



Centro Universitário de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde

TRANSPORTE ATRAVÉS DAS MEMBRANAS BIOLÓGICAS

Camile Mohana Conte

Brasília - 2002

Centro Universitário de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde
Licenciatura em Ciências Biológicas

TRANSPORTE ATRAVÉS DAS MEMBRANAS BIOLÓGICAS

CAMILE MOHANA CONTE

Monografia apresentada à
Faculdade de Ciências da Saúde do Centro
Universitário de Brasília como parte dos
requisitos para a obtenção do grau de
Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientação: Prof. Luiz Carlos Nasser (UNICEUB)

Brasília - 2002

Resumo:

A membrana plasmática é essencial para os seres vivos, pois cria a idéia de compartimentação separando as soluções do meio intra e extracelular, evitando a mistura dessas soluções. A célula necessita de energia para sua sobrevivência, por isso ela tem seu próprio metabolismo, mas esse processo necessita de alguns nutrientes provenientes de fora para ocorrer. Contudo, esses nutrientes têm que atravessar a membrana plasmática para entrar na célula. Esse transporte através das membranas acontece devido à presença de proteínas específicas na membrana que realizam o transporte, além de um potencial eletroquímico entre as soluções. O transporte pode ser passivo, a favor do gradiente eletroquímico, ou ativo, contra esse gradiente. Pode ocorrer, também, o transporte da macromoléculas que é chamado de transporte em massa. Vários experimentos podem demonstrar essas propriedades da membrana, e um dos quais se utiliza de *Beta vulgares*.

Palavras chave: Fisiologia vegetal, membrana plasmática, transporte passivo, transporte ativo, beterraba (*Beta vulgares*).

Sumário

1. Introdução	1
2. Membrana Plasmática	2
3. Proteínas da Membrana	3
4. Potencial da Membrana	6
5. Tipos de Transporte:	8
5.1. Transporte Passivo	10
5.1.1. Osmose	11
5.1.2. Transporte Facilitada	13
5.2. Transporte Ativo	15
5.2.1. Bombas Iônicas	15
5.2.2. Co-transporte	18
5.3. Transporte em Massa	19
6. Experimento: Beterraba	21
6.1. Metodologia	21
6.2. Resultados	22
6.3. Discussão dos resultados	23
7. Bibliografia	24

1. Introdução

Se duas soluções de concentrações diferentes forem separadas por uma distância considerável, será mais difícil de ocorrer mistura entre elas, portanto, não teria necessidade de uma barreira especial para separá-las. Por outro lado, se duas soluções químicas de composição muito diferentes forem separadas por uma distância medida em frações de micra deve existir uma barreira à difusão dos solutos das duas, pode-se citar a solução do citosol e do meio extracelular. O fato de que as soluções externa e interna possam diferir marcadamente em sua composição química é, por conseguinte, evidência da existência de uma barreira à difusão livre. A membrana citoplasmática das é essa barreira, que cria a idéia de compartimentação (Epstein 1975).

As membranas celulares são essenciais para a vida da célula. A membrana plasmática envolve a célula, define seus limites, e mantêm as diferenças essenciais entre o citosol e o meio extracelular. Dentro da célula, as membranas do retículo endoplasmático, aparelho de Golgi, mitocôndrias, e outras organelas envoltas por membrana, em células eucarióticas, mantêm as diferenças características entre os conteúdos de cada organela e o citosol. Todas as membranas biológicas têm uma estrutura geral comum: é um filme muito fino de lipídeos e de proteínas mantidas juntas principalmente por interações não covalentes (Greggi 1999).

As membranas celulares são estruturas dinâmicas, fluidas e são constituídas de uma bicamada lipídica. Essa bicamada lipídica fornece a estrutura básica da membrana e atua como uma barreira relativamente impermeável à passagem da maioria das molécula hidrossolúveis (Greggi 1999).

Quando se fala em relativamente impermeável é o mesmo que citar as propriedades seletivas da membrana, afinal a célula necessita de várias moléculas e nutrientes, e esse material precisa penetrar no meio intracelular. Para que isso ocorra, temos várias propriedades da membrana envolvidas, baseadas na ação de várias unidades funcionais ao longo de toda a membrana. Essas unidades são proteínas modificadas, especializadas em transporte, que podem ser de vários tipos. Esses

nutrientes e moléculas, que vão penetrar na célula através dessas proteínas, são essenciais para o metabolismo celular de todos os seres vivos. Esses procedimentos acontecem em todos os seres vivos, e, em geral, não se tem muita informação sobre o assunto (Ferri 1985).

2. Membrana Plasmática

O transporte entre a célula e o meio é controlado pela membrana plasmática. Esta membrana determina o tipo de molécula a serem movidas para o interior ou para o meio externo, além da direção e a velocidade de transporte (Faria(b) 2000).

O controle exercido pelas membranas, conhecido como permeabilidade seletiva, resulta da natureza lipídica de sua estrutura básica, o que torna mais fácil a penetração de substâncias não polares e dificulta a passagem de compostos hidrossolúveis, a da presença de carreadores ou transportadores específicos de natureza protéica para determinadas substâncias polares. A permeabilidade seletiva das membranas depende também da presença de cálcio, pois este cátion é essencial à integridade das mesmas, pois está envolvido nas pontes de ligação entre os lipídeos e as proteínas (Faria(b) 2000).

O estudo da membrana plasmática se iniciou no começo do século, e mudou muito dessa época até hoje. Na década de 20 descobriram que a membrana era formada por uma dupla camada lipídica. Posteriormente, em 1935, o modelo descoberto tinha de 50 a 60% de proteínas, mas não sabiam exatamente a disposição das mesmas. Os estudo continuaram, mas só na década de 70 os pesquisadores encontraram um modelo mais próximo do real (Garcia 2000).

Foram realizados estudos mais rigorosos sobre os modelos existentes, percebeu-se que nenhum se encaixava nos resultados obtidos e foram descartados. Somente em 1972, Singer e Nicolson, baseados nos resultados, formularam uma proposta mais consistente. Esses autores chegaram a conclusão que a membrana era constituída por uma matriz lipídica e proteínas dispostas de várias maneiras na membrana. As proteínas, segundo este modelo, estariam flutuando na matriz lipídica

que seria fluida. Esse aspecto traria a possibilidade de movimentos laterais ou transversais dessas proteínas. Devido a esses movimentos foi que esse modelo ficou conhecido como modelo do mosaico fluido. Esse modelo é o aceito hoje em dia por responder a uma série de requisitos morfológicos necessários ao funcionamento celular (Garcia 1998).

3. Proteínas da Membrana

Enquanto a bicamada lipídica determina a estrutura básica das membranas biológicas, as proteínas são responsáveis pela maioria das funções da membrana, atuando como receptores específicos, enzimas, proteínas transportadoras, entre outras funções (Greggi 1999).

Muitas proteínas da membrana estendem-se através da bicamada lipídica: em algumas dessas proteínas transmembrana a cadeia polipeptídica cruza a bicamada como uma alfa-hélice única (proteínas unipasso); em outras, inclusive naquelas responsáveis pelo transporte transmembrana de íons e pequenas moléculas hidrossolúveis, a camada polipeptídica cruza a bicamada múltiplas vezes, seja como uma série de alfa-hélices, seja como uma folha beta na forma de um barril fechado (proteína multipasso) (Greggi 1999).

Outras proteínas associadas a membrana não cruzam a bicamada, mas ao contrário são presas a um ou ao outro lado da membrana. Muitas dessa são ligadas por interações não covalentes a proteína transmembrana, enquanto outras são ligadas através de grupos lipídicos ligados covalentemente. Como as moléculas lipídicas na bicamada, muitas proteínas da membranas são capazes de difundir-se rapidamente no plano da membrana. Por outro lado, as células têm mecanismos para imobilizar proteínas específicas da membrana e para confinar moléculas lipídicas e protéicas a domínios específicos (Greggi 1999).

Apesar das várias proteínas diferentes existentes na membrana, e possível, para efeito didático, separar essas estruturas básicas em quatro grupos: Poros ou canais, zonas de difusão facilitada, receptores e operadores (Heneine 1990).

Os canais ou poros são passagens que permitem a comunicação entre o lado externo e interno da célula. Os canais podem possuir carga (positiva ou negativa), ou serem destituídos desta. Essa carga é baseada nos grupos laterais de proteínas. Os canais positivos permitem a passagem de ânions e repelem os cátions, no caso do canal negativo acontece o contrário. Há, também, os canais considerados mais sofisticados, com um ou dois portões que abrem sob estímulo. O canal de sódio é um exemplo, fica fechado durante o potencial de repouso (membrana) e se abre no potencial de ação (Fig. 1). Apesar desse mecanismo ser acionado ativamente, o processo é passivo e se faz de acordo com o gradiente de concentração. No caso dos poros sem carga só passam substâncias sem carga (Heneine 1990).

Zonas de difusão facilitada são regiões que possuem alta concentração de moléculas de determinada espécie química. Nesses locais ocorre a passagem de substâncias semelhantes, ou afins, com essas moléculas, por isso é considerada passagem facilitada (Heneine 1990).

Receptores são sítios que possuem estrutura adequada à ligação de certa moléculas, que quando se ligam causam diversas alterações na proteína. Os receptores podem existir tanto em canais (Fig. 1) quanto nas bombas iônicas (operadores). Existem receptores dos lados intra ou extracelular, que quando se unem ao mensageiro podem causar alterações baseadas em cargas ou em mudanças conformacionais nas proteínas (Heneine 1990).

Operadores (bombas) são mecanismos capazes de realizar transporte ativo, isto é, contra o gradiente eletroquímico. O princípio operacional é simples: a molécula a ser transportada se encaixa no operador, que muda sua conformação e a segura. O operador é posteriormente hidrolizada por um ATP e libera a molécula e volta ao estado inicial. O sentido é unidirecional, sendo que o operador que introduz não é o mesmo que excreta uma substância. Existe sempre uma molécula de Atpase envolvida, sendo o operador mais conhecido a bomba de sódio e potássio (Heneine 1990).

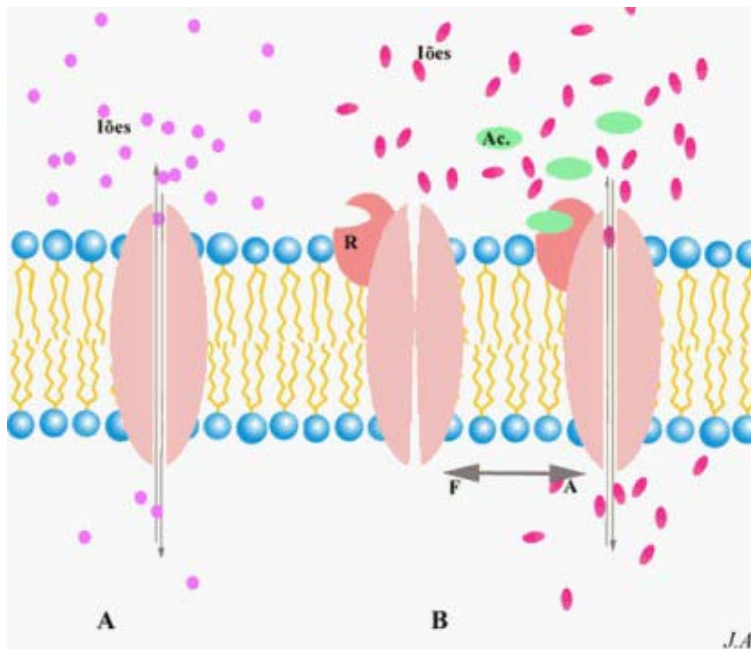


Fig. 1 – Canais iônicos. A: canais simples; B: canais com receptores, podendo assumir a conformação alostérica aberta (A) ou fechada (F) consoante se encontrem associados ou não ao receptor (Ac) (Araújo 2002).

4. Potencial de Membrana e Potencial de Ação

Os íons em solução estão sujeitos a duas “forças” físicas principais: o gradiente de potencial químico, determinado pela atividade do íon, e o gradiente de potencial elétrico. O saldo do movimento de um íon é então determinado por um gradiente de potencial eletroquímico. Seria possível imaginar uma situação na qual as concentrações ou atividades de um íon sejam iguais dentro e fora da célula, nesse caso, para este íon se teria um equilíbrio (Garcia 2000).

Células em equilíbrio com a solução externa apresentam um diferença de potencial elétrico através da membrana, denominado de potencial de membrana. Quando íons de determinada espécie encontram-se em equilíbrio através da membrana, seus potenciais eletroquímicos dentro e fora da célula são iguais (Garcia 2000).

Se no lado externo da membrana acaba se formando um excesso de cargas positivas enquanto que no seu lado interno faz com que o líquido intracelular fique

com mais cargas negativas do que positivas, ocorre a formação do gradiente elétrico. Na maioria das células nervosas tal potencial equivale a algo em torno de -90mv (Malaghini 1999).

Quando a membrana de uma célula é excitada, uma sucessão de eventos fisiológicos ocorrem através da tal membrana. Tais fenômenos, em conjunto, produzem aquilo que chamamos de Potencial de Ação. O potencial de ação tem origem em um mecanismo simples, de alternância entre transporte ativo e transporte passivo de pequenos íons (Heneine 1990).

Geralmente a excitação ocorre no momento em que a membrana recebe um determinado estímulo. Tipos de estímulos: calor, frio, solução salina hipertônica ou hipotônica, ácidos, bases, corrente elétrica, pressão, etc. Algumas células desencadeiam o Potencial de Ação sem a necessidade de receberem estímulos, devido a uma alta excitabilidade que as mesmas apresentam (Malaghini 1999).

Esse processo pode ser dividido em fases. Na primeira fase, ocorre um significativo aumento na permeabilidade aos íons sódio na membrana celular. Isso propicia um grande fluxo de íons sódio de fora para dentro da célula através de sua membrana, por um processo de difusão simples. Como resultado do fenômeno citado acima, o líquido intracelular se torna com grande quantidade de íons de carga positiva (cátions) e a membrana celular passa a apresentar agora um potencial inverso daquele encontrado nas condições de repouso da célula. Mais cargas positivas no interior da célula e mais cargas negativas no seu exterior. O potencial de membrana neste período passa a ser positivo, algo em torno de $+45\text{mv}$ (Malaghini 1999).

A segunda fase do potencial de ação e ocorre logo em seguida à despolarização, chamada de repolarização. Durante este curtíssimo período, a permeabilidade na membrana celular aos íons sódio retorna ao normal e, simultaneamente, ocorre agora um significativo aumento na permeabilidade aos íons potássio. Isso provoca um grande fluxo de íons potássio de dentro para fora da célula (devido ao excesso de cargas positivas encontradas neste período no interior da célula e à maior concentração de potássio dentro do que fora da célula). Enquanto

isso ocorre, os íons sódio (cátions) que estavam em grande quantidade no interior da célula, vão sendo transportados ativamente para o exterior da mesma, pela bomba de sódio-potássio. Tudo isso faz com que o potencial na membrana celular volte a ser negativo (mais cargas negativas no interior da célula e mais cargas positivas no exterior da mesma). O potencial de membrana neste período passa a ser algo em torno de -95 mv (Malaghini 1999).

O repouso é a terceira e última fase. É o retorno às condições normais de repouso encontradas na membrana celular antes da mesma ser excitada e despolarizada. Nesta fase a permeabilidade aos íons potássio retorna ao normal e a célula rapidamente retorna às suas condições normais. O potencial de membrana celular retorna ao seu valor de repouso (cerca de -90 mv) (Malaghini 1999).

Um aspecto importante desse potencial de ação é que os íons envolvidos na sua geração representam uma parte mínima das concentrações desses íons. Pode-se dizer que as concentrações iônicas intra e extracelular permanecem constantes durante todo o tempo (Heneine 1990).

5. Tipos de Transportes

As células são sistemas abertos, através dos quais se processam fluxos de matéria e de energia. A matéria, sob a forma de pequenas moléculas, de macromoléculas ou mesmo de partículas complexas, transitam do exterior para o interior, através de mecanismos de complexidade variada e com diversos encargos energéticos para a economia celular. Se há moléculas, como a água, o oxigênio, que transitam com extrema facilidade através da membrana plasmática, por simples difusão, há outras que, pela sua dimensão ou lipofobia, implicam a instalação, na membrana, de mecanismos específicos. No caso de partículas complexas ou mesmo de macromoléculas, a captação tira partido da plasticidade da membrana, que se deforma especialmente para abraçar os corpos a captar e os interiorizar, submetendo-

os de seguida a um processo interno de digestão, que faz apelo à intervenção dos lisossomas (Araújo 2002).

Alguns nutrientes são absorvidos sob a forma pequenas moléculas, sendo a sua dimensão compatível quer com a arquitetura molecular da membrana, quer com sistemas de transporte molecular nela inseridos. Para estes, identificam-se diversas vias ou mecanismos de transporte membranar diferentes. Importa salientar desde já que estes mecanismos são diferentes se o transporte se efetua "a favor" dos gradientes de potenciais químicos ou eletroquímicos ou se, pelo contrário, se processa "em contra corrente". Por sua vez, outros nutrientes são captados sob a forma de macromoléculas ou partículas volumosas. Para estes, a célula recorre a sistemas de transporte em massa, que têm por base o mecanismo da endocitose (Araújo 2002).

A maior ou menor facilidade com que as moléculas transitam através da membrana traduz-se pelo coeficiente de permeabilidade, determinado em relação a uma dupla camada fosfolipídica artificial e expresso em mm.s^{-1} . (Araújo 2002)

O coeficiente de permeabilidade é, compreensivamente, função essencialmente de três fatores: a dimensão da molécula, o seu estado de ionização e a sua afinidade para com os lipídeos, por isso têm-se tipos de transporte diferentes para cada molécula (fig 2). Por sua vez, a afinidade de uma substância para com os lípidos traduz-se pelo seu coeficiente de partição, o qual se calcula pela razão entre a solubilidade num óleo determinado e a solubilidade na água (Araújo 2002).

A membrana plasmática funcional é chamada de plasmolema. O plasmolema, do ponto de vista funcional, forma o limite externo da célula onde ela está em contato com o fluido extracelular. A parede celular externa ao plasmolema não é uma barreira funcional entre a célula e o meio (Epstein 1975).

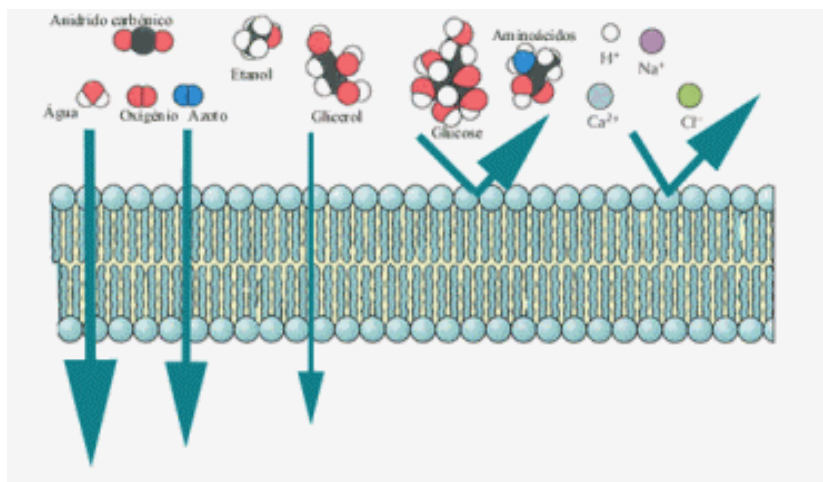


Fig. 2 - Permeabilidade diferenciada de diferentes categorias de moléculas (Araújo 2002).

O processo pelo qual o soluto passa do substrato (solo, solução, nutritiva) para uma parte qualquer da célula (parede, citoplasma, vacúolo). Definem-se dois tipos de mecanismo de absorção (Ferri 1985):

Passivo _ o elemento entra sem que a célula necessite gastar energia deslocando-se de uma região de maior concentração, a solução externa, para outra de menor concentração, a qual corresponde à parede celular, espaços intercelulares e superfície externa do plasmolema; essas regiões delimitam o espaço livre aparente e a quantidade de soluto nele contida corresponde a uns 15% do total absorvido; essa entrada processa-se por fluxo de massa, difusão, troca iônica; os mecanismos são rápidos e reversíveis, isto é, o elemento contido no espaço livre aparente pode sair dele (Ferri 1985).

Ativo _ O processo ativo de absorção faz com que o soluto atravesse a barreira lipídica do plasmolema, atingindo o citoplasma; deste, o elemento pode chegar ao vacúolo depois de vencer a outra barreira representada pelo tonoplasto, para isso a célula tem que gastar energia, uma vez que o elemento caminha contrário ao gradiente químico, o mecanismo ativo é lento e irreversível (Ferri 1985).

O transporte por carreador pode ser ativo ou passivo, enquanto o transporte por canal iônico é sempre passivo. O transporte passivo é aquele que ocorre ao longo

de um gradiente eletroquímico e, às vezes, é chamado de difusão facilitada, quando envolve um canal iônico ou um carregador (Faria 2000).

Todos estes tipos de transporte podem ser evidenciados quando a planta é colocado sob estresse salino, mas os trabalhos realizados nessa área levaram a concluir que alterações adaptativas a esse estresse só foram observadas no que diz respeito ao transporte H^+ / Na^+ na membrana plasmática (Luttge 1993).

5.1. Transporte Passivo

Designam-se genericamente por transportes passivos, todos aqueles que não impliquem, por parte da célula, dispêndio de energia. Englobam-se nesta categoria, os transportes de eletrólitos ou de não eletrólitos que se efetuam, respectivamente, a favor do gradiente de potenciais eletroquímicos ou de concentrações, sendo que o fluxo de transporte passivo aumenta com a concentração (Fig. 3). Há todavia que distinguir duas situações distintas, decorrentes da natureza das moléculas e das suas permeabilidades: ou se trata de substâncias que podem atravessar a membrana por simples difusão ou, pelo contrário, de moléculas que não o podem e, para as quais, a célula dispõe de mecanismos especializados, que seriam as proteínas, facilitando o respectivo tráfego (Araújo 2002).

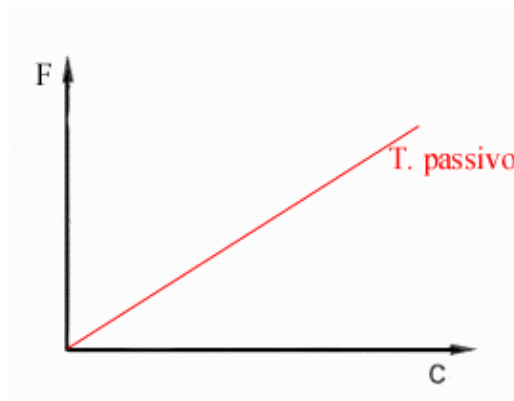


Fig 3 - Variação do fluxo de transporte passivo em função da concentração, independente da unidade (Araújo 2002).

5.1.1. Osmose

As membranas biológicas são em maior ou menor grau seletivamente permeáveis, isto é, permitem a passagem do solvente e de determinados solutos dependendo do seu tamanho, natureza e carga elétrica. Essas membranas semipermeáveis constituem um pré-requisito básico, tanto para definir, como para determinar a pressão osmótica (Souza 1988).

O processo osmótico ocorre nos vegetais e pode facilmente ser demonstrado por diversos experimentos. A água e os sais solúveis penetram no vegetal através dos pelos das raízes (Souza 1988).

Na região dos pêlos, a concentração em solutos é maior do que a concentração de solutos na água do solo. A pressão osmótica dentro das raízes deve ser maior que a pressão osmótica na água do solo, para que tenha lugar a entrada de água; se esta condição não for preenchida, cessa a crescimento da planta, pois, em geral, o crescimento da planta é afetado quando declina a salinidade do solo (Souza 1988).

A célula vegetal é vulnerável aos ambientes hipertônicos, que seriam meios com maior concentração de solutos em relação a célula. A saída da água contida no seu vacúolo, quando em meio hipertônicos, provoca uma diminuição do volume celular e, conseqüentemente, o afastamento da membrana plasmática relativamente à parede celular. Este fenômeno designa-se comumente por plasmólise (Fig. 4) (Araújo 2002).

A grande diferença que se observa entre o coeficiente de permeabilidade da água medido na situação real de uma membrana plasmática e o respectivo coeficiente de difusão (53 m m.s^{-1}), determinado em condições ideais, leva a concluir que a passagem da água não se opera exclusivamente por difusão através da bicamada lipídica, mas que deverão existir poros ou canais por onde as moléculas de água possam transitar mais facilmente. Por sua vez, demonstra-se experimentalmente, que a disposição das proteínas intrínsecas pode também, em certas circunstâncias, favorecer o fluxo de água através da membrana (Araújo 2002).

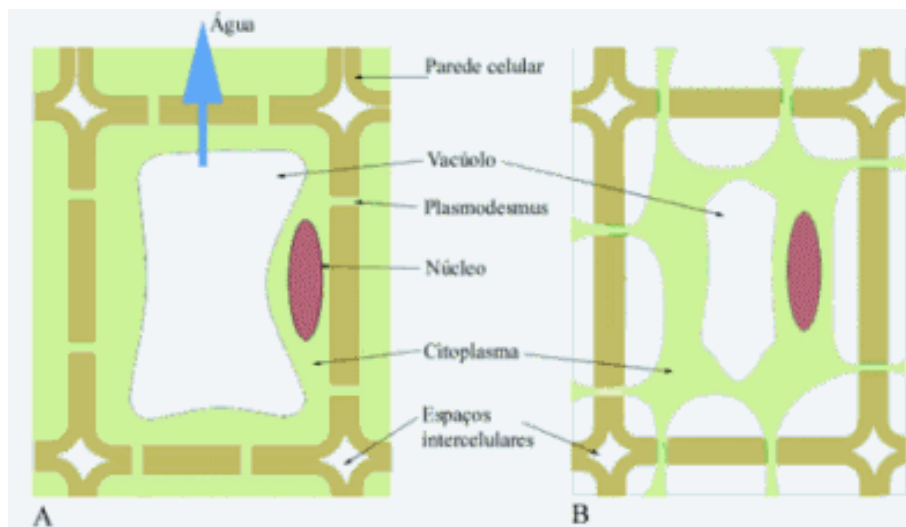


Fig. 4 – Plasmólise. A: Conformação habitual de uma célula vegetal; B: célula vegetal sujeita um meio hipertônico (Gregghi 1999).

5.1.2. Transporte Facilitado

Para as circunstâncias em que a permeabilidade de uma determinada molécula essencial à vida da célula, não permite a sua captação com a destreza requerida pelo metabolismo, a célula dispõe de mecanismos membranares específicos. Se tais mecanismos não dispenderem energia; designam-se genericamente por transporte facilitado. São objeto de transporte facilitado, entre outras moléculas, os monossacáridos, como a glicose, e os aminoácidos. Mas também, em certas circunstâncias, os íons são beneficiários destes sistemas de transporte (Araújo 2002).

O exemplo clássico que ilustra as características deste tipo de transporte, é precisamente o da glicose. Reconhecendo as características que lhe estão associadas, concebe-se um modelo baseado na existência de proteínas (Fig. 5) (Araújo 2002).

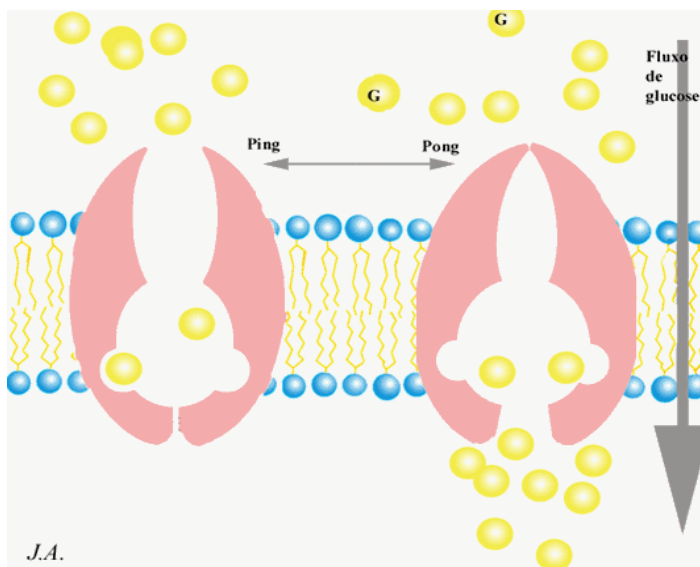


Fig. 5 – Modelo de transporte facilitado da glicose (Araújo 2002).

O transportador de membrana pode assumir duas configurações alostéricas consoante se encontre ligado ou não a uma molécula de glicose. O sentido global do transporte obedece ao gradiente de concentrações transportadoras (intrínsecas) susceptíveis de assumir duas configurações alostéricas consoante se verifique, ou não, a sua ligação específica a uma molécula de glicose (Araújo 2002).

Tal sistema não oferece qualquer preferência de sentido, podendo promover tanto a saída como a entrada de moléculas de glicose. O sentido do fluxo é apenas determinado pelo gradiente de concentração, tal como da difusão simples. Com a diferença, porém, de que permite o trânsito de moléculas que, de outra forma, não transporiam a barreira membranar (Araújo 2002).

Certas substâncias podem tornar as membranas permeáveis aos íons. São geralmente produzidas por microorganismos e atuam como antibióticos já que têm como efeito, contrariar drasticamente os equilíbrios iônicos funcionais das células. Designam-se pelo termo genérico de ionóforos e podem apresentar estruturas muito diversas. Apresentam em comum a característica de serem pequenas edificações

moleculares hidrófobas, que se dissolvem facilmente na bicamada lipídica (Araújo 2002).

Distinguem-se essencialmente duas categorias de ionóforos: aqueles que determinam a formação transitória de um canal e os que, sendo móveis, se comportam como barquetas, assegurando o transporte os íons entre as duas faces da membrana (fig. 6). Enquanto que o fluxo iônico proporcionado pelos primeiros não é afetado por um abaixamento da temperatura, o fluxo assegurado pelos ionóforos móveis, diminui em idênticas circunstâncias. Compreende-se que assim seja, dado que a "agilidade" das barquetas depende da fluidez da membrana e esta característica é função da temperatura. Em ambos os casos, o transporte respeita o gradiente eletroquímico que, como se sabe, em condições naturais, é bastante acentuado, e garantido pelas bombas de transporte ativo de íons. (Araújo 2002)

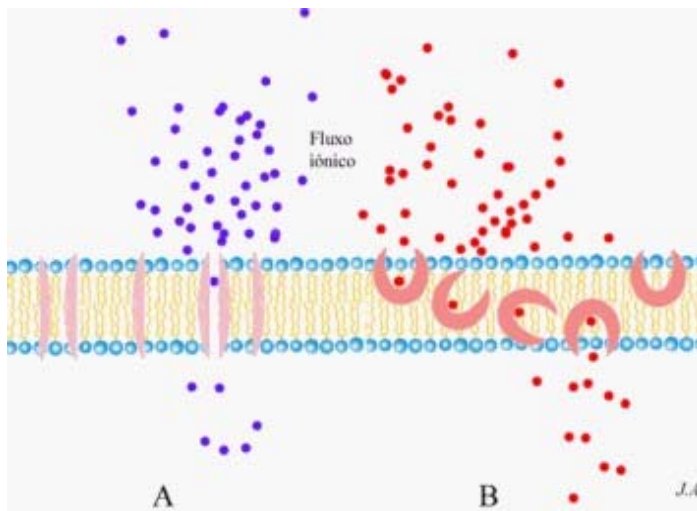


Fig. 6 – Ionóforos. A: ionóforos tipo "canal", de existência transitória; B: ionóforos tipo "barqueta", dotados de elevada mobilidade na camada lipídica (Araújo 2002).

5.2. Transporte Ativo

As células também necessitam de proteínas que ativamente bombeiem certos solutos através da membrana contra seus gradientes eletroquímicos. Esse

processo, conhecido como transporte ativo é sempre mediado por proteínas carreadoras. No transporte ativo, proteínas carreadoras podem agir como bombas para transportar um soluto contra o seu gradiente eletroquímico, usando energia fornecida pela hidrólise de ATP (Gregghi 1999).

As células usam a energia armazenada no ATP para absorver solutos ativamente. O ATP libera energia quando um dos seus fosfatos é hidrolizado formando ADP e fosfato inorgânico. Essa reação é catalisada por uma enzima aparentemente presente em toda membrana, ela é chamada abreviadamente de ATPase. A maioria da energia liberada pelas ATPases encontradas na membrana é usada para transportar prótons de um lado da membrana para outro contra o gradiente eletroquímico (Salisbury 1992).

5.2.1. Bombas Iônicas

A energia livre liberada durante o movimento de um íon inorgânico a favor de seu gradiente eletroquímico é usada como a fonte de energia para bombear outros solutos contra seus gradientes eletroquímicos. Assim, essas proteínas funcionam como transportadores acoplados - algumas como simportadores outras como antiportadores. Na membrana plasmática de células animais, o sódio é o íon usualmente co-transportador, cujo gradiente eletroquímico fornece a força impulsora para o transporte ativo de uma segunda molécula. O sódio que entra na célula durante o transporte é subsequentemente bombeado para fora pela sódio potássio ATPase a qual, por manter o gradiente de sódio, indiretamente fornece energia para o transporte. Por essa razão diz-se que os carreadores impulsionados por íons medeiam o transporte ativo secundário, enquanto as ATPases transportadoras medeiam o transporte ativo primário. Assim, o transporte por proteínas carreadoras pode ser ativo ou passivo enquanto o transporte por canais iônicos é sempre passivo (Gregghi 1999).

A clonagem de DNA e os estudos de sequenciamento mostraram que as proteínas carreadoras pertencem a um pequeno número de famílias, cada uma das quais compreende proteínas com seqüências similares de aminoácidos e que se

supõem terem evoluído de uma proteína ancestral comum atuarem por um mecanismo similar (Greggi 1999).

A necessidade da existência de bombas iônicas decorre do fato de, por exigências funcionais, deverem manter-se elevados desníveis dos teores relativos a diferentes íons, entre o interior da célula e o exterior (Araújo 2002).

No caso específico do sódio e do potássio, que é a mais importante, seria expectável que, a não existirem mecanismos de bombeamento de íons que contrariem o gradiente, rapidamente se atingiria o equilíbrio, graças à simples difusão dos íons através dos respectivos canais. Graças porém às bombas de sódio/potássio, os fluxos passivos de saída do potássio e de entrada do sódio, são constantemente contrariados por fluxos ativos. Assim se mantêm os desníveis de teor destes dois íons (Fig. 7) (Araújo 2002).

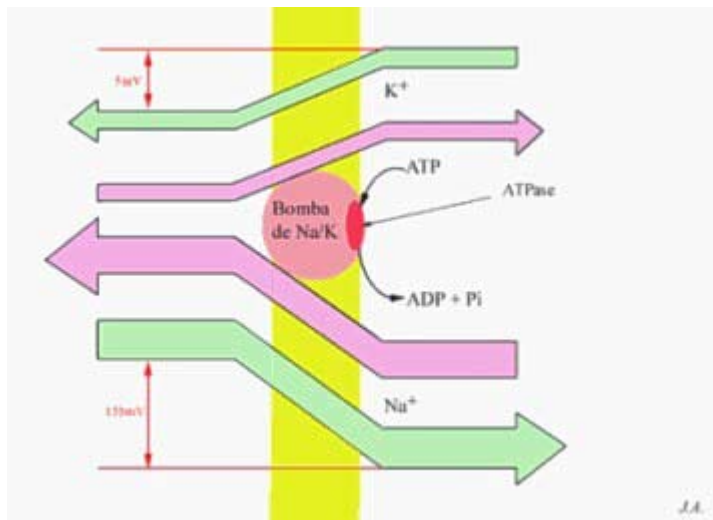


Fig. 7 – Esquema mostrando o funcionamento da Bomba de Sódio e Potássio.

Foram os pesquisadores Hodgkin & Keynes que observaram que o sódio intracelular passava para o meio extracelular por um sistema que consumia energia metabólica, e que esse processo dependia da presença de potássio. Para transportar sódio para fora e potássio para dentro da célula, a bomba retira energia da hidrólise de ATP. Para cada ATP hidrolisado, três íons Na são removidos da célula e dois íons K

são levados para dentro. Assim, a cada ciclo, uma carga positiva é transferida para o meio extracelular. A corrente gerada por essa bomba ajuda a formar o potencial transmembrana. Quando ela é estimulada a bombear íons em grande velocidade, sua corrente passa a contribuir de modo relevante para a formação do potencial de membrana, atuando no sentido de hiperpolarizar a célula. A própria concentração desses íons nos meios intra e extracelular que ativam a atividade dessa proteína (Garcia 1998).

Os gradientes de concentração que se cria com a atividade da bomba Na / K são usados como fonte de energia para que se processem os fenômenos da despolarização e da repolarização das células excitáveis. Servem, também, para promover os diversos fluxos iônicos dos tipos co-transporte e contratransporte. No co-transporte, a movimentação de um cátion arrasta consigo um ânion e no contratransporte, substâncias ou íons de mesma polaridade são trocados entre os lados interno e externo da membrana (Garcia 1998).

5.2.2. Co-transporte

Os processos de co-transporte utilizam a energia armazenada na força motriz protônica, ou seja, no gradiente de potencial eletroquímico criado pela extrusão de prótons (H^+). Bimembranas de fosfolipídeos puros são bastante impermeáveis ao H^+ . Membranas de vegetais possuem proteínas transportadoras para o H^+ . Estas permitem ao H^+ a se difundir de volta à célula e a estrutura da membrana é tal que só permite este retorno se ele se move com outro íon ou soluto. Logo a força motriz protônica gerada pelo transporte eletrogênico de H^+ é usada para conduzir o transporte de muitas outras substâncias contra o seu gradiente eletroquímico. Este transporte acoplado e simultâneo de dois íons ou moléculas por um único carregador é chamado co-transporte (Faria(b) 2000).

Existem dois tipos principais de co-transporte, o simporte e o antiporte. No primeiro caso duas substâncias movem-se na mesma direção através da membrana. Existem carreadores específicos para diferentes ânions, co-transportados com H^+ .

Neste caso, observamos o mecanismo molecular do íon acompanhante, neste mecanismo o H^+ se move a favor de seu gradiente eletroquímico, enquanto que o ânion ou moléculas neutras são transportadas ativamente (Faria(b) 2000).

Nos mecanismos de antiporte, a absorção de H^+ é usada para transportar cátions simultaneamente para fora das células (troca iônica). Neste caso, o carreador combina-se com o H^+ do lado externo da membrana e com o cátion (sódio, por exemplo) no lado interno (Faria(b) 2000).

A glicose é transportada para fora da célula por transporte facilitado e as bombas de sódio/potássio eliminam, da célula, o excedente de Na^+ (Fig. 8). Ainda que na etapa propriamente dita de captação da glicose, não se tenha verificado consumo direto de ATP, o certo é que, globalmente, o processo é consumidor de energia, pois implica, de forma diferida é certo, o funcionamento das bombas de sódio/potássio (Araújo 2002).

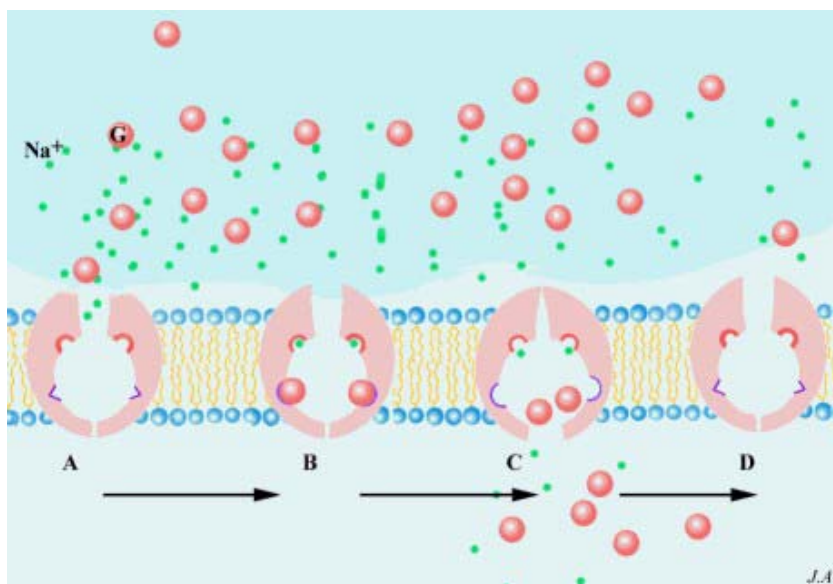


Fig. 8 – Mecanismo membranar do co-transporte da glicose e do sódio. A: transportador acessível ao meio externo com sítios de fixação do sódio, ativos, e sítios de fixação da glicose, inativos; B: a fixação do sódio induz a alteração alostérica que permite fixação da glicose; C: transportador sofre alteração alostérica, expõe-se ao citossol e liberta a glicose e o sódio; D: retorno à situação inicial (Araújo 2002).

5.3. Transporte em massa

Os sistemas que se descreveram anteriormente, destinam-se todos ao transporte de moléculas ou íons de porte relativamente pequeno. Quando porém se trata de captar uma macromolécula, tal como uma proteína, ou mesmo uma partícula maior, que pode mesmo ser uma bactéria, os mecanismos descritos já não são adequados. Nestes casos, a célula recorre ao mecanismo da endocitose, que consiste basicamente na formação de uma depressão membranar, seguida do envolvimento de uma porção do meio extracelular onde a(s) partícula(s) se encontra(m) e da invaginação da membrana e, finalmente, a formação de uma vesícula, denominada genericamente por endossoma. Deve-se citar que esses processos ocorrem principalmente em células animais (Araújo 2002).

A pinocitose ("célula bebendo") envolve a ingestão de fluidos e solutos através de vesículas pequenas (150nm de diâmetro) a fagocitose ("célula comendo") envolve a ingestão de partículas grandes como microorganismos e pedaços de células, via vesículas grandes denominadas fagossomos, geralmente maior que 250nm de diâmetro (Fig. 9). Embora a maioria das células eucarióticas esteja, continuamente, ingerindo fluidos e solutos por pinocitose, partículas grandes são ingeridas principalmente por células especializadas em fagocitose. Pode-se observar na figura um exemplo (Greggi 1999).

A fagocitose, em protozoários, é uma forma de alimentação: partículas grandes captadas por endossomos chegam até os lisossomos e os produtos do processo de digestão subsequente chegam ao citosol para serem utilizados como alimento. Entretanto, poucas células em organismos multicelulares, são capazes de ingerir, eficientemente partículas grandes, e no intestino do animais, por exemplo, partículas grandes de alimento são quebradas no meio extracelular antes de serem importadas para a célula (Fig. 9). A fagocitose é importante, para a maioria dos animais, para outros processos que não de nutrição. Em mamíferos existem dois tipos de glóbulos brancos no sangue especializados em fagocitose: macrófagos e neutrófilos que nos

defendem contra infecções, ingerindo os microrganismos invasores. Para que sejam fagocitadas as partículas devem, em primeiro lugar, ligar-se a superfície do fagócito (Gregghi 1999).

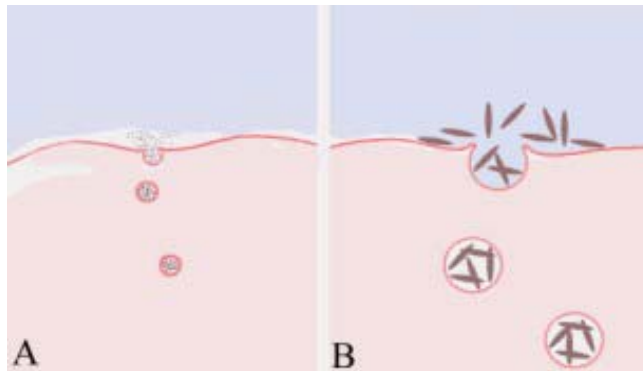


Fig. 9 – Endocitoses. A: pinocitose; B: fagocitose (Araújo 2002).

Em muitas células a endocitose é tão extensiva que uma grande fração da membrana plasmática é internalizada a cada hora. Os componentes da membrana plasmática (proteínas e lipídeos) são continuamente retornados à superfície celular em um ciclo endocítico-exocítico em grande escala, que é, em sua maior parte, mediado por cavidades e vesículas recobertas por clatrina. Muitos receptores da superfície da célula, que ligam macromoléculas extracelulares específicas, localizam-se em cavidades recobertas com clatrina, num processo denominado endocitose mediado por receptores (Gregghi 1999).

As vesículas endocíticas recobertas, rapidamente perdem sua cobertura de clatrina e se fundem com os endossomos prematuros. Muitos ligantes se dissociam de seus receptores no ambiente ácido do endossomo e acabam chegando aos lisossomos, enquanto muitos dos receptores são reciclados, via vesícula de transporte, de volta para superfície da célula para serem reutilizadas. Mas, complexo ligante-receptor pode

seguir outras vias, a partir do compartimento endossomal. Em alguns casos, ambos, receptor e ligante, acabam sendo degradados nos lisossomos, causando a "down regulation" dos receptores (Greghi 1999)

6. Experimento: Beterraba – *Beta vulgares*

6.1. Metodologia

Foi preparado uma bateria com 7 tubos de ensaio. Cada tubo de ensaio receberá cerca de 10 ml de uma das soluções: CaCl₂ (1mM), CaCl₂ (100mM), CaCl₂ (10mM), EDTA (10mM) e um com água. Os dois tubos de ensaio restantes receberam 10 ml de CaCl₂ (10mM) cada, mas sendo destinados aos tratamentos com diferentes temperaturas (Faria(a) 2000)

As fatias de beterraba (*Beta vulgares*) foram cortadas com as medidas de 1 cm de largura, 3 cm de comprimento e 2 mm de espessura, aproximadamente. As fatias foram lavadas em água corrente durante cerca de 3 minutos e depois enxaguadas em água destilada (Faria(a) 2000).

Foram colocadas duas fatias em cada tubo de ensaio, com exceção do tubo de ensaio com água que é usado somente para “zerar” o espectrofotômetro. Imediatamente um tubo de ensaio com CaCl₂ foi colocado na geladeira a 0°C e outro no banho-maria a 70°C (Faria(a) 2000).

Após 30 minutos as fatias foram retiradas com o auxílio das pinças e foi feita a leitura da absorbância das soluções a 540 nm no espectrofotômetro (Faria(a) 2000).

6.2. Resultados

No espectrofotômetro foi observado o valor da absorbância em cada solução. Pode-se observar, os valores encontrados, através da Tabela.

Tabela – Absorbância média da *Beta vulgaris* em diferentes soluções.

Tratamento	Absorbância Inicial (T₀)	Absorbância Final (T₃₀)
CaCl ₂ (1mM)	0	0,04
CaCl ₂ (100mM)	0	0,005
EDTA (10mM)	0	0,06
CaCl ₂ (10mM)	0	0,035
CaCl ₂ (10mM) (0°C)	0	1,00
CaCl ₂ (10mM) (70°C)	0	1,50

6.3. Discussão dos resultados

O funcionamento normal da membrana pode ser afetado por vários fatores, incluindo a presença de diferentes íons. Em geral, têm-se reconhecido que os cátions monovalentes aumentam a permeabilidade da membrana às substâncias, enquanto os cátions divalentes ou trivalentes diminuem-na (Faria(a) 2000).

O cálcio é de importância fundamental para a impermeabilidade e seletividade da entrada e saída de solutos através da membrana. Foi observado no

experimento que quanto maior a concentração de CaCl_2 , menor é a absorvância medida no espectrofotômetro (Faria(a) 2000).

Muitos autores realizaram diversos trabalhos com soluções de cálcio e comprovaram a importância do cálcio na membrana. O cálcio ajuda na manutenção das ligações entre as proteínas e a camada lipídica, tanto que usam o termo de “membrana furada” na ausência de cálcio. Além disso, os pesquisadores também concluíram que o cálcio é importante para evitar o efluxo de nutrientes (Malavolta, 1980).

O EDTA faz com que tecidos vegetais tenham sua capacidade de absorver e reter solutos diminuída, exatamente pelo fato do EDTA agir como quelante, retirando o cálcio do tecido. Portanto, em solução de EDTA observa-se um valor um pouco maior na absorvância (Faria(a) 2000).

A 0°C é uma temperatura baixa em que produz cristais de gelo que geralmente resultam em rompimento do protoplasma, causando danos às células e às membranas, e conseqüentemente ocorre um aumento da permeabilidade (Faria(a) 2000).

Até 60°C ocorre um aumento da permeabilidade, mas neste ponto ocorre a morte da maioria das células causando um aumento irreversível na permeabilidade da membrana. No caso do experimento, foi usada a temperatura de 70°C , portanto o valor da permeabilidade foi muito alto, devido à morte das células (Faria(a) 2000).

7. Bibliografia

- ARAÚJO, J. 2002. *Nutrição Celular*. Versão: 24/04/2002. URL: <http://www.dbio.uevora.pt/biologia1-novo/>
- EPSTEIN, E. 1975. *Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas*. Tradução e notas E. Malavolta. LTC, Rio de Janeiro, RJ.
- FARIAa, C.R. 2000. *Manual de Laboratório de Fisiologia Vegetal*. In: Absorção e Metabolismo de Sais. Edunb. Brasília, DF. pp. 13-14.

- FARIAS, C.R. & CALBO, M.E. & CALDAS L.S. 2000. *Guia de estudos para fisiologia vegetal*. In: Sano, A.C. & Amaral, L.I. (eds.) *Absorção de Sais Minerais* Edunb. Brasília, DF. 3 ed.
- FERRI, M. G. 1985. *Fisiologia Vegetal* v. 1. Editora Pedagógica e Universitária, São Paulo, SP. pp. 77-117.
- GARCIA, E. 1998. *Biofísica* Editora Sarvier.
- GREGHI, C.M. 1999. *Membrana Celular*. Versão: 24/04/2002. URL: <http://www.terraviva.pt/bilene/5547/biologia/Celula/Transp17.htm>
- HENEINE, I.F. 1990. *Biofísica Básica*. Rio de Janeiro.
- LUTTGE, U. 1993. *Plant Cell Membranes and Salinity: Structural, Biochemical and Biophysical Changes*. R. Bras. Fisiol. Veg. 5(2):217-224.
- MALAGHINI, M.C. 1999. *Potencial da Membrana*. Versão: 24/04/2002. URL: <http://www.geocities.com/~malaghini/potencial2.html>
- MALAVOLTA, E. 1980. *Elementos de Nutrição Mineral de Plantas* Editora Agronômica Ceres, São Paulo, SP. pp. 9-80.
- SALISBURY, F.B. & ROSS, C.W. 1992. *Plant Physiology*. 4th ed. Belmont, California, Wadsworth.
- SOUZA, N.J.M. 1988. *ABC dos Processos Osmóticos nos Seres Vivos*. In: *Osmose nos vegetais*. Scientia et Labor, Curitiba, PR. pp. 39-45.