



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOFÍSICA E RADIOBIOLOGIA**

MESTRADO EM BIOFÍSICA

**Estudo do tamanho dos éteres de coroa em solução aquosa e  
da sua interação com o canal iônico formado pela alfa-  
estafilotoxina**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Roberto Santos Medina

**ORIENTADORES**

Dr. Oleg V. Krasilnikov

Dr. Petr G. Merzlyak

RECIFE

2003

**Estudo do tamanho dos éteres de coroa em solução aquosa e  
da sua interação com o canal iônico formado pela alfa-  
estafilotoxina**

Roberto Santos Medina

Dissertação apresentada para obtenção do título de  
Mestre em Biofísica pela Universidade Federal de  
Pernambuco - UFPE.

**ORIENTADORES**

Dr. Oleg V. Krasilnikov

Dr. Petr G. Merzlyak

RECIFE

2003

**Medina, Roberto Santos**

**Estudo do tamanho dos éteres de coroa em solução aquosa e da sua interação com o canal iônico formado pela Alfa-estafilotoxina / Roberto Santos Medina - Recife : O Autor, 2003.**

**X, 60 folhas : il., fig., tab., gráf.**

**Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Biofísica, 2003.**

**Inclui bibliografia.**

**1. Biofísica de membranas - Canais iônicos. 2. Alfa-estafilotoxina 3. Éteres de coroa - tamanho e interação poro aquoso do canal iônico. I. Título.**

**577.352.4  
574.88**

**CDU (20.ed.)  
CDD (21.ed.)**

**UFPE  
BC2004-142**

# **Estudo do tamanho dos éteres de coroa em solução aquosa e da sua interação com o canal iônico formado pela alfa-estafilotoxina**

Roberto Santos Medina

Dissertação submetida ao corpo docente do departamento de biofísica da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre.

Aprovado por:

Professor Dr. Oleg V. Krasilnikov – Orientador.

Depto. Biofísica e Radiobiologia/UFPE

Professor Dr. Petr G. Merzilyak – Orientador.

Depto. Biofísica e Radiobiologia/UFPE

Professora Dra. Maria Teresa Janssen de Almeida Catanho – Banca Examinadora

DBR/UFPE

Professor Dr. Carlos Manoel Machado – Banca Examinadora

DBR/UFPE

Professor Dr. Romildo Albuquerque Nogueira – Banca Examinadora

Depto. Morfologia/UFRPE

RECIFE

2003

*A todos que direta ou indiretamente contribuem para que meu projeto de vida seja sempre um sucesso crescente.*

*Deus todo poderoso, meus pais e meus verdadeiros amigos.*

*Confiança, Honestidade, Amor, Realizações, Lealdade, Espiritualidade, Satisfação.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao professor Oleg Vladimirovich Krasilnikov, pela grande escola viva que é, pela competência e orientação;

Ao professor Petr Merzlyak, por seu tempo e paciência nos momentos compartilhados no laboratório, por sua presteza na realização deste trabalho;

Ao professor Cláudio Rodrigues por sua amizade e atenção em todos os momentos, principalmente nos mais difíceis;

À professora Lylia Yuldasheva pelos incentivos no término deste projeto;

À professora Fátima Capistrano pelo exemplo de dedicação e esforço, por sua amizade e coleguismo;

À toda equipe do laboratório de biofísica de membranas, especialmente aos meus colaboradores diretos da iniciação científica (André, Leandro, Andréa, Tucaauê, Pedro, Antonio e Vinícius);

Às minhas amigas e sócias (Carmem, Lourdinha, Fatinha e Clarice) que literalmente “seguraram a barra” durante a minha ausência;

Ao amigo Tércio Aureliano que muito nos suporta e orienta;

Ao amigo Charles França, por todos os conselhos, amizade e companheirismo;

Aos colegas da FIR, que tanto me incentivaram a fazer o mestrado, especialmente professor Evandro, Ana Paula e que me deram suporte nos momentos necessários, especialmente professora Celina Cordeiro, Bernadete Pita, Carla Fabiana e Andréa Lemos;

Aos meus pais por todo apoio, amor e compreensão;

Às colegas de mestrado Caroline Wanderley, Antonieta Cláudia e Dayse Amorim;

A todos os funcionários do departamento de biofísica, especialmente Fredson;

A todos os demais colegas que muito contribuíram para a realização deste trabalho;

**MUITO OBRIGADO!**

## RESUMO

No trabalho com moléculas muito pequenas (nanoscópicas) o conhecimento a cerca do seu tamanho é um fator importante para o estudo do transporte de substâncias. Para estimar o raio efetivo de moléculas, seguimos o caminho mostrado por Bezrukov (1999) utilizando uma equação matemática que relaciona o tamanho das micropartículas com a variação da condutividade da solução provocada pela adição da própria micropartícula.

Éteres de coroa (moléculas nanoscópicas) são uma família grande de compostos com núcleos cíclicos geralmente formados de etilenoglicol. Algumas dessas substâncias são capazes de atuar como antibióticos (WOODWARD, 1957). Outras supostamente atuam como moduladores de canais (BETHGE, 1991). De acordo com nosso conhecimento não existem estudos sobre o tamanho efetivo das coroas em soluções aquosas nem dados específicos sobre a interação das coroas com canais iônicos.

Baseado na ausência dessas informações o objetivo deste trabalho é estudar o raio efetivo das três coroas mais simples (18coroa6, 15coroa5 e 12coroa4) tanto em solução aquosa quanto na interação delas com o canal iônico formado pela alfa-estafilotoxina. As coroas estudadas são não-eletrólitos por não possuírem grupamentos com carga.

Para estimar o raio efetivo das coroas, dois procedimentos foram realizados: primeiramente o raio das moléculas escolhidas foi estimado através da modelagem molecular realizada pelo *software CSChem3D Pro* desenvolvido pela *Cambridge Software Corporation*. No segundo, o tamanho dessas moléculas foi determinado experimentalmente através do estudo das mudanças de condutividade das soluções aquosas na presença das mesmas. Foram realizados experimentos com soluções de cloreto de potássio, cloreto de sódio e cloreto de lítio em quatro diferentes concentrações (100, 500, 1000 e 2000 mM). Os três tipos de coroa foram adicionadas às soluções para ter seus raios efetivos estimados. Encontramos que os valores obtidos pelos métodos da condutividade e modelagem molecular são semelhantes (12coroa4: 0,46nm - 0,48nm; 15coroa5: 0,5nm - 0,52nm; 18coroa6: 0,56nm - 0,56nm) respectivamente. Essa semelhança indica que os dois métodos podem ser aplicados com sucesso para estimar o tamanho de éteres de coroa. Indica também que a equação matemática que relaciona as mudanças de condutividade com o raio das moléculas, inicialmente desenvolvida para micropartículas, é efetiva para estimação do raio de nanopartículas.

Os raios das coroas estão na faixa do tamanho do menor raio dos canais iônicos: 0,15 nm para os dependentes de voltagem e 1 nm para os dependentes de neurotransmissores. Para estudar a interação das coroas com o poro aquoso de canais iônicos é necessário utilizar um



canal cuja estrutura seja bem estabelecida. O canal formado pela alfa-estafilotoxina satisfaz essa exigência. Ele apresenta características semelhantes às dos canais dependentes de neurotransmissores: estrutura assimétrica, baixa seletividade, condutância relativamente alta e o raio mínimo e máximo iguais a 0,65 nm e 1,3 nm respectivamente (SONG, 1996). A bicamada lipídica plana com este canal incorporado foi utilizado neste trabalho como um sistema modelo para se estudar a influência das coroas nas propriedades dos canais iônicos. O regime de clampeamento de voltagem em canais iônicos unitários foi adotado. Nos experimentos foram utilizadas soluções de KCl, NaCl e LiCl todas com concentração de 1M.

Nosso estudo pela primeira vez mostra que a condutância do canal pode ser influenciada pelas coroas. Indica que as três coroas estudadas apresentam maior efetividade na influência sobre a condutância do canal quando potenciais negativos são aplicados no lado da incorporação do canal na membrana. Essa dependência do potencial indica que a coroa não bloqueia o canal isoladamente, só quando forma um complexo coroa-cátion. Identificamos também que as efetividades das coroas são diferentes entre si e dependem do cátion utilizado.

Vimos que a equação de Michaelis-Menten pode descrever de forma precisa a dependência “dose-efeito”. Concluímos então que o canal iônico possui um único sítio de interação com as coroas e que o bloqueio máximo atingido com o uso das três coroas é similar (~ 53%), entretanto elas têm concentrações de meio-efeito bem diferentes ( $C_{50\%}=186\text{mM}$ ;  $C_{50\%}=96.7\text{mM}$  e  $C_{50\%}=32.6\text{mM}$  para 12crown4, 15crown5 e 18crown6 respectivamente em 1M de KCl). Estabelecemos que a 18coroa6 apresenta maior habilidade de bloqueio na condutância do canal do que a 15coroa5 que por sua vez apresenta maior efetividade do que a 12coroa4.

## ABSTRACT

As the targets for pharmacological substances are, generally, localized inside the cells and many of them are hydrophilic, they have to use such structures as ion channels. Hydrophilic path-way of ion channels generally narrow that, mainly, restricts the transport through them. Hence, the knowledge about size of molecules (which usually is in a nanometric range is an important issue for pharmacology and molecular biology. To estimate the effective molecule radius, we follow the way shown by Bezrukov (1999) using a mathematical equation relating the microparticles size with the variation of the solution conductivity provoked by the addition of the microparticle itself. Crown ethers (nanometric molecules) are a large family whose cyclical nuclei are generally formed of etilenoglicol. Some of these substances are capable to act as antibiotic (WOODWARD, 1957). Others supposedly act as modulating of channels (BETHGE, 1991). In accordance with our knowledge there is not a study of crown size in aqueous solutions as on the interaction of the crowns with ionic channels. Based in the absence of these informations the objective of this work is to study the effective radius of the three simple crowns (18coroa6, 15coroa5 and 12coroa4) in aqueous solution and it's interaction with the ionic channel formed by the alpha-estafilotoxin. To estimate the effective radius of the crowns, two procedures had been employed: first, the radius of chosen molecules was analyzed through the molecular modeling carried through by software CSChem3D Pro developed by Cambridge Software Corporation. Second, the size of these molecules was determined through the study of the conductivity changes of the aqueous solutions in it's presence. Experiments had been carried through with potassium chloride, sodium chloride and lithium chloride solutions with four different concentrations (100, 500, 1000 and 2000 mM). We found that the values obtained with those two methods are similar (12coroa4: 0,46nm - 0.48nm; 15coroa5: 0,5nm - 0.52nm; 18coroa6: 0,56nm - 0.56nm) respectively. Such similarity indicates that the two methods can be successfully applied to estimate the size of

molecules in nanometric scale. It also indicates that the mathematical equation initially developed to relate the changing in conductance with radii of microparticles is effective in nanometric range.

The radius of the crowns are similar to the size of the smaller ionic channels radius: 0,15 nm for the voltage dependents and 1 nm for the neurotransmitters dependents. To study the interaction of the crowns with the aqueous pore of ionic channels it is necessary to use a channel whose structure is well established. The channel formed by the alpha-stapyilotoxin (ST) satisfies this requirement. Its characteristics [asymmetrical structure, low selectivity, relatively highly conductance and the minimum and maximum radii equal to 0,65 nm and 1.3nm respectively (SONG, 1996)] reminds neurotransmitters dependent channels. In this work the planar lipid bilayer with a single  $\alpha$ -ST channel incorporated was used as a model system to study the influence of crowns on the properties of the ionic channels. Experiments were done at voltage clamp conditions. 1M KCl, NaCl and LiCl solutions were used in all experiments.

We, for the first time, demonstrate that the channel's conductance could be influenced by crowns. We showed that all three crowns studied decreased the channel conductance considerably when negatives potential was applied at the side of the channel incorporation in the membrane. This potential dependence indicates that the crowns do not block the channel alone, only when it forms a complex crown-cation. We also demonstrated that the crowns have different effectiveness, which depends on the cation used. We showed that the Michaelis-Menten equation can precisely describe the dose-effect dependence. This finding permit conclude that the ST-channel possess only one site for crowns inside the lumen. We also establish that the value of the maximum blockade evoked by all three crowns are similar (~ 53%), although they have very different half-effect concentrations .

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES (FIGURAS, FÓRMULAS, TABELAS)

### **FIGURAS**

- FIGURA 1: Representação esquemática das famílias de canais iônicos: (A) Dependentes de voltagem, (B) Dependentes de neurotransmissores, (C) Intracelulares (D) dependentes de nucleotídeos cíclicos onde: (1) sub-unidades e seus domínios; (2) alças; (3) segmento transmembrana; (4) sítio de ligação do nucleotídeo cíclico cGMP e (5) proteína-G (Modificado de Numa, 1989). ..... 9
- FIGURA 2: Estrutura primária das sub-unidades  $\alpha$  e  $\beta 1$  do canal de sódio ilustrada como diagrama das dobras transmembranas. A linha representa a cadeia polipeptídica das sub-unidades  $\alpha$  e  $\beta 1$  com o comprimento de cada segmento aproximadamente proporcional ao seu comprimento real nos canais de sódio do cérebro de rato. Cilindros representam alfa-hélices transmembranas. Os quatro domínios estão representados com os algarismos (I), (II), (III) e (IV) respectivamente. Outros segmentos provavelmente associados à membrana também estão representados. .... 10
- FIGURA 3: Modelo para a estrutura do receptor d e acetilcolina. Cinco subunidades homólogas ( $\alpha$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ ) agrupam-se para formar um poro aquoso transmembrana. O poro é revestido por um anel de cinco  $\alpha$ -hélices transmembrana. O anel de  $\alpha$ -hélices é provavelmente circundado por uma borda contínua de folha  $\beta$ -transmembrana constituída pelos outros segmentos transmembrana das cinco subunidades. As cadeias laterais carregadas negativamente em ambas as extremidades do poro garantem que apenas íons positivos passem através do canal. Ambas as subunidades contêm um sítio ligante de acetilcolina. (Adaptado de N. Unwin, *Cell/Neuron* 72/10 [Suppl.] 31-41, 1993 © Cell Press.) ..... 12
- FIGURA 4: Representação esquemática de polímeros cíclicos de etilenoglicol: (A) 18-coroa-6, (B) 15-coroa-5 e (C) 12-coroa-4. Todos com os átomos de oxigênio voltados para a parte central. .... 15
- FIGURA 5: Representação esquemática da interação do 18-coroa-6 com o íon de potássio. .... 16
- FIGURA 6: Diagrama da montagem experimental. 1) Gerador de onda triangular e pulsador DC; 2) Eletrodos de prata-cloreto de prata; 3) Pontes salinas; 4) Partição de Teflon®; 5) Orifício; 6) Seringa hipodérmica; 7) Barras magnéticas; 8) Hemicâmara de Teflon®; 9) Amplificador operacional configurado como conversor corrente-voltagem; 10) Resistência de “feedback”; 11) Ganho e 12) Saída para osciloscópio e computador. .... 21
- FIGURA 7: Eletrodo de prata-cloreto de prata em ponte salina para transdução do sinal elétrico através dos canais iônicos. (A) fio de cobre; (B) tampa de borracha; (C) ponteira plástica; (D) fio de prata cloretado; (E) Pontes salinas do tipo gel de AGAR-KCl (3% em peso de AGAR em KCl 3M). .... 22
- FIGURA 8: Modelo de câmara de Teflon® utilizada durante os experimentos de medição da variação da condutância dos canais iônicos. (A) eletrodos de prata-cloreto de prata; (B) compartimento trans; (C) câmara de Teflon®; (D) partição de Teflon® com orifício; (E) compartimento cis. .... 23

FIGURA 9: Representação do processo de construção da bicamada lipídica plana e da monitoração simultânea do processo. A) Etapas da formação: (1) filmes lipídicos sobre as superfícies das soluções, (2) deposição do segundo filme lipídico e (3) bicamada lipídica plana completamente formada. As setas indicam o sentido da elevação do nível da solução; B) Etapas da monitoração: (1) onda triangular aplicada ao sistema e (2) resposta de corrente capacitiva do sistema. .... 24

FIGURA 10: Reprodução em modelo espacial preenchido com representação do maior diâmetro dos complexos: (A) 18coroa6-K<sup>+</sup>; (B) 15coroa5-Na<sup>+</sup> e (C) 12coroa4-Li<sup>+</sup> onde: esferas azuis representam os átomos de hidrogênio, vermelhas representam os átomos de oxigênio e cinza os de carbono. As esferas centrais lilás, verde e amarela representam os íons de potássio, sódio e lítio respectivamente. .... 29

FIGURA 11: Dependência da condutividade da solução de cloreto de potássio nas variações de concentração de: (A) 18coroa6, (B) 15coroa5 e (C) 12coroa4. .... 30

FIGURA 12: Dependência da condutividade da solução de cloreto de lítio nas variações de concentração de 18coroa6, 15coroa5 e 12coroa4. .... 32

FIGURA 13: Dependência dos raios das coroas nas variações de concentração iônica da solução de: (A) KCl, (B) NaCl e (C) LiCl. Os valores apresentados nos retângulos representam os valores limites dos raios estimados. .... 34

FIGURA 14: Representação da adição da toxina (seta) e de sucessivas incorporações de canais formando os degraus característicos das deflexões negativas de voltagem. .... 36

FIGURA 15: Distribuição da condutância dos canais iônicos onde: (A), (B) e (C) são histogramas cumulativos de fator de não bloqueio-condutância em soluções aquosas de LiCl, NaCl e KCl respectivamente, gerados a partir dos dados da figura 14 com suas respectivas curvas gaussianas. .... 37

FIGURA 16: Corte longitudinal do canal formado pela alfa-estafilotoxina introduzido em uma bicamada lipídica com as medidas de seus diâmetros ao longo do poro aquoso. Os complexos de 18coroa6-K<sup>+</sup> também podem ser vistos dentro do canal (de Song e col. 1996). .... 38

FIGURA 17: Influência do éter de coroa na condutância do canal de estafilotoxina. Todos os gráficos G-V apresentados em A, B ou C foram obtidos através de canais unitários. Soluções padrão continham 1M KCl e 0,005M Tris-Ácido Cítrico com pH 7,5. Curva G-V foi estabelecida e em seguida a concentração da coroa respectiva foi aumentada seqüencialmente (com variações de 10mM ou 20mM) dos dois lados da câmara e as curvas G-V foram medidas a cada nova concentração de coroa. Os resultados de experimentos típicos são apresentados. (EQ) significa que a adição das coroas foi feita de forma equilibrada entre os dois lados da câmara. .... 39

FIGURA 18: Comparação entre a variação de condutância do canal iônico formado pela alfa-toxina do *Staphylococcus aureus* e da condutividade da solução de cloreto de potássio 1M nas condições utilizadas. (A) representa a variação da condutância de acordo com a concentração das coroas utilizadas em voltagens positivas de +100 mV a +120 mV; (B) apresenta as variações da condutividade da solução salina pela concentração das três coroas usadas. .... 41

FIGURA 19: (A) Efetividade dos três tipos de éteres de coroa em solução de cloreto de potássio 1 molar. Dados de experimentos típicos são apresentados. As linhas traçadas representam os dados obtidos através da equação de Michaelis-Menten. ( $G_{\min}$ ) é o valor da mínima condutância e ( $C_{50\%}$ ) é a concentração de meio efeito; (B) Influência das diversas concentrações de coroa na condutividade da solução de KCl. .... 42

FIGURA 20: Influência do éter de coroa na condutância do canal de estafilotoxina. Todos os gráficos G-V apresentados em A, B ou C foram obtidos através de canais unitários. Soluções padrão continham 1M NaCl e 0,005M Tris-Ácido Cítrico com pH 7,5. Curva G-V foi estabelecida e em seguida a concentração da coroa respectiva foi aumentada seqüencialmente (com variações de 20mM) dos dois lados da câmara e as curvas G-V foram medidas a cada nova concentração de coroa. Os resultados de experimentos típicos são apresentados. (EQ) significa que a adição das coroas foi feita de forma equilibrada entre os dois lados da câmara..... 43

FIGURA 21: Efetividade dos três tipos de éteres de coroa em solução de cloreto de sódio 1 molar. Dados de experimentos típicos são apresentados. As linhas traçadas representam os dados obtidos através da equação de Michaelis-Menten. ( $G_{\min}$ ) é o valor da mínima condutância e ( $C_{50\%}$ ) é a concentração de meio efeito. (B) Influência das diversas concentrações de coroa na condutividade da solução de NaCl. .... 45

FIGURA 22: Influência do éter de coroa na condutância do canal de estafilotoxina. Todos os gráficos G-V apresentados em A, B ou C foram obtidos através de canais unitários. Soluções padrão continham 1M LiCl e 0,005M Tris-Ácido Cítrico com pH 7,5. Curva G-V foi estabelecida e em seguida a concentração da coroa respectiva foi aumentada seqüencialmente (com variações de 10mM ou 20mM) dos dois lados da câmara e as curvas G-V foram medidas a cada nova concentração de coroa. Os resultados de experimentos típicos são apresentados. (EQ) significa que a adição das coroas foi feita de forma equilibrada entre os dois lados da câmara. .... 46

FIGURA 23: (A) Efetividade dos três tipos de éteres de coroa em solução de cloreto de lítio 1 molar. Dados de experimentos típicos são apresentados. As linhas traçadas representam os dados obtidos através da equação de Michaelis-Menten; (B) Influência das diversas concentrações de coroa na condutividade da solução de LiCl.... 47

FIGURA 24: Dependência de voltagem do bloqueio do canal de estafilotoxina pelas coroas em KCl 1M. A curva de fator de não bloqueio foi obtida em experimentos típicos de canais unitários. Os experimentos foram realizados na presença de 40mM de diferentes coroas nos dois lados da bicamada..... 49

FIGURA 25: Dependência de voltagem do bloqueio do canal de estafilotoxina pelas coroas em NaCl 1M. A curva de fator de não bloqueio foi obtida em experimentos típicos de canais unitários. Os experimentos foram realizados na presença de 40mM de diferentes coroas nos dois lados da bicamada..... 49

## **FÓRMULAS**

FÓRMULA 1: Fórmula da variação de energia livre envolvida no transporte de uma espécie iônica através da bicamada lipídica segundo Born Onde: ( $\Delta G$ ) é a variação de energia livre, ( $Z$ ) é a valência do íon, ( $R$ ) é o raio iônico, ( $e$ ) é a carga do elétron, ( $\epsilon_0$ ) é a constante dielétrica do vácuo, ( $\epsilon_1$ ) é a constante dielétrica do lipídeo e ( $\epsilon_a$ ) é a constante dielétrica da água (modificada da dissertação de Jackson Cruz, 1997). ..... 4

FÓRMULA 2: Modelo experimental para medição do raio efetivo dos éteres de coroa onde: ( $\Delta\sigma$ ) é a variação da condutividade da solução na presença de partículas não condutoras; ( $\sigma_0$ ) é a condutividade da solução livre de partículas não condutoras e ( $n$ ) é o número de partículas por unidade de volume. .... 19

FÓRMULA 3: Equação para determinação da capacitância da membrana, onde: ( $C$ ) é a capacitância (S); ( $I$ ) é a intensidade de corrente (A); ( $dV$ ) é a variação de voltagem em Volts dos pulsos triangulares e ( $dt$ ) é a variação de tempo em segundos dos pulsos triangulares. .... 25

FÓRMULA 4: Lei de Ohm onde: ( $G$ ) é a condutância medida em Siemens (S); ( $I$ ) é a intensidade de corrente medida em Ampère (A); e ( $V$ ) é a voltagem medida em Volts (V). ..... 26

FÓRMULA 5: Fator que mede a possibilidade do canal permanecer sem obstrução onde: ( $F$ ) é o fator de não obstrução; ( $G_{\text{coroa}}$ ) é a condutância na presença de coroas e ( $G_0$ ) é a condutância na ausência de coroas. .... 28

FÓRMULA 6: Modelo de Michaelis-Menten para condutância de canais iônicos onde: ( $G_i$ ) é a condutância em Siemens; ( $G_{\text{máx}}$ ) é a condutância máxima; ( $G_{\text{mín}}$ ) é a condutância mínima; ( $C_i$ ) é a concentração de coroa e ( $C_{50}$ ) é a concentração de meio efeito. .... 28

FÓRMULA 7: Lei de Stokes-Einstein para difusão de partículas microscópicas esféricas com raio ( $r$ ) em um meio com viscosidade ( $\eta$ ). ( $R$ ) é a constante dos gases, ( $T$ ) é a temperatura absoluta e ( $D$ ) é o coeficiente de difusão. .... 31

FÓRMULA 8: Equação para determinação do coeficiente de mobilidade de partículas carregadas ( $u$ ) em um meio com viscosidade( $\eta$ ). .... 31

## **TABELAS**

TABELA 1: Variação dos valores dos raios dos éteres de coroa, em nanômetros, de acordo com a solução salina utilizada. (†) representa os valores obtidos pelo método de modelagem molecular; (#) representa os valores obtidos pelo método de variação da condutividade (\*) representa o valor médio dos raios com desvio padrão e (§) representa a diferença percentual dos dados obtidos pelos dois métodos..... 35



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Membrana celular.....	1
1.2. Lipídios.....	4
1.3. Proteínas.....	5
1.3.1. Canais iônicos.....	7
1.1.2. Staphylococcus aureus (proteínas exógenas).....	12
1.4. Éteres de coroa.....	14
2. OBJETIVOS.....	18
3. MATERIAL E MÉTODO.....	19
3.1. Análise do raio efetivo das coroas em solução aquosa.....	19
3.2. Interação dos éteres de coroa com o poro aquoso do canal iônico.....	20
3.2.1. Sistema de montagem experimental.....	20
3.2.2. Formação da bicamada lipídica.....	22
3.2.3. Adição de alfa-estafilotoxina.....	25
3.2.4. Obtenção dos valores da condutância em relação à voltagem.....	26
3.2.5. Adição de x-coroa-y.....	26
3.2.6. Análise do fator de não bloqueio do canal iônico.....	27
3.2.7. Análise da dose efeito das coroas sobre a condutância do canal.....	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
4.1. Estudo dos raios de éteres de coroa.....	29
4.1.1. Condutividade das soluções.....	30
4.1.2. Raios efetivos das coroas versus concentrações salinas.....	33
4.2. Interação dos complexos com o canal iônico.....	35
4.2.1. Incorporação e condutâncias do canal de alfa-estafilotoxina.....	35

4.2.2. Características da interação dos complexos com o canal iônico.....	37
4.2.3. Soluções de KCl .....	39
4.2.4. Soluções de NaCl .....	43
4.2.5. Soluções de LiCl.....	45
4.2.6. Fator de não bloqueio .....	48
5. CONCLUSÕES .....	51
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	52

## 1. INTRODUÇÃO

O corpo humano é constituído por diversos órgãos e tecidos que por sua vez são compostos de células – unidade fundamental da vida. Os seres humanos são como cidades celulares, nas quais grupos de células realizam tarefas especializadas e são ligados por um intrincado sistema de comunicação. A célula, como uma unidade viva, é constituída a partir de elementos menores (núcleo, organelas, membranas, etc.) que se agrupam para formar estruturas mais complexas, como os tecidos muscular e neural, por exemplo, que por sua vez realizam atividades e funções vitais para o organismo como um todo.

### *1.1.Membrana celular*

Um dos eventos cruciais na origem da primeira célula foi o desenvolvimento de uma membrana externa. A necessidade de conter moléculas - como o RNA e o DNA, por exemplo - para propiciar a criação de uma unidade viva, foi alcançada com o aparecimento de uma estrutura tipo membrana formada por uma classe de moléculas orgânicas – *anfipáticas* – que possui a propriedade físico-química de ter uma porção hidrófoba (insolúvel em água) e outra hidrofílica (solúvel em água). Quando tais moléculas são colocadas em contato com a água, elas se agregam de tal forma que suas porções hidrófobas ficam em contato íntimo, enquanto que a porção hidrofílica tende a ficar em contato com a água. Moléculas anfipáticas, com formas apropriadas, tendem espontaneamente a se agregar em bicamadas, criando pequenas vesículas fechadas, cuja parte aquosa é completamente isolada do meio externo. Todas as células existentes são delimitadas por uma membrana plasmática constituída de moléculas anfipáticas (a maioria fosfolipídios), colesterol e proteínas anfipáticas (ALBERT e col., 1997).

A membrana plasmática das células foi primeiramente descrita em meados do século XIX. No início do século XX, Overton notou a existência da correlação entre a velocidade em que várias moléculas pequenas penetravam nas células vegetais e seus coeficientes de partição

entre óleo e água (*OVERTON, 1985*) levando-o a especular acerca da natureza lipídica das membranas. Em 1925 Gorter e Grendel propuseram que lipídeos na membrana de eritrócitos eram arranjados na forma de folhetos bimoleculares ou bicamada lipídica. A membrana lipídica bimolecular foi elaborada em 1935 no modelo paucimolecular (modelo de Davson-Danielli) no qual foi postulado que as proteínas cobriam a superfície da bicamada. Em 1972, os pesquisadores Singer e Nicolson agregaram diversas idéias desenvolvidas em experimentos como a espectroscopia, difração de Raios-X e microscopia eletrônica e postularam um novo modelo de membrana celular nomeado de mosaico fluido. Este novo modelo basicamente mostra a membrana como uma bicamada de fosfolipídios fluidos na qual glóbulos protéicos se difundem livremente em vários graus de penetração. Atualmente é aceito que este é o modelo descrito que melhor define a estrutura da membrana plasmática. Segundo Lagüe e col. (2001), evidências na literatura recente demonstram que as moléculas de fosfolipídios na membrana mediam a interação da proteína com a membrana e proteínas entre si. Como exemplo podemos citar a atividade protéica modulada pelas propriedades físicas das moléculas lipídicas (*BROWN, 1994; BURACK e BILTONEN, 1994*) e interações proteína-proteína mediadas pela interação hidrófoba lipídica (*MOURISTEN e BILTONEN, 1993; MAY e BEM SHAUL, 1999; HARROUN e col., 1999*). Esses efeitos mostram claramente que a bicamada fosfolipídica não age apenas de forma estrutural sugerido pelo modelo do mosaico fluido de Singer e Nicolson (1972). Contudo, em várias formas modificadas o modelo do mosaico fluido irá claramente continuar a prover uma base conceitual para diversas pesquisas futuras (*GENNIS, 1989*).

As membranas celulares são essenciais para a vida da célula. A membrana plasmática envolve a célula, define seus limites, e mantém as diferenças essenciais entre o citosol e o meio extracelular. Dentro da célula, as membranas do retículo endoplasmático, aparelho de Golgi, mitocôndria e outras organelas envoltas por membrana, em células eucarióticas,

mantêm as diferenças características entre os conteúdos de cada organela e o citosol. Gradientes iônicos através das membranas, estabelecidos pelas atividades de proteínas especializadas da membrana, podem ser usados para sintetizar ATP, para dirigir o movimento transmembrana de solutos selecionados ou em células nervosas e musculares, para produzir e transmitir sinais elétricos. Em todas as células a membrana plasmática também contém proteínas que atuam como sensores de sinais externos, permitindo à célula mudar o seu comportamento em resposta a sinais ambientais; essas proteínas sensores, ou receptores transferem informação através da membrana ao invés de íons ou moléculas.

A despeito de suas funções diferentes, todas as membranas biológicas têm uma estrutura geral comum: cada qual é uma bicamada lipídica e de proteínas, mantidas juntas principalmente por interações não-covalentes. As membranas celulares são estruturas dinâmicas, fluidas, e a maior parte de suas moléculas são capazes de mover-se no plano da membrana. As moléculas lipídicas são arranjadas como uma dupla camada contínua com cerca de 5nm de espessura. Essa bicamada lipídica fornece a estrutura básica da membrana e atua como uma barreira relativamente impermeável à passagem da maioria das moléculas hidrossolúveis. Moléculas de proteínas “dissolvidas” na bicamada lipídica intermediam a maioria das outras funções da membrana, transportando moléculas específicas através dela (ALBERT e col., 1997).

A difusão de substâncias lipossolúveis na membrana ocorre diretamente pela bicamada lipídica. Já as substâncias hidrossolúveis necessitam de vias hidrofílicas para atravessarem as membranas. Os íons, por exemplo, necessitam da existência de canais protéicos denominados canais iônicos. Tal necessidade deve-se ao fato dos íons encontrar-se em um meio de constante dielétrica muito superior à constante dielétrica dos lipídeos. Logo, seria necessário um elevado gasto de energia pela célula para transportar os íons diretamente através da bicamada lipídica. A variação de energia livre envolvida no transporte de uma espécie iônica

através da bicamada lipídica, pode ser determinada através da equação sugerida por Born (BROCKRIS e REDDY, 1977).

Considerando que a constante dielétrica da água é cerca de 40 vezes maior que a constante dielétrica dos lipídeos, fica evidente na expressão de Born (fórmula 1) que na ausência de vias hidrofílicas a variação de energia livre seria positiva. Portanto na ausência dessas vias iônicas, a energia estocada nos gradientes eletroquímicos celulares não seria suficiente para suprir a energia necessária pra o transporte iônico (CRUZ, 1997).

$$\Delta G = \frac{Z^2 e^2}{8\pi R \epsilon_0} \left( \frac{1}{\epsilon_l} - \frac{1}{\epsilon_a} \right) \quad (1)$$

FÓRMULA 1: Fórmula da variação de energia livre envolvida no transporte de uma espécie iônica através da bicamada lipídica segundo Born Onde: ( $\Delta G$ ) é a variação de energia livre, ( $Z$ ) é a valência do íon, ( $R$ ) é o raio iônico, ( $e$ ) é a carga do elétron, ( $\epsilon_0$ ) é a constante dielétrica do vácuo, ( $\epsilon_l$ ) é a constante dielétrica do lipídeo e ( $\epsilon_a$ ) é a constante dielétrica da água (modificada da dissertação de Jackson Cruz, 1997).

Sendo uma barreira seletiva importante para que a célula mantenha sua estrutura e desenvolva suas funções, a membrana lipoprotéica, como o próprio nome diz, é composta principalmente por lipídeos (fosfolipídios, colesterol e glicolipídios) e proteínas (estruturais e periféricas).

### *1.2.Lipídios*

As moléculas de lipídio são insolúveis em água, mas dissolvem-se facilmente em solventes orgânicos e tendem a formar bicamadas lipídicas ou micelas espontaneamente em solução aquosa. Quando moléculas lipídicas são circundadas por água por todos os lados, elas tendem a agregar-se de modo que suas caudas hidrofóbicas fiquem ocultas no interior e suas cabeças hidrofílicas exponham-se à água. Dependendo da sua forma, elas podem fazer isso de dois modos: formando micelas esféricas, com as caudas para dentro, ou formando folhas bimoleculares, ou bicamadas, com suas caudas hidrofóbicas interpostas entre os grupos

hidrofílicos. Elas constituem cerca de 50% da massa da maioria das membranas de células animais, quase todo o restante sendo proteínas. Existem cerca de  $5 \times 10^6$  moléculas lipídicas em uma área de  $1\mu\text{m}^2$  de bicamada lipídica, ou cerca de  $10^9$  moléculas de lipídeos na membrana plasmática de uma pequena célula animal. Os lipídios mais abundantes são os fosfolipídios. Esses são formados por duas partes principais: cabeça e cauda. A cabeça, polar, pode ser formada por fosfato e glicerol mais uma molécula de colina, serina ou etanolamina enquanto as caudas, apolares, são formadas por duas cadeias de ácido graxo sendo uma saturada e outra insaturada (com uma ou mais ligações *cis*) e podem diferir em comprimento entre 14 e 24 átomos de carbono. Cada dupla-ligação causa uma pequena flexão na cauda. Diferenças no comprimento e saturação das caudas são importantes porque elas influenciam a capacidade das moléculas de fosfolipídios de agrupar-se umas contra as outras, e por essa razão afetam a fluidez da membrana.

Apesar da bicamada lipídica de muitas membranas celulares ser composta principalmente de fosfolipídios; ela freqüentemente também contém colesterol e glicolipídios. As moléculas de colesterol aumentam as propriedades de barreira-de-permeabilidade da bicamada lipídica. Os glicolipídios são integrantes exclusivos da monocamada lipídica externa e acredita-se que desempenham algum papel nas interações da célula com a sua vizinhança.

### *1.3. Proteínas*

As proteínas integrantes da membrana celular desenvolvem funções específicas. Correspondentemente, as quantidades e tipos de proteínas em uma membrana são muito variáveis. Na membrana de mielina, que atua principalmente como isolante elétrico para os axônios das células nervosas, menos de 25% da massa da membrana é de proteínas, enquanto nas membranas envolvidas em transdução de energia, como as membranas internas das mitocôndrias, aproximadamente 75% são de proteínas. A membrana plasmática comum

apresenta um valor intermediário, com cerca de 50% de sua massa constituída por proteínas. As proteínas da membrana podem ser associadas com a bicamada lipídica de vários modos. As que mais nos interessam são as proteínas transmembrana. Como os lipídeos, elas são estruturas anfipáticas tendo regiões interagindo com as caudas hidrófobas das moléculas de lipídeos e outras partes hidrofílicas expostas à água em ambos os lados da membrana. Enquanto a bicamada lipídica determina a estrutura básica das membranas biológicas, as proteínas são responsáveis pela maioria das funções da membrana, atuando como receptores específicos, enzimas, proteínas transportadoras, canais iônicos, entre outras funções. Muitas proteínas das membranas estendem-se através da bicamada lipídica: em algumas dessas proteínas transmembrana a cadeia polipeptídica cruza a bicamada como uma alfa-hélice única (proteínas unipasso); em outras, inclusive naquelas responsáveis pelo transporte transmembrana de íons e pequenas moléculas hidrossolúveis, a cadeia polipeptídica cruza a bicamada múltiplas vezes, seja como uma série de alfa-hélices, seja como uma beta-folha na forma de um barril fechado (proteínas multipasso). Em relação às moléculas não-polares, as membranas celulares permitem a sua passagem por simples difusão. Contudo, também devem permitir a passagem de várias moléculas polares, tais como íons, açúcares, aminoácidos, nucleotídeos e muitos metabólitos celulares, mas com velocidade de difusão bem reduzida. As proteínas carreadoras e canais iônicos existem para acelerar esse processo, sendo que as primeiras precisam se ligar ao soluto específico a ser transportado enquanto as últimas não necessitam desta relação íntima com o soluto para permitir sua passagem através da membrana. Elas formam poros hidrofílicos que se estendem através da bicamada. Como é de se esperar, o transporte através de canais iônicos ocorre a uma velocidade muito maior do que o transporte mediado por proteínas carreadoras (ALBERT e col., 1997).



### *1.3.1. Canais iônicos*

Duas propriedades importantes distinguem os canais iônicos de simples poros aquosos. Primeiro, eles apresentam seletividade iônica, permitindo a passagem de alguns íons inorgânicos, mas não de outros. Isso sugere que os seus poros devem ser suficientemente estreitos em alguns locais para forçar os íons a um contato íntimo com as paredes do canal, de modo que apenas os íons do tamanho e da carga apropriados podem passar. Supõe-se que os íons permeantes têm que perder a maior parte das moléculas de água a eles associados para poder passar, em fila única, através da parte mais estreita do canal, havendo uma substituição das ligações do íon com as moléculas d'água por ligações com as paredes internas do canal sem haver, desta forma, grande perda de energia. Esse processo limita a velocidade de passagem dos mesmos, assim, à medida que as concentrações iônicas são aumentadas, o fluxo de íons, através de um canal, aumenta proporcionalmente, mas a seguir estabiliza-se em uma velocidade máxima. Para que os canais iônicos possam participar da manutenção do potencial de repouso da célula é necessário que haja uma especificidade em relação aos substratos. A seletividade iônica é, talvez, a mais importante característica de um canal iônico (MIEDEMA, 2002).

A segunda diferença importante entre canais iônicos e simples poros aquosos é que os canais iônicos não estão continuamente abertos. Ao contrário, eles têm “portões”, os quais se abrem de acordo com a cinética molecular e então fecham novamente.

Os canais iônicos podem ser classificados de acordo com o tipo de estímulo necessário para a sua ativação, sua forma estrutural e o número de sub-unidades de que ele é composto.

Em relação à sua forma estrutural os canais iônicos, como qualquer outra proteína, são compostos por estruturas primárias, secundárias, terciárias e quaternárias. Por estarem distribuídos no espaço em todas as direções, os átomos constituintes das cadeias peptídicas não estão em um único plano. Faz-se necessário estudar a disposição dos átomos no espaço

em três dimensões. A seqüência de aminoácidos é chamada de estrutura primária da proteína. A estrutura secundária depende da conformação das uniões peptídicas sucessivas e é estabilizada por pontes de hidrogênio e forças não covalentes. Essas forças geralmente originam alfa-hélices e folhas beta-pregueadas. O lugar respectivo ocupado pelos diversos tipos de estruturas secundárias depende da proteína considerada. Algumas têm muitas alfa-hélices e poucas folhas beta-pregueadas, enquanto outras têm o oposto. Denomina-se estrutura terciária a disposição no espaço tomada pelos motivos estruturais distintos (alfa-hélices, folhas beta-pregueadas, codos e barris). Certas combinações formam unidades globulares dobradas compactamente, denominadas de domínio da proteína que são normalmente construídos de uma seção da cadeia polipeptídica, que contém de 50 a 350 aminoácidos.

No que diz respeito ao tipo de estímulo, os canais podem ser divididos em 5 grupos: dependentes de voltagem (Figura 1A), dependentes de neurotransmissores (Figura 1B), intracelulares (Figura 1C), dependentes de nucleotídeos cíclicos (Figura 1D) e acoplados à proteína-G (Figura 1E).

Muitos canais protéicos são formados pela associação de sub-unidades que têm uma estrutura terciária estável, cuja superfície externa apresenta detalhes estruturais que permitem uma disposição em uma ordem específica. Estas sub-unidades estão unidas entre si por ligações não covalentes. Essa associação de sub-unidades é mais estável do que cada sub-unidade isolada e caracterizam a estrutura quaternária do canal protéico (BOREL, 1989).

Os canais dependentes de voltagem são conhecidos por sua alta seletividade ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$ ) e tem seu menor raio em torno de 0,15 nm (HILLE, 1991).

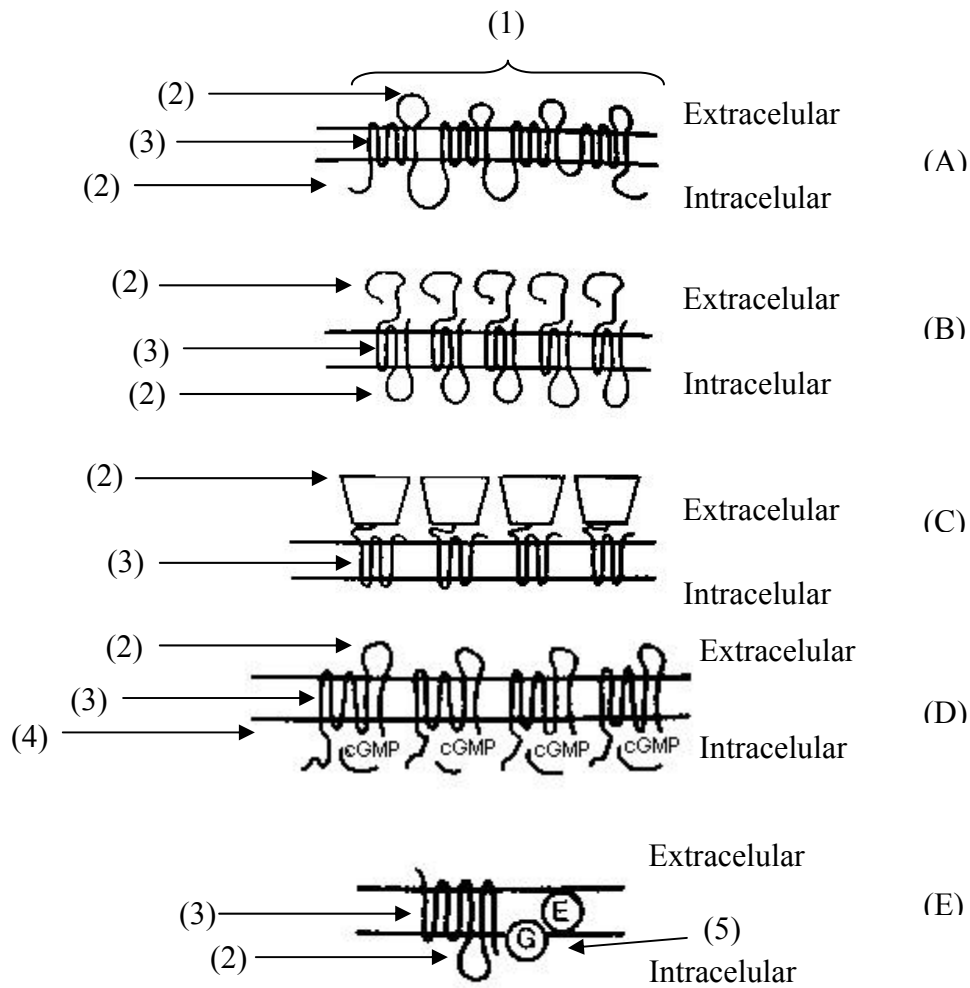


FIGURA 1: Representação esquemática das famílias de canais iônicos: (A) Dependentes de voltagem, (B) Dependentes de neurotransmissores, (C) Intracelulares (D) dependentes de nucleotídeos cíclicos onde: (1) sub-unidades e seus domínios; (2) alças; (3) segmento transmembrana; (4) sítio de ligação do nucleotídeo cíclico cGMP e (5) proteína-G (Modificado de Numa, 1989).

Cada tipo de canal tem um número específico de sub-unidades ou domínios que formam o canal. Os canais de sódio (Figura 2) e cálcio, por exemplo, são formados por uma única cadeia polipeptídica muito longa a qual possui 4 domínios enquanto que os canais de potássio, por sua vez, são formados por 4 moléculas de proteína distintas, sendo cada uma delas uma sub-unidade.

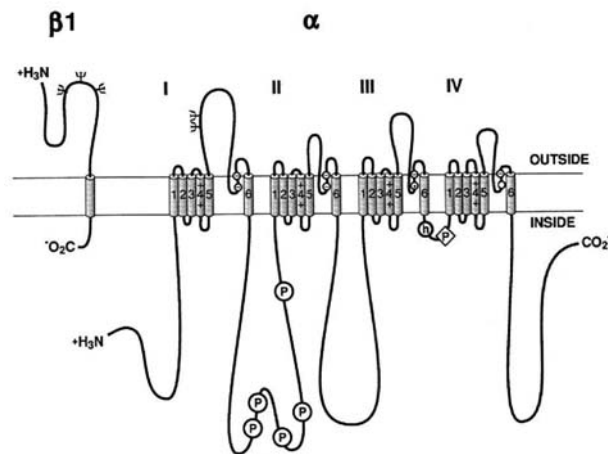


FIGURA 2: Estrutura primária das sub-unidades  $\alpha$  e  $\beta 1$  do canal de sódio ilustrada como diagrama das dobras transmembranas. A linha representa a cadeia polipeptídica das sub-unidades  $\alpha$  e  $\beta 1$  com o comprimento de cada segmento aproximadamente proporcional ao seu comprimento real nos canais de sódio do cérebro de rato. Cilindros representam alfa-hélices transmembranas. Os quatro domínios estão representados com os algarismos (I), (II), (III) e (IV) respectivamente. Outros segmentos provavelmente associados à membrana também estão representados.

As porinas mitocondriais, denominadas de VDAC (Voltage Dependent Anionic Channel) também fazem parte da família dos canais dependentes de voltagem (SCHEIN e col., 1976; COLOMBINI, 1979 e 1989; BENS e col., 1985). Nos últimos 20 anos as propriedades de condução dos VDAC têm sido estudadas em experimentos de reconstituição em bicamadas lipídicas planas e em lipossomas (SCHEIN e col., 1976; COLOMBINI, 1980; ZALMAN, NIKAIDO e KAGAWA, 1980; MANNELLA e GUO, 1990). De acordo com essas investigações os canais de VDAC podem existir em múltiplos estados conformacionais e com seletividades e permeabilidades diferentes.

A porina 31BM possui uma estrutura assimétrica. O diâmetro efetivo do lado da incorporação do canal "cis" é de 1,8 nm no estado de baixa condutância e 2 nm no estado de alta condutância. O lado oposto "trans" apresenta no estado de alta condutância um diâmetro efetivo de 4 nm e para o estado de baixa condutância de 2,4 nm (CARNEIRO e col., 2003). Sua sensibilidade ao potencial transmembrana pode ser aumentada por poliânions sintéticos, metais trivalentes e componentes mitocondriais endógenos. Além

disso, a dependência de voltagem deste canal mitocondrial pode ser alterada dramaticamente elevando o pH (BOWEN e col., 1985; MIRZABEKOV e ERMISHKIN, 1989) e por modificações químicas realizadas pelo anidrido succínico (DORING e COLOMBINI, 1985), sugerindo fortemente que aminoácidos carregados positivamente estão envolvidos no fenômeno de *voltage-gating*.

A neurotransmissão em sinapses químicas é mediada por receptores que fazem com que ligações dos neurotransmissores com receptores específicos promovam alterações no potencial da membrana. Essa família de canais tem a característica de mediar eventos rápidos (frações de milissegundos) (HIGASHIDA, 1993).

O canal receptor de acetilcolina (ACh) tem um peso molecular de 290kDa, localizada nas membranas pós-sinápticas das unidades motoras e é o canal iônico dependente de neurotransmissores mais estudado, pois é encontrado em abundância em peixes elétricos (Figura 3). Consiste de um anel com cinco sub-unidades similares ( $\alpha$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) delineando através da membrana um “túnel” central para a passagem dos íons. Sua estrutura longitudinal apresenta-se com regiões mais estreitas – ~2 nm de diâmetro – e outras mais largas – ~6,5 nm na fenda sináptica, mas com pouca seletividade iônica. O portão abre quando ocorre a ligação da ACh com as duas sub-unidades  $\alpha$  e fecha novamente quando a ACh sai da fenda sináptica ou na presença contínua da ACh, provocando uma dessensibilização do canal (UNWIN, 1995)

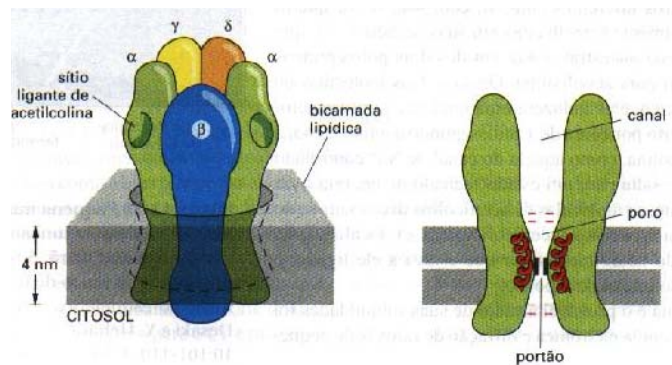


FIGURA 3: Modelo para a estrutura do receptor de acetilcolina. Cinco subunidades homólogas ( $\alpha$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ ) agrupam-se para formar um poro aquoso transmembrana. O poro é revestido por um anel de cinco  $\alpha$ -hélices transmembrana. O anel de  $\alpha$ -hélices é provavelmente circundado por uma borda contínua de folha  $\beta$ -transmembrana constituída pelos outros segmentos transmembrana das cinco subunidades. As cadeias laterais carregadas negativamente em ambas as extremidades do poro garantem que apenas íons positivos passem através do canal. Ambas as subunidades contêm um sítio ligante de acetilcolina. (Adaptado de N. Unwin, *Cell/Neuron* 72/10 [Suppl.] 31-41, 1993 © Cell Press.)

### 1.3.2. *Staphylococcus aureus* (proteínas exógenas)

Diversas proteínas provenientes de microorganismos apresentam a capacidade de formar canais iônicos. Apesar de não serem formas encontradas naturalmente em células humanas, os canais iônicos formados por proteínas exógenas apresentam características e funções semelhantes aos canais encontrados em células humanas. Uma delas é a alfa-toxina do *Staphylococcus aureus* produzida por bactérias, de fácil manuseio e que pode ser utilizada como modelo experimental de canais iônicos em geral (RODRIGUES, 1995).

A identificação do *Staphylococcus aureus* como agente patogênico do ser humano foi descoberto por Ogston e publicado em seu artigo de 1881. Nas décadas seguintes ficou claro que o *S. aureus* era uma das causas mais comuns de infecções bacterianas em humanos, produzindo um grande espectro de doenças desde supurações superficiais da pele até septicemias sistêmicas. A primeira pesquisa realizada com a alfa-toxina foi devido a uma tragédia na cidade australiana de Bundaberg em 1928. Vinte e uma crianças que foram vacinadas com o toxóide da difteria ficaram gravemente doentes e 12 morreram. No percurso

de sua investigação da causa desse desastre, Brunet isolou o *S. aureus* a partir de uma preparação do toxóide (BRUNET, 1929; BRUNET, 1930).

A identificação da alfa-toxina como formadora de poros se deu graças a diversas pesquisas desenvolvidas durante o final da década de 60 e início da década de 80 (ARBUTHNOTT, FREER e BERNHEIMER, 1967; ARBUTHNOTT, FREER e BILLCLIFFE, 1973; BERNHEIMER, 1974; BERNHEIMER e col., 1972; BERNHEIMER e SCHWARTZ, 1963; BHAKDI, FÜSSLE e TRANUM-JENSEN, 1981). Essa toxina é um polipeptídeo de peso molecular entre 33.000 e 34.000 Da, com coeficiente de sedimentação de 3,3 S (BHAKDI e TRANUM-JANSEN, 1991), composta de 293 resíduos de aminoácidos (GRAY e KEHOE, 1984) e, na forma nativa, é uma molécula hidrofílica que está presente na forma monomérica na solução aquosa e que o acoplamento com a célula alvo é acompanhado da formação de um oligômero de estrutura circular, provavelmente heptâmeros (SONG e col., 1996).

Segundo Teixeira (2003), o conceito da alfa-estafilotoxina como proteína formadora de poros foi reforçado por Krasilnikov e col. em 1980 e 1981, quando, em seus trabalhos, observaram a formação de canais iônicos em membranas lipídicas planas. Recentemente, estudos mostraram que a formação do canal se dá quando os monômeros da alfa-toxina ligados à membrana interagem e oligomerizam-se para formar verdadeiros complexos protéicos anfífilicos de estruturas anelares (BHAKDI e col., 1993). A estrutura do canal de alfa-toxina do *Staphylococcus aureus* é um canal preenchido com solvente e mede cerca de 100 Å em comprimento e de 1,4 nm a 4,6 nm em diâmetro (SONG e col., 1996), caracterizando uma baixa seletividade iônica.

Em 1992, Krasilnikov e colaboradores propuseram um método para a determinação do diâmetro efetivo do poro aquoso de canais iônicos o qual foi aplicado na alfa-estafilotoxina. Este método basicamente consiste na mensuração da corrente iônica através do canal na

presença de uma série de substâncias não eletrolíticas de tamanhos diferentes. Deste modo a corrente diminui quando o não-eletrólito penetra no lúmen aquoso do canal, voltando ao seu valor normal quando ele não mais penetra, conseqüentemente o diâmetro do poro será aproximadamente igual ao do raio deste não-eletrólito (RODRIGUES, 1995).

O poro aquoso formado pela alfa-estafilotoxina, dependendo das condições experimentais, pode mostrar alta sensibilidade para voltagem (*gating*).

Devido a essas características e a uma maior facilidade de se obter este canal em relação àqueles de células excitáveis, o canal iônico formado pela alfa-toxina em membranas artificiais é um modelo adequado para se analisar o comportamento do canal em várias condições controladas rigorosamente.

Apesar de não ser uma forma encontrada em células humanas, o canal da alfa-toxina já foi seriamente estudado por inúmeros pesquisadores (SONG e col., 1996; BRAHA e col., 1997; FANG e col., 1997; BAYLEY, 1997; PALMER, 1997; BHAKDI, 1997; KRASILNIKOV e col., 2000; DRAGNEVA e col., 2001; VALEVA e col., 2001) e é altamente reconhecida como canal modelo.

#### *1.4.Éteres de coroa*

Em 1987, o Prêmio Nobel de Química foi concedido a Charles J. Pedersen (aposentado da DuPont), Donald J. Cram (aposentado da Universidade da Califórnia, Los Angeles) e Jean-Marie Lehn (Louis Pasteur University, Strasbourg, França) por terem desenvolvido os éteres de coroa e outras moléculas “com estruturas de interações específicas de alta seletividade” (SOLOMONS e FRYHLE, 2001). Suas contribuições para o nosso entendimento do que é atualmente chamado de “reconhecimento molecular” implica como as enzimas reconhecem seus substratos, como os hormônios causam seus efeitos, como os anticorpos reconhecem os antígenos, como os neurotransmissores propagam seus sinais e muitos outros aspectos da bioquímica.



Éteres de coroa são chamados de x-coroa-y, onde x é o número total de átomos no anel e y é o número de átomos de oxigênio. O relacionamento entre os éteres de coroa e o íon que ele transporta é chamado relacionamento hospedeiro-hóspede. O éter de coroa age como o hospedeiro e o cátion coordenado é o hóspede. (Figuras 4A, B e C).

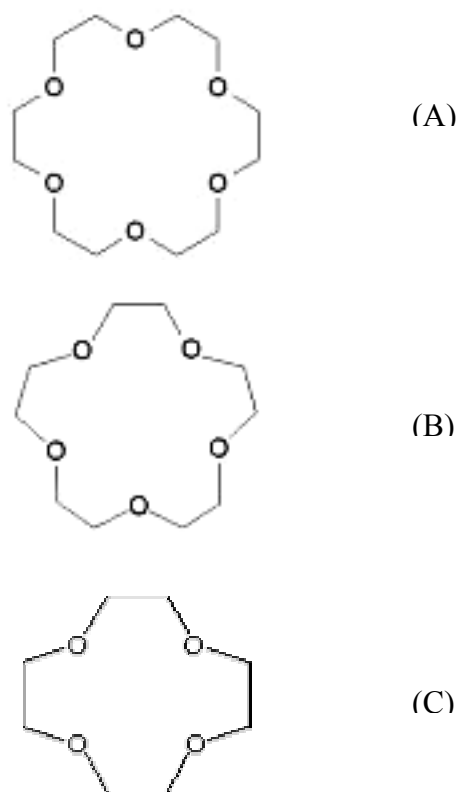


FIGURA 4: Representação esquemática de polímeros cíclicos de etilenoglicol: (A)18-coroa-6, (B) 15-coroa-5 e (C) 12-coroa-4. Todos com os átomos de oxigênio voltados para a parte central.

A interação do ligante macrocíclico com cátions de metais alcalinos, alcalinos terrosos e lantanídeos (III) é considerada primariamente como do tipo íon-dipolo. Um exemplo de tal complexo é a interação existente entre o 18-coroa-6 e o  $K^+$  (Figura 5). Através da cristalografia por raios-X, foi comprovada a existência dessa estrutura no estado sólido. O cátion é mantido por campos elétricos gerados pelas ligações dipolo que o cercam (IZATT e CHRISTENSEN, 1981).

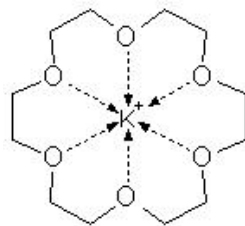


FIGURA 5: Representação esquemática da interação do 18-coroa-6 com o íon de potássio.

Quando éteres de coroa se coordenam com um cátion de metal, eles convertem o íon de metal em uma espécie cujo exterior é semelhante a um hidrocarboneto. O éter de coroa 18-coroa-6, por exemplo, se coordena muito eficazmente com íons potássio, pois o tamanho da cavidade é atenuado e devido aos seis átomos de oxigênio situarem-se de maneira ideal para doar seus pares de elétrons para o íon central (SOLOMONS e FRYHLE, 2001).

Desde o seu desenvolvimento (1987) até os dias de hoje os éteres de coroa têm sido utilizados nas áreas de bioquímica, biofísica, radiobiologia e fisiologia molecular. Esses compostos cíclicos podem ser utilizados em diversas linhas de pesquisa como sondas e componentes de sensores (REESE e ASHER, 2003; DAVID e BRODBELT, 2003; KADO e KIMURA, 2003).

Segundo Braha e col. (1997) sensores de um modo geral são necessários na área militar na bioengenharia e na medicina. Podem ser utilizados para diagnosticar a concentração de componentes em fluidos fisiológicos, monitorar o nível de agentes terapêuticos e detectar a presença de microorganismos e suas toxinas. Podem também identificar componentes de armas químicas e gases tóxicos. Na esfera ambiental seu papel tem sido de quantificar níveis de poluentes e determinar a presença de minerais. Esses sensores também são utilizados nas indústrias de alimento e bebidas para determinar a qualidade e até a origem de vários produtos como o café e o vinho.

Moléculas em geral cujos tamanhos sejam bem definidos podem ser utilizadas como sondas de identificação. No trabalho de Merzlyak e colaboradores (1999) polímeros não eletrolíticos de Polietilenoglicol (PEG) foram utilizados para identificar a geometria dos

canais de alfa toxina do *Staphylococcus aureus*. Segundo eles o uso desses instrumentos é capaz de produzir informações a respeito das propriedades do lúmen do canal mais precisas do que os métodos de microscopia eletrônica e difração por raios-X.

As moléculas teste para a realização deste trabalho foram compostos chamados de éteres de coroa que são polímeros cíclicos do etilenoglicol (Figuras 4A, B e C) em soluções aquosas com diferentes composições iônicas. As coroas podem formar complexos com cátions (Figura 5) e podem entrar no poro aquoso alterando a condutância do canal iônico de forma a obstruir ou diminuir o fluxo iônico pelo poro. Assim, esperamos observar que, variando o nível de voltagem, os complexos bloqueiam o canal iônico em quantidades diferentes, de acordo com a relação entre o tamanho dos complexos e do poro aquoso.

## 2. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho são:

1. Estudar a aplicabilidade da teoria inicialmente desenvolvida para micropartículas na determinação do tamanho de nanomoléculas (éteres de coroa) em solução aquosa;
2. Estudar a interação das moléculas formadoras de complexos (éteres de coroa) com o poro aquoso do canal iônico.

### 3. MATERIAL E MÉTODO

#### 3.1. Análise do raio efetivo das coroas em solução aquosa

Com o objetivo de identificar o raio efetivo das coroas utilizamos dois caminhos: Um *software* criado pela *Cambridge Software Corporation* para modelagem e análise molecular – *CSCChem3D Pro* – e o método da condutividade que utiliza uma função matemática (fórmula 2) desenvolvida para medição de raios efetivos através de medidas elétricas das soluções aquosas na presença de não eletrólitos.

O *software* é muito utilizado por pesquisadores em análises moleculares (CHANG, 2002; BOYSEN, 2002 e YOSHII, 2002) e é aceito como uma ferramenta confiável na criação e estudo de modelos moleculares. Por trabalhar com a mecânica e dinâmica molecular e considerar as forças eletrostáticas existentes entre as partículas que formam as moléculas, este programa é capaz de criar modelos precisos dos éteres de coroa isoladamente e foi utilizado para análise do raio efetivo dos éteres de coroa.

A função matemática (fórmula 2) usada por Beruskov (1999) para medição do raio de moléculas de ATP, foi originalmente desenvolvida para a medição de raios efetivos de estruturas microscópicas. Não existem mais comprovações sobre sua aplicabilidade. Entretanto ela foi utilizada para medir o tamanho médio dos éteres de coroa utilizados (12coroa4, 15coroa5 e 18coroa6) com o objetivo de viabilizar esse caminho para a medição de estruturas nanoscópicas.

$$r = \sqrt[3]{\frac{1}{2\pi n} * \frac{\Delta\sigma}{\sigma_0}} \quad (2)$$

FÓRMULA 2: Modelo experimental para medição do raio efetivo dos éteres de coroa onde: ( $\Delta\sigma$ ) é a variação da condutividade da solução na presença de partículas não condutoras; ( $\sigma_0$ ) é a condutividade da solução livre de partículas não condutoras e ( $n$ ) é o número de partículas por unidade de volume.

A variação de condutividade da solução na presença de partículas não condutoras (12coroa4, 15coroa5 e 18coroa6) e a condutividade da solução livre dessas partículas são valores necessários para a determinação do raio efetivo das coroas em solução aquosa. As medidas de condutividade foram realizadas em diversas concentrações salinas (100, 500, 1000 e 2000 mM) por um condutivímetro HI 9033 (HANNA Instruments Inc., Woonsocket, RI) em um ultratermostato em banho maria (Multitemp II 2219, LKB-Bromma, Suécia). O volume da solução foi fixado em 7,5 ml e a temperatura mantida constante à  $25\pm 0,1^\circ\text{C}$ . Como os valores da condutividade das três soluções (KCl, NaCl e LiCl) nas quatro concentrações utilizadas são consideravelmente diferentes, valores relativos de condutividade foram utilizados para a apresentação dos resultados de estimativa do raio efetivo das coroas neste método.

### *3.2. Interação dos éteres de coroa com o poro aquoso do canal iônico.*

#### *3.2.1. Sistema de montagem experimental*

Em todos os experimentos o sistema utilizado para estimulação, monitoração e aquisição de dados consiste de um gerador de onda triangular e um pulsador de voltagem contínua de +200mV a -200mV, um amplificador configurado como conversor de corrente-voltagem, outro amplificador configurado para gerar ganho no sinal, um osciloscópio (Tektronix, modelo TDS-210), computador IBM 486 de 8MB RAM com Microsoft Windows 95, placa de aquisição de dados da National Instruments (LAB-PC) e programa de registro de dados experimentais WCP (Whole Cell Electrophysiology Program V1.7b) (figura 6).

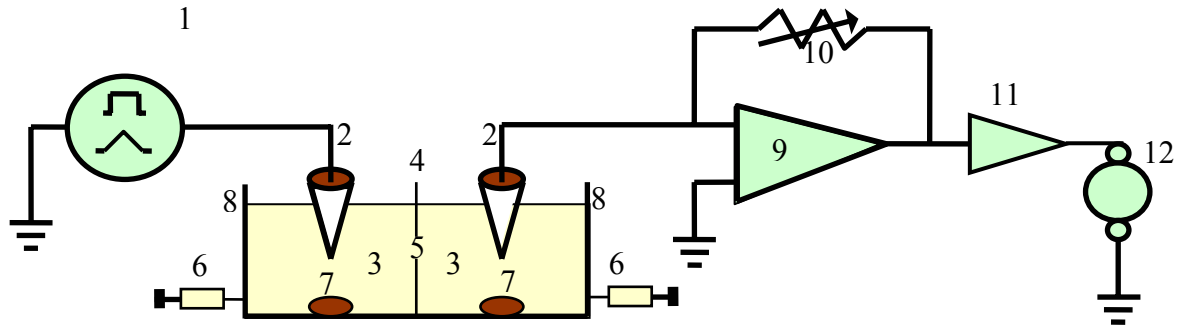


FIGURA 6: Diagrama da montagem experimental. 1) Gerador de onda triangular e pulsador DC; 2) Eletrodos de prata-cloreto de prata; 3) Pontes salinas; 4) Partição de Teflon®; 5) Orifício; 6) Seringa hipodérmica; 7) Barras magnéticas; 8) Hemicâmara de Teflon®; 9) Amplificador operacional configurado como conversor corrente-voltagem; 10) Resistência de “feedback”; 11) Ganho e 12) Saída para osciloscópio e computador.

A conexão dos compartimentos da câmara ao sistema de medidas elétricas é feita através de pontes salinas do tipo AGAR-KCl (3% em peso de AGAR em KCl 3M) e eletrodos de prata-cloreto de prata (Ag/AgCl) (figura 7). O lado *cis* da câmara, é conectado ao gerador de onda triangular e ao pulsador D.C., e o lado *trans* a um amplificador de corrente (K284UD1A, USSR) e a um segundo estágio de amplificação (ganho) de 1, 10 ou 100 vezes. A saída deste circuito é ligada simultaneamente ao osciloscópio e ao sistema de gravação do sinal. O sinal de voltagem aplicada é, por convenção, o sinal do lado *cis* da membrana. Assim, +100mV significa que o lado *cis* se encontrava a um potencial de 100mV acima do lado *trans*. Desta maneira a corrente é definida como positiva quando cátions fluem para fora do compartimento *cis*.

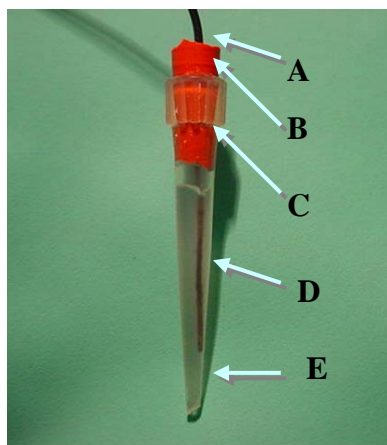


FIGURA 7: Eletrodo de prata-cloreto de prata em ponte salina para transdução do sinal elétrico através dos canais iônicos. (A) fio de cobre; (B) tampa de borracha; (C) ponteira plástica; (D) fio de prata cloretado; (E) Pontes salinas do tipo gel de AGAR-KCl (3% em peso de AGAR em KCl 3M).

Antes do início de cada experimento testa-se sempre se há diferença de potencial de junção dos eletrodos. Em caso de haver potenciais de junção acima de 1mV, o par de eletrodos é substituído. A medida dos potenciais dos eletrodos também é feita após o término de cada experimento e nos casos de assimetria acima de 1 mV, descarta-se o experimento.

### 3.2.2. Formação da bicamada lipídica

As bicamadas lipídicas planas utilizadas neste trabalho foram confeccionadas de acordo com a técnica de Montal e Mueller (1972), a qual baseia-se na junção de dois filmes lipídicos monomoleculares em uma partição de Teflon® (politetrafluoretileno) com um orifício que separa dois compartimentos de uma câmara (figura 8) também de Teflon® contendo soluções salinas, de forma que as porções apolares das moléculas de lipídeo se unam enquanto as porções polares localizem-se externamente em relação às monocamadas centrais.



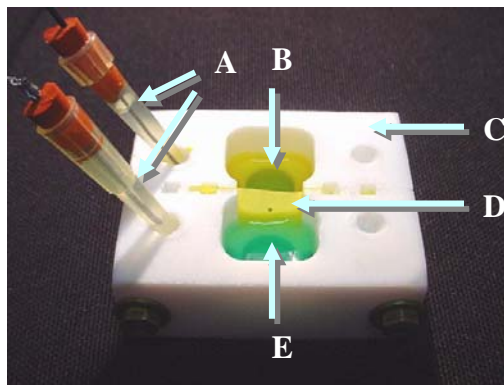


FIGURA 8: Modelo de câmara de Teflon® utilizada durante os experimentos de medição da variação da condutância dos canais iônicos. (A) eletrodos de prata-cloreto de prata; (B) compartimento *trans*; (C) câmara de Teflon®; (D) partição de Teflon® com orifício; (E) compartimento *cis*.

Desta maneira é formada uma verdadeira bicamada lipídica plana no orifício da partição, onde os ácidos graxos estão privados de contato com as soluções salinas externas pelas cabeças polares das moléculas lipídicas.

A membrana artificial é formada através da deposição de 1000µl de solução salina nos dois compartimentos da câmara e em seguida 15µl de uma solução de 1,2 – difitanoil – sn – glicerol – 3 – fosfatidilcolina em hexano (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>) (0,5% peso/volume) foram depositados na superfície da solução salina também nos dois compartimentos de maneira que o nível das soluções fique abaixo do orifício da partição de Teflon®. Após 10 minutos de espera para ocorrer a evaporação do hexano, há a formação espontânea de monocamadas lipídicas na superfície da solução salina em cada lado da partição. Em seguida o orifício é tratado com hexadecano diluído em hexano (1% volume/volume) para que haja uma minimização das irregularidades das bordas internas do orifício além de aumentar a adesão e estabilidade dos lipídeos. Após cerca de 2 minutos as monocamadas são elevadas consecutivamente – primeiro o lado *trans* e em seguida o lado *cis* – contra a partição através da adição lenta de mais 1000µl de solução salina em cada compartimento da câmara (figura 9), de forma que as cadeias hidrocarbonadas toquem a parede de Teflon®. Os filmes lipídicos fazem contato direto entre si quando atingem o orifício, ocorrendo nesse momento, a formação da bicamada lipídica.

O processo de formação da bicamada lipídica é identificado e monitorado pela resposta capacitiva no osciloscópio. Essa resposta aparece toda vez que se aplica uma corrente de pulsos triangulares em um meio condutor (soluções salinas nos compartimentos *cis* e *trans*) separado por um meio isolante (bicamada lipídica). Em seguida mede-se a capacitância (fórmula 3) e a condutância (fórmula 4) da membrana para certificar-se de que a membrana formada é de boa qualidade e irá suportar as pressões elétricas exercidas sobre a mesma. Para que a membrana seja considerada de boa qualidade é preciso que ela tenha uma condutância entre 4 e 5 pS e uma capacitância em torno de 600 pF. Vale salientar que esses valores são dependentes da área do orifício da partição, ou seja, quanto maior for o orifício maior serão os valores da condutância e capacitância.

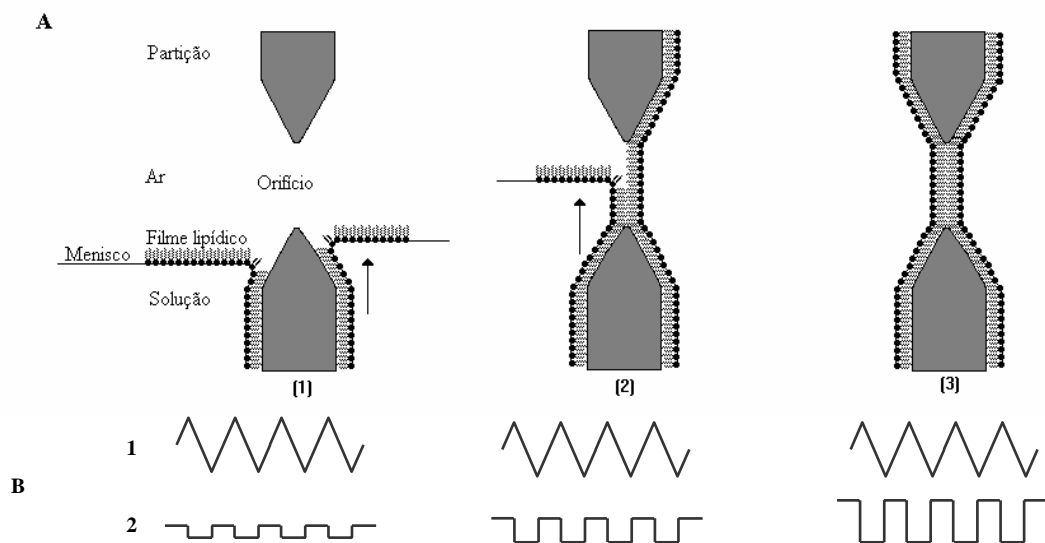


FIGURA 9: Representação do processo de construção da bicamada lipídica plana e da monitoração simultânea do processo. A) Etapas da formação: (1) filmes lipídicos sobre as superfícies das soluções, (2) deposição do segundo filme lipídico e (3) bicamada lipídica plana completamente formada. As setas indicam o sentido da elevação do nível da solução; B) Etapas da monitoração: (1) onda triangular aplicada ao sistema e (2) resposta de corrente capacitiva do sistema.

$$C = \frac{I}{\left(\frac{dV}{dt}\right)} \quad (3)$$

FÓRMULA 3: Equação para determinação da capacitância da membrana, onde: (C) é a capacitância (S); (I) é a intensidade de corrente (A); (dV) é a variação de voltagem em Volts dos pulsos triangulares e (dt) é a variação de tempo em segundos dos pulsos triangulares.

Para determinar o valor da intensidade de corrente na fórmula 3 é preciso dividir a voltagem lida no osciloscópio (módulo da fase positiva ou negativa) pela resistência de retroalimentação utilizada.

Todos os experimentos foram realizados sob as seguintes condições: temperatura ambiente de  $26,5 \pm 1,5^{\circ}\text{C}$ ; partições de Teflon® de  $25\mu\text{m}$  de espessura,  $3,5\text{cm}$  de largura e  $1,5\text{cm}$  de altura, com orifício de aproximadamente  $300\mu\text{m}$  de diâmetro localizado a  $2/3$  da altura da partição. Foram utilizadas 3 soluções salinas diferentes: Cloreto de potássio (KCl), cloreto de sódio (NaCl) e cloreto de lítio (LiCl). Todas com concentração de 1M, tamponadas com tris-hidroximetil-aminometano a 5mM e com pH de 7,5 titulados com ácido cítrico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ ).

### 3.2.3. Adição de alfa-estafilotoxina

A adição da proteína formadora de canal é feita logo após a formação da membrana. Com o uso de uma micropipeta regulável de  $2\mu\text{l}$  retira-se cerca de  $0,5\mu\text{l}$  da solução de estoque de alfa-estafilotoxina ( $0,05\text{mg}/\mu\text{l}$ ) e adiciona-se na solução do compartimento *cis* bem próximo ao orifício da partição. Agita-se a solução para acelerar a difusão da proteína e a incorporação do canal na membrana. A abertura de um canal unitário é monitorada pelo osciloscópio.

A incorporação do canal e os parâmetros elétricos obtidos a partir do sistema da montagem experimental foram armazenados em computador por meio do programa de

aquisição de dados *Whole Cell Electrophysiology Program VI.7b* (WCP) e posteriormente analisados por intermédio do *Microcal Origin V5.0*.

#### 3.2.4. *Obtenção dos valores da condutância em relação à voltagem*

A voltagem foi inicialmente fixada em  $-40\text{mV}$  para identificar se o canal é ou não adequado. Logo em seguida aplica-se uma voltagem de  $+40\text{mV}$  para comprovar a simetria do canal. O próximo passo é variar a voltagem entre valores positivos e negativos de forma crescente, ou seja,  $+10\text{mV}$ ,  $-10\text{mV}$ ,  $+20\text{mV}$ ,  $-20\text{mV}$  e assim por diante até atingir o valor máximo de  $+200\text{mV}$  e  $-200\text{mV}$ .

O valor da condutância de um canal em relação às diversas tensões aplicadas é calculado através da aplicação direta da lei de Ohm (Fórmula 4). Os dados experimentais – intensidade de corrente (A) – colhidos dos registros do WCP são divididos pela respectiva voltagem (V) tendo como resultado o valor da condutância (G).

$$G = \frac{I}{V} \quad (4)$$

FÓRMULA 4: Lei de Ohm onde: (G) é a condutância medida em Siemens (S); (I) é a intensidade de corrente medida em Ampère (A); e (V) é a voltagem medida em Volts (V).

Os valores das condutâncias referentes às aplicações das diversas tensões foram medidos com o canal em seu estado de alta condutância e sem adição de nenhum tipo de bloqueador de canal. Portanto consideramos que os dados obtidos são os parâmetros controle. Ou seja, esses valores serão nossa referência para comparar qual o efeito que as coroas terão na condutância do canal.

#### 3.2.5. *Adição de x-coroa-y*

Três diferentes éteres de coroa foram utilizados: 12coroa4, 15coroa5 e 18coroa6, todos em solução de estoque com concentração de 2M. Apenas o 12coroa4 com NaCl que teve uma menor concentração (0,5M) porque ocorreu precipitação com concentrações mais elevadas.

Os experimentos foram realizados de forma que os três tipos de éter de coroa e os três tipos de solução fizessem todas as combinações possíveis, ou seja: 12coroa4 com KCl, 12coroa4 com NaCl, 12coroa4 com LiCl; 15coroa5 com KCl, 15coroa5 com NaCl, 15coroa5 com LiCl; 18coroa6 com KCl, 18coroa6 com NaCl e 18coroa6 com LiCl.

É importante salientar que as coroas em soluções aquosas podem formar complexos com cátions de acordo com a constante de estabilidade. Portanto as coroas podem se apresentar de duas formas: independentes ou em complexos.

Inicialmente o éter de coroa foi adicionado em quantidades e concentrações iguais dos dois lados da partição, em volume suficiente para que a concentração de coroa nas hemicâmaras aumentasse 10mM ou 20mM de cada vez, progredindo até uma concentração máxima de 100mM. Os valores das condutâncias obtidos nessa fase permitem a geração dos gráficos de condutância em função de voltagem. Em diferentes experimentos o éter de coroa foi adicionado em apenas um dos lados da câmara – *cis* ou *trans*. Desta forma podendo identificar de que lado do canal a coroa tem maior atuação.

### 3.2.6. Análise do fator de não bloqueio do canal iônico

No sistema de registro utilizado não é possível observar a entrada unitária de coroa no poro aquoso. O que se vê é um efeito integral da diminuição da condutância através do canal. A maneira mais simples de se estimar o fator de não bloqueio do canal é calcular a relação existente entre a condutância do canal antes e depois da adição de coroa.

O fator que mede a possibilidade do canal permanecer sem obstrução (fórmula 5) é analisada através da divisão das condutâncias do canal na presença da coroa pelas condutâncias do canal na ausência de coroa. A partir desse simples cálculo obtemos o fator que mede a possibilidade do canal estar no estado não obstruído. Os dados do fator de não bloqueio permitem a criação de gráficos para análise da dependência do canal permanecer sem bloqueio em relação à voltagem.

$$F = \frac{G_{coroa}}{G_0} \quad (5)$$

FÓRMULA 5: Fator que mede a possibilidade do canal permanecer sem obstrução onde: (F) é o fator de não obstrução; ( $G_{coroa}$ ) é a condutância na presença de coroas e ( $G_0$ ) é a condutância na ausência de coroas.

### 3.2.7. Análise da dose efeito das coroas sobre a condutância do canal

É importante saber o nível de tensão no qual a coroa promove maior interferência na condutância do canal iônico. Através da análise do fator de não obstrução do poro aquoso podemos identificar em qual voltagem a coroa promove o maior bloqueio. Em seguida divide-se o valor das condutâncias referente às voltagens de maior influência dos valores experimentais pelo valor controle. Depois se multiplica os dados resultantes por 100. Dessa maneira se tem os percentuais da dependência da condutância do canal pela concentração de coroa. Para analisar essa dependência usamos o modelo de Michaelis-Menten para condutância de canais iônicos (fórmula 6).

$$G_i = \frac{G_{m\acute{a}x} - (G_{m\acute{a}x} - G_{m\acute{i}n}) * C_i}{(C_{50} + C_i)} \quad (6)$$

FÓRMULA 6: Modelo de Michaelis-Menten para condutância de canais iônicos onde: ( $G_i$ ) é a condutância em Siemens; ( $G_{m\acute{a}x}$ ) é a condutância máxima; ( $G_{m\acute{i}n}$ ) é a condutância mínima; ( $C_i$ ) é a concentração de coroa e ( $C_{50}$ ) é a concentração de meio efeito.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Estudo dos raios de éteres de coroa

Como descrito anteriormente, para estimar os raios efetivos dos éteres de coroa (18coroa6, 15coroa5 e 12coroa4) foram usados dois procedimentos. No primeiro foi utilizado um programa de computador criado pela *Cambridge Software Corporation* para modelagem e análise molecular – *CSCChem3D Pro*. Os resultados estão presentes nas figuras 10A, B e C. Vimos que os éteres de coroa possuem os seguintes raios: 0,56nm para 18coroa6; 0,5nm para 15coroa5 e 0,46nm para 12coroa4.

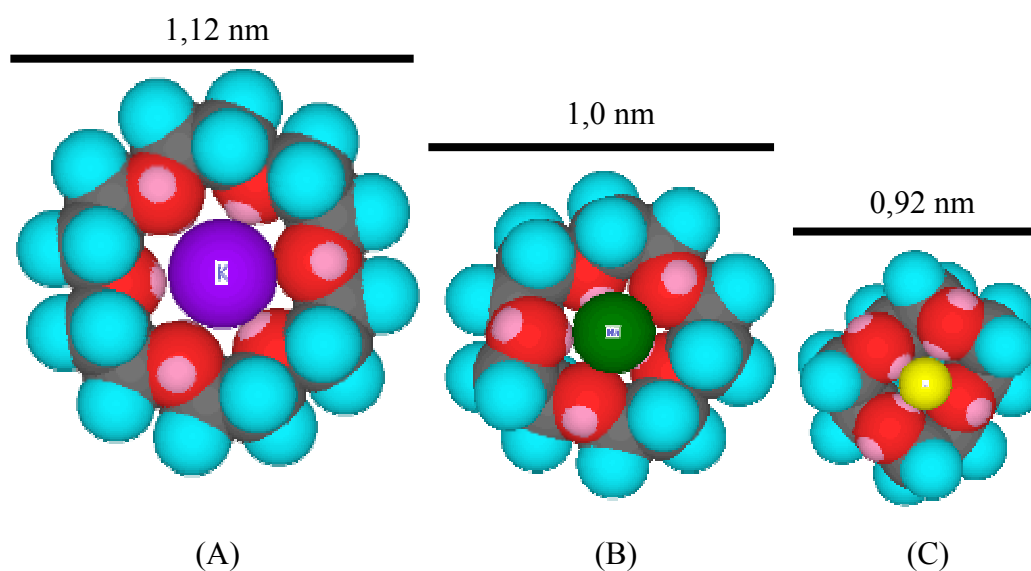


FIGURA 10: Reprodução em modelo espacial preenchido com representação do maior diâmetro dos complexos: (A) 18coroa6- $K^+$ ; (B) 15coroa5- $Na^+$  e (C) 12coroa4- $Li^+$  onde: esferas azuis representam os átomos de hidrogênio, vermelhas representam os átomos de oxigênio e cinza os de carbono. As esferas centrais lilás, verde e amarela representam os íons de potássio, sódio e lítio respectivamente.

O segundo procedimento envolveu a determinação da variação da condutividade da solução salina na presença de éteres de coroa ( $\Delta\sigma$ ), da condutividade da solução livre de coroas ( $\sigma_0$ ) e do número de coroas por unidade de volume ( $n$ ).

#### 4.1.1. Condutividade das soluções

Observamos que com a adição de qualquer éter de coroa sempre há uma diminuição da condutividade da solução. A influência dos três éteres de coroa (18C6, 15C5 e 12C4) com as três soluções salinas (LiCl, NaCl e KCl) foram estudadas.

Com o uso de quatro concentrações bem diferentes de sal, sendo a mais alta (2 M) 20 vezes maior que a concentração mais baixa (0,1 M), a comparação direta dos resultados no mesmo gráfico não seria adequado. Portanto para facilitar a visualização gráfica os valores das condutividades foram transformados em valores relativos, ou seja, consideramos a maior condutividade de cada tipo de solução (na ausência de éteres de coroa) como 100% e os demais valores relativos a ela. Os resultados obtidos com a solução de cloreto de potássio e as três coroas estão presentes nas figuras 11A, B e C.

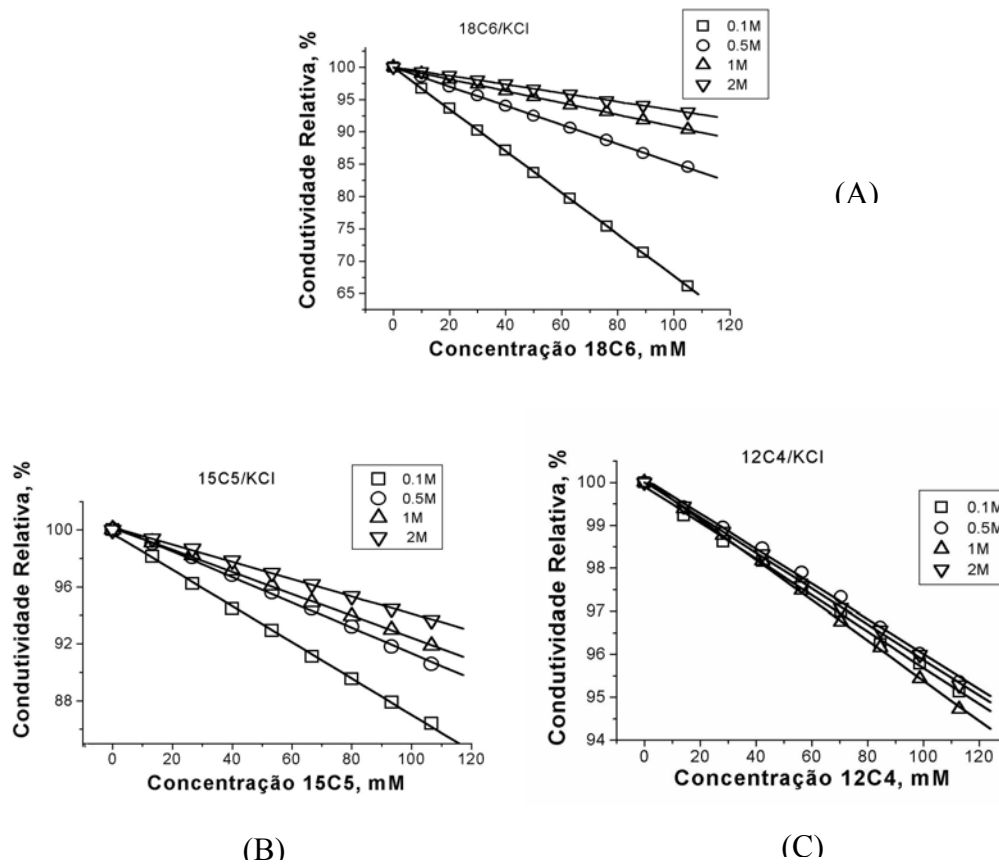


FIGURA 11: Dependência da condutividade da solução de cloreto de potássio nas variações de concentração de: (A)18coroa6, (B)15coroa5 e (C)12coroa4.



Qualitativamente as variações da condutividade das soluções de cloreto de sódio, sob influência das coroas, apresentaram características semelhantes às de cloreto de potássio. Em contrapartida as soluções de cloreto de lítio não apresentaram diferenças entre as mudanças de condutividade com a variação da concentração de coroas. Ou seja, as mudanças relativas de condutividade das soluções de cloreto de lítio tais como 0,1 M e 2 M foram praticamente idênticas.

Para explicar os resultados obtidos temos que lembrar que há pelo menos dois motivos para a diminuição da condutividade das soluções na presença de éteres de coroa ou qualquer outra partícula ou molécula não condutora. O primeiro motivo é o aumento da viscosidade ( $\eta$ ) da solução na presença de partículas não condutoras (coroas). De acordo com a lei de Stokes-Einstein (fórmula 7) o aumento da viscosidade acarretará em uma diminuição do coeficiente de difusão ( $D$ ) de partículas esféricas (íons no nosso caso). O aumento da viscosidade também promove uma redução do coeficiente de mobilidade de partículas carregadas ( $u$ ) (fórmula 8). Então fica claro que o simples aumento da concentração das moléculas não condutoras deve promover a diminuição da condutividade.

$$D = \frac{RT}{6\pi\eta r} \quad (7)$$

FÓRMULA 7: Lei de Stokes-Einstein para difusão de partículas microscópicas esféricas com raio ( $r$ ) em um meio com viscosidade ( $\eta$ ). ( $R$ ) é a constante dos gases, ( $T$ ) é a temperatura absoluta e ( $D$ ) é o coeficiente de difusão.

$$u = \frac{1}{6\pi\eta r} \quad (8)$$

FÓRMULA 8: Equação para determinação do coeficiente de mobilidade de partículas carregadas ( $u$ ) em um meio com viscosidade( $\eta$ ).

Os éteres de coroa não são simples moléculas não condutoras. Eles podem formar complexos com os cátions livres na solução. Os complexos apresentam maior ou menor estabilidade de acordo com a relação entre a cavidade central da coroa e o tamanho do cátion e também com as forças eletrostáticas existentes entre os dois. Existem muitos estudos sobre a formação de complexo coroa-cátion em vários meios, principalmente orgânicos (IZATT e col., 1979, 1981, 1985; PATAI, 1980; ROUNAGHI ESHAGHI e GHIAMATI, 1977) . Em meios (metanol-água) com características próximas da utilizada em nossos experimentos, a estequiometria da interação coroa-cátion é estabelecida como 1:1 (ROUNAGHI e col., 1977; IZATT e col., 1985). Com base nessas informações compreendemos que as variações de condutividade das diferentes concentrações das soluções de KCl e NaCl ocorrem de maneira mais significativa do que nas soluções de LiCl. Isso porque a estabilidade do complexo das coroas (18C6, 15C5 e 12C4) com o  $K^+$  e  $Na^+$  é maior do que com o  $Li^+$  (IZATT e col., 1991). A formação desses complexos específicos provoca diminuição de cátions livres na solução que é a segunda maneira dos éteres de coroa reduzirem a condutividade da solução.

Nas diversas concentrações de cloreto de lítio pesquisadas (0,1, 0,5 1 e 2 M) a diminuição somatória da condutividade das soluções (viscosidade e diminuição de cátions livres), de acordo com o aumento da concentração de cada éter de coroa, são bem parecidas entre si (figura 12).

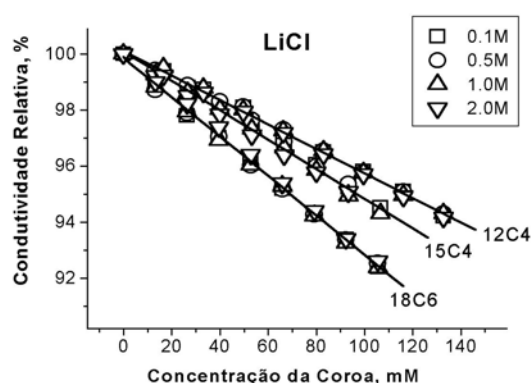


FIGURA 12: Dependência da condutividade da solução de cloreto de lítio nas variações de concentração de 18coroa6, 15coroa5 e 12coroa4.

Portanto é possível concluir que o  $\text{Li}^+$  não forma complexos estáveis com nenhuma das coroas utilizadas. Observamos ainda que os efeitos dependem do tamanho dos coroas: quanto maior o tamanho da coroa maior será a influência (figura 12). Isso sugere que a 18coroa6 apresenta maior influência sobre a viscosidade da solução do que a 15coroa5 que por sua vez influi mais do que a 12coroa4.

#### 4.1.2. Raios efetivos das coroas versus concentrações salinas

Com base nos dados da variação da condutividade ( $\Delta\sigma$ ) de acordo com a concentração dos éteres de coroas presentes nas soluções utilizadas (figuras 11A, B, C e dados análogos) podemos estimar seus raios através da utilização da fórmula 2 que relaciona o raio da partícula não condutora com a  $\Delta\sigma$ .

Encontramos que na maioria dos casos os raios calculados dos éteres de coroa dependem da concentração salina utilizada. Nas soluções de cloreto de potássio (figura 13A) e cloreto de sódio (figura 13B) o raio apresentou um decaimento até atingir um limite. Por outro lado, na solução de cloreto de lítio (figura 13C) não foram observadas variações do raio estimado de nenhuma coroa durante o aumento da concentração do sal. Isso indica a não formação de complexos estáveis entre o lítio e qualquer das coroas estudadas.

Os cálculos mostram que em todas as soluções utilizadas ( $\text{LiCl}$ ,  $\text{NaCl}$  e  $\text{KCl}$ ) a 12coroa4 apresentou-se com o mesmo tamanho em todas as concentrações. Isso demonstra que essa coroa aparentemente não forma complexos estáveis com nenhum dos cátions estudados ( $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ ).

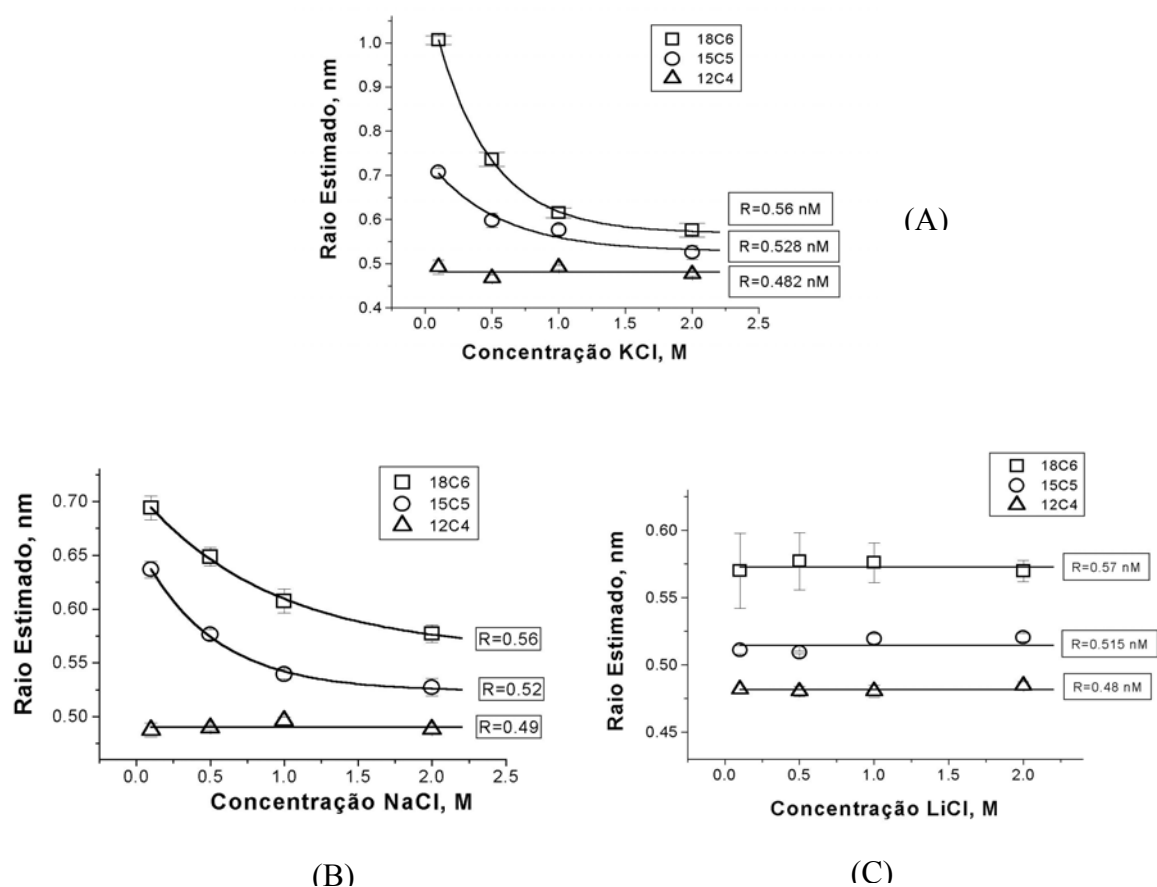


FIGURA 13: Dependência dos raios das coroas nas variações de concentração iônica da solução de: (A)KCl, (B)NaCl e (C)LiCl. Os valores apresentados nos retângulos representam os valores limites dos raios estimados.

A diminuição do raio observado em soluções KCl e NaCl na presença das 18coroa6 e 15coroa5 não reflete a mudança do raio físico das coroas pois é resultado da formação do complexo e poder servir como indicador da formação do mesmo. Mais uma lição que podemos aprender com os experimentos acima é que o método a ser aplicado com moléculas formadoras dos complexos é a utilização de concentrações elevadas dos sais para manter a perda dos íons abaixo da sensibilidade do condutivímetro. Os valores obtidos nessas condições para as coroas de éter estão presentes em tabela 4 em comparação com os dados adquiridos através do *CSCChem3D Pro*. Podemos ver que as duas metodologias são capazes de apresentar praticamente os mesmos resultados.

TABELA 1: Variação dos valores dos raios dos éteres de coroa, em nanômetros, de acordo com a solução salina utilizada. (†) representa os valores obtidos pelo método de modelagem molecular; (‡) representa os valores obtidos pelo método de variação da condutividade (\*) representa o valor médio dos raios com desvio padrão e (§) representa a diferença percentual dos dados obtidos pelos dois métodos.

	12C4	15C5	18C6
Método 1 <sup>†</sup>	0.46	0.5	0.56
Método 2 <sup>‡</sup>			
LiCl	0.482	0.515	0.57
NaCl	0.49	0.52	0.56
KCl	0.482	0.528	0.56
Média*	0.485±0.005	0.521±0.007	0.563±0.006
Diferença, % <sup>§</sup>	5.4	4.2	0.6

A fórmula 2 utilizada foi criada para partículas não condutoras que não interagem com os íons. Os dados aqui obtidos nos permitem concluir que para a utilização deste procedimento de determinação de raio efetivo de partículas nanoscópicas é mais indicado o uso de soluções salinas que não reajam com a molécula estudada ou usá-la com altas concentrações do sal.

#### 4.2. Interação dos complexos com o canal iônico

##### 4.2.1. Incorporação e condutâncias do canal de alfa-estafilotoxina

Quando a alfa-estafilotoxina é adicionada à solução aquosa que banha uma bicamada lipídica com clampeamento de voltagem, a condutância específica da membrana aumenta em forma de degraus discretos. Isso indica a incorporação de canais iônicos na bicamada lipídica.

O potencial de membrana é fixado inicialmente em  $-40\text{mV}$ . Sob essas condições, as aberturas dos canais são detectadas como deflexões negativas da corrente (figura 14).

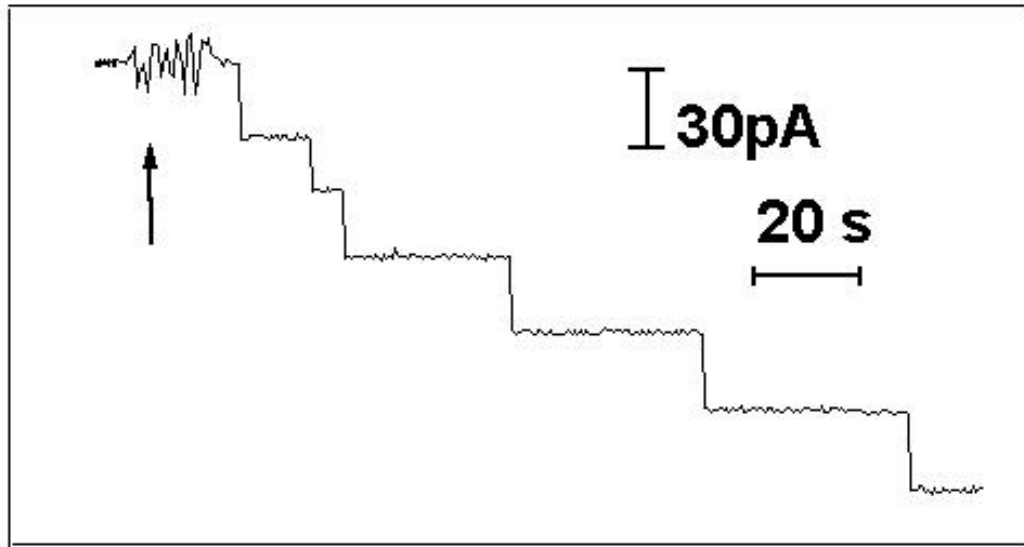


FIGURA 14: Representação da adição da toxina (seta) e de sucessivas incorporações de canais formando os degraus característicos das deflexões negativas de voltagem

Os valores das condutâncias para os eventos unitários são bem semelhantes. Um valor médio da condutância de um único canal é de  $980 \pm 40$  pS em solução de KCl a 1M,  $752 \pm 51$  pS em solução de NaCl a 1M e  $709 \pm 41$  pS em solução de LiCl a 1M. A distribuição da condutância dos eventos unitários (canais iônicos) em condições diferentes estão presentes na figura 15.

Apenas os canais que se apresentaram dentro das faixas de condutância – 940 pS a 1020 pS para KCl, 701 pS a 803 pS para NaCl e 668 pS a 750 pS para LiCl – foram aceitos para a realização do experimento. Com a incorporação do canal adequado faz-se a curva de intensidade-voltagem.

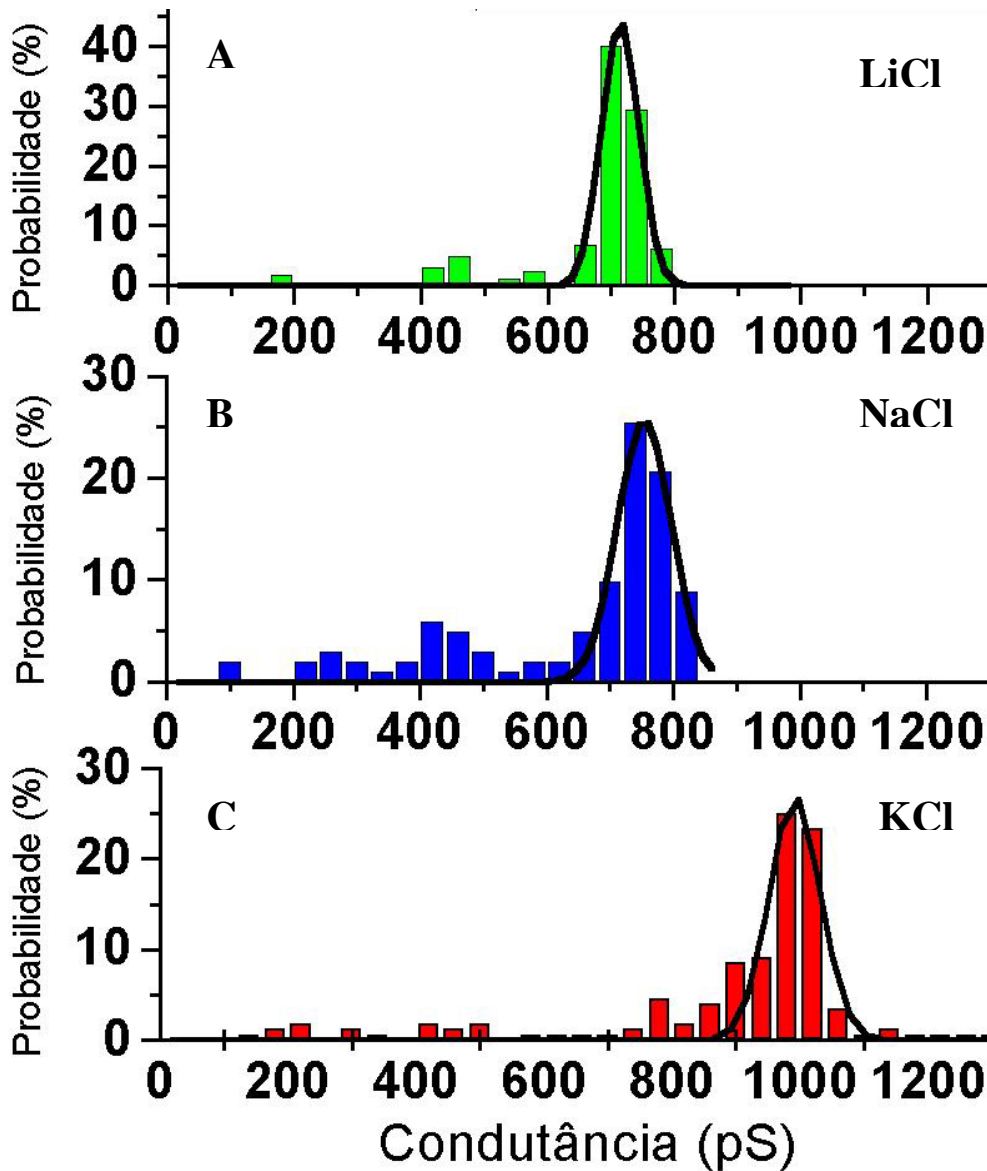


FIGURA 15: Distribuição da condutância dos canais iônicos onde: (A), (B) e (C) são histogramas cumulativos de fator de não bloqueio-condutância em soluções aquosas de LiCl, NaCl e KCl respectivamente, gerados a partir dos dados da figura 14 com suas respectivas curvas gaussianas.

#### 4.2.2. Características da interação dos complexos com o canal iônico

Com os tamanhos das coroas determinados podemos estudar a interação dos complexos com o canal iônico da alfa-estafilotoxina.

Através de estudos realizados com uma técnica de cristalografia, Song e col. em 1996 determinaram que o canal iônico formado pela alfa-estafilotoxina apresenta um poro com comprimento de 10 nm. O raio do lado *cis* é ~ 1,4 nm. À ~3,5 nm da abertura do lado *cis* o

poro do canal atinge seu raio máximo de 2,3 nm. A porção mais estreita do poro, com um raio de ~0,7 nm, foi estabelecida como estando próximo ao centro do canal. Também foi encontrado que na região do cabo (porção do canal que atravessa a bicamada lipídica), o raio do poro varia de 0,7 a 1,2 nm. MERZLYAK e col. (1999) confirmaram essas medidas através da técnica de exclusão por não-eletrólitos com Polietilenoglicol (PEG),

A estrutura do canal formado pela alfa-toxina do *Staphylococcus aureus* com suas respectivas medidas está representada na figura 16.

Do ponto de vista geral a interação das coroas com o canal pode ser vista através da comparação da variação da condutância do canal ( $\Delta G$ ) com a variação da condutividade da solução ( $\Delta\sigma$ ). Sabemos (KRASILNIKOV e col., 1992) que se  $\Delta G \approx \Delta\sigma$  significa que o não-eletrólito entra no canal livremente (a concentração dele na solução banhante e dentro de canal é a mesma ou quase a mesma), mas não interage com suas paredes. Se  $\Delta G > \Delta\sigma$  é sinal que o não-eletrólito está interagindo com as paredes do canal e a concentração efetiva do não eletrólito dentro do canal pode ser maior do que fora. Quando  $\Delta G < \Delta\sigma$  sabemos que a molécula não está entrando no poro aquoso.

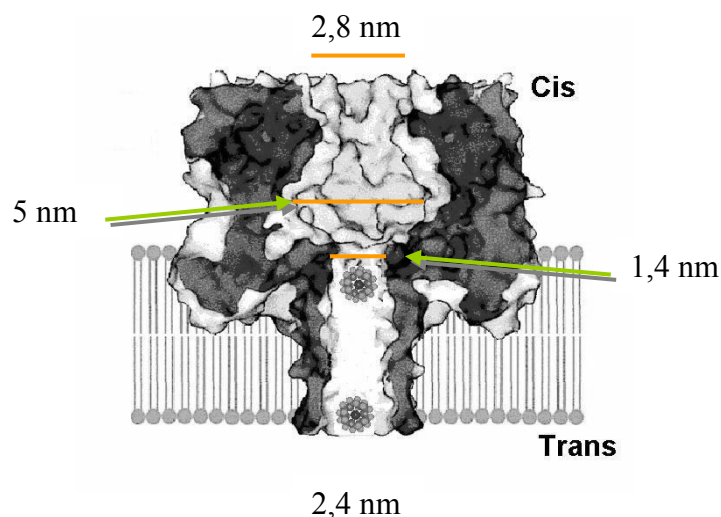


FIGURA 16: Corte longitudinal do canal formado pela alfa-estafilotoxina introduzido em uma bicamada lipídica com as medidas de seus diâmetros ao longo do poro aquoso. Os complexos de 18cora6-K<sup>+</sup> também podem ser vistos dentro do canal (de Song e col. 1996).



### 4.2.3. Soluções de KCl

Na análise dos dados obtidos a partir dos experimentos realizados com o canal formado pela alfa-estafilotoxina em solução de cloreto de potássio 1M encontramos que o efeito das coroas depende do potencial aplicado (figura 17). Em potenciais positivos a variação da condutância do canal em relação ao controle (ausência de coroas) é irrelevante. Por outro lado em potenciais negativos observamos grandes variações da condutância. Nessas condições, à medida que a concentração de éteres de coroa aumenta ocorre uma significativa diminuição da condutância do canal iônico.

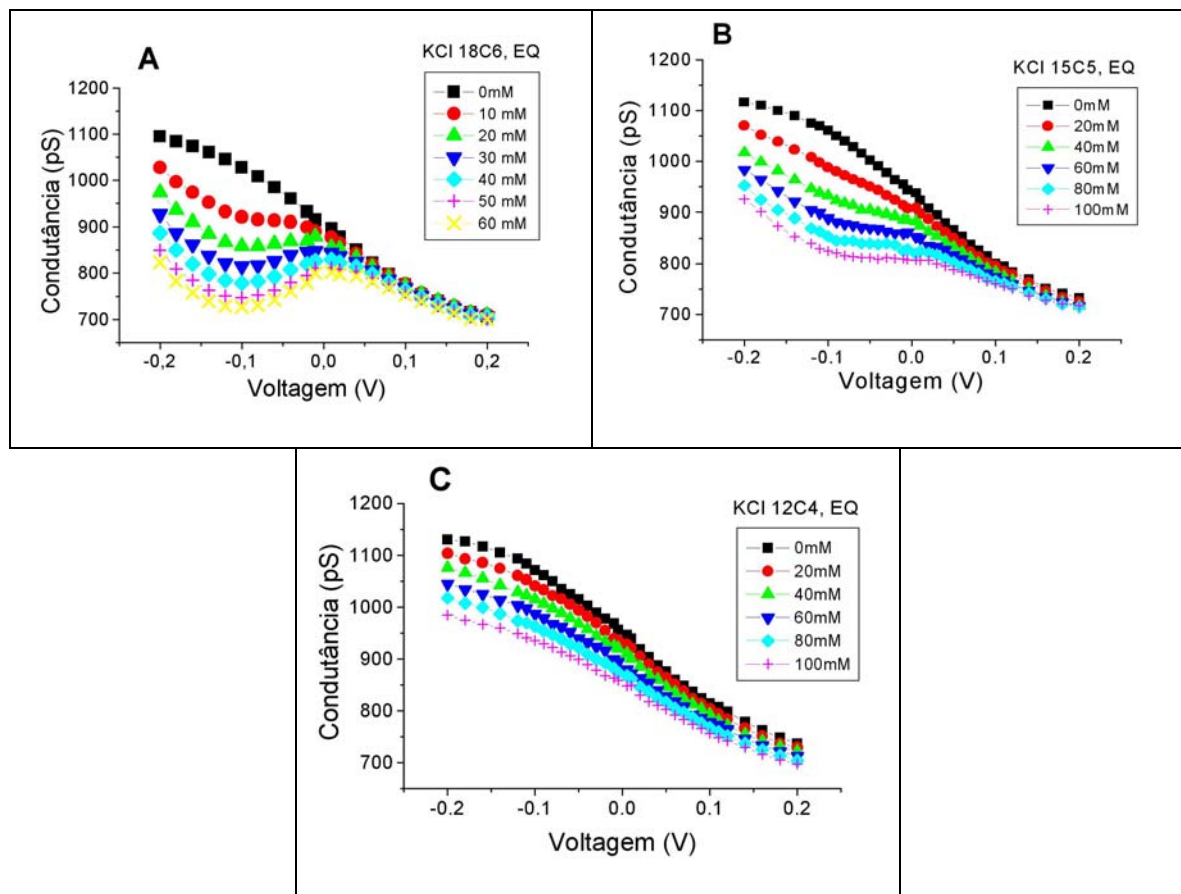


FIGURA 17: Influência do éter de coroa na condutância do canal de estafilotoxina. Todos os gráficos G-V apresentados em A, B ou C foram obtidos através de canais unitários. Soluções padrão continham 1M KCl e 0,005M Tris-Ácido Cítrico com pH 7,5. Curva G-V foi estabelecida e em seguida a concentração da coroa respectiva foi aumentada seqüencialmente (com variações de 10mM ou 20mM) dos dois lados da câmara e as curvas G-V foram medidas a cada nova concentração de coroa. Os resultados de experimentos típicos são apresentados. (EQ) significa que a adição das coroas foi feita de forma equilibrada entre os dois lados da câmara.

Como vimos anteriormente para compreender a interação dos complexos de coroa-cátion com o canal iônico precisamos comparar a variação da condutividade das soluções salinas com a variação da condutância do canal iônico na presença de moléculas não-condutoras. Quando analisamos as variações da condutância dos canais banhados por solução de KCl em voltagens positivas causadas pelos éteres de coroa (figura 18A) observamos que as três coroas influem de maneira similar e os efeitos são pequenos. Da mesma forma quando analisamos o comportamento da condutividade relativa perante as três coroas (figura 18B) também observamos variações pequenas. As variações das condutâncias e condutividades relativas são menores do que 10% em concentrações de até 100mM de coroa. Ambas as variações apresentam valores parecidos ( $\Delta G \approx \Delta \sigma$ ), portanto podemos concluir que as coroas utilizadas nas condições experimentais entram no canal livremente e não interagem com suas paredes. Apesar da semelhança observamos pequenas diferenças na influência das coroas. Na variação da condutância relativa a 18coroa6 apresentou uma ação ligeiramente menor do que a 15coroa5 que por sua vez influenciou menos do que a 12coroa4. Na variação da condutividade relativa observamos uma atuação das coroas na ordem inversa. Essa diferença indica uma influência da voltagem sobre a passagem da coroa através do canal que é maior no caso da 18coroa6, menor no caso da 12coroa4 e intermediário na 15coroa5. Mais pesquisas são necessárias para que se possa explicar melhor esse fato.

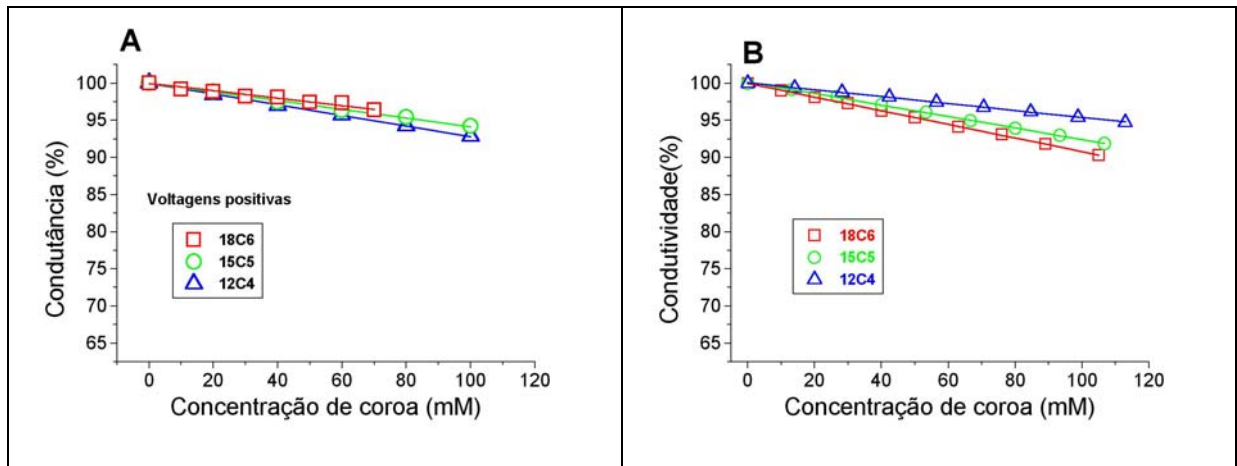


FIGURA 18: Comparação entre a variação de condutância do canal iônico formado pela alfa-toxina do *Staphylococcus aureus* e da condutividade da solução de cloreto de potássio 1M nas condições utilizadas. (A) representa a variação da condutância de acordo com a concentração das coroas utilizadas em voltagens positivas de +100 mV a +120 mV; (B) apresenta as variações da condutividade da solução salina pela concentração das três coroas usadas.

Ao analisamos as variações da condutância dos canais banhados pela solução de KCl em voltagens negativas onde as diversas concentrações de coroa apresentam maior efeito (de  $-100\text{mV}$  a  $-120\text{ mV}$ ), observamos (figura 19A) que as três coroas influem de maneira bem diferente e os efeitos são grandes. Devemos lembrar que o comportamento da condutividade relativa perante as três coroas (figura 19B) apresenta pequenas variações. Quando comparamos as influências das coroas na condutância do canal com a influência na condutividade da solução percebemos que  $\Delta G > \Delta \sigma$ , ou seja, fica claro que em potenciais negativos as coroas se concentram mais no poro aquoso do que na solução banhante e interagem com o lúmen do canal.

Encontramos que as variações da condutância do canal causadas pelos éteres de coroa (dose-efeito) em potenciais negativos podem ser perfeitamente descritas pela simples equação de Michaelis-Menten. Isso indica que o canal possui apenas um sítio de interação com as coroas. A equação permite também estabelecer outros parâmetros da interação entre o canal e as coroas tais como a concentração de meio efeito (meio bloqueio) e o bloqueio máximo que

pode ser atingido (os valores da mínima condutância) nas condições utilizadas. Vimos (figura 19A) que os valores de bloqueio máximo para qualquer éter de coroa são semelhantes. Por outro lado quanto menor o valor da concentração de meio efeito maior será a efetividade da influência da coroa no canal. Percebemos que a 18coroa6 apresenta maior habilidade de bloqueio na condutância do canal do que a 15coroa5 que por sua vez apresenta maior efetividade do que a 12coroa4.

Então podemos concluir que em voltagens negativas as coroas interagem com o lúmen do canal e em um único sítio enquanto que em potenciais positivos não.

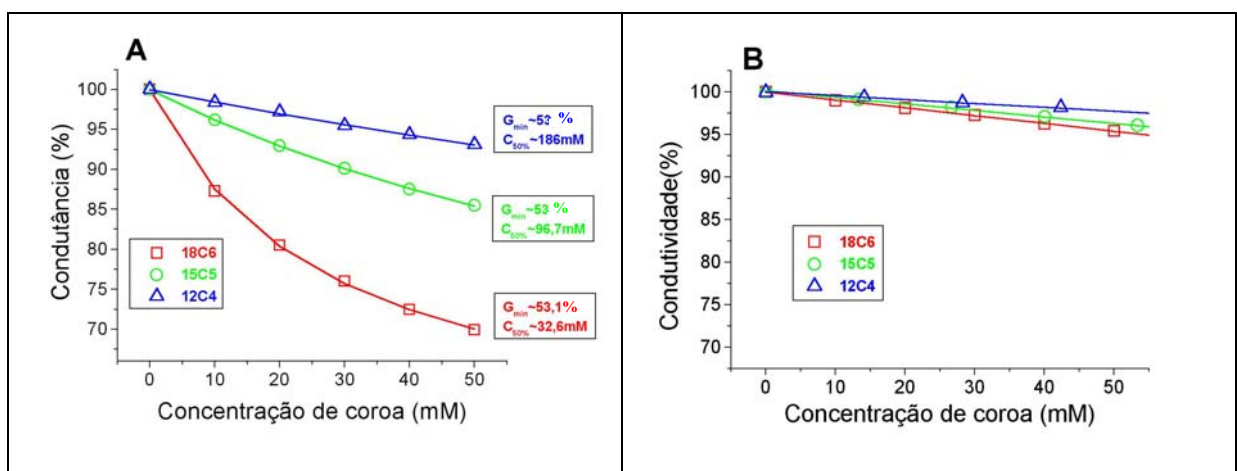


FIGURA 19: (A) Efetividade dos três tipos de éteres de coroa em solução de cloreto de potássio 1 molar. Dados de experimentos típicos são apresentados. As linhas traçadas representam os dados obtidos através da equação de Michaelis-Menten. ( $G_{min}$ ) é o valor da mínima condutância e ( $C_{50\%}$ ) é a concentração de meio efeito; (B) Influência das diversas concentrações de coroa na condutividade da solução de KCl.

Estabelecemos que o bloqueio máximo que pode ser atingido com o uso das três coroas é similar. O que muda é que para cada uma delas atingi-lo será necessário uma concentração diferente. Quanto maior a efetividade da coroa menor a concentração necessária para atingir o bloqueio máximo e quanto menor a efetividade maior será a concentração necessária.

#### 4.2.4. Soluções de NaCl

As influências provocadas pelos éteres de coroa na condutância das soluções de cloreto de sódio ocorreram da mesma forma que nas soluções de cloreto de potássio. Ou seja, em ordem crescente de influência temos a 12coroa4 em seguida a 15coroa5 e por último – a maior influência – a 18coroa6. (figura 20) Assim como no KCl as variações de condutância dos canais banhados por uma solução de NaCl foram maiores em potenciais negativos do que nos potenciais positivos. Isso significa dizer que em tensões negativas os éteres de coroa interagem com as paredes do canal enquanto em tensões positivas as concentrações efetivas delas no interior do canal parecem ser ligeiramente menor do que na solução banhante.

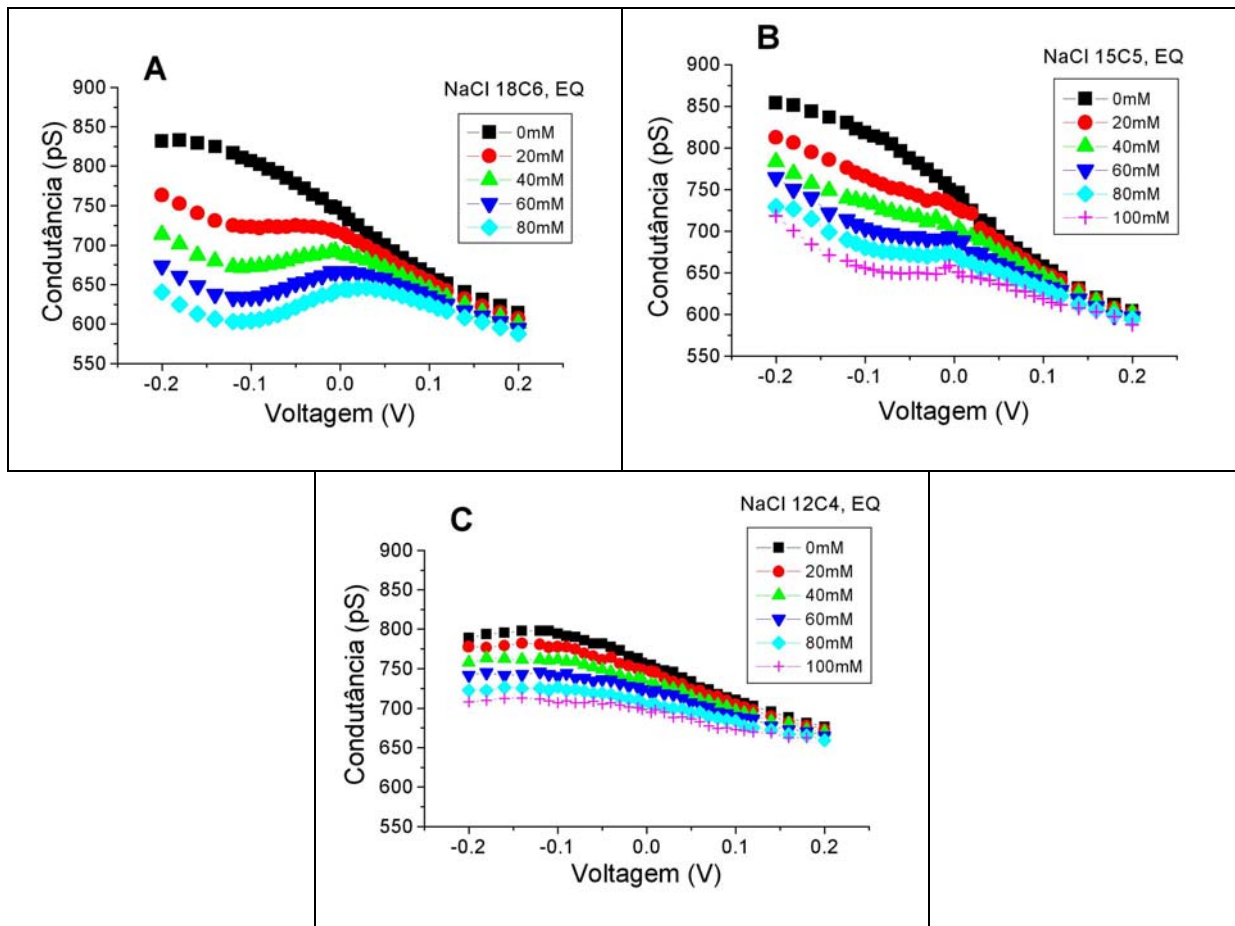


FIGURA 20: Influência do éter de coroa na condutância do canal de estafilotoxina. Todos os gráficos G-V apresentados em A, B ou C foram obtidos através de canais unitários. Soluções padrão continham 1M NaCl e 0,005M Tris-Ácido Cítrico com pH 7,5. Curva G-V foi estabelecida e em seguida a concentração da coroa respectiva foi aumentada seqüencialmente (com variações de 20mM) dos dois lados da câmara e as curvas G-V foram medidas a cada nova concentração de coroa. Os resultados de experimentos típicos são apresentados. (EQ) significa que a adição das coroas foi feita de forma equilibrada entre os dois lados da câmara.

Quantitativamente as variações de condutância em soluções de NaCl foram menores do que em soluções de KCl nas condições usadas.

A curva dose-efeito (figura 21) foi criada a partir dos valores da condutância do canal iônico formado pela alfa-estafilotoxina banhadas por solução de NaCl na presença de diversas concentrações de coroas, obtidos em voltagem onde as coroas apresentam maior efeito (de -100mV a -120 mV).

Da mesma forma que com as soluções de cloreto de potássio, todas as curvas de dose-efeito também podem ser traçadas com a simples equação do Michaelis-Menten. Nas condições utilizadas os valores das condutâncias mínimas para cada tipo de coroa usado, assim como nas soluções de KCl, foram semelhantes. Aqui também houve variação da efetividade das coroas em relação à diminuição da condutância do canal. A coroa que se apresentou mais efetiva foi a 18cora6. Em seguida foi a 15coroa5 e por último a 12coroa4.

Ao fazer uma análise comparativa entre a dose e o efeito causado pelas coroas nas soluções de cloreto de potássio e cloreto de sódio percebemos que os valores de bloqueio máximo para qualquer éter de coroa são semelhantes nas duas soluções ( $52,77 \pm 0,403$ ). Entretanto os valores de concentração de meio efeito são bem diferentes. A 18coroa6 apresentou o menor valor dentre as três coroas e a 12coroa4 foi a que apresentou maior valor, ou seja, esta última necessita de uma maior concentração para causar o mesmo efeito que as outras coroas na condutância do canal. Todas as coroas apresentaram uma maior concentração de meio efeito na solução de cloreto de sódio do que na solução de cloreto de potássio.

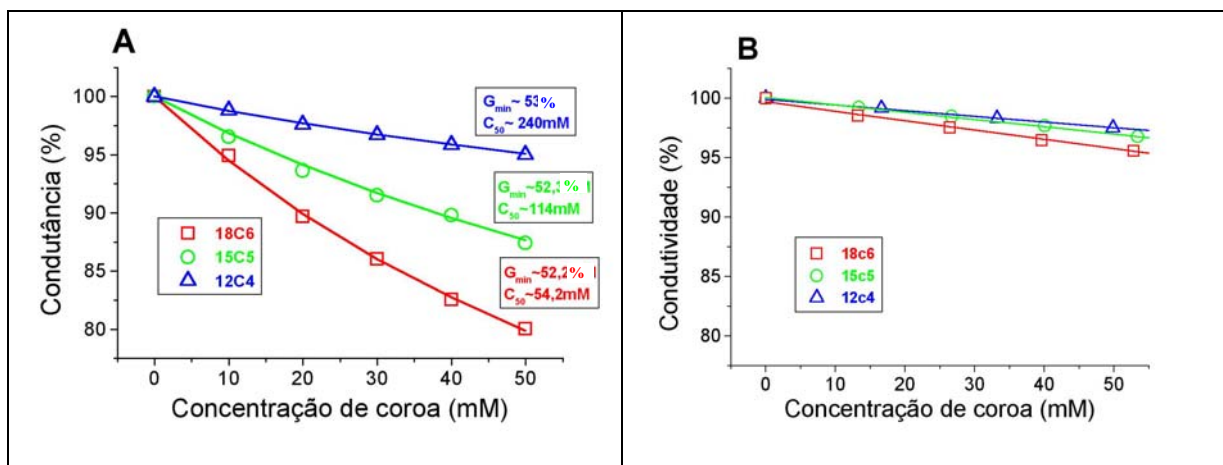


FIGURA 21: Efetividade dos três tipos de éteres de coroa em solução de cloreto de sódio 1 molar. Dados de experimentos típicos são apresentados. As linhas traçadas representam os dados obtidos através da equação de Michaelis-Menten. ( $G_{\min}$ ) é o valor da mínima condutância e ( $C_{50\%}$ ) é a concentração de meio efeito. (B) Influência das diversas concentrações de coroa na condutividade da solução de NaCl.

#### 4.2.5. Soluções de LiCl

As curvas G-V (condutância-voltagem) traçadas através dos dados colhidos com as soluções de cloreto de lítio apresentam um comportamento bem diferente dos demais. Observamos que não há diferença entre os potenciais positivos e negativos quando comparamos as curvas G-V nas diversas concentrações de coroas com a curva controle. Vimos que existe uma diminuição da condutância de forma regular em todas as voltagens utilizadas. Isso nos faz pensar que este fato ocorre porque não há formação de complexos estáveis entre o lítio e qualquer das coroas utilizadas e ocorre um aumento da viscosidade causado pela adição do não-eletrólito à solução como visto anteriormente. A figura 22 apresenta as variações de condutância de acordo com as variações de voltagem nas diversas concentrações de éteres de coroa utilizadas.

Sabemos que a variação da condutância do canal é similar a variação da condutividade da solução ( $\Delta G \approx \Delta \sigma$ ) o que significa que o não-eletrólito entra no canal livremente (a concentração dele na solução banhante e dentro de canal é a mesma ou quase a mesma), mas não interage com suas paredes.

Como a variação da condutância no aumento da concentração de coroas é semelhante entre os potenciais positivos e negativos não é possível escolher em qual potencial houve o maior efeito das coroas na diminuição da condutância. Portanto o estudo da dependência “dose-efeito” foi feito através da média da variação da condutância do canal (figura 23A). Por isso não foi possível para a equação de Michaelis-Menten descrever a diminuição da condutância do canal sob o efeito das coroas.

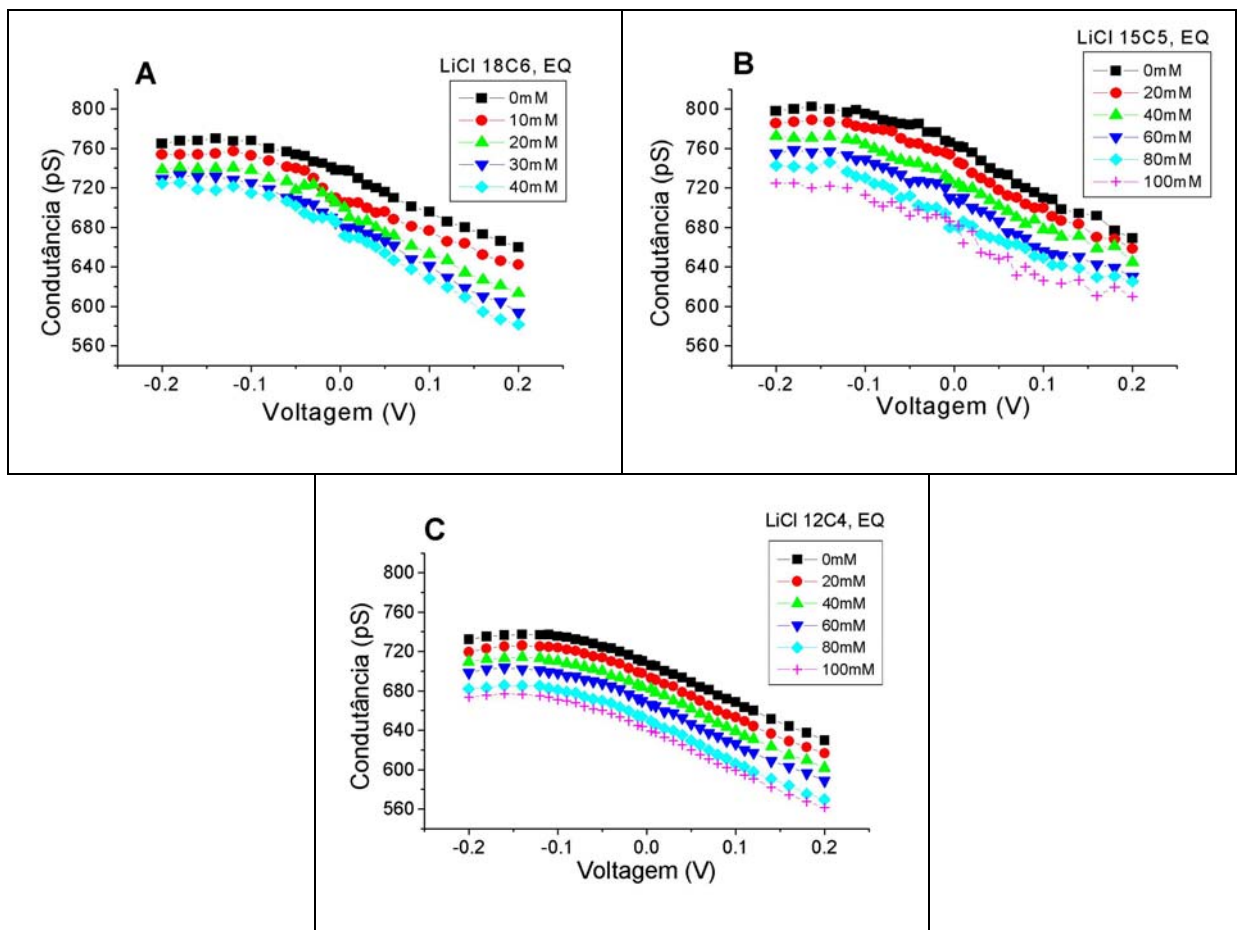


FIGURA 22: Influência do éter de coroa na condutância do canal de estafilotoxina. Todos os gráficos G-V apresentados em A, B ou C foram obtidos através de canais unitários. Soluções padrão continham 1M LiCl e 0,005M Tris-Ácido Cítrico com pH 7,5. Curva G-V foi estabelecida e em seguida a concentração da coroa respectiva foi aumentada seqüencialmente (com variações de 10mM ou 20mM) dos dois lados da câmara e as curvas G-V foram medidas a cada nova concentração de coroa. Os resultados de experimentos típicos são apresentados. (EQ) significa que a adição das coroas foi feita de forma equilibrada entre os dois lados da câmara.



Ao comparar os dados de condutância e voltagem dos experimentos com solução de cloreto de lítio com os demais observamos um comportamento atípico do canal. Baseando-se nas curvas de condutância-voltagem podemos observar diferenças a partir da curva controle. A distribuição dos pontos experimentais tende a descrever uma função linear. Esse fato sugere que não há dependência do efeito da coroa sobre a condutância do canal na variação de voltagem aplicada. Esse mesmo padrão ocorre nas demais curvas G-V com adição de éteres de coroa. Por causa desse comportamento atípico desconfiamos que quando o canal iônico formado pela alfa-estafilotoxina é banhado por uma solução de LiCl sua estrutura é modificada.

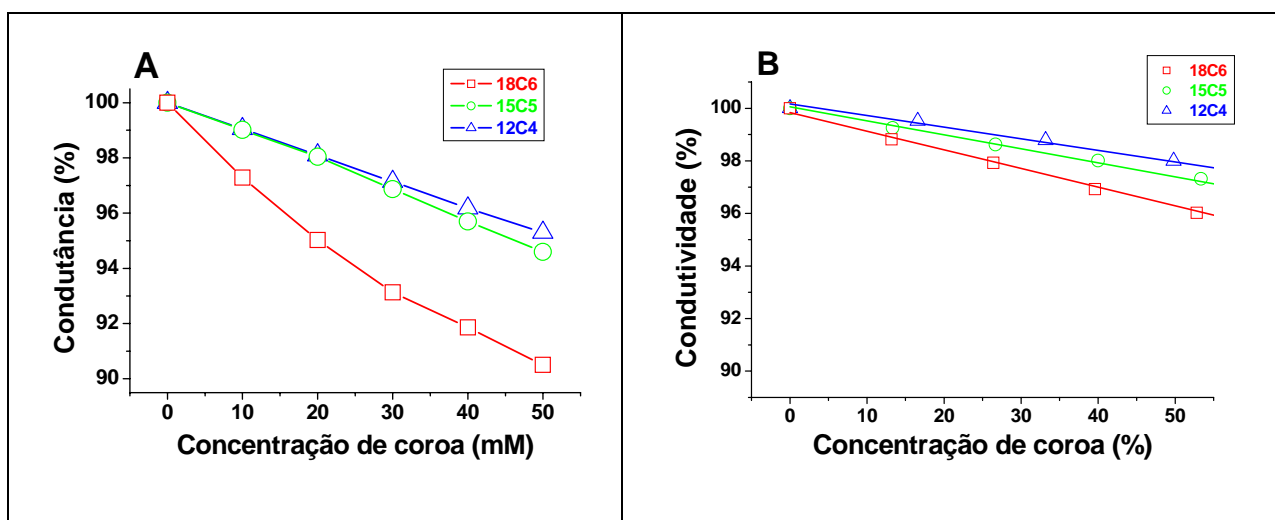


FIGURA 23: (A) Efetividade dos três tipos de éteres de coroa em solução de cloreto de lítio 1 molar. Dados de experimentos típicos são apresentados. As linhas traçadas representam os dados obtidos através da equação de Michaelis-Menten; (B) Influência das diversas concentrações de coroa na condutividade da solução de LiCl.

Ao compararmos a variação da condutância (figura 23A) com a variação da condutividade (figura 23B) observamos que como  $\Delta G > \Delta \sigma$  a possibilidade dos complexos de coroa-cátion estarem no interior do canal é maior do que fora, entretanto é menor do que com as outras soluções.

#### 4.2.6. Fator de não bloqueio

Através do estudo da fator do canal não estar sendo bloqueado pelos éteres de coroa identificamos qual a voltagem aplicada que tem maiores chances de promover uma diminuição na condutância do canal. Observamos (figuras 24 e 25) que nas diversas tensões aplicadas existem diferentes possibilidades do canal apresentar-se bloqueado. As chances disso ocorrer são maiores quando potenciais negativos são aplicados. Concluímos também que é mais provável uma molécula de 18coroa6 bloquear o canal formado pela alfa-estafilotoxina do que uma molécula de 15coroa5. Por sua vez a 15coroa5 apresenta uma maior possibilidade de bloquear o canal do que a 12coroa4.

Quando as voltagens entre  $-100$  mV e  $-120$  mV são aplicadas ao sistema experimental as possibilidades de todas as três coroas bloquearem o canal são maiores. Os estudos do fator de não bloqueio do canal iônico pelos éteres de coroa definem a escolha dos potenciais nos quais as coroas apresentam maior efetividade.

Ao comparamos os fatores de não bloqueio na presença das coroas (40mM) nas soluções de cloreto de potássio e cloreto de sódio percebemos que elas são bastante semelhantes (figuras 24 e 25). O canal apresenta um fator de não bloqueio menor do que 5% na presença da 12coroa4 em ambas soluções. A 15coroa5 promove uma maior possibilidade de bloquear o canal em solução de KCl do que em NaCl. Nas duas soluções o fator de não bloqueio é inferior a 15%. Por sua vez a 18coroa6 foi a que apresentou maior bloqueio do poro aquoso. Assim como a 15coroa5 ela foi mais efetiva na solução de KCl do que na solução de NaCl. 25% foi o maior fator de não bloqueio apresentado pela 18coroa6 em solução de KCl enquanto que 20% foi o maior fator em solução de cloreto de sódio. Os fatores de não bloqueio foram medidos na presença de coroas com concentração de 40mM em todas as soluções.

As figuras 24 e 25 demonstram as variações do fator de não bloqueio do canal de alfa-estafilotoxina pelos éteres de coroa (18coroa6, 15coroa5 e 12coroa4) na presença de tensões entre  $-200$  mV e  $+200$  mV em soluções de KCl e NaCl (40mM) respectivamente. Os dados obtidos em outras concentrações são análogos aos aqui apresentados.

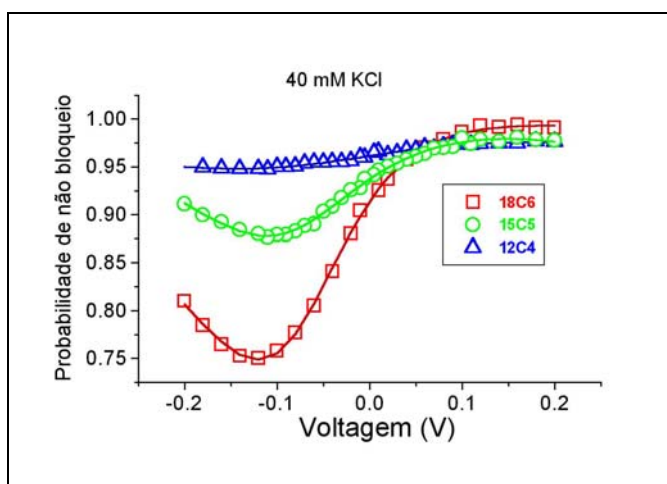


FIGURA 24: Dependência de tensão do bloqueio do canal de estafilotoxina pelas coroas em KCl 1M. A curva de fator de não bloqueio foi obtida em experimentos típicos de canais unitários. Os experimentos foram realizados na presença de 40mM de diferentes coroas nos dois lados da bicamada.

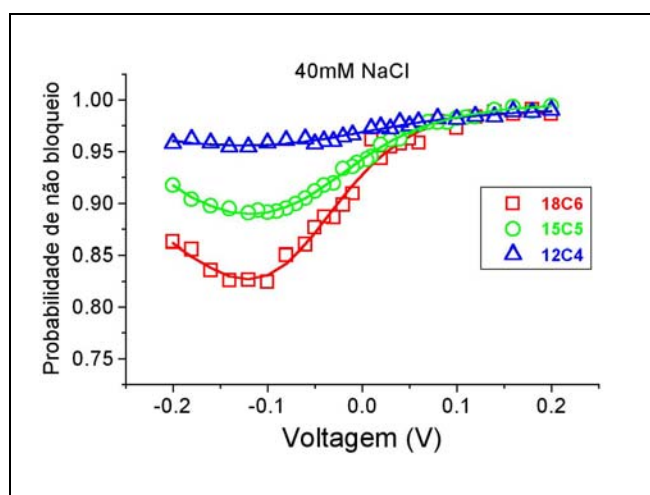


FIGURA 25: Dependência de tensão do bloqueio do canal de estafilotoxina pelas coroas em NaCl 1M. A curva de fator de não bloqueio foi obtida em experimentos típicos de canais unitários. Os experimentos foram realizados na presença de 40mM de diferentes coroas nos dois lados da bicamada.

Através dos estudos da interação dos complexos de coroa-cátion com o lúmen do canal podemos concluir que todas as coroas estudadas têm a capacidade de diminuir a condutância

do canal principalmente em potenciais negativos. Vimos também que quando banhadas por solução de cloreto de lítio as coroas não apresentam a mesma habilidade. Em seguida observamos que a equação de Michaelis-Menten pode descrever a dependência “dose-efeito” de forma precisa. Esse fato nos permite afirmar que a coroa não só interage com o canal, mas que isso ocorre em um único sítio de interação no lúmen do poro aquoso. Ainda na análise de dose-efeito vimos que todas as coroas conseguem atingir o mesmo nível de bloqueio máximo, mas em concentrações bem diferentes. Ou seja, com efetividades diferentes. Vimos também que, diferentemente do bloqueio máximo, a concentração de meio efeito ( $C_{50}$ ) depende de cada tipo de coroa: quanto maior a efetividade menor será a ( $C_{50}$ ) e vice-versa.

Por último confirmamos através da análise da fator de não bloqueio que cada coroa utilizada apresenta uma efetividade diferente da outra e que essa habilidade varia de acordo com o potencial aplicado (principalmente em potenciais negativos) e com a própria concentração da coroa.

Nosso trabalho comprova que os dois métodos - modelagem molecular e condutividade - utilizados para determinação do raio efetivo das coroas são válidos desde que as soluções aquosas utilizadas tenham uma alta concentração ou não interajam com as coroas.

Através deste trabalho, pela primeira vez foi possível demonstrar que as coroas tem capacidade de bloquear os canais iônicos. Foi possível também identificar que a estrutura cíclica das coroas interage melhor com o canal em comparação com a estrutura linear dos Polietilenoglicóis (PEG) (MERZLYAK, 1999).

Por fim, o fato dos bloqueios serem mais efetivos quando potenciais negativos são aplicados indica que quem interage com as paredes internas do poro aquoso do canal iônico são complexos do tipo coroa-cátion.

## 5. CONCLUSÕES

Através deste trabalho podemos concluir que:

1. A estimacão do raio das nanopartículas pelo método da condutividade é válido desde que usado com soluções que não reajam com a partícula não condutora ou em altas concentrações salinas. Os raios estimados são: 0,56nm para 18coroa6; 0,5nm para 15coroa5 e 0,46nm para 12coroa4.
2. Pela primeira vez foi demonstrado que as coroas são capazes de bloquear os canais iônicos. O bloqueio dos canais formados pela alfa-estafilotoxina aumenta com a concentraçao das coroas. As curvas dose-efeito ficam bem ajustadas com a equaçao de Michaelis-Menten demonstrando que o lúmen do canal apresenta um sítio de interaçao com as coroas.
3. O bloqueio provocado pelos éteres de coroa utilizados dependem da voltagem aplicada. O efeito máximo observado ocorre nas voltagens negativas (-100mV a -120mV). A dependência do potencial indica que o bloqueio do canal é provocado pelo complexo coroa-cátion.
4. A efetividade dos complexos estudados está relacionado com o tamanho das coroas: Quanto maior o tamanho maior a efetividade (18coroa6 > 15coroa5 > 12coroa4). Uma maior efetividade representa um maior bloqueio físico do canal pelo complexo.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERT, B. e col., *Biologia molecular da célula*, Artes Médicas, terceira edição, Porto Alegre, 1997.
- ALVARES, O. How to set up a bilayer system. Ion channel reconstitution. Ed. Christopher Miller. Pp. 115-129. New York. Plenum Press, 1986.
- ARBUTHNOTT, J.P., J. H. FREER, e A.W. BERNHEIMER. 1967. Physical states of staphylococcal alpha toxin. *J. Bacteriol.* 94:1170-1177
- ARBUTHNOTT, J. P., J. H. FREER, e B. BILLCLIFFE. 1973. Lipid-induced polymerization of staphylococcal alpha toxin. *J. Gen. Microbiol.* 75:309-319
- BAYLEY H. Toxin structure: part of a hole? *Curr Biol.* 1997 Dec 1;7(12):R763-7. Review.
- BENZ, R. Pore from bacterial and mitochondrial outer membranes. *CRC Crit. Ver. Biochem.* 19:145-190, 1985.
- BENZ, R.; LUDWIG, O.; DE PINTO, V. e PALMIERI, F. Permeability properties of mitochondrial porins of different eukariotic cells, in: *Achievements and Perspectives of Mitochondrial research*. Quagliariello et al., editors. Elsevier, Amsterdam. Vol. 1, pp. 317-327, 1985.
- BERNHEIMER, A. W. e L. L. SCHWARTZ. 1963. Isolation and composition of staphylococcal alpha toxin. *J. Gen. Microbiol.* 30:455-468
- BERNHEIMER, A.W., KIM, K. S.; REMSEN, C. C.; ANTANAVAGE, J. e WATSON, S. W. 1972. Factors affecting interaction of staphylococcal alpha toxin with membrane. *Infect. Immun.* 6:636-642
- BERNHEIMER, A.W. 1974. Interactions between membranes and cytolytic bacterial toxins. *Biochim. Biophys. Acta* 344:27-50
- BETHGE E. W., BOHUSLAVIZKI K. H., HÄNSEL W., KNEIP A., KOPPENHÖFER, E. Effects of some potassium channel blockers on the ionic currents in myelinated nerve. *Gen. Physiol. Biophys.* 1991: 10: 225-244.

BEZRUKOV, S. M., Ion Channels as Molecular Coulter Counters to Probe Metabolite Transport. *J. Membrane Biol.* 174, 1-13, 1999.

BHAKDI, S., R. FÜSSLE, e J. TRANUM-JENSEN. 1981. Staphylococcal alpha toxin: oligomerisation of hydrophilic monomers to form amphiphilic hexamers induced through contact with deoxycholate detergent micelles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 5475-5479

BHAKDI, S., e TRANUM-JENSEN, J. Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol. Rev.* Vol. 55 No. 4. 1991 pp. 733-751.

BHAKDI, S., WELLER, U., WALEV, I., MARTIN, E., JONAS D. E PALMER, M. 1993. A guide to use of pore-forming toxins for controlled permeabilization of cell membranes. *Med. Microbiol. Immunol.* 182:167-175.

BHAKDI, S.; VALEVA, A.; PONGS, J.; PALMER M. Staphylococcal alpha-toxin: the role of the N-terminus in formation of the heptameric pore – a fluorescence study. *Biochimistry Biophysics Acta.* 1997 Apr 26; 1325(2): 281-6

BOWEN, K. A., TAM, K. e COLOMBINI, M. Evidence for titratable gating charges controlling the voltage dependence of the outer mitochondrial channel, VDAC. *J. Membr. Biol.* 86:51-59, 1985.

BOREL, Jacques-Paul, e col. *Bioquímica dinâmica*, 1989, Buenos Aires, Panamericana.

BORISOVA, M. P.; ERMISHKIN, L.N. e SILBERSTEIN, A. Y. Mechanism of blockage of amphotericin B channels in a lipid bilayer. *Biochim. Biophys. Acta.* 553:450-459, 1979.

BORISOVA, M. P. e ERMISKIN, L. N. Tetramethylammonium is a passing blockator of mycoheptin channels in lipid bilayer. *Biol. Membrany.* 1(2): 141-144, 1984.

BOYSEN, R.I.; JONG, A. J.; HEARN, M. T. Thermodynamic assessment of the stability of thrombin receptor antagonistic peptides in gydrophobic environments. *Biophysics journal.* 2002, May; 82(5): 2279-92.

BRAHA O, WALKER B, CHELEY S, KASIANOWICZ JJ, SONG L, GOUAUX JE, BAYLEY H. Designed protein pores as components for biosensors. *Chem Biol.* 1997 Jul;4(7):497-505.

BROCKRIS, J. O. M. e REDDY, A. K. N. Modern Electrochemistry. Vol. 1A. 3<sup>a</sup> Edição. Edt. Plenum/Rosetta. New York, USA, 1977.

BROWN, M. F. 1994. Modulation of rhodopsin function by properties of the membrane bilayer. Chem. Phys. Lipids. 73:159–180.

BRUNET, F.M. 1929. The exotoxins of Staphylococcus pyogenes aureus. J. Pathol. Bacteriol. 32:717-734

BRUNET, F.M. 1930. The production of staphylococcal toxin. J. Pathol. Bacteriol. 33:1-16

BURACK, W. R., e BILTONEN R. L. 1994. Lipid bilayer heterogeneities and modulation of phospholipase A2 activity. Chem. Phys. Lipids. 73:209–222.

CARNEIRO, C. M. M. Estudos da geometria do lúmen aquoso dos canais iônicos formados pela porina-31BM em bicamadas lipídicas nos estados de alta e baixa condutância. Tese de doutorado em Biofísica da UFRJ, Rio de Janeiro, 2000.

CARNEIRO, C. M. M., MERZLYAK, P. G., YULDASHEVA, L. N., SILVA, L. G., THINNES, F. P., KRASILNIKOV, O. V. Probing the volume changes during voltage gating of Porin 31BM channel with nonelectrolyte polymers. Biochimica et Biophysica Acta. 1612 (2003) 144-153.

CHANG, S.; KARAMBELKAR, V. V.; SOMMER, R. D.; RHEINGOLD, A. L.; GOLDBERG, D. P. New monomeric cobalt (II) and zinc (II) complexes of a mixed N,S (Alkylthiolate) ligand: model complexes of (His)(His)(Cys) metalloprotein active sites. Inorganic chemistry. 2002. Jan 28; 41(2): 239-48.

COLOMBINI, M. A candidate for the permeability pathway of the outer mitochondrial membrane. Nature 279:643-645, 1979

COLOMBINI, M. Structure and mode of action of a voltage-dependent anion-selective channel (VDAC) located in the outer mitochondrial membrane. Ann. N. Y. Acad. Sci. 341: 552-563, 1980.

COLOMBINI, M. Voltage gating in the mitochondrial channel, VDAC. J. Membr. Biol. 111:103-111. 1989.



CRUZ, J. Estudo da geometria de canais iônicos em bicamadas lipídicas planas. Dissertação de mestrado em Biofísica da UFPE. Recife, 1997.

DAVID, W. M., BRODBELT, J. S. Threshold dissociation energies of protonated amine/polyether complexes in a quadrupole ion trap. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2003 Apr;14(4):383-92.

DORING, C. e COLOMBINI, M. Voltage dependence and ion selectivity of the mitochondrial channel, VDAC, are modified by succinic anhydride. *J. Memb. Biol.* 83:81-86, 1985.

DRAGNEVA Y, ANURADHA CD, VALEVA A, HOFFMANN A, BHAKDI S, HUSMANN M. Subcytotoxic attack by staphylococcal alpha-toxin activates NF-kappaB and induces interleukin-8 production. *Infect Immun.* 2001 Apr;69(4):2630-5.

FANG Y, CHELEY S, BAYLEY H, YANG J. The heptameric prepore of a staphylococcal alpha-hemolysin mutant in lipid bilayers imaged by atomic force microscopy. *Biochemistry.* 1997 Aug 5;36(31):9518-22.

GADJI, Z. H. A. e SILBERSTEIN, A. Y. The basis of the dependence of ion channels blockage on a membrane voltage. *Kokl. Acad. Sci. USSR.* 275(5): 1204-1207, 1984.

GENNIS, R. B. *Biomembranes: Molecular structure and function.* New York, Springer-Verlag. 1989.

GRAY, G.S. e KEHOC, M. 1984. Primary sequence of the alpha-toxin gene from staphylococcus aureus Wood 46. *Infect. Immun.* 46:615-618.

GUO, X. W. e MANNELLA, C. A. Conformational changes in the mitochondrial channel, VDAC, detected by electro cryo-microscopy. *Biophys. J.* 64(2): 545-549, 1993.

HARROUN, T. A., HELLER W. T., WEISS T. M., YANG L., e HUANG H. W.. 1999. Experimental evidence for hydrophobic matching and membrane mediated interactions in lipid bilayers containing gramicidin. *Biophys. J.* 76:937-945.

HEMSLEY, G.; BUSATH, D. Small iminium ions block gramicidin channels in lipid bilayers. *Biophys. J.* 59(4): 901-907, 1991.

HIGASHIDA, H. Molecular Basis of Ion Channels and Receptors Involved in Nerve Excitation, Synaptic Transmission and Muscle Contraction. 1993, Annals of the New York Academy of Sciences, vol. 707, The New York Academy of Sciences, New York.

HILLE, B. Ionic selectivity, saturation and block in sodium channels. *J. Gen. Physiol.* 66:535-560, 1975.

HILLE, B. Ionic channels of excitable membranes. Second edition, Sinauer Associates Inc., USA, 1991.

HOLZ, R. e FINKELSTEIN, A. The water and nonelectrolyte permeability induced in thin lipid membranes by the polyene antibiotics nystatin and amphotericin B. *J. Gen. Physiol.* 56:125-145, 1970.

HORN, R.; BRODWICK, M. S. e DICKEY, W. D. Asymmetry of the acetylcholine channel revealed by quaternary anesthetics. *Science.* 240(4466): 205-207, 1980.

IZATT R. M.; CHRISTENSEN, J. J. Progress in Macrocyclic chemistry. Vol. 1. 1979. John Wiley e Sons, USA.

IZATT, R. M. e CHRISTENSEN, J. J. Progress in macrocyclic chemistry. 1981, John Wiley e sons inc., New York. Vol. 2, cap. 2, pp. 43-84.

IZATT, R. M., BRADSHAW, J. S., NIELSEN, S. A., LAMB, J. D., CHRISTENSEN, J. J. Thermodynamic and Kinetic Data for Cation-Macrocyclic Interaction. *Chem. Rev.* 1985, 85, 271-339

IZATT, R. M., PAWLAK, K., BRADSHAW, J. S. e BRUENING R. L. Thermodynamic and kinetic data for macrocyclic interaction with cations and anions. *Chem Ver.* 1991, 91, 1721-2085.

KADO, S. e KIMURA, K. Single complexation force of 18-crown-6 with ammonium ion evaluated by atomic force microscopy. *J Am Chem Soc.* 2003 Apr 16;125(15):4560-4.

KRASILNIKOV, O.V., TERNOVSKY, V. I., MUSAEV, Y.M. e TASHMUKHAMEDOV, B. A. 1980. Influence of staphylotoxin on conductance of bilayer phospholipid membranes. *Doklady NA URSS*, N7:6G-68.

KRASILNIKOV, O.V., TERNOVSKY, V. I. e TASHMUKHAMEDOV, B. A. 1981. Properties of ion channels induced by alpha-staphylo toxin in bilayer lipid membranes. *Biofisica* 26:271-275 (in Russian).

KRASILNIKOV, O. V. e SABIROV, R.Z., Ion transport through channels formed in lipid bilayers by *Staphylococcus aureus* alpha-toxin, *Gen. Physiol. Biophys.*, 1989, 8, pp. 213-222.

KRASILNIKOV, O. V.; SABIROV, R. Z.; TERNOVSKY, V. I.; MERZLYAK, P. G.; MURATKHODJAEV, N. A simple method for the determination of the pore radius of ion channels in planar lipid bilayer membranes. *Microbiology Immunology*. 1992. Sep; 5(1-3): 93-100.

KRASILNIKOV, O.V.; MERZLYAK, P.G.; YULDASHEVA, L.N.; RODRIGUES, C.G.; BHAKDI, S. e VALEVA, A. Electrophysiological evidence for heptameric stoichiometry of ion channels formed by *Staphylococcus aureus* alpha-toxin in planar lipid bilayers. *Mol Microbiol*. 2000 Sep;37(6):1372-8.

LAGÜE, P., ZUCKERMANN, M. J., e ROUX B. Lipid-Mediated Interactions between Intrinsic Membrane Proteins: Dependence on Protein Size and Lipid Composition *Biophysical Journal* Volume 81 July 2001 276–284

MANNELA, C. A. Electron microscopy and image analysis of the mitochondrial outer membrane channel, VDAC. *J. Bioenerg. Biomemb.* 19(4): 329-340, 1987.

MANNELA, C. A. e GUO, X. W. Interaction between the VDAC channel and a polyanionic effector. Na electron microscopy study. *Biophys. J.* 57(1): 23-31, 1990.

MANNELA, C. A. Structural analysis of mitochondrial pores. *Experientia* 46:137-145, 1990.

MAY, S., e BEN-SHAUL A. 1999. Molecular theory of lipid-protein interaction and the *La2Hi* transition. *Biophys. J.* 76:751–767.

MERZLYAK, P. G., YULDASHEVA, L. N., RODRIGUES, C. G., CARNEIRO, CARLOS M. M., KRASILNIKOV, O. V., BEZRUKOV, S. M. Polymeric Nonelectrolytes to Probe Pore Geometry: Application to the Alpha-Toxin Transmembrane Channel. *Biophysical Journal*, vol. 77, 1999, 3023-3033.

MIEDEMA, H., Surface potential and the calculated selectivity of ion channels, *Biophysical journal*, vol. 82. Jan. 2002, pp. 156-159.

MILLER, C., Ion channel reconstruction, Plenum Press, chapter 4, New York, 1986, pp. 75-111.

MIRZABEKOV, T. A. e ERMISHKIN, L. N. The gating of mitochondrial porin channel is controlled by a number of negative and positive charges. *FEBS Lett.* 249:375-378, 1989.

MONTAL, M e MUELLER, P. Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers and a study of their electrical properties. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* Vol. 69, N 12, pp. 3561-3566, 1972.

MOURITSEN, O. G., e BILTONEN R. L. 1993. Protein-lipid interactions and membrane heterogeneity. *In Protein-Lipid Interactions.* A. Watts, editor. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.1-39.

NUMA, S. 1989. A molecular view of neurotransmitter receptors and ion channels. *Harvey Lect.* 83: 121-165

OGSTON, A. 1881. Report upon microorganisms in surgical diseases. *Br. Med. J.* May:369-375.

OLAH, G. A.; HUANG, H. W.; LIU W. H. e WU, Y. L. Location of ion binding sites in the gramicidin channel by X-ray diffraction. *J. Mol. Biol.* 218(4): 847-858, 1991.

OVERTON, E. über die osmotischen Eigenschaften der lebenden Pflanzen und Tierzelle. *Vjsch. Naturf. Ges.* 1985. Zurich 40, 159-201

PALMER, S. M.; RYBAK, M. J. An evaluation of the bactericidal activity of ampicillin/sulbactam, piperacillin/tazobactam, imipenem or nafcillin alone and in combination with vancomycin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in time-kill curves with infected fibrin clots. *Antimicro. Chemother.* 1997 Apr; 39(4):515-8.

PATAI, S. The chemistry of ethers, crown ethers, hydroxyl groups and their sulphur analogues. *Supplemente E. Part 1*, 1980. John Wile e Sons, USA.

REESE, C. E. e ASHER, S. A. Photonic crystal optrode sensor for detection of Pb<sup>2+</sup> in high ionic strength environments. *Anal Chem.* 2003 Aug 1;75(15):3915-8.

RODRIGUES, C. G. Estudo da geometria e da distribuição espacial de canais iônicos formados por colicina Ia em bicamadas lipídicas planas. Dissertação de mestrado em Biofísica da UFPE, Recife, 1995.

ROUNAGHI, G., ESHAGHI, Z., GHIAMATI, E. 1977. Thermodynamic study of complex formation between 18crown6 and potassium ion in some binary non-aqueous solvents using a conductometric method. *Talanta*, 44: 275-282.

ROUNAGHI, G. *e col.*, Thermodynamic study of complex formation between 18C6 and potassium ion in some binary non-aqueous solvents using a conductometric method, *Talanta*, 44, 1997, pp. 275-282.

SCHEIN, S. J.; COLOMBINI, M. e FINKELSTEIN, A. Reconstitution in planar lipid bilayers of a voltage-dependent anion-selective channel obtained from *Paramecium* mitochondria. *J. Membr. Biol.* 30:99-120, 1976.

SOLOMONS, G., FRYHLE, C., Química orgânica, LTC, sétima edição, volume 1, 2001, pp. 442 e 443.

SONG L, HOBAUGH MR, SHUSTAK C, CHELEY S, BAYLEY H, GOUAUX JE. Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore. *Science.* 1996 Dec 13;274(5294):1859-66.

TEIXEIRA, L., Influência da heparina no canal formado pela alfa-toxina de *Staphylococcus aureus* em bicamadas lipídicas planas. Dissertação de mestrado em Bioquímica da UFRN. Natal, 2003.

TIEN, H. T. e LEITMANNNOVA, A. T., Membrane biophysics as viewed from experimental bilayers lipid membranes, Elsevier, pp. 150-215.

UNWIN, N. Acetylcholine receptor channel imaged in the open state. *Nature*, Vol. 373, 37-43, 1995.

VALEVA A, WEISSER A, WALKER B, KEHOE M, BAYLEY H, BHAKDI S, PALMER M. Molecular architecture of a toxin pore: a 15-residue sequence lines the transmembrane channel of staphylococcal alpha-toxin. *EMBO J.* 1996 Apr 15;15(8):1857-64.

VALEVA A, PONGS J, BHAKDI S, PALMER M. Staphylococcal alpha-toxin: the role of the N-terminus in formation of the heptameric pore -- a fluorescence study. *Biochim Biophys Acta.* 1997 Apr 26;1325(2):281-6.

VALEVA A, PALMER M, BHAKDI S. Staphylococcal alpha-toxin: formation of the heptameric pore is partially cooperative and proceeds through multiple intermediate stages. *Biochemistry.* 1997 Oct 28;36(43):13298-304.

VALEVA A, SCHNABEL R, WALEV I, BOUKHALLOUK F, BHAKDI S, PALMER M. Membrane insertion of the heptameric staphylococcal alpha-toxin pore. A domino-like structural transition that is allosterically modulated by the target cell membrane. *J Biol Chem.* 2001 May 4;276(18):14835-41.

VILLARROEL, A.; BURNASHEV, N. e SAKMANN, B. Dimensions of the narrow protion of a recombinant NMDA receptor channel. *Biophys. J.* 68:866-875, 1995.

WALKER, B. e col., Functional expression of the alpha-hemolysin of *Staphylococcus aureus* in intact *Escherichia coli* and in cell lysates, *The journal of biological chemistry*, vol. 267, No. 15, issue of may 25 pp. 10902-10909.

WOODWARD, R. B. \_\_\_\_\_ *Angew chem.* 1957 (69) 50-28.

YOSHII, F.; YAMADA, Y.; HOSHI, T.; HAGIWARA, H. The cration of a database of odorus compounds focused on molecular rigidity and análisis of the molecular features of the compounds in the database. *Chem. Senses.* 2002 Jun; 27(5): 399-405.

ZALMAN, L. S.; NIKAIDO, H. e KAGAWA, Y. Mitochondrial outer membrane contains a protein producing nonspecific diffusion channels. *J. Biol. Chem.* 255(5): 1771-1774, 1980.