

Determinación del tiempo de difusión rotacional en moléculas fluorescentes elipsoidales

J. Torga, M. Marconi*

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

e-mail torga@df.uba.ar

C. G. Segundo, M. Villagrán

Lab. de Óptica Aplicada - Centro de Instrumentos - Univ. Nac. Autó. de México - Cd. A.Pdo. 70186, México D. F. (04510), México

En este trabajo se presentan expresiones para la emisión total de fluorescencia producida por la excitación con dos pulsos láser linealmente polarizados en una muestra de moléculas fluorescentes elipsoidales. En el modelo se supone que las moléculas decaen espontáneamente por fluorescencia y que simultáneamente tienen un movimiento de rotación difusional. Se analiza la energía diferencial de fluorescencia y su dependencia con los tiempos de rotación difusional del fluoróforo.

We present the analytical expressions for the total fluorescence produced after a double laser pulse excitation, with polarized light exciting a sample of ellipsoidal fluorescent molecules. In the model it is supposed that the molecules decay by fluorescence and simultaneously have a rotational diffusion movement. The differential fluorescence energy and how it depends on the molecular times.

I. INTRODUCCIÓN

La determinación del tiempo de difusión rotacional en moléculas fluorescentes permite obtener información sobre la dinámica de rotación y la estructura de las moléculas del solvente en el que está inmersa.

Existen una gran variedad de técnicas ópticas para la medición de tiempos de rotación^{(1),(2)} basadas en su mayoría en mediciones de anisotropía de fluorescencia y anisotropía de absorción. Si bien con la aplicación de pulsos láser ultracortos (< 1 ps) se consigue una fuente de excitación rápida comparada con los tiempos a medir, típicamente superiores a los 100 ps, existen pocas técnicas actualmente que permitan alcanzar una resolución temporal por debajo del nanosegundo⁽³⁾.

La técnica que se propone en este trabajo cuya idea ya fue presentada en^{(4),(5)}, para el caso de moléculas esféricas, permitiría tener resolución temporal limitada sólo por el ancho de pulso y sin necesidad de sistemas de detección rápida midiendo solamente la energía de fluorescencia. El método se basa en la excitación con dos pulsos láser iguales y linealmente polarizados que inciden sobre la muestra con un retardo temporal (al que llamaremos t_0) con una duración mucho menor

que los tiempos de rotación y fluorescencia. Se supone que el ancho del pulso de excitación es mucho menor a los tiempos de rotación y fluorescencia de forma que se pueda suponer que el pulso es una delta de Dirac.

II. DESCRIPCIÓN DEL MODELO.

Supondremos que el sistema en estudio es un conjunto de moléculas fluorescentes inmersas en un solvente. La concentración de fluoróforos es lo suficientemente baja como para despreocuparse de las interacciones entre sí mismas y solo tendremos en cuenta la interacción con el medio en el que está inmerso. La interacción con el solvente es a través del tensor de difusión D .

Suponemos que la orientación del fluoróforo puede definirse con el vector $u(\alpha, \beta, \gamma)$ donde la terna α, β, γ representa los ángulos de Euler desde un sistema de laboratorio a un sistema fijo a la molécula que llamaremos a lo largo de este trabajo $X - Y - Z$ y $x - y - z$ respectivamente. La molécula fluorescente es considerada como un sistema de 2 niveles. Teniendo en cuenta esto llamamos $n_e(\Omega, t)$ a la densidad de moléculas excitadas y $n_f(\Omega, t)$ a la densidad de moléculas en el estado fundamental. La densidad de fluoróforos en la muestra antes de toda excitación es n_0 . Con las suposiciones anteriores se debe cumplir en todo

momento que :

$$n_f(\Omega, t) + n_e(\Omega, t) = n_o$$

La excitación se produce con un haz linealmente polarizado en un eje que tomaremos siempre como el eje \mathbf{Z} en el sistema de laboratorio. Supondremos en primer lugar que el haz de excitación es un pulso en forma de delta de Dirac con una energía total que llamaremos a .

La ecuación de evolución con estas suposiciones (4) es:

$$\frac{\partial}{\partial t} n_e(\Omega, t) = K(\boldsymbol{\mu} \cdot \mathbf{Z})^2 n_f(\Omega, t) - \frac{n_e(\Omega, t)}{\tau} + H n_e(\Omega, t) \quad (1)$$

El segundo miembro de la ecuación tiene tres términos. El primero corresponde a la excitación de la muestra, el segundo corresponde al decaimiento por fluorescencia y el último término que tiene en cuenta la rotación difusional a través del operador H . El factor K en el término de la excitación depende de la intensidad del pulso incidente y de la sección eficaz de absorción σ como:

$$K = \sigma \rho \frac{I(t)}{h\nu} \quad (2)$$

Donde ρ es la eficiencia cuántica de fluorescencia que asumimos cercana a 1 y ν es la frecuencia de excitación de la luz incidente, τ es el tiempo de fluorescencia. Como la excitación es una delta podemos resolver la ecuación (1) separando la excitación de la evolución posterior del sistema asumiendo que durante la excitación el decaimiento por fluorescencia y la difusión son despreciables. De esta forma se puede obtener la población de moléculas excitadas en un instante inmediatamente posterior a la excitación ($t = 0^+$).

$$n_e(\Omega, t = 0^+) = n_o \left[1 - \exp - \left(K (\boldsymbol{\mu} \cdot \mathbf{Z})^2 \right) \right] \quad (3)$$

A lo largo de todo este trabajo supondremos que el valor de K es chico, tomando como cota superior $K = 0.01$ y haremos un desarrollo en serie en K de la expresión (3), conservaremos sólo los términos hasta segundo orden.

$$n_e(\Omega, t = 0^+) = n_o \left[K (\boldsymbol{\mu} \cdot \mathbf{Z})^2 - \frac{1}{2} K^2 (\boldsymbol{\mu} \cdot \mathbf{Z})^4 \right]$$

Una vez que la muestra es excitada el sistema decae por fluorescencia pero al mismo tiempo hay un proceso de difusión rotacional. Para describir esta evolución resolvemos (1) pero ahora sin el término de excitación

$$\frac{\partial}{\partial t} n_e(\Omega, t) = -H n_e(\Omega, t) \quad (4)$$

La ecuación (4) es análoga a la ecuación de Shrödinger para un rotor rígido asimétrico. Suponiendo que E_{lm} y Ψ_{lm} son los autovalores y autovectores del operador H .

$$H \Psi_{lm} = (D_1 \mathbf{L}_1^2 + D_2 \mathbf{L}_2^2 + D_3 \mathbf{L}_3^2) \Psi_{lm} = E_{lm} \Psi_{lm} \quad (5)$$

Donde D_1, D_2, D_3 son los elementos diagonales del tensor de difusión y \mathbf{L}_i son las componentes del operador momento angular. La expresión para la evolución temporal de la población de moléculas excitadas será, utilizando (3), (4) y (5) :

$$n_e(\Omega, t) = \sum_{lkm} a_{lkm}(K) \Psi_{lkm}(\Omega) \exp(-E_{lkm} t) \quad (6)$$

Excitación con el segundo pulso.

Suponemos que el segundo pulso es una delta con energía a . La intensidad total de excitación es entonces:

$$I(t) = a\delta(t) + a\delta(t - t_o)$$

En todo momento supondremos que $t_o < \tau$ y $t_o < \Phi$ donde Φ representa el menor de los tiempos característicos de difusión rotacional. Después de la excitación con el segundo pulso la población de moléculas excitadas será:

$$n_e(\Omega, t_o^+) = n_o \left[K (\boldsymbol{\mu} \cdot \mathbf{Z})^2 - \frac{1}{2} K^2 (\boldsymbol{\mu} \cdot \mathbf{Z})^4 \right] - \quad (7)$$

$$n_e(\Omega, t_o^-) \left[K (\boldsymbol{\mu} \cdot \mathbf{Z})^2 - \frac{1}{2} K^2 (\boldsymbol{\mu} \cdot \mathbf{Z})^4 \right]$$

$$+ n_e(\Omega, t_o^-)$$

En esta expresión la población de moléculas excitadas es la suma de tres términos. El primero es idéntico a la primera excitación (3), el segundo término depende sólo de la población remanente del primero y el tercer término que corresponde a las moléculas que permanecen excitadas a t_o cuando llega el segundo pulso.

Llamaremos n_d , población diferencial, a la densidad de moléculas excitadas determinada por el segundo término. O sea que:

$$n_d(\Omega, t_o) = n_e(\Omega, t_o^-) \left[K(\mu \cdot Z)^2 - \frac{1}{2} K^2 (\mu \cdot Z)^4 \right] \quad (8)$$

n_d tiene en cuenta la diferencia entre la cantidad de moléculas excitadas por el primer pulso y la cantidad excitada por el segundo, asumiendo que los dos pulsos son idénticos. Esta diferencia depende de la velocidad de desexcitación del fluoróforo, a través del tiempo de fluorescencia, y de la difusión rotacional de acuerdo a lo ya comentado anteriormente. De esta forma podemos obtener información sobre el tiempo de difusión rotacional y el tiempo de fluorescencia estudiando sólo la evolución de la población diferencial en función del retardo.

Con el mismo razonamiento utilizado para obtener $n_e(\Omega, t)$ podemos estudiar la evolución de $n_d(\Omega, t)$ para $t > t_o$.

$$n_d(\Omega, t) = \sum_{lkm} b_{lkm}(K) \Psi_{lkm}(\Omega) \exp(-E_{lkm}t) \quad (9)$$

Para obtener las expresiones para $n_d(\Omega, t)$ y a partir de estas la intensidad y energía de fluorescencia es necesario conocer la forma de la molécula y la ubicación de los dipolos de absorción y de emisión dentro de la misma.

III. MOLÉCULAS ELIPSOIDALES.

El caso que trataremos es el de una molécula elipsoidal y consideramos que el eje z (fijo a la molécula) corresponde a eje de simetría no degenerado. Suponemos que cada molécula en la muestra tiene un momento dipolar dado por μ y consideramos dos situaciones: cuando el dipolo se encuentra sobre el eje de simetría no degenerado, o sea $\mu \parallel z$ y cuando el dipolo se encuentra sobre el plano ortogonal al eje z , donde asumimos $\mu \parallel x$. En este caso las autofunciones $\Psi_{lkm}(\Omega)$ se reducen a los armónicos esféricos $Y_{lm}(\alpha, \beta)$ y los autovalores $E_{lm} = l(l+1)D_{\parallel} + (D_{\perp} - D_{\parallel})m^2$

$D_{\parallel} = D_3$ y $D_{\perp} = D_1 = D_2$ representan la componente del tensor paralela y perpendicular a z .

A partir de la expresión (9) aplicada al caso de moléculas elipsoidales, obtenemos la expresión para la intensidad diferencial de fluorescencia en

dirección paralela (I_{dp}) y perpendicular (I_{de}) al eje Z .

$$I_{dp} = \int_{\Omega} n_d(\alpha, \beta, t, t_o) (\mu \cdot Z)^2 d\Omega$$

$$I_{de} = \frac{1}{2} \int_{\Omega} n_d(\alpha, \beta, t, t_o) [(\mu \cdot X)^2 + (\mu \cdot Y)^2] d\Omega$$

A partir de las expresiones para las intensidades obtenemos la energía diferencial paralela (E_{dp}) perpendicular (E_{de}) y total (E_{dt}):

$$E_{dp} = \int_{t_o}^{\infty} I_{dp}(t, t_o) dt \quad E_{de} = \int_{t_o}^{\infty} I_{de}(t, t_o) dt \quad (10)$$

$$E_{dt} = E_{dp} + 2E_{de} \quad (11)$$

Dipolo sobre el eje z de simetría.

Para el caso en que el dipolo se encuentra sobre el eje z , del cálculo de (10)-(12) se obtiene:

$$E_{dt} = \frac{K^2 \tau}{270\pi} \exp\left(-\frac{t_o}{\tau}\right) \left(5 + 6 \exp\left(-\frac{t_o}{\Phi_1}\right)\right) \quad (12)$$

Esta expresión muestra que en este caso sólo tenemos un único tiempo de difusión $\Phi_1 = \frac{1}{2D_{\perp} + 4D_{\parallel}}$. En la figura 1 se muestran las curvas de E_{dt} en función del retardo entre pulsos para diferentes valores de Φ_1 . En general, los valores medidos de Φ_1 de la mayoría de las moléculas fluorescentes están en el rango $\frac{\tau}{100} \leq \Phi_1 \leq 2\tau$, por esa razón asumimos esta condición en las curvas graficadas.

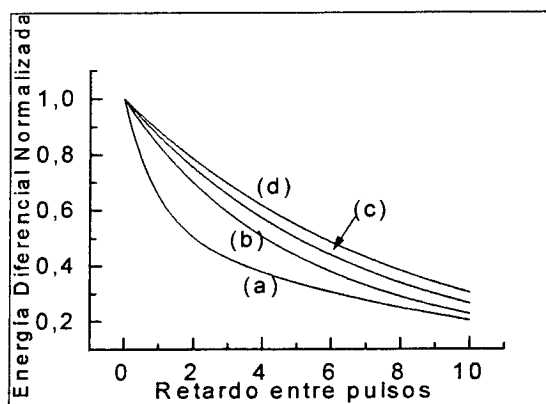


Figura 1: Energía diferencial en función del retardo entre pulsos para el caso $\mu \parallel z$. En los gráficos consideramos: a) $\Phi_1 = 1$, b) $\Phi_1 = 5$, c) $\Phi_1 = 10$, d) $\Phi_1 = 20$. En todos los casos graficados, se consideró un valor de $\tau = 10$.

Dipolo en el plano xy

Consideramos ahora el caso en que μ esta en el plano ortogonal al eje z . Siguiendo los mismos pasos descriptos en la situación anterior se obtiene:

$$Ed_i = \frac{K^2\tau \exp(-\frac{t_0}{\tau})}{180\pi} (5 + 3 \exp(-\frac{t_0}{\Phi_2}) + \exp(-\frac{t_0}{\Phi_1})) \quad (13)$$

De acuerdo a lo obtenido en (13) la energía diferencial tiene dos tiempos característicos de difusión rotacional que llamaremos Φ_1 , que coincide con el anterior, y $\Phi_2 = \frac{1}{2D_{\perp} + 4D_{\parallel}}$.

Las figuras 2 y 3 muestran curvas de energía diferencial en función del retardo entre pulsos, para el caso prolado y oblado respectivamente. Suponemos como en el caso anterior que $\frac{\tau}{100} \leq \Phi_1, \Phi_2 \leq 2\tau$

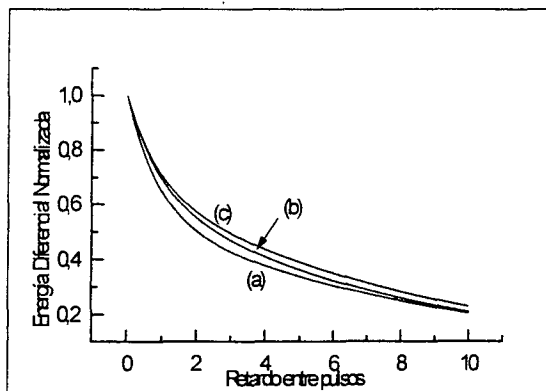


Figura 2: Energía diferencial en función del retardo entre pulsos para el caso de una molécula prolada. Se consideran los casos: a) $\Phi_1 = 1, \Phi_3 = 1$ b) $\Phi_1 = 5, \Phi_3 = 1$ c) $\Phi_1 = 1, \Phi_3 = 1$. Se tomo un valor de $\tau = 10$

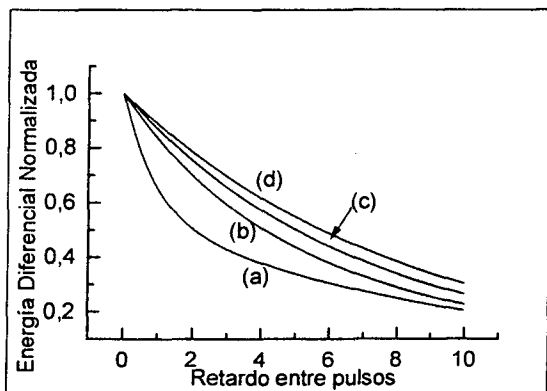


Figura 3: Energía diferencial en función del retardo entre pulsos para el caso de una

molécula oblada. Se consideran los casos:

a) $\Phi_1 = \Phi_3 = 1$ b) $\Phi_1 = \Phi_3 = 5$ c) $\Phi_1 = \Phi_3 = 10$ d) $\Phi_1 = \Phi_3 = 20$.

Se tomo

$\tau = 10$.

IV. CONCLUSIONES

Se presenta en este trabajo la posibilidad de estudiar el fenómeno de despolarización de moléculas elipsoidales a través del estudio de la energía de fluorescencia después de una doble excitación láser. Se define el concepto de energía diferencial total y se muestra su dependencia con los tiempos de rotación difusional y de fluorescencia. De las expresiones obtenidas se ve que la energía diferencial representa la diferencia entre la fluorescencia producida por el primer y segundo pulso. Esta diferencia tiene dos contribuciones. Una que depende sólo del tiempo de fluorescencia y se debe a la variación entre la cantidad total de moléculas en el estado fundamental que encuentran el segundo pulso con respecto a las que encuentra el primero. La segunda contribución que es la que depende de los tiempos de difusión se debe a la anisotropía que encuentra el segundo pulso y que fué producida por la primera excitación. Se plantea la posibilidad de utilizar esta magnitud como una forma para la obtención de estos tiempos a través de la medición en función del retardo entre pulsos.

La técnica presenta como características interesantes que permite la medición de la energía de fluorescencia integrada sin necesidad de detectores rápidos y una resolución temporal limitada sólo por el ancho de pulso.

Agradecimientos

Este trabajo fué subsidiado por la Universidad de Buenos Aires.

REFERENCIAS

- [1] A. Kawski, *Crt. Reviews in Anal. Chemistry* 23(6),459-529 (1993)
 - [2] C. V. Shank, E.P. Ippen, *Appl. Phys. Lett.* 26 (1975) 62.
 - [3] M. L. Horng, J. A. Gardecki, and M. Marroncelli. *J. Phys. Chem. A.* 101. (1997)
 - [4] J Torga, J Etcheverry y M Marconi, *AnalesAFA* (1996)
 - [5] J Etcheverry, J Torga y M. Marconi, *Anales AFA* (1996)
- * Investigador CONICET.