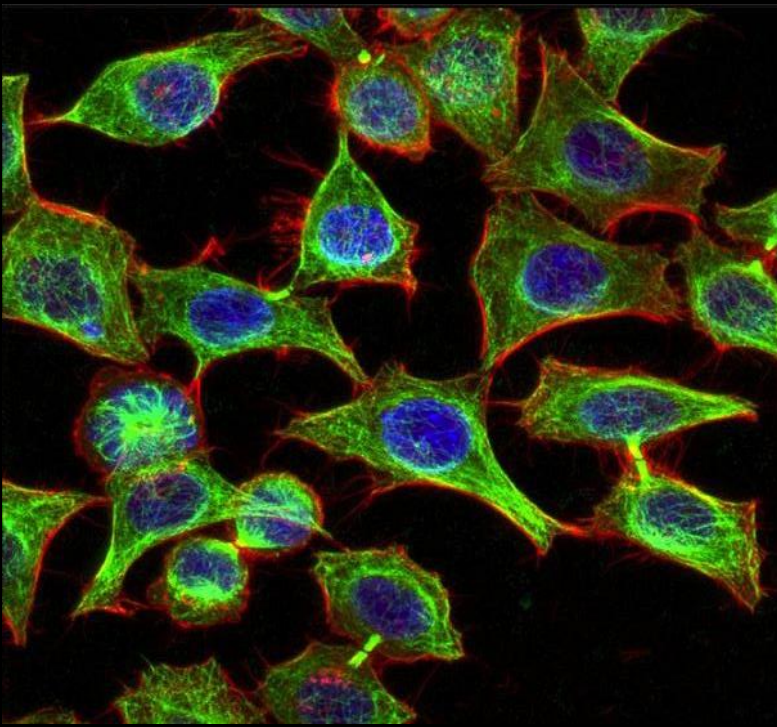


FLUORESCENCIA



TM. Franna Bacic
TM. Pablo Cabrera
TM. Carlos Zamorano
BQ. Javiera villar

Fluorescencia

- Es un fenómeno de luminiscencia.
- La fluorescencia es un proceso de emisión en el cual las moléculas son excitadas por la absorción de radiación electromagnética.

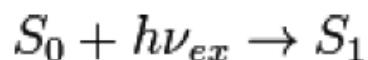


Fenómeno de Fluorescencia

El fenómeno de fluorescencia se caracteriza por un proceso de absorción de una radiación pasando la molécula a un estado excitado, el que para relajarse puede transferir la energía como calor o bien emitiendo radiación a una mayor longitud de onda (tiene menor energía).

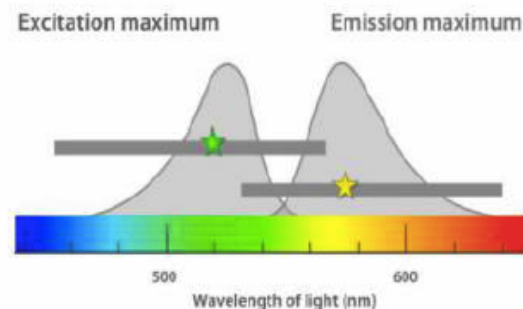
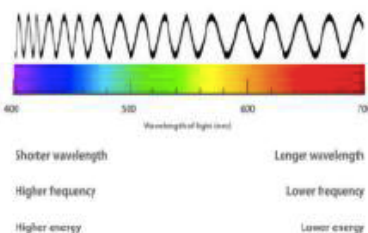
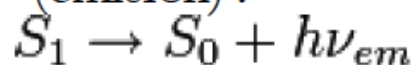
Excitación

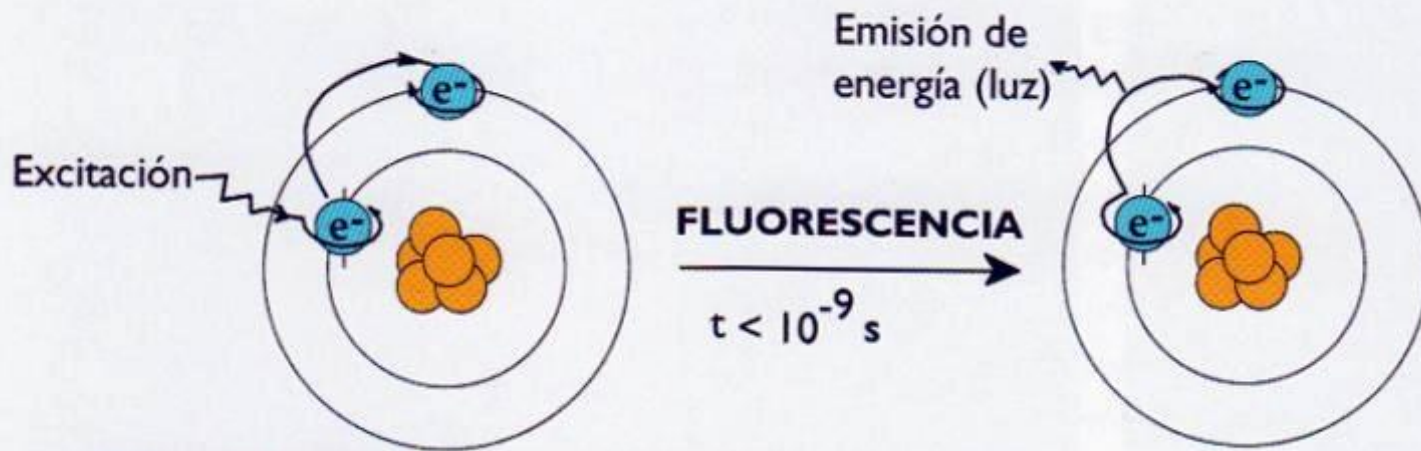
(Absorción):



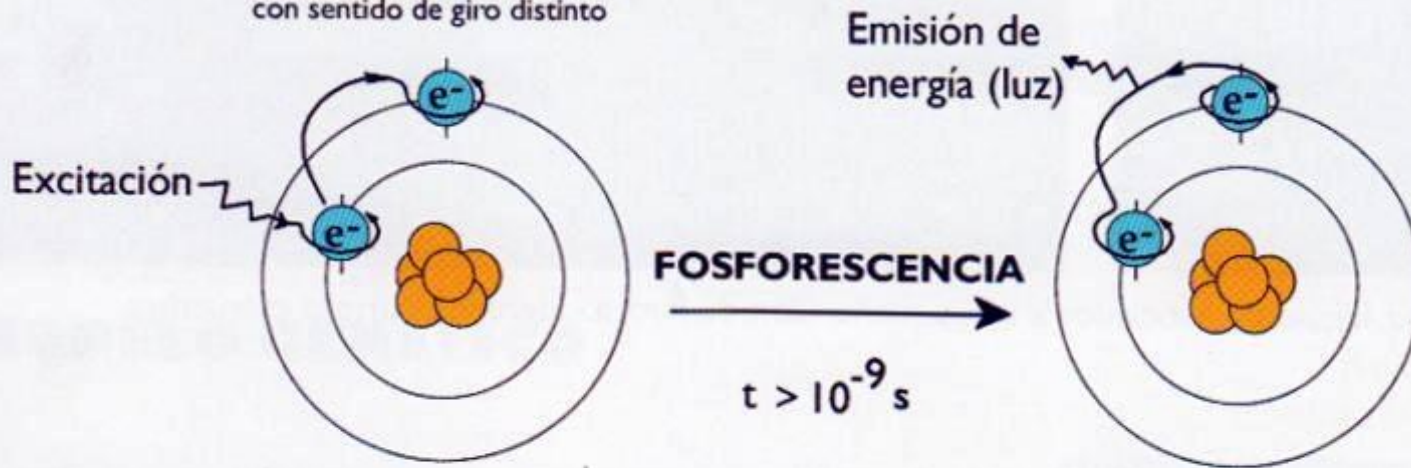
Fluorescencia

(emisión):





Estado excitado SINGLETE. Electrones desapareados con sentido de giro distinto



Estado excitado TRIPLETE. Electrones desapareados con el mismo sentido de giro

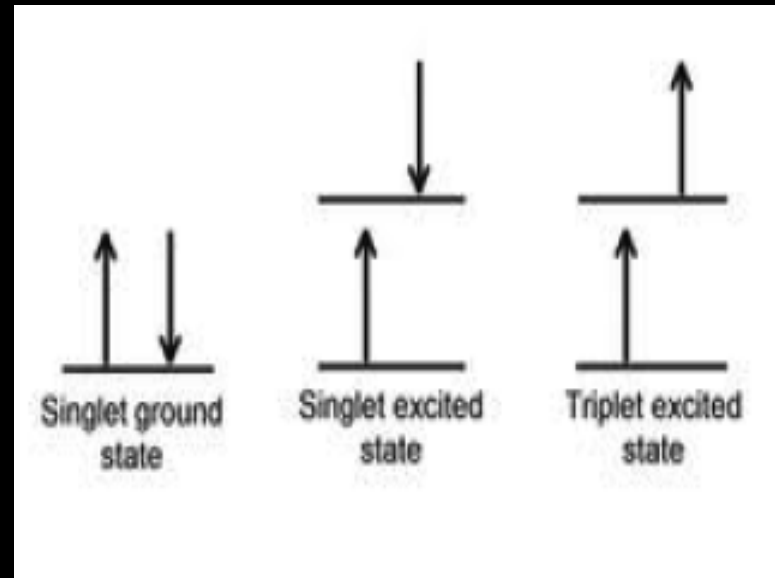
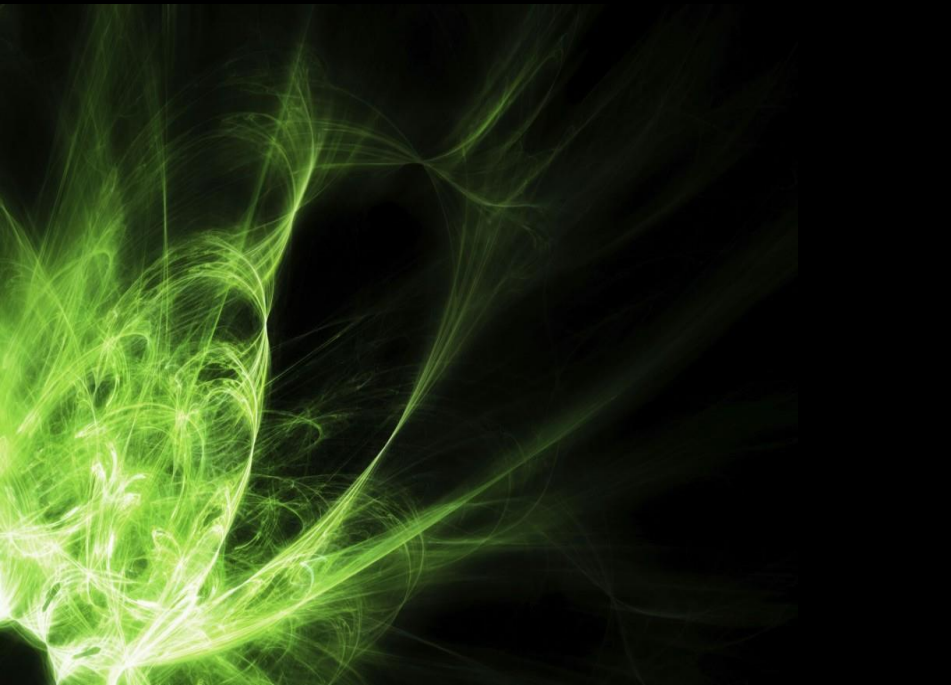
Spin electrónico y estado de excitación

La mayoría de las moléculas poseen un número par de electrones y así los que se encuentran en cada orbital estarán apareados \rightarrow estado basal spines apareados

Momento magnético nulo.

Al excitarlos uno de los electrones pasará a un orbital de mayor energía, si mantiene su estado "spin" se dice que el par electrónico está en este estado **singulette excitado.**

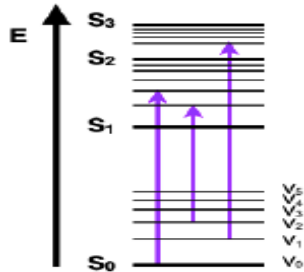
Ahora si el spin cambia su spin entonces el par electrónico está en el estado **triplete excitado**



- **Fluorescencia:** Es la relajación de un estado singulete excitado de baja energía (S_1), hacia el estado fundamental (S_0) mediante la emisión de un fotón. Ocurre con una temporalidad del orden de los (10^{-9} s).
- **Fosforescencia:** Es la relajación de un estado triplete hacia el estado fundamental mediante la emisión de un fotón. Ocurre con una temporalidad del orden milisegundos hasta minutos, incluso días), es un proceso mas lento al estar los 2 electrones con el mismo spin, es una transición cuánticamente prohibida.

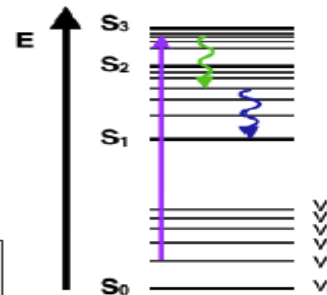
Diagrama de energía de Jablonski

Three possible *absorption* transitions represented



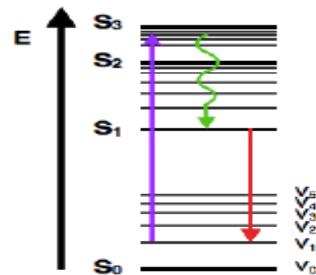
10^{-15} s
Absorción

Possible scenario with *absorbance*, *internal conversion*, *vibrational relaxation* shown.



$10^{-14} - 10^{-11}$ s
conversión
interna y
relajación
vibracional

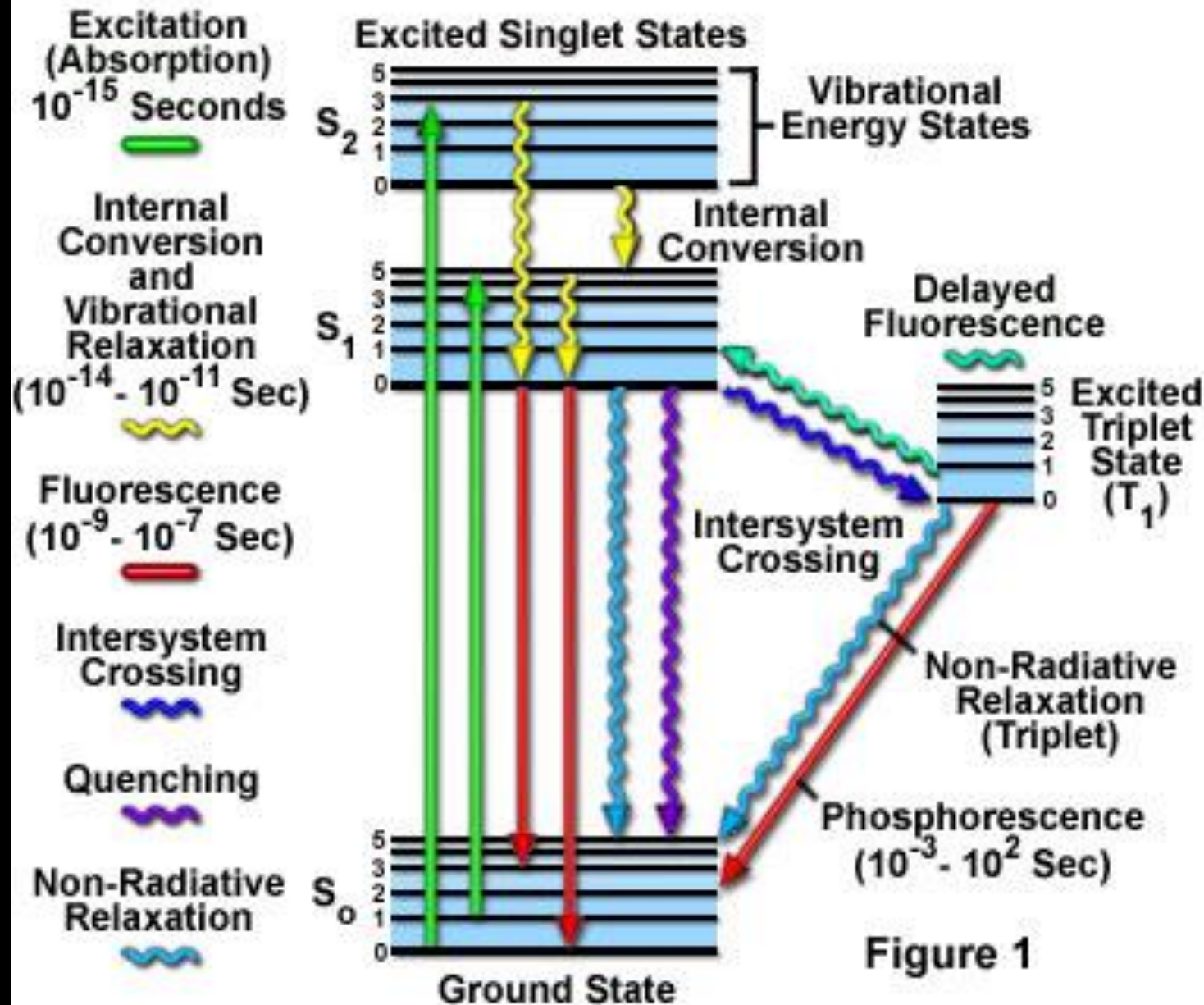
Possible scenario with *absorbance*, *internal conversion*, and *fluorescence* shown.



$10^{-9} - 10^{-7}$ s
Fluorescencia

S: estado singlete,
espines electrónicos
de la molécula están
pareados

Jablonski Energy Diagram

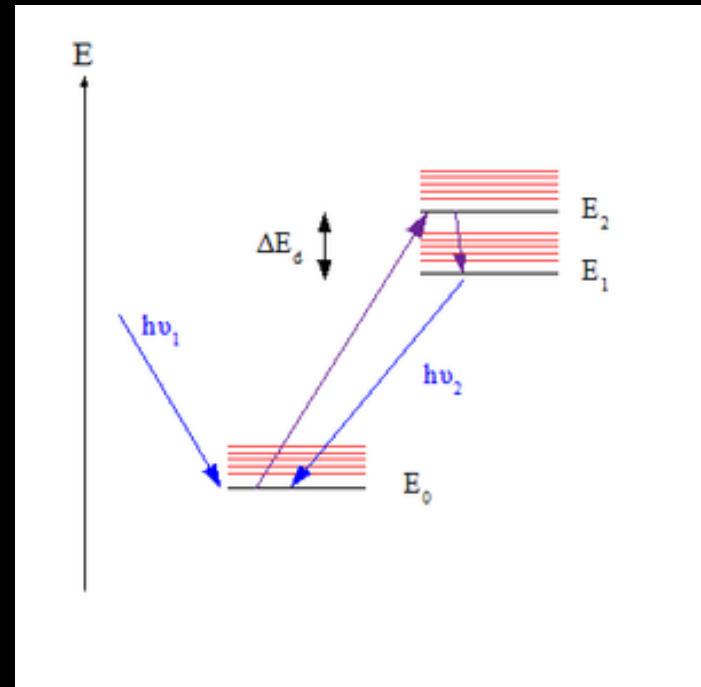
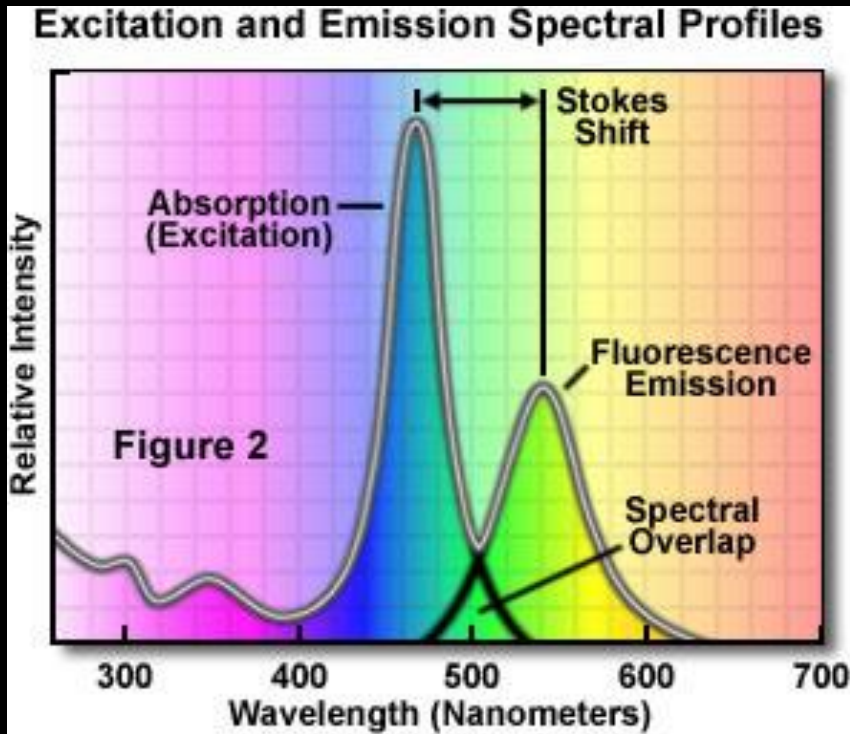


Características de la fluorescencia

Corrimiento de Stoke:

Energía de emisión < Energía de absorción

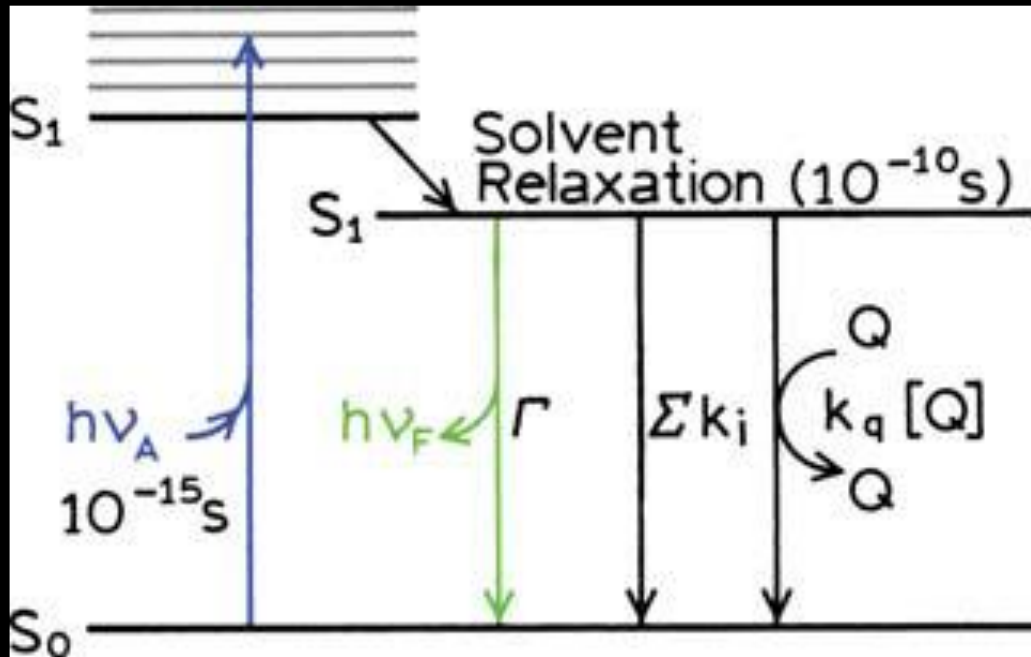
Regla de Kasha: el espectro de emisión es independiente del λ de excitación



Parámetros fluorométricos

- **Tiempo de vida promedio (τ)** : Tiempo promedio en que la molécula pasa en el estado excitado antes de volver al basal. (~10 ns)
- **Rendimiento cuántico (ϕ_F)** : Razón entre fotones emitidos y absorbidos. Siempre menor a 1.

“Quenching” : Apagamiento de la fluorescencia



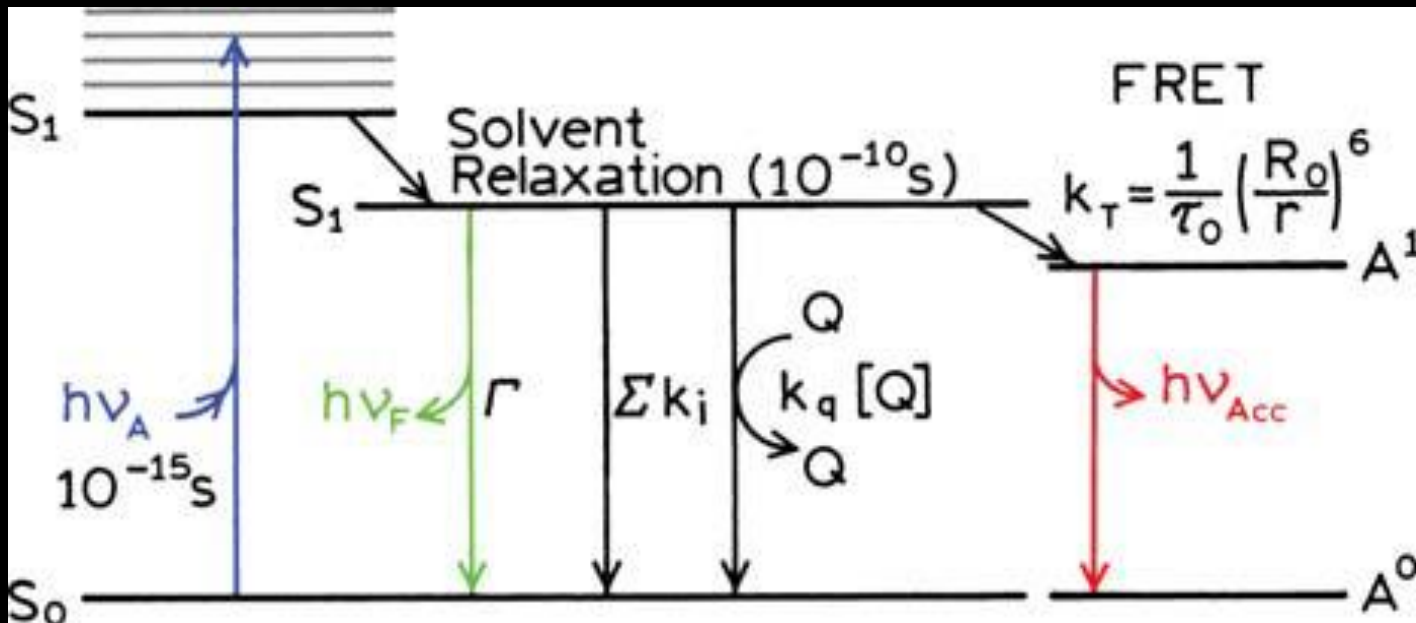
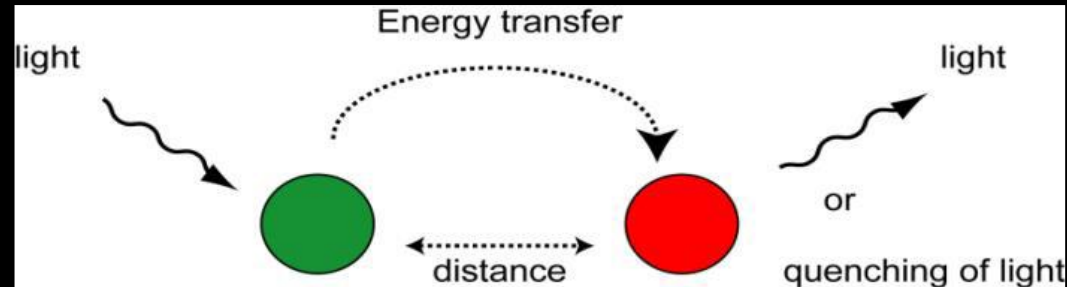
- Quenchers: oxígeno, halógenos, aminas, acrilamida.

Para que ocurra, la molécula debe estar a menos de 100\AA

Transferencia de energía entre fluorocromos

Requerimientos:

- que la energía de emisión del fluoróforo excitado sea coincidente con la energía de absorción del segundo fluoróforo
- Distancia $< 100\text{\AA}$



Fluoróforos

- Es una molécula o parte de una molécula que emite fluorescencia después de ser excitada con luz.
- La intensidad y longitud de onda de la luz emitida dependerá tanto del fluoróforo como de su ambiente químico.

Fluoróforos

Su rendimiento cuántico (Quantum yield) corresponde al cociente del número de fotones emitidos entre el número de fotones absorbidos.

- N° de fotones emitidos / N° de fotones absorbidos

Fluoróforos

Existen varios fluoróforos disponibles comercialmente (difieren en sus características de excitación y emisión)

ALGUNOS FLUORÓFOROS

Fluorochrome	Excitation Wavelength	Emission Wavelength	Applicable Excitation	Comment
Fluorochrome Antibody Method				
BODIPY FL	503	512	B, IB	Antibody Labeling
Cascade Blue	376	425	U	Antibody Labeling
Fluorescein-Isothiocyanate (FITC)	490	520	IB	Antibody Labeling
Phycoerythrin B (PE-B)	545	576	G	Antibody Labeling
Phycoerythrin R (PE-R)	490, 565	578	G, IB	Antibody Labeling
Rhodamine B-Isothiocyanate (RITC)	570	595	G	Antibody Labeling
Texas Red	596	620	IY	Antibody Labeling
Tetramethylrhodamine-Isothiocyanate (TRITC)	541	572	IG	Antibody Labeling

Fluoróforos

Se pueden dividir en 2 grandes grupos:

- Intrínsecos o Naturales incluyen: los aminoácidos aromáticos, NADH, Flavinas, derivados del piridoxyl y clorofila.
- Extrínsecos como: Dansyl, fluoresceína y rodamina entre otras

Fluoróforos

Aplicaciones:

- Brindar contraste en imágenes microscópicas, especialmente en ambientes biológicos.
- Obtener imágenes simultáneamente diferentes usando fluoróforos múltiples (si sus emisiones o tiempos de vida fluorescente se puedan distinguir claramente)

Fluoróforos

Pruebas para marcar proteínas (ANS)

Pruebas de membrana (DHP)

Pruebas de potencial de membrana (Carbocianina)

Pruebas de tinción cercanas al infrarrojo (Cianina)

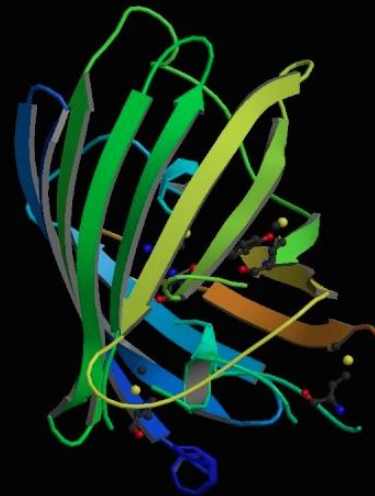
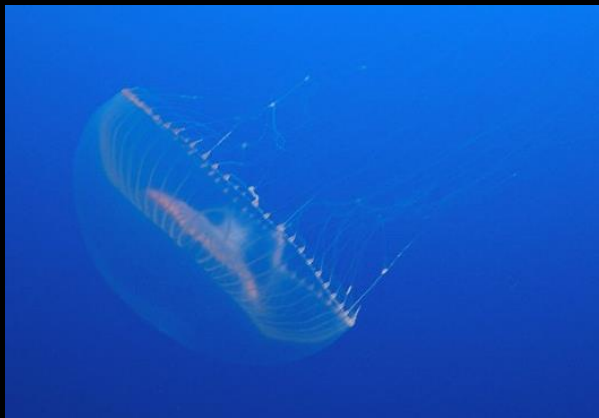
Pruebas de DNA (Bromuro de etidio)

Pruebas de medición química (Fura -2 > Ca^{2+})

Pruebas Especiales (7-UmP > ELISA)

Proteína Fluorescente Verde (GFP)

- Proviene de la medusa bioluminiscente *Aequorea victoria*
- Actualmente se han desarrollado variedades de GFP.



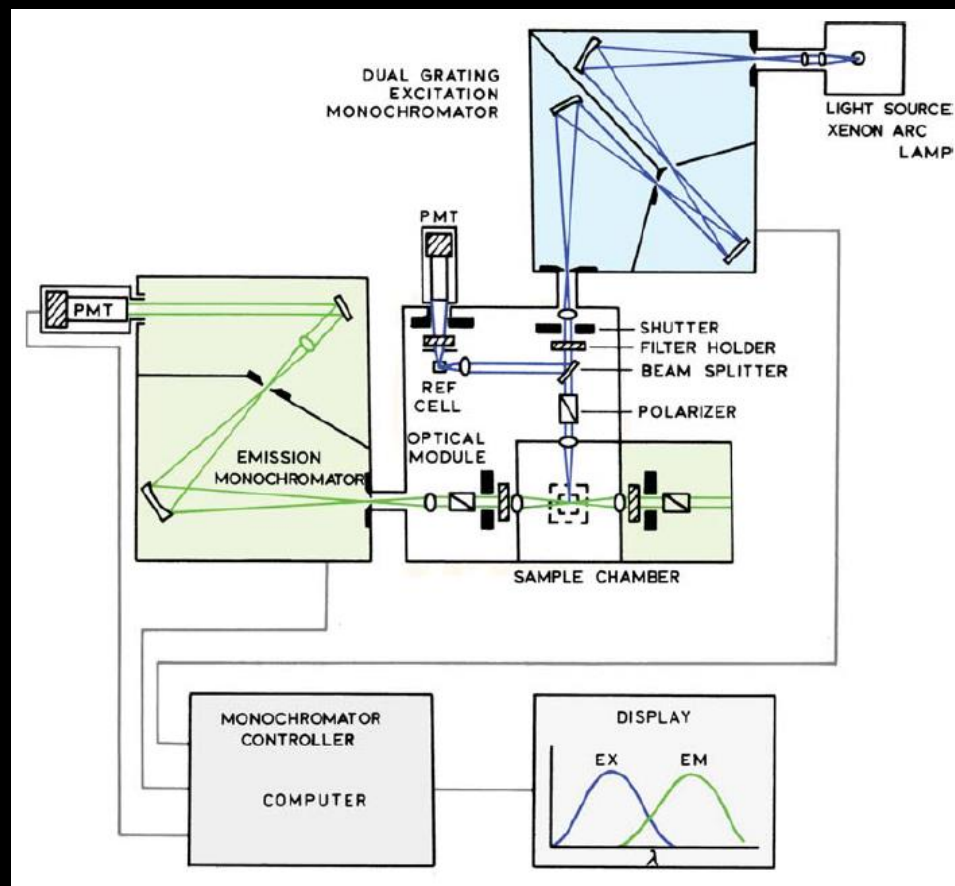
Espectrofluorómetros

Instrumento que utiliza propiedades fluorescentes de algunos compuestos a fin de **proporcionar información** con respecto a su concentración y el entorno químico en una muestra.

Registra la intensidad en función de la longitud de onda emitida (una o varias).

IDEAL

- 1) Fuente de luz produzca una salida de fotones constante en todas las longitudes de onda
- 2) Monocromador debe pasar todas las longitudes de onda de los fotones con igual eficacia
- 3) Eficiencia monocromador debe ser independiente de la polarización
- 4) Detector (tubo fotomultiplicador) debe detectar fotones de todas las longitudes de onda con la misma eficacia.



Fuente de luz

- Lámpara de arco de xenón de alta presión (Xe)
- Proporcionan una salida de luz relativamente continua 250 a 700 nm
- Emiten un continuo de luz como resultado de la recombinación de los electrones con átomos de Xe ionizados.
- La intensidad de salida cae rápidamente por debajo de 280 nm.
- Output de longitud de onda dependiente de las lámparas de Xe es una razón importante para la distorsión de los espectros de excitación de los compuestos que absorben luz visible y ultravioleta.

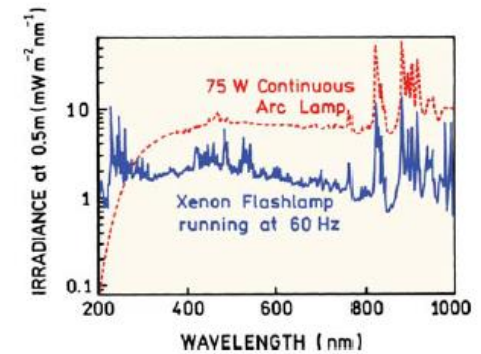


Figure 2.5. Spectral output of a continuous xenon arc lamp and a xenon flash lamp. Revised from [3]. Courtesy of Newport Corp.

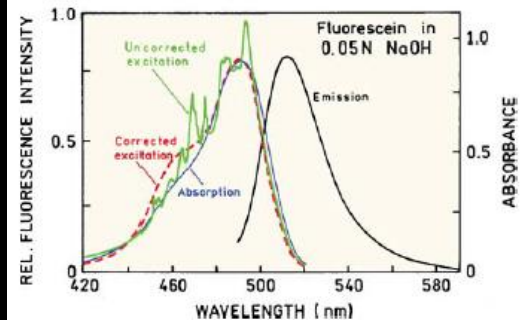


Figure 2.6. Corrected and uncorrected excitation spectra of fluorescein. From [4].

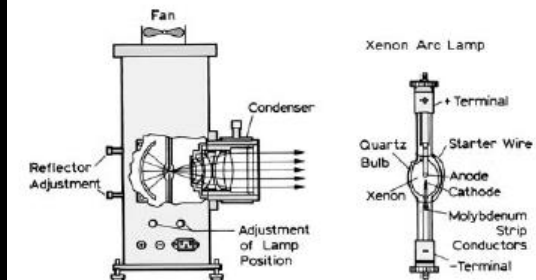
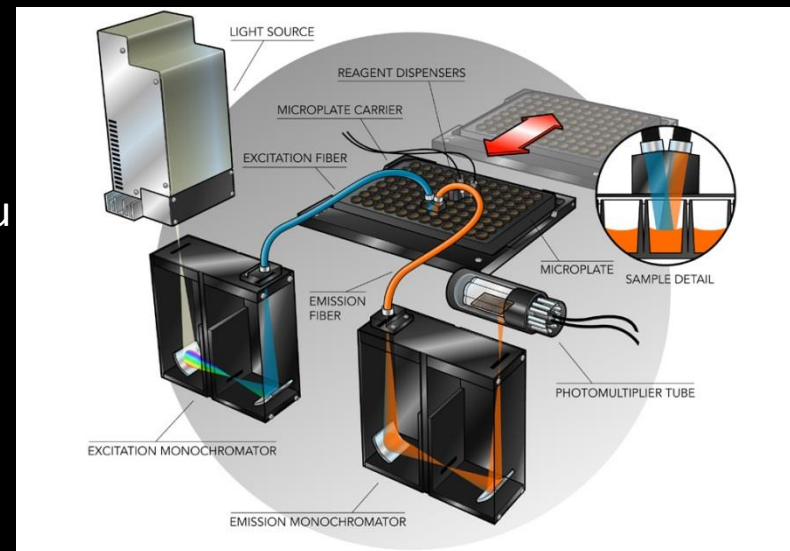
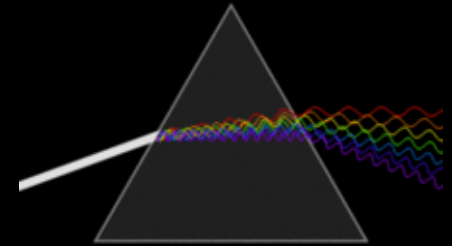


Figure 2.7. Xenon arc lamp and a typical lamp housing. Revised from [5]. Courtesy of Newport Corp.

Monocromador

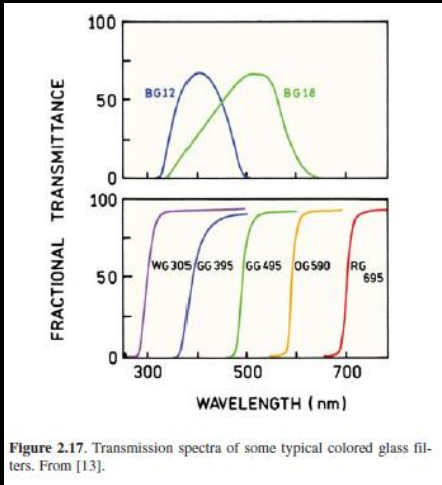
- Dispositivo óptico que selecciona y transmite una estrecha banda de longitudes de onda a partir de una fuente emisora que produzca una amplia gama de longitudes de onda.
- Dispersar la luz blanca en los varios colores o longitudes de onda usando prismas o rejillas de difracción.
- Bajos niveles de luz difusa para evitar problemas debido a la luz dispersa o perdida.
- Diámetro de las hendidura son generalmente variables, y un monocromador típico tendrá tanto una entrada y salida de hendidura.

La intensidad de la luz que pasa a través es aproximadamente proporcional al cuadrado de su anchura. (+ grande + señal + altas relaciones señal-ruido)

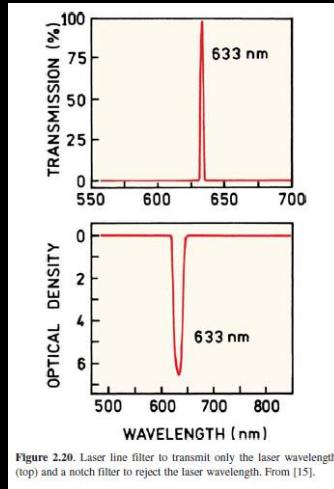


Filtros

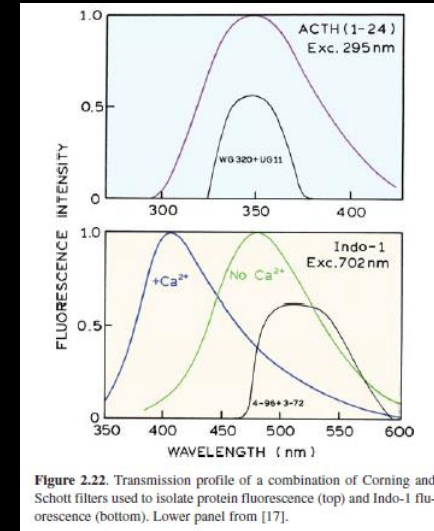
COLORED FILTERS:
transmiten ciertos rangos
de longitud de onda



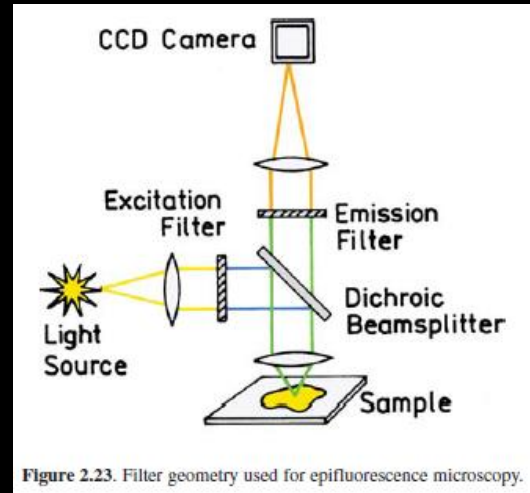
THIN-FILM FILTERS:
permite procesar luz de
rayos laser



FILTER COMBINATIONS:
depende del experimento

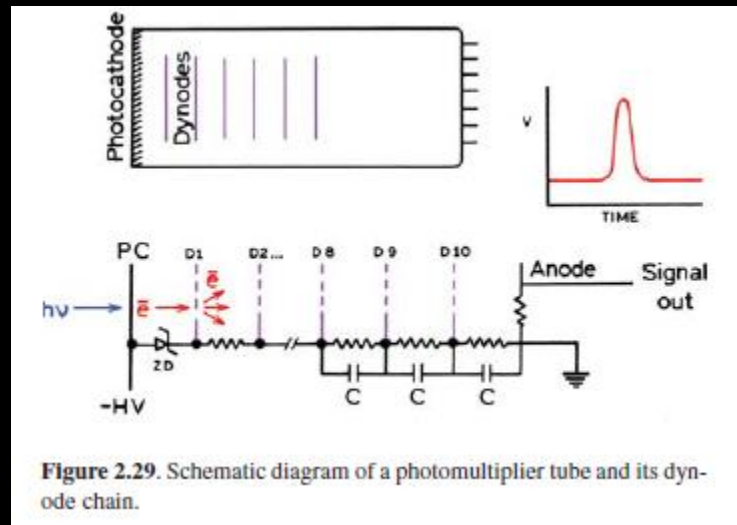


FILTERS for FM: depende del experimento



Tubos fotomultiplicadores

- Instrumento que contiene una célula fotoeléctrica y una serie de electrodos, que se utiliza para detectar y amplificar la luz a partir de fuentes muy débiles.



1 fotoelectrón = 5 a 20 e^-

Dynode: electrodo en un tubo de vacío que sirve como multiplicador de electrones por medio de una emisión secundaria.