

**Studio del quenching di fluorescenza in soluzioni di  
fluoresceina  
- Esperienza F -**

**Bibliografia:**

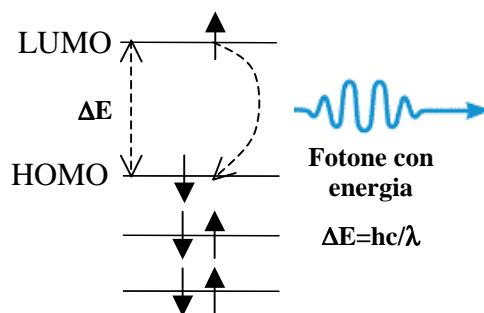
- P. Atkins; Physical Chemistry; Oxford
- Joseph R. Lakowicz; Principles of Fluorescence Spectroscopy (3rd Edition); Springer
- T. Cumberbatch, Q. S. Hanley; J. Chem. Educ. 2007 (8) 1319 - 1322
- Handbook of Chemistry and Physics, CRC press

### Contesto.

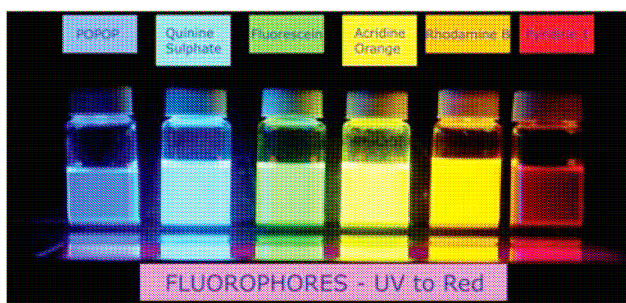
La spettroscopia di fluorescenza è utilizzata in molti settori tecnologici, in particolare nelle scienze biologiche. Inoltre, i fenomeni di fluorescenza e di quenching della fluorescenza consentono di approfondire alcuni importanti concetti di base della meccanica quantistica.

### Cenni generali sulla fluorescenza.

La **luminescenza** è l'emissione di fotoni per rilassamento da uno stato elettronico eccitato ad uno con energia inferiore in una sostanza, che viene pertanto definita **fluoroforo**. Tipicamente si tratta di fotoni con lunghezza d'onda nell'intervallo dell'ultravioletto – visibile – vicino infrarosso (200 – 2000 nm), perchè in tale intervallo cade la differenza di energia tra LUMO ed HOMO nelle molecole (vedi figura).



Vi sono due tipi di luminescenza: la **fluorescenza** e la **fosforescenza**. La differenza tra i due fenomeni è nel meccanismo quantomeccanico che porta all'emissione di fotoni (argomento che sarà chiarito nel corso di Chimica Fisica II). In breve, nella fluorescenza il rilassamento avviene da uno stato elettronico eccitato di singoletto e si tratta di un processo molto veloce, dell'ordine di 10 ns dopo l'eccitazione. Nella fosforescenza il rilassamento avviene da uno stato elettronico eccitato di tripletto e si tratta di un processo che avviene in tempi dell'ordine di 1 ms – 1 s. Pertanto, dal punto di vista fenomenologico, la differenza principale risiede nel tempo che intercorre tra l'eccitazione e la diseccitazione della molecola mediante emissione del fotone.



### Regola di Kasha.

Tipicamente, l'emissione di fluorescenza viene ottenuta eccitando il fluoroforo con altri fotoni, tramite un processo di assorbimento (vedi anche quanto discusso a proposito dell'assorbimento nell'esperienza D).

L'assorbimento del fotone lascia la molecola nello stato eccitato, per cui essa tenderà a rilassare verso lo stato fondamentale, cedendo l'energia in eccesso all'ambiente circostante.

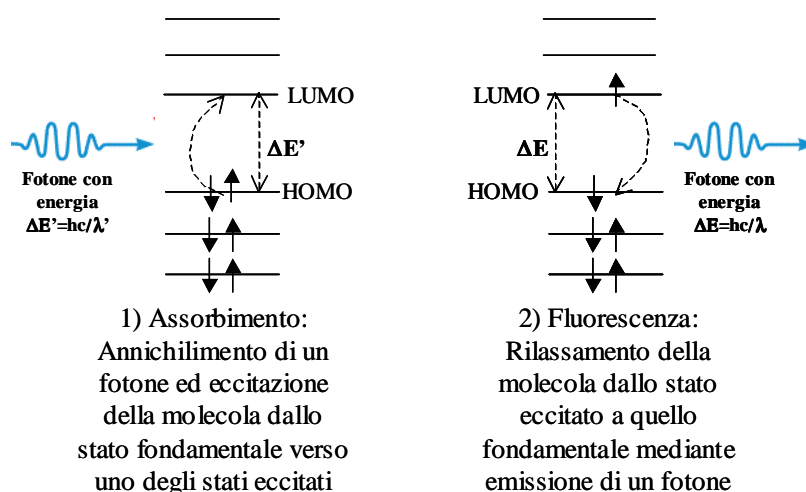
Il rilassamento può avvenire in modo non

radiativo (ad esempio trasferendo energia alle molecole di solvente sotto forma di urti e vibrazioni) oppure in modo radiativo, emettendo un fotone, nel qual caso si parla di fluorescenza.

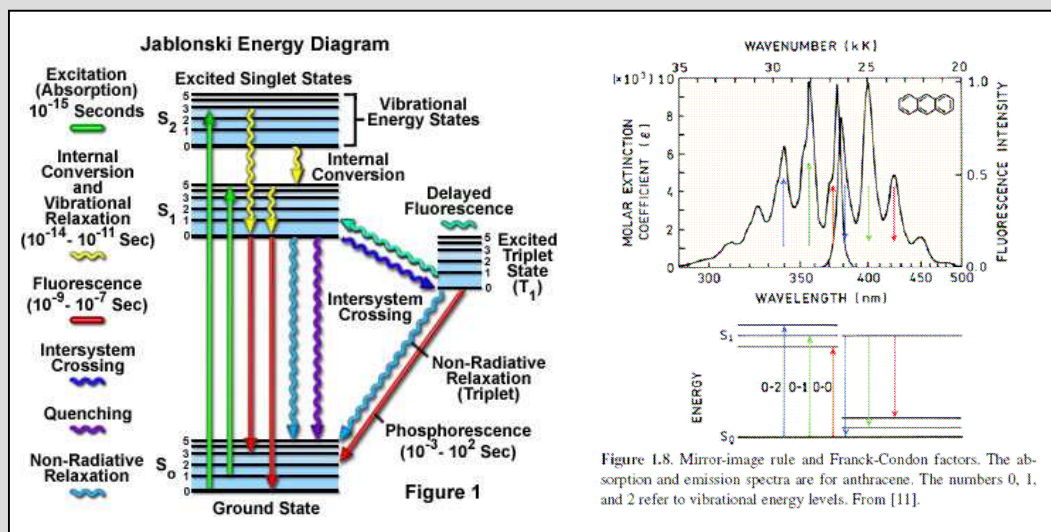
In generale, l'eccitazione del fluoroforo può avvenire dallo stato fondamentale verso tutti gli stati energetici ad energia superiore. Tuttavia la **regola di Kasha** stabilisce che l'emissione di fluorescenza avvenga sempre dal livello energetico non occupato più basso avente stessa molteplicità di spin dello stato fondamentale. Questo perchè i fenomeni di luminescenza avvengono su tempi più lunghi dei processi di **conversione interna**, i quali sono responsabili del rapido rilassamento (in alcuni ps) dagli stati eccitati superiori al più basso livello non occupato.

Inoltre, per effetto della regola di Kasha, l'emissione di fluorescenza è generalmente indipendente dalla lunghezza d'onda di eccitazione, purché la sostanza sia in grado di assorbire alla lunghezza d'onda di eccitazione.

**Per approfondire.** I diagrammi di Jablonski sono usati per illustrare i processi di luminescenza. Tipicamente riportano una struttura energetica principale dovuta ai livelli elettronici più una struttura energetica secondaria dovuta ai livelli vibrazionali del fluoroforo. Per molecole organiche, lo stato elettronico fondamentale è quasi sempre uno stato di singoletto. In base al **principio di Franck – Condon**, le transizioni tra livelli elettronici si possono considerare come transizioni istantanee rispetto alla dinamica atomica-molecolare (alcuni fs) e sono pertanto rappresentate mediante linee verticali. I **fattori di Franck – Condon** determinano la probabilità di transizione tra il livello vibro-elettronico di partenza ed i diversi stati vibrazionali del livello elettronico di arrivo. Ciò vale sia per l'assorbimento che per l'emissione. Solitamente, il set di



livelli vibrazionali dello stato fondamentale e di quello eccitato sono molto simili, anche se non identici, perchè il moto nucleare non cambia in modo rilevante nei due stati.



In seguito alla conversione interna, se esiste una sovrapposizione (overlap) consistente tra il livello eccitato di singoletto e quello di tripletto, può avvenire la conversione intersistema (**intersystem crossing**). In questo caso è possibile l'emissione di fosforescenza. Dato che la transizione dallo stato di tripletto a quello di singoletto è otticamente proibita, i tempi di vita degli stati eccitati di tripletto sono più lunghi di quelli di singoletto e l'emissione di fosforescenza avviene su tempi di 1 ms – 1s invece dei 1 – 10 ns della fluorescenza. La progressione vibronica che si osserva nello spettro di assorbimento e di emissione di alcune molecole è determinata dai fattori di Franck – Condon. Tuttavia, tale progressione vibronica non è sempre visibile, perchè la spaziatura tra i livelli energetici vibrazionali può essere così piccola da risultare inferiore alla larghezza intrinseca delle bande vibroniche, nel qual caso si ottiene un unico picco di emissione.

**Resa quantica e tempo di vita di fluorescenza.** La caratteristica principale di un fluoroforo è la **resa quantica di fluorescenza**  $Q$  (quantum yield), definita come il rapporto tra il numero di fotoni emessi ( $\#_e$ ) e il numero di fotoni assorbiti ( $\#_a$ ):

$$Q = \#_e / \#_a$$

Per collegare in modo quantitativo  $Q$  al processo quantomeccanico, si può considerare che, in presenza di una concentrazione  $[C_F^*]_{t=0}$  di fluorofori nello stato eccitato al tempo  $t=0$ , la diseccitazione dei fluorofori procederà nel tempo in modo proporzionale alla concentrazione di fluorofori eccitati  $[C_F^*]$ :

$$\frac{d[C_F^*]}{dt} = -\frac{I}{\tau}[C_F^*] \rightarrow [C_F^*] = [C_F^*]_{t=0} e^{-t/\tau}$$

Per cui il rilassamento dallo stato eccitato a quello fondamentale avviene secondo una legge esponenziale del tipo  $e^{-t/\tau}$

dove  $\tau$  è il tempo di vita dello stato eccitato o **tempo di vita di fluorescenza**. L'inverso del tempo di rilassamento  $1/\tau$  è la **velocità di rilassamento**. In generale, se sono presenti due

meccanismi di rilassamento, allora si avrà un prodotto di esponenziali del tipo  $e^{-t/\tau_1} e^{-t/\tau_2} = e^{-t/(\tau_1+\tau_2)}$ .

Solitamente si distinguono due contributi, la velocità di rilassamento **radiativo**  $\Gamma$  e **non radiativo**  $k_{nr}$  verso lo stato fondamentale, per cui il tempo di vita di fluorescenza diventa:

$$\tau = \frac{1}{\Gamma + k_{nr}}$$

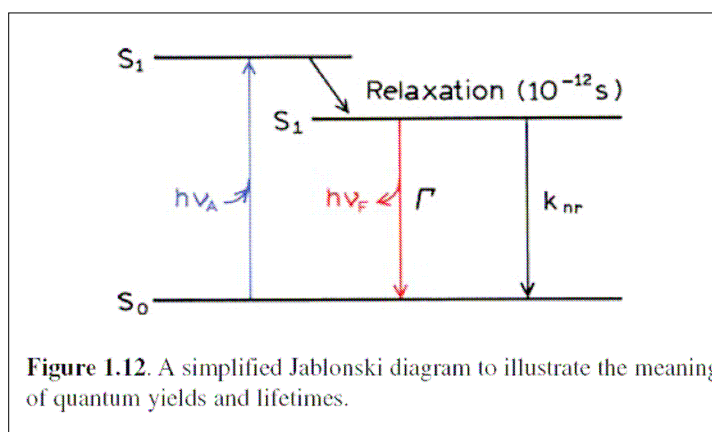
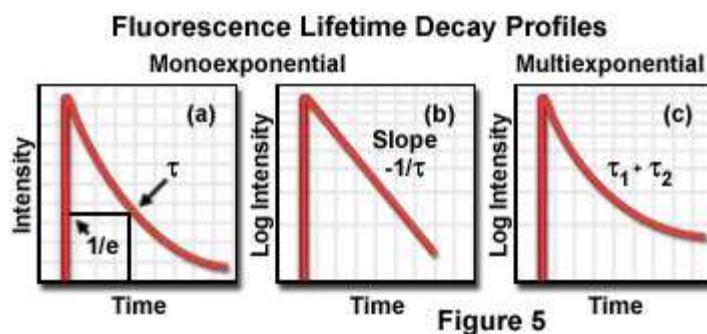
$Q$  può essere espressa in funzione della velocità di rilassamento come:

$$Q = \frac{\Gamma}{\Gamma + k_{nr}}$$

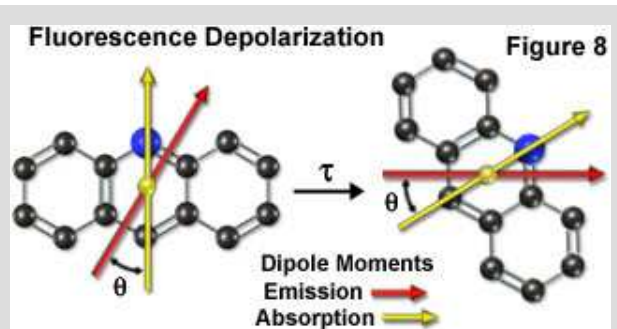
Pertanto si nota subito che la frazione di fotoni emessi è tanto maggiore quanto minore è  $k_{nr}$  rispetto a  $\Gamma$ .

$$\tau/Q = \frac{1}{\Gamma}$$

Il tempo di vita intrinseco è definito come  $1/\Gamma$  e può essere calcolato dal rapporto  $\tau/Q$ .



**Per approfondire. Anisotropia di fluorescenza.** I fluorofori assorbono preferenzialmente radiazione polarizzata parallelamente al momento di dipolo di transizione, il quale dipende dai livelli elettronici coinvolti nella transizione. Se i fluorofori sono in soluzione, la loro orientazione nello spazio sarà casuale. Nel caso di eccitazione con radiazione linearmente polarizzata, solo i fluorofori

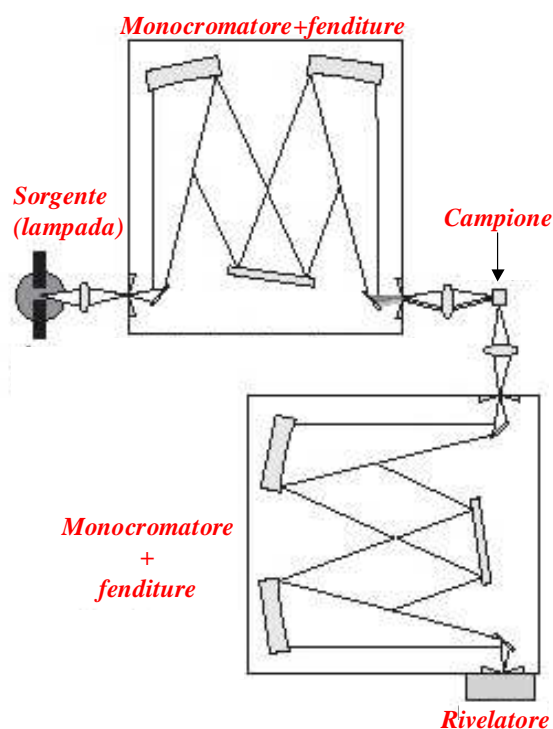


orientati con il momento di dipolo di transizione parallelo ad essa potranno assorbire fotoni e, successivamente, emettere. Quindi anche i fotoni emessi per fluorescenza avranno una direzione di polarizzazione definita dal momento di dipolo di transizione tra il livello eccitato e quello fondamentale. Tuttavia, il momento di dipolo della transizione di emissione non è necessariamente parallelo a quello di assorbimento. Inoltre, i moti rotazionali dei fluorofori possono avvenire su scale di tempi confrontabili con quelle del tempo di vita di fluorescenza, facendo ruotare l'asse molecolare rispetto alla direzione di polarizzazione della radiazione assorbita. Pertanto, i fotoni emessi avranno un certo grado di anisotropia di polarizzazione. L'anisotropia dell'emissione di fluorescenza è tanto maggiore quanto maggiore è l'angolo tra la direzione di polarizzazione della radiazione emessa rispetto a quella incidente. Lo studio dell'anisotropia di fluorescenza fornisce informazioni sui moti rotazionali dei fluorofori o, in alcuni casi, su dinamiche conformazionali della struttura del fluoroforo che avvengono in tempi confrontabili con il tempo di vita di fluorescenza.

### Misure di fluorescenza.

Le misure di fluorescenza si eseguono mediante il **fluorimetro**, che è composto dai seguenti elementi:

- una sorgente di luce per l'eccitazione del campione. Tipicamente una lampada ad arco allo Xe che emette in tutto l'intervallo UV-visibile.
- un monocromatore ed una fenditura per selezionare solo l'intervallo di lunghezza d'onda di eccitazione desiderato. Anche dei filtri polarizzatori possono essere inseriti per misure di anisotropia di fluorescenza. Solitamente il gruppo monocromatore riesce a coprire solo l'intervallo spettrale dell'UV – visibile.

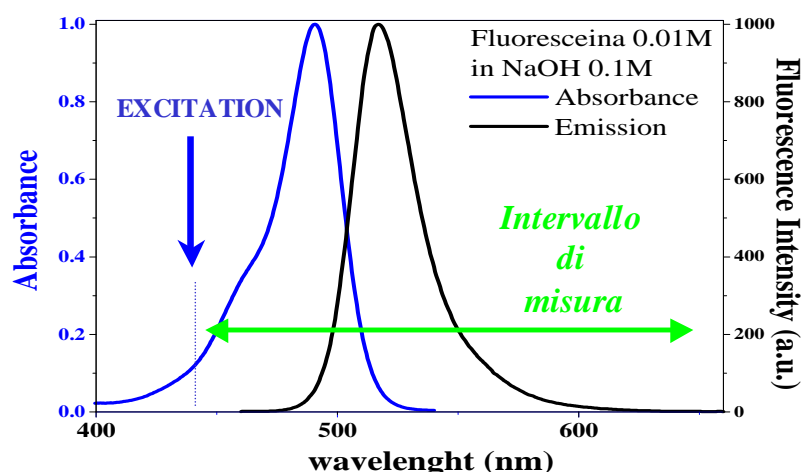




- L'alloggiamento portacampioni, solitamente adatto a celle da fluorescenza a sezione quadrata con 1 cm di cammino ottico per campioni liquidi oppure a celle cilindriche come tubi capillari per campioni in polvere. In genere il portacampioni può essere collegato ad un circuito di raffreddamento per misure a bassa temperatura.
- La rivelazione della radiazione emessa avviene ad un angolo di  $90^\circ$  con un secondo gruppo monocromatore posto dietro una seconda fenditura. Tale angolo è dovuto all'esigenza di minimizzare la quantità di radiazione proveniente dalla sorgente di eccitazione che arriva sul rivelatore. Infatti la radiazione di eccitazione è molto più intensa di quella emessa, e se raggiunge il rivelatore può generare un fondo di fluorescenza che aumenta il rumore e peggiora la qualità della misura.
- Il rivelatore solitamente consiste in un fototubo o, in alcuni casi, in un fotodiodo.

Tutto è contenuto in un unico blocco che costituisce lo strumento.

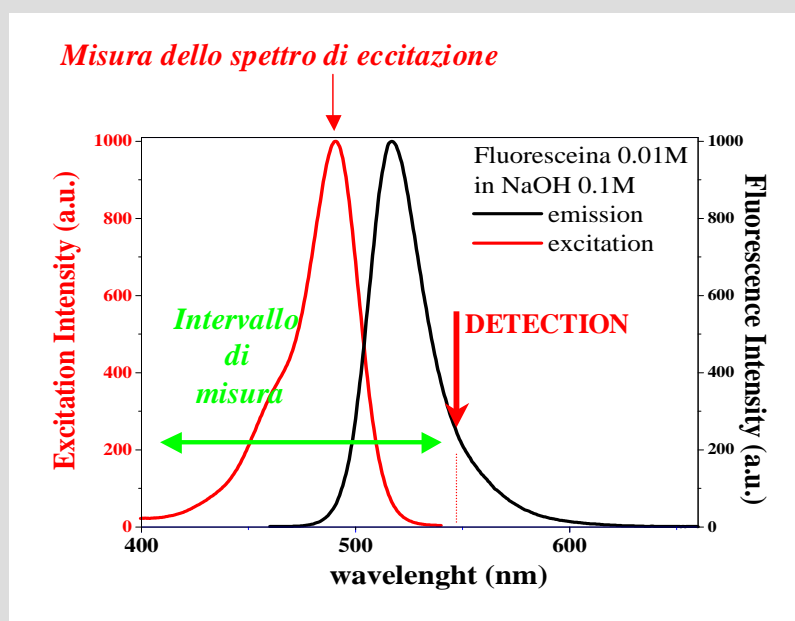
Solitamente le misure di fluorescenza sono riportate su una scala di intensità verso lunghezza d'onda (in nm) oppure verso energia (in eV o, più raramente, in  $\text{cm}^{-1}$ ). Per raccogliere lo spettro di emissione, si seleziona una lunghezza d'onda a cui eccitare il campione ed un intervallo di lunghezze d'onda in cui raccogliere lo spettro della luce emessa.



La scala di intensità è in unità arbitrarie e non assolute. Per effettuare misure quantitative della radiazione emessa, ovvero per misurare la resa quantica di fluorescenza, si deve confrontare lo spettro di emissione del campione con quello di uno standard fluorescente di cui si conosca la concentrazione e la resa quantica di emissione. Dato che la risposta del rivelatore non è piatta in tutto l'intervallo di lunghezze d'onda

si devono usare standard che emettano nello stesso intervallo spettrale del campione da analizzare. Conoscere anche la curva di risposta del rivelatore del fluorimetro è utile in generale ed indispensabile per misure di fluorofori che emettono a basse energie, dove il rivelatore del fluorimetro è poco sensibile. A causa della diversa curva di risposta in fluorimetri diversi, la stessa soluzione può dare spettri apparentemente diversi, se non vengono corretti in base alle curve di risposta degli strumenti.

**Per approfondire.** I fluorimetri possono raccogliere tre tipi di spettri: di **emissione**, di **eccitazione** e **sincrono**. Per raccogliere lo spettro di emissione, si seleziona una lunghezza d'onda a cui eccitare il campione ed un intervallo di lunghezze d'onda in cui raccogliere lo spettro della luce emessa. Per raccogliere lo spettro di eccitazione, si seleziona una lunghezza d'onda in cui misurare l'intensità della luce emessa ed un intervallo di lunghezze d'onda in cui variare la radiazione di eccitazione del



campione. In questo modo è possibile risalire alla forma dello spettro di assorbimento corrispondente alla transizione dal livello fondamentale ai livelli eccitati responsabili dell'emissione del fluoroforo. Per raccogliere uno spettro sincrono, la lunghezza d'onda di eccitazione e di raccolta devono coincidere, e serve ad eseguire una misura di scattering di luce da parte del campione.

Effettuare una misura di fluorescenza in modo corretto non è un'operazione banale, in quanto, per evitare artefatti, bisogna porre particolare attenzione ad alcuni dettagli sperimentali.

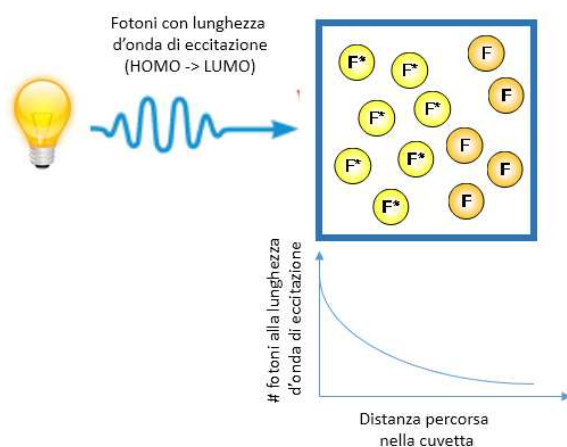
Il parametro più importante è la concentrazione del fluoroforo. Al di sopra di una certa concentrazione il fluoroforo riassorbe parte della radiazione emessa, con l'effetto duplice di alterare la misura della resa quantica di fluorescenza e di alterare la forma dello spettro di emissione. Quest'ultimo aspetto è dovuto al fatto che il riassorbimento si ha nell'intervallo spettrale di sovrapposizione tra spettro di assorbimento e spettro di



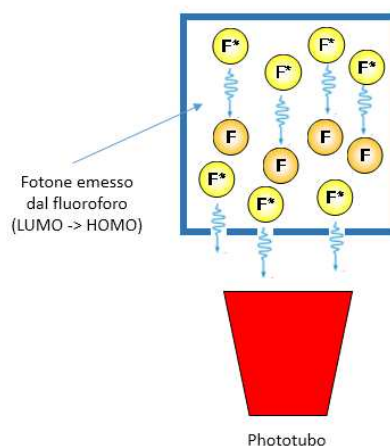
emissione (assorbimento del fascio secondario o di emissione). Alle concentrazioni più elevate può verificarsi addirittura assorbimento del fascio di eccitazione (o primario), proveniente dalla lampada, con conseguente eccitazione solo dei fluorofori che si trovano nella parte di cuvetta più vicina alla sorgente di eccitazione, mentre quelli nella zona centrale della cuvetta ricevono meno luce e quindi hanno minore probabilità di essere eccitati (vedi figura sottostante). A tal proposito è bene precisare che la raccolta della luce emessa dal campione avviene dalla zona centrale della cuvetta, dunque in ipotesi di illuminazione omogenea del campione.

Per evitare questi problemi, solitamente si usano soluzioni con assorbanza inferiore a 0.1 sia alla lunghezza d'onda di eccitazione che a quelle di emissione.

### I) ASSORBIMENTO DEL FASCIO PRIMARIO (DI ECCITAZIONE)



### II) ASSORBIMENTO DEL FASCIO SECONDARIO (DI EMISSIONE)



**Per approfondire. Le impurezze.**

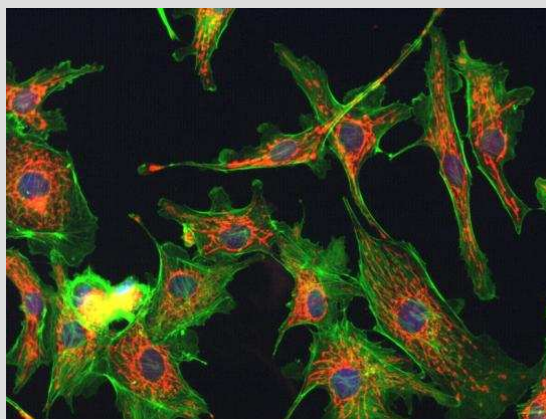
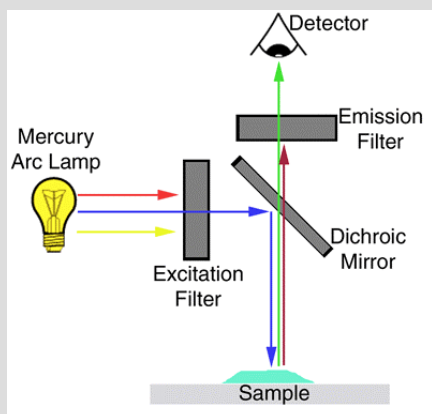
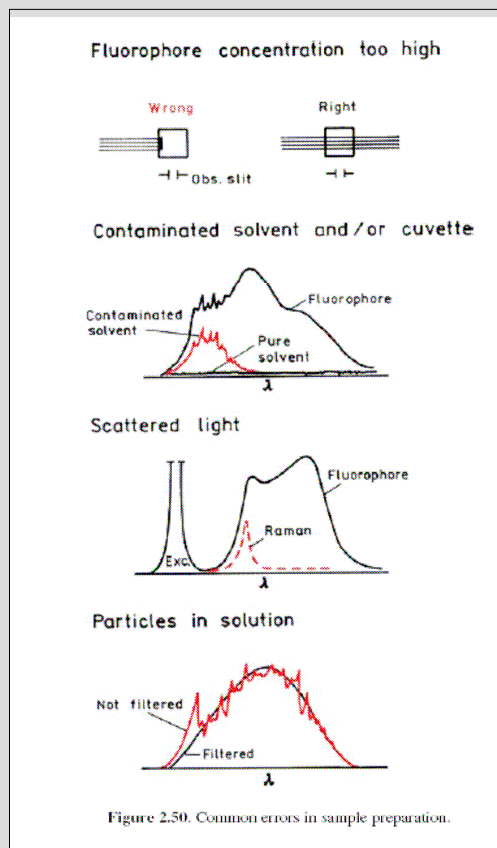
Le impurezze possono originare segnali di fluorescenza specialmente quando l'eccitazione avviene a basse lunghezze d'onda, dove è più facile che le sostanze assorbano ed emettano fotoni. Avere una soluzione di riferimento che contenga esattamente la stessa matrice a meno del solo fluoroforo consente di evidenziare la presenza di impurezze fluorescenti.

Nel caso di campioni con bassi segnali di fluorescenza, è possibile che lo spettro di emissione sia disturbato dalla presenza di scattering Rayleigh o Raman. Ciò avviene in particolare quando il campione contiene particelle di dimensioni nanometriche o micrometriche. La presenza di tali componenti

può essere evidenziata spostando la lunghezza d'onda di eccitazione, in quanto il contributo di fluorescenza è indipendente dalla lunghezza d'onda di eccitazione, mentre i contributi di scattering si spostano con essa.

**Altri tipi di misure di fluorescenza.**

Le misure di fluorescenza possono essere eseguite anche con un microscopio ottico in fluorescenza. In questo caso la rivelazione della radiazione emessa non avviene a  $90^\circ$  bensì in direzione collineare a quella della radiazione di eccitazione e si utilizzano dei filtri per l'eliminazione della radiazione eccitatrice.



Schema di un microscopio a fluorescenza ed esempio di campioni cellulari marcati con fluorofori di diversi colori osservati tramite microscopia a fluorescenza

L'eccitazione può avvenire con lampade o con laser. La rivelazione può avvenire con una camera CCD in modalità di immagine o, in alcuni casi, anche in modalità di spettroscopia se un gruppo monocromatore viene accoppiato con il rivelatore.

Per scopi analitici, la struttura base del fluorimetro è modificata in modo da eseguire analisi su campioni multipli, ad esempio su piastre. In questo caso ciò che si misura è solamente l'intensità di fluorescenza in un certo intervallo spettrale e non lo spettro di emissione vero e proprio di ciascun campione. Le piastre non consentono l'analisi della luminescenza con geometria a  $90^\circ$  ma si basano su sistemi differenti quali, ad esempio, un sistema di specchi che eccitano il campione in un piccolo angolo solido e raccolgono la radiazione emessa in un angolo solido molto maggiore.

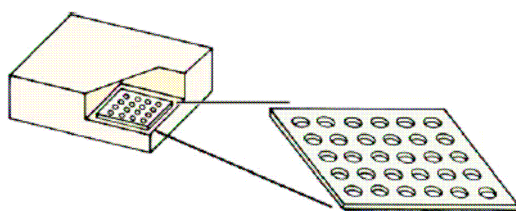


Figure 2.2. Fluorescence microplate reader.

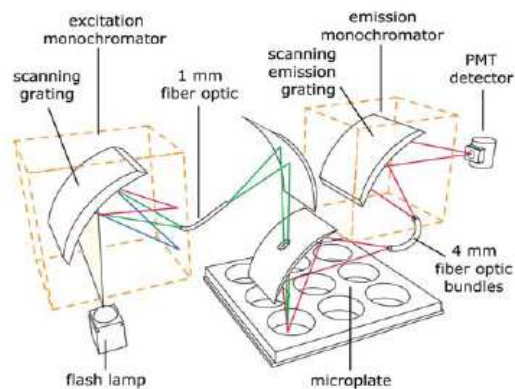
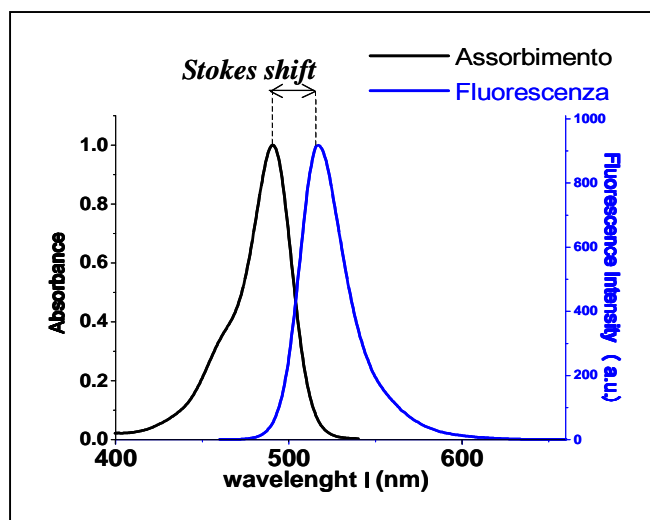


Figure 2.3. Optical path for a microplate reader [2].

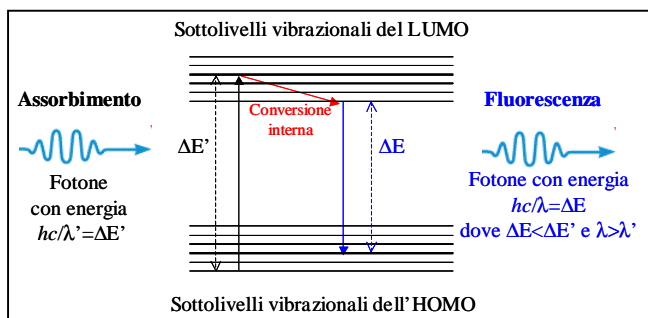
### Stokes shift.

Come si osserva nella figura a lato, l'emissione di fluorescenza è centrata a lunghezze d'onda maggiori rispetto all'assorbimento. La differenza tra i due massimi è detta **Stokes shift**.

Lo Stokes shift dipende da due fattori principali:

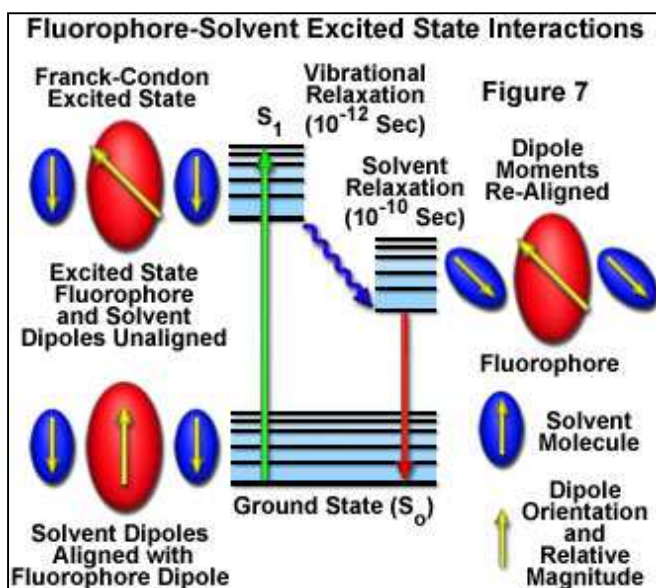


i) i livelli elettronici sono a loro volta suddivisi in sottolivelli vibrazionali (come sarà discusso nel corso di Chimica Fisica II). In seguito all'assorbimento del fotone, si ha un rapido rilassamento verso il



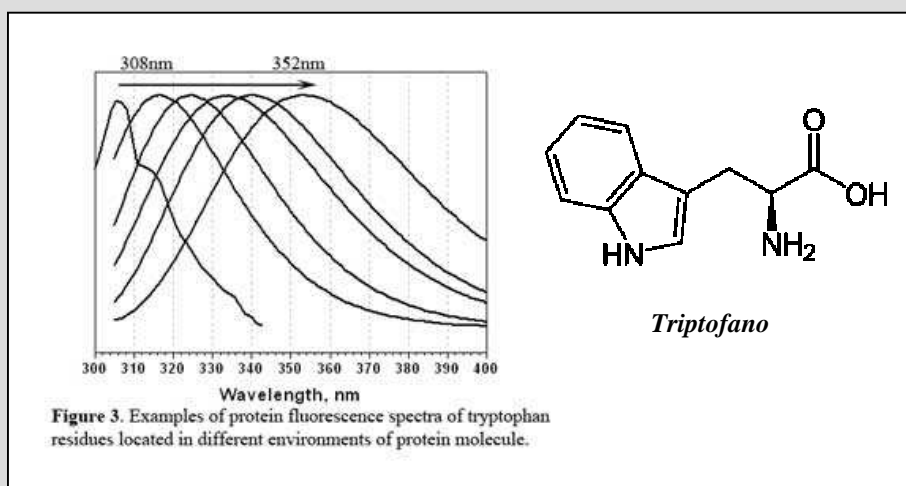
livello vibrazionale fondamentale dello stato eccitato;

ii) l'intorno chimico fisico può stabilizzare più efficacemente il livello elettronico eccitato del fluoroforo di quanto non faccia con il livello elettronico fondamentale. In generale gli stati eccitati corrispondono a condizioni di alta polarizzazione della molecola, pertanto tendono ad essere stabilizzati in un solvente polare, con l'effetto di abbassare lievemente l'energia dello stato eccitato e, quindi, di aumentare lo Stokes shift rispetto ad un ambiente meno polare.



**Per approfondire.** Quando lo spettro di assorbimento e di emissione sono simmetrici, allora l'assorbimento e la fluorescenza coinvolgono gli stessi livelli (tipicamente  $S_0$  ed  $S_1$ ). In caso contrario il fluoroforo nello stato eccitato presenta delle differenze sostanziali rispetto allo stato fondamentale, pertanto anche i livelli elettronici e vibrazionali subiscono delle modifiche in seguito all'eccitazione.

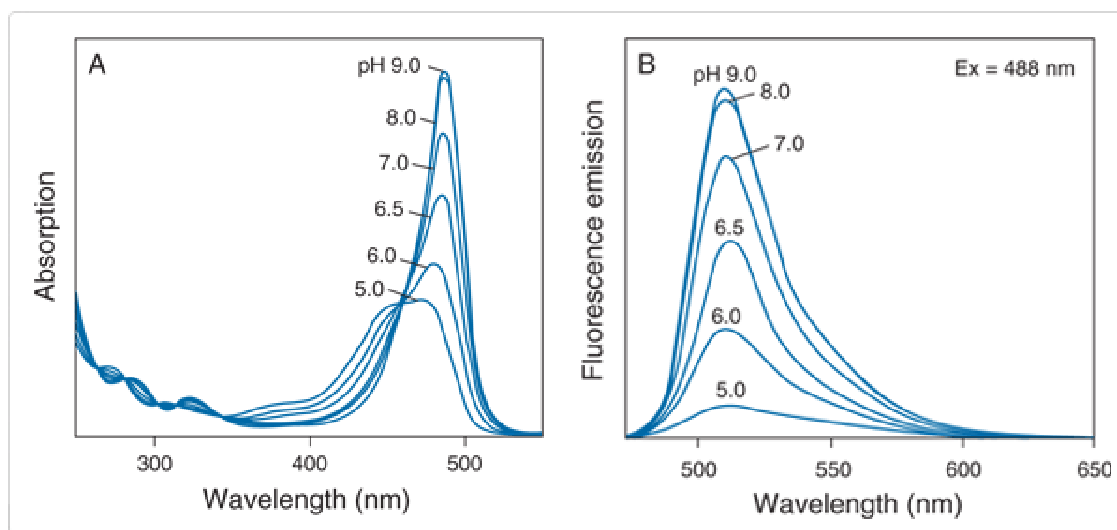
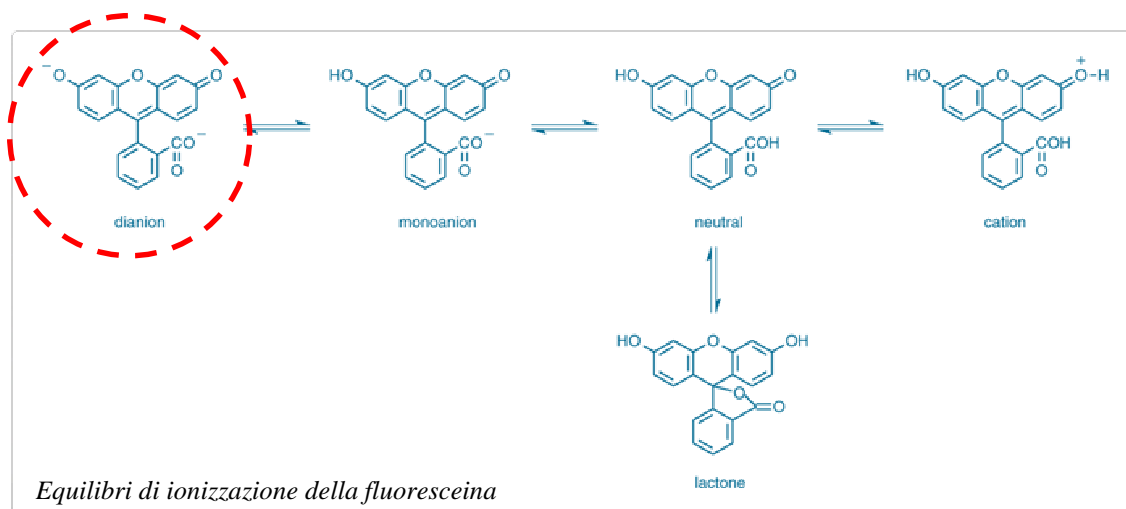
Un esempio interessante di Stokes shift riguarda il triptofano, un aminoacido fluorescente che è presente in molte proteine. Se la conformazione proteica è tale da proteggere il triptofano dall'acqua circostante, si osserverà uno Stokes shift minore rispetto a quando la conformazione proteica è tale da esporre l'aminoacido al solvente. Pertanto l'analisi dello spettro di fluorescenza può fornire informazioni sulla configurazione proteica.



**Fluoresceina.** I fluorofori sono molecole in cui il rapporto  $Q$  tra il numero di fotoni assorbiti e il numero di fotoni emessi è vicino a 1, mentre nella maggior parte delle molecole tale rapporto è molto minore di 1. Esistono migliaia e migliaia di fluorofori, alcuni costituiti da molecole organiche ed altri di tipo inorganico o ibrido. Il fluoroforo utilizzato per questa esperienza di laboratorio è la fluoresceina. La fluoresceina, solitamente utilizzata sotto forma di sale disodico, ha una intensa banda di assorbimento a 490 nm, il che conferisce il colore giallo alle sue soluzioni ed il colore arancio al composto in polvere. L'emissione è centrata intorno ai 520 nm in acqua, pertanto esibisce una fluorescenza di colore verde.



Sia il gruppo fenolo che quello carbossilico sono acidi e deprotonati a pH superiore a 9. Lo spettro di assorbimento e di emissione sono dipendenti dal pH della soluzione, così come il tempo di vita di fluorescenza e, di conseguenza, anche la resa quantica di fluorescenza. In ambiente acido, la fluoresceina dianione subisce per prima la protonazione del fenolo ( $pK_a$  6.4) per diventare fluoresceina monoanione e quindi la protonazione del gruppo carbossilico ( $pK_a < 5$ ) per diventare fluoresceina neutra. L'ulteriore acidificazione può portare alla formazione della fluoresceina catione ( $pK_a$  2.1). Solo il monoanione ed il dianione della fluoresceina sono fluorescenti, con quantum yields di 0.37 e 0.93 rispettivamente. Il tempo di vita di fluorescenza della fluoresceina dianione è 4.0 ns. Lo spettro di assorbimento delle forme protonate è caratterizzato da un blue shift (spostamento verso lunghezze d'onda minori) ed una diminuzione dell'assorbanza rispetto al dianione.



*Spettri di assorbimento (A) e di emissione (B) della fluoresceina a diversi pH*

Esistono vari derivati della fluoresceina, tra i quali il più diffuso è la fluoresceina isotiocianato (FITC), utilizzato per il labelling fluorescente in ambito biologico grazie alla reattività del gruppo isotiocianato con le ammine.

La fluoresceina è ampiamente utilizzata come colorante nonché come fluoroforo per il biolabelling in microscopia di fluorescenza, per bioanalitica, in ambito forense, in medicina per evidenziare le lesioni della cornea, come tracciante per fluidi (ad esempio per il monitoraggio dei fiumi sotterranei, per evidenziare infiltrazioni di acqua, per monitorare il flusso sanguigno in zone periferiche del corpo umano o per esperimenti di microfluidica).

Nonostante la fluoresceina abbia una tossicità molto bassa anche ad elevate concentrazioni, essa può provocare uno shock anafilattico in alcuni soggetti sensibili.

**Per approfondire. Classificazione dei Fluorofori.** In ambito biochimico, è possibile dividere i fluorofori organici in due grandi categorie, gli **intrinseci** e gli **estrinseci**, corrispondenti rispettivamente a quelli che si trovano in natura e a quelli di sintesi. Tra

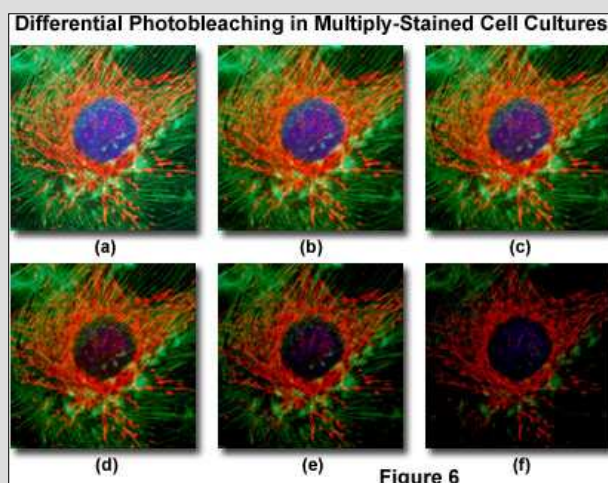


gli intrinseci rientrano, ad esempio, gli aminoacidi aromatici, il NADH, le flavine e le clorofille. Alcune proteine mostrano fluorescenza intrinseca dovuta agli aminoacidi triptofano, tirosina e fenilalanina. Il gruppo indolo del triptofano è la fonte dominante di assorbimento nell'UV e di emissione delle proteine. L'emissione del triptofano è molto sensibile all'intorno chimico-fisico ed è pertanto sfruttato per ottenere informazioni sulla conformazione delle proteine. Un esempio importante di fluorofori intrinseci è la green fluorescent protein (GFP) che è prodotta naturalmente dalla medusa *Aequorea victoria*. La GFP contiene un gruppo altamente fluorescente in una regione interna e molto protetta della sua struttura. La caratteristica più importante della GFP è che il gene per la sua produzione può essere inserito in cellule di vario tipo mediante ingegneria genetica, allo scopo di rendere fluorescenti le cellule, i tessuti da esse composte o addirittura interi organismi.

Tra i fluorofori estrinseci vi sono ad esempio i dansili, la fluoresceina, le rodamine e le cianine. Questi fluorofori sono spesso utilizzati per rendere fluorescenti delle biomolecole di interesse che non hanno fluorescenza intrinseca, come il DNA e i lipidi. Nel caso delle proteine, spesso è necessario conferire fluorescenza a lunghezze d'onda maggiori di quelle a cui emettono gli aminoacidi, per evitare il fondo di fluorescenza delle matrici biologiche.

Il numero di fluorofori per il biolabelling (bio-etichettatura) è cresciuto in modo significativo negli ultimi anni ed esistono degli handbook dei label fluorescenti dove è possibile selezionare i fluorofori di interesse. In particolare, molti fluorofori sono disponibili con funzioni chimiche adatte alla formazione di legami covalenti o non covalenti con le biomolecole di interesse.

I più comuni sono la fluoresceina e le rodamine, che hanno massimi di assorbimento intorno a 490 e 570 nm e massimi di emissione intorno a 520 e 600 nm rispettivamente, hanno elevate rese quantiche di fluorescenza, hanno coefficienti di assorbimento molare molto elevati ( $\sim 80000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) e sono disponibili in un'ampia varietà di derivati come isotiocianati (reattivi verso le ammine), iodoacetamidi e maleimidi (reattivi verso i tioli).





Una delle caratteristiche più importanti di un fluoroforo è la fotostabilità. Tutti i fluorofori organici tendono a danneggiarsi sotto irraggiamento continuo ed intenso (photobleaching). In particolare, la fluoresceina è uno dei label meno fotostabili. Esistono altri tipi di sostanze luminescenti che presentano photobleaching minore, come nanoparticelle di semiconduttori, composti a base di lantandi e complessi metallorganici con metalli di transizione.

### **Quenching della fluorescenza.**

L'intensità di fluorescenza (ovvero la resa quantica di fluorescenza  $Q$  di una sostanza) può diminuire per effetto di molti fattori. Tale fenomeno è noto come quenching (spegnimento). In generale, la diminuzione dell'emissione di fluorescenza avviene per effetto di una seconda sostanza, che si chiama **quencher**.

Ci sono vari processi che possono provocare quenching della fluorescenza: reazioni chimiche che avvengono quando il fluoroforo è nello stato eccitato, formazione di complessi tra il fluoroforo ed una seconda specie presente in soluzione, trasferimento di energia e collisioni. **I meccanismi di quenching più frequenti sono il trasferimento di energia e il quenching collisionale.**

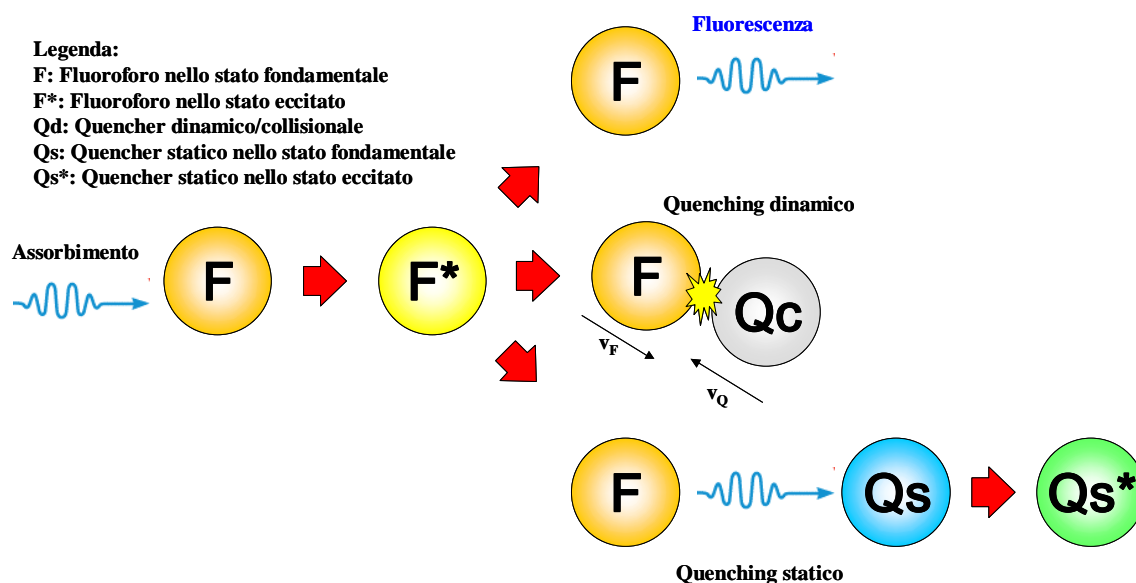
Nel trasferimento di energia, i fotoni sono emessi dal fluoroforo, ma vengono in parte riassorbiti da una seconda specie. Questo fenomeno è molto comune perchè avviene ogni volta che si ha una soluzione molto concentrata di fluorofori, in cui è la stessa specie a svolgere il ruolo di emettitore e di riassorbitore.

Il **quenching collisionale** avviene quando il fluoroforo passa dallo stato eccitato a quello fondamentale in seguito ad un contatto o un urto con il quencher, senza che l'energia in eccesso venga poi emessa sotto forma di un fotone (vedi figura a seguire). L'ossigeno molecolare è un quencher collisionale molto efficiente e capace di agire sulla maggior parte dei fluorofori conosciuti. Altri quencher collisionali molto comuni sono le ammine, gli alogeni e in particolare lo iodio, l'acrilamide, lo Xe, l' $\text{H}_2\text{O}_2$  e gli ossidi di azoto.

**Per approfondire.** I meccanismi di quenching in seguito alle collisioni variano a seconda della coppia quencher – fluoroforo. Ad esempio le ammine alifatiche o aromatiche sono quencher collisionali selettivi per fluorofori aromatici tramite un meccanismo di trasferimento di carica durante la collisione. Gli alogeni e in particolare lo iodio sono quencher collisionali molto efficienti che promuovono l'intersystem

crossing verso uno stato di tripletto del fluoroforo per accoppiamento di spin-orbita del fluoroforo con l'alogeno.

I meccanismi di quenching si dicono **dinamici** se dipendono dalla velocità di diffusione del quencher verso il fluoroforo, mentre si dicono **statici** se sono indipendenti dai processi diffusivi. Il quenching collisionale è un tipico processo dinamico, in quanto il quencher deve diffondere verso il fluoroforo perchè avvenga l'urto, mentre il trasferimento di energia o di carica dovuto alla formazione di complessi è un tipico processo statico.

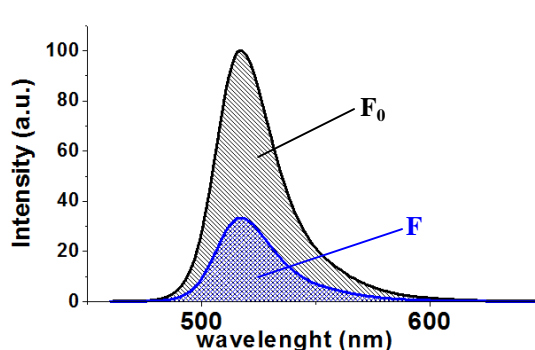


### *Teoria del quenching collisionale.*

Il quenching collisionale è descritto dall'**equazione di Stern-Volmer**:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \tau_0 [C_q] = 1 + K_D [C_q]$$

dove  $F_0$  ed  $F$  sono l'intensità di fluorescenza in assenza ed in presenza del quencher,  $k_q$  è la costante di quenching bimolecolare,  $\tau_0$  è il tempo di vita del fluoroforo in assenza del quencher,  $[C_q]$  è la concentrazione del quencher e  $K_D = k_q \tau_0$  è la **costante di quenching di Stern-**



**Volmer.** L'intensità di fluorescenza  $F$  è proporzionale al numero di fotoni emessi dai fluorofori e, pertanto, risulta proporzionale anche all'area dello spettro di emissione.

Secondo l'equazione di Stern – Volmer, il rapporto  $F_0/F$  dipende linearmente dalla concentrazione di quencher  $[C_q]$  con pendenza pari alla costante di quenching  $K_D$ .

Vi sono diversi modi per dimostrare che l'equazione di Stern – Volmer è in grado di descrivere il quenching collisionale. Ad esempio, si può cominciare considerando che, in condizioni stazionarie, come quelle durante la misura con il fluorimetro, il campione è sottoposto ad illuminazione costante nel tempo ed il numero di molecole che passano allo stato eccitato equivale al numero di molecole che passano allo stato diseccitato. Dunque, la velocità  $f(t)$  con cui il fluoroforo viene eccitato è uguale alla velocità con cui il fluoroforo rilassa allo stato fondamentale:

$$\frac{d[C_{F^*}]}{dt} = f(t) - \frac{1}{\tau} [C_{F^*}] = 0$$

Dato che il quenching collisionale è un processo in cui lo stato eccitato viene depopolato, il tempo di vita di fluorescenza  $\tau$  diminuisce per la presenza del quencher, ovvero è possibile scrivere:

$$\frac{1}{\tau} = \left( \frac{1}{\tau_0} + k_q [C_q] \right)$$

Ciò equivale a dire che, in presenza del quencher, la velocità di diseccitazione è accresciuta di un contributo pari a  $k_q[C_q]$ . Dato che  $f(t)$  è indipendente dalla presenza o meno del quencher, si ha:

$$\frac{d[C_{F^*}]_0}{dt} = f(t) - \frac{1}{\tau_0} [C_{F^*}]_0 = 0 \text{ in assenza di quencher}$$

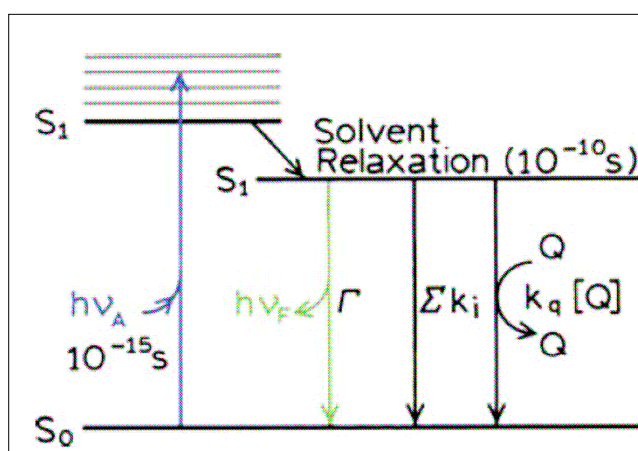
$$\frac{d[C_{F^*}]}{dt} = f(t) - \left( \frac{1}{\tau_0} + k_q [C_q] \right) [C_{F^*}] = 0 \text{ in presenza di quencher.}$$

ed eguagliando le due espressioni pervengo a

$$\rightarrow f(t) = \frac{1}{\tau_0} [C_{F^*}]_0 = \left( \frac{1}{\tau_0} + k_q [C_q] \right) [C_{F^*}]$$

$$\rightarrow \frac{[C_{F^*}]_0}{[C_{F^*}]} = 1 + \tau_0 k_q [C_q] \quad (*)$$

A questo punto, considero che l'intensità di fluorescenza in assenza ( $F_0$ ) e in presenza ( $F$ ) di quencher è proporzionale alla concentrazione di fluoroforo nello stato eccitato



$[C_{F^*}]$  e la costante di proporzionalità è la stessa in entrambi i casi. Infatti, in condizioni di stato stazionario,  $[C_{F^*}]$  è costante nel tempo se si mantiene costante la condizione di illuminazione del campione (stato stazionario), mentre è solo il valore assoluto di  $[C_{F^*}]$  ad essere minore in presenza del quencher. Dunque si può scrivere:

$$\begin{cases} F_0 = kost \cdot [C_{F^*}]_0 \\ F = kost \cdot [C_{F^*}] \end{cases} \rightarrow kost = \frac{F_0}{[C_{F^*}]_0} = \frac{F}{[C_{F^*}]}$$

che, sostituendo in (\*) da l'equazione di Stern – Volmer:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \tau_0 [C_q].$$

Tale relazione è una diretta conseguenza del fatto che il quenching collisionale è un processo in cui lo stato eccitato viene depopolato, per cui il tempo di vita di fluorescenza diminuisce per la presenza del quencher. Ovvero è anche possibile scrivere:

$$\frac{\tau_0}{\tau} = 1 + k_q \tau_0 [C_q] = \frac{F_0}{F}$$

che è una importante caratteristica del quenching collisionale: la diminuzione dell'intensità di fluorescenza è equivalente alla diminuzione del tempo di vita di fluorescenza.

**Deviazioni dalla Stern – Volmer.** Nelle condizioni in cui il quenching è molto elevato, si osservano delle deviazioni dalla linearità per cui il rapporto  $F_0/F$  cresce più rapidamente all'aumentare di  $[C_q]$ .

Tale fenomeno è dovuto al fatto che, al di sopra di una certa concentrazione limite, una parte dei quencher si trova talmente vicino ai fluorofori da avere il 100 % di probabilità di quenching. Si può definire una **sfera di azione** di volume  $V$  intorno al fluoroforo entro la quale il quencher ha probabilità unitaria di provocare il quenching. Tale sfera di azione è solitamente dello stesso ordine di grandezza della somma del raggio del fluoroforo e del quencher, che per molecole corrisponde a grandezze di  $\sim 1$  nm.

La versione modificata della Stern –

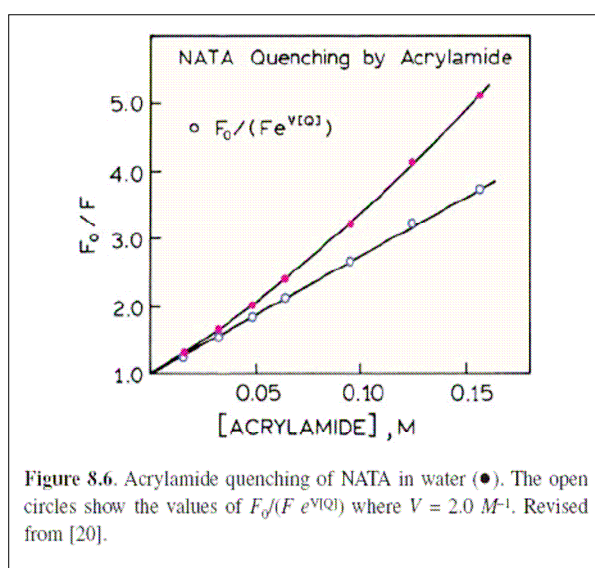


Figure 8.6. Acrylamide quenching of NATA in water (●). The open circles show the values of  $F_0/(F e^{V[Q]})$  where  $V = 2.0 M^{-1}$ . Revised from [20].

Volmer che descrive questo regime è la seguente:

$$\frac{F_0}{F} = (1 + K_D [C_q]) e^{N_A [C_q] / 1000}$$

dove  $V$  è il volume della sfera di azione (espresso in  $\text{cm}^3$ ) e l'esponentiale corrisponde alla frazione di fluorofori che non hanno quencher all'interno della loro sfera di azione per una data concentrazione  $[C_q]$  (espressa in  $\text{mol/dm}^3$ ). Il fattore 1000 serve a omogeneizzare le unità di misura tra  $V$  e  $[C_q]$ .

**Costante di quenching bimolecolare.** È utile mostrare la relazione tra la frequenza degli urti tra fluoroforo e quencher e l'efficienza del processo di quenching. La frequenza collisionale  $Z$  di un fluoroforo con un quencher è data da:

$$Z = k_0 [C_q]$$

dove  $k_0$  è la **costante collisionale bimolecolare in regime diffusivo**.  $k_0$  si ottiene dalla relazione di Smoluchowski che descrive il flusso diffusivo:

$$k_0 = \frac{4\pi N_A}{1000} (R_f + R_q) (D_f + D_q)$$

dove  $N_A$  è il numero di Avogadro,  $D$  è la somma dei coefficienti di diffusione del fluoroforo ( $D_f$ ) e del quencher ( $D_q$ ) ed  $R$  è la somma dei loro raggi. Il termine  $N_A/1000$  è un fattore di conversione dimensionale da molarità a  $\text{molecole/cm}^3$ , dato che  $[C_q]$  è solitamente espressa in  $\text{mol/dm}^3$ .

I coefficienti di diffusione possono essere ottenuti mediante la relazione di Stokes – Einstein (ipotesi di molecole con forma sferica):

$$D_f = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_f}$$

$$D_q = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_q}$$

dove  $k_B$  è la costante di Boltzmann,  $T$  è la temperatura e  $\eta$  è la viscosità della soluzione. La costante di quenching  $k_q$  è legata a  $k_0$  mediante l'**efficienza di quenching**  $\gamma$ , che da conto della frazione di urti tra fluoroforo e quencher che effettivamente portano alla diseccitazione non radiativa:

$$k_q = \gamma k_0.$$

Sostituendo  $k_q$  nell'espressione di  $k_0$  si evidenzia la dipendenza di  $k_q$  dal rapporto  $T/\eta$ :

$$k_q = \gamma \left[ \frac{N_A}{1000} \frac{2}{3} k_B (R_f + R_q) \left( \frac{1}{R_f} + \frac{1}{R_q} \right) \right] \frac{T}{\eta}.$$

Nel caso di quencher come l'O<sub>2</sub> o l'I, si ha  $\gamma \sim I$ .

**Per approfondire. Teoria del quenching statico.** Il quenching statico ricorre quando il fluoroforo forma dei complessi o degli addotti con una seconda specie che agisce da quencher, con l'effetto di avere una intensità di fluorescenza inferiore rispetto al fluoroforo isolato.

La formazione del complesso è regolata da una **costante di associazione**  $K_s$ :

$$K_s = \frac{[C_{Fq}]}{[C_F][C_q]}$$

dove  $[C_{Fq}]$  è la concentrazione del complesso, mentre  $[C_F]$  e  $[C_q]$  sono le concentrazioni del fluoroforo e del quencher non complessati. Se il complesso è non fluorescente, allora l'intensità di fluorescenza  $F$  dipende dalla concentrazione di fluoroforo libero  $[C_F]$ , così come l'intensità di fluorescenza in assenza di quencher  $F_0$  dipende dalla concentrazione totale di fluoroforo  $[C_F] + [C_{Fq}]$ :

$$F = kost \cdot [C_F]$$

$$F_0 = kost \cdot ([C_F] + [C_{Fq}])$$

Pertanto si può scrivere

$$K_s = \frac{[C_F] + [C_{Fq}] - [C_F]}{[C_F][C_q]} = \frac{F_0 - F}{F[C_q]} = \frac{F_0}{F[C_q]} - \frac{1}{[C_q]}$$

da cui deriva

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_s [C_q].$$

Tale relazione ha la stessa forma della Stern – Volmer, ma in questo caso la costante di proporzionalità tra  $F_0/F$  e  $[C_q]$  è la costante di associazione  $K_s$ . Questo significa che la dipendenza lineare del quenching di fluorescenza dalla concentrazione del quencher è propria sia dei fenomeni di quenching dinamico che statico, dunque servono altri esperimenti o altre informazioni per individuare quale dei due meccanismi sia quello effettivamente coinvolto. Nel quenching statico, il tempo di vita di fluorescenza non è alterato dal quencher, in quanto è la frazione di fluoroforo i cui fotoni possono raggiungere il rivelatore ad essere diminuita dall'azione complessante del quencher.

Pertanto vale:

$$\frac{\tau_0}{\tau} = 1 + \frac{F_0}{F}.$$

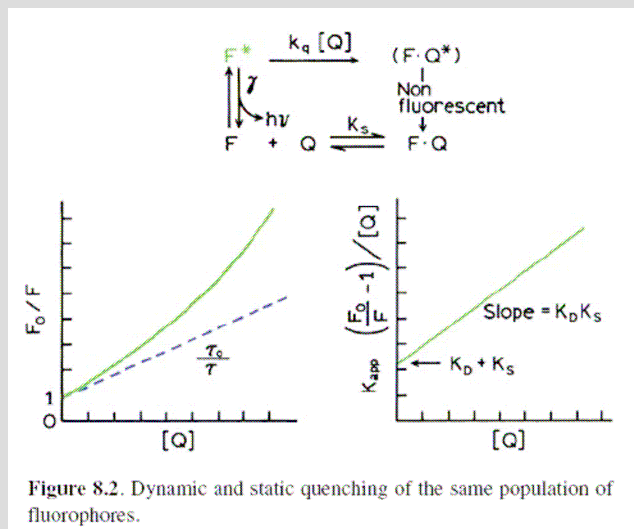
**Combinazione di quenching statico e dinamico.**

Se sono presenti due tipi di quencher, che agiscono rispettivamente come quencher dinamici e statici, entrambi i fenomeni saranno contemporaneamente rilevati dalle misure di quenching di fluorescenza. Questo caso è frequente perchè alcuni quencher possono formare complessi con il fluoroforo ma anche indurre quenching collisionale con la frazione di quencher non legata ai fluorofori.

In questo caso, il quenching di fluorescenza sarà proporzionale al prodotto della frazione di fluoroforo complessato per la frazione di fluoroforo diseccitata mediante collisioni con il quencher:

$$\frac{F_0}{F} = (1 + K_s [C_q])(1 + K_D [C_q]).$$

Dunque si osserva una dipendenza quadratica del quenching di fluorescenza dalla concentrazione del quencher.

**Distinguere tra quenching statico e dinamico.**

Dopo aver introdotto la frequenza collisionale  $Z$ , è possibile riscrivere la Stern-Volmer nel seguente modo:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \tau_0 [C_q] = 1 + \tau_0 \gamma Z = 1 + \tau_0 \gamma \left[ \frac{N_A}{1000} \frac{2}{3} k_B (R_f + R_q) \left( \frac{1}{R_f} + \frac{1}{R_q} \right) \right] \frac{T}{\eta} [C_q]$$

Questa espressione offre diverse possibilità per distinguere tra quenching statico e dinamico. In particolare, si può:

- misurare il tempo di vita di fluorescenza; nel quenching statico, il tempo di vita di fluorescenza non è alterato dal quencher, in quanto è la frazione di fluoroforo i cui fotoni possono raggiungere il rivelatore ad essere diminuita dall'azione complessante del quencher. Pertanto vale:

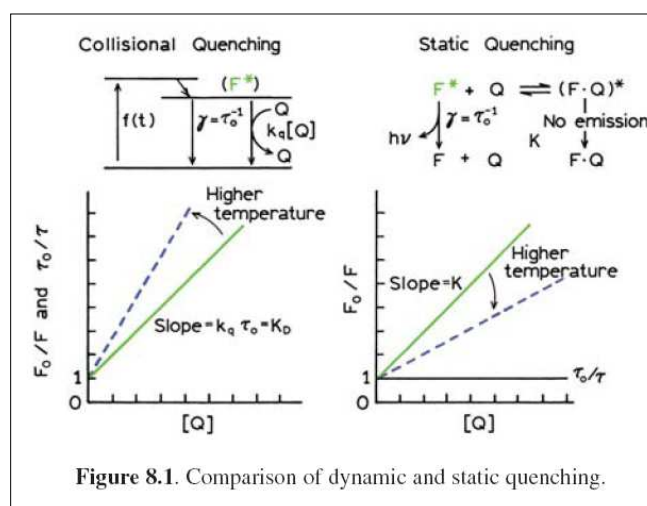
$$\frac{\tau_0}{\tau} = 1 \neq \frac{F_0}{F}$$

- osservare il comportamento del quenching di fluorescenza al variare della temperatura. Infatti il quenching collisionale è un fenomeno che dipende dai processi diffusivi, che sono attivati termicamente. All'aumentare della temperatura,



l'efficienza di quenching dinamico cresce perchè aumenta il coefficiente di diffusione delle specie coinvolte. Al contrario, le costanti di associazione dei complessi tra fluoroforo e quencher solitamente diminuiscono all'aumentare della temperatura perchè l'agitazione termica destabilizza i complessi. Dunque l'efficienza di quenching statico tende a diminuire con l'aumentare della temperatura.

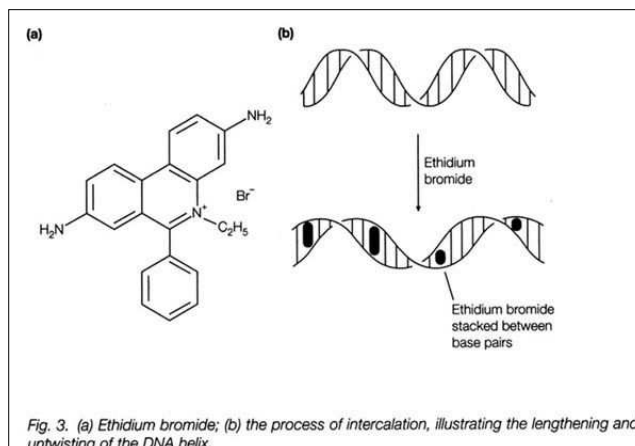
- osservare il comportamento del quenching al variare della viscosità del solvente, in quanto i processi diffusivi sono rallentati in ambienti più viscosi mentre il quenching statico non ne è influenzato.
- Osservare lo spettro di assorbimento del fluoroforo. Il quenching collisionale influenza solo lo stato eccitato del fluoroforo, ma lascia invariato lo stato fondamentale e, di conseguenza, lo spettro di assorbimento è inalterato. La formazione di complessi solitamente influenza anche lo stato fondamentale del fluoroforo con una conseguente alterazione dello spettro di assorbimento.



### Applicazioni del quenching di fluorescenza.

Il quenching della fluorescenza è stato studiato intensamente sia come fenomeno scientifico che per le sue applicazioni, particolarmente frequenti in biochimica, tra cui la rivelazione e quantificazione di DNA, la permeabilità di proteine e lo studio delle membrane cellulari.

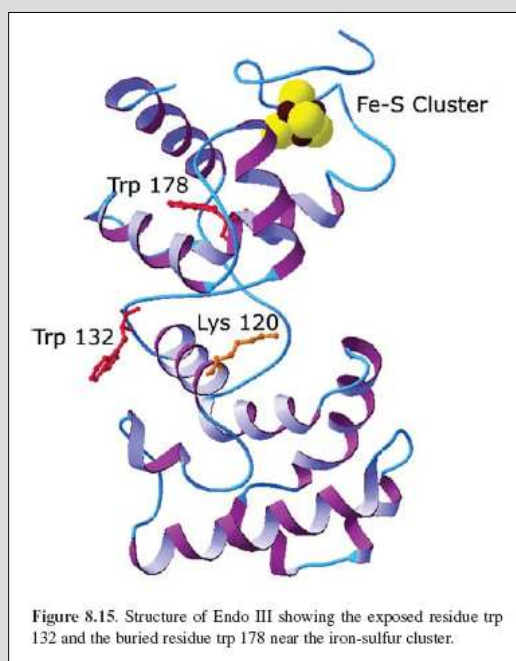
**Rivelazione di DNA.** Il bromuro di etidio (EB) è un fluoroforo planare che intercala tra le basi della doppia elica del DNA. L'ossigeno è il più frequente quencher dinamico di fluorescenza ed è efficace anche con l'EB. Quando l'EB intercala nel DNA, è protetto dalle collisioni con le molecole di  $O_2$  circostanti ed il



suo tempo di vita di fluorescenza passa da 1.75 a 20.5 ns: in pratica il complesso EB-DNA è impermeabile all' $O_2$ . L'EB è il metodo più usato per rivelare e quantificare il DNA.

**Per approfondire. Permeabilità di proteine.** L'efficacia dei quencher dinamici dipende anche dalla loro carica. Gli ioni  $Cl^-$ ,  $Br^-$  e  $I^-$  sono quencher dinamici con efficienza crescente passando dal  $Cl^-$  all' $I^-$ . Se il fluoroforo è circondato da cariche positive, quencher anionici come l' $I^-$  saranno più efficaci di quencher neutri come l' $O_2$  a parità di concentrazione e viceversa se il fluoroforo è circondato da cariche negative.

Il triptofano è un aminoacido fluorescente apolare solitamente ospitato nella parte più interna ed apolare delle proteine che lo contengono. Uno studio comparativo del quenching di fluorescenza di proteine in funzione della concentrazione di  $O_2$  e di  $I^-$  mostra che l'ossigeno è un quencher molto più efficiente dello ioduro. Tale risultato è interpretato come una prova della maggiore permeabilità dell' $O_2$  rispetto agli anioni nella parte più interna delle proteine. Le minori



dimensioni dell'ossigeno rispetto allo ioduro, che è circondato da una sfera di solvatazione, e la natura apolare della parte interna delle proteine spiegano la differente permeabilità dei due quencher.

Se sono presenti dei triptofani in zone diverse della stessa proteina, ad esempio in una zona interna idrofoba scarsamente accessibile e sulla superficie esterna della proteina, come accade nella pepsina o nel lisozima, allora il quenching con  $I^-$  può fornire informazioni sulla percentuale di triptofano presente esternamente rispetto al totale. Tali esperimenti possono essere incrociati con l'analisi dello Stokes shift dell'emissione del triptofano. In questo modo si ricavano informazioni sulla conformazione proteica in un determinato ambiente.

**Studio delle membrane cellulari.** Le proteine di membrana sono proteine che si trovano sulle membrane cellulari. Una parte di queste proteine è esposta verso l'esterno per esplicare la propria funzione, mentre una parte è immersa nella matrice idrofoba. Utilizzando quencher idrofili è possibile quantificare i triptofani facilmente accessibili al solvente. Utilizzando quencher lipofili, che permeano la membrana e si intercalano dentro di essa, è possibile quantificare i triptofani che costituiscono la componente apolare e normalmente non accessibile della proteina.

Il quenching mediante ossigeno può essere usato con fluorofori apolari intercalati in membrane lipidiche, ad esempio per fornire informazioni sulla permeabilità dell' $O_2$  nelle membrane dei liposomi. In alternativa, il quenching della fluorescenza eseguito con quencher polari può fornire informazioni sull'equilibrio di ripartizione di piccoli fluorofori (come alcune tossine) tra la fase liquida e le membrane fosfolipidiche. Allo stesso modo, è possibile ottenere informazioni sull'equilibrio di ripartizione fase polare / fase apolare di alcune piccole molecole che agiscono come quencher (come alcuni anestetici), attraverso il quenching di fluorescenza di fluorofori presenti nella zona idrofila o nella zona lipofila delle proteine di membrana o di alcuni fosfolipidi.

**- Esperienza F -****STUDIO DEL QUENCHING DI FLUORESCENZA IN SOLUZIONI DI FLUORESCINA**

**Obiettivo:** Studiare il quenching di fluorescenza della fluoresceina in presenza di KI e verificare la natura dinamica del meccanismo di quenching.

**Apparecchiatura:** micropipette ( $V_{\max}$ :1mL), pipette in vetro con tettarelle, pipette graduate, 3 beaker da 50 mL ed 1 da 150 ml, spruzzette di acqua deionizzata, ~25 provette in vetro da 6 mL con portaprovette, ~3 cuvette con cammino ottico di 1 cm per spettroscopia di fluorescenza e UV-vis, spettrometro UV-vis e fluorimetro.

**Reagenti:** soluzione acquosa di fluoresceina sale disodico (1 mM); soluzione acquosa di ioduro di potassio (5 M); idrossido di sodio 0.1 M; glicole etilenico.

**Procedura sperimentale**

**Preparazione delle soluzioni.** Lavare tutta la vetreria con abbondante acqua deionizzata prima dell'uso.

Prelevare con il cilindro graduato ~100 mL della soluzione di NaOH (beaker da 150 ml), ~15 mL (non di più) della soluzione di KI (beaker da 50 ml), ~20 mL di glicole etilenico (beaker da 50 ml) e circa ~1 mL della soluzione di fluoresceina (in una provetta, mediante pipetta graduata da 2ml).

Usando le provette, le micropipette e le pipette graduate, si preparano due serie di soluzioni, partendo da una soluzione madre 0.01 mM di fluoresceina in acqua deionizzata. Per la soluzione madre, prelevare 0.3 mL di soluzione 1 mM di fluoresceina per ottenere la soluzione 0.01 mM (beaker da 50 ml), aggiungendo 29.7 mL di acqua deionizzata per pesata. Quindi preparare:

- A) Soluzioni di fluoresceina con diversa concentrazione di KI. Aggiungere 1 mL di fluoresceina 0.01 mM a 2 mL di NaOH 0.1 M in 12 provette. Aggiungere a ciascuna provetta 0, 0.10, 0.15, 0.20, 0.30, 0.40, 0.50, 0.60, 0.70, 0.80, 0.90, 1.00 mL di KI 5 M. Quindi portare tutte le soluzioni ad un volume finale di 4 mL per aggiunta di acqua deionizzata. Preparare anche una soluzione di riferimento contenente 2 mL di NaOH 0.1 M e 2 mL di acqua deionizzata ed un'altra contenente 1.00 mL di KI 5 M e 3 mL di acqua deionizzata.

B) Soluzioni di fluoresceina e KI con diversa concentrazione di glicole etilenico. Aggiungere 1 mL di fluoresceina 0.01 mM a 2 mL di NaOH 0.1 M e a 0.15 mL di KI 5 M in 8 provette. Aggiungere a ciascuna provetta 0, 0.40, 0.80, 1.20, 1.40, 1.60, 1.80, 2.00 mL di glicole etilenico. Quindi portare tutte le soluzioni ad un volume finale di 5.15 mL per aggiunta di acqua deionizzata. Preparare quindi una soluzione di riferimento composta da 1 mL di fluoresceina 0.01 mM, 2 mL di NaOH 0.1 M, 0.15 mL di H<sub>2</sub>O e 2 mL di glicole etilenico. Preparare anche una soluzione di riferimento contenente 2.0 mL di glicole etilenico e 3.15 mL di acqua deionizzata.

Assicurarsi di volta in volta che le soluzioni siano ben miscelate prima di riporle nelle cuvette per le analisi spettrofotometriche.

**Misure.**

Raccogliere lo spettro di assorbimento UV – visible (intervallo 350 - 700 nm, metodo “Esperienza F”) delle seguenti soluzioni precedentemente preparate:

- soluzione contenente 1 mL di fluoresceina 0.01 mM, 2 mL di NaOH 0.1 M ed 1 mL di acqua deionizzata (presa dalla serie A)
- soluzione contenente 2 mL di NaOH 0.1 M e 2 mL di acqua deionizzata (presa dalla serie A)
- soluzione contenente 1.00 mL di KI 5 M e 3 mL di acqua deionizzata (presa dalla serie A)
- soluzione contenente 2.0 mL di glicole etilenico e 3.15 mL di acqua deionizzata (presa dalla serie B).

Raccogliere lo spettro di emissione delle soluzioni preparate al punto A e B usando i seguenti parametri:

- lunghezza d’onda di eccitazione: 440 nm (o 430 nm in caso di saturazione del fluorimetro)
- lunghezza d’onda di raccolta: 460 - 660 nm
- velocità di scansione impostata su “medium”
- fenditure di eccitazione ed emissione impostate su “5 nm”

Al termine dell’esperienza, lavare la vetreria e riporla nei cassetti.

**Analisi dati.*****Confronto tra picchi di emissione e assorbimento.***

Confrontare lo spettro di assorbimento della soluzione di fluoresceina con quello di fluorescenza e quantificare lo Stokes shift (dato dalla differenza in lunghezza d'onda tra il picco di assorbimento e quello di emissione). Per facilitare il confronto tra gli spettri in un unico grafico, è possibile ricorrere alla normalizzazione degli spettri, che consiste nel dividere ciascuno spettro per il suo valore massimo. In tal caso, è opportuno menzionare sull'asse y che si tratta di grandezze normalizzate.

Confrontare gli spettri di assorbimento di tutte le soluzioni per escludere che le sostanze utilizzate (KI, NaOH, Glicole) assorbano a 430-440 nm o emettano tra 460 e 660 nm.

***Analisi con l'equazione di Stern-Volmer.***

Le misure di fluorescenza sulla serie di soluzioni (A) consentono di verificare la rispondenza della relazione tra  $F_0/F$  e  $C_q$  e l'equazione di Stern – Volmer. Si può quindi ottenere il valore di  $K_D$  e  $k_q$  all'analisi dei dati e confrontarlo con quello di letteratura per lo stesso sistema (rispettivamente  $9.0 \pm 0.2 \text{ L mol}^{-1}$  e  $2.25 \pm 0.05 \cdot 10^9 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ). È quindi possibile stimare alcuni parametri coinvolti nel processo di quenching e confrontarli (almeno per quanto riguarda l'ordine di grandezza) con i valori tabulati o riportati in letteratura (ad esempio il diametro della sfera di azione  $V$  può essere confrontato con le dimensioni della fluoresceina e dello ioduro).

La serie di soluzioni (A) contiene una concentrazione crescente di quencher, per cui si osserverà che l'intensità di fluorescenza  $F$  diminuisce progressivamente. Per eseguire l'analisi è innanzitutto necessario misurare  $F$  dall'intensità massima del picco di fluorescenza o, in modo più accurato, dall'integrale dello spettro di fluorescenza. A questo punto è possibile riportare i dati in un grafico che correla  $F_0/F$  a  $C_q$  e ottenere i parametri caratteristici del fenomeno di quenching dal fit dei dati sperimentali con i seguenti modelli:

$$\text{Stern-Volmer} \quad \frac{F_0}{F} = 1 + K_D [C_q]$$

$$\text{Stern-Volmer modificata} \quad \frac{F_0}{F} = (1 + K_D [C_q]) e^{-\frac{V N_A [C_q]}{1000}}$$

Per il fit con la Stern-Volmer modificata, si deve utilizzare la funzione “Fit wizard” in SciDaVis (o “nonlinear curve fit” in Origin 6.0). Si faccia attenzione al fatto che l'equazione di Stern-Volmer vale solo per concentrazioni basse, oltre le quali è

necessario ricorrere alla sua versione modificata. Per individuare l'intervallo di concentrazioni in cui la relazione lineare resta valida, si può fare riferimento al coefficiente di correlazione del fit lineare  $R^2$ .

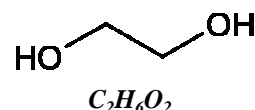
Confrontare i risultati ottenuti dai due modelli con i valori tabulati forniti nella dispensa o da altre fonti a vostra discrezione.

### ***Verifica del meccanismo di quenching.***

Le misure di fluorescenza delle soluzioni (B) consentono di verificare che il meccanismo di quenching sia dinamico, grazie alla relazione tra  $k_q$  ed il reciproco della viscosità della soluzione  $\eta$ :

$$k_q = \gamma \left[ \frac{N_A}{1000} \frac{2}{3} k_B (R_f + R_q) \left( \frac{1}{R_f} + \frac{1}{R_q} \right) \right] \frac{T}{\eta}$$

In prima approssimazione, si può considerare la viscosità come la media pesata di quella dell'acqua e del glicole etilenico (16.1 mPa s a 25°C). La molecola di glicole etilenico possiede due gruppi



ossidrilici –OH capaci di formare legami idrogeno, i quali sono responsabili dell'alta viscosità della soluzione liquida.

Per il calcolo di  $k_q$  è necessario invertire la Stern-Volmer (nella sua forma lineare, la cui validità è soddisfacente per la concentrazione di quencher utilizzata nella serie di soluzioni (B)):

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \tau [C_q] \rightarrow k_q = \left( \frac{F_0}{F} - 1 \right) / (\tau [C_q])$$

dove tutti i parametri restano invariati tranne  $F$  (si ricorda che per la fluoresceina dianione  $\tau$  vale 4ns). A questo punto è possibile verificare se esiste una dipendenza lineare tra  $k_q$  e  $1/\eta$ .

### ***Considerazioni generali.***

- Tutti i dati vanno presentati esprimendo i relativi errori (barre di errore) e facendo attenzione alle unità di misura delle varie grandezze.
- Per aiutare l'analisi dell'errore sui dati, in laboratorio sono presenti le tabelle con gli errori sulla vetreria utilizzata.
- Descrivere in modo rigoroso le operazioni eseguite per l'analisi dei dati.