

luminiscencia

luminiscencia molecular

Se puede dividir en dos:

Fotoluminiscencia: requiere de absorción $h\nu$ y posteriormente emisión $h\nu$. Existen dos procesos fotoluminiscentes

$$\lambda_{em} = 0 > \lambda_{exc}$$

Fluorescencia: transición electrónica sin cambio de espín
($T = < 10^{-5}$ s)

Fosforescencia: trans. electrónica con cambio de espín
($T = 10^{-4}$ a 10 s)

τ = tiempo de vida

Este tiempo de vida media para un estado electrónico excitado, se considera cuando su población disminuye a $1/e$

Quimioluminiscencia: espectro de emisión de una especie excitada que se forma en una reacción química
si hay una emisión pero no hay absorción, sino que una reacción va producir un producto en el estado excitado que posteriormente va emitir

La fluorescencia molecular se mide excitando una muestra a una longitud de onda de absorción, longitud de onda de excitación, y midiendo la emisión a una longitud de onda mayor, longitud de onda de emisión o de fluorescencia

Generalmente, la emisión de fotoluminiscencia se mide en ángulo recto con relación al haz incidente para evitar medir la radiación incidente. La emisión de vida corta que ocurre se llama fluorescencia, mientras que la luminiscencia que dura más tiempo se denomina fosforescencia.

Ventajas de la luminiscencia: sensibilidad 10 veces o $> A$ (absorbancia) } permite mayor rango de detección de concentraciones
límites de detección (ppb = 10^{-9})

La medición de la intensidad de la fotoluminiscencia o de la quimioluminiscencia facilita la determinación cuantitativa de un conjunto de especies inorgánicas y orgánicas importantes cuando están presentes en cantidades de trazas

Limitaciones: aplicabilidad limitada. no todos los compuestos que absorben van a tener fotoluminiscencia

Teoría

La luminiscencia se puede encontrar en sistemas en cualquier estado de la materia

Sistemas químicos luminiscentes: sólidos, líquidos, gaseosos

Sistemas simples: átomos $\lambda_{em} = \lambda_{exc}$ radiación o frecuencia de resonancia

Ej: Na $3s \rightarrow 3p$ $\lambda_{exc} = 589,6$ y $589,0$ nm $\tau = 10^{-8}$ a 10^{-5} s

se excita

$$\lambda_{em} = \lambda_{exc}$$

Sistemas complejos: moléculas, complejos, quelatos $\lambda_{em} > \lambda_{exc}$
desplazamiento de Stokes

en sistemas complejos, la longitud de onda de emisión es mayor a la de excitación, esto se llama desplazamiento de Stokes

en sistemas simples, como los átomos, la longitud de onda de emisión es igual a la de excitación

Este tipo de fluorescencia, en la cual la radiación absorbida se vuelve a emitir sin cambio de frecuencia, se conoce como radiación de resonancia o fluorescencia de resonancia.

• Para qué sirve?

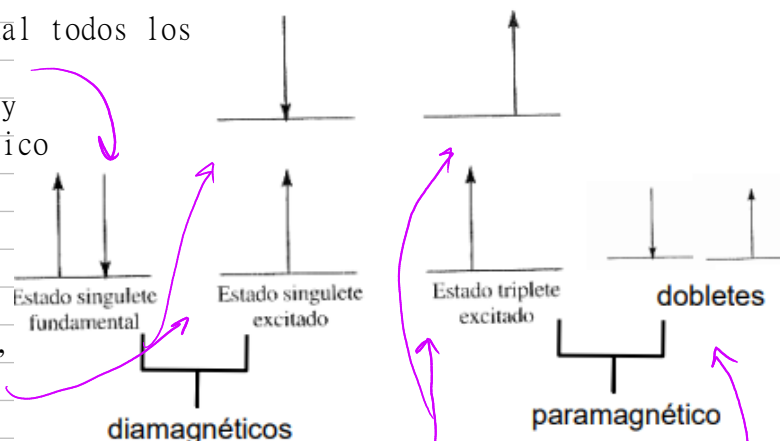
Visualizar partes de la célula
Estudiar procesos celulares
Estudiar la interacción entre moléculas in vivo

Localizar moléculas específicas
Diferenciar partículas muy pequeñas que por contraste de fases no se resolverían

Estados excitados que producen fluorescencia y fosforescencia

- Un estado electrónico de una molécula en el cual todos los espines de los electrones están emparejados se llama estado sencillo, singlete fundamental, y cuando la molécula se expone a un campo magnético no se produce una división de niveles energéticos. Diamagnético

- Si cuando se excita la molécula, uno de estos e- pasa a un nivel superior con el mismo spin, pero ambos continúan apareados, es decir, el otro también conserva su spin pero en nivel electrónico diferente, se trata de un estado singlete excitado



- Si cuando pasa de nivel, lo hace con cambio de spin, se trata de un estado triplete, los e- están desapareados

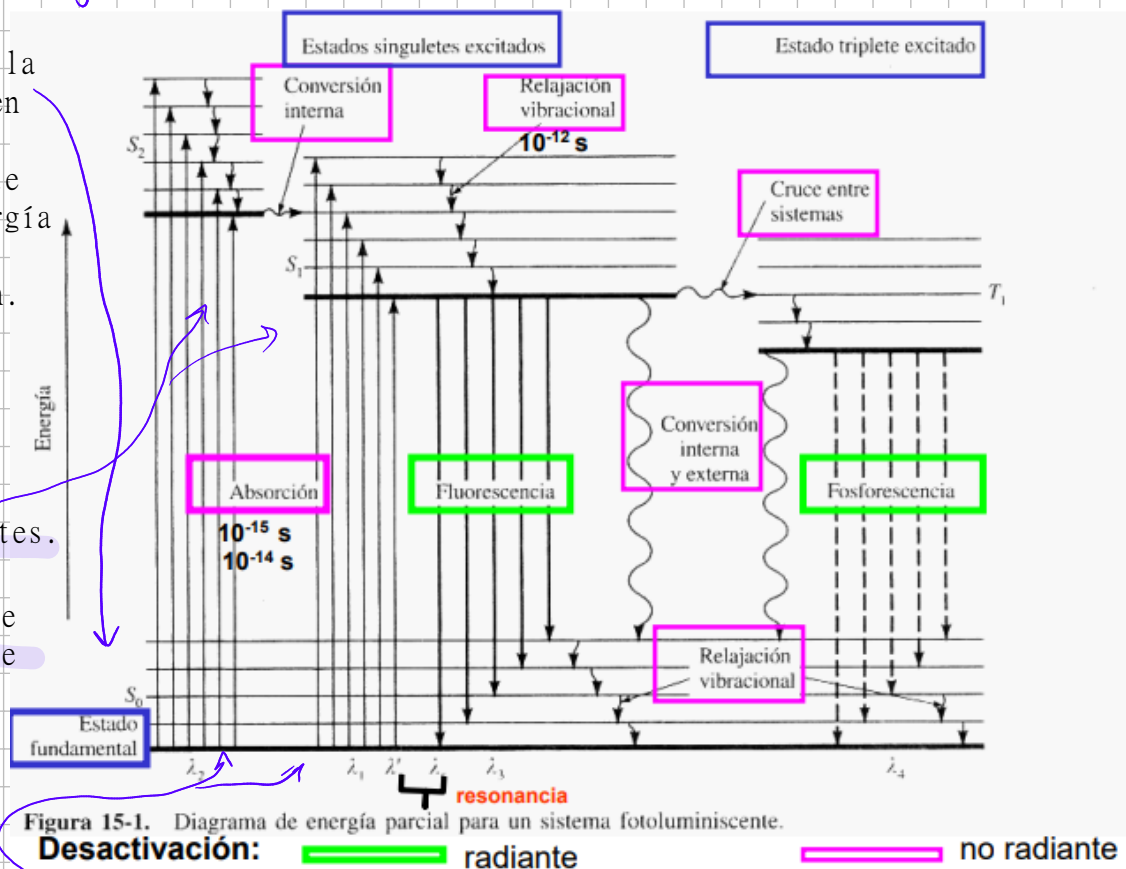
- Por otro lado, el estado fundamental de un radical libre es un estado doble, porque hay dos orientaciones posibles que puede tomar el electrón impar del último nivel en un campo magnético, lo cual proporciona ligeras diferencias de energía al sistema.

Diagrama de nivel de energía p/ moléculas fotoluminiscentes diagrama de Jablonski

- El estado fundamental de la molécula generalmente está en estado sencillo. A temperatura ambiente, este estado representa la energía de la mayor parte de las moléculas en una solución.

- Los niveles de energía de los estados vibracionales fundamentales de tres estados electrónicos excitados, dos son singletes.

- Cuando la molécula absorbe energía puede tener más de una banda de absorción, la longitud de onda más corta corresponde a la de mayor energía. Vemos que la longitud de onda del primer singlete es más corta que la del segundo pero tiene más energía



- Tal como lo sugieren las rectas horizontales finas, con cada uno de los cuatro estados electrónicos están asociados numerosos niveles de energía vibracionales.
- Las moléculas excitadas hacia los estados electrónicos S1 y S2 pierden con rapidez el exceso de energía vibracional y se relajan, con lo que adquieren el nivel vibracional fundamental de ese estado electrónico. Este proceso en el que no hay radiación se denomina relajación vibracional. Todo el exceso de energía vibracional se pierde por choque entre las moléculas hasta llegar al estado fundamental del estado excitado
- A partir de un singlete excitado y luego de ocurrida la relajación vibracional, hay moléculas que pueden emitir en forma de fluorescencia, verde, con distintas long de onda dependiendo a que estado vibracional del estado electrónico fundamental corresponda la long de onda
- La línea de la derecha (T1) representa la energía del primer estado electrónico triple. la energía de este es menor que la energía del correspondiente estado sencillo
- También puede haber cruces entre sistemas, entre el singlete excitado y el triplete excitado. Para que ocurra debe haber solapamiento de niveles vibracionales. Una vez dada la relajación vibracional hasta el estado vibracional fundamental del triplete excitado, se puede producir la fosforescencia, verde, hasta cualquier nivel vibracional del estado fundamental
- La conversión interna es un cruce entre dos estados de la misma multiplicidad (sencillo-sencillo o triplete-triplete). Es eficaz en particular cuando dos niveles de energía electrónicos están lo suficientemente próximos como para que haya traslape de los niveles de energía vibracional. Similar al cruce entre sistemas
- La desactivación de un estado electrónico excitado puede comprender la interacción y la transferencia de energía entre la molécula excitada y el solvente u otros solutos. Estos procesos se llaman conversión externa. Entre la evidencia de la conversión externa se encuentra el marcado efecto que ejerce el solvente en la intensidad de la fluorescencia de la mayor parte de las especies. Además, aquellas condiciones que tienden a reducir la cantidad de colisiones entre partículas (baja temperatura y elevada viscosidad) tienden por lo general a aumentar la fluorescencia
- Las conversiones externas e internas compiten con tanto éxito con la fosforescencia que este tipo de emisión se observa en forma común sólo a temperaturas bajas en medios altamente viscosos o al aplicar técnicas especiales para proteger el estado triplete.

Como tomar espectros de excitación y emisión

- Cuando se conoce el espectro de absorción, se busca la long de onda de mayor abs. Y para tomar un espectro de emisión, se fija una long de onda de excitación y se registra el espectro de emisión
- Luego registro la long de onda de mayor emisión, 450 nm. y hago el espectro de emisión
- Los espectros de excitación y emisión son la imagen especular del otro

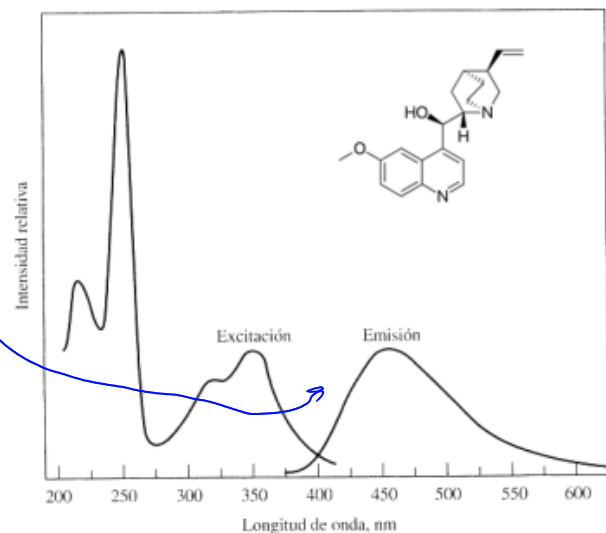


Figura 15-2. Espectros de excitación y emisión de una disolución de quinina.

Variables que afectan la fluorescencia y la fosforescencia

- Rendimiento cuántico o la eficacia cuántica de la fluorescencia o la fosforescencia:
es simplemente la relación entre la cantidad de moléculas que manifiestan luminiscencia y el número total de moléculas excitadas.

El diagrama de niveles y el análisis sobre los procesos de desactivación sugieren que el rendimiento cuántico de fluorescencia ϕ de un compuesto se puede calcular a partir de las constantes de velocidad relativas k_x para los procesos por los cuales queda inactivo el estado sencillo excitado más bajo. Estos procesos son

$$\phi = \frac{k_f}{k_f + k_{ces} + k_{ce} + k_{ci} + k_{pd} + k_d} = 1 \text{ a } 0$$

ϕ = números de fotones emitidos / número de fotones absorbidos

fluorescencia (k_f),
cruce entre sistemas (k_i),
conversión externa (k_{ce}),
conversión interna (k_{ci}),
predisociación (k_{pd}),
y disociación (k_d).

- Tipos de transiciones en fluorescencia: este tipo de emisión está confinada a los procesos menos energéticos $\pi^* - \pi$ $\pi^* - n$

la fluorescencia más común surge a partir de una transición desde el nivel vibracional más bajo del primer estado electrónico excitado a uno de los niveles vibracionales del estado electrónico fundamental. Por lo que se refiere a la mayoría de los compuestos fluorescentes, la radiación se produce por una transición $\pi^* \rightarrow n$ o $\pi^* \rightarrow \pi$ dependiendo de cuál de ellas es la menos energética.

$\pi^* - \pi$

mayor ϕ

$\epsilon = 100 \text{ a } 1000$ mayor que $\pi^* - n$

menor probabilidad de CS;

$\tau = 10^{-9} \text{ a } 10^{-7} \text{ s}$

Esta transición tiene mayor rendimiento cuántico, las abs molares de estos sistemas van entre estos valores, tienen menor probabilidad de realizar cruces entre sistemas
Tienen menor τ , se relacionan con la fluorescencia

$\pi^* - n$

$\tau = 10^{-7} \text{ a } 10^{-5} \text{ s}$

Mayor τ , se relacionan más con los procesos fosforescentes

- Fluorescencia y estructura:

La fluorescencia más intensa y la más útil es la de los compuestos que contienen grupos funcionales aromáticos con transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ de baja energía.

Los compuestos que contienen grupos carbonilo en estructuras alifáticas y alicíclicas o estructuras con dobles enlaces altamente conjugados también presentan fluorescencia

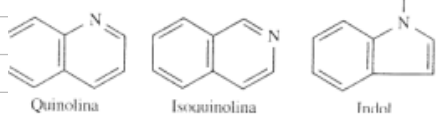
Los heterocíclicos sencillos no presentan fluorescencia.

Pero las estructuras de anillo

condensado con benceno por lo regular sí son fluorescentes

* Grupos carbonilos en estructuras alifáticas dobles enlaces conjugados

* Aromáticos: aumenta con el nro de anillos y la condensación



La condensación de anillos bencénicos para dar núcleos heterocíclicos, da como resultado un aumento en la absorptividad molar de la banda de absorción. En estas estructuras el tiempo de vida del estado excitado es más corto, y la fluorescencia se observa en compuestos como quinolina, isoquinolina e indol.

Compuesto	Fórmula	Longitud de onda de fluorescencia, nm	Intensidad de fluorescencia relativa
Benceno	C_6H_6	270-310	10
Tolueno	$C_6H_5CH_3$	270-320	17
Propilbenceno	$C_6H_5C_3H_7$	270-320	17
Fluorobenceno	C_6H_5F	270-320	10
Clorobenceno	C_6H_5Cl	275-345	7
Bromobenceno	C_6H_5Br	290-380	5
Yodobenceno	C_6H_5I	—	0
Fenol	C_6H_5OH	285-365	18
Ion fenolato	$C_6H_5O^-$	310-400	20
Anisol	$C_6H_5OCH_3$	285-345	20
Anilina	$C_6H_5NH_2$	310-405	20
Ion anilinio	$C_6H_5NH_3^+$	—	0
Ácido benzoico	C_6H_5COOH	310-390	3
Benzonitrilo	C_6H_5CN	280-360	20
Nitrobenceno	$C_6H_5NO_2$	—	0

- Vemos que un grupo alquilo aumenta la fluorescencia a un anillo de benceno, el grupo alquilo cede electrones
- Los halógenos, al aumentar electronegatividad y disminuir el peso aumenta la fluorescencia
- Un sustituyente OH, al donar e- aumenta la fluorescencia
- La anilina tiene el mismo efecto

* En disolución de etanol.

• Grupos tomadores de electrones aniquilan la fluorescencia

• Efecto del pH en la fluorescencia:

- Por lo regular, la fluorescencia de un compuesto aromático con sustituyentes ácidos o básicos en el anillo depende del pH.
- Es probable que tanto la longitud de onda como la intensidad de emisión sean diferentes en las formas protonadas y no protonadas del compuesto.
- Los cambios en la emisión de compuestos de este tipo se producen por el distinto número de especies resonantes que están relacionadas con las formas ácidas y básicas de las moléculas. Por ejemplo, la anilina tiene varias formas resonantes, pero el ion anilinio sólo tiene una.
- Las formas resonantes adicionales ocasionan un primer estado excitado más estable; la consecuencia es una fluorescencia en la región ultravioleta

• Efecto de la rigidez estructural:

- Se tiene que la fluorescencia se ve favorecida sobre todo en moléculas que poseen estructuras rígidas.
- La falta de rigidez de una molécula tal vez cause un aumento de la velocidad de conversión interna, y el correspondiente aumento en la probabilidad de desactivación sin radiación. Una parte de una molécula no rígida puede sufrir vibraciones de baja frecuencia respecto a sus otras partes. Dichos movimientos explican sin duda ciertas pérdidas de energía.

• Efecto del sustituyente flexible: si el sustituyente de un anillo bencénico es pequeño, la fluorescencia se verá favorecida

• Efecto de la temperatura: si se aumenta la temperatura, la fluorescencia se ve desfavorecida, por el aumento de las colisiones moleculares donde puede aumentar la probabilidad de la desactivación no radiantes

• Efecto del solvente: si se aumenta la viscosidad de la solución la fluorescencia aumenta. Es el mismo caso para cuando se usa solventes no polares y con átomos poco pesados

Cambios espectrales

Menor en solventes Polares

Menor con átomos Pesados

Aumenta con la viscosidad

Efecto de la concentración:

- La potencia de la emisión fluorescente F es proporcional a la potencia radiante del haz de excitación absorbido por el sistema. Es decir,
- P_0 es la potencia del haz que incide sobre la solución, $F = \phi_f K'' (P_0 - P) = K' (P_0 - P)$ **Depende de la P_0 y K del ϕ**
- P es su potencia después de atravesar una longitud b del medio,
- La eficacia cuántica de la fluorescencia es una constante de un sistema dado, y de este modo el producto se agrupa en una nueva constante en el segundo miembro de la ecuación.
- Con el objeto de relacionar F con la concentración c de la especie fluorescente, se escribe la ley de Beer en la forma

$$\frac{P}{P_0} = 10^{-\epsilon bc}$$

$$F = K' P_0 (1 - 10^{-\epsilon bc})$$

se desarrolla

$$F = K' P_0 \left[2,303 \epsilon bc - \frac{(2,303 \epsilon bc)^2}{2!} + \frac{(2,303 \epsilon bc)^3}{3!} \dots \right]$$

Si $2,303 \times A \approx 0,05$

desv. neg.

*Mayores a 0,05

*autoamortiguación
*autoabsorción

- La fluorescencia es proporcional con la concentración pero esta no puede ser mayor a 0,05 porque los terminos estos no pueden ser despreciables y se ve una desviación negativa de la recta

$$F = 2,3 K' \epsilon bc P_0$$

$$F = Kc$$

Instrumentos

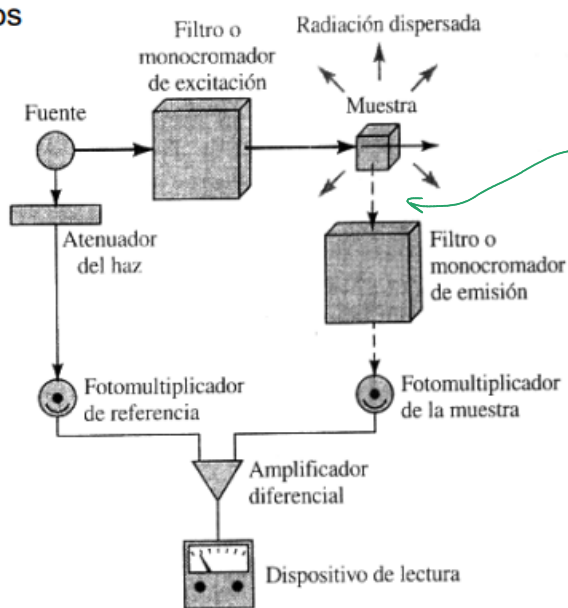
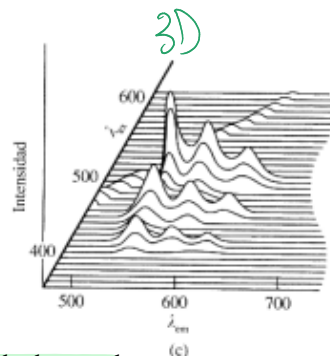
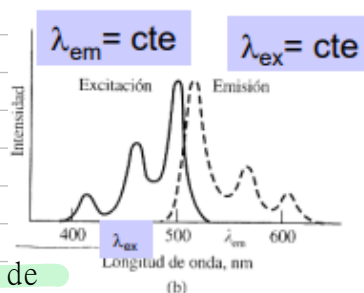
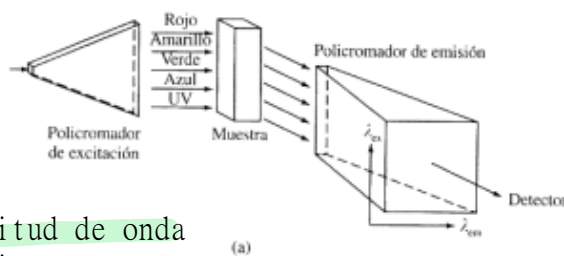


Figura 15-4. Componentes de un fluorómetro o un espectrofluorómetro.

- A diferencia de las demás espectroscopias, se recoge lo que la muestra emite a un ángulo de noventa grados respecto de la luz incidente

Espectros de excitación y emisión



- El espectro de excitación E de la figura se obtiene midiendo la intensidad de la luminiscencia a una longitud de onda fija mientras se varía la longitud de onda de excitación. Como la primera etapa en la generación de la emisión fluorescente es la absorción de radiación para crear los estados excitados, el espectro de excitación es en esencia idéntico a un espectro de absorción obtenido en las mismas condiciones.

- Por otro lado, los espectros de fluorescencia y de fosforescencia (F y P , respectivamente), requieren excitación a una longitud de onda fija mientras se registra la intensidad de emisión en función de la longitud de onda.

- El **espectro de luminiscencia total** es una representación **tridimensional** o una gráfica con curvas de nivel. En forma simultánea, ambas muestran la **señal de luminiscencia** como una **función de las longitudes de onda de excitación y de emisión**. Con frecuencia, dicha información recibe el nombre de matriz de excitación-emisión.

Metodologías p/ análisis de luminiscencia molecular

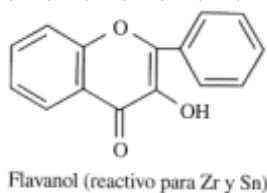
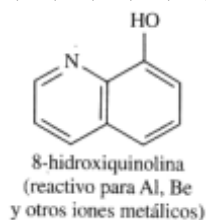
- Método **Directo**: analito tiene un alto rendimiento cuántico
- Método **Indirecto**: reacción de derivatización con Intensificación o Inhibición de fluorescencia
- Se puede realizar la cuantificación de: analitos inorgánicos y orgánicos
- Se debe tener en cuenta el efecto del **oxígeno disuelto**: reduce la F
 - oxidación de la especie fluorescente
 - amortiguación o quenching (CS)

Desactivación de la fluorescencia → Mecanismos de Quenching

- Se excita una molécula con cierta absorción.
 - En el estado excitado pueden decaer en forma no radiativa; relajaciones vib, cruce de sist, etc; en forma radioactiva; con una constante del proceso de fluorescencia emitiendo; o puede suceder que alguna sustancia desactive la molécula produciendo un quenching o desactivación
- Diagrama de los mecanismos de quenching:
- Excitación: $A + h\nu \xrightarrow{k_A \cdot n_A} A^*$
- Desactivación no radiativa: $A^* \xrightarrow{k_{nr} \cdot n_A^*} A$
- Fluorescencia: $A^* \xrightarrow{k_f \cdot n_A^*} A + h\nu$
- Quenching dinámico: $A^* + Q \xrightarrow{k_Q \cdot [Q] \cdot n_A^*} A + Q$
- Quenching estático: $A + Q \xrightleftharpoons{K_e} A-Q \xrightarrow{h\nu} A-Q^* \xrightarrow{\text{calor}} A-Q$
- Definiciones: n_A = nº de fluoróforos en el estado basal, n_A^* = nº de fluoróforos en el estado excitado.
- Ec. de Stern-Volmer: $\frac{F_0}{F} = 1 + K_A[Q]$, donde $K_A = K_e \text{ o } K_Q$.
- Interpretación: F_0 sin quenching, F con quenching.
- Como se produce la colisión entre el quenching y la molécula excitada es un quenching dinámico
 - En el estático, el quenching forma un complejo con la molécula antes de ser excitada que al ser excitado decae por procesos no radioactivos
 - En cualquiera de los casos se usa esta ecuación

Aplicaciones inorgánicas

- Existen compuestos fluorescentes sirven para determinar compuestos que no lo son. Los reactivos fluorométricos más satisfactorios en el análisis de cationes son aquellos con estructuras aromáticas con dos o más grupos funcionales donadores que faciliten la formación de quelatos con el ion metálico.



Medición del tiempo de vida

- proporciona información relacionada con los procesos de desactivación de colisiones, velocidades de transferencia de energía y reacciones de estados excitados.
- A partir de estos graficos se puede sacar el tiempo de vida

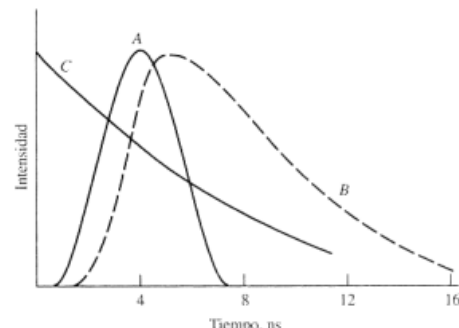


Figura 15-10. Perfiles de tiempo de vida de la fluorescencia: A, impulso de excitación; B, curva de caída aparente; C, curva de caída corregida.

Fosforimetría

- Los métodos fosforescentes y fluorescentes tienden a ser complementarios porque los compuestos fuertemente fluorescentes manifiestan una débil fosforescencia y viceversa
- Entre los hidrocarburos aromáticos con anillos condensados, aquellos que contienen átomos pesados como halógenos o azufre, con frecuencia presentan una fuerte fosforescencia. Por otro lado, los mismos compuestos sin la presencia del átomo pesado tienden a presentar fluorescencia en lugar de fosforescencia
- La fosforimetría se utiliza para determinar una gran variedad de especies orgánicas y bioquímicas, como ácidos nucleicos, aminoácidos, pirina y pirimidina, enzimas, hidrocarburos del petróleo y plaguicidas.
- Sin embargo, el método no ha alcanzado el uso tan difundido de la fluorometría, debido tal vez a que necesita bajas temperaturas y a la casi siempre poca precisión de las mediciones fosforescentes.
- La fosforescencia a temperatura ambiente en solución se ha observado en medios organizados que contienen micelas. Con las micelas, el analito se incorpora al núcleo de la micela, lo cual sirve para proteger el estado triple.
- También se utilizan las moléculas de ciclodextrina, las cuales son polímeros en forma de dona.

Fosforimetría

- *anillos condensados con átomos pesados
- *determinación de ác. Nucleicos, aa, enzimas, pesticidas
- *muy selectivo
- *poco preciso
- *requiere bajas temperaturas
- *fosforimetría a T ambiente
- *sobre soporte sólido
- *miscelas con iones metálicos
- *complejos hésped-receptor
- ciclodextrinas, calixarenos, etc.

- Vemos que los rendimientos cuanticos de la flourescencia disminuye por la presencia del atomo pesado y lo contrario sucede con el rend de fosforescencia

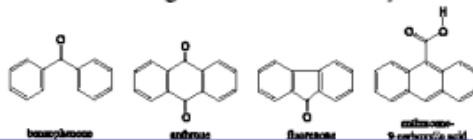
Tab. 3.3. Heavy atom effect on emissive properties of naphthalene (from Wehry, 1990)

	Φ_F	k_{isc}/s^{-1}	Φ_P	τ_T/s
Naphthalene	0.55	1.6×10^6	0.051	2.3
1-Fluoronaphthalene	0.84	5.7×10^5	0.056	1.5
1-Chloronaphthalene	0.058	4.9×10^7	0.30	0.29
1-Bromonaphthalene	0.0016	1.9×10^9	0.27	0.02
1-Iodonaphthalene	<0.0005	$>6 \times 10^9$	0.38	0.002

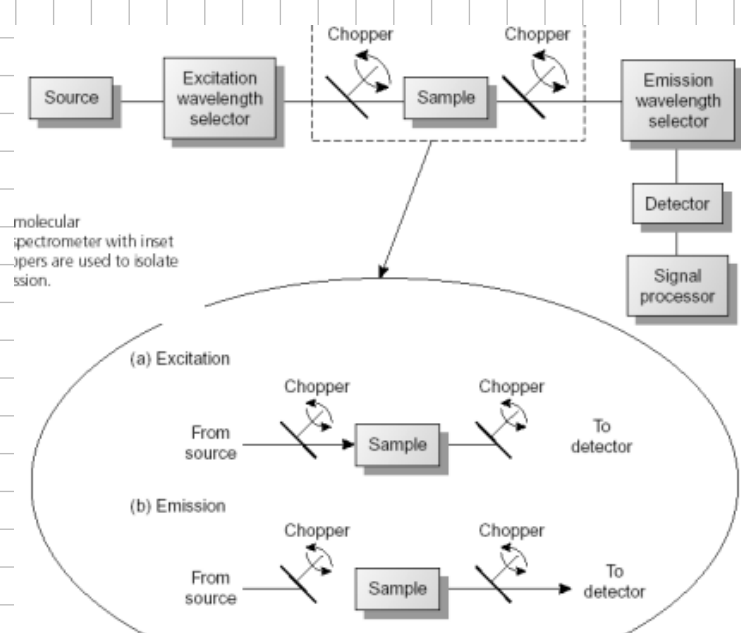
Electron-donating substituents: -OH, -OR, -NH₂, -NHR, -NR₂

Aumento de fluorescencia

Electron-withdrawing substituents: carbonyl and nitro compounds



Disminución de fluorescencia

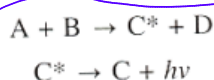


- el equipo de la fluorescencia es similar al de la fosforescencia, este último tiene **cortadores o choppers**. La fosforescencia se produce en tiempo demorado por eso uno excita la muestra y luego se da la emisión

Quimioluminiscencia

- La quimioluminiscencia se produce cuando una reacción química genera una especie electrónicamente excitada que emite luz cuando vuelve al estado fundamental.

- Las reacciones quimioluminiscentes se producen en varios sistemas biológicos, en los que el proceso se suele denominar bioluminiscencia.



Bioluminiscencia: luciérnaga, algas

- La intensidad de radiación ICL (fotones emitidos por segundo) depende de la velocidad de la reacción química ($d[C]/dt$) y de la eficacia cuántica de quimioluminiscencia fCL (fotones emitidos por molécula que ha reaccionado).

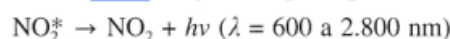
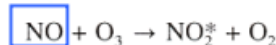
$$I_{CL} = \phi_{CL} \frac{dC}{dt} = \phi_{EX} \phi_{EM} \frac{dC}{dt} \quad \phi_{CL} = 0,01 \text{ a } 0,2$$

- El último término es igual al producto de la eficacia cuántica de excitación fEX (estados excitados por moléculas que han reaccionado) y la eficacia cuántica de emisión fEM (fotones por estado excitado).

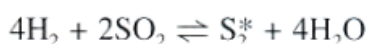
Aplicaciones analíticas

Aplicaciones analíticas

Análisis de gases

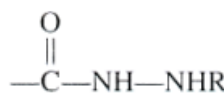


1 a 10.000 ppb



384 y 394 nm

Especies inorgánicas



- Análisis de gases:** De estos métodos, uno de los que más se utilizan es el que detecta monóxido de nitrógeno con las reacciones. Se ha encontrado una respuesta lineal para concentraciones de monóxido de nitrógeno desde 1 parte por mil millones (ppmm) hasta 10 000 ppm. el NO₂ en estado excitado emite luz

- La reacción del óxido nítrico con ozono se ha utilizado también para determinar óxidos de nitrógeno con estados de oxidación superiores

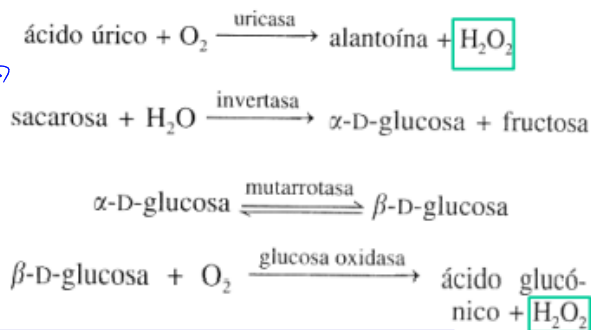
- Y hay aún otro método quimioluminiscente importante en fase gaseosa que se utiliza para la determinación de compuestos azufrados en la atmósfera, como el sulfuro de hidrógeno, el dióxido de azufre y los mercaptanos. La intensidad de la quimioluminiscencia es proporcional a la concentración del dímero de azufre excitado.

- Muchos de los análisis que se llevan a cabo en fase líquida utilizan **sustancias orgánicas quimioluminiscentes** que contienen el grupo funcional en la figura. Estos reactivos reaccionan con oxígeno, peróxido de hidrógeno y muchos otros agentes oxidantes fuertes para originar un producto de oxidación quimioluminiscente.

Especies orgánicas

Para aumentar la selectividad de las reacciones quimioluminiscentes y ampliar la quimioluminiscencia a analitos que no participan directamente en las reacciones de este tipo, es común efectuar paso a paso una reacción enzimática, en la cual el analito por determinar es el sustrato, y uno de los productos de la reacción enzimática se detecta mediante quimioluminiscencia.

Ej en la primera reacción se obtiene el peróxido que al reaccionar con luminol nos da un compuesto con luminiscencia, se mide la cantidad y se obtiene por reacción 1:1 la cantidad de ácido úrico



LD= 0,1 pM 3-4 ordenes de linealidad

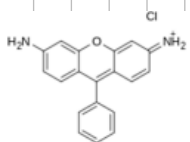
Aplicaciones

Usos de fluorescencia en bioquímica

- Localización subcelular
- Cambios en la concentración
- Interacciones moleculares
- Cambios conformacionales
- Distancias intra/intermoleculares
- Difusión rotacional
- Caracterización estructural
- Actividad enzimática

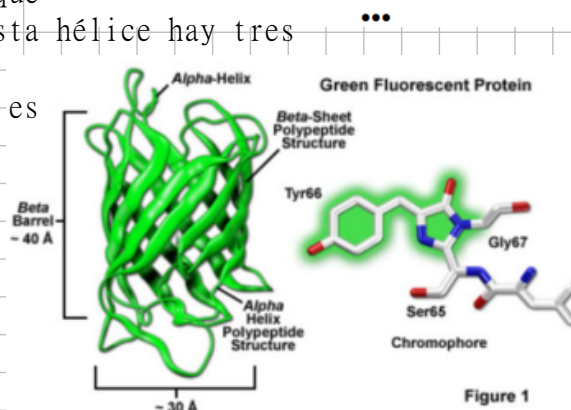
Tipos de fluoróforos

-Moléculas orgánicas: Los fluoróforos Alexa Fluor (derivados de la rodamina) han sido utilizados como marcadores de biomoléculas. La fotoestabilidad es una de las principales características de este tipo de colorantes, además barren todo el espectro.



Esqueleto de las rodaminas

-Proteicos: GFP posee un barril beta formado por 11 cadenas e incluye una hélice alfa central que atraviesa el barril en toda su longitud. En esta hélice hay tres aminoácidos consecutivos que forman un cromóforo natural, de forma que cuando la GFP es iluminada con luz ultravioleta, produce una brillante fluorescencia verde. Mutaciones en residuos clave permitieron obtener variantes de la GFP (espectro de colores y estabilidad).

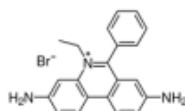


Tipos de fluorescencia

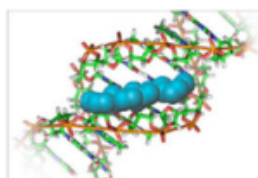
La **fluorescencia primaria (fluoróforos intrínsecos)** es la que se da porque existe una configuración inherente a la estructura molecular. Ejemplo: clorofila, GFP

La **fluorescencia secundaria (fluoróforos extrínsecos)** ocurre cuando una molécula específica o un grupo capaz de fluorescer, un fluorocromo, se introduce en la estructura de la muestra. Ejemplo: sondas catiónicas planares como BrEt o DAPI que se agregan a los ácidos nucleicos

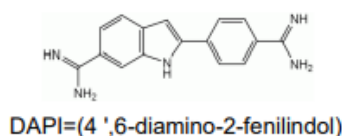
Éste es el procedimiento para la mayoría de las aplicaciones biológicas de la microscopía de fluorescencia.



BrEt= bromuro de etidio



DAPI intercalado en una molécula de ADN



DAPI=(4',6-diamino-2-fenilindol)

Fluorescencia puede ser usada en:

• Proteínas, fluorescencia intrínseca debido a residuos aminoácidos aromáticos, predomina el triptófano. Además marcado con sondas fluorescentes (FITC, DNS). GFP y derivados.

• Ácidos nucleicos, sin fluorescencia intrínseca, se agregan sondas fluorescentes catiónicas planares (EtBr, DAPI) o fosfolípidos marcados

• Membranas, no fluorescentes, se agregan sondas liposolubles con baja fluorescencia en agua (DPH, ANS)