

# Cálculo a segundo orden en la excitación de la fluorescencia de moléculas esféricas dipolares

J. Torga <sup>1</sup>

Laboratorio de Electrónica Cuántica - Dto. Física - FCEN - UBA - Pabellón I, Ciudad Universitaria, 1428 Buenos Aires, Argentina

e-mail [torga@dfuba.df.uba.ar](mailto:torga@dfuba.df.uba.ar)

J. I. Etcheverry

Dto. Matemática - FCEN - UBA - Pabellón I, Ciudad Universitaria, 1428 Buenos Aires, Argentina

e-mail [jetchev@mate.dm.uba.ar](mailto:jetchev@mate.dm.uba.ar)

M. Marconi <sup>2</sup>

Laboratorio de Electrónica Cuántica - Dto. Física - FCEN - UBA - Pabellón I, Ciudad Universitaria, 1428 Buenos Aires, Argentina

e-mail [marconi@dfuba.df.uba.ar](mailto:marconi@dfuba.df.uba.ar)

Se analiza la emisión de fluorescencia inducida por excitación con pulsos láser polarizados en una población isotrópica de fluoróforos. Se supone que las moléculas decaen espontáneamente, que existe difusión rotacional y que la duración de los pulsos de excitación es mucho menor que los tiempos característicos de difusión y fluorescencia.

Se analizan en particular las energías de fluorescencia totales en función del ángulo de polarización cuando se excita con uno y dos pulsos láser separados por un intervalo de tiempo arbitrario. Comparando estas dos señales como función del retardo entre pulsos, se obtienen correlaciones entre los tiempos de difusión y fluorescencia. Se calcula también la sensibilidad de la determinación del cociente entre el tiempo característico de difusión y el tiempo de fluorescencia, a partir de las expresiones obtenidas.

## 1 Introducción

La determinación de los tiempos característicos de difusión rotacional de moléculas inmersas en un solvente, constituye una herramienta importante que permite analizar características de dicho medio a nivel molecular. Una situación especialmente interesante se da cuando las moléculas presentan fluorescencia, pues el análisis de la anisotropía de la fluorescencia producida por excitación con un pulso láser polarizado, proporciona información sobre la difusión rotacional. En el caso de moléculas aproximadamente esféricas, esta difusión rotacional se puede representar en forma relativamente simple mediante una constante de difusión [1, 2, 3].

En este trabajo se resuelve analíticamente un modelo que describe la excitación de un conjunto de moléculas fluorescentes mediante pulsos láser polarizados y el consecuente decaimiento rotacional y por fluorescencia. Se utiliza una aproximación de pulsos láser muy cortos y pequeñas excitaciones. Comparando los resultados obtenidos para uno y dos pulsos consecutivos de láser con la misma polarización, se establecen correlaciones que permiten, en principio, determinar los tiempos característicos de difusión y fluorescencia, a partir de la medición de la energía total de fluorescencia emitida a 90° de la dirección de incidencia, y en función del retardo entre pulsos.

(1) Becario CONICET

(2) Investigador CONICET

## 2 Modelo

Consideramos un modelo para la fluorescencia de moléculas en un medio líquido. Las moléculas se suponen esféricas dipolares. La distribución de orientaciones inicial de los dipolos se supone isotrópica, y se supone que cualquier anisotropía en la distribución desaparece gradualmente por colisiones con las moléculas de solvente.

Sean  $\eta(\theta, \phi, t)$  y  $\epsilon(\theta, \phi, t)$  las densidades de moléculas en el estado fundamental y en el estado excitado respectivamente, con dipolos en la dirección dada por  $(\theta, \phi)$ . En este trabajo los ángulos se miden respecto de un sistema de coordenadas esféricas con eje  $z$  en la dirección de polarización del haz de excitación, y eje  $y$  en la dirección del haz incidente. Denotamos con  $\tau$  el tiempo característico de fluorescencia, y con  $v_n, v_e$  a las constantes de difusión rotacional de los estados fundamental y excitado respectivamente.

Las moléculas se excitan con un pulso láser polarizado en la dirección dada por  $\hat{z}$ , de intensidad  $I(t)$ . Llamamos  $\Phi$  al rendimiento cuántico de excitación, y  $\sigma$  la sección eficaz de excitación. La energía de los fotones incidentes es  $h\nu$ .

Utilizando estas notaciones, el modelo considerado para excitación, difusión y fluorescencia de moléculas

se resume:

$$\begin{aligned}\eta_t &= -I(t) \frac{\Phi\sigma}{h\nu} \cos^2(\theta)\eta + \frac{\epsilon}{\tau} + v_n \Delta \eta \\ \epsilon_t &= +I(t) \frac{\Phi\sigma}{h\nu} \cos^2(\theta)\eta - \frac{\epsilon}{\tau} + v_e \Delta \epsilon\end{aligned}\quad (1)$$

El dato inicial para  $t = 0$  es:

$$\eta(\theta, \phi, 0) = \eta_0 \quad \epsilon(\theta, \phi, 0) = 0$$

y las condiciones de contorno naturales son:

$$\begin{aligned}\eta(\theta, 0, t) &= \eta(\theta, 2\pi, t) & \eta_\phi(\theta, 0, t) &= \eta_\phi(\theta, 2\pi, t) \\ \eta_\theta(0, \phi, t) &= \eta_\theta(\pi, \phi, t) = 0 \\ \epsilon(\theta, 0, t) &= \epsilon(\theta, 2\pi, t) & \epsilon_\phi(\theta, 0, t) &= \epsilon_\phi(\theta, 2\pi, t) \\ \epsilon_\theta(0, \phi, t) &= \epsilon_\theta(\pi, \phi, t) = 0\end{aligned}$$

Si suponemos  $v_n = v_e = v_r$  (corresponde a una situación en que no hay grandes cambios de forma de las moléculas excitadas), podemos simplificar el sistema anterior. Sumando ambas ecuaciones (1), obtenemos que  $\eta + \epsilon$  satisface la ecuación del calor con dato inicial  $(\eta + \epsilon)(\theta, \phi, 0) = \eta_0$ . Trivialmente  $(\eta + \epsilon)(\theta, \phi, t) = \eta_0$  es una solución de este problema, lo que permite eliminar por ejemplo la densidad angular de moléculas en el estado fundamental, obteniendo:

$$\epsilon_t = +I(t) \frac{\Phi\sigma}{h\nu} \cos^2(\theta)(\eta_0 - \epsilon) - \frac{\epsilon}{\tau} + v_r \Delta \epsilon$$

con dato inicial

$$\epsilon(\theta, \phi, 0) = 0$$

y condiciones de contorno

$$\begin{aligned}\epsilon(\theta, 0, t) &= \epsilon(\theta, 2\pi, t) \\ \epsilon_\phi(\theta, 0, t) &= \epsilon_\phi(\theta, 2\pi, t) \\ \epsilon_\theta(0, \phi, t) &= \epsilon_\theta(\pi, \phi, t) = 0\end{aligned}\quad (2)$$

Una vez calculada la densidad de moléculas excitadas, se obtiene la intensidad emitida con dirección de polarización  $\hat{p}$  dada por  $(\theta', \phi')$ :

$$I_f(\theta', \phi', t) = \int_{\Omega} (\hat{p} \cdot \hat{r})^2 \frac{\epsilon(\theta, \phi, t)}{\tau} d\Omega \quad (3)$$

### 3 Resultados y discusión

Obtendremos expresiones que describen la fluorescencia de las moléculas excitadas por pulsos láser de duración mucho menor que los tiempos característicos de fluorescencia y difusión.

Un pulso láser de intensidad  $I(t) = c\delta(t - t_0)$  altera la población inicial de moléculas excitadas  $\epsilon(\theta, \phi, t_0^-)$  según:

$$\begin{aligned}(\eta_0 - \epsilon(\theta, \phi, t_0^+)) &= \\ &= (\eta_0 - \epsilon(\theta, \phi, t_0^-)) \exp(-c \frac{\Phi\sigma}{h\nu} \cos^2(\theta))\end{aligned}\quad (4)$$

Analizaremos en particular el caso de dos pulsos sucesivos de la misma polarización:

$$I(t) = a\delta(t) + b\delta(t - t_i)$$

donde  $t_i$  es el intervalo de tiempo entre los dos pulsos, y  $a, b$  son sus respectivas intensidades. Aplicando la fórmula (4) al primer pulso láser y desarrollando a segundo orden en

$$a \frac{\Phi\sigma}{h\nu} \ll 1$$

se tiene:

$$\epsilon(\theta, \phi, 0^+) = \eta_0 \frac{a\Phi\sigma}{h\nu} \left( \cos^2(\theta) - \frac{a\Phi\sigma \cos^4(\theta)}{2h\nu} \right) \quad (5)$$

Para  $0 < t < t_i$  debemos resolver:

$$\epsilon_t = -\frac{\epsilon}{\tau} + v_r \Delta \epsilon \quad (6)$$

con condiciones de contorno dadas por (2), y dato inicial (5). Como el dato inicial y las condiciones de contorno son independientes de  $\phi$  la solución debe ser independiente de este ángulo. Separando variables, obtenemos la solución en la forma:

$$\begin{aligned}\epsilon(\theta, \phi, t) &= \frac{\eta_0 a \Phi \sigma}{h\nu} e^{-t/\tau} \left[ \left( \frac{1}{3} - \frac{1}{10} \frac{a\Phi\sigma}{h\nu} \right) + \right. \\ &+ \left. \left( \frac{2}{3} - \frac{2}{7} \frac{a\Phi\sigma}{h\nu} \right) P_2(\cos\theta) e^{-6v_r t} - \right. \\ &\left. - \frac{4}{35} \frac{a\Phi\sigma}{h\nu} P_4(\cos\theta) e^{-20v_r t} \right]\end{aligned}$$

donde  $P_n$  es el  $n$ -ésimo polinomio de Legendre.

La población de moléculas excitadas luego de la llegada del segundo pulso se calcula como anteriormente, y desarrollando en serie de Taylor para

$$b \frac{\Phi\sigma}{h\nu} \ll 1$$

a segundo orden, hallamos la población de moléculas excitadas a  $t = t_i^+$ . En esta expresión se retienen consistentemente potencias de  $a$  y  $b$  de grado menor o igual que 2. Expandiendo a su vez este dato inicial para  $t = t_i^+$  en términos de los polinomios de Legendre, obtenemos la solución para  $t_i < t < \infty$  en la forma:

$$\begin{aligned}\epsilon(\theta, \phi, t) &= \\ &= \sum_0^{\infty} b_n P_n(\cos\theta) e^{(t - t_i) \left( \frac{1}{\tau} + v_r n(n+1) \right)}\end{aligned}$$

donde  $b_n$  son los coeficientes del desarrollo del dato inicial a  $t = t_i$  en términos de los polinomios de Legendre  $P_n(\cos\theta)$ . Se omite la expresión explícita de los  $b_n$  por su excesiva longitud.

En lo que sigue, se calcularán la intensidad y la energía total de fluorescencia emitidas a  $90^\circ$  de la dirección de incidencia y con ángulo de polarización  $\xi$  respecto de la dirección  $\hat{z}$  de polarización del láser. La intensidad emitida se calcula de acuerdo a (3), y la energía total emitida se obtiene integrando en el tiempo:

$$Q_f(\xi) = \int_0^{\infty} I_f(\xi, t) dt$$

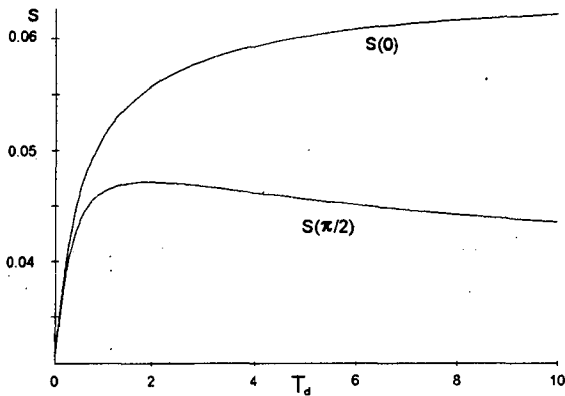


Figura 1: Señal  $S(\xi)$  obtenida para  $\xi = 0$  (curva superior), y  $\xi = \pi/2$  (curva inferior), como funciones del cociente  $T_d$ . Valores de los parámetros:  $T = 0.1$ ,  $R = 0.1$

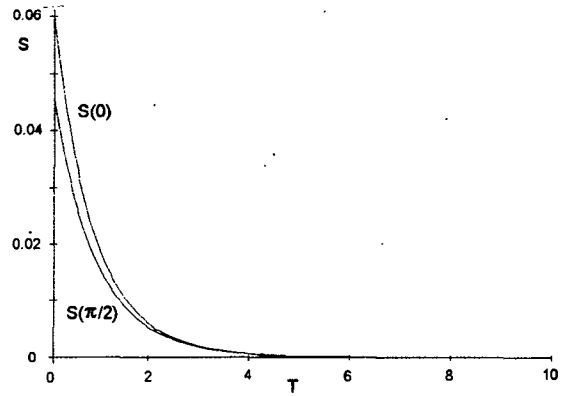


Figura 2:  $S(0)$  y  $S(\pi/2)$ , como funciones del retardo entre pulsos. Valores de los parámetros:  $T_d = 5$ ,  $R = 0.1$

Vamos a analizar esta expresión en dos casos particulares,  $b = 0$  y  $a = b$ , correspondientes a uno y dos pulsos consecutivos de intensidad  $a$ . El cociente entre las energías totales de fluorescencia para ambos casos,  $Q_f^{a=b}/Q_f^{b=0}$ , es una medida de la interacción entre los dos pulsos. Si el retardo entre pulsos es mucho mayor que los tiempos característicos de relajación del sistema,  $Q_f^{a=b}$  debería ser el doble de  $Q_f^{b=0}$ ; al haber moléculas excitadas por el primer pulso que aún no han decaído al estado fundamental a la llegada del segundo pulso,  $Q_f^{a=b}$  será menor que  $2Q_f^{b=0}$ . Desarrollando este cociente en potencias de  $R = \frac{a\Phi\sigma}{h\nu}$  se tiene:

$$Q_r = \frac{Q_f^{a=b}}{Q_f^{b=0}} = 2 - \frac{R}{3} e^{-T} \left[ 1 + 2 \cos(\xi)^2 + \frac{5}{T_d} + \frac{2}{7} \left( 1 + 11 \cos(\xi)^2 + \frac{14}{T_d} \right) e^{-\frac{3T}{T_d}} \right] / \left( 1 + \frac{5}{T_d} + 2 \cos(\xi)^2 \right)$$

donde se han reescalado los tiempos con  $\tau$ :

$$T = \frac{t_i}{\tau} \quad T_d = \frac{1}{2\nu_r\tau}$$

Designaremos con  $S(\xi) = 2 - Q_r(\xi)$  a esta medida de la interacción entre los pulsos. La Figura 1 muestra las señales  $S(0)$  y  $S(\pi/2)$  como funciones del cociente  $T_d$  entre los tiempos de difusión y de fluorescencia, para un retardo  $T = t_i/\tau$  fijo. Notar que es posible utilizar esta curva para hallar experimentalmente el cociente  $T_d$ .

En la Figura 2 se grafican  $S(0)$ ,  $S(\pi/2)$  como funciones del retardo  $T$ . Notar que las curvas obtenidas a ángulo 0 y a  $\pi/2$  coinciden para retardos del orden del  $T_d$  elegido.

Para analizar la sensibilidad en la determinación de  $T_d$ , como función de  $T$ , se muestran en la Figura 3 la derivada con respecto a  $T_d$  de las señales  $S(0)$  y  $S(\pi/2)$ , como función de  $T$ , y para varios valores de  $T_d$ . Se observa que la sensibilidad disminuye rápidamente para retardos entre pulsos del orden del tiempo

característico de difusión, para ambos ángulos de polarización (0 y  $\pi/2$  respecto de la dirección de polarización del haz de excitación). Se observa además que la sensibilidad de la medición a ángulo 0 es mayor que la de la medición a ángulo  $\pi/2$ , sobre todo para retardos pequeños comparados con el tiempo característico de difusión.

## 4 Conclusiones

Se ha demostrado que la medición de la energía de fluorescencia total (no resuelta en el tiempo) producida al excitar un conjunto de moléculas fluorescentes dipolares aproximadamente esféricas con uno y dos pulsos láser polarizados muy cortos, proporciona información sobre los tiempos característicos de fluorescencia y difusión rotacional. Dicha información se puede obtener de analizar el cociente entre las energías totales de fluorescencia ante la excitación con uno y dos pulsos láser. Se ha demostrado también que la señal a medir (la diferencia entre dos veces la energía de fluorescencia para un pulso y la energía de fluorescencia para dos pulsos) es del orden de unos pocos % de la señal total registrada.

Este nuevo método permitiría obtener en forma experimental tiempos de difusión rotacional utilizando

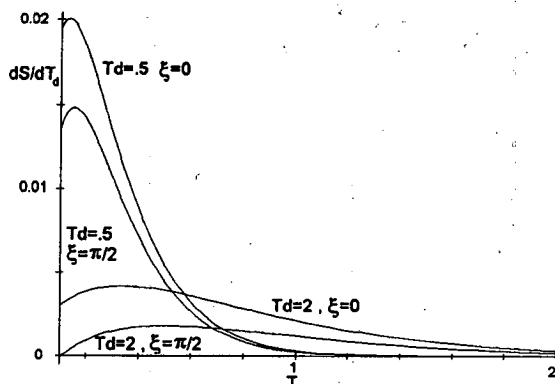


Figura 3: Derivada de  $S(0)$  y  $S(\pi/2)$  con respecto a  $T_d$ , para  $T_d = 2, 0.5$ . Valores de los parámetros:  $R = 0.1$

sistemas de detección lentos y con una resolución temporal limitada sólo por el ancho del pulso de excitación, ya que la medida se obtiene de analizar la señal de fluorescencia total integrada en el tiempo, como función del retardo entre los dos pulsos cortos de excitación.

En otro trabajo se analiza numéricamente el efecto de considerar pulsos de duraciones comparables con los tiempos de fluorescencia o difusión [4].

## 5 Agradecimientos

Este trabajo fue realizado con el aporte de subsidios de la Universidad de Buenos Aires y de la Fundación Antorchas.

## Referencias

- [1] J.R.Lakowicz. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Plenum Press, N.Y., London, 1983.
- [2] A.Kawski. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 23 (6), 459-529 (1983).
- [3] T. Tao. *Biopolymers*, 1969, 8, 609.
- [4] J.I.Etcheverry, J.Torga, M.Marconi. Ver este mismo volumen.