

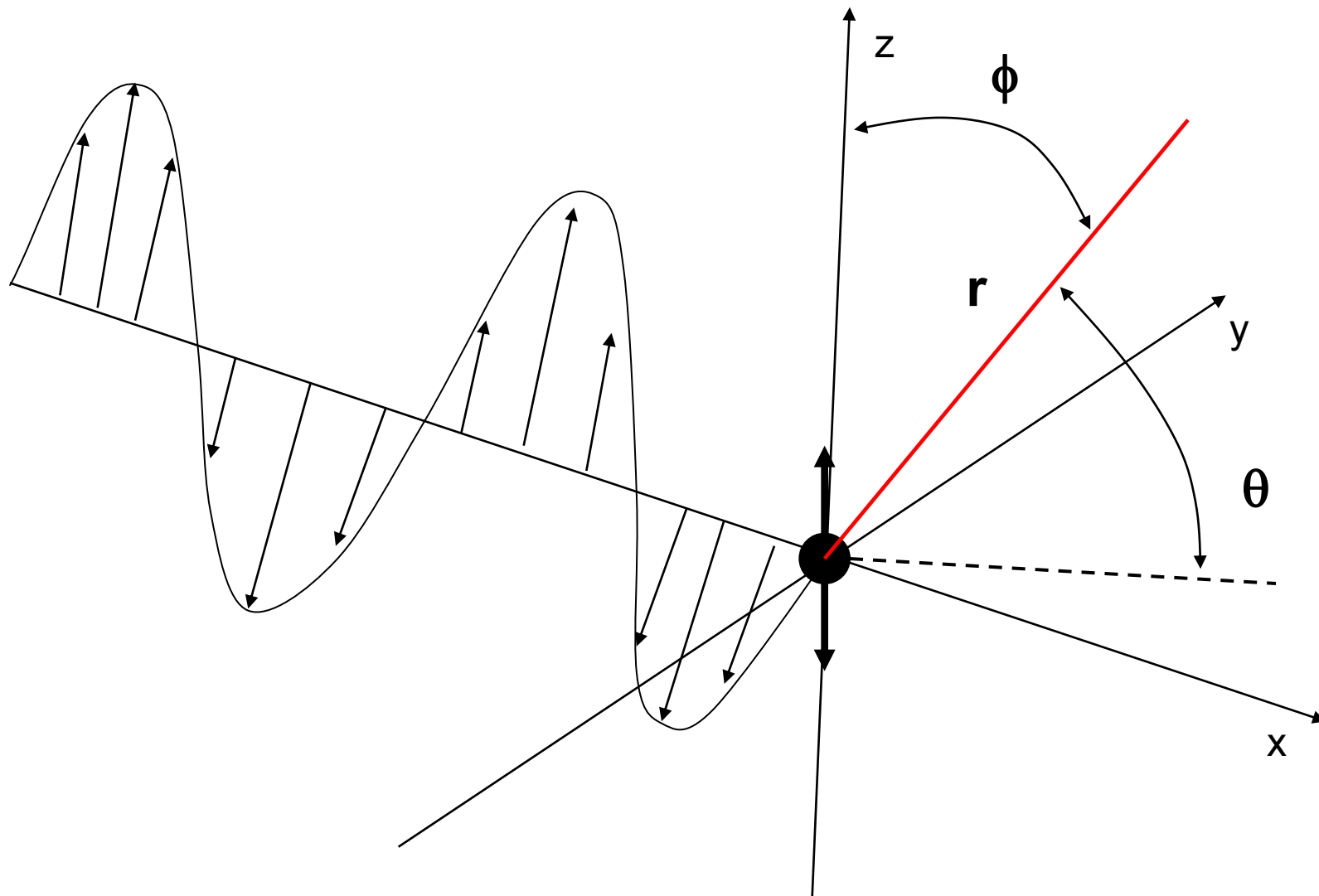
Scattering

Illuminiamo una soluzione con una luce di lunghezza d'onda lontana da qualunque banda di assorbimento

Le molecole sono polarizzabili: la distribuzione degli elettroni può essere perturbata da un campo elettrico (radiazione).

Il campo di una radiazione elettromagnetica varia sinusoidalmente, questo (se appunto la radiazione non è assorbita) produce una oscillazione degli elettroni all'interno della molecola.

Questa oscillazione fa sì da disperdere l'energia in direzioni diverse dalla radiazione incidente poiché la molecola si comporta come un'antenna a sua volta.



$$E = E_0 \cos 2\pi\nu\left(t - \frac{x}{c}\right)$$

$$H = H_0 \cos 2\pi\nu\left(t - \frac{x}{c}\right)$$

per $x = 0$ $E = E_0 \cos 2\pi\nu t$

Siccome tutte le molecole sono polarizzabili: $\mu = \alpha E = \alpha E_0 \cos 2\pi\nu t$

$$E_r = \left[\frac{\alpha E_0 4\pi^2 \sin \phi}{r\lambda^2} \right] \cos 2\pi\nu\left(t - \frac{r}{c}\right)$$

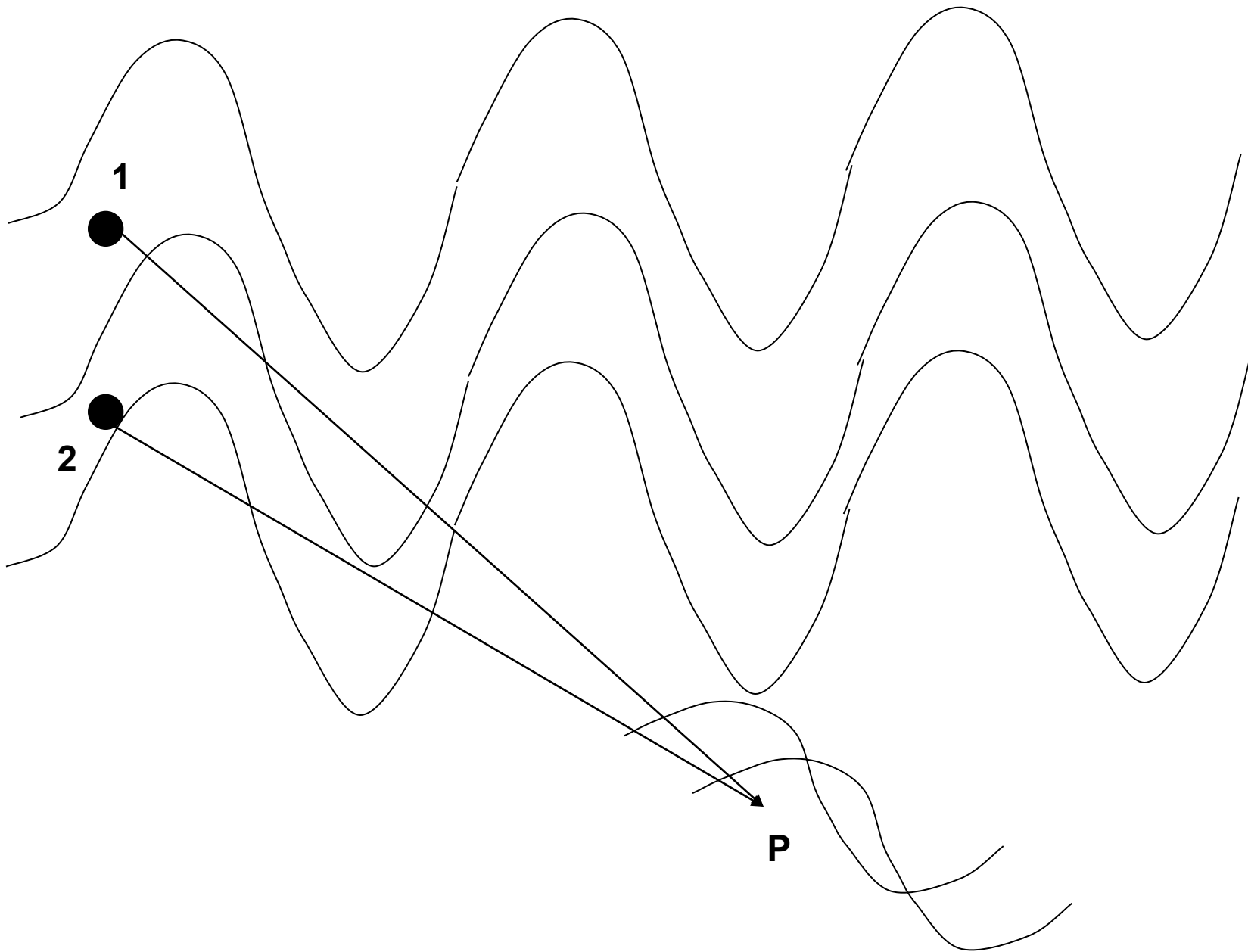
siccome $i = E_r^2$ (prendendo solo l'ampiezza) e $I_0 = E_0^2$

$$\frac{i}{I_0} = \frac{\left(\alpha E_0 4\pi^2 \frac{\sin \phi}{r\lambda^2} \right)^2}{E_0^2} = \frac{16\pi^4 \alpha^2 \sin^2 \phi}{r^2 \lambda^2}$$

Intensità dello scattering

$$\frac{i}{I_0} = \frac{16\pi^4 \alpha^2 \sin^2 \phi}{r^2 \lambda^4}$$

- L'intensità varia con l'inverso del quadrato come ogni sorgente puntiforme
- L'intensità dello scattering aumenta rapidamente con il diminuire della lunghezza d'onda
- L'intensità dipende dall'angolo ϕ : non c'è scattering nella direzione di vibrazione del campo elettrico



$$A_1 \cos(2\pi\nu t + \phi_1) \quad \text{dal centro 1}$$

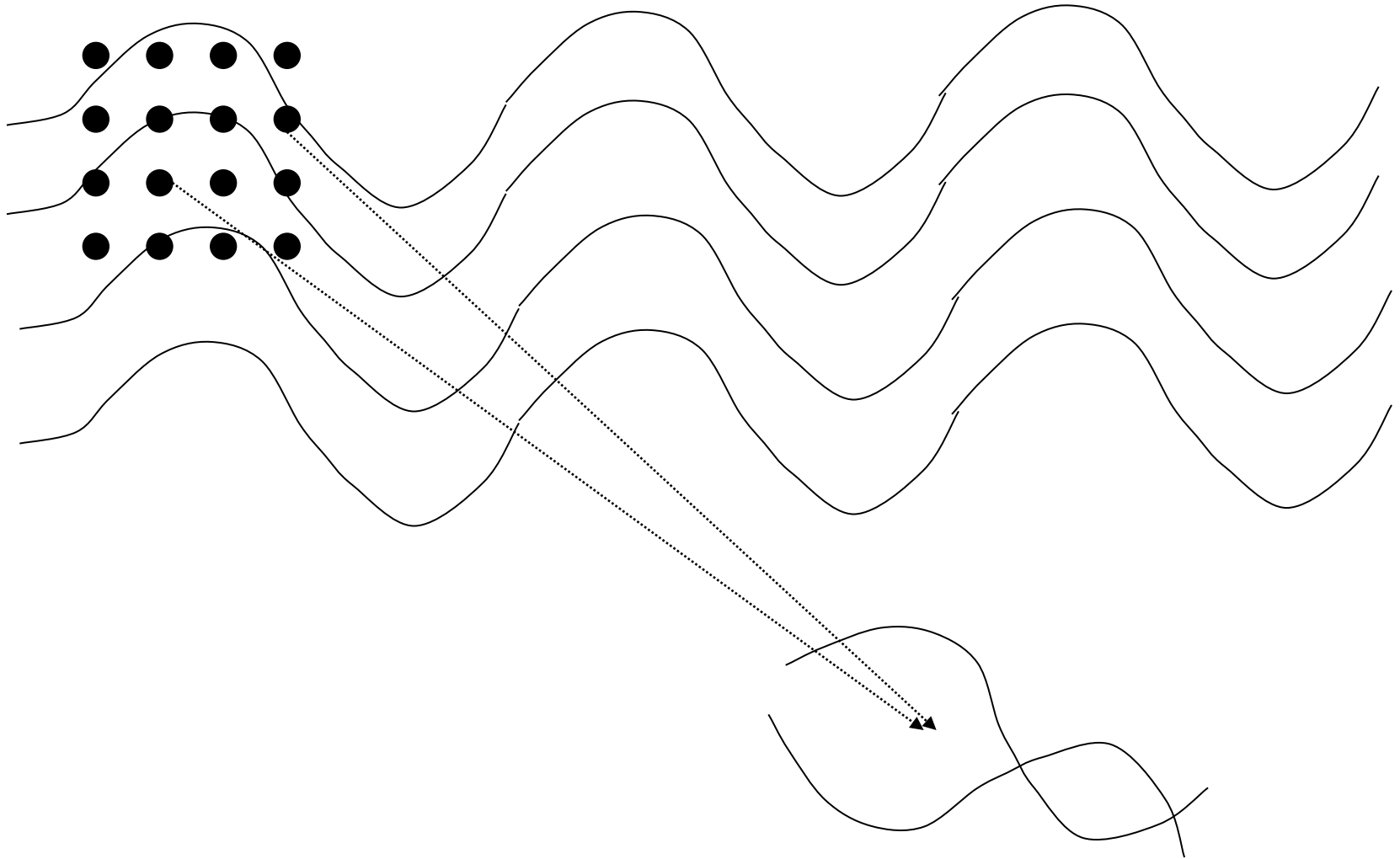
$$A_2 \cos(2\pi\nu t + \phi_2) \quad \text{dal centro 2}$$

$$E = A \cos(2\pi\nu t + \phi_1) + A \cos(2\pi\nu t + \phi_2)$$

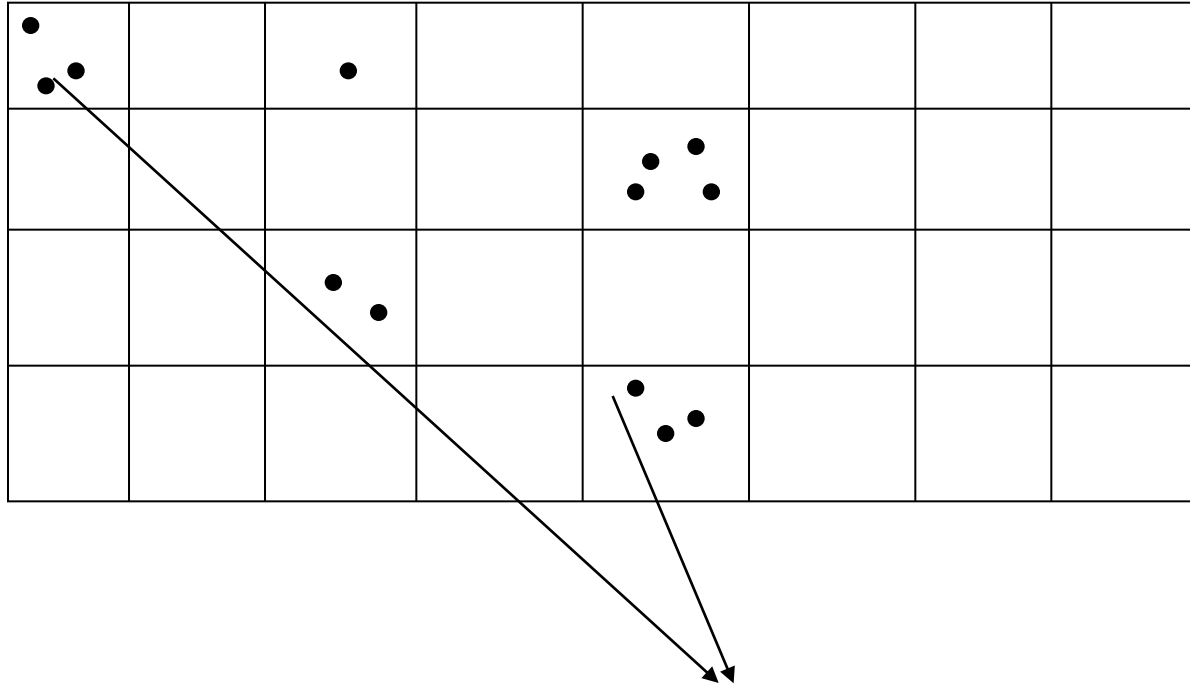
$$E = \underbrace{2A \cos \frac{1}{2}(\phi_1 - \phi_2)}_{\text{ampiezza}} \cos \frac{2\pi\nu t + \phi_1 + \phi_2}{2}$$

$$i_{1,2} = 4A^2 \cos^2\left(\frac{\Delta\phi}{2}\right)$$

Scattering da un cristallo perfetto



Scattering da un cristallo perfetto



Anche se fossero perfettamente sfasati le fluttuazioni delle molecole fa sì che non ci sia un'interferenza perfettamente distruttiva.

In soluzione lo scattering è più elevato che in un cristallo

Effetto Raman

Quando un fotone con una lunghezza d'onda non adatta ad attivare una transizione elettronica interagisce con una molecola, può essere scatterato in tre modi diversi:

- Scattering **elastico** (energia della radiazione emessa è uguale a quella incidente)
- Scattering **anelastico**, cedendo energia (scattering Stokes)
- Scattering **anelastico**, acquistando energia (scattering Antistokes)

Scattering Raman: diffusione anelastica dei fotoni da parte delle molecole.

La frequenza della luce diffusa è diversa da quella incidente; la differenza di frequenza fra luce incidente e quella diffusa è uguale a quella associata ad una transizione vibrazionale o rotazionale.

Un fotone diffuso in maniera anelastica da parte di una molecola, può guadagnare energia e quindi essere diffuso ad una frequenza superiore alla frequenza originale, o può perdere energia ed essere diffuso ad una frequenza inferiore.

$$h\nu' = h\nu \pm (v_m - v_n)$$

Effetto Raman

$$E = E_0 \cos 2\pi\nu t$$

$$\text{se } \nu = \nu_0 \quad \text{dove } \nu_0 \text{ frequenza radiazione incidente}$$



Scattering Rayleigh

$$E = E_0 \cos 2\pi\nu t$$

$$\text{se } \nu = \nu_0 - \nu_v \quad \text{dove } \nu_0 \text{ frequenza radiazione incidente}$$



Scattering Stokes

Effetto Raman

$$E = E_0 \cos 2\pi\nu t$$

se $\nu = \nu_0 + \nu_v$ dove ν_0 frequenza radiazione incidente



Scattering Anti-Stokes

Spettroscopia Raman

L'effetto raman è un processo di scattering a 2-fotoni

Questi processi sono scattering anelastici:

Scattering Stokes : energia persa dal fotone:



Fotone in

Fotone out

No vibrazione

Vibrazione

Scattering Anti-Stokes : energia guadagnata dal fotone:



Fotone in

Fotone out

Vibrazione

No vibrazione

Il processo dominante è però lo scattering elastico:

Scattering Rayleigh



Fotone in

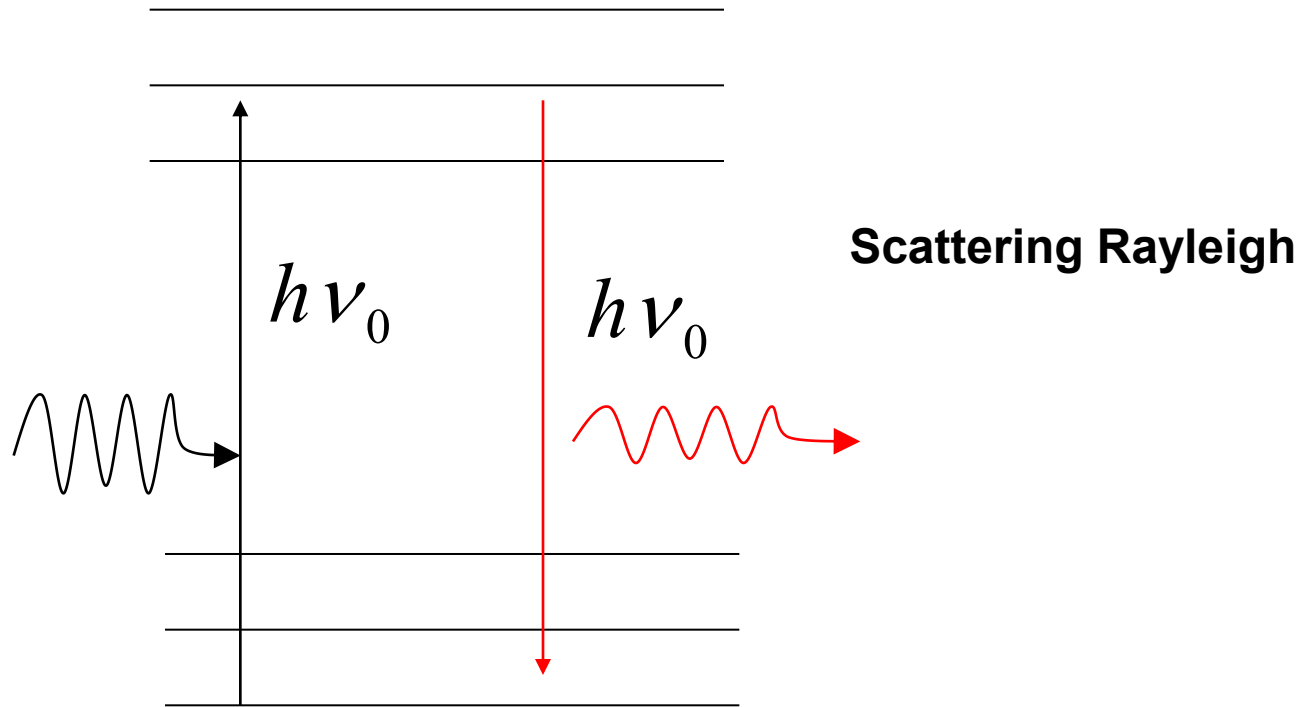
Fotone out

No vibrazione

No vibrazione

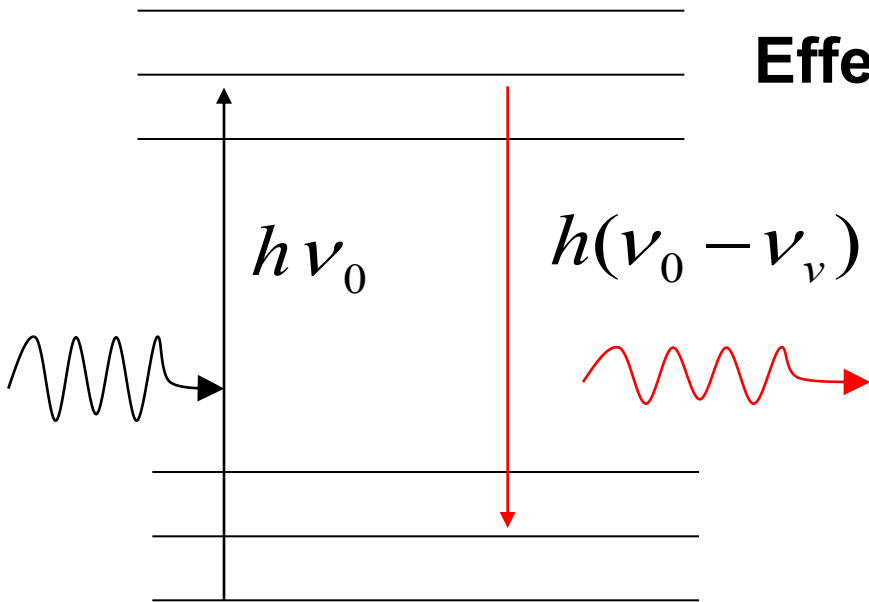
**Energia del fotone incidente E ; energia di vibrazione v ,
allora**

Effetto Raman

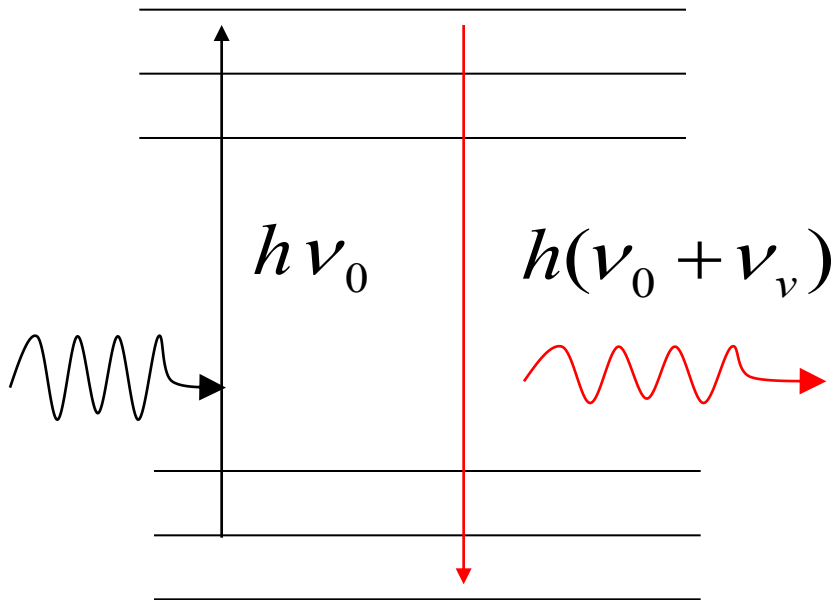


Effetto Raman

Scattering Stokes



Scattering Anti-Stokes



Effetto Raman

Nello scattering Rayleigh le transizioni iniziano e finiscono sullo stesso livello vibrazionale

Nello scattering Stokes lo stato finale è più alto dello stato iniziale (fondamentale)

Nello scattering anti-Stokes lo stato finale è più basso di quello iniziale

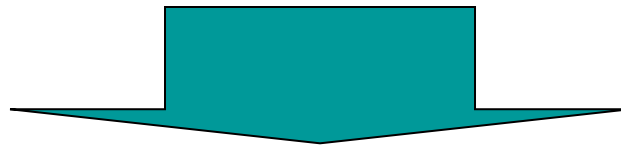
A temperatura ambiente la maggior parte delle vibrazioni molecolari sono sullo stato fondamentale perciò lo scattering anti-Stokes è molto improbabile

Effetto Raman

Tenendo presente come è definito il fenomeno di scattering si può dedurre che le vibrazioni molecolari che saranno “Raman-attive” sono quelle che implicano un cambiamento nella polarizzabilità molecolare.

L'effetto Raman altro non è che un cambiamento della polarizzabilità del materiale.

Per questo motivo lo spettro Raman dell'acqua è molto debole e quindi non si sovrappone a quello delle molecole del campione



Lo spettro Raman ha quindi un indubbio vantaggio rispetto allo spettro infrarosso dove l'assorbimento dell'acqua è un problema

Effetto Raman

Lo scattering anelastico della radiazione dovuto all'interazione dei dipoli molecolari con la radiazione incidente è altamente improbabile.

Solo l'1-2 % dei fotoni scatterati hanno ceduto energia al campione (fotoni raman) per cui lo spettro Raman è molto piccolo.

Ancora più piccolo è il raman Anti-Stokes

Per questi motivi :

Sorgente di luce monocromatica ad alta energia (Laser)

Effetto Raman

Lo shift in frequenza osservato in spettroscopia Raman non corrispondono sempre alle bande di assorbimento della spettroscopia a Infrarosso.

Infatti per avere **bande Raman** i legami chimici devono essere polarizzabili mentre per avere **bande IR** le molecole devono avere un cambiamento di dipolo.

Esempio: molecole simmetriche hanno spettri Raman ma poche bande IR

Effetto Raman

- Regola di selezione generale per l'osservazione degli spettri Raman vibrazionali: la polarizzabilità molecolare deve variare con la distanza internucleare.

- Quindi le transizioni fondamentali Raman sono attive se è diverso da zero l'integrale del momento di transizione:

$$M_{fi} = \int \psi_{vf}^* \alpha \psi_{vi} d\tau_v \neq 0$$

α rappresenta la polarizzabilità della molecola.

l'integrale è diverso da zero quando la polarizzabilità della molecola varia quando avviene la transizione.

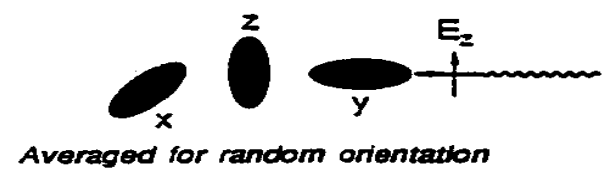
- La regola di selezione specifica per le transizioni vibrazionali Raman nell'ambito dell'approssimazione armonica è $\Delta v = \pm 1$

Effetto Raman

- Informazioni sulle vibrazioni molecolari si ottengono sia dalla spettroscopia IR che Raman.
- Molecole con simmetria molto bassa o senza simmetria hanno spettri IR e Raman molto simili.
- Per molecole con centro di simmetria le due spettroscopie sono complementari per la *regola della mutua esclusione*: in molecole con il centro di simmetria le transizioni vibrazionali che sono permesse in IR sono proibite in Raman e viceversa.
Infatti, la spettroscopia Raman coinvolge la variazione della polarizzabilità mentre IR la variazione del momento di dipolo durante la vibrazione

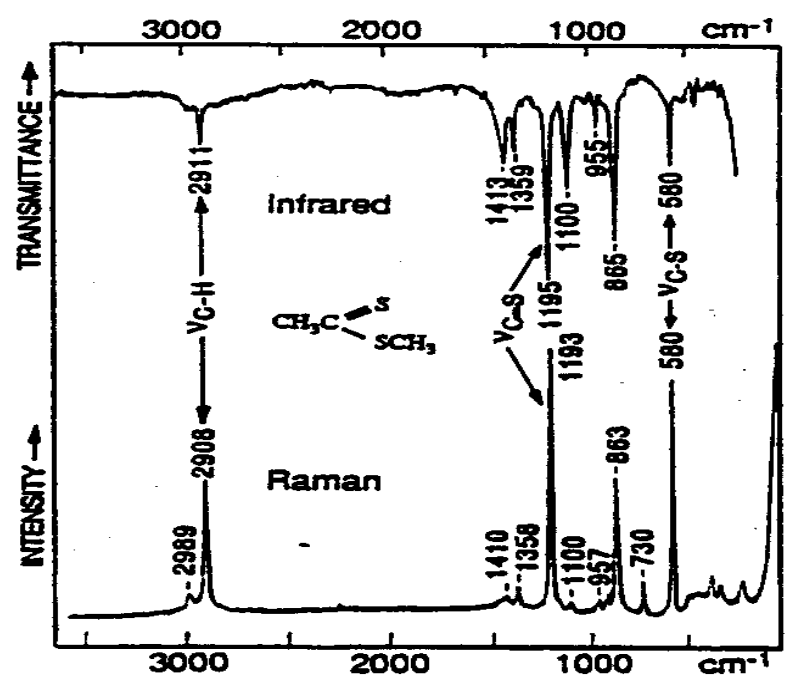
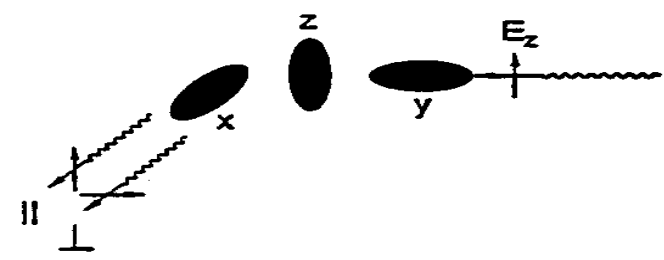
INFRARED

$$\vec{\mu} = \begin{pmatrix} \mu_x \\ \mu_y \\ \mu_z \end{pmatrix}$$



RAMAN

$$\alpha_i = \begin{pmatrix} \alpha_{xx} & \alpha_{xy} & \alpha_{xz} \\ \alpha_{yx} & \alpha_{yy} & \alpha_{yz} \\ \alpha_{zx} & \alpha_{zy} & \alpha_{zz} \end{pmatrix}$$



The Principle of Raman Spectroscopy

- The sample is excited with laser light

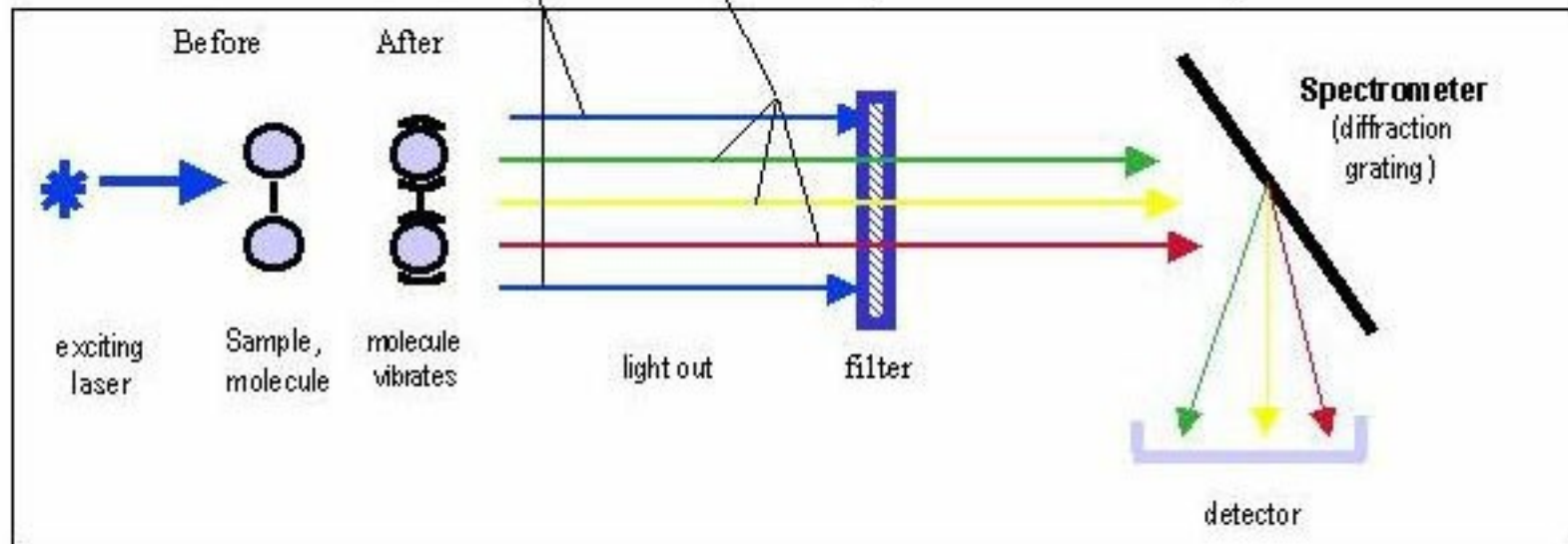


- elastically scattered light (Rayleigh)

- inelastically scattered light (Raman)

- Filter eliminates intense Rayleigh scattering
(typically 10^8 times stronger than the Raman scattering)

- Grating disperses the light onto
a detector to generate a spectrum



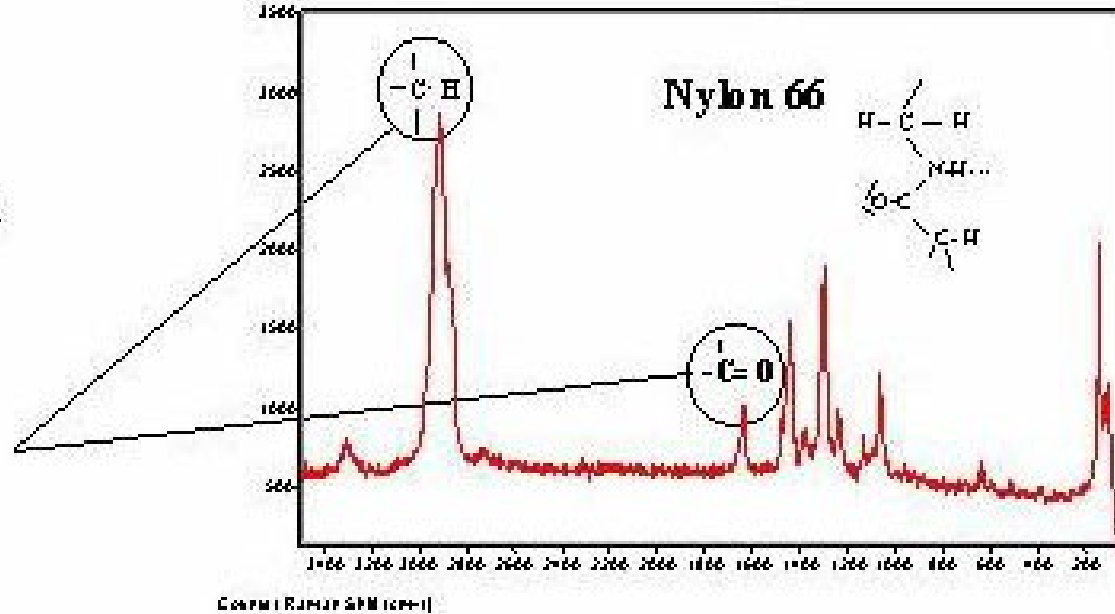


Light loses energy to the molecule vibration

Raman shift:

$$\nu_{\text{laser}} - \nu_{\text{scattered}} = \Delta\nu_{\text{Raman}}$$

The Spectrum gives informations about molecule bondings

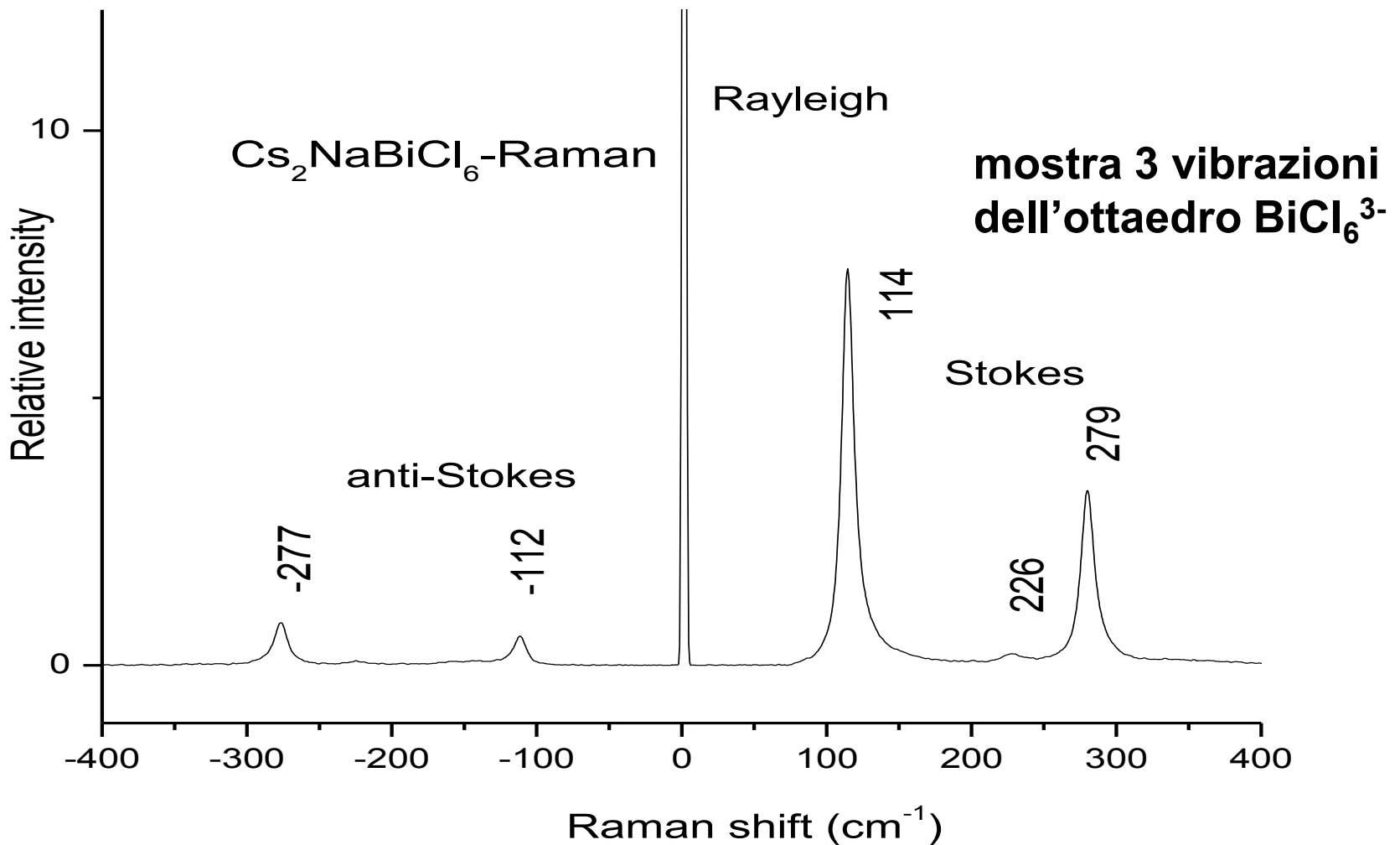


Raman spectroscopy combined with a **conventional optical microscope** opens the possibility of Raman microstructural investigations on the μm scale.

Spettro raman tipico

Intensità del segnale vs shift Raman

(Raman shift, in cm^{-1} = energia del fotone in - energia del fotone out)



Regola di selezione per lo spettro Raman

La vibrazione è attiva se c'è un cambiamento di polarizzabilità, α .

La polarizzabilità rappresenta la facilità di distorsione di un legame.

Per vibrazioni Raman-attive la radiazione incidente non dà un cambiamento nel momento di dipolo della molecola ma invece nella polarizzabilità.

Iniziando la vibrazione, il campo elettrico della radiazione al tempo t , E , induce una separazione di carica (per esempio tra i protoni nel nucleo e gli elettroni di legame).

Questo è detto momento di dipolo indotto, P (da non confondere con il momento del dipolo della molecola o con il cambiamento del momento di dipolo, perchè questo è spesso zero).

$$P = \alpha E$$

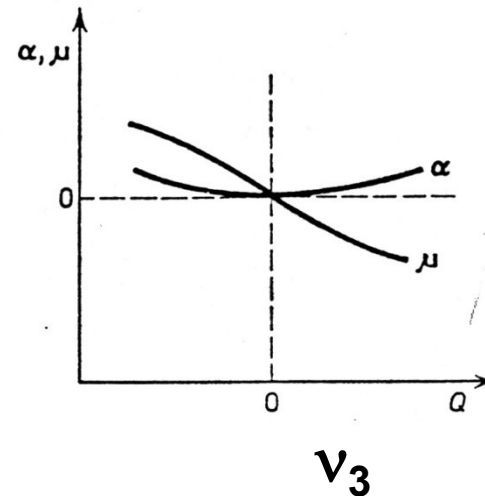
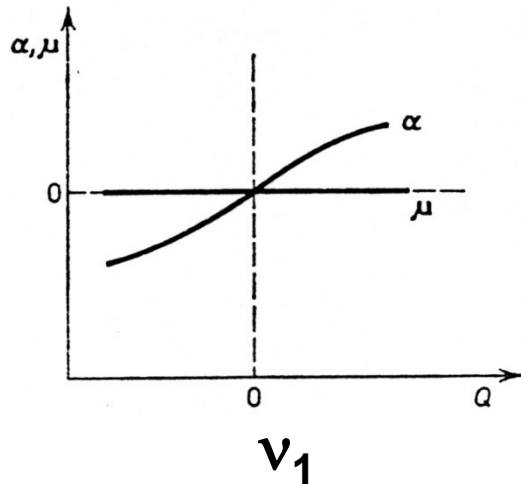
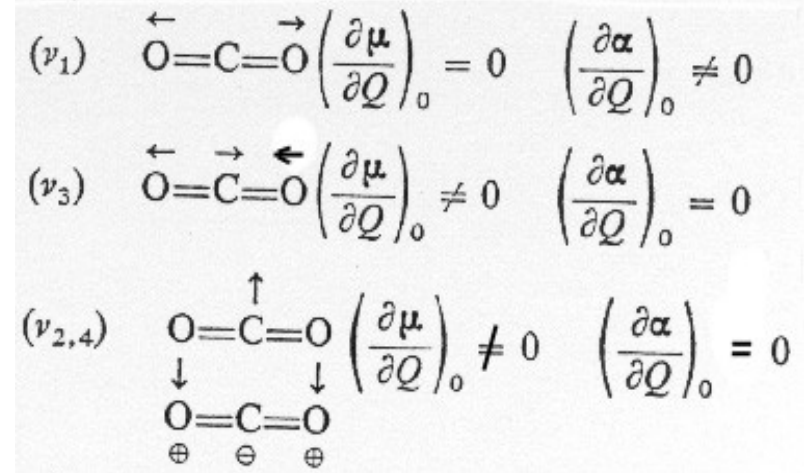
Esempio: Ci sono 4 modi normali dei CO₂. Solo ν₁ è Raman-attivo

μ è il momento di dipolo;

α è la polarizzabilità;

Q è la coordinata di vibrazione,

Le curve sono misurate a Q = 0 (alla posizione di equilibrio).



Cambiamenti nel momento di dipolo, μ, e polarizzabilità, α, durante le vibrazioni di CO₂.

Polarizzabilità

α , polarizzabilità della molecola, relativa alla mobilità degli elettroni :

Per gli atomi: la distorsione è ottenuta per campi in qualsiasi direzione. *La Polarizzabilità è isotropica*

Per molte molecole: la polarizzabilità dipende dalla direzione del campo applicato. *La Polarizzabilità è anisotropica*

La variazione di α con la direzione è descritto dal tensore polarizzabilità.

Classical description of Raman scattering

Molecule is a vibrating dipole: ν_0 is laser energy and ν is vibration energy.

$$P = \alpha_o E_o \cos(2\pi\nu_o t) + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q_\nu} \right)_o A_\nu E_o \{ \cos[2\pi(\nu_o - \nu)t] + \cos[2\pi(\nu_o + \nu)t] \}$$

This shows that the vibrating molecule is the source of 3 scattered radiation frequencies:

- ν_o Rayleigh scattering
- $\nu_o - \nu$ Stokes scattering (*st*)
- $\nu_o + \nu$ anti-Stokes scattering (*ast*)

Intensity of scattering, comparing Stokes and anti-Stokes intensities:

$$I_{\nu,ij}^{st} = \frac{2\pi^2 h}{c} \frac{(\bar{\nu}_o - \bar{\nu})^4}{\bar{\nu} \left[1 - \exp\left(\frac{hc\bar{\nu}}{kT}\right) \right]} g_\nu \left(\frac{\partial \alpha_{ij}}{\partial Q_\nu} \right)_o^2$$

$$I_{\nu,ij}^{ast} = \frac{2\pi^2 h}{c} \frac{(\bar{\nu}_o + \bar{\nu})^4}{\bar{\nu} \left[\exp\left(\frac{hc\bar{\nu}}{kT}\right) - 1 \right]} g_\nu \left(\frac{\partial \alpha_{ij}}{\partial Q_\nu} \right)_o^2$$

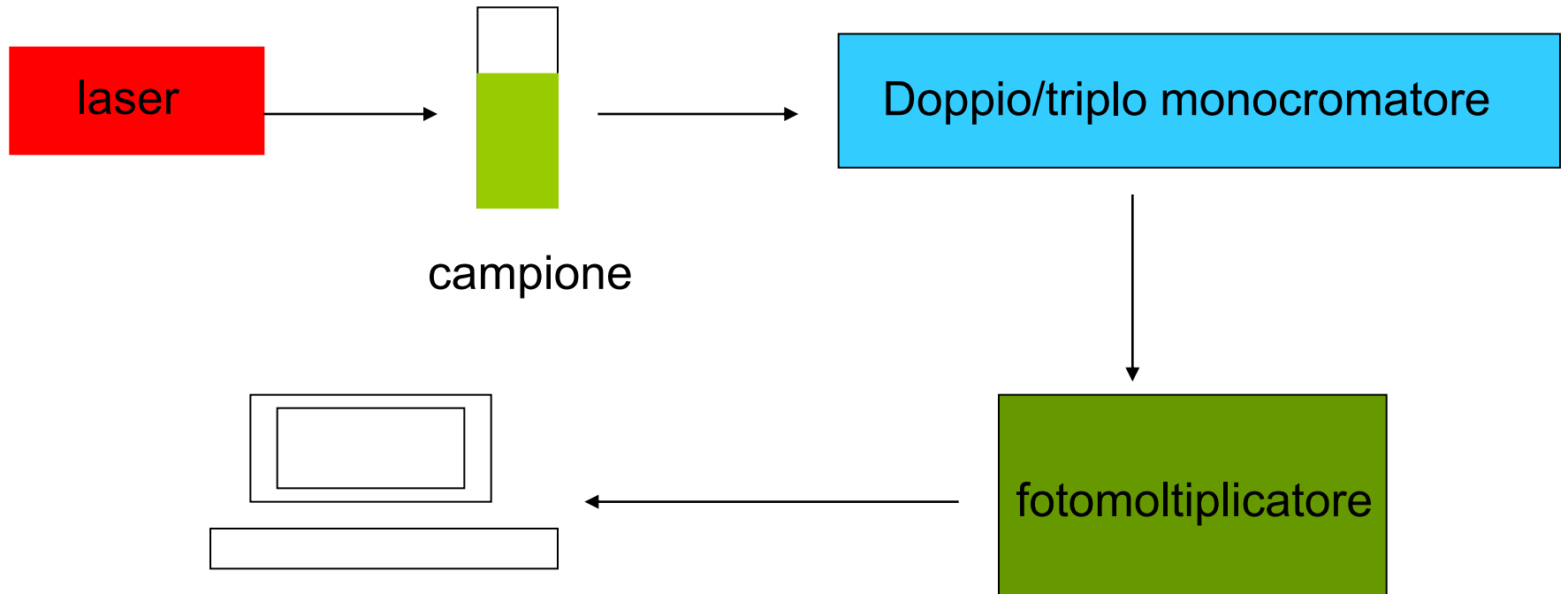
$$\Rightarrow \frac{I_v^{st}}{I_v^{ast}} = \left[\frac{\bar{\nu}_o - \bar{\nu}}{\bar{\nu}_o + \bar{\nu}} \right]^4 \frac{(e^x - 1)e^x}{(1 - e^{-x})e^x} = \left[\frac{\bar{\nu}_o - \bar{\nu}}{\bar{\nu}_o + \bar{\nu}} \right]^4 e^x$$

where $x = \left(\frac{hc\bar{\nu}}{kT} \right)$ [note: $k/hc = 0.695$, where k is in $K^{-1} \text{ cm}^{-1}$; $\bar{\nu}$ in cm^{-1} ; T in K .

The term in brackets is often near 1, since ν is usually much smaller than ν_0 .

Note also that the intensity of Raman scattering is proportional to the 4th power of the laser frequency.

Strumentazione



I monocromatori sono necessari per separare il debole segnale Raman dall'intenso segnale di Rayleigh scattering.

Laser usati sono generalmente Ar^+ (e.g. verde, 514.5 nm) or Kr^+ (e.g. giallo, 530.9 nm).

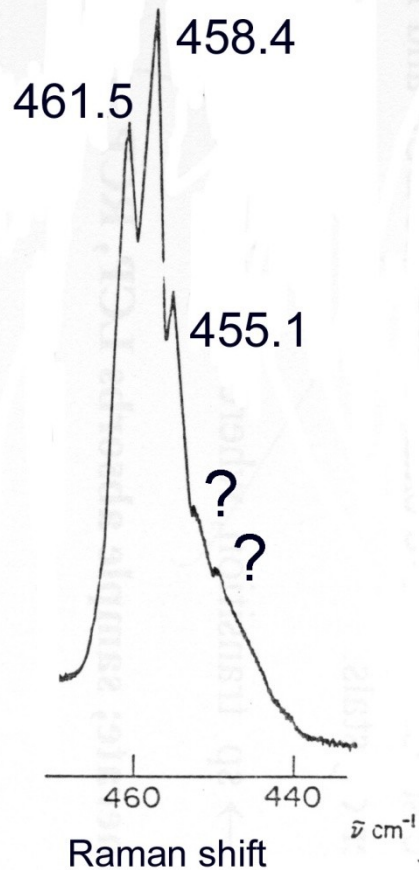
Numero di bande in uno spettro Raman

Come per lo spettro infrarosso, il numero di bande nello spettro Raman per una molecola non lineare di N-atomi è raramente $3N-6$, poichè:

Il cambiamento di polarizzabilità è zero o piccolo per alcune vibrazioni;

Le bande si sovrappongono;

Spettro Raman ad alta risoluzione può mostrare separazioni di picchi dovute a effetti di massa isotopica, per esempio: la banda Raman ν_1 di CCl_4 (corrispondente alla vibrazione di stretching) e' separata in 5 componenti.



461.5 cm^{-1} is due to $^{35}\text{Cl}_4\text{C}$

458.4 cm^{-1} is due to $^{35}\text{Cl}_3^{37}\text{ClC}$

455.1 cm^{-1} is due to $^{35}\text{Cl}_2^{37}\text{Cl}_2\text{C}$

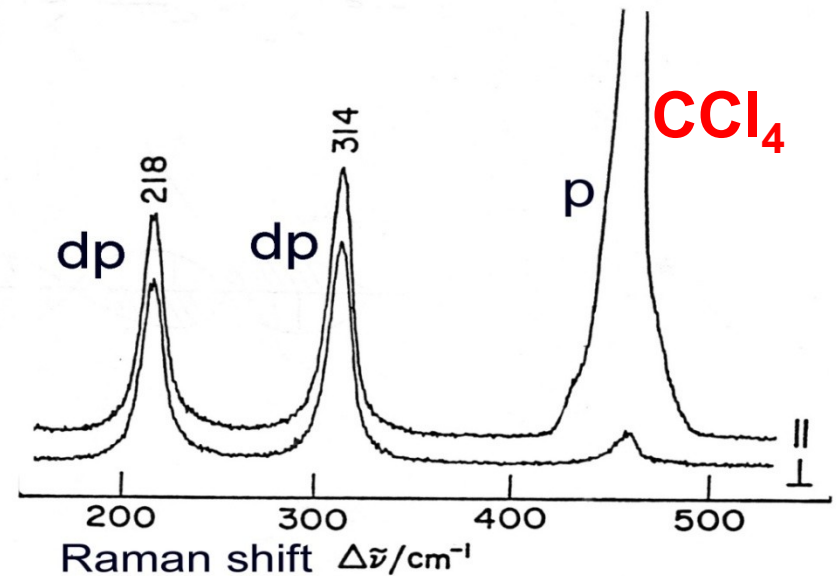
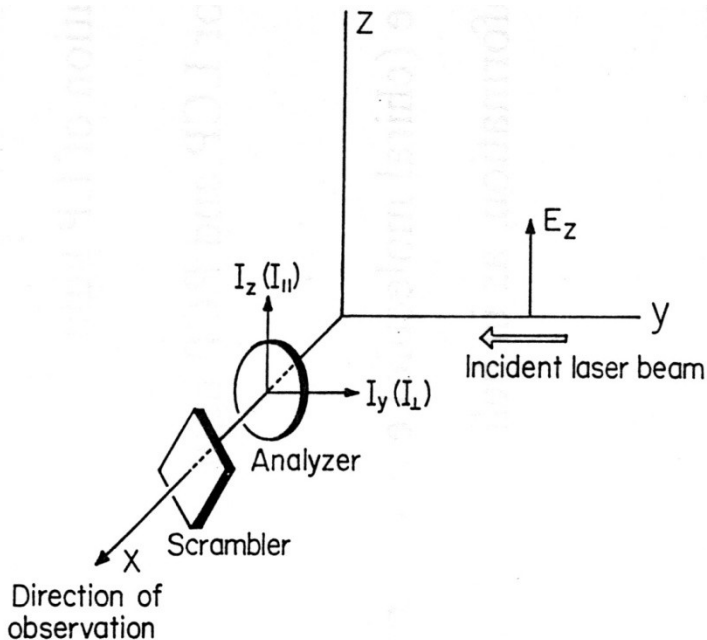
Rapporto di depolarizzazione di un modo vibrazionale nello spettro Raman

Può dare informazione sulla simmetria di una vibrazione.

ρ_p = rapporto di depolarizzazione per luce polarizzata = $I_y/I_z = I_{\perp}/I_{\parallel}$

$0 \leq \rho_p < 0.75$; Raman line is polarized (p). Vibration is totally symmetric

$\rho_p = 0.75$. Raman line is depolarized (dp). Vibration is not totally symmetric.



Usi della spettroscopia Raman

La spettroscopia Raman viene utilizzata maggiormente dall'avvento di sistemi FT-Raman e della possibilità di campionamento remoto per fibre ottiche.

La spettroscopia Raman è complementare alla spettroscopia IR ma il campionamento è più conveniente poichè i contenitori di vetro possono essere usati e i solidi non devono essere pressati o molati in dischi.

Applicazioni della spettroscopia Raman

Qualitativa strumento per identificare le molecole dalle loro vibrazioni, specialmente insieme alla spettrometria a infrarosso.

Quantitativa misure Raman

Non sensibile poichè lo scattering Raman è debole. Ma la risonanza Raman offre una piu' alta sensitività.

Differenze e complementarita' tra Infrarosso e Raman

Infrarosso

Raman

	Infrarosso	Raman
Effetto fisico	Assorbimento Cambiamento del momento di dipolo (forte in: legami ionici come O-H, N-H)	Scattering Cambiamento della polarizzabilita' (forte: legami covalenti come C=C, C-S, S-S)
Preparazione del campione	Spessore ottimizzato (in modo di trasmissione) necessario	Nessun contatto, nessun danneggiamento, preparazione semplice del campione; acqua come solvente e vetro come contenitore non disturbano la misura
Problemi	Forte assorbimento del vetro, dell'acqua, CO ₂	Fluorescenza
Range di frequenza	4000 - 700 cm ⁻¹	4000 - 50 cm ⁻¹ (Stokes and Antistokes)

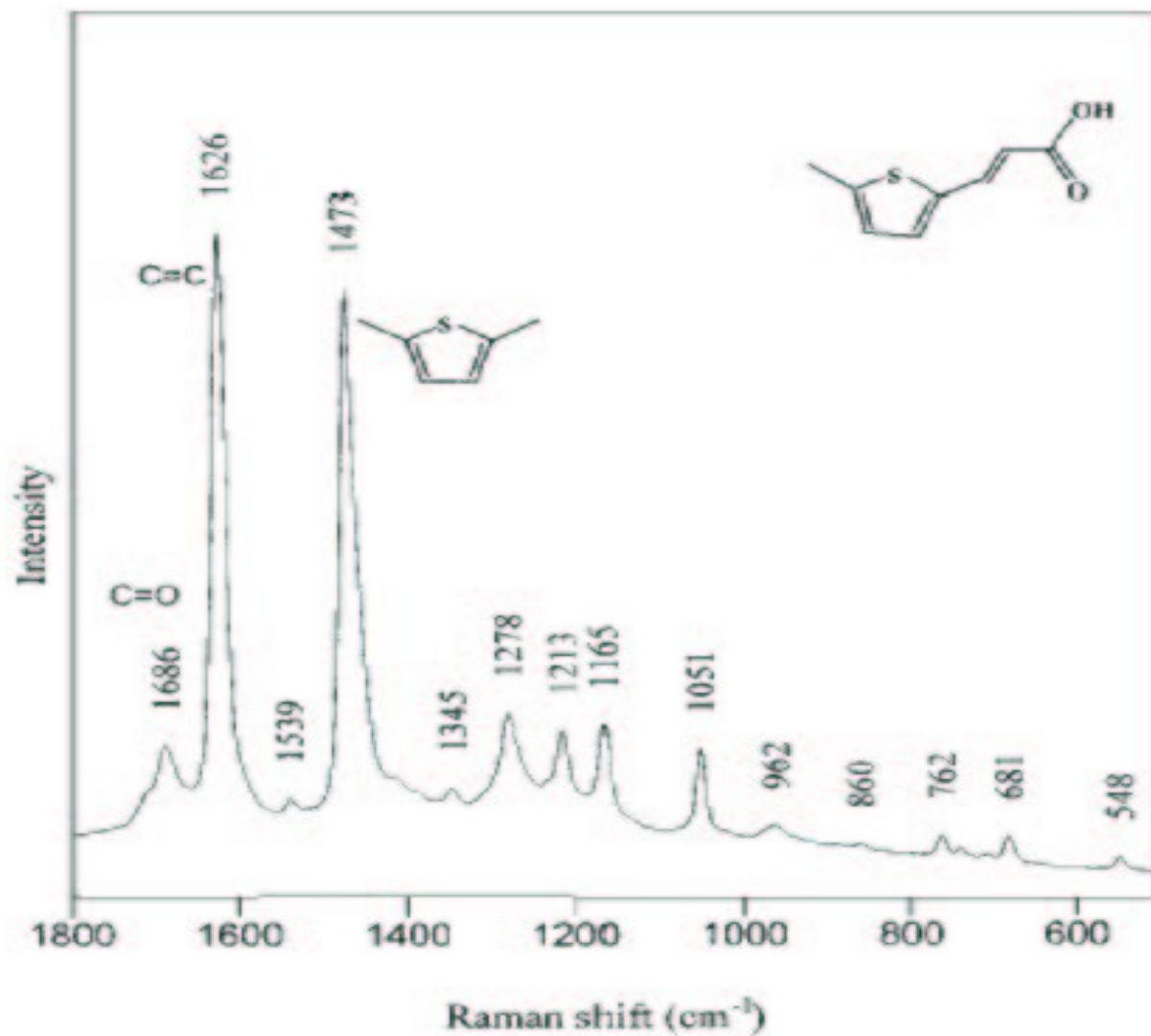
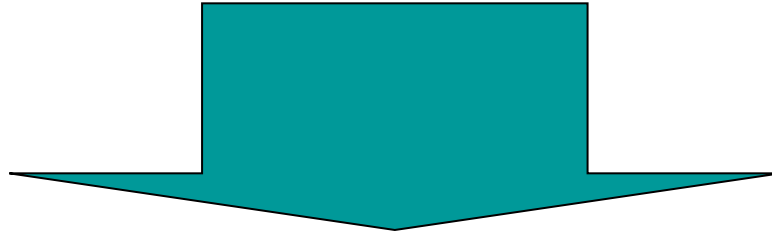


FIG. 1. The normal (non-resonance), 647.1 nm excited, Raman spectrum of 5-MTA. The positions of the peaks are in units of wave numbers (cm^{-1}) and represent the difference in energy between the incoming and scattered photons.

Effetto Raman: applicazioni

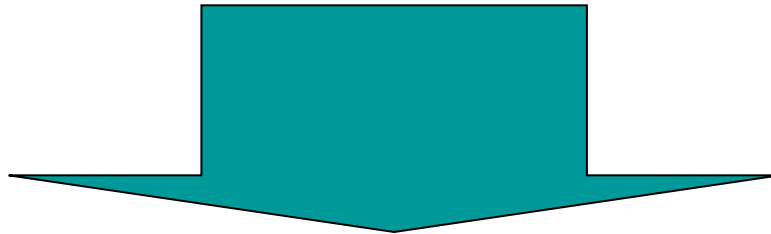
I livelli vibrazionali di una particolare molecola dipendono dalla sua struttura (cioé dai suoi atomi e dai legami tra gli atomi).



La spettroscopia Raman può quindi essere usata come un metodo analitico per determinare la struttura chimica della molecola.

Effetto Raman: applicazioni

Anche la conformazione della molecola stessa e delle interazioni intra-molecolari ed inter-molecolari hanno un ruolo nella definizione dei livelli vibrazionali.

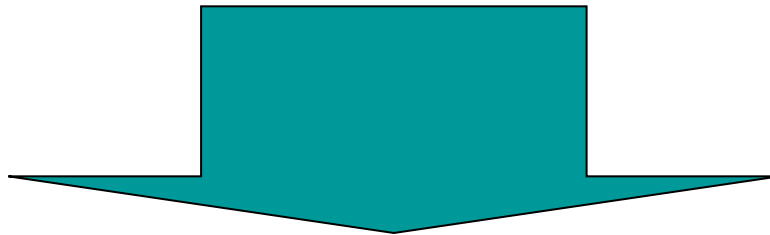


La spettroscopia Raman può quindi essere usata come un metodo analitico per determinare i parametri morfologici della molecola

Effetto Raman: applicazioni

Ogni modo vibrazionale coinvolge le coordinate di ogni atomo della molecola in vibrazione

Per grandi molecole, come per esempio la Clorofilla, alcuni modi vibrazionali coinvolgono le coordinate di gruppi chimici particolari (come il gruppo vinilico o il gruppo carbonile)



In questo caso gli altri atomi della molecola possono essere trattati come una perturbazione di questi modi vibrazionali localizzati e la risoluzione da molecolare diventa submolecolare

Effetto Raman Risonante (RR)

Se la frequenza della radiazione incidente è uguale a quella di una transizione elettronica di una molecola del campione, l'effetto Raman è notevolmente amplificato (fino a 10^6 volte).

In questo modo utilizzando una frequenza specifica si possono selezionare gli effetti Raman relativi ad una particolare parte di una grande molecola come una proteina, quindi si può isolare un particolare cromoforo.

•Raman risonante

- Nella spettroscopia Raman *normale* la radiazione laser impiegata ha energia diversa da quella necessaria per attivare transizioni energetiche nel campione.

In condizioni particolari l'intensità delle linee Raman può essere incrementata se la radiazione eccitatrice ha energia vicina a quella necessaria per attivare una transizione elettronica di una molecola del campione, cioè in condizioni di risonanza elettronica.

Questo può aumentare l'intensità delle linee Raman di un fattore 10^2 - 10^6 , con notevoli vantaggi nell'interpretazione degli spettri e nell'identificazione di sostanze anche a basse concentrazioni

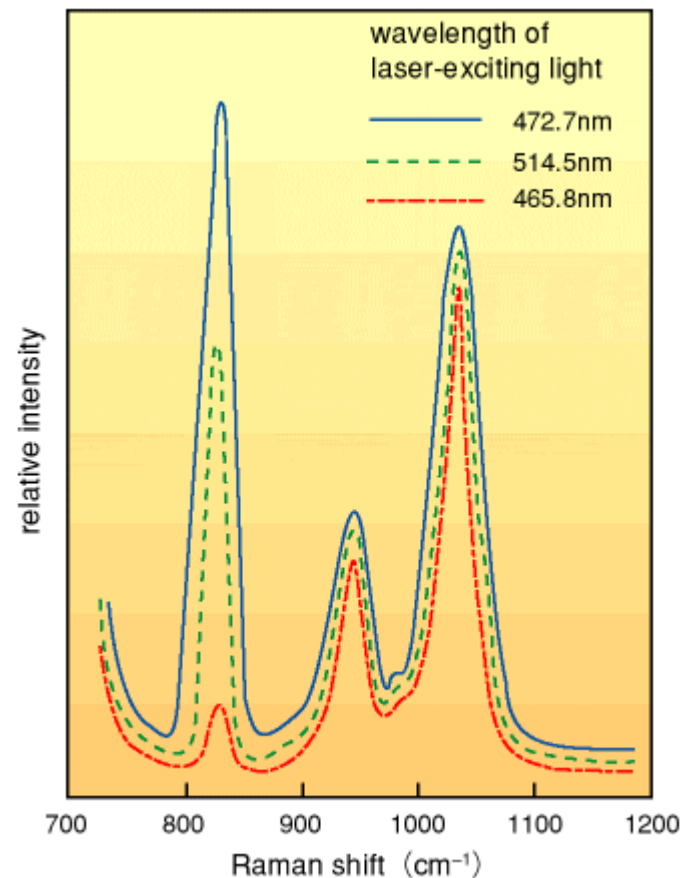
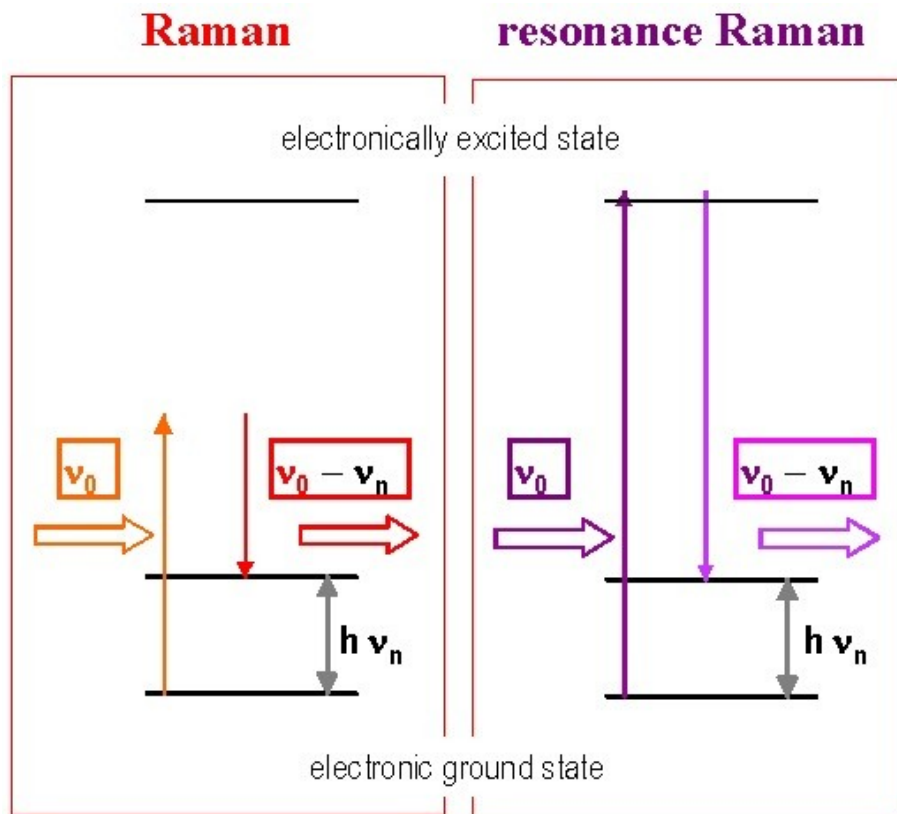
Spettroscopia Raman risonante

- Si ha risonanza Raman quando la frequenza della radiazione eccitatrice ν_L si avvicina molto a quella di una transizione elettronica di frequenza

$$\nu_{ei} = (E_e - E_i) / h$$

- Sono attivi in risonanza Raman solo i modi total-simmetrici del cromoforo che viene eccitato

• Raman risonante



• A destra spettri Raman dello ione uranile (UO_2^{2+}) con tre laser diversi; lo ione ha un massimo di assorbimento a 430 nm

Effetto Raman Risonante (RR)

Informazioni disponibili

Frequenze vibrazionali del cromoforo in risonanza con la frequenza incidente

Geometria della coordinazione metallica e ambiente dei legami per analisi delle frequenze vibrazionali

Intensità dei legami metallici per analisi delle frequenze vibrazionali

Informazioni non disponibili, limitazioni

Insensibile a proprietà magnetiche dei centri metallici

Effetto Raman Risonante (RR)

Maggiori Vantaggi

Molto sensibile a cambiamenti strutturali minori sui siti metallici

Determinazione selettiva delle proprietà vibrazionali dei singoli cromofori in proteine con gruppi prostetici

Si possono misurare cambiamenti su siti metallici fino alla scala dei picosecondi risolvendo la spettroscopia in tempo

Maggiori Svantaggi

Fenomeni di fluorescenza possono coprire l'acquisizione di spettri RR.

I fattori che controllano l'effetto di risonanza dei modi vibrazionali non sono ancora chiare (certe volte questa risonanza non è osservata)

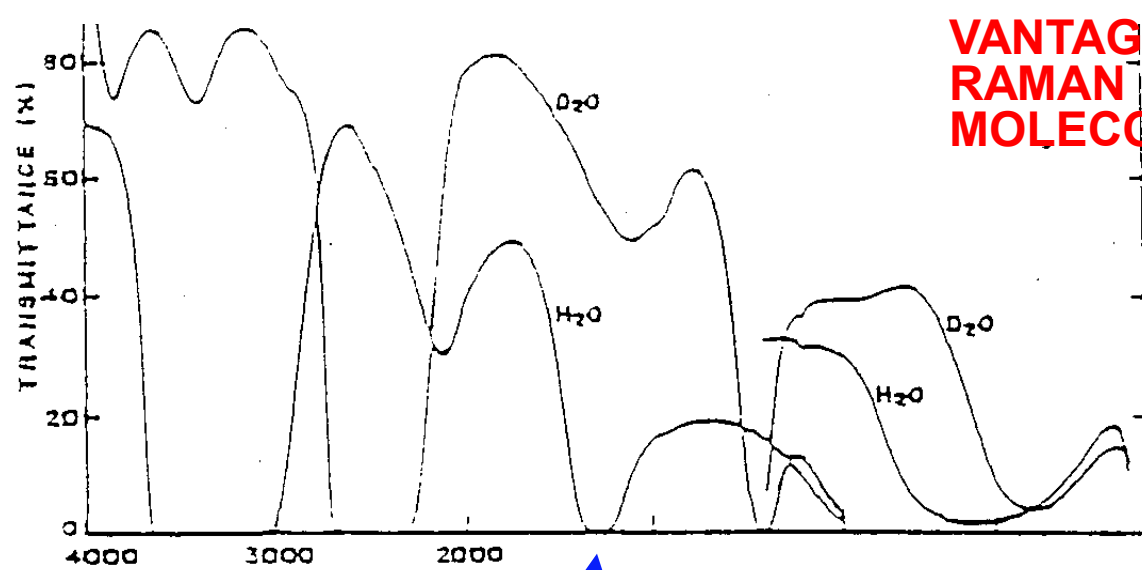
Campione

Almeno 10 μL di proteina *pura* più concentrata possibile

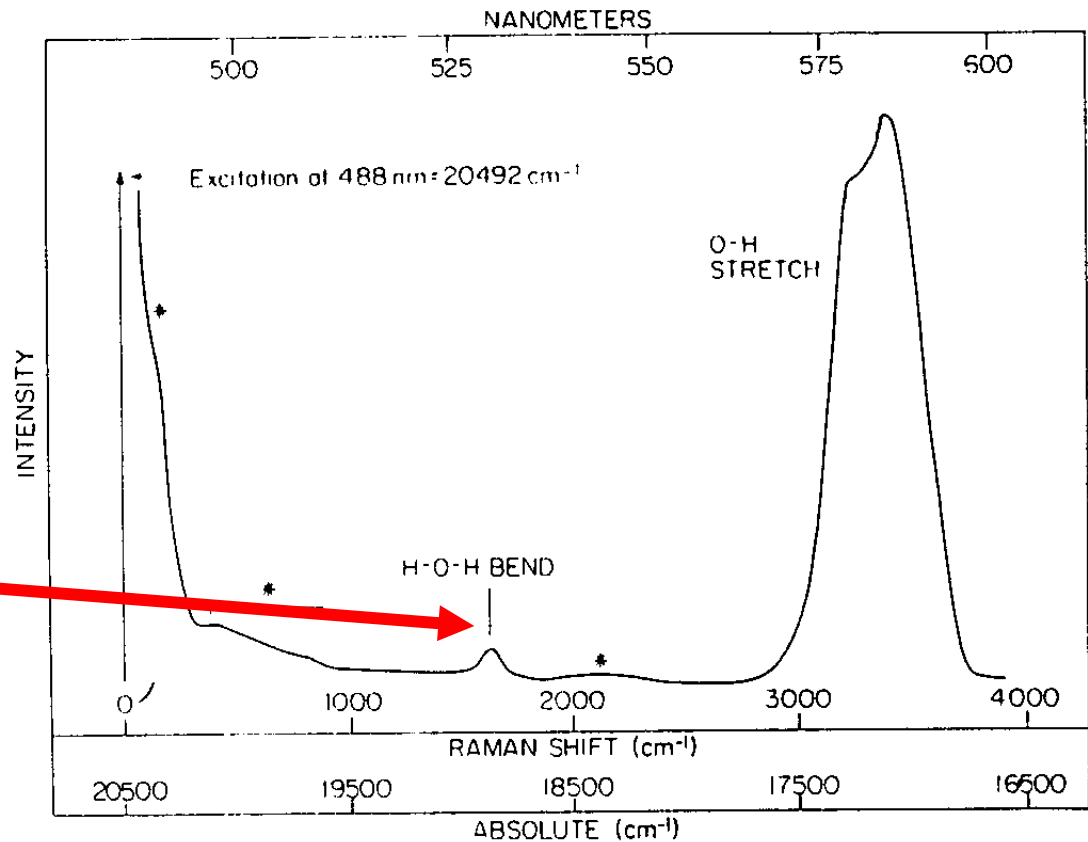
Per evitare degradazioni del campione dovuta a laser bisogna raffreddare, muovere il campione.

VANTAGGI DELLA SPETTROSCOPIA RAMAN O RR PER LO STUDIO DELLE MOLECOLE BIOLOGICHE

Gli spettri possono essere ottenuti in soluzione acquosa come i tamponi.



La $\delta(\text{HOH})$ dell'acqua in Raman, a differenza di quanto accade in IR, dà solo una piccola interferenza

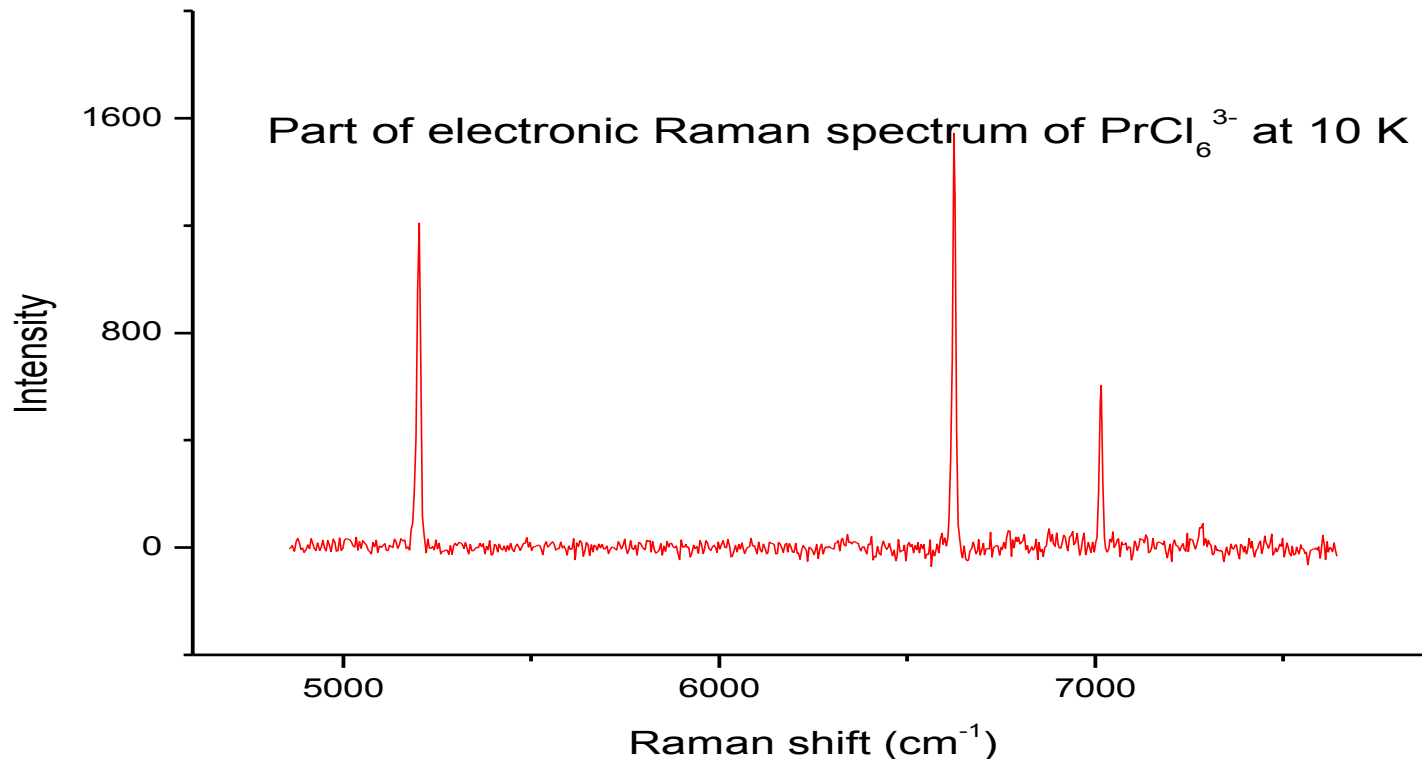


Raman scattering elettronico

Come dagli stati vibrazionali lo scattering Raman può avvenire anche dagli stati elettronici.

A temperatura ambiente le bande sono molto larghe e tendono a confondersi.

A basse temperature (<80k) le bande sono più sottili e danno informazioni sulle energie degli stati elettronici della molecola.



Casi speciali di spettroscopia Raman

Resonance Raman (RR) scattering

Surface enhanced Raman spectroscopy (SERS):

Lo scattering Raman è aumentato (tipicamente di 10^3 - 10^6 volte) quando il campione è adsorbito su superfici metalliche colloidali,

Per esempio su argento colloidale preparato riducendo Ag^+ con citrato, con particelle di grandezze 25-500 nm.

Raman scattering Stimolato (SRS)

Lo scattering Raman da un laser è osservato nella direzione in avanti dal campione (cioè nella stessa direzione oppure con un piccolo angolo rispetto alla radiazione del laser incidente).

Progressioni vibrazionali sono osservati per certi modi.

Coherent anti-Stokes Raman spectroscopy (CARS)

La radiazione di due laser è incidente sul campione e l'intensità dell'energia dell'onda uscente dà informazioni sui modi vibrazionali del campione.

Spettroscopia Hyper-Raman

Lo scattering molto debole al doppio della frequenza del laser, $2\nu_0$, è chiamato scattering Hyper-Rayleigh. Analogamente l'hyper-Raman scattering Stokes and anti-Stokes accade a $2\nu_0 \pm \nu_{\text{vib}}$, dove ν_{vib} è una frequenza di vibrazione. Le regole di selezione sono diverse da quelle dello scattering Raman.

VANTAGGI DELLA SPETTROSCOPIA RAMAN O RR PER LO STUDIO DELLE MOLECOLE BIOLOGICHE

1. Danno del campione minimo o praticamente assente.
2. Spettri di campioni in soluzione, gas, film, superfici, solidi e singoli cristalli. Ciò permette di paragonare gli spettri ottenuti in vivo ed in vitro con gli spettri dello stato cristallino di un campione la cui struttura sia stata risolta con la diffrazione a raggi X.
4. Spettri a varie temperature. Gli spettri a bassa temperatura (10K) permettono i) di minimizzare gli eventuali danni causati al campione dal riscaldamento locale indotto dal laser; ii) possono essere confrontati con gli studi ottenuti con altre metodiche che forniscono buoni risultati a bassa temperatura, quali l'EPR.
5. Piccoli volumi di soluzione (da 5 a 30 μl) con concentrazioni che vanno da 10^{-1} M degli esperimenti Raman a 10^{-5} - 10^{-6} M per gli esperimenti RR.
6. Selettività della risonanza Raman (modi total-simmetrici del cromoforo).

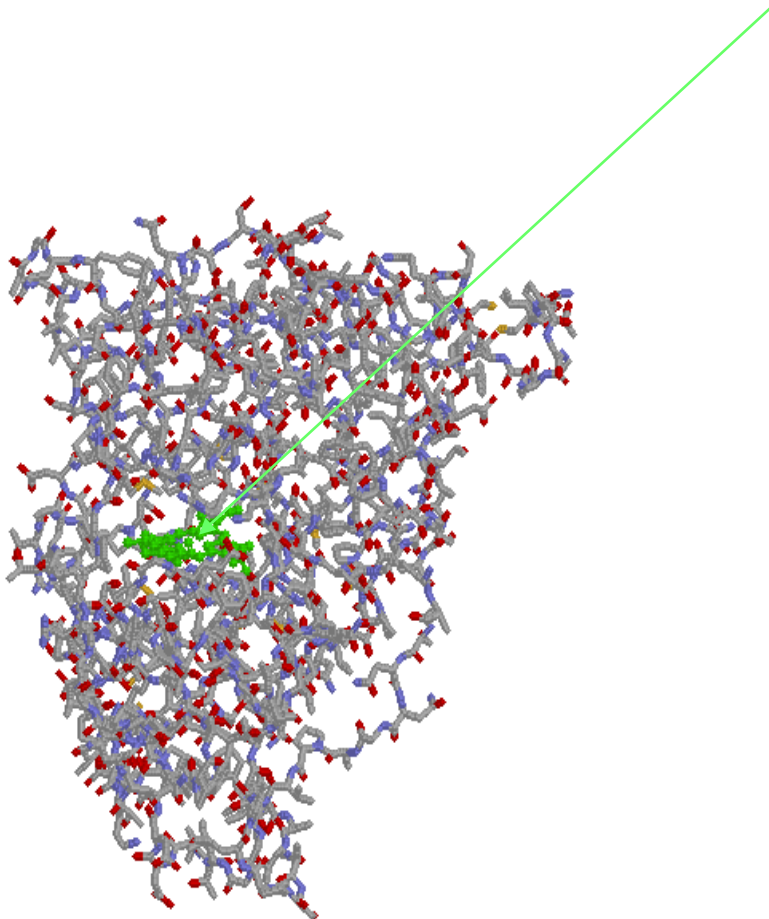
SVANTAGGI

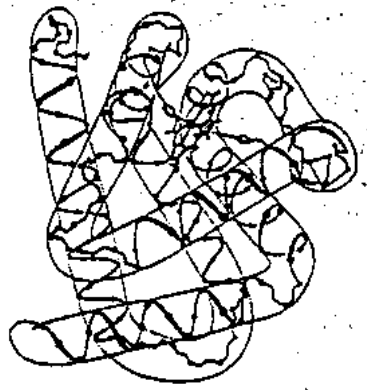
La fluorescenza può rappresentare un problema molto serio. Infatti, la RR e la fluorescenza sono connessi intimamente poiché in entrambi i fenomeni il fotone emesso proviene dall'eccitazione nella banda di assorbimento e la resa quantica della fluorescenza è spesso di ordine di grandezza superiore all'intensità della diffusione Raman.

- Le emoproteine sono un buon esempio per spiegare le applicazioni della risonanza Raman ai sistemi complessi
- Sono costituite da aminoacidi legati covalentemente in modo da formare catene molto lunghe, i polipeptidi, tramite i legami peptidici che si formano per eliminazione di una molecola di acqua dal gruppo carbossilico di un aminoacido e dal gruppo amminico del successivo
- Inoltre contengono il gruppo eme.

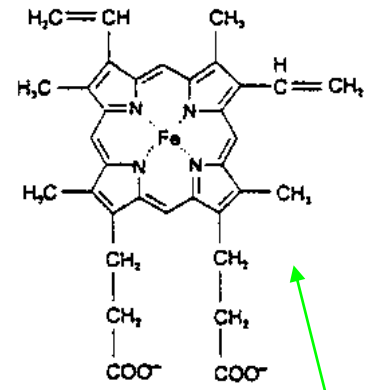
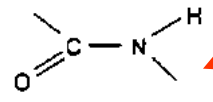
Spettroscopia di risonanza Raman di emoproteine

L'intensificazione del segnale associato con il fenomeno della risonanza permette di ottenere selettivamente spettri vibrazionali di singoli cromofori che compongono un sistema biologico complesso.

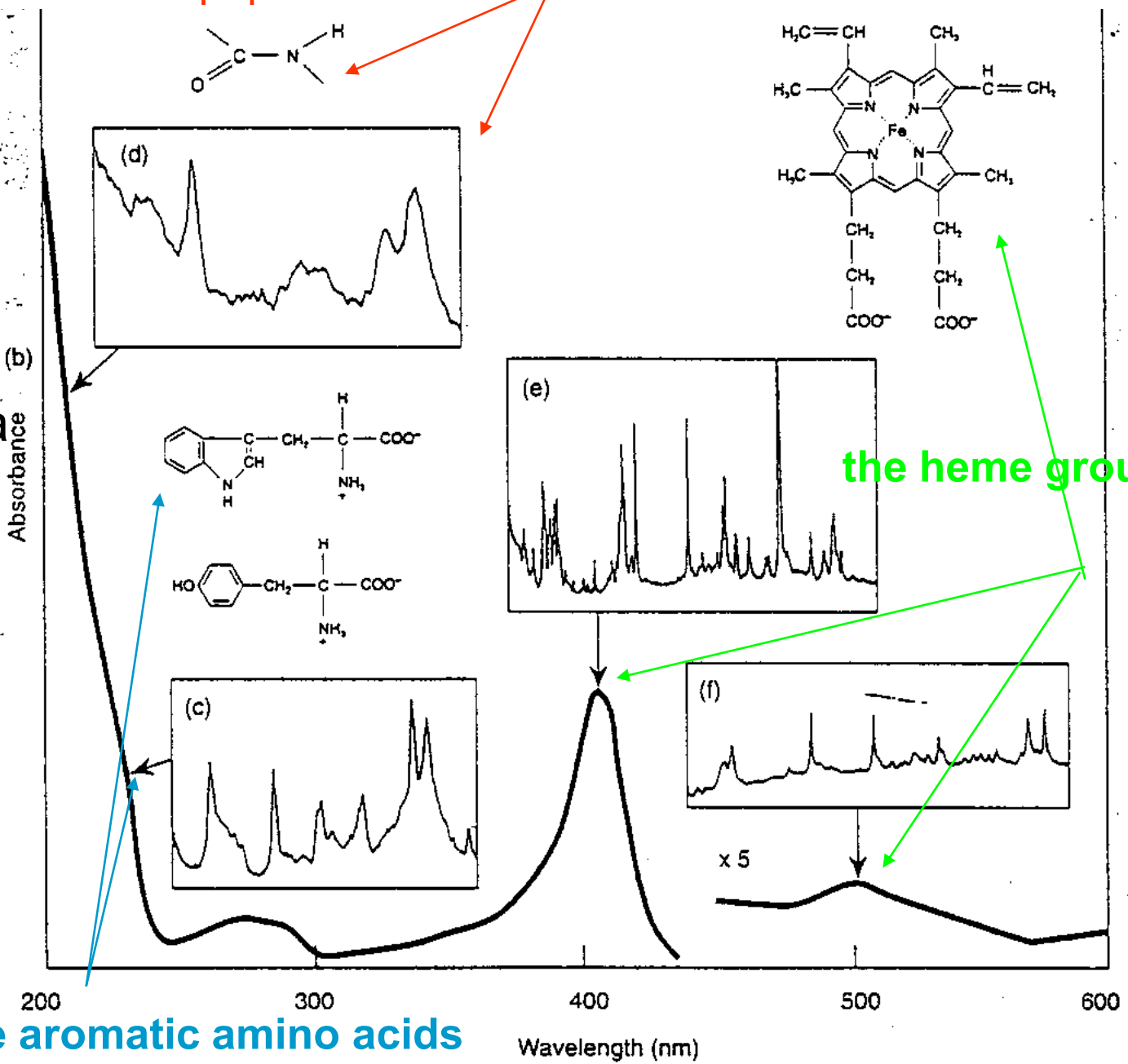




the peptide bonds



Al variare della lunghezza d'onda di eccitazione si ottengono spettri RR diversi dovuti ai diversi cromofori eccitati



Absorbance

Wavelength (nm)

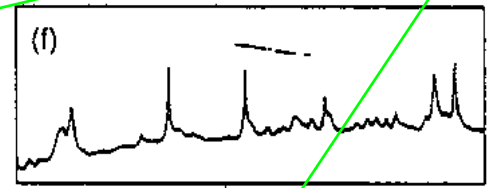
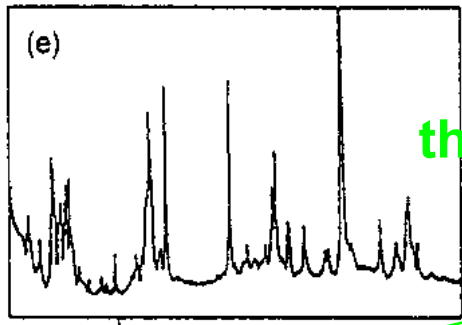
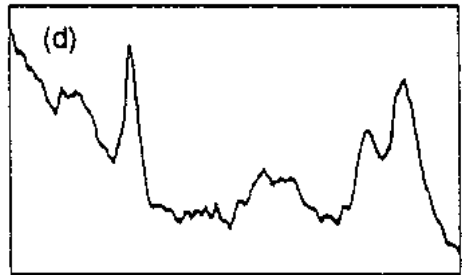
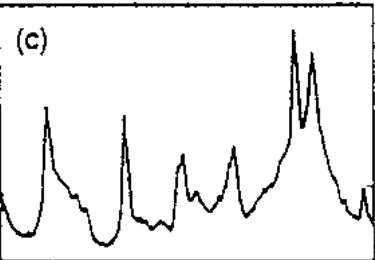
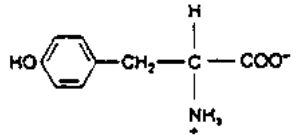
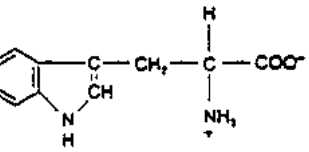
200

300

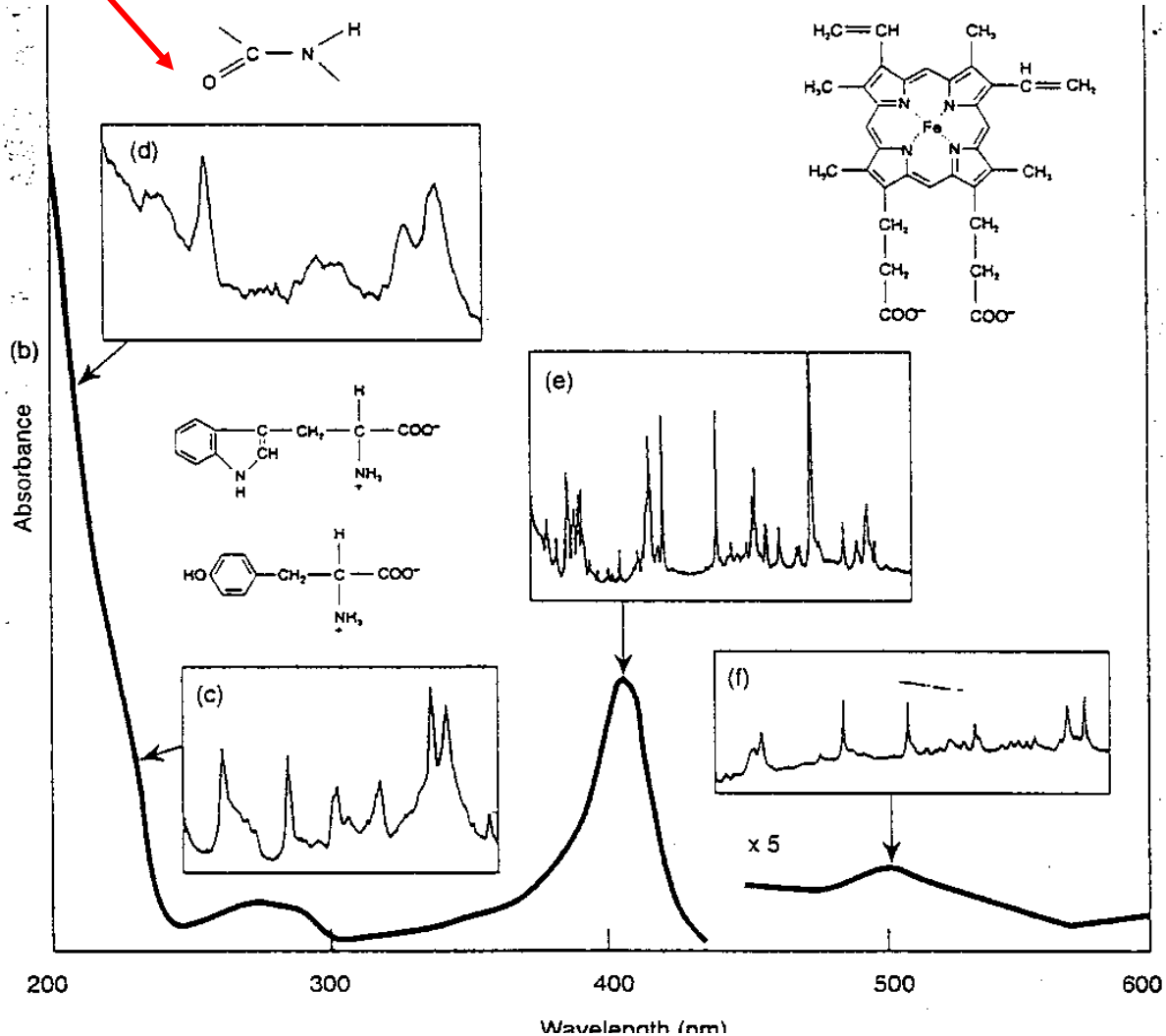
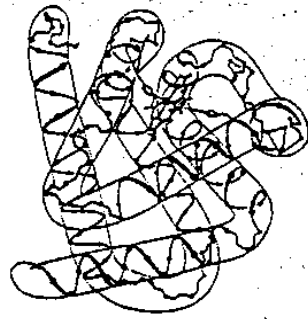
400

500

600




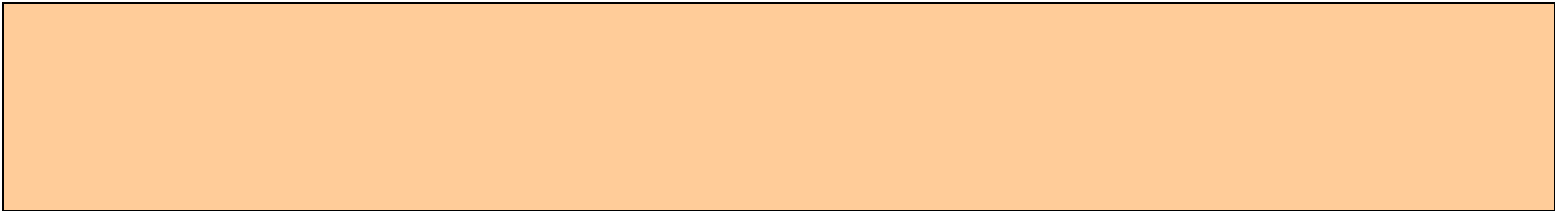
$\lambda_{ecc} < 220 \text{ nm}$: si intensificano selettivamente, via la transizione $\pi \rightarrow \pi^*$ dell'amide, le vibrazioni dello scheletro peptidico. Si ottengono informazioni sulle struttura secondaria



Articoli di review su raman:

- ***George J.Thomas, Annu.Rev.Biophys.Biomol.Struct.1999.28:1–27***
- ***Robert Callender and Hua Deng, Annu. Rev. Biophys. Biomol Struct. 1994.23: 215-45***

Tipi di Raman Scattering

- Normal Raman Spectroscopy
- Confocal Raman Spectroscopy
- 
- FT-Raman Spectroscopy
- 
- Coherent anti-stokes Raman Spectroscopy
- Hyper-Raman Spectroscopy

Strumentazione per spettroscopia Raman

