

Marcelo K. K. Nakaema e Rosemary Sanches

Departamento de Física e Informática - Instituto de Física de São Carlos - Universidade de São Paulo - CP 369 - 13560-970 - São Carlos - SP

Recebido em 11/5/98; aceito em 2/9/98

FREQUENCY-DOMAIN FLUOROMETRY. A didactic description of the frequency-domain fluorometry is presented. Its fundamental aspects, the instrumentation and what one can expect from the technique are discussed.

Keywords: frequency-domain fluorometry; fluorescence lifetime; phase and modulation fluorimeter.

INTRODUÇÃO

Quando uma molécula absorve radiação eletromagnética, a maneira como ela retorna ao seu estado fundamental é regida por sua estrutura e pelas propriedades físico-químicas do seu ambiente local. Em algumas situações o caminho de volta ao estado fundamental envolve a emissão de radiação. Se esta emissão é de um estado singlete o processo é chamado fluorescência, e o grupo molecular que emite a radiação é chamado fluoróforo.

A fluorescência tem sido usada para estudar vários sistemas químicos, físicos e biológicos¹⁻⁶. Apesar da grande quantidade de informações que se consegue com medidas estáticas, é interessante examinar também a fluorescência resolvida no tempo. Com esta técnica pode-se obter o tempo que a molécula permanece no estado excitado, ou seja, seu tempo de vida. Com isto é possível verificar se uma amostra contém vários fluoróforos distintos, pois neste caso o que se espera é mais de um tempo de vida. No caso de um único tipo de fluoróforo, os dados resolvidos no tempo podem indicar se este fluoróforo está presente em um ou mais ambientes distintos (já que o tempo de vida é sensível ao ambiente que circunda o fluoróforo), se o fluoróforo sofre reações quando no estado excitado (como, por exemplo, transferência de energia) e dar informações sobre o tamanho, forma e mobilidade de moléculas (com medidas de anisotropia).

Há duas técnicas para se obter dados de fluorescência resolvidos no tempo¹. Na primeira, uma amostra é excitada com um pulso de luz e observa-se a fluorescência em função do tempo. Na segunda técnica, a amostra é excitada com luz modulada e a fluorescência em função do tempo é obtida da resposta em frequência da emissão. Nos dois casos o objetivo é obter os parâmetros que descrevem a fluorescência em função do tempo.

O modelo mais comum para representar a fluorescência de uma amostra com várias espécies de cromóforos é o modelo multi-exponencial que considera a intensidade da fluorescência em função do tempo como uma soma de exponenciais¹:

$$I_f(t) = \sum_i \alpha_i \exp(-t/\tau_i) \quad (1)$$

onde τ_i é o tempo de vida de cada espécie i e o fator pré-exponencial α_i está relacionado com f_i , que é a contribuição de cada espécie cromófora na intensidade da fluorescência total (com $\sum_i f_i = 1$). Esta contribuição é dada por:

$$f_i = \int_0^{\infty} \alpha_i \exp(-t/\tau_i) dt = \alpha_i \tau_i \quad (2)$$

que, colocado na Eq. (1) resulta em:

$$I_f(t) = \sum_i f_i \tau_i^{-1} \exp(-t/\tau_i) \quad (3)$$

Com este modelo, os dados de fluorescência permitem obter os parâmetros τ e f de cada cromóforo.

FUNDAMENTOS DA TÉCNICA NO DOMÍNIO DA FREQUÊNCIA

Na espectroscopia de fluorescência no domínio da frequência², a amostra é excitada com luz modulada com frequência angular ω ($\omega = 2\pi f$, sendo f a frequência de modulação da luz). A excitação é dada pela expressão:

$$E(t) = E_0[1 + M_E \cos(\omega t)] \quad (4)$$

onde M_E é o fator de modulação, que corresponde à razão entre as partes a.c. e d.c. do sinal.

O sinal da fluorescência também é modulado na mesma frequência, mas o tempo de vida finito do estado excitado causa um atraso na fase e uma diminuição no fator de modulação da fluorescência em relação à excitação (Fig. 1), e pode ser escrito como:

$$F(t) = F_0[1 + M_F \cos(\omega t - \phi)] \quad (5)$$

com $M_F < M_E$.

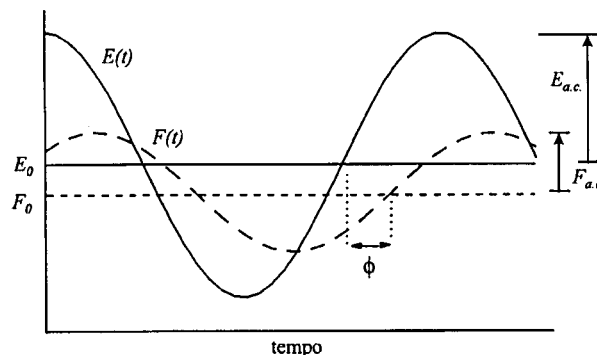


Figura 1. Formas de onda da excitação $E(t)$ e da emissão $F(t)$ e os parâmetros ϕ e M obtidos das medidas.

Medidas do atraso na fase ϕ e do fator de modulação da fluorescência em relação ao da excitação, $M=M_F/M_E$ fornecem os dados para duas determinações independentes do tempo de vida da fluorescência. Estes dados estão relacionados com a intensidade da fluorescência, $I_f(t)$, pela transformada de Fourier seno e cosseno, escritas conjuntamente da forma:

$$I_f(\omega) = \int_0^{\infty} I_f(t) \exp(-i\omega t) dt \quad (6)$$

Considerando, inicialmente, o caso de um único tempo de vida, a intensidade da fluorescência, dada pela Eq. (3), fica escrita como:

$$I_f(t) = \frac{I}{\tau} \exp(-t/\tau) \quad (7)$$

que, colocado na Eq. (6) resulta em:

$$I_f(\omega) = \frac{I}{\tau} \int_0^{\infty} \exp\left[-\left(\frac{1}{\tau} + i\omega\right)t\right] dt = \frac{1 - i\omega\tau}{1 + \omega^2\tau^2} \quad (8)$$

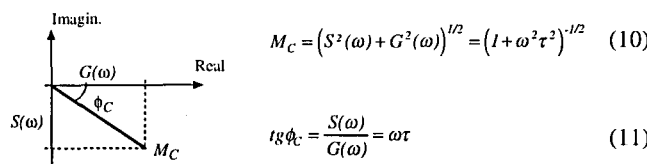
Então, $I_f(\omega)$ pode ser considerada uma função com uma parte real, dada por:

$$G(\omega) = \frac{I}{1 + \omega^2\tau^2} \quad (9a)$$

e uma parte imaginária, dada por:

$$S(\omega) = \frac{\omega\tau}{1 + \omega^2\tau^2} \quad (9b)$$

que, como mostra o esquema abaixo, correspondem a um fator de modulação M_C , que é o módulo da função, e uma diferença de fase ϕ_C .



Os tempos de vida da fluorescência podem ser obtidos tanto da Eq. (10) como da Eq. (11), chamados de τ_M e τ_P , respectivamente, e são dados por:

$$\tau_P = \frac{1}{\omega} \tan^{-1} \phi_C \quad \text{e} \quad \tau_M = \frac{1}{\omega} \left(\frac{1}{M_C^2} - 1 \right)^{1/2} \quad (12)$$

Se o tempo de vida corresponde realmente a um único decaimento exponencial, então τ_P e τ_M devem ser idênticos para todas as frequências de modulação (dentro do erro da medida). Como um exemplo, uma solução de Zn-TPP em tolueno, na presença de O_2 , foi excitada em 422 nm e a emissão foi observada com um filtro que só transmite $\lambda > 475$ nm. Os valores de ϕ e M obtidos para várias frequências e os valores de τ_P e τ_M obtidos da análise dos dados estão mostrados na Tabela 1.

Quando os tempos de vida obtidos da fase e da modulação, considerando-se um único decaimento, são diferentes, deve-se fazer a análise com o **modelo multi-exponencial**. Neste caso, as funções $S(\omega)$ e $G(\omega)$ são somas das contribuições de cada cromóforo, e são escritas como:

$$S(\omega) = \sum_i \frac{f_i \omega \tau_i}{1 + \omega^2 \tau_i^2} \quad (13a)$$

Tabela 1. Parâmetros para Zn-TPP em tolueno.

Freq (MHz)	ϕ (graus)	M	τ_P (ns)	τ_M (ns)
30,00	21,27	0,931	2,065	2,075
37,97	26,17	0,904	2,060	1,988
48,06	32,28	0,846	2,092	2,084
60,82	38,53	0,780	2,048	2,101
76,98	44,42	0,704	2,026	2,087
97,43	51,42	0,623	2,048	2,052
123,31	58,05	0,528	2,070	2,077
156,07	64,60	0,447	2,148	2,044
197,53	69,07	0,364	2,107	2,062
250,00	72,27	0,301	1,991	2,017

$$G(\omega) = \sum_i \frac{f_i}{1 + \omega^2 \tau_i^2} \quad (13b)$$

Tanto com este modelo como no caso de um único decaimento exponencial, o procedimento para a obtenção dos tempos de vida é o seguinte:

São usados valores iniciais para as frações de cada componente f_i (no caso de um só decaimento há uma única fração e $f = 1$) e para os tempos de vida de cada componente τ_i . As funções $S(\omega)$ e $G(\omega)$ são calculadas pelas Eqs. (9) ou (13), para as frequências de modulação usadas nas medidas. O fator de modulação $M_C(\omega)$ e a fase $\phi_C(\omega)$ são obtidos através das Eqs. (10) e (11) e estes valores são comparados com valores de $\phi(\omega)$ e $M(\omega)$, obtidos experimentalmente. É feito um procedimento de ajuste baseado em uma análise de mínimos quadrados não-linear para se deduzir os tempos de vida e as frações de cada componente. A função minimizada é³:

$$\chi^2 = \frac{1}{2n - p - 1} \left[\sum_{\omega} \left(\frac{\phi(\omega) - \phi_C(\omega)}{\delta\phi} \right)^2 + \sum_{\omega} \left(\frac{M(\omega) - M_C(\omega)}{\delta M} \right)^2 \right] \quad (14)$$

onde n é o número de frequências de modulação usadas, p é o número de parâmetros livres no ajuste. No caso de um único decaimento $p=1$, pois só há um tempo de vida a ser determinado. Para dois decaimentos $p=3$, pois há dois tempos de vida e uma das frações a serem determinados. Então, para m decaimentos,

$$p = 2m - 1.$$

$\delta\phi$ e δM são as incertezas nas medidas da fase e modulação, respectivamente. Valores típicos são $\delta\phi = 0,2^\circ$ e $\delta M = 4 \cdot 10^{-3}$.

Para os dados da Tabela 1, o ajuste resulta em um tempo de vida $\tau = 2,07 \pm 0,02$ ns.

Um exemplo para um sistema de dois componentes, uma mistura de Zn-TPP e H_2 -TPP em tolueno, na presença de O_2 , está mostrado na Tabela 2. A amostra foi excitada em 422 nm e a emissão foi medida usando um filtro para $\lambda > 475$ nm. Nesta tabela τ_P e τ_M são obtidos supondo um único decaimento (são tempos aparentes). Observa-se que τ_P aparente é, em geral, menor que τ_M aparente. Além disso, τ_P e τ_M aparentes variam com a frequência de modulação. Os dados de ϕ e M da Tabela II estão mostrados na Fig. 2 em função da frequência de modulação. A análise considerando dois componentes discretos resulta em tempos de vida de $\tau_1 = 9,2 \pm 0,2$ ns e $\tau_2 = 1,98 \pm 0,04$ ns e com contribuições para a fluorescência $f_1 = 0,6$ e $f_2 = 0,4$. Estes valores são um pouco menores do que os encontrados na literatura (2,7 ns para Zn-TPP e 13,6 ns para H_2 -TPP)⁴ devido à presença de O_2 na solução. A figura mostra também os resíduos obtidos do ajuste da fase e da modulação. Uma distribuição em torno do zero em todo o intervalo de frequências, indica um bom ajuste.

Tabela 2. Parâmetros para Zn-TPP e H₂-TPP em tolueno.

Freq (MHz)	ϕ (graus)	M	τ_P (ns)	τ_M (ns)
7,00	15,74	0,956	6,408	6,977
10,16	20,94	0,892	5,994	7,938
14,74	26,53	0,821	5,390	7,500
21,40	33,48	0,723	4,919	7,113
31,06	39,17	0,636	4,175	6,211
45,08	44,12	0,530	3,424	5,656
65,42	50,56	0,447	2,958	4,873
94,95	59,07	0,353	2,797	4,437
137,80	66,42	0,270	2,646	4,120
200,00	72,08	0,199	2,461	3,919

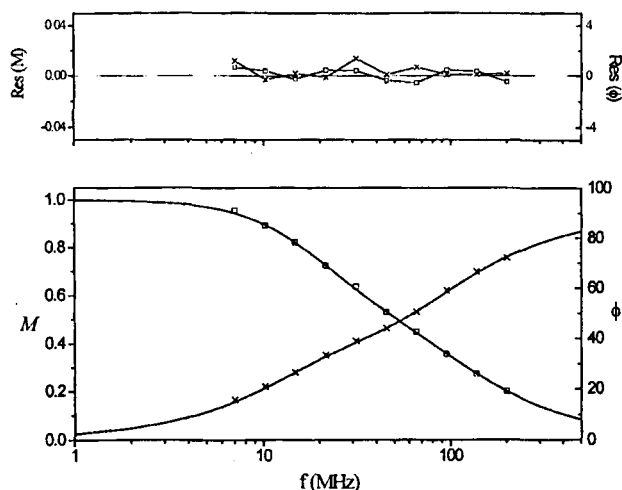


Figura 2. A diferença de fase ϕ e a modulação M em função da frequência de modulação f de uma amostra de H₂-TPP e Zn-TPP em tolueno (medidas feitas na presença de O₂). É mostrado também o resíduo do ajuste para o modelo multi-exponencial.

INSTRUMENTAÇÃO PARA MEDIDAS NO DOMÍNIO DA FREQUÊNCIA

O equipamento básico consiste de uma lâmpada de Xe (de cerca de 300 W) cuja luz é focada em um monocromador e é depois modulada por uma célula de Pockel no intervalo de frequência de 0,4 a 350 MHz (ver Fig. 3). Para se fazer medidas de fase e modulação em frequências tão altas, o equipamento utiliza o princípio de "correlação cruzada".

Um sintetizador de frequência gera um sinal modulado que controla a célula de Pockel. Com um divisor de feixes, uma parte da luz é enviada a uma fotomultiplicadora de referência que mede a intensidade e a fase da luz incidente. O restante da luz entra no compartimento da amostra que é equipado com uma torre girante que permite a troca fácil entre a amostra e uma substância padrão (ver explicação abaixo). A luz emitida é focada em uma outra fotomultiplicadora, depois de passar por um filtro conveniente (ele deve cortar o comprimento de onda da luz de excitação). Um segundo sintetizador, em fase com o primeiro, gera o sinal que modula a resposta das duas fotomultiplicadoras. Os dois sintetizadores têm frequências ligeiramente diferentes, diferença que corresponde à frequência de "correlação cruzada".

Em uma medida típica, o atraso na fase ϕ_S e o fator de modulação M_S são medidos para uma substância padrão (em geral um espalhador - uma solução de glicogênio ou uma suspensão de partículas de látex) em relação ao sinal gerado pela fotomultiplicadora de referência, que tem fase ϕ_R . Esta medida é feita para que se consiga a referência para $\tau = 0$. Então, a diferença de fase ϕ_F e o fator de modulação M_F são obtidos

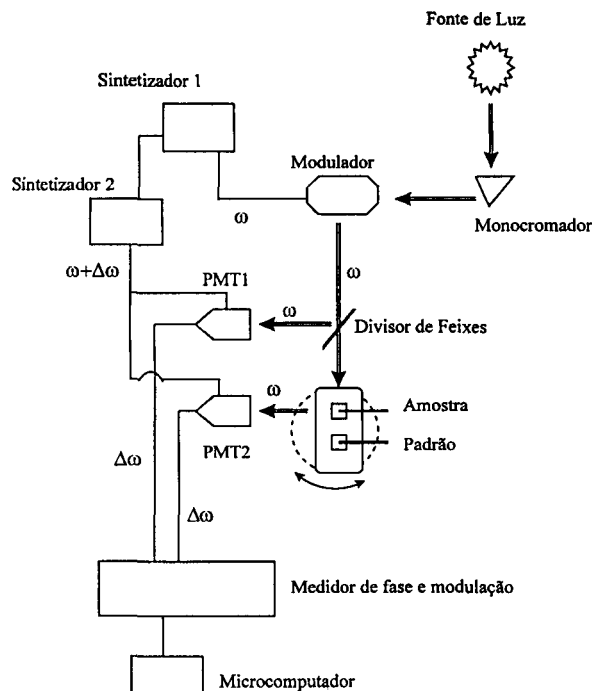


Figura 3. Esquema do equipamento de fluorescência para medidas no domínio da frequência. (PMT1 = fotomultiplicadora de referência)

para a amostra fluorescente também em relação ao sinal da fotomultiplicadora de referência. O atraso absoluto na fase da fluorescência é dado por³:

$$\phi = (\phi_R - \phi_F) - (\phi_R - \phi_S) \quad (15)$$

e o fator de modulação dado por:

$$M = \frac{(ac/dc)_F}{(ac/dc)_S} \quad (16)$$

Essas medidas são repetidas em várias frequências no intervalo de frequências apropriado. Os tempos de vida são determinados pela análise de mínimos quadrados.

A utilização de espalhadores para calibrar o equipamento tem o problema do "efeito da cor" que é devido ao fato do tempo de transito dos elétrons através da fotomultiplicadora variar com o comprimento de onda da luz que atinge o fotocatodo. Consequentemente, a luz espalhada e a fluorescência podem ter atrasos diferentes. O ideal é usar fluoróforos como padrão, de modo que o comprimento de onda da emissão da amostra seja o mais próximo possível do comprimento de onda da emissão do padrão.

Para se entender o método da "correlação cruzada"⁵, deve-se lembrar que o sinal da fluorescência da amostra, dado pela Eq. (5), é da forma:

$$F(t) = F_0[1 + M_F \cos(\omega t - \phi)]$$

e que a resposta das fotomultiplicadoras é modulada por um sinal do tipo:

$$C(t) = C_0[1 + M_C \cos(\omega_c t - \phi_c)] \quad (17)$$

portanto, o sinal resultante detectado é da forma:

$$V(t) = F_0 C_0 [1 + M_F \cos(\omega t - \phi) + M_C \cos(\omega_c t - \phi_c) + M_F M_C \cos(\omega t - \phi) \cos(\omega_c t - \phi_c)] \quad (18)$$

O último termo desta equação pode ser reescrito como:

$$\frac{M_F M_C}{2} [\cos(\omega_c t + \omega t - \phi_c - \phi) + \cos(\Delta\omega t - \Delta\phi)] \quad (19)$$

onde $\Delta\omega = \omega_c - \omega$ e $\Delta\phi = \phi_c - \phi$. Como $\omega_c \approx \omega$, a Eq. (18) contém termos constante, com frequência ω , com frequência $\approx 2\omega$ e com frequência $\Delta\omega$. Este último termo contém toda a informação sobre a fase e a modulação do sinal original $F(t)$ e pode ser totalmente filtrado dos outros termos. Então, para todas as frequências de modulação, a fase e a modulação são medidas na frequência de correlação cruzada, $\Delta\omega$. Esta frequência pode ser escolhida entre 40 e 400 Hz, em um equipamento básico.

SIMULAÇÕES DE RESOLUÇÃO E PRECISÃO DOS TEMPOS DE VIDA

Para se conseguir medir um certo tempo de vida, a frequência de modulação da luz deve ter valores de modo que se consiga:

$$\omega\tau \approx 1 \quad (20)$$

Por exemplo, para se medir um tempo de 2 ns, a modulação da luz deve ser em torno de 80 MHz. A Fig. 4 mostra simulações da diferença de fase ϕ e da razão das modulações M em função da frequência de modulação da luz, para decaimentos exponenciais com diferentes tempos de vida. É importante notar que o intervalo de frequência de modulação a ser usado depende do tempo de vida a ser medido. Na prática são utilizadas cerca de 10 frequências que são espalhadas em escala logarítmica no intervalo selecionado.

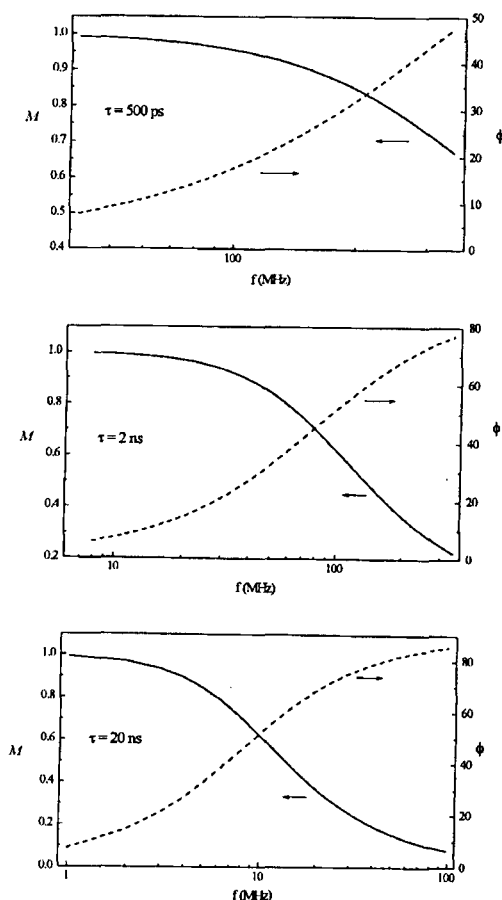


Figura 4. Simulação da diferença de fase ϕ e da modulação M em função da frequência de modulação f , para diferentes tempos de vida.

A presença de tempos bem curtos pode ser facilmente percebida na análise de dados com mais de um decaimento exponencial. A Fig. 5 mostra a simulação para ϕ e M em função da frequência de modulação, considerando-se dois tempos de vida: 10 ns e 100 ps. Uma contribuição de 5% do fluoróforo com $\tau = 100$ ps já é facilmente identificável na fase. A modulação não é tão sensível à presença deste segundo tempo de vida, mas ela ajuda na caracterização de $\tau = 10$ ns.

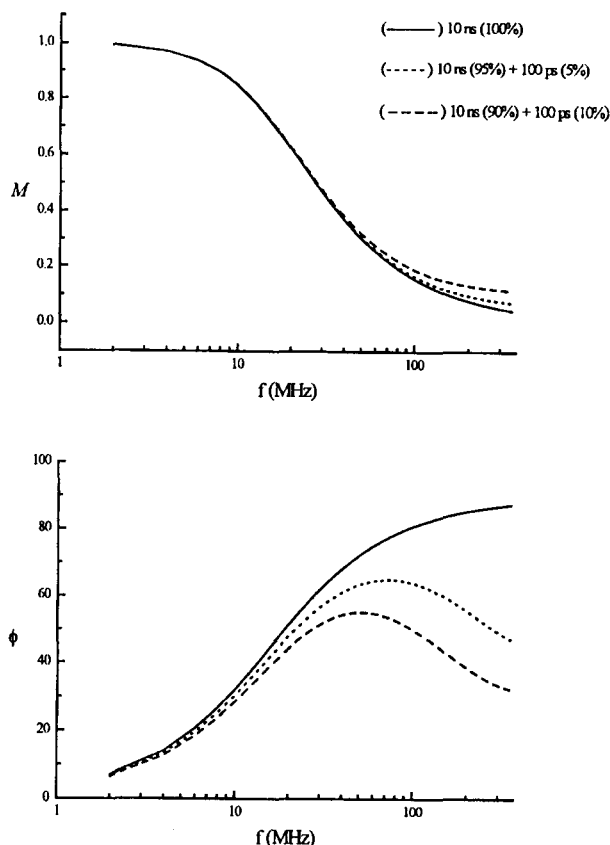


Figura 5. Simulação da diferença de fase ϕ e da modulação M em função da frequência de modulação f , considerando-se diferentes contribuições de dois tempos de vida, 10 ns e 100 ps.

Para se estimar a resolubilidade de pares de tempos de vida, foi feita uma simulação de ϕ e M para um sistema com dois tempos de vida, $\tau = 10$ ns e $\tau = 5$ ns, com diferentes contribuições de cada um deles na intensidade da fluorescência (ver Fig. 6). É preciso pelo menos uns 20% do componente com $\tau = 5$ ns para que ele possa ser percebido tanto no gráfico da fase como no da modulação. É claro que o valor exato depende da qualidade dos dados experimentais (relação sinal/ruído).

Pode-se também estimar qual o erro na medida do tempo de vida. Da relação $\tan\phi = \omega\tau$ e considerando-se que as medidas são feitas na região em que se tem $\omega\tau \approx 1$, consegue-se $\delta\tau = \frac{2\delta\phi}{\omega}$. O erro estimado para a medida da fase é $0,2^\circ$, que resulta em

$$\delta\tau = \frac{10^{-3}}{f} \quad (21)$$

Este cálculo foi feito para alguns tempos de vida. Para se determinar um tempo de vida $\tau = 20$ ns, as medidas devem ser feitas com $f \approx 10$ MHz., resultando em $\delta\tau = 100$ ps. Para um $\tau \approx 500$ ps utiliza-se $f \approx 300$ MHz e o erro que se obtém é 4 ps. Na prática os erros observados podem ser bem maiores do que os

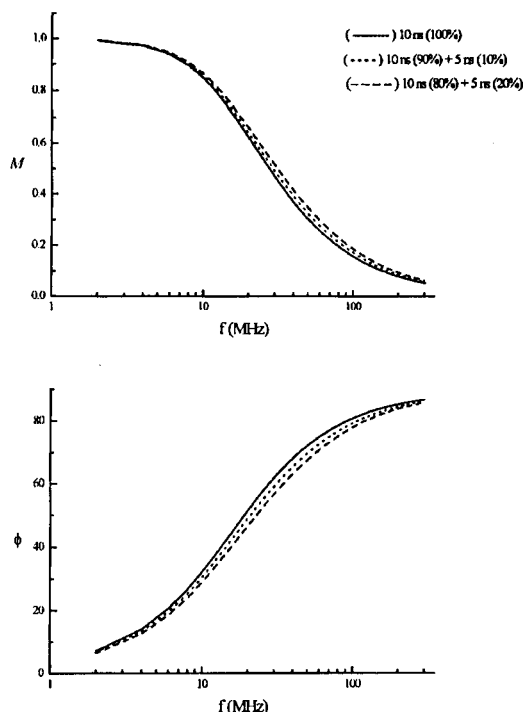


Figura 6. Simulação da diferença de fase ϕ e da modulação M em função da frequência de modulação f , considerando-se diferentes contribuições de dois tempos de vida, 10 ns e 5 ns.

estimados acima. A razão principal é a oscilação na intensidade da lâmpada durante a aquisição dos dados, que pode ser causada pelo envelhecimento da lâmpada e por variações na rede elétrica.

VANTAGENS DA TÉCNICA NO DOMÍNIO DA FREQUÊNCIA

O tempo de vida do estado excitado de uma molécula pode

ser obtido por duas técnicas, uma no domínio do tempo e outra no domínio da frequência. Além da informação conseguida com essas técnicas ser a mesma, a resposta em frequência da emissão pode ser conseguida com a transformada de Fourier da resposta no domínio do tempo, e vice-versa.

No domínio do tempo a excitação é feita com pulsos de um laser e, o ideal, é que eles sejam bem mais curtos do que o tempo que se deseja medir. Ainda assim, é necessário fazer a deconvolução do sinal de excitação da fluorescência medida. Para se medir tempos menores que nanosegundos são usados lasers de picosegundos ou de femtosegundos. Estes lasers precisam ser alinhados com frequência e fornecem linhas em poucos comprimentos de onda. O que se faz muitas vezes é usar também um laser de corante, o que dificulta ainda mais o alinhamento e a manutenção apropriada dos lasers.

Com a técnica no domínio da frequência, não há a necessidade da utilização de um laser. Conseguem-se excelentes medidas com uma lâmpada de Xe que é de fácil manuseio e tem emissão em toda região do espectro ultravioleta-visível. Além disso, consegue-se medida de tempos de vida bem curtos e com uma precisão muito boa. Se houver necessidade de excitação mais intensa ou modulação mais alta, pode ser usado um laser ou radiação sincrotron⁶.

REFERÊNCIA

1. Lakowicz, J. R.; Gryczynski, I. In *Topics in Fluorescence Spectroscopy Vol 1*; Lakowicz, J. R.; Ed.; Plenum Press; New York 1991; p 293.
2. Gratton, E.; Jameson, D. M.; Hall, R. D.; *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* **1984**, *13*, 105.
3. Jameson, D. M.; Hazlett, T. L.; In *Biophysical and Biochemical Aspects of Fluorescence Spectroscopy*; Dewey, T. G.; Ed.; Plenum Press; New York 1991; p 105.
4. Harriman, A.; Porter, G.; Searle, N.; *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2* **1979**, *75*, 1515.
5. Gratton, E.; Limkeman, M.; *Biophys. J.* **1983**, *44*, 315.
6. Gratton, E.; Jameson, D. M.; Rosato, N.; Weber, G.; *Rev. Sci. Instrum.* **1984**, *55*, 486.