

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TRIESTE

DIPARTIMENTO DI FISICA

Corso di Laurea in Fisica



Studio della dinamica ultraveloce vibrazionale del cromoforo retinale e del suo contra-ione in fase liquida

Relatore:
Prof. Fulvio
PARMIGIANI

Correlatore:
Dott. Goran
ZGRABLIĆ

Candidato:
Nicola MAYER

ANNO ACCADEMICO 2013/2014

Abstract

Recenti studi hanno mostrato come l'interazione tra il cromoforo delle proteine retiniche e il suo contra-ione sia un fattore limitante per il processo di isomerizzazione ultraveloce che sta alla base di diversi sistemi biologici fotosensibili. Per studiare più nel dettaglio questo fenomeno, è stato costruito un nuovo setup ottico di spettroscopia ultraveloce che ha permesso l'individuazione di modi vibrazionali a bassa frequenza. Le vibrazioni individuate sono state assegnate a dei modi torsionali altamente delocalizzati lungo la catena del cromoforo. Tali vibrazioni sono state studiate per diverse concentrazioni di contra-ione, in maniera tale da evidenziare eventuali effetti su di esse da parte dell'ambiente circostante la molecola fotosensibile. Ciò ha permesso di concludere che questi modi non sono direttamente influenzati dal cambiamento strutturale dell'ambiente circostante, ma bensì dall'interazione elettrostatica tra il cromoforo e l'ambiente.

Indice

1	Introduzione	1
2	Il retinale e gli effetti dell'ambiente sulla sua fotoisomerizzazione	4
2.1	La funzione biologica del retinale	4
2.2	La dinamica del PSBR	7
2.2.1	Two-state model	7
2.2.2	Il ruolo dell'ambiente nella fotoisomerizzazione del retinale . .	8
2.2.3	L'isomerizzazione del retinale in soluzione	11
2.2.4	Dinamica dello stato eccitato del PSBR	13
2.2.5	Il ruolo e l'effetto del contra-ione	16
3	Processi ultraveloci su scala molecolare	24
3.1	Scattering Raman	24
3.2	Spettroscopia vibrazionale	26
3.3	Meccanismi di eccitazione impulsiva	29
3.4	Scopo dell'esperimento	33
4	Apparato sperimentale	36
4.1	Sorgente laser	36
4.1.1	Compressione dell'impulso	37
4.2	Pump-probe setup	41
4.3	Acquisizione dei dati	45
4.3.1	Calibrazione della lunghezza d'onda	46
4.4	Preparazione del campione	48
4.5	Cross phase modulation (XPM)	48
4.6	Caratterizzazione temporale e spaziale degli impulsi	50
4.7	Il germanato di rame CuGeO_3	51

5	Risultati	55
5.1	Regime di linearità	55
5.2	Matrici dei dati	55
5.3	Residui delle tracce cinetiche	56
6	Discussione	61
7	Conclusioni	64

Capitolo 1

Introduzione

In natura il retinale è il cromoforo, ovvero la molecola fotosensibile, di diverse forme di proteine retiniche come la *rodopsina* (Rh), il pigmento della retina visiva umana, o la *batteriorodopsina* (bR), la quale dopo essere illuminata con luce visibile sviluppa una forza proton-motrice che porta alla sintetizzazione dell'adenosina trifosfato (ATP) nell'*halobacterium salinarum*, un archeobatterio che vive in acque saline sature [15].

L'attività biologica di queste proteine retinali è innescata dalla fotoisomerizzazione ultraveloce del corrispondente cromoforo, che è una delle reazioni fotochimiche più veloci in natura (200 fs in Rh [7]).

In questo lavoro di tesi, si riporta uno studio della dinamica vibrazionale ultraveloce della base di Schiff protonata del retinale (PSBR) *all-trans*, essendo questa la forma più simile al cromoforo delle proteine retiniche.

Da un punto di vista fisico, una volta eccitata dal fotone la molecola compie una transizione elettronica in accordo con il principio di Franck-Condon e in seguito si rilassa lungo le coordinate di reazione dominate da modi torsionali e vibrazionali, sostanzialmente disaccoppiati tra di loro. Vari studi ([17], [3], [25]) hanno mostrato come l'ambiente proteico circostante il cromoforo eserciti un'influenza critica sull'efficienza e la selettività di questo processo ultraveloce; ai fini allora di una maggiore comprensione del suo ruolo, si può pensare di simulare l'ambiente proteico utilizzando come solvente il diclorometano DCM e come contra-ione l'acido trifluoroacetico TFA. Così facendo, l'influenza del micro-ambiente può essere studiata variando i rapporti molari retinale/contra-ione, aggiungendo quindi un ulteriore grado di libertà allo studio della dinamica di questo processo biologico.

La funzione biologica del retinale, i modelli teorici del processo di isomerizzazione e l'influenza dell'ambiente e del contra-ione sulla dinamica di questo processo fotochi-

mico sono approfonditi nel secondo capitolo della tesi.

Lo studio di processi ultraveloci (< 10 ps) richiede però delle tecniche spettroscopiche adeguate per poter individuare i modi vibrazionali più veloci e ricostruire la loro evoluzione nel dominio dei tempi. La spettroscopia dei transienti di assorbimento è una di queste tecniche risolte temporalmente ed è stata utilizzata in questo lavoro di tesi tramite un setup pump-probe, il quale permette di studiare il rilassamento del pacchetto d'onda variando il ritardo temporale tra due impulsi laser incidenti sul campione. Le tecniche e i meccanismi fisici principali che permettono lo studio dei processi ultraveloci sono oggetto del terzo capitolo della tesi.

L'ottimizzazione e la caratterizzazione del setup sperimentale, che è stato modificato in maniera tale da dotarlo della migliore risoluzione temporale possibile e permettere successivamente lo studio dei modi vibrazionali associati alla dinamica ultraveloce della fotoisomerizzazione del retinale in fase liquida, sono approfondite nel quarto capitolo della tesi.

Negli ultimi due capitoli infine sono riportati i risultati ottenuti e le relative discussioni e conclusioni tratte da essi.

Capitolo 2

Il retinale e gli effetti dell'ambiente sulla sua fotoisomerizzazione

2.1 La funzione biologica del retinale

La batteriorodopsina (bR), scoperta nel 1971 nella membrana viola dell'archeobatterio *Halobacterium halobium*, è un esempio di proteina fotosensibile *retinica*, la cui risposta alla luce è determinata dalla presenza di una molecola, comunemente indicata con il termine *cromoforo*, responsabile per l'assorbimento della radiazione visibile. Il retinale, legato covalentemente al gruppo amminico di un residuo di lisina della proteina retinica (Lys²¹⁶ nel caso della bR [15]), è un esempio di base di Schiff protonata. In biochimica, si parla di base di Schiff quando un gruppo amminico si lega al gruppo carbonilico di un aldeide o di un ketone, come in figura (2.1).

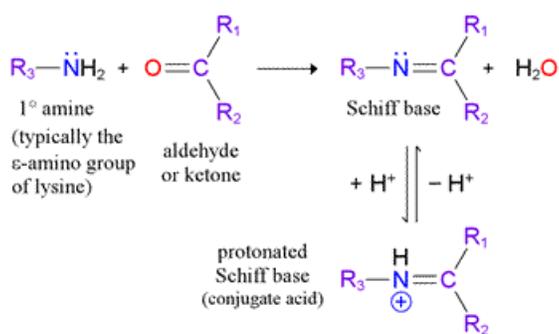


Figura 2.1: Formazione di una base di Schiff.

L'azoto del legame risultante può anche protonarsi, dando vita per l'appunto ad una base di Schiff protonata.

Dopo l'assorbimento di un fotone, la fotoisomerizzazione del cromoforo induce il ciclo biologico delle proteine retiniche, permettendo a diversi sistemi biologici di poter sfruttare la luce solare. In natura lo scopo ultimo e la funzione biologica di queste proteine varia, come d'altronde anche il tipo di isomerizzazione del cromoforo ad esse associato. Riportiamo di seguito alcuni esempi di queste proteine e delle fotoisomerizzazioni corrispondenti:

- **Batteriorodopsina (bR)** (*all-trans* \rightarrow *13-cis*): agisce come una pompa di protoni che porta alla sintetizzazione dell'ATP nell'*Halobacterium halobium* [15]. L'archeobatterio usa la proteina anche per estrarre informazioni date dalla luce e dalla sua composizione spettrale [15].

- **Rodopsina (Rh)** (*11-cis* \rightarrow *all-trans*): è il pigmento biologico principale nei bastoncelli fotoricettori della retina, ed ha la funzione di convertire i fotoni in segnali chimici che stimolano processi biologici nel sistema nervoso degli umani e di altri vertebrati, permettendogli di vedere la luce. Riportiamo la struttura della rodopsina in figura (2.3).

- **Halorodopsina** (*all-trans* \rightarrow *13-cis*): è simile alla bR, che agisce come una pompa cloruro fotoindotta nell'*Halobacteria*.

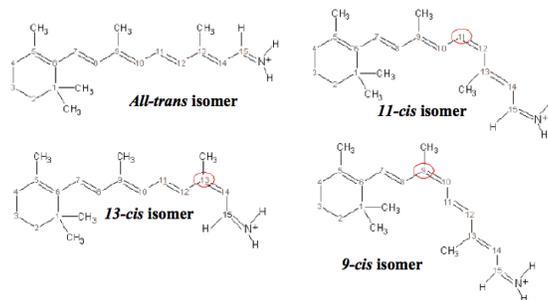


Figura 2.2: Diversi isomeri del retinale [31].

La rodopsina è un pigmento visivo, formato da una proteina transmembrana più grande chiamata *opsina* legata all'*11-cis* retinale. L'*opsina* di per sé non è in grado di assorbire la luce visibile, ma quando si lega al retinale formando la rodopsina si sviluppa una banda di assorbimento molto larga nella regione visibile dello spettro elettromagnetico, il cui massimo dipende dal tipo di residuo di lisina a cui il cromoforo si lega. La struttura cristallina della rodopsina è stata rivelata da Palczewski et

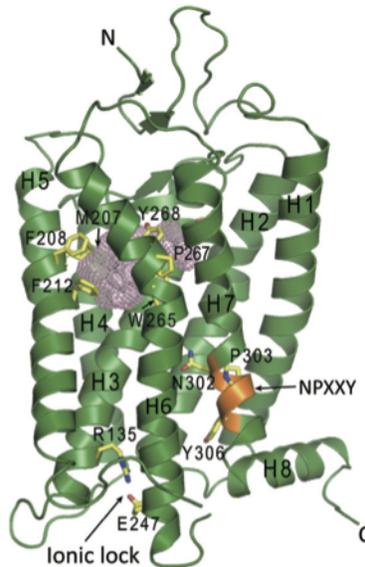


Figura 2.3: Struttura cristallina della rodopsina bovina nel suo stato fondamentale [43].

al. nel 2000 [23]: essa consiste di sette eliche trans-membrana (7TM) con tre regioni loop sia dalla parte extracellulare che da quella citoplasmatica. L'assorbimento di un fotone da parte del retinale 11-*cis* causa la sua isomerizzazione verso la forma all-*trans*. Questa transizione *cis-trans* porta la rodopsina allo stato eccitato, che decade attraverso una serie di stati intermedi e forma lo stato attivo metarodopsina II; in sostanza, il pigmento una volta attivato produce l'amplificazione a cascata del segnale alla base della visione umana. Passato il segnale, il pigmento di rodopsina deve riformarsi per permettere un nuovo ciclo all'arrivo di un nuovo fotone: questo significa rimpiazzare il retinale all-*trans* con l'11-*cis*, e ciò è possibile grazie al decadimento della metarodopsina II, che ha come prodotti finali, tra gli altri, il retinale all-*trans* e l'opsina, tra di loro separati [20].

La batteriorodopsina (bR) è anch'essa formata da un'opsina in questo caso legata però al all-*trans* retinale. La funzione della bR è quella di convertire l'energia della luce verde (500-650 nm) in un gradiente elettrochimico che di fatto agisce come una pompa di protoni e permette la sintesi dell'adenosina trifosfato (ATP). Sia nel batterio che nella Rh, il cromoforo ha uno spettro di assorbimento che l'evoluzione ha spinto, per questioni di efficienza fotosintetica, a sovrapporsi all'irradianza solare, che ricordiamo avere un picco vicino a 570 nm.

La geometria del retinale, la protonazione della base di Schiff, la sua interazione elet-

trostatica con le cariche circostanti e i dipoli determinano l'efficienza del processo di assorbimento. Quando per esempio il retinale è legato attraverso una base di Schiff non protonata in una soluzione di metanolo, il massimo dell'assorbimento del retinale all-*trans* si sposta a ~ 360 nm, mentre quando la base di Schiff è protonata, il massimo è a ~ 450 nm [15]. Questa modulazione del picco di assorbimento delle proteine retiniche è comunemente chiamato *opsin shift*. Di questo ne parleremo più avanti, soprattutto in relazione alla presenza del contra-ione. La struttura della bR è molto simile a quella della Rh, con la differenza che il retinale in questo caso isomerizza dalla forma all-*trans* alla 13-*cis*. Nella bR, l'isomerizzazione del cromoforo porta ad una deprotonazione della base di Schiff seguita da delle alterazioni nei gruppi protonabili nella batteriorodopsina; il cambiamento nel campo di forze induce quindi delle modifiche anche alla struttura terziaria, necessarie per il funzionamento della pompa di protoni. Lo scopo di questa tesi è studiare la fase *ultraveloce* del processo di isomerizzazione (< 1 ps).

2.2 La dinamica del PSBR

2.2.1 Two-state model

La fotoisomerizzazione ultraveloce del retinale è un processo di particolare interesse per il campo della biofisica, ed è stata ampiamente studiata in letteratura attraverso tecniche come *pump-probe* e *spettroscopia di fluorescenza ultraveloce* nelle proteine retiniche e in soluzione. Evidenze sia computazionali sia sperimentali hanno dimostrato come, per descrivere al meglio la fotoisomerizzazione del retinale *in vacuo*, il modello teorico migliore sia il *2-state/2-mode model*, a discapito dell'alternativo *3-state/3-mode model* [18], che non andremo ad approfondire. Di seguito noi considereremo il processo all-*trans* \rightarrow *cis*, ma il modello è applicabile anche per gli altri tipi di isomerizzazione. In accordo con il principio di Franck-Condon, il quale afferma che nelle transizioni elettroniche il moto dei nuclei vada considerato nullo, ci riferiremo a stati *elettronici*.

Denotiamo le due superfici di energia potenziale (PES) dello stato fondamentale e del primo stato eccitato rispettivamente con S_0 e S_1 , con riferimento alla figura (2.4). L'idea di fondo iniziale del modello è che la molecola è accelerata verso il canale di decadimento da una pendenza iniziale non nulla lungo la coordinata di reazione, dominata dal modo torsionale attorno al doppio legame. Sia nel *3-state* che nel *2-state model*, inizialmente la coordinata di reazione era assunta essere dominata dal moto torcente attorno al doppio legame reattivo. In contrasto con questa ipotesi, risultati

provenienti da computazioni sul cammino di reazione per i modelli PSB11 4-cis- γ -methylnona2,4,6,8-tetraeniminium cation e PSBT all-*trans*-hepta-2,4,6-trieniminium cation hanno mostrato come la coordinata di reazione del S_1 sia dominata sequenzialmente da due modi sostanzialmente disaccoppiati [18].

Dopo l'assorbimento del fotone, gli elettroni passano dallo stato fondamentale a quello eccitato in accordo con il principio di Frank-Condon, il quale afferma che durante una transizione elettronica il moto dei nuclei vada considerato nullo a causa della loro massa molto maggiore di quella elettronica¹. Il primo step è il rilassamento strutturale ultraveloce (< 50 fs) del retinale eccitato lungo i *stretching modes* totalmente simmetrici dei doppi legami $C=C$ e la compressione del legame singolo $C-C$. In altre parole, la molecola si rilassa dal punto di Franck-Condon (FC) al punto stazionario (SP), dove SP corrisponde a delle specie metastabili che sono più flessibili con i doppi legami centrali allungati, in maniera tale che l'isomerizzazione avvenga in maniera più efficiente.

Una volta completato il rilassamento iniziale, il secondo modo è asimmetrico ed è dominato dal moto torsionale attorno ad uno dei due doppi legami centrali del sistema. Notiamo come, lungo la coordinata di reazione, il moto di isomerizzazione del doppio legame non cominci immediatamente dopo l'eccitazione, ma solo dopo il rilassamento dello scheletro di carbonio del retinale. Una volta che le coordinate di reazione (che potrebbero essere per esempio la lunghezza dei legami per il primo modo e l'angolo di torsione per il secondo) della molecola raggiungono quelle dell'intersezione conica (CI) tra le superfici potenziali dello stato eccitato S_1 e del fondamentale S_0 , il retinale si trova davanti a due possibili strade per tornare allo stato fondamentale: tornare allo stato iniziale *all-trans*, oppure raggiungere un nuovo punto di equilibrio sulla superficie S_0 , corrispondente ad una conformazione *cis*.

2.2.2 Il ruolo dell'ambiente nella fotoisomerizzazione del retinale

L'esatto ruolo dell'ambiente nella fotoisomerizzazione del retinale a livello microscopico è tuttora oggetto di molti studi, tuttavia è dimostrata la sua influenza sulle proprietà fotochimiche del processo; in particolare i tempi caratteristici, e la selettività e l'efficienza dell'isomerizzazione. Per disaccoppiare la dinamica intramolecolare da quella intermolecolare e chiarificare la loro interazione, è necessario studiare la dinamica ultraveloce della isomerizzazione in funzione di diverse proprietà del sol-

¹Da un punto di vista semiclassico coincide con l'approssimazione di Born-Oppenheimer, che viene introdotta per poter separare le coordinate nucleari da quelle elettroniche e disaccoppiare il moto dei nuclei da quello degli elettroni.

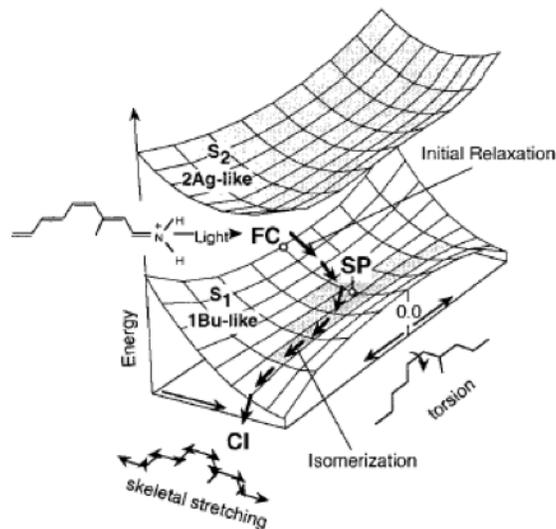


Figura 2.4: Struttura della superficie S_1 lungo la coordinata di reazione [31].

vente, come la viscosità o la costante dielettrica.

Gli effetti dell'ambiente possono essere distinti in *effetti statici*, ovvero quando il solvente cambia la geometria, la topologia e l'energia della CI (o la rimuove completamente come vedremo in seguito), e *effetti dinamici*, quando cambiamenti dei percorsi attorno a CI o potenziali dipendenti dal tempo influenzano in modo sostanziale il numero di molecole che effettivamente attraversano l'intersezione conica.

Le differenze principali osservate nel PSBR in proteina e in soluzione possono essere riassunte in:

a. Selettività della reazione: Come si può osservare dalla figura (2.2), il PSBR possiede cinque doppi legami attorno al quale può avvenire l'isomerizzazione. Becker et al. hanno già da tempo dimostrato come l'isomerizzazione nella batteriorodopsina avvenga selettivamente attorno al doppio legame $C_{13}=C_{14}$, mentre in contrasto in soluzione sia altamente non selettiva. In altre parole, mentre nella bR o nella Rh sono presenti soltanto transizioni *all-trans*→*13-cis* e *11-cis*→*all-trans* rispettivamente, il PSBR in soluzione può isomerizzare verso diversi possibili prodotti, tra cui l'*11-cis* risulta essere il più dominante [25]. Ben-Nun et al. [4] hanno tentato di spiegare questo comportamento, evidenziato per la prima volta da Childs e Shaw nel 1988 [9] e già studiato approfonditamente da Koyama et al., individuando come causa della selettività del legame la topografia delle PES nelle vicinanze delle intersezioni coniche tra gli stati elettronici fondamentali e eccitati. A riprova di ciò, le due CI di

minima energia rilevanti per l'isomerizzazione attorno ai legami $C_{13}=C_{14}$ e $C_{11}=C_{12}$, riportate in figura (2.5), sono iso-energetiche e coincidono con un minimo locale dello stato elettronico eccitato S_1 , ma la loro topografia locale è qualitativamente diversa, così come la selettività del legame.

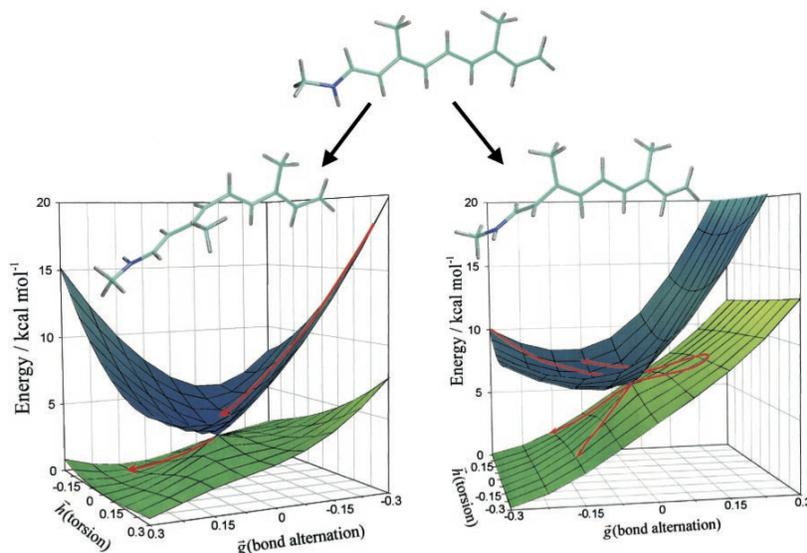


Figura 2.5: Gli stati elettronici fondamentali e primi eccitati del PRSB in funzione delle due coordinate di reazione dominanti. Si possono osservare le CI del legame $C_{11}=C_{12}$ (a sinistra) e del $C_{13}=C_{14}$ (a destra). L'intersezione conica del $C_{13}=C_{14}$ ha una topografia inclinata, mentre l'intersezione conica del $C_{11}=C_{12}$ è fortemente piccata. Le frecce disegnate sulle PES indicano qualitativamente la dinamica prevista del pacchetto d'onda [4].

b. Efficienza della fotoisomerizzazione: La resa quantistica della fotoisomerizzazione Φ_{iso} (di un isomero A) è definita come il numero di molecole dell'isomero di partenza A che si trasformano a causa dell'isomerizzazione per numero di fotoni assorbiti [25]. Moltteplici misure di Φ_{iso} hanno mostrato che in ambiente proteico l'efficienza del processo sia alta ($> 50\%$), mentre in soluzione è molto più bassa ($< 20\%$ per la maggior parte dei solventi) [25, 17]. Una discussione più dettagliata di questo meccanismo è rimandata al paragrafo successivo.

c. Tempi caratteristici: Come visto nel paragrafo precedente, in accordo con la dinamica suggerita dal *two-state model* l'isomerizzazione può essere distinta in tre fasi. La prima corrisponde al rilassamento FC \rightarrow SP, la seconda alla redistribuzione dell'energia vibrazionale dall'iniziale *stretching* sul SP, e, infine la terza al decadi-

mento che indica un'evoluzione della specie S_1 verso CI. I tempi di rilassamento corrispondenti alle tre fasi sono stati misurati e si è osservato come questi processi avvengano con diverse scale temporali a seconda che il retinale si trovi in soluzione o in proteina. Misure di spettroscopia in assorbimento nel dominio dei femtosecondi sul retinale PSB in etanolo (PSBT) [19] mostrano una depopolazione ultraveloce della regione FC (< 100 fs), seguito da una redistribuzione dell'energia che dura ~ 300 fs e un decadimento di pochi picosecondi da S_1 a CI. Anche se studi dello spettro Raman in risonanza [18] suggeriscono che il campo di forze che controlla la dinamica iniziale del retinale PSB11 in soluzione e in Rh sia simile, il successivo moto torsionale non lo è, e infatti le vite medie di S_1 nella cavità della proteina (150-200 fs) e in soluzione (2-3 ps) sono sostanzialmente diverse. Secondo González-Luque et al. [18], questo poteva essere dovuto alla presenza di un lungo *plateau* di energia e/o di una piccola barriera lungo il moto torsionale; questa barriera potrebbe essere più piccola o addirittura sparire quando il cromoforo è chiuso nella cavità della proteina, accelerando così la velocità di reazione. Studi successivi hanno però escluso una dipendenza della rendita Φ_{iso} dalla velocità di reazione [6].

2.2.3 L'isomerizzazione del retinale in soluzione

Le considerazioni fatte finora ci hanno mostrato come l'effetto netto dell'ambiente sul processo fotochimico in esame investa molteplici e diversi aspetti della dinamica del cromoforo. Uno studio comprensivo a riguardo è stato compiuto da Becker e Freedman nel 1984 [17], che hanno determinato l'efficienza quantistica Φ della fotoisomerizzazione, concentrandosi sugli effetti della protonazione, oltre che della polarità e dei legami ad idrogeno che i solventi possono formare. Successivamente nel '91, Koyama et al. [25] hanno continuato il lavoro dei loro predecessori, mettendo in luce diversi aspetti fino ad allora sconosciuti della dinamica del retinale in soluzione. Di seguito riportiamo quindi i risultati più rilevanti di questi due lavori, ricordando che il nostro studio si concentrerà sul diclorometano (DCM). Le proprietà e le strutture molecolari di questo solvente e dell'ACN e DMSO, due altri solventi utilizzati in studi sul retinale, sono riportate in figura (2.6) e in tabella 1.

Ora definiamo le seguenti grandezze:

- Φ' (**isomero A** \rightarrow **isomero B**): è definito come il numero di molecole dell'isomero B prodotte a partire dalle molecole di isomero A per il numero di fotoni

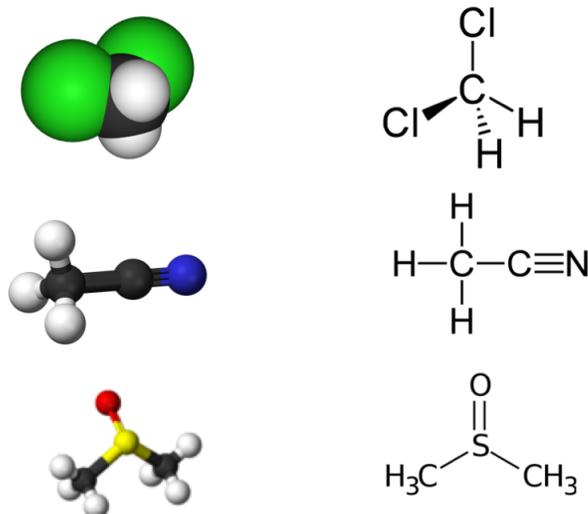


Figura 2.6: Le strutture steriche dei tre solventi utilizzati: DCM (in alto), ACN (in mezzo) e DMSO (in basso).

assorbiti; in generale si può quindi dire che $\sum_i \Phi'_i = \Phi_{iso}$.

- **Isomerizzazione singola/doppia/tripla:** quando solo una (o due o tre) specie di isomeri è/sono prodotta/e dall'isomero di partenza. Notiamo che se $\Phi' = \Phi_{iso}$, questo significa avere una isomerizzazione singola.

- **Isomerizzazione A→B unilaterale:** quando, considerati due isomeri A e B, l'isomerizzazione B→A è trascurabile in confronto a A→B.

- **Isomerizzazione mutuale:** quando l'isomerizzazione in un verso è comparabile a quella nel verso opposto.

Le misure di Koyama et al. e di Becker e Freedman sono state effettuate sulla base di Schiff protonata (PSBR) e non protonata (SBR) del retinale, che è possibile distinguere spettroscopicamente grazie alla loro differenza in valori dei massimi spettrali λ_{max} ($\lambda_{max}^{PSBR} \geq \lambda_{max}^{SBR}$). Confrontando i percorsi di isomerizzazione di PSBR e SBR nei diversi solventi[25], emerge che lo stato protonato del retinale possa formarsi sia per protonazione diretta che attraverso un alcool, formando un legame ad

idrogeno.

Inoltre, confrontando tra di loro le rendite Φ'_{iso} e Φ_{iso} (tabella 2.2), si può vedere come il PSBR in MeOH presenti una tripla isomerizzazione dell'*all-trans* verso 9/11/13-*cis*, mentre in acetonitrile l'isomerizzazione è doppia e il 9-*cis* è un prodotto secondario; in ogni caso, l'11-*cis* mostra la rendita Φ'_{iso} più alta per entrambi. Spicca anche il fatto che in ACN la rendita Φ_{iso} sia più alta di quella in MeOH; a riguardo è interessante notare che i due solventi possiedono proprietà simili, ma si differenziano per l'abilità di formare (MeOH) o meno (ACN) legami ad idrogeno. Da questo punto di vista, l'acetonitrile è più simile all'ambiente che racchiude il cromoforo nella proteina e inoltre è più semplice da studiare data l'assenza di legami ad idrogeno.

2.2.4 Dinamica dello stato eccitato del PSBR

Lo studio della dinamica dello stato eccitato del PSBR è stata compiuta estensivamente da vari studi attraverso tecniche ultraveloci come la *spettroscopia di assorbimento* [19] e di *fluorescenza* [40].

Ricordiamo nuovamente le tre fasi distinte nel decadimento della molecola eccitata: la popolazione della regione FC, la ridistribuzione dell'energia vibrazionale e il rilassamento attraverso i diversi modi torsionali. Inaspettatamente, in un esperimento di pump-probe sul PSBR in etanolo fu osservato un comportamento non previsto di quest'ultima fase: in principio, il raggiungimento di uno stato vibrazionale rilassato come S_1 dovrebbe portare ad una velocità di reazione indipendente dal tempo, ovvero dovrebbe essere possibile osservare un decadimento mono-esponenziale delle molecole eccitate per tempi di delay molto alti; invece, la cinetica di decadimento del S_1 mostrava un decadimento a due canali. Hamm et al. [19] diedero una possibile spiegazione di questo strano comportamento riconducendo la presenza dei due canali a due minimi locali separati sulla superficie di energia S_1 , uno corrispondente al cammino reattivo (cioè il cammino di isomerizzazione) e uno al non-reattivo (ovvero la reazione inversa verso la configurazione *all-trans*).

Al fine di comprendere al meglio la dinamica e il percorso di reazione del processo di isomerizzazione, e come questi sono influenzati dall'ambiente, tecniche come la spettroscopia di fluorescenza ultraveloce hanno il vantaggio di connettere soltanto le superfici dello stato fondamentale e di quello eccitato, rendendo l'osservazione in principio più semplice. Uno studio dettagliato dello spettro di assorbimento dello stato stabile e della fluorescenza del retinale *all-trans* in diversi solventi è stato compiuto da Zgrablic et al. [40], usando lunghezze d'onda di eccitazione pari a 400 e 570 nm. Una decomposizione spettrale dettagliata, ha permesso a Zgrablic et al. [40] di individuare tre componenti spettrali, le cui costanti di decadimento sono riportate

in tabella:

- **Componente spettrale a:** legata alla fluorescenza del rilassamento vibrazionale dello stato S_1 . Rappresenta le transizioni dal livello vibrazionale $\nu = 0$ di S_1 ai livelli vibrazionali del ground state S_0 ($\nu^* = 0 \rightarrow \nu = 0, 1, 2..$).
- **Componente spettrale b:** legata alla fluorescenza del S_1 eccitato vibrazionalmente.
- **Componente spettrale c:** legata alla fluorescenza dello stato S_2 ; è un emissione più alta che è soggetta ad evoluzione spettrale sui 300-400 fs.

Per quanto riguarda la componente spettrale principale **a**, questa mostra come già accennato un decadimento inaspettato per lo stato vibrazionale rilassato S_1 . Infatti, a 400 nm di eccitazione, per la maggior parte dei solventi il decadimento può essere descritto da una tri-esponenziale, con la notevole eccezione di un decadimento a due canali per ACN (sia a 400 che a 570 nm) e di DCM a 570 nm (denoteremo d'ora in poi i canali come I-II-III). Dal confronto tra questi due solventi, quelle che emerge è che la fluorescenza di S_1 deriva da un'ipersuperficie complessa con probabilmente tre minimi, in aggiunta alla fluorescenza *calda* legata alla componente spettrale secondaria **b**, ognuno di essi corrispondente ad un canale di decadimento radiativo la cui relativa popolazione (governata da fattori pre-esponenziali) cambia a seconda dell'energia di eccitazione e del solvente. I canali I e III sono i canali non reattivi, mentre il canale II è quello reattivo assegnato alla isomerizzazione. Dalla tabella (2.1), si può notare inoltre come il canale I non reattivo sia il più veloce tra i tre.

Alla luce di queste considerazioni, è stato proposto quindi un modello teorico, ispirato da quello di Gonzalez-Luque et al. [18], per la dinamica dello stato eccitato in bR. Riferendosi alla figura (2.7) che rappresenta schematicamente la situazione, si può notare che:

- 1): Dopo la fotoeccitazione, abbiamo un rilassamento iniziale (< 50 fs) che include un'espansione dei doppi legami e una compressione dei legami singoli.
- 2): Il pacchetto d'onda nucleare, a partire dalla regione di Franck-Condon (FC) continua a rilassarsi lungo la coordinata di isomerizzazione incontrando una piccola barriera di attivazione sulla PES del S_1 . La barriera è all'origine di uno stato eccitato intermedio, conosciuto in letteratura come stato fluorescente I.
- 3): Le molecole che sorpassano la barriera seguono poi una isomerizzazione senza

	ACN	DCM	MeOH
ϵ_r	35.94	8.93	32.66
n_d	1.342	1.421	1.327
μ (mPa.s)	0.345	0.401	0.547
τ_{rise1}/fs	< 30 (0.58)	< 30 (0.68)	< 30 (0.45)
τ_{rise2}/fs	190 (0.42)	130 (0.32)	110 (0.55)
τ_{nr1}/ps (canale I)	-	1.0 (0.2)	0.6 (0.18)
τ_r/ps (canale II)	3.9 (0.30)	3.7 (0.45)	2.8 (0.36)
τ_{nr2}/ps (canale III)	7.8 (0.70)	6.7 (0.35)	5.2 (0.46)

Tabella 2.1: I valori in ogni riga sono: costante dielettrica statica ϵ_r , viscosità assoluta μ , indice di rifrazione n_d , costanti di decadimento e rise τ_i e relative ampiezze (tra parentesi) dell' i -esimo canale della banda \mathbf{a} . Le vite medie sono date con le seguenti incertezze: $\tau_{rise1} \pm 20 fs$, $\tau_{rise2} \pm 50 fs$, $\tau_{nr1} \pm 0.1 ps$, $\tau_r \pm 0.1 ps$, $\tau_{nr2} \pm 0.2 ps$ [40, 41].

		Φ'_{iso}			Φ_{iso}
		9-cis	11-cis	13-cis	
ACN	<i>all-trans</i>	0.01	0.25	-	0.27±0.04
MeOH	<i>all-trans</i>	0.02	0.14	0.01	0.17±0.03
DMSO	<i>all-trans</i>	-	-	-	0.24±0.03
DCM	<i>all-trans</i>	-	-	-	0.17±0.02

Tabella 2.2: Rendite delle isomerizzazioni verso i diversi possibili prodotti e rendita totale per diversi solventi [2].

barriere fino ad arrivare alla intersezione conica CI tra le PES di S_0 e S_1 .

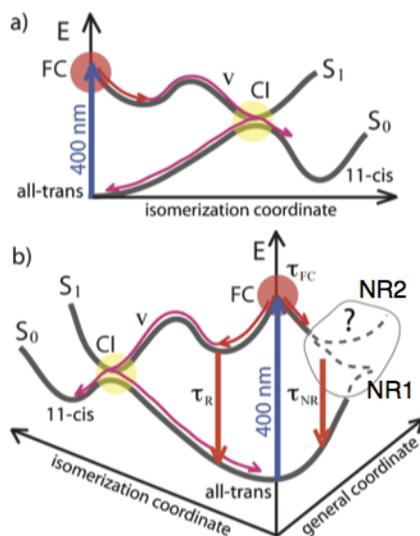


Figura 2.7: Modello a tre step per l'isomerizzazione del PSBR all-trans a) in bR e b) in solvente [40].

La fotofisica del PSBR si complica però andando dalla proteina al solvente, con la nascita di un'ulteriore diramazione vicino al punto FC. La popolazione in questo caso si divide tra canali reattivi e non; la popolazione reattiva dopo l'iniziale rilassamento segue un modello a tre step come quello appena presentato, anche se con una dinamica più lenta. Si capisce quindi che per trovare Φ_{CI} dev'essere possibile isolare la popolazione reattiva mentre si seguono i percorsi vicini al punto topologico CI. Per quanto riguarda invece i canali non reattivi, ci sono ancora pochi studi in letteratura su di essi; come vedremo però nel prossimo paragrafo, questi canali sono accoppiati all'interazione della base di Schiff con il proprio contra-ione. Nel paragrafo seguente andremo quindi ad analizzare l'effetto del contra-ione sulla fotoisomerizzazione del retinale.

2.2.5 Il ruolo e l'effetto del contra-ione

Tra gli altri possibili effetti dell'ambiente, l'interazione del cromoforo retinale cationico con il suo contra-ione sembra giocare un ruolo cruciale nella caratterizzazione delle sue proprietà fotochimiche e fotofisiche. Infatti, dato che S_1 è (rispetto a S_0)

un *charge-transfer state*² (*B_u - like*), la sua energia e la sua stabilità rispetto agli stati covalenti S_0 e S_2 devono dipendere dall'interazione con il contra-ione e dalla sua posizione relativa rispetto allo scheletro del cromoforo [8].

I primi modelli qualitativi dell'interazione del retinale con il contra-ione delineano l'influenza di questo su diversi fattori, tra i quali i) la relativa stabilità degli stati S_0 , S_1 e S_2 , ii) la selezione dello stato eccitato rilevante da un punto di vista fotochimico, iii) l'efficienza e la velocità della reazione, iv) il controllo della stereospecificità³ della fotoisomerizzazione e v) il già citato *opsin shift* [8].

Modelli elettrostatici qualitativi e computazionali dell'interazione hanno concluso che il posizionamento di un contra-ione vicino al cromoforo ha l'effetto di stabilizzare/destabilizzare grazie al suo campo elettrostatico gli stati (S_0 , S_1 , S_2) a seconda della distanza tra i centri di carica negativi (contra-ione) e positivi (cromoforo). In particolare, la vicinanza del contra-ione alla coda di carbonio (**C-tail**) o alla testa di azoto (**N-head**) del retinale comporta l'abbassamento e l'innalzamento dei gap di energia tra i tre stati, portando ad un anticipo (**N-Head**) o ritardo (**C-tail**) dell'intersezione conica lungo il cammino di isomerizzazione del charge-transfer state S_1 e ad un cambiamento della sua pendenza (come rappresentato in figura (2.8)) [7].

La posizione del contra-ione sembra quindi essere uno strumento adatto per modulare la velocità di fotoisomerizzazione, l'efficienza e la scelta del legame $C=C$ reattivo: è solo quando il contra-ione è posto in posizione centrale o i suoi effetti sono repressi che l'efficienza della fotoisomerizzazione è aumentata e vengono aperti dei canali di decadimento ultraveloci (cioè senza barriere); d'altra parte, le interazioni elettrostatiche del contra-ione con la **N-Head** o la **C-tail** risultano in fotoisomerizzazioni e decadimenti più lenti e meno efficienti[7].

Opsin shift

L'effetto chiamato opsin shift si riferisce alla differenza osservata tra il massimo spettrale λ_{max} del PSBR in soluzione e in proteina. E' grazie a questa modulazione spettrale che l'occhio umano si distingue nel regno animale per la varietà di sfumature di colori che è in grado di distinguere; basta pensare che i pigmenti nei bastoncelli mediano la nostra visione notturna con un λ_{max} di 500 nm, mentre i coni che contengono i tre pigmenti dietro alla visione dei colori hanno un massimo di assorbimento che corrisponde alle regioni *blu* ($\lambda_{max}=425$ nm), *verde* ($\lambda_{max}=533$ nm) e *rossa* ($\lambda_{max}=560$ nm) [34].

²Un charge-transfer (CT) state è uno stato legato formato da un elettrone e da una buca elettronica, attratti reciprocamente dalla forza Coulombiana elettrostatica.

³La stereospecificità è la proprietà di una stessa reazione chimica di generare stereoisomeri diversi a partire da stereoisomeri diversi.

Excited State Photoisomerization Profiles

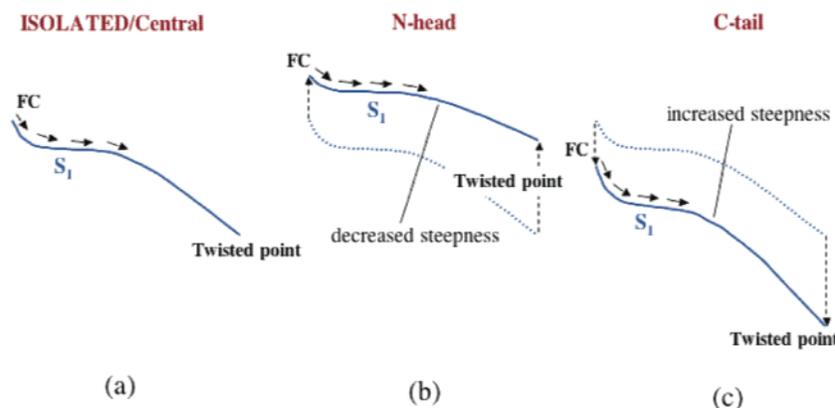
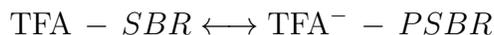


Figura 2.8: Effetti del contra-ione sulla fotoisomerizzazione dello stato eccitato. In figura è riportato il profilo della fotoisomerizzazione, a seconda che il contra-ione sia posizionato a) centralmente, b) vicino al **N-head** o c) vicino al **C-tail** [7].

In generale sono stati individuati quattro fattori che contribuiscono agli spostamenti spettrali osservati; questi includono gli effetti del contra-ione (o un cambiamento nelle interazioni elettrostatiche del cromoforo con il solvente e la proteina), interazioni di carica specifiche, interazioni dispersive ed eventuali cambiamenti strutturali nella conformazione del cromoforo. Questo ultimo contributo in particolare deriva dalla delocalizzazione della densità di carica lungo la catena del poliene; la delocalizzazione nello stato eccitato dipende dal torcersi della catena attorno ai legami singoli e doppi. Se ciò avviene attorno ai legami singoli, si ottiene uno spostamento netto del massimo verso il blu, mentre la torsione attorno ai legami doppi causa uno spostamento verso il rosso.

A riguardo è interessante riportare lo studio computazionale compiuto da Rajamani et al. [34], che hanno studiato il meccanismo dell'ospin shift misurando gli spostamenti spettrali dovuti al trasferimento del cromoforo da una soluzione in metanolo al sito legante della base di Schiff dell'opsina, indagando gli effetti di diversi residui presenti nell'ambiente proteico che sono localizzati vicino alla base di Schiff protonata, lungo la catena del poliene del retinale. Questi residui causano gli spostamenti di riga del massimo spettrale attraverso una serie di effetti elettronici, tra cui la già riportata stabilizzazione o meno relativa degli stati, l'abbassamento o innalzamento del gap di energia tra questi, l'indebolimento delle interazioni elettrostatiche con la

l'idea che la perdita di fotoselettività sia dovuta alla formazione del complesso ionico tra il PSBR e il contra-ione TFA. Infatti, l'interazione a legame a idrogeno tra la coppia acido-base tra il gruppo donatore OH del TFA e il gruppo C=N del SBR causa la protonazione dell'atomo di azoto della base di Schiff secondo l'equilibrio



dando luce ad una coppia ionica [PSBR, TFA⁻]. La fotochimica del PSBR nei diversi solventi è studiata con un eccesso di 3-5 volte di TFA e in queste circostanze ci si aspetta la formazione di dimeri di TFA aperti o ciclici caratterizzati da un'ampia vibrazione diversa in frequenza sul legame ad idrogeno tra le due unità di TFA. La diversità di questa vibrazione può essere allora utilizzata come indicatore della formazione di un'interazione tramite legami ad idrogeno con il PSBR. Variando il rapporto molare cromoforo/acido (*chromophore-to-acid ratio* - *C/A*) nel range tra 1:1 e 1:2, lo studio ha mostrato che per un C/A 1:1 avviene la formazione di una coppia ionica [PSBR, TFA⁻] tra la base di Schiff protonata e il contra-ione, mentre aumentando la concentrazione si forma effettivamente un aggregato con due legami ad idrogeno [PSBR, TFA⁻]TFA [29].

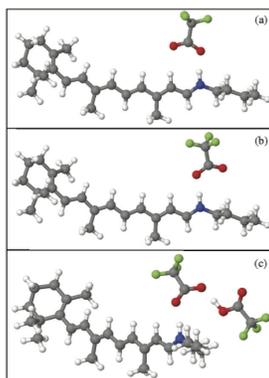


Figura 2.10: La struttura minima di energia di [PSBR, TFA⁻] (a), la struttura di un minimo locale di [PSBR, TFA⁻] $E = 0.41 \text{ kcal/mol}$ maggiore in energia (b) e la struttura minima in energia di [PSBR, TFA⁻]TFA (c)[29].

Come visto in precedenza, la dinamica dello stato eccitato del PSBR è di tipo multiesponenziale e comprende due canali non reattivi e uno reattivo. Dei due non reattivi, il più veloce agisce su una scala dai femtosecondi ai picosecondi. Questo rilassamento non-reattivo veloce è il principale meccanismo di diseccitazione del PSBR in solventi non polari come il DCM e ci si aspetta che sia influenzato dalla interazione

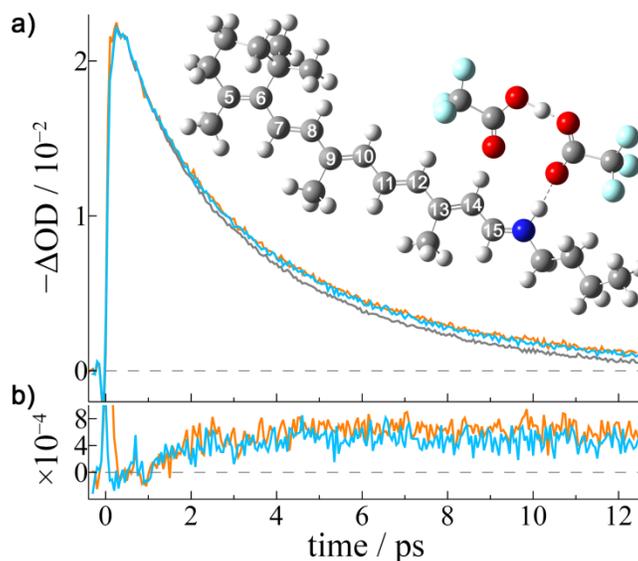


Figura 2.11: Traccia cinetica normalizzata mediata nel range 670 ± 5 nm per tre rapporti diversi di concentrazione SBR-TFA: 1:1 in grigio, 1:2 in blu, 1:4 in arancione. E' riportato inoltre la coppa ionica $[PSBR, TFA^-]TFA$ [30].

elettrostatica del retinale con il contra-ione e il solvente [30]. In particolare, gli effetti elettrostatici derivano dalla redistribuzione di carica nello stato S_1 : la carica positiva migra verso la testa di carbonio mentre i contra-ioni carichi negativamente lungo lo scheletro del retinale regolano la stabilità del S_1 . Questo spostamento di carica sembra essere uno dei fattori principali che rendono il canale veloce non-reattivo quello dominante nella fotodinamica del PSBR in DCM.

Uno studio *pump-probe* ha mostrato come la vita media dello stato eccitato rallenti di 120 fs per il PSBR in DCM, passando da un CC 1:1 a 1:2, riflettendo per l'appunto la formazione del complesso ionico $[PSBR, TFA^-]TFA$ [30]. Ad un CC 1:4 non si trovano sostanziali differenze, non potendosi formare altre strutture molecolari oltre a quelle già presenti (figura (2.11)); anche in DMSO il decadimento non è alterato dalla CC, a riflettere l'impossibilità della formazione di una coppia ionica. Per osservare la dinamica di rilassamento degli stati eccitati è possibile approssimare il decadimento del PSBR con una funzione mono-esponenziale per tempi maggiori di 1 ps. Si possono così ottenere informazioni su come la vita media cambi in funzione del rapporto di concentrazione cromoforo-contraione. L'aumento delle costanti di decadimento da $\tau_{1:1} = 3240 \pm 20$ fs a $\tau_{1:2} = 3355 \pm 25$ fs e $\tau_{1:4} = 3360 \pm 20$ fs in DCM implica allora che la dinamica dello stato eccitato rallenti del 3.7% andando da $[PSBR, TFA^-]$ a $[PSBR, TFA^-]TFA$.

L'interazione con il contra-ione TFA e la formazione del complesso ionico retinale-dimero potrebbe inoltre influenzare la redistribuzione dell'energia vibrazionale nei diversi gradi di libertà nucleari. Uno studio della fluorescenza risolta in tempo dello stato eccitato del PSBR all-trans in diversi solventi ha permesso l'osservazione di vibrazioni coerenti ad un'eccitazione di 400 nm [39]. Questi modi torsionali, tra i 100 e i 120 cm^{-1} , sembrano essere eccitati impulsivamente dal loro accoppiamento con modi a più alta frequenza. Ovvero, quando il cromoforo viene eccitato con una grande energia in eccesso, si rilassa ripartendo l'energia vibrazionale sui diversi modi inclusi quelli a più bassa frequenza, mentre, quando il cromoforo è eccitato a 570 nm, non essendoci energia in eccesso, solo i modi vibrazionali a più alta frequenza vengono eccitati.

Nel capitolo seguente si introducono quindi le tecniche spettroscopiche che permettono uno studio approfondito della dinamica ultraveloce del retinale e dei suoi modi vibrazionali.

Capitolo 3

Processi ultraveloci su scala molecolare

L'uso di tecniche di spettroscopia ultraveloci è necessario e fondamentale per ottenere una adeguata risoluzione temporale atta a osservare la dinamica ultraveloce di processi fotochimici.

In questo capitolo si esporranno quindi le tecniche e i meccanismi fisici principali che permettono lo studio di questi processi.

3.1 Scattering Raman

Quando la luce interagisce con la materia, i fotoni possono essere assorbiti, diffusi oppure non interagire. Nel caso di assorbimento del fotone la molecola studiata può passare ad uno stato eccitato.

Si può intuire come a seconda dell'energia del fotone incidente la transizione possa avvenire tra livelli di diverso tipo.

Tipicamente, se la luce incidente è nella regione dei microonde o del lontano infrarosso (numeri d'onda compresi tra 1 e 10^2 cm^{-1}), avviene una transizione tra livelli rotazionali appartenenti allo stesso stato elettronico e vibrazionale. Nella regione dell'infrarosso ($10^3 - 10^4 \text{ cm}^{-1}$) la transizione agisce invece tra livelli vibrazionali dello stesso stato elettronico, infine nelle regioni spettrali visibile e UV le transizioni avvengono tra livelli elettronici.

E' possibile però che la luce venga diffusa e in tal caso possono aver luogo due tipi distinti di processi (figura (3.1)):

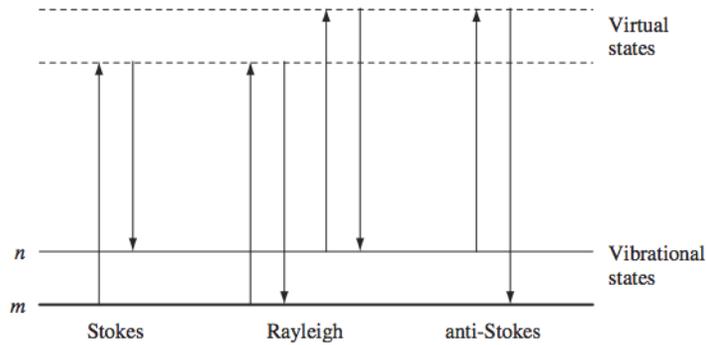


Figura 3.1: Diagramma dei processi di scattering Rayleigh e Raman [26].

- **Scattering Rayleigh:** E' un caso di diffusione elastica, dove c'è soltanto una distorsione della nuvola elettronica attorno ai nuclei della molecola e i fotoni vengono diffusi con la stessa frequenza incidente ν_{inc} o comunque con piccoli spostamenti spettrali $\Delta\nu$. Questo tipo di diffusione è il processo dominante e nelle molecole è detto per l'appunto *scattering Rayleigh*.

-**Scattering Raman:** E' un processo di diffusione inelastica, dove viene indotto del moto nucleare e c'è uno scambio di energia tra molecola e fotone: l'energia del fotone diffuso in questo caso cambia quindi di un'unità di energia vibrazionale. E' un processo ottico non-lineare e quindi intrinsecamente poco intenso. Infatti in termini di probabilità, il processo Raman ha luogo ogni $10^6 - 10^8$ fotoni diffusi. A seconda che il fotone acquisti o perdi energia, si ottengono i due possibili casi dello scattering Raman: lo scattering Stokes, quando il processo porta ad un assorbimento di energia da parte della molecola che viene di conseguenza promossa dal ground state $|m\rangle$ allo stato vibrazionale di energia più alta $|n\rangle$ e scattering anti-Stokes, quando il decadimento di molecole che a causa dell'energia termica già popolano lo stato $|n\rangle$ al ground state $|m\rangle$ porta ad un trasferimento di energia al fotone incidente. Le relative intensità dei due processi dipende dalla popolazione dei diversi stati, la cui distribuzione segue quella di Boltzmann.

Lo scattering Raman ha origine nel cambiamento della polarizzabilità delle molecole o della suscettibilità dei cristalli da parte del fonone (o altre quasi-particelle). Riferendosi alla figura 3.2, in presenza di un campo elettrico applicato $E(\omega)$ la polarizzabilità α_0 degli orbitali porta ad un momento di dipolo $P_D(\omega) = \alpha_0 E(\omega)$ che agisce come sorgente per un'onda elettromagnetica che decade nel tempo e nello spa-

zio. Se la molecola sta vibrando con una frequenza Ω , la distanza tra i due atomi cambierà periodicamente e la polarizzabilità sarà quindi modulata. In questo caso, si ottiene

$$\mathbf{P}_D(\omega) = (\alpha_0 + \alpha_1 \cos \Omega t) \mathbf{E}_0 \cos(\omega t)$$

che con una semplice regola trigonometrica diventa

$$\mathbf{P}_D(\omega) = \alpha_0 \mathbf{E}_0 \cos \omega t + (\alpha_1 \mathbf{E}_0 / 2) [\cos(\omega + \Omega)t + \cos(\omega - \Omega)t]$$

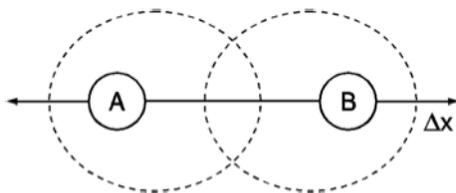


Figura 3.2: Rappresentazione schematica dell'effetto Raman per una molecola diatomica [26].

L'onda elettromagnetica oscilla quindi non solo alla frequenza ω ma anche con le due frequenze laterali $\omega \pm \Omega$, che rappresentano i processi Stokes e anti-Stokes. I fotoni, una volta scatterati, possono quindi essere osservati collezionando la luce ad un certo angolo rispetto al raggio incidente e le informazioni ottiche ricavate possono essere utilizzate per l'identificazione delle proprietà fisiche del campione studiato: è questa l'idea di fondo della *spettroscopia vibrazionale*.

3.2 Spettroscopia vibrazionale

Con il termine spettroscopia vibrazionale solitamente si intendono due tecniche per misurare i modi vibrazionali di una molecola associati ai legami chimici tra i suoi nuclei:

- **Spettroscopia Raman:** quando la molecola viene irradiata da una radiazione a frequenza ν_{inc} , i fotoni subiscono una diffusione anelastica (*Raman scattering*) e vengono diffusi con una frequenza più bassa o più alta attraverso lo scambio di un quanto di energia vibrazionale ($\omega \pm \Omega$). Come visto nel caso diatomico precedente,

i cambiamenti di energia rilevati sono dovuti al moto nucleare causato dalla polarizzazione indotta dalla luce incidente. Notiamo come la tecnica non richieda che la frequenza incidente corrisponda ad una particolare frequenza vibrazionale.

- **Spettroscopia IR:** In questo caso la luce infrarossa, che copre un certo intervallo di frequenze, è diretta sul campione e verrà assorbita in corrispondenza di un matching tra ν_{inc} e un modo vibrazionale ω_{if} ; la molecola è quindi promossa ad uno stato vibrazionale eccitato: ciò che viene rilevato è proprio la perdita di questa particolare frequenza della radiazione una volta superato il campione.

Come già visto, un fotone potrà contribuire ad un processo Raman soltanto se causa una variazione nella polarizzabilità della nuvola elettronica; questo dipenderà dalla deformazione meccanica indotta nella molecola o nella cella unitaria di un cristallo.

In figura (3.3), Q fa riferimento alle diverse possibili deformazioni indotte in diversi tipi di molecola. Come si può notare, le deformazioni asimmetriche comportano un cambiamento del momento di dipolo \mathbf{P}_D della molecola; le vibrazioni di questo tipo sono visibili con la tecnica IR e sono dette *IR-active*. La polarizzabilità in una vibrazione asimmetrica invece non cambia, essendo il cambiamento di polarizzazione da una parte della molecola compensato dall'altro.

Al contrario, le vibrazioni simmetriche comportano una variazione della polarizzazione: sono quindi visibili alla tecnica Raman e sono dette *Raman-active*. Ovviamente, le vibrazioni possono anche essere attive o inattive per entrambe le tecniche.

molecole					
vibration					
change of α with Q					
$\frac{d\alpha}{dQ}$	$\neq 0$	$\neq 0$	$\neq 0$	$= 0$	$= 0$
Raman active	yes	yes	yes	no	no
change of \bar{P}_D with Q					
$\frac{d\bar{P}_D}{dQ}$	$= 0$	$\neq 0$	$= 0$	$\neq 0$	$\neq 0$
infrared active	no	yes	no	yes	yes

Figura 3.3: Regole di selezione per le vibrazioni IR-active e Raman-active [26].

Il tensore Raman

Analizziamo adesso un processo Raman da un punto di vista quantistico. La molecola è inizialmente nello stato iniziale $|i\rangle$, quando il fotone della radiazione incidente eccita la molecola, che prima di raggiungere lo stato finale $|f\rangle$ passa per uno stato intermedio $|z\rangle$, che si differenzia da $|i\rangle$ per l'assorbimento o l'emissione di un fonone con energia $h\Omega$. L'elemento di matrice di transizione tra gli stati $|i\rangle$ e $|f\rangle$, transizione guidata dalla polarizzazione indotta dalla luce $\mathbf{P}=\chi\epsilon_0\mathbf{E}$, è allora dato da:

$$\mathbf{P}_{fi} = \langle f | \mathbf{P} | i \rangle = \langle f | \chi \epsilon_0 \mathbf{E} | i \rangle \quad (3.1)$$

Se la lunghezza d'onda della luce è molto più grande delle distanze interatomiche, il campo elettrico può essere considerato costante nell'elemento di matrice e si può quindi ricavare dall'equazione una forma generalizzata della suscettibilità, conosciuta come *suscettibilità di transizione*

$$[\chi_{mn}]_{fi} = \langle f | \chi_{mn} | i \rangle \quad (3.2)$$

χ_{mn} è una quantità specifica determinata dagli orbitali elettronici del cristallo o della molecola e rappresenta la risposta del materiale ad un campo elettromagnetico esterno. Si può intuire come questa risposta dipenda dalle posizioni dei nuclei, che possono essere sostituite dalle coordinate normali Q_k delle oscillazioni. La parte elettronica della suscettibilità può essere allora espansa rispetto a queste coordinate Q_k :¹

$$[\chi_{mn}]_{fi} = (\chi_{mn})_0 \langle \dots v_{fk} \dots | \dots v_{ik} \dots \rangle + \sum_k \left(\frac{\partial \chi_{mn}}{\partial Q_k} \right)_0 \langle \dots v_{fk} \dots | Q_k | \dots v_{ik} \dots \rangle \quad (3.3)$$

$(\chi_{mn})_0$ descrive il processo di assorbimento o di scattering Rayleigh; il secondo termine $\partial\chi_{jl}/\partial Q_k$ descrive invece il processo Raman ed è una componente del tensore di polarizzazione derivata, che è anche conosciuto come **tensore di Raman**. Gli indici j e l corrono sulle coordinate da 1 a 3, mentre k corre sulle $3N - 3$ coordinate normali delle vibrazioni, dove N è il numero di atomi nella molecola o nella cella

¹Introducendo l'approssimazione adiabatica, o di Born-Oppenheimer, la funzione d'onda totale $\psi([r], [R])$ (dove $[r]$ sono le coordinate elettroniche e $[R]$ quelle nucleari) può essere separata in parte nucleare e elettronica $\psi([r], [R]) = \phi([r], [R])\rho([R])$, ottenendo quindi

$$[\chi_{mn}]_{fi} = \int \rho_f^*(X) \phi_f^*(x, X) \chi_{mn} \phi_i(x, X) \rho_i(X) dx dX$$

unitaria. I bra e i ket rappresentano le funzioni d'onda vibrazionali totali, espresse come il prodotto di oscillatori armonici con numeri di occupazione v_{fk} e v_{ik} .

Il tensore di Raman può essere utilizzato per ricavare le specie simmetriche di un modo vibrazionale o per classificare gli assi di simmetria di un cristallo grazie alla teoria dei gruppi, che permette di determinare quali specie vibrazionali hanno componenti non nulle nel loro tensore di Raman.

Sperimentalmente, è sufficiente di solito determinare quali sono le componenti del tensore di Raman che contribuiscono all'intensità dello scattering. Per il modo k-esimo questa è infatti data, per una direzione di polarizzazione selezionata della luce diffusa \mathbf{e}^s , dal modulo quadro della proiezione del momento di dipolo \mathbf{P}_D^s su \mathbf{e}^s :

$$\Phi(k) = C|\mathbf{e}^s \mathbf{P}_D^s|^2 = C \left| \sum_j e_j^s P_{Dj}^s(k) \right|^2$$

dove P_{Dj}^s sono le componenti del momento di dipolo indotto dallo scattering Raman ed è dato da

$$P_{Dj}^s = \sum_l \chi_{jlk} e_k^i E_0 V_u \epsilon_0 Q_k$$

dove e_l^i sono le componenti del vettore unitario di polarizzazione della luce incidente, V_u il volume della cella unitaria e E_0 l'ampiezza del campo elettrico incidente. Quindi, per una geometria di scattering dove le polarizzazioni della luce incidente e diffusa sono date dai vettori arbitrari \mathbf{e}^i e \mathbf{e}^s , l'intensità di scattering è

$$\Phi(k) = C' |\mathbf{e}^s (\chi_k \mathbf{e}^i)|^2 = C' \left| \sum_{j,l} e_j^s \chi_{jlk} e_l^i \right|^2 E_0^2 \quad (3.4)$$

dove C' è una costante di proporzionalità. La (3.4) mostra come sia possibile selezionare qualsiasi componente del tensore di Raman scegliendo appropriatamente le polarizzazioni della luce incidente e diffusa. Per ulteriori dettagli si rimanda ai libri di testo i cui riferimenti sono riportati in bibliografia [26] [35].

3.3 Meccanismi di eccitazione impulsiva

Lo sviluppo di laser in grado di produrre impulsi della durata di pochi femtosecondi da parte di Shank et al. [16] aprì nuove possibilità nella pratica della spettroscopia vibrazionale risolta temporalmente (*time-resolved vibrational spectroscopy* - TRVS). Per la prima volta, diventò possibile condurre osservazioni su scale di tempi non soltanto più piccole delle vite medie vibrazionali o dei tempi di defasamento, ma

addirittura dei singoli periodi vibrazionali. In principio diventò quindi possibile studiare materiali e molecole durante le loro diverse fasi di distorsione vibrazionale e caratterizzare molecole piegate o allungate per stiramento (*stretching*), reticoli cristallini distorti e altre specifiche strutture non in equilibrio.

La realizzazione in pratica di queste possibilità non richiede però soltanto un'adeguata risoluzione temporale, ma anche un meccanismo di eccitazione in grado di dar inizio a oscillazioni vibrazionali coerenti.

Di seguito vedremo i meccanismi con cui è possibile iniziare il moto vibrazionale coerente e come può essere monitorato nel limite impulsivo, ovvero il limite in cui la durata dell'impulso è più piccola del singolo periodo vibrazionale.

E' utile a questo punto chiarire cosa si intende per scattering Raman *stimolato*.

Nello scattering Raman spontaneo solo un raggio laser a frequenza ω_p viene usato per illuminare il campione e il segnale è generato dalle frequenze Stokes e anti-Stokes ω_s e ω_{as} dovute allo scattering inelastico.

Nello scattering stimolato invece, due raggi vengono diretti sul campione a frequenze ω_p e ω_s : quando la differenza in frequenza $\Delta\omega = \omega_p - \omega_s$ (comunemente chiamata *Raman shift*) coincide con una certa frequenza vibrazionale molecolare Ω , il segnale Raman viene amplificato grazie ad un'eccitazione stimolata del rate di transizione molecolare r

$$r \sim \sigma_R n_p (n_s + 1)$$

dove σ_R è la sezione d'urto di scattering Raman della molecola (che dipende dal Raman shift) e n_p e n_s sono il numero di fotoni per modo per i campi della radiazione a frequenza ω_p e ω_s . Notiamo come nell'assenza del raggio a frequenza ω_s , ovvero $n_s = 0$, si torni al caso dello scattering Raman spontaneo.

Possiamo adesso introdurre i meccanismi di eccitazione impulsiva più usati: **impulsive stimulated Raman scattering** (ISRS), che può avvenire con lunghezze d'onda di eccitazione in risonanza o meno, e **impulsive absorption** che può avvenire solo in risonanza.

La figura (3.4) illustra il funzionamento dei due diversi meccanismi.

Nell'ISRS, l'impulso ultracorto di eccitazione esercita un'improvvisa forza che inizia i moti vibrazionali coerenti nello stato fondamentale elettronico della molecola. Il modulo della forza e la corrispondente ampiezza della vibrazione sono linearmente proporzionali all'intensità della luce incidente e alla polarizzabilità differenziale dovuta allo scattering della luce per il modo che è stato impulsato. Gli unici requisiti per l'eccitazione ISRS sono che la durata dell'impulso sia corta in confronto ai periodi di oscillazione vibrazionale e che il modo sia *Raman-attivo*.

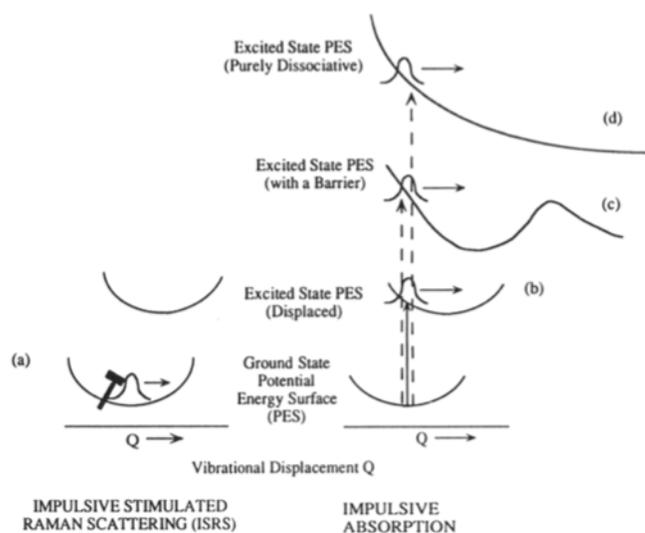


Figura 3.4: I meccanismi di eccitazione impulsiva: a) ISRS b) Impulsive absorption [11].

Lo scattering stimolato nel limite impulsivo non avviene attraverso il *mixing* tra due frequenze discrete come nello scattering Raman stimolato riportato sopra, ma attraverso il *mixing* tra la distribuzione continua delle componenti di Fourier racchiuse dalla larghezza di banda dell'impulso ultracorto. Essendo la durata dell'impulso minore del periodo vibrazionale, la larghezza spettrale dell'impulso conterrà necessariamente la frequenza vibrazionale, in maniera tale che più componenti possano giocare il ruolo di ω_p e ω_s .

E' da notare che nello scattering stimolato con frequenze discrete (assumendo $\omega_p > \omega_s$), la luce è *Stokes-shifted* in frequenza da ω_p a ω_s , e la differenza in energia viene fornita come energia vibrazionale nel mezzo. In ISRS invece, la luce è spostata dalla parte blu alla parte rossa dello spettro dell'impulso per fornire l'energia vibrazionale coerente.

Nell'assorbimento impulsivo la lunghezza d'onda di eccitazione è vicina ad una risonanza elettronica e può così avvenire l'assorbimento della radiazione; il pacchetto d'onda comincia allora il suo moto coerente nello stato elettronico eccitato (caso b) in figura (3.4)). Solitamente, la geometria di equilibrio dello stato eccitato elettronico è spostata rispetto a quella dello stato fondamentale, quindi si hanno delle oscillazioni attorno al nuovo punto di equilibrio. I requisiti dell'assorbimento sono anche qui che la durata dell'impulso sia minore del periodo vibrazionale dello stato eccitato e che il modo abbia una forma di accoppiamento del moto vibrazionale con l'eccitazione elettronica, come evidenziato in figura da una PES spostata.

I moti vibrazionali coerenti influenzano sia la parte reale che la parte immaginaria dell'indice di rifrazione, quindi in generale ci sono molteplici osservabili ottiche via le quali è possibile studiare il moto. In pratica, le oscillazioni vibrazionali negli stati elettronici fondamentali sono studiate principalmente attraverso i loro effetti sulla parte reale dell'indice di rifrazione, mentre i moti coerenti negli stati elettronici eccitati attraverso i loro effetti sulla parte immaginaria.

Il metodo più comune per l'osservazione del moto vibrazionale dello stato eccitato in fase condensata è la misurazione dell'evoluzione temporale dell'assorbimento o della riflessione del campione. Riferendosi alla figura di prima, il pacchetto d'onda mostrerà assorbimento e emissione stimulate diverse a seconda della sua posizione istantanea sulla PES. Queste misure possono essere fatte modulando la frequenza di un impulso di probe dell'ordine dei femtosecondi e registrando la quantità complessiva di luce trasmessa attraverso il campione.

Per maggiori informazioni sui meccanismi di eccitazione impulsiva, si rimanda all'articolo di Dhar et al. [11].

Spettroscopia ultraveloce dei transienti di assorbimento

L'isomerizzazione del retinale è un esempio di processo biologico fotofisico e fotochimico ultraveloce e come visto precedentemente avviene sulle scale dei femtosecondi. L'invenzione di laser in grado di produrre impulsi della durata di pochi fs ci permette di osservare questi processi con l'adeguata risoluzione temporale e in tempo reale. Una delle tecniche più usate è la *ultrafast transient absorption spectroscopy*, di cui si farà uso anche in questo lavoro di tesi.

In questa tecnica (rappresentata schematicamente in figura (3.5)), una frazione delle molecole in soluzione è promossa allo stato elettronico eccitato grazie ad un impulso di eccitazione (pump); questa frazione dipende dal setup sperimentale e copre un range dal 0.1% alle decine percentuali. Un secondo impulso (probe), di bassa intensità in modo da non stimolare ulteriormente la molecola, è mandato attraverso il campione ad un certo ritardo temporale τ rispetto all'impulso di pompa. Si può così misurare una differenza nello spettro di assorbimento tra lo spettro del campione nello stato eccitato e nel ground state ΔA .

Cambiando il ritardo temporale τ tra pump e probe, si può registrare un profilo ΔA per ogni delay temporale, ovvero si può ottenere un profilo temporale dello spettro in funzione della lunghezza d'onda $\Delta A = \Delta A(\lambda, \tau)$. $\Delta A(\lambda, \tau)$ contiene informazioni sui diversi processi che stanno avvenendo all'interno della reazione fotochimica studiata, che possono essere estratte tramite tecniche di analisi che illustreremo nella seconda parte di questa tesi.

Per ulteriori dettagli si rimanda all'articolo in bibliografia [5].

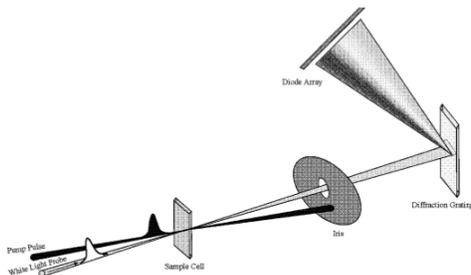


Figura 3.5: Rappresentazione schematica del funzionamento della tecnica di spettroscopia ultraveloce dei transienti di assorbimento [5].

3.4 Scopo dell'esperimento

Come riportato nei due capitoli precedenti, l'interazione del cromoforo con il suo contra-ione influenza diversi aspetti della sua dinamica come i tempi di decadimento, la relativa stabilità degli stati elettronici e la stereoselettività del processo di isomerizzazione.

Utilizzando il diclorometano DCM come solvente e l'acido trifluoroacetico TFA per la protonazione, è possibile studiare gli effetti dell'interazione tra il PSBR all-*trans* e il contra-ione. In particolare, la formazione del dimero di TFA sembra avere un'influenza diretta sul canale ultraveloce non reattivo, che è il meccanismo di disattivazione dominante in solventi non polari come il DCM [30].

D'altra parte, in letteratura sono state osservate delle modulazioni nella trasmittività del campione che indicano la presenza di particolari modi vibrazionali in cui l'energia di eccitazione viene ripartita una volta che il cromoforo comincia il suo rilassamento dalla zona di Franck-Condon. Questi modi, la cui frequenza non sembra mostrare dipendenza dal solvente in cui è disciolto il PSBR, sono relativamente lenti ($100\text{-}120\text{ cm}^{-1}$) e insieme a modi più alti in frequenza sembrano originarsi dalla ripartizione dell'energia in eccesso fornita al cromoforo a 400 nm di eccitazione [39].

Non è stato però ancora condotto uno studio di queste modulazioni per diversi rapporti molarli TFA-SBR.

Alla luce di ciò in questo lavoro di tesi, dopo un'iniziale ottimizzazione e caratterizzazione del setup ottico, sono state effettuate delle misure ultraveloci utilizzando la tecnica spettroscopica dei transienti di assorbimento sul PSBR all-*trans* in DCM

a 400 nm di eccitazione, per diversi rapporti molarì TFA/SBR. In questo modo è possibile evidenziare le eventuali differenze nei modi vibrazionali osservati da parte dell'interazione del retinale con il monomero e il dimero del contra-ione TFA.

Capitolo 4

Apparato sperimentale

4.1 Sorgente laser

La sorgente laser che è stata utilizzata consiste di un sistema laser commerciale composto da un oscillatore (Coherent - Mira Seed) $\text{Ti:Al}_2\text{O}_3$ (Titanium Sapphire - Ti:Sa) e un amplificatore rigenerativo (Coherent - Legend), come riportato in figura (4.1). L'oscillatore è pompato da un laser Nd:YVO_4 (Neodymium Vanadate) (Coherent - Verdi), ovvero un laser CW con lunghezza d'onda di 532 nm e una potenza media di 5 W.

I modi permessi all'interno della cavità hanno una lunghezza d'onda λ legata alla lunghezza della cavità L attraverso la relazione

$$\lambda = \frac{2L}{n}$$

I modi possibili sono molteplici, ma la generazione di impulsi ultracorti stabili necessita di una condizione di mode-locking, ovvero una differenza di fase costante tra l' n -esimo e l' $(n+1)$ -esimo modo. In generale, i laser Ti:Sa usano un mode-locking passivo basato sul meccanismo di mode-locking di Kerr-Lens. Questo effetto consiste nella variazione dell'indice rifrattivo di un materiale, proporzionale all'intensità I della luce che attraverso il mezzo attivo. Considerando un impulso laser temporalmente gaussiano, l'intensità $I(t)$ è data da

$$I(t) = I_0 e^{-\frac{t^2}{\sigma^2}}$$

dove σ è proporzionale alla FWHM gaussiana. Si può esprimere la variazione temporale dell'indice di rifrazione come

$$\frac{dn(I)}{dt} = -I_0 \frac{2n_2 t}{\sigma^2} e^{-\frac{t^2}{\sigma^2}}$$

dove n_2 è il termine non-lineare dell'indice di rifrazione. Il cambiamento di questo induce un effetto di *self-phase modulation* (SPM), che tra poco approfondiremo. Il campo elettrico $\mathbf{E}(t)$ sarà dato dalla somma su tutti i modi permessi all'interno della cavità:

$$\mathbf{E}(t) = \mathbf{E}_0 e^{i\omega_0 t} \sum_{i=-n}^n e^{ik(\Delta\omega + \phi_i(t))}$$

dove $\Delta\omega$ è la differenza in frequenza tra due modi consecutivi. L'intensità del laser sarà allora

$$I \simeq \frac{\sin^2\left((2N+1)\frac{\Delta\omega + \phi}{2}\right)}{\sin^2\left(\frac{\Delta\omega + \phi}{2}\right)} E_0^2$$

dove N è il numero di modi mode-lockati e ϕ è la differenza di fase costante tra due modi consecutivi. Notiamo allora che l'intensità massima è direttamente proporzionale al quadrato del numero totale di modi mode-lockati

$$I_{max} \simeq (2N+1)^2 E_0^2$$

La variazione dell'indice di rifrazione gioca il ruolo della lente che focalizza la parte pulsava del laser, mentre il modo continuo (CW) è bloccata da una fenditura regolabile. Una volta mode-lockato, si ottengono degli impulsi centrati attorno a 797 nm con una larghezza di banda di circa 50 nm, durata di ~ 20 fs, ad un RR di 76 MHz per una potenza media di 350 mW. il laser entra quindi nell'amplificatore pompato da un laser Nd:YLF (Neodymium:Yttrium Lithium Fluoride) (Coherent - Evolution 30) producendo degli impulsi alla lunghezza d'onda di 527 nm, durata di 300 ns, potenza media di 20 W e *repetition rate* (RR) di 1 kHz. Gli impulsi vengono poi allungati, amplificati e ricompresi per ottenere infine impulsi a 2.5 mJ con lunghezza d'onda di 800 nm e durata di 50 fs, che ad un RR di 1 kHz corrispondono ad una potenza media di 2.5 W.

4.1.1 Compressione dell'impulso

Al fine di ottenere una risoluzione temporale sufficiente per poter studiare i processi ultraveloci, è necessario comprimere ancora una volta gli impulsi in uscita dall'amplificatore, ovvero diminuire la loro durata. Per far ciò, si sfrutta il self-phase

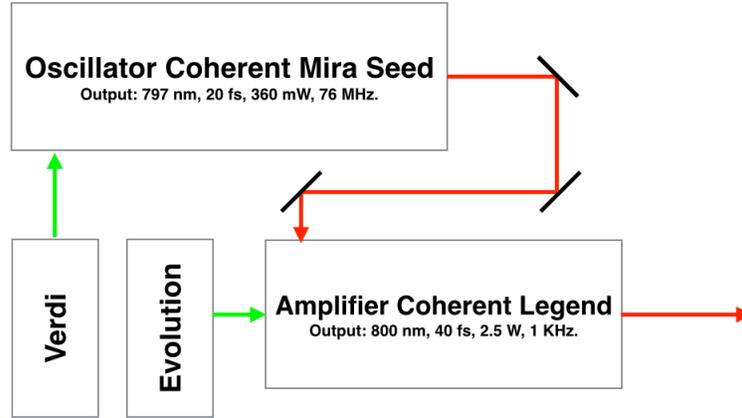


Figura 4.1: Sorgente laser.

modulation, allargando inizialmente la banda di frequenza dell'impulso, ricordando che

$$\Delta\omega \sim \frac{2\pi}{\Delta t}$$

Il processo non-lineare consiste in una dipendenza dell'indice di rifrazione del mezzo dall'intensità dell'impulso:

$$n(t) = n_0 + n_2 I(t) = n_0 + \Delta n_2(t)$$

La componente non-lineare dell'indice di rifrazione n_2 tiene conto delle interazioni tra atomi e campo elettromagnetico. Questa dipendenza induce la modulazione delle fasi tra le diverse componenti dell'impulso; in un mezzo dispersivo di lunghezza L , la fase del campo elettrico è data da

$$\phi_m(t) = n(t)kL = \frac{n(t)2\pi L}{\lambda}$$

e di conseguenza la differenza di fase inizialmente data dalla dipendenza dell'indice dall'intensità dell'impulso diventa

$$\exp(i\Delta\phi(t)) = \exp\left(\frac{-i2\pi\Delta n(t)L}{\lambda}\right) = \exp\left(-\frac{i2\pi n_2 I(t)L}{\lambda}\right)$$

Solitamente $n_2 > 0$ e così si ottiene un abbassamento in frequenza della parte frontale dell'impulso (*red-shift*)

$$\frac{dn}{dt} > 0 \Rightarrow \Delta\omega_i(t) = \frac{d\Delta\phi(t)}{dt} < 0$$

e un'innalzamento di frequenza della parte posteriore (*blue-shift*) (figura (4.2)).

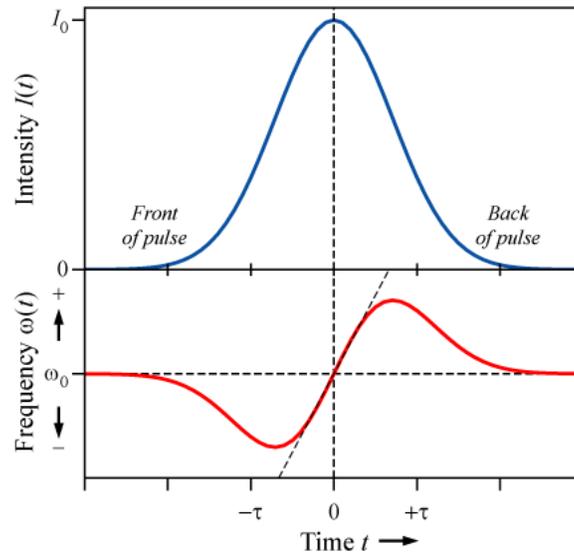


Figura 4.2: Blue e red-shifting della parte frontale e posteriore dell'impulso.

La compressione non-lineare è raggiunta tramite l'uso di una fibra ottica monomodale (Hollow fiber compressor - Femtolasers), sfruttando l'effetto di riflessione interna totale (figura (4.3)). Pompando del gas Neon ad una pressione di circa 1.5 bar all'interno della fibra stessa, si può sfruttare il gas nobile come mezzo non-lineare per la generazione dell'effetto di SPM.

L'allargamento spettrale causa ovviamente la compressione dell'impulso, ma bisogna tener conto di una dispersione nella velocità di gruppo (GVD) a causa della dipendenza non-lineare dell'indice di rifrazione dalla frequenza dell'impulso incidente. Riscrivendo la fase del campo elettrico come $\phi_m(\omega) = n(\omega)kL = k(\omega)L$, possiamo espanderla in serie di Taylor, mettendo in luce i diversi contributi:

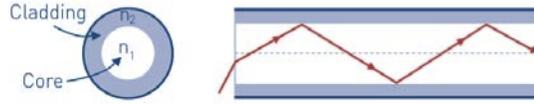


Figura 4.3: Funzionamento di una fibra ottica tramite l'effetto di riflessione interna totale. L'indice di rifrazione del rivestimento esterno (cladding) è leggermente più piccolo di quello del nucleo (core).

$$k(\omega)L = k(\omega_0)L + \left(\frac{dk(\omega)}{d\omega} \right)_{\omega_0} (\omega - \omega_0)L + \frac{1}{2} \left(\frac{d^2k(\omega)}{d\omega^2} \right)_{\omega_0} (\omega - \omega_0)^2 L + \dots$$

Il primo termine tiene conto della velocità della fase, la seconda della velocità di gruppo e la terza della GVD. La dispersione fa sì che le componenti rosse dell'impulso si propagano più velocemente di quelle blu, causando un allungamento dell'impulso come in figura (4.4) (*chirping*).

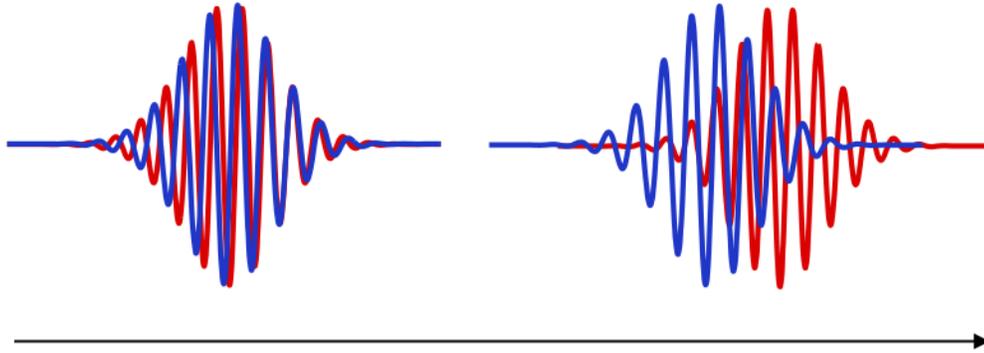


Figura 4.4: Chirping dell'impulso a causa dell'effetto di GVD.

La dispersione della velocità di gruppo può essere compensata se i cammini ottici delle componenti sono diversi tra di loro. Sperimentalmente, ciò è realizzabile tramite dei *chirped mirrors*, degli specchi dielettrici con zone di diversa profondità per riflettere più lunghezze d'onda e ricolimare temporalmente i fronti d'onda. A questo punto il fascio è pronto per entrare nel setup pump-probe.

Hollow fiber compressor

Per la compressione dell'impulso è stata utilizzata una fibra ottica all'interno della quale è stato pompato del gas Neon che gioca il ruolo del mezzo non-lineare per il self-phase modulation. La pressione del gas è cruciale per una compressione ottimale dell'impulso. Una pressione eccessiva, oltre che a danneggiamenti materiali alle pareti della fibra, causa instabilità nella potenza e nella forma del fascio uscente. Una pressione troppo bassa al contrario, diminuisce l'efficacia del processo di self-phase modulation e quindi una perdita da un punto di vista della compressione temporale dell'impulso. Confrontando tra di loro risultati provenienti da impulsi compressi a diverse pressioni, si è potuto stabilire un intervallo di compressione ottimale tra i 1.5 bar e i 2.5 bar di pressione.

Oltre a ciò, è necessario far sì che la fibra di quarzo sia il più possibile collineare al laser entrante, in maniera tale da garantire una riflessione interna ottimale e evitare che le pareti della fibra si danneggino a causa dell'intensità del fascio. Per ovviare a questo, la fibra è dotata di due coppie di controlli manuali che permettono di regolare la sua posizione in entrata e in uscita lungo gli assi verticale e orizzontale. Per quanto riguarda invece le particelle provenienti dalla fusione della fibra da parte del fascio, ogni giorno di misure la fibra è stata preventivamente pulita aspirando tramite una pompa esterna.

Infine, è stato necessario anche ottimizzare la compressione dell'impulso in uscita dall'amplificatore, in maniera tale da rendere il processo di self-phase modulation e la conseguente generazione di seconda armonica nel cristallo di BBO del setup pump-probe il più efficiente possibile.

4.2 Pump-probe setup

Nel nostro setup *pump-probe* viene misurata l'evoluzione temporale dell'assorbanza di un campione ad un certo range di lunghezze d'onda.

Il treno d'onde uscente dalla sorgente laser ($RR = 1$ kHz, $P = 1$ W, durata = 25 fs) è diviso in due raggi: un impulso ecciterà il campione (*pump*) inducendo le variazioni che verranno sondate dal secondo impulso (*probe*), adeguatamente ritardato temporalmente rispetto al primo.

Dal *probe* si possono ricavare informazioni sulla riflettività, l'assorbimento e lo scattering del campione e indagare così i cambiamenti indotti dall'impulso di pompa su di esso.

Misurando l'energia del probe trasmesso oltre al campione in funzione del delay tem-

porale tra i due impulsi, si può così ricostruire l'evoluzione temporale dell'assorbanza del campione.

Come mostrato in figura (4.5), il fascio viene inizialmente diviso in due da un beam-splitter 10%-90%: il raggio meno intenso farà da *probe* (in rosso), mentre l'altro da *pump* (in blu).

La pompa passa attraverso una lamina a $\lambda/2$ (che permette di regolarne la potenza) e incidendo su uno specchio disposto all'angolo di Brewster continua il suo percorso in polarizzazione verticale, ortogonale al piano di riflessione. A questo punto, il fascio viene focalizzato su un cristallo di BBO (beta-BaB₂O₄) per ottenere la seconda armonica (400 nm) dalla fondamentale (800 nm). La focalizzazione è necessaria per permettere le adeguate condizioni di phase-matching e rendere così il processo di SHG il più efficiente possibile¹. E' importante notare che il cristallo di BBO non è stato posto nel fuoco dello specchio sferico che focalizza la prima armonica per evitare che si bruci a causa della grande intensità.

La luce infrarossa rimanente viene poi rimossa da tre specchi diecrici che riflettono unicamente 400 nm e il fascio passa attraverso un chopper a 250 Hz, che permette come vedremo in seguito la distinzione degli spettri pompati da quelli non pompati; il pump viene infine collimato da uno specchio parabolico con lunghezza focale $f = 430$ mm e focalizzato sul campione, per poi essere bloccato da un filtro successivamente. L'altro fascio invece viene inizialmente mandato su di un ulteriore beam-splitter, in maniera tale da ridurre l'energia dell'impulso e evitare che una volta focalizzato sul campione lo ecciti ulteriormente. Il fascio viene poi diretto su uno specchio disposto su di un piezometro che funge da delay, con risoluzione spaziale di $0.03 \mu\text{m}$ e temporale di 0.1 fs: si può così regolare la differenza temporale d'arrivo tra il pump e il probe, ottenendo le misure nel dominio dei tempi delle proprietà che vogliamo studiare. Il fascio passa poi attraverso un terzo beam-splitter, che lo divide ulteriormente in due: una parte farà da *reference*, rispetto al quale verrà misurata la variazione di densità ottica dell'altro, il *probe*.

Il probe e il reference vengono poi collimati e focalizzati sul campione tramite uno specchio sferico di lunghezza focale $f = 260$ mm. Una volta superato il campione, passano infine attraverso un reticolo di diffrazione e gli spettri risultanti vengono

¹Quando un mezzo non-lineare viene eccitato da due onde sinusoidali con frequenza ω_1 e ω_2 , la risposta sarà una polarizzazione oscillante alle frequenze somma e differenze delle due iniziali:

$$\omega_{sum} = \omega_1 + \omega_2$$

$$\omega_{diff} = |\omega_1 - \omega_2|$$

Quando $\omega_1 = \omega_2$, come nel nostro caso, il mezzo emette luce ad una frequenza doppia di quella originale e si ottiene la **SHG** (Second Harmonic Generation).

collezionati da due array di fotodiodi con 512 pixel.

Il retinale in soluzione è fatto scorrere in una cella di quarzo connessa ad una pompa peristaltica (figura (4.6)). La velocità del liquido all'interno della cella è stato scelto adeguatamente in maniera tale da permettere un ricambio continuo del campione. La cella è spessa 1 mm per una sezione di 8x25 mm e contiene al suo interno uno spessore di 0.5 mm di campione in fase liquida. Come vedremo in seguito, la presenza del solvente e del vetro sarà causa di effetti come il cross-phase modulation (XPM) di cui si dovrà tenere conto nell'analisi dei dati.

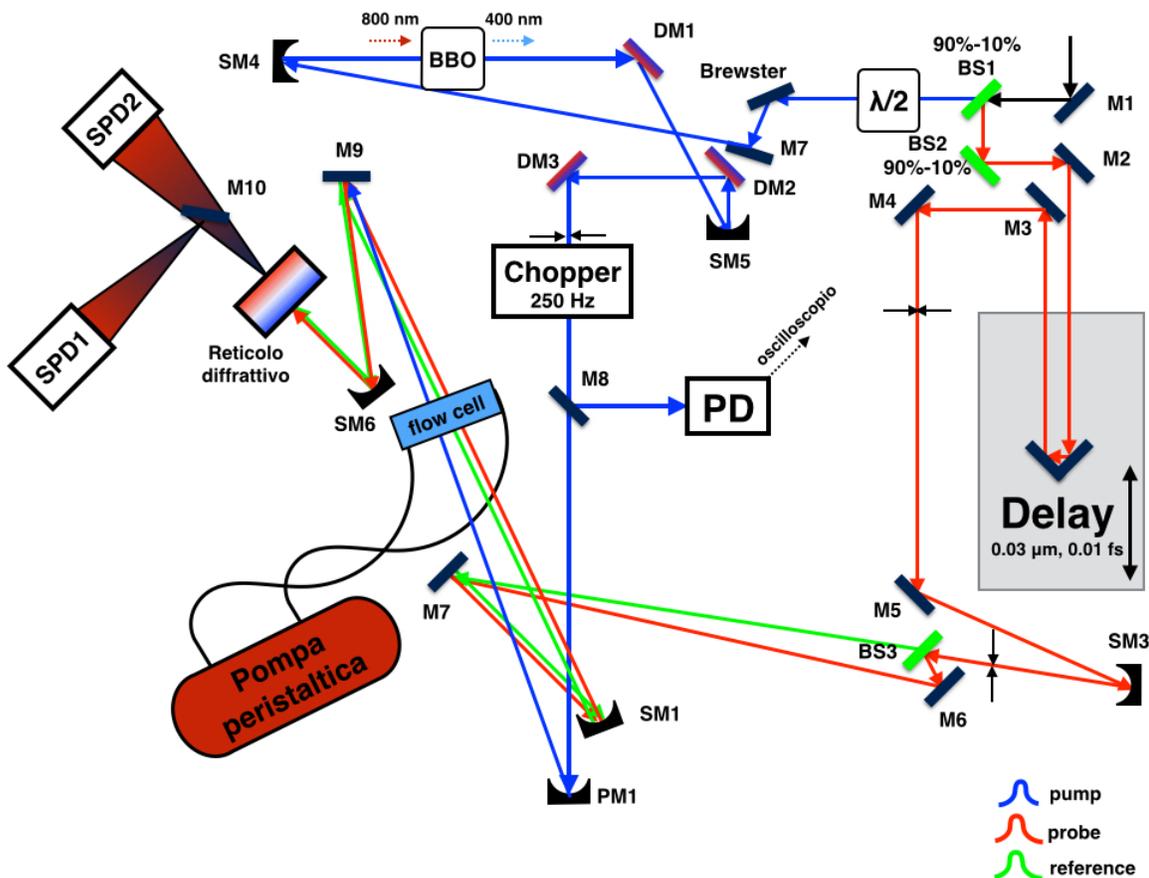


Figura 4.5: Setup pump-probe. BS = beam-splitter, M = mirror, SM = spherical mirror, PM = parabolic mirror, DM = dichroic mirror, SPD = spectrometer.

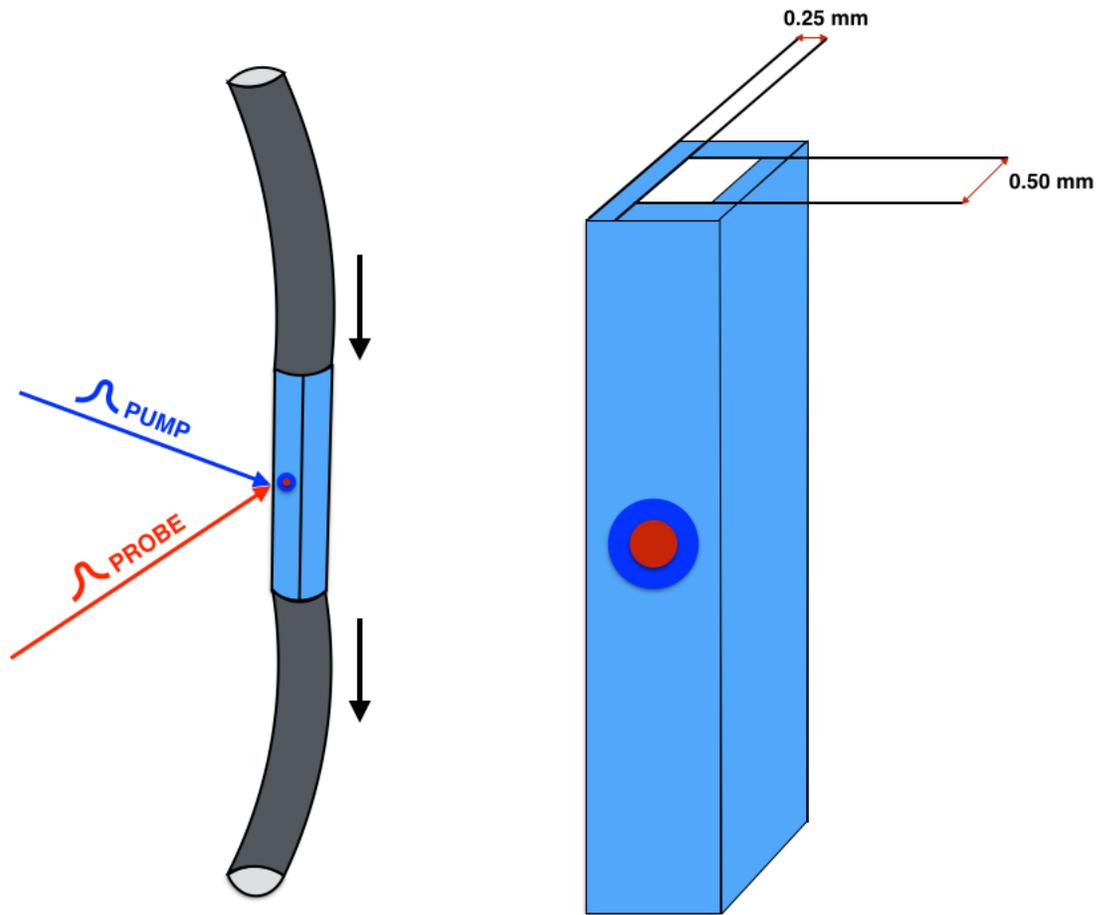


Figura 4.6: Rappresentazione schematica della cella in cui scorre il campione in fase liquida e impulsi incidenti su di essa; in rosso è rappresentato l'impulso di probe, mentre in blu quello di pump.

4.3 Acquisizione dei dati

Se I_0 e I sono rispettivamente le intensità del probe prima e dopo aver attraversato il campione, si può definire il coefficiente di trasmissione come

$$T = \frac{I}{I_0}$$

Nel nostro caso, I_0 è normalizzato e ha un'intensità comparabile con quella del reference. Il coefficiente di assorbimento, indicato come densità ottica (OD), è definito da

$$OD(\lambda) = -\log(T)$$

E' utile ricordare la legge di Beer-Lambert, che può essere espressa come

$$OD(\lambda) = \epsilon bc$$

dove ϵ , misurata in $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ è l'assorbività molare, b è lo spessore del campione e c è la concentrazione del campione in soluzione, espressa in mol L^{-1} .

In un esperimento pump-probe come già accennato ciò che si misura è la perturbazione indotta dal pump, che nel nostro caso può essere espressa come il coefficiente di trasmissione relativo

$$\frac{\Delta T}{T} = \frac{T_p - T_u}{T_u} = \frac{\left(\frac{I_p}{I_{p,0}} - \frac{I_u}{I_{u,0}} \right)}{\frac{I_u}{I_{u,0}}}$$

dove I_p e I_u sono le intensità del probe dopo il campione con e senza pompa e il pedice 0 indica l'intensità prima del campione. Le intensità del reference $I_{p,0}^R$, $I_{u,0}^R$ sono direttamente proporzionali a quelle del probe, ovvero

$$I_{p,0} = CI_{p,0}^R, \quad I_{u,0} = CI_{u,0}^R$$

quindi posso riscrivere

$$\frac{\Delta T}{T} = \frac{\frac{I_p}{I_{p,0}}}{\frac{I_u}{I_{u,0}}} - 1 = \frac{\frac{I_p}{CI_{p,0}^R}}{\frac{I_u}{CI_{u,0}^R}} - 1 = \frac{\frac{S_p - B_p}{S_p^R - B_p^R}}{\frac{S_u - B_u}{S_u^R - B_u^R}} - 1$$

dove S è il segnale misurato con il probe aperto, B è il rumore di fondo quando il probe è chiuso, R indica il reference e p e u indicano il caso *pumped* e *unpumped*, ovvero la presenza o meno della pompa. Ad ogni tempo di delay, vengono raccolti gli

spettri del reference (S_p^R , S_u^R) e del probe (S_p , S_u) dagli spettrometri e viene calcolato il coefficiente di trasmissione. E' qui che il fotodiiodo subito dopo il chopper (figura (4.5)) ci torna utile, permettendo di distinguere lo spettro pompato da quello non pompato.

Il sistema può acquisire ogni singolo impulso laser, ma per migliorare il rapporto segnale/rumore si può mediare l'intensità del probe su di un numero scelto dall'utente di impulsi laser (*shots*). Nel nostro caso, abbiamo scelto un numero di shots pari a 1000. Dato che il RR del laser è 1 kHz, si hanno quindi due spettri pompati e due non per ognuna di queste acquisizioni.

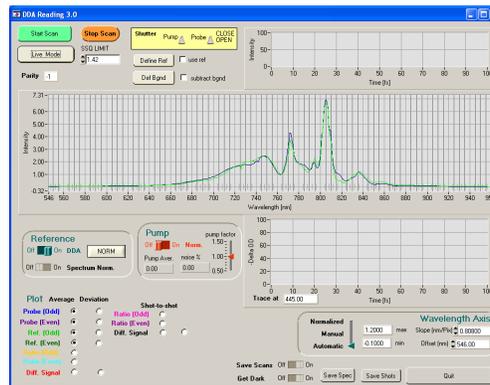


Figura 4.7: Interfaccia grafica del sistema di acquisizione differenziale. In basso a destra si può regolare l'asse delle lunghezze d'onda tramite l'offset e la pendenza (nm per pixel).

Una misura consiste in uno scan del segnale rilevato dagli PDA entro il range delle lunghezze d'onda coperte dall'impulso di probe, misurato a diversi tempi di ritardo temporale tra i due impulsi. In questa maniera si ottengono le matrici dei dati contenenti la variazione della densità ottica in funzione della lunghezza d'onda e del tempo di arrivo relativo degli impulsi sul campione di cui abbiamo parlato in precedenza nel paragrafo 3.3.

4.3.1 Calibrazione della lunghezza d'onda

Il sistema d'acquisizione, la cui interfaccia grafica è riportata in figura (4.7), necessita di una calibrazione della lunghezza d'onda (offset e nm per pixel). Per far ciò, si sfrutta la conoscenza in letteratura dello spettro di trasmissione del cristallo YAlEr (Er:Y₃Al₅O₁₂ - Erbium-doped Yttrium Aluminium garnet) riportato in figura (4.8).

Confrontando lo spettro del probe in assenza di campione con quello ottenuto ponendo il cristallo nel fuoco del fascio, è possibile individuare i picchi ben definiti

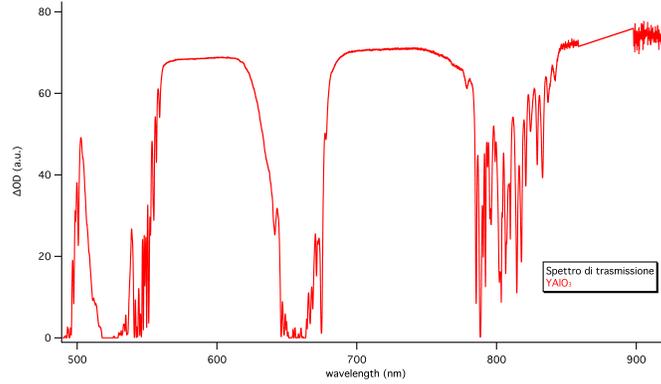


Figura 4.8: Spettro di trasmissione del cristallo YAlEr nel range di lunghezze d'onda dai 490 ai 925 nm.

di assorbimento e verificare la linearità tra le lunghezze d'onda in corrispondenza dei picchi misurate e non calibrate con quelle esatte conosciute in letteratura. In questa maniera tramite un fit lineare (4.9) si possono dedurre il coefficiente angolare e l'intercetta, che rappresentano quindi rispettivamente il rapporto nm/pixel e l'offset nel sistema di acquisizione DDA.

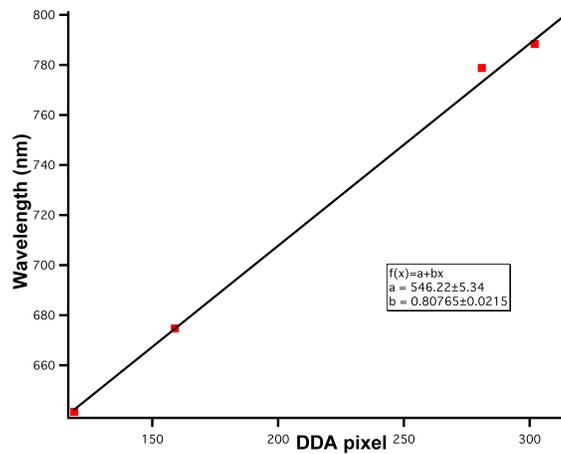


Figura 4.9: Fit lineare tra pixel e lunghezze d'onda per la calibrazione del sistema d'acquisizione DDA.

4.4 Preparazione del campione

Il SBR all-trans è stato preparato secondo metodi già descritti in letteratura [19] e protonato con dell'acido trifluoroacetico, la cui struttura é riportata in figura (4.10). Tramite l'uso di uno spettrofotometro (Ultraspec 3000), sono stati registrati gli spettri di assorbimento del retinale in DCM nella sua forma non protonata e in quella protonata con TFA per diversi rapporti C/A. Come si può notare dalle figure (4.11), il picco di massimo assorbimento λ_{max} si sposta dalla forma non protonata a 360 nm verso la parte rossa dello spettro in quella protonata con TFA. Come ci si aspetta, in conseguenza alla formazione del dimero di TFA il picco si sposta ulteriormente: non potendosi però formare altre strutture molecolari, ad un C/A 1:4 non si nota uno spostamento significativo del λ_{max} . E' interessante notare poi la presenza di una coda verso la parte blu dello spettro a causa di una protonazione non completa del retinale da parte del suo contra-ione.

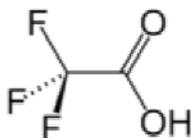


Figura 4.10: Struttura chimica dell'acido trifluoroacetico (TFA) usato per la protonazione del SBR [31].

4.5 Cross phase modulation (XPM)

Il cross phase modulation (XPM) è un effetto non lineare di cui bisogna tenere conto. Esso è funzione dell'intensità dell'impulso di pompa che attraversa il campione in fase liquida. Rispetto ad altri effetti come lo scattering Raman stimolato dalle pareti di vetro della cella, è l'artefatto di maggior entità.

Il XPM consiste in una modulazione temporale della parte reale dell'indice di rifrazione del mezzo, che in concomitanza all'arrivo contemporaneo del pump e del probe causa dei cambiamenti spettrali in quest'ultimo: in particolare, l'energia totale dell'impulso rimane costante ma viene ridistribuita su diverse frequenze. E' bene ricordare che l'effetto di cross phase è presente anche nel caso di un mezzo trasparente a causa del solvente o del vetro della cella.

L'interazione tra pump e probe può essere ricondotta al seguente sistema di equazioni

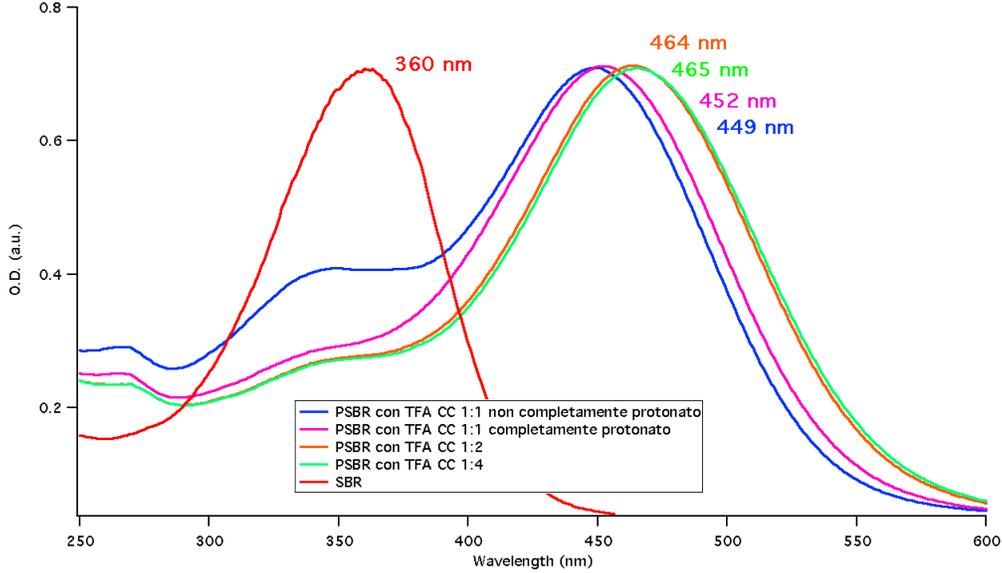


Figura 4.11: Spettro di assorbimento retinale in DCM non protonato SBR e protonato con TFA.

che descrivono la propagazione delle onde nel mezzo, prendendo z come direzione di propagazione [14]:

$$\frac{\partial A_{pump}}{\partial z} + \frac{1}{v_{g,pump}} \frac{\partial A_{pump}}{\partial t} = i \frac{\omega_{pump}}{c} \frac{n_2}{2} |A_{pump}|^2 A_{pump}$$

$$\frac{\partial A_{probe}}{\partial z} + \frac{1}{v_{g,probe}} \frac{\partial A_{probe}}{\partial t} + \frac{i}{2} \beta_{probe}^{(2)} \frac{\partial^2 A_{probe}}{\partial t^2} - \frac{1}{6} \beta_{probe}^{(3)} \frac{\partial^3 A_{probe}}{\partial t^3} = i \frac{\omega_{probe}}{c} \frac{n_2}{2} |A_{pump}|^2 A_{probe}$$

dove A e ω rappresentano l'ampiezza e la pulsazione dell'onda elettromagnetica, v_g la velocità di gruppo e infine $\beta^{(2)}$ e $\beta^{(3)}$ i coefficienti di dispersione che possono essere calcolati per il materiale costituente la cella.

n_2 rappresenta come già visto in questo lavoro di tesi la parte non-lineare dell'indice di rifrazione $n(z, t, \omega)$ e dipende a sua volta dall'intensità della pump:

$$n_2(z, t, \omega) = n_0(\omega) + \frac{n_2(\omega)}{2} |A_{pump}(z, t)|^2$$

Come si può notare dal set di equazioni, a destra dell'uguaglianza possiamo riconoscere l'effetto di self-phase modulation della pompa con se stessa e di cross phase modulation del probe da parte della pompa. A causa dei diversi ordini di grandezza di differenza in intensità, possiamo inoltre trascurare il XPM sulla pompa da parte

del probe. Altri effetti come scattering Raman o il *self-steeping* - un cambiamento nella forma di impulsi di luce a causa della propagazione in un mezzo con un indice di rifrazione dipendente dall'intensità - ci si aspetta siano piccoli [1].

Gli effetti piú importanti del XPM possono essere riassunti in [14]:

- **a)**: *Allargamento del segnale* a causa della differenza nella velocità di gruppo del probe e del pump ($v_{g,pump}$, $v_{g,probe}$).

- **b)**: *Spostamento del massimo positivo dell'oscillazione in ognuna delle curve verso tempi positivi piú grandi di delay*. Questo é dovuto al fatto che la risposta del campione é istantanea e genera il segnale mentre il pump e il probe si sovrappongono nel tempo. Le lunghezze d'onda rosse del probe arrivano sul campione prima di quelle blue e dato che tempi positivi corrispondono ad un impulso di pompa che arriva prima sul campione del probe, la sovrapposizione tra i due e quindi il segnale sono spostati verso tempi di delay maggiori per lunghezze d'onda del probe verso il rosso.

- **c)**: *Abbassamento dell'ampiezza*. A lunghezze d'onda vicine al rosso, la differenza in velocità tra pump e probe fa sí che i due impulsi si sovrappongano soltanto in un volume limitato del campione e che quindi l'ampiezza del segnale sia ridotta.

Nell'analisi dei dati, si è tenuto conto dell'effetto di XPM effettuando delle misure con solo DCM all'interno della cella fino ai 350 fs dopo il tempo zero. Una volta mediato il segnale di XPM sulle diverse lunghezze d'onda, è stato possibile sottrarre il contributo dal segnale ottenuto dalle misure con il retinale in soluzione, ottenendo la risposta effettiva del cromoforo all'eccitazione a 400 nm.

4.6 Caratterizzazione temporale e spaziale degli impulsi

Per ottenere delle misure con un buon rapporto segnale/rumore, è fondamentale che il campione venga posto nello stesso piano in cui si incontrano i fuochi del pump e del probe e che il diametro del primo fuoco sia piú grande di quello di quest'ultimo. Per caratterizzare spazialmente gli impulsi, i loro profili sono stati rilevati con un CCD (charged-couple-device camera). Per il probe, sono state stimate le dimensioni $\Delta x \sim 77 \mu\text{m}$ e $\Delta y \sim 43 \mu\text{m}$, mentre per il pump $\Delta x \sim 121 \mu\text{m}$ e $\Delta y \sim 103 \mu\text{m}$.

Per la caratterizzazione temporale degli impulsi, è bene notare che la presenza lungo il cammino ottico di lenti, beam-splitter e altri mezzi implica tipicamente un allun-

gamento temporale dell'impulso. In più, dato che i cammini ottici del pump e del probe non sono uguali, anche questo potrebbe causare un allargamento nel dominio dei tempi degli impulsi. In un esperimento pump-probe non si ha un accesso diretto alla durata reale dell'impulso e alla luce di ciò si misura la funzione di cross-correlazione tra gli impulsi di pump e probe nella generazione di terza armonica (THG).

A tale scopo, si è posto un cristallo di BBO posto nella posizione del campione. La terza armonica è generata quando la seconda (pump) e la fondamentale (probe) si sovrappongono spazialmente e temporalmente nel cristallo non-lineare; uno scan di questo segnale in funzione del ritardo tra i due impulsi permette di misurare l'intensità della funzione di cross-correlazione della THG, che è una misura esatta della durata del più lungo tra i due impulsi.

L'intensità della funzione avrà un profilo temporale gaussiano descritto da

$$I(t) = \exp\left(-\frac{t^2}{\sigma_c^2}\right)$$

La durata dell'impulso più lungo corrisponderà quindi alla FWHM della curva di cross-correlazione secondo

$$\tau_p = 2\sqrt{\ln 2}\sigma_c$$

A causa però delle difficoltà incontrate nella generazione del processo non-lineare di terzo ordine, per una caratterizzazione temporale adeguata si è deciso di compiere delle misure su un cristallo di germanato di rame CuGeO_3 in maniera tale da ottenere una stima della risoluzione temporale.

4.7 Il germanato di rame CuGeO_3

Per l'ottimizzazione del setup è stato utilizzato un cristallo di germanato di rame CuGeO_3 , la cui struttura ortorombica è riportata in figura (4.12).

Lo spettro Raman e i modi vibrazionali di questo materiale sono conosciuti in letteratura [32]. Grazie a ciò, è possibile avere un confronto diretto con i dati sperimentali misurati e quindi ottenere una stima della risoluzione temporale del setup e una sua caratterizzazione.

Il germanato presenta una dinamica ultraveloce che può essere osservata considerando i residui derivanti dalle tracce cinetiche. È stata scelta la traccia cinetica a 710 nm dato il rapporto segnale/rumore più alto rispetto alle altre; questa scelta è giustificata dalla poca dipendenza dalla lunghezza d'onda nella forma del segnale entro il

range di frequenze coperto dal probe. A questo punto è stata estrapolata una traccia cinetica media dai diversi scan, il cui residuo rispetto alla funzione multiesponenziale di fit ha permesso l'osservazione di una modulazione della trasmittività del campione. Come si può notare dalla figura (4.13), è stato possibile tramite trasformata di Fourier delle oscillazioni individuare un modo vibrazionale a 444 cm^{-1} , che corrisponde ad un periodo vibrazionale di 75 fs. Confrontando con misure antecedenti con un'eccitazione a 800 nm, si può notare come il modo a 854 cm^{-1} sembri essere soppresso nel caso di un'eccitazione a 400 nm. Oltre a ciò, si può notare come si siano riusciti ad individuare altri modi, tra i quali il più alto in frequenza raggiunge i 722 cm^{-1} . Questo ci garantisce che la nostra risoluzione sperimentale sia di ~ 45 fs, ovvero che con il nostro setup siamo in grado di vedere i modi fino ad un numero d'onda di circa 750 cm^{-1} .

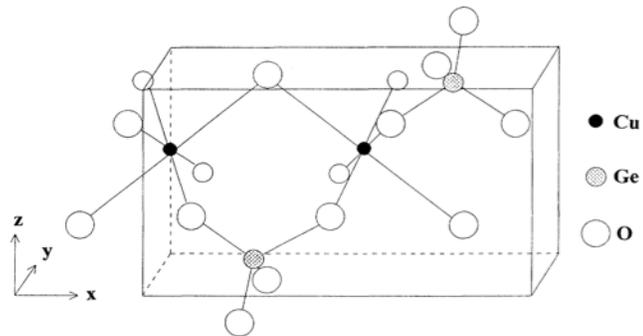


Figura 4.12: Rappresentazione schematica della struttura cristallina del CuGeO_3 [32].

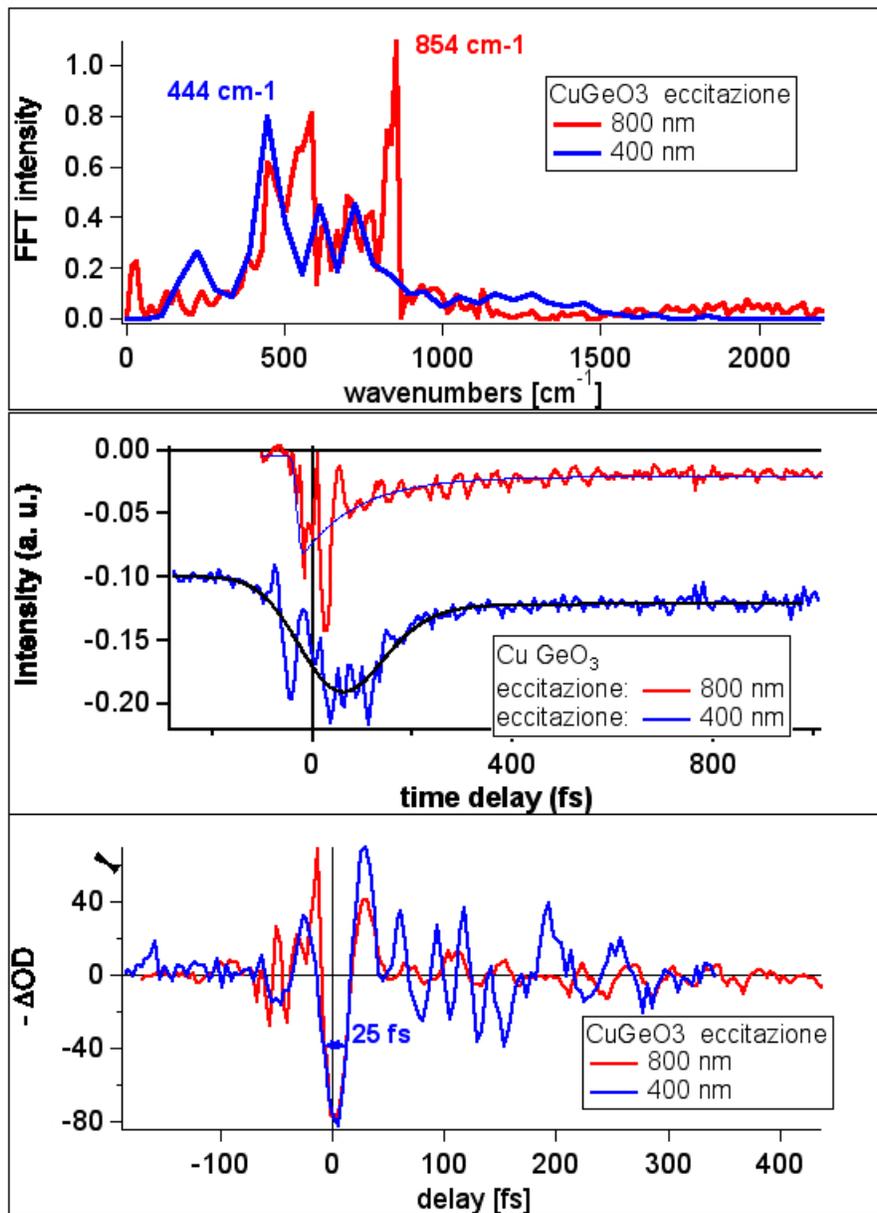


Figura 4.13: In alto sono riportati i modi vibrazionali del CuGeO_3 sotto eccitazione a 800 nm (in rosso) da precedenti misure e 400 nm (in blu). In mezzo sono riportate le tracce cinetiche a 710 nm sotto eccitazione a 400 nm (in blu) e a 603 nm sotto eccitazione a 800 nm (in rosso). La traccia a 710 nm ha un offset di -0.10 in intensità per semplificare la visualizzazione dei risultati. In basso sono riportati i residui delle tracce con i propri fit, da cui possiamo osservare la modulazione nella trasmittività del germanato di rame.

Capitolo 5

Risultati

5.1 Regime di linearità

Per evitare contributi derivanti da processi a più fotoni sul segnale pump-probe, è necessario verificare la linearità della risposta del campione rispetto alla potenza dell'impulso di pompa. Dalle misure effettuate sul CuGeO_3 sappiamo che sono necessarie potenze di eccitazione sull'ordine delle centinaia di μW . Per effettuare la misura di linearità, vengono acquisiti più spettri ad una posizione fissata del delay in corrispondenza del massimo del segnale. Da questi si può ottenere l'intensità del picco massimo in funzione della potenza. Si può notare come il campione mostri una risposta che scala linearmente con la potenza del segnale fino ad un'eccitazione di $\sim 300\mu\text{W}$. Di conseguenza, nelle misure da noi effettuate sul retinale l'energia per singolo impulso di pompa è stata fissata a 580 nJ, mediata su di un range temporale di 30 secondi preventivamente ad ogni set di scan effettuati.

5.2 Matrici dei dati

In figura 5.1 è riportata la matrici media di 5 scan dalle misure effettuate sul PSBR all-trans in DCM protonato con TFA per un C/A 1:1. Dato che un segnale positivo indica un aumento dell'assorbimento, è possibile identificare l'emissione stimolata dello stato eccitato, che ci si aspetta da letteratura essere dominante nel range di lunghezze d'onda considerate. La La correzione della GVD non è necessaria nel nostro studio, dovendoci concentrare sulle tracce cinetiche e non quelle spettrali. E' stato necessario poi rimuovere il rumore di fondo prima di 350 fs dalla salita del segnale e tenere conto del XPM. Per correggere questo ultimo artefatto, sono state

effettuate delle misure con solo DCM in maniera tale da estrapolare il segnale XPM che è stato poi sottratto adeguatamente dalle matrici dei dati. Come ci si aspetta, il segnale mostrava un massimo in corrispondenza dell'arrivo contemporaneo del pump e del probe sul campione.

Il nostro obiettivo è però quello di osservare le modulazioni della trasmittività, che riflettono i modi vibrazionali in cui l'energia elettronica del retinale si ripartisce durante il suo rilassamento dalla zona di Franck-Condon. Per far ciò, dobbiamo estrapolare dalle matrici dei dati i residui derivanti dal fit delle tracce cinetiche.

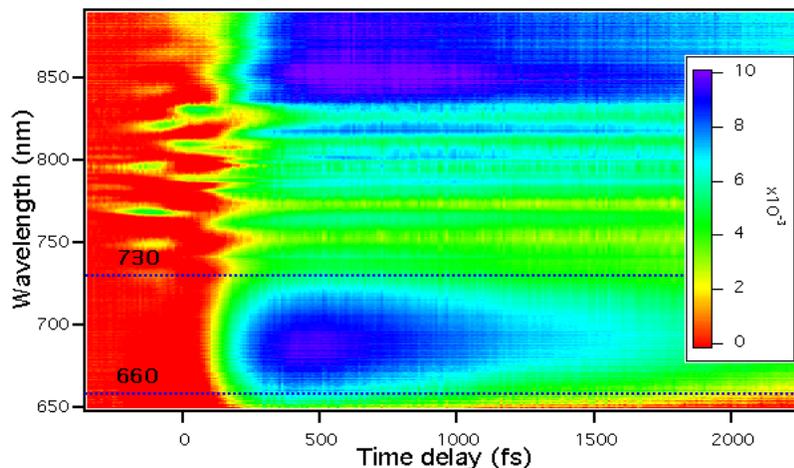


Figura 5.1: Immagine tridimensionale dell'intensità del segnale nel dominio dei tempi e delle lunghezze d'onda per un rapporto di concentrazione SBR-TFA 1:1. Le linee tratteggiate individuano la zona da cui sono state estrapolate le tracce cinetiche per l'analisi dei residui.

5.3 Residui delle tracce cinetiche

In figura (5.2) è riportata come esempio la traccia cinetica a 700 nm per un C/A 1:1 con il relativo fit e il residuo corrispondente.

La funzione di fit scelta è la convoluzione di cinque funzioni esponenziali, una per la salita del segnale e quattro per il decadimento, con una Gaussiana e una funzione scalino. Tre di questi decadimenti, essendo più lenti e tenendo conto della dinamica del retinale a distanze di picosecondi dall'arrivo dell'impulso di eccitazione, sono stati fissati in ampiezza e tempi caratteristici, mentre i parametri della salita e discesa

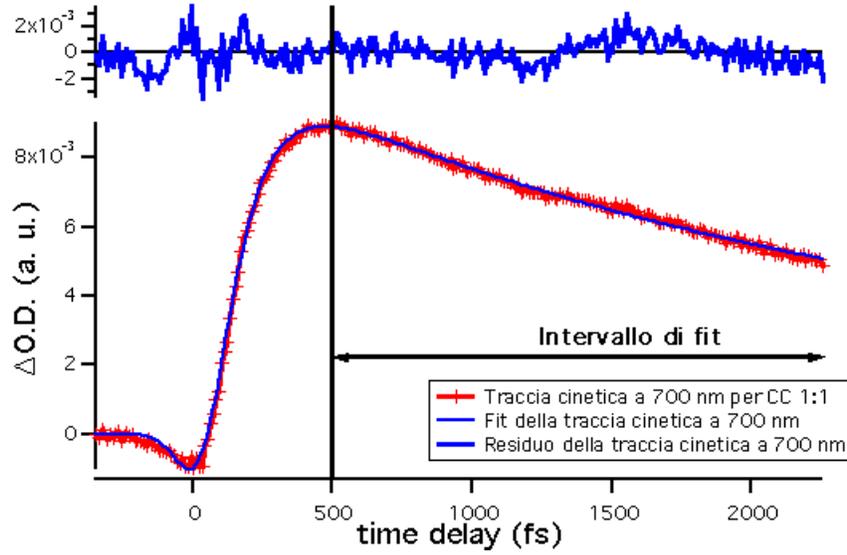


Figura 5.2: Traccia cinetica a 700 nm per C/A 1:1. In blu è riportato il fit multiesponenziale; al di sopra della traccia il corrispondente residuo. E' mostrato anche il range di fit scelto per l'analisi dei residui, per evitare il contributo dato dal segnale XPM.

ultraveloci sono lasciati liberi e fissati inizialmente a 200 fs e 1000 fs rispettivamente. Un ulteriore parametro, rappresentante la risoluzione sperimentale, è stato posto ad un valore più grande di quello effettivo in maniera tale da poter estrapolare dai residui la modulazione della trasmittività.

Per l'analisi dei residui è stata scelta la zona spettrale tra i 660 nm e i 730 nm, essendo qui la modulazione più evidente e distinguibile. L'intervallo di fit considerato comincia dopo 500 fs dall'arrivo dell'impulso di eccitazione; in questa maniera il contributo proveniente dal segnale di XPM può essere trascurato e siamo sicuri che

CC (SBR/TFA)	Ω	τ
1:1	$53 \pm 1 \text{ cm}^{-1}$	629 fs
1:2	$52 \pm 1 \text{ cm}^{-1}$	641 fs
1:4	$58 \pm 1 \text{ cm}^{-1}$	575 fs

Tabella 5.1: Numeri d'onda dei modi vibrazionali per diversi rapporti di concentrazione e corrispondenti periodi vibrazionali. L'incertezza sui modi è di $\pm 1 \text{ cm}^{-1}$.

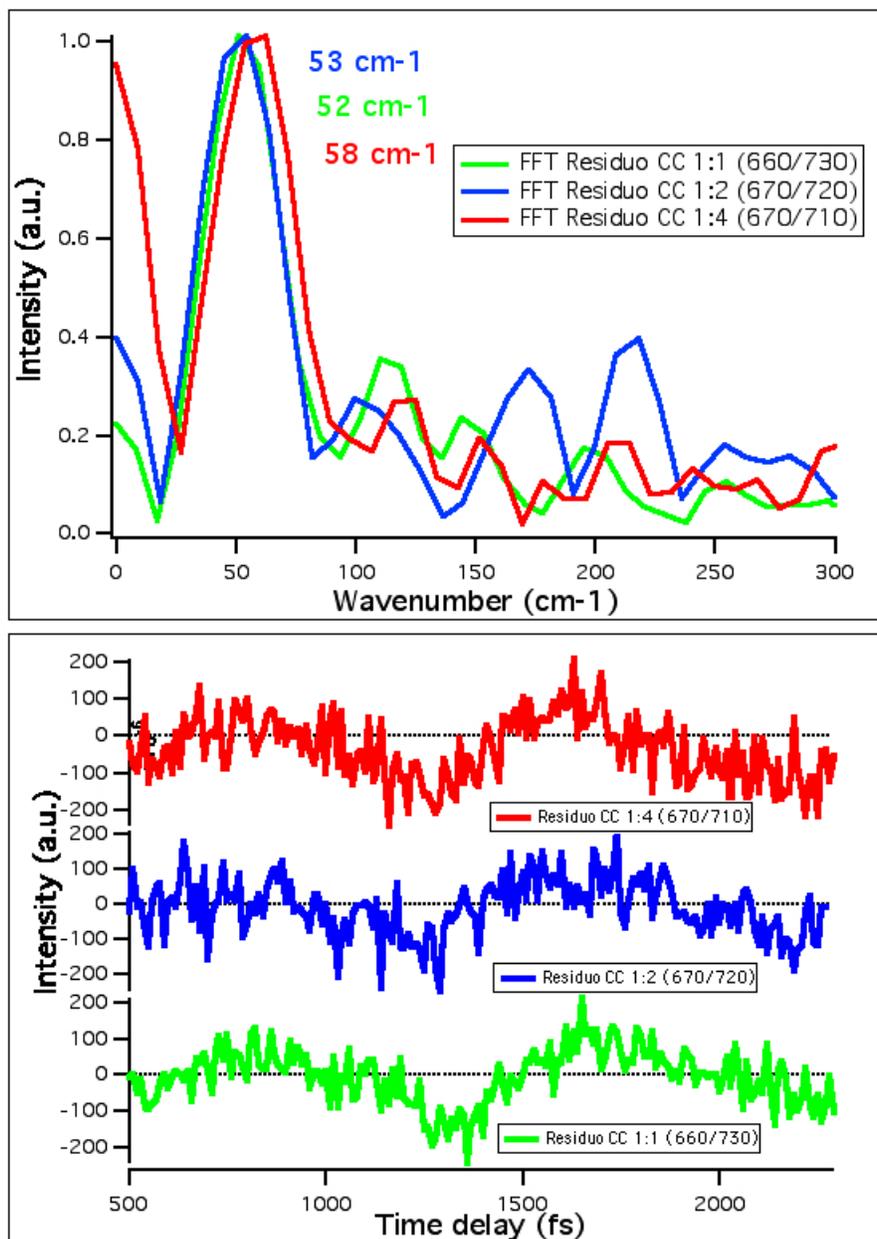


Figura 5.3: In basso sono riportati i residui per diversi C/A ottenuti dal fit multiesponenziale delle tracce cinetiche entro l'intervallo di lunghezze d'onda comprese tra 660 nm e 730 nm. Sopra sono riportate le corrispondenti trasformate di Fourier. Ai numeri d'onda è associata un incertezza di $\pm 1 \text{ cm}^{-1}$.

l'unico contributo ai residui considerati sia la risposta effettiva del cromoforo all'eccitazione. La funzione di fit scelta in questo caso è una semplice esponenziale. In figura (5.3) sono riportati i residui ottenuti a partire dal fit monoesponenziale delle tracce cinetiche a diversi rapporti di concentrazione e le corrispondenti trasformate di Fourier.

I modi vibrazionali sono stati poi ottenuti tramite trasformata di Fourier utilizzando la procedura FFT del programma di analisi statistica IgorPro.

I modi trovati sono di bassa frequenza ($< 100 \text{ cm}^{-1}$) e i loro valori e corrispondenti periodi sono riportati in tabella (5.1) e in figura (5.3).

Capitolo 6

Discussione

In questa tesi è stata studiata la dinamica vibrazionale ultraveloce del PSBR all-trans in fase liquida ad un'eccitazione di 400 nm. Il cromoforo è stato studiato utilizzando come solvente il diclorometano (DCM) e come contra-ione l'acido trifluoroacetico TFA. In letteratura, è nota la formazione della coppia ionica [PSBR, TFA⁻] tra il retinale e il monomero di acido trifluoroacetico per C/A inferiori a 1:2. Per C/A maggiori o uguali a 1:2, il TFA forma un dimero e la coppia ionica viene sostituita dal complesso ionico [SBR, TFA⁻]TFA [29]. La formazione di questo complesso e l'interazione elettrostatica del PSBR con il contra-ione influenzano l'efficienza del processo di isomerizzazione.

Il decadimento del PSBR in soluzione, come visto nel secondo capitolo, è di tipo multiesponenziale ed il meccanismo di diseccitazione dominante in solventi non polari come il DCM è il canale ultraveloce non-reattivo. La formazione del dimero di TFA ha una diretta influenza su questo canale non reattivo attraverso il quale il PSBR si rilassa, rallentando la dinamica dello stato eccitato del 3.7% [30]. Il trasferimento di carica positiva dal cromoforo al contra-ione è il fattore che induce la disattivazione del PSBR attraverso il canale non reattivo verso lo stato fondamentale.

Alla luce di ciò, la nostra motivazione era quella di studiare l'interazione del cromoforo con il suo contra-ione e, tramite l'individuazione di modi vibrazionali a bassa frequenza su cui viene ripartita parte dell'energia elettronica, scoprire se questi sono influenzati o meno dalla formazione del complesso ionico e del dimero per C/A maggiori o uguali a 1:2.

Lo studio dei processi ultraveloci richiede però sia l'uso di tecniche spettroscopiche risolte nel dominio del tempo sia di una sufficiente risoluzione temporale del setup sperimentale. A tale riguardo, è stata utilizzata la spettroscopia dei transienti di assorbimento, realizzata tramite un setup in configurazione pump-probe.

Nella tecnica pump-probe, il campione viene eccitato da un impulso luminoso monocromatico detto pump; in seguito alla fotoeccitazione, è possibile ricostruire lo spettro di assorbanza del materiale misurando l'intensità prima e dopo il campione di un secondo impulso di minore intensità detto probe, ritardato rispetto al primo. Variando il ritardo temporale d'arrivo sul campione tra i due impulsi, è possibile ricostruire l'evoluzione spettrale e temporale dell'assorbanza del campione ed estrapolare informazioni sulla sua cinetica di decadimento tramite l'analisi di queste matrici di dati. Nel nostro caso, l'energia per impulso era di 580 nJ per il pump e di 15 nJ per il probe, entrambi ad un RR di 1 KHz.

Il PSBR è stato preparato in diclorometano (DCM) per diversi C/A, in maniera tale da poter studiare l'effetto della formazione del complesso ionico sulla dinamica del primo stato elettronico eccitato S_1 del retinale e sui modi vibrazionali in cui l'energia elettronica viene ripartita.

Dalle matrici dei dati è stato scelto un intervallo spettrale compreso tra i 650 nm e i 730 nm: in questa zona le modulazioni nella trasmittività, che corrispondono ai modi vibrazionali da noi cercati, risultavano più evidenti e inoltre il segnale XPM dato dalla crosscorrelazione tra il pump e il probe risultava minimo.

Considerato l'intervallo temporale dopo i 500 fs dall'arrivo dell'impulso di pompa, in maniera tale da poter trascurare il segnale XPM, le tracce cinetiche, rappresentanti l'evoluzione temporale dell'assorbanza ad una data lunghezza d'onda, sono state fittate con una funzione esponenziale da cui si sono ricavati i residui. L'analisi di questi residui ha portato alla individuazione di modi vibrazionali a bassa frequenza ($< 500 \text{ cm}^{-1}$) per ognuno dei rapporti di concentrazione scelti. In particolare, per C/A 1:1 abbiamo individuato un modo a $53 \pm 1 \text{ cm}^{-1}$, per C/A 1:2 a $52 \pm 1 \text{ cm}^{-1}$ e infine per C/A 1:4 a $58 \pm 1 \text{ cm}^{-1}$.

Pur non essendoci in letteratura informazioni su modi a così bassa frequenza del PSBR in soluzione, si può concludere che le vibrazioni trovate corrispondano a dei modi torsionali delocalizzati lungo la catena del poliene del retinale essendo questi solitamente nello stesso intervallo di numeri d'onda per i cromofori che si trovano nei vari sistemi biologici [28]. Dalle misure non è stato possibile individuare ulteriori modi a causa della limitata risoluzione temporale, che è stata stimata essere superiore a $\sim 45 \text{ fs}$.

Come si può notare, in corrispondenza al passaggio da un C/A 1:1 a 1:2, non sono state rilevate differenze sostanziali nei modi da noi individuati. Ricordando che in corrispondenza di un C/A 1:2 si ha la formazione del dimero del TFA e del complesso ionico $[\text{SBR}, \text{TFA}^-]\text{TFA}$ in sostituzione alla coppia $[\text{PSBR}, \text{TFA}^-]$, si può affermare che il modo torsionale delocalizzato da noi individuato non è influenzato dai cambiamenti strutturali dell'ambiente circostante il cromoforo e dal trasferimento di carica

dal retinale al contra-ione. Dato che questo trasferimento di carica è legato al canale non-reattivo dominante nella dinamica del PSBR in DCM, si può allora concludere che il modo torsionale da noi individuato non è accoppiato a questo canale.

Per studiare più approfonditamente il ruolo del complesso ionico [SBR, TFA⁻]TFA nella dinamica eccitata del PSBR, sarebbero necessarie ulteriori misure atte a individuare modi a più alta frequenza, dove gli effetti della formazione del dimero potrebbero essere più evidenti. Non è purtroppo stato possibile compiere questo studio a causa della limitata risoluzione temporale.

In corrispondenza di un rapporto C/A 1:4, oltre alla formazione del dimero di TFA, c'è anche un aumento della schermatura di questo contra-ione che fa sì che il retinale senta una carica effettiva minore. L'interazione elettrostatica del contra-ione con il retinale cambia infatti la distribuzione di carica degli elettroni delocalizzati lungo la catena del cromoforo, abbassando il gap di energia tra gli stati S_1 e S_0 per concentrazioni di acido sempre maggiori e determinando così lo spostamento della lunghezza d'onda del massimo di assorbimento del retinale verso il rosso (*opsin shift*), come riportato in figura 4.11.

Avendo noi rilevato uno spostamento del modo vibrazionale verso le più alte frequenze da 53 cm^{-1} a 58 cm^{-1} , si può allora ipotizzare che questo modo torsionale sia associato alla interazione elettrostatica del retinale con l'ambiente circostante e che questo spostamento sia un effetto elettrostatico collettivo dell'ambiente e non della sola interazione cromoforo/contra-ione.

Una conferma di questa ultima conclusione potrebbe venire da misure effettuate con C/A sempre più alti, in maniera tale da verificare l'unidirezionalità dello spostamento di questo modo verso le frequenze più alte e confermare il suo accoppiamento con l'interazione elettrostatica del retinale con l'ambiente circostante.

Capitolo 7

Conclusioni

In questo lavoro di tesi è stata studiata la dinamica vibrazionale ultraveloce del PSBR all-trans e del suo contra-ione TFA in DCM ad un'eccitazione di 400 nm.

L'obiettivo della tesi era di studiare l'interazione del cromoforo con il suo contra-ione e, tramite l'individuazione di modi vibrazionali a bassa frequenza su cui viene ripartita parte dell'energia elettronica, scoprire se questi sono influenzati o meno dalla formazione del complesso ionico $[\text{SBR}, \text{TFA}^-]\text{TFA}$ e del dimero di TFA per rapporti molari cromoforo/acido maggiori o uguali a 1:2.

Dalle misure effettuate, sono state individuate delle vibrazioni che possono essere associate a dei modi torsionali altamente delocalizzati lungo la catena del poliene del PSBR.

Paragonando quanto trovato a diversi rapporti molari C/A, si è concluso che il modo da noi individuato non è influenzato dai cambiamenti strutturali dell'ambiente circostante il cromoforo e dal trasferimento di carica dal PSBR al contra-ione che induce il decadimento del retinale attraverso il canale non reattivo veloce.

Infine, in corrispondenza all'aumento del rapporto C/A da 1:2 a 1:4 è stato rilevato uno spostamento del modo vibrazionale verso frequenze più alte di 5 cm^{-1} .

Tale spostamento è stato spiegato come un effetto dell'interazione elettrostatica del cromoforo retinale con l'ambiente, anche se sono necessarie misure ulteriori a rapporti C/A più grandi per confermare tale conclusione.

Bibliografia

- [1] D. Andersson and M. Lisak. Nonlinear asymmetric self-phase modulation and self-steeping of pulses in long optical waveguides. *Phys. Rev. A.*, 27:1393–1398, 1983.
- [2] Nikola Basarić. Private communication. *Ruder Bošković Institute*, Croatia, Zagreb.
- [3] Ralph S. Becker and K. Freedman. A comprehensive investigation of the mechanism and photophysics of isomerization of a protonated and unprotonated schiff base of 11-*cis*-retinal. *J. Am. Chem. Soc.*, 107:1477–1485, 1985.
- [4] M. Ben-Nun, F. Molnar, K. Schulten, and T. J. Martínez. The role of intersection topography in bond selectivity of cis-trans photoisomerization. *PNAS*, 99(4):1773, 2002.
- [5] Rudi Berera, Rienk van Grondelle, and John T. M. Kennis. Ultrafast transient absorption spectroscopy: principles and application to photosynthetic systems. *Photosynth Res*, 101:105–118, 2009.
- [6] Julien Briand, Jérémie Léonard Olivier Bräm, Julien Réhault, Andrea Cannizzo, Majed Chergui, Vinizio Zanirato, Massimo Olivucci, Jan Helbing, and Stefan Haacke. Coherent ultrafast torsional motion and isomerization of a biomimetic dipolar photoswitch. *Phys. Chem Chem. Phys.*, 12:3178–3187, 2010.
- [7] Alessandro Cembran, Fernando Bernardi, Massimo Olivucci, and Marco Garavelli. Counterion controlled photisomerizaion of retinal chromophore models: a computational investigation. *J. Am. Chem. Soc.*, 126:16018–16037, 2004.
- [8] Alessandro Cembran, Fernando Bernardi, Massimo Olivucci, and Marco Garavelli. The retinal chromophore/chloride ion pair: Structure of the photoisomerization path and interplay of charge transfer and covalent states. *PNAS*, 102(18):6255–6260, 2005.

- [9] R. F. Childs and G. S. Shaw. A quantitative examination of the photoisomerization of retinal iminium salts by high-field ^1H -nmr spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.*, 110:3013–3017, 1988.
- [10] SL Dexheimer, Q. Wang, LA Peteanu, WT Pollard, RA Mathies, and CV Shank. Femtosecond impulsive excitation of non stationary vibrational states in bacteriorhodopsin. *Chem. Phys. Lett.*, 188(61-66), 1992.
- [11] Lisa Dhar, John A. Rogers, and Keith A. Nelson. Time-resolved vibrational spectroscopy in the impulsive limit. *Chem. Rev.*, 94:157–193, 1994.
- [12] Coherent Laser Division. *Legend User Manual*. Coherent Laser Division.
- [13] Coherent Laser Division. *Operator’s Manuals for VERDI and MIRA*. Coherent Laser Division.
- [14] K. Ekvall, P. van der Meulen, C. Dhollande, and L.E. Berg. Cross phase modulation artifact in liquid phase transient absorption spectroscopy. *Journal of applied physics*, 87(5):2340–2352, 2000.
- [15] Feng Gai et al. Chemical dynamics in proteins: The photoisomerization of retinal in bacteriorhodopsin. *Science*, 279(1886), 1998.
- [16] R. L. Fork, C. H. Brito Cruz, P. C. Becker, , and C. V. Shank. Compression of optical pulses to six femtoseconds by using cubic phase compensation. *Optics Letters*, 12(7):483–485, 1987.
- [17] K. A. Freedman and R. S. Becker. Comparative investigation of the photoisomerization of the protonated and unprotonated n-butylamine schiff bases of 9-cis-, 11-cis-, 13-cis-, and all-trans retinals. *J. Am. Chem. Soc.*, 108:1245–1251, 1986.
- [18] R. González-Luque, M. Garavelli, F. Bernardi, M. Merchán, M.A. Robb, and M. Olivucci. Computational evidence in favor of a two-state, two-mode model of the retinal chromophore photoisomerization. *PNAS*, 97(17):9379–9384, 2000.
- [19] P. Hamm, M. Zurek, T. Roschinger, H. Patzelt, D. Oesterhelt, and W. Zinth. Femtosecond spectroscopy of the photoisomerization of the protonated schiff base of all-trans-retinal. *Chem. Phys. Lett.*, 263:613–621, 1996.
- [20] U. Haupts, J. Tittor, and D. Oesterhelt. Closing in on bacteriorhodopsin: Progress in understanding the molecule. *Annu. Rev. Biophys. Mol. Struct.*, 28:367–399, 1998.

- [21] Burghardt I., Cederbaum L. S., and Hynes J. T. -. *Faray Discuss.*, 127:395–411, 2004.
- [22] Burghardt I., Cederbaum L. S., and Hynes J. T. -. *J. Phys. Chem. A*, 110:11411–11423, 2006.
- [23] Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, and et al. Crystal structure of rhodopsin: A g protein-coupled receptor. *Science*, 289(739-745), 2000.
- [24] S. A. Kovalenko, A. L. Dobryakov, J. Ruthmann, and N. P. Ernsting. Femtosecond spectroscopy of condensed phases with chirped supercontinuum probing. *Phys. Rev. A*, 59(3):2369–2384, 1998.
- [25] Y. Koyama, K. Kubo, M. Komori, H. Yasuda, and Y. Mukai. Effect of protonation on the isomerization properties of n-butylamine schiff base of isomeric retinal as revealed by direct hplc analyses: selection of isomerization pathways by retinal proteins. *Photochemistry and photobiology*, 54(3):433–443, 1991.
- [26] Hans Kuzmany. *Solid State Spectroscopy*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2009.
- [27] Ben-Nun M., Molnar F., Schulten K., and Martinez T. J. -. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99:1769–1773, 2002.
- [28] Anne B. Myers, Rober A. Harris, and Richard A. Mathies. Resonance raman excitation profiles of bacteriorhodopsin. *J. Chem. Phys.*, 79, 1983.
- [29] Biliškov Nikola, Novak Jurica, Milena Petković, Goran Zgrablić, Goran Baranović, and Nada Došlić. Localization of the counterion of the protonated schiff base of n-butylretinal in solution. *Croat. Chem. Acta*, 84(2):221–231, 2011.
- [30] Jurica Novak, Momir Mališ, Goran Zgrablić, Fulvio Parmigiani, and Nada Došlić. Ultrafast non-reactive deactivation induced by excited state hole transfer from retinal chromophore to counterion. *Sottomesso a Structural Dynamics nel Febbraio 2015*, 2015.
- [31] Anna Maria Novello. Studio della dinamica elettronica ultraveloce del cromoforo di una proteina retinica. *Tesi di laurea*, 2007-2008.
- [32] Z. V. Popović and S. D. Dević. Phonons in cugeo3 studied using polarized far-infrared and raman-scattering spectroscopies. *Phys. Rev. B*, 52(6):4185–4190, 1995.

- [33] Birge R. R., Murray L. P., Zidovetzki R., and Knapp H. M. -. *J. Am. Chem. Soc.*, 109:2090, 1987.
- [34] Ramkumar Rajamani, Yen lin Lin, and Jiali Gao. The opsin shift and mechanism of spectral tuning in rhodopsin. *J. Comput. Chem.*, 32(5):854–865, 2011.
- [35] Ewen Smith and Geoffrey Dent. *Modern Raman Spectroscopy - A Practical Approach*. John Wiley and Sons Ltd., 2005.
- [36] Wenjing Wang, Zahra Nossoni, Tetyana Berbasova, Camille T. Watson, Ipek Yapici, Kin Sing Stephen Lee, Chrysoula Vasileiou, James H. Geiger, and Babak Borhan. Tuning the electronic absorption of protein-embedded all-trans-retinal. *Science*, 338:1340–1343, 2012.
- [37] Wenjing Wang, Zahra Nossoni, Tetyana Berbasova, Camille T. Watson, Ipek Yapici, Kin Sing Stephen Lee, Chrysoula Vasileiou, James H. Geiger, and Babak Borhan. Tuning the electronic absorption of protein-embedded all-trans-retinal. *Science*, 338:1340–1343, 2012.
- [38] Goran Zgrablić. Solvent effects on the ultrafast dynamics of the retinal chromophore of bacteriorhodopsin. *PhD thesis*, 2006.
- [39] Goran Zgrablić, Stefan Haacke, and Majed Chergui. Vibrational coherences of the protonated schiff base of all-trans retinal in solution. *Chemical Physics*, 338:168–174, 2007.
- [40] Goran Zgrablić, Stefan Haacke, and Majed Chergui. Heterogeneity and relaxation dynamics of the photoexcited retinal schiff base cation in solution. *J. Phys. Chem. B*, 113:4384–4393, 2009.
- [41] Goran Zgrablić, Anna Maria Novello, and Fulvio Parmigiani. Population branching in the conical intersection of the retinal chromophore revealed by multipulse ultrafast optical spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.*, 2011.
- [42] Goran Zgrablić, Kislou Voitchovsky, Maik Kindermann, Stefan Haacke, and Majed Chergui. Ultrafast excited state dynamics of the protonated schiff base of all-trans retinal in solvents. *Biophysical Journal*, 88:2779–2788, 2005.
- [43] X E. Zhou, K. Melcher, and H. E. XU. Structure and activation of rhodopsin. *Acta Ph. Sin.*, 33(291-299), 2012.