



ANÁLISE DA MEMÓRIA DE LONGO ALCANCE NO PROCESSO CINÉTICO DO CANAL IÔNICO FORMADO POR GRAMICIDINA A

Marcia Pereira da Silva^{1*}, Cláudio Gabriel Rodrigues², Romildo de Albuquerque Nogueira¹

¹Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, UFRPE; ²Departamento de Biofísica e Radiobiologia, UFPE

*solaresmps@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

A gramicidina A é um pentadecapeptídeo produzido pelo *Bacillus brevis* (SARGES; WITCOP, 1965) com capacidade de formar canais iônicos em membranas lipídicas (SAWYER; KOEPE II; ANDERSEN, 1990; ANDERSEN; KOEPE II, 1992) com seletividade a cátions monovalentes (WALLACE 1990). Tais canais, quando formados na membrana celular, impedem a célula de manter seu potencial eletroquímico (URRY, 1971), mecanismo responsável por sua ação antibiótica (XIONG et al., 2005). Esse peptídeo possui uma importância na área médica e veterinária, que tem sido explorada ao longo das últimas décadas (HERRELL; HEILMAN, 1941; WADESTEN et al., 1985; BOURINBAIAR; COLEMAN, 1997; BOSSCHA et al., 2004) e mais recentemente tem se analisado seu potencial farmacológico (em diferentes áreas como na ação antitumoral (DAVID et al., 2013; DAVID et al., 2014). A pesar da simplicidade molecular e estrutural dos canais formados pela gramicidina, ela tem sido utilizada como um modelo experimental para o estudo de canais iônicos e muito da compreensão sobre condutância iônica, permeabilidade, seletividade dos canais iônicos bem como das interações entre as proteínas formadoras de canais e os lipídios de membrana tem sido obtidos a partir de estudos com canais formados por gramicidina A (HLADKY; HAYDON, 1970; ANDERSEN, 1983; ANDERSEN; KOEPE II, 1992; CIFU, KOEPE II; ANDERSEN, 1992; LUNDBEAK et al., 1996; ANDERSEN; KOEPE II ROUX, 2005; KELKAR; CHATTOPADHYAY, 2007; ALEJO, et al., 2013).

A cinética de abertura e fechamento dos canais formados pela gramicidina A não possui o mesmo mecanismo dos canais mais complexos formados por grandes subunidades proteicas, como os canais de potássio ou os canais de sódio, por exemplo (O'CONNELL; KOEPE; ANDERSEN, 1990; LUM et al., 2017). Tais canais apresentam mecanismo de *gating*, onde as transições entre os diferentes estados de condutância ocorrem através de mudanças conformacionais na proteína em resposta a estímulos externos, como variação de voltagem, estresse mecânico e a presença de ligantes (HILLE 2001).

De acordo com o modelo clássico, os canais formados por gramicidina A abre e fecham através de um processo de dimerização e dissociação entre dois monômeros de gramicidina A, cada um oriundo de uma das monocamadas que compõe a bicamada lipídica (Figura 1). A abertura desse canal ocorre quando os monômeros se associam formando um poro na bicamada lipídica. A estabilidade do canal ocorre através de ligações de hidrogênio na região formil-NH terminal de cada monômero. A transição para o estado fechado ocorre quando os monômeros se dissociam em subunidades não condutivas e interrompe o fluxo de íons através do poro (O'CONNELL; KOEPE II; ANDERSEN, 1990; LUM et al., 2017). Classicamente o mecanismo de *gating* dos canais iônicos tem sido interpretado como um processo Markoviano (COLQUHOUN; HAWKES, 1981; SANSOM et al., 1989.), onde o canal iônico transita entre poucos estados de condutância, separados por discretas e elevadas barreiras de energia, e a probabilidade de transitar entre os estados abertos e fechados é tempo independente. Dessa forma a transição entre os estados aberto e fechado no tempo $t+1$ depende unicamente do estado em que o canal se encontra no tempo t , ou seja, o processo é randômico.

No entanto, muitos estudos têm demonstrado a presença de memória longa, ou correlação de longo alcance, na cinética dos canais iônicos. A propriedade de memória longa em um dado sistema indica uma dependência persistente ou antipersistente entre os dados observados ao longo do tempo. Canais de potássio, canais de potássio dependentes de cálcio, canais de sódio e canais de cloreto analisados apresentaram esse memória de longo alcance tanto no tempo de permanência nos diferentes estados de condutância (VARANDA et al., 2000; SIWY et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2006; WAWRZKIEWICZ et al., 2012; FUENTE et al., 2017), quanto nos valores de corrente iônica observados nos registros de canais unitários (MERCİK; WERON, 1999).

Diferentes métodos matemáticos têm sido empregados para análise de memória longa em diferentes processos fisiológicos, como a Análise de Hurst, Análise Multifractal e Análise de Flutuação Destendenciada (DFA). O método de DFA é um método utilizado para quantificação de memória longa em séries temporais não-estacionárias, tendo a vantagem de evitar a detecção espúria de memória aparente quando esta é apenas artefatos da não estacionariedade dos dados.

Os estudos sobre a presença de memória no processo cinético de canais iônicos têm sido realizados em canais de sódio, potássio e cloreto (NOGUEIRA; VARANDA; LIEBOVITCH, 1995; TOIB; LYAKHOV; MAROM, 1998; VARANDA et al., 2000; ASTASHEV, KAZACHENKO; GRIGORIEV 2007; FUENTE et al., 2017) formados por proteínas transmembranas constituídas por múltiplas subunidades, subdividida em domínios com funções específicas. Além disso, esses canais apresentam mecanismo de *gating* (HILLE, 2001;

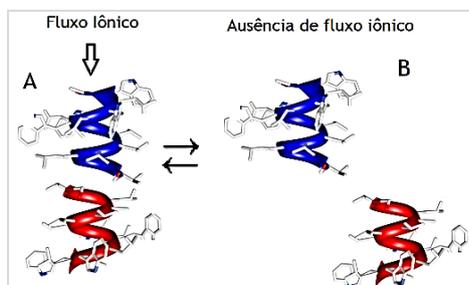


Figura 1. Canal iônico formado por dois monômeros de gramicidina A, as diferentes cores para cada monômero representam a origem a partir de monocamadas opostas que compõe a bicamada lipídica. Adaptado de Protein Data Bank (PDB).

POLLARD; EARNSHAW, 2006; HANKE; SCHULUE, 2012). De acordo com o modelo tradicional os canais iônicos formados por gramicidina A possuem um processo cinético muito mais simples e a ausência de um mecanismo de *gating*. Dessa forma é considerável investigar se a propriedade de memória longa também está presente em canais com mecanismo cinético mais simples. O entendimento desse mecanismo possui importância para uma maior compreensão dos processos que regem o processo cinético dos canais iônicos e entender se a propriedade de memória longa é uma característica apenas presente em canais complexos e que apresentam mecanismo de *gating*.

O objetivo do presente estudo foi de investigar a presença de memória longa no processo de abertura e fechamento dos canais iônicos formados por gramicidina A através do método de análise não-linear Análise de Flutuação Destendenciada (DFA).

MATERIAIS E MÉTODOS

Registro de canal unitário

Os registros de canais unitários foram realizados em bicamadas artificial plana de DPhPC formadas pela técnica de Montal e Mueller (1972) em um orifício de 60 μm de diâmetro presente em uma partição de Politetrafluoretileno (Teflon®) que subdivide uma câmara de Teflon® em dois compartimentos, cada um com volume final igual a 1,2 ml de solução eletrolítica. A solução eletrolítica utilizada nos experimentos foi NaCl 1M (não tamponada).

Os registros da atividade do canal unitário formado por gramicidina A foram obtidos em potencial de membrana igual a 200 mV. A gramicidina A (Sigma-Aldrich, USA) foi diluída em etanol em concentração de 609 μM . Dessa solução estoque de gA foram adicionados uma alíquota de 0,5-0,6 μL em ambos os compartimentos da câmara, resultando uma concentração final na câmara de 0,25-0,3 μM . Todos os experimentos foram realizados a $23 \pm 1^\circ\text{C}$.

Os registros de canal unitário foram obtidos utilizando um gerador de funções (Minipa, modelo MFG-4201A), um amplificador de *patch clamp* (Molecular Devices, USA) e uma placa conversora analógico-digital (Digidata 1440, Molecular Devices, USA) conectado a um microcomputador IBM PC, executando o Programa pClamp 10.5 (Molecular Devices, USA). Esse sistema de monitoramento e aquisição dos registros das correntes iônicas estava conectado a câmara de Teflon® através de eletrodos de Ag/AgCl em pontes salinas do tipo Ágar-KCl 3M (3% p/v). Todos os registros de corrente foram adquiridos a 1 kHz posteriormente processados a 10 Hz por um filtro digital.

Obtenção das séries temporais

As séries temporais analisadas foram obtidas a partir dos registros de canais unitários através dos dados gerados após a detecção dos eventos de abertura e fechamento do canal de gramicidina (idealização dos dados) realizado no Clampfit (versão 10.5.1.0, Molecular Devices, LLC) (Figura 2). O Clampfit gera seqüências de tempos que o canal gastou em cada estado de condutância ao longo do registro. Três tipos de séries foram analisados: série T, composta pela seqüência alternada dos tempos no estado aberto e fechado; série A, formada pela seqüência dos tempos apenas no estado aberto; e série F, constituída pela seqüência de tempos de permanência do canal no estado fechado.

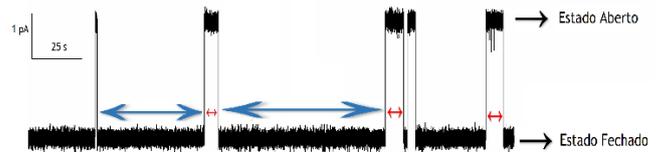


Figura 2. Registro típico do canal de gramicidina A. Setas vermelhas indicam o tempo de permanência nos eventos de abertura e as setas azuis os tempos de permanência nos eventos de fechamento do canal. Três tipos de séries temporais foram geradas a partir dos registros de canais unitários: séries T (séries compostas pelas seqüências de tempos de permanência nos dois estados de condutância, aberto e fechado); Séries A, compostas pelas seqüências de tempos de permanência apenas no estado aberto; e as séries F, construídas com as seqüências de tempos do estado fechado. Os tempos utilizados para a construção das séries são obtidos através dos Δt s gastos em cada evento de abertura e fechamento do canal formado pela gramicidina A. Potencial transmembrana de 200mV.

Durante a obtenção das séries alguns dados dos registros das correntes iônicas foram deletados, devido ao fato de se tratar de ruídos externos ao sinal ou a presença simultânea de múltiplos canais unitários no registro da corrente iônica, de modo que as séries analisadas apresentaram uma descontinuidade nos dados.

Análise de Análise de Flutuação Destendenciadas

A Análise de Flutuações Destendenciadas é um método matemático com a capacidade de detectar a presença de correlação de longo alcance ou o comportamento aleatório em séries numéricas e foi proposto por Peng et al. (1994). O algoritmo utilizado para a análise com o método DFA foi o disponível no site *Physionet* (<https://physionet.org/physiotools/dfa/>) (GOLDBERGER et al., 2000).

O método consiste inicialmente na obtenção de uma série integrada, $y(k)$, a partir da série temporal original de acordo com a equação:

$$y(k) = \sum [y(i) - \bar{y}]$$

Onde $y(i)$ é o valor de tempo de permanência na série original e \bar{y} é a média da série original. Em seguida a série temporal integrada é dividida em N segmentos e ajustadas retas aos dados neles contidos, pelo método dos mínimos quadrados. Estas retas que representam a tendência local de cada segmento ($y_n(k)$), ao serem subtraídas da série integrada ($y(k)$), permite destendenciar a série temporal. Após destendenciar a série temporal calcula-se as flutuações $F(n)$ para cada intervalo de tamanho n da série calculando um $F(n)$ para cada segmento através da equação:

$$F(n) = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{k=1}^N y(k) - y_n(k)}$$

O cálculo de $F(n)$ é repetido várias vezes para valores crescentes de n. Normalmente o valor de $F(n)$ aumenta com o aumento do tamanho de n.

Plota-se um gráfico duplo-log de $F(n)$ x n para determinar a relação entre a função de flutuação, $F(n)$, com o tamanho dos segmentos e o coeficiente angular da regressão linear nos pontos do gráfico $\log F(n)$ x $\log n$ é denominado de αDFA . O valor do αDFA nos fornece informações sobre a presença ou ausência de memória no comportamento da série dos tempos de permanência do canal iônicos nos estados abertos e fechados.

Dentre os possíveis resultados para parâmetro αDFA e o significado de tais valores para o comportamento cinético do canal iônicos temos: $\alpha = 0,5$: indica um comportamento aleatório da série; $0,0 < \alpha < 0,5$: indica a presença de uma memória anti-persistente no comportamento da série, ou seja, um intervalo de tempo de permanência longo do canal no estado aberto, por exemplo, tem uma maior probabilidade de ser seguido por um intervalo curto e o mesmo serve para o contrário; e $0,5 < \alpha < 1,0$: que indica a

presença de uma memória persistente no comportamento da série, ou seja, existe maior probabilidade de um tempo de permanência curto ser seguido por outro curto.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os traçados da corrente obtidos em nossos registros mostram o comportamento típico da corrente iônica no canal de gA, ou seja, saltos discretos indicativo da formação de canais unitários (Figura 3).

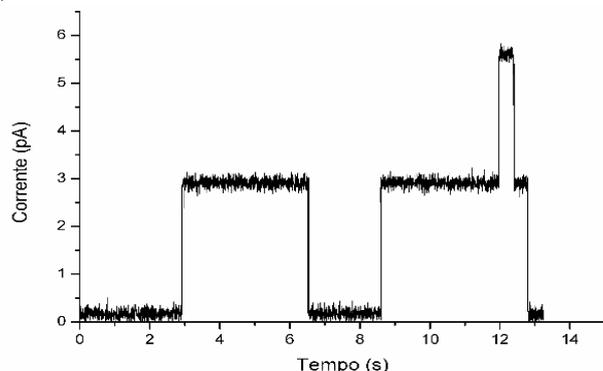


Figura 3. Registro típico corrente iônica dos canais de gA em bicamada plana de DPhPC/hexano com potencial transmembrana aplicado de 200 mV. Cada salto discreto representa a formação de um canal.

Os registros de correntes iônicas de canais formados por gA em bicamadas lipídicas de DPhPC apresentaram uma condutância média de $15,54 \pm 0,055$ pS (Figura 4), os valores estão de acordo com a condutância características desses canais para as mesmas condições experimentais observados em outros estudos (WILLIAMS et al., 1992).

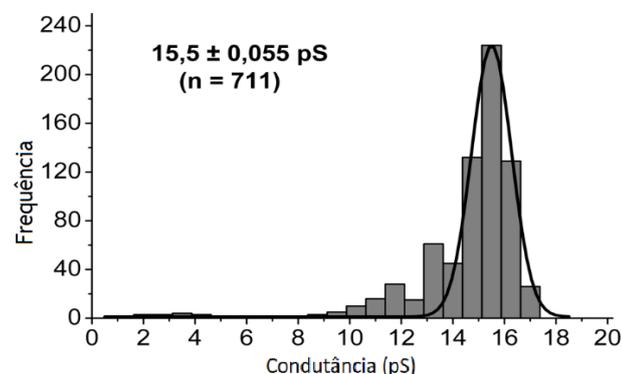


Figura 4. Histograma da condutância de canais iônicos formados por gA em bicamada artificial plana de DPhPC.

Foram analisados um total de seis séries (totalizando 2068 eventos de abertura e fechamento nas seis séries), e suas respectivas séries A (séries formadas apenas pelos tempos de permanência no estado aberto) e F (séries compostas apenas pelos tempos de permanência no estado fechado). Os resultados obtidos através da análise das séries temporais pelo método DFA mostraram a ausência de memória longa tanto para toda a sequência de tempos de abertura e fechamento, quanto para a sequência dos tempos abertos ou fechados, analisados separadamente (Tabela 1).

Os resultados do teste Kruskal-Wallis ($p=0,32$) e *post-hoc* Dunn mostraram que não existe diferença significativa tanto quando comparado os valores do αDFA das séries Ts com as séries As e Fs, tampouco quando comparado os valores do αDFA das séries As e Fs entre si.

Tabela 01. Tabela 2: Valores dos alfas do DFA das séries total (ST), aberta (SA) e fechada (SF).

Registro	αDFA_{ST}	αDFA_{SA}	αDFA_{SF}
01	0,46	0,66	0,53
02	0,53	0,59	0,64
03	0,49	0,50	0,55
04	0,41	0,51	0,44
05	0,55	0,47	0,66
06	0,49	0,54	0,47
Média (\pm Desvio Padrão)	0,49 ($\pm 0,05$)	0,54 ($\pm 0,07$)	0,55 ($\pm 0,09$)

A presença de um comportamento aleatório na cinética dos canais de gA observado nas nossas análises corrobora com o modelo clássico empregado para o processo cinético desses canais. No modelo proposto o fechamento dos canais gA dependem não de mudanças conformacionais da proteína formadora do canal, mas sim da quebra das ligações de hidrogênio entre os monômeros de gramicidina e uma variação de distância δ entre os monômeros que está relacionada com a energia de ativação intrínseca do canal mas também a energia de deformação das monocamadas lipídicas (LUNDBEAK et al., 1996). Por outro lado, o processo de abertura desses canais depende de um encontro entre esses monômeros, subunidades não condutivas, e a eventual dimerização entre eles formando um canal que permite o fluxo iônico (O'CONNELL; KOEPEL II; ANDERSEN, 1990; LUM et al., 2017). No entanto esse encontro ocorre de modo aleatório, já que de acordo com Harms et al. (2003), os monômeros dissociados estão em movimento difusional na bicamada lipídica e a dinâmica dos canais iônicos formados por gA pode ser significativamente diferente quando se muda a composição da bicamada lipídica, devido ao fato da transição entre os estados abertos e fechados estarem associados com o movimento de difusão numa bicamada particular.

Com base nisso, podemos entender que a associação dos monômeros no processo de dimerização durante a formação do canal de gA ocorre de modo randômico e é dependente do tipo de lipídio presente na bicamada lipídica. Essas questões poderiam explicar a presença da aleatoriedade na cinética dos canais de gA em bicamada de DPhPC. Em outras palavras, a ausência de uma memória de longo alcance no processo de abertura e fechamento dos canais iônicos formados por gramicidina A, pode estar relacionado com a ausência do mecanismo de gating desses canais. Propriedade esta que está presente nos canais de potássio, de cloreto e de sódio (HILLE 2001), nos quais tem sido encontrado memória longa (NOGUEIRA; VARANDA; LIEBOVITCH, 1995; VARANDA et al., 2000; SIWY et al., 2001; LAN et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2006; ASTASHEV; KAZACHENKO; GRIGORIEV, 2007; WAWRZKIEWICZ et al., 2012; FUENTE et al., 2017) cujo processo cinético não depende do encontro aleatório entre suas subunidades, dependendo sim de um mecanismo mais complexo onde a macromolécula passa por múltiplos estados aberto e fechados com diferentes valores de energia.

As séries temporais analisadas possuíam descontinuidades originadas nas deleções de dados dos registros das correntes iônicas devido ao fato de se tratar de ruídos externos ao sinal ou a presença simultânea de múltiplos canais unitários no registro. De acordo com Chen et al. (2002) tais descontinuidades podem afetar o valor αDFA dependendo do tipo de comportamento que a série apresenta originalmente antes da deleção de dados (memória persistente, memória anti-persistente ou comportamento randômico), do percentual de corte e da quantidade de descontinuidades geradas ao longo da série. Esses autores demonstraram que a perda de dados em uma série temporal não afeta os valores do alfa nas análises do DFA quando as séries apresentam um comportamento aleatório ou com uma memória

longa persistente ($\alpha > 0,5$) originalmente. Eles observaram que uma perda de até 50% dos dados não modifica os resultados do DFA. No entanto de acordo com seus resultados a perda de dados em séries simuladas com a presença de memória antipersistente pode afetar o valor do α do DFA. Eles demonstraram que em tais séries uma perda de 1% já é suficiente para modificar o valor do α , elevando o esse valor para próximo de 0,5, detectando um comportamento aleatório onde não existe, destruindo assim o regime de memória antipersistente presente na série original.

Sendo assim, novos protocolos devem ser testados de modo a diminuir a necessidade de deleções de dados nos registros de canais unitários de gramicidina A, realizados durante nossas análises em regiões com presença de ruídos, geralmente presentes em séries eletrofisiológicas, como também em áreas que apresentavam múltiplos canais unitários simultâneos. Assim pode-se comprovar a presença de um comportamento aleatório na cinética dos canais formados pela gramicidina A ou demonstrar que esse processo apresenta na verdade uma correlação antipersistente e a perda de dados nas séries temporais afetaram o valor dos resultados do DFA.

CONCLUSÕES

Nossas análises demonstraram que a cinética de transição entres os estados aberto e fechado do canal de gA bem como dentro dos estados abertos e fechados separadamente são processos aleatórios. Dessa forma nossos resultados corroboram com o modelo canônico empregado classicamente para o processo cinético de gramicidina A. De acordo com esse modelo os canais iônicos formados por gA transitam entre dois estados, condutivos e não condutivos (aberto e fechado), através de um processo de dimerização e dissociação entre monômeros originados de lados opostos na bicamada lipídica.

Conclui-se, portanto, que o processo cinético do canal de gramicidina A é desprovido de memória. Nossos resultados que mostraram o fechamento e a abertura dos canais formados por gramicidina A difere dos canais formados por grandes subunidades protéicas, como os canais de potássio, sódio e cloreto, que apresentam um comportamento determinístico em sua cinética.

REFERÊNCIAS

ALEJO, J. L.; BLANCHARD, S. C.; ANDERSEN, O. S. Small-molecule photostabilizing agents are modifiers of lipid bilayer properties. *Biophysical Journal*, v. 104, n. 11, p. 2410-2418, 2013.

ANDERSEN, O. S. Ion movement through gramicidin A channels. Single-channel measurements at very high potentials. *Biophysical Journal*, v. 41, n. 2, p. 119-133, 1983.

ANDERSEN, O. S.; KOEPPE, R. E. D. Molecular determinants of channel function. *Physiological Reviews*, v. 72, n. suppl 4, p. S89-S158, 1992.

ANDERSEN, O.S.; KOEPPE II, R.E.; ROUX, B. Gramicidin channels. *IEEE Transactions on Nanobioscience*, v. 4, n. 1, p. 10-20, 2005.

ASTASHEV, M. E.; KAZACHENKO, V. N.; GRIGORIEV, P. A. Alamethicin channel kinetics: Studies using fluctuation analysis and multifractal fluctuation analysis. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*, v. 1, n. 3, p. 246-252, 2007.

BOSSCHA, M. I. *et al.* The efficacy and safety of topical polymyxin B, neomycin and gramicidin for treatment of presumed bacterial corneal ulceration. *British Journal of Ophthalmology*, 88:25-28, 2004.

BOURINBAIAR, A. S.; COLEMAN, C. F. The effect of gramicidin, a topical contraceptive and antimicrobial agent with anti-HIV

activity, against herpes simplex viruses type 1 and 2 in vitro. *Archives of Virology*, v. 142, n. 11, p. 2225-2235, 1997.

CHEN, Z. *et al.* Effect of nonstationarities on detrended fluctuation analysis. *Physical Review E*, v. 65, n. 4, p. 041107, 2002.

CIFU, A. S.; KOEPPE II, R. E., ANDERSEN, O.S. On the supramolecular organization of gramicidin channels. The elementary conducting unit is a dimer. *Biophysical Journal*, v. 61(1), p. 189-203, 1992.

COLQUHOUN, David; HAWKES, A. G. On the stochastic properties of single ion channels. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, v. 211, n. 1183, p. 205-235, 1981.

DAVID, J.M. *et al.* Gramicidin A induces metabolic dysfunction and energy depletion leading to cell death in renal cell carcinoma cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2013

DAVID, J.M. *et al.* Gramicidin A blocks tumor growth and angiogenesis through inhibition of hypoxia-inducible factor in renal cell carcinoma. *Molecular Cancer Therapeutics*, v. 13, n. 4, p. 788-799, 2014.

FUENTE, I.M. *et al.* Dynamic properties of calcium-activated chloride currents in *Xenopus laevis* oocytes. *Scientific Reports*, v. 7, p. 41791, 2017.

GOLDBERGER A.L. *et al.*, PhysioBank, PhysioToolkit, and PhysioNet: Components of a New Research Resource for Complex Physiologic Signal. *Circulation* 1001 (23): e2015-e220 [Circulation Electronic Pages; <http://circ.ahajournals.org/content/101/23/e215.full>]; 2000.

HANKE, W.; SCHULUE, W.R. *Planar lipid bilayers: methods and applications*. Academic Press, 2012.

HARMS, G.S. *et al.* Probing conformational changes of gramicidin ion channels by single-molecule patch-clamp fluorescence microscopy. *Biophysical Journal*, v. 85, n. 3, p. 1826-1838, 2003.

HILLE, B. *Ion Channels of Excitable Membranes*. 3 ed. Sunderland: Sinauer, 2001. p. 814.

HLADKY, S. B.; HAYDON, D. A. Discreteness of conductance change in bimolecular lipid membranes in the presence of certain antibiotics. *Nature*, v. 225, n. 5231, p. 451-453, 1970.

HERRELL, W. E.; HEILMAN, D. Experimental and clinical studies on gramicidin. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 20, n. 5, p. 583-591, 1941.

KELKAR, D.A.; CHATTOPADHYAY, A. The gramicidin ion channel: a model membrane protein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, v. 1768, n. 9, p. 2011-2025, 2007.

LUM, Kevin *et al.* Exchange of gramicidin between lipid bilayers: implications for the mechanism of channel formation. *Biophysical Journal*, v. 113, n. 8, p. 1757-1767, 2017.

LUNDBÆK, J. A. *et al.* Membrane stiffness and channel function. *Biochemistry*, v. 35, n. 12, p. 3825-3830, 1996

MERCIK, S.; WERON, K.; SIWY, Z. Statistical analysis of ionic current fluctuations in membrane channels. *Physical Review E*, v. 60, n. 6, p. 7343, 1999.

MONTAL, M.; MUELLER, P. Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers and a study of their electrical properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 69, n. 12, p. 3561-3566, 1972.

NOGUEIRA, R. A.; VARANDA, W. A.; LIEBOVITCH, L. S. Hurst analysis in the study of ion channel kinetics. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research= Revista Brasileira de Pesquisas Médicas e Biológicas*, v. 28, n. 4, p. 491-496, 1995.

O'CONNELL, A. M., KOEPPE II, R.E., ANDERSEN, O.S. Kinetics of Gramicidin Channel Formation in Lipid Bilayers: Transmembrane Monomer Association. *Science*, v. 250. p. 1256-1259, 1990.

OLIVEIRA, R.A. *et al.* Long-term correlation in single calcium-

- activated potassium channel kinetics. **Physica A: Statistical Mechanics and Its Applications**, v. 364, p. 13-22, 2006.
- POLLARD, T. D.; EARNSHAW, W. C. E **Biologia Celular**. Rio de Janeiro. Elsevier, 2006.
- PENG, C.K. *et al.* Mosaic organization of DNA nucleotides. **Physical Review E**, v. 49, n. 2, p. 1685, 1994.
- SANSOM, M. S. *et al.* Markov, fractal, diffusion, and related models of ion channel gating. A comparison with experimental data from two ion channels. **Biophysical Journal**, v. 56, n. 6, p. 1229-1243, 1989.
- SARGES, R.; WITKOP, B. Gramicidin AV The structure of valine-and isoleucine-gramicidin A. **Journal of the American Chemical Society**, v. 87, n. 9, p. 2011-2020, 1965.
- SAWYER, D.B.; KOEPPE II, R.E.; ANDERSEN, O.S. Gramicidin single-channel properties show no solvent-history dependence. **Biophysical Journal**, v. 57, n. 3, p. 515-523, 1990.
- SIWY, Z. *et al.* Application of dwell-time series in studies of long-range correlation in single channel ion transport: analysis of ion current through a big conductance locust potassium channel. **Physica A**, v. 297, p. 79-96, 2001.
- TOIB, A.; LYAKHOV, V.; MAROM, S. Interaction between duration of activity and time course of recovery from slow inactivation in mammalian brain Na⁺ channels. **Journal of Neuroscience**, v. 18, n. 5, p. 1893-1903, 1998.
- URRY, D. W. The Gramicidin A Transmembrane Channel: A Proposed $\pi(L,D)$ Helix. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 68, n. 3, p. 672-676, Mar. 1971.
- VARANDA, W.A. *et al.* Hurst analysis applied to the study of single calcium-activated potassium channel kinetics. **Journal of Theoretical Biology**, v. 206, n. 3, p. 343-353, 2000.
- XIONG, Y. Q. *et al.* Functional interrelationships between cell membrane and cell wall in antimicrobial peptide-mediated killing of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 8, p. 3114-3121, 2005.).
- WALLACE, B. A. Gramicidin channels and pores. **Annual review of biophysics and biophysical chemistry**, v. 19, n. 1, p. 127-157, 1990.
- WADSTEN, C. J. *et al.* A randomized clinical trial of two topical preparations (framycitin/gramicidin and oxytetracycline/hydrocortisone with polymyxin B) in the treatment of external otitis. **Archives of Oto-rhino-laryngology**, v. 242, n. 2, p. 135-139, 1985.
- WAWRZKIEWICZ, A. *et al.* On the simple random-walk models of ion-channel gate dynamics reflecting long-term memory. **European Biophysics Journal**, v. 41, n. 6, p. 505-526, 2012.
- WILLIAMS, L.P. *et al.* Molecular and channel-forming characteristics of gramicidin K's: a family of naturally occurring acylated gramicidins. **Biochemistry**, v. 31, n. 32, p. 7311-7319, 1992.