

## Fundamentos de Espectroscopía Molecular

### Guía de problemas N° 5.

#### Tema: Fluorescencia y fosforescencia

- 1) Utilizando las curvas de energía potencial molecular correspondientes a cada estado electrónico explique como ocurre:
- la radiación fluorescente indicando la ubicación del espectro de fluorescencia con respecto al de absorción y el origen de la estructura fina en ambos espectros.
  - la radiación fosforescente indicando la diferencia de tiempo de vida del estado excitado con respecto a la radiación fluorescente y la posición e intensidad del espectro fosforescente con respecto a la fluorescente
- 2) El espectro de absorción de una molécula presenta dos picos de distinta intensidad a dos longitudes de onda diferentes ( $\lambda_1$  y  $\lambda_2$ ). Compare la ubicación e intensidad de los espectros de emisión que se observan cuando la molécula se la excita con  $\lambda_1$  o  $\lambda_2$ .
- 3) a) Describa algunos procesos de desactivación que compiten con la radiación fluorescente.  
b) Defina eficiencia cuántica de fluorescencia y enuncie algunos de los factores que la pueden modificar.  
b) ¿Qué entiende por “quenching” dinámico? Y estático?  
c) ¿Cuáles son las dos condiciones imprescindibles para que se produzca transferencia resonante de energía de fluorescencia (FRET) entre dos fluoróforos?  
d) ¿Qué utilidad principal tiene la técnica de FRET? Justifique.
- 4): Se marcó el péptido Gly-L-Phe con el fluoróforo dansyl (DNS) (ver la molécula resultante en fig. abajo a la izquierda) a fin de estudiar la cinética de su clivaje por la carboxipeptidasa. Para ello, se mezcló rápidamente el péptido marcado con la enzima (método “stopped-flow”), y se estudió la emisión de fluorescencia en función del tiempo, excitando a una longitud de onda de 275nm. En el espectro de emisión se observaron dos picos: el del triptófano de la enzima y el del DNS. La intensidad de esos picos varía en el tiempo como se muestra en las figuras adjuntas.
- Explique por qué la fluorescencia del Trp aumenta con el tiempo mientras la del DNS disminuye.
  - Cuando el ion zinc de la enzima se reemplaza por  $\text{Co}^{2+}$ , la enzima conserva su actividad, pero no se observa fluorescencia del DNS. Sugiera una razón para esto y diga qué información podría obtenerse de esta observación. Los espectros de fluorescencia de Trp y DNS, junto con los de absorción de DNS y  $\text{Co}^{2+}$ , se muestran abajo.

