



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

SPETTROSCOPIA RAMAN STIMOLATA AL FEMTOSECONDO: PRINCIPI E APPLICAZIONI

Facoltà di Scienze Matematiche Fisiche e Naturali
Corso di laurea in Fisica e Astrofisica

Luigi Graziano

Matricola 1914114

Relatore
Prof. Giovanni Batignani

Correlatore
Prof. Tullio Scopigno

Anno Accademico 2022/2023

**SPETTROSCOPIA RAMAN STIMOLATA AL FEMTOSECONDO: PRINCIPI
E APPLICAZIONI**

Sapienza Università di Roma

© 2023 Luigi Graziano. Tutti i diritti riservati

Questa tesi è stata composta con L^AT_EX e la classe Saphthesis.

Email dell'autore: graziano.1914114@studenti.uniroma1.it

Indice

1	Scattering Raman: generalità e applicazioni sperimentali	3
1.1	Raman spontaneo	3
1.2	Raman stimolato	7
2	Spettroscopia Pump-Probe e FSRS	14
2.1	Schema sperimentale Pump Probe	14
2.2	Pump-Probe ed effetto Raman Stimolato	15
2.3	Teoria dell'FSRS	16
3	FSRS applicato allo studio dell'isomerizzazione dell'11-cis retinale	21
3.1	Risultati sperimentali	22
4	Conclusioni	27

Introduzione

Numerosi fenomeni di interesse fisico, chimico e biologico sono basati su processi microscopici di riarrangiamento molecolare e possono coinvolgere modifiche delle distanze internucleari, degli angoli torsionali e la formazione o rottura di legami chimici. Nel corso di una reazione fotochimica si può immaginare che la distribuzione elettronica si modifichi rapidamente e che, su scale di tempo più lunghe, il moto dei nuclei si sviluppi lungo una o più direzioni spaziali, tipicamente definite "coordinate di reazione" e spesso corrispondenti ai modi normali di vibrazione perturbati dal processo reattivo in corso.

La stretta connessione tra le trasformazioni chimiche e i cambiamenti del moto dei nuclei lungo le coordinate di reazione rende lo studio dell'evoluzione temporale degli spettri vibrazionali un ottimo metodo per investigare la dinamica di processi molecolari. Le frequenze associate ai moti vibrazionali sono nettamente inferiori a quelle associate ai moti elettronici e variano in un range che parte da 50 cm^{-1} e arriva fino a circa 3000 cm^{-1} . I corrispondenti periodi, che vanno da circa 10 fs a 600 fs ($1 \text{ fs} = 10^{-15} \text{ s}$), definiscono la scala temporale delle vibrazioni molecolari e quindi anche i tempi che caratterizzano le dinamiche nucleari lungo le coordinate di reazione durante una trasformazione chimica. Di conseguenza, qualunque tecnica spettroscopica che abbia lo scopo di studiare la dinamica di una reazione chimica, deve consentire di acquisire informazioni strutturali sulla scala temporale dei moti nucleari, ossia da 1 ps a 10 fs .

L'esplorazione di processi così rapidi ha guidato lo sviluppo della Femtochimica, una branca spettroscopica basata sull'utilizzo di sorgenti laser ultracorte e sullo schema sperimentale Pump-Probe. Questa tecnica consiste nell'inviare sul campione due impulsi luminosi separati da un intervallo di tempo regolabile. Il primo impulso, detto Pump, innesca la fotoreazione di interesse; mentre il secondo, detto Probe genera il segnale da monitorare al fine di ottenere informazioni sulla dinamica del processo di interesse. L'impulso di Pump sfrutta di solito un processo di assorbimento ottico per promuovere il sistema su uno stato elettronico di non equilibrio. La parte di Probe è spesso basata sulla spettroscopia vibrazionale (infrarossa o Raman), in virtù della sua sensibilità intrinseca alle variazioni della struttura elettronica e molecolare: cambiamenti geometrici di frazioni di Angstrom producono infatti una variazione, in termini sia di intensità, che di frequenza, dei modi normali misurati. L'ostacolo principale nell'implementazione di questo tipo di esperimenti ruota intorno alla richiesta di due ingredienti chiave: un'alta risoluzione spettrale (necessaria per distinguere bande vibrazionali adiacenti) ed un'elevata risoluzione temporale (per seguire appunto processi ultrarapidi). Il limite di Fourier stabilisce quindi un importante vincolo, rendendo tipicamente inefficaci le spettroscopie vibrazionali tradizionali nello studio di processi del sub-picosecondo. Per aggirare questo limite è possibile sfruttare lo schema sperimentale di Pump-Probe per innescare lo scattering Raman stimolato (SRS), al fine di migliorare la risoluzione temporale degli spettri da utilizzare come "reporter" delle trasformazioni chimico-fisiche di interesse, senza

perdere la risoluzione in frequenza garantita dal sopracitato SRS. Quest'ultimo è un effetto ottico nonlineare del terzo ordine che si verifica quando la luce interagisce anelasticamente con un sistema molecolare che possiede modi vibrazionali Raman attivi.

In questa dissertazione si presenta una delle tecniche di spettroscopia Raman più utilizzate nel campo della fotochimica, denominata Femtosecond Stimulated Raman Spectroscopy (FSRS). L'FSRS è una tecnica Pump-Probe basata sull'utilizzo di una sorgente laser ad impulsi ultracorti e caratterizzata da un impulso di Pump convenzionale e da una coppia di impulsi come Probe: il Raman Pulse e il Probe Pulse. Questi ultimi, sfruttando lo scattering Raman stimolato, consentono di effettuare misure spettroscopiche molto precise nel dominio delle frequenze e, allo stesso tempo, di monitorare l'evoluzione delle bande vibrazionali per diversi ritardi temporali dall'impulso iniziale di Pump dell'ordine di circa 20 *fs*.

Le potenzialità di questa tecnica hanno rivoluzionato il campo della spettroscopia vibrazionale risolta nel tempo e hanno permesso lo studio di numerosi fenomeni caratterizzati da estrema rapidità. Uno dei più importanti processi studiati tramite la tecnica FSRS è il cosiddetto "evento visivo primario", ossia l'isomerizzazione fotochimica che avviene nella rodopsina e su cui si basa il meccanismo della visione. I corrispondenti risultati sperimentali ottenuti tramite FSRS sono descritti nel Capitolo (3).

Capitolo 1

Scattering Raman: generalità e applicazioni sperimentali

L'effetto Raman consiste nella diffusione anelastica di fotoni da parte della materia e, grazie all'utilizzo di sorgenti laser monocromatiche, permette di studiare lo spettro vibrazionale di un sistema molecolare. Sfruttando l'azione combinata di due campi elettromagnetici in grado di generare risonanza con i modi vibrazionali del sistema che si sta studiando, è possibile ottenere una versione "stimolata" dell'effetto Raman (SRS), che porta ad aumentare di diversi ordini di grandezza la sezione d'urto del fenomeno.

All'interno di questo capitolo si fornirà una rapida panoramica dei processi di scattering Raman e del loro impiego in spettroscopie lineari e nonlineari.

1.1 Raman spontaneo

Lo scattering Raman spontaneo fu osservato per la prima volta dal fisico indiano Chandrasekhara Venkata Raman nel 1928 [1]. Quest'ultimo, analizzando la luce diffusa da un campione di benzene, misurò, per le righe spettrali rivelate in seguito all'attraversamento del materiale, uno spostamento in frequenza rispetto alla radiazione incidente. Inviando quindi una radiazione monocromatica di frequenza ω su un campione di materiale che non assorbe alla suddetta frequenza, una frazione della luce incidente viene diffusa. Analizzando la luce diffusa si trovano, non solo fotoni di frequenza pari a quella della radiazione incidente, dovuti al fenomeno di scattering elastico Rayleigh, ma anche fotoni a nuove frequenze dovuti all'effetto Raman spontaneo:

$$\omega_S = \omega - \omega_\nu$$

$$\omega_{AS} = \omega + \omega_\nu$$

dove ω_S sta per frequenza Stokes, ω_{AS} sta per frequenza anti-Stokes e ω_ν corrisponde ad una frequenza vibrazionale del materiale considerato. Il fenomeno di diffusione anelastica in cui consiste l'effetto Raman spontaneo può essere descritto in termini di scambio di energia tra il fotone incidente e la struttura molecolare bersaglio. Un fotone di energia $\hbar\omega$ eccita la molecola dal suo stato fondamentale ("0" in figura (1.1)) ad un livello energetico virtuale. Se la molecola diseccitandosi torna allo stato fondamentale, viene riemesso un fotone con frequenza ω (diffusione elastica, scattering Rayleigh). Se invece la molecola decade su un livello vibrazionale eccitato (il livello "1" in figura (1.1)) il fotone riemesso avrà un'energia pari a $\omega_S = \omega - \omega_\nu$, minore di quella della luce incidente. In questo caso si parla di diffusione Stokes

Raman. Se invece la molecola originariamente si trovava su un livello eccitato (il livello "1" in figura (1.1)) e dopo l'eccitazione passa dal livello virtuale al livello fondamentale, il fotone riemesso avrà energia maggiore di quella della luce incidente. In questo caso si parla di diffusione anti-Stokes Raman.

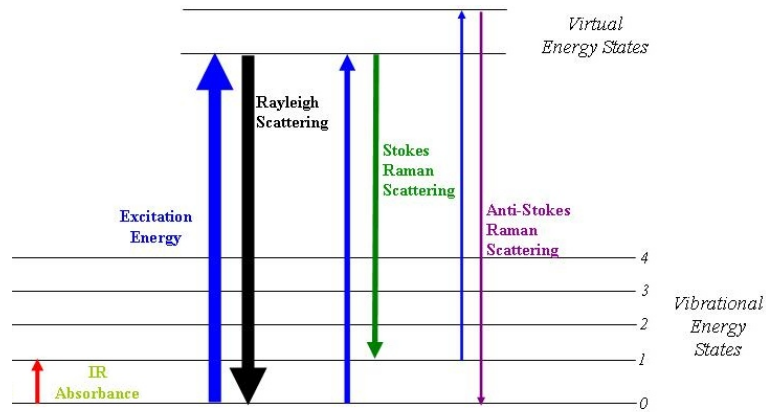


Figura 1.1. Effetto Raman con diffusione Stokes e anti-Stokes sui livelli energetici di una molecola (Figura tratta da Wikipedia)

In condizioni standard la diffusione Stokes è più intensa di quella anti-Stokes, poiché lo stato vibrazionale a più bassa energia è più popolato, in accordo con la distribuzione di Boltzmann [2]:

$$\frac{N_A}{N_B} = e^{-\frac{E_A - E_B}{KT}} \quad (1.1)$$

L'effetto Raman può essere spiegato in prima approssimazione con argomentazioni classiche.

Facendo riferimento al concetto di battimento tra un campo ad alta frequenza ω_H ed uno a bassa frequenza ω_L , e ricordando che le molecole sono caratterizzate da modi normali di vibrazione a frequenze ω_ν , si può innanzitutto giustificare la presenza delle due nuove frequenze ω_S e ω_{AS} nel fascio di luce diffuso dal materiale. Infatti, dalle formule di prostaferesi, si ricava che:

$$\cos(\omega_H t) \cdot \cos(\omega_L t) = \cos[(\omega_H + \omega_L)t] + \cos[(\omega_H - \omega_L)t] \quad (1.2)$$

da cui, sostituendo $\omega = \omega_H$ e $\omega_\nu = \omega_L$, si ottengono al secondo membro $\cos(\omega_S t)$ e $\cos(\omega_{AS} t)$. In questa visione classica, l'origine delle oscillazioni spontanee delle molecole campione (responsabili del battimento con la sorgente monocromatica incidente) è da attribuire a fluttuazioni termiche rispetto alle condizioni di equilibrio dettate dal valore di energia media kT .

Consideriamo il semplice caso di una molecola biatomica omonucleare, caratterizzata da un unico grado di libertà vibrazionale. I fotoni incidenti interagiscono con la nube elettronica della molecola ed inducono un momento di dipolo elettrico $\vec{\mu}$, il cui valore dipende dalla polarizzabilità α in base alla seguente relazione [3]:

$$\vec{\mu} = \alpha \cdot \vec{E}_0 \cos(\omega t) \quad (1.3)$$

dove \vec{E}_0 è l'ampiezza del campo elettrico incidente e ω è la frequenza della radiazione incidente.

Se la polarizzabilità α è costante, l'oscillatore emette radiazione con la stessa frequenza ω della luce incidente (scattering Rayleigh). Tuttavia, in generale, può accadere che la polarizzabilità venga modulata dai moti vibrazionali di origine termica. Tale dipendenza può essere espressa sviluppando la polarizzabilità $\alpha(t)$ in serie di Taylor intorno al punto di equilibrio della coordinata normale $Q(t)$ [4]:

$$\alpha(t) = \alpha_0 + \left(\frac{\delta\alpha}{\delta Q} \right)_0 \cdot Q(t) + \dots \quad (1.4)$$

dove, considerando un modo normale di vibrazione con frequenza ω_ν , $Q(t)$ ha la seguente forma:

$$Q(t) = 2Q_0 \cos(\omega_\nu t + \phi)$$

ottenuta come soluzione dell'equazione di un oscillatore armonico senza smorzamento. Riscrivendo quest'ultima equazione e quella del campo incidente in forma complessa e sostituendo entrambe nell'equazione (1.3), si ottiene:

$$\mu(t) = \alpha_0 E_0 e^{-i\omega t} + E_0 \left(\frac{\delta\alpha}{\delta Q} \right)_0 Q_0 \left(e^{-i(\omega - \omega_\nu)t + i\phi} + e^{-i(\omega + \omega_\nu)t - i\phi} \right) + c.c. \quad (1.5)$$

dove *c.c.* rappresenta il complesso coniugato dell'espressione precedente [4].

L'equazione (1.5) evidenzia il legame tra la componente statica della polarizzabilità α_0 e il fenomeno della diffusione elastica Rayleigh, spiegato dalla presenza del primo termine che oscilla con frequenza ω pari a quella del fascio incidente. Chiarisce inoltre come le frequenze $\omega_S = \omega - \omega_\nu$ e $\omega_{AS} = \omega + \omega_\nu$ caratteristiche dello spettro Raman spontaneo siano generate dalla modulazione temporale della polarizzabilità stessa, indotta dai moti vibrazionali associati ai gradi di libertà Raman attivi. Si può notare che il termine Raman dell'equazione (1.5) è direttamente proporzionale alla quantità $(\delta\alpha/\delta Q)_0$, la quale descrive il modo in cui il campo incidente genera una variazione di polarizzabilità lungo la coordinata normale $Q(t)$.

Dunque, con un approccio classico, si può affermare che l'effetto combinato di un campo incidente a frequenza ottica e delle oscillazioni di natura termica (modi normali di vibrazione) in grado di modulare la polarizzabilità delle molecole del campione, induce la formazione di un dipolo oscillante che emette come un'antenna alla stessa frequenza del campo incidente e a due nuove frequenze che corrispondono a ω_S e ω_{AS} . La possibilità di studiare lo spettro vibrazionale di una molecola su frequenze diverse da quella inviata sul campione, classifica sperimentalmente il segnale rilevato per effetto Raman spontaneo come omodino [4]. Infatti non è presente un campo alle frequenze Raman prima di innescare il processo.

L'intensità delle componenti Stokes e anti-Stokes del fascio diffuso è quindi direttamente proporzionale al modulo quadro dell'ampiezza della radiazione emessa dal dipolo oscillante indotto alle frequenze shiftate per effetto Raman. Considerando la componente Stokes, l'ampiezza scalare del campo elettromagnetico emesso lungo r a frequenza ω_S si ottiene dall'elettrodinamica classica [3]:

$$E(\omega_S) = \frac{\omega_S^2}{4\pi\epsilon_0 c^2} |\mu(\omega_S)| \frac{e^{ikr}}{r} \sin(\theta) \quad (1.6)$$

dove:

- k è il vettore d'onda del campo irradiato;
- θ è l'angolo rispetto all'asse del dipolo;

- r è la distanza tra la posizione del dipolo e l'osservatore;
- $|\mu(\omega_S)|$ è l'ampiezza dell'oscillazione del dipolo alla frequenza ω_S

Il flusso uscente lungo r si può calcolare come valore medio nel tempo del vettore di Poynting \vec{S} [3]:

$$S(\omega_S) = \frac{\epsilon_0 c}{2} |E(\omega_S)|^2 \quad (1.7)$$

Integrando il flusso sull'angolo solido si ricava l'energia totale irradiata da un singolo dipolo alla frequenza ω_S e quindi l'intensità della luce diffusa Stokes è data da [3]:

$$I(\omega_S) = \frac{\omega_S^4}{12\pi\epsilon_0 c^3} Q_0^2 |E_0|^2 \left| \frac{\delta\alpha}{\delta Q} \right|^2 \propto |\ddot{\mu}|^2 \quad (1.8)$$

Dall'equazione (1.8) si può verificare la predizione del modello classico per quanto riguarda la dipendenza dalla quarta potenza della frequenza dell'intensità della luce diffusa per effetto Raman. Si può inoltre apprezzare l'assenza della fase ϕ . Essa dipende dal modo normale di vibrazione ω_ν che modula la polarizzabilità. All'equilibrio termico la vibrazione di ogni singola molecola i è caratterizzata da una determinata fase ϕ_i (che compare nell'equazione (1.5)), non correlata rispetto a quella delle altre molecole e rispetto al campo incidente. Ciò implica l'assenza di una ben precisa relazione di fase tra la radiazione emessa da un dipolo e quella emessa da un secondo dipolo. Quindi, proprio a causa della natura termica delle fluttuazioni responsabili della dipendenza temporale della polarizzabilità $\alpha(t)$, l'effetto Raman spontaneo produce un segnale "incoerente". Matematicamente quest'affermazione si traduce nel fatto che, in presenza di N centri scatteratori (ossia di N molecole), l'intensità media misurata dal detector corrisponde in generale a N volte l'intensità $I(\omega_S)$ della radiazione emessa da un singolo dipolo (1.8):

$$\langle I \rangle = \left\langle |E|^2 \right\rangle = \left\langle \left| \sum_j E_j \right|^2 \right\rangle = \sum_j |E_0|^2 + 2|E_0|^2 \sum_{j < k} \langle \cos(\phi_j - \phi_k) \rangle \quad (1.9)$$

Poichè le fasi sono non correlate a causa dell'origine termica del fenomeno, il valore medio del coseno sull'insieme delle molecole risulta pari a zero (è nullo il termine di interferenza) e l'intensità complessiva è la somma delle intensità delle radiazioni emesse dai singoli dipoli. Pertanto il valor medio sull'insieme dell'intensità dipende linearmente dal numero di centri scatteratori:

$$\langle I \rangle = \sum_j |E_0|^2 = N \cdot I_j \quad (1.10)$$

A completamento dell'approccio classico all'effetto Raman spontaneo è importante sottolineare che la polarizzazione macroscopica $P(t)$ indotta dipende linearmente dal campo $E(t)$ che la induce [3]:

$$P(t) = N \cdot \mu(t) = \epsilon_0 \chi E(t) \quad (1.11)$$

Nell'equazione precedente N rappresenta il numero di molecole del campione, χ la suscettività elettrica e $\mu(t)$, definito dalla (1.5), corrisponde al momento di dipolo per molecola indotto dal campo incidente $E(t)$.

La (1.11) sembrerebbe suggerire che la polarizzazione macroscopica $P(t)$ dovuta ad effetto Raman dipenda dal termine al primo ordine della suscettività elettrica χ . La veridicità di questa affermazione porterebbe a concludere che l'effetto Raman

è un processo di interazione radiazione-materia del primo ordine. Questa conclusione risulta tuttavia controversa, in quanto non sostenuta dal modello quantistico comunemente utilizzato per descrivere l'effetto Raman, che attribuisce l'origine di quest'ultimo ad un'interazione del terzo ordine tra i fotoni del campo incidente e il materiale bersaglio. È invece possibile, senza alcun dubbio, affermare che il segnale prodotto in seguito all'effetto Raman spontaneo (a differenza di quello generato tramite effetto Raman stimolato) è direttamente proporzionale all'intensità del campo incidente $|E_0|^2$, come testimoniato dall'equazione (1.8).

1.2 Raman stimolato

Lo sviluppo della tecnica dello Scattering Raman Stimolato (SRS) deriva, in prima battuta, dalla necessità di aumentare la sezione d'urto dell'effetto Raman spontaneo. Quest'ultimo produce un segnale molto meno intenso rispetto a quelli dovuti a fenomeni come l'assorbimento o la fluorescenza, che può schermare completamente o rendere difficile l'interpretazione dello spettro. Infatti, anche la fluorescenza si manifesta con emissione di fotoni a frequenze diverse da quella dei fotoni incidenti e genera luce diffusa in tutte le direzioni. La fluorescenza però è un fenomeno di emissione, nel quale la molecola transisce verso un livello elettronico eccitato e, dopo un certo tempo caratteristico, decade verso livelli energetici più bassi.

Dunque, la bassa sezione d'urto e la competizione con il processo della fluorescenza limitano spesso la possibilità di utilizzare l'effetto Raman spontaneo. Nel seguito assumiamo per semplicità che il campione sia costituito da molecole biatomiche omonucleari caratterizzate da un solo grado di libertà vibrazionale.

Al fine di superare tali difficoltà l'SRS sfrutta l'azione combinata di due campi elettromagnetici per stimolare l'eccitazione del modo normale di vibrazione delle molecole considerate. Il campione viene irradiato con due fasci monocromatici a frequenze ottiche ω_1 e ω_2 . Se queste due frequenze differiscono di una quantità $\Omega = \omega_1 - \omega_2$ che corrisponde alla frequenza ω_ν dell'unico modo vibrazionale delle molecole che costituiscono il campione, l'effetto congiunto dei due fasci luminosi incidenti provoca delle oscillazioni a frequenza $\Omega = \omega_\nu$ nella nube elettronica molecolare. Queste ultime danno origine ad una forza effettiva che agisce lungo la coordinata corrispondente al modo normale di vibrazione ω_ν , forzandone (stimolandone) il moto oscillante. Utilizzando una descrizione semi-classica del fenomeno di interazione radiazione-materia in atto (come fatto in precedenza per l'effetto Raman spontaneo), si può immaginare che il moto vibrazionale delle molecole lungo il proprio asse internucleare sia ben descritto da un oscillatore armonico. Tale sistema interagisce con i due campi monocromatici incidenti che possono essere considerati onde piane [4]:

$$E_i(t) = A_i e^{-i\omega_i t} + A_i^* e^{i\omega_i t} \quad i = 1, 2 \quad (1.12)$$

Assumendo che le frequenze ω_1 e ω_2 siano molto più grandi della frequenza ω_ν dell'unico modo normale di vibrazione delle molecole che costituiscono il campione, il moto oscillatorio che i nuclei compiono lungo la coordinata ad esso corrispondente (lungo l'asse internucleare) non è influenzato direttamente dai campi E_1 e E_2 . Gli elettroni invece, sono in grado di interagire con la radiazione incidente e, in particolare, se i campi E_1 e E_2 hanno intensità sufficiente, possono iniziare ad oscillare a frequenze ottenute dalla combinazione (dal battimento) tra ω_1 e ω_2 [4]. Tra queste frequenze c'è ovviamente $\Omega = \omega_1 - \omega_2$ che può essere scelta in modo da corrispondere alla frequenza di vibrazione delle molecole considerate. In queste condizioni, il campo combinato generato dall'azione di E_1 e E_2 , attraverso il moto oscillatorio degli elettroni, esercita una forza oscillante a frequenza Ω sull'oscillatore

armonico smorzato che descrive il moto vibrazionale dei nuclei lungo la coordinata normale Q che individua l'asse internucleare. L'espressione matematica di questa forza può essere ricavata dall'elettromagnetismo ricordando la formula dell'energia di un momento di dipolo in un campo elettrico $U(t)$ [3]. Definendo $E(t) = E_1(t) + E_2(t)$ si ha:

- $U(t) = -\vec{\mu}(t) \cdot \vec{E}(t)$
- $F(t) = -\frac{\delta U}{\delta Q}$

dove il momento di dipolo per molecola indotto dal campo combinato $E(t)$ è dato dalla (1.3). Sostituendo l'espressione di $\vec{\mu}(t)$ in quella dell'energia $U(t)$ si ricava la seguente relazione:

$$U(t) = -\alpha(t)|E(t)|^2$$

che può essere sostituita nella definizione di $F(t)$. Svolgendo la derivata rispetto alla coordinata normale Q e facendo riferimento allo sviluppo in serie della polarizzabilità (1.4), si ottiene la seguente espressione per la forza generata dal campo combinato a frequenza Ω che agisce lungo la coordinata normale Q :

$$F(t) = \left(\frac{\delta\alpha}{\delta Q}\right)_0 [A_1 A_2^* e^{-i(\Omega)t} + c.c.] \quad (1.13)$$

Questa relazione è stata ricavata trascurando nel calcolo del modulo quadro $|E(t)|^2$ i termini alle frequenze $2\omega_1$, $2\omega_2$ ed $\omega_1 + \omega_2$ poichè, per radiazione incidente visibile, queste sono molto maggiori rispetto alle frequenze vibrazionali [4]. La (1.13) mostra che la forza $F(t)$ dipende dall'accoppiamento tra il moto degli elettroni e quello dei nuclei e la sua entità dipende dal valore di $(\delta\alpha/\delta Q)_0$. Il moto oscillatorio della nube elettronica modulato dal campo combinato $E(t)$ genera una forza dipendente dal tempo che oscilla alla frequenza corrispondente alla differenza tra ω_1 e ω_2 . Poichè tale differenza cade nell'infrarosso, questa forza è in grado di interagire con il moto vibrazionale dei nuclei lungo la coordinata normale Q . La dipendenza temporale della coordinata normale $Q(t)$ è descritta dall'equazione di un oscillatore armonico smorzato e forzato [4]:

$$\frac{d^2 Q(t)}{dt^2} + 2\gamma \frac{dQ(t)}{dt} + \omega_\nu Q(t) = \frac{F(t)}{m} \quad (1.14)$$

dove γ è la costante di smorzamento e m indica la massa ridotta dell'oscillatore armonico. La soluzione dell'equazione (1.14) è data da:

$$Q(t) = Q(\Omega)e^{-i\Omega t} + c.c. \quad (1.15)$$

dove l'ampiezza $Q(\Omega)$ è la seguente [4]:

$$Q(\Omega) = \frac{1}{m} \left(\frac{\delta\alpha}{\delta Q}\right)_0 \frac{A_1 A_2^*}{\omega_\nu^2 - \Omega^2 - 2i\Omega\gamma} \quad (1.16)$$

Quest'ultima espressione evidenzia la possibilità di generare un fenomeno di risonanza tra il campo combinato e la frequenza del modo normale di vibrazione delle molecole quando $\Omega = \omega_\nu$. In caso di validità della suddetta uguaglianza, l'ampiezza del moto vibrazionale dei nuclei lungo la coordinata Q è massima.

Le equazioni (1.15) e (1.16) possono essere considerate una dimostrazione della possibilità che, in certe condizioni, il campo combinato incidente $E(t) = E_1(t) +$

$E_2(t)$ moduli il moto vibrazionale dei nuclei pur essendo generato da radiazioni a frequenze ottiche. L'oscillazione dei nuclei lungo l'asse internucleare risulta infatti perturbata dal termine forzante $F(t)$ (1.14). Tale effetto si traduce in una dipendenza dell'ampiezza $Q(\Omega)$ del moto vibrazionale forzato dei nuclei dalla polarizzabilità attraverso la quantità $(\delta\alpha/\delta Q)_0$ e dalle ampiezze dei fasci incidenti A_1 e A_2 .

La presenza di un modo normale di vibrazione il cui moto è forzato da un campo combinato generato da due fasci ottici monocromatici incidenti sul campione modifica le proprietà ottiche del materiale. La dipendenza di $\alpha(t)$ dalla coordinata normale $Q(t)$, come nel caso dell'effetto Raman spontaneo, è responsabile dell'emissione, da parte del dipolo oscillante indotto dal campo incidente $E(t)$, di radiazione a varie frequenze. Si può dunque procedere esattamente come nella sezione precedente per ricavare le frequenze a cui viene diffusa la luce incidente dalle molecole. Utilizzando lo sviluppo in serie di Taylor di $\alpha(t)$ (1.4) e calcolando dalla (1.3) il momento di dipolo per molecola indotto per effetto Raman stimolato, si ha [4]:

$$\vec{\mu}(t) = \left[\alpha_0 + \left(\frac{\delta\alpha}{\delta Q} \right)_0 Q(t) \right] (\vec{E}_1(t) + \vec{E}_2(t)) \quad (1.17)$$

Di conseguenza la polarizzazione macroscopica, in presenza di N molecole, è data da:

$$P(t) = N \cdot \vec{\mu}(t) = N \cdot \left[\alpha_0 + \left(\frac{\delta\alpha}{\delta Q} \right)_0 Q(t) \right] (\vec{E}_1(t) + \vec{E}_2(t)) \quad (1.18)$$

Inserendo le espressioni di $Q(t)$, $E_1(t)$ e $E_2(t)$, date rispettivamente dalla (1.15) e dalla (1.12), si ricavano i contributi alla polarizzazione $P(t)$ associati alle 4 possibili frequenze (vedi Figura (1.2)) a cui può emettere il momento di dipolo oscillante indotto dal campo combinato $E(t)$ [4]:

$$P(t) = P(\omega_{cs})e^{-i\omega_{cs}t} + P(\omega_2)e^{-i\omega_2t} + P(\omega_1)e^{-i\omega_1t} + P(\omega_{as})e^{-i\omega_{as}t} + c.c. \quad (1.19)$$

dove:

- $\omega_{cs} = 2\omega_2 - \omega_1$ si riferisce alla frequenza coerente Stokes;
- $\omega_{as} = 2\omega_1 - \omega_2$ si riferisce alla frequenza coerente anti-Stokes.

La polarizzazione macroscopica risulta caratterizzata sia da componenti che oscillano alle frequenze ω_1 e ω_2 dei campi incidenti, sia da componenti che oscillano alle nuove frequenze ω_{cs} e ω_{as} . È interessante evidenziare come, a differenza del caso dell'effetto Raman spontaneo, per il processo stimolato il fenomeno della risonanza tra la frequenza vibrazionale delle molecole ω_ν e la frequenza Ω del campo combinato $E(t)$, generi ampiezze dello stesso ordine di grandezza per le differenti componenti di $P(t)$. Svolgendo i prodotti della (1.18) e sostituendovi l'espressione di $Q(\Omega)$ data dalla (1.16), è possibile ricavare le espressioni matematiche dei 4 termini di polarizzazione della (1.19)[4]:

$$P(\omega_{as}) = \frac{N}{m} \left(\frac{\delta\alpha}{\delta Q} \right)_0^2 \frac{1}{\omega_\nu^2 - \Omega^2 - 2i\Omega\gamma} A_1^2 A_2^* = 6\epsilon_0 \chi(\Omega) A_1^2 A_2^* \quad (1.20)$$

$$P(\omega_{cs}) = 6\epsilon_0 \chi^*(\Omega) A_2^2 A_1^* \quad (1.21)$$

$$P(\omega_2) = 6\epsilon_0 \chi^*(\Omega) |A_1|^2 A_2 \quad (1.22)$$

$$P(\omega_1) = 6\epsilon_0 \chi(\Omega) |A_2|^2 A_1 \quad (1.23)$$

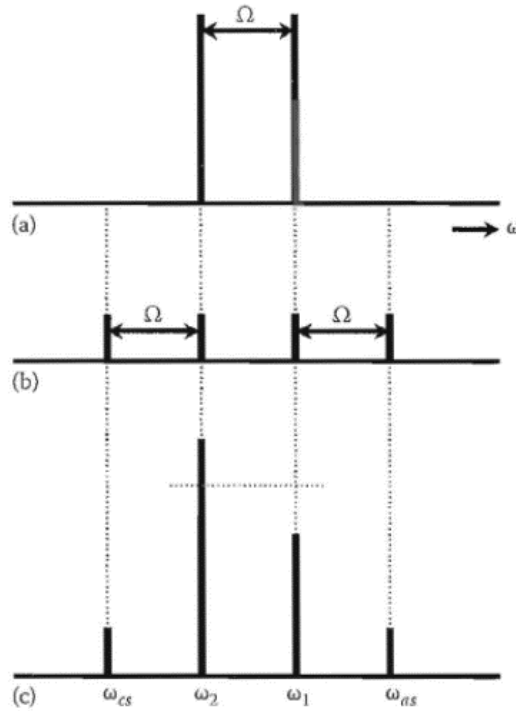


Figura 1.2. Spettro delle componenti in frequenza dell'effetto Raman stimolato. (a) frequenze incidenti ω_1 e ω_2 ; (b) Ciascuna frequenza incidente produce, per effetto Raman due frequenze ai suoi lati: quella Stokes e quella anti-Stokes; (c) Intensità relative alle 4 frequenze prodotte per effetto Raman stimolato. Per quanto riguarda i segnali eterodini, si può notare un guadagno sul canale ω_2 e una perdita sul canale ω_1 (Figura tratta da [4]).

dove la suscettività elettrica $\chi(\Omega)$ è definita come:

$$\chi(\Omega) = \frac{N}{6m\epsilon_0} \left(\frac{\delta\alpha}{\delta Q} \right)_0^2 \frac{1}{\omega_\nu^2 - \Omega^2 - 2i\Omega\gamma} \quad (1.24)$$

Le equazioni precedenti mettono in luce due aspetti fondamentali dell'effetto Raman stimolato. Innanzitutto, gli esponenti delle ampiezze delle radiazioni iniziali A_1 e A_2 dimostrano che l'effetto Raman stimolato è classificabile come un processo di interazione radiazione-materia nonlineare del terzo ordine rispetto al campo totale incidente $E(t)$ [4]:

$$P(t) = \epsilon_0 \chi^{(3)} E^{(3)}(t)$$

Si tratta quindi di un processo caratterizzato da una tripla interazione tra i fotoni incidenti e le molecole del campione. Inoltre, il fatto che tutte le componenti di polarizzazione dipendano dalla stessa suscettività elettrica $\chi(\Omega)$ e debbano la loro origine all'eccitazione della stessa frequenza vibrazionale ω_ν , dimostra che le loro ampiezze sono di grandezza simile.

Le polarizzazioni nonlineari descritte dalle equazioni che vanno dalla (1.20) alla (1.23) descrivono i 4 effetti indotti da un processo Raman stimolato che costituiscono le basi delle seguenti tecniche spettroscopiche [4]:

- $P(\omega_{cs})$ è responsabile del Coherent Stokes Raman Scattering (CSRS);

- $P(\omega_{as})$ è responsabile del Coherent anti-Stokes Raman Scattering (CARS);
- $P(\omega_2)$ è responsabile dello Stimulated Raman Gain (SRG);
- $P(\omega_1)$ è responsabile dello Stimulated Raman Loss (SRL);

É da precisare che, nonostante le ampiezze delle 4 componenti di $P(t)$ siano dello stesso ordine di grandezza, i segnali rilevabili dalle tecniche spettroscopiche che sfruttano gli effetti citati in precedenza, non sono caratterizzati da intensità simile. Una dimostrazione rigorosa dello scattering Raman stimolato richiederebbe la soluzione esplicita delle equazioni di Maxwell per la propagazione dei campi elettromagnetici in gioco. Tutti i campi partecipanti (ω_{cs} , ω_{as} , ω_1 e ω_2) dovrebbero essere calcolati attraverso un approccio basato su un sistema di equazioni (delle onde) accoppiate. L'integrazione di tali equazioni andrebbe effettuata su un volume macroscopico corrispondente a quello che contiene le molecole, al fine di valutare sia lo scambio di energia tra radiazione e materia, sia quello tra i campi elettromagnetici stessi. Tuttavia, al fine di comprendere le differenze in ambito sperimentale tra gli effetti associati al processo Raman stimolato, è sufficiente riprendere il modello classico per descrivere qualitativamente gli scambi di energia associati a questi diversi effetti. Premettendo che un esperimento SRS consentirebbe anche di studiare i due segnali omodini sui canali ω_{cs} e ω_{as} (con $I(\omega_{cs}) \propto |A_{cs}^{(3)}|^2$ e $I(\omega_{as}) \propto |A_{as}^{(3)}|^2$), nel prosieguo l'attenzione sarà focalizzata sul calcolo dell'intensità dei due segnali eterodini alle frequenze dei campi incidenti ω_1 e ω_2 [4]. Infatti i due segnali eterodini prodotti dall'effetto Raman stimolato consentono di misurare l'SRG e l'SRL, i quali rappresentano parametri fondamentali per l'interpretazione dei risultati di un esperimento basato sulla tecnica spettroscopica FSRS.

Nell'SRL il segnale viene rilevato sul canale corrispondente alla frequenza ω_1 . Su questo canale la componente della polarizzazione macroscopica $P(\omega_1)$ (1.23) è la sorgente del campo non lineare $E_1^{(3)}(t)$:

$$E_1^{(3)}(t) = A_1^{(3)} e^{-i\omega_1 t} + c.c.$$

dove $A_1^{(3)}$ indica l'ampiezza della componente $P(\omega_1)$ della polarizzazione macroscopica indotta dai campi incidenti. Poichè ω_1 è anche la frequenza di uno dei due campi principali (E_1), ci sarà interferenza tra il campo diffuso dal dipolo oscillante $E_1^{(3)}$ e il campo E_1 che, incidendo sul campione, induce la formazione del dipolo. Ricordando le relazioni (1.7) e (1.8) e considerando il campo incidente E_1 come un oscillatore locale, l'intensità totale associata al segnale a frequenza ω_1 corrisponde a [4]:

$$\begin{aligned} I(\omega_1) &= \frac{\epsilon_0 c}{2} |E_1^{(3)} + E_1|^2 \\ &\propto |E_1^{(3)}|^2 + |E_1|^2 + [(E_1^{(3)})^* E_1 + (E_1)^* E_1^{(3)}] \end{aligned} \quad (1.25)$$

Il termine tra parentesi quadre rappresenta il contributo eterodino di mixing che dipende dal campo non lineare $E_1^{(3)}$ diffuso dalle molecole del campione e dal campo emesso dall'oscillatore locale E_1 [4]. Tale contributo eterodino all'intensità può essere riscritto come:

$$\begin{aligned} I^{het}(\omega_1) &= 2A_1 \left[\text{Re}(E_1^{(3)}) \cos(\phi) + \text{Im}(E_1^{(3)}) \sin(\phi) \right] \\ &= 2\beta \left[\text{Re}(\chi^{(3)}) \cos(\phi - \phi_p) + \text{Im}(\chi^{(3)}) \sin(\phi - \phi_p) \right] \end{aligned} \quad (1.26)$$

dove:

- $\beta = |I_1 I_2|$;
- ϕ rappresenta la differenza di fase tra il campo diffuso $E_1^{(3)}$ e il campo locale E_1 ;
- ϕ_p indica la differenza di fase tra il campo diffuso $E_1^{(3)}$ e la componente della polarizzazione indotta $P(\omega_1)$.

Sostituendo quest'ultima espressione nella (1.25) si ottiene:

$$I(\omega_1) \propto |E_1^{(3)}|^2 + |E_1|^2 + 2\beta \left[\text{Re}(\chi^{(3)}) \cos(\phi - \phi_p) + \text{Im}(\chi^{(3)}) \sin(\phi - \phi_p) \right] \quad (1.27)$$

Assumendo valida la condizione di risonanza $\Omega = \omega_\nu$, si può notare dalla relazione (1.24) che la suscettività $\chi^{(3)}$ è puramente immaginaria e, pertanto, il fattore che precede il coseno nella formula precedente risulta nullo. In condizioni di risonanza vibrazionale si ha quindi [4]:

$$I(\omega_1) \propto |E_1^{(3)}|^2 + |E_1|^2 + 2\beta \text{Im}(\chi^{(3)}) \sin(\Delta\phi) \quad \text{con } \Delta\phi = \phi - \phi_p \quad (1.28)$$

Tale risultato indica che l'intensità del segnale eterodino rilevata sul canale ω_1 dipende dalla differenza di fase $\Delta\phi$. Questa quantità dipende da fattori di propagazione la cui presenza è trascurata nel semplice modello di interferenza qui descritto. Pertanto ci si limita a citare il caso principale e quindi il valore di $\Delta\phi$ associato agli effetti SRL e SRG. Quando la differenza di fase $\Delta\phi$ è pari a $-\frac{\pi}{2}$, la parte reale del campo di risposta del materiale è in ritardo di $\frac{\pi}{2}$ rispetto alla radiazione incidente E_1 , mentre la parte immaginaria del campo di risposta del materiale è fuorifase rispetto al campo incidente E_1 [4]. Si ha quindi:

$$I(\omega_1) \propto |E_1^{(3)}|^2 + |E_1|^2 - 2\beta \text{Im}(\chi^{(3)}) \quad (1.29)$$

L'equazione (1.29) mostra che, per l'SRL, l'intensità del segnale sul canale ω_1 è ridotta a causa della perturbazione indotta dall'effetto combinato dei campi incidenti sul modo normale di vibrazione ω_ν [4]. La perdita di intensità del segnale sul canale ω_1 è il risultato dell'interferenza distruttiva tra il campo emesso dal dipolo indotto e quello incidente E_1 .

Per quanto riguarda l'SRG invece, il segnale viene rilevato sul canale corrispondente alla frequenza ω_2 . Ripetendo i calcoli fatti nel caso dell'SRL e considerando il campo incidente E_2 come un oscillatore locale, si ricava la seguente intensità per il segnale rilevato alla frequenza ω_2 :

$$I(\omega_2) \propto |E_2^{(3)}|^2 + |E_2|^2 + 2\beta \text{Im}(\chi^{(3)*}) \sin(\Delta\phi) \quad (1.30)$$

Se la differenza di fase $\Delta\phi$ corrisponde a $-\frac{\pi}{2}$, poichè vale che $\chi^* = -\chi$, si ha:

$$I(\omega_2) \propto |E_2^{(3)}|^2 + |E_2|^2 + 2\beta \text{Im}(\chi^{(3)}) \quad (1.31)$$

L'equazione (1.31) mostra che l'intensità del segnale a frequenza ω_2 aumenta. Tale aumento è dovuto all'interferenza costruttiva tra il campo emesso dal dipolo indotto e il campo incidente E_2 [4].

La possibilità di osservare un aumento o una diminuzione di intensità nei canali associati ai segnali eterodini rappresenta un'utile risorsa a livello sperimentale. Infatti la grande sezione d'urto garantita dal fenomeno di risonanza in atto durante

il processo e la relativa facilità di rilevazione dei segnali eterodini, rendono gli effetti SRL e SRS fondamentali per la tecnica FSRs.

Al fine di ottenere una descrizione il più possibile completa dello scattering Raman stimolato, evidenziandone ulteriormente le differenze con l'effetto Raman spontaneo, è opportuno discutere la coerenza dei segnali prodotti da questo processo nonlineare. Come affermato nella sezione precedente, l'effetto Raman spontaneo produce segnali incoerenti a causa della natura termica delle fluttuazioni responsabili dell'interazione anelastica tra i fotoni incidenti e i modi normali di vibrazione molecolari. In presenza di piccole fluttuazioni rispetto all'equilibrio termico, non c'è nessun vincolo sulla fase associata all'oscillazione di ciascuna molecola in qualunque istante temporale. L'effetto Raman stimolato invece, può essere visto come un processo del terzo ordine in cui le prime due interazioni tra radiazione e materia servono per modulare in maniera coerente il modo normale di vibrazione risonante con la differenza Ω tra le frequenze incidenti. La coerenza nasce proprio dall'esistenza di una relazione di fase precisa tra i moti vibrazionali delle N molecole costituenti il campione, in quanto la forza che li eccita è generata dall'azione combinata dei due campi $E_1(t)$ e $E_2(t)$. Matematicamente questa situazione si traduce nel seguente risultato ottenuto a partire dall'equazione (1.9). In presenza di una relazione di fase ben definita, il valore medio sull'insieme delle molecole del coseno nella (1.9) risulta non nullo e uguale per tutte le coppie di molecole i, j possibili, a causa del fenomeno di risonanza indotto dalla forzante $F(t)$. Pertanto l'intensità del segnale coerente generato dall'effetto Raman stimolato è data da:

$$\langle I \rangle = NI_j + \frac{N^2 - N}{2} 2I_j = N^2 I_j \quad (1.32)$$

Questa relazione mostra che il valore medio $\langle I \rangle$ di un segnale prodotto dallo scattering Raman stimolato è caratterizzato da una dipendenza quadratica rispetto al numero di centri scatteratori, ossia rispetto al numero di molecole N . L'interpretazione generale dello scattering Raman stimolato offerta dal modello classico consiste nell'affermare che, nel caso di molecole biatomiche omonucleari, l'unico modo normale di vibrazione, se stimolato tramite l'azione combinata di due campi ottici incidenti, è in grado di modificare le intensità dei fasci E_1 ed E_2 introducendo una modulazione nel materiale [4]. Tale modulazione può essere pensata come la polarizzazione macroscopica indotta nel materiale e, come evidenziato dall'equazione (1.11), essa ha 4 componenti relative a 4 differenti frequenze: 2 già esistenti (ω_1 e ω_2) e 2 non presenti nel campo incidente (ω_{cs} e ω_{as}). Ai segnali omodini a ω_{cs} e ω_{as} sono associati gli effetti nonlineari del terzo ordine definiti rispettivamente CSRS e CARS. Ai segnali eterodini a ω_1 e ω_2 sono associati gli effetti nonlineari del terzo ordine definiti rispettivamente SRL e SRG. L'aumento di intensità nel canale ω_2 è dovuto all'interferenza costruttiva tra il campo incidente E_2 e quello non lineare $E_2^{(3)}$ emesso dal dipolo indotto in ciascuna molecola. Al contrario, la diminuzione di intensità del segnale a ω_1 è dovuto all'interferenza distruttiva tra il campo incidente E_1 e quello non lineare $E_1^{(3)}$.

Capitolo 2

Spettroscopia Pump-Probe e FSRS

2.1 Schema sperimentale Pump Probe

Il Pump-Probe è una tecnica spettroscopica che consiste nell'utilizzare due fasci incidenti sul campione distanziati da un ritardo temporale ΔT . Il primo fascio, detto Pump, perturba il sistema preparando uno stato di non equilibrio e il secondo fascio, detto Probe, interagisce con il sistema eccitato allo scopo di studiarne le proprietà, seguendone l'evoluzione. La riproducibilità e la possibilità di monitorare il segnale di Probe in funzione del ritardo temporale ΔT , rendono la suddetta tecnica sperimentale un'ottima risorsa per ottenere informazioni sulle dinamiche di decadimento degli stati eccitati generati dall'impulso di Pump.

Il set-up sperimentale di un comune esperimento di Pump-Probe è mostrato nella seguente figura (2.1):

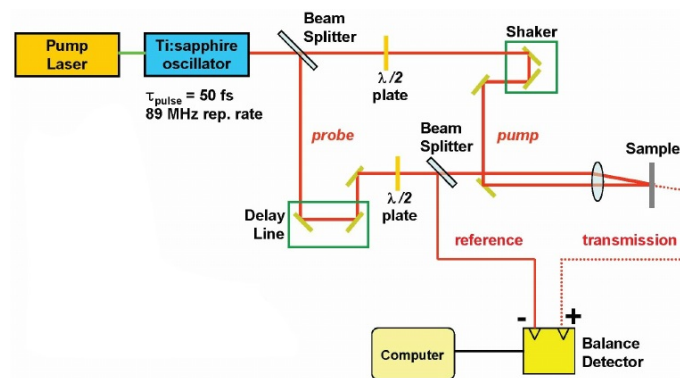


Figura 2.1. Esempio di set-up utilizzato in un esperimento Pump-Probe con impulsi generati da un'unica sorgente e caratterizzati dalla stessa lunghezza d'onda (Figura tratta da Wikipedia).

Nella maggior parte dei casi gli impulsi di Pump e di Probe derivano dalla stessa sorgente laser, ad esempio da un oscillatore Ti:zaffiro, il cui pompaggio è eseguito per mezzo di un altro laser. Il singolo fascio prodotto, grazie ad un beam splitter, genera i due fasci di Pump e di Probe. Il delay temporale con cui si ripetono gli impulsi è controllato con una linea di ritardo ottica: variando la lunghezza del cammino ottico di uno dei due fasci, è possibile controllare il ritardo relativo tra Pump e Probe con un sensore interferometrico. Si noti che non è richiesto un fotorivelatore veloce; la

risoluzione temporale è limitata solo dalla durata degli impulsi di Pump e di Probe. In alcuni casi, le lunghezze d'onda del fascio di Pump e di quello di Probe non sono identiche: questo è spesso reso possibile dall'utilizzo di opportuni processi nonlineari (generazione di seconda armonica, difference frequency generation, generazione di supercontinuo per citarne alcuni), che permettono di manipolare le proprietà spettrali e temporali della sorgente. Il segnale di Probe è tipicamente piuttosto debole. Può essere mediato su molti impulsi per ottenere un migliore rapporto segnale-rumore, presupponendo che il comportamento del campione studiato sia completamente riproducibile. Questo accade se le intensità degli impulsi applicati non sono troppo elevate. Un interessante caso di misurazione Pump-Probe che prevede frequenze diverse (anche non soltanto due) per i due impulsi caratteristici della tecnica è rappresentato dall'FSRS. Questa tecnica spettroscopica basa il suo funzionamento sull'effetto Raman stimolato (SRS) indotto dall'azione combinata di un impulso corto di Pump e di uno ultracorto di Probe. Sfruttando gli effetti SRL e SRG è possibile, tramite l'FSRS, monitorare l'evoluzione nel tempo dello spettro vibrazionale di una molecola soggetta ad una trasformazione fotochimica, seguendo la procedura sperimentale che caratterizza la spettroscopia Pump-Probe risolta nel tempo. Tali concetti sono approfonditi nella prossima sezione.

2.2 Pump-Probe ed effetto Raman Stimolato

La spettroscopia Raman stimolata al femtosecondo (FSRS) è una recente tecnica spettroscopica con cui è possibile ottenere informazioni sulla struttura vibrazionale di molecole soggette ad un processo reattivo fotochimico con ottima risoluzione spettrale (circa 10 cm^{-1}) e temporale (circa 20 fs).

La spettroscopia vibrazionale risolta nel tempo si è sempre limitata ad investigare processi caratterizzati da scale temporali non inferiori al picosecondo.

L'FSRS sfrutta processi nonlineari, in particolare, l'effetto Raman stimolato (processo di interazione radiazione-materia del terzo ordine) ed ha portato a fondamentali passi in avanti nello studio delle strutture molecolari durante le trasformazioni chimiche ultraveloci. L'approccio FSRS infatti, rende possibile la registrazione di spettri vibrazionali rappresentativi della struttura molecolare durante un processo reattivo ad istanti che differiscono tra loro di decine di femtosecondi. L'idea di base dello schema FSRS è quella di combinare un impulso al femtosecondo, detto Pompa Attinica, che svolge appunto il ruolo di Pump, con una coppia di impulsi, la pompa Raman (Raman Pulse) e il Probe Pulse, che, in maniera congiunta misurano lo spettro Raman stimolato del campione in esame, svolgendo il ruolo di probe. L'impulso Raman è narrowband (stretto spettralmente) e garantisce quindi un'alta risoluzione spettrale, mentre il Probe Pulse è ultracorto (pochi fs), garantendo quindi un'elevatissima precisione temporale nell'innescare il processo SRS.

Basandosi esclusivamente sull'evoluzione nel tempo del profilo del segnale di Probe per diversi ritardi ΔT rispetto alla Pompa Attinica, la precisione temporale che caratterizza il campionamento dei segnali FSRS risulta limitata solo dalla durata degli impulsi di Pump e di Probe.

Gli spettri che si ricavano mediante tale approccio sono rappresentativi delle strutture molecolari ad istanti di tempo vicinissimi tra loro e, contemporaneamente, raggiungono una risoluzione in frequenza (molto più fine della larghezza di banda della Pompa Attinica e del Probe Pulse) tale da permettere di osservare piccolissimi spostamenti di riga, tipici delle trasformazioni geometriche in atto durante una reazione chimica.

2.3 Teoria dell'FSRS

La caratteristica principale che differenzia l'FSRS dalla maggior parte delle altre tecniche di spettroscopia vibrazionale risolta nel tempo è proprio la grande "risoluzione temporale". Infatti, non è immediato rendersi conto del motivo per cui la precisione nel dominio del tempo che caratterizza la suddetta tecnica sia un ordine di grandezza inferiore rispetto al valore atteso sulla base del principio di indeterminazione tempo-frequenza. Assumendo una precisione temporale pari alla durata tipica dell'impulso di Probe, ovvero $\Delta t = 50 \text{ fs}$, considerando il valore della costante \hbar , il principio di indeterminazione di Heisenberg porterebbe ad un'incertezza nelle misure di frequenza pari a circa 100 cm^{-1} , non compatibile con la risoluzione richiesta per uno spettro vibrazionale. Per $\Delta t = 50 \text{ fs}$ invece, tramite FSRS, si riesce ad ottenere un'incertezza in frequenza pari a circa 10 cm^{-1} , valore che sembrerebbe addirittura violare il principio di indeterminazione. Tuttavia quest'apparente violazione di una legge fondamentale della fisica è frutto della procedura sperimentale di Pump-Probe utilizzata al fine di "attivare" l'effetto Raman Stimolato sul campione e della tecnica utilizzata per rilevarne i segnali.

Come anticipato, il principio di funzionamento della tecnica FSRS è il seguente. Un impulso ultra corto ($< 30 \text{ fs}$) di luce visibile, detto Pompa Attinica (2.2), dà origine alla trasformazione fotochimica di interesse. L'evoluzione strutturale del sistema viene investigata da due impulsi, il Raman Pulse e il Probe Pulse, i quali inducono il fenomeno dell'effetto Raman stimolato.

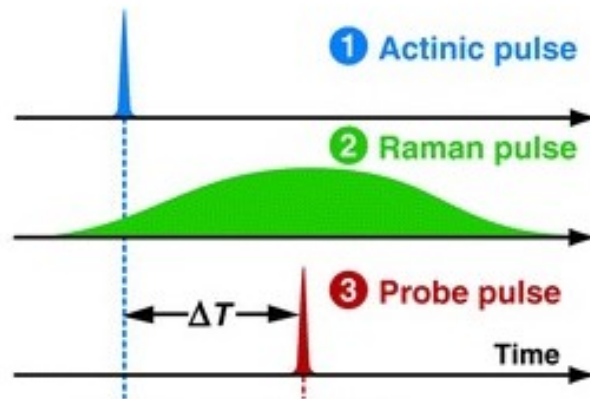


Figura 2.2. Illustrazione della forma dei segnali di Pompa Attinica (in blu), di Raman Pulse (in verde) e di Probe Pulse (in rosso) in funzione del tempo. Il ΔT corrisponde al ritardo temporale regolabile tra gli impulsi 1 e 3, al variare del quale viene monitorato lo spettro vibrazionale Raman delle molecole oggetto di studio (Figura tratta da [5]).

Come è mostrato in figura (2.2), l'effetto combinato di un fascio Raman Pulse molto stretto in frequenza (largo nel tempo $\approx 3 \text{ ps}$) e di un fascio Probe Pulse largo in frequenza (molto stretto nel tempo $\approx 20 \text{ fs}$) genera forzanti periodiche $F(t)$ del tipo (1.13) a differenti frequenze. Queste ultime stimolano (come spiegato nella sezione (1.2)) i modi normali di vibrazione delle molecole del campione. Consideriamo qualche numero: utilizzando un Raman Pulse centrato intorno a 800 nm e un impulso di Probe che copre un intervallo di lunghezze d'onda che va da 830 nm a 960 nm è possibile far risuonare simultaneamente per effetto Raman stimolato i modi normali di vibrazione compresi in un intervallo di frequenze che va da 400 cm^{-1} a 2000 cm^{-1} . La simultanea risonanza tra le frequenze vibrazionali del materiale e i molteplici campi combinati generati dall'accoppiamento tra gli impulsi Raman e di Probe

descritti in precedenza, induce la formazione di una polarizzazione macroscopica $P(t)$. Quest'ultima, come nella (1.11), risulta costituita da varie componenti, le quali diffondono radiazione su canali omodini ed eterodini.

Registando le intensità dei segnali eterodini è possibile visualizzare l'effetto non lineare dello Stimulated Raman Gain (SRG) associato alla tecnica FSRS. Tale effetto si manifesta attraverso la rilevazione di stretti picchi di guadagno sopra l'andamento in frequenza del segnale di Probe [5]. Facendo riferimento al formalismo utilizzato per la descrizione dell'effetto Raman stimolato nella sezione (1.2), i picchi di guadagno mostrati in figura (2.3) si trovano in corrispondenza delle frequenze ω_i , coperte dal Probe, tali che:

$$\omega_i = \omega_{RP} - \omega_{0_i}$$

dove ω_{RP} indica la frequenza a cui è centrato il Raman Pulse, mentre ω_{0_i} rappresenta le varie frequenze dei modi normali di vibrazione che caratterizzano le molecole considerate. Si può notare come, invertendo le posizioni di ω_{0_i} e di ω_i , la relazione precedente sia equivalente alla condizione di risonanza $\omega_1 - \omega_2 = \Omega = \omega_\nu$ utilizzata nella sezione (1.2)

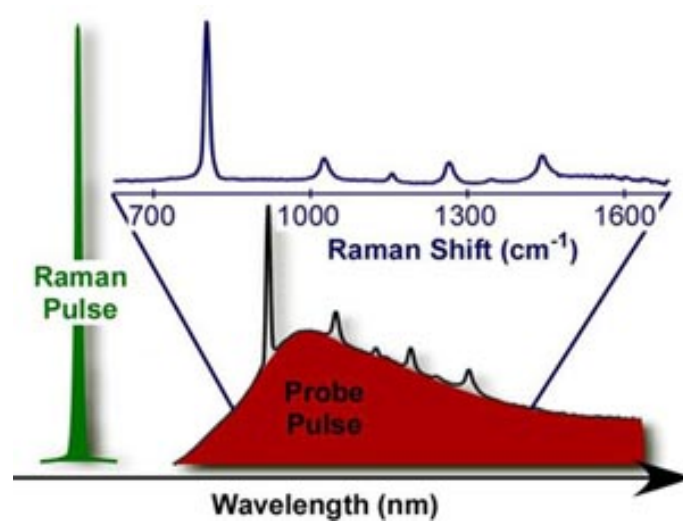


Figura 2.3. Profilo in funzione della lunghezza d'onda del Raman Pulse (in verde) e del Probe Pulse, in assenza del Raman Pulse (in rosso) e in presenza del Raman Pulse (in nero). In alto è mostrato lo spettro Raman vibrazionale corrispondente in funzione del Raman shift, ottenuto dal rapporto tra i due spettri di Probe (Pump On/Pump Off) (Figura tratta da [5]).

La registrazione delle intensità aumentate per effetto Raman stimolato dei segnali eterodini alle frequenze ω_i consente dunque di ottenere agevolmente lo spettro Raman vibrazionale operando uno shift in frequenza e normalizzando l'intensità misurata dopo l'attraversamento del campione rispetto a quella iniziale. Matematicamente ciò si traduce nella rappresentazione del cosiddetto Raman Gain RG in funzione del Raman shift ω_{shift} rispettivamente definiti come:

- $RG = \frac{\Delta I_S}{I_{S_0}}$

dove I_{S_0} è l'intensità del segnale di Probe prima che esso incida sul campione e ΔI_S è la differenza tra l'intensità del segnale di Probe dopo aver attraversato il campione con il Raman Pulse acceso e spento: $\Delta I_S = I_{Raman\ Pulse\ on} - I_{Raman\ Pulse\ off}$.

- $\omega_{shift} = \omega_{RP} - \omega_i = \omega_0$

A titolo illustrativo e come esempio numerico, si presenta la figura (2.4) che mostra: il profilo del Raman Pulse e del Probe in un esperimento sul cicloesano a sinistra e l'andamento dell' RG corrispondente in funzione di ω_{shift} a destra.

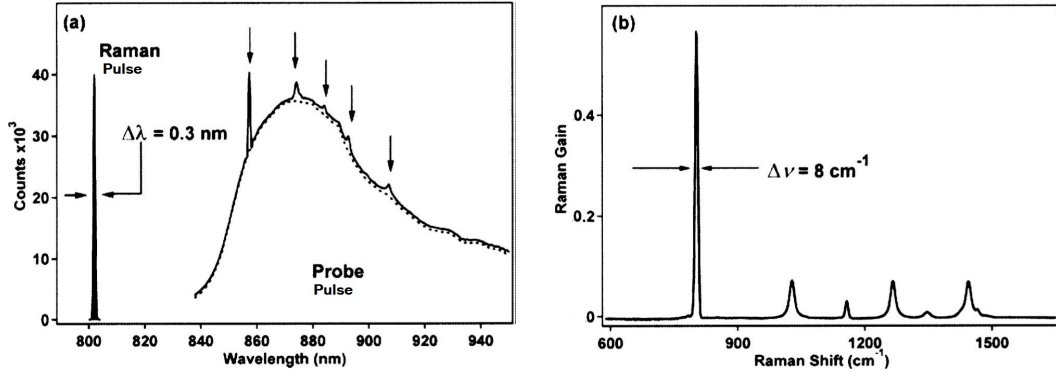


Figura 2.4. A sinistra i segnali Raman e Probe Pulse per un esperimento sul cicloesano. Il profilo del Probe presenta dei picchi di guadagno dovuti all'effetto Raman stimolato (SRG) indotto sul campione. A destra il Raman Gain in funzione del Raman shift corrispondente (Figura tratta da [6]).

Prendendo come riferimento il picco più alto che caratterizza il profilo del Raman Probe nella figura (2.4 a), possiamo assumere che esso sia centrato ad una lunghezza d'onda pari a 860 nm, cui corrisponde una frequenza di 11628 cm^{-1} . Il Raman Pump è centrato a 803 nm, corrispondenti a 12453 cm^{-1} . Utilizzando la sua definizione, il Raman shift risulta quindi: $\omega_{shift} = 825$ cm^{-1} .

La figura (2.5) illustra i fattori che influenzano la risoluzione nel dominio del tempo e nel dominio della frequenza del segnale risultante da un esperimento FSRS [5]. Nelle figure (2.5 a) e (2.5 b) sono mostrati i profili in funzione del tempo e in funzione della frequenza dei due campi Raman Pulse e Probe Pulse. La figura (2.5 c) mostra come l'arrivo dell'impulso di Probe induca, per effetto Raman stimolato, la coerenza dei modi vibrazionali delle molecole del campione, grazie all'azione combinata dei due campi incidenti. Con un approccio classico tale fenomeno può essere interpretato come l'innesco impulsivo dei modi Raman attivi delle molecole prodotto dal battimento tra la frequenza della pompa Raman e alcune delle frequenze coperte dal Probe.

La coerenza così generata decade nel tempo con un suo caratteristico dephasing time T_2 [5]. La durata finita del tempo di coerenza vibrazionale T_2 e la sua lunghezza maggiore rispetto a quella del segnale di Probe determinano la larghezza di banda nel dominio delle frequenze dei segnali rilevati; sono quindi i fattori responsabili della grande risoluzione in frequenza che caratterizza l'FSRS.

Il moto vibrazionale coerente lungo le coordinate normali Raman attive, genera una modulazione della polarizzazione macroscopica del sistema alle frequenze vibrazionali dello stesso. Tale effetto può essere osservato nella figura (2.5 d) dove, in corrispondenza dell'arrivo dell'impulso di Probe, compaiono delle modulazioni che perturbano il profilo gaussiano di $P(t)$ per un certo modo vibrazionale ω_0 [5]. La radiazione generata dalla polarizzazione macroscopica indotta, per il modo normale di vibrazione ω_0 , produce 3 segnali dal profilo Lorentziano. La banda principale corrispondente alla frequenza ω_R è dovuta allo scattering Rayleigh cui è soggetto il Raman Pulse. I due picchi aggiuntivi alle frequenze shiftate di $\pm \omega_0$ rispetto alla banda centrale, corrispondono alle componenti Stokes e anti-Stokes osservate

nell'effetto Raman spontaneo. La larghezza in frequenza di questi profili è determinata dalla durata del Raman Pulse e dal dephasing time della coerenza vibrazionale. Ad esempio, per un Raman Pulse di 2 ps e per un dephasing time vibrazionale di 700 fs , la larghezza a mezza altezza dei profili Lorentziani è pari a circa 17 cm^{-1} , come indicato in figura (2.5). Dunque per i Raman Pulse comunemente utilizzati, caratterizzati da una durata di qualche picosecondo, la risoluzione in frequenza dei segnali ottenuti da un esperimento FSRS è dominata dal dephasing time vibrazionale del modo normale stimolato dal Probe e quindi dalle proprietà del sistema [5].

È da sottolineare che la precisione temporale dell'FSRS non risente delle limitazioni che caratterizzano le misure nel dominio delle frequenze, in quanto i fotoni del segnale FSRS possono essere emessi a qualunque istante durante il dephasing time di $P(t)$. Si può tuttavia affermare che l'evoluzione temporale della polarizzazione macroscopica del sistema è interamente determinata dallo stato del sistema all'istante in cui arriva l'impulso di Probe. Il pacchetto d'onda attivato dall'impulso di Probe evolve nel tempo in maniera differente a seconda del ritardo tra i segnali di Probe e di Pump poiché inizia il suo percorso in una regione differente dell'ipersuperficie di energia potenziale [5]. Gli istanti a cui inizia la coerenza vibrazionale possono essere separati da ritardi temporali ΔT che si avvicinano alla durata dell'impulso di Probe, che nel set-up considerato è di circa 20 fs . Ciò implica che, regolando il ritardo ΔT rispetto alla Pompa Attinica, è possibile ottenere dai segnali emessi dalla polarizzazione macroscopica $P(t)$ spettri Raman vibrazionali rappresentativi della struttura molecolare esistente ai vari istanti in cui l'effetto congiunto degli impulsi Raman e Probe attiva la coerenza vibrazionale. Tali istanti possono quindi essere variati con una precisione di 20 fs .

Riassumendo, quest'approccio consente di rilevare con un detector a più canali i fotoni emessi dalle varie componenti della polarizzazione macroscopica generate dai battimenti tra la frequenza a cui è centrato il Raman Pulse e le frequenze coperte dal Probe. Sfruttando l'effetto SRG sui canali eterodini, ed effettuando un corretto shift in frequenza, è possibile ottenere uno spettro vibrazionale completo e dettagliato del sistema per ciascun tempo di ritardo ΔT tra Pompa attinica e impulsi di Probe considerato. Ciò consente di ottenere una visione della struttura molecolare ai diversi istanti in cui viene generata la coerenza vibrazionale dell'effetto Raman stimolato, con ottima precisione temporale e in frequenza. La precisione temporale della tecnica FSRS è infatti determinata solamente dalla durata della pompa e del Probe Pulse (più precisamente dalla loro cross correlazione). Invece la risoluzione in frequenza è determinata dalla durata della pompa Raman e dal dephasing time vibrazionale della polarizzazione indotta e non dalla durata dei Probe Pulse che generano quest'ultima. I vantaggi garantiti dalla tecnica FSRS possono essere sfruttati per osservare rapidissime e piccolissime variazioni negli spettri vibrazionali connesse a cambiamenti della struttura elettronica di molecole soggette a reazioni fotochimiche ultraveloci. Un'applicazione esemplare delle potenzialità offerte dalla tecnica FSRS è rappresentata dallo studio dell'evento primario della visione, descritto nel capitolo successivo, basato sui risultati ottenuti da Mathies e collaboratori [5].

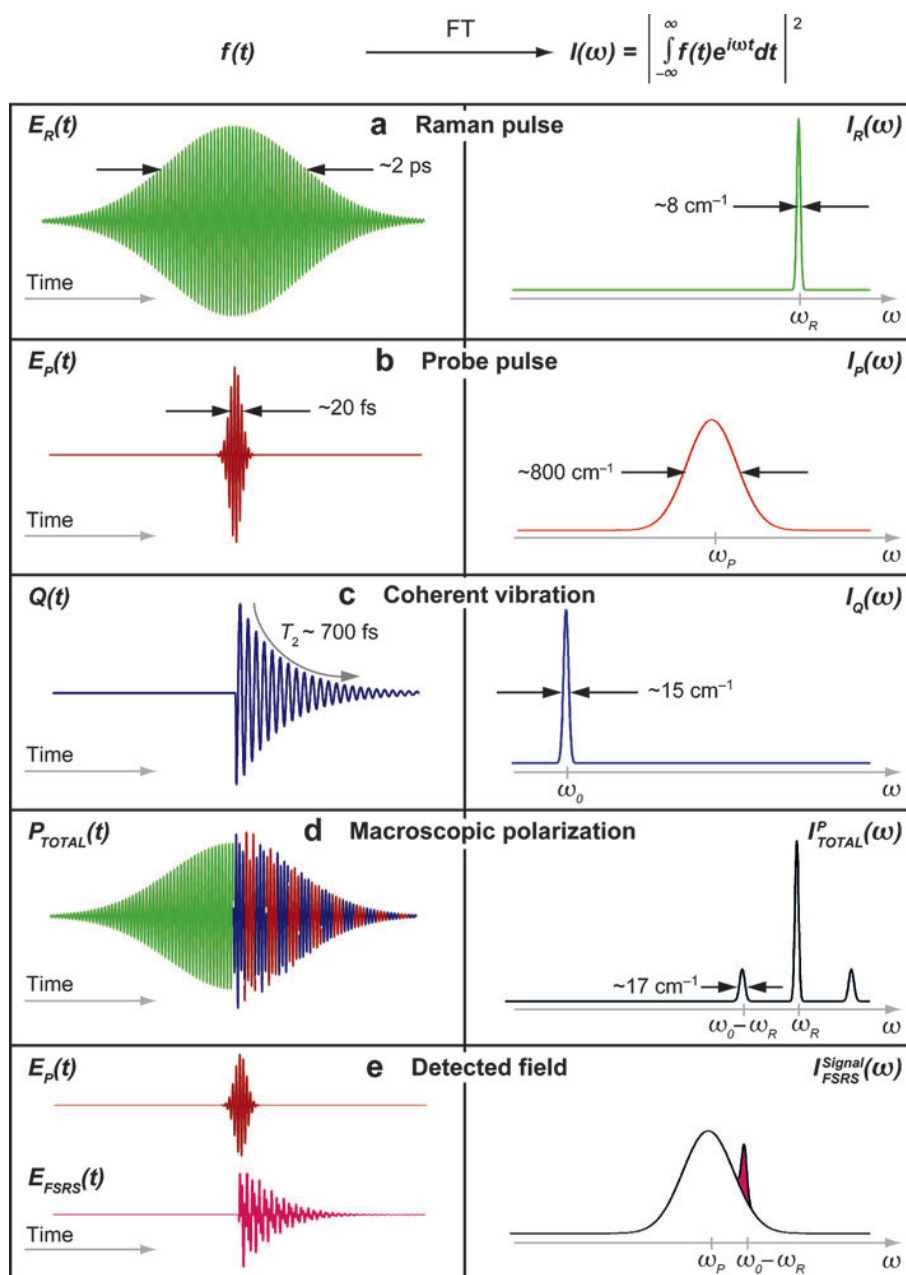


Figura 2.5. (a) Profilo del Raman Pulse nel dominio del tempo e nel dominio delle frequenze. (b) Profilo del Probe nel dominio del tempo e nel dominio delle frequenze. (c) Durata finita (dephasing time T_2) della coerenza vibrazionale indotta dall'effetto congiunto della pompa Raman e dell'impulso di Probe alla frequenza ω_0 che determina la risoluzione spettrale del segnale corrispondente alla suddetta frequenza. (d) Modulazione dell'andamento gaussiano di $P(t)$ per il modo normale di vibrazione ω_0 . (e) Confronto tra l'intensità del segnale FSRS rilevato e dell'impulso di Probe in funzione del tempo e in funzione della frequenza. Si può notare l'aumento di intensità in corrispondenza della frequenza $\omega = \omega_R - \omega_0$ coperta dall'impulso di Probe (Figura tratta da [5]).

Capitolo 3

FSRS applicato allo studio dell'isomerizzazione dell'11-cis retinale

Il meccanismo fotochimico alla base della visione nei mammiferi (e quindi anche nell'uomo) è un processo di isomerizzazione di un doppio legame nella molecola di retinale (una aldeide ottenuta dalla divisione, enzimaticamente-guidata, del beta-carotene in due parti uguali) [7]. In particolare, la molecola di 11-cis retinale isomerizza a 11-trans retinale in seguito all'assorbimento di un fotone nella regione del visibile. La molecola di 11-cis retinale è legata covalentemente ad una specifica proteina, tramite un legame imminico del gruppo aldeidico con il gruppo amminico della lisina in posizione 296.

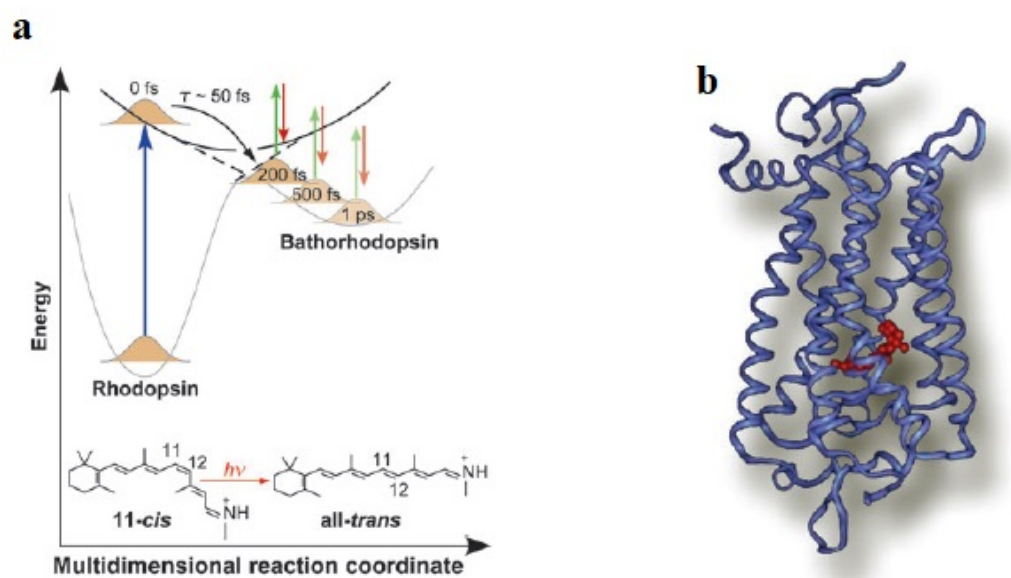


Figura 3.1. A sinistra, modello schematico del processo fotochimico che consente l'isomerizzazione e quindi il passaggio da rodopsina a batorodopsina. A destra, modello a nastro della struttura della proteina rodopsina. In rosso è mostrato l'11-cis retinale posizionato nella tasca di binding della proteina (Figura tratta da [5]).

La proteina, detta opsina (cioè proteina della vista) è mostrata in Figura (3.1 b) e, quando è legata all'11-cis retinale, prende il nome di rodopsina a causa del colore rosa che la caratterizza. La rodopsina è una proteina integrale di membrana con 7 segmenti di alfa-elica che attraversano da parte a parte la membrana e creano una tasca idrofobica adatta ad ospitare l'11-cis retinale e legarlo in maniera covalente. La rodopsina si trova nel doppio strato lipidico delle membrane dei dischi densamente impaccati ed impilati che sono presenti nel segmento esterno delle cellule della retina dette bastoncelli, e che sono responsabili della visione in bianco e nero. In seguito all'assorbimento del fotone visibile, la rodopsina passa dallo stato elettronico fondamentale ad uno stato elettronico eccitato, da cui decade molto velocemente in maniera non radiativa, producendo, in circa 200 *fs*, una struttura denominata fotorodopsina. Poi ha inizio un processo, sempre molto rapido, che, nell'arco di 2 *ps*, porta alla formazione della batorodopsina, in cui l'isomerizzazione del doppio legame è completa, sebbene la molecola di retinale risulti molto distorta. Il processo di foto-isomerizzazione dell'11-cis retinale nella rodopsina ha una resa quantica molto alta pari a circa il 65%, ed è il punto di partenza per la generazione del segnale che dalla retina arriverà al Sistema Nervoso Centrale per la formazione dell'immagine. La sua velocità e la sua efficienza implicano uno straordinario accoppiamento tra l'energia di eccitazione elettronica ed alcuni modi normali di vibrazione dell'11-cis retinale, la cui eccitazione rende possibile l'isomerizzazione cis-trans. Si tratta in particolare della modifica dell'angolo diedro associato al doppio legame $C_{11} = C_{12}$ e della vibrazione al-di-fuori del piano degli idrogeni legati ai carboni C_{10} , C_{11} e C_{12} . Le bande Raman associate a questi modi normali subiscono drastici cambiamenti nel passaggio dalla rodopsina alla batorodopsina, come ben evidenziato dalle misure FSRS.

3.1 Risultati sperimentali

Mathies e collaboratori hanno utilizzato un laser Ti:zaffiro per generare i tre impulsi necessari per gli esperimenti FSRS [5]: un impulso di Pompa Attinica nel visibile, con $\lambda = 500 \text{ nm}$, durata 30 *fs* ed energia 100 *nJ*; un impulso Raman Pump, molto stretto in lunghezze d'onda, centrato a 805 *nm*, con una durata di 3 *ps* ed una energia di 1 μJ (che fornisce quindi il serbatoio di energia per l'amplificazione del segnale Probe); un impulso Probe, che copre un ampio intervallo di lunghezze d'onda, 830 – 960 *nm*, con una durata di 20 *fs* ed una energia di 6 *nJ*. Gli spettri vibrazionali FSRS della rodopsina, registrati a diversi ritardi rispetto all'arrivo dell'impulso di pompa, sono mostrati in Figura (3.2 a).

Lo spettro vibrazionale della rodopsina (riportato in basso nella figura (3.2 a)) mostra: (a) il picco corrispondente allo stretching simmetrico del doppio legame $C = C$ a 1548 cm^{-1} ; (b) una serie di picchi nella regione delle impronte digitali da 1100 a 1300 cm^{-1} , dovuti ai moti lungo i legami singoli C-C ed al rocking dei gruppi C-H; (c) un picco centrato a 969 cm^{-1} dovuto alla vibrazione concertata, fuori dal piano, dei due idrogeni legati agli atomi di carbonio C_{11} e C_{12} del doppio legame (in inglese, Hydrogen Out-Of-Plane, HOOP, wagging motion; vedi Figura (3.2 b)). Lo spettro vibrazionale della batorodopsina, riportato in alto nella figura (3.2a), mostra le variazioni causate dalla isomerizzazione. In particolare, il picco corrispondente allo stiramento simmetrico del doppio legame $C = C$ si sposta verso il rosso ed è centrato a 1535 cm^{-1} , ed il picco centrato a 969 cm^{-1} si sposta verso il rosso e si separa in tre picchi a 920, 875 e 850 cm^{-1} , attribuiti alle vibrazioni di wagging dei tre idrogeni legati agli atomi di carbonio C_{10} , C_{11} e C_{12} . Lo spettro vibrazionale della fotorodopsina registrato con un tempo di ritardo pari a 200 *fs* mostra segnali

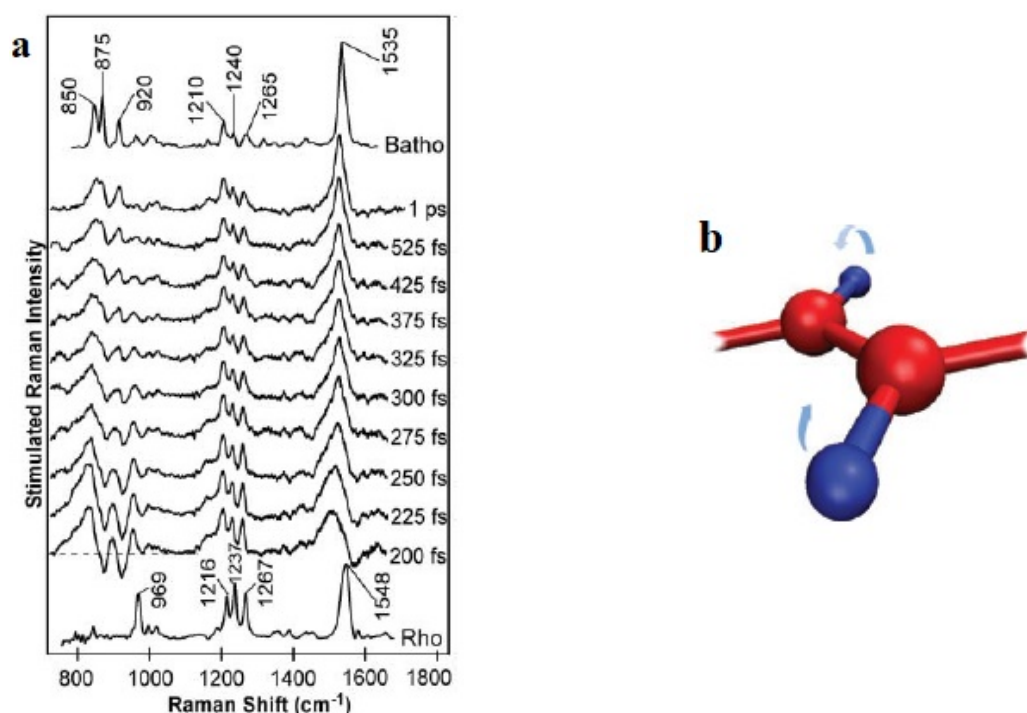


Figura 3.2. (a) Spettri FSRS della rodopsina (in basso), della batorodopsina (in alto) e spettri delle strutture intermedie registrati per differenti ritardi temporali Δt tra Raman Pulse e Probe [8]; (b) immagine schematica del modo vibrazionale di wagging di due gruppi $C - H$, in rosso sono mostrati i carboni e in blu gli idrogeni (Figura tratta da [5]).

caratteristici che sono intermedi tra quelli della rodopsina e della batorodopsina. Gli spettri vibrazionali acquisiti a tempi di ritardo crescenti fino a 1 ps , mostrano l'evoluzione strutturale che porta alla batorodopsina. La cosa più interessante è la comparsa nella regione di HOOP wagging, tra 800 e 950 cm^{-1} , di picchi la cui forma non è Lorentziana, ma "dispersiva", con una evoluzione sulla stessa scala temporale della reazione di isomerizzazione. Infatti, lo spettro vibrazionale FSRS registrato con un ritardo di 1 ps è molto simile a quello della batorodopsina che mostra tre picchi di forma Lorentziana nella regione di HOOP wagging.

La forma "dispersiva" dei segnali nella regione di HOOP wagging a tempi di ritardo brevissimi è una conseguenza del meccanismo di generazione del segnale FSRS, che consente di seguire l'evoluzione strutturale della molecola sulla giusta scala temporale in maniera coerente. L'azione simultanea di un impulso Raman Pump di 3 ps , e di un impulso Probe di 20 fs produce coerenza vibrazionale nel campione. La vibrazione coerente delle molecole modula la polarizzazione del campione macroscopico nel dominio del tempo, generando segnali positivi Stokes ed anti-Stokes nel dominio delle frequenze. Poiché i segnali sono registrati per mezzo dell'interferenza con l'impulso Probe, le righe FSRS appaiono sovrapposte allo spettro in frequenza del Probe stesso. Tuttavia, se la frequenza di questo moto vibrazionale coerente, innescato dall'azione simultanea dell'impulso Raman Pump e dell'impulso Probe, cambia durante il dephasing time vibrazionale T_2 , come mostrato in Figura (3.3), allora la forma dei picchi diviene "dispersiva".

La presenza nel segnale di valori negativi nella zona delle alte frequenze è indicativa di un aumento della frequenza del modo vibrazionale durante il free-induction decay

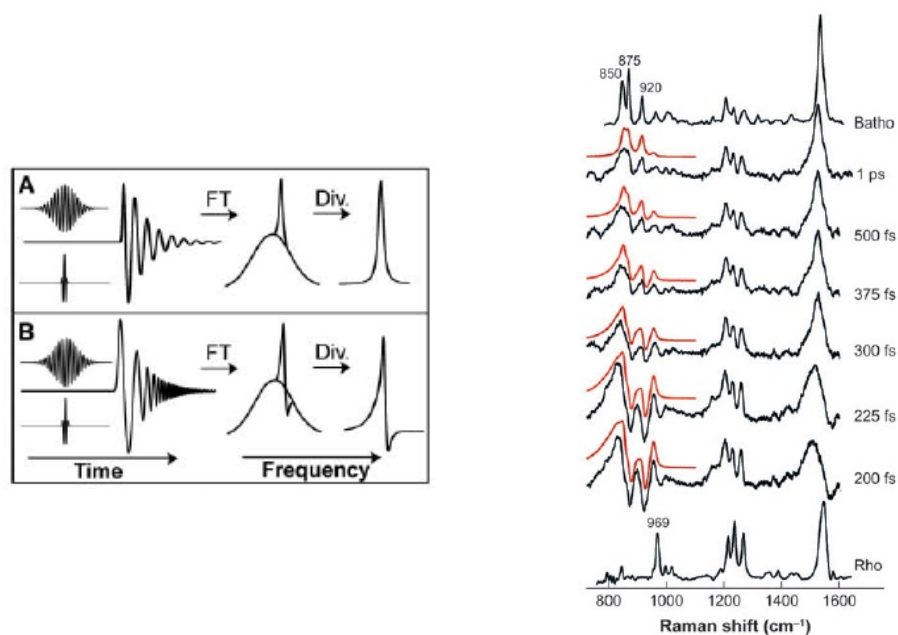


Figura 3.3. A sinistra, la trasformata di Fourier del free induction decay vibrazionale produce un picco Lorentziano se la frequenza del modo normale non cambia durante il dephasing time T_2 (parte A), ma un picco con una coda negativa se la frequenza del modo normale aumenta durante il dephasing time (parte B) (Figura tratta da [8]). A destra, spettri vibrazionali nella regione di HOOP wagging; in rosso sono mostrati gli spettri calcolati secondo il modello descritto nel testo (Figura tratta da [5]).

vibrazionale. Di conseguenza, la forma “dispersiva” dei picchi nella regione di HOOP wagging fornisce indicazioni dirette sulle variazioni strutturali del retinale nel passaggio dalla fotorodopsina alla batorodopsina. Il sistema di registrazione eterodino utilizzato in FSRs consente di vedere cambi nella frequenza del modo vibrazionale che si verificano su scale di tempo più brevi del dephasing time vibrazionale T_2 . Utilizzando un approccio teorico che tiene conto di questi concetti, Mathies e collaboratori hanno simulato l’evoluzione nel tempo dei picchi nella regione di HOOP wagging successivamente al processo di conversione interna che riporta il sistema sulla ipersuperficie di energia potenziale dello stato elettronico fondamentale [8] [5]. Alle frequenze dei tre modi associati al wagging indipendente dei tre idrogeni legati ai carboni C_{10} , C_{11} e C_{12} è stata attribuita una dipendenza esponenziale dal tempo, mentre una quarta frequenza è stata tenuta fissa a 959 cm^{-1} .

Questo semplice modello è in grado di riprodurre gli spettri misurati con le loro caratteristiche “dispersive”, ed anche la loro evoluzione temporale verso quello della batorodopsina (vedi le curve in rosso rispetto a quelle in nero a destra in Figura (3.3)). Il modello fornisce le frequenze associate a tutte le strutture intermedie tra la fotorodopsina e la batorodopsina. Con il passare del tempo da 200 fs a 2 ps , le frequenze nella regione di HOOP wagging aumentano di circa 100 cm^{-1} , con una costante di tempo di 325 fs , uguale per i tre modi di wagging (vedi Figura (3.4 a)). L’evoluzione della struttura vibrazionale tra 200 fs ed 1 ps dimostra che una gran parte del percorso lungo la coordinata di reazione che porta alla isomerizzazione si verifica sulla ipersuperficie di energia potenziale dello stato elettronico fondamentale. Le frequenze di wagging nella fotorodopsina sono più piccole a causa della distorsione strutturale della catena del poliene. L’aumento di tali frequenze nel passaggio dalla

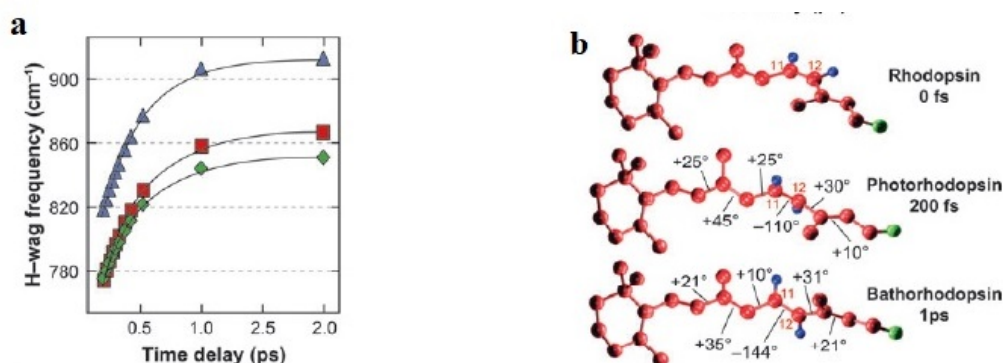


Figura 3.4. (a) Andamento nel tempo delle frequenze calcolate dei 3 modi di wagging HOOP; (b) modelli strutturali del retinale nella rodopsina, fotorodopsina e batorodopsina ottenuti da calcoli DFT (Figura tratta da [5]).

fotorodopsina alla batorodopsina è fisicamente ragionevole perché la costante di forza dei modi di HOOP wagging deve aumentare in quanto il doppio legame in configurazione trans nella batorodopsina è più stabile. Questa interpretazione è stata verificata da Mathies e collaboratori [8] [5], eseguendo dei calcoli DFT sulle strutture dell'11-cis retinale, dell'11-trans retinale e di alcune forme intermedie per ottenere le frequenze dei modi normali rilevanti. I risultati dei calcoli di Density Functional Theory (DFT) sono i seguenti (vedi Figura (3.4 b)):

- la struttura della batorodopsina è molto twisted con angoli diedri di -144° intorno al doppio legame $C_{11} = C_{12}$ e di 31° intorno al legame singolo $C_{12} - C_{13}$ e ulteriori distorsioni per i legami adiacenti;
- la struttura della fotorodopsina è ancora più twisted sia intorno al doppio legame $C_{11} = C_{12}$ sia per i legami adiacenti.

Questi modelli strutturali portano a frequenze nella regione di HOOP wagging in buon accordo con i valori sperimentali. I calcoli DFT, sebbene accurati, dovranno essere estesi in futuro per tener conto dell'effetto esercitato dalle interazioni steriche ed energetiche delle catene laterali dei residui nella tasca di binding dell'opsina.

La transizione elettronica, causata dall'assorbimento del fotone visibile ed avvenuta rispettando il principio di Franck-Condon (si noti che una mole di fotoni con $\lambda = 500 \text{ nm}$ possiede un'energia di 239 kJ/mol , certamente in grado di eccitare elettronicamente la molecola di retinale), innesca la reazione di isomerizzazione dell'11-cis retinale. Il primo passo è un decadimento veloce, non-radiativo del pacchetto d'onda Franck-Condon che riporta la molecola sulla ipersuperficie di energia potenziale dello stato elettronico fondamentale (vedi la Figura (3.5) che è una rappresentazione modellistica di tale ipersuperficie nell'ipotesi che solo due modi normali di vibrazione siano rilevanti). Poiché la transizione elettronica è fortemente favorita (vista l'alta resa quantica del processo complessivo), la transizione dallo stato elettronico fondamentale di simmetria A_g deve popolare uno stato eccitato avente simmetria ungerade. Pertanto, qualunque vibrazione dei nuclei, per essere in grado di accoppiare lo stato elettronico eccitato secondo Franck-Condon allo stato elettronico fondamentale, determinando un veloce decadimento, deve essere non total-simmetrica, quali sono ad esempio i modi di HOOP wagging e di torsione della catena. Inoltre, lo stato elettronico eccitato secondo Franck-Condon ha una vita brevissima, circa 50 fs , e questo implica che il movimento torsionale intorno al

Capitolo 4

Conclusioni

In questa dissertazione sono stati descritti i principi fisici alla base del processo di scattering Raman spontaneo e della sua versione stimolata (SRS). Sono quindi state illustrate le motivazioni teoriche e le procedure sperimentali grazie alle quali l'effetto Raman stimolato può essere impiegato come potente strumento spettroscopico al fine di studiare processi di interesse fotochimico e fotofisico. A tal proposito è stata descritta la tecnica FSRS. Essa prevede l'utilizzo di un impulso visibile ultracorto (pompa attinica) per eccitare elettronicamente la molecola, e sfrutta una coppia di impulsi come Probe: un Raman Pulse di qualche ps ed un impulso di Probe di pochi *fs*, per realizzare esperimenti risolti nel tempo in grado di combinare un'elevata precisione temporale con un'alta risoluzione spettrale. Grazie a queste peculiarità la tecnica è stata provocatoriamente descritta in letteratura, come in grado di aggirare ("circumventing") il principio di indeterminazione [5].

La possibilità offerta dalla tecnica FSRS di registrare spettri vibrazionali Raman con una precisione temporale di qualche decina di femtosecondi ha consentito lo studio di numerose reazioni fotochimiche ultraveloci tra cui l'esempio discusso in questa dissertazione.. Come mostrato da Mathies e collaboratori, le variazioni osservate sui segnali degli spettri vibrazionali forniscono importanti informazioni strutturali sul processo di isomerizzazione dell'11-cis retinale, evento primario della visione [8]. I risultati delle indagini condotte mediante FSRS, abbinati ad opportuni calcoli teorici, hanno permesso di ricostruire il percorso della reazione ed il corrispondente flusso dell'energia che la rodopsina ha guadagnato assorbendo il fotone visibile [9] [8]. Una frazione di quest'energia guadagnata deve essere conservata nella batorodopsina al fine di essere sfruttata per far partire una serie di reazioni enzimatiche a cascata che, amplificando il segnale originario, generano l'impulso che arriverà al Sistema Nervoso Centrale [9].

La capacità di conservare una frazione significativa dell'energia assorbita dai fotoni visibili è una caratteristica di molte proteine responsabili di fondamentali processi biologici e può essere considerata il risultato di un lungo processo evolutivo. L'esempio discusso nella tesi, dimostra che la tecnica FSRS rappresenta un potente strumento per studiare i meccanismi molecolari ultrarapidi alla base di questi processi.

Bibliografia

- [1] C. V. RAMAN e K. S. KRISHNAN. “A New Type of Secondary Radiation”. In: *Nature* 121.3048 (mar. 1928), pp. 501–502. DOI: [10.1038/121501c0](https://doi.org/10.1038/121501c0). URL: <https://doi.org/10.1038/121501c0>.
- [2] Kerson Huang. *Statistical Mechanics*. en. 2^a ed. Nashville, TN: John Wiley & Sons, apr. 1987.
- [3] John David Jackson. *Classical Electrodynamics*. en. 3^a ed. Nashville, TN: John Wiley & Sons, lug. 1998.
- [4] Ji-Xin Cheng e Xiaoliang Sunney Xie, cur. *Coherent Raman Scattering Microscopy*. CRC Press, apr. 2016. DOI: [10.1201/b12907](https://doi.org/10.1201/b12907). URL: <https://doi.org/10.1201/b12907>.
- [5] Philipp Kukura, David W. McCamant e Richard A. Mathies. “Femtosecond Stimulated Raman Spectroscopy”. In: *Annual Review of Physical Chemistry* 58.1 (mag. 2007), pp. 461–488. DOI: [10.1146/annurev.physchem.58.032806.104456](https://doi.org/10.1146/annurev.physchem.58.032806.104456). URL: <https://doi.org/10.1146/annurev.physchem.58.032806.104456>.
- [6] Soo-Y. Lee et al. “Theory of femtosecond stimulated Raman spectroscopy”. In: *The Journal of Chemical Physics* 121.8 (ago. 2004), pp. 3632–3642. DOI: [10.1063/1.1777214](https://doi.org/10.1063/1.1777214). URL: <https://doi.org/10.1063/1.1777214>.
- [7] A Robert Martin et al. *From neuron to brain*. 6^a ed. Sinauer. New York, NY: Oxford University Press, mar. 2021.
- [8] Philipp Kukura et al. “Structural Observation of the Primary Isomerization in Vision with Femtosecond-Stimulated Raman”. In: *Science* 310.5750 (nov. 2005), pp. 1006–1009. DOI: [10.1126/science.1118379](https://doi.org/10.1126/science.1118379). URL: <https://doi.org/10.1126/science.1118379>.
- [9] Paul M. Champion. “Following the Flow of Energy in Biomolecules”. In: *Science* 310.5750 (nov. 2005), pp. 980–982. DOI: [10.1126/science.1120280](https://doi.org/10.1126/science.1120280). URL: <https://doi.org/10.1126/science.1120280>.