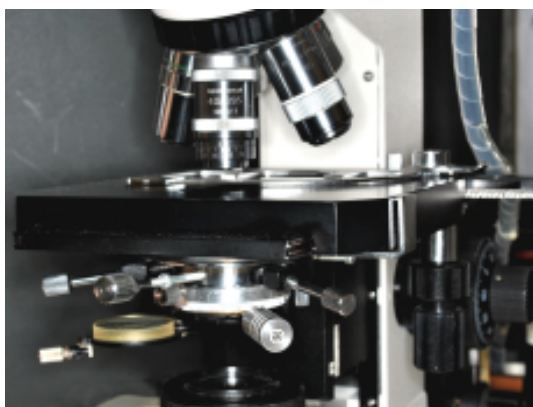


Fig. 28: Illuminazione standard del microscopio con condensatore per diasopia in campo chiaro.

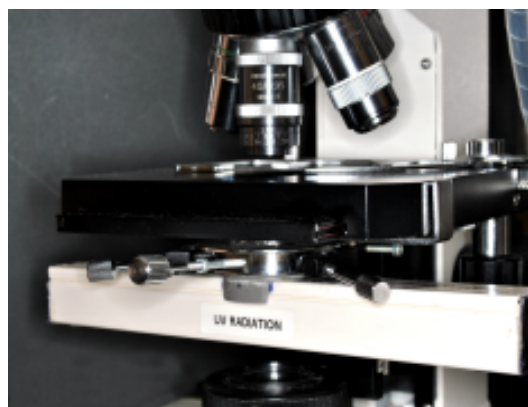


Fig. 29: Il condensatore del microscopio è stato sostituito dal dispositivo illuminatore a "luce di Wood" (UV).

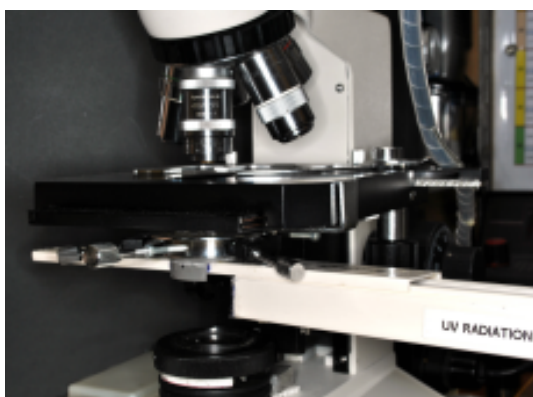


Fig. 30: L'illuminatore a UV è stato rimosso (per scorrimento): la focalizzazione del preparato avviene tramite illuminazione standard.

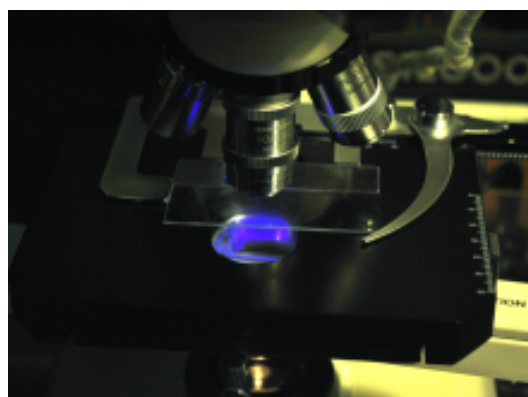


Fig. 31: L'illuminatore per diasopia in radiazione UV in funzione.

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 reflex 34×30 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 trascinamento 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 2,5× e 4×.

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 $\times$);
- 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).

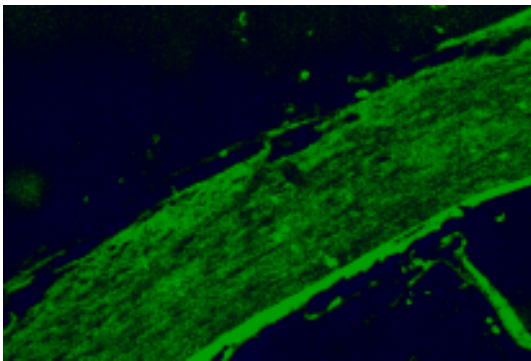


Fig. 32: Sarcoma del bulbo oculare; particolare della parete.
Obiettivo planacromatico 25/0.40; exp.: 1/4" - 400 ISO.

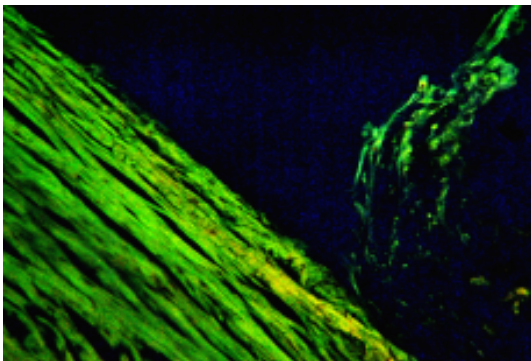


Fig. 33-a: Sarcoma del bulbo oculare; obiettivo apocromatico 40/0.95; exp.: 5" - 1600 ISO.

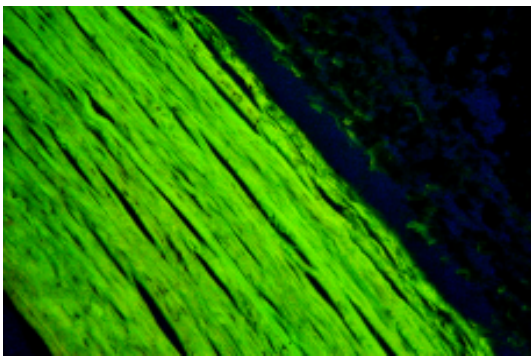


Fig. 33-b: Sarcoma del bulbo oculare (altro campo visivo);
obiettivo apocromatico 40/0.95; exp.: 10" - 1600 ISO.

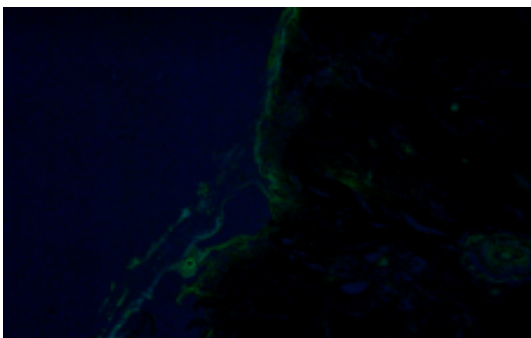


Fig. 34: Linfonodo; obiettivo acromatico 10/0.25; exp.: 5" - 1600 ISO.

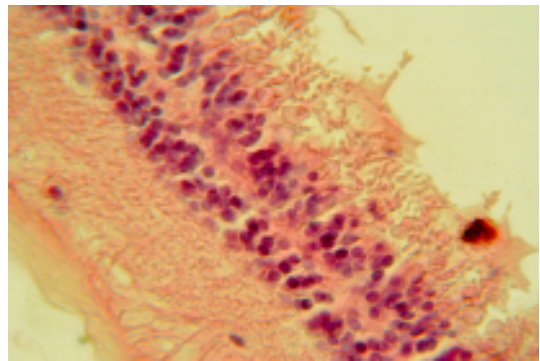


Fig. 35 - a

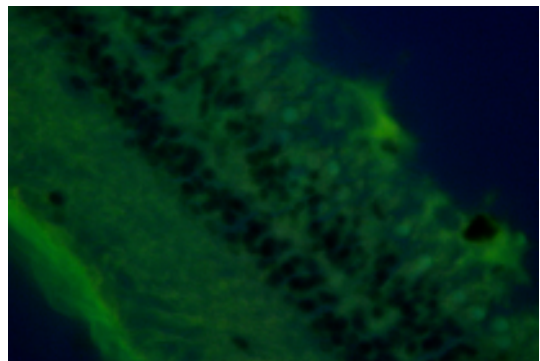


Fig. 35 - b

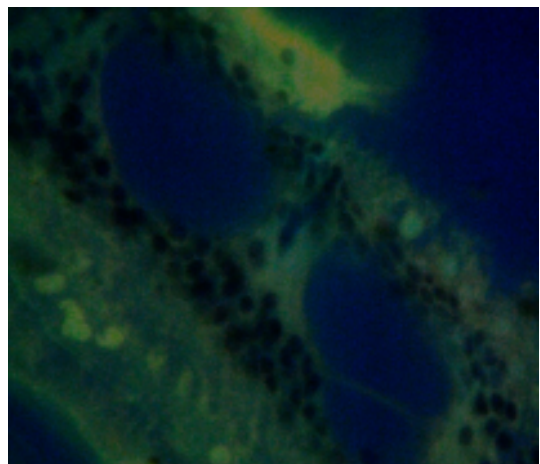


Fig. 35 - c

Fig. 35: Melanoblastoma del bulbo oculare.

- a) in diascopia 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 diascopia con illuminazione in UV (lampada di Wood), obb. apo 40/ 0.95; Ematossilina -Eosina. Exp.: 13"- 800 ISO.
- c) in diascopia 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 luminosa di 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 da Hamperl e Schümmelfeder⁽¹⁰⁷⁾) 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
	giallo-verde	
Porfirine	rosa-rosso	/
Riboflavina	giallo-verde	/
Adrenalina	verde chiaro	solo in ambiente alcalino
Noradrenalina	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⁽¹⁰⁸⁾: 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 ceroidi nelle cellule reticolari del midollo e degli altri organi emopoietici, nonché delle lipofuscine (prodotti di lenta ossidazione dei lipidi) spesso contenute nei macrofagi.

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

(108) - 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⁽¹⁰⁹⁾ e, in seguito, riconfermata da Stich (nel 1959)⁽¹¹⁰⁾ nei *porfiroblasti*⁽¹¹¹⁾.

Degna di nota è la fluorescenza labile presentata dai *fluoresciti di Seggel*⁽¹¹²⁾ 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.

(109) - M. BORST - H. KÖNIGSDÖRFFER, *Untersuchungen über Porphyrin*, Hirzel, Leipzig, 1929.

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

(111) - 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).

(112) - Tipo di eritrociti presenti in percentuale di ~ 0,1% nelle anemie acute e croniche di tipo emorragico, nell'anemia pernicioso 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 ⁽¹¹³⁾.

C. S. Chadwick, dapprima, nel 1958 ⁽¹¹⁴⁾ e nel 1960 ⁽¹¹⁵⁾ e Pearse ⁽¹¹⁶⁾, 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 ⁽¹¹⁷⁾, 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.

(113) - 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.

(114) - 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.

(115) - 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.

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

(117) - 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:

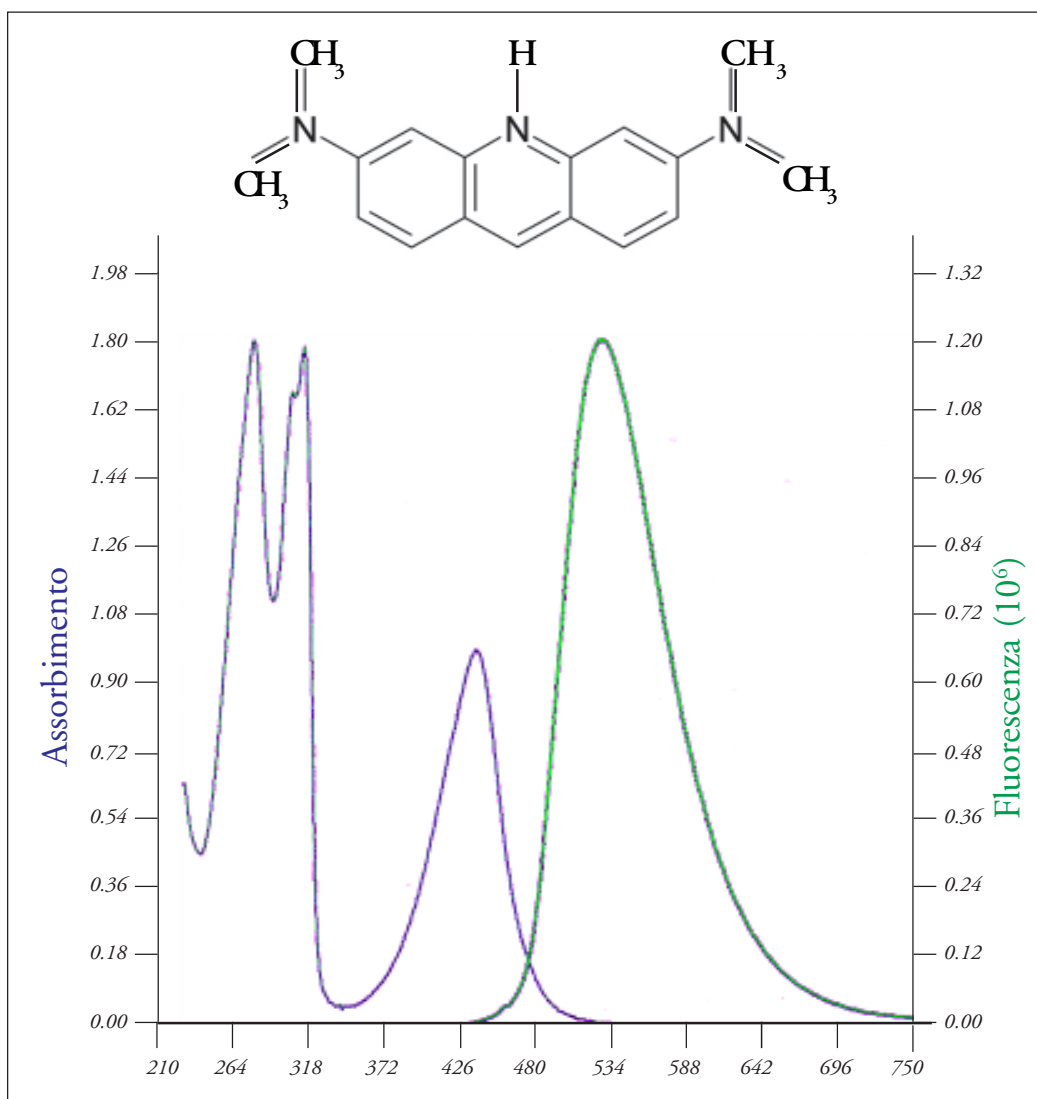


Fig. 36: Formula di struttura e Spettri di assorbimento (violetto) e di emissione fluorescente (verde) dell'Arancio di Acridina

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.

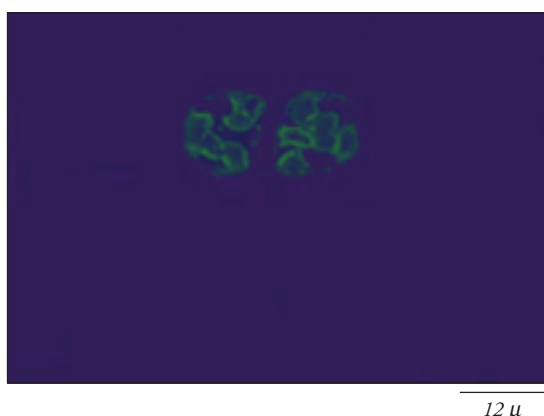


Fig. 37: Due granulociti neutrofili, trattati con arancio di acridina, in fluorescenza con eccitazione in UV; sono evidenziabili praticamente solo i nuclei. Obb. NPL semi-apocromatico 100/1,32 imm. olio.

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 colore 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⁽¹¹⁸⁾. 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 colorante, si ha una maggiore esposizione di radicali acidi⁽¹¹⁹⁾.

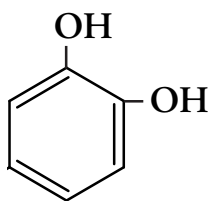
(118) - Vds.: G. CASTOLDI, *cit.*, pag. 205.

(119) - 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*) $[C_6H_6O_2]$, appartengono a quel gruppo di *amine aromatiche* (a stretta analogia con alcuni aminoacidi dai quali vengono ottenute mediante reazione di decarbossilazione), denominate *amine biogene*.

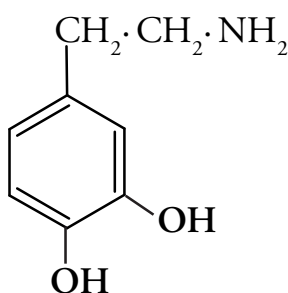
La formula di struttura del Catecolo è:



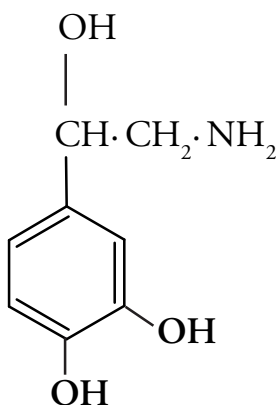
L'esame microscopico in fluorescenza è, attualmente, il metodo di più semplice esecuzione e di maggiore sensibilità.

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.

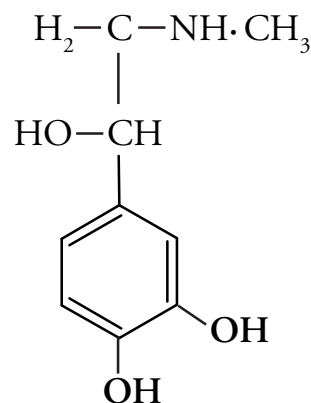
Le catecolamine più attive in questo senso sono la Noradrenalina e la Dopamina, le cui formule di struttura sono:



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*⁽¹²⁰⁾) 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⁽¹²¹⁾.

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*⁽¹²²⁾.

colorazione a 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.

(120) - 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.

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

(122) - 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 inolulato, 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 ⁽¹²³⁾.

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 ⁽¹²⁴⁾ ⁽¹²⁵⁾.

Tuttavia, nel 1959 Eger e Kämmerer dimostrarono che, durante i processi degenerativi del tessuto osseo, le tetracicline vengono depositate anche nelle zone di riassorbimento ⁽¹²⁶⁾. Rall e coll., nel 1957, avevano dimostrato l'insorgere e il persistere della fluorescenza in tessuti tumorali dopo somministrazione di Tetraciclina ⁽¹²⁷⁾.

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 ⁽¹²⁸⁾.

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

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

(125) - 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.

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

(127) - 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.

(128) - 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 a 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⁽¹²⁹⁾ 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⁽¹³⁰⁾ (1953, 1954, 1955), dapprima, e di Lehner e Nowak (1957, 1958⁽¹³¹⁾, 1959⁽¹³²⁾, 1960), poi.

Tuttavia, questi Autori si limitarono a studiare i microrganismi che si possono repertare nei terreni liberi da radici vegetali; Trolldenier e coll.⁽¹³³⁾, 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 questa 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.

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

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

(131) - 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.

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

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

microscopia a 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-Grünwald-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⁽¹³⁴⁾.

Il metodo di colorazione di Papanicolau non si presta molto per la diagnosi oncocitologica nel liquor⁽¹³⁵⁾⁽¹³⁶⁾, per cui si è passati alla microscopia a fluorescenza utilizzando l'Arancio di Acridina secondo il metodo suggerito da Bertalanffy⁽¹³⁷⁾ e coll. nel 1956.

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

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

(136) - 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.

(137) - 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 ⁽¹³⁸⁾ 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 ⁽¹³⁹⁾.

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 ⁽¹⁴⁰⁾.

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 ⁽¹⁴¹⁾.

I principali motivi di perplessità sorgevano 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

(138) - 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.

(139) - 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.

(140) - 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.

(141) - 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;

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.

un 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 ⁽¹⁴²⁾, 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*.

Questa scoperta è stata di grande aiuto nella comprensione di come piccole molecole e mutageni possano interagire con il DNA ⁽¹⁴³⁾.

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

(143) - 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 pagg. 132-133 di questi "Appunti".

microscopia a fluorescenza nell'industria alimentare

La microscopia a 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. ⁽¹⁴⁴⁾

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: $\lambda = 3\ 400 - 5\ 000\ \text{\AA}$			
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
<i>Legenda:</i> - : fluorescenza assente grassetto: fluorescenza intensa normale: fluorescenza di normale intensità <i>corsivo</i>: fluorescenza debole			

Tab. 10

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

IMMUNOFLUORESCENZA

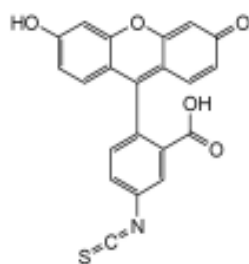
È una tecnica, usata per l'evidenziazione di alcune specifiche componenti tissutali o cellulari, basata sull'uso di fluorocromi coniugati con anticorpi specifici.

Coons⁽¹⁴⁵⁾, nel 1942, e Coons e Kaplan⁽¹⁴⁶⁾, nel 1950, introdussero la tecnica della marcatura di anticorpi per mezzo dell'Isotiocianato di Fluoresceina (FITC).

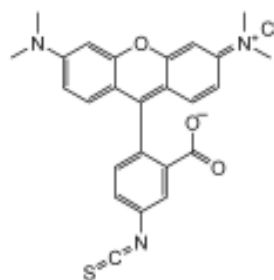
Nel 1958, Wolochow⁽¹⁴⁷⁾ aveva già adottato la tecnica di Coons e Kaplan per identificare i batteri.

Sempre nel 1958, Riggs⁽¹⁴⁸⁾ 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.

(145) - 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.

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

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

(148) - 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*).

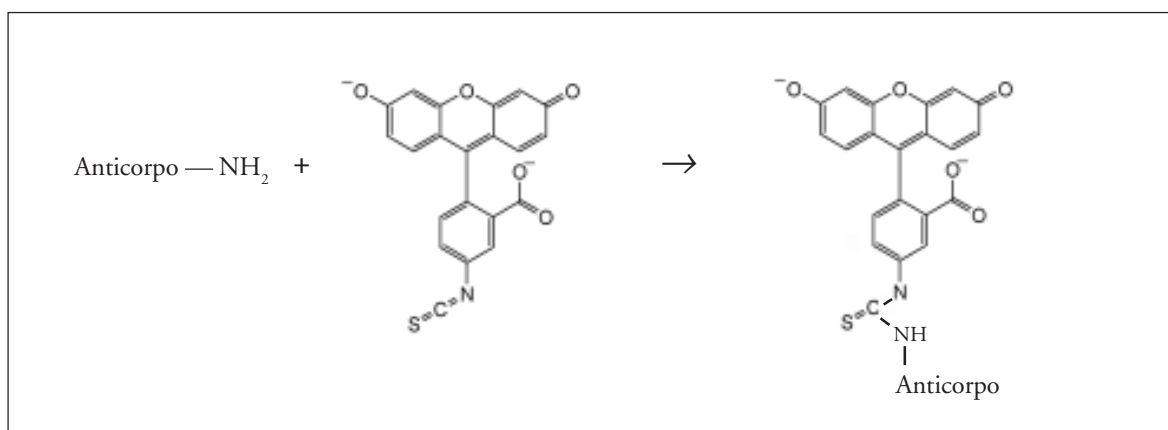


Fig. 38: Coniugazione della FITC con un Anticorpo.

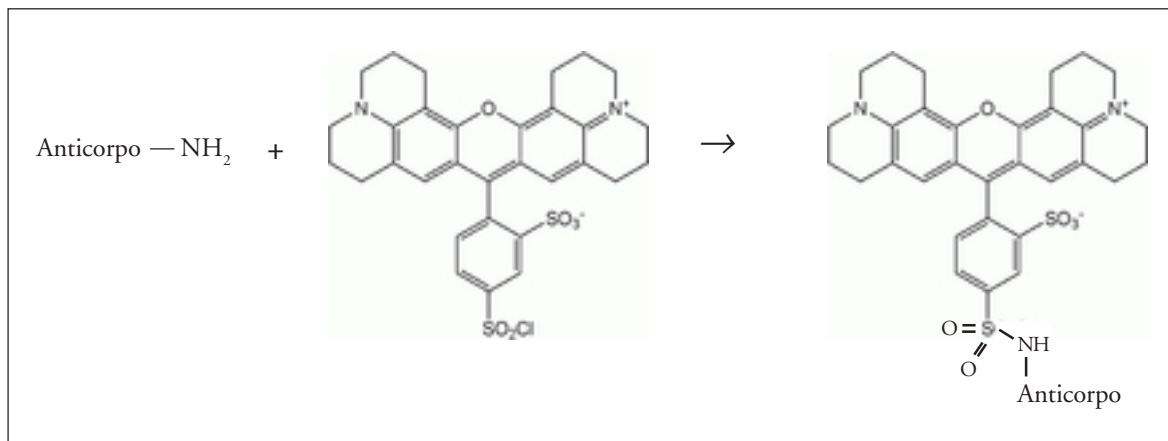


Fig. 39: Coniugazione del TR con un Anticorpo.

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 fluorescenza di 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.

Nel tentativo di fare maggiore chiarezza, le Figure 40 e 41 illustrano sommariamente i processi di immunofluorescenza diretta e indiretta.

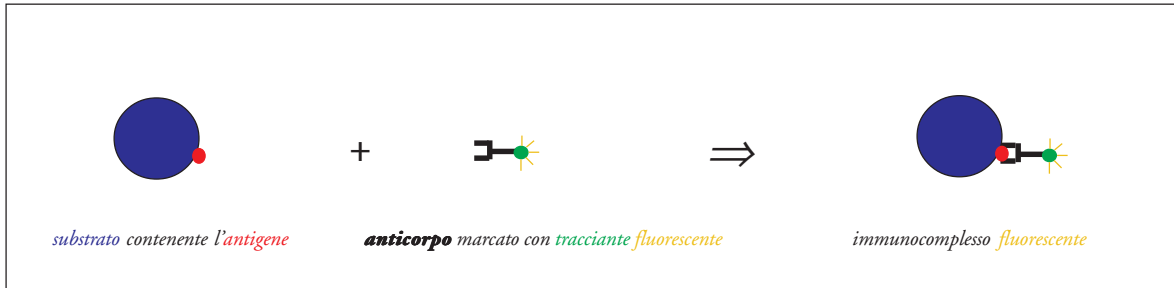


Fig. 40: Immunofluorescenza diretta.

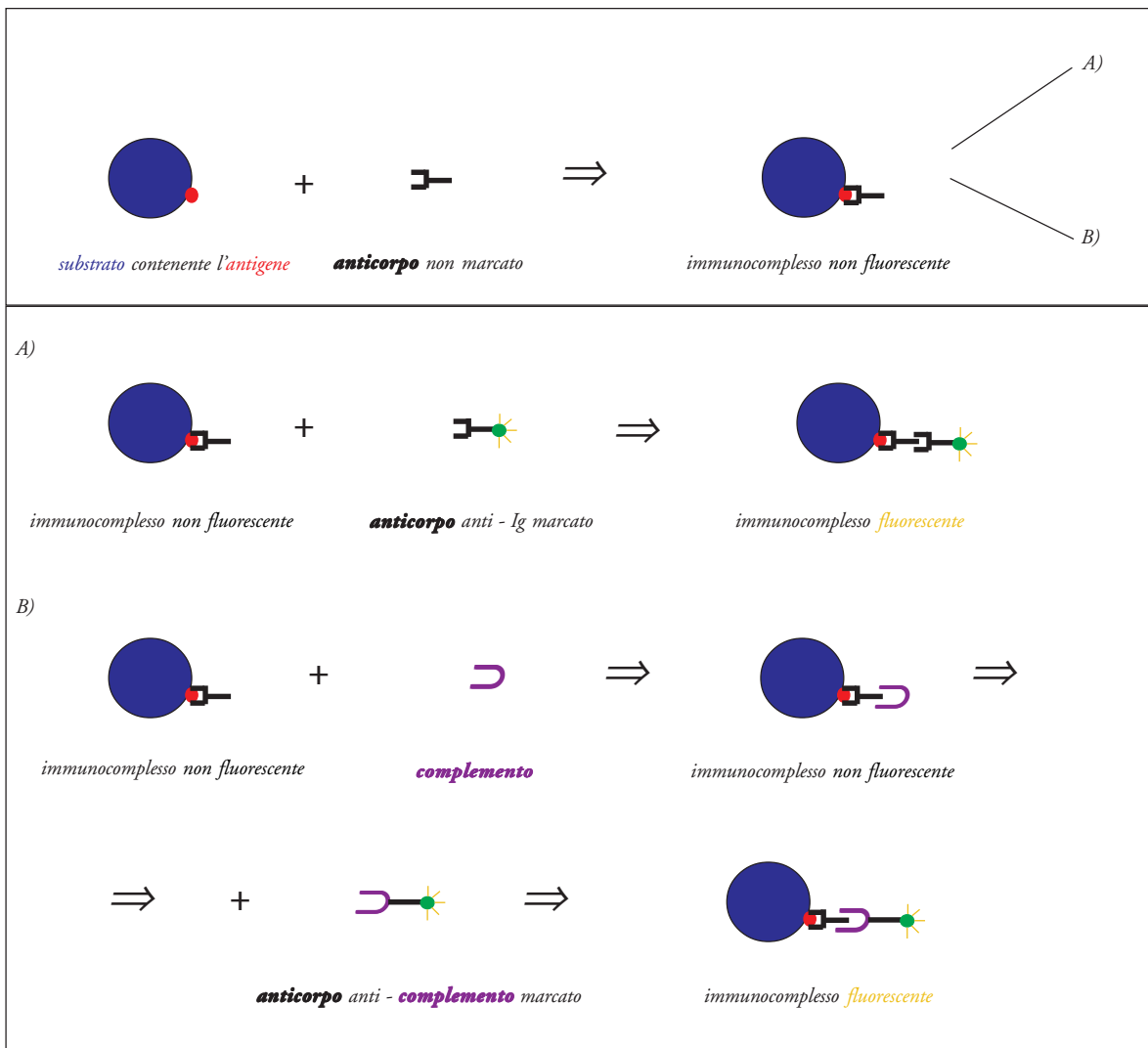


Fig. 41: Immunofluorescenza indiretta.

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⁽¹⁴⁹⁾. Vds.: Fig. 42.

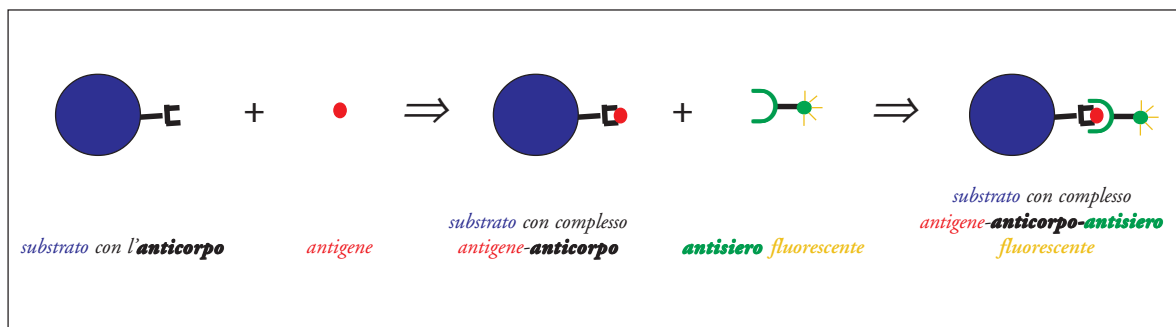


Fig. 42: Metodo di immunofluorescenza "a sandwich"

Il metodo di colorazione del complemento (C'), ideato da Golwasser e Shepard nel 1958⁽¹⁵⁰⁾, 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.

(149) - Vds.: G. CASTOLDI, *Microscopia a fluorescenza*, cit., pag. 210.

(150) - R. A. GOLDWASSER - CC. SHEPARD, *Staining of complement and modifications of fluorescent antibody procedures*, J. IMMUNOL., n.80, 1958, pagg. 122 ss.

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 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⁽¹⁵⁰⁾) 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.

(150) - Vds.: M.BRUSADIN, *I preparati ematologici*, Roma, 2008, pagg. 35, liberamente scaricabile dai siti: <http://www.funsci.com> 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)⁽¹⁵¹⁾; 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.

(151) - 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 ⁽¹⁵²⁾.

(152) - 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;

N. FEDER - R. L. SIDMAN, *Methods and Principles of Fixation by Freeze-Substitution*, J. BIOPHYS. BIOCHEM. CYTOL., vol. 4, 1958, pagg. 593-600;

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. 92 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 vogliano 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-mercaptoetanololo 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-Etanololo 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 ⁽¹⁵³⁾ 0,1 M a pH 6,0 (2').
- 5) Colorare con Arancio di Acridina (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: fluorescenza di colore verde / giallo-verde.

Strutture ricche di RNA: fluorescenza rossa.

(153) - 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).

(154) - 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.

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

H₂O 900 ml

- Sciogliere l'NaCl nell'H₂O e aggiungere la formalina.

- Conservare a temperatura ambiente.

fissativo di Zenker

HgCl₂ 70 g

Na₂SO₄ 25 g

H₂O 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

CaCl₂ 1 g

H₂O 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.com>.

TERRENI DI CULTURA PER CELLULE

PBS (o Terreno di Dulbecco)⁽¹⁵⁴⁾

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)⁽¹⁵⁵⁾

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⁽¹⁵⁶⁾.

(154) - vds.: L. DE CARLI - F. NUZZO, *Culture Cellulari*, Boringhieri, Torino, 1973, pag. 26.

(155) - vds.: L. DE CARLI - F. NUZZO, *ibidem*.

(156) - vds.: S. LAMBERT GARDINI - G. G. COLAROSSO, 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* ⁽¹⁵⁷⁾ della doppia elica, che induce la separazione delle coppie di basi le quali, letteralmente, si innalzano creando una apertura di circa 0,34 nm. Le conseguenze dello "svolgimento" sul filamento del DNA possono consistere in modificazioni strutturali (un allungamento del filamento stesso oppure un

(157) - 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⁽¹⁵⁸⁾.

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 le 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 dell'Etidio Bromuro.

(158) - 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.

APPENDICE B

FISH (*Fluorescent In Situ Hybridization*)

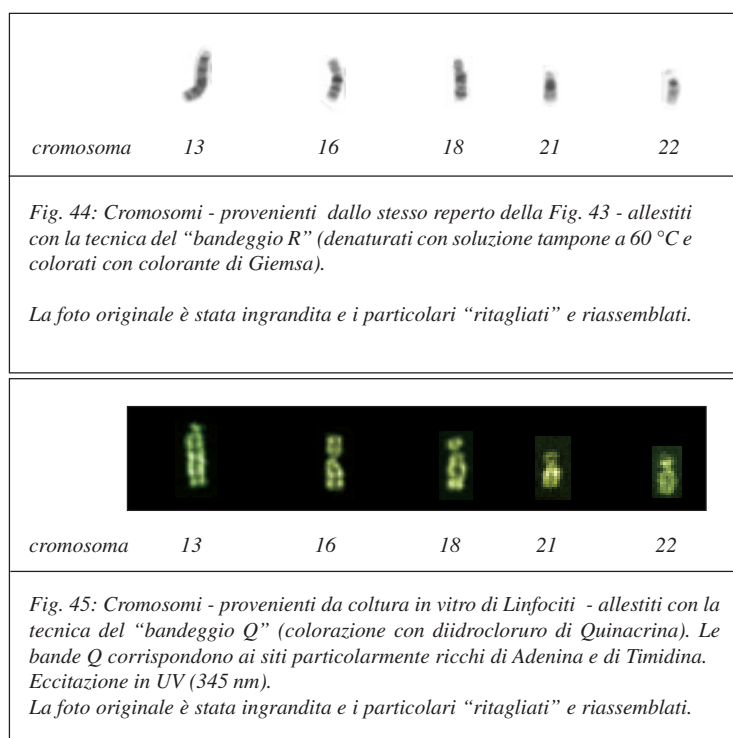
È una tecnica che si avvale, per l'analisi citogenetica, delle sonde nucleotidiche marcate con opportuni fluorocromi per rilevare (e localizzare) la presenza o l'assenza di specifiche sequenze di DNA nei cromosomi.

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 ⁽¹⁵⁹⁾, 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 interfasic ⁽¹⁶⁰⁾.

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 ⁽¹⁶¹⁾.

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).

(159) - 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.

(160) - 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.

(161) - 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 ⁽¹⁶²⁾.

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) ⁽¹⁶³⁾.

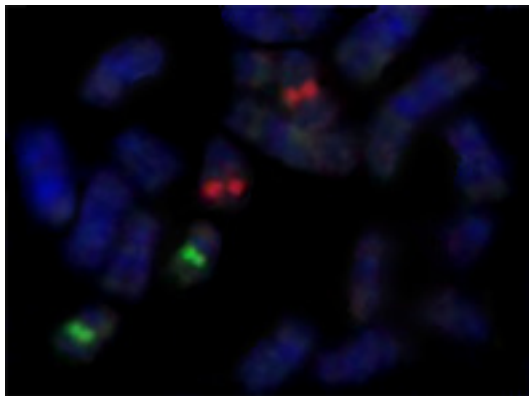


Fig. 46: FISH su Linfociti (coltura).
Metafase normale: si evidenziano 4 segnali:
2 verdi corrispondenti al gene RAR α (cromosoma 17)
2 rossi corrispondenti al gene PML (cromosoma 15)
Sonda LSI Dual Color per PML-RAR α .

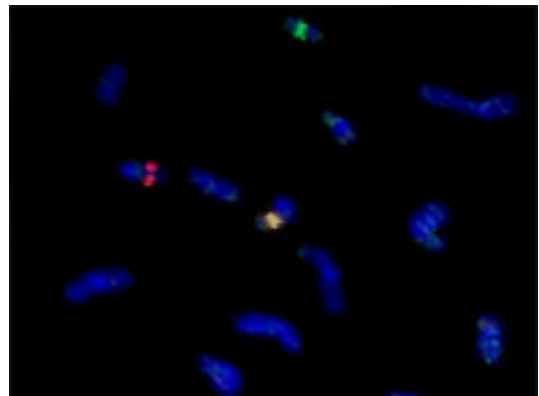


Fig.47: FISH su Linfociti (coltura).
Metafase con traslocazione (si notano un segnale di colore rosso [PML] e uno di colore verde [RARA] nonché un segnale di colore bianco-giallo indicante la fusione).
Sonda LSI Dual Color per PML-RAR α .

(162) - 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.
(163) - 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 ⁽¹⁶⁴⁾.

Il gene del recettore alfa dell'acido Retinoico (situato sul cromosoma 17q21) è interessato specificamente in una traslocazione cromosomica, indicata come t(15;17) ⁽¹⁶⁵⁾, con il gene PML (allocato sul cromosoma 15q22) ⁽¹⁶⁶⁾ e ritenuto probabile fattore di trascrizione ⁽¹⁶⁷⁾.

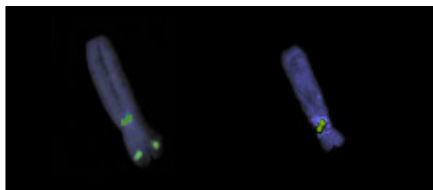


fig. 48: FISH con sonda *locus specifica*.

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" ⁽¹⁶⁸⁾⁽¹⁶⁹⁾.

(164) - Vds.: GOODMAN & GILMAN, *Le Basi Farmacologiche della Terapia*, McGraw-Hill, 2003¹⁰, pagg. 1683 - 1692.

(165) - 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/ Polymerase Chain Reaction to Predict Relapse*, Blood, vol. 82, 1993, pagg. 1264-1269.

(166) - In realtà, sono stati identificati tre tipi di trascritti di fusione PML/RARA: bcr1, bcr2 e bcr3.

(167) - 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>

(168) - 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.

(169) - 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>

APPENDICE C

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

ACETONE
ACETONE, PROPANONE O
DIMETILKETONE (liquidi
chiari 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**

ALCOLI
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
NO

CORROSIVO

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

CORROSIVO

VAPORI DEL SOLVENTE CON L'ARIA
SI
Irrita pelle ed occhi, i vapori creano stati
confusionali
NO

MISURE DI SICUREZZA

STOCCAGGIO

AMBIENTE DI LAVORO

MISURE DI PROTEZIONE
IGIENE

SMALTIMENTO RIFIUTI

Tenere in contenitori sigillati in
luogo asciutto, non fumare
Buona ventilazione, non fumare,
NESSUNA FIAMMA LIBERA
Portare guanti ed occhiali
Usare crema protettiva, lavarsi le
mani dopo il lavoro
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
NO

CORROSIVO

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.

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 the 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, reperibile al sito: <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, (Ed.), *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.

BLACHETT 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, reperibile al sito: <http://rspa.royalsocietypublishing.org/content/139/839/699.full.pdf+html>

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, 2000⁶.

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.

BORST Max - KÖNIGSDÖRFFER Hans, *Untersuchungen über Porphyrrie*, 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/utis/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.

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/brjophthal00360-0029.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.

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.

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.

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.

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.

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 INFECTIOENSKRANKHEITEN UND HYGIENE, ABTEILUNG II,[ZENTRALBL. BAKTERIOL. PARASITENK. INFECTIOENSKR. 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, reperibile al sito: <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.

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/>

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/>

MAY Richard - GRÜNWARD Ludwig, *Über die Färbung von Feuchtpreparaten mit meiner Azur-Eosine methode*, [DEUTSCHE MED. WCHSCHR.] 1909; vol. 35, pagg. 1751-1752.

MCCCLURE 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, reperibile al sito: <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.

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, *Hystochemistry, teoretical and applied*, Churchill, Londra, 3^a ed., 1968 (vol. I)-1972(vol. II).

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.

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 Hirngeschwülst*, 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. GYNÄKOL.]* 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.com/fun3_it/sini/mo/mo.htm

SINI Giovanni Pietro, *La Fluorescenza e le sue applicazioni*, reperibile al sito http://www.funsci.com/fun3_it/sini/eo/o11-fluor.pdf

SLAVÍK Jan, *Fluorescence Microscopy and Fluorescent Probes*, Springer, 1996.

SMITH William F. - HASHEMI Javad, *Scienza e tecnologia dei materiali*, McGraw-Hill, Milano, 2008³.

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.

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.

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)

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.

VENTRUTO Valerio - SACCO Gianfranco - LOMBARDO Fortunato, *Testo-Atlante di Citogenetica Umana*, Springer-Verlag Italia, Milano, 2001.

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.

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.

SANDRITTER W. - THOMAS C., *Istopatologia*, Editoriale Grasso, Bologna, 3^a ed. ita. dalla 7^a ed. tedesca, 1979.

SPRIGGS A. I. - BODDINGTON M. M., *La Citologia dei Versamenti Pleurico, Pericardico e Peritoneale e del Liquido Cerebrospinale*, Ediz. Mediche Scientifiche Internazionali, Roma, 1973.

TURA Sante, *Lezioni di Ematologia*, Editrice Esculapio, Bologna, 2^a ed., 1977.

WHEATER Paul Richard, *Istologia e anatomia microscopica*, Casa Editrice Ambrosiana, Milano, 3^a ed. italiana (a cura di Cremona O. - Marchisio P. C.) dalla 4^a ed. inglese (curata da Young B. - Heath J. W.), 2000.

ZUCKER-FRANKLIN D. – GREAVES M.F. – GROSSI C.E. – MARMONT A.M., *Le Cellule del sangue – Funzioni e patologia*, Atlante, 2 voll., Edi-Ermes, Milano, 2^a ed., 1988.

Per gli approfondimenti in **istochimica**:

BONUCCI Ermanno, *Manuale di Istochimica*, Lombardo Editore, Roma, 1981.

GALLO Piero, *Introduzione allo studio dell'Istochimica*, Lombardo Editore, Roma, 1976.

MASTROSTEFANO Roberto, *Istochimica*, Fonte del Libro Medico, Roma, 1974.

Per la parte più strettamente **analitica**, vedasi:

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.

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 ed., 1978 - 1988.

KARCHER Susan J., *Laboratorio di Biologia Molecolare*, Zanichelli, Bologna, 1998.

PASQUINELLI Filippo, *Manuale per Tecnici di Laboratorio*, 2 voll., Edizioni Rosini, Firenze, 1967.

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.

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.

SINI Giovanni Pietro, *Problemi Tecnici della Microscopia Ottica*, Bologna, 2005, reperibile nel sito http://www.funsci.com/fun3_it/sini/mo/alone.pdf

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^a ed. ital. sulla 26^a 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^a 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^a ed. ital. sulla 6^a 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.

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>

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/>

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/>

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 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 $\vec{v}$ (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: 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 $\hbar/2\pi = 1,054\,571\,628(53) \times 10^{-34} \text{ J}\cdot\text{s}$.

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*) = $2,897\,768\,5(51) \times 10^{-3} \text{ m}\cdot\text{K}$ [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: $6,626\,068\,96(33) \times 10^{-34} \text{ J}\cdot\text{s}$.

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").

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 definisce 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.

tensore: 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:

$$\frac{1}{2}kT \text{ per mole (ovvero } \frac{1}{2}RT \text{ per mole),}$$

ove k è la costante di Boltzmann, R è la costante universale dei gas (il cui valore, secondo la sequenza A070064 dell'OEIS, è: $R = 8,314472 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$) 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].