KELLEN BRUNALDI

**"TRANSPORTE DE ÁCIDOS GRAXOS E PRÓTONS
ATRAVÉS DE BICAMADAS LIPÍDICAS PLANAS"**

**Dissertação apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade
de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências (Fisiologia)**

**Área de concentração:
Fisiologia**

**São Paulo
2000**

Candidato(a): Kellen Brunaldi

Título da Dissertação: Transporte de ácidos graxos e prótons através de bicamadas lipídicas planas.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da
Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada a/...../.....,
considerou o(a) candidato(a):

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

1) Examinador(a) _____

2) Examinador(a) _____

3) Presidente _____

KELLEN BRUNALDI

**"TRANSPORTE DE ÁCIDOS GRAXOS E PRÓTONS
ATRAVÉS DE BICAMADAS LIPÍDICAS PLANAS"**

**Dissertação apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade
de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências (Fisiologia)**

**Área de concentração:
Fisiologia**

**Orientador:
Prof. Dr. Joaquim Procopio de Araujo Filho**

**São Paulo
2000**

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Brunaldi, Kellen .

Transporte de ácidos graxos e prótons através de bicamadas lipídicas planas /
Kellen Brunaldi. -- São Paulo, 2000.

Dissertação (Mestrado) Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de
São Paulo. Departamento de Fisiologia e Biofísica.

Área de concentração: Fisiologia.

Linha de pesquisa: Biofísica de Membrana.

Orientador: Procopio, Joaquim.

Versão do título para o inglês: Fatty acid and proton transport across lipid
bilayer planar membranes.

Descritores: 1. Ácidos graxos 2. Prótons 3. Bicamadas lipídicas 4.
Transporte através de membranas 5. Permeabilidade a prótons

ICB/SBIB/059/2000

Agradeço,

a minha família,
que mesmo distante, esteve sempre presente,
principalmente nos momentos mais difíceis;

ao Sandro,
pelo amor e paciência
a mim dedicados;

ao meu orientador, Prof. Joaquim Procopio, que com muita competência e dedicação soube me conduzir pelo caminho do saber;

ao Prof. Rui Curi, pelo incentivo e apoio imprescindíveis;

ao Prof. Roberto Bazotte, a quem devo a minha iniciação na área científica;

à FAPESP, pelo auxílio financeiro concedido;

e a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para este trabalho.

ÍNDICE

RESUMO

1. INTRODUÇÃO.....	1
Transporte de ácidos graxos através de membranas fosfolipídicas.	2
Ácidos graxos e o transporte de prótons.	7
Fatores moduladores da interação AG/matriz lipídica e alteração das propriedades físico-química de bicamadas pelos AGs.	11
2. OBJETIVOS	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
Formação da bicamada lipídica plana (BLP).	16
Monitoramento elétrico da BLP com o amplificador de patch-clamp (modo voltage-clamp).	18
Monitoramento elétrico da BLP com o eletrômetro digital de alta impedância.	19
Eletrômetro <i>versus</i> amplificador de Patch Clamp (voltage-clamp) na monitoração elétrica de bicamadas lipídicas.	24
Medida da capacitância elétrica da bicamada lipídica plana.	25
Fluxo isotópico de ácido graxo através da BLP.	28
Comparação entre parâmetros cinéticos da transferência de AG em bicamadas lipídicas planas.	31
Densidade superficial de cargas (DSC) e potencial de superfície de bicamadas lipídicas planas.	34
4. RESULTADOS.....	37
Permeabilidade de bicamadas lipídicas planas ao ácido palmítico, medida por fluxo isotópico.	37
Efeito do ácido palmítico sobre parâmetros elétricos de bicamadas lipídicas planas.	38
Efeito do ácido araquidônico sobre parâmetros elétricos de bicamadas lipídicas planas.	41
Permeabilidade a próton de bicamadas lipídicas planas.	45
Interrelações entre flip-flop do ânion palmitato, permeabilidade aparente a próton e corrente de curto-circuito.	46
5 DISCUSSÃO.....	50
Permeabilidade de bicamadas lipídicas planas ao ácido palmítico, medida por fluxo isotópico.	50

Evidências elétricas do transporte de prótons por AGs.	51
Mecanismo envolvido no transporte de prótons por AGs.	55
Transporte de prótons em bicamadas lipídicas planas modificadas pelo ácido araquidônico.	57
Evidências elétricas do flip-flop do ácido palmítico: comparação entre CCC experimentais com as teóricas previstas pelo flip-flop do ácido palmítico (AP).	64
Interação do ácido palmítico com bicamadas modificadas pela valinomicina.	67
6. CONCLUSÕES	72
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

RESUMO

O presente estudo tentou elucidar diversos aspectos da transferência de ácidos graxos (AG) através da matriz lipídica utilizando, como modelo experimental, a bicamada lipídica plana (BLP).

Bicamadas lipídicas planas (BLPs) foram formadas pelo método de MUELLER *et alii* (1963) em um orifício circular (0.4 a 2.4 mm de diâmetro) de um frasco de polietileno cilíndrico acoplado a uma câmara de acrílico com dois compartimentos. Para a monitoração elétrica foram usados um amplificador de patch-clamp (Dagan Instruments modelo 8900), com probe de 10 Gohm, configurado em voltage-clamp e um eletrômetro digital (Keithley, modelo 616), com uma impedância de entrada de 2×10^{14} ohm.

A fase de desorção e a permeabilidade ao AG foram avaliadas pelo fluxo isotópico de ácido palmítico através de bicamadas lipídicas planas e, a fase de flip-flop através de medidas elétricas de corrente de curto circuito e condutância de membranas modificadas pelo ácido palmítico ou ácido araquidônico, na presença de gradiente de concentração de prótons.

O transporte de prótons pelos AGs foi monitorado eletricamente através de medidas de condutância sob a aplicação de um pulso de voltagem, corrente de curto circuito e diferença de potencial elétrico na presença de gradiente de concentração de prótons. Através das medidas de corrente de curto circuito calculava-se o fluxo de prótons, e consequentemente a permeabilidade a próton. Como controle, a permeabilidade a próton de bicamadas desprovidas de AG foi também avaliada.

Alterações da dinâmica da membrana foram estudadas através da monitoração da capacitância elétrica, condutância, corrente de curto circuito e diferença de potencial transmembrana.

Como a transferência de AG, assim como a sua função de carreador de prótons podem ser afetadas pela natureza da membrana e tipo de AG, foram utilizadas membranas de azolecitina, cuja superfície é carregada negativamente, e membranas de DPhPC (diftnoilfosfatidilcolina) que são neutras, assim como membranas modificadas pela valinomicina (ionóforo seletivo para íons K). Os AGs testados foram ácido palmítico (C16:0) e araquidônico (C20:4).

Os resultados obtidos foram:

- A permeabilidade de bicamadas lipídicas planas ao ácido palmítico foi aproximadamente da mesma ordem de magnitude das calculadas para vesículas unilamelares (SUV e GUV);
- A permeabilidade ao ácido palmítico de membranas de azolecitina pouco diferiu da permeabilidade das de DPhPC;
- AGs quando incorporados a bicamadas lipídicas planas aumentaram a seletividade dessas membranas a próton;
- A maior ou menor seletividade a próton de membranas puras como das modificadas por AGs, depende do pH do meio aquoso;
- Ácido araquidônico foi mais eficaz em transportar prótons do que o ácido palmítico.
- Relações $I \times V$ das membranas modificadas por ácido araquidônico foram supralineares e na presença de gradiente de pH passam a apresentar retificação do tipo Goldman;
- O ácido araquidônico aumentou a rigidez das membranas de azolecitina;
- A determinação da corrente de curto-circuito pode ser utilizada como um método de determinação da taxa de flip-flop de ácidos graxos através de bicamadas lipídicas.
- O ácido palmítico inibiu a condutância induzida pela valinomicina em bicamadas de azolecitina e DPhPC, sendo seu efeito mais intenso nas membranas neutras.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Ácidos graxos não esterificados (AG) constituem uma pequena fração dos lipídeos corporais, mas exercem uma função crucial no metabolismo e na regulação dos processos celulares.

Os ácidos graxos são fornecidos as células primariamente pela albumina plasmática ou por hidrólise de triglicerídeos plasmáticos, para ressíntese de lipídeos esterificados ou para oxidação energética. Quando provenientes dos estoques intracelulares, o AG ou é utilizado ou se move para fora da célula para suprir outros tecidos. Entre outras funções, também participam da sinalização intracelular (HANNIGAN & WILLIAMS, 1991), da ativação de canais de K^+ (ORDWAY, *et alii*, 1989), na troca de Na^+/Ca^{2+} (PHILIPSON & WARD, 1985), na modulação do uptake de lipoproteínas plasmáticas (BIHAIN *et alii*, 1989) e no desacoplamento da fosforilação oxidativa (SKULACHEV, 1998). Estudos recentes tem mostrado a função do AG como transportador de prótons na matriz lipídica da membrana plasmática (KAMP e HAMILTON, 1993 e outros).

Devido ao alto coeficiente de partição dos AGs, mesmo em concentrações baixas na fase aquosa, essas moléculas uma concentração molar apreciável na bicamada lipídica. As concentrações citosólicas tóxicas de AG variam de 10^{-7} a 10^{-6} M, enquanto que no meio externo concentrações de aproximadamente 10^{-5} M são potencialmente tóxicas para a célula (GUTKNECHT, 1988).

Os mecanismos de toxicidade do AG são complexos e pouco compreendidos. Porém, muitos resultados sugerem que a toxicidade se deve em parte ao aumento da condutância protônica da bicamada (G_H) e, conseqüentemente a dissipação dos gradientes eletroquímicos de H^+ através das membranas celulares e de organelas (GUTKNECHT, 1988).

Elucidar o mecanismo pelo qual os ácidos graxos são transportados através das membranas celulares se faz importante para compreender melhor o metabolismo dos AG.

Uma questão não estabelecida é se os requerimentos metabólicos podem ser satisfeitos pelo transporte espontâneo de AG através da fase lipídica da membrana, ou se é necessário a intervenção de uma proteína transportadora, ou seja, a questão é

INTRODUÇÃO

se os ácidos graxos poderiam mover-se livremente através das membranas fosfolipídicas ou se proteínas seriam essenciais para seu transporte.

1.1. Transporte de ácidos graxos através de membranas fosfolipídicas

Segundo HAMILTON & KAMP (1999) e KLEINFELD *et alii* (1997), as etapas envolvidas no uptake de ácidos graxos livres (AG) seriam:

1. Dissociação do AG da albumina ou de uma lipoproteína plasmática;
2. Adsorção (on-step): difusão do AG através de uma barreira difusionária (espaço entre as células e ou camada estacionária adjacente à membrana plasmática) e associação com o hemifolheto externo da membrana plasmática;
3. Flip-flop: movimento do AG através da membrana plasmática, ou seja, de um hemifolheto para outro hemifolheto da bicamada;
4. Desorção (off-step): Dissociação do hemifolheto interno e entrada no citosol. A remoção de AG de ambos os folhetos envolve a uma reação de hidratação do AG (KAMP *et alii*, 1995):

5. Difusão, quer na forma monomérica ou ligada a FABP (fatty acid binding protein), através do citosol para sítios de ligação e utilização (mitocôndria, peroxissomas, retículo endoplasmático);
6. Metabolismo.

Para nossa discussão, vamos nos ater apenas as etapas de adsorção (2), flip-flop (3) e desorção (4) as quais definem o transporte de AG propriamente dito.

Cada uma destas etapas referentes ao transporte de AG através de membranas fosfolipídicas apresenta uma cinética diferente, e tem sido sugerido por vários pesquisadores que proteínas poderiam facilitar uma ou mais dessas etapas. Para entender a cinética e a termodinâmica associadas à cada etapa, modelos sistêmicos simples tem sido empregados. Porém, certa dificuldade tem sido observada ao se tentar monitorar e quantificar processos individualmente, mesmo em bicamadas fosfolipídicas livres de proteínas (ZHANG *et alii*, 1996).

INTRODUÇÃO

Adsorção

A primeira fase no transporte de AG através de membranas é a adsorção do AG ao lado da membrana exposta ao AG. Por se tratar de uma molécula lipofílica o seu transporte distingue-se marcadamente do transporte de outras pequenas moléculas, como a glicose. A glicose é altamente solúvel em água e particiona-se muito fracamente em membranas lipídicas, em contraste AGs particionam-se muito favoravelmente em bicamadas lipídicas, criando uma membrana altamente rica em AG quando comparada com o compartimento aquoso (HAMILTON, 1998).

Portanto, quando AGs são adicionados a células *in vitro* ou quando se tem uma alta concentração plasmática de AG alcançando as células, o seu particionamento na membrana plasmática fornece uma alta concentração de AG no hemifolheto externo. Porém, o particionamento não significa que a translocação de AG através da membrana ocorrerá espontaneamente, pois se o AG em questão possuir grupamentos altamente carregados, a sua solubilidade no core hidrofóbico da membrana é restrita (HAMILTON & KAMP, 1999).

Propriedades de ionização do AG em membranas fosfolipídicas

Quando AG não complexado a albumina está presente em baixa concentração em um compartimento aquoso de pH 7.4, o seu pKa é de aproximadamente 4.5, e a espécie predominante é a forma monomérica ionizada do AG, ou seja, ânion do AG. Após a adsorção do AG ao hemifolheto externo da bicamada fosfolipídica, a sua cadeia acil alinha-se com as cadeias acil dos fosfolípidos, e o grupamento carboxil posiciona-se na interface aquosa ficando próximo ao grupamento fosfato carregado negativamente, sendo assim a ionização do grupamento carboxil (pKa) é significativamente alterada. O pKa aparente do AG, quando este incorporado a uma bicamada fosfolipídica, é de 7.6 e é independente do comprimento da cadeia saturada, do número de insaturações e da quantidade relativa de AG na bicamada. Portanto, a superfície carregada da membrana afeta a ionização do AG, aumentando significativamente o seu pKa e na faixa usual de pHs fisiológicos aproximadamente 50% do AG no interior da membranas encontra-se na forma não ionizada (HAMILTON, 1998; HAMILTON & KAMP, 1999).

Movimento transmembrana de AG (flip-flop)

O flip-flop do AG tem sido a etapa de maior controvérsia no transporte de AG, por ambas razões teóricas e experimentais. A grande justificativa teórica para o transporte mediado por proteínas estaria baseado na consideração de que o AG existiria somente na forma de ânion no pH fisiológico. Devido ao flip-flop do ânion do AG ser muito lento, a difusão livre seria muito lenta, e um transportador de ânion seria necessário para ultrapassar a barreira energética do movimento da carga negativa através da bicamada lipídica (HAMILTON & KAMP, 1999). Porém este argumento é contra-atacado por evidências experimentais de que o flip-flop da forma não ionizada do AG é extremamente rápido (KAMP *et alii*, 1995, KAMP & HAMILTON, 1993, GUTCKNECHT, 1988) e que a maior parte do AG na bicamada encontra-se na forma não ionizada (HAMILTON & KAMP, 1999).

O estudo do movimento de AG, mais especificamente, do movimento transmembrana (flip-flop), foi realizada por KAMP & HAMILTON (1993) e KAMP *et alii* (1995), fazendo o uso da piranina, um probe fluorescente sensível a pH, para medir o pH no volume aquoso interno de vesículas após a adição de AG. Verificou-se que após a adição de AG ao tampão externo, uma redução no pH interno ocorria, o que foi atribuído ao rápido movimento transmembrana da forma não ionizada em relação à forma ionizada do AG. O AG adicionado ao tampão externo (pH = 7.4) primeiro se ligava ao folheto externo das vesículas, e rapidamente alcançava 50% de ionização, já que o aparente pKa do AG no meio lipídico da bicamada é de 7.6 (HAMILTON, 1998). Algumas espécies não ionizadas moviam-se para o folheto interno (flip) e então rapidamente alcançavam o equilíbrio de ionização, levando à liberação de prótons no folheto interno da vesícula, o qual se difundia para o volume interno contendo piranina. Como o volume interno das vesículas é pequeno, os efeitos da ligação de menos que 1 mol % de AG conduz a uma redução mensurável do pH interno.

O flip-flop determinado por este método revelou ser um processo de primeira ordem extremamente rápido, com valores de $t_{1/2}$ menores que 10 ms em vesículas unilamelares pequenas (SUV) e menores que 35 ms em vesículas unilamelares grandes (LUV).

INTRODUÇÃO

A constante de flip-flop da forma não ionizada (K_{FAH}) dos AGs testados (ácidos láurico, mirístico, palmítico, oléico e esteárico) em LUV foi de 15 s^{-1} e independente do comprimento da cadeia alifática.

Devido à acidificação do interior da vesícula, o flip-flop da forma não ionizada do AG foi avaliada ser mais rápida que da forma ionizada, porém quando quantidades grandes de valinomicina (ionóforo seletivo para potássio) em relação a AG eram empregadas, o movimento transmembrana da forma ionizada do AG foi intensificado: o colapso do gradiente de próton gerado quando o AG era adicionado ao tampão externo ocorria mais rapidamente, o que foi atribuído ao movimento do AG ionizado pelo complexo valinomicina - K^+ (KAMP & HAMILTON, 1993).

O complexo valinomicina - K^+ transportaria o AG ionizado do folheto externo para o interno, aumentando a concentração do AG ionizado no folheto interno que retiraria prótons da fase aquosa interna e, conseqüentemente o equilíbrio seria deslocado em direção da forma não ionizada que passaria para o folheto externo e ao se dissociar liberaria um próton para a fase aquosa externa, acelerando dessa forma a saída de prótons do interior da vesícula e o colapso do gradiente de pH gerado pela forma não ionizada do AG (KAMP & HAMILTON, 1993).

Baseando-se nesta hipótese proposta, a provável função de uma proteína de transporte transmembrana seria mover a forma ionizada do AG em resposta a um movimento não facilitado da forma não ionizada do AG e a produção de um gradiente de pH transmembrana.

Medidas de pH intracelular em adipócitos sugerem o mecanismo de flip-flop para a entrada e saída de AG. A adição de ácido oléico a uma suspensão de adipócitos conduziu a uma rápida diminuição do pH intracelular. Depois da diminuição máxima, houve um lento retorno ao valor basal de pH. Albumina causou uma rápida alcalinização, sugerindo ser este efeito devido ao flip-flop do AG (CIVELEK *et alii*, 1996).

Desorção

A dissociação de AG a partir do movimento transmembrana (flip-flop), ou seja a etapa off-step, em SUV foi também monitorado pela medida do pH interno com a piranina. A velocidade de dissociação do AG a partir da SUV foi avaliada por mudanças no pH interno ou das vesículas doadoras ou das vesículas aceptoras. A

INTRODUÇÃO

constante de dissociação (K_{off}) para AG saturado com 14 a 26 carbonos, mostrou um aumento de 10 vezes para cada grupamento CH_2 adicionado a cadeia acil. A K_{off} para o ácido oléico (18:1), linoléico (18:2) foram 5 e 10 vezes mais rápida, respectivamente, do que a C18:0 (ZHANG *et alii*, 1996).

Este estudo sugeriu que a fase limitante para a entrada de AG no citosol se deve mais à desorção do AG à partir do folheto citosólico da membrana plasmática do que ao movimento transmembrana, e que AG de estruturas diferentes deixariam o folheto externo da membrana plasmática em diferentes velocidades, não devido a diferenças no movimento transmembrana, mas sim a diferenças na desorção. As velocidades de desorção podem influenciar na transferência de AG entre as células e possibilitar comunicação intercelular e vias de sinalização moduladas por AG (ZHANG *et alii*, 1996).

Um outro método para monitorar o transporte de AG foi utilizado por KLEINFELD *et alii* (1998), usando vesículas lipídicas contendo um probe fluorescente de ácido graxo livre, ADIFAB (proteína ligante de AG do intestino do rato, marcada na Lis²⁷ com acilodam), medindo desta forma a concentração de AG na fase aquosa. Os resultados revelaram tempos de transporte de AG variando de aproximadamente 70 ms a 10 s, dependendo do tipo de vesícula, do tipo de AG, e temperatura. As constantes de dissociação (K_{off}) e ligação (K_{on}) também foram determinadas, e em todos os casos, os resultados indicaram que o flip-flop é a etapa limitante do transporte de AG, ao contrário do previsto por KAMP & HAMILTON (1993), KAMP *et alii* (1995).

A constante de flip-flop (K_{ff}) e dissociação (K_{off}) determinados por este método diminuíam com o aumento do diâmetro da vesícula, e aumentavam de acordo com o tipo de AG: oleato < (18:1) < palmitato (16:0) < linoleato (18:2).

A relação inversa entre a velocidade de flip-flop e o tamanho do AG poderia ser explicada pela formação de um espaço livre suficientemente grande para englobar o AG, o que limitaria o seu transporte. O maior K_{ff} para o linoleato quando comparado com o palmitato e oleato pode também refletir este mecanismo. A ligação dupla adicional do linoleato resulta em um grau maior de desorganização das cadeias acil dos fosfolipídeos, o que pode facilitar a formação da cavidade com espaço livre no interior da bicamada.

INTRODUÇÃO

A formação de cavidades na bicamada lipídica pode ser promovida por defeitos no empacotamento dos fosfolípides, que estaria intensificado com o aumento do “mismatch” (diferença entre a área do folheto interno e externo) das áreas das bicamadas. Diferenças entre as áreas dos folhetos interno e externo é de 90% para SUVs, (200 Å de diâmetro), 15 % em LUV (~1000Å de diâmetro), e menos que 8% em GUV (> 2000 Å de diâmetro).

As características da fase lipídica das membranas biológicas não podem ser comparadas com as bicamadas das vesículas lipídicas, pois a composição é bem mais complexa que apenas fosfatidilcolina e colesterol, e a curvatura de tais membranas é maior que 2000 Å observada em GUVs, assim como a presença de proteínas que modificam as propriedades da fase lipídica. Logo a possibilidade do flip-flop através da fase lipídica das membranas biológicas pode ser tão lento para acomodar o fluxo de AG necessário para suprir as necessidades celulares, o que é condizente com muitos estudos utilizando-se membranas celulares, onde a transferência de AG se dá muito lentamente (KLEINFELD *et alii*, 1997).

1.2. Ácidos graxos e o transporte de prótons

Varias substâncias tem sido apontadas como dissipadoras do gradiente de prótons através da membrana interna mitocondrial, sendo conhecidas pelo nome genérico de desacopladores, dos quais a família de UCPs (proteínas desacopladoras) é a mais divulgada. Mais recentemente ácidos graxos foram incluídos nesta classe (SKULACHEV, 1998). Sendo a membrana interna da mitocôndria uma bicamada lipídica em sua essência, os modelos de bicamada são válidos como sistemas de estudo da questão da dissipação de gradientes de próton.

Em uma investigação realizada por GUTKNECHT (1988), a adição de AG a bicamadas fosfolipídicas causou um aumento da condutância protônica intrínseca da bicamada (G_H) proporcional ou a fração molar de AG na solução de lípide ou a concentração de AG na fase aquosa. Porém, altos níveis de AG foram necessários para se promover um aumento significativo da G_H .

A G_H induzida pelo AG foi aumentada quando - o solvente do lípide era o clorodecano, o qual promove um aumento da constante dielétrica da bicamada; - e com a voltagem da membrana. Já na presença de floretina, baixo pH e soro albumina verificou-se uma redução do G_H .

INTRODUÇÃO

Devido a inibição do G_H pela floretina, cujo efeito primário é a diminuição do potencial de dipolo da membrana e pelo baixo pH foi sugerido que o flip-flop da forma ionizada do AG é a etapa limitante no transporte de H^+ .

A inibição pela albumina, da G_H induzida por AG, provavelmente reflete a remoção de ácidos graxos da membrana devido a alta afinidade que a albumina possui por moléculas anfifílicas, especialmente ácidos graxos de cadeia longa. Porém o mecanismo exato de como ocorre a transferência de AG entre as bicamadas fosfolipídicas e a albumina não é conhecida.

Os AGs quando comparados com os clássicos “protonóforos” são carreadores ineficientes de H^+ . Por exemplo, para a obtenção de um G_H de 100 nS cm^{-2} , a concentração de ácido oléico é de 3 a 4 vezes maior que a concentração equivalente de FCCP (*p*-trifluorometoxifenilhidrazona carbonilcianida) (GUTKNECHT, 1988).

A habilidade dos clássicos protonóforos se deve em parte à presença de elétrons π , os quais deslocam a carga e aumentam a solubilidade do ânion do ácido fraco na região de baixa constante dielétrica da bicamada (MAcLAUGHLIN & DILGER, 1980). Portanto, seria esperado que os AGs fossem ineficientes carreadores de prótons.

GUTKNECHT (1988) estimou a translocação do ânion do AG (taxa de flip-flop) a partir do valor de G_H e da concentração de AG na membrana. Para tal supôs que a fase limitante no transporte de prótons era o flip-flop do AG ionizado. A partir do valor de G_H com voltagens pequenas, o fluxo do ânion do AG foi estimado pela relação:

$$J_A = \frac{RTG_H}{F^2} \quad (1.2.1)$$

Onde, J_A é o fluxo do ânion do AG em $\text{mol cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$, R é a constante dos gases ($8.31 \text{ joule K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), T temperatura em Kelvin, G_H condutância a próton em Siemens cm^{-2} e F constante de Faraday ($96500 \text{ Coulomb mol}^{-1}$). A constante de flip-flop então calculada como:

$$k_{ff} = \frac{J_A}{[A^-]_{\text{surface}}} \quad (1.2.2)$$

INTRODUÇÃO

Onde, k_{ff} é a constante de flip-flop do ânion do AG em s^{-1} e $[A^-_{surface}]$ é a concentração do ânion do AG na superfície da bicamada em $mol\ cm^{-2}$.

As constantes k_{ff} para os AGs testados (ácido mirístico, palmítico e oléico) foram aproximadamente de $10^{-4}\ seg^{-1}$, ficando abaixo das constantes dos clássicos protonóforos por um fator de 10^5 .

Portanto, parece que o transporte de prótons pelo AGs é limitado pela baixa solubilidade do ânion do AG no interior lipídico e, conseqüentemente o seu flip-flop, o que reforçaria a hipótese da necessidade de uma proteína transportadora como carreadora do ânion do AG em resposta a difusão não facilitada da forma não ionizada.

Várias proteínas tem sido imputadas como carreadoras do ânion do AG, como por exemplo a UCP (uncoupling protein, proteína desacopladora), o trocador ATP/ADP, o trocador glutamato/aspartato, etc (SKULACHEV, 1998).

Vias de permeação de prótons em bicamadas lipídicas

O flip-flop de AGs em sistemas vesiculares tem sido usualmente detectado como uma acidificação do interior vesicular (KAMP & HAMILTON (1993), KAMP *et alii* (1995)) e em bicamadas planas como um aumento da condutância a próton (GUTKNECHT, 1988). Portanto, AGs podem modular o fluxo de prótons através de bicamadas fosfolipídicas. Logo, se faz necessário também entendermos os mecanismos envolvidos na difusão de prótons através de membranas não modificadas por AGs.

Tanto nas soluções biológicas como nas inanimadas existe uma associação estreita entre a água e o próton. Isto não é surpreendente uma vez que na água coexistem as formas H_2O , H_3O^+ , OH^- , e H^+ . Além disto, a movimentação da forma H^+ não requer a translocação física de cada próton mas pode ocorrer através da troca de elétrons, proton-jump, etc (HILLE, 1992, VOET & VOET, 1995). Tem sido reportado uma enorme taxa de translocação da forma H^+ . O coeficiente de difusão do próton em água é quase uma ordem de magnitude maior que o de outros íons alcalinos (HILLE, 1992). A associação entre a translocação do próton e sua associação com a água persiste, em alguma escala, no interior da matriz lipídica da membrana, que contém água de forma estruturada, em associações ainda mal conhecidas.

INTRODUÇÃO

As seguintes vias e mecanismos tem sido postulados para explicar a passagem de prótons através de membranas biológicas:

- a) Defeitos flutuacionais de densidade (DEAMER & NICHOLLS, 1989);
- b) Proton-wire, water-wire, condutância associada a água (NAGLE, 1987; HOCH, 1998);
- c) Ácidos graxos intrínsecos (DEAMER & NICHOLLS, 1989);
- d) Ácidos graxos extrínsecos (DEAMER & NICHOLLS, 1989. KAMP & HAMILTON, 1993. KAMP *et alii*, 1995. ZHANG *et alii*, 1996);
- e) Transportadores de próton: canais, trocadores, uniporters e bombas (VOET & VOET, 1995).

Em bicamadas lipídicas a movimentação de próton também é anormalmente alta quando comparada a de íons alcalinos (GUTKNECHT, 1988. DEAMER & NICHOLLS, 1989 e outros). Isto aparentemente contrasta com a necessidade das células em manter e utilizar gradientes de próton em inúmeras funções. Um dos aspectos mais paradoxais do comportamento do próton em bicamadas lipídicas é a relação entre condutância a próton e o pH do meio. Seria de esperar-se que a condutância ao próton aumentasse com a concentração deste íon, de acordo com a equação de eletrodifusão clássica (STEN-KNUDSEN, 1978):

$$G_H = \left(\frac{zF^2}{RT} \right) P_H C_H \quad (1.2.3)$$

Onde P_H e C_H são, respectivamente, a permeabilidade da membrana ao próton e a concentração de próton. A equação acima sugere que a condutância ao próton aumente com a concentração deste íon no meio e na membrana.

No entanto, dados de GUTKNECHT (1988), DEAMER & NICHOLS (1989) e NAGLE (1987), mostram uma dependência paradoxal da condutância a próton em função do pH. Nestes estudos verificou-se um aumento não significativo da condutância de bicamadas lipídicas puras com o aumento da concentração de próton, numa evidente violação da fórmula clássica acima. Uma explicação trivial para este comportamento é a de que o aumento da concentração de prótons leva a uma diminuição da permeabilidade da membrana ao H^+ .

INTRODUÇÃO

O mecanismo subjacente deste fenômeno não é conhecido e necessita portanto de elucidação, mas uma função protetora para a célula é facilmente reconhecível neste efeito. Uma queda excessiva do pH extracelular teria como consequência imediata uma acidificação do citoplasma caso a célula não dispusesse de mecanismos de "fechamento" da membrana ao excesso de íon H^+ . A permeabilidade da membrana a um íon genérico i é dada por:

$$P_i = \frac{(D_i b_i)}{d} \quad (1.2.4)$$

onde D é o coeficiente de difusão, e b_i o coeficiente de partição e d a espessura da membrana. Assim, uma investigação dos mecanismos moduladores da permeabilidade implica em entender como os coeficientes acima são afetados isoladamente.

1.3. Fatores moduladores da interação AG/matriz lipídica e alteração das propriedades físico-química de bicamadas pelos AGs.

A incorporação de AG a bicamadas fosfolípídicas, como mencionado anteriormente, pode alterar a permeabilidade dessas membranas a próton. Porém outros parâmetros podem ser também afetados, como a organização estrutural da bicamada, potencial de superfície, densidade superficial de carga, temperatura de transição, etc...

Por outro lado, também devemos levar em consideração que tais parâmetros podem influenciar a passagem de AGs através de membranas, assim como o transporte de prótons por AGs.

Potencial de superfície

A maior parte das membranas celulares naturais são constituídas por fosfolípidos carregados eletricamente. A carga dos grupos polares dos fosfolípidos e a absorção de íons criam potenciais eletrostáticos que modulam a concentração de prótons, íons metálicos, e outros substratos carregados. Portanto, todos os estudos de transferência de eletrólitos (incluindo prótons) devem ser considerados em função de suas concentrações efetivas junto a superfície da bicamada e não na bulk-phase.

O transporte de AG em membranas carregadas difere do transporte em membranas neutras. SUDERLAND & STORCH (1993) verificaram que a adição de

INTRODUÇÃO

fosfolípidos carregados negativamente a SUV doadora resultou em um aumento na velocidade de transferência de AG, o qual foi atribuído à repulsão entre as cargas negativas do AG e do grupamento polar do fosfolípido.

Quando era promovido um aumento da força iônica, e portanto da redução do potencial de superfície, as cargas do AG e do fosfolípido eram efetivamente “screened” (blindadas), e a velocidade de transferência de AG em SUV carregada em comparação com SUV neutra tornavam-se idênticas.

A incorporação de fosfolípido carregado negativamente em SUV neutra também resultou em um aumento da taxa de flip-flop do ácido oléico marcado com grupo antroloxil (12 AO). Tal efeito foi atribuído ao aumento do pKa do ácido graxo, o qual facilitaria a passagem do grupo carboxilato do AG que se encontra no hemifolheto intreno para o interior hidrofóbico da membrana.

O potencial de superfície pode, além de modular a passagem do AG através de membranas, também modular o transporte de prótons por AGs, pois protonóforos clássicos, como FCCP (*p*-trifluorometoxifenilidrazona carbonilcianida) e CCCP (*m*-clorofenilidrazona carbonilcianida) em concentrações idênticas induzem uma condutância 10 vezes maior em membranas neutras de fosfatidiletanolamina do que em bicamadas lipídicas contendo 20% de cardiolipina (difosfatidilglicerol). Este efeito pode ser compreendido pelo fato da cardiolipina ser um lípido carregado negativamente, e o potencial de superfície desta membrana diminuiria a concentração do ânion do protonóforo dentro da membrana, e portanto a condutância (MAcLAUGHLIN & DILGER, 1980).

Por outro lado, muitos protonóforos podem modificar o potencial eletrostático na superfície da membrana. Por exemplo, o DNP (dinitrofenol) produz um potencial negativo quando adicionado a vesículas multilamelares formadas por lípidos neutros (MAcLAUGHLIN & DILGER, 1980). Portanto, não seria surpreendente que AGs fizessem o mesmo.

POHL *et alii* (2000) verificou o desenvolvimento de carga superficial em membranas neutras quando o flip-flop de AG era intensificado por um gradiente de pH transmembrana: inicialmente o pH de ambas as soluções banhantes eram iguais e o AG estava igualmente distribuído entre os dois hemifolhetos, e ao se reduzir o pH de um dos compartimentos aquosos, as moléculas de AG ionizadas eram protonadas

INTRODUÇÃO

e o flip-flop para o hemifolheto oposto levava a liberação de prótons para o outro compartimento, gerando-se desta forma uma diferença de concentração do ânion do AG entre os hemifolhetos e o aparecimento de uma diferença de potencial elétrico.

Organização estrutural da membrana

Já é bem conhecido que AGs saturados aumentam a temperatura de transição da fase de gel para a fase cristal líquido, enquanto que AG insaturados diminuem a temperatura de transição (CEVC & MARSH, 1987), portanto a fluidez de membranas pode ser alterada pela incorporação de AGs na matriz lipídica.

Transições de fase gel - cristal líquido induzidas por AGs, conduzem também a alterações de permeabilidade, já que na temperatura de transição observa-se um número muito maior de defeitos na matriz lipídica e a permeabilidade da membrana é máxima (LANGNER & HUI, 2000).

O grau de organização da membrana prévio a incorporação de AG pode também afetar em muito o efeito do AG sobre membranas. LANGNER & HUI (2000) avaliaram o efeito da adição de AG sobre a permeabilidade de vesículas fosfolipídicas na transição de fase a íons ditionato e iodeto. AG insaturados reduziram a permeabilidade das vesículas, enquanto que AGs saturados alteravam muito pouco a permeabilidade. Foi proposto que AGs insaturados poderiam modificar regiões “defeituosas” na matriz lipídica, prevenindo desta forma a entrada de íons. Portanto, AGs podem alterar não só a permeabilidade a prótons, mas também a outros íons.

De um modo geral o transporte de AG, assim como a sua função de carreador de prótons são extremamente sensíveis a ambas a natureza do AG assim como da membrana, as investigações de como ocorre o transporte de AG deveriam ser realizadas usando AG naturais e bicamadas com raio de curvatura e composição lipídica mais próximas das membranas biológicas.

A pequena relação área/volume das vesículas unilamelares possibilita a realização de estudos cinéticos, ao contrário dos sistemas que utilizam bicamadas lipídicas planas (BLP), onde se tem compartimentos aquosos muito grandes (centímetros cúbicos) que resultariam em $t_{1/2}$ de dias para a transferência de AG.

Por outro lado, o maior raio de curvatura assim como o reduzido "mismatch" das BLPs em parte melhor se assemelham à matriz lipídica celular. As BLPs

INTRODUÇÃO

constituem sistemas convenientes para o estudo do transporte de AG e os efeitos dos AG sobre a permeabilidade da bicamada. Os AGs podem ser adicionados ou a fase aquosa que banha a bicamada, ou a solução utilizada para a confecção da mesma, além do que esse modelo experimental possibilita a alteração da composição química de ambas as soluções do banho, assim como a monitoração elétrica da membrana e a medida de fluxo de AG utilizando métodos isotópicos ou químicos de alta precisão.

Em bicamadas lipídicas planas, o transporte de prótons por AGs pode ser melhor avaliado através de medidas elétricas de condutância sob a aplicação de um pulso de voltagem ou de potencial de membrana e corrente de curto circuito produzido por um gradiente de concentração de prótons, além do que o flip-flop de AG pode ser estimado monitorando-se eletricamente o fluxo de prótons.

Alterações da dinâmica da matriz lipídica também podem ser evidenciadas em sistemas utilizando bicamada lipídica plana. A capacitância pode nos dar uma idéia da compressibilidade da membrana e o acompanhamento da condutância pode nos fornecer indícios de transição de fase.

2. OBJETIVOS

O presente estudo tentou elucidar diversos aspectos da transferência de ácidos graxos (AG) através da matriz lipídica utilizando, como modelo experimental, a bicamada lipídica plana (BLP) devido as séries de vantagens já descritas.

A fase de desorção e a permeabilidade ao AG foram avaliadas pelo fluxo isotópico de ácido palmítico através de bicamadas lipídicas planas e, a fase de flip-flop através de medidas elétricas de corrente de curto circuito e condutância de membranas modificadas pelo ácido palmítico ou ácido araquidônico, na presença de gradiente de concentração de prótons.

O transporte de prótons pelos AGs foi monitorado eletricamente através de medidas de condutância sob a aplicação de um pulso de voltagem, corrente de curto-circuito e diferença de potencial elétrico na presença de gradiente de concentração de prótons. Através das medidas de corrente de curto circuito calculava-se o fluxo de prótons, e consequentemente a permeabilidade a próton. Como controle, a permeabilidade a próton de bicamadas desprovidas de AG foi também avaliada.

Alterações da dinâmica da membrana foram estudadas através da monitoração da capacitância elétrica, condutância, corrente de curto-circuito e diferença de potencial transmembrana.

Como a transferência de AG, assim como a sua função de carreador de prótons podem ser afetadas pela natureza da membrana e tipo de AG, foram utilizadas membranas de azolecitina, cuja superfície é carregada negativamente, e membranas de DPhPC (diftnoilfosfatidilcolina) que são neutras, assim como membranas modificadas pela valinomicina (ionóforo seletivo para íons K^+). Os AGs testados foram ácido palmítico (C16:0) e araquidônico (C20:4).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Formação da bicamada lipídica plana (BLP)

Bicamadas lipídicas planas (BLPs) foram formadas pelo método de MUELLER *et alii* (1963) em um orifício circular (0.4 a 2.4 mm de diâmetro) de um frasco de polietileno cilíndrico acoplado a uma câmara de acrílico com dois compartimentos: TRANS onde o frasco de polietileno era acoplado; e um outro compartimento denominado de CIS (**figura 1**).

Por ser a bicamada uma estrutura muito frágil, o sistema era montado sobre uma mesa antivibratória, a qual encontrava-se no interior de uma gaiola de Faraday, que tinha a finalidade de blindar o sistema contra ruídos elétricos.

A visualização da BLP foi realizada por meio de um microscópio estereoscópico, através do qual também determinava-se a espessura do tórus da bicamada.

A área da bicamada era estimada por:

$$\text{Área da BLP} = \pi R^2 \quad (3.1.1)$$

Onde, R é o raio da BLP e corresponde a metade do diâmetro da bicamada, o qual é igual a:

$$\text{Diâmetro da BLP} = (\text{diâmetro do orifício}) - (2 \times \text{espessura do tórus}) \quad (3.1.2)$$

As bicamadas apresentavam áreas entre 5 e 10 (10^{-3} cm^2).

Os compartimentos CIS e TRANS eram preenchidos com soluções simétricas em composição (KCl 5 mM + Trizma 5 mM ou Cloreto de colina 10 mM + Trizma 5 mM, pH = 7.4) e tinham volumes entre 5 e 6 ml.

A agitação do banho no compartimento CIS e TRANS foi efetuada por meio de uma pulga magnética e fluxo de ar, respectivamente. Os experimentos eram realizados a temperatura ambiente, controlada entre 22-25 °C.

BLPs com carga superficial negativa foram obtidas com o fosfolípide azolecitina (Sigma), o qual contém cerca de 8% de fosfolípides carregados, principalmente fosfatidilglicerol (KAGAWA & RACKER, 1966). Já BLPs neutras

MATERIAIS E MÉTODOS

eram obtidas com o fosfolípide diftanoilfosfatidilcolina (DPhPC) da Avanti Polar Lipids. Ambos fosfolípides eram diluídos a 2.5 % em *n*-decano (2.5 mg lípide para 100 microlitros de *n*-decano).

Foram também utilizadas membranas modificadas por ácidos graxos de cadeia longa (AG), como o ácido palmítico (C16) ou ácido araquidônico (C20:4), o qual encontravam-se dissolvidos em etanol (solução etanólica a 2 mg/ml).

A incorporação de AG à bicamada era efetuada através da adição de uma alíquota da solução etanólica de AG à fase aquosa, produzindo concentrações aquosas nominais entre 13 e 60 μM .

Bicamadas modificadas pelo ionóforo seletivo para íons K^+ , valinomicina, foram também utilizadas, para tal 5 μL de solução 0.001 mg/ml de valinomicina (Sigma) em etanol era adicionada a solução banhante.

Gradientes de concentração de prótons (H^+) eram gerados através da adição de ácido sulfúrico ao compartimento CIS, produzindo deltas de pH entre 0.1 a 3 unidades de pH. O pH de ambos os compartimentos foi medido por meio do aparelho Radiometer Copenhagen (modelo ABLP5).

O potencial de equilíbrio do próton (E_H) foi também estimado a partir do delta de pH, utilizando-se a equação de *Nernst* :

$$E_{H^+} = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[H^+]_{cis}}{[H^+]_{trans}} = 0.059 \cdot \Delta pH \quad (3.1.3)$$

Onde:

- $[H^+]_{CIS}$: concentração de prótons no compartimento CIS, em mol L^{-1} ;
- $[H^+]_{TRANS}$: concentração de prótons no compartimento TRANS, em mol L^{-1} ;
- R : constante dos gases, $8.31 \text{ joule mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$;
- T : temperatura, 300 K;
- Z : valência do íon, que no caso do próton é igual a +1;
- F : constante de Faraday, $96500 \text{ Coulomb mol}^{-1}$.
- ΔpH : delta de pH, diferença entre o pH em TRANS e o pH em CIS.

Todo material, equipamentos, vidrarias utilizados na formação de bicamadas, no preparo das soluções ou que entraram em contato com o sistema foram rigorosamente limpos.

A lavagem das câmaras foi efetuada com detergente, o enxague com água corrente seguido de álcool e água destilada e, no caso de vidros e metal também foi efetuado a flambagem.

3.2. Monitoramento elétrico da BLP com o amplificador de patch-clamp (modo voltage-clamp)

Para a monitoração elétrica foram usados um amplificador de patch-clamp (Dagan Instruments modelo 8900), com probe de 10 Gohm, configurado em voltage-clamp, acoplado a um osciloscópio digital Tektronix (modelo TDS340A). A voltagem em cada compartimento (CIS, TRANS) foi medida por meio de eletrodos de prata/cloreto de prata, previamente cloretados por imersão em hipoclorito de Na⁺.

O eletrodo de medida encontrava-se no compartimento TRANS e estava conectado no probe do amplificador, enquanto que o de referência encontrava-se no compartimento CIS e estava ligado ao terra da gaiola. Os dados de alguns experimentos foram convertidos para a forma digital através de uma interface A/D tipo Labmaster e adquiridos por um software (Axotape versão 2.0) por meio de um computador (**figura 2**).

O amplificador de patch-clamp quando no modo voltage-clamp possibilita a fixação de uma voltagem (V_{HOLD}) através da membrana. Para isso, os pontos 1 e 2 representados na **figura 3** são sempre mantidos a um mesmo potencial elétrico. Na presença de uma diferença de potencial elétrico (V_{HOLD}) ou gradiente de concentração iônica, tem-se corrente fluindo através da membrana e que, chegando até o ponto 4, faz com que o potencial do ponto 1 tenda a ficar diferente do potencial do ponto 2 e, portanto, para manter esses 2 últimos pontos no mesmo potencial, o amplificador deve injetar uma corrente pelo ponto 3 que coloca ou retira cargas do ponto 4. A corrente injetada é da mesma magnitude da corrente gerada pela membrana (I_m), porém de sinal contrário; e quando passa pela resistência de feed-back, gera uma voltagem (V_{out}). Portanto:

$$V_{out} = I_m \cdot R_{feed-back} \quad (3.2.1)$$

Os parâmetros avaliados em todos os protocolos experimentais foram a condutância (G) da BLP e corrente de curto-circuito (CCC) através da BLP.

Para a determinação da condutância, pulsos de voltagem (V_{HOLD}) entre -10 e -100 mV foram aplicados através da bicamada e a corrente (I_m) passando através da membrana foi determinada. A relação entre I_m e V_{HOLD} nos fornece a condutância da membrana (G_m):

$$G_m = \frac{I_m}{V_{HOLD}} \quad (3.2.2)$$

Para a determinação da CCC, a voltagem através da membrana foi fixada em zero.

A condutância foi sempre expressa em termos de área (condutância específica, G/A), pois assim permite a comparação entre bicamadas com áreas diferentes.

A condutância e a CCC, assim como o potencial de reversão da corrente foram também obtidos a partir de relações de Corrente *versus* Voltagem ($I \times V$), as quais eram realizadas através da aplicação de pulsos de voltagem entre -100 e 100 mV em etapas de 20 mV.

3.3. Monitoramento elétrico da BLP com o eletrômetro digital de alta impedância

A diferença de potencial elétrico (DP), resistência (R) e corrente de curto-circuito (CCC) transmembrana foram determinados através de um eletrômetro digital (Keithley, modelo 616), com uma impedância de entrada de 2×10^{14} ohm (**figura 4A**).

Foram usados eletrodos de prata/cloreto de prata (cloretoados pela imersão em hipoclorito de Na), sendo que o eletrodo de medida encontrava-se no compartimento TRANS e estava conectado ao eletrômetro, enquanto que o de referência encontrava-se no compartimento CIS e estava ligado ao terra da gaiola.

Os dados de alguns experimentos foram convertidos para a forma digital através de uma interface A/D tipo Labmaster e adquiridos por um software (Axotape versão 2.0) por meio de um computador.

O eletrômetro, no modo de voltímetro, fornecia a diferença de potencial elétrico através dos compartimentos.

A DP medida pelos eletrodos de Ag/AgCl, na presença de uma bicamada pode ser considerada como a soma de 3 DPs, conforme mostra a **Figura 4B**: - a DP

MATERIAIS E MÉTODOS

na interface do eletrodo 1 (potencial do eletrodo 1), - a *DP* gerada através da membrana - e a *DP* na interface do eletrodo 2 (potencial de eletrodo 2).

Quando a membrana é rompida, a *DP* instantânea é também a resultante de 2 *DPs*: (1) a determinada pela assimetria de eletrodos e ou gerada pela diferença da concentração de Cl^- nos dois eletrodos; (2) e o potencial de difusão na interface onde estava a membrana.

No caso de membranas submetidas a um gradiente de H^+ (produzido pela adição de ácido sulfúrico a um dos compartimentos aquosos), esta última *DP* seria a decorrente das diferentes mobilidades do próton e do sulfato.

Inicialmente era determinada a *DP* entre os compartimentos na ausência de membrana, ou seja, era verificado a assimetria de eletrodos, a qual era posteriormente subtraída da *DP* com a membrana. A assimetria de eletrodos ficou sempre abaixo de 2 mV.

Potencial de eletrodo

Antes da formação da BLP era determinado o potencial elétrico existente entre o par de eletrodos de Ag/AgCl, mergulhados numa mesma solução, para certificar que a *DP* de assimetria era menor que 2 mV. Caso contrário, o par de eletrodos era cloretado novamente.

O eletrodo de Ag/AgCl é um eletrodo reversível, pois está em equilíbrio químico com o meio onde se encontra. Este eletrodo consiste de um arame de prata revestido com uma fina camada de cloreto de prata. De modo a poder funcionar convenientemente o eletrodo deve ser imerso em uma solução que contenha o íon cloreto. A reação do eletrodo é:

O potencial de eletrodo em relação a solução é dado por:

$$V = 0.2222 - 0.05915 \log a_{\text{Cl}^-} \quad (3.3.1)$$

Onde, a_{Cl^-} é a atividade do íon cloreto na solução.

MATERIAIS E MÉTODOS

Quando um par de eletrodos de Ag/AgCl é usado para medir a *DP* através de uma membrana, a situação pode ser esquematizada pela **Figura 4B**.

A *DP* medida pelo eletrômetro é a diferença entre o potencial em 1 (CIS) e o potencial em 4 (TRANS):

$$DP = V_4 - V_1 \quad (3.3.2)$$

Mas,

$$(V_4 - V_1) = (V_2 - V_1) + (V_3 - V_2) + (V_4 - V_3) \quad (3.3.3)$$

Onde:

$$(V_4 - V_1) = DP \text{ total}$$

$$(V_3 - V_2) = DP \text{ transmembrana}$$

Por definição sabemos que:

$$V_1 - V_2 = 0.2222 - 0.05915 \log a_{Cl^- (CIS)} \quad (3.3.4)$$

$$V_4 - V_3 = 0.2222 - 0.05915 \log a_{Cl^- (TRANS)} \quad (3.3.5)$$

A equação para a *DP* total fica então:

$$V_4 - V_1 = (V_3 - V_2) + 0.05915 \log \frac{a_{Cl^- (TRANS)}}{a_{Cl^- (CIS)}} \quad (3.3.6)$$

Onde:

$$(V_4 - V_1) = DP \text{ total}$$

$$(V_3 - V_2) = DP \text{ transmembrana}$$

$$0.05915 \log (a_{Cl^- (CIS)} / a_{Cl^- (TRANS)}) = \text{soma da } DP \text{ nos dois eletrodos}$$

Na condição usual em que $a_{Cl^- (TRANS)} = a_{Cl^- (CIS)}$, temos que $V_4 - V_1 = V_3 - V_2$ e o instrumento fornece o potencial de membrana desejado.

Para que o potencial de eletrodo ficasse sempre abaixo de 1 a 2 mV, os eletrodos eram recloretados periodicamente.

Diferença de potencial transmembrana (V_m)

O eletrômetro, no modo de voltímetro, fornecia a diferença de potencial elétrico através dos compartimentos.

Se representarmos eletricamente uma membrana como um circuito composto por uma resistência (por exemplo, $R_m = 50 \times 10^9$ ohm) em série com uma bateria (por exemplo, $E_m = 60$ mV) e incluirmos neste circuito o eletrômetro ($R_{\text{eletrômetro}} = 10^{14}$ ohm) podemos prever qual será a DP fornecida pelo display do eletrômetro (**figura 5A**).

A corrente circulante é dada por:

$$i = \frac{E_m}{(R_m + 10^{14})} \quad (3.3.7)$$

Essa corrente, multiplicada pela "resistência interna" nominal do eletrômetro, fornece o valor lido no display digital, que coincide com a DP da membrana (V_m). Podemos calcular o valor desta voltagem, bastando para isso aplicar a lei de Ohm:

$$V_m = R_{\text{eletrômetro}} \cdot i = 10^{14} \cdot (6 \cdot 10^{-16}) = 60 \text{ mV} \quad (3.3.8)$$

Resistência elétrica das BLPs (R_m)

Para medir a resistência da membrana usando o eletrômetro, colocava-se o mesmo no modo de Ohmímetro. Neste modo o instrumento aplica ou injeta uma corrente determinada (1, 10 ou 100 picoAmperes) através da membrana, funcionando como um current-clamp. A corrente elétrica (I) é imposta pelo eletrômetro, o qual também fornece o valor da DP transmembrana (V_m) gerada. Tomando-se como exemplo a membrana representada na **figura 5B**, cuja bateria (E_m) é de 60 mV, se aplicarmos através desta membrana uma corrente de 1 pA e obtermos uma DP de 110 mV (lida no display do eletrômetro), a resistência da membrana será dada por:

$$R_m = \frac{(Display - E_m)}{(corrente imposta pelo eletrômetro)} \quad (3.3.9)$$

$$R_m = \frac{(0.050)}{(1 \times 10^{-12})} = 5 \times 10^{10} \text{ ohm ou } 50 \text{ gigaOhm}$$

Note-se que a *DP* obtida antes da aplicação do pulso de corrente, a qual corresponde a *DP* gerada pela bateria, deve ser subtraída da *DP* obtida com o pulso de corrente.

Os valores de resistência foram também convertidos para condutância (*G*), através da relação:

$$G = \frac{I}{R} \quad (3.3.10)$$

Determinação da corrente de curto circuito (CCC)

Para a determinação da *CCC*, o eletrômetro era colocado no modo de Amperímetro e o multiplicador era ajustado até obter-se uma leitura menor que 1 mV no display. Isto equivalia a reduzir-se a resistência do eletrômetro, até a obtenção de uma *DP* abaixo de 1 mV, produzindo um curto-circuito virtual na membrana.

Nestas condições, considera-se que a *DP* através da "resistência interna" do eletrômetro é igual a *DP* através da membrana.

Como conhecíamos a *R* do eletrômetro e a *DP*, novamente pela lei de Ohm, obtínhamos o valor da *CCC* (em ampere) como:

$$CCC = \frac{Display}{R_{eletrômetro}} \quad (3.3.11)$$

Se retornarmos à membrana representada na **figura 5A**, cuja bateria é de 60 mV e a resistência de 50×10^9 ohm, teremos uma *DP* fornecida pelo eletrômetro de 60 mV, porém se reduzirmos a resistência do eletrômetro de 10^{14} ohm para 10^8 ohm (**Figura 5C**), o novo valor da *DP* transmembrana será de 0.119 mV, ou seja, teremos uma condição de curto circuito e a *CCC* será:

$$CCC = \frac{(Display)}{(1 \cdot 10^8)} = \frac{(0.000119)}{(1 \cdot 10^8)} = 1.19 \text{ picoAmp}$$

3.4. Eletrômetro *versus* Amplificador de Patch-clamp (voltage-clamp) na monitoração elétrica de bicamadas lipídicas

Baseando-se em um modelo de condutâncias paralelas e independentes para o próton (G_H) e para uma via de vazamento inespecífica (G_V) e, portanto, não geradora de força eletromotriz ($E_V = 0$), pode-se calcular a DP espontânea medida pelo eletrômetro e a CCC medida pelo amplificador de patch-clamp (voltage-clamp) para vários valores de ambas as condutâncias.

A voltagem espontânea (V_m) através da membrana é dada pela equação:

$$V_m = \frac{(E_H G_H)}{(G_H + G_V)} \quad (3.4.1)$$

Segundo a equação 3.4.1 aumentando a condutância a próton obtemos um aumento da DP espontânea da membrana. Ao mesmo tempo, aumentando G_H a CCC aumenta, de acordo com a equação 3.4.2:

$$CCC = E_H \cdot G_H \quad (3.4.2)$$

Se utilizarmos como exemplo uma membrana com uma condutância de vazamento inespecífica de 50 pS e uma bateria de próton de 60 mV (**figura 6**), se a condutância da via de próton (G_H) for 1/10 da condutância inespecífica, a DP espontânea será de 5.4 mV e a CCC 0.3 pA, e neste caso o eletrômetro é de grande utilidade pois esta DP é mensurável com fidelidade, enquanto que uma corrente de 0.3 pA não é detectável com o amplificador de patch-clamp. Por outro lado, se a G_H fosse 5 vezes maior que a G_V , teríamos uma DP espontânea de 49 mV e uma CCC de 15 pA, a qual facilmente seria detectada pelo voltage-clamp. Porém, essa corrente também pode ser fornecida pelo eletrômetro, constituindo uma certa vantagem sobre o voltage-clamp, pois teríamos também o valor da DP espontânea não fornecido pelo voltage-clamp.

Portanto, o uso do eletrômetro digital de alta impedância possibilita uma melhor avaliação de bicamadas de baixa condutância ou expostas a pequenos gradientes de concentração, pois pequenas variações do potencial de membrana

podem ser medidas, ao passo que tais variações produziram correntes de curto-circuito abaixo da sensibilidade do amplificador de patch-clamp (menores que 1 pA).

Na determinação da resistência usando o método de voltage-clamp, o valor da corrente resistiva é obtido mais rapidamente, pois a constante de tempo associada a essa medida é muito menor para o voltage-clamp.

3.5. Medida da capacitância elétrica da bicamada lipídica plana

A capacitância da bicamada foi determinada pela aplicação de uma onda de voltagem triangular, a qual induziu o aparecimento de uma onda quadrada de corrente, denominada corrente capacitiva (I_C).

A voltagem triangular foi imposta por um gerador de função (Tektronix, modelo CFG 280), o qual estava conectado a entrada de voltagem de comando do amplificador de patch-clamp (Dagan Instruments modelo 8900). Utilizou-se um probe de 10 Gohm, configurado em voltage-clamp, estando a saída de corrente acoplada a um osciloscópio digital (Tektronix, modelo TDS 340 A) (**figura 7**).

A corrente capacitiva está correlacionada com a variação temporal da voltagem (dV/dt) através da capacitância da membrana (C_m):

$$I_C = C_m \frac{dV}{dt} \quad (3.5.1)$$

O pulso de voltagem triangular tinha 10 mV pico a pico, com um período de 0.2 segundos (frequência de 5 Hertz), produzindo desta forma uma variação da voltagem com o tempo (dV/dt) de 0.1 V/s.

A medida da capacitância foi essencial para o monitoramento da espessura do filme lipídico. A medida em que a espessura do filme lipídico se reduz, ou seja a membrana vai ficando “preta” (o que indica ser uma bicamada verdadeira), tem-se um aumento da área de bicamada no orifício, e portanto verifica-se um aumento da capacitância. A amplitude da corrente capacitiva aumenta até a área máxima da bicamada ser alcançada.

Para a comparação de bicamadas com áreas diferentes, torna-se necessário expressar a capacitância em termo de área, ou seja, capacitância específica.

Medidas de capacitância foram também utilizadas para se estimar a compressibilidade da BLP. Um pulso de voltagem era aplicado por meio do

Amplificador de Patch Clamp, e então avaliava-se o efeito da voltagem sobre a capacitância da bicamada.

Membranas contendo solvente apresentam capacitância voltagem-dependente (SCHOCH *et alii*, 1979). A capacitância aumenta com o quadrado da voltagem aplicada e é explicada por mudanças geométricas devidas à eletrocompressão, em que a espessura da BLP diminui por migração do solvente da bicamada para microlentes próximas ao tórus.

Portanto, voltagens quando aplicadas a BLP, promovem uma eletrocompressão da bicamada, diminuindo a distância entre as monocamadas e, portanto aumentando a capacitância da bicamada, que é dada por:

$$C_m = \epsilon \epsilon_0 \frac{\text{Área}}{\text{Espessura}} \quad (3.5.2)$$

Onde, ϵ e ϵ_0 são, respectivamente as constante dielétrica realtiva e a permitividade do vácuo.

Considerando a bicamada como um material elástico, se uma força deformante, ou seja, uma pressão (*stress*) é aplicada à membrana, está apresentará uma deformação (*strain*), que é representada por uma alteração da distância entre as duas monocamadas (espessura da bicamada).

A relação entre *stress* e *strain* fornece o módulo de elasticidade (E), ou também denominado de módulo Young (HALLIDAY *et alii*, 1997):

$$E = \frac{\text{Stress}}{\text{strain}} = \frac{P}{DL/L} \quad (3.5.3)$$

Onde:

- E : módulo de elasticidade ou de Young;
- DL/L : variação relativa de comprimento do material em resposta a pressão aplicada;
- P : pressão aplicada ao material.

Quanto maior o módulo de Young, mais resistente é um material à deformação, ou seja, é menos elástico

A capacitância da membrana (C_m) pode ser expressa em termos de área e espessura da bicamada (distância entre as monocamadas) é dada pela equação 3.5.2.

No nosso caso, a deformação foi dada essencialmente pela alteração da espessura (uma pequena fração pelo aumento de área) da membrana refletindo, portanto, uma variação da capacitância (DC_m), a qual foi então utilizada como medida indireta da deformação (supondo que a área da membrana permaneceu constante):

$$DC_m = \frac{(C_{-100\text{ mV}} - C_{0\text{ mV}})}{C_{0\text{ mV}}} \quad (3.5.4)$$

Onde:

- DC_m : variação da capacitância da membrana;
- $C_{-100\text{ mV}}$: capacitância da membrana medida com uma voltagem de -100 mV através da membrana;
- $C_{0\text{ mV}}$: capacitância da membrana medida na ausência de voltagem (zero de voltagem) através da membrana.

Já a pressão aplicada a membrana foi uma pressão elétrica associada com a voltagem, a qual foi calculada partindo-se da equação da energia armazenada em um capacitor (HALLIDAY *et alii*, 1997):

$$W = \frac{1}{2} C V^2 = \frac{1}{2} \epsilon \epsilon_o \frac{A}{d} V^2 \quad (3.5.5)$$

Onde:

- W : energia armazenada no capacitor;
- C : capacitância da membrana;
- V : voltagem aplicada (-100 mV);
- A : área da membrana (capacitor);
- d : distância entre as placas do capacitor (espessura da membrana: 5 nm);
- ϵ : constante dielétrica relativa da membrana (aproximadamente 2);
- ϵ_o : permissividade do vácuo (8.85×10^{-12}).

Derivando-se a equação 3.5.5 em relação a d e, supondo que os demais parâmetros se mantêm constante, obtém-se a força elétrica associada a aplicação da voltagem:

$$\text{Força elétrica} = \frac{1}{2} (V)^2 \epsilon \epsilon_0 \frac{A}{d^2} \quad (3.5.6)$$

Da equação 3.5.6 obtém-se a pressão de eletrocompressão como:

$$\text{Pressão elétrica} = \frac{1}{2} \epsilon \epsilon_0 \left(\frac{V}{d} \right)^2 \quad (3.5.7)$$

A pressão elétrica associada com uma voltagem de -100 mV, calculada pela equação 3.5.7 foi $3540 \text{ Newton m}^{-2}$.

Retornando ao módulo de Young e substituindo o *stress* pela pressão elétrica, e o *strain* pela variação da capacitância da bicamada, obteve-se o módulo de Young (E):

$$E = \frac{\frac{P_{eletrica}}{DC}}{C} \quad (3.5.8)$$

3.6. Fluxo isotópico de ácido graxo através da BLP

A transferência de ácido palmítico através de bicamadas foi medida determinando-se o fluxo de ^{14}C -ácido palmítico (DuPont) com atividade específica de 850 Ci mol^{-1} , a mais alta possível, levando-se em conta que corresponde a cerca de 13 carbonos marcados por molécula, conforme calculado a partir da meia-vida (5760 anos) do ^{14}C . As quantidades de traceador no lado CIS (hot), variaram entre $200000 - 1000000 \text{ CPM cm}^{-3}$ produzindo uma concentração máxima de ácido palmítico de $0.5 \mu\text{mole L}^{-1}$.

Bicamadas lipídicas planas foram formadas pelo método de MUELLER *et alii* (1963). O sistema empregado para a medida de fluxo foi o mesmo descrito anteriormente (**figura 1**), porém os experimentos foram realizados em circuito aberto, sem conexões elétricas nos compartimentos aquosos.

O diâmetro do orifício era maior (2 a 2.5 mm) e o compartimento TRANS era constituído de um frasco de vidro para minimizar a adsorção de ácido palmítico as paredes (AG adsorvem a plásticos) (MAILMAN & ROSE, 1990), o que poderia

MATERIAIS E MÉTODOS

diminuir o número efetivo de moléculas de AG na solução, comprometendo a contagem. As amostras do compartimentos TRANS (ou frio) também não entravam em contato com plástico.

A confecção do orifício no frasco de vidro foi realizado pelo método descrito por PROCOPIO *et alii* (1982).

Foram utilizadas membranas de DPhPC e azolecitina. Os fosfolípides encontravam-se diluídos em n-decano (2.5%).

Os potenciais de superfície de membranas com carga elétrica, em solução de 5 mM KCl tamponada com 5 mM Trizma base, foram determinadas pelo método de McLAUGHLIN *et alii* (1971), medindo-se a relação entre a condutância de membranas modificadas pela valinomicina antes e após a adição de Ba^{+2} ao banho (ver explicação adiante).

As soluções de ambos os compartimentos eram simétricas em composição, tinham volumes entre 2 e 3 ml e foram agitadas por meio de uma pulga magnética (lado CIS) e por meio de um jato de ar (lado TRANS), uma vez que o compartimento TRANS não podia entrar em contato com plásticos.

Em experimentos com membranas neutras (DPhPC), a solução empregada era de 150 mM NaCl + Trizma base 20 mM, titulada a pH 7.4. A solução utilizada para membranas carregadas (azolecitina) era KCl 5 mM + Trizma 5 mM e tinha um pH de 7.2 para diminuir a força iônica e aumentar o potencial de superfície negativo, uma vez que o fluxo de AG através de membranas poderia ser modulado pelo menor pH superficial em relação ao pH da bulk phase.

Amostras de 200 μ L eram retiradas do lado TRANS (frio) aos 15 e 30 ou 45 minutos após a introdução de ácido palmítico marcado no lado CIS (quente), enquanto que uma única amostra de 50 μ L era obtida do lado CIS (quente).

O uso dos intervalos de tempo acima foram determinados pela geometria do sistema e pela permeabilidade da membrana: 15 minutos era o intervalo de tempo mínimo para se obter uma contagem (CPM) estatisticamente significativa do lado TRANS e 45 minutos era, em geral, o tempo máximo de duração da membrana.

As amostras eram diluídas em Universol™ da INC Biomedicals e contadas em um contador Beckmann por emissão de partículas β , contando-se apenas partículas com energia superior a 20 keV.

A radiação de fundo (background), obtida pela contagem de amostras contendo apenas Universol (branco), era descontada das contagens das amostras.

Cálculo da Permeabilidade ao Ácido Palmítico

Os coeficientes de permeabilidade para o ácido palmítico através de bicamadas lipídicas planas foi calculada como:

$$Permeabilidade = \frac{Fluxo\ CPM\ (CPM\ s^{-1}\ cm^{-2})}{[CPM]_{CIS}\ (CPM\ cm^{-3})} \quad (3.6.1)$$

O fluxo em CPM é dado por:

$$Fluxo\ CPM = \frac{(totalCPM_{TRANS2} - totalCPM_{TRANS1})}{(D\ tempo\ x\ área)} \quad (3.6.2)$$

Onde:

- $(total\ CPM_{TRANS2} - total\ CPM_{TRANS1})$: diferença entre a CPM total entre 2 amostras TRANS consecutivas, por exemplo a amostra coletada aos 15 (CPM_{TRANS1}) e aos 30 minutos (CPM_{TRANS2});
- **D tempo**: intervalo de tempo entre a coleta das 2 amostras;
- **Área**: área da bicamada $\approx 3 \times 10^{-2}\ cm^2$.

A quantidade total de CPM no compartimento TRANS foi calculada da seguinte forma:

$$Total\ CPM_{TRANS} = (amostra\ CPM_{TRANS}) \times \left(\frac{volume_{TRANS}}{volume_{amostra}} \right) + \dot{a}\ CPM_{TRANS}\ prévias \quad (3.6.3)$$

Onde:

- **Amostra CPM_{TRANS}**: contagem em CPM obtida da amostra coletada em TRANS;
- **Volume_{TRANS}**: volume em cm³ do compartimento TRANS;
- **Volume_{amostra}**: volume em cm³ de amostra retirada de TRANS;
- **CPM_{TRANS} prévias**: somatório das contagens totais em CPM obtidas com as amostras anteriores.

Pode-se também obter o fluxo em moléculas de AG a partir do valores de contagem do lado TRANS (frio):

$$Fluxo = \frac{\text{total de moléculas de AG em TRANS}}{\text{Tempo(s)} \cdot \text{Área (cm}^2\text{)}} \quad (3.6.4)$$

A quantidade total de moléculas de AG em TRANS é por sua vez igual:

$$\text{Moléculas de AG em TRANS} = CPM_{\text{TRANS}} \cdot \text{atividade específica AP} \cdot \text{Avogadro} \quad (3.6.5)$$

Onde:

- CPM_{TRANS} : contagem no lado TRANS corrigida (subtraída da contagem do branco);
- Atividade específica (AP): atividade específica do ácido palmítico em mol/dpm;
- dpm: desintegrações por minuto, considerada igual a CPM.
- Avogrado: $6.02 \cdot 10^{23} \text{ moléculas mol}^{-1}$

Sabendo-se que 1 Curie corresponde a 3.7×10^{10} desintegrações por segundo, pode-se converter a atividade específica do ácido palmítico de Curie mol^{-1} para mol dpm^{-1} :

$$\text{Mol} \cdot \text{dpm}^{-1} = \frac{1}{(\text{Curie} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot 3.7 \times 10^{10}) \cdot 60 (\text{Seg})} \quad (3.6.6)$$

3.7. Comparação entre parâmetros cinéticos da transferência de AG em bicamadas lipídicas planas e vesículas.

Nós analisamos o “washout” de um AG de um compartimento esférico com volume V (lado CIS) através de uma área A para um reservatório externo infinito (lado TRANS), com uma “rate constant” k , para uma reação pseudounimolecular:

A partir da definição da constante k temos:

$$-\frac{d[AG]_{cis}}{dt} = k[AG]_{cis} \quad (3.7.1)$$

Rearranjando e integrando a equação 3.7.1 obtemos:

$$\frac{d[AG]_{cis}}{[AG]_{cis}} = -k dt \quad (3.7.2)$$

e, integrando, obtemos:

$$\int \frac{d[AG]_{cis}}{[AG]_{cis}} = -kt \quad (3.7.3)$$

dando, finalmente, a concentração de AG (no lado CIS) como função do tempo:

$$[AG]_{cis}^t = [AG]_{cis}^0 e^{-kt} \quad (3.7.4)$$

onde $[AG]_{cis}^0$ e $[AG]_{cis}^t$ são as concentrações de AG no tempo zero e no tempo t , no compartimento CIS.

Multiplicando ambos os lados da equação 3.7.1 pelo volume V , e dividindo pela área A obtemos o fluxo de moléculas de AG (em moles $s^{-1} cm^{-2}$) do compartimento interno CIS para o reservatório externo infinito.

$$-\frac{d[AG]_{cis}}{dt} \frac{V}{A} = \frac{V}{A} k [AG]_{cis} \quad (3.7.5)$$

Porém, a relação entre *Fluxo* e diferença de concentração de uma substância S através de uma membrana é o coeficiente de permeabilidade (P) da substância. Portanto podemos escrever, a partir da equação 3.7.5:

$$Fluxo\ de\ AG = k \left(\frac{V}{A} \right) [AG]_{cis} = P[AG]_{cis} \quad (3.7.6)$$

MATERIAIS E MÉTODOS

A partir da equação 3.7.6 obtemos:

$$P = k \left(\frac{V}{A} \right) \quad (3.7.7)$$

Como k e $t_{1/2}$ são relacionados por:

$$t_{1/2} = \frac{0.693}{k} \quad (3.7.8)$$

obtemos:

$$t_{1/2} = 0.693 \frac{V}{PA} \quad (3.7.9)$$

o qual é válido para qualquer geometria.

Para o caso particular de uma vesícula esférica, temos:

$$Volume = (4/3)\pi R^3$$

$$Area = 4\pi R^2$$

E, portanto a relação entre *rate constant* e permeabilidade para uma estrutura vesicular é:

$$Permeabilidade = k \frac{\text{raio vesicular}}{3} \quad (3.7.10)$$

Aplicando a equação 3.7.10 para o caso de uma bicamada lipídica plana de área igual a $3 \times 10^{-2} \text{ cm}^2$ separando um reservatório externo com um volume grande e um reservatório interno de volume de 2 ml, obtemos (usando a permeabilidade calculada a partir do fluxo isotópico de ácido palmítico = $8.8 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$):

$$t_{1/2} = 0.693 \frac{V}{PA} = \frac{0.693 \cdot 2}{(8.8 \cdot 10^{-6})(3 \cdot 10^{-2})} = 5.25 \cdot 10^6 = 60 \text{ dias} \quad (3.7.10 - A)$$

Logo, este sistema não é adequado para determinação de estudos cinéticos baseados no tempo de meia vida, o que justifica o uso de protocolos de fluxos de traceadores.

3.8. Densidade superficial de cargas (DSC) e potencial de superfície de bicamadas lipídicas planas

MAcLAUGHLIN *et alii* (1971) empregam um método para a determinação da densidade de carga de uma bicamada lipídica que se baseia na medida da condutância iônica desenvolvida por um protonóforo. Valores de condutância eram obtidos numa bicamada neutra de fosfatidilcolina (G_{nt}) e numa membrana negativamente carregada de fosfatidilserina (G_{carr}). O potencial de superfície, y_0 , era então determinado pela equação:

$$G_{carr} = G_{nt} \exp\left(\frac{-Fy_0}{RT}\right) \quad (3.8.1)$$

E empregado na equação abaixo para determinar a densidade de carga superficial, s (número de cargas eletrônicas por angstrom quadrado), da membrana carregada:

$$s = \frac{1}{272} \left[\sum_i a_i C_i \left(\exp\left(\frac{-ziFY_0}{RT}\right) - 1 \right) \right]^{1/2} \quad (3.8.2)$$

Pode-se estimar a densidade de carga em uma bicamada lipídica através de um experimento mais simples descrito por FORNÉS & PROCOPIO (1987) em que a condutância é medida em duas situações:

(1) Bicamada lipídica com valinomicina em solução bilateral de KCl na ausência de íons divalentes (condutância G_1);

(2) Bicamada lipídica com valinomicina em solução bilateral de KCl acrescida de íons Mg^{+2} (condutância G_2).

Este método também se baseia no fenômeno de “screening” que ocorre entre cátions e bicamadas fosfolípídicas negativas. O “screening” consiste num pareamento parcial entre as cargas positivas do íon e as cargas negativas do lípide que reduz o efeito observado na solução do potencial eletrostático da bicamada (como a sua condutância frente a um ionóforo). Íons divalentes têm um poder de “screening” muito maior do que íons monovalentes, aproximadamente 1000 vezes maior para o caso do íon Ca^{+2} (MAcLAUGHLIN *et alii*, 1971).

Consideremos uma membrana formada de fosfolípides com carga negativa, modificada pela valinomicina e contendo potássio no banho, como mostrado no diagrama da **figura 8**. Seja G_1 a condutância da membrana na condição inicial (situação 1) onde o meio banhante contém apenas íons potássio, porém está livre de íons divalentes. Ao adicionarmos certa quantidade de íons divalentes (situação 2), simetricamente, nas soluções banhantes da membrana, ocorrerá um “screening” das cargas fixas e uma diminuição sensível do potencial de superfície. Como consequência, diminui a concentração de íons potássio junto a superfície da membrana, de acordo com a distribuição de Poisson-Boltzmann. Na situação 2, portanto, a condutância G_2 da membrana será menor.

No caso de uma mesma membrana, com cargas de superfície negativas, o potencial de superfície pode ser modificado pela adição de cátions divalentes, sofrendo uma variação Δy_0 :

$$G_2 = G_1 \exp \left(\frac{-F \Delta y_0}{RT} \right) \quad (3.8.4)$$

Por sua vez, a densidade de carga, σ , é dada pela mesma equação empregada por MACLAUGHLIN *et alii* (1971) (equação 3.8.2).

Porém na situação 1 há somente íons monovalentes, enquanto que na situação 2 íons monovalentes e divalentes. Segundo dados de MACLAUGHLIN *et alii* (1971), a ligação a íons divalentes as cargas negativas da bicamada é desprezível em concentrações menores do que 10^{-3} M. Ou seja, a densidade de carga permanece constante nas duas situações.

Para provar a validade dessa hipótese fizemos um programa computacional iterativo (linguagem Quickbasic da Microsoft) (**listagem 1**) relacionando a variação de σ nas duas situações com diferentes valores de y_0 (**figura 9**). O potencial no qual $\sigma_1 - \sigma_2 = 0$ determinado pelo programa ($\sigma_1 - \sigma_2$) correspondia àquele determinado experimentalmente por MACLAUGHLIN *et alii* (1971), o que demonstra a validade do nosso método. Também o programa foi elaborado para calcular σ a partir do potencial da equação de y_0 (CEVC & MARSH, 1987):

$$y_0 = (-51.4 \text{ mV}) z^{-1} \ln (0.36 A_c c^{1/2}) \quad (3.8.5)$$

Onde, z é a valência do íon, A_c a área ocupada por uma carga negativa e c a concentração de eletrólito em moles l^{-1} .

O valor de s encontrado também concorda com aquele determinado através da equação 3.8.2, mostrando ser este método válido para se estimar densidade de carga e o potencial de superfície.

Determinação da DCS e potencial de superfície de BLPs

As soluções banhante e de fosfolípide foram as mesmas utilizadas nos experimentos de fluxo isotópico, bem como o arranjo experimental, somente sendo empregados frascos de polipropileno.

Antes da bicamada ser formada, 5 μL de solução 0.001 mg/ml de valinomicina (Sigma) eram adicionados à solução banhante. Pulsos de voltagem eram aplicados à BLP por meio de um amplificador de Patch-Clamp (Dagan 8900) tendo sua resposta condutiva acompanhada em um osciloscópio Tektronix TDS 340A.

Na determinação da DCS de BLPs de azolecitina não modificadas pelo ácido palmítico, após a estabilização da condutância da BLP eram adicionados simetricamente aos dois lados volumes iguais (20 μL) da solução aquosa de BaCl_2 1M. Com isso, ocorre o “screening” das cargas superficiais da BLP, diminuindo a concentração de potássio nas proximidades da BLP, o que reflete uma queda na condutância induzida pela valinomicina.

Como foi discutido acima, o “screening” não altera a DCS da BLP e a diferença de potencial de superfície antes e depois da adição de bário é proporcional ao logarítimo da razão entre as condutâncias da BLP antes e depois da adição de bário.

Por sua vez, na determinação da DCS em BLPs de azolecitina modificadas pelo AP o procedimento seguido foi o mesmo, somente sendo dissolvidos, na solução, 40 μL de solução etanólica de ácido palmítico (Sigma) 1 mg/ml juntamente com a valinomicina.

4 RESULTADOS

4.1 Permeabilidade de bicamadas lipídicas planas ao ácido palmítico, medida por fluxo isotópico.

A **figura 10** mostra a evolução típica da atividade isotópica na lado TRANS (frio), em 3 amostras experimentais. Devido ao enorme $t_{1/2}$ (equação 3.7.10 - A) associado ao processo, durante as primeiras horas após a adição de ácido palmítico marcado ao lado CIS (quente), as seguintes considerações podem ser feitas:

- (a) A atividade isotópica lado CIS é constante;
- (b) O aumento da atividade isotópica em TRANS é linear com o tempo.

Não identificamos, em experimentos preliminares, nenhuma tendência da atividade do lado frio *versus* o tempo desviar da linearidade.

A **tabela 1** mostra as permeabilidades das bicamadas de DPhPC e azolecitina ao ácido palmítico obtidas no nosso estudo, comparada com aquelas calculadas da literatura em vesículas unilamelares. Os coeficientes de permeabilidade para o ácido palmítico- ^{14}C através de BLPs foram calculados através das equações 3.6.1 e 3.6.2 apresentadas em **Materiais e Métodos**.

As permeabilidades para o ácido palmítico em vesículas unilamelares, usadas como comparação, foram estimadas a partir de valores reportados na literatura das constantes de desorção (k_{off}), usando a equação 3.7.10, também descrita em **Materiais e Métodos**.

No grupo de membranas carregadas (azolecitina), o potencial de superfície (Y_0)* em KCl 5 mM + Trizma 5 mM foi de -112.4 ± 11 mV (média $\pm$ desvio padrão) (n = 4).

Os resultados referentes a permeabilidade de bicamadas lipídicas planas ao ácido palmítico foram publicados na revista *Lipids* (ROMANO-FONTES *et alii*, 2000).

* Dado obtido por Fernando R. M. Abdulkader.

4.2 Efeito do ácido palmítico sobre parâmetros elétricos de bicamadas lipídicas planas.*

Bicamadas de Azolecitina não modificadas por AGs quando submetidas a um gradiente de pH apresentaram:

- (a) uma diferença de potencial elétrico (DP) com o lado de maior pH positivo em relação ao de menor pH;
- (b) corrente de curto-circuito (CCC) orientada do lado de menor para o de maior pH;
- (c) e um nível de condutância maior que a basal (condição sem gradiente de pH).

Todos esses parâmetros foram intensificados quando ácido palmítico (AP) era incorporado a bicamadas, indicando ser seu efeito um aumento na condutância ou na taxa de transporte de prótons.

Na condição de pH 7.4 bilateral, a condutância média basal das membranas de azolecitina era de $1.8 \text{ nS cm}^{-2} \pm 0.32$ ($n = 6$). O aumento da concentração de H^+ no compartimento CIS, e consequentemente, o aumento da concentração média de H^+ no interior da membrana, conduzia a um aumento da condutância em relação ao valor basal. Quando ácido palmítico era adicionado ao banho, na presença de gradiente de pH, verificava-se usualmente um aumento da condutância total da membrana, porém em alguns casos, foi verificado uma redução da mesma.

Em um experimento típico, onde a condutância basal da membrana de azolecitina era de 2.3 nS cm^{-2} , quando um gradiente de 3.56 unidades foi gerado pela acidificação do compartimento CIS, a condutância da membrana foi para 10.8 nS cm^{-2} . Com a incorporação de AP, a condutância estabilizou em $18.1 \text{ nS x cm}^{-2}$.

Como mostrado na **figura 11**, redução do pH no compartimento CIS em bicamadas lipídicas induzia sempre ao aparecimento de uma CCC , cujo sentido era do compartimento CIS para o TRANS, ou seja, que convencionamos designar como positiva. A incorporação de ácido palmítico a membranas sempre intensificava a CCC . Foram verificadas $CCCs$ maiores, tanto para membranas puras como para aquelas modificadas pelo ácido palmítico, quando o gradiente de pH ($\text{pH}_{\text{cis}} - \text{pH}_{\text{trans}}$) encontrava-se acima de 3 unidades.

* Dados obtidos em conjunto com Manoel Arcicio Miranda Filho.

RESULTADOS

O aumento da concentração de AP no banho, aumentava a CCC. Em um experimento típico, foi obtido uma CCC de 4 pA com uma concentração de AP no banho de 3.1×10^{-8} moles cm^{-3} e um gradiente de pH de 1.73 unidades. Quando a concentração de AP foi aumentada para 4.7×10^{-8} mol cm^{-3} , a CCC foi para 9.5 pA.

Em todas as condições experimentais, as membranas separavam soluções com concentrações iônicas idênticas, sendo o único gradiente presente o de ácido sulfúrico.

Supondo ser a membrana impermeável ao ânion sulfato, a CCC corresponderia ao fluxo de prótons e, portanto a relação entre a CCC e potencial de equilíbrio do próton (E_H) nos fornece a condutância a próton:

$$G_H = \frac{CCC}{E_H} \quad (4.2.1)$$

A **figura 12** mostra a G_H calculada pela equação acima, para vários gradientes de pH (ou E_H), produzidos pela acidificação do compartimento CIS (o pH em TRANS era fixado em 7).

A condutância a próton foi também estimada, usando a DP transmembrana fornecida pelo eletrômetro, ou seja, a voltagem através da membrana (V_m), e a condutância total da membrana (G_m), medida pela aplicação de um pulso de corrente (current-clamp) ou de voltagem (voltage-clamp). O V_m seria dado pela equação:

$$V_m = \frac{(E_H G_H)}{(G_H + G_V)} \quad (4.2.2)$$

Onde:

- G_H é a condutância da via de próton;
- G_V é a condutância de vazamento inespecífica;
- E_H é a potencial de equilíbrio do próton.

Admitindo-se que a condutância da via de vazamento não é afetada pelo pH do meio aquoso e nem pelo ácido palmítico, e que a condutância experimentalmente determinada (G_m) corresponde a soma da condutância a próton com a condutância da via de vazamento inespecífica, podemos obter o valor de G_H , rearranjando a equação 4.2.2:

$$G_H = \frac{V_m}{E_H} \cdot G_m \quad (4.2.2 - A)$$

A desvantagem em calcularmos a G_H por este método é que utilizaríamos o valor da G_m , o qual foi medido impondo-se ou uma voltagem ou uma corrente através da membrana. Nestas condições, a corrente medida não é apenas a corrente dada pelo fluxo de prótons.

Por outro lado, se usarmos a CCC para estimarmos a G_H não estaremos impondo corrente ou voltagem através da membrana, sendo esta corrente devido apenas ao fluxo de difusional de próton ou associado ao AG.

A **figura 13**, mostra a DP de membranas de azolecitina puras e das modificadas pelo AP como função do gradiente de concentração de prótons, o qual era gerado pela acidificação do compartimento CIS, sendo que o pH em TRANS em torno de 7.

As DP s medidas para ambas as membranas aproximavam-se mais do valor de E_H , quando o pH do compartimento CIS não era tão reduzido. Para gradientes de pH maiores, o que implicava em uma maior acidificação de CIS, a DP era muito menor que E_H . Porém para um mesmo delta de pH (mesmo pH em CIS) a DP de membranas com AP eram em torno de 15 mV maiores do que aquelas sem AP.

Interação do ácido palmítico com bicamadas modificadas pela valinomicina

A incorporação de ácido palmítico a bicamadas lipídicas planas de DPhPC ou de azolecitina modificadas pela valinomicina promoveu uma redução da condutância total destas membranas.

O efeito era mais pronunciado em membranas carregadas do que em neutras: o AP, quando incorporado a bicamadas de azolecitina modificadas pela valinomicina, promoveu reduções de 43 a 90% da condutância (**figura 14**), enquanto que em membranas neutras, a redução máxima foi de 44% (**figura 15**).

O AP promovia maiores reduções da condutância em membranas, cujo nível de condutância conferida pela valinomicina era menor. Em membranas com alto nível de condutância, o AP era menos eficaz em reduzir a condutância.

A albumina promovia uma recuperação da condutância inicial, provavelmente por retirada de ácido palmítico da membrana (**figura 16**).

RESULTADOS

As cargas superficiais parecem também influenciar a ação da valinomicina, pois membranas neutras quando comparadas com as carregadas em um meio aquoso com a mesma concentração de K^+ , requeriam uma dose de valinomicina de até 5 vezes maior para atingirem um mesmo nível de condutância.

Notar, que o nível de condutância de bicamadas de DPhPC modificadas pela valinomicina era menor do que das de azolecitina.

4.3 Efeito do ácido araquidônico sobre os parâmetros elétricos de bicamadas lipídicas planas.

A incorporação de ácido araquidônico a bicamadas de azolecitina promoveu um aumento da condutância total (medida em condições de voltage-clamp) de até 350 vezes em relação à condutância de bicamadas não modificadas. A condutância induzida pelo ácido araquidônico pareceu ser seletiva a H^+ pois, na presença de gradiente de concentração de prótons verificou-se o desenvolvimento de CCC, provavelmente resultante do fluxo de H^+ .

Supondo ser a condutância de bicamadas modificadas pelo ácido araquidônico exclusiva a próton, podemos prever a CCC obtida quando um gradiente de concentração de prótons é gerado através da membrana:

$$CCC_{prevista} = G_{experimental} \cdot 0.059 \cdot \Delta pH \quad (4.3.1)$$

A **figura 17** compara as CCCs experimentais de várias membranas modificadas pelo ácido araquidônico, obtidas com diferentes valores de gradientes de concentração de prótons, com CCCs previstas pela equação 4.3.1. Nota-se que a CCC experimental difere mais da prevista quando a condutância da membrana se encontra acima de 1000 nS cm^{-2} .

Relações corrente *versus* voltagem (IxV)

Relações IxV de membranas modificadas pelo ácido araquidônico em uma condição de pH 7.4 bilateral, mostraram ser supralineares, sendo que na presença de gradiente de concentração de prótons verificava-se em alguns casos uma intensificação da supralinearidade e em outros uma retificação sugestiva ser do tipo Goldman.

RESULTADOS

Devido a relação $I \times V$ de BLPs de azolecitina modificadas pelo ácido araquidônico não ser linear, a condutância considerada foi a obtida com voltagem zero ($G_{V=0}$), ou seja, a derivada da curva (dI/dV) no ponto zero.

A condutância na presença de gradiente de pH geralmente era intensificada, o que poderia ser atribuída a um maior carregamento do interior lipídico da membrana com ácido araquidônico, já que o equilíbrio ácido/base nestas condições é deslocado em direção da forma neutra do AG.

A relação $I \times V$ da membrana representada na **figura 18A** foi realizada em uma condição de pH 7.4 bilateral, e observou-se uma certa supralinearidade. Quando esta membrana foi exposta a um gradiente de 0.27 unidades de pH (pH em CIS menor que em TRANS) verificou-se o desenvolvimento de CCC e a supralinearidade, assim como a condutância, foram intensificadas (**figura 18B**). O E_H de 16 mV, obtido a partir do delta de pH, ficou muito próximo do potencial de reversão da corrente observado experimentalmente (em torno de 11 mV), o que sugere que o ácido araquidônico tornou a BLP seletiva a H^+ .

Quando o compartimento CIS apresentava uma maior concentração de prótons que o TRANS as correntes obtidas com voltagens negativas (TRANS negativo em relação a CIS) foram bem maiores que as obtidas com voltagens positivas (TRANS positivo em relação a CIS) e o contrário também era observado quando TRANS apresentava uma maior concentração de prótons. Logo, em condições de gradiente de concentração de prótons, verificava-se uma retificação sugestiva do tipo Goldman (**figuras 19, 20, 21, 22**). Portanto, foi realizado o “fitting” dos pontos experimentais para a equação de Goldman-Hodgkin-Katz (GHK) (STEN – KNUDSEN, 1978):

$$I = \frac{-P_{H^+} z^2 F^2}{RT} \frac{\left[C_{H^+}^{cis} - C_{H^+}^{trans} \exp\left[\frac{zFV}{RT}\right] \right]}{1 - \exp\left[\frac{zV}{RT}\right]} \quad (4.3.2)$$

Onde:

- I : corrente teórica;
- V : voltagem teórica;

RESULTADOS

- P_{H^+} : permeabilidade a H^+ da BLP de azolecitina modificada pelo ácido araquidônico;
- F : constante de Faraday (96500 Coulomb mol^{-1});
- z : valência do H^+ ;
- R : constante dos gases (8.31 joules. $\text{mol}^{-1} \text{T}^{-1} \text{K}^{-1}$);
- T : temperatura absoluta ($\approx 300 \text{ K}$);
- C_{cis}^H e C_{trans}^H : concentração de H^+ no lado CIS e TRANS, respectivamente.

Para a realização do “fitting” dos pontos experimentais para a curva de GHK, foi criado um programa em Quick Basic (**listagem 2**).

Os pontos experimentais mostrados nas **figuras 19 e 20** foram melhor adequados a curva dada pela equação de GHK, quando a permeabilidade a H^+ foi ajustada para 4×10^{-4} e $1.35 \times 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$, respectivamente. Com este valor da permeabilidade obteve-se a menor soma das diferenças dos quadrados.

Portanto o fitting dos pontos experimentais para a equação de GHK pode constituir um método para se calcular a permeabilidade a H^+ de bicamadas induzida pelo ácido araquidônico.

Foi testado também a possibilidade da BLP de azolecitina modificada pelo ácido araquidônico não ser apenas seletiva a H^+ , mas também ser seletiva, por exemplo a K^+ , o que contribuiria para um potencial de reversão diferente do potencial de equilíbrio do H^+ .

Na ausência de íons K^+ no meio aquoso, o ácido araquidônico conferiu condutância a BLP de azolecitina, a qual, portanto, pode ser atribuído ao transporte de H^+ pelo ácido araquidônico. As curvas IxV também apresentaram retificação sugestiva ser do tipo Goldamn (**figura 21 e 22**).

O fitting para a equação de GHK forneceu valores de permeabilidade de 1.5×10^{-6} e $3.1 \times 10^{-7} \text{ cm s}^{-1}$ (**figuras 21 e 22**, respectivamente).

Nas **figuras 19 e 20** os potenciais de reversão da corrente (25 e 45 mV, respectivamente), obtidos a partir da curva IxV, ficaram muito próximos dos potenciais de equilíbrio do próton (23 e 37.8 mV, respectivamente), assim como as CCCs experimentais (31 e 19 pA, respectivamente) das CCCs teóricas (37.8 e 25.9 pA) calculadas pela equação 4.3.1, portanto o ácido araquidônico parece ter tornado essas membranas altamente seletivas a próton. Por outro lado, as membranas

RESULTADOS

representadas nas **figuras 21 e 22** parecem não ser tão seletivas a próton, pois os potenciais de reversão da corrente (93 mV) ficaram abaixo dos potenciais de equilíbrio do próton (195.3 mV e 217 mV, respectivamente), e as CCCs teóricas (1074 e 1000 pA, respectivamente) foram superiores as experimentais (307 e 244 pA, respectivamente).

Devemos notar que o nível de condutância das membranas representadas pelas **figuras 21 e 22** eram muito maiores que das **figuras 19 e 20**, assim como o delta de pH (o pH em CIS era menor).

Efeito do ácido araquidônico sobre a compressibilidade elétrica de bicamadas

Membranas modificadas pelo ácido araquidônico, apresentaram as seguintes alterações no aspecto e durabilidade: desaparecimento do tórus e maior resistência a rutura.

Portanto, foram realizadas medidas de compressibilidade elétrica através da determinação da capacitância da membrana sem ácido araquidônico e com ácido araquidônico com voltagens de 0 e -100 mV.

A voltagem aplicada promovia eletrocompressão da bicamada, aumentando a sua capacitância por um efeito de diminuição de espessura e aumento de área. Porém na presença de ácido araquidônico o aumento da capacitância foi menor, ou seja, a bicamada ficou mais resistente à deformação induzida pela voltagem, sugerindo que este AG pode estar aumentando a rigidez das BLPs.

Em um experimento típico, a capacitância a voltagem zero de uma membrana de azolecitina pura era de $0.48 \mu\text{F cm}^{-2}$ e, com a aplicação de um pulso de -100 mV, a capacitância aumentava para $0.52 \mu\text{F cm}^{-2}$. Quando ácido araquidônico era incorporado a membrana, a capacitância com zero de voltagem era de $0.54 \mu\text{F cm}^{-2}$ e a medida com -100 mV, $0.55 \mu\text{F cm}^{-2}$. Os módulos de Young da bicamada pura e da modificada pelo ácido araquidônico eram iguais a 0.283×10^5 e 0.658×10^5 Newton m^{-2} , respectivamente.

A menor compressibilidade da bicamada modificada pelo ácido araquidônico pode ser verificada pelo maior valor do módulo de Young dessas bicamadas em relação aquelas constituídas apenas por azolecitina.

RESULTADOS

4.4 Permeabilidade a próton de bicamadas lipídicas planas

A partir dos valores de *CCC* calculamos a permeabilidade a H^+ (P_{H^+}) das membranas de azolecitina não modificadas por AG e a permeabilidade aparente a H^+ ($P_{H^+}^{aparente}$) de membranas modificadas pelo ácido palmítico ou araquidônico. Para tal, convertemos a *CCC* em fluxo de H^+ :

$$\text{Fluxo de } H^+ = \frac{CCC}{F} = P_{H^+} D[H^+] \quad (4.4.1)$$

de onde obtemos a permeabilidade ao próton (P_{H^+}) explicitamente como:

$$P_{H^+} = \frac{CCC}{FD[H^+]} \quad (4.4.2)$$

A permeabilidade aparente a H^+ de bicamadas de azolecitina modificadas pelo ácido araquidônico foi também obtida a partir do “fitting” dos pontos experimentais da curva IxV para a curva dada pela equação de GHK.

A permeabilidade a H^+ tanto de membranas de azolecitina não modificadas por AG (**figura 23 A**) como das modificadas pelo ácido palmítico (**figura 23 B**) ou ácido araquidônico (**figura 23 C**) mostrou ser fortemente dependente do pH, sendo obtidos valores maiores com pHs mais alcalinos.

A um mesmo pH, a permeabilidade de bicamadas de azolecitina modificadas pelo ácido araquidônico era maior que das modificadas pelo ácido palmítico que por sua vez era maior que de membranas puras (sem AG). Por exemplo, a um pH em CIS de 6.66 e em TRANS de aproximadamente 7, as permeabilidades a próton de uma bicamada de azolecitina pura, de uma modificada pelo ácido palmítico e de uma modificada pelo ácido araquidônico eram de 5.66×10^{-5} , 4.28×10^{-4} e $2.72 \times 10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$, respectivamente.

4.5 Interrelações entre flip-flop do ânion palmitato, permeabilidade aparente ao próton e corrente de curto-circuito.

A "rate constant" de flip-flop do ânion palmitato (K_{ff} , em seg^{-1}) entre os dois hemi-folhetos de uma bicamada lipídica pode ser definida pela equação abaixo que exemplifica o caso de transições CIS para TRANS (**figura 24**):

$$K_{ff} = \frac{\text{flip-flop rate}_{(CIS \rightarrow TRANS)}}{[\text{palmitato}]_{CIS}} \quad (4.5.1)$$

Flip-flop rate corresponde à taxa de flip-flop que pode ser expressa como a taxa de variação temporal da concentração superficial do ânion do AG no folheto CIS ou TRANS (em $\text{moles cm}^{-2} \text{ seg}^{-1}$). Há conservação do ânion no interior da bicamada, ou seja:

$$\text{flip-flop rate} = \frac{d[\text{palmitato}]_{TRANS}}{dt} \quad (4.5.2)$$

A *flip-flop rate* também pode ser expressa como o *fluxo* do ânion do AG entre os folhetos CIS e TRANS da bicamada (em $\text{moles seg}^{-1} \text{ cm}^{-2}$).

$$\text{Flip-flop rate} = J_{\text{palmitato}} (CIS \rightarrow TRANS) \quad (4.5.3)$$

Pela definição de *rate-constant* tem-se que:

$$\text{Flip-flop rate} = k_{ff} ([\text{palmitato}]_{CIS}) \quad (4.5.4)$$

O diagrama da **figura 24** descreve a condição de gradiente de concentração de próton através da membrana modificada pelo ácido palmítico, supondo-se que ocorre um acoplamento praticamente total entre os fluxos de próton e o ânion do AG. A membrana é mantida a uma voltagem igual a zero (condição de curto-circuito).

Se a maior concentração de prótons é no lado CIS então ocorre formação de ácido palmítico no folheto CIS (etapa 2), seguido de flip-flop para o hemi-folheto TRANS (etapa 3). O próton desliga-se do palmitato indo para a solução TRANS e um ânion palmitato é regenerado (etapa 1) no folheto TRANS, sofrendo flip-flop em

RESULTADOS

direção ao folheto CIS. Nesta etapa gera-se a corrente de curto-circuito no interior da membrana e fecha-se o ciclo. Neste ciclo ocorre transporte de próton de CIS para TRANS e ciclamento do ânion palmitato entre os dois hemi-folhetos da membrana. O fluxo TRANS $\rightarrow$ CIS de palmitato que gera a CCC é movido pelo gradiente de concentração de palmitato que se estabelece entre os folhetos CIS e TRANS. Devido ao continuo aporte de ácido palmítico ao folheto TRANS (etapa 2) este folheto mantém, supostamente, uma concentração mais alta de palmitato que o folheto CIS.

Supondo um acoplamento de 100% entre fluxo de próton e de palmitato temos que:

$$\text{Fluxo de próton} = \text{Flip-flop rate} \quad (4.5.5)$$

Por sua vez, o fluxo de próton (em $\text{mol s}^{-1} \text{cm}^{-2}$) pode ser expresso como:

$$\text{Fluxo de próton} = \frac{CCC}{F} = P_H^+ \cdot D[H^+] \quad (4.5.6)$$

onde P_H^+ é a *permeabilidade* da membrana ao próton, $D[H^+]$ é a diferença de concentração de próton entre as soluções CIS e TRANS (em moles de íon H^+ por cm^3), CCC é a corrente de curto-circuito veiculada pelo fluxo de próton (em Ampere/ cm^2) e F é a constante de Faraday.

Igualando as equações 4.5.4, 4.5.5 e 4.5.6, podemos escrever:

$$P_H^+ \cdot D[H^+] = k_{ff} \cdot ([\text{Palmitato}]_{CIS}) \quad (4.5.7)$$

Mas, por sua vez:

$$[\text{Palmitato}]_{CIS} = \left(\frac{1}{2}\right)[PA]_{sol(CIS)} b_{PA} \left(\frac{d}{2}\right) \quad (4.5.8)$$

Onde:

- $[PA]_{sol(CIS)}$ é a concentração total de palmitato (na forma de ânion palmitato e ácido palmítico) em moles cm^{-3} , na solução do lado CIS;
- b_{PA} é o coeficiente de partição do palmitato na bicamada lipídica, o termo $(1/2)$ descreve a dissociação de 50% do ácido palmítico a $\text{pH} = 7.4$;

RESULTADOS

- d é a espessura da membrana.

A partir das equações 4.5.6, 4.5.7 e 4.5.8 obtemos:

$$CCC = F P_H^+ D[H^+] = F k_{ff} [PA]_{sol(CIS)} \left(-\frac{1}{2}\right) b_{PA} \left(-\frac{d}{2}\right) \quad (4.5.9)$$

A equação 4.5.9 estabelece a interrelação entre a corrente de curto-circuito, a permeabilidade aparente ao próton e a constante de flip-flop do palmitato.

No exemplo abaixo demonstramos como os parâmetros da equação 4.5.9 são usados para interpretar um experimento típico, que demonstra ser a CCC medida muito próxima da CCC calculada pela taxa de flip-flop ($CCC_{flip-flop}$) e acoplamento de 100% entre palmitato e próton. A partir da equação 4.5.9 obtemos a CCC esperada teoricamente (em ampere) como:

$$CCC_{total} = F \cdot k_{ff} \cdot [PA]_{sol(CIS)} \cdot \left(-\frac{1}{2}\right) b_{PA} \left(-\frac{d}{2}\right) \cdot \text{área} \quad (4.5.10)$$

Utilizando dados da literatura e de nossos dados experimentais temos:

- $\text{área} = 9.15 \times 10^{-3} \text{ cm}^2$ (área da membrana experimental)
- $F = 96500 \text{ coulomb mol}^{-1}$
- $k_{ff} = 4 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ (GUTKNECHT, 1988)
- $[PA]_{sol(CIS)} = 8.6 \times 10^{-8} \text{ mol cm}^{-3}$ (dado experimental)
- $b_{PA} = 7 \times 10^4$ (GUTKNECHT, 1988)
- $(d/2) = 3 \times 10^{-7} \text{ cm}$ (espessura estimada de um folheto da bicamada)

Donde obtém-se que a CCC teórica ou estimada é:

$$CCC_{flip-flop} = 31.8 \text{ picoAmperes}$$

Por outro lado, a CCC experimentalmente medida nas mesmas condições, foi:

$$CCC_{experimental} = 27 \text{ picoAmperes}$$

RESULTADOS

Este exemplo, demonstra o poder desta técnica eletrofisiológica na obtenção de parâmetros cinéticos relacionados ao acoplamento de ácidos graxos e prótons.

A relação entre concentração de prótons e ácido palmítico na membrana, parece ser importante na obtenção de um acoplamento total entre próton e palmitato.

Em um experimento típico, onde inicialmente uma membrana de azolecitina é exposta a um gradiente de pH de 1.51 unidades, sendo o pH em CIS igual a 5.07 e em TRANS 6.58 (equivalente elétrico, E_H : 89.1 mV), observou-se um desenvolvimento de uma diferença de potencial elétrico transmembrana de 50 mV, uma condutância total (G_m) de 18.08 nS cm⁻² e uma CCC de 3.8 pA.

Quando AP foi incorporado a esta membrana, a CCC foi para 5 pA e a DP espontânea e a condutância total da membrana foram reduzidas para 42 mV e 7 nS cm⁻², respectivamente.

A CCC teórica, prevista pelo flip-flop do palmitato, foi de 4.96 pA, muito próxima da CCC experimental, indicando que o acoplamento entre palmitato e próton era elevado.

Após a incorporação de AP, a condutância da membrana a próton, calculada pela relação entre CCC e E_H , foi de 7.77 nS cm⁻², muito próxima da condutância total da membrana (G_m) determinada experimentalmente.

Portanto, nestas condições a G_m era exclusiva a próton, sendo determinada pelo flip-flop do ácido palmítico.

Como mostrado acima, CCC experimentais obtidas com AP eram iguais as teóricas apenas em determinadas condições, onde a concentração de prótons e de ácido palmítico na membrana pareciam ser importantes. Porém, para a maioria das membranas, as CCC experimentais eram menores que as teóricas, mas da mesma ordem de magnitude.

5. DISCUSSÃO

5.1. Permeabilidade de bicamadas lipídicas planas ao ácido palmítico, medida por fluxo isotópico

Nossos resultados indicam que a permeabilidade de bicamadas lipídicas planas ao ácido palmítico foi aproximadamente da mesma ordem de magnitude das calculadas para vesículas unilamelares (SUV e GUV) (**tabela 1**).

A presente comparação necessita uma interpretação cuidadosa, devido a controvérsia sobre a fase limitante no transporte de AG através de bicamadas fosfolipídicas e a diversidade da geometria destes sistemas de membranas.

Nossos experimentos mediram o fluxo isotópico de ácido palmítico ^{14}C , o qual inclui as 3 fases na translocação do AG: adsorção, flip-flop e desorção.

Geralmente assume-se que a fase de adsorção é mais rápida que as fases de flip-flop ou desorção, mas dúvidas ainda persistem quando se compara as taxas de flip-flop e desorção (KLEINFELD *et alii*, 1997).

A **tabela 1** compara a permeabilidade de bicamadas lipídicas planas ao ácido palmítico e os coeficientes de permeabilidade estimados a partir das constantes de desorção do ácido palmítico de vesículas, assumindo-se que a fase limitante é a desorção. Como pode ser inferido a partir da **tabela 1**, os valores de permeabilidade calculados para bicamadas lipídicas planas e vesículas são da mesma ordem de magnitude.

No grupo das membranas carregadas (azolecitina), o potencial de superfície (Y_0) em KCl 5 mM + Trizma 5 mM foi de -112.4 ± 11 mV (média $\pm$ desvio padrão) ($n = 4$), o qual corresponde a um aumento no pKa aparente de superfície dado pela equação (CEVC & MARSH, 1987):

$$DpKa = \frac{F}{2.3 RT} Y_0 = 2 \text{ unidades} \quad (5.1.1)$$

O que favorece a forma protonada do ácido palmítico na proximidade da membrana. Este efeito, supostamente aumenta o particionamento do ácido palmítico na matriz lipídica, porém a permeabilidade ao ácido palmítico de membranas de

azolecitina pouco diferiu da permeabilidade das de DPhPC, favorecendo a idéia de que a fase limitante na passagem de AG é ainda a desorção.

Diferenças entre a permeabilidade ao ácido palmítico em vesículas e em bicamadas planas poderia ocorrer devido a presença de solvente (ex: n-decano) nas bicamadas planas (vesículas não possuem solvente) e ao pequeno raio de curvatura das vesículas.

O pequeno raio de curvatura das SUV e LUV pode criar “mismatch” entre as áreas dos hemifolhetos interno e externo, aumentando a probabilidade de defeitos e levando a facilitação do flip-flop do AG (KLEINFELD *et alli*, 1997). Este último efeito poderia, por outro lado, não ser percebido devido a transferência lenta imposta pela desorção.

Em nossos experimentos, ambos os compartimentos aquosos tinham um pH fixo evitando-se, desta forma, uma redução do pH no compartimento TRANS observado nos estudos usando vesículas unilamelares, devido a entrada do AG. A redução do pH era associada ao “build-up” de potencial de difusão (KAMP & HAMILTON, 1993) que opor-se-ia a passagem de prótons.

5.2. Evidências elétricas do transporte de prótons por AGs

O ácido araquidônico e o ácido palmítico, quando incorporados a bicamadas lipídicas planas, promoveram alterações elétricas que indicam, provavelmente, a geração de um mecanismo adicional para a passagem de prótons através da matriz lipídica.

No caso do ácido araquidônico, verificamos um aumento da condutância total da membrana e, quando um gradiente de pH era gerado, o desenvolvimento de CCC e de um potencial transmembrana.

Já com o ácido palmítico, verificamos um aumento da CCC e da DP espontânea de bicamadas expostas previamente a um gradiente de pH. A condutância total da membrana nem sempre era intensificada, sendo algumas vezes até reduzida.

Para interpretar tais dados experimentais, utilizamos um modelo elétrico da membrana contendo uma via específica ao próton em paralelo a uma via de vazamento não geradora de voltagem. Segundo este modelo, a DP transmembrana

DISCUSSÃO

fornecida pelo eletrômetro ou o potencial de reversão obtido das curvas IxV, equivalem a DP de circuito-aberto, simbolizada por (V_m) , e dada pela equação:

$$V_m = \frac{(E_H G_H)}{(G_H + G_V)} \quad (5.2.1)$$

Onde:

- G_H é a condutância da via de próton;
- G_V é a condutância de vazamento inespecífica;
- E_H é a potencial de equilíbrio do próton.

Em todas as condições experimentais, as membranas separavam soluções com concentrações iônicas idênticas, sendo o único gradiente presente o de ácido sulfúrico. Supondo ser a membrana impermeável ao ânion sulfato, a CCC teoricamente esperada é dada por:

$$CCC = E_H G_H \quad (5.2.2)$$

Qualquer fator que diminua a condutância da via de vazamento e ou aumente a condutância da via de H^+ fará com que o V_m fique mais próximo do valor do E_H e aumentará a CCC , ou seja, aumentará a seletividade da membrana a próton.

Admitindo-se que a condutância da via de vazamento inespecífica, não é afetada pelo pH do meio aquoso e nem por efeito de AGs, podemos, então afirmar que a incorporação de AGs a bicamadas, provavelmente promovia um aumento da condutância a próton, tornando a membrana mais seletiva a próton.

Porém, nem sempre o aumento da seletividade a próton era facilmente evidenciado. Um fator muito importante na determinação de uma maior ou menor seletividade a próton, tanto para membranas puras como para as modificadas por AG, era o pH do meio aquoso.

Tanto membranas puras, como aquelas contendo ácido palmítico apresentavam potenciais de membrana mais próximos dos valores dos E_H , quando o compartimento CIS não era tão acidificado, ou seja quando a concentração média de prótons no interior da membrana era menor (**figura 13**). Nestas condições, V_m

DISCUSSÃO

aproxima-se bastante de E_H sugerindo que a membrana era totalmente seletiva a prótons, e a condutância da membrana seria igual a condutância a próton.

Já nas membranas modificadas pelo o ácido araquidônico, tínhamos um fator adicional: o nível de condutância total da membrana conferida pelo próprio ácido araquidônico. A seletividade a prótons era máxima quando a condutância conferida pelo ácido araquidônico encontrava-se abaixo de 1000 nS cm^{-2} , pois nestas condições a CCC experimental coincidia com a calculada pela equação 4.3.1 e o potencial de reversão da corrente com o potencial de equilíbrio do próton. Logo, podemos assumir que, nestas condições a condutância total da membrana seria igual a condutância a próton. Como será discutido adiante, talvez acima deste nível de condutância teríamos outras vias, geradas pelo ácido araquidônico, contribuindo para a condutância total da membrana.

Verificamos que para um mesmo gradiente de pH, a incorporação de AGs a membrana aumentava a permeabilidade aparente a próton, sendo a permeabilidade aparente a próton de membranas modificadas pelo ácido araquidônico muito maior do que aquelas com ácido palmítico (**figura 23**),consequentemente o ácido araquidônico promovia um maior aumento da CCC do que o ácido palmítico.

Segundo a equação 5.2.2, CCC maiores são obtidas quando é promovido um aumento do gradiente de pH (equivalente elétrico, E_H) e ou da condutância a próton. Logo, a G_H conferida a membranas pelo ácido araquidônico seria maior que a conferida pelo ácido palmítico.

A principal diferença entre o ácido palmítico e o ácido araquidônico, está nas duplas ligações presentes no araquidonato, ou seja, a presença de elétrons π . É conhecido que a habilidade de ácidos fracos, como o FCCP e CCCP, em transportar prótons se deve a presença de elétrons π , os quais delocalizam a carga dos ânions e aumentam a solubilidade dos ânions em um meio de baixa constante dielétrica (McLAUGHLIN & DILGER, 1980).

Portanto, a maior condutância a próton conferida pelo ácido araquidônico (quando comparada com a acido palmítico) pode ser devido a maior solubilidade do araquidonato no interior lipídico da membrana, o que favorece também o seu flip-flop. Enquanto que a carga do palmitato, por ser muito localizada, pode estar

DISCUSSÃO

restringindo o seu flip-flop, dificultando o desenvolvimento de uma condutância mensurável.

Por outro lado, a permeabilidade a próton, tanto de membranas puras como das modificadas por AGs, aumentava com a redução da concentração de prótons, ou seja, para um mesmo pH em TRANS, quanto menor era o pH em CIS, menor era a permeabilidade aparente a próton (**figuras 23**). Isto sugere que quanto maior a concentração média de prótons na membrana, menor é a permeabilidade da membrana ao próton. Segundo a equação abaixo, a condutância a próton destas membranas pode depender de modo complexo da concentração de prótons no meio aquoso, uma vez que fica na dependência do produto $P_H C_H$:

$$G_H = \left(\frac{zF^2}{RT} \right) P_H C_H \quad (5.2.4)$$

Nossos resultados, mostraram que, realmente, a G_H (calculada pela relação entre CCC e E_H), tanto de membranas puras como das modificadas pelo AP, praticamente se mantinha constante com o pH (**figura 12**). Quando o pH em CIS se aproximava de 7, a G_H mostrou uma tendência para valores um pouco maiores, o que poderia justificar a maior seletividade a próton (DPs expôntaneas mais próximas dos valores dos E_H) obtidas com estes valores de pH.

A dependência da permeabilidade a próton de membranas, tanto artificiais como biológicas, frente a concentração de prótons, é bem conhecida (GUTKNECHT, 1988, DEAMER & NICHOLS, 1989 e NAGLE, 1987), porém o mecanismo ainda não foi elucidado. Uma função protetora para a célula é facilmente reconhecível neste efeito. Uma queda excessiva do pH extracelular teria como consequência imediata uma acidificação do citoplasma caso a célula não dispusesse de mecanismos de "fechamento" da membrana ao excesso de íon H^+ .

Esta suposta proteção contra uma acidificação excessiva, parece ser mais uma função da matriz lipídica, independente da sua composição em AG, pois tanto membranas não modificadas por AG como as modificadas apresentaram permeabilidades a próton dependentes do pH aquoso.

O transporte de prótons por AGs pode adquirir uma grande importância em sistemas que utilizam gradientes de concentração de prótons como uma forma de armazenar energia, como a membrana mitocondrial interna. Altos níveis de AG livres na membrana poderiam aumentar a permeabilidade a próton, e consequentemente dissipar o gradiente de pH.

Nossos resultados mostraram que a permeabilidade a próton de membranas puras em um pH médio próximo de 7 (pH em CIS de 6.66 e em TRANS 7) era igual a $5.66 \times 10^{-5} \text{ cm s}^{-1}$, da mesma ordem de magnitude reportada para bicamadas planas e para vários tipos de vesículas fosfolipídicas (GUTKNECHT, 1984).

Portanto, a alta permeabilidade a próton quando comparada com outros íons, provavelmente não é causada por nenhum tipo específico de vesícula, método de preparação da membrana ou método utilizado para medir o fluxo de prótons.

Resumidamente, nossos experimentos até agora discutidos, permitiram concluir que:

- AGs quando incorporados a bicamadas lipídicas planas aumentam a seletividade dessas membranas a próton;
- A maior ou menor seletividade a próton de membranas puras como das modificadas por AGs, depende do pH do meio aquoso;
- Ácido araquidônico é mais eficaz em transportar prótons do que o ácido palmítico.

Mecanismo envolvido no transporte de prótons por AGs.

Supondo-se que o transporte de prótons, em uma membrana modificada por AG, ocorra apenas pela ação deste AG, propusemos um modelo para explicar a corrente gerada por voltagem e a corrente gerada por um gradiente de concentração de prótons, baseando-se para tal, nos modelos propostos por McLAUGHLIN & DILGER (1980) e por KAMP & HAMILTON (1993).

A corrente de membranas modificadas por AGs obtidas com a aplicação de um pulso de voltagem poderia se dar da seguinte forma (**figura 25**): sob a influência de um potencial negativo (lado TRANS negativo em relação ao CIS), ânions do AG sofreriam flip-flop da interface TRANS para a CIS (1). Este processo aumenta a concentração de ânion de AG na interface CIS (2), e consequentemente a sua taxa de protonação (3). Portanto a concentração da forma não ionizada do AG, também

eleva-se na interface CIS, e estas moléculas se difundem para a interface TRANS sob a influência de um gradiente de concentração (4).

O campo elétrico aplicado não tem influência sob a forma não ionizada do AG, por tratar-se de uma espécie neutra. Portanto, o aumento da concentração de forma não ionizada de AG na interface CIS, e consequentemente do flip-flop do AG, conduzirá a uma maior liberação de prótons para o compartimento TRANS (4).

Conforme verificamos, quando uma membrana modificada por AG, em curto-circuito, é submetida a um gradiente de concentração de H^+ , observa-se o desenvolvimento de uma corrente orientada do lado de menor pH para o de maior pH.

Nesta situação (**figura 24**), os prótons adicionados à interface CIS irão combinar-se com o ânion do AG (1) produzindo então um aumento da concentração da forma não ionizada na interface CIS (2), que se difundirá (flip-flop) a favor de um gradiente de concentração (3), e na interface TRANS deslocará o equilíbrio na direção da formação de ânion e H^+ o qual é liberado no lado TRANS (4).

Portanto, na interface CIS ocorrerá uma depleção da forma ionizada do AG enquanto que na interface TRANS um aumento, logo o gradiente de H^+ gerado inicialmente produz um gradiente transmembrana do ânion de AG, o qual direciona o seu flip-flop para a interface onde a concentração de H^+ é maior.

Resumidamente, o efeito primário de um gradiente de prótons é o aumento do da taxa de flip-flop da forma não ionizada, o qual induz secundariamente o aumento da taxa de flip-flop da forma ionizada no sentido oposto e na mesma proporção. Porém, se a constante de flip-flop do ânion do AG for menor que a da forma protonada, o transporte de prótons será limitado pela menor *rate constant*.

A corrente obtida com aplicação de voltagem pode, em princípio, ser regida por mecanismos diferentes da corrente obtida em curto-circuito (onde a força movente é o gradiente de próton), uma vez que não se conhece bem o mecanismo de transporte de carga em bicamadas, não sendo possível descartar-se a possibilidade de condução eletrônica (TI-TIEN, 1974). A voltagem aplicada acelera o flip-flop da forma ionizada do AG, e portanto o transporte de prótons.

5.3. Transporte de prótons em bicamadas lipídicas planas modificadas pelo ácido araquidônico

Bicamadas lipídicas planas de azolecitina modificadas pelo ácido araquidônico apresentaram níveis de condutância bem maiores do que aquelas livres de ácido graxo.

A condutância induzida pelo ácido araquidônico pareceu ser seletiva a prótons, pois na presença de gradiente de concentração de prótons foi verificado o desenvolvimento de corrente de curto-circuito, cuja intensidade e direção, estavam de acordo com o gradiente de pH imposto.

Mediante o exposto, surge a seguinte questão: como o ácido araquidônico interfere no transporte de prótons?

A hipótese mais provável seria aquela ilustrada na **figuras 24 e 25**: a combinação (1) do ânion araquidonato com o H^+ próximo a superfície da membrana, conduzindo à formação de ácido araquidônico (2), o qual realizaria o flip-flop, e ao atingir um novo equilíbrio, liberaria H^+ para a solução aquosa (3 e 4).

Por outro lado, produtos da peroxidação do ácido araquidônico catalizada por radical livre independente da ciclooxygenase (MORROW & ROBERTS II, 1993), poderiam também estar envolvidos no transporte de H^+ , já que o ácido araquidônico trata-se de um ácido graxo insaturado, o que o torna muito susceptível a peroxidação lipídica.

A peroxidação lipídica do ácido araquidônico produz hidroperóxidos com pelo menos 6 diferentes isômeros posicionas e, além do que tem sido proposto que lipídeos oxidados possam talvez apresentarem propriedades ionofóricas, permitindo que íons atravessem membranas (HALLIWELL & ARUOMA, 1993).

O meio lipídico da membrana poderia favorecer a peroxidação do ácido araquidônico, já que o encontro das espécies reativas (ácido araquidônico e oxigênio ou outro radical orgânico) é facilitada pela bicamada lipídica altamente ordenada (SUNAMOTO *et alli*, 1984). Em princípio, estas reações poderiam gerar transportadores de carga, não podendo ser descartada a possibilidade de geração de transportadores de elétrons, modulado por próton.

Membranas modificadas pelo ácido araquidônico tinham um aspecto peculiar: pareciam estar “fossilizadas” e apresentavam um tempo de duração maior. Medidas

de compressibilidade nos levam a supor que o ácido araquidônico confere as membranas maior rigidez.

Talvez, essa observação seja explicada por uma alteração da fluidez da membrana induzida pelo ácido araquidônico ou ainda por produtos da sua peroxidação, já que a geração de lipídios oxidados dentro do core hidrofóbico da membrana tem sido imputada como criadora de distúrbios entre as cadeias acil dos fosfolípides, aumento da rigidez da membranas e flip-flop de fosfolípides (SALGO *et alii*, 1992).

Como mostrado na **figuras 18A e 18B**, relações IxV de membranas de azolecitina modificadas pelo ácido araquidônico apresentaram supralinearidade, tanto com voltagens negativas como com voltagens positivas.

GUTKNECHT (1988) também reportou que membranas modificadas por AGs apresentavam curvas condutância/voltagem moderadamente supralineares, não tendo contudo apresentado qualquer explicação plausível.

Este desvio da linearidade poderia estar associado a indução de poros lipídicos (“defeitos”) na bicamada lipídica observados quando a membrana é submetida a grandes voltagens (BENZ *et alii*, 1979).

A supralinearidade das relações IxV das bicamadas modificadas pelo ácido araquidônico pode, em parte, ser atribuída a “defeitos” no core hidrofóbico induzidos pelo ácido araquidônico ou por produtos da sua peroxidação lipídica, os quais seriam intensificados pela voltagem. Esses “defeitos” poderiam conter água, constituindo “protons wire” por onde prótons se difundiriam.

Um outro produto da peroxidação lipídica do ácido araquidônico, o aldeído 4-hidroxiálquenal (HNE), já foi identificado. Trata-se de uma molécula fortemente eletrofílica, e que portanto pode reagir com grupos amino de fosfolípideos (HALLIWELL, 1993). Logo não podemos descartar a hipótese de que o HNE possa estar reagindo com os fosfolípides da bicamada, alterando a sua dinâmica e também induzindo “defeitos” no core hidrofóbico.

O ácido araquidônico, mais precisamente, o HNE poderia estar conferindo as bicamadas condutância eletrônica, o que também justificaria a supralinearidade. O HNE por ser eletrofílico não transportaria prótons, mas ao reagir com uma molécula

DISCUSSÃO

nucleofílica (por exemplo, fosfolípide ou até mesmo ácido araquidônico), atuaria como transportador de elétrons.

Portanto, a condutância conferida pelo ácido araquidônico a bicamadas de azolecitina pode apresentar 3 componentes:

- condutância específica a prótons, gerada pelo ácido araquidônico ou por produtos da sua peroxidação lipídica (hidroperóxidos): deve gerar CCC em resposta a um ΔpH e gera corrente em resposta a uma variação de voltagem (ΔV).
- condutância a prótons inespecífica gerada pelos “protons wire” presentes em “defeitos” no core hidrofóbico da bicamada induzidos pelo ácido araquidônico ou por produtos da sua peroxidação: pode não gerar CCC em resposta a um ΔpH mas, gera corrente em resposta a um ΔV .
- condutância eletrônica gerada por produtos da peroxidação do ácido araquidônico (aldeídos, como por exemplo o HNE): pode não gerar CCC em resposta a um ΔpH mas, gera corrente em resposta a um ΔV .

As duas últimas condutâncias poderiam explicar a supralinearidade dessas membranas.

Parte da condutância conferida pelo ácido araquidônico a BLPs de azolecitina pode ser também devido a íons K^+ , porém a contribuição da condutância a K^+ para a condutância total da membrana deve ser muito pequena, pois como mostrado nas **figuras 21 e 22**, mesmo na ausência de K na solução aquosa foi verificado desenvolvimento de condutância significativa.

Qual é o componente que maior contribui para a condutância da BLP de azolecitina modificada pelo ácido araquidônico?

Pode ser que, inicialmente a membrana desenvolva uma condutância a H^+ induzida pelo ácido araquidônico. A membrana torna-se apenas seletiva a próton. Como mostrado nas **figuras 19 e 20**, as relações $I \times V$ realizadas nesta etapa apresentariam CCC e potencial de reversão da corrente muito próximos dos previstos teoricamente a partir da equação 4.3.1 e da equação de Nernst, respectivamente.

Com o decorrer do tempo, um nível de condutância maior é alcançado e a seletividade a próton é perdida. Como mostrado nas **figuras 21 e 22**, relações $I \times V$ realizadas nesta etapa, apresentariam CCC experimentais menores que a prevista pela

DISCUSSÃO

equação 4.3.1, e potencial de reversão da corrente abaixo do potencial de equilíbrio do próton.

A perda da seletividade a prótons parece estar associada a um aumento da condutância total da membrana, como pode ser visto na **figura 17** onde membranas com condutância acima de 1000 nS cm^{-2} apresentaram *CCC* experimentais menores que as previstas pela equação 4.3.1. Essa excessiva condutância poderia ter, como mencionado acima, além do componente determinado pelo transporte de prótons pelo ácido araquidônico, outros dois componentes que tornariam a membrana menos seletiva a próton: a condutância eletrônica (dependente de próton) e a condutância associada a “defeitos” no core hidrofóbico induzidos pelo ácido araquidônico e ou produtos da sua peroxidação lipídica.

Esta última condutância pode ter sido proporcionada por uma transição de fase induzida pelo ácido araquidônico, onde um número maior de defeitos na matriz lipídica e a permeabilidade alcançam o seu máximo (LANGNER & HUI, 2000). O que é plausível, pois dados de compressibilidade elétrica sugerem que o ácido araquidônico torna as membranas mais “rígidas”, portanto de alguma forma altera a dinâmica da bicamada, provavelmente induzindo uma transição de fase ou até mesmo a coexistência de ambas as fases de gel e cristal líquido.

Nas **figuras 21 e 22** onde a seletividade a próton parece ter desaparecido, o pH em CIS era em torno de 3, bem abaixo do pH das membranas que eram seletivas a H^+ (**figuras 19 e 20**). Portanto, não devemos descartar a hipótese de que o aumento da concentração de prótons no meio aquoso poderia estar induzindo alterações na dinâmica da membrana, como por exemplo, transição de fase, e portanto aumentando a condutância inespecífica da membrana.

Em alguns experimentos preliminares, observamos oscilações do potencial de bicamadas, induzidos pela combinação de alta concentração de próton no lado CIS e aplicação de corrente durante certo período de tempo. Tal comportamento da membrana poderia ser um indicio de transição de fase, pois oscilações de potencial tem sido atribuídas a repetitivas transições de fase entre dois estados da membrana: um de alta e outro de baixa resistência. A repetitiva adsorção e desorção de prótons pelos grupamentos lipídicos ácidos dos fosfolípides induziriam tais oscilações: a adsorção estabilizaria a fase gel e a desorção a fase de cristal líquido, sendo a

DISCUSSÃO

permeabilidade iônica diferente em cada uma destas fases (YAGISAWA *et alii*, 1993).

Sabe-se, também que a protonação dos grupos polares dos fosfolípides aumenta a temperatura de transição e diminui a hidratação dos mesmos (CEVC & MARSH, 1987).

Em vesículas neutras multilamelares de diacilfosfatidilcolina a redução do pH do meio aquoso, aumenta a protonação dos grupamentos fosfato tornando a superfície das vesículas carregada positivamente. Esta protonação tem 2 consequências: o fosfolípide passa de um estado neutro para carregado; e a energia livre de interação do segmento hidrofílico com a água é modificada. O resultado final é uma alteração da estrutura e organização dos fosfolípides no interior da membrana, conduzindo a um aumento da temperatura de transição da fase de gel para a fase de cristal líquido (FURUIKE *et alii*, 1999).

Portanto, poderíamos estar a frente de uma alteração da dinâmica da BLP, como por exemplo, uma transição da fase fluida cristalina para a de gel ou até mesmo uma separação de fases, ou seja, a coexistência de ambas as fases fluidas e gel. Tais alterações poderiam ser induzidas pelo ácido araquidônico ou por produtos da sua peroxidação lipídica e intensificadas pelo baixo pH.

Observamos, nos protocolos com gradiente de pH, retificação do tipo Goldman (**figuras 19, 20, 21 e 22**), tanto para membranas que pareciam ser seletivas a próton como com aquelas, cuja seletividade parecia ter desaparecido.

A retificação do tipo Goldman é verificada quando se tem assimetria de concentração ao longo da membrana. No nosso caso, onde o compartimento CIS apresentava maior concentração de H^+ , a aplicação de um pulso de voltagem negativo no compartimento TRANS, movia prótons de CIS para TRANS, aumentando a concentração média de prótons na membrana. Por outro lado, quando uma voltagem positiva era aplicada ao compartimento TRANS, a concentração média de prótons no interior lípido era menor, ou seja, semelhante a concentração do lado TRANS. Portanto, tínhamos uma variação da concentração média de prótons no interior lipídico da membrana em função da voltagem aplicada, decorrente da assimetria de concentração do próton.

A condutância depende do produto da permeabilidade ao íon em questão pela concentração do íon no plano da membrana, o que está condizente com os dados experimentais onde a concentração de prótons era maior no compartimento CIS e a condutâncias eram maiores com voltagens negativas do que com voltagens positivas. Já quando a concentração de prótons era maior no compartimento TRANS, a condutância com voltagens positivas foi maior que a condutância com voltagem negativas.

A realização do "fitting" dos pontos experimentais para equação de Goldman-Hodgkin-Katz nos permitiu estimar a permeabilidade aparente a próton induzida pelo ácido araquidônico, a qual mostrou uma dependência com pH e para um mesmo pH, era maior que a permeabilidade a próton de membranas livres de AG e daquelas modificadas pelo ácido palmítico (**figuras 23C**).

Verificamos que em um pH próximo de 7 (pH em CIS 6.88 e em TRANS 7.11), a permeabilidade aparente a próton de uma membrana modificada pelo ácido araquidônico era aproximadamente igual $1.4 \times 10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$, sendo portanto, comparável à permeabilidade de membranas acopladoras que é da ordem de $10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$ (NICHOLS & DEAMER, 1980).

Nos experimentos onde foram verificados retificação do tipo Goldman, a supralinearidade não estava presente. Provavelmente a retificação mascarou a supralinearidade, devido o transporte de H^+ pelo ácido araquidônico ou por produtos da sua peroxidação lipídica ter sido intensificado pelo gradiente de pH.

Nesta etapa do trabalho usamos apenas membranas de azolecitina, cuja carga superficial negativa deve-se aos 8% de difosfatidilglicerol (cardiolipina) presente na azolecitina.

HOCH (1998) tem atribuído a cardiolipinas um papel importante no transporte de H^+ : as cardiolipinas atuam como uma “antena de prótons” na superfície externa das membranas, captando H^+ e os transferindo para agentes protonóforos ou para espaços contendo água (“protons wire”) presentes na membrana.

Portanto, a cardiolipina nas BLPs de azolecitina pode estar captando prótons da solução e transferindo-os para o ácido araquidônico presente no interior

DISCUSSÃO

hidrofóbico da membrana; e ou para água contida em “defeitos” induzidos pelo ácido araquidônico.

Logo, a natureza da membrana pode influenciar a condutância induzida pelo ácido araquidônico em BLPs. Talvez a cardiolipina possa estar intensificando o efeito do ácido araquidônico, e consequentemente membranas sem cardiolipina poderiam apresentar um nível menor de condutância a prótons.

Os efeitos do ácido araquidônico em bicamadas planas até agora verificados, podem também estar ocorrendo em membranas biológicas, sendo de suma importância, principalmente durante a sinalização intracelular, onde grandes quantidades de ácido araquidônico livre são produzidos.

Em algumas células (ex: miócitos cardíacos), a hidrólise acelerada de fosfolípidos celulares endógenos é altamente seletivo para fosfolípidos contendo ácido araquidônico. Portanto, em membranas plasmáticas de células ativas tem-se um acúmulo, pelo menos transitoriamente, de uma quantidade substancial de ácido araquidônico durante a estimulação celular (CHEN *et alli*, 1993).

Resumidamente, os nossos resultados conduzem aos seguintes pontos:

- ácido araquidônico confere a bicamadas de azolecitina seletividade a próton: aumenta a condutância e, na presença de gradiente de concentração de prótons, verifica-se desenvolvimento de CCC e potencial de membrana. Porém, quando a condutância conferida a membrana é muito elevada (geralmente acima de 1000 nS cm⁻²) verifica-se perda da seletividade a próton;
- Relações IxV dessas membranas são supralineares e na presença de gradiente de pH passam a apresentar retificação do tipo Goldman;
- O ácido araquidônico aumenta a rigidez das membranas de azolecitina;
- O ácido araquidônico aumenta a permeabilidade aparente a próton de bicamadas de azolecitina, sendo que permeabilidades maiores eram obtidas com pHs maiores.

5.4. Evidências elétricas do flip-flop do ácido palmítico: comparação entre CCC experimentais com as teóricas previstas pelo flip-flop do ácido palmítico (AP).

As CCC experimentais foram comparadas com CCC teóricas ($CCC_{flip-flop}$) calculadas a partir da *rate constant* de palmitato encontrado na literatura.

Usualmente, a $CCC_{flip-flop}$ obtidas com o ácido palmítico eram superiores as experimentais, porém eram da mesma ordem de magnitude (picoampères).

Fatores como concentração de prótons e de ácido palmítico na membrana parecem ser importantes no acoplamento entre palmitato e próton, pois quando uma concentração de ácido palmítico menor foi utilizada, assim como um pH maior em CIS, a CCC experimental igualou-se a teórica prevista pelo flip-flop do palmitato. Como no exemplo mostrado em **Resultados**, onde a CCC experimental foi igual a 5 pA e a teórica fornecida pelo flip-flop do AP 4.96 pA .

Para interpretar tais resultados consideremos, inicialmente, uma membrana não modificada por AP, exposta a um gradiente de concentração de prótons, como mostrado no diagrama da **figura 26A**. A passagem de prótons através desta membrana se daria através de diferentes mecanismos, como densidades flutuacionais, *proton wire*, tHBC, que poderíamos englobar num *fluxo difusional*, o qual por sua vez apresentaria dois componentes:

(1) um *fluxo difusional simples*, que geraria CCC em resposta a um gradiente de concentração de próton e corrente em resposta a um campo elétrico aplicado externamente;

(2) um *fluxo difusional complexo* que envolveria diferentes mecanismos, entre os quais condução eletrônica. Neste mecanismo, o próton, em combinação com algum outro fator (X, que poderia ser uma espécie nucleofílica), contribuiria para a veiculação de carga elétrica na presença de um campo elétrico mas, não gera corrente em resposta a um gradiente de pH, ou seja, não gera CCC .

Portanto, de acordo com a hipótese acima, em uma membrana pura (sem ácido graxo), a CCC observada em resposta a um gradiente de pH deve-se ao fluxo difusional simples e, portanto depende da condutância gerada por este fluxo. Por outro lado, a corrente gerada quando uma voltagem é aplicada na membrana deve-se tanto a um fluxo difusional simples como a um fluxo difusional complexo. Portanto,

DISCUSSÃO

a condutância total desta membrana apresentará um componente simples e um complexo, além da condutância inespecífica a outros íons que não o próton.

Ao incorporar AP a esta membrana (**figura 26B**), o fluxo de prótons terá um novo componente, além do difusional, que é o fluxo de prótons associado ao ânion palmitato. Portanto, nesta membrana, a CCC será fornecida pelo fluxo prótons difusional simples e pelo fluxo de prótons associado ao palmitato.

Por outro lado, as espécies que gerarão corrente em resposta a uma voltagem através da membrana serão o próton livre, o complexo proton-X e o ânion palmitato não ligado a próton. Além destas supomos uma pequena contribuição de vazamento inespecífica. Logo, a condutância total será determinada pelas condutâncias difusionais simples e complexa, pela condutância facilitada pelo AG, além da condutância inespecífica da membrana.

A taxa de transporte de prótons, na membrana com AP, será determinada pela concentração de ácido palmítico e de próton na membrana, as quais, por sua vez, dependem das respectivas concentrações no meio aquoso.

Se, no interior da membrana, a concentração de prótons for alta em relação a concentração de AP, teremos uma grande quantidade de prótons não ligados ao AP, atravessando a membrana por difusão não facilitada. O AP poderia aumentar o fluxo de prótons, por captar prótons que não fariam parte do fluxo difusional simples, e que então passariam a contribuir para a CCC. Por outro lado, se fração de prótons a qual o palmitato se ligou foi a do fluxo difusional simples, a CCC seria pouco afetada, pois a concentração de prótons é bem maior que a de palmitato, sendo o fluxo de prótons ainda pelo mecanismo difusional simples bem maior. A condutância, nestas condições, seria determinada em grande parte pelos prótons livres, pois a concentração de ácido palmítico é pequena para reduzir a contribuição do mecanismos difusional simples e complexos para a condutância.

Já, se a concentração de prótons for baixa em relação a concentração de AP, todo o fluxo de prótons estará associado ao palmitato, e a taxa de transporte de prótons será determinada pela taxa de flip-flop do palmitato, portanto a CCC experimental será igual a CCC prevista pela taxa de flip-flop do palmitato. A condutância será determinada, essencialmente, pela taxa de flip-flop do palmitato.

DISCUSSÃO

Nestas condições, os mecanismos difusionais contribuirão muito pouco para o transporte de prótons.

Quando o acoplamento entre próton e palmitato for máximo, ou seja, quando todo o fluxo de prótons estiver associado ao flip-flop do palmitato, o transporte de prótons poderá ou não ser intensificado dependendo da taxa de flip-flop do palmitato.

Se a taxa de flip-flop do palmitato combinado com o próton (ácido palmítico) for maior que a taxa difusional do próton livre, teremos uma intensificação do fluxo de prótons, e conseqüentemente da *CCC*. Neste caso, a condutância a próton proporcionada pelo AP, seria maior que a condutância originada da difusão simples do próton, e verificaríamos um aumento na condutância a próton da membrana.

Por outro lado, se a taxa de flip-flop do palmitato (ou do complexo H-palmitato) for menor que a taxa difusional do próton livre, o fluxo de próton fica limitado pela menor taxa de flip-flop (do AP ou do ânion palmitato). Eventualmente, a *CCC* poderia não aumentar e a condutância a próton na presença de AP poderia ser menor que a condutância a próton fornecida pelo fluxo difusional simples.

Os experimentos onde a *CCC* experimental era aproximadamente igual a $CCC_{flip-flop}$, indicam que o acoplamento entre palmitato e próton, era provavelmente de 100%. Portanto, nestas condições, os mecanismos difusionais simples e complexo estariam contribuindo muito pouco para o transporte de prótons através da membrana. A incorporação de AP aumentou a condutância a próton e reduziu a condutância total da membrana, igualando-a ao valor da nova condutância a próton. O AP provavelmente eliminou a contribuição dos mecanismos difusionais para a condutância total da membrana, sendo o único componente responsável pela condutância total da membrana.

Já nas condições onde, a *CCC* experimental era menor que a $CCC_{flip-flop}$, não tínhamos, provavelmente, um acoplamento total entre palmitato e próton. A concentração de prótons era maior que a de palmitato, logo tínhamos um excesso de prótons, os quais, em condição de curto-circuito, atravessariam a membrana pelo mecanismo difusional simples. O AP, neste caso, aumentou a *CCC* provavelmente por ter se ligado a prótons que faziam parte do fluxo difusional complexo e que não contribuíam para a *CCC*, ou ainda por se ligar a prótons que faziam parte do fluxo difusional simples, aumentando a sua taxa de translocação.

O aumento da condutância total da membrana (G_m), verificado em alguns experimentos, poderia ser atribuída a um aumento da condutância a próton, sendo que as condutâncias difusionárias se mantinham constantes, ou seja, o AP interferia muito pouco nestes outros mecanismos, provavelmente por se encontrar em uma menor concentração no interior da membrana.

Por outro lado, a redução da condutância total, por efeito do AP, poderia ter sido ocasionada por uma redução das condutâncias difusionárias, sendo que a contribuição da condutância fornecida pelo AP seria maior.

Deve existir uma combinação de fatores, entre os quais a concentração de prótons e de AG na membrana, onde o acoplamento entre palmitato e próton é máximo, e o AG passaria, então a governar as propriedades eletrofisiológicas da membrana.

Em todos os casos, independente do acoplamento entre palmitato e próton ser ou não total, a condutância a próton e a CCC aumentavam sempre após a adição de AP, indicando que o ácido palmítico realmente cria um mecanismo para transporte de prótons.

Esses resultados são ainda preliminares, mas indicam que a determinação da corrente de curto-circuito pode ser utilizada como um eficiente e original método de determinação da taxa de flip-flop de ácidos graxos através de bicamadas lipídicas.

5.5. Interação do ácido palmítico com bicamadas modificadas pela valinomicina

A valinomicina é um antibiótico macrolídeo que apresenta atividade ionofórica para íons K^+ , ou seja, quando incorporada a membranas fosfolipídicas forma um complexo com íons K^+ e os transporta através da matriz lipídica (HANKE & SCHLUE, 1993). Portanto, membranas modificadas pela valinomicina, na presença de íons K^+ no meio aquoso, apresentam um nível de condutância bem maior do que aquelas livres de valinomicina.

A condutância induzida pela valinomicina é afetada pela natureza da membrana: para uma mesma concentração aquosa de íons K^+ , membranas neutras requeriam uma dose maior de valinomicina do que membranas com carga superficial negativa, para atingirem um mesmo nível de condutância.

O menor aumento da condutância pela valinomicina em membranas neutras poderia ser explicado pelo fato da concentração de íons K^+ junto a membrana ser essencialmente igual aquela na bulk-phase, enquanto que em membranas carregadas negativamente, tem-se um aumento da concentração de K^+ na face da membrana em relação à bulk-phase.

A influência do potencial de superfície (y_0) de membranas carregadas sobre a concentração de K^+ local, pode ser vista num exemplo numérico. Suponha-se uma bicamada de azolecitina, cujo potencial de superfície (y_0) é de -112.4 mV, em uma solução de KCl 5 mM. Admitindo-se uma situação de equilíbrio, temos, pela equação de Nernst, que a relação entre as concentrações de K^+ na bulk-phase e junto a membrana, é dada por:

$$0.1124 = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[K^+]_{superfície}}{[K^+]_{bulk}} \quad (5.5.1)$$

$$\frac{[K^+]_{superfície}}{[K^+]_{bulk}} = 75$$

Portanto, a concentração de K^+ próximo a membrana é 75 vezes maior que a concentração de K^+ na bulk-phase, o que nos leva a supor que a concentração de complexos valinomicina- K^+ é maior no interior lipídico de membranas carregadas, o que justificaria o seu nível maior de condutância.

Observamos que, a condutância de membranas modificadas pela valinomicina era reduzida pelo ácido palmítico. O efeito era mais intenso sobre membranas de azolecitina do que em membranas de DPhPC, indicando que as cargas superficiais também exercem alguma função crucial no mecanismo de supressão da condutância pelo ácido palmítico.

O potencial de superfície negativo das bicamadas carregadas, como mostrado anteriormente, favorece a forma não ionizada do ácido palmítico na superfície da membrana, aumentando o seu particionamento na matriz lipídica. Portanto, a maior redução da condutância de membranas de azolecitina poderia ser atribuída a maior solubilidade do ácido palmítico na matriz lipídica.

Teríamos, então em membranas com cargas superficiais negativas uma maior quantidade de complexos valinomicina- K^+ e ácido palmítico solubilizados, e

portanto os efeitos sobre a condutância determinado pelo ácido palmítico seriam muito mais evidentes.

Já, para um mesmo tipo de membrana, quanto maior o nível de condutância, maior é a concentração de complexos valinomicina – K^+ no interior da membrana, em relação ao ácido palmítico, logo menor será a eficácia do AP em interferir na condutância da membrana.

Uma outra questão que deve ser investigada, é a de como que o ácido palmítico inibe a condutância induzida pela valinomicina. Dois possíveis mecanismos, mostrados na **figura 27**, poderiam estar envolvidos:

Diminuição da carga superficial por ocupação de espaço.

A inclusão de moléculas de ácido palmítico na matriz lipídica pode promover alterações no empacotamento dos fosfolípides. Regiões antes ocupadas apenas por fosfolípides se vêem agora ocupadas também por moléculas de ácido palmítico, levando a um aumento da distância entre as cabeças polares. A carga superficial da membrana, determinada pelas cabeças polares, fica desta forma “diluída”, e as interações eletrostáticas entre a superfície da membrana e os íons de carga contrária (contraíons), no caso o íon K^+ , são reduzidas (**figura 27A**).

Em outras palavras, a inserção de moléculas de ácido palmítico em membranas carregadas pode promover um aumento da área ocupada por uma carga negativa (Ac), e consequentemente reduzir o potencial de superfície (y_0), pois este relaciona-se com Ac através da equação (CEVC & MARSH, 1987):

$$y_0 = (-51.4 \text{ mV}) z^{-1} \ln (0.36 A_c c^{1/2}) \quad (5.5.1)$$

Onde, c é a concentração de eletrólito em mol por litro.

Portanto, a concentração de K^+ junto a superfície da bicamada é reduzida e, logo ocorre uma redução de íons transportados pela valinomicina, ou seja, uma redução da condutância.

Um efeito análogo já foi reportado por ROSTOVTSEVA *et alii* (1998), quando membranas carregadas eram diluídas com fosfolípides neutros, obtendo-se um nível de condutância induzida pela gramicidina menor quando comparada com membranas não diluídas. Essa diferença é atribuída a redução da concentração de

contraíons próximo a entrada do canal devido a diluição das cargas superficiais pelo fosfolípide neutro.

Já o colesterol quando incorporado a membranas carregadas, aumenta o potencial de superfície devido a aproximação das cargas superficiais, ou seja, devido a um aumento da densidade de cargas (FORNES & PROCOPIO, 1987).

No caso de membranas neutras, onde a ausência de cargas superficiais faz com que a concentração de K^+ próximo a membrana ou na bulk-phase sejam a mesma, este efeito não estaria presente, sugerindo que algum outro mecanismo deve estar envolvido.

Formação do complexo valinomicina – K^+ – palmitato na matriz lipídica.

O complexo valinomicina – K^+ pode se combinar com protonóforos de ácidos fracos, assim como com ânions orgânicos (McLAUGHLIN & DILGER, 1980). Portanto, deve ser considerado o fato do palmitato poder se ligar ao complexo valinomicina – K^+ presente na matriz lipídica. Esta hipótese já foi proposta por KAMP & HAMILTON (1993), que atribuiu ao complexo valinomicina – K^+ o transporte da forma ionizada do AG.

O palmitato proveniente da dissociação do ácido palmítico na matriz lipídica poderia se ligar ao complexo valinomicina – K^+ que possui carga positiva, formando um complexo neutro que não sentiria o campo elétrico imposto pelo voltage-clamp, e portanto diminuindo de modo importante a condutância antes estabelecida (**figura 27B**).

A reversão deste efeito pela adição de albumina ao meio aquoso, sugere ser o ácido palmítico o responsável pela supressão da condutância.

A interação entre valinomicina – K^+ e ácido palmítico poderia estar aumentando a taxa de flip-flop do palmitato, e consequentemente o transporte de prótons, porém o transporte de K^+ pela valinomicina estaria comprometido.

SKULACHEV (1998) sugeriu que em membranas biológicas, a translocação dos ânions de AG poderia ser realizada por proteínas desacopladoras, como as UCPs e o trocador ATP/ADP. Portanto, a valinomicina poderia constituir um modelo de proteína transportadora, em bicamadas lipídicas artificiais.

De uma forma geral, não podemos descartar o fato de os 2 mecanismos expostos estarem atuando conjuntamente. O que ficou evidente é o ácido palmítico

DISCUSSÃO

inibe a condutância induzida pela valinomicina em bicamadas e que o potencial de superfície é o grande modulador.

Nossos resultados indicam que AGs, quando incorporados a membranas fosfolipídicas, podem modificar, de forma importante, a passagem de prótons através da membrana, provavelmente por atuarem como carreadores de prótons.

Em membranas biológicas, a elevação da concentração de AG no interior da membrana aumentaria a sua contribuição ou até "dominaria" as vias de condução para prótons, dissipando um gradiente de prótons pré-existente ou gerando um gradiente de prótons. O pH intracelular poderia ser então modificado, afetando de forma considerável a função celular.

Dependendo do tipo do AG poderíamos ter, além da modulação do transporte de prótons, alterações da dinâmica da bicamada, como por exemplo transições de fase. A função de barreira atribuída as membranas poderia ser reduzida drasticamente, sendo, então também alterados o transporte de outros íons e substâncias.

Além disso nossos resultados preliminares indicam que a determinação da corrente de curto-circuito pode ser utilizada como eficiente e original método de determinação da taxa de flip-flop de ácidos graxos através de bicamadas lipídicas.

6. CONCLUSÕES

- A permeabilidade de bicamadas lipídicas planas ao ácido palmítico foi aproximadamente da mesma ordem de magnitude das calculadas para vesículas unilamelares (SUV e GUV);
- A permeabilidade ao ácido palmítico de membranas de azolecitina pouco diferiu da permeabilidade das de DPhPC;
- AGs quando incorporados a bicamadas lipídicas planas aumentam a seletividade dessas membranas a próton;
- A maior ou menor seletividade a próton de membranas puras como das modificadas por AGs, depende do pH do meio aquoso;
- Ácido araquidônico é mais eficaz em transportar prótons do que o ácido palmítico.
- Relações $I \times V$ das membranas modificadas por ácido araquidônico são supralineares e na presença de gradiente de pH passam a apresentar retificação do tipo Goldman;
- O ácido araquidônico aumenta a rigidez das membranas de azolecitina;
- A determinação da corrente de curto-circuito pode ser utilizada como um método de determinação da taxa de flip-flop de ácidos graxos através de bicamadas lipídicas.
- O ácido palmítico inibe a condutância induzida pela valinomicina em bicamadas de azolecitina e DPhPC, sendo seu efeito mais intenso nas membranas neutras.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BENZ, R.; BECKER, F.; ZIMMERMANN, U. Reversible electrical breakdown of lipid bilayer membranes: a charge-pulse relaxation study. **J. Membr. Biol.**, **48**: 181-204, 1979.
- BIHAIN, B.E.; DECKELBAUM, R.J.; YEN, F.T.; GLEESON, A.M.; CARPENTIER, Y.A.; WHITE, L.D. Unesterified fatty acids inhibit the binding of low density lipoproteins to the human fibroblast low density lipoprotein receptor. **J. Biol. Chem.**, **264**: 17316-23, 1989.
- CEVC, G. & MARSH, D. Phospholipid bilayers physical principles and models. In: Bilayer Phase Transition. 1.ed. New York: John Wiley & Sons, 1987. p 231-68.
- CHEN, X.; HAN, X.; GROSS, R.W. Dynamics of binary mixtures of plasmenylcholine / arachidonic acid and phosphatidylcholine / arachidonic acid – a study using fluorescence and NMR spectroscopy. **Biochim. Biophys. Acta**, **1149**: 241-8, 1993.
- CIVELEK, V.N.; HAMILTON, J.A.; TORNHEIM, K.; KATHLEEN L. K.; CORKEY B. E. Intracellular pH in adipocytes: Effects of free fatty acid diffusion across the plasma membrane, lipolytic agonists, and insulin. **Biochemistry**, **93**: 10139-44, 1996.
- DEAMER, D.W. & NICHOLS, J.W. Net proton-hydroxyl permeability of large unilamellar liposomes measured by an acid-base titration technique. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, **77**: 2038-42, 1980.
- DEAMER, D.W. & NICHOLS, J.W. Proton flux mechanisms in model and biological membranes. **J. Membrane Biol.**, **107**: 91-103, 1989.
- FORNÉS, J.A., PROCOPIO, J. Influence of cholesterol on the surface charge density and surface potential of lipid bilayer membranes. **J. Colloid & Interface Sci.**, **117**: 570-3, 1987.
- FURUIKE, S.; LEVADNY, V.G.; LI, S.J.; YAMAZAKI, M. Low pH induces a interdigitated gel to bilayer gel phase transition in dihexadecylphosphatidylcholine membrane. **Biophys. J.**, **77**: 2015-23, 1999.

De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Referências Bibliográficas:

NBR 6023. Rio de Janeiro: ABNT, 1989.

NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. List of Journals Indexed in Index Medicus.

Bethesda: NLM, 1997.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- GUTKNECHT, J. Proton conductance caused by long-chain fatty acids in phospholipid bilayer membranes. **J. Membr. Biol.**, **106**: 83-93, 1988.
- GUTKNECHT, J. Proton/Hydroxide Conductance through lipid bilayer membranes. **J. Membr. Biol.**, **82**: 105-12, 1984.
- HALLIDAY, D., RESNICK, R., WALKER, J. Fundamentals of physics extended. 5.ed. New York: John Wiley & Sons, 1997. p 297-321.
- HALLIWELL B. & ARUOMA, O. DNA and free radicals. 1.ed. Chichester: Ellis Horwood Limited, 1993. p 200
- HAMILTON, J.A. & KAMP, F. How are free fatty acids transported in membranes?: Is it by proteins or by free diffusion through the lipids? **Diabetes**, **48**: 2255-69, 1999.
- HAMILTON, J.A. Fatty acid transport: difficult or easy? **J. Lipid Res.**, **39**: 467-81, 1998.
- HANKE, W.H. & SCHLUE, W.R. Planar lipid bilayers. Methods and Applications. 1.ed. London: Academic Press, 1993. 133p.
- HANNIGAN, G.E. & WILLIAMS, B.R.G. Signal transduction by interferon-alpha through arachidonic acid metabolism. **Science**, **251**: 204-7, 1991.
- HILLE, B. Ionic channels of excitable membranes. 2.ed. Sunderland: Sinauer Associates, 1991. 607p.
- HOCH, F.L. Minireview: cardiolipins and mitochondrial proton-selective leakage. **J. Bioenergetics Biomembr.**, **30**: 511-32, 1998.
- KAGAWA, Y. & RACKER, E. Partial resolution of the enzymes catalyzing oxydative phosphorylation IX. Reconstruction of oligomycin-sensitive adenosine triphosphatase. **J. Biol. Chem.**, **241**: 2467-74, 1966.
- KAMP, F. & HAMILTON, J.A. Movement of fatty acids, fatty acids analogues, and bile acids across phospholipid bilayers. **Biochemistry**, **32**: 11074-86, 1993.
- KAMP, F.; ZAKIM, D.; ZHANG F.; NOY N.; HAMILTON, J.A. Fatty acid flip-flop in phospholipid bilayers is extremely fast. **Biochemistry**, **34**: 11928-37, 1995.
- KLEINFELD, A.M.; CHU, P.; ROMERO, C. Transport of long-chain fatty acids across lipid bilayer membranes indicates that transbilayer flip-flop is rate limiting. **Biochemistry**, **36**: 14146-58, 1997.
- LANGNER, M. & HUI, S. Effect of free fatty acids on the permeability of 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine bilayer at the main phase transition. **Biochim. Biophys. Acta**, **1463**: 439-47, 2000.
- MACLAUGHLIN, S.G.A.; SZABO, G.; EISENMAN, G. Divalent ions and the surface potential of charged phospholipid membranes. **J. Gen. Physiol.**, **58**: 667-87, 1971.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- MAILMAN, D. & ROSE, C. Binding and solubility of oleic acid to laboratory materials: a possible artifact. **Life Sci.**, **47**: 1737-44, 1990.
- McLAUGHLIN, S.G.A. & DILGER, J.P. Transport of protons across membranes by weak acids. **Physiol. Rev.**, **60**: 825-63, 1980.
- MORROW, J.D.; AWAD, J.A.; WU, A.; ZACKERT, W.E.; DANIEL, V.C.; ROBERTS II, J.L. Nonenzymatic free radical-catalyzed generation of thromboxane-like compounds (isothromboxanes) *in vivo*. **J. Biol. Chem.**, **271**: 23185-90, 1996.
- MUELLER, P.; RUDIN, H.T.; TIEN, T.; WESCOTT, W.C. Methods for the formation of single bimolecular lipid membranes in aqueous solutions. **J. Phys. Chem.**, **67**: 534-5, 1963.
- NAGLE, J. F. Theory of passive proton conductance in lipid bilayers. **J. Bioenergetics Biomembr.**, **19**: 413-26, 1987.
- ORDWAY, R.W.; WALSH, J.V. Jr.; SINGER, J.J. Arachidonic acid and other fatty acids directly activate potassium channels in smooth muscle cells. **Science**, **244**: 1176-9, 1989.
- PHILIPSON, K.D. & WARD, R. Effects of fatty acids on Na^+ - Ca^{2+} exchange and Ca^{2+} permeability of cardiac sarcolemmal vesicles. **J. Biol. Chem.**, **256**: 9666-71, 1985.
- POHL, E. E.; PETERSON, U.; SUN, J.; POHL, P. Changes of intrinsic membrane potentials induced by flip-flop of long-chain fatty acids. **Biochemistry**, **39**: 1834-39, 2000.
- PROCOPIO, J.; VARANDA, W.A.; FORNÉS, J.A. A quartz cell for studying planar lipid bilayers. **Biochim. Biophys. Acta**, **688**: 808-810, 1982.
- ROMANO-FONTES, L.G.; CURI, R.; PERES, C.M.; NISHIYAMA-NARUKE, A.; BRUNALDI, K.; ABDULKADER, F.; PROCOPIO, J. Fatty acid transport across lipid bilayer planar membranes. **Lipids**, **35**: 31-4, 2000.
- ROSTOVTSEVA, K.T.; AGUILELLA, M.V.; VODYANOY, I.; BEZRUKVOV, M.S.; PARSEGAN A.V. Membrane surface-charge titration probed by gramicidin A channel conductance. **Biophys. J.**, **75**: 1783-92, 1998.
- SALGO, M.G.; CORONGIU, F.P.; SEVANIAN, A. Peroxidation and phospholipase A2 hydrolytic susceptibility of liposomes consisting of mixed species of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine. **Biochim. Biophys. Acta**, **1127**: 131-40, 1992.
- SCHOCH, P.; SARGENT, D.F.; SCHWYZER, R. Capacitance and conductance as tools for measurement of asymmetric surface potentials and energy barriers of lipid bilayer membranes. **J. Membr. Biol.**, **46**: 71-89, 1979.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- SKULACHEV, V.P. Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics. **Biochim. Biophys. Acta**, **1363**: 100-24, 1998.
- STEN-KNUDSEN, O. Passive transport processes. In: GIEBISH, G.; TOSTESON, D.C.; USSING, H.H. (Eds). Membrane transport in biology. Berlin: Springer-Verlag, 1978. p 5-113.
- SUNAMOTO, J.; BABA, Y.; IWAMOTO, K.; KONDO, H. Liposomal membranes. XX. Autoxidation of unsaturated fatty acids in liposomal membranes. **Biochim. Biophys. Acta**, **833**: 144-50, 1984.
- SUNDERLAND, J. E. & STORCH, J. Effect of phospholipid headgroup composition on the transfer of fluorescent long-chain free fatty acids between membranes. **Biochim. Biophys. Acta**, **1168**: 307-14, 1993.
- TIEN TI, H. Bilayer lipid membranes (BLM) theory and practice. New York: Marcel Dekker, 1974. 655p.
- VOET, D. & VOET, J.G. Biochemistry. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, 1995. 1361p.
- YAGISAWA, K.; NAITO, M.; ICHIRO-KEN, G. KAMBARA, T. A model for self-sustained potential oscillation of lipid bilayer membranes induced by the gel-liquid crystal phase transitions. **Biophys. J.**, **64**: 1461-75, 1993.
- ZHANG, F.; KAMP, F.; HAMILTON, J.A. Dissociation of long and very long chain fatty acids from phospholipid bilayers. **Biochemistry**, **35**: 16055-60, 1996.

Figura 1: Câmara para formação de bicamadas lipídicas planas.

Figura 2: Set experimental utilizada para monitoração elétrica de bicamadas lipídicas planas utilizando o amplificador de patch-clamp no modo voltage-clamp.

Figura 3: Representação esquemática do circuito elétrico utilizado para a determinação de condutância e corrente de curto-circuito em bicamadas lipídicas planas, usando o amplificador de patch-clamp.

Figura 4: Representação esquemática das conexões elétricas do eletrômetro de alta impedância Na figura 4A, o painel frontal mostra os 3 modos de operação: voltímetro (range em Volt), ohmímetro (range em OHM) e amperímetro (range em AMP), enquanto que o painel trazeiro (vista posterior) mostra a conexão entre eletrômetro, placa A/D e terra.

Figura 5: Parâmetros elétricos das bicamadas lipídicas planas determinados através do eletrômetro, para uma membrana hipotética com uma bateria (E) de 60 mV e uma resistência (R) de 50×10^9 ohm. Diferença de potencial elétrico transmembrana (A), resistência (B), corrente de curto circuito (CCC) (C).

Figura 6: Comparação entre a *DP* espontânea medida pelo eletrômetro e a *CCC* medida pelo amplificador de patch-clamp (voltage-clamp) em função da condutância a próton (G_H) em relação a condutância vazamento inespecífica (G_V) da membrana.

Figura 7: Set experimental para registro de capacitância de bicamada lipídica plana. R_m : resistência da membrana. C_m : capacitância da membrana.

Figura 8: "Screening" das cargas superficiais de uma BLP de azolecitina. Método da condutância.

Figura 9: Gráfico fornecido pelo programa computacional (**listagem 1**) para a determinação do potencial de superfície (ψ_0) e densidade de carga (σ).

Figura 10: Evolução da atividade isotópica do lado TRANS (frio). CPM não corrigida corresponde a atividade total do lado TRANS sem considerar a CPM obtidas com as amostras anteriores, enquanto que a corrigida corresponde a CPM total no lado TRANS mais a CPM obtida com as amostras anteriores.

Figura 11: Corrente de curto-circuito (CCC) de bicamadas lipídicas planas de azolecitina não modificadas por AGs (BLP pura) e modificadas pelo ácido palmítico (BLP + AP). O gradiente de pH era produzido pela acidificação do compartimento CIS. O pH em TRANS era fixado em 7. Delta de pH corresponde ao pH em CIS menos o pH em TRANS. Cada par de pontos experimentais corresponde a uma membrana.

Figura 12: Condutância a próton (G_H) de bicamadas lipídicas planas de azolecitina não modificadas por AGs (BLP pura) e modificadas pelo ácido palmítico (BLP + AP), em diferentes pH do compartimento CIS. A G_H foi calculada pela relação entre CCC e potencial de equilíbrio do próton (E_H) (equação 4.2.1). Cada ponto experimental corresponde a uma membrana. O pH em TRANS era aproximadamente 7.

Figura 13: DP espontânea de bicamadas lipídicas planas de azolecitina não modificadas por AGs (BLP pura) e modificadas pelo ácido palmítico (BLP + AP) em diferentes gradientes de pH ($\log([H^+]_{cis}/[H^+]_{trans})$) produzidos por acidificação do compartimento CIS. O pH em TRANS era de aproximadamente 7. Cada ponto experimental corresponde a uma membrana. As DPs experimentais foram comparadas com o potencial de Nernst para o próton (E_H).

Figura 14: Efeito do ácido palmítico sobre a condutância de bicamadas lipídicas planas de azolecitina modificada pela valinomicina. Cada par de barras corresponde a condutância de uma membrana, inicialmente apenas modificada pela valinomicina (valinomicina) e após a incorporação de ácido palmítico (valinomicina + AP).

Figura 15: Efeito do ácido palmítico sobre a condutância de bicamadas lipídicas planas de DPhPC modificadas pela valinomicina. Cada par de barras corresponde a condutância de uma membrana, inicialmente apenas modificada pela valinomicina (valinomicina) e após a incorporação de ácido palmítico (valinomicina + AP).

Figura 16: Efeito típico do ácido palmítico sobre a condutância de uma bicamada lipídica plana de azolecitina modificada pela valinomicina. A incorporação de ácido palmítico à membrana promoveu uma redução de 87 % da condutância e a albumina reverteu este efeito. Este gráfico refere-se a apenas uma membrana.

Figura 17: Comparação entre *CCC* experimental e *CCC* prevista pela equação 4.3.1 de membranas de azolecitina modificadas pelo ácido araquidônico. Cada ponto experimental corresponde a uma membrana.

Figura 18: Relação $I \times V$ de uma bicamada lipídica plana de azolecitina modificada pelo ácido araquidônico em uma condição de pH 7.4 bilateral (A) e de gradiente de 0.27 unidades de pH (B), o qual corresponde a um E_H de 16 mV. Notar que em A a CCC é igual a zero e em B a CCC é igual a 35 pA. A condutância (dI/dV) em zero de voltagem é igual a 1025 pS (A) e 3170 pS (B) e o potencial de reversão da corrente em B é igual a 11 mV.

A

B

Figura 19: Relação IxV de uma bicamada lipídica plana de azolecitina modificada pelo ácido araquidônico. O delta de pH era de 0.39 unidades (pH_{CIS} : 6.72 e pH_{TRANS} : 7.11), o qual correspondia a um E_H de 23 mV. A condutância total era de 1614 pS, a CCC de 31 pA e o potencial de reversão da corrente 25 mV. O "fitting" dos pontos experimentais para a curva obtida a partir da equação de GHK, forneceu uma permeabilidade a próton de $4 \times 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$.

Figura 20: Relação IxV de uma bicamada lipídica plana de azolecitina modificada pelo ácido araquidônico. O delta de pH era de 0.64 unidades (pH_{CIS} : 6.55 e pH_{TRANS} : 7.2), o qual correspondia a um E_H de 37.8 mV. A condutância total era de 686 pS, a CCC de 19 pA e o potencial de reversão da corrente 45 mV. O "fitting" dos pontos experimentais para a curva obtida a partir da equação de GHK, forneceu uma permeabilidade a próton de $1.35 \times 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$.

Figura 21: Relação IxV de uma bicamada lipídica plana de azolecitina modificada pelo ácido araquidônico. O delta de pH era de 3.31 unidades (pH_{CIS}: 3.59 e pH_{TRANS}: 6.9), o qual correspondia a um E_H de 195.3 mV. A condutância total era de 5510 pS e a CCC de 307 pA. O fitting dos pontos experimentais para a curva obtida a partir da equação de GHK, forneceu uma permeabilidade a próton de $1.5 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$.

Figura 22: Relação IxV de uma bicamada lipídica plana de azolecitina modificada pelo ácido araquidônico. O delta de pH era de 3.68 unidades (pH_{CIS}: 3 e pH_{TRANS}: 6.68), o qual correspondia a um E_H de 217 mV. A condutância total era de 4617 pS, a CCC de 244 pS o potencial de reversão da corrente 93 mV. O "fitting" dos pontos experimentais para a curva obtida a partir da equação de GHK, forneceu uma permeabilidade a próton de $3.1 \times 10^{-7} \text{ cm s}^{-1}$.

Figura 23: Permeabilidade a próton de bicamadas lipídicas planas de Azolecitina não modificada por AG (**A**, BLP pura) e modificadas pelo ácido palmítico (**B**, BLP + AP) e pelo ácido araquidônico (**C**, BLP + AR). O pH do compartimento TRANS era igual a 7. Cada ponto experimental equivale a uma membrana.

Figura 24: Transporte de prótons por uma membrana modificada pelo ácido palmítico em uma condição de gradiente de prótons. A membrana é mantida a uma voltagem igual a zero (curto-circuito)

Figura 25: Corrente obtida com um pulso de voltagem em membranas modificadas por AGs.

Figura 26: Fluxo de prótons através de membranas sem AG e modificadas por AGs na presença de gradiente de concentração de prótons.

Figura 27: efeito do ácido palmítico sobre a condutância de bicamadas modificadas pela valinomicina

Tabela 1: Permeabilidades das bicamadas lipídicas planas de DPhPC e azolecitina ao ácido palmítico obtidas através do fluxo isotópico de ácido palmítico e de vesículas unilamelares SUV (small unilamellar vesicles) e GUV (giant unilamellar vesicles) calculadas da literatura a partir da k_{off} (constante de dissociação).

	Bicamadas lipídicas planas (Média $\pm$ desvio padrão)	SUV (diâmetro $\approx$ 25 nm) (ZHANG et alii, 1996) ($k_{\text{off}} = 8.22 \text{ s}^{-1}$)	GUV (diâmetro $\approx$ 200 nm) (KLEINFELD et alii, 1997) ($k_{\text{off}} = 0.5 \text{ s}^{-1}$)
Permeabilidade (cm x s⁻¹)	DPhPC (neutra) (8.8 ± 1.9) x 10 ⁻⁶ (n = 15)	2.7 x 10 ⁻⁶	1.7 x 10 ⁻⁶
	Azolecitina (carregada) (10.3 ± 2.2) x 10 ⁻⁶ (n = 5)		

(n = número de membranas)

Listagem 1: Calcula densidade de carga (σ) e potencial de superfície (ψ_0) a partir de dados experimentais.

' ---Solução banhante = KCl 5 mM / Trizma 5 mM

' ---Valinomicina 0.01 mg/mL, 0.5 μ L adicionado ao lado CIS

' ---BaCl₂ 1 M, adicionado apos a estabilização da condutância induzida pela valinomicina

' ---Condutância estabilizada após 25 minutos da adição de Ba⁺⁺

CLS

SCREEN 12

amplix = 3

ampliy = 250

RT = 2476

F = 96490

Vout1 = 120 'output do osciloscópio somente com

Vout2 = 10 'output do osciloscópio com valinomicina e Ba⁺⁺

ratioG = Vout1 / Vout2

PRINT " AZOLECITINA SEM ACIDO PALMÍTICO "

PRINT "Io ="; Vout1; " pA "; " I1 ="; Vout2; "pA"

PRINT "ratioG ="; ratioG

Vtot = 7.1 'volume de líquido total, em mL

VBa = 40 'volume total de Ba⁺⁺ 1 M adicionado ao sistema, em uL

ConcBa = VBa * .000001 / (Vtot * .001) 'em M

ConcK = .005 ' Conc. de KCl

ConcCl1 = ConcK

ConcCl2 = ConcK + 2 * ConcBa

pH = 7.2

pKtris = 8.1

TdTH = 10 ^ (pH - pKtris) 'razao entre forma nao prot. e prot (eq. Hend-Hass)

ConcTris = .005 'concentracao de trizma em M

ConcTrisH = ConcTris / (TdTH + 1) 'concentracao de trizma carregado

pi = 3.141593

DiamOr = 5 'diâmetro do orificio em divisoes (aum. 40X)

```

Ltrs = .5 'largura do tórus em divisões (aum. 40X)
Rbic = (DiamOr - 2 * Ltrs) / 2
R = .1 * Rbic / 5 'conversão para cm (5 mm /div e conversão mm para cm)
Abic = pi * R ^ 2 'área da bicamada em cm2
LINE (0, 300)-(640, 300)
LINE (0, 0)-(0, 480)
psi1final = 138.9 ' <<<-----
      FOR psi1mV = 0 TO psi1final STEP .1
psi1 = (-1) * psi1mV / 1000
deltaPsi = (RT / F) * LOG(ratioG)
psi2 = psi1 + deltaPsi
sigma1 = ConcK * (EXP(-1 * F * psi1 / RT) - 1) + ConcCl1 * (EXP(1 * F * psi1 /
RT) - 1) + ConcTrisH * (EXP(-1 * F * psi1 / RT) - 1)
sigma2 = ConcK * (EXP(-1 * F * psi2 / RT) - 1) + ConcCl2 * (EXP(1 * F * psi2 /
RT) - 1) + ConcBa * (EXP(-2 * F * psi2 / RT) - 1) + ConcTrisH * (EXP(-1 * F *
psi2 / RT) - 1)
PSET (amplix * psi1mV, 300 - ampliy * (sigma1 - sigma2)), 10
NEXT psi1mV
sigmafina1 = (1 / 272) * SQR(sigma1) ' em cargas/Angstrom2
nanom2carga = (1 / sigmafina1) / 100
PRINT "delta psi em mV ="; 1000 * deltaPsi
PRINT "Densidade de carga em nanom2/carga ="; nanom2carga
PRINT "Sigma (Angstroms2 por carga) = "; 1 / sigmafina1
PRINT "Sigma (in Coul/m2) ="; sigmafina1 * 16
PRINT "area da bicamada (cm2) ="; Abic
PRINT "Psizero (mV) = "; -psi1mV
PRINT "Psizero com Ba (mV) ="; psi2 * 1000
PRINT "concentracao de tris carregado (M) ="; ConcTrisH
FimScale = psi1final + 10
FOR psi1mV = 0 TO FimScale STEP 10
LINE (amplix * psi1mV, 290)-(amplix * psi1mV, 300)
NEXT psi1mV

```

Listagem 2: Realiza o "fitting" para a equação de Goldman-Hodgkin-Katz dos pontos experimentais obtidos com a relação IxV de bicamadas lipídicas planas de azolecitina modificadas pelo ácido araquidônico.

OPEN "fit.dat" FOR OUTPUT AS #1

CLS : SCREEN 12

‘-----

pHcis = 6.55 (dado experimental)

pHtrans = 7.19 (dado experimental)

P = 13.1 'Permeabilidade da membrana a próton (cm x s⁻¹).

‘-----

CENTROX = 300 'Centro da tela gráfica no eixo X

CENTROY = 340 'Centro da tela gráfica no eixo Y

F = 96490: F2 = F ^ 2

'-----Fatores de amplificação em X e em Y -----

fatorarea = 125 'Passa para pAmperes por cm² e usa a área da membrana

amplx = 1.2 * (640 / 400)' Amplificação em X da curva teórica

amplxexp = amplx 'Amplificação em X da curva experimental

amply = 1.5E+10 'Amplificação Y na tela gráfica (teórica)

DIM Voltagem(200): DIM corrente(200) 'Estabelece a dimensão das 2 matrizes

'-----Entrar com os valores da relação I versus V (dados experimentais) -----

Voltagem em miliVolts e corrente em picoAmperes

Voltagem(1) = -99.06: corrente(1) = 124.3

Voltagem(2) = -86.54: corrente(2) = 104.69

Voltagem(3) = -59.26: corrente(3) = 65.76

Voltagem(4) = -39.36: corrente(4) = 47.26

Voltagem(5) = -19.74: corrente(5) = 35

Voltagem(6) = .65: corrente(6) = 11.48

Voltagem(7) = 21.23: corrente(7) = 14.27

Voltagem(8) = 40.8: corrente(8) = 5.08

Voltagem(9) = 60.8: corrente(9) = -8.81

Voltagem(10) = 79.86: corrente(10) = -18.44

```

Voltagem(11) = 100.38: corrente(11) = -17.99
N = 11 ' Número de pontos experimentais (pares de valores)
FOR i = 1 TO N
corrente( i ) = corrente( i ) * (1E-12) * fatorarea 'Corrente em Ampere/cm2
CIRCLE (amplx * Voltagem( i ) + CENTROX, CENTROY - amply * corrente( i )),
2
'>>>> Plota na tela os pontos experimentais
NEXT i
C1 = (10 ^ -pHcis) / 1000 'Concentração de H+ no lado 1 (CIS) (Mol/cm3)
C2 = (10 ^ -pHtrans) / 1000 ' Concentração de H+ no lado 2 TRANS) (Mol/cm3)
VEQ = (2490 / F) * LOG(C1 / C2) 'Potencial de equilíbrio do próton
somasq = 0
FOR i = 1 TO N
v = Voltagem( i ) / 1000 ' Transforma miliVolts em Volts
EXPON = EXP((F * v) / 2490)
'i = (F2 * P * v * (C1 - C2 * EXPON)) / (2490 * (1 - EXPON)) 'equação de GHK
'Calcula a condutância a um íon em um potencial de membrana V
NUMERATOR = (F2 * P * C1 * v) * (1 - EXP(F * (v - VEQ) / 2490))
DENOMINATOR = (2490 ^ 2) * (1 - EXPON) * ((F * v) / 2490 + LOG(C2 / C1))
G = NUMERATOR / DENOMINATOR 'Equation (262) Sten-Knudsen, pag.108
current = G * (v - VEQ) 'Corrente em Ampere/cm2
WRITE #1, v * 1000, (current / 125) * (1E+12), (corrente(i) / 125) * (1E+12)
'somasq = somasq + ((5E+08) * SQR(current ^ 2) - (5E+08) * SQR(corrente(i) ^ 2))
^ 2
somasq = somasq + ((5E+08) * ((SQR(current ^ 2) - SQR(corrente(i) ^ 2)))) ^ 2
CIRCLE (amplx * 1000 * v + CENTROX, CENTROY - amply * -current), 2, 10
'>>>> Plota na tela os pontos teoricos de GHK
NEXT i
LINE (CENTROX, 0)-(CENTROX, 480)
LINE (0, CENTROY)-(640, CENTROY)
PRINT "Soma dos quadrados = "; somasq
PRINT "Permeabilidade = "; P

```