

2

Introdução à Fluorescência

2.1

O fenômeno da fluorescência

Luminescência é a emissão de luz por alguma substância, ocorrendo a partir de estados eletrônicos excitados. Para escrever esse capítulo consultamos principalmente os excelentes livros de Valeur, 2002, e Lakowicz, 2006. A luminescência é formalmente dividida em duas categorias, a fluorescência e a fosforescência, dependendo da natureza do estado excitado. *Fluorescência* é a emissão de luz a partir de um estado excitado singleto, no qual o elétron excitado não muda a orientação de spin, continuando desemparelhado. Conseqüentemente, o retorno ao estado fundamental é permitido e ocorre rapidamente via emissão de um fóton. A taxa de emissão de fluorescência é tipicamente da ordem de 10^8 s^{-1} , então o tempo de vida de fluorescência típico é da ordem de 10^{-9} s . Como iremos ver adiante, o tempo de vida (τ) de um fluoróforo é a média de tempo que ele passa no seu estado excitado antes de retornar ao estado fundamental. Para melhor visualizarmos a escala de tempo de vida de nanossegundos dos fluoróforos é importante contextualizarmos com respeito à magnitude da velocidade da luz. Neste sentido, temos que a luz trafega 30 cm em 1 ns .

Fosforescência é a emissão de luz a partir de um estado excitado tripleto, no qual o elétron excitado muda a orientação de spin ficando emparelhado com o elétron que permaneceu no orbital fundamental. Deste modo, temos que as transições para o estado fundamental são proibidas e as taxas de emissão são mais lentas, estando compreendidas na faixa de $10^3 - 10^0 \text{ s}^{-1}$. Deste modo, o tempo de vida da fosforescência é da ordem de milissegundos – segundos. Contudo, grandes tempos de vida são possíveis. A emissão de fosforescência não é comumente observada em soluções fluidas à temperatura ambiente. Isto porque existem muitos processos de desativação os quais competem com a emissão, tais como decaimento não radioativo e processos de supressão.

Os *fluoróforos* são divididos em duas grandes classes – os intrínsecos e os extrínsecos. Fluoróforos intrínsecos são aqueles que emitem luz naturalmente. Já os extrínsecos são aqueles adicionados à amostra para desempenharem a função sonda. Os fluoróforos emitem luz geralmente na faixa de comprimentos de onda do espectro visível, ou seja, entre o infravermelho e o ultravioleta.

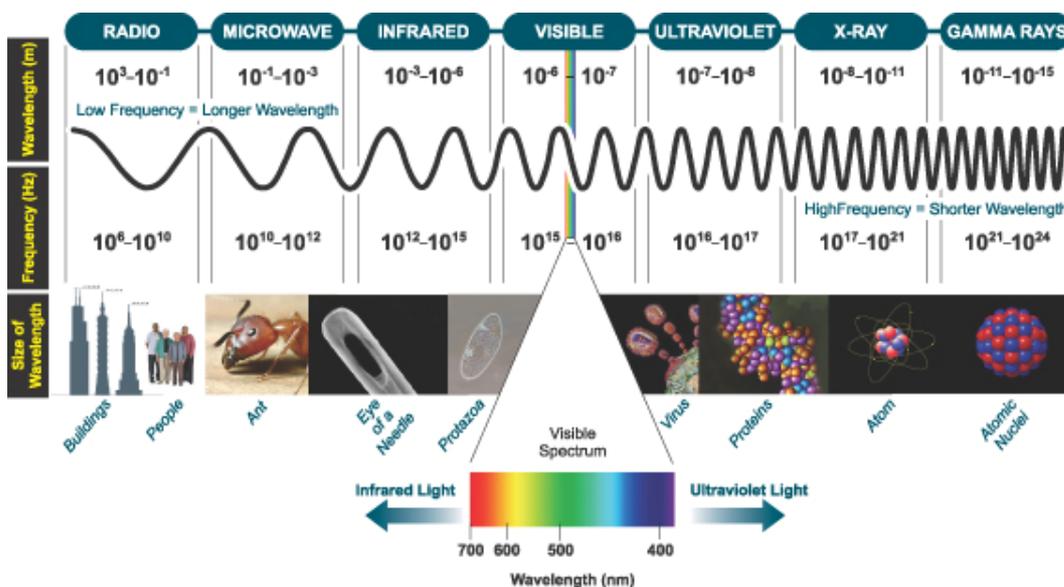


Figura 2.1 – Indicação das frequências e dos comprimentos de onda do espectro eletromagnético.

Em compostos orgânicos, o fenômeno da fluorescência ocorre tipicamente em estruturas aromáticas. Alguns dos fluoróforos típicos são a quinina, a fluoresceína, a rodamina, o POPOP. A quinina, encontrada na água tônica, foi o primeiro fluoróforo estudado e foi o responsável por estimular o desenvolvimento dos primeiros espectrofluorímetros que surgiram somente em 1950. Muitos fluoróforos são encontrados nos dias atuais. Hidrocarbonetos aromáticos polinucleares, tais como o antraceno e o perileno, são também fluorescentes. Em proteínas o fluoróforo dominante é o grupo do triptofano que absorve próximo de 280 nm e emite próximo de 340 nm. Em contraste às moléculas orgânicas aromáticas, átomos são geralmente não fluorescentes em fases condensadas. Uma exceção notável é o grupo dos lantanídeos.



Figura 2.2 – Emissão fluorescente da fluoresceína em meio aquoso. Laboratório de biofísica e síntese, Instituto de Física, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

Uma característica importante da técnica de fluorescência é a alta sensibilidade de observação. Dada esta sensibilidade, a fluorescência foi utilizada em 1877 para comprovar que os rios Danúbio e Reno eram conectados por correntezas subterrâneas. Esta conexão foi demonstrada adicionando-se fluoresceína no rio Danúbio. Após um período de sessenta horas, resíduos verdes fluorescentes apareceram em um pequeno rio que desaguava no rio Reno.

Espectros de fluorescência são geralmente apresentados como espectro de emissão. Um espectro de emissão é uma curva de intensidade de fluorescência (I) versus comprimento de onda (λ) em nanômetros ou número de onda (cm^{-1}). O comportamento do espectro de emissão é altamente sensível à estrutura química dos fluoróforos e à polaridade do solvente no qual estão dissolvidos. O espectro de emissão pode, por exemplo, ser deslocado para o azul se o grupo fluorescente for se aprofundando em uma proteína, bicamada lipídica ou membrana natural. Por outro lado, pode sofrer um deslocamento para o vermelho se um dado grupo fluorescente de uma proteína for desenovelado.

Os processos os quais ocorrem entre a absorção e a emissão da luz são ilustrados pelo *Diagrama de Jablonski*, também conhecido como Diagrama de *Perrin-Jablonski* (Fig. 2.3). Tais diagramas existem em uma variedade de formas e ilustram os vários processos moleculares que ocorrem em estados excitados. Os diagramas foram assim nomeados em homenagem ao professor Alexander Jablonski (1898-1980), considerado como o pai da espectroscopia de fluorescência. Dentre as suas contribuições podemos citar sua definição do termo anisotropia para descrever a emissão polarizada de soluções.

Os diagramas de Jablonski são ferramentas essenciais para a descrição dos processos quânticos envolvidos na absorção e na emissão da luz, tais como absorção de fóton, conversão interna, cruzamento intersistema, fosforescência, transições tripleto-tripletto e fluorescência. Com o diagrama podemos melhor visualizar as interações de supressão, energia de transferência e interação com o solvente. Os estados eletrônicos singletos, o fundamental, o primeiro e o segundo são descritos por S_0 , S_1 e S_2 , respectivamente. Em cada um destes níveis energéticos eletrônicos dos fluoróforos pode existir um conjunto de níveis energéticos vibracionais, denotados por 0, 1, 2,... As transições entre estados são descritos como linhas verticais para ilustrar a natureza instantânea da absorção da luz. As transições ocorrem em um tempo da ordem de 10^{-15} s, um tempo muito pequeno para o deslocamento do núcleo. O que é conhecido como princípio de Franck-Condon. À temperatura ambiente, a energia térmica não é suficiente para ocasionar uma população significativa dos estados vibracionais excitados. A absorção de fótons ocorre por moléculas com energia vibracional mais baixa. Após a absorção da luz, um fluoróforo é excitado para algum nível vibracional mais alto de seus estados de singleto S_1 e S_2 e, então, vários processos ocorrem.

Conversão interna de energia é uma transição não radiativa entre dois estados eletrônicos de mesma multiplicidade de spin. Em solução, este processo é seguido por uma relaxação vibracional em direção ao mais baixo nível vibracional do estado eletrônico fundamental. O excesso de energia vibracional pode ser transferido para o solvente durante colisões entre as moléculas excitadas e as moléculas do solvente. A conversão interna ocorre em um tempo de 10-12 s ou menos e seus tempos de vida de fluorescência são da ordem de 10-8 s. A conversão interna é completada anteriormente à emissão.

Cruzamento intersistema é uma transição não radiativa entre dois níveis vibracionais isoenergéticos pertencentes a estados eletrônicos com diferentes multiplicidades. Moléculas no estado S_1 podem experimentar uma conversão de spin para o primeiro estado de tripleto, T_1 . A emissão de T_1 é denominada de fosforescência e é deslocada para comprimentos de ondas maiores (energias menores) comparados à fluorescência. A transição de T_1 para o estado fundamental de singlete é proibida. Como resultado, a taxa constante de emissão para o tripleto é de várias ordens de magnitude menores que aquelas da fluorescência. Moléculas contendo átomos metálicos, tais como brometos e iodetos são freqüentemente fosforescentes. Os átomos metálicos facilitam o cruzamento intersistema e desta maneira aumentam o rendimento quântico de fosforescência. Cruzamento intersistema reverso, $T_1 \rightarrow S_1$, pode ocorrer quando a diferença de energia entre os estados S_1 e T_1 for pequena e quando o tempo de vida de T_1 for grande o suficiente. Este processo provoca a fluorescência atrasada, onde o espectro é o mesmo da fluorescência comum, no entanto o tempo de vida de decaimento de fluorescência é maior devido à permanência da molécula no estado tripleto T_1 antes da emissão de S_1 . Em soluções concentradas, a colisão entre duas moléculas no estado T_1 pode fornecer energia suficiente para permitir que uma delas retorne ao estado S_1 . Este processo é chamado de aniquilação tripleto-tripletto. Por outro lado, uma vez que a molécula é excitada e atinge o estado T_1 , ela pode absorver fótons com outros comprimentos de onda, dado que as transições tripleto-tripletto são permitidas. A emissão de fluorescência resulta de um equilíbrio térmico dos estados excitados, isto é, dos estados vibracionais de níveis energéticos mais baixos de S_1 . Já o retorno ao estado fundamental ocorre para o nível do estado fundamental excitado vibracional mais alto, o qual então rapidamente (10^{-12} s) alcança seu equilíbrio térmico. Uma vez excitado o fluoróforo é levado ao nível vibracional mais alto do estado eletrônico excitado, S_1 . O excesso de energia é rapidamente dissipado, em um tempo da ordem de 10^{-12} s, levando o fluoróforo ao mais baixo nível vibracional de S_1 . Por causa desta rápida relaxação, os espectros de emissão são independentes do comprimento de onda de excitação. No entanto, exceções existem, tais como os fluoróforos que existem em dois estados de ionização, cada qual exibindo distintos espectros de absorção e emissão. Por outro lado, algumas moléculas são

conhecidas por emitirem do nível S_2 , mas tal emissão é rara e não são observadas em moléculas biológicas.

Uma interessante consequência da emissão dos mais altos estados vibracionais fundamentais é que o espectro de emissão é tipicamente uma imagem espelho do espectro de absorção da transição $S_0 \rightarrow S_1$. Esta similaridade ocorre devido ao fato de que a excitação eletrônica não altera significativamente a geometria do núcleo. Assim, o espaçamento dos níveis energéticos vibracionais do estado excitado é similar ao do estado fundamental. Como resultado, a estrutura vibracional vista no espectro de emissão e de absorção são similares. O espectro de alguns compostos, tais como o perileno, mostram uma significativa estrutura devido aos níveis energéticos vibracionais individuais do estado fundamental e do estado excitado. Outros compostos, por outro lado, podem apresentar um espectro desprovido de estrutura vibracional. Embora a regra da imagem espelho seja frequentemente válida, muitas exceções a esta regra ocorrem. Deste modo, mesmo que o espectro de absorção de um dado fluoróforo seja desprovido de estrutura vibracional, seu espectro de emissão pode apresentar esta estrutura. Tais desvios da regra da imagem espelho indicam um rearranjo diferente da geometria do núcleo no estado excitado comparado ao estado fundamental. Devido ao longo tempo de vida do estado S_1 , deslocamentos do núcleo podem ocorrer antes da emissão de fluorescência. Em reações de estado excitado de complexos e excíplexes também podem ocorrer rearranjos geométricos que impliquem no desvio da regra da imagem espelho.

Abaixo temos os tempos característicos dos processos associados à absorção e a emissão de fótons:

<i>Processo</i>	<i>Tempo característico (s)</i>
Absorção	10^{-15}
Relaxação vibracional	$10^{-12} - 10^{-10}$
Tempo de vida do estado excitado S_1	$10^{-10} - 10^{-7}$
Cruzamento intersistema	$10^{-10} - 10^{-8}$
Conversão interna	$10^{-11} - 10^{-9}$
Tempo de vida do estado excitado T_1	$10^{-6} - 10^0$

Um exame do diagrama de Jablonski (Fig. 2.3) nos revela que a energia de emissão é menor que a energia de absorção. Deste modo, dizemos que a fluorescência ocorre em energias menores ou comprimentos de onda maiores. Este fenômeno foi primeiramente observado por G. G. Stokes. A diferença de energia entre a excitação e a emissão é observada de maneira universal para todas as moléculas fluorescentes em solução. Outra propriedade da fluorescência é que o mesmo espectro de emissão pode ser observado para diferentes comprimentos de onda de excitação. O espectro de emissão de um fluoróforo independe do comprimento de onda da excitação.

O tempo de vida de fluorescência e o rendimento quântico são talvez as mais importantes características de um fluoróforo. O rendimento quântico é a razão do número de fótons emitidos pelo número de fótons absorvidos. Substâncias com um grande rendimento quântico, aproximando-se da unidade, tais como a fluoresceína, apresentam uma emissão visivelmente brilhante. O tempo de vida determina o tempo disponível para o fluoróforo interagir com ou difundir-se no meio, e assim disponibilizar a informação de sua emissão. O significado do rendimento quântico e do tempo de vida de fluorescência pode ser melhor visualizado a partir do diagrama de Jablonski.

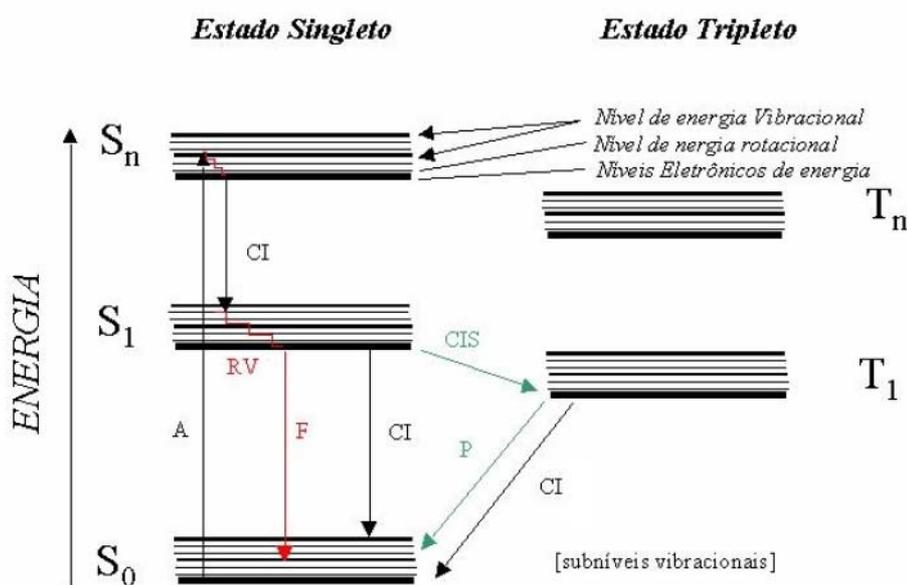


Figura 2.3 – Diagrama de Jablonski modificado. (A) absorção de um fóton, (S_0) estado fundamental de singlete, (S_n) estado excitado de singlete, (S_1) primeiro estado excitado de singlete, (RV) relaxação vibracional, (CI) conversão interna, (CIS) cruzamento intersistemas, (T_n) estado excitado de tripleto.

A partir do diagrama acima podemos definir a taxa de emissão radiativa de um fluoróforo dada por Γ e não radiativa dada por k_{nr} . Tanto a taxa de emissão radiativa, quando a não radiativa são responsáveis pela despopulação do estado excitado. A fração de fluoróforos que decaem através da emissão de fótons, e assim o rendimento quântico, é dada por:

$$\Phi = \frac{\Gamma}{\Gamma + k_{nr}} \quad (2.1)$$

Da equação (2.1) concluímos, naturalmente, que quanto menor a taxa não radiativa, maior o valor do rendimento quântico, de modo que $0 \leq \Phi \leq 1$. Deste modo, o rendimento quântico pode ser tão próximo da unidade quanto menor for a taxa de decaimento não radiativo. No entanto, o rendimento quântico é sempre menor que a unidade devido à perda de Stokes. Por conveniência, todos os possíveis processos não radiativos foram agrupados a uma única taxa k_{nr} .

2.2

Fluorescência resolvida no tempo

Medidas de fluorescência podem ser classificadas em dois tipos: no estado estacionário e resolvidas no tempo. Medidas no estado estacionário são aquelas realizadas com uma iluminação e observação constantes. A amostra é iluminada com um feixe contínuo de luz e a intensidade ou espectro de emissão é então registrado. Quando a amostra é exposta à luz, o estado estacionário é alcançado quase que imediatamente. Já o segundo tipo de medidas, as resolvidas no tempo, é utilizado para medir intensidades e tempos de decaimento de fluorescência. Para estas medidas a amostra é exposta a um pulso de luz, onde a largura do pulso é tipicamente mais curto que o tempo de decaimento da amostra. Esta intensidade de decaimento é registrada com um sistema de alta velocidade de detecção que permite medir a intensidade e a anisotropia em uma escala de tempo de nanossegundos.

É importante ressaltar que podemos estabelecer uma relação entre as medidas de estado estacionário e as medidas de fluorescência resolvida no tempo. A observação do estado estacionário é tida como uma média do fenômeno resolvido no tempo sobre a intensidade de decaimento da amostra. Muitos

fluoróforos dispõem de tempo de vida de subnanossegundos. Devido às curtas escalas de tempo da fluorescência, medidas da emissão de fluorescência resolvida no tempo requerem uma ótica e uma eletrônica sofisticada. No entanto, apesar das dificuldades experimentais, a técnica da fluorescência resolvida no tempo tem sido cada vez mais utilizada.

Dada uma solução diluída de espécies fluorescentes com concentração $[A]$ (em mol L⁻¹), um pulso de luz no tempo $t = 0$ leva certo número de moléculas, A , ao estado excitado de singlete S_1 através da absorção de fótons. Estas moléculas excitadas então retornam ao estado S_0 , através dos processos radiativos, não radiativos e cruzamento intersistema. A taxa de despovoação do estado excitado pode ser descrita com a equação diferencial dada por:

$$-\frac{d[{}^1A^*]}{dt} = (k_r^s + k_{nr}^s)[{}^1A^*] \quad (2.2)$$

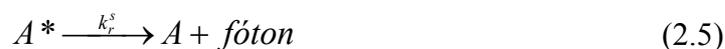
Integrando a equação (2.2) obtemos a evolução no tempo da concentração de moléculas no estado excitado, $[{}^1A^*]$. Deste modo, temos:

$$[{}^1A^*] = [{}^1A^*]_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau_s}\right) \quad (2.3)$$

onde $[{}^1A^*]_0$ é a concentração de moléculas no estado excitado no tempo $t = 0$ e τ_s é o tempo de vida do estado excitado S_1 , dado por:

$$\tau_s = \frac{1}{k_r^s + k_{nr}^s} \quad (2.4)$$

A intensidade de fluorescência é definida como a quantidade de fótons emitida por unidade de tempo por unidade de volume. Assim podemos escrever:



A intensidade de fluorescência i_F no tempo t após a excitação da amostra por um pulso de luz no tempo igual a 0 é proporcional, em cada tempo, à concentração instantânea de moléculas no estado excitado, $[{}^1A^*]$; o fator de proporcionalidade é dado pela taxa radiativa k_r^s :

$$i_F(t) = k_r^s [{}^1A^*] = k_r^s [{}^1A^*]_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau_s}\right) \quad (2.6)$$

onde $i_F(t)$ é a resposta do sistema, o qual diminui de acordo com uma função exponencial. Cabe ressaltar que, para o caso de uma medida de intensidade de

fluorescência, a quantidade medida é proporcional a i_F , onde o fator de proporcionalidade depende das condições experimentais. A medida de fluorescência será denotada por I_F .

O tempo de decaimento de fluorescência τ_s é a propriedade mais importante de uma molécula fluorescente, porque define a janela temporal em que podemos observar o fenômeno dinâmico do sistema. Após a excitação, uma fração de moléculas do sistema pode alcançar o estado excitado tripleto, de onde retornarão ao estado fundamental via processo radiativo, emissão de fótons, e processos não radiativos. A concentração de moléculas no estado tripleto decai exponencialmente com um tempo característico τ_T , o qual representa o tempo de vida do estado tripleto. Deste modo, podemos escrever:

$$\tau_T = \frac{1}{k_r^T + k_{nr}^T} \quad (2.7)$$

O rendimento quântico de fluorescência Φ_F é a fração de moléculas no estado excitado que retornam ao estado fundamental S_0 com emissão de fótons. Assim, temos:

$$\Phi_F = \frac{k_r^s}{k_r^s + k_{nr}^s} = k_r^s \tau_s \quad (2.8)$$

Por outro lado, o rendimento quântico de fluorescência é a razão do número de fótons emitidos (ao longo de toda a duração do decaimento) pelo número de fótons absorvidos. De acordo com a equação (2.6), a razão de $i_F(t)$ pelo número de fótons absorvidos é dada por:

$$\frac{i_F(t)}{[{}^1A^*]_0} = k_r^s \exp\left(-\frac{t}{\tau_s}\right) \quad (2.9)$$

onde a integração desta relação em toda a duração do decaimento (matematicamente de zero a infinito) nos fornece o rendimento quântico, de modo que:

$$\frac{1}{[{}^1A^*]_0} \int_0^{\infty} i_F(t) dt = k_r^s \tau_s = \Phi_F \quad (2.10)$$

Na fluorescência estacionária os espectros de emissão e excitação são registrados com o uso de um espectrofluorímetro. A fonte de luz é uma lâmpada

emitindo um fluxo de fótons constante. Sendo N_0 o número de fótons incidentes durante um intervalo de tempo por unidade de volume da amostra com concentração do fluoróforo $[A]$ (N_0 e $[A]$ em mol L⁻¹), temos que αN_0 representa a quantidade de fótons absorvidos por unidade de volume e o processo de excitação em questão é dado por ${}^1A + h\nu \xrightarrow{k_a} {}^1A^*$, onde $k_a \approx 10^{15} \text{ s}^{-1}$.

Sob iluminação contínua, a concentração $[{}^1A^*]$ permanece constante. Deste modo, dizemos que o sistema está no estado estacionário. Medidas realizadas nestas condições são chamadas de medidas de estado estacionário. A taxa temporal de mudança de $[{}^1A^*]$ é dada por:

$$\frac{d[{}^1A^*]}{dt} = 0 = k_a \alpha N_0 - (k_r^s + k_{nr}^s)[{}^1A^*] \quad (2.11)$$

onde $k_a \alpha N_0$ representa o número de fótons absorvidos por unidade de volume por unidade de tempo. Podemos reescrever a equação (2.11) em termos de αI_0 , onde I_0 representa a intensidade de luz incidente (em mols de fótons por litro por segundo). A concentração constante de $[{}^1A^*]$ é dada por:

$$[{}^1A^*] = \frac{\alpha I_0}{k_r^s + k_{nr}^s} \quad (2.12)$$

A quantidade de fótons fluorescentes emitidos por unidade de tempo e por unidade de volume, ou seja, a intensidade de fluorescência do estado estacionário e dada por:

$$i_F = k_r^s [{}^1A^*] = \alpha I_0 \frac{k_r^s}{k_r^s + k_{nr}^s} = \alpha I_0 \Phi_F \quad (2.13)$$

A equação acima mostra que a intensidade de fluorescência do estado estacionário por fóton absorvido $i_F/\alpha I_0$ é o próprio rendimento quântico de fluorescência.

2.3

Supressão de Fluorescência

A intensidade de fluorescência pode ser diminuída por muitos processos. Tais diminuições em intensidade são chamadas de supressão. A supressão resulta do encontro difusivo entre fluoróforo e supressor durante o tempo de vida do estado excitado do fluoróforo. Uma grande variedade de interações moleculares

pode resultar no fenômeno da supressão. Dentre elas temos as reações de estado excitado, rearranjos moleculares, transferência de energia, formação de complexos no estado fundamental e supressão colisional ou dinâmica. Por outro lado, outro tipo de supressão, a supressão aparente, pode ocorrer devido à alta densidade ótica na excitação e emissão da amostra.

A supressão de fluorescência tem sido estudada como um fenômeno fundamental e como fonte de informação sobre muitos sistemas bioquímicos. Tais aplicações bioquímicas são devidas às interações moleculares que resultam na supressão. Tanto a supressão estática quanto a supressão colisional ou dinâmica requerem contato entre o fluoróforo e supressor. No caso da supressão colisional, o supressor se difundirá no fluoróforo durante o tempo de vida de seu estado excitado. Após o contato, o fluoróforo retorna ao estado fundamental sem a emissão de um fóton. Em geral, a supressão colisional ocorre sem nenhuma alteração permanente na molécula, ou seja, sem reação fotoquímica. Já na supressão estática um complexo não fluorescente no estado fundamental é formado entre o fluoróforo e o supressor. Contudo, em ambos os casos, estático e dinâmico, para que ocorra o fenômeno da supressão o fluoróforo e o supressor devem estar em contato. Tal condição de contato implica em numerosas aplicações da supressão. Se considerarmos um fluoróforo ligado a uma proteína ou a lipídeos de membrana, por exemplo, se a proteína ou a membrana for impermeável ao supressor, e o fluoróforo estiver localizado no interior da macromolécula, nenhuma supressão estática poderá ocorrer. Por esta razão a supressão de fluorescência pode ser usada para revelar a localização de fluoróforos em proteínas e membranas, a acessibilidade dos fluoróforos aos supressores, assim como sua permeabilidade a supressores.

Há uma variedade muito grande de substâncias que agem como supressores de fluorescência. Um dos mais conhecidos supressores colisionais é a molécula de oxigênio. Dependendo do tipo da amostra em investigação é frequentemente necessário remover o oxigênio dissolvido para se obter resultados confiáveis nas medidas de fluorescência estacionária e resolvida no tempo. Outros supressores eficientes são os aromáticos, halogênios, acrilamida, aminas alifáticas, dietilanilina, compostos halogênios, purinas, pirimidinas, etc.

Na supressão colisional ou dinâmica, a diminuição da intensidade fluorescência é descrita pela equação de Stern-Volmer:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_D [Q] \quad (2.14)$$

Nesta expressão F_0 e F são as intensidades de fluorescência na ausência e presença do supressor, respectivamente, k_q é a constante bimolecular de supressão; τ_0 é o tempo de vida do fluoróforo na ausência do supressor, K_D é constante de supressão de Stern-Volmer e $[Q]$ é a concentração de supressor. A constante de supressão bimolecular, k_q , nos informa a eficiência da supressão e a acessibilidade dos fluoróforos aos supressores. As medidas de supressão são geralmente representadas em um gráfico de F_0/F versus $[Q]$. Deste modo, espera-se que F_0/F seja linearmente dependente da concentração de supressor. Um ajuste linear é indicado quando existe uma classe única de fluoróforos, estando todos acessíveis ao supressor. É importante ressaltar que a observação de um ajuste linear de Stern-Volmer não prova que a supressão colisional de fluorescência tenha ocorrido. Por outro lado, se duas populações de fluoróforos estão presentes e uma delas não está acessível ao supressor, temos que o gráfico de Stern-Volmer desvia-se da linearidade e novas considerações devem ser inseridas na equação (2.14).

Outra importante característica da supressão colisional é a equivalência entre diminuição da intensidade de fluorescência e do tempo de vida, ilustrada pelas equações:

$$\frac{\tau_0}{\tau} = 1 + k_q \tau_0 [Q] \quad (2.15)$$

De modo que,

$$\frac{F_0}{F} = \frac{\tau_0}{\tau} \quad (2.16)$$

A diminuição do tempo de vida ocorre devido à diminuição da população do estado excitado devido à desexcitação por colisão. Já a supressão estática não diminui o tempo de vida porque somente moléculas fluorescentes são observadas e os fluoróforos que não formaram complexos possuem o mesmo tempo de vida τ_0 .

O fenômeno da supressão pode também ocorrer como resultado da formação de um complexo não fluorescente entre o fluoróforo e o supressor. Neste sentido, o complexo absorve luz e retorna imediatamente ao estado fundamental sem a

emissão de fóton. Quando isso ocorre dizemos que a supressão é estática e é descrita por:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_S [Q] \quad (2.17)$$

Note que a dependência de F_0/F de $[Q]$ é linear, o que é idêntico para a supressão dinâmica, exceto pelo fato de que a constante de supressão agora é a própria constante de associação.

A distinção entre supressão estática e supressão dinâmica pode ser realizada através da dependência distinta em função da temperatura, da viscosidade e através de medidas de tempo de vida. Em temperaturas elevadas temos uma difusão rápida, o que implica em um aumento da supressão colisional, em uma dissociação das ligações fracas, diminuindo a quantidade de complexos, em uma diminuição da supressão estática. A realização de medidas de tempo de vida é a forma mais definitiva de distinguir supressão estática e dinâmica. A supressão estática remove a fração de fluoróforos da observação, pois os complexos formados são não fluorescentes. A fração de fluoróforos que não formaram complexos possui então um tempo de vida τ_0 . Para a supressão estática $\tau_0/\tau = 1$. Em contraste com a supressão dinâmica onde $\tau_0/\tau = F_0/F$. Outro método para distinguir supressão estática de supressão dinâmica é examinando o espectro de absorção do fluoróforo. Supressão colisional afeta somente os estados excitados dos fluoróforos e, portanto, não altera o espectro de absorção. Em contraste, a formação de complexos no estado fundamental frequentemente resulta em uma perturbação no espectro de absorção do fluoróforo.

Em muitas situações a fluorescência pode ser suprimida por ambos os tipos de supressão: dinâmica, colidindo com o supressor, e estática, formando complexos. Neste caso, a equação de Stern-Volmer é modificada e possui um termo não linear, de segunda ordem em $[Q]$. O que resulta em uma concavidade positiva na curva. Deste modo, temos:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{app} [Q] \quad (2.18)$$

onde $K_{app} = (K_D + K_S) + K_D K_S [Q]$ depende da concentração de supressor.

Proteínas contêm muitos resíduos de triptofano que estão localizados em meios distintos. Deste modo, podemos fazer uso da supressão para avaliar a

acessibilidade das proteínas ao supressor. Neste caso, a equação de Stern-Volmer modificada é dada por:

$$\frac{F_0}{F_0 - F} = \frac{1}{f_a K_a [Q]} + \frac{1}{f_a} \quad (2.19)$$

onde K_a é a constante de supressão de Stern-Volmer da fração acessível, $[Q]$ é a concentração de supressor e f_a é a fração da fluorescência inicial acessível ao supressor, dada por:

$$f_a = \frac{F_{0a}}{F_{0b} + F_{0a}} \quad (2.20)$$

onde F_{0a} e F_{0b} são as intensidade de fluorescência totais na ausência do supressor do fluoróforos acessíveis e inacessíveis, respectivamente.

A intensidade de fluorescência observada para um fluoróforo é proporcional à sua concentração no estado excitado, $[F^*]$. Sob iluminação contínua, temos que a população de fluoróforos excitados é estabilizada, de modo que, $d[F^*]/dt = 0$. Na ausência e na presença do supressor as equações diferenciais que descrevem $[F^*]$, são:

$$\frac{d[F^*]}{dt} = f(t) - \gamma[F^*]_0 = 0 \quad (2.21)$$

$$\frac{d[F^*]}{dt} = f(t) - (\gamma + k_q [Q]) [F^*] = 0 \quad (2.22)$$

onde $f(t)$ é a função de excitação constante, e $\gamma = \tau_0^{-1}$ é a taxa de decaimento do fluoróforo na ausência do supressor. Na ausência do supressor a população do estado excitado decai com uma taxa $\gamma = (\Gamma + k_{nr})$, onde Γ e k_{nr} são as taxas de decaimento radiativas e não radiativas, respectivamente. No entanto, na presença do supressor temos uma taxa de decaimento adicional dada por $k_q [Q]$. Dividindo a equação (2.21) pela equação (2.22), temos:

$$\frac{[F^*]_0}{[F^*]} = \frac{\gamma + k_q [Q]}{\gamma} = 1 + k_q \tau_0 [Q] \quad (2.23)$$

A equação de Stern-Volmer pode ser obtida considerando a fração de fluoróforos excitados que decaem por emissão em relação ao total. Essa fração F/F_0 é dada pela razão da taxa de decaimento na ausência do supressor, γ , pela taxa de decaimento total na presença do supressor $\gamma + k_q [Q]$, de modo que:

$$\frac{F}{F_0} = \frac{\gamma}{\gamma + k_q [Q]} = \frac{1}{1 + K_q \tau_0 [Q]} \quad (2.24)$$

A equação (2.24) é justamente a equação de Stern-Volmer. Como a supressão colisional é um processo que diminui a população do estado excitado, podemos expressar os tempos de vida na ausência e na presença do supressor por:

$$\tau^0 = \gamma^{-1} \quad (2.25)$$

$$\tau = (\gamma + k_q [Q])^{-1} \quad (2.26)$$

Assim, temos que os tempos se relacionam através:

$$\frac{\tau_0}{\tau} = 1 + k_q \tau_0 [Q] \quad (2.27)$$

2.4

Transferência de Energia

Transferência ressonante de energia na fluorescência (FRET) é um fenômeno eletrodinâmico que pode ser explicado através da física clássica. A FRET ocorre entre um doador (D) e uma molécula receptora (A) no estado fundamental. As moléculas doadoras tipicamente emitem em comprimentos de onda que se sobrepõem ao espectro de absorção da molécula receptora. A transferência de energia é um processo que não envolve a emissão e reabsorção de fótons, ou seja, não é o resultado da emissão de um D sendo absorvida por um A. O termo transferência de energia ressonante (RET), portanto, mostra-se mais adequado, ao invés de FRET. Para que a FRET ocorra não é necessário que A seja fluorescente. A teoria da RET baseia-se no conceito do fluoróforo como um dipolo oscilante, o qual pode trocar energia com outro dipolo que possua uma frequência de ressonância similar. Note que o fenômeno da RET é similar ao de osciladores acoplados.

A taxa de RET depende da extensão da sobreposição entre os espectros de emissão do D e de absorção do A, do rendimento quântico do D, da orientação relativa entre os dipolos e da distância entre as moléculas do D e A. RET é comumente utilizada em todas as aplicações da fluorescência, incluindo diagnósticos médicos, análise de DNA, escaneamento ótico. O uso mais comum da RET é a determinação da distância entre dois sítios de uma macromolécula.

Por outro lado, RET também é usada para estudar sistemas macromoleculares mais complexos onde há uma distribuição de doadores e receptores. A transferência de energia pode ser influenciada pela presença pela difusão do par D_A durante o tempo de vida de fluorescência do D. Embora esta influência possa ser observada nas medidas de fluorescência estacionária, tais sistemas são usualmente estudados através da fluorescência resolvida no tempo.

A distância em que a RET possui uma eficiência de 50% é chamada de distância de Förster, que se encontra na faixa de 20 a 60 angstroms em soluções aquosas. A taxa de transferência de energia, $K_t(r)$, de um D para um A é dada por:

$$K_t(r) = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{r} \right)^6 \quad (2.28)$$

onde τ_D é o tempo de decaimento do D na ausência do A, R_0 é a distância de Förster e r é a distância entre o D e o A. Assim, a taxa de transferência de energia é igual à taxa de decaimento do doador, $1/\tau_D$, quando D está a uma distância, r , igual à distância de Förster, R_0 , com a eficiência na transferência de 50%. Deste modo, quando $r = R_0$ a intensidade de emissão de fluorescência do D deverá diminuir em 50% da intensidade na ausência do A. Note que a taxa de transferência depende fortemente da distância e é proporcional a r^{-6} .

Distâncias de Förster na faixa de 20 a 90 angstroms são convenientes para se estudar macromoléculas biológicas, dado que estas distâncias são comparáveis ao tamanho das biomoléculas e às distâncias entre os sítios de proteínas. Determinadas condições que influem na distância D-A influem conseqüentemente na taxa de transferência de energia. Deste modo, podemos usar a RET como uma régua espectroscópica para quantificar distâncias entre D-A.

A eficiência da transferência de energia, E , é definida como a fração de fótons absorvidos pelo D os quais são transferidos para o A. Esta fração é dada por:

$$E = \frac{k_T(r)}{\tau_D^{-1} + k_T(r)} \quad (2.29)$$

onde $k_T(r)$ é a taxa de transferência de energia e τ_D é o tempo de vida do doador na ausência do A. Substituindo a equação (2.28) na equação (2.29), de modo a expressar a eficiência em termos do raio de Förster R_0 e da distância entre o D e A, temos:

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad (2.30)$$

Esta equação mostra que a eficiência de transferência de energia é fortemente dependente da distância. Por outro lado, podemos expressar a eficiência em termos da intensidade de fluorescência do D na ausência, F_D , e na presença, F_{DA} , do A. Assim, temos que:

$$E = 1 - \frac{F_{DA}}{F_D} \quad (2.31)$$

A eficiência pode ser também calculada diretamente dos tempos de vida do D na ausência, τ_{DA} , e na presença, τ_D , de A. Deste modo:

$$E = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D} \quad (2.32)$$

Cabe salientar que estas equações são válidas somente para pares de D–A que estão separados por uma distância fixa, caso típico de marcadores de proteínas. Entretanto, uma distância fixa única entre doadores e receptores não é encontrada em misturas de doadores e receptores solução, ou para receptores dispersos aleatoriamente em membranas. Modelos mais complexos são necessários nestes casos. Modelos que geralmente se baseiam em taxas médias de RET sobre uma distribuição espacial de pares de D–A.