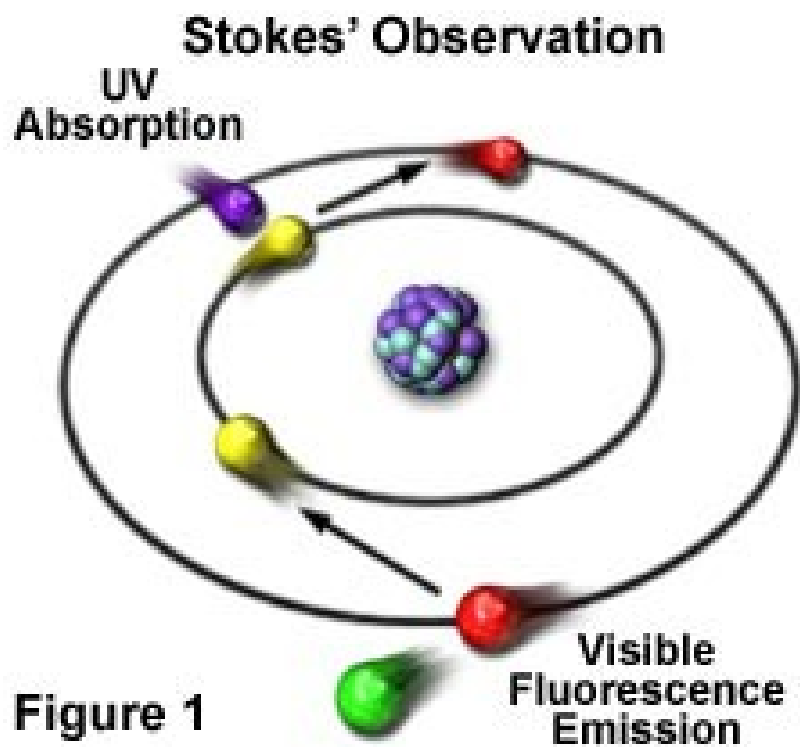


Fluorescenza



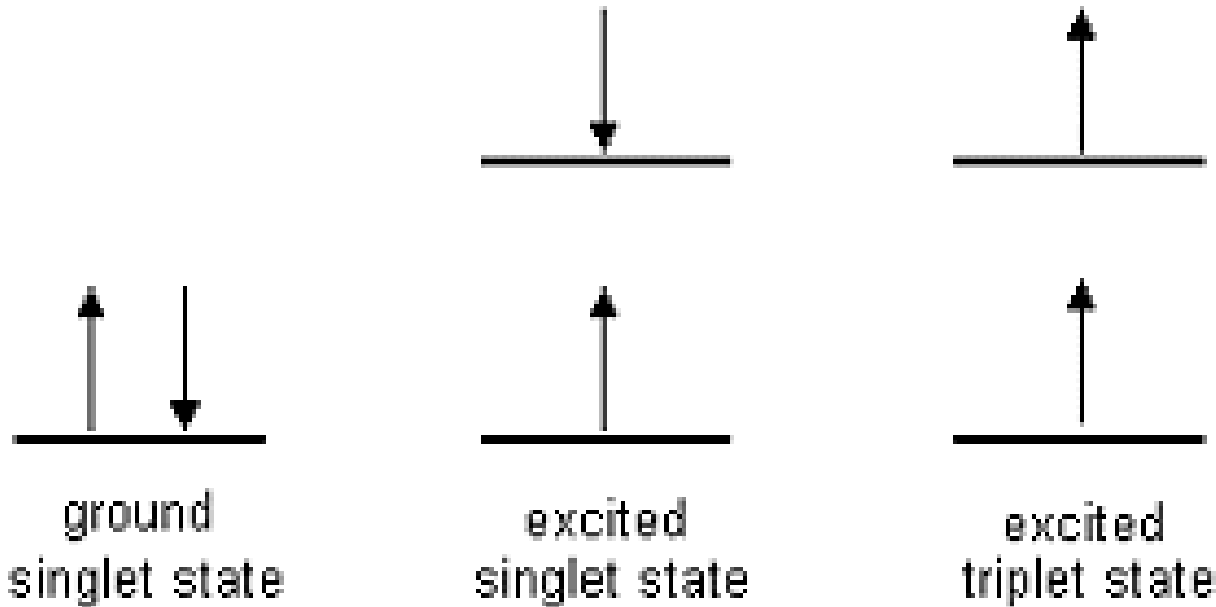
Assorbimento

Rilassamento al più basso livello vibrazionale del primo stato eccitato (S1) (**conversione interna o rilassamento vibrazionale**) (**picosecondo**)

La molecola rimane nello stato eccitato di singoletto (S1) in un periodo dell'ordine dei nanosecondi (il più lungo periodo di tempo nei meccanismi di fluorescenza) per poi passare allo stato fondamentale emettendo un fotone (**fluorescenza**)

Ci sono altri fenomeni che possono accadere dopo l'assorbimento di un fotone

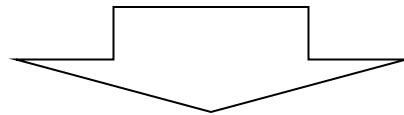
Stato di singoletto e stato di tripletto



Stato di singoletto : Tutti gli spin elettronici nella molecola sono accoppiati
Stato di tripletto: Un set di spin elettronico è disaccoppiato

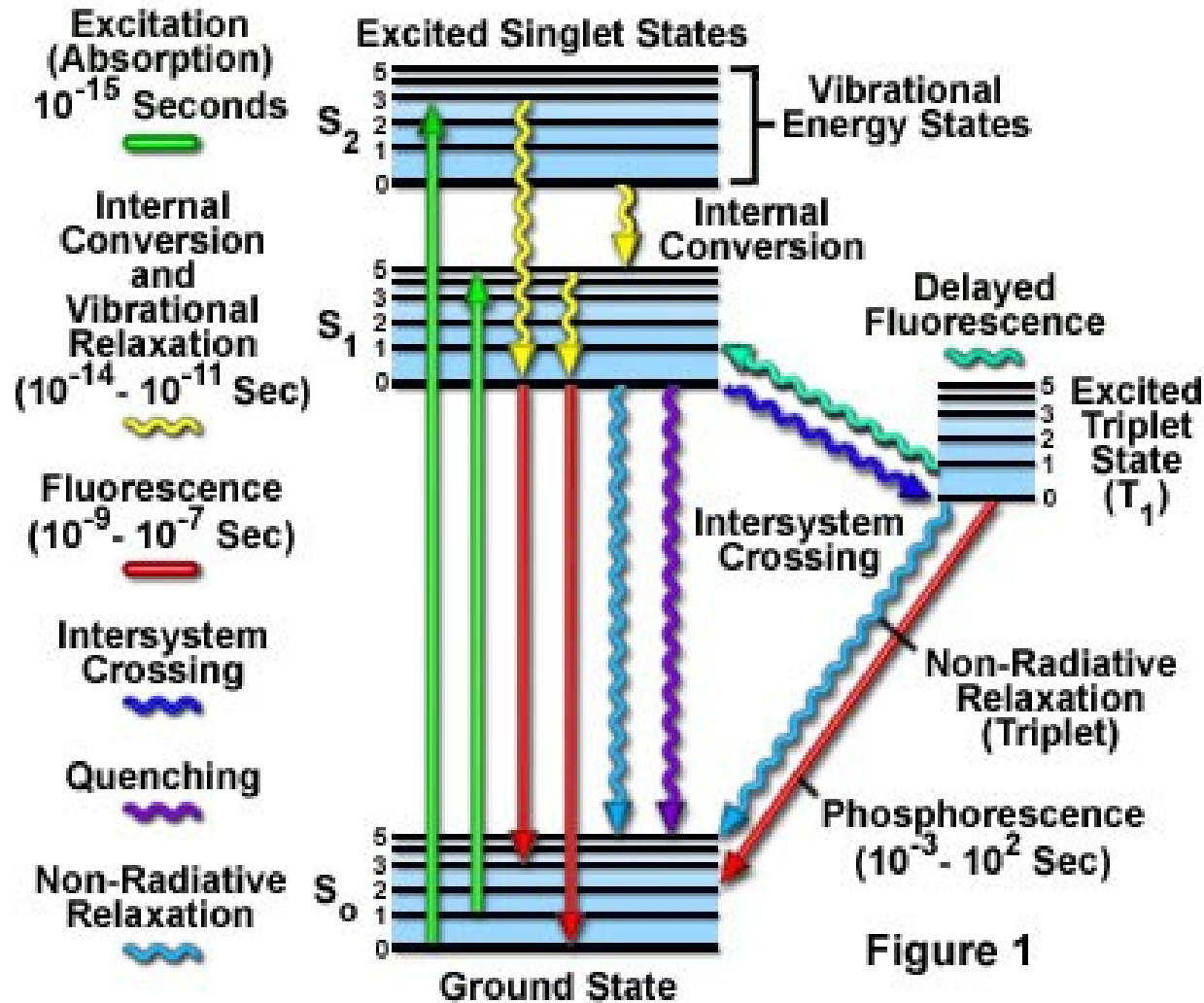
Fenomeni dopo l'assorbimento di un fotone

- L'energia dello stato eccitato può essere dissipata non radiativamente sottoforma di calore
- Il fluoroforo eccitato può collidere con un'altra molecola per trasferire energia in un secondo tipo di processo non radiativo (**quenching**)
- L'energia dello stato eccitato può essere dissipata non radiativamente se lo stato eccitato decade nel più basso stato di tripletto (**intersystem crossing**)



Questo processo è piuttosto raro, poiché gli elettroni devono effettuare una conversione di spin per avere elettroni spaiati.

Jablonski Energy Diagram



Range dei tempi per processi di fluorescenza

Transition	Processo	Costante di rate	Scala dei tempi (Secondi)
$S(0) \Rightarrow S(1)$ or $S(n)$	Assorbimento (Eccitazione)	Istantaneo	10^{-15}
$S(n) \Rightarrow S(1)$	Conversione interna	$k(ic)$	10^{-14} to 10^{-10}
$S(1) \Rightarrow S(1)$	Rilassamento vibrazionale	$k(vr)$	10^{-12} to 10^{-10}
$S(1) \Rightarrow S(0)$	Fluorescenza	$k(f)$ or Γ	10^{-9} to 10^{-7}
$S(1) \Rightarrow T(1)$	Intersystem Crossing	$k(pT)$	10^{-10} to 10^{-8}
$S(1) \Rightarrow S(0)$	Quenching Rilassamento non radiativo	$k(nr)$, $k(q)$	10^{-7} to 10^{-5}
$T(1) \Rightarrow S(0)$	Fosforescenza	$k(p)$	10^{-3} to 100
$T(1) \Rightarrow S(0)$	Quenching Rilassamento non radiativo	$k(nr)$, $k(qT)$	10^{-3} to 100

Resa quantica di fluorescenza

La resa quantica di fluorescenza è definita come il rapporto tra numero di fotoni emessi in fluorescenza (n_g) e numero di molecole eccitate nel campione (n_e), cioè numero di fotoni assorbiti.

$$q = \frac{n_g}{n_e} = \frac{k_F}{k_F + k_{NR}}$$

k_F costante di velocità di decadimento radiativo (emissione di luce di fluorescenza)

k_{NR} somma delle costanti di velocità di tutti i decadimenti non radiativi

Tempo di vita di fluorescenza

Il tempo medio di permanenza in S1 viene detto tempo di vita (τ) e cioè:

$$\tau = \frac{1}{k_F + k_{NR}} \quad \text{se } \tau_R = \frac{1}{k_F} \text{ tempo di vita radiativo}$$

$$q = \frac{\tau}{\tau_R}$$

Il **tempo di vita radiativo** dipende solo dalle funzioni d'onda (probabilità) molecolari di S₀ e S₁ e può essere stimato dagli spettri di assorbimento e fluorescenza.

Quenching

Il fluoroforo eccitato può collidere con un'altra molecola per trasferire energia in un secondo tipo di processo non radiativo (**quenching**)



Le rese quantiche di fluorescenza sono:

$$q_0 = \frac{k_F}{k_F + k_{NR}} \quad q = \frac{k_F}{k_F + k_{NR} + k_Q[Q]}$$

[Q] concentrazione dei quencher

Equazione di Stern-Volmer

$$q_0 = \frac{k_F}{k_F + k_{NR}} \quad q = \frac{k_F}{k_F + k_{NR} + k_Q[Q]}$$

$$\frac{q_0}{q} = \frac{k_F + k_{NR} + k_Q[Q]}{k_F + k_{NR}} = 1 + k_Q\tau_0[Q] = \frac{\tau_0}{\tau}$$

$$\boxed{\frac{q_0}{q} = \frac{\tau_0}{\tau}}$$

τ_0 tempo di vita di M* in assenza di Q

τ tempo di vita di M* in presenza di Q

Trasferimenti di energia tra stati eccitati

Il tipo più semplice di trasferimento energetico è il **trasferimento radiativo**:

I fotoni emessi dalla molecola “donore” sono riassorbiti dalla molecola accettore.
Non c'è nessuna interazione diretta tra la molecola donore ed accettore.

L'assorbimento da parte delle molecole accettrici dipende **dalla concentrazione delle stesse** ed è inversamente proporzionale alla **distanza tra donore ed accettore**.

Trasferimenti di energia tra stati eccitati

Un altro tipo di trasferimento energetico avviene attraverso **l'accoppiamento elettronico delle molecole**

In questo caso la transizione non è radiativa ma avviene per deattivazione dello stato energetico eccitato e implica un riduzione della vita media della fluorescenza.

Anche in questo caso il grado di eccitazione dipende **dalla distanza tra le molecole** ma anche **dalla sovrapposizione spettrale e dalla orientazione dei dipoli di transizione del donore e dell'accettore.**

Trasferimenti di energia tra stati eccitati

A seconda della distanza e della intensità di accoppiamento tra le molecole possiamo distinguere due tipi di meccanismi per il trasferimento tramite accoppiamento elettronico:

1. Trasferimento energetico per risonanza di Förster (FRET) per deboli accoppiamenti
2. Trasferimento energetico di Dexter per accoppiamenti forti e moderati

Il FRET è il risultato di **interazioni dipolo:dipolo** (interazioni coulombiane)

Nel Dexter invece si ha uno **scambio elettronico vero e proprio** e quindi la distanza tra accettore e donore deve essere all'intorno in cui le forze di Van der Waals sono valide (5 Angstroem)

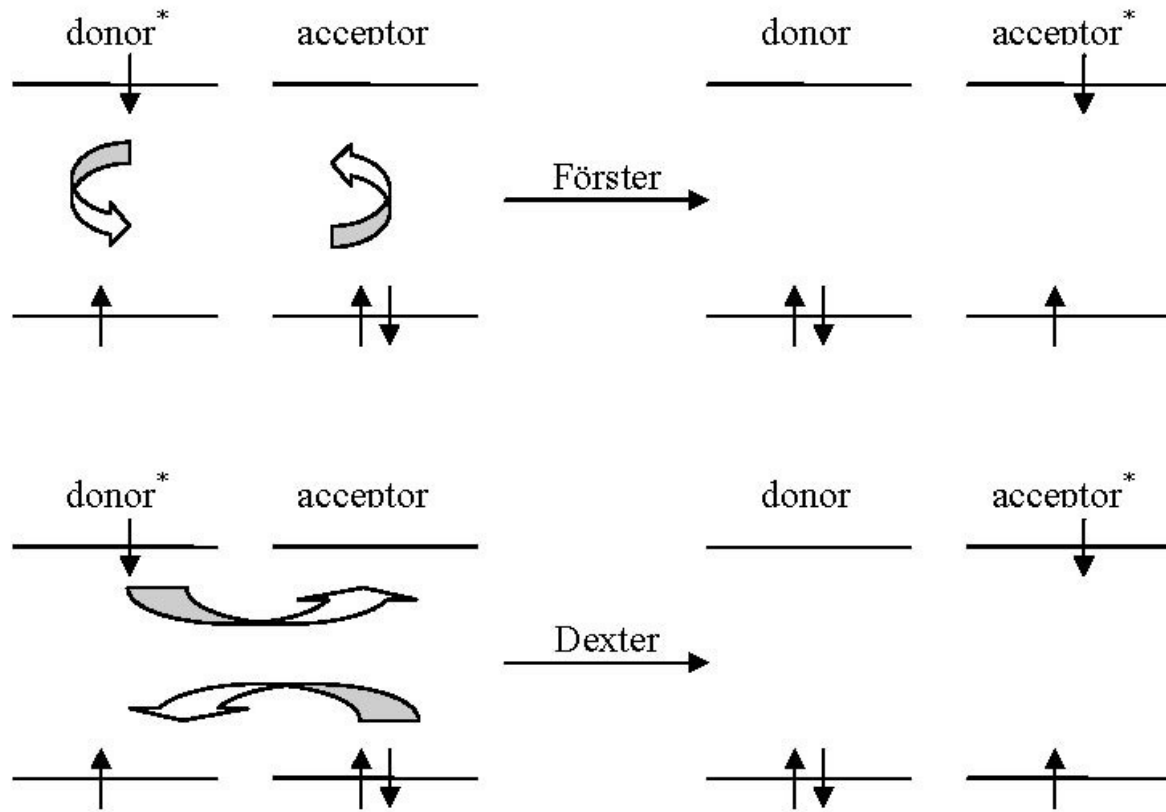
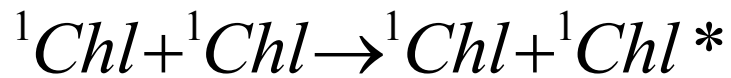
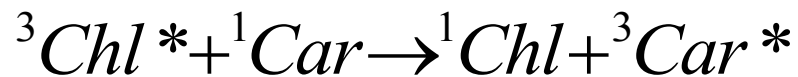
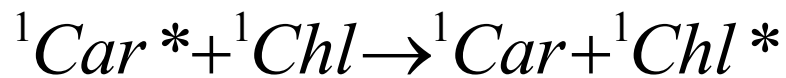


Figure 13 Comparison of Förster and Dexter type excitation energy transfer mechanisms



Singoletto \rightarrow Singoletto (Förster)

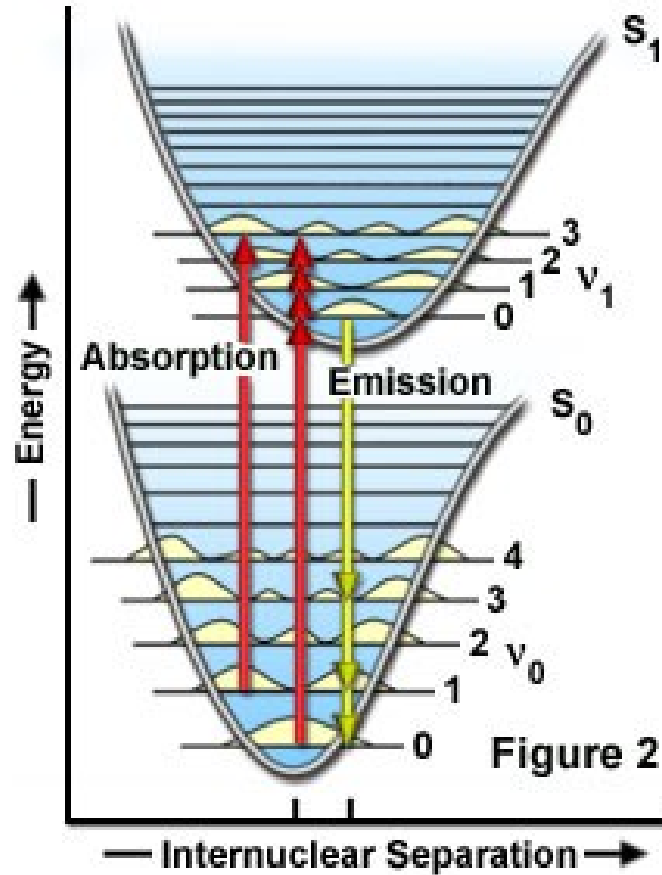


Tripletto \rightarrow Tripletto (Dexter)

Le quattro regole della Fluorescenza

1. **Principio di Franck-Condon:** i nuclei sono stazionari durante le transizioni elettroniche, quindi le eccitazioni sono relative a livelli vibrazionali eccitati dello stato elettronico eccitato
2. **L'emissione** si ha dal livello più basso dello stato vibrazionale dello stato di singoletto eccitato più basso perché il rilassamento dai livelli vibrazionali eccitati è molto più veloce dell'emissione.
3. **Shift di Stokes** : l'emissione ha sempre un'energia più bassa dell'assorbimento a causa del rilassamento nucleare nello stato eccitato
4. **Regola dell' immagine riflessa:** gli spettri di emissione sono immagini riflesse della banda di assorbimento più bassa.

Franck-Condon Energy Diagram



Le transizioni di eccitazione (linee rosse) dallo stato fondamentale allo stato eccitato sono talmente veloci (femtosecondi) che la distanza internucleare associata agli orbitali di legame non ha abbastanza tempo per cambiare, quindi le transizioni sono rappresentate da linee verticali.

Electronic Absorption and Emission Bands

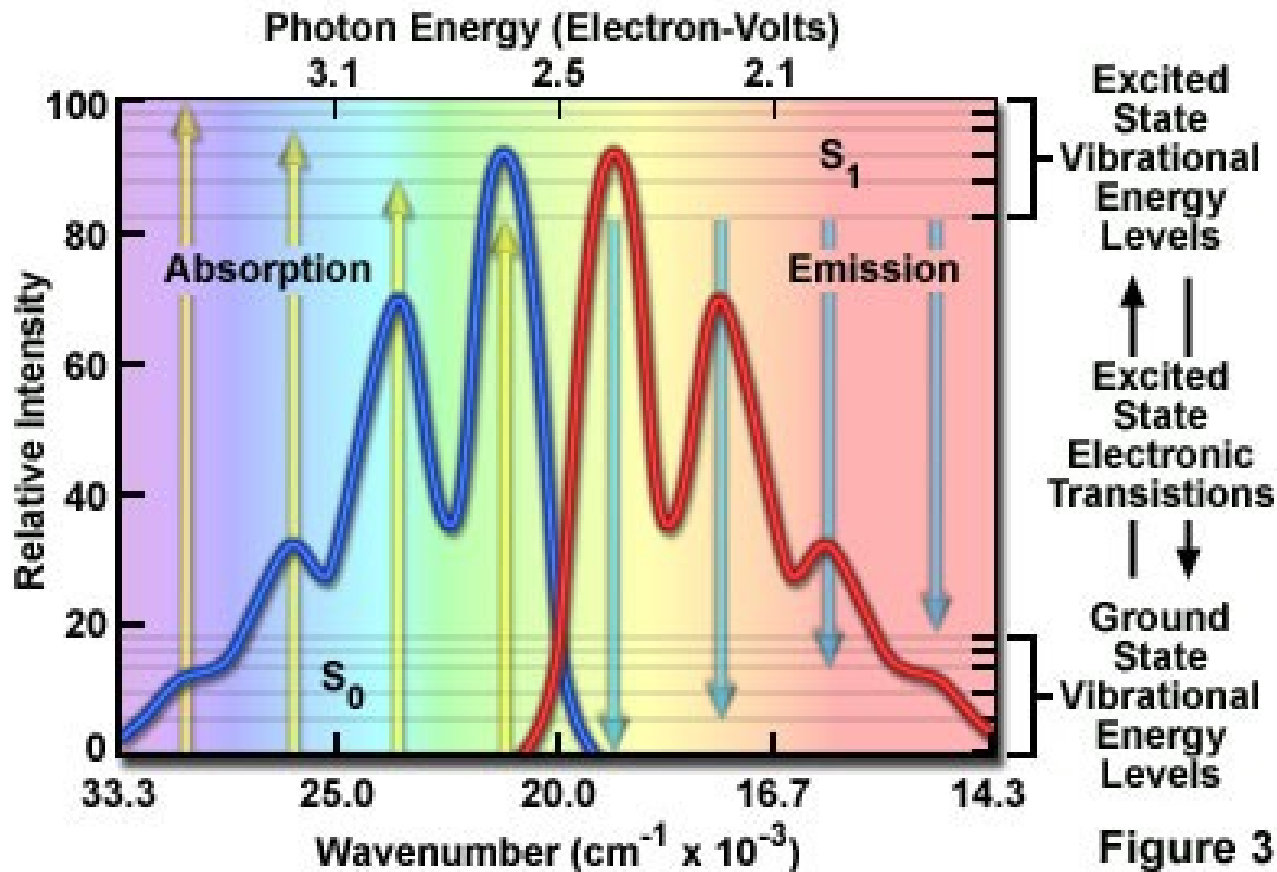
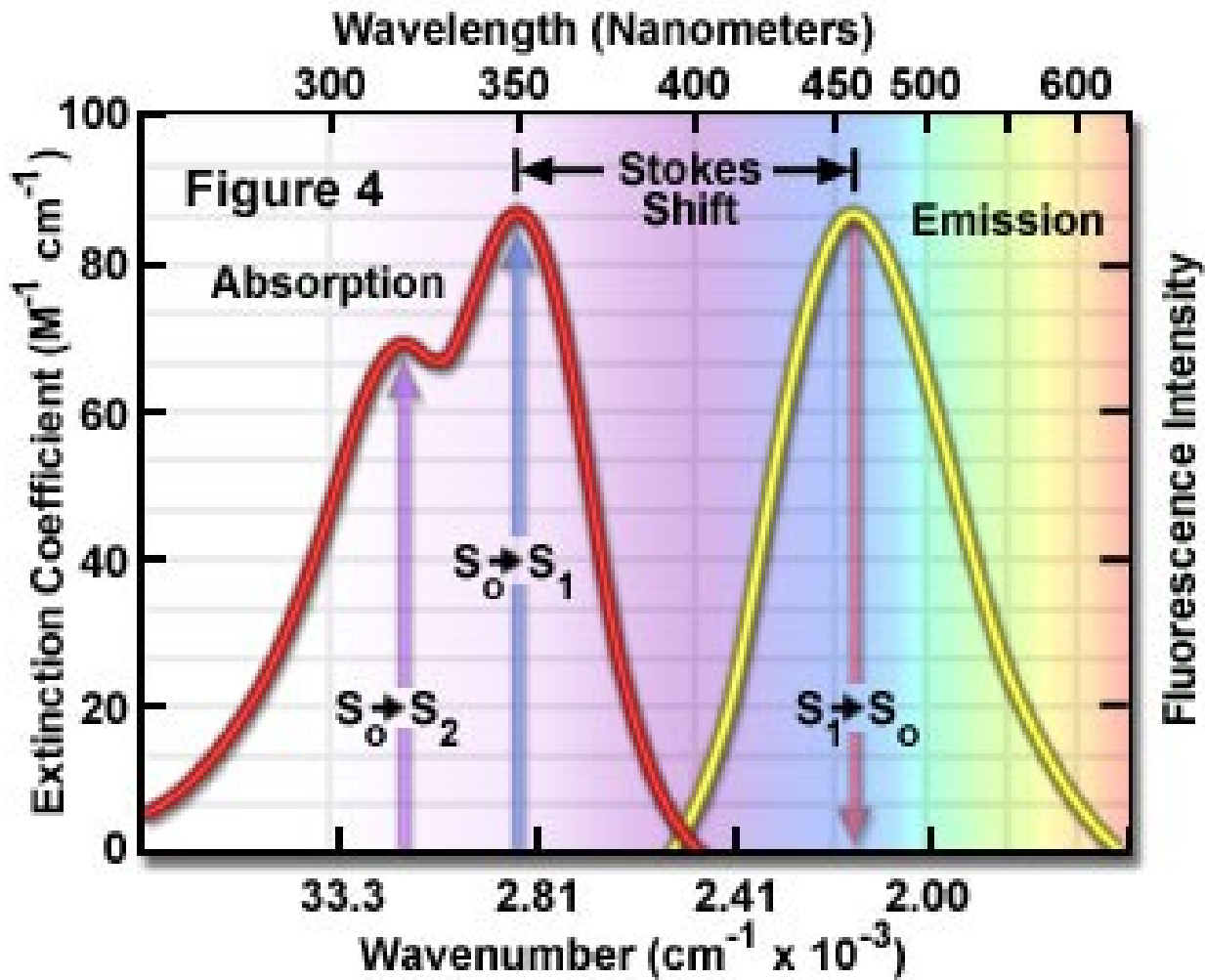


Figure 3

Le transizioni più favorevoli sono quelle in cui le probabilità delle energie rotazionali e vibrazionali dello stato fondamentale e dello stato eccitato si sovrappongono massimamente.

In ogni caso si verificano altri tipi di transizioni che quindi rendono lo spettro continuo

Quinine Absorption and Emission Spectra



Regola dell'immagine riflessa

Spettroscopia di Fluorescenza

- **Statica:** spettro di eccitazione, spettro di emissione, resa quantica, polarizzazione
- **Dinamica:** tempi di vita degli stati eccitati, tempi di correlazione rotazionale (decadimento temporale dell'anisotropia)

Spettro di emissione

Variazione della intensità di fluorescenza letta ad una λ_{em} in funzione della λ_{ecc}

Per molecole isolate in soluzione ed a bassa concentrazione lo spettro di eccitazione è indipendente dalla lunghezza d'onda emessa ed è molto simile allo spettro di assorbimento (rapido rilassamento vibrazionale e conversione interna)

Per molecole in cui subentrano altri meccanismi come quenching, trasferimento di energia, reazioni fotochimiche lo spettro è invece dipendente da λ_{em} ed è molto diverso dallo spettro di assorbimento.

Batocromismo

Spostamento verso il rosso dello spettro di fluorescenza in ambienti polari (con lieve diminuzione della resa quantica)

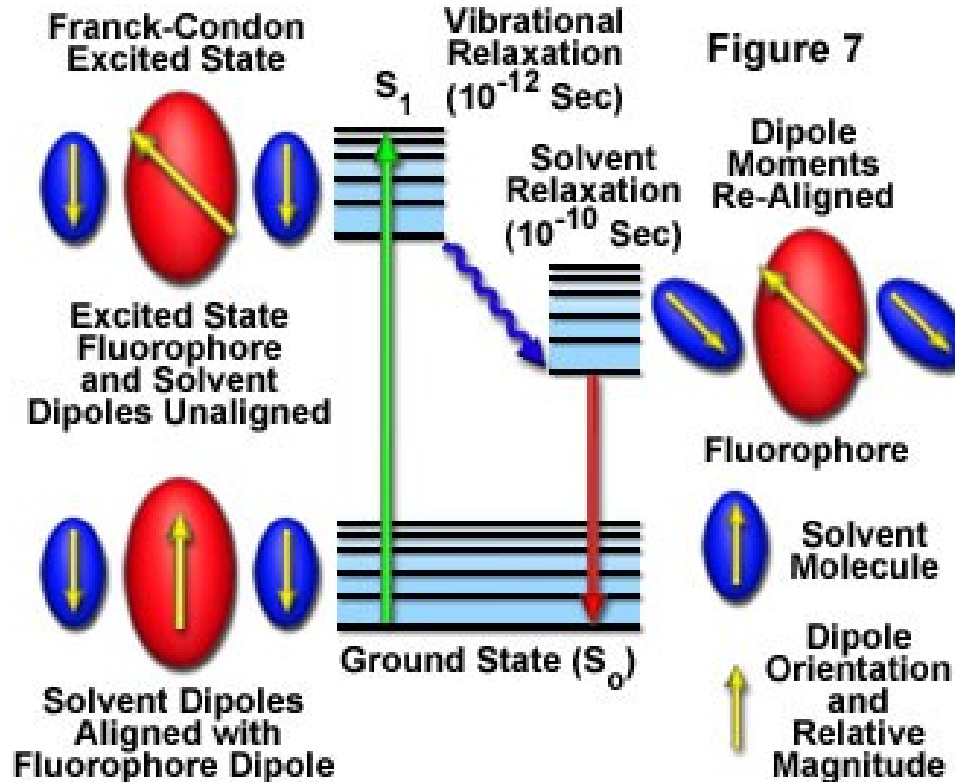
Sonde fluorescenti sono state studiate appositamente per caratterizzare la polarità dei loro siti.

Per esempio:

L'8-anilino 1-naftalene sulfonato (ANS) presenta una fluorescenza attorno ai 450nm nell'eme della apomioglobina e ha una fluorescenza attorno ai 515 nm in acqua.

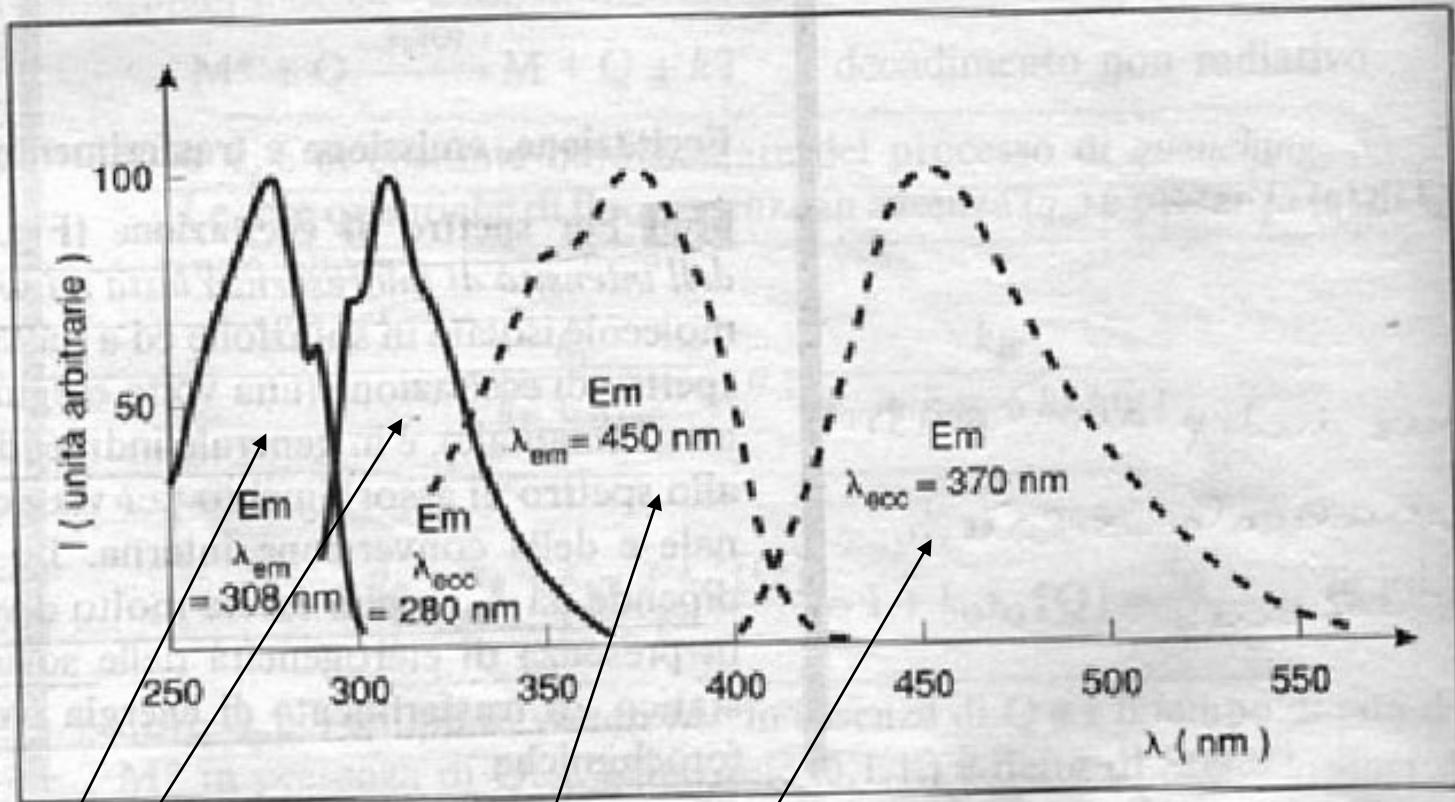
Effetto del solvente

Fluorophore-Solvent Excited State Interactions



Differenze nelle energie tra lo stato fondamentale e lo stato eccitato nel fluoroforo danno luogo a momenti di dipolo che riorientano le molecole del solvente stesso attorno al fluoroforo.

Il decadimento vibrazionale avviene nel fluoroforo molto più velocemente che nel solvente (dove si deve riorientare il dipolo)



Proteina azzurrina
(contiene un solo triptofano)

ANS in eme dell'apomioglobina

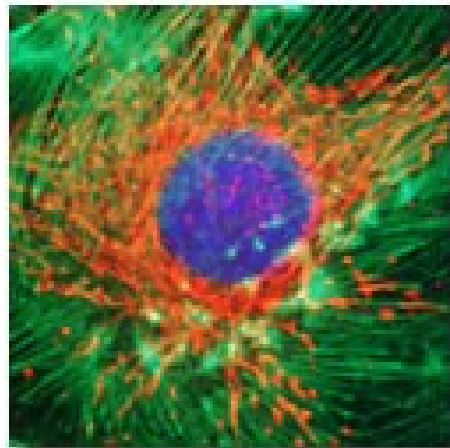
Photobleaching

A differenza del quenching, il photo bleaching accade quando un fluoroforo perde permanentemente la capacità di fluorescere a causa di danneggiamenti chimici indotti dai fotoni e modificazioni di legami covalenti.

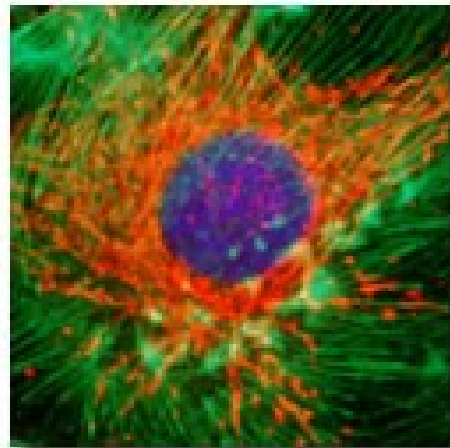
Da una transizione di un singoletto eccitato ad un tripletto eccitato, essendo quest' ultimo uno stato con una vita media alta, la molecola rimane in uno stato di maggiore energia per un tempo sufficiente a reagire con l'ambiente.

Chiaramente il photobleaching è dipendente dalla struttura molecolare e dall'ambiente locale.

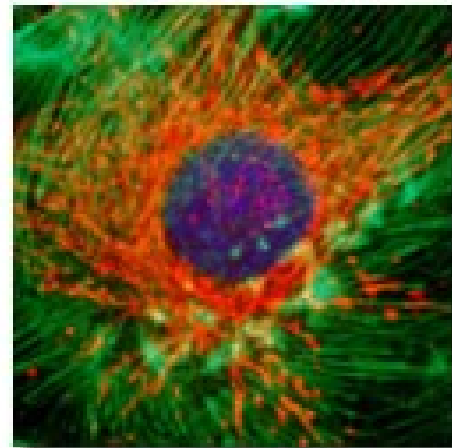
Differential Photobleaching in Multiply-Stained Cell Cultures



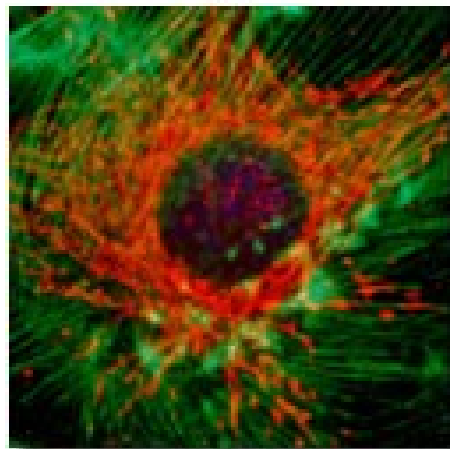
(a)



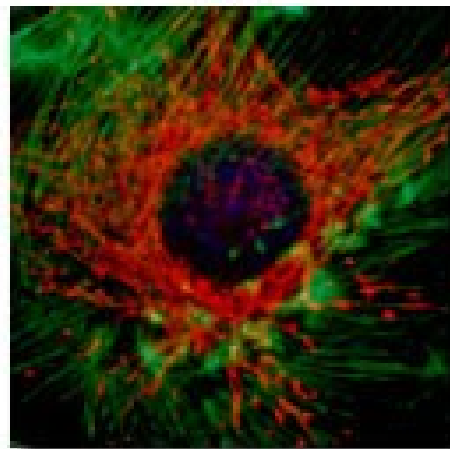
(b)



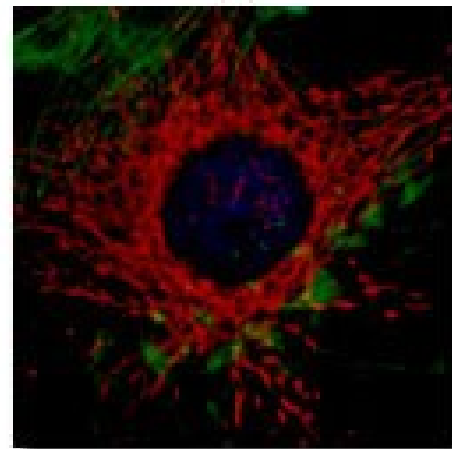
(c)



(d)



(e)



(f)

Figure 6

Spettroscopia risolta in tempo

I parametri che si misurano nella spettroscopia di fluorescenza statica (intensità, spettri, polarizzazione) rappresentano la media delle caratteristiche di emissione di tutti i tipi di fluorofori presenti nel campione.

Se quindi diversi fluorofori hanno degli spettri che si sovrappongono anche parzialmente si vede una media del segnale e vengono perse delle informazioni importanti su transizioni energetiche.

Se però le transizioni vengono risolte nel tempo e cioè si differenziano le varie transizioni a tempi diversi si riescono a risolvere i diversi spettri.

Tempo di vita di fluorescenza

Il **tempo di vita di fluorescenza** corrisponde al tempo in cui la molecola rimane nello stato eccitato prima che ritorni allo stato fondamentale.

Per un decadimento del primo ordine il numero di molecole che perdono un quanto di energia nel tempo dt è proporzionale al numero di molecole N nello stato eccitato, cioè :

$$-\frac{dN(t)}{dt} = N(t)k$$

k costante di proporzionalità

$$\text{integrando : } \int_{N(0)}^N \frac{dN(t)}{N(t)} = \int_0^t -k dt$$

$$\ln N(t) - \ln N(0) = \ln \frac{N(t)}{N(0)} = -kt$$

$$N(t) = N(0)e^{-kt}$$

Tempo di vita di fluorescenza

Il decadimento della intensità di fluorescenza in funzione del tempo in una popolazione uniforme di molecole eccitate con un impulso laser è descritto da una funzione esponenziale:

$$I(t) = I_0 e^{-\frac{t}{\tau}}$$

Da questa equazione si può dire che τ è il tempo in cui l'intensità di fluorescenza decade a 1/e della fluorescenza iniziale e cioè a circa il 37%

Fluorescence Lifetime Decay Profiles

Monoexponential

Multiexponential

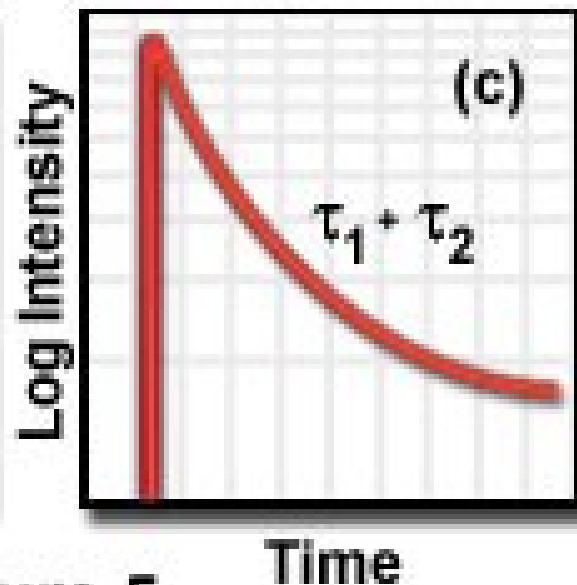
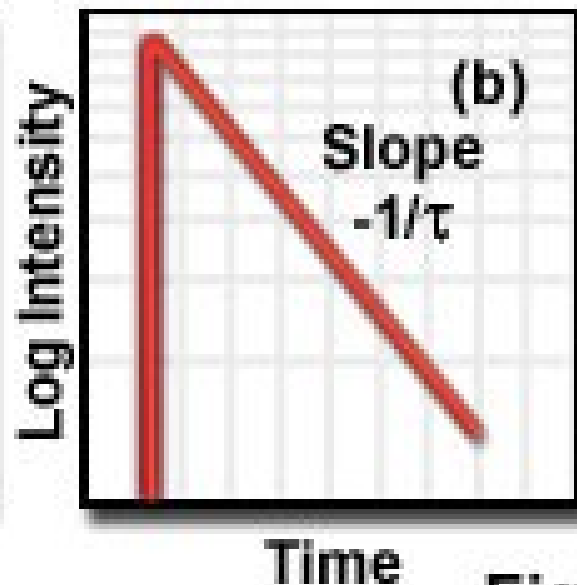
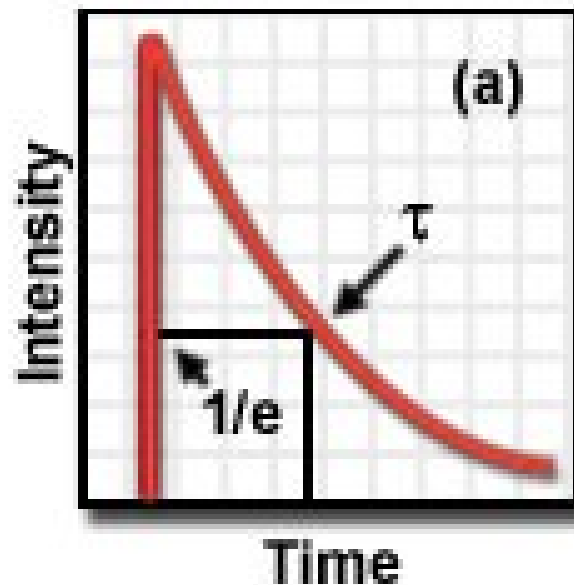


Figure 5

Anisotropia di fluorescenza

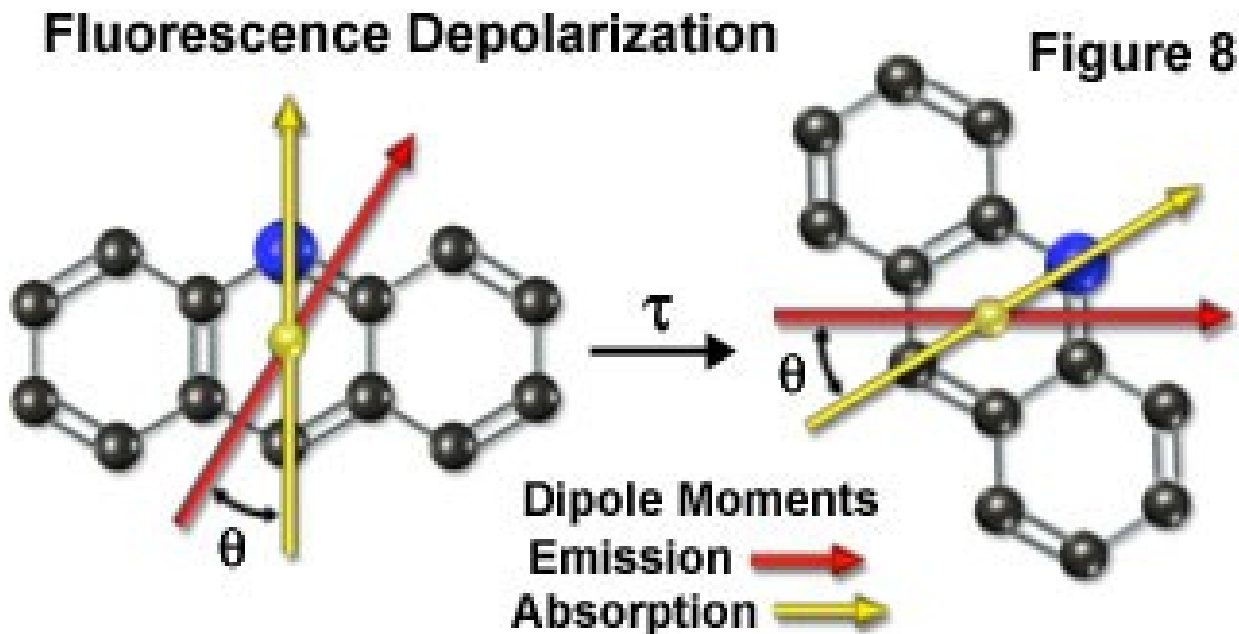
L'emissione di fluorescenza è polarizzata se i fluorofori sono eccitati con luce polarizzata piana.

Il livello di emissione polarizzata è dipendente dalla anisotropia del campione, campioni con un certo grado di anisotropia hanno anche un certo livello di emissione polarizzata.

Infatti l'interazione avviene tra il campo elettrico e la transizione di dipolo creato dallo stato elettronico dagli orbitali molecolari del fluoroforo.

I fluorofori assorbono preferibilmente i fotoni che hanno un vettore del campo elettrico parallelo al momento di dipolo della transizione di assorbimento.

Anisotropia di fluorescenza



La probabilità di assorbimento è proporzionale al quadrato del coseno dell'angolo tra il dipolo ed il vettore del campo elettrico della radiazione incidente.

Anisotropia di fluorescenza

Quindi c'è una specifica fotoselezione della sotto-popolazione dei fluorofori eccitati, risultante negli stati eccitati dei fluorofori orientati verso uno specifico asse.

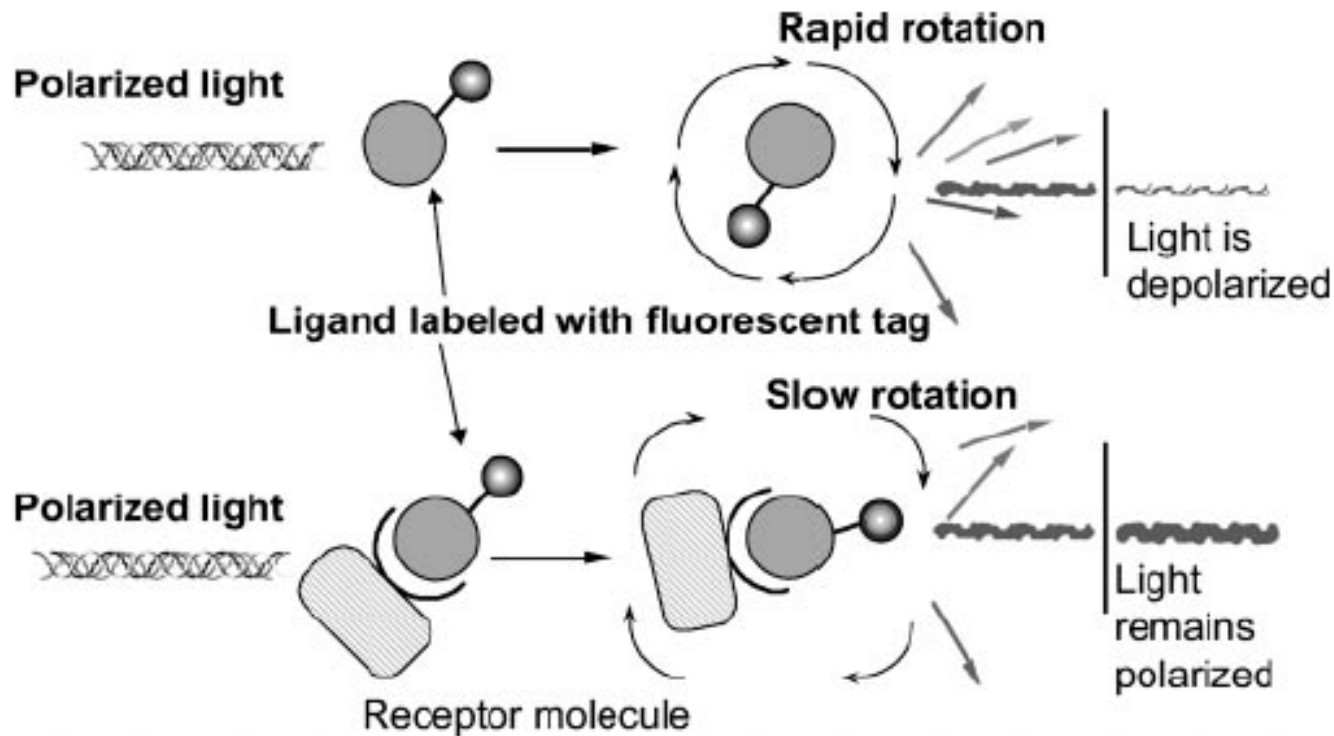
La radiazione di fluorescenza da questa sottopopolazione sarà anch'essa parzialmente polarizzata.

$$A = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}}$$

I_{\parallel} emissione di fluorescenza misurata sul piano parallelo al piano di eccitazione

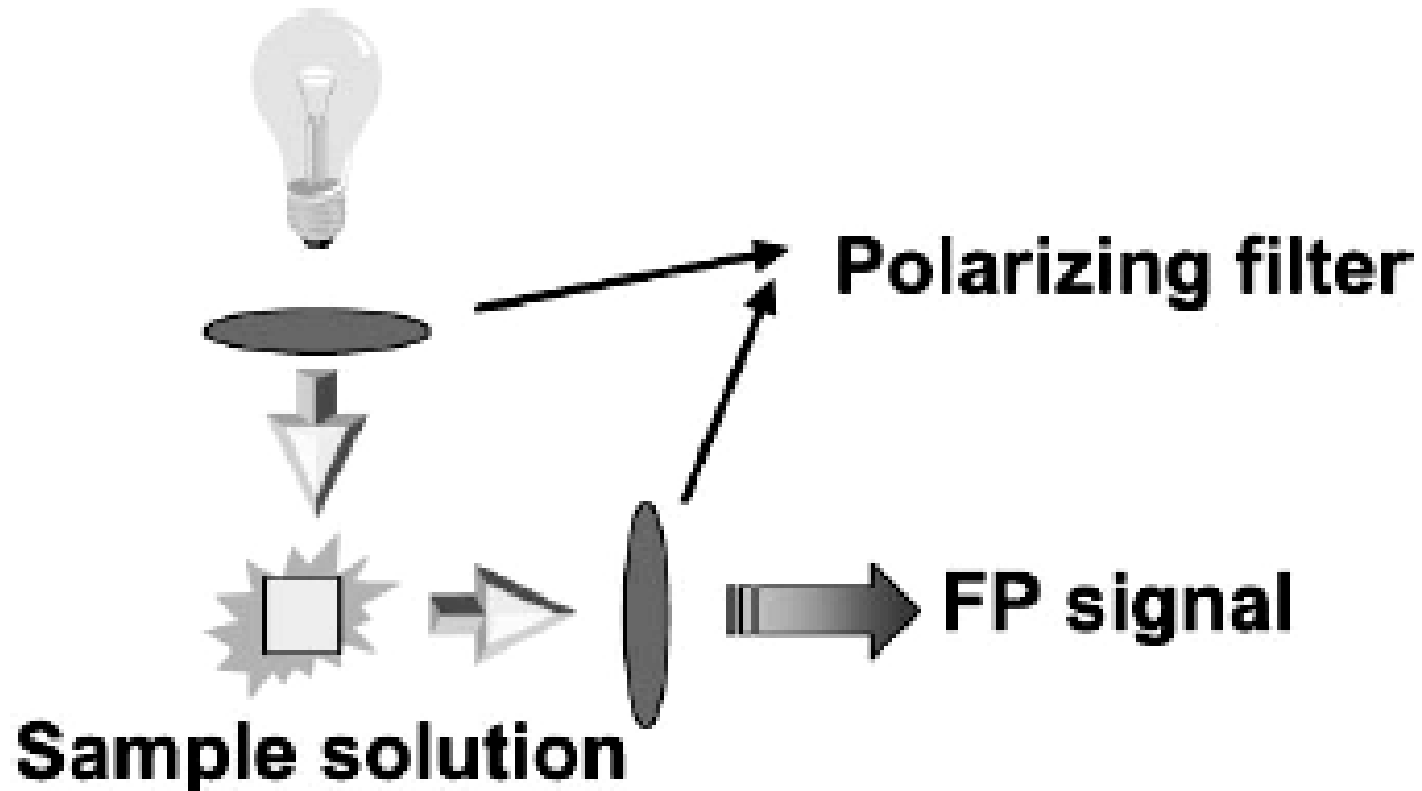
I_{\perp} emissione di fluorescenza misurata sul piano perpendicolare al piano di eccitazione

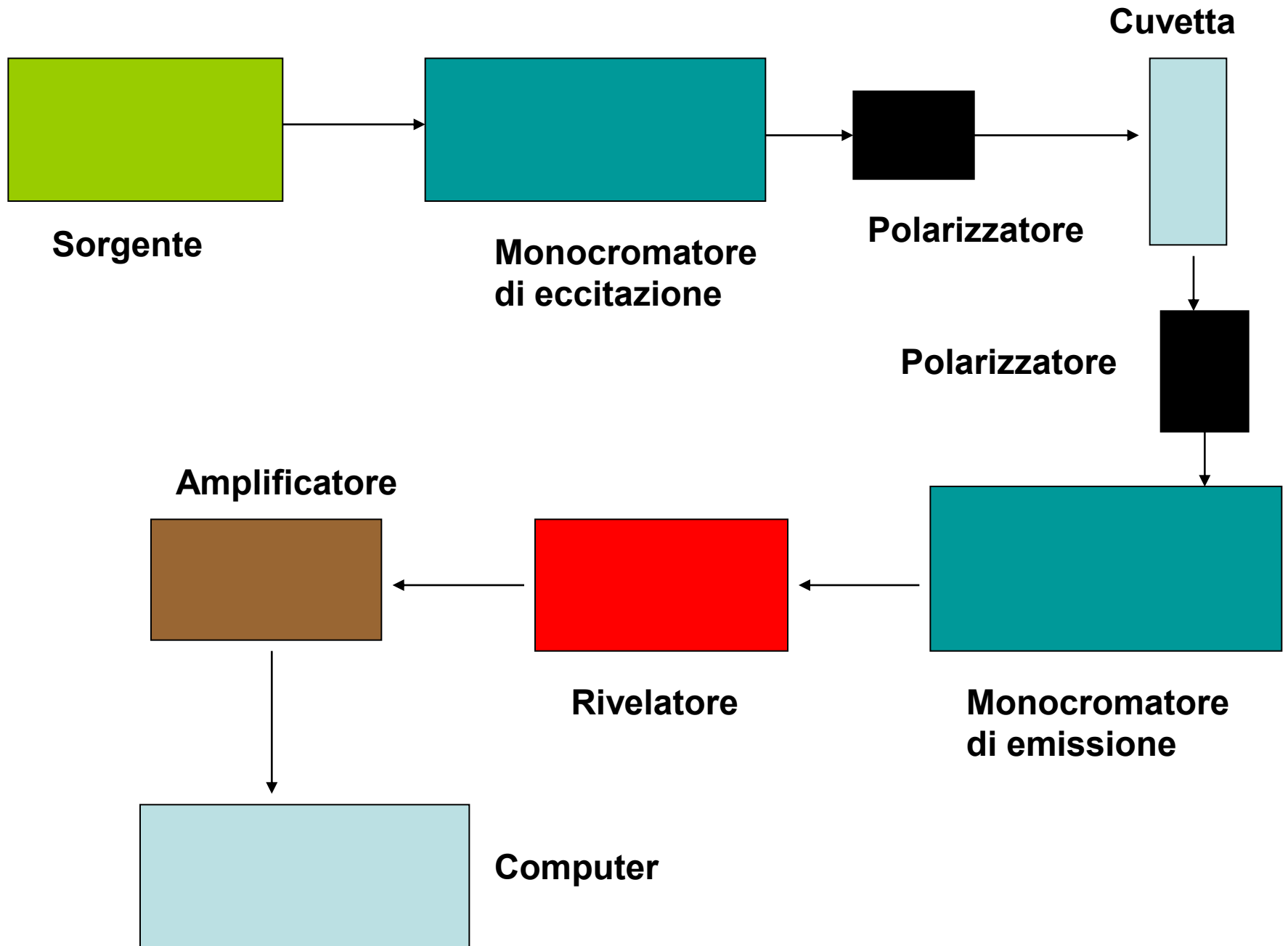
Polarizzazione di fluorescenza



L'emissione è polarizzata se la rotazione molecolare è lenta relativamente al tempo di vita di fluorescenza

Strumentazione per la polarizzazione di fluorescenza





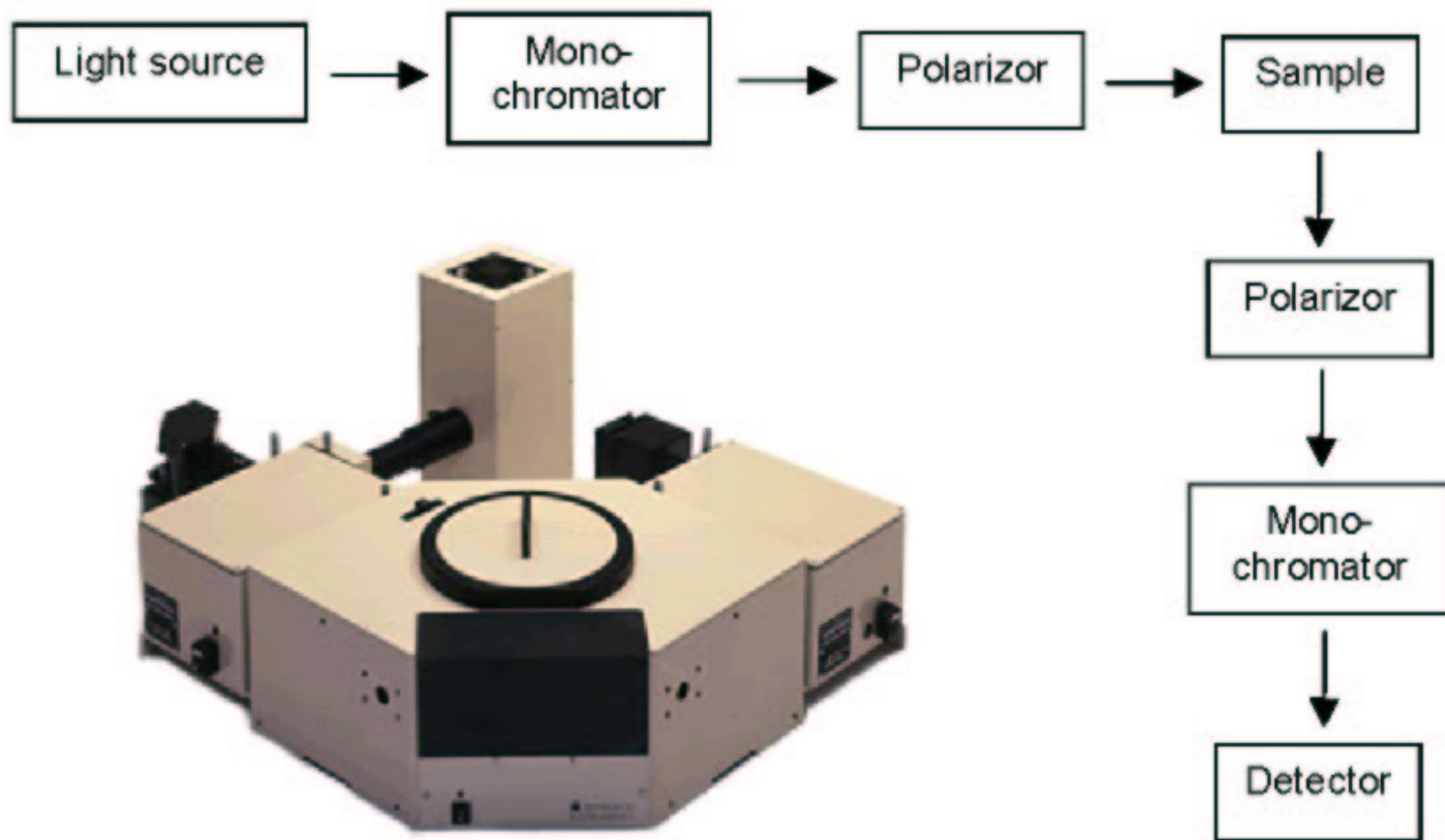
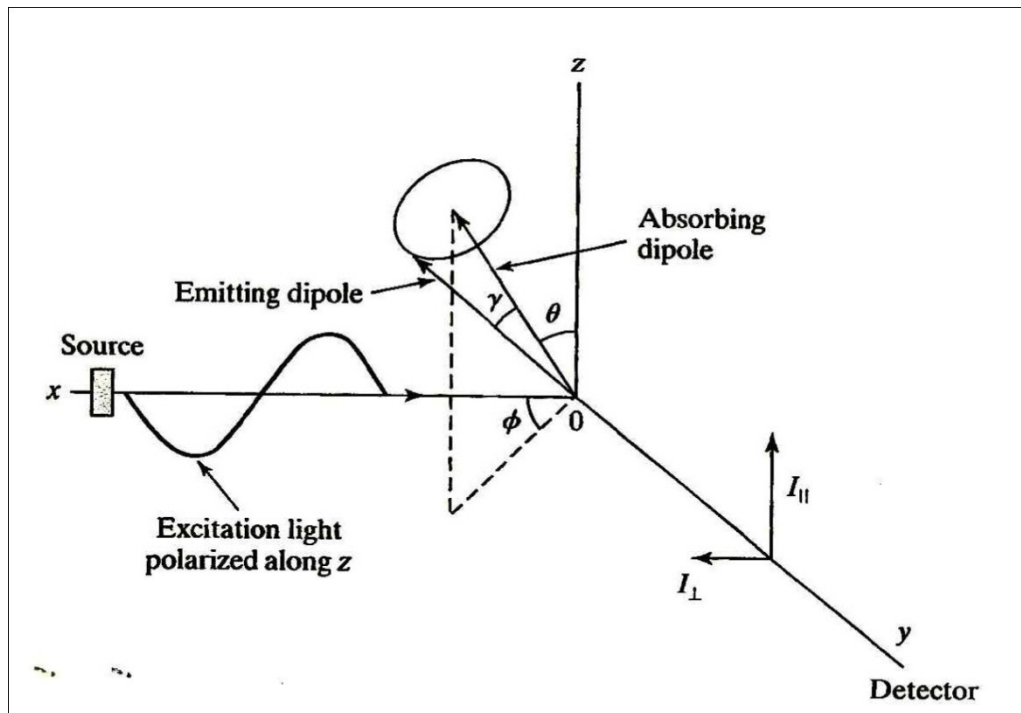


Figure 1-7. The FLS920 fluorescence spectrometer and a principal sketch.

Misure di polarizzazione

Le misure di polarizzazione sono eseguite inserendo due polarizzatori uno nel percorso ottico di eccitazione ed uno in quello di emissione.

Si misurano le intensità di fluorescenza con il polarizzatore di emissione orientato parallelamente I_{\parallel} e perpendicolarmente I_{\perp} al polarizzatore di eccitazione, e viene valutato il grado di polarizzazione, P .



Polarizzazione di un sistema rigido

In una soluzione in cui le molecole siano orientate casualmente ma immobilizzate, il valore di P è detto polarizzazione intrinseca P_0 . Il valore corrispondente per r è l'anisotropia intrinseca, r_0 .

$$P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}}$$

Grado di polarizzazione

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}}$$

Anisotropia R

Polarizzazione di un sistema rigido

In una soluzione in cui le molecole siano orientate casualmente ma immobilizzate, il valore di P è detto **polarizzazione intrinseca P_0** .

Il valore corrispondente per r è **l'anisotropia intrinseca, r_0** .

Campione con orientazione casuale

In un campione con orientazione casuale, la dipendenza dell'intensità assorbita da $\cos^2\theta$ comporta l'eccitazione di un rilevante numero di molecole che non hanno dipoli di transizione orientati esattamente secondo il piano di polarizzazione.

Quando queste molecole non allineate emettono, avranno componenti di luce polarizzata sia parallela che perpendicolare. Se si considera la media su tutti i possibili valori di θ , tenendo conto della dipendenza da θ del numero di molecole in un campione disordinato, risulta che il massimo valore possibile per P_0 è 0.5.

Campione con orientazione casuale e ordinata

Questo è quello che si osserva in una soluzione rigida, disordinata, in cui i momenti di dipolo di transizione per l'assorbimento e l'emissione del fluoroforo sono paralleli.

Questa è la situazione normale quando l'eccitazione porta al primo singoletto eccitato, da cui si ha anche l'emissione.

La **polarizzazione intrinseca sarebbe 1** se il campione fosse ordinato e immobile, con tutti i momenti di assorbimento, e di emissione, paralleli alla direzione di polarizzazione della radiazione eccitatrice.

Il valore misurato del grado di polarizzazione (o dell'anisotropia) dipende, oltre che dal grado di ordine del campione, e dalla sua maggiore o minore mobilità, dall'orientazione del momento di dipolo di transizione per l'emissione rispetto a quello di assorbimento

•Campione con orientazione

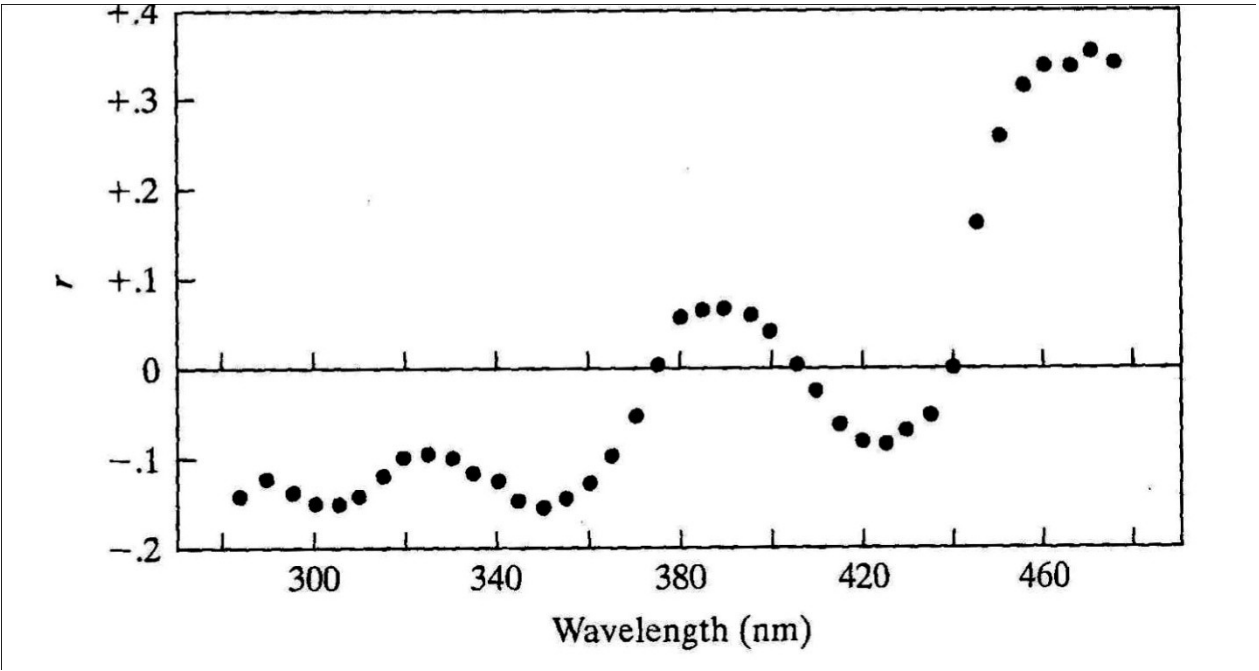
Quando i dipoli di assorbimento ed emissione non sono paralleli, P_0 è minore di 0.5, anche in una soluzione rigida, e al limite opposto (dipoli perpendicolari), $P_0 = -0.3$.

Precisamente, la dipendenza dall'angolo è:

$$P_0 = \frac{3 \cos^2 \gamma - 1}{\cos^2 \gamma + 3}$$

Analogamente, anche l'anisotropia intrinseca varia da un max di $r_0 = 2/5 = 0.4$ (dipoli di assorbimento e di emissione paralleli) ad un minimo di $r_0 = -1/5 = -0.2$ (dipoli perpendicolari).

Anisotropia osservata per la fluorescenza del colorante rodamina al variare della lunghezza d'onda di eccitazione. Si possono osservare 5 transizioni a 5 diversi stati di singoletto eccitato.



La transizione ad S1 (470 nm) comporta un'anisotropia di circa +0.4, come atteso dal momento che dipoli di assorbimento (S0-> S1) e di emissione (S1->S0) sono paralleli.

•Le transizioni ad energia maggiore (S0->S5, 300 nm e S0-> S4 , 350 nm) portano ad un'anisotropia di -0.16, indicando che i dipoli di assorbimento e di emissione sono circa perpendicolari.

Dai valori di anisotropia che si osservano per eccitazione agli altri 2 singoletti (S3, 390 nm e S2, 420 nm) si possono ricavare gli angoli tra i corrispondenti dipoli:

~ 47° ($r_0 \sim +0.08$) e ~ 66° ($r_0 \sim -0.1$), rispettivamente.

Depolarizzazione della Fluorescenza

L'effetto della fotoselezione viene perso se, nel tempo tra l'assorbimento e l'emissione, le molecole ruotano (si tratta di rotazione caotica, "tumbling").

Si avrà depolarizzazione (P ed r tendono a zero) tanto maggiore quanto più veloci sono i moti di "tumbling" molecolare rispetto al tempo di vita di fluorescenza.

Relazione di Perrin

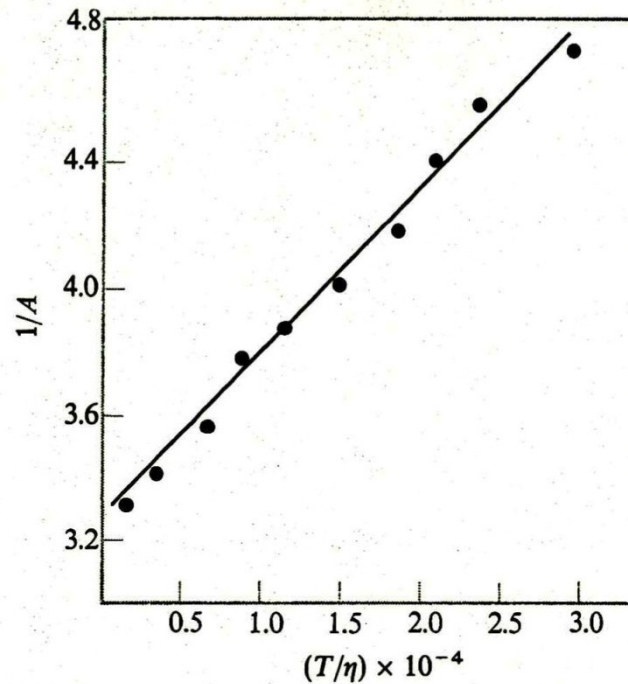
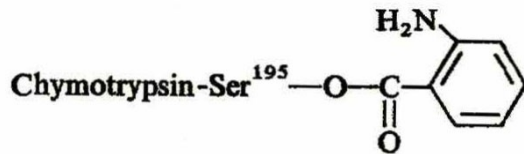
La relazione tra r e r_0 , in stato stazionario (illuminazione costante), (relazione di Perrin), nell'ipotesi che il moto rotazionale delle molecole sia isotropo (le molecole abbiano una forma approssimativamente sferica) è

$$\frac{1}{r} = \frac{1}{r_0} \left(1 + \frac{\tau_f}{\tau_r} \right)$$

τ_f è il tempo di vita della fluorescenza

τ_r , tempo di correlazione rotazionale

è una misura del tempo impiegato dalle molecole, nel loro moto disordinato e impedito dalla presenza delle altre molecole e del solvente (moto Browniano, o diffusivo, rotazionale), a compiere mediamente una rotazione di 1 radiante



Andamento lineare dell'inverso dell'anisotropia di fluorescenza del gruppo antraniloil legato covalentemente a Ser195 della chimotripsina, a 20°C.

La variazione del tempo di correlazione è stata ottenuta variando la viscosità della soluzione mediante aggiunte di glicerina.

Il moto rotazionale si riferisce qui al moto di tutto il complesso, ed è relativamente lento proprio perché il fluoroforo è legato alla proteina.

L'eccitazione con luce linearmente polarizzata fornisce quindi un mezzo per studiare la dinamica della struttura proteica.

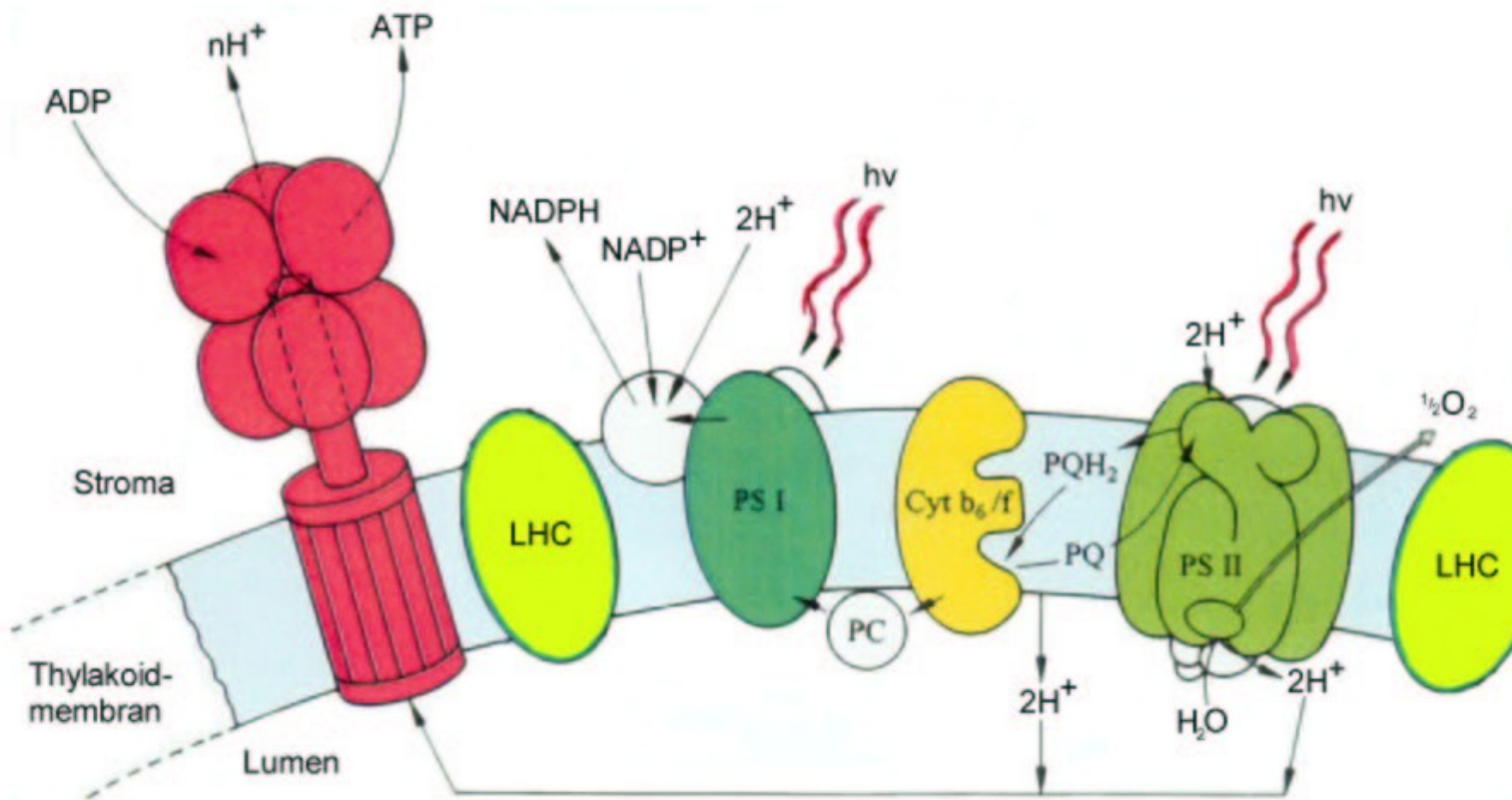


Figure 4 Thylakoid membrane of a higher plant chloroplast with protein complexes involved in linear electron transport and photo-phosphorylation.

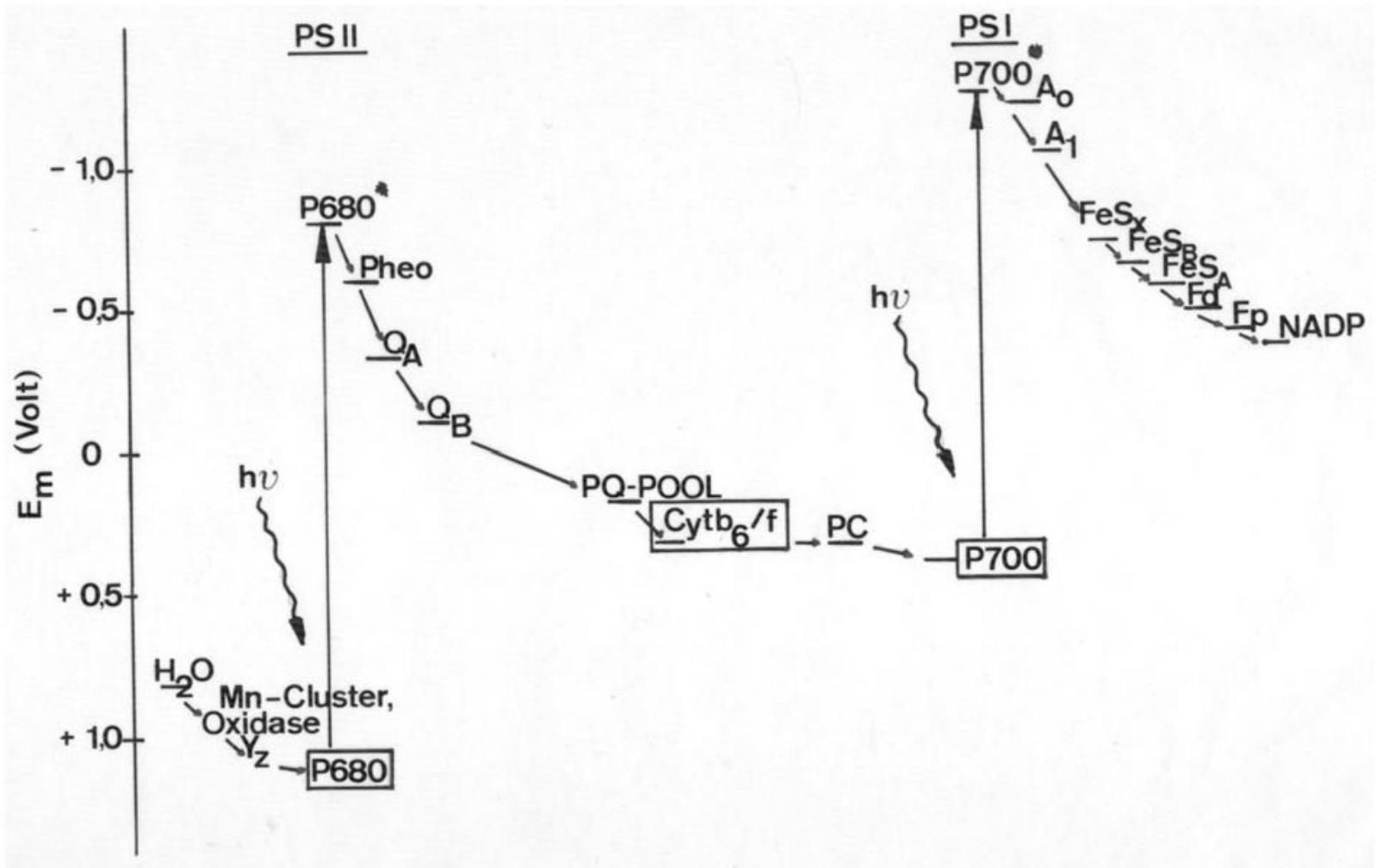


Figure 11 Z-scheme

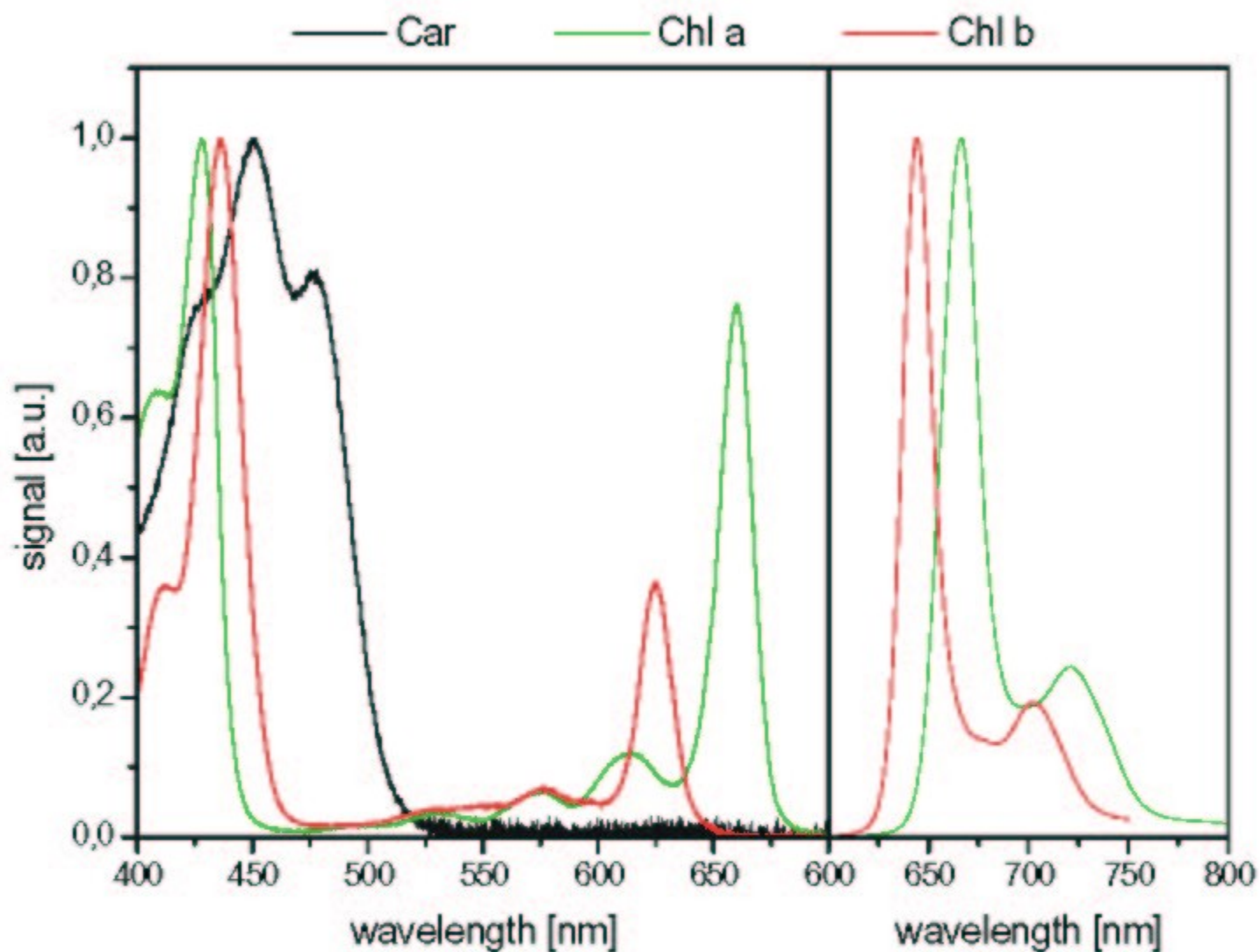


Figure 6 Absorption (left panel) and fluorescence (right panel) spectra of Chl a, Chl b and β -carotene (absorption only) in ether.

Protezione dalla fotodistruzione dei carotenoidi

L'energia assorbita dai carotenoidi è trasferita alla clorofilla via transizioni singoletto-singoletto

La funzione più importante è comunque quella di protezione dalla fotodistruzione: L'effetto è originato dalla generazione di stati di tripletto della clorofilla per intersystem crossing sulla clorofilla stessa.

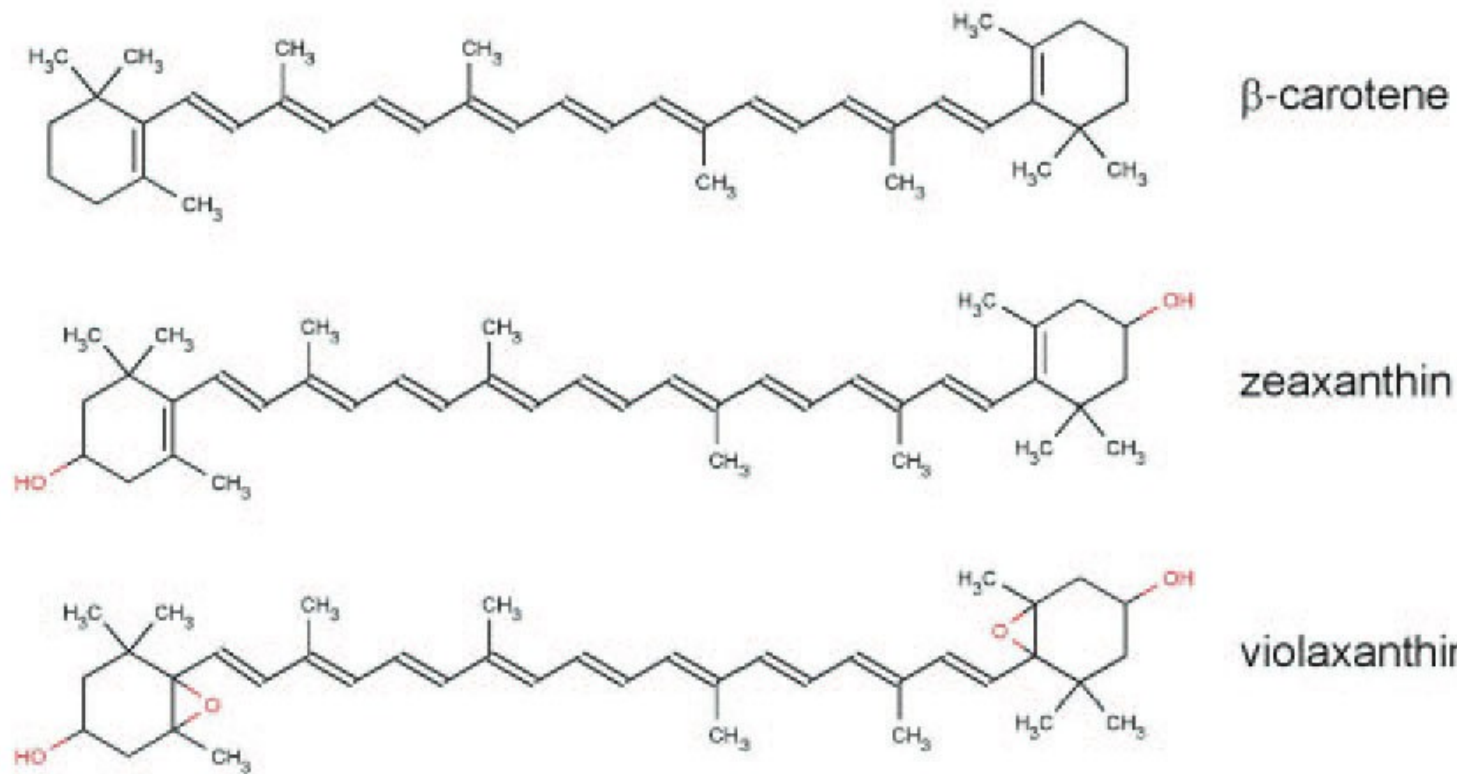
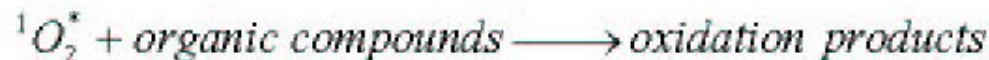


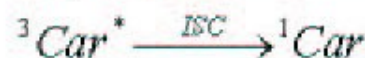
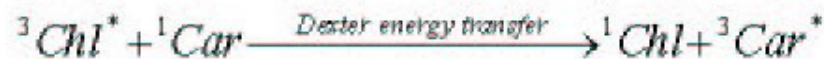
Figure 7 Structure of β-carotene and its oxygenated derivatives zeaxanthin and violaxanthin

Chlorophyll triplet states react with the triplet ground state of molecular oxygen thus generating highly reactive singlet oxygen. Carotenoids prevent these destructive reactions by deactivating triplet chlorophyll as well as singlet oxygen. The reactions involved in photo-destruction and protection can be summarised as follows:

- Generation of singlet oxygen and destructive reactions:

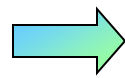


- Protection against singlet oxygen and triplet chlorophyll:



Spettrofotometro di Joliot

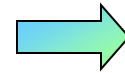
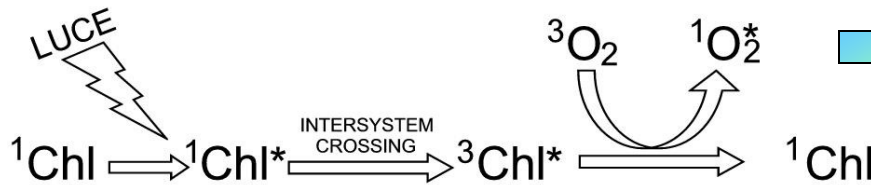
LUCE



necessaria al processo fotosintetico



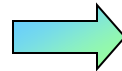
è capace di incrementare la produzione di specie tossiche



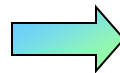
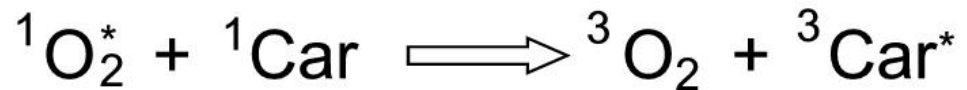
**Ossidazione di lipidi,
proteine e pigmenti**

Le piante superiori hanno evoluto diversi meccanismi che garantiscono la dissipazione dell'energia di eccitazione in eccesso:

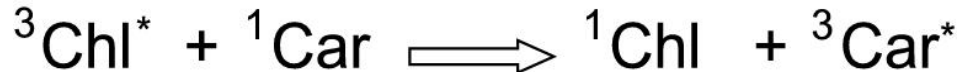
**ruolo dei carotenoidi
(xantofille) legati alle
proteine Lhc**



scavenging di $^1\text{O}_2^*$

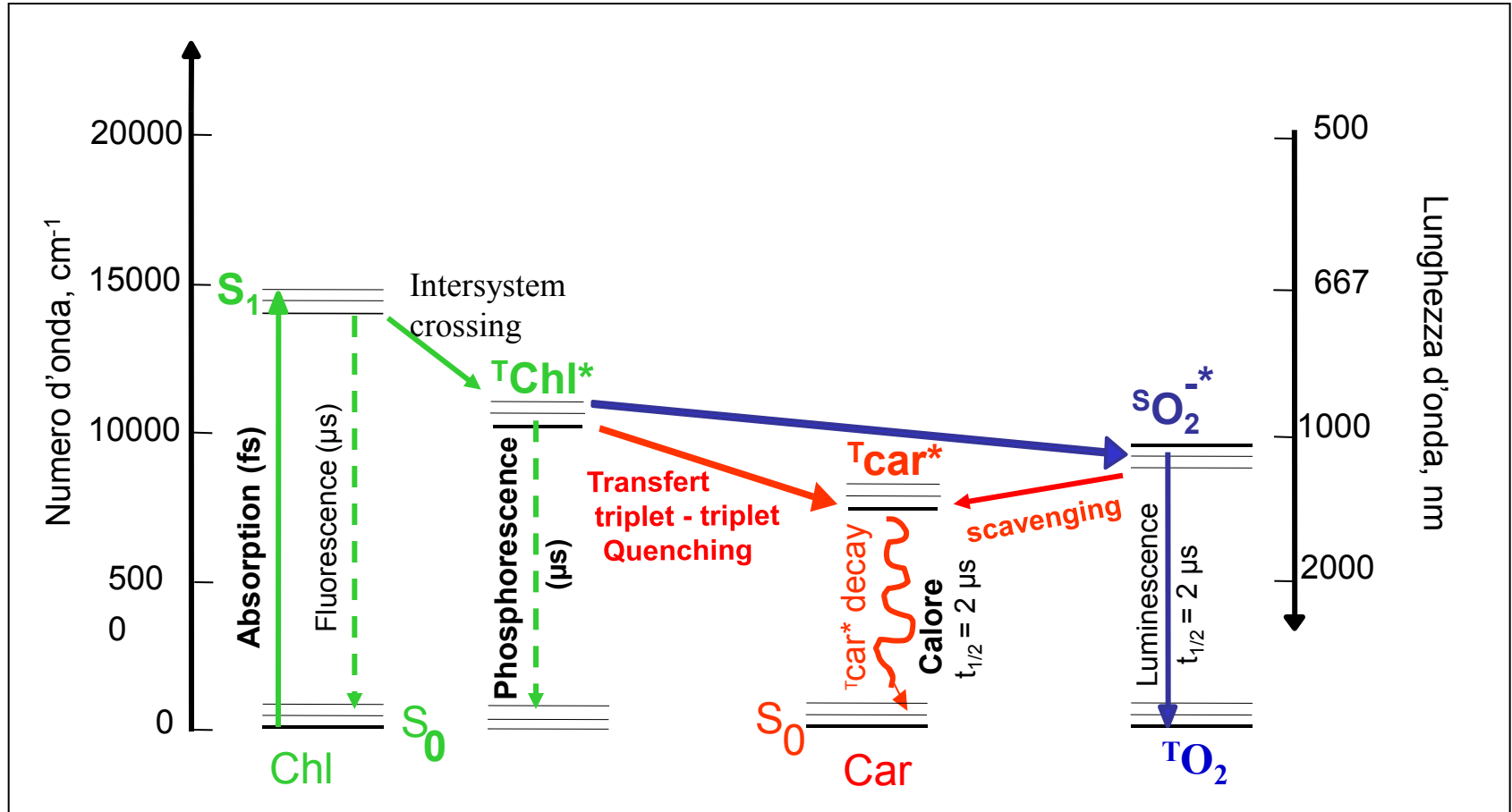


quenching di $^3\text{Chl}^*$



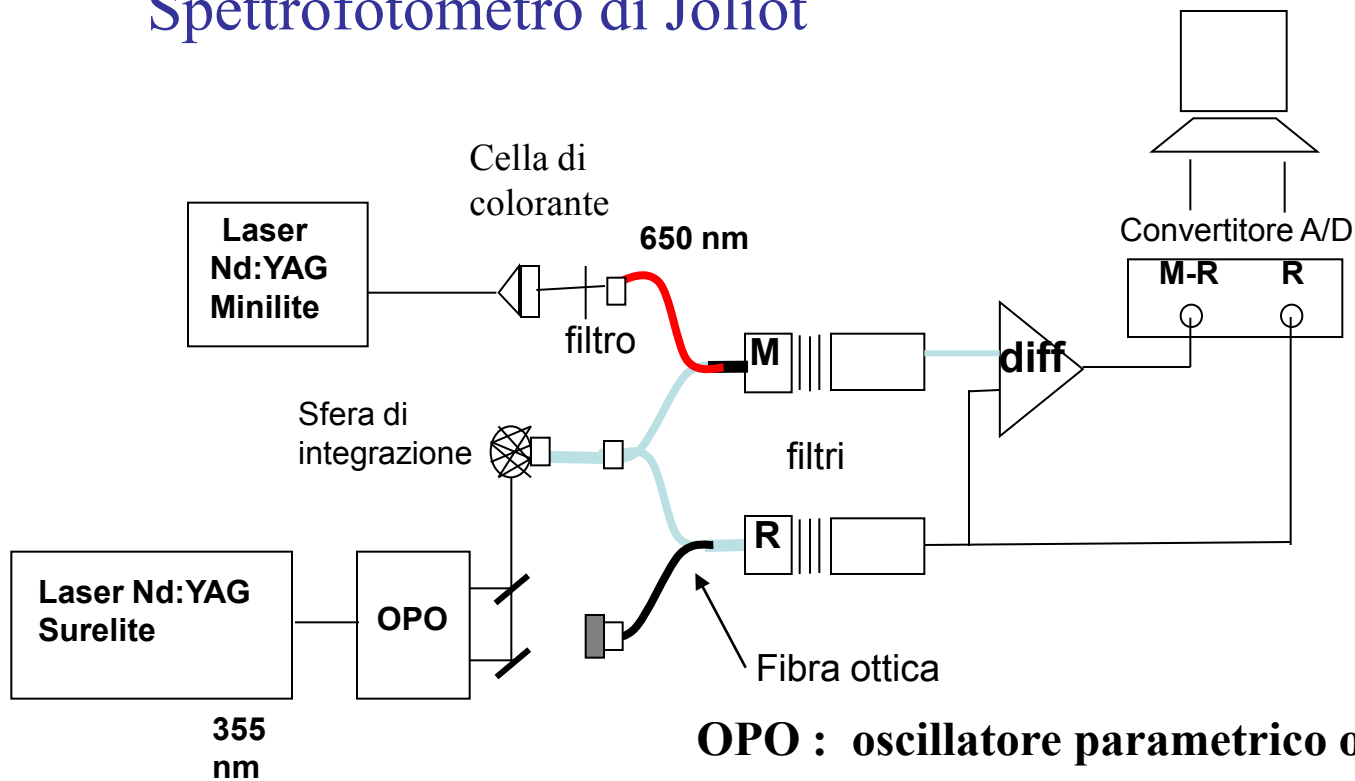
Formazione dei Tripletti dei Carotenoidi

- Quenching di $^1\text{Chl}^*$ e Scavenging dell' $^1\text{SO}_2^*$



Spettroscopia differenziale pulsata risolta in tempo

Spettrofotometro di Joliot



OPO : oscillatore parametrico ottico

M : misura,

R : riferimento,

diff : amplificatore differenziale

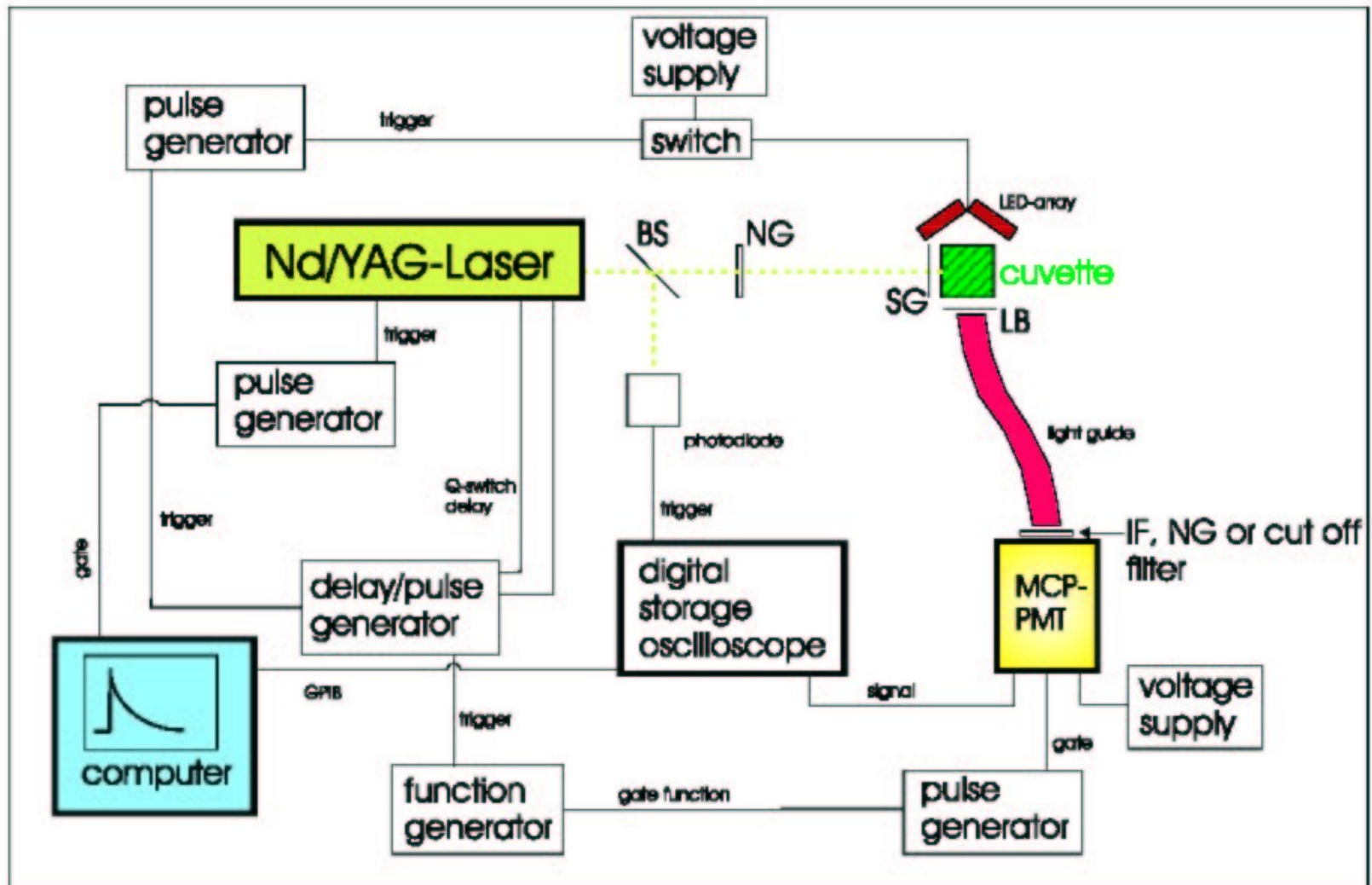
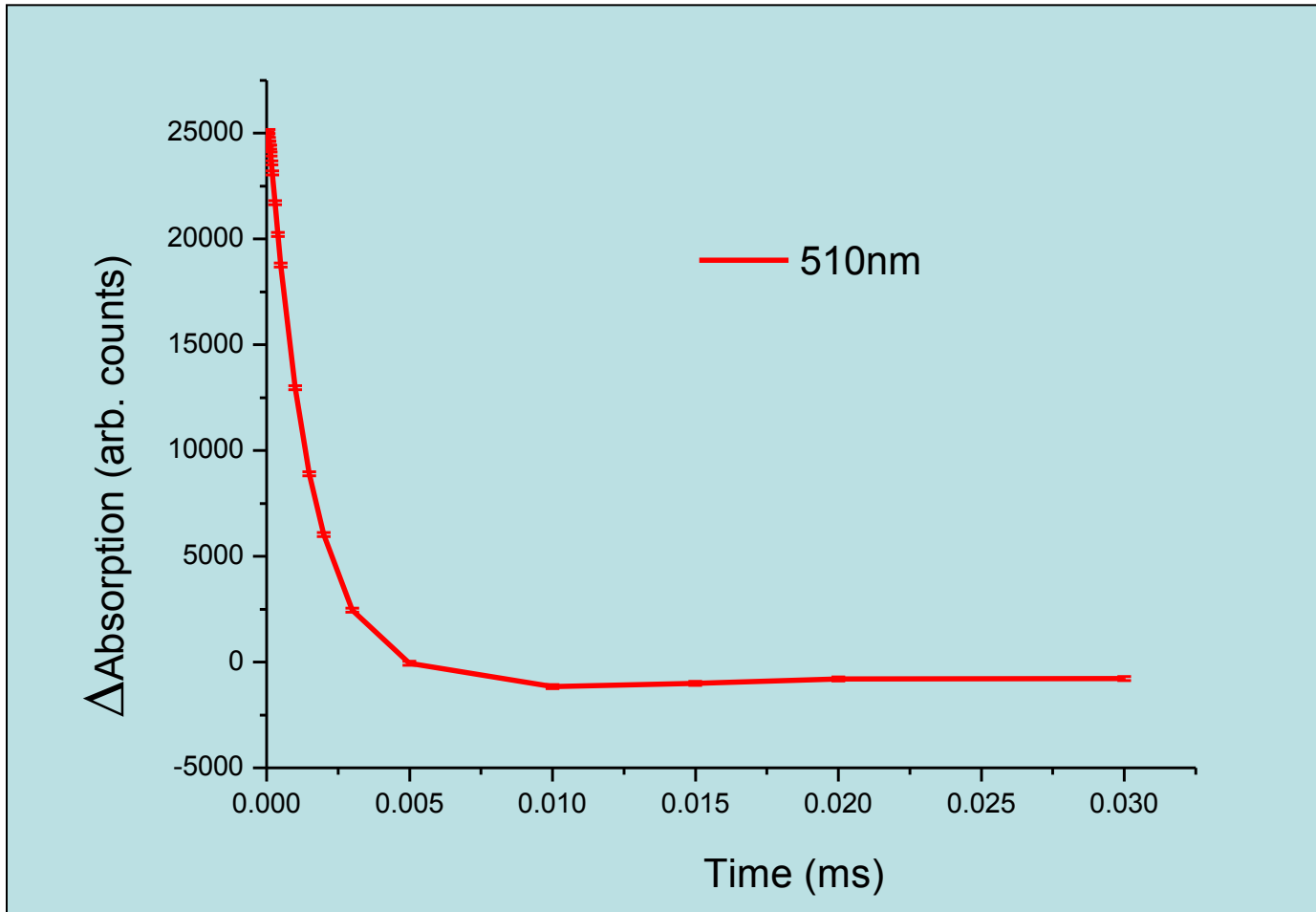


Figure 21 Scheme of measuring system (development stage 1)

Cinetiche



Spettro differenziale

