

L'ACQUA: UN SISTEMA COMPLESSO

DALLA FISICA ALLA BIOLOGIA

FRANCESCO MALLAMACE

Dipartimento di Fisica e CNISM Università di Messina, Messina, Italia

IRCCS Neurolesi "Bonino-Pulejo", Messina, Italia

Dedicato a Placido Migliardo

L'acqua rappresenta, per le sue proprietà inusuali ed anomale se confrontate a quelle di un liquido semplice, un sistema complesso non ancora chiarito. Recentemente una serie di studi sperimentali fatti su acqua confinata in nanostrutture hanno fornito dei risultati in molte grandezze strutturali e dinamiche che hanno permesso di capire la termodinamica di alcune di queste anomalie. Considerando che l'acqua dei sistemi biologici è essenzialmente confinata, in questo articolo si discute su come queste nuove conoscenze, applicate allo studio di alcuni biopolimeri idratati (proteine, RNA e DNA), evidenziano su basi quantitative e molecolari il ruolo primario di questo liquido in biologia.

1 Introduzione

L'acqua è sulla Terra la molecola essenziale. Sin dagli inizi del pensiero capire il ruolo dell'acqua negli aspetti della vita ha rappresentato una sfida affascinante. Per Omero (*Iliade* XIV, vv 201 e 244) l'acqua è l'"Oceano", il grande fiume che circonda "la terra feconda" e "da cui tutti gli Dei hanno origine". Per Aristotele (*Metafisica* I, 3, 983 b, 6 sgg.) la filosofia (cioè a dire la scienza) prende avvio dalla ricerca del "principio" (*arché*) di tutte le cose, concepito come l'elemento materiale da cui tutte le cose sono costituite, traggono origine e in cui alla fine si risolvono; mentre la sostanza permane, pur mutando nelle sue proprietà. Il progenitore di questa filosofia che ricerca una "origine" materiale della natura (*physis*) – riferisce ancora Aristotele – è Talete di Mileto (VI secolo A. C.), che identifica il "principio" di tutte le cose nell'acqua. Poi, con Empedocle di Agrigento (V secolo A. C.), l'acqua è indicata come uno dei quattro elementi fondamentali (o radici) che costituiscono la realtà cosmologica: fuoco, aria, terra ed acqua. Mentre il fuoco è Giove, l'aria Era, la terra Edoneo, l'acqua è Nesti che "di lacrime distilla la sorgente mortale". Lo stesso Aristotele e il suo allievo Teofrasto, osservando che l'acqua è ciò che dà vita e tiene in vita le cose, indicano nell'acqua il "principio" della biologia, e quindi della vita. Da allora, l'evolversi delle umane conoscenze e della ricerca si è focalizzato sulla essenzialità dell'acqua: l'acqua che influenza e controlla tutti gli aspetti della vita di ogni giorno ed è alla sua base.

È noto che le molecole di acqua interagiscono tramite il legame idrogeno ma, a dispetto dei molti secoli di ricerche, le sue proprietà fisiche, anomale e complesse, se paragonate a quelle dei liquidi normali, sono lontane dall'essere comprese. Un esempio, noto da circa 300 anni, è l'evoluzione della densità ρ in funzione della

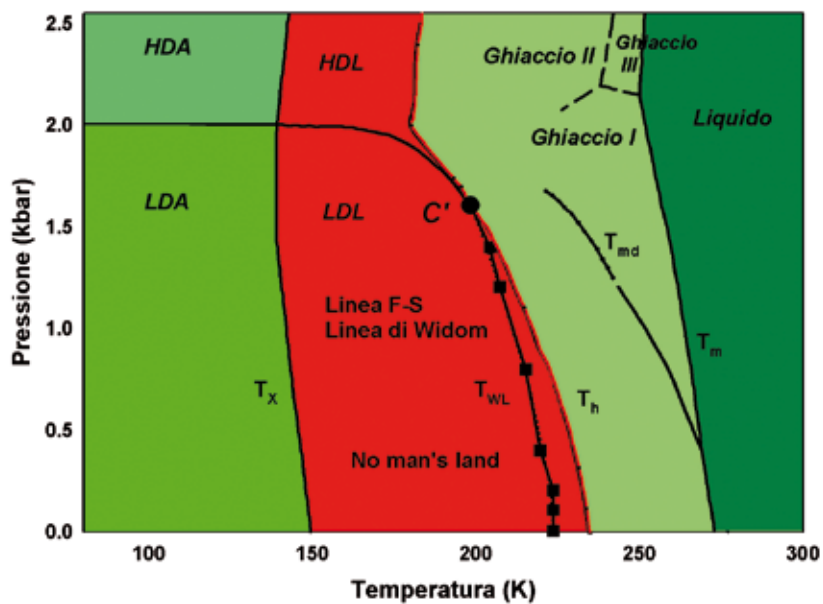
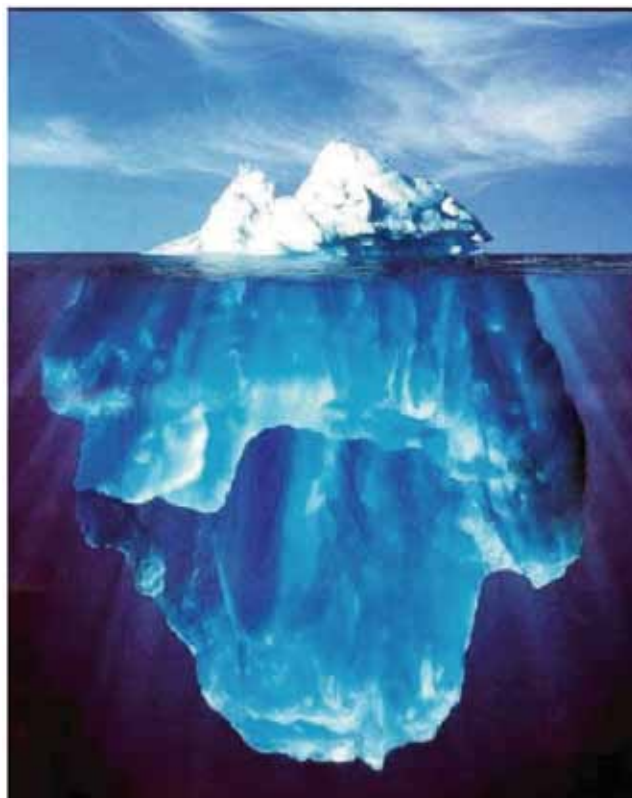
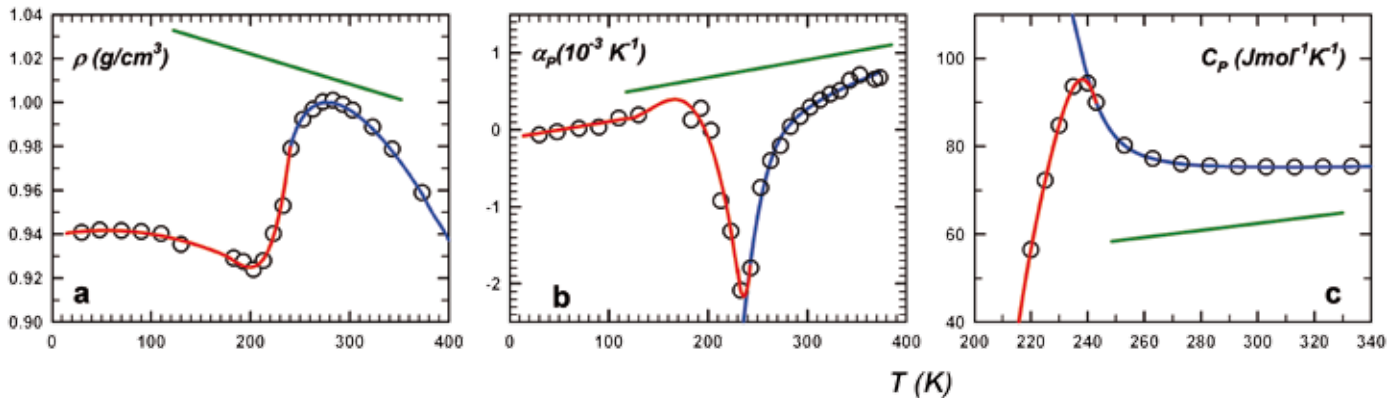


Fig. 1 A sinistra, la prima delle 64 anomalie dell'acqua: un massimo della densità del liquido [www.lsbu.ac.uk/water/anmlies.html]; il ghiaccio galleggia sul liquido (solo il 10% è sopra la superficie). A destra il diagramma di fase dell'acqua nel piano P - T .

temperatura T [1]. Al diminuire di T i liquidi si contraggono mentre l'acqua comincia ad espandersi quando la temperatura scende al di sotto di $T_{md} = 277$ K (4 °C) dove ρ ha il suo valore massimo. Dopo un certo tempo il ghiaccio posto in un bicchiere comincia a liquefarsi ed il restante ghiaccio galleggia su questo; mentre il liquido del fondo si porta a 4 °C il ghiaccio rimane a 0 °C (fig. 1, lato sinistro). Per queste "anomalie" il sistema acqua ha costituito e costituisce una area scientifica ricca di prospettive di ricerca, che si colloca ai confini tra la fisica, la chimica e la biologia e che richiede, per venire descritto, l'utilizzazione delle più sofisticate tecnologie sperimentali e delle più elaborate teorie della fisica statistica [2-4]. Teorie che, articolandosi su basi collettive, includono i modelli e i metodi usati per studiare i fenomeni critici, le cinetiche di aggregazione, i polimeri ed i colloidi, i sistemi con strutture gerarchiche e con dinamiche vincolate, e finalmente i sistemi complessi in generale [5]. Gli stessi approcci permettono la comprensione delle proprietà dei materiali biologici quali: proteine, enzimi, DNA ed RNA, cellule ed in generale i sistemi della moderna biologia molecolare. Tutti questi studi si mostrano, in linea di principio, in sintonia con le intuizioni dei filosofi greci e indicano che l'acqua e la biologia possono essere legate in un unico ordinamento

concettuale capace di provvedere ad una descrizione coerente e precisa dei fenomeni della vita. Come già sottolineato, l'acqua e le sostanze ad essa legate pongono una serie di problemi tuttora aperti. Per l'acqua pura sono: le anomalie nelle sue funzioni di risposta termodinamiche (fig. 2), la localizzazione (o l'esistenza) della sua transizione vetrosa, la maniera con cui arresta la sua dinamica, la definizione della zona di esistenza del liquido nel suo diagramma di fase, la sua metastabilità, il polimorfismo ed infine la possibile esistenza di un secondo punto critico [2-4]. Tutti problemi rilevanti anche in biologia, che, se chiariti, possono aprire una strada per una più piena comprensione dei problemi in cui l'acqua gioca il ruolo principale [6]. Poiché le anomalie si manifestano al di sotto della temperatura di fusione, $T_M = 273.16$ K (0 °C), gli studi si sono focalizzati nella fase metastabile e cioè nel regime sotto-raffreddato ($T < T_M$) dove l'acqua ha due forme amorfe [2]. Sebbene nella regione delle basse temperature T del diagramma di fase (P - T) la forma stabile è di norma il cristallo (di cui esistono molte fasi), l'acqua può esistere anche nella forma liquida e quando ciò accade l'acqua è detta super-raffreddata. Un tale stato è metastabile e di equilibrio precario: semplici perturbazioni quali piccole impurità o



leggeri movimenti portano a improvvise transizioni alla fase stabile cristallina. La fase di metastabilità termina alla cosiddetta temperatura di nucleazione omogenea ($T_H = 231$ K). Quindi l'acqua super-raffreddata (in natura costituisce le nuvole) si trova nell'intervallo compreso fra $T_H < T < T_M$ [2] (vedi la fig. 1, lato destro).

Se l'acqua liquida è portata velocemente a temperature molto basse (poche decine di gradi K) si può evitare la formazione del cristallo ottenendo un solido con un disordine molecolare analogo a quello di un liquido: cioè un *amorfo*. Poiché questo dipende da P e T si hanno due forme amorse caratterizzate da densità differenti. Sebbene l'acqua amorfa sia la forma più comune nell'Universo (è nelle comete ed è una brina nella polvere stellare), la sua formazione in laboratorio è piuttosto complicata. Se riscaldata, a pressione atmosferica, fino a $T \sim 130$ K essa diviene un liquido ultraviscoso la cui esistenza si mantiene fino a $T_X = 150$ K, dopo di che ridiventa spontaneamente ghiaccio. Quindi l'acqua come liquido esiste ad alta, $T > T_H$, ed a bassissima, $T < T_X$, temperatura.

Lo stato liquido si identifica in volumi (bulk) di acqua: mare, laghi, fiumi, ruscelli, gocce di pioggia, rugiada, etc. L'acqua in biologia è invece confinata dentro i corpi viventi: gli alberi, le cellule, le membrane, intorno e dentro alle proteine, etc.; in tali condizioni può essere localizzata intorno alle superfici, in piccole cavità e vicino specifici gruppi chimici (acqua di idratazione). Un esempio di complessità dell'acqua in biologia è costituito dalla banale miscela acqua-sapone [5]. Le

molecole dei saponi, denominati "anfili" sono essenzialmente molecole lineari caratterizzate da una testa idrofila (gruppi OH) ed una coda idrofoba (gruppi CH). È intuibile che in tale miscela l'acqua "preferisce" stare vicino alla testa idrofila allontanandosi dalla parte idrofoba. La competizione tra idrofilicità ed idrofobicità condiziona l'intero sistema. Essa comporta una riduzione di entropia che origina strutture ben definite fatte dei soli anfili (con l'acqua intorno). Strutture che dipendono dalla temperatura e dalla concentrazione dei componenti, assumono differenti geometrie: sfere, ellissoidi, cilindri, monostrati e doppi strati. La membrana cellulare è un doppio strato originato da questa autoaggregazione molecolare. L'idrofilicità e idrofobicità determinano anche la struttura locale dell'acqua; la prima incrementa l'ordine fra le sue molecole mentre l'idrofobicità ha effetti opposti. Questo evidenzia la rilevanza dell'acqua nella complessità dei processi chimico-fisici derivanti dalla idratazione dei biosistemi, quali ad esempio le proteine caratterizzate dalla presenza di gruppi idrofilici ed idrofobici distribuiti secondo uno specifico ordine fuori e dentro la macromolecola. Sono quindi di interesse particolare le seguenti questioni:

- i) È l'acqua allo stato liquido quella che interessa i sistemi biologici?
- ii) Poiché l'acqua in biologia è acqua confinata, la sua fisica è la stessa di quella di bulk?
- iii) È l'acqua che governa le proprietà dei materiali (o sistemi) biologici o questi ne sono indipendenti?

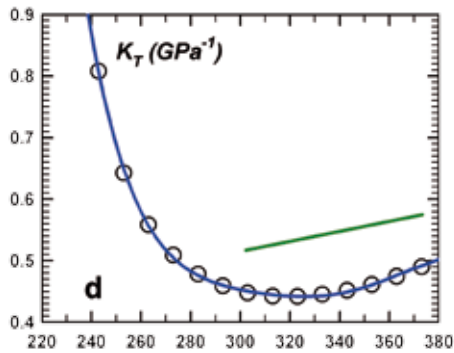


Fig. 2 Alcune delle anomalie termodinamiche dell'acqua: (a) il massimo nella densità; (b) il coefficiente di espansione termica α_p ; (c) il calore specifico isobarico C_p e (d) la compressibilità isoterma K_T . In blu sono riportati i valori di tali grandezze misurati nell'acqua di bulk ed in rosso quelli misurati nell'acqua confinata. Le linee in verde rappresentano i comportamenti di un liquido normale. C_p , α_p , e K_T misurati nel bulk, a pressione ambiente, sembrano avere un comportamento divergente di tipo critico (se estrapolati alle temperature più basse divergono a $T \approx 228$ K [4, 7]). Le stesse grandezze misurate nell'acqua confinata, essendo invece caratterizzate dalla presenza di massimi e minimi, propongono uno scenario ben differente.

Lo scopo di questo articolo è rispondere a queste domande considerando i risultati di recenti studi sull'acqua confinata. Per fare questo in maniera comprensiva e unificante dobbiamo considerare i risultati di una serie di osservazioni sperimentali che, chiarendo alcune anomalie termodinamiche del liquido, contribuiscono a valutare le sue proprietà "biologiche".

2 Le anomalie dell'acqua e la sua fisica

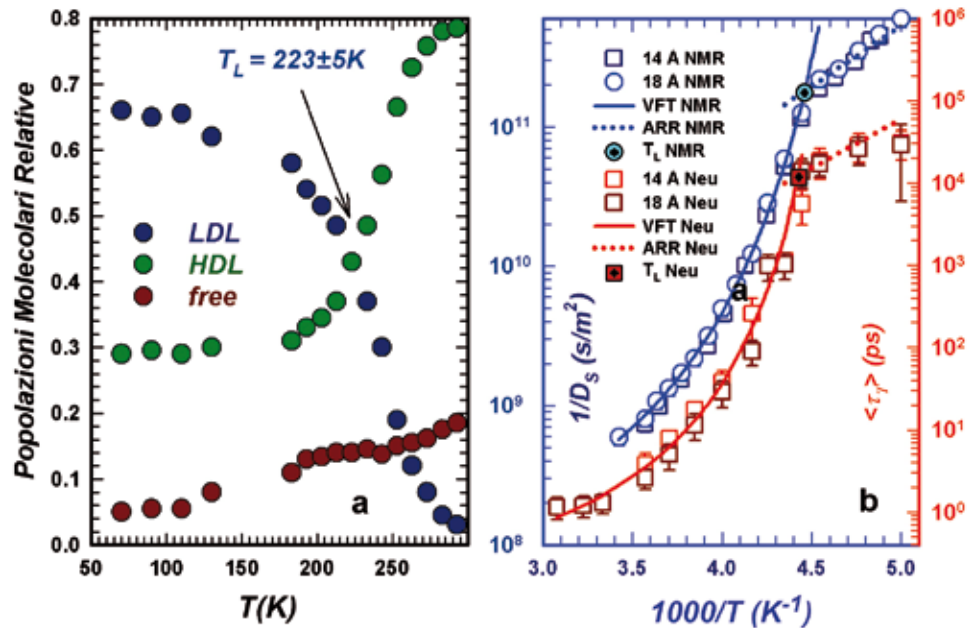
Il numero di anomalie termodinamiche dell'acqua è considerevole. Si pensi ad esempio alle inusuali, e per certi versi contrarie al comune buon senso, proprietà della fase *amorfa*, che quando è sufficientemente fredda si espande e diviene meno comprimibile; inoltre è meno viscosa quando è compressa. Le anomalie del liquido sono più pronunciate nella fase super-raffreddata [2-4]; in tale regione, il coefficiente di espansione termica α_p , il calore specifico isobarico C_p e la compressibilità isoterma K_T misurati nel bulk, sembrano avere un comportamento divergente. Infatti i dati misurati, se estrapolati alle più basse temperature divergono a $T_s \approx 228$ K [7] (linee blu in fig. 2). Il ghiaccio amorfo a *bassa densità* (low-density amorphous ice, LDA) è conosciuto da circa 60 anni [8], mentre un secondo tipo ad *alta densità* (high-density amorphous ice, HDA) è stato scoperto nel 1984 [9]. L'HDA con una struttura simile a quella del liquido ad alta pressione può essere associato alla forma vetrosa dell'acqua ad alta pressione, mentre la fase LDA corrisponderebbe al vetro a bassa pressione. Questa ulteriore anomalia è il *poliamorfismo* dell'acqua [9, 10].

2.1 Ipotesi correnti

Partendo dai modelli classici di Röntgen e Pauling sono state proposte per il misterioso comportamento dell'acqua liquida molte "spiegazioni" che si basano sulla specificità del legame idrogeno [11]. Le più accreditate sono:

- i) Il **limite di stabilità** [12], assume che nel diagramma di fase (P - T) la linea spinodale $T_s(P)$ abbia un comportamento "rientrante" e si congiunga a P negative alla spinodale liquido-gas dell'acqua super-riscaldata: l'acqua non può esistere come liquido quando è raffreddata oltre $T_s(P)$.
- ii) L'**assenza di singolarità** [13], si basa sulla possibilità che le variazioni poliamorfiche somiglino, anche se non lo sono, a vere transizioni. Per esempio, se l'acqua è assimilata a un gel transiente fatto di molecole tenute insieme dal legame idrogeno il cui numero cresce al diminuire di T , si formano aggregati di legami idrogeno o patches locali che portano a fluttuazioni di volume specifico e di entropia con correlazioni incrociate le cui anomalie uguagliano quelle osservate.
- iii) La **transizione di fase liquido-liquido (LL)** [14] nasce da studi di dinamica molecolare sulla struttura e la equazione di stato dell'acqua di bulk super-raffreddata. La specificità di tale modello sta nella ipotesi di un secondo punto critico dove la fase liquida si separa in due fasi distinte: una fase di liquido a bassa densità (low-density liquid, LDL) a bassa pressione ed una seconda ad alta densità (high-density liquid, HDL) ad alte pressioni P (fig. 1, lato destro). L'acqua di bulk vicino al suo classico punto critico ($T = 647$ K) è una miscela fluttuante di molecole le cui strutture locali somigliano rispettivamente a quelle della fase liquida e gassosa. Alla stessa maniera l'acqua di bulk vicino all'ipotizzato secondo punto critico è pensabile come una miscela fluttuante di molecole la cui struttura locale è quella delle due fasi liquide ipotizzate (LDL ed HDL); sono le fluttuazioni associate a queste due fasi che determinano le proprietà del liquido e quindi le sue anomalie.

Il punto critico è uno dei più straordinari fenomeni fisici. Sopra di esso si osserva una sola fase (per esempio "gas") ma al di sotto esistono due fasi distinte l'una dall'altra, caratterizzate da valori differenti di entropia e volume specifico (le derivate prime parziali del potenziale di Gibbs



$G = G(P, T)$). Queste due fasi sono distinguibili solo se si considerano traiettorie termodinamiche che incrociano la linea di transizione di fase del primo ordine. Lungo tali traiettorie si ha una discontinuità non analitica (salto) nelle derivate prime della $G = G(P, T)$. Per esempio, il volume, $V = (\partial G / \partial P)_T$, invece di diminuire in maniera lenta e continua con la pressione, presenta un salto ΔV , e vicino al punto critico $\Delta V \rightarrow 0$. Similmente l'entropia $S = (\partial G / \partial T)_P$, invece di crescere con T , presenta un salto di ΔS , con $\Delta S \rightarrow 0$ al punto critico. Il segno della quantità $\Delta S / \Delta V$ determina la pendenza ($\partial P / \partial T$) della linea della transizione di fase del primo ordine (equazione di Clapeyron: $\partial P / \partial T = \Delta S / \Delta V$).

Tali considerazioni sono verificabili con soluzioni analitiche di modelli teorici. Sperimentalmente la situazione è diversa: infatti l'identificazione della linea di transizione di fase del primo ordine specialmente quando si è in regimi di metastabilità non è semplice. L'acqua di bulk in teoria potrebbe essere raffreddata fino alla temperatura di nucleazione T_H , prima che il liquido con una transizione del primo ordine passi alla fase solida, mentre in realtà si arriva a circa 243 K (-30°C). Per la fase liquida di bulk è possibile studiare le sue proprietà molto al di sotto di T_M , ma la regione fra T_H e T_X , detta "no man's land" (dove dovrebbe essere localizzato il secondo punto critico LL) è al di fuori delle possibilità di analisi sperimentali. Per l'acqua confinata e per quella di idratazione delle proteine, come mostrato da una serie di recenti esperimenti, è invece possibile andare ben al di sotto dei 235 K. Il "trucco" è quello di confinare l'acqua in nanostrutture (pori) così piccole da evitare la formazione di centri di nucleazione. Potendo esplorare quindi quasi l'intero diagramma P - T è stato scoperto un ricco insieme di nuovi

fenomeni dinamici e termodinamici, che hanno aperto nuovi orizzonti per la chimica-fisica del sistema [15-20].

Il fenomeno più importante lo si osserva circa 10 K al di sotto di T_H . Non c'è un generale accordo su come interpretare quanto osservato, ma è ragionevole supporre che esso sia dovuto a un secondo punto critico LL posto al di sotto della temperatura T_H del liquido di bulk. Tale idea, coerente con i dati sperimentali, è in qualche modo in conflitto con il fatto che le transizioni di fase normalmente separano due distinte fasi liquide e gassose, non due liquidi. Ma nulla osta a che il "meccanismo fisico" di separazione di un fluido a singola componente in un gas ed un liquido possa essere anche esteso alla separazione di un liquido in due liquidi rispettivamente di alta (HDL) e bassa (LDL) densità. Le motivazioni di ciò hanno basi microscopiche: i liquidi a simmetria locale tetraedrica (oltre a H_2O , anche P, Si e SiO_2) sono caratterizzati da un potenziale a due minimi che sarebbe all'origine del "polimorfismo liquido".

2.2. Osservazioni sperimentali dirette dentro la no man's land per l'acqua confinata

Un tentativo di prova sperimentale della presenza del secondo punto critico LL è stato effettuato nella regione $T < T_H$ lungo la linea di fusione indotta dalla decompressione (FID) del ghiaccio IV. Misurando curve di FID sono state osservate discontinuità nella pendenza di tali curve (un nodo in tali curve corrisponde ad una grinza nella superficie di Gibbs identificante la transizione liquido liquido (LL)). Gli studi nella no man's land riguardano differenti esperimenti (scattering quasi elastico di neutroni (QENS), Raman e

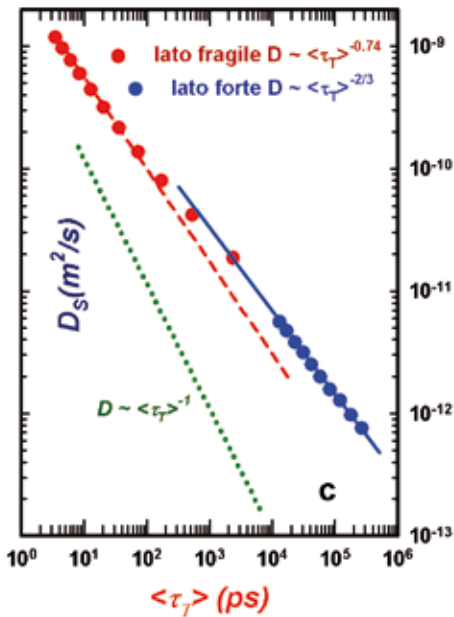


Fig. 3 I principali risultati ottenuti in acqua confinata. (a) Popolazioni molecolari relative delle diverse specie di acqua: free (dati in rosso scuro) le molecole non coinvolte in nessun legame ossia l'acqua allo stato di monomero; HDL (dati in verde) le molecole di acqua che a mezzo del legame idrogeno formano dimeri o trimeri (l'insieme di queste due specie costituisce la fase di alta densità, HDL, nel modello del secondo punto critico LL) e infine (dati in blu) le molecole di acqua appartenenti al reticolo tetraedrico (la fase di bassa densità o LDL). (b) I parametri di trasporto ottenuti rispettivamente dalla NMR (coefficiente di autodiffusione D_s) e scattering quasi-elastico di neutroni (QENS) (tempo di rilassamento longitudinale τ_T) che indicano con chiarezza la transizione dinamica da liquido *fragile* (Super-Arrhenius) a liquido *forte* (Arrhenius) alla temperatura T_L , ossia alla temperatura in cui la fase LDL è dominante rispetto alle altre. Bisogna notare che il comportamento di τ_T (quantità proporzionale alla stabilità del legame idrogeno) in funzione della temperatura (al diminuire di T da 300 K a 225 K cresce di oltre quattro ordini di grandezza) indica che la fase di bassa densità, LDL, è certamente più stabile che la fase HDL. (c) Prova sperimentale della violazione alla transizione della legge di Stokes-Einstein.

spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (NMR)), su acqua confinata in nanopori del diametro di 16–20 Å [15–19], accompagnati, per la loro interpretazione, da calcoli su modelli di acqua di bulk [20]. L'osservazione fondamentale è la presenza di una transizione dinamica a circa 225 K in cui il liquido mostra, al diminuire di T , un cambiamento nei suoi parametri di trasporto (coefficiente di autodiffusione D_s misurato con NMR ed i tempi di rilassamento longitudinali τ_T ottenuti tramite QENS) dal tipo super-Arrhenius al tipo Arrhenius; cioè da materiale dinamicamente fragile a materiale forte (seguendo la classificazione dei materiali nella vetrificazione) [15–16], fig. 3b. Allo stesso tempo misure di assorbimento con spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier hanno evidenziato non solo che l'acqua rimane liquida fino a circa 180 K, ma anche che gli spettri vibrazionali di stretching di OH mostrano con chiarezza la presenza di due fasi liquide di cui una è LDL, cioè formata da molecole di acqua legate tramite legame idrogeno in ben definiti raggruppamenti in cui ogni molecola è vertice di un tetraedro [16], fig. 3a. Tale figura indica come la struttura locale molecolare del sistema influenzi le sue proprietà dinamiche. Infatti la temperatura di transizione delimita due regioni: per $T < T_L$ il numero di molecole impegnate nel reticolo tetraedrico è maggiore

del numero complessivo delle molecole legate parzialmente (dimeri o trimeri) o non legate (monomeri), mentre per $T > T_L$ vale il contrario. Poiché τ rappresenta una grandezza direttamente proporzionale alla stabilità (rottura/formazione) del legame idrogeno il suo crescere più che esponenziale al diminuire di T per $300 > T > 225$ K indica come la fase a bassa densità, LDL, sia molto più stabile della fase ad alta densità, HDL. Le due fasi comunque coesistono in questo regime di liquido super-raffreddato, il che comporta una sua marcata disomogeneità dinamica. Tali risultati sono stati confermati successivamente nel bulk con l'uso di altre tecniche [21, 22]. Specificamente, è stata trovata una correlazione tra la transizione dinamica e la cosiddetta "Widom line", che è definita nel piano P - T come il *locus* dei massimi nelle lunghezze di correlazione [20]. Essendo le funzioni di risposta proporzionali a potenze della lunghezza di correlazione, si trova teoricamente che la Widom line diviene asintoticamente vicina al *locus* dei massimi del calore specifico $C_{p, max}$ e forse a dei possibili massimi nel coefficiente di espansione termica $\alpha_{p, max}$ [15, 16, 23]. Sperimentalmente tali fenomeni non erano mai stati osservati. Dalla combinazione dei dati di scattering di neutroni e di spettroscopia NMR si evince che la temperatura di transizione dinamica da

materiale fragile a materiale forte coincide con la violazione della ben nota relazione di Stokes-Einstein (SE) $D_S = k_B T / 6\pi\eta R$ che lega linearmente fra loro i parametri di trasporto D_S e η . La transizione coincide quindi con un forte disaccoppiamento fra queste grandezze dinamiche comportando la presenza di forti fluttuazioni di densità e la crescita delle corrispondenti lunghezze di correlazione. In altre parole, il liquido raffreddato non si porta all'arresto dinamico in una maniera omogenea, ma è invece caratterizzato dallo svilupparsi al suo interno di eterogeneità di carattere dinamico, per cui il moto degli atomi è spazialmente correlato con forti disaccoppiamenti tra i modi traslazionali e quelli rotazionali. Si originano nel sistema delle aree in cui i tempi di rilassamento strutturale differiscono di diversi ordini di grandezza dai valori medi dell'intero sistema. La presenza di queste eterogeneità origina la violazione di SE. Alle temperature, T , più basse la relazione di Stokes-Einstein è sostituita da una legge di potenza del tipo $D_S \sim (\eta/T)^{-\xi}$, la cosiddetta SE frazionaria. Molto recentemente in un confronto fra dati sperimentali (spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier) e uno studio di dinamica molecolare su due modelli molecolari (TIP5P e Jagla) dell'acqua [24] è stato mostrato che la SE frazionaria si origina in concomitanza dello svilupparsi della fase LDL dimostrando che a queste temperature la fisica del sistema acqua è dominata da variazioni specifiche nella sua struttura locale. Le osservazioni riportate sembrano legarsi fortemente al concetto di Widom line, un concetto non molto popolare sebbene sia noto dal 1958 [24]. Bisogna sottolineare che già in passato era stata suggerita l'ipotesi di un forte cambiamento, entro la no man's land, nelle proprietà dinamiche dell'acqua liquida [2]. A differenza di altri materiali "network-forming" [25], l'acqua si comporta come un liquido fragile in tutta la finestra di temperatura accessibile sperimentalmente [2, 24]. Considerando quindi le analogie con altri liquidi "network-forming" e le proprietà delle sue forme amorfe era ragionevole che, a pressione ambiente, l'acqua di bulk cambiasse da fragile (ad alte T) a forte (a basse T) [26] proprio nella regione di super-raffreddamento al di sotto della temperatura T_H . Lo scattering di neutroni è stato poi utilizzato estendendo lo studio della transizione liquido fragile-liquido forte in funzione della pressione [15]; nel lato destro della fig. 1, è mostrato (quadrati neri) come le funzioni $T_L(P)$ (e quindi la Widom line nel diagramma P - T) dipendano dalla pressione e terminino proprio sul secondo punto critico LL (cerchio nero), che si stima sia collocato a $P_C = 1600 \pm 40$ bar e $T_C = 200 \pm 10$ K. Tale transizione dinamica è stata anche osservata in Si ed SiO_2 [27]. Una interpretazione del fenomeno è stata data, a mezzo di un potenziale a due scale (Jagla model), dalla simulazione di dinamica molecolare e mostra come esso possa essere

dovuto proprio all'incrocio con la Widom line [27]. Un'altra realtà di forte impatto sperimentale riguardante le proprietà dell'acqua è legata ad un nuovo metodo di analisi dei dati di NMR, che mediante il chemical shift del protone $\delta(T)$ permette la stima della parte configurazionale del calore specifico dei materiali [18, 28]. Nel particolare caso dell'acqua sono stati usati dati di bulk di precedenti esperimenti e dati di acqua confinata [15-17, 27] nell'intervallo $195 < T < 350$ K. L'idea è che essendo δ direttamente connesso con il tensore di shielding magnetico ne rappresenti la geometria locale o l'ordine dei legami idrogeno; quindi $-\ln\delta(T)$ "misura" l'entropia configurazionale e la sua derivata $-(\partial\ln\delta/\partial T)_p$ il corrispondente calore specifico a pressione costante; argomento confermato dal confronto con dati di letteratura nell'intervallo 290–370 K. Il risultato è che $-(\partial\ln\delta/\partial T)_p$ mostra un massimo pronunciato quando si incrocia la zona della massima lunghezza di correlazione a circa 240 K, il che è in accordo con l'ipotesi del secondo punto critico LL che predice un massimo per $C_p(T)$ quando si incrocia la Widom line (fig. 2c). Poiché la tecnica NMR fornisce anche il chemical shift di ogni nucleo del campione con spin non nullo un tale approccio è applicabile a materiali più complessi. Come riportato nel seguito, ciò è stato fatto su di una proteina al fine di dettagliare il fondamentale processo di folding/unfolding nei suoi aspetti più rilevanti. Sia dai dati di scattering di neutroni [18] sia da quelli di spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier e Raman [19], mediante la semplice considerazione che l'intensità degli spettri misurati è proporzionale al numero delle molecole presenti nel volume di scattering, è stato possibile misurare l'evoluzione in funzione della temperatura della densità, $\rho(T)$, dell'acqua confinata. Sorprendentemente emerge una nuova anomalia: un minimo per la densità a circa 200 K (fig. 2a), minimo previsto da studi di dinamica molecolare [25]. Derivando appropriatamente $\rho(T)$ in funzione di T è facile calcolare $\alpha_\rho = -(\partial\ln\rho/\partial T)_p = \langle \delta S \delta V \rangle / k_B T V$. Come si può vedere dalla fig. 2b anche questa importante grandezza termodinamica, che è appunto la correlazione incrociata delle fluttuazioni di entropia δS e volume δV , non mostra, come $C_p(T)$, alcuna divergenza, anzi presenta un minimo localizzato proprio alla temperatura T_L della transizione dinamica. Questo risultato rende questa temperatura certamente singolare, non solo perché rappresenta in maniera non ambigua la vera termodinamica del liquido, ma soprattutto perché, se essa è davvero la temperatura della Widom line a pressione ambiente, avvalorare come reale l'ipotesi del secondo punto critico (unico punto a cui le funzioni termodinamiche realmente divergono) per l'acqua.

3 L'acqua e le macro-molecole biologiche (proteine, RNA e DNA)

L'acquisizione di questi risultati sull'acqua confinata ha suggerito analisi analoghe per l'acqua di idratazione delle macromolecole di interesse biologico quali specificatamente la proteina lisozima, l'RNA ed il DNA. Vogliamo comunque ricordare che lo scopo di questo lavoro è indipendente dalla verifica del modello teorico (singularity-free o secondo punto critico LL); ma è piuttosto mirato ad evidenziare quali sono gli effetti dell'acqua sulla proteina.

Solo di recente è stato proposto, in maniera appropriata, che l'acqua rappresenta un costituente attivo della biochimica cellulare [29]. Una prova inconfutabile di ciò è che senza acqua una proteina è un materiale "inerte" (praticamente senza dinamica), ma basta un solo strato di acqua attorno ad essa per "generare" le sue attività biologiche [29, 30]. L'idratazione si identifica come il processo di aggiunta incrementale di acqua alla proteina secca tanto da renderla bioattiva, fino a quando l'ulteriore aggiunta di acqua non cambia più le sue proprietà essenziali, risultando invece in una soluzione macromolecolare. Lo strato di idratazione, ossia l'acqua associata con la proteina ai suoi punti terminali, rappresenta quindi una sorta di coperta monomolecolare, "monostrato", distesa sulla sua superficie. L'acqua fuori dal monostrato provoca alla proteina idratata solo piccolissime alterazioni nelle sue proprietà termodinamiche (ad esempio il calore specifico). La prova che l'idratazione attivi la funzionalità della proteina è data da misure di reazione del lisozima con uno zucchero (esasaccaride di N-acetilglucosamina, alla soglia di idratazione $h = 0.2$ – concentrazione in grammi di acqua su proteina anidra) in cui è mostrato senza ambiguità che la attività enzimatica della biomolecola si sviluppa in parallelo con l'innesto dei suoi moti superficiali [29]. Da queste osservazioni si evince quanto sia importante chiarire le relazioni tra la struttura e la dinamica della proteina e con acqua ad essa associata [29, 30] e come molte funzioni biologiche, ad esempio la catalisi enzimatica, possono essere comprese solo tramite la precisa conoscenza delle funzioni del primo strato di idratazione.

A basse temperature le proteine esistono in uno stato privo di flessibilità conformazionale [29]. Quando T cresce, le ampiezze dei moti atomici cominciano a crescere linearmente, come in un solido armonico [31]. Nella proteina idratata invece, a circa 220 K, tali ampiezze evidenziano un tasso di crescita con la temperatura molto più alto che nella biomolecola anidra, segnalando l'insorgenza di una dinamica di tipo liquido [32]. Come abbiamo visto, avendo l'acqua confinata la transizione liquido fragile-liquido forte proprio intorno a tale temperatura, è ragionevole supporre

che questa transizione delle proteine (definita anche come transizione vetrosa delle proteine) possa essere generata dall'accoppiamento, attraverso il legame idrogeno, della proteina con la sua acqua di idratazione [29-32].

Una seconda specie di acqua che influenza la biomolecola è l'acqua legata al suo interno. Sembra che queste molecole, localizzate nelle cavità della proteina, abbiano un ruolo strutturale nel suo unfolding (ossia quel processo fondamentale in cui la proteina, in analogia ai polimeri, si apre al solvente). Questo processo altrettanto importante per le proprietà biologiche delle proteine avviene alle alte temperature, giusto di poco al di sotto dell'insorgenza del processo di denaturazione che porta alla perdita delle loro biofunzionalità. Una proteina è nel suo stato nativo (folded) fino ad una certa temperatura ed evolve, al crescere di T , in una regione caratterizzata dal processo irreversibile di unfolding-folding; fenomeno la cui insorgenza sembra dipendere, oltre che dal solvente, dalla natura chimica della proteina. Per il sistema acqua-lisozima il fenomeno si manifesta nell'intervallo $310 < T < 360$ K; sopra 355 K il lisozima denatura irreversibilmente. Per tale sistema misure calorimetriche [33] evidenziano un largo picco di C_p in tale regione di temperatura. Più precisamente, il picco è a $T = 346$ K e tutti i dati di tale esperimento sono congruenti nell'associare il primo stadio della denaturazione di una piccola proteina globulare quale il lisozima ad una transizione conformazionale di tipo reversibile, mentre il secondo ad una di tipo irreversibile. Quindi la struttura della proteina subisce un sorprendente cambiamento forse pilotato dal legame idrogeno tra proteina ed acqua poiché la costante di rate varia con T in accordo con una legge di Arrhenius secondo la quale l'energia di attivazione è tipica della forza del legame idrogeno [33], mostrando come l'acqua di idratazione abbia un ruolo anche in questo caso.

Certamente uno studio accurato di queste due transizioni dinamiche può chiarire il ruolo dell'acqua nella biologia molecolare e dare una risposta alle tre domande su cui abbiamo focalizzato questa discussione.

La verifica della prima domanda che ci siamo posti viene sia dalla NMR [18, 34] quanto dai dati di spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FTIR) [34]: a tutte le temperature studiate l'acqua di idratazione rimane allo stato liquido. Mentre la seconda domanda, se l'acqua confinata e quella di idratazione hanno identiche proprietà fisiche, ha ricevuto risposta da differenti tecniche sperimentali [21, 22, 34] e di simulazione di dinamica molecolare [35].

Gli argomenti che confermano come l'acqua "governa" le proprietà dei sistemi biologici trovano sostegno nei risultati ottenuti, oltre che con le tecniche NMR ed FTIR, nello studio con tecniche di scattering quasi elastico di neutroni (QENS)

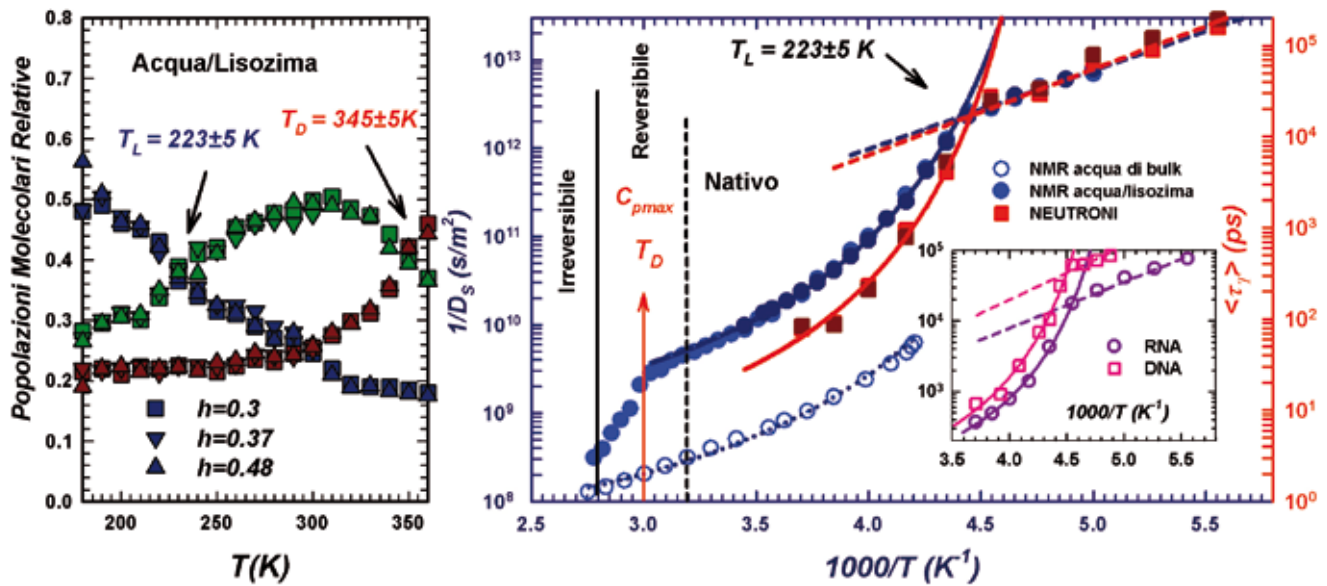


Fig. 4 A sinistra sono mostrate le popolazioni relative (le stesse della fig. 3) delle diverse fasi strutturali dell'acqua di idratazione del lisozima a differenti livelli di idratazione h . I dati evidenziano due transizioni: la prima a T_L ed una seconda a T_D nella regione di forte attività biologica della proteina: dove si manifesta il processo di folding-unfolding della proteina che precede la sua flocculazione irreversibile. T_D cade entro la regione di T dove la fase free costituisce la maggioranza delle molecole di acqua intorno alla proteina, ossia alle temperature in cui i tempi di stabilità del legame idrogeno sono inferiori al picosecondo. A destra sono riportati, in analogia alla fig. 3c, i risultati di NMR e di scattering di neutroni per l'acqua di idratazione della proteina. Sono inoltre riportati i valori di D_s misurati nell'acqua di bulk e nell'inserto, i valori di τ_T misurati nella regione della prima transizione dinamica sia per il DNA che per l'RNA.

dello spostamento quadratico medio atomico e dell'acqua di idratazione ($\langle X^2 \rangle_{H_2O}$) e dei protoni delle biomolecole ($\langle X^2 \rangle_{Biom}$) quali: lisozima [35, 36], DNA ed RNA [37]. Risultati peraltro confermati con tecniche di simulazione di dinamica molecolare [35, 38]. Gli spostamenti quadratici medi sono stati ottenuti dagli spettri di scattering neutronico da una misura del fattore di Debye-Waller [36].

Nel lato di sinistra della fig. 4 sono riportate le popolazioni molecolari relative delle specie LDL (a bassa densità), HDL (ad alta densità) e free dell'acqua di idratazione del lisozima (differenti valori di h), misurate con la tecnica FTIR, usata in precedenza nel caso dell'acqua confinata. I colori associati alle differenti specie sono gli stessi della fig. 3. È chiaramente evidente la presenza di due transizioni di cui la prima è a T_L proprio laddove le popolazioni delle fasi LDL ed HDL si incrociano; in particolare dove (al crescere di T) la popolazione nella fase HDL supera quella nella fase LDL. La seconda è nella regione di temperatura caratterizzata dal processo di transizione della proteina dallo stato nativo a quello della denaturazione

($T_D \sim 345$ K); altrettanto chiaramente si vede che a tale temperatura l'acqua di idratazione è essenzialmente libera da legami idrogeno. In tale regione la stabilità del legame idrogeno è molto bassa. Questo risultato è estremamente rilevante nel contesto della domanda che ci eravamo posti: la proteina si apre ("sfoldandosi") perchè l'acqua (interna e di superficie) non riesce più a mantenere legati fra loro i gruppi interni (amminoacidici) della macromolecola. Schematicamente è come se esistessero due colle, interna ed esterna, che a T_D si sgretolano permettendo alla proteina di aprirsi.

Nella figura di destra in cui sono riportati i dati dinamici (D_s e τ_T) si vede che proprio a T_D si verifica un forte cambiamento nel coefficiente di diffusione dell'acqua di idratazione che evolve velocemente verso i comportamenti dell'acqua di bulk alla stessa temperatura. Queste due transizioni e le corrispondenti variazioni nella dinamica ad essi associata riaffermano l'idea che la fisica dell'acqua pilota quella delle proteine. Come nel caso dell'acqua confinata anche in questo caso

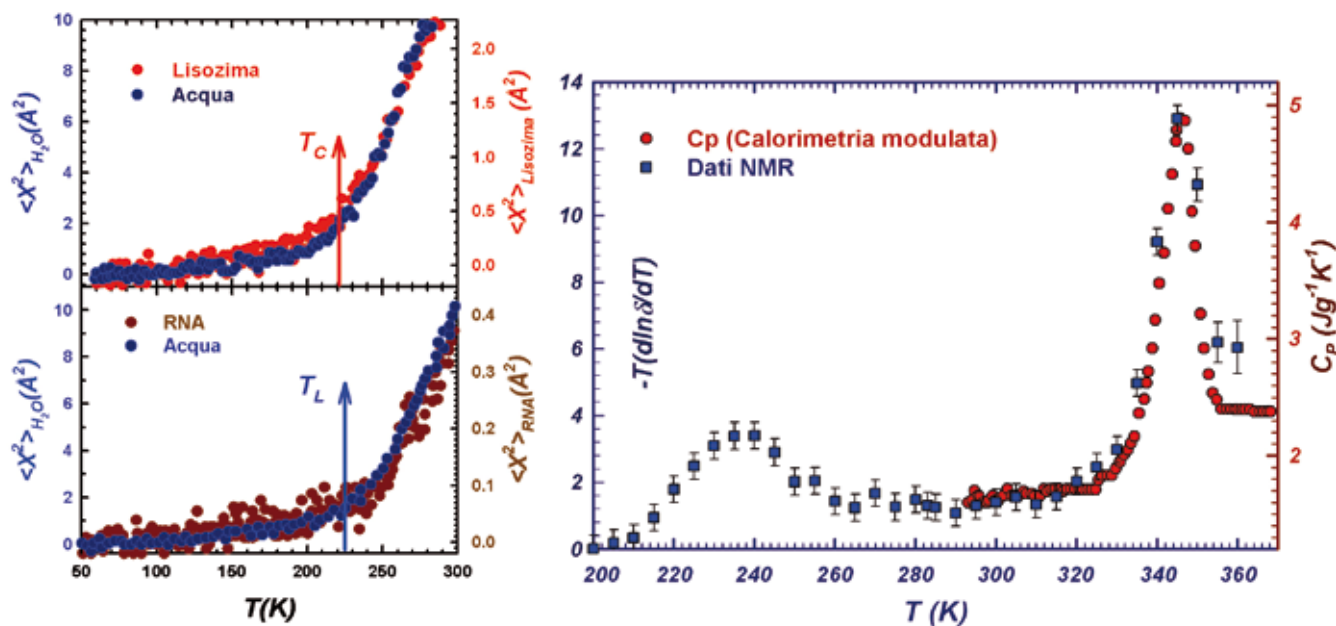


Fig. 5 A sinistra è mostrato lo spostamento quadratico medio dei protoni ($\langle X^2(T) \rangle$) del lisozima e dell'RNA idratati. Tale quantità è stata misurata separatamente, con lo scattering di neutroni (fattore di Debye-Waller), sia per protoni appartenenti alla sola acqua di idratazione ($\langle X^2_{H_2O} \rangle$) che per i protoni appartenenti alla proteina stessa ($\langle X^2_{Biopol} \rangle$; in alto sono rappresentate queste grandezze per il lisozima e in basso per l'RNA). In entrambi i casi si osserva una transazione tra due differenti comportamenti alla stessa T_L ; temperatura che coincide per entrambi i sistemi con la cosiddetta *temperatura di transizione vetrosa* delle biomolecole, T_C , che indica l'inizio della attività enzimatica. Poiché $\langle X^2_{Biopol} \rangle$ misurato nella proteina anidra è caratterizzato da un comportamento lineare in tutto l'intervallo di temperatura esplorato (una sola fase armonica) questi risultati indicano che la bioattività in entrambi i sistemi è dovuta solo all'acqua. A destra è riportato il calore specifico configurazionale misurato, dalla zona della transizione a quella di denaturazione, con la metodica NMR (dal chemical shift dei protoni dell'acqua di idratazione); in questa ultima regione i dati ottenuti sono confrontati con il calore specifico misurato con la calorimetria differenziale.

relativo all'acqua di idratazione del lisozima vi è nella regione del secondo punto critico LL un accordo fra i dati di QENS ed NMR. Lo stesso comportamento lo mostrano i dati di scattering di neutroni dell'acqua di idratazione del DNA e dell'RNA [37] (inserto della fig. 4).

Una ulteriore conferma della "universalità" del ruolo dell'acqua nella dinamica dei biopolimeri è mostrata nella parte di sinistra della fig. 5 in cui sono riportati gli spostamenti quadratici medi dell'acqua di idratazione del lisozima e dell'RNA nonché quelli delle stesse biomolecole. Come si può vedere si ha in entrambi i sistemi una perfetta sovrapposizione fra la temperatura della transazione dinamica liquido fragile-liquido forte, T_L , e la cosiddetta temperatura di transizione vetrosa delle biomolecole, T_C . Il DNA e la sua acqua di idratazione mostrano lo stesso comportamento [37]! Essendo questo processo caratteristico della idratazione, ed indipendente dalla natura del biopolimero idratato, si ottiene con esso la prova definitiva della essenzialità dell'acqua in biologia.

La parte di destra della fig. 5 riporta il calore specifico configurazionale misurato sia

nella zona di transazione che in quella di denaturazione, con la metodica NMR (chemical shift dei protoni dell'acqua di idratazione).

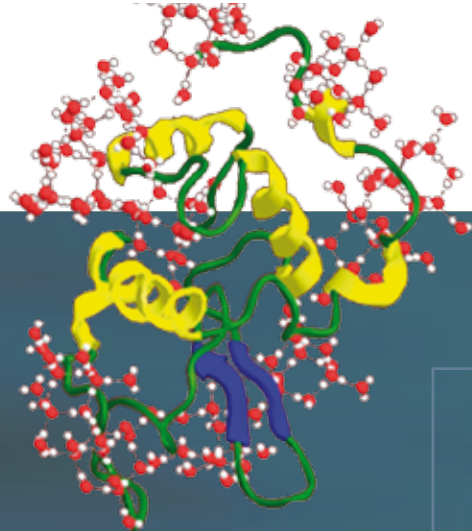
In aggiunta i dati ottenuti in questa ultima regione sono confrontati con il calore specifico misurato con la calorimetria differenziale modulata [33]. Questi ultimi dati rivestono una certa significatività in quanto rappresentano il legame fra due maniere diverse di osservare lo stesso fenomeno: da un lato con visuale "locale" (coefficiente di autodiffusione e spostamento quadratico medio) e dall'altro lato una visione collettiva/termodinamica del processo a mezzo del calore specifico.

Ringraziamenti

Desidero ringraziare tutti i colleghi e gli studenti che hanno contribuito allo sviluppo ed alla verifica delle idee espresse, in particolare Piero Baglioni, Caterina Branca, Matteo Broccio, Sow-Hsin Chen, Carmelo Corsaro, Antonio Faraone, Marco Lagi, Li Liu, Chung-Yuan Mou, Jeroen Spooren, Eugene H. Stanley e Limei Xu.

Bibliografia:

- [1] R. Waller, 1964 "Essays of Natural Experiments" (Johnson Reprint Corporation, New York) 1964, tradotto dall'originale italiano su facsimile del 1684 (Accademia del Cimento e Società Italiana di Fisica).
- [2] P. G. Debenedetti and H. E. Stanley, "The physics of supercooled and glassy water", *Phys. Today*, 56, no. 6 (2003) 40.
- [3] F. Mallamace, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 106 (2009) 15097.
- [4] P. G. Debenedetti, "Metastable Liquids: Concepts and Principles" (Princeton University Press, Princeton) 1996.
- [5] F. Mallamace and H. E. Stanley (editors), "The Physics of Complex Systems" (IOS Press, Amsterdam) 1997; "The Physics of Complex Systems (New advances and Perspectives)" (IOS Press, Amsterdam) 2004.
- [6] P. Kumar, G. Franzese, S. V. Buldyrev and H. E. Stanley, "Aspects of Physical Biology: Biological Water, Protein Solutions, Transport and Replication", edited by G. Franzese and M. Rubi, *Lect. Notes Phys.*, Vol. 752 (Springer, Berlin) 2008.
- [7] R. J. Speedy and C. A. Angell, *J. Chem. Phys.*, 65 (1976) 851.
- [8] E. F. Burton and W. F. Oliver, *Proc. R. Soc. A*, 153 (1936) 166.
- [9] O. Mishima, L. D. Calvert and E. Whalley, *Nature*, 310 (1984) 393; *Nature*, 314 (1985) 76; *Nature*, 384 (1996) 546.
- [10] J. L. Finney *et al.*, *Phys. Rev. Lett.*, 89 (2002) 503.
- [11] D. Eisenberg and W. Kauzmann, "The Structure and Properties of Water" (Oxford University Press, Oxford) 1969.
- [12] R. J. Speedy, *J. Phys. Chem.*, 86 (1982) 982.
- [13] S. Sastry, P. Debenedetti, F. Sciortino and H. E. Stanley, *Phys. Rev. E*, 53 (1996) 6144.
- [14] P. H. Poole, F. Sciortino, U. Essmann and H. E. Stanley, *Nature*, 360 (1992) 324.
- [15] A. Faraone *et al.*, *J. Chem. Phys.*, 121 (2004) 10843; L. Liu *et al.*, *Phys. Rev. Lett.*, 95 (2005) 117802.
- [16] F. Mallamace *et al.*, *J. Chem. Phys.*, 124 (2006) 161102; S.-H. Chen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 103 (2006) 12974.
- [17] F. Mallamace *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 104 (2007) 424.
- [18] F. Mallamace *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 104 (2007) 18387.
- [19] F. Mallamace *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 105 (2008) 12725.
- [20] L. Xu *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 102 (2005) 16558.
- [21] D. Banerjee, S. N. Bhat, S. V. Bhat and D. Leporini, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 106 (2009) 11448.
- [22] C. Huang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 106 (2009) 15214.
- [23] D. Paschek, *Phys. Rev. Lett.*, 94 (2005) 217802.
- [24] L. Xu *et al.*, *Nat. Phys.*, 5 (2009) 565.
- [25] J. Horbach and W. Kob, *Phys. Rev. B*, 60 (1999) 3169.
- [26] K. Ito, C. T. Moynihan and C. A. Angell, *Nature*, 398 (1999) 492.
- [27] S. Sastry and C. A. Angell, *Nat. Mater.*, 2 (2003) 739; I. Saika-Voivod, P. H. Poole and F. Sciortino, *Nature*, 412 (2001) 514.
- [28] C. Corsaro *et al.*, *J. Phys. Chem. B*, 112 (2008) 10449.
- [29] J. A. Rupley, P. H. Yang and G. Tollin, "Water in Polymers", edited by S. P. Rowland, *ACS Symp. Ser.*, 127 (1980) 111.
- [30] R. B. Gregory, "Protein solvent interaction" (Marcel Dekker, New York) 1995.
- [31] A. M. Tsai *et al.*, *Biophys. J.*, 79 (2000) 2728.
- [32] W. Doster, S. Cusack and W. Petry, *Nature*, 337 (1989) 754.
- [33] G. Salvetti *et al.*, *J. Phys. Chem. B*, 106 (2002) 6081.
- [34] F. Mallamace *et al.*, *J. Chem. Phys.*, 127 (2007) 045104; *J. Phys. Chem. B*, 114 (2010) 1870.
- [35] P. Kumar *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 104 (2007) 9575; *Phys. Rev. Lett.*, 97 (2006) 177802.
- [36] S.-H. Chen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 103 (2006) 9012; X. Q. Chu *et al.*, *J. Phys. Chem. B*, 113 (2009) 5001; Y. Zhang *et al.*, *J. Chem. Phys.*, 130 (2009) 135101.
- [37] S.-H. Chen *et al.*, *J. Chem. Phys.*, 125 (2006) 171103; X. Q. Chu *et al.*, *Phys Rev E*, 77 (2008) 011908.
- [38] M. Lagi *et al.*, *J. Phys. Chem. B*, 112 (2008) 1571.



Francesco Mallamace

Francesco Mallamace è professore ordinario di fisica generale all'Università di Messina e responsabile del Centro NMR-Sistemi Complessi del CNRINFN-UNIME. È affiliate professor al Massachusetts Institute of Technology Department of Nuclear Science and Engineering e visiting professor al Center for Polymer Studies della Boston University.

Ha studiato a Messina, Roma e Boston. Durante la sua carriera si è interessato ai liquidi e sistemi complessi che ha studiato tramite differenti tecniche sperimentali: scattering di luce e neutroni, viscoelasticità, sound-propagation e spettroscopia di risonanza magnetica nucleare.

