

## La fluorescenza

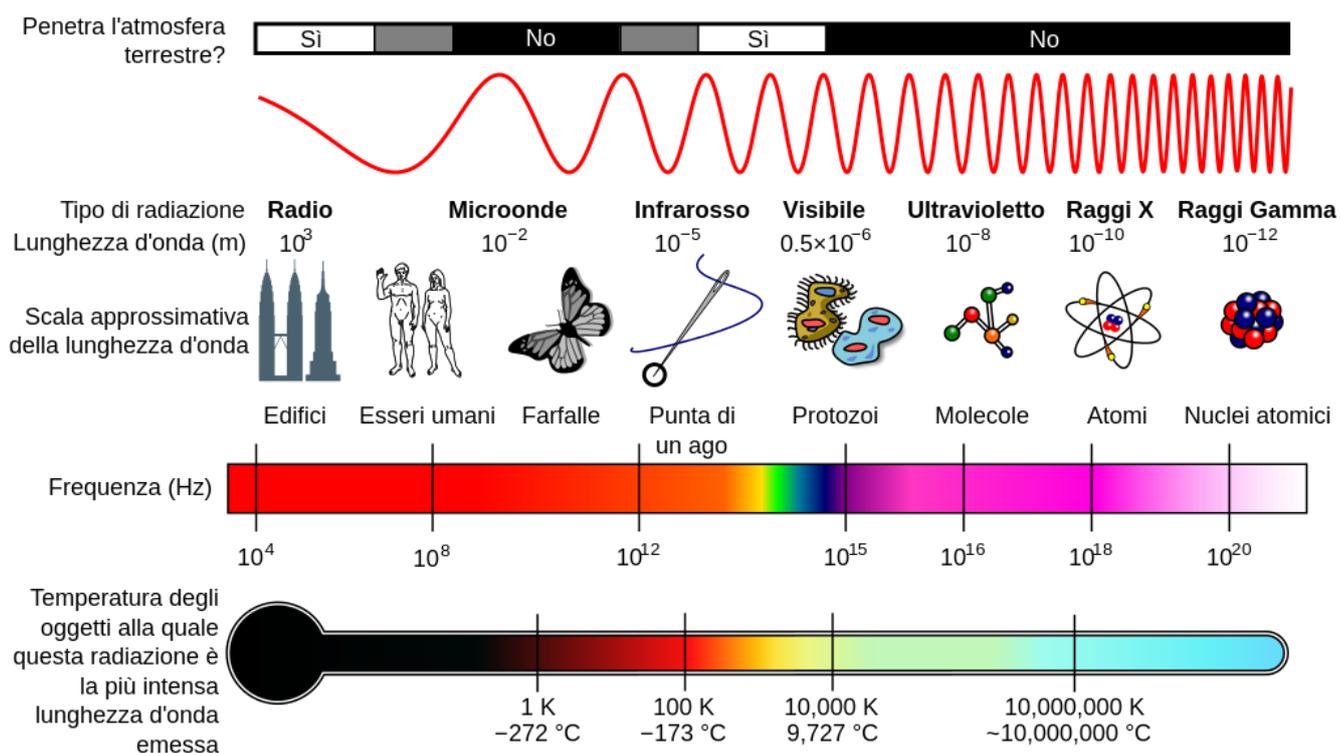
### Cenni generali sulla luce

La **luce**, secondo la teoria attualmente accettata della **meccanica quantistica**, può essere considerata, a seconda dei fenomeni che vengono indagati per studiarla, **sia un'onda che una particella**. Come **particella** (denominata “**fotone**” o “**quanto di luce**”), possiede un'**energia precisa E**, mentre come **onda** è caratterizzata da una **lunghezza d'onda  $\lambda$**  (e quindi da una **frequenza,  $\nu$** ). Tra queste grandezze esistono precise relazioni matematiche:

$$\nu = c/\lambda$$

$$E = h\nu = hc/\lambda$$

in cui **c** è la **velocità della luce nel vuoto** (299.792.458 m/s, pari a 299.792,458 km/s o 1.080.000.000 km/h) e **h** è la cosiddetta “**costante di Planck**”, grandezza fondamentale della meccanica quantistica, che vale  $6,62607015 \times 10^{-34}$  J·s.



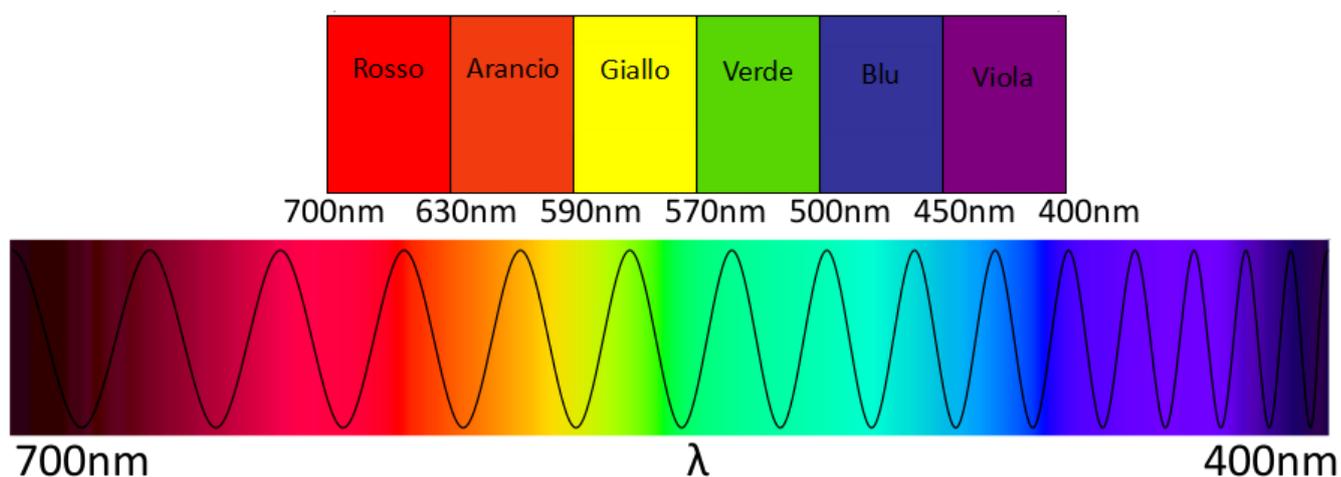
**Figura 1** Caratteristiche principali dello spettro elettromagnetico

Le grandezze e le relazioni appena descritte sono fondamentali per comprendere tutti i fenomeni derivanti dall'**interazione della luce con la materia** (atomi, molecole, aggregati più o meno complessi di molecole, fino ad oggetti macroscopici). Nel caso di **atomi e molecole**, la disciplina che studia la loro interazione con la luce si chiama “**spettroscopia**” **atomica o molecolare**. Nello

studio della **spettroscopia** si osserva o si predice cosa accade quando una **radiazione di una certa frequenza interagisce con diversi tipi di atomi e/o molecole**. In questi casi, la **luce** potrà interagire con un sistema ed essere: a) **assorbita** da questo solo se l'**energia associata alla sua lunghezza d'onda** risulterà **uguale alla differenza tra due livelli energetici i e j del sistema**, rispettivamente di partenza ed arrivo della transizione, b) **emessa**, con una **frequenza dell'onda** legata alla **differenza energetica tra il livello iniziale j e quello finale i**. In entrambi i casi, la relazione tra le caratteristiche della luce assorbita/emessa ed i livelli atomici/molecolari coinvolti è:

$$\Delta E_{ij} = h\nu_{ij} = E_j - E_i$$

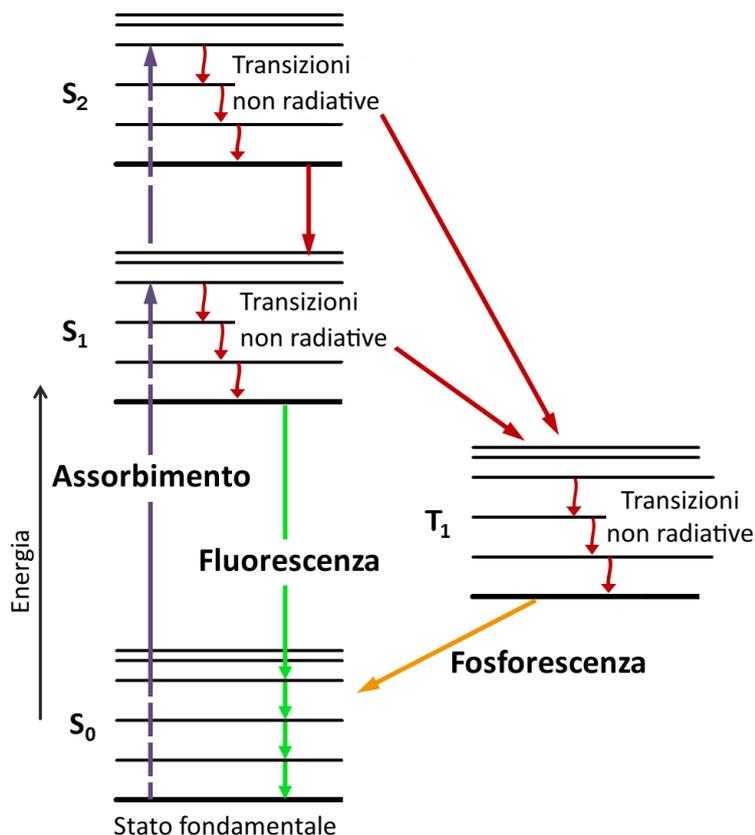
In questo caso, a seconda che stiamo misurando l'assorbimento o l'emissione, misureremo la frazione di luce indirizzata sul sistema che è assorbita da esso, o la quantità di luce prodotta dal sistema (tipicamente dopo essere stato prima "eccitato", cioè **portato ad un livello energetico più alto** di quello "fondamentale" di minima energia, mediante fiamme, scariche elettriche, radiazioni/campi elettromagnetici o reazioni chimiche).



**Figura 2** Spettro visibile con dettaglio schematico dei principali colori (in scala non lineare di  $\lambda$ )

## Il fenomeno della fluorescenza

La **fluorescenza** è un processo a **tre stadi** che avviene in alcune molecole (in genere idrocarburi poliaromatici o eterocicli) chiamati **fluorofori** o **coloranti fluorescenti**. Il processo responsabile della fluorescenza è illustrata dal **diagramma di stato elettronico di Jablonski (Figura 3)**, dove le **linee spesse** rappresentano i **livelli a minor energia per ciascuno stato elettronico**, mentre le **linee più sottili** indicano i **sottolivelli vibrazionali di ciascuno stato elettronico** (pertanto, lo spettro si definisce “**vibronico**”=“**vibrazionale**”+“**elettronico**”)



**Figura 3** Diagramma di stato elettronico di Jablonski con indicazione delle transizioni e dei relativi fenomeni spettroscopici descritti nel testo

### Stadio 1: Eccitazione

Un **fotone** di energia  $h\nu_{EX}$  proveniente da una sorgente esterna come una lampada ad arco, incandescente, a LED, un tubo a scarica o un laser, viene **assorbito dal fluoroforo** nel suo **stato fondamentale energetico**, supposto di **singoleto** (S<sub>0</sub>), creando uno **stato elettronico eccitato di singoletto** (S<sub>2</sub>). Questo processo distingue la **fluorescenza** dalla **chemiluminescenza**, nel quale lo stato eccitato è **popolato mediante una reazione chimica**.

## Stadio 2: emivita dello stato eccitato

Lo **stato eccitato** esiste per un **tempo finito** ( $\tau$ , tipicamente dell'ordine di 1-10 ns). Durante questo tempo, il **fluoroforo** subisce una serie di **variazioni conformazionali** e di possibili **interazioni con l'ambiente** che lo circonda. Se le **variazioni/interazioni** sono relativamente **lente** rispetto al **tempo di vita dello stato eccitato**, quest'ultimo **decadrà riemettendo un fotone uguale a quello di eccitazione**, dando luogo al processo di “**emissione**”. Se invece le **variazioni e/o le interazioni** hanno una **scala temporale paragonabile a  $\tau$** , questi processi possono produrre **due importanti conseguenze**: 1) l'**energia** di  $S_2$  viene **parzialmente dissipata** da uno o più dei processi, portando ad uno stato di **singoleto rilassato** ( $S_1$ ) di **energia minore** di  $S_2$ , dal quale origina l'**emissione di fluorescenza**; 2) il **decadimento** di  $S_2$  avviene **completamente per vie non radiative dirette**, in quanto processi come il **quenching** collisionale o il trasferimento di energia per risonanza (**FRET**), ripristinano completamente la popolazione di  $S_0$ . La **resa quantica di fluorescenza**, che è il rapporto del numero di fotoni di fluorescenza emessi (Stadio 3) rispetto al numero di fotoni assorbiti (Stadio 1), è la **misura dell'intensità relativa (efficienza)** con cui il processo avviene.

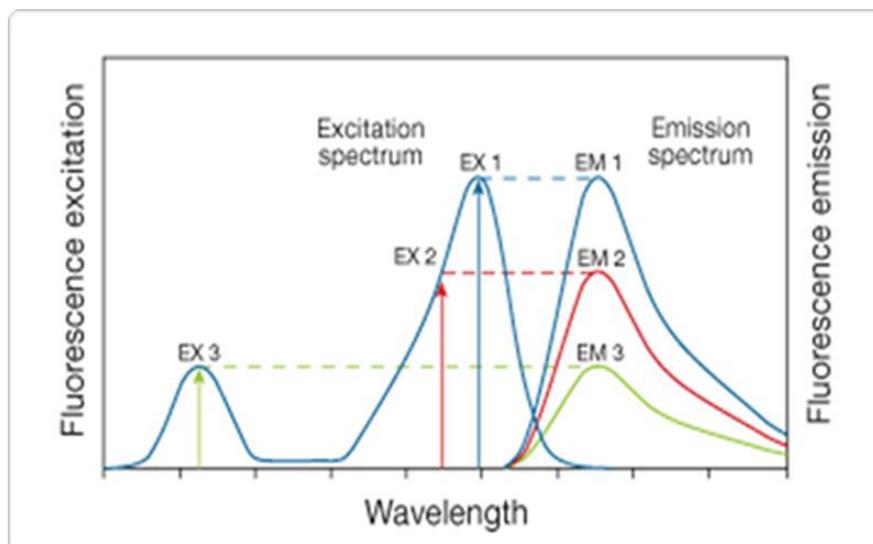
## Stadio 3: Emissione di Fluorescenza

Un **fotone di energia**  $h\nu_{EM}=E(S_1)-E(S_0)$  viene **emesso**, facendo tornare il fluoroforo nel suo **stato fondamentale**. Dal momento che è avvenuta dissipazione di energia nell'emivita dello stato eccitato, l'**energia di questo fotone è minore**, e quindi la lunghezza d'onda maggiore del fotone di eccitazione  $h\nu_{EX}=E(S_2)-E(S_0)$ . La differenza in energia o lunghezza d'onda data da  $(h\nu_{EX} - h\nu_{EM})$  è chiamata **spostamento di Stokes** ed è fondamentale per la sensibilità delle tecniche di fluorescenza perché consente di rilevare l'emissione di fotoni con un basso segnale di fondo, isolato dai fotoni di eccitazione. Al contrario, la **spettrofotometria di assorbimento** richiede **misure di luce trasmessa** relativa ad **alti livelli di luce incidente alla stessa lunghezza d'onda**.

## Lo Spettro di Fluorescenza

Il processo di **fluorescenza** è **ciclico**. A meno che il fluoroforo non venga distrutto nello stato eccitato (fenomeno noto come photobleaching), lo stesso fluoroforo può essere ripetutamente eccitato e rilevato. Il fatto che un singolo fluoroforo possa generare molte migliaia di fotoni è fondamentale per l'**elevata sensibilità di rilevazione** delle tecniche fluorescenti. Per molecole poliatomiche in soluzione, le transizioni elettroniche discrete rappresentate da  $h\nu_{EX}$  e  $h\nu_{EM}$  sono sostituite da un ampio spettro di energia chiamato **spettro di eccitazione** e **spettro di emissione di fluorescenza**, per cui, invece di osservare **singole righe**, lo spettro sarà formato da “**bande**”, caratterizzate da un'altezza massima, da una larghezza (calcolata in vari modi) e da una forma. La larghezza delle bande di questi spettri sono parametri di particolare importanza per applicazioni nei quali due o più differenti fluorofori sono rilevati contemporaneamente. Nelle stesse condizioni, il profilo di emissione è indipendente dalla lunghezza d'onda di eccitazione per via della parziale

dissipazione di energia di eccitazione durante l'emivita dello stato eccitato. L'intensità di emissione è invece proporzionale all'ampiezza dello spettro di eccitazione alla lunghezza d'onda di eccitazione.



**Figura 4** Relazione tra spettri di assorbimento ed emissione in fluorescenza

Alcuni tra i principali fenomeni che possono ridurre o sopprimere completamente l'emissione in uno spettro di fluorescenza (ma che in alcune tecniche sono sfruttati per ottenere informazioni sul sistema o migliorare le caratteristiche di spettri e immagini) sono:

**Quenching** Perdita del segnale di fluorescenza dovuta a interazioni a corto raggio tra il fluoroforo e l'intorno molecolare locale, inclusi altri fluorofori uguali (**self-quenching**). Urti con molecole in grado di assorbire l'energia in eccesso.

**Photobleaching** Distruzione del fluoroforo eccitato dovuta a generazione fotosensibilizzata di radicali liberi, in particolare i cosiddetti ROS (specie reattive dell'ossigeno). L'energia è usata da altre molecole per dissociarsi o per attivare reazioni chimiche.

## La fosforescenza

La **fosforescenza** (Figura 3) è un fenomeno di emissione radiativa, caratteristica di alcune molecole a seguito di eccitazione elettronica, derivante dal decadimento degli elettroni a livelli quantici di minore energia. Si distingue dalla fluorescenza perché in quest'ultima l'effetto è immediato e si interrompe appena viene interrotta la fonte di energia, mentre nella fosforescenza l'effetto continua anche dopo.

Questo fenomeno si osserva in quanto gli elettroni presenti nel livello orbitalico fondamentale passano, per azione di una fonte eccitatrice, che può essere ad esempio un fotone, ad un livello superiore di singoletto (molteplicità spettrale unitaria, presenza di elettroni appaiati). Successivamente, oltre ad altri fenomeni di decadimento non radiativo, il ritorno allo stato

fondamentale stabile con emissione raggiante può avvenire essenzialmente con due modalità: una conversione **singoleto-singoleto** o, alternativamente, un passaggio dal **tripletto** (molteplicità spettrale tre, presenza di due elettroni spaiati) e il successivo decadimento allo stato fondamentale di **singoleto**.

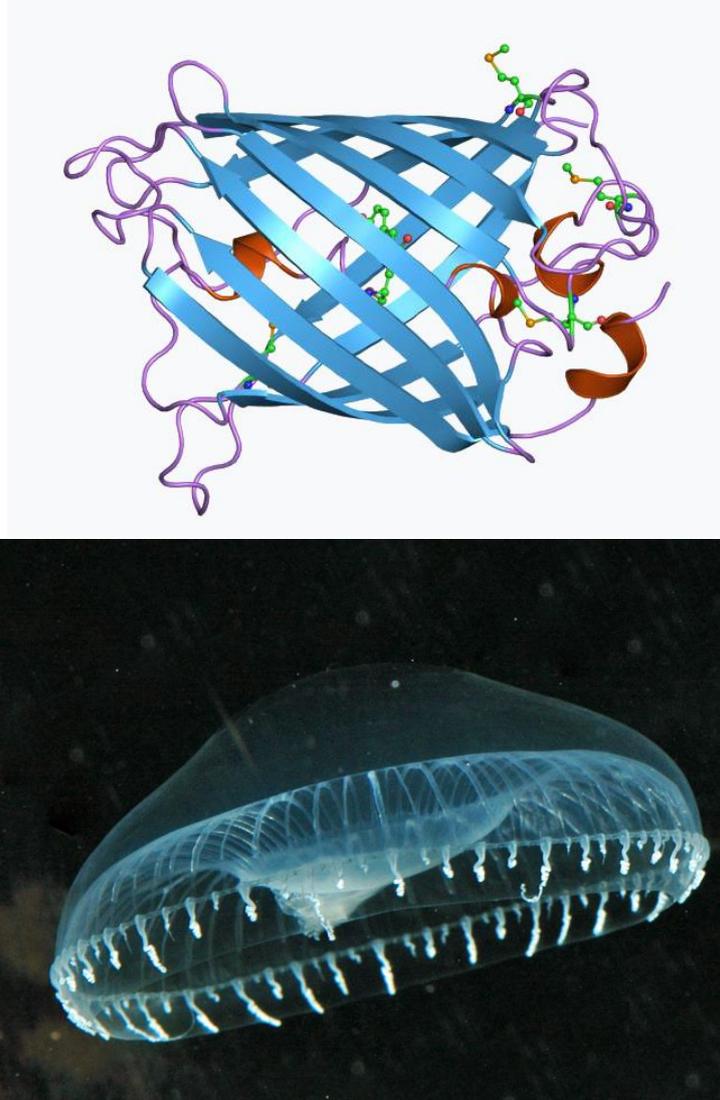
Nel **primo caso** si ha **emissione raggiante fluorescente** mentre nel **secondo** si verifica il fenomeno dell'**emissione fosforescente**. Oltre alla già descritta differenza fondamentale esistente tra i due fenomeni luminescenti, è da notare che il **decadimento** che produce **fosforescenza** è temporalmente **più lungo** ( $10^{-3}$  s contro  $10^{-9}$  -  $10^{-12}$  s) di quello implicante la fluorescenza: la fosforescenza segue con un certo ritardo l'eccitazione e si protrae anche qualche minuto oltre. Questa lentezza è dovuta al fatto che la **transizione da tripletto a singoletto è teoricamente proibita** dalle regole di selezione, implicando una variazione della molteplicità di spin. Tale apparente contraddizione è giustificata dall'interazione spin-orbita. ( $M=2S+1$ , con  $S$  = numero quantico di spin della molecola = somma di spin degli elettroni nella molecola. La maggior parte delle molecole ha  $S=0$  perché le molecole hanno un numero pari di elettroni così che nello stato fondamentale tutti gli elettroni sono appaiati per cui  $M=2(0)+1$  e le molecole si trovano in uno stato di singoletto. Nel caso degli stati eccitati, un elettrone può invertire il suo spin per cui  $S=(+1/2)+(+1/2)=1$  e  $M=2(1)+1=3$ , stato di tripletto T. Molecole con un elettrone spaiato (radicali) si trovano in uno stato di doppietto).

Quindi, il fenomeno della fosforescenza si verifica ogni qual volta l'emissione avviene da uno stato eccitato di tripletto. Poiché lo stato eccitato è uno stato di tripletto, mentre lo stato fondamentale è di singoletto, la diseccitazione è proibita per le regole di selezione; questo si traduce in una minor probabilità che essa si verifichi: una transizione dal più basso livello di tripletto ( $T_1$ ) allo stato fondamentale ( $S_0$ ) ha un tempo di vita medio radiativo maggiore di  $10^{-4}$  s (mentre nel caso della fluorescenza è di circa  $10^{-8}$ - $10^{-9}$  secondi).

A causa del lungo tempo di vita medio radiativo, la probabilità che le molecole in stato di tripletto rilassino attraverso processi non radiativi è molto elevata. Questo avviene sia per urti con altre molecole, che per le interazioni con molecole che posseggono elettroni spaiati (è il caso dell'ossigeno che è estremamente efficiente nel produrre quenching della fosforescenza).

## Fluorescenza: metodi per l'uso della fluorescenza

Uso di **marcatori fluorescenti** per **molecole di interesse biologico** -> possibilità di seguire i fenomeni *in situ* in tempo reale. Lo studio dell'**evoluzione dei processi fisiologici**, la **visualizzazione della localizzazione delle proteine** e la **rilevazione dell'espressione transgenica in vivo**, è possibile grazie alla fusione della **proteina di interesse** con una **proteina fluorescente verde (GFP)** estratta dalla **medusa *Aequorea victoria*** (Figura 5).



**Figura 5** In alto: vista schematica della struttura 3D (PDB:1ema) della proteina GFP (green fluorescent protein). In basso: la medusa *Aequorea victoria* (foto di Sierra Blakely, Attribution, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=4091901>)

**Applicazioni della fluorescenza:**

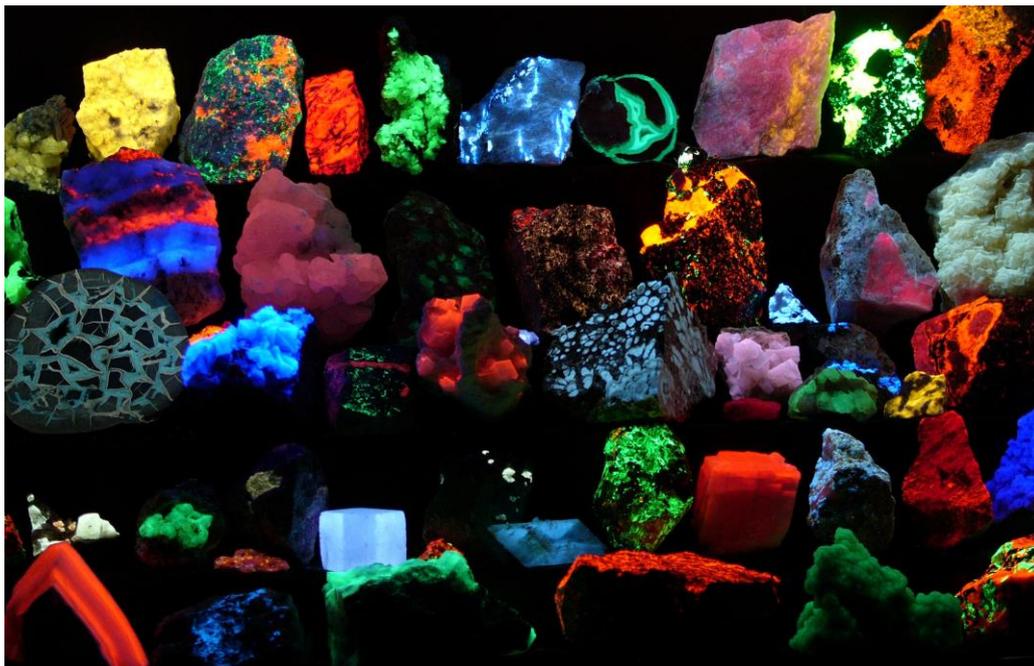
**Dermatologia** (diagnosi dei difetti della cute e delle infezioni (tinea, vitiligine))

**Immunologia** (Rivelazione di batteri in coltura con marcanti fluorescenti)

**Immunoreumatologia** (Presenza di microcristalli nei liquidi sinoviale)

**Oncologia** (Fluorescenza risolta in tempo per la diagnosi)

**Medicina del lavoro** (Analisi di tracce di metalli pesanti - fino alle atto-moli)



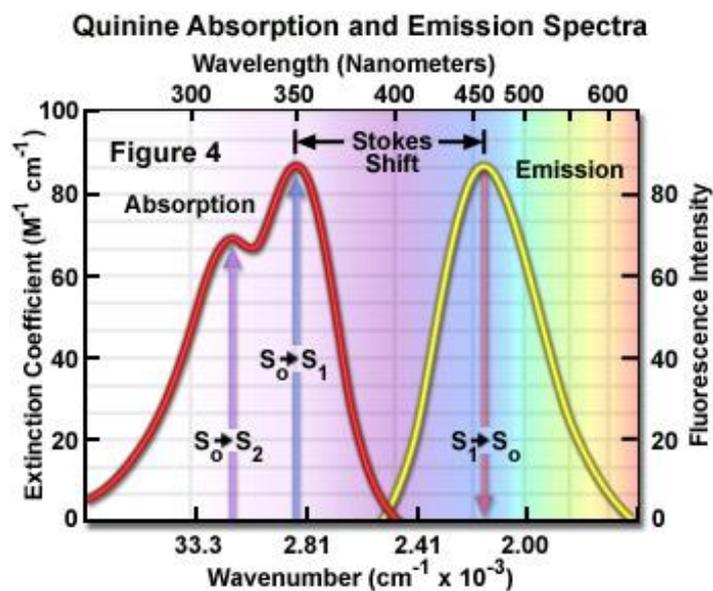
*Figura 6 Minerali fluorescenti*



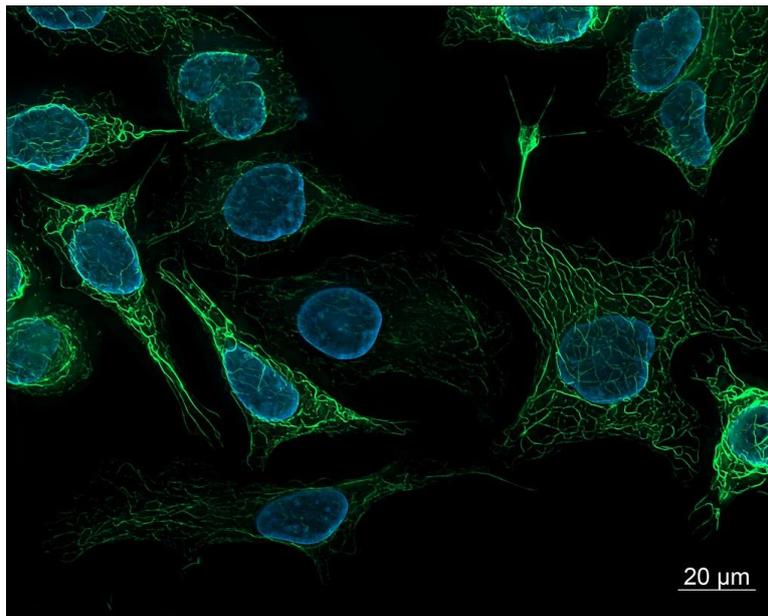
*Figura 7 Proteine fluorescenti*



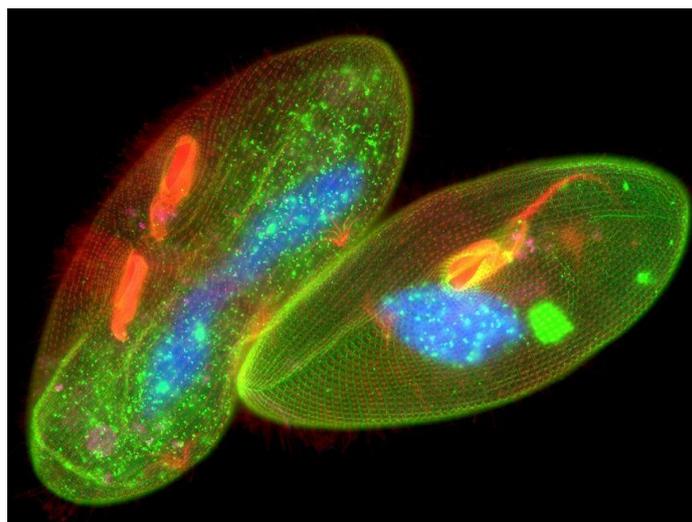
*Figura 8* Tipiche sostanze e coloranti fluorescenti



*Figura 9* Spettro di fluorescenza del chinino, con indicazione dell'assorbimento e dell'emissione



**Figura 10** Applicazione della fluorescenza in microscopia per lo studio di cellule (SK8\_18-2)



**Figura 11** Applicazione della fluorescenza in microscopia per lo studio di organismi (parameci)