



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 4

Modelização de sistemas biológicos: formação de agregados

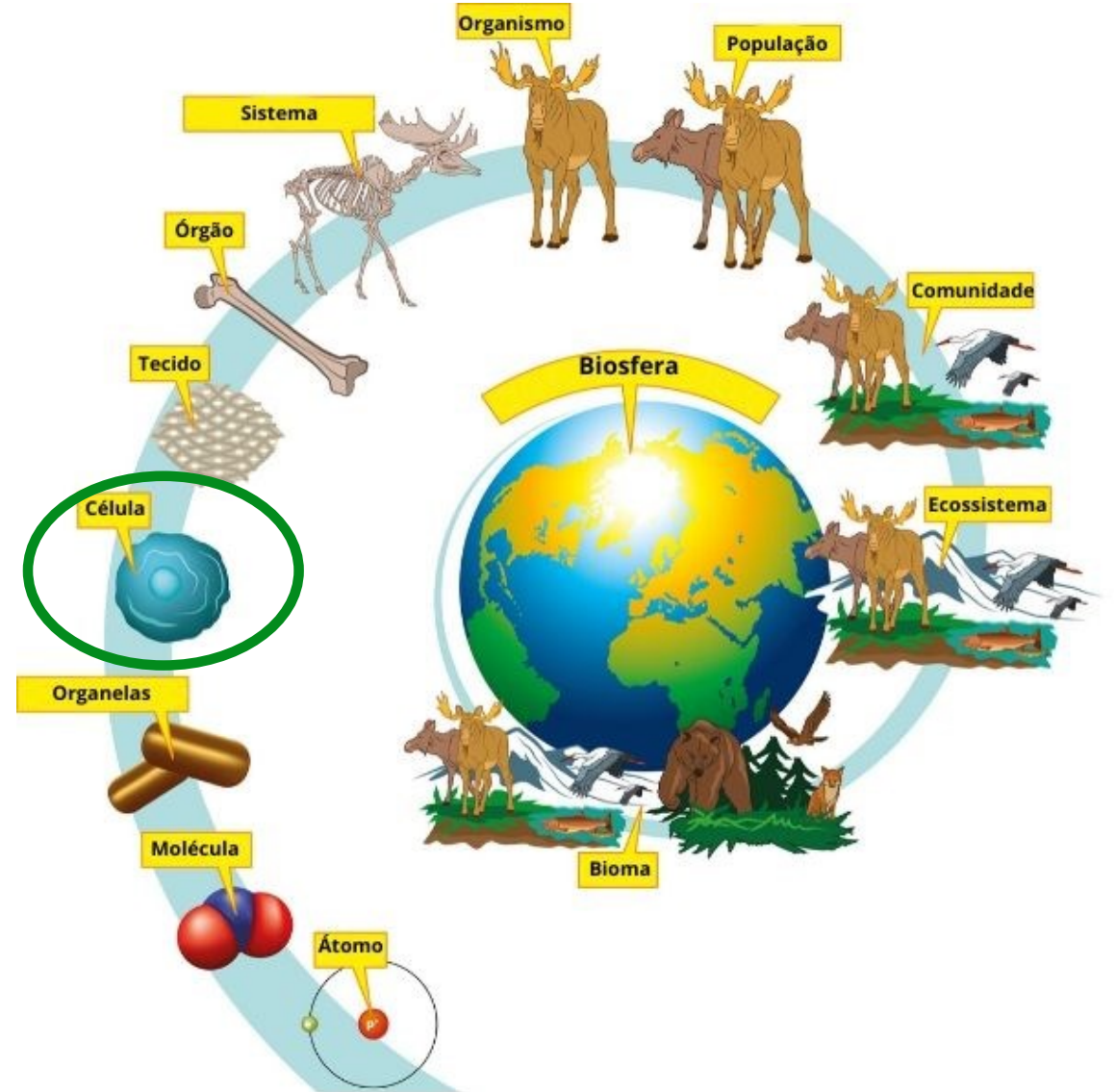
Sistemas Biológicos

Os sistemas biológicos são muito complexos e de difícil controlo experimental.

A complexidade dos sistemas biológicos pode-se, de forma simplificada, hierarquizar em 13 níveis, do átomo à Biosfera ...

A **célula** é a unidade básica da vida, é a unidade estrutural e funcional nos seres vivos, formada obviamente por átomos, moléculas e organelos.

A **célula** é delimitada por uma membrana plasmática porosa (**membrana celular**) e no seu interior encontra-se o **citoplasma** e o **núcleo** com o material genético (nas células eucarióticas).



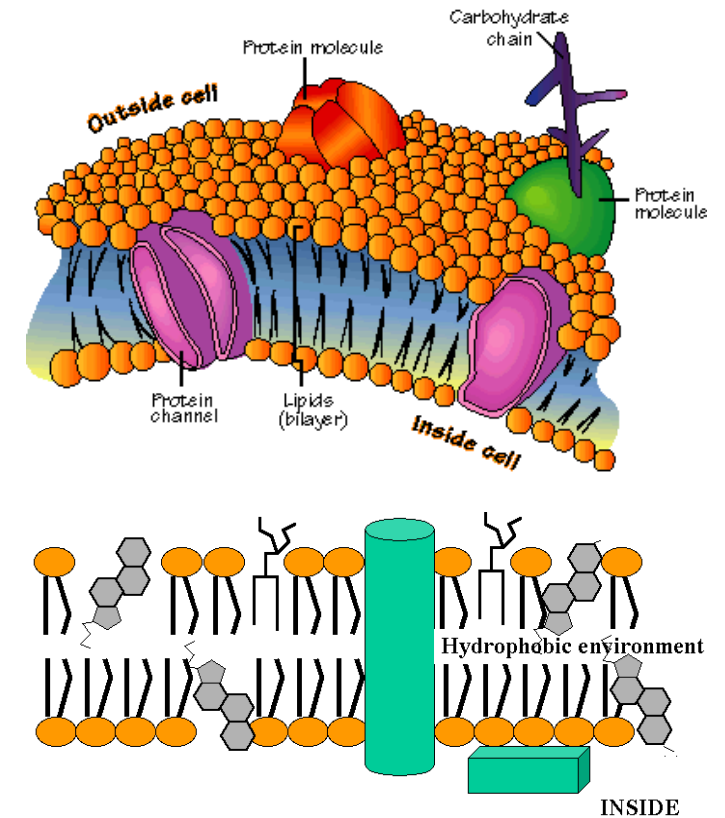
Célula, membrana celular

Os solutos biológicos estão permanentemente a ser trocados, de forma controlada e estacionária, entre o interior e o exterior das células de forma a manter o equilíbrio de nutrientes necessário ao bom funcionamento dos organismos vivos.

Os mecanismos de troca de nutrientes e resíduos entre a célula e o seu exterior são controlados por processos físicos que já abordaram nos capítulos 2 e 3.

Todas estas trocas são feitas através da membrana celular. A atividade nas membranas celulares é assim intensa, permanente e perfeitamente organizada.

A membrana celular é uma estrutura complexa formada por uma bicamada lipídica. Esta bicamada é hidrofóbica no seu interior e hidrofílica (polar) nas superfícies, quer na superfície que está virada para o interior da célula quer na que está virada para o exterior.



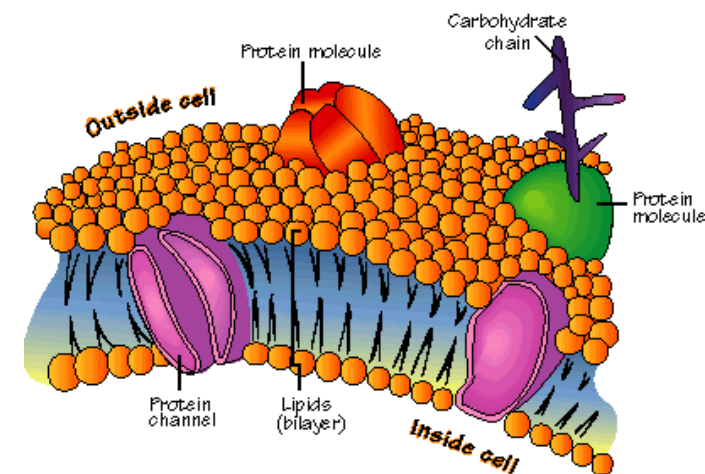
Agregados moleculares organizados

Como se forma esta estrutura em bicamada, tão complexa e tão estável energeticamente? É uma estrutura porosa para permitir a passagem de nutrientes de e para o interior da célula?

Existem vários tipos de moléculas e macromoléculas que, pelas suas características, têm tendência a auto-organizar-se.

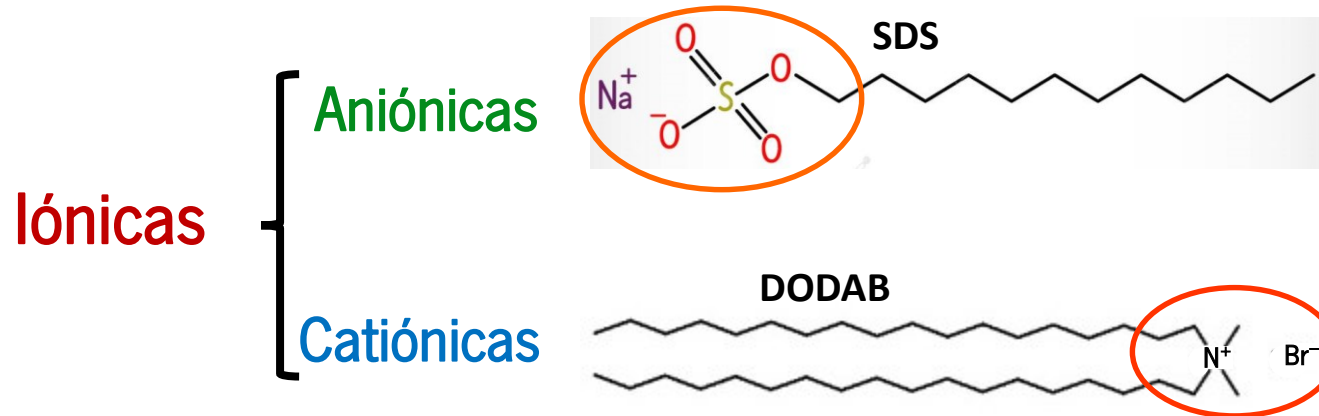
Genericamente chamamos-lhes moléculas anfifílicas.

A característica comum a todas as moléculas anfifílicas é possuírem uma região polar (hidrofílica) e uma região apolar (hidrofóbica). As moléculas que constituem as membranas celulares são deste tipo – são moléculas anfifílicas ou anfipáticas (fosfolípidos) que têm tendência a organizar-se em bicamadas.



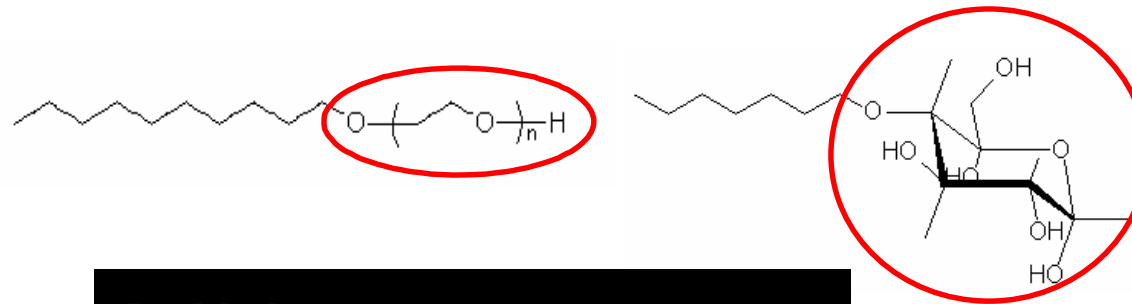
As moléculas anfifílicas podem ser iónicas (catiónicas ou aniónicas), não iónicas e zwitteriónicas.

Moléculas anfifílicas ou anfipáticas

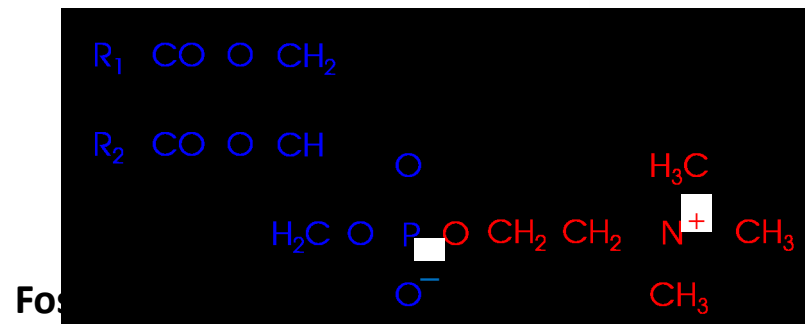


As moléculas anfifílicas aniónicas são solúveis em água (ex:detergentes)

Não iónicas



Zwitteriónicas



Muitas moléculas anfifílicas são insolúveis em água.

a maior parte dos fosfolípidos, monoacylglicerois, alguns glycolípidos;

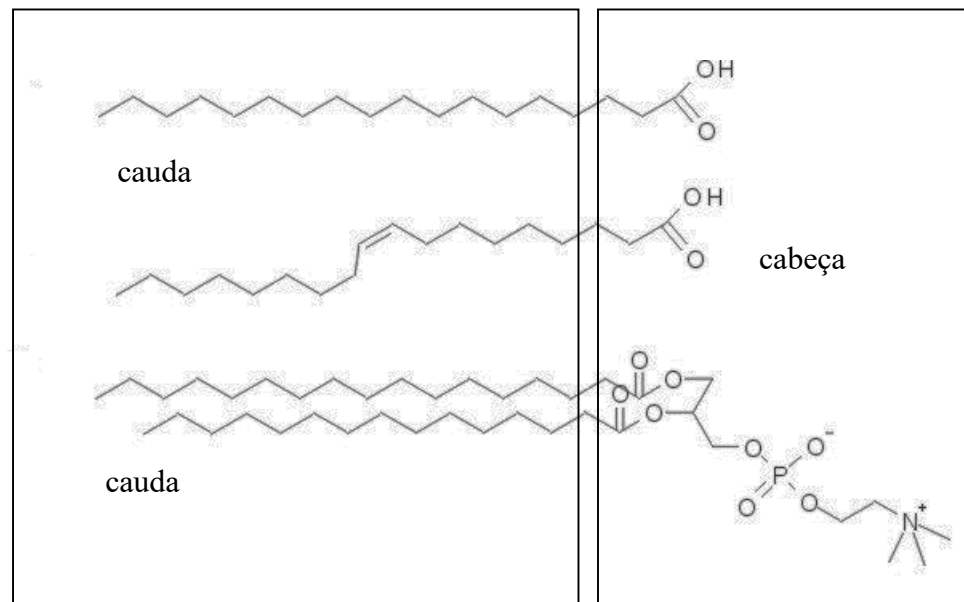
hidrocarbonetos, triglicerídeos, diacylglicerois, ácidos gordos de cadeias saturadas, colesterol.

Agregados moleculares organizados

As moléculas anfifílicas ou anfipáticas são assim designadas porque possuem uma parte com afinidade pela água (hidrofílica) e outra sem afinidade pela água (hidrofóbica).

A parte hidrofóbica é normalmente formada uma ou mais cadeias de um hidrocarboneto (com oito átomos de carbono ou mais) e a parte hidrofílica da molécula é um grupo polar, que pode ser muito diverso, um óxido de etileno, um grupo catiónico ou aniónico, etc.

Ao grupo polar ou iónico chama-se cabeça e às cadeias de hidrocarboneto chama-se cauda.



Agregados moleculares organizados

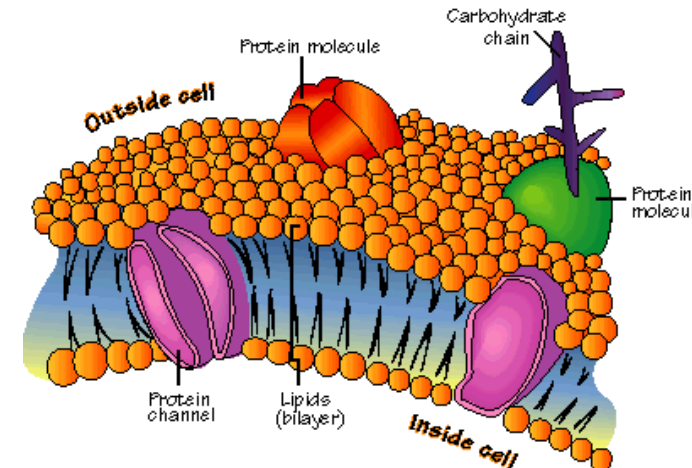
A água é essencial à vida. A maior parte dos seres vivos são constituídos entre 70 a 95% por água.

Como é sabido, moléculas polares são solúveis em água (solvente polar) e moléculas apolares são insolúveis em água.

E as moléculas anfifílicas? Já vimos que podem ser solúveis ou insolúveis em água, mas nunca ficam completamente confortáveis (termodinamicamente estáveis) pelo menos em concentrações elevadas.

Por isso as moléculas anfifílicas têm tendência a formar agregados entre si, adotando diversos arranjos espaciais, para atingirem as configurações termodinamicamente mais estáveis.

O tipo de configuração adotado por cada molécula depende de vários fatores, nomeadamente do tamanho relativo de cada uma das suas partes (polar/apolar).

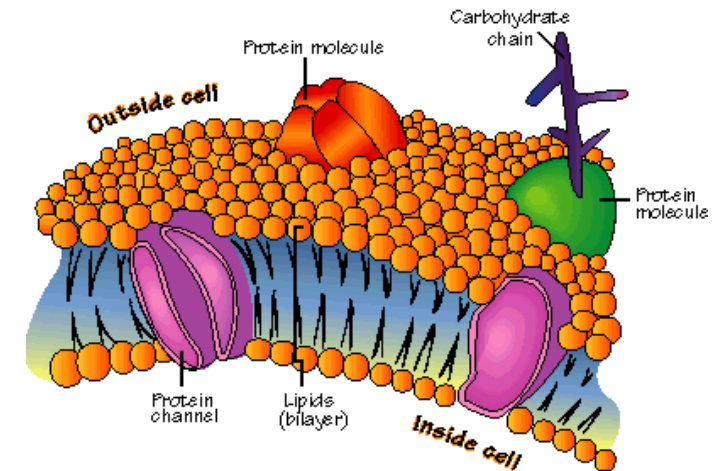


Agregados moleculares organizados

Os agregados moleculares organizados têm geralmente dimensões microscópicas constituindo, por isso, um meio macroscopicamente homogêneo, apesar de serem microscopicamente heterogêneos: são os chamados sistemas microheterogêneos.

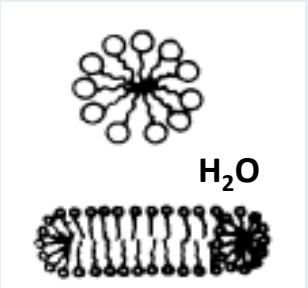
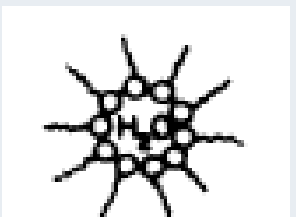
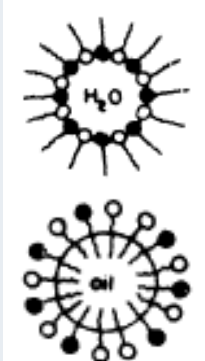
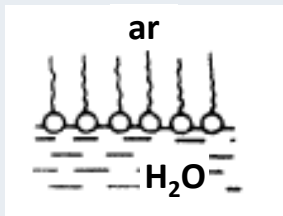
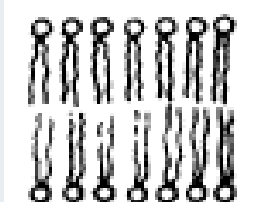

Sendo sistemas microheterogêneos difundem facilmente a radiação (dependendo do seu tamanho) e por isso dão origem, nos espectros de absorção, a uma maior fração de luz que não é transmitida (embora também não seja absorvida) aumentando a absorvância...

A criação de modelos simples de organização molecular permite estudar e prever a formação de agregados moleculares organizados usados por exemplo no estudo da membrana biológica – bicamada lipídica.



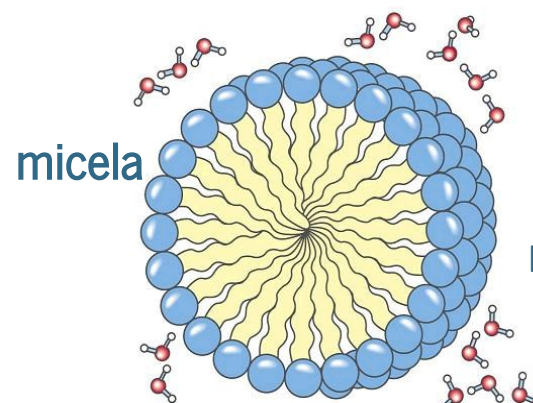
Agregados moleculares organizados

Características de diversos tipos de agregados formados a partir de tensioativos (moléculas anfifílicas)

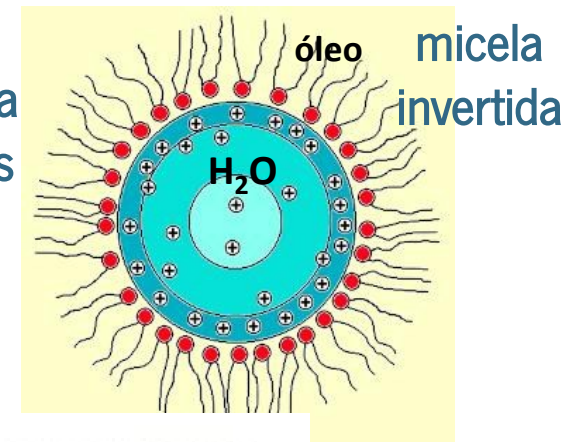
tipo agregado	micelas	micelas invertidas	microemulsões	monocamadas	bicamadas	vesículas
Formação	Dissolução do tensioativo (uma só cauda) em H ₂ O, acima da cmc.	Dissolução do tensioativo (uma só cauda) em solvente apolar	Dissolução de dois tensioativos numa mistura água/óleo	Dissolução do tensioativo (uma só cauda) em H ₂ O mas muito baixa conc.	Dissolução em água de tensioativos com duas caudas	Dissolução em água de tensioativos com duas caudas
Estrutura formada	 <p>Micelas esféricas e micelas cilíndricas</p>					
massa molar média	2000-6000	2000-6000	10 ⁵ -10 ⁶	Muito varável	Muito variável	> 10 ⁷
diâmetro médio (Å)	30-60	40-80	50-100	Não se aplica	Não se aplica	200-10000
estabilidade	Semanas, meses	Semanas, meses	Semanas, meses	Horas, dias	Horas	Semanas

Agregados moleculares organizados

Em 1920, McBain e Salmon propuseram a existência das micelas.
Agregados de 50-100 moléculas



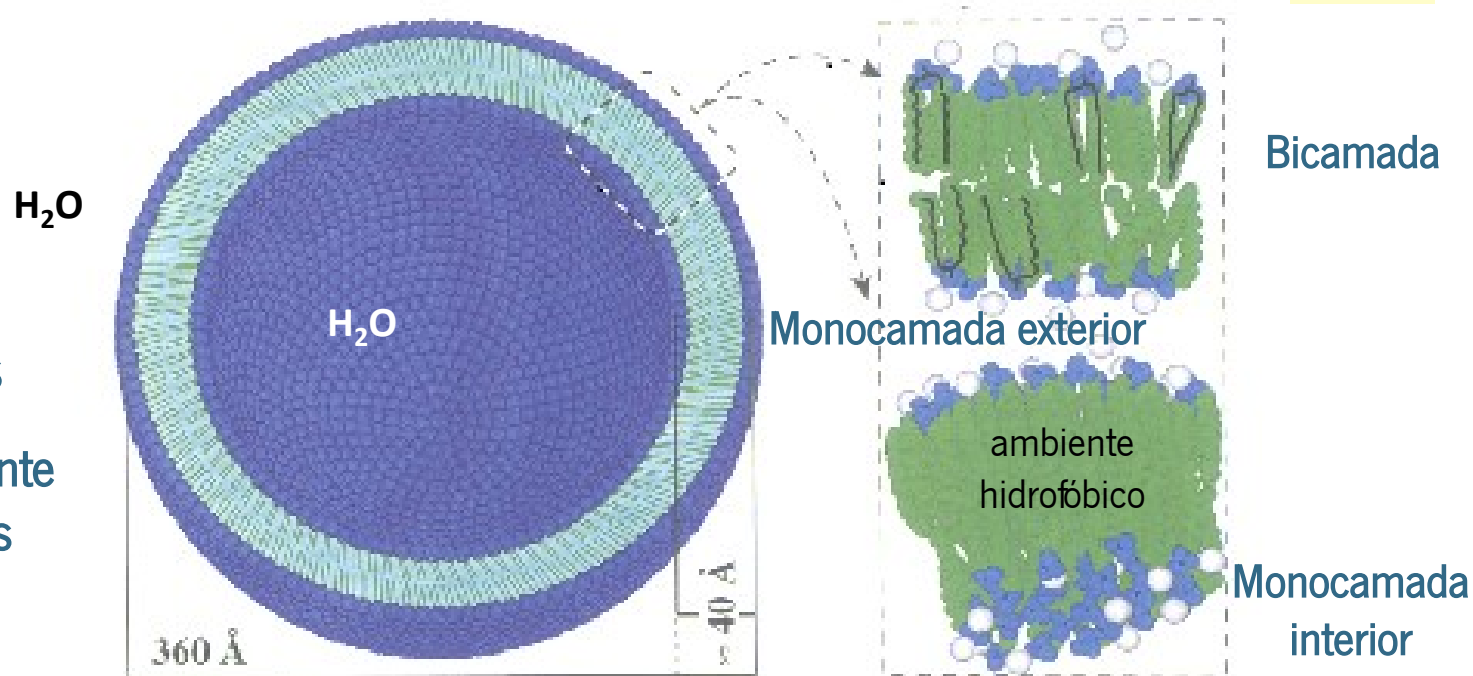
Monocamada formada pelas cabeças polares



Em 1925 Gorter e Grendel mostraram que os lípidos formam bicamadas em água.

Agregados de 10^4 - 10^5 moléculas

As bicamadas adquirem espontaneamente uma certa curvatura e formam vesículas aproximadamente esféricas.

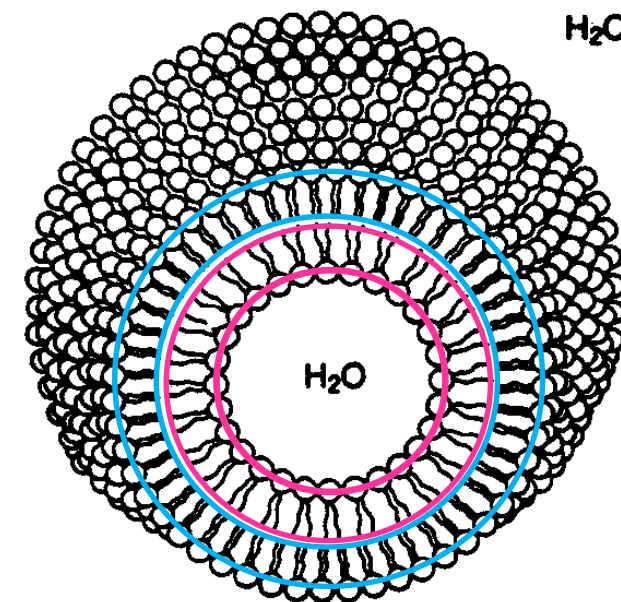
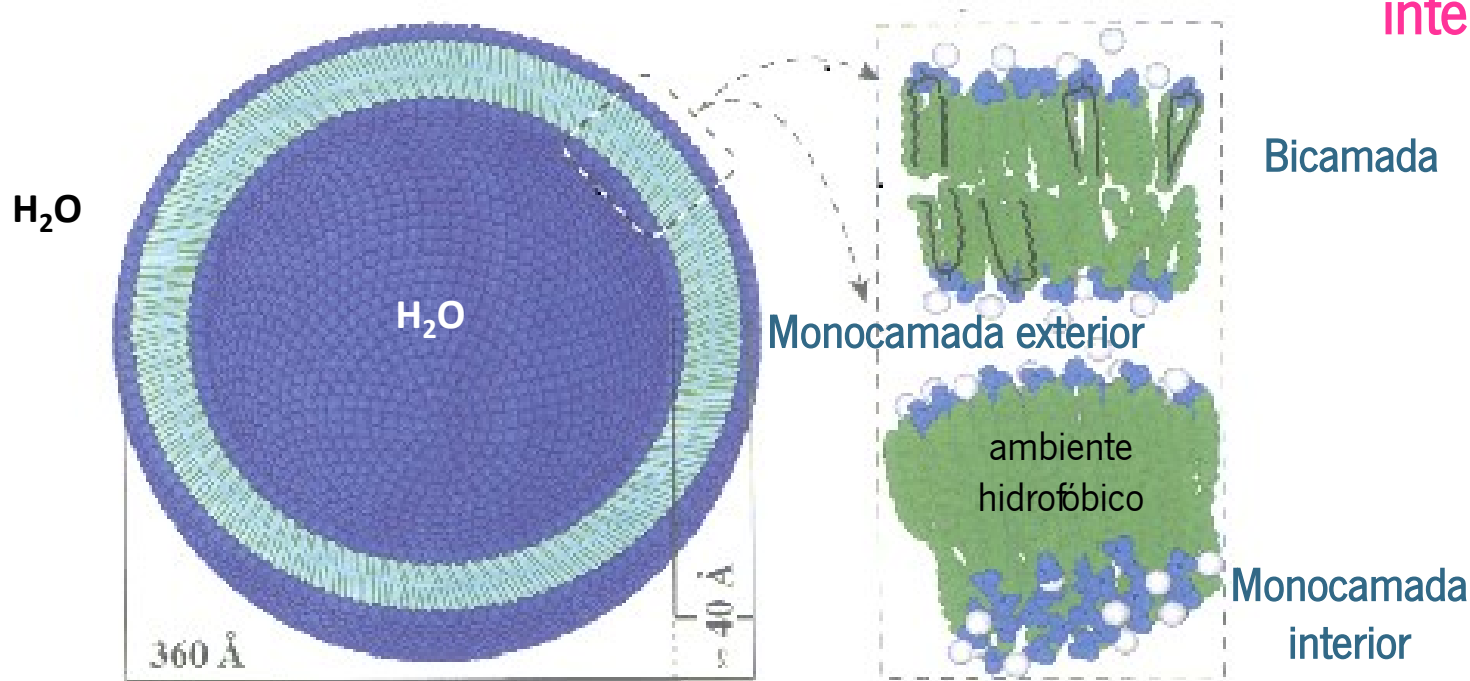


Agregados moleculares organizados

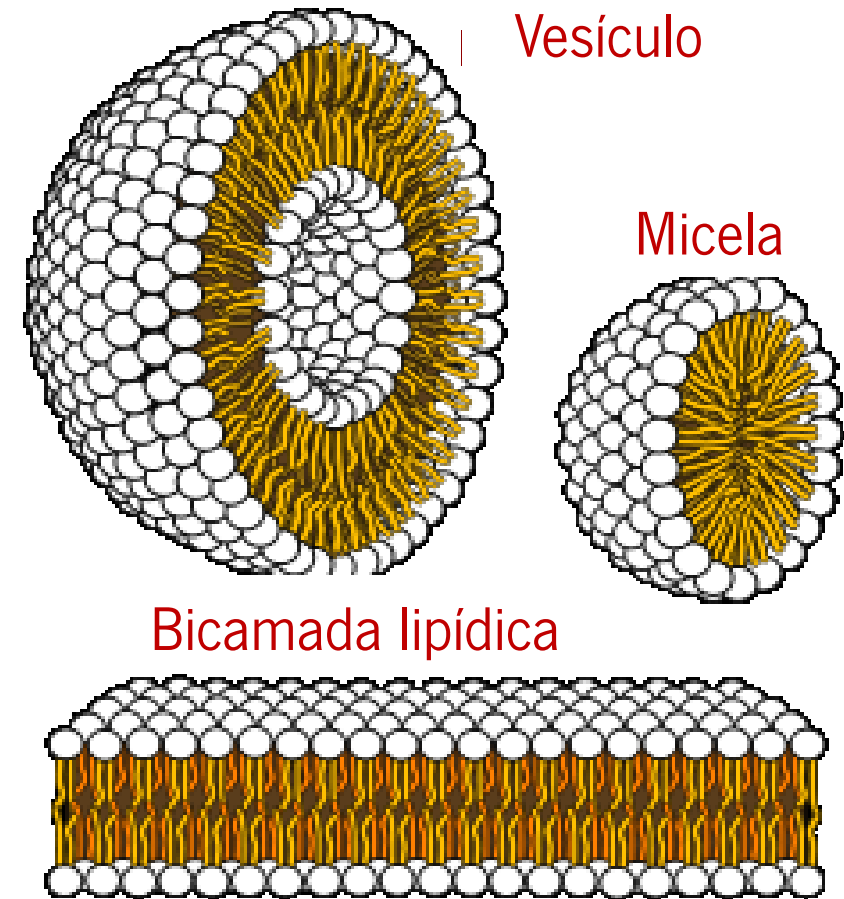
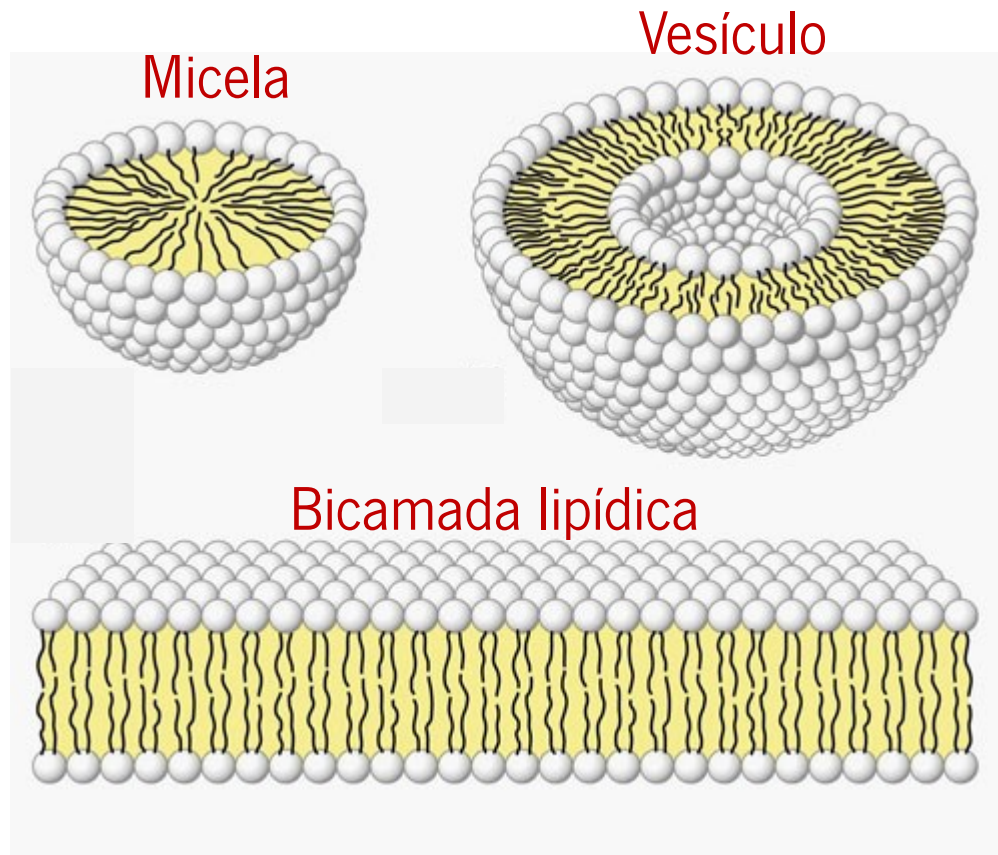
As bicamadas, nos vesículos, adquirem espontaneamente uma certa curvatura formando vesículos aproximadamente esféricos.

A curvature exterior é positiva (diâmetro do círculo que une as cabeças é maior do que o diâmetro do círculo que une a ponta das caudas).

O contrário acontece para a camada interna, em que a curvatura é negativa.



Agregados moleculares organizados

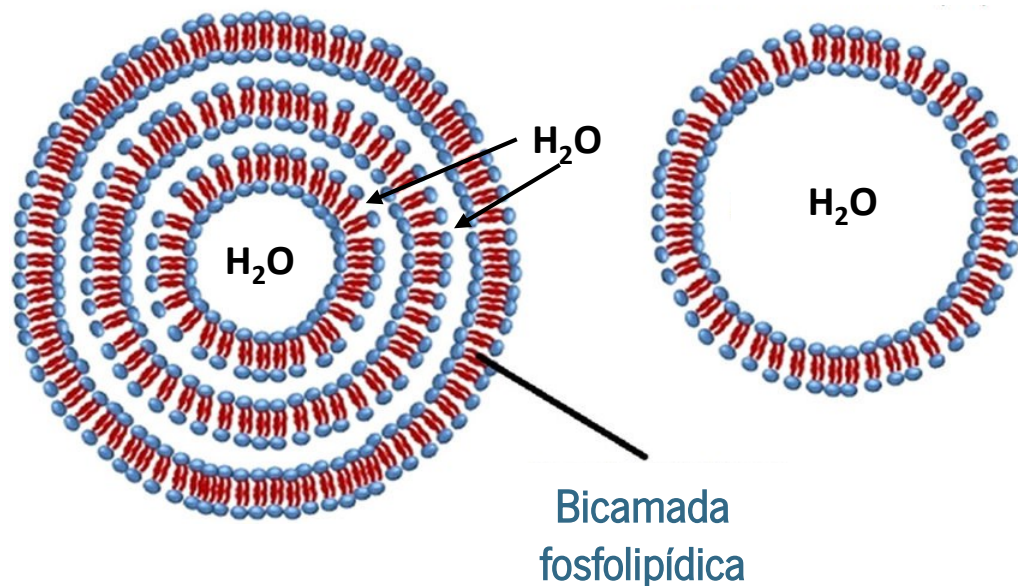


Agregados moleculares organizados

Os vesículos unilamelares (UV) são agregados moleculares muito finos (cerca de 40 Å) formados por cerca de 10^4 - 10^5 moléculas anfifílicas organizadas na forma de bicamada. Em água a bicamada fecha-se sobre si própria, formando vesículas com um interior aquoso separado do exterior. São uma estrutura simples mas não a mais estável.

Vesículos Multilamelares (MLV)

Vesículos Unilamelares (UV)



Os lipossomas são também agregados esféricos, com dimensões variando entre os nanómetros e alguns micrómetros, constituídos por fosfolípidos naturais ou sintéticos. São formados por uma sucessão de bicamadas que, ao fecharem-se sobre si próprias, originam vesículos multilamelares (MLV). Estas bicamadas concêntricas estão separadas por compartimentos aquosos. São termodinamicamente mais estáveis que os vesículos unilamelares.

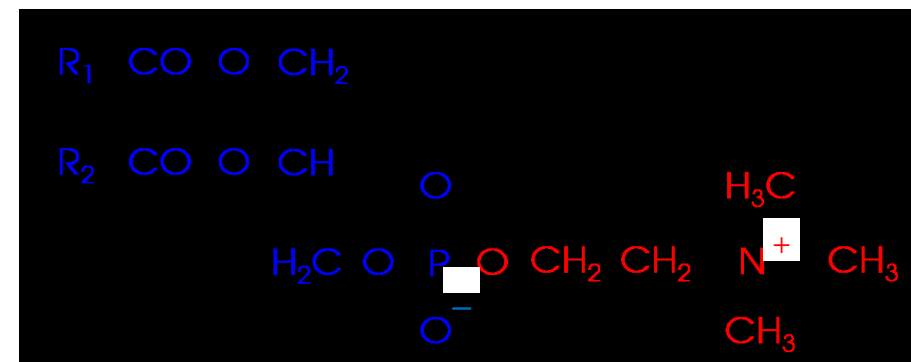
Agregados moleculares organizados

As moléculas anfifílicas mais importantes do ponto de vista biológico são os lípidos e particularmente os fosfolípidos (constituintes essenciais das membranas biológicas).

Os lípidos (ácidos gordos) são compostos químicos formados apenas por carbono, hidrogénio e oxigénio. Não se caracterizam por um grupo funcional comum, mas sim pela sua solubilidade em solventes orgânicos e muito baixa solubilidade em água.

Os fosfolípidos são ésteres de glicerofosfato e são os componentes primários das membranas celulares. São compostos anfifílicos em que a cabeça hidrofílica contém um grupo fosfato, sendo a região apolar constituída por caudas longas de hidrocarbonetos, fortemente hidrofóbicas.

Um exemplo de um fosfolípido é a fosfatidilcolina. (constituente essencial da lecitina de soja usada para formar os vesículos no trabalho T4)

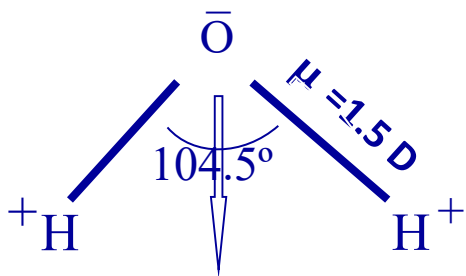


Agregados moleculares - efeito hidrofóbico

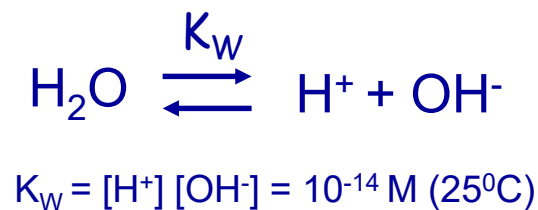
A força motora que promove e condiciona a formação, o tamanho e a forma dos agregados moleculares organizados é a água e as suas propriedades peculiares.

A água é muito polar, facilmente dissociável em iões e estabelece eficazmente ligações de hidrogénio relativamente fortes.

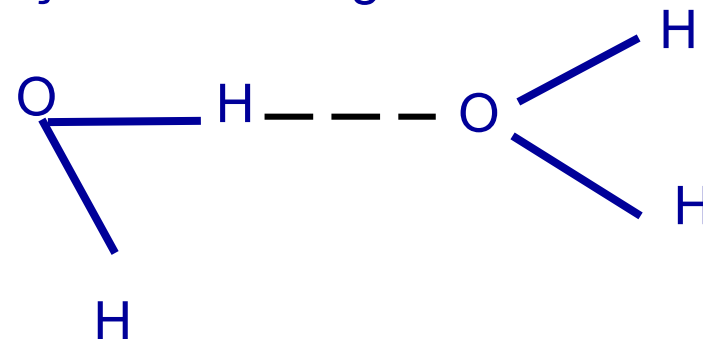
Polaridade



Dissociação em iões



Ligações de hidrogénio



São estas propriedades que dão origem e favorecem o efeito hidrofóbico.

Agregados moleculares - efeito hidrofóbico

O efeito hidrofóbico está relacionado com o facto de as moléculas hidrofóbicas não conseguirem estabelecer ligações de hidrogénio com a água.

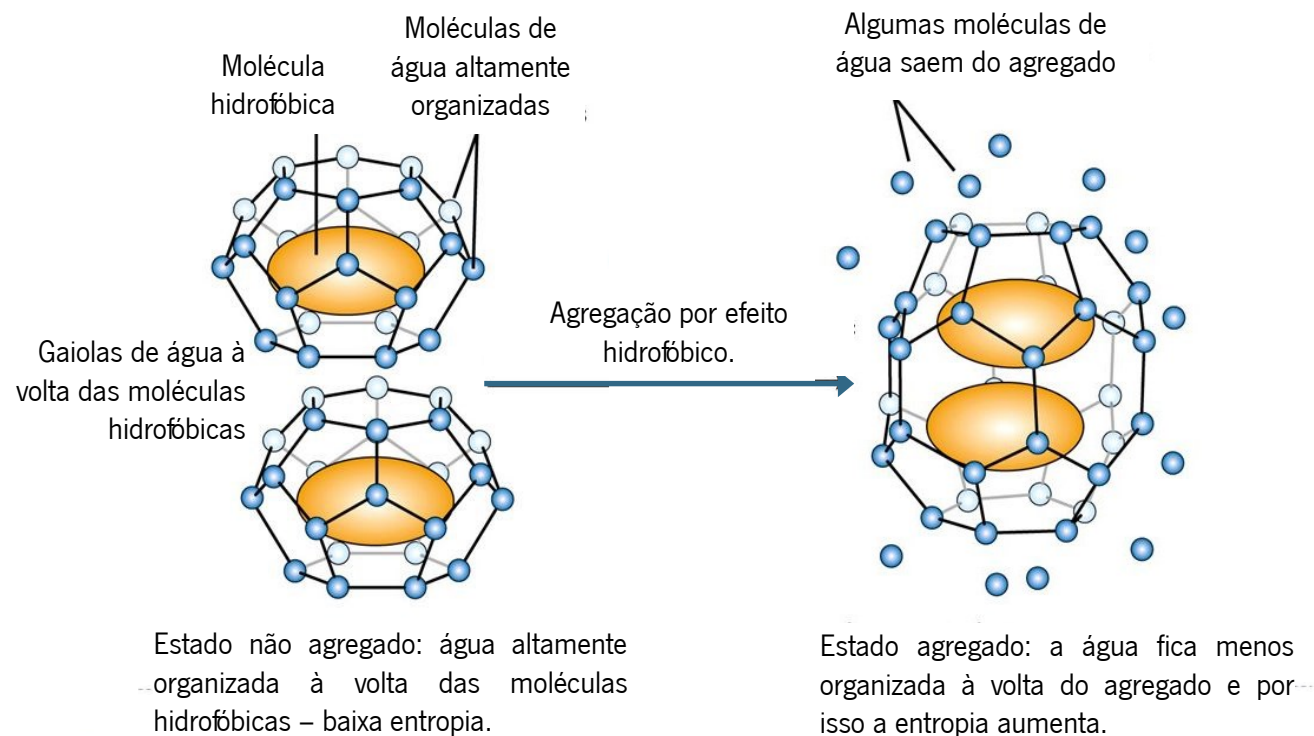
Quando um soluto hidrofóbico é colocado em água, como não consegue estabelecer ligações de hidrogénio com a água, vão existir diversas perturbações energéticas.

As moléculas de água vão-se reorganizar à volta do soluto hidrofóbico formando uma estrutura tipo gaiola, resultando nalguma perda na energia de coesão da água (destabilização).

Por outro lado as moléculas hidrofóbicas tendem a associar-se para criarem uma zona de exclusão de água, ficando assim mais confortáveis (mais estáveis) num meio que lhes é hostil.

Este balanço energético permite a presença das moléculas hidrofóbicas em água.

Agregados moleculares - efeito hidrofóbico



Podemos definir a energia útil de um sistema, a que chamamos energia livre de Gibbs, (ΔG) como a diferença entre a entalpia (ΔH) e a entropia (ΔS), esta multiplicada pela temperatura.

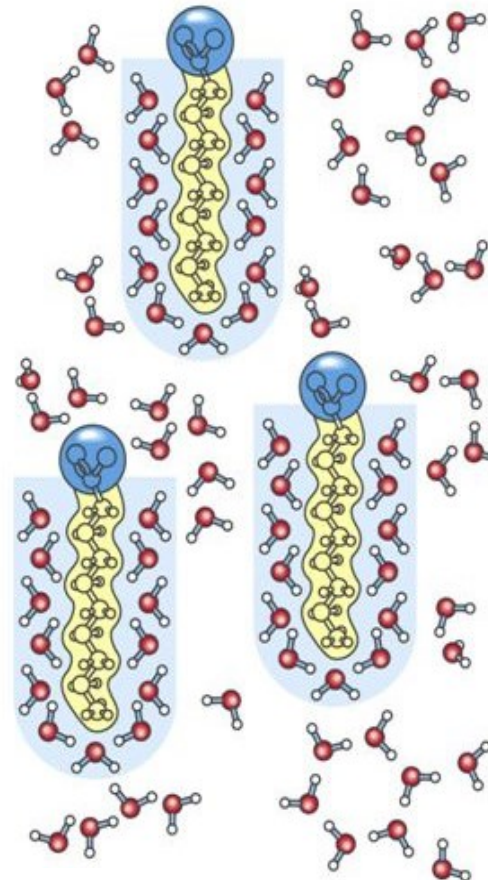
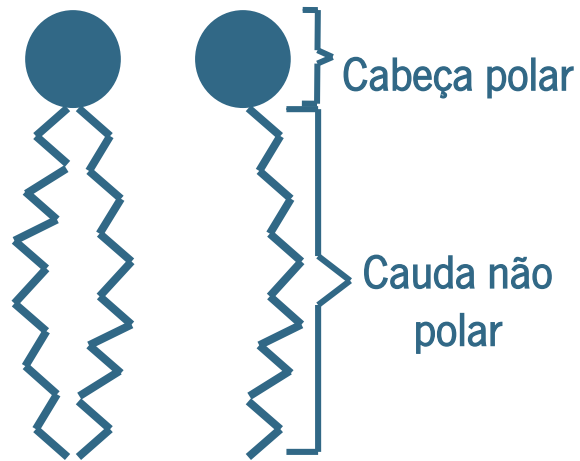
$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S.$$

Um sistema será tanto mais estável quanto maior for o valor da sua energia livre de Gibbs.

No efeito hidrofóbico (formação de agregados por parte das moléculas hidrofóbicas), ΔG aumenta porque diminui a entropia, ΔS , sem que o valor da entalpia (ΔH) seja consideravelmente afetado.

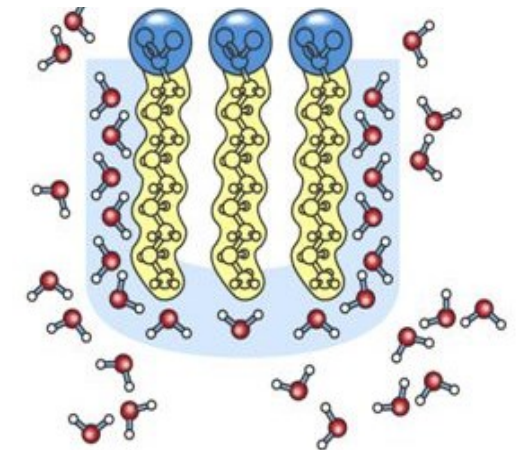
Agregados moleculares - efeito hidrofóbico

Moléculas anfifílicas



Moléculas de lípidos dispersas em solução: as caudas apolares dos lípidos estão rodeadas (aprisionadas) por moléculas de água.

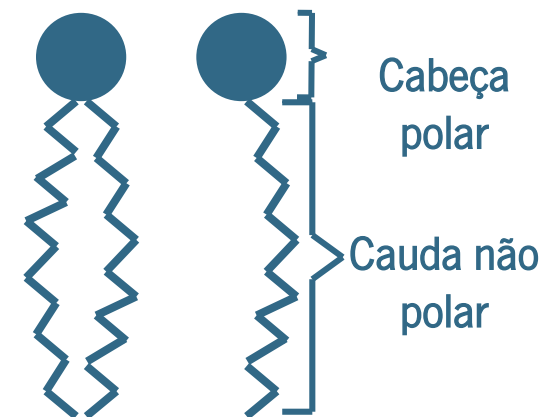
Formação de agregados: muito menos água associada às caudas hidrofóbicas, menor área superficial, aumento da entropia.



Agregados moleculares – condições geométricas

Moléculas anfifílicas com uma só cadeia de hidrocarbonetos formam estruturas micelares.

Moléculas anfifílicas com duas cadeias de hidrocarbonetos formam estruturas vesiculares.

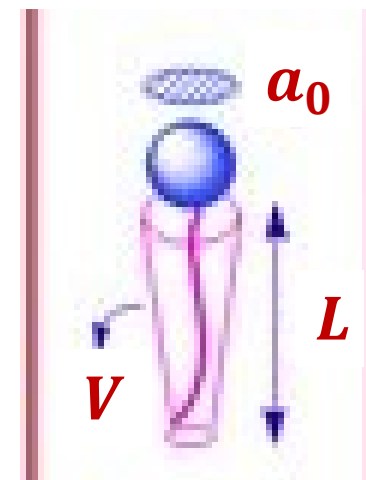


A estrutura adotada pelo agregado depende do tamanho das caudas hidrofóbicas. O agregado tem de ter um volume interno suficiente para acomodar estas caudas.

Define-se um parâmetro empírico, o chamado parâmetro crítico de empacotamento (p) que permite prever a forma/tipo de agregado que se irá formar

$$p = \frac{V}{a_0 L}$$

V – volume da cauda
 a_0 – área da cabeça polar
 L – comprimento da cauda



Agregados moleculares – condições geométricas

Define-se um parâmetro empírico, o chamado fator de empacotamento (p), que permite prever a forma/tipo de agregado que se irá formar

$$p = \frac{V}{a_0 L}$$

V – volume da cauda

a_0 – área da cabeça polar

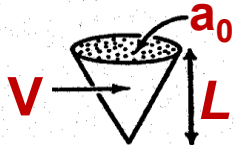


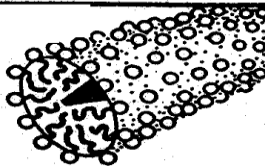

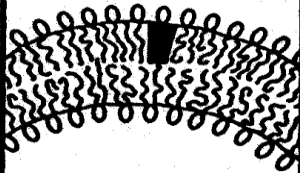

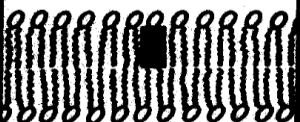

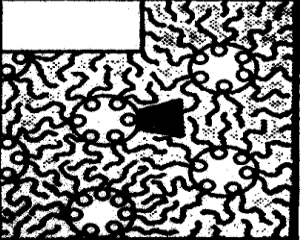
L – comprimento da cauda

Valor do fator de empacotamento	Tipo de gregado formado
$p < 1/3$	Micelas esféricas
$1/3 < p < 1/2$	Micelas cilíndricas
$1/2 < p < 1$	Bicamadas curvas (vesículos mono e multilamelares)
$p = 1$	Bicamadas planares
$p > 1$	Micelas invertidas

Agregados moleculares – condições geométricas

$$p = \frac{V}{a_0 L}$$

V – volume da cauda
 a_0 – área da cabeça polar
 L – comprimento da cauda

Tipo de molécula anfifílica	p	Forma crítica	Estrutura
Uma só cauda a_0 grande	$<1/3$		
Uma só cauda a_0 pequeno	$1/3-1/2$		
Duas caudas a_0 grande	$1/2-1$		
Duas caudas a_0 mais pequeno	~ 1		
Uma ou duas caudas polinsaturadas, a_0 pequeno, lípidos não iónicos	>1		

Micela esférica

Micela cilíndrica

Vesículo

Bicamada plana

Micela invertida

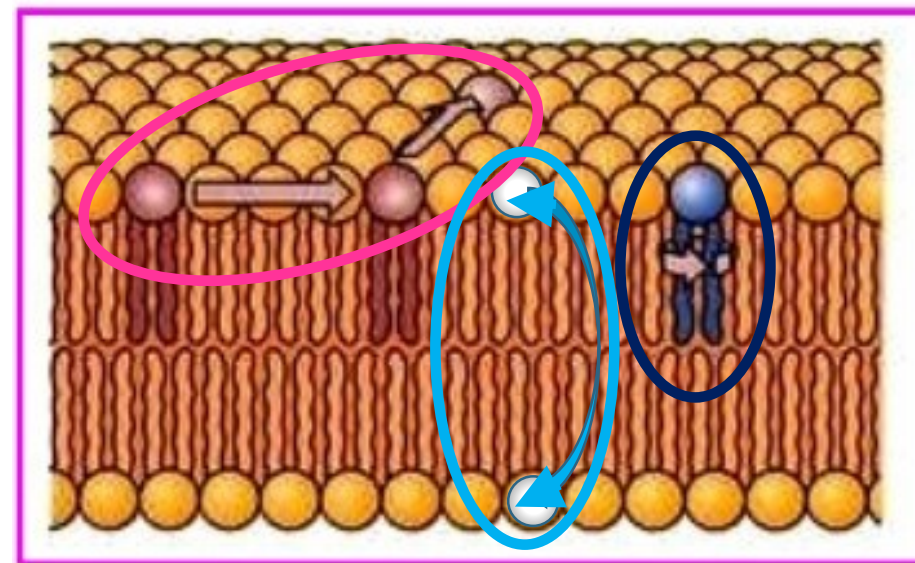
Agregados moleculares – dinâmica

Os monómeros das micelas são solúveis em água, por isso as micelas são estruturas extremamente dinâmicas com monómeros sempre a entrar e a sair e um número de agregação variável no tempo.

Pelo contrário, os monómeros dos vesículos (fosfolípidos) são muito pouco solúveis em água por isso a dinâmica de entrar e sair não existe.

Existem apenas movimentos de difusão lateral e de rotação.

A troca de fosfolípidos duma camada para a outra (flip-flop) é também muito rara.



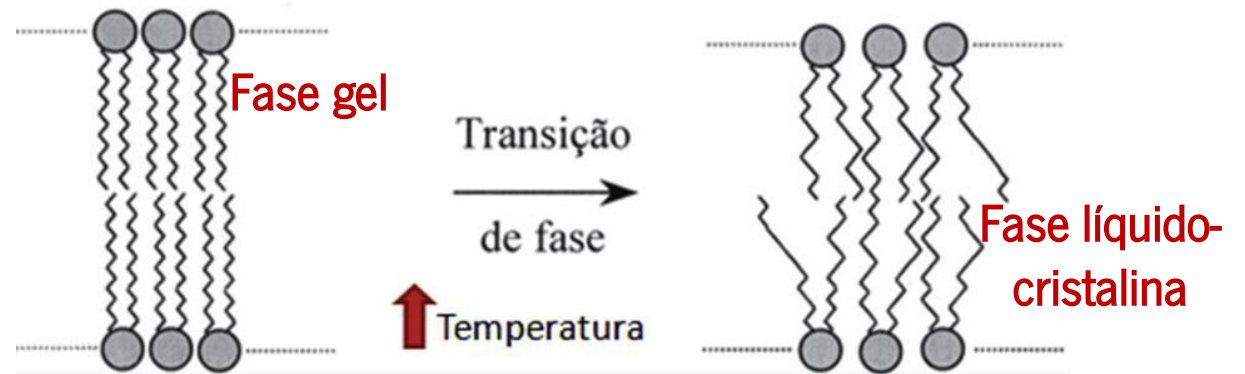
Agregados moleculares – dinâmica

O aumento de temperatura favorece sempre a mobilidade e a fluidez molecular.

No caso de agregados moleculares do tipo vesículos lipídicos, com o aumento da temperatura dá-se uma transição da fase gel, mais organizada, para a fase líquido-cristalina, mais desorganizada.

A temperatura de transição de fase é uma característica de cada fosfolípido.

Numa célula, como existe uma grande variedade de componentes, não há uma transição de fase abrupta. Ocorre um aumento gradual da fluidez da membrana com o aumento da temperatura. Um dos componentes membranares que controla a fluidez das membranas é o colesterol.

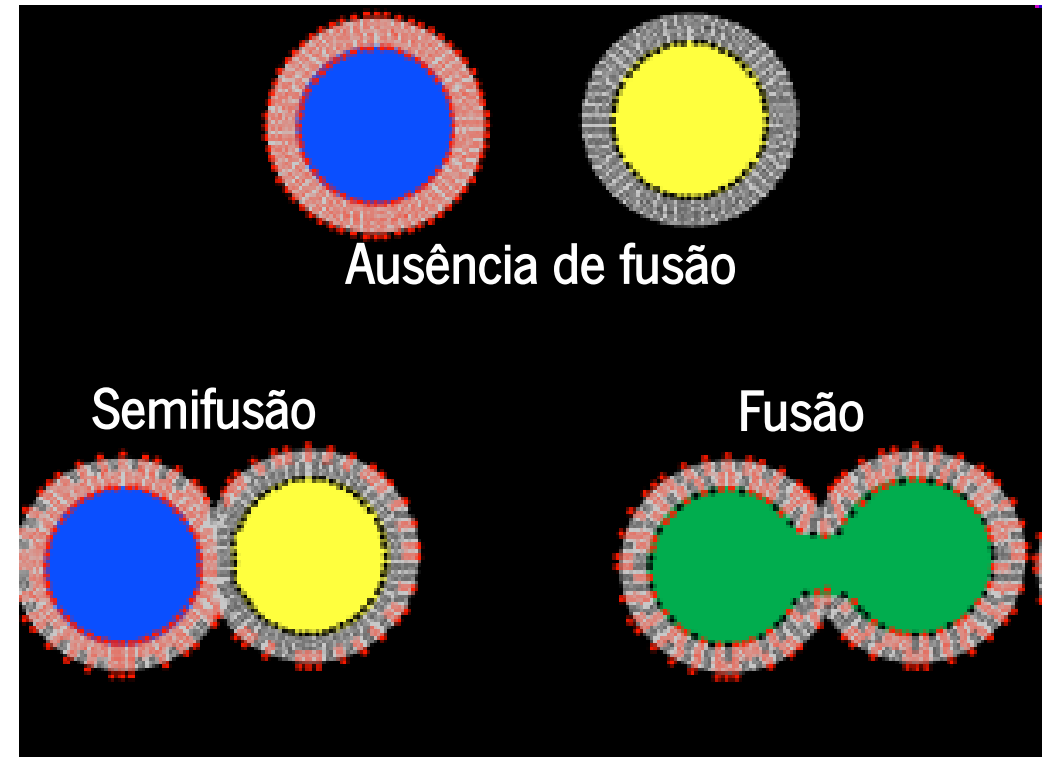


Agregados moleculares – dinâmica

Em certas situações, se as bicamada lipídicas se aproximarem suficientemente, podem fundir-se.

Fusão – processo através do qual duas bicamadas de lípidos juntam as suas partes hidrofóbicas resultando numa estrutura única e numa partilha do seu conteúdo aquoso.

Semifusão – os lípidos da camada exterior misturam-se mas as camadas interiores mantêm-se intactas, não permitindo uma partilha do conteúdo aquoso.



Agregados moleculares – dinâmica

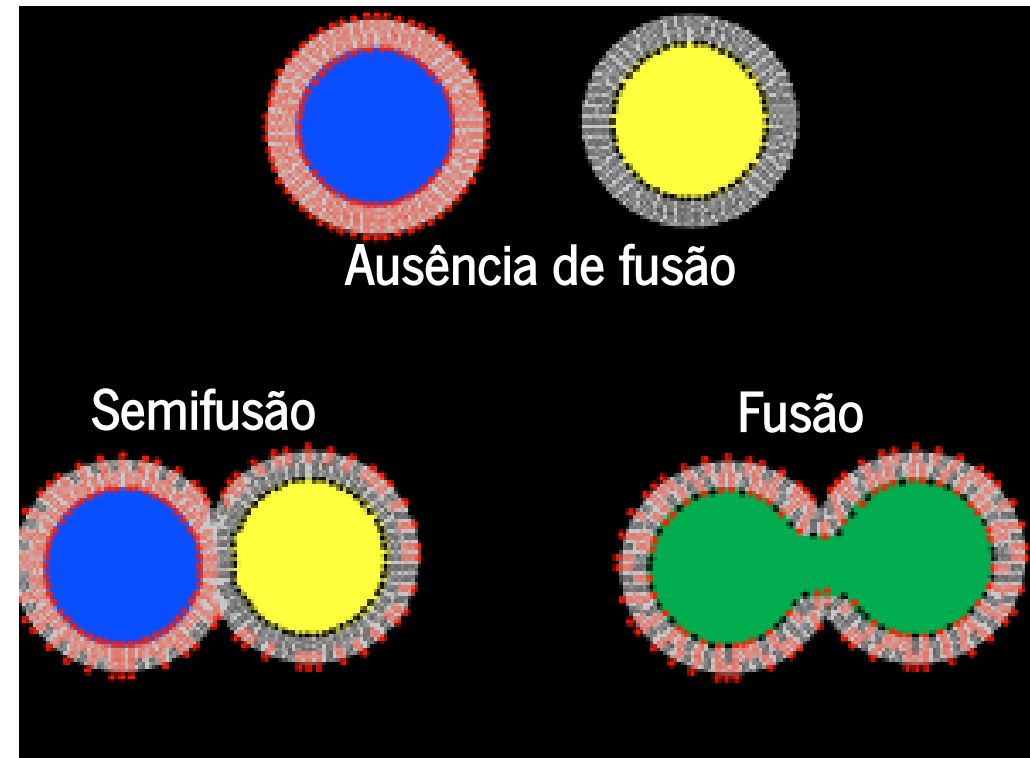
Se se verificarem certas condições as bicamada lipídicas podem-se fundir.

1 – As membranas devem aproximar-se até distâncias de alguns nanómetros (agregação)

2 – As duas bicamadas devem entrar em contacto (distância de alguns angstroms).

3 – Pelo menos uma das membranas deve sofrer de alguma destabilização, isto é, deve ter algum tipo de “defeito” que funcione como ponto de nucleação entre as duas bicamadas.

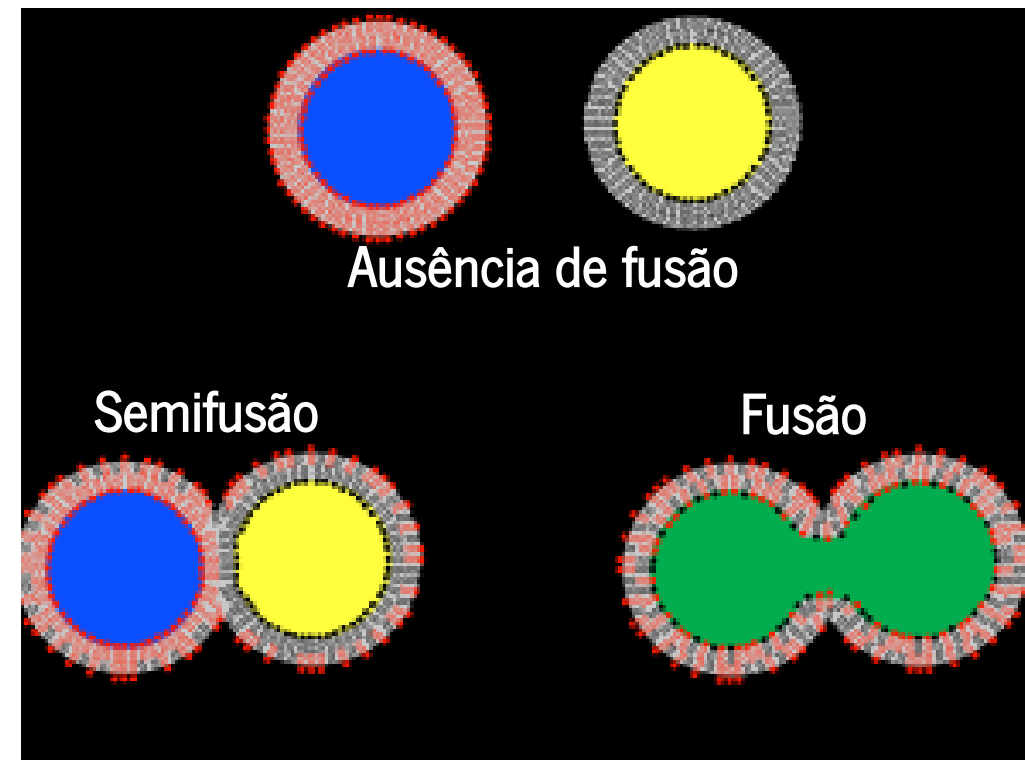
4 – Quando este defeito cresce, as componentes das duas bicamadas misturam-se e difundem-se para longe do ponto de contacto e pode-se dar à fusão .



Agregados moleculares – dinâmica

Se se verificarem certas condições as bicamada lipídicas podem-se fundir.

Alguns estudos mostram que catiões divalentes como o Ca^{2+} , têm um papel ativo no processo de fusão de membranas através da sua ligação à parte da cabeça polar do lípido que é carregada negativamente. Esta ligação introduz um defeito que serve de nucleação para a fusão.



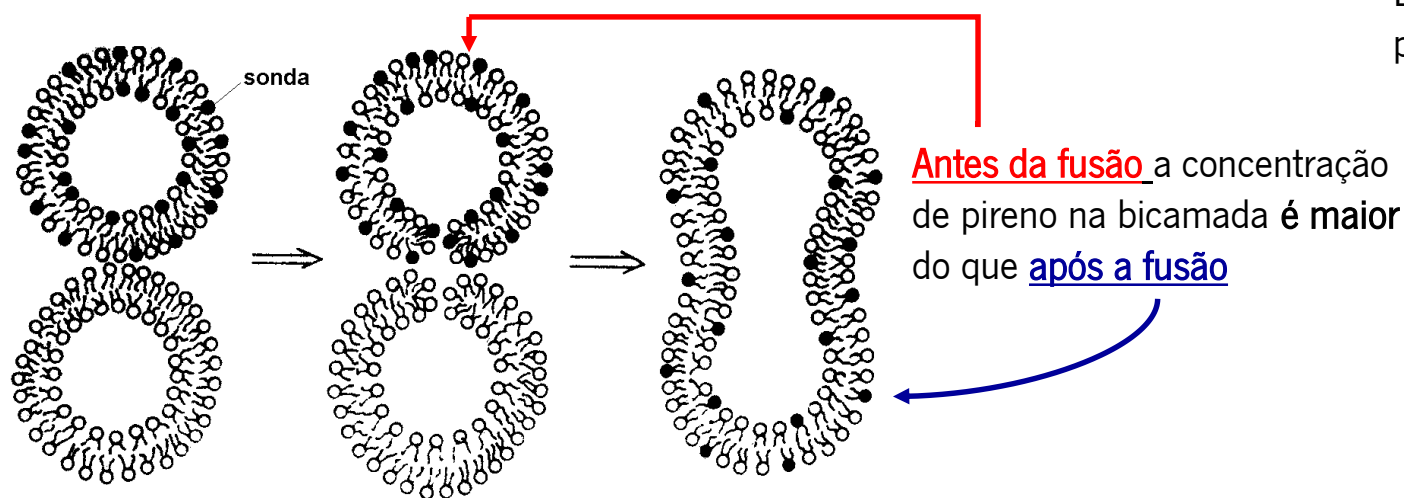
(Processo que se promove no trabalho prático T4)

Agregados moleculares – dinâmica

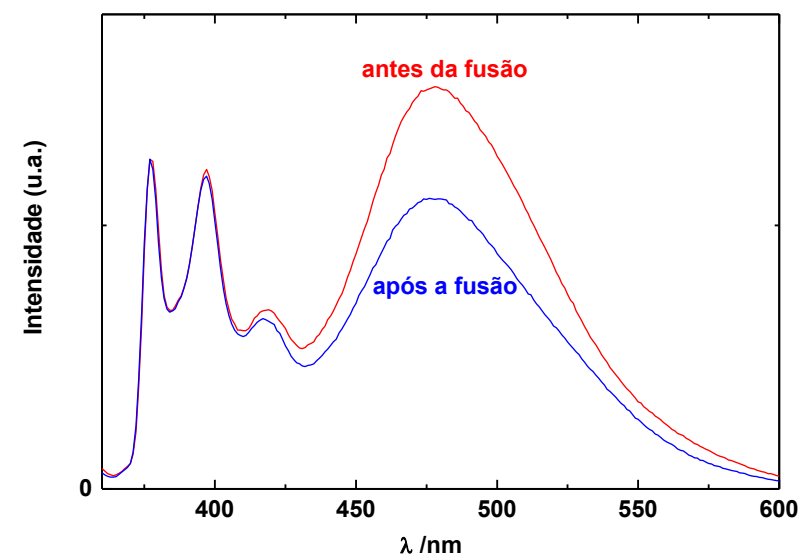
Se se verificarem certas condições as bicamada lipídicas podem-se fundir.

No trabalho prático T4 vão verificar a fusão de vesículas de lecitina de soja, por adição de Ca^{2+} .

A “visualização” da fusão é feita adicionando aos vesículos de lecitina de soja uma sonda fluorescente, neste caso o pireno. O pireno é sensível à concentração local através da formação de excímeros.



Então, antes da fusão a fluorescência do excímero do pireno deve ser mais eficiente do que após a fusão



Agregados moleculares – exercício

Indique se as seguintes afirmações são verdadeiras (V) ou falsas (F):

	Micelas	Vesículos de um único tipo de fosfolípido	Vesículos de misturas de fosfolípidos
São estruturas muito dinâmicas			
Nestas estruturas, as moléculas anfifílicas formam bicamadas			
Os monómeros são solúveis em água			
Os monómeros entram e saem da estrutura			
Existem muitos movimentos de <i>flip-flop</i>			
Os fosfolípidos formam agregados deste tipo			
A estrutura é determinada pelo parâmetro de empacotamento (p)			
Têm transição de fase gel-líquido cristalina			
São termodinamicamente estáveis			