

Capitolo 7

METODI SPETTROSCOPICI CON LUCE POLARIZZATA

7.1 SPETTROSCOPIA DI DICROISMO CIRCOLARE E LINEARE

7.1.1 Introduzione

Già dai tempi di Louis Pasteur era noto che, se un raggio di luce polarizzata linearmente attraversa uno dei due enantiomeri di una sostanza chirale, il piano di polarizzazione viene ruotato di un certo angolo [6001, 8201]. Tale fenomeno prende il nome di *rotazione ottica*. Il comportamento dei due enantiomeri differisce nel fatto che essi ruotano il piano della luce polarizzata linearmente dello stesso angolo, ma in direzioni opposte; di qui la consuetudine di indicare gli enantiomeri con il termine di composti otticamente attivi.

L'attività ottica delle molecole chirali ha origine dal fatto che esse interagiscono in maniera differente con le due componenti polarizzate circolarmente della luce. Le varie manifestazioni dell'attività ottica si possono distinguere a seconda che si basino su fenomeni di dispersione, di assorbimento o di emissione di radiazione. In questa sezione verrà descritta l'attività ottica delle sostanze in condizioni di assorbimento, sulla quale si basa la tecnica del dicroismo circolare. Saranno inoltre discussi brevemente i fenomeni dispersivi, sui quali si basa la tecnica della dispersione rotatoria ottica.

Si è ritenuto opportuno includere in questa sezione anche una breve descrizione della tecnica del dicroismo lineare, nonostante essa non abbia nulla a che fare con l'attività ottica.

Prima di procedere è opportuno richiamare alcuni concetti riguardanti la radiazione elettromagnetica e le sue modalità di polarizzazione.

7.1.2 Luce polarizzata

Com'è noto, una generica radiazione elettromagnetica è formata da un fascio di onde, ognuna delle quali è costituita da un campo elettrico e un campo magnetico oscillanti su piani perpendicolari fra loro e perpendicolari alla direzione di propagazione

dell'onda (Figura 1.1). Tali campi si propagano a una velocità $v = c_0/n$, dove c_0 è la velocità della luce nel vuoto (circa $3 \times 10^8 \text{ m s}^{-1}$) e n è l'indice di rifrazione del materiale attraversato dalla radiazione. Poiché i vettori del campo elettrico e magnetico sono sempre perpendicolari fra loro, spesso è sufficiente considerare uno solo dei due per descrivere le proprietà della radiazione (la scelta, arbitraria, ricade solitamente sul campo elettrico). Il piano individuato dalla direzione di oscillazione del campo elettrico e dalla direzione di propagazione dell'onda è il suo *piano di polarizzazione* (Figura 7.1.1).

La luce prodotta dalle sorgenti comuni (sole, lampade) è costituita da un insieme di onde il cui piano di polarizzazione è orientato in modo casuale attorno alla direzione di propagazione: una radiazione di questo tipo si dice *non polarizzata*. Se, al contrario, tutte le onde che costituiscono la radiazione possiedono il medesimo piano di polarizzazione, si dice che l'onda è *polarizzata linearmente* (Figura 7.1.1). La direzione di oscillazione del campo elettrico è detta direzione di polarizzazione, o semplicemente polarizzazione, dell'onda.

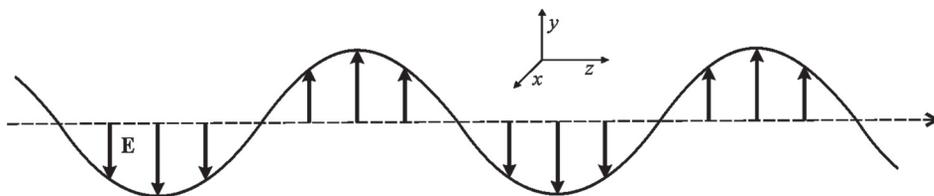


Figura 7.1.1 – Rappresentazione dell'oscillazione del vettore del campo elettrico di un'onda polarizzata linearmente sul piano yz che si propaga nello spazio lungo l'asse z . La direzione di polarizzazione dell'onda è quella dell'asse y . Ciascun vettore rappresenta il campo elettrico nello stesso istante di tempo in posizioni contigue, oppure nello stesso punto dello spazio a tempi successivi (in questo caso l'asse z rappresenta il tempo).

Un'onda con polarizzazione circolare è caratterizzata dal fatto che il vettore del campo elettrico, mentre si propaga, ruota intorno all'asse di propagazione (Figura 7.1.2). Durante il periodo dell'onda il vettore del campo elettrico non cambia in modulo, ma in direzione, rimanendo perpendicolare alla direzione di propagazione. In altre parole, nel caso della polarizzazione circolare è la direzione del vettore campo elettrico ad oscillare, mentre il modulo è costante.

Un'onda può presentare polarizzazione circolare in due direzioni: a destra e a sinistra. Per un'onda polarizzata circolarmente a destra, la rotazione del vettore del campo elettrico osservata in direzione della sorgente dell'onda avviene in senso orario; l'estremità di tale vettore, propagandosi nello spazio, descrive un'elica destrorsa. Nel caso di un'onda polarizzata circolarmente a sinistra, la rotazione del vettore osservata in direzione della sorgente avviene in senso antiorario; l'estremità del vettore che si propaga descrive un'elica levogira (Figura 7.1.2). Un'onda polarizzata circolarmente può dunque essere considerata come una radiazione dotata di chiralità.

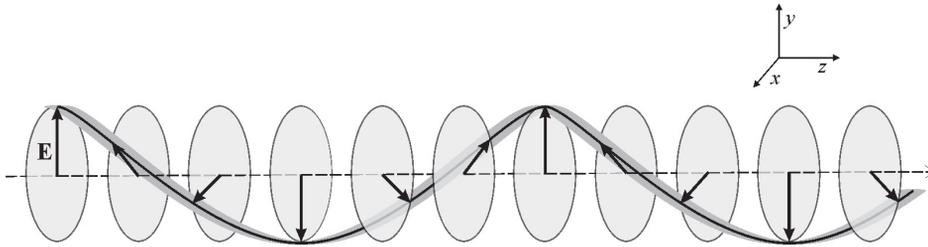


Figura 7.1.2 – Rappresentazione dell'oscillazione del vettore del campo elettrico di un'onda con polarizzazione circolare a sinistra che si propaga lungo l'asse z . Ciascun vettore rappresenta il campo elettrico nello stesso istante di tempo in posizioni contigue, oppure nello stesso punto dello spazio a tempi successivi (in questo caso l'asse z rappresenta il tempo).

È semplice verificare che un'onda con polarizzazione circolare si può ottenere dalla composizione di due onde con la stessa frequenza ed ampiezza massima, polarizzate linearmente su due piani perpendicolari e sfasate di $\pi/2$, in modo che quando il modulo del campo elettrico della prima onda raggiunge il suo valore massimo, quello della seconda è zero.

Per la discussione che segue è importante osservare che, viceversa, un'onda polarizzata linearmente si può ottenere sommando due onde con la stessa frequenza ed ampiezza aventi polarizzazione circolare opposta (Figura 7.1.3). La differenza di fase fra le due onde polarizzate circolarmente determina l'orientazione del piano di polarizzazione della risultante onda polarizzata linearmente.

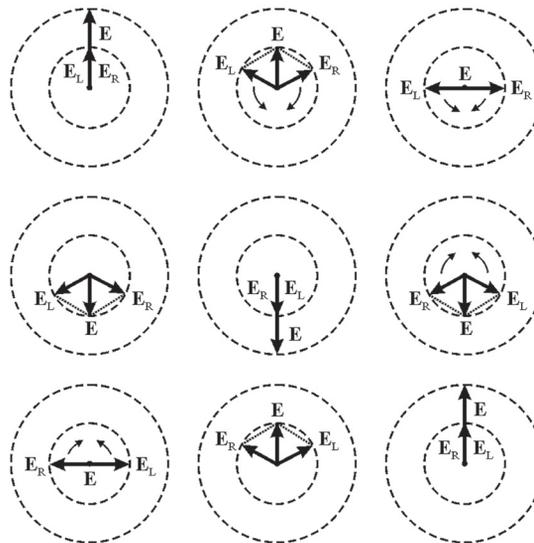


Figura 7.1.3 – Composizione dei vettori campo elettrico \mathbf{E}_L e \mathbf{E}_R di due onde con stessa frequenza ed ampiezza e polarizzazione circolare opposta. Il vettore risultante \mathbf{E} oscilla su un piano perpendicolare alla direzione di propagazione, dando origine ad un'onda polarizzata linearmente.

7.1.3 Birifrangenza e dicroismo circolare

In termini generali, il fenomeno dell'attività ottica si può spiegare considerando che una sostanza chirale interagisce in modo diverso con le due componenti chirali – ovvero polarizzate circolarmente – della luce polarizzata linearmente. In particolare, la rotazione ottica è dovuta al fatto che le radiazioni polarizzate circolarmente a sinistra e a destra si propagano nel mezzo otticamente attivo con velocità diverse (*birifrangenza circolare*). In altre parole $n_L(\lambda) \neq n_R(\lambda)$, dove $n_L(\lambda)$ e $n_R(\lambda)$ sono gli indici di rifrazione per la radiazione di lunghezza d'onda λ con polarizzazione circolare rispettivamente a sinistra e a destra.

Si consideri una radiazione polarizzata linearmente, composta da due onde polarizzate circolarmente in senso opposto, che incide su un mezzo otticamente attivo. Nell'attraversare il mezzo, una delle due componenti polarizzate circolarmente si propaga più velocemente dell'altra; quando esse fuoriescono dal mezzo, la loro differenza di fase è cambiata. Pertanto l'onda risultante è ancora linearmente polarizzata, ma il piano di polarizzazione risulterà ruotato di un certo angolo rispetto a quello dell'onda incidente.

Tale angolo dipende dalla differenza fra gli indici di rifrazione n_L e n_R , dallo spessore del campione attraversato e dalla lunghezza d'onda della radiazione. Lo studio della variazione della rotazione ottica al variare della lunghezza d'onda si dice *dispersione rotatoria ottica* (*optical rotation dispersion*, ORD) [6001].

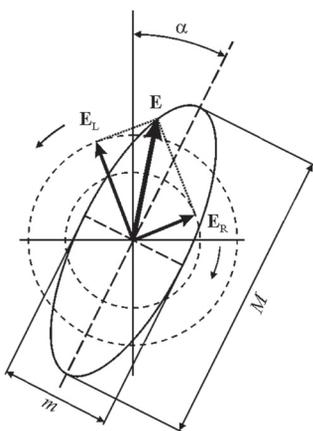


Figura 7.1.4 – Composizione dei vettori campo elettrico di due onde con la stessa frequenza, opposta polarizzazione circolare e diversa ampiezza ($E_L \neq E_R$). L'onda risultante si dice polarizzata ellitticamente.

Nella regione di lunghezze d'onda in cui il campione assorbe la radiazione, si può verificare un diverso assorbimento da parte della sostanza otticamente attiva per le due componenti polarizzate circolarmente di un'onda linearmente polarizzata. Ciò significa che la sostanza possiede diversi coefficienti di assorbimento per la luce levogira e destrogira, $\epsilon_L(\lambda) \neq \epsilon_R(\lambda)$. Questo fenomeno prende il nome di *dicroismo circolare* (*circular dichroism*, CD) [9701, 0001].

In questo caso, quando le due componenti polarizzate circolarmente fuoriescono dal campione avranno, oltre ad uno sfasamento diverso, anche diversa ampiezza. La loro composizione dà origine ad una radiazione polarizzata non più linearmente, ma ellitticamente: l'estremità del vettore campo elettrico risultante, nella sua proiezione su un piano perpendicolare alla direzione di propagazione dell'onda, descrive ora un'ellisse (Figura 7.1.4)

L'asse principale dell'ellisse e la direzione di polarizzazione della luce incidente individuano l'angolo di rotazione ottica (α nella Figura 7.1.4) dovuto ai diversi valori dell'indice di rifrazione per la luce levogira e destrorigira.

Il differente assorbimento per le due componenti polarizzate circolarmente si esprime attraverso l'ellitticità θ , definita come l'angolo la cui tangente è pari al rapporto fra l'asse minore (m) e quello maggiore (M) dell'ellisse (Figura 7.1.4):

$$\tan \theta = \frac{m}{M}$$

Come si vedrà nel paragrafo successivo, il valore dell'ellitticità è legato alla differenza di assorbimento per le due componenti polarizzate circolarmente e dipende dalla lunghezza d'onda della radiazione. La misura dell'ellitticità in funzione della lunghezza d'onda costituisce lo scopo della spettroscopia di dicroismo circolare. Essa può essere effettuata in varie regioni spettrali, ma il caso più comunemente studiato è quello del dicroismo circolare nella regione UV-vis, dovuto cioè alle transizioni elettroniche nelle molecole. Meno comune è la spettroscopia CD nell'infrarosso, nella quale sono coinvolte transizioni vibrazionali.

Lo spettro di dicroismo circolare di una specie chimica in soluzione, come quello di assorbimento isotropo (cioè eseguito utilizzando luce non polarizzata), è costituito da bande. Vi è tuttavia una importante differenza fra gli spettri di assorbimento e quelli di dicroismo circolare: mentre i primi presentano solo segnali positivi, le bande CD, essendo dovute a differenze di assorbimento, possono essere positive o negative (Figura 7.1.5).

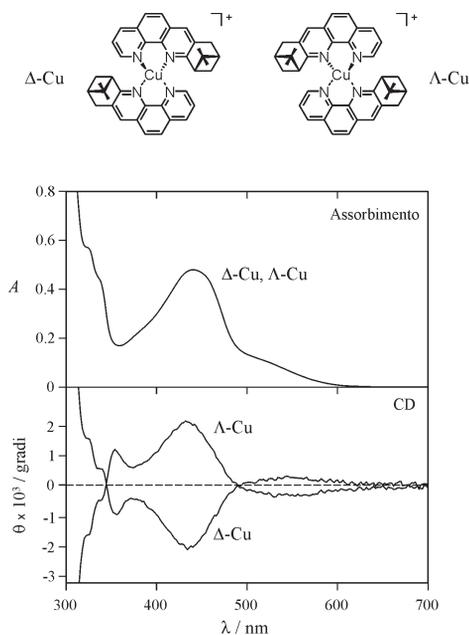


Figura 7.1.5 – Spettro di assorbimento (in alto) e spettri di dicroismo circolare (in basso) di due complessi enantiomerici di Cu(I) in soluzione 1.0×10^{-4} mol L $^{-1}$ in CH $_2$ Cl $_2$ a 298 K [9801]. Notare che i due enantiomeri possiedono lo stesso spettro di assorbimento e spettri CD di segno opposto.

Poiché la dispersione rotatoria ottica e il dicroismo circolare sono causati dallo stesso fenomeno (diversa interazione della luce levogira e destrogira con una sostanza otticamente attiva), non deve sorprendere che esista una stretta relazione fra gli spettri ORD e CD della stessa sostanza. Essi sono legati fra loro dalle cosiddette relazioni di Kramers-Krönig, che permettono di risalire allo spettro ORD conoscendo lo spettro CD e viceversa. Solitamente lo spettro ORD si registra nei campi spettrali in cui il composto esaminato non presenta bande di assorbimento; al contrario, esso presenterà uno spettro CD nella propria regione di assorbimento.

Dal punto di vista qualitativo, la relazione fra gli spettri ORD e CD è simile alla relazione tra lo spettro di dispersione (variazione dell'indice di rifrazione con la frequenza dell'onda) e quello di assorbimento isotropo (Figura 7.1.6a). In corrispondenza delle bande di assorbimento, particolarmente quando ben risolte, si osserva che l'indice di rifrazione aumenta all'aumentare della frequenza (cioè al diminuire di λ), finché, nella regione in cui si ha il massimo di assorbimento, l'indice di rifrazione diminuisce rapidamente con la frequenza fino a raggiungere un minimo. Aumentando ulteriormente la frequenza, l'indice di rifrazione riprende l'andamento crescente.

Un comportamento analogo al variare della frequenza si osserva per la differenza di indice di rifrazione (rotazione ottica) e la differenza di assorbimento (dicroismo). Tale comportamento, limitatamente alla ORD, prende il nome di effetto Cotton e può essere sia positivo che negativo. Nell'effetto Cotton positivo la dispersione rotatoria ottica ha lo stesso andamento dell'indice di rifrazione nel caso isotropo e si verifica in corrispondenza di una banda CD positiva (Figura 7.1.6b). Viceversa, l'effetto Cotton negativo si verifica in corrispondenza di una banda CD negativa (Figura 7.1.6c). Si può notare che la lunghezza d'onda alla quale la rotazione ottica si annulla corrisponde al massimo dell'ellitticità.

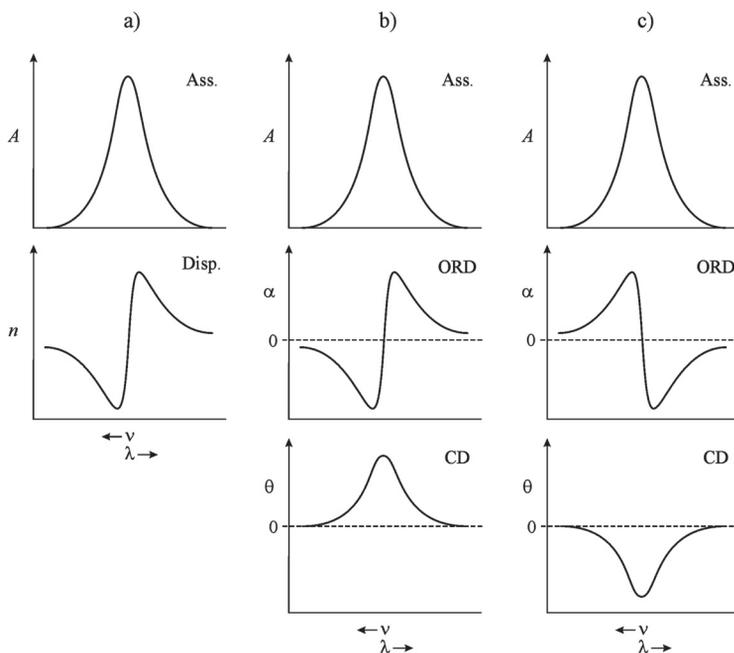


Figura 7.1.6 – Relazione fra lo spettro di assorbimento isotropo e lo spettro di dispersione (a) e relazione fra gli spettri di assorbimento, ORD e CD nel caso di effetto Cotton positivo (b) e negativo (c).

La discussione dettagliata dell'origine del dicroismo circolare va fatta in termini quantomeccanici e, data la complessità dell'argomento, è al di fuori dello scopo di questo testo. Vale comunque la pena di ricordare che qualsiasi transizione elettronica da uno stato iniziale i a uno stato finale f è caratterizzata da una forza rotatoria $R_{i \rightarrow f}$. Essa determina l'intensità dello spettro di dicroismo circolare e può essere calcolata integrando lo spettro CD nella regione spettrale della transizione esaminata. In assenza di orientazione preferenziale delle molecole, la forza rotatoria della transizione è uguale alla parte immaginaria del prodotto scalare fra il momento di dipolo elettrico $\boldsymbol{\mu}$ e il momento di dipolo magnetico \mathbf{m} indotti dalla luce sulla molecola (momenti di transizione, Figura 7.1.7):

$$R_{i \rightarrow f} = \text{Im}(\langle f | \mathbf{m} | i \rangle \cdot \langle i | \boldsymbol{\mu} | f \rangle)$$

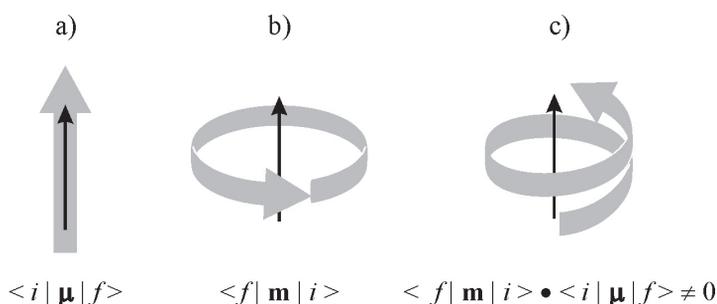


Figura 7.1.7 – Rappresentazione schematica della variazione di distribuzione elettronica indotta in una molecola dal campo elettromagnetico della radiazione nel caso di una transizione di dipolo elettrico (a), di dipolo magnetico (b) e dotata di forza rotatoria (c). In quest'ultimo caso alla transizione è associato il fenomeno dell'attività ottica.

Se la distribuzione delle orientazioni molecolari non è isotropa, l'espressione di $R_{i \rightarrow f}$ diventa molto più complessa. Come discusso in precedenza, il dicroismo circolare si osserva per molecole chirali, cioè prive di un piano o di un centro di simmetria perché dotate di atomi stereogenici o perché intrinsecamente asimmetriche per motivi strutturali (ad esempio composti stericamente ingombri, come l'1,1'-dinaphilene, o i complessi metallici ottaedrici con tre leganti bidentati), conformazionali (come le proteine con struttura ad elica) o topologici (ad esempio, molecole con la forma di un nodo a trifoglio). Per una data transizione la forza rotatoria di un enantiomero è uguale e di segno opposto a quella dell'altro enantiomero. Nelle molecole achirali, per ragioni di simmetria, si verifica che i due vettori $\boldsymbol{\mu}$ e \mathbf{m} sono perpendicolari fra loro oppure uno di essi è uguale a zero, pertanto $R_{i \rightarrow f} = 0$ e non si ha dicroismo circolare. Naturalmente non tutte le bande di assorbimento isotropo di una sostanza otticamente attiva danno necessariamente origine a dicroismo circolare; per alcune di esse, infatti, potrebbe accadere che i coefficienti di assorbimento ϵ_R e ϵ_L siano uguali.

In presenza di un campo magnetico statico qualsiasi campione diventa otticamente attivo in una direzione parallela a quella del campo magnetico e mostra dicroismo circolare di entità proporzionale all'intensità del campo applicato. Questo effetto, che non ha nulla a che vedere con la chiralità molecolare, prende il nome di *dicroismo circolare magnetico* (MCD). I due enantiomeri di una molecola chirale e la loro miscela racemica possiedono lo stesso spettro di dicroismo circolare magnetico, a differenza di quanto

accade per il dicroismo circolare naturale. Inoltre, poiché il segnale MCD cambia segno invertendo la direzione del campo magnetico rispetto a quella di propagazione della luce, l'effetto MCD svanisce se la radiazione viene fatta passare attraverso il campione due volte in direzioni opposte. Questo metodo consente di distinguere in modo semplice il dicroismo circolare magnetico da quello naturale.

Si può osservare dicroismo circolare anche per molecole achirali immerse in ambienti chirali (ad esempio, sciolte in un solvente chirale o complessate da molecole chirali) [0301]. Questo effetto, generalmente molto debole, prende il nome di *dicroismo circolare indotto* (ICD).

Sulla misurazione della polarizzazione circolare della luce *emessa* da un certo campione si fonda la tecnica della spettroscopia di luminescenza polarizzata circolarmente che verrà descritta nella sezione 7.2. Essa può essere dunque considerata il corrispettivo in emissione del dicroismo circolare.

7.1.4 Dicroismo lineare

L'interazione fra la radiazione polarizzata linearmente e le sostanze chimiche costituisce la base di un'altra tecnica piuttosto diffusa, quella del *dicroismo lineare* (*linear dichroism*, LD) [9701]. Essa non ha niente a che fare con la chiralità molecolare e con il dicroismo circolare e trae origine dal fatto che la probabilità di indurre una transizione elettronica con una radiazione elettromagnetica è proporzionale al quadrato del coseno dell'angolo fra il momento di dipolo della transizione e la direzione di polarizzazione della radiazione (che, ricordiamo, coincide con la direzione di oscillazione del campo elettrico). Pertanto, se si usa radiazione polarizzata linearmente in una certa direzione, una transizione ha la massima probabilità di avvenire se il momento di dipolo corrispondente è orientato parallelamente alla direzione di polarizzazione, mentre ha probabilità nulla se è orientato perpendicolarmente. La dipendenza dell'assorbimento di un campione dalla direzione di polarizzazione della luce si chiama dicroismo lineare.

In un campione isotropo (ad esempio una soluzione) le molecole, e quindi anche i loro momenti di transizione, possono assumere tutte le possibili orientazioni. Per osservare dicroismo lineare occorre invece che le molecole del campione siano tutte o in parte orientate secondo una certa direzione, come accade ad esempio in cristalli, polimeri, film sottili, gel o cristalli liquidi. In certi casi l'orientazione delle molecole in un campione isotropo può essere ottenuta mediante campi elettrici.

Lo spettro di dicroismo lineare consiste nel riportare in funzione della lunghezza d'onda la differenza fra l'assorbanza della radiazione con polarizzazione parallela (A_{\parallel}) e quella con polarizzazione perpendicolare (A_{\perp}) rispetto all'orientazione preferenziale delle molecole:

$$\Delta A_{LD}(\lambda) = A_{\parallel}(\lambda) - A_{\perp}(\lambda)$$

Analoghe misurazioni di polarizzazione lineare della luce emessa da un campione costituiscono la tecnica dell'anisotropia di luminescenza che verrà descritta nella sezione 7.3. Essa può essere dunque considerata il corrispettivo in emissione della tecnica del dicroismo lineare.

7.1.5 Grandezze misurate nella spettroscopia di dicroismo circolare

Come detto in precedenza, la differenza di assorbanza manifestata da un campione otticamente attivo per le due componenti polarizzate circolarmente di un'onda polarizzata linearmente si traduce nella comparsa di polarizzazione ellittica della radiazione emergente. L'entità di tale polarizzazione si esprime attraverso l'ellitticità θ :

$$\theta = \arctan \frac{m}{M} \quad [\text{gradi o millesimi di grado (millidegree)}]$$

in cui m e M sono rispettivamente l'asse minore e maggiore dell'ellisse (Figura 7.1.4).

La grandezza che si misura sperimentalmente nella spettroscopia CD è la differenza fra l'assorbanza della luce levogira (A_L) e quella della luce destrogira (A_R) ad una data lunghezza d'onda λ :

$$\Delta A_{\text{CD}}(\lambda) = A_L(\lambda) - A_R(\lambda)$$

Ad una qualsiasi lunghezza d'onda l'ellitticità è legata alla differenza di assorbanza dalla seguente relazione:

$$\theta = \frac{180}{4\pi} \ln 10 \times \Delta A = 32,98 \times \Delta A$$

Nel caso di una sostanza enantiomericamente pura in soluzione vale la legge di Lambert-Beer scritta nella forma:

$$\Delta A = \Delta \varepsilon c l$$

in cui $\Delta \varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R$ (normalmente espresso in $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$) alla lunghezza d'onda esaminata, c è la concentrazione della specie assorbente in mol L^{-1} e l è il cammino ottico della radiazione in cm.

A volte, specialmente in campo biologico, gli spettri di dicroismo circolare riportano al posto di $\Delta \varepsilon$ l'ellitticità molare:

$$[\theta] = \frac{\theta}{c l} \quad [\text{gradi L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}]$$

La relazione fra l'ellitticità molare e il coefficiente di assorbimento differenziale è molto semplice:

$$\Delta \varepsilon = \frac{[\theta]}{32,98}$$

Spesso, per ragioni storiche, l'ellitticità molare si trova espressa in gradi $\text{cm}^2 \text{dmol}^{-1}$; in questo caso $\Delta \varepsilon$ si ricava dividendo il valore di $[\theta]$ per 3298.

Il rapporto fra $\Delta \varepsilon$ e ε a una determinata lunghezza d'onda dà il fattore di dissimmetria dell'assorbimento:

$$g_{\text{abs}}(\lambda) = \frac{\Delta \varepsilon(\lambda)}{\varepsilon(\lambda)}$$

dove $\varepsilon(\lambda) = [\varepsilon_L(\lambda) + \varepsilon_R(\lambda)]/2$. L'analisi della funzione $g_{\text{abs}}(\lambda)$ e del corrispettivo fattore di dissimmetria dell'emissione $g_{\text{em}}(\lambda)$, ricavabile da misure di luminescenza polarizzata circolarmente (paragrafo 7.2.2), consente di studiare le differenze strutturali fra stato elettronico fondamentale ed eccitato, e la natura e le proprietà delle vibrazioni molecolari nei due stati.

7.1.6 Strumentazione e procedure sperimentali

Gli spettri di dicroismo circolare si ottengono con uno strumento detto spettropolarimetro CD o più semplicemente dicrografo. Si tratta in pratica di uno spettrofotometro in grado di misurare la differenza di assorbanza $A_L - A_R$ a tutte le lunghezze d'onda. Esso deve quindi possedere, oltre ai componenti di uno spettrofotometro convenzionale (lampada, monocromatore, portacampione, rivelatore), un polarizzatore circolare della luce (Figura 7.1.8). Il modo più semplice di costruire un polarizzatore (o un analizzatore) circolare è quello di accoppiare un polarizzatore lineare con un elemento ottico in grado di introdurre un ritardo di fase fra radiazioni polarizzate linearmente su piani perpendicolari. Infatti, come descritto in precedenza, un'onda polarizzata circolarmente è composta da due onde polarizzate linearmente su piani perpendicolari e sfasate di $\pi/2$, ovvero di $\lambda/4$. L'elemento ritardante è in genere un modulatore fotoelastico (PEM), contenente un materiale isotropo che diventa otticamente anisotropo in seguito all'applicazione di un potenziale elettrico. La luce non polarizzata della sorgente viene prima polarizzata linearmente, poi attraversa il modulatore fotoelastico (il cui asse principale deve essere orientato a 45° rispetto al piano del polarizzatore lineare) che la converte in luce polarizzata circolarmente. Variando il potenziale elettrico che comanda il PEM con una certa frequenza f , è possibile modulare il ritardo da esso introdotto fra le componenti linearmente polarizzate su piani perpendicolari in ingresso fra $+\pi/2$ e $-\pi/2$. In tal modo il polarizzatore converte la luce non polarizzata in radiazione la cui polarizzazione circolare varia da destra a sinistra con frequenza f . La radiazione così polarizzata attraversa il campione e viene misurata da un rivelatore che, accoppiato ad un amplificatore *lock-in* che opera alla frequenza f , misura direttamente la differenza fra la luce trasmessa levogira e destrógira, dalla quale si ricava poi ΔA .

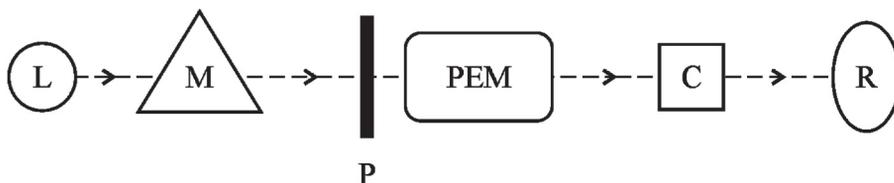


Figura 7.1.8 – Schema a blocchi di uno spettropolarimetro CD. L, lampada; M, monocromatore; P, polarizzatore lineare; PEM, modulatore fotoelastico; C, campione; R, rivelatore.

Negli spettropolarimetri UV-vis il rivelatore è costituito da un tubo fotomoltiplicatore. Il segnale di dicroismo circolare è in genere molto debole ($\Delta\varepsilon$ è piccolo

rispetto a ϵ) e nel processo di polarizzazione della luce viene persa buona parte dell'intensità emessa dalla sorgente; pertanto gli spettropolarimetri devono essere dotati di sorgenti molto potenti, in genere lampade allo xeno da 150 W e oltre. Poiché la regione spettrale del lontano UV è molto importante nella spettroscopia CD, specialmente per gli studi in campo biologico (i segnali CD relativi alle transizioni elettroniche $\pi\pi^*$ e $n\pi^*$ delle proteine, ad esempio, cadono nella zona tra 180 e 220 nm), è necessario eliminare l'ossigeno all'interno dello spettropolarimetro mediante un flusso continuo di azoto. Infatti la molecola di O_2 assorbe nel lontano UV e tale fenomeno è dannoso sia perché diminuisce la sensibilità dello strumento in questa regione spettrale, sia perché causa la produzione di ozono che va a deteriorare le ottiche dello strumento.

In assenza di un campione otticamente attivo è chiaro che lo strumento deve misurare $\Delta A = 0$ per qualsiasi lunghezza d'onda. È quindi necessario effettuare la registrazione della linea di base utilizzando un bianco (nel caso di misure in soluzione esso sarà costituito dalla cella di misura contenente il solo solvente). Per la registrazione di spettri CD nell'UV-visibile si possono utilizzare normali celle per spettrofotometria o spettrofluorimetria, anche se è preferibile che siano certificate per le misure polarimetriche.

Le cautele da adottare in un esperimento CD al fine di ottenere un buon rapporto segnale/rumore sono sostanzialmente le stesse di un esperimento di assorbimento. In particolare è bene effettuare gli spettri su soluzioni con assorbanza non troppo elevata nel campo spettrale di interesse (preferibilmente inferiore a 1 e mai superiore a 2). A causa dell'intensità della luce analizzatrice dello spettropolarimetro, molto più elevata rispetto ad un normale spettrofotometro, nel caso di sostanze fotoluminescenti può succedere che l'emissione di luce da parte del campione introduca una distorsione nello spettro CD. In questo caso occorre minimizzare la fotoluminescenza, per esempio diluendo il campione o impedendo che la luce emessa raggiunga il fotomoltiplicatore utilizzando un filtro *cut-off*.

In caso di necessità, la calibrazione dello spettropolarimetro può essere effettuata utilizzando sostanze standard di cui è noto lo spettro CD [8101, 8501]. Esse devono essere facilmente reperibili in campioni di elevata purezza, stabili, solubili in acqua o in solventi comuni, non pericolose e dotate di uno spettro CD intenso e caratteristico. La scelta dello standard dipende principalmente dalla regione spettrale nella quale deve essere effettuata la calibrazione. Per il lontano UV (180-250 nm) si può utilizzare il pantolattone [7501], per il vicino UV (250-350 nm) si raccomandano il 10-canforsolfonato di ammonio [8502] o l'acido 10-canforsolfonico [6901, 8101] (quest'ultimo è uno standard primario). Per la calibrazione nel visibile si possono utilizzare, in forma enantiomericamente pura, il complesso *tris*-etilendiamminacobalto(III)[6301] oppure il complesso *tris*-(2,2'-dipiridina)rutenio(II) [8102].

Una variante interessante della tecnica spettroscopica CD è il dicroismo circolare con rivelazione a fluorescenza (*fluorescence detected circular dichroism*, FD CD). In questa tecnica viene misurata la differenza nell'intensità di fluorescenza prodotta quando un campione otticamente attivo viene eccitato con luce polarizzata circolarmente a sinistra e a destra. La misura FD CD si esegue con uno spettropolarimetro ponendo il fotomoltiplicatore a 90° rispetto al cammino ottico della luce polarizzata e inserendo

un filtro *cut-off* o un monocromatore per evitare che la luce diffusa raggiunga il rivelatore. La spettroscopia FD CD, come la spettroscopia CD convenzionale, dà informazioni sulla chiralità delle molecole nello stato fondamentale perché la discriminazione chirale avviene nel processo di assorbimento. L'uso della fluorescenza per rivelare il dicroismo circolare presenta due importanti vantaggi: l'assorbimento differenziale viene misurato attraverso una tecnica ad alta sensibilità come la fluorescenza e si ha la possibilità di studiare selettivamente il comportamento dicroico di gruppi fluoroforici in molecole o supermolecole che contengono più cromofori.

Il dicroismo lineare può essere misurato semplicemente applicando un polarizzatore lineare ad uno spettrofotometro UV-visibile. Orientando il polarizzatore a 0° e 90° rispetto al campione è possibile misurare i due valori di assorbanza, A_{\parallel} e A_{\perp} . L'uso di uno spettropolarimetro CD per esperimenti di dicroismo lineare dà tuttavia risultati migliori in termini di sensibilità e accuratezza. Per misurare il segnale LD è sufficiente modificare alcuni parametri dell'insieme polarizzatore lineare/PEM, facilmente effettuabile nella maggior parte dei moderni spettropolarimetri.

Gli spettropolarimetri CD attualmente in commercio sono in grado, di serie o previo montaggio di opportuni accessori, di eseguire spettri di assorbimento e di luminescenza isotropi, ORD, LD, FD CD e MCD. Possono altresì essere equipaggiati con sistemi di termostatazione, celle a flusso, titolatori automatici e sistemi a flusso interrotto (*stopped flow*) per la misura di cinetiche di reazione.

I misuratori di dicroismo circolare sono utilizzati anche come rivelatori nell'analisi cromatografica HPLC con fase stazionaria chirale.

7.1.7 Applicazioni

Dalla misurazione degli spettri CD e ORD, attraverso lo studio delle relazioni fra spettri e struttura molecolare, è possibile indagare la stereochimica delle molecole chirali e determinare la configurazione assoluta degli enantiomeri [0002]. È inoltre possibile evidenziare interazioni intercromoforiche come l'accoppiamento eccitonico, da cui si può stabilire la distanza e l'orientazione dei cromofori coinvolti [8301].

La popolarità della spettroscopia CD è tuttavia dovuta largamente alle sue applicazioni in campo biologico [9601, 0001]. Essa si usa per studiare la conformazione e i processi di *folding/unfolding* (dal punto di vista sia termodinamico che cinetico) di polipeptidi, proteine e acidi nucleici, cinetiche enzimatiche e altre reazioni biochimiche. Gli spettri CD sono particolarmente utili per determinare le percentuali dei vari tipi di strutture secondarie (α -elica, β -sheet, *random coil*, ecc.) in una proteina allo stato nativo [9601]. La Figura 7.1.9 mostra gli spettri di assorbimento e di dicroismo circolare nell'ultravioletto della poli-L-lisina con diverse strutture secondarie.

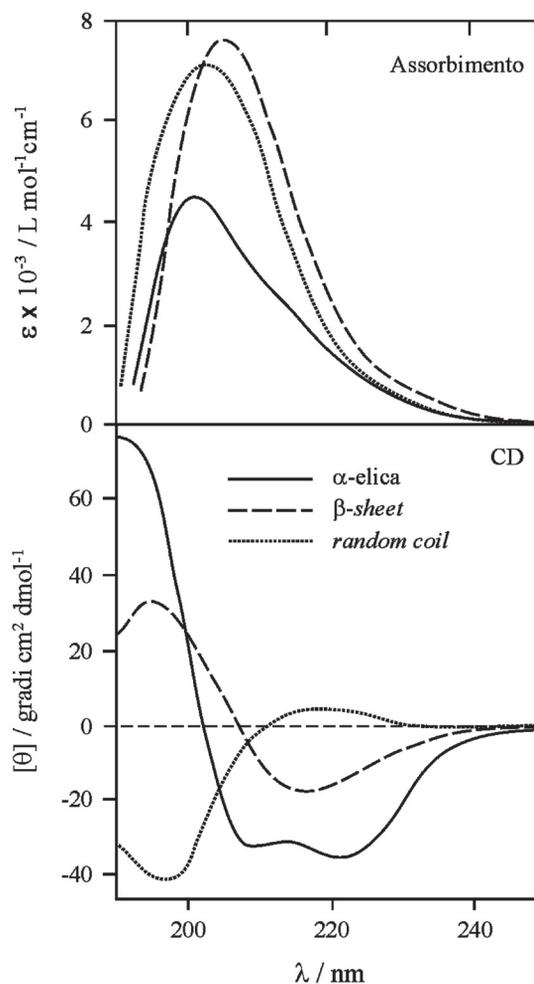


Figura 7.1.9 – Spettri di assorbimento (in alto) e di dicroismo circolare (in basso) nella regione UV della poli-L-lisina in soluzione acquosa nella conformazione ad α -elica (—), β -sheet (---) e disordinata (random coil, ...).

La spettroscopia CD consente di studiare i cambiamenti strutturali o conformazionali dovuti a interazioni in cui sono coinvolte molecole asimmetriche. Tali esperimenti riguardano ad esempio la formazione di complessi *host-guest* fra specie asimmetriche, per i quali è possibile determinare la costante termodinamica di associazione attraverso titolazioni CD. Particolarmente interessante è il caso di un cromoforo achirale (quindi privo di CD naturale) che interagisce con una molecola chirale. Il complesso risultante è ovviamente chirale e può presentare dicroismo circolare nella regione di assorbimento del cromoforo achirale.

La curva (a) nella Figura 7.1.10 [0201] mostra lo spettro CD di una molecola costituita da un gruppo ferrocene (achirale) sostituito con unità D-glucopiranosidiche chirali. Le curve (b-d) rappresentano le variazioni spettrali osservate con l'aggiunta del

macrociclo chirale β -ciclodestrina in soluzione acquosa, con cui il ferrocene forma un complesso di inclusione [9702]. Poiché nella zona spettrale esaminata presenta assorbimento soltanto l'unità ferrocenica, è chiaro che le bande CD osservate nello spettro (a) sono indotte sul cromoforo achirale ferrocene dalla presenza del sostituito chirale. L'aggiunta di β -ciclodestrina provoca variazioni nel dicroismo circolare indotto sulle bande di assorbimento del ferrocene, a causa della formazione di un complesso *host-guest* nel quale l'unità ferrocenica va ad occupare la cavità del macrociclo chirale [0201].

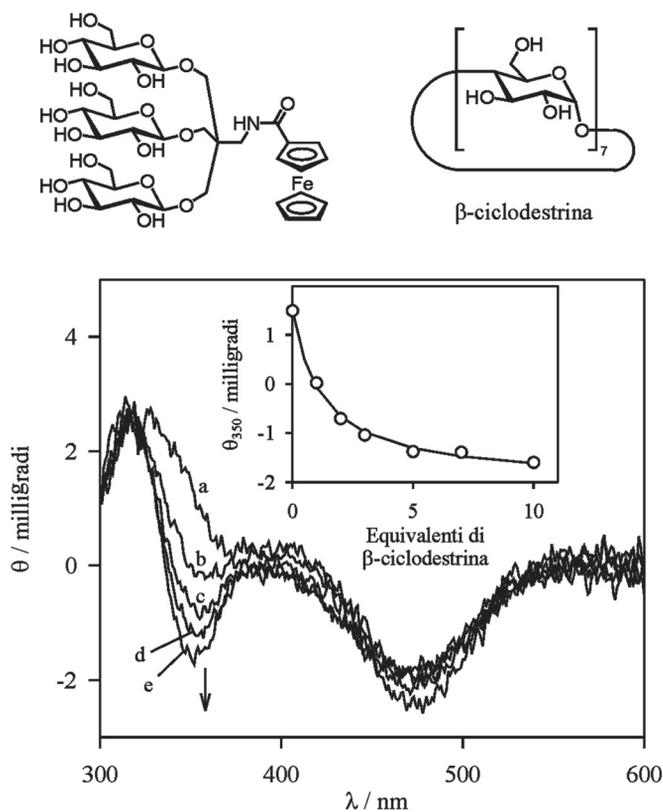


Figura 7.1.10 – Variazioni nello spettro CD di un derivato glucopiranosidico del ferrocene (1×10^{-3} mol L $^{-1}$, H $_2$ O, 295 K) in assenza (a) e in presenza di quantità crescenti di β -ciclodestrina (b-d) [0201]. Si noti che né le unità D-glucopiranosidiche né la β -ciclodestrina presentano bande di assorbimento nella regione spettrale esaminata. Dalla curva di titolazione ottenuta riportando l'ellitticità a 350 nm in funzione del numero di equivalenti di β -ciclodestrina aggiunti (vedi inserto) si determina la costante di stabilità del complesso.

L'analisi dello spettro CD indotto sul cromoforo achirale può dare informazioni sulla sua orientazione relativa rispetto alla molecola chirale. Ad esempio, nel caso dei complessi di inclusione della ciclodestrina, vale una semplice regola: il dicroismo circolare indotto su una certa transizione elettronica del guest cromoforico è positivo se il corrispondente momento di dipolo di transizione è parallelo all'asse di simmetria della ciclodestrina, negativo se è perpendicolare [9702].

Il dicroismo circolare è largamente usato per studiare le interazioni fra diverse biomolecole (proteina-proteina, proteina-acido nucleico, ecc.) e fra biomolecole e altri leganti quali, ad esempio, molecole di interesse farmacologico. Anche in questo caso è possibile non soltanto determinare parametri termodinamici (costante di associazione, entalpia ed entropia di reazione) e cinetici (costanti di velocità e barriere di attivazione), ma anche distinguere fra diverse modalità di associazione (intercalazione fra le basi del DNA oppure complessazione nel solco maggiore o minore della doppia elica). La spettroscopia CD è infine utilizzata in campo analitico, ad esempio per determinare la purezza di sostanze otticamente attive.

La spettroscopia di dicroismo lineare si usa per studiare l'orientazione delle molecole in un campione anisotropo, e si effettua normalmente nell'UV-visibile (LD di transizioni elettroniche) o nell'infrarosso (LD di transizioni vibrazionali).

7.2 SPETTROSCOPIA DI LUMINESCENZA POLARIZZATA CIRCOLARMENTE

7.2.1 Introduzione

Come descritto nella sezione 7.1, le molecole chirali – oppure le molecole achirali in un ambiente chirale – sono in grado di assorbire le due componenti polarizzate circolarmente della luce con diversa probabilità, dando luogo al fenomeno del dicroismo circolare. Analogamente, le molecole luminescenti chirali – oppure achirali, ma immerse in un ambiente chirale – emettono luce levogira e destrogira con diversa probabilità. Tale fenomeno fa sì che la luce emessa sia polarizzata ellitticamente (vedi Figura 7.1.4). È opportuno specificare che in questa sede verrà considerata solo l'emissione spontanea.

L'emissione differenziale di luce polarizzata circolarmente a sinistra e a destra da parte di sistemi molecolari luminescenti prende il nome di luminescenza polarizzata circolarmente (*circularly polarized luminescence*, CPL) ed è alla base della tecnica spettroscopica corrispondente (spettroscopia CPL) [7701, 8601, 0003]. La spettroscopia CPL è distinta dalla tecnica del dicroismo circolare rivelato da fluorescenza (*fluorescence detected circular dichroism*, FD CD; vedi paragrafo 7.1.6) poiché in quest'ultima si osserva l'assorbimento differenziale delle componenti polarizzate circolarmente tramite misurazioni di fluorescenza, in virtù della diversa fotoeccitazione che la luce polarizzata a sinistra oppure a destra opera su una molecola chirale.

Così come qualsiasi sistema molecolare chirale nello stato fondamentale può mostrare dicroismo circolare nella regione del proprio spettro di assorbimento, molecole chirali in uno stato eccitato luminescente sono potenzialmente caratterizzate da CPL. Tale osservazione vale anche per molecole achirali immerse in ambienti chirali (ad esempio, sciolte in un solvente chirale o complessate da molecole chirali) oppure sottoposte ad un campo magnetico: in questi casi si parla rispettivamente di CPL indotta (ICPL) e di CPL magnetica (MCPL).

La spettroscopia CPL può quindi essere considerata come il corrispettivo in emissione della spettroscopia di dicroismo circolare. In sintesi, il fenomeno della CPL si può verificare nei seguenti casi, anche eccitando con luce naturale (non polarizzata) o polarizzata linearmente:

- per molecole chirali enantiomericamente pure o in miscele con eccesso enantiomerico;
- per molecole achirali che si trovano in presenza di specie chirali (ICPL);
- per molecole achirali immerse in un campo magnetico (MCPL); l'emissione di luce con polarizzazione circolare si verifica in una direzione parallela a quella del campo magnetico applicato.

Si può inoltre osservare CPL eccitando una miscela racemica con luce polarizzata circolarmente; in questo caso l'insieme delle molecole eccitate non è più racemico poiché l'assorbimento differenziale della luce polarizzata da parte dei due enantiomeri opera una fotoselezione delle molecole eccitate. La spettroscopia CPL consente pertanto di distinguere un campione racemico da uno costituito da molecole achirali.

7.2.2 Grandezze misurate nella spettroscopia CPL

Le grandezze misurate nella spettroscopia CPL sono la differenza di intensità fra le componenti polarizzate circolarmente a sinistra (I_L) e a destra (I_R) della radiazione emessa, e l'intensità della luminescenza complessivamente emessa dal campione. Tali quantità si possono esprimere nel seguente modo:

$$\Delta I(\lambda) = I_L(\lambda) - I_R(\lambda)$$

$$I(\lambda) = I_L(\lambda) + I_R(\lambda)$$

in cui $I_L(\lambda)$ e $I_R(\lambda)$ sono le intensità della luminescenza con polarizzazione circolare rispettivamente a sinistra e a destra alla lunghezza d'onda λ . La quantità $\Delta I(\lambda)$ è detta intensità di luminescenza circolare differenziale o semplicemente intensità CPL, mentre $I(\lambda)$ è detta intensità di luminescenza totale (intensità TL).

Come detto nel paragrafo precedente, in presenza di CPL le quantità $I_L(\lambda)$ e $I_R(\lambda)$ sono diverse, pertanto la luminescenza totale presenta una parziale polarizzazione circolare; si dice che la luce emessa è polarizzata ellitticamente. In un esperimento CPL si può misurare direttamente l'intensità differenziale $\Delta I(\lambda)$ oppure determinare separatamente le quantità $I_L(\lambda)$ e $I_R(\lambda)$. In entrambi i casi la principale difficoltà dell'esperimento consiste nell'effettuare una misurazione precisa, perché la differenza fra $I_L(\lambda)$ e $I_R(\lambda)$ è generalmente molto piccola.

Da queste grandezze si ricava il fattore di dissimmetria dell'emissione, $g_{em}(\lambda)$:

$$g_{em}(\lambda) = \frac{2\Delta I(\lambda)}{I(\lambda)}$$

La determinazione sperimentale dell'intensità di emissione in unità assolute è molto complessa da effettuare; normalmente $I(\lambda)$ e $\Delta I(\lambda)$ si misurano in unità arbitrarie, dipendenti dalla strumentazione e dalle condizioni sperimentali utilizzate. Il fattore di dissimmetria $g_{em}(\lambda)$ è molto significativo poiché, derivando da un rapporto di intensità di emissione, si può esprimere in una scala assoluta. Il suo valore dà quindi una misura assoluta della chiralità dello stato eccitato emittente.

Il fattore di dissimmetria dell'emissione è utile, poiché può essere paragonato al fattore di dissimmetria dell'assorbimento g_{abs} ricavabile da misure di dicroismo circolare (paragrafo 7.1.5) [8601]. La Figura 7.2.1 mostra, a titolo di esempio, gli spettri di assorbimento, CD, luminescenza e CPL per un complesso polipiridinico otticamente attivo di osmio(II) [9703] e i corrispondenti valori di g_{abs} e g_{em} . In generale, g_{abs} e g_{em} dipendono dagli stessi aspetti della struttura elettronica delle molecole. Tuttavia, mentre il dicroismo circolare è una proprietà delle molecole nel loro stato elettronico fondamentale, la luminescenza polarizzata circolarmente ha origine dagli stati elettronici eccitati. Secondo il principio di Franck-Condon gli spettri CD e CPL riflettono la struttura molecolare rispettivamente nello stato fondamentale e nello stato eccitato luminescente. Le informazioni ricavate dalla spettroscopia CD e da quella CPL sono perciò ridondanti nel caso di molecole che abbiano la medesima geometria nello stato fondamentale e nello stato eccitato luminescente.

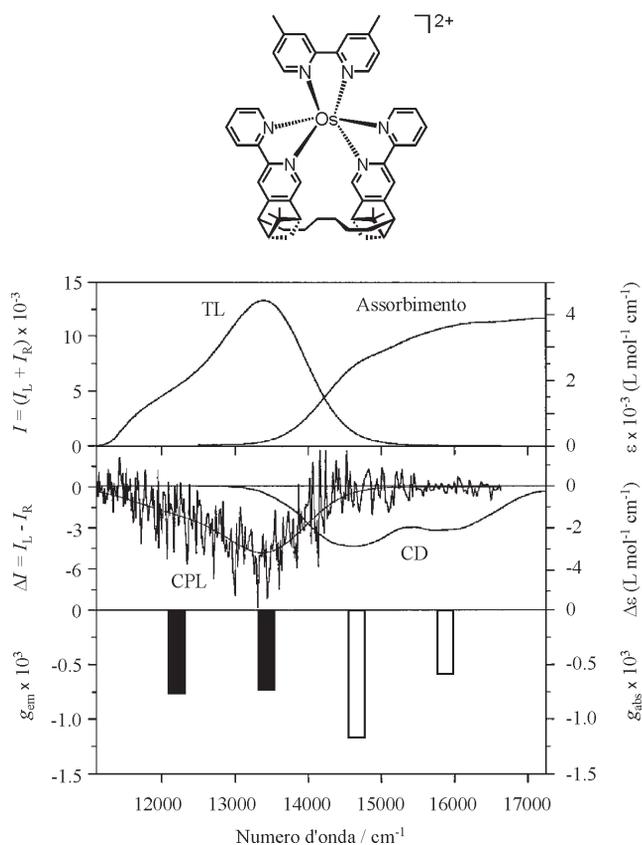


Figura 7.2.1 – Spettri di assorbimento, luminescenza totale (TL), dicroismo circolare (CD) e luminescenza polarizzata circolarmente (CPL) per un complesso polipiridinico chirale di Os(II) nella regione spettrale compresa fra 11100 e 17200 cm^{-1} (CH_3CN , 293 K) [9703]. Il segnale CPL è rumoroso perché è molto debole. Il riquadro inferiore della figura mostra i valori dei fattori di dissimmetria dell'assorbimento e dell'emissione misurati in corrispondenza di specifiche frequenze.

Come osservato per il dicroismo circolare (paragrafo 7.1.3), l'entità della polarizzazione circolare della luminescenza di un sistema molecolare dipende dalla forza rotatoria della transizione elettronica. Il fattore di dissimmetria dell'emissione per un campione di molecole con una distribuzione isotropa sia nello stato fondamentale che in quello eccitato ha la seguente espressione:

$$g_{em} \propto R_{if} / D_{if}$$

in cui R_{if} è la forza rotatoria della transizione $i \rightarrow f$, legata al prodotto scalare di \mathbf{u}_{if} e \mathbf{m}_{if} (momenti di transizione elettrico e magnetico) e D_{if} è la forza dipolare, proporzionale a $|\mathbf{u}_{if}|^2 + |\mathbf{m}_{if}|^2$. In altre parole, R_{if} determina l'intensità CPL, mentre D_{if} determina l'intensità totale della luminescenza. Poiché per la maggior parte delle transizioni elettroniche nelle molecole non centrosimmetriche si ha $|\mathbf{u}_{if}| \gg |\mathbf{m}_{if}|$, si può dire che le transizioni elettroniche in emissione con elevata polarizzazione circolare saranno generalmente quelle caratterizzate da un rilevante momento di dipolo magnetico e da un momento di dipolo elettrico non troppo elevato.

7.2.3 Strumentazione e procedure sperimentali

La spettroscopia CPL è una tecnica poco conosciuta e non altrettanto diffusa come la spettroscopia di luminescenza o il dicroismo circolare. Per questo motivo non esistono strumenti disponibili in commercio per effettuare misure di CPL. Lo schema di uno spettrofluorimetro CPL, tuttavia, non è eccessivamente complicato. Così come lo spettropolarimetro non è altro che uno spettrofotometro in grado di misurare il dicroismo circolare, lo spettrofluorimetro CPL è di fatto un normale spettrofluorimetro dotato di un analizzatore di polarizzazione circolare (Figura 7.2.2).

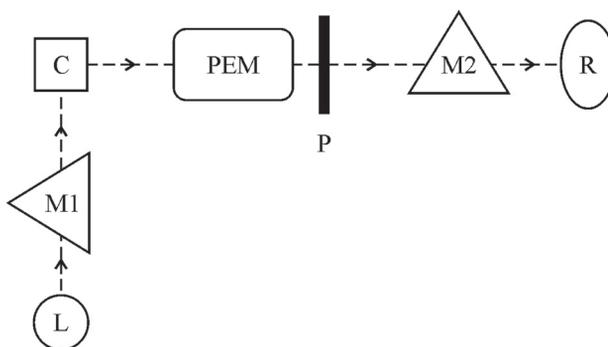


Figura 7.2.2 – Schema a blocchi di uno spettrofluorimetro CPL. L, lampada; M1, monocromatore di eccitazione o, preferibilmente, con un laser perché il segnale CPL è in genere molto debole. La luce emessa attraversa un modulatore fotoelastico, fatto oscillare ad una frequenza f ;

Il campione viene eccitato con una lampada accoppiata ad un monocromatore di eccitazione o, preferibilmente, con un laser perché il segnale CPL è in genere molto debole. La luce emessa attraversa un modulatore fotoelastico, fatto oscillare ad una frequenza f ;

il cui scopo è quello di trasformare la radiazione polarizzata circolarmente in luce polarizzata linearmente (v. paragrafo 7.1.6). Essa viene poi selezionata nel passaggio attraverso un polarizzatore lineare orientato a 45° rispetto all'asse principale del modulatore fotoelastico. In questo modo il rivelatore "vede" alternativamente con una frequenza f la luce emessa in senso destrogiro e levogiro. Collegando il rivelatore ad un amplificatore *lock-in* che opera alla frequenza f si ottiene direttamente la misura di ΔI . L'intensità di luminescenza totale I viene misurata dalla corrente totale in uscita dal fotomoltiplicatore. Occorre tuttavia effettuare un'opportuna calibrazione per correlare quantitativamente il segnale proveniente dall'amplificatore *lock-in*, proporzionale a ΔI , e quello relativo all'intensità totale [7201]. Lo standard maggiormente utilizzato per la spettroscopia CPL è il *tris*(3-trifluoroacetil-*d*-canforato)europio(III). Esso è usato come reagente di shift per NMR ed è facilmente reperibile in campioni di elevata purezza. Per maggiori dettagli, si rimanda alla letteratura specializzata [8601].

Lo schema rappresentato nella Figura 7.2.2 può anche essere adattato ad un sistema di conteggio a fotone singolo. Esso ha il vantaggio di non richiedere la calibrazione perché fornisce direttamente il conteggio dei fotoni relativi a ΔI e I , dal cui semplice rapporto si determina direttamente g_{em} .

Se lo spettrofluorimetro utilizza per l'eccitazione un sistema lampada-monocromatore è possibile effettuare spettri di eccitazione CPL. Gli spettrofluorimetri CPL possono essere altresì modificati per effettuare misure risolte nel tempo, chiaramente utilizzando una sorgente di eccitazione pulsata. In questo caso occorre tenere conto che la risoluzione temporale della tecnica è limitata dalla durata del ciclo di funzionamento del modulatore fotoelastico. Nella maggior parte dei casi quest'ultimo è modulato a 50 kHz, pertanto la massima risoluzione temporale ottenibile è dell'ordine delle decine di microsecondi. A causa di questo limite è possibile effettuare misure di CPL risolte nel tempo soltanto nel caso di emissioni con tempi di vita molto lunghi, quali fosforescenze di molecole organiche o corrispondenti a transizioni elettroniche proibite in complessi metallici, ad esempio di ioni lantanidici.

Nella maggior parte dei casi la componente CPL rappresenta una frazione esigua della luce emessa (normalmente <1%). È quindi importante escludere le fonti anche minime di errore o di artefatto strumentale. L'interferenza più pericolosa, poiché difficile da evidenziare, è la presenza di luce linearmente polarizzata nell'emissione del campione [8601]. Ciò può verificarsi nel caso di una distribuzione anisotropa degli stati eccitati a causa, ad esempio, dell'orientazione non casuale delle molecole nello stato fondamentale oppure dell'effetto di fotoselezione operato dalla radiazione incidente.

7.2.4 Applicazioni

L'analisi degli spettri CPL fornisce un metodo diretto per studiare la chiralità delle molecole negli stati eccitati luminescenti. Studi comparativi CD/CPL consentono poi di mettere in evidenza differenze di geometria fra lo stato eccitato e lo stato fondamentale. La misurazione della CPL presenta limiti e difficoltà in parte già illustrate nei precedenti paragrafi; in particolare è necessaria la presenza nella molecola di un luminoforo con un rendimento quantico di emissione sufficientemente elevato. La spettroscopia CPL presenta tuttavia una serie di vantaggi in termini di specificità e selettività, fra cui:

- la possibilità di esaminare transizioni emissive che terminano in uno stato elettronico non accessibile termicamente e che quindi non possono essere studiate mediante spettroscopia di assorbimento/CD;
- l'osservazione di stati eccitati difficilmente ottenibili per assorbimento diretto di luce;
- lo studio di processi dinamici che coinvolgono stati eccitati luminescenti (ad esempio, trasferimento di energia o di elettroni);
- lo studio di sistemi multicromoforici complessi, per i quali l'interpretazione degli spettri risulta facilitata poiché l'emissione in genere ha luogo solamente da uno dei cromofori.

Come detto in precedenza, la spettroscopia CPL può essere usata anche per distinguere una sostanza chirale racemica da una achirale, sfruttando l'effetto di fotoselezione ottenuto eccitando il campione con luce polarizzata circolarmente. Tutto ciò naturalmente a condizione che il campione sia luminescente e che il processo di racemizzazione sia più lento del decadimento dello stato eccitato sotto osservazione.

Le specie chimiche maggiormente studiate nella spettroscopia CPL sono i complessi degli ioni lantanidici, in particolare quelli di Eu(III) e Tb(III) (per esempi recenti vedi [0401, 0501, 0502]). Le transizioni elettroniche $f-f$ in questi ioni hanno infatti un forte carattere di dipolo magnetico, un modesto momento di dipolo elettrico e danno luogo a bande di emissione molto strette. Tali transizioni sono state sfruttate per studiare l'interazione fra questi ioni metallici (o loro complessi) ed altre molecole, ad esempio di interesse biologico [9201, 0101]. La Figura 7.2.3 mostra la banda CPL relativa alla transizione ${}^7F_5 \leftarrow {}^5D_4$ del Tb^{3+} indotta dall'interazione con il D-(+)-mannosio in soluzione acquosa.

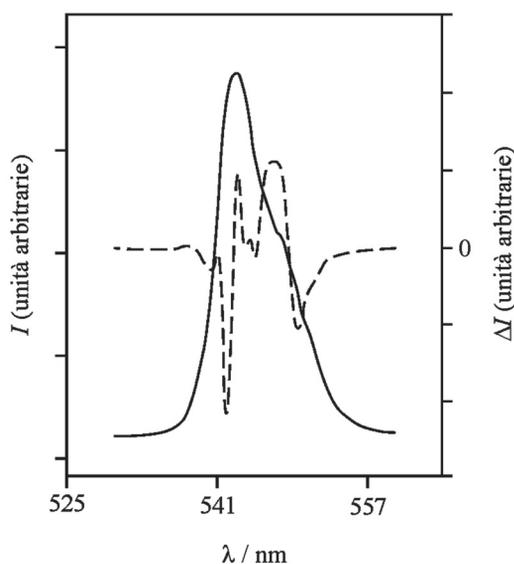


Figura 7.2.3 – Spettro di luminescenza totale (linea continua) e spettro CPL (linea tratteggiata) di una soluzione acquosa a pH 5,6 contenente ioni Tb^{3+} e D-(+)-mannosio in rapporto 1:3. La concentrazione di Tb^{3+} è $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ e la lunghezza d'onda di eccitazione è 488 nm .

Benché più rari, esistono studi di spettroscopia CPL di complessi di metalli di transizione [9703], di specie organiche in soluzione [0302, 0303] e in film sottili [0102], e di sistemi biologici [8601, 0003] fra cui aggregati proteici [0202]. Un lavoro recente ha dimostrato che le proprietà CPL di certe molecole organiche otticamente attive sono influenzate dal solvente e possono essere controllate per via fotochimica [0303].

Studi spettroscopici CPL risolti nel tempo sono stati impiegati per studiare la stereoselettività di fenomeni di trasferimento di energia elettronica fra specie otticamente attive [8901, 9602].

7.3 ANISOTROPIA DI FLUORESCENZA IN STATO STAZIONARIO (SS) E RISOLTA NEL TEMPO (TR)

7.3.1 Introduzione

Le misure di anisotropia di fluorescenza sono principalmente utilizzate per studiare due fenomeni molto diversi fra di loro: la dinamica di rotazione di un fluoroforo nello spazio, ed il trasferimento di energia di eccitazione. Entrambi questi processi, infatti, per quanto diversi, possono essere investigati con le stesse tecniche in quanto producono effetti simili sull'anisotropia di fluorescenza. Per quanto riguarda la velocità e la libertà di rotazione, esse sono condizionate da fattori propri del sistema fluorescente, come la sua massa e struttura, e da altri legati alle proprietà del mezzo. Per questo l'anisotropia di fluorescenza è tradizionalmente utilizzata per studiare processi che comportino variazioni configurazionali o strutturali, come ad esempio la denaturazione nel caso delle proteine, ma anche per caratterizzare microambienti permettendo, ad esempio, di misurare la mobilità di una specifica sonda all'interno di una membrana. Se le tecniche a stato stazionario (*steady state*: SS) sono solitamente sufficienti per questo tipo di applicazioni, lo studio dei processi di trasferimento di energia ha richiesto lo sviluppo di sistemi veloci (nel campo dei picosecondi) per misure risolte nel tempo (*time resolved*: TR). Queste nuove tecniche si sono dimostrate adatte ad esaminare la dinamica dei processi di disattivazione e migrazione dell'energia di eccitazione all'interno di sistemi multifluoroforici ed in particolare di tipo supramolecolare.

Lo scopo di questa sezione sull'anisotropia di fluorescenza è di fornire una conoscenza di base delle tecniche basate su questo fenomeno e degli accorgimenti da seguire nella registrazione di spettri e decadimenti di anisotropia. Per una trattazione più approfondita e la descrizione degli aspetti più sofisticati si rimanda alla referenza [9901].

7.3.2 Definizione di anisotropia di fluorescenza

L'anisotropia di fluorescenza è una grandezza che permette di quantificare il grado di polarizzazione della fluorescenza proveniente da un campione eccitato con luce polarizzata. Per misurarla si utilizza la configurazione schematizzata in figura 7.3.1. Il campione viene eccitato con luce polarizzata verticalmente, interponendo fra esso e la sorgente un polarizzatore opportunamente orientato, detto polarizzatore di eccitazione. La fluorescenza viene invece misurata attraverso un altro polarizzatore detto

polarizzatore di emissione. Se si indica con I_{\parallel} con I_{\perp} le intensità misurate rispettivamente quando il polarizzatore di emissione è verticale (e quindi parallelo a quello di eccitazione) ed orizzontale (perpendicolare a quello di eccitazione) l'anisotropia di fluorescenza r è definita come:

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad (7-1)$$

Per le misure di anisotropia di fluorescenza spesso si utilizzano fluorimetri convenzionali dotati di una coppia di polarizzatori inseriti rispettivamente fra il monocrromatore di eccitazione ed il campione e fra quest'ultimo ed il monocrromatore di emissione. Il tipo di misura che si effettua dipende pertanto dalla modalità di operazione dello strumento. Se si effettua una misura fissando entrambi i monocrromatori si ottiene un valore che dipende dalla lunghezza d'onda di eccitazione e di emissione, che dovranno pertanto essere precisate per fornire un'informazione significativa. Effettuando la misura a diverse lunghezze d'onda di emissione si ottiene uno spettro di anisotropia di emissione, mentre al contrario, mantenendo fissa la lunghezza d'onda di emissione e facendo variare quella di eccitazione, si ottiene uno spettro di anisotropia di eccitazione. Il significato dei due diversi tipi di spettri è discusso in seguito.

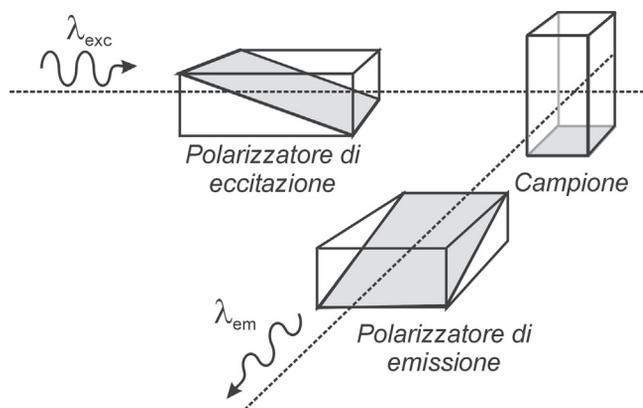


Figura 7.3.1 – Configurazione strumentale utilizzata per le misure di anisotropia di fluorescenza.

7.3.3 Polarizzazione di fluorescenza

Il termine polarizzazione è stato fin qui utilizzato per indicare una particolare orientazione nello spazio di un campo elettromagnetico o di un momento di transizione. In realtà questo termine ha avuto per molto tempo, quando riferito alla fluorescenza, un significato particolare, individuando una grandezza alternativa all'anisotropia di fluorescenza. Questa grandezza, detta appunto polarizzazione di fluorescenza:

$$P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}} \quad (7-2)$$

è stata molto utilizzata in passato, ma è stata recentemente soppiantata per ragioni di praticità (ad esempio non è additiva) proprio dall'anisotropia di fluorescenza. La conversione fra le due grandezze può essere effettuata utilizzando le seguenti espressioni:

$$P = \frac{3r}{2+r} \quad r = \frac{2P}{3-P} \quad (7-3)$$

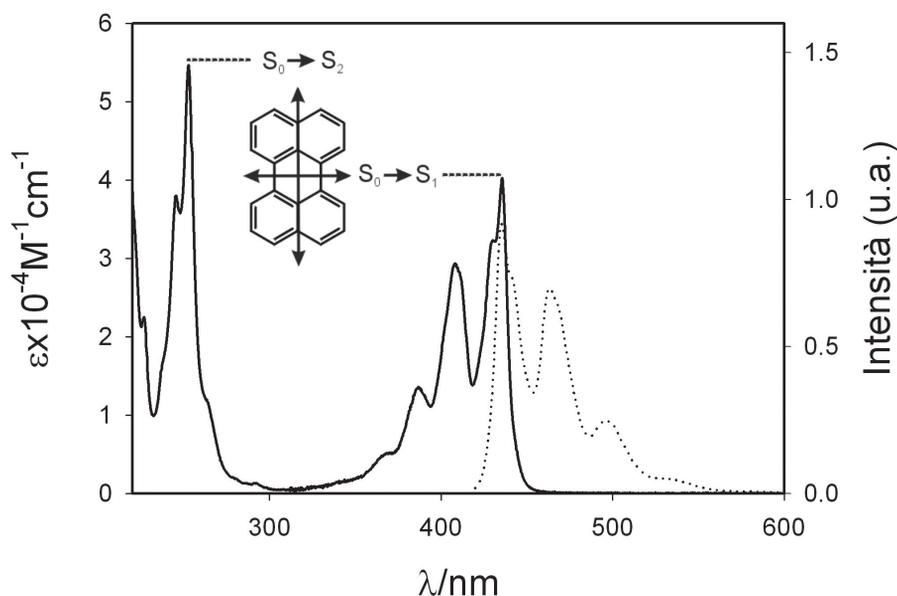


Figura 7.3.2 – Orientazione delle transizioni elettroniche di assorbimento del perilene e bande di assorbimento relative a tali transizioni. Lo spettro tratteggiato rappresenta la fluorescenza del perilene (transizione $S_1 \rightarrow S_0$).

7.3.4 Anisotropia di fluorescenza e transizioni elettroniche

L'origine dell'anisotropia di fluorescenza è legata alla polarizzazione delle transizioni elettroniche nelle molecole: ad ogni transizione è cioè associato un vettore chiamato momento di transizione, che possiede una determinata orientazione rispetto alla struttura della molecola. In figura 7.3.2 sono rappresentate ad esempio le transizioni di assorbimento $S_0 \rightarrow S_1$ e $S_0 \rightarrow S_2$ del perilene. La transizione $S_1 \rightarrow S_0$ responsabile della fluorescenza è approssimativamente parallela alla $S_0 \rightarrow S_1$. In generale, quando la disattivazione di uno stato eccitato avviene per via radiativa, il fotone emesso risulta essere polarizzato parallelamente al momento di transizione. Pertanto, se si osserva una sola molecola, la polarizzazione della luce emessa è parallela alla direzione individuata dalla transizione responsabile della fluorescenza ($S_1 \rightarrow S_0$).

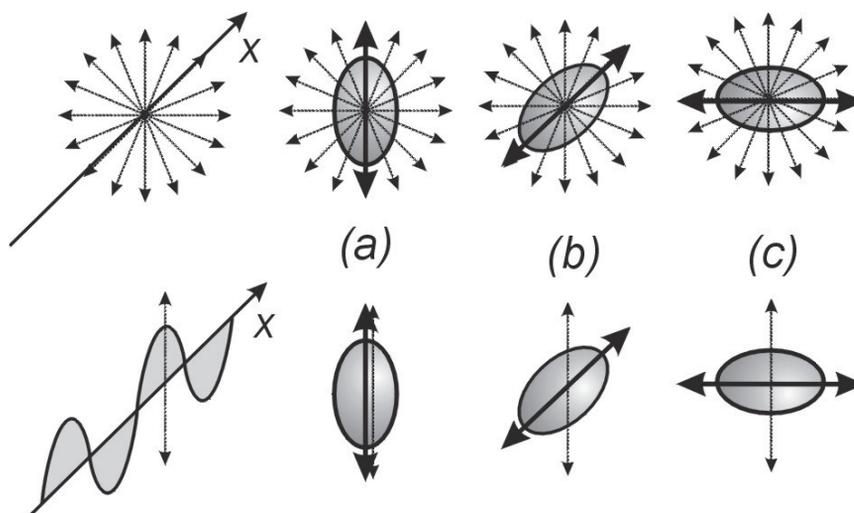


Figura 7.3.3 – Eccitazione in luce non polarizzata (sopra) e polarizzata (sotto); X rappresenta la direzione di propagazione del raggio di eccitazione. Nel primo caso le molecole (a), (b) e (c) hanno la stessa probabilità di essere eccitate. Se la luce è polarizzata come in figura, la molecola (a) ha maggiore probabilità di essere eccitata rispetto a (b); (c) invece non può essere eccitata.

In generale tuttavia le misure di fluorescenza vengono effettuate su un grande numero di molecole simultaneamente, molecole che per di più sono orientate in modo del tutto casuale e libere di ruotare. Ciononostante, se l'eccitazione viene effettuata con luce polarizzata è possibile ottenere emissione di luce polarizzata. Questo avviene perché in tal modo si effettua una eccitazione di tipo selettivo del campione sulla base dell'orientazione dei momenti di transizione. Per capire cosa significhi e quali implicazioni abbia, conviene immaginare una situazione semplificata in cui le unità fluorescenti sono ferme in qualche mezzo e abbastanza distanti le une dalle altre in modo da non potere interagire. Quando questo sistema viene eccitato con luce non polarizzata tutte le molecole hanno la stessa probabilità di essere eccitate, indipendentemente dalla loro orientazione; questa equivalenza viene a mancare nel caso di una eccitazione polarizzata. Come nel caso della polarizzazione della fluorescenza, ciò è dovuto alla particolare orientazione delle transizioni (in questo caso di assorbimento) rispetto allo scheletro della molecola. La probabilità di eccitare ogni singola molecola dipende infatti dall'orientazione del momento di transizione rispetto al piano di polarizzazione della luce di eccitazione (figura 7.3.3): nel caso di luce non polarizzata tutte le molecole si trovano nella stessa situazione. Siccome la probabilità di eccitare una molecola è massima quando il piano di polarizzazione della luce di eccitazione è parallelo al momento di transizione ed è minimo quando è invece perpendicolare, l'utilizzo di una sorgente polarizzata comporta invece un'eccitazione di tipo selettivo. Dei vari fluorofori orientati in maniera casuale verranno eccitati prevalentemente quelli orientati in modo tale che il momento di transizione risulti parallelo al piano di polarizzazione della luce di eccitazione (figura 7.3.4). L'emissione di luce a seguito dell'eccitazione avverrà pure in modo polarizzato secondo la direzione individuata dai momenti di transizione.

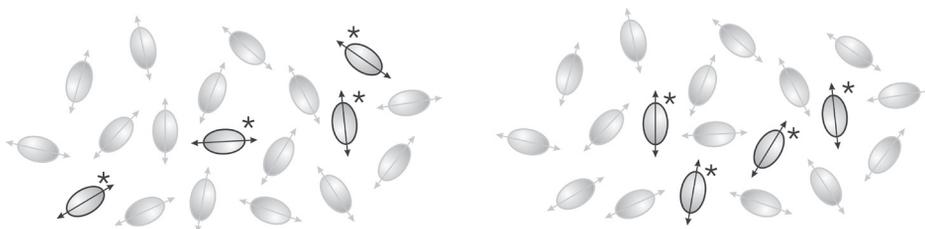


Figura 7.3.4 – Eccitazione in luce non polarizzata (sinistra) e polarizzata verticalmente (destra). Nel secondo caso le molecole con i dipoli orientati orizzontalmente non vengono eccitate.

È da notare che il fatto che la luce emessa sia o meno polarizzata indica, nel caso in esame, semplicemente che l'eccitazione è stata effettuata in modo selettivo. Tornando al caso della luce non polarizzata infatti, nonostante la luce emessa da ciascuna singola molecola sia ancora polarizzata, non si osserva alcuna polarizzazione macroscopica, perché l'emissione complessiva è la somma di transizioni orientate in modo casuale. Esaminando più in dettaglio il caso dell'eccitazione polarizzata si nota che l'emissione risultante sarà polarizzata come l'eccitazione se, come accade per molte molecole, i due momenti di transizione $S_0 \rightarrow S_1$ ed $S_1 \rightarrow S_0$ sono paralleli. Più in generale, il piano di polarizzazione della radiazione emessa presenterà rispetto a quella di eccitazione un angolo identico a quello presente fra i due momenti di transizione.

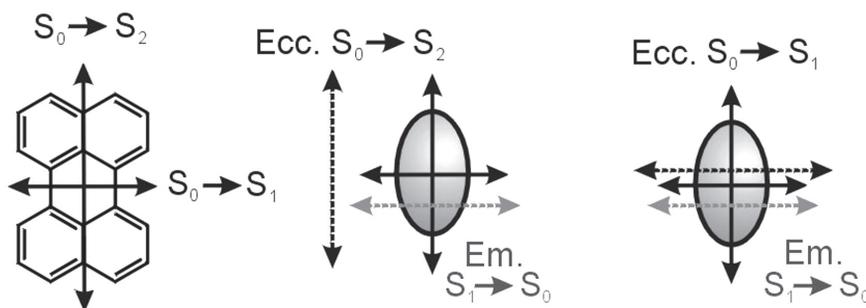


Figura 7.3.5 – Orientazione relativa della polarizzazione della luce assorbita ed emessa dal perilene nel caso di eccitazione sulla transizione $S_0 \rightarrow S_1$ e sulla transizione $S_0 \rightarrow S_2$. Da notare che in ogni caso la fluorescenza corrisponde alla transizione $S_1 \rightarrow S_0$.

Tornando al caso del perilene, per esempio, sono possibili due transizioni di assorbimento ortogonali fra di loro: la $S_0 \rightarrow S_1$, cui è associata una banda di assorbimento strutturata nel visibile, e la $S_0 \rightarrow S_2$, che avviene invece per assorbimento di fotoni nell'ultravioletto (figura 7.3.5). La transizione responsabile della fluorescenza è invece la $S_1 \rightarrow S_0$ orientata come la $S_0 \rightarrow S_1$. Se pertanto si eccita il perilene nell'ultravioletto, attraverso il processo di conversione interna $S_2 \rightarrow S_1$, si ottiene l'emissione di luce polarizzata perpendicolarmente rispetto a quella di eccitazione. Un fenomeno analogo si verifica quando lo stato eccitato fluorescente ha una geometria molto distorta rispetto a quello fondamentale: in questo caso infatti le transizioni di assorbimento $S_0 \rightarrow S_1$ e di emissione $S_1 \rightarrow S_0$ possono essere orientate in modo significativamente diverso.

Risulta quindi evidente come una misura di anisotropia di fluorescenza su molecole immobilizzate (ad esempio congelando il solvente) permetta di calcolare l'angolo compreso fra il momento di transizione associato ad una qualunque transizione in assorbimento (non necessariamente la $S_0 \rightarrow S_1$) e quello relativo alla transizione responsabile dell'emissione.

Utilizzando opportune costruzioni geometriche, è possibile calcolare quale valore di anisotropia è atteso per un insieme di molecole ferme nello spazio e orientate in modo casuale, quando i dipoli di assorbimento ed emissione sono inclinati di un angolo β :

$$r_0 = \frac{2}{5} \left(\frac{3 \cos^2 \beta - 1}{2} \right) \quad (7-4)$$

Questo valore indicato con r_0 viene chiamato *anisotropia fondamentale*. Da notare che il valore massimo osservabile corrisponde al perfetto parallelismo fra la transizione di assorbimento e quello di emissione; in tal caso $r_0 = 0,4$. Il valore minimo invece si registra nel caso di perpendicolarità fra i due momenti di transizione, in tal caso $r_0 = -0,2$. Valori di anisotropia prossimi a 0,4 e -0,2 si registrano in effetti eccitando il perilene immobilizzato in glicole propilenico a -70°C , rispettivamente sulle transizioni $S_0 \rightarrow S_1$ e $S_0 \rightarrow S_2$.

Da notare che in realtà, nel caso di un singolo fluoroforo disposto verticalmente, questo emetterà (nel caso di parallelismo fra la transizione di assorbimento e quella di emissione) solo luce polarizzata verticalmente e quindi, in base all'equazione 7-1, originerà una fluorescenza con $r = 1$. In sistemi disordinati d'altra parte la polarizzazione della fluorescenza è dovuta all'eccitazione selettiva derivante dall'utilizzo di luce polarizzata. Siccome tale selettività è solo parziale, essa consente una eccitazione preferenziale, ma non esclusiva, dei fluorofori orientati con il momento di transizione di assorbimento parallelo alla polarizzazione della luce incidente. Il risultato sarà l'inevitabile presenza di una componente dell'emissione polarizzata orizzontalmente. Per questa ragione 0,4 rappresenta un valore massimo limite ottenibile da sistemi orientati in modo casuale. Valori di anisotropia superiori a 0,4 indicano invece un grado di organizzazione del sistema che prevede una orientazione macroscopica preferenziale dei fluorofori. Anche la presenza di fenomeni di assorbimento a più fotoni può portare a misurare valori di anisotropia superiori a 0,4.

7.3.5 Depolarizzazione per rotazione

Più in generale, le molecole sono libere di diffondere e di ruotare nello spazio; questo non impedisce una loro eccitazione selettiva con luce polarizzata, ma ha delle implicazioni notevoli sulla polarizzazione della luce emessa. Infatti, nel tempo che intercorre fra l'eccitazione e l'emissione (mediamente individuato dal tempo di vita dello stato eccitato, τ) le molecole eccitate possono riorientarsi per effetto dei moti browniani. Il risultato sarà che la popolazione di molecole selettivamente eccitata in virtù della orientazione preferenziale tenderà a riorientarsi in modo casuale, generando un'emissione di luce complessivamente non polarizzata. Questo fenomeno, come tutti quelli che portano a

perdere la polarizzazione, si chiama depolarizzazione (figura 7.3.6). Siccome la radiazione viene emessa in un tempo mediamente individuato da τ , in realtà la riorientazione è efficace solo se avviene in tempi più brevi o al limite confrontabili con τ . Per indicare il tempo impiegato dalle molecole per riorientarsi si utilizza il parametro θ (notare che in letteratura lo stesso simbolo è usato per l'ellitticità, vedi sezione 7.1.5) chiamato *tempo di correlazione rotazionale*, legato al coefficiente di diffusione rotazionale D . La relazione che lega l'anisotropia a questi parametri e al tempo di vita dello stato eccitato è chiamata equazione di Perrin e per un rotatore sferico ha la forma:

$$\frac{r_0}{r} = 1 + \frac{\tau}{\theta} = 1 + 6 D \tau \quad (7-5)$$

dove r_0 è l'anisotropia in assenza di rotazione e, come abbiamo visto, viene chiamata anisotropia fondamentale.

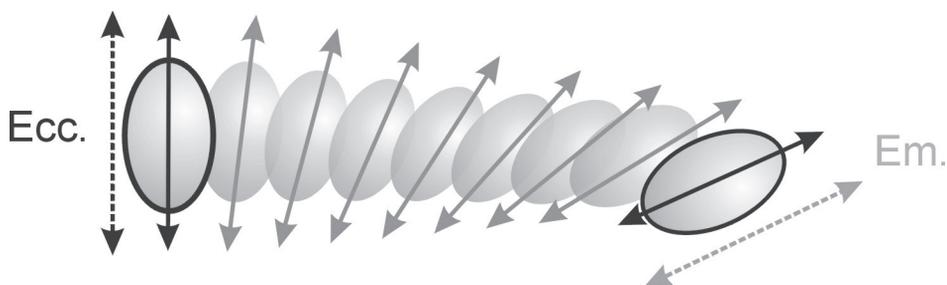


Figura 7.3.6 – Depolarizzazione della fluorescenza per effetto della libera rotazione di un fluoroforo.

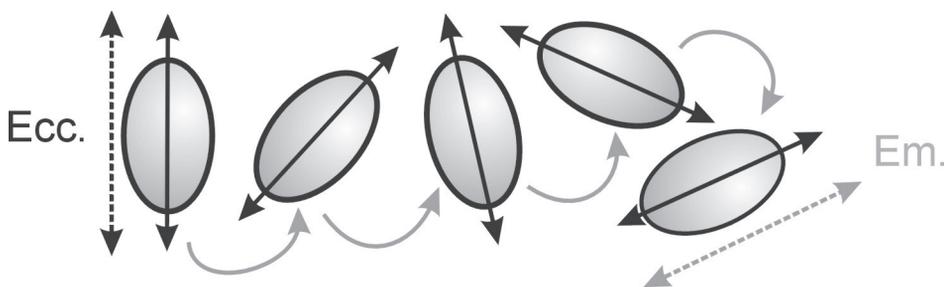


Figura 7.3.7 – Depolarizzazione della fluorescenza per effetto del trasferimento di energia di eccitazione fra fluorofori orientati in modo casuale.

7.3.6 Depolarizzazione per trasferimento di energia

Un altro importante meccanismo di depolarizzazione è il trasferimento di energia fra fluorofori uguali (figura 7.3.7), un processo che non può essere rilevato mediante spetttri

di fluorescenza o misure di tempo di vita dello stato eccitato. Questo fenomeno molto importante, che consente la migrazione dell'energia di eccitazione da un fluoroforo all'altro, per essere efficiente deve avvenire in tempi più brevi di quelli richiesti per la disattivazione dello stato eccitato, ovvero avere una costante cinetica superiore all'inverso di τ . Anche in questo caso, noto il tempo di vita dello stato eccitato, è possibile ricavare da misure di anisotropia di fluorescenza la costante di velocità del processo di trasferimento di energia.

7.3.7 Spettri di anisotropia di emissione

Partendo dalla definizione di anisotropia di emissione, ai fini della registrazione di uno spettro di anisotropia di emissione, sembrerebbe sufficiente registrare due spettri con il polarizzatore di eccitazione verticale e quello di emissione prima verticale (I_{VV}) e poi orizzontale (I_{VH}) e quindi combinarli supponendo che $I_{VV} = I_{\parallel}$ e $I_{VH} = I_{\perp}$. In pratica, se si registra uno spettro in questo modo per un campione che presenta uno spettro di anisotropia nullo, si ottengono valori di anisotropia diversi da zero. Ciò è dovuto al fatto che in realtà la risposta del sistema di misura non è indipendente dalla polarizzazione della luce rilevata. Il risultato è che, a parità di intensità per la componente verticale od orizzontale, si misurano segnali diversi. Pertanto I_{\parallel} e I_{\perp} saranno diversi da I_{VV} e I_{VH} , ma potranno essere ricavati da questi una volta che si conoscano i fattori di correzione S_V ed S_H , che dipendono dallo strumento di misura utilizzato e dalla lunghezza d'onda di emissione. Il componente che determina maggiormente questo comportamento anisotropico del fluorimetro è sicuramente il monocromatore di emissione che possiede appunto una struttura anisotropa. È possibile utilizzare un solo fattore, invece dei due fattori S_V ed S_H , considerando che l'anisotropia di fluorescenza può essere facilmente espressa in funzione del rapporto

$$\frac{I_{VV}}{I_{VH}} = \frac{S_V I_{\parallel}}{S_H I_{\perp}} = G \frac{I_{\parallel}}{I_{\perp}} \quad (7-6)$$

Tale rapporto a sua volta dipende dalle grandezze misurate I_{VV} e I_{VH} attraverso i parametri S_V ed S_H , che possono essere eliminati introducendo il fattore G .

In tal modo è possibile finalmente calcolare l'anisotropia dalle misure di intensità I_{VV} e I_{VH} , una volta che si conosca il valore di G alla lunghezza d'onda di interesse:

$$r = \frac{I_{VV} - G I_{VH}}{I_{VV} + 2G I_{VH}} \quad (7-7)$$

7.3.8 Il fattore G

Il fattore G è un parametro esclusivamente sperimentale, che può essere determinato ad ogni lunghezza d'onda per uno specifico strumento e quindi utilizzato per calcolare l'anisotropia di fluorescenza. Misurare questo fattore è estremamente sem-

plice grazie al fatto che, quando l'eccitazione viene effettuata con luce polarizzata orizzontalmente anziché verticalmente, le componenti di fluorescenza polarizzate verticalmente ed orizzontalmente sono previste risultare identiche, qualunque sia il sistema preso in considerazione. Una differenza fra queste due componenti pertanto è da attribuirsi esclusivamente ad effetti strumentali e può essere utilizzata per ottenere il fattore G:

$$G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}} \quad (7-8)$$

È possibile quindi determinare il fattore G in un determinato intervallo spettrale registrando gli spettri di fluorescenza di un campione che emetta in tale regione spettrale mantenendo il polarizzatore di eccitazione in posizione orizzontale e variando la posizione di quello di emissione. Ovviamente risulta particolarmente comodo utilizzare per il calcolo del fattore G lo stesso campione di cui si desidera registrare lo spettro di anisotropia di emissione. In questo caso infatti si registrano quattro spettri esattamente nelle stesse condizioni combinando le quattro possibili orientazioni (I_{VV} , I_{VH} , I_{HH} , I_{HV}). I quattro spettri possono essere utilizzati direttamente per il calcolo dello spettro di anisotropia di emissione utilizzando l'espressione che risulta esplicitando G nell'equazione 7-7 secondo la 7-8

$$r = \frac{I_{VV} I_{HH} - I_{VH} I_{HV}}{I_{VV} I_{HH} + 2 I_{VH} I_{HV}} \quad (7-9)$$

In alternativa, gli spettri I_{HH} ed I_{HV} possono essere utilizzati per ottenere il fattore G, come per esempio mostrato in figura 7.3.8. La curva ottenuta per il fattore G che mostra una evidente dipendenza dalla lunghezza d'onda può quindi essere usata per ottenere lo spettro di anisotropia mediante gli spettri I_{VV} e I_{VH} come in figura 7.3.9. Da notare che nel caso della fluoresceina in propilenglicole (un solvente ad alta viscosità che riduce la diffusione rotazionale) l'anisotropia di fluorescenza è piuttosto alta ($r = 0,24$ sul massimo di fluorescenza). Conoscendo il tempo di vita dello stato eccitato $\tau = 3,6$ ns e il valore dell'anisotropia fondamentale $r_0 = 0,375$ si può calcolare dalla equazione 7-5 il valore del tempo di correlazione rotazionale $\theta = 6,5$ ns.

7.3.9 Calcolo degli spettri di anisotropia di emissione

Per ottenere gli spettri di anisotropia si può procedere manualmente, ovvero registrando gli spettri di fluorescenza necessari e poi combinandoli con qualunque procedura che consenta di effettuare operazioni sugli spettri (normalmente utilizzando un PC ed un software adeguato), oppure in modo automatico. In questo caso è il software stesso di gestione del fluorimetro che consente di controllare i polarizzatori e di eseguire le scansioni necessarie fornendo infine lo spettro di anisotropia. Questa procedura automatizzata è disponibile per quasi tutti i fluorimetri ed è molto comoda dal punto di vista operativo, ma può in qualche caso trarre in inganno.

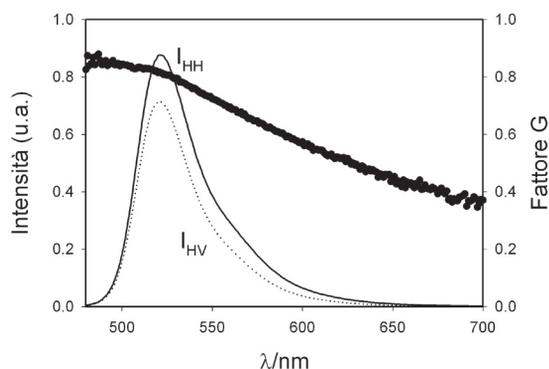


Figura 7.3.8 – Fattore G calcolato secondo l'eq. 7-8 dagli spettri ottenuti per una soluzione di fluoresceina in glicole propilenico ($c = 1 \times 10^{-5} \text{M}$) a temperatura ambiente, utilizzando un fluorimetro Edinburgh FLS920P.

Nell'esame degli spettri di anisotropia occorre infatti sempre tenere presente che questa grandezza risulta dalla combinazione di due o più misure di intensità, secondo le equazioni 7-7 e 7-9, e pertanto ha significato solo nella zona spettrale dove la fluorescenza è significativamente intensa. I fluorimetri in realtà misurano segnali di intensità anche a lunghezza d'onda a cui non si ha emissione. Questi segnali (anche se molto deboli) quando combinati possono originare valori di anisotropia anche molto grandi. Un esempio tipico è dato dalla presenza di luce di eccitazione diffusa dal campione. L'altissimo grado di polarizzazione della radiazione di eccitazione è infatti solo in piccola parte diminuita dallo scattering e presenta una anisotropia molto alta quando raggiunge il rivelatore. Un altro inconveniente che si può incontrare è dovuto alla presenza del segnale di fondo che normalmente presentano i rivelatori utilizzati nei fluorimetri (fotomoltiplicatori). Questo segnale non è dovuto alla fluorescenza e viene tuttavia sommato dallo strumento al valore di intensità di fluorescenza e quindi considerato nel calcolo dell'anisotropia. Il suo peso è ininfluente se l'intensità di fluorescenza è alta, ma può diventare significativo se l'emissione è debole e dovrebbe pertanto essere sottratto per avere misure accurate. In figura 7.3.10 sono evidenziati appunto gli effetti della luce diffusa di eccitazione e del fondo sullo spettro di anisotropia.

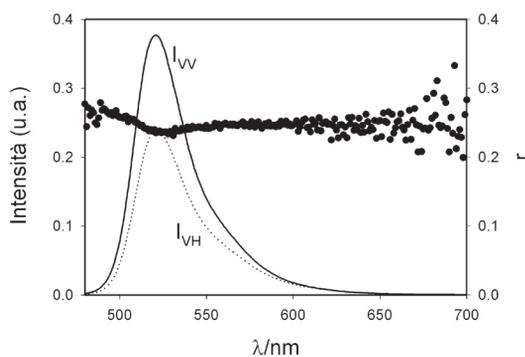


Figura 7.3.9 – Spettro di anisotropia di fluorescenza ($\lambda_{\text{ecc}} = 470 \text{ nm}$) di una soluzione di fluoresceina in glicole propilenico ($c = 1 \times 10^{-5} \text{M}$) a temperatura ambiente, utilizzando un fluorimetro Edinburgh FLS920P ed il fattore G riportato in figura 7.3.8.

7.3.10 Effetto della concentrazione e dello scattering sull'anisotropia

I valori misurati di anisotropia di fluorescenza possono essere alterati da fenomeni quali un cattivo allineamento dei polarizzatori, il riassorbimento o lo scattering dei campioni. Mentre il primo è un problema strumentale che non si presenta se i polarizzatori sono efficienti e installati in modo corretto, gli ultimi due parametri dipendono dalla preparazione del campione di misura. In particolare, riassorbimento e scattering, fenomeni che causano una depolarizzazione triviale della fluorescenza, possono essere ridotti semplicemente diluendo i campioni. In tal modo si possono anche evitare errori di misura derivanti dalla saturazione del rivelatore. Gli spettri di fluorescenza che si misurano con diverse orientazioni dei polarizzatori hanno infatti normalmente intensità molto diverse e può verificarsi che uno di esso superi la soglia di saturazione del fotomoltiplicatore di rilevazione; questo ovviamente si riflette sui valori di anisotropia misurati (vedi figura 7.3.10). Gli effetti di saturazione possono essere facilmente eliminati diminuendo la quantità di luce che raggiunge il rivelatore riducendo le fenditure durante le misure. Occorre comunque ricordare che le misure di anisotropia di fluorescenza, in assenza di fenomeni quali il riassorbimento e lo scattering e nel caso di molecole non interagenti, non dipendono dalla concentrazione.

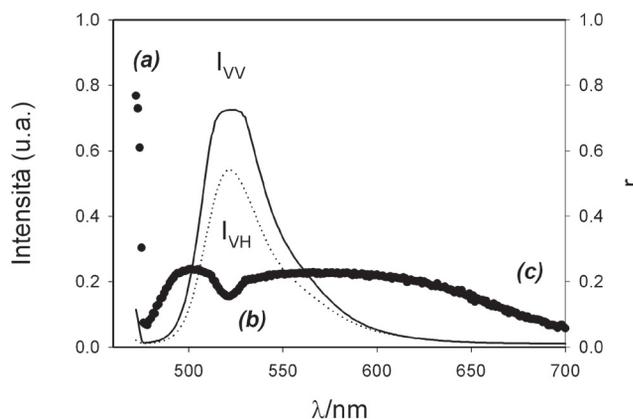


Figura 7.3.10 – Deviazioni nello spettro di anisotropia di fluorescenza di soluzione di fluoresceina in glicole propilenico dovuti a (a) diffusione della luce di eccitazione (b) saturazione del rivelatore (c) presenza di un segnale di fondo.

7.3.11 Configurazioni strumentali (a L o a T)

La configurazione ad L è quella che si ottiene dotando di una coppia di polarizzatori un tradizionale spettrofluorimetro ed è quella più largamente utilizzata. In questo caso esiste un solo canale di lettura che utilizza appunto il monocromatore di emissione ed il rivelatore del fluorimetro. Si può pertanto effettuare una sola misura di intensità per volta. Inevitabilmente, la misura di anisotropia e specialmente gli spettri di eccitazione ed emissione di anisotropia risultano essere la combinazione

di misure di intensità fatte in momenti diversi; perché il risultato sia significativo occorre pertanto che le condizioni in cui si effettuano le misure di intensità siano del tutto identiche.

La configurazione a T richiede due canali di rilevazione e quindi una strumentazione più complicata e costosa, dotata di due sistemi di rilevazione e complessivamente tre polarizzatori (due di emissione e uno di eccitazione). Occorre pertanto utilizzare non un fluorimetro standard, bensì un fluorimetro modulare disegnato opportunamente per effettuare simultaneamente due misure di intensità.

7.3.12 Spettri di miscele

Quando in una soluzione sono presenti più specie fluorescenti lo spettro di anisotropia che si misura è una media degli spettri, dove ciascuna specie pesa per un fattore f_i che dipende dalla frazione di luce emessa dalla specie i -esima nelle condizioni sperimentali considerate:

$$\langle r \rangle = \sum_i f_i r_i \quad (7-10)$$

7.3.13 Spettri di anisotropia di eccitazione

Da quanto descritto nel paragrafo 7.3.4 risulta chiaro che il valore dell'anisotropia di fluorescenza, qualora siano impediti processi di depolarizzazione per rotazione o trasferimento di energia, dipende dall'angolo compreso fra il dipolo di eccitazione e quello di emissione secondo la relazione 7-4.

La situazione ideale di un insieme di fluorofori non interagenti orientati in modo casuale e mantenuti immobili nello spazio può essere realizzata con buona approssimazione portando a bassa temperatura e facendo congelare soluzioni diluite del fluoroforo di interesse. Se si effettuano misure di anisotropia di fluorescenza mantenendo fissa la lunghezza d'onda di emissione e variando quella di eccitazione, diventa quindi possibile ottenere valori di anisotropia che permettono di calcolare l'angolo fra il dipolo di emissione e quello che si va di volta in volta ad eccitare. In questo modo è possibile individuare le diverse transizioni elettroniche del fluoroforo e la loro orientazione relativa. Dal punto di vista sperimentale occorre adottare alcuni accorgimenti. Il punto più critico è la preparazione del campione: occorre infatti utilizzare solventi in grado di formare una matrice estremamente limpida e trasparente; fenomeni di scattering infatti possono rendere la misura del tutto inattendibile. Il glicole propilenico a circa -70 °C si è dimostrato essere un buon solvente. In figura 7.3.11 è rappresentato lo spettro di anisotropia di eccitazione della fluoresceina in tale solvente. Nonostante per semplicità lo spettro sia stato registrato a temperatura ambiente e quindi i fluorofori siano liberi di ruotare, si può chiaramente distinguere il valore negativo (circa $-0,1$) dell'anisotropia per eccitazione nell'ultravioletto ed un valore molto alto (circa $0,25$) per la transizione nel visibile. Lo spettro è stato corretto per il fattore G alla lunghezza d'onda di emissione (550 nm): da notare che il fattore G è funzione della lunghezza d'onda di emissione, ma non di quella di eccitazione.

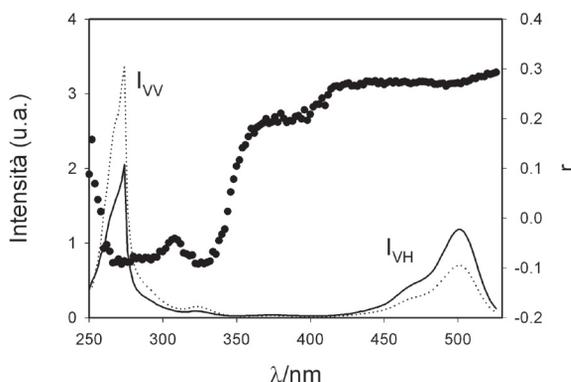


Figura 7.3.11 – Spettro di anisotropia di eccitazione ($\lambda_{\text{exc}} = 550$ nm) di una soluzione di fluoresceina in glicole propilenico ($c = 1 \times 10^{-5}$ M) a temperatura ambiente, utilizzando un fluorimetro Edinburgh FLS920P ed il fattore G riportato in figura 7.3.8.

7.3.14 Anisotropia di fluorescenza allo stato stazionario e risolta nel tempo

Le considerazioni fatte finora si basano sull'orientazione media delle molecole eccitate durante la loro disattivazione e valgono, come si vedrà, nel caso di misure di anisotropia allo stato stazionario. È in realtà possibile studiare come l'anisotropia di fluorescenza varia nel tempo mediante appunto misure risolte nel tempo. Questa opzione diventa particolarmente importante nel caso di processi di depolarizzazione molto veloci (rispetto a τ). In questi casi infatti la depolarizzazione si verifica in tempi molto brevi e la quasi totalità della luce emessa risulta essere non polarizzata e non fornisce alcuna informazione. Utilizzando tecniche pulsate ed esaminando le variazioni di anisotropia a tempi brevi (questo richiede normalmente sistemi molto veloci con risoluzioni temporali nel campo dei ps) è invece possibile ottenere informazioni sulla cinetica di depolarizzazione.

7.3.15 Decadimento di anisotropia

Le misure di anisotropia di fluorescenza allo stato stazionario vengono effettuate utilizzando una sorgente continua per l'eccitazione. Tali misure sono semplici e richiedono una strumentazione molto diffusa ed economica, tuttavia non permettono di seguire effettivamente la dinamica di depolarizzazione e la loro interpretazione non sempre è univoca. In particolare, quando la depolarizzazione è molto veloce, la frazione di luce polarizzata emessa è così piccola da divenire trascurabile e non si misura alcuna anisotropia di fluorescenza. Questo avviene normalmente per la maggior parte dei fluorofori in soluzione fluida. Tornando ad esempio al caso della fluoresceina, se il solvente ad alta viscosità viene sostituito con acqua, il valore di θ diminuisce enormemente con il risultato che il rapporto r_0/r dell'equazione 7-5 diventa molto grande e quindi r è molto prossimo allo zero. Il decadimento dell'anisotropia può essere seguito con tecniche pulsate o a modulazione di fase. Le prime, che verranno descritte in questo capitolo, forniscono certamente risultati più intuitivi e facilmente interpretabili; in questo caso l'eccitazione viene effettuata con un impulso di luce polarizzata verticalmente e vengono misurati i decadimenti delle componenti verticale ed orizzontale della fluorescenza mediante uno

(configurazione L) o due (configurazione T) polarizzatori. Si ottengono così due decadimenti che possono essere combinati secondo l'equazione 7-1 per dare il decadimento dell'anisotropia in funzione del tempo. Le singole componenti del decadimento possono essere registrate o con un sistema 'pump and probe' o, come più frequentemente accade, con un sistema ad accumulazione al singolo fotone (*time correlated single photon counting* TCSPC). Per quanto riguarda l'anisotropia del sistema di misura, che come abbiamo visto è dovuta principalmente al monocromatore di emissione, anche in questo caso occorre introdurre un opportuno fattore di correzione G.

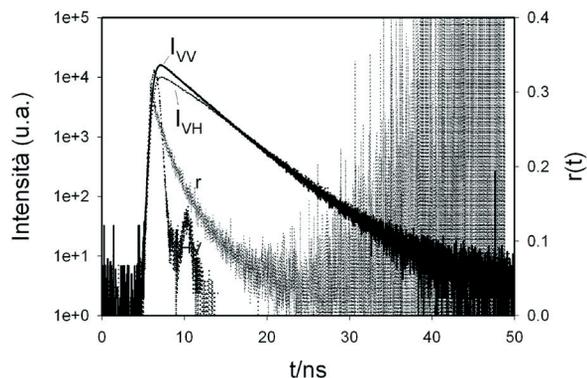


Figura 7.3.12 – Decadimento di anisotropia ($\lambda_{\text{ecc}} = 406 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 550 \text{ nm}$) di una soluzione di fluoresceina in glicole propilenico ($c = 1 \times 10^{-5} \text{ M}$) a temperatura ambiente, utilizzando un fluorimetro Edinburgh FLS920P ed il fattore G riportato in figura 7.3.8. Oltre ai decadimenti è riportato anche il profilo dell'impulso di eccitazione.

7.3.16 L'anisotropia fondamentale r_0 nelle misure risolte nel tempo

Se l'impulso di luce di eccitazione è sufficientemente veloce, ovvero molto più rapido dei processi di depolarizzazione, a tempi molto vicini al tempo zero (individuato dall'impulso) sarà possibile misurare il valore di anisotropia della fluorescenza del fluoroforo in assenza di depolarizzazione, ovvero l'anisotropia fondamentale r_0 . Da notare che questo valore è una misura dell'anisotropia del fluoroforo prima che qualunque processo di depolarizzazione, inclusa la rotazione, possa avvenire, e quindi coincide con l'anisotropia stazionaria dello stesso fluoroforo in condizioni in cui la depolarizzazione è impedita, come ad esempio nel caso in cui sia immobilizzato in matrice rigida. In realtà, spesso i processi di depolarizzazione sono più veloci della durata dell'impulso utilizzati per l'eccitazione. In questi casi l'anisotropia fondamentale non coincide col valore dell'anisotropia al tempo zero, bensì col valore medio dell'anisotropia durante la durata dell'impulso. Si veda per esempio in figura 7.3.12, come il valore dell'anisotropia all'inizio del decadimento sia significativamente inferiore a quello atteso ($r_0 = 0,375$). Come nel caso della misurazione dei tempi di vita, questo inconveniente può essere in parte superato mediante deconvoluzione dei decadimenti, una volta che sia noto il profilo dell'impulso di eccitazione. La procedura è però in questo caso assai più complicata e per la sua trattazione si rimanda a testi specialistici [9901].

7.3.17 Acquisizione del decadimento

La tecnica più semplice e comune per l'acquisizione di un decadimento di anisotropia si basa sull'utilizzo di una apparecchiatura a fotone singolo per la determinazione dei tempi di vita degli stati eccitati (vedi cap. 5). Nel caso della più comune geometria ad L per l'acquisizione occorre dotare lo strumento di un polarizzatore di eccitazione e di uno di emissione. Si effettua quindi l'acquisizione del primo decadimento con entrambi i polarizzatori in posizione verticale $I_{VV}(t)$, si ruota quindi il polarizzatore di emissione di 90° e si registra il secondo decadimento $I_{VH}(t)$. Se si utilizza una geometria a T e quindi due polarizzatori di emissione e due canali di rilevazione, è possibile effettuare le due acquisizioni simultaneamente. Un aspetto fondamentale da considerare durante l'acquisizione è che la misura di anisotropia si basa sulla combinazione di due misure di intensità, che in un esperimento come quello in esame sono proporzionali al tempo di acquisizione. Per avere due decadimenti compatibili occorre pertanto utilizzare per entrambi lo stesso tempo di acquisizione; se questa condizione non viene rispettata si otterranno risultati inattendibili. Da un punto di vista matematico l'anisotropia in funzione del tempo è semplicemente:

$$r(t) = \frac{I_{\parallel}(t) - I_{\perp}(t)}{I_{\parallel}(t) + 2I_{\perp}(t)} \quad (7-11)$$

in realtà anche in questo caso, come in quello dell'anisotropia allo stato stazionario il comportamento anisotropo dello strumento richiede l'introduzione di un fattore di correzione G del tutto analogo a quello visto nel paragrafo 7.3.8:

$$r(t) = \frac{I_{VV}(t) - GI_{VH}(t)}{I_{VV}(t) + 2GI_{VH}(t)} \quad (7-12)$$

Questo fattore che dipende dalla lunghezza d'onda di emissione può essere ottenuto da spettri di anisotropia di emissione. I decadimenti $I_{VV}(t)$ e $I_{VH}(t)$ che risultano dall'acquisizione normalmente presentano un valore di fondo diverso da zero, dovuto prevalentemente a fenomeni di scattering. Come già visto per il calcolo dell'anisotropia allo stato stazionario, anche nel caso delle misure risolte nel tempo questo contributo deve essere sottratto per avere dei risultati significativi. Alcuni strumenti che dispongono di un software dedicato per l'acquisizione dei decadimenti di anisotropia non tengono conto di questo contributo, per cui è comune ottenere a tempi lunghi valori di anisotropia molto alti, ma non significativi.

7.3.18 Interpretazione dei dati sperimentali

Come già messo in evidenza, l'interpolazione dei decadimenti di anisotropia di fluorescenza è molto complicata e laboriosa; richiede pertanto l'utilizzo di software dedicati. Si possono comunque, per questa operazione, seguire due approcci diversi. Il primo,

più rigoroso, prevede l'analisi simultanea dei due decadimenti di intensità $I_{VV}(t)$ e $I_{VH}(t)$ piuttosto che del decadimento dell'anisotropia $r(t)$. Questo richiede l'adozione di modelli specifici per il decadimento e consente la deconvoluzione dei decadimenti rispetto all'impulso di eccitazione. In alternativa, è possibile più semplicemente interpolare direttamente il decadimento dell'anisotropia. Nel caso semplice di un rotatore sferico è infatti atteso un andamento del tipo:

$$r(t) = r_0 e^{-t/\theta} \quad (7-13)$$

Mediante l'utilizzo di funzioni modello di tipo esponenziale si può così ottenere il tempo di correlazione rotazionale θ . Dall'interpolazione dei dati di figura 7.3.12 per esempio si ottiene per la fluoresceina $\theta = 6,3$ ns, in buon accordo con il valore risultante dai dati di anisotropia allo stato stazionario di figura 7.3.9. L'analisi diretta dei decadimenti di anisotropia, largamente adottata per la sua semplicità, non consente tuttavia la deconvoluzione rispetto al profilo dell'impulso di eccitazione.

BIBLIOGRAFIA

- [6001] Djerassi, C. *Optical Rotatory Dispersion: Applications to Organic Chemistry*; McGraw-Hill: New York, 1960.
- [6301] McCaffery, A.J.; Mason, S. F. *Mol. Phys.* **1963**, *6*, 359-362.
- [6901] DeTar, D.F. *Anal. Chem.* **1969**, *41*, 1406-1408.
- [7201] Steinberg, I.; Gafni, A. *Rev. Sci. Instrum.* **1972**, *43*, 409-413.
- [7501] Konno, T.; Meguro, H.; Tuzimura, K. *Anal. Biochem.* **1975**, *67*, 226-232.
- [7701] Richardson, F.S.; Riehl, J.P. *Chem. Rev.* **1977**, *77*, 773-792.
- [8101] Schippers, P.H.; Dekkers, H.P.J.M. *Anal. Chem.* **1981**, *53*, 778-782.
- [8102] Belser, P.; Daul, C.; Von Zelewsky, A. *Chem. Phys. Lett.* **1981**, *79*, 596-598.
- [8201] Mason, S.F. *Molecular Optical Activity and the Chiral Discriminations*; Cambridge University Press: Cambridge, 1982.
- [8301] Harada, N.; Nakanishi, K. *Circular Dichroic Spectroscopy. Exciton Coupling in Organic Stereochemistry*; University Science Books: Mill Valley, 1983.
- [8501] Norden, B.; Seth, S. *Appl. Spectrosc.* **1985**, *39*, 647-650.
- [8502] Takakuwa, T.; Konno, T.; Meguro, H. *Anal. Sci.* **1985**, *1*, 215-218.
- [8601] Riehl, J.P.; Richardson, F.S. *Chem. Rev.* **1986**, *86*, 1-16.
- [8901] Metcalf, D.H.; Snyder, S.W.; Wu, S.; Hilmes, G.L.; Riehl, J.P.; Demas, J.N.; Richardson, F.S. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 3082-3083.
- [9201] Coruh, N.; Riehl, J.P. *Biochemistry* **1992**, *31*, 7970-7976.
- [9601] Fasman, G.D. (ed.) *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*; Plenum: New York, 1996.
- [9602] Maupin, C.L.; Meskers, S.C.J.; Dekkers, H.P.J.M.; Riehl, J.P. *Chem. Commun.* **1996**, 2457-2458.
- [9701] Rodger, A.; Norden, B. *Circular Dichroism and Linear Dichroism*; Oxford University Press: Oxford, 1997.
- [9702] Connors, K.A. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1325-1357.

- [9703] Gunde, K.E.; Credi, A.; Jandrasics, E.; von Zelewsky, A.; Richardson, F.S. *Inorg. Chem.* **1997**, *36*, 426-434.
- [9801] Riesgo, E.C.; Credi, A.; De Cola, L.; Thummel, R.P. *Inorg. Chem.* **1998**, *37*, 2145-2149.
- [9901] Lakowicz, J.R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy, 2nd Ed.*; Kluwer: New York, 1999.
- [0001] Berova, N.; Nakanishi, K.; Woody, R. W. (eds.) *Circular Dichroism: Principles and Applications, 2nd Ed.*; Wiley-VCH: New York, 2000.
- [0002] Lightner, D.A.; Gurst, J.E. *Organic Conformational Analysis and Stereochemistry from Circular Dichroism Spectroscopy*; Wiley-VCH: New York, 2000.
- [0003] Dekkers, H.P.J.M. in Berova, N.; Nakanishi, K.; Woody, R.W. (eds.) *Circular Dichroism: Principles and Applications, 2nd Ed.*; Wiley-VCH: New York, 2000, pp. 185-215.
- [0101] Meskers, S.C.J.; Dekkers, H.P.J.M. *J. Phys. Chem. A* **2001**, *105*, 4589-4599.
- [0102] Marletta, A.; Goncalves, D.; Oliveira, O.N.; Faria, R.M.; Guimaraes, F.E.G. *Synth. Met.* **2001**, *119*, 207-208.
- [0201] Ashton, P.R.; Balzani, V.; Clemente-Leon, M.; Colonna, B.; Credi, A.; Jayaraman, N.; Raymo, F.M.; Stoddart, J.F.; Venturi, M. *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 673-684.
- [0202] Gussakovsky, E.E.; Salakhutdinov, B.A.; Shahak, Y. *Funct. Plant Biol.* **2002**, *29*, 955-963.
- [0301] Gawroński, J.; Grajewski, J. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 3301-3303.
- [0302] Field, J.E.; Muller, G.; Riehl, J.P.; Venkataraman, D. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11808-11809.
- [0303] van Delden, R.A.; Huck, N.P.M.; Piet, J.J.; Warman, J.M.; Meskers, S.C.J.; Dekkers, H.P.J.M.; Feringa, B.L. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 15659-15665.
- [0401] Thompson, N.C.; Parker, D.; Schmitt-Willich, H.; Suelzle, D.; Muller, G.; Riehl, J. P. *Dalton Trans.* **2004**, *12*, 1892-1895.
- [0501] Mamula, O.; Lama, M.; Telfer, S.G.; Nakamura, A.; Kuroda, R.; Stoeckli-Evans, H.; Scopelitti, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2527-2531.
- [0502] Gawryszewska, P.; Sokolnicki, J.; Dossing, A.; Riehl, J.P.; Muller, G.; Legendziewicz, J. *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, 3858-3863.

