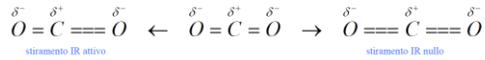


MOTI VIBRAZIONALI

Nel caso della CO₂, che possiede un momento dipolare nullo, lo stiramento simmetrico dei legami carbonilici non porta ad assorbimento nell'IR perché ogni momento dipolare associato ad un legame C=O è annullato dall'altro (la vibrazione simmetrica non distrugge il centro di simmetria del sistema).

Invece lo stiramento asimmetrico comporta la comparsa di un momento dipolare variabile nel tempo, e cioè assorbimento.

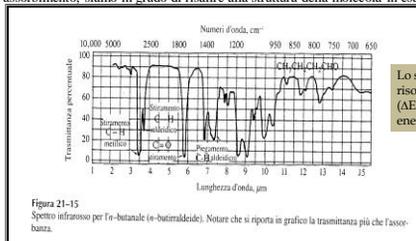


Maggiore è la variazione del momento dipolare, maggiore è l'assorbimento!

SPETTRO IR

Lo spettro IR, che riporta l'intensità dell'assorbimento in funzione della lunghezza d'onda, è caratterizzato da picchi riferibili a gruppi funzionali specifici, che fanno parte della struttura della molecola in esame.

Grazie alla riproducibilità di questi picchi, e soprattutto dei valori caratteristici di assorbimento, siamo in grado di risalire alla struttura della molecola in esame.



Lo spettro è meno risolto a λ maggiori (ΔE tra i livelli energetici è minore)

SPETTRO IR

Lo spettro infrarosso si presenta come una sequenza di bande di assorbimento registrate in funzione della lunghezza d'onda (o del numero d'onda).

Nel caso di composti in fase gassosa le bande appaiono di solito alquanto complesse in quanto prodotte da transizioni vibro-rotazionali delle molecole.

In fase solida e praticamente neanche in liquida le molecole si urtano prima di aver compiuto una rotazione completa (in altre parole il loro cammino libero medio è inferiore al tempo di rotazione), per questo gli spettri si presentano più semplici.

I parametri che caratterizzano una banda di assorbimento IR sono:

POSIZIONE

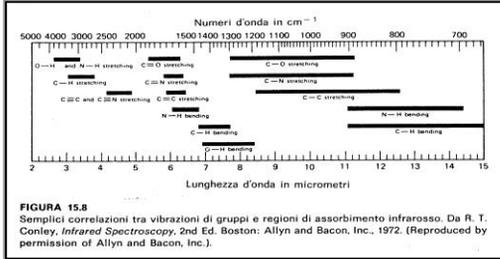
La posizione di una banda viene indicata con la sua λ_{max} (in micrometri μm) o più spesso in numero d'onda ν (cm^{-1}), che dipende dalla costante di forza del legame interessato: più rigido è il legame, quanto maggiore è l'energia necessaria per amplificare le vibrazioni.

INTENSITÀ

L'intensità di una banda (cioè l'altezza del picco) esprime la probabilità che avvenga la transizione energetica dallo stato fondamentale a quello eccitato (da parte del gruppo funzionale) che provoca l'assorbimento.

Lo spettro può essere diviso in 4 zone:

- Zona di stretching dell'idrogeno ($\lambda = 2.7 - 4.0 \mu\text{m}$)
- Zona di stretching del triplo legame ($\lambda = 4.0 - 5.0 \mu\text{m}$)
- Zona di stretching del doppio legame ($\lambda = 5.0 - 6.4 \mu\text{m}$)
- Zona di stretching e bending del legame singolo ($\lambda = 6.0 - 15 \mu\text{m}$)



La strumentazione è paragonabile a quella di uno spettrofotometro con l'uso di materiali che non provochino interferenze (p.es. cuvette di KBr). La sorgente è generalmente un solido riscaldato e in alcuni strumenti si usano rivelatori di calore (p.es. termocoppie) soprattutto utili nella regione a lunghezze d'onda elevate.

Alcuni strumenti più moderni (FTIR, spettrometro infrarosso a trasformata di Fourier) sono in grado di misurare contemporaneamente tutto lo spettro IR.

La spettroscopia IR viene utilizzata molto spesso a scopo qualitativo. È uno strumento molto potente perché lo spettro IR della regione *fingerprint* (impronta digitale) a basse energie è praticamente unico per ogni molecola. Per l'identificazione della molecola si confronta lo spettro ottenuto con quello di molti altri spettri disponibili in banche dati. Lo spettro deve essere registrato in opportune condizioni sperimentali (con la sostanza gassosa, solida o disciolta in un solvente che non interferisce).

VANTAGGI

- fornisce per ciascun composto esaminato una complessa e caratteristica impronta digitale
- avendo a disposizione uno standard del composto, un controllo computerizzato dello strumento IR permette la perfetta sovrapposizione delle impronte digitali

LIMITI

- usata raramente nella tecnica quantitativa a causa della difficoltà nella preparazione del campione e della complessità dello spettro
- identifica solo impurezze grossolane
- la preparazione del campione richiede un certo grado di abilità (pasticche di KBr)
- la manipolazione del campione può avere effetto sullo spettro e rendere la tecnica non del tutto riproducibile

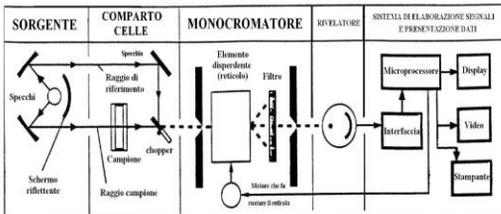
STRUMENTAZIONE

I dispositivi strumentali oggi a nostra disposizione per ottenere spettri nel medio e lontano IR (lo studio e le applicazioni del vicino infrarosso sono relativamente recenti) sono sostanzialmente di due tipi:

- SPETTROFOTOMETRIA A DISPERSIONE
- SPETTROFOTOMETRIA A INTERFERENZA

I primi sono più diffusi nei moderni laboratori, soprattutto per motivi di costo; i secondi offrono invece prestazioni senz'altro superiori ma i costi sono decisamente più elevati. L'intervallo di lunghezze d'onda coperto dagli strumento è generalmente compreso tra **4000 e 625 cm⁻¹**, corrispondente al *medio IR*, ma sono anche molto diffusi quelli con intervallo spettrale esteso verso λ più elevate, fino a **400 e 200 cm⁻¹**, che include anche il *lontano IR*.

SPETTROFOTOMETRIA A DISPERSIONE



SPETTROFOTOMETRIA IN TRASFORMATA DI FOURIER (FT-IR)

Questa tecnica strumentale è basata sulla spettroscopia infrarossa classica. Si tratta di una tecnica recente creata grazie alla computerizzazione del laboratorio strumentale.

Il suo principio di base è rappresentato dalla possibilità di cogliere contemporaneamente tutte le frequenze dello spettro IR nel rivelatore, il che rende superflua la scansione della lunghezza d'onda.

Questo è possibile trasformando, per mezzo di un *interferometro*, la radiazione IR policromatica emessa dalla sorgente (istante per istante con la medesima intensità) in un *interferogramma*, dove l'assorbimento non è più funzione della frequenza, ma del tempo (cioè *si passa da dominio delle frequenze a dominio dei tempi*).

SPETTROSCOPIA DI EMISSIONE FLUORESCENZA

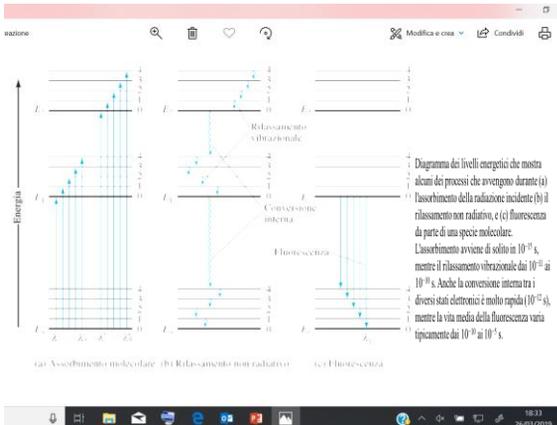
LUMINESCENZA

È necessario che una sorgente esterna fornisca al sistema una quantità di energia sufficiente ad innescare l'emissione luminosa. Differenti tipi di sorgente energetica definiscono, pertanto, differenti tipi di luminescenza.

Si può così parlare, ad esempio, di elettroluminescenza, radioluminescenza, chemiluminescenza e fotoluminescenza.

In quest'ultima forma di luminescenza l'energia è fornita dall'assorbimento di radiazione elettromagnetica nello spettro compreso fra l'ultravioletto e l'infrarosso; la cosiddetta regione del visibile.

Nella fotoluminescenza vengono, infine, distinti due diversi processi: **fluorescenza** e **fosforescenza**. La fluorescenza è il risultato di un processo fisico in tre stadi successivi, che avviene in certe molecole (generalmente idrocarburi policiclici o eterociclici), chiamati per questo motivo fluorofori o fluorocromi.



MECCANISMO FLUORESCENZA

La fluorescenza è uno dei numerosi meccanismi mediante cui una molecola può tornare allo stato fondamentale dopo essere stata eccitata mediante assorbimento di radiazione.

Le molecole potenzialmente possono fluorescere → cammini non radiativi con rilassamento a velocità maggiore dell'emissione fluorescente.

Rendimento quantico → rapporto del numero di molecole che fluoresce rispetto al numero totale di molecole eccitate

Molecole altamente fluorescenti, come la fluoresceina, hanno efficienze quantiche che, in alcune condizioni, si avvicinano all'unità. Le specie non fluorescenti hanno efficienze che sono essenzialmente zero

La fluorescenza è particolarmente favorita in molecole rigide.

La rigidità abbassa la velocità di rilassamento non radiativo al punto in cui il rilassamento per fluorescenza ha tempo sufficiente per avvenire

CONCENTRAZIONE VS INTENSITÀ FLUORESCENZA

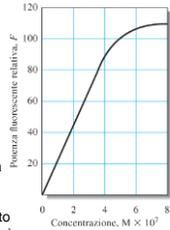
La potenza della radiazione fluorescente F è proporzionale alla potenza radiante del fascio di eccitazione assorbito dal sistema:

$$F = K'(P_0 - P)$$

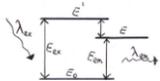
Da cui si può scrivere:

$$F = kc$$

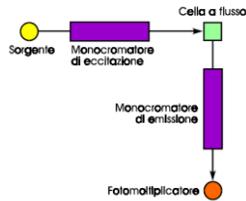
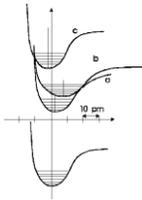
Per c grande la relazione diventa non lineare per effetto dell' **assorbimento primario** in cui il fascio incidente viene assorbito così fortemente che la fluorescenza non è più proporzionale alla concentrazione.
Se c molto alta, F inizia a diminuire per **assorbimento secondario** (assorbimento della radiazione emessa da altre molecole)



SPETTROSCOPIA DI EMISSIONE FLUORESCENZA



λ di emissione $>$ λ di eccitazione



STRUMENTI DI FLUORESCENZA

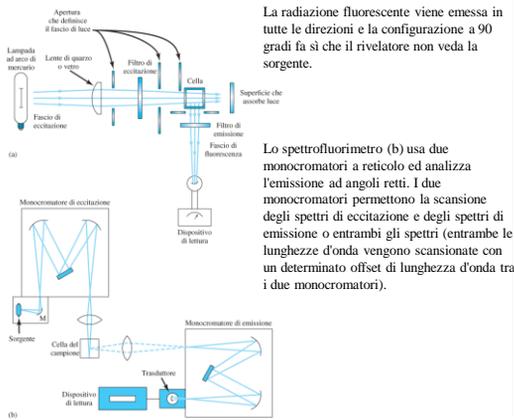
I metodi di fluorescenza sono generalmente da uno a tre ordini di grandezza più sensibili dei metodi basati sull'assorbimento.

Le sorgenti tipiche della fluorescenza sono le lampade ad arco di mercurio, ad arco di xeno, ad arco di xenomercurio e i laser.

I monocromatori e i trasduttori sono di solito simili a quelli utilizzati negli spettrofotometri ad assorbimento.

I fotomoltiplicatori vengono ampiamente utilizzati negli spettrofluorimetri ad elevata sensibilità ma i CCD ed i detector a serie di diodi sono diventati molto popolari negli ultimi anni.

I fluorimetri e gli spettrofluorimetri differiscono ampiamente in sofisticazione, prestazioni e costo, così come gli spettrofotometri di assorbimento.



La radiazione fluorescente viene emessa in tutte le direzioni e la configurazione a 90 gradi fa sì che il rivelatore non veda la sorgente.

Lo spettrofluorimetro (b) usa due monocromatori a reticolo ed analizza l'emissione ad angoli retti. I due monocromatori permettono la scansione degli spettri di eccitazione e degli spettri di emissione o entrambi gli spettri (entrambe le lunghezze d'onda vengono scansionate con un determinato offset di lunghezza d'onda tra i due monocromatori).

APPLICAZIONI FLUORIMETRIA

Il numero di applicazioni dei metodi fluorimetrici a problemi organici e biochimici è impressionante.

Tra i tipi di composti che possono essere determinati per fluorescenza vi sono gli amminoacidi, le proteine, i coenzimi, le vitamine, gli acidi nucleici, gli alcaloidi, le porfirine, gli steroidi, i flavonoidi e molti metaboliti.

Grazie alla sua sensibilità, la fluorescenza è ampiamente utilizzata come tecnica di rilevamento per i metodi di cromatografia liquida, per i metodi di analisi in flusso e per l'elettroforesi.

Diverse applicazioni della fluorimetria nell'analisi dei cibi, dei prodotti farmaceutici, dei campioni clinici e dei prodotti naturali. La sensibilità e la selettività del metodo ne fanno uno strumento particolarmente valido in questi settori.

POTENZIALI APPLICAZIONI

L'USO DI SONDE FLUORESCENTI IN NEUROBIOLOGIA: SONDARE IL CERVELLO ILLUMINATO

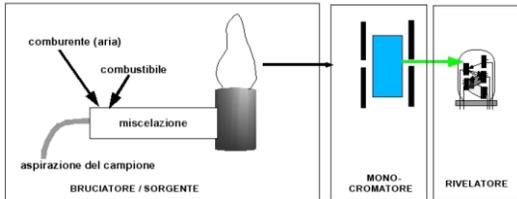
Gli indicatori fluorescenti sono ampiamente usati per indagare ciò che avviene nelle singole cellule.

Una sonda particolarmente interessante è quella chiamata sonda ionica, che varia il suo spettro di eccitazione o di emissione quando si lega a ioni specifici come Ca^{2+} o Na^+ . Questi indicatori possono essere usati per registrare ciò che accade nelle diverse parti dei singoli neuroni o per monitorare simultaneamente l'attività di un gruppo di neuroni.

In neurobiologia, per esempio, il colorante Fura-2 è stato usato per monitorare la concentrazione del calcio libero intracellulare dopo l'applicazione di alcuni stimoli farmacologici o elettrici. Seguendo nel tempo le variazioni di fluorescenza di siti specifici nel neurone, i ricercatori possono determinare quando e dove ha luogo un evento elettrico che coinvolge il calcio.

SPETTROSCOPIA DI EMISSIONE A FIAMMA

La spettroscopia ad emissione di fiamma si presta essenzialmente a determinazioni quantitative; ad esempio i più comuni strumenti sono dedicati all'analisi quantitativa dei metalli alcalini e alcalino terrosi (Li, Na, K, Ca, Mg) in soluzione.



SPETTROSCOPIA DI EMISSIONE A FIAMMA

L'analisi quantitativa si basa sul fatto che intensità della radiazione emessa e concentrazione sono direttamente proporzionali ($I_E = K \cdot C$).

Anche in questo caso si procede alla costruzione della curva di lavoro (o retta di taratura).

La fiamma (che non supera mai i 3000K) riesce ad eccitare facilmente gli atomi di Li, Na, K, Ca e Mg, i quali emettono poi le loro radiazioni caratteristiche nell'ambito del visibile.
