

## TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS EM BIOFÍSICA\*

José Amando Ito

*Instituto de Física - USP*

### 1. Introdução

Tanto a Física como a Biologia buscam reconhecer, na natureza, e explicitar, em linguagem adequada, padrões de "comportamento" que independam do observador e que possam ser generalizados sem limitações de tempo e de espaço. Particularidades na evolução desses dois ramos do conhecimento colocaram-nos em compartimentos separados que, todavia, voltam atualmente a encontrar pontos de contato, pelo alargamento e ampliação de suas fronteiras.

Há uma variedade muito grande de intersecções entre a Física e a Biologia e pretendo apresentar algumas delas, limitadas porém ao tema relacionado ao uso de técnicas espectroscópicas em sistemas de interesse biológico. Vale citar, de início, que o ser vivo caracteriza-se por apresentar diferentes níveis de organização, hierarquicamente ordenados de modo a cumprir sua finalidade principal de reprodução e

manutenção da espécie. Podemos dizer, esquematicamente, que esses níveis seriam:

- a) dos átomos e moléculas como água, aminoácidos, açúcares, nucleotídeos, sais inorgânicos, etc.
- b) das macromoléculas como proteínas, carboidratos, lipídios, ácidos nucleicos e outras.
- c) das estruturas supramoleculares, como membranas, agregados de proteínas, cromossomos, etc.
- d) das organelas sub-celulares, entre as quais mitocôndrias, ribossomos, aparato de Golgi, melanossomos.
- e) das células de diferentes tipos como epiteliais, hemácias, neurônios, etc.
- f) dos tecidos como o conectivo, os músculos, os nervos, o epitélio.
- g) dos órgãos como ossos, coração, fígado e tantos outros.
- h) dos organismos, desde o ser humano até...

Prosseguindo na escala hierárquica, as células interagem entre si e com o meio circundante, de modo a assegurar a estruturação de tecidos e de arranjos mais complexos. Estes, por sua vez,

---

\* Texto oriundo do Mini-curso apresentado na II Semana de Física da Universidade Estadual de Feira de Santana em outubro de 1998.

compõem um todo orgânico, controlado e controlando uma série de processos como respiração, circulação, percepção, etc, de modo a manter vivos na biosfera organismos complexos como, por exemplo, os vertebrados.

Nessa caminhada entre os níveis de organização dos seres vivos, fica clara a impropriedade de se supor o todo como a soma simples das partes. Somos feitos de átomos, a maior parte deles hidrogênio, carbono, oxigênio e nitrogênio, e sabemos obviamente que não basta misturarmos esses elementos na mesma proporção em que aparecem em nossos corpos para que tenhamos uma réplica de nós mesmos. Por outro lado, sem conhecermos os detalhes dos fenômenos biológicos no nível atômico e molecular, ficamos com informações insuficientes para a compreensão dos mesmos. Por exemplo, sabemos que o processo de retirada do oxigênio do ar e sua liberação nos vasos que formam a rede capilar em nossos corpos é essencial para a manutenção da vida. Sabemos também que átomos de ferro são atores principais nesse processo. Ora, na atmosfera, átomos de Fe e moléculas de O<sub>2</sub> também interagem entre si, o que é a ferrugem senão um resultado de reações entre Fe e O<sub>2</sub>? O que ocorre então nos nossos organismos para que a interação entre Fe e O<sub>2</sub> termine por levar o oxigênio dos pulmões para o interior de células onde vai participar dos processos pelos quais geramos energia para a manutenção da vida? Para se entender esse processo, foi preciso conhecer detalhes dos sistemas respiratório e circulatório, dos processos pelos quais

uma célula, a hemácea, é conduzida na corrente sanguínea, até chegar ao conhecimento de que existe uma proteína, a hemoglobina, que atua como agente essencial na interação entre Fe e O<sub>2</sub>. Adentrando no mundo atômico-molecular, foi possível conhecer a estrutura da hemoglobina, e, além disso, dos grupos atômicos, dentro da proteína, que mantêm as ligações que apreendem o átomo de Fe dentro de sua estrutura. Vários métodos da Física foram empregados para se chegar a esse ponto, e muitos outros permitiram saber que o Fe na hemoglobina atua de maneira peculiar, em sincronia com a estrutura da hemoglobina, aprisionando O<sub>2</sub> onde ele é abundante, como nos pulmões e soltando-o onde ele é escasso e necessário, como nos tecidos do cérebro ou da ponta dos pés. Este exemplo ilustra a fertilização que resulta do cruzamento de idéias e conceitos gerados de maneira independente, dentro da Física, Química, Matemática, Biologia, e que acaba por produzir uma compreensão mais elaborada de uma parte de nós mesmos, de alguns processos que acontecem em tantos outros seres vivos, de uns entre tantos eventos que culminaram no estado atual de nosso planeta, e, porque não dizer, dá um contribuição, mínima que seja, para aquela busca do conhecimento que movimenta a atividade humana.

## 1. Técnicas Espectroscópicas

Toda técnica espectroscópica baseia-se na detecção e análise de um feixe de

radiação eletromagnética vinda de uma amostra do material que está sendo investigado. Essa radiação pode ser parte de um feixe que incidiu sobre a amostra e foi parcialmente atenuado (espectroscopia de absorção ou transmissão); pode ser um feixe que, após incidir sobre a amostra foi espalhado ou difratado (espalhamento); pode ainda ter se originado na própria amostra, como resultado de diferentes processos (espectroscopia de emissão). Existem diversas variantes desse esquema básico, mas o importante é entender que tipo de interação ocorre entre a radiação e a matéria, e que tipo de informação pode ser obtida com cada técnica espectroscópica.

As diferentes técnicas espectroscópicas utilizadas em Biofísica cobrem diferentes intervalos do amplo espectro da radiação eletromagnética, desde os raios-X até as microondas. Na região dos raios-X (comprimentos de onda da ordem de alguns Å), a radiação interage com núcleos e elétrons, sofrendo espalhamento, e, se houver periodicidades como estruturas cristalinas, difração. Essa é a região da cristalografia, do espalhamento e difração de raios-X. Ondas eletromagnéticas com energias mais baixas que os raios-X, correspondentes a comprimentos de onda entre 1.000 e 7.000 Å, compõem a região do ultra-violeta e visível. Essa radiação interage com os elétrons de átomos e moléculas, promovendo-os para estados excitados e temos aqui as espectroscopias no UV-visível: absorção ótica, fluorescência e dicroísmo circular. Na faixa espectral seguinte, no infra-vermelho

(comprimentos de onda da ordem de alguns micrometros), a radiação possui energia tal que estimula vibrações e rotações moleculares, associadas às espectroscopias no infra-vermelho e espalhamento Raman. Em comprimentos de onda maiores (comprimentos de onda de milímetros a metros) temos as microondas e ondas de rádio. Nesse caso, a radiação pode ser absorvida por amostras colocadas em campos magnéticos elevados, da ordem de milhares de Gauss, devido à excitação dos spins eletrônicos e nucleares. As técnicas espectroscópicas envolvidas aqui são a Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) e a Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Todas essas técnicas são empregadas no estudo de sistemas de interesse biológico, fornecendo informações que ajudam a entender os diversos níveis de complexidade dos sistemas vivos apresentados anteriormente. Nesta oportunidade destaco apenas algumas dessas técnicas aplicadas ao estudo de macromoléculas biológicas, em particular das proteínas. Conforme será apresentado a seguir, ilustro a obtenção de informações de natureza estrutural em sistemas biológicos, utilizando essas técnicas espectroscópicas.

## 2. Estrutura de Macromoléculas

As proteínas são constituintes essenciais dos seres vivos e são formadas por aminoácidos que se dispõem sequencialmente de modo a formar uma molécula que executa funções bem determinadas e específicas

dentro das células, tecidos e organismos. Cada proteína possui uma sequência própria de aminoácidos, que é única e exclusiva, conferindo à macromolécula o arranjo espacial adequado ao desempenho de sua função biológica. O conhecimento desse arranjo espacial significa a determinação das posições de todos os átomos que constituem a macromolécula, e isso tem sido possível usando as técnicas de difração de raios-X e de RMN. É interessante notar que as regiões situadas nos extremos da faixa espectral da radiação eletromagnética, raios -X de um lado, e microondas do outro, possibilitam, por meios diferentes, obter o mesmo tipo de informação sobre as posições atômicas.

### 3. Cristalografia de Proteínas

Informações detalhadas sobre a estrutura de macromoléculas biológicas têm sido obtidas por experimentos de difração de raios-X. De modo geral, mede-se a função de espalhamento de cristais de proteínas, que depende do espalhamento pelos átomos individuais dentro da célula cristalina unitária e das propriedades de espalhamento da célula unitária dentro da rede cristalina. Da função de espalhamento total, que depende dos parâmetros da célula unitária e das posições atômicas, obtém-se uma distribuição da densidade eletrônica em função do vetor posição dentro da célula. Com o conhecimento sobre a composição da proteína, busca-se obter um modelo para as posições atômicas que ajuste-se

ao mapa de densidade eletrônica. Métodos de simulação computacional por mecânica e dinâmica molecular são amplamente utilizados nessa fase do trabalho. Atualmente já está na casa dos milhares o número de proteínas que tiveram sua estrutura espacial determinada por técnicas cristalográficas. Uma dificuldade inerente ao método é a necessidade de obtenção de cristais de proteínas, coisa nem sempre possível, seja pela quantidade de material necessário, seja por não se conseguir o crescimento de cristais adequados às medidas por Raios-X.

### 4. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Núcleos que possuem momentos magnéticos diferentes de zero podem se orientar em campos magnéticos e suas energias vão depender dessa orientação. Quando incide sobre a amostra radiação com comprimento de onda adequado, a orientação do núcleo pode mudar, passando de uma de menor energia para outra de energia mais elevada, sendo a diferença de energia igual à energia da radiação absorvida. Como exemplos de átomos com núcleos cujo momento magnético é diferente de zero, temos: hidrogênio, deutério,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{14}\text{N}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{31}\text{P}$ . Dada a abundância com que átomos de hidrogênio aparecem nos seres vivos, a chamada ressonância magnética nuclear de prótons ou de hidrogênio é muito usada em estudos sobre sistemas biológicos. A energia necessária para promover a ressonância

entre duas orientações possíveis para o núcleo do hidrogênio, ou o próton, em um campo magnético, depende da intensidade desse campo. Em valores de campo da ordem de 100.000 gauss, ocorre absorção de energia da radiação de frequência de 440 MHz, ou seja, radiação na faixa das microondas.

Na verdade, um próton sente os efeitos de um campo magnético total, que inclui, além do campo externo, campos locais que são gerados pelas nuvens eletrônicas dos átomos próximos ao próton. Assim, se um hidrogênio está ligado a um átomo de carbono de um anel aromático, vai absorver radiação com frequências ligeiramente diferentes dos 440 MHz e um hidrogênio ligado a um átomo de oxigênio absorve radiação com um outro valor de frequência. Dessa forma, uma dada amostra vai apresentar absorção em vários valores de frequência em torno daqueles 440 MHz, cada valor correspondente a um certo tipo de átomo ao qual está ligado o hidrogênio.

Além disso, diferentes prótons podem interagir entre si, dependendo da distância relativa entre eles. Se verificarmos, por RMN, que um hidrogênio ligado a um certo átomo de carbono, dentro de uma proteína, interage com um hidrogênio ligado a um dado átomo de nitrogênio dessa mesma proteína, poderemos encontrar a distância entre esse nitrogênio e aquele carbono. Com base nisso, pode-se obter um mapa de distâncias entre alguns átomos ou grupos de átomos que fazem parte de uma proteína e, então, busca-se um desenho

tridimensional da proteína que se ajuste a todo o conjunto de dados sobre as ressonâncias dos milhares de prótons da macromolécula. Nessa fase, as simulações computacionais usando métodos de dinâmica molecular são extremamente importantes. Apesar da grande quantidade de manipulação de dados experimentais, a metodologia descrita brevemente tem permitido a determinação da estrutura de um número grande de proteínas. Também aqui o número de proteínas com estruturas determinadas por RMN já está na casa dos milhares. Resultados comparáveis foram obtidos tanto por RMN como por cristalografia de raios-X. Apesar de não ser necessária a cristalização das proteínas, ainda é necessária uma quantidade grande (da ordem de dezenas de miligramas) de proteínas altamente purificadas. Dada a necessidade de campos magnéticos muito elevados para o êxito da técnica na determinação de estruturas, os custos dos equipamentos e sua manutenção são bastante elevados, superando a faixa do milhão de dólares.

## 5. Dinâmica das Conformações

As macromoléculas apresentam estruturas estáveis e funcionais. Todavia essas estruturas não são estáticas e, durante a atividade biológica, podem ocorrer mudanças conformacionais nas proteínas. Informações importantes sobre o funcionamento de sistemas biológicos são obtidas através da observação de fenômenos relacionados à mudança de

estrutura das macromoléculas. Muitas técnicas espectroscópicas que não fornecem informações diretas sobre a estrutura de proteínas podem informar sobre a ocorrência dessa dinâmica conformacional e, entre elas, temos as espectroscopias de absorção ótica, de fluorescência e o dicroísmo circular, como ilustrarei a seguir. Apesar de menos informativas quanto a detalhes estruturais, o baixo custo dessas técnicas, a possibilidade de trabalhar com quantidades pequenas de material e menores restrições quanto ao estado físico das amostras, fazem com que elas sejam intensamente utilizadas em Biofísica.

## 6. Absorção Ótica

Na região espectral do UV-visível (1500 a 7000 Å), a radiação promove a transição de elétrons do estado fundamental para estados eletrônicos excitados. Ocorre absorção de radiação quando a energia da mesma for igual à diferença de energia entre dois estados eletrônicos. A espectroscopia de absorção ótica compara a intensidade de um feixe de luz transmitido através de uma amostra, com a intensidade incidente e os dados experimentais são expressos em termos da intensidade absorvida em função do comprimento de onda da radiação. Em muitas moléculas orgânicas que apresentam ligações duplas envolvendo átomos de carbono, nitrogênio e oxigênio, o arranjo eletrônico é tal que as diferenças de energia entre o estado fundamental e os primeiros estados excitados

corresponde à região do UV-visível e, assim, elas podem ser estudadas pela espectroscopia de absorção ótica. Muitas macromoléculas biológicas podem ser investigadas com essa técnica e, no caso das proteínas, devem-se destacar os grupos moleculares que absorvem na região UV-visível. Esses grupos são, principalmente, os aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano, e a chamada ligação peptídica, que faz a união entre dois aminoácidos consecutivos da cadeia proteica.

Existem 20 diferentes aminoácidos que participam da composição de uma proteína e, dessa forma, ao estudarmos a absorção de luz por aqueles 3 aminoácidos, temos apenas informações de natureza local, ou seja, examinamos apenas uma parte da proteína. Assim, a espectroscopia de absorção ótica, diferentemente da cristalografia ou do NMR, não informa sobre as posições atômicas detalhadas da proteína. Todavia, muitas vezes, ao examinarmos uma parte da proteína, somos capazes de saber o que ocorre com a macromolécula como um todo. Isso ocorre em particular nos casos em que a interação dos aminoácidos aromáticos com o meio circundante altera suas propriedades de absorção da radiação. Como exemplo podemos citar o fato de que alterações no pH do meio mudam os comprimentos de onda em que a tirosina absorve luz no UV.

Examinando, em vários pH's, o espectro de absorção de proteínas contendo tirosina, podemos acompanhar mudanças de conformação na macromolécula que estejam

ocorrendo por força de mudanças nas condições de acidez do meio.

## 7. Dicroísmo Circular

Como citado anteriormente, a ligação peptídica também absorve radiação na região UV, mais precisamente em comprimentos de onda entre 1800 e 2300 Å. Existe uma característica especial da ligação peptídica, que é o fato de que os átomos que a compõem podem interagir com os átomos de outras ligações peptídicas, contribuindo para forçar a proteína a assumir uma estrutura peculiar, não aleatória. Essa forma de estruturação da cadeia proteica origina a chamada "estrutura secundária" da proteína, que pode então assumir arranjos helicoidais em determinados trechos de sua sequência de aminoácidos. Estudos cristalográficos e de RMN, conforme citados anteriormene, comprovam que proteínas, de fato, apresentam regiões com arranjos helicoidais, intercaladas com regiões menos estruturadas. Essas formas regulares de arranjos atômicos interagem de modo particular com a radiação polarizada, fazendo, por exemplo, com que uma luz com polarização circular no sentido horário seja absorvida diferentemente do que uma luz com polarização no sentido anti-horário. A espectroscopia de dicroísmo circular mede justamente essa diferença de absorção de radiação com polarização circular e permite verificar se estão ocorrendo arranjos helicoidais dentro de uma molécula de proteína. A propósito, cabe dizer que

essa observação pode ser feita também em macromoléculas como os ácidos nucleicos.

Ao fazermos um experimento de dicroísmo circular em proteínas, estamos nos informando sobre as características da estrutura secundária. Assim, também aqui não conseguimos obter informações sobre as posições dos átomos na macromolécula, mas somos capazes de dizer se estão ocorrendo mudanças na conformação da proteína e, em caso positivo, correlacioná-las com as características do meio circundante. Podemos saber, por exemplo, se mudanças de temperatura, ou de pH, ou a presença de outras moléculas no solvente são capazes de modificar a estrutura da proteína, e se essas modificações de estrutura afetam a atividade biológica da macromolécula. Essa é uma técnica de grande utilidade, dando outro exemplo, nos estudos sobre o dobramento e a desnaturação de proteínas, e na pesquisa, tanto teórica como experimental, sobre os mecanismos pelos quais uma macromolécula tão grande adota um único arranjo estrutural tão particular e compatível com sua atividade em organismos vivos.

## 8. Fluorescência

Uma molécula com elétrons em estados excitados tende a voltar para o estado fundamental cedendo energia para o meio, e um dos processos de volta ao fundamental, chamado fluorescência, envolve a emissão de ftons. Ocorre porém que a energia do

fóton emitido não é igual à do fóton absorvido, apesar do fato de que tanto a absorção de radiação como a emissão da fluorescência resultarem de transições entre um estado eletrônico excitado e o estado fundamental. Ao absorver um fóton, a molécula parte de um arranjo de equilíbrio adequado ao estado eletrônico fundamental. Quando passa a um estado eletrônico excitado, a molécula vai se rearranjar, ou sofrer uma relaxação, para uma outra geometria mais adequada a esse estado excitado. Um pouco de energia é perdida nessa relaxação, de modo que no momento da emissão a diferença de energia entre o estado excitado e o fundamental é menor que aquela existente no momento da absorção.

Como resultado, a energia do fóton emitido é menor que a do fóton absorvido.

Na espectroscopia de fluorescência, uma amostra é irradiada com luz UV-visível (existe também fluorescência com irradiação por raios-X, da qual não nos ocupamos no momento) e deteta-se a radiação emitida pela amostra submetida à iluminação.

Experimentalmente procura-se determinar a energia da radiação emitida, a intensidade com que ocorre a emissão, o desvio na direção de polarização quando a luz incidente é polarizada, o intervalo de tempo no qual a molécula permanece no estado excitado (da ordem de  $10^{-9}$  segundos). Todos esses “parâmetros fluorescentes” dependem da interação da molécula fluorescente com o meio circundante, compreendido como as moléculas vizinhas, sejam essas moléculas do solvente ou outras presentes no meio. No caso de

proteínas, como já citado, existem 3 aminoácidos que absorvem luz UV-visível e que podem apresentar fluorescência: a fenilalanina, a tirosina e o triptofano. Do estudo das características de fluorescência desses aminoácidos em proteínas, é possível obter informações a respeito da ocorrência de mudanças estruturais relacionadas, como sempre, à atividade que as proteínas exercem nos organismos vivos.

O triptofano em particular tem se mostrado bastante conveniente nesse tipo de estudo, dada a dependência entre suas propriedades fluorescentes e o caráter hidrofóbico ou hidrofílico de suas vizinhanças. Por exemplo, há no músculo uma proteína chamada troponina, que sofre uma mudança de conformação quando íons de cálcio ligam-se a ela e essa mudança pode ser claramente notada observando-se a fluorescência de um resíduo triptofano presente na membrana. O que está sendo observado nesse caso é um evento molecular relacionado às etapas iniciais do processo de movimentação muscular, que depende da interação com íons de cálcio presentes no meio celular.

## CONCLUSÕES

Nessa breve apresentação procurei mostrar algumas características e alguns poucos exemplos de utilização de técnicas espectroscópicas em Biofísica. Dada a complexidade dos sistemas vivos, e de seus diferentes níveis de organização, é preciso ter consciência clara dos limites das informações que podem ser obtidas com a aplicação de uma técnica particular. Além disso, muitas vezes

trabalha-se com sistemas modelo que, como tais devem ser entendidos, antes de qualquer generalização para os sistemas vivos, sempre muito mais complexos. Resulta disso que, na pesquisa sobre um determinado sistema biológico, é preciso sempre a utilização de um conjunto de diferentes técnicas experimentais, fornecendo informações complementares entre si.

Este texto esteve restrito a algumas técnicas espectroscópicas, e à classe de macromoléculas incluídas na categoria geral das proteínas, com ênfase na relevância de seus aspectos estruturais para o funcionamento biológico das mesmas. Esse grupo de técnicas aplicada a esse grupo de macromoléculas representa apenas um parte do vasto campo de pesquisa em Biofísica. É fundamental uma visão abrangente sobre a contribuição que informações como as ilustradas ao longo deste texto podem dar para a compreensão de eventos ocorrendo em células, tecidos, organismos. Essa contribuição não vem só do conhecimento aprofundado de uma técnica particular e de uma molécula em especial, mas principalmente do saber situar a especificidade desse conhecimento no cenário amplo representado pela pesquisa sobre sistemas vivos em nosso planeta. E isso só pode ser feito pela interação com outras áreas do conhecimento, sejam as mais estabelecidas como a Biologia, a Química, a Matemática, sejam outras que ainda venham a se estabelecer...