

CAPÍTULO XI

Calorimetria aplicada a membranas e proteínas

KARIN A. RISKE E KATIA REGINA PEREZ - DEPARTAMENTO DE BIOFÍSICA
DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

A **Calorimetria**, do latim *calor* = calor e do grego *metria* = medida, é uma ciência que mede a quantidade de calor transferida entre um sistema e seus arredores. Qualquer processo que resulte na liberação ou absorção de calor é um candidato a um estudo calorimétrico. Portanto, não é surpreendente descobrir que a calorimetria tem um vasto campo de aplicações com exemplos variando de desenho de novas drogas para a indústria farmacêutica ao controle de qualidade de processos em larga escala da indústria química e ao estudo de biomoléculas em ciência básica.

Neste capítulo, serão abordados conceitos básicos de Termodinâmica diretamente relacionados à calorimetria, os principais acontecimentos históricos que marcaram o desenvolvimento da calorimetria e os princípios da medida de uma das técnicas calorimétricas mais utilizadas atualmente, a calorimetria diferencial de varredura (DSC). Por fim, serão apresentadas e discutidas algumas aplicações da calorimetria para o estudo de biomoléculas como lipídios e proteínas.

CONCEITOS BÁSICOS

Calor é a energia em trânsito decorrente de uma diferença de temperatura entre dois corpos. De acordo com a segunda Lei da Termodinâmica, o calor sempre flui do corpo mais quente para o corpo mais frio, até que a temperatura dos

dois corpos se iguale. Portanto, trocas de calor vêm, em geral, acompanhadas de mudanças de temperatura. Entretanto, a relação entre calor trocado por um corpo e variação de sua temperatura depende das propriedades do corpo em questão. Isto ocorre, pois cada substância apresenta uma capacidade distinta de armazenamento de energia interna. A transferência de energia para um corpo pode aumentar a energia cinética de suas moléculas, elevando sua temperatura, mas pode também aumentar a rotação e vibração destas moléculas, assim como alterar sua energia potencial, o que não causa variação de temperatura. A grandeza física que define a capacidade de um corpo de absorver calor e aumentar sua temperatura é o **calor específico**, denotado por ***C***. Cada substância apresenta um calor específico característico, e valores de *C* para diversas substâncias podem ser encontrados em tabelas. O calor específico de uma substância representa a quantidade de calor necessária para aumentar em 1°C a temperatura de 1g desta substância. Assim, o **calor trocado**, ***Q***, entre uma substância de massa *m* e os arredores é dado em função da variação de temperatura decorrente, ΔT , através da seguinte fórmula:

$$Q = C m \Delta T \quad (\text{eq. 1})$$

O sinal de *Q* indica se a substância absorveu (sinal positivo) ou liberou calor (sinal negativo), resultando em um aumento ou diminuição de sua temperatura, respectivamente. O produto ***C.m*** é chamado de **capacidade térmica** do corpo de massa *m*. O calor específico *C* varia bastante entre diferentes substâncias. Em especial, o calor específico da água está entre os mais altos encontrados: 1 cal/g.°C (ou 4,18 J/g.°C). Em comparação, o ar apresenta um calor específico cerca de quatro vezes menor, enquanto os metais exibem calores específicos tipicamente dez vezes menores que o da água. Por este motivo, a água é utilizada para resfriar motores de carro e máquinas industriais. Do mesmo modo, grandes porções de água, como lagos e mares, são responsáveis por atenuar diferenças de temperatura entre estações do ano. Um exemplo clássico é o efeito da corrente do golfo, que leva águas quentes do golfo do México para o continente europeu, tornando-o mais quente que outras regiões da Terra de mesma latitude.

O alto calor específico da água é explicado pelo grande reservatório de energia potencial da água, basicamente devido ao grande número de ligações de hidrogênio entre as moléculas de água. Desta forma, ao absorver calor, gran-

de parte da energia é utilizada para romper ligações de hidrogênio e somente uma pequena porção é revertida em aumento da energia cinética das moléculas, o que efetivamente aumenta a temperatura da água.

Como o calor trocado entre um sistema e seus arredores não é uma função de estado, é necessário definir em que condições o processo de troca de calor é efetuado. Mais especificamente, define-se C_p o calor específico a pressão constante e C_v o calor específico a volume constante. Para gases, os valores de C_p e C_v podem ser bem distintos. A relação entre C_p e C_v para gases ideais é dada por: $C_p = C_v + R$, onde R é a constante universal dos gases. Logo, C_p de gases ideais é sempre maior que C_v . Entretanto, para líquidos e sólidos, que apresentam baixa compressibilidade, C_p e C_v apresentam valores similares. É importante ressaltar que o calor trocado durante um processo efetuado a pressão constante (Q_p) é igual à **variação de entalpia, ΔH** , do processo:

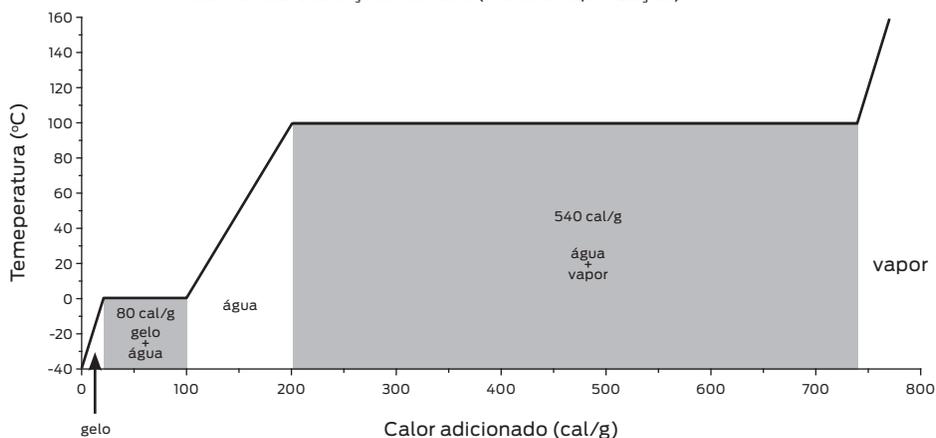
$$Q_p = \Delta H \quad (\text{eq. 2})$$

A discussão acima levou em conta o calor específico de substâncias em um dado estado. Entretanto, mudanças de estado, ou transições de fase, podem ocorrer nas substâncias, o que altera o arranjo de suas moléculas e, portanto, as propriedades desta substância. Quando ocorrem mudanças de estado, uma grande quantidade de calor é absorvida ou liberada pela substância, sem que variações de temperatura decorrentes sejam observadas. Isto ocorre, pois são alteradas as interações entre as moléculas da substância, e, portanto, a energia potencial do sistema muda. Conforme discutido em outros capítulos deste livro, as mudanças de estado se dão entre os estados sólido, líquido e gasoso, e podem ser de fusão, vaporização, condensação, sublimação, etc. Mudanças de estado que diminuem a interação entre as moléculas da substância, como no sentido sólido – líquido – gasoso, requerem absorção de calor para que as interações entre as moléculas sejam rompidas, e são, portanto, processos endotérmicos. Por outro lado, mudanças de estado no sentido contrário, gasoso – líquido – sólido, que envolvem aumento da interação entre as moléculas, são processos exotérmicos acompanhados de liberação de calor. A quantidade de calor absorvida ou liberada para que uma mudança de estado ocorra, depende das interações entre as moléculas da substância que são alteradas na transição, e são características de cada mudança de estado de cada substância. Essa quan-

tidade de calor liberada/absorvida durante uma mudança de estado é chamada de **calor latente**. O termo latente vem do latim *latens*, que significa oculto. Portanto, o calor latente é a porção de calor absorvida/liberada por uma substância, mas que não gera um aumento/diminuição de temperatura.

A Figura 1 mostra a temperatura da água pura (nos estados sólido, líquido e gasoso) à medida que absorve calor. Em cada uma das fases da água (gelo, água líquida e vapor de água), a temperatura apresenta um aumento linear com a quantidade de calor adicionado, seguindo a eq. 1. Entretanto, cada fase apresenta um calor específico distinto, gerando diferentes inclinações: $C = 0,50^{\circ}\text{C}/\text{cal.g}$ (gelo), $1,00^{\circ}\text{C}/\text{cal.g}$ (água) e $0,48^{\circ}\text{C}/\text{cal.g}$ (vapor). Por outro lado, durante as transições gelo-água e água-vapor, uma grande quantidade de calor é adicionada sem causar aumento de temperatura. A quantidade de calor adicionada representa o calor latente de fusão (80 cal/g) e de vaporização (540 cal/g).

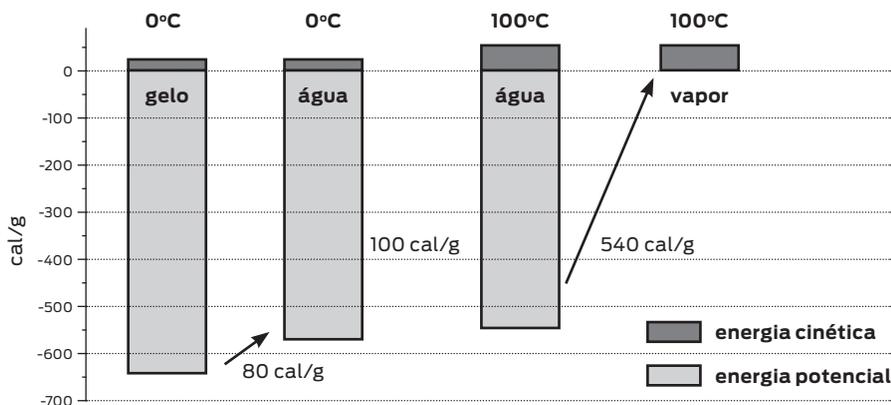
FIGURA 1 – Variação de temperatura da água (nos estados sólido, líquido e gasoso) em função da quantidade de calor adicionado. As áreas em azul indicam o calor latente das transições de fase (fusão e vaporização).



O calor latente de fusão e de vaporização representa a quantidade de calor necessária para alterar a energia potencial das moléculas de água quando ocorre mudança de estado. A Figura 2 ilustra esse fato de uma maneira alternativa à mostrada na Figura 1. Nesta figura, estão representadas as porções de energia potencial e cinética do gelo, água e vapor nas temperaturas de transição de fase. A energia potencial representa basicamente a quantidade de ligações de hidrogênio entre as moléculas de água. A 0°C , o gelo possui uma grande quantidade de

energia potencial armazenada em suas ligações de hidrogênio. Durante o processo de fusão, a 0°C , parte dessas ligações é desfeita, ao que corresponde a absorção de 80 cal/g . Durante a transição, não ocorre mudança de temperatura, e portanto a porção de energia cinética não é alterada. No intervalo de 0 a 100°C , a energia absorvida (100 cal/g) diminui a energia potencial da água e aumenta a energia cinética das moléculas. Na mudança para o estado gasoso, uma grande quantidade de calor é absorvida (540 cal/g), pois todas as ligações de hidrogênio entre as moléculas são desfeitas, e no estado gasoso as moléculas de água não apresentam praticamente nenhuma energia potencial e somente energia cinética.

Figura 2 – Energia interna da água (nos estados sólido, líquido e gasoso) nas temperaturas de fusão, 0°C , e ebulição, 100°C . A porção em cor cinza claro indica a energia potencial, armazenada principalmente nas ligações de hidrogênio entre as moléculas de água, e a porção em cor cinza escuro indica a energia cinética, que depende somente da temperatura. Adaptado de <http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbase/thermo/phase.html#c1>



HISTÓRICO

Embora a sensação térmica sempre tenha sido muito presente no nosso cotidiano, a natureza física do calor foi um tema bastante intrigante na comunidade científica até meados do século XVIII, quando houve um apreciável esforço de cientistas da área para entendê-la.

Neste contexto, as histórias da Calorimetria e da Termometria caminharam juntas até o início do século XVIII quando estas duas áreas da ciência ainda não

eram bem compreendidas, ou seja, não havia uma distinção muito bem estabelecida entre o que é Calor e o que é Temperatura.

Até o início do século XVIII, acreditava-se que a temperatura de equilíbrio de duas substâncias, inicialmente em temperaturas diferentes, era uma média destas temperaturas ponderadas pelos volumes iniciais destas substâncias $[T_{eq} = (T_1V_1 + T_2V_2)/(V_1+V_2)]$. Somente em 1757, o químico escocês Joseph Black (1728-1799), que se preocupava em distinguir calor e temperatura, mostrou que ao misturar água a 78°C com a mesma quantidade de gelo, a temperatura se manteve a 0°C até a fusão completa do gelo. Portanto, este simples experimento, mostrou que esta mistura não respeitava a equação descrita anteriormente, segundo a qual a temperatura de equilíbrio, neste caso, deveria ser de 39°C. Black então propôs que havia um “termo de troca”, o calor, que passava do corpo mais quente para o corpo mais frio e que este termo dependia da natureza do material. Posteriormente, ele ampliou os seus estudos para os fenômenos de fusão e evaporação, postulando que o calor necessário para que houvesse a transição de fase não era desprezível, e que era um calor que se acumulava durante o processo de transição; este calor é o calor latente.

É importante ressaltar que Black tinha um colaborador, o engenheiro também escocês James Watt (1736-1819), que aproveitou os resultados dos experimentos de determinação do calor de vaporização da água para desenvolver um condensador que foi utilizado nas máquinas a vapor, o que revolucionou o campo da engenharia daquela época, o que marca o início da Revolução Industrial.

Além disso, Black e Watt verificaram que a quantidade de calor perdida na expansão do vapor era equivalente à quantidade de calor necessária aplicada para haver a vaporização da água. Neste âmbito, a ideia da “conservação da energia” começa a despontar.

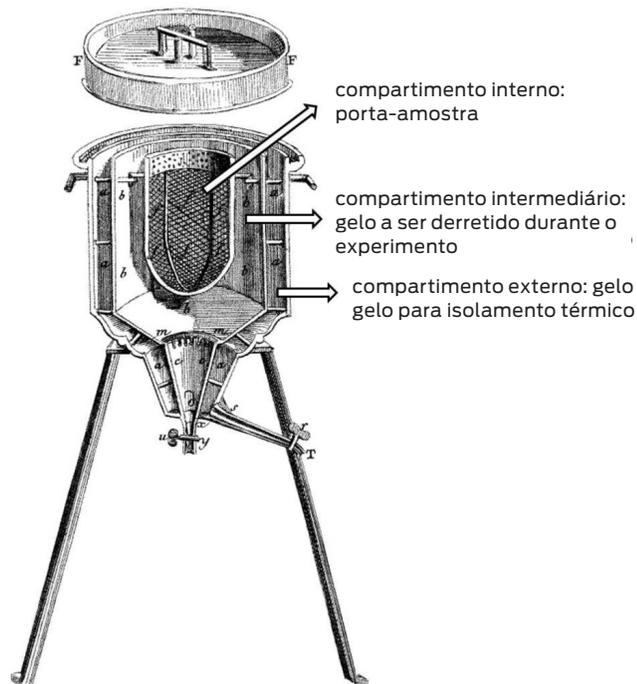
Apesar dos achados de Black, ele não descreveu nada a respeito da natureza do calor. No entanto, ele conclui que deveria haver um fluido imponderável de calor (hipótese corpuscular do calor ou do calórico), o que na época era compartilhado por Lavoisier.

Antoine Laurent Lavoisier (1743-1794), químico francês, era um estudioso do processo de combustão. E, tendo em mente a descoberta do oxigênio por Karl Wilhelm Scheele (1742-1786) em 1771 e sua confirmação por Joseph Priestley (1733-1804) em 1774, Lavoisier postulou que “combustão é um processo no qual algum material combina com oxigênio”. Além disso, uma das principais perguntas

de Lavoisier naquela época era o papel do oxigênio no processo de respiração dos organismos vivos. Baseado nos dados conhecidos de que o oxigênio queimava o carbono dos alimentos, ele determinou que o ar exalado durante o processo respiratório continha dióxido de carbono, que era oriundo da combinação do oxigênio com a matéria orgânica de dentro dos organismos.

Com isso, Lavoisier iniciou outra importante linha de pesquisa relacionada à combustão, que era a medida da quantidade de calor gerada durante este processo. Para tanto, com o auxílio do também francês Pierre Simon, o Marquês de Laplace (1749-1827), que era matemático, físico e astrônomo, estas medidas puderam ser feitas de forma mais precisa utilizando um dispositivo desenhado por eles que foi batizado por Lavoisier como o calorímetro de gelo. Este calorímetro foi inicialmente utilizado para medir o calor específico de substâncias como o mercúrio. Basicamente, este calorímetro tinha três compartimentos, um interno onde a amostra era colocada, um intermediário que circundava o porta-amostra e outro externo para isolamento

FIGURA 3 – Esquema do calorímetro de gelo de Lavoisier-Laplace. Adaptado de [TAVARES].



to térmico, estes dois últimos totalmente preenchidos com gelo (Figura 3). A amostra de massa conhecida e temperatura maior, também conhecida, era colocada no porta-amostras. A temperatura da amostra entrava em equilíbrio com a do gelo do compartimento que a cercava causando um derretimento parcial, que gerava certa massa de água que era posteriormente drenada deste compartimento através de uma torneira e pesada. Como o calor de fusão do gelo já era conhecido graças às contribuições de Black, o calor liberado por este processo poderia ser calculado indiretamente pela massa da água proveniente do gelo fundido. A massa de água que escorria do calorímetro variava de acordo com a temperatura inicial da substância e o calor específico de cada substância (segundo a eq. 1).

Este mesmo aparato foi utilizado por Lavoisier e Laplace para medir o calor de diversas reações, em especial o calor de combustão, o seu maior interesse. Como ele já havia determinado que durante o processo de respiração, gás carbônico era liberado devido à combustão de matéria orgânica, ele procurou medir o calor liberado durante este processo. Para tanto, uma cobaia foi colocada dentro do calorímetro e a quantidade de dióxido de carbono liberada durante o processo respiratório foi medida. A massa de água oriunda do calor liberado durante a respiração também foi medida e o calor total deste processo determinado. Comparativamente, o mesmo experimento foi realizado com uma vela acesa ou com carvão incandescente e a mesma taxa de calor em função da quantidade de dióxido de carbono liberada foi encontrada, levando Lavoisier à conclusão definitiva de que a respiração é um processo de combustão.

Desde o advento da calorimetria no final do século XVIII, diversos dispositivos para a medida da quantidade de calor foram desenvolvidos e com o avanço na área da eletrônica, novos calorímetros têm sido desenhados, possibilitando maior precisão na medida. Além disso, também foram desenvolvidos diversos arranjos experimentais que deram origem a diferentes calorímetros, como: o calorímetro adiabático, os calorímetros de reação, o calorímetro de bomba, o calorímetro de Calvet, o calorímetro a pressão constante, o calorímetro de titulação isotérmica e o calorímetro diferencial de varredura.

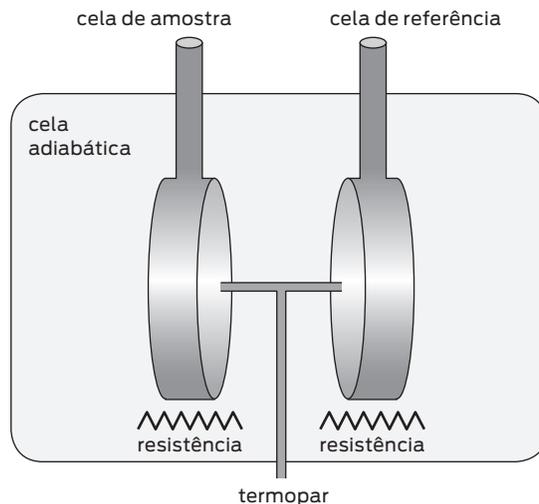
Nas últimas décadas, várias técnicas baseadas em calorimetria diferencial de varredura (DSC) têm sido desenvolvidas para aprimorar as medidas de calor relacionadas com biomoléculas, portanto esta será a técnica calorimétrica abordada em maior detalhe neste capítulo.

PRINCÍPIOS DA MEDIDA DE CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC)

O calorímetro diferencial de varredura mede o calor específico de uma amostra à medida que há uma variação imposta de temperatura. Portanto, o aparelho de DSC é um dispositivo muito utilizado para determinar principalmente o calor envolvido em uma transição de fase: o calor latente. Este tipo de calorímetro pode ter basicamente duas configurações: uma na qual a amostra é sólida e pode ser varrida até altas temperaturas, e outra na qual a amostra está em solução e, portanto, só requer temperaturas entre 0 e 100°C. Aqui, apresentaremos os princípios de medida deste último, que é muito utilizado para estudar biomoléculas como lipídios e proteínas, que serão apresentados na seção seguinte.

O aparelho de DSC é composto basicamente por um compartimento adiabático que acomoda duas celas (uma onde a amostra em estudo é colocada e outra de referência), resistências elétricas utilizadas para variar a temperatura das celas e um sistema de termopar para monitorar a diferença de temperatura entre as celas (Figura 4). Como a amostra está em solução, a referência é normalmente preenchida com o meio em que a amostra é dispersa (geralmente água ou tampão). As celas de amostra e referência são fechadas hermeticamente de modo a permanecerem a pressão constante durante toda a medida.

FIGURA 4 – Diagrama esquemático do aparelho de DSC.



Em um experimento típico de calorimetria, ambas as celas são aquecidas simultaneamente pelas resistências a uma taxa de varredura constante (dada em $^{\circ}\text{C/s}$). Durante o experimento, a potência das duas resistências é continuamente ajustada para que a diferença de temperatura entre as duas celas seja igual a zero. A diferença de potência entre as duas resistências, expressa em (cal/s), é registrada como uma função da temperatura. Se a potência for dividida pela taxa de varredura, resultará em $\text{cal}/^{\circ}\text{C}$, a qual é a unidade de capacidade térmica.

Quando ocorre, por exemplo, uma transição de fase com o aumento da temperatura, a cela de amostra absorve mais calor, o que é compensado pelas resistências, gerando um sinal de diferença de potência que é registrado pelo aparelho como um pico positivo. É importante ressaltar que o mesmo processo descrito acima pode ocorrer com a diminuição da temperatura, quando a amostra então libera calor, o que é registrado como um pico negativo. Neste caso, dizemos que houve um excesso de calor absorvido ou liberado pela amostra (processo endotérmico ou exotérmico, respectivamente).

EXEMPLOS DE APLICAÇÕES

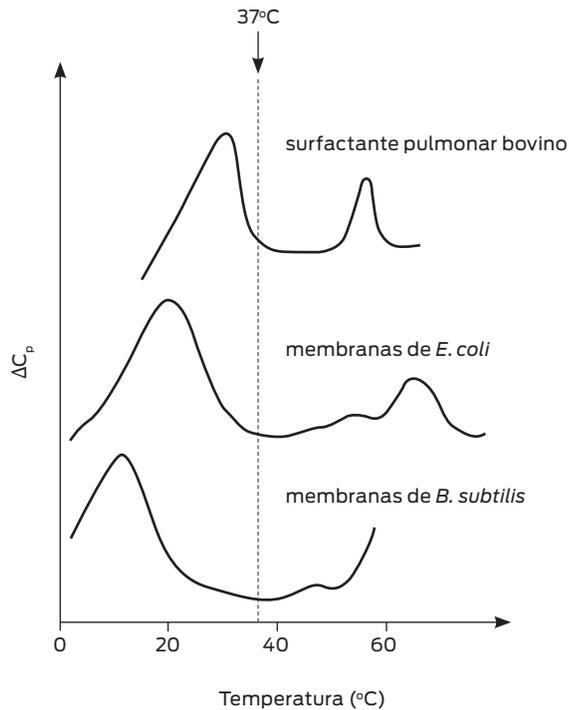
Calorímetros, em especial o calorímetro diferencial de varredura (DSC), têm sido largamente utilizados para o estudo de transições de fases caracterizadas por um calor latente. O calor trocado a pressão constante indica a própria variação de entalpia do processo (veja eq. 2), e, portanto, a determinação da variação de entalpia associada a uma transição de fase é trivial por DSC, como discutido na seção anterior.

Em particular, a calorimetria pode ser aplicada ao estudo de transições de fase de interesse para os tópicos abordados neste livro. Os cristais líquidos, por exemplo, apresentam vários estados intermediários entre um estado convencional sólido e uma fase líquida isotrópica. As transições de fase entre estes estados podem ser determinadas por DSC.

Aqui, vamos mostrar em detalhe duas aplicações da calorimetria diferencial de varredura em sistemas de interesse biológico: transições de fase de bicamadas lipídicas e desnaturação de proteínas, ambos os processos são encontrados em membranas biológicas. A Figura 5 mostra termogramas obtidos de alguns tipos de membranas biológicas: surfactante pulmonar bovino e membranas de dois tipos de bactéria, *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*. Os três termogramas mostram a presença de duas regiões de transição largas, uma abaixo da temperatura fisio-

lógica e outra acima. O pico alargado abaixo de 37°C indica a transição de fase da porção lipídica das membranas, enquanto as transições observadas acima de 40°C estão associadas ao processo de desnaturação de proteínas de membrana. Mesmo antes da proposição do modelo do mosaico fluido por Singer e Nicolson em 1972, que descreve a estrutura básica das membranas biológicas, experimentos de calorimetria de células de *Mycoplasma laidlawii* ([STEIM], [MELCHIOR]) mostraram a presença de duas transições de fase, semelhantes às mostradas na Figura 5. Nestes experimentos pioneiros, foi mostrado que a primeira transição era reversível e coincidia com a transição de dispersões aquosas de lipídios extraídos dessas células. Por outro lado, a segunda transição era irreversível, desaparecendo após a primeira varredura, e foi associada ao processo de desnaturação de proteínas de membrana. Assim, a calorimetria foi essencial para mostrar que os lipídios de membrana encontram-se, essencialmente, na estrutura de bicamadas, semelhante à adotada espontaneamente por lipídios em meio aquoso.

FIGURA 5 – Termogramas obtidos de membranas de diferentes tipos de células. Adaptado de [HEIMBURG, 2007].



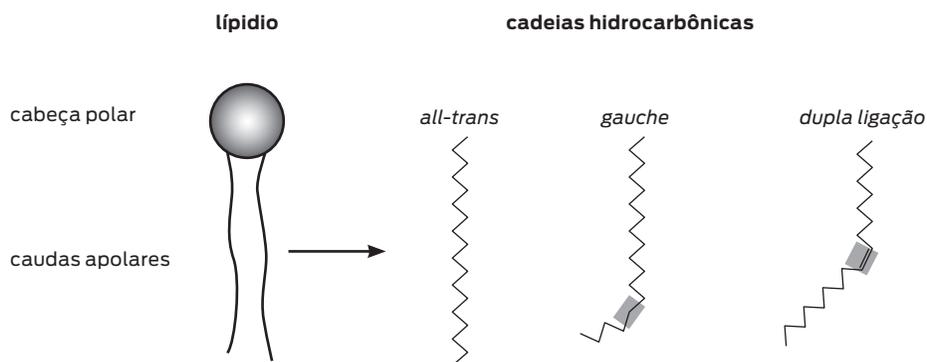
A visão atual que temos da estrutura de membranas biológicas é muito semelhante à descrita no modelo do mosaico fluido em 1972. Membranas biológicas podem ser visualizadas como uma camada protetora e seletiva que delimita a célula e compartimentaliza o meio intracelular em organelas. A organização básica de membranas biológicas é conferida pelo efeito hidrofóbico atuando sobre seus principais constituintes: lipídios e proteínas de membrana, que são moléculas anfífilas. Moléculas anfífilas possuem uma região polar, hidrofílica, e uma região apolar, hidrofóbica. Em meio aquoso, o efeito hidrofóbico faz com que haja uma auto-associação de moléculas anfífilas de tal maneira que somente as porções polares destas moléculas fiquem em contato com o meio aquoso, como visto em detalhe no capítulo VIII deste livro. A estrutura básica de uma membrana biológica é a de uma bicamada lipídica, na qual proteínas de membrana estão embebidas total ou parcialmente.

Assim, vamos apresentar em maior detalhe transições de fase de bicamadas lipídicas e o processo de desnaturação de proteínas. Os lipídios constituintes de membranas biológicas apresentam algumas características de cristais líquidos e diferentes transições de fase. Proteínas, tanto de membrana, como também as globulares, perdem suas estruturas funcionais acima de uma temperatura de desnaturação, podendo envolver a perda total ou parcial de suas estruturas secundária, terciária e quaternária.

TRANSIÇÕES DE FASE DE BICAMADAS LIPÍDICAS

Embora as membranas biológicas sejam compostas por vários tipos de lipídios, a maioria destes apresenta uma região polar, chamada de cabeça polar, e outra apolar, em geral duas cadeias hidrocarbônicas de comprimento e grau de insaturação variáveis. As características básicas dos lipídios de membrana estão mostradas na Figura 6. A cabeça polar pode ser neutra, zwitteriônica (quando possui cargas opostas) ou aniônica. As cadeias hidrocarbônicas possuem, em geral, comprimentos de 16 a 22 carbonos e podem ser saturadas, mono-insaturadas ou poli-insaturadas. Em cadeias saturadas, todas as ligações carbônicas são simples e podem apresentar diferentes isômeros: *trans* e *gauche*. Uma insaturação indica a presença de uma dupla ligação carbônica, o que normalmente resulta em uma dobra permanente na região da dupla ligação. Como veremos, o comprimento e grau de insaturação das cadeias hidrocarbônicas têm influência direta sobre a fluidez e maleabilidade de membranas biológicas.

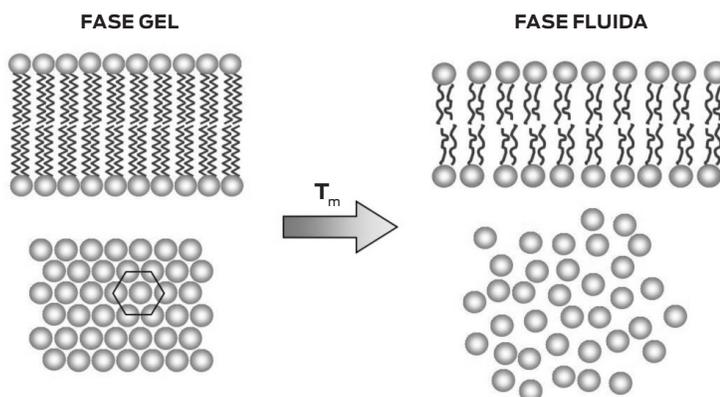
FIGURA 6 – Esquema mostrando um lipídio típico de membrana e as conformações de suas cadeias hidrocarbônicas. Na configuração *all-trans*, todas as ligações carbônicas da cadeia apresentam a configuração *trans*. A cadeia indicada por “*gauche*” apresenta uma isomerização *gauche*, mostrada em vermelho. A última cadeia mostra a presença de uma dupla ligação carbônica.



Vamos agora passar à descrição de dispersões lipídicas puras. Como discutido acima, lipídios em meio aquoso se auto-associam em bicamadas lipídicas devido ao efeito hidrofóbico. As bicamadas lipídicas, em geral, se fecham no espaço formando vesículas com um compartimento aquoso interno. Essas vesículas podem ser unilamelares, com um único compartimento aquoso, ou multilamelares, que apresentam várias vesículas concêntricas com igual espaçamento entre as lamelas.

Bicamadas lipídicas compostas de um único tipo de lipídio apresentam diferentes transições de fase, a principal sendo entre uma fase gel e uma fase fluida. A Figura 7 mostra uma representação esquemática de bicamadas lipídicas nas fases gel e fluida, tanto numa visão lateral quanto do plano das cabeças polares. Na fase gel, encontrada a baixas temperaturas, os lipídios estão ordenados e com pouca mobilidade. As cadeias hidrocarbônicas apresentam principalmente a configuração *all-trans* (quando todas as ligações carbônicas simples estão na configuração *trans*, veja Figura 6), e as moléculas de lipídios encontram-se, portanto, estendidas e muito próximas entre si, favorecendo várias interações de van der Waals ao longo das cadeias, que resultam em uma forte associação entre as cadeias adjacentes. Além disso, as posições das cabeças dos lipídios no plano da bicamada estão correlacionadas, formando quase que uma rede cristalina de arranjos hexagonais ou ortorrômbicos.

FIGURA 7 – Principais características das fases gel e fluida de bicamadas lipídicas, em uma visão lateral (acima) e do plano da membrana (abaixo).



Acima de uma temperatura de transição de fase principal, chamada de T_m , e característica de cada tipo de lipídio, a bicamada passa para um estado fluido, também chamado de líquido-cristalino. As cadeias hidrocarbônicas na fase fluida apresentam vários isômeros, e cada ligação carbônica simples pode ser encontrada nas configurações *trans* e *gauche*, sendo que essas conformações são altamente dinâmicas. Conforme mostrado na Figura 6, cadeias que apresentam isomerizações *gauche* ocupam uma área maior no plano da bicamada, e menor extensão ao longo desta. Portanto, a área por lipídio aumenta consideravelmente na transição de fase gel-fluido (~25%) e a espessura da bicamada diminui (~15%). As interações entre os lipídios tornam-se, portanto, muito mais fracas. No plano da membrana, a correlação posicional entre as cabeças polares é perdida, e os lipídios apresentam alta mobilidade lateral.

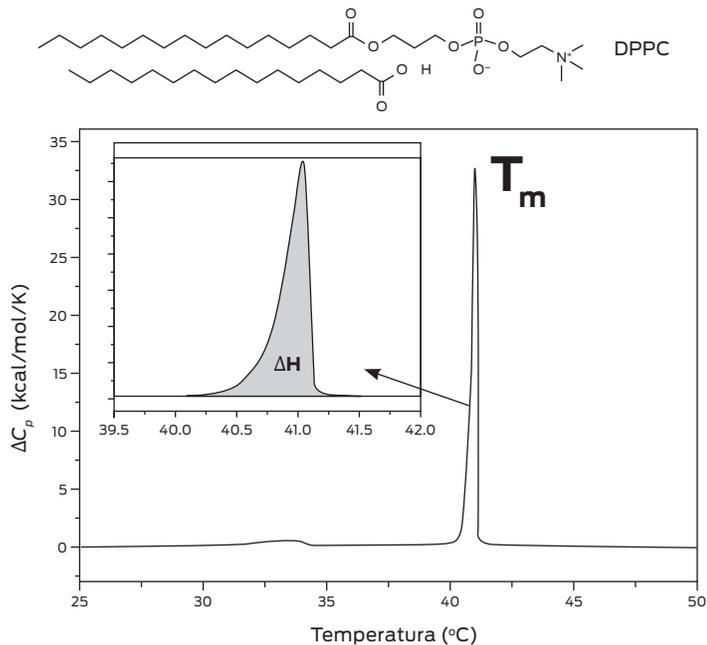
Para visualizar a transição de fase gel-fluido de bicamadas lipídicas, podemos imaginar o que acontece com um pedaço de manteiga quando passa da geladeira para uma frigideira quente, ou com a parafina de uma vela quando a chama é acesa. Tanto a manteiga quanto a parafina são constituídas principalmente por cadeias hidrocarbônicas.

A passagem da fase gel para a fase fluida é um processo endotérmico, caracterizado pela presença de um calor latente, já que as interações entre os lipídios tornam-se bem mais fracas na fase fluida. Além disso, ocorre um grande aumento da entropia, pois cada ligação carbônica pode ser encontrada em um número muito maior de configurações na fase fluida.

A calorimetria diferencial de varredura permite a obtenção de parâmetros termodinâmicos da transição gel-fluido de bicamadas lipídicas. O aparelho de DSC fornece diretamente a medida de calor específico da dispersão lipídica, que na temperatura de transição, T_m , apresenta um pico. Como a medida de DSC é feita a pressão constante, o calor absorvido durante a transição é igual à variação de entalpia da transição gel-fluido (eq. 2).

A Figura 8 mostra um termograma típico de uma dispersão de DPPC, um fosfolipídio que contém duas cadeias saturadas de 16 carbonos e na cabeça polar um grupo fosfato e uma colina. Para este lipídio, a transição gel-fluido ocorre em $T_m = 41^\circ\text{C}$. Por volta de 33°C , um pequeno pico indica uma outra transição, chamada de pré-transição, que não será discutida aqui. O valor de T_m é, em geral, obtido da posição do pico de calor específico. Entretanto, formalmente, T_m é a temperatura na qual metade dos lipídios encontra-se na fase gel e metade na fase fluida, ou seja, quando não existe diferença de energia livre entre as duas fases ($\Delta G = 0$).

FIGURA 8 – Termograma obtido para uma dispersão aquosa do lipídio DPPC, cuja estrutura está mostrada na parte superior da figura. O gráfico em detalhe mostra uma ampliação da região de transição de fase ($T_m = 41^\circ\text{C}$).



É importante ressaltar que o termograma apresentado na Figura 8 mostra a variação do excesso de calor específico (ΔC_p) em função da temperatura. Este excesso de calor específico é obtido subtraindo-se uma linha de base do termograma obtido. Esta linha de base é escolhida de forma a anular o valor absoluto de calor específico da amostra antes e após a transição. Com este procedimento, somente o excesso de calor específico advindo da transição de fase é computado, ou seja, o próprio calor latente.

Os parâmetros termodinâmicos importantes envolvidos nessa transição de fase, como a variação de entalpia, ΔH , e de entropia, ΔS , podem ser obtidos a partir do termograma. A variação de entalpia da transição, ΔH , é dada pela área sob o pico (veja região destacada em cinza no detalhe na Figura 8), ou seja, através da integral do excesso de calor específico, ΔC_p :

$$\Delta H = \int_{T_0}^{T_1} \Delta C_p dT \quad (\text{eq. 3})$$

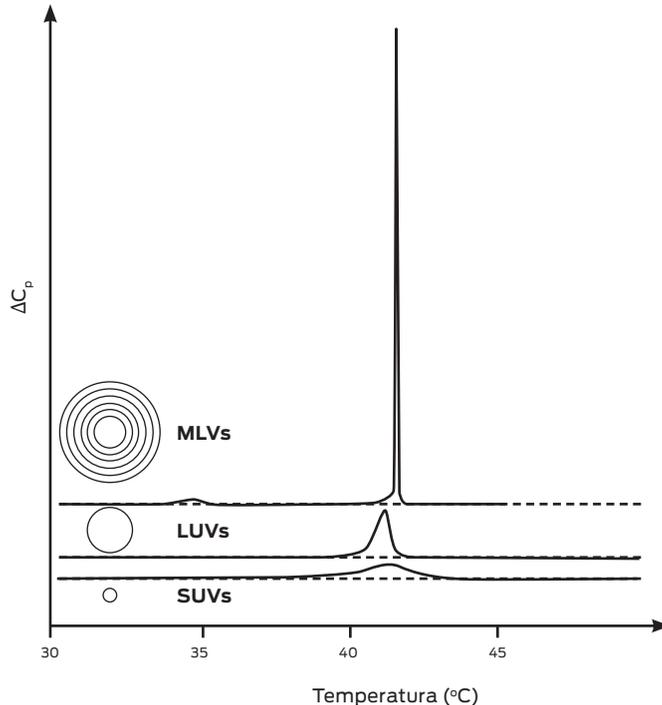
onde T_0 e T_1 são as temperaturas que definem os limites de integração. Para picos estreitos com o mostrado na Figura 8, a variação de entropia, ΔS , sai diretamente da definição da energia livre de Gibbs ($\Delta G = \Delta H - T\Delta S$) e do fato de que, na temperatura de transição, a energia livre das fases gel e fluida é igual, $\Delta G (T_m) = 0$:

$$\Delta S = \frac{\Delta H}{T_m} \quad (\text{eq. 4})$$

A transição de fase gel-fluido é uma transição de fase de primeira ordem, caracterizada por mudanças abruptas na entalpia, volume e área por lipídio. Uma transição de primeira ordem perfeita seria caracterizada por um pico de C_p infinitamente estreito e intenso em T_m . Entretanto, em casos reais a transição é definida por um pico de C_p com uma largura finita. A largura do pico está principalmente correlacionada ao número de lipídios que transicionam juntos, chamado de unidade cooperativa. A cooperatividade da transição pode ser alterada, por exemplo, mudando-se o tamanho e lamelaridade das vesículas lipídicas. Lipídios como o DPPC, mostrado na Figura 8, formam espontaneamente vesículas multilamelares (MLVs), que atingem tamanhos da ordem de 1-10 μm e possuem várias camadas por vesícula. A transição de MLVs, portanto, apresenta uma alta cooperatividade, e uma transição de fase bem estreita, com largura da ordem de 0,5°C, como mostrada na Figura 8. A unidade co-

operativa neste caso pode alcançar quase 1000 lipídios. Alguns métodos permitem a obtenção de vesículas unilamelares de tamanho controlado, como é o caso das LUVs (vesículas unilamelares grandes) com diâmetro da ordem de 100 nm, e das SUVs (vesículas unilamelares pequenas), com diâmetro da ordem de 30nm. Como a espessura da bicamada é definida basicamente pelo comprimento de dois lipídios (~5nm), a curvatura das bicamadas aumenta muito à medida que o raio das vesículas diminui. Esse aumento da curvatura, aliado à unilamellaridade, gera uma diminuição significativa na unidade cooperativa da transição (~30 lipídios para LUVs e ~15 para SUVs; [IVANOVA]), tendo como efeito um alargamento considerável do pico de C_p . Este efeito pode ser visto na Figura 9, que mostra termogramas obtidos de dispersões de MLVs, LUVs e SUVs do lipídio DPPC.

FIGURA 9. Termogramas obtidos de dispersões aquosas do lipídio DPPC formando diferentes tipos de vesículas, mostradas esquematicamente em cinza: MLVs (vesículas multilamelares), LUVs (vesículas unilamelares grandes) e SUVs (vesículas unilamelares pequenas). Adaptado de [HEIMBURG, 1998].



Vamos agora ver o efeito de variação do comprimento e grau de insaturação da cadeia hidrocarbônica. A Tabela 1 mostra os valores de T_m , ΔH e ΔS obtidos para lipídios de mesma cabeça polar, a fosfatidilcolina, mas com diferentes cadeias. As primeiras linhas da tabela mostram os parâmetros da transição gel-fluido de lipídios saturados de comprimento crescente. Cada aumento de 2 carbonos no comprimento da cadeia leva a um aumento substancial de T_m (quase 20°C), que se reflete também nos valores de ΔH e ΔS . Como visto, a fase gel é caracterizada por um grande contato entre lipídios adjacentes, possibilitando uma forte interação de van der Waals entre as cadeias. O aumento do comprimento das cadeias estabiliza a fase gel, pois aumenta as interações entre as cadeias, sendo necessário, portanto, fornecer mais energia na forma de calor para levar os lipídios à fase fluida. O ganho entrópico da fase fluida é também aumentado, pois a adição de carbonos leva a um aumento das configurações possíveis dos isômeros (*trans - gauche*) da fase fluida.

TABELA 1 – Parâmetros termodinâmicos da transição de fase gel-fluido de fosfolipídios de mesma cabeça polar (fosfatidilcolina) e diferentes comprimentos e grau de insaturação de cadeias. A segunda coluna indica a composição das cadeias hidrocarbônicas de cada lipídio: o primeiro número indica o número de carbonos da cadeia e o segundo o número de insaturações; o termo *di* indica que ambas as cadeias são iguais. Valores extraídos de [KOYNOVA] e [HEIMBURG, 2007].

Lipídio		T_m (°C)	ΔH (kcal/mol)	ΔS (cal/mol.°C)
DLPC	di 12:0	0	3,0	11
DMPC	di 14:0	23	5,7	19
DPPC	di 16:0	41	9,1	29
DSPC	di 18:0	51	12,1	37
SOPC	18:0, 18:1	6	6,0	21
DOPC	di 18:0	-18	8,0	31

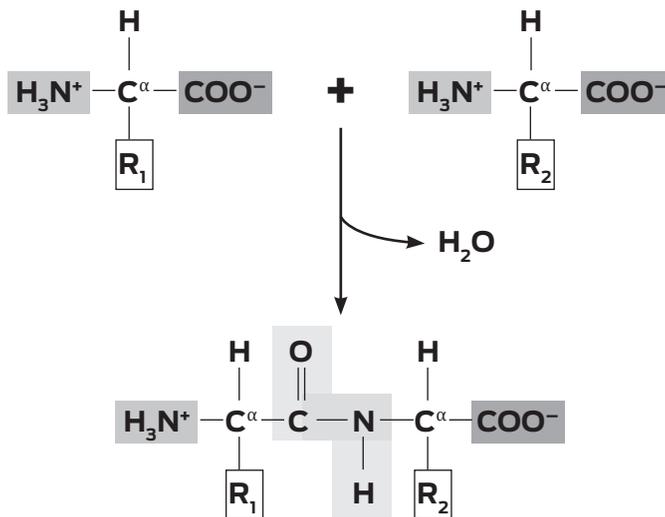
As duas linhas finais da Tabela 1 mostram o efeito da adição de uma insaturação em uma ou nas duas cadeias do fosfolipídio DSPC, com 18 carbonos. Como mostrado na Figura 6, a dupla-ligação carbônica induz uma dobra fixa na cadeia, que perturba consideravelmente o empacotamento da fase gel, diminuindo drasticamente a T_m .

A maioria dos lipídios de membrana possui pelo menos uma cadeia insaturada, e a razão disto torna-se evidente ao analisarmos a Tabela 1. Os lipídios de membrana possuem comprimentos de 16 a 22 carbonos. Lipídios saturados desse comprimento seriam encontrados em uma fase gel na temperatura fisiológica, o que não permitiria a difusão lateral dos componentes da membrana. A presença de insaturações garante o caráter fluido das membranas biológicas.

DESNATURAÇÃO DE PROTEÍNAS

As proteínas são macromoléculas biológicas constituídas de aminoácidos ligados uns aos outros formando uma cadeia polipeptídica. Cada aminoácido tem a mesma estrutura fundamental (Figura 10). Esta estrutura consiste de um átomo de carbono central, chamado de carbono alfa (C^α), ligado covalentemente a quatro grupos químicos diferentes: um átomo de hidrogênio, um grupo amino ($H_3 N^+$), um grupo carboxílico (COO^-) e um grupo lateral, ou cadeia lateral R. A cadeia lateral é responsável por diferenciar os 20 tipos comuns de aminoácidos. Dependendo da natureza química da cadeia lateral, o aminoácido pode ser polar não carregado, polar carregado (apresentando carga positiva ou negativa), apolar de cadeia alifática ou apolar de cadeia aromática.

FIGURA 10 – Estrutura geral de aminoácidos e ligação peptídica.



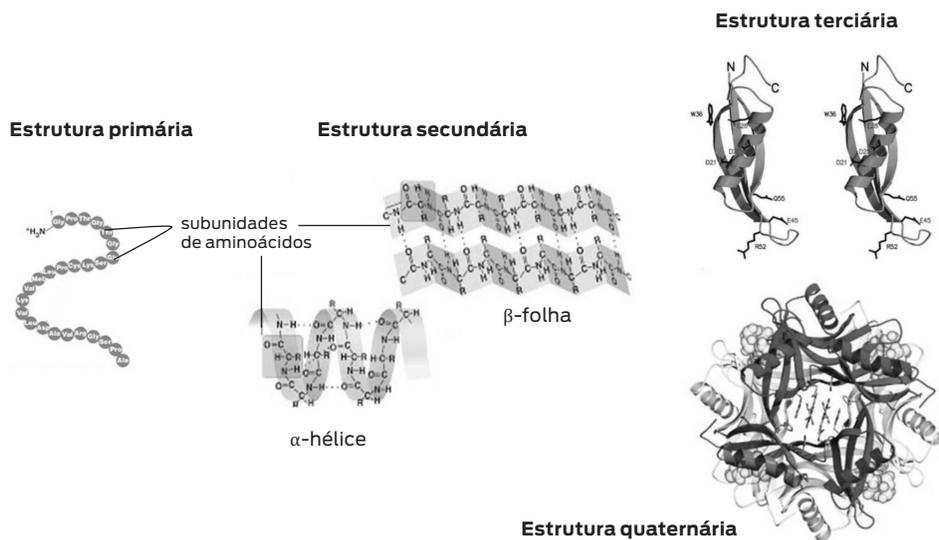
A formação da cadeia polipeptídica se dá quando o grupo carboxílico do primeiro aminoácido e o grupo amino do próximo ligam-se através de uma ligação covalente, chamada, neste caso, de ligação peptídica ($O=C-NH$). A sequência de aminoácidos ligados covalentemente é a **estrutura primária** da proteína (Figura 11), e as ligações peptídicas ao longo dos átomos de C^α formam o arcabouço estrutural da proteína onde as cadeias laterais dos aminoácidos ficam anexadas.

Cada proteína tem um número e sequência distinta de aminoácidos e como veremos a seguir, a estrutura primária de uma proteína determina como será a sua conformação final (arranjo dos átomos no espaço), o que está relacionado com a sua função. Esta conformação é atingida através de uma estruturação intermediária da cadeia polipeptídica em arranjos regulares chamados de **estruturas secundárias** (Figura 11).

As estruturas secundárias regulares mais comuns são as α -hélices, as β -folhas e as β -voltas. A estrutura em α -hélice é adquirida quando o arcabouço polipeptídico se enrola ao redor de um eixo longitudinal imaginário tomando a forma de uma espiral onde as cadeias laterais se projetam para o exterior da hélice. Nesta estrutura, cada volta é formada por 3,6 aminoácidos e tem uma distância da próxima volta de cerca de 5,6 Å. As α -hélices são estabilizadas pela presença de três ou quatro ligações de hidrogênio entre o átomo de hidrogênio de um grupo amino com o de oxigênio do grupo carbonila de aminoácidos de voltas adjacentes. A grande quantidade de ligações de hidrogênio nesta estrutura confere a ela uma alta estabilidade.

As β -folhas ocorrem através da interação de segmentos distantes da cadeia polipeptídica, quando o arcabouço polipeptídico se orienta lateralmente, de modo a formar uma série de pregas, estabilizadas por ligações de hidrogênio entre o hidrogênio do grupo amino de um aminoácido de um segmento com o oxigênio da carbonila de um aminoácido de outro segmento adjacente, resultando em uma estrutura em zigue-zague, na qual as cadeias laterais dos aminoácidos se projetam alternadamente para cima e para baixo do plano formado pela folha pregueada. As β -folhas são divididas em duas classes, as antiparalelas que são formadas conforme descrito acima, e as paralelas que são formadas por regiões bastante distantes da cadeia polipeptídica e que neste caso, também mudam a orientação dos átomos de H e O acarretando uma variação no ângulo das ligações de hidrogênio que as estabilizam.

FIGURA 11 – Estruturas primária, secundária, terciária e quaternária de uma proteína. Nas estruturas terciária e quaternária, as fitas em espiral representam as α -hélices e as fitas em setas representam as β -folhas. Adaptado de [BIEGER] e <http://hanguyenbiologyhblog.blogspot.com.br/2013/01/proteins-homework.html>.



As β -voltas são segmentos de aminoácidos responsáveis por mudar a direção da cadeia polipeptídica no espaço ou conectar sucessivas α -hélices ou os segmentos que vão gerar as β -folhas. Este tipo de estrutura é muito comum para realizar dobras presentes no final de cada folha pregueada. Esta estrutura conta com a presença de quatro aminoácidos com o oxigênio da carbonila do primeiro fazendo uma ligação de hidrogênio com o hidrogênio do grupo amino do quarto. Os aminoácidos mais comuns encontrados nas dobras das β -voltas são glicina e prolina.

Enquanto a estrutura secundária está relacionada com a interação de um aminoácido com outro em uma dada região da cadeia polipeptídica, a **estrutura terciária** é o arranjo espacial que a proteína adota após a interação de aminoácidos de regiões distantes da mesma cadeia polipeptídica (Figura 11). Isto significa que aminoácidos envolvidos nas estruturas secundárias interagem com outros que estão envolvidos em outra estrutura secundária causando um “enovelamento” da cadeia polipeptídica. Esta estrutura é estabilizada, principalmente, por ligações de hidrogênio, interações de van der Waals, interações hidrofóbicas, interações íon-dipolo e interações iônicas. É importante ressaltar que para uma proteína globular, os aminoácidos com caráter mais hidrofóbicos ocupam o centro da molécula.

la de proteína após o seu enovelamento em uma estrutura terciária, justamente devido ao efeito hidrofóbico já mencionado anteriormente, enquanto os aminoácidos mais polares ocupam a superfície da proteína, o que garante a sua solubilidade em meio aquoso. Para proteínas de membrana, domínios hidrofóbicos são responsáveis por associar a proteína à membrana.

Algumas proteínas podem ter duas ou mais cadeias polipeptídicas, que são chamadas de subunidades proteicas. O arranjo tridimensional após a associação das estruturas terciárias de cada uma dessas subunidades com a outra é chamada de **estrutura quaternária** e as interações químicas que regem esta associação são as mesmas descritas acima (Figura 11).

A conformação final adotada por uma proteína é chamada de conformação nativa, portanto qualquer mudança ocasionada nesta conformação pode causar a desnaturação da proteína que pode ser reversível ou irreversível. Como a conformação nativa de uma proteína determina a sua função, a sua desnaturação irreversível causa a perda definitiva da sua funcionalidade.

A estabilidade de uma proteína está relacionada com a sua capacidade em manter a configuração nativa. A diferença entre as energias livres de Gibbs da conformação nativa e desnaturada de uma proteína, em condições fisiológicas, varia em média de somente 5 a 15 kcal/mol. Esta pequena diferença se dá porque uma cadeia polipeptídica pode assumir várias conformações, portanto, o estado “desenovelado” de uma proteína apresenta um alto grau de entropia conformacional. O alto grau de entropia conformacional somado às ligações de hidrogênio que muitos grupos da cadeia polipeptídica podem fazer com o solvente aquoso, implica em uma grande tendência da proteína em desenovelar. Portanto, a estabilidade de uma proteína em condições fisiológicas é principalmente atribuída às ligações químicas que a mantêm na forma enovelada, ou seja, o ΔH .

Uma das formas de estudar, experimentalmente, a estabilidade de uma proteína é submetê-la à variação de temperatura e verificar a temperatura na qual ocorre a sua desnaturação, ou seja, um estudo de DSC.

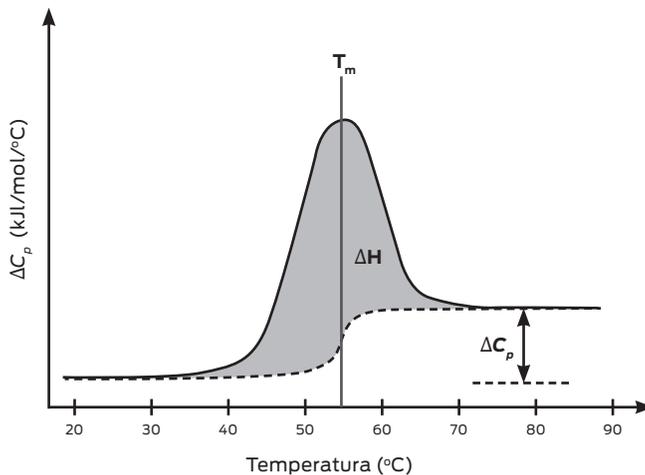
Durante o processo de desnaturação de uma proteína, as interações químicas presentes para manter a sua conformação nativa, precisam ser rompidas. Isto acontece quando a proteína experimenta temperaturas onde a entropia é preponderante às forças das interações químicas que estabilizam a molécula na sua conformação nativa, levando, portanto, ao desenovelamento da proteína.

O aparelho de DSC mede, como já descrito acima, o calor específico C_p em

função da temperatura. A temperatura de transição, aqui também chamada de T_m , é considerada a temperatura de equilíbrio na qual metade das proteínas permanece na sua forma nativa, e a outra metade das proteínas está desnaturada. Do valor de T_m , pode-se avaliar a estabilidade térmica da proteína, pois quanto maior for a temperatura necessária para atingir um estado de entropia preponderante às forças químicas de estabilização, maior será a sua estabilidade na conformação nativa. A variação de entalpia, ΔH , para ocorrer o desenovelamento, como o resultado da variação da temperatura, é dado pela área do pico de excesso de calor.

O procedimento utilizado para se obter o calor específico de uma proteína, assemelha-se ao utilizado para os lipídios, subtraindo-se uma linha de base do termograma obtido. No entanto, não é possível anular o valor absoluto de calor específico da proteína antes e após a desnaturação, resultando em um ΔC_p , que geralmente é maior que zero. Isto se dá, porque associado com o processo de desenovelamento da proteína, ocorrem mudanças na hidratação das cadeias laterais dos aminoácidos que antes estavam localizadas no interior da molécula na conformação nativa. Este novo estado de solvatação gera novas interações químicas, podendo levar inclusive à agregação das cadeias polipeptídicas devido ao efeito hidrofóbico ocasionado pela exposição de cadeias laterais apolares à água.

FIGURA 12 – Termograma típico de uma proteína hipotética. A linha tracejada indica a linha de base, e a região em cinza, a área sob o pico de excesso de calor. A diferença de C_p dos estados desnaturado e nativo está indicada por uma seta.



A Figura 12 mostra o termograma obtido do estudo de DSC de uma proteína hipotética. À medida que a amostra de proteína é varrida a uma taxa de temperatura constante, o calor específico da proteína é medido. O pico de excesso de calor começa a aparecer na temperatura em que as interações químicas que estabilizam a conformação nativa da proteína começam a ser rompidas, chegando em um máximo que representa a temperatura em que 50 % das proteínas estão desnaturadas (T_m). A quantidade de proteína desnaturada aumenta com o aumento da temperatura e o pico inicia a sua volta para alcançar a linha de base. No entanto, para proteínas, o calor específico antes e depois do processo de desnaturação não é o mesmo (ΔC_p). Em um processo de desnaturação, como já descrito acima, os aminoácidos com caráter mais hidrofóbicos que antes estavam no núcleo da proteína, na conformação nativa, são expostos ao solvente aquoso, o que força uma nova estruturação da proteína. A variação de entalpia de desnaturação, ΔH , é obtida a partir da área abaixo do pico de excesso de calor (destacado em cinza na Figura 12).

Portanto, os valores de T_m e ΔH fornecidos do estudo de DSC, estão intrinsecamente relacionados com a estabilidade da proteína. Quanto maior for a T_m e o ΔH , maior será a sua estabilidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS E LITERATURA SUGERIDA

- Bassalo, J. M. F. A crônica do calor: Calorimetria. *Revista Brasileira de Ensino de Física*, 14 (1992) 29-38.
- Bieger, B.; L.-O. Essen, D. Oesterhelt. Crystal Structure of Halophilic Dodecin: A Novel, Dodecameric Flavin Binding Protein from Halobacterium salinarum. *Structure* 11 (2003) 375–385.
- Cevc, G.; D. Marsh. Phospholipid bilayers: physical principles and models. 1ª Ed. Wiley-Interscience, (1987), New York.
- Gill, P.; T. T. Moghadam, B. Ranjbar. Differential Scanning Calorimetry Techniques: Applications in Biology and Nanoscience. *J. Biomol. Tech.* 21 (2010) 167–193.
- Heimburg, T. Mechanical aspects of membrane thermodynamics. Estimation of the mechanical properties of lipid membranes close to the chain melting transition from calorimetry. *Biochim. Biophys Acta* 1415 (1998) 147-162.

- Heimburg, T. *Thermal Biophysics of Membranes*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, KGaA, (2007), Darmstadt.
- Ivanova, V. P.; T. Heimburg. Histogram method to obtain heat capacities in lipid monolayers, curved bilayers, and membranes containing peptides. *Phys. Rev. E* 63 (2001) 041914.
- Koynova, R.; M. Caffrey. Phases and phase transitions of the phosphatidylcholines. *Biochim. Biophys Acta* 1376 (1998) 91-145.
- Melchior, D. L.; H. J. Morowitz, J. M. Sturtevant, T. Y. Tsong. Characterization of the plasma membrane of *Mycoplasma laidlawii*. VII. Phase transitions of membrane lipids. *Biochim. Biophys. Acta* 219 (1970) 114-122.
- Nelson, D.; M. Cox. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. 5ª Ed. Sarvier-Artmed, (2011), Porto Alegre.
- Singer, S. J.; G. L. Nicolson. The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. *Science* 175 (1972) 720-731.
- Steim, J. M.; M. E. Tourtellotte, J. C. Reinert, R. N. Mcelhaney, R. L. Rader. Calorimetric evidence for the liquid-crystalline state of lipids in a biomembrane. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 63 (1969) 104-109.
- Tavares, G. W.; A. G. S. Prado. Calorímetro de gelo: uma abordagem histórica e experimental para o ensino de química na graduação. *Quím. Nova* 33 (2010) 1987-1990.
- Taverna, D. M.; R. A. Goldstein. Why Are Proteins Marginally Stable? *Proteins: Structure, Function, and Genetics* 46 (2002) 105-109.
- Yeagle P. L. *The Structure of cell membranes*. 2ª Ed. CRC Press, (2005), Boca Raton.
- <http://www.physicsclassroom.com/Class/thermalP/>
- <http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbase/thermo/spht.html#c1>