

Tese de Doutorado

ESTUDOS FÍSICO-QUÍMICOS DA AÇÃO DE  
ANESTÉSICOS EM BIOMEMBRANAS  
ATRAVÉS DE TÉCNICAS  
ESPECTROSCÓPICAS E CALORIMÉTRICAS

*CELIA BEATRIZ ANTENEODO*

Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas  
Rio de Janeiro - 1993

ESTUDOS FÍSICO-QUÍMICOS DA AÇÃO DE  
ANESTÉSICOS EM BIOMEMBRANAS ATRAVÉS



1993/14  
A627  
\*020913\*

## Agradecimentos

A Eliane Wajnberg e a Paulo Bisch, pela orientação e pelo apoio permanente. A Jim Lepock, pelas sugestões e pela possibilidade de trabalhar no Laboratório de Biofísica em Waterloo. A Sônia Louro, pela colaboração e as importantes sugestões. A Jeanine Ferreira, pela colaboração e amizade. A Francisco, Gilberto, Celina, Nice, Fernando, Célia, Cambraia, Sergio, Ladário, Zé, Daniel e Welles, pela colaboração, o apoio e, em especial, pelos bons momentos. A César, Geraldo, Elena, Alexandre e todos aqueles que colaboraram na realização deste trabalho. A Betânia, Myriam e Vanda pela valiosa ajuda. Ao CBPF pela possibilidade de realizar esta tese. Ao CNPq pela ajuda financeira.

# Resumo

Foram estudados diferentes aspectos físico-químicos da interação de substâncias anestésicas com membranas biológicas, tanto reconstituídas artificialmente quanto naturais.

Nos capítulos 1 e 2, é feita uma revisão dos conceitos gerais sobre membranas biológicas e dos resultados prévios sobre a ação anestésica, respectivamente.

No capítulo 3, discutimos os princípios termodinâmicos da formação de micelas, propondo um modelo simplificado para descrever a micelização. Neste capítulo, estudamos, também, o comportamento micelar do anestésico cloropromazina (CPZ) em solução aquosa. Mediante a técnica de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) e utilizando uma sonda paramagnética anfifílica que se particiona entre a fase aquosa e a fase apolar, determinamos a concentração micelar crítica da droga em função do pH.

No capítulo 4, estudamos a adsorção da CPZ em lipossomos de fosfolipídios reconstituídos. A incorporação da forma carregada da droga nas vesículas modifica o potencial elétrico superficial da membrana. Assim, medindo-se o potencial superficial e utilizando-se um formalismo apropriado para descrever a incorporação da droga, podem ser determinadas as constantes de adsorção de cada uma das duas formas da droga (protonada e neutra). Para estimar o potencial superficial, foi utilizada uma molécula paramagnética anfifílica positivamente carregada como sonda para medidas de RPE.

No capítulo 5, estudamos a desnaturação térmica de diferentes domínios da enzima  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase do retículo sarcoplasmático, em presença do anestésico local dibucaína. O estudo foi feito mediante a técnica de calorimetria diferencial de varredura (DSC) e mediante experiências de inativação do transporte de cálcio. Os resultados obtidos mostram que a dibucaína desestabiliza a proteína contrabalançando o efeito estabilizante do  $\text{Ca}^{++}$ .

No capítulo 6, realizamos um estudo comparativo das mudanças conformacionais da  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase induzidas por anestésicos locais (dibucaína e tetracaína) e um n-álcool (butanol). Para observar os efeitos destas substâncias sobre a  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase, a proteína foi marcada com radicais nítróxido derivados da maleimida, que se ligam aos grupos -SH e que podem ser monitorados por RPE. Observou-se que os anestésicos locais e o butanol provocam mudanças na estrutura proteica com efeitos semelhantes nos espectros de RPE dos marcadores utilizados, apesar de agir, presumivelmente, através de mecanismos diferentes.

# Abstract

We investigate different physico-chemical aspects of the interaction of anesthetics with biological membranes by using both natural and artificially reconstituted vesicles.

Chapters 1 and 2 consist of a review on general concepts about biological membranes and on previous results related to anesthetics, respectively.

In chapter 3, we discuss the general principles of micelle formation and propose a simplified model of micellization. We also study the micellar behaviour of the anesthetic chlorpromazine (CPZ) in aqueous solutions. An amphiphilic spin-probe which partitions between the aqueous and apolar phases is used to determine the drug critical micellar concentration as a function of pH by electron paramagnetic resonance (EPR).

In chapter 4, we study the adsorption of CPZ in reconstituted phospholipid liposomes. When the charged form of the drug is adsorbed to the membrane, it modifies the membrane surface electric potential. Thus, by measuring the surface potential and based on an appropriate formalism to describe the incorporation of the drug to the lipidic phase, the adsorption constants of each form of the drug (protonated and neutral) may be determined. It is used a positively charged paramagnetic amphiphile as probe for EPR measurements to evaluate the surface potential.

In chapter 5, we investigate the thermal denaturation of different domains of sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase, in presence of the local anesthetic dibucaine, by using differential scanning calorimetry (DSC) and  $\text{Ca}^{++}$ -uptake inactivation. Our results show that the protein is destabilized by dibucaine which counteracts the stabilizing effect of  $\text{Ca}^{++}$ .

In chapter 6, we compare  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase conformational changes induced by local anesthetics (dibucaine and tetracaine) with those induced by a n-alcohol (butanol). In order to observe these effects on the different protein domains, we labelled the  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase with maleimide nitroxides which bind to -SH groups in the protein and may be monitored by EPR. The results show that protein conformational changes induced either by local anesthetics or alcohols are similar even if these changes may be induced through different mechanisms.

# Sumário

<b>Resumo</b>	<b>ii</b>
<b>Abstract</b>	<b>iii</b>
<b>Sumário</b>	<b>iv</b>
<b>Lista de figuras</b>	<b>viii</b>
<b>Lista de tabelas</b>	<b>xiii</b>
<b>Introdução</b>	<b>1</b>
<b>1 Membranas biológicas</b>	<b>7</b>
1.1 Componentes das membranas . . . . .	9
1.1.1 Lipídios de membrana . . . . .	9
1.1.2 Proteínas de membrana . . . . .	11
1.2 Propriedades das membranas . . . . .	12
1.3 Interações proteína-lipídio . . . . .	19

1.3.1	Purificação de proteínas . . . . .	20
1.4	Sistemas modelo . . . . .	21
1.4.1	Vesículas naturais . . . . .	22
1.4.2	Membranas artificialmente reconstituídas . . . . .	22
<b>2</b>	<b>Anestésicos</b>	<b>24</b>
2.1	Especificidade dos anestésicos no sistema nervoso central . . . . .	28
2.2	Solubilidade dos anestésicos na membrana biológica . . . . .	31
2.3	Alterações na membrana induzidas por anestésicos . . . . .	36
2.3.1	Fluidificação e desordem da membrana . . . . .	39
2.3.2	Efeitos sobre as proteínas de membrana . . . . .	40
2.3.3	Ação sobre os processos na membrana que envolvem $\text{Ca}^{++}$ . . . . .	42
2.3.4	Efeitos sobre as secreções neurais . . . . .	44
2.4	Estado atual . . . . .	44
<b>3</b>	<b>Estudo da micelização: determinação da concentração micelar crítica de substâncias anfífilas</b>	<b>46</b>
3.1	Modelo para a micelização . . . . .	48
3.2	Técnica para determinar a concentração micelar crítica . . . . .	58
3.3	Preparação de amostras . . . . .	62
3.4	Medidas e Resultados . . . . .	63
3.4.1	Determinação da cmc da sonda . . . . .	63
3.4.2	Determinação da cmc da clorpromazina . . . . .	70
3.5	Discussão . . . . .	73
<b>4</b>	<b>Estudo da associação droga-lipídio para um anestésico com dois estados de carga</b>	<b>77</b>
4.1	Potencial elétrico superficial da membrana . . . . .	79
4.2	Termodinâmica da incorporação de substâncias anfífilas na membrana . . . . .	82
4.3	Técnica para determinar o potencial elétrico superficial da membrana . . . . .	87
4.3.1	Análise espectral . . . . .	88

4.3.2	Associação da sonda à membrana . . . . .	92
4.3.3	Cálculo do potencial superficial . . . . .	92
4.4	Formalismo para a determinação das constantes de associação CPZ/lipídio	93
4.5	Preparação das vesículas e incorporação da droga . . . . .	97
4.5.1	Preparação das amostras para as medidas de RPE . . . . .	97
4.6	Medidas e resultados . . . . .	98
4.6.1	Comportamento da sonda em ausência de CPZ . . . . .	98
4.6.2	Incorporação da CPZ nas vesículas . . . . .	109
4.7	Discussão . . . . .	113
<b>5</b>	<b>Desnaturação térmica da Ca<sup>++</sup>-ATPase do retículo sarcoplásmico em presença de dibucaína</b>	<b>115</b>
5.1	Vesículas do retículo sarcoplasmático . . . . .	116
5.1.1	Ca <sup>++</sup> -ATPase . . . . .	117
5.1.2	Composição lipídica . . . . .	118
5.1.3	Preparação de vesículas de RS . . . . .	118
5.2	Estudo das interações membrana-anestésico mediante técnicas de análise térmica . . . . .	119
5.2.1	Calorimetria diferencial de varredura . . . . .	120
5.2.1.1	Análise dos perfis obtidos pela técnica de DSC . . . . .	121
5.2.2	Inativação térmica do transporte de Ca <sup>++</sup> . . . . .	124
5.2.2.1	Análise da inativação térmica do transporte de Ca <sup>++</sup> . . . . .	125
5.3	Resultados . . . . .	127
5.3.1	Calorimetria diferencial de varredura . . . . .	127
5.3.1.1	Efeito do Ca <sup>++</sup> sobre a estabilidade térmica da Ca <sup>++</sup> - ATPase . . . . .	129
5.3.1.2	Efeito da dibucaína sobre a estabilidade térmica da Ca <sup>++</sup> - ATPase . . . . .	134
5.3.2	Medidas de inativação . . . . .	140
5.3.3	Discussão . . . . .	143

<b>6</b>	<b>Estudo comparativo dos efeitos de n-álcoois e de anestésicos locais sobre a Ca<sup>++</sup>-ATPase do retículo sarcoplasmático</b>	<b>147</b>
6.1	Preparação de amostras . . . . .	150
6.2	Análise espectral . . . . .	151
6.3	Resultados . . . . .	151
6.4	Discussão . . . . .	163
<b>7</b>	<b>Conclusões</b>	<b>166</b>
	<b>Bibliografia</b>	<b>172</b>
	æ	



3.8	$(A/V)/(A/V)_0$ vs. $n$ . . . . .	57
3.9	Estrutura molecular da sonda paramagnética utilizada: 16-SASL. . . . .	58
3.10	Espectros de RPE de 16-SASL, em tampão fosfato . . . . .	59
3.11	Espectro de RPE de 16-SASL em presença de micelas de CPZ . . . . .	61
3.12	Espectros de RPE de 16-SASL em tampão fosfato a diferentes pH. . . . .	63
3.13	Determinação da cmc da sonda . . . . .	64
3.14	Dependência da cmc da sonda com o pH. . . . .	65
3.15	Concentração de monômeros vs. concentração total . . . . .	66
3.16	Fração de sonda monomérica vs. concentração total da sonda. . . . .	67
3.17	Espectros de RPE de 16-SASL em presença de CPZ . . . . .	70
3.18	Determinação da cmc da CPZ . . . . .	71
3.19	pH vs. cmc da CPZ . . . . .	72
4.1	Esquema da estrutura molecular da sonda paramagnética 4-(N,N-dimetil-N-nonil-amônio)tempo brometo. . . . .	88
4.2	Espectros de RPE de 4-(N,N-dimetil-N-nonil-amônio)tempo brometo . . . . .	89
4.3	Espectros de RPE de 4-(N,N-dimetil-N-nonil-amônio)tempo-brometo . . . . .	90
4.4	Esquema da protonação da droga em cada fase e da adsorção de cada forma da droga. . . . .	94
4.5	$A_a^-(0)$ e $A_a(-1)$ vs. concentração da sonda . . . . .	98
4.6	$A_a^-(0)$ vs. $A_a(-1)$ . . . . .	99
4.7	$P$ vs. concentração de lipídios . . . . .	100
4.8	$A_T^-(0)$ vs. $A_a(-1)$ . . . . .	100
4.9	$P$ vs. força iônica . . . . .	101
4.10	$A_v^-(0)$ vs. concentração da sonda . . . . .	103
4.11	$P$ vs. concentração da sonda . . . . .	105
4.12	$A_T^-(0)$ vs. $A_a(-1)$ . . . . .	105
4.13	$P$ vs. concentração de lipídios . . . . .	107
4.14	$A_v^-(0)$ vs. concentração da sonda . . . . .	107
4.15	$P$ vs. concentração da sonda . . . . .	108

4.16	$A_T^{(0)}$ vs. $A_T^{(-1)}$ . . . . .	108
4.17	$P$ vs. $[A_T]/[L_T]$ . . . . .	109
4.18	$\beta$ em função de $[A_T]/[L_T]$ . . . . .	110
4.19	$\nu_s$ em função de $[A_T]/[L_T]$ . . . . .	110
4.20	$P$ vs. $[A_T]/[L_T]$ . . . . .	111
4.21	$\beta$ em função de $[A_T]/[L_T]$ . . . . .	112
4.22	$\nu_s$ em função de $[A_T]/[L_T]$ . . . . .	112
5.1	Esquema da estrutura molecular do anestésico dibucaína. . . . .	116
5.2	Esquema do retículo sarcoplasmático . . . . .	116
5.3	Esquema da $\text{Ca}^{++}$ -ATPase do retículo sarcoplasmático. . . . .	117
5.4	Perfis, obtidos mediante DSC, típicos de uma amostra de RSL . . . . .	122
5.5	Absorbância de arsenazo III (660 nm) vs. tempo. . . . .	125
5.6	Perfil com linha de base corrigida, obtido mediante DSC, típico de uma amostra de RSL em presença de $\text{Ca}^{++}$ 1 mM. . . . .	128
5.7	Efeito do $\text{Ca}^{++}$ sobre os perfis, obtidos mediante DSC, de amostras de RSL. . . . .	130
5.8	Dependência das temperaturas de desnaturação $T_{m_1}$ e $T_{m_2}$ com a concentração de $\text{Ca}^{++}$ livre. . . . .	131
5.9	Dependência da temperatura crítica $T_{c_2}$ com a concentração de $\text{Ca}^{++}$ livre. . . . .	133
5.10	Perfil, obtido mediante DSC, típico de uma amostra de RSL em presença de $\text{Ca}^{++}$ 1 mM e dibucaína 0,5 mM. . . . .	134
5.11	Efeito da dibucaína sobre o perfil, obtido mediante DSC, de amostras de RSL em presença de $\text{Ca}^{++}$ 1 mM. . . . .	135
5.12	Dependência das temperaturas de desnaturação $T_{m_1}$ e $T_{m_2}$ com a concentração total de dibucaína ( $[A]_T$ ). . . . .	136
5.13	Dependência da temperatura crítica $T_{c_2}$ com a concentração total de dibucaína. . . . .	137
5.14	Perfis, obtidos mediante DSC, utilizando amostras de RS tratadas com detergentes . . . . .	139
5.15	Inativação térmica do transporte de $\text{Ca}^{++}$ . . . . .	140

5.16	Gráficos de Arrhenius da inativação do transporte de $\text{Ca}^{++}$ para diferentes concentrações de dibucaína (indicadas na figura). . . . .	141
5.17	Temperaturas críticas de inativação do transporte de $\text{Ca}^{++}$ e da hidrólise de ATP, e temperatura de desnaturação $T_{m1}$ ( ), vs concentração total de dibucaína. . . . .	142
6.1	Localização dos resíduos de cisteína na $\text{Ca}^{++}$ -ATPase do RS. . . . .	148
6.2	Esquema da estrutura molecular dos anestésicos estudados. . . . .	148
6.3	Radicais nitróxido derivados da maleimida. . . . .	149
6.4	Efeito do butanol sobre os espectros de RPE de amostras de $\text{Ca}^{++}$ -ATPase do RS marcada com MSL114. . . . .	152
6.5	Análise do efeito do butanol sobre os espectros de RPE de amostras de $\text{Ca}^{++}$ -ATPase do RS marcada com MSL114 . . . . .	152
6.6	Efeito do butanol sobre os espectros de RPE de amostras de $\text{Ca}^{++}$ -ATPase do RS marcada com MSL110. . . . .	153
6.7	Análise do efeito do butanol sobre os espectros de RPE de amostras de $\text{Ca}^{++}$ -ATPase do RS marcada com MSL110 . . . . .	153
6.8	Dependência da fração $1 - f$ com a concentração de butanol . . . . .	154
6.9	Efeito da dibucaína sobre os espectros de RPE de amostras de $\text{Ca}^{++}$ -ATPase do RS marcada com MSL114. . . . .	156
6.10	Análise do efeito da dibucaína sobre os espectros de RPE de amostras de $\text{Ca}^{++}$ -ATPase do RS marcada com MSL114 . . . . .	156
6.11	Efeito da dibucaína sobre os espectros de RPE de amostras de $\text{Ca}^{++}$ -ATPase do RS marcada com MSL112. . . . .	157
6.12	Análise do efeito da dibucaína sobre os espectros de RPE de amostras de $\text{Ca}^{++}$ -ATPase do RS marcada com MSL112 . . . . .	157
6.13	Efeito da dibucaína sobre os espectros de RPE de amostras de $\text{Ca}^{++}$ -ATPase do RS marcada com MSL110. . . . .	158
6.14	Análise do efeito da dibucaína sobre os espectros de RPE de amostras de $\text{Ca}^{++}$ -ATPase do RS marcada com MSL114 . . . . .	158

6.15	Dependência da fração $1 - f$ com a concentração de anestésico local . . .	159
6.16	Espectros de RPE de amostras de $\text{Ca}^{++}$ -ATPase do RS marcada com MSL114 com diferente relação molar marcador:proteína. . . . .	161
6.17	Análise dos espectros de RPE de amostras de $\text{Ca}^{++}$ -ATPase do RS marcada com MSL114 com diferente relação molar marcador:proteína. . . .	161
6.18	Dependência da fração $1 - f$ com a concentração de anestésico local . . .	163

# Lista de Tabelas

1.1	Temperaturas de transição ( $T_c$ ) de alguns fosfoglicéridos. . . . .	17
2.1	Algumas famílias de anestésicos. . . . .	25
2.2	Concentração dos anestésicos na membrana. . . . .	33
5.1	Parâmetros termodinâmicos para a desnaturação térmica da $\text{Ca}^{++}$ -ATPase em presença de $\text{Ca}^{++}$ . . . . .	130
5.2	Parâmetros termodinâmicos para a desnaturação térmica da $\text{Ca}^{++}$ -ATPase em presença de $\text{Ca}^{++}$ 1 mM e de dibucaína. . . . .	136
5.3	Parâmetros termodinâmicos para a inativação térmica da $\text{Ca}^{++}$ -ATPase em presença de de $\text{Ca}^{++}$ 1 mM e de dibucaína. . . . .	141
6.1	Concentrações em que os anestésicos locais perturbam a atividade enzimática . . . . .	160

# Introdução

Os anestésicos são substâncias anfífilas que agem através da interação com sítios hidrofóbicos da membrana biológica[1]. Mesmo, sendo este fato comumente aceito, tanto o mecanismo de ação como o sítio preciso em que se localiza a ação anestésica não são ainda completamente conhecidos.

Devido à grande variedade de substâncias que apresentam atividade anestésica, parece mais razoável imaginar que a interação membrana-anestésico não seja específica. Historicamente, procurou-se uma explicação para o fenômeno da anestesia em termos de interações com as regiões lipídicas da membrana. São bem conhecidas as modificações que os anestésicos induzem na organização molecular da fase lipídica: mudanças de fluidez[2-4], transições de fase[5-8], alteração da permeabilidade[9,10] ou micelização da bicamada[11,12]. No entanto, as tentativas para descrever o fenômeno da anestesia, em termos somente destas modificações, têm sido infrutíferas. Por outro lado, os anestésicos podem agir através da ligação com proteínas de membrana provocando mudanças con-

formacionais ou competindo com ligantes.

Embora seja possível que a ação anestésica tenha como alvo final certas proteínas de membrana, é plausível que os anestésicos afetem as proteínas através dos lipídios, dado que a atividade das proteínas de membrana é altamente sensível à natureza química e à organização molecular dos lipídios vizinhos[13-16]. Além do mais, os anestésicos com carga elétrica líquida, modificam o potencial superficial ao alterarem a distribuição de cargas na superfície da membrana. Estas alterações modificam a concentração de substâncias carregadas perto da interface membrana/solução aquosa e, conseqüentemente, podem alterar o funcionamento das proteínas de membrana. Uma ampla discussão ainda está em aberto sobre qual forma da droga, carregada ou neutra, é a forma ativa[2].

Em suma, atualmente é aceito que o alvo final dos anestésicos são as proteínas de membrana, em especial, os canais iônicos das células nervosas. No entanto, as proteínas envolvidas não têm sido claramente caracterizadas, nem chegou-se a um consenso sobre o modo pelo qual seriam afetadas, existindo, basicamente duas categorias de hipóteses: uma, em que se propõe a interação direta dos anestésicos com as proteínas de membrana, e outra, em que se propõe como sítio de ação primário certas regiões lipídicas da membrana, tais como o domínio lipídico em torno das proteínas.

Devido à complexa organização da membrana biológica e à conseqüente complexidade da ação anestésica, muitas vezes é difícil discernir se os efeitos são provocados por ação direta sobre as proteínas ou a partir da interferência com as interações proteína-lipídio. Assim, as membranas reconstituídas artificialmente constituem sistemas modelo convenientes para controlar os parâmetros de interesse e reduzir a complexidade, facilitando a determinação do grau de participação lipídica e proteica nas interações membrana-anestésico. Entretanto, alguns sistemas naturais, como, por exemplo, as vesículas de retículo sarcoplasmático, são bem caracterizados e oferecem suficiente simplicidade para o estudo dos efeitos de fármacos sobre a membrana.

Em relação às técnicas de estudo das interações membrana-anestésico, a técnica de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) tem sido muito utilizada para o estudo de

sistemas biológicos, principalmente a partir da síntese química dos radicais nítróxido[17] que possuem um elétron desemparelhado e, portanto, são detetados por RPE. Estes radicais podem ser incorporados ao sistema de interesse seja como marcadores, ao ligar-se covalentemente a moléculas particulares do sistema estudado, ou, também, como sondas, moléculas independentes que se associam ao sistema de forma não covalente. Se o sistema é diamagnético, o único sinal detetado por RPE provém do radical nítróxido. Como os espectros de RPE destes radicais são sensíveis à natureza do meio no qual estão dissolvidos, então, a análise da forma das linhas do espectro oferece informação sobre as características do meio[17,18]. Assim a técnica de RPE tem sido amplamente difundida para estudar os aspectos estruturais e dinâmicos de bicamadas lipídicas[19-21] e de proteínas[22-24].

Outras técnicas muito utilizadas para o estudo da estrutura molecular dos sistemas biológicos são as técnicas de análise térmica[25]. Dentre estas, uma das mais comuns é a calorimetria diferencial de varredura (DSC) que permite medir a capacidade calorífica relativa de um sistema em função da temperatura, sendo possível registrar transições de fase e determinar os parâmetros termodinâmicos que as caracterizam[26]. A calorimetria diferencial tem sido aplicada ao estudo de transições de fase de lipídios[19,27-29] e ao estudo de macromoléculas tais como as proteínas[30,31], podendo-se obter informação sobre a proteína de forma global ou sobre domínios específicos.

Os aspectos básicos sobre as membranas biológicas são tratados no capítulo 1, sendo enfatizados os pontos de interesse em relação aos trabalhos desenvolvidos: componentes da membrana, interações entre os componentes, propriedades da membrana e sistemas modelo. Uma revisão sobre os resultados prévios relativos tanto ao fenômeno da anestesia ao nível fisiológico quanto aos efeitos dos anestésicos ao nível molecular ou sub-celular é apresentada no capítulo 2.

Dado que os anestésicos são substâncias anfífilas, podem formar sistemas micelares, dependendo da concentração e das características do meio. Segundo a droga esteja dissolvida ou organizada em micelas, a sua reatividade pode mudar, devido à capacidade catalítica das micelas[32,33], portanto, é relevante conhecer o diagrama de fases da droga



estudada, para definir as condições experimentais e/ou interpretar os resultados.

No capítulo 3, discutimos os princípios termodinâmicos da formação de micelas, propondo um modelo simplificado para descrever a micelização. Mesmo se as micelas propriamente ditas não são freqüentes nos sistemas vivos, o estudo das soluções micelares é relevante para compreender a físico-química dos sistemas biológicos, em particular o efeito hidrofóbico. Os princípios termodinâmicos básicos que guiam a formação de micelas são igualmente válidos para a formação de bicamadas lipídicas, enovelamento de proteínas e incorporação de fármacos na membrana. Portanto, os estudos sobre a micelização podem ser estendidos a um contexto mais amplo.

No capítulo 3, estudamos também o comportamento do anestésico clorpromazina (CPZ) em solução aquosa, em ausência de um meio lipídico. Como as propriedades micelares da droga dependem fortemente de condições tais como temperatura, pH e força iônica, a informação existente sobre os valores da concentração micelar crítica (cmc) da droga[22,34,35], determinada para condições particulares, diferem muito entre si. No trabalho apresentado neste capítulo, determinamos a cmc da CPZ em função do pH. A cmc é determinada mediante a técnica de RPE, utilizando-se uma sonda paramagnética anfífila que se particiona entre o meio aquoso e o meio micelar. A partir da análise espectral é possível conhecer a distribuição da sonda entre os dois meios e detectar a formação de micelas da droga. É realizado também um estudo sistemático da micelização da sonda utilizada.

Os anestésicos com amina terciária, como a clorpromazina, possuem dois estados de carga (protonado ou neutro), portanto, modificam o potencial elétrico superficial das vesículas lipídicas. Para estudar as interações membrana-anestésico é essencial conhecer a fração de droga associada à membrana e a proporção das espécies carregada e neutra em cada fase. Embora, cada forma da droga se adsorva com diferente afinidade, são obtidas, normalmente, constantes de partição ou constantes de adsorção aparentes, sem levar em conta o estado de carga da droga[35,36]. No capítulo 4, estudamos a adsorção da CPZ em lipossomos lipídicos reconstituídos artificialmente. Para determinar as constantes de adsorção de cada uma das duas formas, medimos o potencial superficial da

membrana que é modificado pela presença da forma protonada da droga. Utilizando um formalismo apropriado para descrever a incorporação da droga na membrana, podem ser determinadas as constantes de adsorção de cada uma das duas formas da droga. O potencial superficial foi estimado segundo o método que se baseia na utilização de uma molécula paramagnética anfifílica carregada positivamente como sonda para medidas de RPE[37]. Como a sonda se particiona entre o meio lipídico e o meio aquoso em função do potencial elétrico superficial, através da análise espectral, é possível conhecer a distribuição da sonda entre os dois meios e, conseqüentemente, determinar o potencial superficial.

A ação de substâncias anestésicas sobre as proteínas de membrana é investigada nos capítulos 5 e 6, através de técnicas de análise térmica e de RPE, utilizando-se como sistema modelo vesículas de retículo sarcoplasmático rico em  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase.

No capítulo 5, estudamos a desnaturação térmica de diferentes domínios da  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase do retículo sarcoplasmático, em presença do anestésico local dibucaína. O estudo foi feito mediante a técnica de DSC e mediante experiências de inativação do transporte de cálcio. Em ausência de  $\text{Ca}^{++}$ , a  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase desnatura-se, aparentemente, como uma só unidade, entretanto, em presença de  $\text{Ca}^{++}$ , os domínios são estabilizados de tal modo que podem ser detetadas, mediante DSC, duas transições separadas. Assim, observando-se os efeitos da dibucaína sobre a  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase, em presença do cátion, foram obtidos novos resultados em relação a estudos prévios sobre a  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase em ausência do cátion, mediante DSC[38]. Os resultados obtidos mostram que a dibucaína desestabiliza em diferente grau dois domínios da proteína, contrabalançando o efeito estabilizante do  $\text{Ca}^{++}$ .

Para observar os efeitos estruturais e dinâmicos dos anestésicos sobre as diferentes regiões da  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase, marcamos a proteína com radicais nitróxido derivados da maleimida que se ligam aos grupos -SH e que podem ser monitorados por RPE. No capítulo 6, realizamos um estudo comparativo das mudanças observadas nos espectros desses marcadores quando a  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase marcada é tratada com anestésicos locais (dibucaína e tetracaína) ou com um n-álcool (butanol). Observou-se que tanto os anes-

tésicos locais estudados quanto o butanol provocam mudanças na estrutura proteica com efeitos nos espectros de RPE desses marcadores. Todas as drogas estudadas provocam efeitos semelhantes, afetando, aparentemente, a mesma região da proteína que se presume esteja localizada nos domínios globulares da enzima.

Por último, os resultados destes trabalhos e as suas possíveis extensões são discutidos no capítulo 7.

## Capítulo 1

# Membranas biológicas

A membrana celular têm um papel crucial nos processos vitais da célula, limitando sua extensão e controlando a composição iônica e molecular do meio interno. O mesmo papel desempenham as membranas do núcleo, nas células eucariotas, e das organelas intracelulares (mitocôndrias, lissossomos, retículos, etc.).

Embora as diferentes membranas biológicas apresentem características particulares, todas possuem basicamente a mesma estrutura, formada, predominantemente, por lipídios e proteínas associados por interações não covalentes. Segundo o modelo do “mosaico fluido”, proposto por Singer e Nicolson[40], os lipídios se organizam em uma folha bimolecular que constitui a matriz na qual se encontram imersas as proteínas de membrana, como é representado esquematicamente na fig. 1.1.

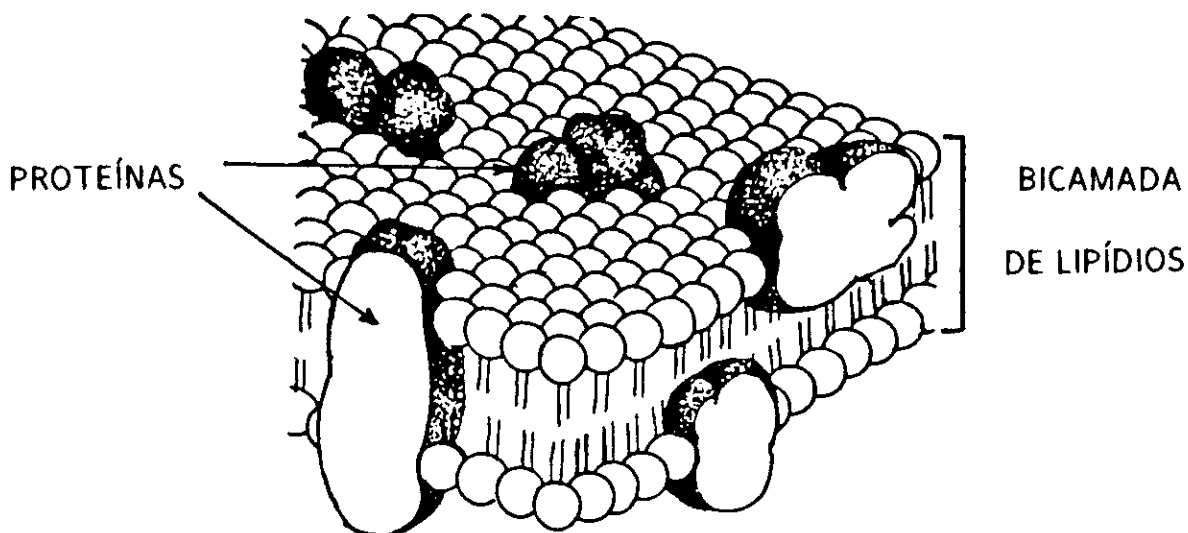


Figura 1.1: Representação esquemática da membrana biológica, segundo o modelo de Singer-Nicolson.

Entre as interações não covalentes responsáveis pela organização da membrana, as mais importantes são as denominadas *hidrofóbicas*[40]. As moléculas de hidrocarbonos apresentam maior solubilidade (ou seja, o potencial químico é mais negativo) em solventes orgânicos que em água. Este efeito, dito hidrofóbico, é devido ao fato de que a estrutura do meio aquoso em torno da molécula hidrocarbônica é alterada por interrupção da rede de pontes de hidrogênio entre as moléculas de água. Portanto, a diferença no potencial químico é proporcional à área do soluto hidrofóbico em contato com a água e, conseqüentemente, depende tanto da extensão da molécula do hidrocarbono quanto do seu empacotamento. As moléculas hidrofóbicas são, então, repelidas pelas moléculas de água, agrupando-se de forma tal que a alteração da rede seja minimizada.

Para os derivados polares (iônicos ou com momento dipolar elétrico) dos hidrocarbonos: ácidos carboxílicos, álcoois, fenóis, etc., o mesmo efeito é observado para a porção hidrocarbônica, enquanto as partes polares têm maior afinidade pelo meio aquoso. Estas últimas regiões, denominadas *hidrofílicas*, se acomodam à estrutura da água através da atração eletrostática ou da formação de pontes de hidrogênio com as moléculas polares de água. Os compostos que apresentam esse tipo de comportamento ambivalente são chamados *anfifílicos*.

## 1.1 Componentes das membranas

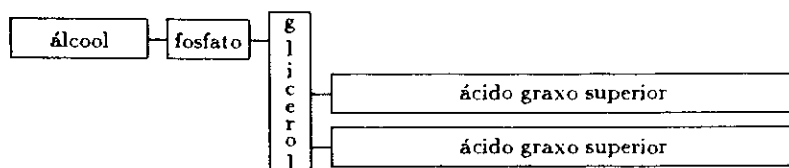
### 1.1.1 Lipídios de membrana

Os lipídios são derivados mistos dos hidrocarbonos, geralmente resultantes da esterificação de álcoois ou açúcares com ácidos graxos. Formados por um grupo polar e por uma ou duas cadeias hidrocarbônicas, são substâncias de caráter anfílico.

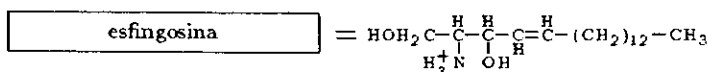
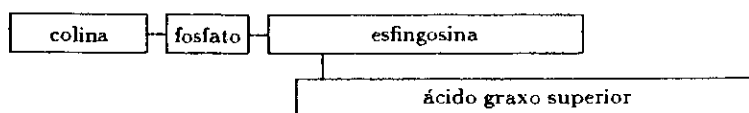
Os tipos de lipídios que predominam nas membranas biológicas são: os fosfolipídios, os glicolipídios e o colesterol[19,41,42], cujas estruturas estão representadas esquematicamente na fig. 1.2.

#### FOSFOLIPÍDIOS

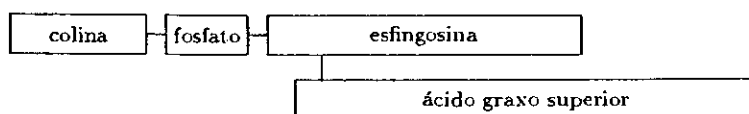
Fosfoglicéridos



Esfingomielina



#### GLICOLIPÍDIOS



#### COLESTEROL

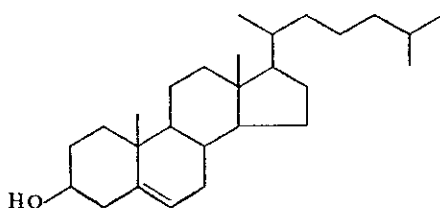


Figura 1.2: Lipídios de membrana.

Os *fosfolipídios* são derivados do glicerol (fosfoglicéridos) ou da esfingosina (esfingomielina). Nos fosfoglicéridos (ver fig. 1.3), que constituem a classe mais abundante, os dois primeiros átomos de carbono do glicerol são esterificados com os radicais carboxila de cada um de dois ácidos graxos (região hidrofóbica) e o terceiro é esterificado pelo ácido fosfórico (região polar). O composto assim resultante (ácido fosfatídico) é o fosfoglicérido mais simples; em seus derivados, o grupo polar é formado pela esterificação do fosfato com o radical hidroxila de certos álcoois. O fosfoglicéridos caracterizados pelos álcoois colina, etanolamina, inositol, serina e glicerol, são, tipicamente nessa ordem, os mais abundantes nos sistemas naturais[19,41]. Por outro lado, dependendo do pH, estes fosfoglicéridos podem apresentar diferentes estados de carga.

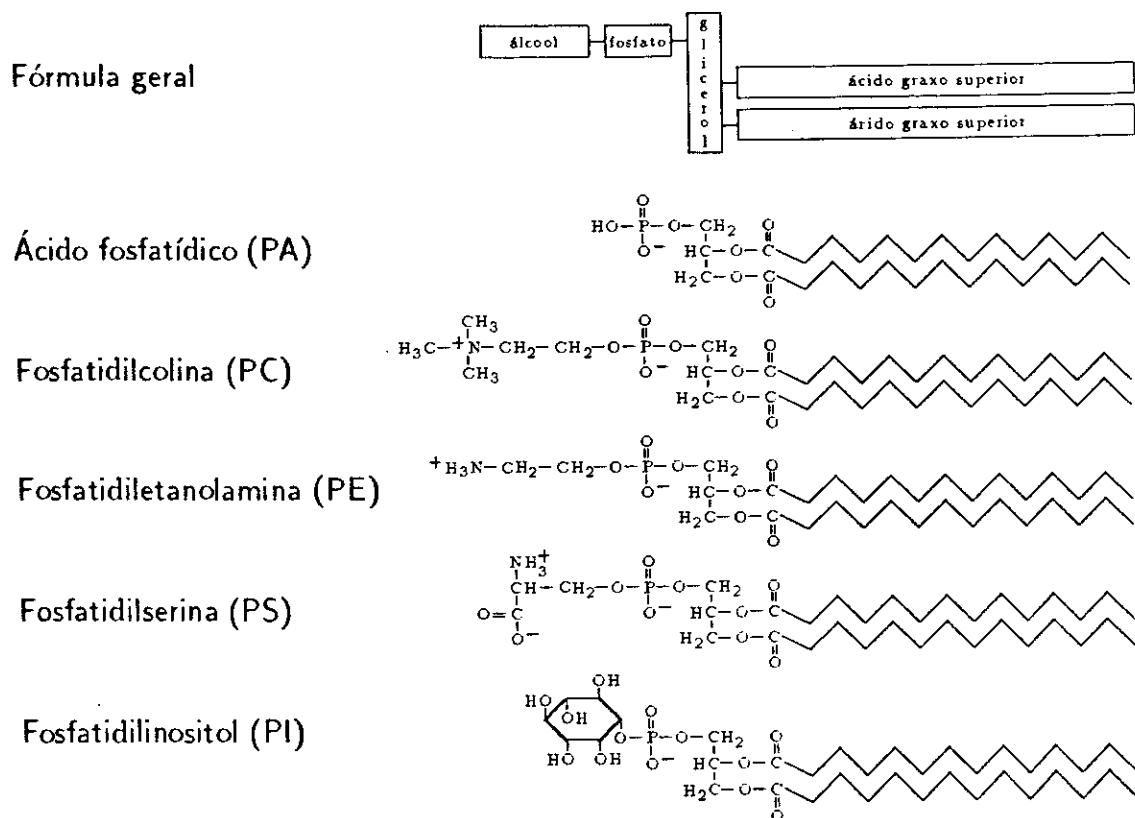


Figura 1.3: Alguns fosfolipídios derivados do glicerol (ou fosfoglicéridos). As cadeias de hidrocarbonos, representadas esquematicamente, são de comprimento e grau de saturação variáveis.

Os *glicolipídios* são similares à esfingomielina (fig. 1.2): derivam da esfingosina e contém um ácido graxo, no entanto, se distinguem pelo fato de seus grupos polares serem constituídos de um ou mais resíduos de açúcar (tais como glucose ou galactose).

As cadeias hidrocarbônicas dos lipídios de membrana variam em comprimento (normalmente com número par de átomos de carbono entre 14 e 24, sendo mais comuns as de 16 e 18) e podem ser saturadas ou insaturadas.

O *colesterol* é um esteróide. A estrutura química desta molécula é bem diferente à dos lipídios de membrana, no entanto, é classificada entre os lipídios devido à similar solubilidade em solventes orgânicos. A molécula de colesterol, cuja estrutura é mostrada na fig. 1.2, é hidrofóbica com exceção do radical hidroxila.

### 1.1.2 Proteínas de membrana

Alguns dos aminoácidos que constituem as proteínas podem ter características hidrofóbicas ou hidrofílicas. Em comparação com as proteínas solúveis, as proteínas de membrana não apresentam diferenças significativas de composição nem de distribuição de resíduos na estrutura primária[43]. Contudo, as proteínas solúveis formam, normalmente, estruturas globulares em que os resíduos hidrofóbicos se encontram no interior, evitando o contato com o meio aquoso, enquanto na maioria das proteínas de membrana, os domínios hidrofóbicos interagem no interior da bicamada com as cadeias de hidrocarbonos dos lipídios e os domínios hidrofílicos se estendem para o exterior da membrana de um ou ambos lados da bicamada. Estas proteínas são denominadas integrais e, em particular, aquelas expostas ao meio aquoso em ambos lados da membrana (como a  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase) são chamadas transmembranares (ver fig. 1.1). Existem, também, outras proteínas de membrana, as periféricas, que estão ligadas à superfície da membrana por interações eletrostáticas ou através de pontes de hidrogênio, sem interagir com as regiões hidrofóbicas.

Na membrana, estão presentes vários tipos de proteínas que desempenham diferentes funções como, por exemplo, a catálise de reações ou o reconhecimento de substâncias específicas. Entretanto, as proteínas que realizam uma das funções mais importantes



são as que permitem o transporte seletivo de substâncias através da membrana. Sem a presença destas proteínas, não haveria, praticamente, troca de matéria entre os meios separados pela membrana, dada a baixa permeabilidade que apresentam as bicamadas de lipídios para íons e moléculas polares. Algumas destas proteínas constituem simples canais para o fluxo de íons segundo o gradiente eletroquímico (gradiente de concentração do íon e gradiente do potencial elétrico), permitindo o *transporte passivo*; outras proteínas promovem o transporte contra esse gradiente, efetuando o *transporte ativo*. Em contraste com o transporte passivo, que se produz espontaneamente, o ativo deve estar acoplado a uma fonte de energia, normalmente proporcionada pela hidrólise de compostos fosforilados como o ATP. Estas proteínas transportadoras são essenciais para a manutenção da composição específica do meio interno, necessária para o desempenho da atividade fisiológica. Uma proteína típica desta classe é a  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase que será descrita no capítulo 5.

As proteínas constituem, em média, a metade da composição em peso das membranas biológicas, sendo também responsáveis, juntamente com os lipídios, pela estrutura da membrana.

## 1.2 Propriedades das membranas

Acima de uma certa concentração em meio aquoso, as moléculas anfifílicas se associam espontaneamente formando agregados globulares denominados *micelas*. Em cada micela, as moléculas se acomodam em uma geometria aproximadamente esférica ou elipsoidal de tal modo que o grupo polar de cada molécula fica exposto à água, sendo que para as regiões hidrofóbicas o contato com a água é minimizado. A relação área/volume da micela será determinada pelo balanço entre o efeito hidrofóbico e a repulsão entre as cabeças polares. Existirá, portanto, uma distribuição de formas e tamanhos tais que satisfazam uma relação área/volume em torno do valor ótimo.

Não podendo haver água ou espaço vacío dentro da micela, pelo menos uma das dimensões do núcleo hidrofóbico deve ser menor que o dobro do comprimento da porção hidrofóbica do monômero[44]. Segundo esta restrição, o crescimento, ou seja o aumento

do número de agregação (número de monômeros por micela), sob geometria esférica, é limitado. Então, o crescimento é somente possível sob formas semelhantes a elipsóides prolatos ou oblatos. No caso em que duas dimensões sejam fixas, a micela, inicialmente esférica, crescerá em forma de cilindro com capas arredondadas (ou elipsóide prolato); no caso em que somente uma dimensão seja fixa, resultará um disco com bordas arredondadas (ou elipsóide oblato). O crescimento acontece, respectivamente, na direção paralela e na perpendicular ao eixo de simetria da micela (ver fig. 1.4).

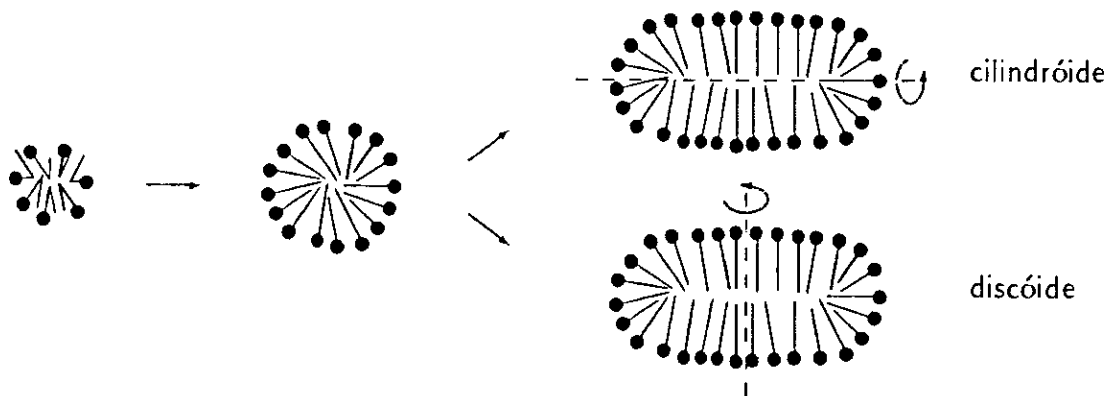


Figura 1.4: Seqüência do crescimento micelar.

O crescimento subsequente destas estruturas se produz praticamente sem variação da relação área/volume, uma vez que os efeitos de bordas são desprezíveis, principalmente à medida que o número de agregação aumenta. A estrutura em forma de discos, leva, através do aumento do número de agregação, à formação de extensas folhas bimoleculares ou *bicamadas*[43]. Estas bicamadas podem dobrar-se sobre si mesmas até delimitar em um compartimento aquoso fechado, denominado *vesícula* ou *lipossomo*, sem modificação da relação área/volume.

Os fosfolípidios, que apresentam duas cadeias hidrocarbônicas por grupo polar, tendem a organizar-se em bicamadas planas (fase lamelar) ou em vesículas, evitando as formas de micelas globulares[44]. A formação destas estruturas é a base para a organização da membrana biológica (fig. 1.1).

A organização da membrana se baseia em ligações *não covalentes*. A formação de bicamadas de lipídios em solução aquosa é um processo rápido e espontâneo. As interações hidrofóbicas são predominantes, mas também participam forças atrativas de van der Waals entre as cadeias dos hidrocarbonos (favorecendo a compactação dos lipídios), interações eletrostáticas entre as cabeças polares e pontes de hidrogênio entre os grupos polares e as moléculas de água. Estas interações são menos intensas do que as covalentes, mesmo as ligações iônicas, que em solução aquosa são enfraquecidas devido à blindagem provocada pelas moléculas polares de água e pela presença de contraíons. O modo de associação entre os componentes da bicamada, assim resultante, confere à membrana uma estrutura de natureza flexível e fluida, sem a rigidez que as ligações covalentes eventualmente provocariam.

Outra característica da membrana biológica é a *assimetria*: a composição lipídica diferente em cada camada e a orientação específica das proteínas de membrana conferem ao conjunto uma assimetria tanto estrutural quanto funcional.

Os componentes da membrana apresentam uma mobilidade muito grande, a temperaturas fisiológicas. Tanto lipídios quanto algumas proteínas se difundem rapidamente no plano da bicamada (*difusão lateral*), com coeficientes de difusão típicos da ordem de  $1\mu\text{m}^2/\text{s}$  e  $10^{-2}\mu\text{m}^2/\text{s}$ , respectivamente[19,45]. Os lipídios podem também passar de uma camada a outra (“flip-flop” ou *difusão transversal*), porém, com frequência muito baixa quando ocorre espontaneamente (1 vez em minutos ou em dias)[19,46]. Por outro lado, os movimentos intramoleculares (tais como vibração e rotação de cada molécula ou de segmentos da mesma) são rápidos dentro da membrana: as cadeias de átomos de carbono constituem regiões muito flexíveis das moléculas de fosfolipídios (a mobilidade dos segmentos é da ordem de  $10^{12}/\text{s}$ [19]) e estas moléculas giram rapidamente em torno do eixo perpendicular ao plano da membrana (*difusão rotacional*), com coeficientes da ordem de  $10^8/\text{s}$ [47,48].

Portanto, pode-se dizer que, a temperaturas fisiológicas, as membranas são *estruturas fluidas*. O termo fluidez é, com frequência, utilizado ambigualmente em relação tanto à ordem orientacional das cadeias de hidrocarbonos quanto à microviscosidade. A

ordem, associada com o grau de organização espacial, não necessariamente corresponde a rigidez das cadeias. Considerando a membrana como bi-dimensional, segundo sugere o modelo de Singer-Nicolson, a sua natureza anisotrópica poderia ser representada pela combinação de dois vetores de viscosidade, um perpendicular e outro paralelo ao plano da bicamada. A membrana biológica, embora seja substancialmente bi-dimensional, é um sistema anisotrópico e inhomogêneo, dado que vários elementos agregam complexidade: a assimetria da bicamada, o gradiente de mobilidade dos segmentos moleculares entre a cabeça polar e o centro da bicamada e a presença de domínios de lipídios em diferentes fases. Portanto, um parâmetro apropriado para medir o grau de fluidez é a microviscosidade[19,20], determinada pela mobilidade translacional e rotacional dos componentes individuais da membrana.

As bicamadas de lipídios podem se encontrar em diferentes fases estruturais diferenciadas pela fluidez das cadeias de hidrocarbonos e pela simetria da organização molecular[48,49].

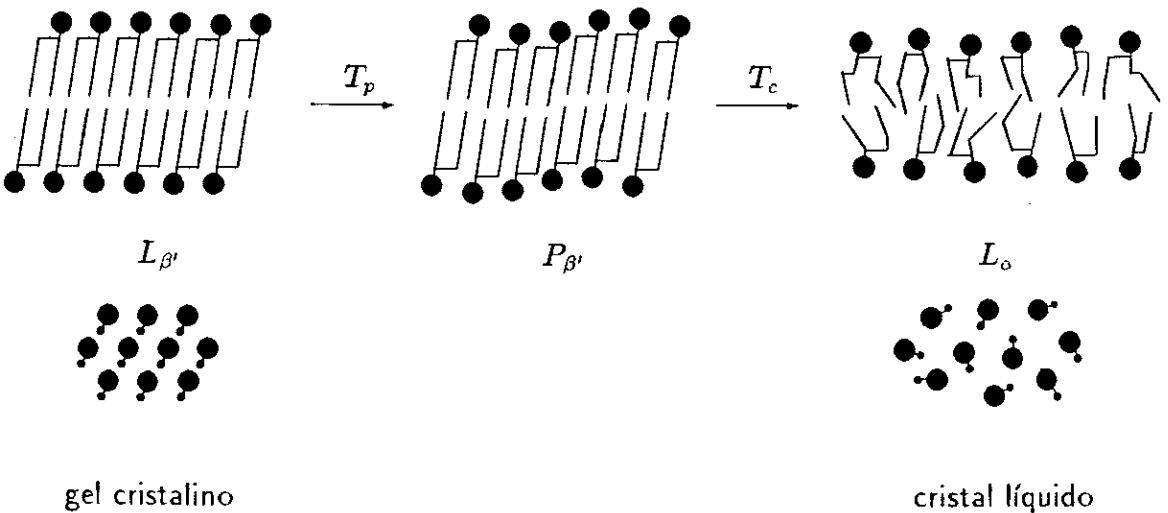


Figura 1.5: Representação esquemática da pré-transição ( $L_{\beta'} \rightarrow P_{\beta'}$ , a temperatura  $T_p$ ) e da transição de fase principal ( $P_{\beta'} \rightarrow L_{\alpha'}$ , a temperatura  $T_c$ ) de uma bicamada de fosfolipídios puros. Na parte superior: corte perpendicular ao plano da bicamada, na parte inferior: uma das superfícies da bicamada.

Uma membrana artificial constituída de um único tipo de fosfolípido com cadeias hidrocarbônicas simétricas, passa, a temperaturas bem definidas, de uma fase  $L_{\beta'}$ , de baixa temperatura, ordenada e rígida (gel cristalino) a uma fase intermediária  $P_{\beta'}$  e de esta para uma fase  $L_{\alpha}$ , de alta temperatura, desordenada e fluida (cristal-líquido ou fase fluida)[19,20,48]. Na figura 1.5, é apresentado um esquema destas transições de fase. Na fase de gel cristalino, tanto as cadeias de ácidos graxos quanto as cabeças polares estão ordenados seguindo direções preferenciais e a mobilidade é baixa. A fase intermediária é, também, uma fase de gel cristalino mas a bicamada apresenta um perfil ondulado característico[48]. Na fase fluida, não existe uma orientação privilegiada das cadeias de hidrocarbonos nem das cabeças polares e a mobilidade dos componentes da bicamada é maior. Quando a bicamada passa da fase cristalina para a fase fluida, aumenta a área, a espessura diminui e o volume total aumenta[20].

A temperatura crítica  $T_c$  da transição principal ( $P_{\beta'} \rightarrow P_{\alpha}$ ) aumenta diretamente com o comprimento das cadeias e inversamente com o grau de insaturação, já que cadeias mais curtas interagem menos fortemente e duplas ligações *cis* (que são as mais comuns nos ácidos graxos[41]) produzem dobras na cadeia de carbonos que impedem o empacotamento. Também o grupo polar tem efeito sobre a temperatura de transição. A tabela 1.1, na qual são apresentados os valores das temperaturas críticas ( $T_c$ ) correspondentes a vários fosfoglicéridos, ilustra esses efeitos sobre a temperatura da transição principal.

O comportamento de fases descrito corresponde principalmente às fosfatidilcolinas simétricas. Para fosfolípidos com carga líquida (tais como PA e PE) não é observada a pré-transição[48].

Em membranas de fosfolípidios puros, dependendo do tipo de fosfolípido, a bicamada pode sofrer outras transições para fases distintas das mencionadas. Os fosfolípidios assimétricos, com cadeias cujos comprimentos diferem em mais de quatro átomos de carbono, podem se encontrar em diferentes fases interdigitadas[27] caracterizadas pelo modo de interpenetração das cadeias dos fosfolípidios de camadas opostas. Também podem existir fases fluidas caracterizadas por uma orientação preferencial das cabeças polares ou das cadeias[48], fases de gel desordenado[47] e fases cristalinas diferenciadas

Grupo polar	Ácidos graxos	$T_c$ ( $^{\circ}\text{C}$ ) <sup>ref.</sup>	
colina	di 12:0	-1,8 <sup>[20,50]</sup>	
	di 14:0	23 <sup>[19,48,50]</sup> ; 23,9 <sup>[20]</sup> ; 24 <sup>[28]</sup>	
	18:0/14:0	31 <sup>[27,50]</sup>	
	di 16:0	41 <sup>[28,48,50]</sup> ; 41,4 <sup>[20]</sup> ; 42 <sup>[19]</sup>	
	16:0/18:0	44 <sup>[50]</sup>	
	18:0/16:0	47 <sup>[50]</sup>	
	di 18:0	54,9 <sup>[20]</sup> ; 55,2 <sup>[27]</sup> ; 58 <sup>[19]</sup>	
	di 18:1 <sub>2</sub>	41 <sup>[20]</sup>	
	di 18:1 <sub>16</sub>	35 <sup>[20]</sup>	
	di 18:1 <sub>4</sub>	23 <sup>[20]</sup>	
	18:1 <sub>9</sub> /18:0	15 <sup>[19]</sup>	
	18:0/18:1 <sub>9</sub>	3 <sup>[19]</sup>	
	di 18:1 <sub>14</sub>	7 <sup>[20]</sup>	
	di 18:1 <sub>6</sub>	1 <sup>[20]</sup>	
	16:0/18:1 <sub>9</sub>	-5 <sup>[19]</sup>	
	di 18:1 <sub>12</sub>	-8 <sup>[20]</sup>	
	di 18:1 <sub>9</sub>	-18 <sup>[48]</sup> ; -21 <sup>[20]</sup> ; -22 <sup>[19,20,50]</sup>	
	glicerol	di 14:0	23 <sup>[50]</sup>
		di 16:0	41 <sup>[19,50]</sup>
serina	di 14:0	38 <sup>[50]</sup>	
	di 16:0	51 <sup>[50]</sup> ; 53 <sup>[19]</sup>	
etanolamina	di 14:0	49,5 <sup>[20]</sup>	
	di 16:0	60 <sup>[50]</sup> ; 63,8 <sup>[20]</sup> ; 64 <sup>[19]</sup>	
a. fosfatídico	di 14:0	51 <sup>[28]</sup>	
	di 16:0	67 <sup>[28]</sup>	

**Tabela 1.1:** Temperaturas de transição ( $T_c$ ) de alguns fosfoglicéridos identificados pelo álcool da cabeça polar, pelo comprimento e pelo número de duplas ligações de cada cadeia carbônica. Os índices inferiores indicam as posições das duplas ligações *cis*. Os valores das temperaturas críticas correspondem a pH 7.

pela direção orientacional das cadeias[48] ou pelo grau de empacotamento (tal como a fase  $L_c$  denominada sub-gel em que o empacotamento é maior e o grau de hidratação menor que na fase  $L_{\beta'}$ , [27]). Também podem produzir-se transições para fases em que os lipídios deixam de organizar-se em bicamadas (fases micelares)[19]. Por exemplo, os fosfolipídios com carga líquida (tal como PE) podem organizarse em aglomerados de micelas cilíndricas invertidas[49].

Em geral, as membranas formadas por um determinado tipo de fosfolipídio podem sofrer só algumas das transições de fase mencionadas[49], sendo induzidas por variação da temperatura (termotrópicas), da concentração lipídica (liotrópicas) ou de outros fatores tais como pH e força iônica.

Em membranas mistas, formadas por dois tipos de fosfolipídios, com diferentes temperaturas críticas, podem produzir-se separações de fases[19,21,48,51], de maneira tal que, na faixa de temperaturas entre as temperaturas de transição de cada lipídio, os lipídios de um mesmo tipo formam aglomerados. Assim, podem coexistir domínios de fosfolipídios em diferentes fases estruturais. Nos sistemas mistos, também é possível a formação de micelas invertidas no interior da bicamada[19].

Em membranas naturais, constituídas por misturas de fosfolipídios, em alguns casos, a mistura pode desfavorecer a cooperatividade das transições de fase[19], em outros, pode surgir um comportamento de fases complexo.

A fluidez e o grau de ordem da membrana biológica, além de serem regulados por fatores físicos como pressão e temperatura, são controlados principalmente pela composição lipídica, já que dependem das características das cabeças polares e do comprimento e insaturação das cadeias de ácidos graxos. Em especial, é relevante o conteúdo de colesterol. O colesterol aumenta a estabilidade mecânica da membrana na fase fluida, diminuindo a compressibilidade lateral, sem afetar sensivelmente a microviscosidade. Na presença de colesterol, a ordem orientacional das cadeias na fase fluida aumenta, enquanto na fase cristalina diminui. Em proporções maiores que as típicas dos sistemas naturais, faz também diminuir a fluidez das cadeias na fase de alta temperatura e aumentar a fluidez na fase cristalina, de modo tal que a transição principal é suprimida[19,47]. Na fase fluida, a porção rígida dos anéis da molécula de colesterol interage e imobiliza parcialmente as regiões das cadeias de hidrocarbonos próximas aos grupos polares deixando somente o final da cadeia flexível. Na fase cristalina, o colesterol tem o efeito de evitar que as cadeias carbônicas se aproximem e cristalizem, inibindo assim o aumento de ordem e a diminuição de fluidez que se produziriam a baixas temperaturas[47,52].

Entretanto, o pH, a força iônica, o grau de hidratação da membrana, as proteínas de membrana (como se verá na seguinte secção), íons como o  $\text{Ca}^{++}$ , que pode ligarse aos lipídios carregados, e outras substâncias presentes são, também, responsáveis pelo estado da bicamada[19,20,48]. Nos organismos vivos, existem mecanismos complexos que permitem manter as membranas no estado fluido requerido para a maioria dos processos biológicos. Por exemplo, nos animais que hibernam, a temperatura do corpo se reduz

durante o inverno mas as membranas se mantêm no estado fluido como conseqüência da alteração da composição lipídica[47].

### 1.3 Interações proteína-lipídio

A fluidez da membrana é de fundamental importância para a maioria de suas funções, especialmente para a atividade enzimática que é modulada pelo entorno lipídico.

Quando o meio é alterado, seja através de mudanças da composição lipídica da matriz em que se acha imersa a proteína, seja através da variação de temperatura, pH ou concentração de outras substâncias, as proteínas podem sofrer mudanças intramoleculares, sem ruptura das ligações covalentes, passando a um estado conformacional em que a proteína está total ou parcialmente desativada, processo denominado *desnaturação*[53].

O modelo do “mosaico fluido” de Singer e Nicholson implica que a membrana é um meio lipídico uniforme no qual estão imersas as proteínas de membrana. No entanto, estudos por EPR revelam a presença de duas populações de lipídios diferenciadas pelo grau de mobilidade, de tal forma que a população mais imobilizada está associada à presença de proteínas e é proporcional à concentração de proteínas na membrana. Portanto, foi proposta a idéia de que os lipídios vizinhos à proteína (lipídios anulares ou de interface) encontram-se mais imobilizados que os outros lipídios na bicamada[54]. As interações lipoproteicas são importantes especialmente para selarem eficientemente a bicamada à proteína (o qual é particularmente vital nos fenômenos de transporte) e para manterem a proteína em uma conformação ativa.

Por exemplo, os lipídios da interface têm um papel importante na determinação da conformação ativa de proteínas de membrana tais como a  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase[13]. A atividade destas proteínas é altamente sensível à composição química (tanto das cadeias de ácidos graxos quanto dos grupos polares) dos fosfolipídios que a rodeiam, assim como à fase em que os lipídios vizinhos se encontram[13-15]. O transporte de cálcio e a atividade da  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase estão relacionados com a fluidez dos lipídios vizinhos de tal forma que a atividade decai quando a fluidez aumenta[16]. Fenômenos tais como desordem, fluidificação ou separação lateral de fases[51] podem alterar a função proteica como resultado



de facilitarem ou inibirem mudanças conformacionais.

As proteínas de membrana também requerem para seu funcionamento adequado de lipídios com grupos polares específicos, por exemplo, o estado de carga elétrica desses grupos é um dos fatores determinantes, dado que alterações de carga podem induzir mudanças conformacionais[55].

Por outro lado, os lipídios desempenham também um papel importante na mediação das interações proteína-proteína com efeitos sobre a agregação de proteínas. Isto é particularmente relevante no caso de formação de canais por polimerização de proteínas, com o qual os lipídios poderiam interferir.

Destas considerações, compreende-se o porque da grande variedade de lipídios que constituem as membranas e das diferentes composições da membrana segundo a sua função biológica.

Assim como as proteínas são sensíveis ao ambiente lipídico, reciprocamente, as proteínas têm efeitos perturbadores sobre o estado da bicamada através das interações proteína-lipídio. A fluidez da bicamada é regulada pelo comprimento e grau de insaturação das cadeias dos lipídios, e, outrossim, por outras substâncias presentes na membrana, tais como, em particular, as proteínas de membrana.

Por exemplo, a incorporação de proteínas em membranas reconstituídas introduz desordem e restringe o movimento das cadeias dos fosfolipídios vizinhos[54,56] ou induz a interdigitação das cadeias[29]. Em alguns casos, as proteínas produzem deslocamento da temperatura de transição, devido à presença de resíduos carregados que reduzem a repulsão eletrostática entre grupos polares[48]. Mudanças na conformação proteica também podem mediar alterações da fluidez da bicamada[22]. Encontrou-se que mudanças conformacionais das proteínas do retículo sarcoplasmático induzem desordem em regiões locais da bicamada lipídica[23].

### 1.3.1 Purificação de proteínas

Em geral, as proteínas de membrana são classificadas segundo o método seguido para sua extração. Assim, distinguem-se as proteínas periféricas ou extrínsecas, que são extraídas utilizando-se soluções salinas (por exemplo, 1M NaCl), e as integrais

ou intrínsecas, que requerem métodos mais agressivos baseados no uso de solventes orgânicos ou detergentes que destroem a bicamada. Esta classificação, apesar de utilizar a mesma nomenclatura mencionada anteriormente na seção 1.1.2, nem sempre corresponde estritamente a uma classificação segundo a descrição molecular de como estas proteínas estão associadas à bicamada, ressaltando, entretanto, que em alguns casos a estrutura molecular não é bem conhecida. Entretanto, é razoável pensar que ambas classificações coincidem na maioria dos casos: para proteínas ligadas à bicamada por interações eletrostáticas ou ponte de hidrogênio, é suficiente a adição de sais ou mudanças no pH para eliminar essas interações, enquanto, para proteínas associadas à bicamada por interações predominantemente hidrofóbicas (caso em que o método anterior resultaria ineficaz), são necessários para solubilizá-las detergentes capazes de romper essas associações.

Na purificação de proteínas integrais, as terminações hidrofóbicas dos detergentes deslocam os lipídios que rodeiam a proteína, entretanto, o extremo polar tende a dissolver a proteína no meio aquoso na forma de um complexo proteína-detergente. Assim, uma complicação resultante deste método é o fato de que os detergentes podem modificar a estrutura terciária da enzima (desnaturação), provocando a perda de atividade enzimática.

## 1.4 Sistemas modelo

Para estudar as propriedades da membrana biológica assim como os efeitos produzidos por substâncias que agem ao nível da membrana, podem ser utilizados sistemas naturais tais como hemácias, bactérias e organelas intracelulares. Porém, a membrana natural é um sistema complexo, com múltiplos componentes que interagem fortemente. A utilização de sistemas modelo artificialmente reconstituídos pode facilitar o seu estudo. As propriedades físico-químicas da matriz lipídica podem ser estudadas em sistemas tais como vesículas reconstituídas em que é possível controlar a composição de fosfolipídios. A purificação de proteínas de membrana permite estudar a sua estrutura e comportamento fora do meio lipídico. A partir destes modelos, podem ser discernidas as

contribuições dos componentes lipídicos e proteicos nos diversos fenômenos. Finalmente, mediante a incorporação de proteínas em vesículas artificiais, podem ser produzidos sistemas mais realistas, ainda assim conservando certa simplicidade.

#### 1.4.1 Vesículas naturais

Existem alguns sistemas naturais que oferecem relativa simplicidade.

Os *eritrócitos*, por exemplo, carecem de organelas e uma vez removido o conteúdo citoplasmático (com uma solução salina hipotônica), fornecem um sistema de membranas puras que podem ser obtidas com facilidade[52].

De particular interesse são as *vesículas do retículo sarcoplasmático*. Estas vesículas constituem um sistema bem caracterizado (composição lipídica e proteica) e é possível isolar frações em que o conteúdo proteico é formado quase exclusivamente pela  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase, cuja estrutura e função são bem conhecidas. Portanto, este sistema representa um modelo apropriado para correlacionar mudanças estruturais com mudanças funcionais. Uma descrição detalhada deste sistema é apresentada no capítulo 5.

#### 1.4.2 Membranas artificialmente reconstituídas

Alguns tipos de membranas que podem ser obtidas artificialmente são as seguintes:

- *monocamadas*: são camadas de lipídios produzidas pelo depósito de lipídios na interface água/ar. Estes sistemas podem ser obtidos facilmente e modelados teoricamente com simplicidade.
- *Filmes*: são bicamadas planas formadas em um orifício ( $\phi \simeq 1\text{mm}$ ) entre dois compartimentos aquosos. Inicialmente, uma monocamada é formada na superfície de um dos compartimentos, diminuindo-se depois o nível de água desse compartimento até transferir a monocamada ao orifício. Transfere-se outra monocamada quando o nível de água é levado novamente acima da posição do orifício[57].
- *Lipossomos multilamelares*: são vesículas formadas por várias bicamadas concêntricas, com diâmetro externo entre  $0,1\mu\text{m}$  e vários  $\mu\text{m}$ [58]. São obtidas por

suspensão de fosfolipídios num meio aquoso. Os lipídios são primeiro dissolvidos em uma solução orgânica, em seguida o solvente é evaporado de maneira tal que se forme um filme lipídico nas paredes do recipiente. O filme é hidratado com a adição de uma solução tampão apropriada, à temperatura acima da temperatura de transição do lipídio utilizado[50].

- *Lipossomos unilamelares*: ou vesículas, são compartimentos aquosos, de geometria aproximadamente esférica, delimitados por uma bicamada de lipídios. São obtidos submetendo uma suspensão de lipossomos multilamelares a ultra-som[50] ou à técnica de extrusão[59,60]. Pelo primeiro método, são produzidas vesículas com diâmetros distribuídos na faixa entre 20 nm e vários  $\mu\text{m}$ , portanto, se for necessária a seleção de tamanhos, deve ser aplicada uma técnica adicional (tal como a centrifugação). A técnica de extrusão permite a obtenção direta de vesículas de um determinado diâmetro, dependendo do filtro utilizado. Uma outra técnica que pode ser utilizada é a diálise[61], que permite a obtenção de lipossomos unilamelares gigantes ( $\phi \simeq 100\mu$ ).

## Capítulo 2

# Anestésicos

As substâncias anestésicas, segundo a definição mais geral, são aquelas capazes de bloquear, em forma reversível, o potencial de ação de células nervosas ou musculares, sem afetar apreciavelmente o potencial de repouso[1]. Conseqüentemente, substâncias muito diversas podem ser consideradas anestésicas. Na tabela 2.1[1], É apresentada uma lista de algumas famílias de anestésicos, agrupados principalmente segundo a sua aplicação farmacológica.

Anestésicos locais usuais	Procaína Cocaína Lidocaína Tetracaína Dibucaína
Álcoois (n-álcoois)	Metanol Etanol Propanol Butanol ... Undecanol
Anestésicos intravenosos	Uretane Cloralose
Tranqüilizantes	Clorpromazina
Anestésicos inaláveis	Éter
Narcóticos	Morfina
Sedativos	Barbital Pentobarbital
Antiinflamatórios	Ácido salicílico Fenilbutazona
Esteroides	Hidroxidiona
Antihistamínicos	Difenhidramina
Antiparkinsonianos	Caramifen
Relaxantes musculares	Benzimidazole
Anticonvulsivos	Paraldeido Trimetadiona
Antiarrítmicos	Propanolol Procaína amida
Detergentes	Lauril sulfato de sódio

**Tabela 2.1:** Algumas famílias de anestésicos.

Dependendo da diferença de potencial através da membrana do axônio de uma célula nervosa, os canais de  $\text{Na}^+$  podem encontrar-se, essencialmente, em algum de três estados: aberto, fechado ou inativado. De modo simplificado, pode dizer-se que, o potencial de ação é gerado basicamente pela abertura dos canais de  $\text{Na}^+$  (aumento significativo da permeabilidade dos canais ao íon) induzida por um estímulo elétrico despolarizante, resultando em um fluxo líquido de  $\text{Na}^+$  (mais abundante no exterior) para o interior da célula. Nesta situação, a diferença de potencial através da membrana alcança o seu valor máximo. Após ficarem abertos durante um intervalo de tempo da ordem de 1 ms, os canais passam para o estado inativado, estado em que ficam fechados e inabilitados

para serem abertos novamente. Durante a inativação dos canais, o potencial volta ao valor de repouso e depois de um certo intervalo de tempo, os canais passam ao estado fechado, que difere do estado inativado no fato de que o canal pode ser aberto ante um novo estímulo. O pulso ou potencial de ação, assim gerado, estimula as regiões vizinhas na membrana, produzindo-se a transmissão do potencial de ação ao longo da membrana celular (ver fig. 2.1). Além dos canais de  $\text{Na}^+$ , participam também outros canais iônicos, como, por exemplo, os de  $\text{K}^+$ , que, quando abertos, hiperpolarizam a membrana de modo tal que permitem restabelecer mais rápido o potencial de repouso e diminuir o tempo durante o qual os canais de  $\text{Na}^+$  permanecem inativados.

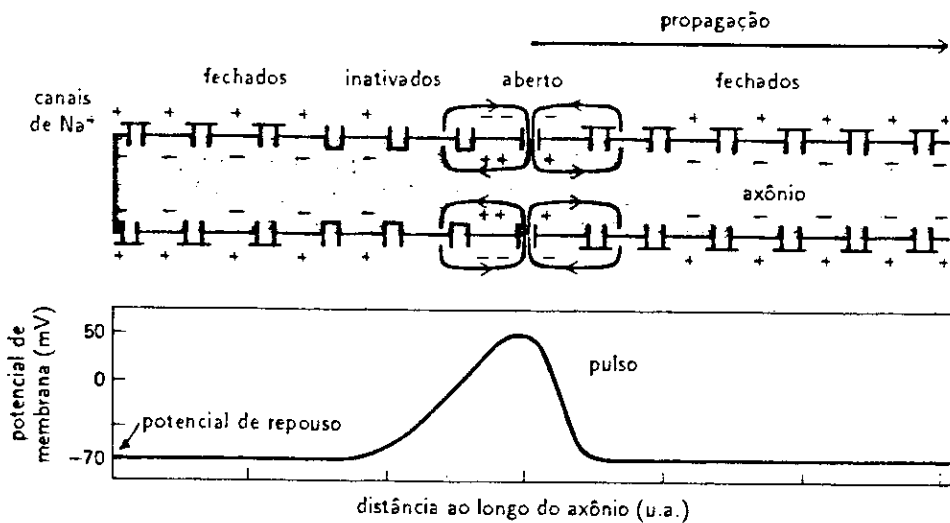


Figura 2.1: Esquema da produção e propagação do potencial de ação.

Dependendo da concentração, os anestésicos podem bloquear a propagação do potencial de ação ou inibir parcial ou totalmente a excitação (capacidade da célula para responder a um estímulo). A concentração de anestésicos requerida para bloquear a propagação do sinal nervoso (condição de anestesia local) é menor que a necessária para bloquear a excitação local, já que, embora as células anestesiadas não possam propagar impulsos, elas podem responder localmente se estimuladas fortemente[1]. O bloqueio da propagação e o bloqueio da excitação poderiam ser fenômenos originados a partir de mecanismos diferentes.

Em contraste com a anestesia local, a indução de anestesia geral envolve sítios em regiões do cérebro[62]. A concentração de anestésicos requerida para provocar anestesia geral é de 10 a 20 vezes menor que a necessária para anestésiar localmente[1]. Nessas condições, a excitabilidade (inverso da intensidade do estímulo mínima necessária para induzir resposta) é reduzida.

Os anestésicos podem bloquear o potencial de ação sem alterarem apreciavelmente o potencial de repouso, portanto, são considerados “estabilizadores elétricos” da membrana. Não são estabilizadores mecânicos porque, mesmo tendo um efeito estabilizador a baixas concentrações, em concentrações altas levam à ruptura ou à dissolução da membrana. A presença de anestésicos, em concentrações que não afetam apreciavelmente o potencial de repouso, inibe o aumento de permeabilidade ao  $\text{Na}^+$  responsável pela indução do potencial de ação[1]. O bloqueio do potencial de ação é, aparentemente, provocado por perturbação dos canais de  $\text{Na}^+$ . No entanto, desconhecem-se tanto o sítio quanto o mecanismo pelo qual os anestésicos modificam o funcionamento normal desses canais. O fluxo de  $\text{Na}^+$  poderia ser reduzido por diferentes mecanismos: redução da permeabilidade (ou condutância) de alguns canais, aumento do número de canais no estado inativado quando é aplicado o estímulo, diminuição da fração de canais ativos que abrem-se como consequência de uma dada despolarização, aumento da constante de tempo do processo de ativação e redução da constante de tempo de inativação[63]. Diversos compostos reduzem o fluxo de  $\text{Na}^+$  através de efeitos diferentes e, aparentemente, existem vários sítios em ou em torno do canal de  $\text{Na}^+$  que são afetados pelos anestésicos[63]. Por outro lado, devido à existência de vários tipos de canais de  $\text{K}^+$  e de outros íons e à interdependência dos diferentes canais iônicos, a alteração da condutância de alguns desses canais poderia ter uma forte influência sobre o funcionamento dos de  $\text{Na}^+$ .

Doses terapêuticas de anestésicos podem provocar, no entanto, uma pequena modificação do potencial de repouso (despolarização ou hiperpolarização, da ordem de até 5 mV). Segundo Seeman[1], essas modificações são insuficientes para causar inexcitabilidade. Segundo outros autores[63], a alteração do potencial de repouso, mesmo sendo pequena, é, contudo, suficiente para desencadear um efeito potencialmente profundo so-



bre a excitabilidade do axônio. A condutância dos canais de  $\text{Na}^+$  depende muito fortemente do potencial da membrana, segundo pode inferir-se, por exemplo, da produção espontânea de pulsos em alguns neurônios. A curva que representa essa dependência é deslocada em presença de anestésicos gerais, em concentrações clínicas, e os deslocamentos observados podem ser correlacionados com as mudanças do potencial de repouso[63].

Outros estudos recentes[64,65] parecem indicar que os efeitos primários poderiam ser produzidos sobre o funcionamento de algum ou alguns canais de  $\text{K}^+$  particulares. Considerando que as redes neurais dependem, para seu funcionamento apropriado, do funcionamento dos diferentes canais, a tendência atual é pensar que a ação dos anestésicos não esteja associada a um único tipo de canal, como o de  $\text{Na}^+$ , senão a um conjunto interdependente de canais iônicos.

Entretanto, os canais envolvidos não são todos bem caracterizados e desconhece-se o modo em que o funcionamento dos canais que podem ser identificados é alterado. Por outro lado, as regiões do cérebro envolvidas na indução de anestesia geral também não estão ainda bem identificadas.

## 2.1 Especificidade dos anestésicos no sistema nervoso central

Apesar da grande variedade de substâncias que produzem efeitos anestésicos em forma aparentemente não específica, o sistema nervoso central apresenta, segundo a prática médica, seletividade para estas drogas.

Por exemplo, a clorpromazina (CPZ) é um anestésico local potente, a droga bloqueia os neurônios de modo não específico como outros anestésicos, entretanto, apresenta uma aparente especificidade, agindo no sistema nervoso central como antipsicótico. A especificidade poderia ser o resultado da localização da droga em regiões particulares do cérebro. As diferenças na localização dos distintos anestésicos seria uma consequência de possuírem propriedades físico-químicas diferentes, além do caráter anfifílico comum.

Por outro lado, por exemplo, a CPZ se adsorve com igual afinidade em distintas regiões do cérebro *in vitro*, portanto, as diferenças observadas *in vivo* podem ser devidas à diferença de permeabilidade quando a droga passa do fluxo sanguíneo para

determinada região do cérebro[1].

Outras possíveis fontes de seletividade são as seguintes:

- o efeito denominado “de corte”[1]. Em princípio, a potência anestésica (inverso da concentração requerida para produzir anestesia) aumenta com o aumento da porção hidrofóbica da molécula, mas existe um limite a partir do qual a potência decai drasticamente. Por exemplo, os n-álcoois apresentam efeitos anestésicos só até o undecanol. Este fato pode ser explicado em termos de que as substâncias pouco solúveis em meios polares tendem a formar agregados na fase aquosa que dificilmente serão adsorvidos pela membrana. Moléculas muito grandes, também poderiam ser excluídas do sítio de ação [62]. Por outro lado, a formação de agregados mantém uma baixa concentração de monômeros na solução (em torno da concentração micelar crítica) e o processo de adsorção de monômeros na membrana é lento de tal modo que a droga possa parecer inativa[62]. Como este efeito depende de fatores tais como pH, força iônica, composição da membrana, etc., as condições locais em determinada região do cérebro podem levar à especificidade observada.
- Os anestésicos podem induzir alterações da organização lipídica, como a separação lateral de fases, fenômeno que depende da estrutura do anestésico e da composição lipídica da membrana[51].
- Efeitos de carga podem produzir bloqueio da excitação ou da condução nervosa, de forma aparentemente diferenciada. A distribuição particular de cargas em uma dada molécula poderia ser outra fonte de seletividade.
- É também possível que a seletividade provenha da existência de receptores específicos na membrana, mas não existem evidências experimentais para esta hipótese.
- Diversos canais iônicos e outras proteínas estão envolvidos no processo de produção e transmissão do sinal nervoso. O funcionamento destas proteínas se interrelaciona de modo complexo e cada uma delas pode apresentar diferente sensibilidade aos

efeitos diretos ou indiretos de um dado anestésico. Sendo que cada neurônio e cada região do mesmo apresenta uma composição proteica particular, poderia originarse seletividade a partir da combinação de diferentes efeitos dos anestésicos sobre regiões particulares das membranas de células pré ou pós-sinápticas (ver fig. 2.2): bloqueio da geração do potencial de ação no axônio, supressão da condução do potencial de ação ao longo do axônio ou modificação da velocidade de condução, supressão do potencial de ação na terminação pré-sináptica, bloqueio diferenciado da excitabilidade segundo o diâmetro do axônio, alteração da secreção pré-sináptica, alteração da captura de neurotransmissores pelas terminações pré-sinápticas, competição com os neurotransmissores pelo sítio receptor e modificação do limiar de ativação pós-sináptico[1]. Deve ter-se em conta a complexidade das redes neurais e a possibilidade de que esses efeitos possam ser produzidos tanto sobre células excitatórias quanto inibitórias. Os anestésicos produzem normalmente efeitos inibitórios, no entanto, os efeitos excitatórios provocados por alguns anestésicos, poderiam provir do bloqueio de células nervosas inibitórias. Além do efeito anestésico, algumas drogas podem também produzir sensibilização, antagonizando, em alguns casos, seu próprio efeito anestésico.

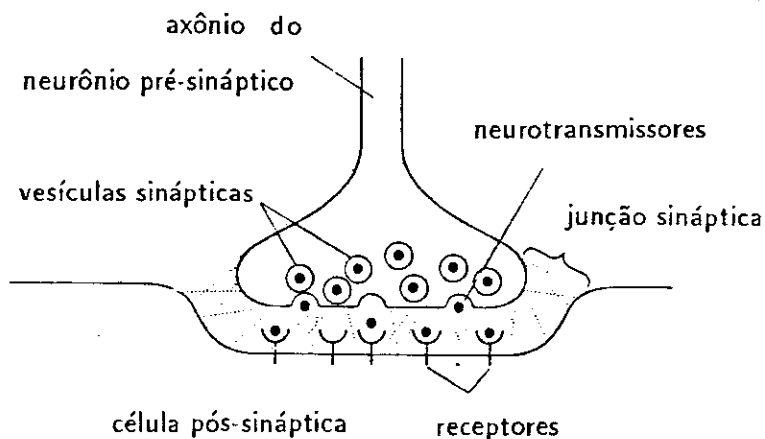


Figura 2.2: Esquema da conexão neural (sinapse química).

## 2.2 Solubilidade dos anestésicos na membrana biológica

A solubilidade destas substâncias num meio não polar pode ser expressada pelo *coeficiente de partição* definido como o quociente entre as concentrações de equilíbrio da droga em cada uma das duas fases de um sistema não-polar/aquoso. Este coeficiente é o parâmetro físico da molécula anestésica que melhor se correlaciona com a potência do anestésico. Dado que o fator comum destas substâncias tão variadas é o caráter anfifílico e que existe uma boa correlação entre as potências anestésicas e os coeficientes de partição destas drogas entre meios apolares/polares, aceita-se normalmente que os anestésicos agem primariamente sobre a membrana biológica e que a interação membrana-anestésico é de natureza essencialmente hidrofóbica. Os sítios receptores dos anestésicos podem ser as regiões não polares da matriz lipídica, da interface proteína/lipídios ou das proteínas de membrana. Uma evidência mais direta da natureza hidrofóbica das interações membrana-anestésico é que a energia livre de adsorção dos n-álcoois às membranas de vários sistemas biológicos diferentes é em torno de -800 cal/mol por grupo  $\text{CH}_2$  do álcool[66], valor que corresponde, aproximadamente, ao valor do trabalho requerido para transferir um mol de grupos  $\text{CH}_2$  da água para diversos meios apolares[43,67]. Como a energia livre de combinação de grupos  $\text{CH}_2$  com proteínas está na faixa entre -500 e -100 cal/mol, foi proposto[66] que os anestésicos podem incorporar-se nas regiões lipídicas da membrana ou em proteínas de membrana e que, no caso em que o sítio hidrofóbico com o qual interagem os anestésicos esteja localizado numa proteína, esta deve sofrer alguma mudança conformacional responsável pela diferença de energia livre observada.

Por outro lado, a existência de uma grande variedade de moléculas orgânicas apresentando atividade anestésica, sugere que a anestesia deve resultar de interações relativamente inespecíficas mais do que da ligação específica da droga a algum receptor particular na membrana[68]. Também é improvável que exista um único receptor para dar conta da extensa gama de efeitos observados.

Considerando que os anestésicos agem sobre a membrana, como primeiro passo na tentativa de compreender o fenômeno da anestesia, é essencial conhecer a concentração

de droga na membrana, dada a concentração aquosa para a qual o efeito anestésico é observado. Inicialmente, tentou-se determinar essa concentração a partir da medida do coeficiente de partição do anestésico entre um meio aquoso e um meio não polar com propriedades físico-químicas similares às dos componentes lipídicos das membranas biológicas, tais como o azeite de oliva ou o álcool oleico. A partir de experiências feitas no começo do século por H. H. Meyer e E. Overton, onde observaram que a potência de um anestésico é, aproximadamente, diretamente proporcional ao seu coeficiente de partição óleo/água, K. H. Meyer formulou, mais tarde, a hipótese conhecida como regra de Meyer-Overton[69]. Segundo esta regra, o efeito anestésico só acontece quando a concentração de uma substância qualquer na membrana supera um valor crítico (da ordem de 0,05 moles/Kg mem.). Esta concentração dependeria da natureza da célula anestesiada mas seria independente do anestésico. O coeficiente de partição de muitos anestésicos no sistema octanol/água é o que melhor se correlaciona com a potência do anestésico, um gráfico logarítmico de ambos parâmetros tem inclinação praticamente unitária. Portanto, se o sítio de ação dos anestésicos apresentasse propriedades de solubilidade similares ao octanol, todos os anestésicos seriam igualmente potentes nesse sítio. No entanto, no sítio, alguns anestésicos poderiam ser mais eficientes que outros, segundo, por exemplo, o tamanho da molécula ou sua capacidade para romper pontes de hidrogênio[62]. Além do mais, as propriedades físico-químicas desses sistemas não polares são diferentes às das membranas biológicas que representam sistemas bem mais complexos: formadas por diferentes proteínas e por diversos tipos de lipídios, seus componentes podem organizar-se em domínios em diferentes fases estruturais.

Tentativas posteriores se baseiam em medidas feitas sobre membranas de eritrócitos em que a partição das drogas anestésicas apresenta valores similares aos achados para membranas de células excitáveis[70,71]. Na tabela 2.2[1], são apresentados os valores das concentrações que provocam anestesia local, dos coeficientes de partição, das correspondentes concentrações na membrana, dos volumes moleculares e dos volumes de ocupação, de diferentes anestésicos.

A partir dos valores apresentados na quarta coluna da tabela 2.2, pode-se ver que a regra de Meyer-Overton é aproximadamente correta mas não rigorosamente. Posterior-

mente, algumas modificações foram propostas, por exemplo, que efeitos equivalentes, em termos de anestesia, acontecem a igual volume de ocupação (aprox. 3 ml/Kg de membrana desidratada)[73], como sugere a última coluna na tabela 2.2, ou a igual energia livre de adsorção da droga à membrana (60 cal/ Kg mem.)[71]. Os valores do coeficiente de partição entre a membrana e o meio aquoso ( $P_{m/a}$ ), apresentados na tabela 2.2, correspondem ao caso em que a concentração de sais é 0,9% NaCl. Sendo que o aumento da força iônica faz aumentar o coeficiente de partição dos anestésicos aniônicos e decrescer o dos catiônicos, para soluções com 0,4% NaCl, as concentrações na membrana dos anestésicos carregados negativamente ficam fora da faixa prevista pela regra de Meyer-Overton (em torno de 0,04 moles/Kg de membrana desidratada). Desta forma, foi concluído[70] que a regra de Meyer-Overton é válida somente para os anestésicos neutros ou carregados positivamente e que os anestésicos negativos poderiam atuar por um mecanismo inteiramente diferente.

Anestésico	$C_{bloq}$ mol/l H <sub>2</sub> O	$P_{m/a}$ (mol/Kg mem)/(mol/l H <sub>2</sub> O)	$C_{mem}$ mol/Kg mem.	$V_{mol}$ [72] ml/mol	$V_{mem}$ ml/Kg mem.
metanol	2,4 †	0,045‡	0,108	21,7	2,3
etanol	5,0 10 <sup>-1</sup> †	0,14‡	0,070	31,9	2,2
propanol	2,2 10 <sup>-1</sup> §	0,45‡	0,098	42,2	4,1
butanol	6,8 10 <sup>-2</sup> §	1,5‡	0,102	52,4	5,3
pentanol	2,1 10 <sup>-2</sup> §	3,6†	0,075	62,6	4,7
morfina	5,5 10 <sup>-3</sup> †	2,7†	0,015	145	2,2
procaína	4,6 10 <sup>-3</sup> §	3,1§	0,014	142	2,0
cocaína	2,6 10 <sup>-3</sup> §	15,7§	0,041	163	6,7
clorpromazina	1,0 10 <sup>-5</sup> †	1600†	0,016	164	2,6
barbital	2,8 10 <sup>-2</sup> †	0,68†	0,019	102	1,9
pentobarbital	1,7 10 <sup>-3</sup> †	9,6†	0,016	133	2,2

**Tabela 2.2:** Concentração dos anestésicos na membrana: valor típico da concentração (em solução aquosa) para provocar anestesia local ( $C_{a.l.}$ ), coeficiente de partição entre a membrana e o meio aquoso ( $P_{m/a}$ ), concentração na membrana ( $C_{mem} = C_{bloq} \cdot P_{m/a}$ ), volume molecular ( $V_{mol}$ ) e volume de ocupação na membrana ( $V_{mem} = C_{mem} \cdot V_{mol}$ ). As unidades de  $C_{mem}$  e de  $V_{mem}$  são por Kg de membrana desidratada. †, ‡ e § correspondem a valores, respectivamente, determinados experimentalmente, estimados e extraídos da literatura por Seeman[1].

Mesmo se a potência anestésica pode depender de vários fatores próprios da droga, é razoável esperar que a sua ação anestésica dependa basicamente da solubilidade da droga na membrana, que pode ser expressada em termos do coeficiente de partição do anestésico entre a membrana e o meio aquoso. Portanto, é relevante conhecer este coeficiente que pode ser estimado como sendo aproximadamente proporcional ao coeficiente de partição da droga em um sistema não-polar/aquoso qualquer. Este coeficiente está relacionado sobretudo com o comprimento da porção hidrofóbica da molécula anestésica. Entretanto, o valor exato do coeficiente de partição depende de diversos parâmetros, relativos tanto à droga como ao meio aquoso e à membrana. Entre estes fatores cabe mencionar:

- volume e forma da molécula.
- Distribuição de cargas na molécula, em especial, a carga líquida. Muitos anestésicos são aminas que podem encontrar-se em dois estados de carga (neutro ou protonado) cuja distribuição depende da constante de ionização da droga e do pH. Cada forma se incorpora na membrana com diferente afinidade[74] e de modo diferente: a membrana é permeável à forma neutra enquanto é impermeável à carregada, conseqüentemente, a adsorção desta última forma se produz só na interface membrana/água dependendo do potencial elétrico superficial da membrana, enquanto a incorporação da forma neutra tem lugar não somente na interface mas também no interior da membrana[2,75].
- Concentração do anestésico. A incorporação inicial da droga pode induzir alterações das propriedades da membrana, modificando, conseqüentemente, a incorporação ulterior. Porém, em concentrações dentro da faixa em que produzem efeito anestésico sem provocar a dissolução da bicamada, o coeficiente de partição é praticamente constante.
- pH. Segundo mencionado acima, este parâmetro regula a fração das duas formas das aminas e como a partição de cada forma é diferente, uma variação do pH, sobretudo em torno do valor do pK de ionização da droga, modifica o coeficiente

de partição aparente. Por outro lado, uma variação do pH pode alterar o potencial elétrico superficial da membrana e, conseqüentemente, a adsorção dos anestésicos carregados.

- Força iônica. O aumento da concentração de sais, tais como NaCl, reduz, em valor absoluto, o potencial superficial da membrana negativamente carregada, favorecendo a adsorção das drogas aniônicas e dificultando a adsorção das carregadas positivamente.
- Concentração de substâncias e íons, como o  $\text{Ca}^{++}$ , que tem um comportamento competitivo com os anestésicos catiônicos[2]. Além de modificarem o potencial superficial, estes cátions se ligam fortemente aos grupos carregados negativamente na membrana, provocando seu enrijecimento e inibindo a interação dos anestésicos com a membrana.

A composição da membrana, que, em último análise, determina o seu estado físico, outrossim, tem influência fundamental no coeficiente de partição. Portanto, a incorporação de drogas também depende dos seguintes fatores:

- comprimento e grau de saturação das cadeias dos lipídios. A partição é reduzida com o aumento do comprimento das cadeias, o que pode ser explicado levando em conta que, quanto maior o comprimento, maiores as interações entre as cadeias, resultando mais difícil a incorporação de outras substâncias.
- Grupos polares dos fosfolipídios. Por exemplo, aminas, como a dibucaína, a tetracaína e a procaína, se adsorvem mais facilmente em membranas com densidade superficial de carga negativa, como as de fosfatidilserina, que em membranas neutras de fosfatidilcolina[2,4,74-76].
- Conteúdo de colesterol. O colesterol é outro regulador importante do estado da membrana, capaz de alterar o grau de ordem da bicamada tanto na fase fluida quanto na fase cristalina. Portanto, o conteúdo de colesterol pode controlar a incorporação de anestésicos.



- Composição proteica. Como se verá numa secção posterior, as proteínas de membrana tem influência sobre o estado da bicamada a través das interações proteína-lipídio e, portanto, sobre a adsorção de substâncias. Por outro lado, as proteínas podem fornecer sítios para a incorporação de anestésicos.
- Temperatura. O coeficiente de partição depende da temperatura através de alguns dos parâmetros já mencionados, entretanto, a dependência do coeficiente de partição com a temperatura é drástica na faixa das transições de fase. Quando a bicamada ou domínios da mesma se encontram numa fase ordenada e rígida, a partição é menor que na fase fluida[74]. A presença de defeitos nessa faixa de temperaturas também influi sobre a incorporação de drogas[35].

### 2.3 Alterações na membrana induzidas por anestésicos

Demostrou-se experimentalmente que os anestésicos provocam a expansão dos lipídios em membranas biológicas (membranas de eritrócitos)[1,71]. A molécula anestésica ocupa espaço dentro da membrana, mas o aumento da área induzido por estas drogas é aproximadamente dez vezes maior que o associado ao volume de ocupação do anestésico, tanto em condições de anestesia local quanto geral.

Foi observado, ainda, que uma pressão alta, da ordem de 100-150 atm., aplicada com gases inertes ou hidrostáticamente, antagoniza ou reverte a anestesia geral[77] e que a pressão requerida para revertê-la está associada a uma compressão equivalente ao valor da expansão induzida pelos anestésicos inaláveis[1,77].

Devido às observações de que a pressão reverte o estado anestesiado e de que os anestésicos induzem aumento do volume da bicamada e considerando que a pressão (a temperatura constante) pode actuar somente por redução de volume, foi proposto[77] que a ação anestésica possa estar relacionada com a expansão de certas regiões da membrana. Estes argumentos levaram à “hipótese do volume crítico”[78]. Segundo esta hipótese, a anestesia se produz quando o volume de uma região hidrofóbica é expandido acima de certo valor crítico como resultado da adsorção de moléculas de uma substância inerte.

No entanto, a expansão poderia ser só um efeito secundário e, ainda neste caso, seria possível explicar o comportamento observado. Por exemplo, a aplicação de pressão pode favorecer a dissociação da molécula anestésica do sítio de ação, com o qual a anestesia seria revertida[62]. Também, um trabalho recente[79] sugere que pressão e anestésicos poderiam também agir sobre sítios diferentes.

A aplicação de pressão, sobre um sistema de fosfolipídios puros, eleva a temperatura da transição de fase gel-cristal líquido (uma pressão de 136 atm produz uma mudança de 3°C na temperatura de transição de bicamadas de dipalmitoilfosfatidilcolina[80]). Enquanto os anestésicos inaláveis fluidificam a região fosfolipídica da membrana, a aplicação isotérmica de pressão faz diminuir a fluidez da bicamada, sugerindo que seus efeitos poderiam ser antagônicos. No entanto, a pressão não antagoniza todos os aspectos do efeito destes anestésicos sobre a bicamada. Acima da temperatura de transição de um sistema de fosfolipídios puros (dimiristoil ou dipalmitoil-fosfatidilcolina), os efeitos sobre a fluidez provocados pelos anestésicos inaláveis ou pela pressão são desprezíveis. Abaixo da temperatura de transição, a pressão faz diminuir a fluidez mas sem antagonizar completamente o efeito fluidificador do anestésico. Os efeitos são completamente antagônicos somente à temperatura da transição de fase. Para o sistema misto formado pela mesma proporção de ambos fosfolipídios, o efeito antagônico é observado a uma temperatura dentro da faixa compreendida entre as temperaturas críticas de cada fosfolipídio[81]. Em suma, os efeitos sobre fluidez são antagônicos na região de coexistência de fases. Estes resultados sugerem que o fenômeno da anestesia possa estar relacionado com uma modificação das fases presentes, o qual poderia perturbar o funcionamento de algumas proteínas, em particular aquelas responsáveis pela condução nervosa.

Por outro lado, o fato dos efeitos da pressão e dos anestésicos sobre o estado da bicamada serem opostos só parcialmente é consistente com a observação de que, ao nível fisiológico, a pressão não é um antagonista perfeito da anestesia. Ao mesmo tempo que certos efeitos fisiológicos dos anestésicos são revertidos pela aplicação de pressão, surgem também outras perturbações.

Boggs[3] reexaminou a hipótese de expansão de lipídios como efeito primário da anestesia. Analizando o efeito provocado por diferentes anestésicos (halotano, butanol,

éter, etc.) sobre a fluidez lipídica, ela observou que a fluidificação produzida é insuficiente para dar conta do aumento de volume. A expansão da membrana em condições de anestesia geral e de anestesia local é, respectivamente, da ordem de 0,5% e de 5%, enquanto a fluidificação está associada, em cada caso, a uma expansão de 0,01% e 0,3%, respectivamente. Observou, também, que os efeitos da pressão sobre a fluidez não se correlacionam com os efeitos da pressão sobre o estado anestesiado, dado que a pressão necessária para reverter a anestesia é muito maior que aquela que seria requerida para reverter a fluidificação observada.

Possivelmente, a expansão da membrana não seja relevante para o mecanismo da anestesia, contudo, esse efeito é observado e é provável que seja o resultado da combinação de alguns dos seguintes fenômenos que os anestésicos induzem:

- desordem e fluidificação das regiões lipídicas da membrana,
- hidratação da membrana,
- mudanças conformacionais nas proteínas de membrana,
- deslocamento de substâncias ou íons associados à membrana, que a mantêm em um estado mais condensado, como, por exemplo, o  $\text{Ca}^{++}$ .

Esta última hipótese é coerente com a observação de que as aminas produzem uma expansão maior que os álcoois que não deslocam o  $\text{Ca}^{++}$ .

Mudanças na conformação de algumas proteínas é o fenômeno que melhor daria conta da expansão observada[3], dado que, durante o seu funcionamento, as proteínas experimentam mudanças de volume significativas. Entretanto, não existem ainda dados experimentais suficientes para confirmar que esta seja a causa da expansão lipídica.

Devemos também notar que um aumento de temperatura também induz a expansão da membrana mas sem produzir efeito anestésico. As alterações da membrana provocadas pelos anestésicos gerais em concentrações clínicas correspondem a mudanças de temperatura inferiores a  $1^\circ\text{C}$ [82], entretanto, nos seres vivos, são observadas mudanças de temperatura maiores sem ter conseqüências anestésicas. Temperatura e anestésicos não podem ser equiparados já que estes podem afetar uma região particular da

membrana, enquanto o efeito da temperatura é mais uniforme. Aparentemente, os anestésicos expandem primeiro as regiões hidrofóbicas enquanto o aquecimento causa desordem e expansão de todos os componentes da membrana[1]. Por outro lado, no animal, uma mudança de temperatura também afetará outros processos que podem compensar as perturbações diretas sobre a matriz lipídica[63].

### 2.3.1 Fluidificação e desordem da membrana

É bem conhecido o fato de que a adsorção de anestésicos na matriz lipídica pode produzir mudanças da fluidez da membrana e da ordem orientacional das cadeias dos lipídios[2-4], induzir transições de fase em bicamadas de fosfolipídios puros[5-8] ou mistos[51], induzir separação lateral de fases em sistemas mistos[51], alterar a permeabilidade da membrana[9,10] ou micelizar a bicamada[11,12].

A associação da molécula de droga com a bicamada pode ser tanto com as cabeças polares dos lipídios como por penetração total ou parcial na região hidrofóbica da bicamada. No caso de interação com a região polar, a cooperatividade lipídica só será levemente afetada. No caso de penetração na bicamada, o estado da fase lipídica poderá ser modificado drasticamente: a molécula anestésica pode empacotar-se bem entre as cadeias de ácidos graxos ou alterar substancialmente a organização lipídica ao interferir com as interações entre as cadeias. A hidrofobicidade, tamanho, forma, carga e outras propriedades da molécula assim como as características particulares da bicamada determinarão o tipo de associação e seus efeitos sobre a organização lipídica.

Por exemplo, a dibucaína induz uma redução significativa da temperatura da transição principal em vesículas de fosfolipídios carregados negativamente (fosfatidilserina e fosfatidilglicerol). Este efeito se produz mesmo na presença de  $\text{Ca}^{++}$ , caso em que, provavelmente, o  $\text{Ca}^{++}$  é deslocado pelo anestésico no estado protonado. Em contraste, em vesículas de lipídios neutros (fosfatidilcolina), em presença da mesma concentração da droga que no caso anterior, não foi observada uma modificação apreciável da temperatura crítica, consistente com a menor afinidade da droga (a pH 7,4, em que está positivamente carregada) por fosfolipídios neutros. Em vesículas com 20% de fosfolipídios neutros (composição similar a das membranas de células nervosas), a

droga também não tem efeitos significativos[4]. Estes resultados sugerem que, se a ação primária destas drogas fosse sobre os lipídios, a interação deveria ocorrer em domínios contendo exclusivamente lipídios negativos. Entretanto, foi observado que, várias drogas anfífilas catiônicas também diminuem a temperatura de transição de vesículas neutras de fosfatidilcolina[83] e que a CPZ reduz a temperatura da transição principal de vesículas de fosfatidilcolina ou de fosfatidiletanolamina, em concentrações comparáveis àquelas que bloqueiam a condutância do  $\text{Na}^+$  em células nervosas[68].

A incorporação de drogas não somente faz diminuir a temperatura da transição gel-cristal líquido mas também alarga a faixa de temperaturas em que as duas fases coexistem[5].

No entanto, segundo Boggs[3], um aumento detetável na fluidez lipídica acontece somente a concentrações maiores que as necessárias para provocar anestesia.

Na membrana biológica composta de vários fosfolipídios com diferentes temperaturas de transição, podem coexistir domínios de fosfolipídios na fase sólida dentro da bicamada fluida. A fração de fosfolipídios em cada fase deve controlar muitas propriedades da bicamada, em especial, o funcionamento das proteínas de membrana[80]. Sendo que os anestésicos induzem mudanças da temperatura de transição, a proporção de lipídios em cada fase pode ser alterada. Portanto, é interessante levar em conta as conseqüências que essas alterações das temperaturas críticas provocam sobre o estado da bicamada ou de domínios da mesma, inclusive no caso em que não sejam detetadas modificações globais de fluidez.

### 2.3.2 Efeitos sobre as proteínas de membrana

Os anestésicos poderiam atuar através da ligação direta com proteínas de membrana específicas[62,84-86], seja produzindo ou inibindo mudanças conformacionais, seja provocando perda de atividade enzimática através de algum mecanismo como competição com outros ligantes.

Também, os efeitos dos anestésicos sobre as proteínas de membrana poderiam ser indiretos, através da modificação primária das interações proteína-lipídio[62,68,13]. Como

já foi mencionado no capítulo anterior, a atividade proteica é altamente sensível à estrutura química e à fase dos lipídios vizinhos. Portanto, pode esperar-se que qualquer droga que se ligue fortemente aos sítios anulares de uma proteína de membrana provoque perturbações, devido às diferenças estruturais entre as moléculas dos lipídios e da droga. Por exemplo, a inibição da atividade da  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase do retículo sarcoplasmático, produzida por anestésicos tais como a dibucaína ou a tetracaína, poderia originar-se no rompimento do anel lipídico em torno à proteína[38]. Segundo Lee[13,68], é possível que os efeitos anestésicos destas drogas se produzam a partir do deslocamento dos lipídios anulares dos canais de  $\text{Na}^+$ , na membrana das células nervosas[13]. Provavelmente, o canal de  $\text{Na}^+$  está rodeado por um anel de lipídios na fase de gel, de tal forma que esse microambiente rígido asseguraria a manutenção de uma conformação apropriada do canal[68]. A adição de anestésicos pode alterar a organização desses lipídios com conseqüências sobre o funcionamento da proteína.

As conseqüências dos anestésicos locais sobre a atividade de proteínas, como a  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase, poderiam surgir, igualmente, a partir de efeitos puramente de carga. A adsorção na membrana de moléculas carregadas positivamente dará lugar a um potencial superficial mais positivo, reduzindo a concentração de  $\text{Ca}^{++}$  na vizinhanza do sítio de ligação na proteína, produzindo-se, assim, um decréscimo da afinidade aparente da  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase pelo íon[55].

Também foi dito no capítulo anterior que, assim como as proteínas são sensíveis ao ambiente lipídico, reciprocamente, mudanças conformacionais podem induzir desordem e imobilização dos lipídios.

Encontrou-se que as mudanças conformacionais das proteínas do retículo sarcoplasmático causadas pela procaína induzem desordem em regiões locais da bicamada lipídica. Porém, em vesículas de fosfolipídios extraídos, não foram observadas mudanças da ordem dos lipídios[23]. Parece, portanto, que estas drogas agem primariamente sobre as proteínas do retículo e depois perturbam debilmente a ordem da fase lipídica, através das interações proteína-lipídio. Em membranas de eritrócitos, a CPZ, em baixas concentrações, atua preferencialmente sobre as proteínas de membrana mais do que sobre os

lipídios. Neste caso, a fluidez da membrana aumenta. A concentrações maiores, a fluidez da membrana diminui. Este último comportamento não é observado em membranas sem proteínas. A fluidez da membrana pode ser alterada por mudanças na conformação proteica, através das interações proteína-lipídio. Portanto, é provável que, na incorporação inicial, a CPZ se localize, preferencialmente, na interface entre os lipídios e as proteínas de membrana, induzindo mudanças na conformação proteica, responsáveis pela fluidificação observada. Depois, a droga entraria mais facilmente na região lipídica, compactando-se com os lipídios e restringindo a mobilidade lipídica[22].

### 2.3.3 Ação sobre os processos na membrana que envolvem $\text{Ca}^{++}$

O  $\text{Ca}^{++}$  desempenha, na membrana, diversos papéis: é estabilizador elétrico da membrana, o influxo de  $\text{Ca}^{++}$  contribui ao potencial de ação, o  $\text{Ca}^{++}$  serve para acoplar os eventos elétricos da membrana com a resposta fisiológica, o  $\text{Ca}^{++}$  intracelular pode regular a permeabilidade da membrana tanto a íons quanto a solutos neutros. Portanto, o cálcio está envolvido na maioria dos processos modificados pelos anestésicos. Considerando este fato, pode-se pensar em uma explicação da ação anestésica baseada na habilidade dos anestésicos em perturbar a ligação ou o metabolismo do cálcio.

O  $\text{Ca}^{++}$  ligado à membrana está associado principalmente a proteínas. Os anestésicos catiônicos (aminas) competem e deslocam o  $\text{Ca}^{++}$  ligado aos sítios negativos da membrana (cada íon divalente compete com duas aminas). Este comportamento dos anestésicos se refere tanto ao  $\text{Ca}^{++}$  associado aos componentes lipídicos quanto ao associado às proteínas[87] e é observado para concentrações de anestésicos em que muitos processos biológicos são perturbados pela presença dessas drogas.

O  $\text{Ca}^{++}$  é requerido para os acoplamentos estímulo-secreção neural e excitação-contracção muscular, portanto, o deslocamento do  $\text{Ca}^{++}$  provocado pelos anestésicos catiônicos poderia explicar, quando menos parcialmente, o efeito inibitório destas drogas. Os anestésicos neutros (álcoois) têm efeitos sensibilizantes, o que pode provir do fato de que estas drogas facilitam a ligação de  $\text{Ca}^{++}$  à membrana. Os anestésicos aniônicos (barbituratos, ácidos graxos) também favorecem a ligação de  $\text{Ca}^{++}$ .

A presença de  $\text{Ca}^{++}$  também faz aumentar o potencial superficial, decaindo, então, a

concentração de anestésicos carregados positivamente perto da superfície da membrana. Por outro lado, os cátions divalentes, especialmente o  $\text{Ca}^{++}$ , se ligam fortemente aos grupos carregados negativamente na membrana, enrijecendo a membrana e inibindo, conseqüentemente, a incorporação de anestésicos[2].

Os anestésicos também têm efeitos sobre os fluxos de  $\text{Ca}^{++}$  através da membrana. O fluxo líquido de um íon é resultante do transporte ativo, do fluxo através de canais e do fluxo através de regiões da membrana permeáveis ao íon. Geralmente, os anestésicos negativos aumentam a permeabilidade da membrana a cátions, em particular ao  $\text{Ca}^{++}$ [1], no entanto os anestésicos com carga positiva inibem o fluxo de  $\text{Ca}^{++}$ , possivelmente, como conseqüência do deslocamento do  $\text{Ca}^{++}$  adsorvido.

A acumulação líquida de cálcio no retículo sarcoplasmático é resultante do influxo ativo e do efluxo passivo de  $\text{Ca}^{++}$ . A tetracaína, em concentrações menores que 1 mM, provoca uma pequena diminuição do efluxo do  $\text{Ca}^{++}$  acumulado. Em concentrações maiores, mas que não inibem a atividade da  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase, a presença do anestésico aumenta o efluxo, evitando, praticamente, a acumulação de  $\text{Ca}^{++}$  [9]. Em um trabalho mais recente[10], mostra-se que, em concentrações que não provocam inibição da atividade da  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase, a tetracaína e a dibucaína aumentam a permeabilidade das vesículas de retículo sarcoplasmático ao  $\text{Ca}^{++}$  e ao  $\text{Mg}^{++}$ . Neste caso, o aumento da permeabilidade a cátions divalentes induzido pelos anestésicos locais não está relacionado com o rompimento da estrutura da membrana nem com mudanças de fluidez, sendo aparentemente específico e relacionado com dois tipos de canais com propriedades cinéticas diferentes.

Alguns anestésicos locais (tetracaína, dibucaína, procaína e xilocaína) inibem o transporte de cálcio, devido, parcialmente, à inibição da formação do complexo fosfoproteico a partir da ATP, como resultado da redução da afinidade aparente das membranas do retículo sarcoplasmático pelo cálcio[88]. Foi também proposto que a inibição que os anestésicos locais provocam sobre a liberação espontânea de  $\text{Ca}^{++}$  é devida à interação direta dessas drogas com um canal de  $\text{Ca}^{++}$  que seria bloqueado pela droga[85].

Não é ainda claro em que medida os fluxos passivos ou ativos facilitados por proteínas e o aumento da permeabilidade da matriz lipídica contribuem para modificar o fluxo líquido.



### 2.3.4 Efeitos sobre as secreções neurais

Praticamente todos os anestésicos induzem aumento da secreção neural. Efeitos como a fluidificação da membrana ou a separação de fases de fosfolipídios[51] podem facilitar a fusão das membranas das vesículas de neurotransmissores com a membrana celular, aumentando, conseqüentemente, a liberação de neurotransmissores.

Os anestésicos locais inibem a atividade da  $\text{Ca}^{++}$ - $\text{Mg}^{++}$ -ATPase de sinaptosomas de cérebro de rato, existindo uma boa correlação entre as concentrações de anestésicos que produzem 20% de inibição e as suas respectivas doses farmacológicas. Como resultado da inibição da ATPase, os anestésicos locais podem produzir aumento do nível de  $\text{Ca}^{++}$  no citosol neural, com conseqüentes efeitos sobre a neurotransmissão[89].

## 2.4 Estado atual

O mecanismo físico-químico segundo o qual os anestésicos interagem com as membranas e bloqueiam a condução nervosa continua sendo desconhecido. Também não foi identificada ainda a região macroscópica do cérebro em que atuam os anestésicos gerais, nem o sítio preciso da atividade anestésica ao nível subcelular[90].

Em geral, pensa-se que os alvos últimos dos anestésicos são as proteínas, em especial, os canais iônicos das células nervosas. No entanto, as proteínas envolvidas não têm sido caracterizadas nem existe consenso sobre o modo em que seriam afetadas. As hipóteses existentes sobre o fenômeno da anestesia podem ser enquadradas dentro de duas categorias, em uma, as que propõem a interação direta dos anestésicos com as proteínas de membrana, sendo perturbadas as propriedades estruturais e/ou dinâmicas das proteínas, em outra, as que propõem como sítio de ação primário certas regiões lipídicas da membrana. A maioria destas últimas se referem aos lipídios que rodeiam as proteínas.

Em relação à primeira classe de hipóteses, muitas vezes é difícil discernir se os efeitos são provocados por ação direta sobre a proteína ou a partir da interferência com as interações proteína-lipídio. Mesmo se a ação anestésica não fosse mediada pelos lipídios, é um fato que os anestésicos interagem com a membrana lipídica e mudam as

suas propriedades físicas. Assim, as hipóteses da segunda categoria baseiam-se na boa correlação entre a potência anestésica e os efeitos físico-químicos observados em fases lipídicas, porém, não explicam em forma completa como esses efeitos induzidos pelos anestésicos afetam as proteínas.

Têm sido também estudadas modificações do potencial superficial devidas à forma carregada de alguns anestésicos[68,83,91] e foi aberta uma ampla discussão sobre qual é a forma (carregada ou neutra) biologicamente ativa e sobre onde estão localizados os sítios de ação de cada uma destas duas formas, questões que continuam em aberto[2].

Os efeitos provocados pelos anestésicos são variados e complexos. Por outro lado, os canais iônicos que, presumivelmente, possam estar envolvidos na indução de anestesia constituem um sistema de grande complexidade devido à interdependência do funcionamento dos diversos canais, ressaltando que muitos desses canais não foram ainda bem caracterizados. Portanto, as tentativas de correlacionar os efeitos observados, para concentrações clinicamente relevantes, com a atividade anestésica têm sido infrutíferas ou pelo menos insuficientes para descrever o fenômeno da anestesia.

## Capítulo 3

# Estudo da micelização: determinação da concentração micelar crítica de substâncias anfílicas

Os anestésicos são substâncias anfílicas que, como tais, podem organizar-se em micelas. As características físico-químicas da droga e do meio determinarão as possíveis formas de agregação e fases presentes no sistema. Estas diferentes formas de agregação podem influir sobre a reatividade da droga e, conseqüentemente, sobre sua eficácia terapêutica[32,33]. Portanto, como primeiro passo para o estudo da ação anestésica, é relevante conhecer o estado de agregação destas drogas em solução aquosa.

Nesta parte do trabalho, será estudado o comportamento do anestésico cloropromazina (CPZ) cuja estrutura molecular é esquematizada na fig. 3.1.

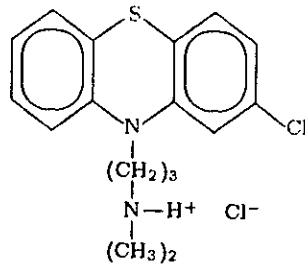
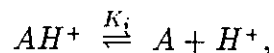


Figura 3.1: Esquema da estrutura molecular do anestésico cloropromazina.

No capítulo 1, foi já descrito o processo de micelização das substâncias anfífilas. Suscintamente, a agregação de monômeros destas substâncias é um processo originado a partir das preferências termodinâmicas opostas de cada extremo da molécula, de modo que, a baixas concentrações, a substância anfífila encontra-se dissolvida na solução, entretanto, para concentrações totais acima de um valor crítico (*concentração micelar crítica*), os monômeros em excesso se associam formando micelas[43].

A CPZ é uma substância anfífila e, portanto, forma fases micelares[34,92].

Por outro lado, a CPZ é um derivado da fenotiazina e, como muitos anestésicos locais, possui uma função amina terciária que pode ser protonada ou não, segundo a seguinte reação química:



onde  $K_i$  é a constante de dissociação ácido-base[93] (ou constante de ionização), que depende da substância e do meio,  $H^+$  representa um próton e,  $A$  e  $AH^+$  representam, respectivamente, as formas neutra e carregada da droga.

As concentrações das formas neutra e carregada da droga ( $[A]$  e  $[AH^+]$ , respectivamente) estarão, no equilíbrio, em uma proporção dada por[94,95]:

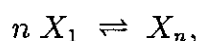
$$K_i = \frac{[A][H^+]}{[AH^+]}. \quad (3.1)$$

onde  $[H^+]$  é a concentração de prótons, expressa em moles/l, sendo o pH do meio definido como  $\text{pH} = -\log [H^+]$ .

Portanto, as moléculas da droga podem associar-se em micelas dependendo do balanço entre as forças atrativas, que se estabelecem entre os segmentos hidrofóbicos das moléculas, e as forças eletrostáticas repulsivas, entre as cabeças polares. Assim, a agregação da droga em micelas dependerá fortemente de condições tais como temperatura, pH e força iônica, podendo produzir-se transições dependentes desses parâmetros e da concentração da droga. No entanto, existe pouca informação sobre os parâmetros característicos destas transições e os valores publicados da cmc da droga, determinados por diversas técnicas e para condições experimentais particulares, diferem muito entre si[22,34,35].

### 3.1 Modelo para a micelização

A micelização é um processo de equilíbrio múltiplo que pode ser descrito mediante um conjunto de reações do tipo[96]:



onde  $X_1$  e  $X_n$  representam, respectivamente, o anfílico  $X$  na forma monomérica e o agregado formado pela associação de  $n$  monômeros de  $X$ , sendo  $n$  variável. Os potenciais químicos de cada espécie são, respectivamente:

$$\begin{aligned} \mu_1 &= \mu_1^\circ + k_B T \ln(\lambda_1) \\ \mu_n &= \mu_n^\circ + k_B T \ln\left(\frac{\lambda_n}{n}\right) \end{aligned}$$

onde  $k_B$  é a constante de Boltzmann,  $T$  a temperatura em graus Kelvin e, para cada espécie,  $\mu^\circ$  corresponde ao potencial químico padrão e  $\chi_n/n$  à fração molar, tal que a fração molar total da substância (na forma monomérica ou agregada) é  $\chi = \sum_{n \geq 1} \chi_n$ .

No equilíbrio,  $\mu_n = n \mu_1$ , portanto, temos:

$$\chi_n = n \chi_1^n e^{-\frac{\mu_n^\circ - n \mu_1^\circ}{k_B T}}.$$

Supondo que, no processo de micelização, predomine uma contribuição atrativa para  $n \geq n_o$ , então,  $\mu_n^\circ - n \mu_1^\circ$  deve decrescer com o número de agregação  $n$ , para  $n \geq n_o$ . Em primeira aproximação, supondo que a relação é linear, temos:

$$\mu_n^\circ = n \mu_1^\circ + k_B T (n - n_o) \delta, \quad n \geq 2, \quad (3.2)$$

com  $n_o$  e  $\delta$  constantes, sendo  $\delta \leq 0$ . Neste caso:

$$\chi_n = n \chi_1^n e^{-(n-n_o)\delta}, \quad n \geq 2. \quad (3.3)$$

Considerando esta expressão, a fração molar total é:

$$\begin{aligned} \chi &= \sum_{n \geq 1} \chi_n = \chi_1 + \sum_{n \geq 2} n \chi_1^n e^{-(n-n_o)\delta} \\ &= \chi_1 + (2 - \chi_1 e^{-\delta}) \left( \frac{\chi_1 e^{-\delta}}{1 - \chi_1 e^{-\delta}} \right)^2 e^{n_o \delta}. \end{aligned} \quad (3.4)$$

Definindo  $\phi = \chi e^{-\delta}$  e  $\phi_1 = \chi_1 e^{-\delta}$ , a equação 3.4 pode ser reescrita como:

$$\phi = \phi_1 + (2 - \phi_1) \left( \frac{\phi_1}{1 - \phi_1} \right)^2 e^{(n_o-1)\delta}. \quad (3.5)$$

A dependência de  $\phi_1$  com  $\phi$  é representada na figura 3.2. Observa-se que, para  $\phi \ll 1$ ,  $\phi_1 = \phi$ , entretanto, para  $\phi \gg 1$ ,  $\phi_1 \rightarrow 1$ . Ou seja, quando o anfifílico é muito diluído, encontra-se completamente dissolvido na solução aquosa, entretanto, ao aumentar a concentração total, uma fração permanece dissolvida enquanto o excedente forma micelas. Portanto, este modelo permite simular o comportamento observado experimentalmente, como veremos na seção de resultados.

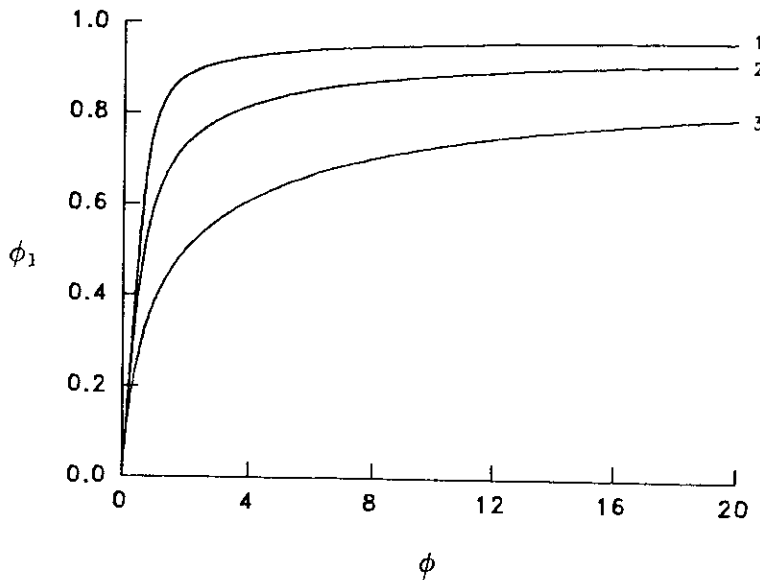


Figura 3.2: Dependência da fração molar de monômeros com a fração molar total. Para  $\delta(n_o - 1) = -4$  (1),  $-2$  (2) e  $0$  ( $n_o = 1$ ) (3). A curva pontilhada corresponde à aproximação de pseudo-fases.

O valor limite  $\chi_1 = e^\delta$  ( $\phi_1 = 1$ ), correspondente à concentração máxima de monômeros dissolvidos, pode ser identificado com a concentração micelar crítica (cmc). Com efeito, no equilíbrio, a energia livre de transferência de um monômero, da solução para a micela com número de agregação  $n$ , é:

$$\Delta G_n^{tr} = \frac{\mu_n^\circ}{n} - \mu_1^\circ = k_B T \left( \ln(\chi_1) - \frac{1}{n} \ln\left(\frac{\chi_n}{n}\right) \right) = k_B T \frac{n - n_o}{n} \delta.$$

Embora a solução micelar constitua uma única fase, o sistema pode ser modelado em forma aproximada como um sistema de duas fases: a fase monômérica e a fase de micelas, com  $n \rightarrow \infty$ . Nesta aproximação, denominada de pseudo-fases[32,97], temos:

$$\Delta G^{lr} = k_B T \ln(\chi_1^*) = k_B T \delta,$$

sendo  $\chi_1^* = e^\delta$  a concentração de monômeros dissolvidos (expressa como fração molar) em equilíbrio com a população no meio micelar. Portanto, a concentração total  $\chi = \chi_1^*$  pode ser identificada com a cmc: se  $\chi \leq \chi_1^*$ , só podem existir monômeros em solução, entretanto, se  $\chi \geq \chi_1^*$ , existe separação de fases e a concentração de monômeros permanece igual a  $\chi_1^*$  (fig. 3.2). Porém, esta definição da cmc é pouco rigorosa, dado que o tamanho dos agregados é finito. No entanto, como nenhum parâmetro físico muda abruptamente na cmc, esta não pode ser definida de modo único e qualquer definição será arbitrária[96]. Alguns autores[96,98] definem a cmc como a concentração para a qual a fração de monômeros em micelas atinge um dado valor na faixa 0,02-0,05. O valor da cmc assim definido é inferior a  $e^\delta$ . Por exemplo, no caso da fig. 3.2, para  $\delta(n_o - 1) = -4$ , a concentração de monômeros em equilíbrio com uma população micelizada correspondente ao 5% do total é  $\chi_1 \simeq 0,5 e^\delta$ .

Por outro lado, definindo  $\phi_n = \chi_n e^{-\delta}$ , então, a partir da relação 3.3, temos:

$$\phi_n = n \phi_1^n e^{(n_o - 1)\delta}, \quad (3.6)$$

onde  $\phi_1$  se relaciona com  $\phi$  através da equação 3.5. Para alguns valores de  $c$  e  $(n_o - 1)\delta$ , é apresentada na figura 3.3 a dependência da fração de moléculas da substância  $X$  associadas em micelas de tamanho  $n$  ( $\frac{\chi_n}{\chi} = \frac{\phi_n}{\phi}$ ) com o número de agregação  $n$ .

Para um valor fixo de  $(n_o - 1)\delta$ , mostra-se na figura 3.4 como varia a distribuição de tamanhos ao variar  $\phi$ , parâmetro relacionado com a concentração total do anfífilico ( $\phi = \chi e^{-\delta}$ ). Quando  $\phi$  cresce, o máximo da distribuição se desloca para valores de  $n$  maiores e o alargamento da curva aumenta. Sendo  $\delta$  uma constante característica do anfífilico, um aumento em  $\phi$  corresponde a um aumento da fração molar total, portanto, segundo este modelo, ao aumentar a concentração do anfífilico é favorecida a formação de micelas com maior número de agregação, consistentemente com o observado empiricamente para diversos anfífilicos[34,99].



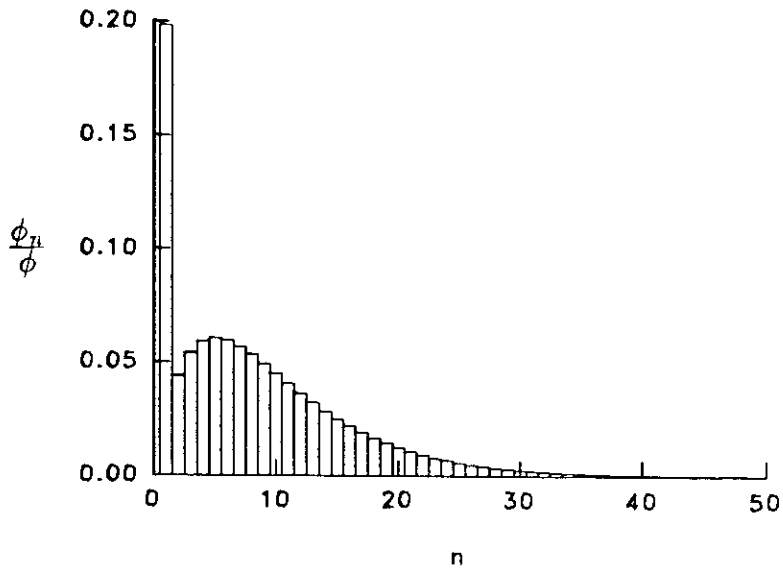


Figura 3.3: Distribuição de tamanhos correspondente a  $\mu_n^o = n \mu_1^o + k_B T (n - n_o) \delta$ . Para  $(n_o - 1)\delta = -2$  e  $\phi = 4$ .

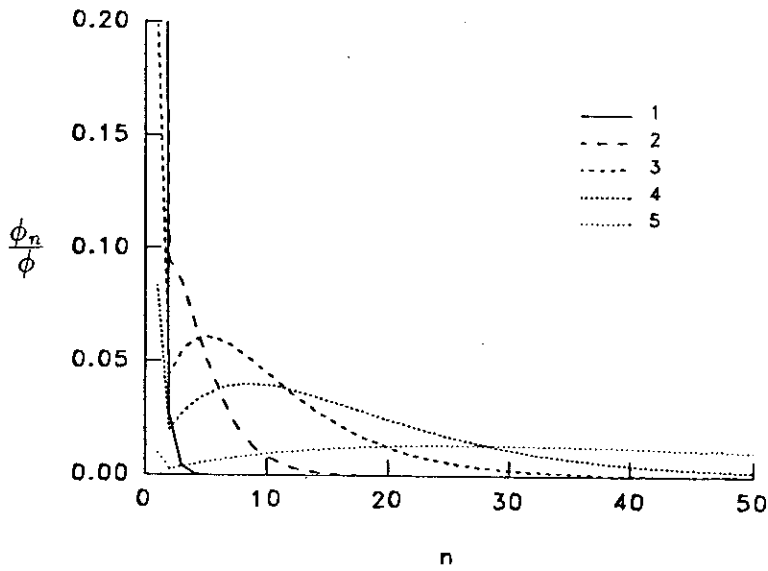


Figura 3.4: Distribuição de tamanhos correspondente a  $\mu_n^o = n \mu_1^o + k_B T (n - n_o) \delta$ . Para  $(n_o - 1)\delta = -2$  e  $\phi = 0,1$  (1), 1 (2), 4 (3), 10 (4), 100 (5).

Este modelo considera que a micelização é regulada, basicamente, pelo efeito hidrofóbico que contribui negativamente na energia livre para transferir um monômero da solução para a micela. No entanto, existe também uma contribuição positiva, devida à repulsão entre as cabeças polares, que desfavorece a micelização para valores grandes do número de agregação. Para obter um modelo mais realista, que leve em conta este fato, a expressão 3.2 foi modificada mediante um fator de correção, de modo que:

$$\mu_n^o = n \mu_1^o + k_B T (n - n_o) \left(1 - \frac{n}{n'_o}\right) \delta, \quad (3.7)$$

com  $n_o$ ,  $n'_o$  e  $\delta$  constantes, sendo  $\delta \leq 0$ . Um aumento de  $n'_o$  corresponde a uma diminuição da componente repulsiva da energia livre, de tal modo que no limite  $n'_o \rightarrow \infty$ , é recuperado o modelo anterior. Segundo a expressão 3.7, a fração molar de monômeros associados em micelas de tamanho  $n \geq 2$  é  $\chi_n = n \chi_1^n e^{-(n-n_o)(1-\frac{n}{n'_o})\delta}$ , onde a variável  $\chi_1$ , como função de  $\chi$  e dos parâmetros  $\delta$ ,  $n_o$  e  $n'_o$ , é encontrada numericamente, a partir da condição  $\chi = \sum_{n \geq 1} \chi_n$ . Na figura 3.5, é apresentada a distribuição de tamanhos, num caso em que a fração de monômeros é a mesma que a da figura 3.3, para comparação.

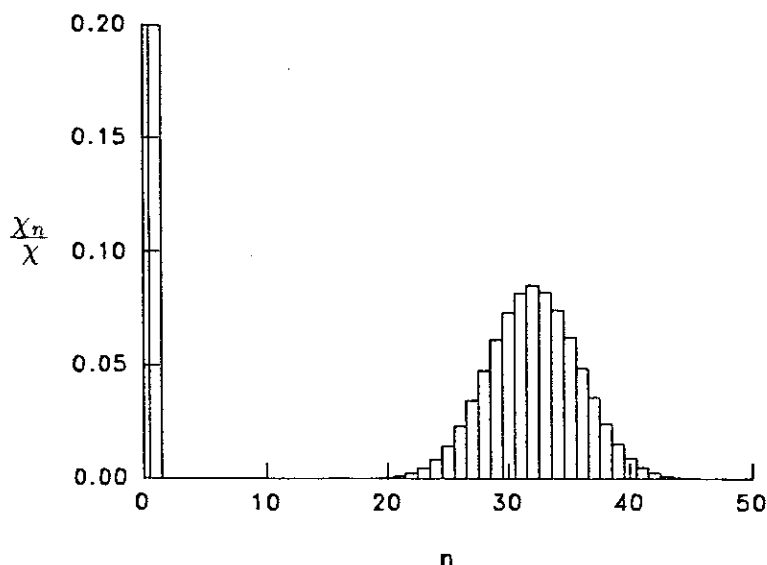
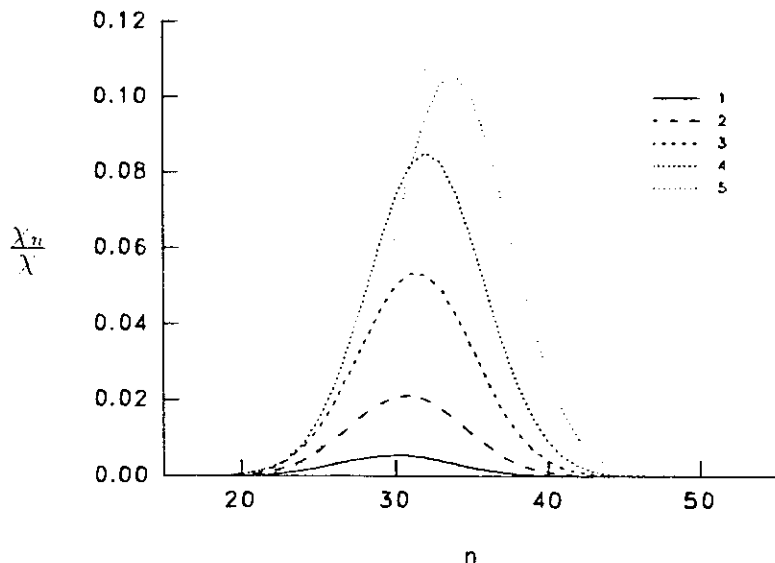


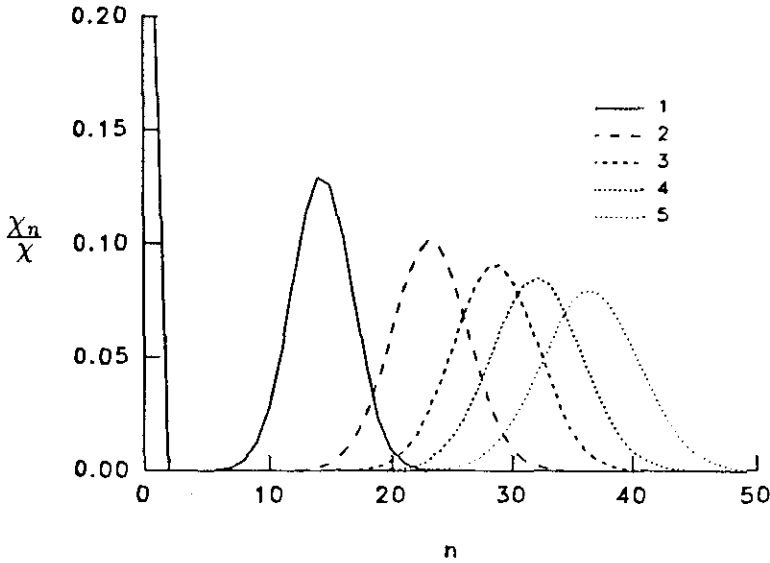
Figura 3.5: Distribuição de tamanhos correspondente a  $\mu_n^o = n \mu_1^o + k_B T (n - n_o) \left(1 - \frac{n}{n'_o}\right) \delta$ . Para  $n_o = 4$ ,  $n'_o = 350$ ,  $\delta = -12,3$  e  $\chi = 40 e^\delta$ .

Observa-se que, neste caso, a distribuição apresenta um comportamento bimodal. A média da distribuição é melhor definida que com o modelo anterior e não depende fortemente da concentração total, por exemplo, para o caso da figura 3.5, ao variar a fração de monômeros no intervalo (0,005;0,95), o número de agregação que maximiza a distribuição só varia um 10% (figura 3.6).



**Figura 3.6:** Dependência do máximo da distribuição com a fração de monômeros. Para  $n_o = 4$ ,  $n'_o = 350$ ,  $\delta = -12, 3$  e  $\chi$  tal que  $\frac{X_1}{X} = 0,95$  (1), 0,80 (2), 0,50 (3), 0,20 (4) e 0,005 (5).

Para  $\chi = 40 e^\delta$ , observamos, também, como varia a distribuição de tamanhos com os parâmetros  $n'_o$  e  $\delta$ , tendo sido ajustado o parâmetro  $n_o$  para que  $\chi_1/\chi \simeq 0,2$  (fig. 3.7). Com os outros parâmetros fixos, quando  $n_o$  aumenta, aumenta  $\chi_1/\chi$ , do mesmo modo que no caso anterior. Ao aumentar  $n'_o$ , com  $-\delta$  fixo (curvas 2, 4 e 5 da fig. 3.7), o máximo do pico se desloca para valores maiores de  $n$ , a largura aumenta e aumenta a fração micelizada para um dado valor de  $\chi$ , consistentemente com a diminuição da repulsão entre monômeros. Entretanto, ao aumentar o parâmetro  $-\delta$  (contribuição hidrofóbica), com  $n'_o$  constante (curvas 1, 2 e 3 da mesma figura), a largura decresce ao mesmo tempo que diminui a concentração total necessária para que uma certa fração seja micelizada (neste caso, 80%) e, em particular, diminui a cmc.



**Figura 3.7:** Distribuição de tamanhos correspondente a  $\mu_n^o = n \mu_1^o + k_B T (n - n_o) (1 - \frac{n_r}{n_o}) \delta$ . Para  $\chi = 40$  e  $\delta$  e para  $n_o$ ,  $n'_o$  e  $\delta$ , respectivamente, 1,823, 250 e -20 (1), 3,207, 250 e -12,3 (2), 4,382, 250 e -10 (3), 4,035, 350 e -12,3 (4), 4,443, 400 e -12,3 (5). Os parâmetros  $n'_o$  e  $\delta$  foram escolhidos arbitrariamente enquanto  $n_o$  é tal que  $\chi_1/\chi \simeq 0,2$ .

Outros modelos propostos para descrever a mecânica da formação de micelas, levando em conta diferentes fatores, segundo o aspecto a ser enfatizado[96,100-102], produzem distribuições com comportamentos semelhantes aos das apresentadas na figura 3.7. Portanto, este modelo para a agregação de anfifílicos, ainda sendo simples, permite estudar, em primeira aproximação, o fenômeno da micelização.

A forma e o tamanho das micelas são resultantes da combinação de fatores termodinâmicos e geométricos[43]. As limitações geométricas já foram discutidas no Capítulo 1. Um fator geométrico relevante é a relação área/volume da micela ( $A/V$ ) proporcional à área por monômero sobre a superfície da micela[98,44]. Para diferentes formas geométricas (esferas, cilindros e discos), foi calculada a relação área/volume ( $A/V$ ) e o número de agregação ( $n$ ), dado um valor arbitrário da densidade do anfifílico na micela. No gráfico da figura 3.8, são apresentados os pares de valores  $(A/V)/(A/V)_o$ .

e  $n$ , sendo  $(A/V)_0$  a relação área/volume para a esfera de raio máximo (máximo comprimento da porção hidrofóbica do anfifílico). Observa-se que para valores de  $n$  acima do valor máximo compatível com a forma esférica, as micelas crescem formando estruturas cilíndricas ou discóides. Para valores de  $n$  um pouco maiores que o valor máximo compatível com a forma esférica, a relação  $A/V$  é menor para os cilindros que para os discos, invertendo-se a desigualdade a partir de  $n \simeq 100$ . Observa-se, também, que, para um dado valor de  $n$ , diferentes estruturas têm o mesmo valor de  $A/V$ .

A energia livre de transferência contém, basicamente, dois termos, associados às forças hidrofóbicas atrativas e às eletrostáticas repulsivas. As forças hidrofóbicas agem no sentido de diminuir a área por monômero da micela, de forma que a sua contribuição para o crescimento micelar aumenta se a área por monômero diminui ao aumentar o número de agregação. Entretanto, as forças repulsivas tendem a aumentar a área por carga, sendo maior a sua contribuição quanto menor a área por monômero carregado. Quando as forças repulsivas são relevantes, o crescimento na forma cilíndrica é mais favorável que na forma discóide. A distribuição de formas e tamanhos será tal que a relação área/volume seja em torno do valor ótimo, determinado pelo balanço entre as forças atrativas e repulsivas entre os monômeros, sendo possível a coexistência de diferentes estruturas, quando igualmente favoráveis.

Como pode ser observado, a partir dos modelos apresentados na seção 3.1, o número de agregação médio aumenta com a concentração total do anfifílico, assim, é possível, também, a ocorrência de transições entre diferentes formas, quando o crescimento é facilitado por uma mudança de geometria ou quando uma forma se torna instável[33,34]. No caso da CPZ, por exemplo, se produz uma transição de esferas para cilindros, ao aumentar o número de agregação, quando a concentração de sais é elevada[34,103]. Além do mais, para altas concentrações do anfifílico, e, conseqüentemente, das micelas (cujo tamanho, por outro lado, aumenta com a concentração), as interações entre agregados deixam de ser desprezíveis, podendo surgir novas formas de agregação[33,34,92] como resultado dessas interações. Outrossim, como a energia livre depende das características do anfifílico e do meio, podem produzir-se transições ao ser alterada alguma das variáveis que caracterizam o sistema, tais como temperatura, pH, força iônica, composição iônica,

além da concentração do anfílico.

Pode mostrar-se que existe uma correspondência entre a dependência de  $\Delta G_n^{tr}$  com  $n$  resultante das expressões 3.2 e 3.7 e aquela que seria obtida se fosse escolhida a geometria cilíndrica numa formulação mais geral[43]. Portanto, uma limitação dos modelos para a micelização propostos neste trabalho é que não permitem estudar transições entre diferentes formas. O tratamento mais geral consiste em considerar uma expressão para  $\Delta G_n^{tr}$  em termos de parâmetros tais como a área por monômero e a área por carga[96], calcular a distribuição  $\chi_n$  supondo diferentes geometrias, fixando os parâmetros independentes da forma geométrica, e determinar a geometria mais favorável para cada valor de  $n$ .

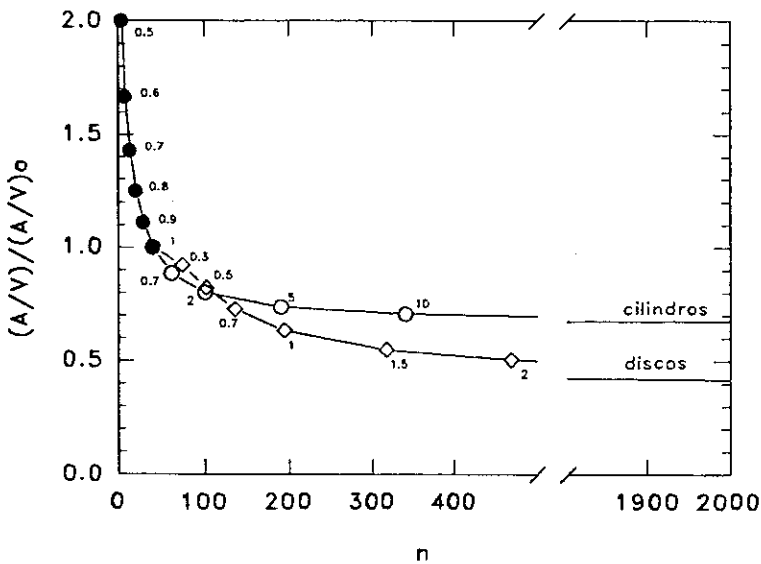


Figura 3.8:  $(A/V)/(A/V)_0$  vs.  $n$ , sendo  $(A/V)_0$  a relação área/volume para a esfera de raio máximo ( $r_0$ ). Os pontos correspondem a esferas de raio  $r$  ( $\bullet$ ), cilindros de raio  $r_0$  e altura  $h$  com capas semiesféricas ( $\circ$ ) e discos de raio  $R$  e altura  $2r_0$ , com bordas arredondadas ( $\diamond$ ). Para cada uma destas geometrias, os números sobre a figura indicam, respectivamente, as relações  $r/r_0$ ,  $h/r_0$  e  $R/r_0$ . A densidade do anfílico foi escolhida arbitrariamente de modo tal que a micela esférica de raio máximo contém 40 monômeros.

### 3.2 Técnica para determinar a concentração micelar crítica

Os radicais nitróxido possuem um elétron desemparelhado e, portanto, podem ser detetados pela técnica de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE). Os espectros de RPE destes radicais são sensíveis tanto aos movimentos moleculares quanto à natureza do meio no qual estão dissolvidos. Os parâmetros das interações magnéticas do radical dependem da distribuição eletrônica na molécula e, conseqüentemente, são influenciados pelas perturbações do meio circundante[18, cap.2].

Neste trabalho foi utilizada uma sonda paramagnética derivada do ácido esteárico (marcado com um grupo doxil no carbono 16). Na figura 3.9, é apresentado um esquema da estrutura molecular da sonda.

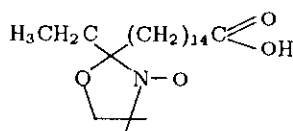
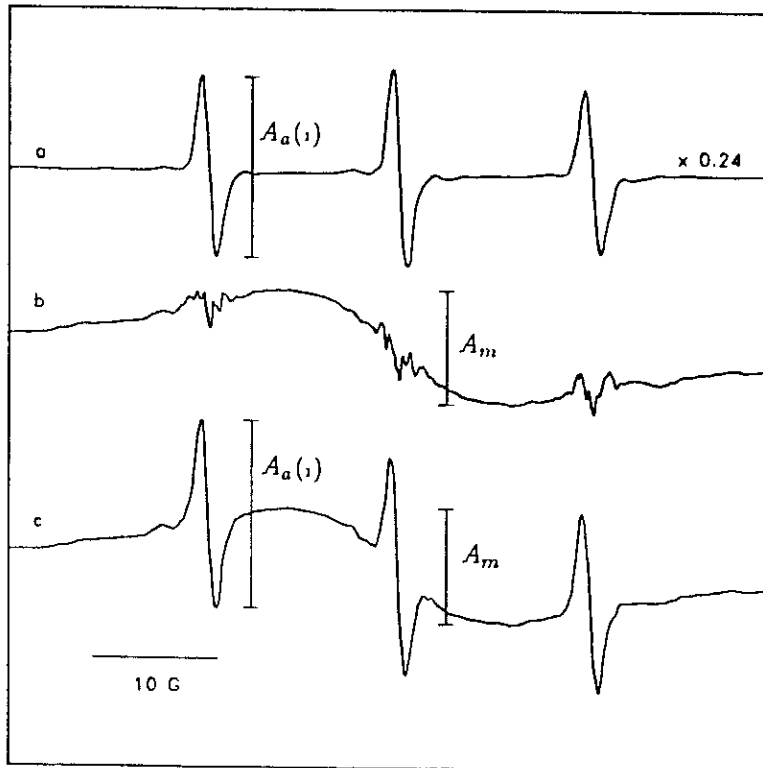


Figura 3.9: Estrutura molecular da sonda paramagnética utilizada: 16-SASL.

O ácido esteárico possui baixa solubilidade em meio aquoso, portanto, em presença de um meio hidrofóbico, esta substância se particiona entre a fase aquosa e a fase apolar. A interpretação dos espectros obtidos utilizando amostras da sonda se baseia nas diferentes características que apresenta o espectro segundo a molécula esteja na solução aquosa ou num meio hidrofóbico[18, cap.2].

Para amostras contendo uma baixa concentração da sonda e em ausência de meio hidrofóbico, é obtido um espectro característico da sonda dissolvida em solução aquosa (fig. 3.10.a), apresentando três linhas estreitas bem resolvidas[18, cap.2].



**Figura 3.10:** Espectros de RPE de amostras de 16-SASL, em tampão fosfato isotônico 310 mOsm, a 20°C: a) em concentração 30 $\mu$ M, a pH 7,4, b) resultante da subtração do espectro 'a' do espectro 'c' e c) em concentração 300 $\mu$ M, a pH 5,9.

Sendo o ácido esteárico uma substância anfifílica e possuindo dois estados de carga (neutra ou carregada negativamente), tem um comportamento análogo ao da CPZ. As interações intermoleculares dependem das condições de temperatura, pH, força iônica e composição iônica, e, para concentrações acima de um valor crítico (cmc da sonda), as moléculas se associam formando micelas. Nas micelas, a concentração local da sonda é muito maior que a concentração volumétrica, assim, as interações spin-spin são relevantes e as linhas do espectro sofrem um alargamento tal que uma única linha larga é observada[18, caps.7,11]. Um espectro típico da sonda micelizada é apresentado na fig. 3.10.b.



Quando as moléculas associadas em micelas e na forma de monômeros coexistem, é obtido um espectro composto, como o da figura 3.10.c, que consiste na superposição dos espectros característicos de cada uma das duas populações.

Como o espectro obtido pela técnica de RPE é a derivada do espectro de absorção, a dupla integral do espectro é proporcional à quantidade total de sonda presente[18, cap.11]. No caso da figura 3.10, foi subtraído do espectro (c) o espectro (a) multiplicado por um fator 0,24, obtendo-se o espectro (b) em que a componente menos imobilizada foi eliminada. Já que o espectro (c) corresponde a uma amostra 10 vezes mais concentrada que a do espectro (a), a dupla integral do espectro subtraído corresponde a  $\sim 2,4\%$  da do espectro (c) ou seja que, na amostra correspondente ao espectro (c), só  $2,4\%$  da quantidade total de sonda está na forma monomérica. Assim, a partir da análise espectral, é possível conhecer a distribuição da sonda entre os dois meios e determinar a concentração micelar crítica da sonda.

Um método alternativo para analisar os espectros se baseia no fato das amplitudes de um espectro puro, correspondente à sonda num determinado meio, serem proporcionais à quantidade total de sonda no meio[18, cap.11]. Assim, utilizando amostras de sonda dissolvida em solução aquosa, podem ser calibradas as amplitudes das linhas do espectro, em particular, a amplitude pico a pico da linha do espectro correspondente a  $I = 1$  ( $A_{a(1)}$ ) (fig. 3.10.a). No espectro composto (fig. 3.10.c), a amplitude  $A_{a(1)}$  não tem, praticamente, contribuição da componente mais imobilizada do espectro. Conseqüentemente, a quantidade de sonda na forma monomérica pode ser calculada a partir da medida da amplitude  $A_{a(1)}$  do espectro composto.

No caso da figura 3.10, a diferença entre os valores obtidos pelos dois métodos é inferior ao 5%. No entanto, na determinação pelo primeiro método o erro é maior, devido a que o cálculo da dupla integral é muito sensível à correção de linha de base, dificultada no caso de espectros muito largos.

Em presença de CPZ, em concentrações muito menores do que a cmc da droga, a sonda se comporta de modo similar ao caso em que a CPZ está ausente, sendo obtidos espectros como o da figura 3.10.c. Entretanto, em presença de um ambiente micelar, a sonda se incorpora nas micelas, devido ao seu elevado coeficiente de partição

micela/água. Assim, para altas concentrações de CPZ, predomina uma nova componente espectral caracterizada por três linhas alargadas (fig. 3.11), típica dos agregados micelares[104]. Observa-se que o alargamento das linhas é muito menor que no caso das micelas de sonda, indicando que a razão molar sonda:droga é baixa. Nota-se também que esta componente corresponde à presença da sonda em um meio apolar ( $a_N \simeq 14,8\text{G}$ ) e no qual a sonda está mais imobilizada que na solução aquosa ( $\tau_c \simeq 2,2 \times 10^{-9}$  s, calculado segundo a expressão na referência [104].), portanto pode ser atribuída à presença da sonda nas micelas da droga. Por outro lado, observa-se que a forma desta componente espectral depende do pH, de tal modo que a mobilidade diminui à medida que o pH aumenta[92]. Este efeito é devido ao fato de que, ao aumentar o pH, diminui a repulsão eletrostática e, conseqüentemente, o meio micelar torna-se mais compacto.

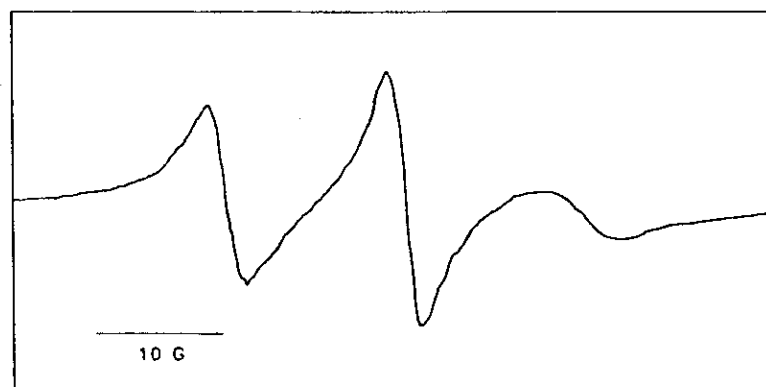


Figura 3.11: Espectro de RPE da sonda 16-SASL incorporada em micelas de CPZ, em tampão fosfato 10 mM, NaCl 0,11 M, pH 5,6, a 20°C. A concentração de CPZ é 8 mM e a relação molar sonda:droga é 1:50

Portanto, em presença de CPZ, podem distinguir-se três populações da sonda: monômeros, moléculas da sonda associadas em micelas e moléculas da sonda incluídas nas micelas de CPZ. Neste caso, também, a partir da análise espectral, pode ser calculada a distribuição da sonda em cada meio e, conseqüentemente, determinada a concentração micelar crítica da droga, como será mostrado na seção 3.4.2.

### 3.3 Preparação de amostras

As amostras marcadas foram preparadas agregando CPZ (20 mM em  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , a componente ácida do tampão fosfato utilizado, para melhor dissolução) a uma solução de sonda paramagnética em etanol previamente evaporado. Para cada série de medidas, a relação molar entre a sonda e a droga foi mantida constante (menor que 1:50).

As experiências foram realizadas a 20 °C. A temperatura da amostra foi controlada mediante um regulador de fluxo de  $\text{N}_2$  da Varian e medida com um termopar de cromel/constantan colocado em contato com o tubo da amostra. O pH foi controlado variando-se a relação entre os dois componentes do tampão ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ). O pH da solução final foi medido com um pH-metro Celm com eletrodo Fisher. Para os estudos sobre a cmc da sonda, foram preparadas soluções isotônicas 310 mOsm a partir de diferentes quantidades de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  155 mM e  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  103 mM. Entretanto, para os estudos sobre a cmc da CPZ, as soluções tampão foram preparadas a partir de soluções de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  120 mM e  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  40 mM. Nos casos que serão indicados, foram incorporadas quantidades apropriadas de NaCl 240 mM em  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ .

Os espectros foram obtidos, a partir de amostras preparadas em tubos de hematócrito de 50  $\mu\text{l}$ , operando um espectrômetro Varian E-9 na banda X de frequências, com uma potência de microonda de 40 mW e modulação de 100 KHz (1G). Normalmente, a varredura do campo magnético foi de 100 G em 8 min., sendo a constante de tempo 0,3 seg.

## 3.4 Medidas e Resultados

### 3.4.1 Determinação da cmc da sonda

A partir da análise espectral foram obtidos os valores da cmc da sonda para diferentes valores do pH.

Na figura 3.12, são apresentados espectros típicos obtidos por RPE utilizando amostras da sonda em tampão fosfato, a diferentes pH. Observa-se que, à medida que o pH diminui, aumenta a componente do espectro que corresponde à sonda em micelas.

Por outro lado, nota-se que, para amostras com  $\text{pH} \leq 5,5$ , a largura da componente mais imobilizada (fig. 3.10.b) aumenta sensivelmente.

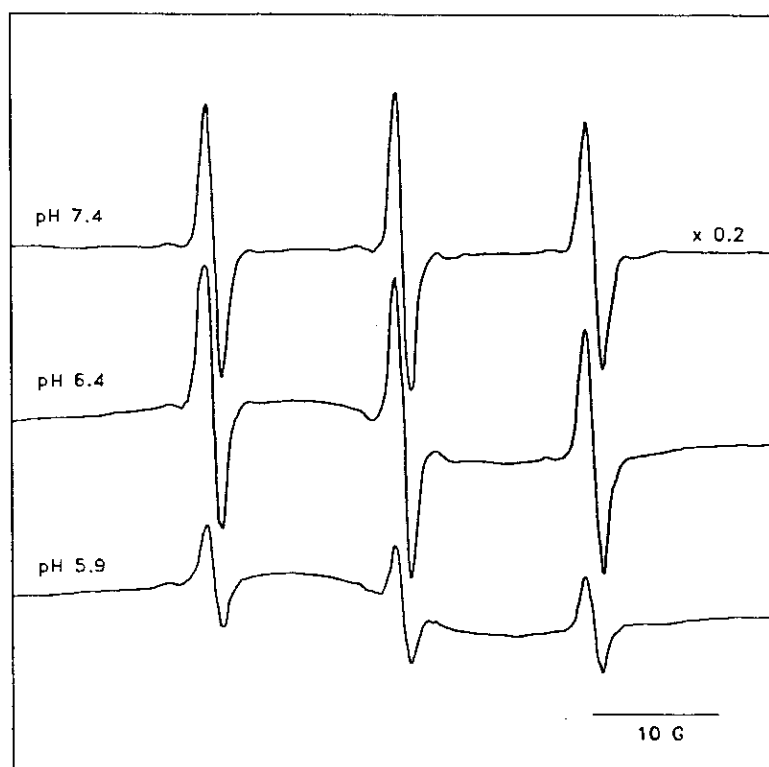


Figura 3.12: Espectros de RPE de amostras de 16-SASL ( $300\mu\text{M}$ ), em tampão fosfato isotônico 310 mOsm, a  $20^\circ\text{C}$ . Os valores do pH são indicados na figura.

Para cada valor do pH, foram preparadas amostras contendo diferentes concentrações da sonda, na faixa  $5\mu\text{M}$ - $1\text{mM}$ . A partir dos espectros obtidos, foram medidas as intensidades  $A_{o(1)}$  e  $A_m$  (fig. 3.10).

Na figura 3.13 é apresentado um gráfico dessas intensidades vs. a concentração total da sonda, para pH 6,9. Analogamente ao comportamento descrito na figura 3.2, observa-se que, inicialmente, à medida que a concentração total da sonda aumenta, a concentração de moléculas dissolvidas (proporcional a  $A_{o(1)}$ ) aumenta linearmente. Entretanto, a partir de um valor crítico da concentração total, a concentração de moléculas dissolvidas permanece praticamente constante, enquanto, a concentração de moléculas micelizadas (proporcional a  $A_m$ ) aumenta linearmente.

Assim, mediante um procedimento gráfico, pode ser determinado um valor crítico da concentração (cmc): igual à abscissa da interseção das retas obtidas por regressão linear dos gráficos  $A_{o(1)}$  vs. concentração total da sonda, para baixas e altas concentrações da sonda[97,105]. Na figura 3.13 é apresentado um exemplo deste procedimento.

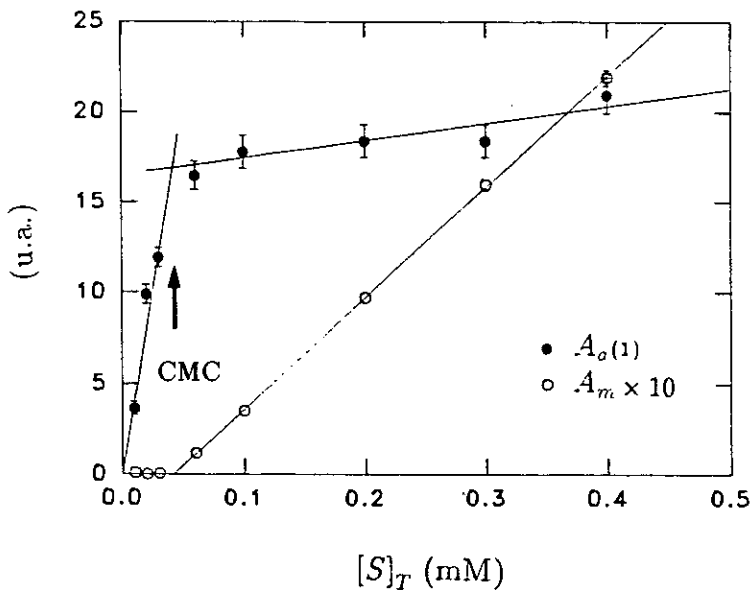


Figura 3.13: Determinação da cmc da sonda. Intensidades  $A_{o(1)}$  e  $A_m$  vs. concentração total da sonda ( $[S]_T$ ), para amostras de 16-SASL em tampão fosfato isotônico 310 mOsm (pH 6,9), a  $20^\circ\text{C}$ . O erro das intensidades leva em conta o erro de medida e a reprodutibilidade dos espectros. O erro das concentrações é inferior ao 5%.

Na figura 3.14, mostram-se os gráficos  $A_a(1)$  vs. concentração total da sonda, para diferentes valores do pH. Para cada pH, foi determinada a cmc da sonda, segundo o procedimento descrito acima, sendo apresentados os resultados no gráfico incluído na mesma figura. Observa-se na figura 3.14 que, à medida que o pH diminui, as curvas  $A_a(1)$  vs.  $[S]_T$  variam mais suavemente, possivelmente devido à formação de agregados premicelares favorecida pela diminuição da fração de sonda carregada a pH baixo.

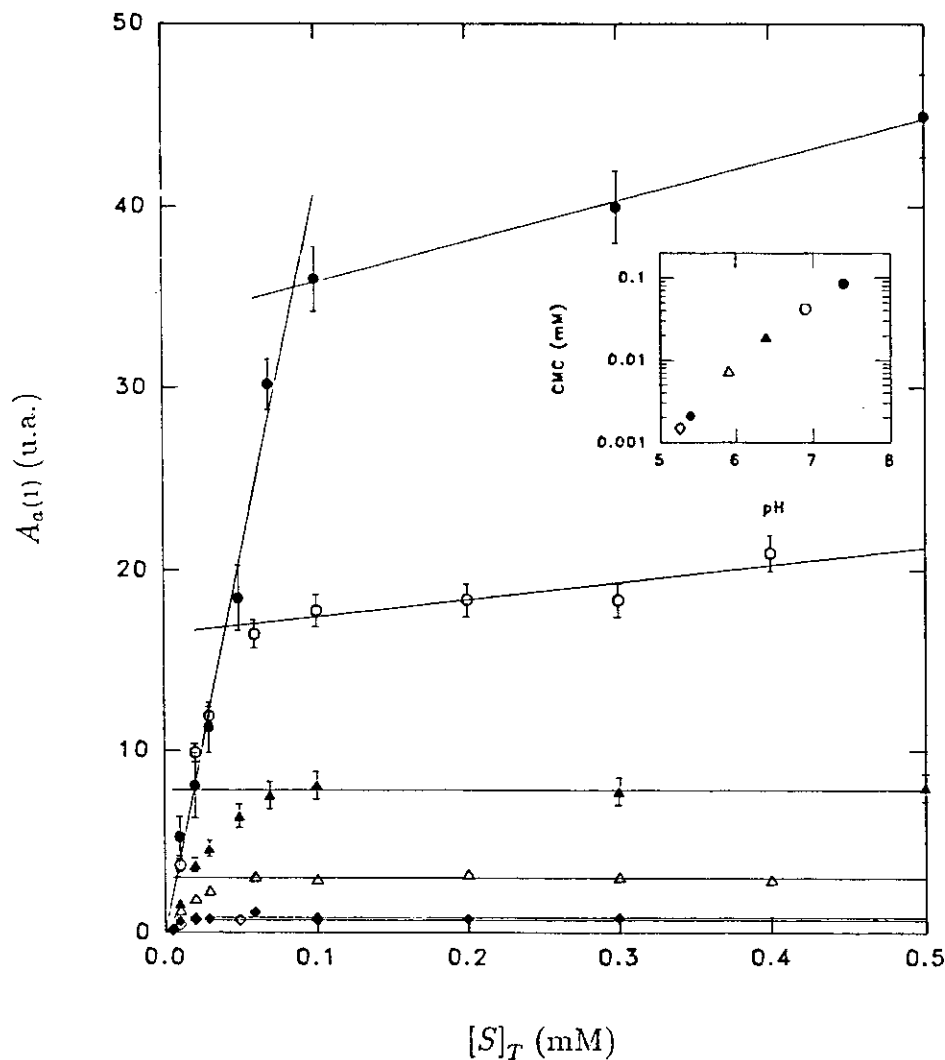


Figura 3.14: Dependência da cmc da sonda com o pH. Intensidade  $A_a(1)$  vs. concentração total da sonda ( $[S]_T$ ), para amostras de 16-SASL em tampão fosfato isotônico 310 mOsm, a 20°C. Cada símbolo corresponde a um valor de pH que coincide com o da figura incluída. Nesta são apresentados os valores da cmc da sonda vs. pH, calculados a partir das curvas  $A_a(1)$  vs.  $[S]_T$ .

A cmc pode ser estimada, também, mediante o ajuste de uma expressão teórica aos dados experimentais. Na figura 3.15, são apresentados os resultados do ajuste da expressão 3.5 aos dados da figura 3.13. A reta  $A_a(1)$  vs. concentração da sonda, determinada pelos pontos obtidos para baixas concentrações e  $pH \geq 6,9$ , é considerada como curva de calibração dessa intensidade, já que, nessas condições, a sonda se encontra na forma monomérica, segundo surge da análise espectral. O valor da cmc obtido a partir do ajuste ( $50\mu M$ ) é superior ao determinado graficamente ( $40\mu M$ ). No entanto, para cada valor de pH, a diferença entre os valores determinados por estes dois métodos é sistemática, não sendo afetada, conseqüentemente, a forma da curva pH vs cmc.

A partir da medida de  $A_a(1)$  e sendo conhecida a concentração total, também pode ser calculada a fração de sonda em cada meio. Na figura 3.16, é apresentado um gráfico da fração de sonda monomérica em função da concentração total da sonda, para cada valor do pH.

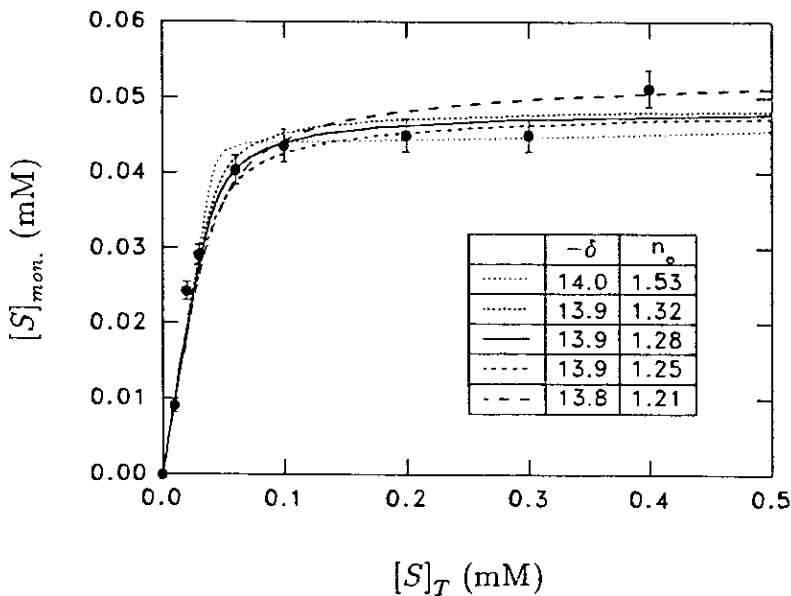


Figura 3.15: Concentração de monômeros vs. concentração total, correspondente aos dados da figura 3.13. A curva contínua corresponde ao melhor ajuste da expressão 3.5 aos dados experimentais, sendo os parâmetros do ajuste  $\delta$  e  $n_o$ . Outras curvas são apresentadas para comparação.

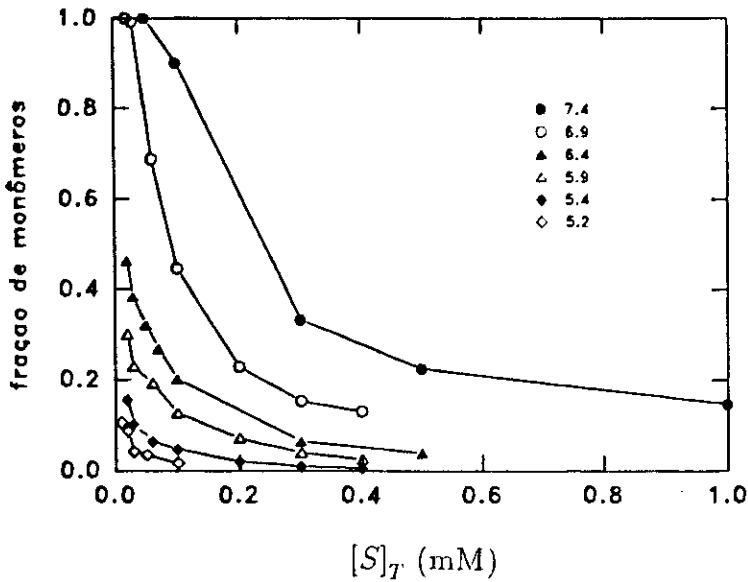
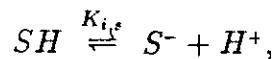


Figura 3.16: Fração de sonda monomérica vs. concentração total da sonda ( $[S]_T$ ), para as mesmas amostras da figura 3.14. Os valores do pH são indicados na figura.

A partir destes resultados, observa-se que a solubilidade da sonda aumenta com o pH. Este efeito pode ser explicado em termos do estado de carga da sonda  $S$ , que é ionizada segundo:



onde  $K_{i,s}$  é a constante de ionização da sonda, tal que, no equilíbrio:

$$K_{i,s} = \frac{[S^-][H^+]}{[SH]}, \quad (3.8)$$

onde  $[SH]$  e  $[S^-]$  são as concentrações das duas formas da sonda, e  $[H^+]$  é a concentração de prótons.

Quando o pH decresce, decresce a fração ionizada e, conseqüentemente, diminui a repulsão eletrostática entre as cabeças polares da sonda, facilitando a micelização, consistentemente com o resultado da cmc da sonda diminuir com o pH.



Por outro lado, a constante de ionização da sonda em meio aquoso ( $K_{i,s}^a$ ) é tal que  $pK_{i,s}^a = -\log(K_{i,s}^a) \simeq 5[106,107]$ . No entanto, para a sonda em micelas, o valor da constante de ionização intrínseca ( $K_{i,s}^m$ ) pode diferir por tratar-se de um meio diferente. Como a constante dielétrica do meio micelar é menor que a do meio aquoso,  $pK_{i,s}$  deve aumentar nas micelas[108,109]. Além do mais, perto da superfície negativamente carregada dos agregados, a concentração local de prótons é dada pela relação de Boltzmann[110,111]:

$$[H^+]_s = [H^+] e^{-\frac{e\psi_s}{k_B T}}, \quad (3.9)$$

onde  $[H]$  é a concentração volumétrica de prótons,  $k_B$  a constante de Boltzmann,  $T$  a temperatura em graus Kelvin,  $e$  a carga do elétron e  $\psi_s$  o valor do potencial elétrico na superfície da micela, tendo sido definido como sendo zero o potencial na solução a distância infinita de qualquer micela[98].

Assim, nas micelas, a constante de ionização intrínseca é dada por:

$$K_{i,s}^m = \frac{[S_m^-][H^+]_s}{[SH_m]} = \frac{[S_m^-][H^+]}{[SH_m]} e^{-\frac{e\psi_s}{k_B T}}, \quad (3.10)$$

onde  $[S_m^-]$  e  $[SH_m]$  são as concentrações volumétricas das duas formas da sonda no meio micelar. A constante de ionização aparente, relativa à concentração volumétrica de prótons, é:

$$K_{ap,s}^m = K_{i,s}^m e^{\frac{e\psi_s}{k_B T}} = \frac{[S_m^-][H^+]}{[SH_m]}, \quad (3.11)$$

expressão que podemos reescrever como:

$$pK_{ap,s}^m = pK_{i,s}^m - \log e \frac{e\psi_s}{k_B T}. \quad (3.12)$$

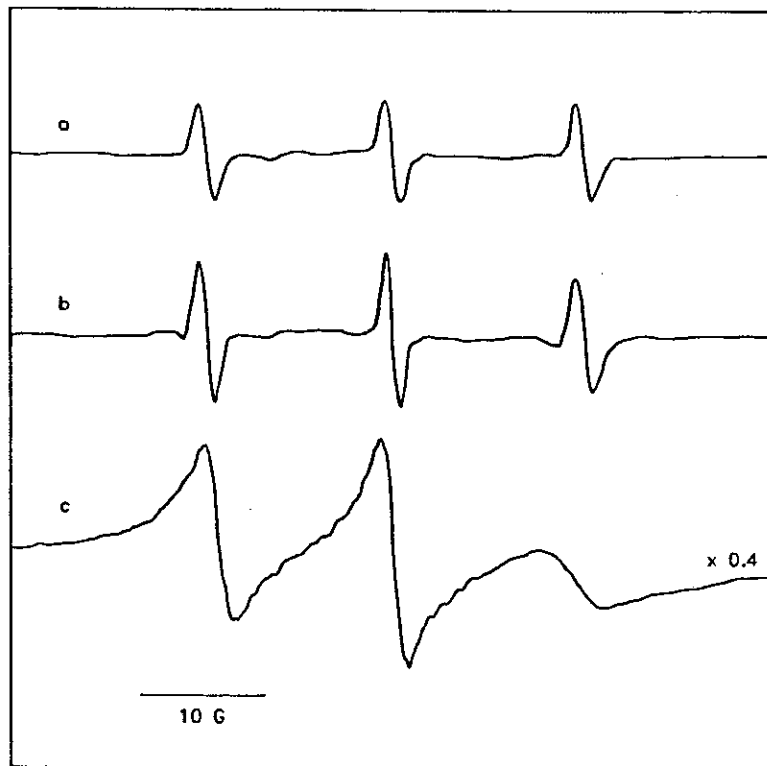
O primeiro termo do segundo membro da igualdade é maior que  $pK_{i,s}^a$ , de acordo

com o discutido previamente, e o segundo termo é positivo, já que a carga superficial  $e$ , conseqüentemente,  $\psi_s$  são negativos. Então,  $pK_{ap,s}^m \geq pK_{i,s}^a$ .

Segundo os resultados apresentados na figura 3.14, a dependência da cmc com o pH é praticamente linear, indicando que a sonda está parcialmente ionizada na faixa de pH estudada (já que se a sonda fosse totalmente ionizada ou neutra, a cmc independeria do pH). Então,  $pK_{ap,s}^m$  deve ser em torno de 6,5, valor maior que  $pK_{i,s}^a$  e, portanto, consistente com a discussão prévia. Por outro lado, este valor é próximo ao observado no caso em que a sonda é incorporada em vesículas de fosfolipídios[106,107].

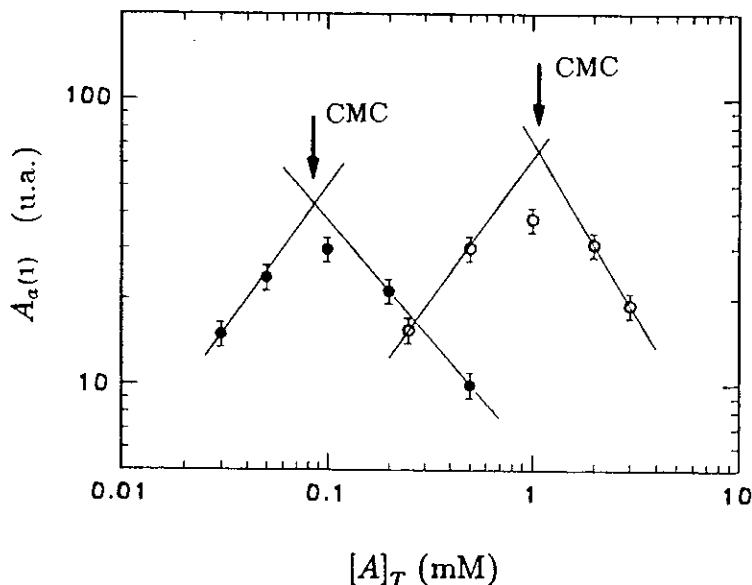
### 3.4.2 Determinação da cmc da clorpromazina

Foram feitas medidas de RPE de amostras contendo diferentes concentrações de CPZ. Várias séries de medidas foram obtidas para diferentes condições de pH e força iônica. Na figura 3.17, são apresentados espectros pertencentes a uma dessas séries. Observa-se que, para baixas concentrações de CPZ, a sonda está dissolvida na solução aquosa (espectros (a) e (b) da figura 3.17), entretanto, para altas concentrações (muito acima da cmc da CPZ), a sonda se incorpora, completamente, nas micelas (espectro (c) da figura 3.17).



**Figura 3.17:** Espectros de RPE de amostras de 16-SASL, em tampão fosfato 0,17 M (pH 5,25), a 20°C. Para todas as amostras da série, a relação molar sonda:CPZ é 1:50. As concentrações de CPZ são: a) 0,025 mM, b) 0,05 mM e c) 10 mM.

A partir destes espectros foi medida a intensidade  $A_{a(1)}$  e, para cada série (em que a fração molar sonda:droga é mantida constante), foi construído um gráfico  $A_{a(1)}$  vs. concentração total da droga, sendo apresentado um gráfico típico na figura 3.18.



**Figura 3.18:** Determinação da cmc da CPZ. Intensidade  $A_{a(1)}$  vs. concentração total de CPZ ( $[A]_T$ ), para amostras de 16-SASL contendo CPZ (relação molar sonda:CPZ = 1:50), a 20°C, em tampão fosfato: 0,12 M, pH 7,55 (●) e 0,22 M, NaCl 0,06 M, pH 6,35 (○). O erro das intensidades leva em conta o erro de medida e a reprodutibilidade dos espectros. O erro das concentrações é inferior ao 5%.

Analogamente a como foi determinada a cmc da sonda, determinamos a cmc da droga através de um método gráfico.

Dadas as condições de temperatura, pH e força iônica, quando a droga se encontra na forma de monômeros, a intensidade  $A_{a(1)}$  varia com a concentração total de sonda de modo similar ao observado no caso da fig. 3.13 em que a droga está ausente. Assim, para baixas concentrações da droga (e da sonda, já que são proporcionais),  $A_{a(1)}$  aumenta com a concentração (espectros (a) e (b) da fig. 3.17).

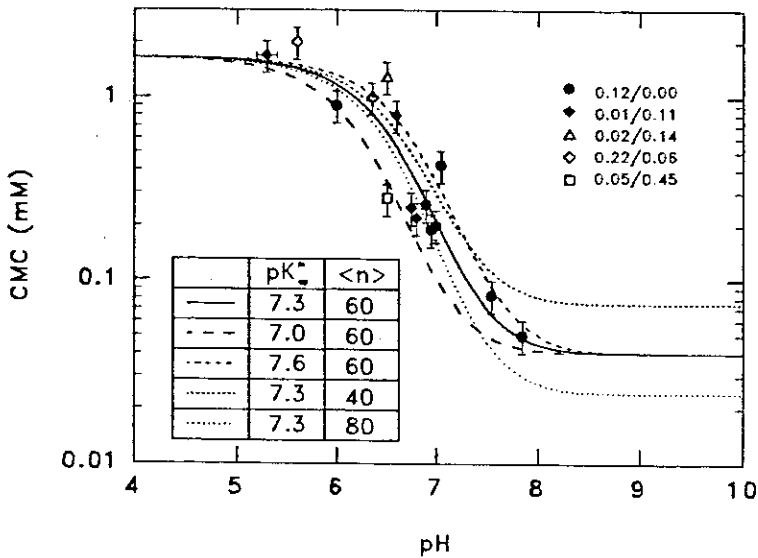
Entretanto, para concentrações da droga acima de um valor crítico,  $A_{a(1)}$  decresce. Se a sonda estivesse formando micelas e a droga não, então,  $A_{a(1)}$  manter-se-ia praticamente constante (fig. 3.13), portanto, se  $A_{a(1)}$  decresce, este comportamento pode ser correlacionado com a formação de micelas da droga. Neste caso, a concentração

de sonda monomérica, proporcional à intensidade  $A_{a(i)}$ , diminui, devido à solubilidade preferencial da sonda nas micelas de droga.

Para altas concentrações da droga (fig. 3.17.c), predomina a componente do espectro correspondente à sonda incorporada nas micelas da droga e a amplitude  $A_{a(i)}$  torna-se praticamente nula.

Assim, a partir do gráfico  $A_{a(i)}$  vs.  $[A]_T$ , determinamos a concentração micelar crítica da droga como o valor correspondente à interseção das retas obtidas para baixas e para altas concentrações da droga, segundo exemplificado na figura 3.18.

Assim como no caso da sonda, o valor crítico determinado segundo este método é arbitrário. No entanto, como o mesmo critério foi utilizado em todos os casos, espera-se que a diferença com os valores críticos determinados segundo algum outro critério seja sistemática, não sendo afetada, substancialmente, a forma da curva pH vs. cmc. Os valores da cmc, obtidos pelo procedimento descrito acima, são representados, em função do pH, no gráfico da figura 3.19.



**Figura 3.19:** pH vs. cmc da clorpromazina. Cada símbolo corresponde a diferentes valores da força iônica do tampão e da concentração de NaCl (M), indicados nessa ordem, na figura. As curvas foram obtidas a partir da equação 3.16. O valor da força iônica considerado nos cálculos é 0,12.

### 3.5 Discussão

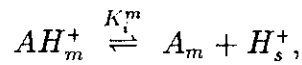
Deve ter-se em conta que a possível formação de micelas mistas[32] da droga e da sonda, favorecida, além das interações hidrofóbicas, pelo fato de suas cargas elétricas serem de sinal oposto, pode induzir um erro na determinação da cmc da droga, no sentido de serem obtidos valores inferiores àqueles próprios da CPZ pura. Portanto, é importante que a relação molar sonda:droga ( $r$ ) seja escolhida de tal modo que  $r \leq \text{cmc}_{\text{sonda}}/\text{cmc}_{\text{droga}}$ . Uma limitação resultante é a estreita faixa de pH que é possível estudar. Para  $\text{pH} \geq 8$ , como a cmc da droga é baixa e a relação molar sonda:droga deve ser menor que 1:50, as concentrações de sonda resultantes não permitem obter um bom sinal de RPE. Para  $\text{pH} \leq 5$ , a cmc da droga é da ordem de 2 mM, mas, como a cmc da sonda é muito menor, deve trabalhar-se com amostras em que a relação molar seja muito pequena ( $\sim 1:500$ ), sendo novamente relevante o limite da sensibilidade do aparelho. No entanto, esta limitação poderia ser reduzida com a utilização de aparelhos mais sensíveis.

Uma outra limitação se deve à possível formação de agregados premicelares da droga[104,112], neste caso, o método de análise espectral utilizado poderia levar a subestimar o valor da cmc, já que a redução da componente do espectro que corresponde à sonda em solução seria devida à sua incorporação nesses agregados.

Para a faixa de pH estudada (figura 3.19), observa-se que o valor da cmc aumenta quando o pH diminui. Para valores do pH inferiores a aprox. 6, a cmc permanece praticamente constante. Este comportamento, pode ser explicado pelo fato de que, segundo a relação 3.1, a fração de CPZ na forma carregada aumenta quando o pH diminui. Assim, a repulsão eletrostática entre as cabeças polares aumenta, predominando sobre as forças intermoleculares atrativas. A baixo pH (muito menor que o valor de  $\text{p}K_i = -\log K_i$ ), a droga encontra-se quase exclusivamente na forma carregada, portanto, uma ulterior diminuição do pH não modificará o valor da cmc.

Para a CPZ em meio aquoso, temos  $pK_i^a \simeq 9,3$ [113]. Assim, como foi já discutido para o caso da sonda, para a droga na micela, a proporção entre as duas espécies (carregada e neutra) é diferente que no meio aquoso. Em primeiro lugar, porque o meio micelar tem propriedades físico-químicas diferentes das do meio aquoso, as constantes de ionização intrínsecas nesses meios podem, em princípio, diferir. Neste caso, a redução da constante dielétrica nas micelas, faz diminuir o valor de  $pK_i$ [108]. Por outro lado, pela presença da forma carregada da droga, existe uma distribuição superficial de cargas na micela que modifica o pH local. O fato da proporção entre as duas espécies na micela ser diferente da proporção no meio aquoso pode ser interpretado, também, como sendo devido ao fato da constante de partição da droga, entre as micelas e o meio aquoso, ser diferente para cada forma da droga.

Formalmente, no meio micelar, temos o processo:



onde  $AH_m^+$  e  $A_m$  representam as duas formas da droga nas micelas,  $H_s^+$  um próton na interface micela/solução aquosa e  $K_i^m$  é a constante de ionização intrínseca da droga nas micelas dada por:

$$K_i^m = \frac{[A_m][H^+]_s}{[AH_m^+]}, \quad (3.13)$$

onde a concentração local de prótons na interface ( $[H^+]_s$ ) é dada pela equação 3.9. A constante aparente ou efetiva (referida ao pH volumétrico) é:

$$K_{ap}^m = K_i^m e^{\frac{e\psi_s}{k_B T}} = \frac{[A_m][H^+]}{[AH_m^+]}, \quad (3.14)$$

ou, também:

$$pK_{ap}^m = pK_i^m - \log e \frac{e\psi_s}{k_B T}. \quad (3.15)$$

De acordo com o discutido acima, o primeiro termo é menor que  $pK_i^a$  e o segundo termo é negativo, então,  $pK_{ap}^m \leq pK_i^a$ .

Cabe notar que, já que  $K_{ap}^m$  depende do potencial superficial  $\psi_s$ , função da carga superficial determinada pela proporção entre as duas espécies na micela, não é uma verdadeira constante de equilíbrio termodinâmico.

Por outro lado, a cmc, segundo foi já tratado na seção 3.1, pode ser definida termodinamicamente como:

$$\ln(cmc) = \Delta G^{tr} / k_B T.$$

Decompondo a expressão para a energia livre em dois termos: um que inclua a contribuição eletrostática ( $\Delta G^{tr,el}$ ) e outro independente dos efeitos de carga ( $\Delta G^{tr,o}$ ), temos:

$$\ln(cmc) = \Delta G^{tr,o} / k_B T + \Delta G^{tr,el} / k_B T = \ln(cmc^o) + \Delta G^{tr,el} / k_B T,$$

onde  $cmc^o$  corresponde ao valor da cmc em ausência de efeitos de carga. Portanto,

$$\Delta \ln(cmc) = \ln(cmc) - \ln(cmc^o) = \Delta G^{tr,el} / k_B T. \quad (3.16)$$

Supondo que a carga superficial da micelas está uniformemente distribuída e que a micela está rodeada por uma camada iônica difusa com comprimento de Debye  $1/\kappa$  (ver capítulo 4), a contribuição eletrostática para a variação de energia livre pode ser calculada a partir da equação de Debye-Hückel para o trabalho requerido para carregar uma esfera de raio  $R$  constante, com  $n^+$  cargas [96-98]:

$$\Delta G^{tr,el} = \frac{\beta (n^+ e)^2 / n}{2\epsilon R (1 + \kappa R)}, \quad (3.17)$$



onde  $e$  é a carga eletrônica,  $\epsilon$  a constante dielétrica na interface micela/solução aquosa ( $\epsilon = 80,4$ , nos cálculos),  $\kappa = \sqrt{\frac{8\pi e^2 N_A 10^{-3} C}{\epsilon k_B T}}$  (onde  $N_A$  é o número de Avogadro e  $C$  é a força iônica expressa em mol/l) e  $\beta$  é um fator de correção que leva em consideração, por exemplo, o fato da distribuição superficial de cargas ser discreta[98,114]. Este fator de correção pode incluir, também, um fator geométrico que leve em conta o afastamento da forma esférica[115]. No entanto, em primeira aproximação, será considerado  $\beta = 1$ , nos cálculos. No nosso caso,  $n^+ = n/(1 + 10^{(pH_s - pK_{ap}^m)}) = n/(1 + 10^{(pH - pK_{ap}^m)})$ , sendo  $n$  o número de agregação médio. Substituindo a expressão para  $\Delta G^{tr,el}$  (equação 3.17), na expressão 3.16, foram obtidas as curvas apresentadas na fig. 3.19 que correspondem a diferentes valores de  $pK_{ap}^m$  e do número de agregação  $n$ . As curvas foram deslocadas segundo o eixo de abcissas, variando o parâmetro  $cmc^\circ$ , para coincidirem em torno de  $cmc = 2mM$ , para baixo pH. O raio médio das micelas  $R$  está relacionado com  $n$  através da densidade da droga nas micelas:  $\sim 250 \text{ cm}^3/\text{mol}$ [34]. Os valores de  $n$  que permitem um melhor ajuste aos dados experimentais são maiores que aqueles estimados para concentrações próximas da  $cmc$ , a partir da extrapolação das curvas de  $n$  vs. concentração de droga[34]. Entretanto, deve ter-se em conta que o número de agregação pode variar com o pH, fato que não foi levado em consideração ao efetuar os ajustes, feitos para  $n$  constante. O valor de  $pK_{ap}^m$  que melhor ajusta os dados experimentais é, consistentemente, inferior ao valor para a droga em solução aquosa (9,3), como discutido previamente.

Observa-se, também, que, dentro da faixa de valores da força iônica estudada, o valor da  $cmc$  praticamente independe da força iônica (fig. 3.19). À medida que aumenta a força iônica, diminui a repulsão eletrostática, pelo qual esperaria-se que a  $cmc$  diminua. No entanto, como o número de agregação aumenta com a força iônica[34], a redução da  $cmc$  pode resultar muito menor, explicando-se o resultado obtido.

## Capítulo 4

# Estudo da associação droga-lipídio para um anestésico com dois estados de carga

Segundo discutido no capítulo 2, a ação anestésica se situa ao nível da membrana biológica, embora o sítio preciso seja ainda desconhecido, e a interação membrana-anestésico é de natureza essencialmente hidrofóbica. Os anestésicos podem ligar-se a regiões não polares da matriz lipídica, da interface proteína/lipídio ou a sítios hidrofóbicos nas proteínas de membrana. Por outro lado, dada a grande variedade de substâncias que apresentam atividade anestésica, parece razoável esperar que os sítios da membrana em que se produzem as interações membrana-anestésico sejam relativamente não específicos. Mesmo sendo muito provável que o alvo final dos anestésicos sejam certas proteínas de membrana, em particular os canais iônicos, pode-se presumir que estas drogas atinjam as proteínas indiretamente, afetando primeiro a organização dos lipídios, especialmente, a organização dos lipídios anulares em torno das proteínas.

Também foi já mencionado, no capítulo 2, que efeitos de carga podem ser responsáveis por mudanças na estrutura lipídica. Por outro lado, independentemente destas mudanças, a adsorção de moléculas carregadas na membrana induz modificação do potencial elétrico superficial da bicamada (valor do potencial na interface membrana/solução aquosa) através da alteração da densidade superficial de carga. A modificação do po-

tencial superficial, por sua vez, modifica a concentração de substâncias carregadas perto da superfície da membrana. Esta consequência e/ou a própria alteração do potencial superficial podem perturbar o funcionamento de algumas proteínas de membrana.

Nesta parte do trabalho, a clorpromazina (CPZ), cuja estrutura molecular foi esquematizada na fig. 3.1, será objeto de estudo. Segundo tratado no capítulo 3, os anestésicos com função amina, como a CPZ, apresentam dois estados de carga distribuídos no equilíbrio segundo a relação 3.1. Para a CPZ em meio aquoso,  $pK_i \simeq 9,3$ [113]. Portanto, a pH fisiológico (em torno de 7,4), ambas formas da droga estão presentes, esperando-se que a forma carregada, quando adsorvida na membrana, modifique o potencial elétrico superficial.

Por outro lado, cada uma das duas formas das drogas com função amina terciária se incorpora na membrana de modo diferente[2] e com afinidades diferentes[74]. A forma carregada é adsorvida de tal modo que a região hidrofóbica da molécula (no caso da CPZ, a porção de anéis) penetra na bicamada interagindo com as cadeias de ácidos graxos, enquanto a região polar interage com as cabeças polares dos lipídios. A adsorção desta última forma depende do potencial superficial da bicamada, sendo mais favorecida quanto mais negativa seja a carga superficial da bicamada. A forma neutra, devido à sua maior hidrofobicidade, pode penetrar mais profundo na bicamada. Considerando estas diferenças, espera-se que os sítios de ação e/ou os efeitos de cada forma sejam diferentes. No entanto, a discussão sobre qual forma da droga é a biologicamente ativa continua em aberto.

Para estudar a interação destas drogas com a membrana, é essencial conhecer qual é a fração de droga que está adsorvida na membrana. Como as duas espécies (protonada e neutra) se adsorvem de modo diferente, é importante conhecer também qual é a distribuição destas espécies na membrana. A proporção destas espécies na membrana não é, necessariamente, a mesma que na solução, devido ao fato da constante de ionização da droga depender do meio. Apesar da extensa literatura existente sobre a CPZ, o estado de carga e, conseqüentemente, os efeitos de carga, não são sempre levados em conta. Na maioria dos casos, são encontradas constantes de partição aparentes, em condições experimentais muito particulares, sem considerar qual é a fração de droga

carregada[35,36]. Em outros casos, as concentrações de droga estão muito acima das concentrações biologicamente relevantes e as extrapolações nem sempre levam em consideração fatos como, por exemplo, da droga estar na solução em forma de monômeros ou de micelas.

Devido à complexa composição das membranas biológicas, os lipossomos artificialmente reconstituídos, representam um sistema modelo conveniente para observar o comportamento dos anestésicos num meio lipídico, permitindo conhecer a contribuição da componente lipídica na interação destas drogas com a membrana. Em comparação com os sistemas naturais, estes sistemas artificiais oferecem a vantagem de que a composição de lipídios pode ser controlada, sendo, assim, possível controlar, em particular, a carga superficial intrínseca da bicamada.

Nesta parte do trabalho, será estudada a incorporação da CPZ em lipossomos multilamelares de fosfatidilcolina. O estudo visa determinar as constantes de adsorção da CPZ na membrana, para cada estado de carga da droga. A partir da medida do potencial elétrico superficial das vesículas, que é modificado pela presença da forma protonada da droga, e utilizando um formalismo apropriado, é possível conhecer as constantes de associação droga/lipídio para cada uma das duas formas da droga. O potencial superficial é obtido a partir de experiências feitas mediante a técnica de ressonância paramagnética eletrônica (RPE), utilizando como sonda paramagnética uma molécula anfifílica com carga líquida positiva.

## 4.1 Potencial elétrico superficial da membrana

Se a superfície da membrana está carregada, seja porque as cabeças polares dos lipídios que compõem a bicamada possuem carga líquida ou porque substâncias carregadas são adsorvidas na membrana, então, na solução aquosa que banha a membrana, as espécies iônicas com carga do mesmo sinal que à da membrana serão repelidas pela carga superficial e as de sinal oposto atraídas. A distribuição espacial desses íons será determinada pela interação eletrostática e pela agitação térmica. No equilíbrio, a con-

centração local de uma espécie  $X$  com carga  $z_c$ , na posição  $x$ , ( $[X]_x$ ) estará relacionada com a concentração local a uma distância infinita da interface ( $[X]_\infty$ ), através da relação de Boltzmann[110,111]:

$$[X]_{\bar{x}} = [X]_\infty e^{-\frac{z_c \psi(\bar{x})}{k_B T}}, \quad (4.1)$$

onde  $k_B$  é a constante de Boltzmann,  $T$  a temperatura em graus Kelvin,  $z$  a valência do íon,  $e$  a carga do elétron,  $\psi(\bar{x})$  o valor do potencial elétrico na posição  $\bar{x}$ , tendo sido definido como sendo zero o potencial a uma distância infinita da membrana. Se a solução de vesículas é suficientemente diluída, pode-se considerar que, longe da interface, a concentração local  $[X]_\infty$  coincide com a concentração volumétrica  $[X]$  (número total de moles de  $X$  por volume da solução).

Segundo a equação de Poisson, o potencial elétrico no meio aquoso deve ser tal que:

$$\nabla^2 \psi(\bar{x}) = -\frac{4\pi}{\epsilon} \rho(\bar{x}), \quad (4.2)$$

onde  $\epsilon$  é a constante dielétrica do meio aquoso (considerada constante em todo o volume da solução) e  $\rho$  é a densidade volumétrica de carga. A partir da relação 4.1,  $\rho$  pode ser expressa em função das concentrações volumétricas  $[X_i]$  (em moles/l) das diferentes espécies iônicas  $X_i$  com carga  $z_i e$  segundo:

$$\rho(\bar{x}) = \sum_i z_i e N_A 10^{-3} [X_i]_{\bar{x}}, \quad (4.3)$$

onde  $N_A$  é o número de Avogadro. Por outro lado, deve ser satisfeita a condição de eletroneutralidade na solução ( $\sum_i z_i [X_i]_\infty = 0$ .)

A partir das equações 4.2 e 4.3, obtém-se a relação (denominada equação de Poisson-Boltzmann[110]):

$$\nabla^2 \psi(\bar{x}) = -\frac{4\pi e N_A 10^{-3}}{\epsilon} \sum_i z_i [X_i]_\infty e^{-\frac{z_i e \psi(\bar{x})}{k_B T}}. \quad (4.4)$$

Considerando a superfície da membrana como um plano infinito em que as cargas

estão distribuídas contínua e uniformemente, a equação anterior depende de uma única coordenada espacial: a distância à superfície externa da bicamada.

No caso em que  $|z\psi| \ll k_B T / e$ , resolvendo a equação 4.4 unidimensional, com a aproximação de Debye-Hückel ( $e^{-\frac{z_i e \psi_i}{k_B T}} \simeq 1 - \frac{z_i e \psi_i}{k_B T}$ ), obtém-se que o potencial em valor absoluto diminui exponencialmente com a posição:

$$\psi(x) = \psi_s e^{-\kappa x},$$

sendo  $\psi_s = \psi(x=0)$  o potencial superficial da membrana e  $\kappa = \sqrt{\frac{8\pi e^2 N_A 10^{-3} C}{\epsilon k_B T}}$ , onde  $C$  é a força iônica ( $C = \frac{1}{2} \sum_i z_i^2 [X_i]_\infty$ ). A distância  $1/\kappa$  à superfície da membrana, para a qual o potencial cai num fator  $1/e$ , é denominada comprimento de Debye. Como se deduz da definição de  $\kappa$ ,  $1/\kappa$  aumenta com a temperatura e diminui com a força iônica. Por outro lado, segundo a equação 4.1, a concentração local de íons com carga de sinal oposto à da membrana, sendo alta perto da superfície, decai rapidamente com a distância. Portanto, a uma distância da ordem do comprimento de Debye, o campo elétrico gerado pela distribuição superficial de cargas é blindado pelos contraíons localizados entre a superfície da membrana e uma distância aproximadamente igual a  $1/\kappa$ .

Pode-se mostrar que, quando a aproximação de Debye-Hückel não é mais válida, o potencial decai mais rápido que exponencialmente com a distância à superfície da membrana.

No caso particular em que se encontram presentes no sistema íons monovalentes e divalentes, a solução exata da equação 4.4 unidimensional é:

$$\psi(x) = \frac{k_B T}{e} \ln \left( \frac{\zeta_1 G^2(x) + 2\zeta_2 G(x) + 1}{\zeta_1 G^2(x) - 2\zeta_3 G(x) + 1} \right), \quad (4.5)$$

com  $G(x) = G_0 e^{-\kappa x}$ , onde  $G_0$  depende somente de  $\psi_s$  e pode ser obtida resolvendo a equação 4.5 especializada em  $x = 0$ . Os parâmetros  $\zeta$  só dependem das concentrações volumétricas  $c_z$  dos íons com valência  $z$ , sendo:

$$\zeta_1 = (c_{-1}/c_{-2} + 2)^2 - 4c_{+2}/c_{-2}$$

$$\zeta_2 = c_{-1}/c_{-2} + 4$$

$$\zeta_3 = c_{-1}/c_{-2} + 2c_{+2}/c_{-2} + 2.$$

O potencial superficial  $\psi_s$  está relacionado com a densidade superficial de carga da membrana  $\sigma$ . Para o caso geral, esta relação pode ser calculada de forma exata, a partir de  $\sigma = -\frac{\epsilon}{4\pi} \frac{\partial \psi}{\partial x} \Big|_{x=0}$ , obtendo-se a relação:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\epsilon N_A 10^{-3} k_B T}{2\pi}} \left( \sum_i [X_i]_{\infty} \left\{ e^{-\frac{z_i e \psi_s}{k_B T}} - 1 \right\} \right)^{1/2}. \quad (4.6)$$

No caso em que  $|z\psi| \ll k_B T/e$ , podemos considerar  $e^{-\frac{z_i e \psi}{k_B T}} \simeq 1 - \frac{z_i e \psi}{k_B T} + \left(\frac{z_i e \psi}{k_B T}\right)^2$ , assim, a partir da relação anterior, obtemos:

$$\frac{e \psi_s}{k_B T} = \sqrt{\frac{2\pi}{\epsilon k_B T N_A 10^{-3} C}} \sigma, \quad (4.7)$$

ou

$$\psi_s = \frac{4\pi \sigma}{\epsilon \kappa}. \quad (4.8)$$

## 4.2 Termodinâmica da incorporação de substâncias anfífilicas na membrana

A incorporação de moléculas ou íons anfífilicos na membrana pode ser modelada considerando duas fases, entre as quais o anfífilico se distribui: a fase aquosa exterior às vesículas, com volume  $\mathcal{V}_a$ , e a fase lipídica caracterizada pelo volume  $\mathcal{V}_v$ . A substância anfífilica se particiona entre essas fases segundo o processo:



onde  $X_a$  e  $X_v$  representam o anfífilico  $X$  na fase aquosa e na fase das vesículas, respectivamente, sendo  $\tilde{K}$  a constante de equilíbrio. Os potenciais eletroquímicos, por molécula (ou íon), na água e nas vesículas são, respectivamente:

$$\mu_a = \mu_a^\circ + k_B T \ln(\chi_a \gamma_a) \quad (4.9)$$

$$\mu_v = \mu_v^\circ + k_B T \ln(\chi_v \gamma_v) + z e \psi_s, \quad (4.10)$$

onde  $\psi_s$  é o valor do potencial elétrico na interface membrana/solução aquosa e, para cada fase,  $\mu^\circ$  corresponde ao potencial eletroquímico padrão (que depende essencialmente da natureza do solvente e das condições de pressão e temperatura),  $\gamma$  ao coeficiente de atividade e  $\chi$  à fração molar do soluto anfifílico.

No equilíbrio,  $\mu_a = \mu_v$ . Portanto, igualando as equações 4.9 e 4.10, temos:

$$\ln\left(\frac{\chi_v \gamma_v}{\chi_a \gamma_a}\right)_{eq} = -\frac{\mu_v^\circ - \mu_a^\circ}{k_B T} - \frac{ze\psi_s}{k_B T}.$$

Supondo que os coeficientes de atividade de  $X$  em cada fase se desviam da unidade de modo similar ( $\frac{\gamma_v}{\gamma_a} \simeq 1$ ), então, a partir da equação anterior, temos:

$$\left(\frac{\chi_v}{\chi_a}\right)_{eq} \simeq K e^{-\frac{ze\psi_s}{k_B T}} = \tilde{K}, \quad (4.11)$$

onde  $\tilde{K}$  é a constante de equilíbrio efetiva, função do potencial superficial  $\psi_s$ , quando a carga  $ze$  do anfifílico é não nula, sendo  $K = e^{-\frac{\mu_v^\circ - \mu_a^\circ}{k_B T}}$  a constante de equilíbrio intrínseca, dependendo da pressão, da temperatura e das características tanto do anfifílico quanto do meio.

Para o soluto anfifílico na fase aquosa, a fração molar é  $\chi_a = \frac{n_a}{n_a + n'_a}$ , sendo  $n_a$  o número de moles do soluto anfifílico nessa fase e  $n'_a$  o número de moles do solvente aquoso. Se esta fase é diluída, ou seja, se  $n_a \ll n'_a$ , então, pode-se considerar que  $n_a + n'_a \simeq n'_a$  e que  $\mathcal{V}_a = n_a \tilde{v} + n'_a \tilde{v}' \simeq n'_a \tilde{v}'$ , sendo  $\tilde{v}$  e  $\tilde{v}'$  os volumes molares do soluto e do solvente, respectivamente. Logo, a fração molar do anfifílico na fase aquosa pode ser escrita como:

$$\chi_a = \frac{n_a}{n_a + n'_a} \simeq \frac{n_a}{n'_a} \simeq \frac{n_a}{\mathcal{V}_a} \tilde{v}'.$$

Para o anfifílico na fase lipídica, podem ser considerados diferentes modelos. Pode-se supor que esta fase é similar à fase aquosa ou que, por exemplo, consiste em um número limitado de sítios fixos espacialmente. No primeiro caso, a fração molar do soluto anfifílico nas vesículas, analogamente à fração molar do soluto na fase aquosa,



é:  $\chi_v = \frac{n_v}{n_v + n'_v}$ , onde o índice  $v$  se refere a vesículas. Sendo que a fase lipídica é uma fase bidimensional e esperando-se que o anfífilo se incorpore em uma única camada superficial, é mais apropriado considerar a área exposta total das vesículas  $\mathcal{A}_v$ , em vez do volume  $\mathcal{V}_v$ . Se  $\tilde{a}$  e  $\tilde{a}'$  são as áreas ocupadas por um mol de soluto e de solvente, respectivamente, então, a área total da fase lipídica é  $\mathcal{A} = n_v \tilde{a} + n'_v \tilde{a}'$ . No caso em que  $\tilde{a} \simeq \tilde{a}'$ , a área total é  $\mathcal{A} \simeq (n_v + n'_v)\tilde{a}'$ . Assim, temos:

$$\chi_v = \frac{n_v}{n_v + n'_v} \simeq \frac{n_v}{\mathcal{A}_v} \tilde{a}'.$$

Considerando que  $n_v/\mathcal{A}_v = [X]_v$  é a concentração superficial do anfífilo  $X$  nas vesículas e que  $n_a/\mathcal{V}_a = [X]$  é a concentração volumétrica de  $X$  na fase aquosa, e definindo  $\lambda = \frac{\tilde{v}'_a}{\tilde{a}'_v}$ , temos:

$$\frac{\chi_v}{\chi_a} \simeq \frac{[X]_v}{\lambda[X]}, \quad (4.12)$$

Por outro lado, se o potencial elétrico superficial é  $\psi_s$ , a concentração local de uma espécie  $X$  com carga  $ze$ , na interface membrana/solução aquosa, ( $[X]_I$ ) estará relacionada com a concentração volumétrica, a partir da equação 4.1, segundo:

$$[X]_I = [X] e^{-\frac{ze\psi_s}{k_B T}}, \quad (4.13)$$

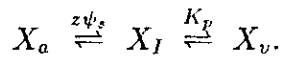
Posto que  $\lambda$  independe das concentrações, então, as constantes de equilíbrio podem ser redefinidas segundo:  $\tilde{K}_p = \lambda \tilde{K} = \lambda K e^{-\frac{ze\psi_s}{k_B T}} = K_p e^{-\frac{ze\psi_s}{k_B T}}$ , sendo expressas em unidades de comprimento.

Com estas considerações, a equação 4.11 pode ser reescrita como:

$$\tilde{K}_p = \frac{[X]_v}{[X]} = \underbrace{\frac{[X]_v}{[X]_I}}_{K_p} e^{-\frac{ze\psi_s}{k_B T}}, \quad (4.14)$$

A constante de equilíbrio efetiva  $\tilde{K}_p$  corresponde à constante de partição do anfífilo  $X$ , entre as duas fases, quando o potencial superficial é  $\psi_s$ .  $\tilde{K}_p$  depende do potencial

superficial só através do fator exponencial, já que  $K_p$  independe de  $\psi_s$ . Quando o potencial superficial é nulo, a concentração na interface coincide com a concentração longe da membrana e  $K_p$  corresponde à partição entre a fase aquosa e a fase da membrana. Quando o potencial superficial é não nulo,  $K_p$  corresponde à constante de partição entre a interface membrana/solução aquosa e a fase das vesículas. Por conseguinte, pode-se pensar que a incorporação do anfifílico  $X$  se produz em duas etapas:



Na primeira etapa,  $X$  se distribue na interface, em função de sua carga  $ze$  e do potencial superficial das vesículas  $\psi_s$ . Na segunda,  $X$  se particiona entre a interface e a membrana, independentemente do potencial superficial, segundo a constante  $K_p$ .

Por outro lado, a quantidade de anfifílico  $X$  incorporado por unidade de área aumenta com o aumento da quantidade total de  $X$  presente no sistema. Entretanto, se  $X$  tem carga líquida  $ze$ , os íons anfifílicos adsorvidos na membrana modificam a densidade superficial de carga, e, conseqüentemente, o potencial superficial, de tal modo que, à medida que aumenta a quantidade de  $X$  na membrana,  $z\psi_s$  aumenta. Assim, como conseqüência da repulsão eletrostática, a adsorção pode apresentar saturação. No entanto, se  $X$  é neutro, o potencial superficial intrínseco da membrana permanece o mesmo e, à medida que aumenta a concentração total de  $X$ , a concentração de anfifílico incorporado por unidade de área aumenta proporcionalmente e, por conseguinte, a adsorção é, em princípio, ilimitada. Entretanto, deve ter-se em conta que este resultado é conseqüência da hipótese de que a fase lipídica oferece um número ilimitado de sítios de adsorção. Por outro lado, foram feitas aproximações válidas somente no caso de baixas concentrações de soluto. Assim, para altas concentrações do anfifílico, este modelo é pouco realista, contudo, para baixas concentrações, permite descrever a incorporação de substâncias na membrana. Em alguns casos, um modelo que leve em conta a saturação por ocupação de sítios pode ser mais apropriado. Por exemplo, pode-se considerar que a adsorção se produz em um número limitado de sítios fixos espacialmente onde as moléculas adsorvidas estão localizadas.

Supondo que os sítios são equivalentes, distinguíveis e independentes, o potencial

eletroquímico do anfífilico  $X$  nas vesículas depende da seguinte fração molar:

$$\chi_v = \frac{n_v}{n_v^{max} - n_v}, \quad (4.15)$$

com  $n_v^{max}$  o máximo número de moles de  $X$  que podem ser adsorvidos. Se  $s$  é o número de sítios por mol de solvente, então,  $n_v^{max} = s n'_v$ .

Definindo concentrações 'volumétricas' (número total de moles por volume da fase aquosa) dos sítios ocupados ( $[LX]$ ), livres ( $[L]$ ) e totais ( $[L_T]$ ), temos:

$$\chi_v = \frac{n_v}{n_v^{max} - n_v} = \frac{n_v/V_a}{(n_v^{max} - n_v)/V_a} = \frac{[LX]}{[L_T] - [LX]} = \frac{[LX]}{[L]}, \quad (4.16)$$

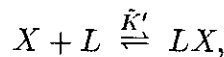
considerando esta expressão, a equação 4.12 é

$$\frac{\chi_v}{\chi_a} \simeq \frac{[LX]}{[X]_f([L_T] - [LX])\tilde{v}'_a}. \quad (4.17)$$

Analogamente ao caso anterior, podemos redefinir as novas constantes de equilíbrio segundo:  $\tilde{K}_a = \tilde{v}'_a \tilde{K}' = \tilde{v}'_a K' e^{-\frac{ze\psi_s}{k_B T}} = K_a e^{-\frac{ze\psi_s}{k_B T}}$ , expressas em unidades de volume por mol e que denominaremos constantes de adsorção. Finalmente, para a constante intrínseca  $K_a$ , obtemos a seguinte expressão, que corresponde à da isoterma de adsorção de Langmuir[110]:

$$K_a = \frac{[LX]}{[X]_f([L_T] - [LX])}. \quad (4.18)$$

Para colocar em evidência que o anfífilico se associa a sítios lipídicos nas vesículas, em vez de considerar o processo  $X \xrightleftharpoons{K} X_v$ , pode-se considerar:



onde  $L$  representa um sítio lipídico livre,  $X$  o anfífilico  $X$  na fase aquosa,  $LX$  o anfífilico  $X$  associado ao sítio  $L$  e  $K'$  é a constante de equilíbrio. Poderíamos ter chegado

à mesma expressão para a constante de equilíbrio tratando  $X$ ,  $L$  e  $LX$  como diferentes espécies no meio aquoso, cujos potenciais eletroquímicos se relacionam, no equilíbrio, segundo  $\mu_X + \mu_L = \mu_{LX}$ .

As concentrações 'volúmetrica' e superficial de  $X$  incorporado nas vesículas estão relacionadas segundo:  $[LX] = [X]_v \mathcal{A}_v / \mathcal{V}_a$ . Se a concentração do anfifílico em cada fase é suficientemente pequena, então, as dimensões de cada fase não são alteradas significativamente com a adição do anfifílico, portanto,  $\mathcal{V}_a / \mathcal{A}_v$  independe das concentrações. Neste caso, também, para a fase das vesículas, o número de sítios livres pode ser considerado, praticamente, constante e igual ao número total de sítios e, conseqüentemente,  $[L_T] - [LX] \simeq [L_T]$ . Portanto, para baixas concentrações do anfifílico, recupera-se a relação que define a partição entre as duas fases, sendo:

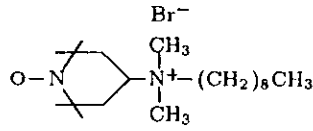
$$K_p = \frac{[X]_v}{[X]_l} = \frac{[LX]}{[X]_l} \mathcal{V}_a / \mathcal{A}_v = K_a [L_T] \mathcal{V}_a / \mathcal{A}_v. \quad (4.19)$$

### 4.3 Técnica para determinar o potencial elétrico superficial da membrana

Como sonda para as medidas por RPE, foi utilizada a molécula anfifílica positivamente carregada (4-(N,N-dimetil-N-nonil-amônio)tempo-brometo), cuja estrutura é esquematizada na figura 4.1.

Em presença de vesículas, a sonda anfifílica se particiona entre a fase lipídica e o meio aquoso em função do potencial elétrico superficial e do estado estrutural da membrana.

Na fase lipídica, a mobilidade da molécula da sonda está limitada pela estrutura da bicamada. por conseguinte, as larguras das linhas do espectro de RPE da sonda nesta fase são maiores que as larguras das linhas do espectro correspondente à molécula na fase aquosa. O espectro resultante é a soma dos espectros correspondentes a cada uma das duas populações [37,116] (ver fig. 4.2).



**Figura 4.1:** Esquema da estrutura molecular da sonda paramagnética 4-(N,N-dimetil-N-nonil-amónio)tempo brometo.

### 4.3.1 Análise espectral

A partir da análise espectral, é possível determinar a distribuição da molécula em ambas as fases. Para tanto, podem ser seguidos vários métodos[37]:

**Método 1:** quando a amostra contém vesículas, obtém-se um espectro composto, como o da fig. 4.2.a. A componente menos imobilizada do espectro composto (aquela que corresponde à população de sonda na solução aquosa) pode ser eliminada subtraindo-se desse espectro composto uma certa fração do espectro puro da sonda em solução aquosa (espectro da fig. 4.2.b). Assim, é obtido o espectro da fig. 4.2.c em que a componente menos imobilizada foi eliminada. Sendo que o espectro obtido pela técnica de RPE é a derivada do espectro de absorção, a dupla integral do espectro é proporcional à quantidade total de sonda presente ( $n_T = n_a + n_v$ ). Se os espectros (a) e (b) correspondem a amostras com a mesma quantidade total de sonda ou seja se as duplas integrais desses espectros são iguais, então, a fração subtraída será igual à fração de sonda no meio aquoso ( $n_a/n_T$ ).

Na fig. 4.2, mostra-se uma aplicação deste método: do espectro composto (a), foi subtraído o espectro (b) que corresponde a 32% de um espectro da sonda em solução aquosa, com a mesma dupla integral que o espectro (a). Logo, neste caso,  $n_v/n_T \simeq 0,68 (\pm 0,02)$ .

**Método 2:** utilizando-se soluções aquosas, a concentrações conhecidas da sonda paramagnética, pode-se calibrar a amplitude de alguma das linhas do espectro (proporcionais

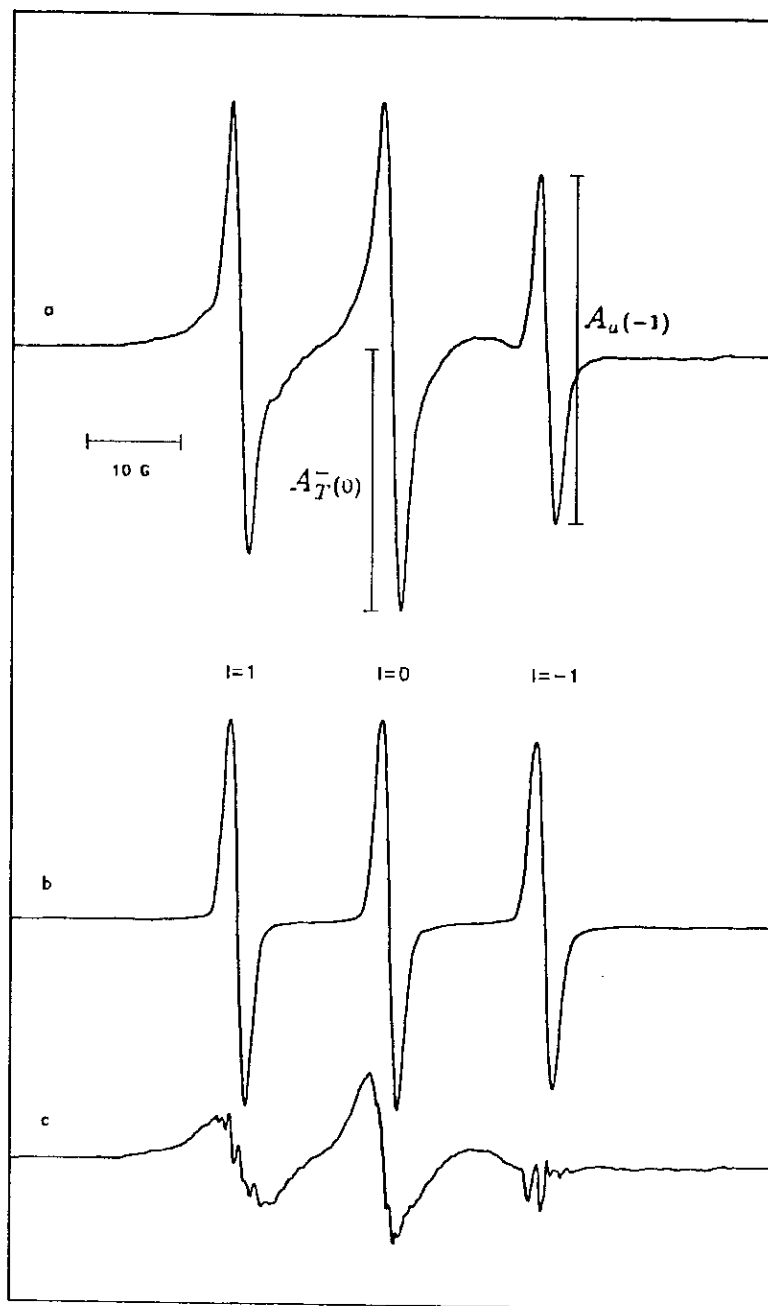


Figura 4.2: Espectros de RPE de 4-(N,N-dimetil-N-nonil-amônio)tempo brometo 0,02 mM, a) em presença de vesículas de fosfatidilcolina, b) em solução aquosa (multiplicado por um fator 0,32). c) resultante de subtrair o espectro b) do espectro a).

à quantidade total de sonda), por exemplo, a amplitude pico a pico da linha do espectro correspondente a  $I = -1$  ( $A_a(-1)$ ).

Em presença de vesículas, a amplitude  $A_T(-1)$  do espectro composto não tem, praticamente, contribuição da componente mais imobilizada do espectro, como pode-se ver na fig. 4.3 em que os espectros da fig. 4.2 aparecem superpostos. Portanto, para amostras contendo vesículas, a quantidade de sonda na fase aquosa ( $n_a$ ) pode ser conhecida a partir da medida de  $A_a(-1) \simeq A_T(-1)$  no espectro composto. Dada a quantidade total de sonda, a quantidade de sonda associada à membrana é calculada por subtração.

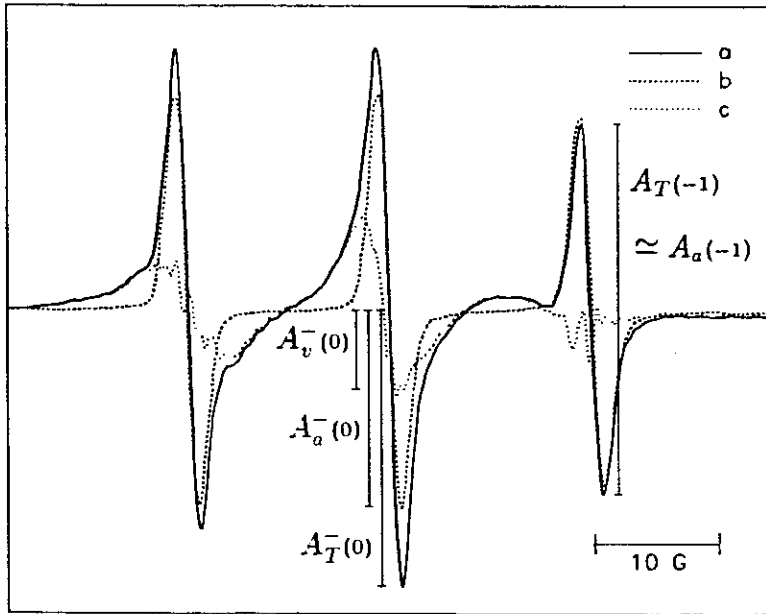


Figura 4.3: Os mesmos espectros da figura anterior, superpostos para comparação.

**Método 3:** segundo a análise do método anterior, no espectro composto,  $A_a(-1)$  é proporcional a  $n_a$ . Entretanto, a amplitude da linha  $I = 0$  ( $A_T^-(0)$ ) em relação à linha de base é a que melhor corresponde à soma das intensidades de cada espectro puro (ver fig. 4.3), então:

$$A_T^-(0) \simeq A_a^-(0) + A_v^-(0) = k_a^{-2}n_a + k_v^{-2}n_v, \quad (4.20)$$

onde  $A_a^-(0)$  e  $A_v^-(0)$  são as amplitudes das linhas  $I = 0$ , em relação à linha de base, dos respectivos espectros puros e  $k_a$  e  $k_v$  são constantes de proporcionalidade relacionadas com as larguras das linhas  $I = 0$  dos respectivos espectros puros.

No espectro puro da sonda em solução aquosa, a intensidade de cada linha é proporcional à quantidade total de sonda. Em particular, pode ser encontrada a relação entre  $A_a^-(0)$  e  $A_a(-1)$ . Para o espectro (b) da fig. 4.2,  $\alpha = \frac{A_a^-(0)}{A_a(-1)} \simeq 0,536$ . Conhecida a quantidade total de sonda  $n_a$ , também, pode ser calculada  $k_a^{-2} = A_a^-(0)/n_a$ .

Consequentemente, para o espectro composto, é possível conhecer o parâmetro  $P$ :

$$P = \frac{A_v^-(0)}{A_a^-(0)} = \frac{A_T^-(0) - A_a^-(0)}{A_a^-(0)} = \frac{A_T^-(0)}{A_a^-(0)} - 1 = \frac{A_T^-(0)}{\alpha A_a(-1)} - 1. \quad (4.21)$$

Por outro lado,

$$P = \frac{A_v^-(0)}{A_a^-(0)} = \left(\frac{k_v}{k_a}\right)^{-2} \frac{n_v}{n_a} = \beta \frac{n_v}{n_a},$$

onde  $\beta = \left(\frac{k_v}{k_a}\right)^{-2}$  é uma constante relacionada com a largura da linha  $I = 0$  do espectro da sonda na fase da membrana e, portanto, é característica da estrutura dessa fase.  $k_v^{-2}$  pode ser calculada segundo:  $k_v^{-2} = A_v^-(0)/n_v = (A_T^-(0) - A_a^-(0))/(n_T - n_a)$ . Já tendo sido determinado  $k_a^{-2}$ , obtemos  $\beta$ . No nosso caso  $\beta \simeq 0,15$ . Aplicando este método para analisar o espectro (a) da fig. 4.2, obtemos  $n_v/n_T \simeq 0,71 (\pm 0,02)$ .

Uma vez determinados  $\alpha$  e  $\beta$ , para diferentes concentrações de lipídios e da sonda (como se verá na parte de resultados), este método, mais complicado que o segundo método, oferece a vantagem de que, ao serem calculados valores relativos ( $P$ ), flutuações na intensidade das linhas e na concentração total da sonda são menos significativas. Por outro lado, a comparação dos resultados obtidos pelos métodos (2) e (3) pode fornecer informação adicional, como se verá na seção de resultados. O primeiro método não foi aplicado aos resultados, devido à impossibilidade de digitalizar o sinal dos espectros de RPE. De todos modos, a partir do exemplo da fig. 4.2, pode-se ver que os resultados coincidem, dentro da faixa de erro.



### 4.3.2 Associação da sonda à membrana

A sonda paramagnética não penetra no interior hidrofóbico da bicamada, segundo fica demonstrado a partir de experiências baseadas na adição de agentes redutores[37,117]. Por conseguinte, a partição se estabelece entre a fase aquosa e a superfície externa dos lipossomos, dependendo do valor do potencial superficial. A incorporação da sonda pode ser descrita através da relação 4.18. Como a concentração da sonda é muito menor que a de lipídios, pode-se considerar que  $[L] \simeq [L_T]$ . Por outro lado, pelo fato da sonda se adsorver só na camada externa das vesículas, devemos considerar a concentração de lipídios que apertencem a essa camada ( $[L_t]$ ), que corresponde a uma fração da concentração total ( $[L_T]$ ). Portanto, para a sonda  $S^+$  utilizada (com  $z = 1$ ), temos:

$$K_a^{S^+} = \frac{[LS^+]}{[S^+][L]} = \frac{[LS^+]}{[S^+][L_t]} e^{\frac{e\psi_s}{k_B T}} = \frac{n_v}{n_a} \frac{e^{\frac{e\psi_s}{k_B T}}}{[L_t]}, \quad (4.22)$$

logo,

$$\frac{n_v}{n_a} = K_a^{S^+} [L_t] e^{-\frac{e\psi_s}{k_B T}}, \quad (4.23)$$

### 4.3.3 Cálculo do potencial superficial

O parâmetro  $P$ , definido anteriormente e obtido a partir da análise espectral, pode ser expresso como:

$$P = \beta \frac{n_v}{n_a} = \beta K_a^{S^+} [L_t] e^{-\frac{e\psi_s}{k_B T}} = P_0 e^{-\frac{e\psi_s}{k_B T}}. \quad (4.24)$$

$P_0 = \beta K_a^{S^+} [L_t]$ , que é o valor do parâmetro  $P$  quando o potencial elétrico superficial é nulo, independe de  $\psi_s$  e permanece constante, para uma dada concentração de lipídios, desde que o estado estrutural das vesículas se mantenha inalterado. Neste caso, a partir da relação 4.24, o potencial elétrico superficial da vesícula ( $\psi_s$ ) pode ser calculado pela expressão:

$$\psi_s = -\frac{k_B T}{e} \ln\left(\frac{P}{P_0}\right). \quad (4.25)$$

#### 4.4 Formalismo para a determinação das constantes de associação CPZ/lipídio para os estados neutro ( $K_A$ ) e carregado da droga ( $K_{AH^+}$ )

A CPZ apresenta dois estados de carga que, dependendo do  $pH$  do meio e do  $pK_i$  da droga nesse meio, estão em uma proporção dada pela relação 3.1. Em uma solução de vesículas, a droga pode encontrar-se na solução aquosa ou incorporada na membrana, assim, para cada fase, teremos uma relação similar à relação 3.1.

Para a fase aquosa, temos:

$$K_i^a = \frac{[A][H^+]}{[AH^+]}, \quad (4.26)$$

onde  $[A]$  e  $[AH^+]$  são, respectivamente, as concentrações volumétricas das formas neutra e carregada da droga no meio aquoso e onde  $K_i^a$  é a constante de ionização da droga no meio aquoso.

De modo similar, na superfície das vesículas onde a droga é adsorvida, temos:

$$K_i^v = \frac{[LA][H^+]_I}{[LAH^+]}, \quad (4.27)$$

onde  $K_i^v$  é a constante de ionização intrínseca da droga nas vesículas, independente do potencial superficial,  $[H^+]_I$  é a concentração local de prótons na interface vesículas/solução aquosa, relacionada com a concentração volumétrica a través da relação de Boltzmann (equação 4.1).  $[LA]$  e  $[LAH^+]$  são as concentrações 'volumétricas' dos sítios ocupados pela forma neutra e carregada, respectivamente.

Por outro lado, cada forma da droga se incorpora na membrana, segundo a relação 4.18[55], com constantes de adsorção  $K_a^{AH^+}$ , para a forma protonada, e  $K_a^A$ , para a forma neutra:

$$K_a^{AH^+} = \frac{[LAH^+]}{[AH^+][L]} \quad (4.28)$$

$$K_a^A = \frac{[LA]}{[A][L]}, \quad (4.29)$$

com

$$[L] = [L_T] - [LA] - [LAH^+] \quad (4.30)$$

Na figura 4.4, é apresentado um esquema destes processos. Comparando as equações 4.26-4.29, note-se que as constantes de adsorção e as constantes de ionização se relacionam da seguinte forma:

$$\frac{K_{AH^+}}{K_A} = \frac{K_i^a}{K_i^v}$$

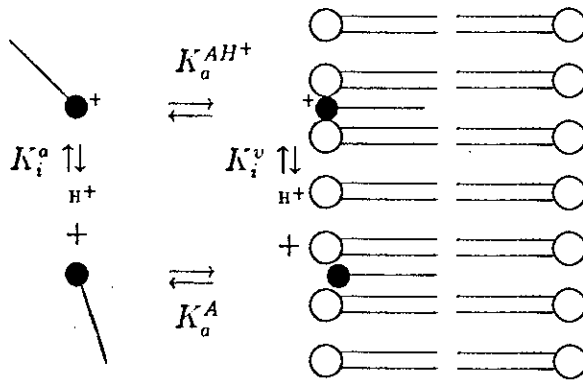


Figura 4.4: Esquema da protonação da droga em cada fase e da adsorção de cada forma da droga.

Por outro lado, a concentração total de droga  $[A_T]$  deve ser tal que:

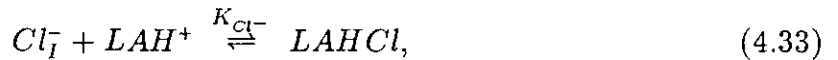
$$[A_T] = [A] + [AH^+] + [LAH^+] + [LA] \quad (4.31)$$

Se os lipídios que constituem as vesículas não têm carga líquida, a densidade superficial de carga  $\sigma$  é dada pela quantidade de droga carregada adsorvida na membrana. Assim, se  $\mathcal{A}_L$  é a área das vesículas por sítio lipídico, temos  $\sigma = ([LAH^+]/[L_T]) e/\mathcal{A}_L$ . Sendo que a equação 4.6 relaciona a densidade de carga com o potencial superficial, obtemos uma última equação relacionando o potencial superficial com as concentrações:

$$[LAH^+]/[L_T] = \sigma \mathcal{A}_L/e = \sqrt{\frac{\epsilon N_A 10^{-3} k_B T}{2\pi}} \left( \sum_i [X_i] \left\{ e^{-\frac{z_i e \psi_s}{k_B T}} - 1 \right\} \right)^{1/2} \mathcal{A}_L/e. \quad (4.32)$$

Como as constantes de ionização e de adsorção não são independentes, pode-se eliminar, por exemplo, a equação 4.29 e, então, temos seis equações (4.26-4.28, 4.30-4.32) com seis incógnitas ( $[AH^+]$ ,  $[A]$ ,  $[L]$ ,  $[LAH^+]$ ,  $[LA]$  e  $\psi_s$ ), onde  $[L_T]$ ,  $[A_T]$ , o pH, a força iônica e  $K_i^a$  são conhecidos. Assim, podemos obter uma expressão que relacione  $\psi_s$  com esses dados e com os parâmetros  $K_a^{AH^+}$  e  $K_i^v$ . Por outro lado,  $\psi_s$  é calculado a partir da análise espectral, conseqüentemente, os parâmetros  $K_a^{AH^+}$  e  $K_i^v$  podem ser obtidos do ajuste da expressão teórica para  $\psi_s$  aos dados experimentais.

Posto que o  $Cl^-$  pode ligar-se à forma protonada da droga na membrana, para as experiências realizadas em presença de NaCl, devemos considerar, também, a seguinte reação:



onde a constante de equilíbrio da reação,  $K_{Cl^-}$ , é:

$$K_{Cl^-} = \frac{[LAHCl]}{[Cl^-]_f([LAH^+] - [LAHCl])}. \quad (4.34)$$

Neste caso, temos uma incógnita adicional ( $[LAHCl]$ ), uma equação adicional (4.34) e a densidade superficial de carga é:  $\sigma = (([LAH^+] - [LAHCl])/[L_T]) e/\mathcal{A}_L$ , onde, para conservar a forma das equações anteriores, consideramos que  $[LAH^+]$  corresponde à

concentração total da forma protonada (clorada ou não).

Se também existe adsorção de  $\text{Cl}^-$  na membrana[91], devemos considerar o processo:



Se não existe competitividade entre o  $\text{Cl}^-$  e a droga, a constante de adsorção do  $\text{Cl}^-$  na membrana é:

$$K_{\text{Cl}^-} = \frac{[\text{LCl}^-]}{[\text{Cl}^-]_I [\text{L}_T]} \quad (4.36)$$

Sendo a densidade superficial de carga:  $\sigma = ([\text{LAH}^+] - [\text{LAHCl}] - [\text{LCl}^-]) / [\text{L}_T] \epsilon / \mathcal{A}_L$ .

Para o cálculo da densidade superficial de carga podem ser introduzidas correções adicionais levando em conta, por exemplo, a expansão da membrana devida à incorporação das moléculas de droga.

## 4.5 Preparação das vesículas e incorporação da droga

PC extraída de ovo é uma mistura de fosfolipídios com o mesmo grupo polar (fosfatidilcolinas) e diferentes cadeias de ácidos graxos. As amostras foram preparadas a partir de uma solução estoque de PC em clorofórmio (Sigma Co.) ou em clorofórmio/metanol (Lipid Products) 100 mg/cc. Evaporando o solvente com um fluxo de nitrogênio, um filme lipídico é formado nas paredes do recipiente e mantido sob vácuo por duas horas no mínimo. Após a adição da solução tampão (fosfato de potássio 8 mM), a pH 5,5 ou 7 com ou sem NaCl 100 mM, as amostras foram agitadas (com vórtice) durante 5 min[50,118].

No caso de lipossomos com cloropromazina, foram misturadas quantidades apropriadas da solução estoque de PC e de uma solução estoque de CPZ (13,5 mM em clorofórmio) seguindo-se o mesmo procedimento enunciado acima. A CPZ-HCl utilizada foi obtida da Sigma Co..

### 4.5.1 Preparação das amostras para as medidas de RPE

Depois de deixar repousar os lipossomos durante 20 min., incorpora-se uma alíquota da solução estoque da sonda paramagnética (250  $\mu$ M no mesmo tampão em que foram preparados os lipossomos). A preparação foi incubada durante uma hora e então colocada num tubo de quartzo apropriado para a medida de RPE.

As medidas foram realizadas num espectrômetro Varian modelo E-9 operado na banda X de frequências, com uma potência de microonda de 10 mW. A varredura do campo magnético foi de 100 G em 8 min. e a constante de tempo empregada de 0,3 seg.

## 4.6 Medidas e resultados

### 4.6.1 Comportamento da sonda em ausência de CPZ

Foram obtidos espectros de RPE e medidas as intensidades  $A_a^-(0)$  e  $A_a(-1)$ , para diferentes concentrações da sonda em solução aquosa, na faixa 20-100  $\mu\text{M}$ . Na figura 4.5 são apresentados os valores de cada uma das duas amplitudes vs. a concentração da sonda. Observa-se que, dentro da faixa de concentrações estudada, esses gráficos são lineares. Este resultado é o esperado já que, como as amostras têm todas o mesmo volume ( $V \simeq 50 \mu\text{l}$ ), se a sonda está na forma de monômeros (não micelizada), então, as amplitudes do espectro devem ser proporcionais à concentração da sonda. Portanto, em vez de considerar o parâmetro  $k_a^{-2} = A_a^-(0)/n_a$ , definiremos  $\kappa_a^{-2} = k_a^{-2} V$  que corresponde à inclinação da reta  $A_a^-(0)$  vs. concentração total da sonda ( $[S_T^+]$ ). As intensidades do espectro são medidas em unidades arbitrárias, dependendo do ganho utilizado. Referindo as intensidades ao ganho  $5 \times 10^2$ , obtemos  $\kappa_a^{-2} = 2,2 \times 10^5 \text{ l/mol}$ .

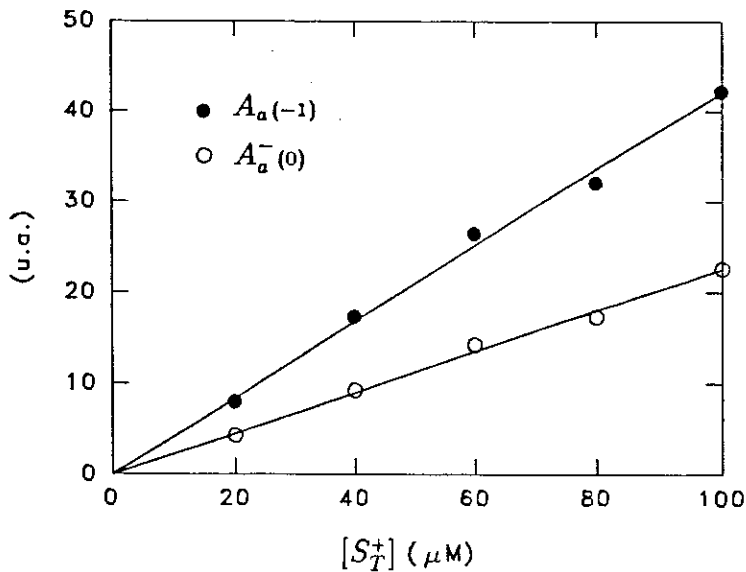


Figura 4.5: Amplitudes  $A_a^-(0)$  e  $A_a(-1)$  do espectro da sonda paramagnética em solução aquosa (tampão fosfato 8 mM, pH 7) vs. concentração da sonda. Cada ponto corresponde à média dos valores medidos, tipicamente, para seis espectros de uma mesma amostra. As curvas contínuas correspondem ao ajuste linear aos dados experimentais pelo método de mínimos quadrados.

O parâmetro  $\alpha = \frac{A_a^-(0)}{A_a(-1)}$  corresponde à inclinação do gráfico linear  $A_a^-(0)$  vs.  $A_a(-1)$  (fig.4.6), obtendo-se:  $\alpha = 0,538 \pm 0,006$ .

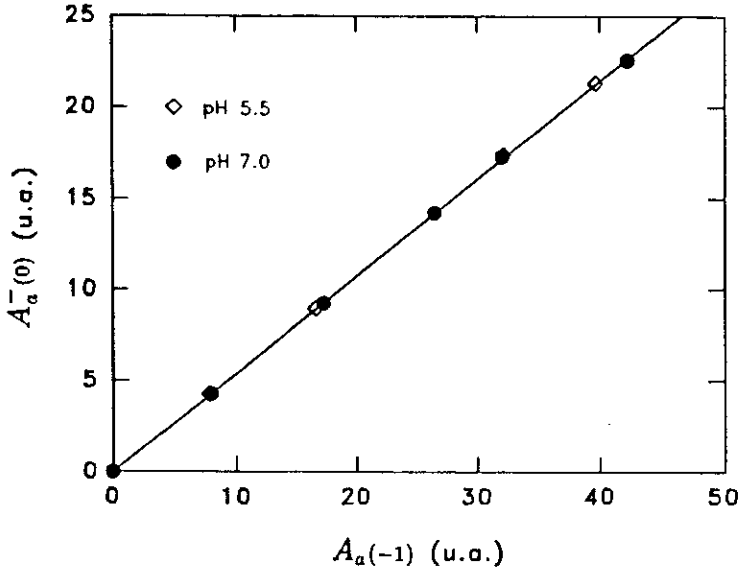


Figura 4.6:  $A_a^-(0)$  vs.  $A_a(-1)$  para a sonda em tampão fosfato 8 mM, a pH 5,5 e 7. A curva contínua corresponde ao ajuste linear aos dados experimentais pelo método de mínimos quadrados.

Foram adquiridos, também, espectros da sonda paramagnética ( $20\mu\text{M}$ ), em presença de várias concentrações de lipídios dentro da faixa 20-100 mM. Para esses espectros foram determinadas as intensidades  $A_T^-(0)$  e  $A_a(-1)$  e foi calculado o parâmetro  $P$ , definido através da expressão 4.21 ( $P = \frac{A_v^-(0)}{A_a^-(0)} = \frac{A_T^-(0)}{\alpha A_a(-1)} - 1$ ), obtendo-se o gráfico da fig. 4.7.

Por outro lado,  $A_v^-(0) = k_v^{-2}n_v = k_v^{-2}(n_T - n_a) = \beta(k_a^{-2}n_T - A_a^-(0))$  e  $A_a^-(0) = \alpha A_a(-1)$ . Conseqüentemente,  $A_T^-(0)$ , definida na equação 4.20 ( $A_T^-(0) = A_v^-(0) + A_a^-(0)$ ), pode ser escrita como:

$$A_T^-(0) = \beta\kappa_a^{-2}[S_T^+] + (1 - \beta)\alpha A_a(-1). \quad (4.37)$$

Sendo conhecido  $n_T$  e tendo sido calculados  $\alpha$  e  $k_a^{-2}$ , ajustando a equação anterior aos pontos do gráfico  $A_T^-(0)$  contra  $A_a(-1)$  (fig. 4.8), obtemos  $\beta = 0,15 \pm 0,01$ , valor que coincide com os publicados por outros autores[37,91].



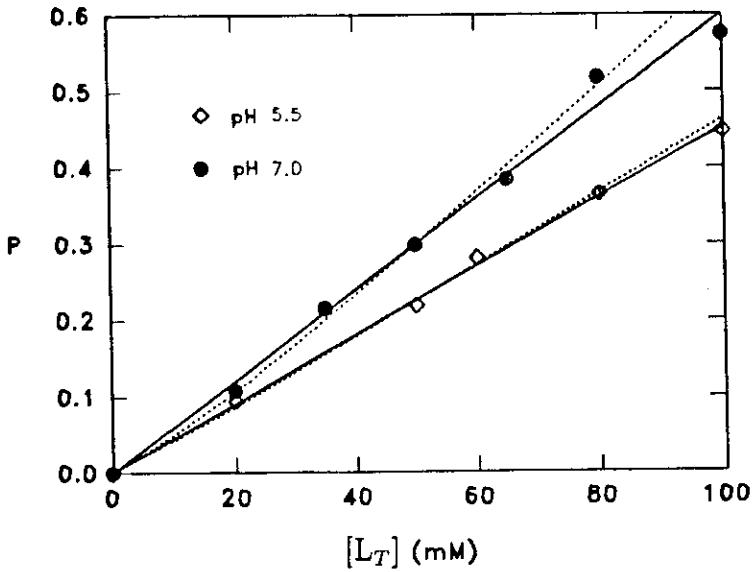


Figura 4.7:  $P$  vs. concentração de lipídios, para 0,02 mM da sonda paramagnética em tampão fosfato 8 mM, a pH 5,5 e 7. Em cada caso, a curva contínua corresponde ao ajuste linear aos dados experimentais pelo método de mínimos quadrados e a curva tracejada corresponde à calculada segundo a equação 4.24 com  $P_0 = 0,22$  (para  $[L_T] = 50$  mM). Nesta figura, assim como nas seguintes, os parâmetros considerados para avaliar  $\psi_s$  são os indicados no texto.

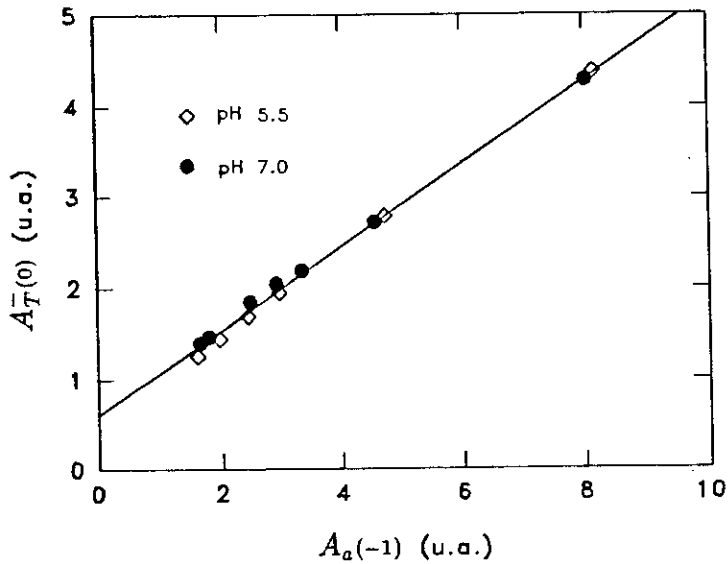


Figura 4.8:  $A_T^{-1}(0)$  vs.  $A_a(-1)$ , para 0,02 mM da sonda paramagnética em presença de vesículas, em tampão fosfato 8 mM, a pH 5,5 e 7. A curva contínua representa o melhor ajuste da expressão 4.37 aos dados experimentais, com  $\alpha = 0,538$ ,  $\kappa_0^{-2} = 2,2 \times 10^5$  l/mol e o parâmetro de ajuste  $\beta = 0,15 \pm 0,01$ .

As sondas incorporadas na membrana, inicialmente neutra, dão lugar a uma distribuição superficial de cargas. No entanto, para as concentrações de sonda  $c$  e de lipídios utilizadas nesta experiências (no máximo 1 molécula de sonda cada 100 moléculas de lipídios), espera-se, a partir da equação 4.6, que o potencial elétrico resultante seja tal que  $|\psi| \ll k_B T/e$ . O parâmetro  $P = P_0 e^{-\frac{e\psi_s}{k_B T}}$ , com  $P_0 = \beta K_a^{S+} [L_T]$  (equação 4.24), é função do potencial superficial. Se a carga superficial da membrana fosse nula, o potencial superficial e, conseqüentemente,  $P$ , para uma dada concentração de lipídios, deveria manter-se constante ao variar a força iônica. Para amostras da sonda (20  $\mu\text{M}$ ) em presença de lipídios (50 mM) em tampão fosfato com diferentes valores da força iônica, a pH 5,5 e 7, foi obtido o parâmetro  $P$  (fig. 4.9). Segundo os resultados apresentados nesta figura,  $P$  varia com a força iônica, portanto, existe carga elétrica superficial nas vesículas. Se a membrana fosse neutra, a carga introduzida pela presença da sonda (positivamente carregada) deveria produzir um potencial superficial positivo que decresceria ao aumentar a força iônica, aumentando o valor de  $P$ . No entanto, o efeito observado é o oposto. Isto pode ser explicado pela presença, na membrana, de impurezas com carga negativa. Com esta hipótese e considerando a equação 4.6, que relaciona a densidade superficial de carga com o potencial superficial, foram ajustados os dados

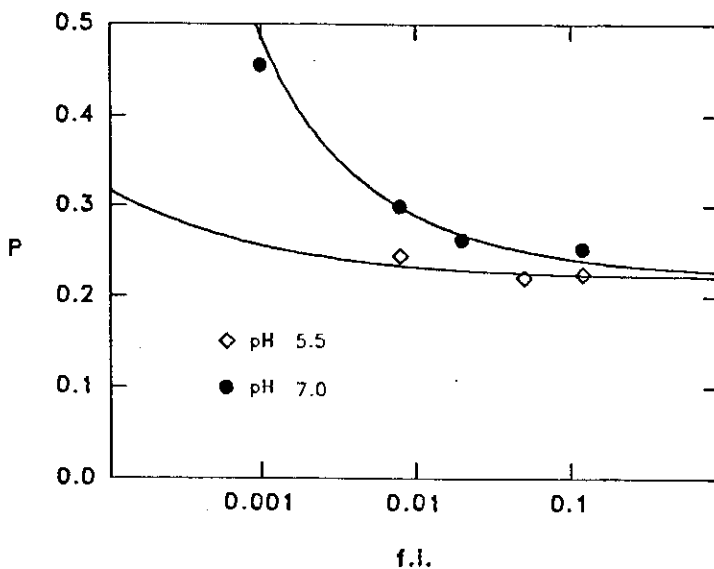


Figura 4.9:  $P$  vs. força iônica para a sonda em presença de vesículas ( $[L_T] = 50 \text{ mM}$ ), em tampão fosfato a pH 5,5 e 7. As curvas contínuas representam o melhor ajuste da expressão 4.24 aos dados experimentais, sendo obtido  $P_0 = 0,220 \pm 0,005$ .

da figura 4.9, obtendo-se, para  $[L_T] = 50 \text{ mM}$ ,  $P_o = 0,220 \pm 0,005$  e que a impureza presente corresponde, para pH 5,5 e 7, respectivamente, a 0,5% e 1,1% do total de lipídios. Sendo que os lipídios utilizados para as medidas a diferente pH são os mesmos, a diferença observada pode ser explicada se o  $pK_i$  da impureza fosse próximo a 5,5. Segundo as especificações do produto utilizado (99% de pureza) que não foi purificado posteriormente, uma impureza dessa ordem pode estar presente. Nos cálculos seguintes será levada em conta a presença desta impureza assim como a presença da sonda carregada na membrana.

A expressão 4.6, que relaciona a densidade superficial de carga com o potencial superficial, corresponde a uma geometria plana. No caso de vesículas globulares seria mais apropriado considerar a geometria esférica, porém para esta geometria a equação de Poisson-Boltzmann não pode ser resolvida algebricamente. Entretanto, por um lado, a geometria é mais relevante quando se estuda a dependência do potencial com a distância à membrana que quando, como em nosso caso, se estuda o potencial na superfície[37,119]. Por outro lado, se o comprimento de Debye é muito menor que o raio das vesículas, a aproximação plana pode ser considerada razoável[120], sobretudo quando o potencial superficial é pequeno. Por exemplo, no caso em que  $|\psi| \leq k_B T/e$ , podemos considerar  $e^{-\frac{e\psi}{k_B T}} \simeq 1 - \frac{e\psi}{k_B T} + (\frac{e\psi}{k_B T})^2$ . Para a geometria plana, com esta aproximação, obtivemos a relação 4.8 ( $\psi_s^{pl.} = \frac{4\pi\sigma}{\epsilon\kappa}$ ). Para a geometria esférica, obtemos  $\psi_s^{esf.} = \frac{4\pi\sigma R}{\epsilon(1+\kappa R)}$ , onde  $R$  é o raio da vesícula. Portanto,  $\frac{\psi_s^{pl.}}{\psi_s^{esf.}} = \frac{1+\kappa R}{\kappa R}$ . Assim, se  $R \gg 1/\kappa$ , então  $\frac{\psi_s^{pl.}}{\psi_s^{esf.}} \simeq 1$ . Nas condições experimentais deste trabalho, a temperatura é 25°C e o comprimento de Debye é sempre inferior a 34 Å (valor correspondente à menor força iônica utilizada, 8 mM) muito menor que o diâmetro das vesículas externas dos lipossomos multilamelares, tipicamente, em torno de 2 μm[59]. Portanto, para estimar  $\Psi = \frac{e\psi_s}{k_B T}$  em função da densidade superficial de carga será utilizada a expressão 4.6.

Em relação a outros valores testados, bons ajustes são obtidos considerando que a área por lipídio é 70Å<sup>2</sup> e que a fração de lipídios na camada externa ( $[L_i]/[L_T]$ ) é aproximadamente 6%. Por outro lado, sendo estes valores, valores típicos, já que se trata de lipossomos multilamelares[50,121], serão adotados para as simulações e ajustes

seguintes, sendo ao mesmo tempo testados nesses ajustes.

Assim, calculando, a partir das equações 4.6 e 4.24, o parâmetro  $P$  em função da concentração de lipídios, obtemos as curvas apresentadas na fig. 4.7. Sendo  $P_0 = \beta K_a^{S^+} [L_t]$ , podemos calcular o valor da constante de adsorção da sonda, obtendo-se  $K_a^{S^+} \approx 479$  l/mol, valor que coincide aproximadamente com os achados por outros autores[37,91]. A partir desta constante de adsorção pode ser calculado o trabalho para transferir um mol de sonda da fase aquosa para a fase das vesículas, sendo aproximadamente igual a -4340 cal/mol. Considerando que o trabalho por mol de grupo  $\text{CH}_2$  é da ordem de -800 cal/mol[37,43], o trabalho total corresponde, aproximadamente, a 5 grupos  $\text{CH}_2$  penetrando na bicamada.

Foram adquiridos, também, espectros correspondentes a várias concentrações de sonda, em presença de vesículas ( $[L_T] = 50$  mM).

Na fig. 4.10 é apresentado o gráfico  $A_v^-(0)$  (proporcional à quantidade de sonda incorporada na membrana) vs. concentração total da sonda. Para baixas concentrações

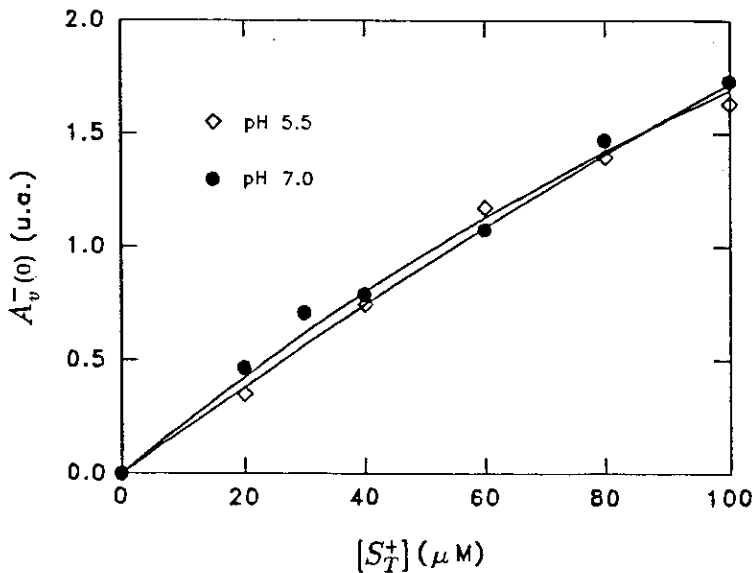


Figura 4.10:  $A_v^-(0)$  vs. concentração da sonda paramagnética em presença de vesículas (tampão fosfato 8 mM, pH 5,5 e 7). A concentração total de lipídios é 50 mM. Em cada caso, a curva contínua corresponde à relação calculada teoricamente considerando  $\alpha = 0,538$ ,  $\kappa_a^{-2} = 2,2 \times 10^5$  l/mol e  $\beta = 0,153$ .

da sonda, o gráfico é linear. No entanto, para concentrações maiores, a incorporação da sonda começa a apresentar saturação devido ao fato das moléculas adsorvidas modificarem apreciavelmente o potencial elétrico superficial da membrana. Nesse caso, a concentração na interface, dada pela relação de Boltzmann, é menor que a concentração volumétrica e, conseqüentemente, a fração incorporada não cresce linearmente com a concentração total. Para descrever quantitativamente este comportamento, foi estimado o potencial superficial. A quantidade de sonda na membrana pode ser calculada a partir da equação 4.22 e, conseqüentemente, pode ser calculada a intensidade  $A_v^-(0) = \kappa_a^{-2} \beta [LS^+]$  em função da concentração total da sonda  $[S_T^+]$ , sendo obtidas as curvas da fig. 4.10.

A partir da análise espectral, foram obtidos também os valores do parâmetro  $P$  (fig. 4.11) e, considerando a equação 4.24, foi calculada a curva teórica.

Considerando os dados experimentais apresentados na figura 4.12 que correspondem a concentrações conhecidas da sonda e da expressão 4.37, pode ser calculado o valor de  $\beta$  para cada concentração da sonda. A média dos valores obtidos é  $\beta = 0,153 \pm 0,008$  que coincide com o valor calculado a partir do gráfico da figura 4.8.

As curvas previstas teoricamente permitem descrever o comportamento observado em todos estes casos, dentro do erro experimental. As intensidades medidas a partir da análise espectral apresentam um erro da ordem de 1%. O erro no cálculo do parâmetro  $P$ , obtido a partir da propagação de erros, é da ordem de 10%. Estima-se que o erro nas concentrações é no máximo da ordem de 5%. Portanto, o modelo e os parâmetros escolhidos (área por lipídio e fração de lipídios na camada externa das vesículas) são apropriados e serão utilizados para o ajuste dos resultados.

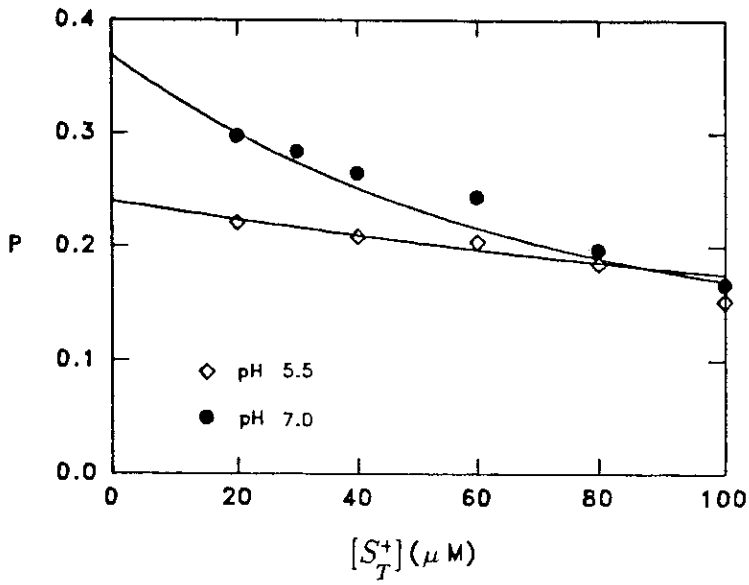


Figura 4.11:  $P$  vs. concentração total da sonda, para os mesmos dados experimentais da figura anterior. Em cada caso, a curva contínua é a calculada teoricamente segundo a expressão 4.24, com  $P_0 = 0,22$ .

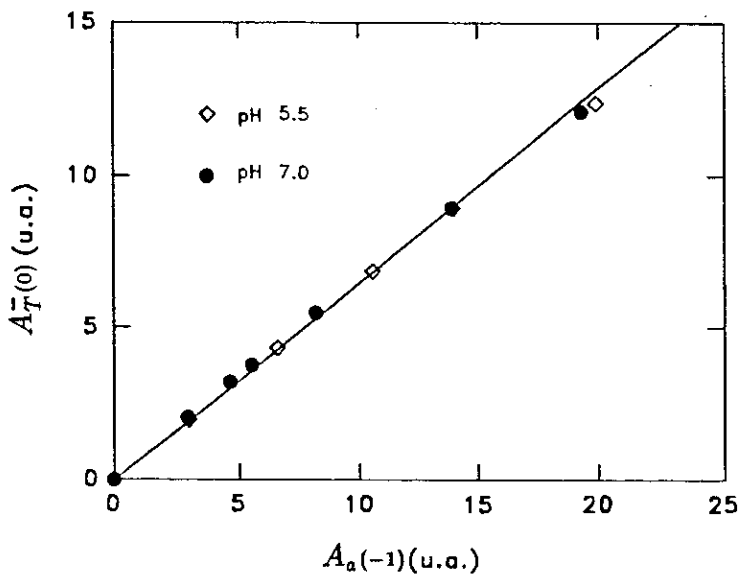


Figura 4.12:  $A_T^-(0)$  vs.  $A_a(-1)$  para os mesmos dados experimentais da figura anterior. A curva contínua corresponde ao melhor ajuste da expressão 4.37, com  $\alpha = 0,538$ ,  $\kappa_a^{-2} = 2,2 \times 10^5$  l/mol e o parâmetro de ajuste  $\beta = 0,153 \pm 0,008$ .

Outras séries de medidas foram feitas com lipídios obtidos da Lipid Products, em tampão fosfato 8 mM, a pH 7, com ou sem 0,1 M NaCl. Foram seguidos os mesmos passos que no caso anterior.

A partir do valor de  $P$  calculado para diferentes valores do pH e da força iônica, com ou sem NaCl, obtivemos, para  $[L_T] = 50$  mM,  $P_0 = 0,146 \pm 0,008$ . Este valor de  $P_0$  é diferente do obtido para a preparação de lipídios da Sigma Co. Apesar de ter sido seguido o mesmo procedimento para preparar as vesículas lipídicas, a discrepância observada pode ser devida ao fato das vesículas resultantes serem diferentes (por exemplo, diferente percentagem de lipídios expostos na camada externa das vesículas) como consequência de se ter partido de preparações de lipídios em diferentes solventes.

O valor do trabalho necessário para transferir um mol de sonda da fase aquosa para a fase das vesículas é, neste caso, aproximadamente igual a  $-4111$  cal/mol. Portanto, o número de grupos  $\text{CH}_2$  penetrando na bicamada, corresponde, como no caso anterior, a aproximadamente 5. Existe também para estes lipídios, algum tipo de impureza carregada negativamente em concentração da ordem de 1% do total de lipídios.

Foram adquiridos, como no caso anterior, espectros da sonda ( $20\mu\text{M}$ ), em presença de várias concentrações de lipídios dentro da faixa 20-100 mM. Os valores do parâmetro  $P$  em função da concentração de lipídios, calculados a partir dos dados experimentais, e a curva prevista teoricamente são representados na fig. 4.13. Também, neste caso, foram obtidos bons ajustes considerando que a área por lipídio é  $70\text{\AA}^2$  e que a fração de lipídios na camada externa ( $[L_t]/[L_T]$ ) é aproximadamente 6%.

Assim como no caso anterior, foram adquiridos espectros correspondentes a várias concentrações de sonda, em presença de vesículas ( $[L_T] = 50$  mM). As figuras 4.14, 4.15 e 4.16 são equivalentes às figuras 4.10, 4.11 e 4.12 obtidas para a preparação anterior. Neste caso, a partir da figura 4.16, obtemos  $\beta = 0,149 \pm 0,005$ .

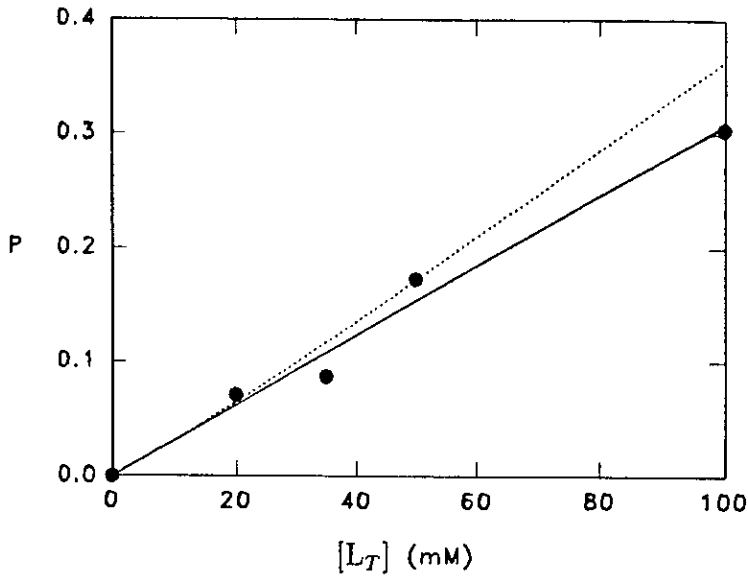


Figura 4.13:  $P$  vs. concentração de lipídios, para 0,02 mM da sonda paramagnética em tampão fosfato 8 mM, a pH 7. A curva contínua corresponde ao ajuste linear aos dados experimentais pelo método de mínimos quadrados e a curva tracejada corresponde à calculada segundo a equação 4.24 com  $P_0 = 0,146$  (para  $[L_T] = 50$  mM).

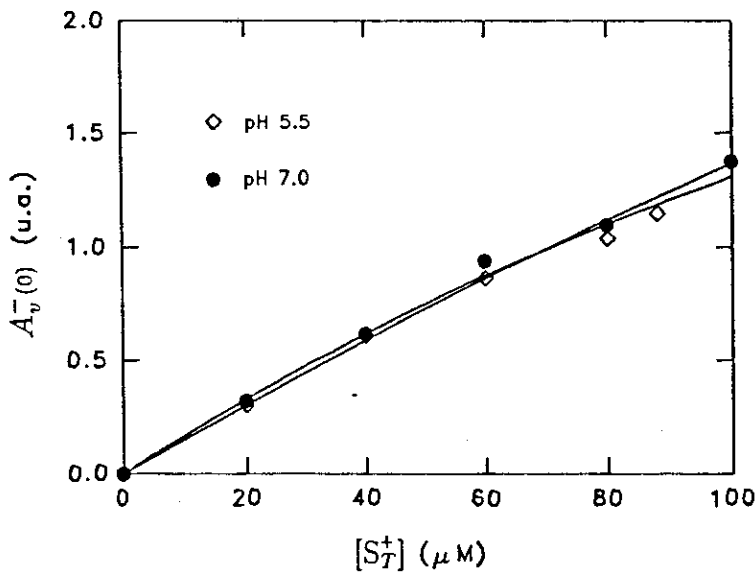


Figura 4.14:  $A_v^-(0)$  vs. concentração da sonda paramagnética em presença de vesículas (tampão fosfato 50 mM a pH 5,5 e 8 mM a pH 7). A concentração total de lipídios é 50 mM. Em cada caso, a curva contínua corresponde à relação calculada teoricamente considerando  $\alpha = 0,538$ ,  $\kappa_a^{-2} = 2,1 \times 10^5$  l/mol e  $\beta = 0,149$ .



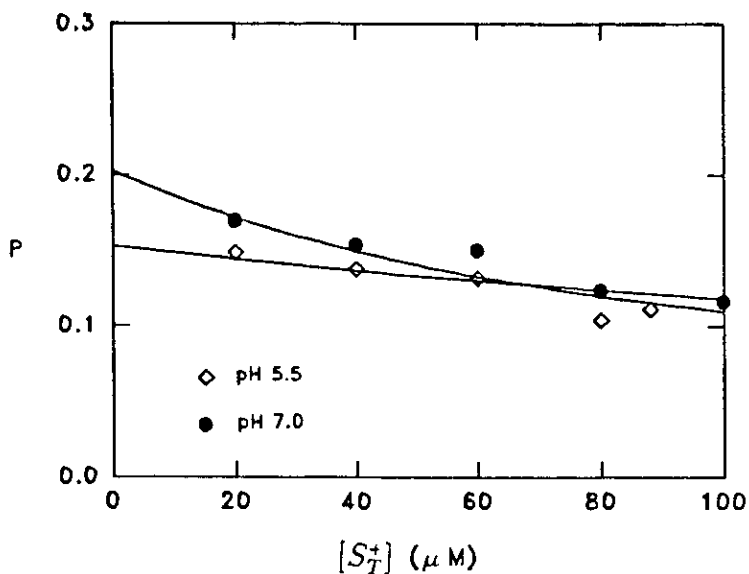


Figura 4.15:  $P$  vs. concentração total da sonda, para os mesmos dados experimentais da figura anterior. A curva contínua é a calculada teoricamente segundo a expressão 4.24, com  $P_o = 0,146$ .

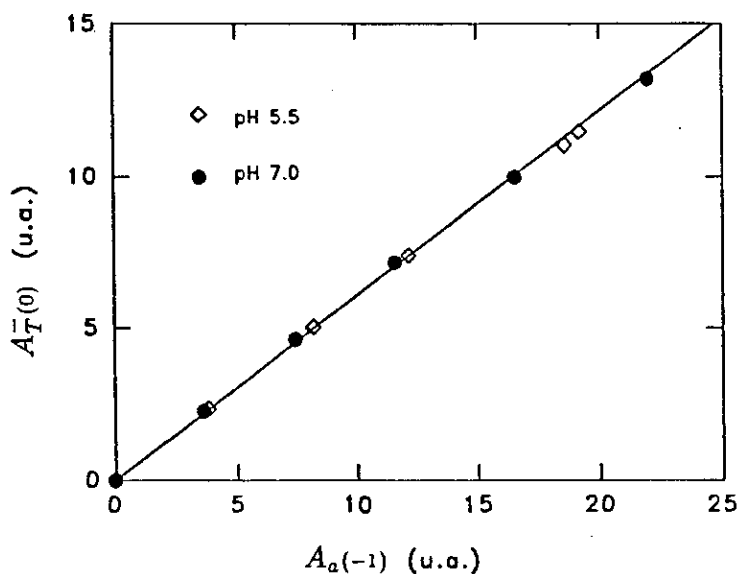


Figura 4.16:  $A_T^-(0)$  vs.  $A_a(-1)$  para os mesmos dados experimentais da figura anterior. A curva contínua corresponde ao melhor ajuste da expressão 4.37, com  $\alpha = 0,538$ ,  $\kappa_a^{-2} = 2,1 \times 10^5$  l/mol e o parâmetro de ajuste  $\beta = 0,149 \pm 0,005$ .

#### 4.6.2 Incorporação da CPZ nas vesículas

Foram preparadas amostras da sonda  $20 \mu\text{M}$  em presença de vesículas (concentração de lipídios  $50 \text{ mM}$ , utilizando os lipídios da Sigma) e de diferentes concentrações da droga, em tampão fosfato  $8 \text{ mM}$ , a  $\text{pH } 5,5$  e  $7$ . Na figura 4.17 são apresentados os valores de  $P$  obtidos a partir da análise espectral. Observa-se que, à medida que a concentração de droga aumenta, o valor de  $P$  decresce. Se a forma das linhas do espectro da componente mais imobilizada não é alterada pela presença da droga, então, a diminuição de  $P$  indica a diminuição da fração de sonda incorporada nas vesículas. Como controle da forma das linhas foi considerado o parâmetro  $\beta$ , sendo calculado para cada concentração de droga (ver fig. 4.18). Para altas concentrações de droga,  $\beta$  aumenta, indicando, presumivelmente, a desorganização da bicamada lipídica pela presença da droga. Para cada concentração da droga, dentro da faixa em que  $\beta$  é constante, foi calculado o potencial superficial  $\psi_s$  a partir do valor de  $P$ , sendo obtidos os pontos da fig. 4.19. Resolvendo o sistema de equações (4.26-4.28, 4.30-4.32) é possível achar uma relação entre  $\psi_s$  e a fração  $[A_T]/[L_T]$ . Esta relação tem como parâmetros a serem ajustados as constantes  $K_a^{AH^+}$  e  $K_i^v$ . Na figura 4.19 são apresentados os melhores ajustes, obtidos para  $pK_i^v = 7,5$  e  $K_a^{AH^+} \geq 10^3$ .

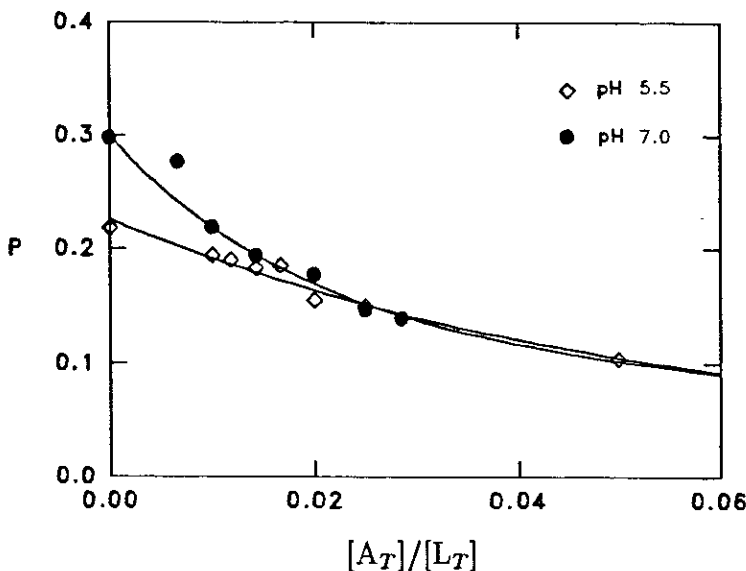


Figura 4.17:  $P$  em função da fração da concentração total de droga por concentração total de lipídios  $[A_T]/[L_T]$ . A concentração de lipídios é  $50 \text{ mM}$  em tampão fosfato  $8 \text{ mM}$ . Os pontos correspondem à média dos valores obtidos para duas ou três amostras.

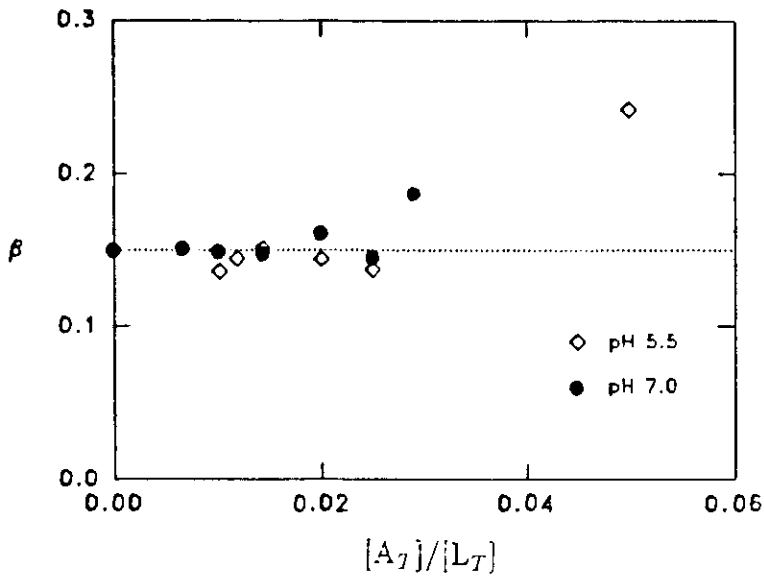


Figura 4.18:  $\beta$  em função de  $[A_T]/[L_T]$  para as mesmas amostras para as quais foi obtida a figura anterior. A concentração de lipídios é 50 mM. O erro no cálculo de  $\beta$  é aproximadamente 0,02.

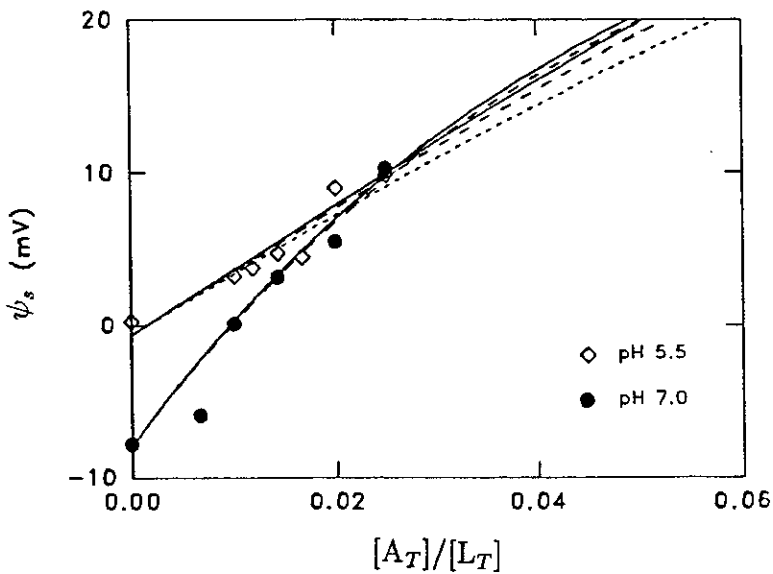


Figura 4.19:  $\psi_s$  em função de  $[A_T]/[L_T]$ . As curvas ajustadas correspondem a  $pK_a^y = 7,5$  e a  $K_a^{AH^+} = 10^{2,5}$  (---),  $10^3$  (--) ,  $\infty$  (—). O erro na determinação de  $\psi_s$  é aproximadamente 3 mV.

Outras séries de medidas foram realizadas a partir de amostras da sonda  $20 \mu\text{M}$  em presença de vesículas (concentração de lipídios  $50 \text{ mM}$ , utilizando lipídios da Lipid Products) e de diferentes concentrações da droga, em tampão fosfato  $8 \text{ mM}$ , a  $\text{pH } 7$ , com ou sem  $\text{NaCl } 0,1 \text{ M}$ . Na figura 4.20 são apresentados os valores de  $P$  obtidos a partir da análise espectral. Para estas amostras foi, assim mesmo, calculado  $\beta$  (ver fig. 4.21), obtendo-se que  $\beta$  é aproximadamente constante na mesma faixa de concentrações que no caso anterior.

Para cada concentração da droga, a partir do valor de  $P$  foi calculado o potencial superficial  $\psi_s$ , sendo obtidos os pontos da fig. 4.22. Em ausência de droga, os valores de  $P$  em presença e em ausência de  $\text{NaCl}$  são diferentes. Este efeito pode ser devido à adsorção de  $\text{Cl}^-$  na membrana. Neste caso, devem ser consideradas as equações adicionais que modelam a incorporação de  $\text{Cl}^-$  na membrana. Segundo a equação 4.36, obtemos  $K_{\text{Cl}} = 0,15$ , este resultado confirma valores que figuram na literatura[91]. Entretanto, ao efetuar o ajuste teórico não parece necessário levar em conta a associação de  $\text{Cl}^-$  com a forma carregada da droga na membrana, considerada por outros autores[55]. A partir do ajuste da relação teórica aos pontos da fig. 4.22, obtemos  $pK_i^v = 7,9$  e  $K_a^{AH^+} \geq 10^3$ .

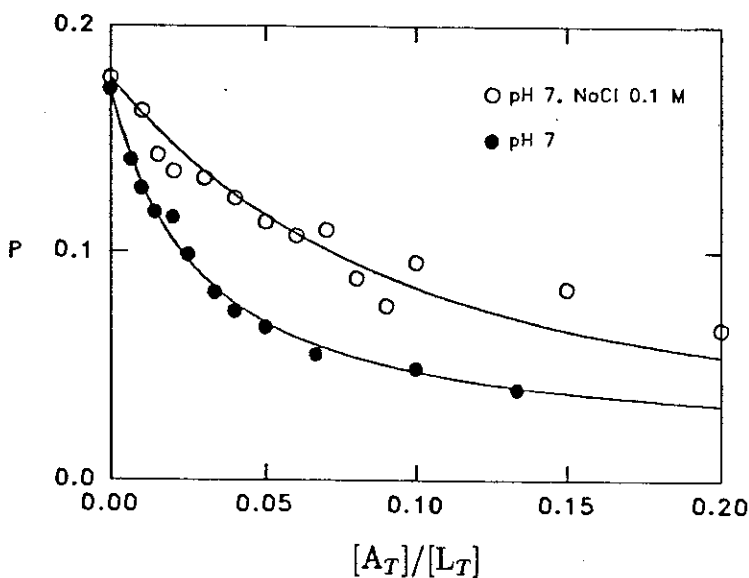


Figura 4.20:  $P$  em função da concentração total de droga por concentração total de lipídios  $[A_T]/[L_T]$ . A concentração de lipídios é  $50 \text{ mM}$  em tampão fosfato  $8 \text{ mM}$  a  $\text{pH } 7$  com ou sem  $\text{NaCl } 0,1 \text{ M}$ . Os pontos correspondem à média dos valores obtidos para duas ou três amostras.

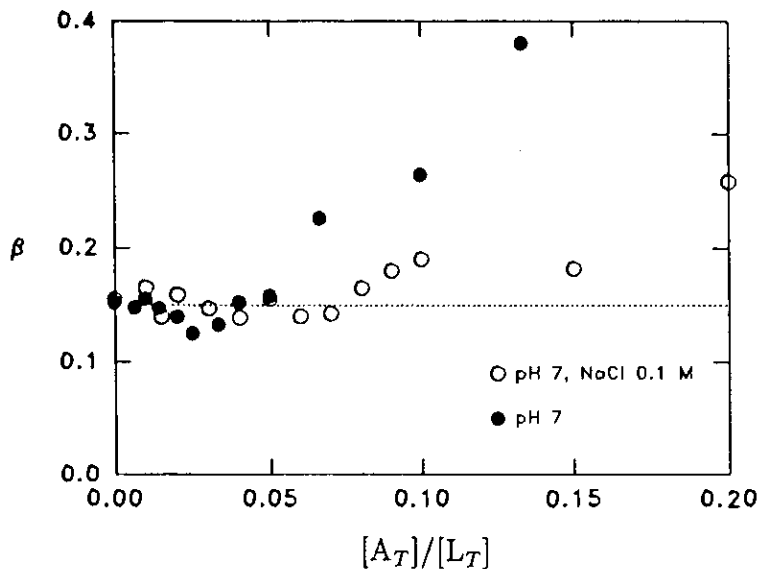


Figura 4.21:  $\beta$  em função de  $[A_T]/[L_T]$  para as mesmas amostras para as quais foi obtida a figura anterior. A concentração de lipídios é 50 mM. O erro no cálculo de  $\beta$  é aproximadamente 0,02.

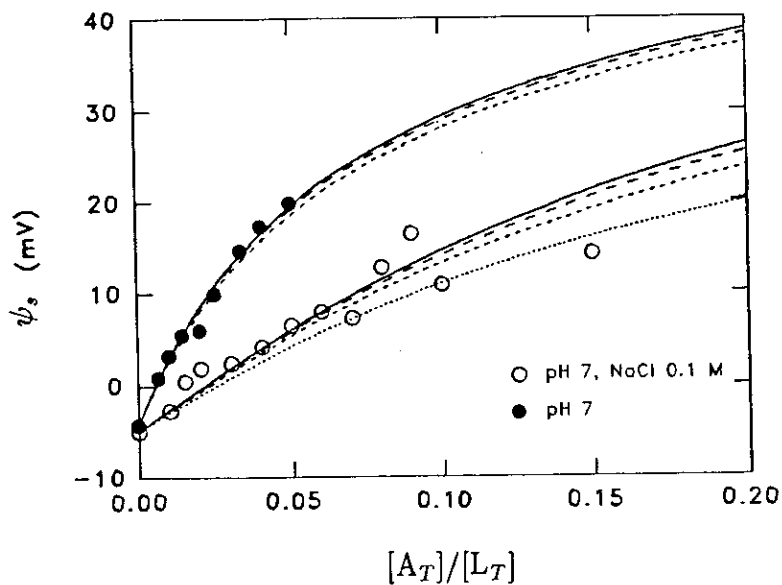


Figura 4.22:  $\psi_s$  em função de  $[A_T]/[L_T]$ . As curvas ajustadas correspondem a  $pK_i^v = 7,9$  e a  $K_a^{AH^+} = 10^2$  (.....),  $10^{2,5}$  (....),  $10^3$  (---),  $\infty$  (—). O erro na determinação de  $\psi_s$  é aproximadamente 3 mV.

## 4.7 Discussão

Observa-se que, para baixas concentrações de CPZ,  $\beta$  é aproximadamente constante, encontrando-se na faixa  $0,15 \pm 0,02$ , entretanto, como pode-se observar na fig. 4.21,  $\beta$  apresenta, aparentemente, um mínimo e, a partir de uma certa concentração de CPZ,  $\beta$  aumenta. Uma variação de  $\beta$  pode ser devida à modificação da componente espectral da sonda na membrana ou à aparição de uma nova componente. No primeiro caso, uma modificação do valor de  $\beta$  indica a alteração do estado da bicamada lipídica de tal modo que, se a bicamada é desorganizada, a largura das linhas do espectro correspondente à sonda nas vesículas decresce e, portanto,  $\beta$  aumenta. No segundo caso, o surgimento de uma nova componente pode ser conseqüência, por exemplo, da formação de micelas de CPZ para concentrações da droga tais que a concentração na solução está acima da cmc. Entretanto, a partir da análise dos espectros obtidos para amostras da sonda  $20 \mu\text{M}$  e CPZ  $10 \text{ mM}$ , em ausência de vesículas, em tampão fosfato  $8 \text{ mM}$ , NaCl  $100 \text{ mM}$  a pH 7, condições em que a droga está micelizada, não é observado alargamento das linhas que indique a incorporação da sonda nas micelas de CPZ.

O fato de  $\beta$  crescer com a concentração de CPZ é presumivelmente indicador de um aumento de fluidez e/ou desordem da bicamada, consistente com o poder fluidificador da CPZ[83,122]. Este efeito poderia ser conseqüência também da formação de agregados micelares[11] que podem levar ao rompimento da bicamada.

Em qualquer caso, se o estado da bicamada é alterado, a adsorção da sonda não é função unicamente do potencial superficial. Neste caso, espera-se, também, que as constantes de adsorção da droga sejam modificadas. Portanto, foram considerados nos ajustes somente os pontos dentro da faixa de concentrações em que  $\beta$  permanece praticamente inalterado e em que, conseqüentemente, a incorporação da sonda é governada, principalmente, por efeitos eletrostáticos. Valores de  $\beta$  na faixa  $0,15 \pm 0,02$ , mesmo em ausência de fármacos, estão dentro do erro experimental, como observado também por outros autores[37].

Os valores de  $pK'_i$  encontrados a partir dos ajustes para cada uma das duas pre-parações de lipídios (7,5 e 7,9) coincidem dentro do erro experimental com o valor

determinado por outra técnica (7,8)[55]. O valor de  $pK_i^y$  é inferior ao valor que corresponde à fase aquosa  $pK_i^a = 9,3$ , ou seja que, na membrana, o processo de ionização da droga é deslocado no sentido de ser favorecida a forma neutra da droga, consistente com o discutido no capítulo 3 sobre a ionização da droga em micelas. Por outro lado, dado que as constantes de adsorção da droga na membrana são tais que  $\frac{K_{AH^+}}{K_A} = \frac{K_i^a}{K_i^y}$ , o resultado obtido indica que a constante de adsorção da forma neutra é maior que a da forma carregada.

Nas figuras 4.19 e 4.22 são apresentadas curvas obtidas para diferentes valores da constante de adsorção, observa-se que, dentro do erro experimental, na faixa de concentrações estudada, não existe diferença apreciável entre as curvas teóricas obtidas para  $K_a^{AH^+} \geq 10^3$ . As curvas contínuas correspondem a  $K_a^{AH^+} \simeq \infty$ . Portanto, nas condições experimentais estudadas, o valor da constante de adsorção não pode ser determinado com maior precisão. Segundo os resultados obtidos por outros autores[55,113], mediante técnicas diferentes, a constante  $K_a^{AH^+}$  é da ordem de  $10^4$ , consistente com o valor limite encontrado.

Como o coeficiente de partição da CPZ entre a membrana e a solução aquosa é muito alto, só é possível determinar, nas condições experimentais estudadas, um limite inferior para o valor da constante de adsorção da forma carregada da droga, entretanto, por exemplo, para outras drogas menos hidrofóbicas ou mudando as condições experimentais, o método pode ser extremamente útil.

Por outro lado, para estimar o potencial superficial fizemos a suposição de que as vesículas multilamelares, formadas tanto em presença quanto em ausência da droga, apresentam sempre a mesma porcentagem de lipídios expostos. Se esta suposição não fosse válida então o valor de  $P_o$  mudaria com a concentração de droga, sendo afetada, assim, a determinação de  $\psi_s$ . Provavelmente, o erro experimental poderia ser reduzido com a utilização de vesículas unilamelares de tamanho bem definido e incorporando-se a droga após formadas as vesículas.

## Capítulo 5

# Desnaturação térmica da $\text{Ca}^{++}$ -ATPase do retículo sarcoplásmico em presença de dibucaína

Em alguns trabalhos anteriores[88,124,125], mostrou-se que os anestésicos locais afetam a função enzimática da  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase do retículo sarcoplasmático (RS), no entanto, o sítio de ação dos anestésicos e as mudanças estruturais por eles induzidas não são ainda bem conhecidas, tendo sido levantadas diferentes hipóteses. Mesmo sendo presumível que a  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase não seja o alvo dos anestésicos, o RS, rico na  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase, é um sistema mais realista que os sistemas artificiais, é bem caracterizado e, portanto, constitui um modelo apropriado para o estudo da ação anestésica.

Neste trabalho, estudamos os efeitos de um anestésico local, a dibucaína cuja estrutura molecular é apresentada na fig. 5.1, em membranas do RS.

Considerando que, segundo discutido no capítulo 2, os anestésicos interferem com



muitos processos na membrana envolvendo  $\text{Ca}^{++}$ , efetuamos um estudo comparativo dos efeitos da dibucaína e do  $\text{Ca}^{++}$  sobre a desnaturação térmica da  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase.

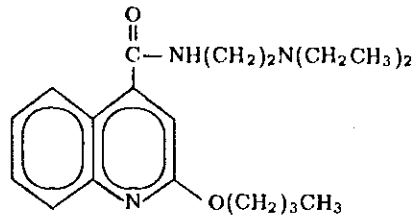


Figura 5.1: Esquema da estrutura molecular do anestésico dibucaína.

## 5.1 Vesículas do retículo sarcoplasmático

Os músculos estriados são compostos por células alongadas contendo filamentos de actina e miosina ordenados em unidades, chamadas miofibrilas, que se contraem na presença de  $\text{Ca}^{++}$ . O retículo sarcoplasmático (cuja morfologia é esquematizada na fig. 5.2) é um compartimento delimitado por uma membrana que forma uma rede de canais envolvendo as miofibrilas e constitui um reservatório de  $\text{Ca}^{++}$ .

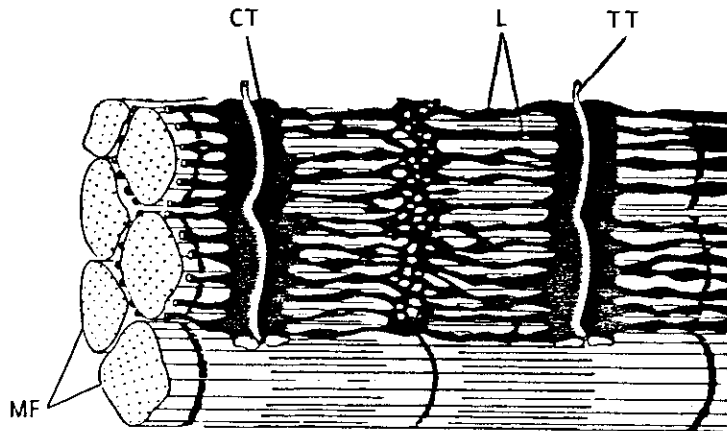


Figura 5.2: Esquema do retículo sarcoplasmático (em preto), distribuído em torno das miofibrilas (MF) de uma célula de músculo estriado. Os túbulos transversais (TT) são invaginações da membrana celular. No esquema, são indicadas as porções longitudinais (L) e as cisternas terminais (CT) do retículo.

Quando um estímulo despolarizante chega na membrana celular, se propagando pelos túbulos transversais (invaginações da membrana celular que a comunicam com as cisternas terminais do retículo), induz a liberação de  $\text{Ca}^{++}$ , produzindo, assim, a contração muscular[126].

### 5.1.1 $\text{Ca}^{++}$ -ATPase

A  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase que constitui 90% da composição proteica do retículo (quase 100% nas regiões longitudinais) efetua o transporte ativo de  $\text{Ca}^{++}$  para o interior do retículo sendo então responsável pela relaxação muscular. A estrutura terciária da  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase consiste, basicamente, em vários domínios globulares orientados para o exterior do retículo (dentre os quais, os domínios de fosforilação e de hidrólise de ATP) e uma região transmembranar formada por 10 hélices  $\alpha$  que atravessam a bicamada lipídica. Um esquema da estrutura desta proteína é apresentado na fig. 5.3.

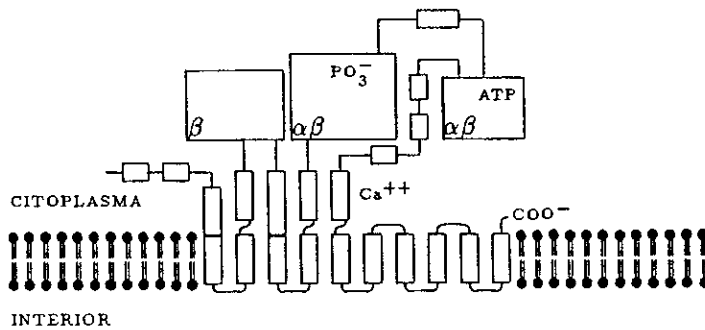


Figura 5.3: Esquema da  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase do retículo sarcoplasmático.

A enzima pode apresentar pelo menos dois estados funcionalmente diferenciados, um em que o sítio de ligação de  $\text{Ca}^{++}$  se encontra exposto ao citoplasma, com alta afinidade ( $0,2-2 \mu\text{M}$ ), e outro em que o sítio está exposto ao interior do retículo, de baixa afinidade ( $1-3 \text{mM}$ ).

### 5.1.2 Composição lipídica

A composição lipídica, assim como o estado estrutural da membrana, é de fundamental importância para o funcionamento da  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase. A remoção de lipídios pode produzir uma completa perda de atividade enzimática e a reincorporação restaurá-la, sendo necessário um mínimo de 30 fosfolipídios por proteína para a conservação da atividade[19,126]. No retículo sarcoplasmático, a relação molar fosfolipídios:proteínas é aproximadamente 75:1[127]. A composição lipídica do retículo é, tipicamente, a seguinte: 65% PC, 19% PE, 12% PI e 4% PS[127].

### 5.1.3 Preparação de vesículas de RS

As vesículas do retículo sarcoplasmático foram isoladas dos músculos das costas e patas traseiras de coelhos brancos de N. Zelândia, essencialmente, como descrito na referência [128]. Diferentes frações do retículo foram obtidas utilizando uma solução com gradiente de densidade de sacarose (25%, 28% e 32%): o material é depositado, inicialmente, sobre a superfície da solução, sendo centrifugado a 24.000 rpm durante um tempo mínimo de 10 h.[129]. A fração na interface 25%-28% é constituída, basicamente, por túbulos T; a fração na parte superior da faixa de sacarosa ao 28% consiste em túbulos T e cisternas terminais. A fração na interface 28%-32%, denominada fração leve (RSL), corresponde às regiões longitudinais do retículo. Entre 90% e 100% da composição proteica desta fração é representada pela  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase, sendo a calseqüestrina a principal das proteínas restantes. O precipitado, na parte inferior da faixa ao 32%, corresponde à denominada fração pesada (RSP), constituída por diferentes regiões do retículo e podendo conter, também, túbulos T. Esta fração é aproximadamente 75% rica na  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase, outras proteínas presentes são a calseqüestrina e a glicoproteína intrínseca. A composição proteica de cada fração obtida foi testada mediante a técnica de separação eletroforética[130]. Nas experiências, foi utilizada a fração RSL ou a fração RSP sempre que a porcentagem de  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase fosse superior ao 75%. A concentração proteica de cada amostra foi determinada pela técnica de absorção ótica[131], utilizando albumina de soro bovino como padrão.

## 5.2 Estudo das interações membrana-anestésico mediante técnicas de análise térmica

Segundo já mencionado no capítulo 1, as proteínas podem sofrer mudanças intramoleculares, quando o meio é alterado. Uma proteína pode assumir várias conformações devido à flexibilidade que lhe conferem algumas das ligações entre os átomos que compõem a cadeia. No entanto, os aminoácidos da proteína também interagem entre si e com as moléculas do solvente, através de ligações não covalentes (principalmente ponte de hidrogênio). Como resultado dessas interações, em geral, só uma das possíveis conformações é estável e, assim, a proteína se organiza espontaneamente[52,53]. Algumas porções das proteínas se organizam segundo padrões comuns, tais como as hélice  $\alpha$  ou as cadeias completamente estendidas (que podem formar planos  $\beta$ ). Estas regiões podem ser classificadas como cristalinas, e as porções desorganizadas (cadeias com dobras aleatórias) como amorfas. Uma dada molécula proteica pode ser cristalina ou amorfa, de forma total ou parcial. Quando o meio é alterado (variação de temperatura, de pH, de concentração de substâncias, etc.), as interações fracas são alteradas e, nesse caso, a conformação nativa da proteína pode sofrer modificações. O processo pelo qual a estrutura terciária da proteína ou de um domínio da mesma sofre uma modificação, sem ruptura de ligações covalentes, passando de um estado organizado a um estado desorganizado, é denominado *desnaturação*[53]. A desnaturação pode ser interpretada como uma transição de fase do estado cristalino ao estado amorfo, podendo ser detetada por técnicas de análise térmica.

Estas técnicas são úteis para o estudo de macromoléculas tais como as proteínas[26]. Basicamente, permitem registrar transições em função da temperatura e determinar os parâmetros termodinâmicos característicos dessas transições. Através destas técnicas, é possível obter informação sobre a proteína, de forma global ou sobre domínios específicos, sobre a interação entre domínios ou sobre os efeitos de ligantes[30]. Dentre estas técnicas, uma das mais utilizadas[31] é a calorimetria diferencial de varredura

(DSC) que permite medir a capacidade calorífica relativa de um sistema como função da temperatura.

Dado que as vesículas de retículo sarcoplasmático são sistemas bem caracterizados (composição lipídica, estrutura e funcionamento da  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase), constituem um modelo apropriado para correlacionar mudanças estruturais com mudanças funcionais, permitindo estudar, em particular, as interações membrana-anestésico e os efeitos destas drogas sobre a função enzimática.

Neste trabalho, é realizado um estudo comparativo dos efeitos do  $\text{Ca}^{++}$  e da dibucaína sobre a estabilidade de diferentes domínios da  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase, através da desnaturação térmica da  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase, utilizando a técnica de DSC. Esses resultados são correlacionados com aqueles obtidos mediante a técnica de inativação térmica do transporte de  $\text{Ca}^{++}$  e com resultados prévios sobre a inativação térmica da hidrólise de ATP.

### 5.2.1 Calorimetria diferencial de varredura

Para as medidas feitas mediante a técnica de calorimetria diferencial de varredura (DSC), as amostras de RS foram suspensas em tampão TES 10 mM, KCl 100 mM, DTT 5 mM a pH 7, sendo a concentração de  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase 4 mg/ml e as concentrações de dibucaína e de  $\text{Ca}^{++}$  variáveis. Como referência foi utilizada a mesma solução sem vesículas de RS.

A dibucaína (base livre) foi obtida da Sigma Co. As soluções de dibucaína foram preparadas adicionando o tampão a baixo pH (antes de ser ajustado ao valor desejado) a alíquotas de uma solução estoque de dibucaína em etanol, tendo sido previamente evaporado o solvente. A solução foi agitada com vórtice a, aproximadamente, 90 °C, para facilitar a solubilização.

A concentração de  $\text{Ca}^{++}$  livre foi controlada mediante uma solução de  $\text{CaCl}_2$ /EGTA em concentrações calculadas utilizando as constantes de associação publicadas na referência [132].

As amostras foram sempre degasificadas (a 0°C) em vácuo durante 5 min., antes de serem carregadas nas cavidades do calorímetro (1,2 ml). Uma vez em equilíbrio a aproximadamente 4°C, a amostra e a referência foram aquecidas até 100 °C, a pressão

constante (1,5 atm). Uma segunda medida foi realizada logo após equilibrar os conteúdos das cavidades novamente a 4°C. A velocidade de aquecimento para todas as varreduras foi 1°C/min. Os perfis de DSC foram obtidos utilizando um calorímetro Microcal-2 interfaceado com um computador DEC Pro 380.

#### 5.2.1.1 *Análise dos perfis obtidos pela técnica de DSC*

Esta técnica permite obter a capacidade calorífica relativa, a pressão constante, como função da temperatura. As cavidades do calorímetro para a amostra e a referência possuem os seus respectivos detetores de temperatura e elementos aquecedores. A amostra e a referência, com capacidades caloríficas similares, são aquecidas a pressão constante de modo tal que as respectivas temperaturas coincidam em cada instante, aumentando linearmente com o tempo. Nestas condições, quando a amostra sofre uma transição de fase e a referência não, os fluxos de calor entregues a cada uma delas são diferentes, porque a amostra absorve ou cede calor durante a transição, e o fluxo diferencial de calor é proporcional ao calor específico relativo a pressão constante.

Um perfil obtido pela técnica de DSC característico de amostras contendo vesículas de retículo sarcoplasmático (fração RSL), no meio descrito previamente, em presença de 1 mM  $\text{Ca}^{++}$ , é apresentado na figura 5.4. Este perfil apresenta vários picos endotérmicos que correspondem à desnaturação de diferentes domínios da  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase, como será discutido na seção de resultados.

A linha de base foi corrigida subtraindo-se do perfil da primeira varredura aquele obtido a partir da segunda varredura. Uma outra correção que leva em conta a diferença do calor específico da proteína, antes e depois da desnaturação, foi feita segundo um procedimento sugerido por Hemminger e Hohne[133].

As curvas corrigidas correspondem ao calor específico em excesso (devido à transição de fase) e podem ser ajustadas mediante uma equação que prediz a forma do perfil. Nas condições experimentais estudadas, o processo de desnaturação é irreversível[38,134], podendo ser representado segundo:



onde  $N$  e  $D$  correspondem, respectivamente, aos estados nativo e desnaturado da  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase, sendo  $k$  a constante de desnaturação função da temperatura  $T$ , tal que a concentração de proteína no estado nativo, em função do tempo, é dada por:

$$\frac{d[N(t)]}{dt} = -k(T(t)) [N(t)]. \quad (5.1)$$

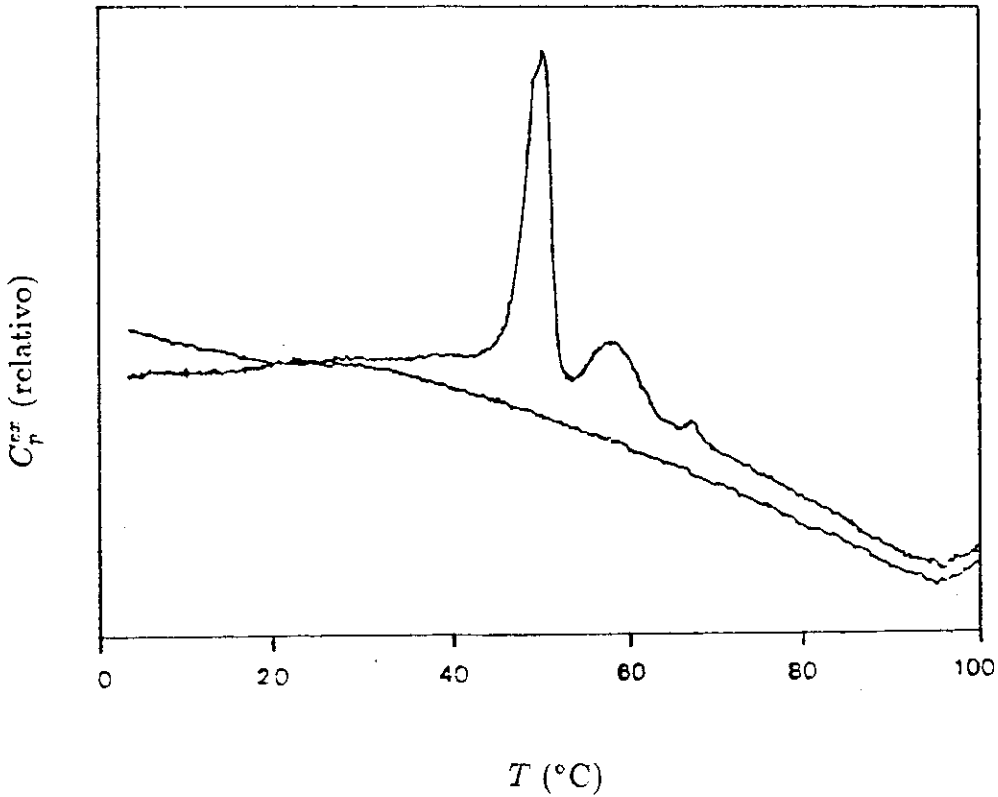


Figura 5.4: Perfis, obtidos mediante DSC (primeira e segunda varreduras da mesma preparação), típicos de uma amostra de RSL em TES 10 mM (pH 7) contendo KCl 100 mM, DTT 5 mM e  $\text{Ca}^{++}$  1 mM. Concentração proteica: 4 mg/ml. Velocidade de varredura: 1°C/min.

A dependência da constante de desnaturação com a temperatura pode ser descrita através da relação de Arrhenius:

$$k(T) = e^{A-E_a/RT} \text{ 1/s,} \quad (5.2)$$

onde  $E_a$  é a energia de ativação,  $A$  uma constante,  $R$  a constante universal dos gases e  $T$  a temperatura em graus Kelvin.

Por outro lado,  $T$  varia linearmente com o tempo, com velocidade constante  $v$ , então,  $T = T_0 + vt$ , onde  $T_0$  é a temperatura inicial, ao tempo  $t = 0$ .

A equação resultante da substituição da relação 5.2, na equação 5.1, levando em conta a dependência temporal da temperatura é a seguinte:

$$\frac{d[N(t)]}{dt} = -e^{A-\frac{E_a}{R(T_0+vt)}} [N(t)]. \quad (5.3)$$

Por outro lado, supondo-se que a variação da concentração de proteína no estado nativo é proporcional à variação de entalpia:  $\frac{dH}{dt} = -c \frac{d[N]}{dt} = c k[N]$ , onde  $c$  é uma constante de proporcionalidade igual à entalpia calorimétrica  $\Delta H_c$ . Levando em conta que  $v dt = dT$ , então, a capacidade térmica em excesso, a pressão constante, é dada por:

$$C_p^{ex}(T) = \frac{\partial H}{\partial T} \Big|_p = \frac{c}{v} k(T) [N(T)]. \quad (5.4)$$

Conhecendo os parâmetros  $E_a$  e  $A$ , a equação 5.3 pode ser resolvida numericamente e, conhecendo adicionalmente o parâmetro  $\Delta H_c$ , a expressão 5.4 permite simular o perfil de DSC. Entretanto, para obter esses parâmetros a partir do ajuste da expressão 5.4 para  $C_p^{ex}$ . às curvas experimentais, foi utilizada uma solução analítica aproximada[135]. A aproximação se baseia em considerar  $T = T_c + v.(t - t_c)$ , onde  $T_c = \frac{E_a}{AR}$  é a temperatura no tempo  $t_c$ , e que  $v.(t - t_c) \ll T_c$  (o qual é válido no nosso caso). Neste caso, a constante de desnaturação pode ser aproximada por:



$$k(T) = e^{A-E_a/RT} = e^{A\frac{T-T_c}{T}} \simeq e^{A\frac{T-T_c}{T_c}} .$$

Assim, a equação 5.3 pode ser integrada analiticamente, obtendo-se a expressão:

$$[N(T)] = [N]_o e^{\frac{T_c}{A_v}} e^{A\frac{T-T_c}{T_c}} , \quad (5.5)$$

onde  $[N]_o$  é concentração inicial de proteína no estado nativo.

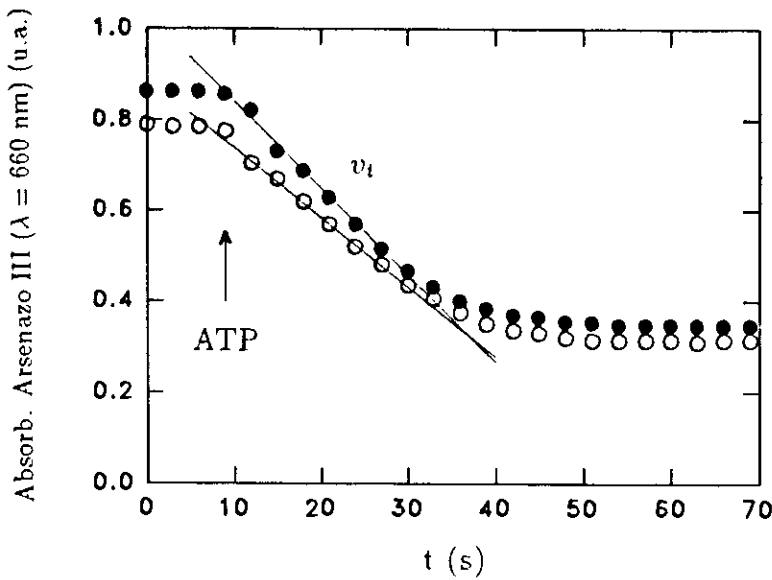
Substituindo-se a expressão 5.5 na relação 5.4, é obtida uma expressão analítica aproximada para  $C_p^{ex}$ . Em cada caso, os parâmetros  $E_a$ ,  $A$  e  $\Delta H_c$  foram determinados ajustando esta expressão aproximada à curva experimental, mediante um programa baseado no algoritmo Simplex[136].

A temperatura de transição  $T_m$  é definida como a temperatura à qual a metade do material total está desnaturado:  $[N(T_m)] = [N]_o/2$ .

### 5.2.2 Inativação térmica do transporte de $Ca^{++}$

Para estimar o transporte de  $Ca^{++}$ , foi medida a absorvância do arsenazo III ligado ao  $Ca^{++}$  externo ( $\lambda = 660$  nm), proporcional à quantidade de  $Ca^{++}$  externo e, portanto, indicador da quantidade de  $Ca^{++}$  transportado[137]. Foi utilizada uma solução de  $KH_2PO_4$  100 mM,  $MgSO_4$  5 mM,  $CaCl_2$  50  $\mu$ M, ATP 0,4 mM, arsenazo III 100  $\mu$ M e  $\sim 50$   $\mu$ g de proteína/ml (RSL), a pH 7. O transporte de  $Ca^{++}$  foi iniciado incorporando ATP.

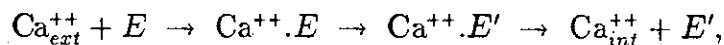
A absorvância foi medida em função do tempo a cada 3 segundos, a temperatura ambiente (25°C). Para as medidas de absorvância de amostras de 1 ml, foi utilizado um espectrômetro HP8451. A atividade foi determinada a partir da inclinação da porção linear da curva de absorvância vs tempo. Na figura 5.5 é apresentado um gráfico de absorvância vs. tempo para as medidas de transporte de  $Ca^{++}$ .



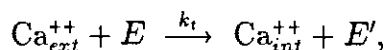
**Figura 5.5:** Absorbância de arsenazo III (660 nm) vs. tempo, em presença de vesículas de retículo sarcoplasmático e dibucaína 1 mM (●), após exposição a 44°C durante 2 min. (○). O instante em que é incorporada ATP é indicado na figura.

### 5.2.2.1 Análise da inativação térmica do transporte de $\text{Ca}^{++}$

Como foi dito previamente, podemos considerar que a  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase pode encontrar-se, basicamente, em dois estados: diferenciados pela localização e afinidade do sítio de ligação de  $\text{Ca}^{++}$ . Denominaremos  $E$  e  $E'$  aos estados em que esse sítio se encontra exposto ao citoplasma e ao interior do retículo, respectivamente. O transporte de  $\text{Ca}^{++}$  pode, então, ser descrito segundo o processo:



onde  $\text{Ca}_{ext}^{++}$  e  $\text{Ca}_{int}^{++}$  representam, respectivamente, o  $\text{Ca}^{++}$  no exterior e no interior do retículo. Se  $k_t$  é a constante do processo de transporte global:

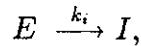


então, a velocidade de transporte de  $\text{Ca}^{++}$  ( $v_t$ ) pode ser escrita como:

$$v_t = - \frac{d[\text{Ca}_{ext}^{++}]}{dt} = k_t [E] [\text{Ca}_{ext}^{++}], \quad (5.6)$$

onde  $[E]$  e  $[\text{Ca}_{ext}^{++}]$  correspondem às concentrações da enzima no estado  $E$  e do cálcio externo, respectivamente.

Por outro lado, a enzima pode passar a um estado inativado  $I$ , estado em que é incapaz de efetuar o transporte iônico, segundo:



onde  $k_i$  é a constante de inativação, função da temperatura, tal que

$$\frac{d[E]}{dt} = -k_i [E].$$

Portanto,  $[E(t)] = [E(t_0)] e^{-k_i(t-t_0)}$ . Assim, quando a enzima é exposta a uma temperatura elevada  $T_e$ , é inativada segundo a constante  $k_i(T_e)$ . Depois de exposta à temperatura  $T_e$  durante o intervalo de tempo  $t_e - t_0$ , a concentração de enzima no estado ativo é:

$$[E] = [E(t_0)] e^{-k_i(T_e)(t_e-t_0)}.$$

Neste caso, a partir da equação 5.6, para a velocidade de transporte, temos:

$$v_t = k_t [E(t_0)] [\text{Ca}_{ext}^{++}] e^{-k_i(T_e)(t_e-t_0)}.$$

A velocidade de transporte de  $\text{Ca}^{++}$ ,  $v_t$ , depende do tempo de exposição através do fator exponencial, portanto, mediante o cálculo da inclinação do gráfico  $v_t$ , em escala logarítmica, vs.  $t_e$ , obtido a partir da exposição de amostras à temperatura  $T_e$ , durante diferentes intervalos de tempo  $t_e - t_0$ , é possível conhecer a constante  $k_i(T_e)$ .

O procedimento anterior foi repetido para diferentes temperaturas de inativação  $T_e$ . A velocidade de inativação foi representada em escala logarítmica em função do inverso da temperatura. Se a constante de inativação segue a lei de Arrhenius:  $k_i(T) = e^{A-E_a/RT}$  1/s, então, a partir do gráfico  $k_i$ , em escala logarítmica, vs.  $1/T$ , podem ser

determinados os parâmetros  $E_a$  e  $A$  que permitem o cálculo da temperatura crítica  $T_m$ .

As amostras de RS (4 mg de proteína/ml) foram expostas à temperatura de inativação na mesma solução utilizada para as medidas pela técnica de DSC. Para cada temperatura de exposição  $T_c$ , várias amostras foram incubadas a esta temperatura durante diferentes intervalos de tempo. A inativação foi detida esfriando bruscamente as amostras a 0°C e adicionando a solução apropriada para as medidas de atividade. Estas medidas foram realizadas segundo enunciado previamente.

## 5.3 Resultados

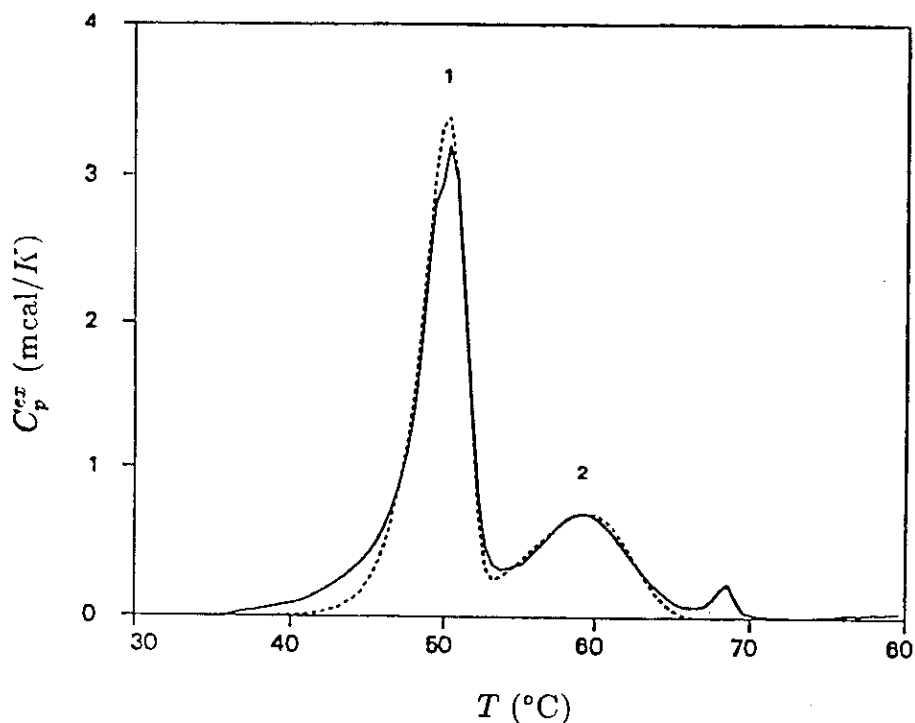
### 5.3.1 Calorimetria diferencial de varredura

A linha de base do perfil apresentado na figura 5.4 foi corrigida como descrito anteriormente, obtendo-se o perfil da figura 5.6. Este perfil é representativo daqueles obtidos a partir de diferentes preparações, apresentando normalmente dois picos endotérmicos: um deles centrado em torno de 50 °C (1) e outro centrado em torno de 60 °C (2). O terceiro pico situado perto de 70 °C não está presente em todas as preparações e pode ser devido a alguma impureza não identificada, portanto, não será discutido.

O desdobramento que, em alguns casos, apresenta o primeiro pico é devido a uma transição exotérmica superposta à transição endotérmica, pois, dependendo da concentração proteica (abaixo de 2 mg de prot./ml), o perfil pode atravessar a linha de base ( $C_p$  negativo). Por outro lado, essa transição exotérmica não é observada utilizando outras técnicas como a fluorescência[134]. Outros autores[38] que, mediante a técnica de DSC, também observaram essa transição, atribuem seu aparecimento à agregação das vesículas induzida pelo processo de desnaturação.

Após aquecer as amostras a 100 °C, nenhum pico é observado ao fazer uma nova varredura, indicando que sob estas condições todas as transições são irreversíveis.

A curva corrigida pode ser ajustada mediante a expressão 5.4 que prediz a forma do perfil obtido por DSC. Se existem várias transições, o perfil global é obtido por superposição dos perfis individuais. A figura 5.6 mostra a curva simulada que melhor ajusta o perfil experimental. A porção correspondente à exoterma não foi considerada ao efetuar



**Figura 5.6:** Perfil, obtido mediante DSC, típico de uma amostra de RSL em presença de  $\text{Ca}^{++}$  1 mM. A linha de base foi corrigida (perfil original na figura 5.4). A linha pontilhada representa o melhor ajuste. Os parâmetros do ajuste ( $E_a$ (KJ/mole),  $A$ ,  $\Delta H_c$ (J/g)) são, respectivamente:

para a transição 1: 603, 219,6, 14,5 ( $T_{m_1} = 49,9^\circ\text{C}$ ),

para a transição 2: 320, 109,8, 5,0 ( $T_{m_2} = 59,0^\circ\text{C}$ ).

os ajustes. O cálculo dos parâmetros das transições foi feito a partir do melhor ajuste da expressão 5.4 aos dados experimentais segundo descrito previamente. A concentração proteica escolhida (4 mg prot./ml) permite uma estimativa mais precisa dos parâmetros característicos das transições.

O perfil apresentado na figura 5.6 mostra que a  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase, em presença de  $\text{Ca}^{++}$  1 mM, desnatura-se em duas etapas. Basicamente, dois mecanismos podem ter lugar: a proteína pode sofrer duas mudanças conformacionais em forma global ou dois domínios diferentes da proteína podem sofrer mudanças conformacionais separadamente. Mediante a técnica de DSC, não é possível distinguir entre estes dois casos. No entanto, esta desvantagem da técnica é compensada pela capacidade de detetar todas as transições. Estudos por fluorescência desenvolvidos por outros autores[134], permitem

identificar estas transições como correspondendo à desnaturação de dois domínios discretos: o domínio I, que inclui os domínios funcionais de ligação de ATP, fosforilação e transdução, e o domínio II, que inclui a porção da proteína composta pelas hélices  $\alpha$  que atravessam a membrana e, provavelmente também, o domínio de ligação de  $\text{Ca}^{++}$ . Brevemente, o domínio I pode ser reconhecido medindo a intensidade de fluorescência da  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase marcada com FITC, que se liga ao resíduo de lisina localizado nesse domínio, e o domínio II medindo a fluorescência intrínseca da proteína devida à presença de resíduos de triptofano localizados principalmente na região de hélices  $\alpha$ .

### 5.3.1.1 Efeito do $\text{Ca}^{++}$ sobre a estabilidade térmica da $\text{Ca}^{++}$ -ATPase

Na figura 5.7, são apresentados perfis (com correção de linha de base) obtidos por DSC a partir de amostras de RS contendo diferentes concentrações de  $\text{Ca}^{++}$  livre.

Foram realizadas experiências de controle utilizando diferentes quantidades de  $\text{Ca}^{++}$  e de EGTA produzindo a mesma concentração de  $\text{Ca}^{++}$  livre, verificando-se que os resultados somente dependem da concentração de  $\text{Ca}^{++}$  livre.

Os parâmetros termodinâmicos  $E_a$ ,  $A$  e  $\Delta H_c$  obtidos a partir do ajuste destas curvas e a temperatura  $T_m$ , para cada transição, são apresentados na tabela 5.1. Os parâmetros  $E_a$ ,  $A$  e  $\Delta H_c$  não variam significativamente ao variar a concentração de  $\text{Ca}^{++}$ , no entanto, a presença de  $\text{Ca}^{++}$  estabiliza ambos domínios cujas temperaturas de transição aumentam ao aumentar a concentração de  $\text{Ca}^{++}$ , sendo o domínio II mais sensível à presença do cátion. Para altas concentrações de  $\text{Ca}^{++}$  (acima de 50 mM), o perfil obtido pela técnica de DSC é qualitativamente diferente, presumivelmente devido à agregação de vesículas[138], e será discutido mais adiante.

Na figura 5.8, são representadas as temperaturas de desnaturação  $T_{m_1}$  e  $T_{m_2}$  em função da concentração de  $\text{Ca}^{++}$  livre.

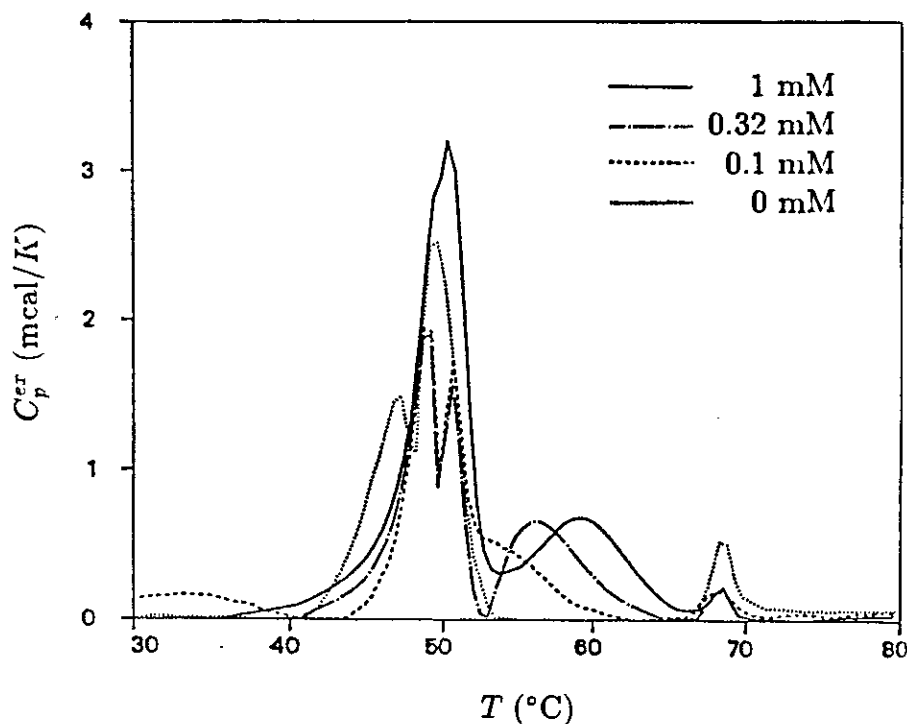


Figura 5.7: Efeito do  $\text{Ca}^{++}$  sobre os perfis, obtidos mediante DSC, de amostras de RSL. Os diferentes perfis (com a linha de base corrigida) correspondem às concentrações de  $\text{Ca}^{++}$  indicadas na figura. Outras condições experimentais segundo indicado na fig. 5.4.

[ $\text{Ca}^{++}$ ] (M)	Transição 1				Transição 2			
	$E_a$ (kJ/mol)	$A$	$\Delta H_c$ (J/g)	$T_m$ (°C)	$E_a$ (kJ/mol)	$A$	$\Delta H_c$ (J/g)	$T_m$ (°C)
0	564±16	206±6	13±2	48,8±0,1	269±19	95±7	4,4±0,3	48,2±0,2
5,3 10 <sup>-5</sup>	580	211	10	49,5	300	106	4,5±2	50,1
1,0 10 <sup>-4</sup>	650	237	8,5	49,5	250	87	5,5	52,1
3,2 10 <sup>-4</sup>	640±40	234±15	9,2±0,3	49,6±0,2	325±25	113±9	3,5±1	55,4±0,7
1,0 10 <sup>-3</sup>	599±53	218±20	11,5±3	49,8±0,2	309±34	106±12	4,0±1,6	59,0±0,9
3,2 10 <sup>-3</sup>	530	192	12	50,0	350	120	4,4	61,6
1,0 10 <sup>-2</sup>	527±3	191±2	11,2±1,2	49,9±0,1	315±35	108±12	5,7±1,1	61,7±0,6
2,6 10 <sup>-2</sup>	480	174	13	49,3	300	102	5	61,5
5,0 10 <sup>-2</sup>					350	121	2,2	59,8

Tabela 5.1: Parâmetros termodinâmicos para a desnaturação térmica da  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase em presença de  $\text{Ca}^{++}$ . A energia de ativação  $E_a$ , a constante  $A$  da relação de Arrhenius e a entalpia calorimétrica  $\Delta H_c$  são determinados a partir do ajuste dos perfis obtidos mediante DSC, segundo descrito previamente.  $T_m$ , a temperatura na qual metade do material está desnaturado, é determinada a partir dos parâmetros  $E_a$  e  $A$ . Os erros dos parâmetros de desnaturação correspondem ao desvio padrão médio dos valores obtidos para várias preparações.

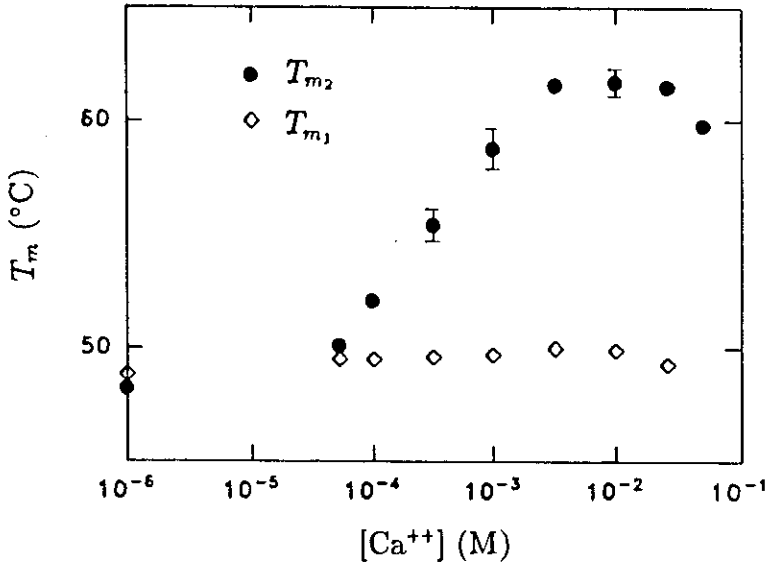
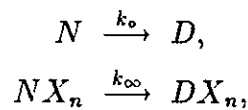


Figura 5.8: Dependência das temperaturas de desnaturação  $T_{m_1}$  e  $T_{m_2}$  com a concentração de  $\text{Ca}^{++}$  livre.

A partir dos resultados apresentados na tabela 5.1 e nas figuras 5.7 e 5.8, observa-se que as temperaturas de desnaturação  $T_{m_1}$  e  $T_{m_2}$  se deslocam em presença de  $\text{Ca}^{++}$ , sendo que, dentro da faixa de concentrações de  $\text{Ca}^{++}$  estudadas, a temperatura de desnaturação  $T_{m_2}$  sofre uma variação de mais de  $10^\circ\text{C}$ . Para extrair mais informação destes resultados, tentaremos descrever o efeito observado.

Em presença de uma substância  $X$  (como, por exemplo, o cálcio) que pode ligar-se à  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase, existem duas populações da proteína nativa correspondentes à proteína livre do ligante ( $N$ ) e à proteína com  $n$  sítios de ocupação associada ao ligante  $X$  ( $NX_n$ ). O processo de desnaturação de cada uma das duas formas ( $N$  e  $NX_n$ ) pode ser descrito segundo:



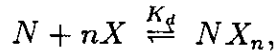
onde as respectivas constantes de desnaturação  $k_o$  e  $k_{\infty}$  dependem da temperatura através de relações análogas à descrita na equação 5.2:

$$k_o(T) = e^{A_o - E_{a,o}/RT} = e^{A_o \frac{T - T_{c,o}}{T}}, \quad (5.7)$$

$$k_{\infty}(T) = e^{A_{\infty} - E_{a,\infty}/RT} = e^{A_{\infty} \frac{T - T_{c,\infty}}{T}}. \quad (5.8)$$



Nos casos extremos em que a substância  $X$  esteja ausente ou em concentrações que garantam a saturação dos sítios da proteína, unicamente uma das duas espécies da proteína nativa ( $N$  ou  $NX_n$ ) está presente. Nesses casos, interessa só uma das duas equações e o problema se reduz ao descrito anteriormente. Para concentrações intermediárias, consideraremos que o processo de associação da substância  $X$  à proteína nativa pode ser descrito por:



onde  $n$  é o grau de cooperatividade e  $K_d$  a constante de equilíbrio dada por

$$K_d = \frac{[N][X]^n}{[NX_n]}.$$

Em primeira aproximação, podemos supor que a variação da constante  $K_d$  com a temperatura é desprezível na faixa das transições de fase. Como foi utilizada uma solução tampão de Ca/EGTA, podemos considerar que  $\frac{d[X]}{dt} = 0$ . Levando em conta, também, que

$$\begin{aligned} \frac{d[N(t)]}{dt} &= -k_o(T(t)) [N(t)], \\ \frac{d[NX_n(t)]}{dt} &= -k_\infty(T(t)) [NX_n(t)], \end{aligned}$$

a concentração total de proteína no estado nativo em função do tempo é dada por:

$$\begin{aligned} \frac{d([N] + [NX_n])}{dt} &= -(k_o + k_\infty [X]^n / K_d) [N] \\ &= -\frac{k_o + k_\infty [X]^n / K_d}{1 + [X]^n / K_d} ([N] + [NX_n]). \end{aligned} \quad (5.9)$$

Resolvendo esta equação numericamente, para valores dos parâmetros similares aos calculados a partir dos dados experimentais, e considerando a expressão para  $C_p^{ex}$ , obtemos um perfil similar aos das espécies puras, tal que a temperatura correspondente ao máximo da curva pertence ao intervalo definido pelas temperaturas dos máximos dos perfis das formas puras.

Definindo  $T_c$ , como a temperatura na qual a constante de desnaturação efetiva

$\frac{(k_o+k_\infty)[X]^n/K_d}{1+[X]^n/K_d}$  é unitária, obtemos uma equação que relaciona  $T_c$  com a concentração da substância  $X$  e com os parâmetros característicos da transição de cada uma das duas populações:

$$e^{A_o \frac{T_c - T_{c,o}}{T_c}} + e^{A_\infty \frac{T_c - T_{c,\infty}}{T_c}} [X]^n / K_d = 1 + [X]^n / K_d \quad (5.10)$$

Na figura 5.9 são representados os valores de  $T_{c_2}$ , obtidos a partir dos dados experimentais, em função da concentração de  $\text{Ca}^{++}$  livre e o ajuste da expressão 5.10 a esses valores, sendo os parâmetros do ajuste  $K_a = (K_d)^{1/n}$  e  $n$ . O melhor ajuste é obtido para  $n = 0,95 \pm 0,3$ , indicando ausência de cooperatividade, e para a constante de dissociação aparente  $K_a = 8,1 \times 10^{-5}$  M ( $\text{p}K_a = 4,1$ ). Os valores dos parâmetros  $A_o$ ,  $A_\infty$ ,  $T_{c,o}$  e  $T_{c,\infty}$  utilizados para efetuar o ajuste são os valores obtidos a partir das curvas experimentais (tabela 5.1). Utilizando valores extremos destes parâmetros (dentro da faixa de erro), para efetuar o ajuste, os valores de  $K_a$  e  $n$  obtidos encontram-se dentro da faixa de erro a eles atribuída.

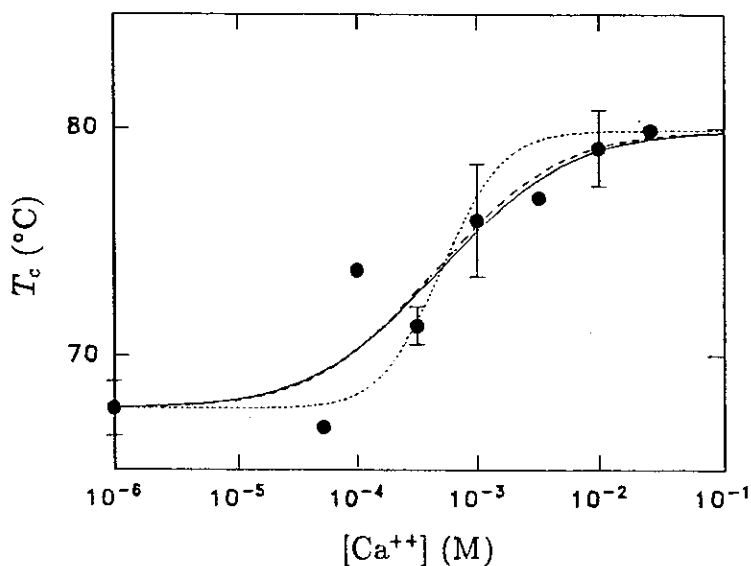


Figura 5.9: Dependência da temperatura crítica  $T_{c_2}$  com a concentração de  $\text{Ca}^{++}$  livre. A curva contínua corresponde ao melhor ajuste, curvas para outros valores dos parâmetros de ajuste ( $\text{p}K_a$  e  $n$ ) são mostradas para comparação. (—):  $\text{p}K_a=4,1$ ,  $n = 0,95$ , (---):  $\text{p}K_a=4,0$ ,  $n = 1$ , (.....):  $\text{p}K_a=3,65$ ,  $n = 2$ .

### 5.3.1.2 Efeito da dibucaína sobre a estabilidade térmica da $Ca^{++}$ -ATPase

Na figura 5.10 é apresentado um perfil, com correção da linha de base, característico de amostras de RSL contendo 1 mM  $Ca^{++}$  e dibucaína (0,5 mM, neste caso). Na mesma figura, apresenta-se, também, o melhor ajuste à curva experimental. Podemos observar que a dibucaína desloca a temperatura  $T_m$  de ambas transições para valores menores e que o segundo pico é mais sensível à presença da droga que parece compensar o efeito estabilizador do  $Ca^{++}$ .

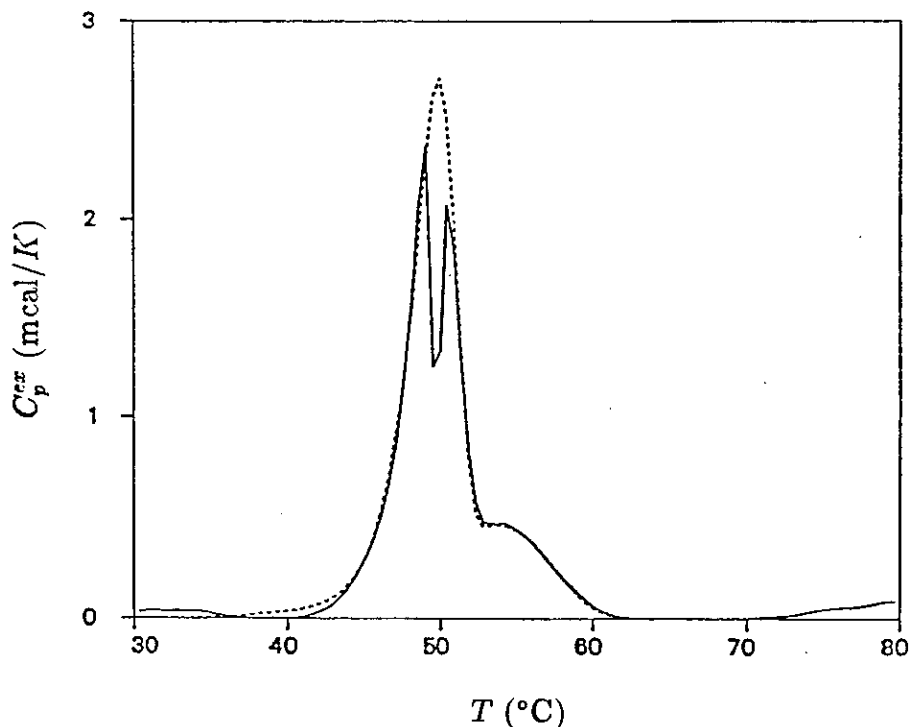
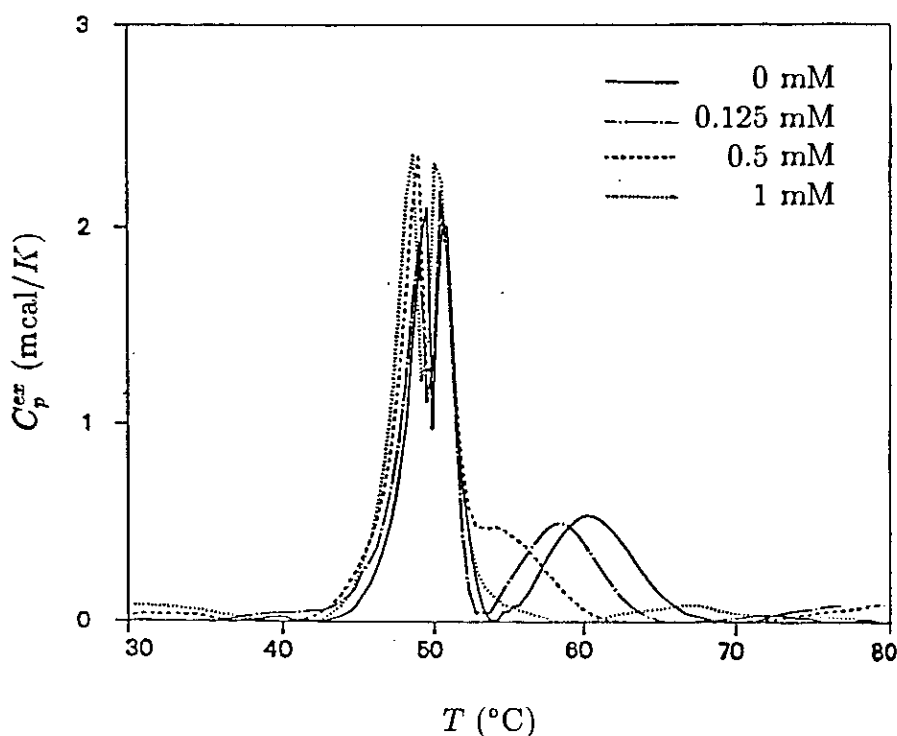


Figura 5.10: Perfil, obtido mediante DSC, típico de uma amostra de RSL em presença de  $Ca^{++}$  1 mM e de dibucaína (0,5 mM). A linha de base foi corrigida, outras condições experimentais segundo indicado na figura 5.4. A linha pontilhada representa o melhor ajuste. Os parâmetros do ajuste ( $E_a$ (KJ/mole),  $A$ ,  $\Delta H_c$ (J/g)) são, respectivamente: para a transição 1: 600, 218,8, 11,5 ( $T_{m_1} = 49,4^\circ\text{C}$ ), para a transição 2: 300, 104,8, 4,0 ( $T_{m_2} = 53,8^\circ\text{C}$ ).

A concentração de  $\text{Ca}^{++}$  escolhida (1 mM) é maior que a concentração do cátion na maioria das células reais, no entanto, sob estas condições, o domínio II é estabilizado e, conseqüentemente, as transições dos dois diferentes domínios na proteína podem ser separadas. Entretanto, em ausência de  $\text{Ca}^{++}$  ambas transições estariam superpostas e a ATPase aparentaria desnaturar-se como uma só unidade. Portanto, desta forma, é possível determinar mediante esta técnica que domínios da proteína e em que grau estes domínios estão sendo afetados pela presença da droga.

Os perfis com correção de linha de base obtidos utilizando amostras de RSL em presença de  $\text{Ca}^{++}$  1 mM e de diferentes concentrações de dibucaína são apresentados na figura 5.11.



**Figura 5.11:** Efeito da dibucaína sobre o perfil, obtido mediante DSC de amostras de RSL em presença de  $\text{Ca}^{++}$  1 mM. Os diferentes perfis (com linha de base corrigida) correspondem às concentrações de dibucaína indicadas na figura. Outras condições experimentais segundo a fig. 5.4.

Assim como no caso anterior, não foi encontrada nenhuma alteração significativa nos parâmetros  $E_a$ ,  $A$  e  $\Delta H_c$  (tabela 5.2). Um gráfico das temperaturas de desnaturação  $T_{m_1}$  e  $T_{m_2}$  vs. a concentração total de dibucaína é apresentado na figura 5.12.

$[droga]_T$ (mM)	Transição 1				Transição 2			
	$E_a$ (kJ/mol)	$A$	$\Delta H_c$ (J/g)	$T_m$ (°C)	$E_a$ (kJ/mol)	$A$	$\Delta H_c$ (J/g)	$T_m$ (°C)
0	599±53	218±20	11,5±3	49,8±0,2	309±34	106±12	4,0±1,6	59,0±0,9
0,125	573±77	209±29	11,1±1,6	49,9±0,1	301±50	104±18	3,0±0,6	57,6±0,7
0,25	593±49	216±22	10,9±2,1	49,8±0,4	293±51	102±18	2,7±0,9	55,5±1,5
0,5	600	219	11,5	49,7±0,3	300	105	4,0	52,6±0,9
1,0	600	219	9,5	49,7±0,1	340	121	3,5	49,8±0,1
2,0	650	238	14	49,2	300	107	3,5	48,4
4,0	600	220	11,5	47,9	350	126	2,8	47,9

**Tabela 5.2:** Parâmetros termodinâmicos para a desnaturação térmica da  $Ca^{++}$ -ATPase em presença de  $Ca^{++}$  1 mM e de dibucaína. A energia de ativação  $E_a$ , a constante  $A$  da relação de Arrhenius e a entalpia calorimétrica  $\Delta H_c$  são determinados a partir do ajuste dos perfis obtidos mediante DSC, segundo descrito previamente.  $T_m$ , a temperatura na qual metade do material está desnaturado, é determinada a partir dos parâmetros  $E_a$  e  $A$ . Os erros dos parâmetros de desnaturação correspondem ao desvio padrão médio dos valores obtidos para várias preparações.

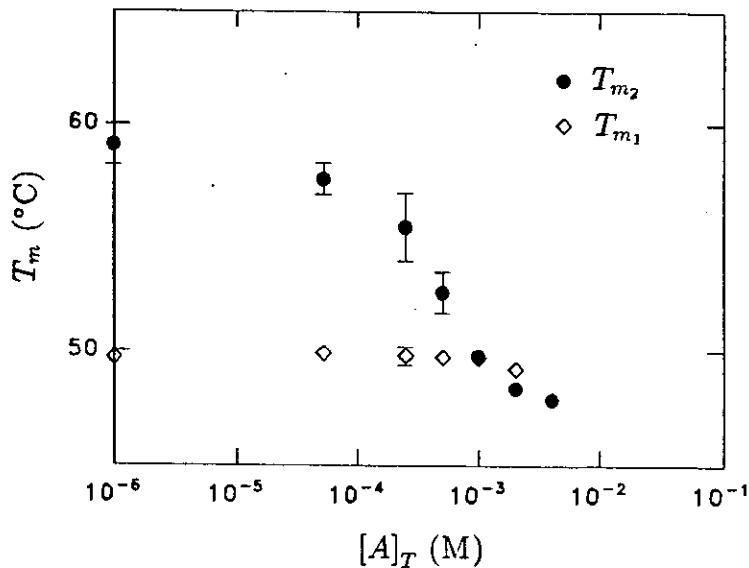
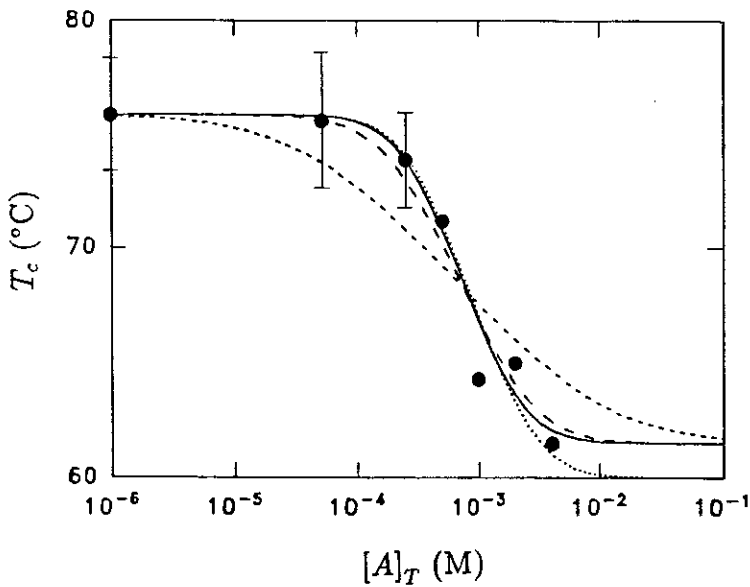


Figura 5.12: Dependência das temperaturas de desnaturação  $T_{m_1}$  e  $T_{m_2}$  com a concentração total de dibucaína ( $[A]_T$ ).

Na figura 5.13 são representados os valores de  $T_{c_2}$ , obtidos a partir dos dados experimentais, em função da concentração total de dibucaína e o ajuste da expressão 5.10 a esses valores, sendo os parâmetros do ajuste  $K_a$  e  $n$ . Neste caso, o melhor ajuste é obtido para  $n = 2,4 \pm 0,3$  e para a constante de dissociação aparente  $K_a = 2,0 \times 10^{-3}$  M ( $pK_a = 2,7 \pm 0,2$ ).



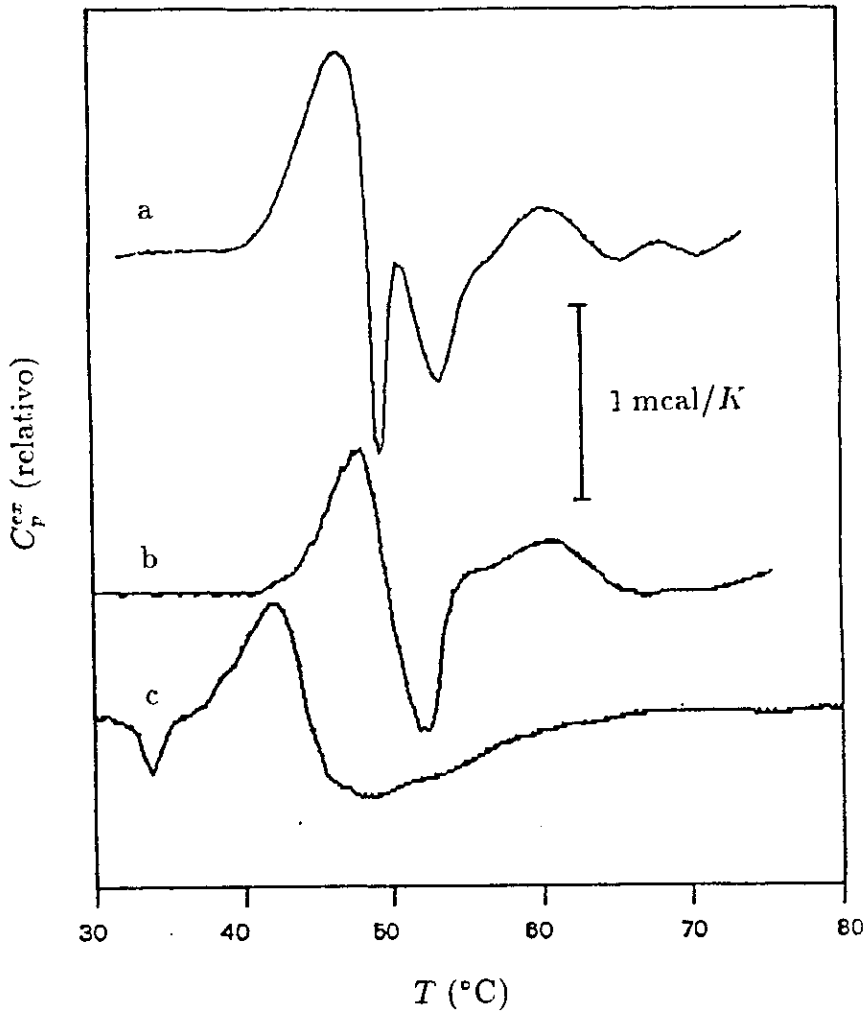
**Figura 5.13:** Dependência da temperatura crítica  $T_{c_2}$  com a concentração total de dibucaína ( $[A]_T$ ). A curva contínua corresponde ao melhor ajuste, curvas para outros valores dos parâmetros de ajuste ( $pK_a$  e  $n$ ) foram também graficadas para comparação. (—):  $pK_a=2,7$ ,  $n = 2,4$ , (- -):  $pK_a=2,6$ ,  $n = 2$ ,(---):  $pK_a=2,0$ ,  $n = 1$ , (— · —):  $pK_a=2,6$ ,  $n = 2,4$ , considerando um valor de  $T_{c,\infty}$   $1,5^\circ\text{C}$  inferior ao valor considerado nos casos anteriores.

Como a dibucaína se adsorve nas membranas do retículo sarcoplasmático, para interpretar a curva da figura 5.13, deve ser calculada a concentração de droga na membrana. Para uma solução tampão similar à utilizada neste trabalho, com força iônica da mesma ordem de grandeza (0,1 M) a pH aprox. 7, outros autores acharam  $K_p=0,75$ [38] e que este valor é constante na faixa 0-6,5 mg prot./ml, para concentrações da droga até aproximadamente 1 mM. Este valor de  $K_p$  é inferior ao que corresponde a membranas de lipídios puros[85,139], provavelmente, devido à presença de proteínas que fazem com que

os lipídios de membrana sejam menos acessíveis à droga. A concentração de dibucaína livre, calculada com esse valor de  $K_p$ , pode ser considerada praticamente igual à concentração total.

Para concentrações superiores a 4 mM, os perfis de DSC são tais que sugerem que a droga age como detergente. Para essas concentrações da droga, a suspensão de RS normalmente turbida vira transparente. Este efeito é devido provavelmente à formação de micelas da droga que podem provocar o rompimento da membrana, segundo foi observado já para a tetracaína[11].

Experimentos mediante DSC em que as membranas de RS foram solubilizadas com detergentes (ácido cólico, DOC e NP40) mostram que, sob estas condições a temperatura de transição  $T_{m_2}$  praticamente não é alterada, entretanto, a temperatura crítica  $T_{m_1}$  diminui vários graus. Além do mais, uma transição exotérmica aparece acima de 50°C. Na figura 5.14 são apresentados perfis de amostras de RS em presença de a) ácido cólico e  $\text{Ca}^{++}$  1 mM, b)  $\text{Ca}^{++}$  50 mM e c) dibucaína 8 mM e  $\text{Ca}^{++}$  1 mM. Pode-se observar que o  $\text{Ca}^{++}$  em concentração 50 mM provoca, sobre o perfil, um efeito similar ao produzido pelo ácido cólico, diferindo só na exoterma estreita a  $\sim 50^\circ\text{C}$ . A dibucaína, em concentração 8 mM, tem um efeito sobre o perfil que difere dos provocados por concentrações menores, entretanto, este perfil é qualitativamente similar ao obtido utilizando uma amostra de RS contendo  $\text{Ca}^{++}$  1 mM, dibucaína 250  $\mu\text{M}$  e ácido cólico (2mg/ml). Assim mesmo, este efeito é diferente dos produzidos pelo  $\text{Ca}^{++}$  50 mM e pelo ácido cólico em presença de  $\text{Ca}^{++}$  1 mM, possivelmente devido a que a droga não somente desestabiliza a proteína a partir da alteração da estrutura lipídica senão também por ação direta sobre sítios na enzima.



**Figura 5.14:** Perfis, obtidos por DSC, utilizando amostras de RS (4mg prot./ml) contendo: a)  $\text{Ca}^{++}$  1 mM + ácido cólico 2 mg/ml, b)  $\text{Ca}^{++}$  50 mM e c)  $\text{Ca}^{++}$  1 mM + dibucaína 8 mM. Este último perfil é similar ao obtido para uma amostra de RS contendo  $\text{Ca}^{++}$  1 mM, dibucaína 250  $\mu\text{M}$  e ácido cólico 2mg/ml.



### 5.3.2 Medidas de inativação

A inativação térmica do transporte de  $\text{Ca}^{++}$ , em presença de 1 mM  $\text{Ca}^{++}$ , para diferentes concentrações de dibucaína, foi determinada medindo a atividade após exposição a temperaturas que provocam inativação, para diferentes tempos de incubação. Na figura 5.15, são apresentadas as curvas correspondentes ao transporte de  $\text{Ca}^{++}$  vs. tempo de exposição, para diferentes concentrações de dibucaína.

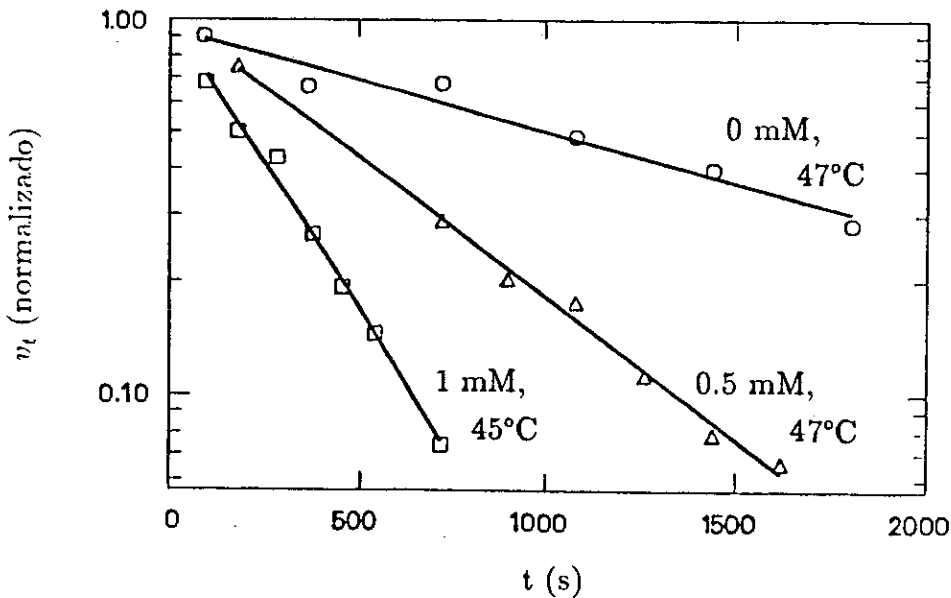


Figura 5.15: Inativação térmica do transporte de  $\text{Ca}^{++}$  para amostras de RSL em 10 mM TES (pH 7), 100 mM KCl, 5 mM DTT,  $\text{Ca}^{++}$  1 mM e dibucaína. As concentrações de dibucaína e as temperaturas de exposição são indicadas na figura.

As velocidades de inativação ( $k_i$ ) foram calculadas a partir destas curvas mediante a análise de regressão linear. A partir da análise linear dos gráficos de Arrhenius (ver figura 5.16), obtidos repetindo as experiências para diferentes temperaturas de inativação, podem ser achados os valores dos parâmetros  $E_a$  e  $A$  e, com eles,  $T_m$ , valores apresentados na tabela 5.3. Nesta tabela são incluídos, também, valores dos parâmetros da inativação da hidrólise de ATP obtidos pelo Prof. J. R. Lepock (Department of Physics, University of Waterloo, Canadá), segundo o método descrito na referência [134]. A solução e a concentração proteica durante a inativação são as mesmas que para as experiências de DSC e de inativação do transporte de  $\text{Ca}^{++}$ .

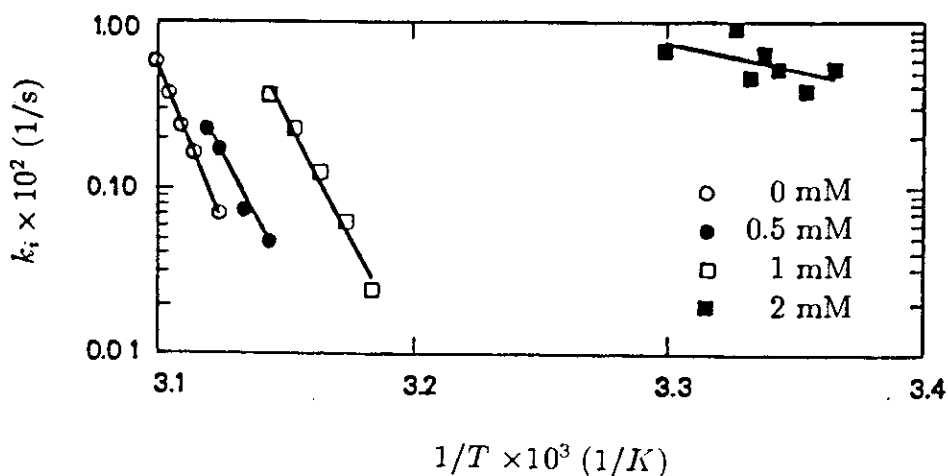


Figura 5.16: Gráficos de Arrhenius da inativação do transporte de  $\text{Ca}^{++}$  para diferentes concentrações de dibucaína (indicadas na figura).

[droga] <sub>T</sub> (M)	Transporte de $\text{Ca}^{++}$			Hidrólise de ATP		
	$E_a$ (KJ/mol)	$A$	$T_m$ (°C)	$E_a$ (KJ/mol)	$A$	$T_m$ (°C)
0	685±58	250±20	50,5±0,3	637±35	232±21	51,2±0,4
0,5	532	194	49,5	561	205	51,3
1,0	599±45	222±18	45,1	632	230	50,4
1,8	234	84	37,5			
2,0	62	20	9,2	665	240	48,6

Tabela 5.3: Parâmetros termodinâmicos para a inativação térmica da  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase em presença de dibucaína. A solução tampão e a concentração proteica, durante a inativação, são as mesmas que para as experiências de DSC.

Tanto o transporte de  $\text{Ca}^{++}$  quanto a hidrólise de ATP são desestabilizados em presença de dibucaína, consistentemente com os resultados obtidos mediante a técnica de DSC. Entretanto, o transporte é mais sensível à presença de dibucaína que a hidrólise de ATP (ver tabela 5.3). Conseqüentemente, assim como em ausência de  $\text{Ca}^{++}$  [134], em presença de dibucaína, o grau de acoplamento entre o transporte iônico e a hidrólise de ATP é pequeno. Em presença de  $\text{Ca}^{++}$  1 mM, a dibucaína compensa qualitativamente

o efeito estabilizador do  $\text{Ca}^{++}$ , desacoplando a hidrólise de ATP do transporte.

Na figura 5.17 é apresentado um gráfico dos valores da temperatura  $T_{m_1}$ , de desnaturação térmica do domínio I (obtido por DSC) e das temperaturas críticas de inativação do transporte de  $\text{Ca}^{++}$  e da hidrólise de ATP em função da concentração total de dibucaína. A curva correspondente à inativação da hidrólise de ATP coincide com a curva para a desnaturação do domínio I (transição 1). Por outro lado, os parâmetros termodinâmicos apresentados na tabela 5.3 são comparáveis aos obtidos para a primeira transição (desnaturação do domínio I) dos perfis obtidos mediante DSC. A inativação do transporte de  $\text{Ca}^{++}$  não corresponde a nenhuma mudança conformacional na proteína detetável mediante a técnica de DSC. A temperatura de inativação para o transporte decai abruptamente para concentrações da droga em torno de 2 mM. O valor da temperatura de inativação  $9^\circ\text{C}$ , fora da faixa de temperaturas em que foi estudada a inativação, pode ser pouco realista, porém, é indicador de um efeito que pode estar relacionado com o comportamento detergente da droga discutido previamente.

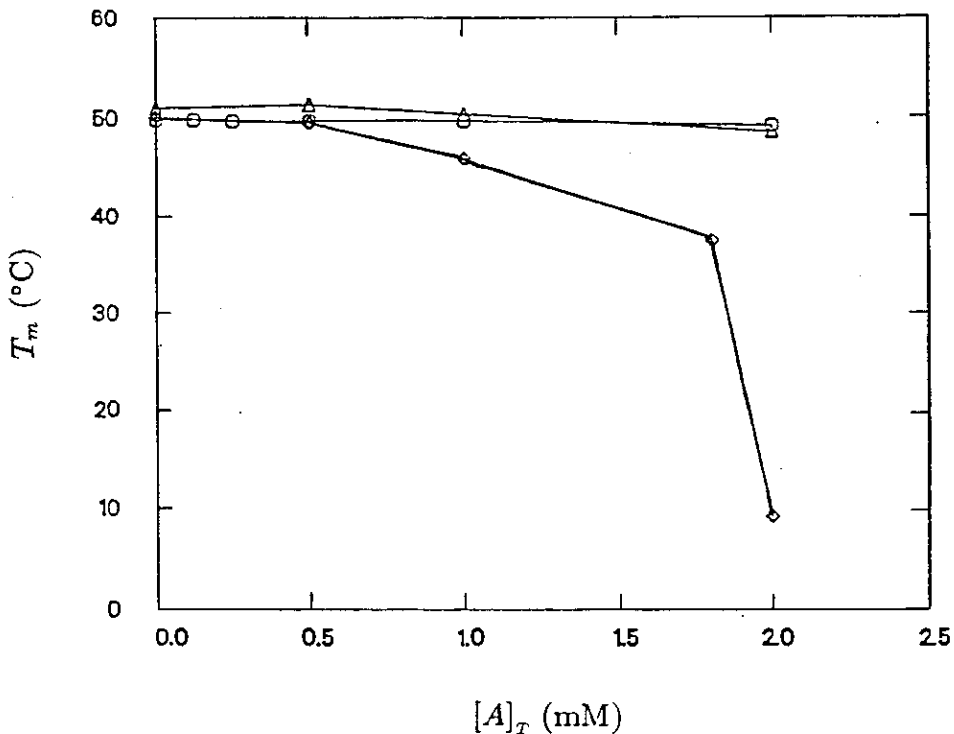


Figura 5.17: Temperaturas críticas de inativação do transporte de  $\text{Ca}^{++}$  ( $\diamond$ ) e da hidrólise de ATP ( $\Delta$ ), e temperatura de desnaturação  $T_{m_1}$  ( $O$ ), vs concentração total de dibucaína ( $[A]_T$ ).

### 5.3.3 Discussão

A  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase do retículo sarcoplasmático apresenta diversas classes de sítios de ligação de  $\text{Ca}^{++}$ , caracterizados pela afinidade, capacidade, grau de cooperatividade e especificidade. Os sítios de alta afinidade, com  $pK_a$  na faixa entre 6,3 e 6,9, são específicos para o  $\text{Ca}^{++}$  e apresentam um comportamento cooperativo, com  $n \simeq 2$ [140-143]. Outros sítios, com afinidades intermediária e baixa, também estão presentes na proteína. A ligação a estes sítios é não cooperativa com valores de  $pK_a$  entre 4,3 e 4,8, para os sítios de afinidade intermediária, e aprox. 3, para os sítios de baixa afinidade[144-147]. Estes últimos são não específicos e podem ser saturados com  $\text{Mg}^{++}$  ou  $\text{K}^+$ . Além do mais, a ligação do  $\text{Ca}^{++}$  aos sítios de alta afinidade ativa a hidrólise de ATP, entretanto, a ligação aos sítios de baixa afinidade provoca a inibição da ATPase[142]. Os sítios intermediários, aparentemente, não estão associados à regulação da atividade enzimática[142].

Em ausência de  $\text{Ca}^{++}$ , a  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase desnatura-se aparentemente como uma só unidade. Entretanto, em presença de  $\text{Ca}^{++}$ , os domínios I e II são estabilizados de tal modo que a desnaturação de cada domínio pode ser detetada separadamente. Neste caso, a temperatura de desnaturação do domínio I é deslocada até aprox.  $1^\circ\text{C}$ , enquanto, a temperatura de desnaturação do domínio II é deslocada até aprox.  $13^\circ\text{C}$ . A ausência de cooperatividade ( $n \simeq 1$ ) e o valor de  $pK_a$  (3,9), achados a partir do ajuste da curva da figura 5.9, sugerem que a estabilização do domínio II da  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase pelo  $\text{Ca}^{++}$  tem lugar mediante ligação a sítios não cooperativos de afinidade baixa ou intermediária. Se o  $\text{Ca}^{++}$  estabilizasse um domínio da proteína através de ligação a sítios de baixa afinidade (não específicos), então, outros cátions, como  $\text{Mg}^{++}$  e  $\text{K}^+$ , deveriam produzir um efeito semelhante. Um estudo variando a concentração destes íons permitiria verificar essa conclusão.

A dibucaína, aparentemente, contrabalança o efeito do  $\text{Ca}^{++}$ . Para diferentes concentrações de dibucaína, a temperatura crítica para a inativação da hidrólise de ATP é próxima da temperatura  $T_{m_1}$  de desnaturação do domínio I da  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase (figura 5.17). Por outro lado, a energia da desnaturação do domínio I é similar à energia de inativação

da hidrólise de ATP. Conseqüentemente, a inativação da hidrólise de ATP pode ser devida à desnaturação do domínio I.

A inativação do transporte, em presença de dibucaína, aparentemente não corresponde a nenhuma mudança conformacional da  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase detetável mediante DSC, já que, mesmo se a energia de ativação é similar à achada para a inativação da hidrólise de ATP e para a desnaturação do domínio I, a temperatura crítica para a inativação do transporte é menor que as temperaturas de transição detetadas. Para altas concentrações de dibucaína (acima de 2 mM), existe uma queda abrupta na energia de ativação que pode estar relacionada com algum efeito da droga sobre a fluidez da membrana como conseqüência do comportamento detergente.

A temperatura  $T_{m_2}$  é sempre maior que  $T_{m_1}$  e, no caso menos favorável (ausência de  $\text{Ca}^{++}$  ou presença de dibucaína), ambos domínios se desnaturam juntos, indicando que, de algum modo, a estabilidade do domínio I contribui a proteger o domínio II. Os sítios de ligação do  $\text{Ca}^{++}$  estabilizante podem estar localizados em alguma região que conecta ambos domínios, provavelmente o domínio de ligação de  $\text{Ca}^{++}$  indicado na figura 5.3. Presumivelmente, o  $\text{Ca}^{++}$  enrijece este domínio protegendo os domínios I e II da desnaturação.

Por outro lado, em presença de  $\text{Ca}^{++}$  e ausência de dibucaína, o transporte do cátion está fortemente acoplado à hidrólise de ATP relacionada com o estado do domínio I. Entretanto, em presença de dibucaína (tabela 5.3), assim como em ausência de  $\text{Ca}^{++}$ [134], a temperatura de inativação do transporte decai muito mais do que a temperatura de inativação da hidrólise de ATP. Isto sugere que existe uma interação fraca entre os correspondentes domínios, apesar de ser necessária, já que a atividade enzimática requer comunicação entre eles. Se o desacoplamento fosse devido a uma mudança conformacional na proteína, deveria tratar-se de uma transição de entalpia muito baixa (correspondendo, provavelmente, a algum domínio pequeno) não detetável mediante DSC como uma transição separada. Uma outra explicação possível para o aparente desacoplamento entre transporte e hidrólise de ATP é o aumento da permeabilidade da membrana ao  $\text{Ca}^{++}$ , no entanto, perdas ou liberação do íon têm uma energia de ativação menor que a observada mediante estas técnicas[134], podendo ser o caso, só

para concentrações de dibucaína acima de 2 mM.

A partir dos dados representados na figura 5.13, foi achado  $n \simeq 2,4$  e  $pK_a \simeq 2,7$ . Estes resultados sugerem que a desestabilização do domínio II pela dibucaína possa ser consequência da sua ligação a sítios na enzima. Nota-se que a concentração total de dibucaína para produzir um deslocamento em  $T_{m_2}$  igual à metade do deslocamento máximo é da mesma ordem que os valores encontrados para a inibição da  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase[89,124], que também correspondem às doses farmacológicas.

Por outro lado, possíveis efeitos de carga também devem ser considerados. Sob as condições experimentais deste trabalho (pH 7), as formas neutra e catiônica da dibucaína podem coexistir, já que o  $pK_i$  da droga em solução aquosa é aproximadamente 8-8,5[2,55,85,139]. Como a adsorção da forma carregada aumenta a densidade superficial de carga, então, a concentração de  $\text{Ca}^{++}$  perto da superfície da membrana será reduzida, de modo tal que os sítios de ligação responsáveis pela estabilização da enzima seriam mais dificilmente atingidos pelo íon. Isto poderia explicar os efeitos aparentemente opostos produzidos pelo  $\text{Ca}^{++}$  e pela droga. Entretanto, as estimativas da variação do potencial superficial levam a concluir que os efeitos de carga não são responsáveis pelos efeitos observados. Por exemplo, para 0,5 mM de dibucaína, se o deslocamento em  $T_{m_2}$  fosse devido exclusivamente à diminuição da concentração local de  $\text{Ca}^{++}$ , então a concentração de  $\text{Ca}^{++}$  perto do sítio de ligação deveria ser 0,13 mM (em vez de 1 mM). Para que a concentração local alcance esse valor, o potencial deveria ter sofrido uma variação de 26 mV no sítio de ligação que, provavelmente, está distante da interface onde a variação do potencial superficial deveria ser ainda maior. Por outro lado, considerando que o potencial superficial é da ordem de 30 mV, estimou-se que a variação do potencial no sítio de ligação devida à presença de dibucaína é menor que 1 mV[38,148]. Portanto, os efeitos de carga são pequenos para serem os únicos responsáveis pela perda de estabilidade.

As alterações na fluidez da membrana são importantes só, aparentemente, para concentrações da droga acima de 2 mM, mas a possível alteração da organização dos lipídios anulares deve ser considerada. Outros autores[38] que também estudaram os efeitos da dibucaína sobre a estabilidade da  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase, sugerem que a desnaturação está rela-

cionada com a ruptura do anel lipídico em torno da proteína. Esta hipótese é consistente com o fato de que o domínio II (transmembranar) seja o mais afetado pela presença de dibucaína. No entanto, a possibilidade de que existam outros sítios de ligação na proteína também deve ser considerada.

## Capítulo 6

# Estudo comparativo dos efeitos de n-álcoois e de anestésicos locais sobre a $\text{Ca}^{++}$ -ATPase do retículo sarcoplasmático

Os efeitos estruturais e dinâmicos de distintos fármacos sobre as proteínas podem ser estudados mediante a técnica de RPE, utilizando-se marcadores nitroxido derivados da maleimida[17]. Estes marcadores se ligam covalentemente aos grupos -SH presentes nos resíduos de cisteína, permitindo estudar as regiões vizinhas a esses grupos.

Em particular, pode ser estudada mediante esta técnica a  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase do retículo sarcoplasmático cuja estrutura já foi descrita no capítulo 5. A partir da análise da seqüência de amino-ácidos[149,150], observa-se que a  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase contém 24 resíduos de cisteína localizados segundo o esquema da fig. 6.1.



Na fig. 6.3, é apresentada a estrutura molecular dos marcadores paramagnéticos derivados da maleimida utilizados neste trabalho: MSL110 a MSL114.

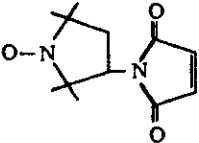
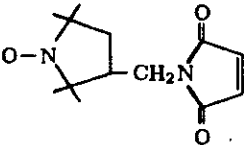
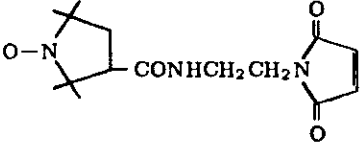
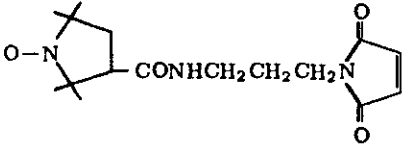
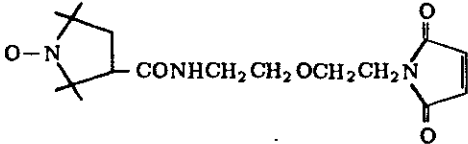
<p>MSL110</p> <p><math>C_{12}H_{17}N_2O_3</math> PM 237,3</p>	
<p>MSL111</p> <p><math>C_{13}H_{19}N_2O_3</math> PM 251,3</p>	
<p>MSL112</p> <p><math>C_{15}H_{22}N_3O_4</math> PM 308,4</p>	
<p>MSL113</p> <p><math>C_{16}H_{24}N_3O_4</math> PM 322,4</p>	
<p>MSL114</p> <p><math>C_{17}H_{26}N_3O_5</math> PM 352,4</p>	

Figura 6.3: Radicais nitróxido derivados da maleimida.

## 6.1 Preparação de amostras

As vesículas de RS utilizadas foram preparadas, segundo um método basicamente similar ao descrito no capítulo 5, no Laboratório de L. de Meis (Departamento de Bioquímica, UFRJ) e armazenadas em nitrogênio líquido. Estas preparações são ricas em  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase que constitui mais de 95% da composição proteica. A  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase do RS foi marcada, alternativamente, com os diferentes radicais derivados da maleimida, em relação molar marcador:proteína, normalmente, na faixa 2:1 a 4:1. Em torno de 1 ml da solução de vesículas de RS, em concentração da ordem de 30 mg de prot./ml, foi adicionado a uma alíquota apropriada da solução estoque do marcador em etanol (10 mM), depois de evaporado o solvente. As vesículas foram incubadas em presença do marcador durante um tempo mínimo de 24 h. a 8°C. Para eliminar o excesso de marcador livre, as amostras marcadas foram centrifugadas durante 20 min a 17.000 rpm e resuspendidas na solução tampão de trabalho (Hepes 20 mM a pH 7,4, com ou sem KCl), duas vezes. Medindo-se o sinal de RPE do sobrenadante após a primeira lavagem, encontrou-se que, para as amostras marcadas com razão molar sonda:proteína menor que 4:1, a quantidade de marcador livre correspondia a aproximadamente 10% da quantidade total de marcador adicionado.

Os anestésicos locais, em diferentes concentrações, foram incorporados evaporando-se o solvente de uma quantidade apropriada da solução estoque da droga em etanol (10 mM) e adicionando-se a solução de vesículas. Nestes casos, assim como no caso do butanol incorporado diretamente, as amostras foram agitadas com vórtice durante 1 min. e incubadas durante 2 h..

Foram utilizadas, também, amostras de albumina e de hemoglobina marcadas. Nestes casos, o excesso de marcador foi eliminado por filtração em coluna (Sephadex G-20, Sigma).

Para as medidas de RPE, as amostras de RS foram colocadas em microtubos e centrifugadas, eliminando-se o sobrenadante. Os espectros foram adquiridos num espectrômetro de banda X Varian E-9 operado na banda X de frequências, com uma potência de microonda de 10 mW e modulação de 100 KHz (1 G) a temperatura ambiente.

## 6.2 Análise espectral

Os espectros adquiridos foram normalizados à mesma integral dupla, após correção da linha de base. Para cada série de medidas, os perfis normalizados foram analisados segundo o método de subtração espectral, utilizando o programa EPRANALA. Como referência para efetuar as subtrações e determinar o parâmetro  $f$  definido abaixo, foi considerada uma série de espectros obtida a partir de amostras de MSL111 em uma solução de glicerol a diferentes temperaturas (de  $-16^{\circ}\text{C}$  até  $31^{\circ}\text{C}$ ), série esta proporcionada pela Prof. Sônia Louro (PUC/RJ).

## 6.3 Resultados

Em amostras de retículo sarcoplasmático (RS) marcadas, observamos os efeitos da presença das diferentes drogas (dibucaína, tetracaína e butanol) sobre o espectro de RPE. Este estudo foi repetido para vários dos marcadores da família de derivados da maleimida.

Na figura 6.4 são apresentados os espectros normalizados à mesma integral dupla obtidos a partir de amostras de RS marcadas com MSL114, contendo diferentes concentrações de butanol. Dos espectros normalizados correspondendo a amostras contendo o álcool, foi subtraída uma certa fração ( $f$ ) do espectro da amostra controle (em ausência do álcool), obtendo-se os perfis da figura 6.5. Observa-se que os espectros resultantes da subtração têm um perfil comparável ao do espectro de RPE do marcador MSL111 em glicerol a  $0^{\circ}\text{C}$ , também apresentado nessa figura.

Espectros de amostras de RS marcadas com MSL110, contendo diferentes concentrações de butanol, são apresentados na figura 6.6. Observa-se que este marcador é mais imobilizado que o MSL114 devido à estrutura molecular menos flexível (ver fig. 6.3), entretanto, também neste caso a presença de butanol induz alterações no espectro do marcador. Os espectros da fig. 6.6 são analisados da mesma forma que no caso anterior, sendo apresentados os espectros subtraídos na figura 6.7. Neste caso os perfis produto da subtração podem ser comparados com o espectro do marcador MSL111 imobilizado a  $\sim -22^{\circ}\text{C}$ .

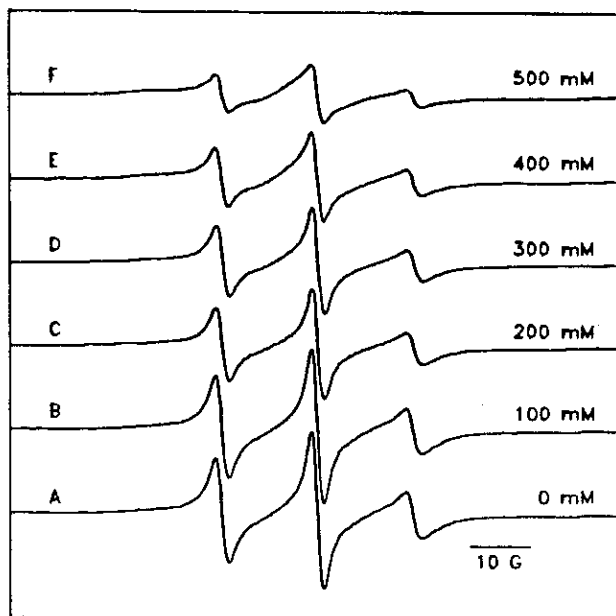


Figura 6.4: Efeito do butanol sobre os espectros de RPE de amostras de  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase do RS marcada com MSL114, em Hepes 20 mM, KCl 100 mM a pH 7,4. A relação molar marcador:proteína é 3:1. A concentração de butanol é indicada na figura.

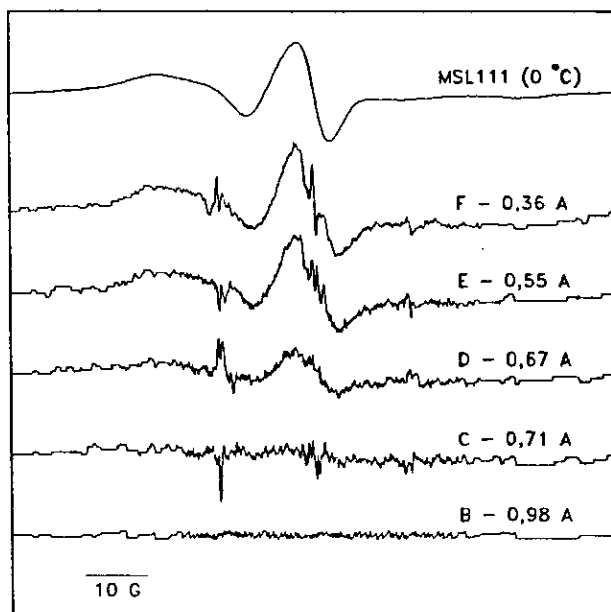
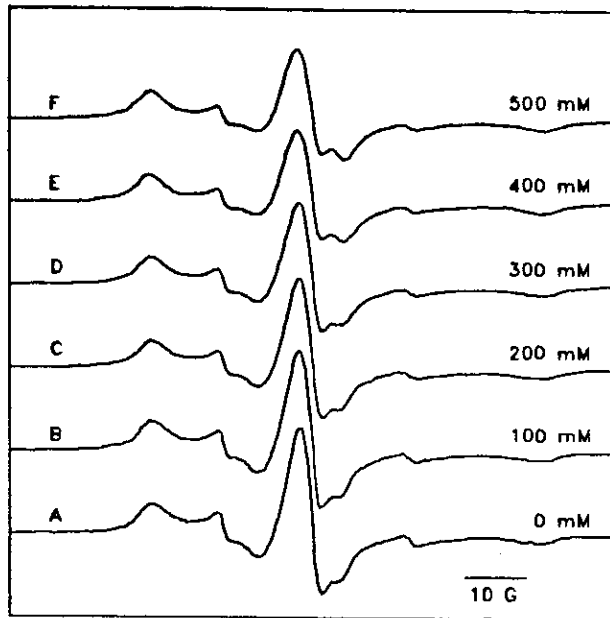
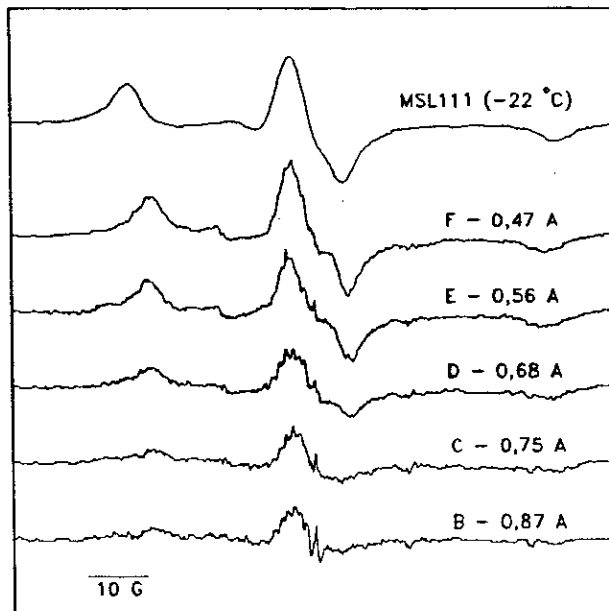


Figura 6.5: Análise do efeito do butanol sobre os espectros de RPE de amostras de  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase do RS marcada com MSL114. Dos espectros da figura 6.4 foi subtraída uma fração do espectro correspondente à amostra em ausência do álcool. Os espectros assim obtidos são apresentados nesta figura assim como o espectro de MSL111 em glicerol a  $0^{\circ}\text{C}$ , para comparação.



**Figura 6.6:** Efeito do butanol sobre os espectros de RPE de amostras de  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase do RS marcada com MSL110, em Hepes 20 mM, KCl 100 mM a pH 7,4. A relação molar marcador:proteína é 3:1. A concentração de butanol é indicada na figura.



**Figura 6.7:** Análise do efeito do butanol sobre os espectros de RPE de amostras de  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase do RS marcada com MSL110. Dos espectros da figura 6.6 foi subtraída uma fração do espectro correspondente à amostra em ausência do álcool. Os espectros assim obtidos são apresentados nesta figura assim como o espectro de MSL111 em glicerol a  $-22^{\circ}\text{C}$ , para comparação.

Para o marcador MSL112, são obtidos resultados similares. Neste caso, os perfis resultantes da subtração são comparáveis ao espectro do MSL111 a  $-2^{\circ}\text{C}$ .

Observa-se, portanto, que, em presença de butanol, uma fração  $f$  da população total de marcador permanece inalterada, enquanto  $1 - f$  da população total passa a um estado mais imobilizado. Dado que o marcador se liga em forma covalente aos grupos  $-\text{SH}$  da proteína, o efeito observado pode ser produzido por mudanças na natureza dos sítios aos quais o marcador se encontra ligado. Na figura 6.8 é apresentada a dependência da fração  $1 - f$  com a concentração de butanol, para as séries de medidas efetuadas utilizando-se os marcadores MSL110, MSL112 e MSL114. Os resultados obtidos para estes três marcadores mostram uma boa concordância entre si, não proporcionando, aparentemente, nenhuma informação complementar. Provavelmente, todos estes marcadores se liguem aos mesmos sítios da proteína.

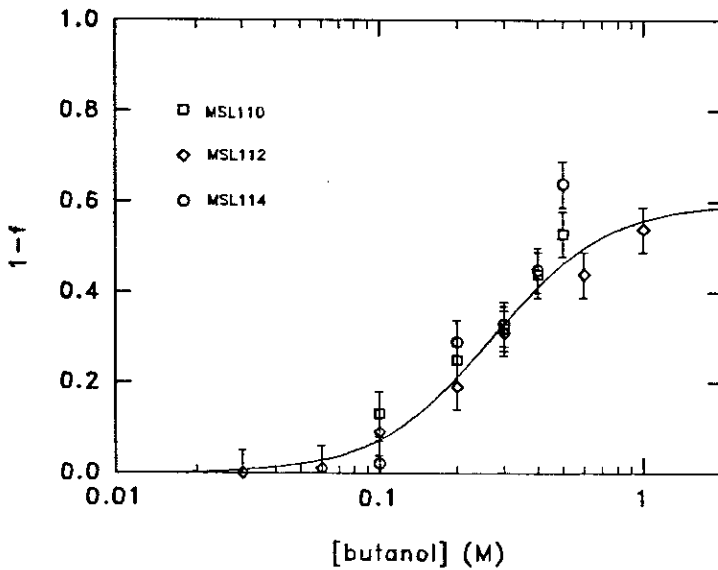


Figura 6.8: Dependência da fração  $1 - f$  com a concentração de butanol. A fração  $f$ , correspondente à fração da população de sonda inalterada pela presença de butanol, é obtida a partir da análise dos espectros de RPE da  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase marcada, em relação molar sonda:proteína 3:1, com os radicais nítróxido derivados da maleimida indicados na figura.

A curva apresentada no gráfico da figura 6.8, assim como nos gráficos análogos seguintes, é calculada supondo que os efeitos sobre os espectros destes marcadores se devem a uma reação do tipo  $P + nD \xrightleftharpoons{K} PD_n$  (onde  $P$  representa a proteína natural,  $D$  a droga,  $PD_n$  a proteína associada à droga e  $n$  o grau de cooperatividade), sendo o efeito proporcional à fração  $PD_n/(P + PD_n)$ .

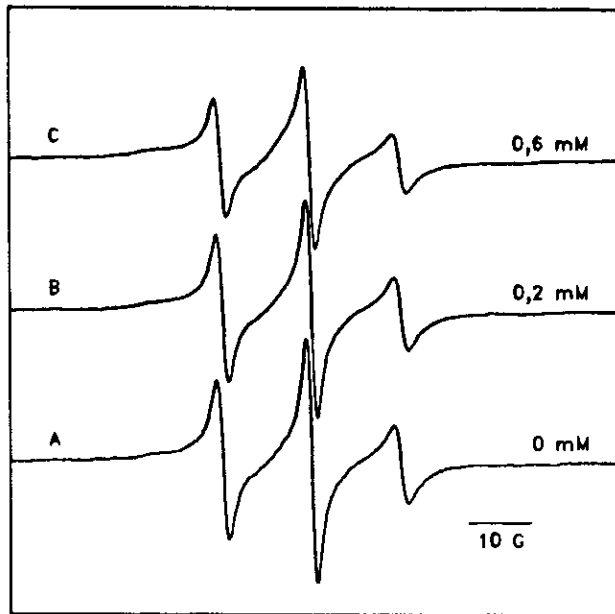
A partir do gráfico da figura 6.8, observa-se que a máxima fração de marcador alterada é menor que 1 ( $\sim 0,6$ ), portanto, não todos os sítios marcados são afetados pela presença do álcool.

Nota-se, também, que a concentração de butanol que produz uma modificação igual à metade da modificação máxima ( $\sim 300$  mM) coincide com a concentração de butanol que corresponde ao máximo de atividade da  $Ca^{++}$ -ATPase, em presença do álcool[39].

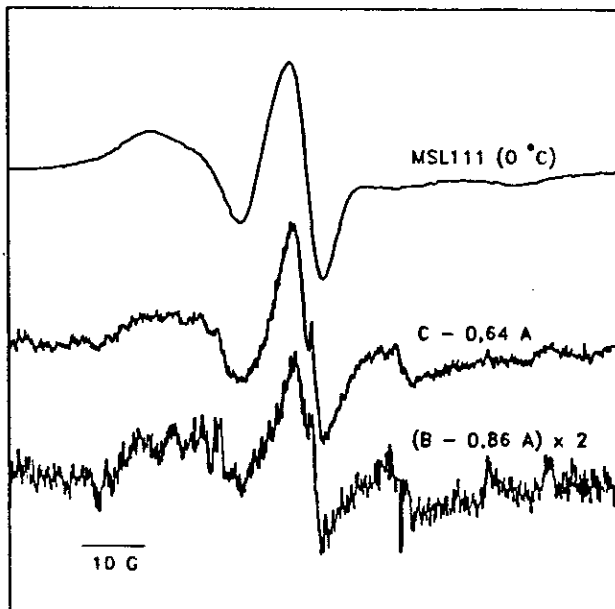
Nas figuras 6.9, 6.11 e 6.13, são apresentados espectros típicos de amostras de RS marcadas com MSL114, MSL112 e MSL110, respectivamente, em proporção molar 2:1, contendo várias concentrações de dibucaína. Alguns dos espectros utilizados na análise do efeito da dibucaína foram cedidos pela Prof. Sônia Louro (PUC/RJ). O método de análise espectral é o mesmo utilizado no caso de amostras tratadas com butanol, sendo obtidos os perfis das figuras 6.10, 6.12 e 6.14, respectivamente.

Para as amostras marcadas com MSL114 e MSL112, os perfis resultantes da subtração são semelhantes aos espectros de MSL111 em glicerol a  $0^\circ\text{C}$  e  $-2^\circ\text{C}$ , respectivamente. Para as amostras marcadas com MSL110, os espectros resultantes da subtração são comparáveis aos do MSL111 em glicerol a temperaturas entre  $-22^\circ$  e  $-4^\circ\text{C}$ , sendo, provavelmente, uma combinação de alguns desses espectros.

Observa-se, portanto, que a dibucaína têm efeitos nos espectros de RPE destes marcadores comparáveis àqueles observados no caso do butanol. Assim como o butanol, a dibucaína induz mudanças na natureza dos sítios aos quais o marcador se encontra ligado de tal modo que o marcador é mais imobilizado. O efeito destas drogas sobre os sítios de ligação do marcador é equivalente a um decréscimo local da temperatura na vizinhança desses sítios.

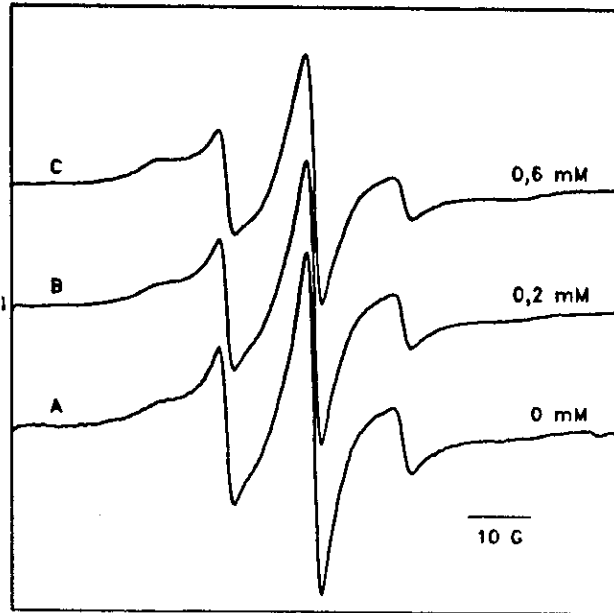


**Figura 6.9:** Efeito da dibucaína sobre os espectros de RPE de amostras de  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase do RS marcada com MSL114, em HEPES 20 mM, a pH 7,4. A relação molar marcador:proteína é 2:1. A concentração de dibucaína é indicada na figura.

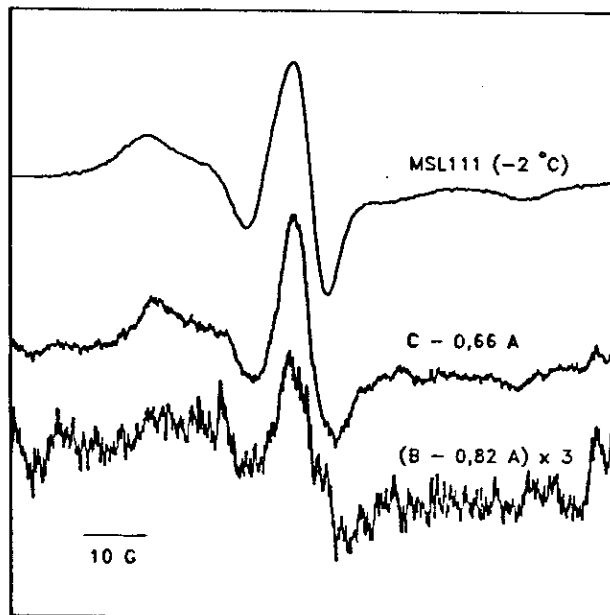


**Figura 6.10:** Análise do efeito da dibucaína sobre os espectros de RPE de amostras de  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase do RS marcada com MSL114. Dos espectros da figura 6.9 foi subtraída uma fração do espectro correspondente à amostra em ausência da droga. Os espectros assim obtidos são apresentados nesta figura assim como o espectro de MSL111 em glicerol a  $0^{\circ}\text{C}$ , para comparação.

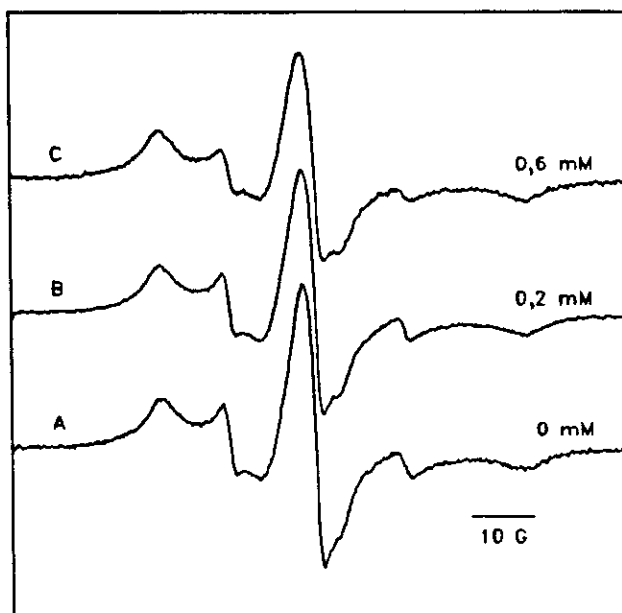




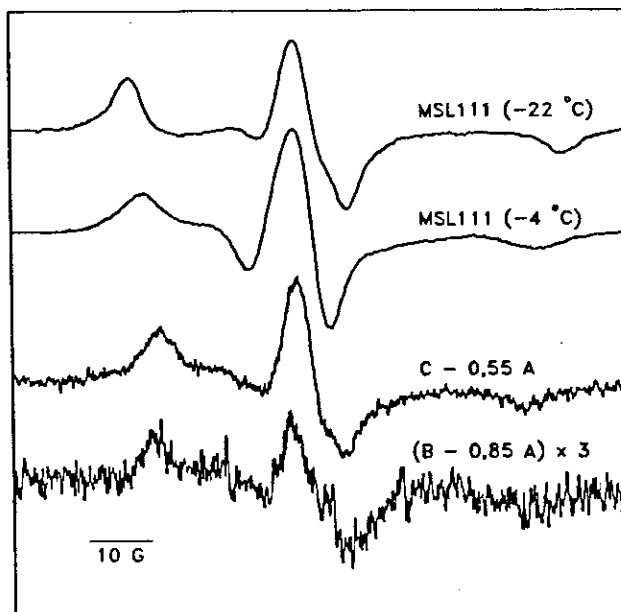
**Figura 6.11:** Efeito da dibucaína sobre os espectros de RPE de amostras de  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase do RS marcada com MSL112, em HEPES 20 mM, a pH 7,4. A relação molar marcador:proteína é 2:1. A concentração de dibucaína é indicada na figura.



**Figura 6.12:** Análise do efeito da dibucaína sobre os espectros de RPE de amostras de  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase do RS marcada com MSL112. Dos espectros da figura 6.11 foi subtraída uma fração do espectro correspondente à amostra em ausência da droga. Os espectros assim obtidos são apresentados nesta figura assim como o espectro de MSL111 em glicerol a  $-2^{\circ}\text{C}$ , para comparação.



**Figura 6.13:** Efeito da dibucaína sobre os espectros de RPE de amostras de  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase do RS marcada com MSL110, em HEPES 20 mM, a pH 7,4. A relação molar marcador:proteína é 2:1. A concentração de dibucaína é indicada na figura.



**Figura 6.14:** Análise do efeito da dibucaína sobre os espectros de RPE de amostras de  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase do RS marcada com MSL110. Dos espectros da figura 6.13 foi subtraída uma fração do espectro correspondente à amostra em ausência da droga. Os espectros assim obtidos são apresentados nesta figura assim como o espectro de MSL111 em glicerol a  $-4^{\circ}\text{C}$  e  $-22^{\circ}\text{C}$ , para comparação.

Para as amostras contendo tetracaína, os efeitos observados são similares, sendo equivalentes para concentrações de tetracaína maiores que as de dibucaína, consistentemente com o fato do coeficiente de partição membrana/solução aquosa da tetracaína ser menor que o da dibucaína[2]. A dependência da fração  $1 - f$  com a concentração de anestésico (dibucaína e tetracaína) é apresentada na figura 6.15.

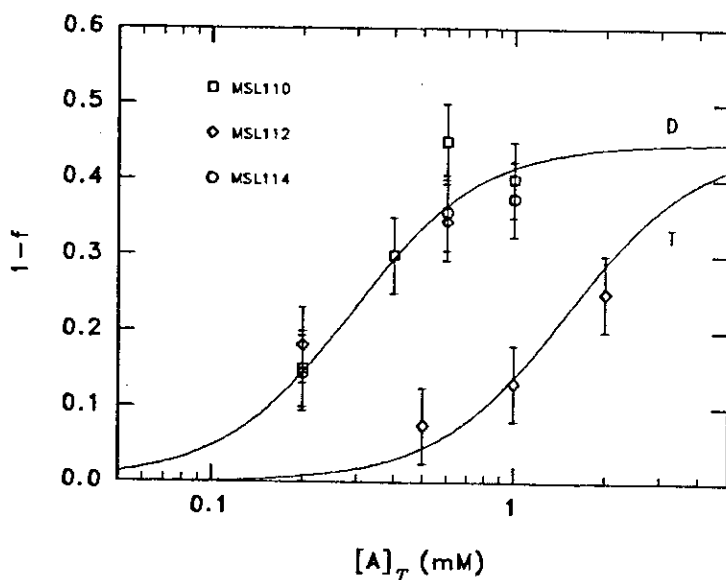


Figura 6.15: Dependência da fração  $1 - f$  com a concentração total de anestésico local  $[A]_T$ , para a dibucaína (D) e a tetracaína (T). A fração  $f$ , correspondente à fração da população de sonda inalterada pela presença de droga, é obtida a partir da análise dos espectros de RPE da  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase marcada com os radicais nitróxido derivados da maleimida indicados na figura. Para as amostras tratadas com dibucaína e tetracaína, respectivamente, a relação molar sonda:proteína é 2:1 e 3:1.

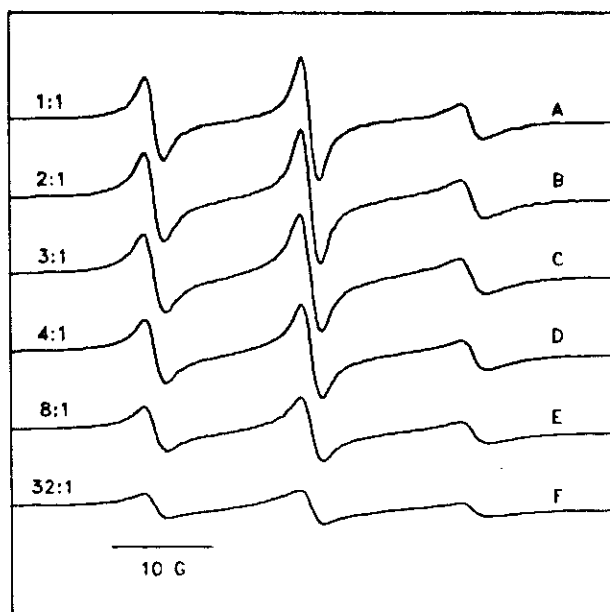
Na tabela 6.1 são apresentados valores típicos das concentrações para as quais os anestésicos locais estudados perturbam o funcionamento enzimático[10,124,151]. No caso da dibucaína, a concentração de droga para a qual a fração  $f$  é igual à metade da fração máxima ( $\sim 0,3$  mM) é próxima das concentrações em que a droga modifica o funcionamento normal da enzima. Para a tetracaína, o número de dados experimentais é insuficiente para efetuar alguma comparação, entretanto, consistentemente com os re-

sultados obtidos, observa-se que são requeridas concentrações de droga maiores que no caso da dibucaína para produzir perturbações equivalentes no funcionamento da  $\text{Ca}^{++}$ .

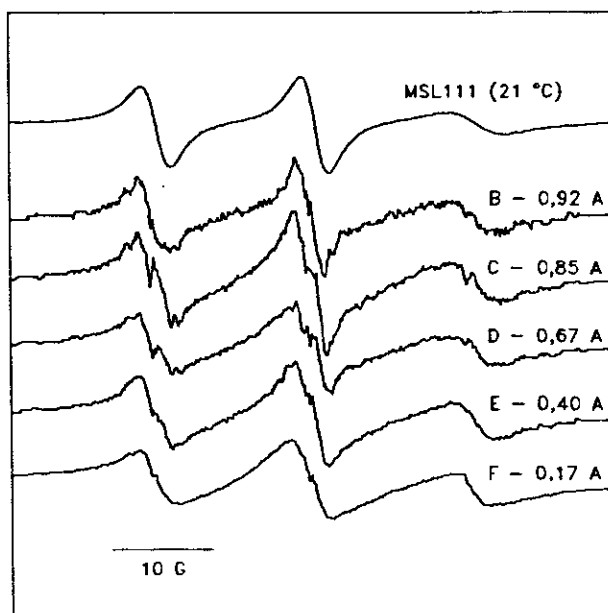
anestésico	50% inib. tr. $\text{Ca}^{++}$ [151];[124]	ativ. máx.[10]	50% inib. hidr. ATP[10]
dibucaína	0,4; 0,75	0,5	1,2
tetracaína	1,3; 2,5	1,3	3,5

**Tabela 6.1:** Concentrações em que os anestésicos locais perturbam a atividade enzimática (expressas em mM), produzindo: 50% de inibição do transporte de  $\text{Ca}^{++}$ , máxima atividade da ATP-ase e 50% de inibição da hidrólise de ATP.

Para amostras marcadas com diferentes razões molares marcador:proteína, são observadas algumas diferenças. Na figura 6.16 é apresentada uma série de espectros correspondendo a amostras de RS marcadas com MSL114 em diferentes proporções molares. A análise destes espectros é apresentada na fig. 6.17, onde são mostrados os perfis resultantes de subtrair de cada espectro da figura 6.16 uma fração do espectro A da mesma figura, correspondente à razão molar 1:1. A partir das subtrações se observa que os espectros da figura 6.16 podem ser descompostos em um perfil coincidente com o espectro A e em uma outra componente (a resultante da subtração) que, nos casos B e C, pode ser comparada ao espectro de MSL111 em glicerol a 21°C. Nos outros casos, os perfis subtraídos são diferentes devido, possivelmente, ao efeito combinado da existência de outras componentes e ao alargamento das linhas por interação entre marcadores se os sítios marcados fossem muito próximos. Subtrações subseqüentes para determinar outras possíveis componentes produzem perfis com relação sinal/ruído muito pequena como para permitir efetuar comparações confiáveis.



**Figura 6.16:** Espectros de RPE de amostras de  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase do RS marcada com MSL114 com diferente relação molar marcador:proteína, em Hepes 20 mM, KCl 100 mM, a pH 7,4. A relação molar marcador:proteína indicada na figura corresponde à relação em que foi adicionado o marcador, entretanto, calcula-se, a partir da análise do conteúdo de marcador no sobrenadante da primeira centrifugação, que o número de moles de marcador ligado por mol de proteína é 0,9, 1,8, 2,6 3,4 5,9 e 13,8, respectivamente.

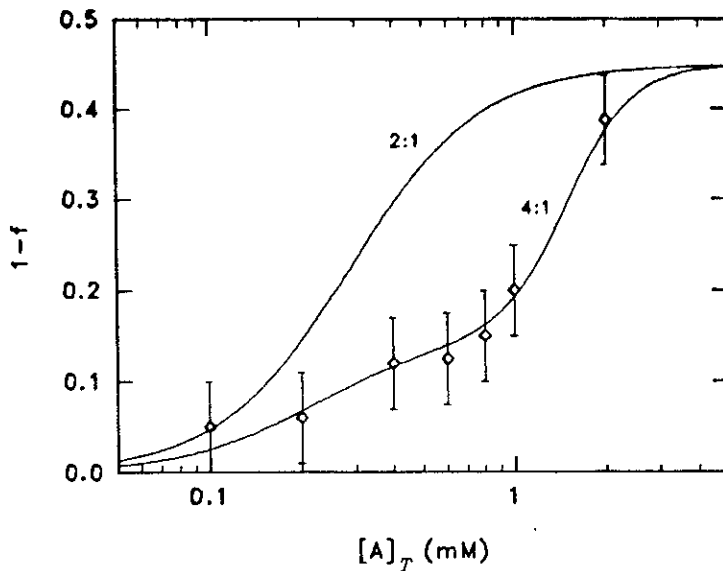


**Figura 6.17:** Análise dos espectros de RPE de amostras de  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase do RS marcada com MSL114 com diferente relação molar marcador:proteína. Dos espectros da figura 6.16 foi subtraída uma fração do espectro correspondente à amostra marcada em relação 1:1. Os espectros assim obtidos são apresentados nesta figura assim como o espectro de MSL111 em glicerol a 21°C, para comparação.

As diferenças observadas podem corresponder à particular natureza dos sítios marcados. Na  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase, o número médio de grupos -SH que apresenta maior reatividade corresponde a  $1,7 \pm 0,2$  [152]. Supondo que, quando a razão molar marcador:proteína é 1:1 ou menor, praticamente só estes sítios reagem, então, o espectro da figura 6.16.A é o produzido pelo marcador nesses sítios. Neste caso, considerando as razões molares finais e as frações subtraídas (fig. 6.17), pode ser calculado em cada caso o número médio de sítios que contribuem com a componente A. Fazendo estes cálculos, para os espectros A a F da figura 6.16, obtém-se: 0,9, 1,7, 2,2, 2,3, 2,4 e 2,3, respectivamente. Portanto, o número médio de sítios reactivos que da lugar ao espectro A é  $2,3 \pm 0,2$ , enquanto os restantes sítios com propriedades, possivelmente, diferentes dão lugar a uma outra componente espectral. O estudo por RPE da  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase marcada, combinado com a técnica de supressão de segmentos através de enzimas apropriadas, permitiria determinar a localização dos diferentes sítios de ligação do marcador. Se as diferenças observadas correspondem à particular natureza dos sítios marcados, variando-se a relação molar marcador:proteína é possível obter informação adicional.

Na figura 6.18 é apresentado um gráfico da fração  $1 - f$  vs. concentração total de dibucaína a partir dos dados obtidos da análise dos espectros de amostras de RS marcadas com MSL114 em relação molar 4:1 e, para comparação, a curva extraída da figura 6.15 que corresponde às amostras marcadas com MSL112 (razão molar 2:1), tratadas com dibucaína.

No caso em que a proteína foi marcada com MSL112 na proporção 2:1, a máxima fração da população total do marcador modificada, em presença de dibucaína, corresponde a aproximadamente 0,45. Quando 4:1 sítios da proteína são marcados, a curva aparenta saturar, inicialmente, aproximadamente à metade desse valor, sendo a concentração para a qual se produz a metade da alteração máxima 0,3 mM, como obtido a partir do gráfico da figura 6.15. Isto pode ser explicado se uma fração menor do total de sítios marcados é afetada pela presença da droga. Para concentrações maiores, a fração alterada aparenta um novo crescimento, indicando que provavelmente as vizinhanças de novos sítios são afetadas pela droga, em concentrações mais elevadas.



**Figura 6.18:** Dependência da fração  $1 - f$  com a concentração total de dibucaína  $[A]_T$ . A fração  $f$ , correspondente à fração da população de sonda inalterada pela presença de droga, é obtida a partir da análise dos espectros de RPE da  $Ca^{++}$ -ATPase marcada com MSL112 em relação molar 4:1. Para comparação é apresentada também a curva que corresponde à relação molar 2:1, extraída da fig. 6.15.

## 6.4 Discussão

Todas as drogas estudadas têm efeitos semelhantes sobre os espectros dos marcadores utilizados que indicam que o marcador é mais imobilizado em presença dessas drogas. Dado que o marcador se liga em forma covalente aos grupos -SH da proteína, as diferenças observadas quando as amostras são tratadas com substâncias anestésicas são devidas a mudanças na natureza dos sítios aos quais o marcador se encontra ligado. Uma possível causa da imobilização do marcador é a agregação de proteínas, porém, utilizando-se agentes que induzem a agregação de proteínas, mostrou-se que esse processo não necessariamente causa a imobilização do marcador[24]. Por outro lado, a partir de experiências de RPE utilizando marcadores derivados da maleimida em preparações de eritrócitos tratadas com anestésicos[22], observou-se, também, a imobilização do marcador, sendo atribuída a mudanças conformacionais nas proteínas. Portanto, os efeitos observados sobre os espectros podem ser devidos às mudanças na organização das regiões da proteína vizinhas aos sítios de ligação do marcador. Entretanto, essas mudanças podem ser causadas por ação direta da droga sobre a enzima ou bem por

ação sobre a matriz lipídica, mais especificamente, sobre a interface proteína/lipídio.

Obtivemos também espectros de proteínas solúveis, tais como albumina de soro bovino e hemoglobina, marcadas com MSL, e, nestes casos, não foram observadas alterações relevantes nos espectros de amostras contendo dibucaína ou butanol, mesmo em concentrações muito maiores que as dos estudos em amostras de RS, indicando que os efeitos observados no caso da  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase não são uma propriedade geral das proteínas e que a ação destas drogas pode estar associada à presença de um meio lipídico.

Por outro lado, estudos desenvolvidos recentemente, sobre a ação de n-álcoois na interface proteína/lipídio da  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase[39] e do receptor de acetilcolina[153], utilizando-se sondas paramagnéticas derivadas da fosfatidilcolina (14-PCSL), mostram que os n-álcoois deslocam e fluidizam os lipídios interfaciais, em contraste com a imobilização do marcador na proteína. Para o anestésico local dibucaína, em concentrações para as quais são produzidas mudanças estruturais na  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase detetáveis por RPE, não são observados efeitos importantes sobre o estado da fase lipídica. Estes resultados sugerem que as mudanças induzidas por n-álcoois na conformação enzimática, são produzidas a partir de interferência com as interações proteína-lipídio, enquanto os anestésicos locais atuam através de um mecanismo diferente, provavelmente, interagindo em forma direta com sítios da proteína. Além do mais, medidas feitas utilizando-se amostras da  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase marcada parecem indicar que os efeitos devidos à presença de dibucaína são dependentes da concentração de sais, em contraste com os produzidos pelo butanol, consistentemente com a diferente natureza das porções polares das moléculas destas drogas. Entretanto, as características espectrais expostas neste trabalho não revelam a diferença da ação, mostrando que o n-álcool butanol e os anestésicos locais dibucaína e tetracaína têm um efeito final equivalente sobre os sítios marcados. Aparentemente, todas estas drogas afetam, de modo similar, os mesmos sítios na enzima. Possivelmente, os sítios de ligação dos derivados da maleimida, que parecem ser os mesmos para todos os membros dessa família, sejam sítios localizados nos domínios globulares mais expostos que o domínio de hélices  $\alpha$  que atravessam a membrana e que as regiões interfaciais e, onde, os grupos -SH são mais abundantes (ver fig. 6.1). Isto explicaria o fato de que as alterações estruturais detetadas por RPE sejam praticamente independentes das



modificações que possam ocorrer simultaneamente na interface. Esta suposição é consistente com a hipótese de que o mecanismo de ação dos anestésicos teria um caráter dual[151], podendo estar associado a sítios específicos e não-específicos e resultando das interações, por exemplo, com sítios lipídicos e com domínios hidrofóbicos da proteína, respectivamente.

## Capítulo 7

### Conclusões

Apresentamos neste capítulo um resumo dos resultados e das conclusões gerais mais importantes deste trabalho.

No capítulo 3, foi determinado o diagrama da concentração micelar crítica da CPZ vs. pH. Os resultados podem ser interpretados em termos de uma expressão para a energia livre de transferência de um monômero do meio aquoso às micelas que leve em conta o estado de ionização da droga. Mostra-se que a micelização é facilitada quando o pH favorece a forma neutra da micela.

Neste capítulo, estudou-se, também, a termodinâmica da formação de micelas mediante um modelo simplificado que permite prever os principais aspectos do comportamento dos sistemas micelares.

A técnica utilizada para a determinação de cmc poderá ser aplicada a outras substân-

cias anestésicas. Uma outra extensão consiste no estudo do comportamento de sistemas mistos droga/sonda. A determinação da concentração micelar crítica, em função da fração de cada espécie, pode oferecer informação adicional sobre os parâmetros termodinâmicos que caracterizam a formação de micelas da droga.

No capítulo 4, introduzimos um método para a determinação das constantes de adsorção de anestésicos com dois estados de carga. Este método permite obter informação adicional sobre o estado da bicamada.

As curvas experimentais do potencial elétrico superficial vs. concentração total da droga são ajustadas com uma expressão teórica, sendo os parâmetros de ajuste a constante de adsorção da forma carregada da droga ( $K_a^{AH^+}$ ) e a constante de ionização da droga na membrana ( $K_i^v$ ). Conhecendo estes parâmetros e a constante de ionização da droga na solução aquosa ( $pK_i^v = 9,3$ ), pode ser calculada a constante de adsorção da forma neutra ( $K_a^A$ ) relacionada com esses parâmetros. A partir dos ajustes encontramos  $pK_i^v = 7,7 \pm 0,2$ . Este valor, inferior ao valor de  $pK_i$  correspondente à fase aquosa indica que, na membrana, a reação de ionização é deslocada de tal modo que é favorecida a forma neutra. Este fato equivale a que a constante de adsorção da forma neutra na membrana seja maior do que a da forma carregada.

Por outro lado, como o coeficiente de partição da CPZ entre a membrana e a solução aquosa é muito alto, nas condições experimentais estudadas, só é possível determinar um limite inferior para o valor da constante de adsorção da forma carregada da droga. Porém, este valor limite é consistente com os valores de  $K_a^{AH^+}$  determinados mediante outras técnicas[55,113]. Apesar desta indeterminação, o método pode ser extremamente útil, por exemplo, para outras drogas menos hidrofóbicas.

Uma possível extensão deste trabalho consiste na determinação das constantes de adsorção de anestésicos em lipossomos contendo diferentes proporções de lipídios negativamente carregados. Segundo pode ser deduzido da literatura, a presença de lipídios negativos aumenta a afinidade dos anestésicos catiônicos[2]. Entretanto, não é explicado se este efeito é puramente um efeito devido à carga negativa dos lipídios ou se existe algum tipo de afinidade específica entre a droga positivamente carregada e os lipídios

negativos. No primeiro caso,  $K_a^{AH^+}$  deverá ser a mesma em sistemas de diferente composição de lipídios carregados. Portanto, a comparação das constantes de adsorção para sistemas de lipossomos carregados (lipossomos mistos, compostos, por exemplo, de diferentes proporções de fosfatidilcolina e ácido fosfatídico) permitiria elucidar essa questão.

No capítulo 5, é apresentado um estudo sobre a desnaturação térmica de diferentes domínios da  $Ca^{++}$ -ATPase do retículo sarcoplasmático, em presença de dibucaína, mediante a técnica de DSC e mediante experiências de inativação do transporte de cálcio.

Observa-se, mediante DSC, que em ausência de  $Ca^{++}$ , a  $Ca^{++}$ -ATPase desnatura-se aparentemente como uma única unidade, entretanto, em presença de  $Ca^{++}$ , os domínios I e II são estabilizados em diferentes graus, de tal modo que a desnaturação de cada domínio pode ser detetada separadamente. Em presença de  $Ca^{++}$ , a temperatura de desnaturação do domínio I é deslocada até aprox. 1°C, enquanto, a temperatura de desnaturação do domínio II é deslocada até aprox. 13°C.

A ausência de cooperatividade ( $n \simeq 1$ ) e o valor de  $pK_a$  (4,1) encontrados, a partir do ajuste aos dados experimentais obtidos variando a concentração de  $Ca^{++}$ , sugerem que a estabilização do domínio II da  $Ca^{++}$ -ATPase pelo  $Ca^{++}$  deve-se a sua ligação a sítios não cooperativos de afinidade baixa ou intermediária. Neste caso, como os sítios são não específicos, outros cátions, como  $Mg^{++}$  e  $K^+$ , deveriam ter um efeito semelhante. Uma investigação variando a concentração destes íons permitiria obter mais informação sobre a natureza dos sítios de ligação do  $Ca^{++}$  estabilizante.

A dibucaína, aparentemente, contrabalança o efeito do  $Ca^{++}$ . Para diferentes concentrações de dibucaína, a temperatura crítica para a inativação da hidrólise de ATP é próxima da temperatura de desnaturação do domínio I da  $Ca^{++}$ -ATPase. Por outro lado, a energia da desnaturação do domínio I é similar à energia de inativação da hidrólise de ATP. Conseqüentemente, a inativação da hidrólise de ATP é provavelmente devida à desnaturação do domínio I.

A inativação do transporte, em presença de dibucaína, aparentemente não corresponde a nenhuma mudança conformacional da  $Ca^{++}$ -ATPase detetável mediante DSC, apesar da energia de ativação ser similar à encontrada para a inativação da hidrólise

de ATP e para a desnaturação do domínio I, a temperatura crítica para a inativação do transporte é menor que as temperaturas de transição detetadas. Para altas concentrações de dibucaína (acima de 2 mM), existe uma queda abrupta na energia de ativação que pode estar relacionada com algum efeito da droga sobre a fluidez da membrana.

A temperatura de desnaturação do domínio II é sempre maior que a do domínio I e, no caso menos favorável (ausência de  $\text{Ca}^{++}$  ou presença de dibucaína), os dois domínios se desnaturam juntos, indicando que, de algum modo, a estabilidade do domínio I contribui para a proteção do domínio II. Os sítios de ligação do  $\text{Ca}^{++}$  estabilizante podem estar localizados em alguma região que conecta ambos domínios. O  $\text{Ca}^{++}$  presumivelmente enrijece este domínio protegendo os domínios I e II da desnaturação. Por outro lado, em presença de  $\text{Ca}^{++}$  e ausência de dibucaína, o transporte do cátion está fortemente acoplado à hidrólise de ATP que está claramente relacionada com o estado do domínio I. Entretanto, em presença de dibucaína, assim como em ausência de  $\text{Ca}^{++}$ [134], a temperatura de inativação do transporte decai muito mais do que a temperatura de inativação da hidrólise de ATP. Isto sugere que existe uma interação fraca entre os correspondentes domínios, apesar de ser necessária, já que a atividade enzimática requer comunicação entre eles. Se o desacoplamento fosse devido a uma mudança conformacional na proteína, deveria tratar-se de uma transição de entalpia muito baixa (correspondendo, provavelmente, a algum domínio pequeno) não detetável mediante DSC como uma transição separada. Uma outra explicação possível para o aparente desacoplamento entre transporte e hidrólise de ATP é o aumento da permeabilidade da membrana ao  $\text{Ca}^{++}$ , no entanto, perdas ou liberação do íon têm uma energia de ativação menor que a observada mediante estas técnicas[134].

A partir do ajuste teórico aos dados experimentais obtidos para amostras contendo dibucaína encontramos  $n \simeq 2,4$  e  $pK_a \simeq 2,7$ . Estes resultados sugerem que a desestabilização do domínio II pela dibucaína pode ser conseqüência de sua ligação a sítios na enzima. Nota-se que a concentração total de dibucaína para produzir um deslocamento na temperatura de desnaturação do domínio II igual à metade do deslocamento máximo é da mesma ordem que os valores encontrados para a inibição da  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase[89,124], que também correspondem às doses farmacológicas. Parece pouco provável que os efeitos

aparentemente opostos do  $\text{Ca}^{++}$  e da dibucaína sejam devidos à diminuição da concentração de  $\text{Ca}^{++}$  na interface como conseqüência da modificação do potencial superficial pela forma carregada da droga. Por outro lado, as alterações na fluidez da membrana são importantes só, aparentemente, para concentrações da droga acima de 2 mM, mas a possível alteração da organização dos lipídios anulares deve ser considerada[38]. Esta possibilidade é consistente com o fato de que o domínio II (transmembranar) seja o mais afetado pela presença de dibucaína.

No capítulo 6, realizamos um estudo comparativo das mudanças conformacionais da  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase induzidas por anestésicos locais (dibucaína e tetracaína) e um n-álcool (butanol). Sondas paramagnéticas derivadas da maleimida foram utilizadas para investigar, em vesículas do retículo sarcoplasmático, as regiões vizinhas aos grupos SH da  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase, mediante a técnica de RPE.

Observou-se que, em presença de butanol, a  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase sofre mudanças estruturais detetáveis por RPE. Os anestésicos locais dibucaína e tetracaína também induzem mudanças na estrutura da  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase com efeitos nos espectros de RPE comparáveis àqueles observados no caso do butanol. Em presença destas drogas, a mobilidade da sonda incorporada diminui.

Por outro lado, em proteínas solúveis, tais como albumina e hemoglobina, não foram observadas alterações relevantes quando tratadas com dibucaína ou butanol, indicando que os efeitos observados não são propriedade geral das proteínas podendo estar associados à presença de um ambiente lipídico.

Estudos prévios sobre a interface proteína/lipídio, mediante RPE utilizando 14-PCSL como sonda, mostram que os n-álcoois deslocam e fluidizam os lipídios interfaciais[39]. Estes resultados sugerem que as mudanças induzidas na conformação enzimática pelo butanol são produzidas a partir de interferência com as interações lipídio-proteína. Entretanto, para a mesma faixa de concentrações de dibucaína em que são observadas mudanças na estrutura proteica, não são observados efeitos na interface, indicando que estas drogas podem agir mediante um mecanismo diferente, interagindo, provavelmente, em forma direta com sítios localizados na enzima.

Porém, os dados expostos neste trabalho mostram que não existe uma diferença fundamental entre a ação do n-álcool butanol e a dos anestésicos locais dibucaína e tetracaína. Aparentemente, todas estas drogas afetam de modo similar os mesmos sítios na enzima. Possivelmente, os sítios de ligação dos derivados da maleimida, que parecem ser mesmos para todos os membros dessa família, sejam sítios localizados nos domínios globulares mais expostos que o domínio de hélices  $\alpha$  que atravessam a membrana e que as regiões interfaciais e, onde, os grupos -SH são mais abundantes. Isto explicaria o fato de que as alterações estruturais detetadas por RPE sejam praticamente independentes das modificações observadas na interface.

Esta hipótese pode ser testada, utilizando-se vesículas de RS invertidas. Neste caso, os grupos -SH localizados na região transmembranar ficariam mais expostos e acessíveis para a ligação da maleimida, permitindo detetar as modificações estruturais que possa sofrer esse domínio.

Uma outra extensão deste trabalho consiste em determinar a localização dos sítios de ligação dos radicais nítróxido derivados da maleimida cuja natureza é alterada em presença de anestésicos. Este estudo pode ser realizado mediante a utilização de enzimas apropriadas para a digestão da  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase.

As mudanças conformacionais induzidas pelos anestésicos podem determinar que novos sítios de ligação do marcador fiquem expostos, portanto, seria interessante pesquisar se os espectros dos marcadores derivados da maleimida apresentam diferenças quando a proteína é tratada com a droga antes de ser marcada.

Por outro lado, medidas feitas utilizando-se amostras da  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase marcada parecem indicar que os efeitos na estrutura proteica devidos à presença de dibucaína são dependentes da concentração de sais, em contraste com os produzidos pelo butanol, consistentemente com a diferente natureza das porções polares dessas moléculas. A verificação deste efeito e a sua quantificação podem proporcionar informação adicional sobre o modo em que os anestésicos locais afetam esta enzima.

## Bibliografia

- [1] Seeman P. (1972), *Pharmacol. Reviews* **24**, N° 4, 583-655.
- [2] Ohki, S. (1984), *Biochim. Biophys. Acta* **777**, 56-66.
- [3] Boggs, J. M., Yoong, T., and Hsia, J. C. (1975), *Molecular Pharmacol.* **12**, 127-135.
- [4] Papahadjopoulos, D., Jacobson, K., Poste, G., and Shepherd, G. (1975), *Biochim. Biophys. Acta* **394**, 504-519.
- [5] Jain, M. K., Wu, N. Y., and Lewis, V. W. (1975), *Nature* **255**, 494-495.
- [6] Hornby, A. P., and Cullis, P. R. (1981), *Biochim. Biophys. Acta* **647**, 285-292.
- [7] McIntosh, T. J., McDaniel, R. V., and Simon, S. A. (1983), *Biochim. Biophys. Acta* **731**, 109-114.
- [8] Hill, M. W. (1974), *Biochim. Biophys. Acta* **356**, 117-124.
- [9] Jonhson, P., and Inesi, G. (1969), *J. of Pharmacol. and Exp. Therap.* **169**, N° 2, 309-314.



- [10] Escudero, B., and Gutierrez-Merino, C. (1987), *Biochim. Biophys. Acta* **902**, 374-384.
- [11] Fernandez, M. S. (1981), *Biochim. Biophys. Acta* **646**, 27-30.
- [12] Frezzati, W. A., Toselli, W. R., and Schreier, S., (1986), *Biochim. Biophys. Acta* **860**, 531-538.
- [13] Lee, A. G., East, J. M., Jones, O. T., McWhirter, J., Rooney, E. K., and Simmonds, A. C. (1983), *Biochim. Biophys. Acta* **732**, 441-454.
- [14] Benga, G. (ed.) (1985), *Structure and Properties of Cell Membranes*, Vol. I, Chap. 8, Boca-Raton, Florida, CRC Press.
- [15] Simmonds, A. C., East, J. M., Jones, E. K., Rooney, E. K., McWhirter, J., and Lee, A. G. (1982), *Biochim. Biophys. Acta* **693**, 398-406.
- [16] Hidalgo, C., Ikemoto, N., and Gergely J. (1976), *J. Biol. Chem.* **251**, N° 14, 4224-4232.
- [17] Axel, F. S. (1976), *Biophys. Struct. Mechanism* **2**, 181-218.
- [18] Berliner, L. J. ed. (1976), *Spin Labelling Theory and Applications*, Vol. 1.
- [19] Sim, E. (1982), *Membrane Biochemistry*, Chapman and Hall eds.
- [20] Lenaz, G., and Castelli, G. P. (1985), Membrane Fluidity em *Structure and Properties of Cell Membranes*, Vol. I, Cap. 6, G. Benga Ed., CRC Press, Florida.
- [21] Sankaram, M. B., Marsh, D., and Thompson, T. E. (1992), *Biophys. J.* **63**, 340-349.
- [22] Yamaguchi, T., Watanabe, S., and Kimoto, E. (1985), *Biochim. Biophys. Acta* **820**, 157-164.
- [23] Takishima, K., Shimizu, H., Setaka, M., and Kwan, T. (1980), *J. Biochem.* **87**, 305-312.

- [24] Thomas, D. D., Bigelow, D. J., Solier, T. C., and Hidalgo, C. (1982), *Biophys. J.* **37**, 217-225.
- [25] Ribeiro da Silva ed., *Thermochemistry and its Applications to Chemical and Biochemical Systems*, Nato ASI Series C: Mathematical and Physical Science, Vol. 119 (1982).
- [26] Donovan, J.W. (1984), *Trends Biochem. Sci.* **9**, 340-344.
- [27] Boggs, J. M., and Mason, J. T. (1986), *Biochim. Biophys. Acta* **863**, 231-242.
- [28] Serrallach, E. N., Haas, G. H., and Shipley, G. G. (1984), *Biochemistry* **23**, 713-720.
- [29] Boggs, J. M., and Moscarello, M. A. (1982), *Biophys. J.* **37**, 57-59.
- [30] Privalov, P.L. (1982), *Adv. Protein Chem.* **35**, 1-104.
- [31] Mateo, P. L., Differential Scanning Calorimetry Applications to Protein Solutions, em *Thermochemistry and its Applications to Chemical and Biochemical Systems*, Nato ASI Series C: Mathematical and Physical Science, Vol. 119 (1982).
- [32] Wennerström H., and Lindman, B. (1979), *Phys. Rep.* **52**, N°1, 1-86.
- [33] Lasic, D. D. (1992), *Nature* **355**, 279-280.
- [34] Atherton, A. D., and Barry, B. W. (1984), *J. of Colloid and Interface Science*, **106**, N°2, 479-489.
- [35] Luxnat, M., and Galla, H. J. (1986), *Biochim. Biophys. Acta* **856**, 274-282.
- [36] Binford, J. S., and Wadsö I. (1984), *J. Biochem. Biophys. Methods* **9**, N°2, 121-131.
- [37] Castle, J. D., and Hubbell, W. L. (1976), *Biochemistry* **15**, N° 22, 4818-4831.
- [38] Gutierrez-Merino, C., Molina, A., Escudero, B., Diez, A., and Laynez, J. (1989), *Biochemistry* **28**, 3398-3406.

- [39] Lopes, C. M. B. e Louro, S. R. W. (1991) *Nota Científica* **23**, Física-PUC/Rio.
- [40] Singer, S. J., and Nicolson, G. L. (1972), *Science* **175**, 720-731.
- [41] Stryer, L. (1988), *Biochemistry*, W. H. Freeman & Co., New York.
- [42] Jellinck, P. H. (1963), *Biochemistry*, Holt Rinehart and Winston, Inc., U.S.A.
- [43] Tanford, C. (1978), *Science* **200**, 1012-1018.
- [44] Tanford, C. (1972), *J. Phys. Chem.*, Vol. **76**, Nº 21, 3020-3024.
- [45] Benga, G. (ed.) (1985), *Structure and Properties of Cell Membranes*, Vol. I, Caps. 3 e 4, CRC Press, Florida.
- [46] Bergelson, L. D., and Barsukov, L. I. (1985), Topological Asymmetry and Flip-Flop of Phospholipids in Biological Membranes, em *Structure and Properties of Cell Membranes*, Vol. I, Cap. 5, G. Benga Ed., CRC Press, Florida.
- [47] Mouritsen, O. G. (1986), em *Lecture Notes in Physics* **284**, Physics in Living Matter, 76-109.
- [48] Sackmann, E. (1978), *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **82**, 891-909.
- [49] Litzinger, D. C., and Huang, L. (1992), *Biochim. Biophys. Acta* **1113**, 201-227.
- [50] Szoka, F. (1980), *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* **9**, 467-508.
- [51] Trudell, J. R. (1977), *Anesthesiology* **46**, 5-10.
- [52] Alberts, B. et al. (1991), *Molecular Biology of the Cell*, Garland Publishing Inc., New York.
- [53] Scheraga, H. A. (1961), *Protein Structure*, Molecular Biology, An International Series of Monographs and Textbooks, Academic Press, New York and London.
- [54] Watts, A. (1981), *Nature* **294**, 512-513.
- [55] Rooney, E. K., and Lee, A. G. (1983), *Biochim. Biophys. Acta* **732**, 428-440.

- [72] Bondi, A. (1964), *J. Phys. Chem.* **68**, N° 3, 441-451.
- [73] Mullins, L. J. (1954), *Chem. Rev.* **54**, 289-323.
- [74] Kaminoh, Y., Kamaya, H., and Ueda, I. (1989), *Biochim. Biophys. Acta* **987**, 63-68.
- [75] Kelusky, E. C., Boulanger, Y., Schreier, S., and Smith, I. C. P. (1986), *Biochim. Biophys. Acta* **856**, 85-90.
- [76] Shimooka, T., Shibata, A., and Terada, H. (1992), *Biochim. Biophys. Acta* **1104**, 261-268.
- [77] Lever, M. J., Miller, K. W., Paton, W. D. M., and Smith, E. B. (1971), *Nature* **231**, 368-371.
- [78] Miller, K. W., Paton, W. D. M., Smith, R. A., and Smith, E. B. (1973), *Mol. Pharmacol.* **9**, 131-143.
- [79] Moss, G. W. J., Lieb, W. R., and Franks, N. P. (1991), *Biophys. J* **60**, 1309-1314.
- [80] Trudell, J. R., Payan, D. G., Chin, J. H., and Cohen, E. N. (1974), *Biochim. Biophys. Acta* **373**, 436-443.
- [81] Trudell, J. R., Payan, D. G., Chin, J. H., and Cohen, E. N. (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **72** N° 1, 210-213.
- [82] Franks, N. P., and Lieb, W. R. (1987), *TIPS* **8**, 169-174.
- [83] Kursch, B., Lüllmann, H., and Mohr, K. (1983), *Biochemical Pharmacology* **32**, N° 17, 2589-2594.
- [84] Franks, N. P., and Lieb, W. R. (1984), *Nature* **310**, 599-601.
- [85] Volpe, P., Palade, P., Costelo, B., Mitchell, R. D., and Fleischer, S. (1983), *J. Biol. Chem.* **258**, N° 20, 12434-12442.
- [86] Richards, C. D. (1980), *Topical Reviews in Anesthesia* **1**, 1-84.

- [87] Low, P. S., Lloyd, D. H., Stein, T. M., and Rogers, J. A. (1979), *J. Biol. Chem.* **254**, N° 10, 4119-4125.
- [88] Suko, J., Winkler, F., Scharinger, B., and Hellmann, G. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* **443**, 571-586.
- [89] Garcia-Martin, E., and Gutierrez-Merino, C. (1986), *J. Neurochem.* **47**, N°3, 668-672.
- [90] Franks, N. P., and Lieb, W. R. (1987), *Nature* **328**, 113-114.
- [91] Eriksson, L. E. G., and Westman, J. (1981) *Biophys. Chem.* **13**, 253-264.
- [92] Wajnberg, E., Tabak, M., Nussenzveig, P. A., Lopes, C. M. B., and Louro, S. R. W. (1988), *Biochim. Biophys. Acta* **944**, 185-190.
- [93] Miyazaki, J., Hideg, K., and Marsh, D. (1992), *Biochim. Biophys. Acta* **1103**, 62-68.
- [94] Dawber, J. G., and Moore, A. J. (1973), *Chemistry for the Life Sciences*, Mc Graw-Hill Book Co. Ltd., U.K.
- [95] Hamm, D. I. (1969), *Fundamentals Concepts of Chemistry*, Meredith Publishing Co., U.S.A.
- [96] Tanford, C. (1974), *J. Phys. Chem.* **78**, N°24, 2469-2479.
- [97] King, M. D., and Marsh, D. (1987), *Biochemistry* **26**, 1224-1231.
- [98] Stigter, D. (1974), *J. Colloid and Interface Science* **47**, N°2, 473-482.
- [99] Bezzobotnov, V. Yu., Borbély, S., Cser, L., Faragó, B., Gladkih, I. A., Ostanovich, Yu. M., and Vass, Sz. (1988), *J. Phys. Chem.* **92**, N°20, 5738-5743.
- [100] Goldstein, R. E. (1986), *J. Chem. Phys.* **84** (6), 3367-3378.
- [101] Ben-Halm, A., and Stillinger, F. H. (1980), *J. Phys. Chem.* **84**, 2872-2876.

- [102] Missel, P. J., Mazer, N. A., Benedek, G. B., and Young, C. Y. (1980), *J. Phys. Chem.* **84**, 1044-1057.
- [103] Attwood, D. (1983), *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1*, N°79, 2669-2677.
- [104] Hernandez, J. R., Schreier, S. and Chaimovich, H. (1976), *Chemistry and Physics of Lipids* **16**, 19-30.
- [105] Schmidt, D., Gähwiller, Ch., and Von Planta, C. (1981), *J. of Colloid and Interface Science*, **83**, N°1, 191-198.
- [106] Ptak, M., Egret-Charlier, M., Sanson, A., and Bouloussa, O. (1980), *Biochim. Biophys. Acta* **600**, 387-397.
- [107] Egret-Charlier, M., Sanson, A., Ptak, M., and Bouloussa, O. (1978), *FEBS Letters* **89**, N°2, 313-316.
- [108] Fernandez, M. S., and Fromherz, P. (1977), *J. Phys. Chem.* **81**, N°18, 1755-1761.
- [109] Stigter, D. (1974), *J. Phys. Chem.* **78**, N°24, 2480-2485.
- [110] McLaughlin, S. (1977), *Current Topics in Membranes and Transport*, vol. 9, 71-144.
- [111] McLaughlin, S., and Harary H. (1976), *Biochemistry* **15**, N°9, 1941-1948.
- [112] Schreier, S., Hernandez, J. R., Cuccovia, I., and Chaimovich, H. (1978), *J. Magnetic Resonance* **30**, 283-298.
- [113] Welti, R., Mullikin, L. J., Yoshimura, T., and Helmkamp, G. M. (1984), *Biochemistry* **23**, 6086-6091.
- [114] Stigter, D. (1975), *J. Phys. Chem.* **79**, N°10, 1015-1022.
- [115] Stigter, D. (1964), *J. Phys. Chem.* **68**, N°12, 3603-3611.
- [116] Cafiso, D. S., and Hubbell, W. L. (1981), *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* **10**, 217-244.

- [117] Cafiso, D. S., and Hubbell, W. L. (1978), *Biochemistry* **17**, N°1, 187-195.
- [118] Goormaghtigh, E., Caspers, J., and Ruyschaert, J. M. (1981), *J. of Colloid and Interface Sci.* **80**, N°1, 163-170.
- [119] Fernandez, M. S. (1981), *Biochim. Biophys. Acta* **646**, 23-26.
- [120] Natarajan, R., and Schechter, R. S. (1984), *J. of Colloid and Interface Science* **99**, N°1, 50-58.
- [121] Schwartz, M. A., and McConnell, H. M. (1978), *Biochemistry* **17**, N°5, 837-840.
- [122] Pang, K. Y., and Miller, K. W. (1978), *Biochim. Biophys. Acta* **511**, 1-9.
- [123] Lee, A.G. (1978), *Biochim. Biophys. Acta* **514**, 95-104.
- [124] Katz, A. M., Repke, D. I., Corkedale, S., and Schwarz, J. (1975), *Cardiovasc. Res.* **9**, 764-769.
- [125] Kurebayashi, N., Ogawa, Y., and Harafuji, H. (1982), *J. Biochem.* **92**, 915-920.
- [126] Meis, L. (1981), *The Sarcoplasmic Reticulum: Transport and Energy Transduction*, Transport in Life Sciences, Vol. 2, J. Wiley & Sons, Inc.
- [127] Campbell, K. P. (1986), *Sarcoplasmic Reticulum in Muscle Physiology*, Entman and Van Winkle eds., CRC Press, Boca Raton, Florida.
- [128] Eletr, S., and Inesi, B. (1972), *Biochim. Biophys. Acta* **282**, 174-179.
- [129] Campbell, K. P., Armstrong, C. F., and Shamoo, A. E. (1980), *Biochim. Biophys. Acta* **602**, 97-105.
- [130] Laemli, U. K. (1970), *Nature* **227**, 680-685.
- [131] Lowry, O. H. et al. (1951), *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- [132] Fabiato, A., and Fabiato, F. (1978), *J. Physiol.* **276**, 233-255.

- [133] Hemminger, W., and Hohne, G. (1984), *Calorimetry - Fundamentals and Practice*, Verlag Chemie GmbH, Weinheim.
- [134] Lepock, J. R., Rodahl, A. M., Zhang, C., Heynen, M. L., Waters, B., and Cheng, K. H. (1990), *Biochemistry* **29**, 681-689.
- [135] Fujita, S. C., Gu, N., and Imahori, K. (1979), *Biochemistry* **18**, 24-28.
- [136] Nelder, J. A., and Mead, R. (1965). *The Computer Journal* **7**, 308-313.
- [137] Herbette, L., Marquardt, J., Scarpa, A., and Blasie, J. K. (1977), *Biophys. J.* **20**, 245-272.
- [138] Chiu, V. C. K., and Haynes, D.H. (1980), *J. Membrane Biol.* **56**, 203-218.
- [139] Eftink, M. R., Puri, R. K., and Ghahramani, M. D. (1985), *Biochim. Biophys. Acta* **813**, 137-140.
- [140] Watanabe, T., Lewis, D., Kurzmack, M., Fronticelli, C., and Inesi, G. (1981), *Biochemistry* **20**, N°23, 6617-6625.
- [141] Highsmith, S.R. (1982), *Biochemistry* **21**, N°16, 3786-3789.
- [142] Inesi, G. (1983), *Biomembrane Structure and Function*.
- [143] Meltzer, S., and Berman, M. (1984), *J. Biol. Chem.* **259**, N°7, 4244-4253.
- [144] Chevalier, J., and Butow, R.A. (1971), *Biochemistry* **10**, N°14, 2733-2737.
- [145] Ikemoto, N. (1974), *J. Biol. Chem.* **249**, 649-651.
- [146] Ikemoto, N. (1975), *J. Biol. Chem.* **250**, 7219-7224.
- [147] Chiu, V. C. K., and Haynes, D.H. (1977), *Biophys. J.* **18**, 3-22.
- [148] Fernandez-Salguero, P., Henao, F., Laynez, J., and Gutierrez-Merino, C. (1990), *Biochim. Biophys. Acta* **1022**, 33-40.



- [149] Brandl, C. J., Green, N. M., Korczak, B., and MacLennan, D. H. (1986), *Cell* **44**, 597-607.
- [150] MacLennan, D. H., Brandl, C. J., Korczak, B., and Green, N. M. (1985), *Nature* **316**, 696-700.
- [151] Shoshah-Barmatz, V. (1988), *Biochem. J.* **256**, 733-739.
- [152] Andersen, J. P., Le Maire, M., and Moller, J. V. (1980), *Biochim. Biophys. Acta* **603**, 84-100.
- [153] Fraser, D. M., Louro, S. R. W., Horváth, L. I., Miller, K. W., and Watts, A. (1990), *Biochemistry* **29**, 2664-2669.