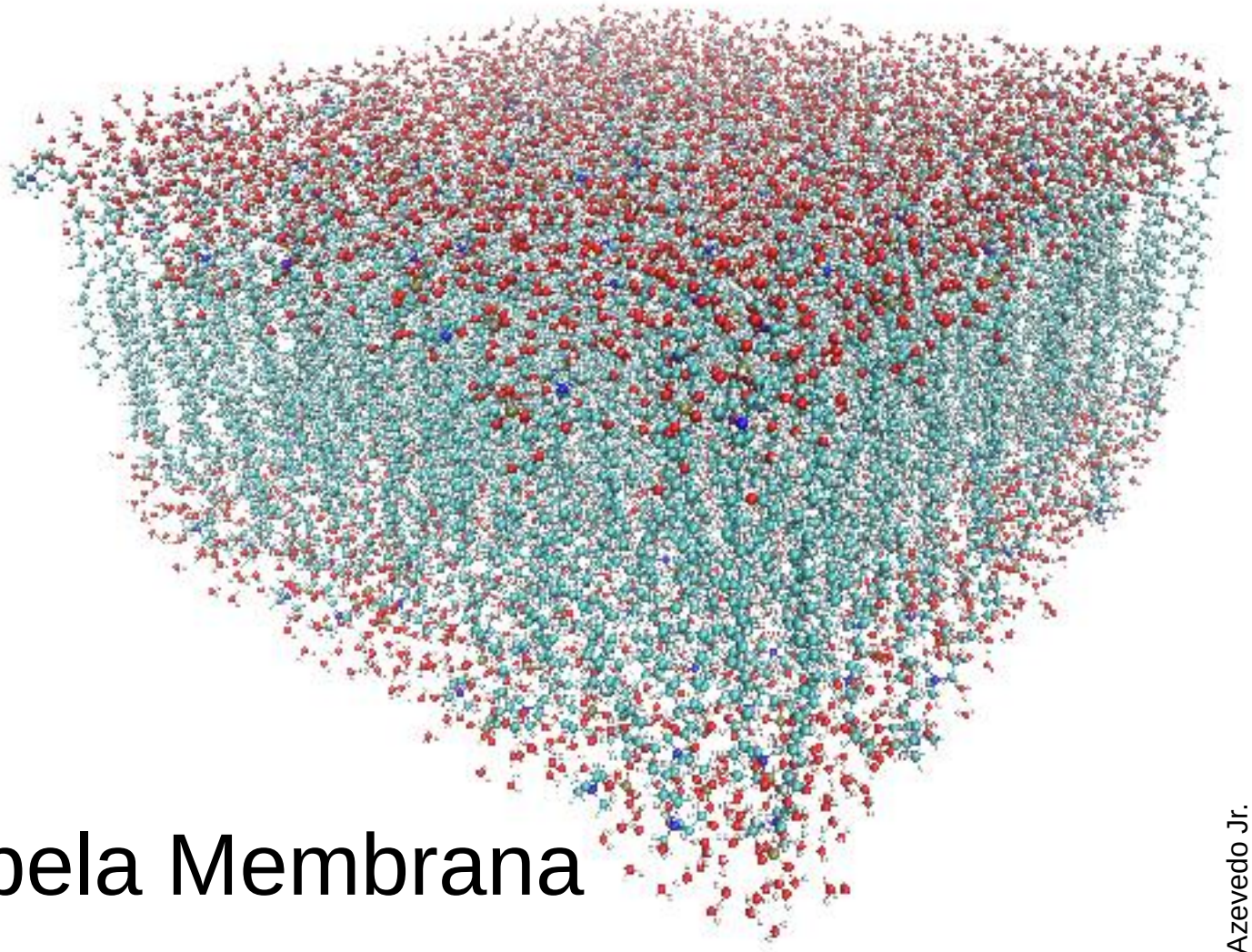
Biofísica

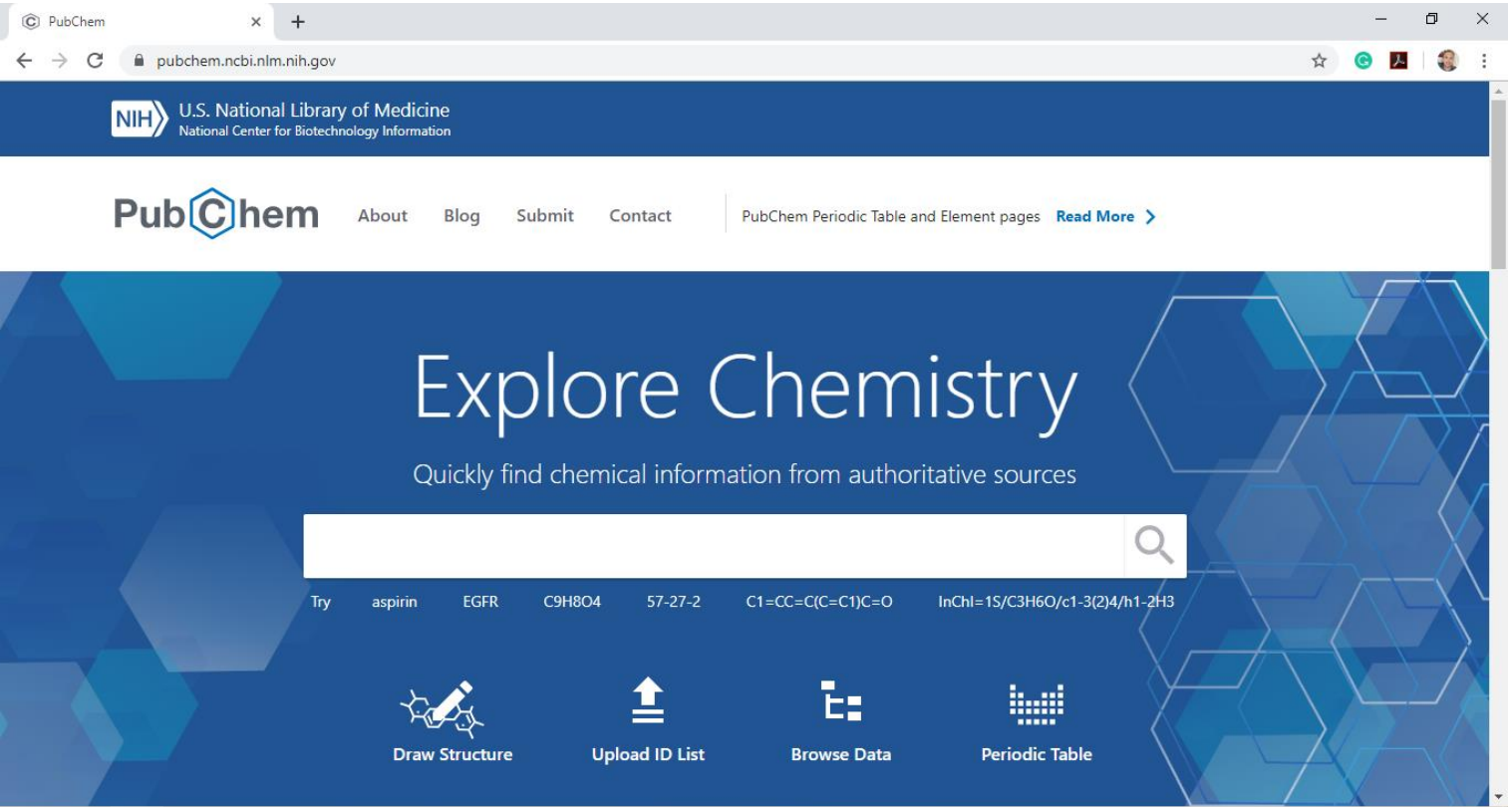


Transporte pela Membrana

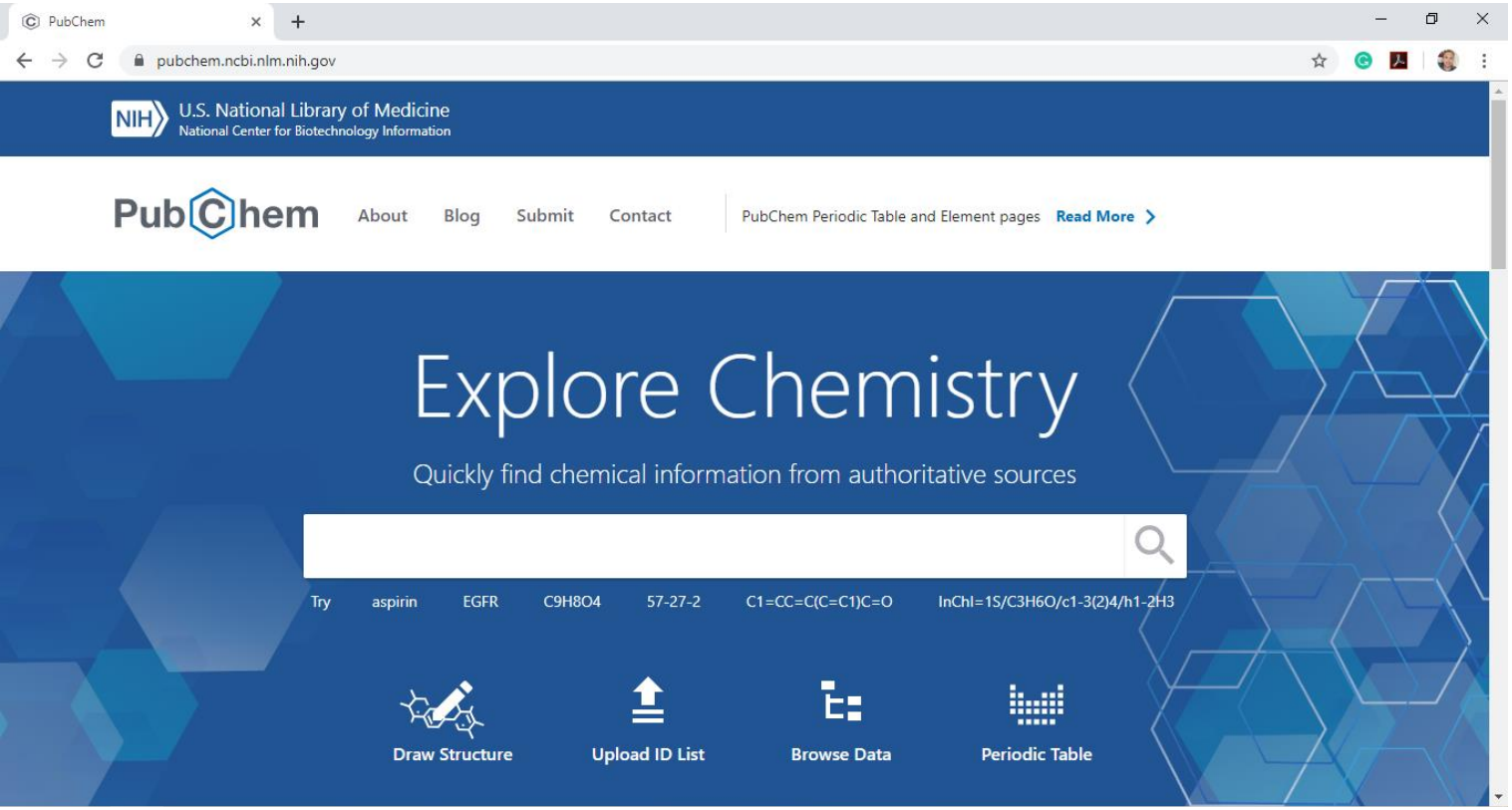
Prof. Dr. Walter F. de Azevedo Jr.

© 2020 Dr. Walter F. de Azevedo Jr.

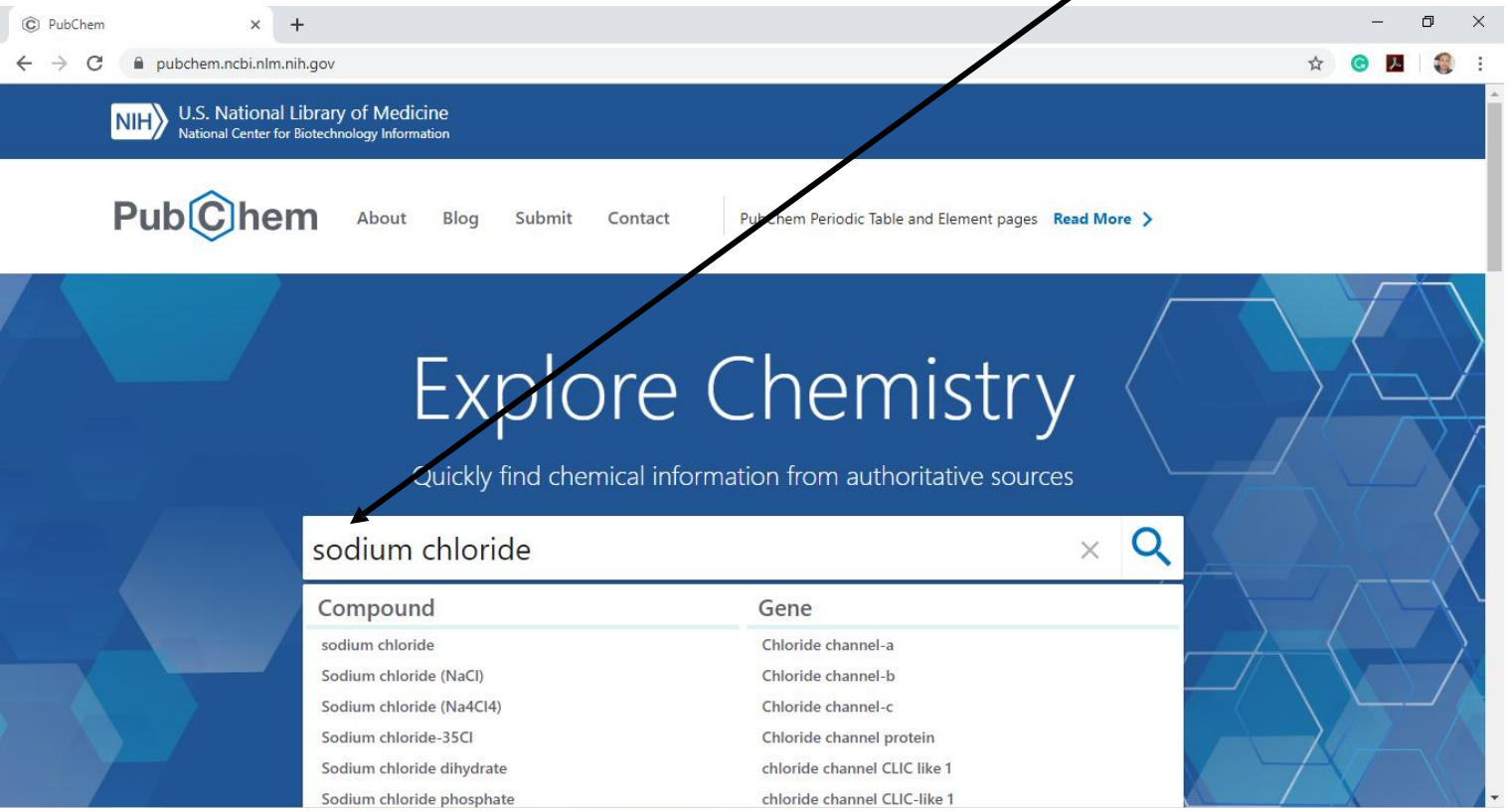
No estudo de fármacos é comum lidarmos com reagentes diversos para o preparo de soluções. Informações sobre parâmetros físico-químicos e biológicos podem ser encontradas em base de dados, como o PubChem (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/). O PubChem permite uma busca por reagentes específicos, abaixo temos a página de entrada do PubChem.



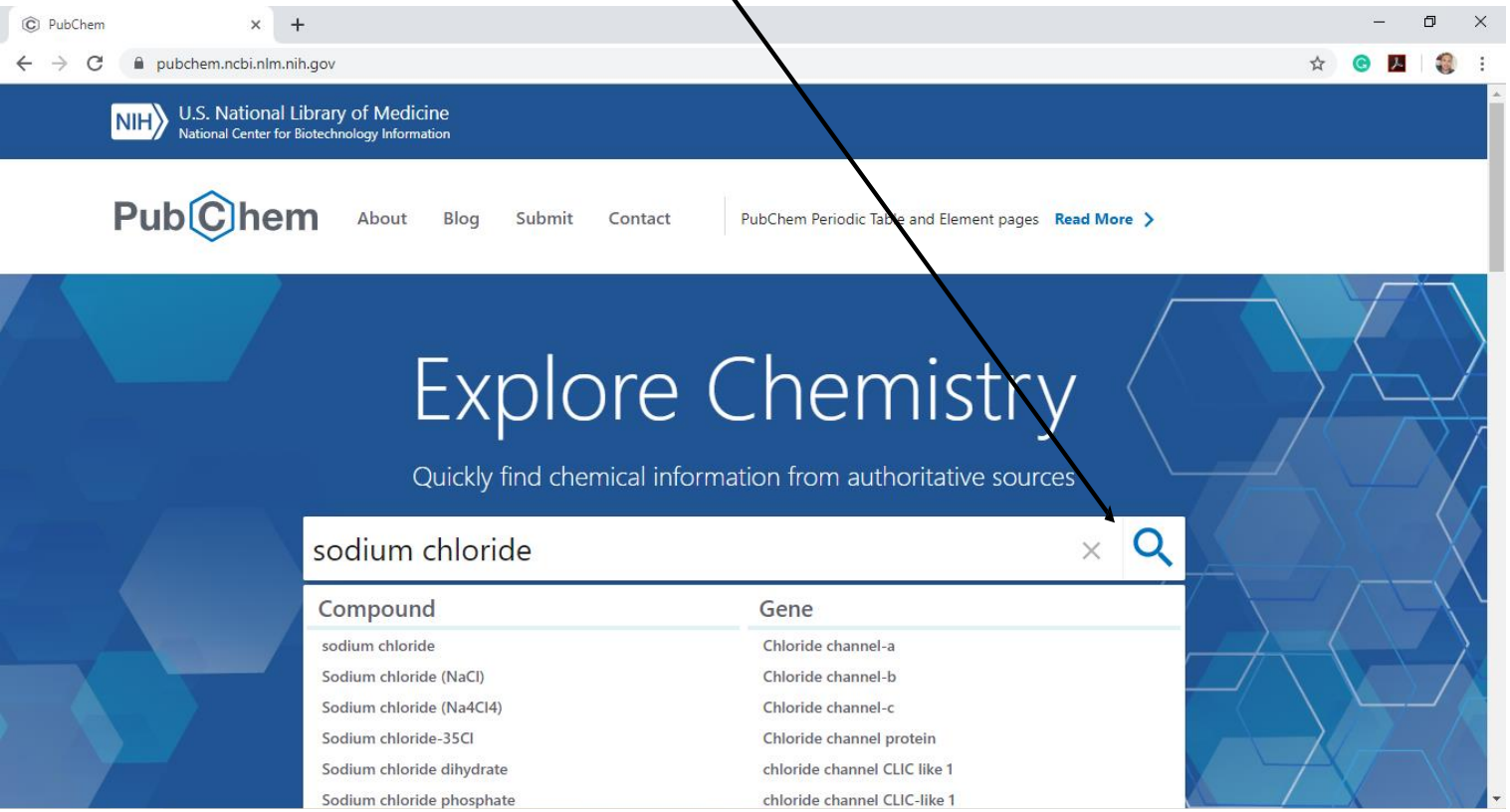
Para ilustrar, vamos considerar uma busca pelo cloreto de sódio (NaCl) no PubChem. As informações do PubChem serão usadas posteriormente para a preparação de uma solução de NaCl. Para a busca por substâncias no PubChem, usaremos o nome em inglês, no caso “sodium chloride”.



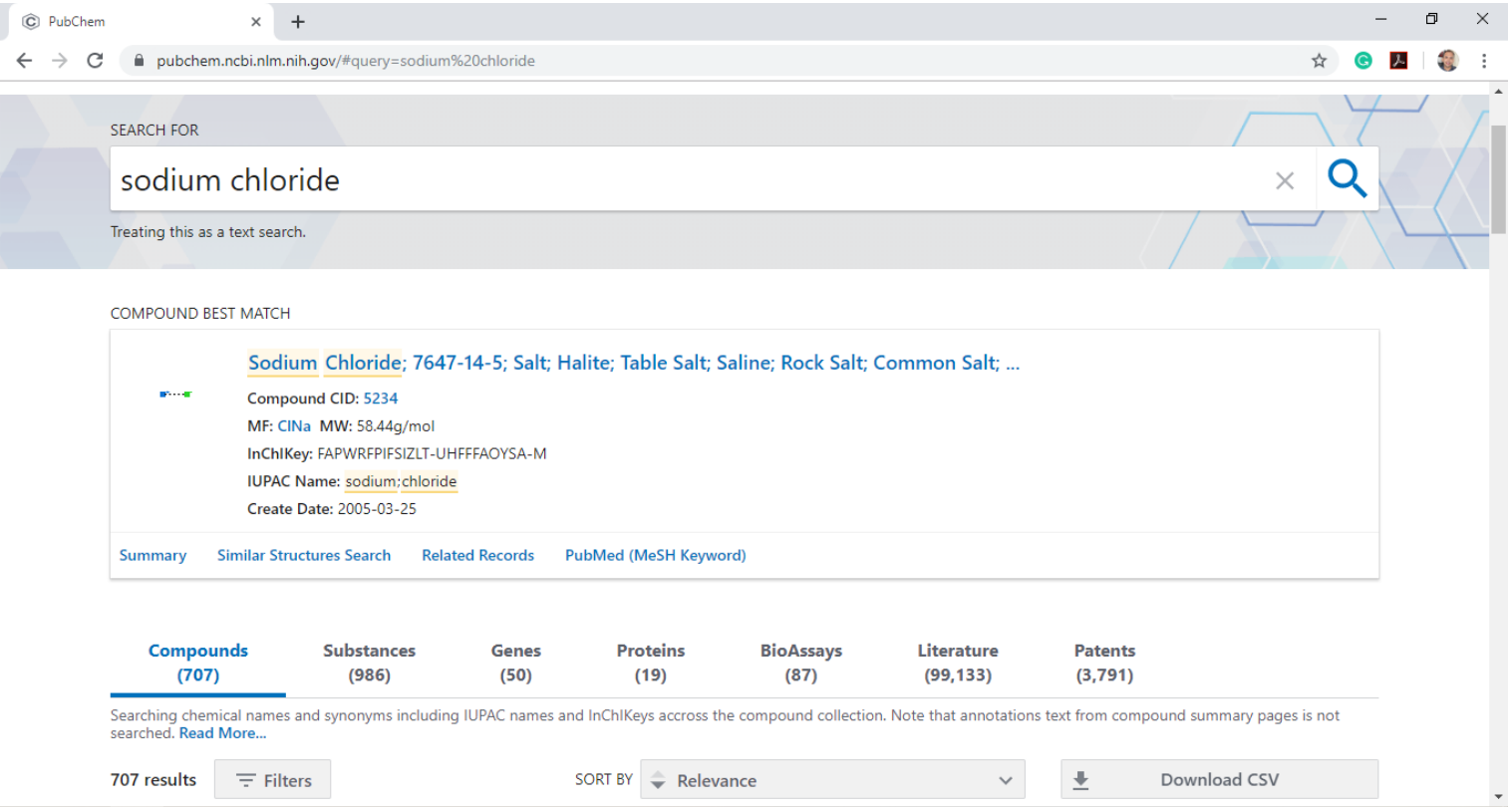
No campo de busca digitamos sodium chloride, como indicado abaixo.



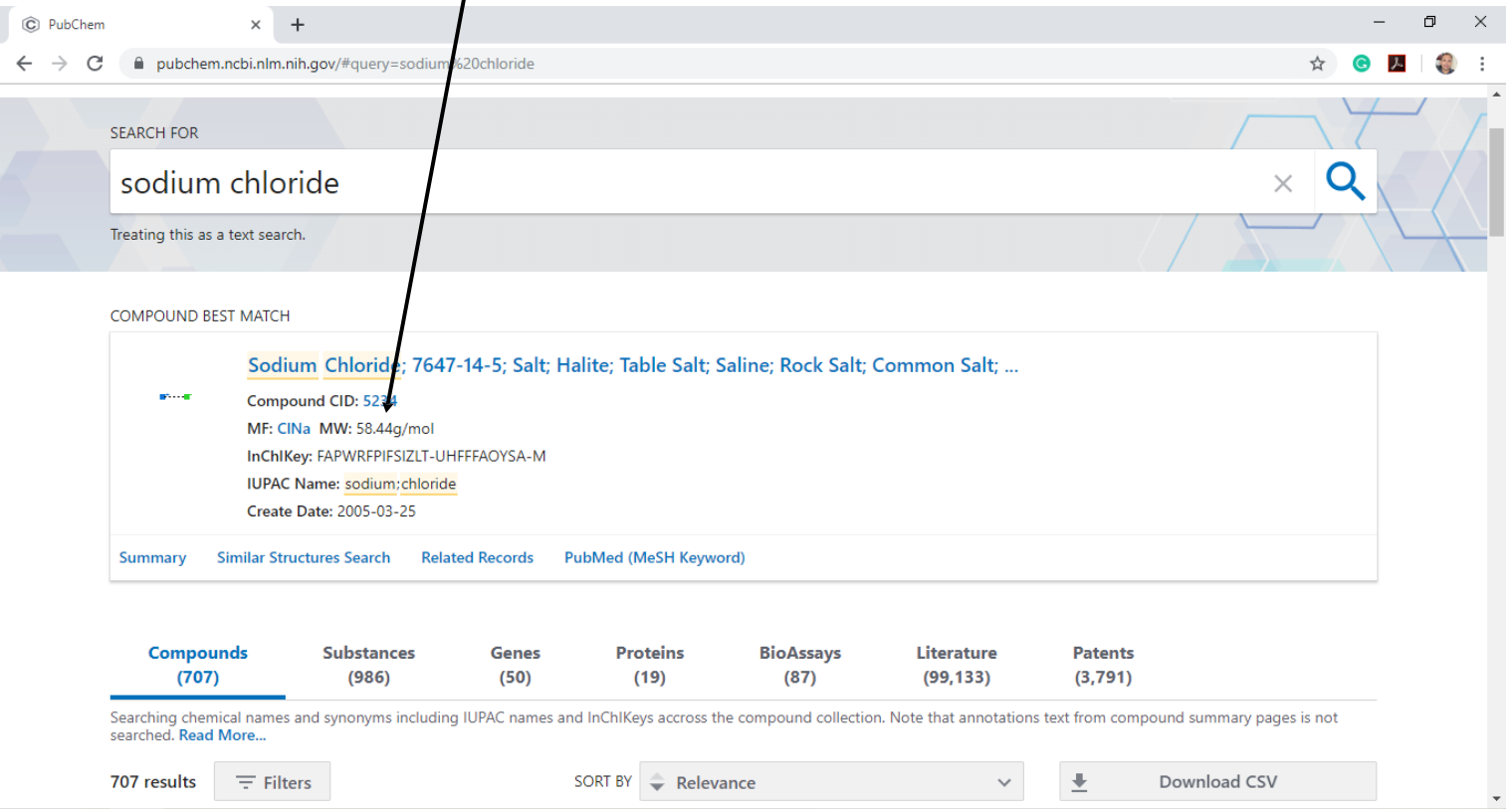
Depois clicamos na lupa.



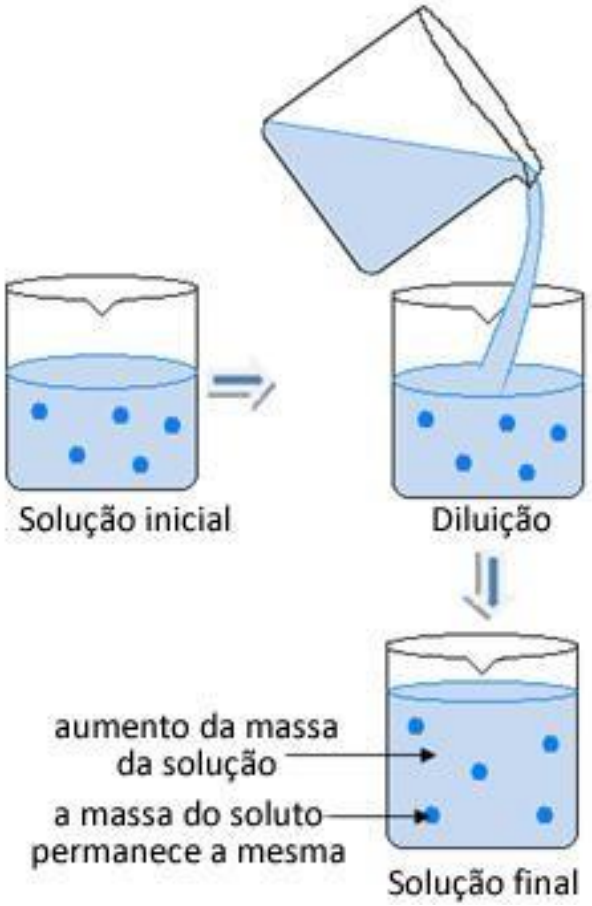
O resultado da busca é mostrado abaixo. Veja que temos centenas de resultados para nossa busca. O número elevado de resultados deve-se à variação de fornecedores e nomes similares que apresentam o termo “sodium chloride”.



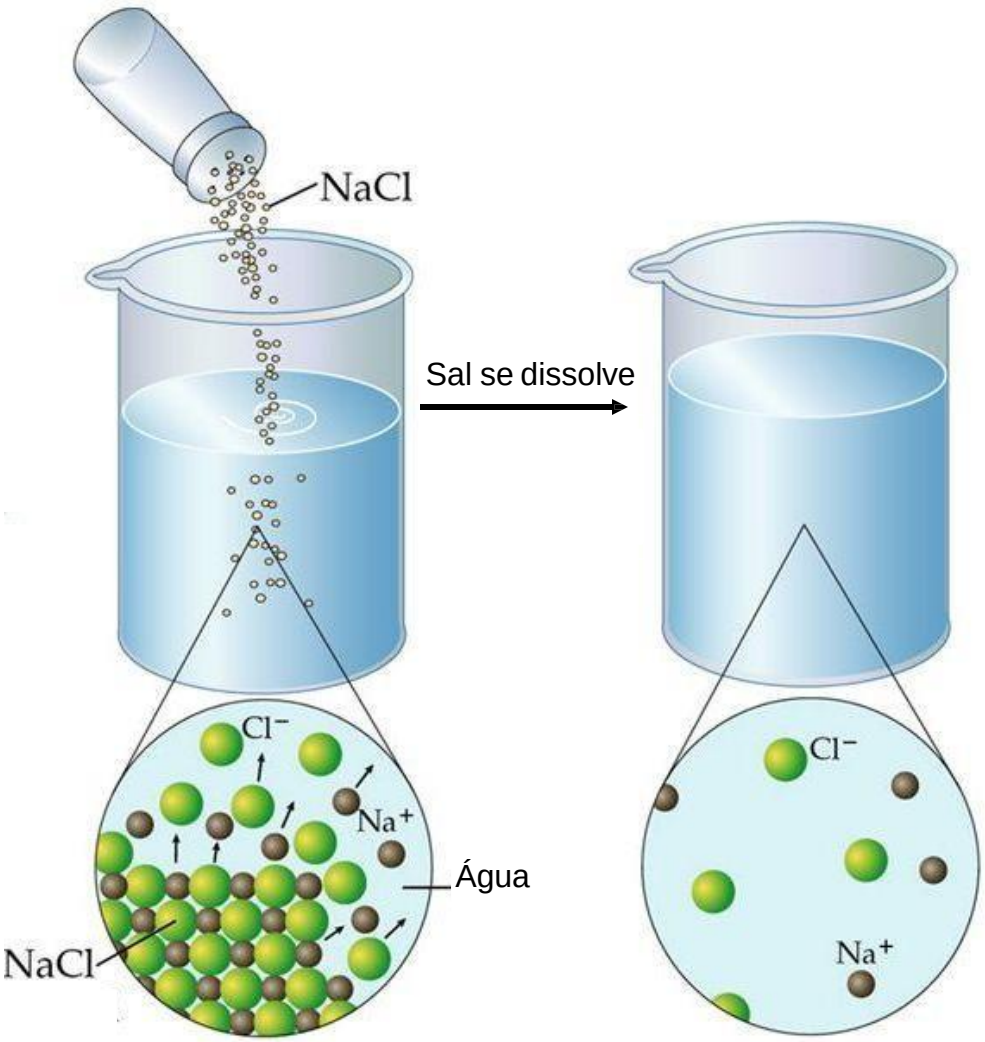
Olhando-se o resultado para “sodium chloride”, temos a página abaixo. O conjunto de informações é vasto, vamos nos deter na informação sobre a massa molecular do cloreto de sódio, 58,44 g/mol. Usaremos esta informação para o cálculo de soluções.



Uma prática comum em laboratórios na área de saúde é a preparação de amostras diluídas. O conceito é simples, por exemplo quando queremos diluir 1 em 10, ou preparar um diluição de 1 para 10, ou ainda, diluir 1/10, queremos dizer a mesma coisa. Numa diluição 1/10, o maior número significa o número total de partes, neste caso 10. O menor número significa o que está sendo diluído. No caso de uma diluição 1/10 de soro com salina. Temos que pegar uma parte de soro e acrescentar 9 partes de salina. Para um volume de 10 mL, teremos 1 mL de soro e 9 mL de salina. Veja que o 10 representa a soma dos volumes.



Na prática do dia-a-dia do laboratório, constantemente é necessário o preparo de soluções relacionadas à elaboração de um fármaco. As soluções são misturas de substâncias, onde a maioria é feita por duas partes. Uma chamada **soluto** e outra **solvente.** Vamos ilustrar com um exemplo. Consideremos uma solução de cloreto de sódio (NaCl), o cloreto de sódio é o **soluto** e a água onde o sal foi dissolvido o **solvente**.

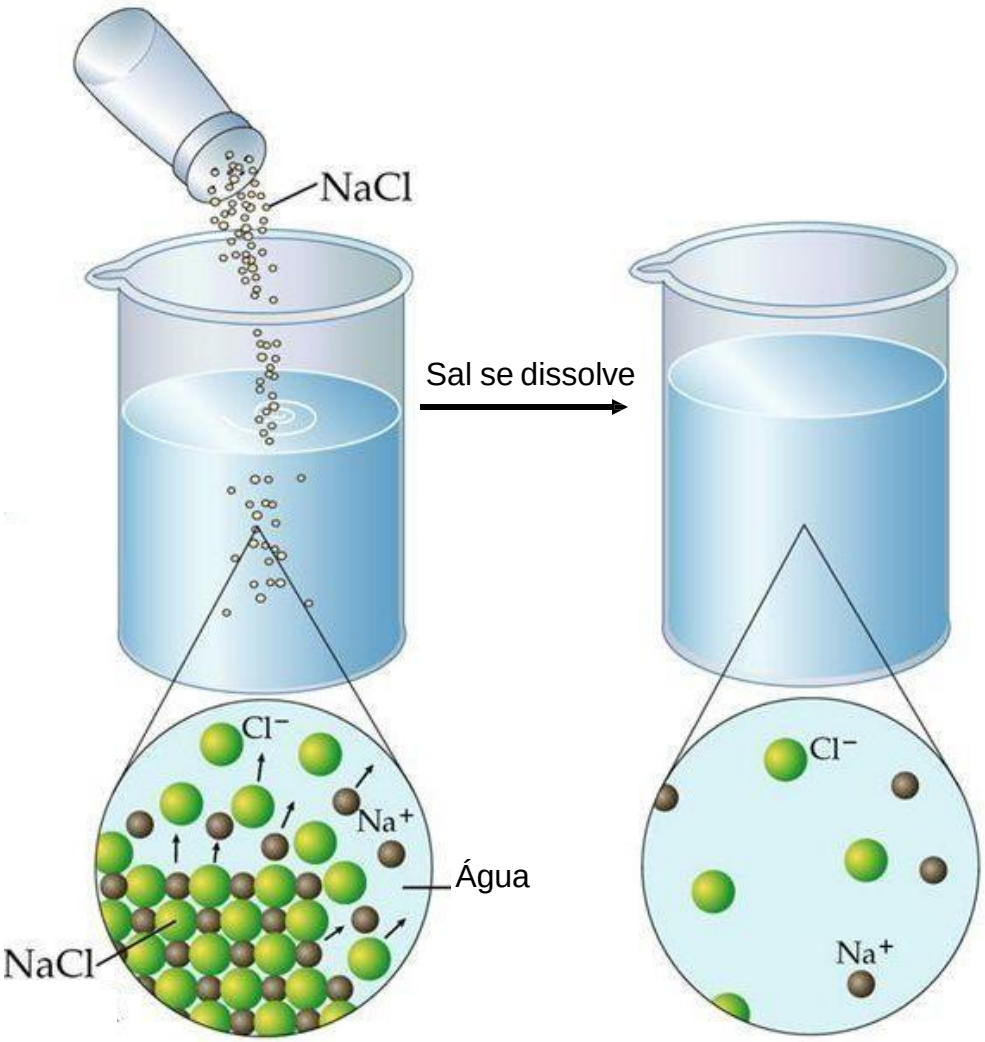


Há três formas principais de quantificarmos soluções.

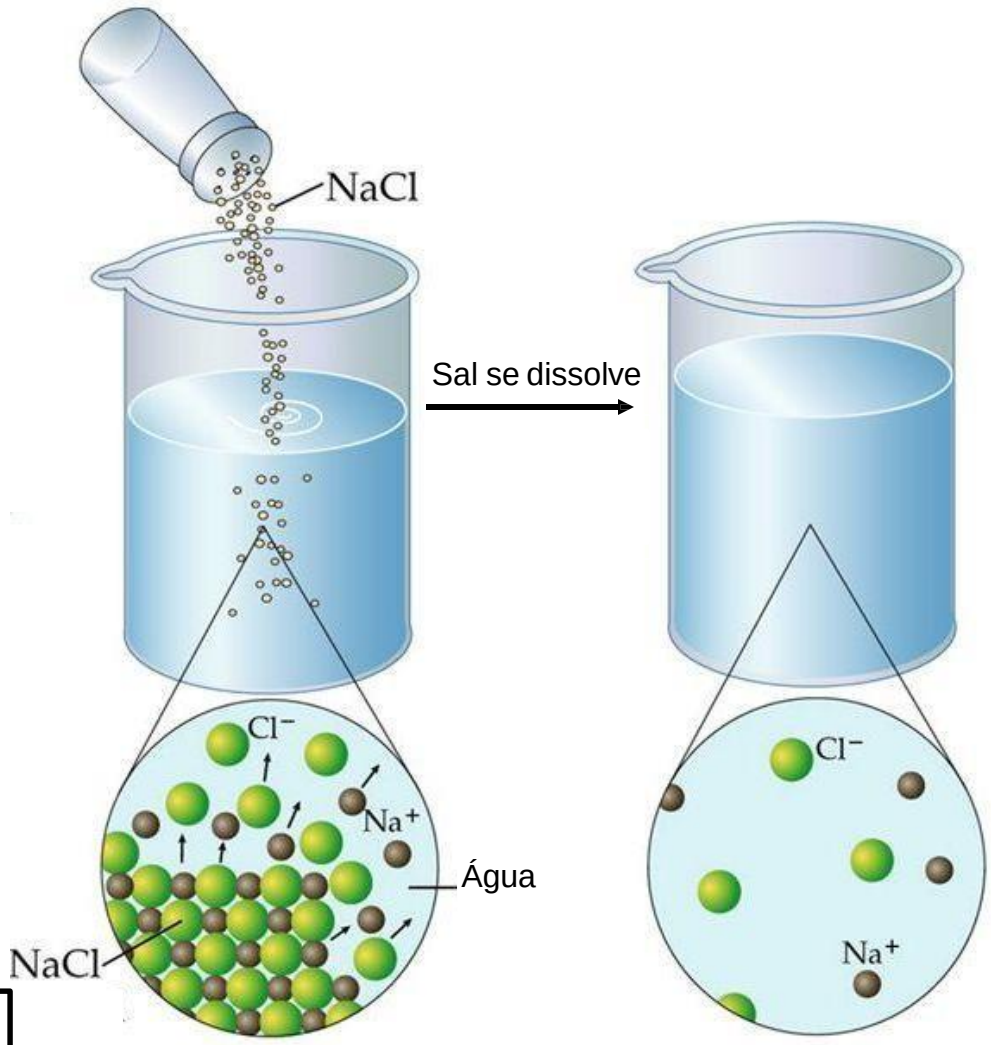
1) Massa por unidade de massa (m/m)

2) Massa por unidade de volume (m/V)

3) Volume por unidade de volume (V/V).



Podemos quantificar soluções por meio de porcentagem. Quando quantificamos o soluto em gramas com relação a um volume fixo de solvente de 100 mL, temos uma solução percentual. Mantendo uma solução de cloreto de sódio como exemplo, consideremos o preparo de uma **solução de 400 mL de NaCl a 5 %.**



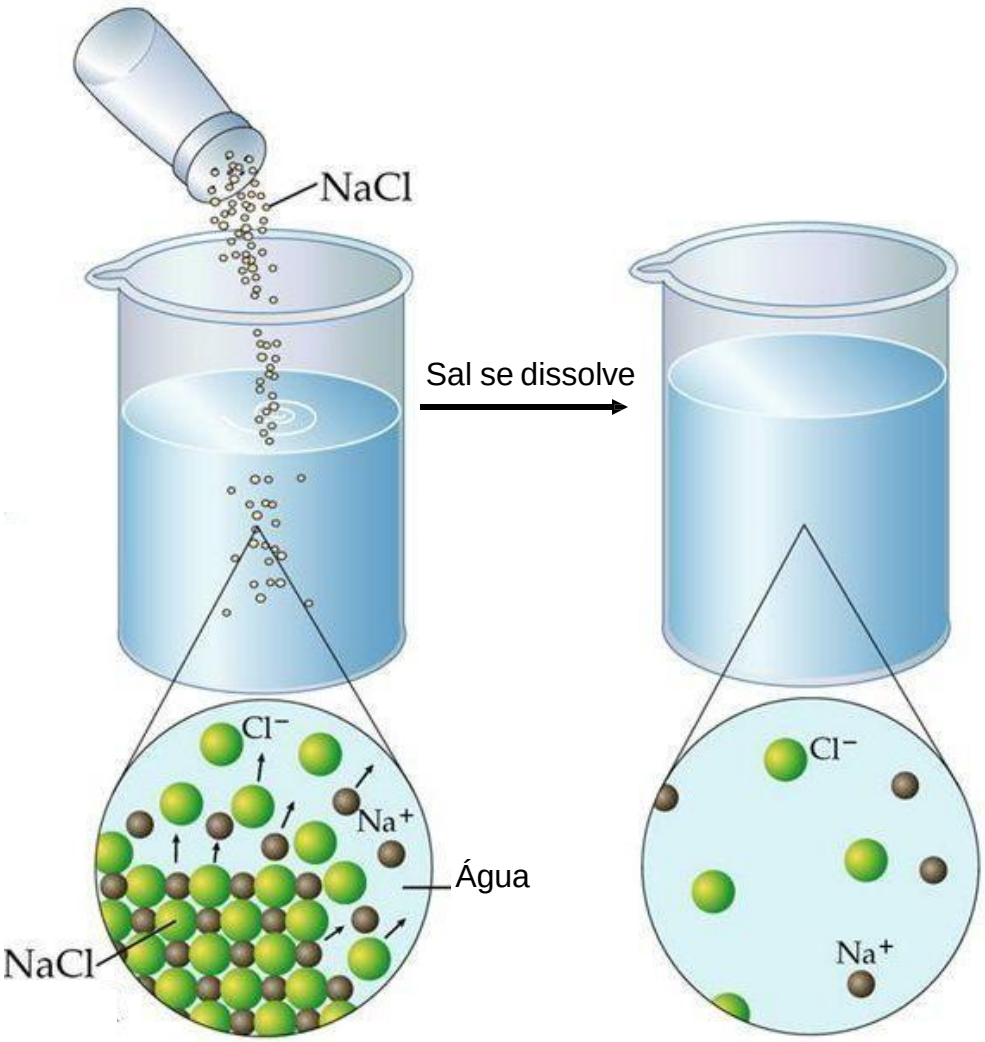
Solução

5 % representa 5 g em 100 mL
5 % representa xg em 400 mL

Ou seja: 100.(xg) = 5 g. 400 mL

$$xg = \frac{5g.400mL}{100mL} = \frac{2000g.mL}{100mL} = 20g$$

Assim, precisamos diluir 20 g de NaCl em 400 mL de água para termos 400 mL de NaCl a 5 %.



Vamos considerar agora o preparo de uma **solução de 250 mL de ureia a 8 %.**

Solução

8 % representa 8 g em 100 mL
8 % representa xg em 250 mL

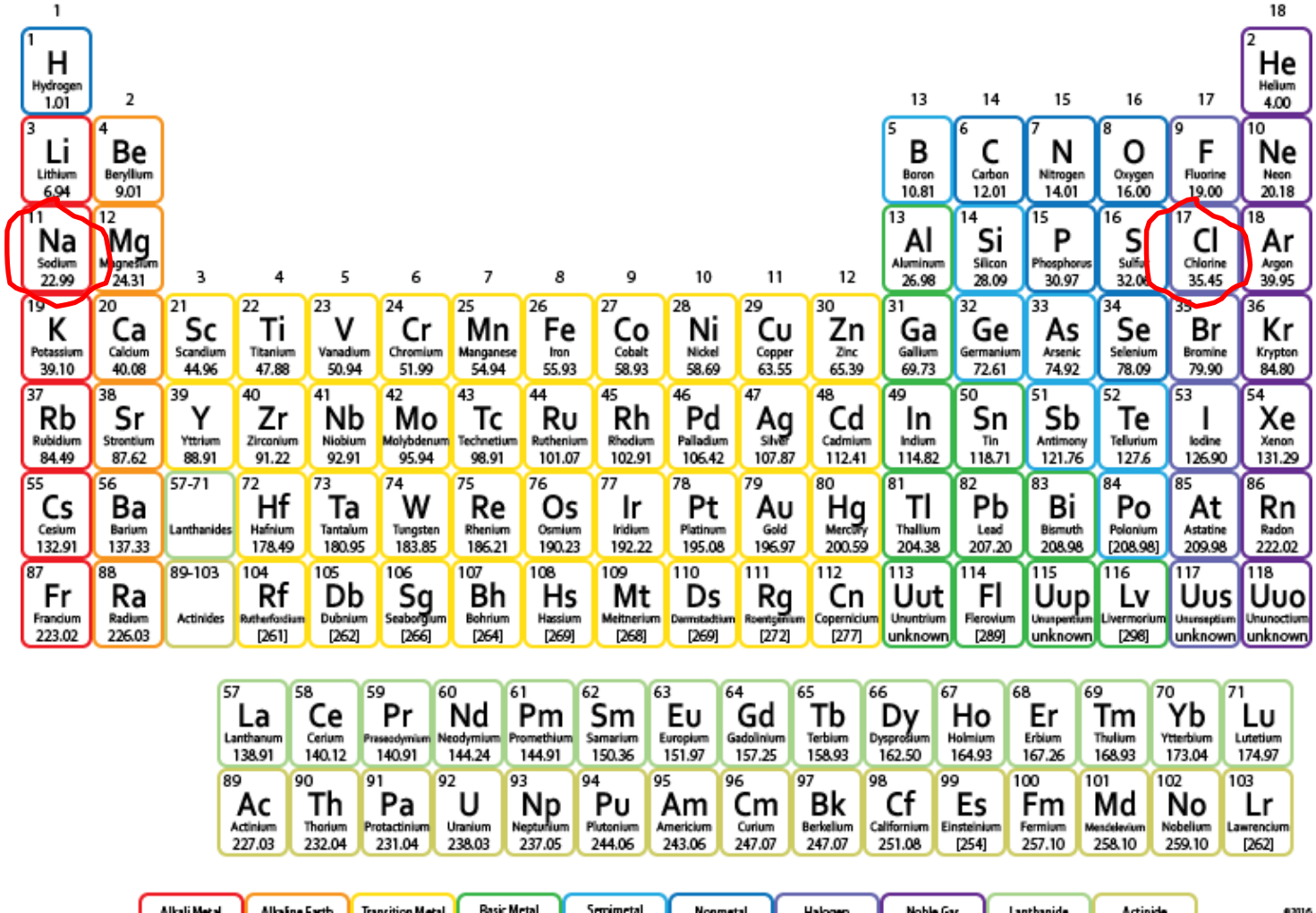
Ou seja: 100.(xg) = 8 g. 250 mL

$$xg = \frac{8g.250mL}{100mL} = \frac{2000g.mL}{100mL} = 20g$$

Assim, temos que diluir 20 g de ureia em 250 mL de água para conseguirmos uma solução a 8 %.

É comum expressarmos a concentração de uma substância em molar. O cálculo da concentração molar de uma dada substância leva em consideração a massa molecular da substância dissolvida. A massa molecular é a soma dos pesos atômicos dos átomos que formam a substância. A informação sobre a massa molecular pode ser obtida do site do PubChem ou calculada a partir da soma dos pesos atômicos disponíveis nas tabelas periódicas.

Para ilustrar, vamos determinar o valor da massa molecular do NaCl. O peso atômico do Na é 22,99 g/mol e do Cl é 35,45 g/mol, assim para o NaCl a massa molecular é 58,44 g/mol, como já havíamos visto no PubChem.



Vamos determinar a massa de NaCl necessária para prepararmos 50 mL de uma solução de NaCl a 0,20 M (Solução 1).

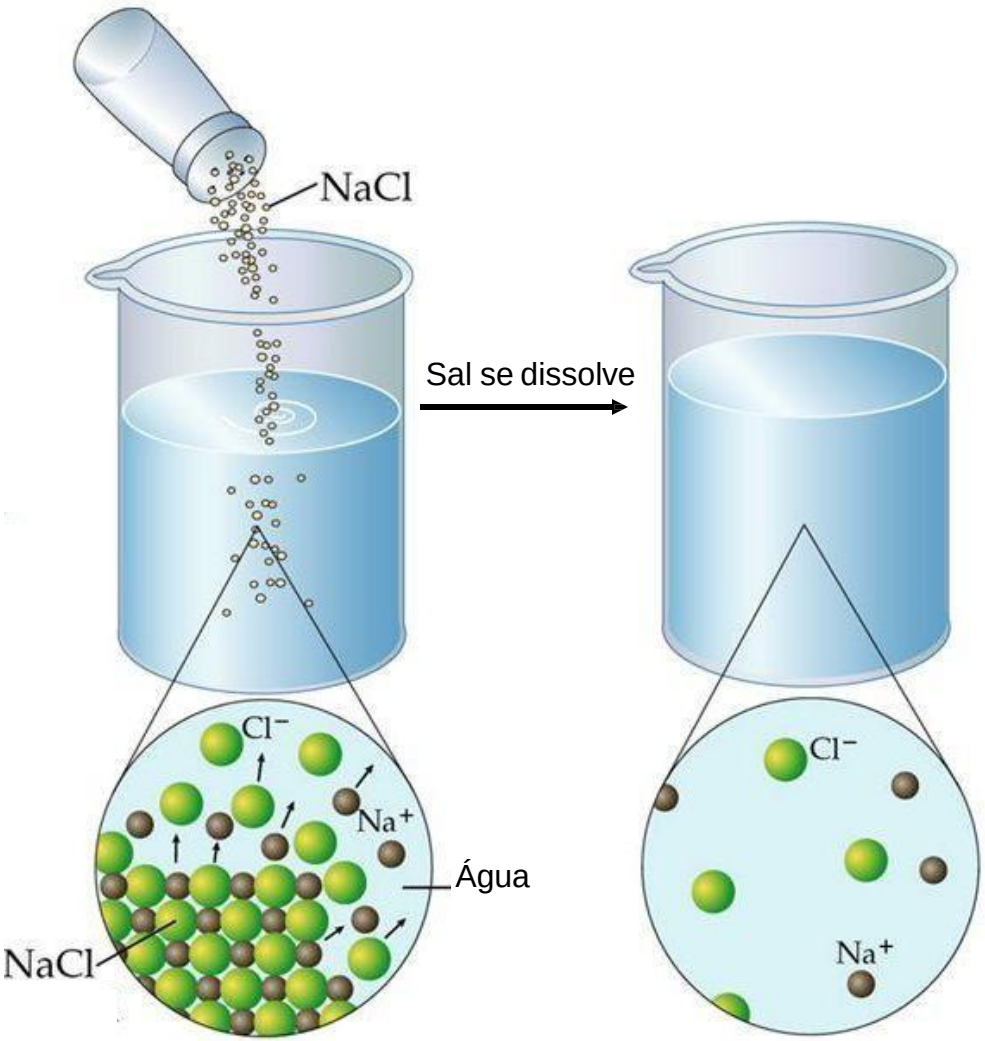
Solução

Sabemos que 1 M de NaCl tem 58,44 g para cada litro de solução (1 L = 1000 mL), ou seja:

58,44 g	1 M	1000 mL
xg	0,2 M	

Depois de multiplicarmos em cruz, temos:

$$xg = \frac{58{,}44g.0{,}2M}{1M} = 11{,}688g$$



Solução (continuação)

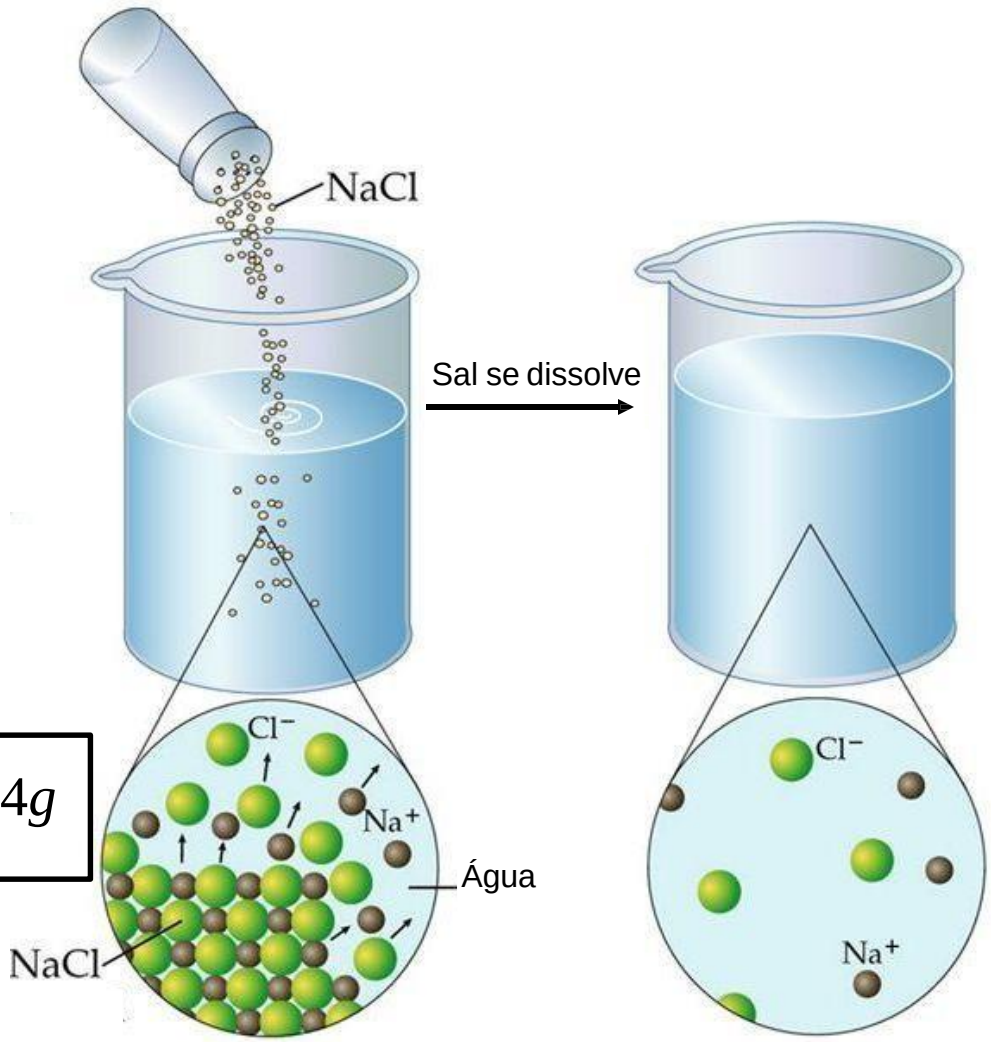
Bem, sabemos que para 1 L (1000 mL) seria necessário dissolver 11,688 g de NaCl, mas o que desejamos é 50 mL. Assim continuamos o cálculo.

11,688 g	—	1000 mL
xg	—	50 mL

Multiplicarmos em cruz e temos:

$$xg = \frac{11{,}688g.50mL}{1000mL} = \frac{584{,}4g}{1000} = 0{,}5844g$$

Assim temos que dissolver 0,5844 g de NaCl em 50 mL de água para obtermos uma solução de 0,2 M de NaCl.



Considere agora o preparo de uma solução de 30 mL de NaCl a 0,15 M (Solução 2).

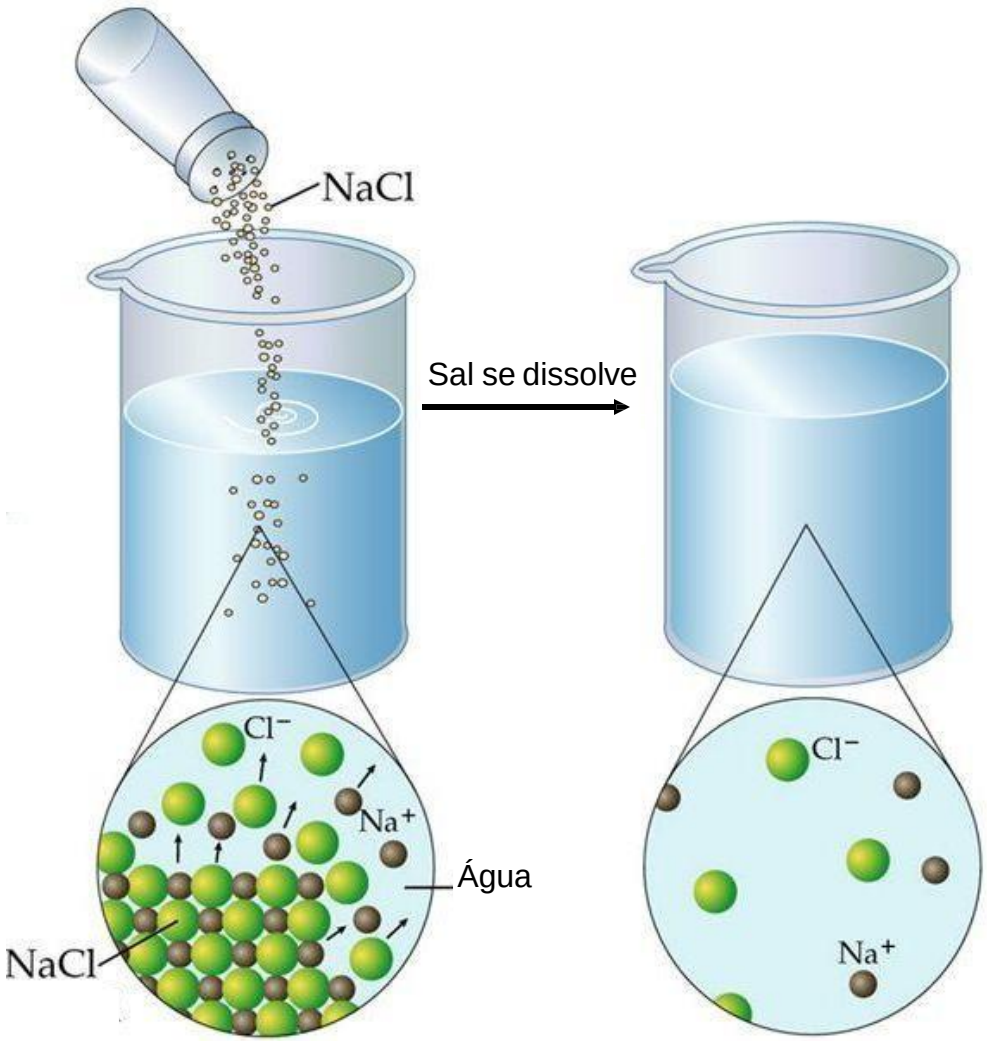
Solução

Sabemos que 1 M de NaCl tem 58,44 g para cada litro de solução (1 L = 1000 mL), ou seja:

58,44 g	1 M	1000 mL
xg	0,15 M	

Depois de multiplicarmos em cruz, temos:

$$xg = \frac{58{,}44g.0{,}15M}{1M} = 8{,}766g$$



Solução (continuação)

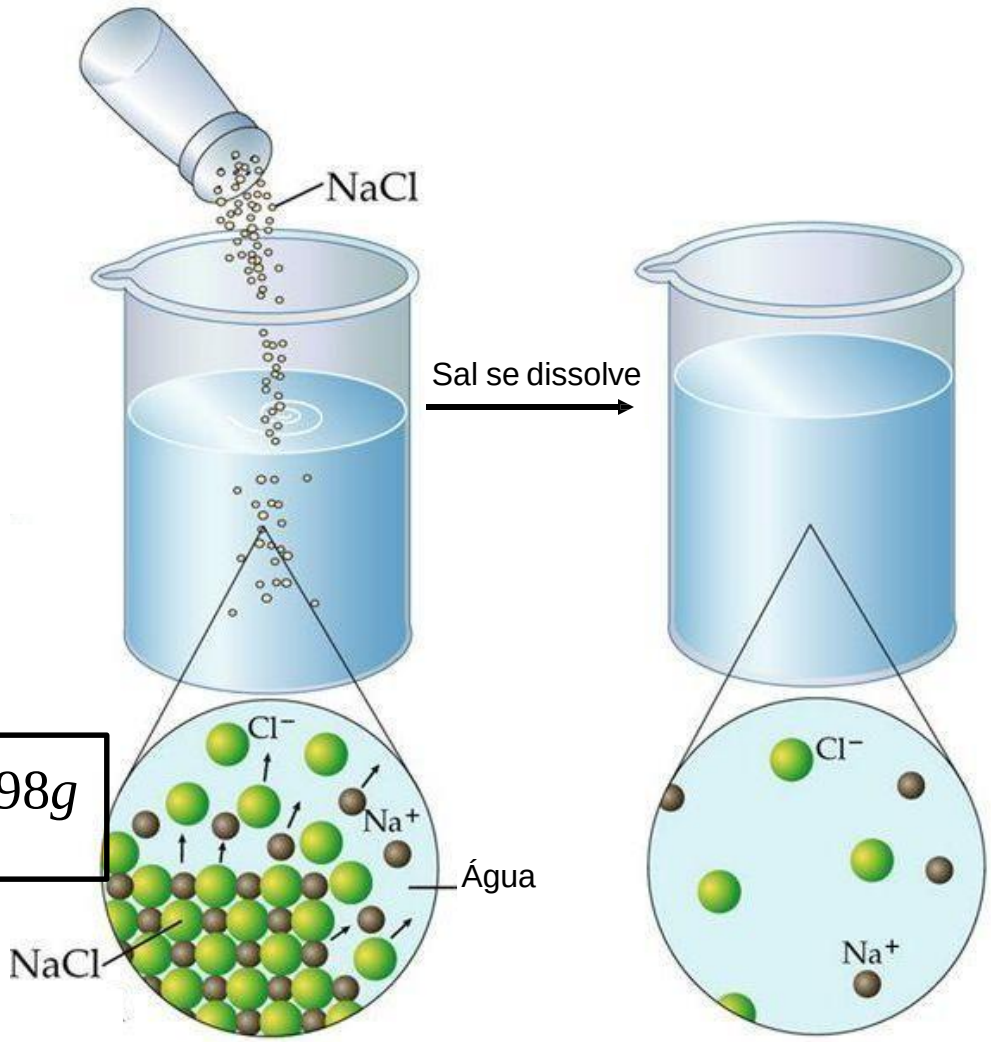
Como já vimos, sabemos que para 1 L (1000 mL) seria necessário dissolver 8,766 g de NaCl, mas o que desejamos é 30 mL. Assim continuamos o cálculo.

8,766 g — 1000 mL
xg — 30 mL

Multiplicarmos em cruz e temos:

$$xg = \frac{8{,}766g.30mL}{1000mL} = \frac{262{,}98g}{1000} = 0{,}26298g$$

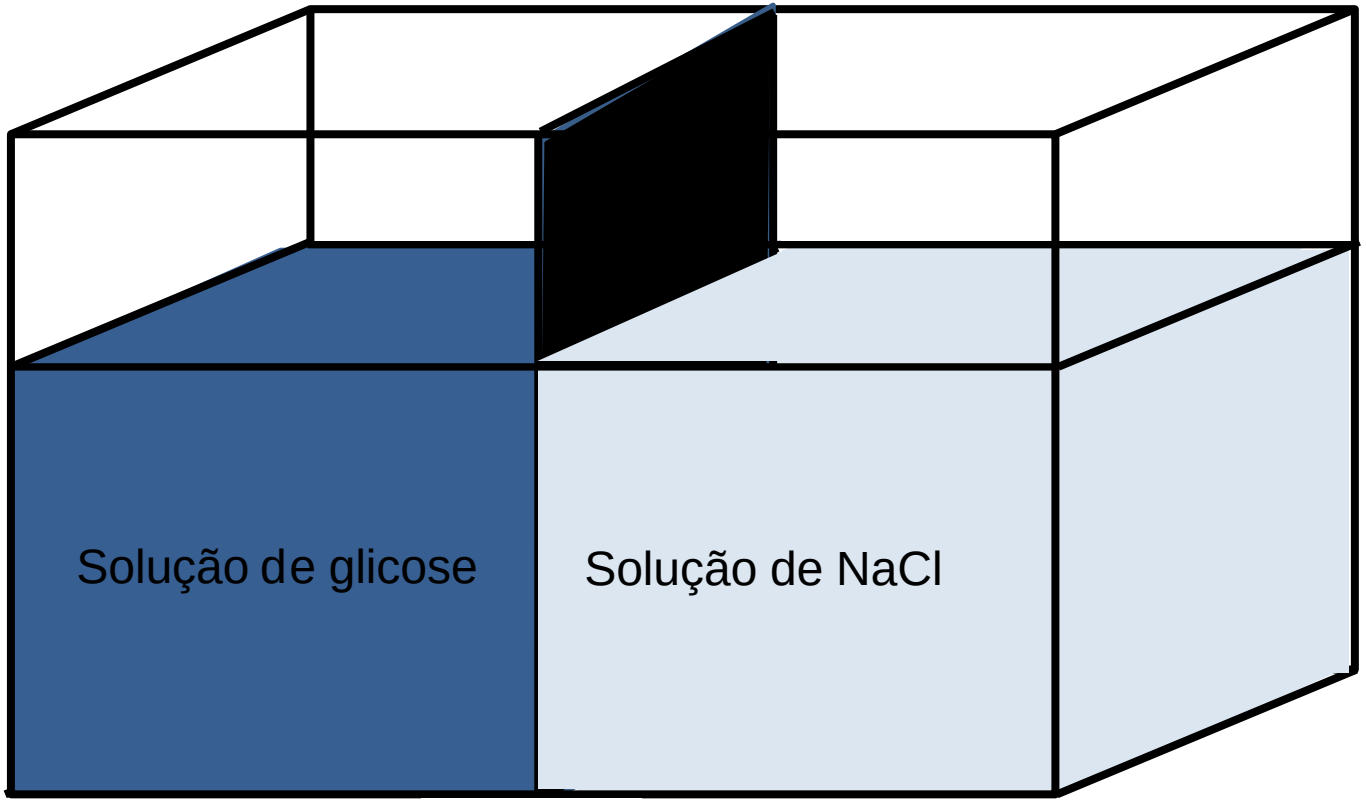
Precisamos dissolver 0,26298 g de NaCl em 30 mL de água para conseguirmos uma solução de 0,15 M de NaCl.



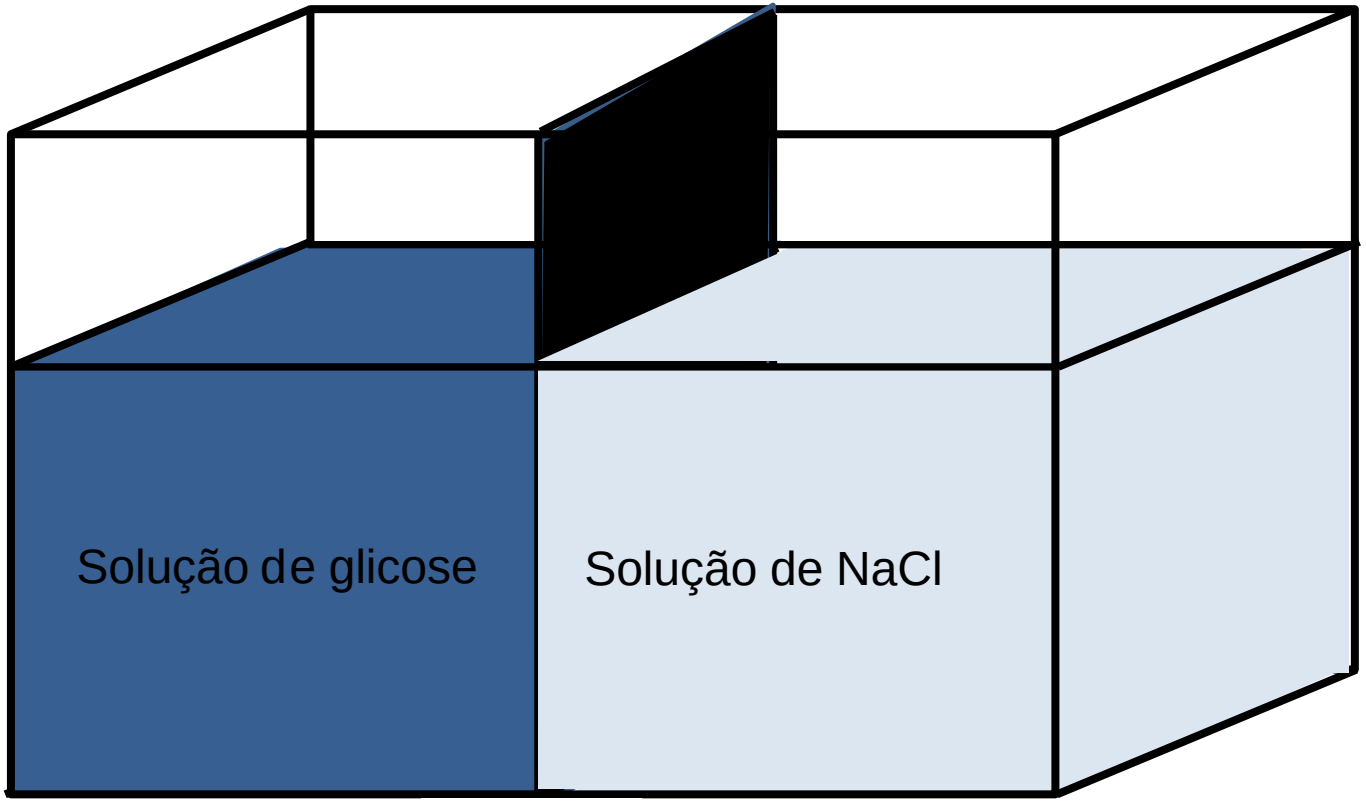
Visite o site do PubChem https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/ a faça buscas por substâncias que você tem conhecimento de serem usadas como fármacos.

Visite os site do Protein Data Bank (http://pdb101.rcsb.org/motm/motm-by-category) e pesquisa sobre proteínas que estão relacionadas com patologias. Procure sobre proteínas relacionadas com diabetes.

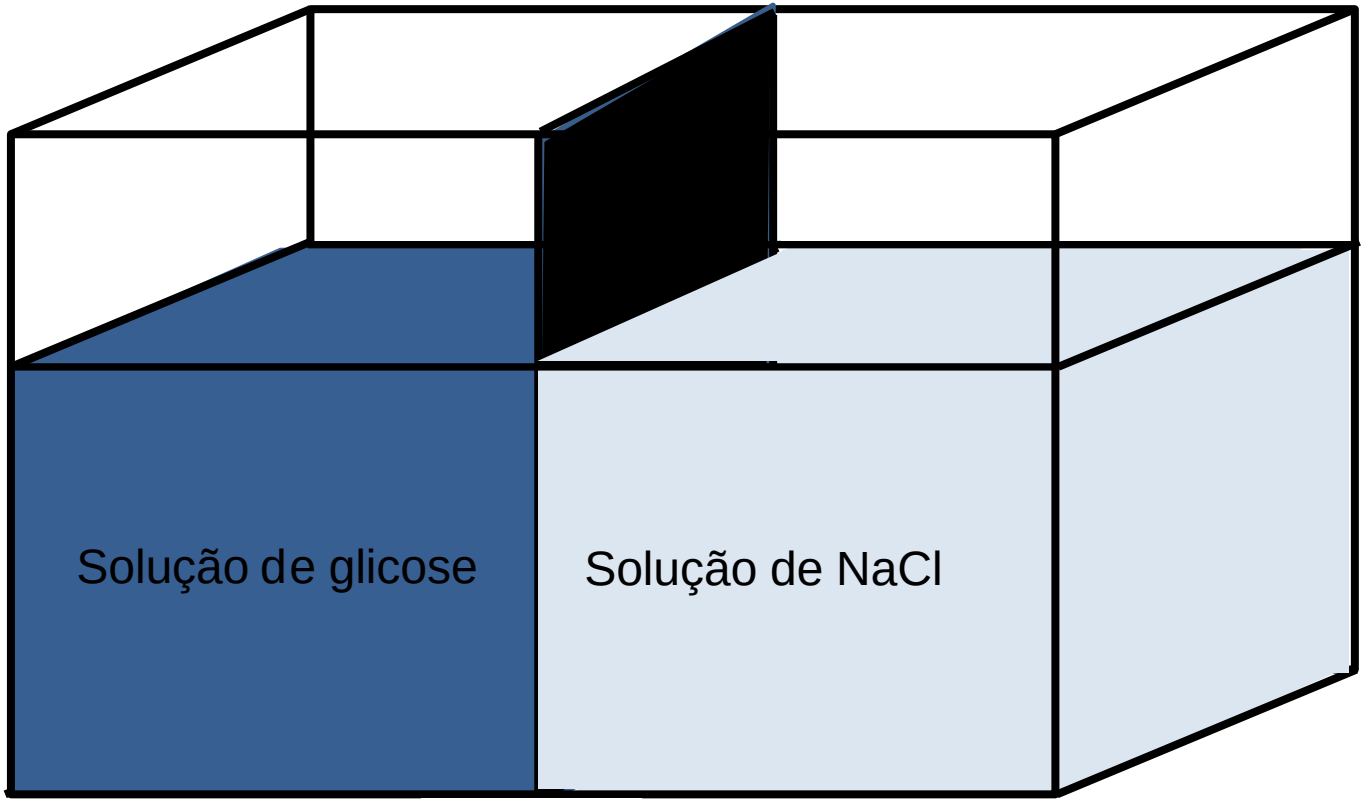
Considere uma cuba com uma membrana semipermeável, como mostrada abaixo. À esquerda temos uma solução de glicose e à direita uma solução de NaCl.



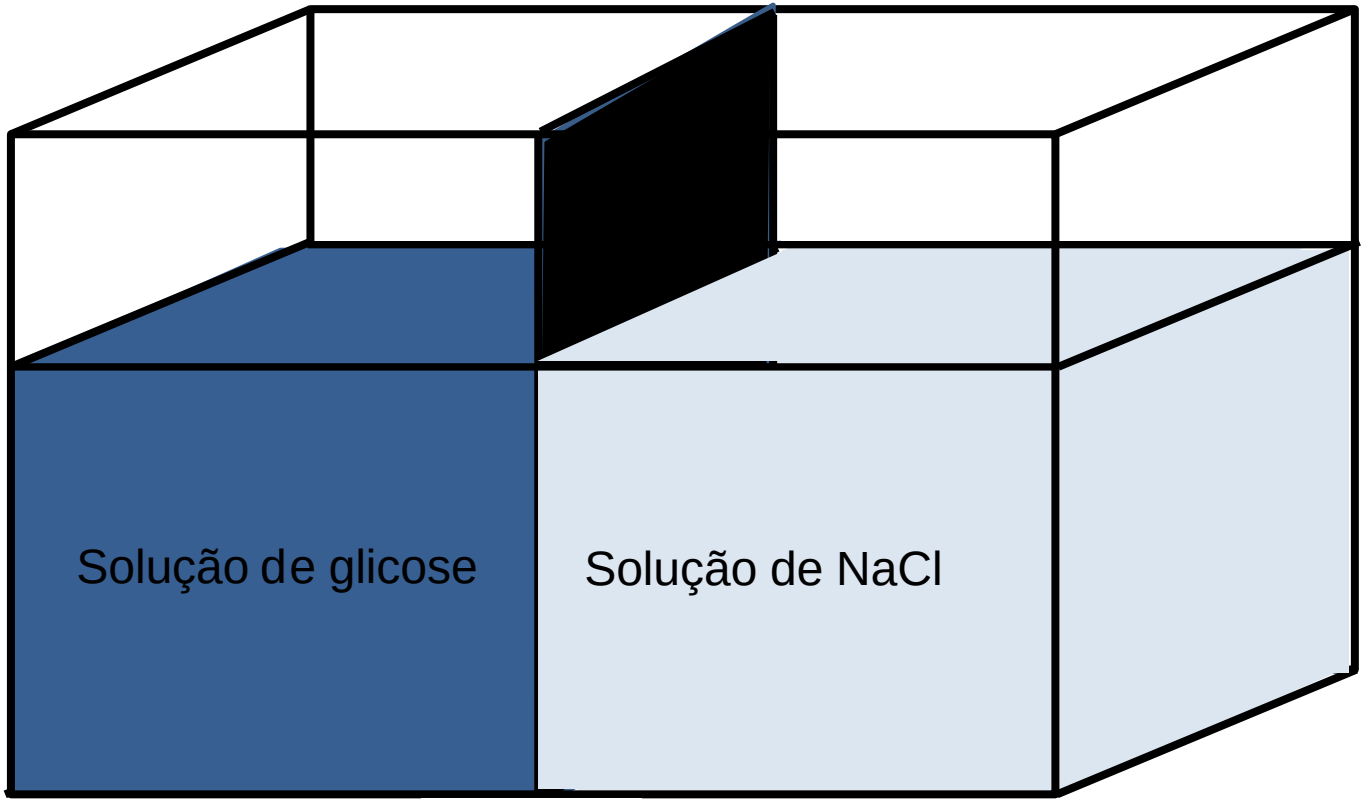
Para analisarmos o sistema, temos que recorrer ao conceito de osmolaridade. Um substância molecular como a glicose apresenta uma osmolaridade idêntica a sua concentração molar, ou seja, 1 molar de $C_6H_{12}O_6$ tem 1 osmolar.



No caso do NaCl temos uma substância iônica, que em solução dissocia-se nos íons Na^+ e Cl^-. **Assim temos o dobro de partículas em solução**. Para 1 molar de NaCl temos 2 osmolar de NaCl.



A **osmolaridade** é a molaridade multiplicada pelo número de partículas em que uma molécula ou agregado iônico pode se dissociar em solução aquosa.



No caso da maioria das células, o meio intracelular apresenta uma osmolaridade de 0,3 osmolar = 300 miliosmolar. **Qualquer solução que apresente uma osmolaridade de 0,3 osmolar é chamada de solução fisiológica**.

Consideremos 1 litro de uma solução fisiológica de NaCl, ou seja, uma solução de 0,3 osmolar de NaCl. Precisamos de 0,15 M de NaCl, pois 2 x 0,15 = 0,3 osmolar. Assim temos,

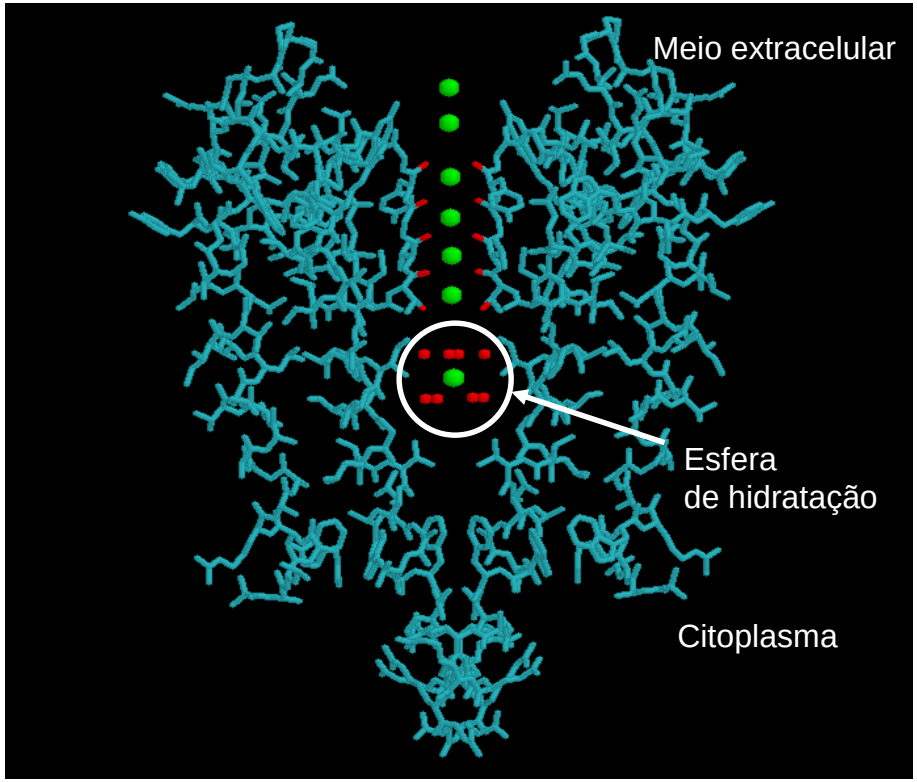
Massa molecular = 22,99 g/mol + 35,45 g/mol = 58,44 g/mo

58,44g	1 M	1 L
X	0,15 M	1 L

$$X = \frac{58{,}44g.0{,}15M}{1M} = 8{,}766\text{g}$$

Ou seja, precisamos de 8,776 g para 1 L de água para termos uma solução fisiológica de NaCl.

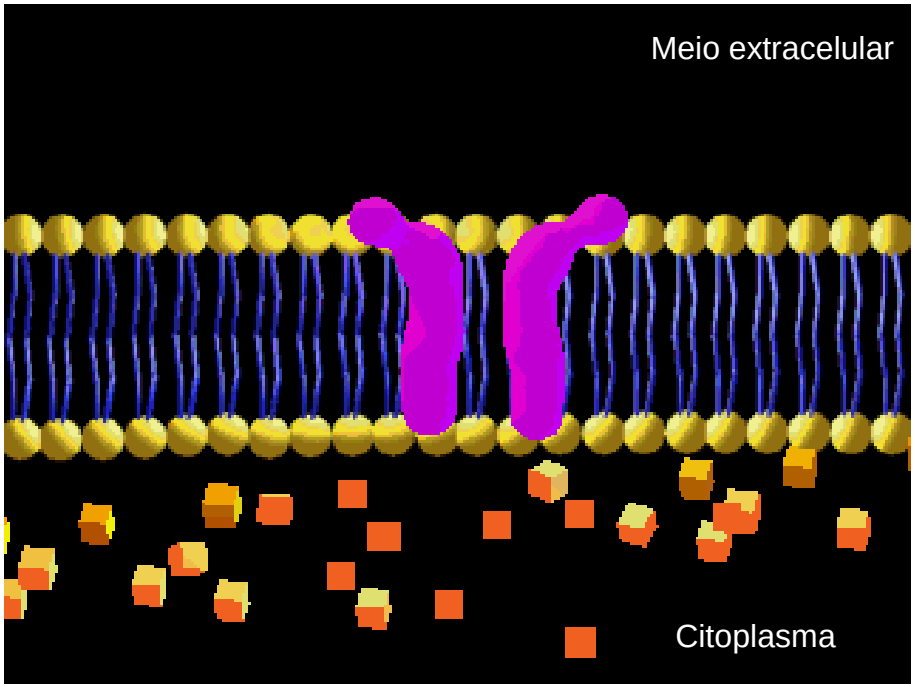
Canais de K^+ são proteínas transmembranes que permitem a saída de íons de potássio da célula. A habilidade mostrada pelos canais de K^+ dependentes de voltagem, de permitirem majoritariamente a saída de íons de K^+ é conseguida por meio de um filtro de seletividade, presente numa das extremidades do poro. A figura ao lado ilustra a passagem de íons de K^+ (esferas verdes) pelo canal de K^+. A região mostrada é a parte do filtro. Em solução, os íons de K^+ apresentam-se envolvidos por 8 moléculas de água (esferas vermelhas), formando uma **camada de hidratação**. A **esferas de hidratação** dos íons de K^+ acomodam-se no canal de K^+ e começam a perder as moléculas de água, a interação com a água é substituída pela interação com os oxigênios das carbonilas do canal de K^+ dependente de voltagem.



Interação intermolecular do canal de K^+ dependente de voltagem com íons de K^+ (esferas verdes).

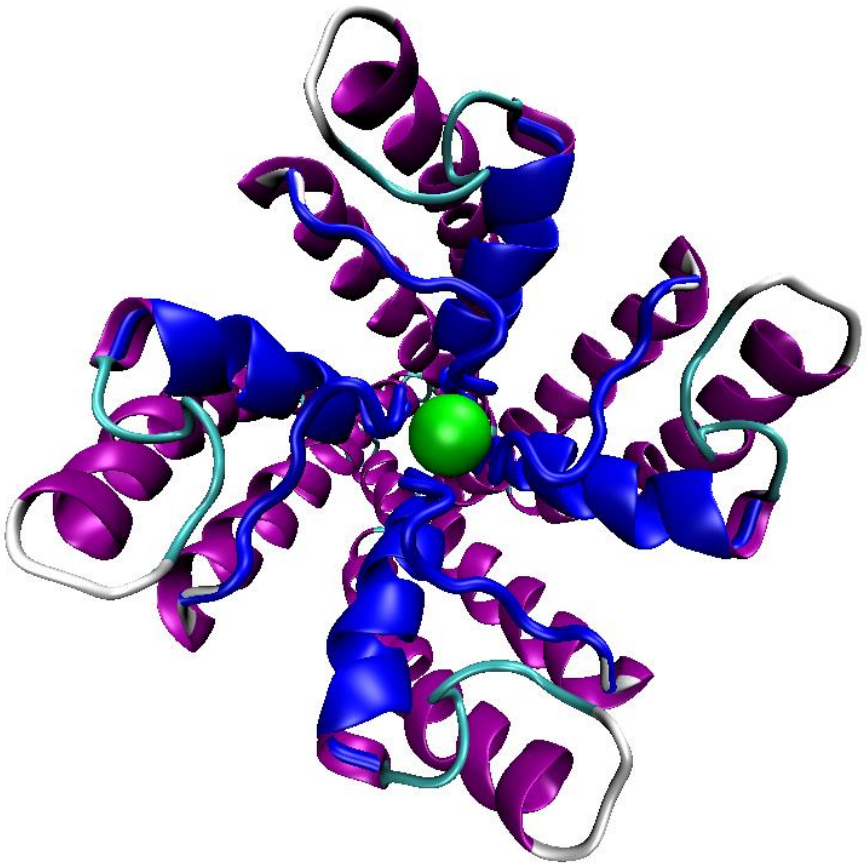
Disponível em: <http://www.rcsb.org/pdb/101/motm.do?momID=38 >. Acesso em: 17 de março de 2020.

A região do canal de K^+ apresenta um tamanho preciso para uma interação favorável com a camada de hidratação envoltória de K^+. No caso do íon de Na^+, a esfera envoltória é menor que a do K^+, levando a uma interação fraca com o canal de K^+. Assim, o sistema da esfera de Na^+, não tem uma interação favorável com o canal de K^+, permanecendo no interior da célula. Por ser menor que a do K^+, podemos pensar que a esfera de hidratação do Na^+ está frouxamente ligada ao canal de K^+ dependente de voltagem, o que não é favorável para a perda das moléculas de água e posterior passagem pelo canal.



Animação mostra a difusão de íons pelo canal iônico. Disponível em: < http://leavingbio.net/OSMOSIS%20AND%20DIFFUSION.htm >. Acesso em: 17 de março de 2020.

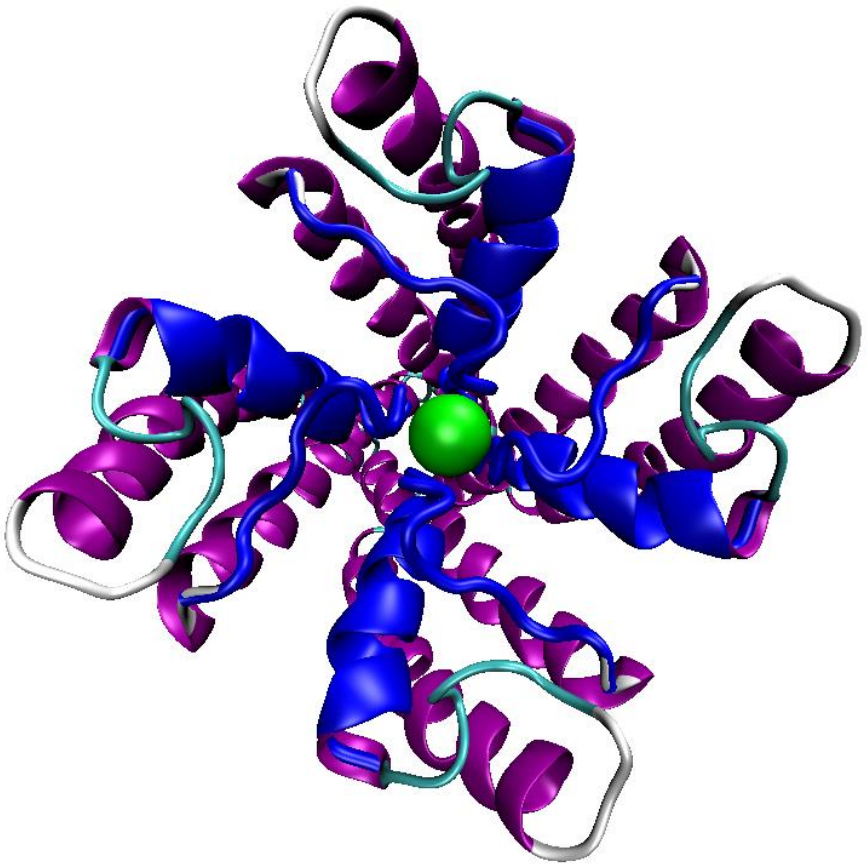
A estrutura do canal de K^+ dependente de voltagem de *Streptomyces lividans* apresenta estrutura quaternária tetramérica (4 cadeias polipeptídicas), representadas na figura ao lado. Cada cadeia é formada por três hélices transmembranares e um *loop* (laço), o íon de potássio está representado no centro do tetrâmero em verde. Também vemos o *loop* P e a hélice P, que são responsáveis pela seletividade iônica (indicados em azul). O *loop* P é formado pelo resíduos Gly-Tyr-Gly, que estão alinhados de forma a estreitar o funil formado pela estrutura do canal. Estamos olhando do meio extracelular para o meio intracelular.



Canal de K^+ dependente de voltagem visto do meio extracelular para o meio intracelular. Código de acesso PDB: 1BL8.

Fonte: Sansom, MS. Current Biology 1998, 8:R450–R452
http://biomednet.com/elecref/09609822008R0450

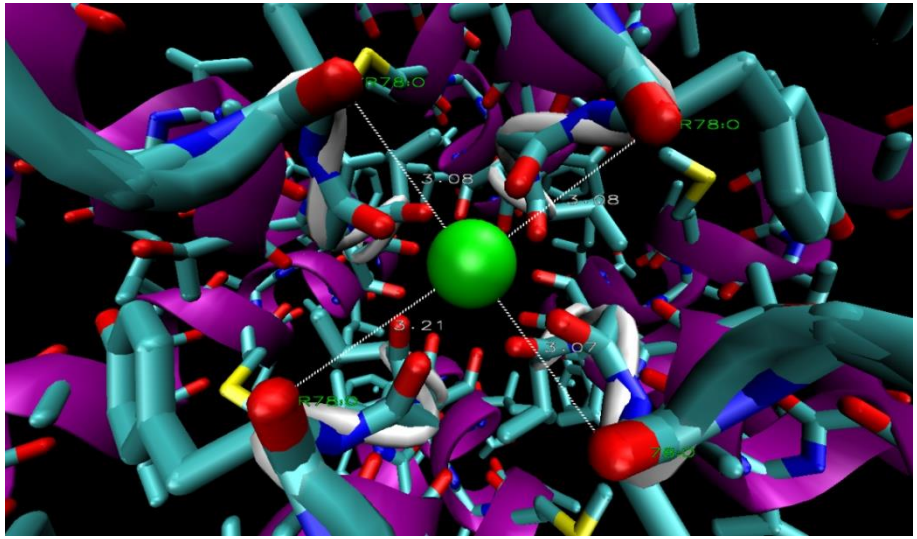
O canal de K^+ dependente de voltagem forma uma passagem na membrana celular. Tal passagem é altamente seletiva por K^+ e sensível à mudança de potencial elétrico. A parte intracelular do tubo do canal de K^+ apresenta uma cavidade de 10 Å de diâmetro. A cavidade está alinhada com resíduos hidrofóbicos e preenchida por moléculas de água. As dimensões dessa cavidade permitem um ajuste ideal para interação com os íons de K^+.



Canal de K^+ dependente de voltagem visto do meio extracelular para o meio intracelular. Código de acesso PDB: 1BL8.

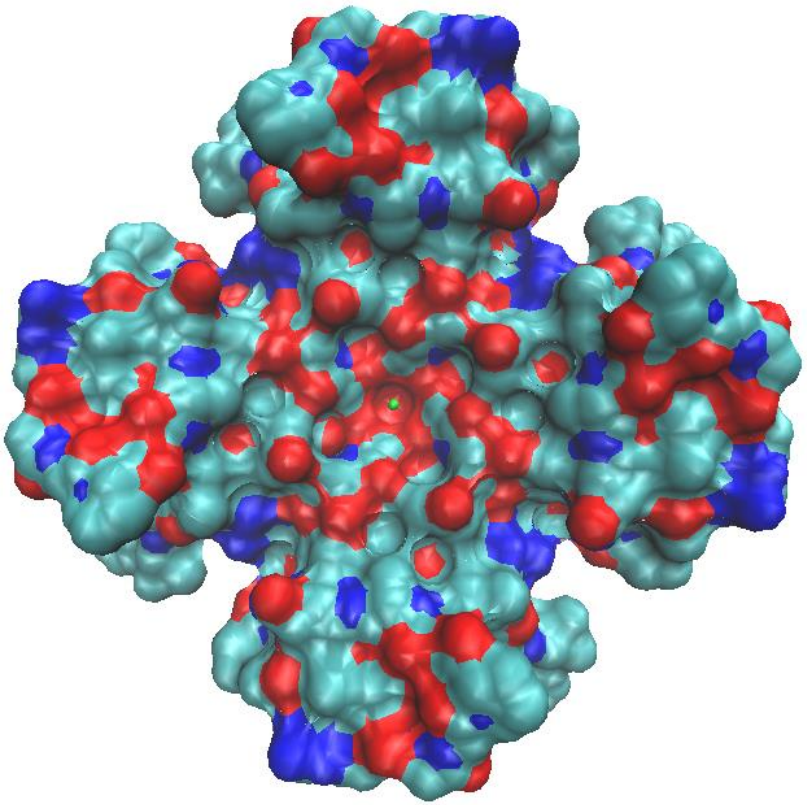
Fonte: Sansom, MS. Current Biology 1998, 8:R450–R452
http://biomednet.com/elecref/09609822008R0450

A figura a lado mostra um zoom da região que interage com o íon de K^+. A carga positiva do íon de K^+ interage eletrostaticamente com os oxigênios das carbonilas dos resíduos de Tyr58, com as distâncias interatômicas variando de 3,07 a 3,21 Å. Os oxigênios das carbonilas não apresentam uma carga elétrica completa, mas uma carga elétrica parcial negativa, que sofre atração eletrostática pela carga positiva do íon de K^+. O íon de K^+ é mostrado pela esfera verde no centro da figura.



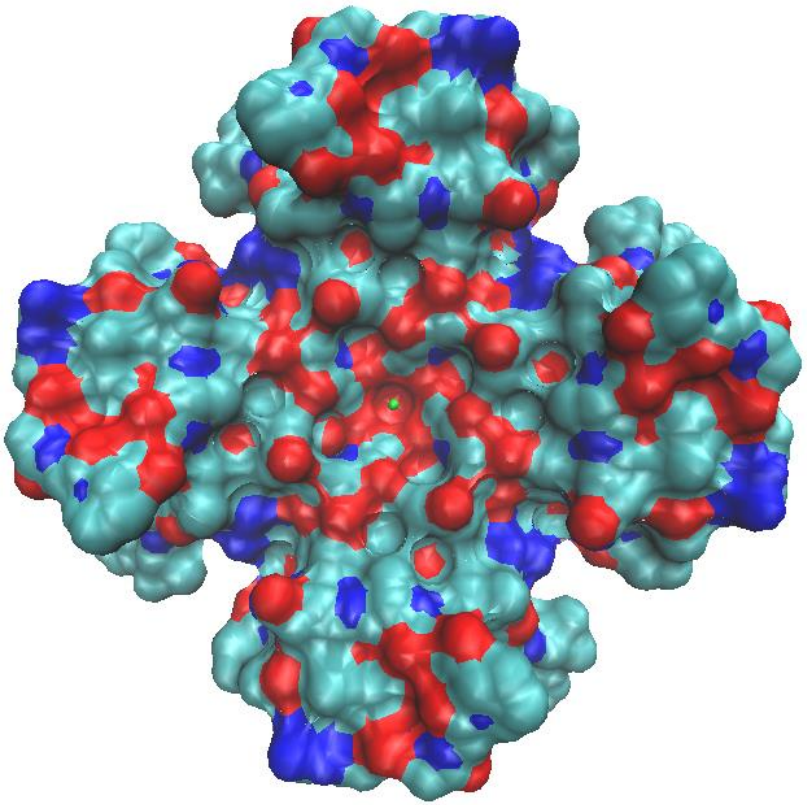
A figura acima mostra a interação do íon de potássio (esfera verde) com 4 carbonilas. Cada carbonila pertence à tirosina 58, que está presente em cada monômero da estrutura do canal de K^+ dependente de voltagem . Código de acesso PDB: 1BL8.

Na figura ao lado, vemos a superfície molecular do canal de K^+ dependente de voltagem. A coloração azul indica carga relativa positiva, a vermelha carga relativa negativa e a azul ciano carga neutra. O íon de K^+ (indicado pela esfera verde no centro da estrutura) sofre interação eletrostática com as concentrações de cargas negativas do canal de K^+. A estrutura quaternária do canal iônico fica clara na figura, com 4 cadeias polipeptídicas. A estrutura do canal de K^+ dependente de voltagem é chamada homotetrâmero, ou seja, um tetrâmero com 4 monômeros idênticos.



Superfície molecular do canal de K^+ dependente de voltagem. A figura mostra a visão do meio extracelular, como se observássemos do meio extracelular para o meio intracelular. Código de acesso PDB: 1BL8.

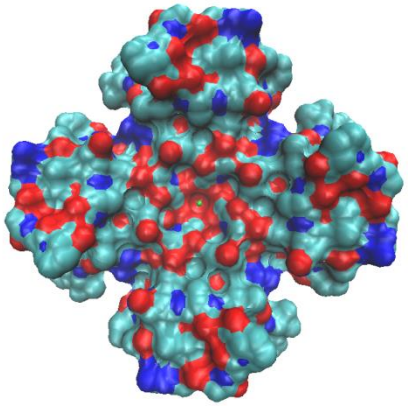
Podemos fazer uma analogia do canal de K^+ dependente de voltagem com uma maçã, onde a visão da molécula ao lado é análoga à visão da deliciosa maçã mostrada na foto abaixo.

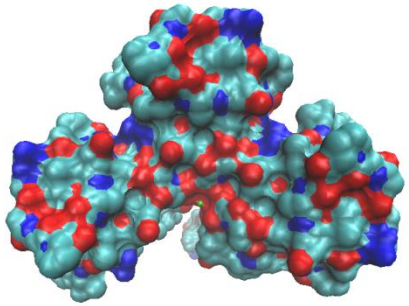


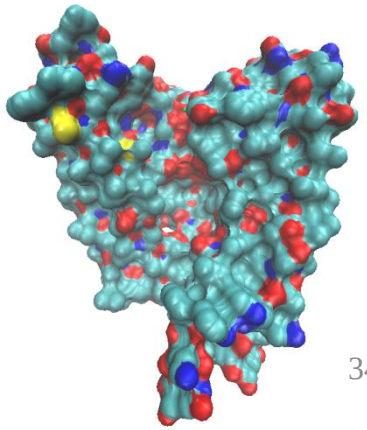
Superfície molecular do canal de K^+ dependente de voltagem. A figura mostra a visão do meio extracelular, como se observássemos do meio extracelular para o meio intracelular. Código de acesso PDB: 1BL8.

Usando a maçã, podemos imaginar o que temos que fazer para visualizarmos o interior da maçã, como se quiséssemos observar o interior do canal de K^+ dependente de voltagem. Na primeira foto à esquerda, temos a maçã inteira, vista de cima. Na foto seguinte, temos a maçã com a quarta parte removida. Na terceira foto, temos a maçã com a quarta parte removida vista de perfil.

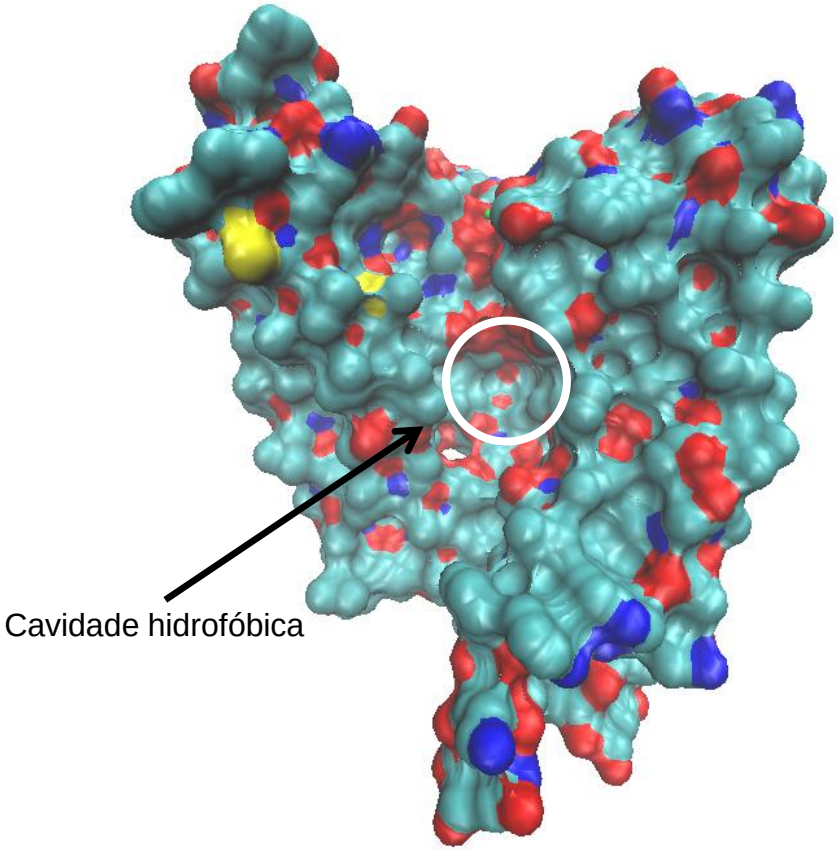
Agora temos o análogo do canal de K^+ dependente de voltagem, mostrado abaixo de cada foto da maçã, deixando clara a visualização do interior do canal na última figura da direita. A primeira figura da molécula vemos o canal por cima, na segunda com um dos monômeros retirados e, por último, de perfil, vemos o interior do canal de K^+ dependente de voltagem.





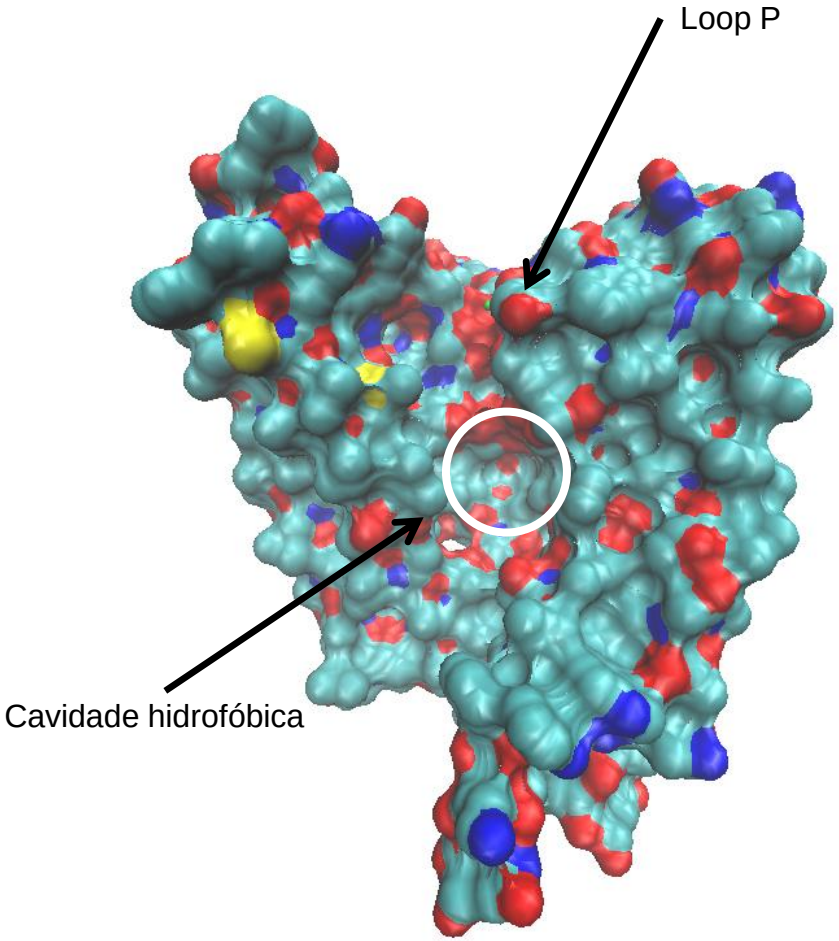


Na figura ao lado removemos o monômero B, o que possibilita visualizarmos o interior do canal de K^+. A figura foi girada 90° em relação à figura vista de cima. O tubo formado permite a passagem do íon de K^+ do meio intracelular (parte de baixo) para o meio extracelular (parte de cima). Na parte de baixo, vemos uma região essencialmente hidrofóbica, no centro do canal (indicada por uma circunferência branca), esta região apresenta uma cavidade, que permite a passagem dos íons de K^+. Podemos pensar que essa cavidade é uma antecâmara, onde o íon de K^+ despe-se de sua camada de solventes (as 8 moléculas de água que cercam o íon).



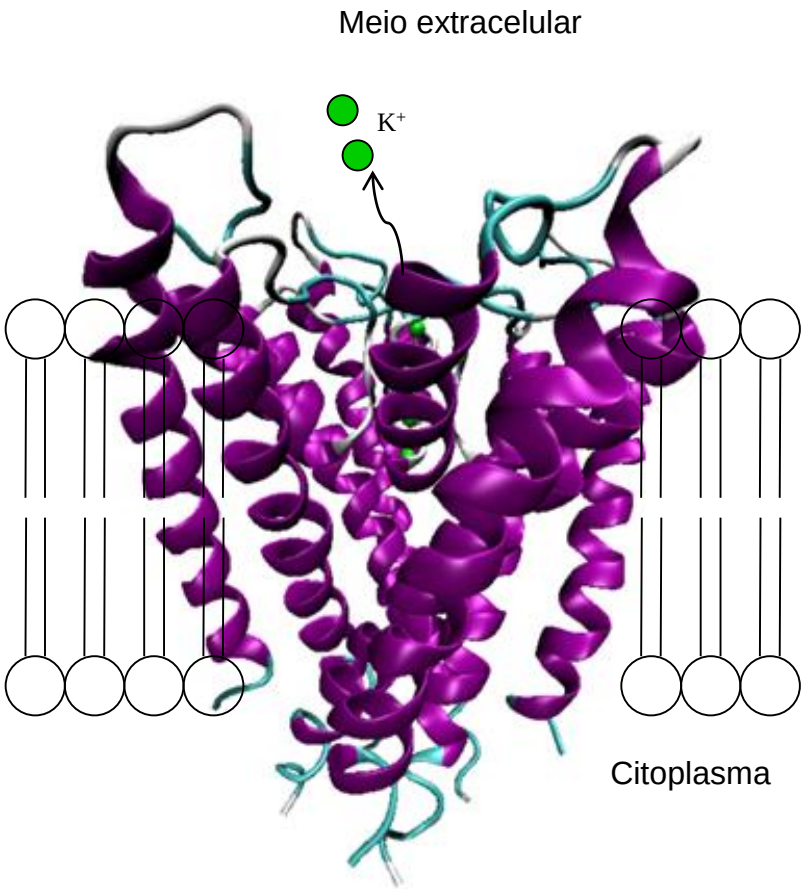
Superfície molecular do canal de K^+. A figura mostra a visão de perfil do canal. Código de acesso PDB: 1BL8.

O íon de K^+ intracelular é capturado e desloca-se para a cavidade hidrofóbica, indicada pela circunferência branca. Acima desta cavidade temos o *loop* P, com a sequência de resíduos de aminoácido Gly-Tyr-Gly, que estreitam o tubo que liga ao meio extracelular, selecionando os íons de K^+. A presença de resíduos glicina (Gly) no *loop* P confere grande flexibilidade estrutural a esta região da proteína.



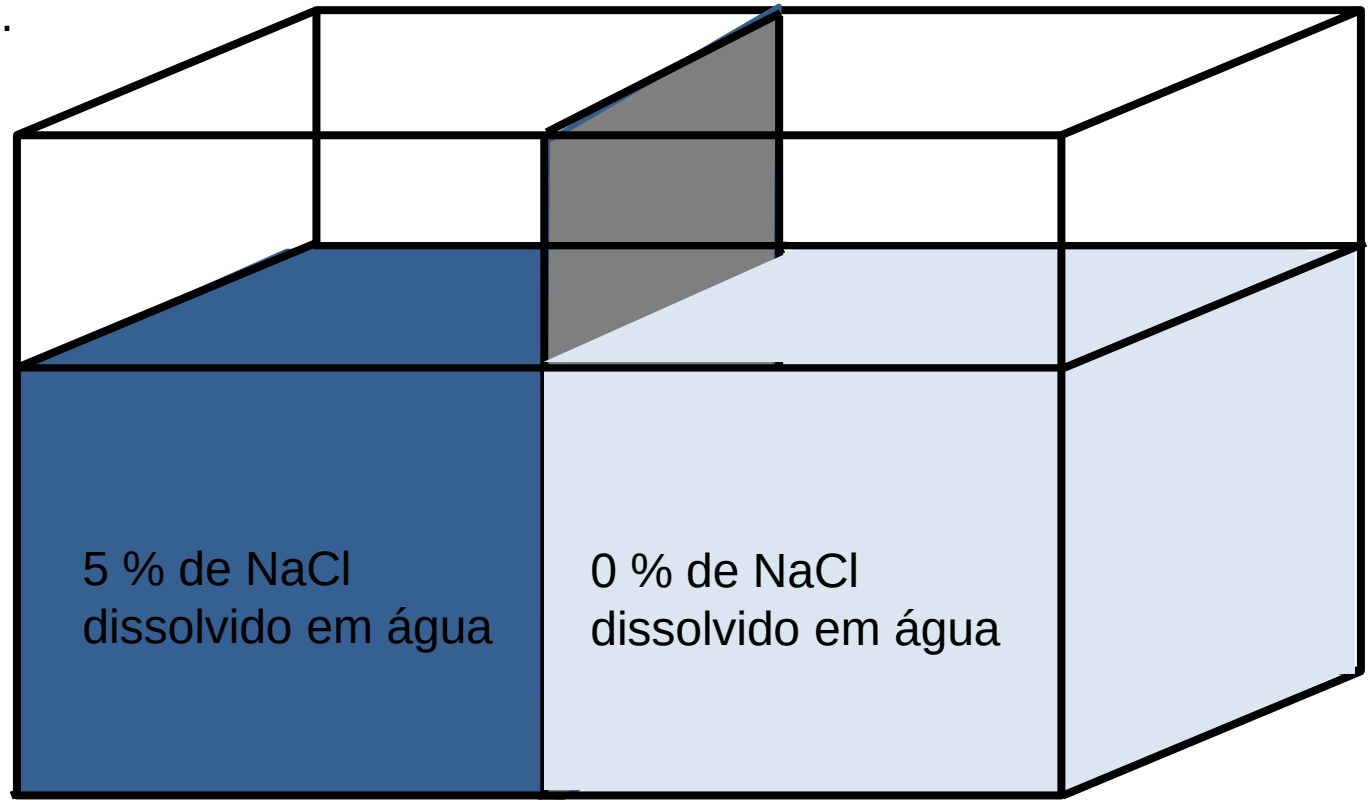
Superfície molecular do canal de K^+. A figura mostra a visão de perfil do canal. Código de acesso PDB: 1BL8.

Como já destacamos anteriormente, um aspecto estrutural comum a muitas proteínas intrínsecas é a presença de hélices na região transmembranar. Na estrutura do canal de K^+, vemos um feixe de hélices interagindo com as caudas hidrofóbicas da bicamada fosfolipídica, como mostrado ao lado. O canal de K^+ tem um aspecto de cone, como se fosse uma casquinha de sorvete.

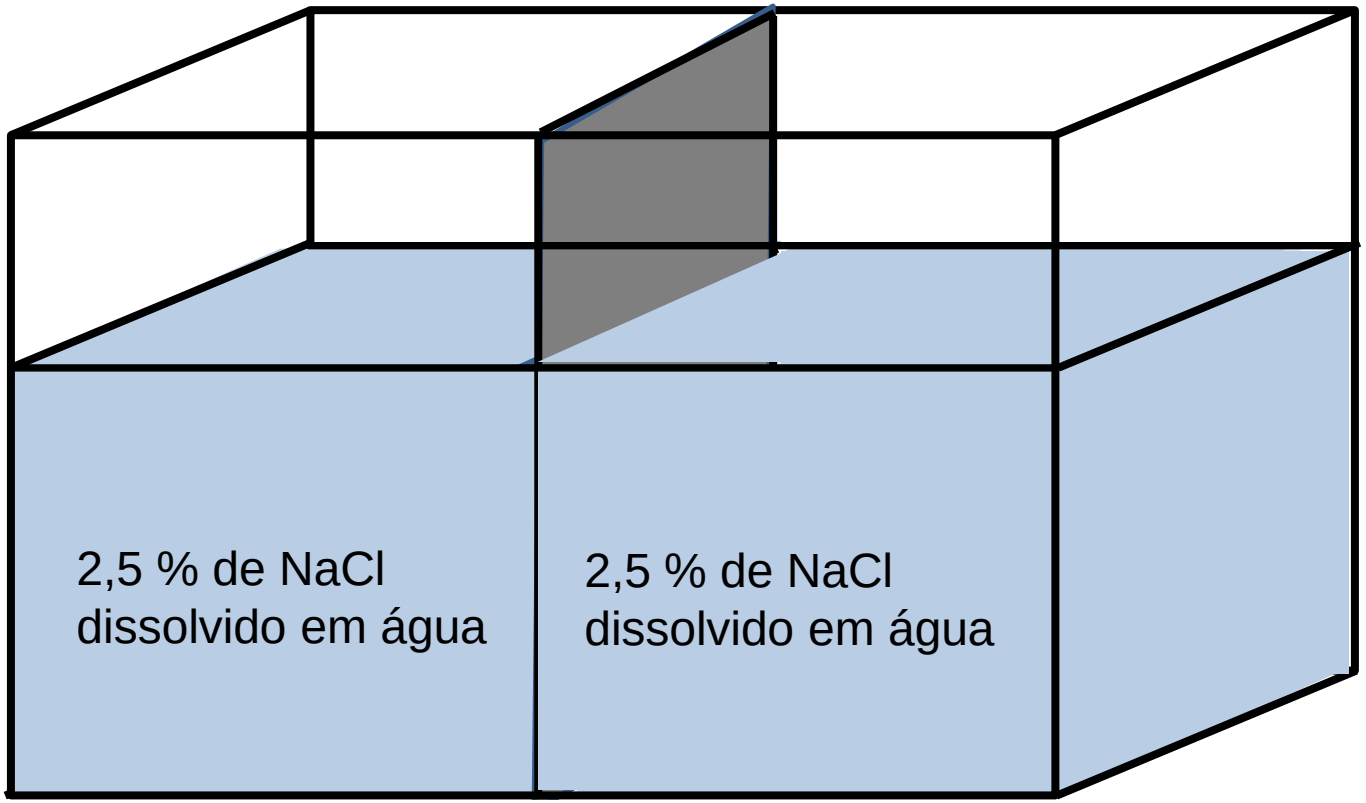


Estrutura do canal de K^+ dependente de voltagem interagindo com a bicamada fosfolipídica. Código de acesso PDB: 1BL8.

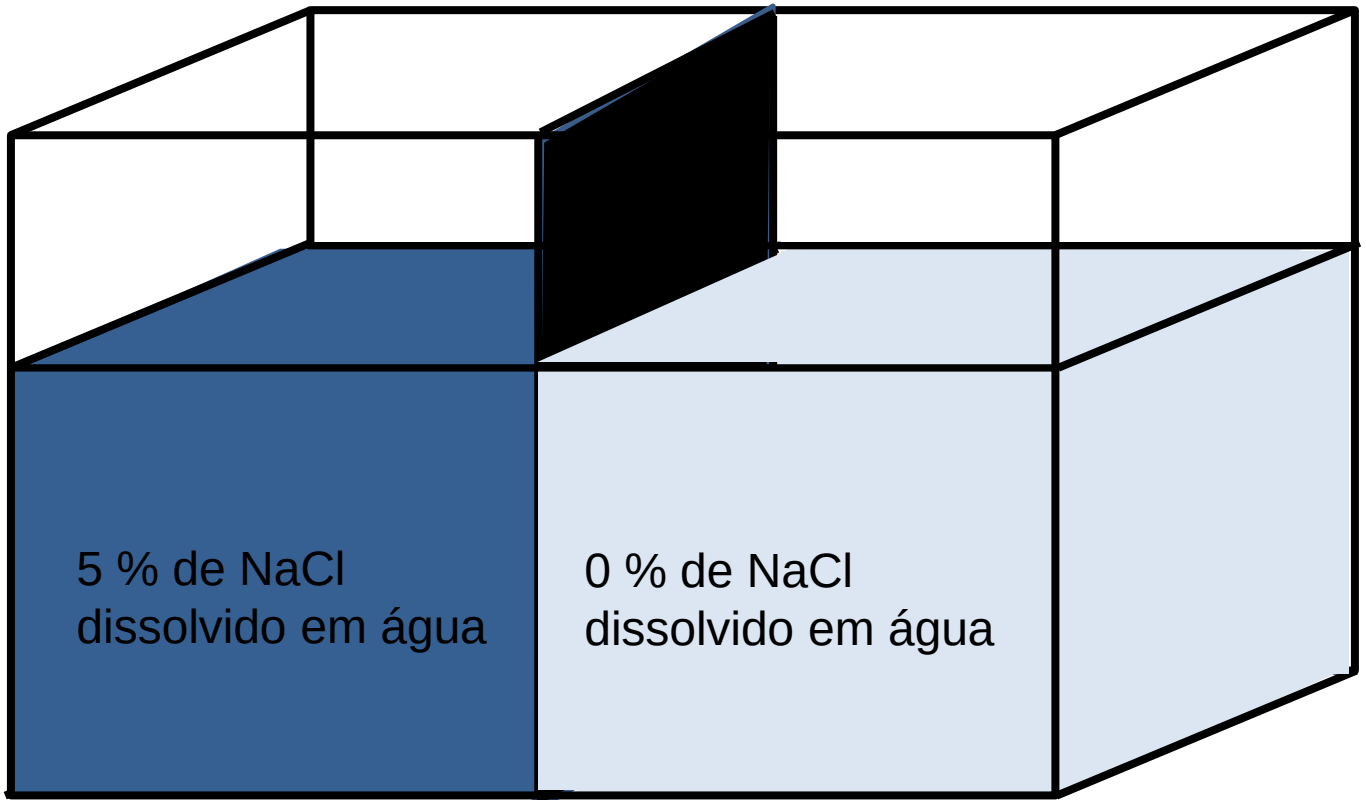
Os canais iônicos permitem a difusão de íons, este fenômeno pode ser estudado a partir de uma analogia com uma cuba de vidro, onde temos cloreto de sódio (5 % de NaCl) dissolvido de um lado da cuba e do outro água pura. Os dois sistemas estão separados por uma **membrana permeável** ao NaCl e à água. Como a membrana é permeável, ocorre a **difusão,** que leva as moléculas de água do lado direito a movimentar-se para o setor do lado esquerdo e, os íons de NaCl, a difundirem-se para o lado direito.



Com a difusão o sistema atinge o equilíbrio, onde a concentração salina é idêntica em ambos os lados. Considerando-se que o volume é o mesmo em ambos os lados, e que a concentração inicial de NaCl do lado esquerdo era 5 % e 0% do lado direito, temos, no equilíbrio, 2,5 % de NaCl em ambos os lados. O fenômeno da difusão é dependente da temperatura do sistema, pois, conforme aumentamos a temperatura, aumentamos a energia cinética dos componentes do sistema (água e NaCl).

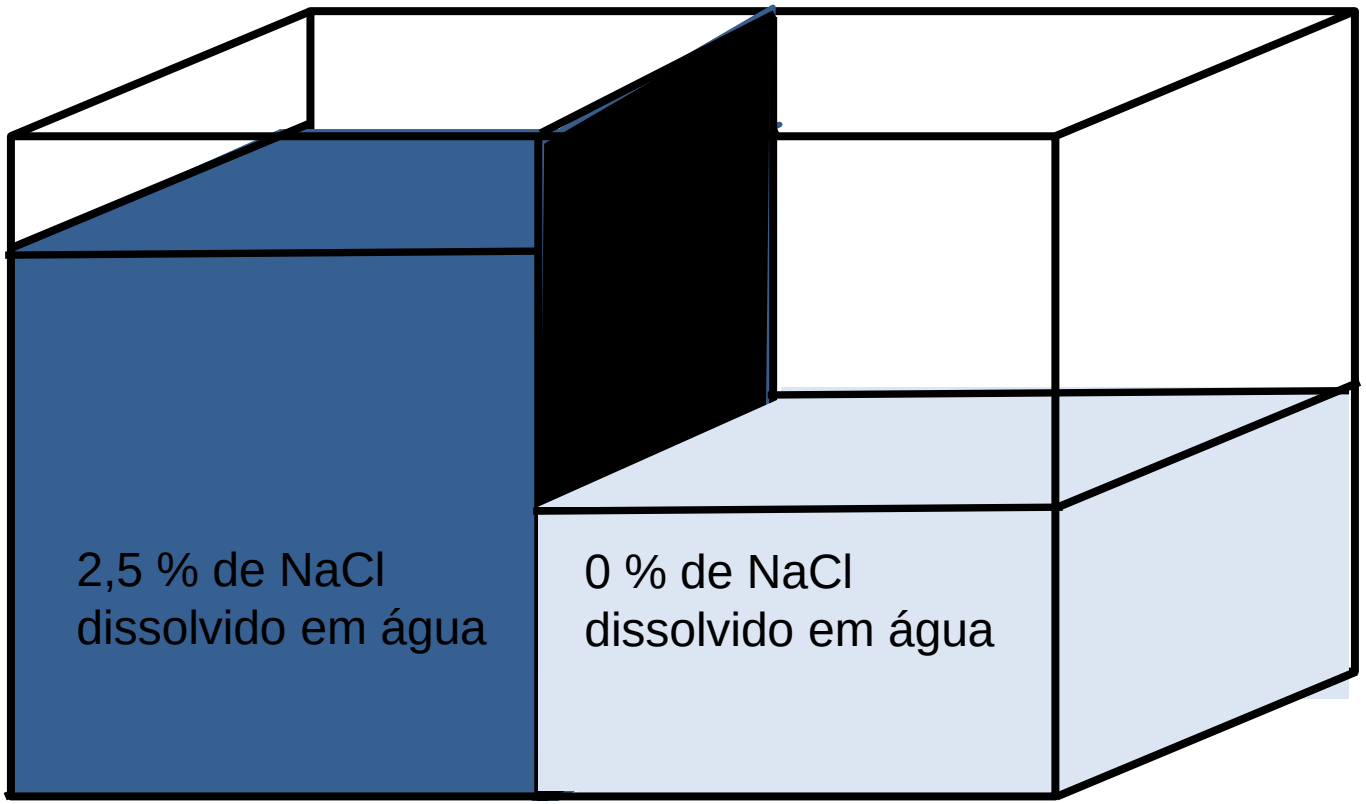


Quando trocamos a membrana permeável por uma **semipermeável**, observamos o fenômeno da **osmose**. Na osmose temos a transferência de moléculas de água da região com baixa concentração de soluto (lado direito da cuba), para uma região com alta concentração de soluto (NaCl), lado esquerdo da cuba. Assim, temos uma pressão atuando do lado direito para o lado esquerdo, a **pressão osmótica** (Π). O fluxo de água do lado direito para o esquerdo é chamado de **fluxo osmótico**.



Abaixo temos a situação que ocorre quando o equilíbrio é atingido. A pressão da coluna de líquido do lado esquerdo compensa a pressão osmótica. A **pressão osmótica** (Π) depende da concentração do soluto (C_M), da temperatura em Kelvin (T) e da constante dos gases (R = 0,0821 L atm mol^{-1} K^{-1}), conforme a equação abaixo:

$$\Pi = C_M RT$$



Exemplo 1: Considere uma massa de hemoglobina de 0,263 g, dissolvida em 10 mL de água. Essa solução apresenta uma pressão osmótica de 0,00988 atm. Calcule a massa molecular da hemoglobina.

Solução:

A partir da equação da pressão osmótica temos:

$$\Pi = C_M RT \rightarrow C_M = \frac{\Pi}{RT}$$

Substituindo-se os valores para T = 25 + 273,15 = 298,15 K e para R = 0,0821 L atm mol^{-1} K^{-1} temos:

$$C_M = \frac{\Pi}{RT} = \frac{0{,}0098815\,atm}{0{,}0821 L.atm.mol^{-1}K^{-1}.298{,}15K} = 4{,}0369.10^{-4} mol/L$$

Lembrando-se que C_M é a concentração molar, temos: $C_M = \frac{n}{V}$ e o número de moles (n) é a massa (m) dividida pela massa molecular (MW), chegamos a

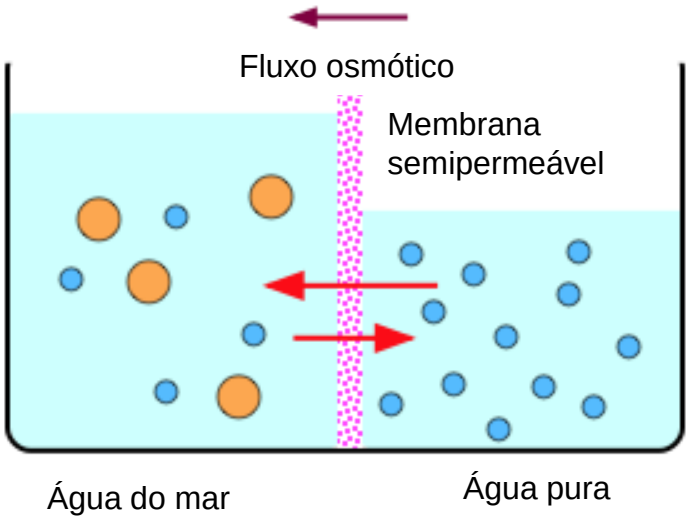
$$n = \frac{m}{MW} \rightarrow C_M = \frac{n}{V} = \frac{m}{V.MW} \rightarrow MW = \frac{m}{C_M V}$$

Exemplo 1(Continuação):

$$MW = \frac{m}{C_M V} = \frac{0{,}263\,g}{4{,}0369.10^{-4}\,mol/L.10.10^{-3}\,L} = 0{,}065149.10^{6}\,g/mol$$

$$MW = 65.149\,g/mol$$

Exemplo 2. A água do mar apresenta em média uma concentração salina de 1,13 mol/L. Calcule a pressão que deve ser aplicada para barrar o fluxo de água pura em contato com a água do mar, considere uma temperatura de 25 ºC.



Fluxo osmótico. Imagem disponível em: < http://www.chem1.com/acad/webtext/solut/solut-4.html >.
Acesso em: 17 de março de 2020.

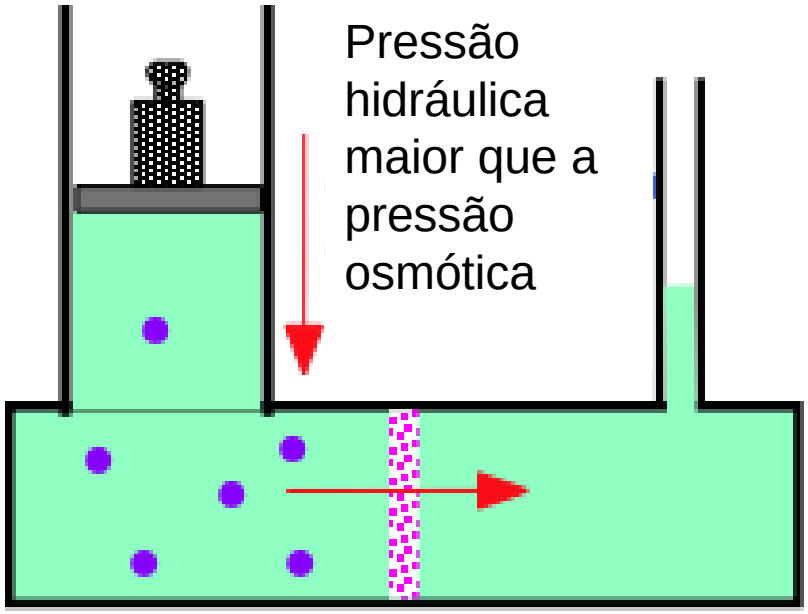
Solução:
Inicialmente temos que passar a temperatura para Kelvin, T = 25 + 273,15 = 298,15 K.
Agora aplicamos a equação da pressão, como segue:

$$\Pi = C_M RT =$$

$$= 1{,}13 mol/L . 0{,}0821 L.atm.mol^{-1}.K^{-1}.298{,}15 K$$

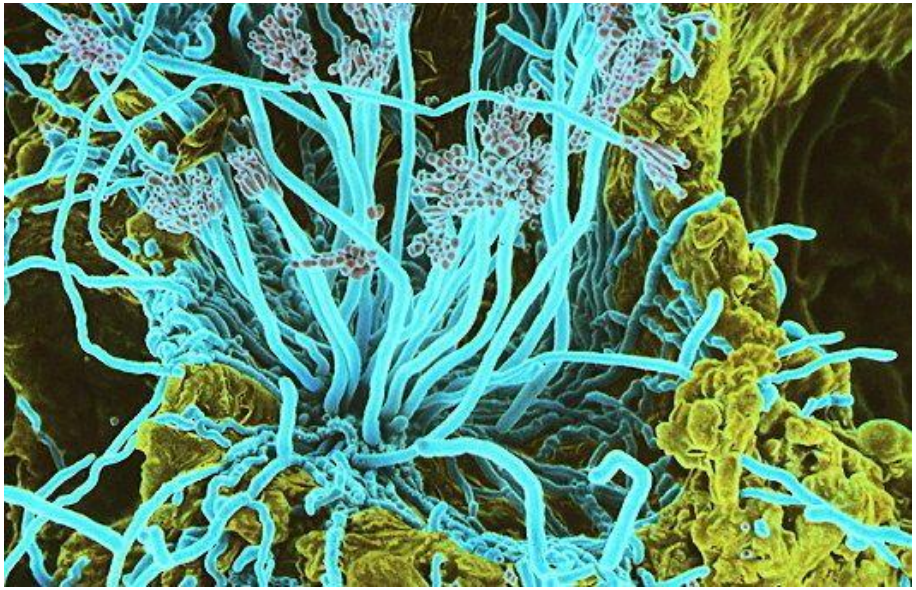
$$\Pi = 27{,}66 atm$$

Se aplicarmos uma pressão maior que a pressão osmótica, do lado onde a concentração salina é alta, teremos um fluxo de água pura para o lado direito, conforme mostra na figura ao lado. Esse processo é chamado de **osmose reversa** e é utilizado para dessalinizar a água do mar. Obviamente, para exercermos uma pressão contrária e maior que a pressão osmótica, teremos gasto de energia. Esse processo é caro e depende da eficiência da membrana semipermeável.



Osmose reversa. Imagem disponível em: < http://www.chem1.com/acad/webtext/solut/solut-4.html >.
Acesso em: 17 de março de 2020.

A penicilina é um dos maiores sucessos da história da descoberta de fármacos. Para entendermos o seu sucesso, temos que estudar seu mecanismo de ação. Sabemos que bactérias são ameaças constantes aos seres humanos e uma forma de identificar novos agentes antibacterianos é observar como plantas, outros animais e fungos protegem-se. Foi assim, de maneira acidental, que Alexander Fleming identificou a ação antibacteriana da penicilina em 1928. Fleming observou que a presença de mofo (figura ao lado), numa colônia de bactérias, adiava o crescimento destas. Um estudo posterior, identificou que o mofo estava inundando a colônia de bactérias com uma molécula, a penicilina.



Micrografia eletrônica do fungo da penicilina crescido no pão.
Disponível em:
< http://www.sciencephoto.com/media/13663/enlarge >

Acesso em: 17 de março de 2020.

A penicilina ataca um aspecto único da vida das bactérias, sem atacar o metabolismo humano, um processo chamado toxicidade seletiva. Outra razão para o sucesso da penicilina, é que os alvos são proteínas que se encontram fora da membrana citoplasmática, assim não há necessidade de atravessar a membrana para atingir o alvo.

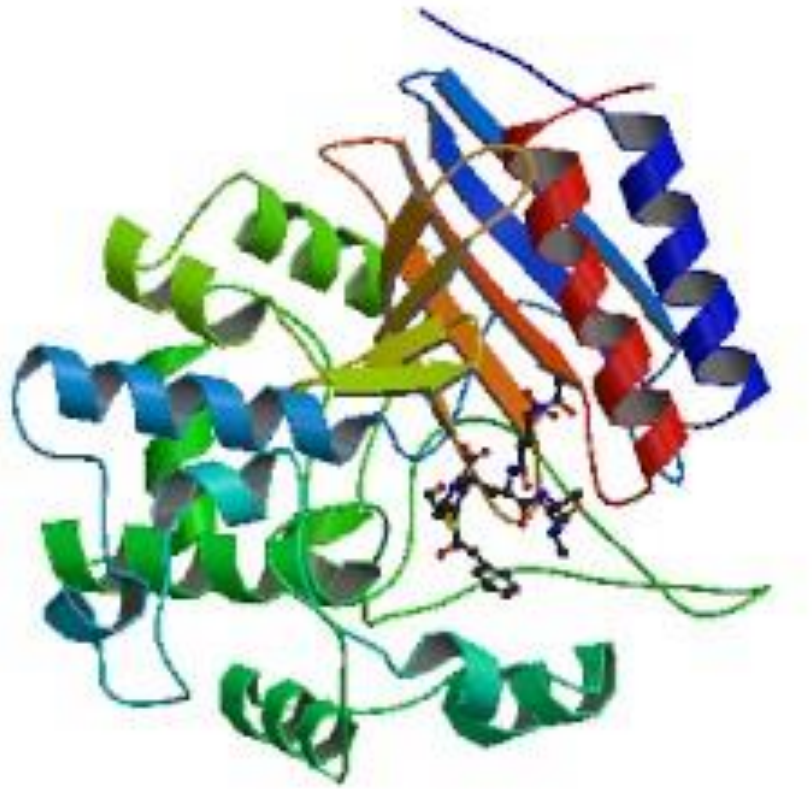
Quando tratada com baixas doses de penicilina, as bactérias mudam de formato e longos filamentos crescem a partir do corpo central da bactéria (figura ao lado). Um aumento da dose de penicilina leva à perda da integridade estrutural da superfície da bactéria, ela incha e finalmente se rompe.

Efeito da penicilina na bactéria Escherichia coli. Na parte inferior vemos o corpo central arredondado da bactéria, onde temos protrusões na parte esquerda e direita superior. Essas protrusões devem-se à ação da penicilina, que afeta a parede celular e deforma a célula antes do rompimento que mata a bactéria. Fonte da imagem: http://www.sciencephoto.com/media/12498/enlarge

Acesso em: 17 de março de 2020.

A penicilina ataca enzimas envolvidas na montagem de uma forte rede de cadeias de proteínas e carboidratos, chamada **peptídeoglicano**. O peptídeoglicano é a estrutura responsável pela rigidez estrutural da parede celular de bactérias e determina a forma da bactéria. Outra característica dos peptídeoglicanos, é a proteção contra a **lise osmótica**, quando em **meio hipotônico**.

A penicilina é quimicamente similar aos blocos construtivos do peptídeoglicano, e sua ação inibe a montagem destes. As proteínas alvos da penicilina são chamadas de proteínas que se ligam à penicilina (*penicillin-binding proteins*). Uma dessas proteínas é **carboxipeptidase**, que catalisa a ligação de peptídeos para formar uma rede que envolve a bactéria.

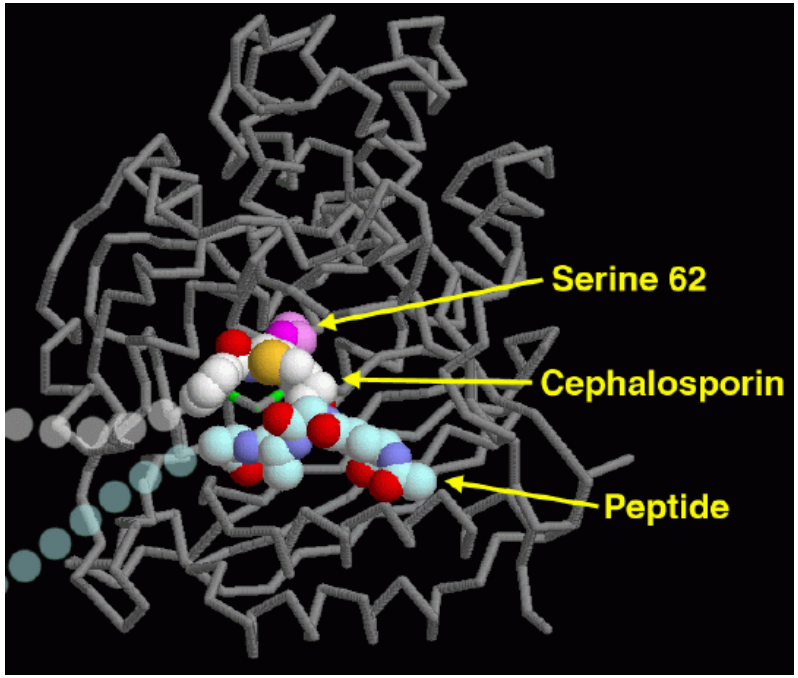


Estrutura cristalográfica da carboxipeptidase. Fonte da imagem: http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1hvb

Acesso em: 17 de março de 2020.

A estrutura da carboxipeptidase em complexo com cefalosporina mostra detalhes da inibição dessa enzima.

O uso indiscriminado de penicilina levou ao surgimento de bactérias resistentes a esse antibiótico. O fato das bactérias apresentarem um ciclo de evolução relativamente rápido, quando comparado com outros organismos, leva a uma evolução acelerada, onde as regras da seleção natural acabam selecionando as bactérias resistentes aos antibióticos. Há diversos mecanismos de resistência, um dos mais comuns é a produção de uma enzima similar à carboxipeptidase, chamada betalactamase, que se liga à penicilina, modificando sua estrutura, de forma que ela não inibe mais a carboxipeptidase.



Estrutura da carboxipeptidase em complexo com cefalosporina, que liga-se covalentemente à serina 62. Fonte da imagem: http://www.rcsb.org/pdb/education_discussion/molecule_of_the_month/images/1hvb.gif . Acesso em: 17 de março de 2020.

OLIVEIRA, J.R, WACHTER, P.H, AZAMBUJA, A.A. Biofísica para Ciências Biomédicas. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2002. 313 p.

CONSTANZO, L. Fisiologia. 4. ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2008. 321 p.

GUYTON, A.C. Tratado de Fisiologia Médica. 11. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. 1115 p.