5 - SPETTROSCOPIA UV - VISIBILE EMISSIONE

La maggior parte delle molecole, nello stato elettronico fondamentale, si trova in uno stato di singoletto, S_0, (tutti gli elettroni con spin appaiati, 2 elettroni per orbitale molecolare). L'assorbimento di radiazione più probabile è quello che avviene con conservazione della molteplicità di spin, e porta perciò ad uno stato di singoletto eccitato: S_1, S_2, …, S_n (primo, secondo, etc. n-esimo stato di singoletto eccitato) a seconda della lunghezza d'onda del fotone assorbito.
Una molecola che si trovi in uno stato elettronico eccitato tende spontaneamente a perdere l'eccesso di energia e a portarsi allo stato elettronico fondamentale.
Uno dei possibili modi di diseccitazione è attraverso l'emissione spontanea di radiazione elettromagnetica, di frequenza corrispondente alla differenza di energia tra i due stati.
Se sia lo stato eccitato sia quello fondamentale sono stati di singoletto, l'emissione spontanea viene detta Fluorescenza. (Più correttamente, la fluorescenza è l'emissione spontanea che comporta una transizione elettronica senza cambiamento di spin).

Quando una molecola è eccitata, si può venire a trovare ad un livello vibrazionale qualsiasi dello stato elettronico eccitato. Se si tratta di un livello vibrazionale eccitato, il primo processo che avviene (il più rapido), in soluzione, è la cessione dell'eccesso di energia vibrazionale, mediante urti, alle altre molecole, cioè fondamentalmente con aumento dell'agitazione termica dell'ambiente (calore). Il processo, non radiativo e intermolecolare, avviene, in genere, a stadi, con cessione di un quanto vibrazionale

alla volta, ed è detto Rilassamento Vibrazionale (VR). I tempi caratteristici sono dell'ordine di 10^{-12} s, vale a dire l'inverso delle tipiche frequenze di collisione in soluzione.

Le molecole si portano perciò rapidamente al livello vibrazionale fondamentale (v' = 0') dello stato elettronico eccitato. Il tempo di vita medio in uno stato elettronico eccitato è, infatti, relativamente più lungo: dell'ordine di 10^{-9} s, e tutte le molecole fanno in tempo a rilassare vibrazionalmente prima che abbia inizio una qualche forma di diseccitazione.
Perciò è a partire dallo stato v' = 0' che le molecole possono eventualmente decadere allo stato elettronico fondamentale con emissione di radiazione.

Le molecole, in particolare, possono passare ad un qualsiasi livello vibrazionale dello stato elettronico fondamentale. L'intensità della radiazione emessa consisterà in una serie di bande, caratterizzate da frequenze diverse a seconda del livello vibrazionale di arrivo. Se, come è il caso più frequente, lo stato elettronico di partenza è S_1, si avranno le transizioni:

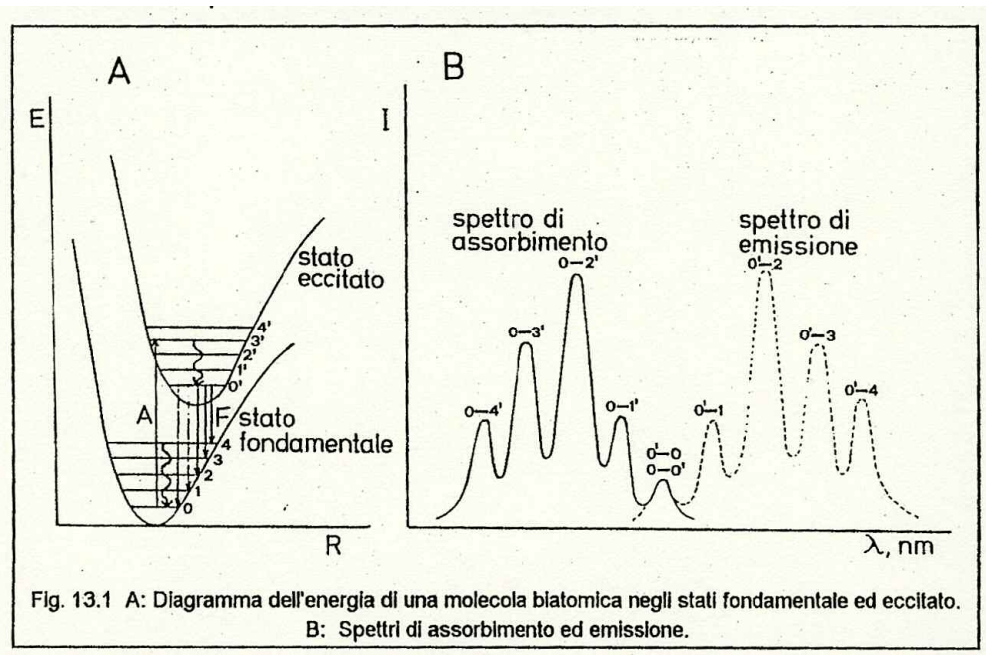


Fig. 13.1 A: Diagramma dell'energia di una molecola biatomica negli stati fondamentale ed eccitato. B: Spettri di assorbimento ed emissione.

S_1 (v' = 0') → S_0 (v = 0)
S_1 (v' = 0') → S_0 (v = 1)
S_1 (v' = 0') → S_0 (v = 2)
S_1 (v' = 0') → S_0 (v = 3)
……

La prima corrisponde alla transizione a maggior differenza di energia (minor lunghezza d'onda) ed è l'unica che può coincidere con una banda in assorbimento. Tutte le altre coinvolgono differenze di energia minori (lunghezze d'onda maggiori).
Lo spettro dell'intensità emessa in funzione della lunghezza d'onda, a partire da S_1, avrà l'aspetto mostrato in Figura (curva tratteggiata), cioè mostrerà una serie di picchi corrispondenti alle transizioni indicate sopra. Lo spettro di emissione può confrontarsi con lo spettro di assorbimento (curva continua) relativo alla transizione da S_0 a S_1., in cui sono mostrati picchi corrispondenti ai diversi livelli vibrazionali di arrivo in assorbimento.

A causa del rilassamento vibrazionale, una parte dell'energia dello stato eccitato è convertita in energia termica, e lo spettro di emissione risulta spostato a lunghezze d'onda maggiori rispetto a quello di assorbimento (legge di Stokes).
Come per lo spettro di assorbimento, si osserva una "struttura vibrazionale" relativa alle transizioni a diversi livelli vibrazionali dello stato elettronico di "arrivo" (eccitato per l'assorbimento, fondamentale per l'emissione). Nell'emissione, le differenze (in energia) fra due bande vibrazionali adiacenti dovrebbero corrispondere ad una differenza di energia tra stati vibrazionali adiacenti dello stato elettronico fondamentale, in particolare relativi ad uno specifico moto vibrazionale.

Poiché, in qualsiasi stato elettronico, livelli energetici vibrazionali adiacenti, relativi ad una data vibrazione hanno sempre la stessa differenza di energia, pari a $\Delta E = h\nu_0$, dove ν_0 è la frequenza vibrazionale di quel moto, indipendentemente dal livello considerato (purché sia valido il modello di un oscillatore armonico), si dovrebbe ottenere sempre la stessa differenza di energia, ed inoltre determinare la frequenza ν_0 di quel moto, in questo caso nello stato elettronico fondamentale.
(Si ricorda che, invece, in assorbimento, era possibile determinare, sulla base dell'analisi della `struttura vibrazionale' della banda di assorbimento, la frequenza di un moto vibrazionale dello stato elettronico eccitato, vedere Cap. 2).

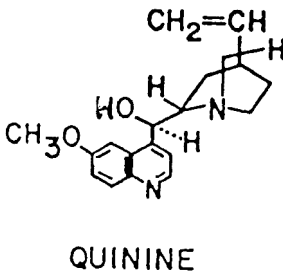
Come nel caso dell'assorbimento, vale il principio di Franck-Condon e le intensità relative dei diversi picchi della struttura vibrazionale sono determinate dai Fattori di Franck-Condon, cioè dalla sovrapposizione delle curve di distribuzione di probabilità dello stato $S_{1,0'}$ e degli stati corrispondenti ai vari v di S_0 ($S_{0,0}$, $S_{0,1}$, etc.).

In fase gas, o in solventi poco polari, le transizioni 0-0 in assorbimento e in emissione pressoché coincidono.
Inoltre, se la geometria e le frequenze vibrazionali dei due stati sono poco diverse, i due spettri sono approssimativamente le "immagini speculari" l'uno dell'altro.

5a - Effetto di un solvente polare:

In un solvente polare, oltre a prodursi un allargamento delle bande che impedisce la risoluzione della struttura vibrazionale,

come nel caso dell'assorbimento, si osserva uno spostamento verso il rosso dello spettro di emissione.
Confrontare, ad esempio, in Figura, gli spettri di assorbimento ed emissione del perilene in benzene e del solfato di chinina in acqua.



QUININE

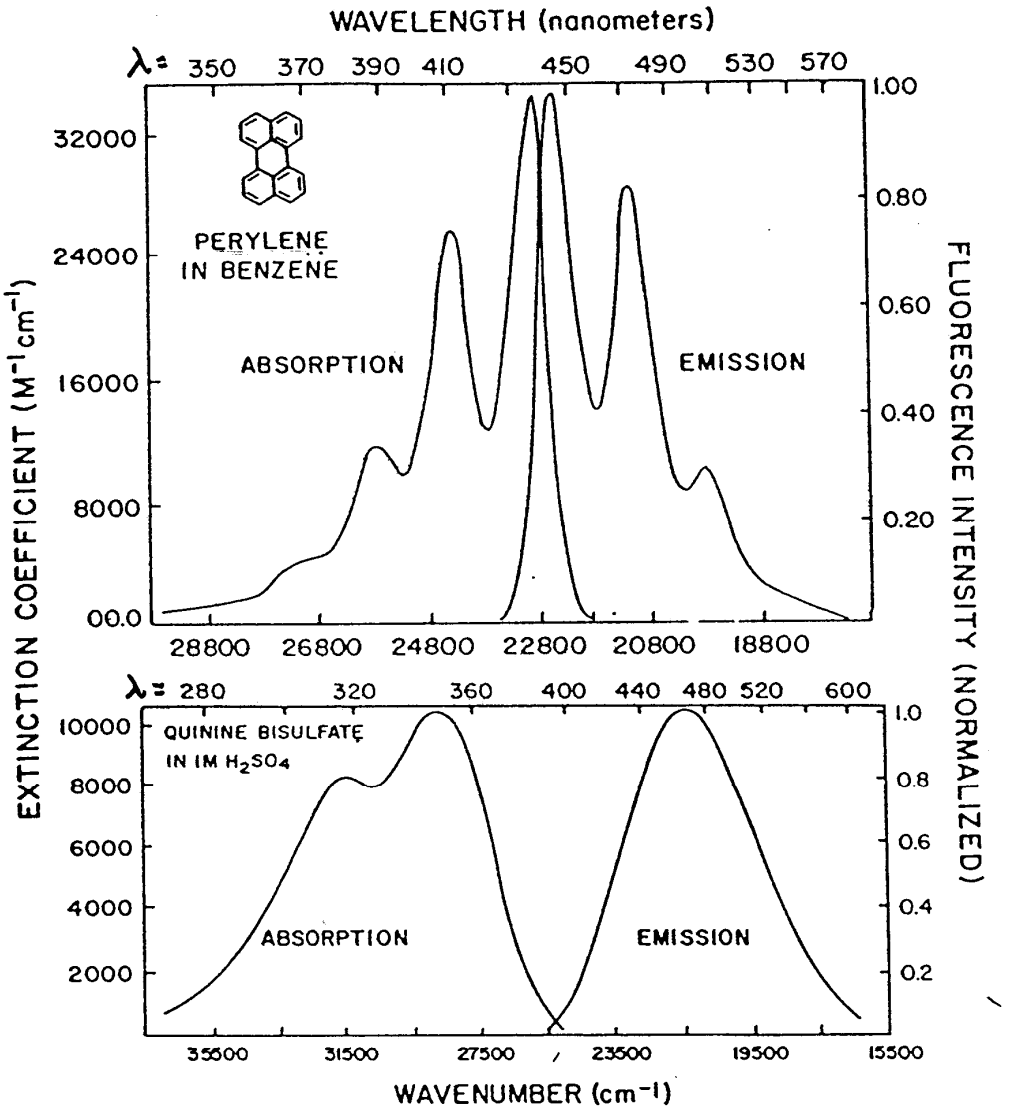
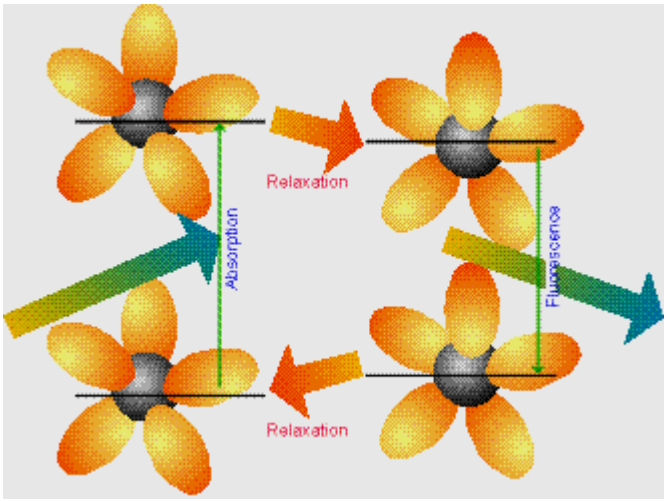


Figure 1.2. Absorption and fluorescence emission spectra of perylene and quinine. Emission spectra cannot be correctly presented on both the wavelength and wave number scales. The wave number presentation is correct in this instance. Wavelengths are shown for convenience. See Chapter 2. (From Ref. 2.)

Lo stato fondamentale e quello eccitato hanno, di norma carattere dipolare diverso (diverso momento di dipolo) e quindi diversa solvatazione. Durante la transizione elettronica in assorbimento (10^{-15} s), le molecole di solvente non fanno in tempo a ri-

arrangiarsi completamente attorno alla molecola eccitata e mantengono la solvatazione (orientazionale), di non equilibrio e quindi ad energia maggiore, caratteristica della polarità dello stato fondamentale. L'equilibrazione della solvatazione (rilassamento del solvente) avviene in tempi più lunghi (10^{-12} s) portando alla nuova situazione ad energia minore. L'eventuale emissione di fluorescenza ha luogo partendo da quest'ultimo livello energetico.

Anche durante l'emissione, tuttavia, le molecole di solvente non hanno tempo di riorientarsi secondo la diversa polarità dello stato fondamentale, e la transizione porta ad una situazione di energia superiore rispetto al vero stato fondamentale, a causa del non equilibrio della solvatazione. Il rilassamento del solvente avviene, anche in questo caso, in tempi successivi.



Il risultato globale, come mostra la figura, è che la transizione in assorbimento corrisponde ad una differenza di energia maggiore di quella in emissione, anche se gli stati molecolari coinvolti sono gli stessi.
L'effetto è tanto più grande quanto maggiore è la differenza di momento di dipolo tra i due stati.

In un solvente non polare la differenza di solvatazione è trascurabile, e l'energia della luce emessa non differisce sostanzialmente da quella assorbita. Viceversa, quanto più polare è il solvente, tanto più grande è la differenza tra solvatazione di non

equilibrio e di equilibrio, e tanto più grande è lo spostamento verso il rosso della banda di emissione.

Ad esempio, la lunghezza d'onda del massimo di emissione del triptofano è molto sensibile alla polarità del solvente e al fatto che Trp si trovi più o meno esposto al solvente. Nell'azzurrina, Trp si trova all'interno, in un ambiente poco polare, e λ_{max} = 308 nm; nel glucagone Trp si trova a contatto con la fase acquosa, e λ_{max} = 362 nm.
Variazioni conformazionali della proteina, denaturazioni o associazioni con substrati o altre proteine possono portare Trp in un microambiente più polare, con spostamento dell'emissione a lunghezze d'onda maggiori.

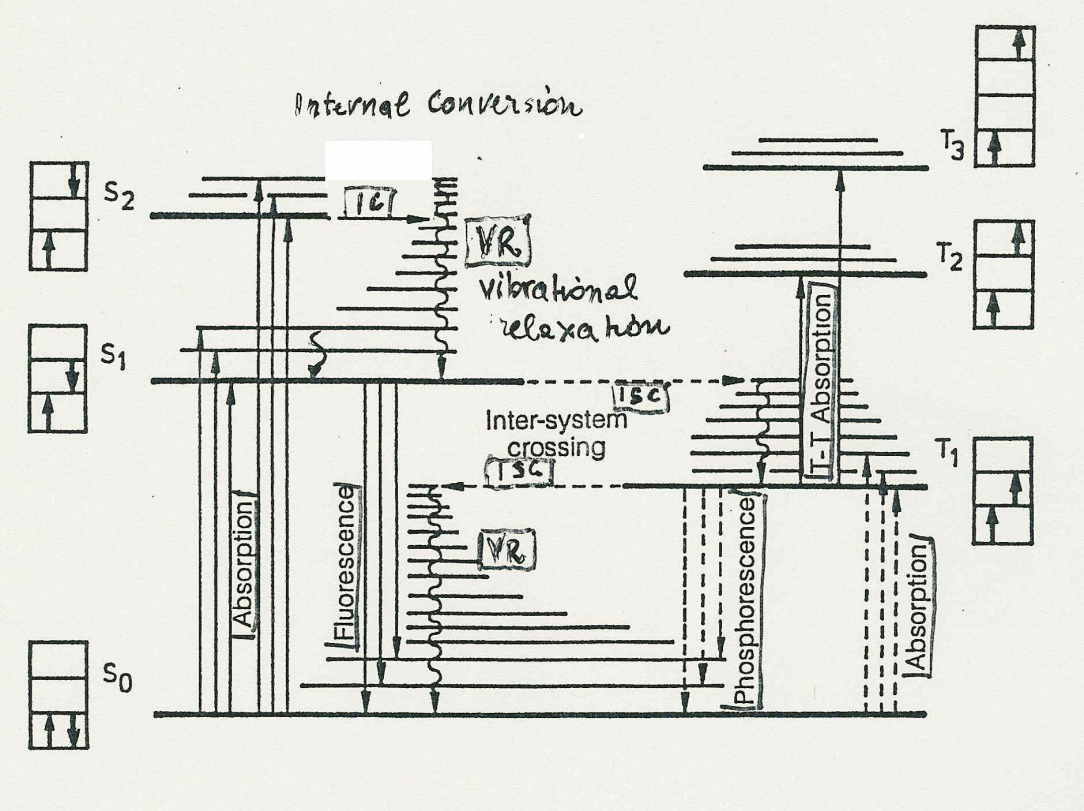
5b - Processi Non Radiativi

L'energia di eccitazione elettronica può essere persa in modi diversi, competitivi con l'emissione di radiazione em:

- Conversione Interna (IC)
- Trasferimento di Energia (ET)
- Intersystem Crossing (ISC)
- Quenching (smorzamento) della Fluorescenza
- Reazioni Fotochimiche

Diagramma di Jablonski

Alcuni dei processi radiativi e non radiativi e dei livelli energetici coinvolti sono indicati nel Diagramma di Jablonski in Figura.



CONVERSIONE INTERNA (IC):

Una transizione non radiativa intramolecolare "orizzontale" (ad energia costante) da uno stato elettronico eccitato ad un altro stato elettronico ad energia minore, con conservazione della molteplicità di spin (es.: $S_2 \rightarrow S_1$, $S_1 \rightarrow S_0$, etc.). L'eccitazione di natura elettronica è convertita in eccitazione vibrazionale.
Anche questa transizione avviene partendo dallo stato vibrazionale fondamentale di un dato stato elettronico. Si passa ad un livello vibrazionale eccitato dello stato elettronico inferiore, e l'eccesso di energia vibrazionale nel nuovo stato viene dispersa nel veloce rilassamento vibrazionale.
Il processo è favorito se i due stati elettronici differiscono poco in energia (come avviene per molti stati elettronici eccitati. Il diagramma nella Figura successiva non è corretto: in genere la

differenza di energia tra 2 stati elettronici eccitati è molto minore della loro differenza di energia con lo stato fondamentale). È favorito se la molecola ha molti gradi di libertà vibrazionali a bassa frequenza (molecola poco rigida, con gradi di libertà torsionali). Come nella transizione radiativa, la probabilità dipende dalla sovrapposizione tra le curve di distribuzione di probabilità dei due stati vibrazionali coinvolti (fattori di Franck-Condon).
Per stati di tipo $\pi\pi^*$, IC è più rapida dell'emissione di radiazione quando l'eccitazione porta ad uno stato elettronico eccitato superiore al primo. Perciò la fluorescenza e gli altri processi competitivi, hanno luogo, tranne poche eccezioni (azulene e derivati, rodopsina) partendo sempre da S_1.

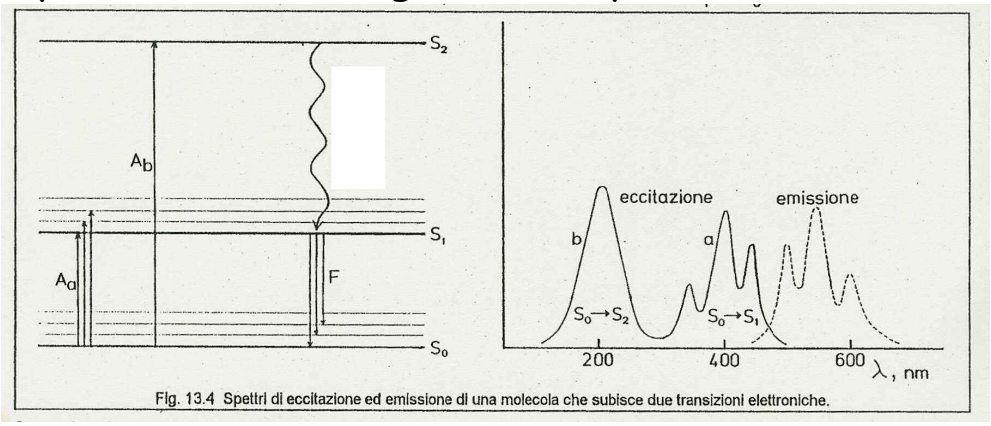


Fig. 13.4 Spettri di eccitazione ed emissione di una molecola che subisce due transizioni elettroniche.

Ne risulta, inoltre, che lo spettro di emissione è approssimativamente l'immagine speculare solo della banda di assorbimento a lunghezza d'onda maggiore (transizione $S_0 \rightarrow S_1$), e che la forma dello spettro di emissione (non l'intensità assoluta) non dipende dalla frequenza di eccitazione.
Naturalmente anche la conversione interna $S_1 \rightarrow S_0$ può essere rapida, in particolare per molecole poco rigide, la cui fluorescenza risulterà perciò bassa (o nulla).

INTERSYSTEM CROSSING (ISC):

È una transizione non radiativa orizzontale analoga alla IC, favorita dagli stessi fattori che favoriscono IC, ma che comporta

una inversione dello spin, cioè il passaggio da singoletto a tripletto. Il processo sarebbe "proibito" e risulta perciò più difficile (lento) rispetto a IC. Si tratta in genere di una transizione $S_1 \rightarrow T_1$.
L'inversione dello spin è resa possibile, in parte, da qualche tipo di interazione magnetica del dipolo magnetico di spin dell'elettrone.
Spesso si tratta dell'interazione fra il momento magnetico di spin e il momento magnetico dovuto al moto orbitalico (rotazione dell'elettrone attorno al nucleo), nota con il nome di Interazione Spin-Orbita. L'interazione è abbastanza rilevante in presenza di atomi con numero atomico grande (cosiddetti, impropriamente, "atomi pesanti") come S, Br, I, etc. (effetto atomo pesante), in quanto dipende dalla quarta potenza del numero atomico.
L'interazione di tipo magnetico può aver luogo anche con i dipoli magnetici di spin di altri elettroni spaiati presenti nel campione, ad esempio in presenza di gruppi prostetici con metalli di transizione aventi elettroni spaiati negli orbitali d (complessi paramagnetici), vedere la discussione sulle metallo-proteine nel Cap. 2.

L'intersystem crossing, facendo diminuire la popolazione dello stato eccitato, determina una diminuzione della fluorescenza.
Ne deriva che sistemi in cui sono presenti gruppi prostetici paramagnetici hanno, in genere, scarsa fluorescenza.
Le molecole, passate mediante ISC ad uno stato vibrazionale eccitato del tripletto, rilassano velocemente al corrispondente livello vibrazionale fondamentale. La ulteriore perdita di eccitazione elettronica dal tripletto può aversi ancora una volta secondo percorsi non radiativi (ISC inverso a S_0, ET, quenching generico, reazioni chimiche) o radiativi.