

# CAPÍTULO 2

## FLUORESCENCIA

*Eduardo De Gerónimo y Lisandro Jorge Falomir Lockhart*

### Introducción

La fluorescencia es una de las técnicas más ampliamente empleadas dentro de las áreas de las ciencias biológicas y químicas. Su alta sensibilidad se combina con un alto grado de especificidad que permite trabajar en un amplio rango de concentraciones y, en particular, dentro de los valores relevantes para los sistemas vivos, ya sean células, tejidos o animales. En el presente capítulo nos centraremos en analizar los fundamentos de la técnica así como distintas variables y parámetros que pueden asociarse al fenómeno de fluorescencia. Luego describiremos los equipos y las técnicas más comunes para el estudio *in vitro* de reacciones químicas y la caracterización de biomacromoléculas. Por otro lado, las aplicaciones en células y tejidos serán dejadas para el Capítulo 13, en el que se describen las técnicas de Microscopía Óptica. Finalmente, concluiremos el presente capítulo resumiendo las propiedades más sobresalientes de los fluoróforos más frecuentemente empleados.

### 2.1. Fenómenos Luminiscentes

La luminiscencia es la propiedad que presentan ciertas sustancias de poder emitir luz sin la necesidad de ser sometidas a altas temperaturas. Los fenómenos luminiscentes pueden clasificarse según la fuente de energía que excite la molécula emisora, teniendo así los siguientes procesos luminiscentes:

- Fotoluminiscencia: La energía activadora es radiación electromagnética del espectro visible, ultravioletas o rayos X.
- Quimioluminiscencia: La energía de excitación se libera mediante una reacción química.
- Bioluminiscencia: La energía proviene de reacciones químicas, como en el caso anterior, pero que tienen lugar en los seres vivos.
- Triboluminiscencia: Se produce al liberarse la energía almacenada en ciertas sustancias cristalinas como consecuencia de su ruptura.

La fotoluminiscencia, a su vez, puede subdividirse en fluorescencia y fosforescencia, según el tiempo que transcurre desde la absorción de la radiación hasta la emisión de luz. La fluorescencia puede considerarse un fenómeno prácticamente instantáneo, transcurre en tiempos del orden de la milmillonésima de segundo ( $1 \text{ ns} = 10^{-9} \text{ s}$ ) y dura únicamente mientras haya un estímulo excitatorio. Por el contrario, en la fosforescencia la energía absorbida se libera lenta y continuamente ya que existe un retraso temporal considerable entre la excitación y la emisión de fotones. Normalmente el proceso transcurre entre millonésimas de segundo ( $>1 \mu\text{s} = 10^{-6} \text{ s}$ ) a varios minutos, y algunas sustancias pueden continuar emitiendo luz hasta incluso durante horas después del corte del estímulo que la provoca.

El mecanismo físico que rige ambos procesos es similar. Las moléculas absorben energía en la forma de fotones y algunos de sus electrones son promovidos a orbitales moleculares de mayor energía. En este estado electrónico excitado, la molécula puede sufrir diferentes mecanismos de conversión interna que disipan parte de la energía absorbida como calor o excitando otras moléculas. Los cambios energéticos están cuantizados y deben cumplir con las leyes físicas. En el caso del fenómeno de fosforescencia en particular, los electrones excitados cambian su estado cuántico de spin, pasando de una configuración de estado *Singlete* a una de estado *Triplete*, lo que clásicamente está "prohibido" o, mejor dicho, tiene una probabilidad muy baja. Del mismo modo, la desexcitación de los electrones desde el estado *Triplete* al basal (*Singlete*) también es un proceso poco probable. Esta es la razón por la cual la fosforescencia puede durar varios minutos. El decaimiento

de los electrones excitados nuevamente al orbital de menor energía (estado basal *Singlete*) se asocia a la emisión de un fotón que arrastra el exceso de energía (equivalente a la diferencia entre los niveles excitados y basal). De este modo, en el caso de la fluorescencia, por ejemplo, la longitud de onda del fotón emitido es más larga que la de aquel absorbido en primera instancia para excitar la molécula. Cabe mencionar también aquí el fenómeno de Quimioluminiscencia, en el cuál la excitación de una molécula está acoplada a una reacción química, y a la cual también se asocia la disipación de parte de la energía puesta en juego como luz.

Las sustancias que tienen la capacidad de emitir luz por fluorescencia al ser excitadas por diferentes tipos de radiación son llamadas *Fluoróforos*. Dichas sustancias suelen ser moléculas orgánicas poliaromáticas o heterociclos con un sistema de enlaces- $\pi$  conjugado. Sin embargo, más recientemente se han descrito nanopartículas de semiconductores, así como también nanocristales de diamante impurificados con átomos de N, que también presentan esta propiedad. En el presente capítulo describiremos en detalle el fenómeno de fluorescencia y sus distintas variantes y aplicaciones para el estudio de sistemas biológicos. Especial atención prestaremos a los distintos tipos de fluoróforos disponibles hoy en día y a las ventajas de los últimos desarrollos.

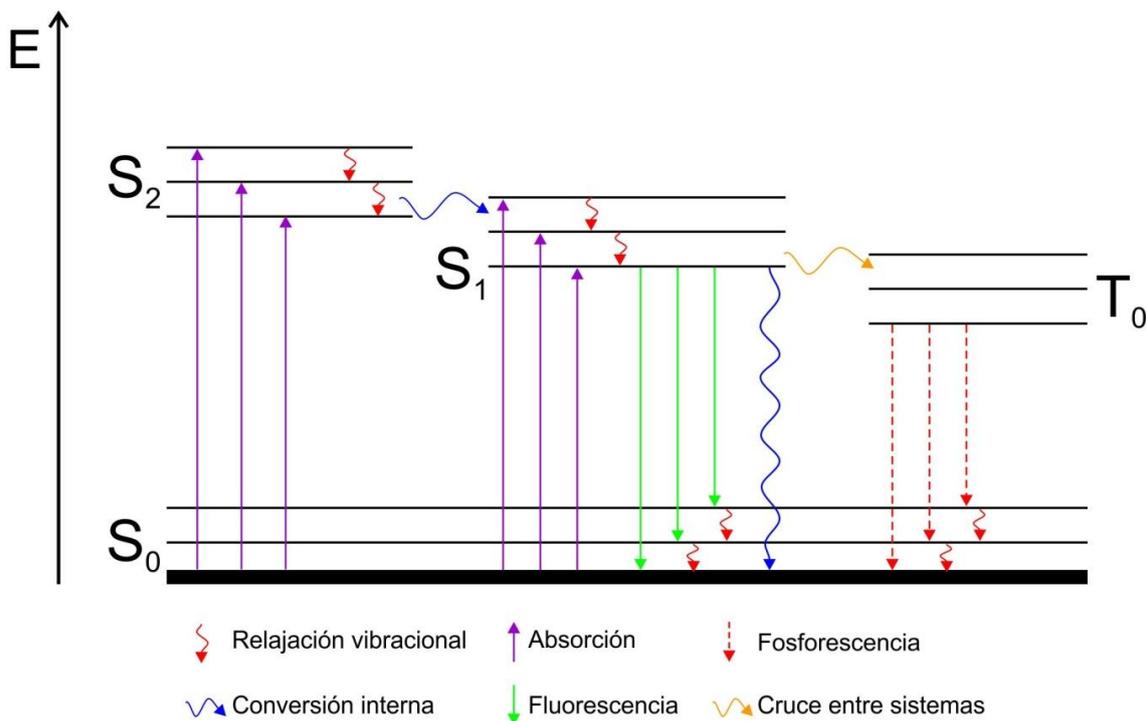
## **Diagrama de Jablonski**

El diagrama de Jablonski es una representación simplificada de los niveles electrónicos (orbitales) de una molécula y de las posibles transiciones electrónicas que se pueden dar entre estos niveles (Atkins, 2002). Se agrupan verticalmente los estados electrónicos de acuerdo a su energía y horizontalmente de acuerdo a su multiplicidad de espín (Figura 2.1).

Cuando una molécula absorbe un fotón, un electrón salta desde el nivel vibracional más bajo del estado *Singlete* fundamental ( $S_0$ ) a uno de los niveles vibracionales del primer estado *Singlete* excitado ( $S_1$ ) y cuya diferencia de energía sea equivalente a la del fotón absorbido. La energía necesaria para

que ocurra el salto de nivel es igual a  $h\nu$ , donde  $h$  es la constante de Planck y  $\nu$  es la frecuencia de excitación. El tiempo transcurrido en la absorción de ese fotón es del orden de  $10^{-15}$  segundos. Si las moléculas se encuentran en solución, pierden rápidamente el exceso de energía vibracional por transferencia no radiativa a las moléculas del solvente, quedando entonces en el nivel más bajo posible de energía vibracional del estado excitado  $S_1$ . Este proceso se denomina *relajación vibracional* y ocurre en un tiempo que oscila entre  $10^{-11}$  y  $10^{-13}$  segundos. Si la energía es suficiente, el electrón puede pasar a un estado electrónico superior al primer estado excitado ( $S_2$ ). Previo a la emisión de luz, es necesario un proceso de conversión interna durante el cual el electrón pasa desde un nivel vibracional inferior del estado  $S_2$  a un nivel vibracional elevado del estado  $S_1$ , y por mecanismos de relajación vibracional retorna al nivel más bajo posible de energía vibracional de éste último. La ganancia de energía vibracional del disolvente puede comprobarse en un ligero incremento de la temperatura del medio.

Aunque teóricamente sería posible que el electrón cayera desde el estado vibracional alto al estado basal  $S_0$ , en la práctica esto no ocurre dado que el mecanismo de reconversión de energía interna ocurre usualmente en tiempos muy cortos, por lo que resulta virtualmente imposible para el electrón ceder nuevamente el total de la energía que recibió, y como consecuencia la luz emitida es siempre de menor energía y, consecuentemente, de mayor longitud de onda que la recibida. El tiempo de vida media o *lifetime* ( $\tau$ ) de una especie excitada es relativamente breve, entre 1 y 10 ns, porque existen diversos mecanismos por los cuales un átomo o una molécula excitada libera el exceso de energía y se relajan a su estado fundamental:



**Figura 2.1.** Diagrama de Jablonski. Representación esquemática de la distribución de niveles electrónicos de una molécula donde se indican con diferentes colores las transiciones electrónicas posibles entre el estado fundamental S<sub>0</sub> y los distintos estados excitados singlete S<sub>1</sub>, singlete S<sub>2</sub> y triplete T<sub>0</sub>.

- **Fluorescencia:** La emisión de un fotón arrastra el exceso de energía residual del electrón al caer del estado S<sub>1</sub> al S<sub>0</sub>. Debido a la disipación de energía por relajación vibracional, el fotón emitido posee mayor longitud de onda y, por lo tanto, menor energía que el fotón absorbido. Este corrimiento hacia longitudes de onda mayores se conoce como desplazamiento de Stokes. En aquellos casos en los que la radiación absorbida sea emitida sin cambio en la longitud de onda (misma energía), el fenómeno se conoce como radiación de resonancia o resonancia fluorescente.

- **Disipación no radiativa:** Este conjunto de procesos implica, generalmente, una interacción y transferencia de energía entre la molécula excitada y el medio circundante. Este conjunto de procesos suele denominarse conversiones externas.

- **Fosforescencia:** Ocurre en moléculas que poseen orbitales degenerados con energías muy similares a las de los niveles excitados. Ocasionalmente, un electrón con alta energía puede ceder parte de su energía a un electrón en estado basal y formar dos electrones desapareados en dos orbitales

degenerados (estado triplete excitado  $T_1^*$ ), lo que conlleva a un cambio de multiplicidad. El estado triplete es metaestable, pero puede existir por tiempos muy largos (hasta horas) debido a que las transiciones entre estados singlete y triplete está “prohibida” (es muy poco probable). Cuando los electrones en estado triplete aparean sus espines ceden esa energía de apareamiento en forma de luz.

- *Quenching*: La extinción de la fluorescencia (o *Quenching*) es un mecanismo de desexcitación por el cual el fluoróforo interacciona con ciertas moléculas denominadas “quenchers” (como cloroformo, acrilamida, TEMPO, etc.) que son capaces de capturar el exceso de energía del estado excitado y de disiparla completamente como calor. Los quenchers pueden localizarse selectivamente en membranas o proteínas al igual que los fluoróforos, pudiendo estos combinarse para obtener información sobre interacción de proteínas o sobre cambios conformacionales.

- *Reacciones químicas*: En muchos casos el estado excitado puede tomar una vía química lo que suele degradar el fluoróforo, con la consecuente pérdida de la intensidad de fluorescencia. De este modo, se pueden interconvertir formas fluorescentemente activas y “oscuras”.

## 2.2. Espectrometría de Fluorescencia

La espectrometría de fluorescencia (también llamada fluorimetría o espectrofluorimetría) es un método espectroscópico ampliamente utilizado en mediciones analíticas y en investigaciones científicas (Sharma, 1999). Consiste en la caracterización de los espectros de excitación y/o de emisión de fluoróforos, así como la interacción entre más de uno de ellos o con el entorno en el que se encuentran. Se aplica comúnmente para estudiar, entre otras cosas, relaciones estructura-función e interacciones de biomoléculas como proteínas y ácidos nucleicos; secuenciación de ADN y caracterización genómica, así como en métodos de inmunoensayos ampliamente empleados en análisis clínicos.

La espectrofluorimetría es una técnica muy sensible y relativamente sencilla de realizar. Todos los métodos espectrofotométricos se basan en la ley de Lambert y Beer:

$$\log(I_0/I) = \epsilon \times l \times C \quad \text{Ec. 2.1}$$

donde  $I_0$  es la intensidad de la luz incidente,  $I$  es la intensidad de la luz transmitida,  $\epsilon$  es el coeficiente de absortividad molar,  $l$  es el camino óptico de la cubeta y  $C$  es la concentración del fluoróforo. De esta expresión se deduce que la cantidad de luz absorbida es proporcional al número de moléculas de fluoróforo a través de las cuales pasa la luz. La intensidad de la fluorescencia emitida depende de una serie de factores, no todos propios exclusivamente del fluoróforo estudiado, sino también del solvente y las condiciones en las cuales se realiza la medida. Las más importantes son:

- *Concentración del fluoróforo*: La intensidad de la radiación fluorescente también es proporcional al número de fotones de excitación absorbidos por el sistema y, por lo tanto, es proporcional a la concentración de la sonda fluorescente. Sin embargo, es importante tener en cuenta que a concentraciones elevadas pueden aparecer efectos de filtro interno, es decir, absorción de la fluorescencia dentro de la misma muestra. Este efecto puede ser más relevante en el caso en que se mezclan más de un fluoróforo en el mismo ensayo.
- *Absortividad molar ( $\epsilon$ )*: La intensidad de fluorescencia también depende de la facilidad con que se excita el fluoróforo, es decir de su sección efectiva de captura de fotones. Este parámetro se resume en el coeficiente de extinción o de absortividad molar ( $\epsilon$ ) de la sonda.
- *Estructura Química del Fluoróforo*: Los compuestos que contienen grupos funcionales aromáticos presentan una fluorescencia más intensa. Estructuras alifáticas y alicíclicas con dobles enlaces conjugados pueden presentar también fluorescencia. La estructura está íntimamente relacionada a la rigidez estructural, que es uno de los factores determinantes de la fluorescencia.
- *Rendimiento cuántico ( $QY_f$ )*: El rendimiento cuántico o eficacia cuántica de fluorescencia es la relación entre el número de moléculas que emiten

fluorescencia respecto al número total de moléculas excitadas. Cuanto más procesos de desexcitación coexistan para un fluoróforo, menor será la fracción de moléculas que se desexcitan de forma radiativa, y por lo tanto menor será la intensidad de fluorescencia (Ec. 2.2).

$$QY_f = \frac{k_f}{k_f + k_q + k_{nr}}$$

**Ec. 2.2**

- *Tiempo de vida media ( $\tau$ ):* El tiempo de vida media (o *lifetime*) representa el tiempo que el fluoróforo se mantiene en los estados excitados ( $S_1$ ,  $S_2$ ,  $T_0$ , etc.) antes de decaer al estado fundamental ( $S_0$ ) nuevamente. Cuanto menor sea el  $\tau$  más fotones puede emitir una sonda por unidad de tiempo y la intensidad será mayor.

- *Temperatura:* el aumento de la temperatura favorece las colisiones moleculares aumentando la probabilidad de fenómenos de desactivación no radiativos (conversión externa) y, por lo tanto, disminuyendo el  $QY_f$ .

- *Disolvente:* La naturaleza del disolvente es uno de los factores principales que define la intensidad de fluorescencia de un compuesto en solución, así como sus propiedades espectrales. Parte de la pérdida de energía por interacción con el solvente se debe al reordenamiento del solvente ante el cambio del momento dipolar del estado excitado respecto a estado basal. De este modo, solventes menos polares tienden a inducir menor desfasaje de Stokes y un mayor  $QY_f$ . Lo opuesto ocurre con los solventes más polares, que sensan mejor el cambio del momento dipolar del fluoróforo. Por otro lado, una disminución en la viscosidad del disolvente aumenta la probabilidad de conversión externa y produce una disminución de la intensidad de fluorescencia.

- *Efecto del pH:* Cuando los fluoróforos poseen sustituyentes ácidos o básicos en los anillos aromáticos es común que las formas ionizadas y no ionizadas presenten diferente longitud de onda e intensidad de excitación y/o de emisión. Por lo tanto, es necesario tener un estricto control del pH durante los ensayos fluorimétricos en los que se emplean este tipo de sondas fluorescentes.

El  $\tau$  dependerá de los mecanismos de desexcitación activos para una sonda en un determinado entorno (solvente, presencia de quenchers, temperatura, pH,

etc.). Este parámetro define cuántos fotones de fluorescencia pueden recuperarse por unidad de tiempo. Por otro lado, la intensidad de fluorescencia también depende de la multiplicidad de mecanismos no radiativos que compitan con las desexcitaciones luminiscentes. De este modo, es importante conocer el  $QY_f$  de los fluoróforos y el coeficiente de absorptividad molar ( $\epsilon$ ). El brillo aparente ( $B$ ) de un fluoróforo puede estimarse como el producto entre el  $\epsilon$  a la longitud de onda del máximo del espectro de excitación y el  $QY_f$ .

$$B = QY_f \times \epsilon$$

Ec. 2.3

### **Instrumentos para la medida de la fluorescencia**

Dos tipos generales de instrumentos suelen usarse en la espectrometría de fluorescencia:

- *Fluorómetros de filtro:* Utilizan filtros para seleccionar y separar la luz incidente y la luz fluorescente.
- *Espectrofluorómetros:* Usan monocromadores de red de difracción para seleccionar y diferenciar la luz incidente y la luz fluorescente.

Ambos tipos de instrumentos poseen un diseño similar. La luz de una fuente de excitación pasa a través de un filtro o monocromador, la luz de la longitud de onda seleccionada incide sobre la muestra, donde parte de la luz incidente es absorbida (Lakowicz, 1999). La radiación fluorescente es emitida en todas las direcciones, pero se medirá a  $90^\circ$  o a  $180^\circ$  en relación a la dirección del haz de excitación. La luz emitida atraviesa un segundo filtro o monocromador y se selecciona el haz de luz fluorescente al tiempo que se elimina la luz de excitación que haya sido dispersada en la dirección de lectura de la fluorescencia. Esto último puede lograrse también con ayuda de un espejo dicróico. El haz de fluorescencia llega luego al detector, donde se registra su intensidad (Figura 2.2). La diferencia entre el diseño basado únicamente en filtros y el de monocromadores es que estos últimos permiten registrar los espectros de excitación y/o de emisión. Sin embargo, los monocromadores

poseen el inconveniente de que las redes de difracción no sólo seleccionan una longitud de onda determinada, sino que también la luz de longitudes de onda equivalentes a los múltiplos de la seleccionada, lo que suele crear artefactos, en especial en relación a la luz de excitación dispersada. Esto puede solucionarse de dos formas. Por un lado, puede interponerse un filtro o un espejo dicróico de pasaje largo que bloquee la luz de excitación. De lo contrario se pueden emplear monocromadores que funcionen con dos redes de difracción diferentes de forma tal que los múltiplos de longitudes de onda seleccionados en la primera sean eliminados en la segunda red. Esta última opción suele ser significativamente más costosa.

Los componentes generales que forman parte de los fluorómetros y espectrofluorímetros son:

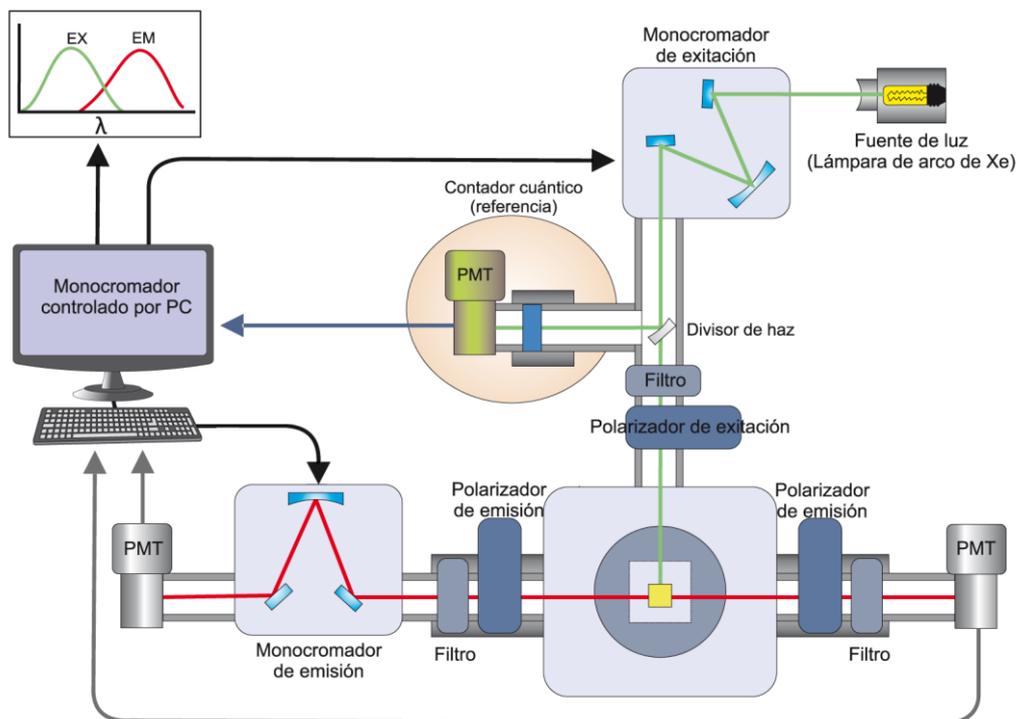
- Fuentes de radiación: lámparas o láseres
- Filtros y/o monocromadores
- Cubetas portamuestra
- Detectores
- Sistema electrónico y registrador

Describiremos a continuación más en detalle las características y funciones de cada componente:

- *Fuentes de luz*: Los factores a considerar en una fuente de radiación son la intensidad de la lámpara, la distribución de longitudes de onda de la radiación que la fuente emite y su estabilidad. Los espectrofluorímetros de barrido requieren fuentes de radiación que emitan continuamente sobre un amplio intervalo espectral. En cambio, los fluorómetros de filtro o espectrofluorímetros que se usan específicamente para mediciones analíticas a longitudes de onda fijas pueden usar fuentes de luz discretas, ya sea de líneas atómicas o, más recientemente, fuentes de luz LED (por sus siglas en inglés, *Light Emitting Diodes*, diodos emisores de luz). Las lámparas usualmente empleadas son:

a) *Lámparas de arco de alta presión de Xenón*: Se usan en casi todo espectrofluorímetro comercial. Emiten una radiación continua, intensa y relativamente estable que se extiende de los 300 a los 1300 nm.

b) *Lámpara de destello de Xenón*: Es una fuente compacta de poco costo. Genera un destello de alta energía producido por la descarga de un capacitor a través de la lámpara llena de Xenón. Tiene un espectro de emisión continuo con intensidad casi constante en el rango de 300-800 nm, y una radiación suficiente para las mediciones por encima de 200 nm.



**Figura 2.2.** Esquema general de un espectrofluorímetro. Los haces de excitación (verde) y de emisión (rojo) atraviesan los distintos componentes del espectrofluorímetro. En el esquema se representa un equipo híbrido con características de un espectrofluorímetro de monocromadores (excitación y emisión hacia la izquierda) y de un fluorómetro de filtros (emisión hacia la derecha). También se observa un espejo divisor de haces que dirige una pequeña fracción de la luz de excitación hacia el contador cuántico para medir una referencia de la intensidad de excitación. La señal registrada por los distintos detectores (PMT) es registrada, digitalizada e integrada en una computadora, que a su vez controla la posición y la abertura de las rendijas de los monocromadores, así como la posición de los polarizadores.

c) *Lámparas de vapor de mercurio de baja presión*: Son utilizadas frecuentemente en los fluorómetros de filtro. Estas lámparas pueden recubrirse con fósforo para obtener un espectro de emisión más cercano al continuo, o pueden tener un bulbo claro de material que transmite el UV para permitir el uso de líneas individuales del mercurio. Las líneas de emisión discontinuas que irradian de la lámpara de mercurio muestran una sensibilidad considerable para un material cuyo espectro de excitación coincide con una línea de emisión de mercurio, por lo que se usan con frecuencia en microscopía (ver Capítulo 13).

d) *Láseres*: Un láser emite luz de alta intensidad en uno o unos pocos intervalos muy estrechos de longitudes de onda, por lo general de 0.01 nm. En el caso de láseres con una única longitud de onda, se hace innecesario el monocromador o el filtro de excitación. La desventaja de este tipo de fuentes es que la longitud de onda de un láser no se puede variar. Las fuentes de láser suelen emplearse cuando se requiere una radiación de excitación altamente monocromática para minimizar los efectos de las interferencias fluorescentes, como por ejemplo en microscopía (ver Capítulo 13).

- *Filtros y Monocromadores*: Un monocromador transmite luz de una longitud de onda y tolerancia ajustables. Los monocromadores más utilizados son las redes de difracción, en las cuales la luz sale con un ángulo diferente dependiendo de la longitud de onda y se puede, entonces, seleccionar qué longitudes de onda transmite con una rendija de ancho variable. El monocromador de excitación se localiza entre la fuente de radiación y la muestra, mientras que el monocromador de emisión se halla entre la muestra y el detector (Figura 2.2). Para tener una buena selectividad espectral y poder resolver la estructura fina de los espectros, el monocromador de emisión debe ser capaz de resolver dos líneas con diferencia de 0.1 nm. En mediciones de anisotropía (ver siguiente sección) se añaden además dos filtros de polarización, uno después del monocromador de excitación, y otro antes del monocromador de emisión. Es importante recordar que los polarizadores tienen un rango de eficiencia, la cual depende también de la longitud de onda seleccionada, y por lo general es difícil fabricar polarizadores que funcionen bien en todo el rango de uso un espectrofluorímetro (UV-Visible-IR).

Los monocromadores no son perfectos y transmiten luz con otras longitudes de onda diferentes a las establecidas. Muchos equipos disponen de un sistema de monocromación doble que comprende dos monocromadores en tándem para dispersar la luz de excitación y otros dos para examinar los espectros de fluorescencia. El monocromador doble reduce drásticamente la interferencia de la radiación dispersada por la muestra y también permite el uso de rendijas más grandes para alcanzar la misma resolución que los monocromadores comunes. Las rendijas más grandes permiten el paso de más radiación a

través del monocromador de excitación, lo que permite trabajar con muestras a concentraciones bajas sin sacrificar resolución.

- *Cubetas Portamuestras*: Las cubetas utilizadas en fluorescencia pueden ser rectangulares o cilíndricas, aunque las primeras son más frecuentemente empleadas. Se utilizan cubetas de sílice (cuarzo) cuando se trabaja con luz UV, ya que el vidrio absorbe significativamente a esas longitudes de onda (<300 nm). En caso de emplear luz visible, se pueden emplear también cubetas de vidrio o incluso de algunos tipos de plásticos. Se debe tener cuidado en el diseño del compartimento de la cubeta para reducir la cantidad de radiación dispersada que alcanza el detector. Con este propósito, suelen introducirse deflectores en el compartimento. Durante los ensayos, es muy importante evitar dejar las huellas dactilares en las cubetas, ya que la grasa de la piel con frecuencia fluoresce y produce dispersión de luz.

- *Detectores*: La señal de fluorescencia es de baja intensidad, por lo cual se requieren dispositivos amplificadores. Los tubos fotomultiplicadores (PMT, *Photo-Multiplier Tube*) son los detectores más utilizados en instrumentos de fluorescencia. Estos detectores suelen trabajarse en la modalidad de recuento de fotones para mejorar la relación señal/ruido. También son empleados los detectores de diodos en serie y de transferencia de carga. Este tipo de detectores permite el registro rápido de los espectros de excitación y de emisión.

El detector puede ser de un solo canal, detecta la intensidad de una longitud de onda en cada momento, o de múltiples canales, detecta la intensidad en todas las longitudes de onda simultáneamente (detector espectral). Este tipo de detectores consiste en un arreglo de detectores puntuales que se disponen luego de un componente que discrimina las distintas longitudes de onda. En el caso de algunas aplicaciones particulares, los detectores también clasifican la intensidad en función del tiempo de arribo de los fotones dividiéndolos en canales temporales. Este es el caso de las medidas de tiempo de vida media en el dominio de tiempo (ver más adelante).

Cabe destacar que, en los equipos más actuales, una pequeña fracción de la radiación de excitación es dirigida hacia un detector de referencia, o detector cuántico, que registra las variaciones de intensidad de la fuente de luz.

- *Espectrofluorómetros*: La fluorescencia suele medirse en un ángulo de  $90^\circ$  en relación a la luz de excitación con el fin de evitar la interferencia de la luz de excitación transmitida. Esto se traduce en una mejor relación señal-ruido y reduce el límite de detección si se compara con una geometría de  $180^\circ$ .

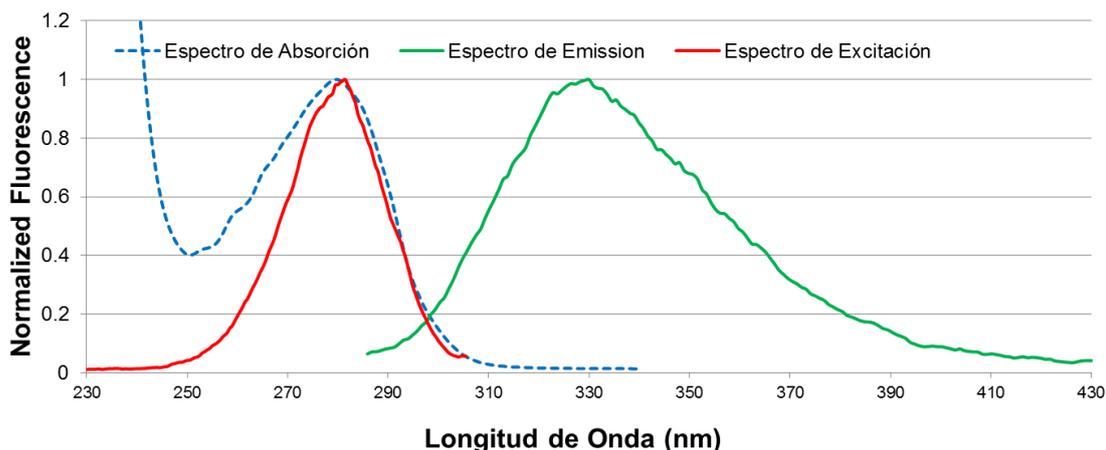
Casi todos los espectrofluorómetros utilizan ópticas de doble haz, para compensar las fluctuaciones en la potencia de la fuente. Las señales procedentes de los detectores de la muestra y de referencia se dirigen a un amplificador diferencial. La técnica de doble haz suministra una mayor precisión analítica, conveniencia y velocidad que las técnicas de un solo haz comparables, ya que discrimina mejor la fluorescencia de la muestra de la dispersión interferente.

### **Espectros de excitación y emisión**

El espectro de excitación es una representación del número de fotones absorbidos, en función de su longitud de onda, por una molécula y que se traducen en la emisión de fluorescencia. El espectro de excitación presenta cierta correspondencia, en general, con el espectro de Absorbancia. Para registrar el espectro de excitación se fija el monocromador de emisión a una longitud de onda cercana al máximo de fluorescencia y se hace un barrido exploratorio de longitudes de onda con el monocromador de excitación.

El espectro de emisión representa el número de fotones emitidos, según su longitud de onda. Se obtiene fijando el monocromador de excitación a una longitud de onda cercana al máximo del espectro de excitación y haciendo un barrido espectral con el monocromador de emisión (Figura 2.3). Una propiedad de la fluorescencia es que, debido a la disipación parcial de la energía de excitación que ocurre durante la vida del estado excitado, el espectro de emisión normalizado es independiente de la longitud de onda de excitación ( $\lambda_{exc}$ ) empleada. Esto se conoce como la Regla Kasha.

La naturaleza generalmente simétrica de ambos espectros es el resultado de la misma transición, involucrada tanto en la absorción como en la emisión y las similitudes de los niveles vibracionales de  $S_0$  y  $S_1$ . Esta propiedad se conoce como la regla de la imagen espejo. Existen muchas excepciones a esta regla, como cuando los fluoróforos forman complejos o cuando existen grupos ionizables.



**Figura 2.3.** Espectros de absorción, excitación y emisión. En el gráfico se muestra, a modo de ejemplo, los espectros de fluorescencia de excitación (rojo) y de emisión (verde) del triptófano Trp<sup>82</sup> de la proteína IFABP-W6F. Además se muestra el espectro de absorción de la proteína (azul) con fines comparativos.

Los espectros de fluorescencia se encuentran a menudo acompañados por cuatro bandas indeseables: la dispersión Rayleigh, la dispersión Raman, la posible fluorescencia del solvente y los máximos de segundo orden (cuando se emplean redes de difracción). Sin embargo, en la práctica resulta sencillo distinguir estas cinco emisiones contaminantes que deforman el espectro real del fluoróforo analizado realizando el registro de espectros de muestras blanco en ausencia de dicho fluoróforo.

El espectro de emisión de los compuestos fluorescentes es especialmente sensible al entorno molecular. Por ello, el estudio de los factores ambientales que pueden afectar al proceso de fluorescencia es muy importante y se desarrollará en detalle en la última sección del presente capítulo.

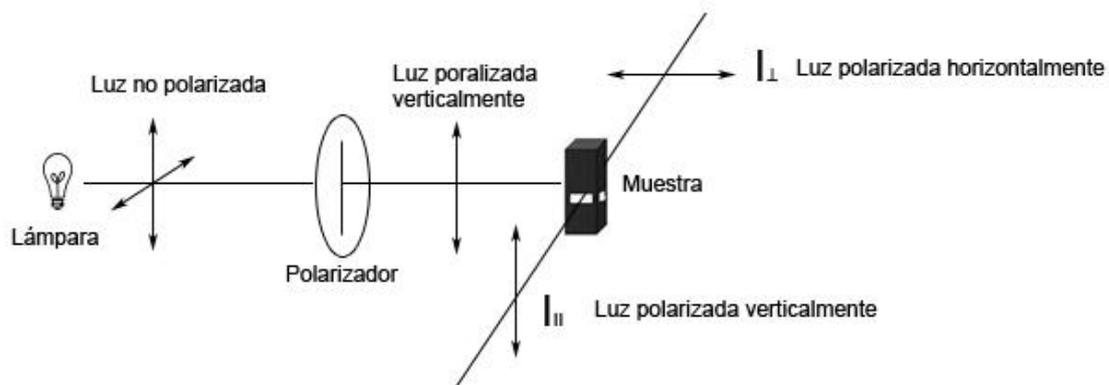
### 2.3. Anisotropía

Se define como anisotropía al grado de polarización de la emisión que presentan los fluoróforos al ser excitados con luz linealmente polarizada. La luz polarizada es aquella radiación electromagnética cuya onda presenta un solo plano de oscilación. Al excitar una molécula pequeña fluorescente con luz polarizada, la luz emitida deja de estar polarizada debido a la movilidad aleatoria que presentan las moléculas en solución durante su tiempo de vida en el estado excitado. Sin embargo, si se trata de una molécula de mayor volumen, o si una molécula pequeña se une a otra de mayor tamaño, la movilidad va a ser menor y la luz emitida va a estar más polarizada en el mismo plano que la luz de excitación. Esto depende del tiempo de vida media del fluoróforo, siendo los fluoróforos de menor  $\tau$  los que presentan mayor polarización, debido a que tienen menos tiempo para rotar entre la excitación y la emisión. Del mismo modo, aquellos fluoróforos con  $\tau$  más largos son aquellos que presentan menos polarización de su emisión.

Suponiendo el hipotético caso en que se pudieran tener moléculas inmóviles, con sus dipolos de excitación paralelos al plano vertical, y fuesen excitadas con luz polarizada en el mismo plano, la luz emitida también estaría totalmente polarizada en el plano vertical. En la situación de que las moléculas inmóviles estuvieran orientadas al azar (de forma que la orientación de sus dipolos de excitación podría ser cualquiera) y fuesen excitadas con luz polarizada en el plano vertical, sucederían varios eventos a la vez. Las moléculas con sus dipolos en el plano vertical actuarían según lo descrito anteriormente. Las moléculas con sus dipolos perpendiculares al plano de la luz polarizada no absorberían luz y, por tanto, no emitirían radiación. Las moléculas con cualquier otra orientación absorberían luz en distintos grados, dependiendo de lo cerca o lejos que estuvieran de su orientación óptima. Por lo tanto, la luz emitida no estaría totalmente polarizada en el plano vertical sino que incluiría componentes en otras direcciones. En una situación real, las moléculas rotan, lo cual introduce una nueva variable en la que las moléculas absorben luz

cuando su dipolo tiene una determinada dirección y, al emitirla, dicha orientación ha variado (Weber, 1966).

Para medir el grado de polarización, se excita la muestra problema con luz verticalmente polarizada (Figura 2.4) y se mide la intensidad de la luz emitida que pasa a través de dos polarizadores, uno orientado paralelamente a la dirección de la luz polarizada de excitación (intensidad que se denomina  $I_{||}$ ) y otro orientado perpendicularmente a dicha dirección (valor llamado  $I_{\perp}$ ).



**Figura 2.4.** Medición de la Anisotropía de un Fluoróforo. El esquema de un espectrofluorímetro en forma T es una de las opciones para medir la polarización de la fluorescencia. La emisión de la fluorescencia pasa por dos polarizadores de análisis en cada canal de emisión, pero orientados en forma perpendicular uno respecto del otro.

A partir de estos dos valores, la anisotropía ( $r$ ), que es una magnitud adimensional y es independiente de la intensidad total de la muestra, se calcula como:

$$r = \frac{I_{||} - I_{\perp}}{I_{||} + 2I_{\perp}} \quad \text{Ec. 2.4}$$

Otro parámetro empleado con frecuencia es el de Polarización ( $P$ ), que se define como:

$$P = \frac{I_{||} - I_{\perp}}{I_{||} + I_{\perp}} \quad \text{Ec. 2.5}$$

Tanto  $r$  como  $P$  contienen la misma información, pero la anisotropía es empleada preferentemente porque es normalizada por el total de la intensidad ( $I_{\tau} = I_{||} + 2 \times I_{\perp}$ ). Si la luz emitida está totalmente despolarizada, por lo que los

valores de  $I_{||}$  y de  $I_{\perp}$  son iguales, el valor de la anisotropía es 0. En cambio, si la luz emitida está totalmente polarizada (valor de  $I_{\perp}$  igual a 0), la anisotropía tiene un valor de 1. Es necesario notar que los valores de  $P$  también varían entre 0 y 1, pero no es exactamente equivalente.

El valor de la anisotropía disminuye, generalmente, al aumentar la movilidad de las moléculas. La diferente orientación de los dipolos de excitación y de emisión debido a la libre rotación de las moléculas en solución es uno de los principales mecanismos de la despolarización que experimentan los fluoróforos. Por este motivo, los compuestos orgánicos fluorescentes en estado libre (soluble) prácticamente no tienen polarización. Pero si estas moléculas pequeñas se unen a otras estructuras de mayor tamaño, como proteínas o membranas) su movimiento se ve reducido y su anisotropía aumenta. La despolarización de las sustancias se debe también a otros procesos importantes como el movimiento browniano de las partículas fluorescentes, la reabsorción de la luz emitida por una segunda molécula, la luz dispersada, fenómenos de transferencia de energía y el aumento del tiempo de vida media del estado excitado.

### **Equipos para medida anisotropía**

Los equipos para medir la Anisotropía de fluorescencia son muy similares a los espectrofluorímetros o los fluorímetros clásicos y comparten varios de los componentes básicos. El diseño incluye una fuente de luz, un selector de longitud de onda de excitación (monocromador o filtro), polarizador de excitación, portacubeta, polarizador de emisión, selector de longitud de onda de emisión (monocromador o filtro) y detector. Los polarizadores deben poder ser rotados para cambiar la orientación del plano de polarización y/o de emisión.

Los polarizadores lineales son elementos ópticos que transmiten la luz cuyo vector eléctrico está alineado con el eje de polarización y bloquean aquella cuyo vector forme un ángulo de  $90^\circ$  con dicho eje. Están fabricados con materiales formados por partículas alargadas, varillas o placas alineadas

paralelamente unas a otras, debido a lo que transmiten sólo un plano de luz polarizada y absorben el perpendicular. Para una adecuada medida de la anisotropía se requiere que los polarizadores estén correctamente calibrados y colocados en las posiciones horizontal y vertical ya que, de lo contrario, la relación de intensidades que se calcula no sería real.

### **Modos de medida de la anisotropía**

Existen dos formatos posibles para las medidas de Anisotropía, el L y el T. El formato L consta de un canal de excitación y un canal de emisión. Debido a ello, es necesario poder ubicar en el canal de emisión el polarizador en distintas orientaciones. De este modo se mide el componente paralelo y perpendicular en forma sucesiva para obtener  $\tau$  y  $P$ . Además, es necesario el uso de un factor de corrección para tener en cuenta la polarización parcial que ocurre en el monocromador de emisión y la dependencia de su eficiencia de transmisión con el ángulo del polarizador. En el formato T hay un canal de excitación y dos canales de emisión, uno para el componente vertical y otro para el horizontal, lo que permite medir ambos simultáneamente (Figura 2.4). Las distintas sensibilidades que suelen tener los polarizadores de los dos canales de emisión, así como los dos detectores empleados, se corrigen también con un factor de corrección calculado experimentalmente. Este factor de corrección ( $G$ ) se calcula a partir del cociente entre las mediciones de las intensidades de fluorescencia registradas al mantener el polarizador de excitación en posiciones horizontal ( $90^\circ$  respecto a la posición de medida normal) y el polarizador de emisión en posiciones vertical ( $0^\circ$ ) y horizontal ( $90^\circ$ ). Los ensayos de anisotropía, como permiten obtener medidas de la libertad de movimiento del fluoróforo, por ejemplo libre y unido, se aplican principalmente al estudio de las interacciones moleculares. Algunos ejemplos serían ensayos con receptores y ligandos, interacciones proteína-péptido, proteína-ADN, inmunoensayos competitivos, etc. También se usan para obtener información sobre el tamaño, la forma y la orientación de moléculas (principalmente

proteínas), la rigidez de los medios moleculares. Concretamente, esta técnica es muy importante en el estudio de la movilidad de los lípidos de la membrana y la desnaturalización de proteínas.

## 2.4. *Quenching* de la Fluorescencia

El fenómeno de *Quenching* de la fluorescencia se refiere a los procesos que provocan una disminución en la intensidad de emisión fluorescente de una sustancia dada. Puede ser el resultado de varios mecanismos como, por ejemplo, reacciones de los estados excitados, transferencia de energía, formación de complejos y por colisiones (Eftink, 2000). Los fenómenos de *Quenching* pueden clasificarse en dos grandes grupos: los llamados “colisionales o dinámicos”, debido a los choques entre las moléculas (fluoróforo y *quencher*) y los “estáticos”, resultado de la formación de complejos. Dado que ambos tipos de *Quenching* requieren del contacto molecular entre el fluoróforo y el *quencher*, este fenómeno es especialmente importante en soluciones acuosas donde las colisiones son frecuentes.

Una gran variedad de sustancias son capaces de actuar como *quenchers* de fluorescencia, entre ellas, el oxígeno molecular en estado *singlete*, las aminas alifáticas y aromáticas, xenón, peróxido de hidrógeno, acrilamida, bromuros y yoduros, así como la mayoría de los radicales como el TEMPO.

### ***Quenching* dinámico.**

El *Quenching* dinámico puede representarse, esquemáticamente, como una transferencia de energía entre una especie excitada ( $M^*$ ) y una especie *quencher* (Q):



Este proceso se describe por la ecuación de Stern-Volmer:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv} \times [Q] \quad \text{Ec. 2.6}$$

donde  $F_0$  y  $F$  son las intensidades de emisión fluorescente en ausencia y presencia del quencher, respectivamente, a una concentración del quencher  $[Q]$ , y  $K_{sv}$  es la constante de Stern-Volmer.

A su vez, la constante de Stern-Volmer está relacionada con el tiempo de vida media de la fluorescencia de la especie emisora:

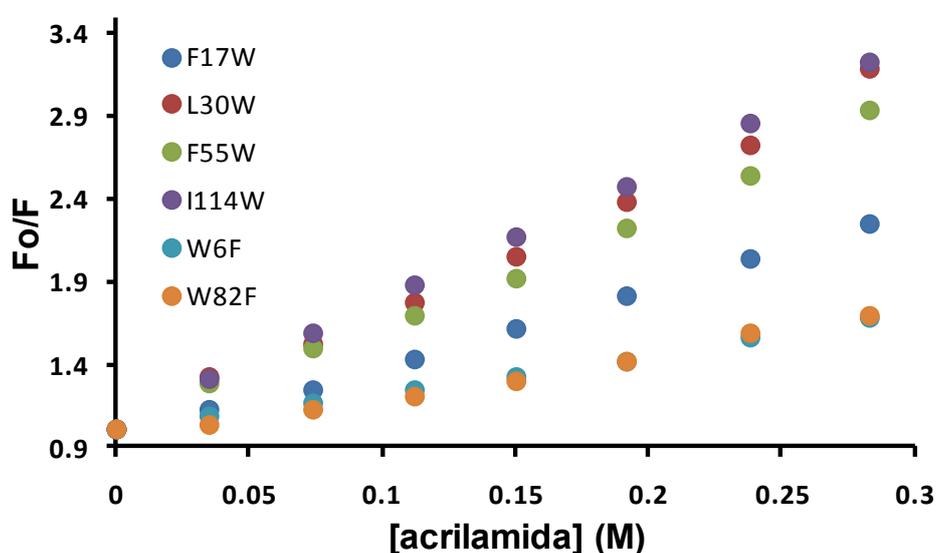
$$K_{sv} = k_q \times \tau_0 \quad \text{Ec. 2.7}$$

$k_q$  es la constante bimolecular de *Quenching* y  $\tau_0$  es el tiempo de vida de fluorescencia de la especie emisora.

Un ejemplo de *Quenching* colisional es el que experimentan los residuos de triptófano por la acrilamida. Dado que la acrilamida es soluble en medio acuoso, la efectividad del *Quenching* es muy utilizada para analizar el grado de exposición que presentan estos aminoácidos al solvente en las proteínas. Por ende, aquellos triptófanos ubicados en entornos hidrofóbicas serán menos accesibles a las moléculas de acrilamida y, por consiguiente, afectados con una menor eficiencia que aquellos triptófanos expuestos al medio acuoso. En la Figura 2.5 se muestra un ejemplo del método de Stern-Volmer aplicado a una serie de mutantes puntuales de triptófano de la proteína que une ácidos grasos de intestino (IFABP). La relación de la fluorescencia de los triptófanos en ausencia y presencia de acrilamida ( $F_0/F$ ) se grafica en función de la concentración de acrilamida creciente. De la pendiente se obtiene la constante de Stern-Volmer ( $K_{sv}$ ). A mayor  $K_{sv}$  observada, más expuesto al solvente, y por ende a la acrilamida, se encuentra el triptófano analizado.

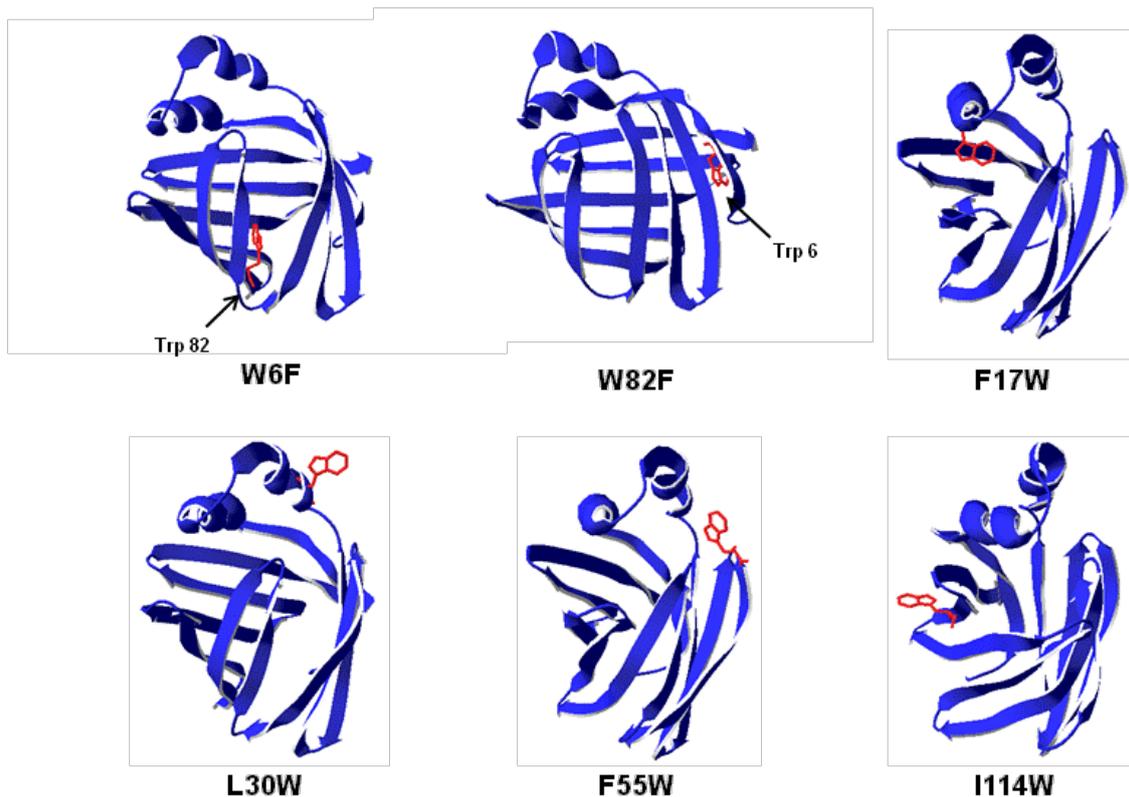
Los resultados demuestran que los triptófanos naturales Trp<sup>82</sup> (mutante W6F) y Trp<sup>6</sup> (mutante W82F) se encuentran poco accesibles al entorno. El Trp<sup>82</sup>, al estar localizado profundamente en el sitio de unión de ligandos, difícilmente sufre el *Quenching* de la acrilamida, confirmando la alta hidrofobicidad presente en su entorno. El Trp<sup>6</sup>, si bien se ubica más cercano a la superficie externa de la proteína, no es accesible al solvente ya que se encuentra rodeado también por grupos hidrofóbicos (Figura 2.6). Los mutantes puntuales L30W, F55W e

I114W, cuyos triptófanos se localizan en la interfase de la proteína, son más fácilmente afectados por la acrilamida al estar más expuestos al solvente. El Trp<sup>17</sup> (mutante F17W) presenta una accesibilidad intermedia a la acrilamida, lo que puede corresponderse a que este residuo se orienta hacia el interior de la proteína, y forma la parte superior del sitio de unión de ligandos, por lo que resulta estar menos expuesto que los otros mutantes, pero más que los triptófanos naturales.



**Figura 2.5.** Quenching Triptófanos con Acrilamida. El gráfico muestra un ensayo tipo de Quenching con acrilamida de una serie de mutantes de triptófanos en la proteína IFABP. A una solución de cada uno de los mutantes se le agregó concentración creciente de acrilamida (0 – 0.3 M).  $F_0/F$  es la relación entre la intensidad de fluorescencia de la proteína en ausencia ( $F_0$ ) y presencia de acrilamida ( $F$ ). Del ajuste de la ecuación de Stern-Volmer a los datos experimentales puede obtenerse la constante de Stern-Volmer ( $K_{sv}$ ).

Una gráfica de Stern-Volmer lineal generalmente indica la presencia de un solo fluoróforo o especie emisora. Por el contrario, una gráfica de Stern-Volmer no lineal puede suponer la presencia de dos poblaciones distintas de fluoróforos. A su vez, una gráfica de Stern-Volmer lineal no asegura que el proceso de Quenching estudiado sea de tipo dinámico, un proceso de Quenching de tipo estático también genera un comportamiento lineal en las gráficas de Stern-Volmer.



**Figura 2.6.** Modelos moleculares de los mutantes de IFABP. Las figuras fueron obtenidas por minimización de energía empleando el programa Swiss-PdbViewer a partir de la estructura cristalográfica de la proteína nativa. El esqueleto peptídico se muestra en el formato de cintas (azul) y los residuos de Trp analizados en los ensayos de Quenching están resaltados en rojo.

### 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.



La constante de formación del complejo ( $K_s$ ) es definida como:

$$K_s = \frac{[MQ]}{[M][Q]}$$

**Ec. 2.8**

donde [MQ] es la concentración del complejo, [M] es la concentración del fluoróforo libre, y [Q] es la concentración del quencher. Si el complejo MQ no emite, la relación de intensidades  $F_0/F$  es igual a la relación de concentraciones  $[M]_0/[M]$ , donde  $[M]_0$  es la concentración total del fluoróforo:

$$[M]_0 = [M] + [MQ]$$

Reemplazando esta expresión en la constante de formación del complejo, se puede despejar la siguiente ecuación:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_S \times [Q] \quad \text{Ec. 2.9}$$

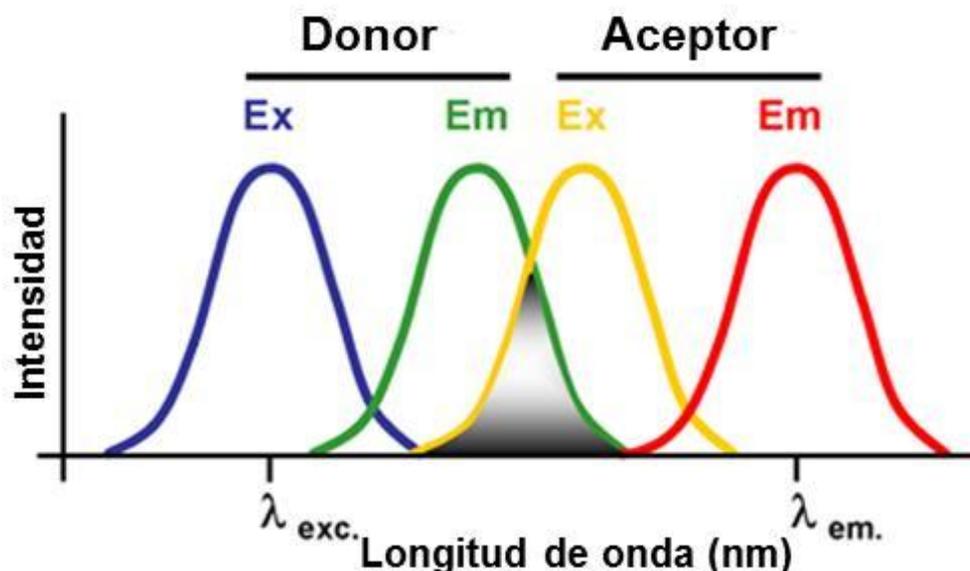
El *Quenching* estático también conduce a una relación lineal entre  $F_0/F$  y [Q], excepto que la constante de *Quenching* es la constante de formación del complejo.

Para diferenciar entre ambos tipos de *Quenching* el método más conveniente es el análisis de la dependencia de los tiempos de vida de fluorescencia con la concentración del quencher. Si el *Quenching* es dinámico, el cociente de los tiempos de vida de fluorescencia en ausencia y presencia de quencher ( $\tau_0 / \tau$ ) es igual al cociente de las intensidades de fluorescencia ( $F_0/F$ ). Si, por el contrario, existe un *Quenching* estático, una fracción del compuesto emisor se encuentra secuestrada formando parte del complejo no emisor y la fluorescencia observada proviene solamente 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 ( $\tau_0$ ). En definitiva, el cociente  $\tau_0 / \tau$  no demostrará dependencia con la concentración del quencher. De este modo, la medida del tiempo de vida de la fluorescencia ( $\tau_0$ ) a distintas concentraciones del quencher y de la gráfica de  $\tau_0 / \tau$  versus [Q] puede diferenciar claramente entre un proceso de *Quenching* de tipo dinámico y otro estático.

## 2.5. Fenómeno de Transferencia de Energía de Resonancia Förster (FRET)

La transferencia resonante de energía tipo Förster (o FRET) es un mecanismo de transferencia no radiativa de energía entre dos fluoróforos que poseen una superposición espectral significativa y una orientación relativa apropiada. Este fenómeno ocurre sin la emisión fluorescente por parte del fluoróforo dador y se produce debido a un acoplamiento entre los momentos dipolares entre las transiciones de desactivación del estado excitado de la molécula dadora y la excitación de una molécula aceptora, originalmente en su estado fundamental. Ocurre a través del espacio sin necesidad de contacto dador-aceptor. Este proceso compite con los demás procesos de desactivación del estado excitado de la molécula dadora y por ello determina la disminución del rendimiento cuántico de fluorescencia y la disminución del tiempo de vida.

Para que ocurra FRET entre dos fluoróforos, el dador debe emitir (en ausencia del aceptor) a longitudes de onda más cortas que las del aceptor y el espectro de emisión del dador debe superponerse, al menos parcialmente, con el espectro de absorción de aceptor (Figura 2.7).



**Figura 2.7.** Superposición entre el espectro de emisión del dador y el espectro de excitación del aceptor.

De acuerdo con la teoría desarrollada por Theodor Förster, que considera una aproximación dipolar para la interacción coulombica, la velocidad de transferencia de energía se expresa como:

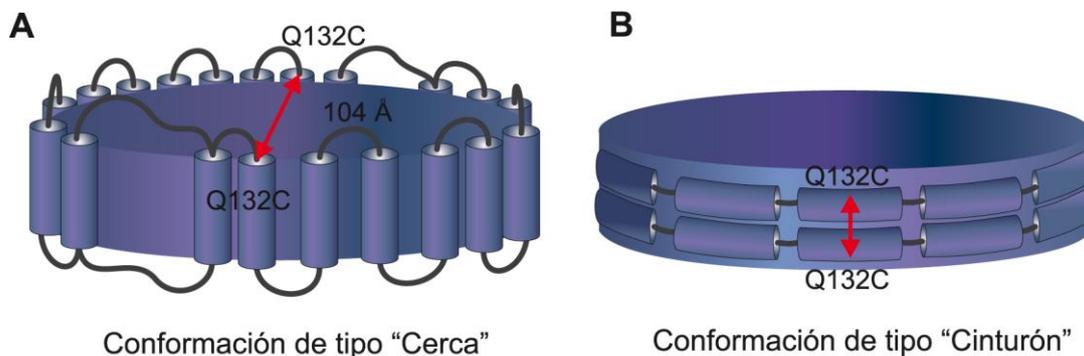
$$K_T(r) = \left(\frac{1}{T_d}\right)\left(\frac{R_0}{r}\right)^6 \quad \text{Ec. 2.10}$$

donde  $K_T$  es la velocidad de decaimiento del estado excitado del dador (en ausencia de aceptor),  $T_d$  es la vida media del dador,  $R_0$  es el radio crítico de Förster, donde la transferencia de energía y el decaimiento espontáneo del estado excitado del dador son igualmente probables, y  $r$  es la distancia entre el dador y el aceptor. De esta ecuación se deduce que la eficiencia de FRET disminuye con la inversa de la sexta potencia de la separación entre los fluoróforos. La distancia a la que la energía de transferencia disminuye un 50% (conocida como radio de Förster) es alrededor de 3-6 nm para los pares más comunes dador-aceptor.

Las condiciones necesarias para que el fenómeno de FRET ocurra son las siguientes:

- a) Las moléculas de aceptor y dador deben estar muy próximas (10-100 Å), pero no necesariamente en contacto, y deben tener una orientación definida.
- b) El espectro de absorción del aceptor debe superponerse, al menos parcialmente, con el espectro de emisión del dador.

Si se desactiva la fluorescencia del fluoróforo aceptor (*photobleaching*), aumenta la intensidad de emisión del fluoróforo dador, ya que el dador no es más desexcitado por el fenómeno de FRET al interactuar con el aceptor.



**Figura 2.8.** Conformaciones posibles para la apolipoproteína A1 cuando está unida a lípidos.

Los procesos FRET contienen información estructural acerca del par dador-aceptor. Un ejemplo de este tipo de estudios es la determinación de la conformación de una apolipoproteína (ApoA-I) cuando se une a lípidos (Li, 2000). ApoA-I es una proteína anfipática con un alto contenido alfa hélices que une fosfolípidos con alta afinidad y los organiza en bicapas solubles o *discos* que toman colesterol de los tejidos. Numerosos estudios revelaron que cada *disco* contenía dos moléculas de ApoA-I pero no la manera en que interaccionaban. De esta manera, surgieron dos hipótesis para describir su interacción con los fosfolípidos: a) el modelo de “cerca”, donde las distintas alfa hélices se disponen alrededor del disco de manera antiparalela, y b) el modelo de “cinturón”, donde las hélices se disponen con sus ejes de manera perpendicular a las cadenas aciladas de los fosfolípidos (Figura 2.8). Para dilucidar la conformación de las moléculas de apoproteína cuando forman parte de los discos se construyeron mutantes puntuales donde se reemplazó la glutamina 132 por una cisteína (ApoA-I Q132C) de manera de incluir grupos -SH con reactividad selectiva para marcar a la proteína en forma específica. Los ensayos de FRET se realizaron empleando moléculas de ApoA-I marcadas con 5-iodoacetamidofluoresceína (5-IAF), como dador, y con tetrametilrodamina iodoacetamida (TMRIA), como acepto. Dado que el diámetro de los discos es de 104 Å, si las hélices se encuentran en la conformación de tipo “cerca” el fenómeno de FRET no ocurriría debido a la distancia que separaría ambos fluoróforos. Mientras que si las hélices estuvieran en la conformación de tipo cinturón si se observaría dicho fenómeno (Figura 2.8). Los espectros de emisión de la ApoA-I marcada en los discos HDL mostraron un decaimiento en la intensidad de emisión del dador y un incremento en la intensidad de emisión del acepto consistente con una eficiencia FRET del 40%. La presencia de FRET demostró que la ApoA-I adopta la conformación de “cinturón” en vez de la conformación en “cerca”. Otras aplicación muy frecuente de FRET es la medición de distancias entre dos sitios en una macromolécula, como por ejemplo, la determinación de la distancia entre un triptófano (dador) y un acepto extrínseco unido en forma covalente o no covalente. Los estudios FRET también son empleados en la

determinación de constantes de afinidad de distintas interacciones moleculares o complejos macromoleculares en los que más de un par dador-aceptor es posible. Ver ejemplos en el Capítulo 11 sobre interacción proteína-proteína

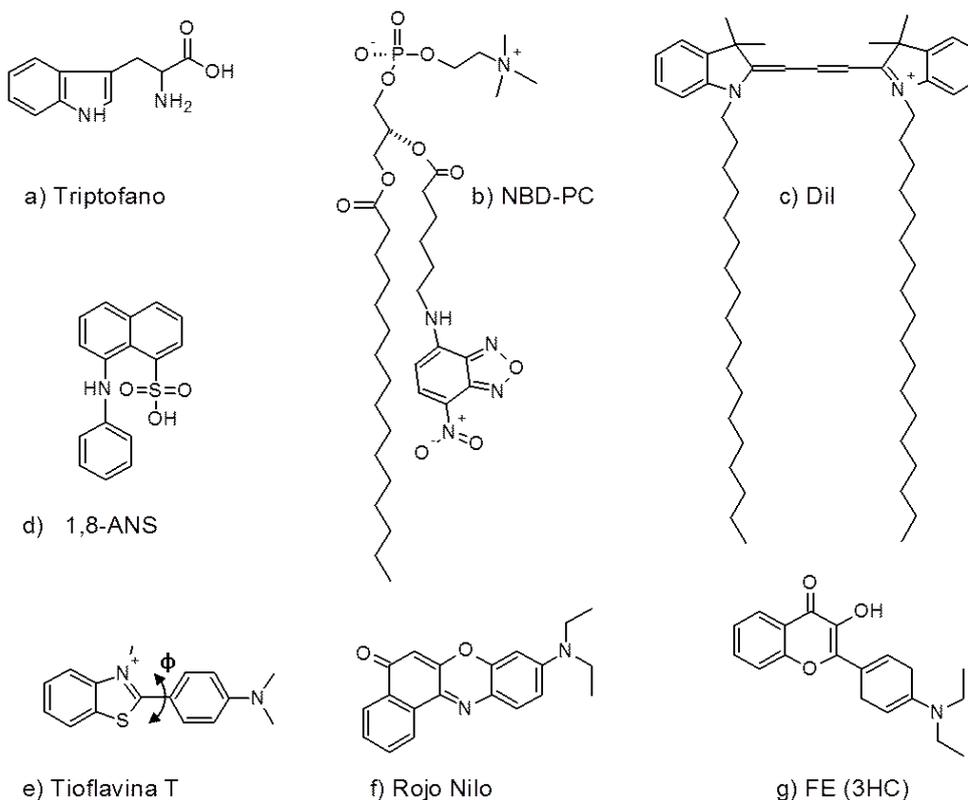
## 2.6. Sondas Fluorescentes

Algunas bio(macro)moléculas presentan naturalmente fluorescencia gracias a los grupos aromáticos de las proteínas, cofactores lipídicos o complejos de iones metálicos. Sin embargo, para la mayoría de los estudios de fluorescencia se recurre a fluoróforos externos sintetizados por técnicas químicas a partir de compuestos orgánicos que les brindan sus variadas propiedades fisicoquímicas y espectrales. Sin embargo, en las últimas décadas se ha vuelto cada vez más frecuente el uso de compuestos inorgánicos, complejos metálicos y cristales que también presentan el fenómeno de fluorescencia. Finalmente, no podemos dejar de mencionar el desarrollo de los distintos tipos de proteínas fluorescentes, que promovieron los estudios de procesos biológicos en células vivas gracias a que pueden ser codificadas genéticamente y que actualmente ofrecen una paleta completa de colores. La Figura 2.9 muestra un ejemplo de cada tipo de sonda fluorescente. A fin de comparar y contrastar las ventajas y limitaciones de los distintos fluoróforos disponibles hoy en día, desarrollaremos a continuación una breve guía de selección de sondas fluorescentes.

- 1. *Fluoróforos Naturales*: Prácticamente en cada grupo de biomoléculas existen subunidades con propiedades fluorescentes. En las proteínas, por ejemplo, los residuos de Triptófano (Trp) y Tirosina (Tyr) son los fluoróforos intrínsecos naturales y presentan espectros de fluorescencia en el UV. Los mismos pueden emplearse para estudiar las estructuras de las proteínas y el entorno inmediato que rodea estos residuos. Los residuos de Trp resultan más convenientes que los de Tyr, ya que poseen un rendimiento cuántico superior y a que su espectro de emisión responde a la polaridad de su entorno. Sin embargo, como su distribución dentro de la célula es muy amplia y abundante, su señal no resulta específica para su uso en muestras complejas, como en las

técnicas de microscopía de fluorescencia. Además, en muestras de células y tejidos existe una alta contaminación de la señal por la fluorescencia de otras proteínas y demás componentes celulares, como los cofactores RedOx derivados de nucleótidos, como  $\text{NAD}^+$  y FAD. Los ácidos nucleicos no emiten una fluorescencia considerable, pero, sin embargo, si pueden absorber luz UV (filtro interno).

Por otro lado, los tejidos vegetales tienen gran cantidad de pigmentos, moléculas lipídicas coloreadas como clorofilas, xantofilas o carotenoides; y muchas de ellas también son fluorescentes. Los iones de metales de transición complejados con proteínas también presentan propiedades de absorción de luz, a veces absorbiendo la fluorescencia propia de la muestra y otras incluso emitiendo, dependiendo del ion y el complejo. Por estas razones, los grupos fluorescentes naturales sólo suelen ser empleados cuando uno trabaja con sistemas puros (*in vitro*), donde resultan de gran utilidad.



**Figura 2.9.** Estructura química de ejemplos de distintos tipos de sondas fluorescentes empleadas en sistemas biológicos. (a) Sonda natural: Aminoácido Tryptófano; (b) análogos fluorescentes de metabolitos: NBD-PC; (c) fluoróforo anfifílico: Dil; (d) fluoróforo lipofílico: 1,8-ANS; (e) rotor molecular: Tioflavina T; (f) sonda sensible al entorno; Rojo Nilo; (g) sonda multiparamétrica: FE (de la familia de las 3HCs). Ver descripciones detalladas en el texto.

- 2. *Sondas Fluorescentes Orgánicas*: Distintos compuestos orgánicos con sistemas de enlaces- $\pi$  conjugados presentan fluorescencia en el rango de luz UV-Visible-IR. La ventaja principal de los fluoróforos orgánicos es el alto coeficiente de extinción ( $\epsilon$ ) y el alto rendimiento cuántico de fluorescencia ( $QY_f$ ) que presentan. Para su uso en el estudio de una biomacromolécula en particular es necesario unirlos en forma específica y estable a la misma. Los lípidos por ejemplo pueden ser sintetizados como análogos fluorescentes en los que una parte de los mismos se reemplaza o modifica para incorporar el grupo responsable de la fluorescencia. En el caso de las proteínas se recurre a las técnicas de química de proteínas para modificar los residuos específicos mediante la unión covalente de la sonda fluorescente. Los grupos que normalmente se modifican para tal fin son los amino, los carboxilo o los sulfhidrilos, correspondientes a Lisinas (Lys), Glutámicos (Glu) y Aspárticos (Asp), y Cisteínas (Cys) respectivamente. De este modo, los fluoróforos deben ser modificados para contener un grupo succinilimido, tetrafluorofenilo o isotiocianato si se desea que se unan a los residuos de Lys. Los mismos reactivos se emplean para marcar los nucleótidos través de sus grupos amino. Los grupos carboxilos se conjugan con fluoróforos carbodiimidas, pero puede ser necesario activar los carboxilos con 3-sulfo-tetrafluorofenilo. En el caso de los residuos de Cys, los fluoróforos se acoplan a iodoacetamida o maleimida. Estos reactivos pueden emplearse para marcar fluorescentemente anticuerpos y sondas de ADN que permitan reconocer proteínas, secuencias de ADN o ARN, así como estructuras subcelulares con alta especificidad y sensibilidad. Esta es la base del fundamento de técnicas como Inmunofluorescencia (IF), Citometría de flujo o Fluorescencia por Hibridización *in situ* (FISH) (para más detalles, ver Capítulo 13).

Existen muchas sondas fluorescentes que, debido a su estructura química, presentan afinidad por distintos componentes subcelulares, como por ejemplo membranas biológicas. Existen tres categorías de sondas fluorescentes que permiten teñir bicapas fosfolipídicas: análogos de fosfolípidos, fluoróforos con un grupo de anclaje y fluoróforos liposolubles. Estas sondas generalmente

presentan una limitada solubilidad y su  $QY_f$  aumenta notablemente en entornos lipofílicos respecto a su rendimiento en medio acuoso.

a) *Análogos de Fosfolípidos*: Las cabezas polares y/o sus cadenas aciladas son modificadas químicamente para contener un fluoróforo. De este modo, los análogos fluorescentes se comportan como los fosfolípidos naturales y pueden ser incorporados en las membranas biológicas. Algunos ejemplos son el NBD-PE, el NBD-PC o el BODIPY-PC (Cairo, 2010).

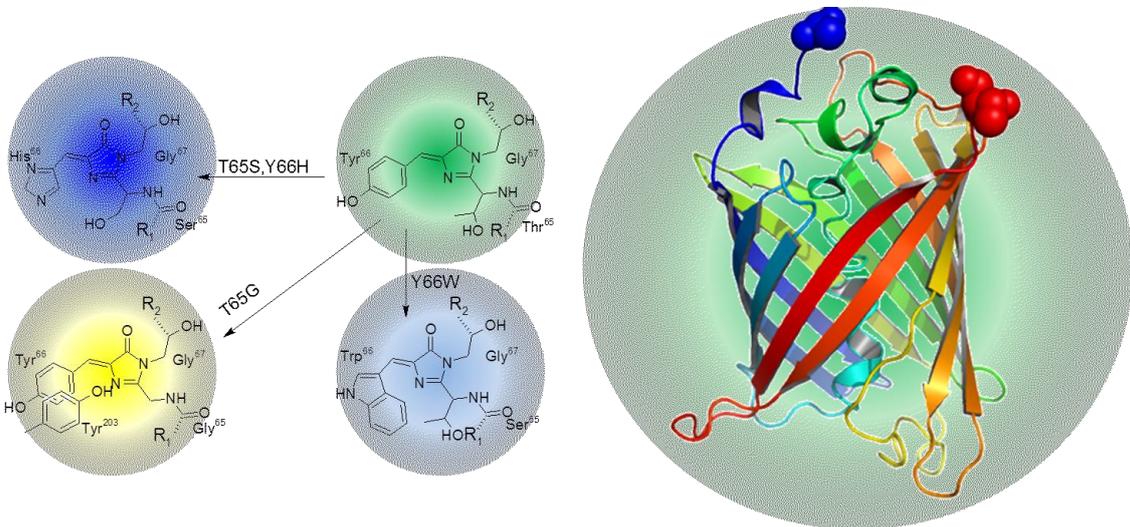
b) *Fluoróforos Anfifílicos*: La estructura química de estos compuestos fluorescentes, que normalmente incluyen largas cadenas hidrofóbicas, favorece la localización de estas sondas en las bicapas fosfolipídicas y lipoproteínas. Podemos incluir en este grupo a las sondas de la familia de las Dialquilcarbocianinas y de las Dialquilaminoestirilos. Entre los ejemplos sobresalientes debemos mencionar DiI, DiO, DiD y DiR (Johnson, 2010). Más recientemente se han desarrollado fluoróforos anfifílicos cargados, pero en los que las cargas positivas y negativas se invierten respecto a su configuración en los fosfolípidos naturales. Esto les brinda una muy alta afinidad por membranas biológicas, como en el caso del NR12S (Kucherak, 2010; Demchenko, 2009).

c) *Fluoróforos Lipofílicos*: Este grupo de sondas fluorescentes se caracteriza por tener gran afinidad por estructuras hidrofóbicas y particionan preferentemente en membranas. En este grupo se incluyen las sondas de fluidez de membranas DPH y TMA-DPH, además de las sondas de superficie de membranas ANS y Laurdan (Johnson, 2010).

Una limitación importante de este tipo de sondas fluorescentes es la promiscuidad que muestran por diversas estructuras dentro de la célula. Por tal motivo, dependiendo de la sonda, su uso puede restringirse casi exclusivamente a ensayos *in vitro*.

- 3. Proteínas Fluorescentes: Las proteínas fluorescentes (PFs) disponibles hoy en día han sido el resultado de más de 30 años de investigación y desarrollo que les terminó valiendo el premio Nobel de Química de 2008 a tres investigadores. Originalmente, Osamu Shimomura describió la purificación de la GFP (proteína Fluorescente Verde) de *Aequorea victoria* en la década del '60 (Shimomura, 1962). A mediados de los años '90 fue Martin Chalfie quien

propuso por primera vez su uso como marcador en células vivas (Chalfie, 1994). Finalmente fue Roger Y. Tsien junto a su grupo de trabajo quien por más de 15 años estudió y modificó la secuencia de esta proteína para comprender cómo se formaba el fluoróforo y cómo poderlo modificar para lograr distintas propiedades fotofísicas y espectrales (Heim, 1994). Posteriormente a la descripción de la avGFP, le han sucedido otras PFs de otras especies, algunas de las cuales han sido más fáciles de extender su espectro más allá del rojo. Actualmente se cuenta con una variedad muy amplia de colores que abarcan desde los 430 nm hasta más allá de los 700 nm, permitiendo múltiples marcaciones en paralelo (Giepmans, 2006). Los diferentes colores de las PFs se fueron obteniendo progresivamente sumando mutaciones a la secuencia original de la aqGFP, especialmente una vez que se resolvió su estructura cristalográfica, pudiendo diseñar racionalmente los mutantes puntuales para obtener efectos específicos. Las PFs empleadas actualmente acumulan una serie de mutaciones que optimizan o limitan el plegado, la maduración, la dimerización de las proteínas, además de sus propiedades espectroscópicas (Shaner, 2007).



**Figura 2.10.** Proteínas fluorescentes. El esquema muestra los cromóforos ubicados en el centro de las estructuras para una serie de mutantes de proteínas fluorescentes basadas en aqGFP que muestran diferentes propiedades espectroscópicas: GFP, BFP, CFP e YFP. Notar que sólo se indican las mutaciones del cromóforo propiamente dicho, pero que otras mutaciones son introducidas también para compensar estas mutaciones y lograr mejor estabilidad.

- 4. Puntos Cuánticos (Qdots): Se conoce como Puntos Cuánticos (Qdots o *Quantum Dots*) a los nanocristales de semiconductores recubiertos de una capa protectora, descritos originalmente a inicios de los '80, lo suficientemente pequeños como para mostrar propiedades de mecánica cuántica, en particular *excitones* definidos. Los Qdots presentan propiedades intermedias entre las de las moléculas individuales y las de los semiconductores macroscópicos, las que dependen fuertemente del tamaño y la forma de los mismos. Como fluoróforos, los Qdots tienen las ventajas de ser mucho más estables que las PFs o los fluoróforos orgánicos, y presentan un espectro de excitación inusualmente ancho, pudiendo separar perfectamente la luz de excitación de la luz de emisión así como excitar Qdots de varios colores al mismo tiempo con luz de una única longitud de onda. Esto los convierte en muy buenos dadores, pero en pésimos aceptores FRET. Además el color puede ser sintonizado controlando el tamaño y la forma del núcleo del Qdot, lo que también afecta el prendido y apagado (*blinking* o pestañeo). Así, por ejemplo, los Qdots de Cd:Te presentan emisión desde los 450 nm hasta los 850 nm dependiendo de su tamaño, el que varía entre 2 y 50 nm respectivamente.

### **Sondas sensibles al entorno**

Entre los fluoróforos orgánicos clásicos se incluyen a la fluoresceína, la rodamina, la cumarina, las cianinas y todos sus derivados. Algunos de estos compuestos presentan una solubilidad bastante alta y además son fluorescentes aun cuando están libres en solución. La fluoresceína por ejemplo, presenta los espectros que casi no se modifican en condiciones bastante extremas. Este es uno de los factores más importantes si se desea poder monitorear o detectar un fluoróforo en forma independiente de su localización subcelular. Sin embargo, en el caso de estudiar fenómenos en los que el objeto de estudio se particiona entre dos o más estados o fases (por ejemplo, soluble y unido a membranas), se revaloriza el uso de sondas capaces de reconocer y

reportar cambios en su entorno y de traducir estos cambios como alteraciones medibles en su espectro y/o en las propiedades del mismo (tiempo de vida o anisotropía). Del mismo modo, los biosensores basados en fluorescencia emplean cambios de intensidad o forma de su espectro para reportar sobre la presencia de su ligando específico (metabolitos, iones, etc.). Las sondas sensibles al entorno son herramientas muy útiles para monitorear y analizar por fluorescencia diferentes procesos biológicos así como las propiedades de los componentes en estudio. Este tipo de sondas puede clasificarse en intensiométricas, de corrimiento de banda o multiparamétricas de acuerdo a la naturaleza del origen de su capacidad de censo de su entorno (Demchenko, 2009).

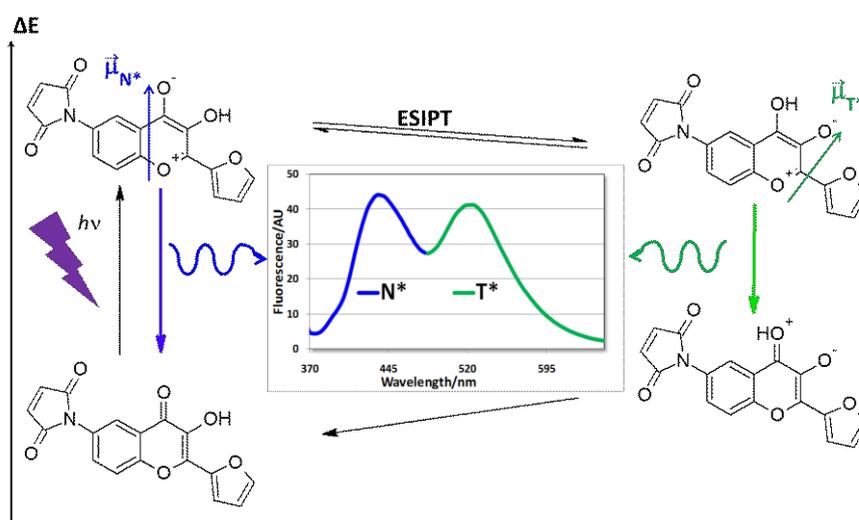
1. - *Sondas Intensiométricas*: Esta familia de fluoróforos está representada mayormente por los llamados “rotores moleculares”. Consisten en dos grupos aromáticos planares conectados por un enlace simple de libre rotación. Esas sondas muestra una dependencia muy fuerte de su intensidad de fluorescencia emitida (aumento del  $QY_f$ ) dependiendo de las restricciones impuestas a su libertad de rotación por el microentorno en el que se encuentra. Por lo tanto, su unión a estructuras de mayor tamaño o su partición en un medio de mayor viscosidad aumentan su intensidad de emisión al disminuir la rotación de sus grupos funcionales. Compuestos como la Tioflavina T (ThT), por ejemplo, son comúnmente empleados para monitorear la agregación amiloide de proteínas gracias a que su unión específica a las estructuras amiloideas viene acompañada de un significativo aumento de la intensidad de fluorescencia emitida. La ThT tiene una estructura de dos anillos prácticamente planar en su estado basal ( $\phi = 30^\circ$ ) (Figure 2.9). Al ser excitada, la molécula comienza a rotar explorando diversas conformaciones y pierde su planaridad, desacoplando el sistema de enlaces- $\pi$  conjugados y disminuyendo su  $QY_f$ . La unión a las estructuras amiloideas previene esta diversificación estructural y mantiene al fluoróforo en su conformación planar, maximizando la emisión de fluorescencia, que puede ser hasta 500 veces mayor que la de la sonda libre en agua (Biancalana, 2009). En algunas aplicaciones, las sondas intensiométricas presentan algunos problemas para el análisis cuantitativo

debido a que la respuesta registrada (cambio de intensidad observado respecto a la fluorescencia basal del fluoróforo libre, o  $F_0$ ) muestra una dependencia con la concentración local, parámetro que puede ser muy difícil de controlar en los entornos biológicos.

2. - *Sondas con Corrimiento de Banda*: Los fluoróforos que muestran corrimiento de su banda de emisión también se conocen como sondas solvatocrómicas, ya que dicho corrimiento depende de su interacción con el solvente. Estas sondas presentan un fuerte cambio en su polaridad intramolecular al pasar del estado basal al excitado por la transferencia intramolecular de carga (ICT, *Intramolecular Charge Transfer*). Esta es la razón por la cual la interacción con el solvente relaja el estado excitado de forma más eficiente cuando el entorno es más polar e induciendo en consecuencia una emisión con un corrimiento de Stokes más importante. Los factores que afectan el  $QY_f$  de las sondas solvatocrómicas son la polaridad del entorno y el grado de hidratación de la misma, ya que el estado excitado puede relajarse por interacciones dipolo-dipolo o por la formación de puentes de hidrógeno, respectivamente. En algunas sondas puede observarse también un corrimiento del espectro de absorción/excitación, pero el efecto suele ser mucho más notorio sobre el espectro de emisión. Debido a estas características, este tipo de sondas tiene gran utilidad en el estudio de estructuras de membranas e interacciones lípido-proteína, pero también pueden emplearse para analizar cambios conformacionales de polipéptidos o interacciones entre proteínas. Algunos ejemplos de sondas solvatocrómicas son el Prodan, el NBD o el Rojo Nilo.

3. - *Sondas Fluorescentes Multiparamétricas*: Esta tercera clase de fluoróforos sensibles al entorno muestra más de una banda de emisión, correspondientes a la coexistencia de más de un estado excitado. Así, estas sondas presentan espectros con dos o más bandas. Existen distintos tipos de sondas multiparamétricas, dependiendo del origen de la multiplicidad de estados. Una de las familias de compuestos más prolífera de esta clase de sondas pertenece a los derivados de la 3-hidroxicromona (3HCs) (Yushchenko, 2006; Yushchenko, 2007a). Las 3HCs presentan un equilibrio tautomérico por la

Transferencia Intramolecular de Protones en el Estado Excitado (ESIPT, *Excited State Intramolecular Proton Transfer*) entre las formas  $N^*$  y  $T^*$ . La forma tautomérica  $T^*$  se relaja como parte de los procesos de conversión interna y se relaja nuevamente por interacciones con el solvente, por lo que la emisión correspondiente al decaimiento de este estado presenta un máximo de emisión de mayor longitud de onda (menor energía) respecto a la banda correspondiente a la emisión de la forma normal excitada ( $N^*$ ). La Figura 2.11 muestra el equilibrio tautomérico para la sonda multiparamétrica Maleimida-FC (o MFC) de la familia de las 3HCs y su relación con la emisión de dos bandas de fluorescencia (Yushchenko, 2010).



**Figura 2.11.** Sondas multiparamétricas ESIPT. El esquema muestra el equilibrio tautomérico en el estado excitado por la transferencia intramolecular de protones (ESIPT). Estas sondas están basadas en el núcleo básico de la 3-hidroxicromona, que muestra una emisión de múltiples bandas de acuerdo al entorno en el que se encuentre. En este caso, la sonda MFC muestra dos bandas de emisión correspondientes a la forma normal  $N^*$  (azul) y una banda de mayor longitud de onda (menor energía) correspondiente a la emisión desde la forma tautomérica  $T^*$  (verde).

Las intensidades absoluta y relativa de ambas bandas de emisión son muy sensibles a la polaridad y/o a la hidratación del entorno de la sonda. El cociente de las intensidades de ambas bandas ( $T^*/N^*$ ) es particularmente conveniente un indicador apto para monitorear estas propiedades, por lo que a estas sondas también se las conoce como sondas de “proporción métrica” (*ratiometric*) (Klymchenko, 2004). Sin embargo, es necesario contemplar que, dependiendo de la sonda empleada, las bandas de emisión también pueden

sufrir corrimientos del máximo por mecanismo similares a los fluoróforos con corrimiento de banda. Por otro lado, algunas de las 3HC pueden presentar una alta sensibilidad a la hidratación de la sonda mediante la formación de un puente de hidrógeno entre el carbonilo en posición 4 del heterociclo y una molécula de agua. En entornos acuosos la sonda con el puente de hidrógeno presenta espectros de excitación y emisión que difiere de los de la sonda “no hidratada”. La forma hidratada presenta una única banda de emisión (H-N\*), especialmente en solventes próticos.

La proporción de las intensidades de cada banda brinda información sobre la presencia de agua y la polaridad del entorno. Esta capacidad de censar más de una propiedad a la vez es la que les da el nombre de sondas multiparamétricas. La respuesta relativa de cada banda puede optimizarse modificando los sustituyentes en las posiciones 2 y 7 del heterociclo de las 3HCs. A mayor capacidad donante de electrones en el sustituyente 2, menor es la relación T\*/N\*; mientras que el agregado de un grupo donante de electrones en posición 7 resulta en un aumento de dicha relación (M'Baye, 2007; Klymchenko, 2007). De este modo se pueden calibrar las propiedades de la sonda a distintos rangos de sensibilidad a las propiedades de su microentorno (distintas proporciones métricas) como para detectar cambios conformacionales de proteínas, interacciones con proteínas o ácidos nucleicos (Yushchenko, 2007b), cambios de fase membranas fosfolipídicas modelo o naturales (Avilov, 2005).

Además de las sondas ESIPT, existe otro tipo de sondas multiparamétricas. Un ejemplo son los sensores de iones, capaces de reconocer con muy alta afinidad y especificidad un catión metálico, como Fura-2 que puede reconocer al  $\text{Ca}^{+2}$ . En estos casos la formación de un complejo quelante entre el fluoróforo y el ión cambia las propiedades espectrales del primero. En el caso de Fura-2 se altera el espectro de excitación, por lo que comparando la fluorescencia emitida (505-530 nm) cuando se excita con longitud de onda de 340-350 nm con la registrada al excitar la sonda con luz de 375-390 nm se puede calcular la concentración de  $\text{Ca}^{+2}$  libre calibrando el sistema con una curva patrón.

Un tercer grupo de sondas fluorescentes multiparamétricas está representado por aquellos fluoróforos sensibles a potenciales transmembrana. Así, por ejemplo, sondas como el JC-1, que pertenece a la familia de las carbocianinas catiónicas, es concentrado en las mitocondrias por la presencia de un potencial transmembrana. El JC-1 soluble y monomérico presenta una fluorescencia verde (510-540 nm). Pero su acumulación en la mitocondria induce la formación de agregados-J que presentan una fluorescencia roja (570-620 nm). El cociente entre ambas señales permite reconocer mitocondrias activas de las no funcionales.

## Bibliografía

Atkins P, De Paula J. Atkins' Physical chemistry. Oxford University Press, Bath, 2002.

Avilov SV, Bode C, Tolgyesi FG, Klymchenko AS, Fidy J, Demchenko AP. Heat perturbation of bovine eye lens  $\alpha$ -crystallin probed by covalently attached ratiometric fluorescent dye 4'-diethylamino-3-hydroxyflavone. *Biopolymers* **78**: 340-348, 2005.

Biancalana M, Makabe K, Koide A, Koide S. Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to the surface of  $\beta$ -rich peptide self-assemblies. *Journal of Molecular Biology* **385**: 1052-1063, 2009.

Cairo CW, Key JA, Sadek CM. Fluorescent small-molecule probes of biochemistry at the plasma membrane. *Current Opinion in Chemical Biology* **14**: 57-63, 2010.

Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**: 802-805, 1994.

Demchenko AP, Mely Y, Duportail G, Klymchenko AS. Monitoring biophysical properties of lipid membranes by environment-sensitive fluorescent probes. *Biophysical Journal* **96**: 3461-3470, 2009.

Eftink MR. Fluorescence quenching: theory and applications. En Lakowicz JR (Ed.), Topics in fluorescence spectroscopy, Vol. 2: Principles (pp. 53-126). Plenum Press, New York. 2000.

Giepmans BN, Adams SR, Ellisman MH, Tsien RY. The fluorescent toolbox for assessing protein location and function. *Science* **312**:217-24, 2006.

Heim R, Prasher DC, Tsien RY. Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci* **91**:12501-12504, 1994.

Johnson ID, Spence M. (Eds.), Probes for Lipids and Membranes, Chapter 13, en The Molecular Probes® Handbook—A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies 11th Ed, Life Technologies, 2010. <https://www.lifetechnologies.com/ar/es/home/references/molecular-probes-the-handbook/probes-for-lipids-and-membranes.html> (Visitada el 30 de Agosto 2013).

Klymchenko AS, Demchenko AP. 3-Hydroxychromone dyes exhibiting excited-state intramolecular proton transfer in water with efficient two-band fluorescence. *New Journal of Chemistry* **28**: 687-692, 2004.

Klymchenko AS, Yushchenko DA, Mely Y. Tuning excited state intramolecular proton transfer in 3-hydroxyflavone derivative by reaction of its isothiocyanate group with an amine *Journal of Photochemistry and Photobiology, A: Chemistry* **192**: 93-97, 2007.

Kucherak OA, Oncul S, Darwich Z, Yushchenko DA, Arntz Y, Didier P, Mely Y, Klymchenko AS. Switchable Nile Red-based probe for cholesterol and lipid order at the outer leaflet of biomembranes. *Journal of the American Chemical Society* **132**: 4907-4916, 2010.

Lakowicz JR. Principles of Fluorescence Spectroscopy, 2<sup>nd</sup> Ed., Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York /NY), 1999.

Li HH, Lyles DS, Thomas MJ, Pan W, Scorci-Thomas MG. Structural determination of lipid-bound ApoA-I using fluorescence resonance energy transfer. *J. Biol. Chem.* **275**:37048–37054, 2000.

M'Baye G, Klymchenko AS, Yushchenko DA, Shvadchak VV, Ozturk T, Mely Y, Duportail G. Fluorescent dyes undergoing intramolecular proton transfer with improved sensitivity to surface charge in lipid bilayers. *Photochemical and Photobiological Sciences* **6**: 71-76, 2007.

Shaner NC, Patterson GH, Davidson MW. Advances in fluorescent protein technology. *J Cell Sci* **120**: 4247-4260, 2007.

Sharma A, Schulman SG. Introduction to Fluorescence Spectroscopy. Wiley-Interscience, Hoboken (NJ), 1999.

Shimomura O, Johnson F, Saiga Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol* **59**: 223–39, 1962.

Weber G. Polarization of the fluorescence of solutions. En Hercules DM (Ed.), Fluorescence and phosphorescence analysis (pp. 217–240). John Wiley and Sons, New York (NY), 1966.

Yushchenko DA, Shvadchak VV, Bilokin MD, Klymchenko AS, Duportail G, Mely Y, Pivovarenko VG. Modulation of dual fluorescence in a 3-hydroxyquinolone dye by perturbation of its intramolecular proton transfer with solvent polarity and basicity. *Photochemical and Photobiological Sciences* **5**: 1038-1044, 2006.

Yushchenko DA, Shvadchak VV, Klymchenko AS, Duportail G, Pivovarenko VG, Mely Y. Steric control of the excited-state intramolecular proton transfer in 3-hydroxyquinolones: Steady-state and time-resolved fluorescence study. *Journal of Physical Chemistry A* **111**: 8986-8992, 2007a.

Yushchenko DA, Vadzyuk OB, Kosterin SO, Duportail G, Mely Y, Pivovarenko VG. Sensing of adenosine-5'-triphosphate anion in aqueous solutions and mitochondria by a fluorescent 3-hydroxyflavone dye. *Analytical Biochemistry* **369**: 218-225, 2007b.

Yushchenko DA, Fauerbach JA, Thirunavukkuarasu S, Jares-Erijman EA, Jovin TM. Fluorescent ratiometric MFC probe sensitive to early stages of  $\alpha$ -synuclein aggregation. *Journal of the American Chemical Society* **132**: 7860-7861, 2010.