

18

CAPÍTULO

ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA E ESTUDOS DE BIOMOLÉCULA

Silva, Jaqueline G ¹;
Silva, Edson dos S. ¹;
Souza, Eduardo S. de ¹ *

¹Instituto de Física e Química - Regional Catalão - UFG

* email: souza.es@gmail.com

Resumo: Espectroscopia de fluorescência é uma técnica que permite estudo de sistemas biológicos por meio da análise de suas interações com sondas fluorescentes. Essa interação é monitorada medindo as alterações nas propriedades espectroscópicas da sonda fluorescente. O sinal de fluorescência é sensível as propriedades do ambiente bioquímico local da sonda, como viscosidade, pH, polaridade, etc. O uso de FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer), na investigação da interação da heparina com peptídeos ligantes da heparina foi apresentado com um exemplo de aplicação. Nesta investigação foram obtidas informações da dinâmica e da estrutura dos peptídeos contribuindo para a pesquisa de desenvolvimento de peptídeos neutralizadores da heparina.

Palavras-chave: Fluorescência; biomoléculas; espectroscopia

1. Estados Eletrônico Moleculares

Fluorescência e fosforescência consistem em processos de emissão de fótons que ocorrem durante o relaxamento molecular dos estados eletrônicos excitados. Estes processos envolvem transições entre estados eletrônicos e vibracionais das moléculas fluorescentes (fluoróforos). O diagrama de Jablonski (Figura 1) oferece uma representação conveniente da estrutura do estado excitado e as transições relevantes. Os estados eletrônicos são tipicamente separados por energias da ordem de 10000 cm^{-1} , equivalentes a dos fótons da região espectral do uv-vísivel. Cada estado eletrônico é dividido em vários subníveis que representam os modos vibracionais da molécula. As

energias dos níveis vibracionais estão separadas por cerca de 100 cm^{-1} . Além disso, uma vez que a diferença de energia entre os estados excitado e fundamental é significativamente maior do que a energia térmica, a termodinâmica prediz que a molécula predominantemente permanece no estado eletrônico fundamental.

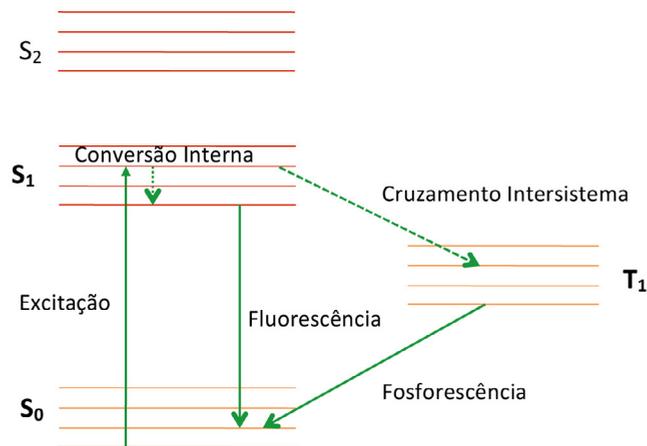


Figura 1 – O diagrama de Jablonski da excitação de um fluoróforo, processos de decaimentos radiativos e não radiativos. S₀ é o estado eletrônico singlete fundamental; S₁ e S₂ são sucessivamente estados singletos excitados de maior energia. T₁ é o estado tripleto de menor energia.

Os estados eletrônicos excitados de uma molécula poliatômica, podem ser classificados com base em sua multiplicidade. O fato dos elétrons serem indistinguíveis e o princípio da exclusão de Pauling, implicam que as funções de onda eletrônicas tenham estados de spin simétricos ou assimétricos. As funções de onda simétricas, também chamada de estado tripleto, possui multiplicidade três, enquanto que a função de onda antissimétrica, também chamada de estado singlete, possui multiplicidade um.

Em primeira ordem, a transição óptica acopla estados com a mesma multiplicidade. A transição óptica excita as moléculas do nível vibracional mais baixo do estado eletrônico fundamental, para um nível vibracional acessível do estado eletrônico excitado. Como o estado eletrônico fundamental é um estado singlete, o estado eletrônico de destino também o é.

Depois da excitação, a molécula relaxa rapidamente para o nível vibracional mais baixo do estado eletrônico excitado. Este rápido processo de relaxamento vibracional ocorre na escala de tempo de femtossegundos para picossegundos. Este processo de relaxamento é responsável pelo deslocamento de Stokes. O deslocamento

de Stokes descreve a observação de que os fótons de fluorescência tem um comprimento de onda maior, portanto com menor energia, que os fótons de excitação.

O fluoróforo permanece no nível vibracional mais baixo do estado eletrônico excitado por um período da ordem de nanossegundos, o tempo de vida de fluorescência. A emissão de fluorescência ocorre com o decaimento do fluoróforo do estado singleto excitado para um nível vibracional permitido no estado eletrônico fundamental.

Os espectros de absorção e emissão de fluorescência refletem as estruturas dos níveis de vibraçõais nos estados eletrônicos fundamental e excitados, respectivamente. O princípio de Frank-Condon indica o fato de que os níveis vibraçõais não são significativamente alterados durante as transições eletrônicas. A semelhança das estruturas dos níveis de vibraçõais nos estados eletrônicos fundamental e excitado, em geral, resulta no fato dos espectros de absorção e de emissão serem o espelho um do outro.

O estado eletrônico excitado também tem propriedades de polarização específicas. Os fluoróforos são preferencialmente excitados quando a polarização da luz está alinhada ao longo de um eixo molecular específico (orientação do dipolo de excitação). Além disso, os fótons de fluorescência subseqüentemente emitidos pela molécula terão polarização orientada ao longo de outro eixo molecular (orientação do dipolo de emissão). Em geral, as orientações dos dipolos de excitação e de emissão não coincidem.

2. Processos de Decaimentos

Decaimento radiativo descreve os processos moleculares de despopulação do estado excitado acompanhada por emissão de fóton. Moléculas nos estados eletrônicos excitados também podem relaxar por meio de decaimentos não-radiativos, ou seja processos em que a energia de excitação não é convertida em fótons, mas são dissipados por processos térmicos, tais como relaxamento vibracional e supressão colisional. Seja k_r e k_{nr} as taxas de decaimento radiativo e não radiativo, respectivamente e $N^*(t)$ é a fração de fluoróforos no estado excitado no instante t após a excitação. A evolução temporal do estado excitado pode ser descrita por

$$-\frac{dN^*(t)}{dt} = (k_r + k_{nr})N^*(t) \quad (1)$$

cuja solução resulta no decaimento exponencial da população do estado excitado conforme

$$N^*(t) = N^*(0)e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (2)$$

O tempo de vida de fluorescência do fluoróforo, τ , corresponde a taxa combinada de decaimento radiativo e não-radiativo, assim:

$$\tau = \frac{1}{k_r + k_{nr}} \quad (3)$$

Na ausência de processos de decaimentos não-radiativos, pode-se definir o tempo de vida intrínseco do fluoróforo:

$$\tau_0 = \frac{1}{k_r} \quad (4)$$

A "eficiência" do fluoróforo pode, então, ser quantificada pelo rendimento quântico de fluorescência, ϕ :

$$\phi = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} = \frac{\tau}{\tau_0} \quad (5)$$

3. Processos de supressão da fluorescência

Um grande número de fatores contribui para a despopulação não-radioativa e reduzem a intensidade de fluorescência de amostras. Em geral, os processos não-radiativos podem ser classificados como:

$$k_{nr} = k_{ic} + k_{ec} + k_{is} \quad (6)$$

Em que k_{ic} é a taxa de conversão interna, k_{ec} é a taxa de conversão externa, e k_{is} é a taxa de cruzamento intersistema.

A conversão interna é um processo onde a energia eletrônica é convertida em energia vibracional do fluoróforo. Uma vez que os processos vibracionais são acionados por processos térmicos, a taxa de conversão interna tipicamente aumenta com a temperatura, que é responsável pela diminuição na intensidade de fluorescência.

A conversão externa descreve o processo em que o fluoróforo perde energia eletrônica para o ambiente através de colisão com outros solutos. Os processos de supressão colisional são particularmente interessantes por permitirem a sondagem do

ambiente bioquímico do fluoróforo. Uma série de solutos moleculares importantes, tais como oxigênio, são eficientes supressores de fluorescência. No processo de colisão o fluoróforo é desexcitado não-radiativamente. A taxa de supressão colisional é dada por:

$$k_{ec} = k_0[Q] \quad (7)$$

em que k_0 depende do coeficiente de difusão e do raio hidrodinâmico dos interagentes e $[Q]$ é a concentração do supressor.

Quando a supressão colisional é o processo não-radiativo dominante, a equação (1) prevê que o tempo de vida de fluorescência diminui com a concentração do supressor:

$$\frac{\tau_0}{\tau} = 1 + k_0\tau_0[Q] \quad (8)$$

A intensidade de fluorescência no estado estacionário, F , também diminui em relação à intensidade de fluorescência na ausência do supressor, F_0 . Este efeito está descrito pela equação de Stern-Volmer:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_0\tau_0[Q] \quad (9)$$

A redução do sinal de fluorescência pode também resultar de processos no estado fundamental (supressão de estado estacionário). Um fluoróforo pode ser ligado quimicamente a um supressor para formar um "complexo apagado", um complexo não fluorescente. A intensidade de fluorescência diminui com a supressão de estado estacionário de acordo com a seguinte equação.

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_s[Q] \quad (10)$$

em que K_s é a constante de associação do supressor com o fluoróforo. O tempo de vida de fluorescência não é afetado pela supressão de estado estacionário, pois não há envolvimento dos estados excitados.

4. Fosforescência

O cruzamento intersistema é outro processo em que o sinal de fluorescência é reduzido e ocorre a geração da fosforescência. O acoplamento spin-orbita é o processo, descrito pela mecânica quântica, responsável pelo cruzamento intersistema. O cruzamento intersistema consiste no relaxamento de uma molécula do estado singleto excitado para um estado tripleto com menor energia. Como o acoplamento spin-orbita é um efeito fraco, a taxa para o cruzamento intersistema é baixa. O relaxamento do estado tripleto para o estado singleto fundamental exige outra mudança de multiplicidade. Por isso, a taxa de decaimento a partir do estado tripleto é muito baixa. No entanto, o relaxamento radiativo, fosforescência, ocorre de fato devido ao acoplamento spin-órbita. O tempo de vida de fosforescência típico é da ordem de microssegundos para segundos. Fosforescência tem deslocamento de Stokes maior que o de fluorescência devido a menor energia do estado tripleto.

Como a taxa de fosforescência é frequentemente muito mais baixa do que as dos processos de decaimento não-radiativos ativados termicamente, tal como, supressão colisional, a fosforescência é raramente observada em sistemas aquosos à temperatura fisiológica. No entanto, uma série de estudos de conformação de proteínas a temperaturas criogênicas utilizam a espectroscopia de fosforescência.

5. Instrumentação

A medição dos sinais de fluorescência proporciona um método sensível de monitoramento do ambiente bioquímico de um fluoróforo. Instrumentos foram desenvolvidos para medir intensidade de fluorescência, espectro, tempo de vida e polarização.

A medição da intensidade de fluorescência é usada em numerosos ensaios bioquímicos, e permite a determinação da presença de fluoróforos e de suas concentrações. Os projetos de instrumentos para estes ensaios são bastante simples, mas são tão variados quanto as aplicações.

Fluorímetros são instrumentos de uso geral projetados para medir espectro de fluorescência e de excitação, polarização e / ou tempo de vida. Um fluorímetro típico inclui uma fonte de luz, um porta amostras com componentes ópticos integrados, e detectores de alta sensibilidade (Figura 2). As fontes de luz mais comuns para fluorímetros são lâmpadas, tais como as lâmpadas de arco de xenônio. Estas lâmpadas proporcionam uma intensidade relativamente uniforme em uma ampla faixa espectral do ultravioleta ao o infravermelho próximo. Os caminhos ópticos de excitação e de

detecção de luz estão alinhados em eixos ortogonais. O arranjo ortogonal assegura fuga mínima da luz de excitação para o lado de detecção. Fotodetectores com alta sensibilidade tais como fotomultiplicadores ou câmaras com dispositivos de cargas acopladas (CCD) são comumente utilizados.

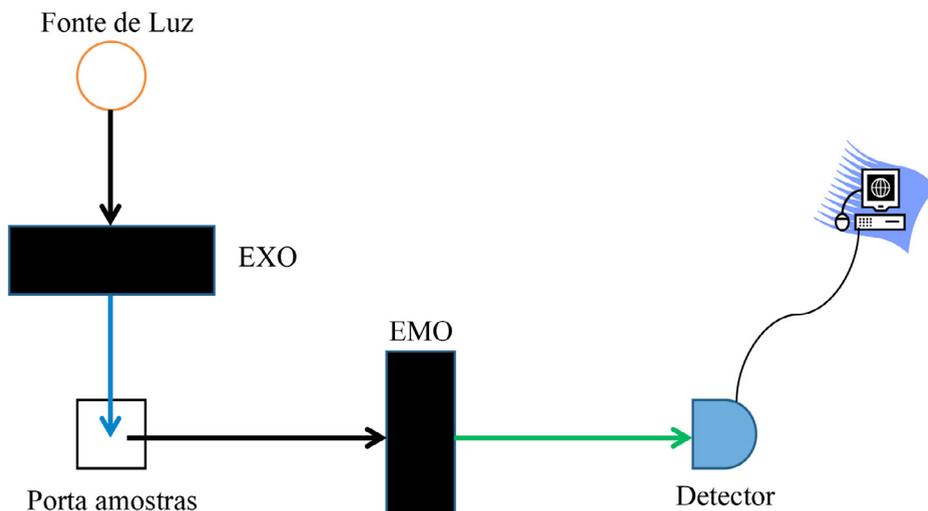


Figura 2: Um projeto típico de fluorímetro. EXO é o conjunto óptico de excitação, EMO é o conjunto óptico de emissão. Os conjuntos ópticos de excitação e de emissão incluem ópticas de colimação de alinhamento do feixe, componentes ópticos para seleção espectral, como filtros e monocromadores. Para a medição de polarização, polarizadores são adicionados ao EXO e ao EMO. Para a medição de tempos de vida, uma fonte de luz laser é normalmente usada e componentes eletrônicos de alta velocidade são integrados no subsistema do detector.

Para medição de espectros monocromadores ou filtros passa-banda, são colocados nos caminhos ópticos da excitação e da emissão para selecionar uma banda espectral específica. O espectro de excitação é definido como a intensidade fluorescente medida, como função do comprimento de onda de excitação, em um comprimento de onda de emissão fixo; o espectro de emissão é a intensidade de fluorescência medida, como função do comprimento de onda de emissão, num comprimento de onda de excitação fixo.

Fluorímetros também foram projetados para medir o tempo de vida de fluorescência. Dado o tempo de vida típico dos fluoróforos, a medição do tempo de vida com acurácia requer fotodetectores e eletrônicos de processamento de sinal com resolução abaixo de nanossegundos. Fluorímetros de alta precisão foram desenvolvidos para trabalhar tanto no domínio do tempo quanto da frequência. No domínio do

tempo, são frequentemente utilizados como fonte de excitação lasers pulsados na faixa de fentossegundos ou picossegundos. O método de contagem de fóton único com correlação temporal é frequentemente empregado. Neste método a amostra é excitada por um pulso de luz e os fótons de excitação são correlacionados temporalmente com os fótons emitidos pela amostra. O tempo é medido por componentes eletrônicos de alta velocidade. No domínio da frequência, a amostra é excitada por uma fonte de luz com amplitude modulada. O sinal de fluorescência resultante também é modulado mas tem um deslocamento de fase e uma demodulação em relação ao espectro da fonte de excitação. O deslocamento de fase e a demodulação contém a informação tempo de vida do fluoróforo.

Para a medição de polarização, polarizadores são inseridos nos caminhos ópticos de excitação e emissão. Com o polarizador de excitação fixo, o polarizador de emissão pode ser girado para medir as componentes perpendicular (I_{\perp}) e paralela (I_{\parallel}) da emissão de fluorescência. A polarização (P) de estado de estacionário é definida como:

$$P = \frac{I_{\perp} - I_{\parallel}}{I_{\perp} + I_{\parallel}} \quad (11)$$

e uma medida equivalente é a anisotropia estado estacionário (r):

$$r = \frac{I_{\perp} - I_{\parallel}}{I_{\perp} + 2I_{\parallel}} \quad (12)$$

6. Aplicações de Fluorescência no Estudo de Sistemas Biológicos

A utilização da fluorescência em biologia e medicina é generalizada. Em particular, as medidas de espectro fluorescência, tempo de vida e polarização são poderosos métodos de estudo da estrutura e função biológica.

O espectro de fluorescência é altamente sensível ao ambiente bioquímico do fluoróforo. Tem sido desenvolvido fluoróforos de tal modo que suas alterações espectrais sejam função da concentração de metabólitos, tais como pH e cálcio. Alterações no espectro de fluorescência resultantes de relaxamento do solvente de aminoácidos fluorescentes, tais como triptofano e tirosina, reportam informações importantes sobre a estrutura e o envelhecimento de proteínas. A estrutura e dinâmica de domínios proteicos na escala subnanométrica podem ser espectralmente monitorados usando a

transferência ressonante de energia de fluorescência (FRET – Fluorescence Resonance Energy Transfer). FRET requer a superposição do espectro de emissão de um fluoróforo (o doador) com o espectro de absorção de um segundo fluoróforo (o aceitador). A eficiência (E) deste processo é dada por

$$E = \frac{R_0^6}{r^6 + R_0^6} \quad (13)$$

em que R_0 , distancia crítica de Förster, depende das propriedades do solvente das propriedades espectrais das sondas e r é a distância relativa entre as moléculas doadora e aceitadora. A conformação da proteína pode ser monitorada através da marcação de partes relevantes com um par FRET. A distância entre os dois fluoróforos pode ser quantificada pela análise espectral das intensidades relativas da fluorescência do doador e do aceitador.

Tempos de vida de fluorescência fornecem informação complementar à das medidas de espectro. Muitos fluoróforos podem responder a mudanças em seu ambiente com variações de tempos de vida. Um exemplo importante é a medição da concentração de oxigênio com base na supressão dinâmica de fluoróforos com tempos de vida longos. Medições de tempo de vida também são utilizadas para distinguir os mecanismos de supressão dinâmicos e estáticos. Medidas FRET com resolução temporal permitem a determinação de distribuição de distâncias de uma população de pares FRET. (Souza et al, 2000 e 2014; Ito et al, 2001; Pimenta et al, 2002; Montalti et al, 2014)

A polarização da fluorescência mede a taxa de difusão rotacional de macromoléculas. A difusão rotacional contém informações relacionadas com a forma das proteínas. Restrição da difusão de moléculas em macroestruturas biológicas, como a membrana celular ou o citoesqueleto, também podem ser quantificados com base em medições de polarização. A aplicação mais comum de espectroscopia de polarização da fluorescência é o monitoramento da ligação proteína-ligante e da oligomerização. A combinação de medidas de tempos de vida e de polarização permite a quantificação da taxa de difusão rotacional e tem sido utilizada para estudar o movimento de domínios proteicos.

O propósito deste artigo não é apresentar uma discussão completa sobre o uso de diferentes métodos espectroscópicos para deduzir as estruturas e funções biológicas. No entanto, como uma demonstração dos princípios gerais, examinaremos a utilização do FRET para monitorar ensaios proteolíticos. Peptídeos contendo um grupo doador em um dos terminais e um grupo aceitador no outro terminal tem sido utilizados como substrato em ensaios proteolíticos através do monitoramento do aumento do sinal de

fluorescência com progresso da hidrólise enzimática devido a eliminação da transferência de energia intramolecular entre os grupos doadores e aceitadores (Gershkolovich e Kholodovich, 1996; Knight, 1995). O ácido orto-amino benzóico (o-Abz) é uma sonda fluorescente pequena, de tamanho comparável ao dos aminoácidos naturais, e tem sido utilizada como grupo doador, formando um par doador-aceitador com o etilenodiamina-N-[2,4-dinitrofenil] (EDDnp), em peptídeos fluorescentes com supressão interna (IQF - internally quenched fluorogenic), empregados, por exemplo, na investigação e de proteases como a calicreína do tecido humano (Chagas et al, 1995; Del Nery et al, 1995) e na investigação da interação da heparina com peptídeos ligantes da heparina, onde foram obtidas informações da dinâmica e da estrutura dos peptídeos contribuindo para a pesquisa de desenvolvimento de peptídeos neutralizadores da heparina (Pimenta, et al, 2002)

7. Conclusões

Espectroscopia de fluorescência é amplamente utilizada em muitas áreas da biologia e da medicina (Machán e Thorsten, 2014). Técnicas modernas de fluorimetria tem permitido o estudo de moléculas individuais (Ha, 2014). A fluorescência permite também técnicas de processamento de imagem tais como TIRF (Total Internal Reflection Microscopy), FLIM (Fluorescence-Lifetime Imaging Microscopy), FLIP (Fluorescence Loss in Photobleaching) e FRAP (Fluorescence Recover After Photobleaching) (Esposito et al, 2009). Uma compreensão básica princípios de fluorescência, propriedades de fluoróforos, instrumentos e técnicas é um pré-requisito para o estudo de uma ampla gama de sistemas biológicos, tais como DNA, proteínas e peptídeos e agregados anfifílicos. A espectroscopia de fluorescência é também importante na identificação de minerais fluorescentes, contaminantes e impurezas na ciência de materiais, geologia, inspeção de semicondutores e proteção ambiental.

Fluorescence Spectroscopy and biomolecular studies

Abstract: Fluorescence spectroscopy is a technique that allows the study of biological systems by studying its interaction with fluorescent probes. This interaction is monitored by measuring changes in spectroscopic properties of fluorescent probe. The fluorescence signal is very sensitive to the biochemical environment properties, such as viscosity, pH, polarity, etc. The use of FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) to investigate the interaction of heparin with heparin-binding peptides was shown as an application. In this investigation dynamic and structure information of peptides was obtained contributing to research to design peptides that neutralize the effects of heparin.

Keywords: Spectroscopy, Fluorescence; Biomolecules

Referências bibliográficas

Chagas JR, Portaro FC, Hirata IY, Almeida PC, Juliano MA, Juliano L, Prado ES. **Determinants of the unusual cleavage specificity of lysyl-bradykinin-releasing kallikreins.** *Biochem J* 306:63–69. 1995

Del Nery E, Chagas JR, Juliano MA, Prado ES, Juliano L. **Evaluation of the extent of the binding site in human tissue kallikrein by synthetic substrates with sequences of human kininogen fragments.** *Biochem J* 312:233–238. 1995

Gershkolovich AA, Kholodovich VV. **Fluorogenic substrates for proteases based on intramolecular fluorescence energy transfer (IEFTS).** *J Biochem Biophys Methods* 33:135–162. 1996

Ha, T. **Single-molecule methods leap ahead.** *Nature Methods* 11, 1015–1018. 2014

Ito AS, Souza ES, Barbosa SR, Nakaie CR. **Fluorescence study of conformational properties of melanotropins labeled with aminobenzoic acid.** *Biophys J* 81:1180–1189. 2001

Knight CG (1995) **Fluorometric assays of proteolytic enzymes.** *Methods Enzymol* 248:18–34. 1996

Machán, M ; Thorsten, M. **Recent applications of fluorescence correlation spectroscopy in live Systems.** *FEBS Letters* 588: 3571–3584. 2014

Montaldi LR, Berardi M, Souza ES, Juliano L, Ito AS. **End-to-end distance distribution in fluorescent derivatives of bradykinin in interaction with lipid vesicles.** J Fluoresc 22:1151–1158. 2012

Pimenta DC, Nantes IL, Souza ES, Le Bonniec B, Ito AS, Tersariol ILS, Oliveira V, Juliano MA, Juliano L. **Interaction of heparin with internally quenched fluorogenic peptides derived from heparin binding consensus sequences, kallistatin and anti-thrombin III.** Biochem J 366:435–44. 2002

Souza ES, Hirata IY, Juliano L, Ito AS. **End-to-end distribution distances in bradykinin observed by fluorescence energy transfer.** Bioch Biophys Acta 1474:251–261. 2000

Souza ES, Katagiri AH, Juliano L, Juliano MA, Pimenta DC, Ito AS. **FRET Studies of Conformational Changes in Heparin-Binding Peptides.** J Fluoresc 24:885–894. 2014

Esposito A, Schlachter S, Schierle GS, Elder AD, Diaspro A, Wouters FS, Kaminski CF, **Iliev AI Methods Mol Biol 586:117-42.** 2009

Bibliografia consultada

So, PTC; Dong, CY. **Fluorescence Spectrophotometry.** In: eLS. John Wiley & Sons Ltd, Chichester: 2001. Disponível em: <<http://www.els.net>>. Acesso em: 10 agosto 2014.

Becker, RS. **Theory and Interpretation of Fluorescence and Phosphorescence.** Wiley. New York: 1969.

Birks, JB. **Photophysics of Aromatic Molecules.** Wiley. New York: 1970.

Lakowicz, JR. **Principles of Fluorescence Spectroscopy.** Plenum Press. New York: 1999

Becker, RS. **Theory and Interpretation of Fluorescence and Phosphorescence.** Wiley. New York: 1969.

Pavia, D.; Lampman G.; Kriz, G. **Introdução a Espectroscopia.** 4.ed. Cengage Learning. São Paulo: 2010.

Custodio, R.; Kubota, L.; Andrade, J. **Lei dos Processos de Absorção da Radiação.** Chemkeys. 2000. Disponível em <http://chemkeys.com/br/>. Acesso em 12/11/2014.