

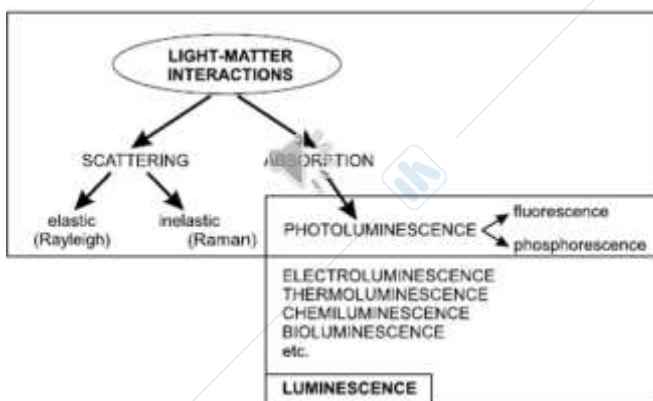
## FOTOLUMINESCENZA E RISONANZE MAGNETICHE: APPLICAZIONI IN CHIMICA INORGANICA E METALLORGANICA

Focus del corso: interazione radiazione elettromagnetica e materia.

Luminescenza: processo di emissione di luce visibile, ultravioletta o infrarossa da specie in stato elettronico eccitato. La luminescenza è luce fredda (non si usa temperatura per eccitare le molecole in questione = non è un processo termico) mentre l'incandescenza è luce calda.

I vari tipi di luminescenza sono classificati secondo la modalità di eccitazione; per esempio si può avere FOTOLUMINESCENZA = lo stato eccitato è raggiunto tramite l'assorbimento di fotoni oppure la CHEMILUMINESCENZA = lo stato eccitato è stato raggiunto tramite reazione chimica.

Il nostro sistema parte dal trovarsi nello stato fondamentale e passa tramite assorbimento di rad elettromagnetica allo stato eccitato; da qui può scegliere diversi cammini per tornare allo stato elettronico fondamentale emettendo fotoni. L'assorbimento è uno degli eventi possibili quando la materia incontra la radiazione elettromagnetica ma non è l'unica. Se non ho assorbimento di radiazione ho invece deviazione del cammino della radiazione elettromagnetica che però mantiene la sua natura energetica (ciò vale per l'ottica lineare e non per l'ottica non lineare). La deviazione avviene tramite diffusione, riflessione, rifrazione ecc. Quindi all'interno della diffusione abbiamo SCATTERING che può essere elastico (l'energia della radiazione non varia) oppure anelastico (raman, l'energia della radiazione cambia)



Se ho fotoluminescenza posso avere fluorescenza o fosforescenza

### Fotofisica vs fotochimica

Posso avere fotoluminescenza di molecole organiche oppure inorganiche. Noi ci occuperemo di fotofisica dei complessi dei metalli di transizione e dei lantanidi. La molecola ha UN SOLO stato fondamentale ma può andare a popolare diversi stati eccitati raggiungibili mediante assorbimento di radiazione elettromagnetica. La reattività chimica di una molecola negli stati eccitati è diversa da quella della molecola nello stato fondamentale.

La fotofisica molecolare riguarda l'interazione della luce con le molecole con conseguente cambiamento fisico netto (noi tratteremo questa). La fotochimica molecolare riguarda l'interazione della luce con le molecole con conseguente cambiamento chimico netto.

L'eccitazione della luce provoca cambiamenti nella struttura elettronica di una molecola, cosicché ogni tipo di stato eccitato ha una propria struttura elettronica, diversa da quella dello stato del suo. Poiché le proprietà chimiche e fisiche di una molecola dipendono dalla sua struttura elettronica, ogni stato eccitato ha le sue proprietà chimiche e fisiche. Numerosi dati sperimentali e studi teorici hanno dimostrato che è proprio questo il caso.

Se il  $\Delta E$  è grande allora l'unico stato popolato è quello fondamentale; per popolare quelli eccitati devo scaldare.

## Concetti di base

La molteplicità di spin è fondamentale che è calcolata come  $2S + 1$  dove S è il numero quantico totale di spin.

Due elettroni appaiati, quindi con spin opposto, danno origine ad uno **stato di singoletto** mentre due elettroni con uguale numero quantico di spin danno origine ad uno **stato di tripletto**. La maggior parte delle molecole organiche si trova in uno stato fondamentale di singoletto e può avere stati eccitati di singoletto o tripletto (quindi posso avere mantenimento o inversione dello spin) mentre per i complessi o le specie con ioni lantanidi la varietà delle molteplicità di spin varia molto e non abbiamo solo tripletto o singoletto.

Regione elettromagnetica che ci interessa è quella dell'UV, del visibile e del vicino infrarosso (dai 200 ai 1000 nm)

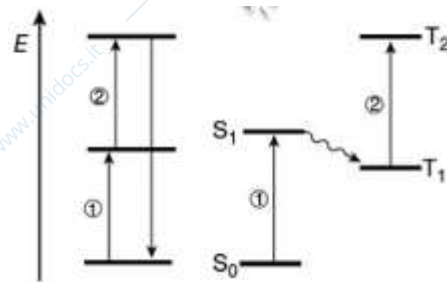
Sono 3 i processi che permettono il salto della molecola tra due suoi stati quantici diversi:

- **Assorbimento** → passaggio da stato elettronico a più bassa energia verso uno a più alta energia. Ci sono due leggi fondamentali alla base dell'assorbimento cioè quella di **Grotthuss – Draper** che ci dice che solo la radiazione assorbita da un'entità chimica comporta una trasformazione fotochimica del sistema mentre ci può essere il caso in cui la radiazione viene perturbata ma il sistema NON è trasformato fotochimicamente. L'altra legge è quella di **Stark – Einstein** e ci dice che l'assorbimento è ad un fotone (non è strettamente rigoroso poiché esistono processi multifotonici in cui la molecola assorbe simultaneamente o sequenzialmente più fotoni; ciò avviene se la sorgente è molto intensa ad es. il laser).
- Emissione spontanea
- Emissione stimolata → è alla base del meccanismo di funzionamento dei **laser**

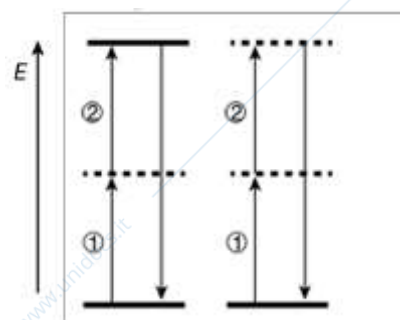
## Processi multifotonici

Ad intensità di luce sufficientemente elevate una molecola può assorbire più di un fotone. I processi multifotonici diventano sempre più improbabili man mano che aumenta il numero di fotoni necessari. L'eccitazione bifotonica può avvenire secondo due meccanismi diversi e per entrambi lo stato INTERMEDIO NON è proprio del sistema mentre quello iniziale e finale sì.

*Eccitazione sequenziale:* il primo fotone viene assorbito con la formazione di uno stato eccitato, poi viene assorbito un altro fotone che quindi si trova già in uno stato eccitato. Alternativamente, lo stato eccitato intermedio subisce la disattivazione ad uno stato eccitato di tripletto che assorbe il secondo fotone. I due fotoni possono avere energia uguale o diversa. Questa situazione può riguardare una sola molecola o più molecole dove una fa da sensibilizzatore delle altre. *Qui lo stato di vita del sistema dipende da quanto a lungo riesce a rimanere il primo fotone nello stato eccitato.*



*Eccitazione simultanea:* assorbimento di due fotoni contemporaneamente. *Dipendono maggiormente dall'intensità della radiazione rispetto a quelli sequenziali.* Fenomeno più dipendente dall'intensità della radiazione incidente rispetto a quello sequenziale. Il primo fotone eccita la molecola ad uno stato eccitato; solo se il secondo fotone arriva entro la durata della prima interazione (ca.  $10^{-16}$  s) può essere assorbito. I due fotoni possono avere frequenze identiche o diverse e la somma delle loro energie è



uguale alla differenza di energia tra lo stato fondamentale e gli stati eccitati. Di solito si manifesta per assorbimento di energia emessa da una fonte laser.

Nei processi a due fotoni, il tasso di assorbimento della luce da parte di una molecola dipende dal quadrato dell'intensità della luce.

In questi casi la radiazione emessa ha energia **MAGGIORE** di quella incidente (quindi lunghezza d'onda minore) → **PARTICOLARITA'** poiché per i processi ad assorbimento di 1 fotone è il contrario

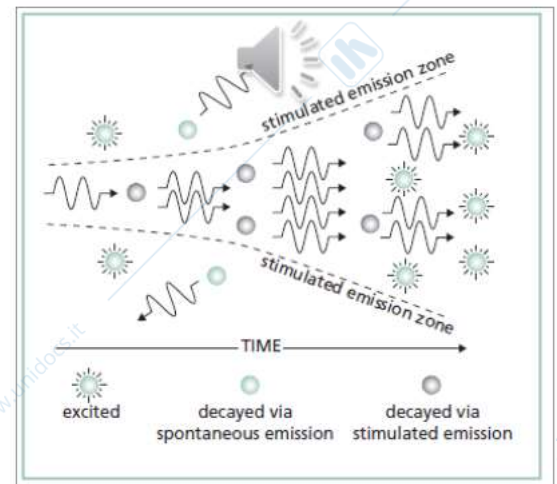
### Processi di assorbimento di UN fotone

Una volta che la molecola si trova nello stato eccitato può rimettere radiazione in maniera spontanea o stimolata

- **Emissione spontanea:** è la molecola o le molecole che emettono quando vogliono emettere. I fotoni emessi **non sono coerenti** cioè vengono emessi con tempi diversi e in direzioni diverse
- **Emissione stimolata:** arriva il fotone stimolante mentre la molecola è nello stato eccitato, si forma il fotone stimolato che è **coerente** in tutto e per tutto con il fotone stimolante. Il fotone stimolante deve avere l'energia corrispondente al salto quantico tra i due livelli che la molecola compie (pari al  $\Delta E$ ).

La seconda emissione (quella stimolata) è alla base del meccanismo di funzionamento dei laser. Si consideri il gruppo di atomi mostrato in figura: tutti iniziano esattamente nello stesso stato eccitato, e la maggior parte sono effettivamente all'interno della gamma di stimolazione di un fotone di passaggio. Supponiamo inoltre che la  $t$  sia molto lunga e che la probabilità di emissione stimolata sia del 100 per cento.

Il fotone in ingresso (stimolante) interagisce con il primo atomo, causando l'emissione stimolata di un fotone coerente; questi due fotoni poi interagiscono con i due atomi successivi in linea, e il risultato è quattro fotoni coerenti, lungo la linea. Alla fine del processo, avremo molti fotoni coerenti, tutti con fasi identiche e tutti viaggiano nella stessa direzione. In altre parole, il fotone iniziale è stato "amplificato". Si noti che l'energia per mettere questi atomi in stati eccitati è fornito esternamente da qualche fonte di energia che di solito è indicato come la "pompa" fonte.



**I laser sono dispositivi che producono intensi fasci di luce monocromatici, coerenti e altamente collimati.** La lunghezza d'onda (colore) della luce laser è estremamente

pura (monocromatica) rispetto ad altre fonti di luce, e tutti i fotoni (energia) che compongono il raggio laser hanno una relazione di fase fissa (coerenza) rispetto all'altro. La luce di un laser ha tipicamente una divergenza molto bassa. Può viaggiare su grandi distanze o può essere messo a fuoco ad un punto molto piccolo con una luminosità che supera di queste proprietà, i laser un'ampia gamma di settori della vita.

**Luce normale**



BASSA DIREZIONALITA'  
BASSA MONOCROMATICITA'  
BASSA COERENZA  
BASSA POTENZA

**Luce laser**



ALTA DIREZIONALITA'  
ALTA MONOCROMATICITA'  
ALTA COERENZA  
ALTA POTENZA

**Due "ingredienti"**

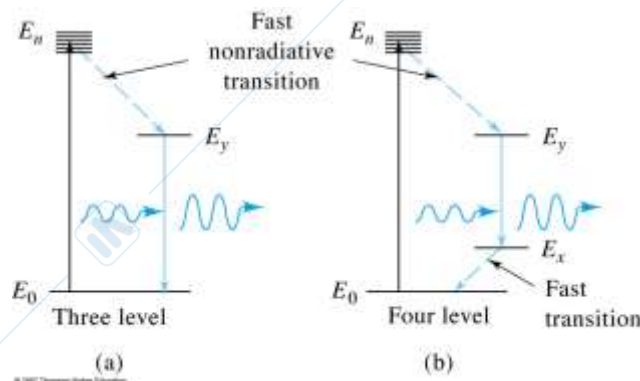
- IL MECCANISMO DI EMISSIONE  
(Emissione Stimolata vs. Emissione Spontanea)  
- LA CAVITA' OTTICA RISONANTE

## Fasi di funzionamento di un laser

La prima fase è il pompaggio (di solito lo faccio con energia ottica con una lampada a flash intenso) che può essere fatto per esempio con una sorgente ottica esterna; esso serve per poter portare popolazione dallo stato  $E_0$  (fondamentale) allo stato eccitato ( $E_n$ ). Mi servono sistemi che siano a più di due livelli (tre o quattro) perché una volta popolato tutto lo stato eccitato è come se avessi uguale popolazione nello stato fondamentale e in quello eccitato quindi sono ad un punto morto.

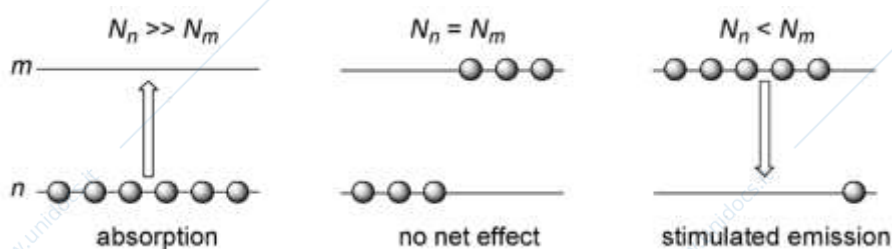
In un laser a tre livelli lo stato  $E_n$  si depopola facilmente per popolare in modo NON radiativo lo stato  $E_y$ .  $E_y$  è **uno stato metastabile** cioè ha un tempo di vita sufficientemente lungo per permettere l'inversione di popolazione rispetto a  $E_0$ . Si popola facilmente e si svuota difficilmente. Quando lo stato  $E_0$  è depopolato per più della metà della sua popolazione ho INVERSIONE DI POPOLAZIONE e **il materiale se inserito all'interno di un'opportuna cavità ottica può compiere la sua attività laserante che corrisponderà al passaggio da  $E_y$  a  $E_0$** . Quindi non essendo coinvolto lo stato fondamentale è più facile l'inversione di popolazione rispetto ad un laser a tre livelli.

In un laser a quattro livelli invece ho uguale situazione fino alla popolazione di  $E_y$  ma da lì poi la radiazione laserante coinvolge gli stati  $E_y$  e  $E_x$ . Quindi non essendo coinvolto lo stato fondamentale è più facile l'inversione di popolazione rispetto ad un laser a tre livelli.



Per la legge di distribuzione di Boltzmann lo stato elettronico fondamentale è l'unico popolato a T ambiente. Lo stato di partenza sarà anche quindi il livello vibrazionale fondamentale dello stato elettronico fondamentale perché è il più popolato per la legge di distribuzione di Boltzmann quindi a questo punto parliamo di PIU popolato e non di UNICO popolato perché il  $\Delta E$  vibrazionale è molto minore del  $\Delta E$  elettronico.

Il fotone stimolante che ha energia pari al salto  $m-n$  può dare assorbimento o emissione stimolata, quindi le due sono in competizione. *Perché si abbia intensificazione del segnale l'emissione stimolata deve prevalere sull'assorbimento che invece attenua la radiazione.* Ricordando che all'equilibrio termico lo stato più popolato è quello fondamentale allora possiamo dire che generalmente prevarrà l'assorbimento; per far prevalere l'emissione stimolata si deve  $>$  la popolazione dello stato  $m$  rispetto a quello  $n \rightarrow$  devo creare un'inversione di popolazione.



## Basi fisiche dell'assorbimento della luce

Quando un fotone, ad es. un campo elettromagnetico oscillante, incontra un cromoforo che possiede stati elettronici quantizzati può essere assorbito e la sua energia trasferita ad un elettrone per partecipare ad una transizione elettronica.  $E_{\text{photon}} = \Delta E_{\text{electronic transition}} = h\nu$

Quando una mole di molecole assorbe un Einstein (un Einstein è una mole di fotoni) di fotoni, equivale ad un fotone assorbito da una molecola. L'energia di un Einstein di fotoni a 200 nm è di 599 kJ (143 kcal), e quella di un Einstein di fotoni a 1000 nm è di 119.8 kJ (28.6 kcal). La radiazione elettromagnetica che può permettere il salto energetico da uno stato ad energia inferiore ad uno ad energia superiore è quella che va dall'UV al vicino infrarosso.

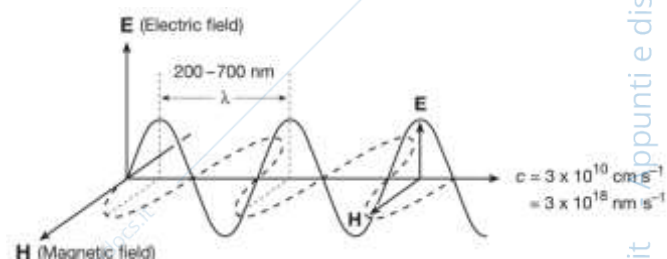
L'energia del singolo fotone è MOLTO IMPORTANTE. Per esempio una lampada rossa intensa è meno pericolosa dal punto di vista della degradazione fotofisica rispetto ad una lampada blu poco intensa.

Questi valori energetici sono dello stesso ordine di grandezza di quelli necessari per rompere i legami chimici (ad esempio, 190 kJmol<sup>-1</sup> per il legame Br-Br di Br<sub>2</sub>; 416 kJmol<sup>-1</sup> per il legame C-H di CH<sub>4</sub>). L'energia che una molecola ottiene quando assorbe un fotone di luce non è quindi affatto trascurabile.

Una molecola può essere promossa dallo stato elettronico di terra ad uno stato eccitato elettronicamente mediante l'assorbimento di un fotone nella condizione necessaria che il cambiamento di energia nella molecola e la frequenza della luce deve essere correlato dalla cosiddetta equazione di Bohr. **Il fatto che sia rispettata la condizione di risonanza è la conditio sine qua non dell'assorbimento ma importanti sono anche le regole di selezione** (vedi più avanti).

$$E_{\text{photon}} = \Delta E_{\text{electronic transition}} = h\nu = E_f - E_i$$

dove  $E_f$  e  $E_i$  sono le energie dello stato eccitato  $\Psi_f$  e dello stato del suolo  $\Psi_i$ , rispettivamente. Inoltre, deve esistere un'interazione specifica tra il campo elettromagnetico e la molecola. Per la maggior parte delle molecole e degli ioni, il campo magnetico può essere ignorato in quanto le transizioni generate dal campo magnetico oscillante sono generalmente molto più deboli (circa 10<sup>5</sup> volte più deboli) delle transizioni di dipolo elettrico. Pertanto, consideriamo l'interazione del vettore elettrico  $E$  dell'onda elettromagnetica e del dipolo elettrico della molecola.



## Classica descrizione dell'assorbimento della luce

Da un punto di vista classico la molecola è costituita da cariche che possono essere messe in movimento dal campo elettrico oscillante della radiazione elettromagnetica. I dipoli elettrici oscillanti della molecola hanno delle frequenze che sono proprie della molecola. Questi dipoli elettrici oscillanti e il campo elettrico oscillante della radiazione elettromagnetica sono visti come due oscillatori armonici accoppiati. Quando le frequenze di oscillazione dei due coincidono, l'energia viene trasferita dal campo della radiazione cioè in altre parole si ha assorbimento di un fotone da parte della molecola; l'intensità di questa interazione dal punto di vista classico è indicato come la forza dell'oscillatore  $F$ .

Nel modello classico il fotone è considerato un campo elettromagnetico oscillante.

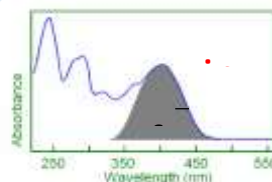
Uno stato eccitato è considerato come un oscillatore armonico, in essenza un dipolo elettronico oscillante. Quando entrambe le oscillazioni condividono la stessa frequenza si dice che siano in risonanza l'una con l'altra = un criterio per l'assorbimento del fotone.

Quando si incontra la risonanza e si verifica una transizione elettronica, l'energia del fotone viene assorbita quantitativamente.

## Forza dell'oscillatore (f): modello classico

Il coefficiente di assorbimento molare,  $\epsilon(\lambda)$ , esprime la capacità di una molecola di assorbire la luce della lunghezza d'onda  $\lambda$  in un dato solvente. **Un coefficiente elevato implica una probabile transizione.** Tuttavia, poiché le bande di assorbimento non sono mai infinitamente strette, un modo più rigoroso per definire la forza di una transizione prevede l'integrazione del coefficiente di assorbimento nell'intervallo di lunghezze d'onda associate alla transizione. Nella teoria classica, l'assorbimento molecolare della luce può essere descritto considerando la molecola come un dipolo oscillante, che consente l'introduzione di una quantità conveniente senza dimensioni chiamata forza dell'oscillatore, direttamente correlata all'integrale della banda di assorbimento come segue:

Il componente integrale corrisponde all'area sotto la curva di assorbimento su un grafico di assorbimento molare vs. numero d'onda ( $\epsilon$  vs.  $\nu$ ).



La forza dell'oscillatore è un rapporto che confronta la forza della transizione con quella di un elettrone legato che si comporta come un perfetto oscillatore armonico ( $f = 1$ ). Per transizioni molecolari forti, i valori di  $f$  sono vicini a 1. Per le transizioni deboli, i valori di  $f$  possono essere di diversi ordini di grandezza inferiori a 1 e inferiori a  $10^{-8}$ .

*Quindi nota la forza dell'oscillatore che è misurabile sperimentalmente essendo l'intensità di assorbimento integrata su tutta la banda, allora possiamo ricavare anche il momento della transizione.*

Una transizione con  $f = 1$ , è nota come transizione totalmente consentita.

Ma le transizioni tra tutti gli stati elettronici, vibrazionali o rotazionali non sono ugualmente consentite. Alcuni sono vietati che possono essere ammessi in determinate condizioni e quindi apparire come fasce di assorbimento deboli. Le regole che regolano tali transizioni sono note come regole di selezione.

L'energia totale ( $E_t$ ) di una molecola nel suo stato fondamentale elettronico (esclusa l'energia traslazionale ed energia nucleare interna) è la somma di tre componenti:  $E_{\text{total}} = E_{\text{electronic}} + E_{\text{vibrational}} + E_{\text{rotational}}$

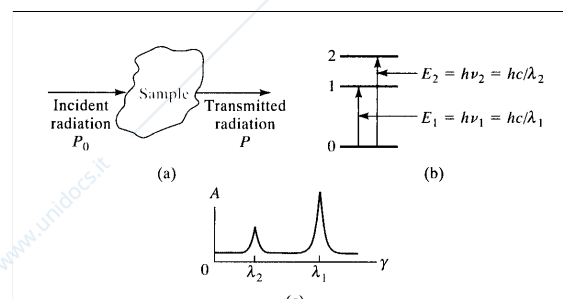
Allo stesso modo, l'energia totale ( $E'$ ) di una molecola in uno stato elettronico eccitato è la somma dei suoi componenti elettronici, vibrazionali e rotazionali:  $E'_{\text{total}} = E'_{\text{electronic}} + E'_{\text{vibrational}} + E'_{\text{rotational}}$

Transizione di assorbimento:  $\Delta E_x = E'_x - E_x$

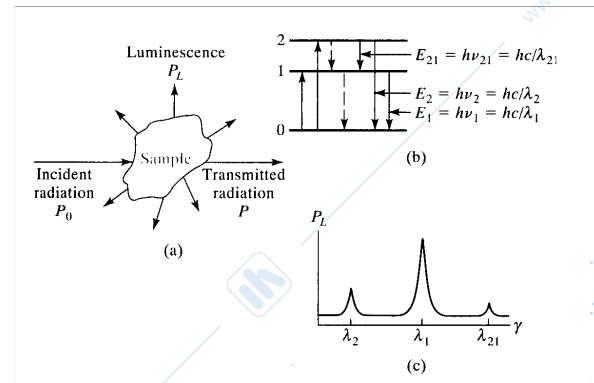
Le transizioni che coinvolgono solo  $\Delta E_r$  ( $\Delta E_e = \Delta E_v = 0$ ) producono lo spettro di assorbimento rotazionale che si verifica nella regione dell'infrarosso lontano. Le transizioni che coinvolgono  $\Delta E_v$  e  $\Delta E_r$  ( $\Delta E_e = 0$ ) producono lo spettro di assorbimento vibrazionale e vibrazionale-rotazionale, che si verifica nella regione del vicino infrarosso. Le transizioni che coinvolgono  $\Delta E_e$  ed  $\Delta E_v$  ( $\Delta E_r$  possono essere trascurate) producono l'elettronica e spettro di assorbimento elettronico-vibrazionale, che si verifica nella regione visibile e ultravioletta. Uno stato che coinvolge energia elettronica e vibrazionale è indicato come stato vibronico e una transizione tra due di tali stati è una transizione vibronica.  $\rightarrow$  in pratica nel processo di fotoluminescenza di un sistema molecolare abbiamo a che fare con transizioni vibroniche cioè TRANSIZIONI ELETTRONICHE + TRANSIZIONI VIBRAZIONALI.

## Spettro di assorbimento + spettro di fotoluminescenza

In uno spettro di assorbimento si utilizza una geometria a  $180^\circ$ ; la radiazione incidente di potenza  $p_0$  colpisce il campione e viene attenuata appunto per effetto dell'assorbimento. Dobbiamo dire che potenza ed intensità vengono usate come sinonimi anche se a rigore non lo sarebbero. Potenza = energia del fascio che raggiunge una certa area per secondo. Intensità = potenza per unità di angolo solido.



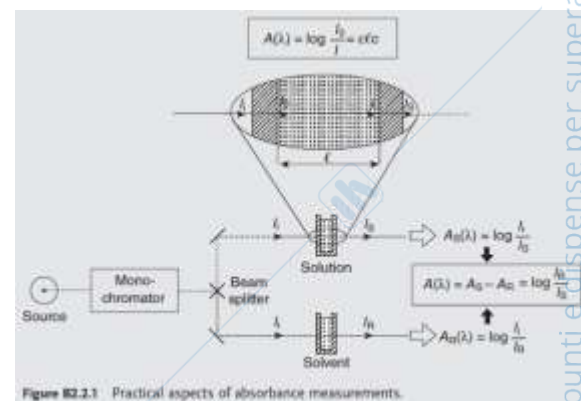
Nella spettroscopia di fotoluminescenza il campione viene eccitato utilizzando una lunghezza d'onda che è in grado di assorbire. Dallo stato eccitato il sistema può rilassare con emissione spontanea e in questo modo i fotoni saranno messi in tutte le direzioni. La geometria più comune (ma non l'unica) di raccolta del segnale emesso è a  $90^\circ$ . La radiazione usata per l'eccitazione che non è diagnostica arriva a  $90^\circ$  solo per diffusione



### Accenni legge di Lambert- Beer

Sono utili per il confronto tra l'assorbimento e la sua controparte cioè la spettroscopia di fotoluminescenza. Entrambe le tecniche a causa della presenza di bande vibroniche larghe nello spettro sono maggiormente adatte ad indagini di tipo quantitativo più che qualitativo. Per ciò nella spettroscopia di assorbimento si usa la legge di Lambert Beer che correla l'assorbanza alla concentrazione. **Per escludere effetti di attenuazione della radiazione a causa di fenomeni spuri cioè non dovuti al campione stesso, nella spettroscopia di assorbimento elettronico si usa una configurazione a doppio raggio.**

L'uso pratico della legge Beer-Lambert merita attenzione. L'assorbanza deve essere caratteristica solo delle specie assorbenti. Pertanto, è importante notare che  $I_0$  è l'intensità del raggio che entra nella soluzione ma non quella del raggio incidente  $I_i$  sulla cuvetta, e  $I$  è l'intensità del raggio che lascia la soluzione ma non quella del raggio  $I_s$  che lascia la cuvetta. In effetti, ci sono alcuni riflessi sulle pareti della cuvetta e queste pareti possono anche assorbire leggermente la luce. Inoltre, si presume che il solvente non abbia alcun contributo, ma può anche essere parzialmente responsabile di una diminuzione dell'intensità a causa della dispersione e del possibile assorbimento.



La legge di Beer-Lambert dimostra una correlazione diretta tra l'assorbanza ( $A$ ) di una molecola alla concentrazione ( $c$ ) e la lunghezza del percorso ( $b$  o  $l$ ) del campione. Questa relazione è per lo più lineare.

### Limitazione e deviazione reali della legge Beer-Lambert

**La legge di Lambert-Beer è una legge limite che funziona per le singole lunghezze d'onda e per le soluzioni diluite.** Tuttavia, in determinate circostanze la relazione Beer Lambert si interrompe e fornisce una relazione non lineare. Queste deviazioni dalla legge Beer Lambert possono essere classificate in tre categorie:

1. **Deviazioni reali** - Queste sono deviazioni fondamentali a causa dei limiti della legge stessa. → es. A causa della radiazione policromatica (anche il motivo per cui le misurazioni dell'assorbanza sono prese alla lunghezza d'onda dell'assorbanza massima  $\lambda_{max}$ ). La legge Beer-Lambert è rigorosamente seguita quando esiste una fonte monocromatica di radiazioni. Dal momento che tutti gli strumenti hanno un passaggio di banda finito, un intervallo di  $l$  viene inviato attraverso il campione. e può essere diverso per ogni  $l$ .
2. **Deviazioni chimiche** - Queste sono deviazioni osservate a causa di specifiche specie chimiche del campione che viene analizzato.
3. **Deviazioni strumentali** - Queste sono deviazioni che si verificano a causa di come vengono eseguite le misurazioni dell'assorbanza. → Se le celle che trattengono l'analita e le soluzioni in bianco hanno lunghezze del percorso diverse o caratteristiche ottiche disuguali, è ovvio che ci sarà una deviazione osservata nella legge di Beer-Lambert.

La legge di Lambert Beer è in grado di descrivere il comportamento di assorbimento di soluzioni contenenti quantità relativamente basse di soluti disciolti in essa (<10mM). Quando la concentrazione dell'analita nella soluzione è elevata (> 10mM), l'analita inizia a comportarsi diversamente a causa delle interazioni elettrostatiche tra molecole nelle immediate vicinanze.

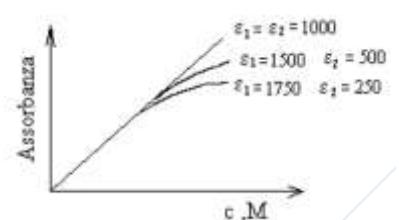
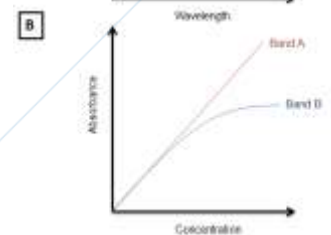
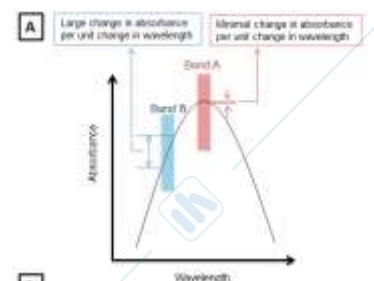
Ad alte concentrazioni, le molecole di soluto possono causare una diversa distribuzione della carica sulle specie vicine nella soluzione. Poiché l'assorbimento visibile ai raggi UV è un fenomeno elettronico, alte concentrazioni potrebbero comportare uno spostamento della lunghezza d'onda di assorbimento dell'analita. Alcuni grandi ioni o molecole mostrano deviazioni anche a concentrazioni molto basse. Ad es. l'assorbimento del blu di metilene a 436 nm non riesce a osservare la legge di Beer Lambert anche a concentrazioni di soli 10  $\mu$ M.

Alte concentrazioni di analiti possono anche alterare l'indice di rifrazione ( $\eta$ ) della soluzione che a sua volta potrebbe influenzare l'assorbanza ottenuta. Se l'aggiunta di soluto provoca un cambiamento significativo nell'indice di rifrazione della soluzione, è possibile posizionare una correzione alla formula di Beer Lambert come:

$A = \epsilon bc\eta / (\eta + 2)^2$  Questa correzione non è normalmente richiesta al di sotto delle concentrazioni di 10mM.

Rispetto al grafico a parità di banda passante del monocrromatore l'analisi quantitativa condotta in A è più corretta che in B perché in B il coefficiente di estinzione molare varia molto all'interno della banda.

Quindi le analisi quantitative devono essere condotte sul massimo di una banda di assorbimento questo per ragioni di sensibilità e perché questo punto è un punto in cui si hanno piccole variazioni di nel valore della  $\epsilon$ .



### Meccanica quantistica (tempo - teoria della perturbazione dipendente)

Modello più completa in cui si considera che il passaggio tra uno stato e l'altro dipenda dal momento di dipolo della transizione; il dipolo della transizione è diverso dal dipolo della molecola nei due stati coinvolti. E' di fatto un dipolo transiente che esiste per la durata della transizione.

Il momento di transizione dipolo ( $M_{fi}$ ) dura solo per la durata della transizione elettronica e sorge a causa del processo di spostamento degli elettroni durante la transizione. Il momento di transizione rappresenta il dipolo transitorio risultante dallo spostamento delle cariche durante la transizione; pertanto, non è strettamente un momento dipolo.  $M_{fi} = \int \mathbf{Y}_f \boldsymbol{\mu} \mathbf{Y}_i dt = \langle \mathbf{Y}_f \boldsymbol{\mu} \mathbf{Y}_i \rangle$  (integrale del momento della transizione e la probabilità che il sistema passi dallo stato iniziale  $\Psi_i$  a quello finale  $\Psi_f$  è proporzionale al quadrato della transizione).

$\Psi_f$  and  $\Psi_i$  sono le funzioni d'onda degli stati coinvolti, l'integrazione corre su tutto lo spazio di configurazione delle coordinate  $3N$ , e  $\mu$  è l'operatore dipolo momento ( $\mu = \sum e r_j$ , dove  $r_j$  è il vettore che unisce l'elettrone  $j$  all'origine di un sistema di coordinate collegato alla molecola).

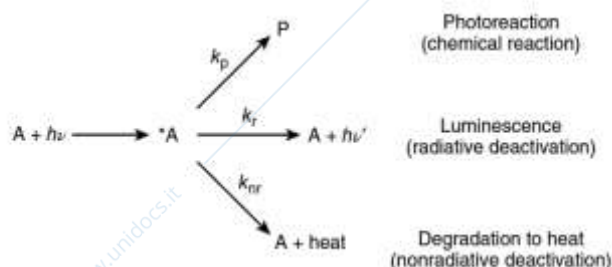
È interessante notare che esiste una relazione tra la forza dell'oscillatore  $f$  e il quadrato dell'integrale del momento di transizione, che colma il divario tra gli approcci meccanici classici e quantistici.

$$f \propto M_{fi}^2$$

$$f = \frac{8\pi^2 m c}{3 h e^2 \lambda_{av}} |M_{12}|^2$$

## Resa quantica e tempo di vita

Step essenziali per l'interazione luce-materia



Una volta che ha raggiunto lo stato eccitato la disattivazione radiativa è solo uno dei cammini che la molecola può perseguire per tornare ad uno stato a più bassa energia; ad esempio se consideriamo solo processi unimolecolari la molecola potrebbe dare reazioni chimiche come disattivazione radiativa oppure NON radiativa. Questi processi che sono governati dalle loro costanti di velocità sono in competizione fra loro.

L'unica misura significativa della reattività allo stato fondamentale di una molecola, rispetto a una determinata reazione, è la costante di velocità o la velocità specifica della reazione. Lo stesso vale per la molecola eccitata, tranne per il fatto che, in tal caso, di solito vi è una concorrenza tra diversi processi e le costanti di velocità possono essere ottenute solo indirettamente dalla misurazione delle quantità correlate. Gli aspetti quantitativi delle conseguenze dell'eccitazione della luce possono essere facilmente discussi all'interno del paradigma più semplice e più comune che una molecola assorbe un fotone e l'ipotesi che la disattivazione dello stato eccitato avvenga per mezzo di una chimica unimolecolare concorrente (costante di velocità  $k_p$ ) e processi fisici radiativi ( $k_r$ ) e non radiativi ( $k_{nr}$ ).

Secondo la figura, lo stato eccitato decade con cinetica generale di primo ordine; la sua vita  $\tau(*A)$  (che rappresenta il tempo necessario per ridurre il numero di molecole che popolano lo stato eccitato a  $1/e$  del suo valore iniziale cioè quello immediatamente raggiunto all'atto dell'impulso) è dato da:

$$\tau(*A) = \frac{1}{k_p + k_r + k_{nr}} = \frac{1}{\sum_j k_j}$$

La probabilità di ogni processo di disattivazione è correlata al suo tasso relativo (in pratica il meccanismo più veloce è di fatto il più probabile). Per ogni processo dello stato  $*A$  eccitato, una efficienza  $\eta_i(*A)$  (la probabilità che  $A^*$ , una volta formata, subisca tale processo) può essere definita come segue:

$$\eta_i(*A) = \frac{k_i}{\sum_j k_j} = k_i \tau(*A)$$

Per ogni processo che comporta l'assorbimento della luce possiamo definire il resa quantica ( $\Phi_i$ ) (= collega il processo di disattivazione all'atto primario di formazione dello stato eccitato, cioè l'assorbimento) come:

$$\Phi_i = \frac{\text{Number of molecules undergoing that process}}{\text{Number of photons absorbed by the reactant}}$$

Se lo stato eccitato  $*A$  raggiunto direttamente dall'irradiazione dà luogo a  $n$  processi, la resa quantica di uno specifico processo  $i$  è dato dal rapporto della costante di velocità (cioè la reattività) di tale processo alla somma dei tassi di tutti i processi  $n$  che disattivano lo stato eccitato:

$$\Phi_i = \frac{k_i}{\sum_j k_j}$$

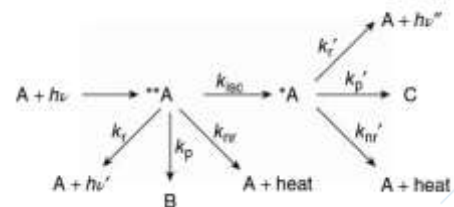
Se lo stato eccitato  $*A$  è raggiunto direttamente per assorbimento, ne consegue che:

$$\Phi_i = k_i \tau(*A) = \eta_i(*A)$$

Pertanto, la resa quantica coincide numericamente con l'efficienza quantica del processo e quindi il suo valore deve variare da zero a unità. Per esempio se lo stato  $S_1$  è stato raggiunto per assorbimento e  $S_1$  rilassa con meccanismo fluorescente, allora la resa quantica di fluorescenza coincide con l'efficienza di fluorescenza. Questa equazione mostra anche che la costante di velocità del processo  $i$  può essere ottenuta dalla resa quantica misurata sperimentalmente e dalla durata dello stato eccitato.

$$k_i = \frac{\Phi_i}{\tau(*A)}$$

Rappresentazione schematica dei processi di disattivazione di due stati eccitati, in cui lo stato  $*A$  eccitato è popolato da intersistema che attraversa dalla posizione superiore  $**A$  eccitato.



Se lo stato eccitato  $*A$  è popolato seguendo uno o più passi non radiativi da altri stati eccitati (ad esempio,  $T_1$ ), allora il valore della resa quantica è dato da:

$$\Phi_i(*A) = \eta_i(*A) \prod_n \eta_n$$

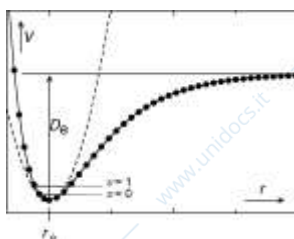
**La resa quantica di un processo in più fasi è uguale al prodotto delle efficienze di tutte le fasi necessarie per completare tale processo.** E' per esempio il caso della fosforescenza in cui il processo si realizza tramite passaggio  $S_1$  che rappresenta il nostro stato  $A^{**}$  cioè quello raggiunto direttamente per assorbimento che va su  $T_1$  (nel grafico  $A^*$ ) mediante un processo di intersystem crossing e successivamente una disattivazione per fosforescenza.

La funzione d'onda può essere fattorizzata nella componente elettronica e in quella vibrazionale e abbiamo utilizzato funzioni d'onda monoelettroniche e le configurazioni come modelli per approssimare e visualizzare la componente orbitale della porzione elettronica della funzione d'onda. Ora passiamo a visualizzare la componente vibrazionale della funzione d'onda: per fare ciò in partenza possiamo usare il modello dell'oscillatore armonico e successivamente applichiamo le restrizioni quantiche.

Ogni livello vibrazionale corrisponde a una funzione d'onda nucleare il cui numero di nodi aumenta con il numero quantico vibrazionale; la forma di queste funzioni d'onda cambia con numeri quantici elevati nei quali l'ampiezza è concentrata sempre più ai lati del moto nucleare = situazione di un pendolo classico in cui la velocità è zero ai margini detti punti di *turning point* (dove il moto viene invertito) e massima al punto di equilibrio. Quindi la pendenza massima del pendolo è ai lati e è molto piccola al centro del pendolo.

### Un miglioramento del primo ordine del modello di oscillatore armonico: L'oscillatore anarmonico

Questa teoria viene corretta per il primo ordine mediante la **correzione anarmonica** che tiene conto da una parte dell'indebolimento dei legami per elevati valori di  $r$  (=lo spostamento dalla distanza di equilibrio).



L'energia dell'asintoto nella figura corrisponde all'energia di dissociazione del legame della molecola; dall'altra parte tiene conto del fatto che la compressione dei nuclei risulta in un  $>$  dell'energia potenziale rispetto a quanto previsto dall'oscillatore armonico a causa dell' $>$  della repulsione elettrostatica al diminuire della separazione nucleare.

Diagramma di energia potenziale per una molecola diatomica. La linea tratteggiata è l'approssimazione armonica dell'energia potenziale che viene spesso utilizzata per determinare le funzioni d'onda vibrazionale e le energie vicino al fondo del pozzo potenziale

L'oscillatore armonico è un'approssimazione di ordine zero per una molecola diatomica vibrante X-Y (e per le vibrazioni di una molecola). Tuttavia, il modello semplice non riesce per le geometrie nucleari corrispondenti a compressioni gravi e in particolare per gravi allungamenti. Ad esempio, quando un legame è stato esteso, per esempio, 2 o 3 volte la sua lunghezza normale (da 1-2 Å a 5-6 Å), gli atomi X e Y sperimentano una forza di "ripristino" molto piccola, cioè il legame è essenzialmente rotto e gli atomi possono volare a pezzi e la forza di ripristino è zero per separazioni più lunghe dopo la rottura del legame. L'"oscillatore anarmonico" tiene conto di questi fattori nelle correzioni del Primo Ordine al modello di oscillatore armonico di ordine zero. D'altra parte, la compressione dei nuclei provoca un aumento più rapido dell'energia potenziale di quanto previsto dall'oscillatore armonico, a causa dell'improvviso aumento delle repulsioni elettrostatiche con diminuzione della separazione nucleare.

### LE REGOLE PER LA TRANSIZIONE TRA DUE STATI ENERGETICI: La base delle regole di selezione

L'interazione della radiazione elettromagnetica con la materia porta all'assorbimento solo se si crea un momento di dipolo come risultato di tale interazione. Perché ci sia transizione l'integrale sotto deve essere DIVERSO da zero. La forza o intensità dell'assorbimento è correlata al quadrato dell'integrale del momento di transizione ed è espressa in termini di forza dell'oscillatore o estinzione molare (sperimentalmente) integrata.

$$M_{fi} = \int \Psi_f \mu \Psi_i d\tau = \langle \Psi_f | \mu | \Psi_i \rangle$$

la probabilità di una data transizione è proporzionale al quadrato del momento di dipolo della transizione che, in linea di principio, può essere ottenuto dagli spettri di assorbimento attraverso la sua relazione con la forza dell'oscillatore  $f$ , che è una misura dell'intensità di assorbimento integrata sull'intera banda.

Secondo l'approssimazione BO, l'assorbimento della luce avviene in una scala temporale molto breve rispetto alla scala temporale dei movimenti nucleari, in modo che la funzione d'onda totale  $\Psi$  possa essere scomposta in una funzione d'onda elettronica  $\psi$  e in una funzione d'onda nucleare (vibrazionale)  $\theta$ . Pertanto, il momento della transizione è dato da

$$M_{fi} = \int \psi_f \theta_f \mu \psi_i \theta_i d\tau$$

Poiché l'operatore dipolo-momento  $\mu$  è considerato indipendente dalle coordinate nucleari, opera solo sulle funzioni dell'onda elettronica e l'equazione può essere scritta nella forma

$$M_{fi} = \int \psi_f \mu \psi_i d\tau_e \int \theta_f \theta_i d\tau_N$$

Con un'ulteriore approssimazione,  $\psi$  può essere scomposto in un prodotto di una funzione d'onda elettronica  $\phi_i$  (orbitali) e della corrispondente funzione di spin  $S_i$ .

Il momento di transizione diventa quindi  $M_{fi} = \int \phi_f \mu \phi_i d\tau_e \int S_f S_i d\tau_s \int \theta_f \theta_i d\tau_N$

Dove  $\phi_i$  e  $\phi_f$  sono gli orbitali iniziali e finali dell'elettrone eccitato e  $S_i$  e  $S_f$  sono le corrispondenti funzioni di spin. Il primo termine è chiamato momento della transizione elettronica, il cui valore dipende dalla simmetria e dalle quantità di sovrapposizione spaziale degli orbitali iniziali e finali. Il secondo termine è un integrale di sovrapposizione di spin, il cui valore dipende dagli stati di spin iniziale e finale dell'elettrone promosso. Il terzo termine, l'integrale di sovrapposizione delle funzioni d'onda iniziale e finale per le vibrazioni nucleari è la base meccanica quantistica del principio di Franck-Condon. Il valore del momento della transizione è zero se uno di questi integrali va a zero e in questi casi si dice che la transizione è proibita; le regole di selezione per l'assorbimento o l'emissione di radiazione si basano sui criteri per i quali l'integrale non si annulla.

### Regole di selezione

Una transizione permessa dalle regole di selezione corrisponde a una banda intensa nello spettro di assorbimento e ad una costante di velocità elevata per il processo radiativo che porta dallo stato a più bassa energia a quello a minore energia. Una transizione non permessa in ordine zero può realizzarsi se vi è un'interazione vibronica o un accoppiamento spin-orbita che la rende permessa superando il carattere proibito che è stato determinato mediante l'approssimazione in ordine zero.

Le regole di selezione vengono utilizzate per prevedere l'intensità delle transizioni elettroniche sulla base dei termini che compaiono nell'equazione

$$M_{fi} = \int \phi_f \mu \phi_i d\tau_e \int S_f S_i d\tau_s \int \theta_f \theta_i d\tau_N$$

Questa equazione mostra che il momento di transizione può essere espresso come il prodotto di tre integrali separati e che, nell'ambito delle approssimazioni utilizzate, il suo valore sarà zero se uno di essi è zero. Quando ciò accade, si dice che la transizione è proibita, dove come quando  $M_{fi}$  non è zero la transizione si dice consentita. In pratica, a causa dell'approssimazione utilizzata, si può spesso osservare una transizione proibita, sebbene con intensità molto inferiori a quelle delle transizioni consentite. La plausibilità della transizione nel primo ordine dipenderà dall'esistenza di un'interazione (ad es. Vibronica o spin-orbita) che può superare il carattere proibito dell'approssimazione di ordine zero.

### Simmetria - transizioni proibite (non fondamentale)

Sarebbero necessarie considerazioni dettagliate sulla simmetria usando la teoria dei gruppi.

Il momento di transizione elettronica  $\int \phi_f \mu \phi_i d\tau_e$  è legato alla simmetria degli orbitali. Poiché l'operatore del momento dipolo  $\mu$  è un vettore che può essere risolto lungo gli assi cartesiani, il momento di transizione elettronica può essere risolto in modo simile in tre componenti separati:

$$\int \phi_f \mu_{total} \phi_i d\tau_e = \int \phi_f \mu_x \phi_i d\tau_e + \int \phi_f \mu_y \phi_i d\tau_e + \int \phi_f \mu_z \phi_i d\tau_e$$

Tutti i componenti dell'operatore vettoriale sono funzioni antisimmetriche.

Le rappresentazioni irriducibili, a cui devono appartenere i MO costruiti da un dato insieme di orbitali di base, possono essere determinate dalla sola teoria dei gruppi. Transizioni elettroniche il cui momento di transizione è zero in tutte le direzioni perché la densità di transizione appartiene a una rappresentazione irriducibile che non si trasforma come uno degli assi di simmetria si dice che sia vietata la simmetria.

Un caso particolare importante della regola di selezione della simmetria è quello relativo alle molecole che hanno un centro di simmetria (ad esempio etano e complessi di metalli di transizione). Tutte le funzioni d'onda sono simmetriche o antisimmetriche rispetto al centro di simmetria, ovvero gerade (pari), g o ungerade (dispari), u, e tutti i componenti del vettore  $\mu$  sono ungerade. La rappresentazione totalmente simmetrica nei gruppi di punti di queste molecole è ovviamente gerade. Il prodotto di due funzioni è ungerade solo se uno è gerade e l'altro ungerade.

Quindi, l'integrando nell'equazione precedente può essere gerade solo se la funzione d'onda iniziale  $\phi_i$  e la funzione d'onda finale  $\phi_f$  hanno un carattere disuguale gerade / ungerade. Ne consegue che sono consentite le transizioni  $g \rightarrow u$  e  $u \rightarrow g$ , mentre  $g \rightarrow g$  e  $u \rightarrow u$  sono vietate simmetria.

**Regola di selezione di Laporte** (vale per molecole centro simmetriche): deve esserci un cambiamento nella parità della funzione d'onda (simmetria)

La transizione elettrica del dipolo può avvenire solo tra stati di parità opposta.

Transizioni consentite da Laporte:  $g \rightarrow u$  oppure  $u \rightarrow g$     g sta per gerade

Transizioni proibite da Laporte:  $g \rightarrow g$  oppure  $u \rightarrow u$     u sta per ungerade

### Regola di selezione di spin

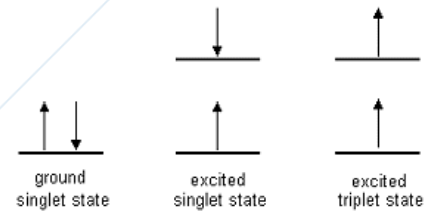
L'effetto dello spin degli elettroni sulle intensità di transizione è dato dal fattore  $\int S_i S_f d\tau_s$  nell'espressione del momento di transizione. Le funzioni di spin sono ortonormali:  $\int S_i S_f d\tau_s = 1$  if  $S_i = S_f$

Pertanto, le transizioni singoletto  $\rightarrow$  singoletto e tripletto  $\rightarrow$  tripletto sono consentite. Poiché lo stato fondamentale delle molecole è di solito un singoletto, le transizioni di singoletto  $\rightarrow$  singoletto sono molto comuni. In realtà, rappresentano la maggior parte delle bande di assorbimento osservate per molecole che hanno uno stato fondamentale singoletto. A causa dell'ortogonalità delle funzioni d'onda di spin, l'integrale di  $\int S_i S_f d\tau_s$  svanisce ogni volta che gli stati iniziale e finale hanno una molteplicità di spin diversa e le transizioni elettroniche corrispondenti sono chiamate spin proibite. Pertanto, le transizioni singoletto  $\rightarrow$  tripletta sono vietate (per esse l'integrale va a zero). Questa regola di selezione di spin è valida nella misura in cui le funzioni di spin e orbitale possono essere separate rigorosamente.

Regola selezione centrifuga:  $\Delta S = 0$

transizioni consentite: singoletto  $\rightarrow$  singoletto o tripletto  $\rightarrow$  tripletto

transizioni proibite: singoletto  $\rightarrow$  tripletto o tripletto  $\rightarrow$  singoletto



**Sono vietati cambiamenti nella molteplicità di spin**

Nella teoria delle perturbazioni, le perturbazioni deboli vengono applicate per distorcere la funzione d'onda  $\Psi_0$  di ordine zero e fornire una stima più accurata della probabilità di transizione.

Lo spirito generale della teoria delle perturbazioni è di iniziare con un sistema più semplice e risolvibile di funzioni d'onda (ad esempio, approssimazione BO) che assomigliano molto alla funzione d'onda reale, come approssimazione di ordine zero, e quindi di "perturbare la funzione d'onda di ordine zero" per ottenere il Primo Ordine funzioni d'onda ed energie approssimative. Utilizzando le funzioni d'onda e le energie del Primo Ordine, si presume che la perturbazione distorca il sistema nella direzione della funzione d'onda vera. Se le funzioni d'onda semplici e vere sono molto simili, l'entità della distorsione è piccola e una perturbazione molto debole può fare il lavoro.

La teoria delle perturbazioni fornisce la ricetta per mescolare i sistemi e determinare il metodo per calcolare i termini aggiuntivi del Primo Ordine che devono essere aggiunti per rendere il sistema il più vicino possibile al sistema reale.

La funzione d'onda del Primo Ordine si ottiene moltiplicando  $\Psi_0$  (Funzione d'onda Ordine zero) per un "coefficiente di miscelazione",  $\lambda$ , che è direttamente proporzionale alla forza della perturbazione,  $P$  e inversamente proporzionale alla separazione dell'energia tra gli stati ( $\Delta E$ ) miscelato da  $\lambda$ .

$$\lambda = (\text{forza della perturbazione } P) / \Delta E$$

$$\Psi_1 (\text{funzione d'onda del primo ordine}) = \Psi_0 + \lambda \Psi_0' (\text{funzione d'onda dello zero})$$

*Il risultato è che uno stato di ordine zero, originariamente descritto in termini di una singola configurazione orbitale elettronica (o molteplicità di spin) viene miscelato con un secondo stato elettronico di diversa configurazione orbitale (o molteplicità di spin).*

$$\lambda = \frac{\text{strength of perturbation}}{\text{energy of separation}} = \frac{\langle \Psi(S_1) | P(S_1 \rightarrow S_0) | \Psi(S_0) \rangle}{\Delta E(S_1 \rightarrow S_0)}$$

$\lambda$ , resonance mixing coefficient

Due regole generali molto importanti della teoria delle perturbazioni:

- più forte è la perturbazione, più forte è la miscelazione e la distorsione della funzione d'onda iniziale  $\Psi_0$
- maggiore è la separazione energetica tra le due funzioni d'onda interagenti, più debole è la miscelazione.

Queste semplici regole indicano che per due stati ( $\Psi_0$  e  $\Psi_0'$ ) che sono ampiamente separati in energia rispetto alla perturbazione, si prevede generalmente che il sistema sia debolmente sensibile alla perturbazione e non si mescoli bene.

$P_{\text{vib}}$  e  $P_{\text{SO}}$  = operatore vibrazionale e di spin-orbita che mescola  $\Psi_0(S_1)$  e  $\Psi_0(S_0)$  o  $\Psi_0(S_1)$  e  $\Psi_0(T_1)$ .

- Per le transizioni radiative (e senza radiazioni), la miscelazione del primo ordine è generalmente un meccanismo significativo che "consente" un processo che è severamente vietato nell'ordine zero di verificarsi con probabilità misurabile. Possiamo vedere il mixaggio come un'interazione tra funzioni d'onda che sono vicine nell'energia.
- Tipicamente, una funzione d'onda per la quale è vietata una transizione in ordine zero prende in prestito parte del carattere di una funzione d'onda per la quale la transizione è consentita; quindi una transizione non permessa all'ordine zero lo può diventare al primo ordine e si vedrà una banda corrispondente a quella transizione che sarà unbanda con una bassa intensità.

L'approssimazione BO consente di generare una descrizione di ordine zero della struttura elettronica e dell'energia elettronica di una molecola, basata sulla presunta geometria nucleare fissa e non in vibrazione. Dobbiamo considerare l'effetto del movimento vibratorio nucleare sulla struttura elettronica e l'energia elettronica di una molecola e come questo movimento vibrazionale può servire come una perturbazione che mescola le funzioni dell'onda elettronica e come questa miscelazione può indurre transizioni tra stati elettronici. In pratica, le transizioni vietate dalla simmetria hanno un'intensità bassa ma considerevole a causa della scarsa separabilità delle funzioni elettroniche e nucleari (interruzione dell'approssimazione). Questo può essere trattato come una perturbazione, chiamata accoppiamento vibronico. In questo caso, la transizione acquisisce una certa intensità perché vibrazioni di appropriata simmetria portano a una mescolanza dello stato eccitato "vietato" (ordine zero) con uno stato "consentito" (ordine zero).

- 1) **Accoppiamento vibronico.** Le vibrazioni servono costantemente come fonte di miscelazione di stati elettronici, in particolare stati elettronici che hanno energia simile o identica in ordine zero. Alcune vibrazioni sono in grado di perturbare le funzioni dell'onda elettronica e l'energia elettronica dello stato elettronico di ordine zero in modo da fornire un meccanismo di primo ordine per la transizione da uno stato vibronico a un altro anche se la transizione elettronica è severamente vietata nell'approssimazione di ordine zero.

L' a.v. può essere visto come una perturbazione, che mescola parzialmente nello stato eccitato "proibito" altri stati eccitati "permessi" (si dice che le transizioni proibite "rubano" intensità da quelle permesse).

vale a dire una transizione  $n \rightarrow \pi^*$  in assorbimento (o  $\pi^* \rightarrow n$  in emissione) con  $f = 0$  in ordine zero. Nel primo ordine le vibrazioni possono mescolare configurazioni  $n$ ,  $\pi^*$  e  $\pi$ ,  $\pi^*$ . Includere interazioni vibroniche è quindi una migliore descrizione di  $S_1$  che è uno stato di configurazioni "miste" e il coefficiente  $\lambda$  è una misura dell'entità della miscelazione:

$$S_1(\text{pure}) = n, \pi^*$$

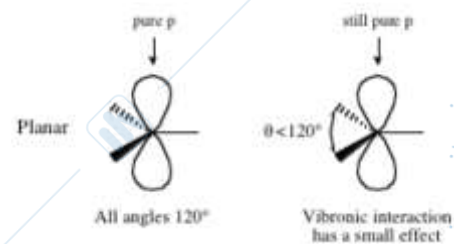
$$S_1(\text{mixed}) = n, \pi^* + \lambda(\pi, \pi^*)$$

Dato che  $S_0 \rightarrow \pi$ , la transizione  $\pi^*$  è generalmente «consentita», il primo ordine  $S_0 \rightarrow S_1$  (misto) è consentito solo nella misura in cui  $S_2(\pi, \pi^*)$  viene miscelato in  $S_1(n, \pi^*)$ .

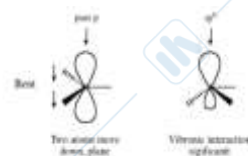
DA QUI MENO IMPO : Come semplice esempio dell'effetto del movimento vibratorio sull'energia orbitale ed elettronica elettronica, si consideri l'effetto delle vibrazioni di un atomo di carbonio che è legato ad altri tre atomi (ad esempio, un gruppo metilico come uno ione radicale, anione o carbonium). Quando il sistema è planare e gli angoli tra gli atomi sono  $120^\circ$ , l'atomo di carbonio è un ibrido  $sp^2$  puro e possiede un orbitale p che funge da orbitale di "valenza libera".

Cosa succede alla forma e all'energia di questo orbitale mentre la molecola vibra?

Se le vibrazioni non distruggono la geometria planare (gli angoli tra gli atomi cambiano ma il sistema rimane planare), l'ibridazione rimane  $sp^2$  e la distribuzione spaziale dell'orbitale di valenza libera sopra e sotto il piano deve essere identica a causa del piano di simmetria che contiene tutto il sistema. In altre parole, se mettessimo gli elettroni nell'orbitale di valenza libera, la densità dell'elettrone dovrebbe essere la stessa sopra e sotto il piano di simmetria, poiché tutte le interazioni concepibili su un lato del piano sono identiche a quelle sull'altro lato. In effetti, l'orbitale p rimane essenzialmente "p puro" durante la vibrazione di flessione planare in piano e non si prevede che l'energia dell'orbitale cambi in modo significativo. Diciamo che durante questa vibrazione si verifica un debole accoppiamento vibronico di movimenti elettronici (p orbitali) e vibrazionali (in piano) e la distorsione della funzione d'onda p indotta dalle vibrazioni è piccola.



Consideriamo ora una vibrazione flettente ("capovolgimento dell'ombrello") che rompe la simmetria planare della molecola e provoca un cambiamento nell'ibridazione dell'atomo di carbonio. Intuitivamente, ci aspettiamo che l'orbitale "puro p" cambi la sua forma in risposta al fatto che una maggiore densità di elettroni (dovuta agli elettroni nei legami) si trova su un lato del piano. Diciamo che si verifica una reibridazione dell'atomo di carbonio e si può immaginare che l'orbitale "puro p" inizi a prendere il carattere s, cioè la vibrazione fuori piano converte l'orbitale p in un orbitale  $sp_n$ , dove n è una misura del "carattere p" rimanente. Poiché un orbitale s ha un'energia considerevolmente più bassa di un orbitale p, la miscelazione dovuta al movimento vibratorio può cambiare significativamente l'energia dell'orbitale. Nella situazione estrema  $n = 3$ , immaginiamo che la vibrazione fuori dal piano causi un cambiamento elettronico oscillante continuo  $p$  (planare)  $\leftrightarrow$   $sp^3$  (piramidale). Un accoppiamento vibronico significativo del movimento elettronico e nucleare si verifica a causa di questa vibrazione, facendo oscillare il valore di n tra 2 e 3. Ora se lo stato iniziale,  $\Psi_0$ , è una funzione d'onda pura p e lo stato finale,  $\Psi_0'$ , è un puro stato  $sp^3$ , possiamo vedere che il movimento vibratorio fuori dal piano fa apparire  $\Psi_0$  come " $\Psi_0'$ ", ma il movimento vibratorio nel piano non lo fa perché la vibrazione di flessione nel piano non introduce alcun carattere nel p orbitale. In altre parole, il movimento vibrazionale fuori dal piano "mescola" l'ibridazione dell'orbitale di valenza libera, ma il movimento vibratorio nel piano no. STOP MENO IMPO



**2) Interazione spin-orbita.** La regola che governa la transizione tra gli stati di similitudini simili è rigorosamente rispettata.

Le transizioni tra stati di singoletto e di tripletto ideali sono severamente vietate. Questa regola di selezione di spin è valida nella misura in cui le funzioni di spin e orbitale possono essere separate rigorosamente. Le deviazioni da questa approssimazione possono essere affrontate in termini di perturbazioni intramolecolari e intermolecolari chiamate accoppiamento spin-orbita, mediante le quali si possono mescolare stati di diversa molteplicità di spin. L'accoppiamento spin-orbita è definito come l'interazione magnetica tra il momento magnetico dovuto al momento angolare di spin dell'elettrone, S, con il momento magnetico dovuto al momento angolare orbitale dell'elettrone, L. Fisicamente, possiamo vedere l'accoppiamento spin-orbita come l'accoppiamento del momento magnetico dovuto alla rotazione dell'elettrone al momento magnetico dovuto al movimento orbitale dell'elettrone. **Queste perturbazioni sono funzioni del campo magnetico vicino al nucleo e sono quindi una funzione della massa atomica** (effetto dell'atomo pesante). Viene espresso l'operatore hamiltoniano che causa la miscelazione di stati di molteplice diversità come  $H_{SO} = K\xi(L \cdot S)$

dove  $\xi$  è una funzione che dipende dal campo del nucleo,  $(L \cdot S)$  è il prodotto scalare rispettivamente dei vettori del momento angolare orbitale e di spin e K è una costante per la molecola. La funzione d'onda ottenuta su tali interazioni di accoppiamento spin-orbita che causano la miscelazione della tripletta pura  $\psi_T$  e del singoletto puro  $\psi_S$  è espressa come  $\Psi_{SO} = \Psi_T + \lambda \Psi_S$

L'intensità della banda di assorbimento integrata dipende solo dai primi due termini (elettronici) di  $M_{fi}$ . Il terzo termine (nucleare) è importante nel determinare la forma della banda di assorbimento. Viene spesso

chiamato termine di Franck-Condon in quanto rappresenta la controparte meccanica quantistica dell'affermazione classica del principio FC.

### Il principio FC

Per FC la transizione elettronica è una transizione verticale che avviene a nuclei fermi. Il principio FC afferma che poiché i nuclei sono molto più massicci degli elettroni (la massa di un protone è più di 1000 volte la massa di un elettrone), avviene una transizione elettronica da un orbitale all'altro mentre i nuclei massicci a inerzia più elevata sono essenzialmente stazionario. A differenza dei primi due termini è di solito diverso da zero quindi non rende nullo il momento della transizione ma *determina la FORMA della banda di assorbimento e della banda di emissione.*

Espresso in termini di meccanica quantistica, il principio FC afferma che le transizioni più probabili tra stati elettronici si verificano quando la funzione d'onda dello stato vibrazionale iniziale ( $\theta_1$ ) assomiglia maggiormente alla funzione d'onda dello stato vibrazionale finale ( $\theta_2$ ).

Il potenziale anarmonico (ad es. il potenziale Morse) che descrive la dinamica vibrazionale di una molecola è, in generale, diverso per ogni stato elettronico.

L'eccitazione di un elettrone legato dall'HOMO al LUMO aumenta l'estensione spaziale della distribuzione dell'elettrone, rendendo la densità totale dell'elettrone più diffusa e spesso più polarizzabile. Pertanto, si trova in generale che la lunghezza del legame tra due atomi in una molecola diatomica è maggiore e la forza del legame è più debole negli stati eccitati elettronicamente. D'altra parte, un legame leggermente più debole significa che la costante di forza per le vibrazioni sarà inferiore e la relazione tra la costante di forza e la seconda derivata del potenziale indica che la costante di forza più debole nello stato eccitato implica non solo una vibrazione inferiore frequenza ma allo stesso tempo un'estensione spaziale più ampia per la curva del potenziale energetico.

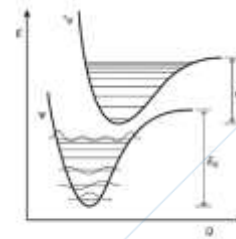
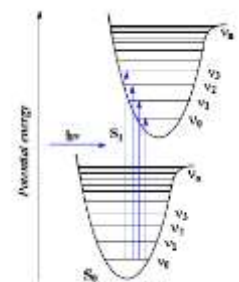


Figure 3.5 Schematic potential energy curves for electronic states  $S_0$  and  $S_1$  types

- A temperatura ambiente, la maggior parte delle molecole si trova nello stato vibrazionale  $n_0$  dello stato fondamentale elettronico  $S_0$  (distribuzione di Boltzmann). I nuclei non si muovono, solo gli elettroni
- Ogni livello vibrazionale ha una funzione d'onda associata, il cui quadrato si riferisce alla configurazione nucleare più probabile.

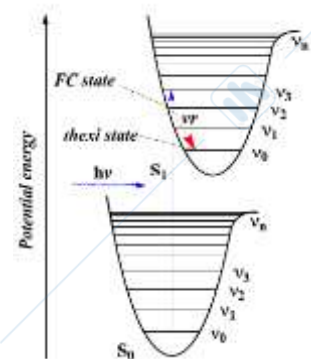


$$\frac{N_n}{N_0} = e^{(-\Delta E/RT)}$$

$N_0$  = population of  $n_0$  vibrational state  
 $N_n$  = population of  $nn$  vibrational state  
 $\Delta E = E(nn) - E(n_0)$

R = gas constant ( 8.314 J K<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>) T = absolute temperature (K)

Il principio di Franck-Condon è l'approssimazione che è più probabile che si verifichi una transizione elettronica senza cambiamenti nelle posizioni dei nuclei nell'entità molecolare e nel suo ambiente. (limitazione dell'approssimazione di Born-Oppenheimer). Lo stato risultante è chiamato stato di Frank-Condon e la transizione in questione è una transizione verticale.



**Il fattore FC fornisce una regola di selezione per le transizioni elettroniche e regola le intensità relative delle transizioni radiative** (assorbimento ed emissione). Per processi emissivi la sovrapposizione critica è tra  $\theta$  corrispondente a  $S_1(v_0)$  e i vari livelli vibrazionali ( $v_n$ ) di  $S_0$ .

Lo stato eccitato ha una superficie di energia potenziale (PES) identica per forma e geometria di equilibrio a quella dello stato fondamentale. In questo caso, le funzioni delle onde nucleari di terra e di stato eccitato sono soluzioni dello stesso problema vibrazionale e costituiscono un insieme ortonormale. Pertanto,  $\langle \theta_i, 0 | \theta_f, 0 \rangle = 1$  e tutti gli altri termini nella somma sono zero. In altre parole, tutta l'intensità della transizione elettronica è concentrata in una netta banda a forma di linea corrispondente alla transizione 0-0 (cioè da  $v_0$  di  $S_0$  a  $v_0$  di  $S_n$ ); quindi il risultato è una banda di assorbimento la cui intensità è centrata sulla 0-0 quindi è una banda molto STRETTA. Bande strette le troveremo quando parleremo degli e- interni (= f) nei complessi dei lantanidi. Caso specifico e raro.

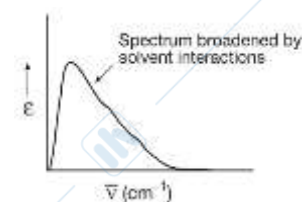
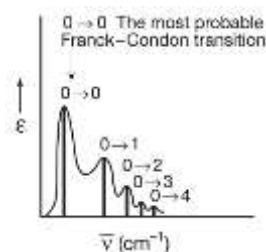
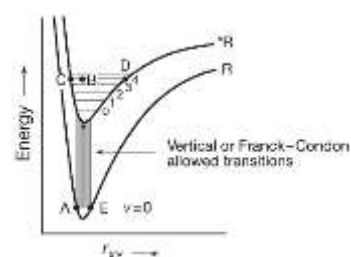
### 1. Piccola distorsione dello stato eccitato rispetto allo stato fondamentale PEC (caso comune)

Esempi possono essere molecole organiche rigide (i loro spettri) come l'antracene. In questo caso la transizione più probabile sarà quella 0-0 ma non è l'unica possibile come nel caso precedente. Quindi ho anche un contributo dalle altre transizioni; alla fine ottengo una sola banda larga con il massimo dell'intensità in corrispondenza della transizione 0-0.

In questo caso il principio FC stabilisce, poiché l'assorbimento deve avvenire attraverso una transizione verticale, che la transizione  $Y_0 (v_0) \rightarrow * Y (v_0)$  sarà intensa a causa di un fattore FC elevato.

Spettri di assorbimento corrispondenti alla situazione in esame: primo caso è quello in cui la risoluzione delle bande vibroniche sia evidente (cioè le componenti vibroniche all'interno di quella transizione elettronica sono visibili). Spettro 2  $\rightarrow$  la risoluzione vibronica viene persa per effetto dell'allargamento delle bande per interazione del solvente. **NB:**

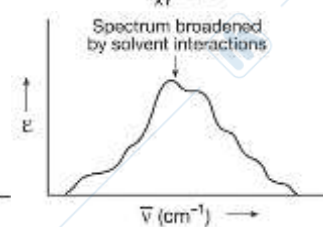
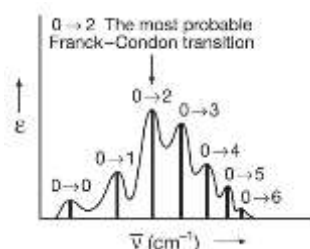
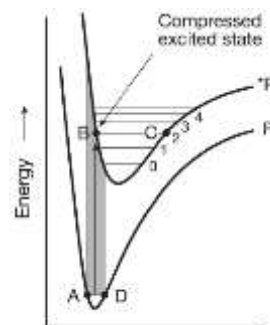
Noi lavoreremo molto con spettri con epsilon contro lambda quindi troveremo spesso che il valore massimo di assorbimento corrispondente alla transizione 0-0 sarà alle massime lambda e quindi alle MINIME energie questo perché la transizione 0-0 è quella ad energia più bassa nello spettro di assorbimento.



### 2. Forte distorsione dello stato eccitato

Qui la transizione 0-0 non è la più intensa e potrebbe essere addirittura non visibile nello spettro (qui è detta transizione NON FC permessa). Sono altre transizioni di più alta energia che hanno maggiore probabilità di realizzarsi. Nello schema preso come esempio si può vedere come la transizione più probabile è la 0-2 e sarà quindi la più intensa.

Spettri di assorbimento corrispondenti: stessa situazione di prima solo che la transizione principale è la 0-2



### Il principio di FC e lo spettro di emissione elettronica molecolare

Prima dell'emissione, una rapida conversione interna attraverso molteplici perturbazioni avviene dallo stato  $S_n (v_n)$  aiutato da collisioni molecolari in soluzione (con solvente). I sistemi molecolari poliatomici mostrano una conversione interna particolarmente rapida a causa di perturbazioni indotte dall'accoppiamento vibronico attraverso la struttura nucleare.

Questa è la base della **regola di Kasha** secondo la quale l'emissione avverrà solo dallo stato elettronico  $S_1$  ( $v_0$ ) ... esistono ovviamente delle eccezioni, ad es. azulene  $S_2 \rightarrow S_0$ .

In analogia all'assorbimento, le emissioni più probabili si verificano tramite transizioni "allineate verticalmente" con il fattore FC più grande.

In pratica ad un certo punto qualsiasi sia lo stato elettronico in cui la molecola si trovi, va in  $S_1$  in cui certamente si è realizzato il rilassamento vibrazionale, quindi di fatto il sistema si riporta sul livello vibrazionale  $v_0$  di  $S_1$  che diventa per noi il punto di partenza per la transizione radiativa di ritorno che lo porterà a  $S_0$ . Ancora una volta la transizione radiativa  $v_0$  di  $S_1$  è una transizione la cui probabilità è dettata dai fattori di FC. E' ancora una transizione verticale che avverrà con max probabilità sul livello vibrazionale  $v_n$  di  $S_0$  che ha il max overlap con la funzione vibrazionale  $v_0$  di  $S_1$ .

Quindi ciò che ci siamo detti sulle transizioni in andata vale anche per quelle di ritorno e sono i fattori FC che determinano la probabilità di queste transizioni vibrazionali e quindi la forma della banda di emissione. *Se lo stato eccitato è poco distorto la banda di emissione sarà una banda stretta ancora una volta centrata sulla transizione 0-0; se invece lo stato eccitato è molto distorto la transizione 0-0 sarà meno probabile e sarà più probabile una transizione del tipo  $v_0$  di  $S_1 \rightarrow v_n$  di  $S_0$  a più alta energia rispetto alla 0-0. Quindi se la transizione 0-0 è quella a più bassa energia nella banda di assorbimento è anche quella a più alta energia nella banda di emissione.*

Quindi la 0-0 di assorbimento e la 0-0 di ritorno sono le uniche due bande che la banda di assorbimento e emissione hanno in comune anche se può accadere che per effetto del rilassamento del solvente queste due non siano sovrapponibili. Inoltre possono anche essere sovrapposte per una porzione superiore alla 0-0 che è rappresentata dalle cosiddette **BANDE CALDE** = sono quelle che avvengono per transizioni da livelli vibrazionali a più alta energia dello stato elettronico fondamentale (e vale anche per livelli vibrazionali eccitati dello stato elettronico eccitato).

Se quindi la transizione 0-0 non è la più probabile sia la banda di assorbimento che la banda di emissione avranno il massimo corrispondente a transizioni rispettivamente a più alta e più bassa energia; quindi di fatto il risultato della forma delle bande di assorbimento e di emissione è che abbiamo due bande allargate i cui massimi sono abbastanza distanti fra di loro.

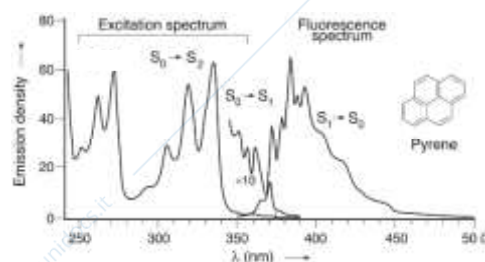
La differenza tra il massimo della banda di assorbimento e il massimo della banda di emissione è lo spostamento di Stokes. Quindi max della banda di assorbimento e della banda di emissione sono molto spostate tra di loro e la transizione 0-0 non è la più probabile.

Quindi lo spostamento di Stokes diventa più importante se lo stato eccitato è molto distorto rispetto allo stato fondamentale quindi lo spostamento di stokes può essere una misura per vedere l'entità della distorsione dello stato eccitato rispetto allo stato fondamentale.

In alcune condizioni e per alcuni composti le componenti vibrazionali delle bande elettroniche sono ben visibili e in altri no. Per esempio quando si fa uno spettro registrato in un solvente non polare dove queste componenti sono visibili mentre passando ad un solvente polare non si vedrebbero più. = **le componenti vibroniche possono essere visibili o non visibili.**

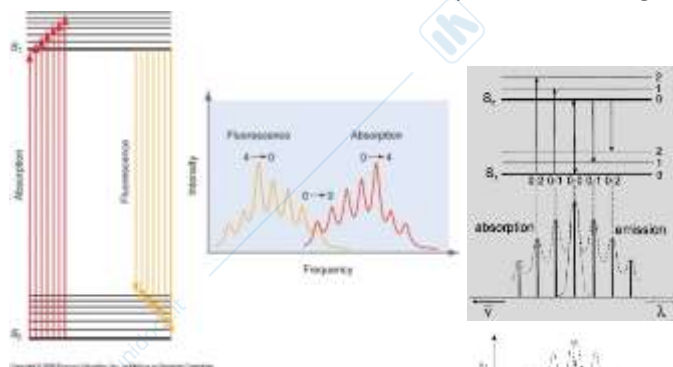
Quello che succede è che siccome in l'assorbimento la transizione tra è da  $v_0$  di  $S_0$  sui vari  $v_n$  di  $S_1$ , la componente vibrazionale della banda di assorbimento è informativa dei livelli vibrazionali dello stato elettronico eccitato. A partire da  $v_0$  di  $S_1$  sui vari  $v_n$  di  $S_0$  è chiaro che le componenti vibrazionali della banda di emissione dipendono dai livelli vibrazionali dello stato elettronico fondamentale.

Spettro del pirene (sono riportati lo spettro di eccitazione e lo spettro di emissione): di fatto quello di eccitazione è il fratello dello spettro di assorbimento. Questo spettro ci dice che la transizione  $S_0 - S_2$  è una transizione permessa, la transizione  $S_0 - S_1$  è non permessa e infatti diventa visibile se si moltiplica per dieci volte la sua intensità nello spettro. La transizione  $S_1 - S_0$  appare e la relazione di sovrapposizione della banda 0-0 è ovviamente tra l'assorbimento  $S_0 - S_1$  e la sua corrispondente banda di assorbimento  $S_0 - S_1$ .



In diversi fluorofori la banda di emissione di fluorescenza sembra essere l'immagine speculare della banda di assorbimento  $S_0 - S_1$  (si parla infatti di specularità tra lo spettro di assorbimento e quello di emissione). Tale relazione speculare si osserva specialmente negli idrocarburi aromatici per i quali gli stati vibrazionali dello stato elettronico eccitato che sono appunto responsabili della struttura vibrazionale della banda di assorbimento, e quelli dello stato elettronico fondamentale che sono responsabili della struttura vibrazionale della banda di fluorescenza sono abbastanza simili. In questi casi passando dallo stato elettronico fondamentale a quello eccitato di bassa energia non si hanno variazioni notevoli della superficie di energia potenziale.

Si vede qui lo spettro di assorbimento e di emissione prodotto per disattivazione tra  $S_1$  e  $S_0$  in cui banda di assorbimento e di emissione sono sovrapposte esclusivamente per la banda 0-0 e sono una l'immagine speculare dell'altra. La 0-0 è, insieme ad altra bande calde, la zona di sovrapposizione tra assorbimento e emissione ma non è detto che le due siano sovrapposte (magari per effetto del solvente).



Primo spettro: le due sono sovrapposte per la transizione 0-0 e la 0-0 è la transizione FC permessa quindi stato eccitato poco distorto rispetto allo stato fondamentale.

Secondo spettro: le due sono sovrapposte per la 0-0 ma la transizione 0-0 non è la banda più intensa quindi non è FC permessa, lo spostamento di Stokes è maggiore e di fatto lo stato eccitato sarà più distorto di quello fondamentale.

Terzo spettro: ancora due bande di assorbimento ed emissione sovrapposte per la loro transizione 0-0 in cui è stata persa la risoluzione vibronica.

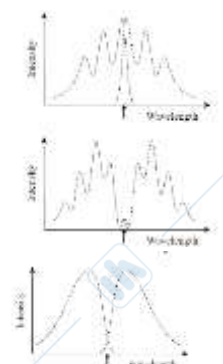
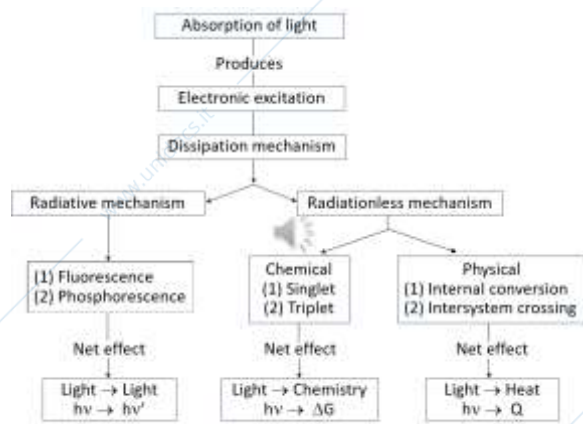


Fig. 10.5. Stokes shift and vibronic structure in the fluorescence spectra of a fluorophore in different solvents. The Stokes shift is the energy difference between the maximum of the absorption and emission bands. The Stokes shift is larger in more polar solvents.

**Da qui argomenti importanti:** a noi interessano i processi fotofisici che avvengono come conseguenza di uno stato eccitato che è stato popolato mediante assorbimento di luce che ritorna allo stato a più bassa energia con meccanismi diversi. Essi possono essere, radiativi (fluorescenza o fosforescenza) o non radiativi (es. reazioni di tipo chimico dagli stati di singoletto o tripletto raggiunti oppure meccanismi di disattivazione come la conversione interna e la conversione intersistema).

L'interpretazione, la descrizione e la visualizzazione dei processi fotofisici unimolecolari che il sistema può compiere dopo aver raggiunto lo stato eccitato per assorbimento, viene fatto attraverso il diagramma di Jablonski (anche Perrin contribuì nella fase iniziale a questo diagramma). Entrambi riconobbero il caso di emissione per fluorescenza e poi il caso di emissione per fluorescenza ritardata.

**Processi di disattivazione**



Schematic of the network of processes of interest to a molecular photochemist

Transizioni radiative: frecce con linee dritte → emissione di un fotone

Transizioni non radiative: frecce ondulate → energia elettronica si converte in energia vibrazionale, traslazionale e rotazionale senza emissione di fotoni.

Transizioni non radiative con frecce orizzontali: processi di conversione intersistema e conversione interna che sono conversioni isoenergetiche tra stati elettronici diversi senza emissione di radiazione.

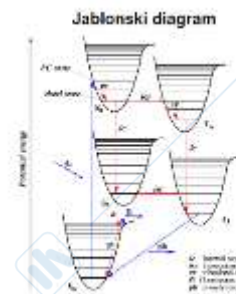
Può esserci anche il processo di back intersystem crossing che da  $T_1$  riporta a  $S_1$ .

Name	Time scale ( $\tau = 1/k_{process}$ )/s
Absorption	$10^{-15}$
Internal conversion	$10^{-12}$ - $10^{-6}$
Intersystem crossing ( $S \rightarrow T$ )	$10^{-12}$ - $10^{-6}$
Intersystem crossing ( $T \rightarrow S$ )	$10^{-9}$ - $10^1$
Vibrational relaxation	$10^{-13}$ - $10^{-12}$
Fluorescence	$10^{-9}$ - $10^{-7}$
Phosphorescence	$10^{-6}$ - $10^{-3}$

Qui oltre che le bande di assorbimento corrispondenti al passaggio  $v_0-S_0$  sui vari livelli  $v_n$  di  $S_n$  dei livelli eccitati si vede anche una **banda calda** = transizione relativa al passaggio da  $v_1$  di  $S_0$  e si chiama così perché la popolazione dei livelli vibrazionali eccitati dipende dalla T e quindi tanto più diminuisce la T tanto più diminuisce l'importanza delle bande calde.

Rappresentazione del diagramma di Jablonski usando curve di energia potenziale che ci mostra che non è sempre come pensavamo cioè che il passaggio a  $T_1$  implica un passaggio intermedio a  $S_1$  ma che ci possono essere altri cammini che portano a  $T_1$ . Es qui l'assorbimento passa da  $S_0$  a un generico  $S_n$  da cui si ha intersystem crossing che porta la popolazione su  $T_n$  da cui si ha conversione interna su  $T_1$ .

Nel diagramma di Jablonski l'orientazione in senso verticale dei livelli ha un senso fisico nel senso che è collegato al  $\Delta E$  tra i livelli mentre la disposizione orizzontale non ha nessun significato serve solo per la visualizzazione. **In generale  $T_n$  sono a MINOR energia di  $S_n$**  (per convenzione però li trovo a uguale energia in molti diagrammi). Di solito salendo di energia diminuisce il  $\Delta E$  es.  $\Delta E S_0-S_1$  è > di quello  $S_1>S_2$ . Di solito (ma non è anche qui sempre così)  $S_1$  e  $T_1$  appartengono alla medesima configurazione elettronica. Ci sono diversi meccanismi attraverso i quali una molecola può tornare allo stato fondamentale e la diversa probabilità con cui essi possono manifestarsi dipendono dalla loro costante di velocità → il più probabile sarà quello con la k maggiore.

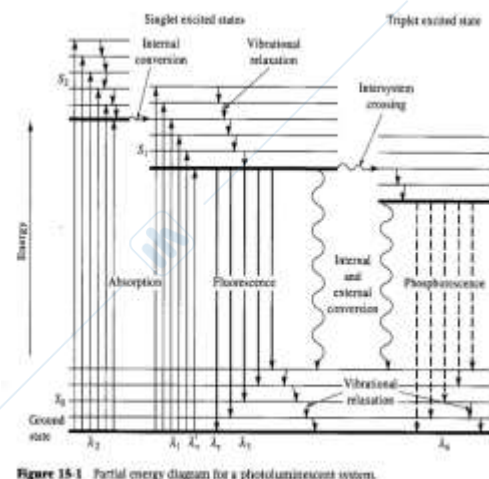


#### Processi differenti unimolecolari/intramolecolari

- **Conversione interna (IC)** = transizione non radiativa tra stati isoenergetici aventi la stessa molteplicità di spin
- **Intersystem crossing (ISC)** = transizione non radiativa tra stati isoenergetici aventi diversa molteplicità di spin. Può essere favorita dalla presenza di molecola paramagnetiche o atomi pesanti per i quali l'accoppiamento spin orbita diventa particolarmente importante. Precede la fosfo perché è il modo di popolare  $T_1$  a partire da  $S_1$  (in un caso del genere guardo il  $\Delta E S_1-T_1$  per vedere quanto è favorito il processo). Potrebbe essere un  $\Delta E S_n-T_n$  quindi devo utilizzare una sorgente di eccitazione ad alta energia per popolare quel  $S_n$  affinché si veda l'emissione per fosfo.
- **Redistribuzione vibrazionale intramolecolare (IVR)** = dissipazione di energia vibrazionale in eccesso dal modo vibrazionale raggiunto in assorbimento ad altri modi vibrazionale presenti nella molecola. Il rilassamento vibrazionale intramolecolare (ridistribuzione) è più veloce del rilassamento vibrazionale:  $10^{-13}$  -  $10^{-11}$  sec.

L'energia originariamente localizzata nella modalità popolata dall'assorbimento della luce viene rapidamente distribuita tra le altre modalità vibrazionali. In altre parole, una molecola, in particolare una grande molecola, può fungere da proprio bagno di calore.

- **Rilassamento vibrazionale** = processo non radiativo, qui la dissipazione di energia vibrazionale in eccesso non viene fatta intramolecolarmente ma attraverso la cessione di questa energia con altre molecole per esempio con le molecole di solvente. Può essere considerato un processo bimolecolare. La molecola eccitata trasferisce rapidamente l'energia vibrazionale in eccesso al solvente / mezzo attraverso le collisioni. La molecola si rilassa rapidamente nel livello vibrazionale del terreno nel livello elettronico eccitato.  $T = 10^{-11} - 10^{-10}$  sec.
- **Fluorescenza** = emissione di un fotone. Essa comporta una transizione radiativa tra stati con uguale molteplicità (spin permessa), di solito tra il livello vibrazionale più basso del più basso stato eccitato  $S_1$ .  $\rightarrow S_1(v=0) \rightarrow S_0 + h\nu$
- **Fosforescenza** = emissione di un fotone. Essa comporta una transizione radiativa spin proibita tra stati aventi diversa molteplicità, di solito dal più basso livello vibrazionale del più basso stato di tripletto  $T_1$ .  $T_1(v=0) \rightarrow S_0 + h\nu$ .



La dissipazione di energia vibrazionale in eccesso praticamente si manifesta sempre perché i processi di disattivazione vibrazionale sono molto veloci con la redistribuzione vibrazionale più veloce rispetto al rilassamento vibrazionale (inteso come processo bimolecolare). Quindi tutti i processi successivi sono generalmente a partire dal livello  $v_0$  dello stato elettronico considerato. VR e IVR sono i processi più veloci che si verificano nello stato eccitato. Pertanto, tutti gli altri processi, di natura fisica o chimica, di solito avvengono da stati eccitati termicamente equilibrati e competono tra loro.

#### Caratteristiche di transizioni non radiative: transizione intersistema e conversione interna

Avvengono su livelli isoenergetici, qui l'energia elettronica in eccesso viene trasformata in energia vibrazionale in eccesso perché sono a partire dal livello vibrazionale fondamentale dello stato elettronico a più alta energia su livelli isoenergetici vibrazionali eccitati di uno stato elettronico a minore energia. Le **disattivazioni non radiative** sono un tipo di transizione *isoenergetica* che avviene tra due livelli vibrazionali appartenenti a due stati elettronici differenti. Le transizioni non radiative sono in genere fenomeni irreversibili, in quanto sono associati ad un aumento dell'entropia, (lo stato elettronico di arrivo possiede una densità di livelli vibrazionali maggiore a parità di energia), e perché il fenomeno del rilassamento vibrazionale dello stato elettronico a minore energia è un fenomeno estremamente veloce, livelli vibrazionali attraverso i quali il rilassamento vibrazionale si realizza velocemente quindi il sistema passa velocemente sul livello vibrazionale dello stato elettronico fondamentale che ha raggiunto mediante transizione non radiativa.

Le tre classi più importanti di conversione interna comunemente riscontrate per le molecole organiche sono:

1. Transizione senza radiazioni da uno stato di singoletto eccitato superiore allo stato di singoletto eccitato più basso,  $S_n \rightarrow S_1$ ;
2. Transizione senza radiazioni da uno stato di terzina eccitata superiore allo stato di terzina disteso più basso,  $T_n \rightarrow T_1$ ;
3. Transizioni senza radiazioni dallo stato di singoletto di energia più basso allo stato di singoletto di terra,  $S_1 \rightarrow S_0$

#### Regole per queste transizioni:

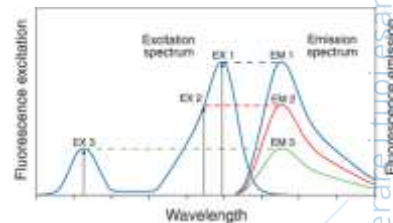
- Legge dell'energy gap che ci dice che la costante di velocità della conversione interna e della conversione intersistema decresce esponenzialmente con la differenza tra i due stati elettronici coinvolti. Processi favoriti per  $\Delta E$  piccoli.

Quindi essi sono tanto più facili tanto più il  $\Delta E$  tra gli stati elettronici coinvolti è più piccolo.

- Regola di Kasha (deriva dalla legge dell'energy gap) ci dice che se io osservo emissione la osservo a partire dagli stati elettronici di più bassa energia di una certa molteplicità di spin; di fatto i miei stati emettitori sono  $S_1$  e  $T_1$ . Ci sono poi delle eccezioni oggi vanno di moda comportamenti anti-Kasha.
- Regola di Vavilov (deriva dalla legge dell'energy gap) ci dice che la resa quantica di fluo e di fosfo sono indipendenti dall'energia usata inizialmente per l'eccitazione.
- Regola di Elsayed vale per la conversione intersistema

Le transizioni non radiative sono identificate, determinate e ipotizzate per via indiretta. L'approva provata che esistano è che, ovunque io vada ad eccitare, per la regola di Kasha, il sistema emette sempre per disattivazione da  $S_1$  o  $T_1$ . Ciò significa che il sistema deve poter passare da livelli maggiori come  $S_2, S_3, T_2, T_3$  a  $S_1$  e  $T_1$ .

Se cambio la lambda di eccitazione in uno spettro di emissione in generale non cambia la posizione della banda di emissione che è sempre a partire dallo stesso stato emissivo e che in generale per la regola di Kasha è  $S_1$  o  $T_1$ . Quello che cambia è la l'intensità della banda perché a seconda della capacità di assorbire la radiazione di una determinata lunghezza d'onda quindi in dipendenza della epsilon di un campione alla lambda di eccitazione, io popolerò più o meno efficacemente lo stato da cui avviene l'emissione.



#### Costanti di velocità per conversione interna e intersystem crossing

Esse sono date dalla regola d'oro di Fermi che dipende principalmente da due parametri: in primis dal quadrato dell'integrale di Frank-Condon (che è l'overlap tra le funzioni vibrazionali degli stati coinvolti) e poi da  $\rho_f$  che è la densità degli stati considerabili isoenergetici nello stato d'arrivo rispetto a quello di partenza (che sarà il  $v_0$  dello stato elettronico a maggiore energia).

$$k_{i \rightarrow f} = \frac{2\pi}{\hbar} V_{if}^2 \rho_f$$

#### Digressione su intersystem crossing

Qui come per la fosforescenza è necessario il flip dello spin di un elettrone quindi nella conversione intersistema ci sono delle regole restrittive in più rispetto alla conversione interna legate al fatto che qui la transizione avviene tra stati aventi diversa molteplicità. Esattamente come le fosforescenza la conversione intersistema è favorita in presenza di un forte accoppiamento spin orbita che si ha in presenza di atomi pesanti e per  $\Delta E$  molto piccoli tra gli stati di tripletto e singoletto coinvolti nella transizione.

La conversione intersistema favorisce il passaggio singoletto tripletto che è sia quello da  $S_1$  a  $T_1$  ma anche quello da  $T_1$  a  $S_0$ . Quindi la presenza di un atomo pesante sicuramente favorisce la formazione di uno stato di tripletto dopodiché non è necessariamente vero che in un sistema con un atomo pesante io osservi fosforescenza. Se c'è un atomo pesante io avrò una < della resa quantica di fluorescenza e questo perché la conversione intersistema  $S_1 \rightarrow T_1$  con il decadimento radiativo  $S_1 \rightarrow S_0$  (quindi con la fluorescenza). Quella che > è la resa quantica di tripletto cioè > il numero di molecole che passa a popolare quello stato di tripletto.

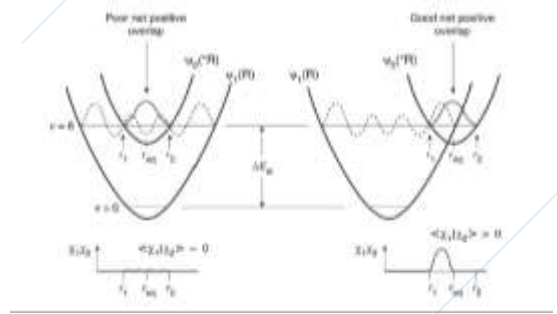
In seguito il cammino che seguirà il mio sistema non è facilmente prevedibile perché prima l'atomo pesante favorisce sia il ritorno radiativo (cioè fluo)  $S_1 \rightarrow S_0$  sia la transizione non radiativa con intersystem crossing  $T_1 \rightarrow S_0$ . A priori non posso sapere quale sarà la più favorita.

Sperimentalmente si osserva che le costanti di velocità di questi processi non radiativi > al < del  $\Delta E$  tra gli stati elettronici coinvolti = legge dell'energy gap. Supponiamo che il mio stato di partenza sia  $T_f$  di  $S_1$  e il  $\Delta E$  è grande e ciò vuol dire che, da una parte, io arrivo in una zona di alta densità vibrazionale dello stato elettronico di arrivo ma inoltre gli integrali di F-C sono piccoli e quindi pesano poco perché il numero di nodi della funzione vibrazionale > all'> dell'energia vibrazionale e quindi la funzione vibrazionale diventa sempre più appiattita e l'overlap tra le due sarà sempre più piccolo.

Di solito la conversione intersistema e interna sono transizioni irreversibili perché parto da uno stato elettronico in cui la densità degli stati vibrazionali è piccolo e arrivo su uno stato ad elevata densità vibrazionale e quindi il sistema passa su questi stati vibrazionali dai quali esso rilassa molto velocemente per portarsi su  $V_0$  dello stato elettronico di arrivo.

Di solito il  $\Delta E$  tra i livelli elettronici < all' > dell'energia degli stati quindi le transizioni non radiative tra stati elettronici eccitati sono molto facili e quindi il sistema torna molto velocemente dagli stati  $S_n$  sullo stato  $S_1$ . Solo a questo punto, essendo il  $\Delta E$   $S_1 \rightarrow S_0$  maggiore di quelli superiori allora la fluorescenza diventa competitiva con la conversione interna. Quindi il sistema emetterà una volta trovatosi su  $S_1$ , non prima (= legge di Kasha).

Può accadere che il  $\Delta E$  non pesi tanto se lo stato eccitato è molto distorto rispetto allo stato fondamentale; questo perché in quel caso accadrebbe che le due curve di energia potenziale si incontrano in un punto laterale e ciò vuol dire che la sovrapposizioni tra le funzioni d'onda vibrazionali dello stato di partenza ( $v_0$  di  $S_n$ ) su uno stato  $v_n$  di  $S_{n-1}$  è comunque uno stato, un overlap alto (i fattori di F-C sono elevati) perché la probabilità delle funzioni vibrazionali è max nelle zone laterali che sono le zone di turning point quindi anche se il numero di nodi della funzione vibrazionale è elevato per  $v_n$  elevato e la funzione è di bassa ampiezza nelle zone centrali la sua ampiezza resta consistente nelle zone laterali. Quindi detto tutto ciò sarà probabile la transizione non radiativa in un caso del genere. Si dice infatti che **la rigidità fa bene alla transizione radiativa, e nei sistemi la distorsione fa bene alla transizioni non radiative.**



Un'evidenza sperimentale dell'importanza dell'energy gap e dei fattori di FC nel determinare la velocità delle transizioni non radiative è data dagli effetti di deuterazione; si è visto che nei sistemi deuterati le costanti di velocità dei processi non radiativi sono più piccole rispetto agli analoghi non deuterati e questo lo si capisce ragionando sulla dipendenza della frequenza vibrazionale dalla massa ridotta.

Sappiamo che la frequenza vibrazionale è direttamente proporzionale alla costante di forza ma inversamente proporzionale alla massa ridotta quindi > la massa ridotta (come in un sistema deuterato rispetto all'analogo non deuterato) abbiamo che la frequenza vibrazionale < quindi i livelli vibrazionale avranno tra loro una spaziatura ridotta.

Quindi il processo di conversione interna è più favorito per l'idrocarburo aromatico non deuterato (quindi avrà costante di velocità maggiore) = i fattori di FC pesano molto. Qui non c'è molta competizione con la fluorescenza; si è infatti visto che il pirene non deuterato e quello deuterato hanno uguali tempi di vita del singoletto e la stessa resa quantica di fluorescenza. Siccome i 2 si comportano nello stesso modo quindi non c'è molta competizione con la fluorescenza negli idrocarburi aromatici condensati.

**Regole di selezione per conversione intersistema**

**Regole di El-Sayed:** la costante di velocità del processo di intersystem crossing è più elevata se lo stato di tripletto e quello di singoletto associati a quella conversione intersistema sono caratterizzati da configurazioni elettroniche diverse.

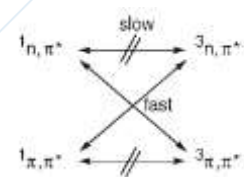
El-Sayed's Rule for  $S_1 \rightarrow T_1$  ISC: Allowed:  $(^1n, \pi^*) \leftrightarrow ({}^3\pi, \pi^*)$ ;  $({}^3n, \pi^*) \leftrightarrow ({}^1\pi, \pi^*)$

Forbidden:  $({}^1n, \pi^*) \leftrightarrow ({}^3n, \pi^*)$ ;  $({}^3\pi, \pi^*) \leftrightarrow ({}^1\pi, \pi^*)$

El-Sayed's Rule for  $T_1 \rightarrow S_0$  ISC:

$T_1(n, \pi^*) \rightarrow S_0(n_2)$  Allowed

$T_1(\pi, \pi^*) \rightarrow S_0(\pi_2)$  Forbidden



## Predissociazione e dissociazione

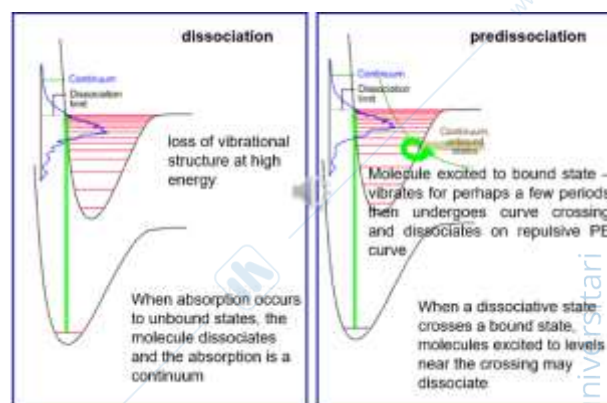
Sono altri possibili meccanismi competitivi nei confronti dei processi radiativi.

La **dissociazione** è l'eccitazione della molecola in andata su livelli corrispondenti a energie dissociative per la molecola.

La **predissociazione** è dovuta al passaggio del mio sistema da uno stato elettronico eccitato in cui la molecola è legata e interseca la curva di energia potenziale di uno stato che corrisponde ad una situazione dissociativa per la molecola quindi io passo dallo stato dissociato con conseguente fotolisi del mio sistema.

Nei casi in cui un'eccitazione elettronica passa una quantità di energia che solleva la molecola in uno stato al di sopra dei più alti livelli vibrazionali, si verifica la dissociazione. Il rispettivo spettro visualizza una zona sfocata oltre il cosiddetto limite di dissociazione.

La predissociazione si trova per molecole in cui potenziali curve di uno stato legato e uno non legato si incrociano. Una quantità inferiore di energia solleva la molecola in uno stato in cui gli elettroni possono riorganizzarsi in uno stato non legato (conversione interna).

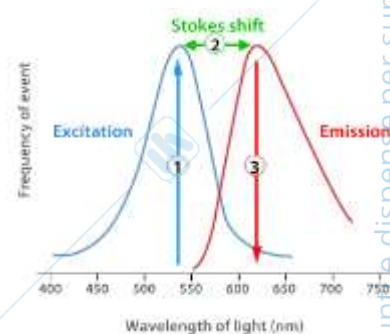


## Fluorescenza

Rilassamento radiativo tra stati aventi la stessa molteplicità di spin. Si realizza con almeno 4 passaggi: il primo è l'assorbimento, poi rilassamento vibrazionale, fluorescenza, rilassamento vibrazionale. Quindi avviene solo se il processo radiativo è preceduto da assorbimento  $S_0 \rightarrow S_1$ . La fluo può essere conseguente anche ad altri passaggi ad es. se ho da  $S_0$  a  $S_2$  e poi conversione interna a  $S_1$ , rilassamento, fluorescenza e successivo rilassamento vibrazionale.

**Per lo Stok shift si ha sempre che l'emissione radiativa cadda ad energia più basse delle corrispondenti eccitazioni;** più è grande lo Stok shift è più sono facili le registrazioni delle misure.

Se una transizione è caratterizzata da una grande forza dell'oscillatore ciò significa che in andata avrò una banda di assorbimento di elevata intensità; in ritorno la grande forza dell'oscillatore si traduce in un'elevata costante di velocità del processo radiativo quindi qui di fluorescenza. Questo non vuol dire che il sistema per cui la transizione  $S_0 \rightarrow S_1$  è caratterizzata da elevata forza dell'oscillatore sia necessariamente un emettitore di fluorescenza ad elevata resa quantica, è solo una possibilità.



Se in andata il sistema non può far altro che assorbire o non assorbire la radiazione, in ritorno il sistema che ha raggiunto il suo  $S_1$  può fare tante cose e se la costante di velocità della fluorescenza sarà elevata allora il sistema potrà disattivare per fluorescenza ma potrebbe sceglierne altre con costanti di velocità competitive. Inoltre un sistema è un buon emettitore per fluorescenza se il suo stato di fluorescenza  $S_1$  è uno stato a carattere  $n, \pi^*$  oppure  $\pi, \pi^*$ . Ciò è perché in genere le transizioni  $S_0 \rightarrow S_1$  a carattere  $\pi, \pi^*$  hanno forze dell'oscillatore > rispetto a quelle  $S_0 \rightarrow S_1$  corrispondenti a quelle  $n, \pi^*$  e ciò è dovuto alle regole selezione di simmetria. **In assorbimento una banda  $\pi, \pi^*$  è spesso più intensa di una  $n, \pi^*$ .**

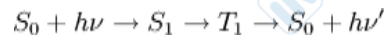
Un'altra ragione è che per uno stato  $S_1, \pi^*$  si fanno risentire di più i processi competitivi come per esempio l'intersystem crossing perché lo splitting singoletto-tripletto a carattere  $n, \pi^*$  è più piccolo di quello tra  $S_1 \rightarrow T_1$  in cui i due hanno carattere  $\pi, \pi^*$ . Infatti la stabilizzazione dello stato di tripletto dipende dall'overlap degli orbitali coinvolti nella transizione e l'overlap è > per una transizione  $\pi, \pi^*$  piuttosto che per una  $n, \pi^*$ . Se  $S_1$  è vicino a  $T_1$  la conversione intersistema sarà più facile.

Inoltre se per un sistema sono possibili solo transizioni  $\pi, \pi^*$  la conversione intersistema non è favorita neanche dalle regole di El-sayed; in un sistema dove sono possibili sia transizioni  $\pi, \pi^*$  e  $n, \pi^*$  accade che sappiamo che un singoletto e un tripletto che hanno carattere diverso daranno più facilmente conversione intersistema. **Quindi ci importa sia del  $\Delta E$  singoletto-tripletto sia del carattere del singoletto e del tripletto.**

**Riassunto:** se lo stato di singoletto è  $\pi, \pi^*$  è un più probabile emettitore per fluorescenza rispetto ad un sistema in cui il singoletto è  $n, \pi^*$  perché la costante di velocità della fluo è più elevata di quella di intersystem crossing.

## Fosforescenza

Transizione radiativa tra stati aventi diversa molteplicità di spin. Percorso più lungo di quello per fluorescenza. E' poco probabile che il livello  $T_1$  si popoli direttamente da  $S_0$  perché ciò va contro le regole di selezione di spin; si passa da  $S_1$  per intersystem crossing.

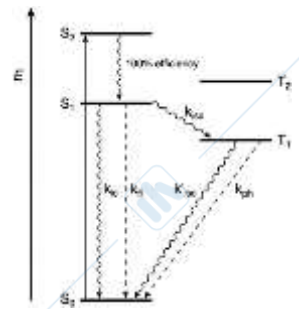


Siccome lo stato  $T_1$  è sempre a minor energia di  $S_1$  quindi la banda di fosforescenza sarà spostata verso il rosso rispetto a quella di fluorescenza e quindi lo Stokes Shift rispetto alla banda di assorbimento che di fatto è nel caso generico relativo alla transizione  $S_0 \rightarrow S_1$  diventa ancora più imponente per la banda di fosforescenza rispetto a quella di fluorescenza.

La fosforescenza è una transizione decisamente poco probabile in una molecola organica a T ambiente e questo perché in una molecola puramente organica è difficile popolare lo stato di tripletto mediante intersystem crossing  $S_1 \rightarrow T_1$  perché è debole l'accoppiamento spin orbita quindi quella transizione è una transizione non facile da realizzare perché è facilmente non permessa dalle regole di selezione di spin e successivamente perché in una molecola organica anche se venisse popolato lo stato di tripletto il suo tempo di vita è così lungo che viene facilmente quenched attraverso per esempio quenching collisionale con l'ossigeno.

*In un complesso di un metallo di transizione oppure se inseriamo un atomo pesante nella molecola organica facilitiamo sia processi per intersystem crossing che la disattivazione radiativa mediante fosforescenza da  $T_1$ .*

Nello schema abbiamo assorbimento su  $S_2$ , conversione interna su  $S_1$  da cui può tornare a  $S_0$  con conversione interna, o ritornarci con fluorescenza oppure fare intersystem crossing e andare su  $T_1$  da cui può tornare a  $S_0$  con intersystem crossing oppure tramite fosforescenza.

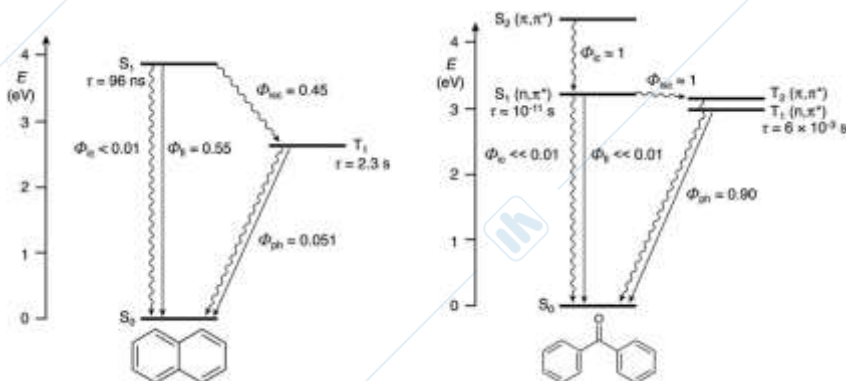


Ricordo che potrei avere intersystem crossing da  $S_n$  su  $T_n$  che poi rilassa su  $T_1$  che può dare fosforescenza.

**L'effetto dell'atomo pesante presente sulla molecola si fa risentire attraverso l'accoppiamento spin-orbita che rende il tripletto a parziale carattere di singoletto con risultato che i processi di conversione intersistema e la fosforescenza sono processi più facili di quanto succede in assenza di atomi pesanti che può avvenire se la molecola si coordina ad un metallo di transizione oppure se si introduce un ALOGENO sulla molecola organica.** Andando da Cl a I l'effetto si rende sempre più marcato. Inoltre tale effetto è tanto più importante tanto più gli orbitali dell'atomo pesante sono coinvolti nello stato di cui stiamo trattando quindi il tripletto da cui si può avere intersystem crossing o fosforescenza.

Naftalene non è emettitore per fosforescenza ma il benzofenone è un buon emettitore (si osserva a 77 K perché in queste condizioni la fosforescenza è meno dei processi di disattivazione competitivi con essa, e si quenches con ossigeno). Il diagramma del naftalene presenta solo transizioni  $\pi, \pi^*$  e non avendo eteroatomi con doppietti di non legame sulla molecola abbiamo che il sistema ha una resa quantica di fluo pari a 0.55 (vedi esempio dei sistemi deuterati dove si vede che la conversione interna tra  $S_1$  e  $S_0$  nei sistemi aromatici policiclici condensati non è molto efficiente); la sua resa quantica tripletto cioè la resa quantica del processo di intersystem crossing pari a 0.45; la resa quantica di fosfo da  $T_1$  è bassa, è 0.051.

Nel benzofenone ho stati sia a carattere  $\pi, \pi^*$  che  $n, \pi^*$  e il sistema non è un buon emettitore per fluorescenza perché dallo stato  $S_1$  avviene con resa pari 1 la conversione intersistema  $S_1 \rightarrow T_2$  e questo deriva dal fatto che il gap energetico  $S_1 \rightarrow T_2$  è un gap energetico molto piccolo e perché i due corrispondono a due diverse configurazioni elettroniche il che rende quel processo di intersystem crossing particolarmente favorito sia dal punto di vista dell'energy gap sia dalle regole di El-sayed. Poi ho conversione interna su  $T_1$  e fosforescenza da  $T_1$  con resa quantica di fosfo pari a 0.90.



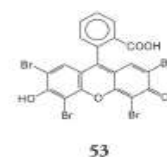
Vediamo ora cosa succede se aggiungiamo un atomo pesante (alogeno) sul naftalene che non avrebbe voglia di comportarsi da emettitore per fosforescenza. Ci aspettiamo che l'effetto dell'atomo pesante cresca da F a I. > l'atomo costante mi aspetto che la costante di intersystem crossing relativa al passaggio  $S_1 \rightarrow T_1$  >. Questo > della  $k$  si manifesta da una parte con una < del tempo di vita dello stato di singoletto (perché è inversamente proporzionale alla somma delle  $k$  dei processi che si realizzano da  $S_1$  quindi se  $k_{isc}$  > il tempo di vita di  $S_1$  <; lo posso anche immaginare pensando che se  $k_{isc}$  è elevata questo processo è favorito e  $S_1$  viene svuotato velocemente) e dall'altra con una < della resa quantica di fluo. La resa quantica di fluo < perché ho un processo competitivo con la fluo che diventa più facile, che si realizza più velocemente. L'efficienza del processo  $S_1 \rightarrow T_1$  >. Questo è l'effetto dell'atomo pesante sul  $k_{isc}$   $S_1 \rightarrow T_1$  e ci aspettiamo che tale effetto faccia > la  $k_{isc}$  tra  $T_1$  e  $S_0$ . Se la  $k_{isc}$   $T_1 \rightarrow S_0$  aumenta, il tempo di vita del tripletto < ma < anche l'efficienza di fosfo. Di contro si ha che per effetto dell'atomo pesante la  $k_{ph}$   $T_1 \rightarrow S_0$  > e quindi il tempo di vita del tripletto < e > l'efficienza di fosfo. Quindi questi ultimi due effetti sono in competizione e a priori non possiamo sapere quale prevarrà quindi dall'aggiunta dell'atomo pesante possiamo dire con certezza solo che < la resa quantica di fluo e < il tempo di vita del singoletto.

Table 1 Internal heavy-atom effect on electronic transitions between states of naphthalene derivatives in a rigid matrix at 77 K (vol. 2, p. 126 of ref. 27)

Molecule	$\Phi_{fl}$	$\Phi_{ph}$	$\tau(T_1)$ (s)	$\eta_{isc}$	$k_{ph}$ ( $s^{-1}$ )	$k_{isc}$ ( $s^{-1}$ )	$k_{isc}'$ ( $s^{-1}$ )
Naphthalene	0.55	0.051	2.3	0.45	0.05	$0.82 \times 10^6$	0.39
1-Fluoronaphthalene	0.84	0.056	1.5	0.16	0.23	$0.57 \times 10^6$	0.42
1-Chloronaphthalene	0.058	0.30	0.29	0.94	1.10	$49 \times 10^6$	2.35
1-Bromonaphthalene	0.0026	0.27	0.02	1	13.5	$1850 \times 10^6$	36.5
1-Iodonaphthalene	<0.0005	0.38	0.002	1	190	$>6000 \times 10^6$	310

## Fluorescenza ritardata

Ne esistono due tipi di cui uno è bimolecolare e l'altro intramolecolare. La prima ha alla base una nichilazione tripletto-tripletto e è anche chiamata di tipo  $P$  perché è stata osservata per la prima volta nel pirene (vedi più avanti). Ora trattiamo quello di tipo  $E$  che è stato osservato per l'eosina (vedi figura). La fluo ritardata di tipo  $E$  è un processo intramolecolare e per questo è rappresentato nel diagramma di Jablonski relativo solo ai processi intramolecolari.



53

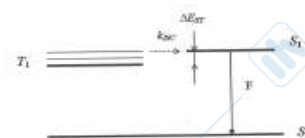


Figura 2.20 - Fluorescenza ritardata di tipo E.

Cade, dal punto di vista della banda, nella zona di fluorescenza classica quindi nell'intervallo nei nanosecondi e questo perché è una disattivazione da  $S_1$ . Si realizza però in tempi più lunghi rispetto alla classica fluo e questo perché si realizza in un passaggio  $S_1 \rightarrow T_1$  per conversione intersistema e il mio stato  $S_1$  viene ripopolato per un processo di back-intersystem crossing da  $T_1$  a  $S_1$  e successivamente vedo fluorescenza (ritardata).

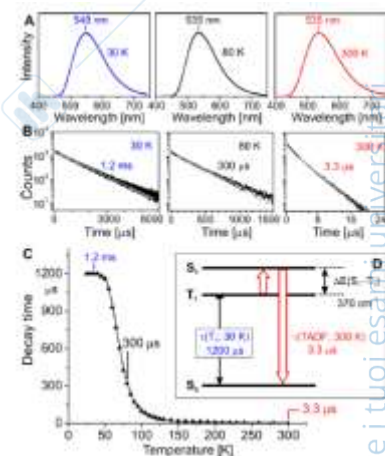
Sono molti i sistemi che danno fluo ritardata che può essere chiamata **TADF**. Il requisito fondamentale per osservare TADF è che il passaggio di intersystem crossing  $S \rightarrow T$  sia facile e che il gap tripletto singoletto sia molto piccolo. Così da degli stati vibrazionali eccitati di  $T_1$  il sistema può tornare a popolare  $v_0$  di  $S_1$ .

Potrei avere fluo ritardata anche se il processo di back intersystem crossing riguardasse dei livelli a più alta energia  $S_n \rightarrow T_n$ .

La fluo ritardata ha avuto un grosso impatto nel 2012 quando è stato pubblicato un lavoro in cui si diceva che era possibile usare sistemi che manifestassero TADF per applicazioni negli OLED.

I composti di  $Cu^I$  sono molto studiati per le loro proprietà di TADF infatti essi spesso presentano basso splitting singoletto-tripletto. Guardando gli spettri non cambia nulla rispetto alla fluo perché la posizione della banda a RT è la stessa perché dipende dal gap  $S_1 \rightarrow S_0$ . Però a RT, effettuando una misura con uno strumento che possa misurare i tempi di vita, si vede che in corrispondenza della posizione della banda di emissione, si osservano sia tempi caratteristici della banda di emissione classica (quindi nell'ordine dei ns) sia tempi più lunghi anche fino ai  $\mu s$ .

Se abbasso la T la banda si sposta poco verso il rosso e i tempi si allungano decisamente. Quindi a causa della T bassa non è più possibile la ripopolazione per via termica di  $S_1$  a partire da livelli  $T_n$  quindi il processo di back intersystem crossing non ci può essere e quindi ho emissione per fosfo.



### Spettroscopia di assorbimento VS spettroscopia di fotoluminescenza

Quando la radiazione incidente incontra il sistema succedono molte cose che funzionano come perturbazione sul sistema o perturbazione sulla radiazione elettromagnetica oppure perturbazione su entrambi. La radiazione può essere assorbita e nella spettro di assorbimento mi preoccupo di determinare e quantificare la radiazione trasmessa attenuata per effetto dell'assorbimento. Mentre per la fotoluminescenza non mi interessano le info riguardo la radiazione incidente ma solo quelle riguardo la radiazione emessa. La maggior geometria utile per raccogliere la radiazione prodotta per fotoluminescenza è di *posizionarmi a 90°*; così ho meno disturbo ad opera della radiazione incidente che comunque opera a 90° mediante diffusione di tipo Rayleigh ma è comunque attenuata rispetto a quanto sarebbe se io raccogliessi (cercassi di raccogliere la rad prodotta per fotoluminescenza) nella direzione di trasmissione della radiazione incidente. **Può succedere che la rad non venga assorbita ma per effetto di interazione con il campione venga diffusa con conservazione dell'energia (=diffusione rayleigh) o con variazione dell'energia per effetto di urti anelastici (=diffusione raman).**

Technique	Synopsis
Absorption spectrometry	Scan $\lambda_{in}$ , measure intensity of transmission.
Photoluminescence (PL)	Fixed $\lambda_{in}$ , scan $\lambda_{out}$
Photoluminescence Excitation (PLE)	Fix $\lambda_{out}$ , scan $\lambda_{in}$
Raman scattering	Laser in, scan $\lambda_{out}$ very close to $\lambda_{in}$

Il grosso pregio della spettroscopia di assorbimento è la sua universalità perché tutti i composti in regioni caratteristiche mostrano assorbimento. La fotoluminescenza invece non è un fenomeno universale però è maggiormente sensibile di 2/3 ordini di grandezza rispetto all'assorbimento e ciò è dovuto al diverso fenomeno su cui si basano le due tecniche.

Nella spettro di assorbimento io devo determinare  $i$  o  $i_0$  o  $p$  e  $p_0$  ed è la differenza tra le due che determina il limite di rivelabilità del composto mentre nella spettro di foto io devo raccogliere solo il segnale emesso per foto e quindi questo rispetto ad un segnale di background molto basso. Per questo ho dei vantaggi se uso un laser nella spettro di luminescenza ma in quella di assorbimento non ce l'ho perché la differenza tra  $i$  e  $i_0$  resta uguale.

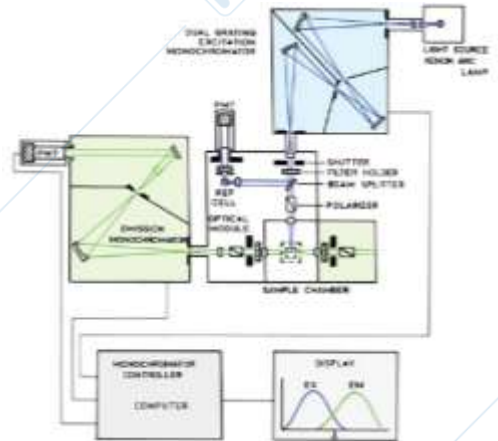
Oltre alla grande **sensibilità**, la spettro di fotoluminescenza mi permette anche la determinazione di fenomeni che si realizzano durante il tempo di vita del fluoroforo nel suo stato eccitato che di fatto rappresenta la finestra di spazio temporale che io ho per visualizzare variazioni nell'intorno del fluoroforo che comportano variazioni nella risposta spettroscopica del fluoroforo stesso.

Un altro vantaggio della spettro di foto è la più elevata **specificità**: infatti l'analisi per assorbimento viene fatta sulla singola lunghezza d'onda mentre in fotoluminescenza l'analisi è fatta sulle due  $\lambda$ , quella di assorbimento e quella di emissione. Quindi ho due  $\lambda$  su cui discriminare i composti.

## Lo spettrofluorimetro

Mentre la spettro di assorbimento è fatta in sistemi a doppio raggio, questo non accade nella spettroscopia di fotoluminescenza il che rende la misura molto più dipendente dalle prestazioni dei diversi comparti strumentali rispetto alla spettro di assorbimento. Abbiamo:

- Sorgente continua di radiazione UV-vis e tipicamente una lampada ad arco a xenon. Essa è continua ma non è ideale perché l'intensità della radiazione emessa varia al variare della  $\lambda$  d'onda e anche con il tempo. Una sorgente continua ideale dovrebbe dare emissione di uguale intensità per ogni  $\lambda$ .
  - Primo monocromatore, detto monocromatore di eccitazione
  - Il sistema viene inviato con un bin-splitter ad un comparto di riferimento che serve per tenere conto delle fluttuazioni della sorgente
  - Il raggio arriva dal monocromatore di eccitazione sul comparto portacampione dove il segnale di emissione viene raccolto a  $90^\circ$  (detta "right angle") e passa attraverso un secondo monocromatore che è detto di emissione e viene rivelato dal sistema di rivelazione che tipicamente è un tubo fotomoltiplicatore. La raccolta viene fatta nella porzione centrale della cuvetta e le facce laterali invece vengono schermate dal portacampione per minimizzare gli effetti di diffusione e riflessione. Su solidi o su liquidi molto [] la geometria di raccolta è quella "front face" e non più "right angle".
- Anche i fotomoltiplicatori non sono sistemi ideali infatti si vede dalle curve di risposta che le prestazioni dipendono dalle  $\lambda$ . Anche i monocromatori dipendono dalla  $\lambda$ .



Il fatto che i vari componenti dello spettrofluorimetro non siano ideali mi dà dei problemi che non avevo nello spettro di assorbimento perché in ass il valore di assorbanza è in UNITA' ASSOLUTE: perché la misura dell'assorbanza dipende dall'intensità della luce trasmessa e di quella incidente cioè di quella tra due raggi che hanno  $\lambda$  e sono posti lungo lo stesso percorso ottico; quindi le fluttuazioni nella risposta su un segnale si sentono allo stesso modo sull'altro quindi annullandosi a vicenda.

Nella spettro di foto invece io misuro SOLO una  $\lambda$  particolare quindi il problema delle fluttuazioni non è autocorretto dallo strumento e questo fa sì che gli spettri di fotoluminescenza vengono diagrammati in intensità in funzione delle  $\lambda$  dove l'intensità viene data in UNITA' ARBITRARIE (quindi l'intensità che sto misurando per un fluoroforo in certe condizioni es. solvente, non sono riproducibili esattamente da tutti gli strumenti). Quindi ho fluttuazioni strumentali di cui devo tenere conto correggendo i miei spettri per quanto riguarda la risposta non ideale del comparto sorgente (=monocromatore di eccitazione) e per il comparto rivelazione (=il monocromatore di eccitazione e il tubo fotomoltiplicatore).

Parliamo di "spettri" e non di "spettro" perché con lo spettrofluorimetro possiamo identificare due diverse tipologie di spettri. Infatti rispetto al fluorimetro, lo spettrofluorimetro è accessorizzato con due monocromatori che mi permettono di registrare due spettri diversi: di eccitazione e di emissione.

Lo spettro di emissione viene registrato fissando il monocromatore di eccitazione ad una  $\lambda$  corrispondente ad una transizione che il sistema può compiere (quindi deve essere una transizione presente nello spettro di assorbimento del composto) e facendo una scansione col monocromatore di emissione; essa deve essere fatta a  $\lambda$  maggiori/energie minori rispetto alla  $\lambda$  di eccitazione e questo perché è sempre presente uno stokes shift e quindi la banda di emissione cade a  $\lambda$  maggiori/energie minori rispetto alle bande di assorbimento o eccitazione. **Per registrare uno spettro di emissione, il monocromatore di eccitazione viene impostato su un valore di lunghezza d'onda all'interno dello spettro di assorbimento del campione (spesso, nell'ultima banda di assorbimento), e il**

monocromatore di emissione viene spostato per scansionare un intervallo spettrale a un'energia inferiore rispetto alla lunghezza d'onda di eccitazione.

Si acquisisce uno spettro di eccitazione fissando il monocromatore di emissione ad un valore di lunghezza d'onda all'interno della banda di emissione del campione (solitamente, la banda massima), mentre il monocromatore di eccitazione viene utilizzato per scansionare l'intervallo di lunghezze d'onda corrispondente allo spettro di assorbimento del campione

Lo spettro di eccitazione invece lo ottengo tenendo fisso il monocromatore di emissione su una  $\lambda$  corrispondente alla banda di emissione e facendo la scansione con il monocromatore di eccitazione a  $\lambda$  minori (energie maggiori) rispetto alla banda monitorata in emissione. Quindi il mio spettro di eccitazione mi dice come varia l'intensità del segnale di foto al variare della  $\lambda$  di eccitazione che sto inviando al campione. Se lo spettro di eccitazione è corretto (cioè abbiamo rimosso gli errori derivanti dalle fluttuazioni) allora esso è fratello dello spettro di assorbimento nel senso che avrà un andamento/posizione dei segnali che ricalcano quelli dello spettro di assorbimento.

Lo spettro di eccitazione può darci info molto importanti: se il campione emette ed è presente in tracce in soluzione e non sono riuscita a registrare uno spettro di assorbimento è possibile che ciò possa essere fatto mediante lo spettro di eccitazione essendo la tecnica più sensibile. Altro es, se ho miscela di componenti nello spettro di assorbimento io vedo tutto ma se io ho che solo uno emette nello spettro di eccitazione io vedrò solo il componente responsabile dell'emissione.

- *spettro di emissione*: mantenendo costante la lunghezza d'onda di eccitazione e facendo variare la lunghezza d'onda di emissione
- *spettro di eccitazione*: mantenendo costante la lunghezza d'onda di emissione e registrando il variare della sua intensità in funzione del variare della lunghezza d'onda di eccitazione.

**Fase tecnica della misura:** preparo il campione che deve essere purissimo a causa dell'alta sensibilità dello strumento e preparo una soluzione in bassa  $[\ ]$  cioè ca.  $10^{-5}$ - $10^{-6}$  M. Metto la soluzione in una cuvetta di quarzo e inizio registrando uno spettro di emissione questo perché per registrare un spettro di eccitazione devo sapere se A emette e se sì, dove emette. Per lo spettro di emissione invece mi basta sapere dove posso eventualmente eccitare il mio campione e questo posso saperlo se ho fatto lo spettro di assorbimento oppure se ho guardato la mia soluzione: se essa è incolore o colorata posso capire quali sono le possibili  $\lambda$  di eccitazione che posso usare per eccitare il campione. Se è incolore però radiazione UV ma di energia non troppo elevata per non rischiare di fotodegradare il campione e in generale NON si usa una  $\lambda$  di eccitazione inferiore ai 280 nm. Una volta che ho visto dove emette il mio campione e mi fissa sul max di emissione e registro lo spettro di eccitazione. Di solito comunque si prova ad eccitare a minimo due  $\lambda$  diverse e questo perché bisogna essere sicuri che non si abbiano variazioni nello spettro di emissione perché se io osservo una variazione nello spettro di emissione usando due  $\lambda$  diverse devo sospettare la presenza di un'impurezza; se infatti vale la regola di Kasha, lo spettro di emissione deve essere indipendente dalla  $\lambda$  di eccitazione.

**Sia le misure di assorbimento che di emissione sono ben adatte a misure di tipo quantitativo.** Se per l'assorbimento usiamo la Lambert-Beer che collega l'assorbimento alla  $[\ ]$ , invece in fotoluminescenza usiamo una simil-Lambert Beer che ci permette di usare lo spettro di foto per quantificare gli analiti.

$I_0$  è l'intensità del raggio incidente che ecciterà il campione. Pertanto, l'eccitazione con un laser consentirà di produrre una migliore intensità di fluorescenza rispetto a una lampada utilizzata per l'eccitazione. L'intensità di fluorescenza è proporzionale alla resa quantica, cioè un'alta resa quantica porta automaticamente ad un'alta intensità di fluorescenza. L'intensità della fluorescenza è proporzionale alla densità ottica. Ciò significa che è proporzionale a  $\epsilon c l$  e  $I$ . Poiché  $\epsilon$  dipende dalla lunghezza d'onda, anche l'intensità della fluorescenza dipende dalla lunghezza d'onda.

$$\Phi_f = \frac{I_f}{I_A}$$

$$I_A = I_0 - I_f \quad \text{and}$$

$$I_f = I_0(1 - e^{-\epsilon c l}) = I_0 e^{-2.3 \epsilon c l}$$

$$I_A = I_0 - I_0 e^{-2.3 \epsilon c l} = I_0(1 - e^{-2.3 \epsilon c l}) = I_0 [2.3031 \epsilon c l - \frac{(2.303 \epsilon c l)^2}{2!} + \frac{(2.303 \epsilon c l)^3}{3!} \dots]$$

$$\text{If } \epsilon_0 c l = A < 0.1:$$

$$I_A = 2.3 I_0 \epsilon_0 c l$$

$$\text{Thus, } I_f = \Phi_f I_0 (2.3 \epsilon_0 c l) = K c = \Phi_f I_0 (2.3 A_{0(\epsilon)})$$

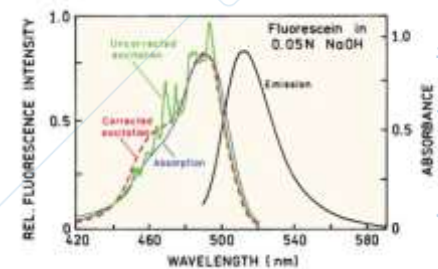
Per avere info quantitative devo però lavorare con soluzioni DILUITE altrimenti perdo la relazione di linearità tra intensità e  $I_0$  sia per ragioni matematiche che geometriche → effetti del filtro interno.

L'aspetto matematico è descritto da questa equazione:  $I_{F(\lambda_E, \lambda_F)} = \Phi_{F I_0(\lambda_E)} 2.3A(\lambda_E)$

Vediamo questa relazione dal punto di vista dello spettro di eccitazione che è effettuato monitorando l'intensità di fluorescenza ad una  $\lambda$  di fluorescenza fissa, variando la  $\lambda$  di eccitazione. Se variamo la  $\lambda$  di eccitazione nella  $>$  parte dei composti la resa quantica di fluo non varia perché vale la regola di Vavilov: **la resa quantica di luminescenza è generalmente indipendente dalla lunghezza d'onda di eccitazione.** Se anche  $I_0$  è costante abbiamo che  $I_0$  intensità di fluorescenza è lineare nell'assorbanza e quindi in queste condizioni lo spettro di eccitazione è il fratello di quello di assorbimento. Io avrò un massimo dell'intensità di fluo corrispondente al massimo del valore di assorbanza e questo corrisponderà ad un massimo nello spettro di eccitazione. Quindi lo spettro di eccitazione è "fratello" di quello di assorbimento se sono realizzare due condizioni: **la soluzione deve essere diluita e  $I_0$  deve essere costante al variare della  $\lambda$  di eccitazione.** In realtà sappiamo che  $I_0$  varia al variare della  $\lambda$  di eccitazione ed è per questo l'unica cosa per cui siano "fratelli" è che la soluzione sia diluita e che lo spettro di eccitazione sia corretto perché la risposta non ideale dato dal comparto sorgente quindi sorgente e monocromatore di eccitazione.

Quindi lo spettro deve essere corretto per la risposta non ideale del comparto sorgente può essere ottenuto con diversi metodi. Oggigiorno tutti gli spettrofluorimetri sono accessoriati con file dati dalla ditta che produce lo strumento che sono file di correzione utili per questo scopo. Se no si può correggere mettendo nel ramo di riferimento un contatore quantico la cui resa quantica è indipendente dalla  $\lambda$  di eccitazione ad elevata  $I_0$  in modo che l'intensità emessa dal campione sia proporzionale al flusso di fotoni incidenti e quindi permette di contare il numero di fotoni emessi dalla sorgente a quella  $\lambda$ .

Abbiamo spettro con a destra lo spettro di emissione della fluorescina e sulla sinistra lo spettro in blu di assorbimento; in verde lo spettro di eccitazione non corretto e in rosso quello corretto. Nello spettro non corretto ci sono picchi dovuti a fluttuazioni di intensità nel comparto sorgente che vengono eliminati una volta eseguita la correzione. Lo spettro corretto ricalca quello di assorbimento.



Uno spettro di emissione invece viene registrato tenendo fisso il monocromatore di eccitazione (=  $\lambda$  di eccitazione fissa) e facendo una scansione con monocromatori di emissione quindi variando la  $\lambda$  di emissione. Se lavoro su una  $\lambda$  di eccitazione fissa il problema delle fluttuazioni non mi interessa e al max mi interessano fluttuazioni temporali della sorgente alla singola  $\lambda$ . Anche se registro spettri corretti l'intensità di fotoluminescenza è espressa in unità arbitrarie. A questo punto è il comparto rivelazione che può modificare la forma dello spettro di emissione perché la risposta del comparto rivelazione non è indipendente dalla  $\lambda$  a cui sto lavorando.

Lo spettro di emissione può essere corretto in vari modi: di solito si usano i file di correzione dati dalla ditta che ha prodotto lo spettrofluorimetro. Alternativamente si può registrare lo spettro di emissione di una lampada calibrata e usare quello per la correzione oppure usare lo spettro di un composto standard per il quale è noto lo spettro corretto. Tra spettro non corretto e corretto si ha uno spostamento nel max di emissione cioè è dovuto alla minore sensibilità del comparto rivelazione alla minore delle  $\lambda$ .

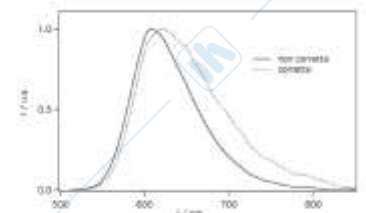


Fig. 4.10 - Spettri di emissione di Rhodamine B in acqua, prima e dopo la correzione per la sensibilità spettrale del comparto di rivelazione.

Oltre alla correzione degli spettri di eccitazione e di emissione è necessario anche, negli spettri di fotoluminescenza, avere molta consapevolezza di come si sta effettuando la misura che è un aspetto assolutamente diverso rispetto alla spettro di assorbimento dove questa consapevolezza non è così

necessaria. Infatti lo spettro di foto può essere complicato dalla presenza di altre bande spurie (vedi spettro): qui ci sono oltre alla banda di emissione, due bande relative alla banda Raman e Rayleigh. Ci potrebbero essere anche segnali che sono le bande armoniche dovute al monocromatore.

### Banda Raman e Rayleigh

Dovute alla diffusione della radiazione.

**Bande Rayleigh:** Sono dovute alla luce diffusa dall'interfaccia cella-aria, cella-soluzione, particelle sospese nella soluzione

**Bande Raman:** sono dovute all'interazione dei fotoni con il solvente

Il processo di diffusione avviene per interazione della rad elettromagnetica con il mio sistema e il risultato è una polarizzazione del sistema che viene portato in uno stato virtuale (quindi può essere qualsiasi stato, non è proprio del sistema). Il meccanismo è più rapido di quello in assorbimento. Dopo la perturbazione del sistema esso torna allo stato fondamentale e il risultato è che **il cammino della radiazione viene variato e la radiazione viene diffusa**. Viene diffusa o con conservazione dell'energia se l'urto è di tipo elastico e darà luogo ad una banda diffusa di tipo Rayleigh oppure con una variazione dell'energia che si origina secondo il fenomeno Raman. Allora l'energia della radiazione diffusa può essere maggiore di quella della radiazione incidente (quindi avrà una banda di tipo anti-Stokes) invece quando l'energia della radiazione diffusa è minore di quella incidente avrà una banda di tipo Stokes.

**Il  $\Delta E$  tra la banda incidente e la banda Stokes e la banda anti-Stokes corrisponde a un  $\Delta E$  vibrazionale proprio del sistema.** Infatti la spettro raman e una spettro vibrazionale proprio perché lo shift raman (cioè la differenza tra le due frequenze) corrisponde ad una frequenza vibrazionale del sistema.

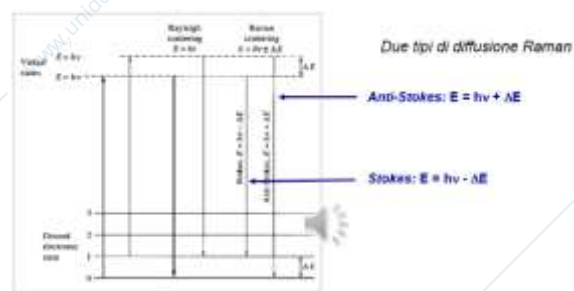
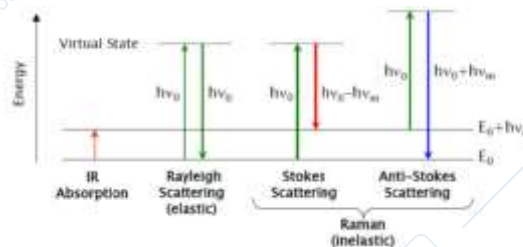
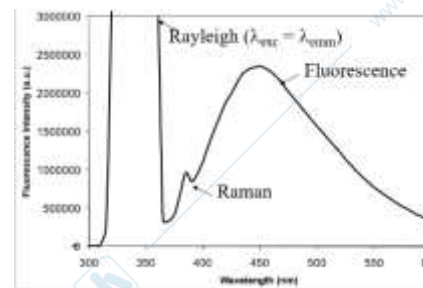
Alcune emissioni diffuse hanno la stessa energia mentre altre ritornano in uno stato differente da quello di partenza.

**Elastica:** collisione tra fotone e molecola che non porta a variazioni di energia.

**Anelastica:** collisione tra fotone e molecola che porta ad una netta variazione di energia.

La banda Rayleigh è sicuramente la più intensa perché riguarda il numero maggiore di fotoni e dopo di che ci sono a minore intensità e bande Raman (di cui la più intensa è la Stokes). Ciò perché essa è a partire dal livello vibrazionale fondamentale che è quello più popolato per la legge di distribuzione di Boltzmann. La differenza tra le due bande Raman può essere colmata mediante effetti di T. La banda diffusa Rayleigh è quella di maggiore intensità ed è quella che cade alla  $\lambda$  usata per l'eccitazione.

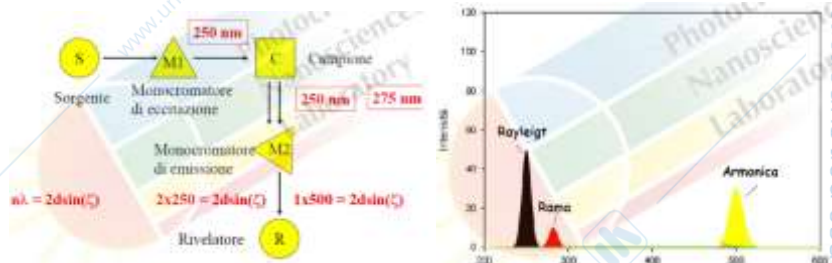
Quindi quando registro uno spettro di fotoluminescenza mi devo preoccupare della banda Rayleigh e di quella Raman; la Rayleigh c'è sempre e la elimino se mi metto a raccogliere e a far partire la scansione con il monocromatore di emissione spostata di 15-20 nm (dipende dalle prestazioni del mio monocromatore) verso  $\lambda$  maggiori rispetto a quella usata per l'eccitazione. La banda raman potrebbe essere presente e vicina alla mia banda di fluorescenza; il segnale raman del fluoroforo è sicuramente trascurabile e quindi non è importante = la banda raman non è presente nelle misure fatte allo stato solido. Può diventare un segnale importante nelle misure fatte in soluzione perché io posso avere bande raman ad opera del solvente che è in una [] decisamente > rispetto a quella del fluoroforo. Quindi in soluzione spesso succede, soprattutto se il mio fluoroforo non è caratterizzato da intensità di emissione elevata, che possa essere presente un picco Raman dovuto al solvente.



Un aspetto importante è che se io cambio la  $\lambda$  di eccitazione, il picco raman si sposta e la differenza di energia tra i due resta costante e corrisponde al  $\Delta E$  vibrazionale quindi se cambio la  $\lambda$  di eccitazione sono in grado di riconoscere il picco raman perché il segnale raman si sposta di conseguenza mentre la banda di emissione NON si sposta.

In figura c'è lo spettro della fluorescenza a diverse  $\lambda$  di eccitazione: vi è il picco di fluorescenza che non si sposta ma varia la sua intensità mentre il picco raman si sposta. Quello che però resta costante è il  $\Delta E$  tra il picco raman e la banda usata per l'eccitazione. Per poter **eliminare il picco Raman** dallo spettro ci sono invece diverse strategie: una è quella di eccitazione alla  $\lambda$  di eccitazione più bassa possibile (=maggiore energia) cioè in modo da spostare ad alta energia il picco raman e poterlo allontanare dalla banda di emissione. Questo metodo funziona ad es se lo Stokes shift tra la banda di assorbimento e emissione è sufficientemente elevata. In alternativa posso registrare lo spettro del solvente e poi sottrarlo a quello della soluzione contenente il fluoroforo. Per fare questo lo spettro del solvente deve essere registrato in condizione analoghe anche dal punto di vista strumentale di quello registrato per la soluzione. Esiste poi anche la possibilità di usare dei filtri.

Facciamo un es come se stessi eccitando il campione 250 nm. Ciò che posso ottenere come bande Rayleigh e Raman si vede nel rispettivo spettro. Il problema è che devo tenere conto di bande aggiuntive spurie nel mio spettro perché se sto eccitando a 250 nm la radiazione arriva sul monocromatore come radiazione diffusa Rayleigh. I miei



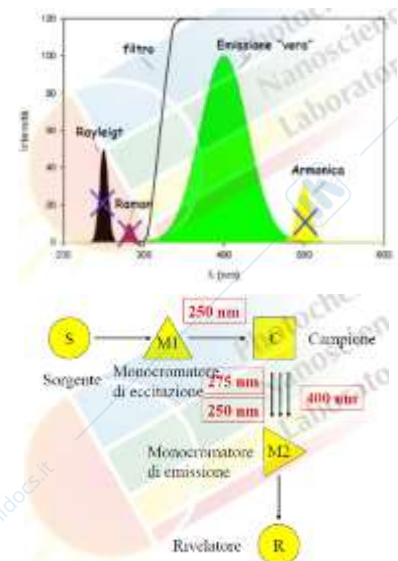
monocromatori sono sistemi di dispersione che si basano sui reticoli a diffrazione il che significa che la 250 nanometrica arriva come radiazione diffusa al mio monocromatore e viene riconosciuta da esso come radiazione di 250 nm al primo ordine. Il problema è che quando l'angolo sul mio monocromatore è settato per selezionare la 500 nm in realtà a quell'angolo passa per la legge di Bragg anche la 250 al secondo ordine. Ciò significa che il mio comparto rivelazione indica erroneamente che quella 250 che passa all'angolo che dovrebbe corrispondere al 500 nm se io non ho come radiazione a 500 nm confondo quella 250 al secondo ordine come radiazione di 500. Quindi nel mio spettro otterrò un segnale, una banda a 500 nm che in realtà è l'armonica di secondo ordine della 250. Il punto da capire è che io non ho radiazione a 500 nm, è la mia 250 che passa nell'angolo corrispondente alla 500 nm perché ne costituisce un multiplo. Quindi per la legge di Bragg la 250 al secondo ordine è sovrapposta alla 500 nm che passa per quell'angolo al primo ordine.

Quindi riassunto eccitando a 250 avrò:

- una banda a 250 che è la banda diffusa Rayleigh
- una banda a 275 che è la banda diffusa Raman di tipo Stokes
- una banda a 500 nm che in realtà è la 250 che passa a 500 nm al secondo ordine

Supponiamo ora che la mia  $\lambda$  di emissione sia 400 nm, come faccio ad ottenere lo spettro di emissione che campione senza queste bande spurie?

Le posso eliminare posizionare un **filtro cut off** a 300 nm dopo il comparto portacampione. Così sono in grado di tagliare la 250 nm in uscita dal campione come radiazione diffusa, la 275 nm e anche il segnale a 500 nm dovuto alla banda a 250 nm. L'unica a non essere tagliata è la banda di foto a 400 nm. Il filtro cut off deve essere posizionato tra il campione e il



monocromatore di emissione; deve essere scelto in modo che sia tra la lambda di eccitazione e la banda di emissione ma solo le bande spurie a più alta energia.

Quindi il ruolo dell'operatore nel registrare lo spettro di fotoluminescenza è più attivo rispetto a quello di assorbimento.

Se non ci fossero molti filtri a disposizione per eliminare le bande spurie allora dovrei variare la lambda di eccitazione per eliminare il segnale raman. Ma posso anche provare ad agire fermandomi con il mio monocromatore prima della banda armonica

### Regolazione delle fenditure

Tipo di spettro	Fenditura eccitazione	Fenditura emissione	NOTE
Eccitazione	Stretta	Larga	Se le bande sono larghe, le fenditure possono essere larghe
Emissione	Larga	Stretta	
Analisi quantitativa	Larga	Larga	Per ottenere un segnale più alto
Campioni fotolabili	Stretta	larga	Fare lo spettro velocemente

Fenditure aperte se voglia raccogliere o inviare molta radiazione dal/sul campione; fenditure strette quando voglio migliorare i dettagli dell'acquisizione ad es. la risoluzione delle bande vibroniche all'interno della mia transizione elettronica.

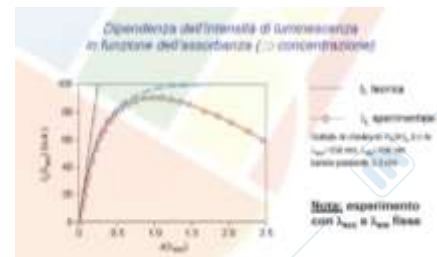
Quindi se sto registrando uno spettro di eccitazione sono interessata alla risoluzione delle bande di eccitazione quindi userò le fenditure in emissione larghe e strette in eccitazione, farò il dettaglio se registro uno spettro di emissione. Per misure

quantitative mi conviene mettermi in condizione di elevata sensibilità quindi mandare molto segnale e raccoglierne molto (fenditure sempre larghe) invece se il composto è fotolabile devo inviare poca eccitazione per non rischiare di degradare il campione quindi le fenditure di eccitazione saranno strette.

"Luminescenza in stato stazionario" = misura quantitativa fatta sotto continuo irraggiamento. Diverse sono le misure fatte con sorgenti pulsate = vengono definite "risolte nel tempo" in cui i parametri fotofisici vengono determinati a sorgente di eccitazione spenta. Quindi stato stazionario *significa misure con continuo irraggiamento del campione.*

Quantificazione dell'analita misurato con geometria di raccolta a 90° fissando la lambda di emissione e la lambda di eccitazione quindi monitorando l'intensità di fotoluminescenza ad una lambda di emissione fissa. La curva che ci aspettiamo di monitorare in queste condizioni al variare della [] del campione e quindi della sua assorbanza sarebbe la linea blu tratteggiata; questo perché per relazione che lega l'intensità di fluorescenza all'assorbanza che non è una relazione lineare ma lo diventa solo per basse assorbanze del campione (inferiori a 0.05). Successivamente il termine  $10^{-A}$  diventa sempre più piccolo all'aumentare della [] quindi all'> dell'assorbanza del campione e il termine tra parentesi nell'equazione tenderà a 1. Quindi ci aspettiamo che l'andamento sia asintotico all'> della [] del campione e che un andamento lineare si abbia solo per soluzioni molto diluite, valori di assorbanza molto bassi.

$$I_F = \Phi_{F/A} = \Phi_{F/I_0}(1 - 10^{-A})$$



Poi osservando i grafici si vede che l'intensità di fotoluminescenza non arriva ad un valore asintotico ma all'> della [] si osserva una < del segnale di fotoluminescenza prodotto dal campione. Quindi l'andamento con linea blu tratteggiata lo spieghiamo con una relazione matematica invece per interpretare l'andamento reale osservato della linea rossa bisogna tenere conto che le misure di foto condotte a alte [] risentono di un fattore di deviazione aggiuntivo di tipo geometrico. Effetto matematico + geometrico = **effetto del filtro interno.**

In fotofisica si parla di 2 effetti del filtro interno: quello primario e quello secondario.

FILTRO INTERNO PRIMARIO: è l'attenuazione della rad di eccitazione che raggiunge la parte centrale della cuvetta dovuto ad una forte assorbimento di quella radiazione ad opera del campione oppure ad opera di un'altra specie presente in soluzione col campione. Forte assorbimento della radiazione incidente.

FILTRO INTERNO SECONDARIO: riassorbimento della radiazione emessa dal campione ad opera del campione stesso quando lo Stokes shift è piccolo o ad opera di una specie presente in soluzione col campione.

Per capire da dove nasce questo fattore geometrico dobbiamo ragionare sul fatto che quando la luminescenza viene misurata con un angolo di  $90^\circ$  rispetto alla luce eccitazione negli spettro fluorimetri commerciali di solito, per eliminare lo scattering dovuto all'interfaccia aria-parete della cella e parete della cella soluzione, la cella viene solitamente mascherata in modo che il rivelatore veda solo la parte centrale del liquido illuminato e non le sue facce laterali. Diventa importante quindi non solo quanta luce viene emessa dal campione ma anche in che zona della luce tale cella viene generata.

Se la soluzione è diluita l'assorbanza è bassa e il raggio di eccitazione è in grado di attraversare tutta la cella prima di essere attenuato quindi di fatto la luce assorbita è trascurabile rispetto a quella incidente e in questo caso la  $I_0$  degli stati eccitati resta costante lungo tutto il cammino percorso dal raggio di eccitazione; viceversa se la  $I_0$  è elevata, l'assorbanza è alta e il raggio di eccitazione subisce una forte attenuazione per il passaggio tra i primi stati della cuvetta che sono i primi dai quali il segnale emesso non viene raccolto dal segnale rivelazione. Quindi in questo caso la  $I_0$  degli stati eccitati è molto alta nei primi mm della cuvetta ma si attenua fortemente nel passaggio più all'interno della cuvetta (cioè nella zona centrale) che è dove viene si ha la monitoraggio dal sistema di rivelazione. Quindi quando il raggio di eccitazione arriva al centro della cuvetta ci arriva fortemente attenuato e il risultato è che l'intensità della radiazione emessa in questa zona che è quella che viene raccolta, è più bassa di quella che si osservava nella soluzione diluita.

Se è necessari fare misure su soluzioni ad elevate  $I_0$ , il fattore geometrico viene minimizzato lavorando con una geometria di raccolta di tipo front-face. Si può anche ottenere tale geometria usando una cuvetta triangolare. Tale geometria è l'unica che si può usare nel caso in cui venga fatta su campioni solidi.

L'effetto appena descritto è l'effetto del filtro interno primario cioè l'effetto dell'attenuazione della radiazione incidente prima che arrivi sul campione. L'effetto del filtro interno secondario è invece l'attenuazione del segnale prodotto per emissione dal fluoroforo prima che esso arrivi al comparto di rivelazione. Quindi la rad incidente arriva sul fluoroforo che emette ma questa rad emessa viene riassorbita prima di arrivare al rivelatore e questo riassorbimento può essere ad opera di una specie presente in soluzione o ad opera del fluoroforo stesso. Perché la radiazione emessa possa essere riassorbita è necessario che il sistema che l'assorbe deve poterla riassorbire quindi se la specie è una specie diversa dal campione lo spettro di assorbimento di questa specie deve in qualche modo contenere la banda di emissione che deve essere sovrapposta alla banda di emissione prodotta dal fluoroforo.

Se invece è il fluoroforo stesso a riassorbire questo riassorbimento deve essere di zone in zone in cui la rad emessa e quella assorbita si sovrappongono; lo sappiamo che questa zona di sovrapposizione riguarda la banda 00 e le bande calde ed è tanto maggiore tanto maggiore è lo stokes shift del mio campione.

L'effetto del filtro interno secondario è anche detto "AUTOASSORBIMENTO" ma l'effetto del filtro interno sec può essere sia ad opera del fluoroforo sia di un'altra specie presente in soluzione. E' un tipo di trasferimento di energia di tipo *triviale* cioè si osserva quando lo spettro di emissione di una specie è sovrapposto allo spettro di assorbimento di una seconda specie.

Se l'effetto del filtro interno primario risulta nell'attenuazione di tutta la banda di emissione, l'effetto del filtro interno secondario risulta in una modifica della forma della banda di emissione perché quella che viene attenuata è solo la porzione di spettro di emissione sovrapposta alla banda di assorbimento della specie assorbente. In figura si hanno gli effetti dell'autoassorbimento del difenilantracene che autoassorbe la radiazione emessa con il risultato che la banda di emissione è attenuata in corrispondenza delle bande ad alta energia che sono quelle sovrapposte allo spettro di assorbimento.

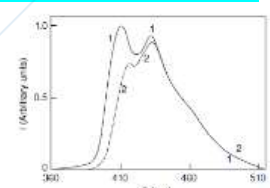
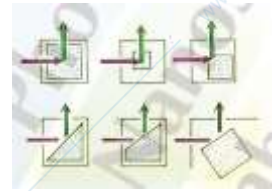


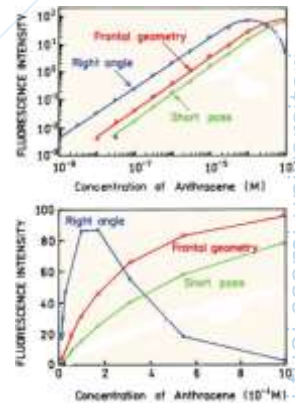
Figure 8.3 Effect of self-absorption on the fluorescence spectrum of diphenylanthracene in benzene. Right angle recorded emission spectra for a dilute solution,  $10^{-4}$  M (1), and with front-face geometry for a concentrated solution, 0.05 M (2) (adapted from Martini et al. (1989), *Chim. Phys.* 60, 53).

Gli effetti del filtro interno possono essere ridotti variando la geometria di raccolta, per esempio usando una geometria front-face. Un'altra strategia potrebbe essere quella di ridurre sia il cammino in entrata sia che in uscita della radiazione quindi ridurre sia gli effetti del filtro interno primario che secondario usando una geometria off center.



Effetto delle concentrazioni sull'intensità dell'antracene. Il passaggio corto si riferisce a una cuvetta da 1 mm x 10 mm.

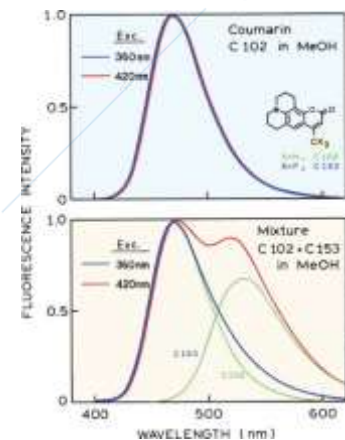
I livelli di segnale più alti si ottengono con la geometria standard ad angolo retto. La gamma lineare può essere in qualche modo estesa usando altre geometrie. Quando si utilizza l'illuminazione frontale, la densità ottica totale può essere molto grande. Tuttavia, elevate concentrazioni di fluoroforo possono causare estinzione a causa di una varietà di interazioni, come il trasferimento radiativo e non radiativo e la formazione di eccimeri.



**RIASSUMENTO:** lavorando su misure di fotoluminescenza uso soluzioni diluite e controllo la autofluorescenza cioè la fluo che è dovuta a specie presenti in soluzione che non siano il fluoroforo. Riconoscere le bande spurie e il rumore dovuto alla presenza di particelle che scatterano in soluzione.

Un aspetto molto impo sulle misure di fotoluminescenza è che è sempre bene farle usando al minimo due lambda di eccitazione diverse perche so che nella maggior parte dei casi lo spettro di emissione non deve variare al variare della lambda di eccitazione e quindi se lo spettro cambia cambiando la lambda di eccitazione devo subito sospettare la presenza di un'impurezza a cui non avevo osservato con altre tecniche analitiche. Infatti la spettroscopia di fotoluminescenza è più sensibile di altre tecniche.

Caso di due cumarine differientemente sostituite: in alto abbiamo spettro di emissione della cumarina C102 a diverse lambda di eccitazione (360 nm e 420 nm); si vede come cambiando la lambda di eccitazione lo spettro di emissione non cambia. Nello spettro in basso invece abbiamo miscela delle due cumarine: se eccito la miscela a 360 nm quello che vedo è lo spettro riportato in blu che è sostanzialmente lo spettro della cumarina C102. Se però eccito a 420 nm ottengo lo spettro in rosso che è diverso dallo spettro blu perché è dovuto al fatto che a 360 nm potevo eccitare solo la cumarina C102 (perché solo lei dà assorbimento a quella lambda) mentre ora posso eccitare entrambe le cumarine a 420nm. Così ottengo uno spettro di emissione che è la sovrapposizione delle due bande di emissione delle due cumarine.



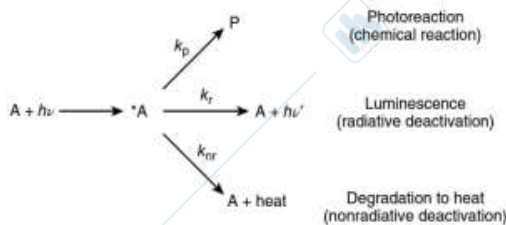
### Tempo di vita e resa quantica

**Definizione di resa quantica:** numero di eventi di un certo tipo in un certo tempo/numero fotoni assorbiti nello stesso periodo di tempo.

La misura è intuitiva e si può fare con uno spettrofluorimetro normale lavorando in stato stazionario sotto irraggiamento oppure con uno strumento accessoriatato con una sfera integratrice.

**Definizione di tempi di vita:** rappresenta il tempo necessario perché la  $[I]$  di una data entità raggiunga un valore pari ad  $1/e$ . Nella fotolum questo valore iniziale è un valore ottenuto in un tempo arbitrario che è quello raggiunto ad impulso di eccitazione terminato. Es. invio un impulso di eccitazione, a quel punto la  $[I]$  dello stato eccitato è la mia  $[I]$  iniziale, l'impulso di eccitazione è finito e non sono più sotto irraggiamento. Misure che richiedono una strumentazione che consenta di fare misure risolte nel tempo. I tempi di decadimento degli stati eccitati dipendono dalla variazione della  $[I]$  degli stati iniziali raggiunti per eccitazione. Non è possibile monitorare la  $[I]$  degli stati iniziali ma quello che si fa è che si monitora il decadimento radiativo da questi stati perché quel decadimento radiativo ha un andamento temporale uguale al tempo di vita dello stato eccitato cioè il tempo di vita *per esempio dello stato di singoletto viene monitorato monitorando il*

decadimento della fluorescenza perché l'andamento della fluorescenza ricalca la depopolazione di quello stato eccitato. I due (l'intensità di fluorescenza e la popolazione dello stato eccitato) decadono con lo stesso andamento quindi è sufficiente e intuitivo che, se monitoro l'intensità di decadimento di fluo ottengo il tempo di vita del suo stato di singoletto. Allo stesso modo spesso si indica il decadimento della fosfo per definire il tempo di vita dello stato di tripletto.



Il tempo di vita di  $A^*$  è definito come il reciproco delle costanti di velocità di tutti i processi che da  $A^*$  possono avere luogo. Quindi il tempo di vita di  $A^*$  è definito come  $1/\text{costante di velocità della reazione chimica oppure la costante del processo radiativo o non radiativo}$ . La efficienza di un processo, che è la probabilità che quel processo si realizzi è legata alla costante di velocità del

processo considerato. Quindi l'efficienza del processo iesimo in  $A^*$  è data dalla costante di velocità del processo iesimo/la sommatoria delle costanti di velocità. E riarrangiata ci dice che l'efficienza del processo iesimo in  $A^*$  data dalla costant edi velocità di quel processo per il tempo di vita di  $A^*$ .

Per come le abbiamo definite se  $A^*$  è lo stato direttamente popolato per assorbimento, allora l'efficienza del processo iesimo e la resa quantica del processo iesimo coincidono.

Quindi la relazione tra tempo di vita, resa quantica e velocità ci dice che nel caso in cui  $A^*$  sia lo stato direttamente raggiunto per eccitazione e se la resa quantica del processo iesimo è misurabile e il tempo di vita dello stato  $A^*$  è misurabile, dal rapporto tra il processo iesimo e il tempo di vita di  $A^*$  possiamo determinare la costante di velocità del processo iesimo.

Esempio:  $A^*$  è uno stato di singoletto raggiunto direttamente per irraggiamento quindi supponiamo che il nostro sistema passi da  $S_0$  a  $S_1$  direttamente per irraggiamento; la resa quantica del processo di fluo in quel caso coincide con l'efficienza di fluorescenza.

Se nel processo di assorbimento andiamo a popolare  $S_2$  o  $S_3$  il risultato nella maggior parte non cambia perché la conversione interna si verifica con efficienza unitaria su  $S_1$  e quindi poi comunque la resa quantica di fluo coincide con l'efficienza di fluo. Quindi le due coincidono e la resa quantica di fluo è data dal rapporto tra la costante del processo di fluo / la sommatoria dei processi radiativi + quelli non radiativi. La resa quantica di fluo quindi varia tra 2 estremi che sono il max valore per cui l'efficienza di fluo è = 1 ed è nel caso in cui le costanti di velocità dei processi non radiativi siano trascurabili rispetto alla costante di velocità del processo radiativo (cioè di fluo)  $\rightarrow$  processi non radiativi lenti e la resa quantica di fluo è molto elevata perché la costante di fluo è nettamente superiore rispetto ai processi competitivi.

Di contro la resa quantica di fluo si approssima a zero quando la costante di velocità di fluorescenza risente della competizione con i processi non radiativi.

Se invece  $A^*$  non è ottenuto direttamente per assorbimento ma è uno stato che viene raggiunto dallo stato  $A^{**}$  che è quello popolato direttamente per eccitazione le cose si complicano un po' e la resa quantica del processo iesimo che si realizza da  $a^*$  in questo caso è dato dall'efficienza del processo iesimo per la produttoria di tutte le effieienze e di tutti i processi che portano dallo stato  $A^{**}$  allo stato  $A^*$ . Se pensiamo che questo  $A^*$  sia uno stato di tripletto diventa tutto più facile mentre il nostro stato  $A^{**}$  direttamente popolato per assorbimento di fotoni è lo stato di singoletto quindi  $A^*$  è  $T_1$  e  $A^{**}$  è  $S_1$ . Quindi la resa quantica di fosfo (quindi di emissione radiativa da  $T_1$ ) non equivale all'efficienza di fosfo ma è data dal prodotto di efficienza di fosfo per tutti i processi che dal singoletto hanno portato a popolare il tripletto e quindi l'efficienza del processo di intersystem crossing. Quindi la resa quantica di fosfo è data dall'efficienza di intersystem crossing  $S_1 \rightarrow T_1$  per l'efficienza di fosfo dove le due sono rispettivamente il prodotto tra la costante di velocità di intersystem crossing / la costante di velocità di tutti i processi quindi costante di fluo + costante di intersystem crossing + costante di conversione interna  $S_1 \rightarrow S_0$  mentre l'efficienza di fosforescenza è data dalla costante di fosfo / costante di fosfo + costante di intersystem crossing  $T_1 \rightarrow S_0$ .

Siccome  $S_1$  è lo stato direttamente popolato per assorbimento la efficienza di intersystem crossing coincide con la resa quantica di intersystem crossing singoletto  $\rightarrow$  tripletto che viene anche chiamata resa quantica di tripletto. Quindi la resa quantica di fosfo è data dalla resa quantica del prodotto della resa quantica di intersystem crossing  $S_1 \rightarrow T_1$  per l'efficienza di fosfo che è data dal prodotto della costante di velocità di fosfo per il tempo di vita dello stato di tripletto. Mentre la resa quantica di tripletto che coincide con l'efficienza quantica di tripletto cioè di intersystem crossing  $S_1 \rightarrow T_1$  è data dal prodotto della costante di velocità dell'intersystem crossing  $S_1 \rightarrow T_1$  per il tempo di vita del singoletto.

$$\Phi_F = k_F / (k_F + k_{ST} + k_{IC})$$

$$\Phi_{IC} = k_{IC} / (k_F + k_{ST} + k_{IC})$$

$$\Phi_{ST} = k_{ST} / (k_F + k_{ST} + k_{IC})$$

$$\Phi_P = \Phi_{ST} \times k_P / (k_P + k_{TS})$$

$$\Phi_{TS} = \Phi_{ST} \times k_{TS} / (k_P + k_{TS})$$

$$\Phi_F = k_{FTS} \text{ (resa quantica di fluo)}$$

$$\Phi_{IC} = k_{ICTS} \text{ (di conversione interna)}$$

$$\Phi_{ST} = k_{STTS} \text{ (di tripletto } S_1 \rightarrow T_1)$$

$$\Phi_P = \Phi_{ST} k_{PTT} \text{ (di fosfo)}$$

$$\Phi_{TS} = \Phi_{ST} k_{TST} \text{ (di intersystem crossing } T_1 \rightarrow S_0) \text{ che è data dal prodotto della resa quantica di tripletto (o resa quantica di intersystem crossing } S_1 \rightarrow T_1) \text{ per l'efficienza del processo di intersystem crossing } T_1 \rightarrow S_0.$$

Se la resa quantica di tripletto è molto piccola è molto difficile osservare fosfo per diretta eccitazione di  $S_1$  quindi è per questo che la resa quantica di fosfo dipende dall'efficienza dei due processi. Abbiamo anche già definito i tempi di vita del singoletto e del tripletto come dati dall'inverso della sommatoria delle costanti di velocità dei processi che si possono realizzare su  $S_1$  o  $T_1$ . Questi tempi di vita del singoletto e del tripletto sono misurabili sperimentalmente e sono misurabili sperimentalmente attraverso il decadimento della fluorescenza da  $S_1$  e della fosfo da  $T_1$ . Ed è per questo che talvolta si parla del tempo di vita di fluo e di fosfo indicando questi tempi di vita sperimentali del singoletto e tripletto.

Il tempo di vita del singoletto e del tripletto che sono misurabili sperimentalmente sono il reciproco della sommatoria delle costanti di velocità di tutti i processi radiativi e non che da quegli stati hanno luogo perché sia i processi radiativi che quelli non radiativi contribuiscono a depopolare  $S_1$  e  $T_1$ . Sono studiabili sperimentalmente studiando il decadimento dell'intensità di fluo e di fosfo perché l'intensità di fluo e di fosfo decadono in modo analogo al decadimento della popolazione in questi stati eccitati. Sperimentalmente quindi quello che io misuro sono i tempi di vita del singoletto e del tripletto che dipendono da tutte le costanti di velocità dei processi che hanno luogo da quegli stati. Vi è però un altro tempo di vita che è definito come il tempo di vita intrinseco o radiativo o naturale che è il tempo di vita che lo stato avrebbe in assenza di disattivazioni non radiative quindi se la disattivazione avvenisse solo attraverso il processo radiativo. Quindi il tempo di vita naturale della fluorescenza è uguale a  $1/k_r$  l'inverso della costante di velocità del processo di fluo e lo stesso vale per la fosfo.

$$\tau_n = \frac{1}{k_r}$$

Una transizione molto probabile in andata sarà una transizione anche molto probabile in ritorno, transizione molto probabile in andata quindi forza dell'oscillatore elevato = elevata intensità della banda di assorbimento. Nel ritorno questa probabilità si riflette in una costante radiativa elevata e abbiamo chiarito che costante radiativa elevata non significa necessariamente elevata capacità emissiva poiché elevata probabilità vuol dire elevata costante radiativa ma questa costante radiativa deve fare i conti con le altre costanti di velocità competitive che permettono al sistema di rilassare da quello stato eccitato.

La relazione che lega la banda di assorbimento quindi la probabilità in andata e la probabilità in ritorno è la **relazione Strickler-Berg**: la relazione della vita radiativa della molecola e il coefficiente di assorbimento sullo spettro.

$$k_r = \frac{1}{\tau_n} = \frac{\nu_{\max}^2 \cdot n^2}{3.42 \cdot 10^8} \int \epsilon(\nu) d\nu$$

n: refractive index of medium  
 ν: position of the absorption maxima in wavenumbers [cm<sup>-1</sup>]  
 ε: absorption coefficient

$\tau_{\max} \sim 5 \cdot 10^4 \text{ l} / \text{mol cm}$   
 Larghezza banda 3000 cm<sup>-1</sup>  
 $\nu_{\max} 35000 \text{ cm}^{-1}$  (290 nm)  
 n = 1

$$\tau_{\text{cal}}^f = \frac{1}{k_{\text{cal}}^f} = 1,2 \text{ ns}$$

$\epsilon_{\max} \sim 10^4 \text{ l} / \text{mol cm}$   
 (transizioni proibite per simmetria)

$$\tau_{\text{cal}}^f = \frac{1}{k_{\text{cal}}^f} = 6 \text{ } \mu\text{s}$$

$\tau_{\max} \sim 0.01 \text{ l} / \text{mol cm}$   
 (transizioni proibite per spin)

$$\tau_{\text{cal}}^f = \frac{1}{k_{\text{cal}}^f} = 6 \text{ ms}$$

In realtà esiste anche una relazione approssimata per il tempo di vita radiativo del singoletto che può essere un'alternativa semplificata rispetto all'uso della Strickler-Berg. Per usarla basta avere il coefficiente di estinzione molare relativo al max della banda di assorbimento. Una transizione totalmente permessa es. S<sub>0</sub>→S<sub>1</sub> con un epsilon intorno a 10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> (come negli idrocarburi aromatici) il tempo di vita radiativo è dell'ordine dei 10<sup>-9</sup> secondi. Quindi un tempo di fluo misurato inferiore a 10<sup>-9</sup> secondi ci dice che è più veloce del tempo minimo calcolato per una radiazione di fluo totalmente permessa ci dice che oltre alla disattivazione radiativa per fluo quello stato di singoletto viene depopolato con altri meccanismi di disattivazione. Di contro se noi calcoliamo il tempo radiativo per una transizione S<sub>0</sub>→S<sub>1</sub> non permessa per simmetria arriviamo a dire che il tempo di vita radiativo di quella transizione fluorescente è di ca. 10<sup>-5</sup> s.

$$\tau_0 \approx \frac{10^{-4}}{\epsilon_{\max}}$$

Significa che quello è il tempo più lungo che posso osservare per una fluorescenza quindi questi 10 μs di fatto costituiscono il limite superiore del tempo di vita di una fluorescenza; per una molecola organica questi 10 μs possono essere usati come parametro grossolano per dire che oltre quel valore cioè per tempi misurati più lunghi dei 10 μs per una mol organica quello stato è probabilmente uno stato di tripletto.

**Quindi di fatto per calcolare la costante radiativa e il tempo di vita radiativo posso usare diversi metodi:**

- Strickler-berg
- Forma approssimata
- Dalla misura sperimentale della resa quantica e il tempo di vita

Formule usate nel terzo caso:  $\Phi = \frac{\tau}{\tau_0}$        $k_r = \Phi/\tau$        $k_{nr} = (1 - \Phi)/\tau$

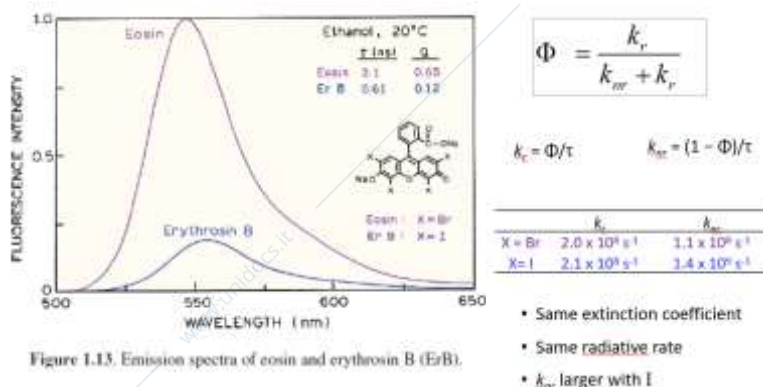
Quando parliamo di costante radiativa, di probabilità in andata/ritorno ci stiamo riferendo alla transizione S<sub>0</sub>→S<sub>1</sub> perché stiamo ragionando nell'ipotesi che i nostri emettitori siano emettitori ideali e si comportino secondo la regola di Kasha cioè che lo stato emissivo sia S<sub>1</sub>.

In tabella ci sono i tempi radiativi determinati mediante l'equazione approssimata e l'utilizzo invece dei valori sperimentali della resa quantica e del tempo di vita. I due valori sono spesso in buon accordo e può succedere che ci siano delle deviazioni tra le due. I motivi sono che nel calcolo con l'equazione approssimata quello che succede è che per esempio che si sta usando la epsilon non di una transizione S<sub>0</sub>→S<sub>1</sub> ma di una transizione S<sub>0</sub>→S<sub>n</sub> che di fatto copre nello spettro di assorbimento la banda corrispondente alla transizione S<sub>0</sub>→S<sub>1</sub>.

	τ <sup>cal</sup> (ns)	τ <sup>esp</sup> (ns)
Benzene	407	414
Alcol benzilico	237	362
Toluene	174	200
Etilbenzene	185	172
p-xilene	92.5	75
Fluorobenzene	33.8	61.5
Tetracene	27.1	30.5
Fenolo	29	26
9,10-diclorobenzene	10.4	15.5
Antracene	12.9	13.8
9-metilantracene	13.6	13.1
9,10-difenilantracene	8.4	9.35
perilene	4.7	6.8

Studio sull'eosina e eritrosina B: l'eosina ha atomi di Br mentre l'eritrosina ha atomi di I. Le due hanno lo stesso coefficiente di estinzione molare quindi stessa intensità della banda di assorbimento ma proprietà emissive molto diverse. Ciò a dispetto del fatto

che essendo la banda di assorbimento la medesima per entrambe le due avranno la stessa costante radiativa di fluorescenza. Quindi potenzialmente la stessa probabilità di mostrare le stesse proprietà emissive ma in realtà l'eritrosina B è decisamente un peggior emettitore rispetto all'eosina e questo è dovuto al fatto che nell'eritrosina B le disattivazioni e i processi di disattivazione non radiativa si fanno sentire in modo pesante e sono fortemente competitive con l'emissione per fluo; infatti a dispetto del medesimo valore della costante radiativa, la costante non radiativa dell'eritrosina B è un ordine di grandezza superiore a quella dell'eosina. Ciò fa sì che le proprietà emissive dell'eosina siano decisamente superiori a quelle dell'eritrosina e arriviamo a dire che una costante radiativa elevata significa che ho un buon punto di partenza ma che poi in realtà il sistema è un buon emettitore se i processi competitivi sono piccoli, sono trascurabili rispetto al processo radiativo. Nel caso particolare dell'eritrosina B è probabile che la presenza dell'atomo di I svolga un maggior effetto dell'atomo pesante rispetto al Br favorendo un processo di intersystem crossing  $S_1 \rightarrow T_1$  che di fatto spegne l'emissione per fluorescenza.



**Quindi ricordo che:** le capacità emissive dipendono dalla costante radiativa del sistema ma dalla costante radiativa del sistema in relazione con le costanti non radiative dei processi competitivi. La resa quantica dipende dalle probabilità relative delle varie transizioni competitive e non è direttamente collegata alla costante di velocità del processo radiativo.

Es. il benzofenone e acetofenone nei composti aromatici, sono cattivi emettitori per fluo e infatti hanno una bassa resa quantica di fluo e questo perché sia la costante radiativa di fluo è bassa essendo lo stato  $S_1$  uno stato  $n \rightarrow \pi^*$  quindi una transizione  $S_0 \rightarrow S_1$  non permessa per simmetria (basso coefficiente di estinzione molare, bassa probabilità in andata e bassa probabilità in ritorno quindi bassa costante radiativa ma anche perché la costante di velocità del processo di intersystem crossing  $S_1 \rightarrow T_1$  è alta (perché l'energy gap  $S_1 \rightarrow T_1$  è un gap piccolo e perché la transizione è una transizione permessa dalle regole di El-Sayed).

**Quindi i chetoni aromatici, cattivi emettitori sia perché la costante radiativa è piccola e sia perché le costanti non radiative competitive sono alte.**

Un altro caso di confronto per esempio è quello del 9,10-difenilantracene col diaza2,2,2-biciclotano; entrambi hanno un'elevata resa quantica di fluo circa uguale a 1 a dispetto del fatto che per il difenilantracene la costante radiativa è elevata mentre è decisamente più piccola per l'altro composto che ha però resa quantica elevata perché le costanti di velocità dei processi non radiativi sono piccole quindi non sono efficienti. Quindi la disattivazione per fluo è la più probabile.

*Come si misura la resa quantica?*

Possiamo usare diversi tipi di tecniche e in particolare con una misura ASSOLUTA e con una misura relativa rispetto a uno standard di riferimento a resa quantica assoluta nota. Le misure di resa quantica relativa con uno standard possono essere fatte con uno spettrofluorimetro modello base, senza accessori aggiuntivi. Di fatto quello che possiamo fare è registrare spettri di emissione e di eccitazione e fare la determinazione delle misure di resa quantica relativa come vedremo. La misura quantica di tipo assoluto invece richiede uno accessorio aggiuntivo che è una sfera integratrice.

Il modo più facile e immediato per determinare una resa quantica è quello di tipo relativo in cui le proprietà emissive del fluoroforo in opportune condizioni vengono confrontate con quelle dello standard di riferimento. Sappiamo che le misure di emissione sono purtroppo dipendenti, anche se consideriamo spettri corretti, dalle prestazioni delle componenti ottiche; quindi la scelta dello standard di riferimento andrà fatta

tenendo conto degli spettri di emissione dei due composti e in particolare lo spettro di emissione dello standard scelto come riferimento deve cadere in una regione simile a quella del nostro composto. L'altra cosa che ci dobbiamo dire è che sappiamo che vale la relazione che abbiamo riportato (che l'intensità di fluo è lineare nell'assorbanza) a patto che la l'assorbanza alla lambda di eccitazione a cui stiamo lavorando sia minore di 0.1 o ancora meglio minore di 0.05.

$$I_f(\lambda_{exc}, \lambda_{em}) = \Phi_{f10}(\lambda_{exc}) 2.3031 \varepsilon(\lambda_{exc}) l c = \Phi_{f10}(\lambda_{exc}) 2.3031 A(\lambda_{exc})$$

Di fatto la misura di quantica relativa viene fatta registrando lo spettro di emissione del mio fluoroforo indicato con S (=sample) enlle equazioni di seguito riportate con quello del mio standard R (=reference). Gli spettri di emissione per essere il più indipendenti possibile dalle componenti strumentali devono cadere nello stesso intervallo di lambda. I due spettri di standard e di campione vengono registrati ad delle lambda di eccitazione in cui i due abbiano assorbanze minori di 0.1 (o, ancora meglio minori di 0.05). Questo requisito è necessario perché valga la relazione di linearità tra intensità e assorbanza. Teniamo conto però che è sempre bene lavorare in soluzioni diluite in modo da minimizzare gli effetti di autoassorbimento che possono essere presenti lavorando ad alte concentrazioni.

A questo punto il rapporto tra la resa quantica del nostro standard incognito e quella del nostro standard di riferimento corrisponde all'equazione riportata dove  $I_s$  e  $I_r$  sono le intensità integrate area sottesa alla curva dello spettro di emissione corretto del campione e del riferimento. Il rapporto tra le assorbanze e gli standard e campione alle due lambda di eccitazione. Ho poi bisogno di un termine correttivo legato agli indici di rifrazione del solventi usati per standard e fluoroforo se i due solventi sono diversi; intensità della sorgente alla lambda di eccitazione usata per il campione e alla lambda di eccitazione usata per il riferimento.

$$\frac{\Phi_S}{\Phi_R} = \frac{I_S}{I_R} \times \frac{A_s(\lambda_s)}{A_r(\lambda_r)} \times \frac{n_s^2}{n_r^2} \times \frac{I_{0R}(\lambda_r)}{I_{0S}(\lambda_s)}$$

Reported      Measured      Known

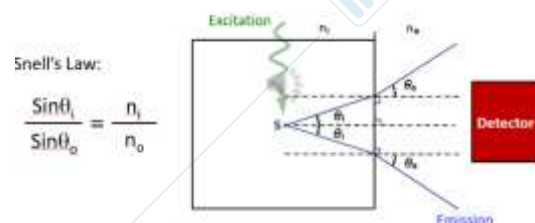
Se la lambda di eccitazione usata per standard e campione sono le stesse questo termine può essere cancellato dall'equazione.

$$\frac{\Phi_S}{\Phi_R} = \frac{I_S}{I_R} \times \frac{A_r(\lambda)}{A_s(\lambda)} \times \frac{n_s^2}{n_r^2}$$

Il termine  $(n_s/n_r)^2$  dove  $n$  è l'indice di rifrazione del solvente in cui vengono registrati gli spettri di emissione del campione e del riferimento rispettivamente, entra nell'equazione perché di fatto la radiazione prodotta da una sorgente che si trova in un mezzo ad un certo indice di rifrazione viene piegata nel passaggio ad un mezzo con un indice di rifrazione diverso. Quindi per esempio il passaggio soluzione-aria dove il nostro rivelatore si trova nell'aria.

Quindi di fatto l'intensità prodotta dalla nostra sorgente che si trova in un mezzo ad indice di rifrazione  $n_i$  e che arriva al rivelatore che si trova in un mezzo ad indice di rifrazione  $n_o$  deve essere corretta per un termine  $(n_i/n_o)^2$ . Quindi per i nostri due sistemi che si trovano in due solventi ad indice di rifrazione diverso questo si risolve in un rapporto  $(n_s/n_r)^2$ . Questo termine correttivo può essere un termine piuttosto grande e oltretutto, l'utilizzo di solventi ad indice di rifrazione diversi, possono anche dare risultati in parte compromessi da problemi di riflessini diverse all'interno della cella.

Quindi di fatto la condizione ottimale è di registrare spettri di emissione di fluoroforo e standard nello stesso solvente e di trascurare questo fattore correttivo.



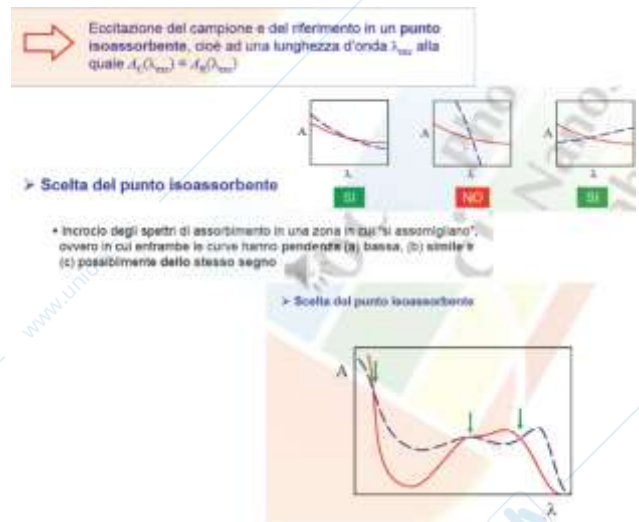
Se quindi il solvente usato è lo stesso allora il termine associato agli indici di rifrazione dei due solventi può essere cancellato e la nostra equazione è ulteriormente semplificata in quella riportata. Possiamo fare un'ulteriore semplificazione: abbiamo detto che scegliamo una lambda di eccitazione che vada bene per

entrambi i composti sia per il riferimento sia per lo standard, in modo tale da non dover correggere la diversa intensità della sorgente di eccitazione a due diverse lambda.

L'altra cosa che si può fare è che in realtà possiamo scegliere un punto isoassorbente cioè un punto in cui i due spettri di assorbimento (del campione e del riferimento) siano sovrapposti cioè abbiano lo stesso valore di assorbanza a quella lambda.

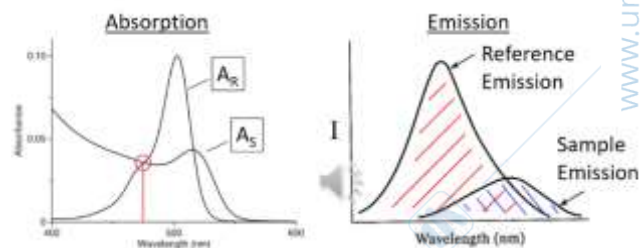
In questo caso la nostra equazione può essere ulteriormente semplificata del termine relativo all'assorbanza dei due composti, e la resa quantica dello standard è uguale al rapporto tra l'integrale dell'area sottesa alla curva della banda di emissione dello standard e quella del campione che risultano dalla misura per la resa quantica dello standard che è nota da letteratura.

Per minimizzare gli errori il punto isoassorbente è meglio scelto ove possibile, in una zona corrispondente a una zona di piatto per entrambi gli spettri cioè una zona in cui l'assorbanza dei due campioni varia poco al variare della lambda. Se così non fosse è meglio scegliere zone in cui si abbia una piccola pendenza e perpendenza nella stessa direzione cioè corrisponda ad un punto di decrescita per entrambi oppure ad un punto di crescita per entrambi; per intenderci, nello spettro riportato in basso alla figura abbiamo che i due spettri s'incontrano in tre punti quindi ho la possibilità di decidere tra tre punti isoassorbenti e il migliore dei tre è quello centrale.



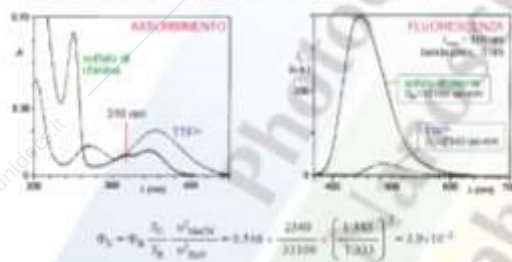
Diversi composti utilizzabili come standard, rese quantiche note, sono tabulati. Uno standard deve sottostare ad alcuni requisiti di tipo chimico: deve essere stabile, facilmente purificabile ecc. Ma la scelta che io devo fare è basata sulle proprietà ottiche del campione quindi deve avere uno spettro di assorbimento in corrispondenza allo spettro di assorbimento del mio campione; quindi devo poter trovare una lambda di eccitazione che vada bene per entrambi e deve emettere nello stesso intervallo di lambda in cui emette il mio campione.

Sperimentalmente la misura della resa quantica relativa che di fatto è il numero di fotoni emessi/numero di fotoni assorbiti, si risolve nella registrazione dello spettro di assorbimento e dello spettro di emissione del fluoroforo e dello standard scelto opportunamente. Spettro di assorbimento di soluzioni diluite, scelta del punto isoassorbente in cui entrambi abbiano assorbanza minore di 0.1 o di 0.05. Questa è la lambda di eccitazione che userò per la registrazione degli spettri di emissione dei due composti, preferibilmente sciolti nel medesimo solvente, e dal rapporto tra le aree sottese alle curve degli spettri di emissione dei due, nota la resa quantica dello standard calcolo la resa quantica del mio campione.



**Determinazione di  $\Phi_f$ : metodi relativi**

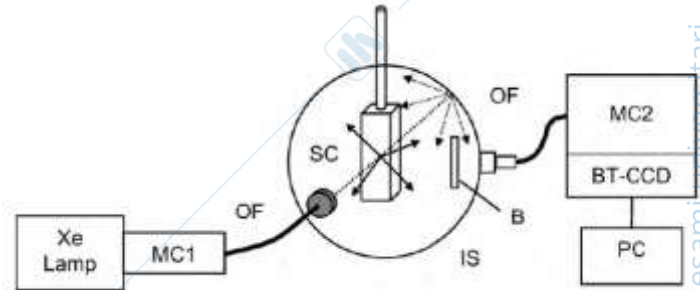
Esempio: misura di  $\Phi_f$  del dicazone tetrafluorileno  
 situazione di acetonitrile equilibrata all'aria, temp. 40°C  
 Standard di fluorescenza utilizzato: sulfato di chinina in H<sub>2</sub>O, 0.1 N



## Resa quantica assoluta

Non si usano standard e la resa quantica viene determinata con numero fotoni emessi/numero fotoni assorbiti quindi attenuazione della radiazione incidente e raccolta della radiazione emessa quindi dei fotoni emessi sull'intero angolo solido. La raccolta della radiazione emessa in tutte le direzioni viene fatta utilizzando una sfera integratrice che è all'interno ricoperta da un materiale altamente riflettente come il BaSO<sub>4</sub> o MgO.

Quindi la radiazione di eccitazione entra da un foro di ingresso e la radiazione riflessa dal foro della pareti, attenuata per effetto dell'assorbimento da parte del campione e prodotta per emissione, passa dopo essere stata riflessa dalle pareti della sfera in un foro di uscita in cui è presente un monocromatore e un sistema di rivelazione.

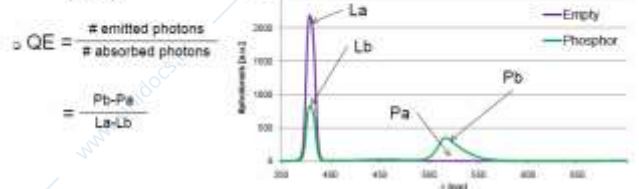


**Operativamente:** all'interno della sfera integratrice viene messa prima la cuvetta contenente il solvente ma non il fluoroforo; la radiazione incidente entra all'interno della sfera, colpisce la cuvetta e viene diffusa in tutte le direzioni. Riflessa dalle pareti della sfera e raccolta sul comparto di rivelazione. A questo punto questo spettro ci permette la raccolta del termine La (definisce il numero totale di fotoni incidenti). Successivamente viene inserita nella sfera integratrice la cuvetta contenente solvente e fluoroforo, la radiazione eccitatrice colpisce la cuvetta e come prima viene diffusa ma viene anche attenuata per effetto dell'assorbimento.

Il segnale di eccitazione attenuato viene raccolto dal comparto rivelazione insieme alla radiazione emessa (al segnale emesso) prodotta in tutte le direzioni e riflessa dalla sfera integratrice anche in questo caso raccolta dal comparto rivelazione. Quindi la nostra radiazione eccitatrice attenuata per effetto dell'assorbimento in questo caso il termine Lb indicato nello spettro, mentre il secondo segnale emissivo prodotto dalla soluzione è indicato come Pb.

Si può raccogliere anche il segnale di emissione del solvente indicato come Pa anche se è generalmente preferibile che il solvente da solo non abbia emissione nella zona di emissione del composto. A questo punto il nostro calcolo numero di fotoni emessi/numero di fotoni assorbiti sarebbe il termine Pb-Pa/La-Lb.

- Step 1: Empty cuvette in sample holder
  - Total number of incident photons/s ("La")
  - "Dark signal" in the emission wavelength area ("Pa")
- Step 2: Cuvette with phosphor powder in sample holder
  - Total number of photons/s not absorbed by the phosphor ("Lb")
  - Total number of photons/s emitted in emission wavelength area ("Pb")



## Tempi di vita

Fino ad ora abbiamo parlato di misure alla stato stazionario mentre per le misure dei tempi di vita si usano tecniche che sono dette "risolte nel tempo". Si dice così perché le misure vengono effettuate dopo un impulso di luce di eccitazione quando questo impulso di luce di eccitazione è terminato. Tipicamente si usano delle sorgenti pulsate come i laser.

Il tempo di vita dello stato eccitato è il tempo che viene speso in questo stato eccitato prima che il mio fluoroforo decada radiativamente o non radiativamente. La misura del tempo di vita non può essere fatta sulla singola molecola ma quello che viene fatto è che viene determinato su un numero molto grande di fluorofori.

Se noi indichiamo con  $N(0)$  la popolazione di fluorofori che ha raggiunto lo stato eccitato attraverso questo impulso di luce non appena l'impulso di luce è terminato, abbiamo che la velocità di decrescita della popolazione nel tempo è descritta da quella legge dove la nostra  $k$  è l'insieme delle costanti radiative e non che il sistema ha a disposizione per tornare allo stato fondamentale.

$$dN(t)/dt = (k_r + k_{nr})N(t) = kN(t)$$

Riarrangiando l'equazione e integrandola arriviamo a dire che  $N$ , il numero di fluorofori nello stato eccitato in un tempo  $T$  è uguale a  $N(0)$  cioè il numero di fluorofori iniziale per  $e^{-kt}$ .

$$-\frac{dN(t)}{dt} = N(t)k$$

$$\text{integrando: } \int_{N(0)}^N \frac{dN(t)}{N(t)} = \int_0^t -k dt$$

$$\ln N(t) - \ln N(0) = \ln \frac{N(t)}{N(0)} = -kt$$

$$N(t) = N(0)e^{-kt}$$

E se il nostro stato eccitato è uno stato di singoletto possiamo riarrangiarla e sostituendo quel  $N(t)$  come [] di  $S_1$ .

A questo punto la nostra legge di decadimento è uguale a  $[S_1] = [S_1]_0 \exp(-t/\tau_s)$ .

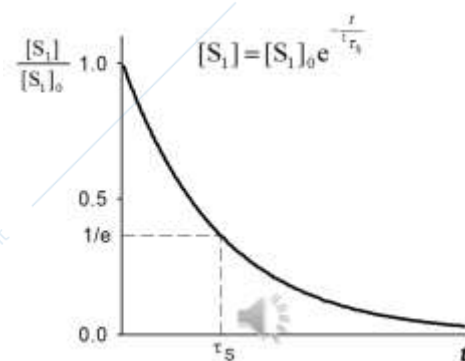
$\tau_s$  = tempo di vita del singoletto che è il reciproco della sommatoria delle costanti radiative e non a partire da quello stato. Se consideriamo il caso in cui  $t$  sia uguale a  $\tau_s$  la nostra equazione diventa:

$$[S_1] = [S_1]_0 \exp(-1) = [S_1]_0 / e$$

Quindi il tempo di vita è definito come il tempo necessario perchè la [] iniziale di  $S_1$  decresca ad  $1/e$  il suo valore originale cioè diventi  $[S_1]_0$ .

Siccome  $1/e$  è uguale a 0.37 quello che abbiamo è che il 37% delle molecole decade in un tempo con  $t > \tau$  mentre il 63 % decade in un tempo inferiore. Non si possono calcolare il numero di fluorofori nello stato eccitato e calcolare il numero di fluorofori corrispondente a  $1/e$ . Quel che si fa è che si misura un segnale che è proporzionale alla [] di questi stati eccitati e il segnale proporzionale alla [] di questi stati eccitati è nel caso in cui quello stato sia uno stato di singoletto l'intensità di fluorescenza che decede secondo la stessa legge esponenziale essendo dipendente dagli stati eccitati. Quindi di fatto io mando un impulso di radiazione e determino l'andamento dei fotoni emessi per fluo nel tempo e dal decadimento dell'intensità di fluo nel tempo determino il tempo di vita.

La det del tempo di vita può essere molto utile non solo per iniziare a capire se il segnale che stiamo osservando è un segnale di fluo o che è a più le caratteristiche di una fosfo; per esempio nel caso in cui sia una molecola organica, tempi superiori ai 10  $\mu s$ . Ma anche perchè fluorofori misurati in condizioni diverse possono dare tempi di vita diversi dovuti all'aggiunta di fenomeni competitivi che contribuiscono alla disattivazione di quello stato eccitato e quindi contribuiscono a depopolare quello stato eccitato e quindi a diminuirne il tempo di vita. Importante per uno studio anche sull'intorno del fluoroforo.



Quindi bisogna usare per le misure risolte nel tempo degli impulsi che siano ovviamente molto più brevi del tempo di decadimento dello stato eccitato. Il problema dal punto di vista sperimentale è dato da tempi di vita molto brevi, questo perché l'elettronica dello strumento deve rispondere a segnali che si spengono molto velocemente e questo viene risolto con diverse tecniche di misura. Sapere che le misure risolte nel tempo sono molte emolto diverse tra loro e che soprattutto si distinguono per il tipo di misura a cui sono adatte. Ad es non è difficil fare le misure risolte nel tempo quando i tempi sono quelli della fosfo decisamente più critiche sono le misure in tempi più rapidi.

### Effetti dell'interazione fluoroforo-intorno

Oltre alla elevata sensibilità, il processo di fluorescenza ha un altro vantaggio rispetto a quello di assorbimento. Mentre il processo di assorbimento è un processo istantaneo che non è sensibile ai processi dinamici che avvengono nell'intorno del fluoroforo, invece nel processo di emissione succede che il fluoroforo viene eccitato e portato così nel suo stato eccitato nel quale rimane un certo periodo di tempo. Durante questo periodo di tempo può subire dei processi sia intramolecolari (es variazioni nella sua conformazione) sia intermolecolari (es effetti di interazione fluoroforo-intorno) che se si realizzano durante

il tempo di vita allora avremo modo di monitorare sia dal punto di vista spaziale che temporale il realizzarsi di questi effetti.

Es. un fluoroforo nel suo stato eccitato può interagire con molecole del fluoroforo nello stato fondamentale dando la formazione di eccimeri oppure la formazione di ecciplessi.

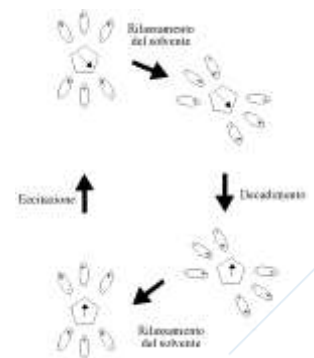
Alcuni processi si manifestano nell'attenuazione di processi di fotoluminescenza e nella variazione del tempo di vita, altri proprio con l'insorgere di nuove bande di emissione (caso della formazione degli eccimeri o dei processi di trasferimento di energia). Quindi tutta una serie di variazioni, processi dinamici che si realizzano nell'intorno del fluoroforo che possono essere studiate con metodi spettrofluorimetrici.

Importanti fattori di cui risente il fluoroforo nel suo stato eccitato sono:

- **modifiche nella temperatura:** gli effetti della temperatura sugli spettri di emissione sono molteplici. Sicuramente un effetto della temperatura è che un  $\Delta T$  comporta un  $\Delta$  della velocità dei processi di disattivazione non radiativa competitivi con le emissioni radiative e quindi di fatto un  $\Delta$  di  $T$  comporta in genere una  $\Delta$  delle intensità delle bande di emissione. Effetti di  $T$  gli abbiamo visti con la fluorescenza ritardata di tipo E che viene inibita per la  $\Delta$  di  $T$ . Sicuramente gli effetti di variazione di  $T$  si fanno risentire molto per fenomeni di fosforescenza che nelle molecole organiche viene tipicamente osservata solo a basse  $T$  perché così si disattivano/rallentano i processi di disattivazione non radiativa.
- **effetti del solvente:** possono essere dovuti ad interazione soluto-solvente di tipo non specifico (il che significa interazioni dipolo-dipolo o dipolo-dipolo indotto tra fluoroforo e solvente) oppure di tipo specifico tipo legame ad H. Oppure il solvente può farsi risentire con effetti diversi legati alla sua viscosità oppure alla stabilizzazione di stati eccitati a carattere di intramolecolare chair transfer or twisted intramolecolare chain transfer che risentono della polarità del solvente.
- **effetti di interazione con specie diverse**

#### Rilassamento del solvente

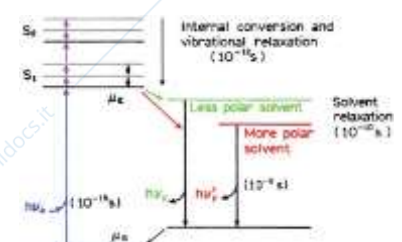
Per F-C la transizione elettronica è una transizione verticale, gli e- si muovono e i nuclei sono troppo pesanti e non fanno in tempo a seguire il moto degli e-. Quindi i nuclei sono fermi anche per quanto riguarda le molecole di solvente quindi in questa transizione verticale io ho un'organizzazione elettronica che porta ad uno stato di F-C che però non è praticamente mai lo stato emettitore. Questo perché durante il tempo di vita di quello stato eccitato le molecole di solvente che inizialmente sono rimaste ferme durante la transizione elettronica, fanno in tempo a riarrangiarsi in una conformazione che corrisponde ad una stabilizzazione dello stato eccitato rispetto alla situazione raggiunta mediante transizione verticale e questo stato rilassato è lo stato da cui io osservo poi emissione. Il rilassamento del solvente (cioè questa situazione di stabilizzazione appena indicata) si realizza in tempi di reazione piuttosto rapidi quindi a meno di casi particolari per esempio elevata viscosità del solvente, il rilassamento del solvente fa quasi sempre in tempo a realizzarsi e lo stato emissivo è questo stato rilassato.



#### Polarità del solvente

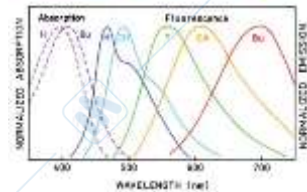
Se lo stato eccitato ha elevato momento di dipolo è chiaro che la stabilizzazione per effetto di rilassamento del solvente  $>$  tanto più il solvente è polare per effetto delle interazioni stabilizzanti dipolo-dipolo. Quindi lo stato emettitore viene stabilizzato e quello che si osserva è un solvato fluorocromismo cioè uno spostamento della banda di emissione all'  $>$  della polarità del solvente verso il rosso quindi a minor energia.

Teniamo conto che anche per il ritorno per F-C, la transizione è una transizione verticale quindi porterà ad uno stato che è uno stato a maggiore energia rispetto allo stato di partenza e che ritornerà alla condizione di



partenza dopo una successiva riorganizzazione, un successivo rilassamento del solvente anche per quanto concerne lo stato fondamentale.

Es. solvatofluocromismo del 4-dimetilammino-4'-nitrostilbene in solventi a polarità crescente. All'> della polarità del solvente > lo stokes shift tra assorbimento ed emissione.



Gli effetti di interazione dipolo-dipolo, dipolo-dipolo indotto soluto solvente sono indicati come effetti del solvente di tipo generale e la previsione di come andranno questi effetti generali può essere fatta attraverso l'equazione di **Lippert-Mataga** che permette di calcolare lo stokes shift in  $\text{cm}^{-1}$  (differenza tra la banda di assorbimento e la banda di fluorescenza) in funzione delle proprietà del solvente (cioè costante dielettrica e indice di rifrazione e la differenza tra il momento di dipolo tra lo stato eccitato e lo stato fondamentale). Ha il raggio della cavità (raggio di Onsager) occupata dal soluto all'interno del solvente che deve essere approssimata note le dimensioni della molecola.

$$\bar{\nu}_A - \bar{\nu}_F = \frac{2}{hc} \left( \frac{\epsilon - 1}{2\epsilon + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1} \right) \frac{(\mu_E - \mu_G)^2}{a^3} + \text{constant}$$

Le deviazioni rispetto all'andamento previsto dalla Lippert-Mataga sono spesso dovute ad interazioni di tipo specifico. L'utilizzo della Lippert-Mataga in generale molto spesso è fatto per determinare il  $\Delta\mu_{ge}$  cioè la variazione del momento di dipolo tra lo stato fondamentale e lo stato eccitato note tutte le altre grandezze che entrano nell'equazione. Il maggior grado di inaccuratezza è dovuto all'approssimazione che viene fatta per il raggio della cavità per l'espressione del raggio di Onsager.

Quindi quello che noi vediamo è emissione non dallo stato di F-C raggiunto dalla nostra transizione verticale ma uno stato in cui il solvente si è rilassato, questo perché il tempo richiesto dal rilassamento del solvente è di solito un tempo molto breve e quindi durante il tempo di vita dello stato eccitato il solvente ha ampiamente tempo di riorganizzarsi e lo stato emettitore sarà quello rilassato. Può succedere però che la viscosità del solvente sia troppo elevata e che questo processo di rilassamento si compia in tempi così lunghi che in realtà superano il tempo di vita dello stato eccitato e quindi lo stato che emette è uno stato non rilassato molto vicino allo stato di F-C raggiunto per irraggiamento nella nostra transizione verticale (è lo stato F nel grafico, lo stato F' è invece l'emissione dallo stato rilassato che porta ad un groundstate non rilassato e terminata l'emissione si ha poi successivo rilassamento del solvente).

Può succedere anche che questo processo dinamico di rilassamento del solvente sul fluoroforo eccitato abbia tempi compatibili dello stesso ordine di grandezza dei tempi di vita dello stato eccitato; la spettroscopia di fotoluminescenza ha il vantaggio di permettere anche gli studi dinamici che avvengono durante il tempo di vita dello stato eccitato, se i tempi di questi processi dinamici sono compatibili con i tempi di vita dello stato eccitato; quindi quello che in questo caso può succedere è che potete raccogliere spettri temporalmente diversi l'uno dall'altro che permettono di seguire la dinamica di rilassamento del solvente.

Gli spettri riportati sono spettri raccolti in tempi diversi che dicono come il nostro stato emettitore si sta spostando nel tempo verso uno stato rilassato. La cosa a cui bisogna prestare attenzione è che tali spettri non sono in stato stazionario cioè sotto irraggiamento ma sono spettri risolti nel tempo cioè raccolti con le

tecniche di determinazione dei tempi di vita. Sono di fatto spettri ricostruiti sulla base dell'andamento del decadimento temporale alla diverse lambda di eccitazione. Sono spettri "TRES". Con queste analisi tres possiamo monitorare processi dinamici che si realizzano durante il tempo di vita dello stato eccitato. Sono in grado di ricostruire questi spettri e capire come nel tempo ho delle variazioni associate a diverse variazioni nell'intorno del fluoroforo (in questo caso alla dinamica di riorganizzazione del solvente).



Esempio: spettri tres della 4-amminoftalimide fatti a  $-70^{\circ}\text{C}$  in propanolo. Il momento di dipolo dello stato eccitato è più elevato di quello dello stato fondamentale, mi aspetto una forte stabilizzazione per rilassamento del solvente che è un solvente polare; il rilassamento che avviene con tempi compatibili con quello dello stato eccitato e con le risposte strumentali a  $-70^{\circ}\text{C}$  visto che la viscosità del solvente  $>$  al  $<$  della T. Quindi sono in grado di seguire la mia dinamica di rilassamento del solvente. A T ambiente questo non è possibile perché il rilassamento avviene in tempi molto veloci e così di fatto quello che vedo è soltanto l'emissione dallo stato rilassato.

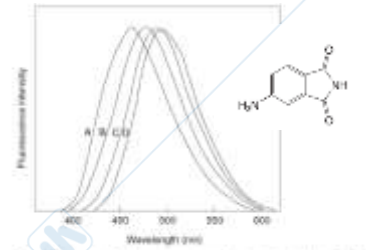


Figure 1.3 Time-resolved fluorescence spectrum of 4-aminophthalimide at  $-70^{\circ}\text{C}$  in propanol. A: 4 ns, B: 20 ns, C: 100 ns, D: 21 ns (from Ware et al., 1971).

Fra le interazioni di tipo specifico e forse anche tra le più diagnostiche per identificare la natura della transizioni nelle molecole organiche c'è il legame ad H. In realtà esso impatta sia sullo spettro di assorbimento sia sullo spettro di emissione, infatti la formazione del legame ad H può avvenire sia per il fluoroforo nel suo stato fondamentale sia per il fluoroforo nel suo stato eccitato. Nel caso avvenga nello stato eccitato la formazione del legame ad H accompagna la riorganizzazione e il rilassamento del solvente durante il tempo di vita dello stato eccitato quindi mentre il solvente si riorganizza dopo che è avvenuta la transizione elettronica abbiamo anche che si riorganizza questa interazione soluto-solvente. Questa interazione che può avere effetti osservabili sia mediante studi risolti nel tempo sia in stato stazionario ad esempio perché l'emissione è accompagnata da un forte spostamento della banda di emissione verso il rosso appunto dovuta alla formazione di un legame ad H stabilizzante del fluoroforo nel suo stato eccitato.

Schema generico dei livelli energetici di un fluoroforo dipolare in grado di formare legami ad H nel suo stato fondamentale e in quello eccitato quindi cosa succede ai livelli energetici di un fluoroforo in presenza di un solvente aprotico polare? (Parte sinistra del grafico) Per protico polare parte dx.

Lo schema di sx è quello che ci aspettiamo, lo schema dovuto a effetti generali del solvente cioè la stabilizzazione dello stato eccitato per la presenza di un solvente polare che comporta uno spostamento verso il rosso della banda di emissione, mentre nello schema dei livelli di dx, quelli che tengono conto dell'ipotetica formazione del legame ad H nello stato fondamentale e nello stato eccitato, si ha quella che viene indicata come "anomalia del legame ad H" cioè un forte spostamento della banda verso il rosso, molto di più di quella che avrei considerando esclusivamente gli effetti di tipo generale.

Parto da un ground state stabilizzato per effetto dei legami ad H, ho una transizione verticale che porta ad uno stato destabilizzato perché non ho ancora avuto riorganizzazione quindi rottura del legame ad H conseguente alla nuova distribuzione elettronica del fluoroforo nello stato eccitato e non ho avuto ancora il rilassamento da parte del solvente. Quindi questa transizione verticale che porta da uno stato stabilizzato ad uno destabilizzato fa sì che si abbia uno spostamento verso il blu della banda di assorbimento rispetto alla situazione precedente dopo di che nello stato eccitato avrò rottura del legame ad H (passaggio 3), rilassamento del solvente (passaggio 4), formazione del nuovo legame ad idrogeno nella distribuzione elettronica presente per il fluoroforo nello stato eccitato (passaggio 5), poi emissione di radiazione, poi transizione verticale conclusa la quale avrò rottura del legame ad H (passaggio 6), poi organizzazione e rilassamento del solvente intorno al fluoroforo (passaggio 7) ed infine formazione del nuovo legame ad H compatibile con la conformazione della molecola nel suo stato fondamentale (passaggio 8).

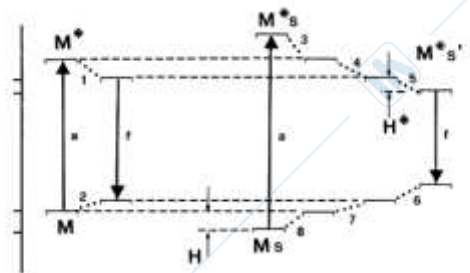


Figure 3.54 Energy levels of a dipolar, hydrogen bonding molecule  $M$  (excited state  $M^*$ ) in a polar, non-protic solvent (left) and a polar, protic solvent (right).  $H$  is the  $H$ -bond energy in the ground state,  $H^*$  in the excited state. (1), (2), (4) and (7) correspond to solvent relaxation, (3) and (5) to anti- $H$ -bond dissociation, and (5) and (8) to  $H$ -bond formation.

Esempio: la possibilità di interazioni, legami ad H fluoroforo-solvente nel caso di un eterociclo contenente N. Se la nostra transizione è una transizione  $n \rightarrow \pi^*$  io di fatto sto togliendo densità elettronica dall'eteroatomo

per spostarlo su orbitali delocalizzati sull'intera molecola. In questo caso < nello stato eccitato la capacità di formare legami ad H rispetto a quanto accade nello stato fondamentale in cui il doppietto è localizzato sull'eterotomo; quindi di fatto lo stato fondamentale è fortemente stabilizzato per la presenza del legame a H che invece non ha voglia di formarsi nello stato eccitato. Quindi avrò che per questa banda mi aspetto una forte influenza nello spettro di assorbimento quando questo venga registrato in un solvente in grado di dare legami a H e quello che mi devo aspettare è che la banda di assorbimento si sposti verso il blu (a più alta energia).

Viceversa se la transizione è una transizione  $\pi \rightarrow \pi^*$  mi aspetto che in quel caso l'eteroatomo sia più basico nello stato eccitato che nello stato fondamentale quindi mi aspetto che si abbia una > capacità di formare legami ad H nello stato eccitato rispetto a quello fondamentale e quello che mi aspetto è uno spostamento della banda di emissione verso il rosso e una scarsa dipendenza della posizione della banda di assorbimento utilizzando o meno un solvente in grado di dare legami a H.

Gli effetti di interazione specifica si fanno sentire per esempio anche per piccola aggiunta di solvente in grado di dare legame a H a una soluzione del fluoroforo in un solvente che NON è in grado di dare quel legame a H. Per esempio con piccole aggiunte di etanolo ad una soluzione della 2-anilinaftalene in cicloesano: le aggiunte non varia la costante dielettrica di rifrazione del solvente e mi danno un certo andamento atteso sulla base della Lippert-Mataga che però vengono identificate come anomalie rispetto all'andamento previsto dalla Lippert-Mataga proprio perché ci sono queste interazioni di tipo specifico delle quali in quell'equazione non viene tenuto conto. Bastano piccole aggiunte di etanolo per spostare macroscopicamente lo spettro di fluo del fluoroforo.

Gli effetti generali e specifici del solvente possono farsi risentire a tal punto da invertire l'ordine degli stati eccitati; per esempio se lo splitting dei livelli  $n \rightarrow \pi^*$  e  $\pi \rightarrow \pi^*$  è piccolo può succedere che si abbia un'inversione dell'ordine di questi due livelli passando da un solvente non polare ad uno polare o polare protico. Supponiamo per esempio che lo stato a più bassa energia sia uno stato  $n \rightarrow \pi^*$  (uno stato S1 a carattere  $n \rightarrow \pi^*$  nel solvente non polare), può succedere che nel solvente protico polare l'energia dello stato  $\pi \rightarrow \pi^*$  sia ribaltata e in questo solvente lo stato a minor energia è il singoletto quindi S1 corrisponde ad una transizione  $\pi \rightarrow \pi^*$ . In queste condizioni potrebbe ad esempio succedere che (visto che la forza di un oscillatore di una transizione  $n \rightarrow \pi^*$  è piccola o ha una costante radiativa piccola mentre quella di una transizione  $\pi \rightarrow \pi^*$  è decisamente più elevata) io cambio la natura del solvente e nel passaggio solvente non polare a solvente polare protico osservo un notevole > dell'intensità di fotoluminescenza, un > della resa quantica di emissione e un macroscopico spostamento della banda verso il rosso.

Uncomportamento un po' peculiare associato agli effetti di stabilizzazione dello stato eccitato ad opera del solvente polare è il comportamento mostrato da sistemi in grado di produrre uno stato eccitato twistato a carattere di trasferimento di carica intramolecolare. Il prototipo di questa classe di composti è il dimetilamminobenzonitrile che ha un gruppo donatore (il dimetilammino) e un gruppo attrattore che è il CN. Per questo composto si era osservato inizialmente che il composto dava una singola emissione in solventi non polari e una doppia emissione con una banda di emissione fortemente spostata verso il rosso nei solventi polari. Ovviamente gli studi per capire a cosa fosse associato questo diverso comportamento emissivo sono durati tantissimo per capire l'origine di questa emissione duale. L'interpretazione a cui si è arrivati è che nel dimetilammino benzonitrile (come poi in altri composti simili) il ground state è uno stato planare ad elevata coniugazione, lo stato eccitato in cui ho trasferimento di carica dal gruppo donatore a quello accettore è ancora uno stato planare, è uno stato F-C in cui la molecola non ha tempo di organizzarsi. Nei solventi non polari questo stato F-C è lo stato emettitore (chiamato anche local exciting) ed io osservo una sola emissione ad alta energia ad opera di questo stato eccitato. Nei solventi polari io ho che durante il rilassamento del solvente ho anche la rotazione, il twisting del gruppo dimetilammino che si dispone in modo perpendicolare rispetto al resto della molecola cosicché viene persa la coniugazione e io ho uno stato eccitato a totale trasferimento di carica. Quindi rilassamento del solvente, rotazione del gruppo dimetilammino e

stabilizzazione di questo stato twistato. Diventa così il nuovo stato emettitore e in un solvente polare se i due stati sono equilibrati io ho emissione sia dallo stato twistato che dal local exiting.

Uno degli studi fatti a supporto di questa rotazione nello stato eccitato è nata dall'osservazione che nei composti simili al prototipo ma in cui la rotazione del gruppo dimetiammino è impedita, non si osserva la variazione dell'emissione al variare della polarità del solvente. In questi sistemi l'unico stato emettitore è il local exiting del F-C.

### *Effetti di processi intermolecolari sull'emissione*

Effetti dovuti all'incontro del fluoroforo nello stato eccitato con un'altra molecola che può essere ad es di fluoroforo nello stato fondamentale come accade nella formazione degli eccimeri oppure con una molecola diversa che indicheremo generalmente come "quencher". **Il risultato di questo incontro del fluoroforo nel suo stato eccitato e la molecola di quencher va sì che io offra un cammino di disattivazione aggiuntivo rispetto ai processi intrinseci il che comporta un depopolamento più veloce dello stato eccitato quindi una riduzione dei tempi di vita dello stato eccitato e una diminuzione della resa quantica di fluorescenza.**

Quindi di fatto da questo incontro io ho un'attenuazione delle proprietà emissive del mio fluoroforo ed è per questo che si parla di quenching. La premessa da fare è che parlando di quenching io parlo dell'incontro, dello spegnimento dell'emissione radiativa per effetto dell'incontro del mio fluoroforo eccitato con un'altra molecola anche se poi i meccanismi all'interno di questo quenching cioè questi cammini radiativi aggiuntivi possono essere diversi. Io parlo di quenching se la vedo dal punto di vista del mio fluoroforo perché sempre da questo incontro risulta un'attenuazione della sua emissione anche se dal punto di vista dello spegnitore può succedere che in realtà (come nei processi di trasferimento di energia) il risultato di questo incontro sia che io osservo emissione da parte dello spegnitore quindi è quenching dal punto di vista del fluoroforo ma è accensione dell'emissione (sensibilizzazione) dal punto di vista dello spegnitore.

Questo quenching non va visto solo negativamente nel senso che può essere usato come determinazione analitica della presenza di molecole di quencher nell'intorno del mio sistema. es. per fare misure quantitative della presenza di ossigeno posso usare il quenching della fosforescenza.

Di fatto l'aver in soluzione oltre al mio fluoroforo molecole di quenchant significa fornire al mio fluoroforo nel suo stato eccitato un cammino di disattivazione aggiuntivo in competizione con i processi intrinseci cioè processi a disposizione del fluoroforo in assenza di quenchant. Il risultato è un'attenuazione dell'emissione del fluoroforo quindi un quenching dell'emissione del fluoroforo anche se, come vi ho detto, questo spegnimento non corrisponde ad una situazione di buio. Potrei invece accendere l'emissione dal punto di vista della molecola quenchant.

### *Quenching*

Di fatto i processi di quenching si dividono in meccanismi di quenching a corto raggio e meccanismo di quenching a lungo raggio. Il meccanismo di quenching a lungo raggio = Forster cioè in cui quencher e fluoroforo sono a una distanza relativamente elevata l'uno dall'altro, è quello di trasferimento di energia (vedi più avanti).

I meccanismi di quenching a corto raggio sono invece dovuti all'incontro, all'interazione tra il quencher e il fluoroforo e si dividono in **quenching statico** e **quenching dinamico**. Nei meccanismi di quenching statico io ho che l'interazione tra fluoroforo e quencher avviene con il fluoroforo nel suo stato fondamentale a dare la formazione di un complesso che viene detto dark-complex che è un composto o non emissivo o che comunque ha un'emissione diversa da quella che ha il fluoroforo isolato; mentre sotto il nome di **quenching collisionale** vengono indicati tutti quei processi di quenching a corto raggio che avvengono durante il tempo di vita del fluoroforo nel suo stato eccitato. Sotto il termine di quenching collisionale rientrano poi tutta una serie di meccanismi diversi che risultano nello spegnimento dell'emissione del fluoroforo che nel suo stato eccitato incontra il quencher.

Quindi il quenching collisionale mi indica che serve questo incontro e che questo incontro deve essere fatto con il fluoroforo nel suo stato eccitato. Dopo di che i meccanismi attraverso i quali si ha lo spegnimento possono essere molti e molto diversi tra di loro.

Sia il quenching statico che quello dinamico richiedono l'incontro, il contatto tra le molecole di quencher e le molecole di fluoroforo; nel quenching statico fluoroforo nel suo ground state, quenching dinamico invece con fluoroforo nel suo stato eccitato.

Il quenching può essere usato per indagini di tipo analitico, determinazioni di tipo qualitativo o quantitativo; per esempio per studiare l'accessibilità di un fluoroforo ad una determinata molecola di quencher. Per studiare la permeabilità di una membrana/superficie ad una determinata molecola di quencher.

### Quenching collisionale/dinamico

E' regolato dall'equazione di Stern-Volmer che ci dice che il rapporto tra  $\tau_0/\tau$  dove  $\tau_0$  è il tempo di vita intrinseco del fluoroforo cioè è il tempo di vita del fluoroforo in assenza di quencher mentre  $\tau$  è il tempo di vita del fluoroforo che disattiva per processi intrinseci e per quenching collisionale, è uguale a  $1 +$  la costante che è la costante di Stern-Volmer per la [B] dove B è il nostro quencher.

$$\tau_0/\tau = 1 + k_{SV}[B]$$

Quindi se noi supponiamo che oltre ai processi di disattivazione intrinseci si aggiunga un processo di disattivazione attraverso quenching collisionale che segue una cinetica del 2° ordine in cui entra una costante cinetica che è la costante  $k_q$  (costante di quenching), abbiamo che la nostra rate equation ricavata tenendo conto sia dei processi di disattivazione intrinseci sia del processo di quenching collisionale, arriviamo a dire che il tempo di vita del fluoroforo nel suo stato eccitato è  $1/$ le costanti dei processi intrinseci + la  $k_q$  per [B].

$$\tau = \frac{1}{k_r + k_p + k_{nr} + k_q[B]}$$

Dall'estensione di  $\tau_0/\tau$  arrivo a dire che tale rapporto è:  $\tau_0/\tau = 1 + k_q\tau_0[B]$

Sapendo che la resa quantica del processo  $I_0$  in assenza di quencher vale  $\tau_0$  per la costante di velocità di quel processo iesimo, in presenza di quencher la resa quantica di questo processo iesimo vale  $\tau$  per  $k_i$ .

$$\Phi_i = \tau k_i$$

In opportune condizioni cioè misurando l'intensità di fotoluminescenza in assenza e in presenza di quencher nelle stesse condizioni strumentali io ho che questa equazione vale anche per il rapporto  $I_0/I$  quindi ho che tale rapporto è uguale a:

$$I_0/I = \Phi_0/\Phi = \tau_0/\tau = 1 + K_{SV}[B]$$

Diagrammando un plot di Stern-Volmer in funzione della [B] ottengo una retta la cui intercetta è 1 e in cui la pendenza è la costante di S-V. Quindi da questi plot, noti i tempi di vita del fluoforo in assenza di quencher e noti gli altri parametri (quindi avendo misurato i tempi di vita o la riduzione dell'intensità di fotoluminescenza per effetto della presenza del quencher) sono in grado di ricavare la costante di quenching dinamico.

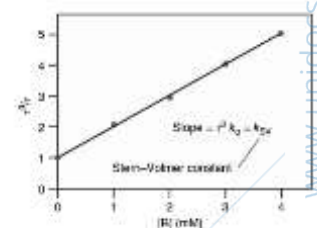


Figure 6.1 A representative Stern-Volmer plot.

I plot di S-V possono essere usati a diversi scopi: uno può essere la determinazione della  $k_q$  cioè la costante di velocità del quenching dinamico che dipende dall'incontro del fluoroforo nel suo stato eccitato con le molecole di quencher quindi quencher e fluoroforo si devono incontrare. Nel caso in cui l'efficienza del processo di quenching sia unitaria quindi il processo di quenching sia un processo efficace, e il fluoroforo sia accessibile al quencher (quindi l'incontro tra i due non sia per qualche motivo inibito) allora la  $k_q$  eguaglia la  $k_d$  cioè la costante di diffusione. La costante di diffusione può essere ricavata dall'equazione di Smoluchowski che dipende dai coefficienti di diffusione del quencher e del mio fluoroforo (qui indicato come A) che variano in modo direttamente proporzionale alla T; più è elevata la T più la diffusione > e inversamente proporzionale alla viscosità del solvente e inversamente proporzionale alla grandezza delle molecole (molecole grandi diffondono poco facilmente).

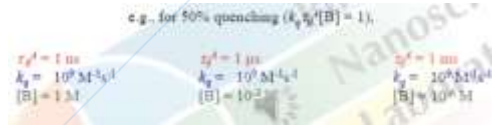
$$k_d = 4\pi N_A (R_A + R_B)(D_A + D_B)$$

Quindi di fatto  $k_q$  dipende dall'efficienza del processo di quenching, dall'effettivo spegnimento dell'emissione per effetto dell'incontro tra il fluoroforo nel suo stato eccitato e il quencher e dalla  $k_d$  che è grande per

molecole piccole cioè che diffondono molto efficacemente. L'ossigeno è un ottimo quencher collisionale date le sue piccole dimensioni.

Di fatto per l'equazione di S-V il quenching della resa quantica, dell'intensità di fotoluminescenza, la riduzione dei tempi di vita per azione del quenching dinamico dipende sia dalla  $k_q$  ma anche da  $\tau_0$  cioè dal tempo di vita intrinseco del fluoroforo nel suo stato eccitato. Quindi se noi consideriamo l'ossigeno che è il prototipo del nostro quencher collisionale esso è un quencher collisionale fantastico più per la fosfo che per la fluo. Al di là dei meccanismi specifici che funzionano per il quenching del tripletto o quello del singoletto ad opera dell'ossigeno ma che in questo momento non ci interessa la definizione generica come quenching collisionale. **Quindi l'ossigeno è un miglior quencher collisionale per il tripletto perché esso ha un tempo di vita più lungo di quello del singoletto.**

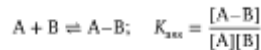
Qui si vede come per la fosfo mi serve una [B] (cioè ossigeno, quencher) più piccola che per la fluo.



### Quenching statico

Si realizza dall'incontro del fluoroforo A nel suo stato fondamentale con la molecola di quencher. E' ancora un quenching a corto raggio (cioè deve avvenire l'incontro molecolare il cui risultato è la formazione di un complesso che viene definito dark complex = perché è non emettitore o se è emettitore lo è in una regione diversa da quella del fluoroforo libero). Di fatto ho un'attenuazione della reazione prodotta dal fluoroforo libero in assenza di quencher.

La formazione del dark complex è governata da un equilibrio che dipende da una costante di formazione in cui le [] delle specie sono quelle all'equilibrio.



$I_0$  è l'intensità di emissione in assenza di B e  $I$  è l'intensità di emissione in presenza di B. La [B] all'equilibrio di B la posso approssimare con  $a$  [] iniziale e da qui ho che:

$$K_{ass} = \frac{[A]_0 - [A]}{[A][B]} \quad \frac{I_0}{I} = \frac{[A]_0}{[A]} = \frac{[A] + [A-B]}{[A]} = 1 + K_{ass}[B] \quad \frac{\tau_0}{\tau} = 1 + K_{ass}[B]$$

Un aspetto importante è che se ho effettivamente per formazione del dark complex un'attenuazione del quenching dell'emissione prodotta dal fluoroforo, a differenza di ciò che avviene nel quenching dinamico io non ho variazione del tempo di vita del fluoroforo nel suo stato eccitato perché la formazione del dark complex riduce il numero di molecole in grado di dare emissione e io ho quindi un'attenuazione dell'intensità dell'emissione ma le molecole che non sono entrate nella formazione del dark complex si comportano come in assenza del quencher; quindi esse raggiungono il loro stato eccitato e ci restano per un tempo di vita che è quello che io avevo senza quencher. **Quindi mentre nel q. dinamico varia sia l'intensità che il tempo di vita tra la situazione con e senza quencher, nel caso del quenching statico il tempo di vita non varia mentre diminuisce l'intensità dell'emissione prodotta dal fluoroforo.**

Se i due meccanismi di quenching, statico e dinamico, avvengono insieme (cosa che spesso succede) io ho di fatto che il tempo di vita risente solo dell'effetto dovuto al quenching dinamico mentre la variazione dell'intensità è dovuta ad entrambi i quenching (intensità di emissione che io osservo è data solo dal numero delle molecole di A che non hanno dato formazione del dark complex e dalla frazione delle molecole nello stato eccitato che non sono state quencheate per effetto dell'intrazione con B).

$$I_0/I = (1 + K_{ass}[B])(1 + k_q \tau_0[B])$$

Di fatto così il rapporto  $I_0/I$  dipende dal quadrato della [] di B quindi se io diagrammo  $I_0/I$  e  $\tau_0/\tau$  in funzione della [B] osservo un andamento lineare  $\tau_0/\tau$  (che risente solo del quenching dinamico) per mentre osservo una curvatura per  $I_0/I$  che dipende da  $[B]^2$ .

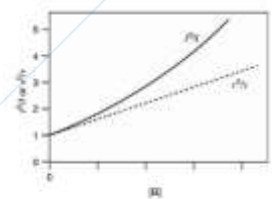


Figure 8.2 Plot of the rate of intensity ( $I/I_0$ ) and excited-state lifetime ( $\tau/\tau_0$ ) versus the concentration of quencher [B] where quenching takes place by both static and dynamic mechanisms.

**Per distinguere tra quenching statico e dinamico si può:**

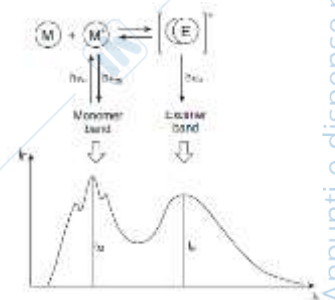
- Il quenching statico non subirà la presenza di solvente, quello dinamico sì.

- Un  $\lambda$  di T favorisce il quenching dinamico mentre spesso sfavorisce quello statico perché all' $\lambda$  della T aumenta l'instabilità del dark complex
- Posso anche vedere se compaiono delle bande nello spettro di assorbimento in presenza di quencher che io non osservo in assenza di quencher perché ovviamente la formazione del dark complex sarà accompagnata da un corrispondente finger print nello spettro di assorbimento
- misurare il tempo di vita in presenza o assenza di quencher. Nel quenching statico il tempo di vita non è alterato dal quencher in quanto è la frazione di fluoroforo i cui fotoni possono aggiungere il rivelatore ad essere  $<$  dall'azione complessante del quencher
- osservare lo spettro di assorbimento del fluoroforo. Il quenching collisionale influenza solo lo stato eccitato del fluoroforo ma lascia invariato lo stato fondamentale e, di conseguenza, lo spettro di assorbimento è inalterato. La formazione di complessi solitamente influenza lo stato fondamentale del fluoroforo con una conseguente alterazione dello spettro di assorbimento

### Eccimeri ed ecciplessi

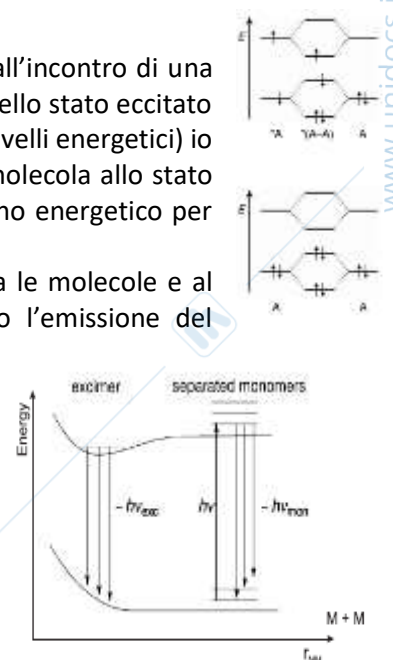
Alcuni dettagli dei processi di quenching dinamico: si possono formare eccimeri ed ecciplessi che sono rispettivamente dati dall'incontro tra la molecola di fluoroforo nel suo stato eccitato con una molecola di fluoroforo nel suo stato fondamentale (a dare gli eccimeri) oppure dall'incontro collisionale tra la molecola di fluoroforo nel suo stato eccitato e una molecola diversa nel suo stato fondamentale dove uno dei due funziona da donatore di e- e l'altro da accettore. Proprio per questo scambio elettronico, la banda dell'ecciplesso è più sensibile alla polarità del solvente rispetto a quello che succedere per l'eccimero. Il risultato della formazione di eccimeri ed ecciplessi è un'attenuazione dell'emissione del fluoroforo (=quenching) e ovviamente la riduzione del tempo di vita del fluoroforo; essendo processi collisionali dipendono dalla  $[M]$  della soluzione che tanto più  $>$  tanto più rende maggiormente probabile l'incontro tra il fluoroforo e la specie quenchant.

Dal punto di vista qualitativo la formazione di eccimeri o ecciplessi è caratterizzata dalla presenza di una banda aggiuntiva rispetto a quella del monomero spostata verso il rosso con la perdita della struttura fine vibrazionale che invece poteva essere presente e visibile ad opera del monomero. Quindi mi accorgo dell'eventuale formazione di eccimeri ed ecciplessi  $>$  la  $[M]$  di una soluzione perché compare una banda a più bassa energia in cui è sparita, se era visibile in origine, la risoluzione vibrazionale nella banda corrispondente all'eccimero o all'ecciplesso.



Eccimeri ed ecciplessi sono dimeri che si formano nello stato eccitato e nascono dall'incontro di una molecola nello stato eccitato con una molecola nello stato fondamentale. Esistono nello stato eccitato ma non esistono nello stato fondamentale perché (come si vede nello schema con i livelli energetici) io ho un guadagno energetico ad opera della formazione dell'eccimero quando una molecola allo stato eccitato incontra ad una molecola dello stato fondamentale ma non ho un guadagno energetico per formazione del dimer con le due molecole nello stato fondamentale.

Nel grafico si vede l'andamento dell'energia potenziale al variare della distanza tra le molecole e al variare della concentrazione. Per distanze elevate (=soluzioni diluite) io osservo l'emissione del monomero, quella del monomero isolato in cui la banda di emissione avrà se visibile, una componente vibrazionale che dipende dalla struttura vibrazionale e dai livelli vibrazionali dello stato di arrivo. Se la  $[M]$  della soluzione  $>$  la distanza tra le molecole  $<$  e io ho ad un certo punto una stabilizzazione, una diminuzione dell'energia potenziale nello stato eccitato dovuta alla formazione dell'eccimero che corrisponde a una buca e per emissione da essa io ritorno su uno stato fondamentale che è una curva dissociativa cioè una curva in cui le due molecole non sono legate. Dal punto di vista quindi dello spettro questo comporta la presenza di una banda di emissione spostata verso il rosso, dovuta alla stabilizzazione dell'eccimero rispetto al monomero isolato, con la perdita della



struttura vibrazionale perché la disattivazione radiativa porta su una curva dissociativa quindi non esiste di fatto la molecola e ovviamente non esistono livelli vibrazionali corrispondenti.

Oltre che dalla  $\tau$  la formazione di eccimeri e ecciplessi dipende anche dal tempo di vita del fluoroforo nel suo stato eccitato e quanto più lungo è il tempo di vita del fluoroforo nel suo stato eccitato tanto più facile è l'incontro con una molecola nello stato fondamentale a dare la formazione del corrispondente eccimero o ecciplesso. Più  $\tau >$  il tempo di vita più  $\tau <$  la  $\tau$  alla quale io comincio ad osservare la banda di formazione dell'eccimero e dell'ecciplesso. Questo è il caso del pirene che ha un tempo di vita del singoletto piuttosto lungo (650 ns) e un tempo di vita sufficientemente lungo perché si abbia un incontro diffusoriale tra una molecola di pirene allo stato eccitato con una molecola di pirene allo stato fondamentale anche per basse  $\tau$  della soluzione.

Più breve è il tempo di vita più difficile sarà osservare la banda di formazione dell'eccimero e quindi dovrà  $>$  la concentrazione per poterla osservare. La formazione dell'eccimero e dell'ecciplesso sono processi dinamici, e nascono dalla diffusione/incontro delle nostre 2 molecole e quindi la formazione di eccimeri ed ecciplessi posso seguirli nel tempo mediante la spettroscopia risolta nel tempo.

### Processi di trasferimento di energia

Sono ulteriori processi che risultano nell'attenuazione e quindi nel quenching dell'emissione del mio fluoroforo. Possono essere sia a lungo raggio che a corto raggio; in essi l'energia viene trasferita da una molecola che si trova in uno stato eccitato e che viene indicata come il donatore ad una molecola che si trova nello stato fondamentale (oppure potrebbe essere in uno stato già eccitato ma in conseguenza di questo trasferimento di energia) passa ad occupare uno stato a maggiore energia.

**Quindi in pratica il donatore passa ad uno stato ad energia inferiore e l'accettore ad uno a più alta energia.**

All'interno dei vari meccanismi di trasferimento di energia possiamo trovare processi di *eterotrasfer* (donatore e accettore sono due molecole chimicamente diverse) o *omotrasfer* (sono la stessa specie chimica).

Possiamo anche fare un'ulteriore classificazione in processi radiativi (il trasferimento di energia avviene attraverso l'emissione di un fotone da parte del donatore) e non radiativi (il trasferimento di energia avviene senza emissione di fotoni da parte del donatore).

Nella nomenclatura dei processi di trasferimento di energia, per indicarli, ci si riferisce alla molteplicità degli stati eccitati di partenza del donatore e di arrivo dell'accettore. Per es due processi di trasferimento di energia abbastanza comuni sono il trasferimento di energia singoletto-singoletto e tripletto-tripletto. Nel processo di trasferimento di energia singoletto-singoletto io ho che il donatore nel suo stato eccitato di singoletto trasferisce energia all'accettore probabilmente in uno stato fondamentale di singoletto, e il risultato del trasferimento di energia è che il donatore rilassa al suo stato fondamentale di singoletto e l'accettore passa ad uno stato eccitato di singoletto. Nel tripletto-tripletto il principio è lo stesso con alla fine che il donatore rilassa ad uno stato fondamentale di singoletto e l'accettore passa ad uno eccitato di tripletto.

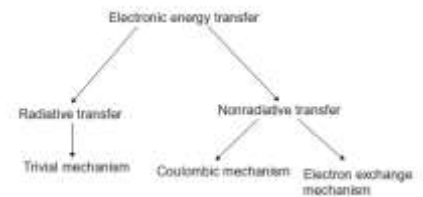
Quello che può succedere è che l'accettore che per trasferimento di energia è passato a popolare uno stato eccitato rilassa da quello stato eccitato con emissione di radiazione quindi se io parlo di quenching dal punto di vista di quello che succede a D non posso parlare di quenching dal punto di vista di A. Dal punto di vista del donatore parlo di quenching, dal punto di vista di A parlo di sensibilizzazione o sensitizzazione: io eccito col mio fotone iniziale il donatore e osservo emissione dall'accettore perché questo è stato sensibilizzato ad opera di D (c'è stato un processo di trasferimento di energia).

Processi di trasferimento di energia sono molto utili e impongono anche in ambiente biologico e sono un modo di poter popolare lo stato eccitato di A usando dei fotoni che vengono in realtà assorbiti da D. Quenching e sensitizzazione sono due facce diverse della stessa medaglia: il quenching è dal punto di vista del donatore e la sensitizzazione dal punto di vista dell'accettore. Ricordiamo che A potrebbe raggiungere uno stato eccitato da cui ho emissione di radiazione ma potrebbe anche essere che di fatto io non osservi emissione neanche da A. Posso avere che A emette con rilassamento radiativo oppure no.

I processi di trasferimento di energia siano essi radiativi o no sono ISOENERGETICI nel senso che l'energia che viene persa dal donatore viene acquistata tale e quale dall'accettore. Non sono possibili cessioni di energia da parte di D su livelli elettronici a più alta energia di A che quindi richiederebbero una > energia di eccitazione e quindi andrebbero contro il principio di conservazione dell'energia; mentre è possibile che l'energia venga trasferita ad A anche se il suo livello elettronico eccitato è ad energia minore rispetto al livello elettronico eccitato di D.

In questo caso quello che verrà popolato nel trasferimento di energia isoenergetico è un livello vibrazionale eccitato dello stato elettronico eccitato di A da cui poi avrà rilassamento e A si porterà sul suo stato vibrazionale fondamentale di quello stato elettronico eccitato. E' chiaro che la presenza di livelli isoenergetici, io la osservo sulla base dello spettro di assorbimento dell'accettore e di emissione del donatore. Tali spettri devono essere almeno in parte sovrapposti perché questo è garanzia dell'esistenza di transizioni isoenergetiche fra i due.

I processi di trasferimento non radiativo sono quelli che non passano attraverso l'emissione di un fotone e vedremo poi come sono i meccanismi sui quali si basano e sono sia di tipo a lungo raggio che a corto raggio. Invece quelli radiativi sono solo a lungo raggio e spesso il trasferimento radiativo è indicato come "meccanismo triviale" cioè che è di semplice intuizione. I metodi non radiativi sono più complessi e il meccanismo coulombiano è a lungo raggio mentre quello di scambio elettronico è a corto raggio.



#### *Distinzione tra trasferimento radiativo e non radiativo*

Il meccanismo triviale corrisponde a quando abbiamo parlato dell'effetto del filtro interno secondario che dicevamo che poteva essere un problema nel caso stessimo lavorando ad alte [ ]. Stiamo lavorando ad alte [ ] quindi può succedere che il mio fluoroforo venga nel suo percorso assorbito o da molecole di fluoroforo nel suo stato fondamentale (e in quel caso parliamo di omotransfer) o da molecole diverse (etero transfer). La condizione è che i fotoni emessi da uno debbano poter essere assorbiti dall'altro. Questo implica un overlap tra lo spettro di emissione del donatore e lo spettro di assorbimento dell'accettore.

Nel caso dell'omotransfer (fenomeno di cui abbiamo parlato anche come fenomeno dell'autoassorbimento) io lo so che la regione di overlap tra lo spettro di emissione e quello di assorbimento è centrato intorno alla banda 0-0. Inoltre avevamo visto che in caso di autoassorbimento la banda di emissione del fluoroforo viene attenuata tanto da deformare la forma della banda di emissione rispetto a quella della zona intorno alla banda 0-0 (quindi banda 0-0 e bande calde). Nel caso dell'eterotransfer l'overlap (sovrapposizione) tra lo spettro di emissione del donatore quello di assorbimento dell'accettore può essere molto grande e non siamo più vincolati alla regione 0-0 (i due possono essere sovrapposti). Diverso è il meccanismo dei processi di trasferimento di energia non radiativi che non avvengono attraverso l'emissione di questo fotone.

Possiamo iniziare a dire (approfondiremo dopo) che i processi di trasferimento radiativo e non hanno diversi effetti sui parametri spettroscopici del fluoroforo.

Per lo spettro di fluorescenza se il meccanismo di trasferimento di energia è di tipo radiativo lo spettro di fluo del fluoroforo viene modificato nella regione in cui si ha overlap spettrale (es. nel caso dell'omotransfer, in corrispondenza della transizione 0-0). Invece nei processi non radiativi la forma non viene variata. Per quanto riguarda l'intensità della banda tale intensità viene diminuita nel caso di un processo radiativo nella zona di overlap spettrale mentre nel caso dei processi non radiativi viene diminuita per l'intera banda di emissione.

Per quanto riguarda i tempi di vita abbiamo che per il processo di trasf radiativo il tempo di vita del fluoroforo non viene variato poiché il fluoroforo emette nei tempi in cui deve emettere e trasferisce emettendo il suo fotone che poi viene assorbito dall'accettore invece nei processi di trasferimento di energia non radiativa il tempo di vita del fluoroforo diminuisce perché di fatto il processo di trasferimento di energia costituisce un cammino aggiuntivo che il mio donatore nel suo stato eccitato trova a sua disposizione per disattivare.

Quindi nel processo di trasferimento triviale D emette quando deve emettere e A, se si trova sul cammino del fotone emesso da D e se c'è un overlap spettrale come abbiamo visto, può venire riassorbito da A. E' un

trasferimento a lungo raggio, non serve contatto tra le due specie che potrebbero anche essere in contenitori diversi. Il tempo di vita non viene variato nel trasferimento di energia triviale perché D emette quando deve emettere.

Le regole di selezione per il processo di trasferimento radiativo sono le stesse viste precedentemente: la transizione singoletto-singoletto è favorita anche in assorbimento quindi la transizione è più probabile se il passaggio dell'accettore dallo stato più basso a quello eccitato è uno stato  $S_0 \rightarrow S_1$ .

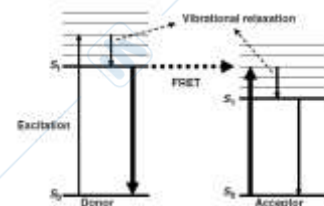
I processi di trasferimento di energia non radiativi sono invece di più difficile comprensione e la loro trattazione potrebbe avvenire in maniera simile a quella fatta per conversione interna e intersystem crossing; ciò perché anche in questo caso vale la regola d'oro di Fermi.

Questi processi si basano o sul meccanismo coulombiano (lungo raggio) o su quello a trasferimento di e- (corto raggio).

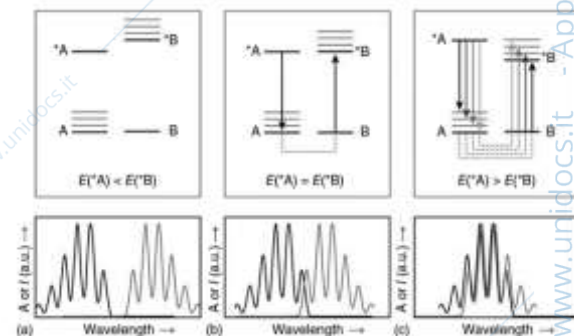
Tra i processi di tipo coulombiano affronteremo il meccanismo di tipo Forster mentre per l'altra tipologia faremo il meccanismo di Dexter. Può accadere che il donatore venga chiamato A e l'accettore D, dipende dal libro.

### Meccanismo di Forster

È il meccanismo indicato come meccanismo coulombiano per le interazioni dipolo-dipolo e viene anche indicato come FRET o RET (Forster/fluorescence resonance energy transfer). In questo processo si ha che il donatore per interazione col fotone di eccitazione passa a popolare uno stato eccitato con i soliti meccanismi di rilassamento non radiativo ci si porta su  $v_0$  di  $S_1$  e da lì il donatore trasferisce energia su un livello isoenergetico dell'accettore (potrebbe essere un livello vibrazionalmente eccitato dell'accettore dal quale rilassa e l'accettore si riporta su  $v_0$  di  $S_1$  dal quale può emettere per fluorescenza (non è detto che lo faccia)). L'interazione dipolo-dipolo è tra i momenti di transizione del donatore e il momento della transizione dell'accettore se questi hanno delle frequenze di risonanza. Se ci sono delle transizioni nel donatore che sono isoenergetiche nell'accettore. Questo lo si vede dallo spettro di emissione del donatore e dallo spettro di assorbimento dell'accettore (devono essere sovrapposti).



In figura tre casi diversi: nel primo caso abbiamo che il livello elettronico eccitato dell'accettore B è a energia maggiore del livello elettronico eccitato del donatore A\* e in questo caso non è possibile il processo di trasferimento di energia perché NON avrei conservazione dell'energia (il livello eccitato di B dovrebbe essere ad energia minore rispetto a quello di A). Nel secondo caso io ho i due livelli elettronici hanno la stessa energia, ho una sola transizione isoenergetica, un solo livello isoenergetico, una sola frequenza di risonanza che è quella corrispondente alla transizione 0-0. Nell'ultimo caso invece ho che ci sono molte frequenze di risonanza, transizioni isoenergetiche tra il decadimento del donatore e l'assorbimento dell'accettore. Infatti i due spettri sono molto sovrapposti.



Dal processo di trasferimento di energia io arrivo su livelli vibrazionalmente eccitati isoenergetici nella molecola accettrice. Da tali livelli il sistema rilassa velocemente per riportarsi a  $v_0$  su  $S_1$  di A. Proprio perché a questo punto io ho una perdita di uguaglianza di energia tra gli stati di D e gli stati di A, di fatto i processi di trasferimento di energia dopo che è avvenuto il rilassamento vibrazionale sono processi irreversibili. Esattamente come irreversibili erano i processi di conversione interna e intersystem crossing ma come allora sappiamo che in determinate condizioni (ad es. quando il gap energetico era piccolo) potevo avere popolazione anche su stati vibrazionalmente eccitati e si avevano processi di back internal conversion o back intersystem crossing. Nel caso dei processi di trasferimento di energia succede la stessa cosa cioè generalmente sono processi irreversibili ma quando il gap tra i livelli è opportuno, *si possono osservare anche processi di back energy transfer*. Per quanto riguarda il meccanismo alla base del trasferimento energia di tipo coulombiano io ho che si ha questa interazione dipolo-dipolo tra il momento della transizione di D e il

momento della transizione di A. Questa interazione dipolo dipolo può essere trattata esattamente in modo classico come abbiamo fatto quando abbiamo parlato del fenomeno di assorbimento. **Io ho assorbimento quando si realizza la condizione di risonanza e quando il momento della transizione associato alla transizione elettronica nella molecola che deve assorbire è non nullo e in quel caso si ha un'interazione dipolo dipolo tra il campo oscillante della radiazione elettromagnetica e il momento della transizione non nullo sulla molecola che assorbe.** Quindi se è realizzata la condizione di risonanza io ho assorbimento. La trattazione è esattamente la stessa e in questo caso il dipolo oscillante non è più quello della radiazione elettromagnetica ma il dipolo oscillante è quello associato al momento della transizione di D e quando i due dipoli interagiscono si sarà realizzata la condizione di risonanza e io ho trasferimento di energia di ritorno allo stato fondamentale e A passa a popolare il suo stato eccitato.

Dal punto di vista di A non cambia molto che questa interazione sia data da un fotone o dal dipolo oscillante in D, è come se A vedesse un fotone virtuale e per effetto di interazione con questo fotone virtuale passasse nel suo stato eccitato.

electrostatic interaction energy (E) between 2 dipoles is directly related to their magnitude and the distance between them...

$$E(\text{dipole} - \text{dipole}) \propto \frac{\mu_D \mu_A}{R_{DA}^3}$$

\* in this case we use the center-to-center distance,  $R_{DA}$ .

Il decadimento nel tempo del donatore eccitato  $D^*$  ad opera del processo di trasferimento di energia e quindi la velocità del trasferimento di energia segue una cinetica di pseudo primo ordine che dipende dalla costante di velocità che indichiamo come  $k_{ET}$ . Questa costante di velocità del processo di trasferimento di energia dipenderà anche dal quadrato dell'energia di interazione dipolo-dipolo. Anche la distanza tra donatore e accettore è imo e è correlata alla costante di velocità con elevazione alla sesta.

rate of energy transfer is related to the interaction energy according to

$$k_{et}(\text{dipole} - \text{dipole}) \propto E^2 \approx \left( \frac{\mu_D \mu_A}{R_{DA}^3} \right)^2 = \frac{\mu_D^2 \mu_A^2}{R_{DA}^6}$$

Quindi siccome la costante di velocità e quindi la facilità del processo di energia (in pratica la sua velocità) dipende dal quadrato del momento della transizione tanto più è elevato il momento della transizione del donatore, tanto più è elevato il momento della transizione dell'accettore, tanto più veloce/probabile è il processo di trasferimento di energia. Transizioni singoletto-singoletto sono associati ad elevati momenti della transizione (poiche sono transizioni spin permesse) quindi è ovvio che il processo della trasferimento di energia secondo Forster è sicuramente un processo che si realizza facilmente nei trasferimento di energia singoletto-singoletto.

Quindi il meccanismo di energy transfer secondo Forster avviene facilmente quando il trasferimento è singoletto-singoletto. Sicuramente è molto difficile un processo di energy transfer tripletto tripletto perché in questo caso sia il momento della transizione  $D^* \rightarrow D$  che il momento della transizione  $A^*$ , sono momenti della transizione piccoli perché entrambi sono transizioni non permesse per spin.

**NB:** perché una transizione di trasferimento di energia serve che il livello elettronico dell'accettore sia a energia inferiore a quella del donatore.

### Processi fotofisici del donatore in presenza dell'accettore

Il tempo di vita del donatore nel suo stato eccitato in presenza dell'accettore è l'inverso della somma di tutte le costanti cinetiche di decadimento radiative e non (vedi prima) +  $k_{ET}$ . La resa quantica di fluo del donatore in assenza dell'accettore sappiamo già come è fatta. La resa quantica del donatore in presenza di accettore è data dal rapporto tra la costante radiativa / sommatoria costanti intrinseche +  $k_{ET}$ . Tale tempo di vita è più piccolo di quello intrinseco del donatore e lo stesso vale per la resa quantica. Il rapporto resa quantica  $(D+A)$  / resa quantica (D) è uguale al rapporto tra i rispettivi tempi di vita.

$$\tau_{(D+A)} = \frac{1}{K_R + k_{NR} + k_{ET}} = \frac{1}{k + k_{ET}}$$

$$\Phi_D = \frac{K_R}{k + k_{ET}} = K_R \tau_D$$

$$\Phi_{(D+A)} = \frac{K_R}{k + k_{ET}} = K_R \tau_{(D+A)}$$

In realtà Forster ha determinato un'espressione per la costante di velocità del processo di energy transfer perché secondo la sua teoria essa è correlata al tempo di vita del donatore in assenza dell'accettore e anche alla distanza tra donatore e accettore  $r$  secondo quella relazione.

**Distanza di Forster ( $R_0$ ):** distanza alla quale la costante di velocità del processo di energy transfer diventa uguale alla costante di velocità dei processi intrinseci cioè  $k_{ET} = k_D$  (sommatoria delle costanti di velocità dei processi intrinseci). Quindi  $k_{ET} = 1 / \tau_D$  in assenza dell'accettore. E' anche la distanza alla quale il 50% delle molecole di donatore decadono secondo il processo di energy transfer e il 50% decadono con meccanismi di tipo intrinseco (cioè processi radiativi e non che si realizzano in assenza del donatore).

$$k_T(r) = \frac{1}{\tau_D} \left( \frac{R_0}{r} \right)^6$$

Per la maggior parte delle coppie donatore-accettore la distanza  $R_0$  varia da 0 a 60

Amstrong ed è un parametro che indica quanto efficacemente avviene il processo di trasferimento di energia. Per  $R_0$  distanza di Forster molto elevate, il processo di energy transfer si realizza con  $k$  elevate anche a distanze elevate: quindi per  $R_0$  molto grandi,  $k_{ET}$  continua a essere grande anche per  $R$  grandi. Piu  $R_0$  è grande più il processo di energy transfer si realizza efficacemente. Donatori e accettori si sentono anche a lunga distanza.

Forster ha fatto uno studio completo e usando la regola d'oro di Fermi ha trovato un modo per ricavare  $R_0$  in funzione dei parametri spettrali di accettore e donatore. La distanza di Forster dipende dalla resa quantica del donatore in assenza dell'accettore  $\phi_D^0$  quindi è chiaro che  $R_0$  aumenta tanto più aumenta la resa quantica del donatore.

$$R_0^6 = \frac{9 \ln(10)}{128 \pi^5 N_A} \frac{\kappa^2 \phi_D^0}{\pi^4} J$$

Quindi **la distanza di Forster dipende da  $\tau_D$  e dall'integrale di overlap tra lo spettro di emissione del donatore e quello di assorbimento dell'accettore.** L'integrale di overlap può essere riportato come si vede nella formula dove  $F$  è la fluorescenza del donatore e dove  $\epsilon$  è il coefficiente di estinzione molare dell'accettore. L'integrale in questione è normalizzato dal punto di vista dello spettro di fluorescenza ma non dal punto di vista di quello di assorbimento. Quindi l'integrale di overlap deve essere elevato ma deve essere elevato nel punto in cui la  $\epsilon$  dell'accettore è *elevata*. Quindi dipende dalla singola coppia e dalle proprietà ottiche dei due.

$$J = \frac{\int F(\lambda) \epsilon(\lambda) \lambda^4 d\lambda}{\int F(\lambda) d\lambda}$$

Oltre che le transizioni singoletto-singoletto, si possono realizzare con meccanismo di Forster anche quelle singoletto-tripletto a patto che la resa quantica di fosfo del donatore sia una resa quantica elevata (anche se è una transizione spin proibita può realizzarsi in modo radiativo); se l'emettitore è un buon emettitore per fosforescenza e l'integrale di overlap è un integrale elevato, il meccanismo di Forster può realizzarsi.

L'interazione tra i due momenti dipolari dipende anche da un fattore orientazionale  $\kappa^2$  (cioè dall'orientazione reciproca). Tale fattore può assumere valori compresi tra zero e quattro (0 quando i dipoli sono perpendicolari fra loro e 4 quando sono colineari). Assume valori = 1 quando i dipoli sono paralleli. In caso di gruppi donatori e accettori in grado di ruotare liberamente il valore di  $\kappa^2$  è 2/3.

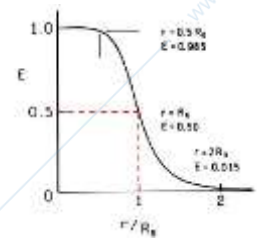
L'entità del fenomeno di energy transfer con meccanismo di Forster viene espressa misurando sperimentalmente con misure di fotoluminescenza che misurano l'efficienza del processo di energy transfer. Efficienza che è definita come il rapporto tra il numero di molecole di donatore eccitato che trasferiscono la loro energia all'accettore / il numero totale di molecole eccitate (posso anche definirlo come la frazione dei fotoni assorbiti in un'unità di tempo dal donatore che vengono trasferiti all'accettore).

$$E = \frac{k_T}{\tau_D + k_T}$$

Sappiamo però che una  $k_{ET}$  elevata significa un processo di energy transfer probabile ma la realizzazione di questo processo deve fare i conti con i processi competitivi presenti; quindi la costante di velocità elevata significa efficienza del processo di energy transfer elevata se i meccanismi di disattivazione intrinseci hanno costanti cinetiche piccole e il tempo di vita del donatore in assenza dell'accettore è grande. Questa equazione può però essere espressa in termini della distanza di Forster ( $r$  è la distanza tra accettore e donatore nella particolare situazione considerata):  $E = \frac{R_0^6}{r^6 + R_0^6}$

Quando  $r = R_0$  l'efficienza dell'energy transfer è del 50%. Ciò ce lo aspettiamo per la definizione della distanza di Forster che è quella alla quale in 50% delle molecole decadono con i comuni processi intrinseci e il 50% con i processi di energy transfer.

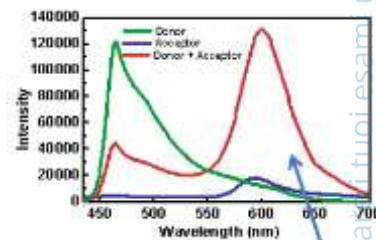
Per  $r = \frac{1}{2} R_0$  l'efficienza del processo è al 98% e per  $r$  più piccoli di questo valore l'efficienza si appiattisce al 100%. Se  $r = 2 R_0$  l'efficienza è 1.5%. e per  $r$  ancora maggiori la curva si appiattisce vicino al minimo (zero). Diciamo che la finestra in mezzo cioè quella intorno al 50% di efficienza è la finestra limite per avere buoni livelli di efficienza.



$$E = \frac{K_T}{K + K_T} = \frac{K_T + K - K}{K + K_T} = 1 - \frac{K}{K + K_T} = 1 - \frac{\tau(D+A)}{\tau_D} = 1 - \frac{E(D+A)}{E_D} = 1 - \frac{I(D+A)}{I_D}$$

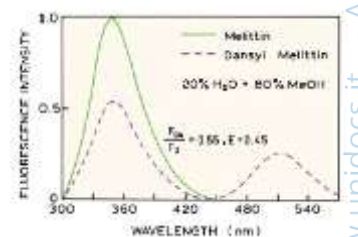
L'esistenza dei processi di energy transfer la vedo attraverso l'attenuazione dei tempi di vita, l'attenuazione della resa quantica e dell'intensità di fotoluminescenza (sempre perché fa da quenching). L'altra finger print che potrei avere è che io stia eccitando ad una  $\lambda$  del donatore e osservo emissione dell'accettore. In questo senso il processo di energy transfer è un processo di sensitizzazione.

Es di sensitizzazione ad opera del FRET: un'intensificazione della banda di assorbimento dell'accettore in presenza del donatore in corrispondenza dell'eccitazione ad una  $\lambda$  corrispondente all'assorbimento da parte del donatore. Se non c'è sensitizzazione dell'accettore è difficile individuare l'origine del quenching dell'emissione del donatore.



Il FRET fa da righello molecolare poiché permette di calcolare la distanza tra donatore e accettore e quindi di fatto di misurare la distanza tra le molecole che contengono il gruppo donatore e accettore. **Il FRET diventa utile così per lo studio di variazioni conformazionali di una molecola.**

Es di calcolo: melitina (principio attivo tra quelli presenti nell'ape domestica). Il triptofano fa da gruppo donatore e può essere funzionalizzata la molecola con un gruppo dansile che è accettore. Dall'integrale di overlap tra lo spettro di emissione del donatore normalizzato e lo spettro di assorbimento dell'accettore non normalizzato e dall'utilizzo di altri parametri spettroscopici che entrano nell'equazione di Forster si ricava un  $R_0 = 23.6 \text{ \AA}$ . Dopo valuto con misure di fotoluminescenza, l'efficienza del processo di energy transfer e lo faccio misurando l'intensità della banda di emissione della melitina sostituita e non sostituita con il gruppo dansile nelle stesse condizioni strumentali. Si vede nello spettro che ho un'attenuazione del gruppo triptofano in presenza del gruppo dansile e il rapporto tra l'intensità di fluorescenza del sistema donatore accettore rispetto a quella che contiene solo il donatore è pari a 55% e siccome l'efficienza è  $1 - \text{rapporto tra le intensità di fluo}$  ho che l'efficienza di energy transfer è 45%. I due gruppi sono quindi ad una distanza maggiore rispetto alla distanza di Forster. Quindi ora posso dire precisamente la distanza tra i due gruppi che è  $24.4 \text{ \AA}$ . Per tale calcolo si è usato un fattore orientazionale  $\kappa^2$  pari a  $2/3$  e si è assunto che la melitina sia presente in una sola conformazione in soluzione, quindi ci sia una sola distanza accettore-donatore = molta cautela quindi nelle registrazioni degli spettri e nelle condizioni di queste registrazioni.



### Meccanismo di Dexter

E' un meccanismo di trasferimento di energia a *corto raggio* (quindi il donatore e l'accettore devono venire in contatto) di tipo non radiativo. Qui abbiamo uno scambio di elettroni tra il donatore eccitato e l'accettore in uno stato fondamentale o a più bassa energia; in seguito allo scambio il donatore passa allo stato fondamentale e l'accettore passa ad uno stato eccitato a più alta energia rispetto a quello di partenza. Servono basse distanze, **CONTATTO MOLECOLARE**; rientra nel gruppo di meccanismi detti collisionali.

Espressione della costante di energy transfer:

$$k_{ET} (\text{exchange}) = KJ \exp(-2 r_{DA}/L)$$

$K$  = parametro correlato all'interazione orbitale specifica, come la dipendenza della sovrapposizione orbitale dagli orientamenti istantanei di  $D$  e  $A$

$J$  = integrale di sovrapposizione spettrale normalizzato  
 $r_{DA}$  = distanza da bordo a bordo tra donatore e accettore  
 $L$  = è la somma del raggio di van der Waals

I parametri hanno una dipendenza esponenziale dalla distanza quindi vi è una decrescita molto veloce all' > della distanza (tale diminuzione è molto più veloce rispetto a Forster). Tale meccanismo dipende dall'integrale di overlap tra lo spettro di emissione del donatore e quello di assorbimento dell'accettore in cui entrambi gli spettri rientrano normalizzati a differenza di quanto succedeva nel meccanismo di Forster.

$$J = \frac{\int F(\bar{\nu}) \epsilon(\bar{\nu}) d\bar{\nu}}{\int F(\bar{\nu}) d\bar{\nu} \int \epsilon(\bar{\nu}) d\bar{\nu}}$$

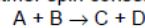
Sono diverse le regole di selezione rispetto a Forster: il processo di trasf di energia secondo F era legato al momento della transizione di donatore e accettore e quindi siamo arrivati a dire che è altamente probabile in una transizione  $S \rightarrow S$  e è impensabile per una transizione  $T \rightarrow T$  e avviene lentamente in una  $T \rightarrow S$ ; per Dexter invece io ho che i due e- vengono scambiati e nello scambio l'elettrone mantiene il suo spin quindi di fatto si vede che sono possibili transizioni sia  $S \rightarrow S$  e  $T \rightarrow T$ .

I processi di trasferimento di energia secondo Dexter sottostanno alla regola di conservazione dello spin di Wigner che dice che: la risultante di spin di partner collisionali deve essere conservata nel complesso collisionale e successivamente nei prodotti. Questo si traduce nel dire che le componenti di spin dei partner collisionali e dei prodotti devono avere almeno un numero in comune.

Supponiamo di avere la reazione:  $A + B \rightarrow C + D$

dove  $S_A$  è lo spin totale di A e  $S_B$  è lo spin totale di B,  $S_C$  quello di C e  $S_D$  quello di D. Le componenti di spin dei reagenti corrispondono a:

'Wigner-Witmer spin conservation rules'



total spin of reactants:  $(S_A + S_B), (S_A + S_B - 1), \dots, |S_A - S_B|$

total spin of products:  $(S_C + S_D), (S_C + S_D - 1), \dots, |S_C - S_D|$

reaction allowed if two sequences have a number in common

Secondo Wigner la reazione è possibile se le due sequenze hanno almeno un numero in comune. Consideriamo ora le nostre regole di Wigner riferite ai processi di trasferimento di energia. Consideriamo per esempio la combinazione donatore-accettore  $S \rightarrow S$ ; le componenti di spin del donatore e dell'accettore in cui  $S_D = 0$  e  $S_A = 0$  sono una ed è zero. Quindi i prodotti devono avere la stessa componente (condizione realizzata solo se i prodotti sono singoletto-singoletto). Quindi tale trasferimento di energia è PERMESSO.

Ora consideriamo il caso: donatore tripletto e accettore singoletto. Quindi  $S_D = 1$  e  $S_A = 0$ . Quindi le componenti sono 1+0 e 1-0 e quindi la componente è unica e è uguale a 1. Quindi con questa combinazione io posso formare una coppia di prodotti singoletto + tripletto  $\rightarrow$  quindi la transizione è PERMESSA. Porviamo ora a fare il caso di donatore tripletto e accettore tripletto:  $S_D = 1$  e  $S_A = 1$  quindi ho 1+1 e 1+1-1 e 1-1 = ho 2,1,0 sono le componenti di spin che ottengo. Per queste tre componenti i prodotti potranno essere singoletto-singoletto, singoletto-tripletto o tripletto-tripletto  $\rightarrow$  la transizione è PERMESSA.

Quindi il processo di Dexter rientra nella categoria dei processi di quenching collisionale; quenching collisionale dal punto di vista del donatore/sensitizzazione dal punto di vista dell'accettore. Quindi il trasf di energia si realizza dalla collisione di donatore e accettore se l'overlap dello spettro di emissione del donatore e quello di assorbimento dell'accettore è consistente e se nel complesso collisionale nei prodotti viene conservato lo spin come indicato dalle regole di Wigner.

*Meccanismo di quenching ad opera dell'ossigeno*

L'ossigeno essendo piccolo e diffondendo molto bene è un ottimo quencher collisionale. Ci può essere quenching ad opera dell'ossigeno (che è nello stato di tripletto) di singoletto eccitato o tripletto eccitato secondo il meccanismo di Dexter. Questi meccanismi sono ulteriori rispetto a quelli esposti prima  $S \rightarrow S$  e  $T \rightarrow T$ .

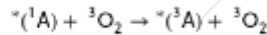
Quindi quenching dell'ossigeno sul singoletto in cui io ho che l'ossigeno passa a popolare uno stato eccitato di singoletto e il donatore passa in uno stato di tripletto a più bassa energia; nel quenching sul tripletto invece

ho che il donatore nel suo stato di tripletto collide con l'ossigeno nel suo stato fondamentale di tripletto e il risultato di quella collisione è che il donatore passa in uno stato di singoletto a più bassa energia e l'ossigeno in uno stato di singoletto a più alta energia (infatti l'ossigeno ha due stati eccitati di singoletto).

Viene quenched meglio il tripletto del singoletto perché l'efficienza del quenching collisionale dipende dal tempo di vita del donatore nel suo stato eccitato che è ovviamente più lungo nello stato di tripletto.

**NB:** di solito prevale Forster su Dexter per quanto riguarda la transizione singoletto-singoletto

Un altro meccanismo per il quale lo stato eccitato di singoletto ad opera del donatore può essere quenched dall'ossigeno (è un meccanismo che si realizza più facilmente rispetto a quello di trasferimento di energia secondo Dexter di singoletto): è un quenching attraverso una reazione di intersystem crossing che è catalizzata dall'ossigeno allo stato fondamentale di tripletto; di fatto dalla collisione tra la molecola nello stato eccitato di singoletto e l'ossigeno nello stato fondamentale di tripletto ho che viene facilitata un'intersystem crossing di A nel suo stato di tripletto eccitato che quindi risulta in uno spegnimento della fluo di A per effetto della presenza dell'O<sub>2</sub>.



Quindi **per riassumere**: il singoletto eccitato può essere spento con il collisionalmente ad opera dell'ossigeno nel suo stato fondamentale sia mediante trasferimento di energia secondo Dexter sia mediante intersystem crossing catalizzato dall'ossigeno. L'ossigeno invece quencha efficacemente il tripletto con meccanismo collisionale di Dexter.

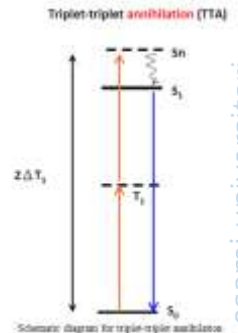
Nel meccanismo di Dexter NON importa il momento della transizione del donatore e dell'accettore.

Un'altra reazione che avviene secondo Dexter: la **nichilazione tripletto-tripletto** → due molecole nel loro stato eccitato di tripletto interagiscono in modo che una funzioni da donatore e l'altra da accettore e il risultato è che da quel due tripletti eccitati la molecola di donatore passa a un singoletto fondamentale mentre la molecola dell'accettore passa ad un singoletto eccitato ad alta energia. Da questo stato di singoletto la molecola che ha fatto da accettore può emettere.

La nichilazione tripletto-tripletto può esistere sia in situazioni di etero (D e A sono molecole diverse) e omo transfer. Prendiamo l'esempio con due molecole diverse (etero transfer): in questo caso io ho due molecole diverse nel loro stato eccitato di tripletto e dall'incontro collisionale tra i due il donatore cede energia e psassa nel suo stato fondamentale di singoletto e l'accettore acquista energia e passa ad uno stato eccitato di singoletto. La cosa avviene se sono presenti i soliti requisiti energetici cioè l'energia persa dal donatore deve essere accettata dall'accettore. Di solito però questo non è un requisito difficile da realizzare nel senso che il donatore perde energia corrispondente al salto  $T_1 \rightarrow S_0$  che è in genere un salto elevato ed è in genere più elevato del salto  $T_1 \rightarrow S_1$  dell'accettore (potremmo dire  $S_n$  perchè l'importante è che si arrivi ad uno stato eccitato dell'accettore dal quale può rilassare con processi non radiativi ad  $S_1$  dal quale, se vuole, può emettere). Sappiamo dal nel nostro requisito di energy transfer che alla perdita di energia nel donatore deve corrispondere un salto di pari o minore energia nell'accettore. Di soliti  $T_1 \rightarrow S_1$  dell'accettore ha un ga piu piccolo di  $T_1 \rightarrow S_0$  del donatore quindi è facile che quel requisito sia soddisfatto.

Un caso particolare della nichilazione  $T \rightarrow T$  è la **nichilazione di omotransfer**: D e A sono la stessa molecola. L'accettore può emettere poi e lo farà con un meccanismo che viene detto fluorescenza ritardata perchè l'emissione cadrà nella stessa posizione del singoletto di A con tempi ritardati perchè nel frattempo ho dovuto avere la formazione di uno stato eccitato di tripletto (che ha tempi di vita lunghi che possono perdurare fino all'incontro collisionale con un'altra molecola nello stato eccitato). Quindi un'altra fluorescenza ritardata diversa da quella che di cui abbiamo già parlato detta "di tipo E" che è osservata per la prima volta nell'eosina e che ha un meccanismo di tipo intrinseco. La fluo ritardata conseguente a una nichilazione  $T \rightarrow T$  di omotrasfer è detta anche "di tipo P" perchè è stata osservata per la prima volta nel pirene. Meccanismo del processo: in pratica sia D che A (che fanno parte della stessa molecola) si trovano inizialmente allo stato eccitato e ho cessione dic energia da parte di quella che fa da D che si porterà nel suo

stato fondamentale di singoletto e assorbimento di energia da A che si porterà in uno stato eccitato di singoletto a più alta energia. Quindi avrà che le molecole si trovano nello stato isoenergetico di  $T_1$  perché sono uguali (il livello  $T_1$  è lo stesso per entrambe) e D cede energia pari al salto  $T_1 \rightarrow S_0$  e A che si trovava già su  $T_1$ , adesso passa ad occupare un livello con energia doppia rispetto a quella corrispondente al gap  $T_1 \rightarrow S_0$ . Ovviamente questo passaggio può avvenire se in corrispondenza di quella energia ci sono dei livelli elettronici occupabili quindi se  $S_1$  si trova ad un'energia inferiore al salto perché se  $S_1$  si trova ad un'energia a quel livello posso avere o un livello vibrazionalmente eccitato di  $S_1$  oppure in corrispondenza di quel gap ho uno stato elettronico eccitato  $S_n$  da cui il mio sistema si riporterà su  $S_1$  per conversione interna da cui posso osservare fluo ritardata.

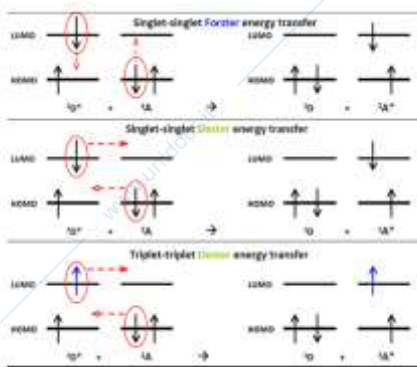


Il meccanismo di Forster può essere efficace anche se il donatore si trova in uno stato di tripletto e la cessione di energia avviene dopo una transizione di tipo  $T \rightarrow S$  (transizione per fosfo in cui il momento della transizione non è elevato ma per il quale la resa quantica di fosfo può essere elevata se i meccanismi in competizione con essa non sono particolarmente favoriti). Di fatto un processo di trasferimento di energia secondo Forster è possibile anche in una transizione tripletto-singoletto se la resa quantica del donatore è elevata e se l'integrale di overlap ha un valore elevato. Quindi il meccanismo di Forster è possibile per una transizione  $S \rightarrow S$  ad elevato integrale di overlap ma è anche possibile per un trasferimento di energia  $T \rightarrow S$ .

In realtà questi due tipi di transizione sono possibili anche a partire dall'accettore in uno stato eccitato; esempi:

- $^1D^* + ^3A^* \rightarrow ^1D + ^3A^{**}$  (tripletto eccitato, stiamo supponendo ad es. che A passi da  $T_1$  a  $T_2$ ). Questo tipo di trasferimento richiede la sovrapposizione dello spettro di fluorescenza di D e lo spettro di assorbimento  $T - T$  di A (ad esempio, l'estinzione del perilene da fenantrene nel suo stato di tripletto più basso). Si noti che in questo caso sia il donatore che l'accettore si trovano in stati eccitati, ma il formalismo FRET rimane valido.
- $^3D^* + ^3A^* \rightarrow ^1D + ^3A^{**}$  (terzina più alta). Questo tipo di trasferimento richiede la sovrapposizione dello spettro di fosforescenza di  $D^*$  e lo spettro di assorbimento  $T - T$  di A. Il donatore e l'accettore sono nuovamente entrambi in stati eccitati.

CFR Forster-Dexter  $\rightarrow$



Schematic diagram for Förster and Dexter energy transfer.

**Coulombic (Förster) Mechanism**  
Dipole-dipole, long-range mechanism (in favorable conditions, efficient over 50 Å)  
- Can be efficient between electronically isolated chromophores (spatially separated, saturated bridges)  
- Fast when there is good spectral overlap between donor emission and acceptor absorption and both are allowed  
- Förster formula for calculating exc. tr. rate constants from experimental data on A and B

$$k_{ET} = 2.25 \times 10^{-18} \left( \frac{\kappa^2}{r^6} \right) \left( \frac{f_D}{f_A} \right) \left( \frac{\nu_D}{\nu_A} \right)^4 \int \epsilon_A(\nu) I_D(\nu) \nu^{-4} d\nu$$

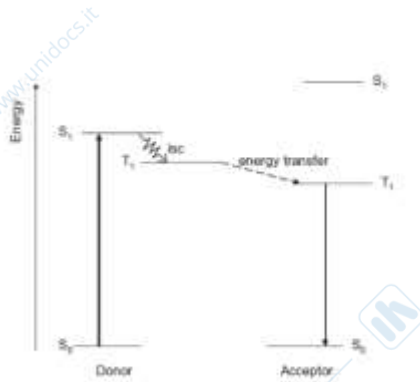
**Spin selection rule**  
(spin conservation within each molecule)  
e.g.,  
\* $A(S_1) + B(S_1) \rightarrow A(S_1) + ^*B(S_1)$  allowed  
\* $A(S_1) + B(S_1) \rightarrow A(S_1) + ^*B(T_1)$  forbidden  
\* $A(T_1) + B(S_1) \rightarrow A(S_1) + ^*B(T_1)$  forbidden

**Exchange (Dexter) mechanism**  
- Requires orbital overlap (HOMO-HOMO and LUMO-LUMO) between donor and acceptor (direct or bridge-mediated)  
- Short-range mechanism, exponential dependence on distance  
- In fluid solution, requires diffusional encounters. Blocked in rigid media

**Spin selection rule:**  
(spin conservation within the A.B supermolecule)  
e.g.,  
\* $A(S_1) + B(S_1) \rightarrow A(S_1) + ^*B(S_1)$  allowed  
\* $A(S_1) + B(S_1) \rightarrow A(S_1) + ^*B(T_1)$  forbidden  
\* $A(T_1) + B(S_1) \rightarrow A(S_1) + ^*B(T_1)$  allowed  
\* $A(T_1) + B(S_1) \rightarrow A(S_1) + ^*B(S_1)$  forbidden  
\* $A(T_1) + B(T_1) \rightarrow A(S_1) + ^*B(S_1)$  allowed

Riprendiamo a parlare di meccanismi di Dexter

Il trasferimento di energia tripletto-tripletto è un modo per popolare lo stato di tripletto di una molecola che non ha voglia di popolare quello stato mediante processi intrinseci, quindi è una molecola in cui lo stato di singoletto non dà facilmente intersystem crossing sullo stato di tripletto oppure lo stato di singoletto preferisce dare foto reazioni per cui po idi fatto non si ha transizione a popolare  $T_1$ . Quindi se voglio popolare quello stato di tripletto un modo conveniente per popolarlo sarebbe sfruttare un trasferimento di energia  $T \rightarrow T$  secondo Dexter. Nello schema si vedono le caratteristiche che i livelli del donatore e accettore devono avere per dare efficacemente un trasferimento  $T \rightarrow T$ .



Per la conservazione dell'energia lo stato di tripletto dell'accettore deve essere a energia più bassa di quello del donatore (perché si abbia così un sufficiente grado di overlap tra lo spettro di emissione di fosfo del donatore e lo spettro di assorbimento dell'accettore).

Per quanto riguarda i singoletti il singoletto del donatore deve essere a energia più bassa di quello dell'accettore perché non voglio che la transizione  $S_0 \rightarrow S_1$  dell'accettore sia una transizione competitiva col mio processo (questo perché portare popolazione su quello stato di singoletto dell'accettore non è utile per arrivare

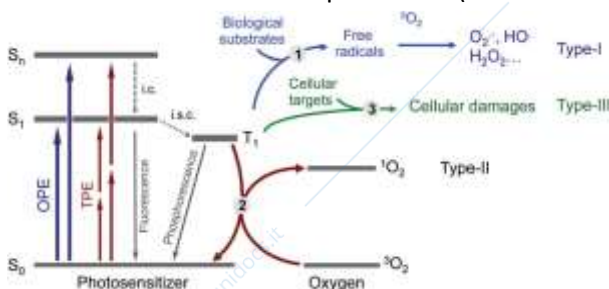
lo stato di tripletto). Devo eccitare il mio donatore nel suo stato di singoletto senza rischiare di aver popolato anche il singoletto dell'accettore. Quindi  $S_1$  del donatore energia < di  $S_1$  dell'accettore e  $T_1$  del donatore a più alta energia di  $T_1$  dell'accettore. Quindi lo splitting  $S_1 \rightarrow T_1$  del donatore deve essere uno splitting ad energia piccolo in modo che i due si trovino in mezzo tra il singoletto e il tripletto eccitati dell'accettore.

Il trasferimento di energia  $T \rightarrow T$  secondo Dexter se lo scopo è quello di ottenere la molecola di accettore nel suo stato di tripletto è anche indicata come "sensitizzazione di tripletto" e il donatore è indicato come il "sensibilizzatore di tripletto". Ovviamente il donatore deve essere un sistema che ha voglia di passare facilmente a popolare il suo stato di tripletto dal quale poi trasferisce energia al suo accettore.

Un esempio: utilizzo del benzofenone come sensibilizzatore di tripletto. Il benzofenone è una molecola che ha tantissima voglia di passare a popolare il suo stato di tripletto (perché lo splitting singoletto-tripletto è uno splitting piccolo e su stati corrispondenti ad una transizione permessa perché c'è un cambio di configurazione, dalle regole di El-Fayet). Posso per esempio sensitizzare il naftalene con il benzofenone: io parto con una iniziale eccitazione a 366 nm che corrisponde ad una banda di assorbimento singoletto-singoletto del benzofenone e quella che osservo è un'emissione per fosforescenza ad opera del naftalene. Quindi il meccanismo attraverso cui si realizza il processo è: assorbimento della radiazione a 366 nm  $\rightarrow$  passaggio  $S_0 \rightarrow S_1$  sul benzofenone  $\rightarrow$  intersystem crossing sul benzofenone a popolare il suo stato di tripletto  $\rightarrow$  incontro collisionale del benzofenone nel suo tripletto eccitato col naftalene in  $S_0 \rightarrow$  trasferimento di energia secondo Dexter quindi scambio di elettroni benzofenone-naftalene  $\rightarrow$  benzofenone passa su  $S_0$  e naftalene passa a popolare il suo  $T_1$  da cui osserverò emissione per fosfo.

Una particolare reazione di sensitizzazione è la **formazione di ossigeno singoletto**: è il trasferimento di energia secondo Dexter che vede come donatore una molecola nel suo stato eccitato di tripletto e l'ossigeno nel suo stato di tripletto con formazione del donatore nel suo stato fondamentale di singoletto e l'ossigeno nel suo stato eccitato di singoletto). Questa reazione è permessa dalle regole di Wigner ed è di fatto la reazione corrispondente al quenching del tripletto ad opera dell'ossigeno molecolare. Dal punto di vista dell'ossigeno è la sua sensitizzazione.  $O_2$  singoletto è altamente citotossico e la cui formazione viene usata nella terapia fotodinamica che serve per la cura di alcune forme tumorali e malattie della pelle.

Step iniziale della terapia fotodinamica: irraggiamento del fotosensibilizzatore con radiazione di opportuna  $\lambda$  ed è anche uno step critico del processo perché l'ideale sarebbe poter usare radiazione il più possibile penetrante nei tessuti biologici. Le radiazioni di più bassa energia sono di fatto più penetranti rispetto a quelle ad alta energia ed è per questo che fotosensibilizzatori che si usano attualmente in terapia fotodinamica sono a base porfirinica (hanno assorbimento in una regione compresa tra i 600 e gli 800 nm



che permette di usare questa rad. elettromagnetica per l'iniziale processo di sensitizzazione). In realtà nella terapia fotodinamica la generazione di ossigeno singoletto per effetto di energy transfer di tipo Dexter dal sensibilizzatore nel tripletto è solo uno dei tre possibili meccanismi che posso avere (ed è il meccanismo di TIPO II nell'immagine). Una delle vie che si sta percorrendo per ovviare al problema della scarsa penetrazione ad alta energia nei tessuti biologici è quello di usare l'eccitazione mediante processi multifotonici ad es. assorbimento a due fotoni del quale avevamo parlato all'inizio del corso.

**Tipo I:** il PS nel suo stato di eccitazione tripletto reagisce con substrati biologici tramite trasferimento di elettroni o protoni per formare radicali, che quindi reagiscono con l'ossigeno per generare specie ossigenate reattive (ROS) come O<sub>2</sub>, HO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**Tipo II:** il PS nel suo stato di eccitazione tripletta converte l'ossigeno molecolare circostante in ossigeno singoletto (1O<sub>2</sub>) tramite trasferimento diretto di energia. ROS compreso 1O<sub>2</sub> ossidano molti costituenti cellulari, producendo stress ossidativo letale per le cellule.

Un processo di **tipo III** meno comune deriva da una reazione di trasferimento di elettroni dal PS eccitato a biomolecole come il DNA. Non implica ossigeno e può quindi verificarsi in condizioni ipossiche.

Oggi vengono utilizzati laser a colorante sintonizzabili in lunghezza d'onda, laser a stato solido e laser a diodi a emissione rossa accoppiati con fibre ottiche. L'esposizione dura in genere da pochi minuti a qualche decina di minuti e viene quindi ripetuta.

### Teoria del campo cristallino

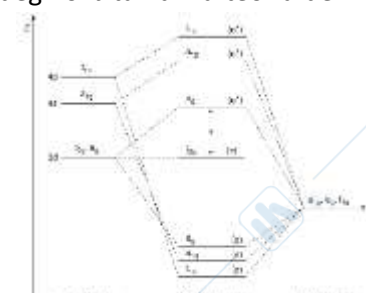
Ricordo che essendoci il metallo nelle molecole prese spesso in esame, vi è un effetto dell'atomo pesante che può ad es. favorire processi di intersystem crossing, rilassamenti per fosfo alleggerendo la regola di selezione di spin; inoltre in presenza dei metalli il diagramma di Jablonski si complica e non abbiamo solo transizioni  $n \rightarrow \pi^*$  e  $\pi \rightarrow \pi^*$  ma abbiamo anche transizioni in cui sono coinvolti gli orbitali del metallo. Un altro aspetto è che in realtà  $>$  il numero di molteplicità di spin che possiamo trovare quindi non abbiamo solo singoletto e tripletto (es. nel Cr<sup>3+</sup>).

Il comportamento dei metalli di transizione può essere interpretato con modelli come quello della teoria del campo cristallino  $\rightarrow$  l'interazione tra metallo e leganti è vista come puramente elettrostatica e il suo risultato è una destabilizzazione dei 5 orbitali degeneri d del metallo che diventano t<sub>2g</sub> (d<sub>xy</sub>, d<sub>yz</sub>, d<sub>xz</sub> sono a più bassa energia, stabilizzati) e e<sub>g</sub> (d<sub>z2</sub> e d<sub>y2-x2</sub> sono destabilizzati poiché puntano nella direzione dei leganti). Questo vale per i complessi ottaedrici, per quelli tetraedrici lo splitting è più piccolo e contrario rispetto a quello ottaedrico.

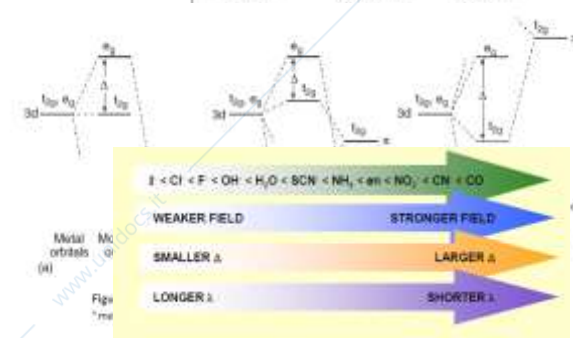


Lo splitting tra gli orbitali d dipende dalla geometria del complesso (vista appena sopra), dalla natura dei leganti e in particolare dalla posizione dei leganti nella serie spettrochimica, dal numero di ox dello ione centrale e dal numero quantico principale n degli orbitali d. In particolare Δ aumenta all'aumentare del numero di ox dello ione metallico e scendendo lungo il gruppo (es. Co, Ro, Ir).

La serie spettrochimica permette di organizzare i leganti in base al loro effetto sullo splitting degli orbitali d ottenuti sperimentalmente; qui l'effetto dello splitting dei leganti va dai donatori π ai leganti donatori σ fino ai leganti accettori π che sono quelli che hanno maggiore effetto di splitting degli orbitali d. La teoria del campo cristallino non è in grado di spiegarci la spiegazione dei leganti all'interno della serie spettrochimica e si basa su risultati sperimentali. Per capirlo devo usare la teoria del campo dei leganti che si basa sull'uso degli orbitali molecolari. I 9 orbitali del metallo (s,p,d) secondo la teoria dei gruppi sono classificati come d<sub>z2</sub> e d<sub>y2-x2</sub> = e<sub>g</sub>, d<sub>xy</sub>, d<sub>yz</sub>, d<sub>xz</sub> = t<sub>2g</sub>, s = a<sub>1g</sub> e p<sub>x</sub>, p<sub>y</sub>, p<sub>z</sub> = t<sub>1u</sub>. Gli e<sub>2g</sub> e a<sub>1g</sub> hanno simmetria corretta per dare un solo legame di tipo sigma. I t<sub>2g</sub> danno solo legami di tipo π e i t<sub>1u</sub> possono darli entrambi. In presenza di leganti σ gli orbitali t<sub>2g</sub> restano orbitali di non legame.

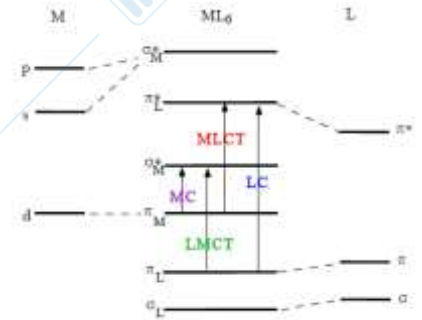


Con leganti π accettori (schema a destra) ho la stabilizzazione degli orbitali t<sub>2g</sub> del metallo e quindi il Δt<sub>2g</sub> aumenta rispetto a quello in cui ho leganti π donatori (schema centrale) e σ donatori (schema a sinistra)  $\rightarrow$  con leganti π accettori ho maggior stabilizzazione del complesso. I leganti π donatori si trovano a campi bassi per la serie spettrochimica (piccolo splitting) e quelli π accettori a campi alti. Il riempimento degli orbitali t<sub>2g</sub> e e<sub>g</sub> dipende dagli effetti di repulsione interelettronica e da Δ: se Δ è poi minore della repulsione



interelettronica allora gli elettroni iniziano ad occupare gli orbitali  $e_g$  prima che i  $t_{2g}$  vengano completamente occupati.

Come per le molecole organiche nel considerare gli stati nel diagramma di Jablonski ci concentriamo sugli stati a minor energia perché sono quelli coinvolti nel processo radiativo (per la regola di Kasha). Quindi con un complesso di un metallo di transizione usiamo gli stati a più bassa energia la cui natura cambierà a seconda dell'energia delle transizioni corrispondenti: quindi a seconda che l'energia più bassa si abbia per una transizione metal center allora il nostro stato a più bassa energia sarà uno stato a carattere metal center (e viceversa per il legante). **In generale mi aspetto che sia più probabile avere uno stato metal center a bassa energia in presenza di un metallo della prima serie di transizione (in cui lo splitting  $t_{2g}$  e  $e_g$  è piccolo).** Invece uno stato a bassa energia metal to legand charge transfer me lo aspetto quando il metallo è facile da ossidare e il legante è facile da ridurre. Invece uno stato a bassa energia legand to metal charge transfer me lo aspetto quando almeno uno dei leganti è facile da ossidare e il metallo è facile da ridurre. Infine transizioni a bassa energia legand center ci sia con leganti aromatici con orbitali "extended"  $\pi$  e  $\pi^*$ .



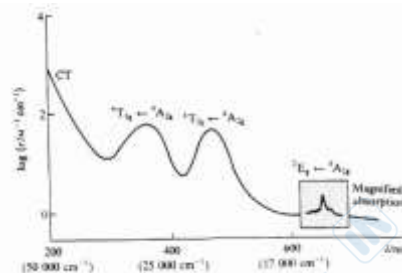
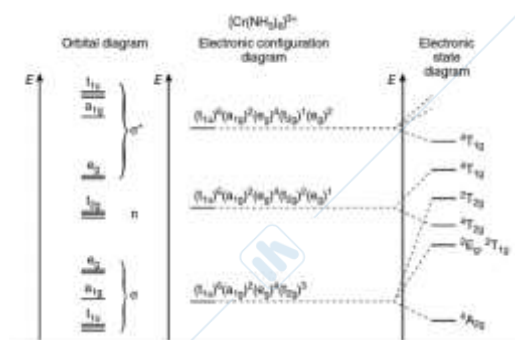
Es con il  $Cr^{3+}$ : prendiamo il sistema  $[Cr(NH_3)_6]^{3+}$  la cui configurazione di stato fondamentale la indichiamo per semplicità con  $t_{2g}^3$  (cioè per l'orbitale di valenza). Da tale configurazione hanno lungo stati di quartetto e stati di doppietto e ciò lo sappiamo poiché all'interno dei  $t_{2g}$  gli elettroni possono occupare i tre orbitali  $t_{2g}$  singolarmente con lo stesso spin, originando così lo stato di quartetto che sarà lo stato fondamentale di quel complesso. Alla configurazione  $t_{2g}^3$  corrispondono però anche degli stati di doppietto perché io ho che lo spin di un elettrone può essere cambiato dando origine a stati di doppietto i quali appartengono alla stessa configurazione e si troveranno a più alta energia. Quindi avrò stati di doppietto diversi associati a distribuzioni elettroniche diverse di questi e- all'interno dei  $t_{2g}$  che daranno luogo a interazioni interelettroniche diverse. **Riassunto ho uno stato di quartetto e diversi stati di doppietto a diversa energia proprio per effetto della repulsione interelettronica.**

La configurazione di stato eccitato, sempre considerando gli orbitali di valenza, sarà una configurazione in cui ho  $t_{2g}^2$  e  $e_g^1$  in cui un e- è passato da un orbitale  $t_{2g}$  a uno  $e_g$ . La separazione energetica tra queste due configurazioni elettroniche dipende dal  $\Delta E$  che l'elettrone deve compiere quindi dallo splitting  $t_{2g}-e_g$  a opera del legante.

Quindi lo stato a più bassa energia per la regola di Hund è quello con la massima molteplicità quindi sarà uno stato di quartetto (a seconda di come dispongo gli elettroni avrò diversi stati di quartetto). La figura (c) mostra il risultato.

Quindi per questo composto io mi aspetto di osservare lo spettro di assorbimento in cui vi è una banda di assorbimento molto debole (perché è non permessa per le regole di spin) e stretta e a bassa energia (corrispondente alla transizione quartetto-doppietto  $^4A_{2g} \rightarrow ^2E_g$ ) e poi avrò degli spettri di assorbimento più intensi (corrispondenti a transizioni spin permesse tra stati di quartetto ad altri stati di quartetto). Lo splitting energetico tra le configurazioni dipende dallo splitting energetico  $t_{2g}-e_g$ . Con come legante  $NH_3$  io ho uno stato di doppietto  $^2t_{2g}$  che corrisponde a una configurazione  $t_{2g}^3$  di stato fondamentale, la quale si trova a più alta energia di uno stato  $^4t_{2g}$  che corrisponde a una configurazione di stato eccitato  $t_{2g}^2$  e  $e_g^1$ . Se il legante fosse a maggior forza di campo (es. CO) io avrei uno splitting  $t_{2g}$  e  $e_g$  più elevato e questo mescolamento tra stati corrispondenti alla conf di stato fondamentale e quelli corrispondenti alla conf di stato eccitato non ci sarebbe (avrei che il  $^2t_{2g}$  è più basso del  $^4t_{2g}$ ).

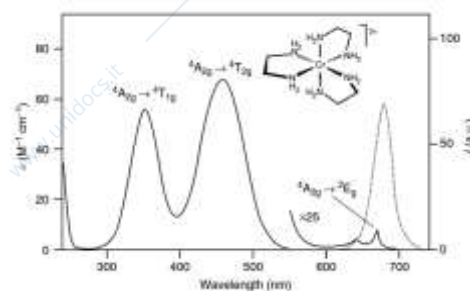
Inoltre posso avere una seconda configurazione di stato eccitato a più alta energia corrispondente ad una configurazione  $t_{2g}^1$  e  $e_g^2$  (lasciamola perdere).



Es con  $[Cr(en)_3]^{3+}$  in soluzione acquosa: caso simile a prima e abbiamo che sono visibili le due transizioni quartetto  $\rightarrow$  quartetto con bande di media intensità perché associate a transizioni tra stati gerade-gerade quindi non permessi dalle regole di simmetria in particolare per le regole di selezione di Laport. Poi vi è una banda stretta di bassa intensità = transizione quartetto-doppietto che è non permessa per le regole di selezione di spin ma è visibile perché abbiamo l'effetto dell'atomo pesante che "alleggerisce" l'effetto della regola di spin per accoppiamento spin-orbita. In questo caso è interessante valutare anche lo spettro di emissione che corrisponde alla banda tratteggiata. La banda di emissione è dovuta al rilassamento radiativo doppietto-quartetto che secondo la IUPAC è una fosforescenza (è una fosfo stretta con uno stokes shift assolutamente trascurabile rispetto alla corrispondente banda di assorbimento).

**Perché le due bande sono strette e lo stokes shift è piccolo?** E' a causa della natura della configurazione che è intraconfigurazionale (poiché stiamo ragionando su uno stato di quartetto e doppietto riferiti alla medesima configurazione elettronica cioè la  $t_{2g}^3$ ). Le transizioni intraconfigurazionali sono associate a una scarsa/nulla distorsione dello stato eccitato rispetto a quello fondamentale e quindi le due curve di energia potenziale riferite allo stato fondamentale e allo stato elettronico eccitato sono sovrapposte e quindi la transizione più impo è quella 0-0 con contributo minoritario delle altre transizioni. Quindi banda stretta per trans intraconfigurazionale e piccolo stokes shift che mi misura la distorsione dello stato eccitato che qui è poca.

E' chiaro che le due transizioni in assorbimento relative allo stato fondamentale di quartetto e agli stati eccitati di quartetto danno luogo a bande più intense ma bande larghe perché corrispondono a un cambio di configurazione  $t_{2g}^3$  alla configurazione  $t_{2g}^2$  e  $e_g^1$  quindi sto portando un e- da un orbitale legante a uno antilegante e lo stato eccitato corrispondente sarà uno stato distorto in cui avrò allungamento delle distanze. Quindi qui ho grande stokes shift se guardassi la banda di emissione e le due curve di energia potenziale sarebbero spostate (= bande larghe).



Quindi io ho:

- stato fondamentale di quartetto
- per assorbimento il sistema passa a popolare uno dei due stati di quartetto
- da qui si ha cambio di configurazione e un e- passa da un orbitale  $t_{2g}$  a uno  $e_g$  con conseguente aumento della distanza metallo legante
- così gli stati eccitati divengono stati distorti (lo vedo dalle curve di energia potenziali dove il  $4T_{2g}$  è distorto rispetto a quello fondamentale)
- così succede che lo stato  $4T_{2g}$  è altamente fotoreattivo e per molto tempo la fotochimica dei metalli di transizione che è partita dal  $Cr^{3+}$  è stata basata proprio su questo stato  $4T_{2g}$  altamente fotoreattivo
- lo stato distorto è poco emissivo poiché è uno stato che ha una bassa costante di velocità del processo radiativo (in quel caso parleremmo di fluo, caso raro ma possibile; avrebbe banda larga)

perché è associato ad una transizione con un non elevato coefficiente di estinzione molare, una transizione proibita per simmetria

- più che emettere il sistema ha voglia di dare fotoreazione o di passare per intersystem crossing allo stato di doppietto a più bassa energia che corrisponde alla configurazione  $t_{2g}^3$
- se lo splitting  ${}^4T_{2g}-e_g$  è piccolo come nel complesso con l'etilendiammina è facile che si abbia back-intersystem crossing a tornare sullo stato  ${}^4T_{2g}$ . Lo splitting  ${}^4T_{2g}-e_g$  in generale nei complessi di Cr dipende dalla forza dei leganti che tanto più sono forti tanto più portano lo stato  ${}^4T_{2g}$  ad alta energia (leganti pgreco accettori  $\Delta > \delta$   $t_{2g}-e_g$  = non si manifesta il back-intersystem crossing). Il sistema potrebbe anche dare intersystem crossing per tornare allo stato fondamentale e potrebbe anche emettere radiativamente dando emissione per fosfo
- il nostro complesso dà un'emissione per fosfo non molto intensa ma presente con tempi di vita a RT pari a  $1.33 \mu s$  (tempo breve). Questo me lo aspetto per l'effetto dell'atomo pesante che mi alleggerisce la regola di selezione di spin e quindi l'emissione per fosfo non è così impedita e non ha tempi così lunghi come per le molecole organiche.
- tale fosfo ha un piccolissimo stokes shift rispetto alla banda di assorbimento poiché la transizione corrisponde ad uno stato non distorto.

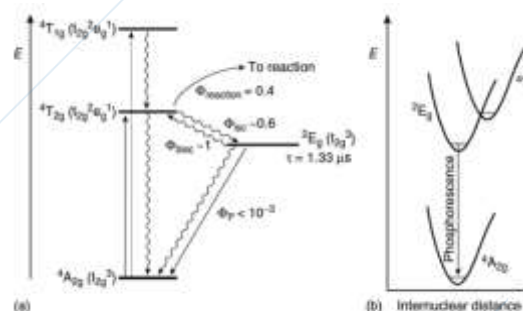
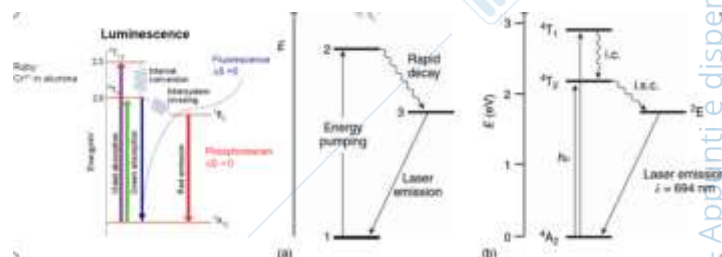


Figure 3.22 (a) Jablonski diagram at room temperature and (b) schematic view of the potential energy curves of the electronic states of  $[Cr(en)_3]^{3+}$ .

Per la costruzione del primo laser (laser a rubino, 1960) è stato sfruttato lo stato metastabile di doppietto del  $Cr^{3+}$ . Si ha una dispersione di  $Cr^{3+}$  in allumina  $Al_2O_3$  dove il Cr è circondato da 6 atomi di O in una geometria ottaedrica distorta. Lo schema dei livelli e del funzionamento del laser si vede nell'immagine in cui si mostra che il laser è un laser a tre livelli: abbiamo che il pompaggio allo stato eccitato di quartetto che viene depopolato rapidamente per popolare lo stato di doppietto che è uno stato metastabile e che dà emissione laserante per ritorno allo stato fondamentale. Quindi l'emissione laserante si ha nel passaggio  ${}^2E \rightarrow {}^4A_2$  con un'emissione nel rosso a 694 nm.

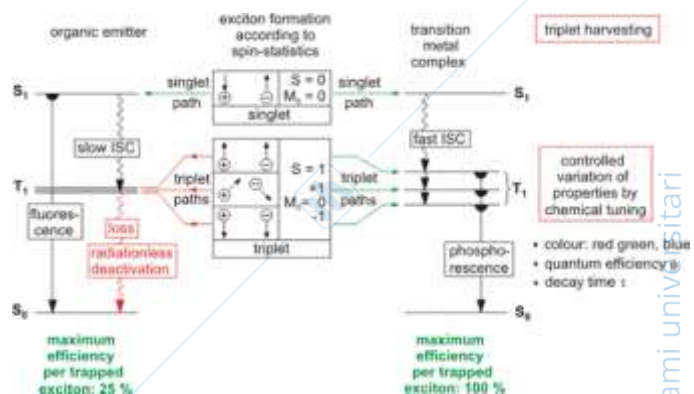


### OLED (Organic light emitting diode)

Oltre che ai complessi di  $Cr^{3+}$  si è studiato complessi con metalli  $d^6, d^8$  e  $d^{10}$  come ad es i complessi di  $Ru^{2+}$ . L'interesse verso i metalli di transizione con stati di tripletto a carattere metal to ligand charge transfer (MLCT) è nata per le importanti applicazioni industriali nel campo degli OLED in cui questi sistemi potevano essere impiegati. Essi rispetto al caso del  $Cr^{3+}$  che era MC sono MLCT.

Gli OLED sono di fatto la conversione di un segnale elettrico in un segnale ottico, una produzione di radiazione elettromagnetica perché quando io applico un campo magnetico io inietto un sistema di buche e elettroni che si combinano a dare degli eccitoni (sono delle coppie neutre formate da una buca e un elettrone). Questi eccitoni si formano per ragioni statistiche con una composizione data da 25% eccitoni di singoletto e 75% eccitoni di tripletto. Quando io quindi spendo energia elettrica per formare gli eccitoni posso poi recuperare questa energia elettrica usata se ho modo di avere emettitori sia dallo stato di singoletto che di tripletto. Il problema dei primi OLED che usavano molecole fosforescenti era che in questo modo io recuperavo solo il 25% dell'energia spesa per la formazione degli OLED che veniva recuperata sotto forma di emissione fosforescente MA il 75% degli eccitoni di tripletto veniva persa  $\rightarrow$  vi era un grosso svantaggio dal punto di vista energetico.

Gli OLED di seconda generazione sono quelli che al posto della molecola organica usano come emettitori i complessi di metalli di transizione e in particolare i complessi inizialmente di Ru<sup>II</sup> (e poi da un punto di vista applicativo Ir e Pt) che emettono con elevate efficienze da uno stato di tripletto a bassa energia a carattere MLCT. Con questi OLED si poteva recuperare il 100% dell'energia spesa inizialmente. Usando i complessi di met di trans io ho il process definito "triplet harvesting" nel senso che recupero sia il 25% degli eccitoni di singoletto che passano per intersystem crossing in stato di tripletto che poi emette e recupero anchel'altro 75% di eccitoni.



Gli OLED di prima generazione sfruttavano sostanzialmente molecole organiche.

Con un primo lavoro ad opera di Adachi nel 2012 si è passati agli OLED di terza generazione in cui si ha il meccanismo di "singlet harvesting" nel senso che si utilizzano come materiali emettitori sistemi che emettono mediante TADF (fluorescenza ritardata di tipo E) e quindi si ha un passaggio dal tripletto al singoletto per una *thermally assisted reverse intersystem crossing* e ho poi un'emissione dallo stato di singoletto. Quindi ci siamo spostati sui complessi molecolari di Cu<sup>I</sup> che danno più facilmente TADF (posso in realtà anche usare molecole organiche che danno TADF).

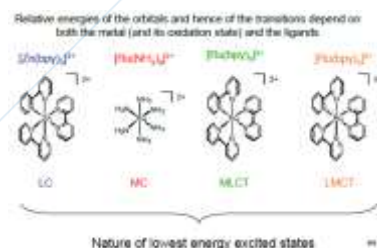
### Complessi fotoluminescenti

Le transizioni nei complessi dei metalli di transizione possono essere metal centered, intralegand, legand to metal o le metal to legand chain transfer.

- Eccitazioni ligand-centered (**LC**): ad es. di carattere  $\pi-\pi^*$ : coinvolgono l'eccitazione tra orbitali a base di legando che si trovano sullo stesso legando.
- Eccitazioni metal-centered (**MC**): ad es. di carattere  $d-d^*$ : in linea di principio le transizioni non sono rigorosamente consentite dalle regole di Laporte in ambienti centrosimmetrici ma sono parzialmente consentite a causa dell'accoppiamento vibronico e quindi presentano coefficienti di estinzione generalmente più bassi rispetto al trasferimento di carica (CT) transizioni.
- Eccitazioni di trasferimento di carica da metallo a legando (**MLCT**): ad es. di carattere  $d-\pi^*$ : coinvolgono eccitazioni da orbitali a base di metallo  $d$  a orbitali vuoti a bassa posizione situati sul legando, tipicamente di carattere  $\pi^*$ . Sono previsti al regime a bassa energia quando il metallo è facile da ossidare e il legando è facile da ridurre
- Eccitazioni da legando a metallo - trasferimento di carica (**LMCT**): ad esempio di carattere  $\pi-d^*$ : comportano la promozione di elettroni dagli orbitali del legando occupato al guscio  $d$  parzialmente vuoto del metallo. Sono stati bassi quando almeno uno dei leganti è facile da ossidare e il metallo è facile da ridurre.

Quindi posso avere stati eccitati a bassa energia che sono quelli che regolano il comportamento fotoemissivo del mio sistema associati a transizioni di tipo diverso. Variando la natura del metallo, la natura dei leganti, lo stato di ox del metallo posso cambiare l'ordine degli stati eccitati e quindi variare la natura degli stati eccitati a più bassa energia che sono quelli che dettano il comportamento fotoemissivo del complesso.

Dal punto di vista delle proprietà emissive, stati eccitati a carattere MLCT o intralegand sono sicuramente i più interessanti. I MC non sono interessanti perché queste transizioni  $d \rightarrow d^*$  tendono a labilizzare il complesso e oltre tutto a tali transizioni sono associate basse costanti radiative (=bassa probabilità di funzionare come emettitori). Inoltre spesso sono molto distorti e la distorsione è negativa per l'emissione radiativa perché favorisce rilassamento attraverso emissione non radiativa.



Tutto quello che abbiamo detto sulle molecole organiche continua a valere per i complessi dei metalli. Supponiamo di avere un complesso ottaedrico di  $Ru^{II}$  con legante a campo forte: avrò che per assorbimento le transizioni più probabili saranno quelle associate a passaggi singoletto-singoletto; per la presenza del metallo ho che avvengono facilmente i processi di conversione intersistema singoletto-tripletto e quindi gli stati emittitori sono di fatto gli stati di tripletto. Come visto per le molecole organiche l'ordine degli stati di singoletto può essere invertito con gli stati di tripletto e questo perché lo splitting singoletto  $\rightarrow$  tripletto è diverso a seconda del carattere della transizione a cui quegli stati di singoletto e tripletto sono associati. Lo splitting  $S \rightarrow T$  è sicuramente più grande in transizioni MC e LC piuttosto che nelle transizioni a carattere di trasferimento di carica questo perché tale splitting dipende dall'overlap tra gli orbitali coinvolti in quella transizione che è sicuramente più piccolo in transizioni a carattere di trasferimento di carica.

Quindi in questo generico complesso di  $Ru^{2+}$  abbiamo che lo stato eccitato a più bassa energia di singoletto è uno stato MLCT mentre lo stato di tripletto a più bassa energia cioè quello emettitore, è un tripletto ligand centered. **Teniamo conto che per il singoletto  $\rightarrow$  tripletto MLCT il  $\Delta E$  è più piccolo e questo ci dice che la conversione intersistema è più facile** (perché lo splitting energetico è più piccolo) ma è anche più facile perché in quegli stati intervengono gli orbitali del metallo e quindi gli effetti di accoppiamento spin-orbita da parte del metallo è sicuramente più importante. Un metallo contribuisce con l'effetto di accoppiamento spin orbita tanto più se gioca secondo un ruolo intrinseco cioè se i suoi orbitali sono coinvolti nella transizione. Quindi la conversione intersistema singoletto  $\rightarrow$  tripletto MLCT è sicuramente una transizione che avviene facilmente.

Ritornando un po' su cosa conviene sperare sulla natura dello stato eccitato a minore energia perché il mio sistema sia un sistema emettitore; *gli stati MC non sono buoni candidati a produrre sistemi emittitori e tornando su cose che abbiamo già detto ciò è perché tali transizioni sono transizioni Laporte proibite quindi basso coefficiente di estinzione molare in andata e bassa costante radiativa in ritorno. Gli MC sono stati dal punto di vista del complesso labilizzanti, portano a stati eccitati distorti da cui il sistema preferisce o dare labilizzazione o dare disattivazioni non radiative piuttosto che disattivazioni radiative. Quindi gli stati MC non devono essere quelli a minore energia se voglio che il mio sistema sia un probabile emettitore e inoltre non devono neanche essere energeticamente vicini agli stati a bassa energia e questo perché non avvenga una loro ripopolazione termica quindi con spegnimento delle proprietà emissive.*

Quindi devo spostare questi stati MC ad alta energia e per farlo posso giocare sulla natura del metallo e sulla natura dei leganti perché l'energia di questi stati dipende dallo splitting  $d \rightarrow d$  e tale splitting dipende dal metallo, dal suo stato di ossidazione, dalla sua geometria e dai leganti.

**Quindi per spostare ad alta energia gli stati MC devo lavorare con metalli della seconda e terza transizione con leganti a campo forte.**

*Di contro stati eccitati a carattere MLCT sono un miglior punto di partenza se io voglio produrre un composto emettitore e questo perché il momento di una transizione MLCT è elevato e quindi sono elevati i coefficienti di estinzione molare in andata e quindi elevata costante radiativa di ritorno = maggior probabilità che il sistema sia emettitore. Sono stati meno distorti, l'elettrone viene trasferito su un orbitale  $\pi$  delocalizzato antilegante del legante, e quindi le costanti non radiative non sono così competitive per gli stati distorti e sono meno labilizzanti dal punto di vista del complesso.*

**Complessi di metalli  $d^6$ ,  $d^8$  (specialmente della seconda serie di trans con leganti a campi forti) e  $d^{10}$  sono buoni emittitori.**

*Anche le LMCT non vanno bene perché sono labilizzanti dal punto di vista del complesso.* In conclusione sono interessanti le MLCT e le LC dove però **le MLCT sono meglio delle LC e questo perché le MLCT hanno un maggior contributo degli orbitali del metallo** quindi di fatto la disattivazione radiativa  $T \rightarrow S$  avviene più rapidamente (la regola di spin è più alleggerita) e il fatto che disattivi più velocemente significa che di fatto è più facilmente emettitrice e risente meno dei fenomeni di quenching. Quando ho l'emissione del LG di fatto è come se avessi l'emissione del legante perturbato dalla presenza del metallo e i tempi di vita di uno stato di tripletto LC sono sicuramente più lunghi di quello a carattere MLCT (perché la regola di selezione di spin è meno alleggerita per la presenza di un metallo in una LC rispetto ad una MLCT in cui gli orbitali del metallo contribuiscono attivamente al carattere della transizione).

E' meglio lavorare con i metalli della seconda e terza serie di transizione rispetto a quelli della prima serie e cio per due ragioni:

1. con metalli della 2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> serie l'energia delle transizioni MC > e quindi allontanano tali stati dalle basse energie cosi non sono accessibili e impediscono la loro popolazione per via termica
2. metalli della 2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> serie sono metalli piu pesanti quindi hanno una > costante di accoppiamento spin orbita quindi aumentano la costante di disattivazione radiativa della transizione T→S

### Metalli in configurazione d<sup>6</sup>

In particolare sono usati i complessi di Ru(II) Os(II) e Ir(III) la cui geometria di coordinazione è ottaedrica. I sistemi ottaedrici a basso spin dei metalli a tale configurazione hanno come configurazione fondamentale la t<sub>2g</sub><sup>6</sup> (quindi stato fondamentale e stati eccitati sono di singoletto). Per effetto dell'assorbimento di radiazione elettromagnetica le transizioni piu probabili sono quelle che portano dallo stato fond di singoletto a stati eccitati di singoletto ma per effetto della elevata costante di accoppiamento spin orbita si ha che gli stati emettitori siano i corrispondenti stati di tripletto. Il sistema è probabilmente emettitore se questi stati emettitori di tripletto a bassa energia sono i LC o i MLCT mentre non va bene se sono MC che è distorto e fa cosi il sistema rilassa non radiativamente.

CFR tra le proprietà emissive dei complessi con leganti polipiridinici e con metallo Fe, Ru o Os.

- I complessi di Fe(II) sono tipicamente non emettitori
- I complessi di Ru(II) sono emettitori ad elevata resa quantica
- I complessi di Os(II) sono debolmente emettitori con emissione piu spostata nel rosso rispetto agli analoghi di Ru(II)

Tali differenze sono spiegabili sulla natura e posizione dei loro livelli elettronici eccitati. Nel Fe(II) che è un 3d<sup>6</sup>, lo splitting ottaedrico t<sub>2g</sub>-e<sub>g</sub> è molto piccolo e quindi lo stato a piu bassa energia è a carattere MC e cio si traduce in uno scarso potere emissivo con risultato che il sistema non è emettitore. Nel Ru(II) in configurazione 4d<sup>6</sup> lo splitting t<sub>2g</sub>-e<sub>g</sub> > e lo stato a piu bassa energia è un tripletto a carattere MLCT che però ha vicino di energia uno stato di tripletto MC che sappiamo può funzionare come quencher di fotoluminescenza perche a T ambiente può essere ripopolato se abbastanza vicino in energia a partire dallo stato MLCT di piu bassa energia e quindi risultando in una riduzione della resa quantica di emissione. Tanto piu > la T tanto piu diventa probabile che ciò accada e per cio se abbasso la T la resa quantica di questi complessi aumenta.

Per l'Os(II) lo splitting t<sub>2g</sub>-e<sub>g</sub> > rispetto all'analogo di rutenio e quindi lo stato MC non dà problemi ma il problema è che io abbasso l'energia dello stato di tripletto MLCT e questo piccolo gap tripletto MLCT→singoletto fa si che da una parte l'emissione sia piu spostata verso il rosso e d'altro canto sia anche un'emissione piu debole perché diventa piu competitiva la disattivazione non radiativa verso lo stato fondamentale che dipende dal ΔE tra i due stati.

[Ru(bpy)<sub>3</sub>]<sup>2+</sup> tra i complessi polipiridinici è sicuramente quello che è stato piu studiato. Lo stato fondamentale è di singoletto e anche quelli eccitati lo sono anche se sappiamo che la differenza tra S e T perde un po' di senso quando l'accoppiamento spin orbita è un accoppiamento forte e quindi i due si mescolano. E' come se il tripletto rubasse un po' di carattere al singoletto.

è il prototipo di una grande classe di complessi ed è stata sicuramente una delle molecole più ampiamente studiate e ampiamente utilizzate nei laboratori fotofisici e fotochimici negli ultimi 40 anni. Ru<sup>2+</sup> è un sistema d<sup>6</sup> e i ligandi polipiridinici sono di solito molecole incolori che possiedono orbitali σ-donatori localizzati sugli atomi di azoto e π donatori e π\* accettori orbitali più o meno delocalizzati sugli anelli aromatici. [Ru(bpy)<sub>3</sub>]<sup>2+</sup> ha una simmetria D<sub>3</sub>, ma, per una prima approssimazione, può essere considerato un complesso ottaedrico. La configurazione elettronica di terra ha un guscio chiuso con πM (t<sub>2g</sub>)<sup>6</sup> come orbitale molecolare occupato superiore (HOMO). Lo stato fondamentale è un singoletto e tutti gli stati eccitati possono avere una molteplicità di singoletto o di tripletta, sebbene l'atomo di Ru pesante causi una grande miscelazione di

singoletto-tripletta, in particolare quando l'eccitazione riguarda gli orbitali di metallo. La promozione di un elettrone da  $\pi_M$  a  $\sigma_M^*$  dà origine a stati eccitati MC. Gli stati eccitati centrati sul ligando (LC) possono essere ottenuti promuovendo un elettrone da  $\pi_L$  a  $\pi_L^*$ , una transizione che nel ligando libero provoca l'assorbimento nell'UV. Poiché Ru(II) è facilmente ossidato e difficile da ridurre, mentre bpy è facile da ridurre, gli stati eccitati da MLCT dovrebbero trovarsi a energie relativamente basse. Gli stati eccitati MC dei complessi ottaedrici  $d^6$  sono fortemente spostati rispetto alla geometria dello stato fondamentale lungo le coordinate di vibrazione metallo-ligando. Gli stati eccitati di MLCT e LC non sono così distorti perché l'elettrone promosso è delocalizzato sui leganti.

Spettro di assorbimento in una miscela metanolo-etanolo a T ambiente, lo spettro di emissione a T ambiente che è la linea tratteggiata e lo spettro di emissione a 77 K che è la linea puntinata. Nello spettro di assorbimento sono riportati i picchi con le relative assegnazioni e sono bande associate a stati di singoletto, l'assorbimento a più bassa energia (460 nm) corrisponde alla transizione al singoletto a carattere MLCT ed è possibile vedere una coda a ca. 550 nm che è assegnata ad un tripletto MLCT. Nella banda di emissione a 77 K vediamo che sono riconoscibili le componenti vibroniche della banda mentre non lo sono a T ambiente.

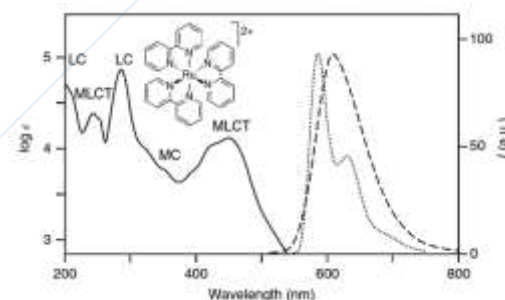


Diagramma di Jablonski e schema delle curve di energia potenziale del complesso  $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ . Di fatto per eccitazione che avviene prevalentemente sugli stati di singoletto, il composto rilassa riportandosi sullo stato di singoletto a più bassa energia che è il singoletto a carattere MLCT e da questo passa con una resa quantica di tripletto uguale a 1 sullo stato di tripletto a carattere MLCT. L'elevata resa quantica è dovuta al basso gap tra i due stati di singoletto e di tripletto e all'alleggerimento della regola di selezione di spin dovuta alla presenza dell'atomo pesante. Dà facilmente intersystem crossing, si riporta su questo stato di T a bassa energia dove emette in tempi rapidi ( $0.75 \mu s$  a T ambiente).

Nello schema relativo alle curve di energia potenziale si vede ciò che sappiamo già cioè che lo stato di tripletto MLCT è uno stato distorto rispetto al fondamentale che emette e parliamo di fosfo anche se in alcuni libri di testo si parla genericamente di luminescenza e ciò è dovuto al grosso contributo del metallo pesante con il grosso accoppiamento spin-orbita. E' riportato anche il tripletto a carattere MC a dimostrare che è uno stato distorto e che può essere ripopolato per via termica a partire dallo stato di tripletto a più bassa energia del MLCT e in quel caso io ho che quel sistema distorto non emette ma rilassa non radiativamente su  $S_0$  e dà reattività fotochimica.

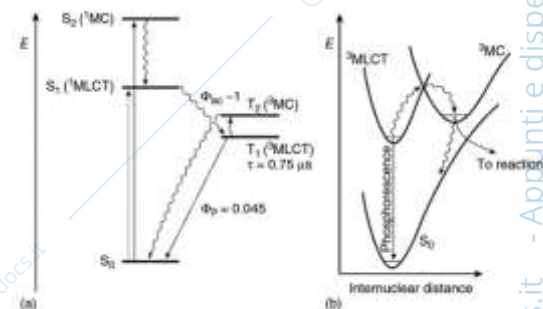


Figure 3.26 (a) Jablonski diagram at room temperature and (b) schematic view of the energy curves of the electronic states of  $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ .

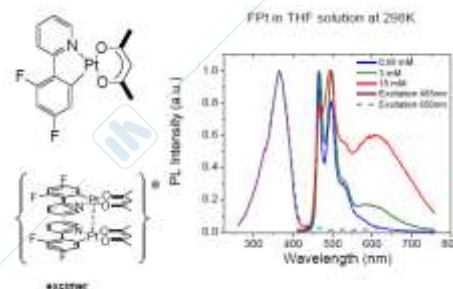
### Metalli in configurazione $d^8$

Nella famiglia dei sistemi  $d^8$  la fa da padrone il Pt(II) che ha geometria di coordinazione planare quadrata con l'orbitale  $d_{x^2-y^2}$  vuoto a più alta energia. E' proprio la configurazione planare quadrata che conferisce al Pt proprietà peculiari rispetto agli altri complessi di transizione fotoemettitori.

Anche per i complessi di Pt vale tutto quello che abbiamo detto quindi se lo stato a bassa energia è MC quello che ho è che il sistema risulterà non o scarsamente emettitore. Lo stato eccitato a carattere MC corrisponde al trasferimento di un e- in un orbitale  $d_{x^2-y^2}$  e lo stato eccitato è uno stato distorto con allungamento delle distanze Pt-legante e una labilizzazione del complesso e da questo stato distorto io ho che il sistema dà facilmente disattivazione non radiativa.

Come nei casi precedenti la probabilità che si abbia rilassamento con emissione è dato quando lo stato a bassa energia è a carattere LC o MLCT; anche in questi sistemi la vicinanza con lo stato MC è da evitare perché a T ambiente potrebbe essere ripopolato e spegnere l'emissione.

Come visto sopra, la configurazione quadrato planare del Pt introduce nei suoi sistemi delle proprietà emissive peculiari. Tale configurazione è essenzialmente piatta (a meno che ci siano leganti ingombranti) è particolarmente disponibile a formare legami intermolecolari che portano alla formazione di dimeri oppure eccimeri ed ecciplessi. Qui vediamo lo spettro di un complesso di Pt al variare della  $[\text{Pt}(\text{L})_2]$  e si vede che con l'> della  $[\text{Pt}(\text{L})_2]$  insieme alla banda del composto monomero con risoluzione vibrazionale alle componenti si ha che  $\lambda > \lambda_0$  si genera (e poi aumenta l'intensità) della banda a ca. 640 nm. Tale banda è dovuta alla formazione di un eccimero tant'è che lo spettro di eccitazione raccolto su tale banda o sulla banda di un monomero dà un'unica componente che si equivale nei due casi ad indicazione che quella banda non ha un corrispondente allo stato fondamentale ma è originata dalla banda di assorbimento del monomero. Sempre da quest'ultimo è originata la perdita di struttura fine vibrazione in emissione.



## Lantanidi

Sistemi in cui le configurazioni elettroniche sono  $f_n$  cioè sono gli orbitali  $f$  ad essere occupati. **Gli stati emettitori sono associati a transizioni MC.** L'emissione a differenza dei metalli di transizione non è modulabile, è tipica del lantanide. Inoltre un'altra differenza riguarda il fatto che mentre nei complessi di transizione le bande sono larghe, nei lantanidi le bande sono molto strette perché si tratta transizioni  $f-f$  intraconfigurazionali.

I lantanidi vengono anche chiamati "elementi delle terre rare" anche se in realtà non sono particolarmente rari (ci sono metalli di transizione che sono più rari dei lantanidi). La rarità associata a questi elementi è dovuta alla difficoltà di separarli gli uni dagli altri essendo che le loro proprietà chimiche sono molto simili. Hanno configurazione elettronica ad open-shell  $4f$  e lo stato di ossidazione più comune è il +3. Sono acidi hard di Lewis che legano particolarmente facilmente basi hard di Lewis con interazioni di natura soprattutto elettrostatica dovuta al fatto che gli orbitali  $f$  sono orbitali particolarmente schermati dai  $5s$  e  $5p$  occupati rispetto ai leganti che ne fa degli orbitali interni che danno appunto legami di natura elettrostatica tant'è che danno composti con non particolari requisiti geometrici e numeri di coordinazione elevati dettati dal raggio del catione e soprattutto dall'ingombro sterico dei leganti.

**Le transizioni intraconfigurazionali  $f-f$  sono transizioni proibite per simmetria e quindi sono caratterizzate da bassi coefficienti di estinzione molare per quanto riguarda la transizione in andata (cioè in assorbimento) e basse costanti radiative per quanto riguarda la transizione in ritorno.** Quindi hanno bande in assorbimento strette e bande strette in ritorno. Bande strette deboli (bassa  $\epsilon$  in andata e in ritorno basse costanti radiative = tempi di vita lunghi). Assorbimenti ed emissioni caratteristici dello ione metallico perché queste transizioni sono scarsamente influenzate dai leganti = tipiche del metallo.

**Termini di Russel-Saunders (NO ESAME):** quando abbiamo costruito il nostro diagramma degli stati per i complessi dei metalli di transizione ci siamo arrivati partendo da uno schema di campo forte cioè abbiamo considerato prima lo splitting dei livelli ad opera dei leganti e poi lo splitting successivo ad opera della repulsione inter-elettronica. Saremmo potuti partire da uno schema di costruzione che viene detto schema a campo debole cioè considerare prima la repulsione interelettronica e poi sullo splitting della repulsione interelettronica, calcolare lo splitting successivo ad opera dei leganti. Passando ai lantanidi si deve partire dalla repulsione interelettronica che la fa da padrone poiché l'interazione ione-lantanide è un'interazione che ha pochissimo effetto sui livelli del metallo. Quindi lo schema da cui dobbiamo costruire il nostro diagramma degli stati nel caso dei lantanidi è quello dello schema ione libero cioè cosa succede allo ione libero (e ai suoi livelli) per effetto dello splitting dei livelli ad opera della repulsione interelettronica al quale aggiungiamo al limite lo splitting ad opera dei leganti che ha un contributo molto più piccolo.

Quindi partiamo dai quei termini che sono detti di "Russel-Saunders" quindi per una data configurazione  $f_n$  abbiamo lo splitting dei livelli ad opera dei termini di Russel Saunders corrispondenti a cui aggiungiamo uno splitting dovuto agli accoppiamenti spin-orbita e solo successivamente lo splitting dei livelli ad opera dei leganti.

In pratica per i lantanidi ci basta lo schema dei livelli dello ione libero poiché i comportamenti fotofisici di un complesso di un lantanide non sono molto influenzati dai leganti.

Se ho il  $Nd^{3+}$  uso le regole di Hund per determinare qual è il termine di R-S corrispondente allo stato fondamentale. Ho  $3+$ . La prima regola mi dice che devo massimizzare lo spin (= massimizzare la molteplicità di spin) quindi metterò i tre elettroni all'interno degli orbitali f, ciascuno occupando singolarmente un orbitale e tutti avendo lo stesso spin. Quindi ho tre elettroni con lo stesso spin e S totale sarà uguale a  $3/2$  e la molteplicità che è data da  $2S+1$  sarà uguale a 4. La molteplicità del termine di R-S dello stato fondamentale sarà di quartetto. La molteplicità la potrei anche calcolare partendo da numero di elettroni spaiati + 1.

Ho massimizzato S e ora devo massimizzare L cosa che faccio disponendo questi elettroni in modo da occupare gli orbitali con  $m_l$  più elevato e siccome per gli orbitali f  $l = 3$  ho che  $m_l$  va da +3 a -3 e quindi i valori più alti saranno +3, +2, +1. L somma degli  $m_l$  che mi dà 6. Per  $l = 6$  la lettera corrispondente è I quindi il termine di stato fondamentale sarà un quartetto I. Poi ci metto anche gli effetti di accoppiamento spin-orbita e quel termine  $^4I$  per effetto di accoppiamento spin orbita sarà splittato in diversi stati corrispondenti a valori diversi di j che nascono da  $l+s$  fino a  $l-s$  assoluto. In questo caso i valori di j possono variare da  $9/2$  a  $15/2$ . Siccome il mio livello è riempito per meno della metà (ho solo tre elettroni all'interno dei 7 orbitali possibili) allora il valore di j sarà il più piccolo possibile. Quindi il termine di R-S corrispondente alla configurazione fondamentale  $4f^3$  è il termine  $^4I_{9/2}$ .

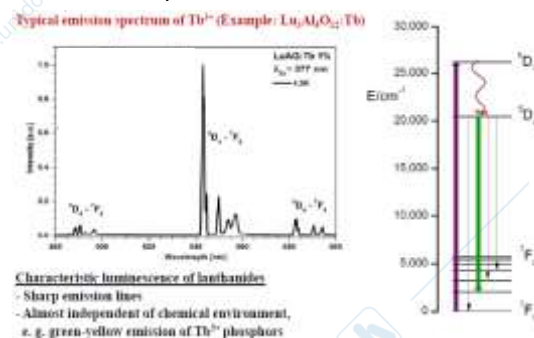
Con la regole di Hund non riusciamo a determinare i termini di R-S per gli stati a più alta energia poiché le cose si complicano.

Es con  $Er^{3+} 4f^{11}$ , ho 11 elettroni da piazzare negli orbitali f e massimizzando S ottenendo il valore più alto possibile di L. Riempio gli orbitali f con gli elettroni occupando per primi i livelli con valori di  $m_l$  più alti. Così massimizzo anche il numero di elettroni spaiati = 3 che corrisponde ad uno stato di quartetto. La configurazione che ottengo è:

L sarà = a 6. Qui il termine di R-S sarà il più grande poiché ho che il guscio è riempito per più della metà, ho più di 7 elettroni. R-S =  $^4I_{15/2}$ .

Quindi la configurazione elettronica dei lantanidi è splittata nei termini spettroscopici dagli effetti di repulsione interelettronica con una separazione dell'ordine del  $10^4 \text{ cm}^{-1}$  (paragonabile a quella che avevamo nei met di trans), poi ho un effetto dovuto agli effetti di accoppiamento spin orbita (maggiore di quella che avevamo nei met di trans) il cui splitting energetico è dell'ordine dei  $10^3 \text{ cm}^{-1}$  e poi ho un contributo molto piccolo dovuto al contributo dei leganti detto "effetto Stark" con uno splitting di  $10^2 \text{ cm}^{-1}$  (è trascurabile praticamente rispetto ai precedenti, molto minore a quello presente nei met di trans).

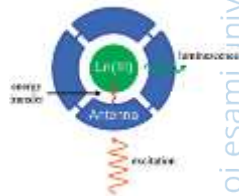
Spettro di emissione tipico dello ione  $Tb^{3+}$  (terbio): le bande sono molto strette e sono caratteristiche dello ione, i leganti hanno poca influenza. La banda più intensa è quella caratteristica dell'emissione giallo-verde del  $Tb^{3+}$ . L'assorbimento può in teoria promuovere lo ione in qualsiasi stato accessibile e poi lo ione si riporterà al livello più basso del termine eccitato dal quale rilascerà radiativamente sui vari livelli dei termini di stato fondamentale con una transizione più probabile che è quella che dà luogo alla banda stretta più intensa.



Tra i lantanidi ci sono emettitori nel vicino IR, nel visibile e nell'UV. Tra questi ci sono anche emettitori che secondo la IUPAC danno fosfo e altri fluo. Gli emettitori con emissione più intensa nel visibile sono l'Eu(III) e il Tb(III) con l'Eu che emette nel rosso con emissione intensa a 612 nm dovuta ad una transizione  $5d^0 \rightarrow 7f^2$  invece il Tb nel verde in conseguenza ad una radiazione a 595 nm dovuta ad una transizione  $5d^4 \rightarrow 7f^5$ .

### Proprietà spettroscopiche dei lantanidi

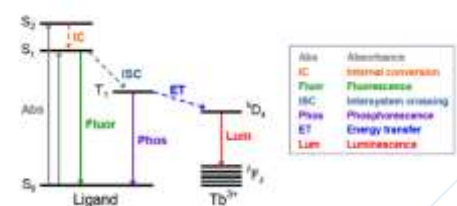
Il fatto che i lantanidi abbiano bassi valori di  $\epsilon$  è dovuto al fatto che quelle transizioni sono transizioni  $f \rightarrow f$  spesso non permesse per simmetria e spesso anche non permesse per spin. Il problema, volendo osservare emissione dai lantanidi, è quello di portare popolazione sul livello emettitore popolazione che non ha voglia di andare per eccitazione diretta perché tale eccitazione non è un processo che il sistema ha voglia di compiere. Potrei portare molta popolazione su quegli stati eccitati usando una sorgente molto intensa come un laser ma dal punto di vista applicativo non sarebbe vantaggioso economicamente. Quindi la strategia deve essere diversa. Sapendo che quella transizione in andata è difficile da compiere (quindi poco probabile in ritorno) e quindi la costante radiativa sarà bassa e il tempo di vita sarà lungo ma non necessariamente ci sarà una bassa resa quantica di emissione poiché la resa quantica di emissione dipende sia dalla costante radiativa ma è anche legata alle costanti non radiative che il sistema può compiere. Quindi le rese quantiche di emissione dei lantanidi sono elevate anche se il problema è come andare a popolare adeguatamente lo stato eccitato. Una strategia alternativa al laser è usare l' "effetto antenna": si usa un'antenna cioè un sistema che ha voglia di compiere una transizione in andata quindi di popolare il suo stato eccitato e in seguito questo sistema deve essere in grado di trasferire la sua energia con un processo di energy transfer al lantanide che si porta sul suo stato emettitore da cui osserverò emissione. Tipicamente lo stato da cui si osserva trasferimento di energia è lo stato di tripletto dell'antenna anche se non è obbligatorio.



L'emissione sensitizzata dai lantanidi è utile per molte applicazioni soprattutto in ambito biologico; innanzitutto è una disattivazione che avviene in tempi lunghi quindi per esempio in un contesto biologico avere un sistema che è emettitore con tempi lunghi permette di liberare il segnale da fenomeni di scattering e di autofluorescenza (cioè fluo prodotta dal sistema biologico stesso) quindi si ha un grosso vantaggio dal punto di vista della sensibilità della misura. Oltretutto sono anche emissioni caratterizzate da un elevatissimo stoke shift perché io sto eccitando ad una  $\lambda$  di assorbimento corrispondente all'antenna e dopo avvengono molte cose tra cui rilassamento dell'antenna e trasferimento di energia al lantanide quindi l'emissione è molto spostata rispetto all'eccitazione. Questo significa che il segnale è molto lontano da quello prodotto dalla sorgente con conseguente  $>$  di sensibilità della tecnica. Il problema è trovare leganti adatti che mi diano un corretto trasferimento di energia e anche che i complessi siano solubili in acqua e quindi utilizzabili nel contesto biologico.

L'antenna può essere coordinata direttamente allo ione oppure può essere legata covalentemente a un frammento che entra nella sfera di coordinazione dello ione.

Il diagramma di Jablonski corrispondente al processo di sensitizzazione dell'antenna (che di solito è una molecola organica: di solito popola stati di singoletto). Poi l'intersystem crossing da  $S_1 \rightarrow T_1$  (ci sono casi studiati in cui avviene anche direttamente da  $S_1$ ) è favorito dalla presenza dell'atomo pesante. Invece per il meccanismo di trasferimento di energia ci possono essere diversi meccanismi:



- Forster
- Dexter
- altri meccanismi che non abbiamo visto

Perché il processo si realizzi serve che siano rispettati dei requisiti in termine soprattutto di posizione dei livelli del donatore e dell'accettore sui quali avviene il trasferimento  $\rightarrow$  quindi impo la scelta di antenna opportuna. L'antenna di solito è un composto organico ma può essere anche un complesso di un metallo di transizione con trasferimento da uno stato del metallo del tipo MLCT.

Ovviamente all'emissione sensitizzata possono competere la disattivazione per fluo o fosfo oppure le disattivazioni non radiative e il quenching da parte dell'ossigeno. Un altro processo può essere quello di back-energy transfer (attivato per via termica). Quest'ultimo è limitato se il gap tra lo stato di tripletto dell'antenna e il livello emettitore del lantanide è sufficientemente elevato con valore critico  $1700 \text{ cm}^{-1}$ .

C'è una stretta relazione tra i livelli elettronici dell'antenna e quelli del lantanide  $\rightarrow$  scelgo bene l'antenna che deve avere stati elettronici opportunamente ad energia maggiore rispetto al livello emettitore presente sul

lantanide. Quando si utilizzano lantanidi che emettono nel visibile si dovrà usare antenna che assorbono nell'UV e quando ho lantanidi che emettono nel vicino IR allora vanno bene anche antenne che assorbono nel visibile (questo è utile perché così riusciamo a avere un risparmio nella scelta dei lantanidi e anche una maggior penetrazione all'interno dei tessuti biologici).

Per i lantanidi la disattivazione radiativa (quindi l'emissione) prodotta per rilassamento quando il lantanide è popolato per eccitazione diretta viene detta **resa quantica di tipo intrinseco**; quella invece ottenuta attraverso il processo di sensitizzazione è data dalla produttoria delle efficienze di una serie di processi (es. se avviene dal tripletto avremo l'efficienza di intersystemcrossing, l'efficienza del processo di energy transfer e l'efficienza del processo di disattivazione intrinseco).

$$\phi_{Ln}^L = \phi_{ISC} \times \phi_{ET} \times \phi_{Ln}^{Ln} = \phi_{sens} \times \phi_{Ln}^{Ln}$$

L'efficienza della disattivazione radiativa intrinseca di uno ione lantanide dipende dal  $\Delta E$  tra il suo stato emettitore e il livello ad energia più elevata del termine di stato fondamentale. Tanto più piccolo è il  $\Delta E$  tanto più facile è che la disattivazione avvenga per via non radiativa, soprattutto per trasferimento di energia dal livello emettitore a livelli corrispondenti a overton ad alta frequenza (soprattutto OH, NH, CH). Quindi questi gruppi, funzionano da spegnitori della luminescenza ad opera dei lantanidi tanto più piccolo è il  $\Delta E$ . Quindi la presenza di questi gruppi diventa un problema soprattutto per gli emettitori nel vicino IR in cui il  $\Delta E$  è piccolo. La presenza di questi gruppi che hanno vibrazioni di alta frequenza, risulta in uno spegnimento dell'emissione e in una riduzione dei tempi di vita rispetto al tempo di vita intrinseco dello ione che è l'inverso della costante radiativa (che è molto piccola per il lantanide). A questo punto il tempo osservato in presenza di queste vibrazioni è un tempo che è legato alla costante radiativa e a quella non radiativa e il risultato è che il tempo osservato < rispetto al tempo radiativo intrinseco o naturale.

L'efficienza del trasferimento di energia sulle vibrazioni NH, OH, CH che funziona da spegnitore dell'emissione luminescente dei lantanidi dipende dal numero di livelli vibrazionali che riempiono in gap tra il livello emettitore e il livello più alto che termine fondamentale del lantanide. Tanto più piccolo è il  $\Delta E$  tanto più basso è il livello vibrazionale isoenergetico con il livello emissivo e tanto più efficace è il trasferimento di energia a queste vibrazioni e quindi la disattivazione non radiativa del lantanide. Siccome dipende dal  $\Delta E$  è particolarmente dannosa per gli emettitori nel vicino infrarosso che devono effettivamente essere schermati rispetto alla vicinanza con molecole contenenti NH, OH, CH quindi per esempio dal solvente.

Es. se consideriamo l'Eu(III) il gap tra il livello  $^5d_0$  e  $^7f_6$  esso corrisponde a 3 quanta vibrazionali OH. Se noi poi consideriamo il legame O-D invece che quello O-H la frequenza vibrazionale del gruppo O-D è più bassa e questo gap è riempito da 5 quanta vibrazionali quindi è chiaro che l'emissione dell'Eu è spenta più efficacemente dalle vibrazioni OH che dalle vibrazioni OD.

Quindi il problema della presenza di gruppi soprattutto OH ma anche CH e NH diventa importante per gli emettitori del vicino IR anche se è un peccato perché da un punto di vista applicativo sono molto interessanti perché posso eccitarli usando una radiazione che assorbe nel visibile. Purtroppo queste emissioni vengono spente efficacemente dalle vibrazioni ad alta frequenza (diventa un grosso problema perché ad es. l'acqua diventa un forte spegnitore dell'emissione dei lantanidi nel vicino IR).

## Nd: YAG

L'utilizzo dell'emissione dei lantanidi spazia per esempio nei laser come quello neodimio-Yag che è un laser a 4 livelli con emissione a 1064 nm. Composizione: granato di ittrio e alluminio (YAG) drogato al neodimio ( $Nd:Y_3Al_5O_{12}$ ).

## Sensori

Possiamo usare anche i lantanidi come sensori con diversi sistemi di funzionamento:



Nel sistema di tipo B il complesso (recettore) contiene già l'antenna ma l'emissione è quenched perché il

complesso è insaturo e lo spegnimento avviene ad opera di solvente coordinato. Grazie all'analiticità che sposta il solvente dalla coordinazione del lantanide si ha accensione dell'emissione. Questo meccanismo viene sfruttato per anioni che non sono antenne cioè non danno assorbimenti nell'UV e non funzionano da sensibilizzatori per il lantanide. Nel tipo A l'analita è l'antenna.

Nel meccanismo C il recettore è già emettitore ed è già coordinativamente saturo e contiene anche già l'antenna ma l'effetto dell'analita è quello di perturbare le proprietà emissive: varia  $\lambda$  e  $\tau$  il tempo di vita, la resa quantica.

## FINE FOTOLUMINESCENZA

## NMR in inorganica e metallorganica

L'NMR è una spettroscopia di **assorbimento**. In un campo magnetico esterno e statico, un campione può assorbire radiazione elettromagnetica nella regione delle radiofrequenze (rt, range  $10^6$ - $10^8$  Hz).

### ASPETTI TEORICI - INTRODUZIONE PROPRIETÀ MAGNETICHE DEI NUCLEI

Tutti i nuclei possiedono una carica e in alcuni di essi, ruotando (spinning) sull'asse nucleare, questa carica produce un dipolo magnetico orientato parallelamente all'asse di rotazione a cui è associato un momento angolare nucleare "P".

$$\text{MOMENTO ANGOLARE NUCLEARE} \quad P = [I(I+1)]^{1/2} \frac{h}{2\pi}$$

Gli atomi che ruotano su loro stessi possiedono un numero dispari di protoni, un numero dispari di neutroni o tutte e due le cose. I è il numero di spin, ed è un indice dell'intensità (o modulo) del momento angolare P.  $I = 0, \frac{1}{2}, 1, \dots$  fino a 6.

Quindi P risulta quantizzato in funzione del numero di spin I. Se la particella che ruota è carica si genera un momento magnetico  $\mu$ .

### SPIN NUCLEARE

Ogni nucleo è caratterizzato da uno specifico numero di spin nucleare I, che dipende dal numero di massa (protoni+neutroni) e dal numero atomico (protoni). Se  $I = 0$  i nuclei non sono NMR attivi.

Numero di massa	Numero atomico	Spin nucleare	Esempi
dispari	pari o dispari	$1/2, 3/2, 5/2, \dots$	$I = 1/2$ ( $^1\text{H}, ^{13}\text{C}, ^{19}\text{F}, ^{31}\text{P}$ ) $I = 3/2$ ( $^{11}\text{B}, ^{33}\text{S}$ ) $I = 5/2$ ( $^{17}\text{O}$ )
Par	par	0	$I = 0$ ( $^{12}\text{C}, ^{16}\text{O}$ and $^{25}\text{Mg}$ )
Par	dispari	$1, 2, 3, \dots$	$I = 1$ ( $^2\text{H}, ^{14}\text{N}$ ), $I = 3$ ( $^{10}\text{B}$ )

I nuclei con  $I = \frac{1}{2}$  hanno distribuzione sferica della carica •  
I nuclei con  $I > \frac{1}{2}$  hanno distribuzione oblate o prolata della carica, ovvero sono quadrupolari.

Cosa succede in un campo magnetico? In presenza di un campo magnetico esterno  $B_0$ :

- ✓ L'interazione tra il momento magnetico  $m$  della particella e il campo magnetico  $B_0$  è quantizzata:
- ✓ L'orientazione del momento magnetico rispetto a  $B_0$  è quantizzata
- ✓ Sono permesse  $2I+1$  orientazioni

### Il moto di precessione di Larmor

In presenza di un campo magnetico esterno  $B_0$  quest'ultimo genera un momento torcente sul momento magnetico che quindi indurrà la particella ad assumere un moto di precessione attorno alla direzione del campo magnetico  $B_0$  ad una frequenza  $\omega_0$  (o  $\nu_0$ ) detta frequenza di Larmor.

### I livelli energetici di Zeeman

In assenza del campo magnetico applicato, gli stati di spin hanno uguale energia. Maggiore è il campo applicato, e maggiore sarà il gap energetico. La differenza di energia tra gli stati energetici dipende dal campo magnetico applicato  $B_0$ .

$$\Delta E = -\mu \cdot B_0 = -\gamma \hbar I \cdot B_0 \text{ dove } m_I \rightarrow -I, -I+1, \dots, +I$$

$$E = -\gamma \hbar B_0 m_I$$

Qual è la condizione per cui la radiazione può essere assorbita da un nucleo?

$h\nu = \Delta E = \gamma \hbar B$   
 $\nu = \frac{\gamma}{2\pi} B$   
 Condizione di risonanza  
 Frequenza di Larmor

**REGOLA DI SELEZIONE**  
 Per transizioni di spin nucleare indotte da radiazioni:  
 $\Delta m_I = \pm 1$

Rispetto alla spettroscopia di fluorescenza possiamo notare due prime differenze: intanto che una è una spettro di assorbimento e l'altra di emissione e inoltre che l'NMR ha una sensibilità bassa rispetto all'altra. Cio è dovuto al fatto che i livelli energetici coinvolti nel caso dei **livelli nucleari** sono distanziati da una piccolissima energia; cioè a differenza di ciò che succede ai livelli elettronici, gli stati nucleari posso distanziarli > il campo magnetico esterno però la differenza di energia  $\Delta E$  rimane sempre molto piccola: questa è una mancanza abbastanza importante perché se andiamo a considerare i protoni a T ambiente in un campo magnetico di 400 MHz vediamo che  $\Delta E = \text{ca. } 3.8 \cdot 10^{-5} \text{ Kcal/mol}$  (valore piccolo).

E proprio perché la distribuzione dei livelli energetici ci è data dalla equazione di Boltzmann possiamo usarla per avere una conferma e così vediamo che la % di spin alfa rispetto a spin beta è maggiore di una quantità bassissima 0.0064%.

*Differenze con altre tecniche*

	UV vis	IR	ESR	NMR B <sub>0</sub> 14 T	7 T
$\lambda$	500 nm	10000 nm	3 cm	0.5m	1 m
$\nu$	6.00E+14	3.00E+13	9.99E+09 (10 GHz)	6.00E+08 (600 MHz)	3.00E+08 (300 MHz)
$\Delta E$ (J)	3.97E-19	1.99E-20	6.62E-24	3.97E-25	1.99E-25
kJ/mol	2.39E+02	1.19E+01	3.99E-03	2.39E-04	1.20E-04
N $\beta$ /N $\alpha$	2.268E-42	8.275E-03	0.998403	0.999904	0.999952

Scarsa sensibilità della tecnica NMR rispetto ad altre spettroscopie. Andare su campi B<sub>0</sub> intensi aumenta la sensibilità.

Per stimolare i livelli nucleari significa che siamo nell'ambito delle radiofrequenze.

Per nostra fortuna la frequenza reale di Larmor dipende dall'intorno atomico

Il campo locale sentito da ogni isotopo nella molecola è leggermente diverso da B<sub>0</sub>.

Dipende dal suo intorno → Chemical Shift

Negli strumenti che lavorano ad impulsi, la

radiofrequenza applicata non è monocromatica, ma copre un intervallo di frequenze che è sufficiente ad eccitare lo specifico isotopo che vogliamo osservare in tutti i diversi intorni (campi locali diversi da B<sub>0</sub>) cui può essere soggetto.

Un esperimento NMR può essere condotto su isotopi con numero quantico di spin diverso da zero e la cui abbondanza naturale sia sufficientemente elevata. Alcuni esempi sono riportati qui di seguito:

- è l'abbondanza nucleare ma anche  $\gamma$  è il rapporto giromagnetico ( $\gamma$ ),  $\gamma$  sarà la facilità con cui riusciamo ad osservare il segnale di quel particolare isotopo.  $\gamma = \text{momento magn} / \text{momento ang}$

Nucleo	Spin N	Abbondanza naturale %	$\gamma$ ( $10^4 \text{ rad T}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )
$^1\text{H}$	1/2	99.98	26.7519
$^2\text{H}$	1	0.016	4.1066
$^{31}\text{P}$	3/2	100	10.841
$^{13}\text{C}$	1/2	80.42	8.5843
$^{15}\text{N}$	1	99.63	1.9338
$^{14}\text{N}$	1/2	0.37	-2.712
$^{12}\text{C}$	0	98.9	-
$^{13}\text{C}$	1/2	1.108	6.7283
$^{16}\text{O}$	0	99.96	-
$^{17}\text{O}$	5/2	0.037	-4.811
$^{19}\text{F}$	1/2	100	25.181
$^{29}\text{Si}$	1/2	4.70	-5.3188

Il momento angolare  $P$  è proporzionalmente associato ad un momento nucleare magnetico  $m$ , che indica l'intensità del dipolo magnetico generato dalla carica in rotazione.  $g$  = rapporto giromagnetico, costante per ogni isotopo o nuclide. La osservabilità di un nuclide all'NMR dipende da quanto elevati sono i valori di due parametri:  $\gamma$  e l'abbondanza isotopica naturale.  $\gamma$  è una costante di proporzionalità che correla la frequenza di osservazione per un particolare nucleo al campo applicato  $\rightarrow \omega = \gamma B_0$

$^{12}\text{C}$  e  $^{16}\text{O}$  non sono nuclei NMR attivi, in quanto  $I=0$ . Viceversa,  $^{13}\text{C}$  e  $^{17}\text{O}$  sono NMR attivi ( $I$  diverso da 0) ma abbondanza naturale e  $g$  molto bassi  $\rightarrow$  sensibilità molto bassa allora posso scegliere di arricchire il mio campione di  $^{13}\text{C}$  ad es (molto costoso) oppure di  $\gamma$  di molto i tempi di analisi in modo da avere più scansioni (posso farla lavorare anche notti intere). In questo modo mi  $\gamma$  il rapporto segnale/rumore.

### Nuclei quadrupolari

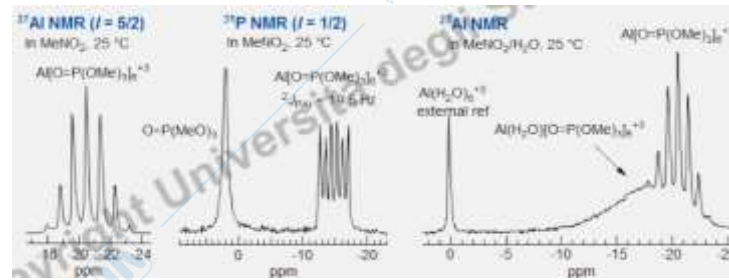
La principale difficoltà della spettroscopia NMR dei nuclei quadrupolari è che il tempo di rilassamento  $T_1$  può essere molto corto e si osservano bande molto larghe o nessuna banda. L'accorciamento o meno del  $T_1$  è determinato da due fattori:

**1) Il momento di quadrupolo elettrico  $Q$**   $\rightarrow$  Un momento di quadrupolo  $Q$  grande dà luogo ad un rilassamento dei nuclei efficiente tramite il movimento molecolare e quindi a larghezze di riga molto larghe.

Ad esempio,  $^{125}\text{I}$  - in acqua ( $I = 5/2$ ,  $Q = 0.6$ ) ha una  $\nu_{1/2}$  di 1800 Hz. Tutti gli altri composti di iodio sono molto meno simmetrici e hanno linee così larghe da non essere visibili. Il deuterio ( $I = 1$ ,  $Q = 0.0028$ ) e il  $^6\text{Li}$  ( $I = 1$ ,  $Q = 0.00046$ ) hanno tra le più piccoli momenti di quadrupolo tra tutti gli isotopi, e sono facilmente osservabili, dando luogo di solito a linee strette a sufficienza da risolvere le costanti di accoppiamento  $J$ .

**2) La presenza di gradienti di campi elettrici che attraversano il nucleo.**  $\rightarrow$  Le molecole con alta simmetria (tetraedrica e ottaedrica) in cui i nuclei quadrupolari in questione si trovano nel centro di simmetria possono dar luogo a linee sharp con multipletti visibili.

Ad es. Spettri NMR di  $^{27}\text{Al}$  ( $I = 5/2$ ,  $Q = 0.15 \cdot 10^{-24} \text{ cm}^{-1}$ , 22.63 MHz) e  $^{31}\text{P}$  (24.288 MHz) di una soluzione di  $\text{Al}(\text{ClO}_4)_3$  contenente un eccesso di trimetilfosfato in nitrometano (spettri più a sinistra) e in soluzione acquosa di nitrometano (spettro di destra).



L'alluminio coordinato a sei

ottaedrico trimetilfosfati da

luogo ad un multipletto sharp a causa delle JP-Al. Questo si può vedere bene sia dal 27Al che dal 31P, mentre quando uno dei trimetilfosfati è sostituito dall'acqua, il segnale dell'Al diventa molto largo e non risolto a causa del gradiente di campo elettrico che in questa nuovo addotto è presente sull'Al.

Nel caso di più isotopi NMR attivi dello stesso elemento tutti quadrupolari, Quale isotopo scegliere?

Es se ho 10B e 11B. Devo considerare anche un altro fattore che è la larghezza di riga che ci fa propendere per l'isotopo più abbondante. Devo però considerare anche  $\gamma$  (e anche li il 11B ha un valore molto più alto del 10B. Se però mi trovo con il 6Li e 7Li le cose cambiano perché per abbondanza naturale "vince" il 7Li ma vedendo come si ripercuote il momento di quadrupolo sulla larghezza di riga vediamo che il 6Li ha un valore migliore e quindi sceglieremo lui per l'analisi. Quindi sceglieremo l'isotopo che ci permette di vedere meglio il segnale. Lavoro anche a bassa T.

Table 2 Nuclear properties of  $^6\text{Li}$  and  $^7\text{Li}$ , including data for  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  for comparison<sup>a</sup>

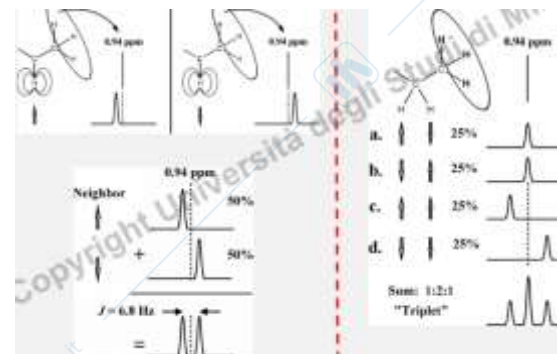
Natural abundance (%)	Spin I	Magnetic moment $\mu_N$ (nM)	Gyromagnetic ratio $\gamma$ ( $10^7$ rad $\text{T}^{-1} \text{s}^{-1}$ ) (g/10 <sup>-28</sup> )	Quadrupole moment $Q$ (b) ( $10^{-28} \text{m}^2$ )	Quadrupole receptivity <sup>b</sup> $\gamma^2 Q$ (a <sup>2</sup> b) ( $10^{-28} \text{m}^2 \text{s}^{-2}$ )	Resonance frequency $\nu$ (MHz) at 4.7 T (50 MHz T <sup>-1</sup> )	Larmor factor $(\gamma/\text{H})^2$ ( $10^{-10} \text{s}^{-2}$ )
$^6\text{Li}$ 7.42	1	1.1635	5.9371	$-2.2 \times 10^{-28}$	1.64	58.889	$1.4 \times 10^{-10}$
$^7\text{Li}$ 92.58	3/2	4.2361	10.7977	$-4.0 \times 10^{-28}$	1.60	155.844	$2.1 \times 10^{-10}$
$^1\text{H}$ 99.985	1/2	4.8374	26.7522	0	1.91	400.000	-
$^{13}\text{C}$ 1.108	1/2	1.2146	6.7281	0	1.3	100.380	-

Sono molto informativi i chemical shift, gli integrali, le costanti di accoppiamento e i tempi di rilassamento. A seconda del numero di psin avremo n livelli energetici di Zeeman. Quindi sappiamo che per tutti i nuclei con spin 1/2 ci sono solo due stati detti anche alfa o beta ma se passiamo a un elemento come il deuterio che ha un momento di quadrupolo avremo 3 livelli energetici accessibili agli spin nucleari. Il numero di livelli energetici determina poi il pattern di accoppiamento scalare osservato.

**Riassunto dei tipi di accoppiamenti NMR multinucleari**

Quando i protoni tendono ad allinearsi rispetto a un campo magnetico esterno, può infatti verificarsi tra loro un'interazione, chiamata accoppiamento spin-spin.

1) Due spin 1/2 con abbondanza naturale circa 100% (1H, 19F, 31P, 103Rh, 89Y). Entrambi i nuclei mostreranno un pieno accoppiamento, semplicemente come succede nell'accoppiamento protone-protone

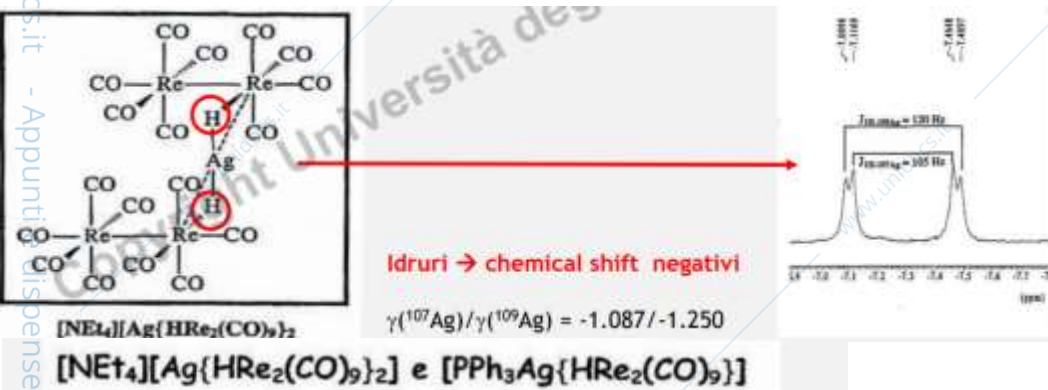


2) Uno spin 1/2 con abbondanza naturale circa 100% e uno spin 1/2 con bassa abbondanza naturale (es 1H e 13C). Il nucleo con bassa abbondanza naturale mostrerà pieno accoppiamento, mentre il nucleo con abbondanza naturale al 100% mostrerà le satelliti.

- 3) Due spin 1/2 entrambi con bassa abbondanza naturale. Entrambi i nuclei mostreranno le satelliti. L'accoppiamento omonucleare sarà visibile solo con le satelliti.
- 4) Uno spin 1/2 e un nucleo quadrupolare. Quello che si vedrà dipenderà essenzialmente dai tempi di rilassamento

1) *Caso di un nucleo osservato che si accoppia con un atomo di un elemento che ha più isotopi con I=1/2 ma a.n. totale = 100%*

Esempio:  $^{107}\text{Ag}$  a.n. 51.8%,  $^{109}\text{Ag}$  a.n. 48.2%. In questo caso gli spettri sono «sdoppiati» perché a.n. ca 50-50 tra i due isotopi e i rapporti giromagnetici molto simili, quindi anche JAg-X molto simili. In questo caso «manca» il singoletto centrale (non sono più satelliti!)

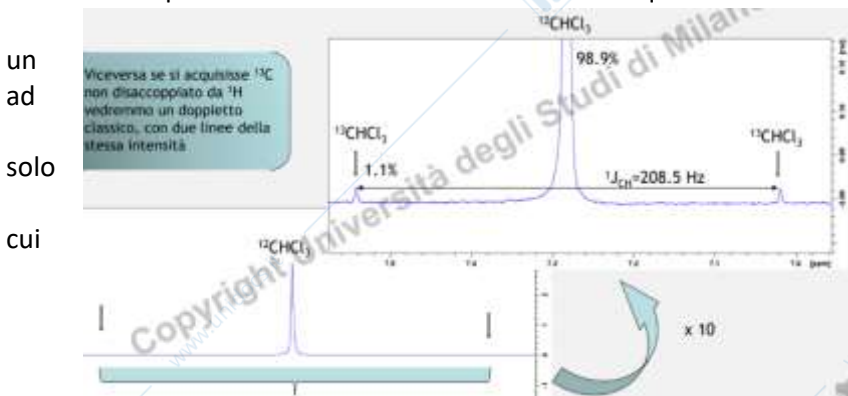


Spettro del  $^1\text{H}$  in cui i due doppietti sono quelli collegati e non quelli che verrebbe da dire intuitivamente, e cio è dovuto al fatto che l'H accoppi con due nuclei di Ag diversi uno è l'isotopo 107 e l'altro il 109. Se disaccoppiassi dall'Ag vedrei dei singoletti.



Facciamo un altro esempio prendendo una miscela del complesso di Ag di prima con un altro complesso che contiene anche P. Partendo dallo spettro piu in basso che è del  $^1\text{H}$  non disaccoppiato con nulla, si vede come oltre ai due doppietti di prima relativi all'accoppiamento H-Ag, si hanno anche degli altri doppietti (freccia blu) dovuti al fatto che l'H sperimenta anche un accoppiamento con il P quindi il tutto è ulteriormente sdoppiato per questo. Cio lo si può provare andando a fare gli spettri disaccoppiati da Ag e P insieme e poi separati: disaccoppiando dall'Ag ottengo un disaccoppiamento parziale da tutto l'Ag che c'è

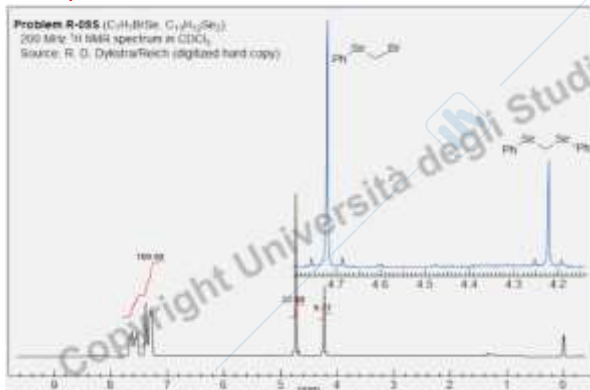
nella molecola perché il 50% ca. non potrà essere disaccoppiato; cio perché alcuni nuclei risuonano molto bassi come frequenza di Larmor e l'hardware non riesce a raggiungere quella bassa frequenza e quindi rimangono del doppietto originario due componenti (quelle relative all' $^{107}\text{Ag}$ ) e il disaccoppiamento dall' $^{109}\text{Ag}$  eliminerà le altre due componenti facendo venire fuori il singoletto centrale. Dal punto di vista dell'altro complesso abbiamo innanzitutto che anche qui verrà eliminato  $^{109}\text{Ag}$  e il  $^{197}\text{Ag}$  rimane e però c'è



contemporaneamente viene fatto disaccoppiamento dal P che porta avere un sistema uguale a quello dell'Ag (tripletto). Se disaccoppio dall' $^{109}\text{Ag}$  splittano tutte e tre le componenti (quelle dell' $^{107}\text{Ag}$  a rimane l'accoppiamento con il P) e quella dell' $^{109}\text{Ag}$  che è disaccoppiato dando un doppietto invece che un singoletto centrale a causa del fatto che non sto

disaccoppiando dal P. Infine se disaccoppio solo dal P il secondo complesso produrrà uno splitting pattern uguale a quello del complesso dimerico di Ag.

2)

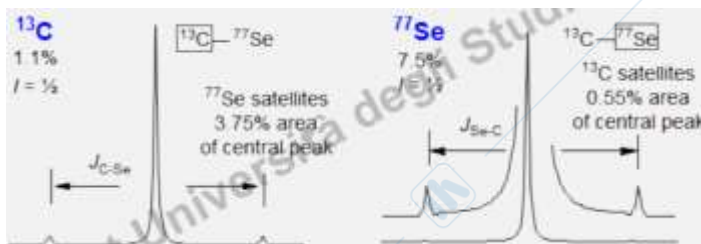


Lo spettro mostra una miscela di due composti a base di selenio, PhSe-CH<sub>2</sub>-Br and PhSe-CH<sub>2</sub>-SePh. L'intensità delle satelliti permette di attribuire i picchi CH<sub>2</sub> - il picco meno intenso e a campi più alti a  $\delta$  4.22 ha le satelliti di <sup>77</sup>Se che sono due volte più intense rispetto a quelle del CH<sub>2</sub> a campi bassi a  $\delta$  4.72. Da qui l'attribuzione.

Alcuni elementi (ad es. Sn e Te) hanno più di un segnale NMR con spin 1/2, e conseguentemente, sarà osservato più di un set di satelliti. Per queste, la grandezza delle costanti di

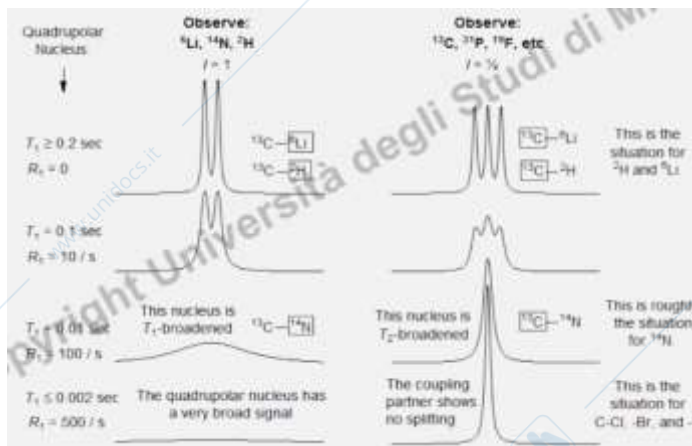
accoppiamento sarà in rapporto con i rapporti giromagnetici, e le intensità saranno dipendenti dalla abbondanza naturale dei loro isotopi. Un esempio è riportato qui di fianco con lo spettro <sup>1</sup>H NMR di PhTe-CH<sub>2</sub>-TePh. Per il CH<sub>2</sub> centrale si possono osservare le satelliti per gli accoppiamenti con gli isotopi <sup>125</sup>Te e <sup>123</sup>Te

3)



Il Se ha un'abb. naturale del 7.5 % e quindi ci dovremo aspettare delle satelliti attorno al segnale del C13 che siano ciascuna con un'area di ca. il 3.75% rispetto all'area del picco centrale. Stessa cosa se consideriamo lo spettro del Se accoppiato con il C13 che ha abb. nat. del 1.1 % che quindi ci darà un'area delle satelliti

dell'accoppiamento con il C dell'0.55% ciascuna rispetto all'area del picco naturale.



4) Spettri simulati in cui dei composti qualsiasi che contengono un C accoppiato con un Li6 o con un deuterio o con un N14 (quindi nuclei quadrupolari con I=1). Essi mostreranno una variazione dello splitting pattern a seconda del tempo di rilassamento. Tipicamente il Li6 e il deuterio hanno un momento di dipolo molto piccolo e quindi spesso i loro tempi di rilassamento non sono così corti come per altri nuclei quadrupolari; quindi a parità di I dovremmo ottenere un certo splitting delle risonanze. Se io vado ad analizzare lo spettro del Li6 o del D2 mi

posso aspettare di avere un doppietto con T<sub>1</sub> > 0.2 s. Se poi accorcio il T<sub>1</sub> avrò linee più allargate. Se poi passo al N che di solito ha T<sub>1</sub> molto veloci perché il suo momento di dipolo elettrico è molto più grande, accadrà che perderò l'accoppiamento. Ora vediamo cosa succede dal punto di vista dell'atomo a spin 1/2 (spettri a dx): nel caso di tempi abbastanza lunghi io vedrò le 3 linee come atteso dalla regola 2N+1 (tipica situazione dei solventi deuterati). Se però accorcio il T di rilassamento posso osservare un allargamento delle bande con variazione dell'intensità relativa delle bande a causa delle sovrapposizioni. Posso arrivare a perdere totalmente l'accoppiamento.

Un nucleo quadrupolare vicino splitta un segnale di uno spin 1/2 in un multipletto del tipo 1:1:1 (1:1:1 per I=1, 1:1:1:1 per I=3/2,...) al posto di un doppietto 1:1 che si verifica con un nucleo con spin 1/2, e questo perché tali nuclei hanno più di due possibili orientazioni nel campo magnetico (per I=1, m= 1, 0, -1). Tale accoppiamento

spesso non si vede poiché in molti casi il rilassamento T1 quadrupolare è troppo veloce. Per il deuterio ( $I=1$ ) i tempi di rilassamento sono più lunghi e per questo motivo spesso sono visibili tripletti 1:1:1 per nuclei accoppiati a 2H

### Accoppiamenti con il Boro ( $^{11}\text{B}$ e $^{10}\text{B}$ )

Il boro ha due isotopi NMR attivi,  $^{10}\text{B}$  (19%,  $Q = 0.086$   $I = 3$ ) e  $^{11}\text{B}$  (81%,  $Q = 0.036$ ,  $I = 3/2$ ). Il valore relativamente favorevole di  $Q$  e l'alta abbondanza naturale di  $^{11}\text{B}$  fa sì che si possa sfruttare nell'investigazione di composti contenenti boro. Nuclei come  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  si accoppiano al boro (così come le risonanze del B stesso) tendono ad essere larghe e alcune volte difficili da risolvere a causa dei T1 relativamente corti a causa dell'efficacia del rilassamento quadrupolare.

Se la simmetria è molto elevata, le righe si stringono: per  $\text{BH}_4^-$  - è possibile osservare entrambi i contributi allo splitting, sia di  $^{11}\text{B}$  che di  $^{10}\text{B}$  →

E' interessante notare come i tempi di vita di ciascuno stato di Zeeman quadrupolare non siano necessariamente uguali. Infatti, per quei casi in cui i tempi di vita sono confrontabili al reciproco della costante di accoppiamento  $J$ , si possono osservare differenti allargamenti nelle linee del multipletto. Un esempio lampante è mostrato in figura.

### Shift isotopico

Può essere primario o secondario. Si intende che se in un composto mi aspetterei che sia tutta la stessa cosa ma poi ottengo due segnali diversi uno dovuto ad es. al  $^{10}\text{B}$  e l'altro al  $^{11}\text{B}$ . Quindi lo stesso fluoro su due nuclei diversi viene influenzato a seconda che giaccia su un B di un tipo o di un altro.

Ciò può essere visto per i segnali  $^{13}\text{C}$  dei sali di tetraalchil ammonio o il segnale  $^1\text{H}$  per HDO diluita dove, in ogni caso, le due linee più esterne dei tripletti osservati sono allargate più della linea centrale tale per cui l'intensità (l'altezza) delle linee non appaiano in rapporto 1:1:1.

### Chemical shift

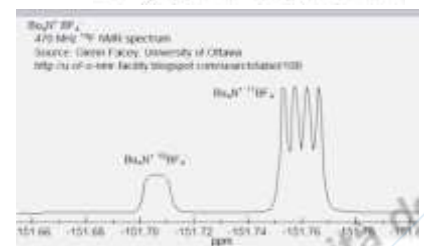
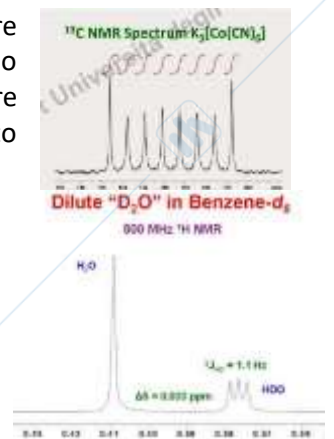
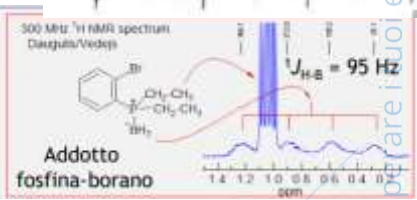
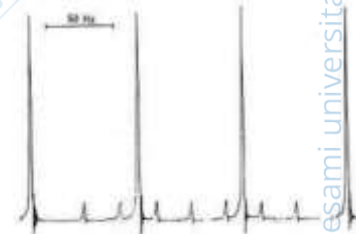
In un campione reale i nuclei dell'isotopo osservato risentono di un campo magnetico locale diverso dal  $B_0$ . Quindi avremo un campo magnetico effettivo che sarà dato da  $B_{\text{eff}} = B_0 (1 - \sigma)$  dove  $\sigma$  è la costante di schermo quindi la frequenza di risonanza  $\nu$  sarà diversa da quella di Larmor → avremo un importante spostamento dei chemical shift soprattutto per gli eteronuclei.

$$\nu = \frac{\gamma}{2\pi} B_0 (1 - \sigma)$$

Poiché gli elettroni muovendosi creano un campo magnetico, la frequenza di Larmor dello spin in questione dipenderà dall'intorno elettronico. Il campo magnetico esterno  $B_0$  induce correnti nella nuvola elettronica della molecola e le correnti molecolari circolanti a loro volta generano un campo magnetico indotto.

La frequenza di Larmor quindi dipende dalla presenza di altri spin nucleari magnetici nella stessa molecola e dalle direzioni dei loro momenti magnetici: in questo caso si parla di accoppiamento nucleare spin-spin. in

$^{11}\text{B}$ :  $I = 3$ , n.a. 20%,  $^{10}\text{B}$ :  $I = 3/2$ , n.a. 80%  
H NMR è quartetto 1:1:1:1 ( $^{11}\text{B}$ ) più settopletto per  $^{10}\text{B}$



genere il campo magnetico indotto è circa  $10^{-4}$  volte il campo esterno: piccolo quindi, ma sufficiente a causare spostamenti osservabili delle frequenze precessionali.

**Frequenze vs ppm**

La posizione del segnale nello spettro non viene data in termini di frequenza  $\nu$  ma

- Come spostamento rispetto alla frequenza di una sostanza di riferimento  $\nu_{ref}$
- Normalizzata rispetto alla frequenza operativa  $\nu_0$
- In ppm (chemical shift e non frequenze sull'asse x!)

Per due ragioni principali: 1)  $\nu$  dipende da  $B_0$  2) Le differenze tra le frequenze di risonanza della specie di interesse e il riferimento sono piccolissime, sulla scala degli Hz e non dei MHz!

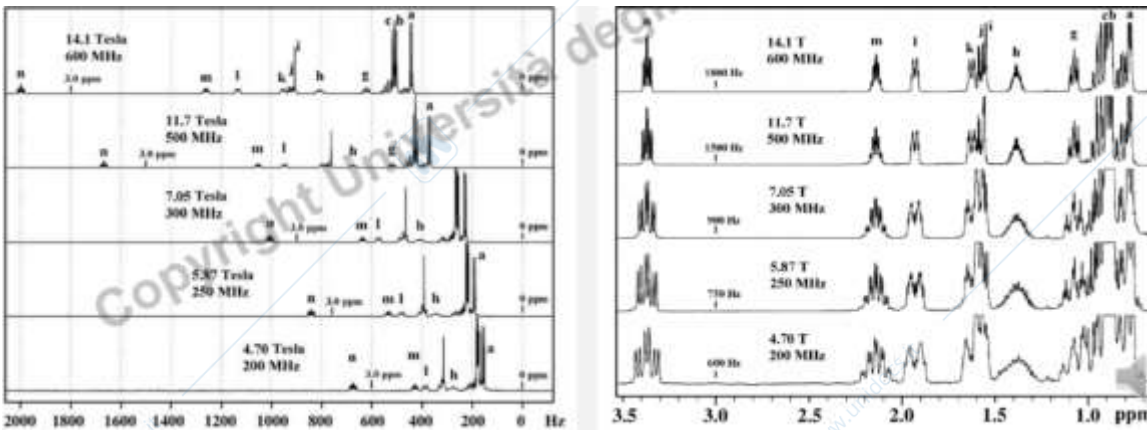
$$\delta = \frac{\nu - \nu_{ref}}{\nu_0} \cdot 10^6$$

La differenza nelle frequenze è molto piccola (Hz)

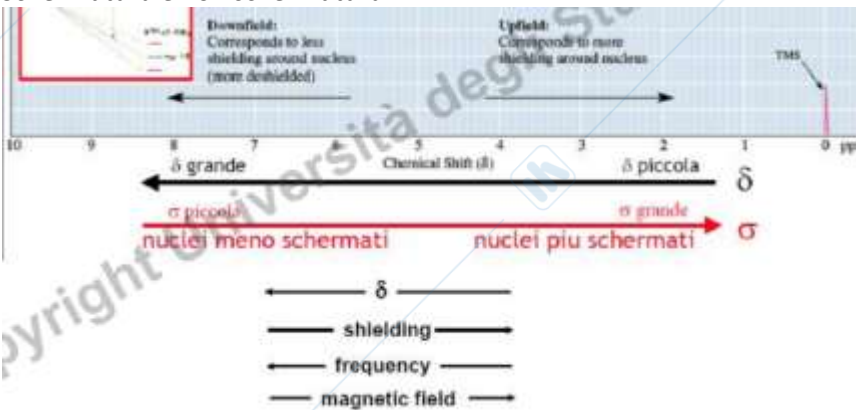
La frequenza di Larmor di un certo isotopo è in MHz

$$\delta(\text{ppm}) = 10^6 (\sigma_{ref} - \sigma)$$

I chemical shift sono indipendenti dal campo poiché sia  $\nu$  che  $\nu_{ref}$  aumenteranno egualmente in campi più forti. Tuttavia, le costanti di accoppiamento rappresentano splitting energetici che non dipendono dall'intensità del campo esterno. Ciò significa che con intensità di campo più elevate, le frequenze si estendono su un intervallo più ampio. Poiché invece le costanti di accoppiamento rimangono fisse, i multipletti sembrano più stretti in termini di spostamento chimico.



**Schermatura e non schermatura**



Se il nucleo è schermato allora il campo magnetico aggiuntivo si va a sommare a quello esterno, per nuclei non schermati vale il contrario.

$\tau$  era uguale a  $(10 \text{ ppm} - \delta)$  e la scala cresceva andando a destra. Ciò non è più corretto ai giorni nostri, e nel tempo ha causato una considerevole confusione.

Non ha più senso parlare di campi bassi o alti perché non si lavora più con strumenti a corrente continua. Quindi la scala cresceva andando da sx a dx.

I contributi alla costante di schermo e dunque al chemical shift

Lo schermo magnetico di un nucleo è per lo più dato dal guscio elettronico. L'effetto è spiegato assumendo che il campo magnetico  $B_0$  induce una corrente elettronica nel guscio di elettroni. Ciò produce in genere un campo opposto centrato sul nucleo che riduce il  $B_0$  effettivo. La costante di schermo dipende dall'elemento chimico preso in considerazione e dalle interazioni con i suoi vicini.

Le correnti indotte sono proporzionali al campo magnetico applicato  $B_0$ . Vi sono vari contributi a tali correnti indotte che si sommano tra loro:  $\sigma = \sigma_{diam} + \sigma_{para} + \sigma_{anis} + \sigma_{solv}$

**$\sigma_{diam}$**

**SHIFT DIAMAGNETICI:** Se consideriamo gli elettroni s in una molecola sappiamo che hanno simmetria sferica e che si muovono circolarmente nel campo magnetico applicato, producendo così un campo magnetico che si oppone (legge di Lenz) al campo applicato stesso. L'importanza pratica di questo termine alla costante di schermo globale è molto limitata poiché nelle molecole la distribuzione di carica non è mai sferica.

**$\sigma_{para}$**

**SHIFT PARAMAGNETICI:** gli elettroni p, d, f in una molecola non hanno simmetria sferica e danno luogo a campi magnetici più intensi (relativamente al nucleo interessato) originando uno spostamento a frequenze maggiori ("spostamento a campi bassi"). Questo "deshielding" viene detto shift paramagnetico. Non dipende dalla densità elettronica. Nella risonanza protonica  $^1H$  gli orbitali p ovviamente non hanno alcun ruolo ed è per questo motivo che si osserva solo un piccolo range di chemical shift (in genere 10-15 ppm per composti organici) Per gli eteronuclei la situazione è completamente diversa.

$$\sigma = \sigma_{diam} + \sigma_{param} + \sigma_{anis} + \sigma_{solv}$$

$\sigma_{diam}$   
 $\sigma_{param}$

**importante per eteronuclei**

$$\sigma_{para} \propto \frac{r^{-3}}{\Delta E}$$

$\Delta E$  è la differenza di energia HOMO/LUMO

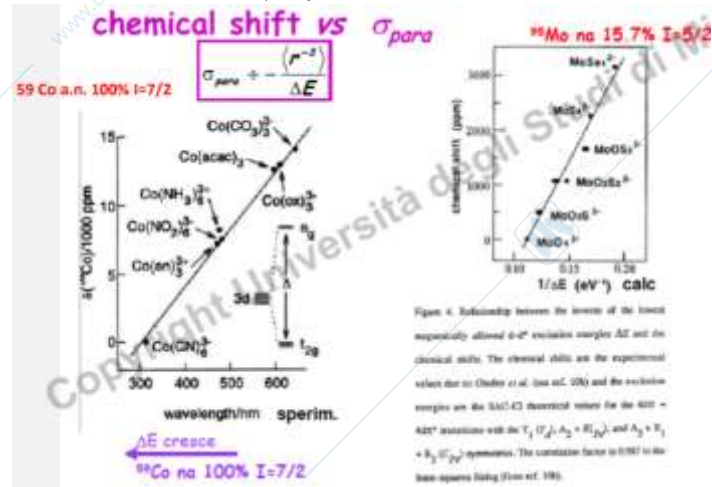
determina l'intervallo di chemical shift osservati per un certo isotopo

- $^1H$ : -10 ppm
- $^{13}C$ : -200 ppm
- $^{19}F$ : -300 ppm
- $^{31}P$ : -500 ppm

Per i protoni in genere i termini importanti che determinano il chemical shift sono il diamagnetico e l'anisotropia (cioè l'effetto dovuto agli atomi vicini)

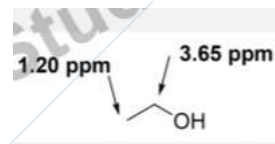
Per gli eteronuclei il contributo maggiore deriva dal termine paramagnetico.

**CHEMICAL SHIFT vs.  $\sigma_{para}$  per  $^{59}Co$  e  $^{95}Mo$**

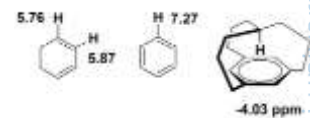


Sostituenti elettronegativi riducono  $\sigma_{para}$   
 Sostituenti elettropositivi aumentano  $\sigma_{para}$

**Chemical shift del protone: cosa c'è ancora da dire?** La riduzione del campo sentito quando viene indotto un campo locale che va sottrarsi a quello esterno è in accordo con la legge di Lenz e abbiamo detto viene chiamato shielding DIAMAGNETICO. Questo termine dipende da quanta densità elettronica è presente. Ad esempio se consideriamo l'etanolo in cloroformio: Queste giaciture ci piacciono perché i protoni del CH<sub>2</sub> più elettron-poveri vista la maggiore influenza del gruppo elettroneattrattore OH.  $\diamond$  I CH<sub>2</sub> sono meno schermati (o più deschermati) rispetto al gruppo metilico.



MA LA DENSITA' ELETTRONICA NON BASTA A SPIEGARE ALCUNI SPOSTAMENTI CHIMICI. In alcuni casi l'ANISOTROPIA MAGNETICA ( $\sigma_{\text{aniso}}$ ) porta a effetti di deshielding particolarmente forti come ad esempio il caso famosissimo dell'anello benzenico. Secondo il seguente schema ci si aspetta che i protoni periferici siano deschermati ma che i protoni che cadano sopra e sotto il centro dell'anello siano schermati, che è proprio quello che succede!



### $\sigma_{\text{aniso}}$

I termini  $\sigma_{\text{dia}}$  e  $\sigma_{\text{para}}$  non sono sufficienti per spiegare degli shift di molti segnali in svariate molecole. Devono essere considerati altri termini come ad esempio gli effetti indotti dall'anisotropia dei gruppi vicini. La coordinazione ad un metallo ancor di più può indurre delle variazioni importanti di chemical shift.

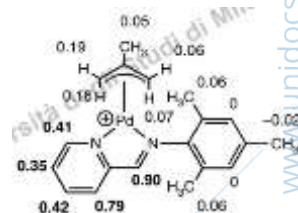


Può accadere che H legati a L finiscano nel cono di schermo o deschermo del gruppo piridinico (o legante adiacente aromatico)



Hc', He, e Hk non risuonano dove ci aspetteremmo (2-3 ppm) a causa della rigidità strutturale di questa molecola. Infatti il cono di schermo di un anello fenilico va a **schermare** in modo significativo la giacitura dei segnali dei protoni Hc', He ed Hk. Ciò è stato provato anche con la struttura a raggi x della molecola: lì si vede che il legante fosfinico va ad avvicinarsi intimamente alla parte alifatica di questa struttura dando un effetto anisotropo locale molto spiccato.

Il chemical shift può essere influenzato anche dalla presenza di controioni dotati di anelli aromatici o meno. In questo esempio viene riportato il  $\Delta\delta$  dello stesso catione con due diversi controanioni: PF<sub>6</sub><sup>-</sup> e B(Ph)<sub>4</sub><sup>-</sup> in cui c'è una significativa formazione di una coppia ionica stretta tra catione e anione data dalla presenza degli anelli fenilici che danno anisotropia.



Un classico esempio di effetto anisotropico è quello dei composti Fe-porfirinici che inducono degli shift a bassissime frequenze dei protoni che vengono a localizzarsi sopra e sotto al piano porfirinico.

### Composti idrurici

Per molto tempo non si è razionalizzato davvero il motivo per cui i segnali idrurici cadevano a chemical shift così negativi. La spiegazione, confermata da conti DFT, **sta nel contributo alla costante di schermo anche del termine paramagnetico**, sebbene si tratti di un atomo di idrogeno! **Di fatto il metallo adiacente all'idruro ha delle correnti ad anello che sono così forti da indurre una schermatura molto pesante**. La variazione nel valore negativo del chemical shift dipende molto dalla struttura del complesso e dal contributo paramagnetico allo shielding.

### Idruri a ponte

l'accoppiamento H-P è efficace solo con la fosfina in trans, mentre con quella in cis la J è troppo piccola per essere risolta!

**Chemical shift di protoni arenici- $\eta^6$  e olefinici- $\eta^2$ ,  $\eta^4$**

A causa della coordinazione che implica un certo grado di retrodonazione da parte del metallo, i chemical shifts, che usualmente per anelli aromatici si trovano a ppm >7, li troviamo tra 4 e 6 ppm, mentre le olefine le troviamo shiftate tra 0 e 5 ppm.

**NMR DEGLI ATOMI piÙ PESANTI: il  $^{13}C$**

In genere per i composti organici il range del  $^{13}C$  è compreso tra 0 e 250 ppm: Composti carbonilici = 150/220 ppm Specie olefiniche e aromatiche = 110/160 ppm Composti acetilenici = 60/90 ppm Segnali alifatici = 0/90 ppm. Quando complessati a metalli di transizione questi range cambiano drasticamente e il range totale si espande a -50/400. Cio è dovuto principalmente al termine paramagnetico.

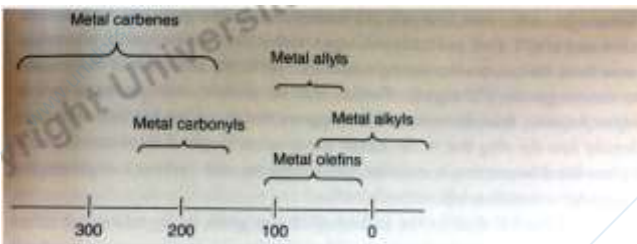
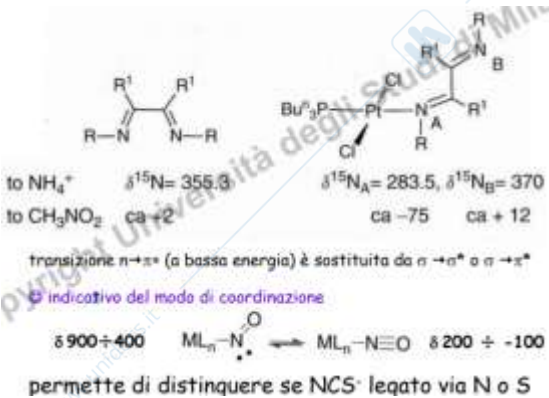


Figure 6.6 Approximate  $^{13}C$  chemical shifts ranges for selected transition metal complexes.

**$^{15}N$ : isotopo difficile ma interessante dal punto di vista degli studi di complessazione**



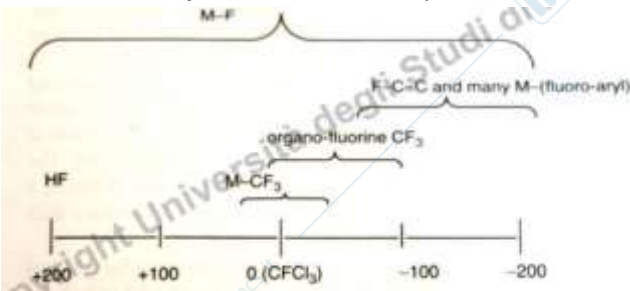
$^{15}N$  è un isotopo difficile dal punto di vista della sensibilità ma ci sono degli esperimenti che possono essere condotti e che mirano a < il detection limit per poter rilevare il segnale dell' $^{15}N$ . Di solito si fanno degli esperimenti in cui si ha un trasferimento di magnetizzazione da un nucleo sensibile (es. H legato all' $N$ ) al nucleo poco sensibile > la sua sensibilità. Così si può ottenere i segnali in qualche ora e non in giorni/settimane.

Un altro problema è che N ha un gamma negativo. Storicamente si sono usati come riferimento l' $NH_3$  acquosa

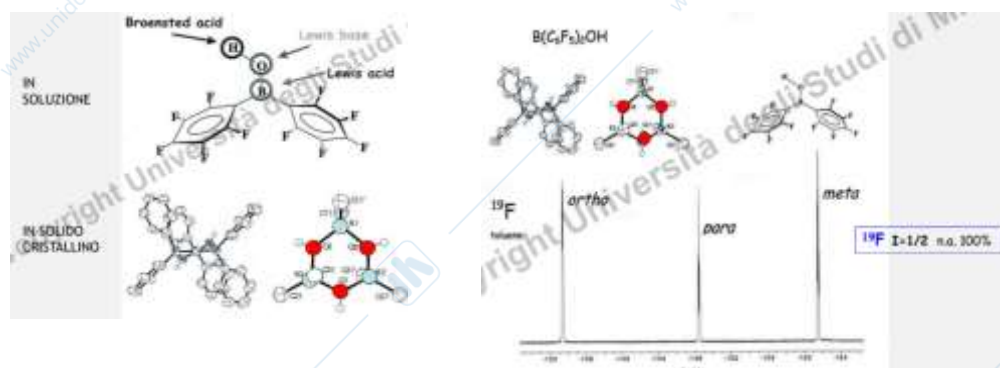
e il  $CH_3NO_2$  quindi devo sapere se mi riferisco ad uno o all'altro perche cadono in regioni molto diverse.

Una volta che coordino usando il doppietto elettronico il salto HOMO-LUMO > e quindi le ppm diminuiscono. Infine posso capire dal chemical shift dell N se esso è legato bent o lineare.

**$^{19}F$  Chemical Shifts (abb nat 100%, spin  $1/2$ )**



Riferimento è il  $CFCl_3$ .

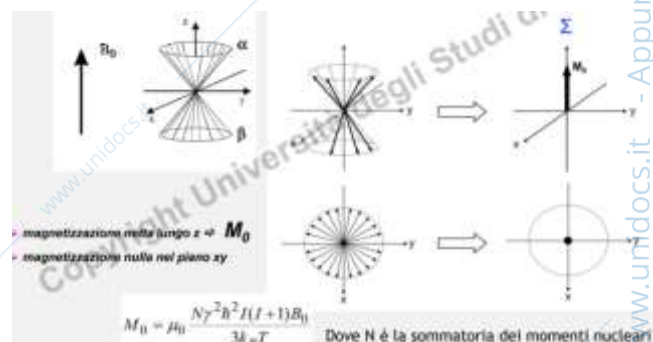


Esempio: lo spettro NMR ci dice che tutto è molto mobile e quindi non c'è una conformazione fissa ma abbiamo dei segnali mediati che non distinguono né un anello perfluorurato dall'altro né una parte dell'anello dall'altra. Questi segnali sono compatibili sia con l'opzione che la specie sia monomerica sia trimerica (il B nei trimeri è però tetraedrico mentre nei monomeri trigonale planare). Noto che c'è un grande spread tra i segnali orto, meta e para: posso ben percepire con questa sensibilità delle variazioni piccole nell'intorno; più l'anisotropia di chemical shift è grande e maggiore sarà la capacità di quell'isotopo specifico di rilevare delle piccole variazioni strutturali. Infatti i segnali di arili degli arili orto, para e meta sono molto spazati fra loro mentre per esempio nel protone i segnali degli arili sono molto vicini fra loro.

Per avere più info sulla struttura della specie potrei fare lo spettro del  $^{11}\text{B}$  poiché a seconda che sia mono o tri coordinato il chemical shift varia molto. Da ciò si è visto che la specie è monomerica in toluene visto che il segnale del B cade a ca. 42 ppm, se fosse stato trimero sarebbe caduto a ca. 5 ppm. Se cambio solvente però la situazione si complica: quando lo stesso acido borinico perfluorurato viene sciolto in un altro solvente (cloruro di metilene vs toluene) lo spettro presenta due set di segnali!! Ci sono due specie ora! Ma quali?? Rifaccio lo spettro del  $^{11}\text{B}$  che dandomi due segnali mi dice che il cloruro di metilene anidro ha una miscela di monomero e trimero.

### Il modello vettoriale

Esso prevede di indicare gli stati alfa e beta come dei vettori che sono disposti su dei coni che sono allineati a  $180^\circ$  rispetto al campo magnetico applicato. Nell'immagine gli stati alfa eccedono di poco i beta e quindi se facciamo la somma vettoriale di questi alfa e beta otterremo quella che viene chiamata magnetizzazione totale  $\Sigma$ . Quindi il modello vettoriale prevede di considerare innanzitutto una magnetizzazione netta lungo  $z = M_0$  e che all'equilibrio prevederà una magnetizzazione nulla nel piano  $xy$ .

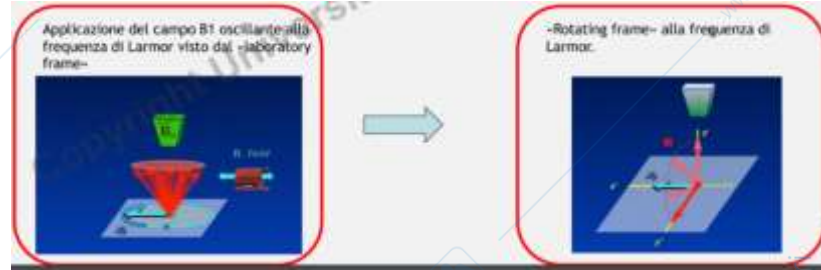


Cosa succede alla magnetizzazione totale quando vi è una magnetizzazione a  $90^\circ$ ? Quello che succederà all'insieme dei vettorini sarà quello di raccogliere tutti i vettorini come se fossero attratti da una magnetite che viene posta lungo  $+y$  sotto l'influenza di questa radiazione oscillante  $B_1$  si ha una coerenza di fase = i vettori si concentreranno da una parte del cono.

Dopo l'impulso a  $90^\circ$ , la magnetizzazione che continua a ruotare alla sua frequenza di Larmor nel piano  $x-y$ , si rilasserà e tornerà lungo  $z$  in un certo tempo, tracciando un movimento a spirale. Questo movimento è molto complesso da descrivere, perché istante per istante la posizione del vettore magnetizzazione deve essere descritto dalle tre coordinate cartesiane.

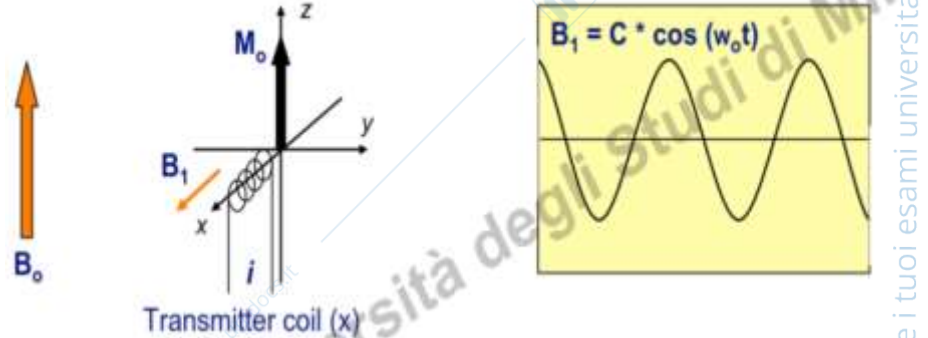
Perché preoccuparsi del rotating frame? Se limitassimo la nostra discussione alla semplice precessione di  $M$  attorno a  $B_0$  in realtà non ci servirebbe a molto. Tuttavia, quando iniziamo a considerare gli effetti di altri campi magnetici (come  $B_1$ ) o i cambiamenti dinamici di fase o ampiezza della magnetizzazione (come con il rilassamento  $T_1$  o  $T_2$ ), a quel punto il movimento di  $M$  diventa molto complicato se visto solo dal sistema di

riferimento del laboratorio. In questi casi la prospettiva del sistema di riferimento rotante diventerà essenziale per rendere comprensibile il movimento complesso di M.

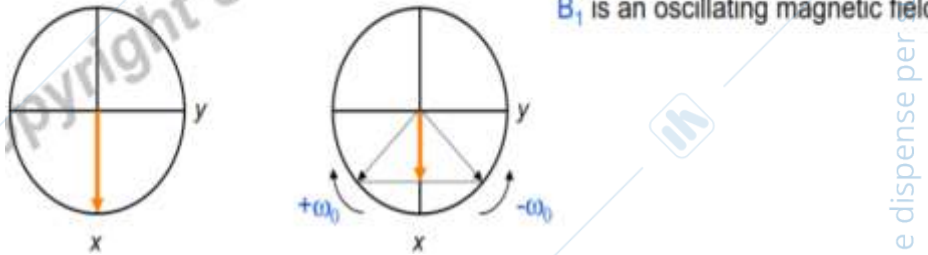


**La radiofrequenza o campo B1: l'eccitazione NMR**

Il campo oscillante lo possiamo vedere lungo l'asse x. Il campo B1 di radiofrequenza alternante lungo l'asse x è rappresentato come due vettori di uguale B1, che ruotano nel piano xy con frequenza  $\nu_1 = \nu_L$  ma in direzioni opposte. Di queste due solo quella che ruota nello stesso verso della magnetizzazione può interagire con essa ed essere quindi assorbita.



1) L'effetto del campo esterno B0 scompare. Nel Sistema di rif rotante la precessione di M (e quella degli spin individuali attorno a B0 non si verifica più. Tutto è "congelato" sul posto come se B0 non esistesse più.



2) Il campo B1 non è più rotante ma appare statico. B1 è bloccato in una posizione fissa rispetto al Sistema rotante

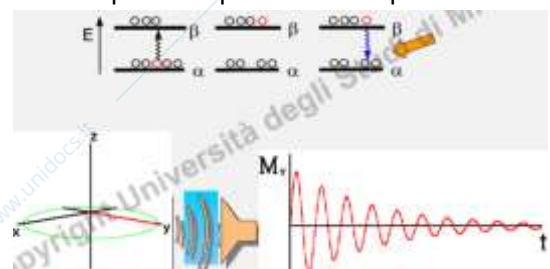
**Perchè dobbiamo preoccuparci del rilassamento?**

NMR tecnica a bassa sensibilità, una scansione non basta (a meno che registri uno spettro protonico o uno spettro molto [ ]), dobbiamo ripristinare la magnetizzazione Mz prima di un ulteriore impulso e quindi poi una nuova scansione.

Dopo che la magnetizzazione avrà interagito con l'impulso di radiofrequenza B1, tornerà all'equilibrio e lo potrà fare seguendo due tempi di riferimento diversi

- possiamo innanzitutto verificare se la magnetizzazione una volta portata da lungo z nel piano xy, persista nel piano xy per un po' di tempo in modo tale che tutti i magnetini che la compongono rimangano in fase fra di loro.
- Il ritorno lungo l'asse z sarà il tempo T1 e il tempo in cui la magnetizzazione nel piano xy si annulla si chiama T2

Il ritorno all'equilibrio dopo la perturbazione può essere descritto in due modi: il primo è quello classico per cui si indica sui due piani energetici il ritorno della popolazione che è stata eccitata allo stato di partenza; oppure si può andare a misurare in quanto tempo, una volta che è stata tiltata nel piano xy, va a cambiare di intensità in funzione del tempo. Si forma così il free induction decay che è quello con la linea ondulata rossa nell'immagine.



La scarsa sensibilità determina la necessità di accumulare più scansioni e i tempi di rilassamento devono essere rispettati.

**Ritorno all'equilibrio di Mz**

**Ritorno all'equilibrio di Mxy**

$\frac{dM_y}{dt} = -k_2(M_y)$   $k_2$  costante di velocità ( $s^{-1}$ )  $\rightarrow R_2$   $\frac{dM_y}{dt} = -R_2(M_y)$

$M_y = M_{xy} e^{-R_2 t}$

$R_2$  velocità di rilassamento trasversale  
 $T_2 = (R_2)^{-1}$  tempo di rilassamento trasversale

**Perché dobbiamo preoccuparci del rilassamento?**

Relassamento: non avviene per emissione

Eccitazione  $\rightarrow$  Campo magnetico  $B_1$  applicato nel piano xy fluttuante alla frequenza di Larmor.

Relassamento  $\rightarrow$  un campo magnetico fluttuante alla frequenza di Larmor può indurre il rilassamento.

**Da dove arrivano le rf necessarie alle transizioni?**

Uno spin risente di campi magnetici locali  $B_1$  dati, ad es., da altri spin presenti nelle vicinanze (interazione tra dipoli magnetici)

la cui intensità dipende dall'orientazione della molecola nel campo magnetico

Il moto molecolare rende  $B_1$  oscillante nel tempo.

Il rilassamento dipende

- Dal fattore che genera il campo magnetico locale  $B_1$
- Dalla velocità del moto molecolare

Le componenti del campo locale che fluttuano nel piano xy permettono il rilassamento della magnetizzazione longitudinale. Le componenti del campo locale che fluttuano nei piani x'z o y'z permettono il rilassamento della magnetizzazione trasversale ( $Mx'$  o  $My'$ ).

La componente BLz si somma al campo esterno B0 provocandone delle variazioni (= influenza la larghezza di riga, ma non scambia energia).

**In condizioni ideali in liquidi isotropi**

ma in realtà  $R_1 \leq R_2$   $T_1 \geq T_2$

$\Delta \nu_{1/2} = (\pi T_2)^{-1}$

Se non ci fossero le disomogeneità di campo!!

Dall'altezza di riga a metà altezza potresti determinare il T2 ma poi non ci si riesce a causa delle disomogeneità di campo. Con T2 corti indicano un rilassamento veloce e determineranno un allargamento della banda e un andamento a zero del feed rispetto ad una situazione in cui il T2 è più lungo e quindi da un rilassamento più lento e con minor allargamento di banda e un andamento del feed che persiste di più nel tempo.

**Perché Dobbiamo Preoccuparci Del Rilassamento?**

- per avere intensità corrette
- per la calibrazione degli impulsi
- integrazioni affidabili
- per impostare correttamente esperimenti più complessi
- per avere informazioni strutturali

Dopo un tempo  $t$ , che percentuale della magnetizzazione è tornata lungo  $z$ ? che percentuale è ancora nel piano  $xy$ ?

dopo un tempo  $t = T_1 = T_2 \rightarrow$  che percentuale della magnetizzazione è tornata lungo  $z$ ?

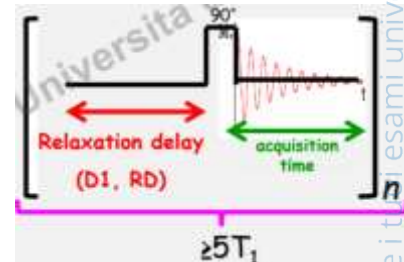
$M_z = M_\infty(1 - \exp(-t/T_1)) = M_\infty(1 - e^{-1}) = M_\infty(1 - 0.37) = 0.63 M_\infty$  quindi al tempo  $T_1$  la magnetizzazione lungo  $z$  è solo del 63%

che percentuale è ancora nel piano  $xy$ ?  $M_y = M_\infty \exp(-t/T_2) = M_\infty(e^{-1}) = 0.37 M_\infty$

Se sostituissi i valori mettendo 5 volte  $T_1$  quindi  $>$  i tempi di rilassamento vedrei che il recovery arriverebbe al 99%.

Quindi dobbiamo assicurarci che il delay affinché  $T_1$  sia completamente rilassato sia abbastanza lungo. Anche il tempo di acquisizione può essere lungo (anche se qualche secondo) e bisogna tenerne conto. La somma del relaxation delay (prima di dare l'ennesima scansione) e il tempo di acquisizione dà il tempo che noi lasciamo la nostra magnetizzazione per tornare lungo  $z$ .

Quindi riassunto all'inizio avremo l'allineamento della magnetizzazione con il campo  $B_0$  da cui si ha il primo impulso (indicato come un rettangolo) e registriamo il nostro feed e durante il nostro acquisition time abbiamo il ritorno a zero della magnetizzazione; prima di fare l'altro impulso lasciamo che ci sia il relaxation delay e poi diamo un altro impulso a  $90^\circ$  e ricominciamo.



Se  $D_1$  è troppo corto ( $D_1 = \text{relaxation delay} + \text{acquisition time}$ ) e quindi non diamo tempo ai H aromatici di rilassarsi, si ottiene un valore di integrazione dei CH alifatici sfalsato. Es di molecola in cui ho tre H aromatici e 3 gruppi  $CH_2$  che inizialmente vengono visti come se avessero 3H invece che 2. Quando poi  $>$  il tempo di rilassamento, ottengo il giusto valore di integrazione.

*La durata dell'impulso e l'angolo di tilting (inclinazione)*

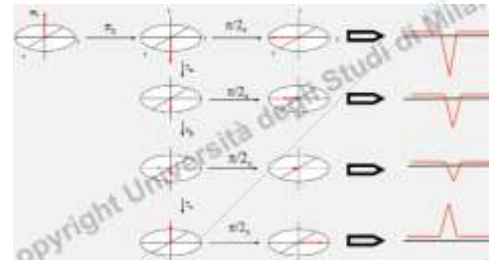
La durata dell'impulso  $t_p$  determina l'angolo di rotazione della magnetizzazione e applicare il campo  $B_1$  per un tempo di durata inferiore a quella per il  $90^\circ$  porta sul piano  $xy$  solo parte della magnetizzazione.

Come possiamo misurare  $T_1$  e  $T_2$ ? Con una serie di esperimenti con sequenze di impulsi.  $T_1$ : sequenza di inversion recovery  $T_2$ : sequenza di spin echo.

Nella sequenza di inversion recovery si ha un primo impulso a  $180^\circ$  seguito da uno a  $90^\circ$ . A separare i due impulsi c'è un tempo/delay che viene detto "tempo di evoluzione" e prima dell'impulso a  $180^\circ$  abbiamo un tempo di rilassamento per fare sì che la magnetizzazione vada a zero. Di solito durante il relaxation delay torniamo ad avere tutta la magnetizzazione che è allineata con  $+z$ , quando poi diamo l'impulso a  $180^\circ$  avremo un'inversione della magnetizzazione lungo  $-z$ . La magnetizzazione tenterà di tornare lungo  $+z$  e per questo dopo un certo tempo  $\tau$  avremo che la magnetizzazione lungo  $-z$  si è accorciata. Se a questo punto il vettore che indica la magnetizzazione è ancora rivolto verso  $-z$  e io do un impulso a  $90^\circ$  lungo  $x$ , quello che succede (per la regola della mano destra) è che il vettore si metterà lungo  $-y$ . A questo punto accendo il ricevitore e acquisisco il mio feed. Questa sequenza la possiamo fare per un qualsiasi intervallo di tempo  $\tau$  e proprio in questo sta l'esperimento di Inversion Recovery cioè di ripetere questa sequenza per  $n$  esperimenti. In genere si ripete la sequenza per 16 esperimenti variando  $\tau$ .

Se quindi inizio la mia sequenza dando un tempo piccolissimo  $\tau$  dopo che ho dato un impulso che porta la magnetizzazione su  $-z$ , allora avrò che tutta la magnetizzazione sarà trasferita su  $-y$ . Man mano che  $>$   $\tau$  posso

arrivare al momento in cui tutta la magnetizzazione si è messa lungo +z e quindi poi dando l'impulso a 90° la magnetizzazione si tilterà verso +y.



Alla fine elaboro i dati ottenendo un grafico esponenziale (per ogni segnale si costruisce una curva intensità vs tempo). Si può ricavare la funzione che descrive il ritorno all'equilibrio della magnetizzazione in un esperimento di Inversion Recovery.

$$\frac{M(t) - M(\infty)}{M(0) - M(\infty)} = \exp(-R_1 t)$$
 Magnetizzazione dopo la perturbazione a 180°  $M(0) = -M(\infty)$ 

$$\frac{M(t) - M(\infty)}{-M(\infty) - M(\infty)} = \exp(-R_1 t)$$

$$\frac{M(t) - M(\infty)}{-2M(\infty)} = \exp(-R_1 t)$$

$$M(t) = M(\infty) - 2M(\infty)\exp(-R_1 t) = M(\infty)(1 - 2\exp(-R_1 t))$$

$$M_z(t) = M_\infty (1 - 2 \exp(-t/T_1))$$

$$M_z(t) = M_\infty (1 - 2 \exp(-R_1 t))$$

 fitting non lineare dei dati sperimentali secondo la funzione in cui si ottimizzano 3 parametri
 
$$M_z(t) = A(1 - B \exp(-Ct))$$

$$C \equiv R_1$$
 oppure linearizzando
 
$$M_\infty - M_z(t) = 2 M_\infty \exp(-R_1 t)$$

$$\ln(M_\infty - M_z(t)) = \ln(2 M_\infty) - R_1 t$$

$$\ln(M_\infty - M_z(t)) \text{ vs } t \text{ è una retta con pendenza } -R_1$$

esiste un valore di  $\tau$  per cui  $M_z(t)$  si annulla:  $[\tau_{null}]$ 

$$\ln(M_\infty - M_z(t)) = \ln(2 M_\infty) - R_1 t$$

$$\ln(M_\infty) = \ln(2 M_\infty) - R_1 \tau_{null}$$

$$R_1 \tau_{null} = \ln 2$$

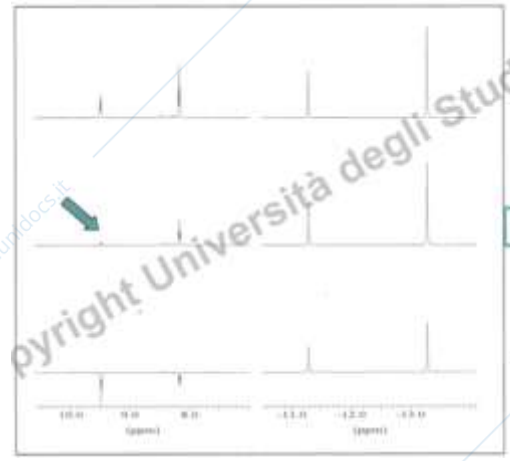
$$R_1 = \ln 2 / \tau_{null} \text{ ovvero } T_1 \approx \frac{\tau_{null}}{\ln 2}$$

$\tau_{null}$  è il valore di  $\tau$  per cui la magnetizzazione si annulla.

Il valore di  $\tau_{null}$  può essere utile per una stima veloce del  $T_1$ .

Se  $\tau$  è troppo corto accade che in una molecola

con protoni idrurici e altri aromatici quelli idrurici recuperano quasi tutta la loro intensità all'equilibrio e questo perché hanno tempi di rilassamento corti. Gli aromatici invece hanno tempi di rilassamento maggiori e quindi hanno bisogno che  $\tau$  sia sufficientemente lungo per dare innanzitutto inversione e poi anche per recuperare la loro intensità. Nell'immagine, il segnale indicato con la freccia indica il valore di  $\tau_{null}$  per un protone aromatico.



**Definizione di T2**

E' la costante di tempo per il decadimento della magnetizzazione trasversale ( $M_{xy}$ ) dopo un impulso di radiofrequenza. Sinonimi: rilassamento trasversale, rilassamento spin-spin.

Quindi durante questo tempo si ha quella che viene chiamata perdita di coerenza nel piano xy dovuta • all'interazione con i campi locali fluttuanti che sono dovuti principalmente ai moti molecolari ( $B_{Lz}$ ) • alle disomogeneità del campo  $B_0$  nel campione.

$T_2$  è dovuto alle piccole differenze di campo magnetico locale che determinano una piccola differenza nella frequenza di precessione degli spin, che porta alla fine ad un totale defasamento della magnetizzazione nel piano xy. → La larghezza di riga non ci dà immediatamente il  $T_2$

## Cause dell'allargamento di riga nei segnali NMR

1) I segnali NMR sono larghi almeno tanto quanto specificato dal principio di indeterminazione di Heisenberg a causa del tempo di vita degli stati di spin, ma la reale larghezza è spesso governata dal T2 :

$$\Delta\nu_{1/2} = \frac{1}{\pi T_2^*} \quad \frac{1}{T_2^*} = \frac{\gamma \Delta B_0}{2} + \frac{1}{T_2}$$

Il rilassamento T2 è causato da campi magnetici transienti (di solito provocati dai moti molecolari) a qualsiasi frequenza. Il T2 si accorcia sempre più a mano a mano che le velocità di riorientamento rallentano. Altre cause del rilassamento T2 :

- Scambio chimico o interconversione conformazionale che portano alla mediazione dei chemical shift e alla mediazione delle costanti di accoppiamento.
- Interazione con nuclei quadrupolari vicini
- Presenza di specie paramagnetiche (ossigeno molecolare!!). esse possono accorciare molto i tempi di rilassamento, sono nefaste

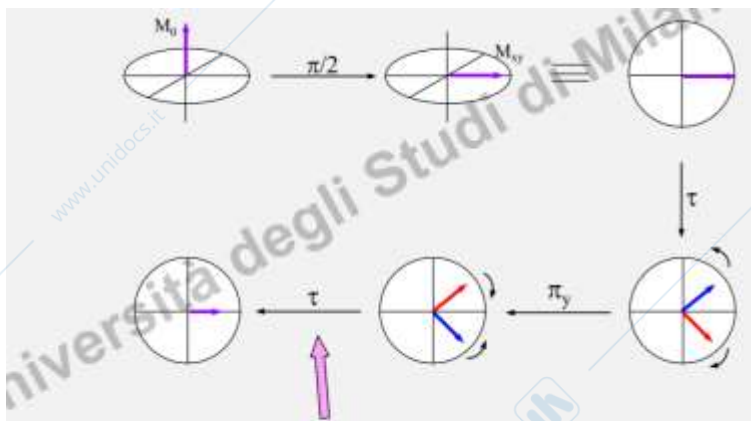
2) Problemi strumentali che contribuiscono molto al termine di disomogeneità magnetica (1/T2\*):

- Tuning
- tubo NMR di scarsa qualità (es. tubi usa e getta). Più costa il tubo migliore lui sarà soprattutto a campi alti
- shimming scadente = regolazione della risoluzione
- gradienti di temperatura (ci potrebbero essere tra il punto più alto, medio e basso del campione nel tubo)

3) Problemi del campione:

Disomogeneità del campione (campione mal mescolato – gradienti di concentrazione-, presenza di corpo di fondo)

Come faccio a misurare il T2? Sequenza di Spin-Echo (Hahn)



$$M(t) = M(\infty) \exp(-2\tau R_2) = M(\infty) \exp(-2\tau / T_2)$$

Vi è un primo impulso a 90° (=  $\pi/2$ ), seguito da un intervallo di tempo  $\tau$  con poi un altro impulso a 180° seguito da un altro tempo  $\tau$ .

Il tempo di echo (TE) è definito come il tempo tra il 90° e il completamento del rifasamento, quindi è pari a  $2\tau$

A cosa serve misurare il T2?

E' importante per programmare:

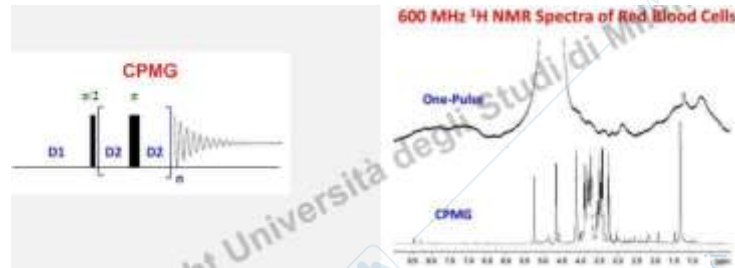
- 1) esperimenti NMR di dinamica;
- 2) indagini di spin diffusion

3) escogitare nuove sequenze di impulso visto che i periodi di evoluzione non devono eccedere significativamente il T2

Utilizzo della sequenza CPMG per sopprimere bande larghe ed aumentare la risoluzione di componenti piccole

In questo confronto sono riportati due spettri di un campione di globuli rossi, in alto riportato lo spettro registrato con un 90° semplice, mentre in basso con la sequenza CPMG. Chiaramente, lo spettro in alto mostra molti pochi dettagli ed è dominato dal picco fuori scala dell'acqua. In basso invece è riportato lo

spettro CPMG ottenuto dopo 350 eco utilizzando un tempo di eco ( $2\tau = 640 \mu\text{sec}$ ). Si può chiaramente vedere la soppressione di tutti i segnali larghi (compreso quello dell'acqua) con T2 corti, lasciando uno spettro incredibilmente dettagliato e ad alta risoluzione dei composti solubili sciolti nella componente liquida dei globuli rossi (amminoacidi, zuccheri etc...)



### Densità spettrale e meccanismi di rilassamento

#### Che cosa genera i campi magnetici fluttuanti utili per il rilassamento?

Il rilassamento dello spin nucleare non è un processo spontaneo. Abbiamo bisogno di indurre campi fluttuanti.  $B_L(t)$  sono generati da diversi meccanismi fisici di interazione con altre particelle dotate di momento magnetico presenti nel campione (atomi, elettroni). Queste interazioni costituiscono i meccanismi di rilassamento.

**Da cosa dipende la velocità di rilassamento?** La velocità di rilassamento è legata alla probabilità  $W_{\alpha\beta}$  con cui questi campi possono far avvenire le transizioni tra i due stati  $\alpha$  e  $\beta$ .

La probabilità della transizione  $\alpha \leftrightarrow \beta$   $W_{\alpha\beta}$  dipende da 1) efficacia del meccanismo di rilassamento 2) densità spettrale, funzione che descrive il matching tra la frequenza della fluttuazione del campo magnetico locale e quella che serve per il rilassamento  $\rightarrow W_{\alpha\beta} = K J(\omega_{\alpha\beta})$

$J(\omega_{\alpha\beta})$ : La densità spettrale

$$J(\omega_{\alpha\beta}) = \frac{2\tau_c}{1 + \omega_{\alpha\beta}^2 \tau_c^2}$$

$\tau_c$  tempo di correlazione

$\tau_c$  tempo necessario affinché la molecola approssimabile ad una sfera in soluzione si riorienta di un radiante (ca  $57^\circ = 180/\pi$ ) ( $10^{-12}$ - $10^{-11}$  s molecole piccole-  $10^{-8}$ - $10^{-7}$  s proteine/polimeri)

$\omega_{\alpha\beta}$  frequenza (frequenze) della transizione che deve rilassare, dipende dal campo  $B_0$  e dal  $\gamma$  del nucleo osservato

Il requisito fondamentale per il rilassamento longitudinale è la presenza di un campo magnetico fluttuante tempo dipendente alla  $\nu_L$  in grado di far avvenire un cambio dello stato di spin. I campi magnetici locali derivano dal movimento delle molecole. Una misura del movimento molecolare è espresso dal tempo di correlazione  $\tau_c$  che rappresenta il tempo medio impiegato da una molecola per riorientarsi.  $\tau_c$  brevi indicano molecole in rapido movimento.

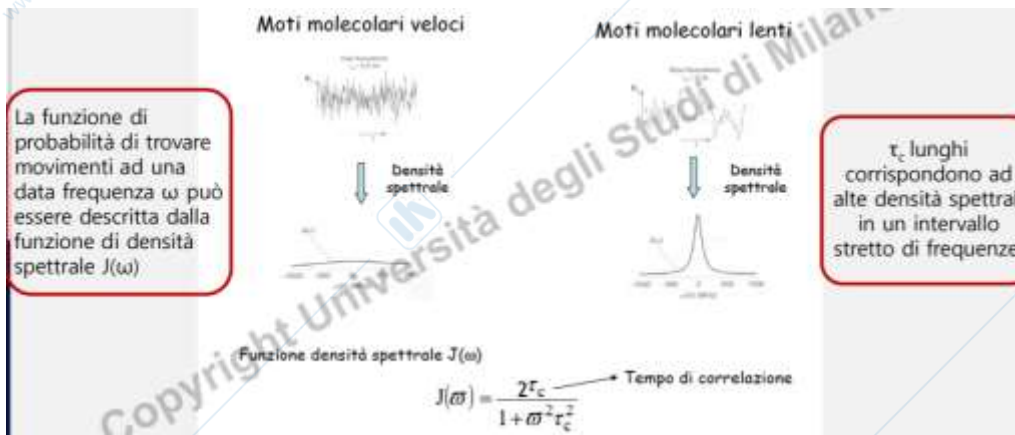
Come regola empirica utilizzata dai chimici, il tempo di correlazione rotazionale (in nanosecondi) di una molecola in soluzione acquosa a temperatura ambiente è circa la metà del suo peso molecolare (in kilodalton).  
Es: polimero da 10 kDa avrà un  $\tau_c$  di ca 5 ns, una molecola come l'acqua (18 Da =  $1.8 \times 10^{-2}$  kDa) avrà un  $\tau_c$  di ca 0.009 ns.

#### Che cosa genera i campi magnetici fluttuanti utili per il rilassamento?

Le molecole subiscono tre tipi di movimento: traslazione, rotazione e vibrazione.  $\rightarrow$  I movimenti vibrazionali si trovano nella regione infrarossa dello spettro, oltre un milione di volte in più per influenzare il segnale NMR.  $\rightarrow$  I movimenti traslazionali in un campo omogeneo avranno poco o nessun effetto sul segnale NMR a meno che due molecole non si scontrino o passino molto vicine le une alle altre.  $\rightarrow$  I movimenti rotazionali, tuttavia, si verificano in una gamma di frequenze che si sovrappongono in modo significativo alla regione MHz dello spettro elettromagnetico e quindi possono indurre campi magnetici fluttuanti adatti al rilassamento T1 e T2.

**Tumbling molecolare:** diffusione rotazionale in combinazione con rotazioni e collisioni con altre molecole.

La densità spettrale  $J(\omega_{\alpha\beta})$  ha una forma analitica lorentziana



La distribuzione di frequenze associate ai moti molecolari è indicata come densità spettrale  $J(\omega)$  e rappresenta la probabilità di trovare un determinato valore di frequenza associato ad un

moto molecolare.  $J$  è funzione del tempo di correlazione e della frequenza di risonanza.

La densità spettrale  $J(\omega, \tau)$  VS il tempo di correlazione  $\tau_c$

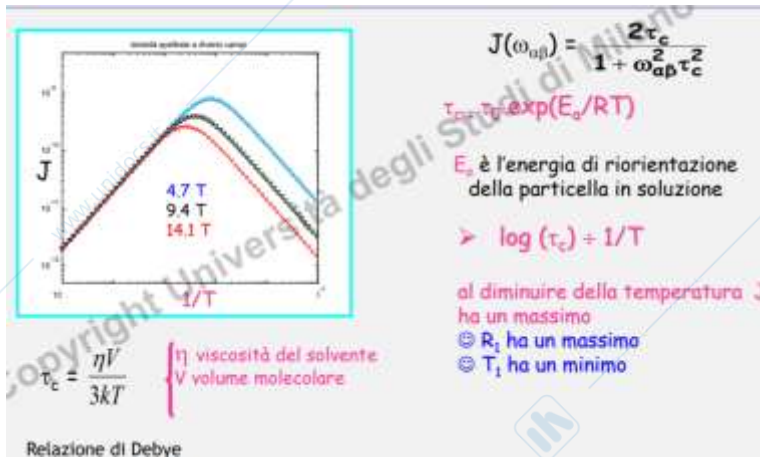
Se  $\omega_{\alpha\beta}^2 \tau_c^2 \ll 1$   $J(\omega_{\alpha\beta})$  è indipendente dalla frequenza e proporzionale a  $\tau_c$   $J(\omega_{\alpha\beta}) = 2 \tau_c \rightarrow$  extreme narrowing conditions (e.n.c.)

Nella extreme narrowing conditions (e.n.c.):

- > se  $\tau_c$  è dovuto alla riorientazione della molecola  $\rightarrow R_i$  è proporzionale a  $\tau_c$  molecole piccole  $\rightarrow \tau_c$  corti  $\rightarrow R_i$  basse  $\rightarrow T_1$  lunghi
- > se righe strette molecole grandi  $\rightarrow \tau_c$  più lunghi  $\rightarrow R_i$  più elevate  $\rightarrow T_1$  più corti e righe più larghe

$J(\omega_{\alpha\beta})$  ha un massimo quando  $\omega_{\alpha\beta}^2 \tau_c^2 = 1$

Le dimensioni molecolari ottimali diminuiscono a campi alti. Al di sotto di un certo valore di  $\tau_c$  non fa più differenza a quale campo lavoriamo: la  $J$  risulta indipendente da  $\omega$  e proporzionale al  $\tau_c$ . Dopo aver superato il massimo, la  $J$  diventa inversamente proporzionale al  $\tau_c$ .



Ma per il rilassamento trasversale...

Le fluttuazioni del campo locale lungo  $z$  creano anche contributi "a frequenza zero". Il significato fisico è che  $T_2$ , ma non  $T_1$ , dipende dal campo STATICO generato da ciascuno spin.



Densità spettrale disponibilità di fluttuazioni del campo locale alla frequenza  $\omega$

- dipende da:
- dimensioni della particella
  - tipo di soluzione
  - temperatura
- per R1 ha un massimo quando  $\omega \tau_c = 1$  allora T1 ha un minimo
  - per R2 la  $J(\omega)$  aumenta sempre con  $\tau_c$  allora T2 diminuisce sempre

**I meccanismi di rilassamento**

- Dipolo-dipolo nucleare e/o elettronico (d.d.)
- Anisotropia del tensore di schermo o del chemical shift (c.s.a.)
- Quadrupolare (q.)
- Accoppiamento scalare nucleare e/o elettronico (s.c.)
- Spin-Rotazionale (s.r.)

$$R_i = R_i(\text{d.d.}) + R_i(\text{c.s.a.}) + R_i(\text{q.}) + R_i(\text{s.c.}) + R_i(\text{s.r.}) \quad i=1, 2$$

**Perché misurare i tempi di rilassamento?**

$$R_i = R_i(\text{d.d.}) + R_i(\text{c.s.a.}) + R_i(\text{q.}) + R_i(\text{s.c.}) + R_i(\text{s.r.}) \quad i=1, 2$$

Ognuno di questi contributi dipende da proprietà → strutturali (distanze, angoli) → chimiche (tipi di legami, intorno chimico) → dinamiche (dimensioni molecolari, solvente, temperatura) specifiche del nucleo che stiamo considerando, quindi..

si possono avere informazioni 1) strutturali 2) chimiche 3) dinamiche

Velocità di rilassamento longitudinale dipolare del nucleo I dovuto a nuclei S

✓ e' il meccanismo più comune per gli isotopi con I=1/2 (idrogeni e carboni non isolati)

$$R_1(I) = \frac{1}{15} \left( \frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \hbar^2 \gamma_I^2 \gamma_S^2 S(S+1) \frac{1}{r_{IS}^6} [J + 3J_I + 6J_S]$$

Distanza internucleare I-S

✓ proporzionale al  $\gamma^2$  del nucleo che genera il campo magnetico locale

✓ ⇒ <sup>1</sup>H the best! (ma anche l'elettrone non scherza!!)

Nucleo	(x 10 <sup>7</sup> rad s <sup>-1</sup> T <sup>-1</sup> )
<sup>1</sup> H	26.75
<sup>13</sup> C	6.73
<sup>15</sup> N	10.8
<sup>31</sup> P	-17.61

NB = S è IL NUMERO DI SPIN di solito indicato con I relativo al nucleo S!!

vedi slides da 20 a 28 presentazione "lezione 5 parte 2"

**Rilassamento longitudinale dipolo-dipolo omonucleare (tra due o più 1H)**

- 1) C'è una potente dipendenza diretta con  $\gamma^4$
- 2) C'è una forte dipendenza inversa dalla distanza alla sesta tra gli spin
- 3) Per R1 compaiono i termini delle densità spettrali singolo quanto ( $\omega = \omega_0 =$  frequenza di Larmor) e doppio quanto ( $\omega = 2 \omega_0$ : due volte la frequenza di Larmor). Quest'ultima corrisponde al doppio flip degli spin di due particelle. (NB Le transizioni doppio quanto e zero quanto non possono essere stimulate con una radiofrequenza)

Cio che cambia è il termine di sommatoria delle densità spettrali (parti in verde e blu). Sono state messe in due colori diversi per far vedere che nel

$$R_1(I) = \sum_n \frac{3}{20} \left( \frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \hbar^2 \gamma_H^4 \frac{1}{r_{IS}^6} [J(\omega) + 4J(2\omega)]$$

$$R_1(I) = \sum_n \frac{3}{10} \left( \frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \hbar^2 \gamma_H^4 \frac{\tau_c}{r^6} \left[ \frac{1}{1 + \omega^2 \tau_c^2} + \frac{4}{1 + 4\omega^2 \tau_c^2} \right]$$

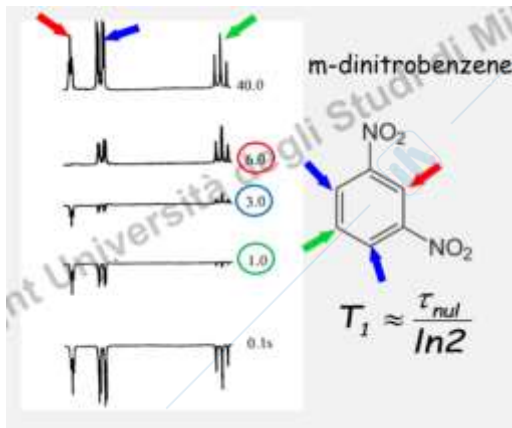
$$R_1(I) = \sum_n K \frac{1}{r^6} [J(\omega) + 4J(2\omega)]$$

➤ Se  $\omega^2 \tau_c^2 \ll 1$  (e.n.c.)

$$R_1(I) = \sum_n \frac{3}{2} \left( \frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \hbar^2 \gamma_H^4 \frac{\tau_c}{r^6}$$

caso del rilassamento longitudinale, non compare più la densità spettrale per frequenze nulle.

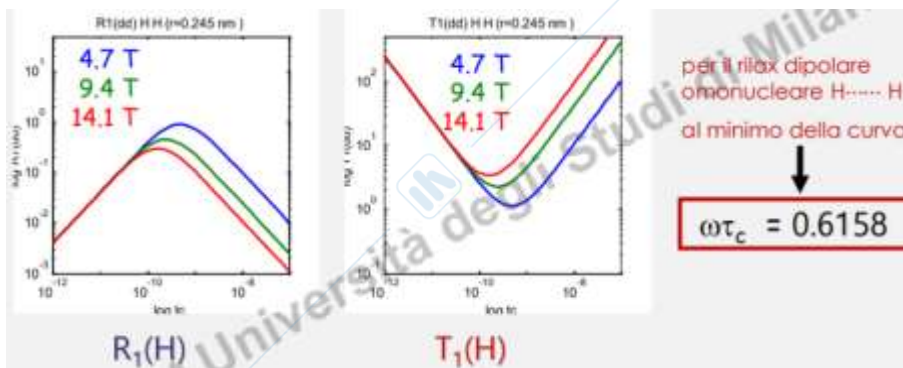
**Sequenza di inversion recovery. Effetto della numerosità e della distanza**



3 tipi di protoni diversi. Qui con la sequenza di inversion recovery possiamo vedere come appaiono i segnali a diversi  $\tau$ . Il CH in verde è quello che mostra un  $\tau$  nul più corto rispetto agli altri e questo è perché è l'unico protone che si trova equidistanziato da due altri CH. Per quelli blu invece possiamo dire che hanno un  $\tau$  nul minore dell'altro rosso poiché vedono entrambi un solo protone e sono troppo distanti tra di loro per essere efficaci nel provocare un rilassamento. Infine c'è il CH rosso che stando tra 2 NO<sub>2</sub> che sono abbastanza lontani in modo che l'N non risenta di un effetto quadrupolare, non avranno un tempo di rilas che è molto più lungo poiché non possono

usufruire della vicinanza di altri idrogeni che sono i più efficaci (a parte l'elettrone) per provocare il rilassamento di tipo dipolo-dipolo.

*R<sub>1</sub>(H) ha un massimo e T<sub>1</sub>(H) ha un minimo quando si ha un matching con la frequenza di Larmor del tumbling molecolare*



si può calcolare il  $\tau_c$  :

- a campi alti il minimo si osserva a
  - temperature più alte (a parità di molecola)
  - per molecole di dimensioni più piccole (a parità di T)

**A che serve conoscere il  $\tau_c$  ?**

• noto  $\tau_c$   $\omega\tau_c = 0.6158$

$$R_1(^{13}C) = \frac{1}{10} \left( \frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 h^2 \gamma_C^2 \frac{\tau_c}{r_{CH}^6} \left[ \frac{1}{1 + \omega^2 \tau_c^2} + \frac{3}{1 + \omega_c^2 \tau_c^2} + \frac{6}{1 + \omega^2 \tau_c^2} \right]$$

$$R_1(H) = \frac{3}{10} \left( \frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 h^2 \gamma_H^4 \frac{\tau_c}{r^6} \left[ \frac{1}{1 + \omega^2 \tau_c^2} + \frac{4}{1 + 4\omega^2 \tau_c^2} \right]$$

➔ stima della distanza C---H o H----H

Se il rilassamento è dovuto ad una specifica interazione dipolare, dalla misura sperimentale di T<sub>1</sub> al minimo dove è noto  $\tau_c$

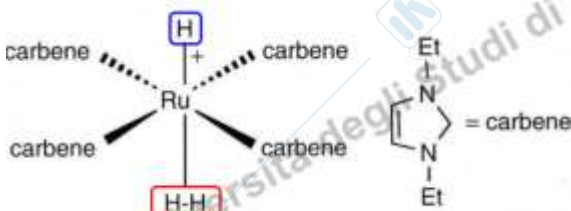
ho il diidrogeno

Importanza della distanza H----H quando

Il diidrogeno si coordina con il doppietto sigma.

La distanza H---H dipende dalla retrodonazione che a sua volta dipende da: n° di ossidazione di M, Leganti su M, Tipo di M.

In H<sub>2</sub> coordinato i due idrogeni a distanza di legame garantiscono un meccanismo d.d. molto efficiente → T<sub>1</sub> piccolo. Il diidrogeno è sempre in equilibrio con il di-idruro. Per distinguerli posso basarmi sui tempi di rilassamento: **il diidrogeno avrà tempi di rilass molto brevi poiché in queste condizioni di distanza ravvicinata il meccanismo dipolo-dipolo è molto efficiente.**



✓ H	-8.7 ppm	T <sub>1</sub> 241 ms
✓ H <sub>2</sub>	-4.1 ppm	T <sub>1</sub> 36 ms

Sia chemical shift che i T di rilass mi mostrano la differenza tra i due tipi di H.

Posso usare anche le diverse costanti di accoppiamento. Se il legame H-H si allenta, la J scalare diminuisce; distanza H-H SE nello spettro del derivato HD è risolta la 1J(HD). Per fare questo studio devo però usare una specie che contiene H-D e non H-H e questo perché i due H nell'idrogeno molecolare sono isocroni e quindi non potremo mai

risolvere una J di accoppiamento.

**Studio di interazioni deboli: legami di di-idrogeno**

Definizione di legame di di-idrogeno: Interazione tra un idrogeno polarizzato positivamente (N-H, O-H) ed uno polarizzato negativamente (M-H idruri)

Tramite lo studio dei tempi di rilassamento si può : Evidenziarne la presenza → Isolare il contributo d.d. → Calcolare la distanza H-H

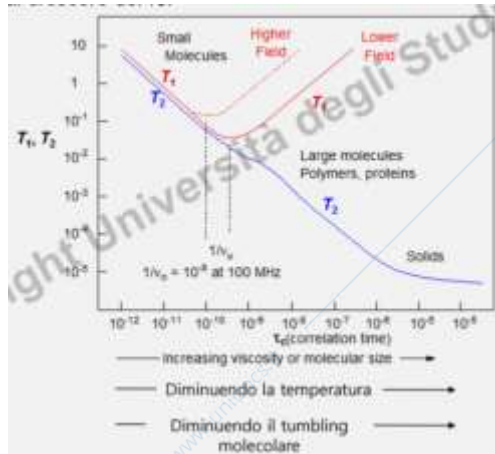
**Rilassamento trasversale dipolo-dipolo omonucleare (tra due o più 1H)**

$$R_2(I) = \sum_n \frac{3}{20} \left( \frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \hbar^2 \gamma_H^4 \frac{1}{r^6} \left[ \frac{3\tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2} + \frac{2\tau_c}{1 + 4\omega^2 \tau_c^2} \right]$$

Labels: Costanti, Rapp giromagn, Distanza tra i due H, J(0), J(ω), J(2ω)

I termini nelle parentesi sono la somma pesata delle densità spettrali J a diverse frequenze. Per il rilassamento NMR le frequenze più rilevanti sono quelle vicino a ω = 0 (condizione statica), a ω = ω<sub>0</sub> (la frequenza di Larmor), e a ω = 2ω<sub>0</sub> (due

volte la frequenza di Larmor). Le velocità di rilassamento (1/T<sub>1</sub> and 1/T<sub>2</sub>) sono fortemente dipendenti dalla relazione del tempo di correlazione (τ<sub>c</sub>) alla frequenza di Larmor. Nella espressione per 1/T<sub>2</sub> (ma non per 1/T<sub>1</sub>) c'è un termine di densità spettrale con ω = 0. (il termine J(0). Il significato fisico è che il T<sub>2</sub>, ma non il T<sub>1</sub>, dipende dai campi statici generati da ciascun spin.



T<sub>1</sub> è minimizzato tutte le volte che la velocità di tumbling è il più simile possibile alla frequenza di Larmor. → T<sub>2</sub> è minimizzato anche ogni volta che τ<sub>c</sub> = ω = 0 (condizione statica). Sia T<sub>1</sub> che T<sub>2</sub> crescono al crescere del τ<sub>c</sub>.

**Come riconosco il meccanismo di tipo dipolo-dipolo?** Il rilassamento dipolo-dipolo ha due importanti caratteristiche fenomenologiche: (i) I tempi T1 nella extreme narrowing condition non dipendono dalle frequenze di Larmor e aumentano all'aumentare della temperatura (ii) I minimi valori del T1 si spostano in funzione del campo magnetico, ovvero delle frequenze di Larmor.

Queste due caratteristiche possono essere sfruttate per riconoscere il meccanismo dipolo-dipolo.

In presenza però di più di un meccanismo, un metodo più semplice per riconoscere come attivo questo meccanismo è tramite l'acquisizione di esperimenti NOE: la presenza di un effetto nucleare Overhauser testimonia la presenza di un'interazione dipolare e quindi della presenza di questo meccanismo di rilassamento

**Anisotropia del tensore di schermo o del chemical shift (c.s.a.) (Secondo metodi di rilassamento)**

$$R_i = R_i(\text{d.d.}) + R_i(\text{c.s.a.}) + R_i(\text{q.}) + R_i(\text{s.c.}) + R_i(\text{s.r.}) \quad i=1, 2$$

Se l'intorno elettronico è anisotropo, lo schermo degli elettroni sul nucleo ( $\sigma$ ) dipende dall'orientazione della molecola rispetto a  $B_0$ . Il campo locale fluttua durante la riorientazione della molecola.

*Il chemical shift di un nucleo è una funzione dell'orientazione della molecola*

Il chemical shift di un nucleo è una funzione dell'orientazione della molecola rispetto al campo magnetico (a parte per quei nuclei che sono al centro di una simmetria elevata come quella tetraedrica o ottaedrica). Qui sono riportati i chemical shift limite di  $^{13}\text{C}$  e  $^{15}\text{N}$  per le tre principali orientazioni di tre molecole.

Poiché le molecole si muovono continuamente in soluzione il chemical shift che vediamo è mediato (chemical shift isotropico): il termine paramagnetico della costante di schermo ha una dipendenza direzionale.

*Meccanismo del rilassamento longitudinale per c.s.a*

$R_1(I)_{\text{csa}} = \frac{1}{15} \gamma_I^2 B^2 \Delta\sigma^2 J(\omega_I)$

**$\Delta\sigma$  anisotropia del chemical shift**

- $\Delta\sigma = \sigma_{\parallel} - \sigma_{\perp}$
- se la simmetria non è tetraedrica o ottaedrica ma cilindrica
- è proporzionale al quadrato del campo magnetico applicato
- dipende da una sola densità spettrale
- Se e.n.c.  $\rightarrow J(\omega) = 2\tau_c$

→ importante per eteronuclei ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{31}\text{P}$ ,  $^{199}\text{Pt}$ , metalli di transizione) [legami p o ibridazioni non simmetriche]

Esempio con  $^{13}\text{C}$

$R_1(I)_{\text{csa}} = \frac{2}{15} \gamma_I^2 B^2 \Delta\sigma^2 \tau_c \left[ \frac{1}{1 + \omega_I^2 \tau_c^2} \right]$

**$\Delta\sigma$  legato alla modalità di legame** (legami  $\pi$  o ibridazioni non simmetriche)

$^{13}\text{CH}_3$	$sp^3$	35 ppm
$^{13}\text{CH}_2$	$sp^3$	32 ppm
$^{13}\text{CH}$	$sp^2$	12 ppm
$^{13}\text{C}=\text{CH}_2$	$sp^2$	189 ppm
$^{13}\text{C}=\text{C}$	$sp$	230 ppm
$^{13}\text{C}\equiv\text{N}$	$sp$	316 ppm

NC—Hg—CN  
At 0.40 T,  $\tau_c = 0.063$  sec  
 $T_1 = +6.9$  sec

è proporzionale a  $(B_0)^2$   
a campi alti può diventare l'unico meccanismo di rilassamento  
Il T1 a campi alti si accorcia se CSA domina

**NB:** La larghezza di riga dipende sempre dal rilassamento trasversale quindi se il rilass trasversale dipende dal B2, > il campo le righe si allargheranno.

**Quadrupolare (q.) (Terzo metodo di rilassamento)**

I nuclei quadrupolari, oltre al momento di dipolo magnetico, possiedono un momento di quadrupolo elettrico dovuto alla distribuzione di carica che devia dalla simmetria sferica.

Rilassamento molto efficiente per isotopi con  $I > \frac{1}{2}$  quali  $^{2}\text{D}$ ,  $^{14}\text{N}$ , ma anche  $^6\text{Li}$ ,  $^{11}\text{B}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{23}\text{Na}$ ,  $^{59}\text{Co}$ .

La larghezza di riga dipende dall'intorno chimico. La larghezza di riga può essere così grande da impedire l'osservazione dello spettro.

$R_1(I)_q = R_2(I)_q = \frac{3\pi^2}{10} \chi^2 \left[ \frac{2I-3}{I^2(2I-1)} \right] \left[ \frac{1+\eta^2}{3} \right] \tau_c$

$\chi$  (Nuclear Quadrupole Coupling Constant, NQCC)

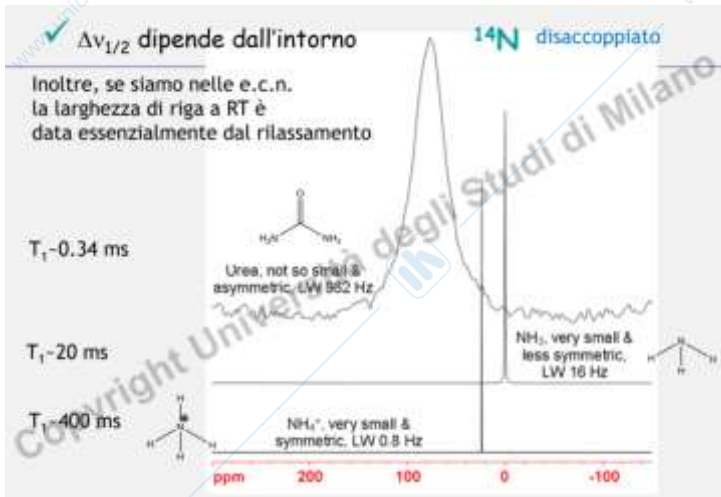
$\chi = \frac{e^2 q_{zz} Q}{h}$

$e^2 q_{zz}$  entità  
 $\eta$  Costante di asimmetria

del gradiente di campo elettrico locale

Legami chimici

Un veloce tumbling molecolare diminuisce la velocità R



### Accoppiamento scalare nucleare e/o elettronico (s.c.) Meno frequente

$$R_1(I)_{sc} = \frac{4\pi^2}{3} J^2 S(S+1) \left[ \frac{2\tau_{sc}}{1 + (\omega_I - \omega_S)^2 \tau_{sc}^2} \right]$$

Costante di accoppiamento scalare tra I ed S

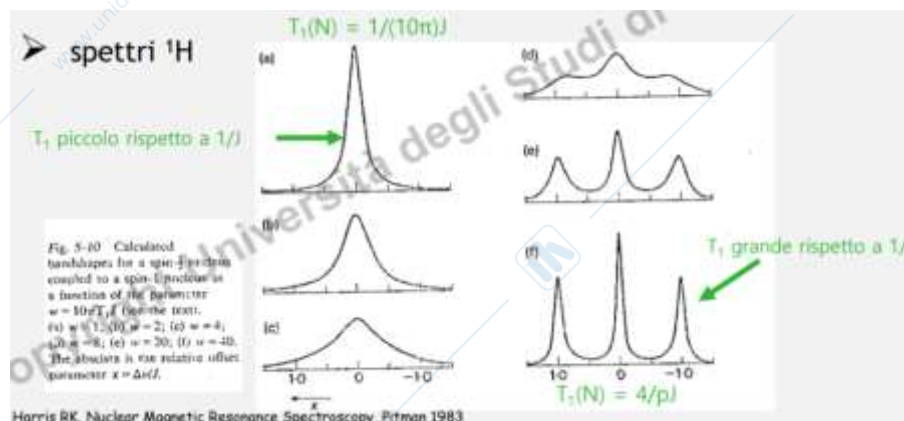
L'accoppiamento scalare tra I ed S può variare nel tempo se:

- il legame tra S ed I si rompe  $\rightarrow$  scambio chimico  
s.c. del I tipo  $\tau_{sc} = k^{-1}$
- lo stato di spin di S cambia velocemente (a causa di altri meccanismi di rilassamento)  
s.c. del II tipo  $\tau_{sc} = T_2(S)$

Allargamento della righe del multipletto di I quando  $\tau_{sc}$  dell'ordine di  $(\pi)^{-1}$  si ha per scambio chimico o se S è quadrupolare o rilassa velocemente

Se invece  $\tau_{sc} \ll (\pi)^{-1}$  allora = self-decoupling

Come si presenta il multipletto di un nucleo con spin  $\frac{1}{2}$  ( $^1\text{H}$ ) accoppiato ad un nucleo con spin 1 ( $^{14}\text{N}$ )? DIPENDE dal  $T_1$  dello spin quadrupolare (qui 1)



Per tempi di rilass piccoli si ha il self-decoupling cioè è talmente breve il tempo in cui rimane nel suo stato di spin non del ground state, che il protone non se ne accorge. Andando verso la (f) ho che i  $T_1$  della specie con spin  $1 >$  e quindi lascio il tempo al nucleo protonico di accorgersi della sua presenza e di potersi

accoppiare. Quindi il segnale protonico si presenterà mano a mano diverso.

### Spin-Rotazionale (s.r.)

Ruotando attorno al suo momento di inerzia la molecola genera un momento magnetico che si accoppia con quello del nucleo. Gli urti in soluzione fanno cambiare lo stato rotazionale della molecola e fluttuare il momento magnetico sul nucleo.

$$R_1(I)_{sr} = \frac{2k}{3\hbar^2} MT C^2 \tau_{sr}$$

$M$  momento di inerzia  
 $T$  temperatura  
 $C$  costante di accoppiamento spin rotazionale  
 $\tau_{sr}$  tempo di correlazione spin-rotazionale  
 $\tau_{sr} = \frac{M}{6kT} \frac{1}{\tau_c} \Rightarrow R_1(sr) \text{ diminuisce al crescere di}$

Si è osservato per

- piccole molecole con assi di inerzia preferenziali
- frammenti mobili in molecole

### Diffusion Ordered Spectroscopy (DOSY)

Una particella può sperimentare in soluzione la cosiddetta *autodiffusione*, che si traduce nella possibilità della particella stessa di migrare, in un tempo  $t$ , da una posizione iniziale  $r(0)$  ad un posizione  $r(t)$ . Questa capacità di migrare è legata al coefficiente di diffusione, caratteristico di ogni particella nel suo intorno (cioè in uno specifico ambiente).

Per una particella browniana sferica di raggio  $r$  che diffonde in un mezzo continuo di viscosità  $\eta$ , il coefficiente di diffusione ( $D$ ) è legato alle dimensioni molecolari dalla relazione di Stokes-Einstein.  $r_s$  = raggio idrodinamico della molecola.

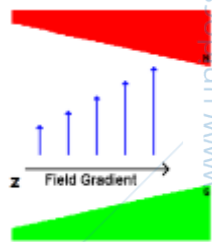
$$D = \frac{k_b T}{f} = \frac{RT}{Nf}$$

$f$  coefficiente di frizione idrodinamica  
 $\eta$  viscosità del mezzo  
 $f = 6\pi\eta r_s$   
 $D = \frac{k_b T}{6\pi\eta r_s}$  Stokes-Einstein

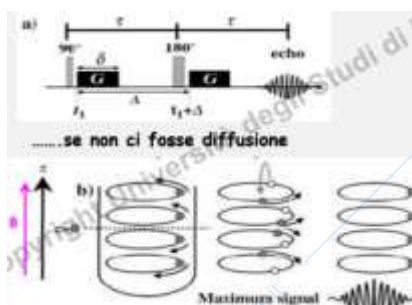
Per poter misurare i coefficienti di diffusione è necessario utilizzare un metodo che etichetti le singole molecole a seconda della posizione che occupano nello spazio. → GRADIENTI (variazione controllata di  $B_0$  imposta dall'esterno (gradiente di campo magnetico)).

L'utilizzo dei gradienti di campo rende la tecnica NMR un buon candidato per la misura dei tempi di diffusione. Infatti l'applicazione di un gradiente di campo rende il campo magnetico statico  $B_0$  temporaneamente disomogeneo di modo che le singole molecole nelle diverse parti dello spazio sperimentino campi magnetici risultanti diversi, ovvero la frequenza di precessione dei loro spin dipenderà dalla posizione della molecola nello spazio.

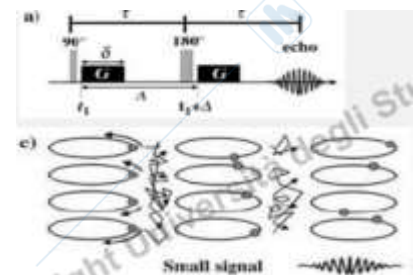
**$B_0$  omogeneo o non omogeneo?** La frequenza del segnale dipende dal campo magnetico • se il campo non è costante ma varia in maniera controllata nelle diverse zone del campione. • Se il campo cresce in una direzione crescerà anche la frequenza di risonanza (La frequenza di risonanza dipende dalla posizione lungo  $z$ ).



L' esperimento NMR: PGSE (Pulsed Gradient Spin Echo) (vedi T2)



Come nel T2 ma aggiungo 2 gradienti di campo magnetico. Se non ci fosse diffusione succedrebbe che dopo l'impulso a 90° questi ruoterebbero ad una certa velocità; però applicando un gradiente accadrà che a seconda della posizione nel campione le molecole inizieranno a girare ad una velocità differente rispetto a quella di molecole in altre posizioni. Poi riporto tutto a posto applicando il 180° avremo un'inversione e le molecole ricominceranno a muoversi con la medesima velocità. Poi arriva un altro gradiente uguale al primo che le rifocalizzerà. Se però ci fosse diffusione la situazione sarebbe diversa, ed è ciò che accade. → A parità di  $G$ ,  $d$



e D, i segnali delle molecole che diffondono velocemente saranno più attenuati di quelli di molecole che diffondono più lentamente perché andranno a finire in una zona del campione molto diversa e molto distante da quella iniziale e quindi non riusciranno a rifocalizzarsi bene come le molecole che restano vicine alla loro posizione iniziale.

Per valutare il coefficiente di diffusione si registra una serie di spettri variando in modo progressivo e controllato l'intensità del gradiente applicato. Quindi otterremo una serie di spettri monodimensionali dove le molecole piccole verranno rifocalizzate peggio a mano a mano che cresce l'intensità del gradiente.

Quantitativamente:

Coefficiente di diffusione è piccolo = molecola grande e pendenza lieve. Il contrario per molecole piccole.

La DOSY funziona bene quando c'è tanto segnale e non devono essere dei fenomeni associativi perché vedremmo il dimero ad esempio e non la molecola in se. serve un elevato rapporto segnale/rumore. Per macromolecole con T2 corti si possono usare altre sequenze come la STE e la LED con attenzione perché se il t1 è sufficientemente corto noi non rifocalizziamo più niente.

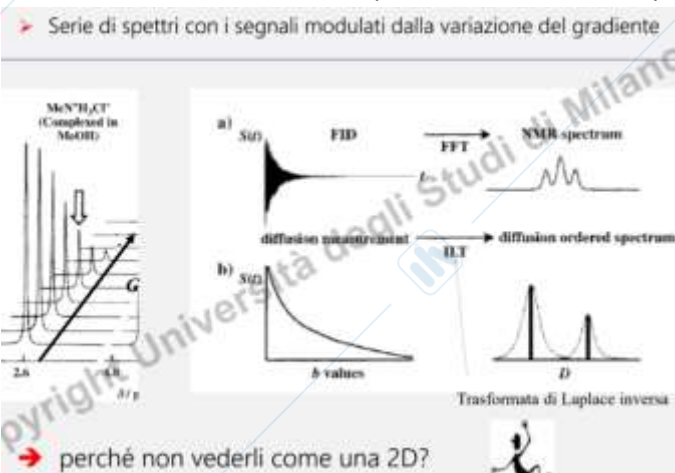
$$I_{(z,t)} = I_{(0,0)} \exp\left(-\frac{2\tau}{T_2}\right) f(\delta, G, \Delta, D) = I_{(0,0)} f(\delta, G, \Delta, D)$$

$$I_{(z,t)} = I_{(0,0)} \exp\left(-\frac{2\tau}{T_2}\right) \exp(-\gamma^2 G^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3) D)$$

$$I_{(z,t)} = I_{(0,0)} \exp(-\gamma^2 G^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3) D)$$

$$\ln\left(\frac{I_{(z,t)}}{I_{(0,0)}}\right) = -\gamma^2 G^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3) D = -b D$$

ci  
Ci



il t1 è sufficientemente corto noi non rifocalizziamo più niente.

La seconda trasformata non è una trasformata di Fourier, ma una trasformata di Laplace inversa (ILT). Segnali non sovrapposti per le diverse specie. Ci vuole un ottimo segnale rumore. E' una specie di cromatografia virtuale. Permette di identificare specie con coefficienti di diffusione diversi (meglio se molto diversi perché è più facile distinguerli) presenti in miscele complesse. Ottengo uno spettro bidimensionale con sull'asse x le ppm e sull'asse y ho i coefficienti di diffusione.

Ogni picco corrisponderà ad una molecola diversa perché corrisponde ad un diverso coeff di diffusione.

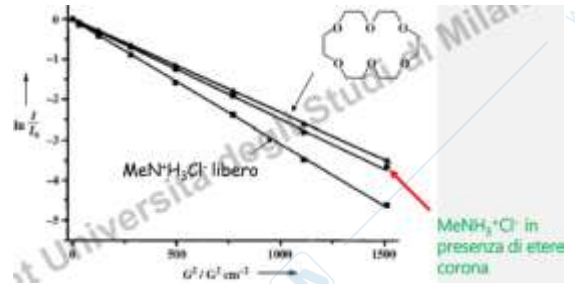
### Applicazioni della DOSY

Misura della dimensioni molecolari (raggio idrodinamico). Risoluzione virtuale di miscele complesse (individuazione di monomeri e oligomeri in soluzione). Studio dei processi di binding/interazione (determinazione delle costanti di associazione). Studio di aggregazioni e ion-pairing in soluzione. Studio di fenomeni supramolecolari.

ES. polimero con attaccata una fenantrolina. Ci si chiede se la fenantrolina sia parte del polimero. Nella zona aromatica ci sono solo i 7 segnali della fenantrolina. Faccio esperimento DOSY per capirlo e si visto che era incorporata perché la parte alifatica e aromatica avevano lo stesso coefficiente di diffusione trovandosi sullo stesso livello dello spettro bidimensionale. Confrontandolo con una miscela di omopolimero + fenantrolina si ha conferma di ciò perché lì vi erano due livelli di coefficienti diversi.

ES 2: MeNH3+Cl- e un etere corona si associano in MeOH? Si vede che il metilammonio in soluzione ha una certa intensità del segnale che se poi la si confronta con la medesima in presenza dell'etere corona mostra che il decadimento nel secondo caso è meno netto di quanto si vede nel ligando libero. Quantificando

costruendo un grafico con intensità contro  $G^2$  ottengo tre diverse rette (metto anche l'etere corona libero in soluzione) e vedo che il metilammonio si è complessato con una certa costante di binding.



ES 3. Si è visto che confrontando un erbicida nella sua forma monomerica e dimerica si vede che il coeff di diffusione diminuisce passando da monomero a polimero (ESPRESSO IN  $m^2/s$  quindi è la velocità con cui le molecole si muovono sulla superficie).

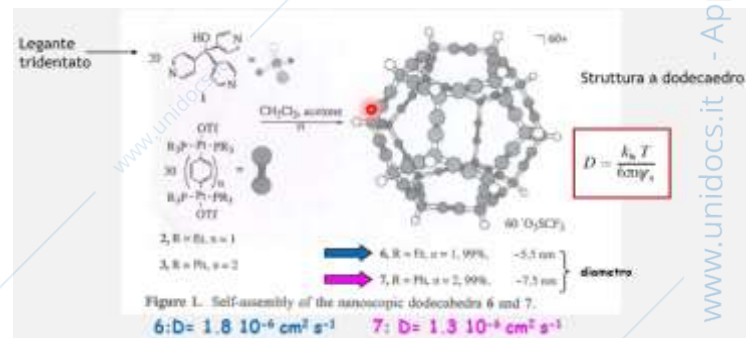
ES 4. studio dei legami ad H in una miscela di due alcoli uno è il fenolo e l'altro è il 1-idrossicicloesano. Vedo i loro coefficienti di diffusione e noto che il cicloesano ha un coeff più piccolo dell'altro essendo leggermente più ingombrante. Se però aggiungo DMSO deuterato (che è un accettore di legami H) accadrà che il fenolo formerà un legame ad H con l'O del DMSO più facilmente del cicloesano e riuscirà ad instaurare un legame ad H più forte e lo vedo dal fatto che il coeff di diffusione dei due addotti è a favore del fenolo che è anche più acido del cicloesano. Quindi ho confermato la maggiore capacità del fenolo di formare un legame ad idrogeno rispetto all'altro.

ES 5. DOSY e lo scambio chimico. Alcuni OH scambiano più velocemente con H<sub>2</sub>O e appaiono ad una diffusione intermedia. Si sono visti due spettri di uno zucchero in DMSO + acqua e solo in DMSO. Quando è solo in DMSO tutti gli H hanno lo stesso coeff di diffusione; invece quando aggiungo acqua tutti quei protoni legati a degli OH scambiano con l'acqua (anche a velocità diverse) e quindi succede che alcuni H appaiono ad una diffusione intermedia. Ciò è dovuto allo scambio chimico che deve essere lento.

ES 6. Cobaltocene e ferrocene in soluzione possono essere inglobati da un calixarene. Si vede dagli spettri DOSY che solo il cobaltocene viene incapsulato mentre il ferrocene resta libero cioè a dimostrazione della affinità per una specie carica positivamente (cobaltocene) rispetto ad una neutra. Si vede infatti che l'HOST (calixarene) ha lo stesso coeff di diffusione del cobaltocene quando è complessato.

**Aggregazioni supramolecolari studiate con DOSY**

ES 1. legante tridentato azotato + complesso di Pt in diclorometano/acetone. Si forma una struttura supramolecolare con 60 cariche positive. E a seconda che si usi R1 o R2 cambia la grandezza delle strutture a dodecaedro.



ES 2. Coppia ionica stretta o separata?

Table 1.  $D$  ( $10^{-6} m^2 s^{-1}$ ) and  $\alpha_2$  Values for Several  $L_2^+$  and  $BF_4^-$  Salts at Ambient Temperature

compound	solvent	concentration	anion	$D^a$	$\alpha_2$ (Å)
1	CDCl <sub>3</sub>	1	Cl <sup>-</sup>	0.22	6.4
			Br <sup>-</sup>	0.22	6.4
			I <sup>-</sup>	0.25	6.4
1	THF-d <sub>6</sub>	10	Cl <sup>-</sup>	0.35	6.8
			Br <sup>-</sup>	0.36	6.7
			I <sup>-</sup>	0.38	6.7
L1BF <sub>4</sub>	THF-d <sub>6</sub>	10	Cl <sup>-</sup>	11.66	4.2
			Br <sup>-</sup>	11.90	4.2
			I <sup>-</sup>	12.29	4.4
L1BF <sub>4</sub>	MeCN-d <sub>3</sub>	10	Cl <sup>-</sup>	16.3	2.5
			Br <sup>-</sup>	15.6	4.1
			I <sup>-</sup>	11.4	2.7
L1Bu <sub>4</sub> N <sup>+</sup>	THF-d <sub>6</sub>	1	Cl <sup>-</sup>	0.55	5.5
			Br <sup>-</sup>	0.56	5.5
			I <sup>-</sup>	0.57	5.4
L1Bu <sub>4</sub> N <sup>+</sup>	THF-d <sub>6</sub>	10	Cl <sup>-</sup>	1.11	6.4
			Br <sup>-</sup>	1.11	6.4
			I <sup>-</sup>	1.11	6.4

Chart 1: Complex 1 (the Circle Represents an Al-p-Cymene Ligand)

Catione e anione in 1 viaggiano assieme!

Es 3. Su nanoparticelle, si può fare? Posso visualizzare i leganti superficiali sulle NPs. Esempio con quantum dots a base di Cd-Se e hanno come stabilizzare l'acido oleico (sulla superficie). Faccio spettro dell'acido oleico da solo e vedo che le bande sono sharp mentre quando faccio lo spettro delle NPs con l'acido oleico le bande si allargano. Più ci si avvicina alla superficie della NP più i segnali si allargano con un deshielding a frequenza più alte.

Notare lo shift delle risonanze  $^1\text{H}$  e loro allargamento:  $\rightarrow$  Moti segmentali differenti!  $\rightarrow$  Più vicino alla superficie e maggiore  $\tau_c$ . Poi hanno fatto il DOSY e hanno visto che si ottiene un coeff che è di un ordine di grandezza più piccolo rispetto a quello atteso per l'acido oleico libero. Da qui si può determinare il diametro idrodinamico tramite la Stokes-Einstein.

La possibilità che l'esp. DOSY offre nel distinguere in situ leganti liberi e legati è una caratteristica unica della spettroscopia NMR in soluzione. È cruciale, ad esempio, per l'analisi della purezza del campione e costituisce la base per lo studio quantitativo della chimica della superficie dei nanocristalli colloidali. Un problema quando si considerano le misurazioni DOSY è che la codifica della diffusione nelle risonanze richiede ritardi minimi per gli impulsi di gradiente durante i quali la magnetizzazione si evolve sul piano trasversale. Di conseguenza, le risonanze con un breve tempo di rilassamento  $T_2$  vengono filtrate in una misurazione DOSY come si può vedere dalla mappa 2D, dove non viene recuperato alcun coefficiente di diffusione per la risonanza  $\alpha\text{-CH}_2$ .

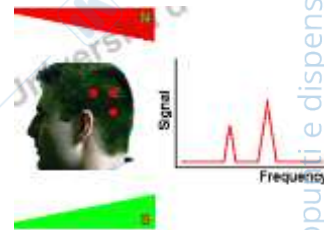
ES 4. Sulla superficie delle NPs ci possono essere dei fenomeni dinamici cioè di scambio tra legante legato alla NPs e legante libero. Qui ho quantum dots legato con ammina alifatica. In assenza di eccesso di legante avremo un certo coeff di diffusione e in eccesso un altro. Se la velocità di scambio è sufficientemente veloce avrò un segnale mediato con coefficiente mediato e a quel punto per capire quale è la frazione complessata e quella no. Se ho eccesso avrò coeff molto più piccolo

### Agenti di contrasto in Magnetic Resonance Imaging MRI

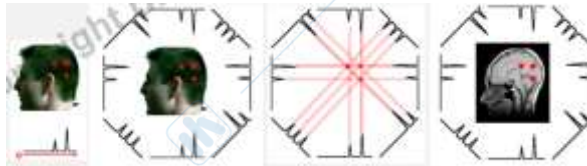
3 concetti importanti della spettroscopia NMR: Gradiente di campo, Rilassamento, Scambio chimico.

#### Gradiente di campo

Ci aiutano perché se disomogeneizziamo il campo in modo regolare noi avremo che l'acqua (poiché è il 75% del nostro corpo) subirà in un certo punto un campo magnetico diverso da quello che viene sentito in altri punti. Ragiono per colonne: puntini sulla stessa colonna sentono lo stesso campo magnetico. Quindi otterremo due segnali distinti con due frequenze di Larmor diverse. La frequenza del segnale dipende dal campo; se il campo cresce in una direzione crescerà anche la frequenza.



Supponiamo ad esempio di voler produrre l'immagine di un oggetto nel piano YZ. Viene applicato all'oggetto un gradiente di campo magnetico nella direzione +Y e viene registrato lo spettro NMR. •Viene poi registrato un secondo spettro con il gradiente lungo una direzione che forma con l'asse +Y un angolo di un grado. Il processo è ripetuto per i 360 angoli compresi tra  $0^\circ$  e  $359^\circ$ . •Una volta registrati tutti i dati nella memoria del computer, questi possono essere retroproiettati nello spazio. •Infine, soppressa l'intensità di fondo, l'immagine diventa visibile.



La codificazione spaziale viene fatta mediante gradienti di campo. Il voxel è un pixel tridimensionale e ad ognuno è associato un segnale. ATTENZIONE! Il campo magnetico è disomogeneo perché lo vogliamo noi perché se invece accadesse in maniera non voluta si possono avere delle distorsioni molto forti delle immagini ottenute.

L'osservabile generalmente è l'acqua ma anche i grassi, i polimeri e le proteine. L'intensità del segnale sarà proporzionale alla  $[\ ]$  della specie in quel voxel di indagine.

**Morfologia** richiede definire dei contorni basati su differenze di comportamento tra diverse parti. Nelle immagini di un organismo come esaltare le differenze tra i tessuti?  $\rightarrow$  **Contrasto**: diversità di rilassamento

Riorientazione delle molecole: molecole piccole  $\rightarrow$  riorientaz veloce  $\rightarrow$  tc piccolo; molecole grandi  $\rightarrow$  riorientaz lenta  $\rightarrow$  tc grande

tc piccolo  $\rightarrow$   $R_{1,2}$  piccola  $\rightarrow$   $T_{1,2}$  lunghi

tc grande  $\rightarrow$   $R_{1,2}$  grande  $\rightarrow$   $T_{1,2}$  corti

### Origine del contrasto MRI

Il segnale MRI è espresso in livelli di grigio: un'intensità maggiore del segnale appare in bianco e un segnale debole apparirà nero o grigio scuro. L'immagine MRI è ottenuta proprio per contrasto tra diversi tessuti biologici. Per aumentare il contrasto possono essere variati alcuni parametri delle sequenze NMR utilizzate.

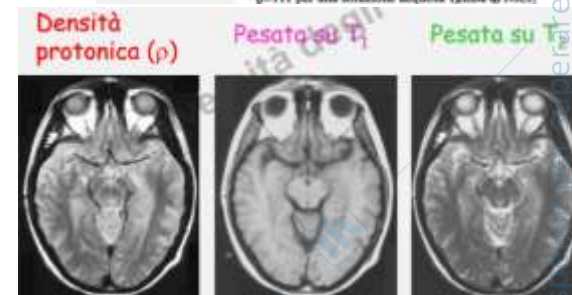
TR = repetition time; TE = tempo di echo (se stiamo facendo una sequenza di spin echo); Angolo di flipping  
FOV=field of view

La scelta dei parametri MRI permette di variare il contrasto di immagine in funzione dei valori dei parametri intrinseci dei differenti tessuti osservati:  $T_1$ ,  $T_2$ ,  $T_2^*$  e densità protonica  $\rho$ . Si dice generalmente che sto pesando l'immagine in  $T_1$ ,  $T_2$ ,  $T_2^*$  o  $\rho$ .

Un corto TR e un corto TE danno luogo ad una immagine pesata in  $T_1$   
Un lungo TR e un lungo TE danno luogo ad una immagine pesata in  $T_2$   
Un lungo TR e un corto TE danno luogo ad una immagine pesata in densità protonica  $\rho$ .

Tessuto	$T_1$ (s)	$T_2$ (ms)	$\rho^*$
Liquido cerebro spinale *	0.8 - 20	110 - 2000	70 - 230
Sostanza bianca	0.76 - 1.08	61 - 100	70 - 90
Sostanza grigia	1.09 - 2.15	61 - 109	85 - 125
Meningi	0.5 - 2.2	50 - 165	5 - 44
Muscolo	0.95 - 1.82	20 - 67	45 - 90
Cranio	0.2 - 0.75	53 - 94	50 - 100

\* $\rho=111$  per una soluzione acquosa 12mM di NaCl.



### Immagine pesate sulla densità protonica

Se prendiamo due tessuti A e B caratterizzati da  $T_{1A} < T_{1B}$ ,  $T_{2A} < T_{2B}$  e  $\rho_A > \rho_B$ . Dopo un impulso a  $90^\circ$  l'evoluzione del segnale NMR p funzione dei valori TR o TE. La velocità con cui ciascun tessuto ripristina la sua magnetizzazione longitudinale dipende dal suo valore di  $T_1$ . La magnetizzazione trasversale è massima per tempi di echo TE corti. I contrasti sono definiti dalla scelta di TR e TE, prendendo in considerazione anche la sequenza utilizzata.

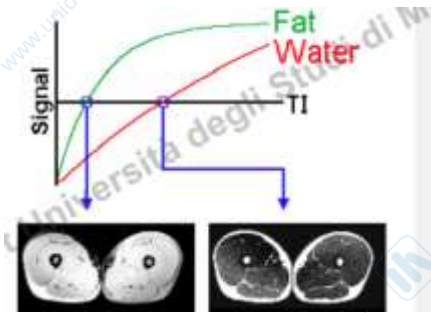
Con un lungo TR, la magnetizzazione longitudinale è completamente ripristinata prima dell'impulso successivo di RF. Quindi il contrasto dipenderà solo dalla concentrazione protonica.

### Immagine pesate sui $T_1$

Se il TR viene accorciato, l'impulso di eccitazione è ripetuto rapidamente al fine di ripetere una nuova scansione. In questo caso visti i tempi di rilassamento ( $T_{1A} < T_{1B}$ ) ci sarà una maggiore intensità del vettore magnetizzazione per il campione A che ha un  $T_1$  più corto. L'immagine viene detta «pesata sui  $T_1$ » poiché la differenza di segnale è maggiormente dovuta alla differenza nel recovery della magnetizzazione longitudinale per un dato TR. Ad ogni modo il segnale dipende anche dalla densità protonica.

### Immagine pesate sui $T_2$

Se consideriamo una sequenza di spin echo, se viene applicato un tempo di ripetizione TR lungo per rimuovere l'effetto del  $T_1$ , possiamo utilizzare il tempo di echo TE per ottenere un contrasto che dipenda dalle differenze nei tempi di rilassamento  $T_2$ . Se al posto di usare la sequenza SE usiamo una Gradient Echo GE, il segnale defasato per via delle disomogeneità durante il tempo di echo TE, non viene rifocalizzato. La durata del TE permetterà di pesare l'immagine in  $T_2^*$ . Più lunga è la durata, e maggiore sarà la pesata in  $T_2^*$ .



Se annullo il segnale del grasso esalterà l'acqua presente nel tessuto e se annullo la parte acquosa esalterò la parte grassa. Così ho un'idea della composizione del tessuto.

L'agente di contrasto naturale spesso non basta anche se l'MRI è molto sensibile, anche più di una fotografia fatta tagliando il cranio a fette. Per accentuare la diversità di rilassamento di due tessuti si possono usare due tipi di agenti di contrasto:

- **positivi se riducono T1** (così ho un recovery > più veloce della magnetizzazione e quindi con schiarimento dell'immagine avrò un segnale più intenso)
- **negativi se riducono T2** (lavora contro il segnale quindi avrò minore luminosità e toni di grigi più accentuati)

Sostanze che contengono ioni metallici con elevato numero di elettroni spaiati (Gadolinio, Ferro, Manganese) → sono ottimi agenti di contrasto positivi.

SPION: Super Paramagnetic Iron Oxide Nanoparticles (ricoperte e funzionalizzate) → agenti di contrasto negativi.

### Gadolinio(III) $f^7$

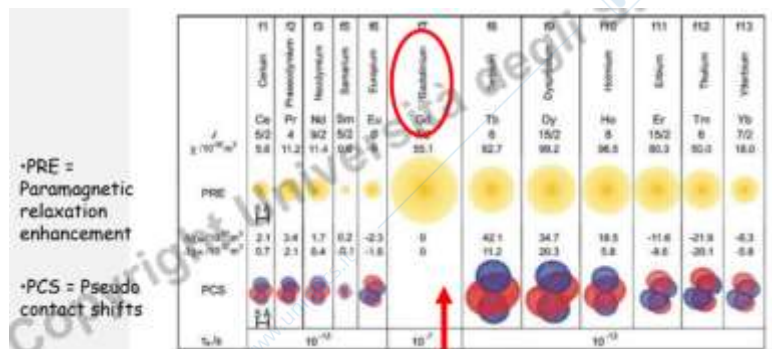
Non c'è anisotropia (7 elettroni omogeneamente distribuiti danno una nuvola totalmente isotropa) ma 7 elettroni spaiati = alta efficacia nell'indurre rilassamento. Ha oltre agli e- f 2 e' s e 1 p che sono facilmente perdibili.

PSC: è un contributo speciale al chemical shift.

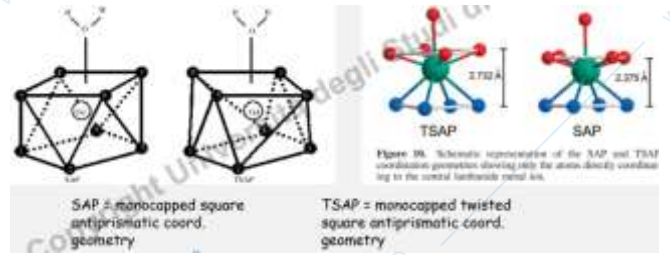
Ci sono due zone (blu e rossa) intorno al centro metallico che portano a schermare o deschermare molto gli e-. Si hanno così grandi variazioni di chemical shift. Nel gadolinio manca e ciò perché il tempo di rilass dei suoi elettroni è talmente grande rispetto agli altri ioni lantanidei che di fatto succede che tutto quello che sta vicino al gadolinio è "ammazzato". Cioè i suoi e- riescono a fare un accoppiamento con il nucleo e inducono quindi un rilassamento velocissimo tale per cui non si potranno mai osservare i segnali dei leganti attorno al Gadolinio.

In una serie di complessi di un Ln con una serie di leganti macrociclici di «scheletro» simile, il chemical shift dei protoni più prossimi al centro metallico (schermati e deschermati) non cambieranno molto la loro giacitura. I lantanidi sono molto selettivi verso l'O<sub>2</sub>.

Gd non ha funzioni fisiologiche. Gd<sup>3+</sup> aq è molto tossico 10-20 mmol Kg<sup>-1</sup> ed è molto simile al Ca<sup>2+</sup> che è implicato in una serie di importanti processi nel nostro corpo. Quindi il Gd può andare a sostituire il Ca = tossicità. Quindi non può essere somministrato come aquo-ione ma deve essere complessato formando complessi con leganti chelanti ad alta affinità (es- macrocicli con 4 atomi di N es il Gd-DOTA (nome commerciale DOTAREN)).

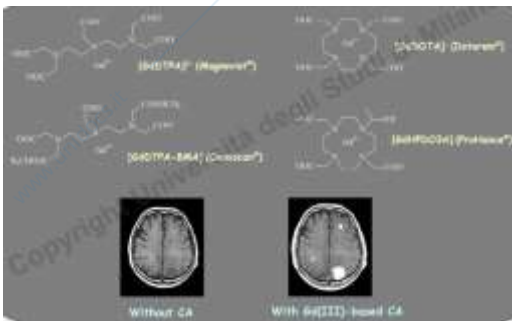


N° di coordinazione 9 → leganti chelanti ottadentati + 1 posizione libera per l'acqua. Acqua coordinata → T1 diminuisce e se è in scambio rapido con l'acqua di "bulk" il Gd trasferisce l'effetto di rilassamento a tantissime molecole di acqua del bulk (cio permette di osservare con l'MRI zone più chiare).



In scambio rapido il segnale di H2O mostra la media pesata di TUTTI i parametri: chemical shift, costanti di accoppiamento, velocità di rilassamento.

Acqua coordinata ha una elevata velocità di rilassamento; acqua coordinata è in scambio rapido con l'acqua di "bulk" → trasferisce l'effetto di rilassamento

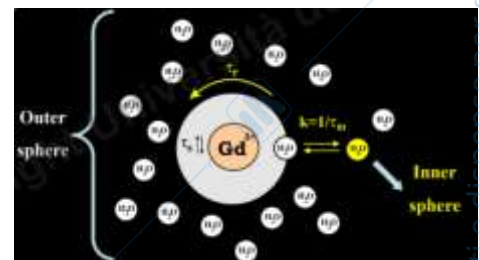


L'uso dell'agente di contrasto permette di vedere metastasi che senza non si vedrebbero.

Per confrontare l'efficacia dei complessi si usa la "relattività" = velocità di rilassamento di H2O in una soluzione 1 mM di complesso.

**Determinazione del numero di molecole d'acqua coordinate (q)**

Un metodo molto usato sfrutta la misura dei tempi di vita di LUMINESCENZA di chelate di Eu(III) e Tb(III) che mette in relazione il numero di molecole d'acqua coordinate e i tempi di vita differenti in acqua e in acqua deuterata per la stessa molecola. •ALn è una costante di proporzionalità specifica per ogni ione lantanoideo.



•Funzione empirica

VELOCITÀ DI RILASSAMENTO DELL'ACQUA COORDINATA

$$\frac{1}{T_{1M}} = \frac{2}{15} \left( \frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\gamma^2 \mu_B^2 \mu_N^2 S(S+1)}{r_H^6} \left( \frac{7\tau_c}{1 + \omega_H^2 \tau_c^2} + \frac{3\tau_c}{1 + \omega_N^2 \tau_c^2} \right)$$

Freq. elettrone      Freq. nucleo  
 dipendono dal campo B<sub>0</sub>

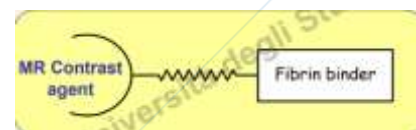
$\tau_c^{-1} = \tau_R^{-1} + \tau_M^{-1} + \tau_{RE}^{-1}$

( $\tau_c$  o  $\tau_M$ ) tempo di rilassamento elettronico del metallo

Tempo di riorientazione di un radiante      tempo di scambio o tempo di vita al sito di coordinazione

Per migliorare la sensibilità si può indirizzare il complesso andando ad > il PM modificando i leganti del Gd. Un'altra possibilità è aggiungere al legante del Gd un legante che potesse legarsi bene con una proteina (l'albumina che fa da vettore per il complesso di Gd); così quando si ha l'aggancio, il complesso di Gd sperimenta il  $\tau_r$  della proteina aumentando anche di un ordine di grandezza e > così la relattività del complesso. Si possono fare analisi quali angiografia renale e angiografia coronaria per valutare lo stato di salute di queste zone (posso vedere aneurismi ad es).

ES. con la fibrina. La specificità per la fibrina è ottenuta legando una sonda ad un vettore peptidico. Perché la Fibrina come target? -crescita tumorale e metastasi -arteriosclerosi -infiammazione - formazione di coaguli



Di solito si fa un pre-scan dell'analisi senza agente di contrasto che viene poi sottratta all'immagine ottenuta con l'aggiunta del CA. In rpresenza ad es di carcinomi ci sarà una sovraespressione della fibrina.

ES. con legame con il colesterolo utile per individuare delle metastasi da colon nel fegato. Si vede che nei epatociti sani, poiché metabolizzano bene il colesterolo, il colesterolo legato al Gd si concentrerà in tutta la parte sana del fegato. Invece nella parte fatta di cellule di colon vedremo delle macchie scure dovute al fatto che tali cellule non sono in grado di metabolizzare il colesterolo.

Per > il rapporto segnale/rumore e non > la dose esiste un altro metodo: Aumentare il n.ro di centri paramagnetici

Polimeri con molti siti di legame per il metallo nanoparticelle naturali ed artificiali con i centri paramagnetici incorporati. Essi vengono consegnati tutti in un certo settore anatomico, sono molto organo-specifici cosa che per esempio non fa il Gd che viene presto escreto.

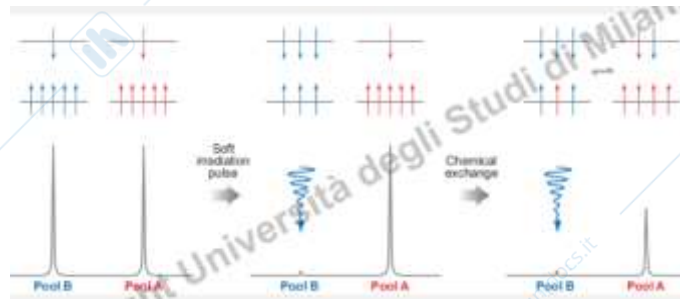
Si può prendere la ferritina e riassemblandola si toglie il Fe e si mette un complesso di Gd. Così ho parte esterna biocompatibile. Se no gli agenti di contrasto a base di ossidi di Fe (ag negativi) sono buoni per identificare metastasi e la zona con le NPs di ossido di ferro saranno più scure.

*Agenti di contrasto CEST Chemical Exchange Saturation Transfer*

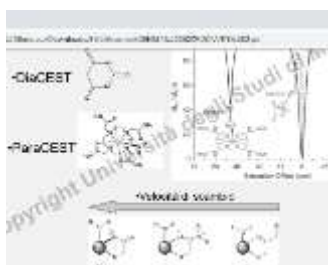
Ci deve essere uno scambio chimico tra la molecola d'acqua che lega il centro paramagnetico nella ottava/nona posizione e l'acqua di bulk. Questo scambio deve essere sufficientemente lento. Supponiamo di avere due segnali (pool A = acqua di bulk) e pool B = segnale in scambio con acqua di bulk, può essere l'acqua coordinata. Se c'è questo scambio lento, e se il raggio è selettivo e con un impulso soft per il mio segnale del pool B di protoni io andrò a saturare questo segnale e quindi questo non potrà più assorbire. Ma se c'è nello stesso tempo uno scambio chimico, allora alcune magnetizzazioni (e gli e-) del pool A andranno a scambiare con il pool B. Quindi l'effetto della saturazione del pool B porterà una diminuzione del segnale del pool A.

I primi agenti CEST non paramagnetici e per chiamate DIA-CEST (es passati ai PARA-CEST questi otterremo un distante dall'acqua di vogliamo andare a

DIA sono quasi sovrapposti). Quindi è una sicurezza quella di spostare il segnale il più possibile dall'acqua di bulk. Di solito si usano per questo complessi di lantanidi che NON SIANO il Gd (es. Eu). È importante che sugli N ho delle ammidi e non dei gruppi COOR e ciò perché così < la velocità di scambio perché trasferisco più lentamente la densità elettronica al metallo.



contenevano specie questo sono state barbiturico). Poi si è perché grazie a segnale molto bulk che noi ridurre (mentre nel



Gli agenti CEST non hanno ancora preso piede in ambito medico perché hanno bassa sensibilità.

Se carico su una stessa struttura nanoparticellare molti agenti CEST posso > la sensibilità. Si è provato a legarli con polimeri dendrimerici o con micelle o caricare dei liposomi. The ST (saturation transfer) efficiency is proportional to the number of mobile protons. A ST of 10% requires a total concentration of mobile protons of few mM. Troppo pochi protoni disponibili nelle piccole molecole biologiche.

LIMITI: 1. Bassa sensibilità 2. Tossicità a dosi elevate → accentrare molte sonde su una sola nanoparticella