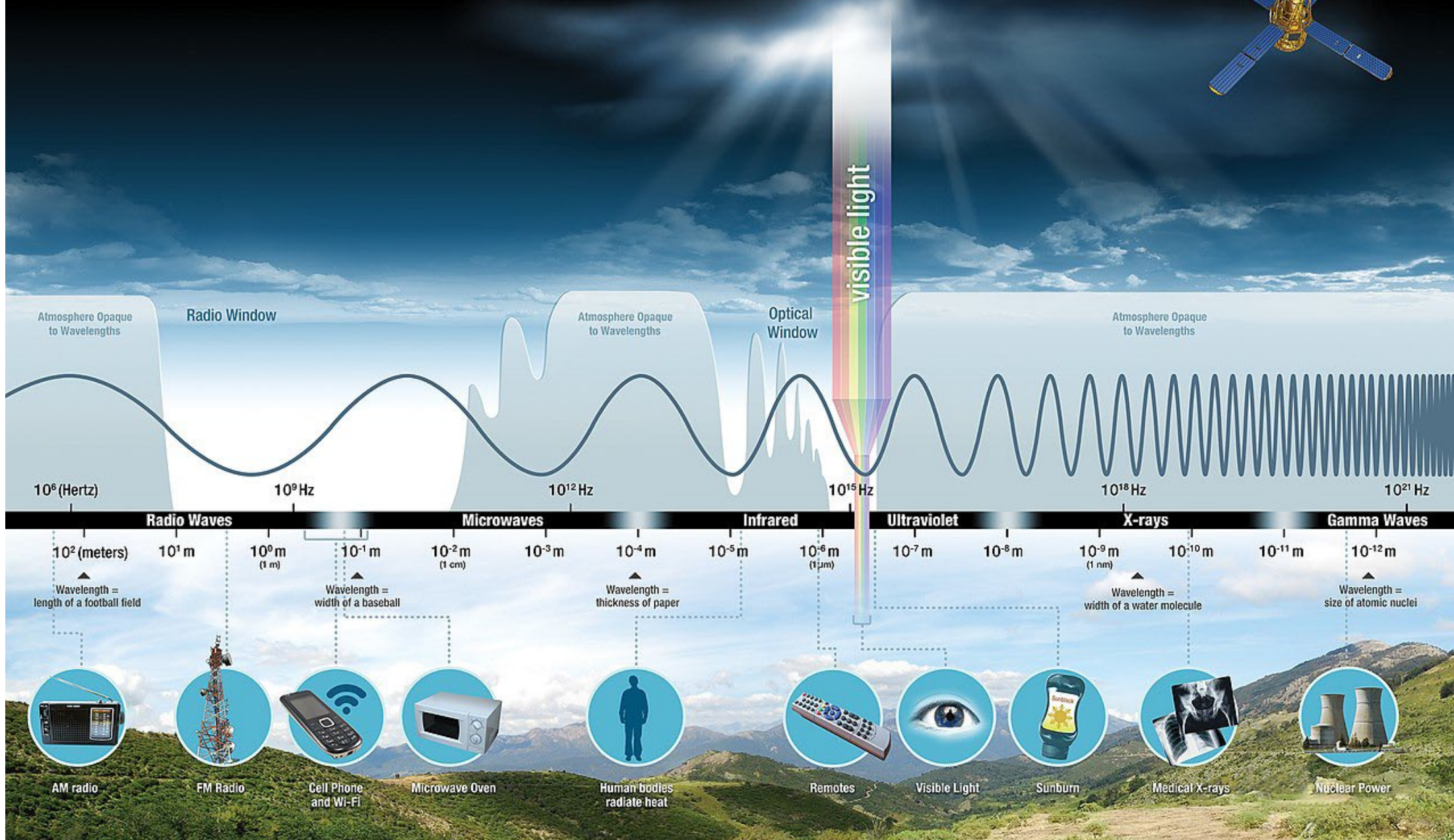
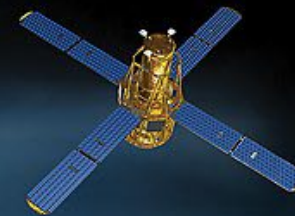


Técnicas fotométricas



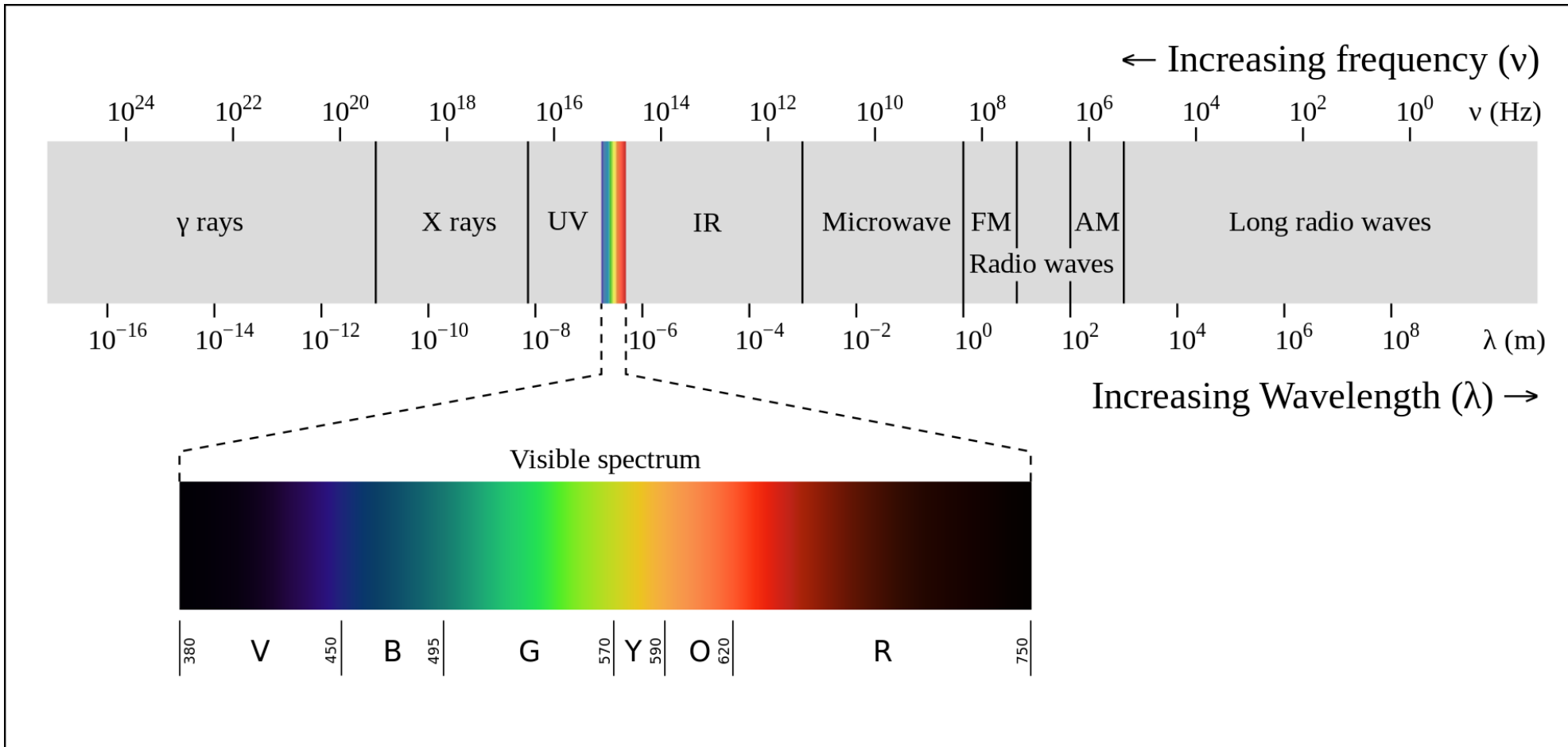
Absorbância, fluorescência e quimioluminescência.

Radiação eletromagnética



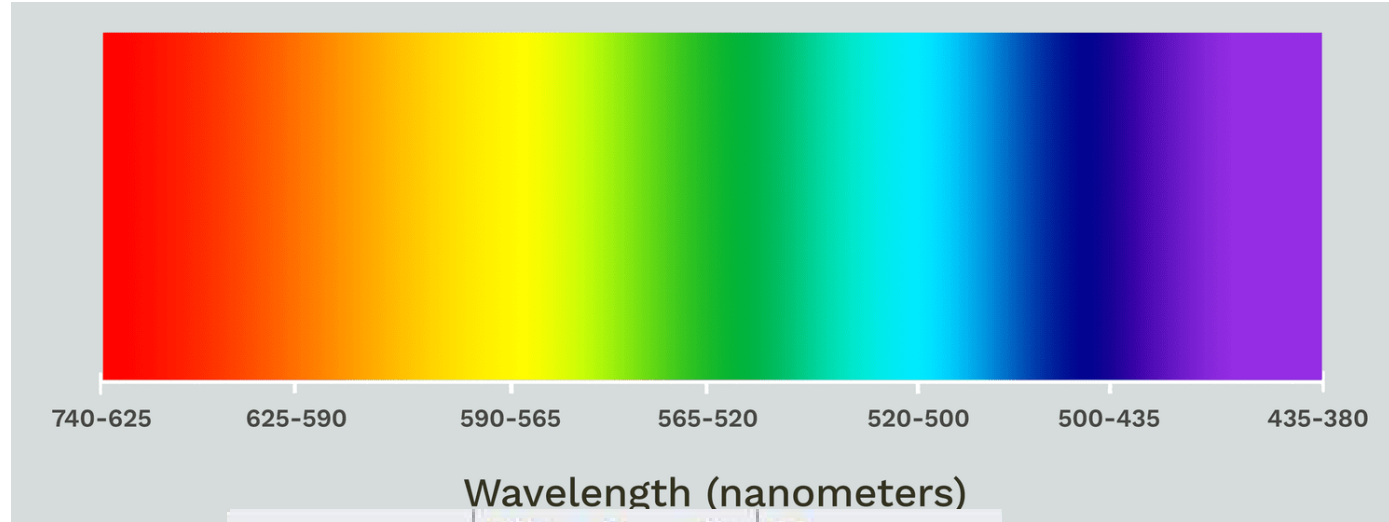
Espectroscopia








- Estudo das medidas e interpretações dos espectros da radiação eletromagnética visível ou não visível.

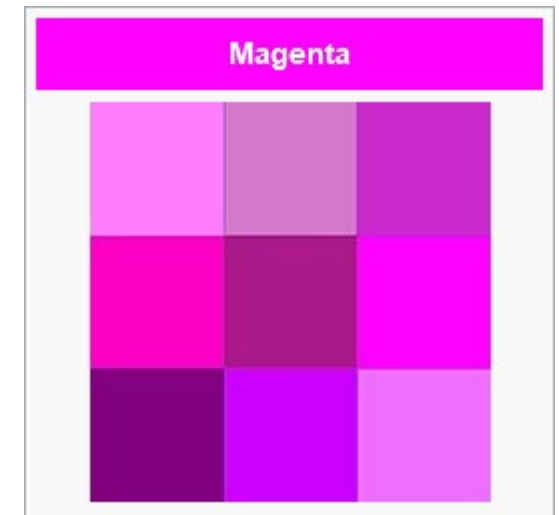


Luz

- Radiação eletromagnética que é visível ao olho humano



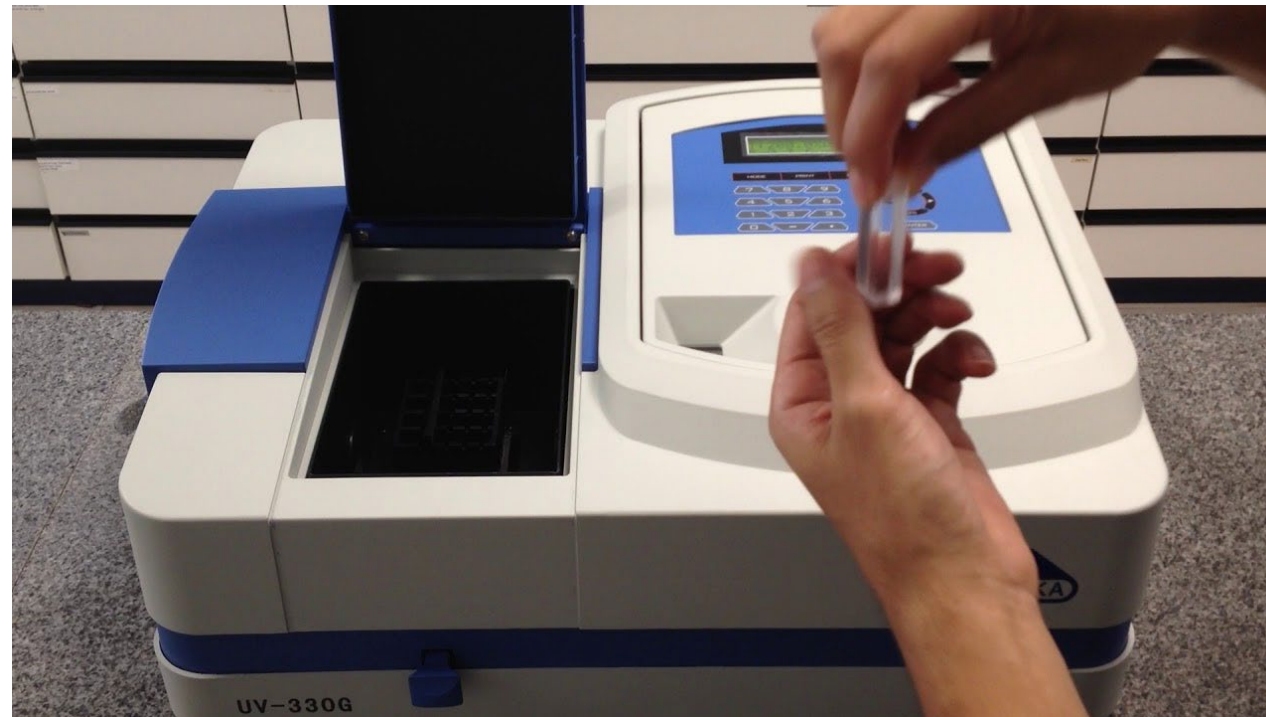
Color	Wavelength (nm)	Frequency (THz)
 violet	380–450	670–790
 blue	450–485	620–670
 cyan	485–500	600–620
 green	500–565	530–600
 yellow	565–590	510–530
 orange	590–625	480–510
 red	625–750	400–480



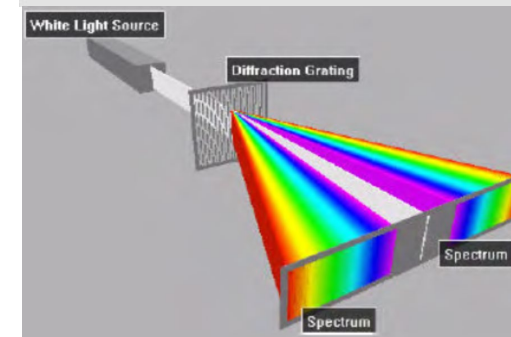
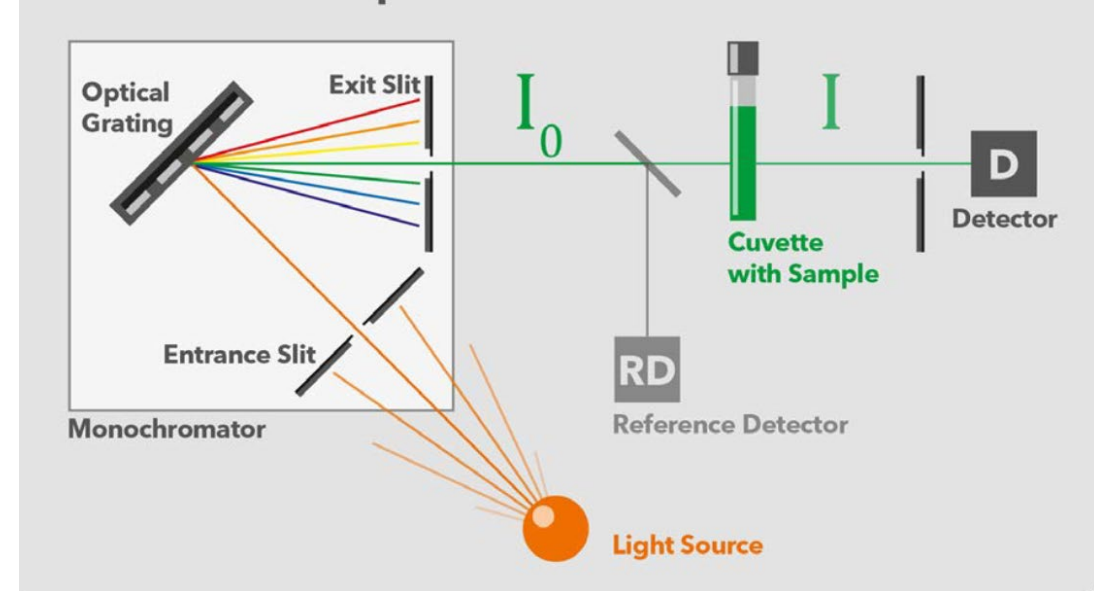
Não corresponde a um comprimento de onda específico

Espectrofotometria

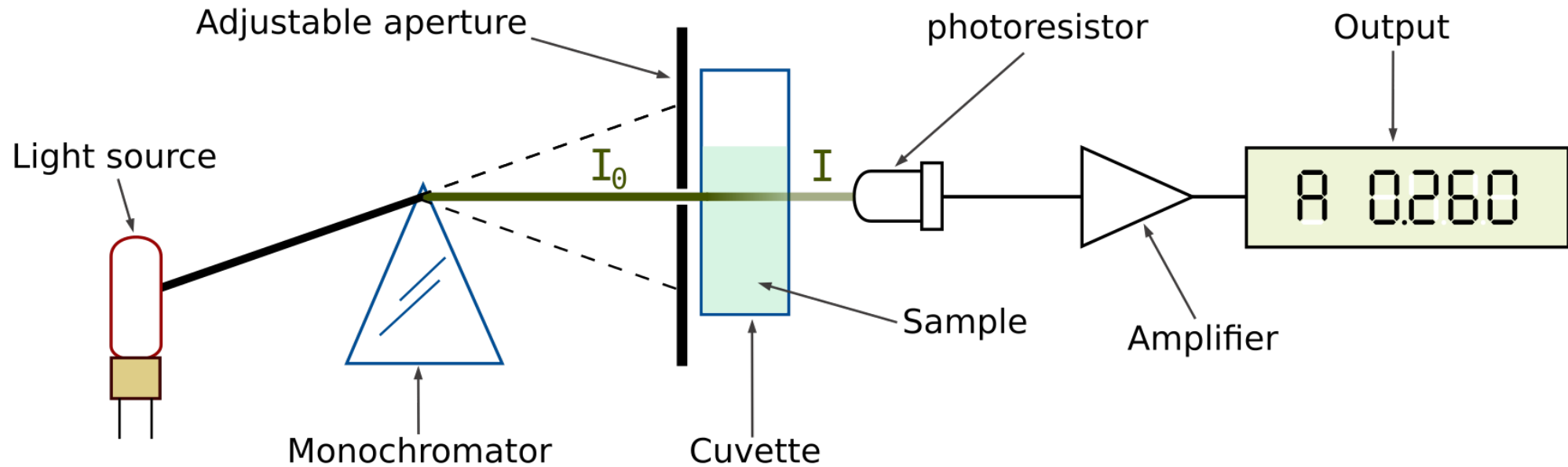
- Estudo quantitativo das propriedades reflexivas ou transmitivas da radiação eletromagnética em função do seu comprimento de onda.
 - Espectrofotômetros: aparelhos usados em estudos espectrofotométricos
 - Em biologia os espectrofotômetros usados abrangem a luz visível, ultra violeta e/ou infravermelho.



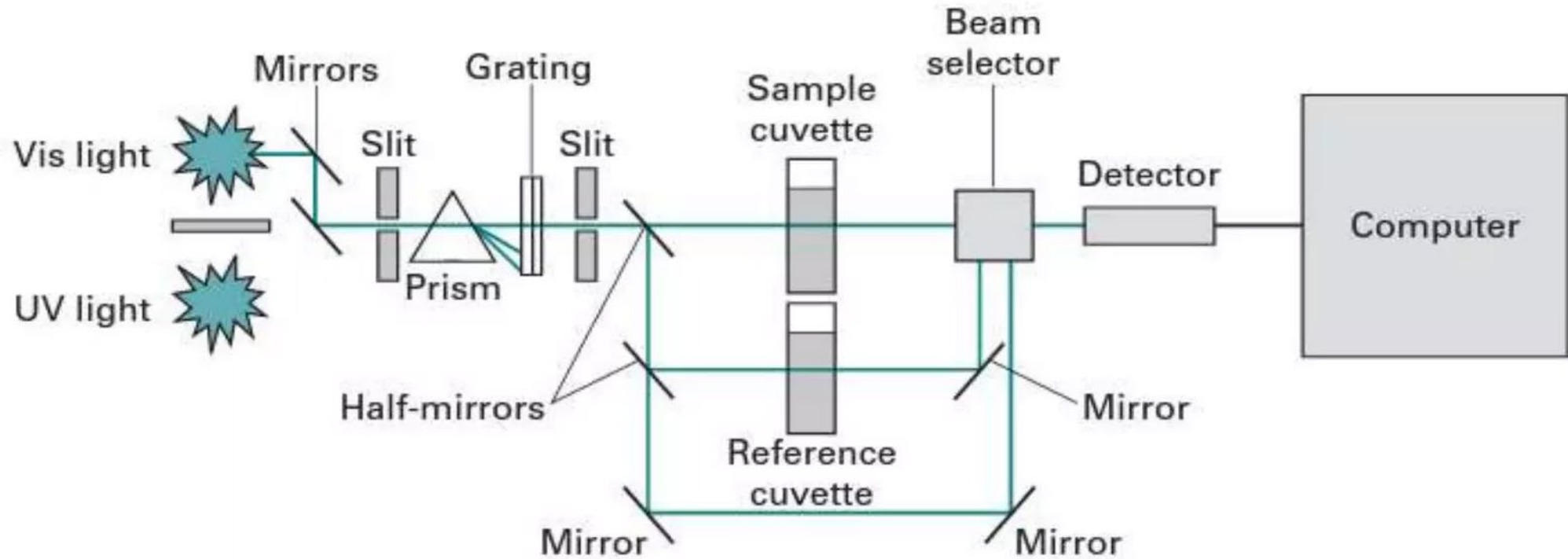
- “Branco” - amostra com 100% de transmitância, água.
 - Medido previamente – “single beam”
 - Medido simultaneamente – “double beam”
- Fonte de luz:
 - lâmpada de tungstênio – espectro visível
 - lâmpada de deutério: espectro UV
 - Lâmpada de xenônio: espectro visível/UV
- Colimadores: “colimam” a luz (ondas paralelas)
- Monocromador: seleciona o comprimento de onda a partir de uma fonte de luz branca
 - Espelho, grade (*grating*) ou prisma decompõem a luz branca
 - *slit* – fenda que seleciona o comprimento de onda
- Cuveta contendo a amostra
 - Vidro (borossilicato), plástico: radiação visível
 - Quartzo: UV e radiação visível
- Fotodetectores



Princípio de funcionamento – *single beam*

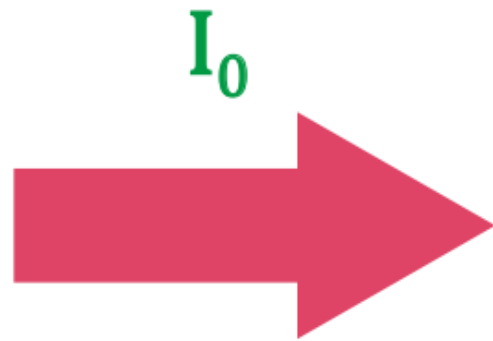


Princípio de funcionamento - *dual-beam*



Transmitância

- **Transmitância (T)**: razão da intensidade luminosa antes (I_0) e depois (I) de passar pela cuveta (I/I_0).



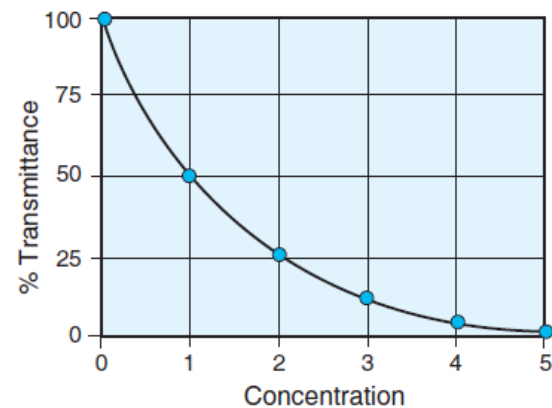
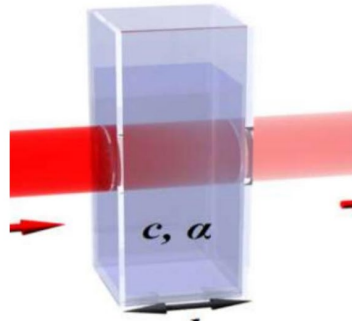
$$T \% = \frac{I}{I_0} \times 100$$

Detector

Lei de Beer-Lambert

- Lei de Beer
 - A lei de Beer determina que a intensidade da luz transmitida decai **exponencialmente** com a concentração e uma substância que absorve essa luz na solução
 - Ou seja a quantidade de luz absorvida é diretamente proporcional a concentração da substância colorida na solução

$A = \epsilon c l$



Lei de Beer-Lambert

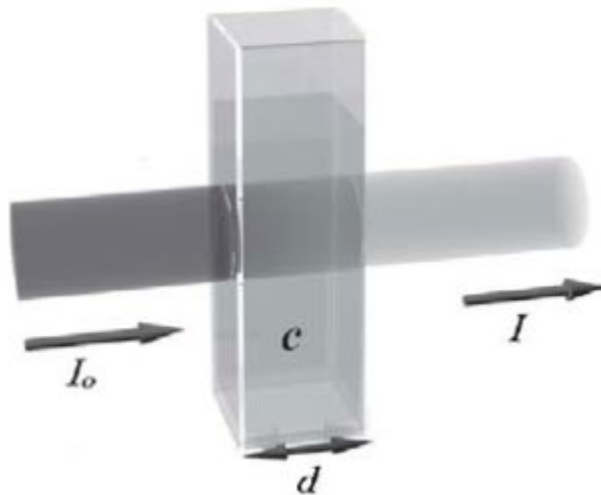
- Lei de Lambert
 - A lei de Lambert determina que a intensidade da luz transmitida decai exponencialmente com o comprimento do caminho por onde a luz passa pela solução e pela concentração da substância.
 - Ou seja a quantidade de luz absorvida é diretamente proporcional ao caminho por onde a luz passa pela solução

$$A \propto L$$



Lei de Beer-Lambert

- Lei de Beer Lambert
 - A lei de Beer- Lambert determina que a intensidade da luz transmitida decai exponencialmente com o comprimento do caminho por onde a luz passa (d) e pela concentração da substância (c)
 - Ou seja a quantidade de luz absorvida é diretamente proporcional ao comprimento do caminho por onde a luz passa (d) e a concentração da substância (c)



$$A = \epsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d$$

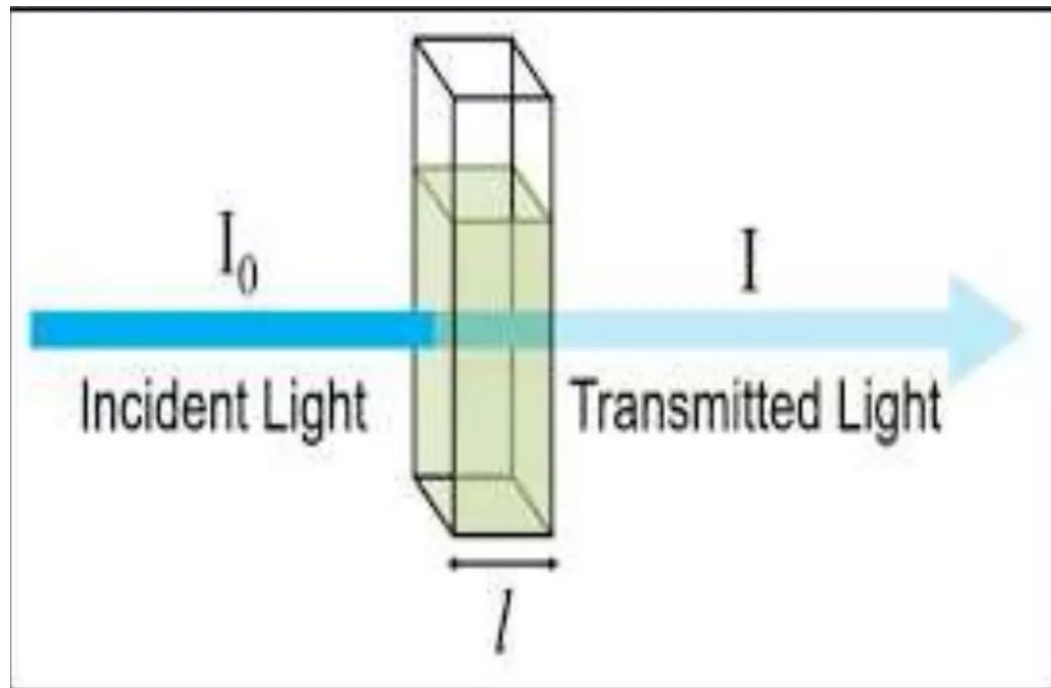
ϵ_{λ} = molar absorptivity, in l/mol x cm

d = Path length of the cell, in cm

c = Concentration of the analyte, in mol/l

Absorbância.

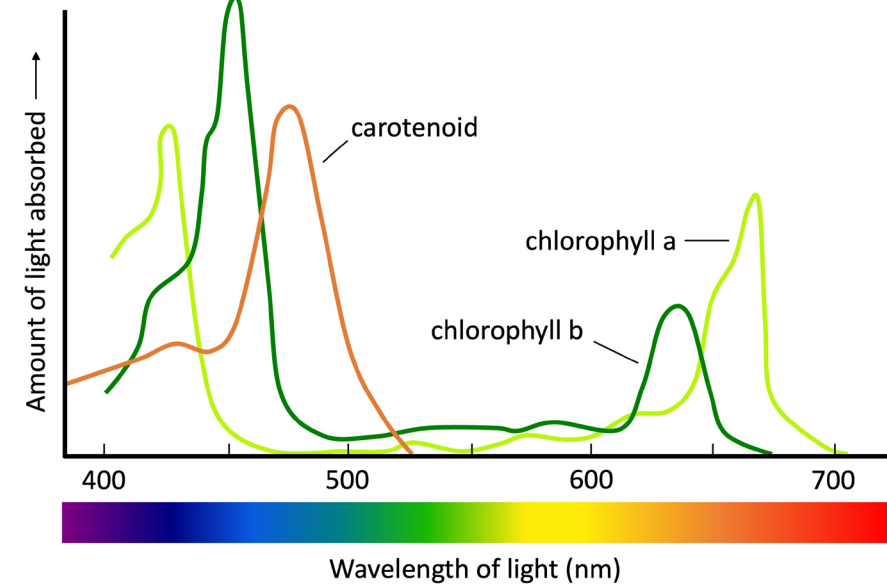
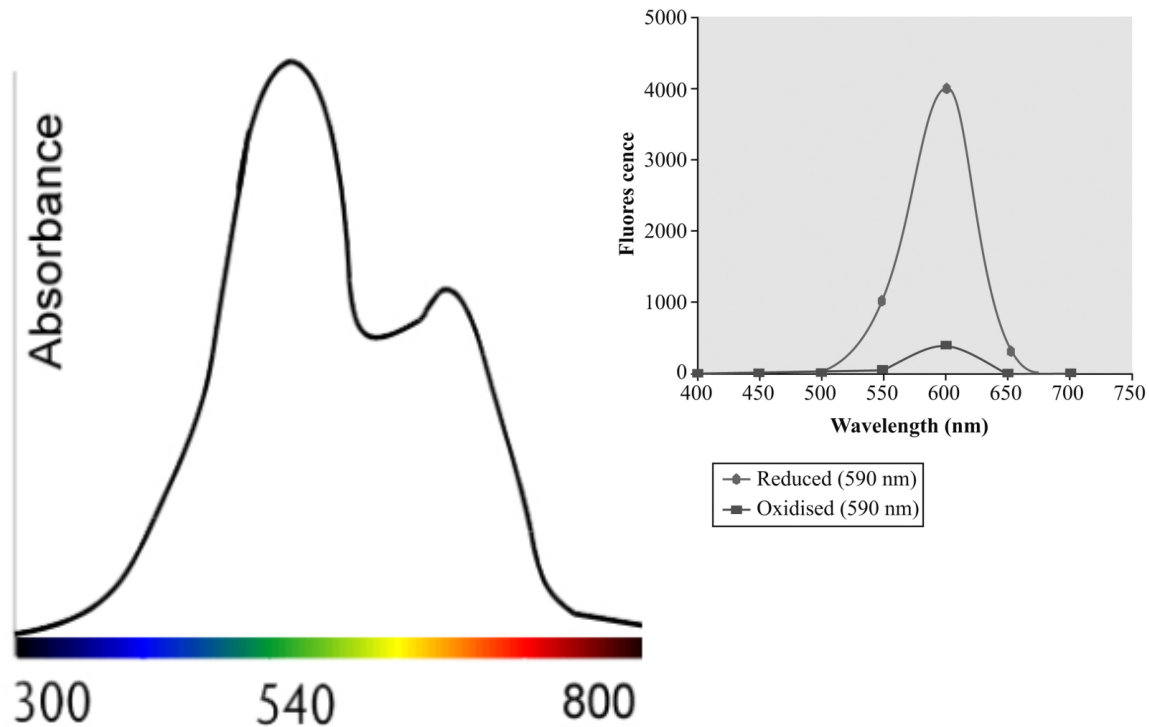
- **Absorbância (Abs)** ou Densidade Óptica (DO) = extinção da luz ao passar pela cuveta:
 - Abs = Luz incidente (I_0) – Luz transmitida (T)
 - **Abs = $-\log(I/T)$**
 - Não pode ter espalhamento (solução opaca). - turbimetria



Absorbância: $-\log_{10}(I/I_0)$ ⇄	Transmitância: I/I_0 ⇄
0	1
0.1	0.79
0.25	0.56
0.5	0.32
0.75	0.18
0.9	0.13
1	0.1
2	0.01
3	0.001

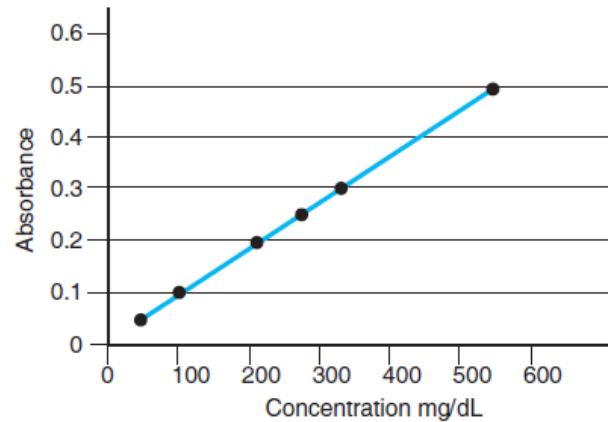
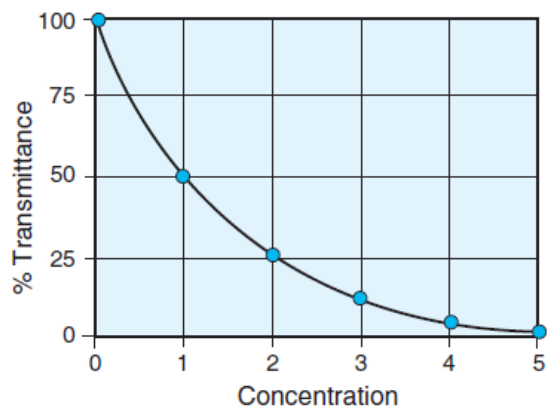
Absorbância

- **Absorbância (Abs)** ou Densidade Óptica (DO) = extinção da luz ao passar pela cuveta: $-\log(I/I_0)$
 - Abs = Luz incidente (I_0) – Luz transmitida (T)
 - Abs = $-\log (I/T)$
- **As moléculas possuem absorbância em comprimentos de onda específicos**



Relação Transmitância e Absorbância com a concentração

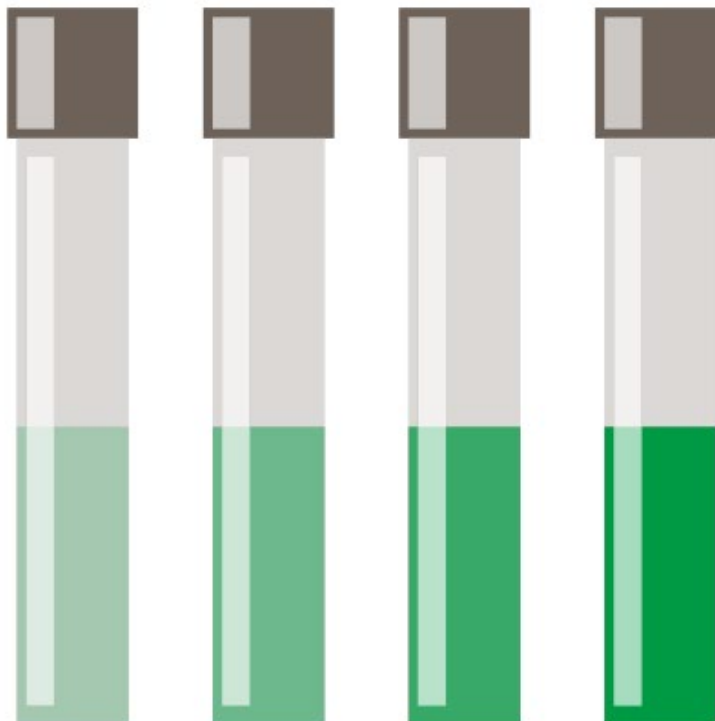
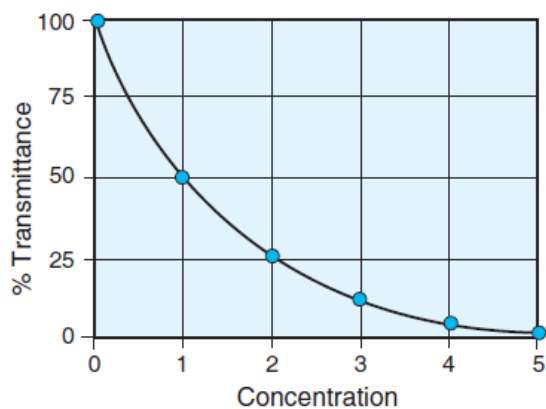
- Transmitância (T) é inversamente e logaritmicamente proporcional a concentração da substância: $T \propto \log (1/C)$
- Absorbância sendo o log da transmitância varia linearmente com a concentração



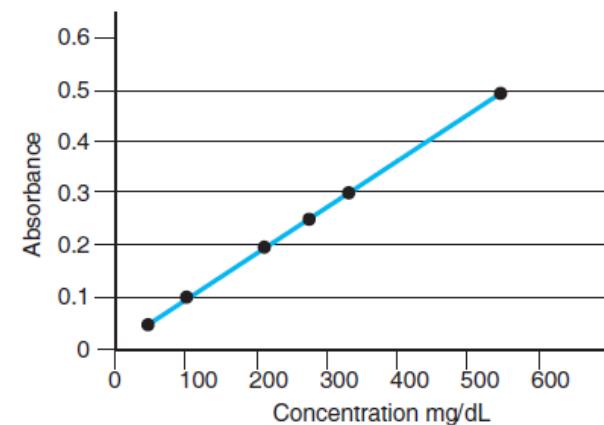
Absorbância: $-\log_{10}(I/I_0)$ ↕	Transmitância: I/I_0 ↕
0	1
0.1	0.79
0.25	0.56
0.5	0.32
0.75	0.18
0.9	0.13
1	0.1
2	0.01
3	0.001

Relação absorvância X concentração

Transmitância: varia exponencialmente com a concentração



Absorbância: varia linearmente com a concentração



Transmitância

100 10 1 0,1

Absorbância

0 1 2 3

Concentração

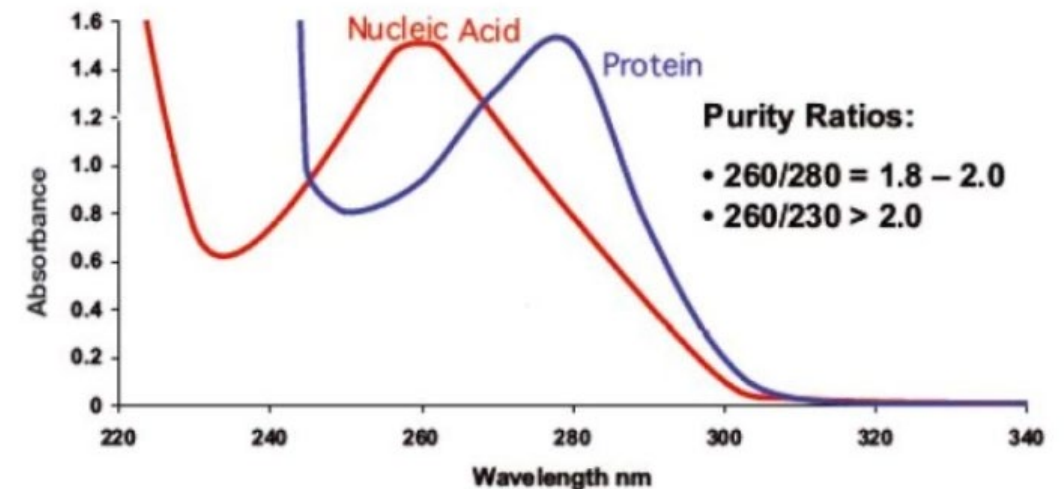
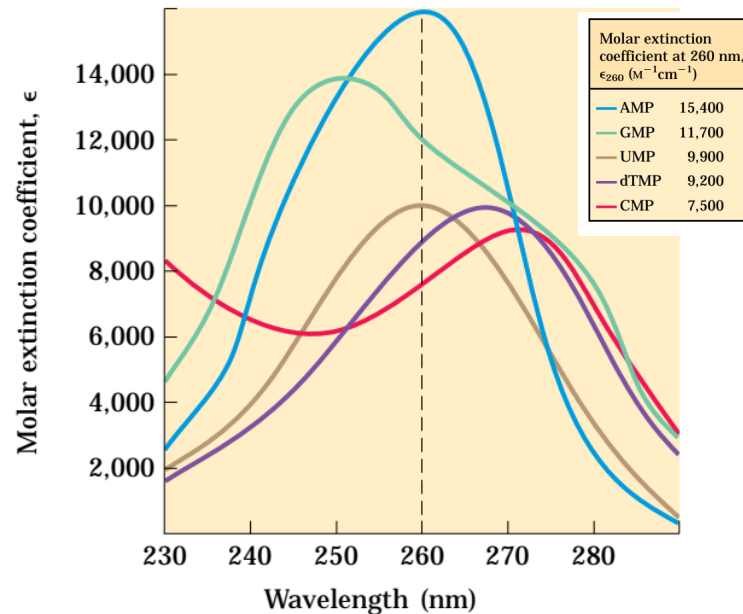
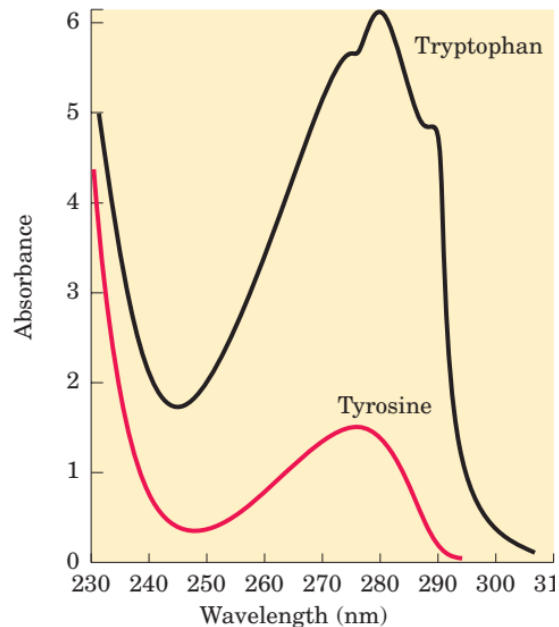
0 4 8 12

→ Logaritimica

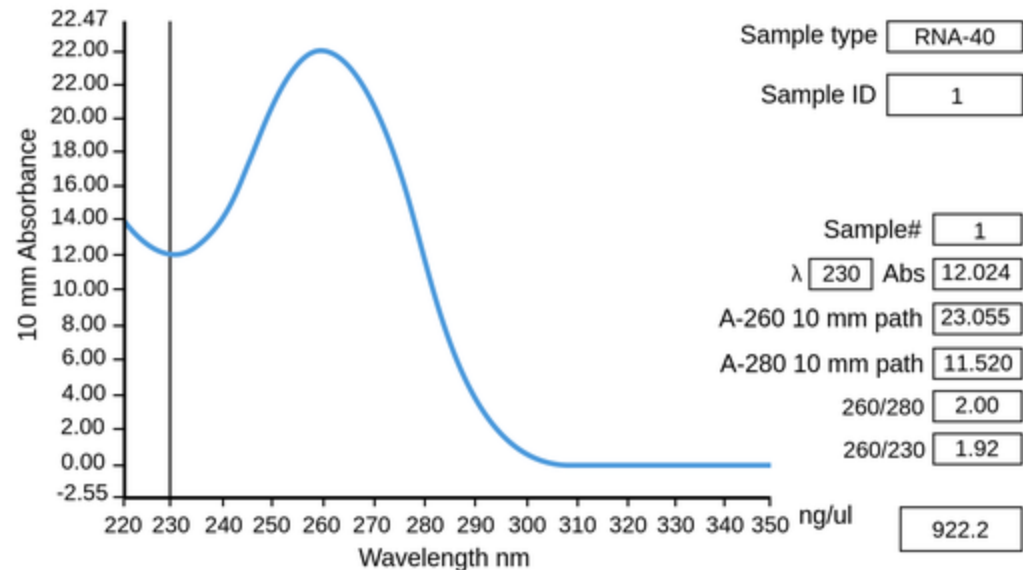
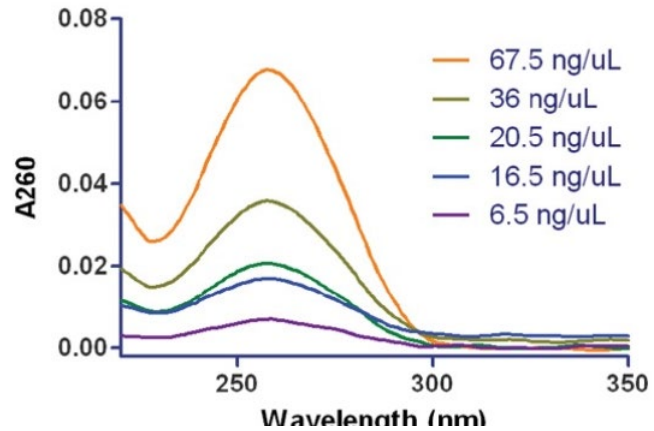
} → linear

Determinando a concentração e uma substância por absorbância

- Substâncias podem ter uma absorbância maior em determinado comprimento de onda.
 - P ex., resíduos de aminoácidos aromáticos (Phe, Tyr, Trp) absorvem em UV (280 nm) ácidos nucleicos em 260 nm.
- Escolher o comprimento de onda específico para sua molécula

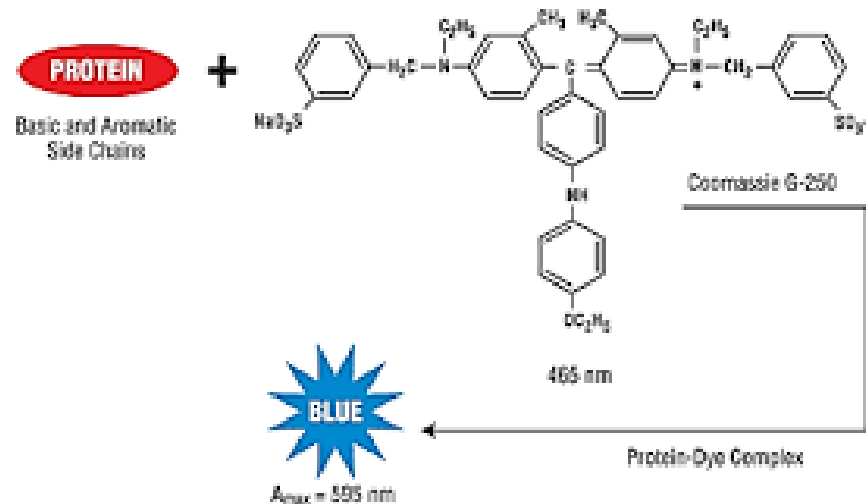


Nanodrop: quantificação de ácidos nucleicos ou proteínas em pequenas amostras



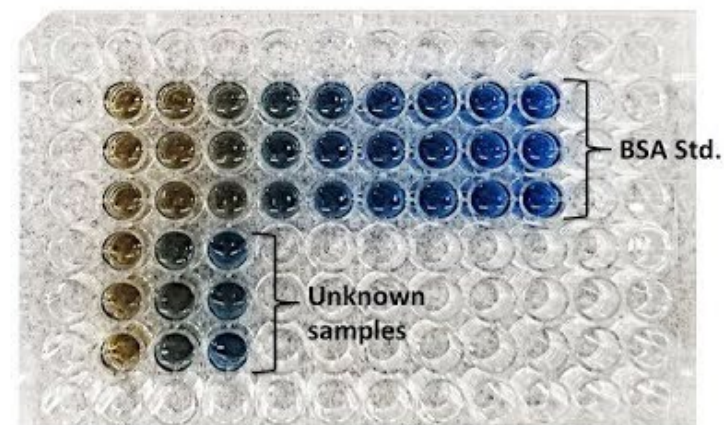
Determinando a concentração de uma substância por absorbância

- Dosagem de moléculas usando-se uma reação química que produz um composto “colorido”.
 - Dosagem de proteíns pelo método de Bradford, Biureto, Lowry
- Escolher o comprimento de onda específico para sua reação (Bradford = 595 nm)



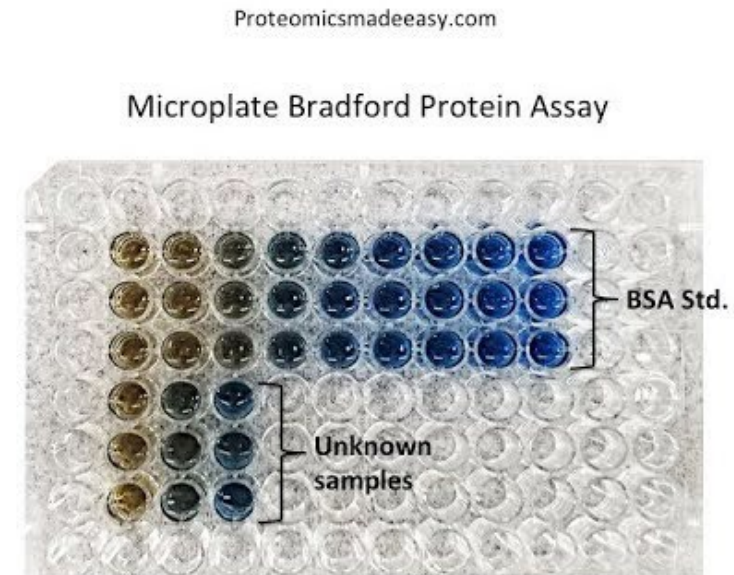
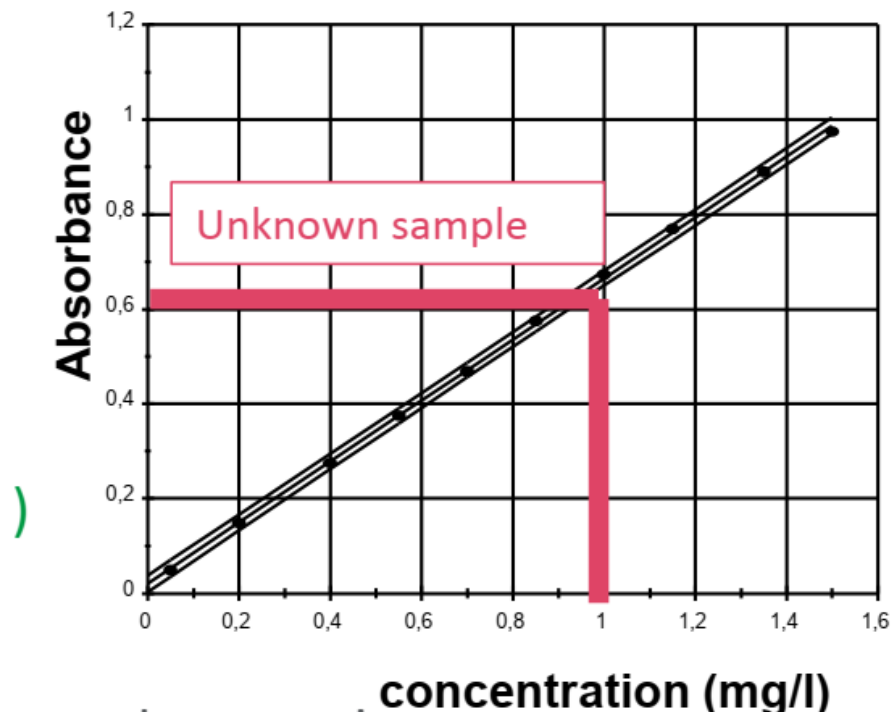
Proteomicsmadeeasy.com

Microplate Bradford Protein Assay



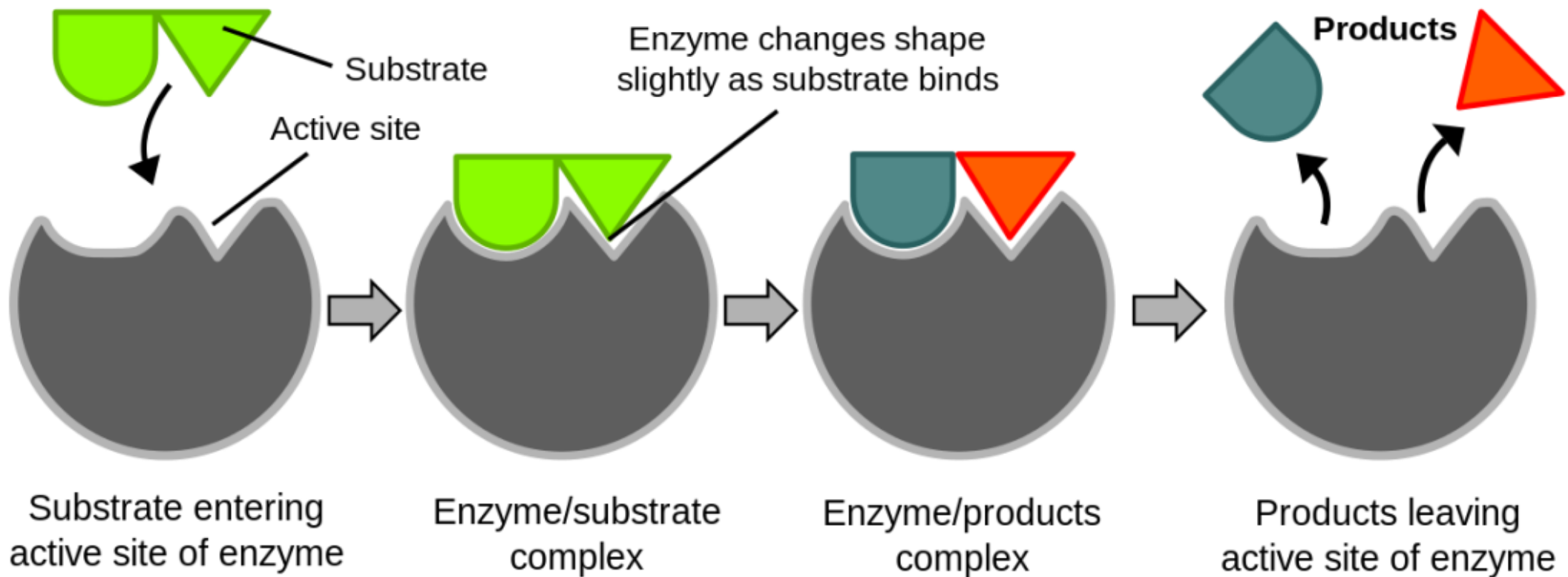
Determinando a concentração de uma substância por absorbância

- Realizar uma “curva padrão” com concentrações conhecidas de proteína, por exemplo, e comparar com a absorbância de uma amostra desconhecida.



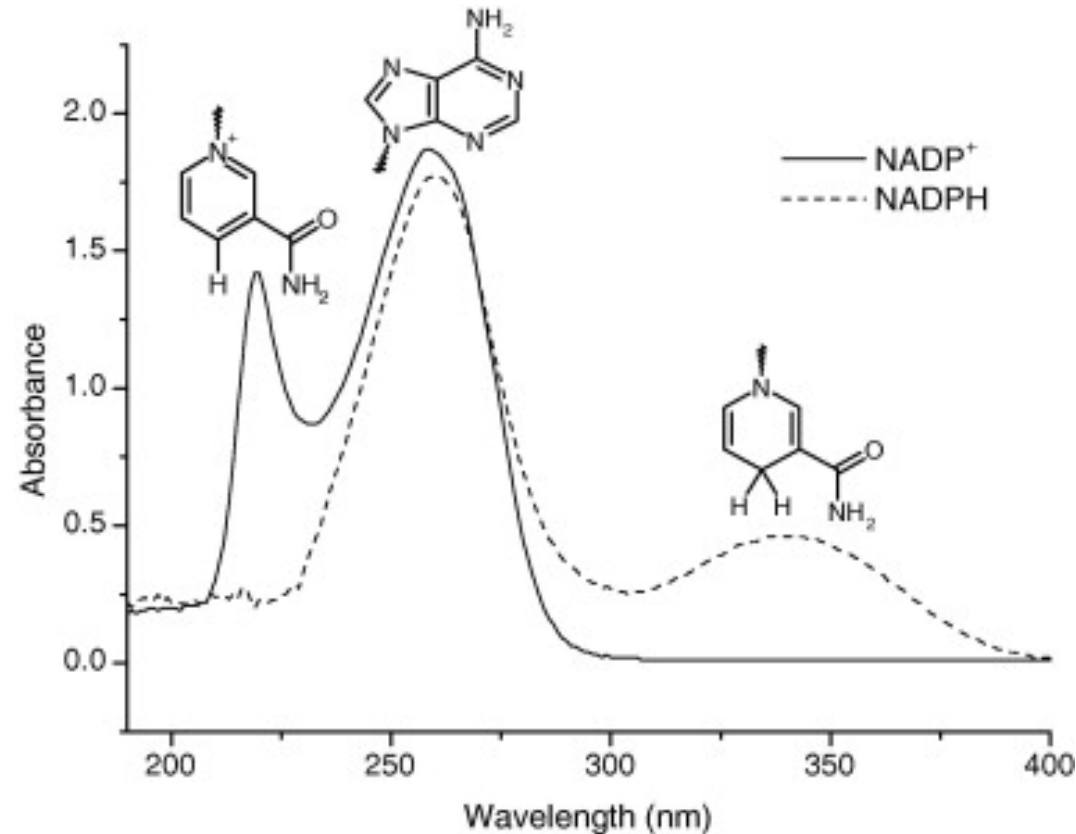
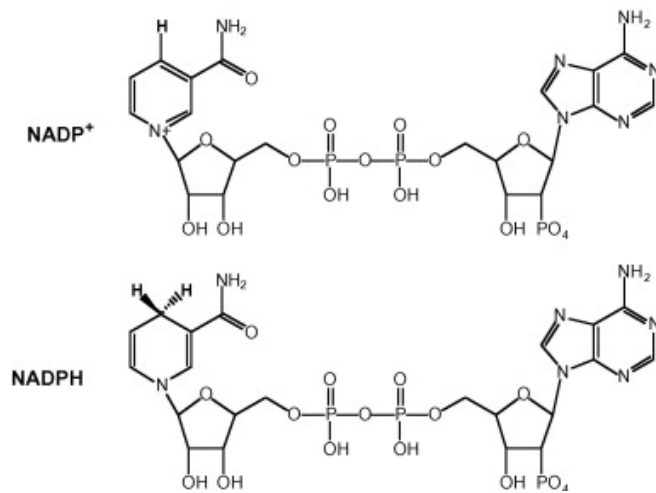
Determinando atividade enzimática por absorvância

- Se baseia na formação de um produto que apresenta absorvância específica.



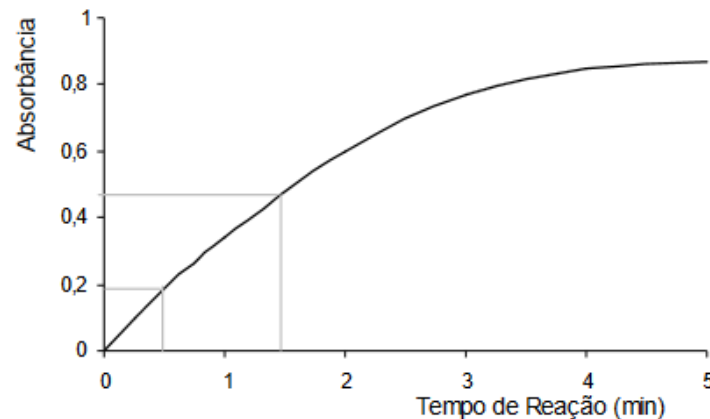
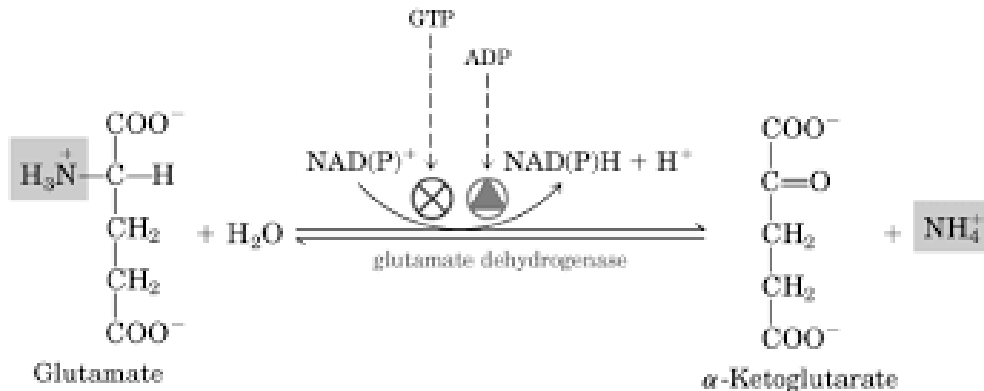
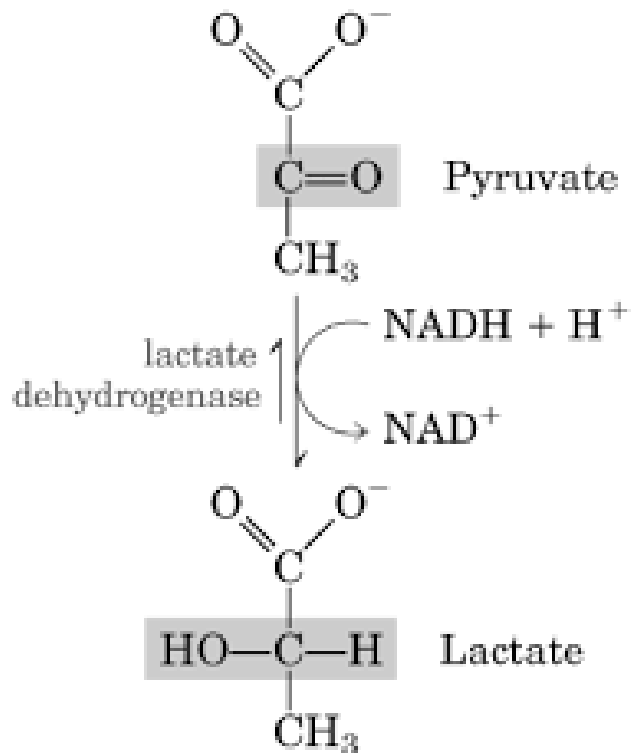
Determinando atividade enzimática por absorvância

- Se baseia na formação de um produto que apresenta absorvância específica.
- Exemplo: Dosagem de desidrogenases baseado na absorvância do NAD(P)H em 340 nm



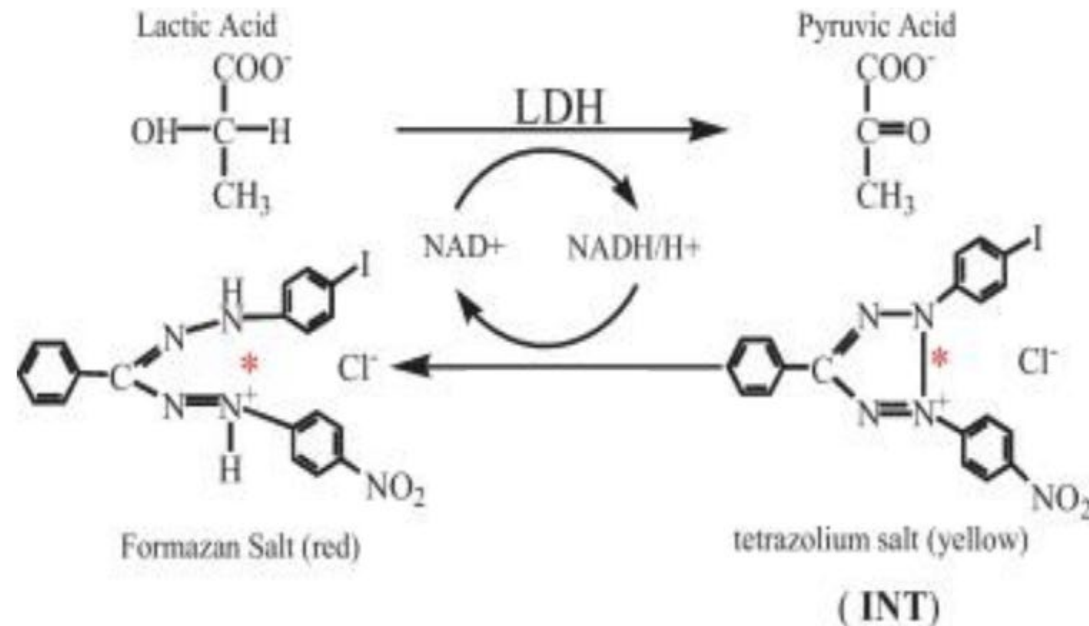
Determinando atividade enzimática por absorbância

- Se baseia na formação de um produto que apresenta absorbância específica.
- Exemplo: Dosagem de desidrogenases baseado na absorbância do NAD(P)H em 340 nm
 - Lactato desidrogenase
 - Glutamato desidrogenase



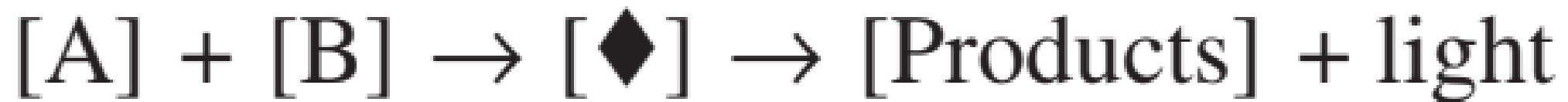
Determinando atividade enzimática por absorbância

- Uma reação química pode ser usada para produzir um composto “colorido” a ser quantificado
- Exemplo: Dosagem de lactato desidrogenases baseado na redução, pelo NADH produzido pela reação ,do sal de tetrazolio a formazan que absorve em 503 nm



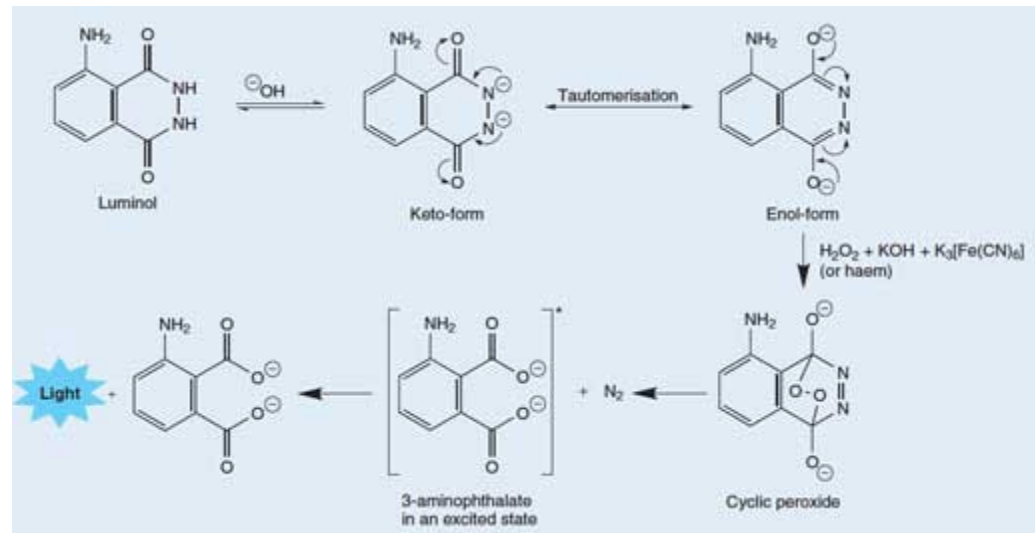
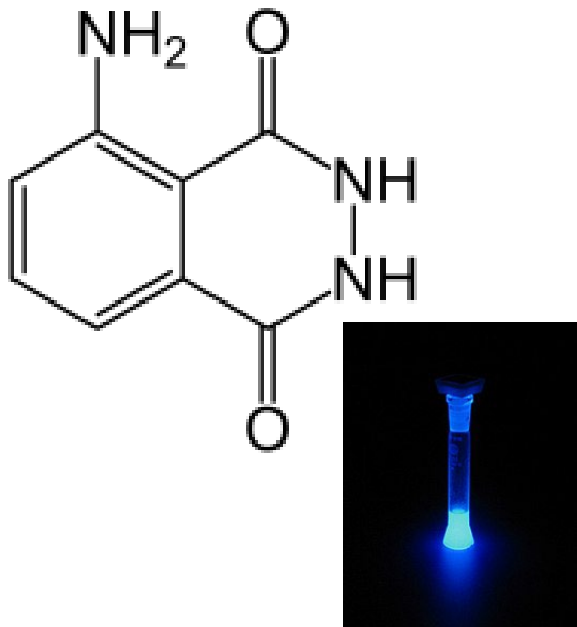
Quimioluminescência

- Quimioluminescência é a produção de luz por uma reação química que pode ser usada para quantificar substâncias.



Quimioluminescência

- LUMINOL produz luz quando oxidado, normalmente com peróxido de hidrogênio
 - Como o ferro é um catalizador da reação, o luminol é usado forensicamente para a detecção e traços de sangue



Quimioluminescência

- Detecção de acetilcolina por quimioluminescência usando a reação do luminol

Neurochemistry International, Vol. 3, No. 1, pp. 81–90, 1981.
Printed in Great Britain.

0197-0186/81/010081-10\$02.00/0
© 1981 Pergamon Press Ltd.

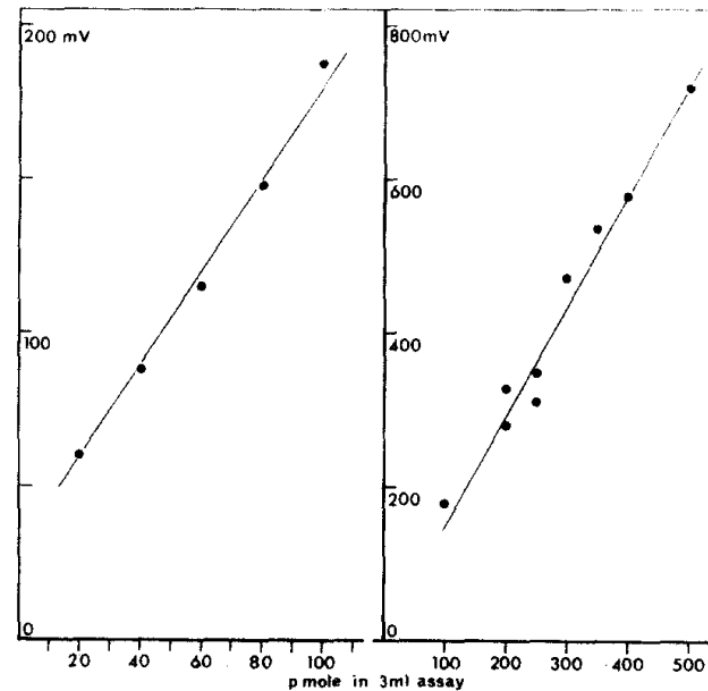
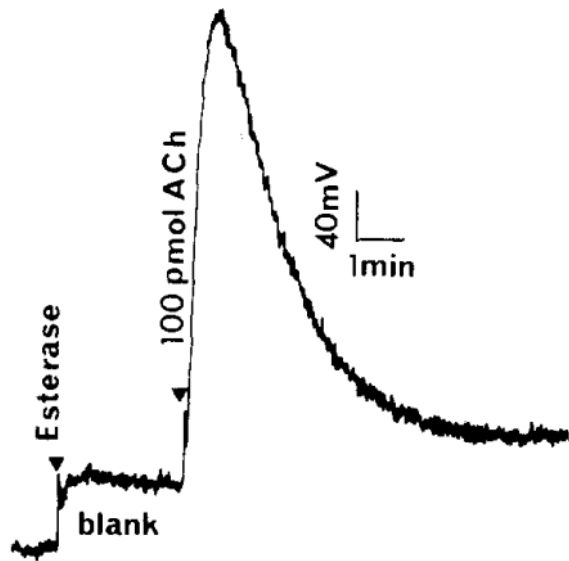
CHEMILUMINESCENT DETERMINATION OF ACETYLCHOLINE, AND CONTINUOUS DETECTION OF ITS RELEASE FROM TORPEDO ELECTRIC ORGAN SYNAPSES AND SYNAPTOSOMES

M. ISRAEL and B. LESBATS

Departement de Neurochimie, Laboratoire de Neurobiologie Cellulaire, CNRS,
91190 GIF sur Yvette, France

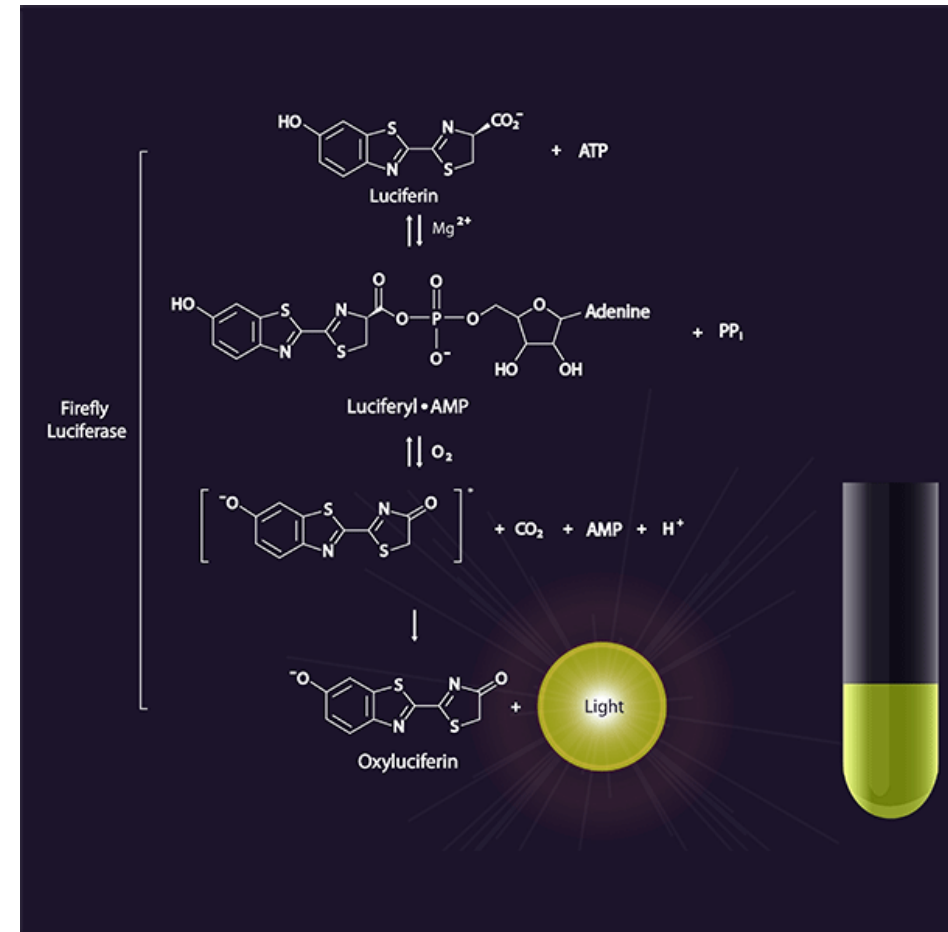
Quimioluminescência

- Detecção de acetilcolina por quimioluminescência usando a reação do luminol



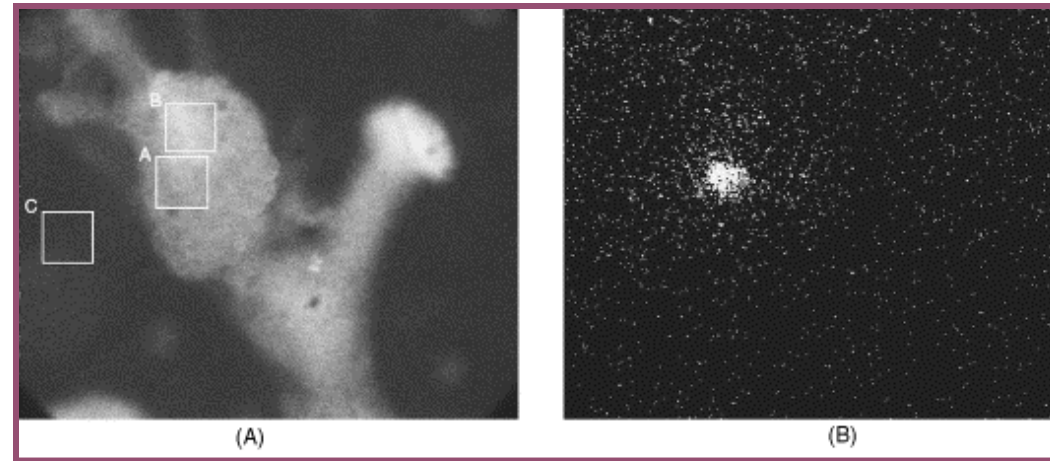
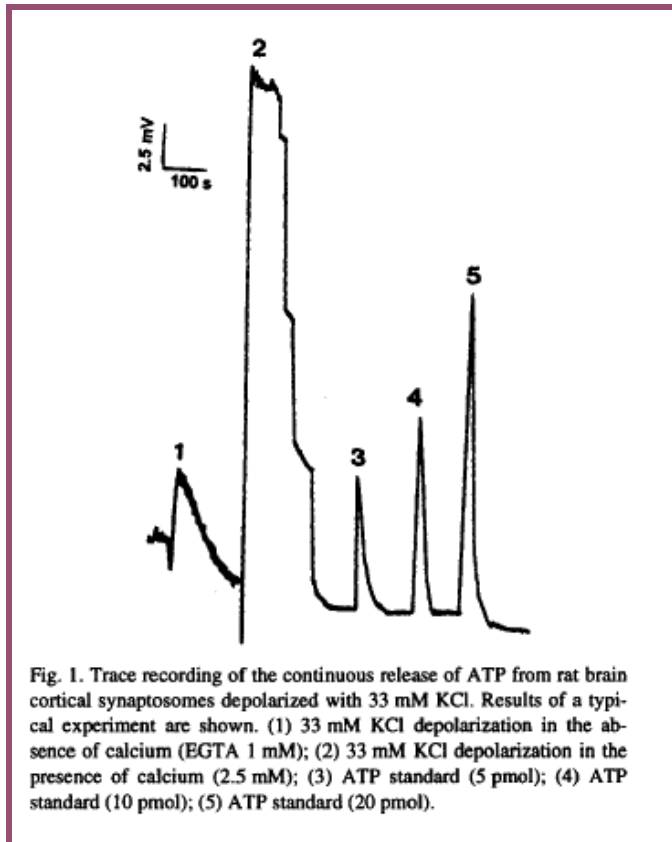
Quimioluminescência

- Detecção de ATP pela reação da luciferina-luciferase



Quimioluminescência

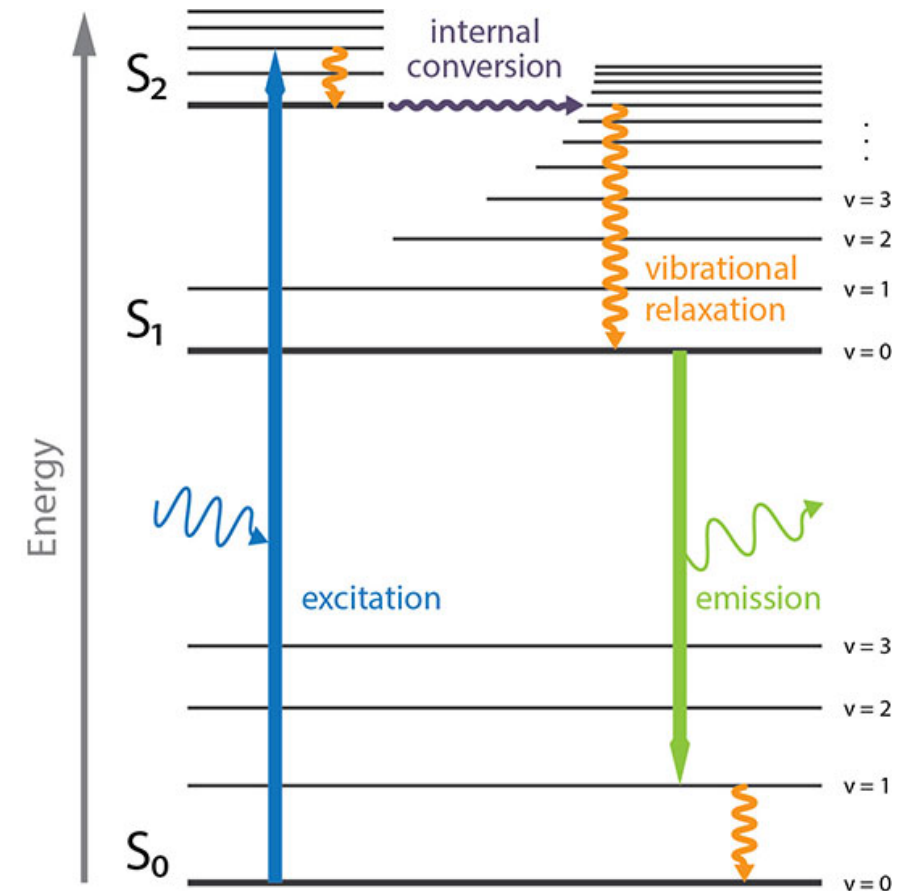
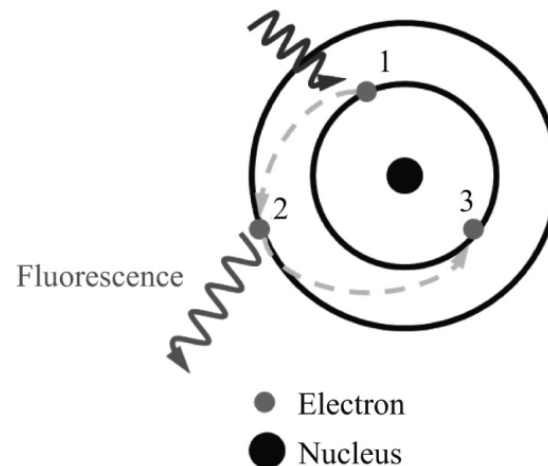
- Detecção de ATP pela reação da luciferina-luciferase



Visualização em tempo real de ATP sendo liberado em um gânglio nervoso de molusco

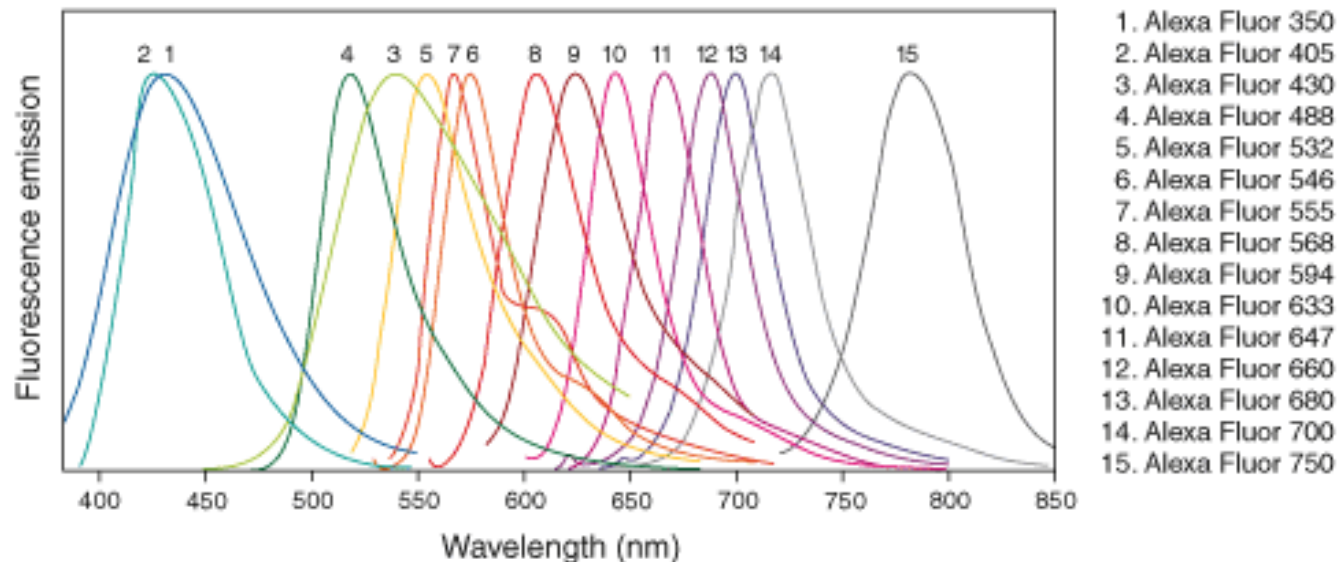
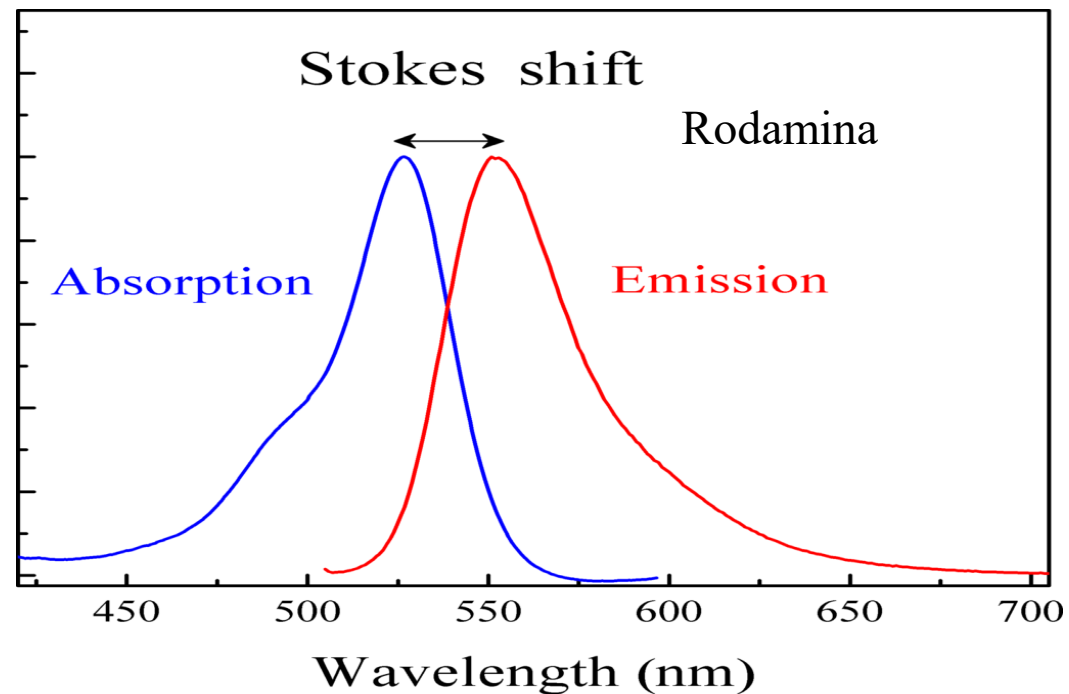
Fluorescência

- Emissão de luz de comprimento de onda específico por uma molécula em resposta a excitação por um comprimento de onda menor (de maior energia)
 - 1- radiação excita eletron em camada eletrônica inferior
 - espectro de excitação
 - 2-eletron excitado pula de camada eletrônica
 - 3-Ao retornar emite de volta radiação em comprimento de onda maior
 - espectro de emissão



Fluorophore Spectral Data & Quencher Selection Guide

Fluorophore Name	Excitation Max, nm	Emission Max, nm	Extinction coefficient*	Color**	Quencher
AZDye-350 NHS	346	445	19,000	Blue	Dabcyl λ (max) = 453 nm Range = 380-530 nm
AZDye-405 NHS	402	424	33,000		
PBlue-455 NHS	410	455	46,000		
MBlue-460 NHS	362	459	20,000		
AZDye-488 NHS	494	517	73,000	Blue-Green	BHQ-1 λ (max) = 534 nm Range = 480-580 nm
FAM	495	520	75,850	Yellow-Green	
TET	521	536	99,000		
AZDye-430 NHS	430	539	15,000	Yellow	
Cal Fluor Gold 540	552	543	81,100		
JOE	520	548	75,000		
Yakima Yellow	531	549	83,800	Yellow-Orange	
AZDye-532 NHS	530	555	81,000		
HEX	535	556	98,000		
Cal Orange 560	537	558	81,000		
Cy3	550	570	150,000	Orange	BHQ-2 λ (max) = 579 nm Range = 550-650 nm
AZDye-555 NHS	555	572	155,000		
TAMRA	555	576	65,000		
CAL Fluor Red 590	569	591	79,000		
Redmond Red	579	595	52,300	Yellow-Orange	
Cy3.5	581	596	150,000		
ROX NHS	575	602	82,000	Orange	
AZDye-568 NHS	578	602	88,000		
Cal Red 610	590	610	108,000	Orange-Red	
TXRed-616 NHS	589	616	69,000		
AZDye-594 NHS	590	617	92,000	Red	BHQ-650 λ (max) = 650nm Range = 550-750 nm
CAL Fluor Red 635	616	637	112,000		
LC Red 640 NHS	625	640	110,000		
AZDye-647 NHS	649	671	270,000		
Cy5	649	670	250,000	Near-IR region: Human vision is insensitive to light beyond ~650 nm; it is not possible to view near-IR	
Cy5.5	675	694	190,000		
AZDye-680 NHS	678	701	185,000		
Cy7 NHS	750	773	199,000		
IR 750 NHS	756	776	260,000		
Cy7.5 NHS	788	808	223,000		



1. Alexa Fluor 350
2. Alexa Fluor 405
3. Alexa Fluor 430
4. Alexa Fluor 488
5. Alexa Fluor 532
6. Alexa Fluor 546
7. Alexa Fluor 555
8. Alexa Fluor 568
9. Alexa Fluor 594
10. Alexa Fluor 633
11. Alexa Fluor 647
12. Alexa Fluor 660
13. Alexa Fluor 680
14. Alexa Fluor 700
15. Alexa Fluor 750

* Extinction coefficient at λ (max) in $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$. ** Typical emission color seen through the eyepiece of a conventional fluorescence microscope with appropriate filters.

Microscopia de epifluorescencia

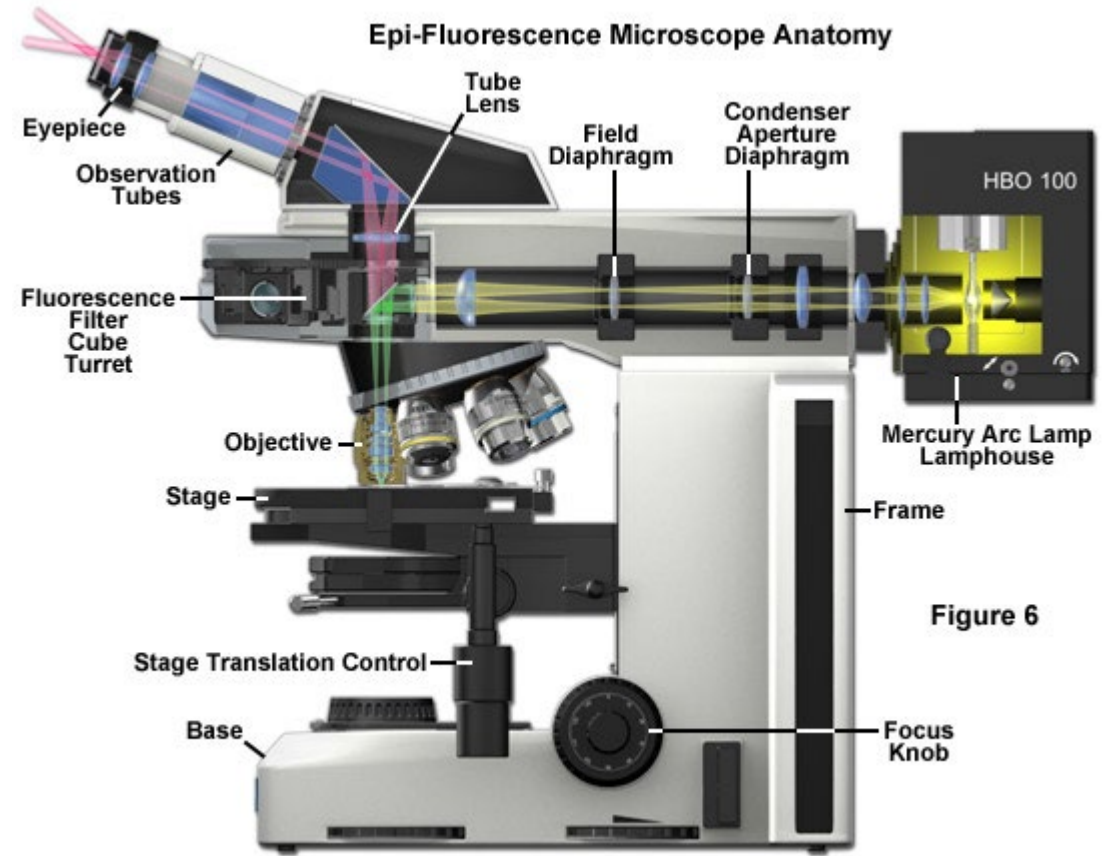
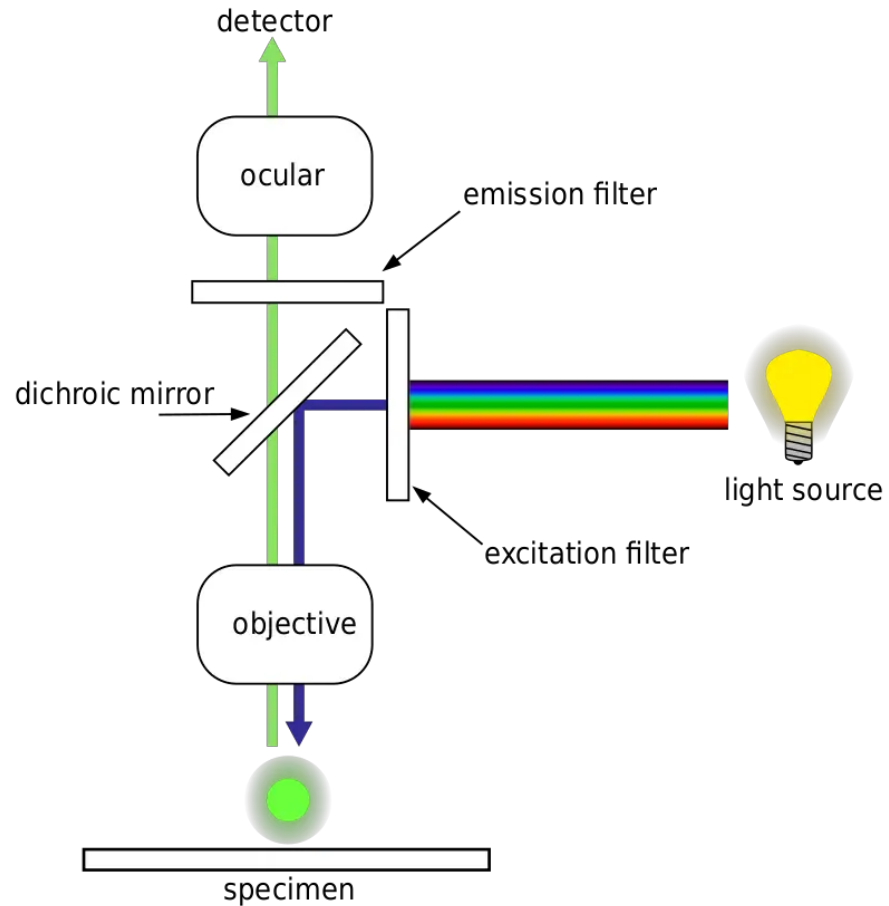
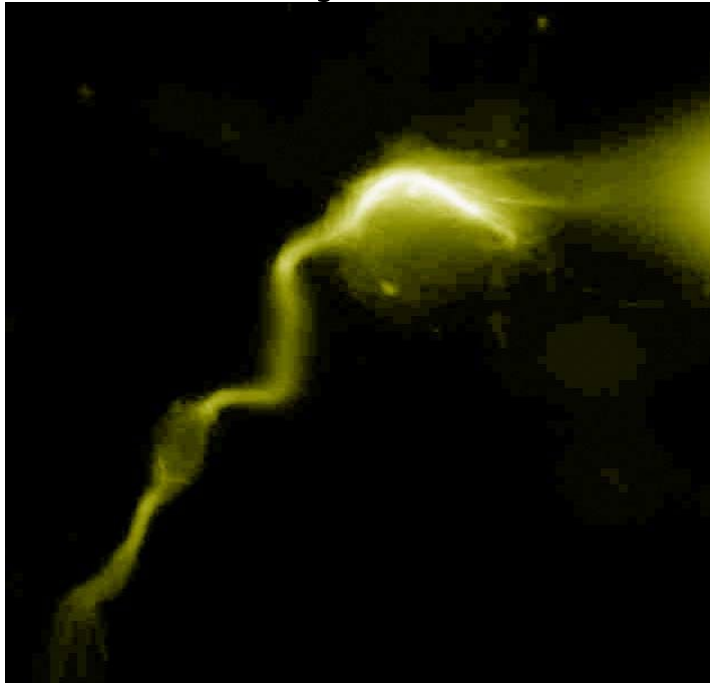


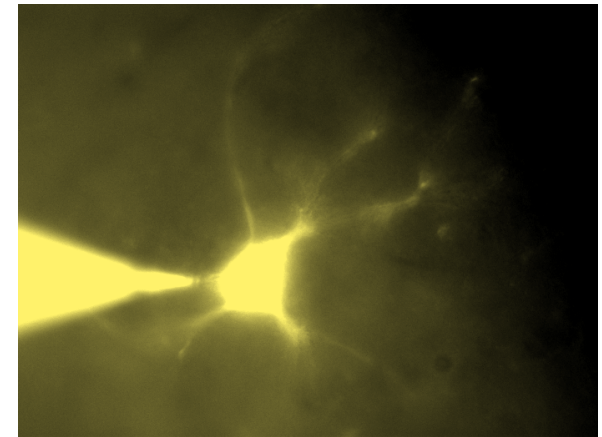
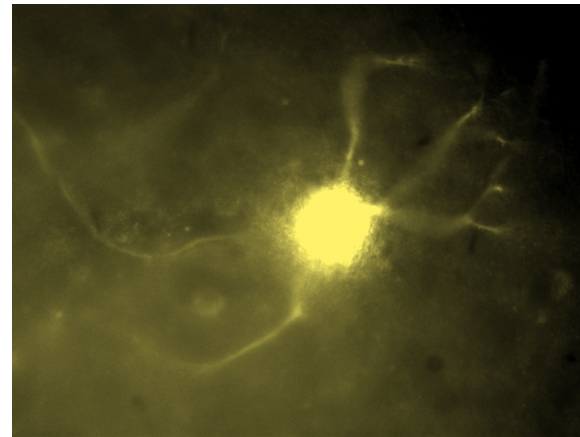
Figure 6

Fluorescência - aplicações

- Visualização intracelular por injeção de fluoróforo

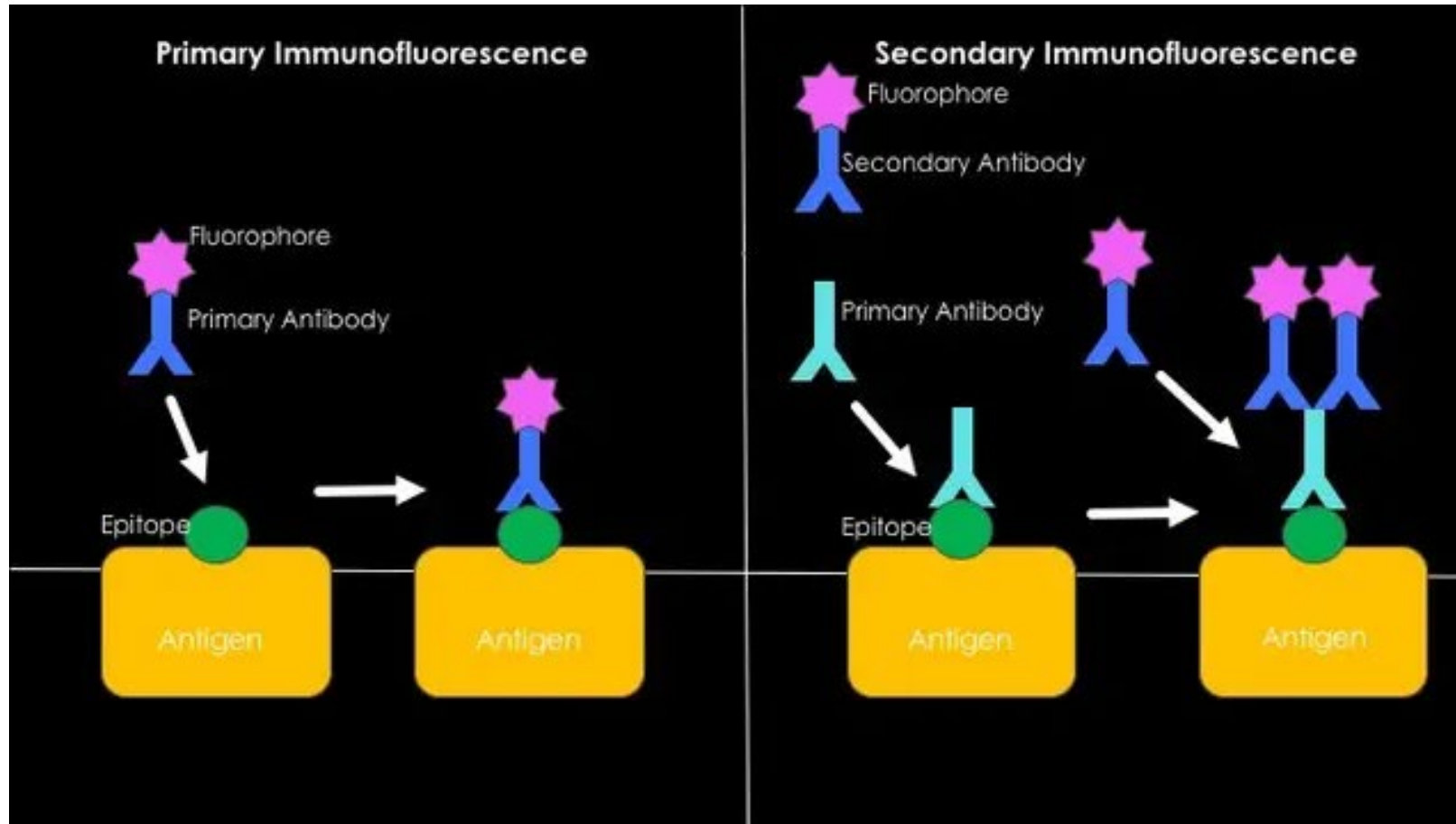


Registro de neurônios com Lucifer Yellow na pipeta do patch-clam



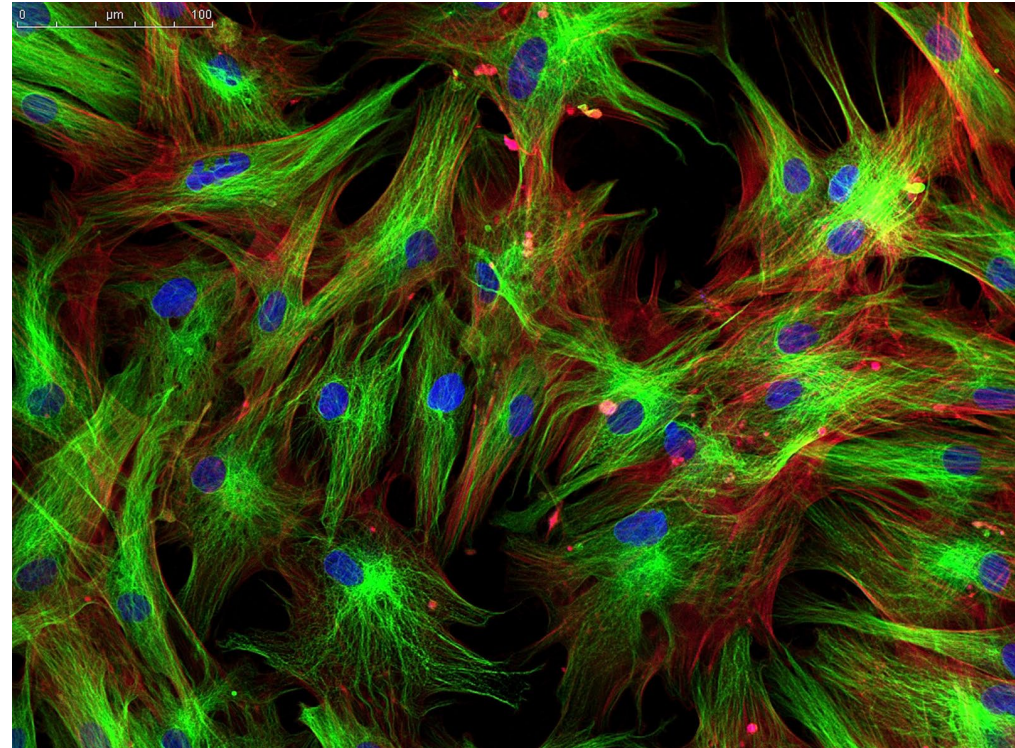
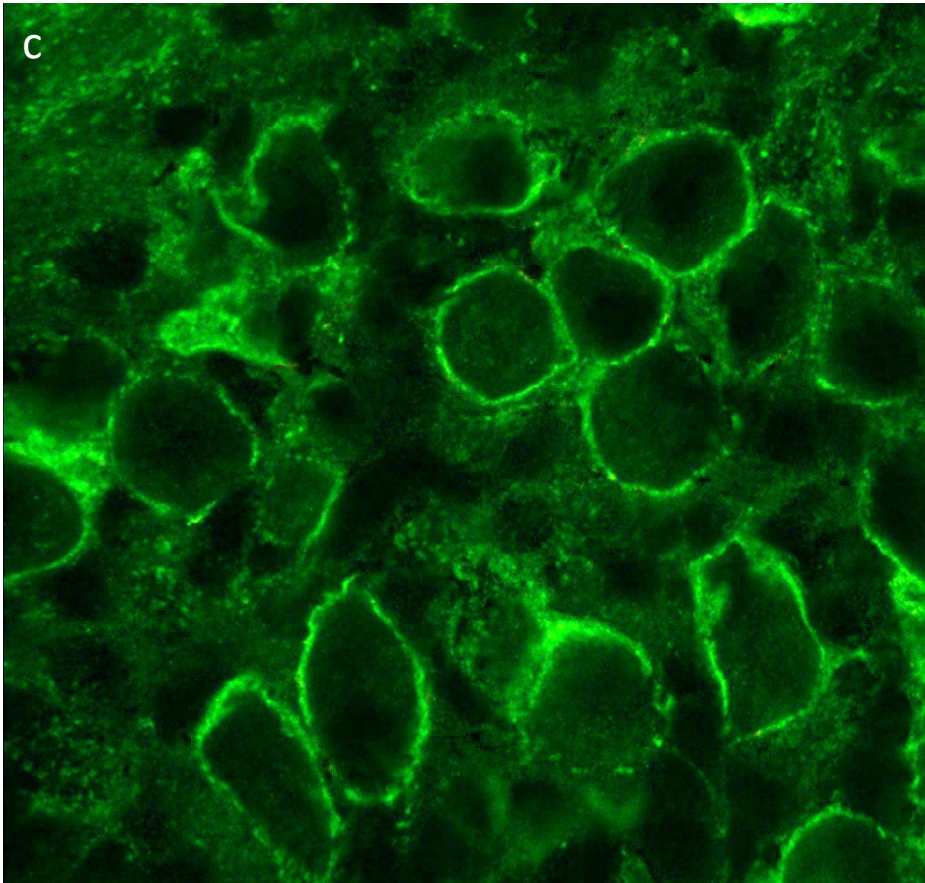
Fluorescência - aplicações

- Detecção de proteínas por imunofluorescencia



Fluorescência - aplicações

- Detecção de proteínas em tecidos por imunofluorescencia

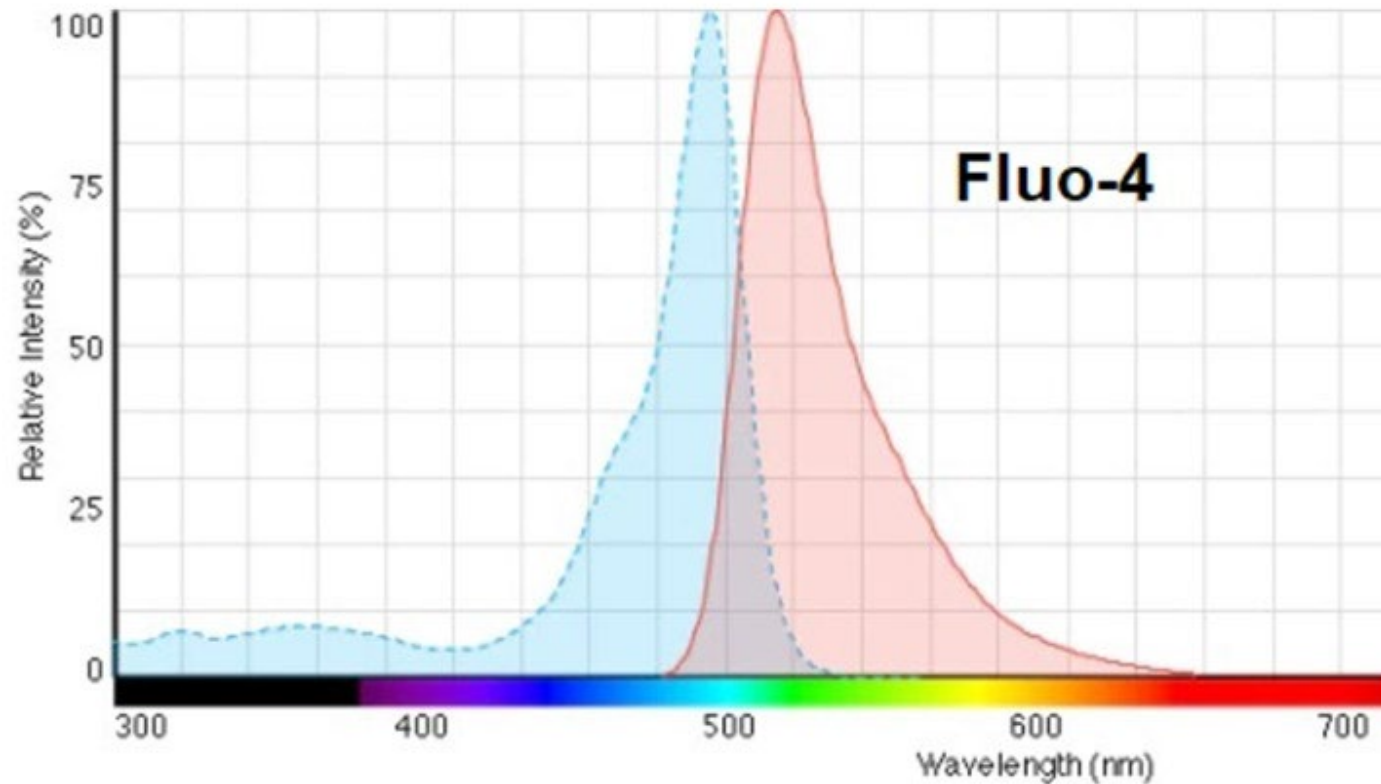
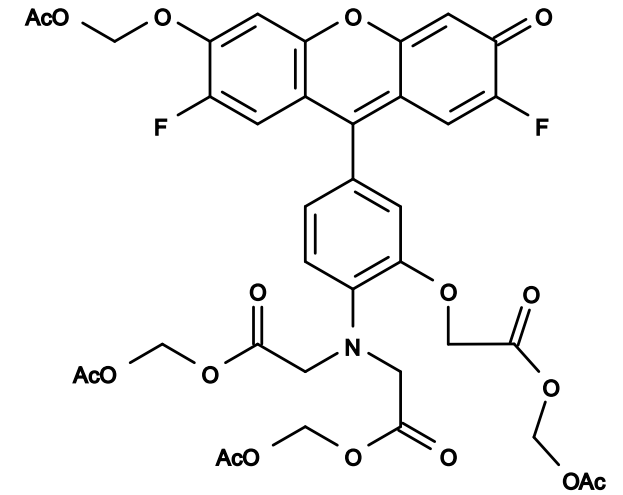


Fluorescência - aplicações

- Detecção de alterações na concentração de íons por sondas fluorescentes.
 - Sondas são moléculas orgânicas que se ligam a íons e quando isso acontece elas emitem fluorescência ou alteram sua fluorescência (ratiométrico)
 - Existem várias sondas no mercado, a maioria para detectar cálcio, mas já existem sondas de sódio, potássio e pH (H^+)

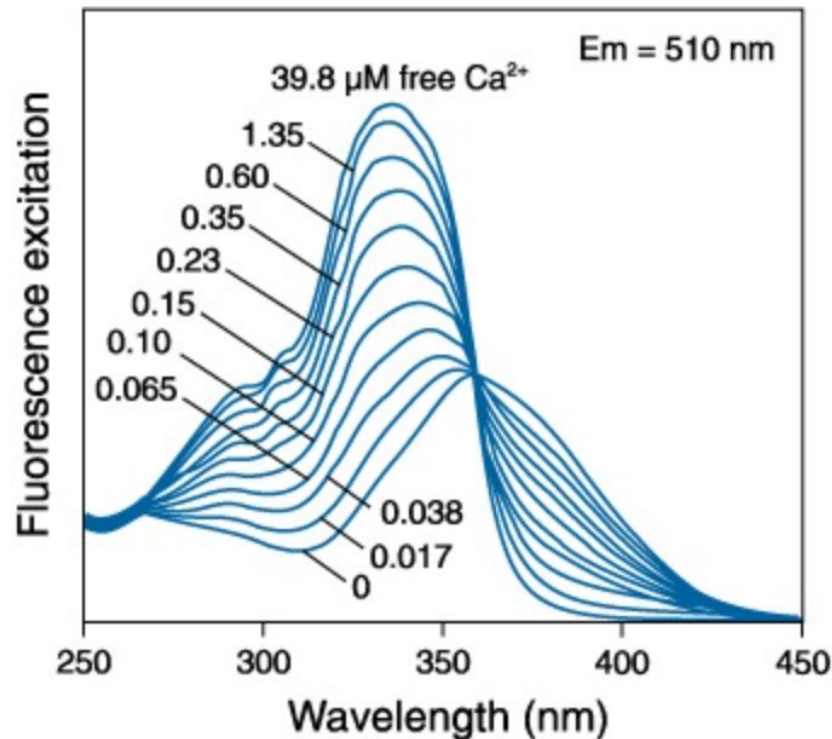
Fluorescência - aplicações

- Indicadores de calcio
 - Fluo-4: emissão 490 nm/excitação 520 nm



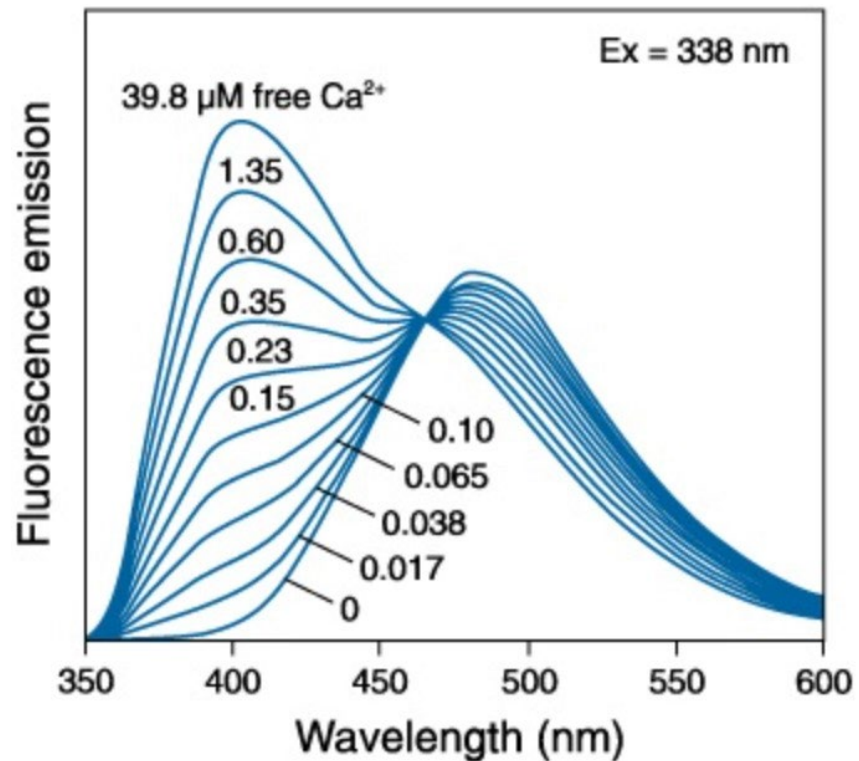
Fluorescência - aplicações

- Indicadores de cálcio ratiométricos
 - Fura-2: excitação: razão 340/380 nm; emissão 540 nm

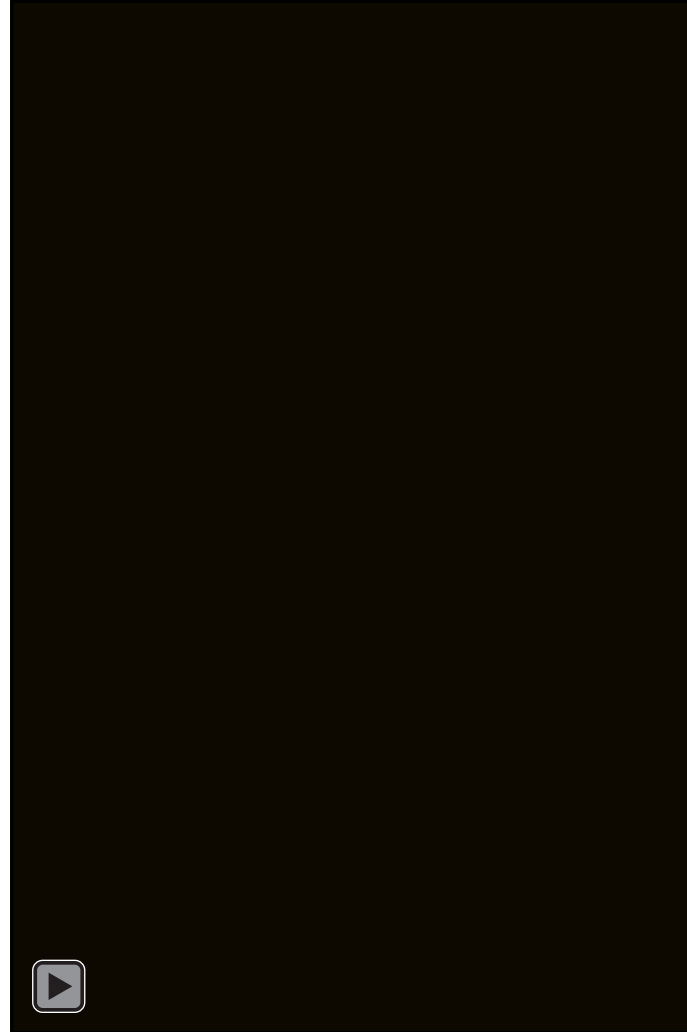
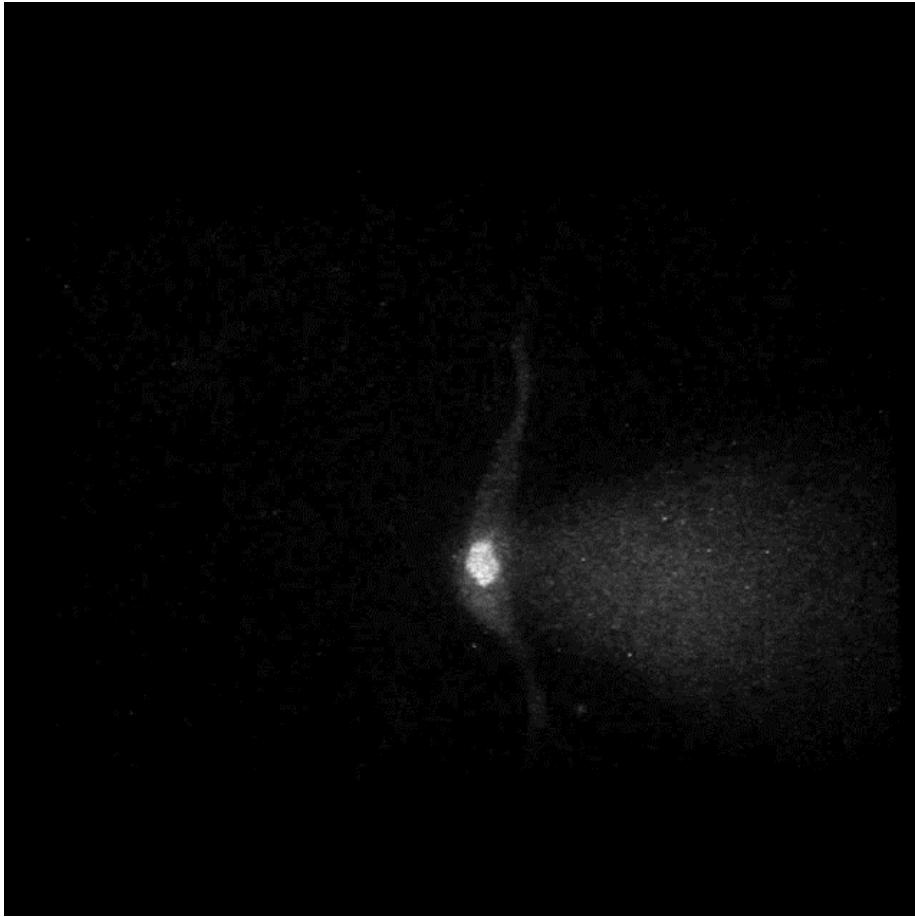


Fluorescência - aplicações

- Indicadores de cálcio ratiométricos
 - Indo-1: excitação: 340 nm; emissão razão 401/485 nm



Fluo-4 imagens



Fluorescência - aplicações

- Indicadores genéticos de cálcio - GCaMP6

