

Introdução à Fluorescência

1ª aula

Técnicas espectroscópicas

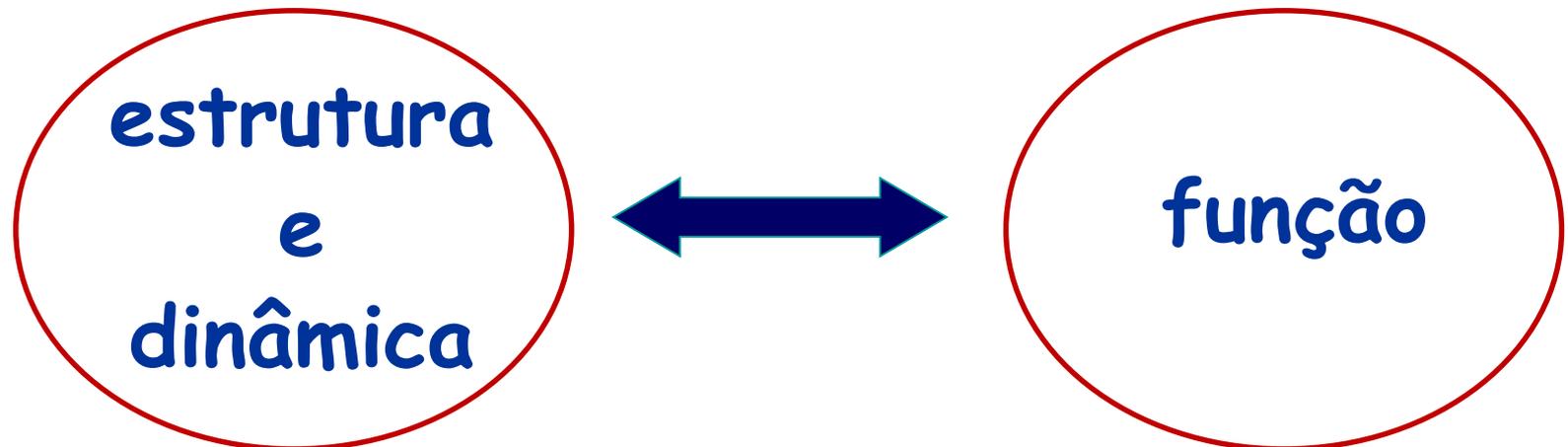
Interação da radiação eletromagnética com a matéria

Absorção

Absorção/Emissão



Em biomoléculas:



Luminescência

Emissão de fótons de estados eletrônicos excitados
UV e visível



fluorescência

singlete \rightarrow singlete

$$\tau \approx 10^{-8} \text{ s}$$

fosforescência

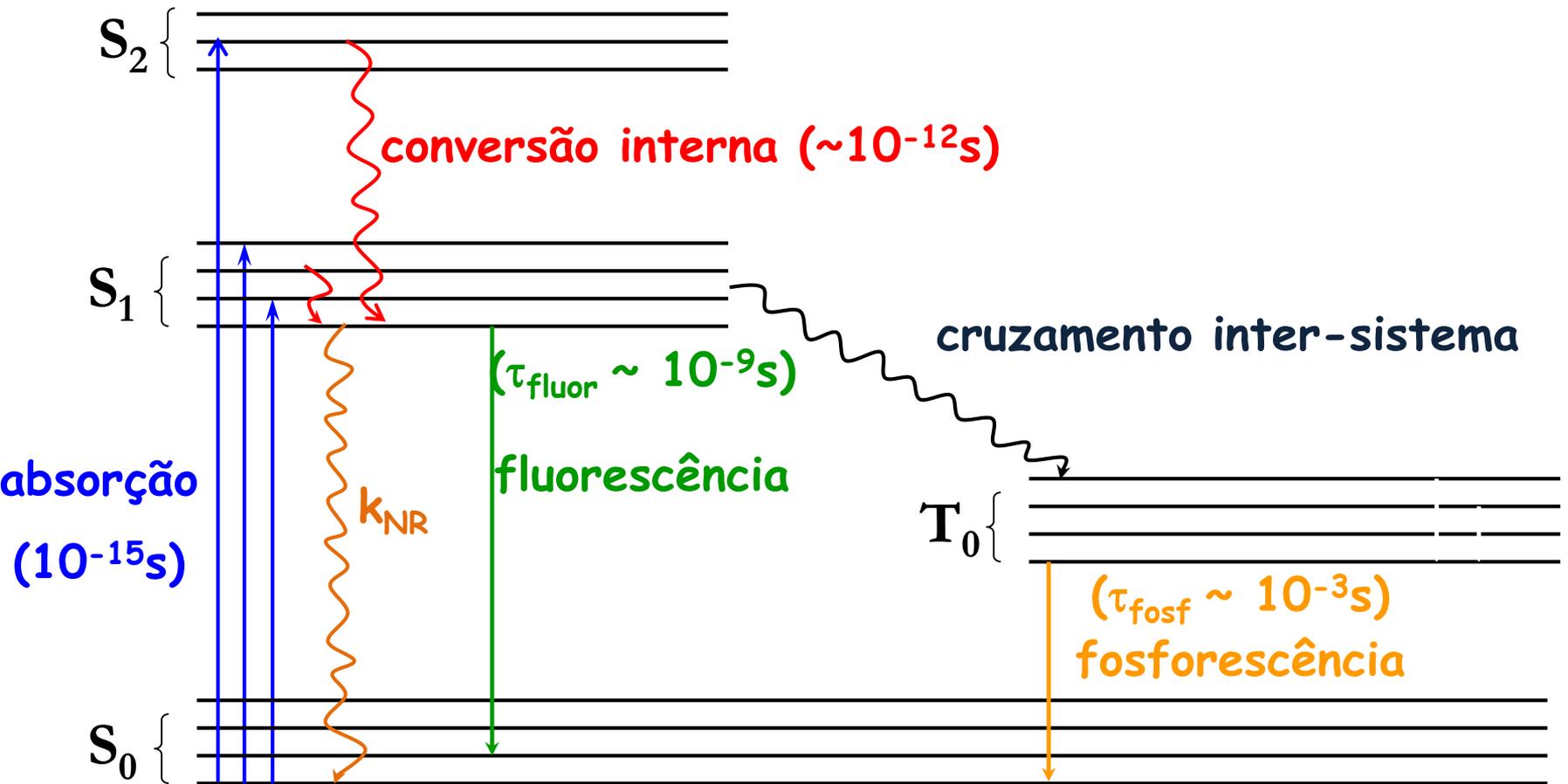
triplete \rightarrow singlete

$$\tau \approx 10^{-3} - 10^0 \text{ s}$$

Cromóforos - moléculas que absorvem luz

Fluoróforos - moléculas que fluorescem
Geralmente possuem elétrons delocalizados/duplas
ligações/anéis

Diagrama de Jablonski



Estado Singlete: $S = 0$

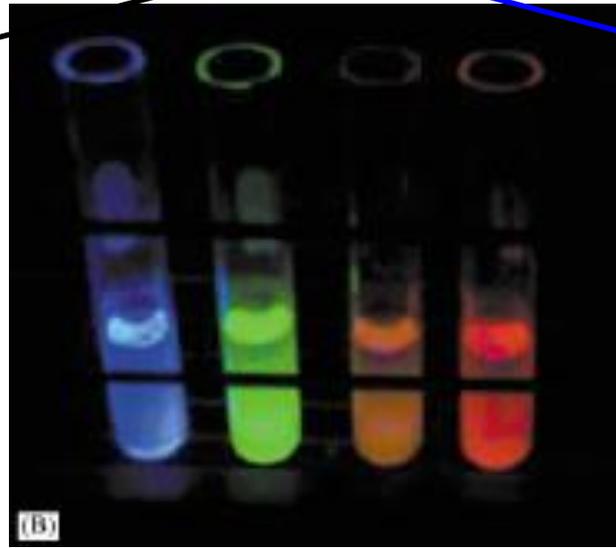
Estado Triplete: $S = 1$

Fluorescência

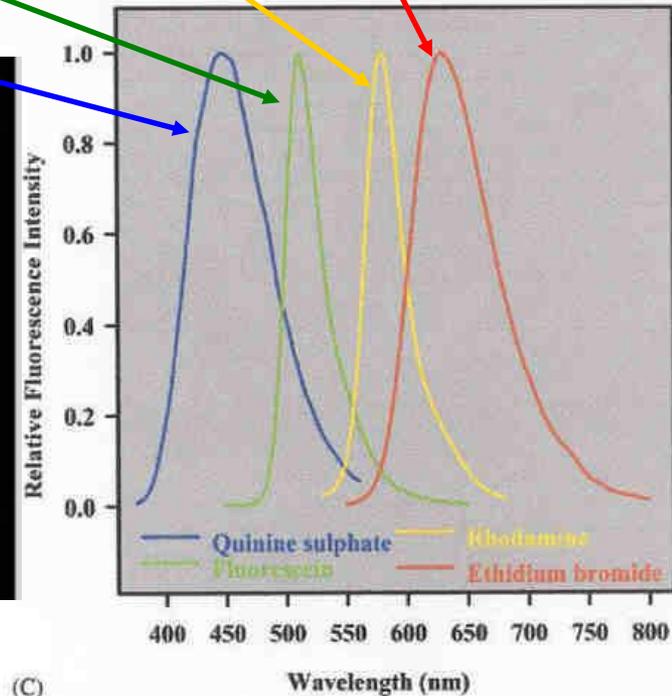
sulfato de quinina, fluoresceína, rodamina, brometo de etídio



luz branca



luz UV



(C)

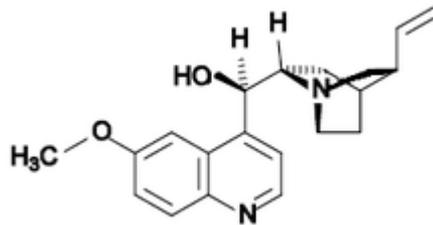
espectros de emissão

Fluorescência: primeiras observações

1565 → infusão da madeira *Lignum Nephriticum*
(*N. Monardes*)

Herschel

1845 → observação de fluorescência em uma
solução de quinino



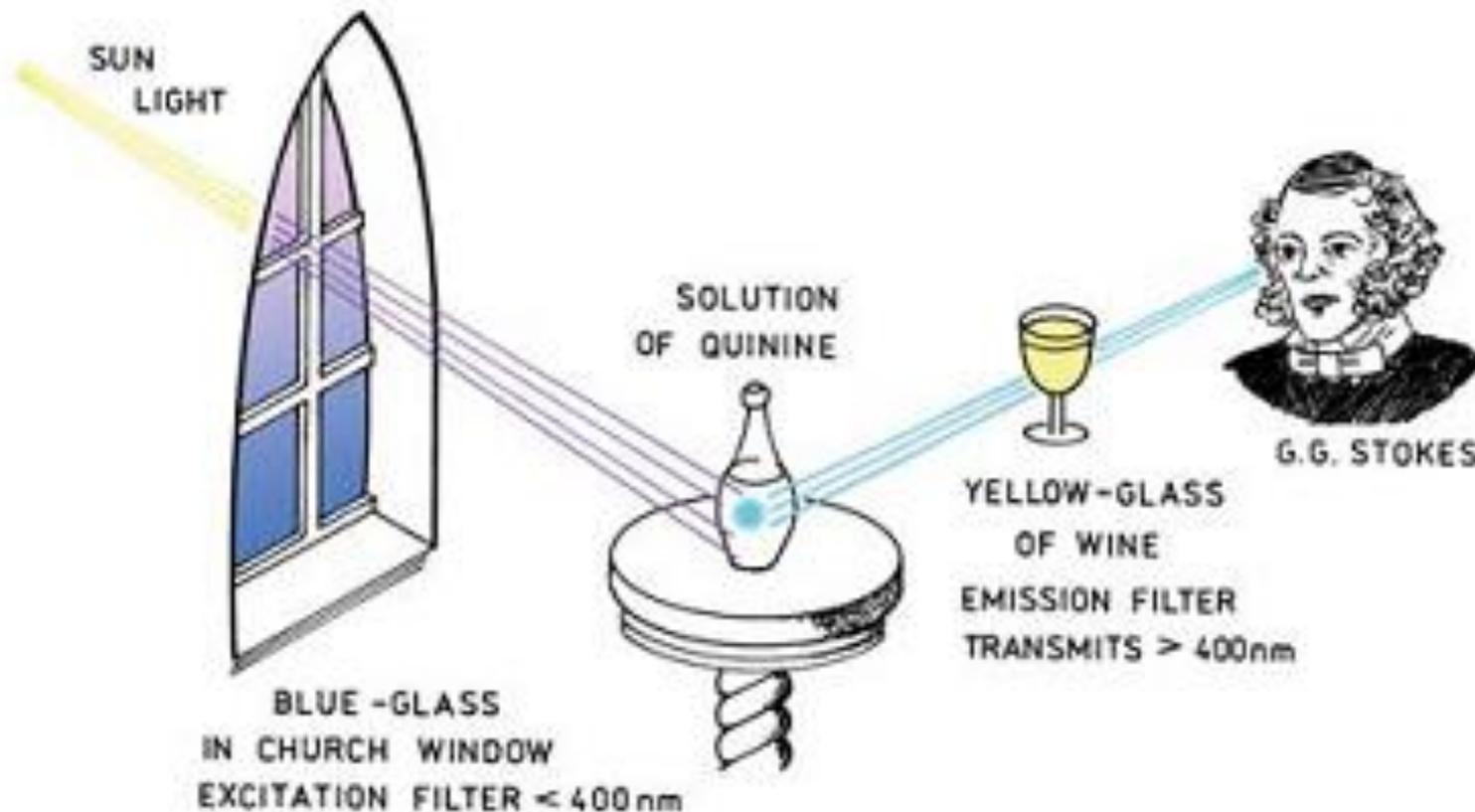
água tônica

(*Wikipedia*)



Fluorescência: primeira observação rigorosa

Stokes (1852)



Quinino \rightarrow $\left\{ \begin{array}{l} \text{Absorve luz no ultra-violeta: } \lambda_{\text{abs}} = 350 \text{ nm} \\ \text{Emite no visível: } \lambda_{\text{em}} = 450 \text{ nm} \end{array} \right.$

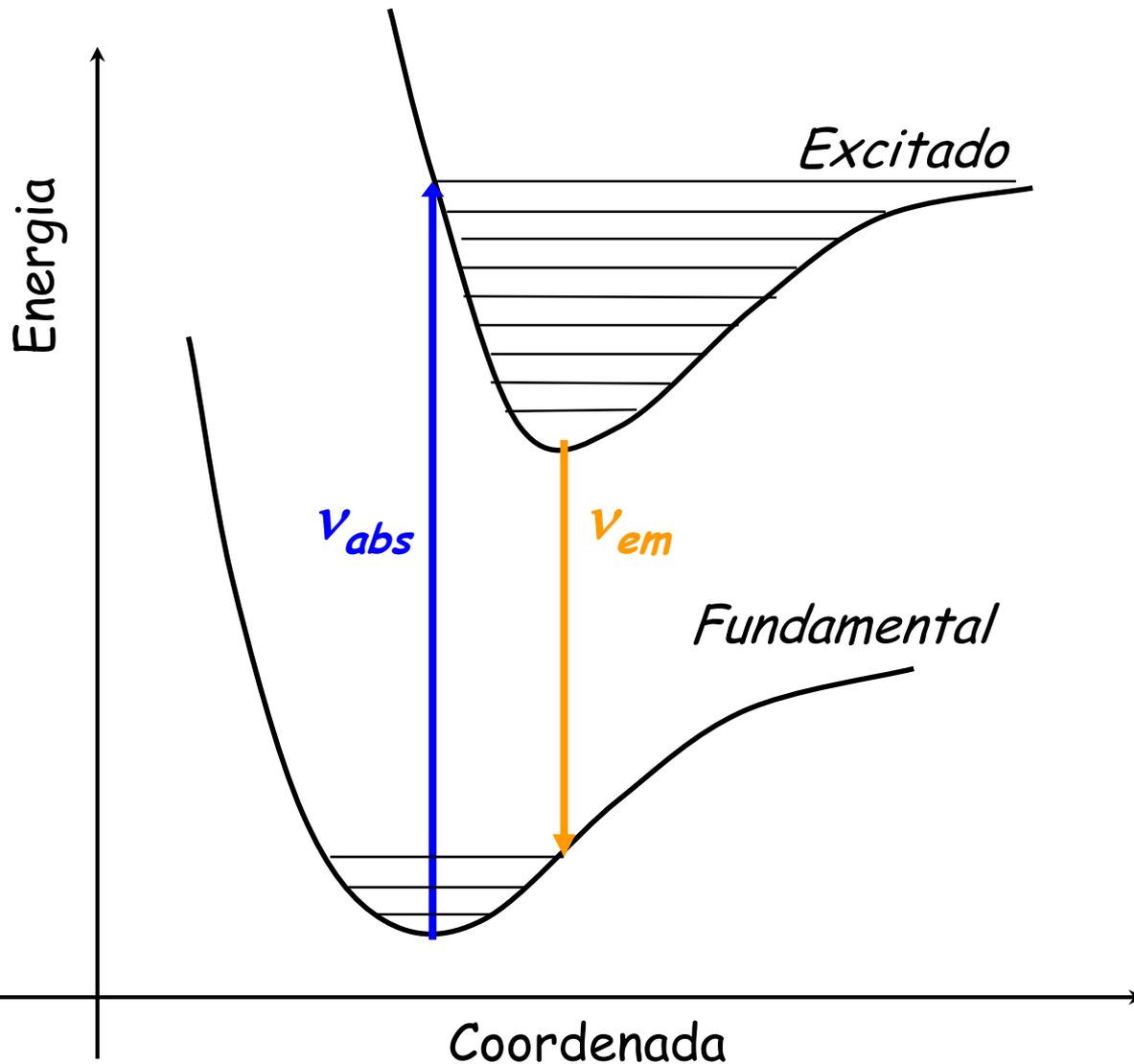
Fluorescência

- Deslocamento espectral
- Anisotropia de fluorescência
- Intensidade de fluorescência
- Tempos de vida de fluorescência
- Tempos de correlação rotacional
- Efeitos de solventes
- Supressão de fluorescência
- Transferência de energia
- Excitação multi-fótons
- Microscopia de fluorescência
- Correlação de fluorescência
- Detecção de Molécula Única
- ...

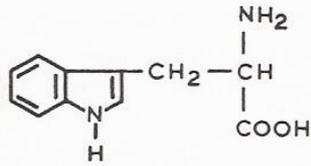
Princípio de Franck-Condon

Todas as transições eletrônicas ocorrem sem que as posições dos núcleos se alterem: **transições verticais**

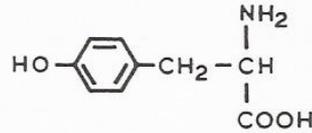
$$\begin{aligned} \nu_{\text{absorção}} &\geq \nu_{\text{emissão}} \\ \lambda_{\text{absorção}} &\leq \lambda_{\text{emissão}} \end{aligned}$$



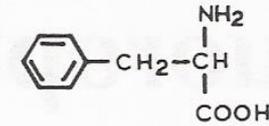
Fluoróforos naturais



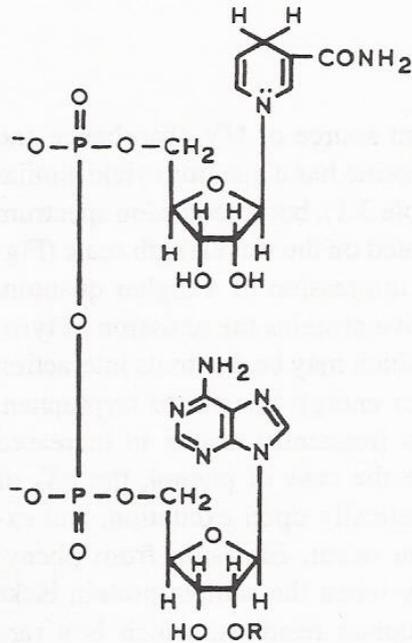
Tryptophan



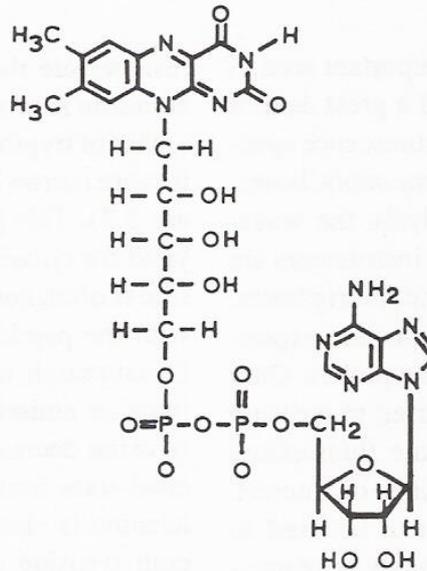
Tyrosine



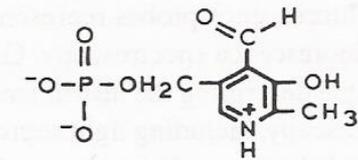
Phenylalanine



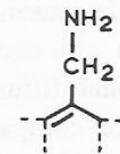
NADH



FAD



Pyridoxal phosphate



Pyridoxamine phosphate

Figure 3.1. Intrinsic biochemical fluorophores. In NADH, R is a hydrogen; in NADPH, R is a phosphate group.

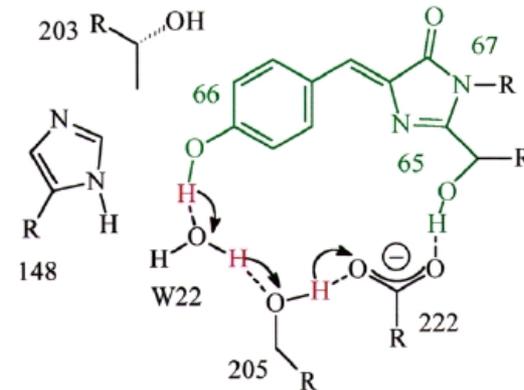
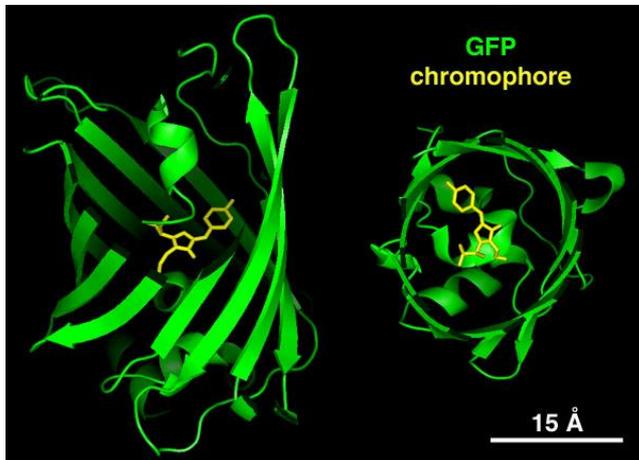
Fluoróforos naturais em Proteínas

Green Fluorescent Protein (GFP)



Água-viva bioluminescente *Aequorea victoria*.

Cromóforo formado espontaneamente por enovelamento da cadeia polipeptídica, e ciclização (Ser-65, Tyr-66, Gly-67)



Inserção do gen para GFP em células e uso da proteína como sonda.

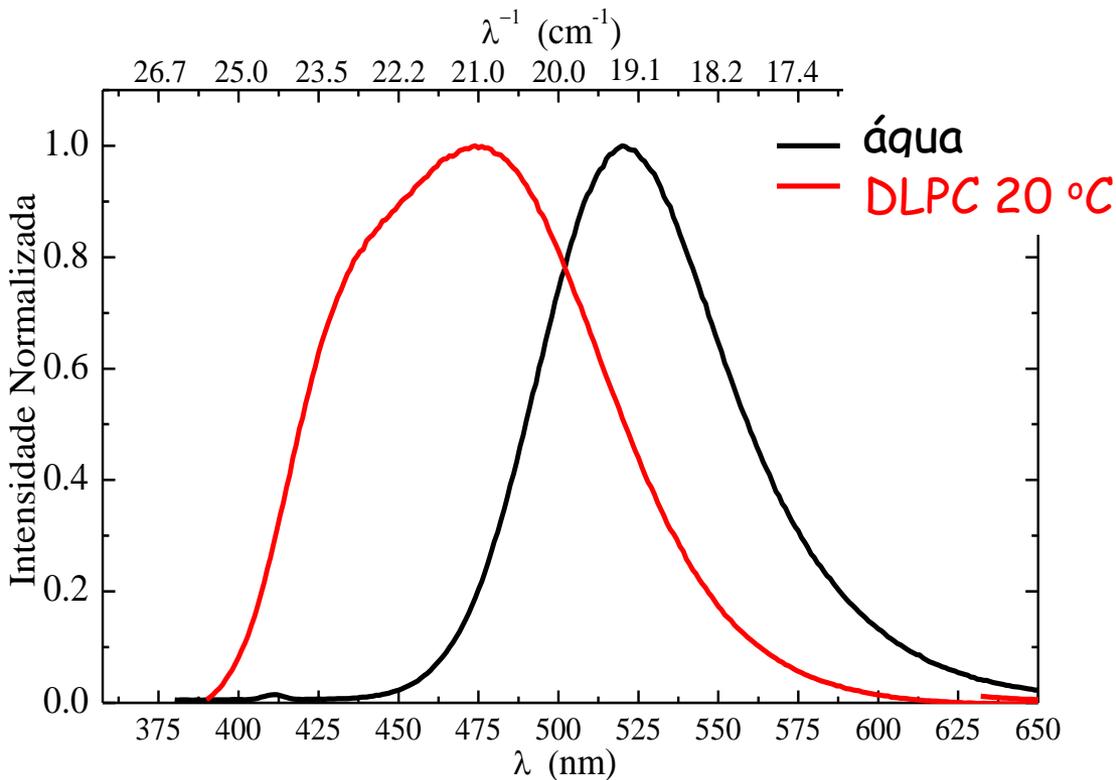
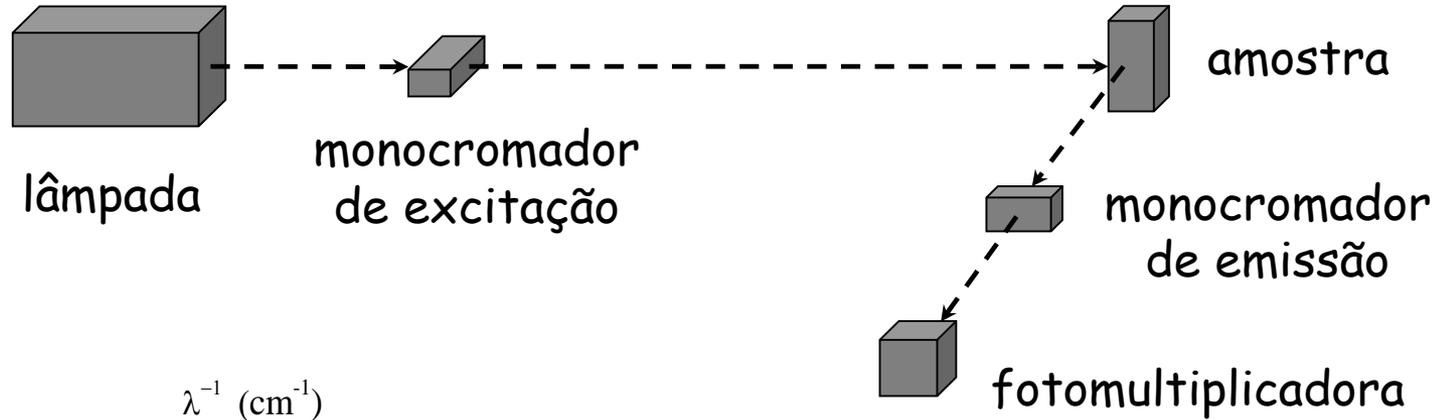
Interação da radiação eletromagnética com a matéria

modelo semi-clássico

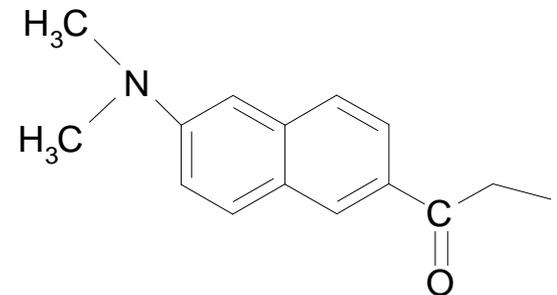
radiação: onda EM

matéria: estados quantizados de energia

Fluorímetro de estado estacionário



Prodan

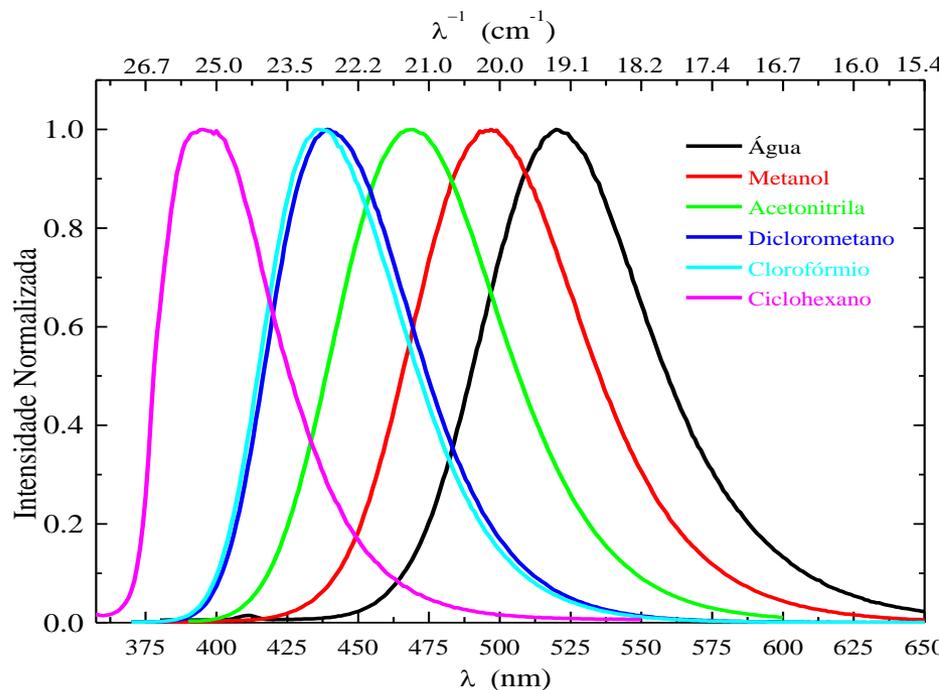
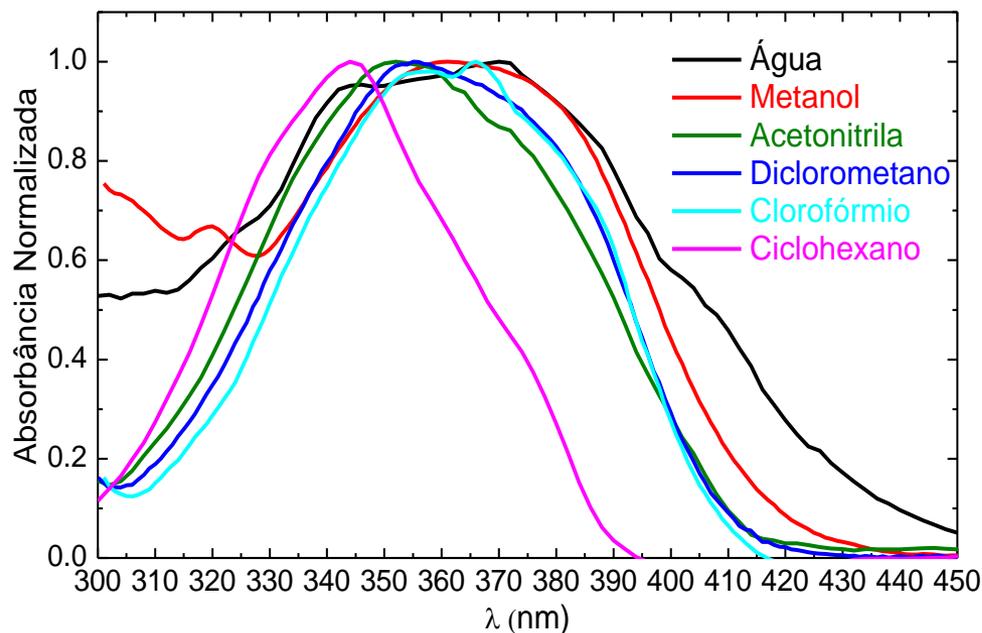


Grande sensibilidade da fluorescência ao meio onde encontra-se o fluoróforo

Prodan

absorção

emissão



Nome	Fórmula	ϵ	μ (D)	n	ρ (g/cm ³)	Δf^*
Ciclohexano	C ₆ H ₁₂	2.0	~0	1.43	0.779	0.00
Clorofórmio	CHCl ₃	4.8	1.0	1.45	1.210	0.15
Diclorometano	CH ₂ Cl ₂	8.9	1.6	1.42	1.330	0.22
Acetonitrila	C ₂ H ₃ N	36.6	3.9	1.34	0.786	0.30
Metanol	CH ₃ OH	33.0	1.7	1.33	0.790	0.31
Água	H ₂ O	78.9	2.7	1.00	1.000	0.32

$$\Delta f = \frac{\epsilon - 1}{2\epsilon + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1}$$

Grande sensibilidade da fluorescência ao meio onde encontra-se o fluoróforo

Longo tempo de vida do estado excitado
($\sim 10^{-9}$ s)

\Rightarrow o espectro de fluorescência é muito mais sensível ao meio do que o espectro de absorção

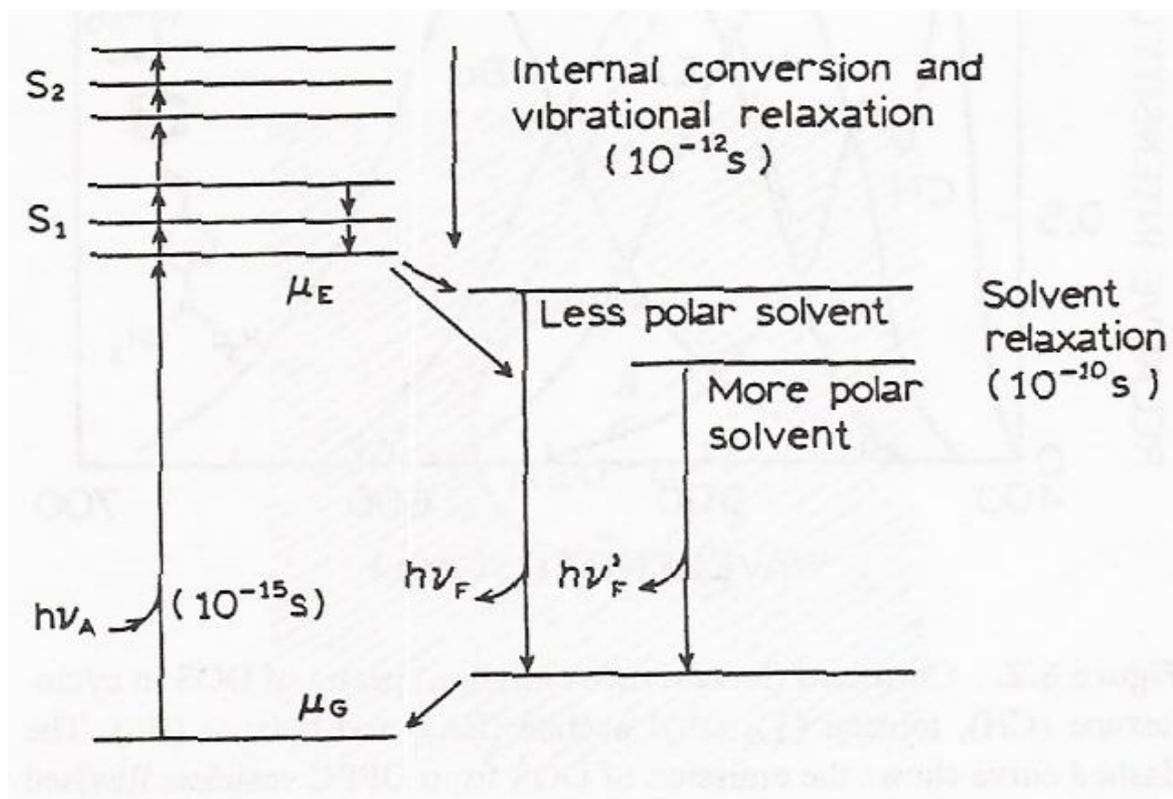


Figure 6.1. Jablonski diagram for fluorescence with solvent relaxation.

(Lakowicz, 1999)

Por que estudar o efeito do solvente?

Auxiliar o estudo da estrutura do fluoróforo no estado fundamental e excitado

Conhecer o microambiente onde se encontra o fluoróforo

- Trp em uma proteína: exposto ao meio aquoso ou no seu interior?

- penetração de moléculas na membrana lipídica

Modelo de Lippert

- fluoróforo esférico
- solvente meio contínuo
- não são consideradas interações moleculares específicas

$$(v_{\text{abs}} - v_{\text{em}}) = \frac{2}{ha^3} \left[\frac{\epsilon - 1}{2\epsilon + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1} \right] (\mu^* - \mu)^2$$

Usa o modelo de Clausius-Mosotti para molécula esférica

($r = a$), polar, em dielétrico:

ϵ = polarizabilidade eletrônica e molecular

n = polarizabilidade eletrônica

Explicação no quadro: modelo de Lippert

Bibliografia

"Physics of Atoms and Molecules"

B.H. Bransden, C.J. Joachain

"Principles of Fluorescence Spectroscopy"

J.R. Lakowicz

"Molecular Fluorescence: Principles and Applications"

B. Valeur

- .

Série dos livros de "Topics in Fluorescence Spectroscopy"

Ed. J.R. Lakowicz