

Prêmio Nobel de Química 2014: Usando Moléculas Fluorescentes para Transformar a Microscopia em Nanoscopia

René Alfonso Nome Silva

O Prêmio Nobel de Química de 2014 foi conferido aos cientistas Eric Betzig, Stefan Hell e William E. Moerner pelo desenvolvimento da microscopia de fluorescência super-resolvida. Este artigo discute o contexto desse desenvolvimento desde o limite de resolução de microscópios óticos até o uso das propriedades fluorescentes de moléculas para superar a barreira física da resolução em microscopia, transformando-a efetivamente em uma técnica ótica de resolução de nanômetros: a nanoscopia.

► fluorescência, moléculas individuais, microscopia ◀

280

Recebido em 06/11/2014, aceito em 06/11/2014

A curiosidade natural do ser humano

A maioria dos seres vivos ocupa o dia inteiro lutando para garantir a própria sobrevivência. Por outro lado, a nossa espécie, o *homo sapiens*, graças à revolução cognitiva ocorrida há aproximadamente 70 mil anos, desenvolveu maneiras de sobreviver que não requeriam o uso de todo seu tempo e energia à procura de alimentos ou protegendo-se de predadores. Nesse cenário, pergunta-se: o que fazer com o tempo livre resultante? A nossa espécie utilizou seu cérebro para explorar a própria criatividade e imaginação, presumivelmente dando origem à curiosidade natural do ser humano.

Um bom exemplo da nossa curiosidade natural é a observação de pequenos insetos. Quem não se diverte observando uma formiga em seu habitat natural? Estas conseguem realizar proezas impensáveis para um ser humano como carregar alimentos muito maiores do que seu próprio peso ou literalmente caminhar sobre a água. O genoma de formigas foi sequenciado recentemente e aprendemos, entre outros assuntos, que existe uma similaridade considerável entre nosso DNA e o de formigas. Ou seja, apesar de seu pequeno tamanho, elas possuem uma complexidade parecida com a do ser humano. Nesse sentido, é relevante perguntar: quais

são os organismos vivos mais simples? Qual é o conjunto mínimo de componentes necessários para sustentar a vida? Quais são as bases moleculares por trás da origem da vida? Esse tipo de questionamento é antigo e motivou o desenvolvimento de instrumentação para observação de objetos cada vez menores, objetos invisíveis a olho nu. Com a invenção do microscópio no século 17, foi possível observar objetos cada vez menores, incluindo organismos microscópicos e até mesmo subcomponentes de organismos (Figura 1).

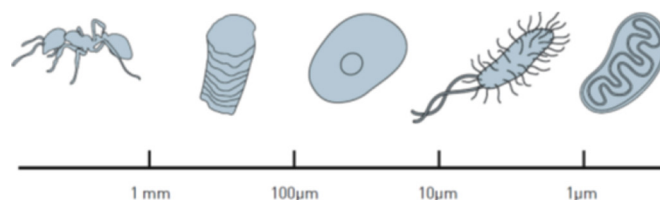


Figura 1: Objetos observáveis com um microscópio ótico convencional. Figura original de Johan Jarnestad/The Royal Swedish Academy of Sciences.

Limites de observação de microscópios óticos

O desenvolvimento e a aplicação da microscopia ótica naturalmente suscita a questão: até onde podemos chegar? Em um microscópio ideal, seria possível observar átomos ou moléculas? Se não, qual é a resolução espacial de um microscópio ótico ideal? Em 1873, Ernst Abbe formulou

A seção "Atualidades em Química" procura apresentar assuntos que mostrem como a Química é uma ciência viva, seja com relação a novas descobertas, seja no que diz respeito à sempre necessária revisão de conceitos.

uma resposta: a resolução de um microscópio ótico ideal é aproximadamente igual à metade do comprimento de onda da luz incidente. Normalmente, microscópios empregam luz visível, ou seja, radiação com comprimento de onda entre 400 nanômetros e 700 nanômetros. Consequentemente, a resolução de microscópios óticos é de aproximadamente 200 a 350 nanômetros. Instrumentos reais (ou seja, não ideais) apresentam limitações adicionais, associadas a componentes óticos simples e/ou imperfeitos. Como resultado disso, muitos microscópios convencionais exibem resoluções típicas da ordem de 500 nanômetros ou 0,5 micrômetros.

O que significa dizer que um microscópio ótico tem resolução de 200 nanômetros? Significa que, se dois objetos estiverem a uma distância menor do que 200 nanômetros entre si, a imagem obtida com o microscópio aparecerá distorcida e não será possível observar dois objetos distintos. Ou seja, com microscópios óticos convencionais, não é possível ver objetos em escalas de nanômetros como, por exemplo, moléculas, proteínas e vírus.

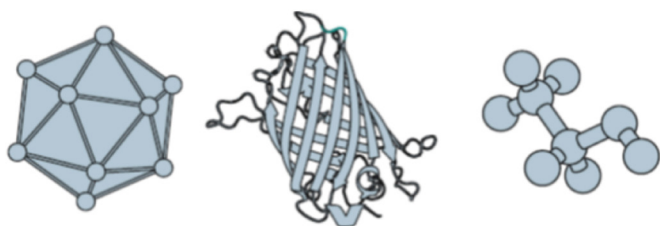


Figura 2: Objetos não observáveis com um microscópio ótico convencional. Figura original de Johan Jarnestad/The Royal Swedish Academy of Sciences.

Como observar objetos menores como nanomateriais, moléculas e átomos? Esse tipo de pergunta levou ao desenvolvimento de novas tecnologias, as quais não exibiam essa limitação física de microscópios óticos. Por exemplo, o desenvolvimento de microscópios eletrônicos foi baseado no conceito quântico da dualidade onda-partícula. Isso significa que elétrons, por exemplo, exibem propriedades ondulatórias assim como a luz. O comprimento de onda dos elétrons pode ser sintonizado e alcança valores menores do que o próprio tamanho de átomos e moléculas, sem aberrações que afetam a qualidade da imagem. Outra tecnologia desenvolvida para esse fim é pelo uso de técnicas mecânicas. Por exemplo, o microscópio de força atômica emprega uma ponteira mecânica de altíssima precisão com resolução espacial desde nanômetros até angstroms. A deflexão da ponteira decorrente de sua interação com o material em estudo é utilizada para recriar a imagem do material. Dessa forma, avanços em microscopia eletrônica e de força atômica permitiram a observação direta de átomos, moléculas e nanomateriais, todos muito pequenos para serem observados por técnicas de microscopia ótica convencional.

Apesar dos enormes avanços na observação de objetos pequenos, o microscópio ótico ainda é preferido para diversas aplicações em química e biologia em que o contraste de microscópios eletrônicos e de força é baixo. Por exemplo, a

possibilidade de analisar sistemas complexos em solução e em três dimensões, como uma célula viva, é uma das grandes vantagens da microscopia ótica.

Moléculas iluminadas superando um limite físico

Nesse contexto, o Prêmio Nobel de Química de 2014 celebra o desenvolvimento de uma abordagem molecular para superar o limite físico da resolução de microscópios óticos. Por meio da utilização de moléculas fluorescentes, ou seja, moléculas que emitem luz, é possível obter imagens com resolução na escala de nanômetros, dessa forma, combinando em um só instrumento as vantagens individuais dos microscópios óticos convencionais com a resolução espacial de microscópios eletrônicos e mecânicos.

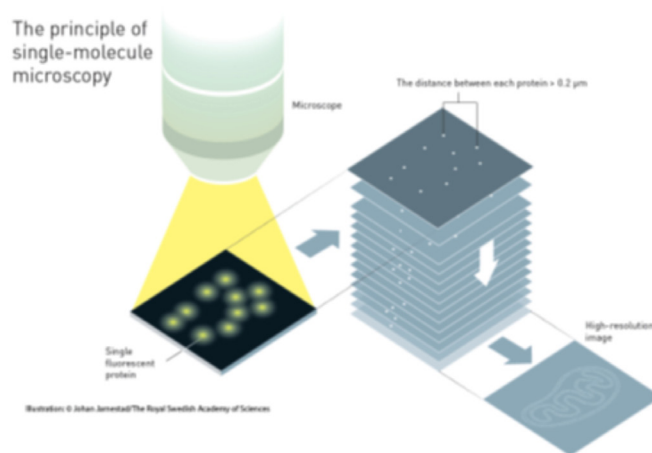


Figura 3: Princípio da microscopia com moléculas individuais fluorescentes. Figura original de Johan Jarnestad/The Royal Swedish Academy of Sciences.

Uma solução para o limite de Abbe é a utilização de moléculas fluorescentes. Como existem muitas moléculas contendo entre 10 e 20 átomos e, portanto, possuem dimensões da ordem de apenas alguns nanômetros, é possível utilizá-las como uma pequena fonte de luz ou uma nanoluz. Dessa forma, a resolução da imagem é determinada pelo tamanho da molécula que emite luz, ao contrário de microscópios óticos convencionais com resolução de 200 nanômetros. Essa ideia é a base do princípio da microscopia de moléculas individuais, ilustrada na Figura 3. O professor William E. Moerner foi o primeiro cientista a detectar uma molécula individual fluorescente. Se o objeto em estudo contiver múltiplas moléculas fluorescentes com distância entre si maior do que 200 nanômetros, então é possível observar cada uma individualmente, com resolução de nanômetros, mesmo com um microscópio ótico.

Por si só, este trabalho é muito importante, pois permite a observação de moléculas individuais, uma molécula de cada vez. No entanto, para fins de caracterização de objetos por microscopia ótica, o limite de Abbe volta a ser um problema. Se duas moléculas fluorescentes estiverem a uma distância menor do que 200 nanômetros, então o microscópio

ótico não terá a resolução necessária para fazer a distinção entre esses dois objetos. Em outras palavras, um objeto de 50 nanômetros de tamanho contendo duas moléculas fluorescentes produzirá uma imagem de um único objeto com fluorescência uniforme. Novamente, o limite de Abbe afeta a resolução espacial da imagem.

Para superar esse limite, os pesquisadores Eric Betzig e Stefan Hell propuseram e desenvolveram soluções distintas. Em ambos os casos, a ideia seria adicionar várias moléculas fluorescentes na região de observação de interesse. A ideia de Betzig é complementar à de Moerner e também envolve microscopia de moléculas individuais. Especificamente, envolve o uso de várias moléculas brilhando com cores distintas, obtendo imagens em sequência e cada imagem sendo gravada com uma cor diferente. Se as moléculas estiverem a uma distância menor do que 200 nanômetros, porém brilhando com cores distintas, é possível obter imagens com altíssima resolução espacial, como mostra a Figura 3.

Por sua vez, o professor Stefan Hell desenvolveu seu nanoscópio a partir de uma estratégia distinta, baseada no conceito de emissão estimulada. Esse conceito foi descrito teoricamente por Einstein em 1916. Em 1960, Theodore Maiman utilizou emissão estimulada para construir o primeiro laser. Na ideia desenvolvida por Stefan Hell, dois lasers são empregados simultaneamente como fonte de luz do microscópio ótico. Nesse aparato, a radiação do primeiro laser é absorvida pelas moléculas fluorescentes presentes na amostra em estudo. O segundo laser interage com as moléculas fluorescentes pelo mecanismo de emissão estimulada e o brilho dessas moléculas é suprimido. O segundo laser suprime a emissão de luz de todas as moléculas presentes na

região de observação, exceto algumas moléculas que estão em uma pequena região central onde o segundo laser não incide. Consequentemente, há uma resolução de nanômetros.

O sonho do químico

Em resumo, como observar objetos pequenos como nanomateriais, moléculas e átomos? O uso de moléculas fluorescentes para alcançar esse objetivo levou ao desenvolvimento da nanoscopia, tema do Prêmio Nobel de Química de 2014. Graças a avanços no desenvolvimento de novas tecnologias, hoje em dia, é possível observar desde átomos e moléculas até componentes celulares e nanomateriais, uma molécula de cada vez. Trata-se de um momento único na história da química, no qual nós podemos observar átomos e moléculas em tempo real. Além de ser atrativo do ponto de vista de pesquisa científica, esses avanços também são importantes do ponto de vista didático, pois permitem realizar uma comparação direta entre modelos moleculares comumente empregados em sala de aula e resultados experimentais obtidos por meio da nanoscopia.

René Alfonso Nome Silva (nome@iqm.unicamp.br), bacharel e mestre em Química pela Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), doutor em Química pela University of Chicago (EUA), pós-doutorado no Center for Nanoscale Materials do Argonne National Lab (EUA), professor adjunto do Instituto de Química da Unicamp, trabalha nas áreas de femtoquímica, espectroscopia monomolecular e nanofotônica.

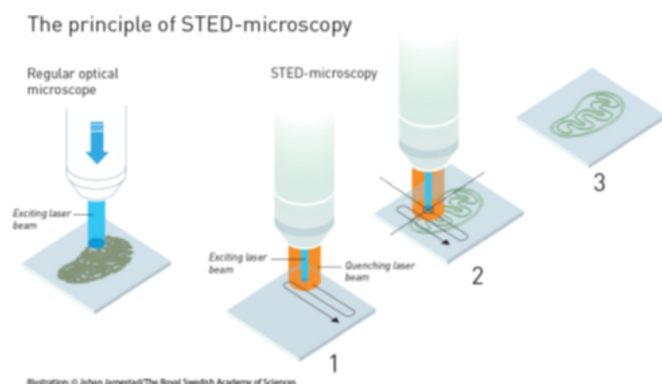


Figura 4: O princípio da microscopia por depleção estimulada de emissão (STED). Figura original de Johan Jarnestad/The Royal Swedish Academy of Sciences.

Referências

The Royal Swedish Academy of Sciences, The Nobel Prize in Chemistry 2014 – Popular Science Background. Disponível em: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2014/popular-chemistryprize2014.pdf. Acesso: em 19 nov. 2014.

Abstract: *The Nobel Prize in Chemistry 2014: Using fluorescent molecules to transform microscopy into nanoscopy.* The Nobel Prize in Chemistry 2014 was awarded to Eric Betzig, Stefan Hell and William E. Moerner for the “development of super-resolved fluorescence microscopy.” The present article discusses this development, from the resolution limits in optical microscopy to the use of fluorescent molecules that overcome the physical limits of resolution in microscopy, thus giving rise to a nanometer-resolution optical technique: nanoscopy.

Keywords: fluorescence, single molecules, microscopy