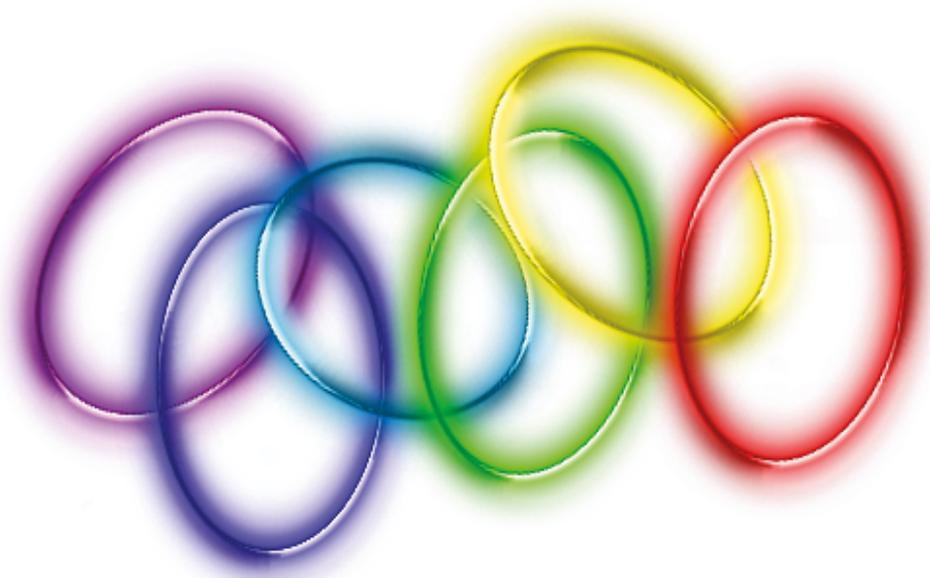


Consiglio Nazionale delle Ricerche
Area della Ricerca di Firenze

Edizione Speciale
Anno della Luce




Book Series

Consiglio Nazionale delle Ricerche
Area della Ricerca di Firenze

Edizione Speciale

ANNO DELLA LUCE

Copyright © 2016 by Italian National Council (CNR), Rome, Italy

The published material is protected by copyright© and is, therefore, the property of the authors, as well as of IFAC-CNR, which is the publisher. Consequently, it can be reproduced only partially (with credit being given to the source) and exclusively for educational purposes. It may not be marketed either on paper or electronically, whether using optical media or through Internet access.

Il materiale pubblicato è tutelato da Copyright© ed è quindi proprietà degli autori, oltre che dell'IFAC-CNR che ne è editore. Pertanto, può essere riprodotto solo parzialmente (citando la fonte) ed esclusivamente per scopi didattici; non può esserne fatto commercio né in forma cartacea né in forma elettronica, sia essa su supporto ottico o tramite accesso in internet.



Printed in Florence
IFAC - Book Series
CNR Publisher
Series Editor: Daniela Mugnai

Grafica in copertina: Daniela Mugnai

Consiglio Nazionale delle Ricerche
Area della Ricerca di Firenze



Edizione Speciale

ANNO DELLA LUCE



Book Series

Indice

Prefazione	p. VII
FARI MOLECOLARI: LUCE NELLE CELLULE <i>Barbara Adinolfi, Francesco Baldini, Ambra Giannetti, Sara Tombelli, Cosimo Trono, Marco Ballestri, Giovanna Sotgiu, Greta Varchi, Sara Carpi, Paola Nieri, Claudio Domenici, Mario Pellegrino</i>	1
IL BUIO E LA LUCE ARTIFICIALE <i>Luciano Massetti, Francesco Sabatini, Andrea Giacomelli</i>	11
LA LUCE NELLE FIBRE OTTICHE: RETICOLI A PASSO LUNGO COME STRUMENTO DI RIVELAZIONE DI PARAMETRI CHIMICI E BIOCHIMICI <i>F. Chiavaioli, C. Trono, A. Giannetti, S. Tombelli, F. Baldini</i>	25
LA STIMA DELLA CLOROFILLA DA SATELLITE NEL MAR LIGURE E TIRRENO SETTENTRIONALE <i>Chiara Lapucci, Carlo Brandini, Alberto Ortolani, Maurizio Pieri, Fabio Maselli, Bernardo Gozzini</i>	41
OLTRE IL VISIBILE: LA RADIAZIONE SOLARE ULTRAVIOLETTA E I SUOI EFFETTI BIOLOGICI <i>G. Zipoli, F. Sabatini, M. Morabito, D. Grifoni</i>	49
STUDIO DELLA PERCEZIONE VISIVA DEI DIPINTI ILLUMINATI CON LUCE LED <i>Elisabetta Baldanzi, Arianna Desideri, Alessandro Farini</i>	65
UNA NUOVA TECNOLOGIA FOTOVOLTAICA: CELLE SOLARI A COLORANTE (DSSC) <i>Gianna Reginato, Alessandro Mordini, Lorenzo Zani, Massimo Calamante</i>	83
LA MISURA DEL COLORE A SUPPORTO DEL RESTAURO DI MANUFATTI ARTISTICI <i>Costanza Cucci, Veronica Marchiafava, Marcello Picollo</i>	93
LA LUCE AL SERVIZIO DELLA MEDICINA: I BIOSENSORI OTTICI A FIANCO DEL LETTO DEL PAZIENTE <i>B. Adinolfi, S. Berneschi, C. Berrettoni, F. Chiavaioli, A. Giannetti, S. Tombelli, C. Trono, F. Baldini</i>	103

Prefazione

Il 20 dicembre 2013 l'Assemblea Generale delle Nazioni Unite, in collaborazione con l'UNESCO e con varie Istituzioni di Ricerca, ha proclamato il 2015 *Anno Internazionale della Luce*.

Questa iniziativa ha voluto riconoscere l'importanza della luce e, più in generale, delle onde elettromagnetiche nella storia della nostra civiltà. Basti ricordare che lo studio delle onde elettromagnetiche ha aperto la strada a nuove forme di comunicazione rendendo il pianeta un villaggio globale, agevolando gli scambi tra nazioni e culture diverse, accrescendo quindi la reciproca conoscenza.

Lo scopo dell'*Anno della Luce* è anche quello di divulgare e far conoscere al grande pubblico come, in questo ambito, la ricerca e le sempre nuove conoscenze scientifiche hanno cambiato, e cambieranno, la vita di tutti noi, giocando un ruolo fondamentale nel nostro quotidiano, sia che si tratti di salute, energia, comunicazione o agricoltura.

Questo testo vuole essere una testimonianza di come l'Area della Ricerca di Firenze, del Consiglio Nazionale delle Ricerche, ha contribuito ad accrescere le conoscenze in questo campo, spaziando dall'uso della luce per scopi medici, allo studio di dipinti e di tecniche per il restauro, alla ricerca di nuove fonti energetiche, alla valutazione di varie forme di inquinamento, e molto altro ancora.

Poiché uno degli intenti principali dell'*Anno della Luce* è quello di diffondere la conoscenza, i testi sono stati scritti, per quanto possibile, in modo divulgativo, proprio per renderli di facile lettura anche al grande pubblico.

IL CURATORE

FARI MOLECOLARI: LUCE NELLE CELLULE

Barbara Adinolfi, Francesco Baldini¹, Ambra Giannetti, Sara Tombelli, Cosimo Trono
Istituto di Fisica Applicata Nello Carrara, CNR, Sesto Fiorentino, Italia

Marco Ballestri, Giovanna Sotgiu, Greta Varchi
Istituto per la Sintesi Organica e la Fotoreattività, CNR, Bologna, Italia

Sara Carpi, Paola Nieri
Dipartimento di Farmacia, Università di Pisa, Pisa, Italia

Claudio Domenici
Istituto di Fisiologia Clinica, CNR, Pisa, Italia

Mario Pellegrino
*Dipartimento di Ricerca Traslazionale e delle Nuove Tecnologie in Medicina e Chirurgia,
Università di Pisa, Pisa, Italia*

1.1 - Introduzione

Perché portare luce nelle cellule attraverso i fari molecolari?

Le molecole di RNA hanno una vasta gamma di funzioni nelle cellule, dal trasporto di informazioni derivanti dal genoma al controllo della sintesi di proteine coinvolte in vari meccanismi cellulari (Figura 1). Queste funzioni si realizzano mediante un controllo dei livelli di espressione proteici e sono strettamente correlate alla localizzazione intracellulare dell'RNA messaggero (mRNA). Metodi *in vitro* che prevedono l'estrazione di RNA da cellule, sono in grado di fornire informazioni sui livelli di espressione di un dato RNA, senza però dare indicazioni sulla localizzazione spaziale e sulle variazioni temporali all'interno di una singola cellula.

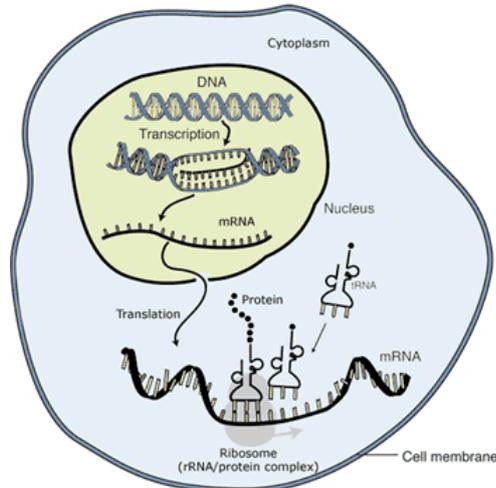


Image adapted from: National Human Genome Research Institute.

Figura 1 – L'RNA è trascritto nel nucleo della cellula; dopo essere stato completamente modificato viene trasportato nel citoplasma e tradotto sui ribosomi. (Da <http://www.genome.gov/>)

L'*imaging* di RNA in cellule vitali consente di ottenere in *real-time* informazioni sulla sintesi, sulle modifiche, sul trasporto e localizzazione di tale RNA. Queste informazioni possono offrire nuove opportunità in vari ambiti, quali lo sviluppo di procedure diagnostiche per la determinazione precoce di varie patologie, primo fra tutti il cancro, il

¹ f.baldini@ifac.cnr.it

monitoraggio della terapia e il *follow-up* del paziente dopo trattamento chirurgico o chemioterapico [1].

Un approccio innovativo che consente l'*imaging* di mRNA intracellulare, prevede l'utilizzo di nanosensori ottici. Tali nanosensori possono essere rappresentati da oligonucleotidi antisense a DNA, strutturati in modo da comportarsi sia da sensore che da farmaco. Il concetto della tecnologia degli antisense come farmaci è immediato: l'uso di una sequenza complementare all'RNA messaggero può inibire la sua espressione e quindi indurre un blocco nel trasferimento dell'informazione dal DNA alla proteina. La possibilità di usare un antisense anche come sensore può venire perseguita progettandolo come un faro molecolare (*molecular beacon*) [2,3]. I fari molecolari (Figura 2) sono sequenze oligonucleotidiche marcate alle due estremità, con un fluoroforo da un lato e un *quencher* dall'altro, progettate in modo da formare una struttura a forcina in assenza della sequenza complementare: in tale conformazione l'emissione di fluorescenza è inibita per la vicinanza tra *quencher* e fluoroforo. L'ibridazione con la sequenza complementare apre la forcina determinando la separazione fisica tra il fluoroforo e il *quencher*, con conseguente emissione del segnale di fluorescenza in seguito ad eccitazione. Conseguentemente il segnale fluorescente risulta essere direttamente legato al legame specifico tra il faro molecolare e l'mRNA target [3].

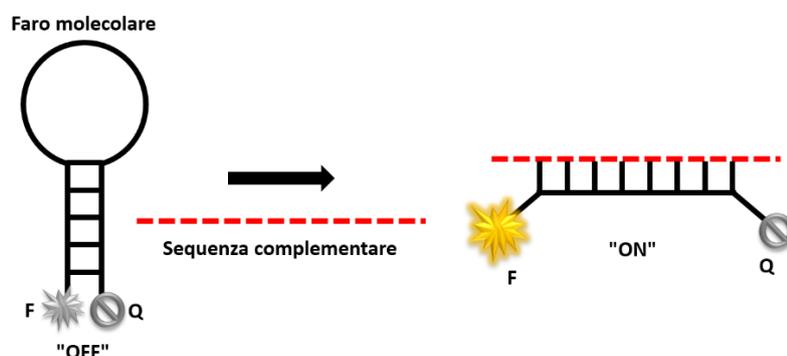


Figura 2 – Schema di un faro molecolare e del suo meccanismo di apertura a seguito dell'interazione con la sequenza complementare

L'utilizzo di fari molecolari per il *sensing* intracellulare pone delle problematiche collegate alla loro stessa natura; il primo ostacolo, infatti, da superare è la difficoltà nell'ingresso in cellula dovuta alla repulsione tra la carica negativa della membrana cellulare e quella propria di tutti gli acidi nucleici. Un altro problema è rappresentato dalla possibile degradazione da parte di enzimi, quali le nucleasi, che può avvenire sia nell'ambiente extracellulare che intracellulare [4,5]. Un ulteriore elemento da considerare è la corretta localizzazione all'interno della cellula del faro molecolare, intimamente connessa alla distribuzione intracellulare dell'RNA target, per esempio citoplasmatico o nucleare.

Per quanto riguarda l'internalizzazione dentro la cellula dei fari molecolari, sono disponibili ed in utilizzo metodi fisici di veicolazione tra cui i principali sono la microiniezione e l'elettroporazione. Altri metodi classicamente utilizzati sfruttano strutture più o meno complesse, completamente biocompatibili, come liposomi e micelle [3].

Con l'avvento di nuovi materiali nanostrutturati, si stanno aprendo altre affascinanti possibilità per il trasporto intracellulare. Lo sviluppo di metodologie efficienti per la modificazione chimica di queste nanostrutture ha portato alla preparazione di nanoparticelle funzionalizzate su cui una grande varietà di molecole, come i fari molecolari, possono essere chimicamente legate. Le nanostrutture modificate possono attraversare la membrana cellulare sotto condizioni ben controllate e mediante meccanismi appropriati. Questi meccanismi possono essere sia endocitosi-dipendenti che endocitosi-indipendenti. La possibilità di avere un ancoraggio con la nanostruttura è un aspetto che elimina o riduce fortemente la perdita della molecola immobilizzata al di fuori della cellula.

Le varie tipologie di nanoparticelle (ovvero particelle con diametro inferiore a 100 nm) hanno mostrato avere anche una migliore selettività rispetto ai liposomi e alle micelle quando il target è un tessuto tumorale. È stato, infatti, osservato che nanoparticelle circolanti si concentrano spontaneamente nei tumori solidi in virtù del maggiore grado di permeabilità vascolare e ritenzione a livello di questi tessuti [6].

Alcuni esempi di possibili target nella patologia tumorale sono gli mRNA codificanti per survivina e Bcl-2, due importanti proteine antiapoptotiche che sono sovraespresse in molti tipi di tumore [7,8].

In particolare, queste proteine sono coinvolte nella regolazione dell'apoptosi cellulare, o morte cellulare programmata, e i loro livelli elevati in diversi tipi di tumore contribuiscono alla resistenza alla terapia antitumorale. Sulla base di questa evidenza, nel corso degli anni si sono tentate strade diverse per ridurre i livelli di espressione. La terapia antisenso, che va a silenziare i geni che codificano per le proteine antiapoptotiche, è considerata una buona strategia per combattere il cancro.

In questo ambito, lo sviluppo di nanoparticelle che trasportino fari molecolari che agiscano da sensori e in grado di inibire il processo di traduzione, rappresenta una strategia promettente per la diagnosi e la terapia antitumorale.

1.2 - Fari molecolari come elementi di riconoscimento molecolare in cellule tumorali umane

1.2.1 - Caratterizzazione dell'agente veicolante il faro molecolare

Allo scopo di valutare la capacità di nanoparticelle di essere internalizzate da cellule tumorali e poter rappresentare un agente idoneo al processo di *uptake* di fari molecolari specifici per mRNA di proteine antiapoptotiche, la procedura sperimentale da seguire prevede vari step:

a) osservazione al microscopio ottico delle cellule prima e dopo il trattamento con concentrazioni scalari di nanoparticelle e valutazione dell'effetto delle nanoparticelle in termini di alterazione morfologica delle cellule e tempo dipendenza dell'effetto;

b) valutazione della vitalità cellulare mediante saggio colorimetrico, in seguito a trattamento delle cellule con concentrazioni scalari di nanoparticelle e valutazione della tempo dipendenza dell'effetto;

c) osservazione al microscopio a fluorescenza delle cellule trattate con le nanoparticelle opportunamente funzionalizzate con fluorofori alla concentrazione e per il tempo di esposizione ottenuti ai punti a) e b);

d) osservazione al microscopio confocale delle cellule trattate con le stesse nanoparticelle alla concentrazione e per il tempo di esposizione precedentemente selezionati.

Queste fasi sono condotte allo scopo di ottimizzare le condizioni sperimentali da utilizzare per garantire l'internalizzazione delle nanoparticelle all'interno delle cellule tumorali in studio.

A questo proposito, è importante scegliere un modello cellulare con caratteristiche morfologiche e genetiche idonee allo studio da realizzare, ovvero, un'adeguata distanza tra il nucleo e la membrana esterna della cellula, al fine di poter verificare la localizzazione intracellulare delle nanoparticelle, e l'effettiva espressione dell'mRNA target.

Un esempio di modello cellulare tumorale umano che risponde a questi requisiti può essere rappresentato dalle cellule di adenocarcinoma polmonare A549 (Figura 3).

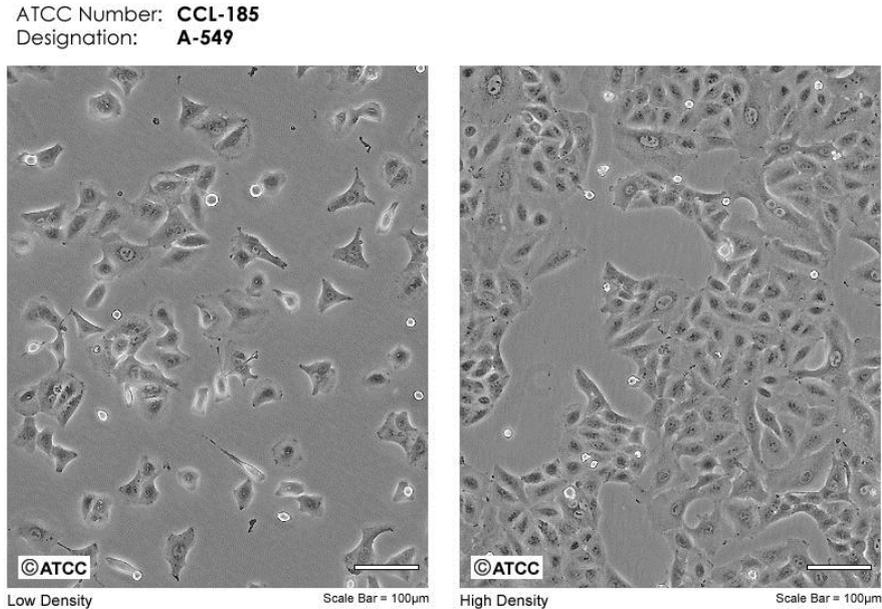


Figura 3 – Fotomicrografia di cellule A549 a diversi ingrandimenti. (Da <http://www.lgcstandards-atcc.org/>)

Per quanto riguarda la scelta delle nanoparticelle, un esempio può essere rappresentato da nanoparticelle di polimetilmetacrilato (PMMA) marcate con un opportuno fluoroforo, ad esempio fluoresceina, per poter monitorare il loro percorso intracellulare. La scelta del materiale che costituisce le nanoparticelle è strettamente correlata alla biocompatibilità: il PMMA è stato recentemente approvato dalla Food and Drug Administration (FDA) per uso umano ed è già utilizzato per la realizzazione di protesi dentarie e ossee [9]. Un'altra caratteristica rilevante delle nanoparticelle è la loro carica superficiale: per garantire l'adsorbimento sulla membrana esterna della cellula (con carica netta negativa) le nanoparticelle vengono opportunamente modificate decorando la loro superficie con gruppi funzionali carichi positivamente, quali NH_4^+ (Figura 4) [10,11].

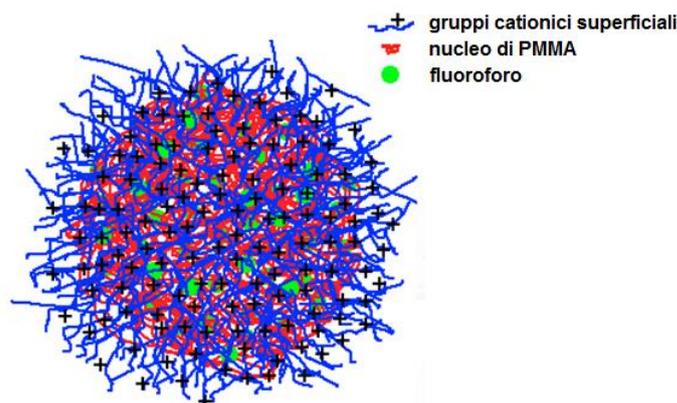


Figura 4 – Rappresentazione schematica di una nanoparticella di PMMA.

Una volta ottimizzati la concentrazione e il tempo di trattamento delle cellule scelte con le nanoparticelle, come indicato ai punti c) e d), si procede con l'osservazione del campione biologico prima al microscopio a fluorescenza e successivamente al microscopio confocale. Nelle figure 5 e 6 sono visualizzate, rispettivamente, immagini al microscopio a fluorescenza di cellule A549 non trattate e delle stesse cellule dopo trattamento per 90 minuti con le nanoparticelle di PMMA alla concentrazione di $10 \mu\text{g/mL}$.

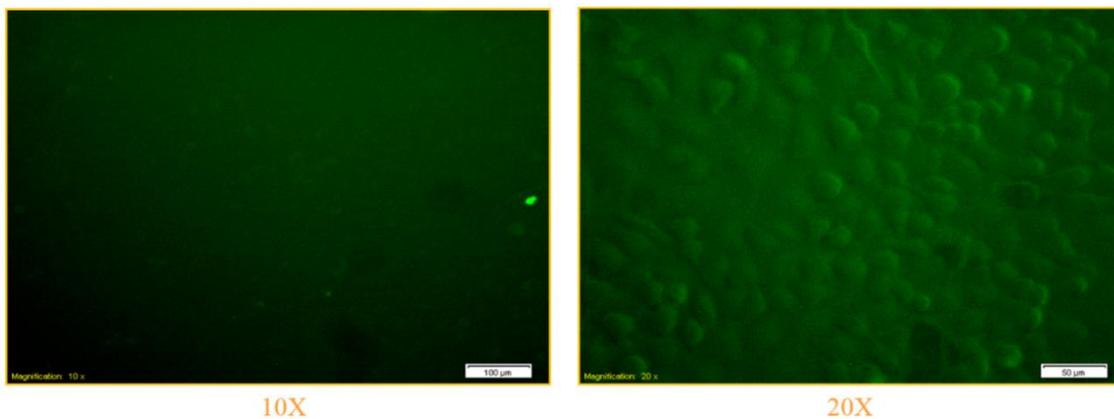


Figura 5 – Immagini al microscopio a fluorescenza di cellule A549 non trattate (controllo). Le immagini sono ottenute con obiettivo 10X (a sinistra) e 20X (a destra). λ_{ex} 488 nm.

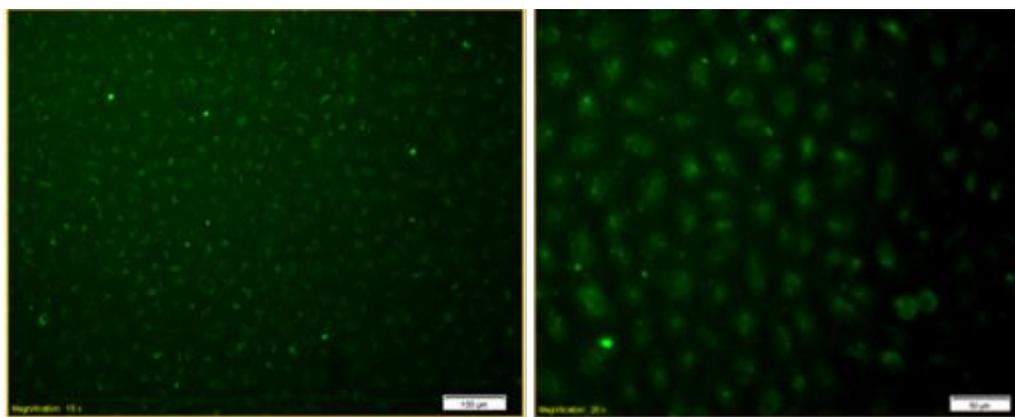


Figura 6 – Immagini al microscopio a fluorescenza di cellule A549 trattate con nanoparticelle di PMMA fluorescenti per 90 minuti. Le immagini sono ottenute con obiettivo 10X (a sinistra) e 20X (a destra). λ_{ex} 488 nm.

Per individuare chiaramente la localizzazione delle nanoparticelle di PMMA all'interno delle cellule A549 nelle condizioni sperimentali sopra indicate, è necessario osservare il campione al microscopio confocale. Nella Figura 7 è riportata una sezione equatoriale dell'intero stack cellulare e in verde si osservano aggregati intracellulari di nanoparticelle. Si può osservare una localizzazione prevalentemente perinucleare, cioè in prossimità del nucleo, e citoplasmatica.

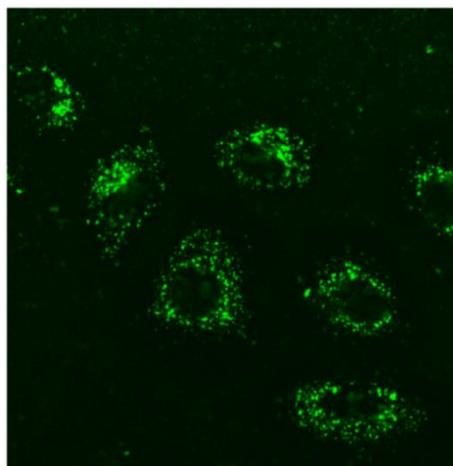


Figura 7 – Immagine al microscopio confocale di cellule A549 trattate con nanoparticelle di PMMA fluorescenti per 90 minuti. λ_{ex} 488 nm.

Prima dell'utilizzo in cellula, il faro molecolare deve essere caratterizzato per studiarne la funzionalità in soluzione, mediante studi di ibridazione con la sequenza complementare sintetica a diverse concentrazioni, ottimizzando vari parametri, al fine di raggiungere la più alta sensibilità. Lo studio dei parametri generalmente valutati, quali la concentrazione del faro molecolare e il tempo di incubazione con la sequenza complementare, può essere condotto in diversi tamponi, compreso il mezzo di coltura in cui verrà somministrato il faro molecolare alle cellule tumorali scelte.

Questi studi hanno rivelato un'alta specificità del faro molecolare per la sequenza complementare, come dimostrato dallo spettro di fluorescenza in presenza della sequenza non-complementare che si sovrappone a quello registrato in presenza del solo mezzo di coltura (Figura 9).

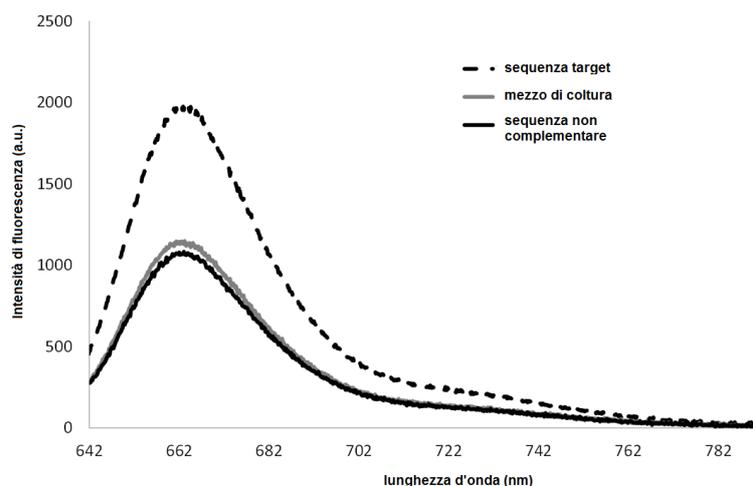


Figura 9 – Spettri di fluorescenza del faro molecolare incubato con la sequenza target, il solo mezzo di coltura e la sequenza non complementare. λ_{ex} 635 nm.

La specificità è stata ulteriormente confermata esaminando il grado di ibridazione del target con la sequenza indicata come faro molecolare *reverse* ovvero la sequenza rovesciata rispetto a quella del faro molecolare (Figura 10).

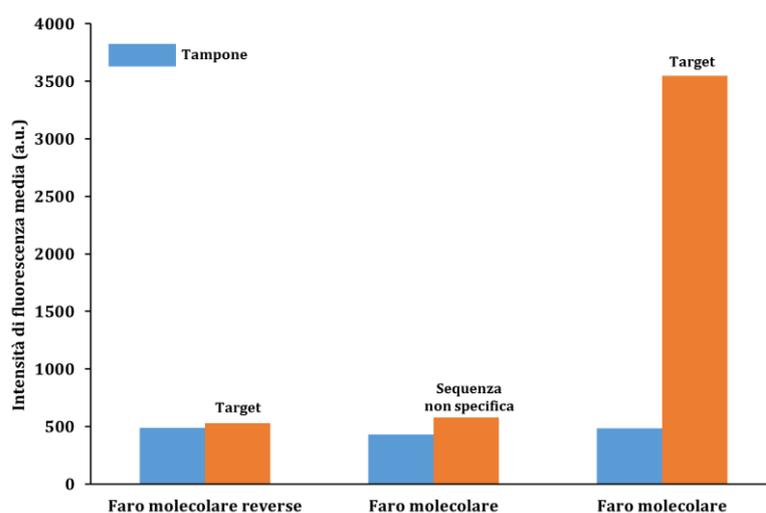


Figura 10 – Intensità di fluorescenza media (a.u.) dovuta all'interazione del faro molecolare reverse con il target del faro molecolare, e del faro molecolare con la sequenza non specifica e con il suo target. λ_{ex} 635 nm.

Per esaminare la capacità del faro molecolare ad agire come elemento di riconoscimento molecolare in soluzione, si procede all'incubazione, a diversi tempi, del faro molecolare, ad una concentrazione stabilita, con concentrazioni crescenti della sequenza complementare sintetica. In questo modo è stato osservato un incremento della fluorescenza del faro molecolare al crescere della concentrazione di sequenza target, risultante in un limite di determinazione di 8 nM (Figura 11).

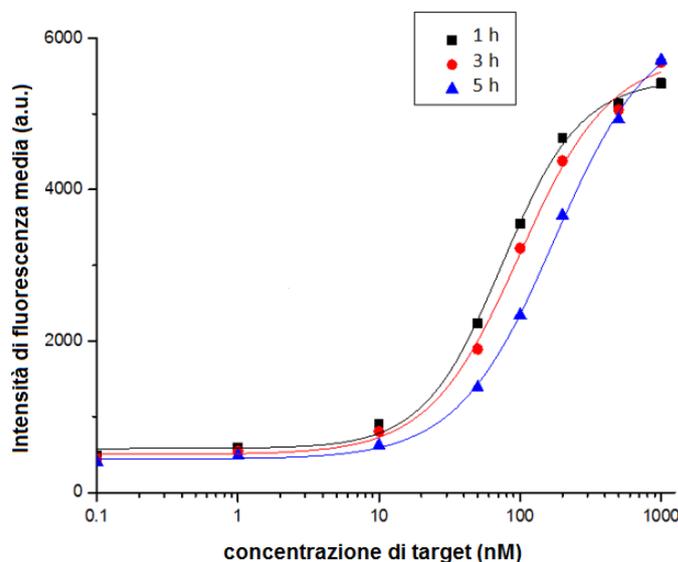


Figura 11 – Curve di intensità di fluorescenza del faro molecolare in funzione della concentrazione della sequenza target a diversi tempi di incubazione (1 ora, 3 ore, 5 ore). λ_{ex} 635 nm.

1.2.4 - Il faro molecolare come elemento di rivelazione intracellulare

Data l'evidenza che acidi nucleici a singola catena non sono in grado di essere internalizzati all'interno della cellula nella loro forma integra, è necessario veicolare il faro molecolare in cellula mediante opportuni sistemi di trasporto [16,17]. Le nanoparticelle di PMMA costituiscono un esempio di veicolanti e data la loro carica netta positiva sono in grado di interagire elettrostaticamente con le cariche negative della catena di nucleotidi che costituisce il faro molecolare. La formazione di questo nano-complesso riduce l'azione di enzimi presenti nel mezzo di coltura cellulare proteggendo il faro molecolare dalla degradazione [5].

La procedura sperimentale prevede l'incubazione delle cellule A549 con il nano-complesso per 90 minuti in mezzo di coltura addizionato di siero fetale bovino (FBS) al 10%. L'analisi di fluorescenza al microscopio confocale ha rivelato spot verdi corrispondenti alle nanoparticelle e spot rossi corrispondenti alla forma aperta del faro molecolare interni alle cellule (Figura 12).

Come si può osservare in Figura 12D, i due segnali di fluorescenza indicano uno scarso grado di colocalizzazione di nanoparticelle e faro molecolare, il che fa ragionevolmente pensare ad un diverso destino intracellulare dei due componenti del nano-complesso.

Il confronto tra i dati ottenuti in cellule tumorali rispetto a quelli ottenuti su un modello di cellule umane non tumorali, ovvero esprimenti bassi livelli di mRNA di survivina, ha confermato la specificità del faro molecolare per il target in studio, escludendo così che il segnale di fluorescenza nel rosso ottenuto nelle cellule tumorali sia dovuto, almeno in parte, ad una degradazione enzimatica del faro molecolare stesso [18,19].

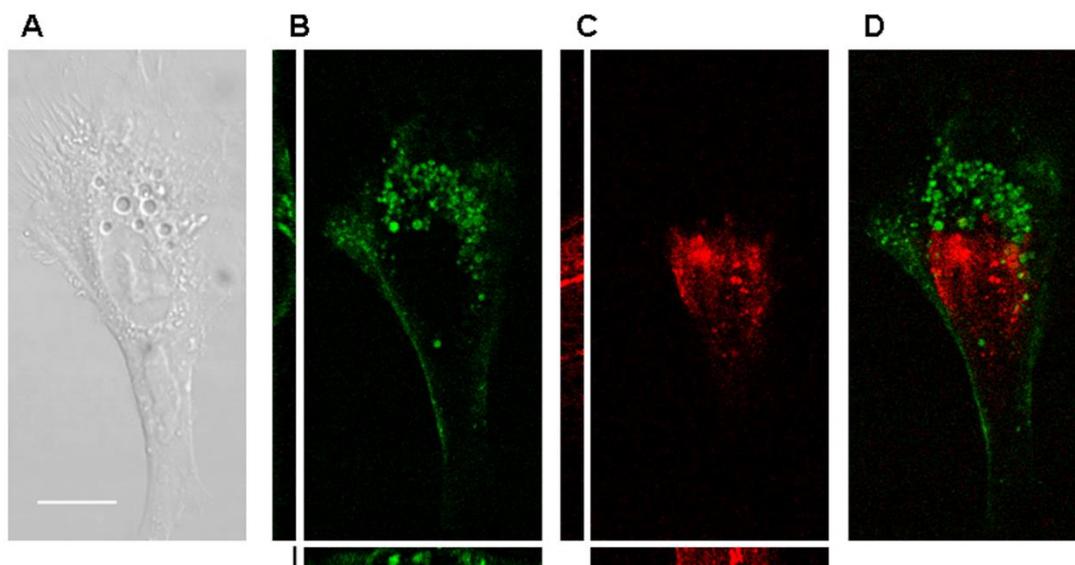


Figura 12 – Immagini al microscopio confocale di una cellula A549 trattata per 90 minuti con il fari molecolare adsorbito sulle nanoparticelle di PMMA. A) Immagine in trasmissione (DIC). B) Immagine in fluorescenza (λ_{ex} 488 nm). C) Immagine in fluorescenza (λ_{ex} 635 nm). D) Sovrapposizione delle immagini B e C. Proiezioni yz e xz dello stack visualizzato.

1.3 - Conclusioni e prospettive

L'utilizzo in medicina di nanosensori ottici capaci di monitorare in tempo reale marker biologici che hanno un valore diagnostico e prognostico per patologie o che indicano il grado di risposta alla terapia, costituisce una nuova e promettente risorsa. Tramite l'utilizzo di nanostrutture capaci di penetrare la membrana cellulare è possibile trasportare all'interno delle cellule sonde ottiche fluorescenti come i fari molecolari. Questa peculiarità, offerta solamente dai sensori ottici, ha aperto enormi prospettive per un *imaging in vitro* ed *in vivo* in grado di studiare in tempo reale meccanismi e processi cellulari e di valutare la risposta delle stesse cellule ai farmaci. È importante sottolineare, inoltre, come i sensori submicrometrici abbiano una sensibilità maggiore di quelli micro/macroscopici. Questo aspetto è da attribuire al fatto che sensori nanostrutturati hanno dimensioni confrontabili con quelle delle molecole da determinare.

Oltre a fornire un *sensing* intracellulare, l'utilizzo di fari molecolari a singola elica di DNA permette, in seguito al legame con l'RNA messaggero target, di inibire il processo di traduzione proteica riducendo i livelli di proteine coinvolte, per esempio, nei processi di genesi e proliferazione tumorale.

La combinazione di *sensing* e di effetto silenziante è racchiusa nel termine teranostica.

Ringraziamenti

Gli autori ringraziano il progetto bandiera del CNR Nanomax Encoder per il finanziamento.

Bibliografia

1. Avnesh S. Thakor MD, Sanjiv S. Gambhir MD, *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 63, 395. (2013)
2. Santangelo P, Nitin N, Bao G, *Ann Biomed Eng*, 34, 39. (2006)
3. Giannetti A, Tombelli S, Baldini F, *Anal Bioanal Chem*, 405, 6181. (2013)
4. Teo PY, Cheng W, Hedrick JL, Yang YY, *Adv Drug Deliv Rev*, S0169-409X(15)00239-2. (2015, in press)
5. Bishop CJ, Kozielski KL, Green JJ, *J Control Release*, 219, 488. (2015)
6. Kobayashi H, Turkbey B, Watanabe R, Choyke PL, *Bioconjug. Chem*, 25, 2093. (2014)
7. Baran, M.; Möllers, L.N., Andersson, S. Jonsson, I.M., Ekwall, A.K., Bjersing, J., Tarkowski, A., Bokarewa, M.J., *Cell Mol Med*, 13, 3797. (2009)
8. Mera, S., Magnusson, M., Tarkowski, A., Bokarewa, M, *J Leukoc Biol*, 83, 149. (2008)
9. Lou P-J, Cheng W-F, Chung Y-C, Cheng C-Y, Chiu L-H, Young T-H, *J. of Biomedical Materials Research Part A*, 849. (2007)
10. Maurizi L, Papa AL, Dumont L, Bouyer F, Walker P, Vandroux D, Millot N, *J Biomed Nanotechnol*, 11, 126. (2015)
11. Li JJ, Kawazoe N, Chen G. *Biomaterials*, 54, 226. (2015)
12. Brun, S.N., Markant, S.L., Esparza, L.A., Garcia, G., Terry, D., Huang, J.M., Pavlyukov, M.S., Li, X.N., Grant, G.A., Crawford, J.R., Levy, M.L., Conway, E.M., Smith, L.H., Nakano, I., Berezov, A., Greene, M.I., Wang, Q., Wechsler-Reya, R.J., *Oncogene*, 34, 3770. (2014)
13. Liu, Y.B., Gao, X., Deeb, D., Brigolin, C., Zhang, Y., Shaw, J., Pindolia, K., Gautam, S.C., *Int J Oncol*, 45, 1735. (2014)
14. Fukuda, S., Pelus, L.M., *Mol Cancer Ther*, 5, 1087. (2006)
15. Nitin, N., Santangelo, P.J., Kim, G., Nie, S., Bao, G., *Nucleic Acids Res*, 32, e58. (2004)
16. Saengkrit N, Sanitrum P, Woramongkolchai N, Saesoo S, Pimpha N, Chaleawlert-Umpon S, Tencomnao T, Puttipipatkachorn S, *Carbohydr Polym*, 90, 1323. (2012)
17. Mastrobattista E, van der Aa MA, Hennink WE, Crommelin DJ, *Nat Rev Drug Discov*, 5, 115. (2006)
18. Adinolfi, B.; Pellegrino, M.; Baldini, F., *Biomed Pharmacother*, 69, 228. (2015)
19. Adinolfi, B.; Giannetti, A.; Tombelli, S.; Trono, C.; Baldini, F.; Pellegrino, M.; Sotgiu, G.; Varchi, G., *Proceedings of the 2015 18th AISEM Annual Conference, AISEM 2015*, art. no. 7066788. (2015)

IL BUIO E LA LUCE ARTIFICIALE

Luciano Massetti¹, Francesco Sabatini
CNR - Istituto di Biometeorologia
Andrea Giacomelli
Attivarti.org

1.1 - Introduzione

L'Istituto di Biometeorologia (Ibimet) è un istituto di ricerca del Consiglio Nazionale delle Ricerche che opera nella definizione di strategie e nello sviluppo di tecnologie e soluzioni operative che contribuiscano alla resilienza ed alla sostenibilità dei sistemi territoriali e produttivi rispetto alle emergenze globali che interessano le risorse agroalimentari e no- food, il clima e la meteorologia.

Tra i fattori ambientali principali e caratterizzanti le attività dell'Istituto si trovano le variabili meteorologiche e climatiche e la loro influenza sulle specie viventi ed in particolare quelle vegetali. Recentemente l'Istituto ha iniziato a considerare tra le sue attività di studio un ulteriore fattore antropico che può influenzare l'ambiente in cui viviamo, la luce artificiale notturna. Questo interesse è maturato a seguito del coinvolgimento dell'Ibimet in un'azione COST finanziata dalla Comunità Europea denominata Loss of the Night Network (LoNNe) o Perdita della notte. Lo scopo di questo capitolo è quello di descrivere le attività sinora svolte dall'Ibimet sia a livello regionale sia a livello internazionale nell'ambito della Cost Action LoNNe.

La luce artificiale notturna costituisce un elemento essenziale della civiltà moderna, consentendo di illuminare aree residenziali, industriali e infrastrutture dopo il calar del sole. Per quanto ormai dati per acquisiti, i vantaggi dovuti alla luce artificiale sono immensi, sia in termini di prolungamento degli orari per svolgere qualsiasi attività, che per garantire condizioni di sicurezza: negli anni si è giunti a una tale diffusione di impianti di illuminazione che il loro effetto è chiaramente visibile dallo spazio (Figura 1). Allo stesso tempo, la quantità e la tipologia di luce emessa, spesso eccessiva rispetto alle effettive necessità, determina effetti negativi, alcuni dei quali acclarati da tempo, e altri tuttora in corso di studio. Tali effetti possono essere ripartiti in cinque macro-aree.

Spreco di energia: sulla base di analisi (Poggio et al., 2011) svolte in nuclei abitati in cui sono stati eseguiti lavori di adeguamento degli impianti di illuminazione, in modo da azzerare il flusso luminoso verso l'alto, e installando lampade di potenza inferiore, è stato possibile misurare risparmi notevoli in termini di energia elettrica per illuminazione pubblica (raramente inferiori al 50%), con un conseguente risparmio di emissioni e, fattore non trascurabile, un risparmio economico.

Effetti in campo ecologico: la letteratura riporta numerosi casi di studio legati all'impatto della luce su varie specie animali notturne, con effetti a livello genetico, fisiologico, sugli spostamenti quotidiani, sulle migrazioni, sul comportamento riproduttivo e sulla mortalità (Gaston et al. 2015).

Deterioramento del paesaggio: la sempre maggiore quantità di luce diretta verso l'alto, diffusa dall'atmosfera, va a coprire la naturale luminosità della volta celeste. In questo modo viene compromessa la possibilità di osservazioni astronomiche, con ripercussioni diverse per astronomi e astrofili (Aubé et al., 2013). Moltissime persone sono poi sensibili al cielo stellato e l'eccesso di illuminazione sta riducendo le zone del globo caratterizzate da un cielo di buona qualità (generalmente quello in cui la Via Lattea sia visibile a occhio nudo).

¹ l.massetti@ibimet.cnr.it



Figura 1 - Image number ISS041-E-90188; Italy at night, panorama. "Image courtesy of the Earth Science and Remote Sensing Unit, NASA Johnson Space Center; <http://eol.jsc.nasa.gov>"

Sicurezza: la presenza di illuminazione notturna è finalizzata a ridurre la percentuale di "zone buie" in città e nelle infrastrutture viarie al fine di prevenire il potenziale verificarsi di episodi criminosi e a diminuire la possibilità di incidenti. Tuttavia esistono diversi studi e casi pratici che dimostrano che i casi in cui è stata ridotta l'illuminazione stradale non sempre hanno portato automaticamente a un incremento di episodi criminosi o incidenti (Marchant, 2004).

Salute umana: l'uomo regola tutta una serie di funzioni fisiologiche (ad esempio il sonno e la veglia) tramite un ritmo circadiano basato sulla naturale alternanza del giorno e della notte, il cui segnale principale è dato dalla presenza di luce blu (condizione tipica di giorno, con il cielo sereno); la luce artificiale notturna, specialmente la componente blu, può alterare il nostro orologio biologico e indurre una riduzione di produzione della melatonina durante la notte (Reiter et al., 2007).

Le soluzioni per contenere le varie forme di impatto sono definite da tempo, soprattutto per quanto riguarda la quantità di flusso luminoso, e hanno costituito la base di normative in vigore in varie regioni italiane. Le normative più recenti, come ad esempio quella dell'Alto Adige (Provincia Autonoma di Bolzano, 2012), oltre a definire criteri per il contenimento della direzione del flusso luminoso hanno anche iniziato a tenere conto della qualità della luce, imponendo soglie sulla temperatura di colore delle sorgenti di illuminazione.

Mentre sono tuttora in corso numerosi studi per quantificare l'effetto della luce artificiale nelle varie categorie di impatto sopra riportate, è abbastanza chiaro che l'introduzione della luce in ambienti notturni avviene spesso senza considerare tali effetti, talvolta anche per la limitata conoscenza da parte dei tecnici riguardo alle buone pratiche di progettazione e installazione. Ci troviamo quindi in una congiuntura in cui vi è sia la necessità di indagare su alcune delle problematiche legate alla luce artificiale notturna al fine di caratterizzare in modo più esaustivo il fenomeno, che di sensibilizzare varie categorie della società su questo tema.

1.2 - I primi passi dell'Ibimet nello studio di luce artificiale notturna e dell'inquinamento luminoso

I primi contatti con la tematica sono avvenuti con il coinvolgimento dell'Ibimet nella COST Action Loss of the Night Network. L'azione COST è un programma dell'Unione Europea che finanzia la formazione di reti di ricercatori e studiosi per incentivare la collaborazione tra coloro che svolgono attività di ricerca su un tema comune, così da aumentare l'impatto della ricerca scientifica sulle politiche decisionali. Il programma mette a disposizione risorse finanziarie a favore di attività ed incontri di scambio di mezzi ed esperienze (meeting, esperienze in altre strutture straniere, pubblicazioni). Ad ogni azione COST possono partecipare fino a due membri di ogni nazione.

Nel 2014 l'Ibimet ha iniziato ad occuparsi di questo tema in concomitanza con la sua nomina di membro rappresentante dell'Italia. L'Ibimet si è così aggiunto all'altro rappresentante italiano Andrea Giacomelli presidente dell'associazione Attivarti.org.

Attivarti.org è un'associazione di promozione sociale costituita nel maggio 2011. L'associazione si occupa di "tutela e valorizzazione di risorse minori o poco note nel campo della cultura, dell'ambiente e dell'innovazione libera", ed è stata creata per dare una veste formale a una serie di iniziative avviate sin dal 2006 da alcuni cittadini sparsi tra Milano e la Toscana. Il principale progetto coordinato da Attivarti.org è la BuioMetria Partecipativa (BMP), nato nel 2008 come iniziativa congiunta di sensibilizzazione sul tema dell'inquinamento luminoso e di raccolta di dati quantitativi di qualità del cielo notturno. La figura 2 rappresenta le località e i livelli di qualità del cielo notturno misurati nell'ambito del progetto BMP.

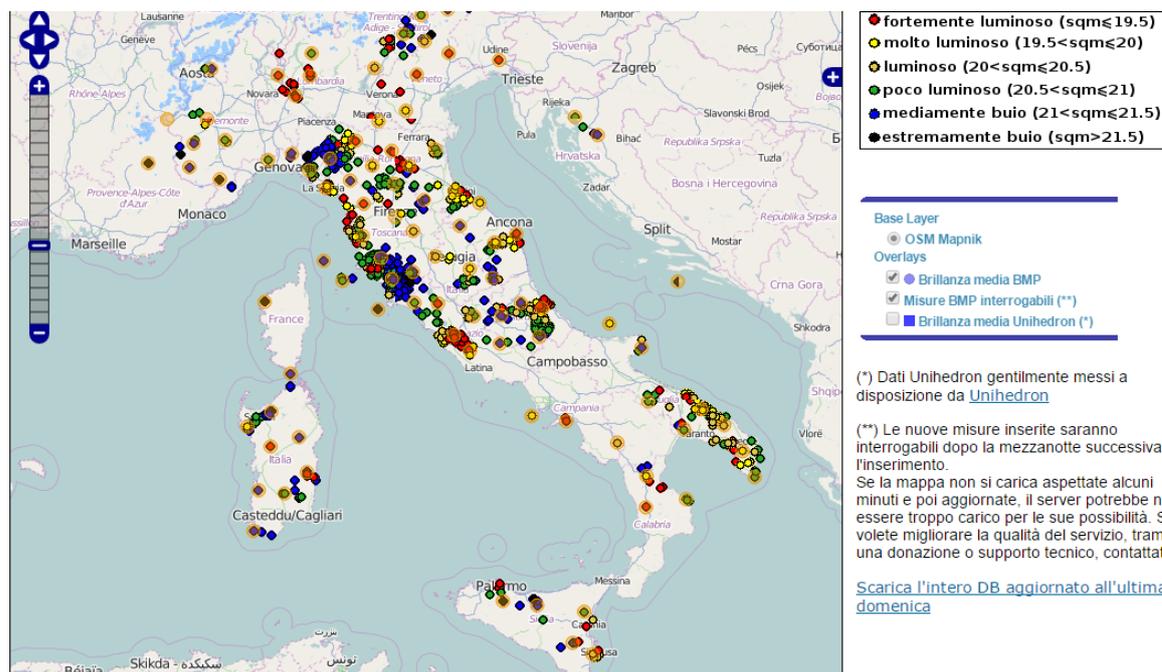


Figura 2 – Mappa delle misure raccolte dal progetto BuioMetria Partecipativa

L'associazione è animata da un lato da tecnici con esperienza pluriennale e di livello internazionale di ingegneria ambientale, pianificazione territoriale e sistemi informativi territoriali e dall'altro da cittadini residenti in alcuni borghi rurali della bassa Toscana. La combinazione di questi elementi costituisce un insieme forse non inedito, ma abbastanza originale, nello sviluppo dei progetti. Il gruppo di lavoro della BuioMetria Partecipativa ha operato sin dal 2008 su quattro linee principali:

- La *citizen science*, cioè il coinvolgimento dei cittadini in attività di raccolta di misure sia tramite sensori manuali che stazioni di monitoraggio in continuo della qualità del cielo notturno per finalità divulgative e scientifiche;
- l'attività divulgativa su tematiche ambientali ed in particolare sull'inquinamento luminoso, con interventi pubblici o su vari canali mediatici a cadenza mensile dal 2008, sia in Italia che all'estero;
- il consolidamento di una rete di contatti, sia su scala nazionale che internazionale, con altri esperti e organizzazioni impegnate sul tema inquinamento luminoso;
- la creazione di un sistema informativo per la raccolta e la condivisione dei dati di qualità del cielo notturno (che integra le misure manuali eseguite dai cittadini e le misure automatizzate raccolte nell'ambito del coordinamento italiano per la raccolta dati sull'inquinamento luminoso, o CORDILIT).

I primi contatti tra Ibimet e Attivarti.org avvengono sul terreno della Citizen Science dove entrambe le organizzazioni sono coinvolte. Infatti, analogamente alla buiometria partecipativa, l'Ibimet ha mantenuto sin dal 2004 una rete di contatti per la raccolta di osservazioni della migrazione primaverile delle rondini nell'ambito del progetto Gilia. Un altro carattere in comune a Ibimet e Attivarti.org è stato la divulgazione di argomenti a carattere ambientale rispettivamente presso le scuole e i cittadini. Ed è su questo fronte che è nata la prima significativa collaborazione che ha visto Attivarti.org partecipare nel 2014 al progetto INVOLLEN e concorrere alla competizione internazionale per la costruzione di un location based game ambientato nella Val di Farma (Giacomelli e Ceccarini, 2015).

Dal 2014 entrambe le organizzazioni collaborano nell'ambito della COST Action LoNNe.

1.3 - La rete Loss of the Night (COST Action LoNNe)

Loss of the Night Network (LoNNe) persegue l'obiettivo di creare una piattaforma per favorire:

- la collaborazione tra ricercatori che studiano la luce artificiale, l'inquinamento luminoso e i suoi impatti sull'ambiente, la biodiversità e l'uomo;
- la raccolta di dati e studi relativi all'inquinamento luminoso e ai suoi impatti;
- la definizione delle soglie di inquinamento luminoso nocive agli esseri viventi;
- l'interazione con varie categorie di soggetti al di fuori dell'ambito di ricerca (a partire dai decisori politici e dall'industria illuminotecnica);
- l'identificazione dei futuri campi di ricerca e proposta di progetti congiunti.

LoNNe è composta da ricercatori e tecnici di tutta Europa (Figura 3) organizzati in un comitato di gestione formato da due rappresentanti per ogni paese partecipante e quattro gruppi di lavoro (o working group, WG) di esperti.

IL WG1 comprende esperti che si occupano della fisica della luce artificiale, della sua misurazione e delle metodologie di modellazione e mira a promuovere la collaborazione dei componenti a ricerche scientifiche e scambio di conoscenze sulla luce artificiale.

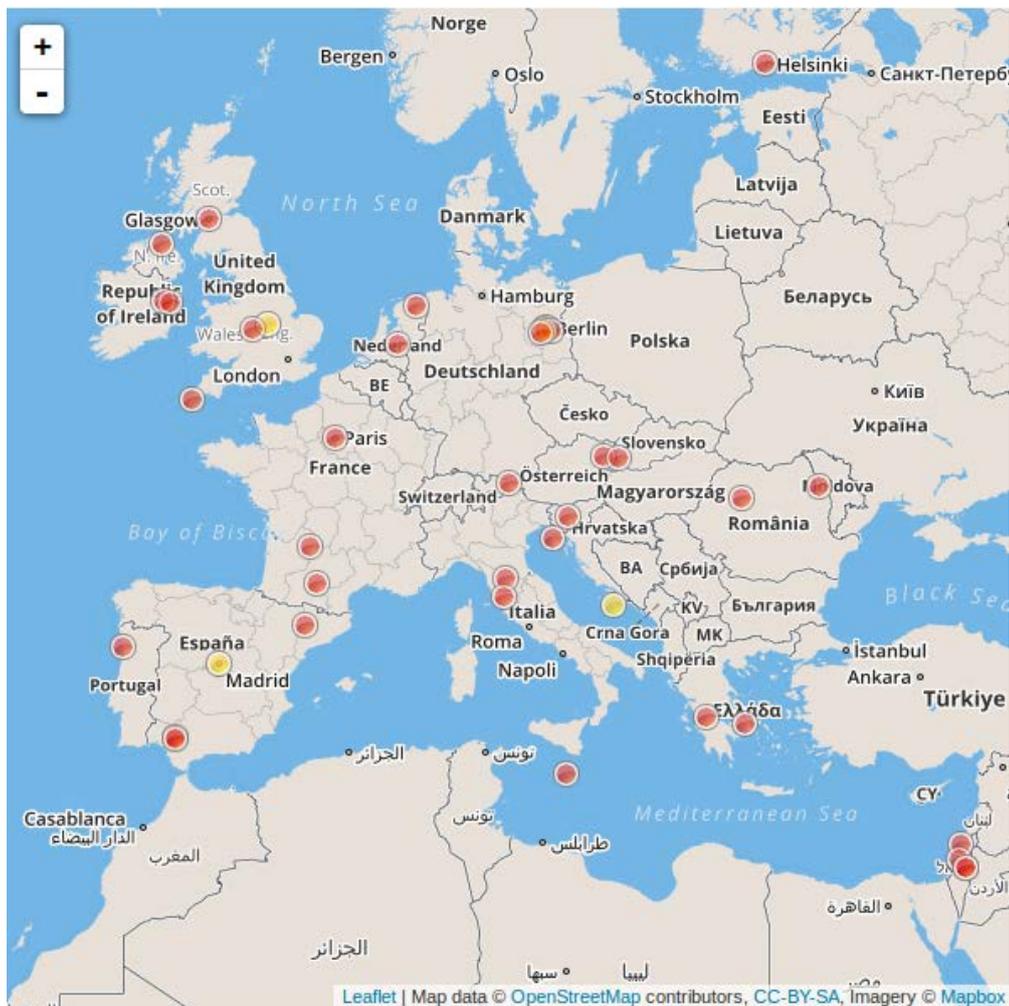


Figura 3 – Provenienza geografica dei membri della COST Action LoNNe

Il WG2 ha l'obiettivo di caratterizzare i dati di luce artificiale e inquinamento luminoso raccolti a vario titolo a livello europeo e nel mondo per definirne l'integrazione ed identificare impatti sulla natura e stabilire soglie massime riferite a varie categorie di effetti (fauna, flora, salute umana)

Il WG3 si occupa di analizzare la luce artificiale notturna dal punto di vista socioeconomico, analizzando sia i casi di uso dell'illuminazione nelle città, che esempi di promozione e valorizzazione del cielo notturno in aree rurali.

Il WG4 è centrato sulla divulgazione dei risultati e sulla sensibilizzazione di cittadini, dell'industria, delle associazioni e dei decisori amministrativi e politici.

1.4 - L'attività dell'Ibimet in LoNNe

L'Ibimet ha partecipato alle riunioni del comitato dei rappresentanti (MC) e del WG4 per pianificare le azioni di comunicazione e la gestione del sito (<http://www.cost-lonne.eu>) tenuti a Leicester nel 2014 e a Firenze ed Atene nel 2015. Attivarti.org e Ibimet in collaborazione con altri attori italiani nel campo dell'inquinamento luminoso hanno presentato uno stato delle proprie attività condotte su questo tema alla conferenza internazionale Balkan Light 2015 (Giacomelli et al., 2015).

Inoltre Ibimet e Attivarti.org hanno organizzato in Toscana, la campagna di misura annuale che i ricercatori della rete LoNNe effettuano con lo scopo di confrontare le prestazioni e le differenze di differenti strumenti di misura della qualità del cielo. La

campagna 2015 si è svolta dal 21 al 25 marzo e ha coinvolto 12 tra i principali esperti a livello europeo nel campo della misurazione della qualità del cielo notturno che hanno svolto nello stesso sito, misure in parallelo utilizzando diverse tipologie di strumentazione. Questa campagna è stata la terza, dopo quelle che si sono svolte nel 2013, nell'isola di Lastovo (Croazia) caratterizzata da un basso livello di inquinamento luminoso e, nel 2014, in Spagna, utilizzando come sito luminoso la città di Madrid e come sito buio Avila. In Toscana sono stati selezionati rispettivamente un sito buio in prossimità del piccolo abitato di Torniella a circa 40 km a sud di Siena e un sito luminoso collocato presso l'area di ricerca del CNR di Sesto Fiorentino (Figura 4).



Figura 4 - Montaggio di un sensore durante la campagna LoNNe 2015 sul tetto dell'area di ricerca del CNR di Firenze

A questa campagna hanno partecipato complessivamente 12 ricercatori, provenienti da sei nazioni, europee. Le misure sono state effettuate per due notti a Torniella e una notte a Sesto Fiorentino, utilizzando più di 18 strumenti tra sky quality meter (SQM), luxmetri e fotocamere digitali (Kyba et al. 2015). Uno degli obiettivi della campagna di misura era verificare l'affidabilità e la corrispondenza tra i vari strumenti di misura con una particolare attenzione agli SQM che per i costi contenuti potrebbero essere una valida soluzione per realizzare reti di monitoraggio estese a basso costo. Sebbene i risultati abbiano messo in evidenza i limiti connessi alla durata ridotta della campagna di misura e al fatto che gli strumenti sono stati calibrati in contesti differenti, complessivamente le differenze di misura sono state piccole in condizioni di cielo sereno e più elevate con cielo nuvoloso in particolare a Sesto Fiorentino che è un sito luminoso in condizioni normali. Per ulteriori approfondimenti si consiglia di consultare il report della Campagna di misura del 2015 (Kyba et al. 2015).

Infine tra le altre attività di divulgazione è da menzionare la partecipazione alla conferenza "Luci e colori del futuro" organizzata il 29 novembre 2015 dalla Società Astronomica Italiana di Livorno proprio per celebrare "l'anno internazionale della luce", nel corso della quale l'Ibimet ha illustrato le tematiche riguardanti la qualità del cielo notturno, la luce artificiale e l'inquinamento luminoso.

1.5 - Rete di monitoraggio di Firenze

Ispirati dai risultati ottenuti durante la campagna di misura, si è deciso di istituire, in via sperimentale, un prototipo di rete di monitoraggio permanente a Firenze. La scelta è caduta sui sensori Sky Quality Meter (SQM) che come già detto sono caratterizzati da un

costo contenuto accompagnato da un'affidabilità accettabile soprattutto nel caso di misure di confronto tra dati rilevati dallo stesso tipo di sensore e sono ampiamente utilizzati sia a fini di ricerca che di monitoraggio.

Questo strumento è dotato di un sensore che puntato allo Zenit misura la quantità di luce ($\text{mag}/\text{arcsec}^2$) ricevuta su un angolo di 40° in lunghezze d'onda fra i 350-400 e 700 nm.

L'SQM non è l'unico tipo di strumento disponibile per l'acquisizione di dati di qualità del cielo notturno: esistono altri modelli di fotometri, più costosi, e procedure basate sull'elaborazione di immagini acquisite tramite sensori CCD. Rispetto a questi lo SQM costituisce un buon compromesso in termini di costo, semplicità di utilizzo e possibilità di acquisire dati comparabili con altri sensori. Infatti è il sensore oggi più diffuso per la determinazione della luminosità del fondo del cielo notturno.

Essendo lo strumento nato in ambito astronomico, la grandezza misurata viene espressa in magnitudine per arco di secondo quadrato. Si ricorda che la magnitudine è utilizzata per misurare la luminosità di una stella. Riferendo la magnitudine a una porzione areale, si può quindi dare un'indicazione della luminosità del fondo del cielo. Tale luminosità è determinata dal contributo di tutte le sorgenti luminose orientate verso l'alto in una zona attorno al punto di misura. L'estensione di questa zona non è determinata a priori, derivando dalla combinazione di vari fattori, ma può arrivare anche a 100 km di raggio e oltre, in funzione della tipologia di impianti esistenti nella zona, dell'orografia locale e delle condizioni atmosferiche. In questa unità di misura i valori decrescono all'aumentare della luminosità del cielo, tanto che la scala di valori registrati in condizioni tipiche di campionamento all'esterno varia da circa 15, in condizioni di inquinamento luminoso elevato tipiche di grandi agglomerati urbani, per arrivare quasi a 22 in zone rurali senza infrastrutture e centri urbani nei dintorni.



Figura 5 - Sensori SQM installati sul tetto dell'area di ricerca del CNR di Firenze

Alcuni tipi di SQM possono essere installati in modo permanente all'aria aperta, grazie ad uno schermo di protezione che protegge il sensore dalla pioggia (Figura 5). Il sensore può essere collegato ad un computer e raccogliere dati in modo illimitato oppure collegato ad una batteria che garantisce una durata che dipende dalla frequenza di campionamento (circa 3 mesi nel caso di una misura ogni 10 minuti). La rete è stata attivata

a novembre 2015 ed è composta da due sensori SQM-LU-DL. Inizialmente i due sensori sono stati installati sul tetto dell'area di ricerca del CNR per verificare la loro corrispondenza (Figura 5). I risultati hanno confermato un grado di corrispondenza delle misure, dello stesso ordine di grandezza dell'accuratezza dello strumento riportate sul manuale operativo del sensore ($\pm 0.10 \text{ mag/arcsec}^2$).



Figura 6 - Immagine presa dalla stazione spaziale della piana Firenze-Prato-Pistoia e del Valdarno inferiore (nel riquadro rosso l'area di ricerca del CNR di Sesto Fiorentino) (foto: ISS026-E-28831, "Image courtesy of the Earth Science and Remote Sensing Unit, NASA Johnson Space Center; <http://eol.jsc.nasa.gov>")

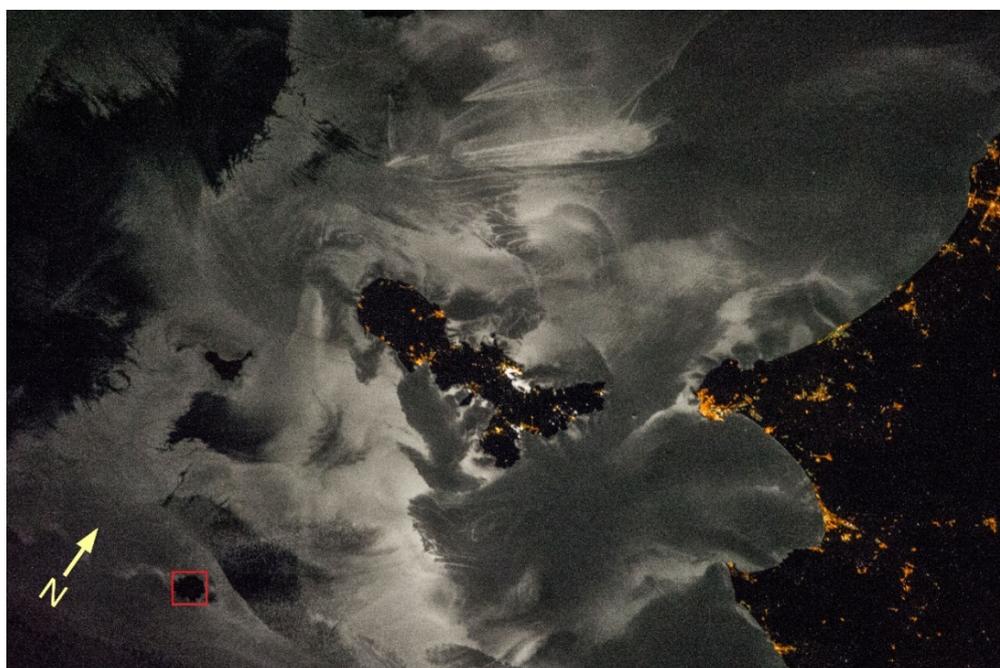


Figura 7 - Immagine presa dalla stazione spaziale dell'arcipelago Toscano (nel riquadro rosso l'isola di Montecristo) (foto: ISS037-E-15305, "Image courtesy of the Earth Science and Remote Sensing Unit, NASA Johnson Space Center; <http://eol.jsc.nasa.gov>")

Il primo obiettivo che ci siamo posti poi, è quello di caratterizzare la luminosità del cielo notturno in un sito con elevata quantità di luce artificiale e uno contraddistinto dalla quasi totale assenza di luce artificiale in Toscana. Per questo scopo sono state selezionate l'area della piana fiorentina a Firenze (Figura 6) e l'isola di Montecristo (Figura 7). L'installazione del sensore sull'isola di Montecristo è stata possibile grazie alla collaborazione del Corpo Forestale dello Stato, che ha permesso di posizionare il sensore in un promontorio dell'isola (Figura 8).



Figura 8 - sensore installato sull'isola di Montecristo

Il monitoraggio è iniziato il 25 novembre a Sesto Fiorentino e il 4 dicembre 2015 sull'Isola di Montecristo. Attualmente sono disponibili i primi risultati delle misure effettuate a Sesto Fiorentino dal 25 al 30 Novembre 2015 che sono riportati nelle figure 9 e 10. Durante la notte i valori orari minimi e massimi di luminosità registrati nel periodo si sono assestati rispettivamente tra $15.4 \text{ mag/arcsec}^2$ e $17.6 \text{ mag/arcsec}^2$ (Figura 9) che sono valori comparabili a quelli misurati durante la campagna LoNNe di marzo.

La Figura 10 mette a confronto l'evoluzione dei valori nella notte del 26-27 e quella del 27-28 novembre 2015. A parte un breve episodio il 26 è caratterizzato da una luminosità maggiore dovuta alla riflessione causata dalla copertura nuvolosa la cui presenza è confermata dalle immagini satellitari. Inoltre il grafico del 27-28 novembre mostra chiaramente l'aumento di luminosità del cielo legato al passaggio della luna che quel giorno sorgeva alle 17.30 e raggiungeva il culmine verso l'una di notte.

I dati acquisiti dai due sensori SQM installati dall'Ibimet potranno essere periodicamente integrati nel database CORDILIT, gestito da Attivarti.org, che dal 2011 raccoglie serie storiche da vari sensori in Italia (dislocati in Veneto, Toscana, Lombardia, Lazio e Val d'Aosta).

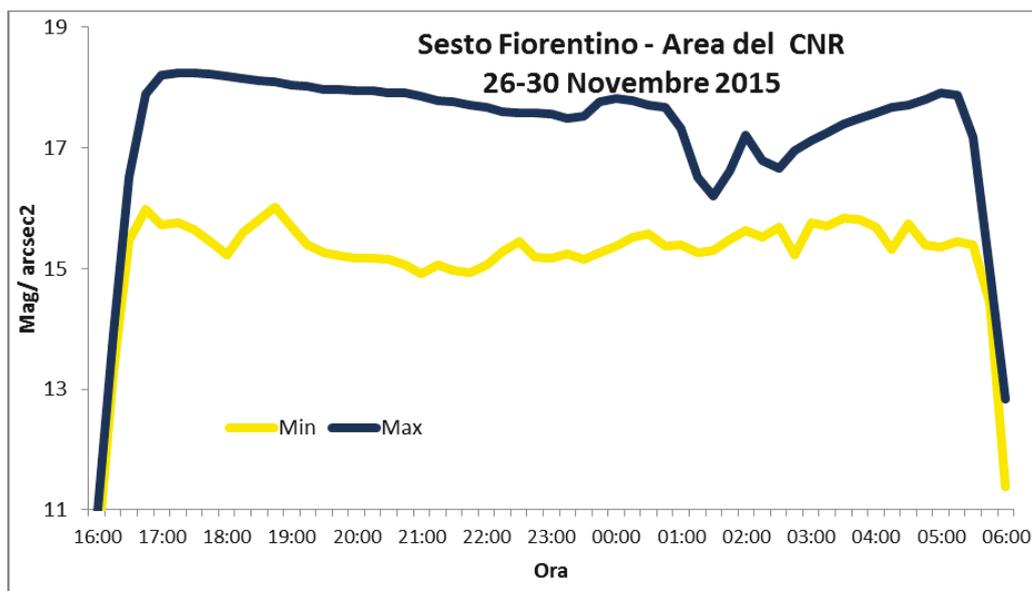


Figura 9 - Minima e massima luminosità oraria notturna dal 26 al 30 novembre 2015 a Sesto Fiorentino

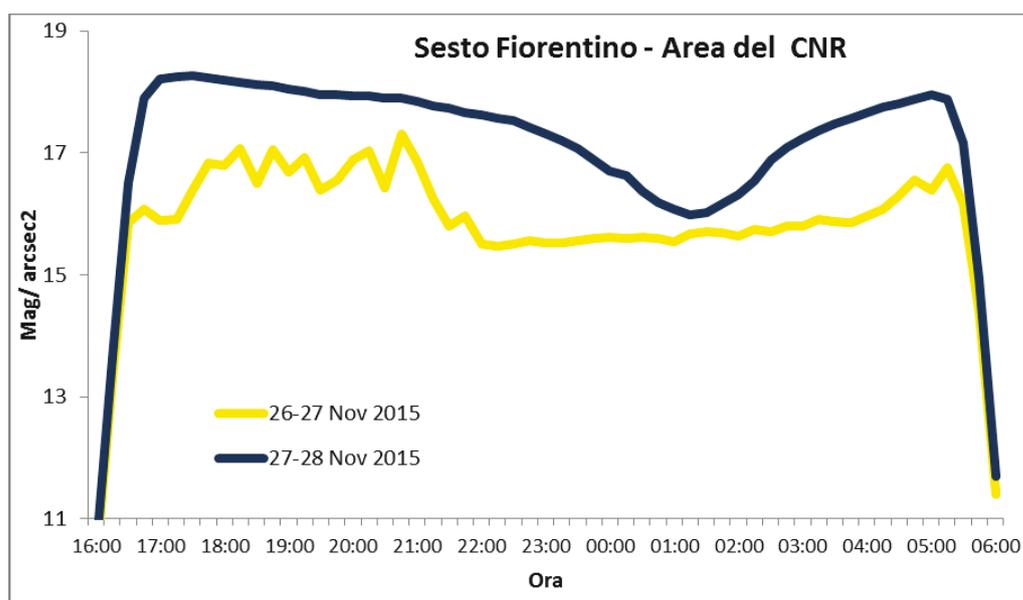


Figura 10 - Luminosità delle notti 26-27 e 27-28 novembre 2015 rilevate dall'SQM a Sesto Fiorentino

1.6 - Monitoraggio alberature stradali potenziali effetti dell'illuminazione artificiale

È ben noto che la luce artificiale è comunemente utilizzata per stimolare la crescita delle piante, ad esempio in orticoltura. Però poco si sa se l'illuminazione artificiale delle nostre città abbia un effetto sullo sviluppo del verde urbano. L'impatto dell'illuminazione artificiale notturna sulle piante è stato poco studiato e i risultati sono contraddittori. Uno studio (Kramer, 1937) ha documentato un effetto sullo sviluppo dei germogli alla fine della stagione vegetativa in due specie vegetali (*Abelia grandiflora* e *Robinia pseudocacia*) che continuavano a crescere e generare germogli nella porzione di chioma vicino alla luce artificiale. Invece un altro studio, condotto in Finlandia, non ha riscontrato alcun

significativo effetto della luce artificiale sulla colorazione autunnale delle foglie di *Betula pendula* (Sarala et al., 2013).



Figura 11– Chioma delle alberature stradali a Firenze il 7 gennaio 2015

Durante l'inverno 2014-2015, è stato osservato che alcune alberature stradali della città di Firenze, in particolare della specie *Platanus acerifolia*, hanno conservato foglie verdi fino a gennaio 2015 sui rami posti sotto il cono di luce dell'illuminazione stradale (Figura 11). In particolare è stato osservato che lungo una via della città affiancata da un filare di platani, la frequenza di alberi con parte della chioma verde era elevata in prossimità dei lampioni e bassa in lontananza da essi. Ad ogni modo c'è da considerare che a Firenze, il mese di dicembre 2014 è stato caratterizzato da temperature minime giornaliere mediamente 2°C più elevate della media climatica e questa situazione anomala potrebbe avere condizionato il comportamento della vegetazione. Comunque la maggior frequenza di foglie verdi sotto i lampioni suggerisce un'influenza della luce artificiale sulla senescenza che dovrà essere ulteriormente studiata negli anni a venire.

1.7 - Sviluppi futuri

L'inquinamento luminoso, o meglio l'effetto della luce artificiale notturna, è un tema su cui la ricerca in Italia ha seguito un percorso particolare. Dopo una fase alla fine degli anni '90 in cui sono stati prodotti lavori in cui ricercatori italiani hanno avuto un ruolo di riferimento mondiale, le attività si sono disperse.

Il tema è stato molto trattato da parte di altre organizzazioni, più attive sul fronte della sensibilizzazione e dell'attivismo che della ricerca. A nostro parere è necessario che questo tema sia maggiormente approfondito seguendo un approccio scientificamente fondato ed interdisciplinare al fine di produrre risultati certi e quantificabili che possano

essere utilizzati in modo efficace dai decisori politici e dai produttori per realizzare un'illuminazione a basso impatto ambientale.

La ricerca in questo settore necessita però di un'ampia gamma di dati distribuiti nel tempo e nello spazio e la collaborazione dei cittadini, declinata secondo i canoni della cosiddetta citizen science, può essere, in questo senso, un valido supporto alle reti di ricerca.

Infine questo tipo di ricerca può essere un supporto significativo allo sfruttamento delle opportunità che possono offrire aree caratterizzate da bassi livelli di inquinamento luminoso, in termini di attrazione per astrofili e turisti in genere, specialmente per regioni come la Toscana, che in Italia costituisce una delle tre zone di maggior pregio dal punto di vista della qualità del cielo notturno.

Ringraziamenti

Si ringraziano il Dott. Stefano Vagniluca del Corpo Forestale dello Stato e il PhD. Francesco Primo Vaccari dell'IBIMET per aver reso possibile l'installazione del sensore SQM sull'isola di Montecristo.

Bibliografia

1. Aubé, M., Roby, J, Kocifaj, M. PLoS ONE 8(7): e67798 (2013). Evaluating Potential Spectral Impacts of Various Artificial Lights on Melatonin Suppression, Photosynthesis, and Star Visibility,. doi:10.1371/journal.pone.0067798,
2. Gaston, K., Visser, M, Hölker, F, Phil. Trans. R. Soc., 2015 The biological impacts of artificial light at night: the research challenge. B 370 : 20140133. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2014.0133>
3. Giacomelli, A. Falchi, F, Dalla Gassa, L., Di Sora. M., Massetti L.. Proceedings of the Balkan Light 2015, Athens. Artificial Light at Night in Italy: a joint perspective by four NGOs, p. 69-72.
4. Giacomelli. A, Ceccarini G, , Atti della conferenza Innovation in environmental education: ICT and intergenerational learning, Firenze, 2015. Integrating Culture, Environment, and Open Innovation for Awareness Raising: a case from the Farma Valley, Tuscany
5. Giubbilini, F, Giacomelli, A, Gazzetta Ambiente n.3, 2010. Visioni globali e azioni locali sull'inquinamento luminoso,
6. Kramer, PJ. Plant Physiology, 12(3): 881-83 (1937) Photoperiodic stimulation of growth by artificial light as a cause of winter killing.
7. Kyba, C, Bouroussis, C, Canal, R, Falchi, F, Giacomelli, A., Haenel, Kolláth, Zoltán, Massetti, L., Ribas, S., Spoelstra, H. Tong, Kai Pong, Wuchterl, G., Report of the 2015 Intercomparison report, http://www.cost-lonne.eu/wp-content/uploads/2015/04/2015_LoNNe_IC_Report.pdf
8. Marchat, P. R., British Journal of Criminology, 44(3), 2004. A demonstration that the claim that brighter light reduces crime is unfounded,
9. Poggio, A, Borgonovo, T, Saibene, D (a cura di)"Rapporto Clima in Comune 2011"., online su www.ecosportello.org
10. Provincia Autonoma di Bolzano, Approvazione dei criteri per le misure di contenimento dell'inquinamento luminoso e per il risparmio energetico, Deliberazione della Giunta Provinciale, Bollettino Ufficiale n. 31/I-II del 31-7-2012
11. Reiter RJ, Tan DX, Korkmaz A, Erren TC., Piekarski C., Tamura H., Manchester LC. Crit Rev Oncog. 13:303–28 (2007). Light at night, chronodisruption, melatonin suppression, and cancer risk: A review. DOI: 10.1615/CritRevOncog.v13.i4.30
12. Sarala, M, Tahkokorpi, M, Niinimaa, A, Laine, K, Taulavuori, E, Taulavuori, K. Trees-Structure And Function, 27(4): 1193-1199 (2013). Street lamp light does not delay autumnal leaf colouration of *Betula pendula*. DOI: 10.1007/s00468-013-0841-9

LA LUCE NELLE FIBRE OTTICHE: RETICOLI A PASSO LUNGO COME STRUMENTO DI RIVELAZIONE DI PARAMETRI CHIMICI E BIOCHIMICI

F. Chiavaioli, C. Trono, A. Giannetti, S. Tombelli, F. Baldini
*Istituto di Fisica Applicata "Nello Carrara", Consiglio Nazionale delle Ricerche, IFAC-CNR, Via
Madonna del Piano 10, 50019 Sesto Fiorentino, Firenze, Italy*

1.1 - Introduzione

La crescente necessità di dispositivi in grado di eseguire misure *in situ*, veloci ed affidabili nel campo della chimica e biochimica ha spinto e continua a spingere i ricercatori a cercare nuove soluzioni tecnologiche nel settore. Una possibilità può sicuramente essere l'utilizzo di rifrattometri ottici che misurano la variazione di indice di rifrazione associata ad una reazione chimica o ad un'interazione biochimica. Essi offrono la possibilità di utilizzare un approccio ottico per rivelare una reazione chimica o un'interazione biochimica senza ricorrere a misure di luminescenza o d'assorbimento. Questa caratteristica distintiva è di fondamentale importanza e può essere essenziale per misurare elementi chimici e specie biochimiche che non hanno specifiche proprietà ottiche o che interagiscono selettivamente con elementi di riconoscimento molecolare senza l'emissione di fluorescenza o variazioni di assorbimento. In saggi biologici, per esempio, l'approccio ottico più diffuso è quello che prevede l'utilizzo di marcatori (*label-based*) nei quali si sfrutta l'interazione tra l'analita sotto esame ed un elemento di riconoscimento molecolare etichettato con marcatori fluorescenti o chemiluminescenti. D'altro canto, l'uso di un elemento di riconoscimento molecolare marcato implica molto spesso l'utilizzo di un protocollo di rilevamento in più fasi (come nel test ELISA o in saggi di tipo sandwich), che può complicare l'interazione biochimica riducendone la selettività. Al contrario, un approccio senza l'utilizzo di marcatori (*label-free*) non presenta questo tipo di inconvenienti e offre la possibilità di misurare direttamente e in tempo reale l'interazione tra l'elemento di riconoscimento molecolare e l'analita, fornendo dunque la possibilità di analizzare la dinamica delle interazioni oltre che determinare la concentrazione dell'analita [1].

Tra tutte le attuali piattaforme tecnologiche a disposizione per la misurazione dell'indice di rifrazione, quelle basate su risonanza plasmonica superficiale (SPR) sono quelle più diffuse, caratterizzate da elevate risoluzioni dell'ordine di $10^{-7}/10^{-8}$ unità di indice di rifrazione (RIU) [2]. Altre ben note ed interessanti piattaforme tecnologiche sono basate sull'uso di interferometri, realizzati sia su fibre ottiche che su guide d'onda planari, o di risonatori ottici, che in termini di risoluzione possono essere confrontabili con sistemi SPR. In questi ultimi anni, i reticoli in fibra ottica sono stati proposti come strumenti per la rivelazione di parametri chimici e biochimici [3], con moltissimi esempi descritti nella recente letteratura. L'uso di reticoli in fibra ottica offre alcuni vantaggi rispetto all'uso delle altre sopracitate dispositivi grazie alle caratteristiche tipiche delle fibre ottiche, come compattezza, flessibilità, maneggevolezza e leggerezza, oltre al fatto di essere altamente compatibili ed integrabili con i componenti optoelettronici standard e i dispositivi disponibili in commercio in quanto la lunghezza d'onda di lavoro corrisponde generalmente a quella relativa alle finestre di trasmissione delle telecomunicazioni con minimo di attenuazione a circa $1.3 \mu\text{m}$ ($\approx 0.5 \text{ dB/km}$) e $1.5 \mu\text{m}$ ($\approx 0.2 \text{ dB/km}$). Inoltre, la combinazione dell'uso delle fibre ottiche con il fatto che il segnale trasmesso è modulato spettralmente (si veda la sezione "Principi Fondamentali") offre la possibilità di *multiplexing* e la capacità di trasmissione a grande distanza che le altre piattaforme tecnologiche non sono in grado di offrire o lo sono solo in maniera parziale. È anche importante sottolineare che, poiché la

codifica ottica del segnale è una modulazione di lunghezza d'onda, la lettura del segnale non è influenzata da variazioni o fluttuazioni della potenza ottica della sorgente né dalla curvatura della fibra stessa.

Vantaggi e limitazioni nell'utilizzo dei reticoli in fibra ottica per la misurazione di parametri chimici e biochimici sono analizzati in questo capitolo insieme ad alcune applicazioni pratiche ed uno sguardo agli sviluppi più recenti con nuove prospettive nel settore.

1.2 - Principi fondamentali dei reticoli a fibra ottica

Le prime fibre ottiche furono realizzate nel 1953. Le due principali applicazioni delle fibre ottiche sono state e sono tutt'ora per la trasmissione di segnali nelle telecomunicazioni e come sensori. Tuttavia il loro primo impiego è stato come sensore visto che il loro utilizzo nell'altro campo era limitato dalle grandi attenuazioni. Una fibra ottica è costituita da un cilindro interno detto nucleo (*core*), con indice di rifrazione uguale a n_1 e da una corona esterna detta mantello (*cladding*), con un indice di rifrazione $n_2 < n_1$. Oltre questi due strati ne esiste almeno un altro per rivestire e proteggere la fibra stessa. Una fibra ottica è generalmente realizzata in vetro o silicio fuso SiO_2 , ma purché il materiale sia un dielettrico trasparente alla luce, può essere realizzata anche in plastica. Il suo utilizzo è quello di trasportare energia luminosa in modo guidato sfruttando il principio della riflessione interna totale. Una caratteristica che deriva direttamente dalla sua natura, è l'immunità della fibra ottica ai disturbi di natura elettromagnetica (EMI) e radiofrequenza (RFI); tale proprietà impedisce fenomeni di interferenza (diafonia), così come non permette di prelevare segnale dall'esterno (intercettazione). Le fibre ottiche sono infine classificate in due grandi gruppi: fibre monomodo (*single-mode fiber*) e multimodo. Nelle fibre monomodali, le uniche prese in considerazione in questo capitolo, si ha un solo modo che si propaga nel nucleo e quindi il fenomeno della dispersione modale non esiste. In quest'ultime, le dimensioni di nucleo e mantello delle fibre disponibili commercialmente sono tipicamente $9 \mu\text{m}$ e $125 \mu\text{m}$.

Un reticolo in fibra ottica è una modulazione periodica dell'indice di rifrazione del nucleo (n_{core}) di una fibra monomodo, come mostrato in Figura 1.

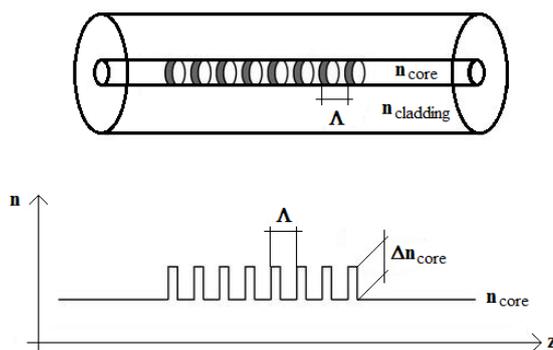


Figura 1 – Schematizzazione di un reticolo in fibra ottica (in alto). I dischi all'interno del nucleo della fibra mostrano la modulazione periodica dell'indice di rifrazione del nucleo della fibra (n_{core}), mentre Λ rappresenta il periodo o passo del reticolo.

Profilo dell'indice di rifrazione del nucleo della fibra lungo l'asse della fibra (in basso) [3]

I reticoli in fibra ottica sono classificati in base al periodo di reticolo Λ , ovvero la distanza tra due modulazioni successive lungo l'asse della fibra. Tale distanza produce un accoppiamento ben preciso della luce e definisce la propagazione all'interno della fibra monomodo [4]. Il primo tipo di reticolo, conosciuto come reticolo di Bragg (*fiber Bragg grating*, FBG), è caratterizzato da un periodo dell'ordine delle centinaia di nanometri e dà luogo all'accoppiamento della luce tra il modo fondamentale copropagante nel nucleo della

fibra e il suo rispettivo modo contropropagante. Tale accoppiamento avviene ad una lunghezza d'onda ben precisa che è chiamata lunghezza d'onda di risonanza di Bragg ($\lambda_{res,FBG}$) e che è espressa dalla seguente relazione:

$$\lambda_{res,FBG} = 2 n_{core,eff} \Lambda \quad (1.1)$$

dove $n_{core,eff}$ rappresenta l'indice di rifrazione efficace del nucleo della fibra. A questa lunghezza d'onda, un FBG è caratterizzato dalla massima riflettanza e dalla minima trasmittanza, come mostrato in Figura 2a. È importante sottolineare che un FBG può essere interrogato sia in riflessione che in trasmissione. Questo tipo di reticolo, nella sua configurazione standard, non può essere usato per la misurazione della variazione dell'indice di rifrazione del mezzo circostante la fibra (*surrounding refractive index*, SRI), poiché la radiazione ottica è fortemente confinata all'interno del nucleo della fibra e solo una piccola quantità di radiazione viene trasferita al mantello della fibra, ma in ogni caso non raggiunge mai il suo esterno. L'interazione della radiazione ottica che viaggia lungo il nucleo della fibra con l'ambiente esterno può essere ottenuta mediante un'opportuna modifica della geometria di un FBG sia attraverso una diversa modulazione dell'indice di rifrazione o sfruttando una diversa configurazione. I tre tipi di reticoli in fibra ottica modificati, le cui proprietà di trasmissione sono modulate da una variazione di SRI, sono illustrati in Figura 2: il reticolo a passo lungo (*long period grating*, LPG) in Figura 2b, il reticolo di Bragg con piani reticolari inclinati (*tilted FBG*, TFBG) in Figura 2c ed infine il reticolo di Bragg con riduzione parziale o totale del mantello della fibra (*etched FBG*, EFBG) in Figura 2d.

Un LPG è caratterizzato dalla stessa modulazione periodica dell'indice di rifrazione del nucleo della fibra (come mostrato in Figura 1) ma da un periodo dell'ordine delle centinaia di micrometri invece di centinaia di nanometri. Questo valore del periodo sostanzialmente più lungo genera l'accoppiamento tra il modo fondamentale copropagante nel nucleo della fibra (LP_{01}) ed un numero discreto di modi di mantello copropaganti (LP_{0m}). Per ogni m-esimo modo di mantello, l'accoppiamento avviene ad una lunghezza d'onda ben definita, chiamata lunghezza d'onda di risonanza di un LPG ($\lambda_{res,LPG}$), data dalla seguente relazione:

$$\lambda_{res,LPG(m)} = (n_{core,eff} - n_{clad,eff(m)}) \Lambda \quad (1.2)$$

dove $n_{clad,eff(m)}$ rappresenta l'indice di rifrazione efficace dell'm-esimo modo di mantello e che dipende dall'indice di rifrazione del mezzo che circonda la fibra (SRI). L'esistenza di diversi modi di mantello, il cui profilo di campo elettrico decade esponenzialmente a causa dell'assorbimento e della dispersione all'interfaccia mantello/mezzo esterno, implica la presenza di diverse bande di attenuazione nello spettro di trasmissione come evidenziato in Figura 2b. Quindi, è grazie all'accoppiamento tra il modo fondamentale del nucleo ed i modi di mantello che la radiazione ottica può interagire con l'ambiente esterno.

In corrispondenza dell'interfaccia mantello/mezzo esterno, l'interferenza ottica tra i raggi incidenti e quelli riflessi genera un'onda ottica, chiamata onda evanescente, che si propaga nella direzione dell'asse della fibra e decade esponenzialmente in direzione perpendicolare e che caratterizza ogni modo di mantello [5]. La profondità di penetrazione dell'onda evanescente è un parametro chiave per scopi sensoristici: essa è definita come la distanza dall'interfaccia mantello/mezzo esterno in cui l'ampiezza del campo elettrico diminuisce di un fattore pari a $1/e$. In generale, maggiore è la profondità di penetrazione dell'onda evanescente, maggiore è la sensibilità di un LPG a variazioni di SRI [6]. Poiché è la presenza dell'onda evanescente che garantisce l'interazione della radiazione ottica che viaggia lungo l'asse della fibra con l'ambiente esterno, è chiaro che un FBG standard può essere reso sensibile ad una variazione di SRI modificando la sua struttura geometrica come mostrato in Figura 2c e 2d. In particolare, la Figura 2c mostra la TFBG, dove la modulazione dell'indice di

rifrazione del nucleo è costituita da piani reticolari inclinati di un certo angolo rispetto all'asse della fibra (θ). Tipici valori dell'angolo di inclinazione sono 2° – 10° .

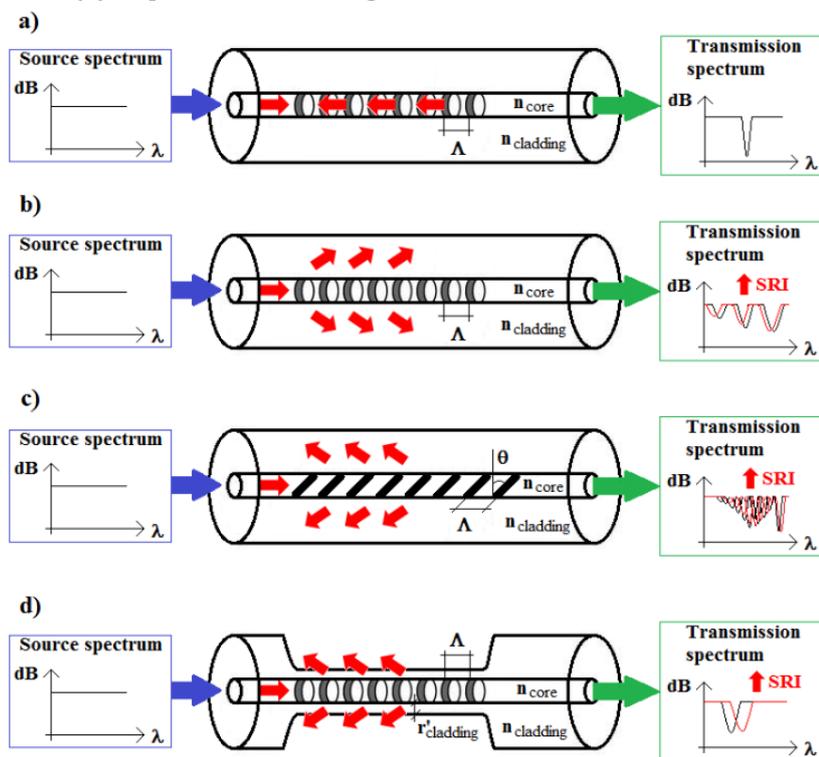


Figura 2 – Configurazioni di base dei reticoli in fibra ottica: a) reticolo di Bragg standard (FBG) che non può essere usato come sensore di indice di rifrazione del mezzo circostante il sensore (*surrounding refractive index*, SRI); b) reticolo a passo lungo standard (LPG); c) reticolo di Bragg con piani reticolari inclinati (*tilted FBG*); d) reticolo di Bragg con riduzione parziale o totale del mantello della fibra (*etched FBG*). Le frecce rosse indicano come avviene l'interazione con il mezzo circostante. Il grafico sulla destra di ciascun reticolo mostra lo spettro di trasmissione in presenza di una sorgente a banda larga posta in ingresso, mentre le curve di colore rosso forniscono un'indicazione dell'effetto dovuto ad un aumento di SRI sullo spettro trasmesso [3]

Tale modulazione consente l'accoppiamento della luce dal modo fondamentale del nucleo e modi di mantello contropropaganti, i quali risultano essere sensibili alle variazioni di SRI [3]. Infine la Figura 2d mostra un EFBG, in cui una riduzione (generalmente chimica con acido fluoridrico HF) parziale o totale del mantello della fibra, consente l'estensione del campo evanescente oltre il mantello e quindi permette l'interazione con il mezzo esterno [3].

È evidente che lo spettro di trasmissione di un LPG (Figura 2b) e degli FBG modificati (Figure 2c e 2d) dipende dal SRI. Una variazione del SRI implica diverse condizioni di accoppiamento, che portano allo spostamento delle bande di attenuazione nello spettro di trasmissione. La misura di tale spostamento della λ_{res} rappresenta il parametro di interesse nella maggior parte dei sensori basati su reticoli in fibra ottica. Pertanto questi dispositivi possono essere utilizzati per la rivelazione e la determinazione quantitativa di composti chimici o di specie biochimiche quando la reazione chimica o l'interazione biochimica avviene nel volume che circonda la fibra o direttamente sulla superficie della fibra, modificando il valore del SRI [7]. Un cambiamento del SRI dà luogo ad un comportamento opposto nello spettro di trasmissione di un LPG e degli FBG modificati (TFBG e EFBG). In particolare, un aumento del SRI dà luogo in un LPG ad uno spostamento delle bande di attenuazione verso lunghezze d'onda inferiori (*blue-shift*), mentre uno spostamento delle bande di attenuazione verso lunghezze d'onda maggiori (*red-shift*) è osservato in entrambi gli FBG modificati. Inoltre, per tutti i reticoli in fibra ottica, la sensibilità massima è raggiunta quando il valore del SRI raggiunge quello del mantello della

fibra (circa 1.44–1.45 RIU) [8]. D'altro canto, più il valore del SRI si avvicina a quello del mantello della fibra, meno definita risulta essere la banda di assorbimento fino alla sua completa scomparsa quando $SRI = n_{\text{clad}}$. Questo appiattimento della banda di attenuazione porta ad una maggiore difficoltà nella valutazione della λ_{res} e di conseguenza ad un peggiore rapporto segnale-rumore che influisce pesantemente nella risoluzione del sensore [9].

Fino ad ora, sono stati descritti in letteratura tre diversi approcci per migliorare le prestazioni di un LPG in termini di sensibilità all'indice di rifrazione del mezzo che circonda la fibra:

1. diminuendo il passo del reticolo Λ (per esempio, da 600 μm a 350 μm) utilizzando un LPG standard si è in grado di aumentare l'ordine del modo di mantello accoppiato, da un ordine basso (es. LP_{04}) ad un ordine più alto (es. LP_{07}), mantenendo la stessa finestra di lunghezze d'onda analizzate [10];
2. diminuendo ancor di più il passo del reticolo (Λ compreso tra 150 μm e 180 μm), si è in grado di accoppiare modi di mantello speciali caratterizzati da un ordine di modo ancora più elevato ($LP_{011} - LP_{013}$) e da una doppia banda di attenuazione. Questi reticoli speciali sono noti in letteratura come LPG *turn-around point* (TAP LPG) [10]. Inoltre, la presenza di una doppia banda di attenuazione relativa allo stesso modo di mantello, permette di effettuare una misura differenziale dello spostamento spettrale (*shift* della $\lambda_{\text{res,LPG}}$) tra le due bande in quanto queste si muovono in direzione opposte al variare dell'indice di rifrazione, aumentando così ancor di più la sensibilità del dispositivo;
3. depositando un rivestimento ad alto indice di rifrazione (indice di rifrazione maggiore di quello del mantello della fibra, ovvero maggiore di 1.5 RIU fino a 2 RIU) con spessore dell'ordine delle centinaia di nanometri sopra la regione sensibile di un LPG, si è in grado di utilizzare questo nuovo rivestimento come strato guidante del modo di mantello accoppiato e questo induce una ridistribuzione del $n_{\text{clad,eff (m)}}$ dei modi di mantello causando a sua volta spostamenti elevati della $\lambda_{\text{res,LPG}}$, in quanto si ha un aumento dell'interazione dell'onda evanescente con il mezzo esterno. Questi reticoli sono meglio noti in letteratura come LPG in transizione modale [11]. Inoltre, un'opportuna scelta sia dell'indice di rifrazione che dello spessore del rivestimento permette di selezionare il valore del SRI in cui si hanno le migliori prestazioni in termini di sensibilità.

Infine, è stato recentemente proposto un approccio che sfrutta l'utilizzo di un TAP LPG in transizione modale (rivestito con uno strato ad alto indice di rifrazione), quindi che combina il secondo e terzo approccio appena descritti [12]. L'analisi teorica ha dimostrato che un tale LPG può raggiungere valori di sensibilità dell'ordine di 10^5 nm RIU^{-1} .

1.3 - I reticoli a fibra ottica come sensori chimici e biosensori

Come spiegato nella sezione precedente, la variazione del SRI indotta da un composto chimico o da un'interazione biochimica è il principio base di funzionamento utilizzato nei reticoli in fibra ottica per la determinazione della concentrazione dell'analita. Si possono distinguere due classi principali di sensori basati su reticoli a seconda della regione dove si verifica la variazione dell'indice di rifrazione. Nel caso di reticoli "nudi" (*bare*, ovvero la fibra ottica non è rivestita con alcun materiale ed dunque il mantello è direttamente a contatto con il mezzo esterno), tutto il volume della soluzione che circonda il reticolo viene interrogato dalla radiazione luminosa e quindi l'analita interagisce con tutto il campo evanescente. Un caso ben diverso si ha quando la superficie della fibra è rivestita da uno strato opportuno così che l'interazione chimica/biochimica avviene solo in corrispondenza di tale superficie. In questo caso, solo una porzione della radiazione ottica associata al campo evanescente è modulata a seconda dello spessore della regione di interazione [3].

Il primo caso è sicuramente il più semplice e uno dei primi esempi di LPG come sensore chimico ha riguardato il suo utilizzo per determinare la concentrazione di cloruro di

calcio, cloruro di sodio e glicole etilenico in soluzione. Da allora molte altre piattaforme ottiche basate su reticoli sono state descritte in letteratura per la misurazione di alcool isopropilico, glicerina, saccarosio, etanolo e glucosio, zucchero di canna, antigelo, xilene e ioni cloruro. È importante osservare che questo tipo di approccio ha chiaramente lo svantaggio di misurare una qualsiasi variazione che si verifica nel volume entro cui l'onda evanescente si estende e la misura può essere quindi altamente influenzata da interferenti, ovvero da specie diverse dell'analita in esame.

L'utilizzo di un rivestimento in grado di catturare l'analita, eventualmente in modo selettivo, è senza dubbio molto importante per lo sviluppo di un sensore più credibile ed affidabile. In questo caso, il campione può essere sostituito dopo l'interazione con questo strato di riconoscimento con un adeguato campione standard (ad esempio una soluzione buffer nel caso di saggi biologici), lavando via qualsiasi composto che non ha reagito con lo strato di riconoscimento. Opportuni polimeri o matrici di sol-gel sono stati depositati sulla superficie della fibra per la rivelazione di sostanze chimiche che vengono adsorbite o che penetrano all'interno dello strato di riconoscimento [3]: matrice di sol-gel con SnO_2 per la rivelazione di vapori di etanolo, film sottili polimerici per la misura di pH, polistirene sindiotattico nella forma cristallina nanoporosa δ per la rivelazione del cloroformio, strato sottile di palladio/ strato sottile di argento per la rivelazione di H_2 , film sottile di perovskite con nanocristalli per la rivelazione di bassi livelli di H_2 e copolimeri per la rivelazione di vapori di composti organici volatili. In questo caso, generalmente, la selettività è soltanto parziale in quanto lo strato non risulta essere completamente selettivo per un solo analita ma assorbe più di un composto. Per questi tipi di sensori, lo spessore dello strato entro il quale l'analita viene assorbito è chiaramente critico e svolge dunque un ruolo fondamentale. Più spesso è lo strato, maggiore è la sensibilità del sensore poiché maggiore è la frazione di radiazione ottica modulata dall'analita. D'altro canto, lo spessore dello strato è limitato da due fattori: la profondità di penetrazione dell'onda evanescente all'interfaccia mantello/strato di riconoscimento (se l'indice di rifrazione dello strato è inferiore rispetto a quello del mantello della fibra, come in quasi tutti i casi) e il tempo di risposta del sensore, il quale ovviamente aumenta con l'aumentare dello spessore dello strato. Pertanto, deve essere sempre fatto un compromesso tra la sensibilità e il tempo di risposta.

In sensori biochimici, l'utilizzo di un elemento di riconoscimento biologico (*biological recognition element*, BRE) in grado di legarsi con l'analita in esame è molto comune, vista anche l'elevata selettività che può anche essere ottenuta, a seconda dell'affinità tra il BRE e l'analita in esame. La prima dimostrazione che i reticoli a fibra ottica possono essere utilizzati come biosensori è stata realizzata da *Wang et al.* [13], che hanno dimostrato come multistrati ionici autoassemblati si possano assorbire sulla superficie di un LPGs e possano essere efficacemente utilizzati come biosensori, sfruttando la coppia bioconiugata biotina-streptavidina. Inoltre, gli LPG sono stati anche utilizzati come sensori *label-free* per la rivelazione di: batteri specifici utilizzando batteriofagi [14], ibridazione di sequenze di DNA [15] e interazione anticorpo-antigene [7,16-18].

Un aspetto critico nei biosensori è il fatto che il saggio biologico è condotto in soluzione acquosa ad un indice di rifrazione intorno a 1.333 RIU, dunque abbastanza lontano dal valore dell'indice di rifrazione del mantello della fibra e, di conseguenza, in un range di valori in cui la sensibilità all'indice di rifrazione risulta essere bassa (dell'ordine delle decine di nm RIU^{-1}). Come accennato nella sezione precedente, questo problema può essere superato con la deposizione lungo la porzione di fibra contenente un LPG di uno strato ad alto indice di rifrazione, ovvero un indice di rifrazione più elevato rispetto a quello del mantello della fibra. L'uso di un LPG ricoperto con uno strato di spessore nanometrico ad alto indice di rifrazione (*high refractive index*, HRI) è stato proposto per la prima volta da *James et al.* [19]. Un'analisi teorica e numerica è stata riportata da *Del Villar et al.* [11], mentre *Cusano et al.* [20] hanno studiato teoricamente e sperimentalmente le risposte e le sensibilità di LPG rivestiti per applicazioni chimiche e biochimiche. Infatti, combinando opportunamente i parametri del rivestimento HRI, si può spostare la massima sensibilità del

senso nel range desiderato di indice di rifrazione, quindi attorno all'indice di rifrazione della maggior parte delle soluzioni biologiche, ovvero 1.33–1.34 RIU [21].

Un reticolo TFBG ed un approccio di tipo SPR possono essere combinati mediante la deposizione di un sottile strato di oro sulla superficie di reticolo [22]. Questo ha permesso di sfruttare i vantaggi dell'uso di un reticolo in fibra ottica con le peculiarità di un sensore basato su SPR dando luogo a biosensori estremamente sensibili [23].

1.3.1 – Biosensori basati su reticoli a passo lungo presso l'IFAC-CNR

Un aspetto che sicuramente ha impedito ai sensori basati su reticoli in fibra ottica di raggiungere valori elevati di sensibilità, di risoluzione e di limite di rilevazione a confronto con i sistemi SPR è l'assenza nell'apparato di misura di una stabilizzazione termica e meccanica affidabile ed efficace. Infatti, tutti i dispositivi basati su reticoli sono anche sensibili alla deformazione e alla temperatura e questo aspetto può influire notevolmente sulla precisione e sull'accuratezza nella valutazione dello spostamento spettrale della λ_{res} indotto dalla sola variazione dell'indice di rifrazione. Per far fronte a ciò, come prima cosa, è stata progettata e realizzata una cella di flusso che permette la stabilizzazione termica e meccanica sia del sensore che dell'ambiente di misura in modo da poter effettuare misure di indice di rifrazione accurate ed affidabili [9]. Successivamente, al fine di confrontare le prestazioni di un sensore basato su LPG sia come rifrattometro ottico (sensibilità di volume all'indice di rifrazione) che come biosensore (sensibilità di superficie all'indice di rifrazione), sono stati realizzati quattro diversi tipi di LPG. Le sezioni seguenti descrivono in dettaglio il setup sperimentale sia di scrittura di un LPG che di misura, il protocollo del saggio biologico anticorpo-antigene utilizzato ed i risultati sperimentali ottenuti con i diversi tipi di LPG.

Setup sperimentale di scrittura degli LPG

I reticoli LPG sono realizzati utilizzando una procedura di scrittura che prevede la realizzazione della modulazione dell'indice di rifrazione su un piano reticolare alla volta, sfruttando la fotosensibilità intrinseca del nucleo delle fibre ottiche dopate con Boro e Germanio (Fibercore PS1250/1500) ed utilizzando una sorgente laser KrF ad eccimeri (Lambda Physic COMPex 110) alla lunghezza d'onda di 248 nm. La fibra ottica, montata su un traslatore motorizzato (Burleigh 6000), viene irradiata dalla radiazione laser, opportunamente sagomata da una fessura micrometrica variabile e focalizzata per mezzo di una lente cilindrica. Sia la fase di traslazione che quella di azionamento del laser sono controllate e sincronizzate da un PC attraverso un programma NI-CVI sviluppato ad hoc, con il quale è possibile scegliere sia il periodo del reticolo che il numero di impulsi laser per ogni piano reticolare. Ulteriori dettagli riguardo il setup di scrittura dei reticoli sono descritti in letteratura [24].

Le caratteristiche spettrali tipiche degli LPG fabbricati sono le seguenti: λ_{res} nel range di 1300–1650 nm, visibilità della banda di attenuazione nel range di -10/-20 dB e larghezza di banda a metà altezza (*full width at half maximum*, FWHM) nel range di 15–20 nm. Il sistema di fabbricazione degli LPG realizzato permette ogni tipo di personalizzazione delle caratteristiche del reticolo [9], quale, ad esempio, quella di fabbricare LPG con piani reticolari inclinati rispetto l'asse della fibra [6].

Gli LPG presi in esame in questo capitolo sono quattro. I primi due sono LPG standard realizzati utilizzando il setup di scrittura appena descritto e le cui bande d'attenuazione sono relative a due differenti modi di mantello [7]. Il terzo tipo è invece un TAP LPG la cui realizzazione è descritta in dettaglio in letteratura [17] e prevede ulteriori trattamenti chimici (un etching debole del mantello della fibra con acido fluoridrico HF) per ottimizzare le caratteristiche del reticolo. Il quarto tipo è infine un LPG rivestito con matrice di sol-gel silice/biossido di titanio la cui realizzazione è descritta in dettaglio in letteratura

[18] e prevede una serie di passaggi sia fisici che chimici per la preparazione e deposizione della matrice di sol-gel considerata. In generale, il rivestimento, realizzato mediante la tecnica *dip-coating* variando la viscosità della soluzione colloidale (*sol*) e/o la velocità di estrazione della fibra dalla soluzione colloidale, ha un indice di rifrazione attorno ad 1.7 RIU e uno spessore variabile tra 120 nm e 170 nm[18]. Tutte le principali caratteristiche, quali passo del reticolo, lunghezza del reticolo, ordine del modo di mantello accoppiato e lunghezza d'onda di risonanza, sono riportate in Tabella 1.

Tabella 1 – Parametri caratteristici dei quattro tipi di LPG utilizzati

Parametro caratteristico	LPG standard [7]	LPG standard [7]	LPG di tipo TAP [17]	LPG rivestito con matrice di sol-gel Si/TiO ₂ [18]
Passo del reticolo (μm)	615	370	165	342
Lunghezza del reticolo (mm)	24.6	20.35	15.2	20.52
Ordine del modo di mantello accoppiato	LP ₀₄	LP ₀₇	LP ₀₁₂	LP ₀₇ in transizione modale
Lunghezza d'onda di risonanza (nm)	1567	1553.5	1341 al TAP (1262 banda sinistra e 1460 banda destra)	1586.2

Setup sperimentale di misura

Lo schema della cella di flusso e una sua fotografia sono mostrati in Figura 3. La cella consiste di due parti: quella superiore è uno strato trasparente di PMMA spesso 4 mm che permette di vedere e controllare il canale della cella di flusso, mentre quella inferiore è uno strato di alluminio spesso 6 mm disposto in contatto termico con un elemento di raffreddamento termoelettrico composto da una serie di tre celle di Peltier. Una seconda barra di alluminio è montata sotto le celle di Peltier per aumentarne la loro efficienza. L'intero sistema di termostatazione è montato su un dissipatore di calore. La cella di flusso ha una lunghezza di 80 mm, una larghezza di 15 mm ed un'altezza di 10 mm. Il canale della cella a sezione rettangolare è realizzato sia sul PMMA che sulla barra di alluminio ed ha una lunghezza di 50 mm, una larghezza di 1 mm e una profondità di 0.5 mm. Una guarnizione realizzata in Parafilm appositamente per tale canale è interposta fra le due parti per assicurare l'impermeabilizzazione della cella di flusso. Il volume del canale risulta essere di circa 50 μL . La fibra con il suo rivestimento è incollata ai bordi della cella di flusso dove è presente una scanalatura a V, facendo uso di un adesivo ottico (Norland 65) che, dopo la sua fotopolimerizzazione con luce UV, garantisce un sigillamento sicuro della cella stessa. Due tubi di acciaio inossidabile (diametro esterno da 1.6 mm e diametro interno da 1 mm) sono posizionati sulla parte superiore della cella (PMMA) e servono da ingresso e da uscita del canale microfluidico. Per la stabilizzazione della temperatura della cella di flusso si usa un termistore, inserito nella barra inferiore di alluminio il più vicino possibile al canale, che funziona da elemento di *feedback* sulle celle di Peltier opportunamente controllate in corrente da un regolatore (ILX Lightwave LDC-3722B). La temperatura della cella microfluidica è misurata da una termocoppia collegata ad una unità termometrica (Lutron TM-917) ed inserita nella barra superiore di PMMA il più vicino possibile al canale. I dati relativi alla temperatura vengono acquisiti da un PC attraverso l'interfaccia seriale RS-232 con una risoluzione di $\pm 0.01^\circ\text{C}$ ed un tempo di campionamento di 2 s. Nonostante il fatto che il sistema di controllo TEC permette di mantenere una temperatura costante, la misura continua della temperatura è resa necessaria sia per controllare possibili derive termiche indotte da variazioni di temperatura dell'ambiente di misura che per considerare possibili effetti indotti dovuti all'iniezione di liquidi a differente temperatura all'interno della cella stessa. Ulteriori dettagli riguardo il sistema microfluidico termostatato sono descritti in letteratura [9,24].

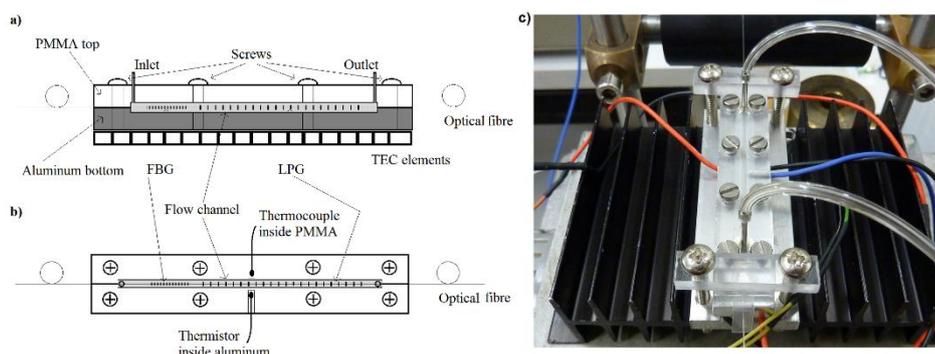


Figura 3 – Schema della cella di flusso termostata realizzata: sezione trasversale (a), vista dall'alto (b) ed una fotografia della stessa (c) [9]

Il setup sperimentale è completato da un diodo superluminescente a banda larga (Inphenix IPSDD1503) utilizzato come sorgente ottica, da un analizzatore di spettro ottico (Anritsu MS9030A e MS9701B) usato per registrare lo spettro trasmesso del LPG centrato nella lunghezza d'onda della banda di attenuazione di interesse e da una pompa peristaltica (Gilson MINIPULS 3), che permette di iniettare le soluzioni nella cella di flusso attraverso dei tubi in PVC (F117938, diametro interno: 1.02 mm). L'analizzatore di spettro è collegato ad un PC attraverso un'interfaccia GPIB ed è controllato per mezzo di un programma NI-CVI sviluppato *ad-hoc*. Tale programma permette di salvare sia la temperatura che lo spettro del LPG, dal quale è possibile estrapolare il valore della λ_{res} facendo uso di una procedura di fitting non lineare tramite una funzione lorenziana con un tempo di acquisizione di 20 s e con una risoluzione di pochi picometri. Un esempio di tale procedura è mostrato in Figura 4 [18]. Ogni misura prevede l'acquisizione di 15 spettri, dai quali si ottiene il valor medio della $\lambda_{res,LPG}$ insieme alla relativa deviazione standard seguendo la procedura appena descritta. Questo permette di ottenere anche una valutazione dell'errore di misura dovuto all'intero setup sperimentale.

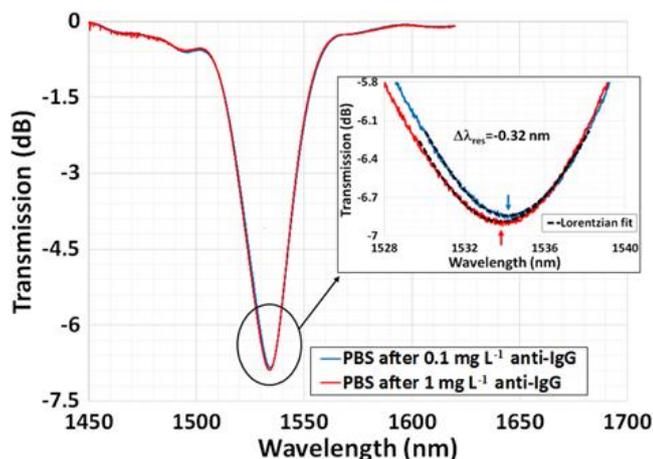


Figura 4 – Esempio della procedura di analisi dati e *processing*: due spettri presi durante l'interazione anticorpo-antigene a due differenti concentrazioni di analita (linea blu per la concentrazione di 0.1 mg L⁻¹, linea rossa per la concentrazione di 1 mg L⁻¹). Il grafico più piccolo mostra le rispettive curve di *fitting* (linee nere tratteggiate) usate per valutare in modo attendibile ed efficace lo spostamento spettrale della λ_{res} [18]

Prova di stabilità del setup di misura

Grazie alla cella di flusso realizzata è possibile misurare e, quindi, correggere possibili derive o fluttuazioni del segnale di un LPG (λ_{res}) determinate da variazioni di temperatura che potrebbero verificarsi durante la misura [9]. È stata dunque effettuata una

prova di stabilità di diverse ore sul segnale di un LPG posto all'interno della cella di flusso, facendo fluire una soluzione tampone ad una velocità costante di $250 \mu\text{L min}^{-1}$, come mostrato in Figura 5. Dalla pendenza della linea di tendenza di un approccio a regressione lineare, è stato possibile valutare un drift medio della λ_{res} inferiore al picometro all'ora con una fluttuazione massima della temperatura di $0.07 \text{ }^\circ\text{C}$ [18].

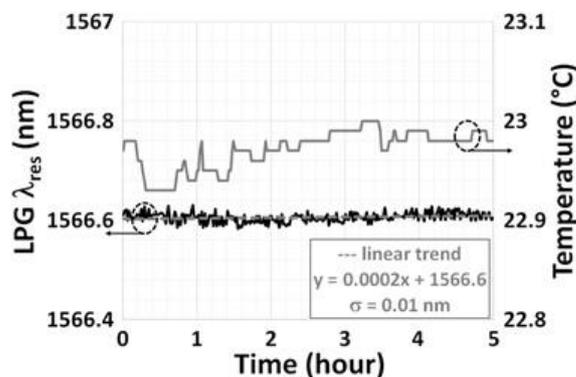


Figura 5 – Prova di stabilità di diverse ore sul segnale di un LPG (λ_{res}) posto all'interno della cella di flusso e facendo fluire una soluzione buffer ad una velocità costante di $250 \mu\text{L min}^{-1}$. La linea grigia tratteggiata rappresenta la linea di tendenza di un approccio a regressione lineare, mentre la linea grigia mostra l'evoluzione in tempo reale della temperatura della cella di flusso, impostata a $23 \text{ }^\circ\text{C}$, con fluttuazione massima di $0.07 \text{ }^\circ\text{C}$ [18]

Il biosensore

Prima di effettuare il saggio biologico, ogni sensore è stato preventivamente caratterizzato come “semplice” rifrattometro ottico in grado di misurare una variazione del segnale ($\lambda_{\text{res,LPG}}$) in funzione di un cambiamento del SRI. Per poter far ciò, sono state preparate soluzioni di acqua e glicerolo con indice di rifrazione variabile da 1.333 RIU (indice di rifrazione dell'acqua pura) fino a 1.393 RIU (40% di glicerolo), intervallo nel quale la risposta di un LPG si può considerare lineare [6,9,17,18]. L'intero esperimento è stato effettuato alla temperatura costante di $23 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$. Inoltre, per ciascuna soluzione analizzata, la misura è stata effettuata dopo circa 10 minuti quando sia il segnale del LPG che la temperatura risultavano stabili. Dopo ciascuna misura, la fibra è stata pulita facendo fluire ad alta velocità ($500 \mu\text{L min}^{-1}$) acqua deionizzata per 10 minuti.

Una volta eseguito il test rifrattometrico, per ognuno dei quattro tipi differenti di LPG, è stato effettuato il saggio biologico anticorpo-antigene IgG/anti-IgG che prevede i seguenti passi:

- funzionalizzazione della superficie della fibra depositando un copolimero anionico (Eudragit L100) disciolto in etanolo che fornisce i gruppi carbossilici (-COOH) funzionali all'immobilizzazione dell'elemento di riconoscimento biologico, nel nostro caso un anticorpo (1 minuto di immersione della fibra nella soluzione e 15 minuti di evaporazione del solvente); da qui in poi la fibra è montata all'interno della cella di flusso e tutti i passi successivi sono eseguiti in flusso;
- attivazione dei gruppi funzionali con chimica di *cross-linking* standard EDC (2 mM) ed NHS (5 mM) (30 minuti a $150 \mu\text{L min}^{-1}$);
- immobilizzazione dell'anticorpo di cattura (immunoglobulina G, IgG, disciolto in tampone fosfato salino (phosphate buffered saline, PBS) alla concentrazione di 1000 mg L^{-1}) (1 ora a $25 \mu\text{L min}^{-1}$);
- lavaggio con la soluzione tampone pura per rimuovere gli anticorpi non immobilizzati sulla superficie del sensore (5 minuti a $250 \mu\text{L min}^{-1}$);

- passivazione della superficie sensibile utilizzando una soluzione di BSA in PBS al 3% per ridurre l'adsorbimento non specifico, ovvero l'interazione sulla superficie sensibile di antigeni non specifici per l'anticorpo immobilizzato (15 minuti a $150 \mu\text{L min}^{-1}$).
- completamento del saggio biologico facendo fluire concentrazioni crescenti di antigene specifico (anti-IgG) coprendo un intervallo di concentrazione da 0.01 mg L^{-1} a 100 mg L^{-1} (15 minuti di incubazione dell'antigene a $25 \mu\text{L min}^{-1}$ e 5 minuti di lavaggio in soluzione tampone PBS pura a $250 \mu\text{L min}^{-1}$).

Tutto il saggio biologico è stato eseguito mantenendo costante la temperatura della cella di flusso a 23°C . La Figura 6 schematizza passo passo il protocollo anticorpo-antigene appena descritto. Per ulteriori dettagli riguardo il protocollo IgG/anti-IgG, si consulti la letteratura [7,17,18].

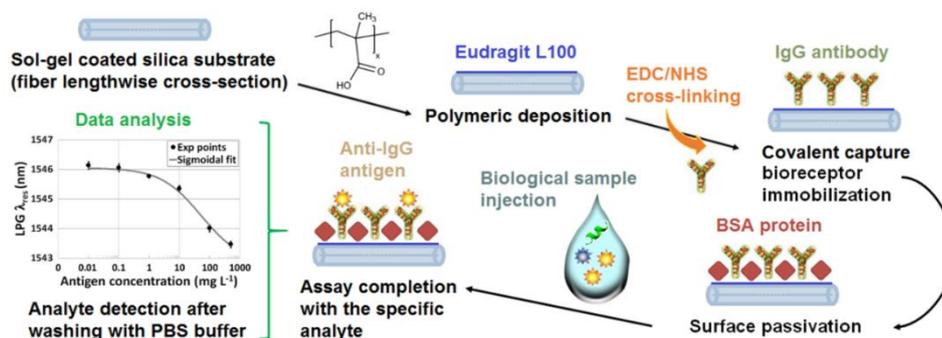


Figura 6 – Schematizzazione passo passo del protocollo utilizzato per la realizzazione del saggio biologico anticorpo-antigene su sensori in fibra ottica basati su LPG: dalla preparazione dello strato biologico sensibile (funzionalizzazione della superficie, attivazione dei gruppi funzionali, immobilizzazione dell'anticorpo di cattura e passivazione della superficie sensibile) fino al completamento del saggio e l'analisi dei dati [18]

Risultati sperimentali in termini di sensibilità e limite di rivelazione

Dal test rifrattometrico eseguito su tutti e quattro i sensori qui considerati, è stato possibile valutare la loro sensibilità (*bulk* o di volume) all'indice di rifrazione come misura preliminare delle prestazioni di un biosensore [3]. Due esempi di tale test sono mostrati in Figura 7 e in Figura 8.

Figura 7 dettaglia il test rifrattometrico per il TAP LPG, ovvero riporta lo spostamento della $\lambda_{\text{res,LPG}}$ in funzione dell'indice di rifrazione esterno (miscele di acqua e glicerolo ad indice di rifrazione crescente da 1.333 RIU a 1.393 RIU) con il dettaglio degli spostamenti della banda d'attenuazione a più basse lunghezze d'onda (in nero) e di quella a più alte lunghezze d'onda (in grigio) in Figura 7(a), mentre Figura 7(b) riporta lo spostamento differenziale tra le due bande d'attenuazione. La barra di errore orizzontale rappresenta l'errore sulla misura dell'indice di rifrazione della soluzione che è stata posta fissa a ± 0.001 RIU. Eseguendo un fit lineare dei dati sperimentali si ricava la pendenza della retta di fitting che fornisce il valore di sensibilità del sensore espresso in nm RIU^{-1} . In questo caso si è ottenuto una sensibilità di $1.3 \times 10^3 \text{ nm RIU}^{-1}$.

Figura 8 riporta invece il test rifrattometrico eseguito nel caso di un LPG rivestito con matrice di sol-gel silice/biossido di titanio. In questo caso si mostra l'evoluzione complessiva dello spettro (banda d'attenuazione considerata) in funzione dell'indice di rifrazione esterno (sempre miscele di acqua e glicerolo ad indice di rifrazione crescente da 1.333 RIU a 1.393 RIU). In questo caso si è ottenuto una sensibilità di $2 \times 10^3 \text{ nm RIU}^{-1}$. Tutti gli altri valori relativi ai due LPG standard sono riportati in Tabella 2.

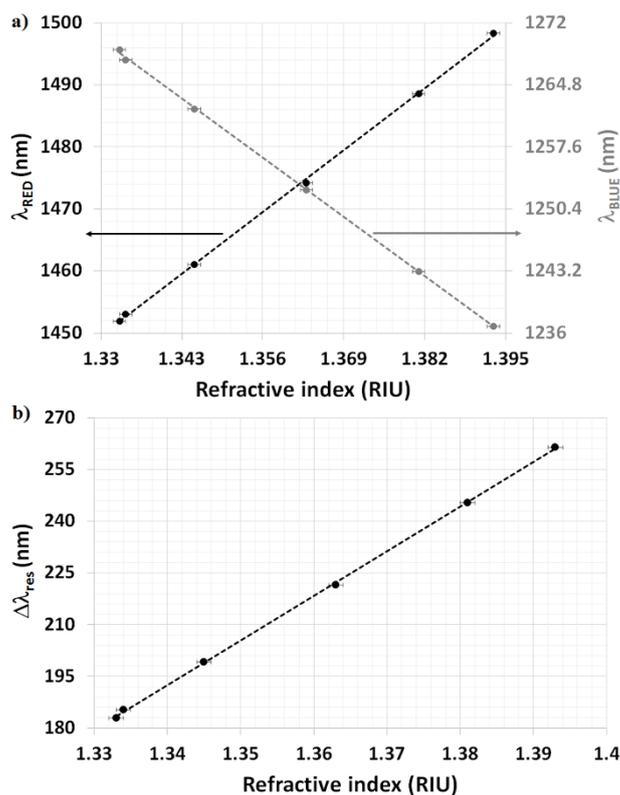


Figura 7 – Test rifrattometrico per il TAP LPG: spostamento della $\lambda_{res,LPG}$ in funzione dell'indice di rifrazione esterno facendo uso di diverse miscele di acqua e glicerolo ad indice di rifrazione crescente da 1.333 RIU a 1.393 RIU. (a) Dettaglio degli spostamenti della banda d'attenuazione a più basse lunghezze d'onda (*blue shift* in grigio) e di quella a più alte lunghezze d'onda (chiamata *red* in nero). (b) Dettaglio dello spostamento differenziale tra le due bande d'attenuazione del TAP LPG. La barra di errore orizzontale rappresenta l'errore sulla misura dell'indice di rifrazione della soluzione che è stata posta fissa a ± 0.001 RIU [17]

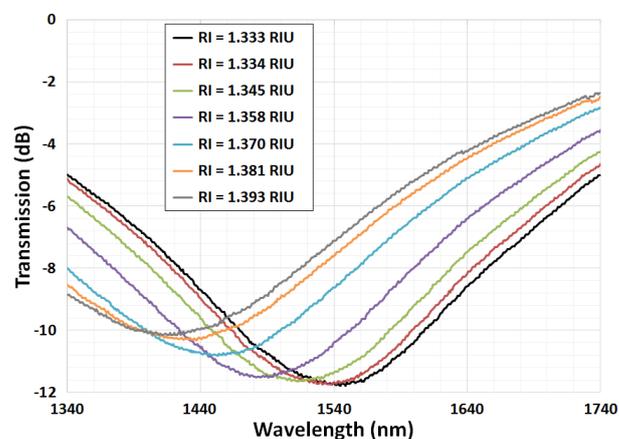


Figura 8 – Test rifrattometrico eseguito per il LPG rivestito con matrice di sol-gel silice/biossido di titanio: evoluzione complessiva dello spettro (banda d'attenuazione considerata) in funzione dell'indice di rifrazione esterno facendo uso di diverse miscele di acqua e glicerolo ad indice di rifrazione crescente da 1.333 RIU a 1.393 RIU

Utilizzando il setup di misura descritto in questo capitolo, tutti i passi del protocollo di implementazione del saggio biologico possono essere monitorati in tempo reale al fine di seguire l'evoluzione della $\lambda_{res,LPG}$ in funzione del tempo. Esempi di tali curve di risposta sono mostrati in letteratura in differenti pubblicazioni [7,17,18,24].

Riportando il valore della $\lambda_{res,LPG}$ in funzione della concentrazione dell'antigene, è possibile ottenere la curve di calibrazione del biosensore in esame. Al fine di avere un

confronto immediato tra le varie risposte, il valore della $\lambda_{res,LPG}$ relativo alla prima concentrazione di antigene è stato riportato a 0 per tutti i biosensori testati. Un esempio di tali curve di calibrazione è mostrato in Figura 9 per il saggio biologico IgG/anti-IgG implementato seguendo il protocollo descritto in questo capitolo. La figura far vedere i punti sperimentali (ogni punto indica il valor medio di 15 misure dalle quali si ottiene anche la relativa deviazione standard) ottenuti nel caso del LPG standard (cerchi blu) ed in quello del LPG rivestito con matrice di sol-gel silice/biossido di titanio (cerchi rossi). Le due linee grigie tratteggiate rappresentano invece la miglior curva di fitting sigmoidale dei dati sperimentali utilizzando la funzione logistica. La stessa procedura è stata eseguita per tutti gli altri sensori presi in esame in questo capitolo.

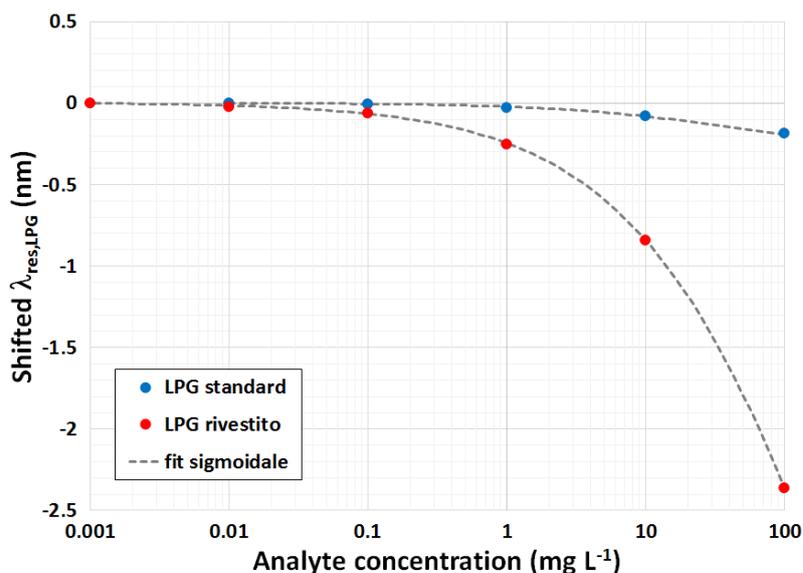


Figura 9 – Curva di calibrazione del biosensore ($\lambda_{res,LPG}$ riportata a 0 in funzione della concentrazione di analita) ricavata dall'implementazione del saggio biologico IgG/anti-IgG per il LPG standard (cerchi blu) e per il LPG rivestito con matrice di sol-gel silice/biossido di titanio (cerchi rossi). Le due linee grigie tratteggiate rappresentano la miglior curva di fitting sigmoidale (funzione logistica) dei dati sperimentali.

Tre parametri importanti per la valutazione delle prestazioni di un biosensore possono essere estrapolati direttamente (e solamente) dalla sua curva di calibrazione. Il primo è chiamato range dinamico del segnale (*dynamic signal range*, DSR) e rappresenta la variazione totale del segnale durante l'intera misura (spostamento totale della $\lambda_{res,LPG}$). Il secondo è rappresentato dalla deviazione standard sperimentale σ usata come figura di rumore della misura. L'ultimo parametro, ed anche il più importante, è chiamato limite di rivelazione (*limit of detection*, LOD) del sensore. In accordo con la definizione fornita da IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), esso è definito come la concentrazione corrispondente a tre volte la deviazione standard σ della misurazione del bianco, ovvero il punto iniziale a concentrazione 0 di antigene. Praticamente, può essere estrapolato attraverso l'inverso della funzione di fitting valutata nel punto della curva definito in precedenza. Vale la pena sottolineare che il valore della deviazione standard sperimentale risulta sempre confrontabile col valore massimo dei residui ottenuti dal fitting sigmoidale, testimoniando la bontà e la funzionalità dell'intero sistema di misura proposto.

Tabella 2 riporta tutti i parametri prestazionali dei reticoli considerati in questa analisi al fine di valutare in modo oggettivo le performance di un sensore basato su LPG in termini di sensibilità all'indice di rifrazione del mezzo che circonda la fibra, deviazione standard della misura come studio di rumore del sistema, risoluzione in termini di minimo segnale distinguibile dal rumore e calcolato come 3 volte la deviazione standard diviso la sensibilità [9], di DSR e di LOD. Come si può osservare, le migliori performance sono state ottenute con il LPG rivestito con matrice di sol-gel silice/biossido di titanio.

Tabella 2 – Parametri prestazionali per valutare le performance di un sensore basato su LPG in termini di sensibilità di volume, rumore (deviazione standard), risoluzione, DSR e LOD: esempio di due LPG standard, LPG di tipo TAP e LPG rivestito con matrice di sol-gel silice/biossido di titanio.

Parametro prestazionale	LPG standard (LP04) [7]	LPG standard (LP07) [7]	LPG di tipo TAP [17]	LPG rivestito [18]
Sensibilità di volume S (nm RIU ⁻¹)	14	29	1306	2008
Deviazione standard σ (nm)	0.005	0.011	0.22	0.012
Risoluzione R (RIU)	10^{-3}	10^{-3}	5×10^{-4}	1.8×10^{-5}
Range dinamico del segnale DSR (nm)	0.03	0.27	5.7	3
Limite di rivelazione LOD (mg L ⁻¹)	7.6	0.5	0.05	0.025

Infine, una prova di fattibilità del biosensore proposto è stata effettuata utilizzando un altro TAP LPG e lo stesso saggio biologico qui descritto ma con l'antigene (anti-IgG) mescolato in una matrice biologica complessa (ovvero che contiene molti altri antigeni non specifici per l'anticorpo di cattura immobilizzato) fatta di siero umano, invece che una semplice soluzione tampone (cioè che contiene solamente l'antigene specifico per l'anticorpo di cattura immobilizzato). Il valore del LOD ottenuto è risultato essere di 70 $\mu\text{g L}^{-1}$ quindi confrontabile con quello ottenuto in PBS. Questo risultato testimonia, non solo la bontà del sensore ma anche la specificità del saggio biologico.

1.4 - Conclusioni e prospettive future

È difficile confrontare tutti i diversi tipi di sensori chimici e biosensori basati su reticoli in fibra ottica, avendo ognuno i suoi vantaggi e svantaggi. Alcuni autori rivendicano un miglioramento delle prestazioni sfruttando ordini superiori di modi di mantello. Questo è sicuramente vero in termini di sensibilità di volume all'indice di rifrazione del campione, poiché un modo di mantello di ordine elevato penetra maggiormente nel mezzo esterno, essendo caratterizzato da un valore maggiore di profondità di penetrazione del campo evanescente [3]. Considerando la misura di variazione dell'indice di rifrazione di superficie, questo miglioramento non è automaticamente tradotto in una migliore prestazione del sensore chimico o del biosensore in quanto l'interazione avviene lungo uno strato spesso poche decine di nanometri, come nel caso di un saggio biologico dove le specie in gioco sono dello stesso ordine di grandezza. Se si considera che, come già accennato, la lunghezza d'onda di lavoro di un reticolo in fibra ottica è generalmente compreso nell'intervallo 1.3-1.6 μm e, conseguentemente, la profondità di penetrazione è dell'ordine di alcune centinaia di nanometri [3], un sensore basato su reticoli in fibra ottica può giocare un ruolo importante soprattutto nel caso di misura di analiti di dimensioni maggiori, quali microrganismi o virus. In questo caso, essi sono in linea di principio in grado di ottenere prestazioni migliori a confronto con altri approcci ottici, come SPR o sensori in guida d'onda planare, che sono caratterizzati da valori di profondità di penetrazione che può essere anche dell'ordine delle decine di nanometri [2].

In generale, un LPG opportunamente rivestito permette di ottenere attualmente elevate prestazioni, non solo in termini di sensibilità (circa 10^4 nm RIU⁻¹) ma anche come LOD (dell'ordine dei microgrammi per litro o 10^{-11} M) [18]. Inoltre, sfruttando l'utilizzo della fibra ottica, questi risultati potrebbero aprire nuovi scenari nel panorama della misura simultanea multi-analita in matrici biologiche complesse, quali siero e plasma fino ad arrivare al sangue.

Bibliografia

1. Fan X, White IM, Shopova SI, Zhu H, Suter JD, Sun Y, *Analytica Chimica Acta*, 620, p. 8–26 (2008)
2. Piliarik M, Homola J, *Optics Letters*, 17, p. 16505–16507 (2009)
3. Baldini F, Brenci M, Chiavaioli F, Giannetti A, Trono C, *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 402, p. 109–116 (2012)
4. Erdogan T, *Journal of the Optical Society of America A*, 14, p. 1760–1773 (1997)
5. Stewart G, Jin W, Culshaw B, *Sensors and Actuators B*, 38, p. 42–47 (1997)
6. Chiavaioli F, Trono C, Baldini F, *Applied Physics Letters*, 102, p. 231109(4pp) (2013)
7. Chiavaioli F, Trono C, Giannetti A, Brenci M, Baldini F, *Journal of Biophotonics*, 7, p. 312–322 (2014)
8. Patrick HJ, Kersey AD, Bucholtz F, *Journal of Lightwave Technology*, 16, p. 1606–1612 (1998)
9. Trono C, Baldini F, Brenci M, Chiavaioli F, Mugnaini M, *Measurement Science and Technology*, 22, p. 075204 (9pp) (2011)
10. Shu X, Zhang L, Bennion I, *Journal of Lightwave Technology*, 20, p. 255–266 (2002)
11. Del Villar I, Matias IR, Arregui FJ, Lalanne P, *Optics Express*, 13, p. 56–69 (2005)
12. Del Villar I, *Optics Express*, 23, 8389–8398 (2015)
13. Wang Z, Heflin JR, Van Cott K, Stolen RH, Ramachandran S, Ghalmi S, *Sensors and Actuators B*, 139, p. 618–623 (2009)
14. Smietana M, Bock WJ, Mikulic P, Ng A, Chinnappan R, Zourub M, *Optics Express*, 19, p. 7971–7978 (2011)
15. Chen X, Zhang L, Zhou K, Davies E, Sugden K, Bennion I, Hughes M, Hine A, *Optics Letters*, 32, p. 2541–2543 (2007)
16. DeLisa MP, Zhang Z, Shiloach M, Pilevar S, Davis CC, Sirkis JS, Bentley WE, *Analytical Chemistry*, 72, p. 2895–2900 (2000)
17. Chiavaioli F, Biswas P, Trono C, Bandyopadhyay S, Giannetti A, Tombelli S, Basumallick N, Dasgupta K, Baldini F, *Biosensors and Bioelectronics*, 60, p. 305–310 (2014)
18. Chiavaioli F, Biswas P, Trono C, Jana S, Bandyopadhyay S, Basumallick N, Giannetti A, Tombelli S, Bera S, Mallick A, Baldini F, *Analytical Chemistry*, 87, p. 12024–12031 (2015)
19. James SW, Rees ND, Ashwell GJ, Tatam RP, *Optics Letters*, 9, p. 686–688 (2002)
20. Cusano A, Iadicicco A, Pilla P, Contessa L, Campopiano S, Cutolo A, Giordano M, *Optics Express*, 14, p. 19–34 (2006)
21. Pilla P, Trono C, Baldini F, Chiavaioli F, Giordano M, Cusano A, *Optics Letters*, 37, p. 4152–4154 (2012)
22. Shevchenko YY, Albert J, *Optics Letters*, 32, p. 211–213 (2007)
23. Voisin V, Pilate J, Damman P, Mégret P, Caucheteur C, *Biosensors and Bioelectronics*, 51, p. 249–254 (2014)
24. Chiavaioli F, Tesi di Dottorato dal titolo “Design, development and test of a refractometer based on optical fiber gratings: physical and biochemical applications” (Gennaio 2012)

LA STIMA DELLA CLOROFILLA DA SATELLITE NEL MAR LIGURE E TIRRENO SETTENTRIONALE

Chiara Lapucci^{1,2}, Carlo Brandini^{1,2}, Alberto Ortolani^{1,2},
Maurizio Pieri^{1,2}, Fabio Maselli¹, Bernardo Gozzini²

¹ *Istituto di Biometeorologia (IBIMET) del CNR*

² *Consorzio LaMMA*

1.1 - Introduzione

Il telerilevamento, o *remote sensing*, rappresenta l'insieme delle tecniche, strumenti e mezzi interpretativi che permettono l'acquisizione a distanza di informazioni qualitative e quantitative su fenomeni o oggetti, senza entrare in contatto diretto con essi. Il veicolo che trasporta l'informazione dalla Terra al sensore è la radiazione elettromagnetica.

L'abbondanza di fitoplancton (come concentrazione di clorofilla) nella superficie del mare può essere mappata appunto con il telerilevamento, misurando la radiazione elettromagnetica proveniente dal mare con strumenti ottici a bordo di satelliti in orbita intorno alla Terra. La tecnica si chiama radiometria di *ocean color*, e ha dimostrato di essere una delle più fruttuose tra le tecnologie di telerilevamento.

La clorofilla è infatti presente nel mare, contenuta nel fitoplancton¹. Esso è costituito da organismi unicellulari, delle dimensioni dell'ordine di millesimi di millimetro, importantissimi perché, in quanto produttori primari, sono alla base della catena alimentare del mare. La clorofilla cattura l'energia elettromagnetica della luce, sotto forma di fotoni, che tramite la fotosintesi viene immagazzinata nei legami chimici ad alta energia del glucosio (organizzazione del carbonio). Questo processo comporta consumo di molecole di anidride carbonica e rilascio di molecole di ossigeno: il fitoplancton, in alcune zone oceaniche nei periodi dell'anno di massima fioritura arriva a produrre la metà dell'ossigeno totale prodotto dagli organismi vegetali della Terra.

In particolari condizioni si forma un eccesso di fitoplancton, eutrofizzazione, che è indice di uno stato di squilibrio dell'ecosistema, causato di norma da inquinamento antropico. Ecco perché le più recenti direttive europee, Water Framework Directive (2000/60/EC) e Marine Strategy (2008/56/EC), indicano la clorofilla come parametro importante (buon indicatore) per determinare lo stato ecologico del mare. I satelliti che osservano l'*ocean color* forniscono dati che elaborati con opportuni algoritmi permettono di calcolare il contenuto di clorofilla nello strato superficiale del mare.

Uno dei problemi più importanti che affliggono il nostro Pianeta oggi è il *climate change*. Uno degli aspetti più preoccupanti di questo fenomeno è costituito dall'aumento della CO₂ atmosferica, che provoca acidificazione del mare (*ocean acidification*) e aumento della temperatura del globo, e di conseguenza anche delle temperature marine. La qualità delle acque del mare nelle zone costiere, particolarmente vulnerabili alle attività antropiche, costituisce un'altra criticità importante. L'*ocean color* costituisce una finestra unica di osservazione dell'ecosistema marino a scala sinottica: è il solo metodo che permette di ottenere una visione globale della biosfera marina, risultando così uno strumento fondamentale per investigare questi problemi. Il *climate change* risulta accelerato dall'aumento dell'effetto serra, che è principalmente dovuto all'aumento di CO₂ provocato dalle attività antropiche. È importante perciò comprendere i processi che controllano le concentrazioni atmosferiche di CO₂ come anche di altri gas serra. Il nostro Pianeta è un sistema in cui la terra, i mari e l'atmosfera interagiscono strettamente tra di loro, e ciò

¹ La clorofilla in mare è contenuta anche nelle alghe pluricellulari e nelle piante acquatiche, che si trovano in particolari zone costiere, e solo in queste zone possono contribuire al segnale radiometrico che arriva al sensore.

richiede sistemi di osservazione che mettano in luce le connessioni fra questi. Il ciclo del carbonio terrestre include flussi bidirezionali tra le varie componenti, tra le quali il ruolo del mare è di particolare importanza. Lo studio dell'*ocean color* permette di individuare indicatori ecologici, che aiutino a definire i cambiamenti degli ecosistemi conseguenti alle perturbazioni provocate da cause naturali o antropiche. Esso permette anche di seguire l'andamento delle fioriture algali e dei fenomeni di eutrofizzazione, e questo oltre che tutela della salute del mare costituisce un prezioso supporto per il turismo e per l'acquacultura. I dati di *ocean color* sono anche importanti per definire le aree marine protette, come anche gli habitat delle specie a rischio di estinzione. Inoltre il fitoplancton utilizza la CO₂ nella fotosintesi, costituendo così di per sé un *sink* di carbonio² potenzialmente importante, dunque riveste un ruolo chiave proprio nel ciclo del carbonio. L'uptake annuale di CO₂ su scala globale (circa 50 gigatonnellate) può essere quantificato utilizzando dati di *ocean color*, che vengono anche utilizzati per inizializzare e validare modelli di ecosistema marini (per lo studio del *climate change* e dei cicli di carbonio globali).

1.2 - Telerilevamento e *ocean color*: lo studio del colore del mare

Analizzando la luce riflessa o emessa dalla superficie marina nelle varie lunghezze d'onda si possono ottenere numerose informazioni sul mare, come quelle relative alla sua temperatura superficiale, o al colore del mare, che può anche essere definito come la risposta spettrale del mare misurata da un sensore remoto che opera nel campo visibile dello spettro elettromagnetico (400-700 nm). Lo studio del colore del mare tramite telerilevamento permette di ottenere informazioni sui parametri biogeochimici, principalmente sulla clorofilla, che influenzano proprio il colore del mare. In determinate condizioni ambientali, ossia in presenza di sostanze nutrienti (azoto, fosforo, silicio, ecc.) nell'acqua marina, e in condizioni di illuminazione solare idonea, il fitoplancton può riprodursi molto intensamente formando tipiche fioriture (bloom) algali su vaste superfici marine. Queste fioriture sono alla base della catena alimentare marina, ed hanno un ruolo analogo alle piante terrestri, rappresentando la produzione primaria da cui si sviluppa tutta la materia organica marina. Alla morte del fitoplancton, o degli organismi animali che lo hanno ingerito, il carbonio organico presente in questi organismi tenderà a depositarsi sui fondali oceanici, determinando una diminuzione di CO₂ negli strati superficiali.

La formazione dei bloom algali determina un cambiamento del colore del mare, che dal suo blu naturale tende spesso ad un colore verde, causato dalla presenza di clorofilla, e talvolta può virare anche verso tonalità di bianco o di rosso, in base alle specie fitoplanctoniche che si sono sviluppate. Per questo motivo si osserva il mare nella gamma visibile dello spettro, in modo da cogliere proprio queste variazioni di colore.

Le osservazioni dei satelliti costituiscono un grande vantaggio rispetto all'analisi puntuale ottenuta dalle campagne di misura eseguite in mare, proprio per la possibilità di esaminare, nel momento della ripresa satellitare, vaste superfici del globo (visione sinottica). I dati satellitari permettono, tramite specifici algoritmi, di stimare le concentrazioni dei principali parametri marini. Infatti il colore del mare è determinato dal colore dell'acqua in se (acqua pura) e da alcuni costituenti biogeochimici, otticamente attivi, presenti nell'acqua marina, per lo più rappresentati dalla clorofilla, presente come pigmento nel fitoplancton, dalla sostanza organica disciolta (CDOM, Colored Dissolved Matter), detta anche sostanza gialla (YS, Yellow Substance), che per lo più deriva dalla degradazione di sostanza organica vegetale di origine terrestre o marina, e dal materiale particellato in sospensione (SS, Suspended Sediments), di natura biotica e abiotica. Il contributo di CDOM e SS al segnale radiometrico è paragonabile in intensità a quello della clorofilla solo in certi tipi di acque, che si possono trovare in aree costiere in particolare vicine alle foci dei fiumi; nelle acque di mare aperto (offshore) il segnale radiometrico proveniente dall'acqua marina

² Attività, processi, o meccanismi di rimozione (e sequestro) di biossido di CO₂ dall'atmosfera.

è da attribuirsi quasi interamente alla clorofilla. La variazione di concentrazione di questi parametri modifica le caratteristiche ottiche di assorbimento e di diffusione dell'acqua marina, e di conseguenza il colore del mare, e ciò è osservabile dai satelliti di *ocean color*.

1.2.1 Telerilevamento e sensori satellitari per lo studio dell'*ocean color*

Il telerilevamento da satelliti di osservazione della Terra è diventato un aspetto sempre più importante nel monitoraggio del pianeta, e ha permesso di aumentare notevolmente la nostra comprensione della natura, con i suoi complessi e numerosi sistemi e processi ambientali e climatici interconnessi. I satelliti per l'osservazione della Terra possono essere collocati in orbite polari relativamente vicine, ad esempio ad una altezza poco inferiore a 1000 km, ed hanno un tempo di rivisitazione di circa 2 giorni. Questo significa che per una determinata area sulla Terra abbiamo un'immagine ogni due giorni e di conseguenza, questo è il tempo necessario perché tutto il globo venga osservato dal quel satellite. I satelliti per l'osservazione dell'*ocean color* sono di questo tipo. I satelliti possono anche essere collocati ad una distanza molto maggiore, come quelli in "orbita geostazionaria", in cui il satellite rimane ad un punto fisso apparente relativamente alla rotazione della Terra, a 36.000 km di distanza da questa. In quest'ultimo caso la risoluzione spaziale delle immagini risulterà molto scarsa (ordine dei km) ma la scansione del globo può essere eseguita a scale temporali dell'ordine dei minuti.

I segnali di radiazione elettromagnetica provenienti dalla superficie terrestre, come anche dalla superficie marina, prima di giungere al sensore sul satellite devono passare attraverso l'intero spessore dell'atmosfera terrestre, e in questo cammino tali segnali interagiscono con questa e vengono modificati. Questi 'effetti atmosferici' devono essere misurati e eliminati prima dell'applicazione degli algoritmi di stima dei parametri marini, e ciò è importante sia nella progettazione di questi strumenti che nello sviluppo delle tecniche di elaborazione dei dati. Il processo di correzione atmosferica è particolarmente delicato, dato che il segnale che viene misurato dal sensore è dovuto in gran parte al contributo atmosferico, mentre quello che giunge dalla superficie marina rappresenta solo il 5-10% del segnale totale. Un insieme di equazioni matematiche descrive la fisica del trasferimento radiativo nell'atmosfera e nel mare.

Le immagini e i dati forniti dai satelliti di osservazione della Terra in quasi mezzo secolo sono stati la pietra angolare del lavoro che permette una maggiore comprensione del fenomeno di cambiamento climatico, e i dati che stanno raccogliendo oggi e in futuro sono di vitale importanza per capire come i vari ecosistemi terrestri sono fra loro interconnessi.

Il telerilevamento dell'*ocean color* ebbe un primo significativo sviluppo nel 1978, quando la NASA mise in orbita il satellite Coastal Zone Color Scanner (CZCS). Anche se quella del CZCS era una missione sperimentale la cui durata era stimata di un anno, questo sensore ha continuato a fornire una serie temporale di dati, valida solo su alcune aree di test, fino ai primi mesi del 1986. Sono dovuti trascorrere 10 anni per la messa in orbita di nuovi satelliti per l'*ocean color* (MOS, OCTS e POLDER). Ma il vero passo in avanti nell'*ocean color* è stato fatto con la messa in orbita dei satelliti SeaWiifs (Sea-viewing Wide Field-of-view Sensor) (NASA) (1997-2010), AQUA che ha a bordo il sensore MODIS (Moderate Resolution Imaging Spectroradiometer) NASA (2002), ed Envisat che ha a bordo il sensore MERIS (MEdium Resolution Imaging Spectrometer) (ESA) (2002-2012).

Questi satelliti, di cui solo l'AQUA MODIS è ancora operativo, hanno fornito e forniscono un'ampia disponibilità di dati di alta qualità. Infatti, oltre ad una discreta risoluzione spaziale e temporale i loro sensori hanno una particolare sensibilità radiometrica e quindi hanno un ottimo rapporto fra segnale e rumore.

Recentemente è stato messo in orbita il Suomi National Polar-orbiting Partnership che ha a bordo il sensore VIIRS (Visible Infrared Imaging Radiometer Suite) (NASA) (2011), e nei primi mesi del 2016 è in programma il lancio del satellite Sentinel-3 che ha a bordo il sensore OLCI (Ocean and Land Colour Instrument) (ESA).

1.3 - Algoritmi di stima della clorofilla da dati satellitari

La ricerca sullo sviluppo di algoritmi per ottenere stime accurate delle concentrazioni di clorofilla sia in mare aperto che in acque costiere a partire dai dati di *ocean color* è attiva da più di trenta anni.

Ci sono varie forme di questi algoritmi, e tutti prevedono una fase di pre-elaborazione dei dati satellitari. L'energia elettromagnetica del sole colpisce l'acqua del mare, dove interagisce con i costituenti otticamente attivi (clorofilla, CDOM, SS), e poi torna verso il sensore satellitare.

Dalla correzione atmosferica, che come menzionato sopra consiste nel ripulire il segnale dall'effetto dell'atmosfera, si ricava la *water leaving radiance*, la radianza che in uscita dall'acqua, che viene poi convertita in riflettanza³, *remote sensing reflectance* (R_{rs}), l'input degli algoritmi per la stima della clorofilla.

La *water leaving radiance* dipende anche dalla geometria di vista e dalla posizione solare. L'uso dei rapporti tra radianze permette di eliminare almeno parzialmente questi effetti, infatti i rapporti tra radianze variano lentamente con lunghezza d'onda, rispetto alle singole radianze.

La clorofilla assorbe molto nella zona blu dello spettro elettromagnetico, dove il massimo cade intorno 445 nm, e presenta anche un assorbimento molto debole nella fascia verde-giallo (550-580 nm). In acque oceaniche, lontane della coste, le variazioni di colore dell'acqua variano da un profondo blu nelle zone oligotrofiche ad un verde scuro in quelle eutrofiche. Gli algoritmi empirici di *ocean color* si basano su questo spostamento di riflettanza: e sono basati sul rapporto tra R_{rs} , misurate a diverse lunghezze d'onda. Il rapporto è stato scelto a causa della variabilità e incertezza riguardo al valore assoluto di R_{rs} . Per una data concentrazione di clorofilla, infatti, variazioni di specifici coefficienti di diffusione e assorbimento possono influenzare direttamente la R_{rs} , che può variare notevolmente, mentre i rapporti tra R_{rs} rimangono praticamente costanti. L'uso del rapporto riduce inoltre i problemi causati dal carattere bidirezionale della riflettanza, e riduce anche gli errori che rimangono dopo il processo di correzione atmosferica (IOCCG 1998).

Sono stati definiti due tipi principali di algoritmi di stima dei parametri marini: empirici o semi-analitici.

Spesso gli algoritmi empirici si basano sulla correlazione fra le concentrazioni di clorofilla e vari tipi di rapporto di R_{rs} a diverse lunghezze d'onda. Quindi, gli algoritmi empirici utilizzano semplici relazioni statistiche che permettono di mettere in relazione il rapporto di riflettanza, a varie lunghezze d'onda, con la concentrazione di clorofilla misurata *in situ*. Questo tipo di algoritmi presenta un grado di incertezza legato principalmente alla stima delle riflettanze da parte del sensore.

Gli algoritmi semi-analitici, invece, giungono alla stima della concentrazione di clorofilla tramite l'utilizzo di modelli. Infatti, basandosi sulla conoscenza di relazioni matematiche tra riflettanza e determinate proprietà ottiche del mezzo, dette proprietà ottiche inerenti⁴ (IOPs), determinano la concentrazione di biomassa tramite inversione di modelli bio-ottici (Morel 1988). Questo tipo di algoritmi, oltre ad essere influenzati dall'incertezza legata alla misura satellitare della riflettanza, come gli algoritmi empirici,

³ La remote sensing reflectance si calcola così:

$$R_{rs}(\lambda) = \frac{nLw(\lambda)}{F_0(\lambda)}$$

dove F_0 è l'irraggiamento solare medio, e λ è la lunghezza d'onda. La normalized water - leaving radiance, nLw , la radianza normalizzata che viene fuori dall'acqua, è definita come la radianza in risalita verso il sensore appena sopra la superficie del mare, in assenza di atmosfera, dunque per ottenerla si opera il processo di correzione atmosferica, e con il sole sulla verticale.

⁴ Proprietà intrinseche dell'acqua di mare che dipendono unicamente dalle sostanze presenti in acqua e dalla loro concentrazione.

sono influenzati anche dall'incertezza associata alle relazioni matematiche tra riflettanza e IOPs.

La concentrazione di clorofilla può essere stimata tramite algoritmi standard, come l'OC3M (O'Reilly et al., 1998) per i dati del sensore MODIS, validi a scala globale se si considerano solo le acque di mare aperto, di tipo oceanico, caratterizzate dalla presenza significativa della sola concentrazione di clorofilla, mentre per le acque più complesse, come quelle costiere, dove possono dare un contributo significativo anche gli altri parametri marini, è necessario definire degli algoritmi, di tipo regionale o locale.

La necessità di algoritmi che diano buone *performances* nell'area di studio è connessa a due caratteristiche importanti di questa.

La prima è che l'area di studio è rappresentata da due sottobacini del Mare Mediterraneo, il Mare Ligure e il Mare Tirreno settentrionale compreso fra la costa della Regione Toscana e le isole Corsica e Sardegna, e include il Santuario Pelagos per la protezione dei mammiferi marini, noto anche come Santuario dei Cetacei, un'area marina protetta in cui si trova una grande concentrazione di cetacei. Ciò è dovuto al fatto che, benché il Mare Mediterraneo sia un bacino oligotrofico e in mare aperto la concentrazione di clorofilla raramente supera i 2-3 mg m⁻³, questa area è caratterizzata, specie nel periodo della fioritura primaverile, da una maggiore produttività causata da una varietà di meccanismi di fertilizzazione che aumentano il livello di produzione primaria: le acque costiere, l'effetto differito del mescolamento invernale, fenomeni di *upwelling* e strutture complesse che sono connesse a zone di divergenza e convergenza. Conoscere la produttività di questa area costituisce un elemento chiave per la tutela dei mammiferi marini, e anche per questo è necessario disporre di algoritmi per la stima della clorofilla che diano buone *performances* a scala regionale.

La seconda è legata alla qualità delle acque nelle zone costiere, in quanto un aumento del carico di nutrienti e un arricchimento di sostanza organica possono portare a condizioni di eutrofizzazione fino addirittura alla crescita di alghe tossiche (*harmful algal bloom*). Barale et al. (2008) ha utilizzato immagini satellitari per individuare fioriture algali nel Mediterraneo.

Studi effettuati in particolare nel Mar Ligure e Nord Tirreno (Lapucci et al., 2012; Pieri et al., 2015) hanno confrontato le *performance* di diversi algoritmi per la stima della concentrazione superficiale di clorofilla con dati in situ ottenuti da campagne oceanografiche specifiche sull'area di studio. IBIMET-CNR ha implementato un algoritmo specifico, denominato SAM_LT, per l'area di studio (Maselli et al., 2009) (Figura 1). Anche l'algoritmo OC5 (Gohin et al, 2002), ha mostrato buone *performance* nell'area di studio, Figura 2.

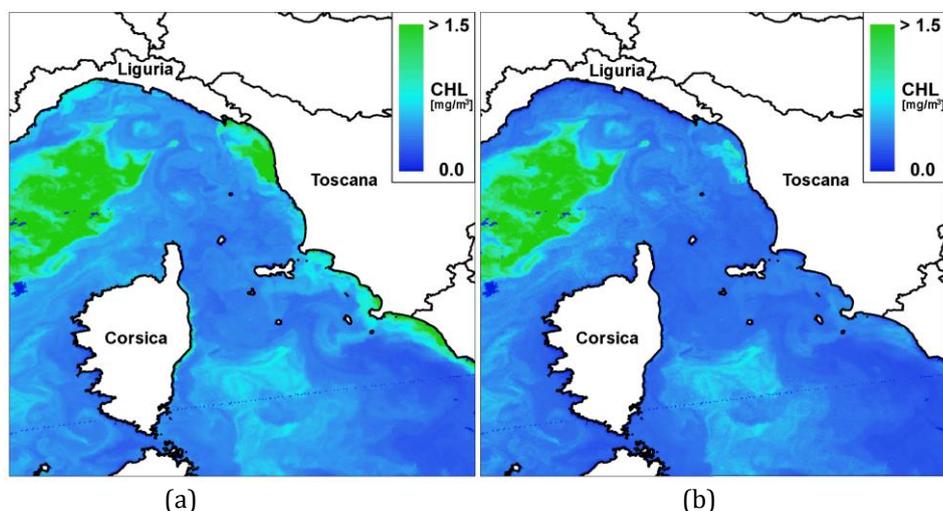


Figura 1 - Esempio di mappa giornaliera di clorofilla OC3M (a) e SAM_LT(b) relativa ad un passaggio nella primavera del 2011.

Clorofilla a MODIS OC5

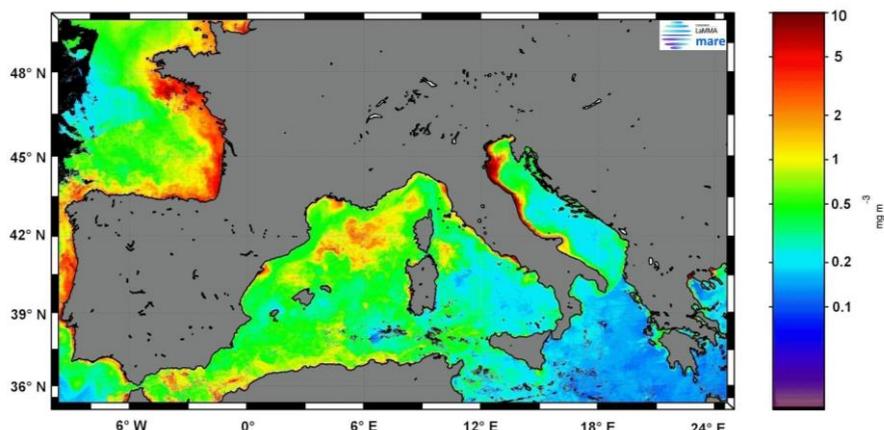


Figura 2 - Mappa di clorofilla media di 8 giorni (9 – 16 marzo 2015) ottenuta con l’algoritmo OC5 su dati MODIS.

Il CNR Ibimet insieme al Consorzio LaMMA, nell’ambito di alcuni progetti di ricerca, incluso il progetto europeo MOMAR, ha condotto vari studi che coinvolgono i dati satellitari per la stima della clorofilla e degli altri parametri marini in alcuni sottobacini del mar Ligure e Tirreno settentrionale, raccogliendo tramite campagne oceanografiche dati *in situ* di clorofilla che hanno permesso di confrontare con questi le performances degli algoritmi. È stato sviluppato un modello idrodinamico di previsione delle correnti marine (ROMS), configurato a scala regionale. Le misure di correnti marine effettuate durante le campagne oceanografiche hanno permesso di verificare l’accuratezza delle uscite del modello marino ROMS. L’utilizzo dei dati satellitari come mappe di clorofilla, di CDOM, di SS, come anche di SST (Sea Surface Temperature), unito alla modellistica oceanografica costituisce dunque uno strumento molto importante per la tutela del mare e di conseguenza utile a soddisfare le esigenze della recenti Direttive Europee sul mare. Le catene operative, che trattano i dati satellitari e li rendono disponibili alle attività di previsione delle condizioni meteo-marine del Consorzio LaMMA forniscono attualmente mappe di temperatura superficiale del mare e di concentrazione di clorofilla, come anche mappe di previsione di corrente dal modello ROMS operativo presso il LaMMA.

Il CNR Ibimet insieme al Consorzio LaMMA, tramite il progetto Interreg Sicomar, ha oggi a disposizione diversi strumenti che permettono la determinazione della clorofilla in mare tramite fluorimetro. Anche in questo caso, con questo strumento, proprio una porzione della radiazione elettromagnetica viene utilizzata per ottenere informazioni su un parametro biogeochimico grazie a una proprietà ottica della clorofilla, la fluorescenza. Lo strumento è un WaveGlider, un veicolo autonomo marino di superficie, che ha a bordo vari strumenti tra cui il fluorimetro per la stima della clorofilla, e un correntometro per la stima delle correnti marine. I dati raccolti tramite questo strumento possono essere usati nell’ambito dei sistemi operativi per la previsione o l’analisi dello stato del mare, in connessione a modelli atmosferici, idrodinamici e di moto ondoso, operativi presso il Consorzio LaMMA, sia a scopo di calibrazione/validazione dei modelli che di assimilazione in catene operative, per ridurre l’incertezza dei prodotti numerici e delle mappe di previsione. Fanno parte della dotazione strumentistica anche due FerryBox⁵, che hanno a bordo tra vari sensori e analizzatori anche un fluorimetro.

Grazie a questa strumentazione è ora possibile tracciare un quadro più chiaro delle dinamiche di clorofilla nelle zone di interesse del progetto, il mar Ligure e nord Tirreno, in prospettiva di soddisfare le recenti esigenze delineate proprio dalle recenti direttive europee come anche dalla Blue Growth Strategy.

⁵ Un FerryBox è un assemblamento di una serie di strumenti automatizzati per l’analisi di dati oceanografici, ed è installato su una nave commerciale, in genere un traghetto.

Bibliografia

1. A. Morel, IOCCG (International Ocean Color Coordinating Group) "Minimum Requirements for an Operational, Ocean-Colour Sensor for the Open Ocean," IOCCG, Dartmouth, Canada (1988), in *Reports of the International Ocean-Colour Coordinating Group*, No. 1, p. 50.
2. F. Gohin, J. N. Druon, and L. Lampert, "A five channel chlorophyll concentration algorithm applied to seawifs data processed by seadas in coastal waters," *Int. J. Rem. Sens.* 23(8), 1639-166 (2002).
3. Barale V., Jaquet J.M., Ndiaye M. (2008) - Algal blooming patterns and anomalies in the Mediterranean Sea as derived from the SeaWiFS data set (1998-2003). *Remote Sensing of Environment*, 112: 3300-3313. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rse.2007.10.014>.
4. Lapucci C., Ampolo Rella M., Brandini C., Ganzin N., Gozzini B., Maselli F., Massi L., Nuccio C., Ortolani A., Trees C., (2012) Evaluation of empirical and semi-analytical chlorophyll algorithms in the Liguran and North Tyrrhenian seas, *J. Appl. Remote Sens.* 6 (1), 063565 (September 21, 2012); doi: 10.1117/1.JRS.6.063565.
5. Maselli F., Massi L., Pieri M., Santini C. (2009) - Spectral Angle Minimization for the Retrieval of Optically Active Seawater Constituents from MODIS Data. *Photogrammetric Engineering & Remote Sensing*, 75 (5): 595-605.
6. Pieri Maurizio, Luca Massi, Luigi Lazzara, Caterina Nuccio, Chiara Lapucci, Fabio Maselli (2015) - Assessment of three algorithms for the operational estimation of [CHL] from MODIS data in the Western Mediterranean Sea. *European Journal of Remote Sensing*, 48: 383-401.
7. J. E. O'Reilly et al., "Ocean color chlorophyll algorithms for seaWiFS," *J. Geophys. Res.* 103(C11), 24937-24953 (1998), <http://dx.doi.org/10.1029/98JC02160>.

OLTRE IL VISIBILE:
LA RADIAZIONE SOLARE ULTRAVIOLETTA E I SUOI EFFETTI BIOLOGICI

G. Zipoli, F. Sabatini, M. Morabito e D. Grifoni
Istituto di Biometeorologia, Firenze
Consiglio Nazionale delle Ricerche

1.1 - Introduzione

Nell'evoluzione del pianeta Terra due processi hanno avuto un ruolo importante: la radiazione elettromagnetica in arrivo dal Sole, ed in particolare la porzione ultravioletta, e la fotosintesi, in cui gli organismi capaci di questo processo assorbono CO₂ e rilasciano O₂. Con l'attività dei primi organismi fotosintetizzanti è iniziato l'accumulo nell'atmosfera di molecole di O₂ e la complessa serie di reazioni in cui queste colpite dalla radiazione UV si scindono in atomi che reagendo con le altre molecole di O₂ danno luogo a Ozono, O₃. Questo meccanismo ha portato lentamente alla creazione dello strato di O₃ che protegge la Terra dalle più pericolose componenti della radiazione solare permettendo lentamente l'instaurarsi di forme viventi via via più complesse.

La radiazione ultravioletta, compresa tra 100 e 400 nm, è una piccola parte della radiazione elettromagnetica in arrivo dal Sole, rappresentando circa il 7-8% della radiazione in arrivo sulla superficie terrestre. Tuttavia per il suo alto contenuto di energia ha una notevole importanza per gli effetti biologici che induce. I target biologici dell'UV vanno dalle piante agli insetti agli animali incluso l'uomo. Per quest'ultimo essa ha caratteristiche particolari: infatti non è visibile dall'occhio umano (a differenza di quanto avviene per molte specie di uccelli ed insetti) e non ne percepiamo la presenza non producendo effetti immediati come avviene invece per la radiazione infrarossa di cui ci accorgiamo per il riscaldamento prodotto sulla pelle.

In relazione agli effetti biologici la radiazione UV viene convenzionalmente divisa in tre bande, UVC (da 100 a 280 nm), UVB (da 280 a 315 nm) e UVA (da 315 a 400 nm), caratterizzate da contenuti energetici crescenti al decrescere della lunghezza d'onda.

L'UVA comprende lunghezze d'onda che non vengono assorbite da nessun componente dell'atmosfera e quindi raggiungono quasi del tutto inalterate la superficie terrestre. Si è ritenuto per molto tempo che non fosse dannosa per gli esseri viventi mentre oggi esistono evidenze della pericolosità anche per la salute umana essendo ritenuta mutagenica e responsabile di danni al sistema immunitario.

La banda UVB comprende invece lunghezze d'onda caratterizzate da intensi effetti biologici che però subiscono attenuazioni per opera di vari costituenti dell'atmosfera nel loro percorso verso terra; un'altra sua rimarchevole caratteristica è l'alta diffusività responsabile del fatto che in generale della radiazione in arrivo a terra la componente diffusa dall'atmosfera rappresenta una parte assai importante, come illustra la Figura 1. A ciò è attribuito il fatto che su una superficie schermata dalla radiazione diretta dal Sole arrivi comunque una considerevole quantità di radiazione UVB.

L'UVC comprende le lunghezze d'onda più pericolose dal punto di vista biologico per il loro elevato contenuto energetico con effetti sterilizzanti; tuttavia Ozono e altri componenti atmosferici la filtrano completamente e non arriva a terra.

La quantità di UV che arriva a terra è influenzata da fattori geografici, astronomici nonché dalle condizioni dell'atmosfera e dall'ambiente circostante. La posizione geografica si traduce in termini di elevazione del Sole nel cielo nei vari periodi dell'anno e del giorno; tanto più alto è il Sole nel cielo tanto minore è il percorso ottico della radiazione UV nell'atmosfera e tanto maggiore è la sua quantità a terra. Allo stesso modo agisce la quota

cosicché l'irradianza UV aumenta con la quota. In sintesi, nell'emisfero nord per latitudini superiori ai 30°Nord, la quantità di radiazione UV in arrivo a terra, a parità degli altri fattori

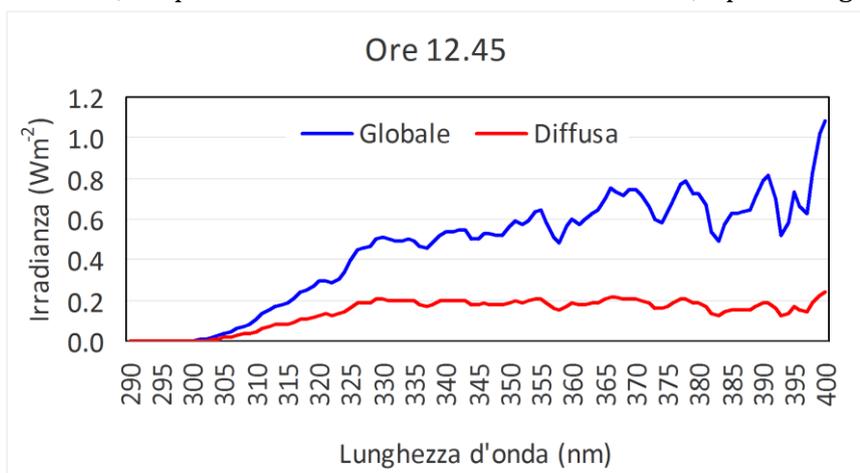


Figura 1 – Irradianza globale e diffusa intorno al mezzogiorno solare di un giorno di primavera a Firenze.

più avanti trattati, è massima al mezzogiorno solare di un giorno estivo in alta montagna.

Gli altri fattori che condizionano l'entità della radiazione in arrivo a terra si riferiscono allo stato dell'atmosfera in termini di concentrazione della colonna di Ozono, di aerosol e vapor d'acqua e soprattutto dalla presenza e tipo di copertura nuvolosa.

L'Ozono, prevalentemente quello della stratosfera, attenua la radiazione UV in modo molto selettivo filtrando quasi completamente la banda UVC e riducendo in modo marcato anche quella UVB. Il risultato è che la radiazione UV che arriva a terra è composta in modo assolutamente predominante dalla componente UVA.

È stata proprio la scoperta nella metà degli anni '80 del drammatico assottigliamento dell'O₃ stratosferico sul polo Sud e delle possibili conseguenze dell'aumento della radiazione UV in arrivo a terra da una parte a stimolare una lunga serie di ricerche per valutarne l'impatto e dall'altra a indurre la comunità internazionale a ratificare l'unico protocollo climatico (quello noto come di Montreal) entrato effettivamente e efficacemente in funzione. In effetti da allora c'è stata una sostanziale riduzione dei gas responsabili dell'assottigliamento dell'O₃ stratosferico tant'è che le previsioni relative all'irradianza UV a terra nei prossimi decenni indicano una riduzione dell'UV responsabile dell'eritema dal 2 all'8% alle nostre latitudini rispetto a quelle del 1980. Tali previsioni tuttavia sono tutte da verificare anche in relazione ai cambiamenti di altri costituenti dell'atmosfera come, oltre ai gas clima-alteranti, il vapor d'acqua e gli aerosol.

Anche l'aerosol atmosferico e altri inquinanti gassosi contribuiscono ad attenuare l'UV a terra in modo selettivo in funzione delle varie lunghezze d'onda. Ma senza dubbio il ruolo principale nel regolare il clima radiativo UV a terra è svolto dalla presenza e dalle caratteristiche delle nubi; se è vero che esse in generale attenuano la radiazione UV diretta verso terra è anche vero che in certe condizioni (presenza di sottili formazioni nuvolose, come i cirri) la radiazione UV riesce comunque ad arrivare a terra soprattutto grazie alla sua componente diffusa. Questa è una condizione di rischio non percepito di esposizione all'UV perché questo leggero strato nuvoloso blocca la componente infrarossa a cui siamo sensibili per l'effetto di riscaldamento che produce.

Tutto questo vale per la radiazione UV in arrivo su una superficie orizzontale; se invece prendiamo in considerazione superfici diversamente orientate nello spazio le cose si complicano e in particolare diventa non marginale il ruolo che viene svolto dalle caratteristiche di riflessione delle superfici, ossia dal loro albedo. E' per esempio il caso quando si studia quanta radiazione UV può ricevere una persona in posizione eretta e quindi con molte parti del corpo orientate verticalmente. Così superfici molto riflettenti come la neve possono quasi raddoppiare la radiazione in arrivo dal cielo, come bene sanno coloro che opera-

no professionalmente sulla neve e che prestano, o dovrebbero prestare, molta attenzione a proteggere la pelle e gli occhi.

Tra i diversi modi di esprimere la radiazione UV due sono più frequentemente usati in fotobiologia: l'irradianza (ossia la potenza radiante incidente sull'unità di superficie) espressa in Wm^{-2} e la dose (in Jm^{-2}), l'energia incidente sull'unità di superficie in un determinato tempo. Più avanti torneremo su quest'ultimo aspetto quando affronteremo il discorso degli effetti dell'UV sulla salute umana.

Per facilitare la diffusione dell'informazione relativa al rischio potenziale per la salute umana di una sovra-esposizione alla radiazione UV, è stato proposto l'UV-Index, un indice che va da 0 (nessun rischio) a valori che alle nostre latitudini non superano 10 (massimo rischio di esposizione, necessità di attuare tutte le misure di prevenzione e protezione).

La Figura 2 mostra il tipico andamento dell'Indice UV in una giornata estiva caratterizzata da cielo sereno.

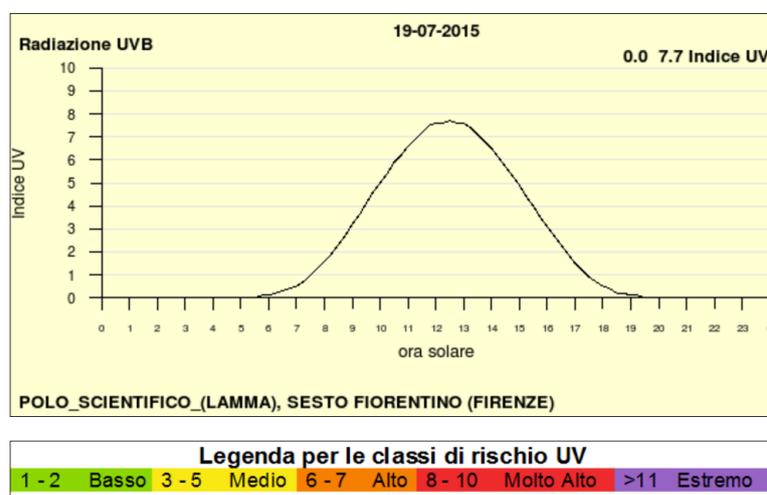


Figura 2 - Andamento giornaliero dell'Indice UV a Sesto Fiorentino.

1.2 - Gli effetti biologici

1.2.1 - Spettro d'azione

Come già accennato è l'alto contenuto energetico di questa parte della radiazione in arrivo dal Sole che la rende particolarmente efficiente nell'interagire e modificare le molecole che sono raggiunte e quindi a produrre effetti biologici. Tuttavia non tutte le lunghezze d'onda hanno la stessa efficacia nell'interagire con le varie molecole che sono alla base di molteplici processi biologici. Questo concetto sta alla base del cosiddetto *spettro d'azione* che descrive, anche matematicamente, l'efficacia delle varie lunghezze d'onda nel produrre una particolare risposta biologica. Esistono spettri d'azione molto specifici, riferendosi alle modifiche di una specifica molecola, ovvero molto più generalisti, riferendosi alle risposte di un intero organismo. Un esempio del primo è lo spettro del DNA mentre per il secondo tipo si può considerare lo spettro generale della risposta delle piante.

Si parla quindi di "radiazione UV biologicamente efficiente per..." (UVBE) quando per ciascuna lunghezza d'onda è stato applicato il fattore di efficienza proprio del processo considerato. In questo capitolo ci occuperemo prevalentemente di radiazione UV biologicamente pesata (o efficiente) per l'eritema (UVBE_{ery}), e di quella che ha effetti sulla crescita delle piante.

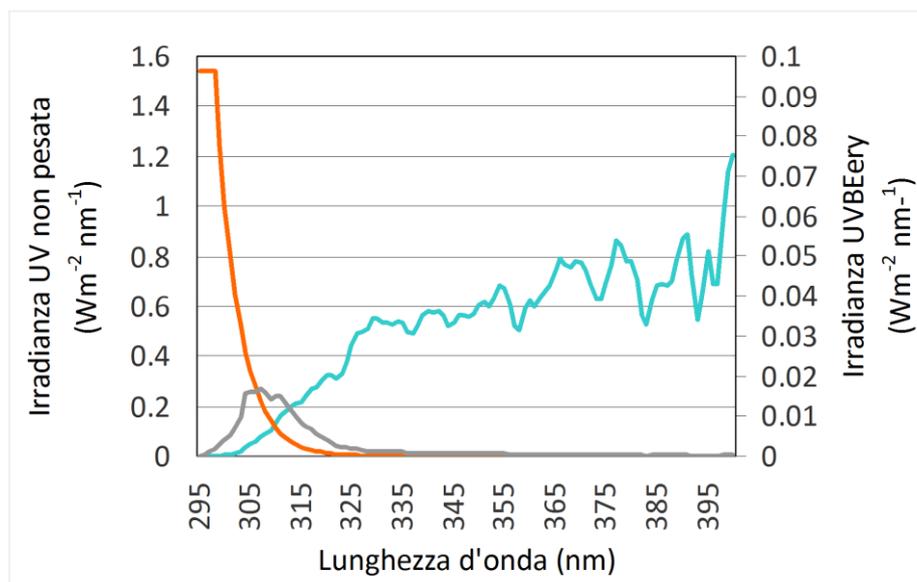


Figura 3 - Irradianza spettrale, spettro d'azione dell'eritema e irradianza eritematica

Nella Figura 3 viene riportata l'irradianza spettrale non pesata misurata intorno al mezzogiorno solare a Sesto Fiorentino il 17 Maggio 2012 (traccia blu), lo spettro d'azione dell'eritema (traccia arancione) e il risultato della combinazione delle due ovvero l'irradianza biologicamente efficace nel produrre l'eritema (traccia grigia).

1.2.2 - Effetti sulla salute umana

- **Pelle**

L'effetto acuto più conosciuto dell'eccessiva esposizione ai raggi UV è l'eritema, il familiare arrossamento della pelle popolarmente indicato come "scottatura". I tessuti della pelle reagiscono allo stress indotto dall'esposizione all'UV producendo un pigmento, la melanina, con funzioni protettive per i tessuti più profondi. Un altro effetto di adattamento meno evidente è costituito dall'ispessimento degli strati superficiali della pelle che attenua la penetrazione dei raggi UV negli strati più profondi. Ambedue le risposte sono un segno della reazione della pelle ad una situazione di stress.

Negli individui la soglia dell'eritema e la capacità di adattamento all'esposizione UV variano notevolmente a seconda del tipo di pelle. Quelle più scure contengono maggiori quantità di melanina che le rende meno sensibili ai danni da UV. Individui con pelle molto chiara e capelli biondi o rossi (fototipo I/II) presentano una maggiore sensibilità rispetto a individui con pigmentazione della pelle e dei capelli più scura (fototipo IV). E' sulla base di tale diversa sensibilità che deve essere scelto il valore del Fattore di Protezione delle creme solari con cui proteggersi.

L'esposizione cronica alla radiazione UV causa anche varie alterazioni degenerative su cellule, tessuto fibroso e vasi sanguigni della pelle. Tra queste ci sono le efelidi e i nevi, che sono aree pigmentate della pelle, e aree di diffusa pigmentazione marrone. Questi mutamenti portano all'invecchiamento precoce della pelle ed alla graduale perdita dell'elasticità che genera rughe e pelle secca.

Gli effetti cronici sulla pelle di maggiore rilevanza sanitaria sono i tumori. Ogni anno, nel mondo, si manifestano da due a tre milioni di tumori della pelle non melanocitici (carcinomi cutanei) e circa 132.000 melanomi. Mentre i primi possono essere rimossi chirurgicamente e sono raramente letali, il melanoma, sebbene molto meno diffuso, rappresenta la causa più frequente di morte per cancro della pelle. Dai primi anni '70, l'incidenza dei tumori della

pelle è significativamente aumentata. Fra i principali fattori di rischio vi sono le caratteristiche genetiche dell'individuo: i tumori della pelle sono più comuni tra le persone con la carnagione chiara, occhi chiari e capelli rossi o biondi. Generalmente l'incidenza dei tumori della pelle nella popolazione di pelle chiara aumenta al diminuire della latitudine; la più alta incidenza è stata registrata in Australia, dove i tassi annuali sono 10 e 20 volte più alti che in Europa per le femmine e per i maschi rispettivamente. Ciò in relazione alla presenza in zone caratterizzate da alte irradiante UV di una popolazione (i discendenti degli immigrati dalla Gran Bretagna) geneticamente non adattata all'ambiente.

I carcinomi ed i melanomi della pelle si manifestano più frequentemente sulle parti del corpo che sono solitamente esposte al sole come le orecchie, il viso, il collo e gli avambracci: questo implica che il principale fattore causale è l'esposizione alla radiazione UV ripetuta e di lungo periodo.

- **Occhi**

Anche gli occhi possono essere danneggiati dall'UV nonostante alcuni meccanismi automatici di difesa come la riduzione del diametro della pupilla o il riflesso che porta a socchiudere gli occhi o a non guardare il disco del Sole.

È il caso qui di rammentare che per quanto riguarda i possibili danni agli occhi non esiste la diversa sensibilità individuale vista per la pelle e il rischio di danni alla vista è ugualmente alto per tutti i fototipi indipendentemente anche dal colore degli occhi.

L'esposizione prolungata alla luce solare e soprattutto alla componente UV può indurre una serie di disturbi agli occhi che possono andare dal "semplice" bruciore che caratterizza la condizione di "occhio secco" a più serie patologie come la cataratta e patologie degenerative dei delicati tessuti che contornano l'occhio.

Tra i danni alla cornea, la fotocheratite è uno dei principali effetti acuti dell'esposizione ad alte irradianze UV come tipicamente può avvenire in condizioni in cui alla già intensa radiazione in arrivo direttamente dal Sole si aggiunge una cospicua ulteriore componente dovuta alla riflessione verso la faccia da parte delle superfici circostanti, come neve o spiagge particolarmente riflettenti.

La radiazione UV che riesce ad arrivare all'occhio viene in massima parte assorbita dai tessuti più superficiale che costituiscono la cornea e la lente. Una minoritaria porzione (nella banda UVA ed ancor più nel blu) riesce tuttavia a penetrare fino alla retina esponendola al rischio di possibili danneggiamenti.

Il cristallino è però il bersaglio più esposto allo stress da UV. La perdita progressiva di trasparenza della lente è la principale causa di cecità a livello mondiale. Questa degenerazione, almeno in alcune sue forme, si ritiene sia accelerata dall'esposizione ad alti valori di UV; non sembra casuale, infatti, che la sua diffusione a livello mondiale sia più marcata in quelle aree caratterizzate da più lunghi periodi ad alti valori UV.

A tale tipo di rischio si è esposti un po' tutti ma certamente lo sono in misura maggiore tutti coloro che lavorano all'esterno (pescatori, agricoltori, giardinieri, muratori) e soprattutto quelli che sono esposti ad un contributo aggiuntivo dovuto alla riflessione verso la faccia dell'irradianza solare dovuta a superficie molto riflettenti nella banda UV (addetti ai campi di sci, guide alpine).

- **Sistema immunitario**

Diversi studi hanno mostrato che l'esposizione, sia acuta che cronica, alla radiazione UV induce un sistematico effetto immunodepressivo, riduce cioè le capacità del sistema di difesa dell'organismo. Di conseguenza l'esposizione solare può aumentare il rischio di infezione da agenti virali, batteri, parassiti e funghi, come è stato dimostrato in differenti modelli animali. Alti livelli di radiazione UV solare, specialmente nei paesi in via di sviluppo, possono inoltre ridurre l'efficacia dei vaccini.

1.2.3 - Effetti sulle piante

Anche per le piante la radiazione UV, e particolarmente quella UVB, rappresenta un elemento di rischio potenziale per la loro crescita e sviluppo. Il verificarsi o meno di tale rischio potenziale è determinato dal livello della radiazione che le raggiunge e dal fatto che la pianta possa avere messo in funzione le proprie difese. Le piante infatti non potendo spostarsi hanno selezionato un serie di meccanismi che le rendessero adattate ai livelli di UV dell'ambiente in cui crescevano. I controversi risultati di almeno tre decenni di ricerche in questo settore confermano che non è possibile identificare un'univoca risposta delle piante all'UV anche perché sono molti e interagenti tra loro i fattori che intervengono a regolare la risposta delle piante.

La molteplicità e la varietà di risposte delle piante, spesso anche assolutamente contraddittorie, è certamente legata alla modalità con cui sono stati condotti gli esperimenti e alla molteplicità di specie e varietà anche soltanto delle piante coltivate. A ciò si aggiunga l'oggettiva difficoltà nel misurare e riprodurre questa regione dello spettro solare sia quando si voglia aumentarne l'irradianza, come è stato fatto nella maggioranza degli esperimenti, che attenuarla con l'uso di filtri.

Il risultato è che si hanno evidenze di effetti sia positivi che negativi sul funzionamento delle piante in funzione alle dosi di UVBE somministrate, alla presenza e entità di altre lunghezze d'onda (UVA, Blu e PAR), alla specie e varietà solo per citare i fattori principali.

Tuttavia sono stati fatti importanti passi avanti nella comprensione della complessità dei meccanismi coinvolti nell'interazione tra UV e funzionamento delle piante. Si è messo in luce per esempio il ruolo che gioca una speciale proteina, l'UV Resistance Locus8 (UVR8) che agisce come sensore della radiazione UV e attiva un numero di geni coinvolti nei meccanismi di fotoprotezione e riparazione del danno, come hanno evidenziato le ricerche condotte soprattutto su *Arabidopsis*. Gli esperimenti condotti con questa pianta modello hanno evidenziato che piante in cui non era presente questa proteina se esposte all'UVB erano fortemente danneggiate al contrario di quelle in cui l'UVR8 era presente.

Le risposte delle piante all'esposizione all'UV riguardano sia l'attivazione di meccanismi di riparazione del danno che modifiche morfologiche e fisiologiche. Tra le prime si annoverano modifiche dell'architettura della pianta e dello spessore delle foglie così come una modifica della loro crescita che può risultare come il prezzo, in termini energetici, che la pianta ha dovuto pagare per produrre i pigmenti che la proteggono dall'UV. Tra le seconde c'è l'accumulo di composti UV-assorbenti, come molti dei fenoli, che peraltro sono attivati anche da altri fattori di stress, inclusi quelli derivanti da attacchi di insetti fitofagi.

1.3 - Le attività dell'Istituto di Biometeorologia (IBIMET)

Le attività di IBIMET in questo settore hanno spaziato negli anni dalle previsioni del rischio UV per la salute al monitoraggio della radiazione UV in vari contesti allo studio dei suoi effetti sul funzionamento delle piante.

1.3.1 - Previsione e monitoraggio del rischio UV per la salute

Per prevenire i possibili danni alla salute prodotti da un'inadeguata esposizione al Sole, oltre agli interventi propri del settore medico, dal punto di vista biometeorologico si è operato puntando a informare la popolazione sulle possibili condizioni di rischio legate all'esposizione all'UV e a monitorarne la presenza e l'entità nei vari ambienti, anche per valutarne eventuali modifiche nel tempo.

L'Istituto di Biometeorologia di Firenze ha operato su entrambi i fronti. Dal 1998 anche grazie alla partecipazione alle varie azioni di cooperazione europea del programma COST dedicate al tema UV e alle collaborazioni internazionali come quella col Servizio Me-

teorologico Tedesco, IBIMET ha iniziato per primo in Italia a realizzare e divulgare via web le previsioni del rischio UV nell'ambito del progetto LaMMA.

Ma ancora prima era iniziata l'attività di monitoraggio della radiazione UV responsabile dell'eritema prima a Campi Bisenzio e dal 2003 presso l'Area di Ricerca CNR di Sesto Fiorentino, dove viene misurata in continuo la UVBEery mediante radiometri a banda larga dotati di uno spettro di sensibilità che mima assai fedelmente lo spettro d'azione relativo.

I dati prodotti dal radiometro, convertiti in termini di UV-Index, vengono immagazzinati in un archivio ad hoc e resi disponibili per il pubblico sulla pagine web <http://www.lamma.rete.toscana.it/meteo/osservazioni-e-dati/dati-stazioni>.

Per assicurare l'accuratezza delle misure i radiometri sono sottoposti a verifiche presso centri internazionali e nazionali di certificazione come il World Radiation Center di Davos e l'ARPA valle d'Aosta dove sono stati effettuati anche controlli incrociati con i radiometri in uso presso gli altri centri di monitoraggio europei.

Il grafico della Figura 4 illustra l'andamento dell'integrale giornaliero della radiazione biologicamente efficace per l'eritema (in KJm^{-2}) misurata a Sesto Fiorentino nel periodo dal 1 gennaio 2004 al 31 dicembre 2013.

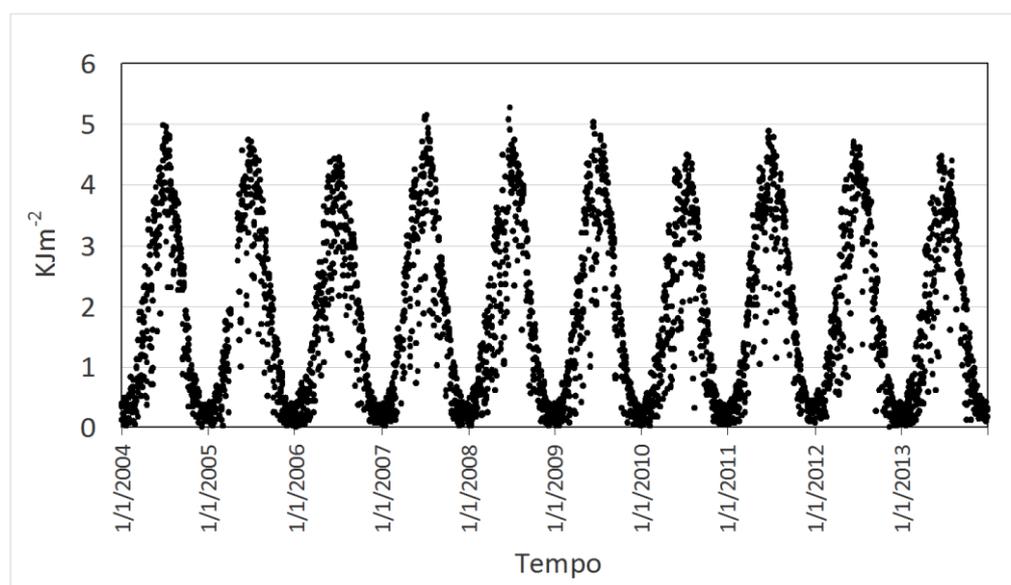


Figura 4 - Andamento della radiazione eritematica (KJm^{-2}) a Firenze nel periodo 1/1/2004-31/12/2013.

La figura evidenzia l'attesa variazione stagionale con i minimi nei mesi invernali e i massimi in quelli estivi come pure la variabilità indotta, per esempio nei mesi estivi, dalla nuvolosità che fa decadere drammaticamente l'irradianza a terra. L'analisi di questa figura evidenzia inoltre che, almeno per il limitato periodo di tempo considerato, non si è riscontrato alcun trend di variazione dei valori massimi associabile a cambiamenti dello strato di ozono. Questo risultato era d'altronde atteso e già evidenziato in altre ricerche; infatti alle nostre latitudini i valori massimi di UV-Index si hanno nei mesi di giugno-luglio che non corrispondono a mesi in cui la colonna d'ozono raggiunge i valori più bassi che sono invece tipici del periodo febbraio-marzo. E se anche è vero che in quest'ultimo periodo si hanno in genere le più ampie variazioni del valore della colonna d'ozono, con temporanei "buchi", in questi mesi il fatto che il Sole è abbastanza basso nel cielo e soprattutto l'alta probabilità di avere copertura nuvolosa rappresentano fattori che potrebbero mascherare un eventuale trend di assottigliamento dello strato di Ozono.

La Figura 5 illustra l'andamento nei vari mesi del valore medio dell'irradianza UV per l'eritema di ciascun giorno calcolata per il periodo 2004-2013.

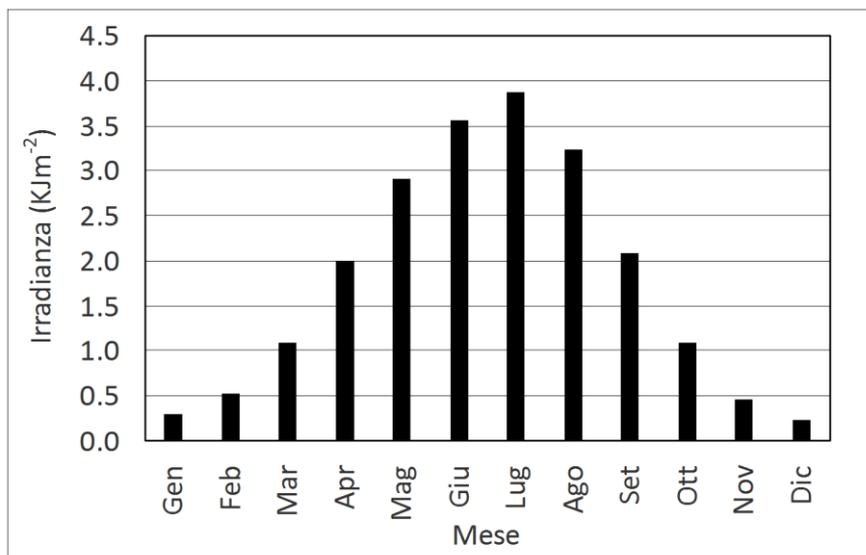


Figura 5 - Andamento stagionale della UVBEery (KJm⁻²) giornaliera media del periodo 2004-2013.

Come atteso (in relazione agli angoli di elevazione solare) i valori più alti si hanno nei mesi estivi, col picco in luglio, mentre in inverno si raggiungono i valori minimi.

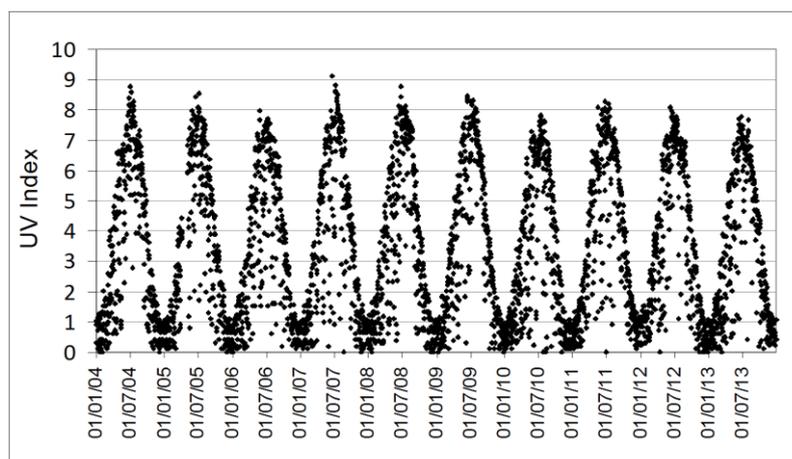


Figura 6 - Variazione dell'Indice UV massimo giornaliero del periodo 2004-2013.

L'andamento nel tempo dell'Indice UV (Figura 6) è ovviamente molto simile a quanto visto nella Fig. 4. L'elevazione del Sole in cielo e la copertura nuvolosa sono i principali fattori di variazione dell'Indice anche se non si possono escludere minori contributi anche da variazioni della colonna di Ozono e del contenuto di aerosol e inquinanti presenti nei bassi strati dell'atmosfera.

Parlando dei modi per definire la radiazione UV si è già accennato all'importanza, soprattutto quando se ne valutino gli effetti biologici, del concetto di dose. Nel tempo sono state date due definizioni: MED (Minimal Erythemal Dose, Dose Minima che induce l'Eritema) e SED (Standard Erythemal Dose, Dose Standardizzata per l'Eritema). La MED è definita come la dose effettiva minima di UVBEery che provoca un arrossamento della pelle non precedentemente esposta alla radiazione. Com'è intuibile non essendo definita la sensibilità dei vari tipi di pelle il valore di 1 MED varia da 200 (pelle molto chiara) a 500 Jm⁻² (pelle decisamente scura) a seconda del tipo di pelle considerato. Per ovviare a tale incertezza è stato successivamente proposto l'uso del SED equivalente ad una dose di UVBEery di 100 Jm⁻².



Figura 7 - Andamento stagionale della UVBEery giornaliera media (KJm⁻²) misurata nelle ore di lavoro.

La Figura 7 illustra l'andamento nei vari mesi dell'anno della media della radiazione UV eritematica (in KJm⁻²) in arrivo a terra a Firenze nelle otto ore lavorative ossia dalle 8.00 alle 12.00 e dalle 13.00 alle 17.00, tipiche soprattutto per chi lavora all'aperto. Per inciso si rammenta che i valori misurati in tale intervallo rappresentano la quota maggiore (dal 76 all'81%) dell'integrale giornaliero.

La Commissione Internazionale per la Protezione dalle Radiazioni Non-Ionizzanti (ICNIRP; Ziegelberger, 2010) ha stabilito in 30 Jm⁻² il limite di radiazione UV eritematica oltre il quale il soggetto esposto dovrebbe prendere precauzioni per tutelarsi dai possibili rischi per la sua salute. Anche se tale limite appare eccessivamente basso, allo stato attuale non esiste altro riferimento ed è a questo che quindi ci si riferisce. Considerando i valori della Figura 7 risulta evidente che ad eccezione dei mesi invernali chi opera per molte ore all'aperto senza protezione per la pelle è esposto a dosi che superano di molte volte il limite ICNIRP, come mostra in dettaglio la tabella 1. Questa illustra per le varie fasce orarie di ciascun mese di quanto viene superata la dose di UVBEery considerata il limite di sicurezza per la salute umana dal ICNIRP (30 Jm⁻²).

Il passaggio dal giallo al rosso indica l'aumento dell'entità del superamento della soglia di sicurezza riportata dall'ICNIRP. Com'è evidente sono soprattutto le ore centrali le più pericolose soprattutto nei mesi estivi. Giova tuttavia sottolineare come anche in fasce orarie che potrebbero essere considerate sicure, come quella tra le 09.00 e le 10.00 (tra le 15.00 e le 16.00) dei mesi di primavera/estate, si superi tale soglia di molte volte.

Tabella 1- Quante volte la UVBEery delle varie fasce orarie supera il limite ICNIRP di possibili danni alla salute.

	08:00-09:00	09:00-10:00	10:00-11:00	11:00-12:00	12:00-13:00	13:00-14:00	14:00-15:00	15:00-16:00	16:00-17:00
Gen	0.03	0.45	0.45	1.97	2.22	2.22	1.19	0.43	0.03
Feb	0.22	0.99	0.99	3.33	3.79	3.79	2.31	1.08	0.25
Mar	1.09	2.70	2.70	6.46	6.88	6.88	4.44	2.48	0.94
Apr	3.01	5.81	5.81	11.32	11.48	11.48	7.54	4.60	2.07
Mag	5.37	9.14	9.14	15.58	15.22	15.22	10.48	6.97	3.68
Giu	6.61	10.77	10.77	18.17	18.37	18.37	12.98	8.74	4.97
Lug	6.85	11.65	11.65	19.95	19.70	19.70	14.25	9.70	5.48
Ago	5.26	9.49	9.49	17.32	17.41	17.41	12.26	8.11	4.15
Set	3.20	6.40	6.40	12.20	12.34	12.34	7.57	4.40	1.77
Ott	1.45	3.46	3.46	7.13	6.94	6.94	3.75	1.74	0.38
Nov	0.36	1.31	1.31	3.38	3.32	3.32	1.58	0.43	0.01
Dic	0.03	0.45	0.45	1.80	1.84	1.84	0.86	0.18	0.00

Quanto riportato finora si riferiva alla radiazione in arrivo dal cielo ossia la somma della componente diretta dal Sole più quella diffusa dai costituenti atmosferici; ma le carat-

teristiche di riflessione delle superfici (altrimenti nota come albedo) può giocare un ruolo molto importante quando si analizza la quantità di radiazione in arrivo su piani non orizzontali. È il caso per esempio di molte superfici del corpo di una persona in posizione eretta in ambienti molto riflettenti.

Per valutare tale effetto IBIMET ha condotto diverse campagne per misurare la radiazione UV in arrivo su una superficie verticale in ambiente diversi. Sono quindi state effettuate indagini su una spiaggia, sulla neve, in una cava di marmo a Carrara e in un cantiere edile nell'ambito per Progetto della Regione Toscana "Piano mirato sul rischio della radiazione ultravioletta per i lavoratori *outdoor*".

La tabella 2 illustra i valori di albedo nella banda UV da noi misurato su varie superfici: è evidente l'alto contributo che può arrivare da superfici coperte da neve (con valori superiori all'80%) così come assolutamente non trascurabile è da considerare anche il contributo delle bianche superfici di una cava di marmo (intorno al 40%). In quest'ultimo caso si tenga presente che per l'effetto della quota (intorno ai 1000-1300 m) una persona è già esposta a irradiazioni dal cielo più alte a cui si aggiunge una forte riflessione dalla superficie.

Tabella 2 – Albedo nella banda UV (%) di alcune superfici.

Neve	85
Cave di marmo	40
Prato	1
Sabbia	6

Misure effettuate sulla neve con albedo intorno all'80-90%, hanno evidenziato incrementi di radiazione su superficie verticale rivolta verso il sole, rispetto alla stessa superficie posta su un prato, pari a circa l'80-100%, almeno per angoli di elevazione solare fino a 40°.

L'effetto dell'albedo della superficie sull'irradianza UV (in questo caso espresso in termini di UV-Index) nelle varie ore di un giorno estivo (21 giugno) con cielo sereno viene illustrata dalla Figura 8 ottenuta utilizzando un modello di trasferimento radiativo (STAR model, Rugabber 1994) che consente di simulare con buona approssimazione la radiazione UV in arrivo su superfici variamente orientate nelle varie condizioni ambientali. È drammatico l'incremento di UV eritematico che una superficie verticale (parti della faccia di una persona in piedi) riceve in presenza di una copertura come quella di una cava di marmo. In presenza di neve (albedo ancora maggiore) l'effetto è corrispondentemente maggiore.

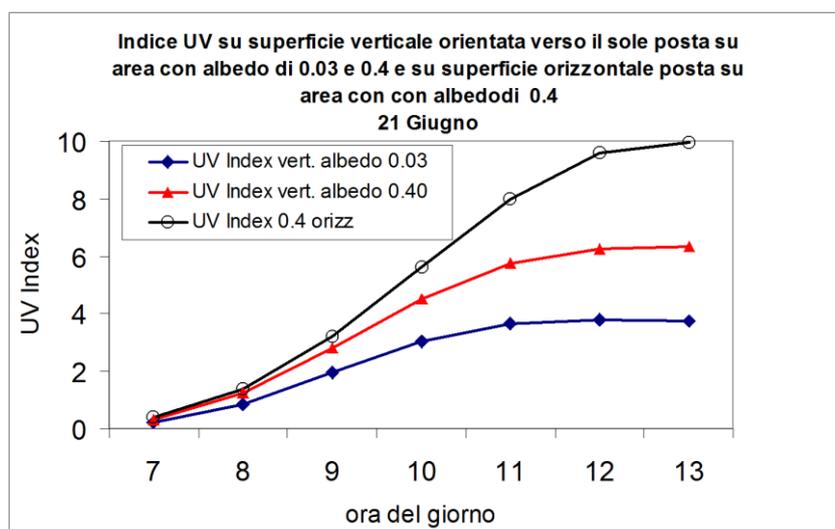


Figura 8- Simulazione da modello dell'UV-Index giornaliero per vari tipi di superfici e loro albedo.

Su una superficie coperta di sabbia (una spiaggia della costa Toscana) una superficie verticale (es. la faccia di una persona) seppure posta all'ombra di un ombrellone viene raggiunta da una quantità non trascurabile di radiazione UV per effetto combinato della riflessione dalla superficie sabbia-mare e della componente diffusa dell'atmosfera (Grifoni et al., 2005).

Sempre col fine di caratterizzare il regime radiativo UV in vari ambienti sono state realizzate diverse campagne di misura in ambienti rurali e particolarmente in vigneti vista l'importanza che questa banda della radiazione solare riveste nelle sintesi nelle uve di composti che ne determinano la qualità. È noto infatti che molte delle molecole che esaltano la qualità dei vini vengono sintetizzate a livello della buccia dell'acino in risposta all'UV come quelle della famiglia dei fenoli, tra cui anche il resveratrolo, diventato ormai famoso per le sue proprietà antiossidanti. È stato così descritta l'influenza dell'orientamento dei filari di vite sulla radiazione UV e su quella fotosinteticamente attiva (PAR) nelle varie ore del giorno evidenziando che mentre la quantità di PAR in arrivo sulla parete fogliare del filare risulta fortemente influenzata dal suo orientamento questo avviene in maniera molto minore per la radiazione UV, e particolarmente quella UVB, per effetto della sua alta diffusività (Fig. 9).

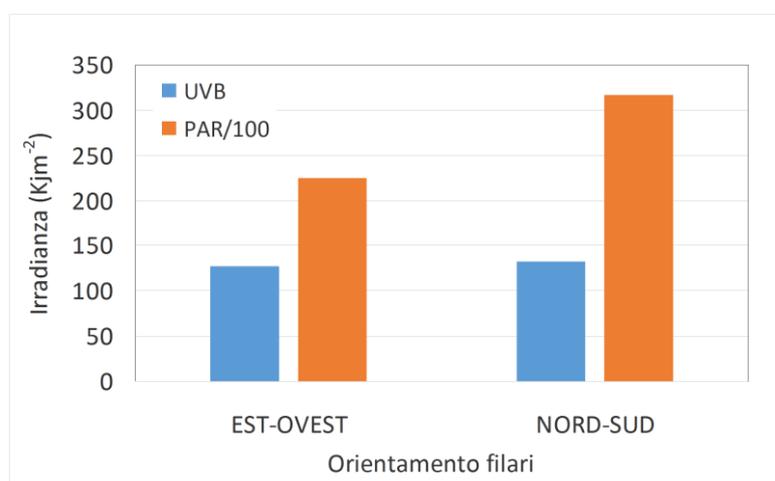


Figura 9 – Irradianza (KJm⁻²) di UVB e PAR (diviso per 100) nelle 24 ore su le due facce di filari diversamente orientati di un vigneto.

All'IBIMET si è infine indagato se il disagio termico da caldo percepito all'aperto in ambiente urbano può rappresentare un proxy utile per prevedere gli effetti impercettibili legati al rischio di danno eritematico dovuto alla esposizione alla radiazione ultravioletta. Si è quindi ricercata una metodica in grado di integrare le informazioni relative alla radiazione solare UV e quelle dello stress termico da caldo mediante l'applicazione di due indici riconosciuti a livello internazionale: UV-Index e l'indice Universal Thermal Climate Index (UTCI).

Lo studio è stato condotto nell'area metropolitana di Firenze e le analisi sono state dettagliate per differenti fototipi. Per il periodo 2004-2012 si sono presi in considerazione i valori di SED di 2.0, 2.5, 3.0, 4.5, 6.0 e 10.0 che rappresentano i valori soglia per l'induzione per i sei tipi di pelle umana (fototipi): dal "fototipo I" al "fototipo VI". Per lo stesso periodo è stato anche calcolato l'indice UTCI, che rappresenta lo stato dell'arte degli indici biometeorologici razionali per valutare una condizioni di benessere/disagio termico all'aperto e, in questo caso, utilizzato per definire condizioni di stress da caldo percepite da un soggetto con caratteristiche standard (altezza circa 1.70 m, peso circa 70 kg, e un contenuto di grasso corporeo pari al 14%).

Lo studio ha mostrato per la prima volta l'associazione a livello mensile tra condizioni di disagio da caldo e il rischio di danno eritematico causato da una dose eccessiva di radiazione UV. Lo stress da caldo rappresenta un buon proxy del potenziale danno eritematico durante la maggior parte delle ore diurne durante i mesi estivi ma anche durante i mesi

di settembre e maggio nel caso di soggetti con pelle moderatamente o poco sensibile. In altre parole, durante questi mesi, le persone ricevono dall'ambiente un "avviso" di potenziale danno da radiazione UV sotto forma di disagio da caldo. Tuttavia, quando nei mesi di settembre e maggio vengono considerati i soggetti con pelle più sensibile, oppure quando vengono considerati i mesi di aprile, marzo e ottobre, lo stress da caldo può essere solo parzialmente un indicatore di potenziale danno da radiazione UV. Infatti, in questi mesi si verificano troppi giorni senza "segnali" di disagio da caldo anche se i soggetti sono esposti a dosi di radiazione UV sufficienti a determinare danni eritematici per vari fototipi (mai però per i soggetti con pelle poco sensibile). Inoltre, durante i mesi più freddi (da novembre a febbraio) le condizioni di disagio da caldo sono molto sporadiche o completamente assenti, quindi i "segnali termici" (disagio da caldo) percepibili dall'ambiente sono assenti o molto rari. Per contro anche in tali condizioni chi si trovi sulla neve (o anche a quote elevate) può essere esposto a dosi inaspettatamente alte di UV.

Questi risultati sottolineano la necessità di avere a disposizione avvisi città-specifici differenziati su base mensile e per fototipo relativamente al potenziale danno da radiazione UV. Tali informazioni sono fondamentali per "educare" la popolazione locale e i turisti che frequentano molte delle città italiane con l'obiettivo di ridurre i danni da radiazione UV nel breve periodo, ma anche di limitare i danni molto seri per la salute evidenziabili nel lungo periodo causati da esposizioni eccessive alla radiazione solare.

Anche se la maggiore attenzione è stata rivolta ai possibili danni per la salute e a come evitarli non va dimenticato che la radiazione UV ha anche importanti effetti benefici essendo il fattore che attiva il processo che porta alla biosintesi della vitamina D, essenziale regolatore per molte funzioni biologiche. Alle medie latitudini la dose di UV per la sintesi della vitamina D viene facilmente soddisfatta nei mesi primaverili-estivi anche solo esponendo mani, braccia e faccia al Sole. Il 21 Giugno una persona, che non assuma dalla dieta sufficiente vit. D, può soddisfare il proprio fabbisogno (circa 25 microgrammi) con una esposizione al Sole di queste parti del corpo un giorno sì e uno no per circa 3-4 minuti. Al contrario il 21 dicembre l'esposizione deve protrarsi per oltre 50 minuti, come è possibile stimare in base a quanto indicato su http://zardoz.nilu.no/~olaeng/fastrt/VitD-ez_quartMED.html.

1.3.2 - Protezione dal rischio UV

Esistono diversi modi per proteggersi da una sovra-esposizione alla radiazione UV il primo dei quali è di evitare l'esposizione prolungata non protetta e diretta nelle ore centrali dei giorni estivi. Se però questa raccomandazione, che era anche quella delle nostre nonne, è attuabile da chi si espone al Sole per piacere, chi invece lavora all'aperto ha bisogno di ricorrere ad altre misure. Gli abiti possono svolgere questa funzione protettiva e la ricerca si è orientata verso la realizzazione di capi che uniscano condizioni di confort termico a quelle di protezione dal rischio UV. Così analogamente a quanto avvenuto con le creme solari protettive sono stati proposti indici che valutano tale grado di protezione, il cosiddetto UPF (Ultraviolet Protection Factor, Fattore Protettivo per l'UV). L'UPF, determinato dal grado di trasmittanza nell'UV da parte del tessuto, indica il grado di protezione del tessuto che per sommi capi risulta fissato dalla struttura del tessuto (quanto fitte sono le fibre che lo compongono, "cover factor") e dalle caratteristiche ottiche (di assorbanza e trasmittanza) delle fibre in combinazione con i coloranti che le tingono: da 0 a 15 UPF insufficiente protezione, buona da 16 a 24, molto buona da 25 a 39 e eccellente da 40 in su.

Conviene a questo punto rammentare il significato di questi fattori di protezione: una crema con fattore di protezione (SPF) 30 fa sì che l'eritema si sviluppi con una dose di esposizione 30 volte superiore a quella della stessa pelle non protetta. Peraltro molte creme solari non contengono filtri per l'UVA che, come già accennato, non risulta del tutto innocua.

Oggi il valore in UPF è spesso riportato in etichetta di molti capi d'abbigliamento soprattutto per quelli per lo sport e le attività all'aria aperta. IBIMET ha svolto attività di ricerca in questo settore indagando le proprietà protettive UV di tessuti ottenuti con fibre natu-

rali (lino, canapa, ortica, lana, ecc) e tinteggiate con coloranti naturali come quelli ottenuti dall'estrazione di alcune molecole da piante o insetti. Le nostre indagini sono state svolte sia in laboratorio (con misure di trasmittanza effettuate con uno spettrofotometro messo a disposizione dal Dr. Giovanni Agati dell'IFAC-CNR di Sesto Fiorentino) che all'aperto mediante lo spettroradiometro dell'IBIMET (Macam SR9910) al fine di valutare eventuali differenze delle due tecniche. Tali indagini hanno permesso di appurare che i fattori responsabili del grado di protezione di un tessuto sono nell'ordine: "cover factor", trattamento pre-tinteggiatura e tipo di colorante impiegato. Per questi ultimi, risultati particolarmente interessanti sono stati ottenuti dall'impiego di coloranti come quelli ottenuti dall'estrazione della Reseda, una pianta con foglie ricche di luteolina, un flavonoide che conferisce al tessuto un colore giallo. Così tessuti di canapa (assai adatti per essere indossati da chi lavora all'aperto perché offrono un buon confort termico) che di per sé non offrirebbero alcuna protezione (UPF intorno a 7) colorati con reseda hanno un UPF di circa 19, quindi con un buon grado di protezione. Risultati simili abbiamo riscontrato anche per i coloranti estratti da un'altra pianta, la Robbia che inducono un colore rossastro. Sfortunatamente tale colorante non porta alcun miglioramento al basso livello di UPF del lino che raggiunge un valore massimo di 9 (Grifoni et al., 2009 e 2014).

1.3.3 - Effetti sulla vegetazione

Lo studio degli effetti della radiazione UV sulla vegetazione sono iniziati negli anni '90 nell'ambito delle ricerche dell'Istituto relative agli effetti sugli ecosistemi agrari e naturali dei cambiamenti del clima. In quegli anni, in effetti, c'era una grande preoccupazione nella comunità scientifica per il rapido procedere del fenomeno dell'assottigliamento dello strato d'Ozono stratosferico, popolarmente noto come "buco dell'Ozono". Effettivamente i rilievi satellitari mostravano un rapido trend crescente sia dell'area interessata dal fenomeno sul polo Sud sia della sua entità. L'assottigliarsi di tale strato d'Ozono portava ad un aumento della radiazione UV a terra in particolare della componente UVB e alla conseguente alterazione rispetto all'UVA e alle bande del visibile segnatamente quelle coinvolte nei processi fotosintetici e non solo.

Per studiare l'effetto di queste attese accresciute irradianze UVB erano stati già condotti numerosi studi che in quei primi anni mostravano drammatici effetti come forte riduzione della fotosintesi e della crescita delle piante con forti riduzioni della loro produttività. Tuttavia questi primi esperimenti erano condizionati dall'essere condotti in serre o camere di crescita e quindi in condizioni in cui le piante, sottoposte a questo stress, non potevano far funzionare i loro meccanismi di difesa e riparazione dei danni stimolate da altre lunghezze d'onda presenti nella radiazione solare all'aperto; e ciò era ancora più importante in ambienti mediterranei caratterizzati da alti valori di radiazione solare. A ciò si aggiunga che in questi primi esperimenti, come spesso succede quando si avviano nuove ricerche, le dosi di UVB somministrate alle piante erano fortemente irrealistiche rispetto anche alle più pesimistiche stime di aumento dell'UVB.

Tutte queste considerazioni ci indussero a programmare esperimenti all'aperto e con somministrazione di dosi più realistiche di UVB. Fu così messo a punto un complesso apparato da campo composto da banchi attrezzati con tubi a fluorescenza che emettevano radiazione con un picco a 313 nm opportunamente schermati per eliminare code di UVC non desiderata. Questi banchi erano regolabili in altezza in modo da mantenere una distanza fissa rispetto alle piante che vi crescevano sotto. Impostammo questo primo sistema in modo da simulare l'incremento di UVB associato ad un decremento di Ozono del 20%. Oltre ai banchi di controllo il sistema includeva anche banchi sotto cui le piante ricevevano dalle lampade una dose aggiuntiva di UVA, previa filtraggio dell'UVB ottenuto con filtri di poliestere (Mylar), che non era possibile eliminare dal trattamento UVB. Successivamente tale sistema fu ulteriormente modificato per rendere modulabile la radiazione aggiuntiva emessa dalle lampade per adattarla alla dinamica giornaliera della radiazione solare e alla presenza

delle nubi (Benincasa et al., 2000). Nel tempo sono state sottoposte a indagine diverse specie vegetali tra cui fagiolino, pomodoro, cavolo e querce.

Riassumendo, questi esperimenti hanno mostrato che le modifiche indotte dal trattamento erano molto più contenute rispetto a quanto evidenziato precedentemente: non si sono riscontrate significative modifiche della fotosintesi né della crescita delle piante, in termini di biomassa prodotta, mentre anche le nostre ricerche confermavano l'accumulo di pigmenti nelle foglie, soprattutto flavonoidi che si ritiene abbiano anche una funzione di schermo rispetto alla radiazione UVB. Un'altra evidenza ha riguardato la morfologia della pianta: quelle cresciute sotto alte irradiazioni UVB mostravano una architettura più compatta (sia la querce che le erbacee) e la colorazione delle bacche del pomodoro risultava accelerata e intensificata. In altre parole era dimostrato che realistiche dosi aggiuntive (rispetto a quelle in arrivo dal cielo) potevano essere tollerate dalle piante indagate grazie alla messa in atto dei meccanismi di fotoprotezione e riparazione dei danni (al DNA) stimolati dalla luce blu e dalla stessa UVA. Anzi proprio nell'esperimento condotto sul fagiolo verificammo che le piante cresciute sotto la naturale radiazione solare e con in più la luce UVA irradiata dalle lampade mostravano tutta una serie di positive risposte, in termini di biomassa accumulata, area fogliare ed altri parametri indicativi del benefico effetto dell'UVA aggiuntivo che riteniamo compensasse l'effetto limitativo per la crescita dell'UVB presente comunque nella radiazione naturale (Antonelli et al, 1997 e 1998; Bacci et al, 1999).

A questo approccio sperimentale è seguito quello cosiddetto "sottrattivo" che sostanzialmente consiste nel far crescere le piante nelle loro condizioni naturali e nell'effettuare il trattamento escludendo selettivamente una o entrambe le componenti UV che arrivano a terra. Questo approccio oltre che essere molto più semplice e meno costoso si è sviluppato anche in ragione del mutato oggetto delle indagini sulle relazioni tra UV e piante. Questo perché nel frattempo si era raggiunta una mole di informazioni considerevole ma soprattutto perché l'interesse scientifico si era spostato dallo studio dei possibili effetti di un accresciuto clima radiativo UV a quello del ruolo ecologico di questa componente della radiazione solare.

Con l'approccio sottrattivo IBIMET, in collaborazione con IFAC-CNR, IBBR-CNR e il DISPAA dell'Università di Firenze, ha condotto negli ultimi anni studi su frumento, vite e corbezzolo (una specie tipica della nostra macchia mediterranea). Questi esperimenti sono stati condotti facendo crescere le piante sotto film plastici che lasciavano passare in maniera quasi inalterata la radiazione solare (il controllo, Teflon) e sotto altri che tagliano solo tutte le lunghezze d'onda dell'UV (Lee) e solo della componente UVB (Mylar), come mostra la Figura 10.

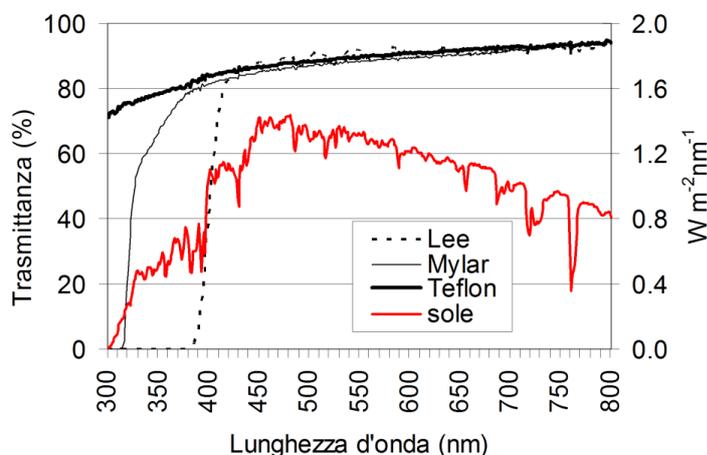


Figura 10 - Spettri di trasmittanza dei filtri usati nelle esperimenti di sottrazione UV e irradianza dal Sole non filtrata.

Le indagini sul frumento duro hanno evidenziato nelle piante a cui era stato sottratto tutto l'UV, oltre all'atteso decremento nei tessuti delle foglie di pigmenti della famiglia dei flavonoidi, una significativa diminuzione del contenuto in Azoto rispetto alla biomassa secca. Anche l'analisi delle cariossidi ha evidenziato una diminuzione del contenuto in sostanze azotate e di glutine secco delle piante cresciute in assenza totale di UV. Questi risultati sono importanti in quanto per la prima volta si è indagato il ruolo che la radiazione UV ha sulla qualità della granella di frumento: il glutine infatti è la parte proteica che conferisce alla cariosside (e quindi al prodotto finale, la farina) il carattere di qualità, aspetto determinante per il grano duro destinato a impieghi a maggior reddito.

Anche nell'indagine su vite e corbezzolo abbiamo riscontrato una netta risposta della sintesi di pigmenti della famiglia dei flavonoidi alla presenza delle diverse bande di UV, infatti le piante del controllo hanno presentato i maggiori contenuti, all'opposto delle foglie sottoposte all'esclusione totale dell'UV. Ma era proprio da questo atteso risultato che era nostro interesse partire per indagare la capacità di recupero al ritorno a condizioni normali di radiazione delle piante prima sottoposte a differenti privazioni della radiazione UV. Questa indagine protrattasi per oltre 15 giorni è stata possibile grazie ad un'innovativa tecnica di misura messa a disposizione dal Dr. Agati dell'IFAC-CNR che consente di stimare in modo non distruttivo (e quindi operando sempre sulle stesse foglie) il contenuto in flavonoidi. Si è così potuto verificare il diverso comportamento delle due specie, pure entrambe adattate al clima mediterraneo. Infatti mentre le foglie della vite delle piante riportate in condizioni naturali hanno mostrato una buona capacità di recupero sintetizzando questi importanti composti (anche se sono rimaste delle differenze tra i tre trattamenti) recuperando quasi il 50% della differenza iniziale, le foglie del corbezzolo hanno mantenuto quasi uguale le differenze iniziali.

Abbiamo inoltre riscontrato che mentre il corbezzolo non presentava differenze tra i trattamenti per quanto riguarda i parametri della fotosintesi (a ulteriore dimostrazione della sua tolleranza a climi radiativi intensi) nella vite è stata osservata una riduzione dell'attività fotosintetica nelle piante prima cresciute in totale assenza di UV che erano state spostate in condizioni naturali di luce (Grifoni et al, submitted).

Le molecole antiossidanti che la pianta produce per difendersi dall'UV sono però anche molto importanti per la nostra salute una volta assimilate con il cibo com'è stato provato da numerose ricerche relative al ruolo delle sostanze antiossidanti come elementi per contrastare varie patologie. Sono state condotte quindi ricerche che hanno messo in evidenza l'importanza di usare materiale trasparente all'UV nelle serre così come la possibilità di effettuare trattamenti in post-raccolta, per esempio di ortaggi o frutta per stimolare un'ulteriore sintesi di tali composti.

1.4 - Conclusioni

Le ricerche condotte negli ultimi 25 anni hanno evidenziato la complessità e la non univocità delle interazioni tra questa banda della radiazione elettromagnetica in arrivo dal Sole e la vita degli organismi biologici. Dal punto di vista degli effetti sulla salute umana è stato evidenziato come esposizioni prolungate a dosi eccessive di radiazione UV (come può capitare nelle ore centrali delle giornate estive) possano essere decisamente pericolose per la salute soprattutto per persone geneticamente non adattate a climi radiativi intensi. D'altro lato è risultata ugualmente evidente l'importanza dell'esposizione al Sole in altri periodi dell'anno per la sintesi della vitamina D oltre che per il piacere che può dare.

Le piante hanno mostrato di possedere meccanismi di difesa e di riparazione dei danni indotti dall'UV che le rendono ben adattate a vivere anche in ambienti caratterizzati da alte irradiazioni UV. E' risultato altresì evidente che dosi non eccessive di UV stimolano apprezzate sintesi di composti oggi noti come nutraceutivi, tant'è che si pensa a trattamenti in post-raccolta di frutta e ortaggi per aumentarne il contenuto.

Le conoscenze acquisite dalla comunità scientifica se da una parte stanno chiarendo numerosi lati oscuri sul ruolo biologico della radiazione UV dall'altro aprono stimolanti prospettive di ricerca anche per valutarne le possibili applicazioni.

Bibliografia

1. Aphalo, P. J., Albert, A., Bjorn, L. O., McLeod, A., Robson, T. M. e Rosenquist, E. Beyond the visible: A handbook of best practice in plant UV photobiology. 2012.
2. Antonelli, F., Grifoni, D., Sabatini, F. e Zipoli, G. *Plant Ecology*, (128) :127-136. 1997.
3. Antonelli, F., Grifoni, D., Bussotti, F., Grossoni, P., Tani, B., Mori, C. e Zipoli, G. *Chemosphere*. 36: 841-845. 1998
4. Bacci, L., Grifoni, D., Sabatini, F. e Zipoli, G. *Global change biology*. 5:635-646. 1999.
5. Benincasa F., Fasano G., Grifoni D., Materassi A., Zipoli G., AMI: Automatically modulated Irradiator. Proc. of 7th ICCTA, Florence, 1998.
6. Grifoni D., Carreras, G., Sabatini, F. e Zipoli, G. *International Journal of Biometeorology*. 50:75-82. 2005
7. Grifoni D., Carreras, G., Sabatini, F. e Zipoli, G. *International Journal of Environmental Health Research*. 16:6: 427-437. 2006.
8. Grifoni D., Carreras, G., Sabatini, F., Zipoli, G., Dalla Marta, A. e Orlandini S. *International Journal of Biometeorology*. 52:755-763. 2008.
9. Grifoni, D., Bacci, L., Zipoli, G., Carreras, G., Baronti, S. e Sabatini, F. *Photochemistry and Photobiology*. 85:313-312. 2009.
10. Grifoni, D. Agati, G., Bussotti, F., Michelozzi, M., Pollastrini, M. e Zipoli, G. submitted. 2015.
11. Miligi, L. et al. *Epidemiology Preview*. 37(1): 51-59. 2013.
12. Morabito, M., Grifoni, D., Crisci, A., Fibbi, L., Orlandini, S., Gensini, G.F. e Zipoli, G. *Journal of Photochemistry and Photobiology: B*. 130:338-348. 2014.
13. Rugabber, A. *Journal of Atmospheric Chemistry*. 18:171-210. 1994.
14. Ziegelberger G. *Health Physics*. 99(1):66-87. 2010

STUDIO DELLA PERCEZIONE VISIVA DEI DIPINTI ILLUMINATI CON LUCE LED

Elisabetta Baldanzi¹, Arianna Desideri², Alessandro Farini¹

¹ *Istituto Nazionale di Ottica Applicata del Consiglio Nazionale delle Ricerche- INO CNR*

² *Corso di Laurea in Ottica e Optometria, Università degli Studi di Firenze*

1.1 - Introduzione

L'esigenza di uno studio della percezione visiva dei dipinti illuminati con luce LED nasce dalla consapevolezza di due importanti elementi: da un lato l'innovazione dovuta all'inserimento sul mercato delle sorgenti LED, dall'altro l'importanza della luce per la percezione di un'opera d'arte e più in generale di qualsiasi oggetto.

I LED rappresentano una rivoluzione nel mercato dell'illuminazione. Il loro principio di funzionamento permette infatti di ottenere performance illuminotecniche sostanzialmente diverse rispetto alle tradizionali sorgenti luminose e di realizzare soluzioni illuminotecniche idonee anche per gli ambienti museali [1,2]. I LED hanno, ad esempio, una lunga vita media, efficienza luminosa elevata, sono resistenti agli urti, permettono nuove soluzioni di design e hanno altre caratteristiche che lasciano intravedere in questa sorgente grandi potenzialità per il futuro. La luce ha un ruolo fondamentale per la percezione delle immagini: a seconda del tipo di luce che illumina un oggetto è possibile ottenere molteplici letture e differenti valorizzazioni cromatiche. I musei stanno avviando un cambiamento delle sorgenti presenti all'interno dei loro ambienti espositivi passando dalle più tradizionali sorgenti alogene e a scarica alle sorgenti LED. Questo cambiamento può portare a un beneficio energetico ed economico per gli ambienti ma, parlando di arti visive, occorre un approccio rigoroso che permetta di avere informazioni attendibili sugli effetti che questo tipo di luce è in grado di portare a livello percettivo.

Lo studio svolto presso il laboratorio dell'Istituto nazionale di ottica del Consiglio nazionale delle ricerche Ino Cnr situato all'interno dei laboratori di restauro dell'Opificio delle pietre dure di Firenze ha permesso di approfondire come cambia la percezione di un'opera d'arte a seconda del tipo di luce utilizzato generato con sorgenti LED. L'utilizzo di questo tipo di lampade con caratteristiche di funzionamento differenti ha inoltre permesso di investigare l'attendibilità per i LED dei parametri di caratterizzazione cromatica delle sorgenti, come ad esempio l'Indice di Resa Cromatica [3] visto che il metodo di calcolo tradizionale non è idoneo per sorgenti con uno spettro di emissione stretto come ad esempio i LED RGB [4].

I risultati ottenuti confermano l'importanza della luce LED per l'illuminazione dei dipinti dovuta alle soluzioni spettrali che il LED è in grado di realizzare e ribadiscono la necessità di definire una nuova procedura di caratterizzazione cromatica delle sorgenti luminose.

1.2 - Svolgimento dell'esperimento

L'esperimento è stato realizzato presso il laboratorio Ino Cnr all'interno degli ambienti di restauro dell'Opificio delle pietre dure. Sono state selezionate tre opere d'arte di autori e periodo storico differente che sono state mostrate ai soggetti selezionati in sequenza illuminati esclusivamente da prodotti che montano sorgenti LED con diverse emissioni spettrali. Ad ogni soggetto il dipinto è stato mostrato con due diversi tipi di illuminazione e gli/le è stato chiesto di esprimere una preferenza focalizzando l'attenzione sulla naturalezza

del colore, la sua definizione e vivacità. Ad ogni soggetto sono state presentate diverse coppie di illuminazione e le risposte sono state registrate. Per arrivare a stilare una classifica di preferenza per un determinato dipinto, per ogni soggetto è stato utilizzato un sistema di attribuzione dei punteggi denominato Swiss System mettendo a confronto sorgenti con punteggi analoghi [5].

Le opere mostrate sono diverse per soggetto, autore e periodo storico: 'Sant'Agostino nello studio' di Sandro Botticelli (1480 circa) Figura 1, 'Figura di donna' anonimo (1930 circa) Figura 2 e 'Memoria della luce' di Giovanna Rasario (2002) Figura 3.



Figura 1 – 'Sant'Agostino nello studio' di Sandro Botticelli

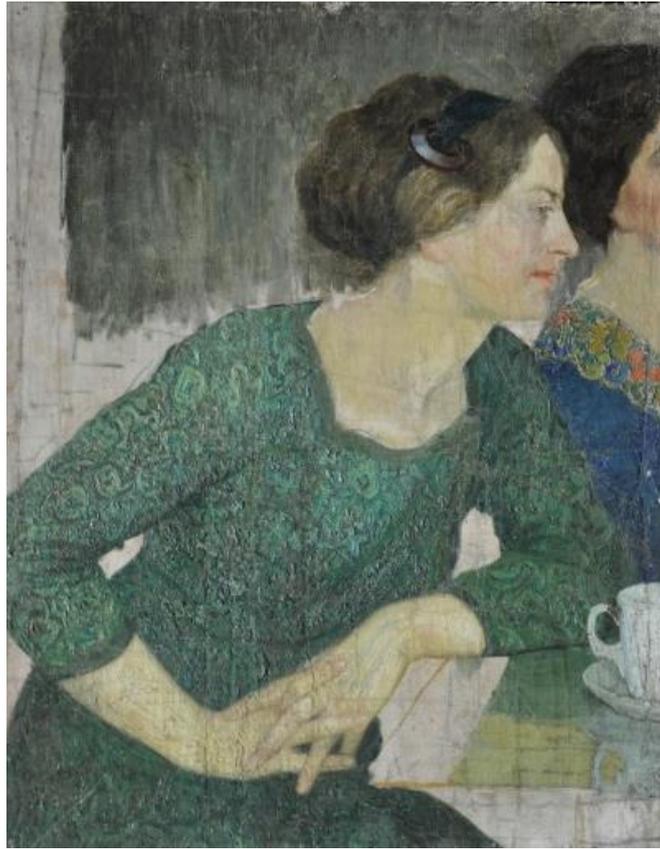


Figura 2 – 'Figura di donna' Anonimo

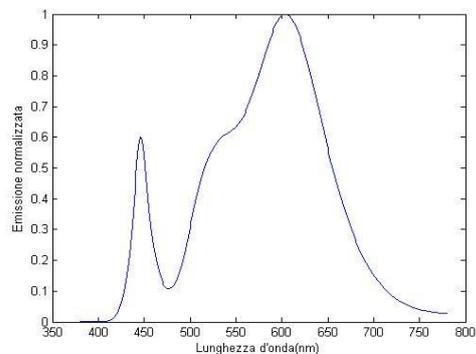


Figura 3 – 'Memoria della luce' Giovanna Rasario

Le opere sono state illuminate con 6 apparecchi che montano sorgenti LED. In Figura 4 e 5 le sorgenti utilizzate e i relativi spettri di emissioni rilevati con lo spettrometro Minolta Cs-1000 con una larghezza di banda di 5 nm.



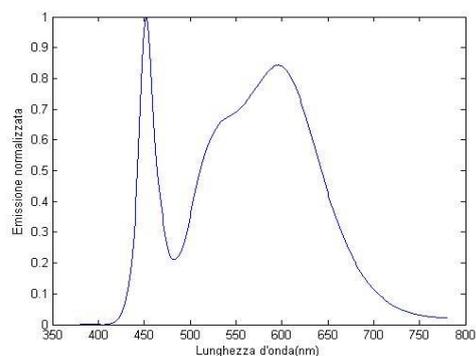
R_a 84 3000 K



Spettro di emissione normalizzata R_a 84 3000 K



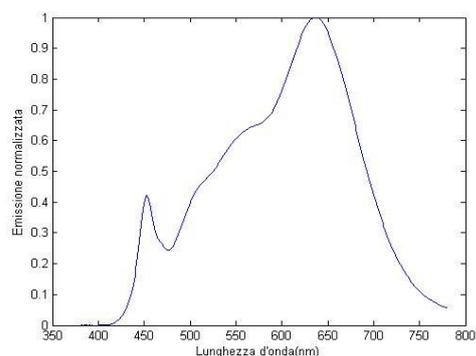
R_a 84 4000 K



Spettro di emissione normalizzata R_a 84 4000 K



R_a 98 3000 K

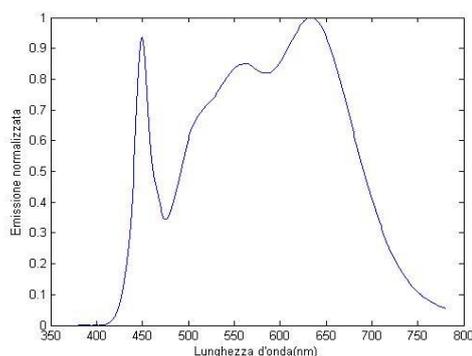


Spettro di emissione normalizzata R_a 98 3000 K

Figura 4 – Apparecchi utilizzati per l'esperimento e relative sorgenti LED



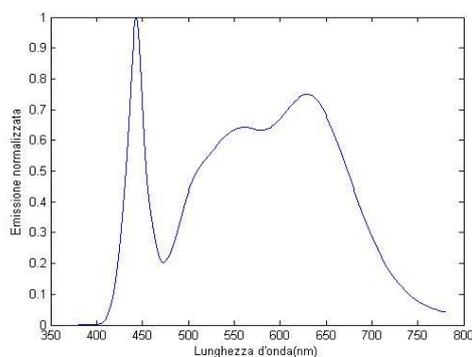
R_a98 4000 K



Spettro di emissione normalizzata R_a98 4000 K



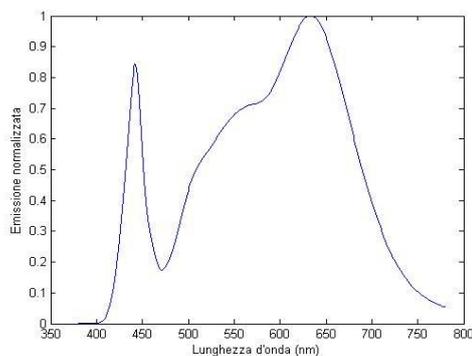
VividB R_a92 4200 K



Spettro di emissione normalizzata VividB 4200 K



VividB R_a92 3500 K



Spettro di emissione normalizzata VividB 3500 K

Figura 5 – Apparecchi utilizzati per l'esperimento e relative sorgenti LED

I soggetti selezionati sono stati 25 (9 uomini e 16 donne) di età compresa tra i 25 e i 60 anni, tutti normovedenti e senza problemi relativi alla percezione del colore. Il gruppo è stato inoltre suddiviso in due categorie: 20 'non esperti' d'arte, soggetti comuni senza nessuna preparazione professionale dedicata alla storia dell'arte, e 5 'esperti d'arte' in particolare restauratori dell'Opificio delle pietre dure.

Le sorgenti sono state regolate in modo tale da avere gli stessi livelli di illuminamento al centro delle opere esposte (150 lux al centro dell'opera). Gli apparecchi di illuminazione sono stati posti tutti frontalmente alle opere stesse.

La principale differenza tra le due sorgenti 'calde' Ra 84 T 3000 K e Ra 98 3000 K è il picco di emissione (Ra 84 T 3000 K 640 nm e Ra 98 3000 K 605 nm) Figura 6.

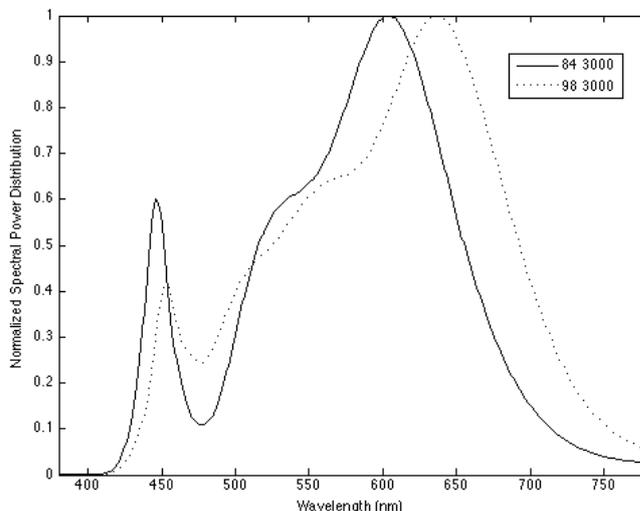


Figura 6 – Spettro di emissione normalizzato delle sorgenti Ra 84 T 3000 K (linea continua) e Ra 98 3000 K (linea tratteggiata)

Le due sorgenti 'fredde' Ra 84 T 4000 K e Ra 98 4000 K sono ottenute con lo stesso principio di funzionamento rispetto alle altre sorgenti, il picco nel blu coincide, ma quello che cambia è la quantità di radiazione emessa che comporta una Temperatura di colore più elevata Figura 7.

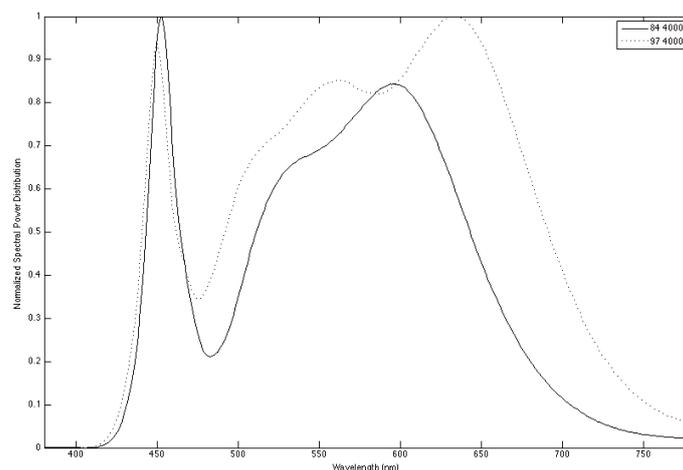


Figura 7 – Spettro di emissione normalizzato delle sorgenti Ra 84 T 4000 K (linea continua) e Ra 98 4000 K (linea tratteggiata)

Le seguenti due sorgenti sono invece più bilanciate Ra 92 T 3500 K e Ra 92 4200 K e, rispetto alle altre, emettono maggiormente nella regione dello spettro corrispondente al colore rosso Figura 8.

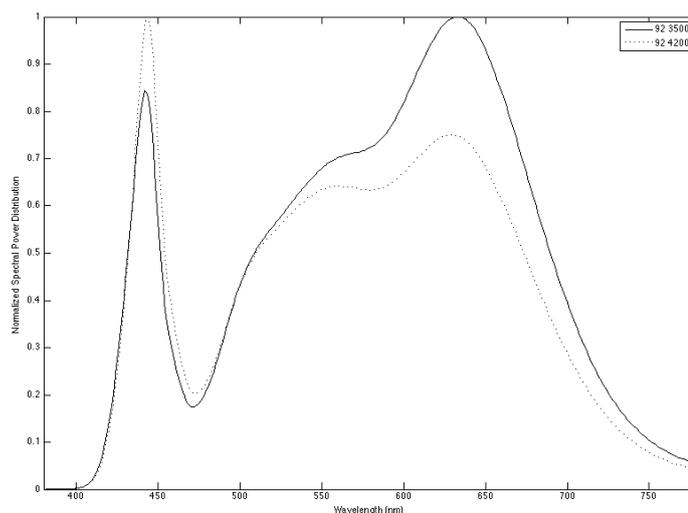


Figura 8 – Spettro di emissione normalizzato delle sorgenti Ra 92 T 3500 K (linea continua) e Ra 92 4200 K (linea tratteggiata)

1.3 - Risultati

Le opere illuminate con prodotti che presentano diverse caratteristiche spettrali sono apparse ai soggetti selezionati tutte evidentemente differenti da un punto di vista cromatico a seconda del tipo di luce utilizzato. L'effetto è stato notato da parte di tutti i soggetti interpellati che hanno espresso la loro preferenza tra le soluzioni mostrare in sequenza con punteggio simile.

In alcuni casi i colori apparivano più accesi e maggiormente distinguibili, in altri più tenui e omogenei e in altri casi ancora si accendevano maggiormente i verdi e gli azzurri rispetto ai colori rosso arancio. Questo avveniva sia per le opere figurative che per quella astratta.

Compatibilmente con i limiti dovuti all'utilizzo della macchina fotografica riportiamo nelle Tabelle 1, 2 e 3 le immagini delle opere sotto i diversi tipi di luce.

Tabella 1 - 'Figura di donna' Anonimo illuminato con sorgenti LED con diverse caratteristiche spettrali

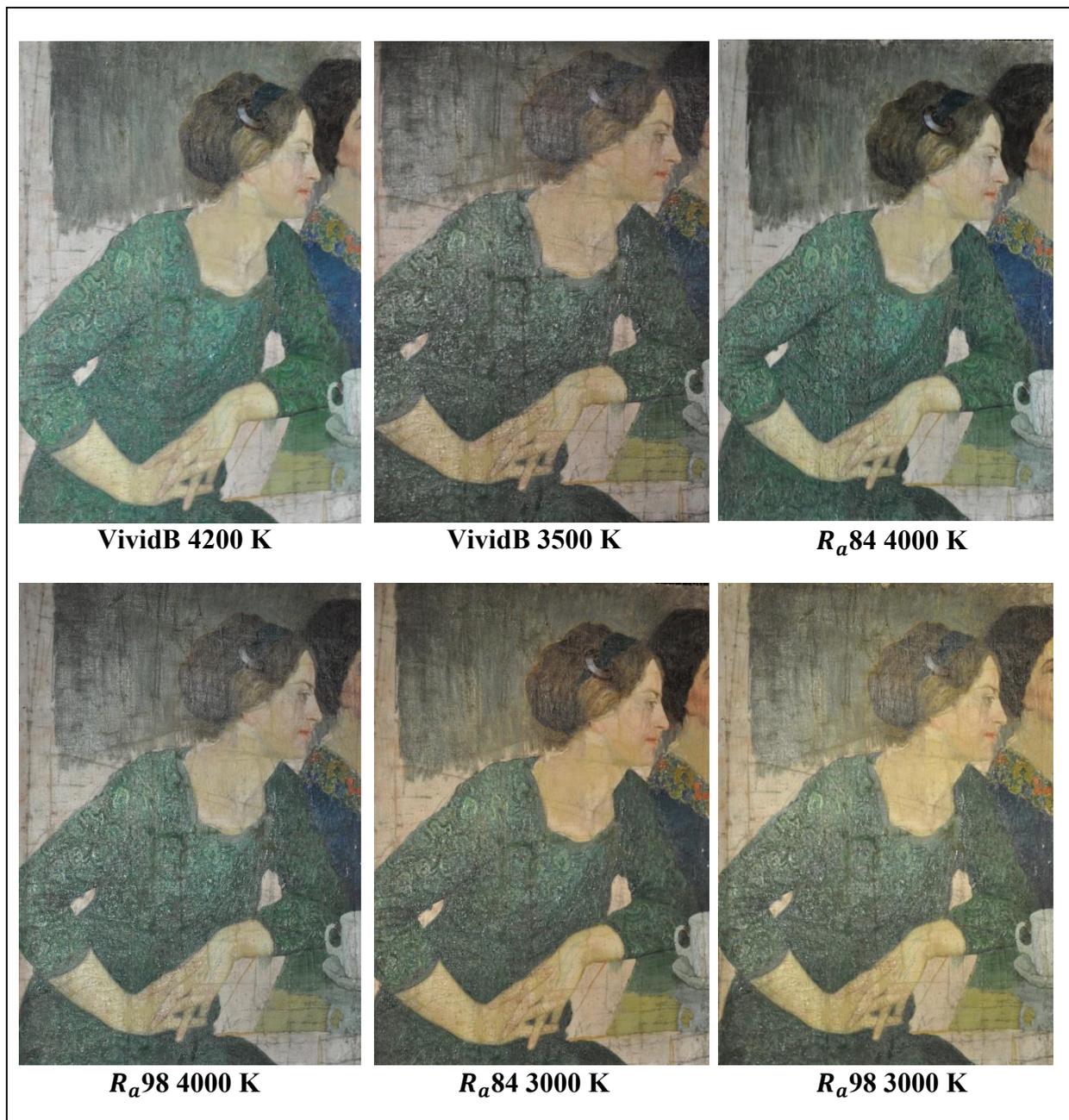


Tabella 2 – ‘Sant’Agostino nello studio’ di Sandro Botticelli illuminato con sorgenti LED con diverse caratteristiche spettrali



VividB 4200 K



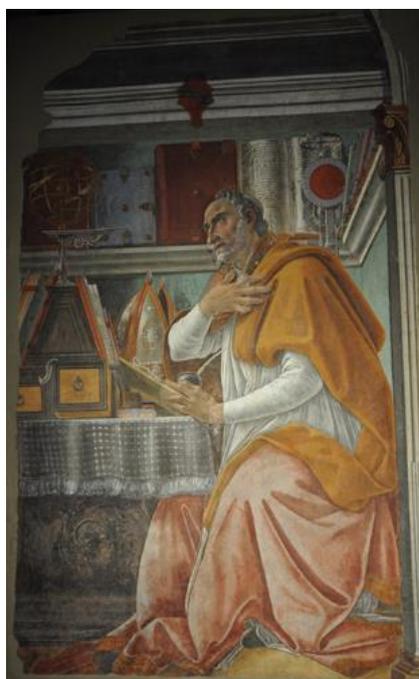
VividB 3500 K



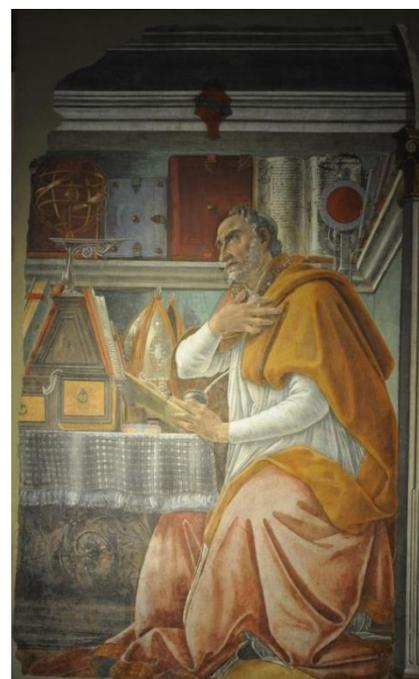
R_a84 4000 K



R_a98 4000 K

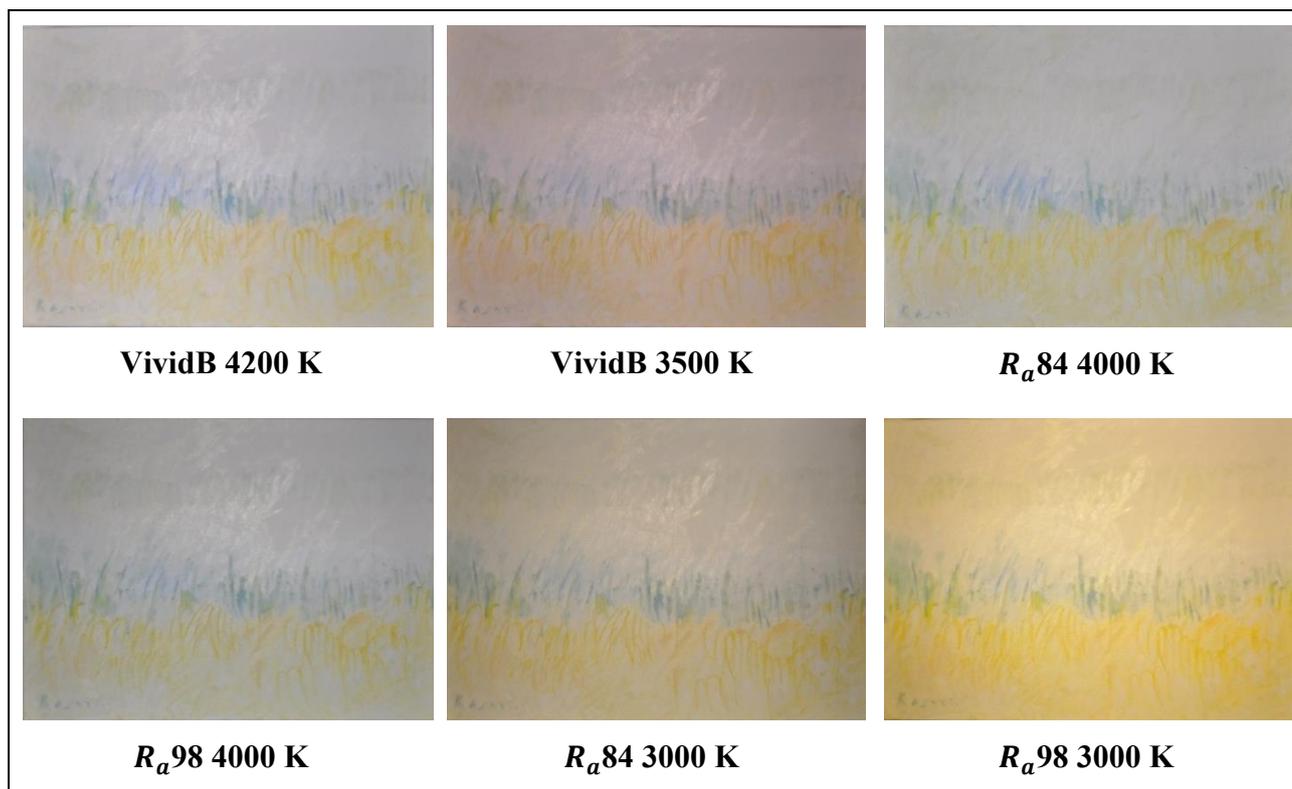


R_a84 3000 K



R_a98 3000 K

Tabella 3 – ‘Memoria della luce’ di Giovanna Rasario illuminato con sorgenti LED con diverse caratteristiche spettrali



Le preferenze variano a seconda del tipo di opera illuminata. Per il dipinto ‘Figura di donna’ la sorgente che ha ottenuto un punteggio superiore è quella con Temperatura di colore ‘fredda’. I non esperti preferiscono la lampada R_a 92 T 4200 K mentre gli esperti quella con R_a 84 e T 4000 K. È interessante notare che per gli esperti d’arte la sorgente che è piaciuta di meno tra tutte quelle proposte è quella con l’indice di resa cromatica più alto e maggiormente simile alle lampade alogene. I risultati sono riportati in Figura 9.

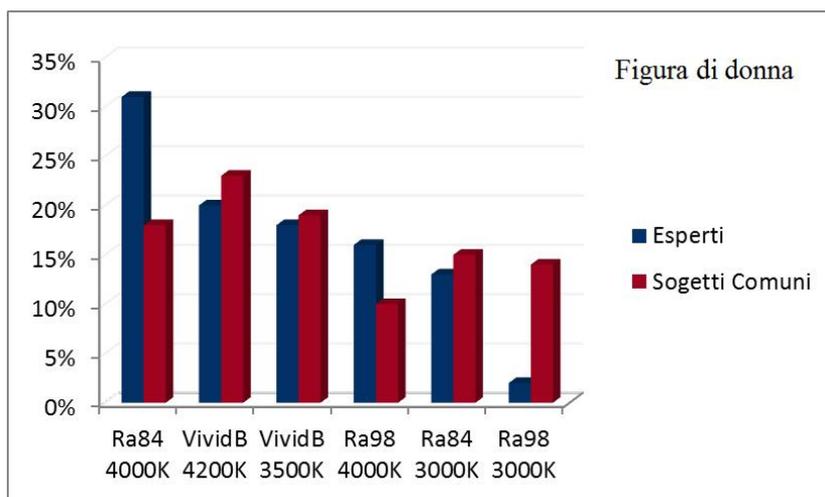


Figura 9 – ‘Figura di donna’ preferenze espresse da soggetti comuni e esperti d’arte

Come si può notare in Figura 10 e 11 la differenza cromatica ottenuta con la sorgente ‘fredda’ rispetto a quella ‘calda’ è molto evidente ed è stato percepito da tutti i soggetti selezionati.



Figura 10 – Sorgente Ra 84 T 4000 K



Figura 11 – Sorgente Ra 98 T 3000 K

Per l’opera ‘Sant’Agostino nello studio’ la sorgente preferita dai soggetti comuni è la Ra 92 T 3500 K mentre gli esperti d’arte preferiscono la Ra 92 e T 4200 K. Anche per questa opera la sorgente che è piaciuta di meno tra tutte quelle proposte è quella con l’indice di resa cromatica più alto e T 3000 K. I risultati sono riportati in Figura 12.

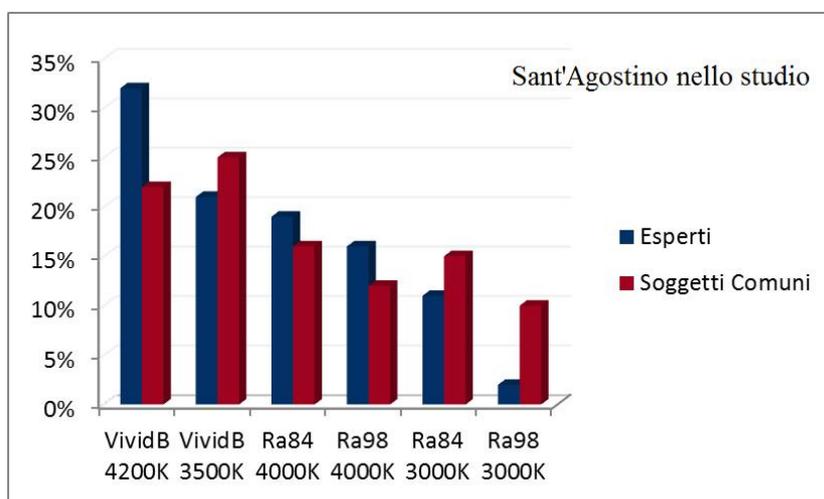


Figura 12 – ‘Sant’Agostino nello studio’ preferenze espresse da soggetti comuni e esperti d’arte

In Figura 13 e 14 il confronto tra le opere illuminate con la sorgente preferita dagli esperti d’arte e quella che ha ottenuto il punteggio minimo.



Figura 13 – Sorgente Ra 92 T 4200 K



Figura 14 – Sorgente Ra 98 T 3000 K

Le preferenze per il dipinto 'Memoria della luce' di Giovanna Rasario sono prevalentemente per le sorgenti 'fredde' Ra 84 T 4000 K e Ra 98 e T 4000 K. L'assenza di elementi figurativi riconoscibili ha determinato un punteggio inferiore per le sorgenti 'calde'. I risultati sono riportati in Figura 15.

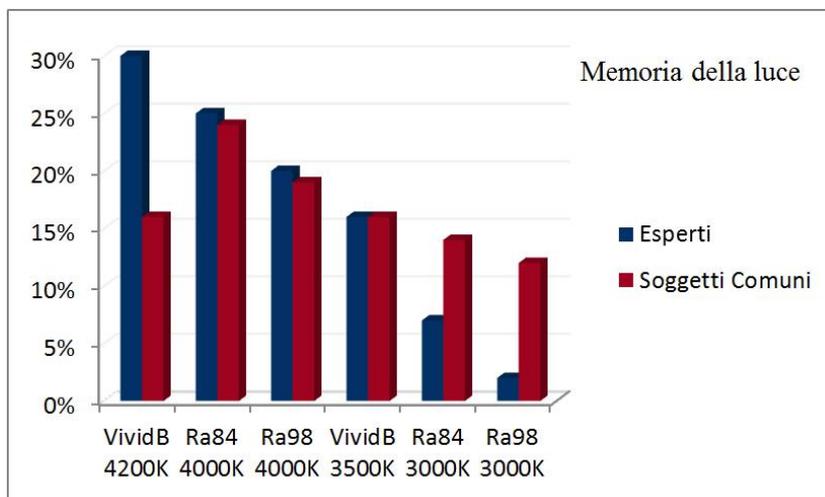


Figura 15 – 'Memoria della luce' preferenze espresse da soggetti comuni e esperti d'arte

In Figura 16 e 17 il confronto tra le opere illuminate contemporanee con la sorgente preferita dagli esperti d'arte e quella che ha ottenuto il punteggio minimo.



Figura 16 – Sorgente R_a 92 T 4200 K



Figura 17 – Sorgente R_a 92 T 4200 K

1.4 - Conclusioni

Le prove effettuate hanno permesso di ottenere interessanti risultati. Tra le sorgenti LED utilizzate per illuminare le opere d'arte selezionate hanno ottenuto una maggiore preferenza quelle più 'fredde' sia per i soggetti comuni che per gli esperti d'arte.

Per le opere figurative 'Memoria di donna' e 'Sant'Agostino nello studio' hanno ottenuto un risultato migliore le sorgenti con R_a 92 T 3500 K e 4200 K. E' interessante notare che queste sorgenti si distinguono per una maggiore emissione nel rosso in grado di enfatizzare elementi rappresentativi nell'opera e di maggior impatto come ad esempio l'incarnato del volto. Una prova viene dal fatto che l'opera astratta 'Memoria della luce', in cui predomina il bianco, ha ottenuto maggiori preferenze per le sorgenti di tipo differente.

Abbiamo potuto verificare inoltre l'inadeguatezza dell'attuale metodo di calcolo per l'indice di Resa Cromatica per la caratterizzazione delle sorgenti LED. Dai risultati ottenuti si può infatti notare che le sorgenti con R_a 84 sono state preferite in modo evidente rispetto a quelle con R_a 98. In Tabella 4 è possibile mettere a confronto i risultati ottenuti tra le sorgenti a parità di Temperatura di Colore. Risulta dunque necessario mettere in atto una nuova procedura per la caratterizzazione cromatica delle sorgenti che sia attendibile non solo per le sorgenti più tradizionali, come ad esempio le sorgenti incandescenti e a scarica, ma anche per i LED.

Tabella 4 – Confronto percentuale di preferenza per Indice di Resa Cromatica

<i>Memoria della luce</i>	<i>Figura di donna</i>	<i>Sant'Agostino nello studio</i>
<p>Ra84 Ra98 3000K 3000K</p>	<p>Ra84 Ra98 3000K 3000K</p>	<p>Ra84 Ra98 3000K 3000K</p>
<p>Ra84 Ra98 4000K 4000K</p>	<p>Ra84 Ra98 4000K 4000K</p>	<p>Ra84 Ra98 4000K 4000K</p>
<p>Ra84 Ra98 3000K 3000K</p>	<p>Ra84 Ra98 3000K 3000K</p>	<p>Ra84 Ra98 3000K 3000K</p>
<p>Ra84 Ra98 4000K 4000K</p>	<p>Ra84 Ra98 4000K 4000K</p>	<p>Ra84 Ra98 4000K 4000K</p>

Ringraziamenti

Gli autori ringraziano Giancarlo Castoldi della Targetti per gli apparecchi di illuminazione forniti, Raffaella Fontana, Marco Raffaelli e Marco Barucci dell'Ino Cnr per la preziosa collaborazione, i referenti dell'Opificio delle pietre dure per le opere messe a disposizione per le prove in laboratorio, Giovanna Rasario per l'opera 'Memoria delle luce' e tutti i soggetti che si sono resi disponibili e che hanno collaborato all'esperimento.

Bibliografia

1. Berns, Roy S., "Designing white-light LED lighting for the display of art: A feasibility study." *Color Research & Application* 36.5, 324-334 (2011)
2. Mou, X., and R. S. Berns. "Design of LED for Museum Lighting Application." *Proceedings of CIE2013, CIEx038*, 758-766 (2013).
3. Commission Internationale de l'Éclairage, *Method of Measuring and Specifying Colour Rendering Properties of Light Sources*, CIE 13.3 (1995).
4. Narendran, Nadarajah, Lei Deng. "Color rendering properties of LED light sources." *International Symposium on Optical Science and Technology*. International Society for Optics and Photonics (2002)
5. Csató, László. "Ranking by pairwise comparisons for Swiss-system tournaments." *Central European Journal of Operations Research* 21.4, 783-803 (2013)

UNA NUOVA TECNOLOGIA FOTOVOLTAICA: CELLE SOLARI A COLORANTE (DSSC)

Gianna Reginato, Alessandro Mordini, Lorenzo Zani, Massimo Calamante
Istituto di Chimica dei Composti Organometallici (ICCOM)

1.1 - Fotovoltaico di nuova generazione

A seguito del rapido sviluppo scientifico, tecnologico ed economico che ha caratterizzato il XX secolo, la domanda energetica globale ha subito una crescita costante, che non si è arrestata nemmeno in anni recenti nonostante il rallentamento dovuto alla crisi economica mondiale (+0.9% nel 2014, a fronte di un aumento annuo medio del 2.1% nel periodo 2005-2014)[1,2]. In questo contesto, lo sviluppo di fonti energetiche rinnovabili appare la strada più promettente per assicurare un'evoluzione sostenibile del sistema energetico globale, sia dal punto di vista ambientale, sia da quello delle risorse, sia da quello socio-economico.

Nella ricerca di fonti energetiche alternative a quelle fossili, che coniughino efficienza, facilità di uso e ridotto impatto ambientale, la possibilità di sfruttare l'energia solare risulta interessante per almeno tre motivi:

- è gratuita ed inesauribile;
- non produce scarti;
- è abbondante alle nostre latitudini.

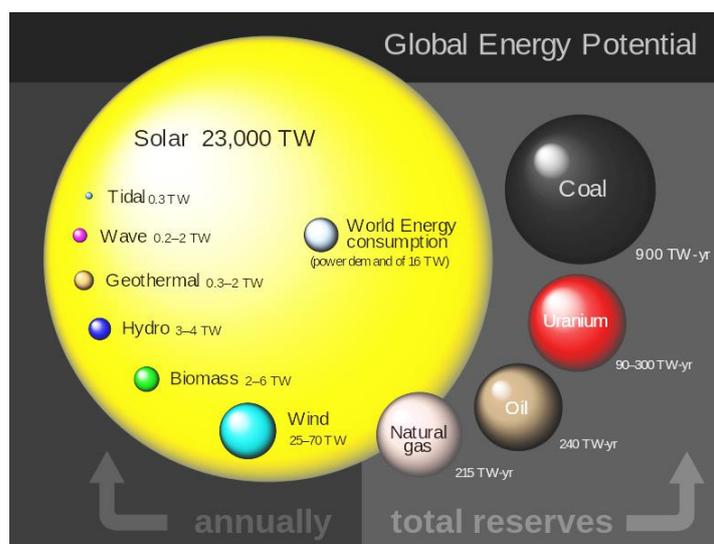


Figura 1 – Rappresentazione schematica del fabbisogno energetico mondiale e delle risorse disponibili

Inoltre, come mostrato in Figura 1, la quantità di energia solare che annualmente raggiunge il nostro pianeta risulta essere di diversi ordini di grandezza superiore al fabbisogno energetico globale: pur tenendo conto del fatto che non tutta quell'energia è praticamente utilizzabile, il suo efficace sfruttamento appare sicuramente in grado di contribuire significativamente alla risoluzione del problema energetico globale.

Alla base della tecnologia che consente lo sfruttamento dell'energia solare sta la cella fotovoltaica, cioè un dispositivo in grado di convertire l'energia della luce solare in energia elettrica.

Il tipo di dispositivi fotovoltaici più diffusi, nonché i primi ad essere stati sperimentati (fin dal 1954), sono le celle al silicio (cristallino o amorfo) che rappresentano sicuramente una delle principali tecnologie per la produzione di energia dal sole. Nel corso

degli anni il costo dei moduli al silicio si è notevolmente ridotto, fino al punto che, secondo alcuni studi, il prezzo dell'energia prodotta in questo modo raggiungerà presto quello dell'energia prodotta in modo tradizionale (la cosiddetta *grid-parity*). Ciononostante, l'elevato grado di purezza necessario per l'impiego del silicio nella realizzazione delle celle rende il processo produttivo complesso ed oneroso dal punto di vista energetico. Inoltre, i moduli fotovoltaici al silicio presentano varie limitazioni, quali spessore e peso elevati, forte dipendenza delle prestazioni dall'angolo d'incidenza della luce e scarsa adattabilità in contesti architettonici (difficoltà/impossibilità di variarne forma, dimensioni e colore)[3]. Per tutte queste ragioni, negli ultimi anni la ricerca in campo fotovoltaico si è indirizzata verso lo sviluppo di tecnologie alternative basate su materiali e principi di funzionamento innovativi. Fra le tecnologie fotovoltaiche emergenti, che hanno avuto un notevole sviluppo negli ultimi anni, ci sono le celle solari organiche ed ibride, le celle solari sensibilizzate a colorante (Dye Sensitized Solar Cells, abbreviato in DSSC) e le celle a perovskiti[4].

1.2 - Dye Sensitized Solar Cells (DSSC)

All'inizio degli anni '90 il chimico svizzero Michael Grätzel[4] iniziò a studiare un nuovo rivoluzionario tipo di celle solari, successivamente divenute note come Dye Sensitized Solar Cells (DSSC)[5], il cui funzionamento è completamente diverso rispetto alle altre classi di dispositivi fotovoltaici e si ispira al meccanismo della fotosintesi clorofilliana, nella quale la luce solare è in grado di promuovere un processo di eccitazione elettronica nella clorofilla, dando così luogo ad un meccanismo di trasferimento elettronico che produce l'energia necessaria per la sopravvivenza della pianta.

Rispetto alle celle solari tradizionali, le DSSC hanno caratteristiche strutturali e di funzionamento che le rendono estremamente vantaggiose da un punto di vista economico, essendo costruite a partire da materiali a basso costo, non tossici, facilmente reperibili e riciclabili, utilizzando quindi un processo produttivo a basso impatto ambientale. Inoltre, esse hanno recentemente dimostrato di poter fornire buone efficienze di conversione della luce in elettricità, con rendimenti superiori al 14% (per confronto, il rendimento di una cella al silicio si aggira intorno al 25%)[6].

Gli elementi che compongono una cella DSSC sono sostanzialmente cinque (Figura 2):

- 1) un supporto di vetro conduttore composto da biossido di stagno (SnO_2) "dopato" con fluoro (FTO);
- 2) un film sottile di materiale semiconduttore nanocristallino (generalmente TiO_2);
- 3) un colorante che funziona da fotosensibilizzatore;
- 4) una soluzione elettrolitica che abbia proprietà ossido-riduttive;
- 5) un supporto di vetro conduttore ricoperto da platino come contro-elettrodo.

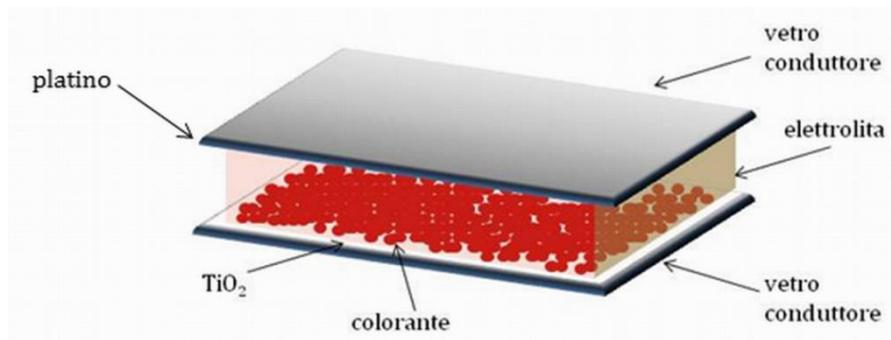


Figura 2 - Rappresentazione schematica dei componenti di una cella DSSC

Il meccanismo di funzionamento della cella è molto semplice ed rappresentato nella Figura 3[7].

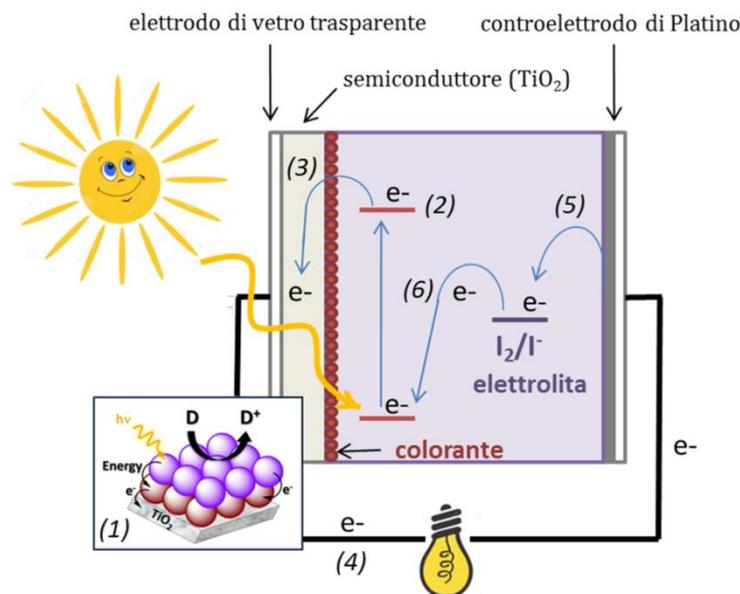


Figura 3 - Meccanismo di funzionamento di una cella DSSC

Su di un elettrodo (*anodo*) formato da uno strato di un materiale semiconduttore (TiO_2), che viene depositato su un supporto trasparente e conduttore, sono assorbite molecole di colorante (o sensibilizzatore), cioè di una sostanza capace di assorbire la luce. Inizialmente, il colorante assorbe la radiazione solare (1) e raggiunge uno stato eccitato, promuovendo un elettrone da un livello fondamentale a un livello energetico superiore (2). L'elettrone viene successivamente trasferito sul semiconduttore (3) e passa in seguito nel circuito esterno (4). Il sensibilizzatore ossidato viene ridotto dagli ioni I^- della coppia redox I^-/I_3^- presente nella soluzione elettrolitica (5), ritornando allo stato iniziale; infine, gli ioni I_3^- così generati diffondono verso il contro elettrodo dove sono ridotti per mezzo degli elettroni provenienti dal circuito esterno (6), chiudendo così il ciclo. Il processo complessivo quindi, in un sistema ideale, non provoca trasformazioni chimiche permanenti e produce una corrente che può essere utilizzata per alimentare un carico esterno.

È chiaro che i moduli (cioè i dispositivi derivanti dall'unione di più celle) ottenibili a partire da questa tecnologia risultano estremamente versatili poiché i supporti utilizzabili sono molteplici (vetro o plastica conduttiva, rigidi o flessibili), permettendo di ottenere dispositivi modulabili in termini di forma, trasparenti e colorati. Inoltre, l'efficienza di questi dispositivi risulta indipendente dall'angolo di incidenza della luce solare, consentendo dunque buone prestazioni anche quando vengano installati in posizione verticale o orientati verso nord. Questo rappresenta di fatto un deciso passo avanti rispetto all'attuale fotovoltaico e può facilitare notevolmente la trasformazione del concetto di modulo *adattato* agli edifici in quello di una vera e propria *integrazione* architettonica (*Building-Integrated PhotoVoltaics*, abbreviato con BIPV) (Figura 4).

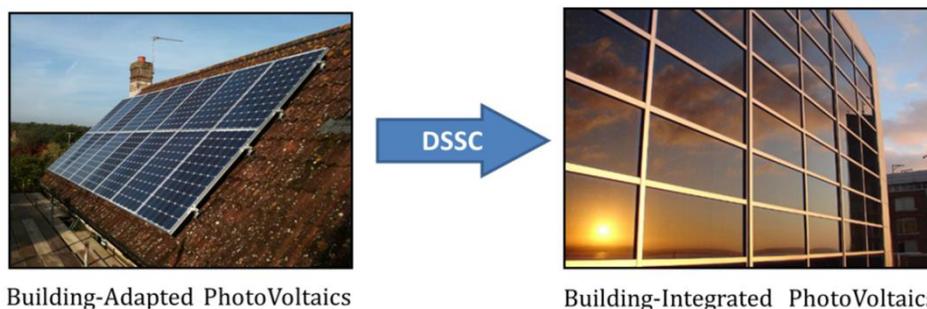


Figura 4 - Confronto tra "Building-Adapted PhotoVoltaics" e "Building-Integrated PhotoVoltaics" (BIPV)

Per quanto riguarda il fotovoltaico *indoor*, invece, la principale limitazione connessa con l'uso delle celle a base di silicio è rappresentata dalla loro insufficiente risposta spettrale nelle regioni di lunghezza d'onda breve (<600 nm), caratteristiche dei sistemi artificiali d'illuminazione, nonché dalle loro prestazioni insoddisfacenti in situazioni di bassa illuminazione.

Alcuni studi recenti hanno dimostrato che in tali condizioni le celle solari di nuova generazione, ed in particolare le DSSC, sono in grado di fornire prestazioni migliori, in particolare modo per quanto riguarda la densità di potenza fornita sotto illuminazione a fluorescenza[8]. Queste caratteristiche suggeriscono che le celle fotovoltaiche di nuova generazione potrebbero essere proficuamente utilizzate all'interno di edifici per alimentare dispositivi a basso consumo energetico, come sensori od attuatori di varia natura, ovvero per la ricarica di piccoli dispositivi elettronici (telefoni cellulari, tablet *etc. etc.*).

1.3 - Il colorante

Il colorante rappresenta uno dei componenti più importanti di una DSSC, essendo impegnato sia nel processo di cattura della luce che in quello di trasferimento di carica. In linea di principio, possono essere utilizzati come sensibilizzatori tutti quei coloranti in grado di legarsi al TiO_2 e di assicurare il trasferimento elettronico al semiconduttore, ma in pratica la scelta di un colorante ottimale risulta essenziale non solo per migliorare l'efficienza e la durata della cella, ma anche per influenzare proprietà quali colore e trasparenza (Figura 5), utili a definirne precisi ambiti di applicazione e pertanto a favorirne l'utilizzo commerciale.

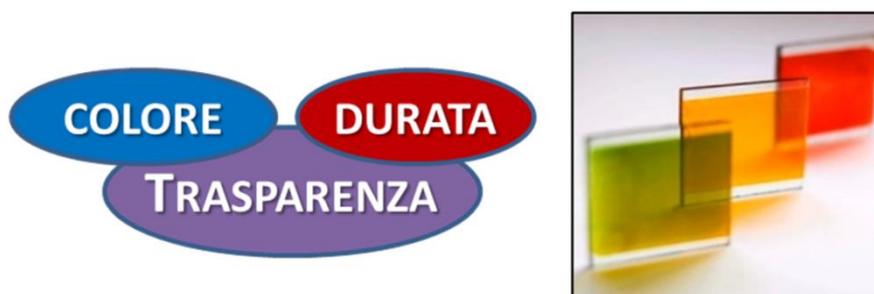


Figura 5 Esempio di piccoli dispositivi su supporto trasparente

Il colorante ideale per celle DSSC dovrebbe avere un ampio spettro di assorbimento della luce nel campo del visibile e del vicino infrarosso (dove massimo è l'irraggiamento solare), e dovrebbe garantire un legame sia chimico che fisico il più possibile stabile con l'ossido semiconduttore. Inoltre, il livello energetico dello stato eccitato (processo (2) nella Figura 3) dovrebbe essere ben allineato con il livello energetico più basso della banda di conduzione dell'ossido semiconduttore, al fine di ridurre la perdita di energia nel trasferimento di carica, e raggiungendo così la massima efficienza possibile nell'iniezione degli elettroni dallo stato eccitato al conduttore. Infine, è cruciale che il potenziale di ossidoriduzione del colorante abbia un valore appropriato per consentirne la riduzione da parte dell'elettrolita utilizzato.

Esistono coloranti naturali (Figura 6) che possiedono le caratteristiche strutturali adatte per far funzionare una DSSC[9]. Fra questi ci sono ad esempio le clorofille (verde), gli antociani (rosso o viola), ottenibili per estrazione di frutti rossi o melanzane, e le betalaine (rosso o arancio), i cui estratti grezzi da ravanello e da fico d'India hanno dato i migliori risultati finora ottenuti con coloranti naturali. Purtroppo in tutti i casi fin qui esaminati le efficienze delle celle corrispondenti sono risultate relativamente basse, perlomeno in confronto a quelle ottenute con coloranti sintetici (vedi sotto).

Al contrario, l'utilizzo di coloranti sintetici, specificamente progettati per rispondere ai requisiti necessari per l'applicazione in DSSC, ha permesso la fabbricazione di celle in grado di fornire efficienze molto più elevate, fino a superare il 14% su scala di laboratorio[6]

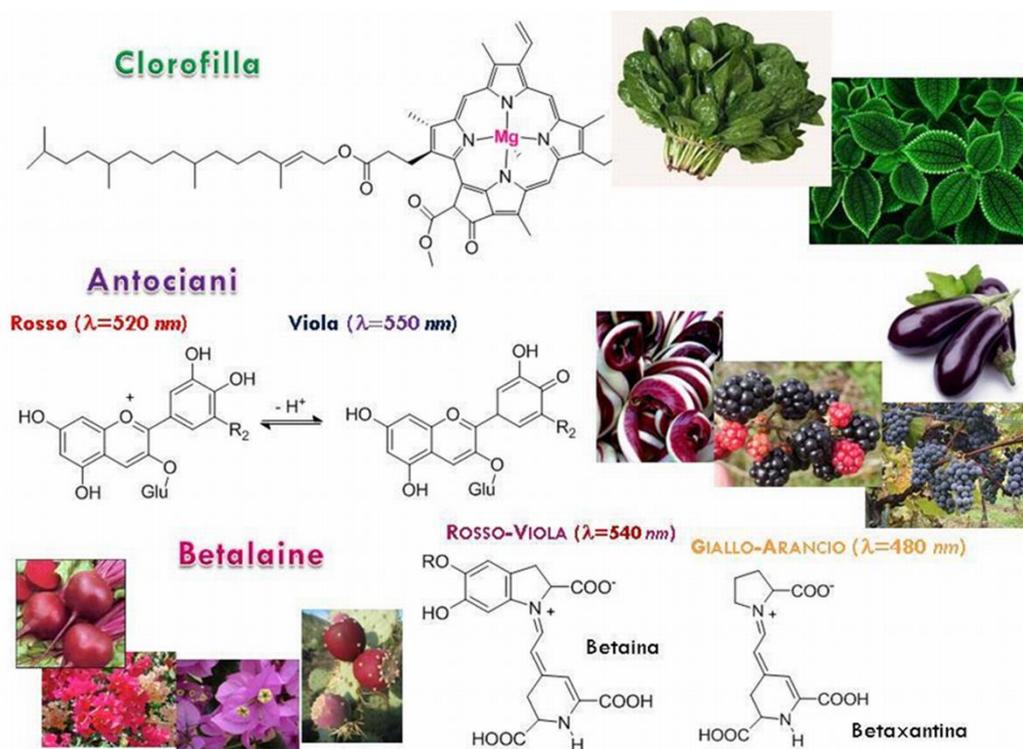


Figura 6 – Esempi di coloranti naturali usati come sensibilizzatori per DSSC

I coloranti sintetici per celle DSSC possono essere suddivisi in varie classi a seconda della loro composizione e delle loro caratteristiche strutturali: laddove nei primi anni di sviluppo di questa tecnologia essi erano quasi esclusivamente costituiti da complessi organo-metallici di rutenio, attualmente la categoria di sensibilizzatori oggetto di maggiore interesse è quella dei coloranti organici. Questi ultimi, infatti, presentano alcuni grossi vantaggi rispetto alle altre classi di coloranti, che sono così riassumibili: (a) elevato assorbimento della radiazione luminosa; (b) processi di sintesi e purificazione più semplici ed economici; (c) possibilità di modulare le loro proprietà fotofisiche attraverso l'introduzione di modifiche in parti diverse della struttura.

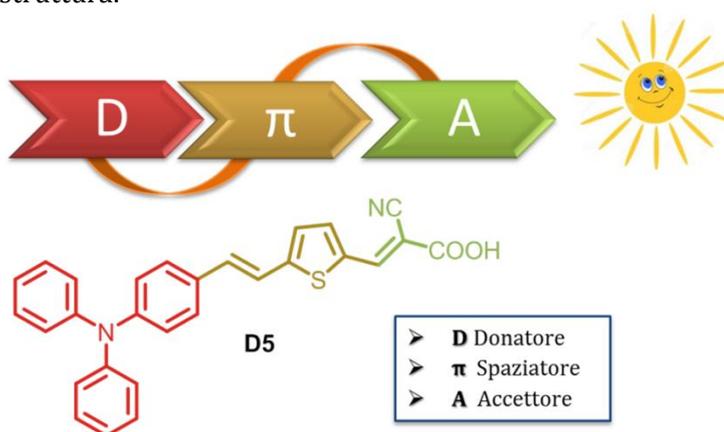


Figura 7 – Tipica composizione di un colorante organico per DSSC, esemplificata dalla struttura del colorante organico standard **D5**.

La struttura tipica di un colorante organico sintetico è caratterizzata dalla presenza nella molecola di tre porzioni distinte: una parte ricca di elettroni costituita da gruppi funzionali donatori (**D**), una parte centrale di collegamento (π) ed una parte costituita da grup-

pi funzionali accettori (**A**), capace di attrarre gli elettroni (Figura 7). In pratica in questo tipo di molecole si realizza una corrente di elettroni dalla parte più ricca di carica (D) a quella più povera (A), attraverso un connettore capace di consentire tale mobilità: per questo motivo queste molecole sono anche descritte come *push-pull* (dall'inglese spingere-attrarre). Tali architetture vengono solitamente indicate con la sigla *D- π -A*[10]. Nella Figura 7 è rappresentato un tipico esponente di questa classe di sensibilizzatori, il colorante **D5**[11], che, a causa della semplicità della sua struttura e delle sue discrete prestazioni, è oggi diventato uno standard di riferimento per la valutazione dell'efficienza delle celle costruite con coloranti organici di più recente concezione.

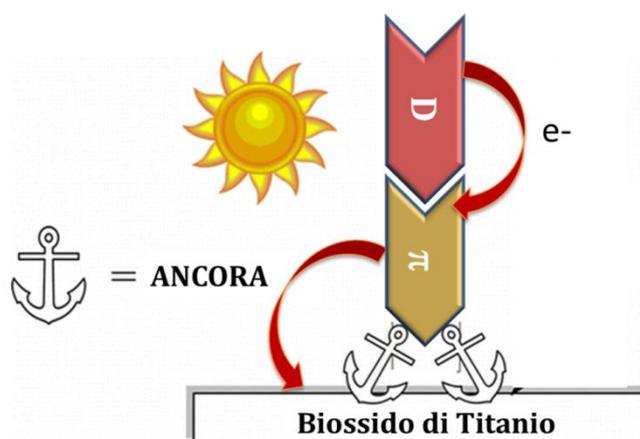


Figura 8 – Schematizzazione del legame tra il colorante ed il biossido di titanio.

Molto importante nella struttura è il ruolo del gruppo accettore, il quale, oltre ad influenzare le proprietà elettroniche della molecola di colorante, deve anche essere in grado di formare legami stabili con il biossido di titanio in modo da consentire un forte ancoraggio al semiconduttore (Figura 8) ed un efficace trasferimento elettronico (detto anche iniezione). Per questo, in anni recenti, una sempre crescente parte dell'attività di ricerca svolta sui coloranti per celle DSSC ha riguardato l'introduzione di nuovi gruppi ancoranti e la valutazione della loro influenza sulle proprietà generali dei sensibilizzatori[12].

Modificando le varie porzioni della molecola è possibile modulare le proprietà elettroniche del sensibilizzatore, ed in particolare è possibile alterare il profilo e l'intensità del suo spettro di assorbimento (Figura 9), con importanti conseguenze in termini di applicabilità pratica. Ad esempio, molti dei sensibilizzatori utilizzati comunemente in DSSC assorbono la luce nella regione del visibile (verde e blu), risultando quindi tipicamente di colore rosso scuro. Questo comporta uno scarso assorbimento di luce rossa o vicino infra-rossa con una conseguente limitazione del flusso di elettroni (quantità di corrente) prodotto e quindi della efficienza finale della cella.

Un'estensione nel rosso, sebbene modesta, dell'assorbimento del fotosensibilizzatore può portare quindi al duplice vantaggio di aumentare la densità di corrente prodotta e di sfruttare la radiazione solare durante un arco di tempo più ampio nella giornata (dal momento che le caratteristiche spettrali dell'irraggiamento luminoso variano, arricchendosi delle componenti rosso-arancio, quando i raggi solari attraversano l'atmosfera con un minore angolo d'incidenza).

Dal momento che, con l'aiuto di calcoli quanto meccanici (quali ad esempio quelli basati sulla teoria del funzionale-densità, DFT), siamo in grado di predire le proprietà ottiche ed elettroniche dei composti finali, è possibile progettare nuove molecole con caratteristiche ottimali, che possono poi essere preparate in laboratorio ed utilizzate per la costruzione e la caratterizzazione di celle DSSC, in modo da determinarne l'efficienza di conversione fotovoltaica e confrontarla con quella dei dispositivi già noti.

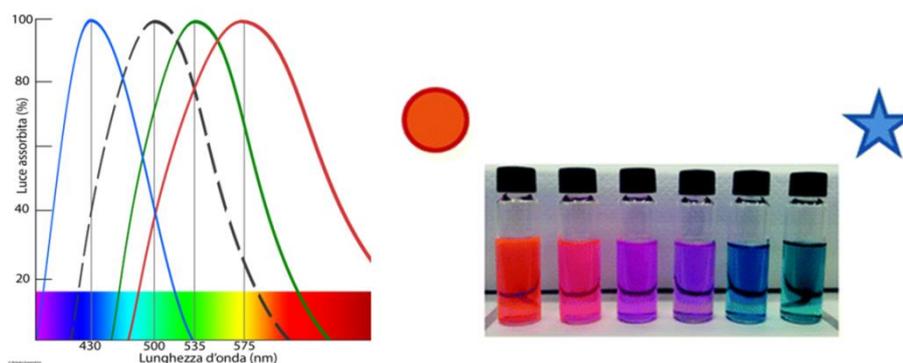


Figura 9 – Effetto della variazione del massimo di assorbimento sul colore dei composti organici

Ad esempio, le due molecole riportate in Figura 10 (denominate rispettivamente **TTZ1** e **TTZ5**) sono molto simili fra di loro, e rappresentano due coloranti organici di sintesi in cui si riconosce facilmente lo scheletro tipico D- π -A[13,14]. Uno studio teorico condotto su queste strutture molecolari ci consente di ottenere la distribuzione spaziale degli orbitali molecolari di frontiera HOMO (highest occupied molecular orbital) e LUMO (lowest unoccupied molecular orbital), che corrisponde alla localizzazione della densità elettronica nei vari livelli energetici, insieme alle rispettive energie rispetto al vuoto.

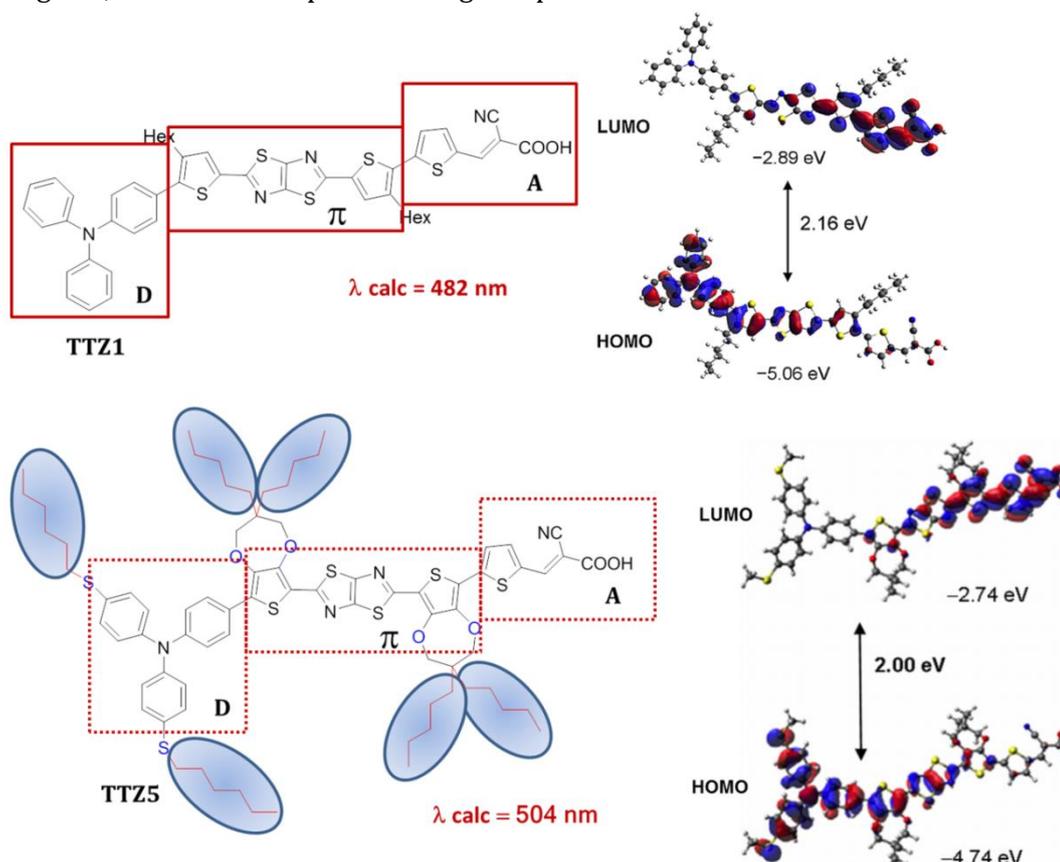


Figura 10 – Forma ed energia degli orbitali molecolari dei sensibilizzatori organici **TTZ1** e **TTZ5**.

Questo tipo d'investigazione ci consente pertanto di determinare la differenza energetica tra lo stato fondamentale del colorante ed il primo stato eccitato (che si determina quando un elettrone viene promosso dall'HOMO al LUMO). Analizzando le immagini corrispondenti agli orbitali di frontiera (Figura 10, destra), appare evidente come per entrambe le molecole l'orbitale HOMO sia principalmente localizzato sul gruppo donatore, mentre il LUMO sul gruppo accettore. Questa è in realtà una geometria corretta, poiché prevede che

quando l'elettrone, a seguito dell'assorbimento della radiazione solare, viene promosso dal livello energetico fondamentale al primo livello energetico superiore possa poi facilmente essere trasferito sul semiconduttore, grazie alla sua vicinanza spaziale rispetto alla superficie di quest'ultimo (si ricordi che, come indicato in precedenza, il gruppo accettore svolge anche il ruolo di ancorante della molecola sulla titania).

Il calcolo dei livelli energetici ci consente anche di fare una previsione sulla lunghezza d'onda corrispondente al massimo di assorbimento del colorante. Come possiamo notare (Figura 10, sinistra), la variazione di struttura fra le due molecole può essere considerata in realtà abbastanza piccola ed è dovuta all'introduzione di raggruppamenti ricchi di elettroni (S e O, indicati in blu) sia sulla porzione donatrice (D) che sullo spaziatore π . Ciononostante si determina una variazione dei livelli energetici tale da produrre uno spostamento di circa 20 nm nel massimo di assorbimento. Le catene alchiliche legate a S e O hanno invece l'effetto di aumentare la solubilità del composto finale. Questo comportamento, previsto teoricamente, può essere verificato una volta che il colorante è stato preparato in laboratorio.

Nel caso delle molecole illustrate in Figura 10, si osserva in effetti come le piccole modifiche strutturali sopra descritte inducano sia una variazione di colore, denotata dallo spostamento del massimo dello spettro UV-Visibile, che un aumento notevole dell'intensità dell'assorbimento, come si può notare in Figura 11.

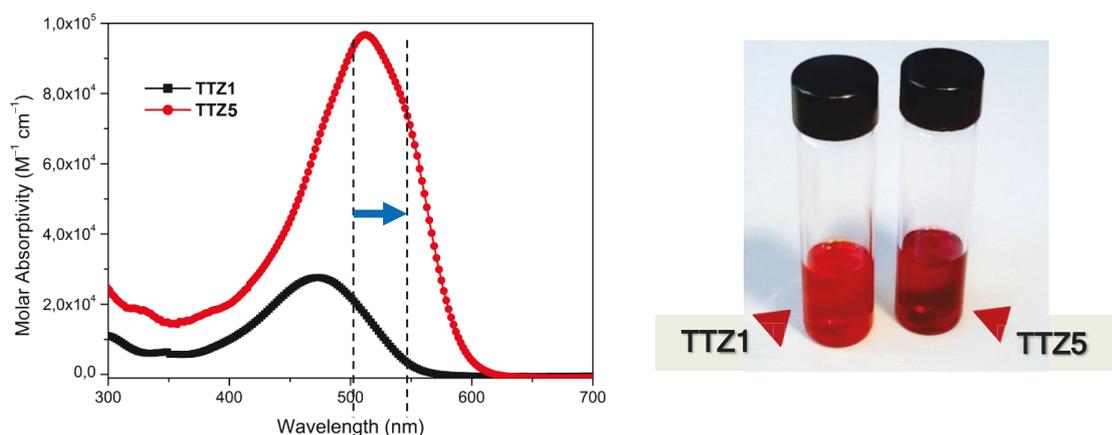


Figura 11 - Effetto sulla variazione del colore e l'intensità di assorbimento dovuti alle modifiche strutturali dei coloranti **TTZ1** e **TTZ5**.

Quest'ultima proprietà risulta anch'essa molto interessante, poiché consente in linea di principio di utilizzare quantità inferiori di colorante e quindi strati più sottili di TiO_2 , nella realizzazione delle celle, con conseguente aumento della trasparenza del dispositivo.

In questo modo, le celle costruite utilizzando il colorante **TTZ5**, appositamente ingegnerizzato, hanno generato una efficienza di conversione energetica (definita come la densità di potenza massima generata dalla cella divisa per la densità di potenza incidente su un'area di riferimento della cella) di circa il 7.7%[14], doppia cioè rispetto a quella ottenuta in precedenza con il colorante **TTZ1**[13]. È inoltre importante sottolineare come tale efficienza sia stata ottenuta utilizzando uno strato abbastanza sottile di semiconduttore (6.5 μm , circa la metà di quanto normalmente impiegato), con evidenti positive ricadute sui costi di produzione dei dispositivi in vista di un possibile *scale-up* del sistema: in tali condizioni, coloranti standard a base di rutenio, nonché il colorante organico di riferimento **D5**, già citato in precedenza, hanno prodotto efficienze decisamente inferiori, testimoniando ancora una volta l'importanza della corretta progettazione strutturale dei coloranti al fine di ottenere risultati sempre migliori[14].

Ovviamente, oltre alla semplice efficienza fotovoltaica, ci sono anche altri aspetti estremamente importanti di cui è necessario tenere conto quando si progettano strutture molecolari per l'utilizzo in DSSC. Ad esempio, come abbiamo accennato, il gruppo accettore

(A) deve necessariamente essere in grado di formare legami stabili con il biossido di titanio, al fine di limitare i deleteri fenomeni di desorbimento, decomposizione e resistenza all'umidità che influenzano drasticamente la stabilità della cella e quindi la durata dei dispositivi. Ritornando all'esempio del colorante **TTZ5**, in studi successivi è stato possibile osservare come celle costruite con esso fornissero prestazioni piuttosto stabili nel tempo anche in condizioni relativamente drastiche (*storage* ad 85°C per 1000 h), indicando pertanto un'ottima stabilità fotochimica del sensibilizzatore ed un'eccellente resistenza del suo ancoraggio sul semiconduttore[15].

Riassumendo, gli esempi sopra descritti mostrano come sia possibile preparare nuovi coloranti, caratterizzati da proprietà fotofisiche ottimizzate, ed utilizzarli per ottenere dispositivi con buone efficienze fotovoltaiche, attraverso un processo di design molecolare ed ottimizzazione che può essere schematizzato nei seguenti punti (mostrati schematicamente in Figura 12):

- Selezione delle proprietà più importanti del colorante (colore, trasparenza, stabilità);
- Progettazione molecolare del colorante;
- Analisi computazionale degli orbitali molecolari e delle relative energie, e possibile revisione del processo di *design*;
- Sintesi di laboratorio;
- Caratterizzazione spettroscopica ed elettrochimica del colorante;
- Costruzione di celle DSSC su scala di laboratorio e misura delle loro proprietà salienti (efficienza di conversione fotovoltaica, stabilità);
- Revisione ed eventuale miglioramento delle strutture sintetizzate attraverso il *feedback* derivante dai test su cella.

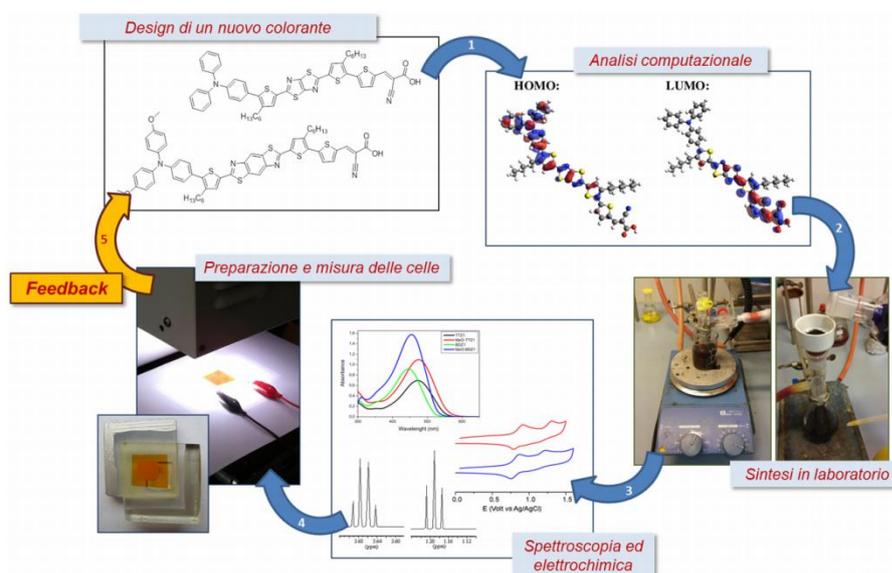


Figura 12 – Processo di sviluppo, caratterizzazione e valutazione di un nuovo colorante per celle DSSC

1.4 - L'elettrolita

I mediatori redox costituiscono un'altra parte fondamentale delle celle DSSC, dal momento che sono responsabili del trasferimento di carica tra gli elettrodi (vedi Figura 3). Essi sono tradizionalmente utilizzati in forma liquida, come soluti in soluzioni elettrolitiche, anche se è ormai piuttosto diffuso anche l'impiego di conduttori di buche solidi sia organici che inorganici[16].

Il mediatore redox di gran lunga più utilizzato nelle soluzioni elettrolitiche è costituito dalla coppia I^-/I_3^- [17]. Il suo diffuso utilizzo è stato motivato in primo luogo dalla sua ca-

pacità di ridurre molto efficacemente la forma ossidata dei coloranti a base di complessi di rutenio, usati in origine nelle DSSC; in secondo luogo, la forma ossidata di questa coppia redox è a sua volta molto efficacemente ridotta sul controlettrodo di platino, dando luogo ad un facile trasferimento di carica all'interno della soluzione.

Accanto a queste caratteristiche positive, si devono però annoverare anche alcuni svantaggi: prima di tutto, la coppia I^-/I_3^- è in grado di assorbire la radiazione luminosa nel campo del visibile, entrando così talvolta in competizione con i coloranti stessi. Inoltre, I_3^- può formare una coppia ionica con il colorante ossidato, facilitando così il processo di ricombinazione della carica appena iniettata (trasferimento dell'elettrone in senso inverso, dal semiconduttore all'elettrolita), nocivo per il funzionamento della cella. Infine, le soluzioni contenenti la coppia I^-/I_3^- possono nel tempo intaccare alcuni dei materiali con cui sono realizzati i moduli DSSC (in particolare i contatti metallici tra le celle), portando a fenomeni di corrosione[17].

Per queste ragioni, recentemente si sono intensificati gli studi volti ad identificare classi di coppie redox alternative a I^-/I_3^- [18], come ad esempio i mediatori redox organici (Figura 13, sopra), tra i quali le coppie solfuro/disolfuro risultano particolarmente interessanti, considerato che sono semplici da preparare, trasparenti alla luce visibile, non tossiche, e che le celle costruite usando tali sostanze hanno fornito buone efficienze.

La categoria di coppie redox alternative che però sino a questo momento ha dato i migliori risultati è quella dei composti di coordinazione di metalli di transizione (Figura 13, sotto), che sono particolarmente adatti ad essere impiegati con coloranti organici. Recentemente, è stato dimostrato che anche il semplice ferrocene può fornire prestazioni eccellenti se usato in combinazione con un colorante adatto: una cella fabbricata usando il sensibilizzatore organico coniugato **PAHTDIT** e contenente ferrocene nella soluzione elettrolitica ha fornito un'efficienza del 7.5% con un elevato valore di tensione[19], dati molto superiori a quanto ottenuto in passato usando coloranti al rutenio. Inoltre, di recente è stato dimostrato che anche complessi di rame con leganti azotati[20], nonché semplici composti a base di manganese[21], possono essere usati con profitto come mediatori redox in DSSC.

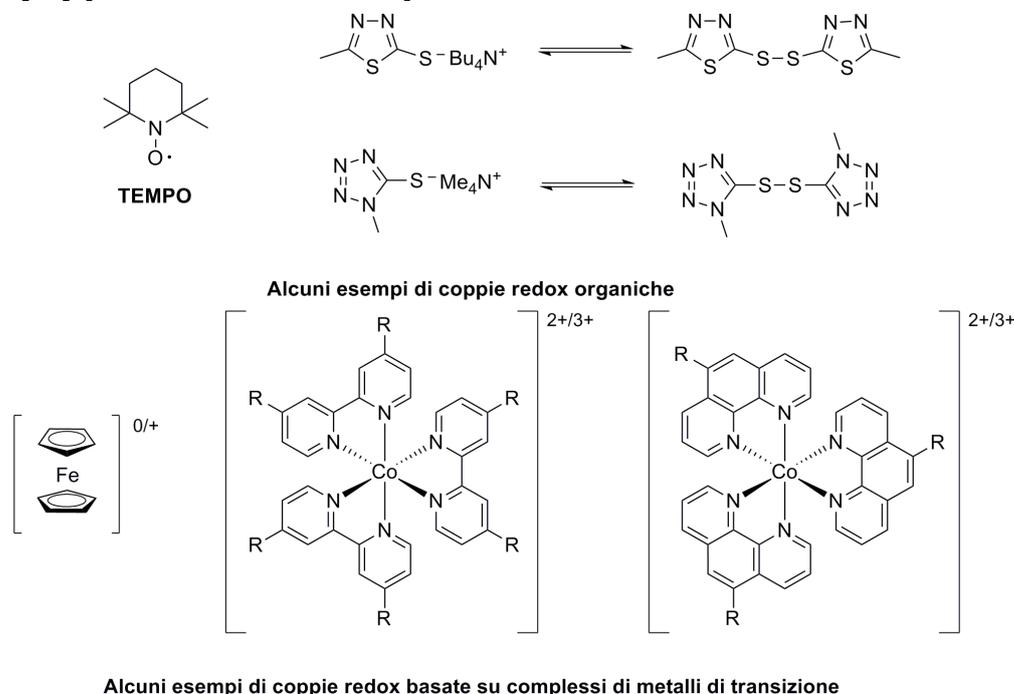


Figura 13 – Esempi di coppie redox diverse da I^-/I_3^- usate in celle DSSC

La più promettente classe di composti metallorganici che sono stati utilizzati come mediatori redox nelle DSSC è comunque costituita da complessi tris-bipiridinici e tris-fenantrolinici

di cobalto. Questi complessi sono molto facili da sintetizzare, non assorbono la luce nel campo del visibile e le loro proprietà possono essere facilmente modulate modificando opportunamente i leganti. Nel 2010 l'uso di questi complessi come mediatori redox in combinazione con il colorante organico **D35** ha portato all'ottenimento di efficienze nell'ordine del 6.7-7.2% con un voltaggio molto alto di 0.92 V, valori entrambi superiori a quelli forniti da I^-/I_3^- [22]. Più recentemente, tali complessi sono stati impiegati nella fabbricazione delle celle contenenti sia coloranti porfirinici, che hanno dato efficienze intorno al 13% [23], che coloranti organici coniugati, con i quali sono state addirittura raggiunte efficienze record superiori al 14% [6].

1.5 - Conclusioni

La necessità impellente di sviluppare nuove tecnologie per l'approvvigionamento energetico da fonti rinnovabili rende di importanza cruciale la ricerca nel settore dell'energia solare, ed in particolare della sua conversione in elettricità per mezzo di dispositivi fotovoltaici. In tale contesto, l'utilizzo della tecnologia DSSC è attualmente considerato una delle opportunità più promettenti a nostra disposizione. Tuttavia, lo sviluppo commerciale delle DSSC sarà indissolubilmente legato sia alla possibilità di ridurre ulteriormente i costi, sia all'introduzione di caratteristiche attraenti come ad esempio basso peso, flessibilità e semi-trasparenza. Queste proprietà aggiuntive potranno permettere l'utilizzo del fotovoltaico per nuove applicazioni, per le quali i dispositivi tradizionali, rigidi e pesanti, non sarebbero adatti: tra i possibili settori di applicazione vengono indicati quello dei dispositivi elettronici portatili, quello dei sensori ed attuatori, quello del fotovoltaico indoor e, in particolar modo, quello del BIPV. In questo senso, le DSSC, più che costituire un'alternativa *tout court* alle tecnologie fotovoltaiche tradizionali, si propongono quindi come una soluzione ideale per ampliare il mercato del fotovoltaico verso nuovi, ed economicamente inesplorati, ambiti applicativi.

È chiaro come, per soddisfare pienamente tali aspettative, sia ancora necessario un ulteriore miglioramento dei vari materiali che costituiscono le celle, così come una più approfondita comprensione dei meccanismi elementari che ne determinano il funzionamento. In particolare, lo sviluppo di procedure produttive in grado di fornire moduli dotati di prestazioni elevate e riproducibili, e soprattutto stabili per un lungo periodo di tempo, dovrà costituire un passaggio fondamentale per consentire l'applicazione pratica su grande scala della tecnologia DSSC. Il compito della comunità scientifica sarà quindi quello di fornire, attraverso la continuazione del lavoro di ricerca brevemente descritto nelle pagine precedenti, gli strumenti necessari a rendere possibile tale passaggio.

Bibliografia

1. *BP Statistical Review of World Energy*, Giugno 2015:
<http://www.bp.com/en/global/corporate/about-bp/energyeconomics/statistical-review-of-world-energy.html>
2. N. Armaroli, V. Balzani, *Chem. Eur. J.*, 22, pp. 32-57 (2016).
3. S. W. Glunz, R. Preu, D. Biro, *Crystalline Silicon Solar Cells: State-of-the-art and Future Developments*, in *Comprehensive Renewable Energy*, Elsevier, Amsterdam, 2012, pp. 353-387.
4. B. O'Regan, M. Grätzel, *Nature*, 353, 737-740 (1991).
5. A. Hagfeldt, G. Boschloo, L. Sun, L. Kloo, H. Pettersson, *Chem. Rev.*, 110, pp. 6595-6663 (2010).
6. K. Kakiage, Y. Aoyama, T. Yano, K. Oya, J.-i. Fujisawa, M. Hanaya, *Chem. Commun.*, 51, pp. 15894-15897 (2015).
7. M. Grätzel, *Acc. Chem. Res.*, 42, 1788-1798 (2009).
8. N. Sridhar, D. Freeman, *Electron. Prod.*, 3, pp.74-78 (2011).
9. G. Calogero, A. Bartolotta, G. Di Marco, A. Di Carlo, F. Bonaccorso, *Chem. Soc. Rev.*, 44, pp. 3244-3294 (2015).
10. Y. Ooyama, Y. Harima, *ChemPhysChem*, 13, pp. 4032-4080 (2012).
11. D. P. Hagberg, T. Edvinsson, T. Marinado, G. Boschloo, A. Hagfeldt, L. Sun, *Chem. Commun.*, 42, pp. 2245-2247 (2006).
12. L. Zhang, J. M. Cole, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 7, pp. 3427-3455 (2015).
13. A. Dessi, G. Barozzino Consiglio, M. Calamante, G. Reginato, A. Mordini, M. Peruzzini, M. Taddei, A. Sinicropi, M.L. Parisi, F. Fabrizi de Biani, R. Basosi, R. Mori, M. Spatola, M. Bruzzi, L. Zani, *Eur. J. Org. Chem.*, pp. 1916-1928 (2013)
14. A. Dessi, M. Calamante, A. Mordini, M. Peruzzini, A. Sinicropi, R. Basosi, F. Fabrizi de Biani, M. Taddei, D. Colonna, A. Di Carlo, G. Reginato, L. Zani, *Chem. Commun.*, 50, pp. 13952-13955 (2014).
15. A. Dessi, M. Calamante, A. Mordini, M. Peruzzini, A. Sinicropi, R. Basosi, F. Fabrizi de Biani, M. Taddei, D. Colonna, A. di Carlo, G. Reginato, L. Zani, *RSC Adv.*, 5, pp. 32657-32668 (2015).
16. M. S. Su'ait, M. Y. A. Rahman, A. Ahmad, *Sol. Energy*, 115, pp. 452-470 (2015).
17. G. Boschloo, A. Hagfeldt, *Acc. Chem. Res.*, 42, pp. 1819-1826 (2009).
18. J. Cong, X. Yang, L. Kloo, L. Sun, *Energy Environ. Sci.*, 5, pp. 9180-9194 (2012)
19. T. Daeneke, T.-H. Kwon, A. B. Holmes, N. W. Duffy, U. Bach, L. Spiccia, *Nat. Chem.*, 3, pp.213-215 (2011).
20. M. Freitag, Q. Daniel, M. Pazoki, K. Sveinbjörnsson, J. Zhang, L. Sun, A. Hagfeldt, G. Boschloo, *Energy Environ. Sci.*, 8, pp. 2634-2637 (2015).
21. I. R. Perera, A. Gupta, W. Xiang, T. Daeneke, U. Bach, R. A. Evans, C. A. Ohlina, L. Spiccia, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 16, pp. 12021-12028 (2014).
22. S. M. Feldt, E. A. Gibson, E. Gabrielsson, L. Sun, G. Boschloo, A. Hagfeldt, *J. Am. Chem. Soc.*, 132, 16714-16724 (2010).
23. S. Mathew, A. Yella, P. Gao, R. Humphry-Baker, B. F. E. Curchod, N. Ashari-Astani, I. Tavernelli, U. Rothlisberger, Md. K. Nazeeruddin, M. Grätzel, *Nat. Chem.*, 6, pp. 242-247 (2014).

LA MISURA DEL COLORE A SUPPORTO DEL RESTAURO DI MANUFATTI ARTISTICI

Veronica Marchiafava, Costanza Cucci, Marcello Picollo
Istituto di Fisica Applicata "Nello Carrara"
Consiglio Nazionale delle Ricerche, Sesto Fiorentino, Italia

1.1 - Introduzione

La colorimetria è la disciplina scientifica che si occupa della "misura del colore". Nel caso di oggetti non autoluminosi, quando una sorgente di radiazione luminosa illumina un oggetto il segnale che nasce dall'interazione luce-materia raggiunge l'occhio dell'osservatore. I fotorecettori posti sulla retina dell'occhio vengono stimolati dalla radiazione incidente e successivamente trasmettono il segnale ricevuto al cervello, dove avviene l'elaborazione dei dati acquisiti. La visione cromatica nasce quindi come interpretazione da parte del cervello della composizione spettrale della radiazione assorbita dai tre tipi di fotorecettori responsabili della visione a colori (detti coni) concentrati sulla retina dell'occhio umano, in funzione della composizione spettrale della radiazione emessa dalla sorgente luminosa dopo aver interagito con l'oggetto osservato.¹

A partire dai primi anni del '900 due organismi internazionali, la Commission Internationale de l'Eclairage (CIE) e l'Optical Society of America (OSA), hanno realizzato una serie di studi mirati alla definizione degli standard necessari per la misura del colore (sorgenti luminose, illuminanti, ecc.)² e alla creazione di opportuni spazi colorimetrici. In particolare la CIE ha associato alla specificazione psicofisica del colore due osservatori:

1. l'Osservatore Standard CIE 1931 per la visione foveale (visione a piccolo angolo, 2°)
2. l'Osservatore Standard supplementare CIE 1964 per la visione extra-foveale (visione a grande angolo, 10°).

La definizione dell'Osservatore Standard garantisce di convertire in modo univoco una distribuzione qualsiasi di luminanza spettrale in tre valori numerici, denominati valori di tristimolo (X,Y,Z), che identificano il colore in termini di combinazione lineare di luci primarie. Applicando un procedimento numerico che consenta di combinare la distribuzione spettrale dell'illuminante con lo spettro di riflettanza della superficie in esame e con le *colour matching functions*³ medie dell'Osservatore Standard, è possibile definire i tre valori di tristimolo. Partendo dai valori di tristimolo si possono calcolare le coordinate di cromaticità che identificano un colore all'interno di uno spazio colorimetrico. Lo spazio di colore più utilizzato nel campo industriale e nel settore dei Beni Culturali è lo spazio

¹ I fotorecettori si suddividono in base alla loro forma in *bastoncelli* e *coni*. I bastoncelli sono responsabili della visione in bianco e nero, detta *scotopica*, e consentono di distinguere le forme e le diverse gradazioni di grigio. I coni sono invece responsabili della visione a colori, detta *fotopica*, e si distinguono in tre tipologie in base ai diversi pigmenti in essi contenuti. I "coni S" (*short*) hanno un massimo di assorbimento a circa 445 nm e presentano un'elevata sensibilità nella zona blu - violetto dello spettro. I "coni M" (*medium*) presentano un picco di assorbimento a circa 540 nm con una maggiore sensibilità nella regione del verde dello spettro. La curva di sensibilità dei "coni L" è invece spostata nella zona dello spettro visibile con le lunghezze d'onda più lunghe, nella regione del giallo-rosso, con un picco massimo di assorbimento a circa 565 nm

² Nel 1931 la CIE ha scelto le prime tre sorgenti luminose standard da impiegare nella colorimetria:

- Sorgente A = lampada ad incandescenza (temperatura di colore: 2856 K)
- Sorgente B = simula il cielo a mezzogiorno (temperatura di colore: 4900 K)
- Sorgente C = rappresenta la media della luce ambientale (temperatura di colore: 6800 K), realizzata filtrando la sorgente A.

Dalle misure radiometriche della distribuzione spettrale di queste tre sorgenti sono stati definiti rispettivamente gli illuminanti standard A, B e C, a cui si sono aggiunte nel tempo altre tipologie di illuminanti come quelli della serie D ("daylight") che simulano la luce naturale, e quelli della serie F che simulano il comportamento delle lampade fluorescenti.

³ Curve di sensibilità spettrale corrispondenti alla sensibilità dell'occhio umano.

CIEL^{*}a^{*}b^{*} 1976, descritto da una sfera dove le tre coordinate colorimetriche L^* , a^* e b^* rappresentano rispettivamente la chiarezza, l'opponenza verde-rosso e l'opponenza blu-giallo. La coordinata L^* può assumere solo valori compresi tra 0 e 100, mentre a^* e b^* possono assumere sia valori negativi (<0) sia positivi (>0).⁴ In particolare, i valori negativi di a^* corrispondono a tinte verdi, quelli positivi a tinte rosse, mentre i valori negativi di b^* corrispondono a tinte blu e quelli positivi a tinte gialle. Nello spazio CIEL^{*}a^{*}b^{*} 1976 la distanza tra due colori (L^*1, a^*1, b^*1) e (L^*2, a^*2, b^*2) è definita come distanza euclidea allo scopo di rappresentare la differenza di colore ΔE^* .

Negli anni lo spazio CIEL^{*}a^{*}b^{*} 1976 è stato rivisto in maniera critica in particolare nel cercare di ottimizzare la definizione delle formule per il calcolo della differenza di colore (formula ΔE^*) sviluppandone di nuove, come la CIE94 o la più recente CIEDE2000, per meglio rappresentare le reali differenze cromatiche percepite dall'occhio umano.

Un sistema di misura colorimetrico comprende tre elementi fondamentali:

1. la sorgente di illuminazione
2. l'oggetto da misurare
3. un rivelatore di radiazione

La misura del colore di uno stesso oggetto può fornire coordinate colorimetriche diverse in funzione degli spettri di emissione delle sorgenti impiegate, del tipo di osservatore utilizzato e della disposizione spaziale degli elementi che costituiscono il sistema di misura. La definizione del colore può essere eseguita o con metodi di confronto visivo (mediante l'ausilio di campioni standard o di atlanti di colore)⁵ o con misure strumentali. Nel secondo caso si possono avere due approcci strumentali diversi:

- il metodo spettrofotometrico che si basa sulla misura dello spettro di riflettanza (generalmente nell'intervallo spettrale 380-780nm) della radiazione riflessa dall'oggetto in esame;
- il metodo tricromatico che, mediante l'uso dei filtri RGB (rosso, verde e blu, rispettivamente dall'inglese red, green, blue), consente una misura diretta delle coordinate di cromaticità senza misurare lo spettro della radiazione riflessa dall'oggetto.

Il vantaggio maggiore nell'impiego del metodo spettrofotometrico rispetto a quello tricromatico risiede nella possibilità di caratterizzare spettralmente il materiale oggetto di studio così da poter approfondire e chiarire certe problematiche qualora i parametri

⁴ Se si considera l'Osservatore Standard CIE1931, le tre coordinate colorimetriche sono definite dalle seguenti equazioni (Palazzi, 1995):

$$L^* = 116 \sqrt[3]{\frac{Y}{Y_n}} - 16$$

$$a^* = 500 \left(\sqrt[3]{\frac{X}{X_n}} - \sqrt[3]{\frac{Y}{Y_n}} \right)$$

$$b^* = 200 \left(\sqrt[3]{\frac{Y}{Y_n}} - \sqrt[3]{\frac{Z}{Z_n}} \right)$$

dove X, Y e Z corrispondono ai valori di tristimolo misurati sperimentalmente e riferiti ad un certo illuminante e ad un certo osservatore; mentre X_n, Y_n e Z_n corrispondono ai valori di tristimolo di un bianco ideale di riferimento nelle stesse condizioni di illuminante ed osservatore. Talvolta al posto delle coordinate $L^*a^*b^*$ si impiegano le coordinate cilindriche $L^*h^*C^*$ in cui:

$$C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}}$$

$$h^* = \arctan \left(\frac{b^*}{a^*} \right)$$

⁵ Tra gli atlanti di colore più usati ricordiamo il sistema Munsell, il sistema svedese dei colori naturali (NCS), il sistema a scale di colori uniformi della Società Americana di Ottica (OSA-ucs) e il sistema dei colori del Deutsche Institut für Normung (DIN 6264)

colorimetrici diano informazioni dubbie o di scarsa rilevanza, tipo fenomeni di metamerismo.⁶

1.2 - Colorimetria e Beni Culturali

La colorimetria è una tecnica d'indagine non invasiva che consente di ottenere misure di colore puntuali o su ampie aree di manufatti di svariato tipo. Soltanto negli ultimi anni, grazie anche allo sviluppo di strumentazioni sempre più compatte, versatili ed economiche, questa metodologia si è diffusa anche nel settore dei beni culturali (Figura 1). In questo campo, dove la minima invasività e la possibilità di realizzare misure *in situ* sono requisiti spesso fondamentali, la misura del colore può assumere una valenza primaria. Questa consente, infatti, di caratterizzare in maniera oggettiva il colore di un'opera e, all'occorrenza, di valutare eventuali variazioni cromatiche indotte da invecchiamento o in seguito a interventi di restauro (pulitura, applicazione di protettivi e/o consolidanti, ecc.). Di seguito si riportano un paio di casi dell'impiego di tecniche colorimetriche per lo studio di manufatti artistici aventi diversa costituzione materica.

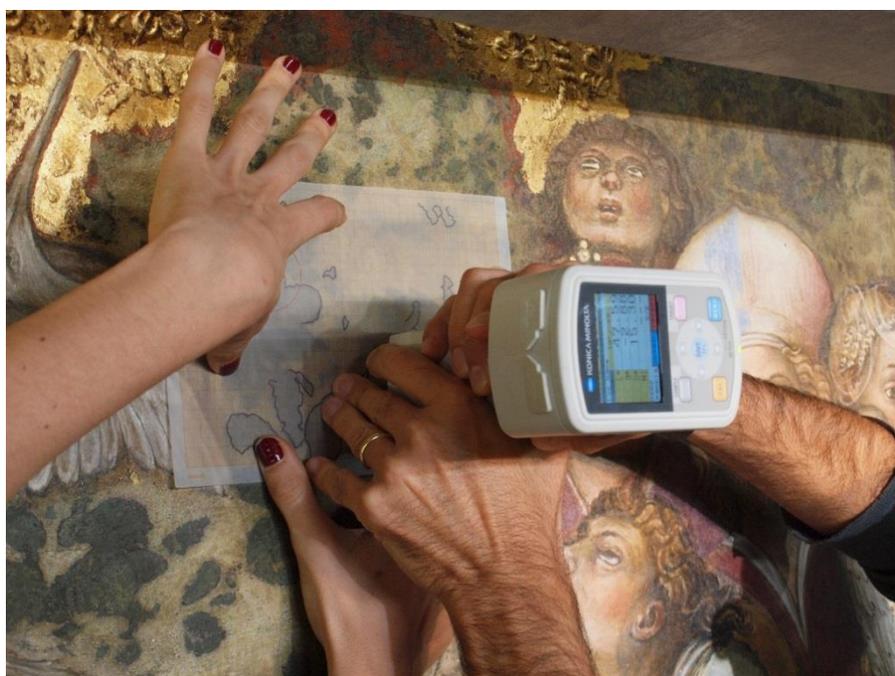


Figura 1 - Misure colorimetriche su dipinto murale, ciclo di affreschi degli Zavattari nella Cappella della Regina Teodolinda nel Duomo di Monza, durante l'intervento di restauro.

1.2.1 - Valutazione dell'efficacia di interventi di pulitura e consolidamento su dipinti murali contemporanei

I dipinti murali d'arte contemporanea conservati all'aperto, spesso realizzati con materiali non convenzionali, tendono a perdere facilmente nel tempo le loro caratteristiche estetiche, in particolare quelle cromatiche. Anche in questo caso le analisi colorimetriche si rivelano uno strumento diagnostico molto utile nelle indagini preliminari agli interventi conservativi e di restauro. Nell'ambito del progetto CoPAC (Conservazione Preventiva dell'Arte Contemporanea),⁷ indagini colorimetriche sono state eseguite sull'opera

⁶ Il metamerismo è un fenomeno ottico che si verifica quando colori che appaiono identici sotto una determinata luce, mostrano tonalità differenti se illuminati con una luce diversa.

⁷ Il Progetto CoPAC (Conservazione Preventiva dell'Arte Contemporanea) è stato finanziato dalla Regione Toscana (CoPAC, 2011-2013) nell'ambito dei Progetti Regionali PAR-FAS (2007-13) e ha visto coinvolti il

Tuttomondo di Keith Haring (1958-1990) al fine di valutare eventuali variazioni cromatiche indotte dalle operazioni di pulitura e consolidamento oltre a monitorare l'efficacia e la stabilità dell'intervento di restauro nel tempo.

L'opera *Tuttomondo*, realizzata nel 1989 su una parete esterna del convento annesso alla chiesa di Sant'Antonio Abate a Pisa (Figura 2), esprime il tema "dell'armonia e della pace nel mondo" rappresentato da 30 figure realizzate con nove colori diversi (burgundy, red, pink, yellow, orange, green, blue, violet, black), più il bianco del supporto (background). Dopo 20 anni dalla sua realizzazione il murale presentava un ingiallimento evidente su tutto il bianco di fondo, uno scolorimento delle linee nere che delinero le figure e un'accentuata desaturazione delle campiture colorate.



Figura 2 – Particolare dell'opera *Tuttomondo* di Keith Haring (Pisa)

L'efficacia della procedura conservativa applicata è stata valutata anche mediante misure colorimetriche sulle diverse campiture cromatiche presenti.⁸ Le misure di colore, eseguite prima e dopo i trattamenti di pulitura e consolidamento, sono state ripetute dopo l'applicazione del protettivo e un anno dopo l'intervento conservativo (Figura 3).

La campagna diagnostica ha confermato l'efficacia del trattamento di pulitura. Le campiture cromatiche sono risultate infatti più sature e luminose, eccetto le aree pink e violet per le quali è stato registrato un aumento delle coordinate a^* e b^* e quindi della saturazione, ma non della chiarezza L^* che è rimasta invariata. L'area burgundy è risultata

Consorzio Interuniversitario Nazionale per la Scienza e Tecnologia dei Materiali (INSTM), l'Istituto di Fisica Applicata "Nello Carrara" del Consiglio Nazionale delle Ricerche (IFAC-CNR) e la Scuola Normale Superiore (SNS) di Pisa.

⁸ Le aree colorate del murale, a esclusione dei contorni neri delle figure, sono state pulite con una miscela acquosa di agar gel (5 %), EDTA disodico (1%) e carbonato d'ammonio (0.2 %), riscaldata a 60°C. Le linee nere, invece, sono state sottoposte a un trattamento di consolidamento con una emulsione di Microacril® IMAR diluito al 5% in acqua. Infine il protettivo alchilalcolossilanico Hydrophase® è stato applicato su tutta la superficie.

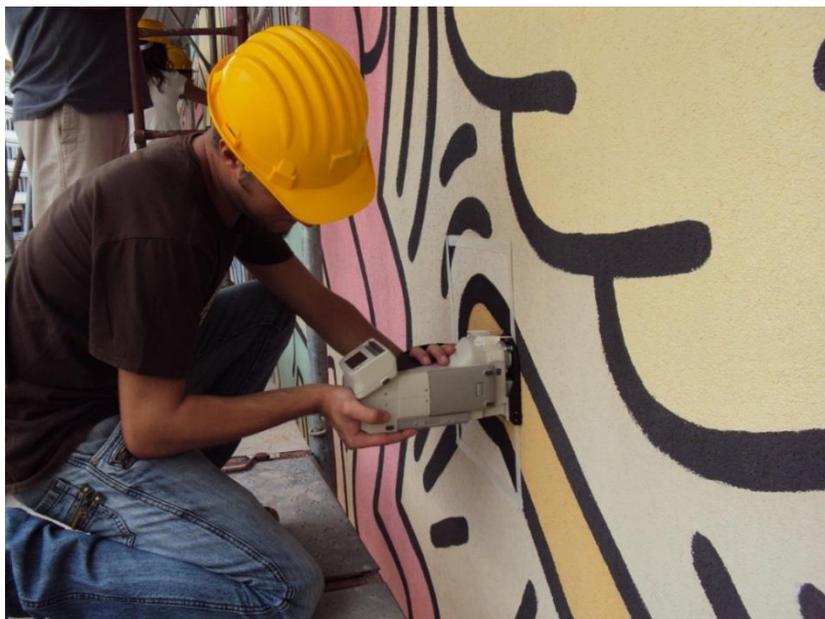


Figura 3 – Acquisizione di dati colorimetrici sul dipinto murale *Tuttomondo*

però più scura dopo la pulitura ($\Delta L^* \approx -2$) a causa dell'aumento della saturazione della tinta a seguito dell'intervento di pulitura (Figura 4).

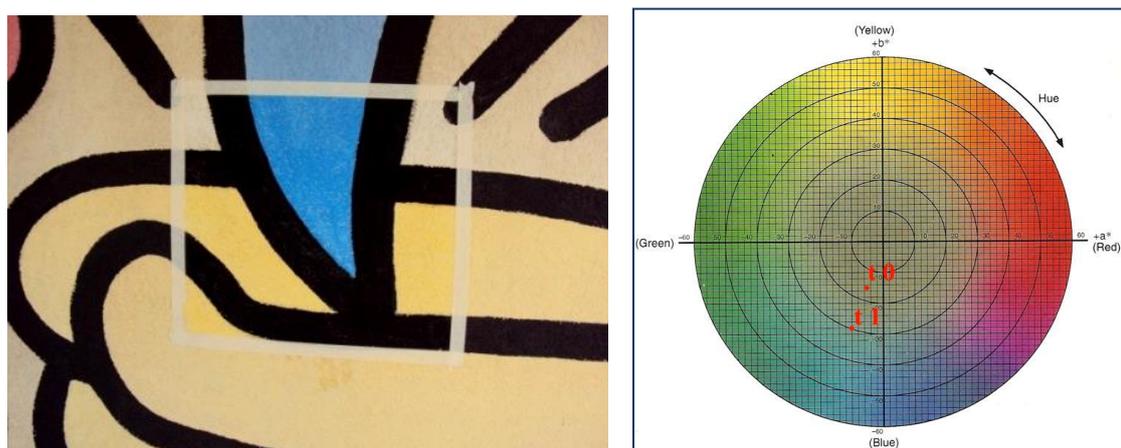


Figura 4 – Prova di pulitura su un'area blu del murale *Tuttomondo* (a sinistra) e riproduzione della relativa variazione colorimetrica sullo spazio CIE L*a*b*1976 (a destra; t_0 = prima della pulitura, t_1 = dopo la pulitura)

L'applicazione del protettivo ha indotto variazioni di colore minime con ΔE intorno a 1 (aree violet, blue, yellow, pink e black) o a 2 (aree background, green e burgundy). Le analisi colorimetriche ripetute un anno dopo l'intervento conservativo non hanno mostrato variazioni significative a conferma della stabilità delle proprietà chimiche – fisiche del prodotto prescelto. La raccolta dei dati colorimetrici, al termine dell'intervento, ha inoltre permesso di creare una mappatura cromatica fornendo valori di riferimento che potranno essere impiegati durante i futuri interventi di manutenzione dell'opera.

1.2.2 – Valutazione dell'efficacia di interventi di pulitura su materiale lapideo

Il processo di pulitura, tra gli interventi di restauro, riveste, come noto, un ruolo primario nel recupero estetico dei manufatti artistici, compresi quelli lapidei. In seguito

all'instaurarsi di processi di degrado, fenomeni di dilavamento, formazione di patine di sporco o a errati interventi di restauro le caratteristiche cromatiche originali della pietra possono trasformarsi nel tempo determinando, nel peggiore dei casi, la perdita della leggibilità dell'opera. Si comprende, quindi, la necessità e l'importanza che riveste un corretto recupero cromatico di un'opera nel corso del suo restauro. Se da un lato la pulitura si presenta come un'operazione indispensabile, risulta però estremamente delicata. Un errato intervento può infatti danneggiare in maniera irreversibile l'opera favorendo la perdita del modellato originario, eliminando le testimonianze di interventi di manutenzione effettuati in passato o rendendo il materiale maggiormente predisposto all'instaurarsi di fenomeni di degrado successivi.

I metodi d'intervento sono scelti in base alla natura e allo stato di conservazione dell'opera, alla tipologia di sostanze da asportare e alla distribuzione del deposito sulla superficie. In base alla loro natura possono essere suddivisi in metodi chimici, meccanici e fisici e possono essere applicati da soli, in successione o distribuiti selettivamente in aree predeterminate. I metodi chimici prevedono l'impiego di prodotti pulenti di varia natura (acqua, acqua deionizzata, solventi organici, ecc.) applicati mediante sistemi a nebulizzazione o a impacco. I metodi di pulitura meccanica si basano sull'asportazione dello sporco mediante appositi strumenti, come il bisturi, il vibroincisore o la microsabbiatrice, tutti da impiegare solo su superfici compatte. Tra i metodi fisici quello più impiegato è il metodo di pulitura mediante strumentazione laser, basato sulla reazione fotomeccanica indotta dall'interazione tra il fascio di luce generato da un impulso laser ad alta intensità e lo strato di sporco.

Nell'ambito del programma di monitoraggio del gruppo scultoreo *Ratto della Sabina* (1583) del Giambologna, il Gruppo di Spettroscopia Applicata dell'IFAC-CNR ha effettuato una campagna di misure colorimetriche finalizzata a definire il metodo di pulitura più appropriato del marmo (Figura 5).



Figura 5 – *Ratto della Sabina*, Giambologna, presso la Loggia dei Lanzi (Firenze)

La statua, che venne ricavata da un unico blocco di marmo, è sempre stata esposta, fin dalla sua realizzazione, sotto la Loggia dei Lanzi in Piazza della Signoria a Firenze. Così, per secoli, l'opera è stata soggetta all'aggressione degli agenti atmosferici (vento, pioggia, ecc.) e dell'inquinamento (Figura 6). La campagna diagnostica ha riguardato l'indagine di undici aree, selezionate per la diversa esposizione ambientale, che sono state sottoposte a differenti trattamenti di pulitura (con acqua deionizzata, con impacchi di ossalato d'ammonio al 5% o con trattamento laser).



Figura 6– Particolare del *Ratto della Sabina* dove si evidenziano gli effetti del degrado dovuto all'esposizione ambientale (formazione di croste nere, dilavamento, inscurimento della superficie)

Le misure dei parametri colorimetrici sono state eseguite sulle medesime zone al fine di evidenziare eventuali alterazioni cromatiche durante tutta la campagna diagnostica. Per garantire la ripetibilità delle misure nel tempo, sono state impiegate maschere di riferimento collocate tra la superficie della statua e il colorimetro per effettuare misurazioni senza contatto diretto con l'opera e per fornire dei punti di riferimento per ripetere le misurazioni nelle stesse aree a distanza di mesi (Figura 7).

Nonostante questo accorgimento, la forma arrotondata di alcune superfici ha reso talvolta difficile riposizionare correttamente lo strumento. Anche le condizioni climatiche hanno influenzato le misure. In caso di pioggia abbondante nei giorni precedenti all'indagine diagnostica, l'intensa umidità ha fortemente influenzato lo stato della superficie di marmo, invalidando alcune misure colorimetriche (in particolare per quanto riguarda le variazioni nel parametro L^* che, come dimostrato da prove riprodotte in laboratorio su campioni di marmo bagnato, presenta sulle superfici bagnate valori inferiori a quelli registrati su superfici asciutte). Ciononostante i dati rimanenti sono stati impiegati per valutare l'efficacia dei diversi test di pulitura a supporto della scelta dei migliori trattamenti conservativi. In particolare, la pulizia tramite laser è risultata essere la più efficace (con un evidente aumento della chiarezza della pietra), sebbene in alcune zone abbia indotto anche un lieve ingiallimento della superficie (aumento del parametro b^*). Inoltre, le misure di colore eseguite pochi mesi dopo i vari trattamenti hanno mostrato una tendenza all'inscurimento del marmo (diminuzione del parametro L^*). Questo comportamento è plausibilmente riconducibile alla sedimentazione di polvere e particolato atmosferico sulla superficie, in particolare sulle zone non sottoposte a dilavamento.



Figura 7 – Particolare del *Ratto della Sabina*. Maschera di riposizionamento impiegata per garantire la ripetibilità delle misure su una delle aree oggetto d'indagine

Bibliografia

1. Chorro E., Perales E., de Fez D., Luque M.J., Martínez-Verdú, *Optics Express*, 15-12, pp. 7810-7817 (2007)
2. Burns P.D., Berns R.S., *Color Research and Application*, 22-4, pp. 280-289 (1997)
3. Melgosa M., Huertas R., Berns R.S., *Journal of the Optical Society of America A*, 21-12, pp. 2269-2275 (2004)
4. AA.VV., *Misurare il colore. Fisiologia della visione a colori - Fotometria - Colorimetria e norme internazionali*, Ed. C. Oleari, Hoepli (2008).
5. Palazzi S., *Colorimetria. La scienza del colore nell'arte e nella tecnica*, Nardini Editore, (1995)
6. Brommelle N., *Studies in Conservation*, 2(32), pp 76-85, 1955
7. AA.VV., *Colour Coded*, Ed. C. Parraman, The Society of Dyers and Colourist. (2010)
8. Bacci M., Boselli L., Picollo M., Pretzel B., *New trends in Analytical, Environmental and Cultural Heritage Chemistry Developments*, L. Tassi e M. P. Colombini editori, pp.333-344, 2008
9. Bardelli A., *Keith Haring a Pisa: cronaca di un murales*, edizioni ETS, 2003
10. Colombini M.P., Modugno F., Di Girolamo F., La Nasa J., Duce C., Ghezzi L., Barone V., Palleschi V., Bramanti E., Legnaioli S., Lorenzetti G., Pardini L., Grifoni E., Marras L., Picollo M., Bartolozzi G., Cucci C., De Vita M., Marchiafava V., Rava A., Shank W., *Conservation Issues in Modern and Contemporary Murals*, " Mercedes Sanchez Pons, Will Shank e Laura Fuster López editori, Cambridge Scholars Publishing, 274-284, 2014
11. Marchiafava V., Bartolozzi G., Cucci C., De Vita M., Picollo M. *JAIC Journal of the International Colour Association*, 13, pp. 36-42, 2014
12. Biscontin G., Bakolas A., Longega G., Moropoulou A., Zendri E. *Proceedings of the third International Symposium "The conservation of monuments in the Mediterranean Basin"*, editori scientifici V. Fassina, H. Ott, F. Zezza, 1994, pp. 929-935
13. Doherty B., Pamplona M., Selvaggi R., Miliani C., Matteini M., Sgamellotti A., Brunetti B., *Applied Surface Science*, 253, pp. 4477-4484, 2007
14. Marchiafava V., Cucci C., Picollo M., *Colour and colorimetry. Multidisciplinary contribution*, Maurizio Rossi e Daria Casciani editori, M. Rossi and D. Casciani, Gruppo del Colore- Associazione Italiana Colore, XI/B, pp. 183-193, 2015

LA LUCE AL SERVIZIO DELLA MEDICINA:
I BIOSENSORI OTTICI A FIANCO DEL LETTO DEL PAZIENTE

B. Adinolfi, S. Berneschi, C. Berrettoni, F. Chiavaioli, A. Giannetti, S. Tombelli,
C. Trono, F. Baldini

*Istituto di Fisica Applicata "Nello Carrara", Consiglio Nazionale delle Ricerche, IFAC-CNR,
Via Madonna del Piano 10, 50019 Sesto Fiorentino, Firenze, Italy*

1.1 - Introduzione

Gli ultimi venti anni hanno visto la crescente richiesta da parte dei medici di dispositivi in grado di effettuare vicino al letto del paziente misure veloci ed affidabili di parametri chimici e biochimici tali da permettere la formulazione di una diagnosi rapida e affidabile e/o la scelta della terapia più idonea, evitando di ricorrere alle analisi di laboratori centralizzati e di attendere alcune ore e talvolta un'intera giornata per ottenere i risultati. Si tratta dei dispositivi "Point of Care Testing" (POCT) (letteralmente test vicino al punto di cura) che stanno diventando essenziali per l'analisi di numerose patologie, laddove un intervento rapido del medico risulta cruciale per la vita del paziente [1]. Alcuni dispositivi sono già disponibili sul mercato, come quelli per la misurazione di marcatori cardiaci (p.e. troponina, mioglobina, D-dimero, BNP, CK-MB) in quindici-venti minuti [2]. È evidente che nel caso di un possibile infarto, un risparmio di tempo, anche di pochi minuti, nell'effettuare la diagnosi corretta può essere essenziale per la sopravvivenza del paziente. Questi dispositivi POCT stanno trovando una sempre più diffusa applicazione in ospedale e nelle ambulanze ma si sta consolidando la convinzione che sia importante anche un loro utilizzo sia da parte del medico di famiglia, ad esempio per determinare in maniera rapida la necessità o meno di ospedalizzazione del paziente, sia da parte direttamente dei pazienti nel caso questi ultimi siano affetti da malattie croniche (p.e. pazienti diabetici o pazienti che devono ricorrere regolarmente a dialisi) con il fine di tenere maggiormente sotto controllo determinati parametri senza dover ricorrere ad analisi ospedaliere.

I biosensori ottici possono sicuramente avere un ruolo estremamente importante in questo settore. Con il termine di biosensore ottico si intende un dispositivo abile a misurare tramite metodologie ottiche la concentrazione di un analita in quanto quest'ultimo è in grado di modulare otticamente il segnale rivelato [3]. Per quanto riguarda il principio di funzionamento di un biosensore ottico, possiamo distinguere due casi principali:

- la misura diretta dell'analita mediante la misura della variazione di proprietà spettroscopiche (assorbimento, luminescenza, Raman, etc.) sue o di un suo marcatore;
- la misura indiretta dell'analita tramite la misura delle variazioni di indice di rifrazione nella regione di rivelazione indotte da una variazione di concentrazione dell'analita stesso.

Dal punto di vista dell'interazione del biosensore con il paziente si possono distinguere tre classi di sensori:

- sensori invasivi, che tramite l'utilizzo di fibre ottiche sono in grado di entrare all'interno del corpo umano;
- sensori minimamente invasivi, dove l'interazione con il corpo umano è minimizzata;
- sensori non invasivi, che utilizzano campioni biologici prelevati dal paziente.

L'atteggiamento generale dei medici è quello di adottare soluzioni che possano essere facilmente tollerate dal paziente e che introducano un rischio minimo per la sua sicurezza. Da questo punto di vista, i sensori non invasivi sono sicuramente preferibili. D'altra parte, per alcune applicazioni, la necessità per un monitoraggio continuo di composti biologici comporta obbligatoriamente l'utilizzo di sensori invasivi ed, in tal caso, devono essere soddisfatte normative molto severe al fine di garantire completamente la sicurezza dei pazienti. Nel caso di applicazioni invasive, le fibre ottiche garantiscono prestazioni uniche, grazie alla loro versatilità geometrica, maneggevolezza e alto grado di

miniaturizzazione. Cateteri ottici con un diametro dell'ordine di decine di micron e sonde ottiche miniaturizzate fino a pochi micron consentono ai medici di raggiungere posizioni all'interno del corpo umano impensabili da raggiungere con sensori basati su altre tecnologie.

Talvolta la determinazione di un solo parametro è sufficiente, ma è importante sottolineare come molto spesso si rendono necessari la determinazione e il monitoraggio non di un solo parametro ma di un set di parametri. In questo ambito, i biochip ottici possono svolgere un ruolo fondamentale nello sviluppo di strumentazione POCT. Un biochip ottico può essere considerato come costituito da una matrice di biosensori interrogati singolarmente. A causa della sua miniaturizzazione, del suo basso costo e della sua potenziale automazione su larga scala, un suo utilizzo può condurre ad un'analisi più efficiente rispetto alle attrezzature attualmente disponibili in laboratorio. Diversamente dalla genomica e proteomica, dove migliaia di punti di rilevamento sono controllati simultaneamente tramite scanner di fluorescenza [4], nelle maggior parte delle applicazioni POCT, vi è la necessità di misurare solo un numero limitato di parametri al fine di individuare la patologia corretta o per controllare gli effetti della terapia somministrata.

Il presente capitolo fornisce una carrellata sull'attività portata avanti presso l'Istituto di Fisica Applicata "Nello Carrara" nel settore dei biosensori e dei biochip ottici per la diagnostica clinica. Tale attività è iniziata storicamente agli inizi degli anni '90, quando l'Istituto si chiamava Istituto di Ricerca sulle Onde Elettromagnetiche e quando non era stata ancora coniata la terminologia di dispositivi POCT, con lo sviluppo di un sensore per la determinazione del reflusso contenente bile nell'apparato gastro-esofageo ed è proseguita con lo sviluppo di numerosi altri dispositivi per differenti patologie.

1.2 - Il monitoraggio di reflusso contenente bile

Il reflusso contenente bile può aver luogo dal duodeno allo stomaco o dallo stomaco all'esofago. Il primo è comunemente chiamato reflusso enterogastrico o reflusso biliare mentre il reflusso dallo stomaco all'esofago contenente bile è spesso denominato reflusso gastro-esofageo non-acido; tale denominazione viene utilizzata perché il reflusso gastro-esofageo si compone generalmente di solo succo gastrico, fortemente acido con $\text{pH} < 4$. La presenza di bile in questo tipo di reflusso può aumentare il valore pH anche fino a $\text{pH} 7$, a causa del valore di pH della bile, che è praticamente neutra o debolmente basica. Chiaramente, la presenza di reflusso enterogastrico rappresenta un prerequisito per tale reflusso gastroesofageo non-acido [5, 6].

Il sensore ottico in grado di misurare la presenza di bile basa il suo funzionamento sull'assorbimento della radiazione luminosa da parte della bilirubina, principale pigmento biliare. La bilirubina, che può adottare una varietà di configurazioni, a causa dei numerosi legami a ponte idrogeno che rendono la bilirubina scarsamente solubile in acqua, viene solubilizzata da interazioni con micelle di sali biliari e altri lipidi presenti nella bile. Inoltre, essa è spesso coniugata con acido glucuronico, dando luogo alla formazione di mono- e diglucuronidi [7]. A causa delle considerazioni di cui sopra, non è facile determinare completamente la composizione della bilirubina e le sue interazioni tra tutte le specie presenti nella bile ed è quindi perfettamente comprensibile la presenza di uno spettro di assorbimento sì centrato nella regione blu dello spettro visibile, ma soggetto a variazioni che ne spostano il picco nella regione compresa fra 420 e 470 nm.

L'aspetto importante da sottolineare da un punto di vista clinico è che la bile è semplicemente un marker di reflusso mentre gli agenti dannosi sono rappresentati da acidi biliari e enzimi pancreatici che sono considerati fattori che contribuiscono allo sviluppo di diverse condizioni patologiche, quali gravi gastriti ed esofagiti, ulcera gastrica, ed un aumentato rischio di tumori gastroesofagei.

La misura viene effettuata inviando tramite un fascio a fibre ottiche introdotto nello stomaco (o nell'esofago) del paziente il segnale proveniente da due diodi emettitori, con emissione centrata rispettivamente a 470 nm e a 565 nm. Una sonda posizionata all'estremità del fascio a fibre ottiche (Figura 1) permette la misura dell'assorbimento causato dal contenuto gastrico (o esofageo). Il parametro che viene misurato è la differenza tra l'assorbimento a 470 nm dove si trova l'assorbimento della bilirubina, e l'assorbimento a 565 nm, utilizzato come riferimento. La sonda quindi può essere considerata nient'altro che una cella miniaturizzata per la misura dell'assorbimento del contenuto gastro-esofageo ed in questo modo è possibile effettuare una misura della presenza della bilirubina e di conseguenza della bile nello stomaco (o nell'esofago).



Figura 1 - La sonda a fibre ottiche per la misura del reflusso contenente bile

Il sensore sviluppato non è in grado di determinare in maniera analica la concentrazione della bilirubina presente nell'apparato gastroesofageo ma è in grado di effettuarne solo una misura semiquantitativa. D'altra parte è importante sottolineare come il parametro clinicamente rilevante non sia la concentrazione della bilirubina, bensì il tempo di contatto della bile con la mucosa, definito come il tempo di permanenza del contenuto biliare nello stomaco o nell'esofago: questo parametro, infatti, consente di valutare il tempo di contatto degli acidi biliari, che costituiscono i componenti effettivamente dannosi nel contenuto biliare, con la mucosa dello stomaco o dell'esofago. Le validazioni cliniche condotte presso la Clinica Chirurgica dell'Università di Firenze dal Prof. Paolo Bechi [1] e presso altri ospedali sia europei che americani [8-10], hanno dimostrato la validità del metodo e hanno permesso di definire le soglie al di sopra del quale il reflusso biliare può considerarsi patologico.

In Figura 2 è mostrato il dispositivo Bilitec2000 realizzato in collaborazione con Cecchi srl che è stato commercializzato da Medtronic fino al 2007 ed è attualmente distribuito da EBNeuro [11]. Il dispositivo, in grado di essere collegato a due sonde a fibre



Figura 2 - Il sensore Bilitec 2000 per la misura del reflusso contenente bile

ottiche contemporaneamente, è costituito da una scheda optoelettronica contenente sia la parte hardware per l'amplificazione dei segnali ottici rilevati che la parte software per il calcolo della differenza degli assorbimenti a 470 nm e a 565 nm. Il tutto è alimentato a batterie e ha una autonomia tale da permettere una misura continua per 24 ore. Una volta terminata la misura, i dati registrati possono essere trasferiti ad un personal computer per una ulteriore elaborazione.

In Figura 3 è mostrato il tipico tracciato di una bilimetria (è questo il termine coniato clinicamente in analogia con la pH-metria di una misura di 24 ore effettuata con lo strumento Bilitec) ottenuta posizionando la sonda nello stomaco di un paziente affetto da reflusso entero gastrico.

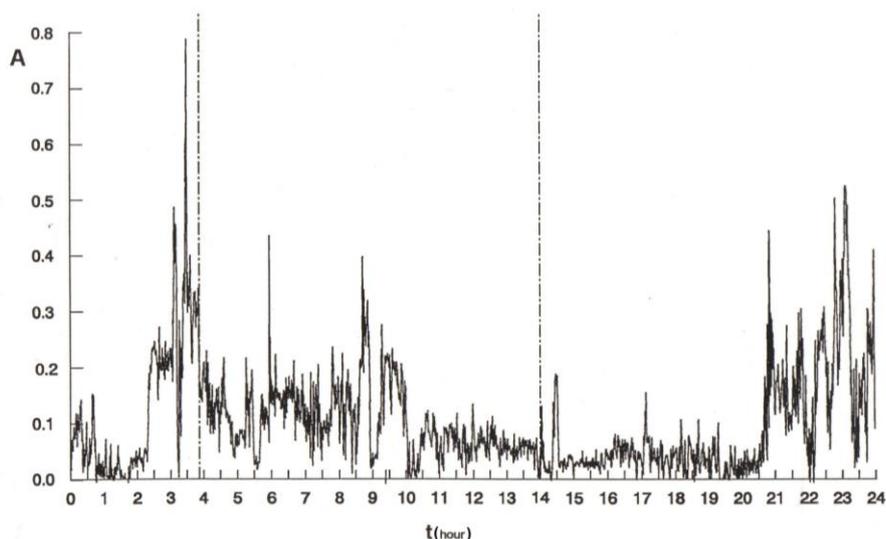


Figura 3 - Bilimetria di 24h su paziente. A è una grandezza legata alla differenza degli assorbimenti a 470 nm e a 565 nm.

1.3 - La misura di biomarcatori della sepsi

La sepsi, o setticemia, è una complicazione potenzialmente letale di un'infezione che si verifica quando le sostanze chimiche che entrano in circolo per combattere l'infezione stessa scatenano un'infiammazione diffusa in tutto l'organismo. Rappresenta la causa più alta di mortalità in pazienti in terapia intensiva ed è stata fino a 10-15 anni fa assai sottovalutata. Estremamente importante è riuscire a determinare se la sepsi è di tipo virale o batterico in quanto questo aspetto è strettamente legato al tipo di terapia da adottare. Nel caso in cui la sepsi sia di tipo batterico, è stato recentemente dimostrato come ogni ora di ritardo nella somministrazione di una efficace e corretta terapia antibiotica aumenti la mortalità nei pazienti in terapia intensive di un fattore pari al 7% [12].

Per una corretta diagnosi della eziologia della sepsi, possono essere estremamente importanti le misure simultanee nel sangue di analiti quali la proteina C reattiva (CRP), la procalcitonina (PCT), il fattore di necrosi tumorale, le interleuchine 6, 8 e 10, la neopterinina e il recettore solubile per l'urochinasi (suPAR) [13]. Si comprende quindi perfettamente come lo sviluppo di un dispositivo POCT per questa patologia sia essenziale.

Nell'ambito del progetto europeo CARE-MAN, attivo dal 2006 al 2011, è stata realizzata una piattaforma POCT funzionante in fluorescenza per la rivelazione simultanea di più biomarcatori della sepsi, nella quale il componente essenziale è costituito da un chip ottico di polimetilmetacrilato (PMMA) a tredici microcanali in cui le dimensioni del singolo microcanale sono: altezza 50 μm , larghezza 600 μm e lunghezza 10 mm (Figura 4) [14-16]. Grazie alla sua particolare sagomatura a pettine, sopra ciascun microcanale si trova una guida ottica in PMMA che corre parallelamente al canale per tutta la sua lunghezza. Ciascun microcanale viene chimicamente modificato in modo da poter effettuare al suo interno un

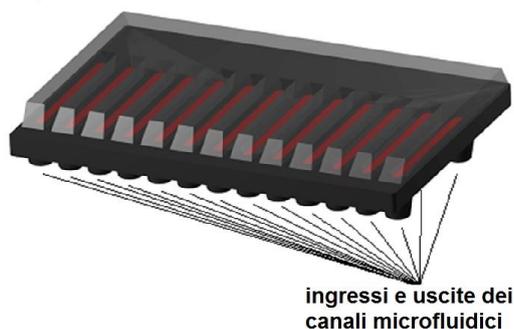


Figura 4 - Il chip ottico a tredici microcanali per la misura dei marcatori della sepsi

saggio biochimico. Sulla sua superficie interna viene immobilizzato un anticorpo selettivo ad uno dei biomarcatori sotto studio, il cosiddetto anticorpo di cattura (Figura 5a); in seguito al passaggio del campione biologico, il biomarcatore analizzato interagisce con l'anticorpo di cattura e rimane immobilizzato sulla superficie del microcanale (Figura 5b); dopo un lavaggio con una soluzione tampone, il successivo passaggio di una soluzione contenente un secondo anticorpo anch'esso selettivo al determinato biomarcatore, il cosiddetto anticorpo

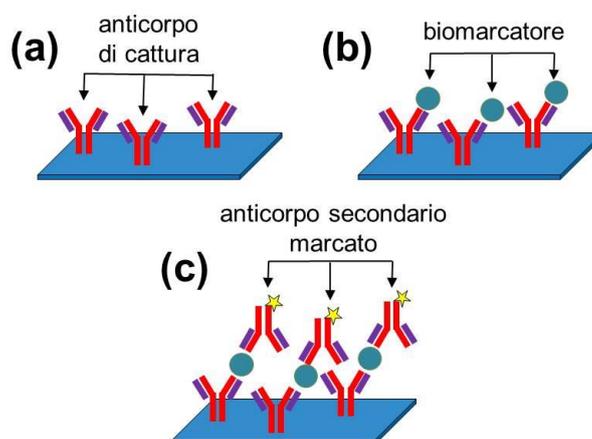


Figura 5 - Schematizzazione del saggio biologico sulla superficie dei microcanali per la rivelazione ottica dei biomarcatori della sepsi

secondario, dà luogo ad una seconda interazione con l'analita immobilizzato sulla superficie del canale in seguito alla precedente interazione con la conseguente formazione di una struttura a sandwich (Figura 5c); questo secondo anticorpo secondario è marcato con un fluoroforo (e per questo tale anticorpo viene anche indicato anche con il nome di anticorpo di rivelazione), aspetto questo che consente di procedere ad una rivelazione ottica del biomarcatore.

La struttura a 13 canali permette di studiare fino a 4 biomarcatori con la possibilità di ripetere tre volte la rivelazione dello stesso analita.

Il principio ottico su cui si basa la misura di fluorescenza è costituito dall'anisotropia di fluorescenza che si presenta ogni qualvolta un fluoroforo emette trovandosi ad una distanza da una interfaccia fra due mezzi di indice di rifrazione diversi dell'ordine od inferiore alla lunghezza d'onda di emissione [17]. In tal caso la fluorescenza è emessa in massima parte verso il mezzo più denso con direzioni preferenziali. Questa situazione è schematizzata in Figura 6, nel caso di un fluoroforo in prossimità dell'interfaccia tra acqua e PMMA. In questo caso la direzione preferenziale è caratterizzata da un angolo di circa 57° , superiore all'angolo di riflessione totale all'interfaccia plastica/aria. Nel caso di una lastrina di PMMA a contatto con acqua dalla parte del fluoroforo e a contatto con aria dall'altro lato,

come mostrato in Figura 6 in basso, gran parte della fluorescenza rimane confinata all'interno della lastrina di PMMA.

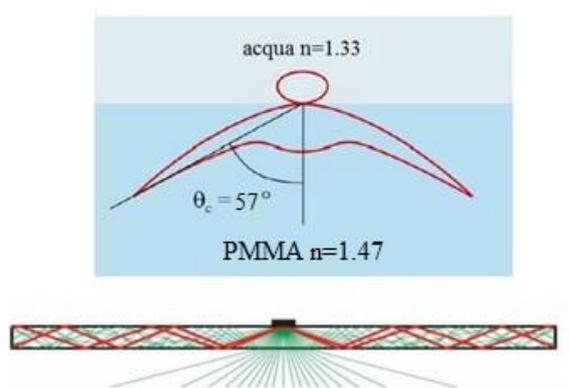


Figura 6 - Schematizzazione del principio dell'anisotropia di fluorescenza nel caso di una lastrina di PMMA a contatto su un lato con acqua e sull'altro con aria.

Come schematizzato nella Figura 7 che mostra la sezione longitudinale del chip in corrispondenza di un microcanale, la radiazione ottica di eccitazione proveniente da un laser disposto perpendicolarmente sopra il canale è in grado di eccitare lo strato biochimico sensibile in cui avviene il saggio di tipo sandwich; la fluorescenza emessa, principalmente indirizzata all'interno del chip, viene accoppiata alla guida ottica in PMMA e inviata lateralmente dove viene raccolta da una fibra ottica che la trasmette ad un rivelatore.

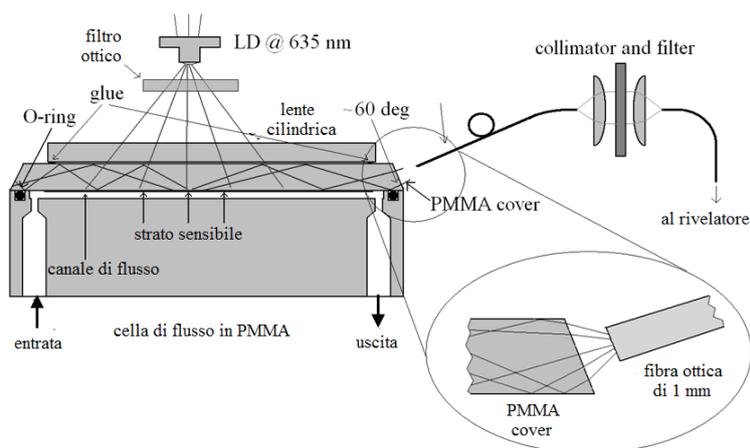


Figura 7 - Sezione longitudinale del chip in corrispondenza di un microcanale.

In Figura 8 è mostrato il dispositivo POCT realizzato, interfacciato con un computer portatile in grado di elaborare i dati e fornire la misura dell'intensità di fluorescenza in corrispondenza di ciascun canale. La scansione dei tredici diversi canali è realizzata grazie alla movimentazione solidstate del laser di eccitazione e della fibra ottica di raccolta.

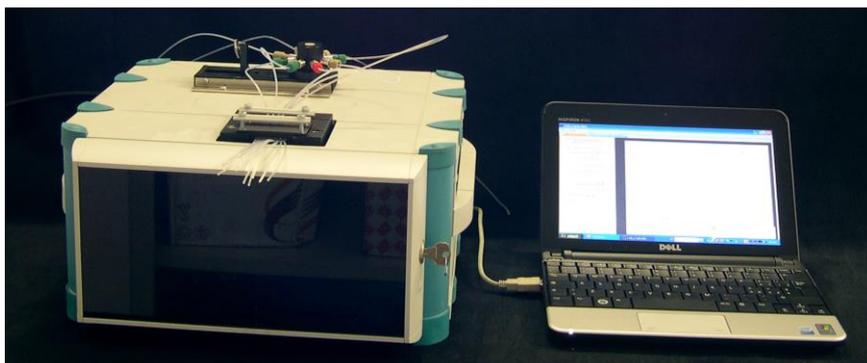


Figura 8 - Il dispositivo POCT per la misura dei biomarcatori della sepsi

Per quanto riguarda i biomarcatori della sepsi, l'attenzione si è concentrata sulla proteina C reattiva e sulla procalcitonina. In Figura 9 è mostrato il risultato del scansione sui diversi microcanali, con i canali 2-6 dedicati alla misura della CRP (cioè con uno strato biochimico con immobilizzato l'anticorpo di cattura selettivo alla CRP) e i canali 8-13 dedicati alla misura della PCT (con lo strato biochimico con immobilizzato l'anticorpo di cattura selettivo alla PCT). La misura è stata realizzata facendo fluire sui canali 2-6 un campione contenente la stessa concentrazione di CRP e nei canali 7-13 differenti campioni contenenti concentrazioni di PCT via via crescenti.

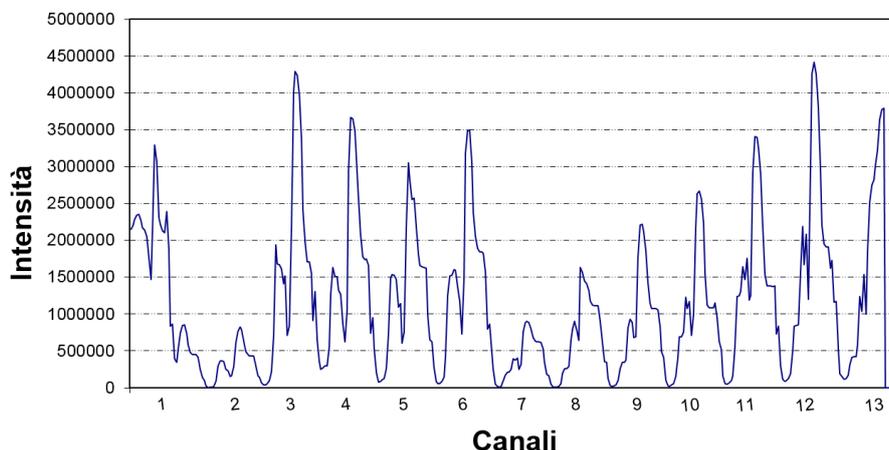


Figura 9 - Scansione dei tredici canali con i canali 2-6 e i canali 7-13 dedicati rispettivamente alla misura di CRP e PCT.

1.4 - La misura degli immunosoppressori in pazienti trapiantati

Nei pazienti che hanno subito un trapianto, uno degli aspetti più critici è il corretto dosaggio degli immunosoppressori, sia nella fase immediatamente successiva al trapianto che in una situazione a regime, i quali hanno il delicato compito di evitare le crisi di rigetto dell'organo trapiantato, mediante una parziale inibizione della risposta del sistema immunitario [18, 19]. Se da una parte l'abbassamento delle nostre difese immunitarie è necessario perché il nostro organismo accetti un organo esterno, una eccessiva somministrazione di tali farmaci può avere pesanti effetti collaterali tali da mettere a serio rischio la vita del paziente. E' stato dimostrato che la finestra di dosaggio di tali farmaci è estremamente stretta e varia da paziente a paziente. Per questo esiste una richiesta crescente da parte dei medici di un dispositivo di misura in grado di monitorare il più rapidamente possibile e con elevata frequenza la concentrazione degli immunosoppressori nel sangue dei pazienti trapiantati sia nella fase immediatamente successiva al trapianto che durante il periodo di follow-up post-operatorio, al fine di definirne il corretto dosaggio. Attualmente il protocollo seguito si basa sulla misura della concentrazione degli immunosoppressori immediatamente prima di una loro somministrazione (generalmente effettuata ogni ora) mediante il prelievo e l'invio del campione presso un laboratorio centralizzato. La possibilità di effettuare una rilevazione più frequente, utilizzando una strumentazione vicino al letto del paziente, rappresenterebbe un notevole passo in avanti fornendo un aiuto estremamente importante per l'individuazione in tempi rapidi della corretta terapia.

Oggetto del progetto europeo Nanodem (www.nanodem.eu), iniziato ad ottobre 2012 e della durata di quattro anni, di cui IFAC è coordinatore, è la realizzazione di un dispositivo POCT che utilizza un chip multicanale per la misura simultanea di tre immunosoppressori utilizzati spesso in combinazione sullo stesso paziente: ciclosporina, tacrolimus e acido micofenolico [21]. La misura viene effettuata su un campione dializzato prelevato continuamente mediante una catetere da microdialisi. L'utilizzo della microdialisi,

essenziale in quanto permette un'interfaccia minimamente invasiva, si basa sull'inserzione di un catetere contenente una membrana da dialisi in una opportuna zona del corpo del paziente. Come mostrato in Figura 10, una soluzione, il perfusato, viene fatta fluire ad un flusso molto lento (dell'ordine di $\mu\text{l}/\text{min}$) all'interno del catetere dove si raggiunge un equilibrio tra la concentrazione degli analiti all'esterno del catetere e quella al suo interno in virtù della loro diffusione attraverso la membrana da dialisi. Effettuando quindi una misura della concentrazione degli analiti nel fluido che esce dal catetere, il cosiddetto dializzato, è possibile determinarne la loro concentrazione all'interno del corpo umano.

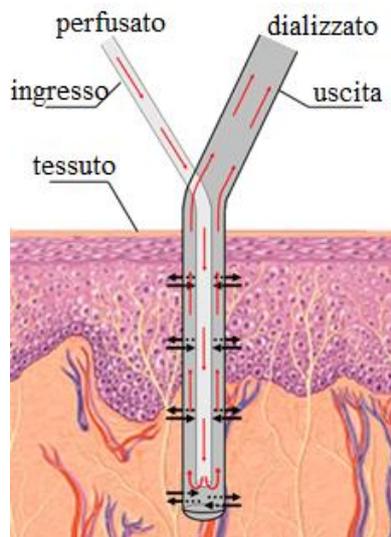


Figura 10 - Schematizzazione di un catetere da microdialisi applicato a livello tissutale

Esistono alcuni aspetti tecnici che devono essere attentamente valutati al fine di rendere la microdialisi una tecnica affidabile per applicazioni cliniche [20]. È anche importante osservare che non tutti gli analiti possono essere monitorati utilizzando questa tecnica, in quanto composti chimici con alto peso molecolare non possono essere diffusi attraverso la membrana, oppure la loro diffusione è molto limitata. Il cut-off della membrana di dialisi è quindi uno dei fattori limitante nella scelta degli analiti e il più alto cut-off di una membrana da dialisi è dell'ordine di 100 kdal. Altro parametro importante è il tasso di recupero (il cosiddetto recovery rate) che fornisce il rapporto tra la concentrazione dell'analita indagato nel dializzato e la sua concentrazione reale all'esterno del catetere. È evidente come i fattori che influenzano il tasso di recupero sono la dimensione dei pori della membrana, l'area della membrana a contatto con l'ambiente esterno, e la velocità di flusso del perfusato attraverso il catetere. Minore è tale velocità, maggiore è il tasso di recupero, poiché maggiore è il tempo disponibile per la diffusione degli analiti attraverso la membrana da dialisi. Alti tassi di recupero sono desiderabili, poiché assicurano una migliore precisione nella determinazione dell'analita. D'altra parte, più lenta è la velocità di flusso, maggiore è il tempo per effettuare la misura, in quanto maggiore è il tempo necessario perché venga raccolto un volume sufficiente di dializzato per procedere alla determinazione della concentrazione dell'analita.

Per quanto riguarda l'ubicazione del catetere, quando questo è applicato nel tessuto adiposo, è necessario verificare l'esistenza della corrispondenza tra il valore della concentrazione dell'analita misurata nel tessuto e il suo valore misurato nel sangue, dal momento che quest'ultimo è generalmente il parametro clinicamente rilevante. La recente comparsa sul mercato di un catetere da microdialisi per applicazioni intravascolari, quale il MicroEye® (www.probescientific.com), ha permesso di superare questo aspetto non sempre di facile soluzione ed è questo tipo di catetere da microdialisi che viene utilizzato nel progetto Nanodem.

Uno schema del dispositivo attualmente in fase di sviluppo nell'ambito del progetto europeo Nanodem, nella sua applicazione al paziente, è mostrato in Figura 11 dove il dispositivo POCT è collegato al paziente mediante un modulo per il prelievo del campione dializzato e il catetere da microdialisi MicroEye® è inserito a livello intravascolare nel braccio del paziente. All'interno del dispositivo si trova un chip a dieci canali (Figura 11) progettato e realizzato insieme a *microfluidic ChipShop* (www.microfluidic-chipshop.com); su ciascun canale è realizzato un biostrato contenente un derivato dell'analita in grado di competere con l'analita presente nel campione nel legarsi ad un anticorpo, utilizzato come elemento di riconoscimento molecolare, immobilizzato su nanoparticelle allo stesso tempo fluorescenti e magnetiche.

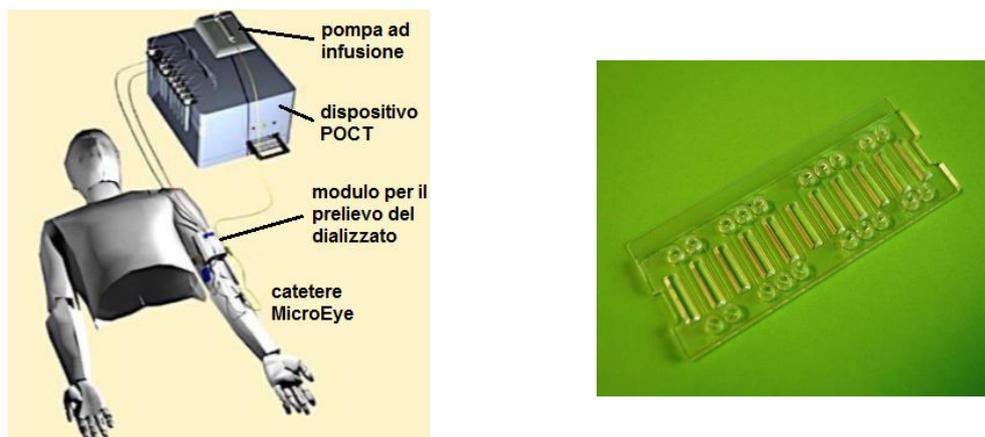


Figura 11 - Schema del dispositivo POCT per la misura degli immunosoppressori in pazienti trapiantati (a sinistra) e chip multicanale utilizzato per la misura simultanea degli immunosoppressori (a destra).

Lo schema del saggio biologico è schematizzato in Figura 12 nel caso di alte e basse concentrazioni dell'analita nel campione dializzato esaminato. Dopo una fase di incubazione fuori dal canale del campione con le nanoparticelle, la miscela viene iniettata nei canali del chip; la presenza di un campo magnetico velocizza la preconcentrazione delle nanoparticelle in prossimità del biostrato immobilizzato sulla parete del microcanale e facilita quindi l'interazione tra anticorpo presente sulla superficie delle nanoparticelle e il derivato dell'analita immobilizzato sulla superficie del biostrato. Un successivo lavaggio rimuove dalla

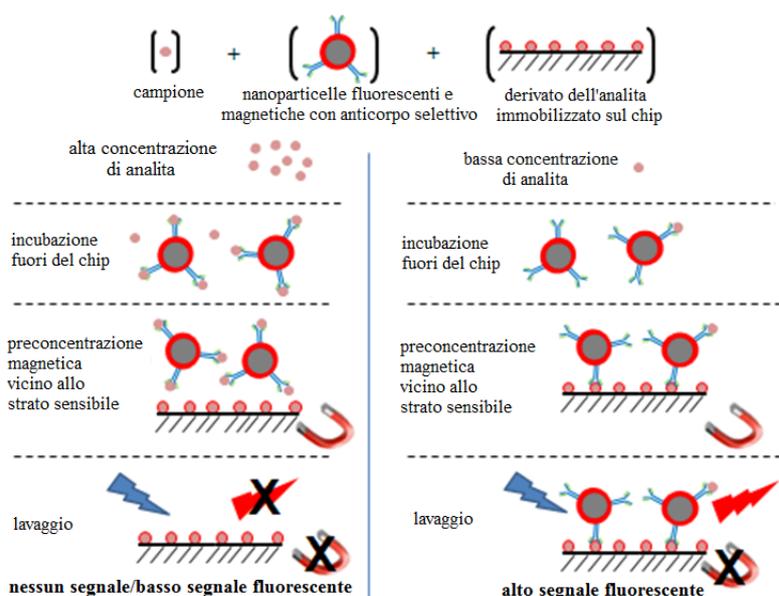


Figura 12 - Schema del saggio che ha luogo all'interno di ciascun canale del chip per la rivelazione degli immunosoppressori.

superficie le nanoparticelle i cui anticorpi non hanno interagito con il derivato dell'analita. Chiaramente il numero di nanoparticelle che interagisce con il biostrato attraverso i suoi anticorpi è strettamente legato alla concentrazione di analita presente nel campione. Infatti maggiore è tale concentrazione, maggiore sarà il numero di anticorpi presenti sulle nanoparticelle che interagisce con l'analita durante la fase di incubazione fuori dal chip e minore sarà il numero di anticorpi liberi di interagire con il derivato dell'analita presente nel biostrato con il risultato che sarà minore il numero di nanoparticelle che rimarrà bloccato sulla superficie del biostrato. Questo si traduce in un segnale fluorescente rivelato che è massimo in assenza dell'analita nel campione (massimo numero di nanoparticelle immobilizzate sul biostrato) e che diminuisce all'aumentare della concentrazione dell'analita nel campione.

1.5 - Conclusioni e prospettive future

I dispositivi POCT sono in continuo sviluppo e alcuni di loro sono già presenti sul mercato. Gli aspetti critici, che al momento ne frenano una loro maggiore diffusione, sono legati, da un punto di vista tecnologico, alle problematiche relative alle procedure di calibrazione dei sensori e dei biochip da doversi effettuare nell'area vicino al paziente, e, da un punto di vista analitico, alla necessità di confrontarsi con le misure effettuate nei laboratori centralizzati.

Si tratta comunque di problematiche destinate ad essere superate in tempi più o meno brevi in quanto grande è lo sforzo non solo degli istituti di ricerca ma anche delle grandi compagnie industriali che vedono in questo settore delle grandi possibilità di commercializzazione, vista la richiesta sempre più insistente da parte del personale medico per questi dispositivi che in molti casi possono rappresentare maggiori possibilità di sopravvivenza per il paziente.

E, sulla base di quanto descritto nelle sezioni precedenti, è evidente che i sensori ottici e i biochip ottici avranno un ruolo essenziale, offrendo prestazioni equivalenti se non superiori rispetto alle tecnologie non ottiche.

Ringraziamenti

Gli autori ringraziano il progetto europeo Nanodem (NANOphotonic Device for Multiple therapeutic drug monitoring, FP7-ICT-2011, contract 8318372) per il finanziamento.

Bibliografia

1. Luppia PB., Bietenbeck A, Beaudoin C, Giannetti A, *Biotech. Adv.*, in press, available on line (2016)
2. Yang Z, Zhou DM, *Clin. Biochem.*, 39 (8), 771–780 (2006)
3. Baldini F, Chester AN, Homola J, Martellucci S, *Optical Chemical Sensors*, vol. 224, NATO Science Series, Springer, The Netherlands, 2006
4. Preininger C, in: F. Baldini, J. Homola, S. Martellucci, A. Chester (Eds.), *Optical Chemical Sensors*, vol. 224, NATO Science Series, Springer, The Netherlands, 2006, 479–500 (Chapter 23).
5. Bechi P, Pucciani F, Baldini F, Cosi F, Falciai R, Mazzanti R, Castagnoli A, Passeri A, Boscherini S, *Dig. Dis. Sci.*, 38, 1297-1306 (1993)
6. Bechi P, *Disease of Esophagus*, 7, 131-138 (1994)
7. Baldini F, Bechi P, Cianchi F, Falai A, Fiorillo C, Nassi P, *J. Biom. Opt.*, 5(3), 321–329 (2000)
8. Vaezi MF, Lacamera RG, Richter JE, *Am. J. Phys.*, G1050 (1994)
9. Stipa F, Stein HJ, Feussner H, Kraemer S, Siewert JR, *Dis. Esoph.*, 104-109 (1997)
10. Fein M, Fuchs K-H, Bohrer T, Freys SM, Thiede A, *Dig. Dis. Sci.*, 1, 216-225 (1996)
11. EBNeuro, via Pietro Fanfani 97/A, 50127 Firenze, Italy, <http://win.ebneuro.biz>
12. Kumar A et al. *Crit. Care Med.*, 34, 1589- 96 (2006)
13. Pierrakos C, Vincent JL, *Crit. Care*, 14, R15, 3-18 (2010)
14. Baldini F, Carloni A, Giannetti A, Porro G, Trono C, *Anal. Bioanal. Chem.*, 391, 1837–1844 (2008)
15. Baldini F, Carloni A, Giannetti A, Porro G, Trono C, *Sens. Actuat. B*, 139, 64–68 (2009)
16. Baldini F, Bolzoni L, Giannetti A, Kess M, Krämer PM, Kremmer E, Porro G, Senesi F, Trono C, *Anal. Bioanal. Chem.*, 393, 1183–1190 (2009)
17. Polerecky L, Hamrle J, MacCraith BD, *Appl Opt*, 39, 3968-3977 (2000)
18. Weltz A, Scalea J, Popescu M, Xu J, Bromberg JS, in: M.R. Weir, E.V. Lerma (Eds.), *Kidney Transplantation*, Springer, New York, 2014, pp. 127-141
19. Streit F, Armstrong VW, Oellerich M, *Clin. Chem.*, 48, 955-958 (2002)
20. Baldini F, *Anal. Bioanal. Chem.*, 397, 909–916 (2010)
21. Berrettoni C, Berneschi S, Bernini R, Giannetti A, Grimaldi IA, Persichetti G, Testa G, Tombelli S, Trono C, Baldini F, *Procedia Eng.* 87, 392-395 (2014)

