

Difusão entre dois compartimentos

Antonio Roque

Agosto 2023

1 Introdução

A lei de Fick para membranas (equação 16 da aula passada) implica que a permeabilidade de uma membrana a um soluto n é dada pela razão entre o fluxo do soluto pela membrana e a diferença de concentração do soluto entre os dois lados da membrana:

$$P_n = \frac{\phi_n}{c_n^i - c_n^e}. \quad (1)$$

Esta equação nos sugere como se pode medir a permeabilidade P_n de um dado material a um soluto n . Pode-se tomar uma lâmina do material, de uma dada espessura, e usá-la para separar dois compartimentos cheios com uma solução cujo soluto seja n (veja a Figura 1).

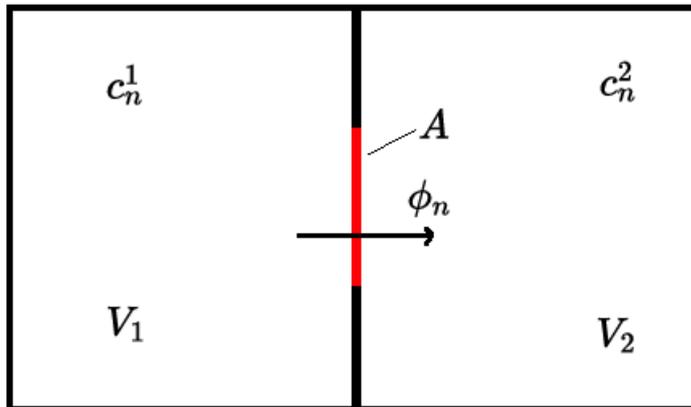


Figura 1: Esquema do método para medir a permeabilidade de uma lâmina de um dado material a um soluto n . A lâmina está indicada em vermelho. O volume do compartimento 1 é V_1 e a concentração de n nele é c_n^1 ; O volume do compartimento 2 é V_2 e a concentração de n nele é c_n^2 .

As concentrações do soluto nos dois compartimentos podem ser medidas por métodos químicos ou ópticos ou por detectores de radiação no caso de solutos radioativos. O módulo do fluxo pode ser estimado tomando-se a diferença da concentração do soluto em um dos compartimentos entre dois instantes diferentes

de tempo e dividindo-se essa diferença pelo tempo entre as duas medidas e a área superficial da lâmina,

$$|\phi_n| = \frac{|c_n^1(t_2) - c_n^1(t_1)|}{(t_2 - t_1) A}.$$

Pela equação (1), a permeabilidade do material ao soluto n será dada pela razão entre o módulo do fluxo e o módulo da diferença das concentrações nos dois compartimentos.

Note que, como a equação (1) foi obtida sob a hipótese de regime estacionário, o método descrito acima só é válido se o fluxo for suficientemente pequeno para não alterar substancialmente as concentrações nos dois compartimentos entre os dois instantes de tempo utilizados.

Este método, porém, dificilmente poderia ser usado para medir a permeabilidade da membrana de uma célula. Imagine as dificuldades técnicas envolvidas para se extrair a membrana de uma célula microscópica e formar uma partição entre dois compartimentos com ela.

Como podemos medir a permeabilidade de uma membrana celular?

Se considerarmos que a difusão entre os lados interno e externo de uma célula é equivalente a um processo de difusão entre dois compartimentos, como ilustrado na Figura 2, pode-se encontrar um método para estimar a permeabilidade de uma membrana celular baseado no chamado **modelo de difusão entre dois compartimentos**.

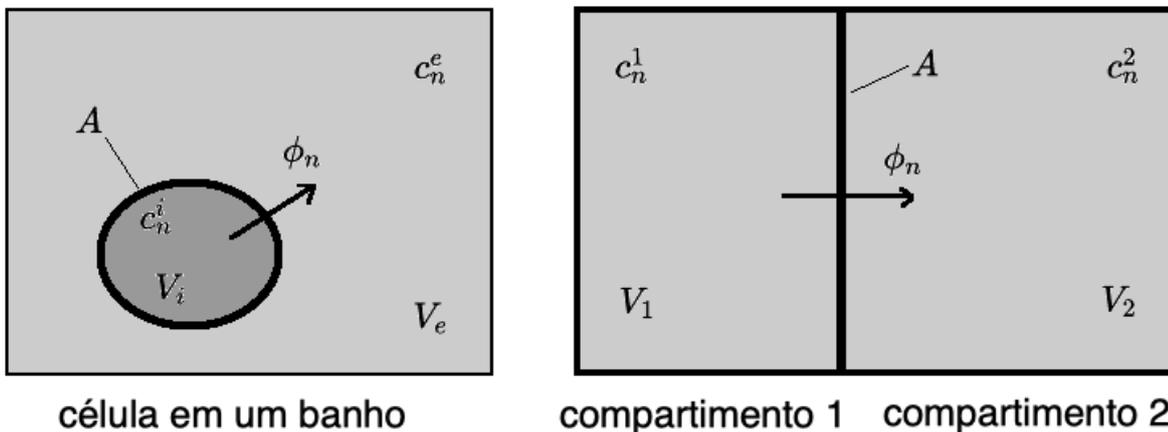


Figura 2: Esquema do modelo de difusão entre dois compartimentos. A figura da esquerda ilustra a situação experimental de uma célula imersa em um banho. A área da superfície da célula é A e as concentrações do soluto n no interior e no exterior da célula são, respectivamente, c_n^i e c_n^e . O volume da célula é V_i , o volume do banho é V_e e o fluxo pela membrana da célula é ϕ_n (positivo para fora). A figura da direita mostra dois compartimentos, de volumes V_1 e V_2 , separados por uma membrana de área A . As concentrações do soluto n nos compartimentos 1 e 2 são, respectivamente, c_n^1 e c_n^2 e o fluxo do compartimento 1 para o 2 é ϕ_n .

2 Aproximação de membrana fina

Vamos considerar dois compartimentos de volumes V_1 e V_2 separados por uma membrana de área A , como no desenho da direita na Figura 2. Vamos supor o seguinte:

- As soluções nos dois compartimentos estão bem misturadas, de maneira que a concentração do soluto n é uniforme no espaço dentro de cada compartimento e depende apenas do tempo t . As concentrações nos dois compartimentos serão designadas por $c_n^1(t)$ e $c_n^2(t)$.
- As partículas do soluto são conservadas, ou seja, não há reações químicas presentes que criem ou destruam partículas do soluto. Se N_n for o número total de moles do soluto n nos dois compartimentos, esta condição implica que

$$V_1 c_n^1(t) + V_2 c_n^2(t) = N_n. \quad (2)$$

- O número de partículas de soluto dentro da membrana a qualquer instante de tempo é desprezível em comparação com as quantidades presentes nos dois compartimentos.
- A qualquer instante de tempo, a relação entre o fluxo e a diferença de concentrações é dada pela primeira lei de Fick para membranas,

$$\phi_n(t) = P_n (c_n^1 - c_n^2), \quad (3)$$

onde $\phi_n(t)$ é o fluxo de partículas do compartimento 1 para o 2.

Note que a última suposição é uma hipótese forte, pois implica assumir que uma condição que, rigorosamente, só vale no regime estacionário é válida também quando as concentrações e o fluxo variam no tempo.

O fluxo ϕ_n se relaciona com a variação da concentração no lado 1 por:

$$\phi_n = -\frac{1}{A} \frac{dN_n^1}{dt}. \quad (4)$$

Para entender esta equação, note que se $dN_n^1/dt > 0$ isto implica que o número de partículas no compartimento 1 cresce. Isso significa um fluxo líquido do compartimento 2 para o 1, que é *negativo* pela convenção adotada para o sentido positivo de ϕ_n . Por outro lado, se $dN_n^1/dt < 0$ o fluxo líquido é do compartimento 1 para o 2 e deve ser positivo. É por isso que se usou o sinal negativo na equação (4).

Da definição de concentração, temos que

$$c_n^1 = \frac{N_n^1}{V_1} \Rightarrow N_n^1 = c_n^1 V_1.$$

Substituindo este resultado na equação (4),

$$\phi_n = -\frac{1}{A} \frac{d(c_n^1 V^1)}{dt} = -\frac{V_1}{A} \frac{dc_n^1(t)}{dt}. \quad (5)$$

Usando ϕ_n dado por (3) nesta equação,

$$\begin{aligned} -\frac{V_1}{A} \frac{dc_n^1(t)}{dt} &= P_n (c_n^1(t) - c_n^2(t)) \Rightarrow \\ \frac{dc_n^1(t)}{dt} &= -\frac{AP_n}{V_1} (c_n^1(t) - c_n^2(t)). \end{aligned} \quad (6)$$

Isolando $c_n^2(t)$ na equação (2) e substituindo em (6):

$$\begin{aligned} \frac{dc_n^1(t)}{dt} &= -\frac{AP_n}{V_1} \left[c_n^1(t) - \left(\frac{N_n}{V_2} - \frac{V_1}{V_2} c_n^1(t) \right) \right] = -AP_n \left(\frac{c_n^1(t)}{V_1} - \frac{N_n}{V_1 V_2} + \frac{c_n^1(t)}{V_2} \right) \Rightarrow \\ \frac{dc_n^1(t)}{dt} &= -AP_n \left(\frac{V_2 c_n^1(t) + V_1 c_n^1(t)}{V_1 V_2} - \frac{N_n}{V_1 V_2} \right) = -AP_n \left[\frac{(V_1 + V_2)}{V_1 V_2} c_n^1(t) - \frac{N_n}{V_1 V_2} \right]. \end{aligned}$$

O termo $V_1 V_2 / (V_1 + V_2)$ na expressão acima tem dimensões de volume. Em analogia com o conceito de massa reduzida da mecânica, vamos definir o *volume reduzido* dos compartimentos de volumes V_1 e V_2 como:

$$V_r \equiv \frac{V_1 V_2}{V_1 + V_2}. \quad (7)$$

Com esta definição, podemos escrever:

$$\begin{aligned} \frac{dc_n^1(t)}{dt} &= -AP_n \left(\frac{V_n^1(t)}{V_r} - \frac{N_n}{V_1 V_2} \right) \Rightarrow \\ \frac{dc_n^1(t)}{dt} + \frac{AP_n}{V_r} c_n^1(t) &= \frac{AP_n}{V_1 V_2} N_n. \end{aligned} \quad (8)$$

A equação (8) é uma equação diferencial linear ordinária de primeira ordem com coeficientes constantes. A solução de equações desse tipo foi revista no Apêndice da aula de Cinética Bioquímica (veja a equação (A8) do apêndice). Portanto, a solução de (8) é:

$$c_n^1(t) = c_n^1(\infty) - (c_n^1(\infty) - c_n^1(0)) e^{-t/\tau}, \quad (9)$$

onde $c_n^1(0)$ é o valor inicial da concentração do soluto n no compartimento 1, $c_n^1(\infty)$ é o valor final (assintótico) da concentração do soluto n no compartimento 1, dada por

$$c_n^1(\infty) = \frac{V_r}{V_1 V_2} N_n, \quad (10)$$

e τ é a constante de tempo que governa o processo de variação exponencial da concentração, do seu valor inicial para o seu valor assintótico, dada por

$$\tau = \frac{V_r}{AP_n}. \quad (11)$$

Quando o valor assintótico de $c_n^1(t)$ é atingido, a concentração não varia mais no tempo.

Os mesmos passos acima podem ser executados para se obter a solução para $c_n^2(t)$ (faça como exercício). Ela é dada por

$$c_n^2(t) = c_n^2(\infty) - (c_n^2(\infty) - c_n^2(0)) e^{-t/\tau}, \quad (12)$$

onde $c_n^2(0)$ é o valor inicial da concentração do soluto n no compartimento 2, $c_n^2(\infty)$ é o valor assintótico de $c_n^2(t)$, que é igual ao de $c_n^1(t)$,

$$c_n^2(\infty) = c_n^1(\infty) = c_n(\infty),$$

e τ é a mesma constante de tempo dada por (11).

Como os valores assintóticos das duas concentrações são iguais, o estado assintótico é um estado de *equilíbrio* (lembre-se do processo de equilíbrio estudado na aula passada). No estado de equilíbrio, o fluxo ϕ_n entre os dois compartimentos é nulo.

Por causa disso, vamos chamar a constante temporal τ de τ_{eq} (“tau de equilíbrio”), pois ela é a constante de tempo com a qual os dois compartimentos tendem ao equilíbrio:

$$\tau_{\text{eq}} = \frac{V_r}{AP_n}. \quad (13)$$

Igualmente, podemos reescrever as equações (9) e (12) como:

$$c_n^1(t) = c_n(\infty) - (c_n(\infty) - c_n^1(0)) e^{-t/\tau_{\text{eq}}}, \quad (14)$$

e

$$c_n^2(t) = c_n(\infty) - (c_n(\infty) - c_n^2(0)) e^{-t/\tau_{\text{eq}}}. \quad (15)$$

Desenvolvendo um raciocínio semelhante ao feito acima para o fluxo $\phi_n(t)$, obtemos que ele também decai exponencialmente no tempo em direção a zero com a mesma constante temporal τ_{eq} .

Da equação (10) e da definição de V_r temos que o valor da concentração de equilíbrio é,

$$c_n(\infty) = \frac{V_r}{V_1 V_2} N_n = \frac{N_n}{V_1 + V_2}. \quad (16)$$

Ou seja, no equilíbrio o número total de moles do soluto n está distribuído uniformemente pelo volume total dos dois compartimentos, $V_1 + V_2$.

Substituindo a equação (2) em (16) (lembre-se que a equação (2) vale para qualquer t), obtemos uma expressão para a concentração de equilíbrio em termos das concentrações iniciais:

$$c_n(\infty) = \frac{N_n}{V_1 + V_2} = \frac{V_1 c_n^1(0) + V_2 c_n^2(0)}{V_1 + V_2}. \quad (17)$$

Podemos observar os comportamentos das concentrações e do fluxo fazendo gráficos dessas quantidades em função do tempo. Um exemplo está mostrado na Figura 3.

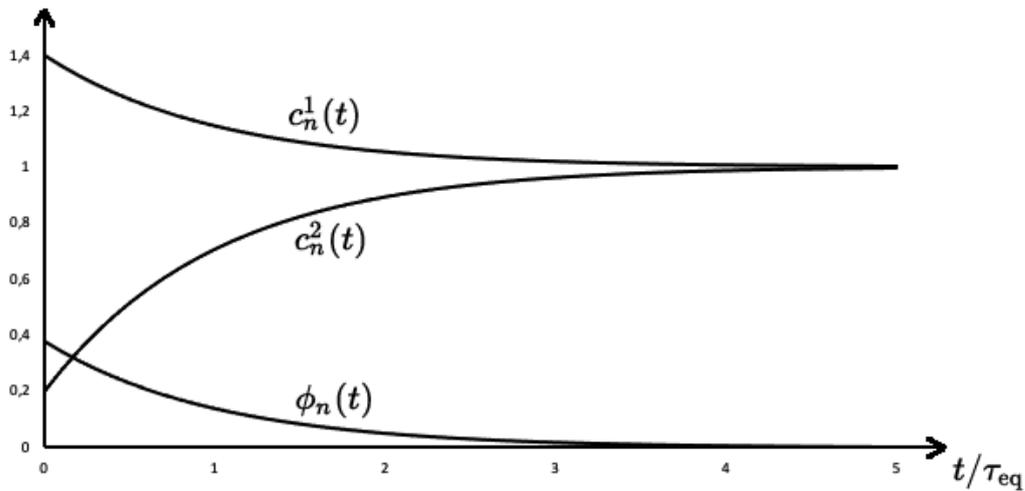


Figura 3: Variação temporal das concentrações c_n^1 e c_n^2 e do fluxo ϕ_n para o modelo de difusão entre dois compartimentos. O eixo vertical mostra c_n^1 , c_n^2 e ϕ_n e o eixo horizontal mostra o tempo parametrizado pela constante de tempo τ_{eq} . Para a construção do gráfico, as escalas foram normalizadas pela seguinte escolha de parâmetros: $N_n/(V_1 + V_2) = 1$, $V_2 = 4V_1$ e $P_n = 3/4$. Como condições iniciais, usou-se $c_n^1(0) = 1,4$ e $c_n^2(0) = 0,2$.

Note que embora a constante de tempo seja a mesma para $c_n^1(t)$ e $c_n^2(t)$, as *taxas de variação* de $c_n^1(t)$ e $c_n^2(t)$ não são iguais:

$$\frac{dc_n^1(t)}{dt} = \frac{(c_n(\infty) - c_n^1(0))}{\tau_{eq}} e^{-t/\tau_{eq}} \quad (18)$$

e

$$\frac{dc_n^2(t)}{dt} = \frac{(c_n(\infty) - c_n^2(0))}{\tau_{eq}} e^{-t/\tau_{eq}}. \quad (19)$$

Uma análise da expressão (13) para a constante de tempo de equilíbrio nos diz que quanto maiores forem a permeabilidade P_n ou a área da membrana A , menor será τ_{eq} . Isso faz sentido intuitivamente, pois aumentando-se a permeabilidade ou a área da membrana aumenta-se o fluxo através dela e, portanto, mais rapidamente o sistema chega ao equilíbrio.

Por outro lado, aumentando-se o volume dos compartimentos (isto é, aumentando-se V_r) aumenta-se a constante de tempo τ_{eq} . Isso também faz sentido intuitivamente, pois um aumento nos volumes dos compartimentos implica num aumento da quantidade de soluto que tem que se difundir até que se atinja o equilíbrio, causando um aumento no tempo necessário para o estabelecimento do equilíbrio.

Outra observação importante é que V_r é dominado pelo *menor* dos dois volumes. Por exemplo, se $V_1 \gg V_2$, então

$$V_r = \frac{V_1 V_2}{V_1 + V_2} \approx \frac{V_1 V_2}{V_1} = V_2.$$

Já se $V_2 \gg V_1$, então

$$V_r = \frac{V_1 V_2}{V_1 + V_2} \approx \frac{V_1 V_2}{V_2} = V_1.$$

Isso é importante para o caso de uma célula em um banho, como no desenho da esquerda na Figura 2. Em geral, o volume da célula V_i é muito menor que o volume do espaço extracelular V_e onde ela se encontra. Então, para o caso de uma célula em um banho

$$V_r \approx V_i. \quad (20)$$

3 Condição de validade da aproximação de membrana fina

Os resultados obtidos na seção anterior são válidos para a aproximação de membrana fina. O ponto central dessa aproximação foi a hipótese de que a lei de Fick para membranas é válida a cada instante de tempo.

A lei de Fick para membranas foi obtida (veja a aula passada) para o caso de um fluxo *estacionário* através da membrana, implicando que a concentração de soluto varia *linearmente* através dela.

Portanto, ficou implícito no estudo feito para uma membrana fina que o fluxo assumido como existente através da membrana até o equilíbrio ser atingido é estacionário.

Esta condição é válida apenas quando $\tau_{eq} \gg \tau_{est}$, ou seja, quando o tempo que o sistema leva para chegar ao equilíbrio é muito maior que o tempo que ele leva para atingir o estado estacionário.

Neste caso (e apenas nele) a aproximação feita de usar a lei de Fick para membranas para descrever o fluxo entre os dois lados pode ser considerada adequada.

Para determinar até que ponto a aproximação de membrana fina é boa, vamos calcular a razão entre as constantes de tempo de equilíbrio (τ_{eq}) e de estado estacionário (τ_{est}), usando as equações (13) desta aula e a equação (22) da aula

passada (repetida abaixo por conveniência):

$$\tau_{\text{est}} = \frac{d^2}{\pi^2 D_n}. \quad (21)$$

A razão entre elas é:

$$\frac{\tau_{\text{eq}}}{\tau_{\text{est}}} = \frac{V_r \pi^2 D_n}{A P_n d^2}. \quad (22)$$

Substituindo a expressão para a permeabilidade (equação (15) da aula passada),

$$P_n = \frac{D_n k_n}{d},$$

em (22), obtemos:

$$\frac{\tau_{\text{eq}}}{\tau_{\text{est}}} = \frac{V_r \pi^2 D_n d}{A D_n k_n d^2} = \frac{V_r \pi^2}{A k_n d}. \quad (23)$$

Assumindo que $k_n = 1$ para simplificar,

$$\frac{\tau_{\text{eq}}}{\tau_{\text{est}}} = \frac{V_r \pi^2}{A d}. \quad (24)$$

Se esta razão for grande, a aproximação de membrana fina é boa.

Para uma célula típica, o volume da solução externa a ela é muito maior que o volume da solução no seu interior, $V_e \gg V_i$, de maneira que podemos usar a aproximação dada por (20) e escrever:

$$\frac{\tau_{\text{eq}}}{\tau_{\text{est}}} = \frac{\pi^2 V_i}{A d}. \quad (25)$$

Aproximando a célula por uma esfera de raio r , o seu volume e a sua área superficial são, respectivamente:

$$V_i = \frac{4}{3} \pi r^3 \quad \text{e} \quad A = 4 \pi r^2,$$

de maneira que

$$\frac{V_i}{A} = \frac{r}{3}.$$

Portanto,

$$\frac{\tau_{\text{eq}}}{\tau_{\text{est}}} = \frac{\pi^2 r}{3 d}. \quad (26)$$

Um valor típico para r de uma célula ou organela é 1 μm , e para d é 10 nm. Para estes valores,

$$\frac{\tau_{\text{eq}}}{\tau_{\text{est}}} \approx 330.$$

Isto implica que, para células típicas, a aproximação de membrana fina é uma boa aproximação.

4 Método experimental para a determinação de P_n para membranas celulares

Alguns métodos experimentais para se medir a permeabilidade de membranas celulares a vários tipos de solutos são baseados no modelo de difusão entre dois compartimentos apresentado nesta aula.

Segundo esse modelo, a concentração intracelular de um soluto n varia no tempo de acordo com a equação (9):

$$c_n^i(t) = c_n^i(\infty) - (c_n^i(\infty) - c_n^i(0)) e^{-t/\tau}, \quad (27)$$

Vamos supor que o volume da célula é muito menor que o volume do espaço extracelular, de maneira que a constante de tempo de equilíbrio é dada por:

$$\tau_{\text{eq}} = \frac{V_r}{AP_n} \approx \frac{V_i}{AP_n}, \quad (28)$$

onde V_i é o volume da célula e A é a área da sua superfície.

A equação (27) pode ser reescrita como,

$$\frac{c_n^i(t) - c_n^i(\infty)}{c_n^i(0) - c_n^i(\infty)} = e^{-t/\tau_{\text{eq}}}.$$

Tomando o logaritmo dos dois lados da expressão acima, obtemos:

$$\ln \left(\frac{c_n^i(t) - c_n^i(\infty)}{c_n^i(0) - c_n^i(\infty)} \right) = -\frac{t}{\tau_{\text{eq}}}. \quad (29)$$

Se tivermos um meio de medir a concentração intracelular de n em função de t , de maneira que se possa determinar o valor assintótico $c_n^i(\infty)$, um gráfico em coordenadas semi-logarítmicas da quantidade entre parênteses na equação (29) em função do tempo terá a forma de uma reta com inclinação negativa (igual a $-1/\tau_{\text{eq}}$).

Portanto, determinando τ_{eq} pela inclinação da reta e estimando o volume V_i e a área superficial A da célula, podemos obter uma estimativa experimental para P_n usando a equação (28):

$$P_n = \frac{V_i}{A\tau_{\text{eq}}}. \quad (30)$$