



Biofísica

2021-2022

Docentes:

- Teresa Viseu
- Júlia Tovar

Programa sucinto da UC

1. Introdução
2. Técnicas não invasivas para o estudo de sistemas biológicos
3. Sondas fluorescentes aplicadas ao estudo de sistemas biológicos
4. Modelização de sistemas biológicos
5. Física da radiação e os seus efeitos biológicos
6. Processos de transporte
7. Bioeletricidade

Programa das PL

PL1 - Introdução à espectroscopia eletrónica e molecular

Cap2

Cap 2 e 3

PL2 - A fluoresceína como sonda de pH: aplicação à estimativa do pH de uma água natural

PL3 - Detecção de variações conformacionais de proteínas por transferência de energia

Cap 2 e 3

PL4 - Detecção da formação e fusão de membranas utilizando o pireno como sonda fluorescente

Cap 2, 3, 4

PL5 - Estudo da radiação emitida por uma fonte radioativa de ^{226}Ra

Cap5

Capítulo 3

Sondas Fluorescentes para o estudo de sistemas biológicos

Sondas Fluorescentes

O que é uma sonda? Uma sonda é um repórter, dá-nos informações sobre o meio onde se localiza!

No estudo de sistemas biológicos usam-se muitas vezes sondas.

São moléculas ou partes de moléculas que têm alguma propriedade físico-química que pode ser utilizada para o estudo da região do meio biológico onde se localizam.

Podem ser sondas/marcadores radioativos, fluorescentes, ...

Só nos vamos referir às sondas fluorescentes.

Há sondas extrínsecas (são adicionadas ao meio biológico em estudo) e intrínsecas (já fazem parte do meio biológico em estudo).

Sondas Fluorescentes

É da interação da sonda (intrínseca ou extrínseca) com o meio (normalmente com o solvente) que se tira a informação acerca desse meio.

Sondas fluorescentes extrínsecas – a sonda não existe naturalmente no meio biológico, mas é introduzida no sistema, dando informação sobre o local que ocupou por alteração de alguma propriedade do meio – há sondas de polaridade, de pH, de viscosidade, de iões, de concentração local...

Sondas fluorescentes intrínsecas – fazem naturalmente parte do modelo biológico e podem dar informações sobre o local onde se situam. São essencialmente os aminoácidos fluorescentes (triptofano, tirosina, fenilalanina) existentes nas proteínas e dão informação sobre as diferentes conformações das proteínas.

Sondas Fluorescentes Intrínsecas – exemplos

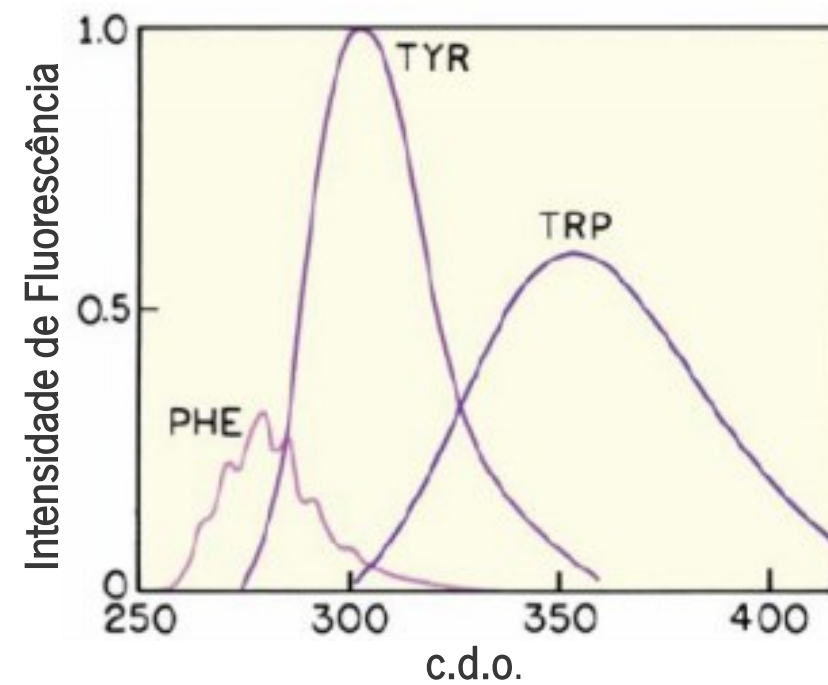
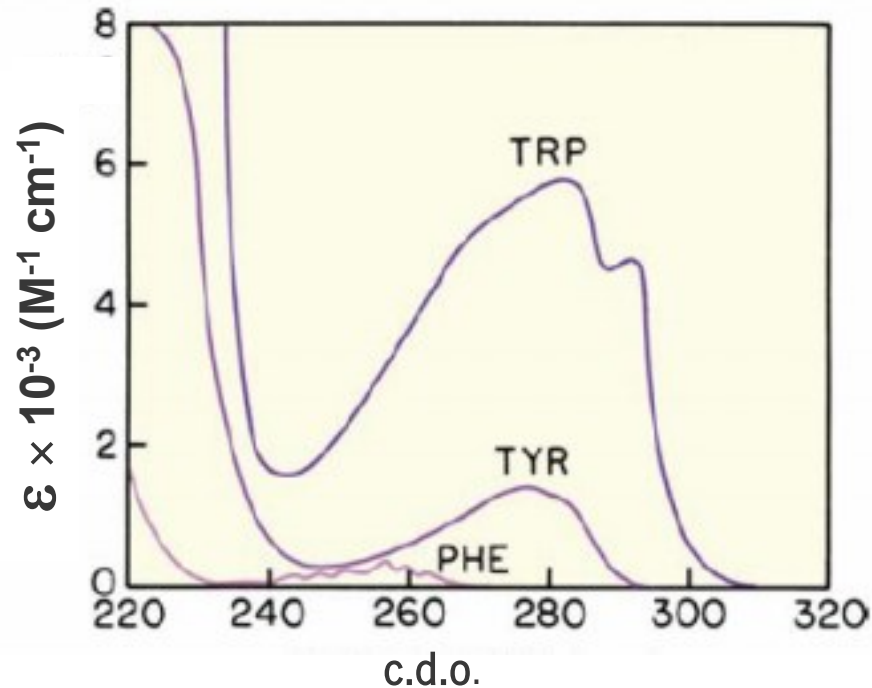
O $\lambda_{\text{máx}}$ do espectro de fluorescência do triptofano desvia-se para comprimentos de onda menores e a intensidade aumenta quando a polaridade do meio diminui. Se o triptofano ou a tirosina estiverem num meio polar, os seus rendimentos quânticos de fluorescência diminuem com o aumento da temperatura, mas se o meio for não-polar, esta diminuição é mínima (sonda de polaridade).

O rendimento quântico de fluorescência do triptofano e da tirosina decresce fortemente se o grupo carboxilo destes aminoácidos estiver protonado, ou seja ϕ_F é muito mais baixo em meio ácido do que em meio alcalino (sonda de pH).

No trabalho T3 estudam as alterações de conformação da BSA com a variação do pH do meio, observando alterações na transferência de energia entre a tirosina e o triptofano (sonda de concentração).

Sondas Fluorescentes Intrínsecas – exemplos

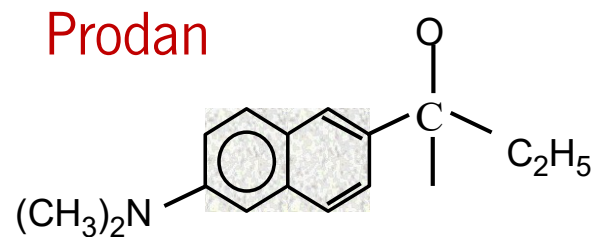
No trabalho T3 verificam a existência de diferentes conformações da BSA em função do pH do meio, observando alterações na transferência de energia entre a tirosina e o triptofano.



Verificam que a TE é mais eficiente a pH 7 do que a pH 2, logo a BSA deve estar com uma conformação mais helicoidal (aminoácidos mais próximos) a pH 7 do que a pH 2.

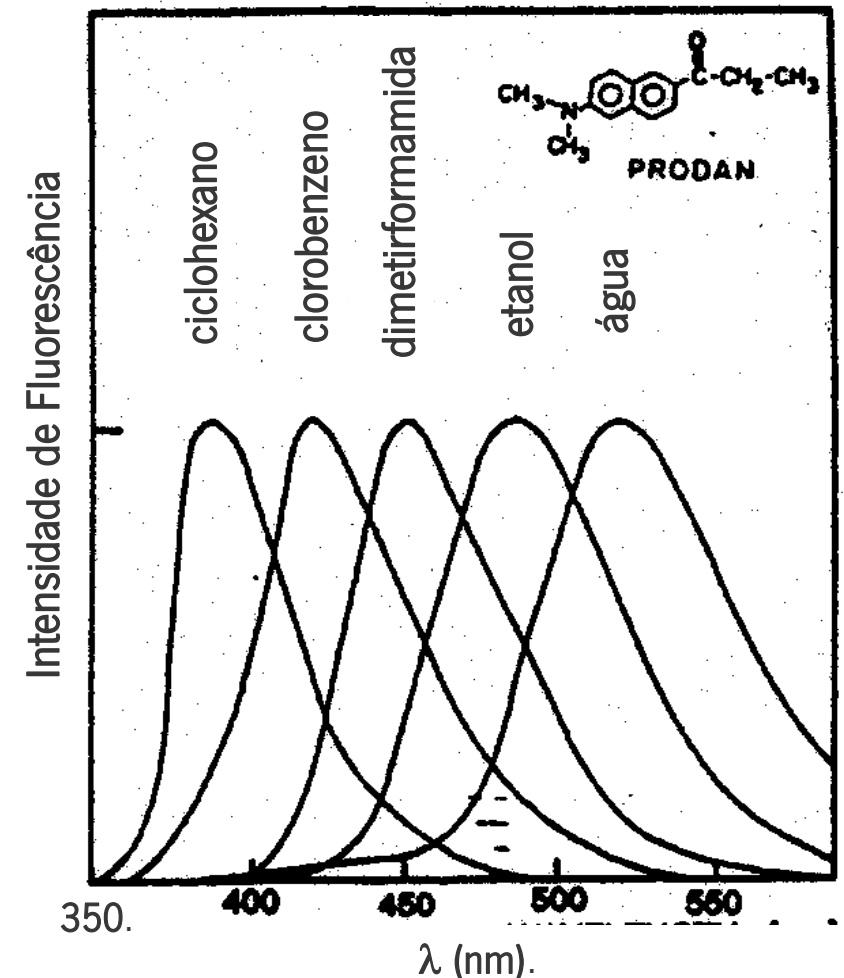
Sondas Fluorescentes Extrínsecas – exemplos

O Prodan é um derivado do naftaleno.
É uma molécula fluorescente, polar.



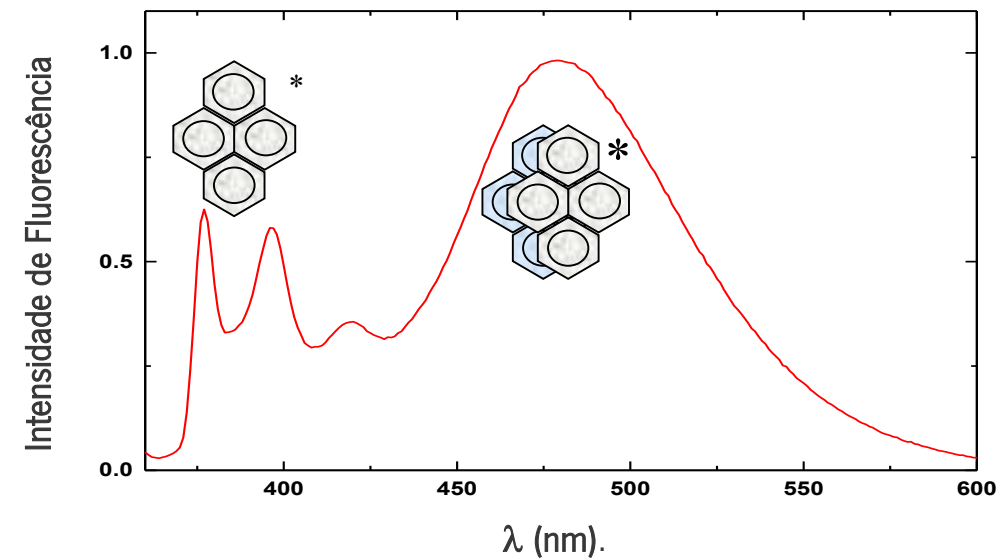
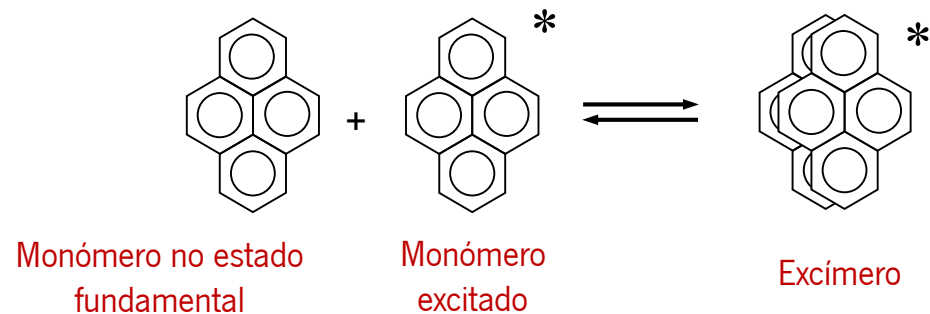
O dipolo da molécula interage fortemente com os dipolos do solvente e a energia emitida por fluorescência depende fortemente desta interação.
O Prodan é assim uma sonda de polaridade permitindo conhecer a polaridade local.

Aumento da polaridade do meio



Sondas Fluorescentes Extrínsecas – exemplos

O pireno forma com muita eficiência excímeros desde que a concentração local seja elevada.

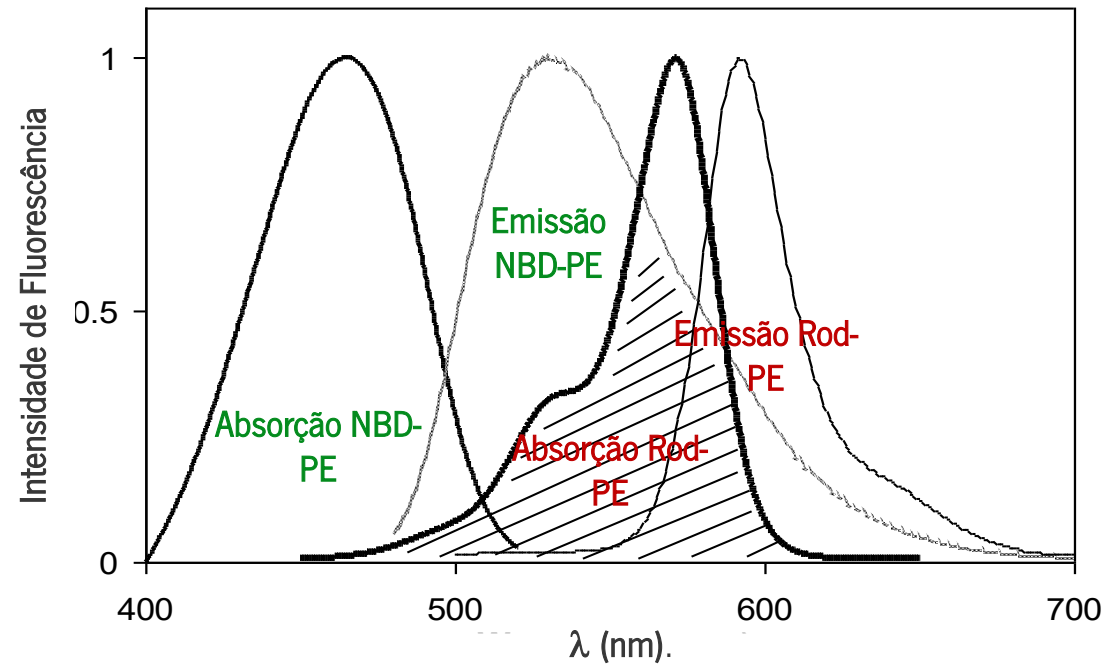


No trabalho T4 usa-se o pireno como sonda (formação ou não de excímeros – sonda de concentração) para confirmar a existência de agregados (vesículas) e a sua fusão.

Sondas Fluorescentes Extrínsecas – exemplos

Também com o intuito de sondar a concentração local (fusão de membranas) podem-se adicionar ao meio em estudo sondas de transferência de energia (TE) (sondas de concentração). Se a TE ocorrer é porque a concentração local é elevada, se a sua eficiência diminuir é porque a concentração local diminui.

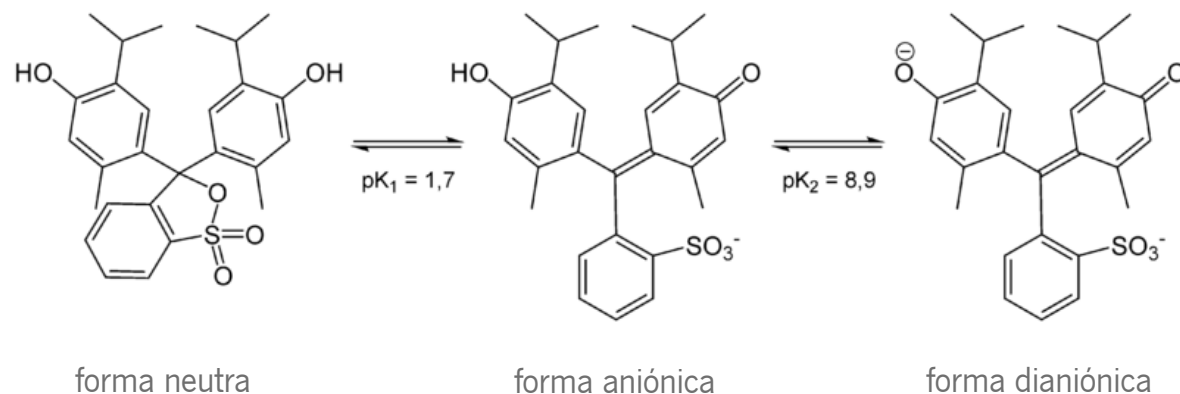
Exemplo: dois lípidos polares derivados da fosfoetanolamina (PE), NBD-PE e Rodamina-PE.



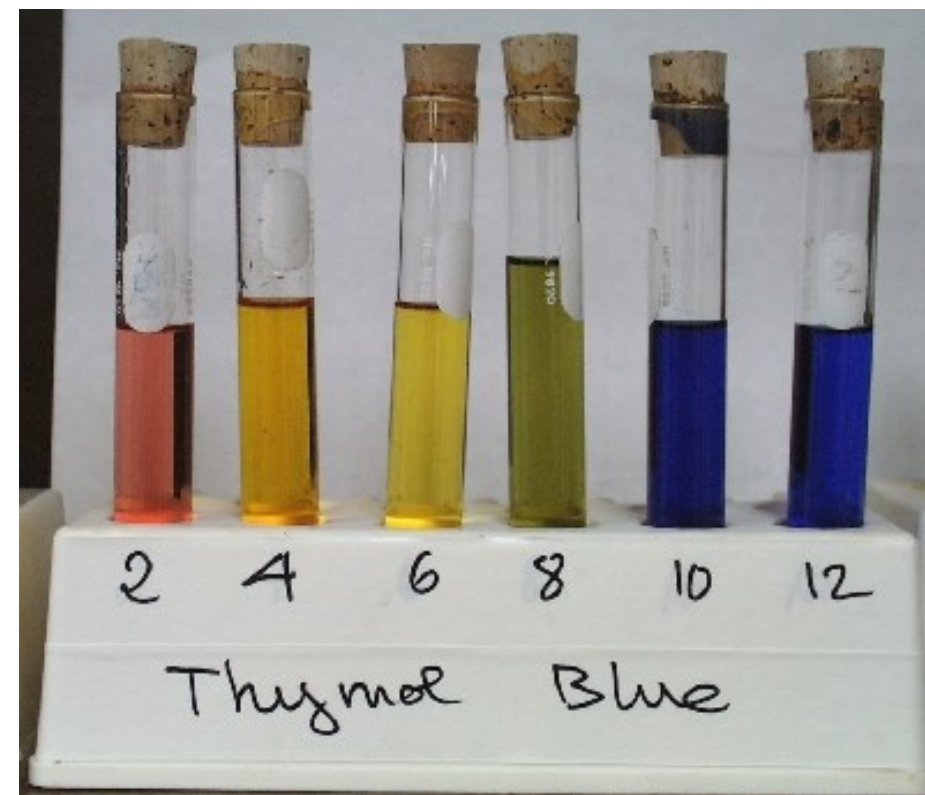
Sondas Fluorescentes Extrínsecas – exemplos

O azul de timol (tymol blue) é um indicador de pH porque a sua cor, em soluções diluídas de etanol, varia do vermelho até ao azul quando o pH da solução varia de 2 até 10.

É uma sonda de pH sensível à transferência de carga.



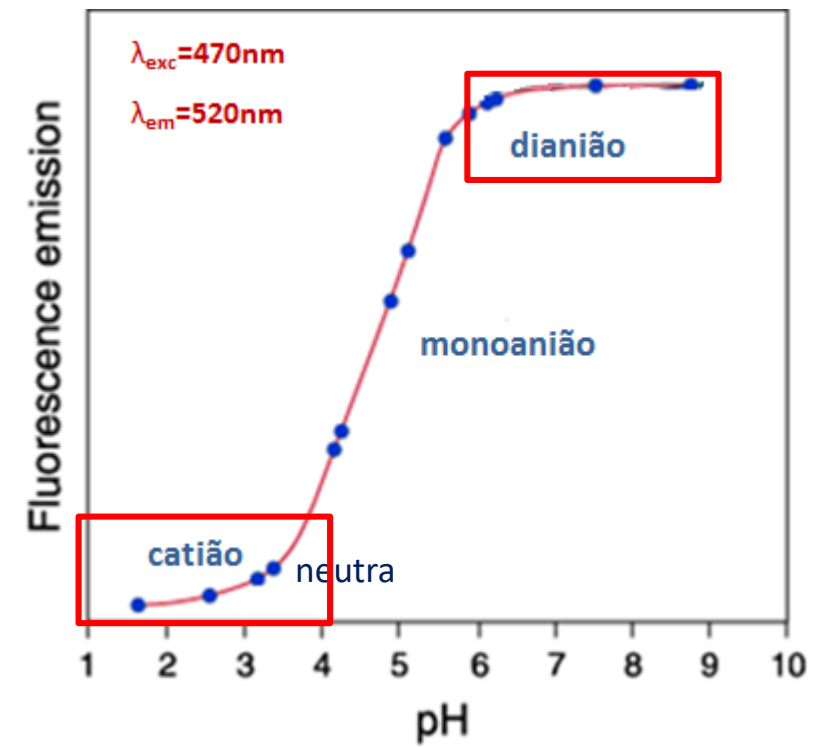
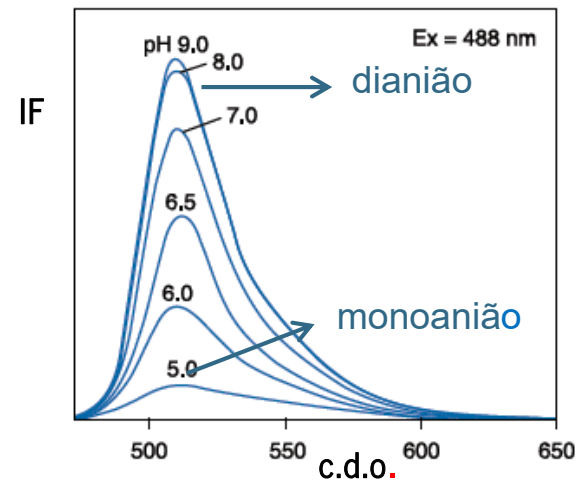
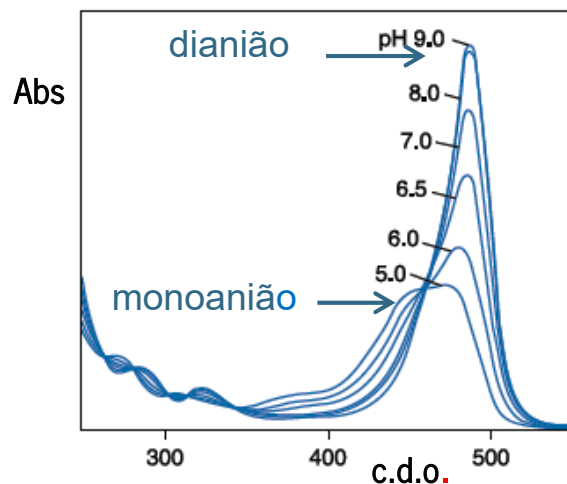
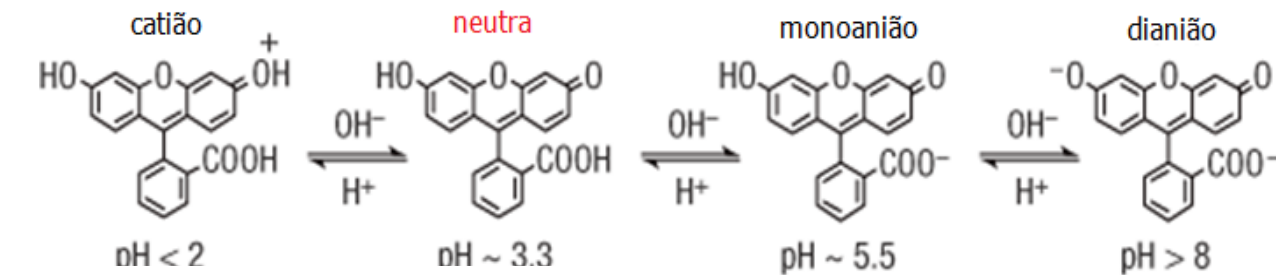
Como observado no trabalho prático T2, a fluoresceína é também uma sonda de pH, sensível à transferência de carga. Qual é a propriedade mais sensível ao pH? Para que valores de pH pode ser usada como sonda?



Sondas Fluorescentes Extrínsecas – exemplos

Trabalho Prático T2: Transferência de carga na fluoresceína por ação do pH do meio

A fluoresceína é também uma sonda de pH, sensível à transferência de carga. Na fluoresceína o que muda drasticamente com o pH é a intensidade de fluorescência porque apenas os aniões são fluorescentes.



Sondas Fluorescentes Extrínsecas – exemplos

Falta referir as chamadas sondas de iões. São moléculas específicas cuja intensidade de fluorescência aumenta significativamente se elas se ligarem a um dado ião.

Há sondas específicas para “medir” as concentrações intracelulares de cálcio, magnésio, sódio, potássio, cloro, Fazendo uma curva de calibração é possível determinar a fração de moléculas de sonda ligadas ao ião e assim, indiretamente, a concentração desse ião no local sondado.

Takahiro Egawa, et al.. *Development of a Far-Red to Near-Infrared Fluorescence Probe for Calcium Ion and its Application to Multicolor Neuronal Imaging*. J. Am. Chem. Soc. 2011, 133, 14157–14159

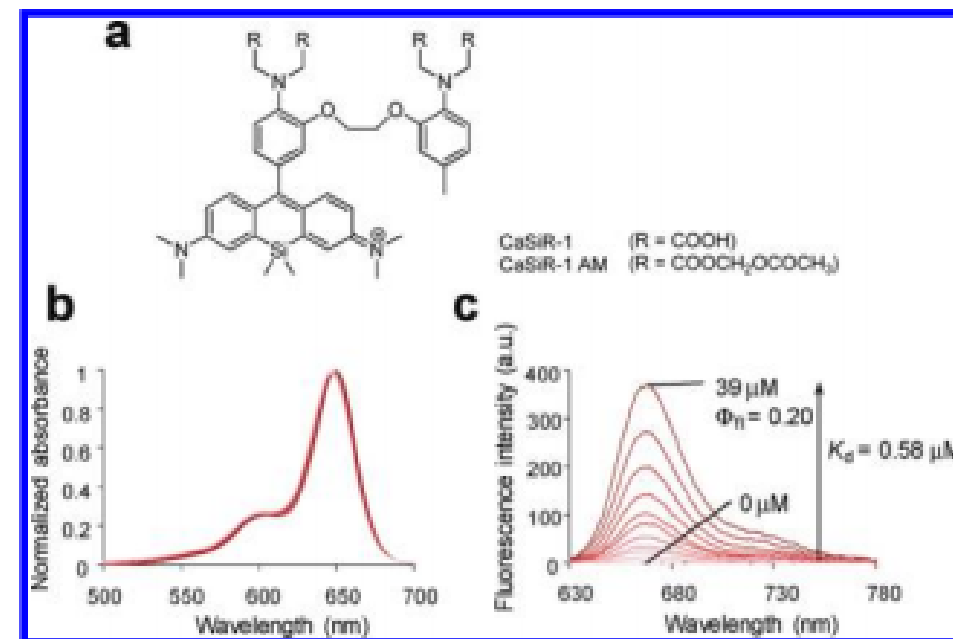


Figure 1. (a) Chemical structures of the novel Ca²⁺ fluorescence probe CaSiR-1 and its cell-permeable derivative CaSiR-1 AM. (b) Absorption and (c) emission spectra of 1 μM CaSiR-1 in the presence of various concentrations of free Ca²⁺ (0, 0.017, 0.038, 0.065, 0.100, 0.150, 0.225, 0.351, 0.602, 1.35, and 39 μM) in 30 mM 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid (MOPS) buffer containing 100 mM KCl and 10 mM ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA) (pH 7.2) at 22 °C. The excitation wavelength was 620 nm. The fluorescence quantum yield in the presence of 39 μM Ca²⁺ was 0.20. The fluorescence spectrum of the Ca²⁺-free solution was indistinguishable from the baseline.

Sondas Fluorescentes – requisitos e vantagens

Qualquer sonda deve, dentro do possível, não influenciar a estrutura/funcionalidade do sistema biológico onde é inserida.

Deve também, idealmente, permitir estudos “in vitro” e “in vivo” (isto é, não deve ser tóxica).

As sondas fluorescentes facilmente cumprem estes requisitos e são por isso muito utilizadas para o estudo de sistemas biológicos.

A espectroscopia de fluorescência é uma técnica não destrutiva (se se usarem sondas não tóxicas) e quase não invasiva (porque se usam concentrações muito baixas). É possível trabalhar com concentrações da ordem de 10^{-12} a 10^{-11} M devido à alta sensibilidade da técnica.