

Roteiro prática sobre potencial de membrana e permeabilidade

Prof. Ricardo M. X. Leão

Parte 1-Demonstração da criação de uma diferença de potencial por soluções com diferentes concentrações iônicas.

Nessa parte iremos demonstrar a formação de uma diferença de potencial entre duas soluções de concentrações iônicas diferentes, usando eletrodos seletivos, demonstrando assim a lei de Nernst do equilíbrio eletroquímico.

Iremos simular uma membrana seletiva ao cloreto usando eletrodos de cloreto de prata mergulhados em uma solução de cloreto de potássio. Nessa situação a corrente passa pelo eletrodo como íons cloreto na seguinte reação: $\text{Ag}^+ + \text{Cl}^- \leftrightarrow \text{AgCl} + \text{e}^-$. Assim se aplicarmos uma corrente negativa pelo eletrodo, ela retira os íons cloreto do eletrodo, doando o elétron ao átomo de prata e liberando Cl^- na solução. Inversamente, se o fluxo de corrente for positivo, o íon cloreto é depositado no eletrodo, liberando o seu elétron para fluir pelo metal (prata) do eletrodo. Dessa forma precisamos ter cloreto tanto no eletrodo quanto na solução para fluir a corrente. O eletrodo simula assim um canal seletivo para cloreto.

Para essa prática temos a nossa disposição:

- 1 – dois bequeres de 50 ml cada.
- 2 – solução de KCl 100 mM, 10 mM e 3 M.
- 3 – solução de KCl de concentração desconhecida (X mM).
- 4- pontes de Agar/KCl 3 molar.
- 5 – eletrodos de Ag/AgCl (para fazê-los basta mergulhar o fio de prata em solução de hipoclorito de sódio, também conhecida como água sanitária).
- 6 – multímetro.
- 7 – agitadores magnéticos.
- 8 – fios de cobre.
- 9- termômetro.
- 10- conectores do tipo “jacaré”.

Procedimentos

1-preencha um bequer com 30 ml da solução de KCl de 100 mM e outro com 30 ml da solução de KCl de 10 mM.

2-conecte as pontes de agar, já preparadas, aos dois béqueres. Elas são importantes para fecharmos o circuito e a corrente fluir pelo sistema.

3-submerja os dois eletrodos de prata, já cloretados, nos dois béqueres, e conecte-os ao multímetro. Selecione o modo do multímetro para medirmos diferenças de voltagem, e a escala para podermos ver alterações de milivolts.

4-coloque uma barras magnéticas no béquer com KCl 10 mM (solução teste) e o posicione no agitador magnético, e comece a agitar a solução levemente. Observe a diferença de potencial mostrada no multímetro e anote.

5-agora adicione no bequer com KCl 10 mM, 100 μ l da solução de KCl 3 M. Observe a alteração da diferença de potencial no visor do multímetro e assim que ela estabilizar anote.

6-repita esse procedimento adicionando 101 μ l; 205 μ l; 208 μ l e 320 μ l da solução de KCl 3M, anotando sempre os valores de diferença de potencial mostrados no visor do multímetro.

7-calcule as concentrações de KCl em cada situação.

8- retire a solução KCl teste e substitua por uma solução de KCl 10 mM nova. Adicione 100 μ l da solução KCl de concentração desconhecida (X mM) e anote a diferença de potencial observada.

9- retire a solução de KCl teste e substitua por uma solução de KCl 100 mM. Anote o valor da diferença de potencial observado no visor do multímetro.

10-mergulhe o termômetro na solução teste e anote a temperatura.

Agora vamos usar um programa de planilhas como o MS Excel e construir um gráfico de dispersão da concentração de KCl versus a diferença de potencial registrada. Primeiro calcule a concentração final de KCl após cada adição de KCl 3 M. Coloque esses valores em uma coluna e os valores de diferença de potencial em outra coluna. Agora subtraia desses valores o valor de potencial medido com as duas soluções de KCl de 100 mM. Esse valor representa o “offset” do sistema, ou seja, diferenças de potencial elétrico entre os dois eletrodos. Faça um gráfico do logaritmo (log) da concentração de potássio teste versus a diferença de potencial medida (menos o “offset”). Agora obtenha o valor da concentração de potássio “X” a partir do gráfico.

Calcule pela equação de Nernst o potencial de equilíbrio eletroquímico do cloreto para cada situação e coloque esses valores em uma coluna de acordo com a concentração teste de KCl. Adicione ao gráfico dos valores experimentais os dados do potencial de equilíbrio do cloreto e compare com os valores experimentais. Comente os seus resultados.

Parte 2-Demonstração da influência da permeabilidade iônica seletiva no potencial de membrana usando um modelo computacional simples.

-Nessa parte usaremos a equação de Goldman-Hodgkin-Katz (GHK) para demonstrar a relação do potencial de repouso da membrana com a sua permeabilidade iônica aos diferentes íons presentes fisiologicamente.

A equação GHK simplificada para o sódio e o potássio é mostrada abaixo

$$E_m = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K [K^+]_o + P_{Na} [Na^+]_o}{P_K [K^+]_i + P_{Na} [Na^+]_i}$$

Use a lição 1 do programa METANEURON que é um simulador da equação acima. Vá em <http://www.metaneuron.org/> e baixe o software *MetaNeuron*. Baixe também o manual do programa.

Nos painéis podemos controlar as concentrações de sódio e de potássio fora e dentro da célula, e suas permeabilidades. A partir da equação de Nerst o programa calcula o potencial de equilíbrio para cada íon, mostrando-os em uma janela e no gráfico temos linhas representando o potencial de repouso da membrana, em amarelo, e os potenciais de equilíbrio do potássio e do sódio, em azul e verde respectivamente.

-Para iniciar altere as concentrações **intracelulares** de potássio para 130 mM, que é um valor característico da concentração intracelular de potássio na maioria das células.

1) Nesse exercício vamos estudar como as alterações da concentração de potássio extracelular afetam o potencial de repouso. Meça o potencial de repouso da membrana (E_m , linha amarela) e o potencial de equilíbrio do potássio (E_K , linha azul) em diferentes concentrações de potássio extracelulares: 1 mM, 3 mM (concentração inicial), 6 mM, 12 mM, 18 mM, 24 mM, 32 mM, 64 mM e 128 mM.

-Usando um programa de computador, como o Microsoft Excel, por exemplo, plote os valores de E_K e E_m contra o logaritmo (log) da concentração de potássio extracelular. Compare os dois gráficos e explique a diferença. Sugestão: Plote as duas curvas no mesmo gráfico para facilitar a comparação.

2) Nesse exercício vamos estudar como as alterações da concentração de sódio extracelular afetam o potencial de repouso. Meça o potencial de repouso da membrana (E_m , linha amarela) e o potencial de equilíbrio do sódio (E_{Na} , linha verde) em diferentes concentrações de sódio extracelulares: 120 mM (concentração inicial), 200 mM, 60 mM, 30 mM, 15 mM e 5 mM . Plote ambos os valores contra o logaritmo (log) concentração de sódio extracelular. Compare os dois

gráficos e explique a diferença. Sugestão: Plote as duas curvas no mesmo gráfico para facilitar a comparação.

3) Nesse exercício vamos estudar o efeito da permeabilidade iônica no potencial de repouso da membrana. Compare as permeabilidades da membrana, mostradas nos painés, ao sódio e ao potássio dadas pelo programa e explique como elas influenciaram os gráficos das questões 1 e 2? Refaça os gráficos trocando a permeabilidades do sódio pela do potássio, e vice-versa. Explique os resultados.