

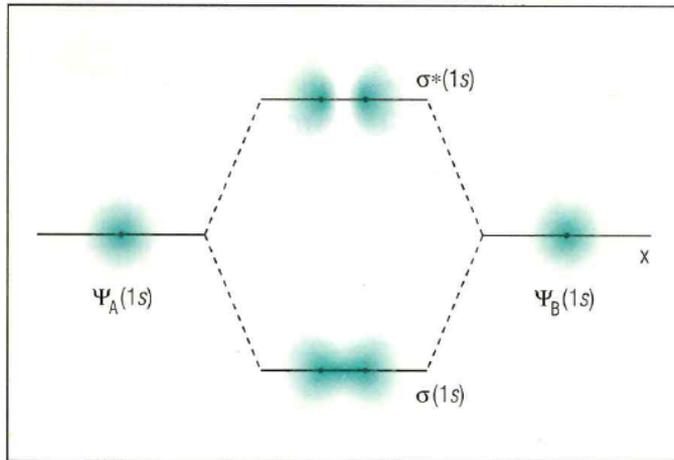
# Spettroscopia



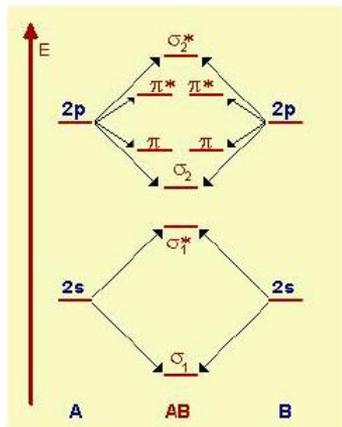
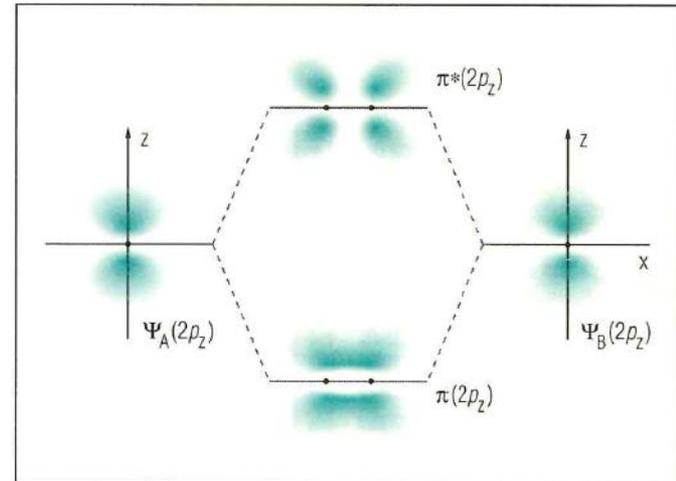
Studia le interazione tra le radiazioni elettromagnetiche e la materia. Come sono fatti questi sistemi?

La formazione dei legami chimici viene spiegata in termini di interazioni di orbitali atomici, che **sovrapponendosi formano gli orbitali molecolari**.

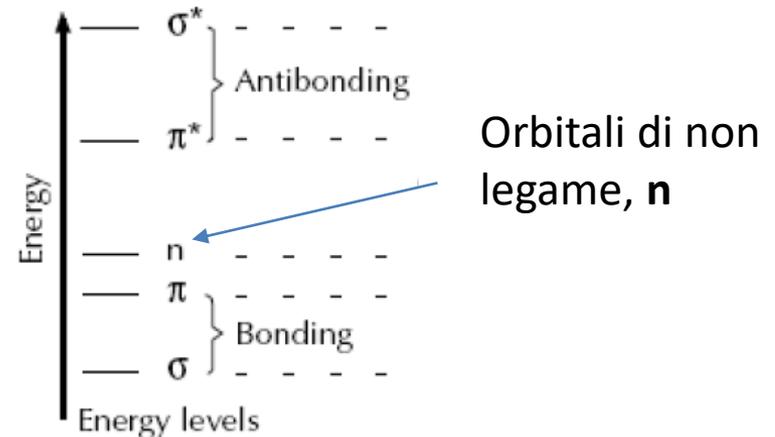
### Formazione di legame $\sigma$ nell' $H_2$



### Formazione di orbitali $\pi$



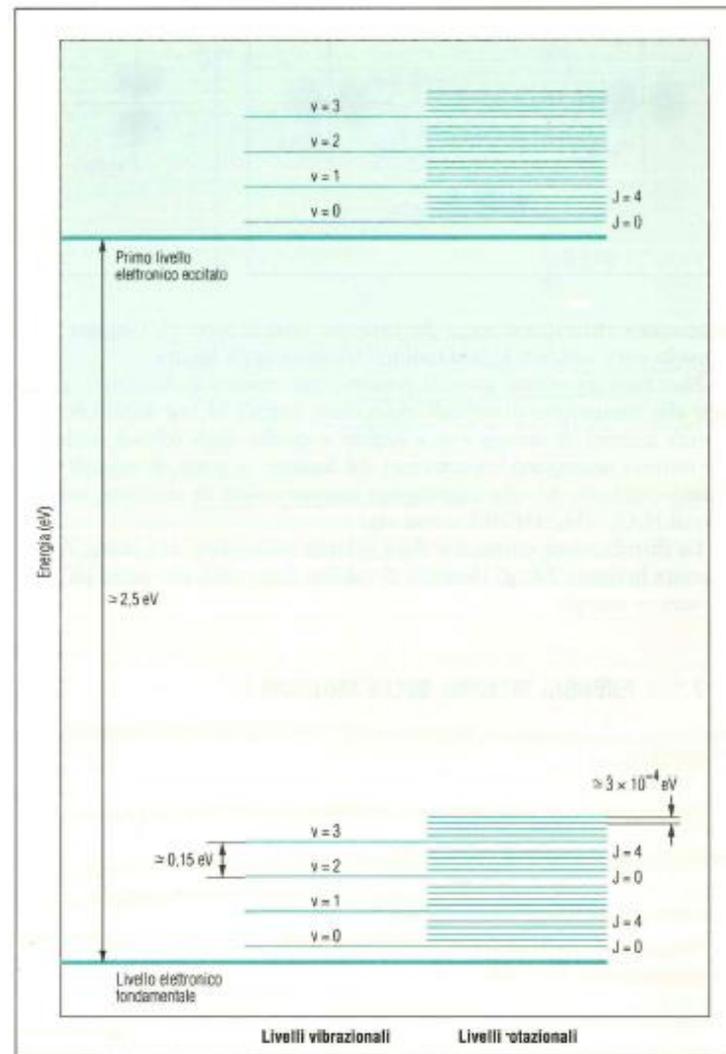
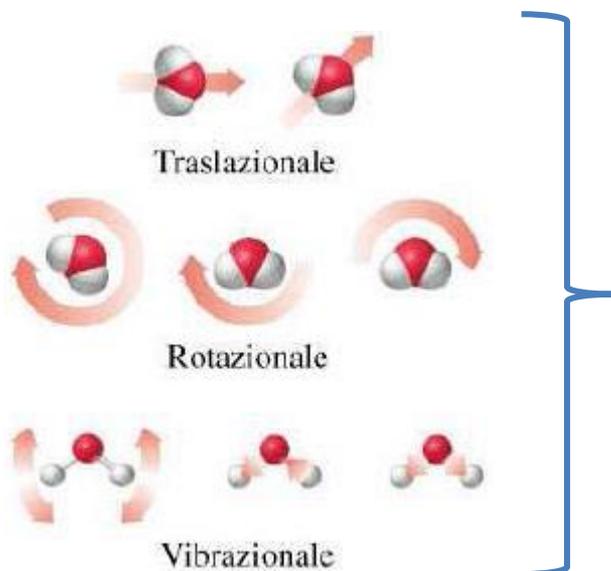
La differenza di energia tra due orbitali  $\pi$  è minore di quella tra due orbitali  $\sigma$ .



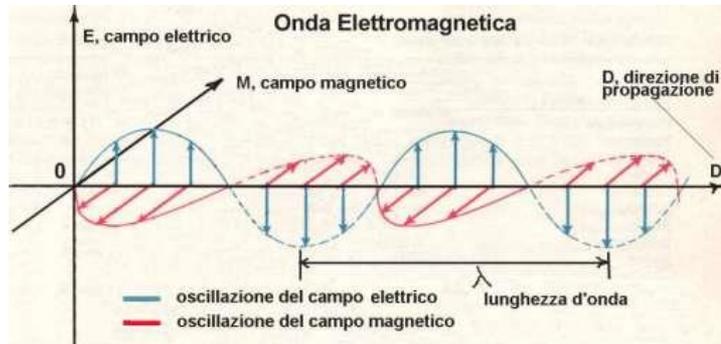
Le molecole e gli atomi possiedono una **energia interna** dovuta a diversi contributi:

$$E_{interna} = E_{nucleo} + E_{elettronica} + E_{traslazionale} + E_{rotazionale} + E_{vibrazionale}$$

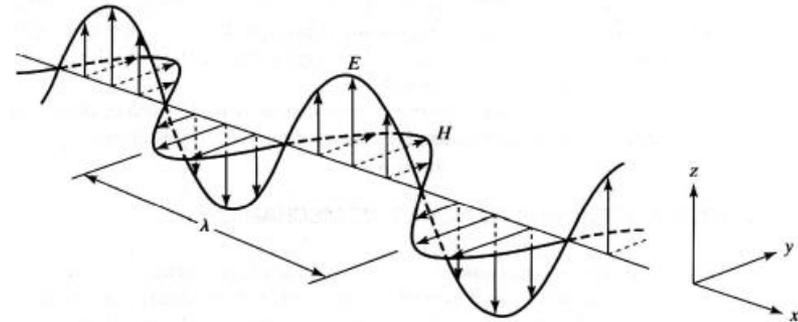
**L'energia della molecola è quantizzata: sono permessi solo determinati livelli energetici.**



**Radiazione elettromagnetica:** energia che si propaga in un mezzo → fenomeno ondulatorio dovuto alla propagazione simultanea nello spazio di un campo elettrico (E) e di uno magnetico (M) perpendicolari tra loro e oscillanti



Fonte: Internet



Sono generate da una qualsiasi carica (es. elettrone) sottoposta ad accelerazione. Ogni onda è caratterizzata da diversi valori, tra cui:

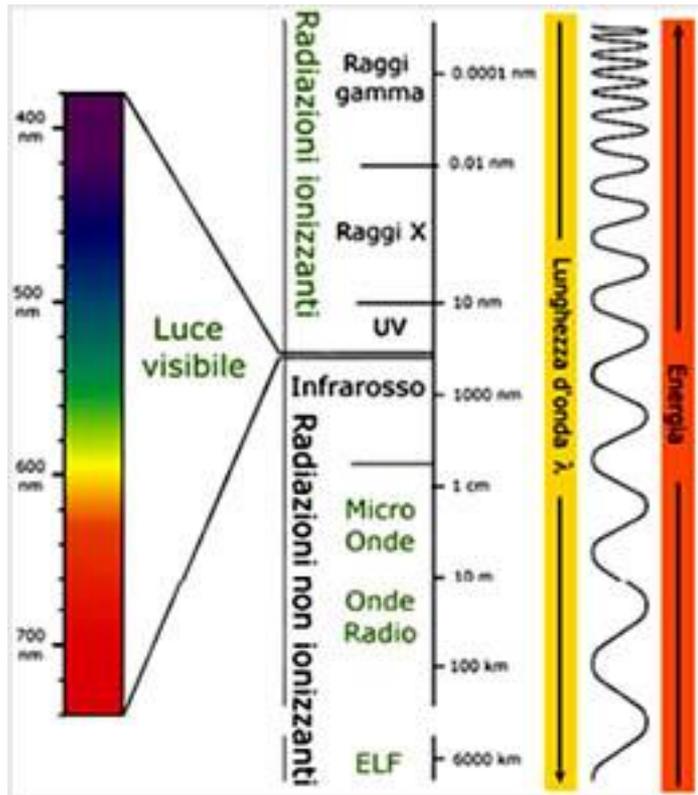
- **Lunghezza d'onda ( $\lambda$ )** → distanza tra due punti in fase tra loro, espressa in nanometri ( $\text{nm} = 10^{-9} \text{ m}$ );
- **Frequenza ( $\nu$ )** → numero di oscillazioni in un punto, nell'unità di tempo (secondo).

Lunghezza d'onda e frequenza sono legate tra loro da una relazione:

$$\lambda = \frac{c}{\nu}$$

$c = \text{velocità luce} = 300000 \text{ Km/s}$   
(o  $3 \cdot 10^8 \text{ m/s}$ )

L'insieme di tutte le radiazioni elettromagnetiche costituisce lo **spettro elettromagnetico**.



Fonte: Internet

La somma di tutte le radiazioni elettromagnetiche visibili corrisponde allo **spettro visibile (380 nm – 780 nm)** → **luce bianca** (o policromatica).

Ogni onda elettromagnetica ha una energia direttamente proporzionale alla frequenza, definita dalla legge di Planck:

$$E = h * \nu = h * \frac{c}{\lambda}$$

dove h = costante di Planck.

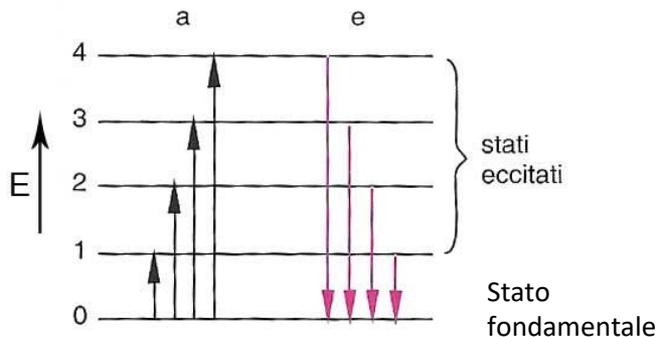
Ogni fotone (elettrone) ha una quantità di energia discreta che dipende dalla frequenza, e quindi dalla lunghezza d'onda, dell'onda associata.

**Alta Frequenza = alta Energia oppure, bassa Lunghezza d'Onda = alta Energia**

# Interazione Radiazione elettromagnetica-Materia

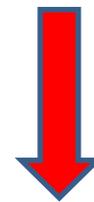
L'interazione della radiazione elettromagnetica con la materia può portare a:

- *Deviazione della luce da parte della materia* (scattering, riflessione, rifrazione, diffrazione).
- *Assorbimento* → energia trasferita dall'onda alla materia.



Fonte: Principi di Metodologia Biochimica, Ed. Piccin, 2009

**Stato fondamentale:** livello energetico più basso della molecola (minor energia interna).



assorbimento  
(eccitazione)



rilassamento

**Stato eccitato:** livello energetico maggiore ed instabile → ritorno spontaneo allo stato fondamentale.

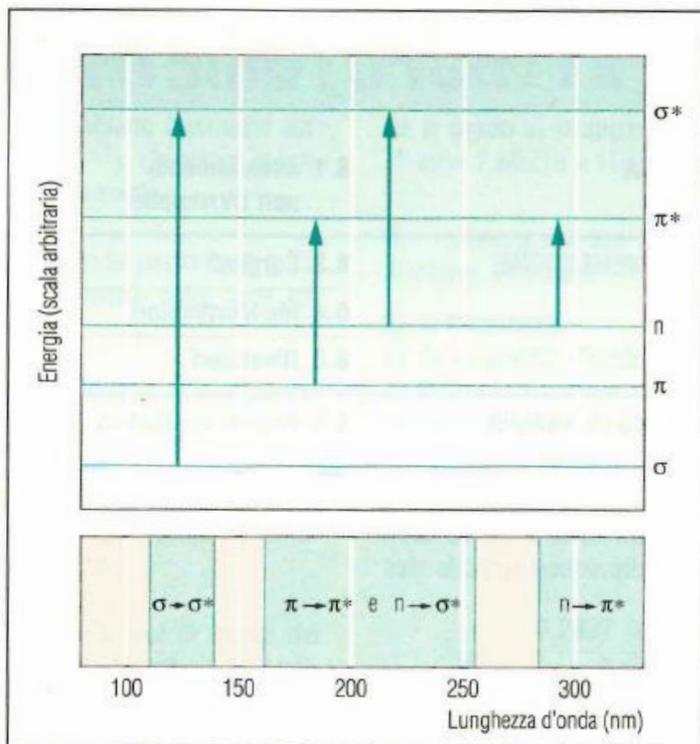
Le specie chimiche accetteranno quantità determinate di energia pari ad  $h\nu$  **se la transizione è permessa!**

Esistono diverse **regole di selezione per la spettroscopia UV-VIS**, regole che identificano se una transizione elettronica è probabile o meno.

### Prima regola di selezione

in corrispondenza di una transizione energetica, la materia deve comportarsi come un **dipolo elettrico oscillante** (es. come la radiazione elettromagnetica) (*regola di selezione generale*) → **ridistribuzione di carica**.

### Energie orbitali molecolari e transizioni



Le più comuni transizioni energetiche **ELETTRONICHE** sono:

	TIPO DI TRANSIZIONE	LUNGHEZZA D'ONDA DELLA RADIAZIONE NECESSARIA PER OTTENERE LA TRANSIZIONE	La $\lambda$ necessaria per la transizione è tanto maggiore quanto minore è il dislivello energetico
1	$\sigma \rightarrow \sigma^*$	110 – 135 nm	
2	$\pi \rightarrow \pi^*$	160 – 255 nm	
3	$n \rightarrow \sigma^*$	> 285 nm	
4	$n \rightarrow \pi^*$	> 285 nm	

Le transizioni elettroniche che di solito si studiano in UV-VIS vanno dalla 2 alla 4 e avvengono a partire da orbitali di legame o **non legame** (buona parte sono proibite da regola di selezione).

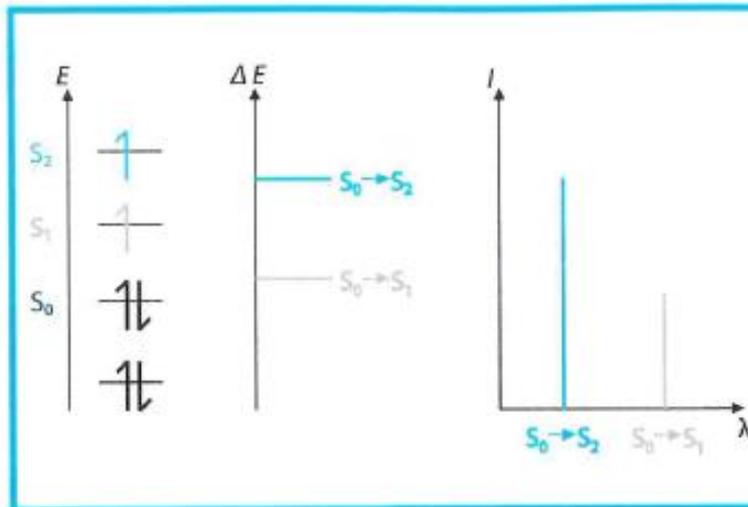
# Riassumendo...

La transizione energetica avviene solo se la materia riceve esattamente l'energia necessaria e se è permessa.

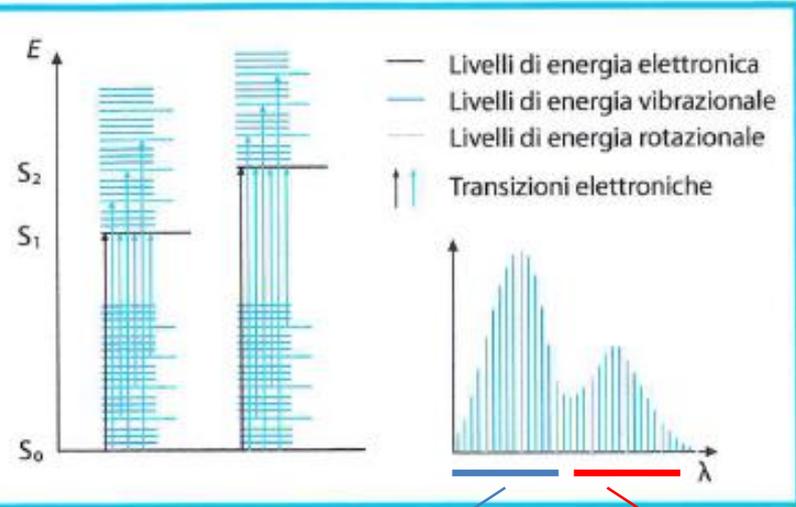
Tutti gli atomi di un elemento danno luogo alle stesse transizioni energetiche indipendentemente dalla matrice.

Ogni gruppo funzionale assorbe sempre (con buona approssimazione) ad una lunghezza d'onda caratteristica → **CROMOFORI!!!**

## Es. Elio



## Molecola complessa



Fonte: Metodologie Biochimiche, Ed. Casa Editrice Ambrosiana, 2012

$S_0 \rightarrow S_2$

$S_0 \rightarrow S_1$

# Spettroscopia di assorbimento UV/Visibile

Valuta l'assorbimento selettivo della radiazione elettromagnetica con lunghezza d'onda compresa tra 10 nm e 780 nm

UV lontano: 10 - 200 nm (poco usato)

UV vicino: 200 - 380 nm

Visibile: 380 - 780 nm

**Legge di Lambert-Beer:** La quantità di energia luminosa assorbita è proporzionale al numero di molecole che la radiazione incontra sul suo cammino

$$A = \epsilon_{\lambda} * b * c$$

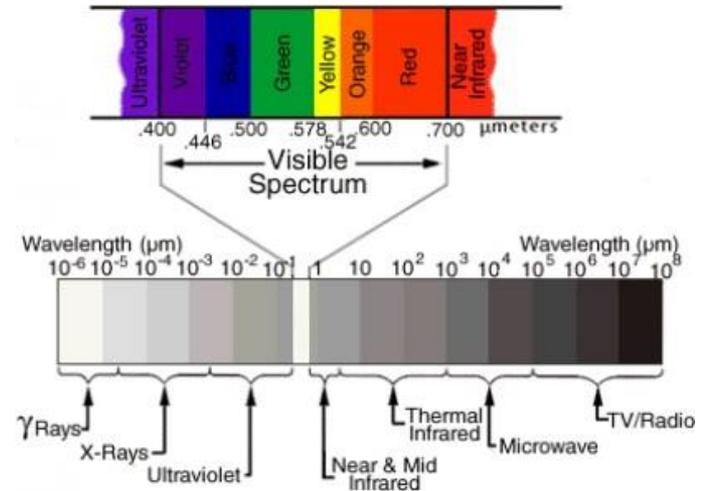
In cui:

A = assorbanza

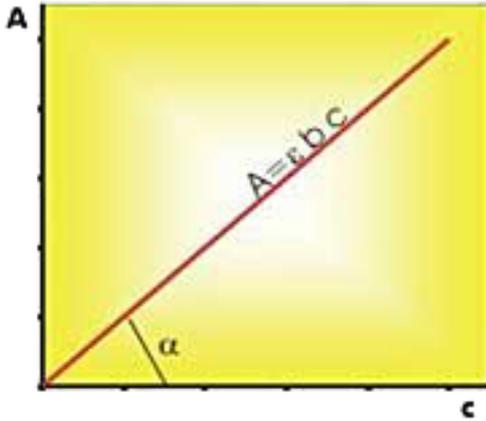
b = cammino ottico (in cm)

c = concentrazione della soluzione

$\epsilon$  = coefficiente di estinzione alla lunghezza d'onda considerata



Fonte: Internet



Fonte: Internet

In genere  $b$  è unitario e fisso, quindi c'è una proporzionalità diretta tra  $A$  e  $c$  → se mettiamo in grafico si ha una retta!

Il suo coefficiente angolare rappresenta  $\epsilon$

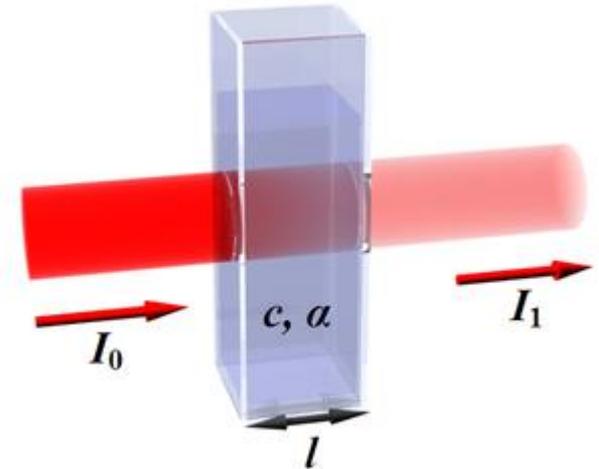
Un'altra grandezza utile per esprimere l'assorbimento è la Trasmittanza → rapporto tra luce emergente dal campione ( $I$ ) e luce incidente ( $I_0$ ).

$$T = \frac{I}{I_0} \rightarrow \text{in percentuale} \rightarrow T_{\%} = \frac{I}{I_0} * 100$$

Mentre  $T\%$  varia da 0 a 100,  $A$  può assumere qualsiasi valore  $> 0$  (in genere, però,  $< 2$  o  $3$  a causa di limitazioni strumentali).

$T$  ed  $A$  sono collegate tra loro:

$$A = \log \frac{1}{T} = \log \frac{I_0}{I}$$



Fonte: Internet

# Spettrofotometro

Gli strumenti usati per misurare l'assorbimento della luce da parte di soluzioni sono detti **spettrofotometri**.

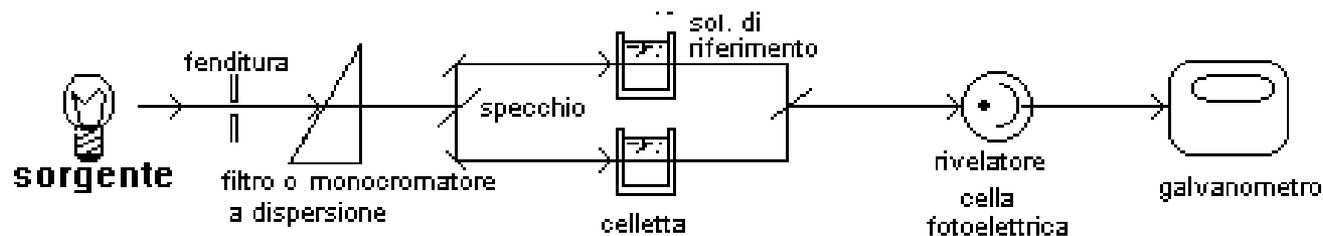
Hanno diversi elementi:

- Sorgente di luce
- Monocromatore
- Compartimento campioni (porta cuvette)
- Rivelatore
- Indicatore del segnale



Fonte: Internet

Schema a blocchi di uno spettrofotometro



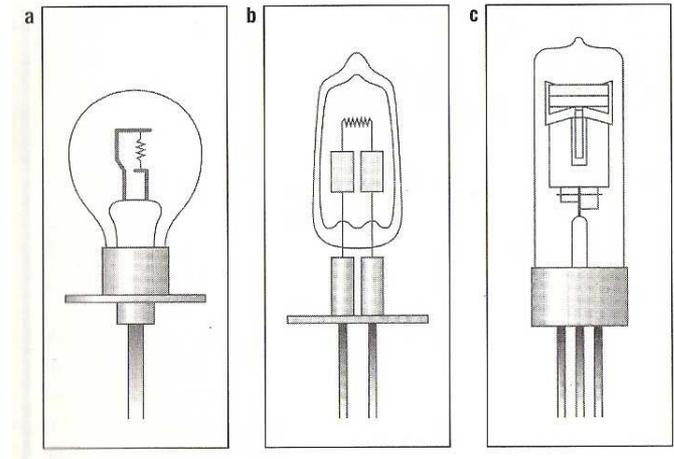
Fonte: Internet

# Sorgente di Luce

Le lampade possono emettere nel visibile o nell'UV.

**VISIBILE:** lampade a filamento di tungsteno ( $\lambda$  330 nm – 930 nm). Migliori sono le lampade tungsteno-alogeno, con energie più elevate e maggior durata.

**UV:** lampade al deuterio, in cui il bulbo di quarzo è riempito di deuterio. Emette uno spettro continuo di radiazioni al di sotto dei 400 nm.



Fonte: Analisi chimica strumentale, Ed. Zanichelli, 2000

a: lampada tungsteno.

b: lampada tungsteno-alogeno

c: lampada deuterio

I porta-campioni vengono chiamati cuvette. Si usano cuvette diverse a seconda della regione spettrale in cui leggere il campione:

visibile → cuvette di vetro o plastica.

UV → cuvette di quarzo (non assorbono la radiazione UV).



vetro  
(OS)



quarzo  
(QS)

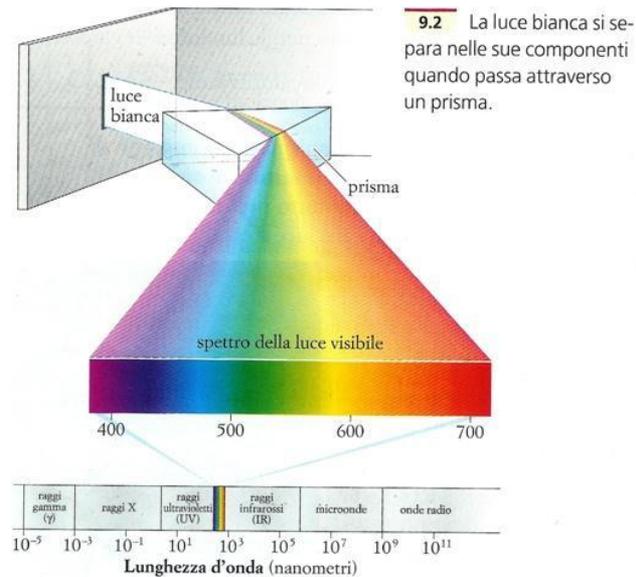
# Monocromatori

La luce policromatica viene «scomposta» in luce monocromatica (il più possibile) da un monocromatore.

Luce monocromatica → luce ad una particolare  $\lambda$

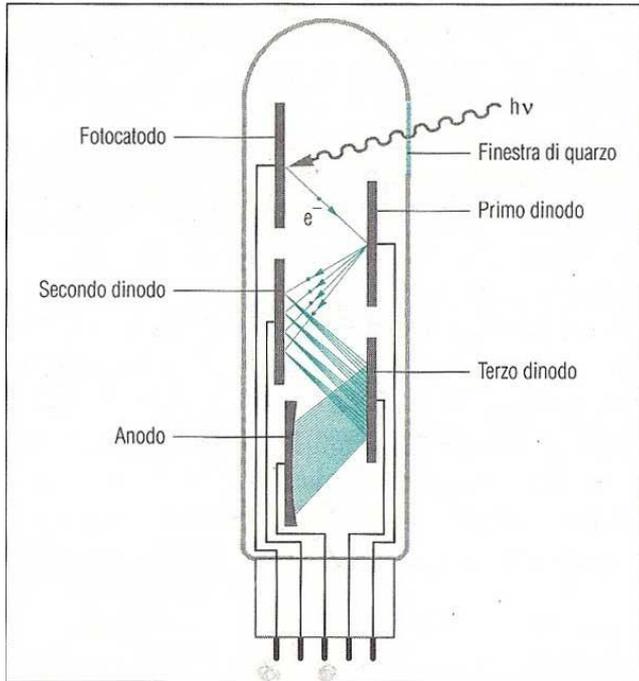
Due tipi principali di monocromatori:

- filtri, assorbono parte della radiazione luminosa, facendo passare quella di interesse.
- prismi e reticoli, separano la luce per rifrazione o diffrazione nelle componenti monocromatiche.



# Rivelatore

I più usati (e i migliori) sono i fotomoltiplicatori.



Fonte: Analisi chimica strumentale, Ed. Zanichelli, 2000

## Funzionamento

Gli elettroni emessi dal catodo illuminato vengono accelerati da un campo elettrico → acquistano energia.

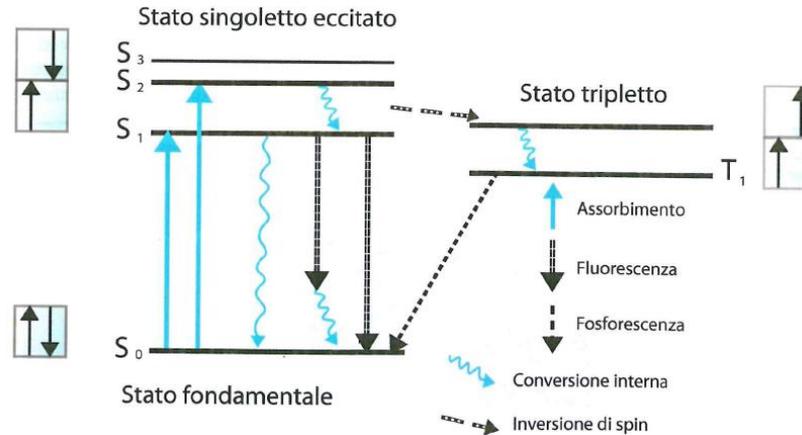
Quando colpiscono un'altra superficie elettronicamente attiva (**dinodo**) liberano elettroni in numero maggiore rispetto a quelli iniziali (sfruttando l'effetto fotoelettrico).

Facendo accadere questi passaggi più volte, si amplifica il segnale: es. dopo 9 passaggi il fotone iniziale è stato amplificato di un fattore  $10^6$ .

L'uso dei fotomoltiplicatori permette di osservare anche alti assorbimenti della radiazione incidente.

# Fluorescenza e fluorimetria

Alcune molecole sono in grado di emettere luce visibile, in seguito ad una eccitazione.



Fonte: Metodologie Biochimiche, Ed. Casa Editrice Ambrosiana, 2012

L'assorbimento di un quanto di energia radiante ( $h\nu$ ) porta la molecola dallo stato fondamentale ad uno eccitato.

Lo stato eccitato è instabile  $\rightarrow$  ritorna al livello di partenza disperdendo energia

Una parte di energia assorbita viene persa, mentre una parte viene emessa come luce che possiede perciò una energia minore rispetto a quella usata per l'eccitazione (quindi maggior lunghezza d'onda).

Fluorimetria molecolare  $\rightarrow$  tecnica analitica utile per rivelare quantità piccolissime di sostanza fluorescente. E' **più sensibile della spettrofotometria**.