

# Aula de Bioquímica Avançada

**Tema:**

## **Enzimas**

**Prof. Dr. Júlio César Borges**

*Depto. de Química e Física Molecular – DQFM*

*Instituto de Química de São Carlos – IQSC*

*Universidade de São Paulo – USP*

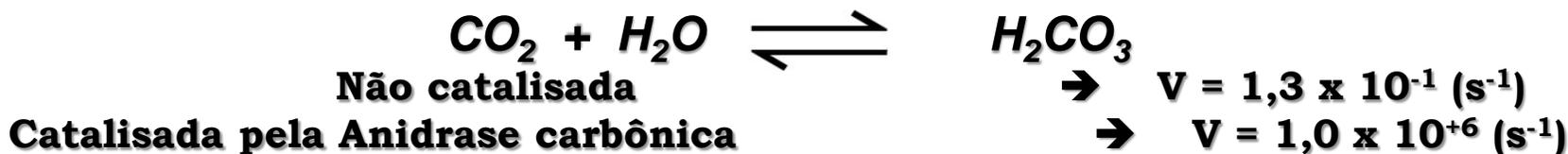
*E-mail: [borgesjc@iqsc.usp.br](mailto:borgesjc@iqsc.usp.br)*

## Reações Biológicas

→ Em condições normais similares as celulares, as reações químicas para a vida são “improváveis”

→ Obedecem os mesmos princípios que as reações químicas

- Porém são mais rápidas: fator de  $10^5$ - $10^{17}$  vezes



### Catalisadoras biológicas: Enzimas

Permitem que as reações aconteçam em tempos biologicamente úteis

→ Alta eficiência e grande poder catalítico;

→ Atuam em condições reacionais brandas;

→ Podem ser reguladas por diferentes estratégias (ativadas ou inibidas);

→ São específicas quanto aos substratos/produtos e/ou localização tecidual;

→ Podem catalisar reações específicas relacionadas – evitam reações competidoras;

→ Convertem diferentes tipos de Energia;

**Enzimas (Proteínas) e Ribosimas (RNAs)**

## Enzimas: Nomenclatura

- Muitas enzimas são conhecidas pelo seu nome comum
- Sem informação direta sobre que tipo de reação elas catalisam

→ **International Union of Biochemistry and Molecular Biology – Enzyme Commission (EC)**

- **Nomenclatura e classificação das enzimas segundo o tipo de reação catalisadas**

→ **Nome aceito/recomendado**      → **Nome sistemático**      → **Classificação de 4 números**

**Ex: NMP Cinase (nome aceito) → transfere um Fosfato do ATP para o NMP.**

**ATP:nucleosídeo-Fosfato Fosfotransferase (Nome sistemático)**

→ **O nº EC 2.7.4.4 designa especificamente o tipo de reação que a Enzima catalisa.**

**TABELA 6-3**

Classificação internacional das enzimas

Classe nº	Nome da classe	Tipo de reação catalisada
1	Oxidoredutases	Transferência de elétrons (íons hidrido ou átomos de H)
2	Transferases	Reações de transferência de grupos
3	Hidrolases	Reações de hidrólise (transferência de grupos funcionais para a água)
4	Liasas	Clivagem de C—C, C—O, C—N ou outras ligações por eliminação, rompimento de ligações duplas ou anéis, ou adição de grupos a ligações duplas.
5	Isomerases	Transferência de grupos dentro de uma mesma molécula produzindo formas isoméricas
6	Ligases	Formação de ligações C—C, C—S, C—O e C—N por reações de condensação acopladas à hidrólise de ATP ou cofatores similares

## Termodinâmica da reação

**Critério de espontaneidade: Variação da Energia Livre –  $\Delta G$**

→ Para uma reação ocorrer espontaneamente →  $\Delta G < 0$

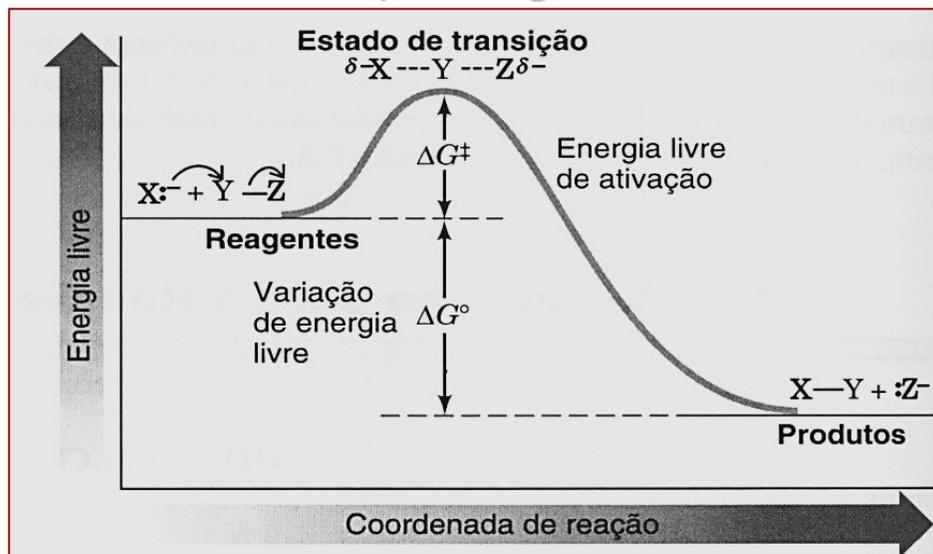
Depende do estado Inicial e Final



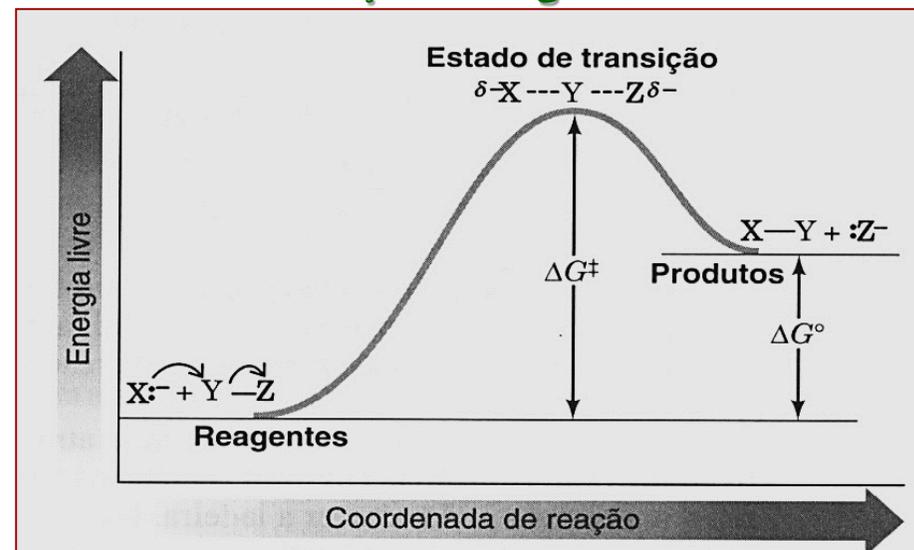
$$\Delta G = \Delta G^0 + RT \ln K_{eq}$$

$$K_{eq} = \frac{[C][D]}{[A][B]}$$

### Reação Exergônica



### Reação Endergônica



→ A espontaneidade não diz se ela vai ocorrer em uma velocidade mensurável:

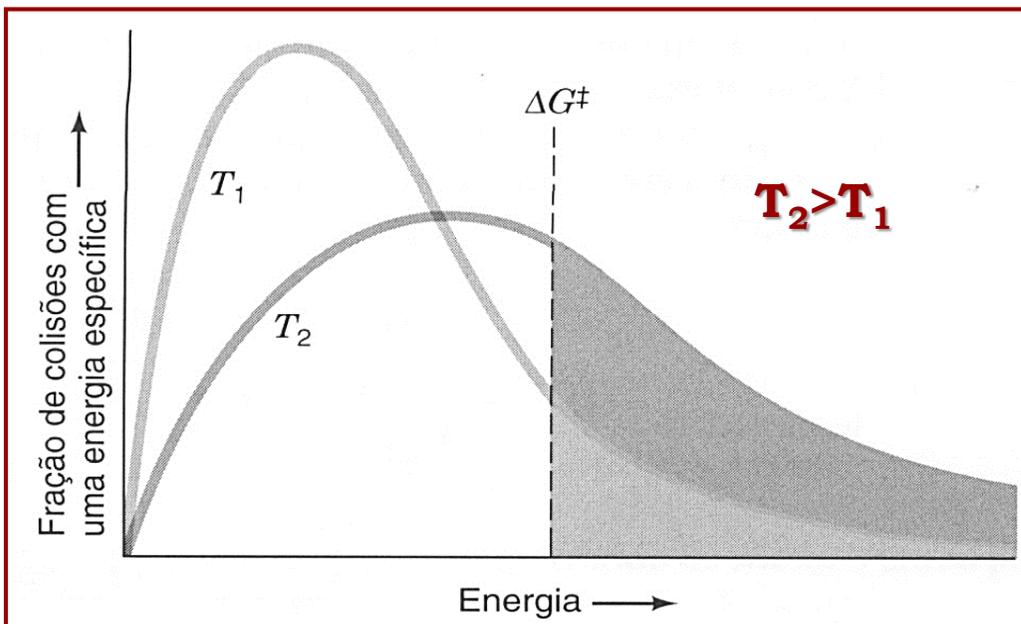
→ Depende da **Barreira de energia** para a formação do **Estado de transição**

**Barreira de energia** → Variação da Energia livre de ativação ( $\Delta G^\ddagger$ )

→ Domina a Cinética da Reação

## A Energia Livre de ativação

Velocidade da reação aumenta com a temperatura



Quanto maior a  $T$ , maior o número de colisões entre moléculas com  $\Delta G^\ddagger$  adequadas para a reação.

“Superação da Barreira de energia”

### Reações não-enzimáticas

Em determinadas reações, dependendo da Temperatura, serão obtidos produtos diferentes por reações de mecanismos concorrentes –  $SN_1$  versus  $SN_2$ :

- **Termodinâmicos**  $\rightarrow \Delta G$  favorável com uma Alta  $\Delta G^\ddagger$
- **Cinéticos**  $\rightarrow \Delta G$  favorável com um  $\Delta G^\ddagger$  menor

## Enzimas são catalizadores

→ Estabilizam o **Estado de transição (ET ou  $X^\ddagger$ )** de uma reação

- O ET não é um “intermediário” reacional com estabilidade

- É um momento molecular transitório com igual probabilidade de se decompor em P ou S

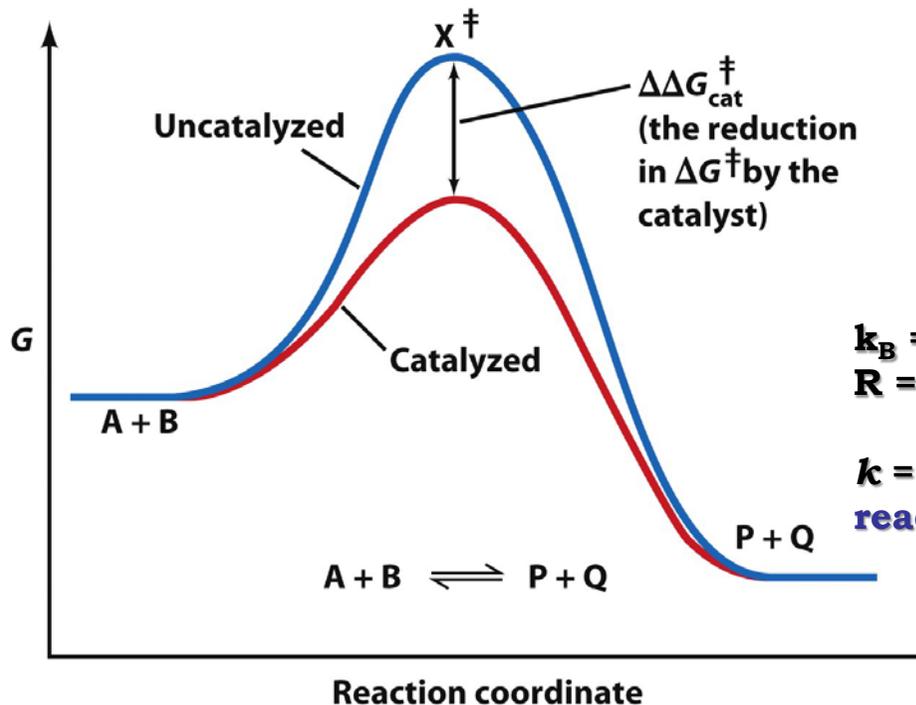
→ Portanto, as enzimas reduzem a  $\Delta G^\ddagger$



$$K^\ddagger = \frac{[X^\ddagger]}{[A][B]}$$

$$\Delta G^\ddagger = G_{X^\ddagger} - G_S = -RT \ln K^\ddagger$$

→ Quanto maior a  $[S]$  e  $[X^\ddagger]$  → maior a velocidade da reação →  $V \propto [S]$  e  $V \propto [X^\ddagger]$



$$k = \frac{k_B T}{h} e^{\frac{-\Delta G^\ddagger}{RT}}$$

$$V = k[S] = \frac{k_B T}{h} [S] e^{\frac{-\Delta G^\ddagger}{RT}}$$

$k_B$  = Constante de Boltzmann  
 $R$  = Constante dos Gases

$h$  = Constante de Planck  
 $T$  = Temperatura absoluta

$k$  = constante de velocidade → indica a probabilidade da reação acontecer nas condições indicadas

$k = 0,03 \text{ seg}^{-1}$  → 3% de conversão  $S \rightarrow P$  por seg  
Relação inversa e proporcional entre  $k$  e  $\Delta G^\ddagger$

## Enzimas são catalizadores

→ Estabilizam o **Estado de transição (ET ou X<sup>‡</sup>)** de uma reação

→ As enzimas reduzem a  $\Delta G^\ddagger$  sem alterar o equilíbrio termodinâmico entre S e P

$$V = v[X^\ddagger] = \frac{kT}{h} [S] e^{\frac{-\Delta G^\ddagger}{RT}}$$

$$\frac{kT}{h} = 6,2 \times 10^{12} \text{ seg}^{-1} \text{ à } 25^\circ \text{C}$$

→ Se  $\Delta G^\ddagger_{n-cat} = 6,82 \text{ kcal/mol} \rightarrow K_{eq} = [X^\ddagger]/[A][B] = 1 \times 10^{-5}$

$$\rightarrow V = 6,2 \times 10^7 \text{ seg}^{-1}$$

**Se  $\Delta G^\ddagger_{cat} = 4,09 \text{ kcal/mol}$**

$\Delta \Delta G^\ddagger = 2,73 \text{ kcal/mol} \rightarrow K_{eq} = [X^\ddagger]/[A][B] = 1 \times 10^{-3}$

$$\rightarrow V = 6,2 \times 10^9 \text{ seg}^{-1}$$

→ Uma pequena redução na  $\Delta G^\ddagger$  resulta num grande aumento na Velocidade da Reação

→ O aumento da Velocidade da reação é dado por:

$$\Delta \Delta G^\ddagger_{cat} = \Delta G^\ddagger_{n-cat} - \Delta G^\ddagger_{cat}$$

$$e^{\Delta \Delta G^\ddagger_{cat} / RT}$$

K <sup>eq</sup>	$\Delta G^{0'}$ (kcal/mol)
0,00001	6,82
0,0001	5,46
0,001	4,09
0,01	2,73
0,1	1,36
1	0
10	-1,36
100	-2,73
1000	-4,09
10000	-5,46
100000	-6,82

**TABELA 6-5**

Alguns aumentos de velocidade proporcionados por enzimas

Ciclofilina	$10^5$
Anidrase carbônica	$10^7$
Triose-fosfato-isomerase	$10^9$
Carboxipeptidase A	$10^{11}$
Fosfoglicomutase	$10^{12}$
Succinil-CoA-transferase	$10^{13}$
Urease	$10^{14}$
Orotidina-monofosfato-descarboxilase	$10^{17}$

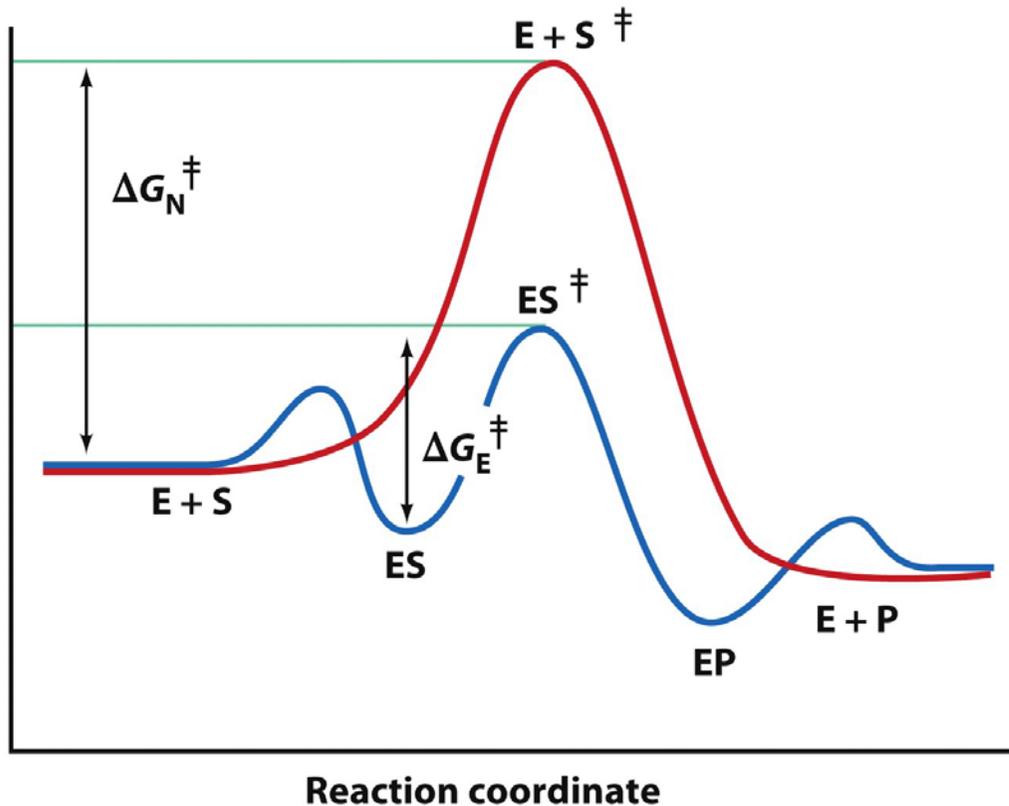
# Enzimas

**Formação do complexo “Enzima-Substrato — ES” numa “Orientação favorável”**

**A formação do complexo ES distingue as Enzimas dos demais catalizadores**



**-As Enzimas “criam” um novo caminho para a reação química estabilizando o ET.**



**→ Enzimas não alteram o equilíbrio de uma reação**

**-A enzima não é gasta no processo e portanto não altera o equilíbrio químico**

**-Elas aceleram ambos os sentidos da reação pelo mesmo fator!!!**

$$\Delta G = \Delta G^0 + RT \ln K_{eq}$$

$$K_{eq} = \frac{[E][P]}{[E][S]} = \frac{[P]}{[S]}$$

## Enzimas: Sítio Ativo

- Participação direta na formação do complexo ES
- Pequena porção da enzima
- Interagem com substratos por ligações fracas

### O SÍTIO ATIVO é um micro-ambiente

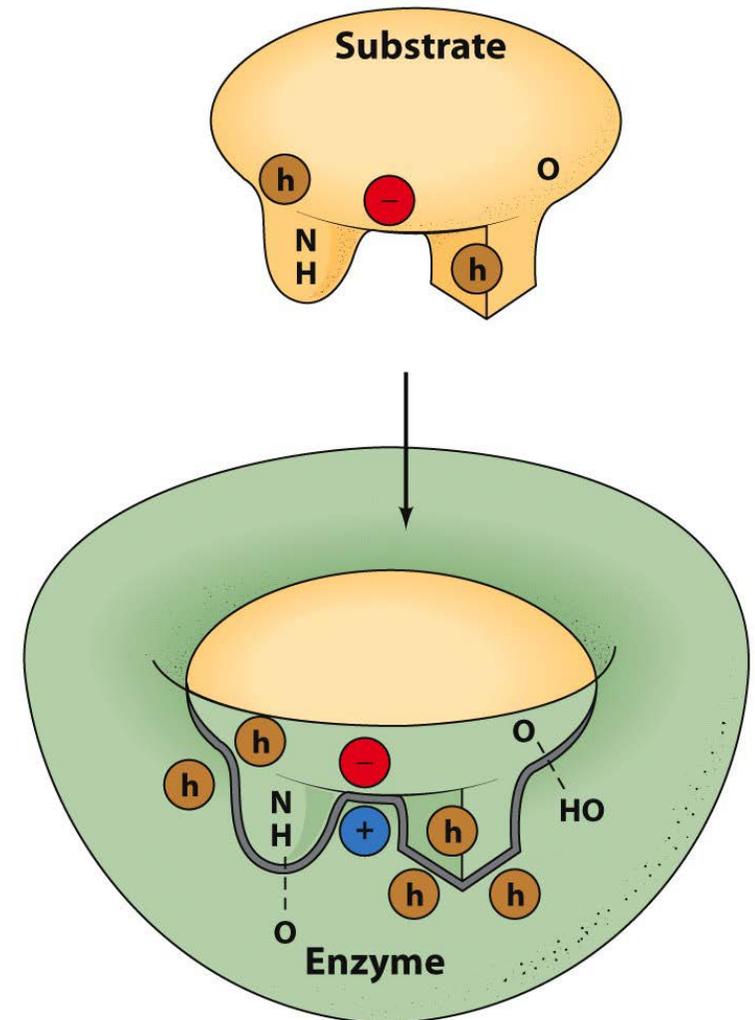
- Selecionar substratos complementares
- Especificidade eletrônica e geométrica
- Influência nas propriedades das cadeias laterais

→ São quirais

- São estereoespecíficas

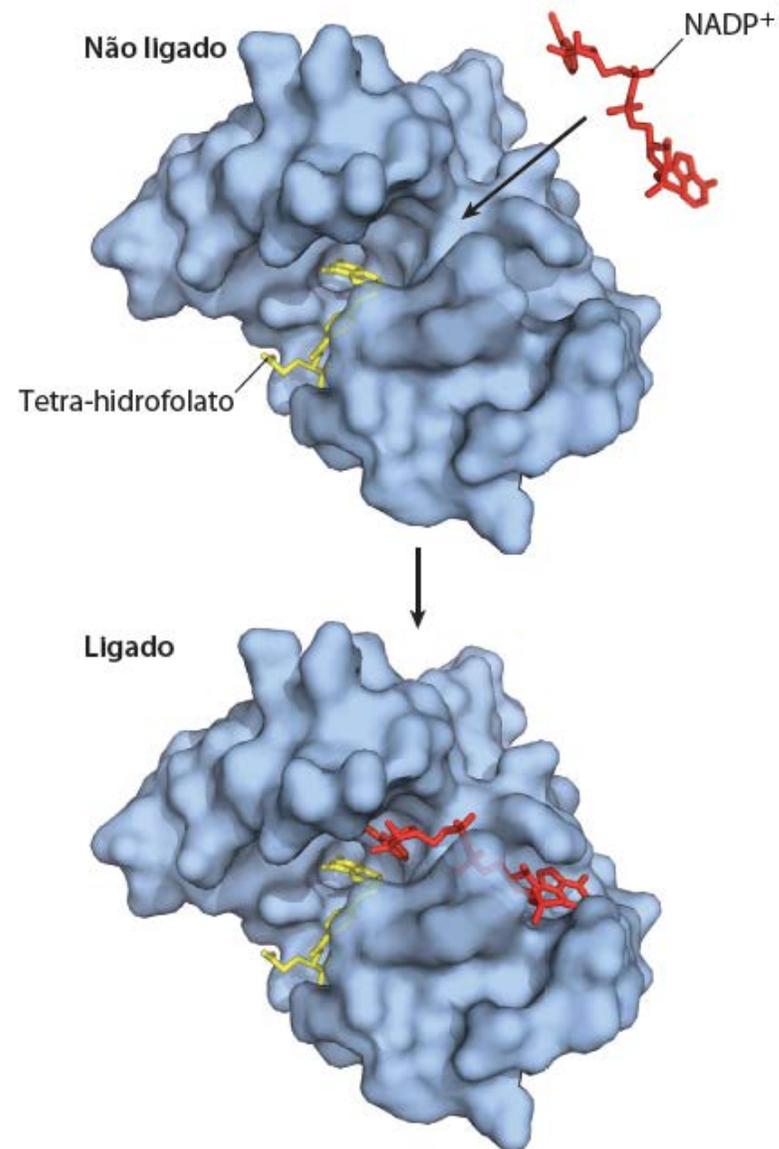
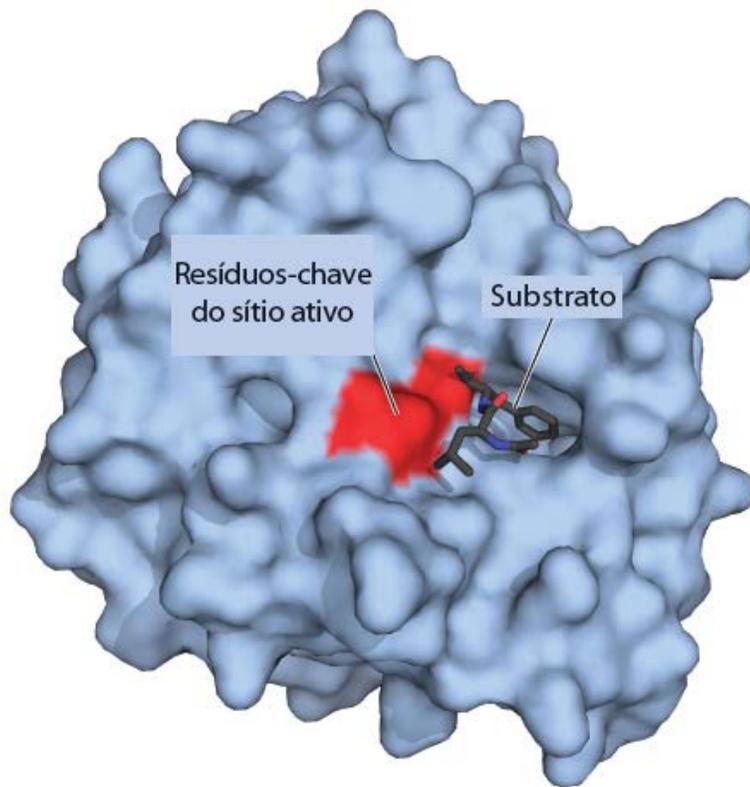
### Tipos de interações Enzimas-substratos

- van der Waals
- Eletrostáticas
- Ligações de hidrogênio
- Hidrofóbicas



## Enzimas: Sítio Ativo

→ Formam fendas e possuem arranjo pré-definido



**FIGURA 6-1** Ligação de um substrato no sítio ativo de uma enzima.

A enzima quimotripsina, com o substrato ligado (PBD ID 7GCH). Alguns dos resíduos-chave do sítio ativo aparecem como uma mancha vermelha na superfície da enzima.

## Enzimas: Sítio Ativo

A energia de ligação do ES provêm Energia Livre utilizada pela enzima



$$K_{eq} = \frac{k_1}{k_2} = \frac{[ES]}{[E][S]}$$

$$\Delta G_B = \Delta G^0 + RT \ln K_{eq}$$

$$\Delta G_B = \Delta H - T\Delta S$$

### Afinidade do complexo Enzima Substrato - ES

→ DEPENDE da contribuição da  $\Delta H$  e  $\Delta S$

- Formação de interações energéticas ( $\downarrow \Delta H$ )

- Expulsão de água do Sítio ativo ( $\uparrow \Delta S$ )

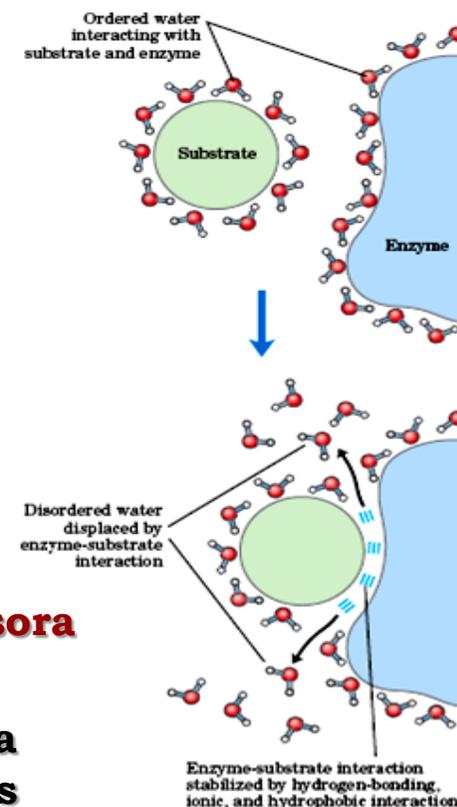
- Liberação da água de solvatação do substrato ( $\uparrow \Delta S$ )

- Flexibilidade do Substrato no Sítio Ativo ( $\downarrow \Delta S$ )

→ Contribuições maximizadas no Estado de transição

**A  $\Delta G_B$  influencia a especificidade e fornece substancial força propulsora para a catálise enzimática.**

- Fatores que contribuem  $\downarrow \Delta G_B$  contribuem para  $\downarrow \Delta G^\ddagger$  por ajudar a superar efeitos de aproximação, orientação e fixação de substratos



*A especificidade de uma enzima é devida à interação precisa do substrato com a enzima. Tal precisão é resultado da complexa estrutura 3D da proteína/enzima*

## Enzimas: Sítio Ativo

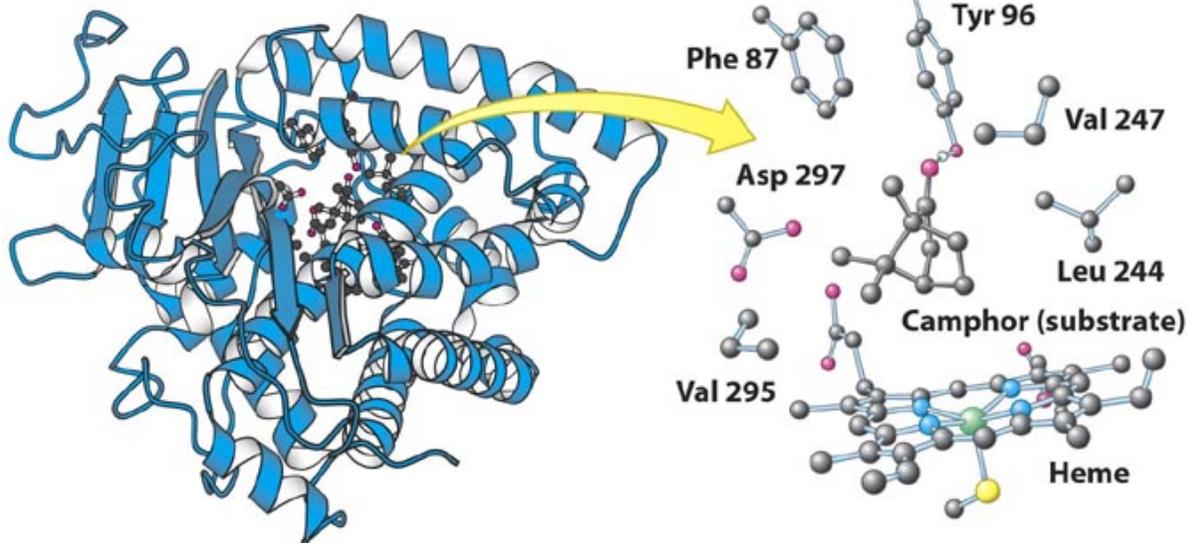
→ Pequena porção da enzima

→ Contam com aminoácidos ou “grupamentos catalíticos” provenientes de diferentes posições na estrutura primária da proteína

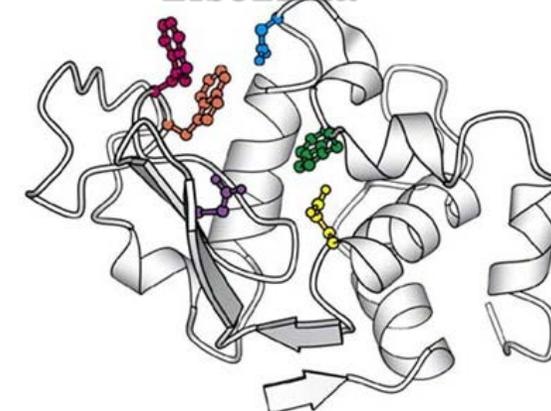
→ Os demais aminoácidos formam a estrutura 3D da enzima para “POSICIONAR” os Aminoácidos “catalíticos” no sítio ativo → Funcionam como um “andaime”

- Garantem a estrutura e forma do sítio ativo

### Citocromo P-450



### Lisozima



**Posição dos Aminoácidos catalíticos na estrutura primária**

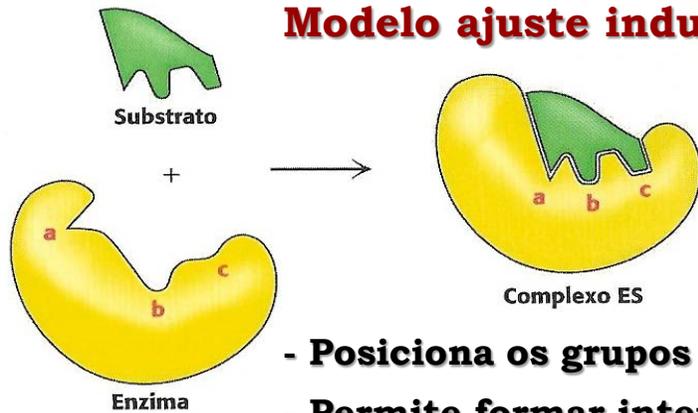
# Enzimas: Sítio Ativo

→ Os sítios ativos são pré-formados na estrutura das enzimas

→ A maioria absoluta sofre mudanças conformacionais → Ajuste induzido – “Induced fit”

- Podem ser rearranjos de cadeias laterais ou grande movimento de domínios

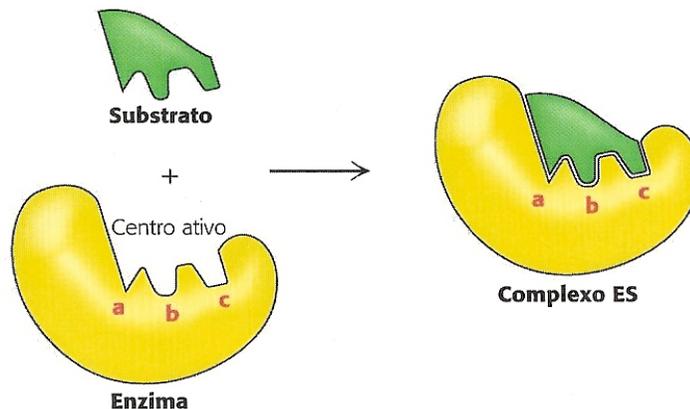
## Modelo ajuste induzido



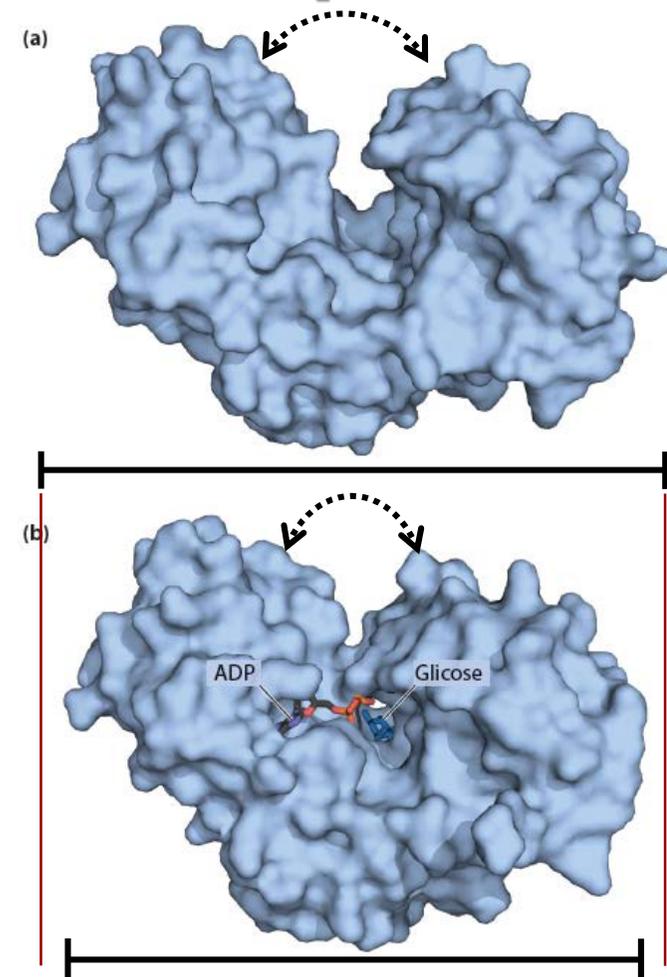
- Posiciona os grupos catalíticos no ET
- Permite formar interações adicionais no ET
- Protege S de reações concorrentes
- Mudanças conformacionais compensadas pela  $\downarrow \Delta G_B$

## Modelo chave-fechadura

- Emil Fischer (1894)
- Em desacordo com observações experimentais



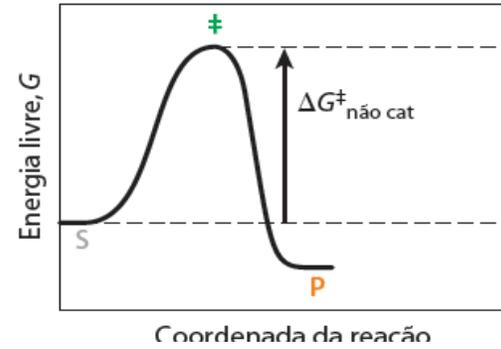
## Hexoquinase



# Enzimas

## As Enzimas apresentam Alta afinidade pelo Estado de Transição Reacional

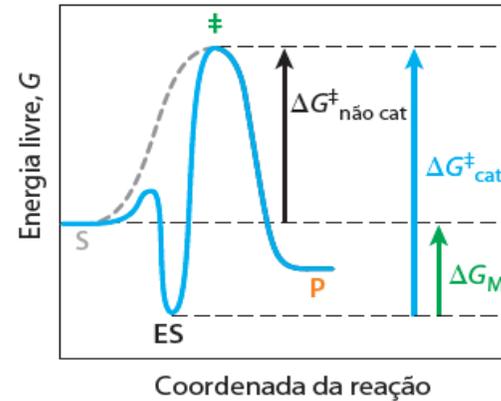
(a) Sem enzima



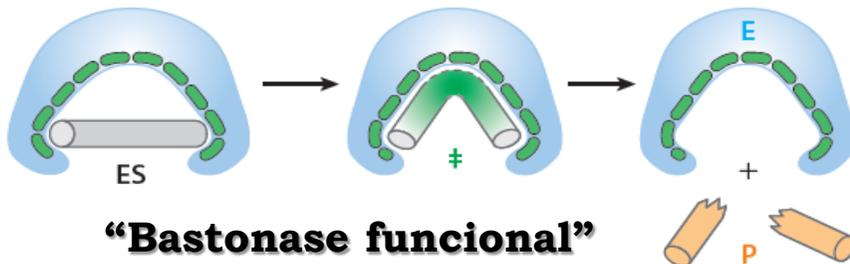
(b) Enzima complementar ao substrato



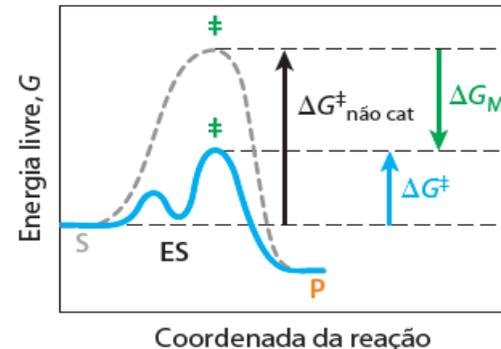
**“Bastonase não funcional”**



(c) Enzima complementar ao estado de transição



**“Bastonase funcional”**

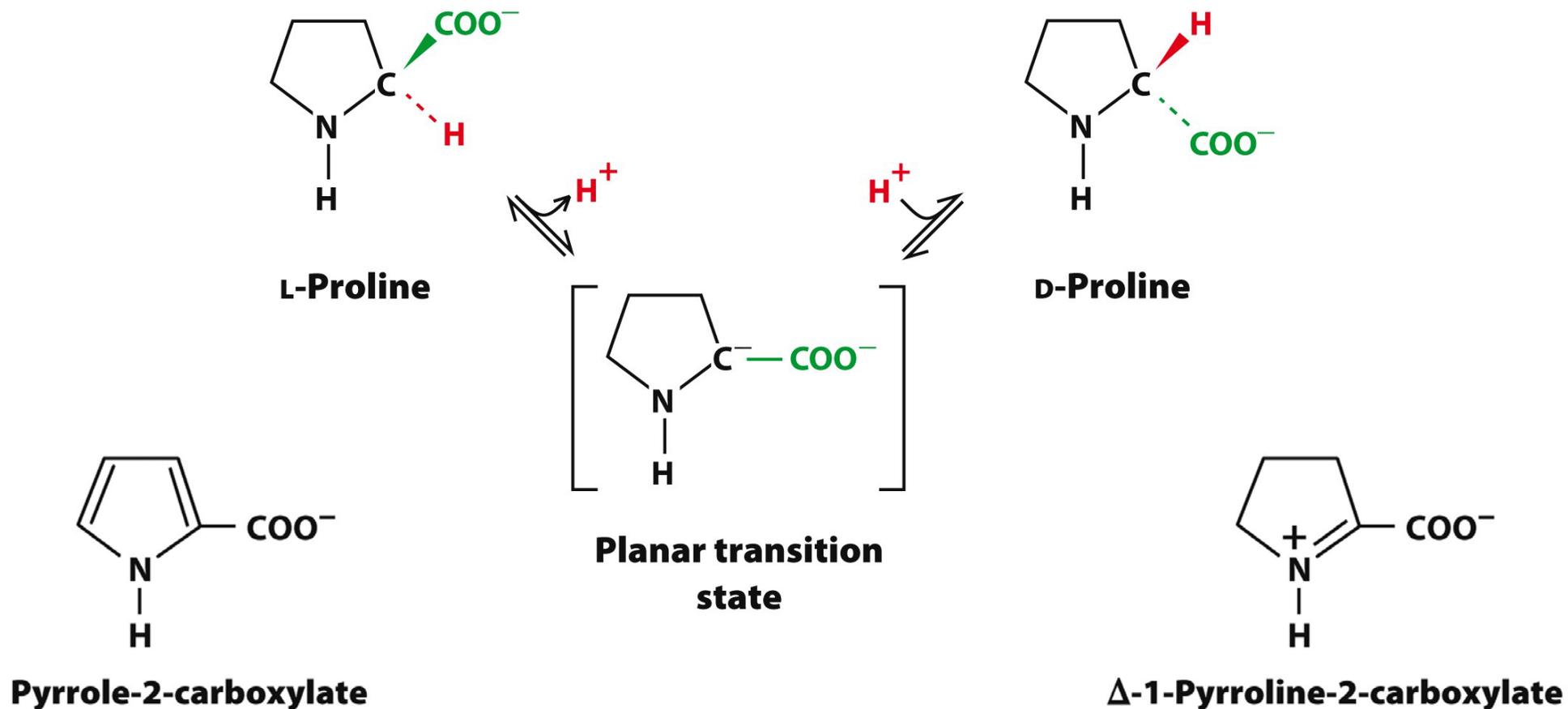


**As enzimas estabilizam a formação do Estado de Transição pois devem ser complementares a este estado!**

# Enzimas

**As Enzimas apresentam Alta afinidade pelo Estado de Transição Reacional**

**→ As enzimas estabilizam a formação do Estado de Transição**



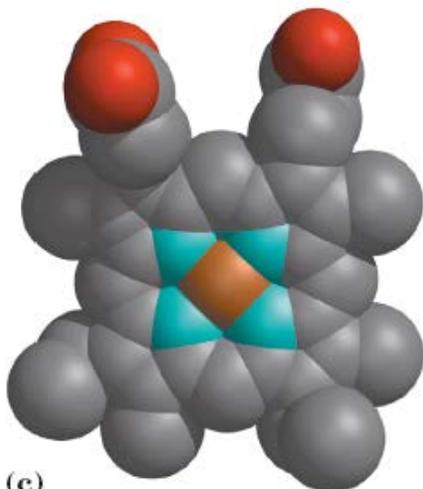
**O Pirrol-2-carboxilato tem afinidade 160 x maior do que a Prolina**

## Enzimas

As Enzimas apresentam Alta afinidade pelo Estado de Transição Reacional

→ As enzimas estabilizam a formação do Estado de Transição

### Heme



### Anticorpos Catalíticos

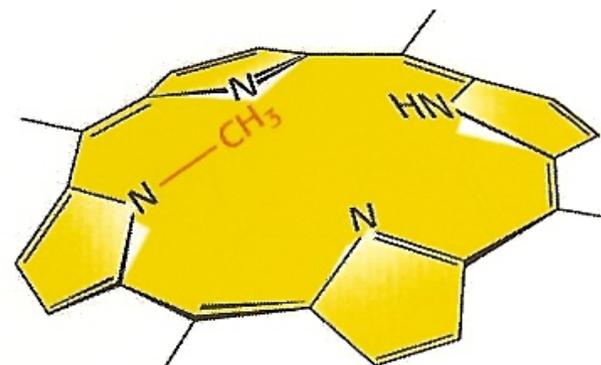


Fig. 8.25 Uso de análogos de estado de transição para gerar anticorpos catalíticos.

## Importância

Desenvolvimento de inibidores análogos do estado de transição

- Estudos do mecanismo catalítico
- Desenvolvimento de Fármacos

Indústria QUÍMICO-FARMACÊUTICA → \$\$\$\$\$

## **Enzimas necessitam de auxílio**

→ **As cadeias laterais das enzimas participam diretamente da catálise**

→ **Co-fatores → localizados no Sítio Ativo**

**Muitas enzimas necessitam → Essenciais para a atividade enzimática**

- **Participam de reações Óxido-redução**

→ **Íons Metálicos**

→ **Coenzimas - Moléculas orgânicas → devem ser regeneradas**

- **Grupos prostéticos – Coenzima ligada fortemente**

**Diferentes enzimas com uma mesma coenzima → mecanismo catalítico similar**

**Apo-enzima**

**e**

**Holoenzima**

**Cadeia protéica**

**+**

**Co-enzima ou metal**

→ **Ativadores → localizados fora do Sítio Ativo**

- **Aumentam a atividade enzimática**