



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de São José do Rio Preto

DAVI RUBINHO RATERO

DETERMINAÇÃO DO GRADIENTE DE pH NA
REGIÃO INTERNA A DUAS MEMBRANAS EM
EQUILÍBRIO COM ELETRÓLITO

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO – SÃO PAULO

2013

DAVI RUBINHO RATERO

DETERMINAÇÃO DO GRADIENTE DE pH NA REGIÃO
INTERNA A DUAS MEMBRANAS EM EQUILÍBRIO COM
ELETRÓLITO

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Biofísica Molecular, área de Biofísica Molecular, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. João Ruggiero Neto

São José do Rio Preto, 16 de agosto de 2013

Ratero, Davi Rubinho.

Determinação do gradiente de pH na região interna a duas membranas em equilíbrio com eletrólito / Davi Rubinho Ratero. -- São José do Rio Preto, 2013
77 f. : il., tabs.

Orientador: João Ruggiero Neto

Dissertação (mestrado) ã Universidade Estadual Paulista óJúlio de
Mesquita Filhoô, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Biologia molecular. 2. Biofísica. 3. Membranas (Biologia) 4. Equilíbrio iônico. 5. Ionização. 6. Eletrostática. 7. Teoria de campo médio. I. Ruggiero Neto, João. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU ã 577.352

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Campus de São José do Rio Preto

DAVI RUBINHO RATERO

DETERMINAÇÃO DO GRADIENTE DE pH NA REGIÃO
INTERNA A DUAS MEMBRANAS EM EQUILÍBRIO COM
ELETRÓLITO

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Biofísica Molecular, área de Biofísica Molecular, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. João Ruggiero Neto
Professor Titular
UNESP – São José do Rio Preto – SP
Orientador

Prof^a. Dr^a. Iolanda Midea Cuccovia
Professora Associada
USP – São Paulo – SP

Prof. Dr. Sidney Jurado de Carvalho
Professor Assistente Doutor
UNESP – São José do Rio Preto – SP

São José do Rio Preto, 16 de agosto de 2013

Dedico este trabalho à memória do Professor Augusto Agostinho Neto, a todos aqueles que estão ao meu lado, amigos e família, e ao bom Deus, que me deu a vida e a vida de todos eles.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente ao meu caríssimo e saudoso professor Augusto, meu grande mestre da cultura humana, que me ensinou muito mais que ciência e conhecimento; ensinou que o saber é um caminho para a felicidade, para si mesmo e para o próximo. Descanse em paz professor, e muito obrigado por tudo, por tudo que aprendi com o senhor e por ser uma pessoa tão importante para mim, meu amigo e exemplo. Quero ser como o senhor um dia e também espalhar o máximo de sementes, para fazer do mundo um lugar mais agradável e mais rico.

Agradeço à minha família, meu pai Valnei, minha mãe Leiliane, minhas irmãs Lilian e Ana Cristina; e também à minha namorada Maria Fernanda, que me apóiam e sempre me apoiaram em tudo que fiz. O amor, o carinho e o suporte deles me fazem crescer e ser verdadeiramente feliz.

Agradeço a todos os professores do departamento de física, que sempre foram solícitos em ajudar a sanar as dúvidas e as dificuldades no decorrer do caminho. Agradeço em especial ao professor João Ruggiero, que aceitou ser meu orientador e me ajudou muito com seus conhecimentos experimentais, dando uma contribuição fundamental a este trabalho. Agradeço ao professor Elso Drigo, que participou da minha banca de qualificação, dando contribuições para este trabalho. Agradeço ao professor Sidney J. de Carvalho, pela banca de qualificação e por estar sempre disposto a me ajudar nesse trabalho.

Agradeço a todos os meus amigos, aos companheiros de mestrado, meus amigos que estão trabalhando comigo desde a graduação e os que foram adentrando o círculo, em especial ao Guilherme Volpe Bossa, pelo apoio e dedicação e ao Daniel Z. Caetano; pela sua ajuda com a parte computacional de processamento de dados, agradeço imensamente a todos. Agradeço também a Tereza P. de Souza, por ter se prontificado a ajudar e pela contribuição na correção da qualificação. Agradeço ao CNPq pelo apoio financeiro e à prefeitura de José Bonifácio pelo auxílio no transporte.

Agradeço por fim, como o mais importante de todos, ao bom Deus. Ele que me dá a vida todos os dias e que me providencia essas pessoas maravilhosas a cada dia ao meu lado. Que este trabalho seja uma forma simples de louvor, uma forma de agradecimento pela inteligência, pela ciência e pelo entendimento, que nos é dado. A Ele sejam dadas glórias e louvores pelos séculos dos séculos.

“ O que uma árvore faz quando percebe que está morrendo? Ela espalha o máximo de sementes.”

(Augusto Agostinho Neto)

Resumo

Este trabalho desenvolve uma investigação teórica sobre o gradiente de pH em uma região delimitada por duas membranas que se ionizam em equilíbrio com uma solução eletrolítica. O objetivo foi de aplicar esta teoria para o espaço intermembranar da mitocôndria, investigando uma possível relação entre a ionização dos fosfolipídeos que constituem estas membranas e o controle de pH . O modelo utiliza a aproximação de campo médio, resolvendo-se a equação de Poisson-Boltzmann para um sistema composto por dois planos infinitos, fixos e separados por uma distância L . A densidade superficial de carga em cada plano é função da ionização dos grupos que o compõem e, portanto, dependente do equilíbrio químico com a solução circundante. Dois sistemas foram considerados, o primeiro com a solução contendo apenas os contraíons provenientes da ionização e o segundo contendo, uma solução eletrolítica, além dos contraíons. Foram analisados o potencial eletrostático médio e o pH em função da distância, variando-se a concentração de sal e a área disponível por molécula ionizável. O comportamento resultante mostra que a ionização contribui para manter o valor do pH estável nas vizinhanças da membrana. Assim, o gradiente de pH no espaço intermembranar da mitocôndria pode estar associado à ionização das moléculas que a compõem.

Palavras-chave: Equação de Poisson-Boltzmann, Equilíbrio Iônico, Dupla membrana.

Abstract

This work develops a theoretical model to investigate the pH gradient in a region bounded by two phospholipid bilayers that ionize in equilibrium with an electrolytic solution. The objective was to apply this theoretical model to the mitochondrial intermembrane space by investigating a possible relationship between the ionization of the phospholipids of the membrane and the pH control. The theoretical model was based on a mean field approximation. The Poisson – Boltzmann equation was solved for a system composed by two infinite planes separated by a distance L . The surface charge density in each plane is a function of the ionization of their ionizing groups and therefore dependent on the chemical equilibrium with the surrounding solution. Two systems were considered, the first takes into account only the counterions from the ionization. The second takes into account also the presence of an electrolyte besides the counterions. For these two systems the mean electrostatic potential and the pH were analyzed as a function of the distance from the charged planes for different values of both the added salt concentration and the cross section of the ionizable groups. The results obtained evidence that the ionization contributes to maintain the pH value stable near the membranes. These results suggest that the pH gradient in the mitochondrial intermembrane space is likely to be associated to the ionization of the phospholipid molecules.

Keywords: Poisson-Boltzmann equation, Ionic Equilibrium, Double Layer.

Sumário

CAPÍTULO 1	10
INTRODUÇÃO	10
1.1. MEMBRANAS BIOLÓGICAS	10
1.2. O MEIO INTRACELULAR	13
1.3. A MITOCÔNDRIA	14
1.4. A APROXIMAÇÃO DE CAMPO MÉDIO	16
1.5. MOTIVAÇÃO E OBJETIVOS	17
CAPÍTULO 2	18
MODELO TEÓRICO	18
2.1. A EQUAÇÃO DE POISSON-BOLTZMANN COM GEOMETRIA PLANA.	19
CAPÍTULO 3	26
SISTEMA SÓ COM CONTRAÍONS.	26
3.1. ANÁLISE DO SISTEMA SÓ COM CONTRAÍONS.	26
3.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
CAPÍTULO 4	39
SISTEMA COM CONTRAÍONS E ELETRÓLITO ADICIONADO.	39
4.1. ANÁLISE DO SISTEMA COM CONTRAÍONS E ELETRÓLITO ADICIONADO.	39
4.2. ELETRÓLITO ADICIONAL UNI-UNIVALENTE.	42
4.3. ELETRÓLITO ADICIONAL DE BI-UNIVALENTES.	50
CAPÍTULO 5	56
APLICAÇÃO DO MODELO À MITOCÔNDRIA.	56
CAPÍTULO 6	62
CONCLUSÕES	62
APÊNDICE A	63
APÊNDICE B	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

Capítulo 1

Introdução

Este capítulo trata de uma visão geral dos objetos de estudo deste trabalho: as membranas biológicas e suas propriedades, a membrana interna da mitocôndria, além de uma sucinta explanação sobre a aproximação de campo médio e uma breve revisão de alguns trabalhos nesta área. Na última seção são apresentados os objetivos e a motivação do trabalho.

1.1. Membranas biológicas

O modelo de mosaico fluido para as membranas biológicas sugerido por Singer e Nicholson em 1972 [1] propõe uma bicamada lipídica fluida, formada por fosfolipídios que envolvem proteínas periféricas e integrais, estando também presentes frações de oligossacarídeos (açúcares). Os fosfolipídios são moléculas que possuem a propriedade de serem anfifílicos (possuem uma parte polar e outra apolar).

Devido a essa característica anfifílica, os fosfolipídios tendem naturalmente a formar bicamadas na presença de um solvente polar como a água e isolar o meio intramembrana do meio exterior, criando uma espécie de microespaço isolado. A parte hidrofóbica fica organizada na região interna da bicamada e as cabeças polares permanecem na parte externa, expostas ao solvente. A Figura 1.1 é uma representação da bicamada lipídica:

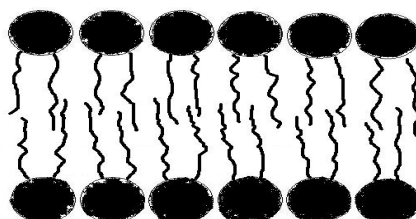


Figura 1.1: Representação simplificada da bicamada lipídica.

A bicamada lipídica das membranas biológicas possui de 6 a 10 nm de espessura e o seu comportamento é o de um fluido bidimensional. Os fosfolipídios se movimentam em torno de seu eixo, livremente em uma mesma monocamada e raramente (por ação de enzimas) de uma monocamada para a outra. O grau de fluidez depende da composição dos fosfolipídios, do tamanho da cauda apolar e do número de insaturações. Em células animais, a fluidez é modulada pela presença do colesterol, que enrijece a membrana, tornando-a menos fluida e menos permeável. [2]

A função primária das biomembranas é delimitar o espaço celular. Nas organelas, elas são responsáveis por delimitar o espaço interno, proporcionando que se tornem compartimentos com funções específicas. Além de dar a forma, as membranas possuem permeabilidade seletiva, isto é, controlam a passagem de íons e pequenas moléculas impedindo a troca indiscriminada dos componentes das organelas entre si e dos componentes extracelulares com aqueles intracelulares. Enzimas e proteínas transmembrânicas são as principais responsáveis por essa função. O transporte através da membrana pode ser feito de duas maneiras: passivamente (sem gasto de energia da célula) por difusão e osmose; ou ativamente (com gasto de energia) geralmente contra o gradiente de concentração. [3]

As membranas também possibilitam o deslocamento de substâncias pelo citoplasma, através de vesículas de secreção; e participam dos processos de endocitose e exocitose. Provêem suporte físico para as atividades ordenadas das enzimas nelas contidas. São responsáveis também pela comunicação intercelular, possuem especificações que possibilitam a recepção de estímulos e informações, um exemplo são as microvilosidades, especializações da membrana que aumentam a sua superfície de contato.

Dos componentes da membrana, os fosfolipídios são particularmente interessantes devido à sua propriedade anfifílica. São divididos em dois principais grupos: os fosfoglicerídeos e os esfingolipídios. Os fosfoglicerídeos possuem em sua composição uma cabeça polar e duas caudas apolares ligadas entre si por um grupo fosfato. São constituídos por dois grupos ácidos graxos, um saturado e o outro insaturado, esterificados ao primeiro e segundo grupo hidroxila do glicerol. O terceiro grupo do glicerol liga-se ao ácido fosfórico, e este por sua vez liga-se a um grupo álcool que forma a cabeça polar. Esse grupo pode ionizar-se dependendo do *pH* da solução, liberando um próton para a solução [3].

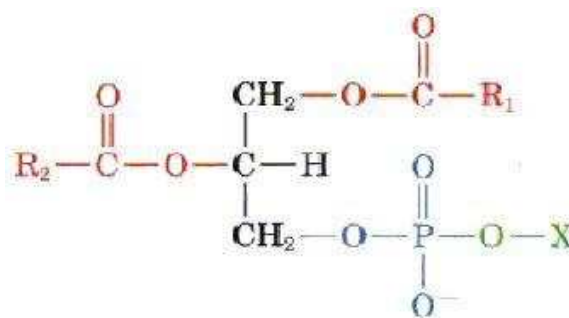


Figura 1.2: Representação geral de um fosfoglicerídeo. O grupo X é a cabeça polar e os grupos R são as caudas apolares.

Alguns exemplos de fosfoglicerídeos são a fosfatidiletanolamina, a fosfatidilcolina, a fosfatidilserina, que é encontrada na monocamada interna das membranas, e a cardiolipina, presente na membrana interna da mitocôndria. O segundo grupo de fosfolipídios são os esfingolipídios, que diferem dos fosfoglicerídeos por não possuírem o grupo glicerol. O exemplo mais simples é a esfingomielina presente na maioria das membranas de animais. Uma revisão sobre os lipídeos componentes das membranas de mamíferos é feita por Meer e Kroon [4].

A membrana celular está em contato com o eletrólito em cuja composição há íons positivos e negativos principalmente mono e bivalentes. A carga efetiva superficial, resultado do equilíbrio entre os fosfolipídios que se ionizam e o eletrólito, pode desempenhar um papel no controle do *pH* e do potencial eletrostático médio intercelular. Portanto, função adicional pode ser atribuída à membrana quando age em conjunto com o eletrólito circundante: a de estabilizar as suas vizinhanças elétrica e quimicamente. Esta estabilização entende-se aqui no sentido de que as variações nos valores de *pH* e do potencial eletrostático entre dois pontos da solução sejam mínimas nas proximidades da membrana, ou seja, quanto mais perto da membrana essas variações tendam a um valor mínimo, mais estável estará o sistema.

Estudos recentes em microbiologia propõem a importância dessas paredes de membrana nos períodos pré-bióticos para o início da formação das primeiras proto-células levando em conta as propriedades dos oceanos primitivos de altas concentrações iônicas [5] e [6].

1.2. O meio intracelular

O meio intracelular, ou citoplasma, é dividido em citosol e compartimentos intracelulares (organelas). O citosol é formado por basicamente água, íons dissolvidos, macromoléculas, aminoácidos livres e ácidos nucleicos. Nele ocorre grande parte do metabolismo celular; como processos de degradação e síntese, transporte de moléculas e transferência de informação.

A estabilidade química e elétrica deste meio é bastante controlada. O *pH* intracelular é estável em torno de 7,0-7,2 sendo levemente mais ácido que o meio extracelular. Em algumas organelas, como os lisossomos, o *pH* é mantido mais ácido em torno de 5,0 para o correto funcionamento das enzimas lisossomais. Diversos fatores estão relacionados com a estabilidade do *pH* nas vizinhanças da membrana plasmática, o exemplo mais importante é o mecanismo das proteínas transportadoras [2].

A presença de íons dissolvidos também modula este gradiente de *pH* devido à força iônica, que controla o alcance das interações intermoleculares. O citosol possui em média a mesma quantidade de cargas negativas e positivas, o que torna a célula eletricamente neutra. As concentrações médias de eletrólito no citosol são mostradas na Tabela 1:

Tabela 1

Espécie iônica	Concentração (mM)
K^{+}	140
Na^{+}	5-15
Mg^{2+}	0.5
Ca^{2+}	10^{-4}
Cl^{-}	5-15

Tabela 1: Concentrações iônicas presentes no citosol. Adaptado de Alberts et al.[2]

Outros ânions também estão presentes, como bicarbonato e fosfato. A maior parte da carga negativa está contida nas proteínas e ácidos nucleicos presentes no citoplasma. A presença de íons bivalentes positivos contribui de maneira significativa no comportamento do grau de ionização da membrana [7].

1.3. A mitocôndria

As mitocôndrias são compartimentos celulares essenciais para a manutenção da vida complexa nas células. São responsáveis pela conversão da energia estocada nas moléculas alimentares em uma molécula de mais fácil metabolismo, a adenosina trifosfato (ATP); utilizando o processo bioquímico denominado respiração aeróbica.

A eficiência do processo de produção de energia na mitocôndria é da ordem de 15 vezes maior que a obtida exclusivamente pela glicólise [2]. Tal fato se deve à maneira de como acontecem as etapas da respiração, na chamada cadeia respiratória, que ocorre na membrana especializada da mitocôndria. O piruvato, obtido do metabolismo da glicose, é completamente oxidado em CO_2 , H_2O e energia na forma de ATP que é distribuída para a célula.

A estrutura da mitocôndria é altamente especializada e funcional. Experimentos de caracterização dos componentes mitocondriais, por exemplo, são apresentados em De Robertis e Raffo [8], Pappas e Brant [9] e Fleischer et al. [10]. A respeito dos fosfolipídios que as compõem, uma recente revisão pode ser encontrada em Osman et al. [11]. A Tabela 2 sumariza de forma simplificada a porcentagem desses fosfolipídios na composição mitocondrial.

A mitocôndria é envolvida por duas membranas, uma externa e outra interna, que delimitam dois compartimentos internos: a matriz mitocondrial e o espaço intermembranas. A Figura 1.2 mostra uma micrografia eletrônica de uma mitocôndria.

A membrana externa fica em contato com o citosol e possui em sua composição várias unidades de uma proteína transmembrânica chamada porina, que forma canais na bicamada lipídica, permitindo a passagem de moléculas de até 5 kDa.

Tabela 2

Fosfolipídios	Porcentagem total
Cardiolipina	~ 18
Fosfatidiletanolamina	~ 35
Fosfatidilcolina	~ 40
Fosfatidilinositol	~ 5
Fosfatidilserina	~ 1

Tabela 2: Composição percentual de fosfolipídios na mitocôndria. Adaptado de Robert B. Gennis. [12]

A membrana interna é seletivamente permeável e possui na sua composição uma proporção de aproximadamente 18% de cardiolipina, um fosfolipídio duplo que possui quatro cadeias acíclicas ligadas a dois grupos fosfato, que possuem um grupo OH que podem ionizar-se.

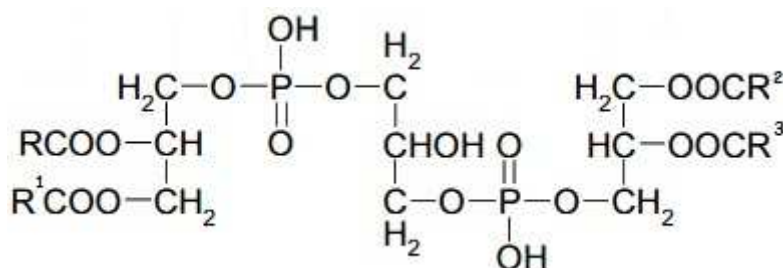


Figura 1.3: Representação da cardiolipina, com as quatro cadeias apolares R ligadas aos dois fosfatos unidos pelo glicerol.

Possui também várias proteínas transportadoras que regulam a entrada e a saída de moléculas na matriz, sendo especialmente impermeável a íons. Essa membrana é retorcida formando estruturas que se estendem pelo interior da mitocôndria denominadas cristas. Isso aumenta a sua área de superfície, o que é muito importante para a cadeia respiratória. A membrana interna delimita a matriz mitocondrial, formada por enzimas necessárias para a síntese de ATP e outras moléculas, possuindo também o

DNA mitocondrial, tRNA e ribossomos mitocondriais. A matriz e a membrana interna são as partes mais funcionais da mitocôndria. [2]

O espaço intermembranas possui uma composição química semelhante àquela do citosol. As cristas da mitocôndria possuem uma distancia de separação da ordem de 200Å [8]. Existe um gradiente de pH no espaço intermembranas que é responsável por fazer com que os íons H^+ atravessem a membrana em direção à matriz [3,13,14]. Este movimento dos prótons é essencial para o funcionamento da enzima ATP-sintase, localizada na membrana interna por onde passam os íons H^+ e que é responsável pela formação do ATP na etapa de fosforilação oxidativa. [3]

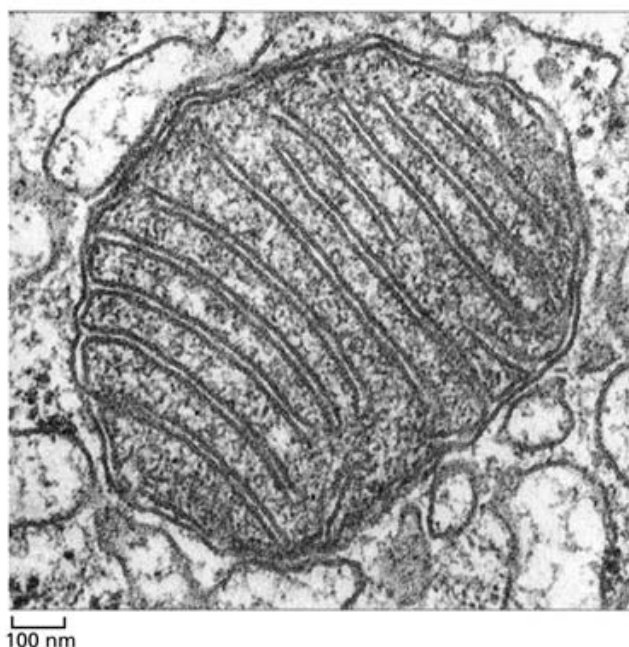


Figura 1.4: Micrografia de uma mitocôndria. Adaptado de Alberts et al. [2]

1.4. A aproximação de campo médio

O problema físico de uma superfície carregada na presença de uma solução eletrolítica é de grande aplicabilidade nos sistemas biológicos. Para tratar esse tipo de problema neste trabalho, existe um conjunto de aproximações conhecidas como teoria de campo médio.

A teoria de campo médio está fundamentada na aproximação que a interação eletrostática é dependente apenas do valor médio do campo elétrico devido a todos os

componentes do sistema. Em outras palavras, o campo sentido por uma das partículas da solução é o valor médio do campo produzido por todas as outras.

O solvente que compõe a solução eletrolítica é considerado um meio dielétrico contínuo. As espécies iônicas diferem apenas pela carga, assim sendo, não se leva em consideração o tamanho das partículas iônicas. A distribuição iônica segue o mínimo da energia livre de Gibbs e é modulada por um fator de Boltzmann, sendo assim considerada como uma distribuição contínua de cargas. A equação que rege o comportamento do potencial eletrostático médio é a equação de Poisson-Boltzmann, obtida e analisada nas próximas seções.

Vários trabalhos já foram feitos na área de campo médio, apresentando soluções para a equação de Poisson-Boltzmann para diferentes geometrias e concentrações iônicas, como Agostinho Neto e Drigo Filho [15] e em Zhou e Zhang [16]; para problemas de geometria plana em geral, como em Andelman [17]; para um plano carregado na presença de até quatro espécies iônicas, em A. Teso et al. [18]; para o problema de dupla camada elétrica uma abordagem geral analítica é feita em Agostinho Neto e Drigo Filho [19]. Soluções numéricas para a equação de Poisson-Boltzmann são apresentadas, por exemplo, em James e Williams [20] e Zhang et al. [21].

1.5. Motivação e objetivos

Este trabalho tem como principal objetivo elaborar um modelo teórico simplificado para determinar e descrever o gradiente de pH em uma região limitada por duas membranas ionizáveis que encerram uma solução eletrolítica, levando em consideração o equilíbrio químico entre as moléculas que compõem a membrana e os íons da solução. A metodologia utilizada para elaborar o modelo está baseada na aproximação de campo médio, com a solução da equação de Poisson-Boltzmann não-linear com geometria plana para dois tipos de sistemas: o primeiro no qual a solução entre as membranas só possui os contraíons provenientes da ionização e o segundo cuja solução é composta por contraíons e um eletrólito. Este modelo pode ser aplicado, por exemplo, ao espaço intermembranas nas cristas da mitocôndria, onde existe um gradiente de pH essencial para a funcionalidade da organela. A hipótese testada nesse trabalho é a de que existe uma relação entre a estabilidade do pH nesta região e a ionização que pode ocorrer nas vizinhanças da membrana interna da mitocôndria.

Capítulo 2

Modelo teórico

O modelo estudado pode ser aplicado ao espaço intermembranas nas cristas da mitocôndria. Assim sendo, consiste de duas membranas compostas por fosfolipídios que podem se ionizar, representadas por planos paralelos infinitos e separados por uma distância L . Entre as membranas há uma solução eletrolítica. A ionização depende do equilíbrio químico com a solução e confere à membrana uma densidade efetiva de cargas negativa. A Figura 2.1 ilustra este modelo de maneira simplificada:

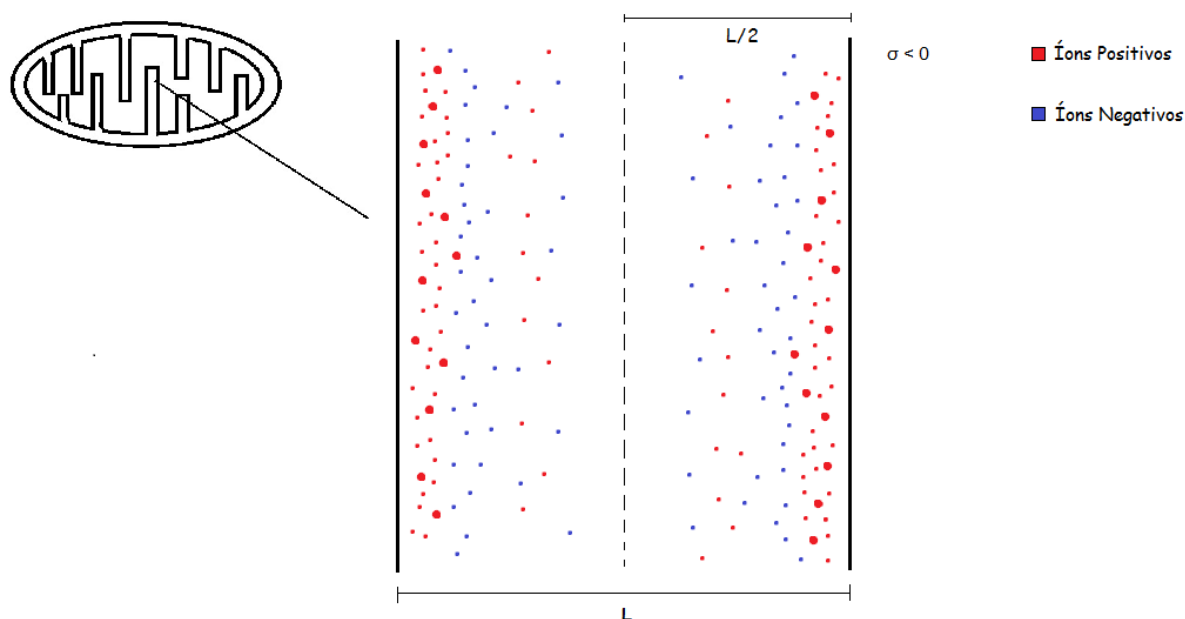


Figura 2.1: Imagem ilustrativa do modelo adotado neste trabalho. Os planos representam as membranas ionizáveis, separadas por uma distância L .

A interação mais importante para esse tipo de sistema é a eletrostática, entre os íons da solução e a densidade de cargas na superfície. Dois sistemas são considerados nesse trabalho: o primeiro é tratado no Capítulo 3 e considera a solução entre as membranas composta somente pelos contraíons provenientes da ionização. No segundo sistema, tratado no Capítulo 4, a solução é composta pelos contraíons e por um

eletrólito formado por até três espécies iônicas, a saber, íons bivalentes positivos, monovalentes positivos e monovalentes negativos, em equilíbrio químico com as moléculas que compõem a membrana. No Capítulo 5, é feita uma aplicação do modelo às condições aproximadas do espaço intermembranas das cristas da mitocôndria.

2.1. A Equação de Poisson-Boltzmann com geometria plana.

O modelo para a análise da distribuição iônica e grau de ionização de uma membrana usado no presente trabalho está ancorado na hipótese do equilíbrio termodinâmico.

A hipótese de equilíbrio termodinâmico (energia livre de Gibbs tem valor mínimo) implica que para qualquer espécie iônica o potencial químico é o mesmo em qualquer ponto da solução.

Há contribuições ao potencial químico devido aos graus de liberdade internos de uma molécula ionizada ou de um íon hidratado, em geral representada por $\mu_i^0(T)$; a contribuição entrópica é representada por $kT \ln[c_i]$, kT produto da constante de Boltzmann k com o valor da temperatura em kelvin T , $\ln[c_i]$ designa a função logaritmo natural do número c_i , valor da concentração milimolar da espécie iônica i ; ou seja, $c_i = n_i/n_A$, n_i representa o número de íons por unidade de volume (m^3) e n_A é o número de Avogadro.

A contribuição da energia de interação com íons e moléculas em solução é dada por $kT \ln[\gamma_i]$, γ_i é o coeficiente de atividade do íon i , $kT \ln[\gamma_i]$ representa o trabalho reversível realizado isotermicamente (contra as forças intermoleculares), para adicionar um íon à solução. O termo representa a contribuição da interação do íon com as moléculas do solvente na sua vizinhança e esta interação depende da contribuição devido à interação com os outros íons na solução, que pode ser representada por $z_i e \psi$, admitindo geometria esférica para o íon hidratado.

Portanto, o potencial eletrostático médio tem o papel de potencial da força média para os íons hidratados e é tomado como $z_i e \psi$, z_i é a valência iônica, e o módulo da carga de um elétron e ψ representa o potencial eletrostático médio. Isto significa dizer que a aproximação de campo médio não leva em consideração as diferentes

configurações dos íons na solução como influenciáveis no valor médio do potencial eletrostático, desprezando as contribuições de dipolo, quadripolo e assim por diante.

Em termos matemáticos, o potencial químico é escrito como:

$$\mu_i = \mu_i^0 + kT \ln [c_i] + z_i e \psi$$

Levando em conta a igualdade do potencial químico em todo o espaço, obtém-se:

$$\mu_i = \mu_i^0 + kT \ln [c_{0i}] = \mu_i^0 + kT \ln [c_i] + z_i e \psi$$

sendo que a concentração milimolar da espécie iônica i é dada por:

$$c_i(\vec{r}) = c_{0i} e^{-z_i e \psi / kT}$$

c_{i0} é a concentração na região onde o potencial eletrostático médio é nulo. Essa região é denominada *bulk* da solução.

Para se obter a equação de Poisson-Boltzmann, pode-se partir da equação de Poisson, que relaciona o potencial eletrostático ψ com a densidade de cargas ρ e a permissividade elétrica do meio ϵ :

$$\nabla^2 \psi(\vec{r}) = -\frac{\rho}{\epsilon} \quad (1)$$

A distribuição iônica, para as espécies iônicas que compõem a solução, é dada pelo fator de Boltzmann:

$$\rho(\vec{r}) = n_A \sum_i z_i e c_{0i} e^{-z_i e \psi / kT} \quad (2)$$

Combinando as duas expressões, obtêm-se:

$$\nabla^2 \psi = -\frac{n_A}{\epsilon} \sum_i z_i e c_{0i} e^{-z_i e \psi / kT} \quad (3)$$

As seguintes substituições foram utilizadas: $\phi = e\psi/kT$ é o potencial reduzido, que corresponde à razão entre a energia eletrostática de uma carga e com a energia térmica kT ; $\xi = r/\lambda$ é a distância reduzida sendo $\lambda = (\epsilon kT / 2e^2 N_A)^{1/2}$ uma unidade de comprimento. Na forma adimensional a equação de Poisson-Boltzmann é dada por:

$$\nabla^2 \phi = -\frac{1}{2} \sum_i z_i c_{0i} e^{-z_i \phi} \quad (4)$$

Esta é uma equação diferencial parcial não-linear elíptica. O operador laplaciano em coordenadas cartesianas possui a seguinte representação:

$$\nabla^2 = \frac{\partial^2}{\partial \xi_1^2} + \frac{\partial^2}{\partial \xi_2^2} + \frac{\partial^2}{\partial \xi_3^2}, \text{ com } \xi_1 = x/\lambda, \xi_2 = y/\lambda \text{ e } \xi_3 = z/\lambda$$

Considerando a geometria plana do problema estudado, pode-se admitir o potencial eletrostático médio como função da coordenada x perpendicular aos planos das duas membranas, portanto o laplaciano só depende de uma coordenada e a equação de Poisson-Boltzmann pode ser escrita como:

$$\frac{d^2 \phi}{d\xi^2} = -\frac{1}{2} \sum_i z_i c_i e^{-z_i \phi} \quad (5)$$

Esta é uma equação diferencial ordinária linear de segunda ordem, necessitando, portanto de duas condições de contorno para ser bem definida e resolvida. De maneira geral, se os planos possuem densidades de carga arbitrárias, as condições de contorno podem ser obtidas a partir da Lei de Gauss. Esta Lei que afirma que o fluxo do campo elétrico sobre uma superfície gaussiana fechada S é igual à carga Q interna na superfície S dividida por ϵ , que é a permissividade elétrica do meio. Em termos matemáticos:

$$\oint_S \vec{E} \cdot d\vec{S} = \frac{Q}{\epsilon} \quad (6)$$

$d\vec{S}$ é o elemento de superfície orientado na direção da normal à superfície gaussiana. Como o campo tem a mesma direção e sentido deste vetor normal $d\vec{S}$ e lembrando que $\vec{E} = -\nabla\psi$, o resultado pode ser escrito como:

$$E\Delta S = \frac{\sigma\Delta S}{\epsilon} \Rightarrow E = \frac{\sigma}{\epsilon} \Rightarrow \frac{d\psi}{dx} = \frac{\sigma}{\epsilon}$$

Aplicando este resultado em cada um dos planos e fazendo as substituições para ψ e x , em $\xi = 0$ e em $\xi = \frac{L}{\lambda}$, devido ao caráter vetorial do campo, as condições de contorno ficam expressas por:

$$\frac{d\phi}{d\xi} = -\frac{e\lambda\sigma_1}{\epsilon kT} \quad \text{em} \quad \xi = 0 \quad (7)$$

$$\frac{d\phi}{d\xi} = \frac{e\lambda\sigma_2}{\epsilon kT} \quad \text{em} \quad \xi = \frac{L}{\lambda} \quad (8)$$

O significado destas expressões está apoiado no modelo, que admite a existência de campo elétrico apenas na região interna às duas membranas. O sinal do campo é devido à sua característica vetorial. Isso ocorre devido ao rearranjo dos íons da solução, que se distribuem de maneira contínua em função da distância.

Como o modelo apresentado neste trabalho considera que as membranas sejam idênticas, a densidade de cargas terá o mesmo valor para ambas. Pode-se assim considerar, por simetria, que no ponto médio entre as duas membranas, $\xi = \frac{L}{2\lambda}$, o campo se anula, ou seja, $\frac{d\phi}{d\xi} = 0$. Para a análise do problema proposto nesse trabalho devido às condições de simetria do problema e também da condição de neutralidade da solução no ponto médio entre as membranas, pode-se escolher o ponto em que o potencial é zero, $\phi = 0$, também em $\xi = \frac{L}{2\lambda}$. Tal condição facilita os cálculos e não prejudica a análise do problema para esse sistema. A escolha do ponto onde o potencial se anula é arbitrária. Devido ao interesse de aplicar esse modelo para o sistema intermembranas da mitocôndria, onde se tem uma concentração iônica definida na

solução, é interessante assumir essa condição para se garantir que as concentrações na região do meio das membranas sejam as fisiológicas.

Portanto, as condições de contorno que são utilizadas para a análise dos problemas são a equação (7) e:

$$\frac{d\phi}{d\xi} = 0 \quad \text{e} \quad \phi = 0 \quad \text{para} \quad \xi = \frac{L}{2\lambda} \quad (9)$$

O equilíbrio entre as moléculas que compõem a membrana e a solução eletrolítica pode ser representado por:



A partir do equilíbrio, pela “lei de ação das massas”, pode-se definir a constante de ionização, que é função da temperatura:

$$K = \frac{[A^-][H^+]}{[A-H]} \quad (11)$$

A quantidade total de moléculas ionizadas e não-ionizadas deve ser constante, logo se pode concluir que:

$$[A^-] + [A-H] = [A]_{TOTAL} \quad (12)$$

assim, dividindo ambos os lados pelo número total de grupos ionizáveis,

$$\frac{[A^-]}{[A]_{TOTAL}} + \frac{[A-H]}{[A]_{TOTAL}} = 1 \quad (13)$$

pode-se definir o chamado grau de ionização, como sendo a razão de moléculas que estão ionizadas na membrana:

$$\alpha = \frac{[A^-]}{[A]_{TOTAL}} \quad (14)$$

Substituindo a equação (14) na equação (13) e fazendo uso da relação (12) pode-se escrever uma relação para a constante de ionização e para o grau de ionização em função da concentração de prótons livres:

$$\frac{\alpha[H^+]}{1-\alpha} = K \quad (15)$$

$$\alpha = \frac{1}{1 + \frac{[H^+]}{K}} \quad (16)$$

A distribuição de Boltzmann permite escrever a concentração de prótons livres na solução como

$$[H^+] = 10^{-pH} e^{-\phi_0}$$

e a constante de ionização pode ser escrita em função do pK do grupo ionizável das moléculas que compõem as membranas como:

$$K = 10^{-pK}$$

Substituindo essas duas expressões na equação (16):

$$\alpha = \frac{1}{1 + \frac{10^{-pH} e^{-\phi_0}}{10^{-pK}}}$$

$$\alpha = \frac{1}{1 + 10^{pK - pH - \log(e)\phi_0}} \quad (17)$$

Desta maneira, o grau de ionização fica estabelecido como função do pK do grupo ionizável, do pH da solução e do potencial reduzido.

A densidade de cargas nas membranas depende do equilíbrio, portanto, pode ser escrita em função do grau de ionização α e da área disponível por grupo ionizável A_M :

$$\sigma = \frac{e\alpha}{A_M} \quad (18)$$

Com esses parâmetros estabelecidos, o modelo está pronto para ser aplicado para os sistemas com diferentes concentrações iônicas.

Capítulo 3

Sistema só com contraíons.

No presente capítulo é apresentado e discutido o primeiro sistema para o qual o modelo é aplicado, consistindo de duas membranas que se ionizam em equilíbrio com uma solução na qual só há os contraíons provenientes da ionização, que são considerados prótons livres, ou seja, íons monovalentes positivos. Os resultados obtidos, analisados e discutidos são o potencial eletrostático em todo o espaço, o grau de ionização, o pH em função da distância, a distribuição dos contraíons livres e a pressão entre as membranas, em função da distância de separação L . A seção 3.1 trata da análise matemática do problema e os resultados são apresentados na seção 3.2.

3.1. Análise do sistema só com contraíons.

Partindo da equação de Poisson-Boltzmann, como a única espécie iônica presente na solução são os contraíons provenientes da ionização, só aparece um termo na somatória da equação (5) e a forma resultante se escreve como:

$$\frac{d^2\phi}{d\xi^2} = -\frac{1}{2}c_0e^{-\phi} \quad (19)$$

onde c_0 é o valor da concentração milimolar de contraíons livres no *bulk* da solução. Esse valor depende da ionização e, portanto, também é um parâmetro a ser calculado.

Para uma primeira integração, é conveniente multiplicar os dois lados da equação por $\frac{d\phi}{d\xi}$ e, utilizando as propriedades da derivação, rearranjar os termos para se obter:

$$\frac{d}{d\xi} \left[\frac{1}{2} \left(\frac{d\phi}{d\xi} \right)^2 \right] = \frac{1}{2} c_0 \frac{d}{d\xi} e^{-\phi} \quad (20)$$

Integrando a expressão (20) dos dois lados, obtém-se a primeira constante de integração.

$$\frac{1}{2} \left(\frac{d\phi}{d\xi} \right)^2 - \frac{1}{2} c_0 e^{-\phi} = \text{const} \quad (21)$$

Para o cálculo desta constante de integração, pode-se valer da condição de simetria que em $\xi = \frac{L}{2\lambda}$ o campo se anula e escolher o valor zero para o potencial neste ponto. Logo o valor da constante de integração é:

$$\text{const} = -\frac{c_0}{2} \quad (22)$$

Substituindo esse valor na equação (21) e extraíndo a raiz quadrada:

$$\frac{1}{2} \left(\frac{d\phi}{d\xi} \right)^2 - \frac{1}{2} c_0 e^{-\phi} = -\frac{c_0}{2} \quad (23)$$

$$\left(\frac{d\phi}{d\xi} \right)^2 = c_0 (e^{-\phi} - 1) \quad (24)$$

$$\frac{d\phi}{d\xi} = \pm \sqrt{c_0} e^{-\phi/2} (1 - e^{\phi})^{1/2} \quad (25)$$

Como os contraíons são considerados positivos, então a densidade de cargas na membrana é negativa, $\sigma < 0$, portanto, o sinal da equação (25) é o positivo. Como as funções envolvidas são todas bem comportadas, essa equação diferencial é do tipo separável e para resolvê-la deve-se rearranjar os termos para que os integrandos fiquem da forma:

$$\frac{e^{\phi/2} d\phi}{(1 - e^{\phi})^{1/2}} = \sqrt{c_0} d\xi \quad (26)$$

Para facilitar a solução desta integral é interessante fazer uma substituição de variáveis que permita a simplificação dos termos que a compõem. Como no denominador há uma raiz quadrada de uma subtração, pode-se fazer bom uso das identidades trigonométricas escolhendo a substituição de variáveis $e^{\phi/2} = \text{sen}\theta$, o que resulta em:

$$\frac{2 \cos \theta d\theta}{(1 - \text{sen}^2 \theta)^{1/2}} = \sqrt{c_0} d\xi \quad (27)$$

Integrando ambos os lados da equação, obtêm-se a solução para a variável θ . A constante de integração é aqui denominada d .

$$\theta = \frac{\sqrt{c_0}}{2} (\xi + d) \quad (28)$$

Voltando a expressão para a variável ϕ , a solução para o potencial eletrostático médio se escreve:

$$e^{\phi/2} = \text{sen} \left[\frac{\sqrt{c_0}}{2} (\xi + d) \right] \quad (29)$$

$$\phi = 2 \ln \left\{ \text{sen} \left[\frac{\sqrt{c_0}}{2} (\xi + d) \right] \right\} \quad (30)$$

Para se obter a constante de integração d e o valor de c_0 , é necessário fazer uso das condições de contorno e de simetria para o campo eletrostático médio. Para obtê-lo, basta derivar a expressão (30):

$$\frac{d\phi}{d\xi} = \sqrt{c_0} \cot \left[\frac{\sqrt{c_0}}{2} (\xi + d) \right] \quad (31)$$

Em uma primeira análise, para obter uma expressão para c_0 faz-se uso da condição que em $\xi = \frac{L}{2\lambda}$, o campo se anula:

$$\sqrt{c_0} \cot \left[\frac{\sqrt{c_0}}{2} \left(\frac{L}{2\lambda} + d \right) \right] = 0 \quad (32)$$

ou seja, se e somente se:

$$\frac{\sqrt{c_0}}{2} \left(\frac{L}{2\lambda} + d \right) = \frac{\pi}{2} \quad (33)$$

O valor de c_0 é obtido a partir de uma equação transcendental em função de $\frac{d\sqrt{c_0}}{2}$. Essa equação é obtida rearranjando-se os termos de (33):

$$\frac{d\sqrt{c_0}}{2} = \frac{\pi}{2} - \frac{L\sqrt{c_0}}{4\lambda} \quad (34)$$

$$\sqrt{c_0} = \frac{2\lambda\pi}{L} - \frac{4\lambda}{L} \left(\frac{d\sqrt{c_0}}{2} \right) \quad (35)$$

$$c_0 = \frac{4\lambda^2}{L^2} \left[\pi - 2 \left(\frac{d\sqrt{c_0}}{2} \right) \right]^2 \quad (36)$$

Em $\xi = 0$, a condição de contorno para o campo é dada pela equação (7). Para este sistema composto apenas de contraíons na solução, a concentração de prótons livres na solução é dada por:

$$[H^+] = c_0 e^{-\phi_0}$$

e a densidade de cargas também depende do equilíbrio e do grau de ionização. Combinando as expressões (18) e (16) se obtém:

$$\sigma = \frac{e\alpha}{A_M} = \frac{e}{A_M} \frac{1}{1 + \frac{c_0}{K(T)} e^{-\phi_0}} \quad (37)$$

Assim, substitui-se a equação (37) na expressão para o campo da condição de contorno (7), para se obter:

$$\left. \frac{d\phi}{d\xi} \right|_{\xi=0} = -\frac{e^2 \lambda}{\varepsilon k T A_M} \frac{1}{1 + \frac{c_0}{K(T)} e^{-\phi_0}} \quad (38)$$

O campo também é dado em $\xi = 0$ pela expressão (31):

$$\left. \frac{d\phi}{d\xi} \right|_{\xi=0} = \sqrt{c_0} \cot\left(\frac{d\sqrt{c_0}}{2}\right) \quad (39)$$

Utilizando a equação (30) para o potencial, aplicada em $\xi = 0$ e igualando (39) com (38) o campo fica:

$$\left. \frac{d\phi}{d\xi} \right|_{\xi=0} = \sqrt{c_0} \cot\left(\frac{d\sqrt{c_0}}{2}\right) = -\frac{e^2 \lambda}{\varepsilon k T A_M} \frac{1}{1 + \frac{c_0}{K(T) \operatorname{sen}^2\left(\frac{d\sqrt{c_0}}{2}\right)}} \quad (40)$$

Elevando essa expressão ao quadrado e substituindo c_0 de (36), com um pouco de álgebra obtêm-se uma expressão para d em função de c_0 , obtendo-se uma equação transcendental como função de $\frac{d\sqrt{c_0}}{2}$:

$$\frac{d\sqrt{c_0}}{2} = \frac{\pi}{2} - \frac{e^2 L}{4\varepsilon k T A_M \cot\left(\frac{d\sqrt{c_0}}{2}\right)} \frac{1}{1 + \frac{\left(\frac{2\lambda}{L}\right)^2 \left[\pi - 2\left(\frac{d\sqrt{c_0}}{2}\right)\right]^2}{K(T) \operatorname{sen}^2\left(\frac{d\sqrt{c_0}}{2}\right)}} \quad (41)$$

Para resolver essa equação, desenvolveu-se um programa em linguagem Fortran, apresentado no Apêndice A, que calcula o valor de $\frac{d\sqrt{c_0}}{2}$ a partir de um método numérico.

A equação (41) possui a forma geral:

$$x = Ax \quad (42)$$

na qual A , dado um espaço métrico R , é uma aplicação contratante de R em R e x é chamado ponto fixo por A , solução da equação. Para resolver este tipo de equação pode-se utilizar um método numérico de solução aproximada baseado no princípio das aplicações contratantes: qualquer contração, definida num espaço métrico completo R , admite um e um só ponto fixo [22].

O método consiste no seguinte princípio, seja f uma função definida sobre o intervalo $[a, b]$, possuindo valores neste mesmo intervalo e que satisfaz a seguinte condição:

$$|f(x_2) - f(x_1)| \leq C|x_2 - x_1| \quad C < 1 \quad (43)$$

Desta maneira, f é uma aplicação contratante e a sequência $x_0, x_1 = f(x_0), x_2 = f(x_1) \dots$; converge para uma única solução da equação $x = f(x)$.

No programa, essa operação é repetida dentro de um laço, até que a diferença seja menor que 10^{-9} , suficiente para a convergência da solução. Com o valor obtido para $\frac{d\sqrt{c_0}}{2}$, o programa calcula os valores de d e de c_0 , e assim, o potencial fica definido em todo o espaço. Para calcular o pH , basta calcular o logaritmo da concentração hidrogeniônica e somar 3, lembrando que a concentração de contraíons está expressa em milimolar, e o pH é calculado em molar:

$$pH = -\log[H^+] = -\log c_0 e^{-\phi} + 3 \quad (44)$$

A pressão osmótica é calculada a partir da força que a primeira membrana faz na segunda. Existem duas contribuições para a pressão osmótica entre as membranas, de

maneira que a primeira, que é repulsiva, está relacionada com o transporte de momento devido à presença das partículas na solução, e a segunda, atrativa, é de origem eletrostática, devido às cargas das membranas e dos contraíons [7]. Em termos matemáticos:

$$p = \rho kT - \frac{\sigma^2}{2\epsilon} \quad (45)$$

Substituindo ρ pela equação (2) e utilizando a condição de contorno (7), a expressão para a pressão osmótica pode ser escrita como:

$$p = n_A kT \left[c_0 e^{-\phi_0} - \left(\frac{d\phi}{d\xi} \right)^2 \Big|_{\xi=0} \right] \quad (46)$$

onde ϕ_0 é o valor do potencial na membrana.

3.2. Resultados e discussão

Os dados de entrada do programa, que estabelecem as condições iniciais do sistema são os seguintes:

- Temperatura igual a 37 °C;
- Área por molécula ionizável (A_M) igual a 50Å²;
- pK do grupo ionizável igual a 2.8, que é o valor para o grupo ácido da cardiolipina [24];
- O número máximo de pontos, para o cálculo das interações.
- O valor da distância de separação entre as membranas (L), em ângstrons (Å).

Foram utilizados no programa quatro diferentes valores para a distância de separação L ; sendo elas 50Å, 200Å, 500Å e 1000Å. A Tabela 3 mostra os valores calculados de c_0 e d para cada caso. O grau de ionização é calculado no programa a partir da expressão (16). Os resultados estão mostrados em função da distância de separação na Tabela 4.

Tabela 3

L	C_0	d
50 Å	1,313	2,479
200 Å	0,445	3,662
500 Å	0,187	4,647
1000 Å	0,087	5,388

*Tabela 3: Valores calculados para C_0 e d , em função da distância de separação entre as membranas.***Tabela 4**

Distância de separação L	Grau de ionização α
50 Å	0,54
200 Å	0,76
500 Å	0,85
1000 Å	0,90

Tabela 4: Grau de ionização em função da distância de separação entre as membranas.

Observa-se um aumento no valor do grau de ionização quando as membranas estão mais afastadas. Pode-se explicar esse comportamento com um argumento entrópico, ou seja, como as membranas estão mais afastadas há mais espaço para os contraíons livres e consequentemente um ganho entrópico, logo a possibilidade de interagirem novamente com a membrana é menor. Isso contribui de forma significativa para o potencial nas vizinhanças da membrana, como está mostrado nas Figuras 3.1 e 3.2.

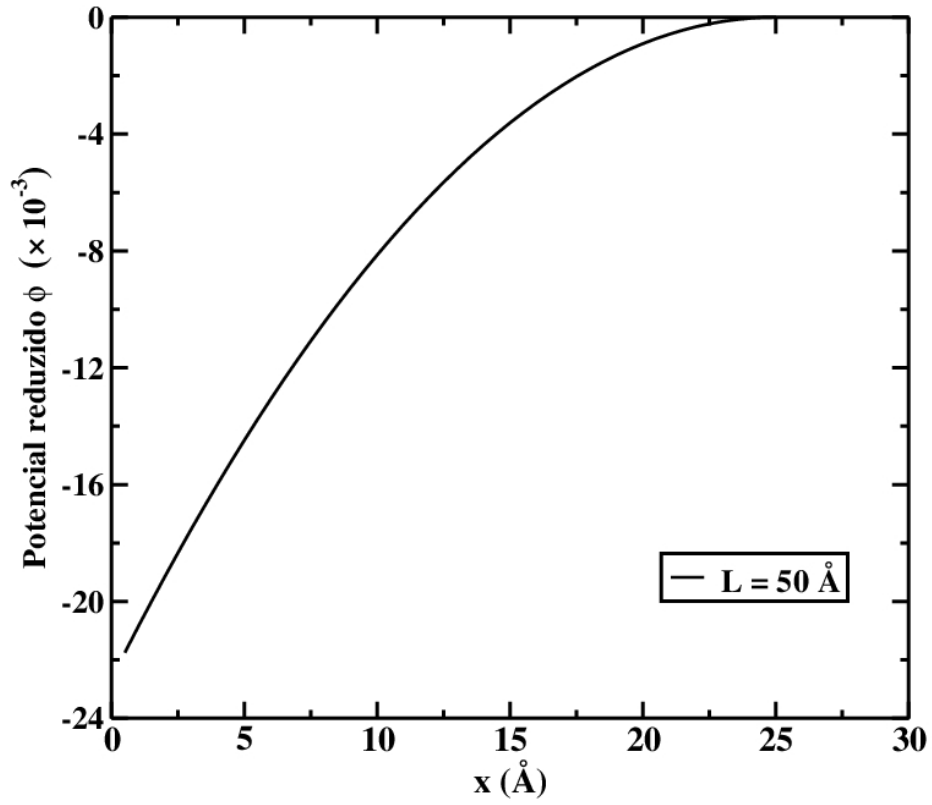


Figura 3.1: Potencial reduzido em função da distância em Angstroms. As membranas constituintes do sistema estão separadas em 50 Å.

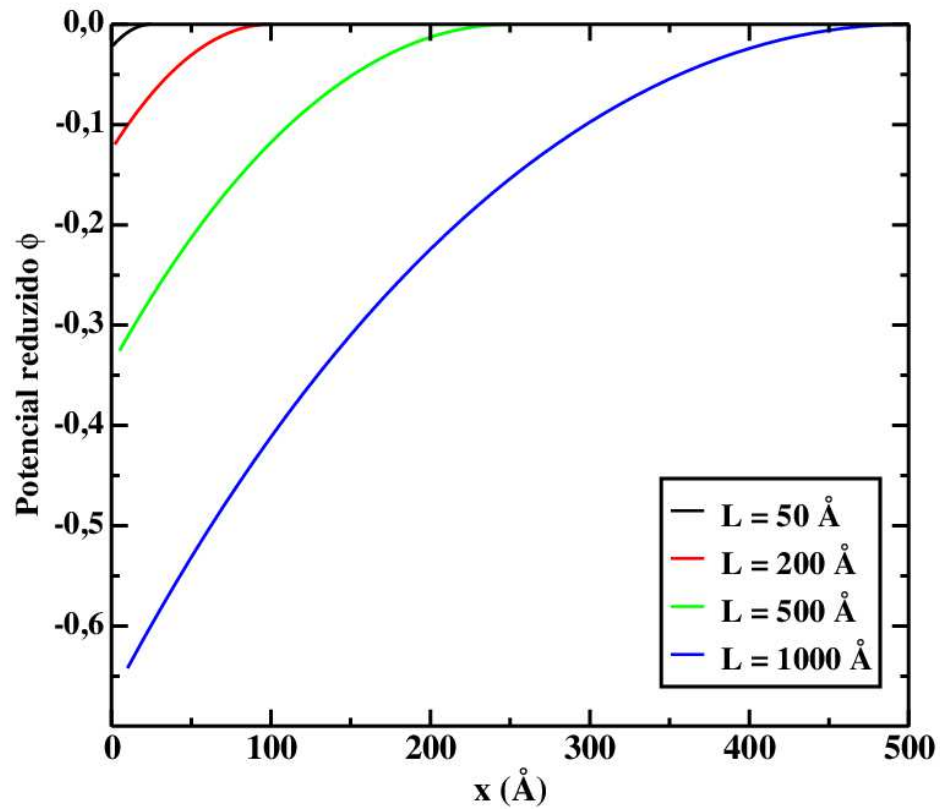


Figura 3.2: Potencial reduzido em função da distância em Angstroms. As distâncias de separação entre as membranas estão mostradas na legenda.

Na Figura 3.1, o valor do potencial tende a zero na região de $25\text{\AA}$, que é exatamente a metade da distância de separação das membranas, devido à condição de contorno considerada. Como as duas membranas são igualmente constituídas, o problema torna-se simétrico em relação ao ponto médio entre elas. Na Figura 3.2, nota-se que os valores de potencial na vizinhança da membrana se tornam maiores em módulo à medida que a distância de separação aumenta.

Como a carga efetiva na membrana depende da ionização, quanto maior a ionização maior será a densidade de carga e, por conseguinte, maior será o campo e o potencial médio nas vizinhanças da membrana.

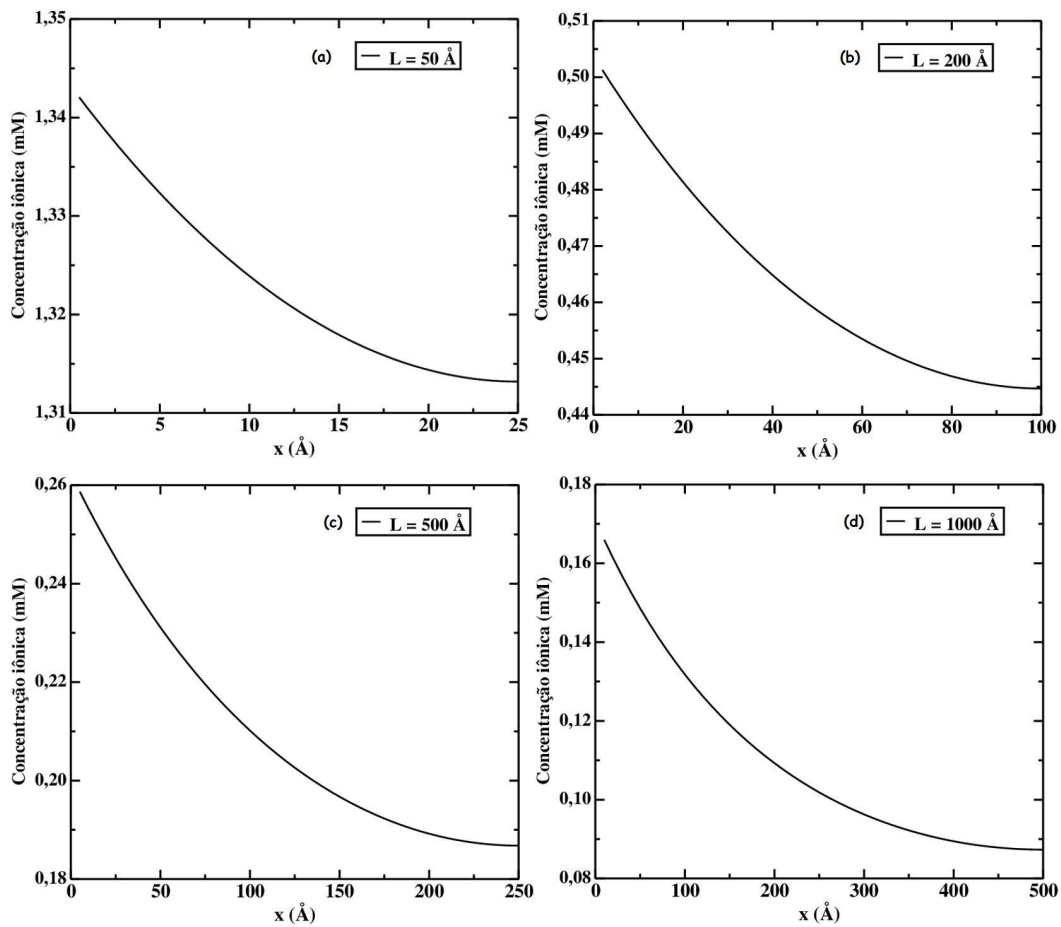


Figura 3.3: Concentração de contraíons livres em mM, como função da distância em Angstroms. As distâncias de separação L estão explicitadas para cada caso.

A concentração dos contraíons livres em função da distância também foi calculada no programa e os resultados estão apresentados nos gráficos da Figura 3.3.

Os contraíons tendem a se distribuir de maneira homogênea com relação ao plano da membrana, para uma dada distância fixa. Devido à interação eletrostática, a

maior parte dos íons se distribui nas proximidades da membrana; conforme a distância aumenta e o potencial médio diminui a densidade de contraíons também vai diminuindo até chegar ao valor da concentração no meio da solução, c_0 , ou seja, na região onde o campo é zero, chamado *bulk* da solução. Os gráficos mostram o mesmo comportamento, porém os valores para a distribuição são menores na medida em que se aumenta a distância de separação. Isto parece contraditório, visto que com o aumento da distância de separação o potencial e a interação dos contraíons com a membrana aumentam. Desta maneira, seria de se esperar que mais contraíons estivessem livres, pois o grau de ionização também é maior. Observa-se que a concentração de contraíons livres na solução tende a diminuir em cada ponto conforme o potencial aumenta, porém se for observada a diferença entre os valores nas imediações da membrana e os valores no ponto médio, notar-se-á que ela é maior quando a distância L é maior. Isso mostra que a quantidade efetiva de contraíons livres na solução é maior (d), como esperado. Este comportamento resultante da distribuição também foi obtido e apresentado em [19].

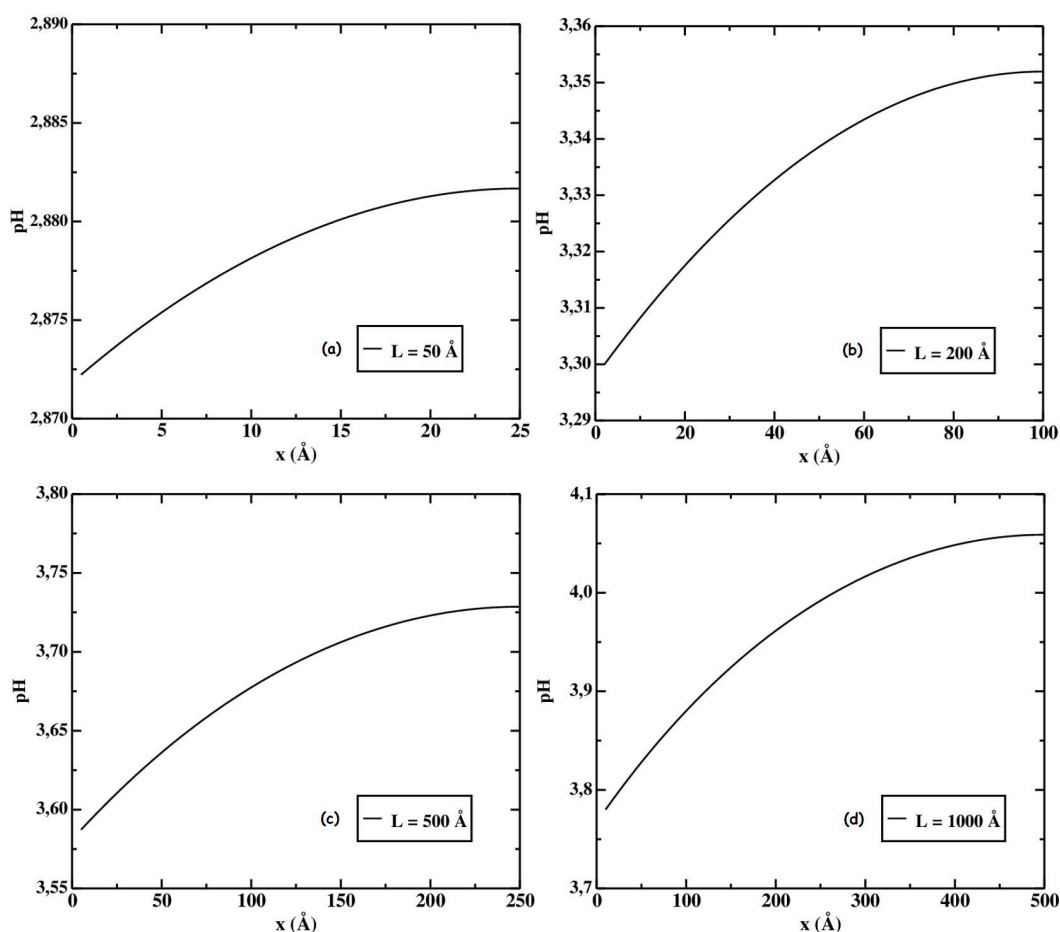


Figura 3.4: pH em função da distância em Angstroms. As distâncias de separação L estão explicitadas para cada caso.

Para analisar o comportamento do pH , o programa utiliza a solução do potencial obtida para calcular a concentração hidrogeniônica em função da distância. Os resultados estão mostrados na Figura 3.4.

Observa-se em (a) que para uma distância de separação de $50\text{\AA}$ entre as membranas o pH varia muito pouco, praticamente na terceira casa decimal, com valores tendendo a uma estabilização na região próxima à meia distância entre as duas membranas. Os gráficos (b) e (c) mostram o mesmo comportamento, porém os valores são maiores e a variação, apesar de ainda pequena, é na segunda casa decimal. Para uma distância de $1000\text{\AA}$, a variação é na primeira casa decimal.

O campo médio tende a estabilizar o pH com a distância até um valor praticamente constante. Este comportamento está ligado à distribuição dos contraíons livres. Conforme o potencial aumenta com a distância de separação, os valores do pH também são mais elevados, visto que os contraíons estão em menor número na região mais afastada da membrana. O mais importante é observar quão próximo da membrana ocorre esta estabilização, ou seja, como se comporta o pH nas vizinhanças e o quanto ele varia nas vizinhanças da membrana. Para este sistema contendo apenas os contraíons, apesar de não haver uma grande variação dos valores numéricos, o pH não está estabilizado nas proximidades da membrana, mas apenas na região próximo ao ponto médio.

Para calcular a pressão osmótica entre as membranas, o programa foi executado variando-se a distância de separação L de $50\text{\AA}$ até $2000\text{\AA}$, em intervalos de 50. A Figura 3.5 mostra um gráfico com o resultado da pressão em função da distância de separação. Para pequenas distâncias de separação a pressão é alta, com valores da ordem de 3000 Pa . Porém com o aumento de L , o comportamento vai tendendo a zero, ou seja, uma membrana não sente mais a presença da outra. Este comportamento é mostrado em [7] e obtido também em [19], mas sem considerar o equilíbrio químico entre a solução e as membranas.

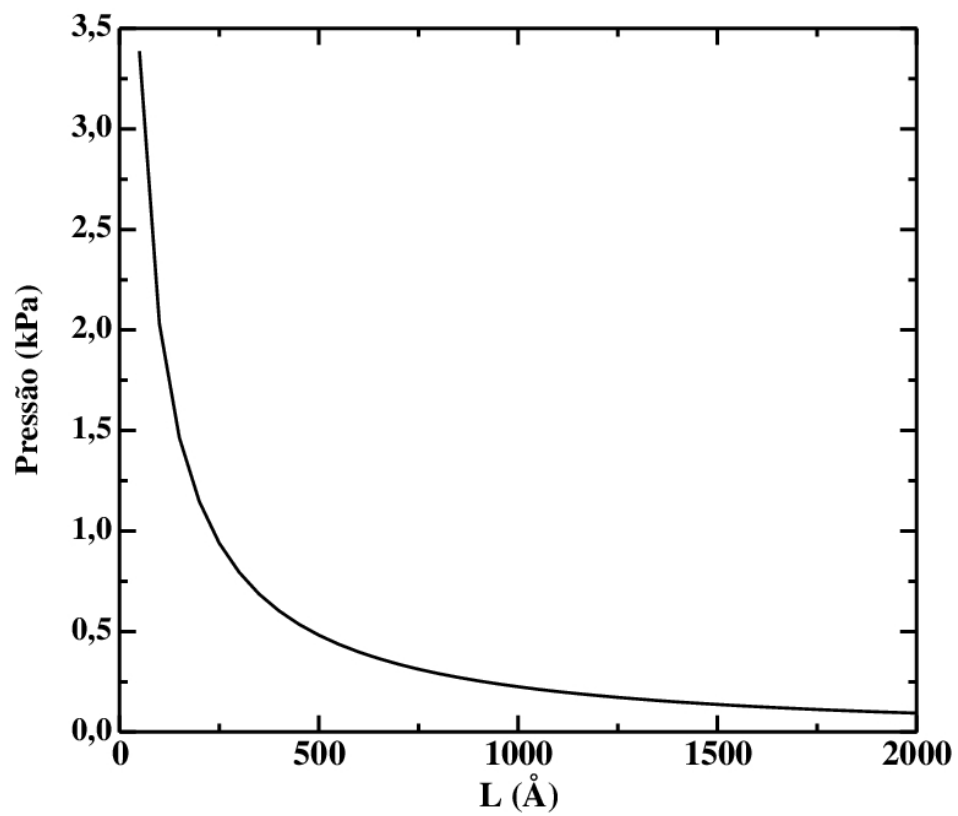


Figura 3.5: Pressão osmótica entre as membranas em kPa, como função da distância de separação L em Angstroms.

Capítulo 4

Sistema com contraíons e eletrólito adicionado.

Neste capítulo, é apresentada a análise matemática de um sistema de duas membranas ionizáveis em equilíbrio com uma solução que contém os contraíons monovalentes devidos à ionização e uma concentração de íons adicional. Para aplicar o modelo a este problema, dois sistemas são considerados: um com o eletrólito adicional composto por apenas íons monovalentes positivos e negativos, discutido na seção 4.2, e o outro composto também por íons bivalentes positivos, na seção 4.3, com o objetivo de se observar o efeito da presença de cátions bivalentes na solução.

Os resultados obtidos e analisados são o potencial eletrostático médio em todo o espaço e o pH em função da distância. São variáveis a concentração de eletrólito adicionado e a área disponível por molécula ionizada, para que haja diferentes densidades de carga na membrana. A distância de separação entre as membranas foi mantida constante e igual a 200Å.

Uma consideração feita neste trabalho para este sistema é que na região do *bulk* a solução seja neutra, em outras palavras, as concentrações de sal são adicionadas de tal forma que exista uma condição de neutralidade na solução. Essa consideração é feita com o objetivo de comparar o modelo teórico com o meio intracelular, que como um todo é neutro.

4.1. Análise do sistema com contraíons e eletrólito adicionado.

Para a análise deste sistema, utilizou-se um método de integração numérico para se obter uma solução da equação de Poisson-Boltzmann para o potencial eletrostático. Portanto, a partir da expressão geral para geometria plana:

$$\frac{d^2\phi}{d\xi^2} = -\frac{1}{2} \sum_i z_i c_{oi} e^{-z_i\phi} \quad (47)$$

As condições de contorno são as mesmas que para o caso só com contraíons, para o campo elétrico médio e o potencial médio:

$$\frac{d\phi}{d\xi} = -\frac{e\lambda\sigma}{\varepsilon kT} \quad \text{em} \quad \xi = 0 \quad (48)$$

$$\frac{d\phi}{d\xi} = 0 \quad \text{e} \quad \phi = 0 \quad \text{para} \quad \xi = \frac{L}{2\lambda} \quad (49)$$

Primeiramente, realiza-se uma integração sob o intervalo de zero a ξ , de ambos os lados da equação, obtendo-se assim

$$\left. \frac{d\phi}{d\xi} - \frac{d\phi}{d\xi} \right|_{\xi=0} = -\frac{1}{2} \int_0^\xi \left[\sum_i z_i c_{0i} e^{-z_i \phi} \right] d\xi' \quad (50)$$

e substituindo o valor do campo em $\xi = 0$, dado pela condição de contorno, o resultado é o campo eletrostático médio, que se escreve como:

$$\frac{d\phi}{d\xi} = -\frac{e\lambda\sigma}{\varepsilon kT} - \frac{1}{2} \int_0^\xi \left[\sum_i z_i c_{0i} e^{-z_i \phi} \right] d\xi' \quad (51)$$

Para se obter o potencial propriamente dito, é necessário integrar todos os termos novamente sob o intervalo de zero a ξ .

$$\phi(\xi) - \phi(0) = -\frac{e\lambda\sigma}{\varepsilon kT} \xi - \frac{1}{2} \int_0^\xi d\xi' \int_0^{\xi'} \left[\sum_i z_i c_{0i} e^{-z_i \phi} \right] d\xi'' \quad (52)$$

Como passo intermediário e para deixar todas as integrais em função de $d\xi'$, o que facilita a integração numérica, pode-se integrar por partes o segundo membro do lado direito da equação:

$$\int_0^\xi d\xi' \int_0^{\xi'} \left[\sum_i z_i c_{0i} e^{-z_i \phi} \right] d\xi'' = \xi \int_0^\xi \left[\sum_i z_i c_{0i} e^{-z_i \phi} \right] d\xi' - \int_0^\xi \xi' \left[\sum_i z_i c_{0i} e^{-z_i \phi} \right] d\xi'$$

a substituição desta expressão na equação (52) resulta em:

$$\phi(\xi) - \phi(0) = -\frac{e\lambda\sigma}{\varepsilon kT} \xi - \frac{1}{2} \xi \int_0^\xi \left[\sum_i z_i c_{0i} e^{-z_i \phi} \right] d\xi' + \frac{1}{2} \int_0^\xi \xi' \left[\sum_i z_i c_{0i} e^{-z_i \phi} \right] d\xi' \quad (53)$$

Admitindo que $\xi = \frac{L}{2\lambda}$ o potencial se anula, pode-se calcular o valor de $\phi(0)$

substituindo ϕ e ξ na equação (53).

$$-\phi(0) = -\frac{e\lambda\sigma}{\varepsilon kT} \frac{L}{2\lambda} - \frac{1}{2} \frac{L}{2\lambda} \int_0^{L/2\lambda} \sum_i (z_i c_{0i} e^{-z_i \phi}) d\xi + \frac{1}{2} \int_0^{L/2\lambda} \xi' \sum_i (z_i c_{0i} e^{-z_i \phi}) d\xi' \quad (54)$$

Substituindo essa expressão na equação (53) e rearranjando os termos e os intervalos de integração, obtém-se a solução para o potencial médio:

$$\begin{aligned} \phi(\xi) = & \frac{e\lambda\sigma}{\varepsilon kT} \left[\left(\frac{L}{2\lambda} \right) - \xi \right] \\ & + \frac{1}{2} \left(\frac{L}{2\lambda} \right) \int_0^{L/2\lambda} \left[\sum_i z_i c_{0i} e^{-z_i \phi} \right] d\xi' - \frac{1}{2} \xi \int_0^\xi \left[\sum_i z_i c_{0i} e^{-z_i \phi} \right] d\xi' \\ & - \frac{1}{2} \int_\xi^{L/2\lambda} \xi' \left[\sum_i z_i c_{0i} e^{-z_i \phi} \right] d\xi' \end{aligned} \quad (55)$$

A partir desta expressão para o potencial, pode-se calcular também o grau de ionização, a distribuição de íons livres na solução e o comportamento do pH nas vizinhanças das membranas. O cálculo é feito em um programa por meio de uma interpolação, com um critério de convergência definido. Assim, a cada passo, o potencial calculado é comparado com o anterior, até que o valor satisfaça o critério de convergência.

As integrais na equação (55) são calculadas no programa utilizando a Regra de Simpson. Essa fórmula utiliza uma aproximação do tipo [23]:

$$\int_{x_0}^{x_0+n\Delta x} y(x) dx \approx \sum_0^n a_i y_i$$

Para o caso específico da Regra de Simpson, $n = 2$ e os coeficientes $a_i y_i$ são dados por:

$$\frac{\Delta x}{3}(y_0 + 4y_1 + y_2) \quad (56)$$

O programa desenvolvido em linguagem para calcular o potencial em função da distância e assim calcular o pH em todo o espaço é apresentado no Apêndice B. Os dados de entrada do programa que são comuns aos sistemas analisados neste capítulo são:

- Temperatura igual a 37 °C;
- Área por molécula ionizável (A_M)
- O pK do grupo ionizável igual a 2.8;
- O pH do *bulk* da solução, igual a 7,0;
- O número máximo de pontos, para o cálculo das interações.
- O valor da distância de separação entre as membranas (L) igual a 200Å.
- A concentração máxima de eletrólito, para cada espécie iônica, de modo que a solução como um todo seja neutra.

4.2. Eletrólito adicional uni-univalente.

Nesta seção são apresentados os resultados obtidos na aplicação do modelo teórico para o sistema no qual o eletrólito adicional é uni-univalente (1:1) composto por íons monovalentes positivos e negativos. Três concentrações foram analisadas: 50mM, 100mM e 150mM.

A densidade de cargas na membrana é função da ionização e da área ocupada pelo grupo ionizável. Assim, quanto maior for a área, menor a carga efetiva na membrana. Para verificar essa influência, os cálculos foram realizados para três valores de A_M : 50Å², 500Å² e 1000Å². Fixando um valor de A_M , o programa é executado variando as concentrações de eletrólito. Os parâmetros analisados foram o potencial eletrostático médio e o pH em função da distância.

O grau de ionização para estes sistemas foi calculado a partir da expressão (17) e está na faixa de 0,95 a 0,99. De maneira geral, para o problema de dupla camada, a ionização depende da distância de separação, da concentração de eletrólito e do potencial médio. Como neste caso o valor de L é fixo, os fatores que influenciam o grau de ionização são o potencial e o eletrólito. Os valores obtidos para este sistema se devem ao fato de o eletrólito facilitar muito a ionização, porque atenua a interação do contraíon com o grupo ionizável na membrana.

Desta maneira, considerando um valor médio para o grau de ionização de 0,97 os valores das densidades de carga na membrana são dados pela equação (18) e são iguais a 0,31; 0,031 e 0,015 C/m^2 ; respectivamente para $50\text{\AA}^2$, $500\text{\AA}^2$ e $1000\text{\AA}^2$.

Para a análise do potencial, o comportamento resultante está mostrado nos gráficos das Figuras 4.1, 4.2 e 4.3; respectivamente com valores de A_M iguais a $50\text{\AA}^2$, $500\text{\AA}^2$ e $1000\text{\AA}^2$. Os valores representados nos gráficos são para a primeira membrana, lembrando que o sistema é simétrico e o comportamento da segunda membrana deve ser idêntico.

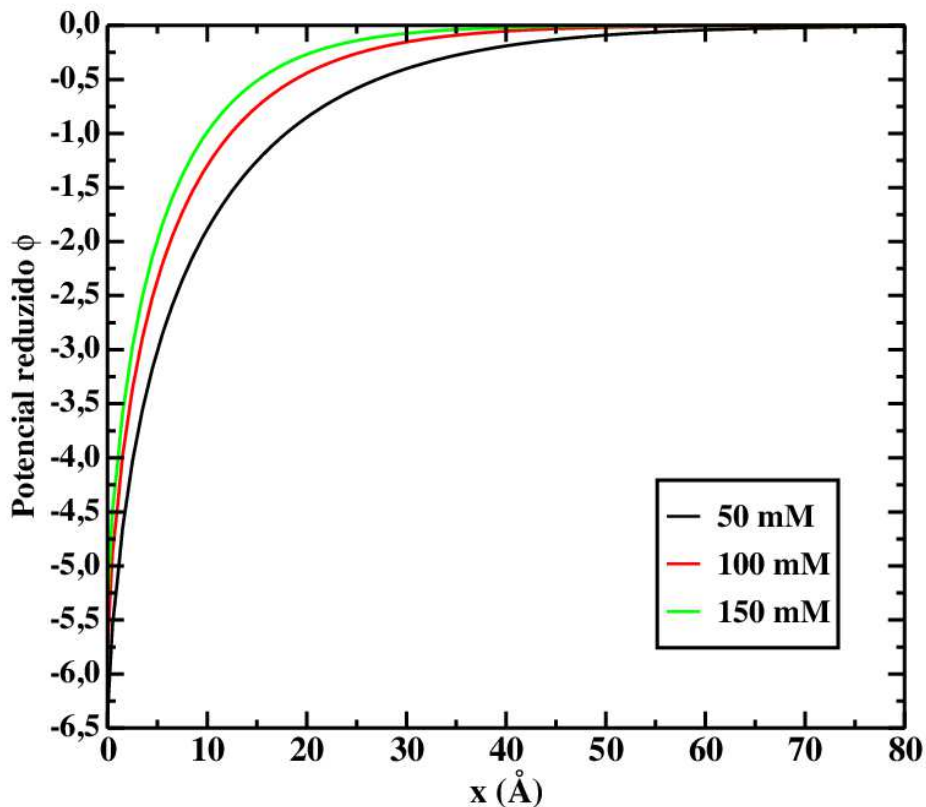


Figura 4.1: Potencial reduzido em função da distância em Angstroms. As concentrações de eletrólito estão mostradas na legenda. O valor da área dos grupos ionizados é $A_M = 50\text{\AA}^2$.

Comparando-se os valores de potencial para as diferentes concentrações de eletrólito, fixado um valor de A_M , o comportamento resultante mostra que com o aumento da concentração de eletrólito há uma diminuição do valor efetivo do potencial médio. Esse fenômeno é conhecido como blindagem eletrostática e é responsável por diminuir o alcance das interações intermoleculares. A presença do eletrólito faz com que o valor do potencial caia mais rapidamente para zero, estabilizando eletricamente a solução. Além disso, os valores nas proximidades da membrana também diminuem em módulo com o aumento da concentração.

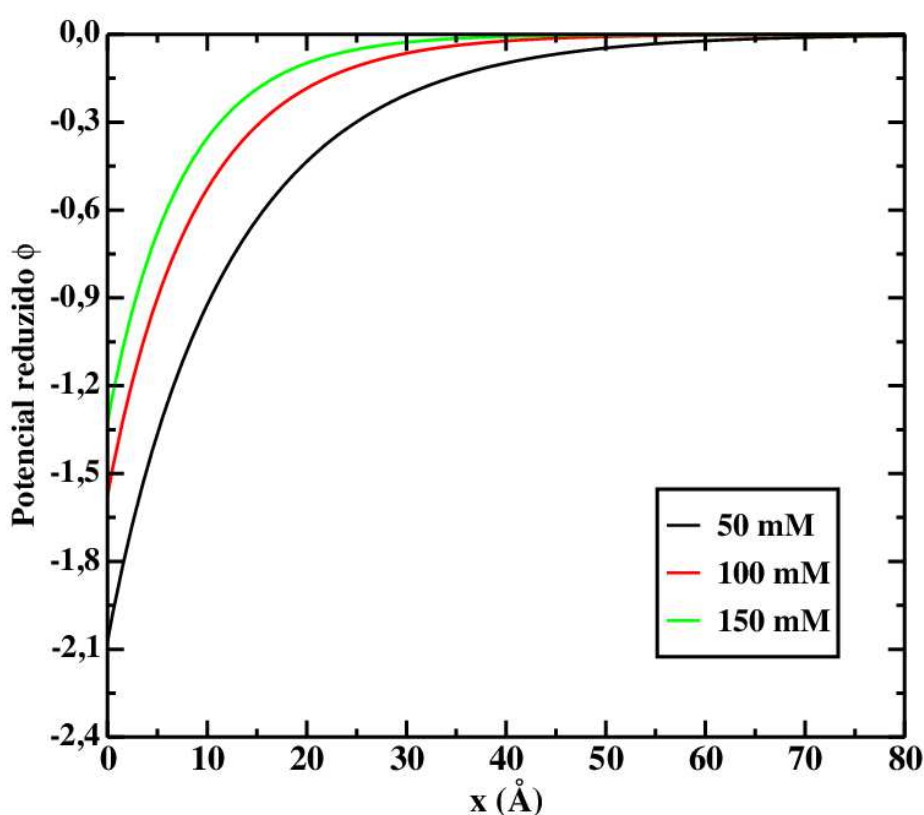


Figura 4.2: Potencial reduzido em função da distância em Angstroms. As concentrações de eletrólito estão mostradas na legenda. O valor da área dos grupos ionizados é $A_M = 500\text{\AA}^2$.

Fixando um valor da concentração e comparando nos três gráficos os valores de potencial, pode-se notar que com o aumento da área dos grupos ionizáveis o potencial diminui de forma sensível. Isso ocorre exatamente devido ao fato de que a densidade de carga na membrana é inversamente proporcional à área. Com o aumento de A_M a carga efetiva na membrana diminui, portanto o potencial também é menor. Para $1000\text{\AA}^2$, a

uma distância de $10\text{\AA}$ e com 50mM , por exemplo, o potencial cai pela metade do valor na superfície; enquanto que para $50\text{\AA}^2$ o valor cai três vezes.

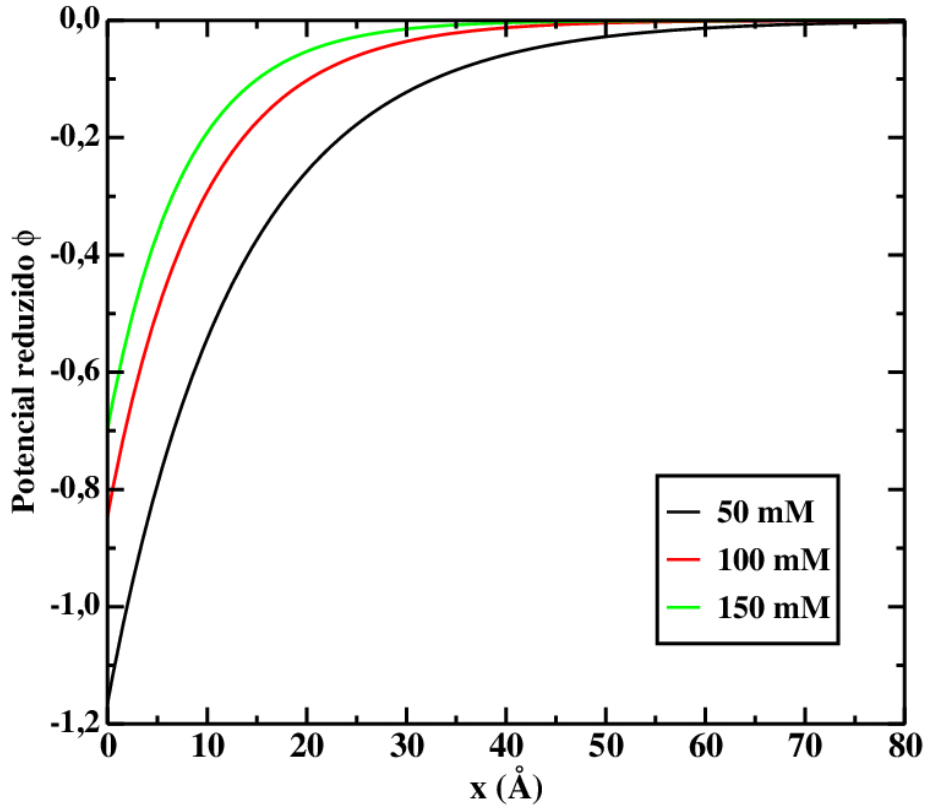


Figura 4.3: Potencial reduzido em função da distância em Angstroms. As concentrações de eletrólito estão mostradas na legenda. O valor da área dos grupos ionizados é $A_M = 1000\text{\AA}^2$.

Ao serem comparados os valores do potencial médio obtidos neste problema com aqueles para o sistema composto apenas por contraíons, nota-se que o potencial tende a zero bem antes do ponto médio entre as membranas, para todas as densidades de carga. Esse comportamento é devido à presença dos íons livres na solução, que blindam a interação eletrostática. Com o aumento da concentração de íons livres, diminui o alcance significativo da interação entre os componentes da solução e consequentemente o valor do potencial tende mais rapidamente a zero. Para $50\text{\AA}^2$ de A_M , por exemplo, o potencial nas vizinhanças da membrana é da ordem de sessenta vezes maior do que no caso só com contraíons.

Estes resultados podem ser comparados com outros resultados teóricos da literatura, como apresentados em Israelachvili [7], para sistemas com íons negativos e positivos monovalentes. Tais resultados possuem a mesma ordem de grandeza dos

apresentados aqui. Outro resultado teórico pode ser encontrado em Aguilera et al. [25], no qual se calcula o potencial na membrana em função da área disponível por molécula, para um sistema de monocamada. Para $47\text{\AA}^2$ e 100mM de sal, o potencial na superfície é da ordem de 150mV. Neste trabalho, o resultado obtido para $50\text{\AA}^2$ e 100mM de sal se aproxima de 152mV na superfície.

Para efeito de comparação com resultados experimentais, um trabalho interessante pode ser encontrado em [26], no qual se mediu a mobilidade eletroforética de vesículas feitas de fosfatidilcolina (PC) e fosfoinositol (PI) para assim estimar o potencial na superfície. Os resultados para o potencial na superfície com 100 mM de sal, $65\text{\AA}^2$ de área dos grupos, para 100% de PI mostram valores da ordem de 100 mV. Nestas condições, o modelo aqui apresentado calcula valores de 120 mV na superfície. Uma diferença entre este sistema analisado experimentalmente e o proposto neste trabalho é a composição dos lipídeos, que em [26] estão na forma de sal e aqui são considerados na forma ácida.

Tsui e Hubble [27] mediram o potencial na superfície de vesículas formadas por fosfatidilserina (PS) e fosfatidilcolina (PC). As condições utilizadas foram vesículas de 14% de PS em uma solução com *pH* 4,1 no *bulk*; concentração de NaCl variando de 10-100mM e *pK* dos grupos ionizáveis igual a 3,6. O potencial na superfície das vesículas foi medido através de experimentos de EPR (espectroscopia de ressonância paramagnética). O modelo teórico foi aplicado para estas mesmas condições e os resultados estão apresentados, em comparação com os resultados experimentais de [27], na Figura 4.4.

A curva (a) na Figura 4.4 mostra os valores do potencial na superfície calculados a partir do modelo aqui apresentado. A curva (b) mostra o resultado do modelo considerando o *pK* dependente da força iônica e a curva (c) mostra as medidas experimentais do potencial na superfície das vesículas em [27]. A correção para o *pK* aparente é dada pela equação (57), na qual *F* é a constante de Faraday, ψ é o potencial na membrana; *R* é a constante dos gases e *T* a temperatura.

$$pK = pK_A + \frac{F\psi}{2,303.RT} \quad (57)$$

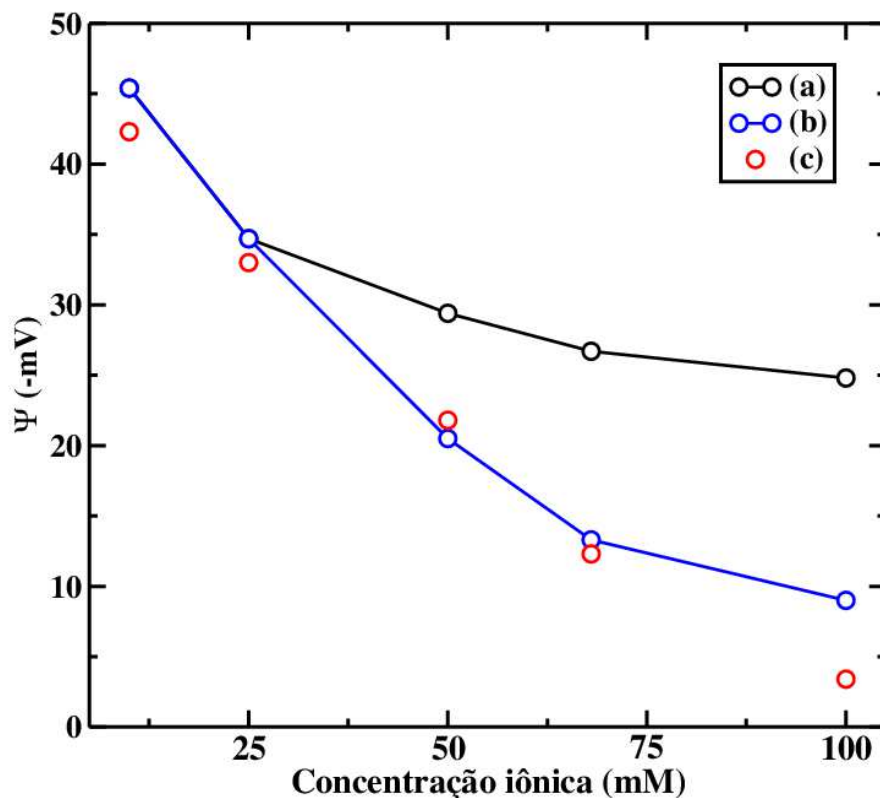


Figura 4.4: Potencial na superfície em função da concentração de NaCl. (a) Resultado teórico com o modelo apresentado neste trabalho. (b) Correção no modelo para levar em conta o pK dependente do eletrólito. (c) Medidas experimentais de [27].

Na Figura 4.4, nota-se uma diferença entre os valores calculados pelo modelo teórico e as medidas experimentais. Isso ocorre porque a aproximação aqui utilizada não considera o pK dependente da força iônica. Ao fazer esta correção no modelo, os valores calculados se aproximam mais dos valores experimentais.

Experimentalmente é difícil medir o potencial na membrana. É possível inferir o seu valor a partir do potencial zeta; que é calculado através de experimentos de mobilidade eletroforética [28]. O potencial zeta é o valor do potencial numa região da solução chamada de plano de cisalhamento; é função da carga na superfície e das condições da solução. Em média, a distância do plano de cisalhamento varia de 2-5Å da superfície [26,29], mas pode variar dependendo das condições do meio. A Tabela 5 mostra os valores do potencial médio calculados a 2Å da membrana, para associar esse valor ao potencial zeta.

Tabela 5

Conc. \ A_M	50Å²	500Å²	1000Å²
50mM	114 mV	45 mV	26 mV
100mM	96 mV	32 mV	18 mV
150mM	85 mV	26 mV	14 mV

Tabela 5: Valores em módulo do potencial médio a 2Å da primeira membrana, para cada valor de A_M e da concentração de sal.

O *pH* é calculado a partir da equação (44), em função da concentração dos contraíons provenientes da ionização. Os resultados obtidos no cálculo do *pH* estão mostrados nas Figuras 4.5, 4.6 e 4.7.

Nota-se o mesmo tipo de comportamento das curvas de *pH* para o sistema só com contraíons, porém a distâncias menores da superfície os valores de *pH* estabilizam-se em torno do valor do *pH* do *bulk* 7,0. Para 50Å² por exemplo, lembrando que as membranas estão separadas de 200Å, a partir de 60Å os valores praticamente não mudam, ao passo que para o sistema do capítulo 3 este fato só ocorre bem próximo ao ponto médio 100Å. Isso ocorre novamente devido à blindagem eletrostática causada pela presença do eletrólito adicionado, que estabiliza eletricamente a solução. Esse argumento pode ser verificado fixando um valor para a área dos grupos e observando o comportamento do *pH* em função da concentração. Para 150mM a curva tende mais rápido para o valor do *bulk* do que para 100mM e 50mM. Os valores do *pH* nas vizinhanças da membrana são maiores conforme se aumenta a concentração de eletrólito, o que pode ser explicado pelo fato de que o potencial é mais atenuado e isso faz com que existam menos contraíons livres e portanto maior valor de *pH*.

Ao fixar um valor de concentração e variar a área dos grupos, pode-se observar que o valor do *pH* aumenta com a diminuição da densidade de cargas. Isso é natural, pois, diminuir a carga efetiva na membrana significa haver menos grupos ionizados e, por conseguinte, menos contraíons livres na solução. Assim, o valor do *pH* aumenta nas vizinhanças da membrana conforme a densidade de cargas diminui. Ao afastar-se da membrana o *pH* é modulado pelo potencial médio e tende para o valor do *bulk*.

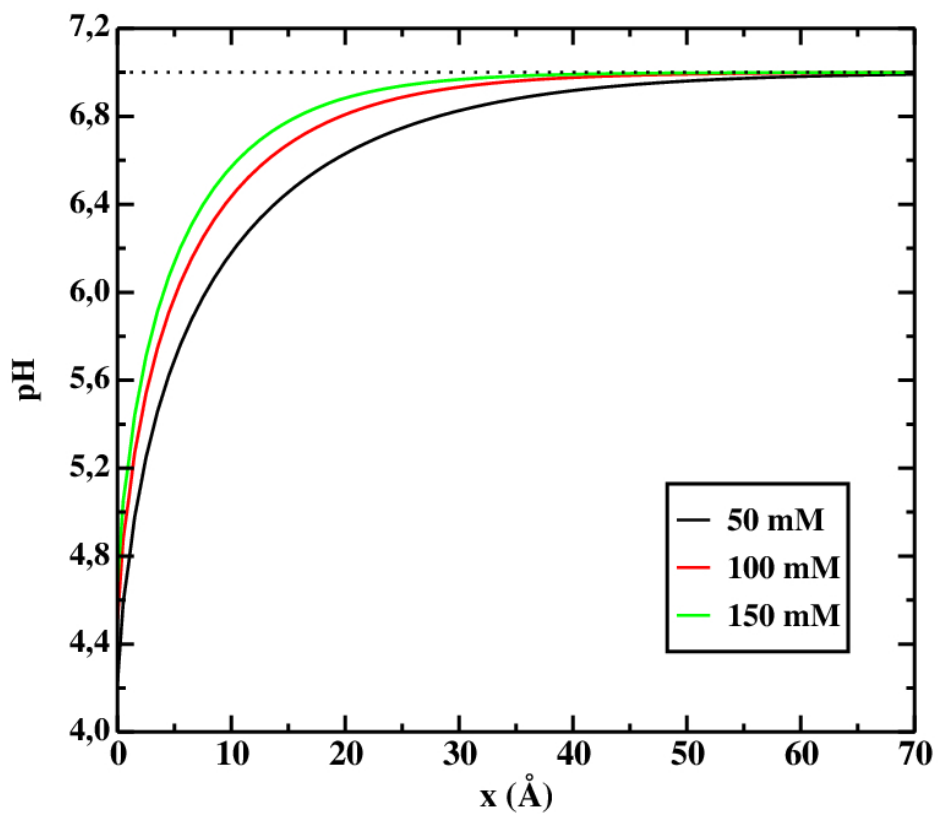


Figura 4.5: pH em função da distância em Angstroms. As concentrações de eletrólito estão mostradas na legenda. O valor da área dos grupos ionizados é $A_M = 50\text{\AA}^2$.

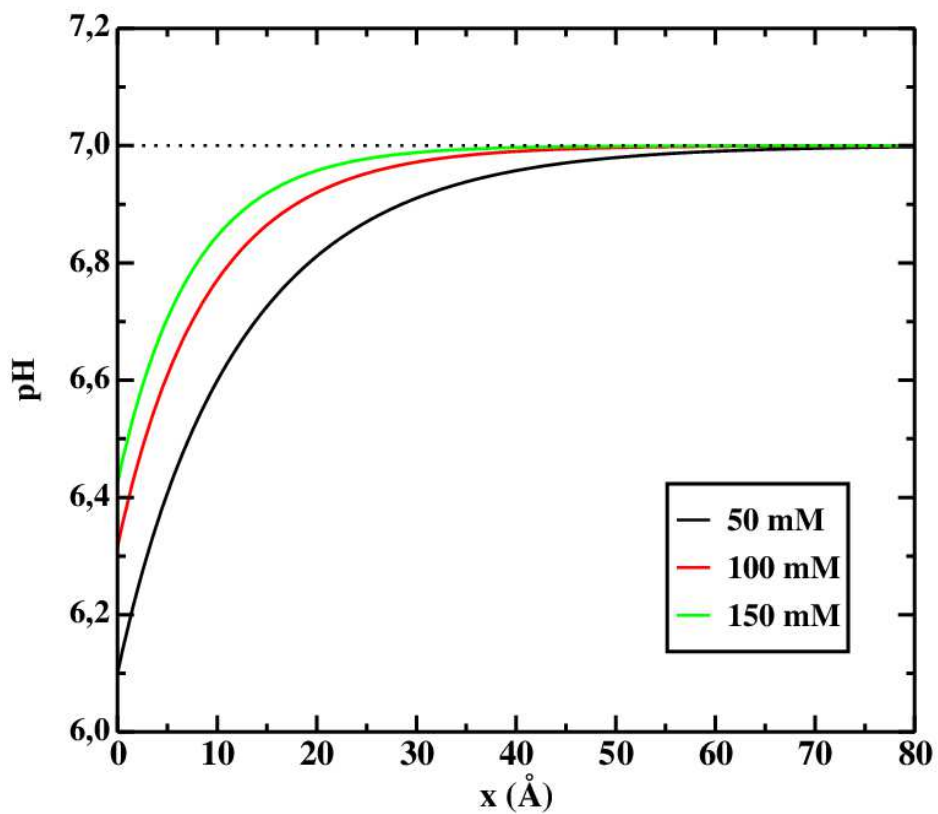


Figura 4.6: pH em função da distância em Angstroms. As concentrações de eletrólito estão mostradas na legenda. O valor da área dos grupos ionizados é $A_M = 500\text{\AA}^2$.

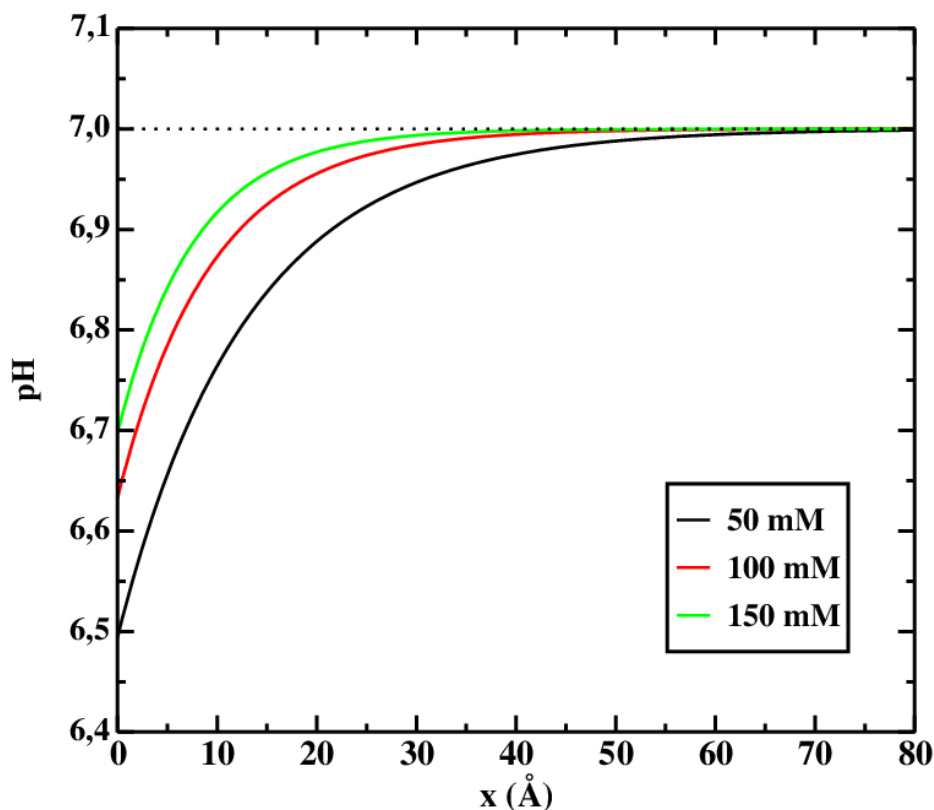


Figura 4.7: pH em função da distância em Angstroms. As concentrações de eletrólito estão mostradas na legenda. O valor da área dos grupos ionizados é $A_M = 1000\text{\AA}^2$.

4.3. Eletrólito adicional de bi-univalentes.

Na presente seção, foi investigado um sistema com dois eletrólitos, um deles bi-univalente (2:1) e o outro uni-univalente (1:1), com o propósito de estudar o efeito de uma quantidade constante de íons bivalentes em comparação com a concentração variável de monovalentes. O objetivo é observar o efeito produzido pela presença de cátions bivalentes no potencial e no pH em função da distância, lembrando que no meio celular há pequenas concentrações de íons bivalentes como cálcio e magnésio.

A concentração iônica foi escolhida como 50mM, 100mM e 150mM para os íons monovalentes positivos e um valor constante de 5mM de íons bivalentes positivos. Para os monovalentes negativos, a concentração é dada de tal forma que a solução permaneça neutra, por exemplo, para 50mM de positivos e 5mM de bivalentes, 60mM de monovalentes negativos são necessários. O mesmo é feito com as outras duas situações. A área dos grupos é variada com os mesmos três valores da seção anterior, $50\text{\AA}^2$, $500\text{\AA}^2$ e $1000\text{\AA}^2$.

O valor do grau de ionização para este sistema é praticamente independente da concentração, se mantendo em 0,99; variando na terceira e quarta casa decimal. Isso ocorre devido à presença de cátions bivalentes, que blindam muito a interação entre os grupos e os contraíons, contribuindo para a ionização.

Os resultados obtidos estão apresentados em gráficos nas Figuras 4.8, 4.9 e 4.10 para o potencial e 4.11, 4.12 e 4.13 para o pH em função da distância. As linhas cheias representam o sistema com eletrólito contendo 5mM de cátions bivalentes e as linhas tracejadas são os mesmos gráficos respectivos do sistema com eletrólito de apenas monovalentes. Dessa maneira, pode-se comparar os resultados de forma simples.

O potencial médio apresenta o mesmo comportamento que o sistema anterior, tendendo a zero na região do ponto médio entre as membranas, porém a curva é mais acentuada e sobe mais rapidamente para zero do que para o sistema só com monovalentes. Tal fato se deve à presença dos íons bivalentes, que blindam o potencial de maneira eficiente, fazendo com que os valores convirjam mais rapidamente do que no caso só com monovalentes. Na Figura 4.8 essa diferença é nítida, pois como a densidade de cargas é maior que nos outros casos, os efeitos eletrostáticos, como a blindagem, são mais acentuados.

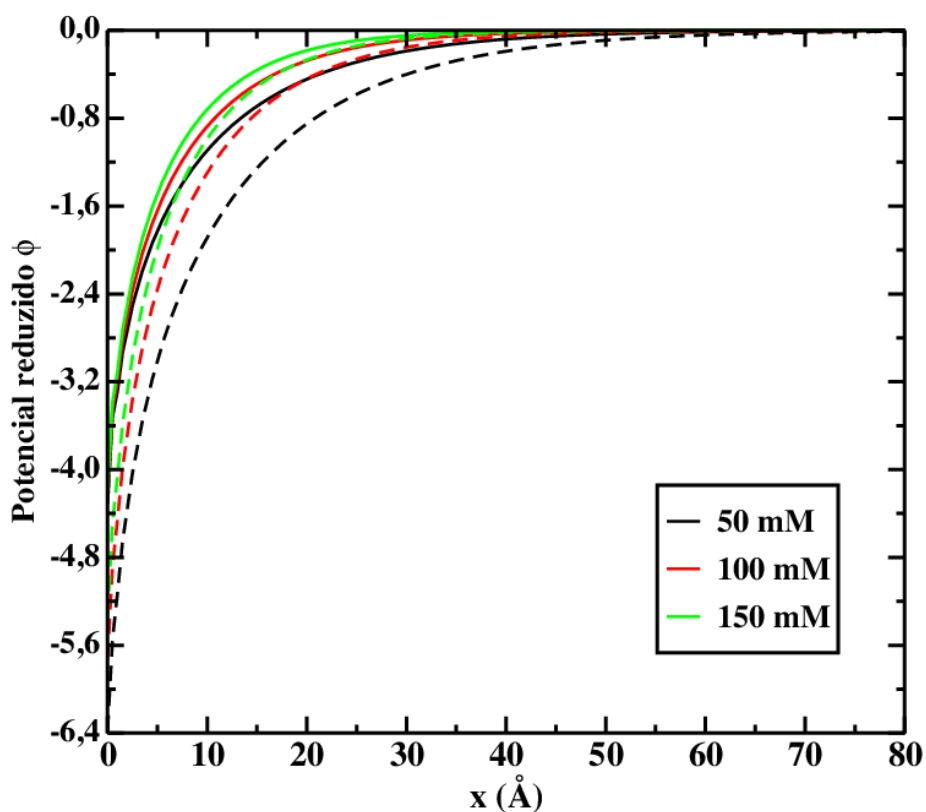


Figura 4.8: Potencial reduzido em função da distância em Angstroms. As linhas pontilhadas representam o comportamento sem os bivalentes. O valor da área dos grupos ionizados é $A_M = 50\text{\AA}^2$.

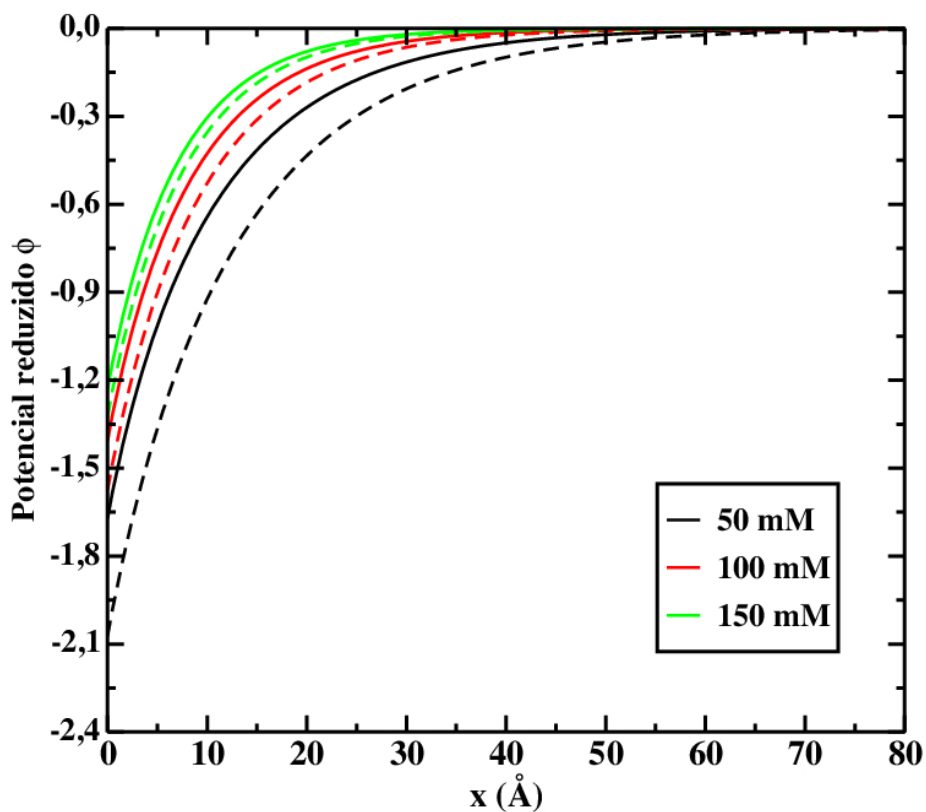


Figura 4.9: Potencial reduzido em função da distância em Angstroms. As linhas pontilhadas representam o comportamento sem os bivalentes. O valor da área dos grupos ionizados é $A_M = 500\text{\AA}^2$.

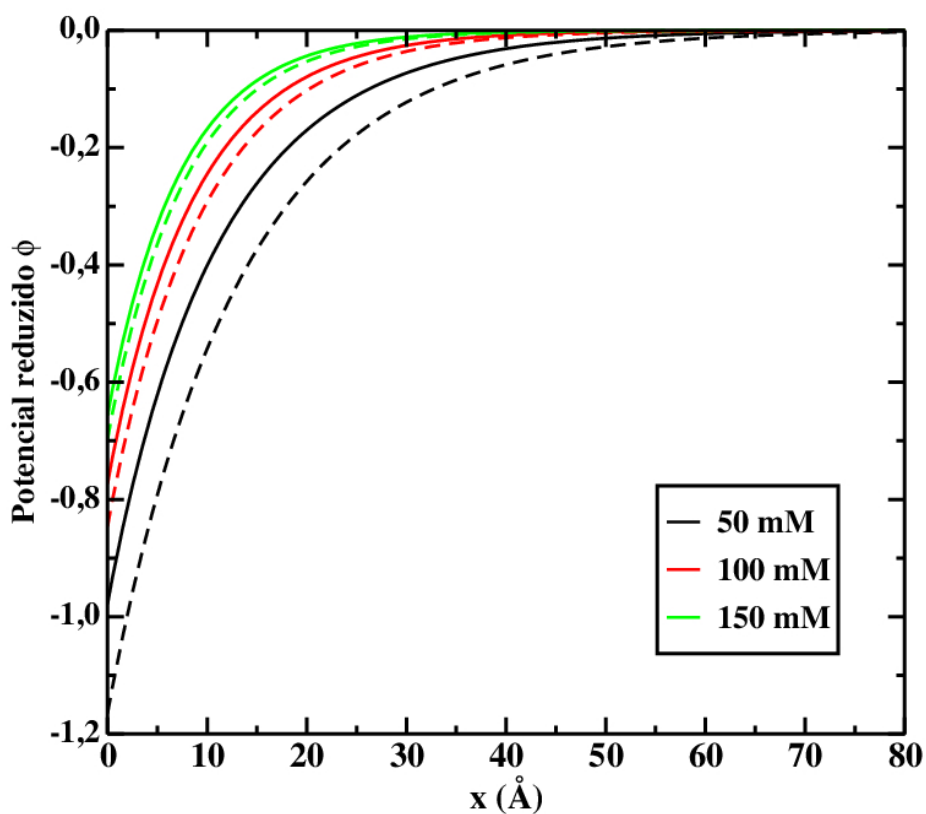


Figura 4.10: Potencial reduzido em função da distância em Angstroms. As linhas pontilhadas representam o comportamento sem os bivalentes. O valor da área dos grupos ionizados é $A_M = 1000\text{\AA}^2$.

Os valores do potencial na membrana também são menores em módulo, conforme se aumenta a concentração de eletrólito. Na Figura 4.10, por exemplo, pode-se notar que o potencial na membrana é menor do que com apenas monovalentes, e conforme a concentração aumenta esse efeito vai diminuindo, devido ao efeito da blindagem eletrostática ser cada vez maior. Na tabela 6 estão mostrados os valores do potencial a $2\text{\AA}$ da membrana, inferindo o valor aproximado do potencial zeta.

Tabela 6

Conc. \ A_M	$50\text{\AA}^2$	$500\text{\AA}^2$	$1000\text{\AA}^2$
50mM	72 mV	34 mV	21 mV
100mM	69 mV	29 mV	16 mV
150mM	64 mV	24 mV	13 mV

Tabela 6: Valores em módulo do potencial médio a $2\text{\AA}$ da membrana, para cada valor de A_M e da concentração de sal.

Comparando-se as Tabelas 5 e 6, pode-se notar que para uma maior densidade de cargas ($50\text{\AA}^2$) o potencial zeta é mais afetado pela presença dos bivalentes, havendo uma diferença maior comparando-se os valores para uma concentração fixa de eletrólito. Para $1000\text{\AA}^2$, essa diferença é menor, mostrando a dependência do potencial nas vizinhanças da membrana com a carga na superfície.

Para o pH da solução, os resultados obtidos para este tipo de sistema mostra que existe uma estabilidade maior na presença de bivalentes, do que só com monovalentes. Independente da densidade de carga na membrana, os valores tendem ao valor do *bulk* aproximadamente entre $40\text{-}50\text{\AA}$ da membrana, principalmente para baixas concentrações de monovalentes, o que é mais nítido para $A_M = 50\text{\AA}^2$, como mostra a Figura 4.11.

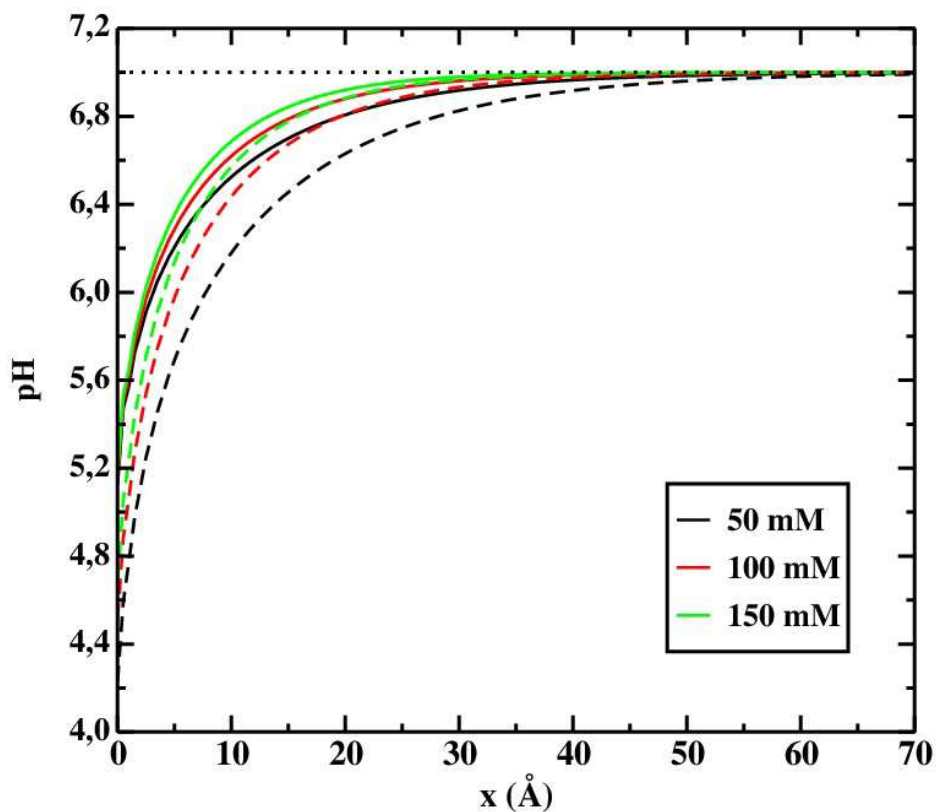


Figura 4.11: pH em função da distância em Angstroms. As linhas pontilhadas representam o comportamento sem os bivalentes. O valor da área dos grupos ionizados é $A_M = 50\text{\AA}^2$.

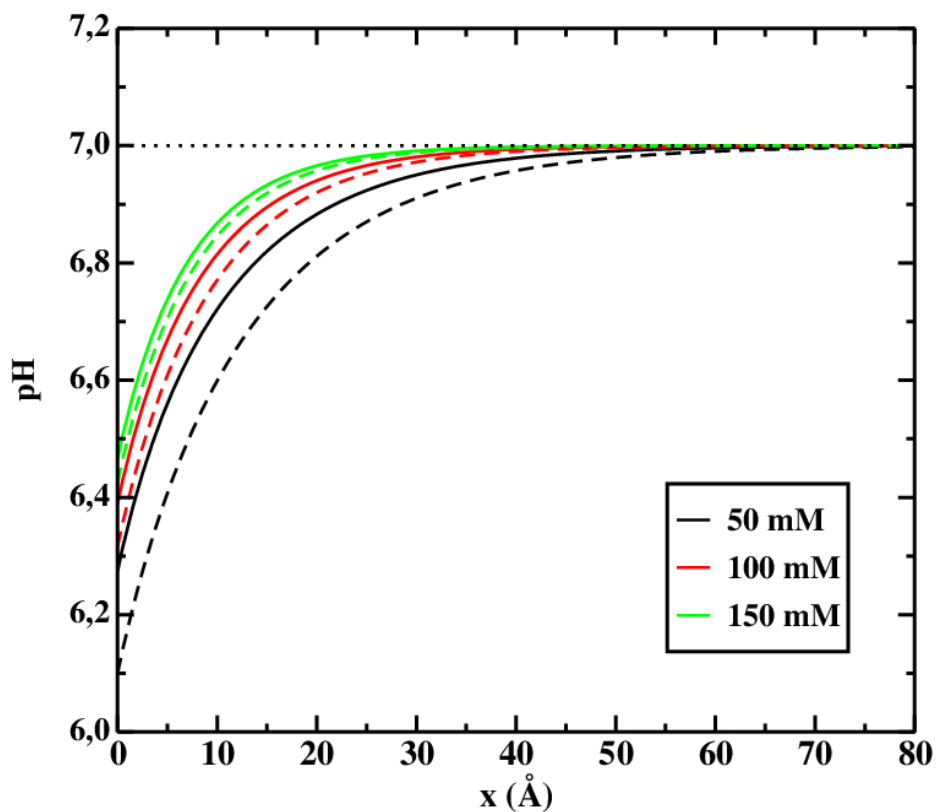


Figura 4.12: pH em função da distância em Angstroms. As linhas pontilhadas representam o comportamento sem os bivalentes. O valor da área dos grupos ionizados é $A_M = 500\text{\AA}^2$.

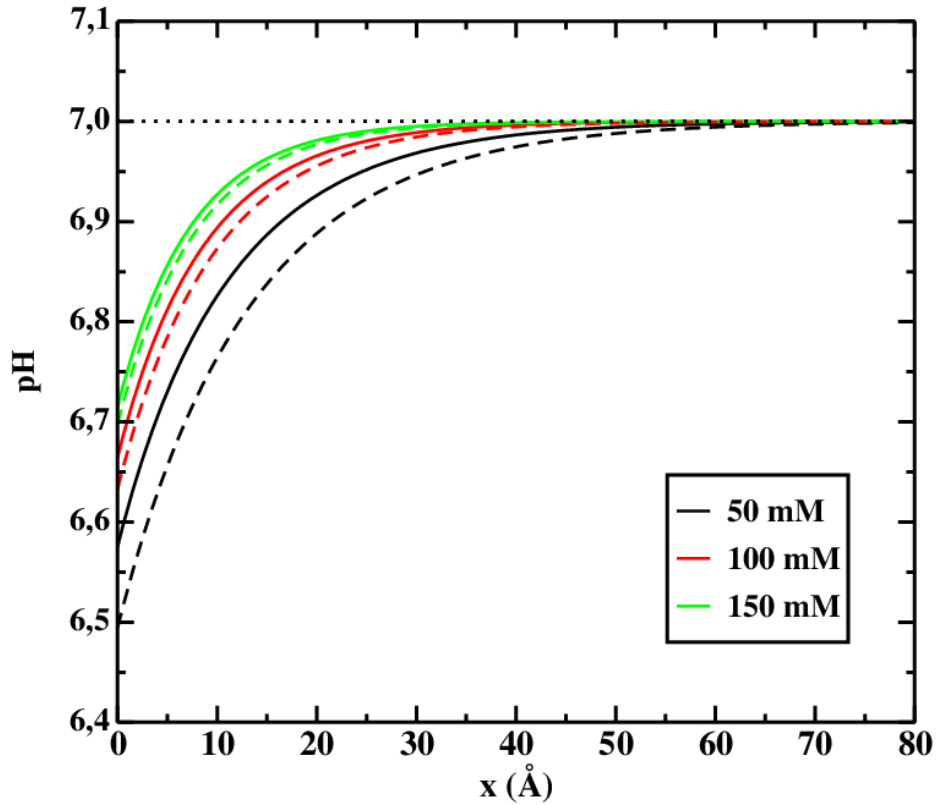


Figura 4.13: pH em função da distância em Angstroms. As linhas pontilhadas representam o comportamento sem os bivalentes. O valor da área dos grupos ionizados é $A_M = 1000\text{\AA}^2$.

Ao aumentar a área dos grupos ionizáveis, ou seja, diminuir a carga efetiva na membrana, o pH começa a ter valores mais altos já desde as vizinhanças da membrana. Nas Figuras 4.12 e 4.13, o pH varia menos do que na Figura 4.11, com um valor de quase 6,2 e 6,6 na proximidade da membrana. Como a densidade de cargas é baixa, novamente menos contraíons estão disponíveis e isso acarreta um valor de pH mais elevado.

Capítulo 5

Aplicação do modelo à mitocôndria.

Este capítulo apresenta uma aplicação do modelo teórico a um sistema com condições aproximadas ao espaço intermembranas das cristas da mitocôndria, executando o mesmo programa utilizado no capítulo anterior para analisar o potencial médio e o pH nas vizinhanças da membrana.

A concentração de eletrólito foi considerada como sendo a concentração do meio intracelular, como foi dito no Capítulo 1 na Tabela 1. Também se utiliza a aproximação de neutralidade da solução, apoiado na hipótese de que o citosol como um todo é neutro. Portanto, para íons monovalentes positivos, o valor da concentração é de 150 mM; para cátions bivalentes 0,5mM e para ânions monovalentes 151 mM.

As membranas foram escolhidas como sendo formadas de cardiolipina. A distância de separação foi mantida constante igual a $200\text{\AA}$ e o pK dos grupos ionizáveis foi escolhido 2.8. O pH da solução no *bulk* é de 7,0 e a temperatura igual a 37°C . A área disponível por molécula foi variada com os valores $50\text{\AA}^2$, $500\text{\AA}^2$ e $1000\text{\AA}^2$ para se analisar o comportamento da densidade de carga. A cardiolipina ocupa uma área de aproximadamente $120\text{\AA}^2$ [24], mas como ela possui dois grupos ionizáveis pode-se admitir que cada um deles ocupa uma área da ordem de $60\text{\AA}^2$. Dessa maneira, mudar a área significa considerar variável a fração de cardiolipina componente da membrana. De acordo com a Tabela 2, a porcentagem de cardiolipina na membrana interna da mitocôndria é da ordem de 18%. Assim, considerando a razão entre $120\text{\AA}^2$, a área de uma cardiolipina, e a área total disponível assumida nos cálculos pode-se calcular a fração de cardiolipina na membrana modelo. Desta maneira, com $50\text{\AA}^2$ a membrana está composta por 100% de cardiolipina; com $500\text{\AA}^2$ existe 24% de cardiolipina e com $1000\text{\AA}^2$ a fração é de 12%. Ou seja, ao se pegar $50\text{\AA}^2$ da membrana, certamente haverá uma cardiolipina ali; ao olhar para $500\text{\AA}^2$ haverá 24% dessa área é cardiolipina e assim sucessivamente.

A cardiolipina possui uma importante função na membrana interna da mitocôndria, que é a de funcionar como uma “armadilha” para prótons, mantendo-os nas vizinhanças da membrana e estabilizando eletricamente a solução mantendo o

gradiente de pH no espaço intermembranas, como sugerido por Haines e Dencher [30]. O grupo ácido possui pK de 2.8 e o outro está na faixa de 7.5 – 9.5, sendo afetado pela ionização do primeiro [24]. Esse segundo grupo pode influenciar tanto quanto o grupo ácido, no controle do pH nas vizinhanças da membrana. Dessa maneira, não só a presença de cardiolipina na membrana da mitocôndria é fundamental para o metabolismo dessa organela, mas também é importante para manter o potencial e o pH controlados naquela região.

A concentração iônica foi calculada em cada ponto entre as membranas utilizando a relação

$$c_i(\xi) = c_{0i} e^{-z_i \phi} \quad (58)$$

e os resultados estão representados nos gráficos das Figuras 5.1, 5.2 e 5.3; para cada espécie iônica componente do eletrólito, respectivamente ânions monovalentes, cátions monovalentes e cátions bivalentes.

Na Figura 5.1, o comportamento dos ânions é caracterizado por uma baixa concentração nas vizinhanças da membrana, devido à repulsão eletrostática que há entre a carga negativa efetiva na membrana e os íons negativos. Na região do ponto médio entre as membranas, o valor tende a 151mM, que é o valor do *bulk*. A Figura 5.2 mostra um comportamento inverso, para os cátions monovalentes, que se concentram nas vizinhanças da membrana e tendem para 150mM no ponto médio; da mesma forma que os bivalentes, na Figura 5.3, que se aproximam do valor 0,5mM. Comparando os resultados para ânions variando os valores de A_M as concentrações na membrana aumentam, na medida em que a densidade de carga efetiva diminui. Isso é natural, devido à própria repulsão entre as cargas da membrana e dos ânions, se a densidade é menor, mais cargas conseguem se aproximar da superfície. O inverso ocorre com os cátions, pois a concentração diminui quando a densidade de cargas diminui, visto que ocorre atração com a membrana.

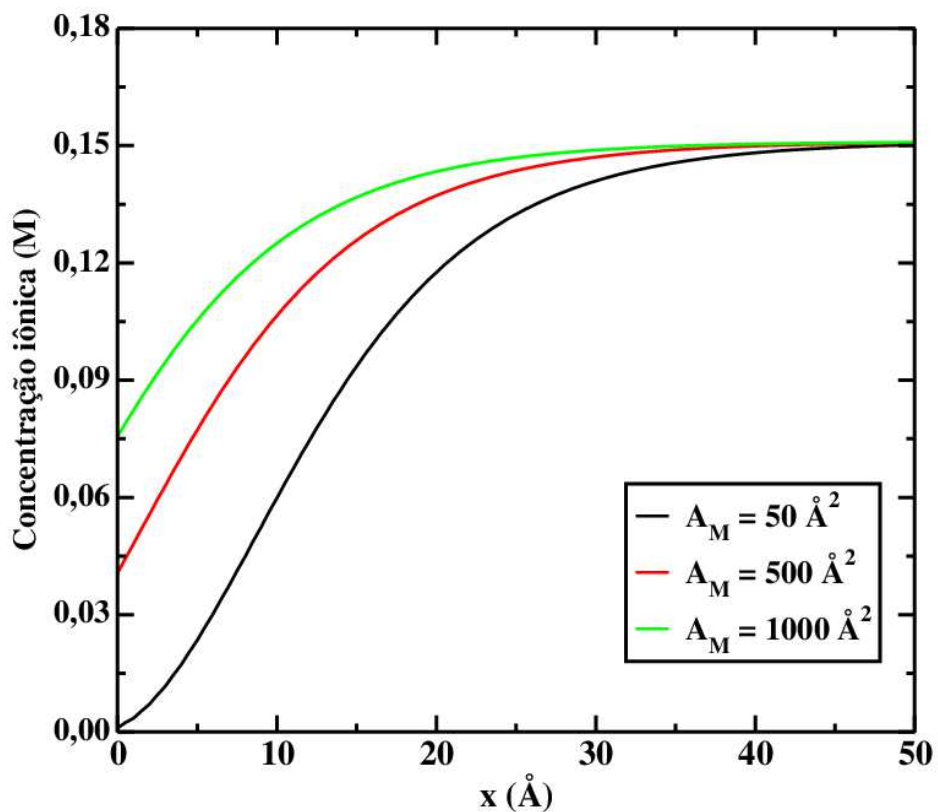


Figura 5.1: Concentração dos íons monovalentes negativos livres em função da distância da superfície em Angstroms. Os valores da área dos grupos ionizáveis são mostrados na legenda.

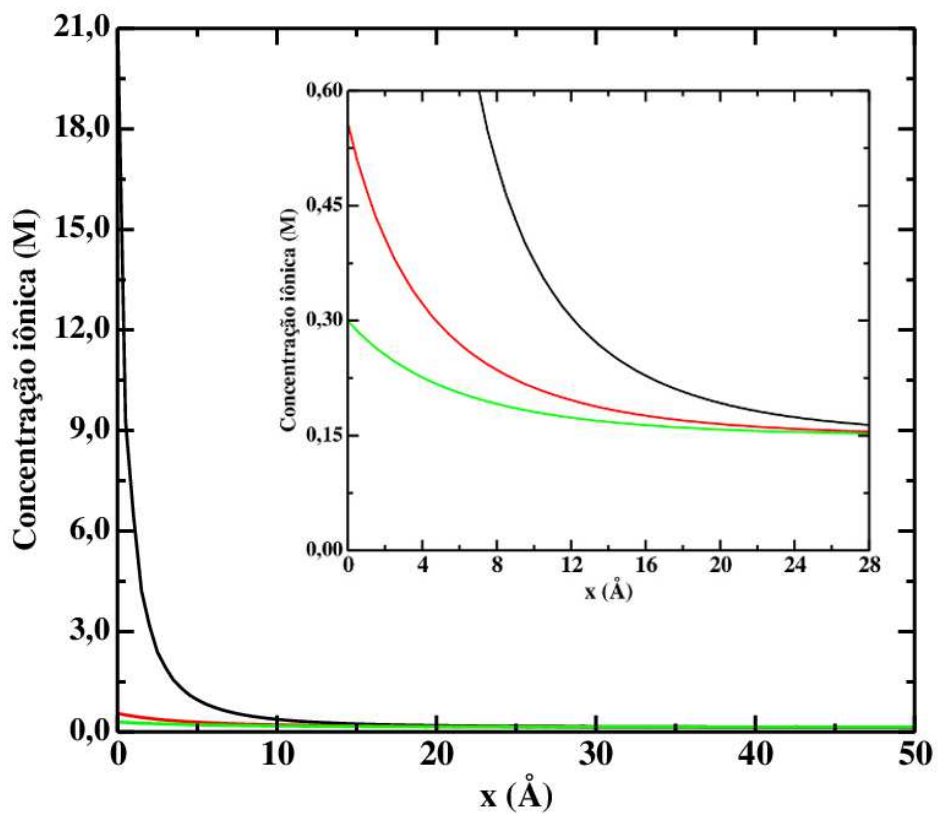


Figura 5.2: Concentração dos íons monovalentes positivos livres em função da distância da superfície em Angstroms. Os valores de A_M são 50 Å^2 , 500 Å^2 e 1000 Å^2 respectivamente preto, vermelho e verde.

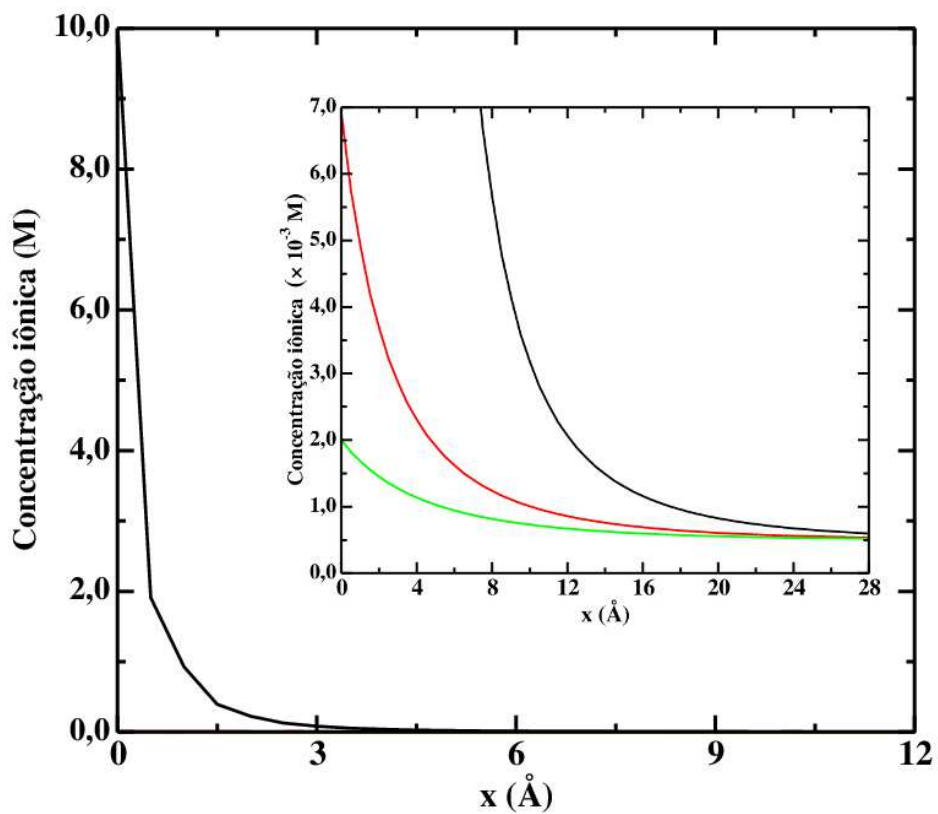


Figura 5.3: Concentração dos íons bivalentes positivos livres em função da distância da superfície em Angstroms. Os valores de A_M são 50 Å^2 , 500 Å^2 e 1000 Å^2 , respectivamente preto, vermelho e verde.

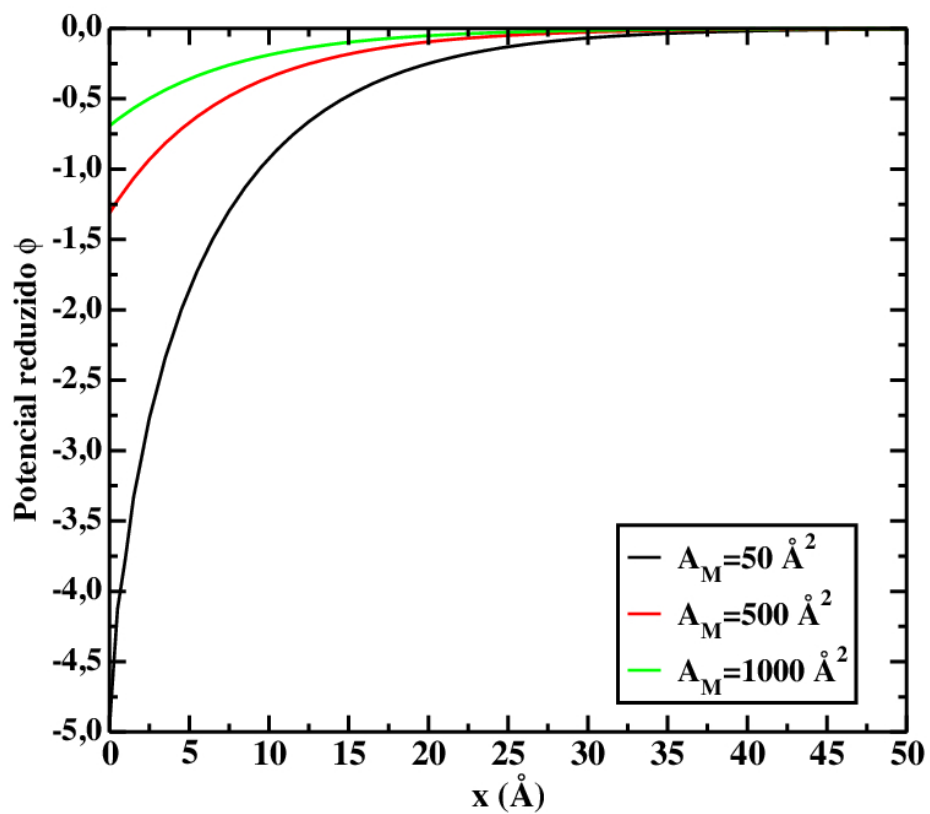


Figura 5.4: Potencial reduzido em função da distância da superfície em Angstroms. Os valores da área dos grupos ionizáveis estão mostrados na legenda.

O resultado para o potencial médio está representado na Figura 5.4, em função da distância, variando-se a área dos grupos ionizáveis. Observa-se o mesmo comportamento do capítulo precedente, com uma nítida diminuição dos valores próximo à membrana, conforme a área dos grupos aumenta. Novamente isso se deve ao fato da carga na superfície ser menor.

A Tabela 7 apresenta os valores de potencial calculados a $2\text{\AA}$ da primeira membrana, para estimar o valor do potencial zeta para as condições aqui assumidas para a solução.

Tabela 7

$50\text{\AA}^2$	$500\text{\AA}^2$	$1000\text{\AA}^2$
80 mV	26 mV	14 mV

Tabela 7: Valores em módulo do potencial médio a $2\text{\AA}$ da membrana para cada valor da área por molécula..

Em [31], é apresentado uma medida experimental de potencial zeta, feita para vesículas contendo 20% de cardiolipina, em uma solução de 100mM de NaCl, em pH 4,0, com área disponível por molécula de $64\text{\AA}^2$. O valor obtido foi de 45mV para o potencial zeta. Aqui, utilizando o modelo para estas mesmas condições o valor calculado é de 42mV, para uma distância de $200\text{\AA}$ entre as membranas.

Na Figura 5.5 estão representados os valores de pH em função da distância, para os três valores de A_M . Novamente, a maior variação dos valores do pH acontece para $50\text{\AA}^2$, no qual o valor eleva-se de 4,8 até 7,0 e a ionização dos grupos constituintes da membrana contribui para que exista essa diferença no valor do pH .

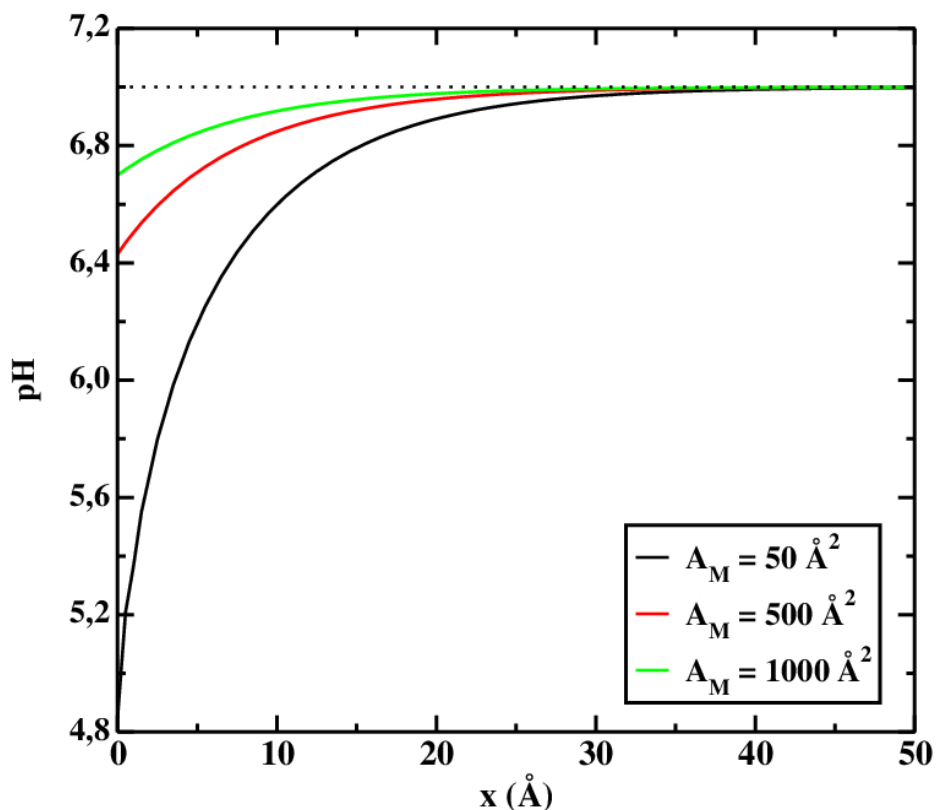


Figura 5.5: pH em função da distância da superfície em Angstroms. Os valores da área dos grupos ionizáveis são mostrados na legenda.

Um resultado experimental para fins de comparação com o modelo aqui apresentado pode ser encontrado em [24], para o pH na interface para vesículas compostas de cardiolipina e fosfatidilcolina. Com 40% de cardiolipina e 200mM de sal, o valor do pH na superfície cai para 6,0 comparado ao valor 7,0 do *bulk*. Aplicando o modelo para as mesmas condições, o valor obtido na superfície é de 5,7. O autor apresenta outra medida, considerando 5mM de sal, para o qual o valor do pH medido nas vizinhanças da membrana vale 4,3; ao passo que o calculado aqui para 5mM de sal e 40% de cardiolipina é 4,2 na superfície.

Capítulo 6

Conclusões

Este trabalho teve como objetivo investigar um sistema físico biológico que é constituído por duas membranas, separadas por uma distância fixa e em equilíbrio com o eletrólito circundante. Nesta investigação a metodologia proposta foi de descrever as interações eletrostáticas que são envolvidas no sistema, utilizando a equação de Poisson-Boltzmann. Duas situações foram abordadas, na primeira considerou-se o sistema só com contraíons monovalentes positivos e no segundo considerou-se a presença de um eletrólito adicional além dos contraíons. Na primeira situação a equação de Poisson Boltzmann foi resolvida analiticamente e na segunda por integração numérica. Este eletrólito foi considerado como uni-univalente e como bi-univalente.

A investigação se deu particularmente sobre a relação existente entre o pH e a ionização dos grupos que constituem as membranas. Uma aplicação para este modelo teórico simplificado é o espaço intermembranas da mitocôndria, que possui condições semelhantes ao problema estudado. O modelo mostrou-se eficiente em calcular valores do potencial nas vizinhanças da membrana e apresentou boa concordância com valores experimentais de medidas de pH e de potencial na superfície para sistemas modelo. A abrangência do modelo também foi elevada, mesmo considerando as condições de simplificação do problema; desta maneira pode-se concluir que o modelo funciona a contento.

O comportamento resultante mostrou também que a ionização contribui para estabilizar eletricamente a solução entre as membranas, e também contribui para manter um gradiente de pH nas proximidades da membrana. A presença de íons na solução facilita a ionização e também contribui para a estabilidade dos valores do pH nas vizinhanças da membrana. Seguindo esse raciocínio, pode-se admitir que no sistema biológico do espaço intermembranas da mitocôndria a ionização dos grupos constituintes da membrana interna, como por exemplo, a cardiolipina, deve ter influência no pH da região.

Apêndice A

Programa em linguagem Fortran, desenvolvido para executar os cálculos para o sistema composto apenas de contraíons.

```
PROGRAM contraion
```

- C programa para estudar o comportamento de duas membranas na
- C presença de contraíons.

```
IMPLICIT REAL*8 (A-H,K-Z)
```

```
DIMENSION A1(5),A2(5),ROO(500),P(500),CAMPO(500)
```

```
DIMENSION FI(500),EFI(500),KSI(500),CHION(500)
```

```
DATA KB,QE,EPSL0,NA,PI/1.380662D-23,1.60217733D-19,8.8541878D-12,
```

```
C 6.022045D 23,3.141592654D 00/
```

```
DATA A1(1),A1(2),A1(3)/0.4478566D04,-0.6130929D01,0.1712587D-01/
```

```
DATA A2(1),A2(2),A2(3),A2(4),A2(5)/0.8774702D 02,-0.4018290D 00,
```

```
10.1023978D-02,-0.2758337D-05,0.6822337D-08/
```

```
OPEN(UNIT=11,FILE='contraion.dat')
```

```
OPEN(UNIT=12,FILE='contraionfi.out')
```

```
OPEN(UNIT=13,FILE='contraionC0D.txt')
```

```
OPEN(UNIT=14,FILE='contraionALFA.txt')
```

```
OPEN(UNIT=15,FILE='contraionfi.txt')
```

```
OPEN(UNIT=16,FILE='contraionroo.txt')
```

```
OPEN(UNIT=17,FILE='contraionph.txt')
```

```
OPEN(UNIT=18,FILE='contraionPRESSAO.txt')
```

```
OPEN(UNIT=19,FILE='contraionCAMPO.txt')
```

```
READ(11,1001) TEMP,AM,PK,L
```

```
WRITE(*,*)TEMP,AM,PK,L
```

1001 FORMAT(4D15.5)

READ(11,1002) INPT

1002 FORMAT(I5)

C-----

T=273.15D 00+TEMP

KT=KB*T

C-----

C Cálculo do produto iônico da água.

PIA=0.0D0

DO 100 I=1,3

PIA=PIA+A1(I)*T**(I-2)

100 CONTINUE

C-----

C Cálculo da constante dielétrica da água.

Z=0.0 D 00

DO 200 I=1,5

Z=Z+A2(I)*TEMP**(I-1)

200 CONTINUE

CD=Z

C-----

EPSL=EPSL0*CD

CDISS=10.D 00**(-PK+3.D 00)

LAMB=DSQRT((EPSL*KT)/(2.D 00*QE*QE*NA))

WRITE(*,*)LAMB

C1=(QE*L)/(4.D 00*LAMB*AM)

C2=((2.D 00*LAMB/L)*(2.D 00*LAMB/L))/CDISS

X=0.7D 00

NT=0

310 CONTINUE

NT=NT+1

Y=(PI/2.D 00)-C1*DTAN(X)/(1.D 00+C2*(PI-2.D 00*X)*

1(PI-2.D 00*X)/(DSIN(X)*DSIN(X)))

```

DIF=DABS(X-Y)
IF (DIF .LT. 1.D-09) GO TO 320
X=(X+Y)/2.D 00
IF (NT .GT. INPT) GO TO 320
GO TO 310
320 CONTINUE

```

```

X1=X

```

```

C-----
C0=4.D 00*LAMB*LAMB/(L*L)*(PI-2.D 00*X1)*(PI-2.D 00*X1)
D=PI/DSQRT(C0)-L/(2.D 00*LAMB)
WRITE(*,*)C0,D
EFI0=SIN(X1)*SIN(X1)
ALFA=1.D 00/(1.D 00+C0/(CDISS*EFI0))
WRITE(*,*)ALFA
C3=DSQRT(C0)/2.D 00

```

```

C-----
KSI(1)=0.D 00
DKSI=L/(2.D 00*LAMB)/DFLOAT(50)

DO 400 J=2,51

KSI(J)=KSI(J-1)+DKSI
EFI(J)=SIN(C3*KSI(J)+C3*D)*SIN(C3*KSI(J)+C3*D)
EFI00=SIN(C3*D)*SIN(C3*D)

CAMPO(J)=(DSQRT(C0)*(COS(C3*KSI(J)+C3*D)))/SIN(C3*KSI(J)+C3*D)
CAMPO0=(DSQRT(C0)*(COS(C3*D)))/SIN(C3*D)

ROO(J)=C0/EFI(J)
CHION(J)=-DLOG10(ROO(J)*1.D-03)
FI(J)=DLOG(EFI(J))

ROOO=C0/EFI00

```

SIGMA=-(QE*ALFA)/AM

P(J)=NA*ROOO*KT-(CAMPOO*CAMPOO)*NA*KT

WRITE(12,*)LAMB*KSI(J),FI(J)

WRITE(15,*)LAMB*KSI(J),FI(J)

WRITE(16,*)LAMB*KSI(J),ROO(J)

WRITE(17,*)LAMB*KSI(J),CHION(J)

WRITE(18,*)LAMB*KSI(J),P(J)

WRITE(19,*)LAMB*KSI(J),CAMPO(J)

400 CONTINUE

WRITE(13,*)C0,D

WRITE(14,*)ALFA

CLOSE(11)

CLOSE(12)

CLOSE(13)

CLOSE(14)

CLOSE(15)

CLOSE(16)

CLOSE(17)

CLOSE(18)

CLOSE(19)

STOP

END

Apêndice B

Programa em linguagem Fortran, desenvolvido para executar os cálculos para o sistema composto de contraíons e eletrólito adicionado.

PROGRAM numerico

C PROGRAMA PARA CALCULAR NUMERICAMENTE O POTENCIAL.

IMPLICIT REAL*8 (A-H,K-Z)

DIMENSION A1(5),A2(5),CAMPO(700),CAMPON(700)

DIMENSION FI(700),KSI(700),CHION(700),X11(700),X21(700),X31(700)

DIMENSION QION(7),CIOND(7),CION(7),CTOTAL(700),CONBP(700)

DIMENSION CIONR(7,700),FIN(700),CONMP(700),CONMN(700)

DIMENSION P(700),LCTOTAL(700),CIONRL(7,700)

DATA KB,QE,EPSL0,NA,PI,E/1.380662D-23,1.60217733D-19,

C 8.8541878D-12,6.022045D 23,3.141592654D 00,2.71828183D 00/

DATA A1(1),A1(2),A1(3)/0.4478566D04,-0.6130929D01,0.1712587D-01/

DATA A2(1),A2(2),A2(3),A2(4),A2(5)/0.8774702D 02,-0.4018290D 00,

10.1023978D-02,-0.2758337D-05,0.6822337D-08/

C-----

OPEN(UNIT=11,FILE='numerico.dat')

OPEN(UNIT=12,FILE='numerico.out')

OPEN(UNIT=13,FILE='ions.dat')

OPEN(UNIT=14,FILE='numericofi.txt')

OPEN(UNIT=15,FILE='numericoint.txt')

OPEN(UNIT=16,FILE='numericoCTOTAL.txt')

OPEN(UNIT=17,FILE='numericoCONMP.txt')

OPEN(UNIT=18,FILE='numericoCONMN.txt')

```

OPEN(UNIT=19,FILE='numericoCONBP.txt')
OPEN(UNIT=20,FILE='numericoPH.txt')

C-----
  READ(11,1001) TEMP,AM,PK,PH
  READ(11,1001) L,BETA
1001 FORMAT(4D15.5)
  READ(11,1002) INPT,ITER
  READ(13,1002) INQ
1002 FORMAT(2I5)
C-----
  T=273.15D 00+TEMP
  KT=KB*T
C-----
C   CALCULO DO PRODUTO IÔNICO DA ÁGUA
  PIA=0.0D0
  DO 100 I=1,3
    PIA=PIA+A1(I)*T**(I-2)
  100 CONTINUE
C-----
C   CALCULO DA CONSTANTE DIELÉTRICA DA AGUA
  Z=0.0 D 00
  DO 200 I=1,5
    Z=Z+A2(I)*TEMP**(I-1)
  200 CONTINUE
  CD=Z
C-----
  EPSL=EPSL0*CD
  LAMB=DSQRT((EPSL*KT)/(2.D 00*QE*QE*NA))
  CDISS=10.D 00**(-PK+3.D 00)
  CLAMB=LAMB*QE*QE/EPSL/KT
  WRITE(*,*) CLAMB,EPSL,KT

  QION(1)=1.D 00

```

```

QION(2)=-1.D 00
QION(3)=0.D 00
QION(4)=0.D 00
QION(5)=0.D 00
CIOND(3)=0.D 00
CIOND(4)=0.D 00
CIOND(5)=0.D 00

IF (INQ.LE.2) GO TO 120
DO 210 I=3,INQ
READ(13,1001)QION(I),CIOND(I)
WRITE(*,*)QION(I),CIOND(I)
210 CONTINUE

120 CONTINUE

CION(1)=10.D 00**(-PH+3.D 00)
CION(2)=10.D 00**(-PIA+6.D 00)/CION(1)
CION(3)=CIOND(3)
CION(4)=CIOND(4)+CION(1)-CION(2)
IF (INQ.GT.4) CION(4)=CION(4)+2.D 00*CIOND(5)
IF (INQ.GT.4) CION(5)=CIOND(5)
SQ=CION(1)-CION(2)+CION(3)-CION(4)+2.D 00*CION(5)

DO 220 I=1,INQ
WRITE(*,*)QION(I),CION(I)
220 CONTINUE

C-----
KSI(1)=0.D 00
DKSI=L/(2.D 00*LAMB)/DFLOAT(2*INPT)
DKSI1=DKSI/3.D 00

C-----
DO 300 J=2,2*INPT+1
KSI(J)=KSI(J-1)+DKSI

```

300 CONTINUE

DO 302 J=1,2*INPT+1

FI(J)=0.D 00

CAMPO(J)=0.D 00

P(J)=0.D 00

DO 301 I=1,INQ

CIONR(I,J)=CION(I)

301 CONTINUE

302 CONTINUE

C-----

INSS=0

ALFA=0.D 00

800 CONTINUE

C-----

K1=DLOG10(E)

ALFAX=1.D 00/(1.D 00+10**(PK-PH-FI(1)*K1))

ALFA=BETA*ALFA+(1.D 00-BETA)*ALFAX

C-----

DO 400 I=1,2*INPT+1

X=0.D 00

DO 401 J=1,INQ

X=X+CIONR(J,I)*QION(J)

401 CONTINUE

CTOTAL(I)=X

400 CONTINUE

C-----

X=0.D 00

DO 500 I=1,INPT

J=2*I+1

X=X+DKSI1*(CTOTAL(J-2)*KSI(J-2)+4.D 00*CTOTAL(J-1)*

1KSI(J-1)+CTOTAL(J)*KSI(J))

X11(J)=X/2.D 00

500 CONTINUE

```

X11(1)=0.D 00
DO 501 I=1,INPT
  J=2*I
  X11(J)=(X11(J-1)+X11(J+1))/2.D 00
501 CONTINUE

```

```

DO 502 I=1,2*INPT+1
  X11(I)=X11(2*INPT+1)-X11(I)
502 CONTINUE

```

```

CFIN=CLAMB*ALFA/AM
RBX=KSI(2*INPT+1)

```

```

X21(1)=0.D 00
X=0.D 00
DO 600 I=1,INPT
  J=2*I+1
  X=X+DKSI1*(CTOTAL(J-2)+4.D 00*CTOTAL(J-1)+CTOTAL(J))
  X21(J)=X/2.D 00
600 CONTINUE

```

```

DO 601 I=1,INPT
  J=2*I
  X21(J)=(X21(J-1)+X21(J+1))/2.D 00
601 CONTINUE

```

```

X31(1)=0.D 00
X=0.D 00
DO 860 I=1,INPT
  J=2*I+1
  X=X+DKSI1*(CTOTAL(J-2)+4.D 00*CTOTAL(J-1)+CTOTAL(J))
  X31(J)=X/2.D 00
860 CONTINUE

```

```

DO 801 I=1,INPT
  J=2*I
  X31(J)=(X31(J-1)+X31(J+1))/2.D 00
801 CONTINUE

```

```

CFI=-CLAMB*ALFA/AM

```

```

C-----

```

```

DO 620 I=1,2*INPT+1
  FIN(I)=CFI*(KSI(2*INPT+1)-KSI(I))-X11(I)-X21(I)*KSI(I)+
  1KSI(2*INPT+1)*X21(2*INPT+1)
620 CONTINUE

```

```

  X=FIN(I+2*INPT+1)
DO 630 I=1,2*INPT+1
  FIN(I)=FIN(I)-X
  FI(I)=BETA*FI(I)+(1.D 00-BETA)*FIN(I)
630 CONTINUE

```

```

C-----

```

```

C  CAMPO ELETRICO

```

```

DO 820 I=1,2*INPT+1
  CAMPON(I)=CFIN-X31(I)
820 CONTINUE

```

```

  X=CAMPON(I+2*INPT+1)
DO 830 I=1,2*INPT+1
  CAMPON(I)=CAMPON(I)-X
  CAMPO(I)=BETA*CAMPO(I)+(1.D 00-BETA)*CAMPON(I)

```

830 CONTINUE

C-----

DO 700 J=1,5

DO 710 I=1,2*INPT+1

CIONR(J,I)=CION(J)*DEXP(-QION(J)*FI(I))

710 CONTINUE

700 CONTINUE

C-----

ITEST=0

DO 320 I=1,2*INPT+1

IF(DABS(FI(I)).LT.1.D-08)GO TO 320

IF(DABS((FI(I)-FIN(I))/FI(I)).GT.1.D-06) ITEST=1

320 CONTINUE

INSS=INSS+1

IF(INSS.GE.INITER)GO TO 330

IF(ITEST.EQ.0.AND.INSS.GT.10)GO TO 330

GO TO 800

330 CONTINUE

C-----

WRITE(*,*)INSS

WRITE(*,*)ALFA

DO 900 I=1,2*INPT+1

CONMP(I)=CION(3)/DEXP(FI(I))

CONMN(I)=CION(4)*DEXP(FI(I))

CONBP(I)=CION(5)/DEXP(2.D 00*FI(I))

CHION(I)=-DLOG10(CION(1)/DEXP(FI(I)))

WRITE(17,1001)LAMB*KSI(I),CONMP(I)

WRITE(18,1001)LAMB*KSI(I),CONMN(I)

```
WRITE(19,1001)LAMB*KSI(I),CONBP(I)
WRITE(20,1001)LAMB*KSI(I),CHION(I)
WRITE(12,1001)LAMB*KSI(I),FI(I),CTOTAL(I)
WRITE(14,1001)LAMB*KSI(I),FI(I)
WRITE(15,1001)X11(I),X21(I),X31(I)
WRITE(16,1001)LAMB*KSI(I),CTOTAL(I)
```

```
900 CONTINUE
```

```
CLOSE(11)
CLOSE(12)
CLOSE(13)
CLOSE(14)
CLOSE(15)
CLOSE(16)
CLOSE(17)
CLOSE(18)
CLOSE(19)
CLOSE(20)
```

```
END
```

Referências Bibliográficas

- [1] SINGER, S. T.; NICOLSON, G. L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. **Science**, v.175, n.4023, p. 720-731, 1972.
- [2] ALBERTS, B.; et al. **Biologia Molecular da Célula**. e. 5, Porto Alegre: Artmed, 2010.
- [3] NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. Coordenação de tradução de Arnaldo A. Simões e Wilson R. Lodi. 4.ed. São Paulo: Sarvier, 2006.
- [4] MEER, G.; KROON, A. Lipid map of the mammalian cell. **J. Cell Sci.**, v. 124, p. 5-8, 2011.
- [5] SPITZER, J.; POOLMAN, B. The role of biomacromolecular crowding, ionic strength, and physicochemical gradients in the complexities of life's emergence. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v.73, n.2, p. 371-388, 2009.
- [6] MONNARD, P.; et al. Influence of ionic inorganic solutes on self-assembly and polymerization process related to early forms of life: implications for a prebiotic aqueous medium. **Astrobiology**, v.2, n.2, p. 139-152, 2002.
- [7] ISRAELACHVILI, J.; **Intermolecular and Surface Forces**. e. 2, Academic Press, 1992.
- [8] DE ROBERTIS, E.; RAFFO, H.; Submicroscopic organization of the mitochondrial body and other cytoplasmic structures of insect testis. **Exp. Cell Research**, v. 12, e. 1, p. 66-79, 1957.
- [9] PAPPAS, G.; BRANDT, P.; Mitochondria I. Fine Structure of the Complex Patterns in the Mitochondria of *Pelomyxa carolinensis* Wilson (Chaos chaos L.). **J. Biophys. Biochem. Cytology**, v. 6, e. 1, p. 85-90, 1959.
- [10] FLEISCHER et al.; Lipid composition of mitochondria from bovine heart, liver, and kidney. **J. Lipid Research**, v. 8, e. 3, p. 170-180, 1967.
- [11] OSMAN, C. et al.; Making heads or tails of phospholipids in mitochondria. **J. Cell Biol.**, v. 196, n. 1, p. 7-16, 2011.
- [12] GENNIS, R. B.; **Biomembranes: molecular structure and function**. Nova Iorque: Springer-Verlag, 1989.
- [13] JUNG, D. W.; DAVIS, M. H.; BRIERLEY, G. P.; Estimation of the pH gradient and Donnan Potential in De-energized Heart Mitochondria. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 263, n.1, p. 19-28, 1988.

- [14] MITCHELL, P.; Chemiosmotic Coupling and Energy Transduction, Inglaterra: Glynn Research, 1968.
- [15] DRIGO FILHO, E.; AGOSTINHO NETO, A.; Equilibrium Ionic Distribution as a Boundary Value Problem. In: Robert Richard. (Org.). **Trends in Phys. Chem.** e. 4, Trivandrum: Research Trends, v. 10, p. 65-77, 2004.
- [16] ZHOU, S.; ZHANG, G.; Approximate analytical expressions for electrical potential distribution and surface charge density/surface potential relationship for planar, cylindrical, and spherical entities immersed in a general electrolyte solution. **Col. Surf. A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 385, p. 28-39, 2011.
- [17] ANDELMAN, D.; Electrostatic Properties of Membranes: The Poisson-Boltzmann Theory. In: R. Lipowsky and E. Sackmann. (Org.). **Handbook of Biological Physics.** Elsevier Science B. V., v. 1, p. 603-641, 1995.
- [18] AGOSTINHO NETO, A.; TESO, A.; DRIGO FILHO, E.; Solution of Poisson-Boltzmann equation for system with four ionic species. **J. Math. Biol.**, Alemanha, v. 35, p. 814-824, 1997.
- [19] AGOSTINHO NETO, A.; DRIGO FILHO, E.; Planar Membranes Interaction. **J. Phys. Chem. B**, v. 110, 2006.
- [20] JAMES, A. E.; WILLIAMS, D. J. A.; Numerical solution of the Poisson-Boltzmann equation. **J. Col. Interface Science**, v. 107, n. 1, p. 44-59, 1985.
- [21] ZHANG, J. et al.; A simple and practical approach to implement the general Poisson-Boltzmann equation of symmetric and asymmetric electrolytes for electrical double layer interactions. **Col. Surf. A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 242, p. 189-193, 2004.
- [22] KOLMOGOROV, A. N.; FOMIN, S.V. **Elementos da teoria das funções e de análise funcional.** p. 71-73, Mir, 1982.
- [23] KORN, G. A.; KORN, T. M.; **Mathematical handbook for scientists and engineers.** p.772, Dover, 2000.
- [24] GORBENKO, G. P.; MOLOTKOVSKY, J. G.; KINNUKEN, P. K. J.; Cytochrome c interaction with cardiolipin/phosphatidilcoline model membranes: effect of cardiolipin protonation. **Biophys. J.**, v. 90, p. 4093-4103, 2006.
- [25] AGUILELLA, V. M. et al.; Double Layer potential and degree of dissociation in charged lipid monolayers. **Chem. Phys. lipids**, v. 105, p. 225-229, 2000.

- [26] OHKI, S. et al.; Surface potential of phosphoinositide membranes: comparison between theory and experiment. **Col. Surf. B: Biointerfaces**, v. 79, p. 210-218, 2010.
- [27] TSUI, F. C.; OJCIUS, D. M.; HUBBELL, W. L.; The intrinsic pK_a values for phosphatidylserine and phosphatidyletanolamine in phosphatidylcholine host bilayers. **Biophys. J.**, v. 49, p. 459-468, 1986.
- [28] EVANS, D. F.; WENNERSTRÖN, H.; **The colloidal domain: where physics, chemistry, biology and technology meet.** p. 428-436, Wiley-vch, 1999.
- [29] KIRBY, B. J.; HASSELBRINK JR., E. F.; Zeta potential of microfluidic substrates: 1. theory, experimental techniques, and effects on separations. **Electrophoresis**, v. 25, p. 187-202, 2004.
- [30] HAINES, T. H.; DENCHER, N. A.; Cardiolipin: a proton trap for oxidative phosphorylation. **FEBS Letters**, n. 528, p. 35-39, 2002.
- [31] ANGELOVA, M. I. et al; Membrane Deformation under local pH gradient: mimicking mitochondrial cristae dynamics. **Biophys. J.**, v. 95, p. 4924-4933, 2008.