Capítulo 6

QUENCHING DE FLUORESCENCIA

El fenómeno de *quenching* de fluorescencia se refiere a procesos que provocan una disminución de la intensidad de fluorescencia de una sustancia dada. El *quenching* puede ser resultado de varios mecanismos. Estos mecanismos incluyen reacciones de los estados excitados, transferencia de energía, formación de complejos y *quenching* por colisiones [Lakowicz, 1983]. El *quenching* de fluorescencia provee evidencia de interacciones moleculares.

El fenómeno puede dividirse en dos grupos: *"quenching colisional o dinámico"*, cuando la desactivación es resultado de los choques entre moléculas (molécula fluorescente y *quencher*), y *"quenching estático"*, cuando es el resultado de formación de complejos. A veces no resulta fácil distinguir entre uno y otro, pero es posible con un estudio adecuado de los tiempos de vida de fluorescencia.

Ambos tipos de desactivación requieren de contacto molecular entre la molécula fluorescente y la molécula *quencher*. Este fenómeno es especialmente importante en soluciones acuosas donde las colisiones son frecuentes. En solución, el proceso difusional limita la velocidad con que ambas moléculas, especie excitada y *quencher*, se encuentran, pero hace prolongado el encuentro pudiendo ocurrir cientos de choques antes de separarse.

Una gran variedad de sustancias pueden actuar como *quenchers* de fluorescencia. Uno de los mejores ejemplos de *quenching* colisional está dado por el oxígeno molecular. Por ello muy frecuentemente es necesario eliminar el oxígeno disuelto de las muestras sobre las que se desea medir tiempos de vida de fluorescencia o rendimientos cuánticos de fluorescencia. Otros ejemplos son las aminas alifáticas y aromáticas, xenón, peróxido de hidrógeno, acrilamida,

bromato, yoduro, etc. Debido a la gran variedad de moléculas *quenchers*, se debe identificar aquéllas de interés para cada molécula fluorescente en particular.

***Quenching* dinámico.**

Esquemáticamente, el *quenching* dinámico puede representarse como una transferencia de energía entre una especie excitada (M*) y una especie *quencher* (Q):

$$M^* + Q \longrightarrow M + Q^*$$

El *quenching* dinámico se describe por la ecuación de Stern-Volmer:

$$I_F^0/I_F = 1 + K_{SV}[Q] = 1 + k_q\,\tau^0\,[Q]$$

donde I_F^0 e I_F son las intensidades de emisión fluorescente en ausencia y presencia del *quencher* respectivamente, K_{SV} es la constante de Stern-Volmer, [Q] es la concentración del *quencher*, k_q es la constante bimolecular de quenching y τ^0 es el tiempo de vida de fluorescencia de la especie emisora.

Esta ecuación puede deducirse planteando estado estacionario de la fluorescencia de una molécula excitada en presencia de un *quencher*. La molécula *quencher* puede ser cualquiera, pero debe permanecer químicamente invariable para que la disminución de la concentración del estado excitado, y, por consiguiente, de la emisión fluorescente, se deba a una única interacción entre la molécula emisora y ella. Para realizar el análisis de este estado estacionario debemos considerar las siguientes ecuaciones:

Etapas:		Velocidad:
Absorción de luz:	$M + h\nu \rightarrow M^*$	I_A
Fluorescencia:	$M^* \rightarrow M + h\nu'$	$k_F^0\,[M^*]$
Decaimientos distintos de quenching:	$M^* \rightarrow M$	$\Sigma\, k_i\,[M^*]$
Quenching:	$M^* + Q \rightarrow M + Q$	$k_q\,[M^*]\,[Q]$

donde k_F^0 es la constante de fluorescencia intrínseca.

Si se asumen condiciones de estado estacionario (-d[M*]/dt = 0), entonces:

$$[M^*] = \frac{I_A}{\Sigma\, k_i + k_q\,[Q]}$$

El rendimiento cuántico de fluorescencia está dado por:

$$\Phi_F = \frac{k_F^0}{\Sigma\, k_i + k_q\,[Q]} = \frac{k_F^0}{k_F + k_q\,[Q]}$$

donde k_F definida en el Capítulo anterior como el coeficiente de velocidad de emisión espontánea, es igual a la suma de las constantes de velocidad que contribuyen al decaimiento de M* ($\Sigma\ k_i$), excepto k_q. Debe observarse que el rendimiento cuántico disminuye en una cantidad proporcional a la concentración del *quencher*. Se obtiene el valor máximo de rendimiento cuántico (Φ_F^0) en ausencia de *quencher*. La relación Φ_F^0 / Φ_F está dada por:

$$\frac{\Phi_F^0}{\Phi_F} = \frac{k_F^0}{k_F}\,\frac{k_F + k_q\,[Q]}{k_F^0} = 1 + \frac{k_q\,[Q]}{k_F}$$

Esta ecuación indica que la relación de los rendimientos cuánticos de fluorescencia es linealmente dependiente de la concentración del *quencher*, siendo la ordenada al origen igual a 1. Esta relación se denomina *relación de Stern-Volmer*.

La determinación de los rendimientos cuánticos de fluorescencia requiere del conocimiento de la luz absorbida. Sin embargo, si se realizan medidas de intensidad de fluorescencia en función de la concentración del *quencher*, bajo idénticas condiciones de geometría de irradiación, concentración de molécula fluorescente, intensidad de excitación, longitud de onda y sensibilidad de detector, entonces la luz absorbida es idéntica para cada medida. Bajo dichas circunstancias, la relación de rendimientos cuánticos es igual a la relación de intensidades de emisión fluorescente:

$$\frac{I_F^0}{I_F} = 1 + \frac{k_q [Q]}{k_F}$$

Así una gráfica de I_F^0/I_F versus [Q] (gráfica de Stern-Volmer) debería ser lineal, e interceptar en la unidad al eje I_F^0/I_F. La pendiente de dicha gráfica se denomina constante de Stern-Volmer (K_{SV}), y es igual a $k_q / k_F = \tau_F^0 k_q$. En esta última expresión τ_F^0 es el parámetro τ_F definido en el Capítulo anterior. Sin embargo, en los experimentos de *quenching* se le suele agregar el superíndice ^{0} para diferenciarlo de los tiempos de vida en presencia de *quencher*.

El análisis de las gráficas de Stern-Volmer permite obtener valiosa información. Por ejemplo, el determinar el coeficiente de Stern-Volmer da un método indirecto para obtener el tiempo de vida de fluorescencia si se conoce o puede calcularse k_q, o por el contrario, se puede determinar k_q si se conocen los tiempos de vida de fluorescencia. Por otro lado, una gráfica de Stern-Volmer lineal generalmente indica la presencia de un solo fluoróforo o especie emisora. Por el contrario, si la gráfica de Stern-Volmer no es lineal puede suponerse la presencia de dos poblaciones distintas de fluoroforos.

Es importante remarcar que una gráfica de Stern-Volmer lineal no asegura que el proceso de *quenching* estudiado sea de tipo dinámico. Como se explicará a continuación, un proceso de *quenching* de tipo estático también genera un comportamiento lineal en las gráficas de Stern-Volmer. Debido a ello, debe recurrirse a otras medidas, que serán expuestas más adelante, para distinguir entre ambos tipos de *quenching*.

***Quenching* estático.**

El *quenching* estático se produce, generalmente, como consecuencia de la formación de un complejo no fluorescente entre la molécula emisora y la molécula *quencher*.

$$M^* + Q \rightleftharpoons M\text{-}Q$$

La dependencia de la intensidad de fluorescencia (I_F) con la concentración de *quencher* puede deducirse considerando la constante de asociación (K_S):

$$K_S = \frac{[M\text{-}Q]}{[M] \,.\, [Q]}$$

Si el complejo M-Q no emite, la relación de intensidades I_F^0/I_F será igual a la relación de concentraciones $[M]_0$ / [M], donde $[M]_0$ es la concentración total del fluoróforo.

$$[M]_0 = [M] + [M\text{-}Q]$$

Combinando ambas ecuaciones se obtiene:

$$K_S = \frac{[M]_0 - [M]}{[M] \,.\, [Q]} = \frac{[M]_0}{[M] \,.\, [Q]} - \frac{1}{[Q]}$$

$$\Rightarrow \qquad \frac{[M]_0}{[M]} = \frac{I_F^0}{I_F} = 1 + K_S\,[Q]$$

Puede apreciarse que, tal como se dijo, un proceso de *quenching* estático también conduce a una relación de Stern-Volmer lineal. Sin embargo, en este caso, K_{SV} es igual a K_S.

Metodología para diferenciar tipos de *quenching*.

Existen varios métodos tendientes a distinguir entre un proceso de *quenching* dinámico y uno estático. Entre ellos se encuentran el estudio de la dependencia del *quenching* con la temperatura y la viscosidad de medio. Sin embargo, el método más conveniente para este propósito es el análisis de la dependencia de los tiempos de vida de fluorescencia con la concentración del *quencher*.

Puede deducirse rápidamente que, si el *quenching* es dinámico el cociente de los tiempos de vida de fluorescencia en ausencia y presencia de *quencher* (τ_F^0 / τ_F) es igual al cociente de los correspondientes rendimientos cuánticos de fluorescencia (Φ_F^0 / Φ_F). Por consiguiente, puede escribirse la siguiente ecuación para describir la dependencia de los tiempos de vida de fluorescencia con la concentración de *quencher*:

$$\frac{\tau_F^0}{\tau_F} = 1 + k_q \, \tau_F^0 \, [Q]$$

Si por el contrario, existe un *quenching* estático una fracción del compuesto emisor se encuentra "secuestrado" formando parte del complejo no emisor. Por lo tanto, la fluorescencia observada proviene del fluoróforo "libre". Esta fracción no ha sido alterada, por lo que el tiempo de vida de fluorescencia que se mide es igual al tiempo de vida en ausencia del *quencher* (τ_F^0). En definitiva, el cociente de tiempos de vida de fluorescencia (τ_F^0 / τ_F) no demostrará dependencia con la concentración del *quencher*:

$$\frac{\tau_F^0}{\tau_F} = 1$$

Puede apreciarse, entonces, que midiendo el tiempo de vida τ_F a distintas concentraciones del *quencher* y luego realizando las graficas de τ_F^0 / τ_F versus [Q] puede diferenciarse claramente entre un proceso de *quenching* de tipo dinámico y

otro estático. En el primer caso se obtendrán curvas lineales con pendientes idénticas a las constantes K_{SV} encontradas en las gráficas de Stern-Volmer obtenidas de las medidas de intensidad de fluorescencia. En el segundo caso, se obtendrá una línea horizontal. Ambos comportamientos están representados en la Figura 6.1. Este método fue el empleado en el presente trabajo de tesis para analizar los procesos de *quenching* estudiados.

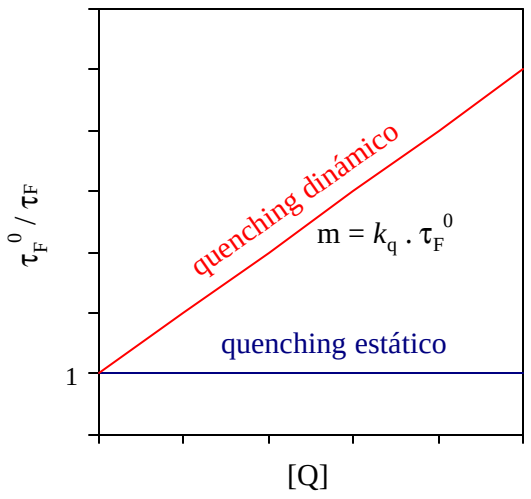

Figura 6.1: Representación de Stern-Volmer a partir de tiempos de vida de fluorescencia para quenching dinámico (-) y quenching estático (-).

En el presente trabajo de tesis se realizaron experimentos de *quenching* por aniones. Muchos trabajos que se encuentran en literatura sobre pterinas se refieren a medidas de emisión de fluorescencia en presencia de solución reguladora. Por ello se decidió realizar un estudio sobre la influencia de los aniones que contienen las soluciones reguladoras, con el fin de conocer su efecto sobre las propiedades fluorescentes de las pterinas en soluciones acuosas. Los resultados de este estudio se presentan en el *Capítulo 10*.

Los estudios de *quenching* de fluorescencia se realizaron con el equipo *Single Photon Counting FL900CDT (Edinburgh Analytical Instruments)*,

detallado en el capítulo anterior. Preliminarmente se realizaron experimentos midiendo la emisión, en el espectrofotómentro Cary 3 de Varian. En este estudio previo se buscó la presencia de procesos de *quenching* realizando un gran número de experimentos cambiando el derivado pterínico, el *quencher* (anión) y su concentración y el pH. Luego se realizó un estudio sistemático midiendo los espectros de emisión y los tiempos de vida de fluorescencia en soluciones de pterinas a diferentes concentraciones de aniones.

Las soluciones se prepararon a partir de soluciones madres a las que se les ajustó el pH al valor final y agua al mismo pH. Se mezcló 2 ml de la solución madre de pterina con 2 ml de una solución del anión a diferente concentración del mismo pH. Esta última solución fue preparada a partir de la solución madre del anión y agua. En todos los casos se registraron los espectros de absorción.