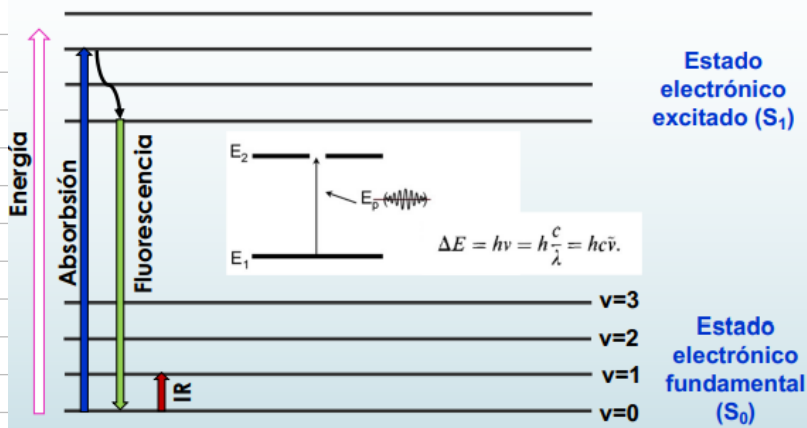


RAMAN

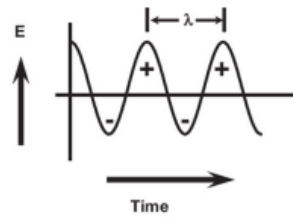
Radiación electromagnética

REPASO

"Cuando la luz interacciona con una molécula pueden producirse fenómenos de..."

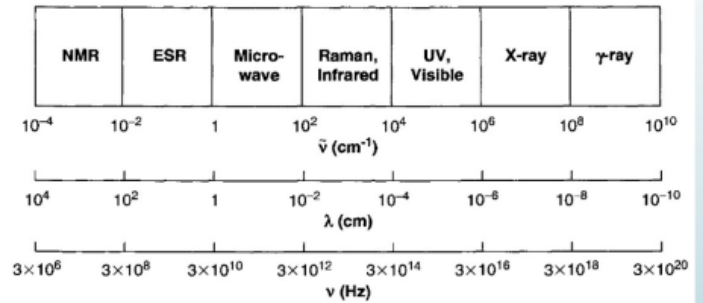


Componente eléctrica



$$\Delta E = h\nu = h\frac{c}{\lambda} = hc\bar{\nu}$$

Regiones del espectro electromagnético

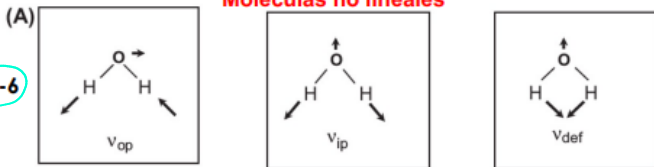


Movimientos moleculares que alteran la distancia entre átomos

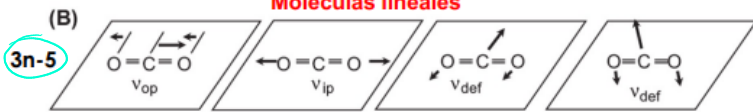
Tensiones o estiramientos y deformaciones de los enlaces

Modos normales de vibración

Moléculas no lineales



Moléculas lineales



Podemos saber la cantidad de tipos de vibraciones que puede tener una molécula con estas ecuaciones

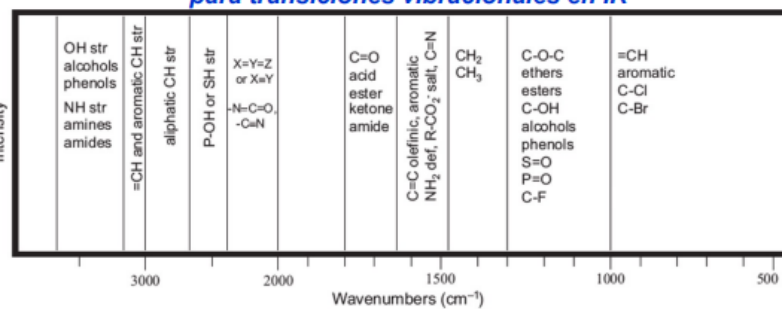
se descuentan los movimientos de traslación y rotacional

porque considera los ejes x, y, z, tiene un movimiento menos de los rotacionales y traslacionales al ser lineal la molécula

modos activos en IR
 $\Delta\mu \neq 0$

REPASO

Regiones características de las frecuencias para transiciones vibracionales en IR



Espectroscopia IR => transición entre estados vibracionales
técnica de absorción => información estructural

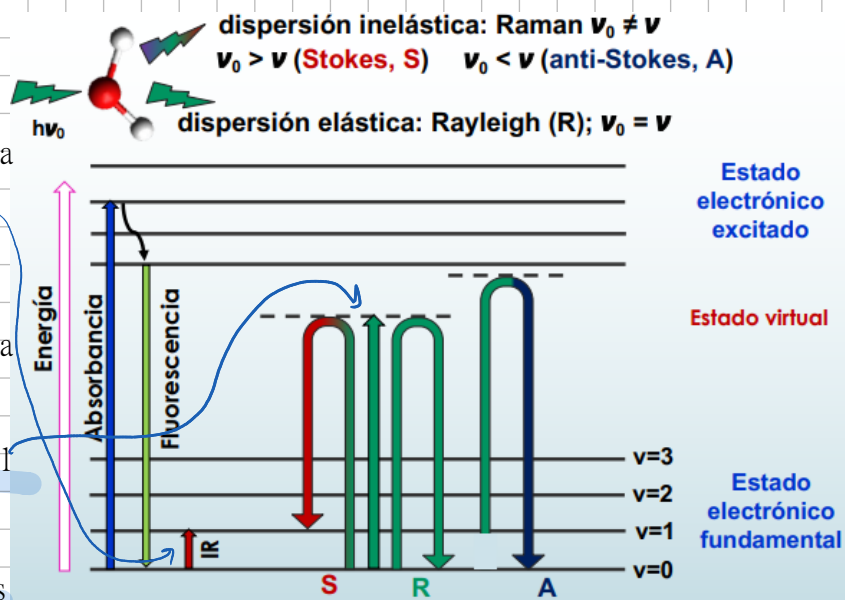
Espectroscopia RAMAN

- La espectroscopia raman utiliza la radiación IR; la energía dada a la molécula en estudio es vibracional y esta se mueve en el estado electrónico fundamental, sin llegar a excitarse.

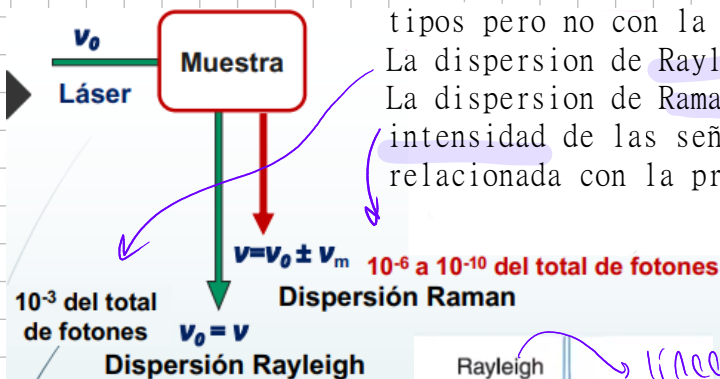
- En el caso de raman, la vibración IR genera que la molécula llegue a un estado virtual entre el fundamental y el excitado y luego se relaja volviendo a su estado fundamental o a un estado vibracional más alto.

- Lo que sucede es que la luz incidente no es cuantizada, no permite que haya un salto de nivel porque no tiene la cantidad suficiente de E. La muestra es irradiada con un haz monocromático de energía $h\nu_0$. Como la longitud de onda de la excitación está muy lejos de una banda de absorción, se puede considerar que la excitación afecta un estado virtual del nivel energético j. Luego, la molécula lo que hace es dispersar esa luz.

- Una molécula en el nivel vibracional fundamental ($v = 0$) puede absorber un fotón de energía $h\nu_{ex}$ volver a emitir un fotón de energía $h(\nu_{ex} - \nu)$.
 - Si la molécula se relaja al estado vibracional igual al que estaba, la dispersión es llamada elástica o rayleigh $\nu_0 = \nu$ (2)
 - Si hay modificación de la energía con respecto a la incidente es una dispersión de RAMAN o inelástica, puede darse:
 - Cuando la radiación difundida es de frecuencia más baja que la radiación de excitación se denomina difusión de Stokes. llega a un nivel vibracional mayor (S)
 - La radiación difundida de una frecuencia más alta que la radiación de la fuente se llama difusión anti-stokes. $\nu_0 < \nu$ (A)

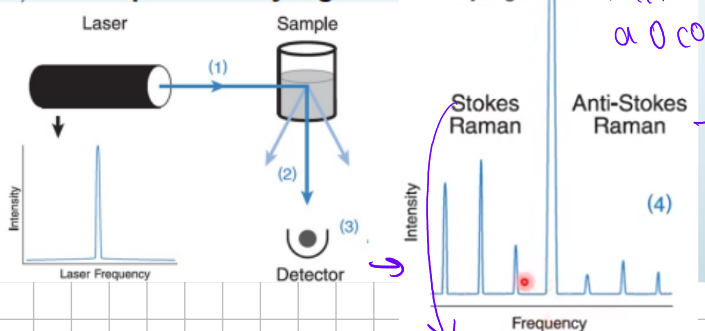


Espectrofotometría



- Se incide la muestra con un laser y podemos tener dispersión de ambos tipos pero no con la misma probabilidad de que sucedan. La dispersión de Rayleigh sucede en uno de cada mil fotones. La dispersión de Raman sucede en uno de cada un millón de fotones. La intensidad de las señales Raman son mucho mas pequeñas porque esta relacionada con la probabilidad de que ocurran.

- La frecuencia del laser atraviesa la muestra, se dispersa la luz y llega al detector para obtener el espectro.



corrimiento a menores frecuencias

línea a 0 corrimiento

corrimiento a mayores frecuencias

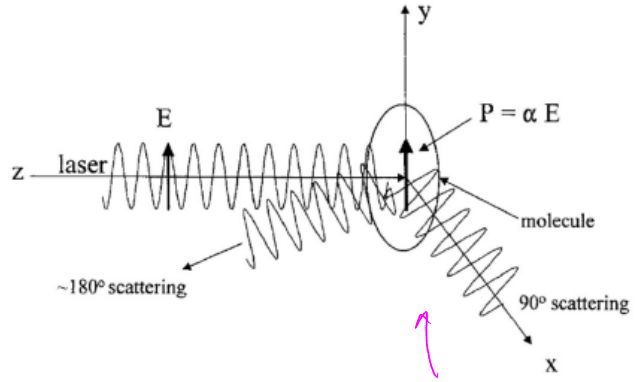
- Estos corrimientos van a tener igual energía que la diferencia de energía entre los estados vibracionales.

Difusión de Rayleigh	Difusión de Raman
$E = h\nu_{ex}$	$E = h\nu_{ex} \pm \Delta E$

- Podemos asegurarnos que estas señales son de antistokes porque sabemos que las moléculas que inicialmente estuvieron en un nivel vibracional ma alto (V=1) son muy pocas, entonces la intensidad de la señal va ser muy chica

- Aumentando la tra estas intensidades crecerian porque la poblacion de moléculas en nivel mas alto seria mayor

Fundamentos

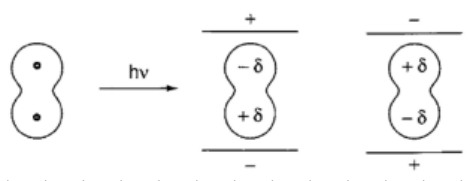


Polarización de una molécula por acción de un campo eléctrico incidente

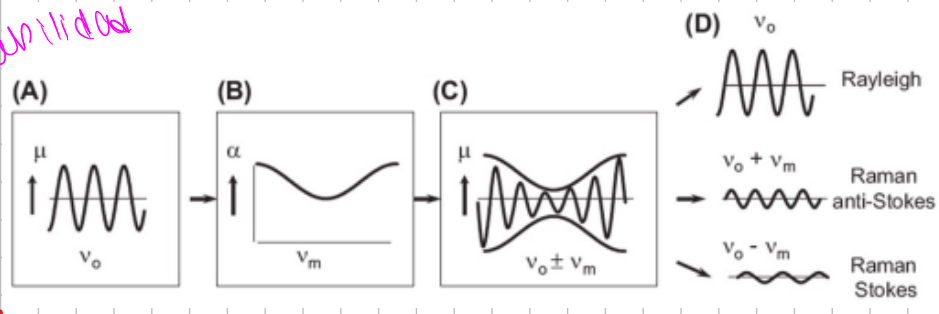
- Además de la información relacionada con la frecuencia y la intensidad, las mediciones Raman proporcionan una variable más que a veces es útil para determinar las estructuras moleculares, a saber, la relación de despolarización.
- Es importante distinguir con cuidado entre los términos polarizabilidad y polarización. El primer término describe una propiedad molecular que tiene que ver con la deformabilidad de un enlace.

- En cambio, la polarización es una propiedad del haz de radiación y describe el plano en el que vibra la radiación. Cuando se obtienen los espectros Raman mediante una radiación polarizada en un plano, se observa que la radiación dispersada está polarizada en distintas direcciones, lo cual depende del tipo de vibración responsable de la difusión.

Polarización de una molécula diatómica en presencia de un campo eléctrico



polarizabilidad
 $\mu = \alpha E$



Magnitud de la dispersión RAMAN

- La intensidad de la señal o la magnitud de la dispersion Raman es proporcional a la diferencia entre la frecuencia del laser y de la vibracion. Vemos que es a la cuarta, es mucha la dependencia que tiene. La frecuencia de vibracion es propio de la molécula, no se puede cambiar. Podemos cambiar la frecuencia del laser
- Tambien es proporcional, obvio a la intensidad del laser y tambien al cambio en la polarizabilidad de la molécula. No todos los enlaces tienen la misma probabilidad de que sucedan por dispersion raman. Para que suceda raman, debe haber cambio neto en la polarizabilidad del enlace

$$I_{Raman} \propto (v_L - v_m)^4 I_0 N \left(\frac{d\alpha}{dQ} \right)^2$$

- I_{Raman} : Intensidad
- v_L : frecuencia del láser
- v_m : frecuencia de la vibración
- I_0 : intensidad del láser
- N : número de moléculas
- α : polarizabilidad
- Q : amplitud de la vibración

Sección eficaz

Probabilidad de que un foton se disperse por efecto raman con un dado corrimiento raman

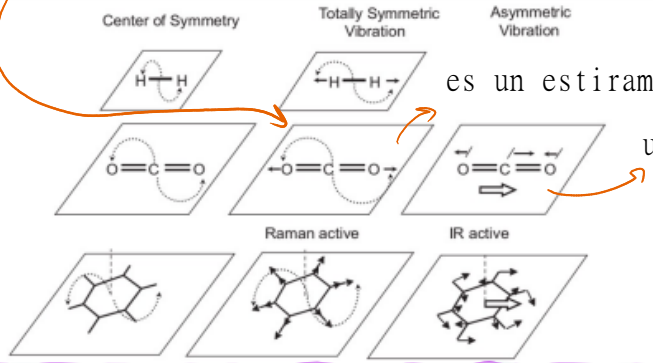
σ (cm² por molécula)
 $\frac{d\sigma}{d\Omega} \propto B$ (cm² molécula⁻¹ sr⁻¹)

Estructura molecular y espectro vibracional

- moléculas con centro de simetría tienen esta condición

Moléculas con centro de simetría: la regla de exclusión mutua establece que una vibración no puede ser activa en ambos espectros (IR y Raman)

Vibraciones totalmente simétricas siempre son activas en Raman

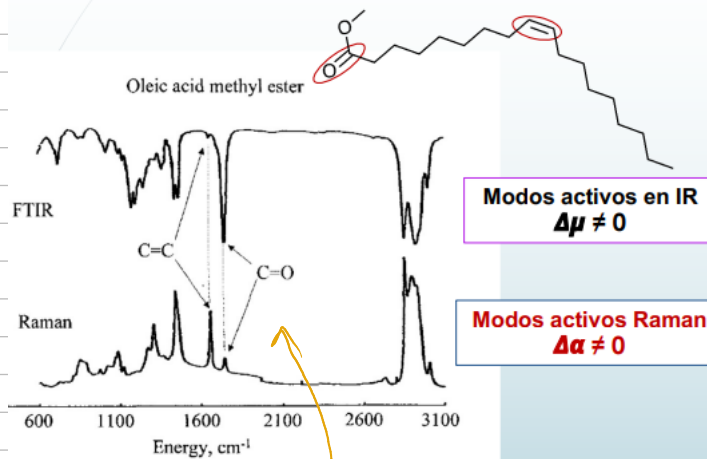


es un estiramiento simétrico, por ambos lados

una parte se estira y otra se encoje

Otras moléculas (sin centros de simetría) pueden tener vibraciones de enlaces activas tanto en IR como en Raman, con igual o diferente intensidad.

comparación de magnitudes entre dispersión Raman y abs IR



	Frequency (cm^{-1})	IR ^a	Raman ^b
Alkanes			
CH ₃ sym stretch	2862–2882	vs	vs
C—C stretch	1040–1100	—	s
Cyclopentane ring breathing	889	—	s
Alcohol O—H stretch	3635–3644	m	w
Acetylene C—H bend	825–640	s	w
Acetylene C≡C	2230–2237	—	s
C≡N stretch in R—CN	2230–2250	s	vs
Cyanate C≡N	2245–2256	s	vs
C—H in R—CHO	2800–2850	m	—
C=O in R—CHO	1730–1740	vs	w
R—NO ₂ asym stretch	1530–1600	vs	m–w
R—NO ₂ sym stretch	1310–1397	s	vs
C—S stretch	580–704	—	vs
S—H stretch	2560–2590	w	s
R ₂ S ₂ S—S stretch	507–512	m–w	s
Benzene ring breathing	992	—	vs
Primary R—Cl	650–660	s	s
Primary R—Br	565–560	s	vs
Primary R—I	500–510	s	vs

^aTaken from Reference 8.

^bvs = very strong, m = medium, w = weak, dash = absent.

- Viendo la señal del carbonilo, es muy fuerte en IR, porque tiene un cambio de momento dipolar $\Delta\mu$ fuerte. Como el cambio en la polarizabilidad $\Delta\alpha$ no es grande, en raman no es fuerte la señal

- El doble enlace CC, no tiene cambio de momento dipolar entonces no se observa nada en IR, pero en raman es intenso

Muestras

- Se pueden analizar sólidos, líquidos transparentes y sólidos translúcidos, polvo, pellets, gases.
- Raman normal necesita concentraciones mM.

Raman vs IR

Dispersión Raman

- Líneas estrechas
- Compatible con agua
- Uso de fibras, muestreo remoto
- No invasivo generalmente
- Modos a bajas frecuencias observable
- Posibilidad de incremento por resonancia y superficie

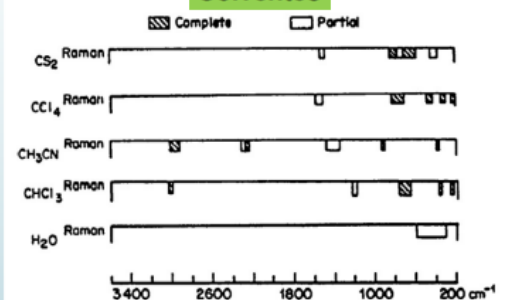
- Baja sensibilidad
- Interferencias

Absorción FTIR

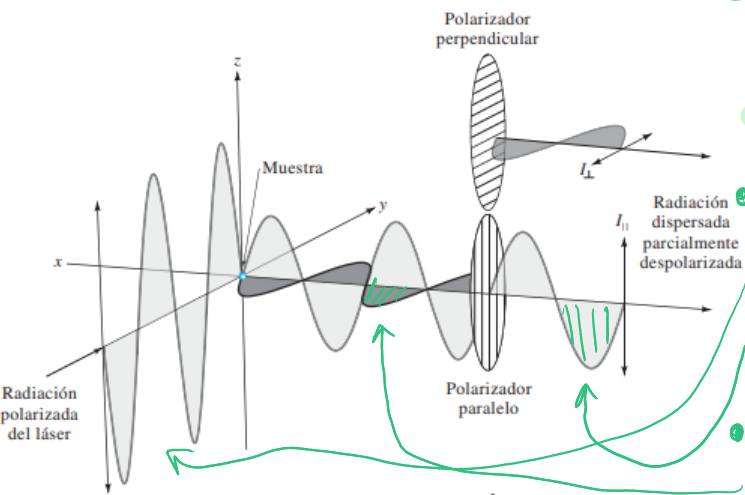
- Líneas estrechas
- Buena huella digital
- Biblioteca de espectros
- Vibraciones fundamentales

- Muestreo difícil
- Agua absorbe fuertemente

Solventes



Relación de despolarización Raman



• Cuando se obtienen los espectros Raman mediante una radiación polarizada en un plano, se observa que la radiación dispersada está polarizada en distintas direcciones, lo cual depende del tipo de vibración responsable de la difusión.

• La radiación procedente de una fuente láser está polarizada en el plano yz. Parte de la radiación dispersada resultante está polarizada paralelamente al haz original, es decir, en el plano xz; la intensidad de esta radiación se simboliza por el subíndice ||.

• El resto del haz dispersado está polarizado en el plano xy que es perpendicular a la polarización del

haz original; la intensidad de esta radiación, polarizada perpendicularmente, se indica con el subíndice \perp .

• La relación de despolarización p se define como
$$p = \frac{I_{\perp}}{I_{||}}$$

• La relación de despolarización depende de la simetría de las vibraciones causantes de la difusión. Es posible demostrar que la despolarización máxima para las vibraciones no simétricas es de $6/7$, y para las vibraciones simétricas la relación es siempre menor a este valor. Por tanto, la razón de despolarización es útil para correlacionar las líneas Raman con los modos de vibración.

Útil para determinar estructuras moleculares
Correlacionar líneas Raman con modos vibracionales

Vibraciones no simétricas: p aprox. 0,75
Vibraciones simétricas, p va de 0 a $< 0,75$

Selección de la λ_{exc}

• En la espectroscopía Raman se requiere un dispositivo de alta calidad para seleccionar la longitud de onda con el fin de separar las líneas Raman, relativamente débiles, de la intensa radiación difundida de Rayleigh.

• Los filtros de interferencia holográficos, llamados filtros de ranura o de muesca, y las redes holográficas han mejorado a tal grado que han eliminado en la práctica la necesidad de monocromadores de redes múltiples. Los instrumentos con monocromadores invariablemente contienen tubos fotomultiplicadores como transductores debido a las señales tan débiles que miden. La mayoría de los espectrómetros también están equipados con sistemas que cuentan los fotones para medir la intensidad Raman.

• Se requiere de altas concentraciones de muestra para ver una mínima señal

• Las fuentes de excitación deben ser especiales (láseres monocromáticos intensos).

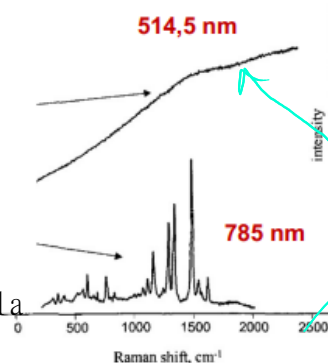
• Si aumento la long de onda del laser, la intensidad sera menor.

• Independientemente de la long de onda que elige el corrimiento siempre es el mismo, porque esto esta relacionado con los modos vibracionales de la molecula. Lo que cambia es la intensidad. Vemos que estos dos espectros a distintas long de onda son muy distintos. En el primero esta afectado o tiene "ruido" por la interferencia de la flourescencia

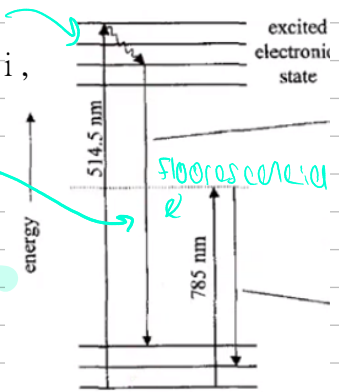
Para tener en cuenta
- Baja intensidad de la señal Raman
↓
Fuentes de excitación monocromáticas e intensas:
Láseres

$$I_{Raman} \propto \lambda^{-4} I_0 N \left(\frac{d\alpha}{dQ} \right)^2$$

- Interferencia de la fluorecencia



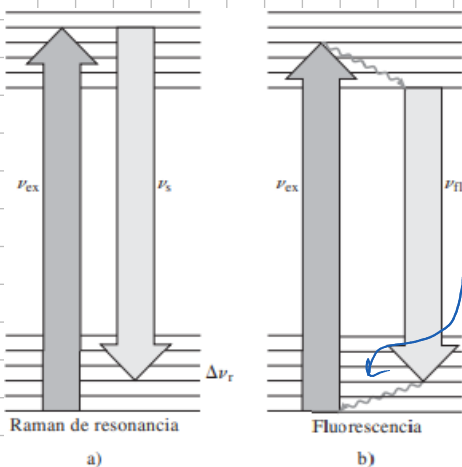
Vemos que a esa long de onda mas corta, se sobrepasa el estado virtual y se llega a un nivel electronico mas alto. Una vez ahi, puede desactivarse y producir flourescencia despues. Esto es lo que geenera el background tan grande que esconde las señales raman, que de por si no son tan intensas



Si no se puede evitar esta flourescencia, se puede usar un laser de menor energia para evitar el salto de nivel electronico

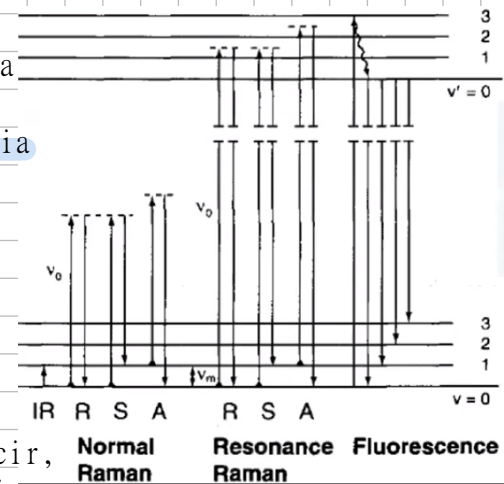
Raman de resonancia

- La dispersión Raman de resonancia hace referencia a un fenómeno en el cual las intensidades de las líneas Raman son realizadas en gran manera al excitarlas con longitudes de onda que se aproximan mucho a la banda de absorción electrónica de un analito. La intensidad de las líneas en un experimento Raman de resonancia aumenta con rapidez cuando la longitud de onda de excitación se aproxima a la longitud de onda de la banda de absorción electrónica.
- Las magnitudes de las líneas Raman asociadas con las vibraciones más simétricas aumentan en un factor de 10^{-2} a 10^{-6} . Se han podido obtener espectros Raman de resonancia con concentraciones tan bajas de analito como 10^{-8} M. Los estudios Raman normales se limitan de ordinario a concentraciones mayores que 0.1 M.
- Además, puesto que el aumento de la resonancia se limita a las bandas Raman asociadas con el cromóforo, por lo regular, los espectros Raman de resonancia son muy selectivos



- La dispersión Raman de resonancia difiere de la flourescencia en que la relajación al estado fundamental no está precedida de una relajación hacia el nivel vibracional más bajo del estado electrónico excitado.

- La aplicación más importante de la espectroscopia Raman de resonancia es el estudio de moléculas biológicas en condiciones fisiológicamente importantes; es decir, en presencia de agua y a concentraciones de bajas a moderadas.

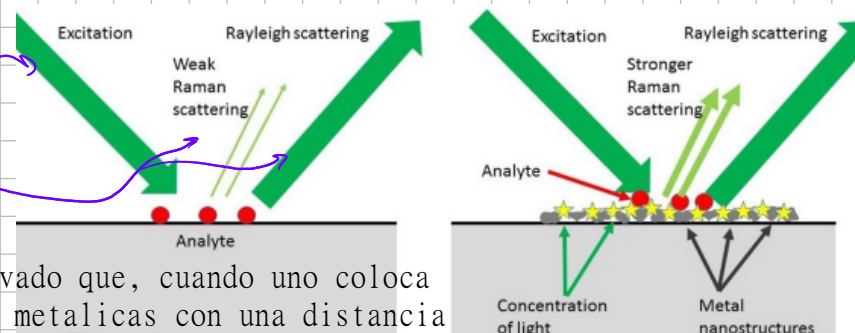


(Surface enhanced Raman spectroscopy)

SERS espectroscopia raman incrementada por la superficie

- Supone la obtención de espectros Raman, a la manera usual, de muestras que se adsorben sobre la superficie de partículas metálicas coloidales, casi siempre plata, oro o cobre; o bien, sobre superficies rugosas de trozos de estos metales. Las líneas Raman de la molécula adsorbida se intensifican a menudo en un factor de 10^{-3} a 10^{-6}

- Tenemos un analito que se excita con un laser. El ancho de las flechas tiene que ver con la intensidad o la probabilidad de que ocurra, vemos que raileigh tiene mas intensidad que raman.



- Para incrementar las de raman, se ha observado que, cuando uno coloca el analito en presencia de nanoestructuras metalicas con una distancia

muy cercana, se da un incremento de raman. No de toc vibracionales que estan intimamente relacionados cor

Instrumentación

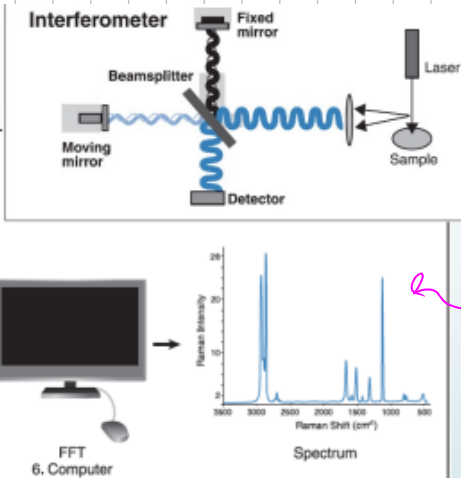
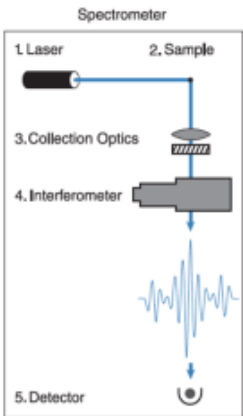
Componentes básicos

- 1- Fuente de excitación: láser
- 2- Muestra y sistema de colección de luz
- 3- Selector de longitudes de onda
- 4- Detector

constan de una fuente láser, un sistema para iluminar la muestra y un espectrómetro apropiado

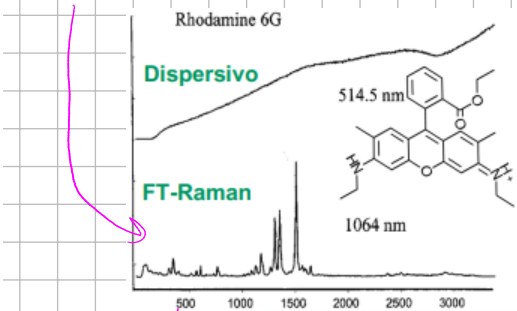
Tipo de fuente	Longitud de onda, nm
Ion argón	488,0 o 514,5
Ion criptón	530,9 o 647,1
Helio/neón	632,8
Láser de diodos	782 o 830
Nd/YAG	1.064

Transformada de Fourier



- El instrumento Raman de transformada de Fourier está equipado con un interferómetro de Michelson y con un rayo láser Nd-YAG de onda continua,
- El interferómetro permite que haya señales mas estrechas y resueltas
- El uso de una fuente de 1064 nm (el rayo Nd-YAG) elimina virtualmente la fluorescencia o la fotodescomposición de las muestras. Por tanto, los colorantes y otros compuestos fluorescentes pueden ser

estudiados con los instrumentos Raman de transformada de Fourier. Éstos también proporcionan una precisión mucho mejor de la frecuencia comparados con los instrumentos ordinarios, lo cual facilita las sustracciones de espectros y las mediciones de alta resolución. Sin embargo, al ser una long de onda tan alta, la intensidad es muy baja con respecto a un dispersivo



ESPECTROSCOPIA RAMAN

Dispersivos vs FT-Raman

Dispersivo/CCD	FT-Raman
Sensibilidad	Ventajas
Alta S/N	Precisión en frecuencias
$\lambda = 200-800 \text{ nm}$	Siempre $\geq 1064 \text{ nm}$
Bajas potencia de láser	Evita fluorescencia
Desventajas	Desventajas
Puede haber fluorescencia	Alta potencia de láser
Resolución variable	Resolución constante

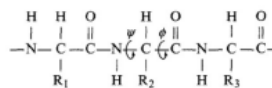
Aplicaciones

- Identificación de compuestos orgánicos.
- Determinación de grupos funcionales.
- Identificación de compuestos inorgánicos en soluciones acuosas o sólidos.
- Determinación de la composición molecular de superficies
- Determinación cuantitativa de compuestos en mezclas.
- Determinación de estructuras en estado fundamental junto con IR
- Información de estructuras en estados excitados.
- Detección de impurezas o aditivos.
- Identificación de polímeros, plásticos y resinas.
- Análisis no-destructivo de sistemas bioquímicos *in vivo* y *in vitro*.
- Estudios de superficies empleando SERS.

Aplicaciones en Biotecnología

- Identificación de microorganismos
- Monitorear bioprocesos complejos. Ej. Fermentación de glucosa a etanol por levaduras.
- Cuantificación de modificaciones post-traslacional. Ej. Acetilación, metilación.

- Estudio de la conformación estructural de proteínas, ácidos nucleicos y membranas.



α -Helix
 β -Sheet
 Random coil

Amide I
 1,645–1,600
 1,680–1,658
 1,665–1,660

Amide III
 1,300–1,260
 1,243–1,230
 1,243

Estructura peptídica

Tensión de C=O

Combinación de modos*

Table 4-7 Key Raman Bands of Amino Acid Residues

Amino Acid Residue	Raman Band (cm ⁻¹)
Phenylalanine (Phe)	1,203 (w), 1,032 (w), 1,004 (s), 624 (w)
Tryptophan (Trp)	1,623 (w), ^a 1,555 (s), 1,436 (s), 1,016 (s), 882 (w), 762 (s)
Tyrosine (Tyr)	Doublet at 850 and 830
Histidine (His)	1,408
Disulfide (S—S) bond	540–510

^aStrong by 251 nm excitation (see Section 6.1.5)

* Amide III (40% C—N, str., 30% NH in-pl. bend, 20% CH₃—C str.)

Estudio de carotenos en plantas