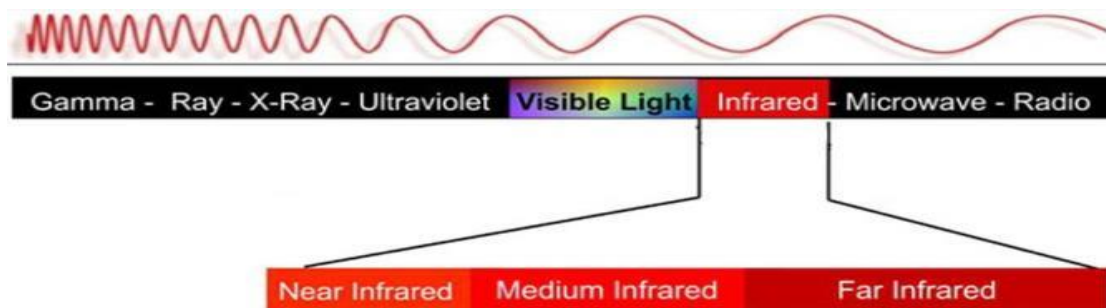


# **La Spettroscopia Infrarossa**

Principi di base e applicazioni

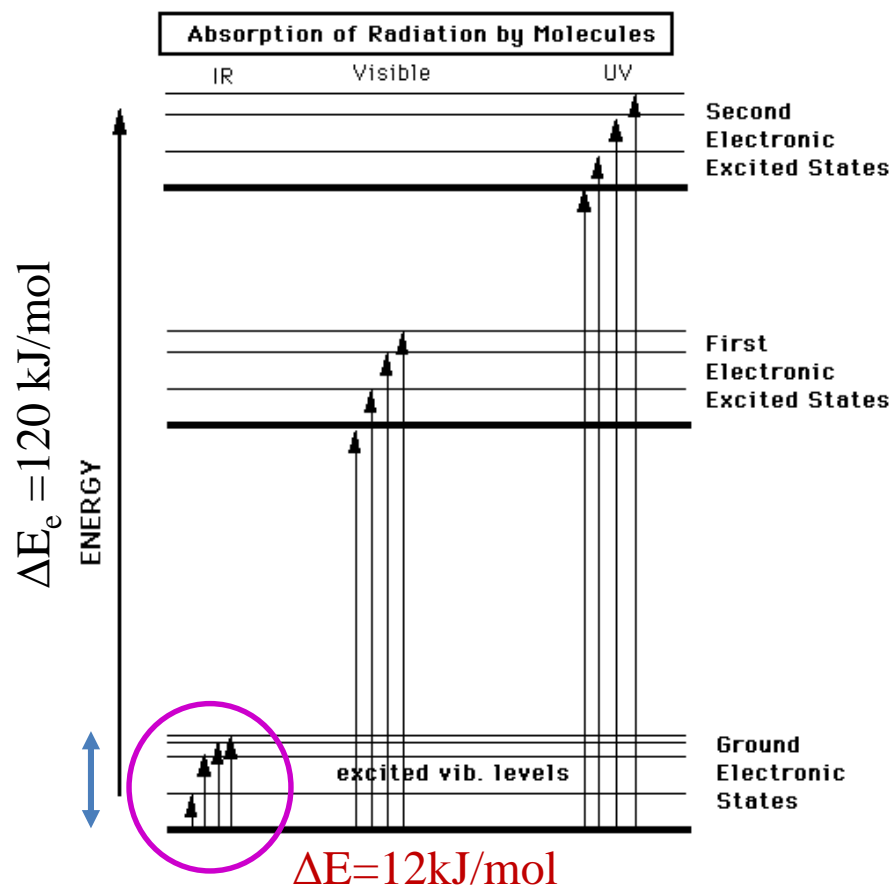
# La radiazione infrarossa



	NIR	MIR		FIR
$\lambda$ ( $\mu\text{m}$ )	0.74	3	30	300
$\nu$ (THz)	400	100	10	1
$\nu$ ( $\text{cm}^{-1}$ )	~13000	~3333	~333	~33
E (eV)	1.65	0.413	0.041	0.004
E (Kcal/mol)	37	10	1	0.1

- Luce infrarossa: radiazione elettromagnetica con lunghezza d'onda maggiore di quella della luce visibile
- Lo spettro IR si estende dal rosso della luce visibile ( $0.74 \mu\text{m}$ ) fino alle microonde ( $300 \mu\text{m}$ ).
- La frequenza va da 1 a 400 THz.
- Lo spettro IR viene comunemente diviso in tre regioni: Vicino, medio e lontano IR, in relazione alla luce visibile.

Se comparata alla luce visibile e alla luce ultravioletta, l'energia della radiazione infrarossa è piuttosto debole. Essa corrisponde alle transizioni energetiche fra i livelli vibrazionali delle molecole. Per questo motivo è comunemente definita **spettroscopia vibrazionale**.



L'interazione della luce infrarossa con le molecole causa una variazione temporanea dei movimenti roto-vibrazionali.

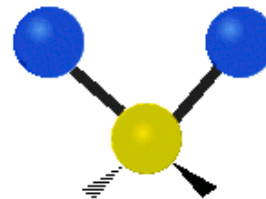
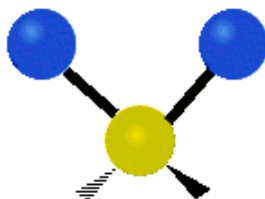
E' una radiazione non distruttiva: non causa rottura dei legami molecolari, li fa solo vibrare.

Per le **molecole triatomiche** (vedi es. molecola di acqua H<sub>2</sub>O), ed in generali per i gruppi di atomi legati da legame covalente, esistono diversi tipi di vibrazioni che possono essere:

- di stiramento (stretching) → cambia la lunghezza del legame
- di piegamento/deformazione (bending) → cambia l'angolo fra i legami

## Stretching modes ( $\nu$ )

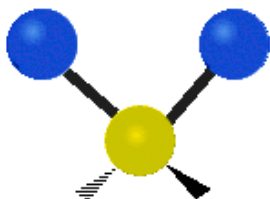
Symmetric  
Stretching



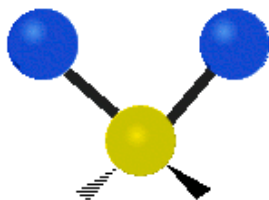
Antisymmetric  
Stretching

## Bending modes

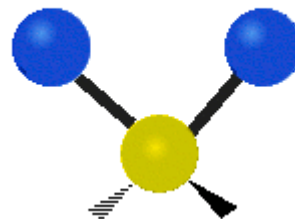
Scissoring ( $\delta$ )



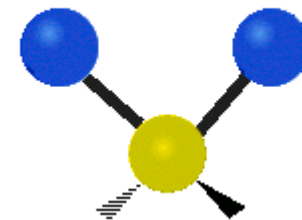
Rocking ( $r$  or  $\rho$ )

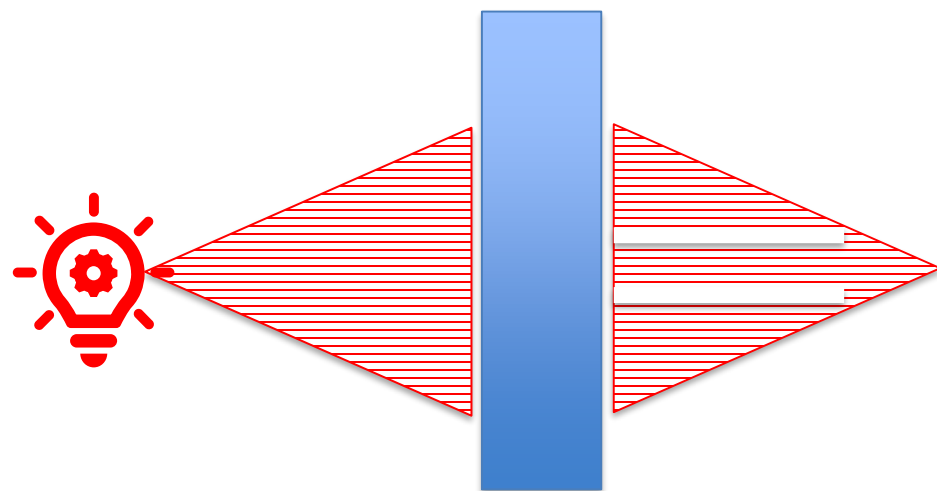


Wagging ( $\omega$ )



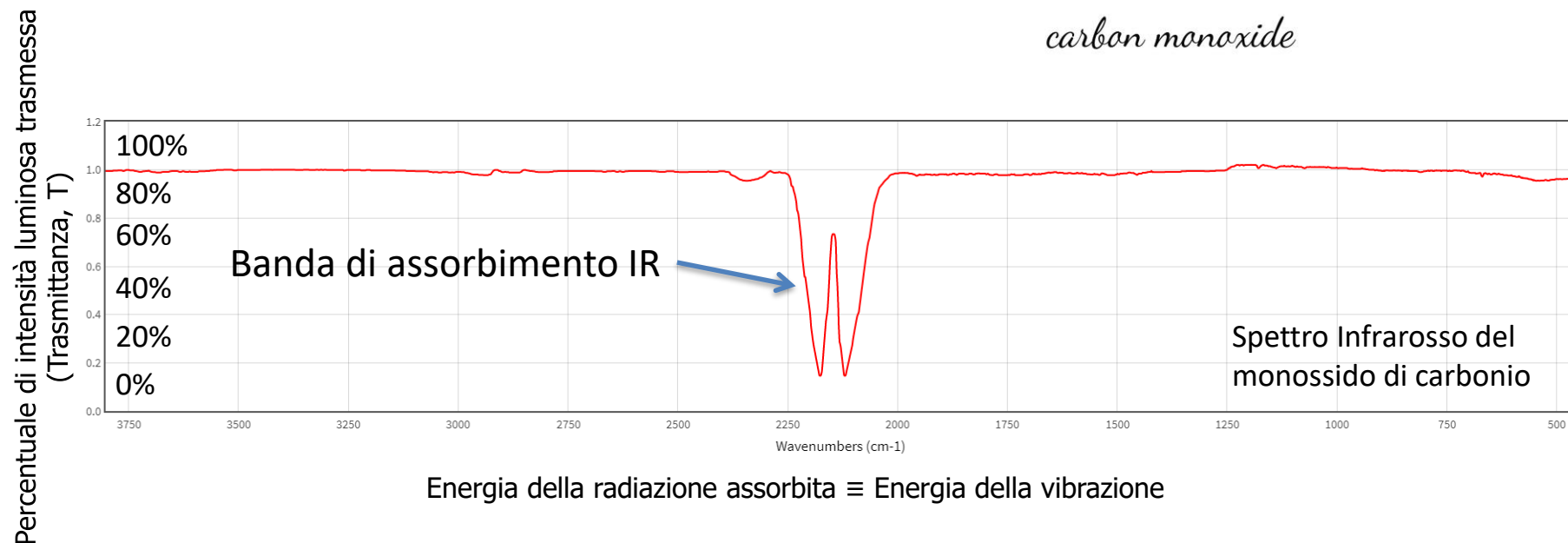
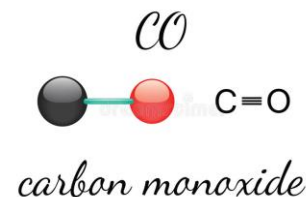
Twisting ( $\tau$ )





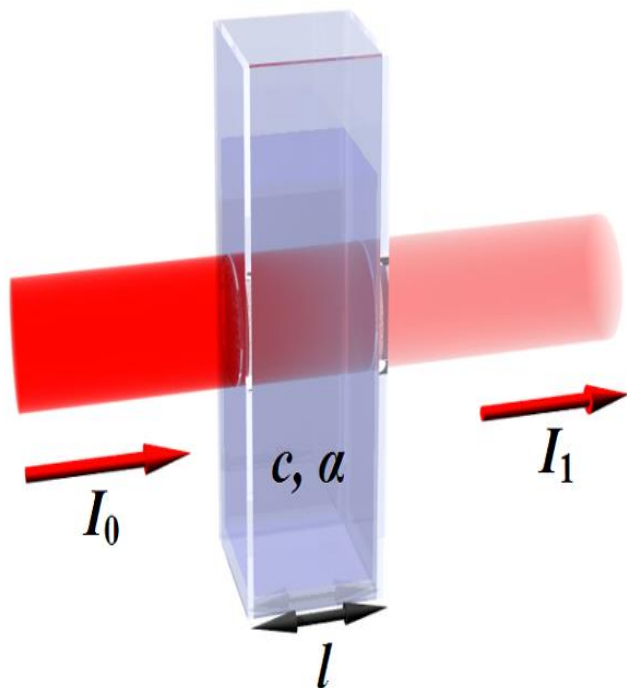
- Lo strumento opera irradiando un campione con radiazioni IR a diverse frequenze (energie)
  - Il campione assorbirà parte della radiazione alla specifica frequenza associata alla vibrazione molecolare
- 
- Identificando la specifica frequenza assorbita possiamo determinare quale sia la molecola costituiva del campione
    - **La spettroscopia infrarossa è qualitativa**

# Lo spettro infrarosso



La **posizione** della **banda di assorbimento** dipende dal **tipo di molecola**  $\rightarrow$  (dalle masse degli atomi costituenti, dalla forza del legame covalente). La **percentuale di assorbimento** dipende dalla **concentrazione della molecola**: maggiore la concentrazione di monossido, più intensa sarà la banda.

L'intensità del assorbimento è proporzionale allo spessore dello strato assorbente e la costante di proporzionalità è caratteristica della banda e della sostanza (legge di Lambert-Beer).



$$T = \frac{I}{I_0} \rightarrow \text{Trasmittanza}$$

$$A = \log_{10} \frac{I_0}{I} \rightarrow \text{Assorbanza}$$

$$A = \alpha c l \rightarrow \text{Lambert - Beer law}$$

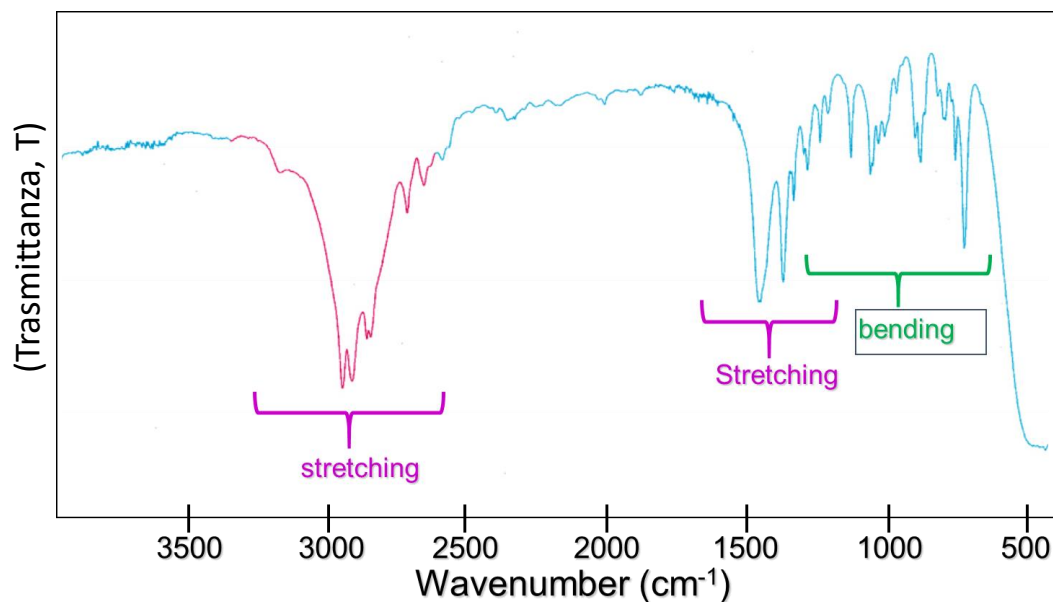
$\alpha$  = Molar Absorption coefficient [ $M\text{cm}^{-1}$ ]

$l$  = Optical path [ $\text{cm}^{-1}$ ]

$c$  = Molar concentration [ $M$ ]

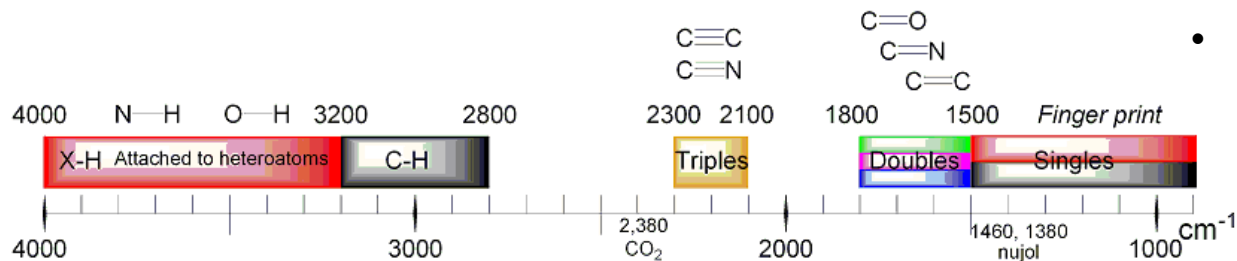
Misurando l'attenuazione della radiazione possiamo conoscerne la concentrazione della molecola costitutiva del campione → **La spettroscopia infrarossa è quantitativa**

# La complessità spettrale aumenta all'aumentare del numero di atomi di una molecola



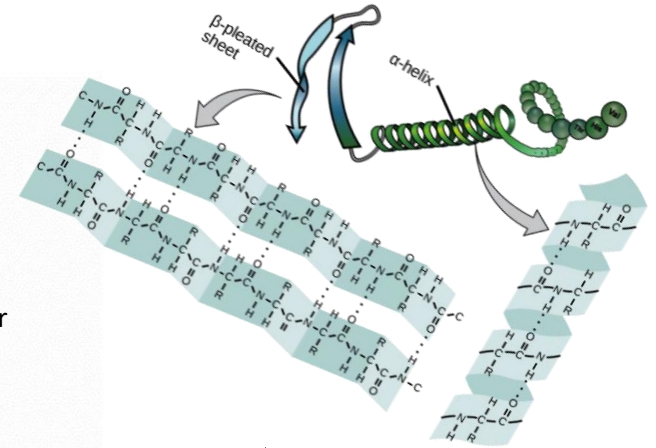
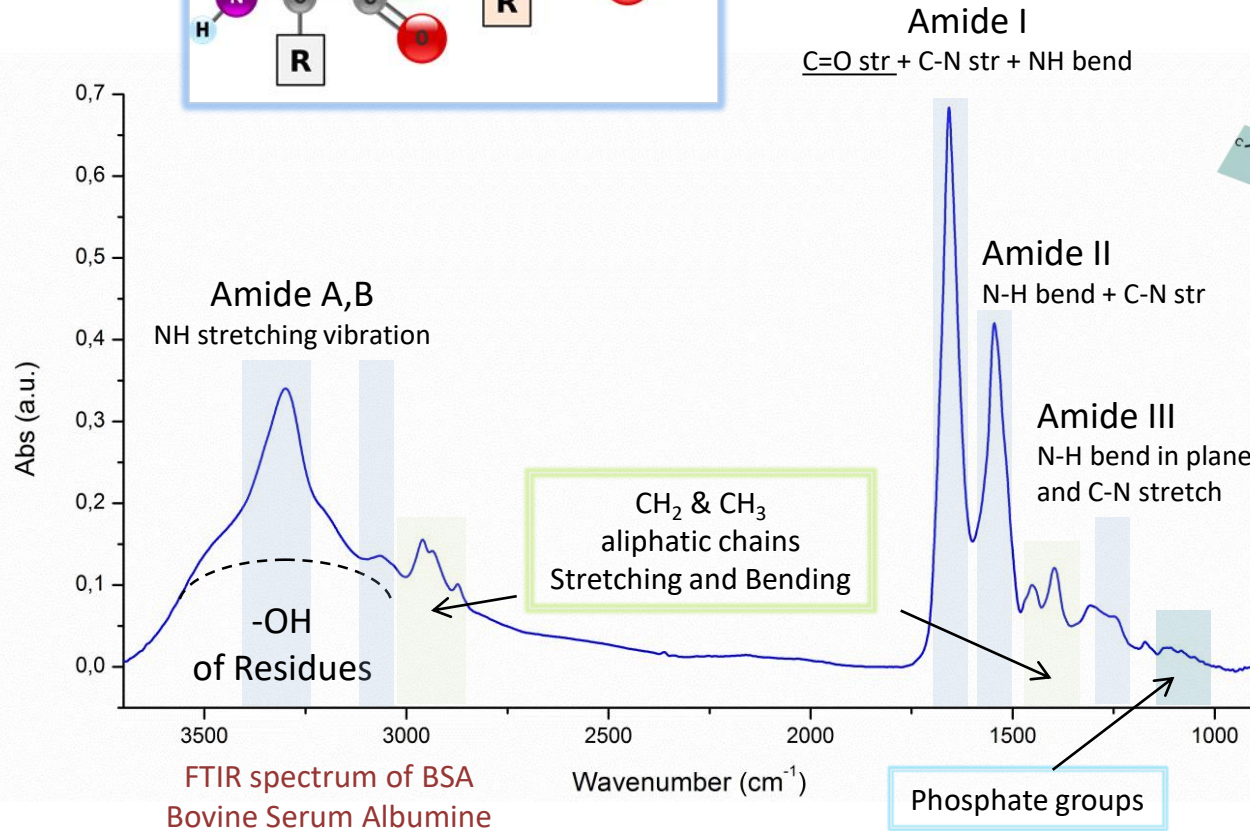
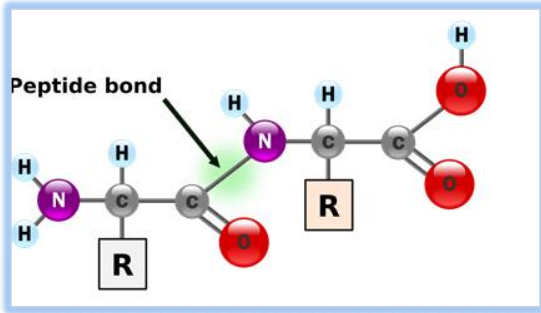
Osservando la **posizione** (frequenza), la **forma**, l'**intensità** e la **larghezza** dei picchi nel nostro spettro possiamo ricavare informazioni su:

- La natura degli atomi coinvolti nelle specifiche vibrazioni molecolari
- Caratteristiche dei legami atomici: lunghezza e forza di legame
- Il tipo di legame covalente: singolo, doppio o triplo
- L'intorno chimico

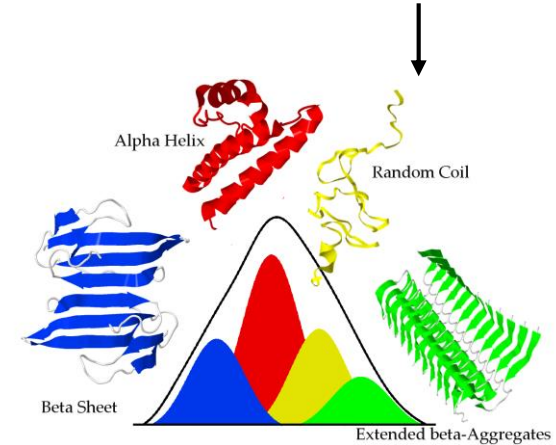




# Lo spettro infrarosso delle proteine



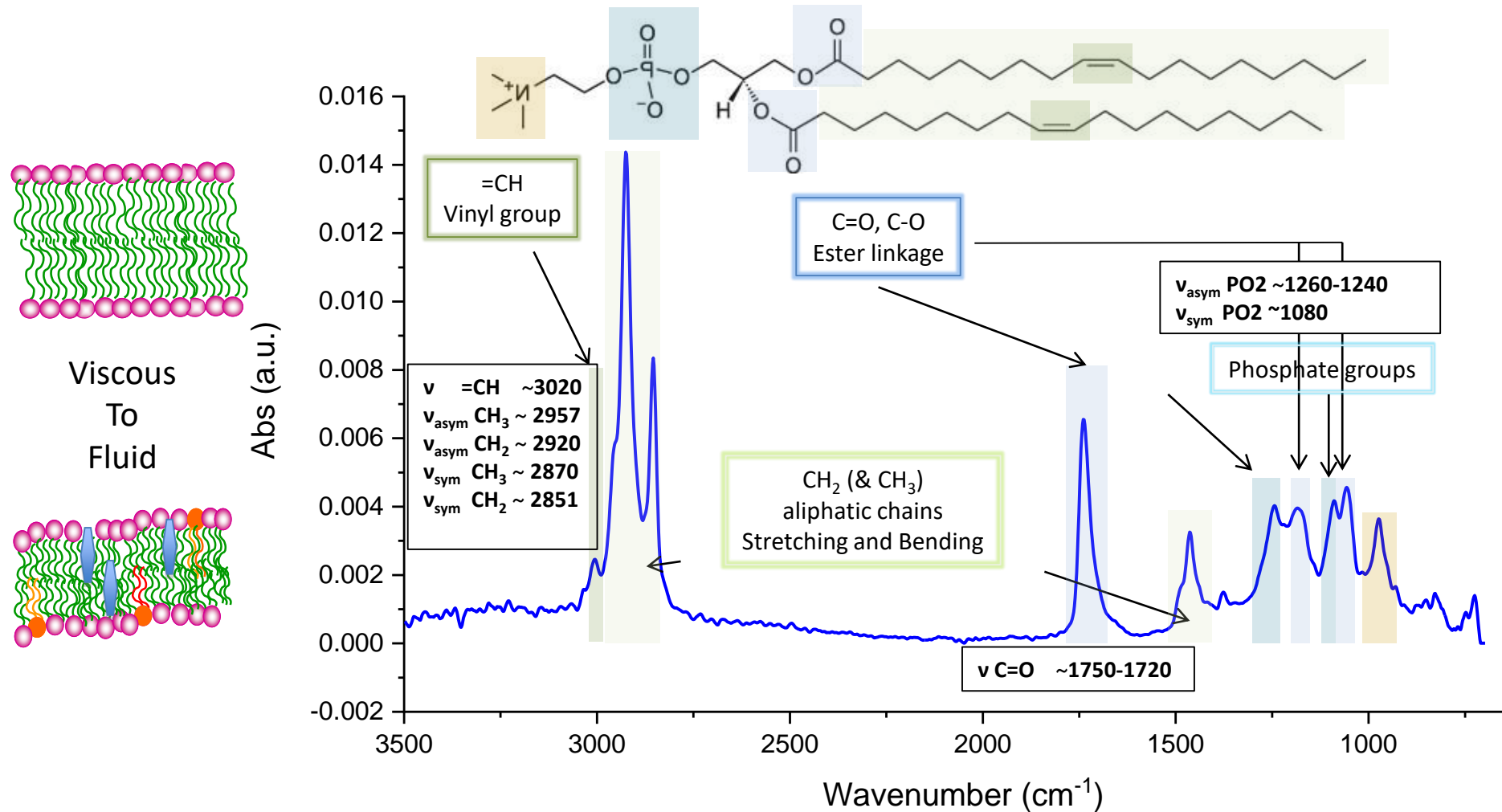
Different H-bonding networks for different peak positions



Amide I band is particularly sensitive to protein secondary structure, and conventionally employed for protein conformational studies

# Lo spettro infrarosso dei lipidi

DOPC - Dipalmitoilfosfatidilcolina

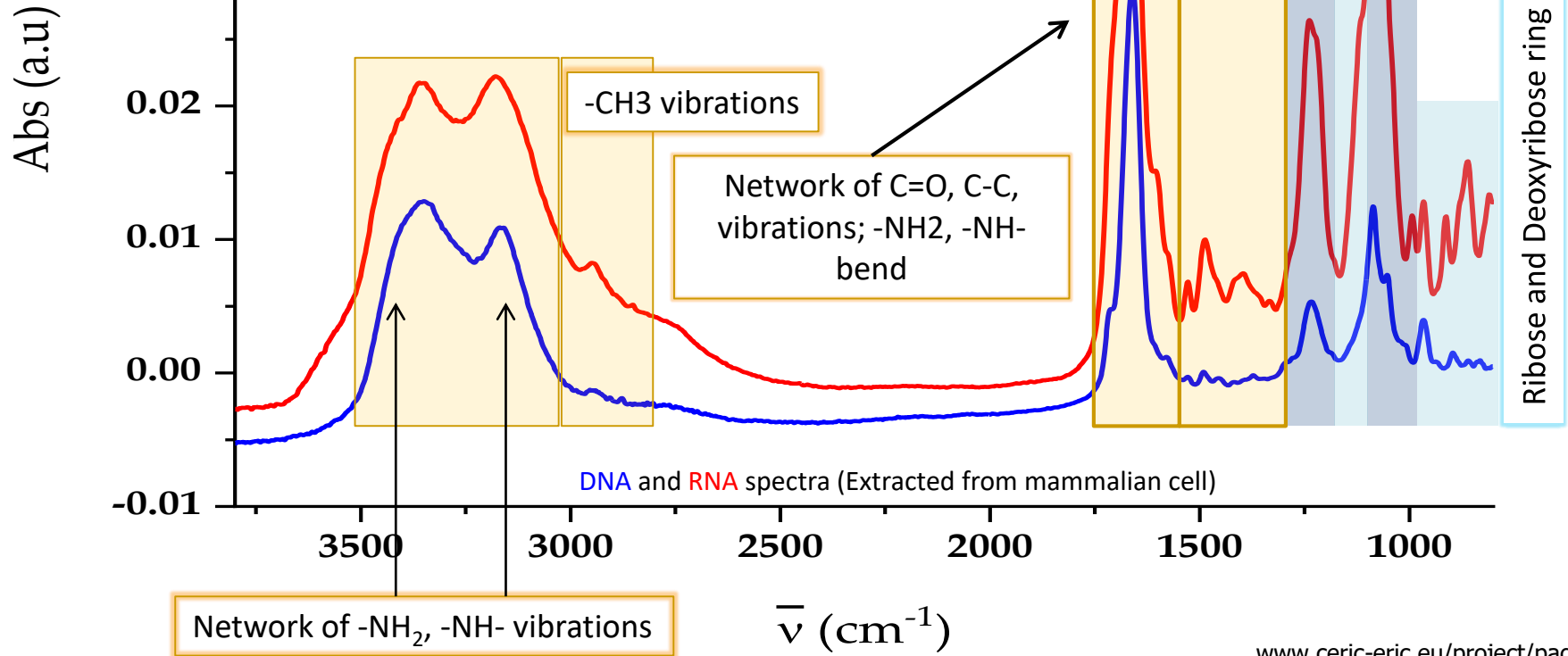
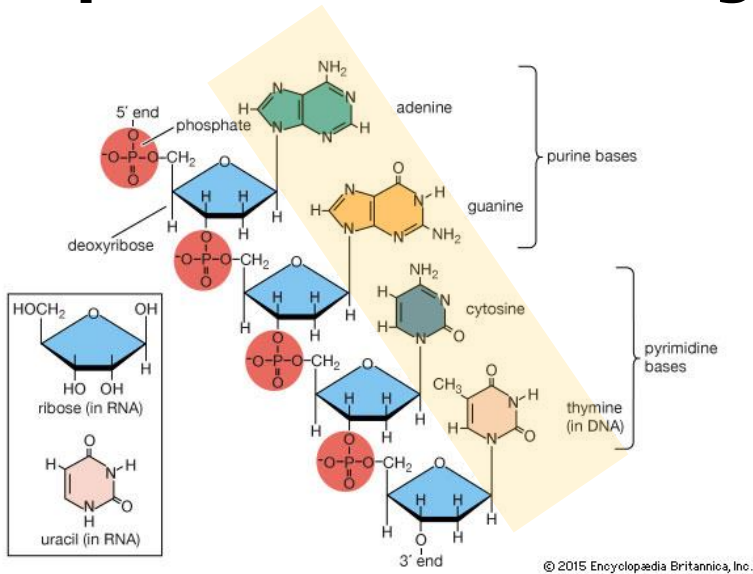


CH<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub> ratio: methyl-branched fatty acids increase membrane fluidity

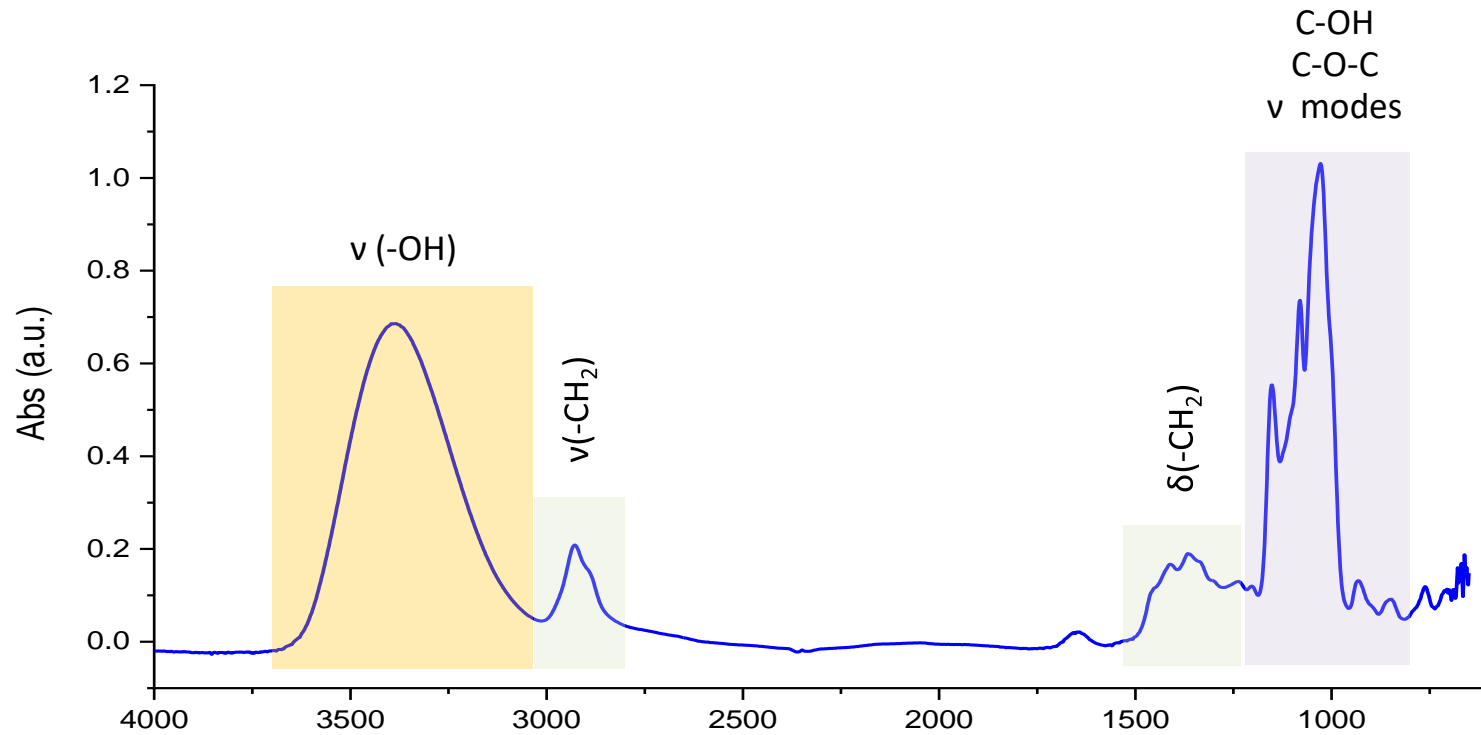
=C-H: Unsaturated fatty acids increase membrane fluidity

Shifts and broadening of the methyl and methylene bands are indicative of increased lipid disorder/fluidity

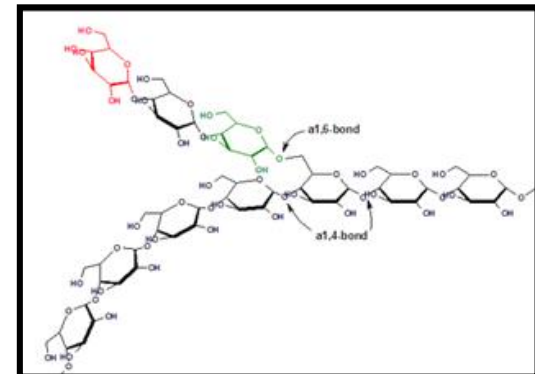
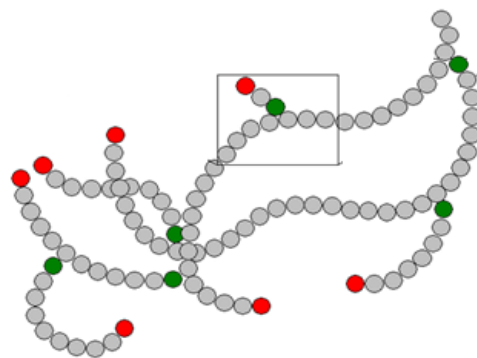
# Lo spettro infrarosso degli acidi nucleici



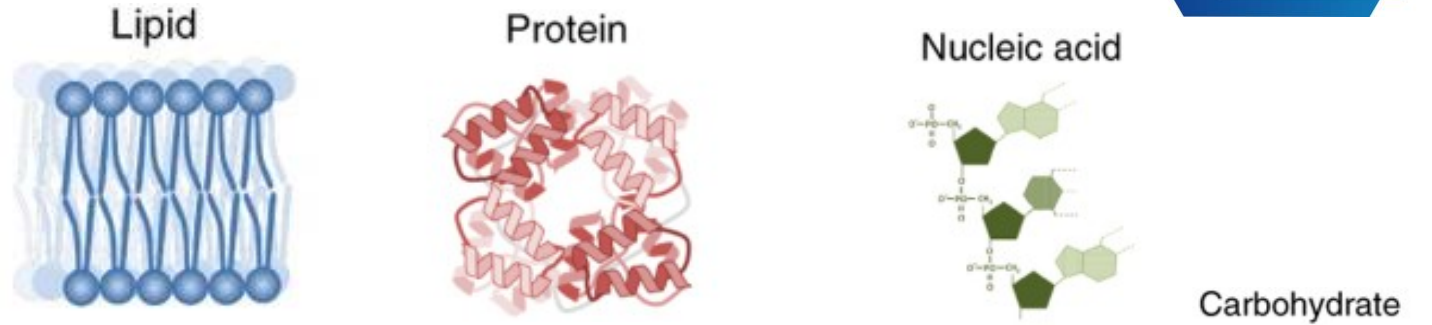
# Lo spettro infrarosso dei carboidrati



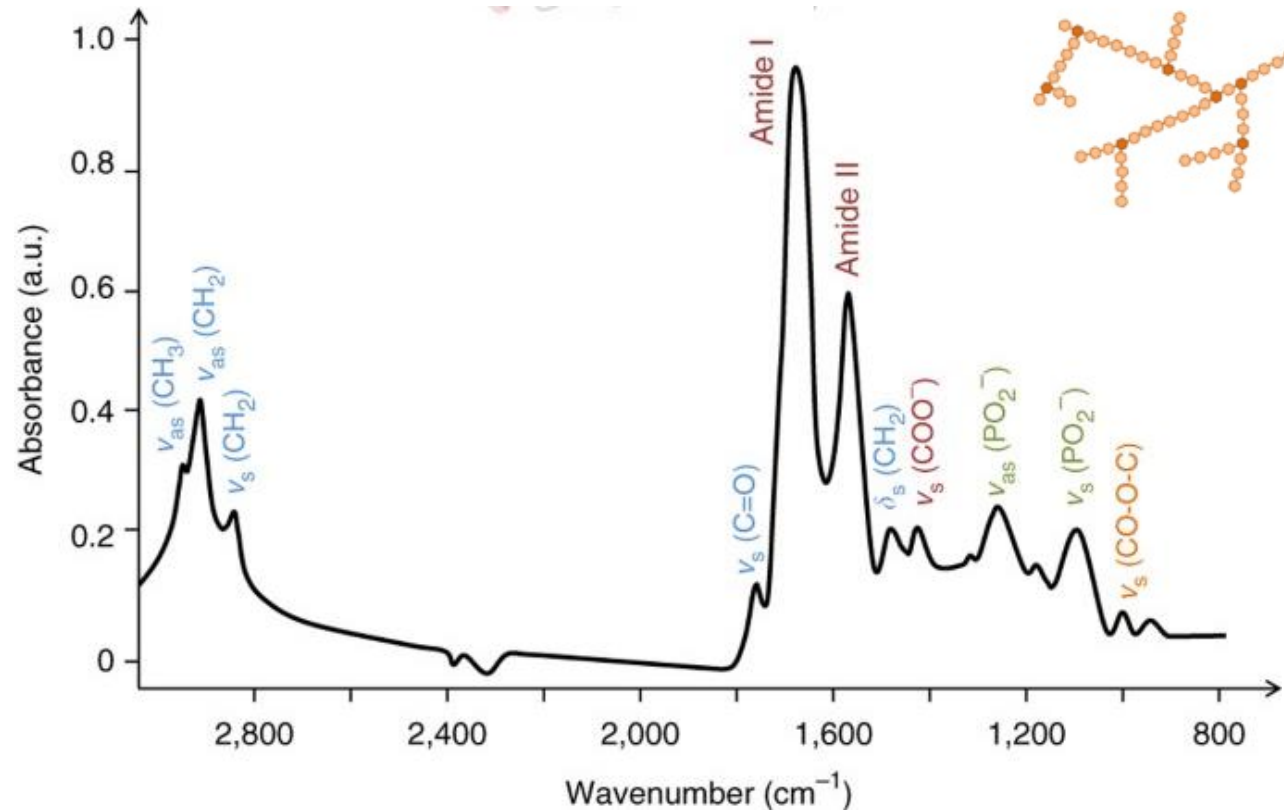
GLYCOGEN



# Le cellule animali: lo spettro infrarosso e le informazioni contenuto in esso



- Proporzioni relative delle varie classi di macromolecole
- conformazione
- Stato di Ordine/disordine
- Reazioni molecolari



# Svariate applicazioni



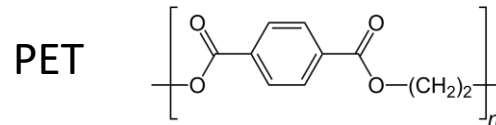
*Scienze mediche e farmaceutiche*



*Biochimica*



*Biologia*



Polietilen tereftalato



*Mineralogia e scienze della terra*



*Polimeri*

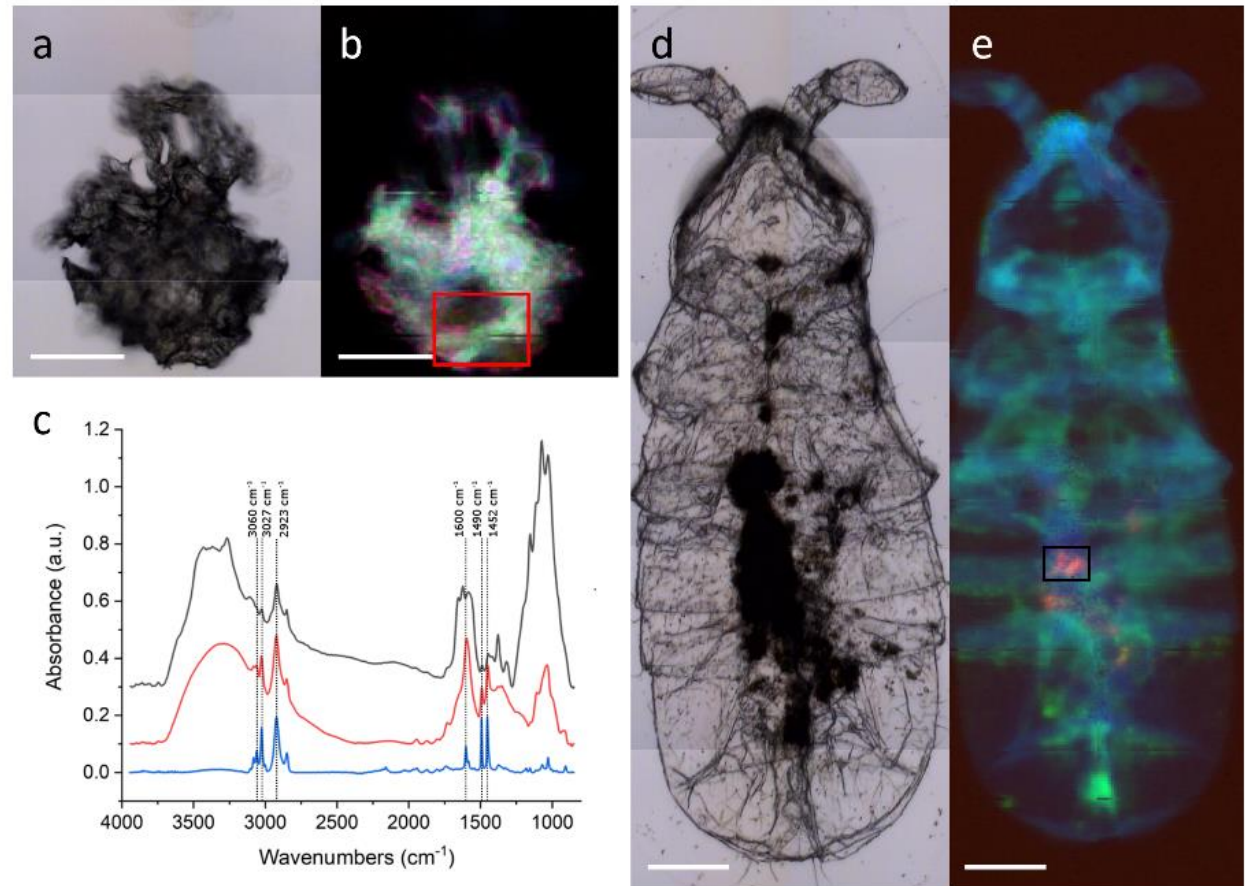


*Beni Culturali*

# Contaminazioni da microplastiche

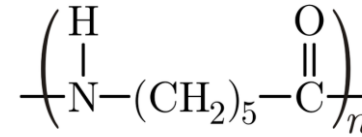


Ritrovate microplastiche (polistirene) all'interno dello stomaco di piccoli insetti antartici → collemboli (*Cryptopygus antarcticus*)

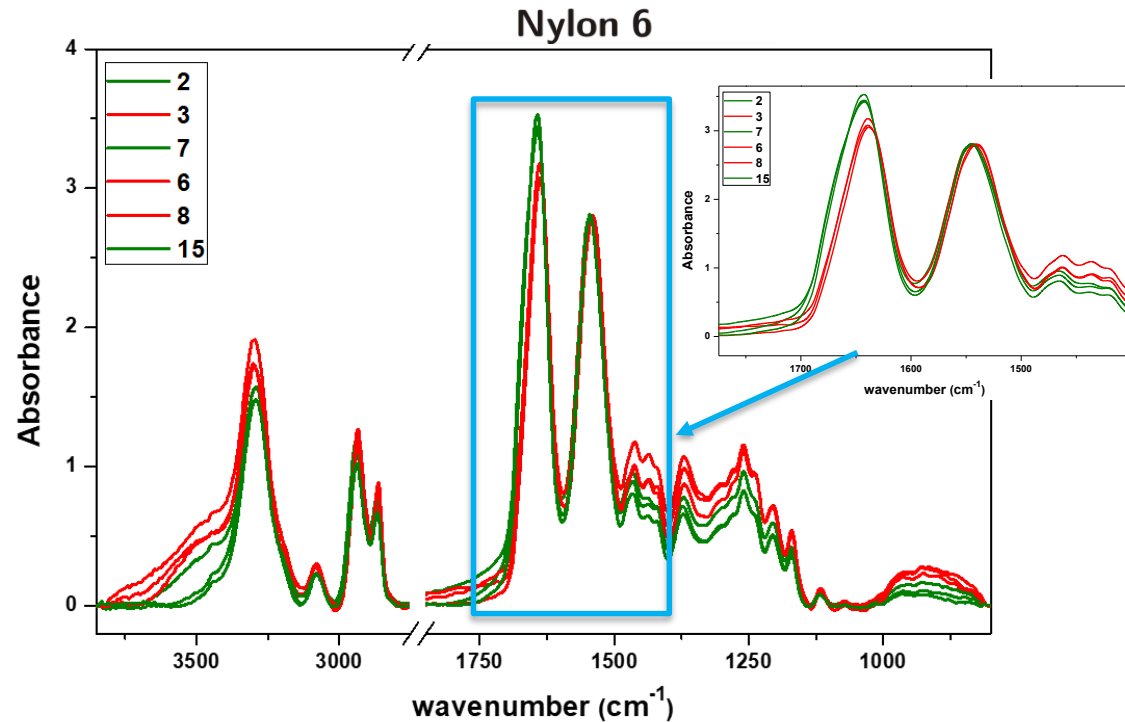
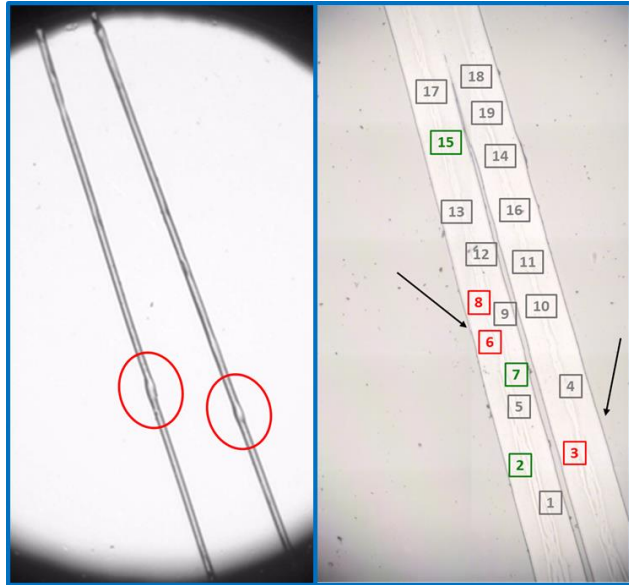


Bergami et al, Plastics everywhere: First evidence of polystyrene fragments inside the common Antarctic collembolan *Cryptopygus antarcticus*. Biol Lett. 2020

# Studio di difetti strutturali in filati sintetici (nylon 6)



Filato bianco



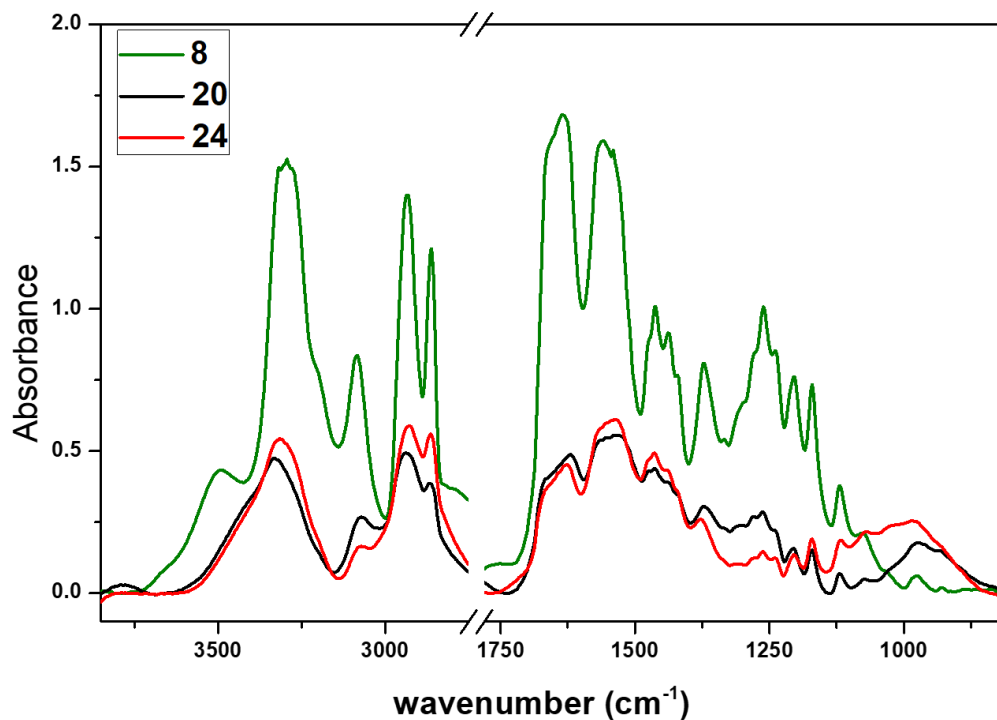
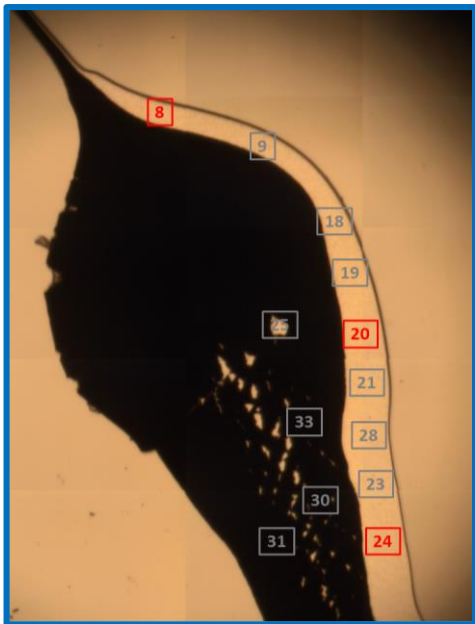
Gli spettri raccolti nei punti difettosi (spettri rossi) mostrano uno shift (spostamento della posizione) ed una diminuzione dell'intensità della banda



Diminuzione dell'ordine strutturale del polimero



Filato nero → ottenuto mediante l'aggiunta di nanoparticelle di carbonio



Generale diminuzione di intensità e slargamento (perdita di definizione) di tutti i segnali IR



Perdita dell'ordine conformazionale e della struttura cristallina del polimero

Spettrofotometro IR



Beamline

Microscopio VIS-IR

SISSI-Bio@Elettra - Photo courtesy of CERIC-ERIC  
R. Barnabà Ph.

## Vantaggi

- Analisi non distruttive
- Preparativa campioni scarsa o assente
- Tempi di misura veloci
- Possibilità di utilizzare strumenti portatili

## Applicazioni

- Identificazione di gruppi funzionali e strutture molecolari o loro modifiche
- Identificazioni di impurezze
- Monitoraggio di processi industriali

## Svantaggi

- Complessa interpretazione degli spettri
- Complesse analisi quantitative
- Misure fortemente sensibili a vapore aqueo e anidride carbonica
- Non dà informazioni elementari

## Settori d'applicazione

- Biologia
- Medicina
- Farmaceutica
- Scienze della terra
- Scienze dei polimeri
- Beni Culturali
- Produzioni industriali

# Thank you

[chiaramaria.stani@ceric-eric.eu](mailto:chiaramaria.stani@ceric-eric.eu)

SISSI-Bio Beamline

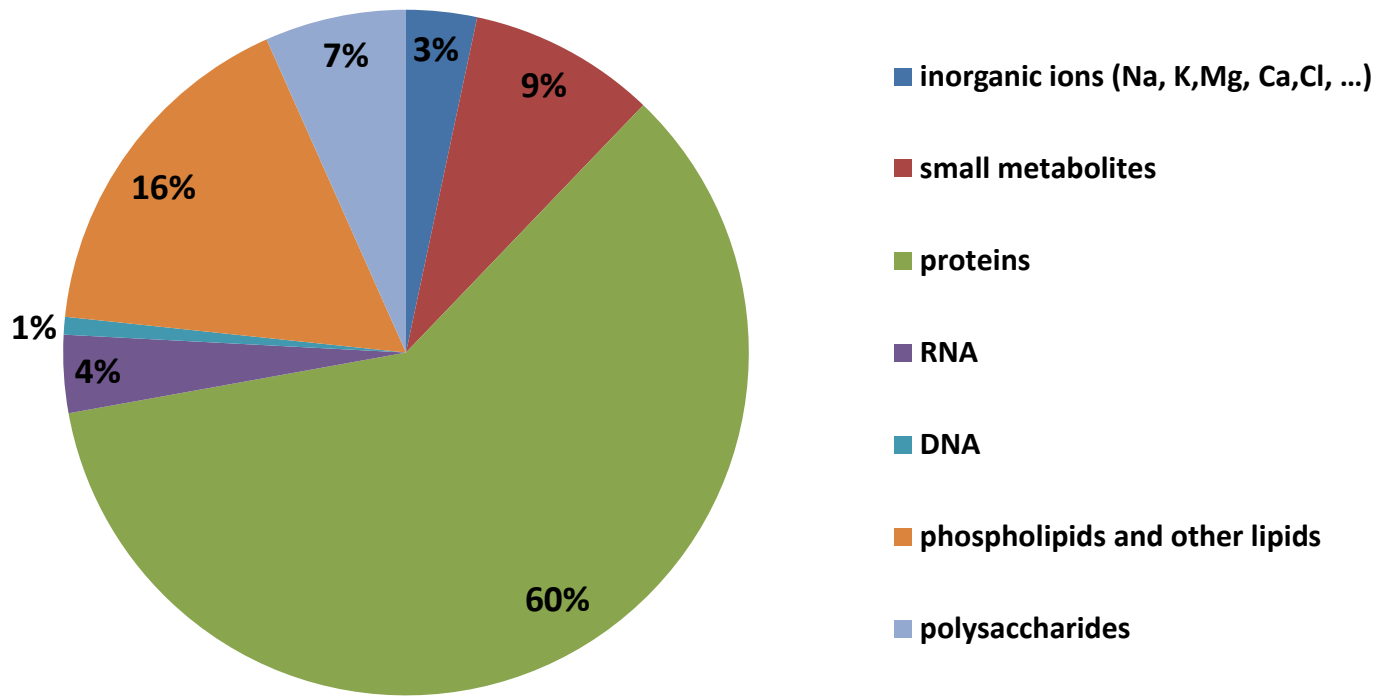




# Le cellule animali: Composizione media

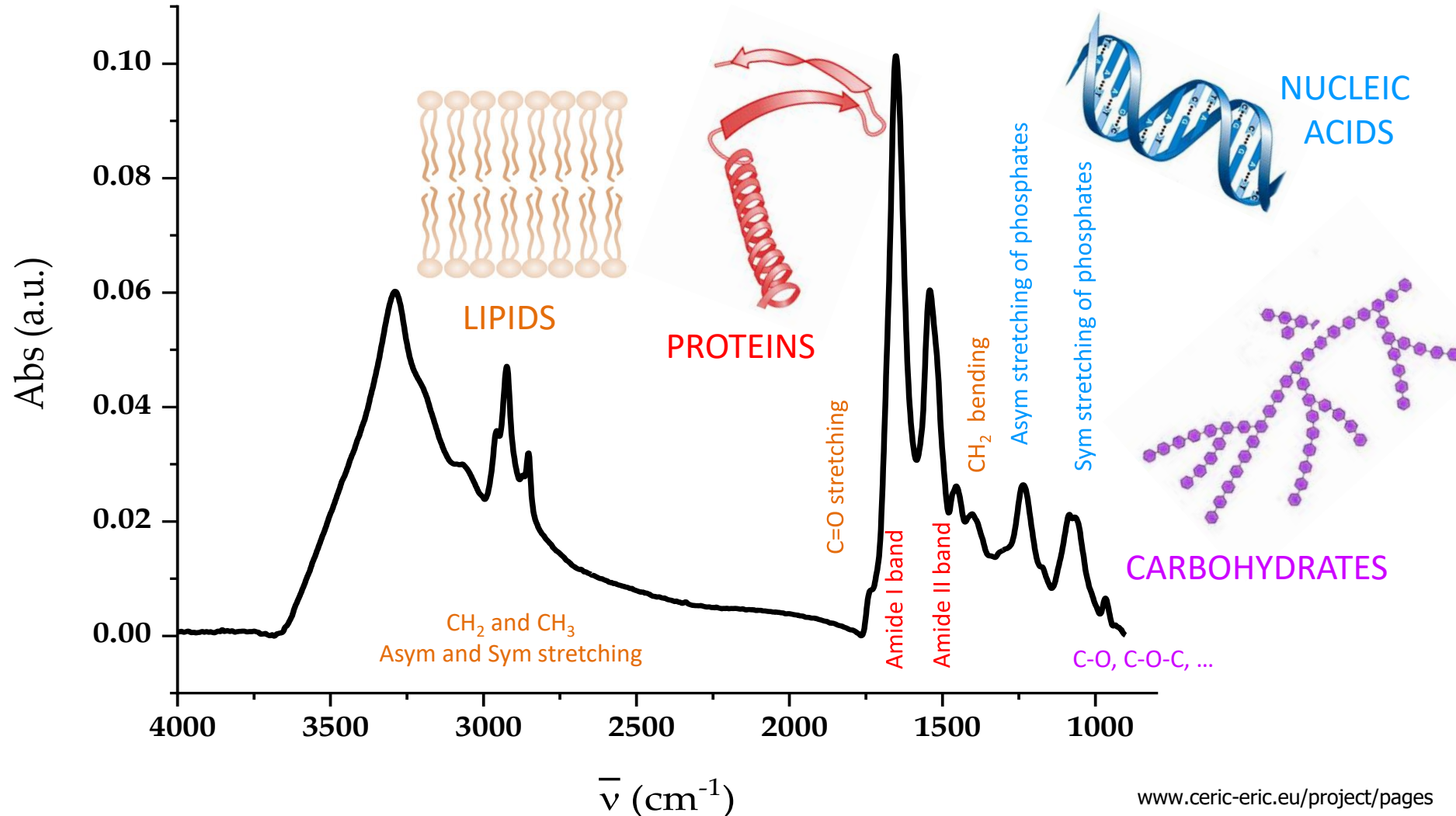
At a first glance, the FTIR spectrum of a mammalian cell can be viewed as the over imposition of the diverse spectral contribution of each individual components

**Typical mammalian dried cell chemical composition  
(component percent of total cell weight)**

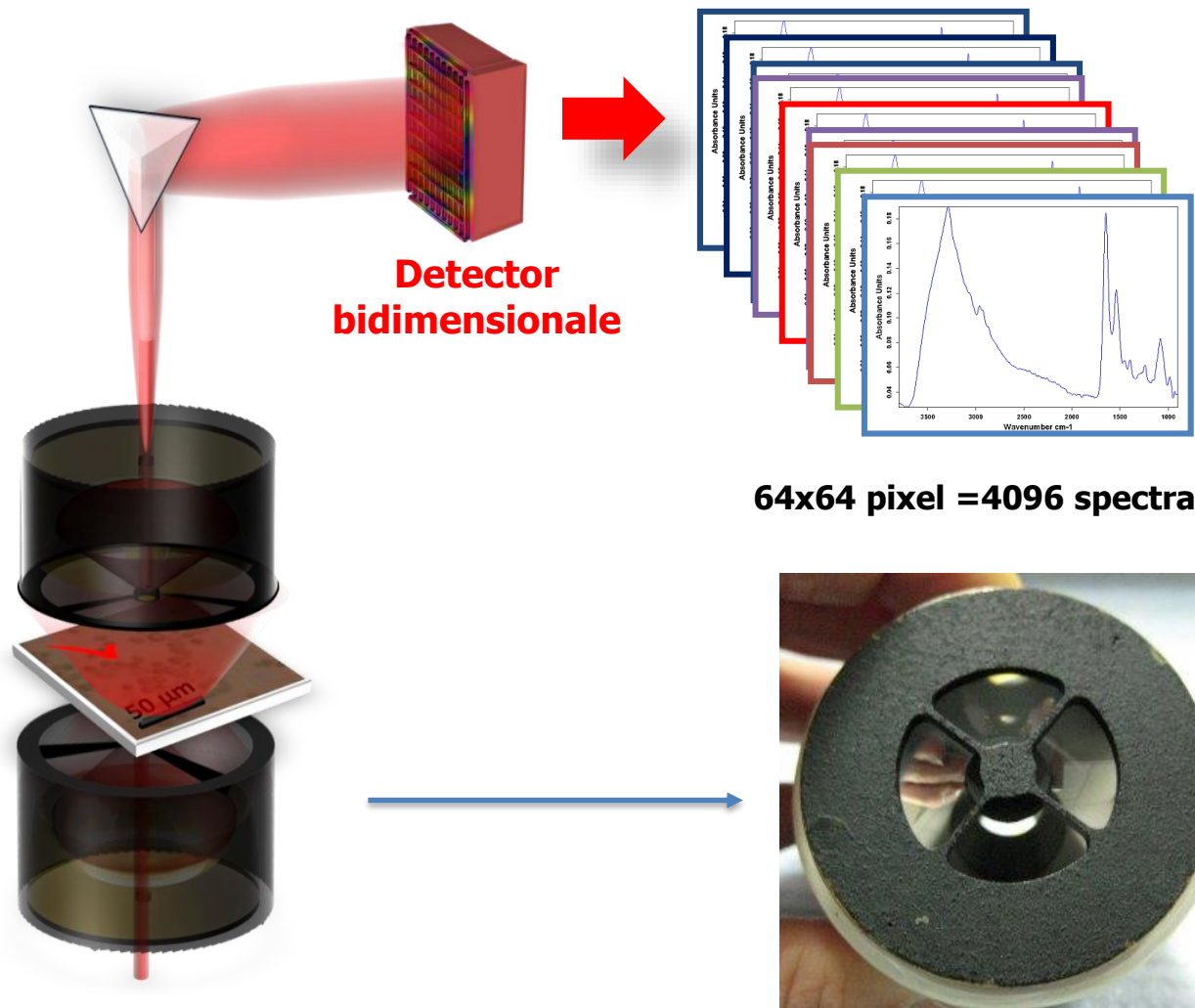


# Le cellule animali: lo spettro infrarosso e le informazioni contenuto in esso

Band intensity, position, width and shape (band components) are sensitive to subtle biochemical changes of bio-specimens.

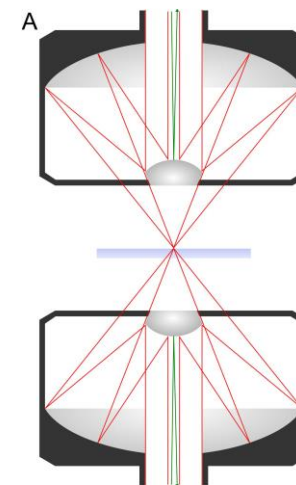


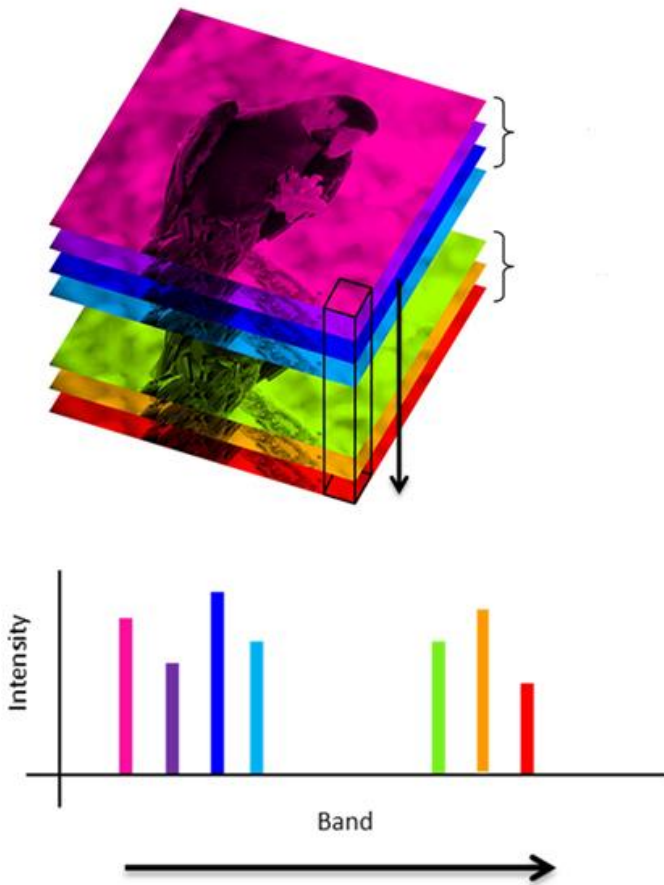




Ad ogni pixel del detector è associato uno spettro. Quindi, per ogni pixel abbiamo 4 variabili (x,y,I,v)

Come rappresentiamo le immagini infraosse?



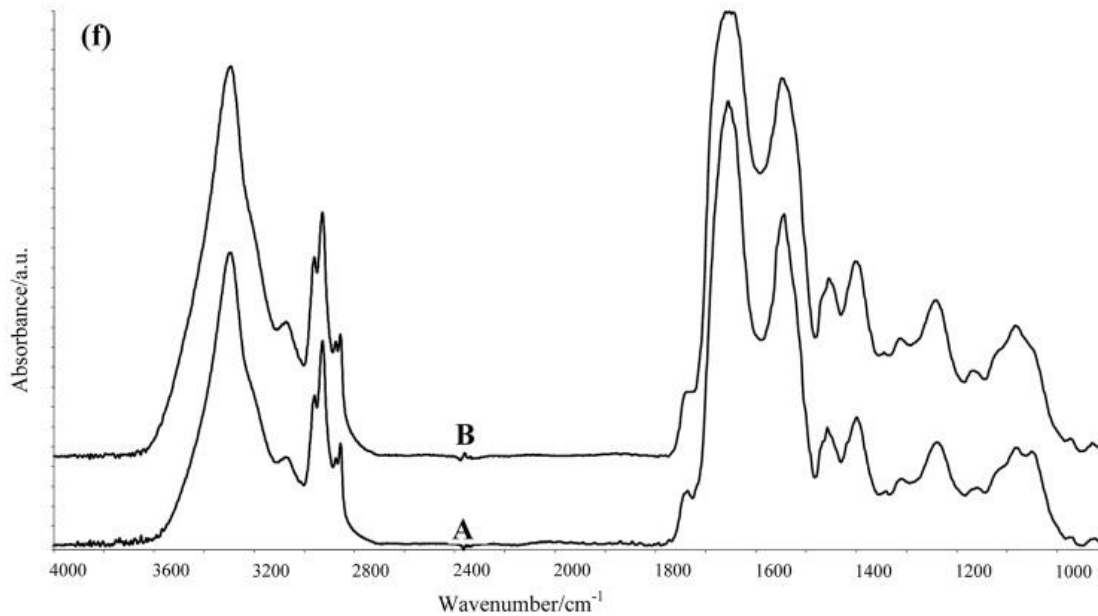
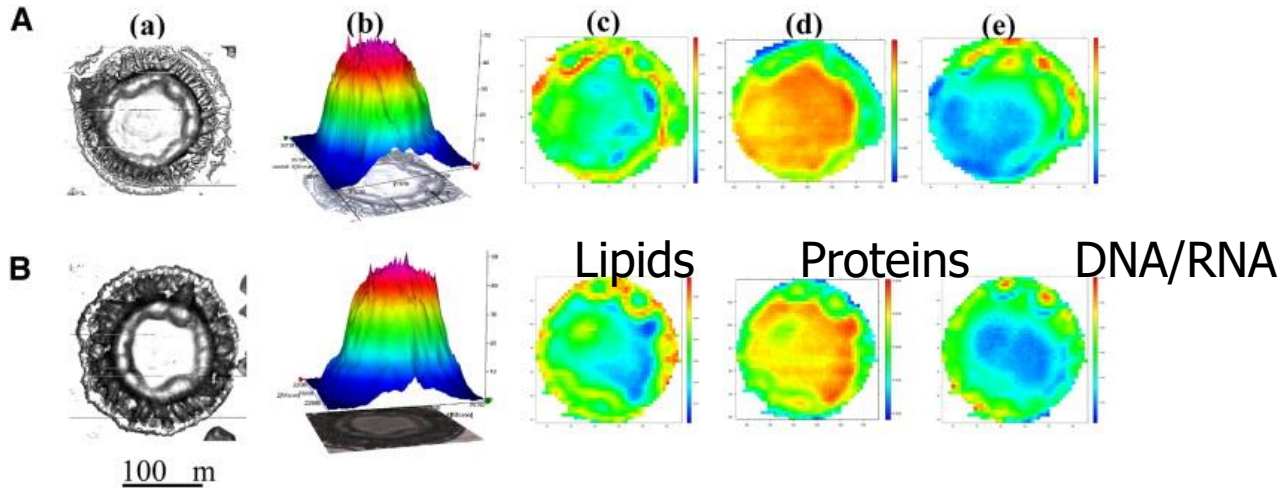


Per ogni banda dello spettro, possiamo costruire un'immagine per cui ogni pixel assuma una colorazione proporzionale all'intensità della banda considerata.

Le immagini all'infrarosso rappresentano quindi una distribuzione della bio-macromolecola associata alla banda considerata.

## Si tratta di **IMMAGINI CHIMICHE**

La banda porta con sé informazioni sulla tipologia di molecola investigata e dal confronto con le immagini di altri campioni possiamo raggiungere lo scopo diagnostico desiderato. Per esempio, dal confronto fra tessuti malati e sani, definire in maniera oggettiva il grado della lesione, anche per i casi più incerti.



group A, 30  $\pm$  2 years old;  
group B, 39  $\pm$  2 years old;







# Add Title

Add subtitle (if needed)

Add Text