

ENZIMAS E BIOENERGÉTICA

24-AGO-2018

QBQ-0230

Bioquímica do Metabolismo – Biologia Noturno

A catálise na vida

- Um dos princípios da vida é que os organismos sejam capazes de extrair, transformar e utilizar a energia do ambiente.
- Para tal, sistemas biológicos são dotados de catalisadores (enzimas), que são, por sua vez, essenciais para que esta transformação ocorra de maneira eficiente.

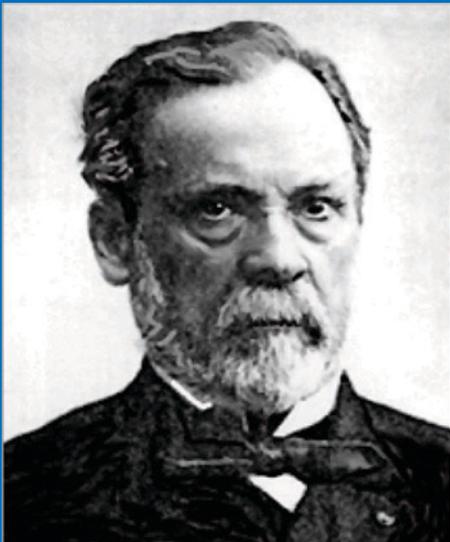


As enzimas

- O estudo das enzimas é muito importante para entender os processos biológicos.
- As enzimas são elementos centrais em todos os processos bioquímicos, trabalhando em conjunto, elas transformam as moléculas constituintes da vida, tais como CO_2 , compostos nitrogenados, açúcares (carboidratos), gordura e proteínas (aminoácidos) em todas as demais substâncias que compõem sistemas biológicos.
- O estudo das enzimas é portanto essencial para entendermos como a vida funciona.
- A falta (ou excesso) de uma atividade enzimática, frequentemente resulta em doenças genéticas.
- O estudo das enzimas é também fundamental para processos biotecnológicos, tais como a conversão do suco da cana-de-açúcar em etanol para consumo pelos carros, ou outros processos industriais.

O começo: Louis Pasteur e a fermentação

- As enzimas foram primeiramente reconhecidas no final dos anos de 1700 como componente da degradação da carne pelos sucos gastrointestinais, ou pela conversão do amido a açúcar pela saliva.
- Nos anos de 1850, Louis Pasteur propôs que a conversão do açúcar em álcool pelas leveduras era catalisado por “fermentos”, inseparáveis das células das leveduras.



Louis Pasteur



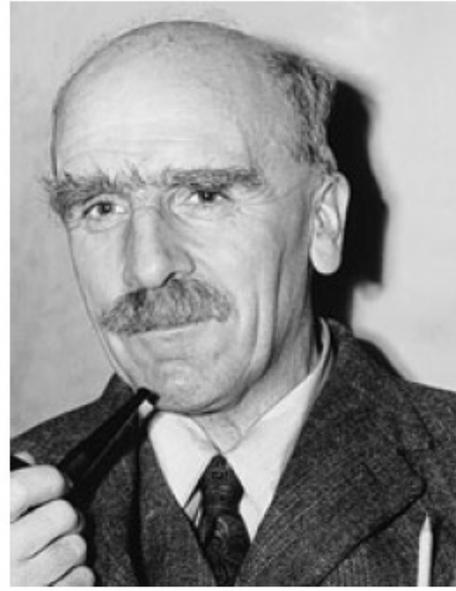
Levedura (*Saccharomyces cerevisiae*)

O começo

- Em 1897, Eduard Buchner demonstrou que moléculas presentes em extratos de levedura eram capazes de fermentar o açúcar em etanol.
- Wilhelm Kühn sugeriu, pela primeira vez, o nome enzimas para essas moléculas (do grego ἔνζυμον, levedar).



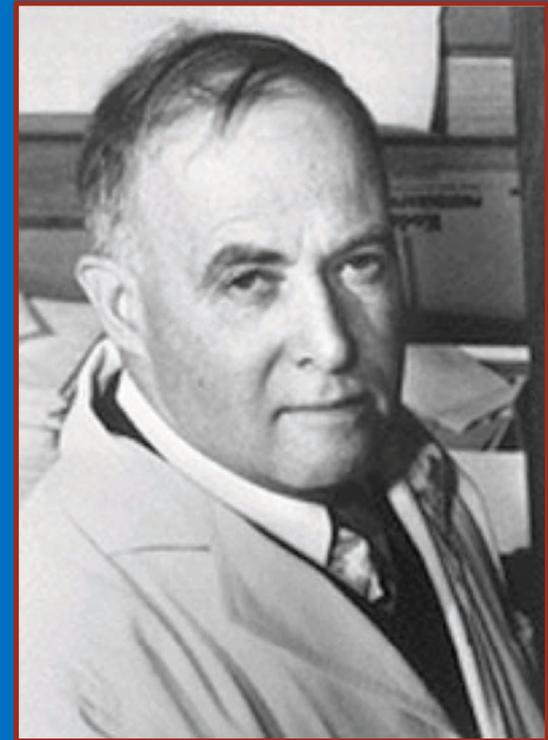
Eduard Buchner, 1860–1917



J. B. S. Haldane, 1892–1964

O começo: enzimas são proteínas

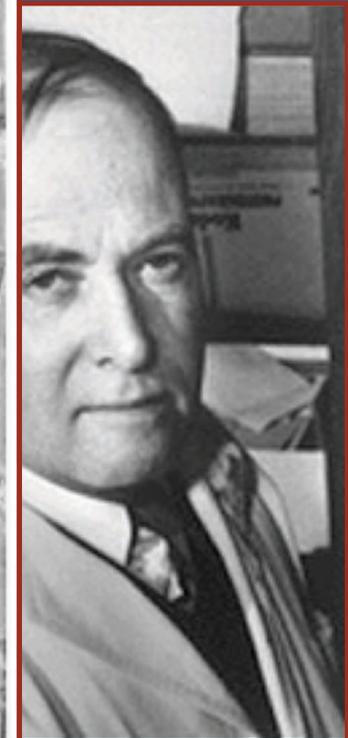
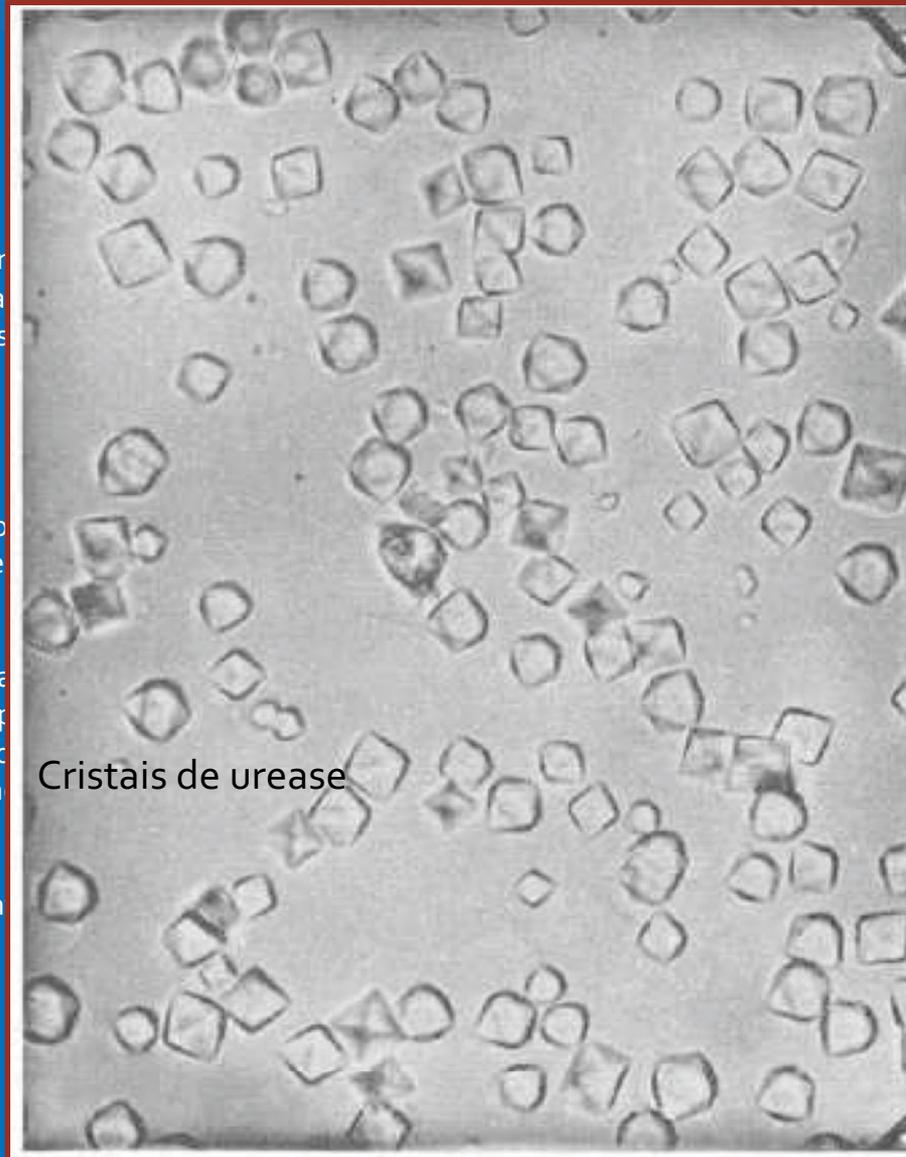
- Em 1926, James Sumner cristalizou a enzima urease e mostrou que ela era composta exclusivamente por proteína. Ele propôs que todas as enzimas fossem proteínas.
- Esse conceito só foi aceito anos mais tarde, quando John Northrop e Moses Kunitz cristalizaram a tripsina, a pepsina e outras enzimas digestiva.
- Nesta mesma época, J. B. S. Haldane escreveu um tratado (*Enzymes*), propondo que interações fracas entre as enzimas e os substratos fossem utilizados para catalisar as reações biológicas.
- Esses princípios continuam válidos até hoje.



James Sumner (Nobel em química, 1946)

O começo: enzimas são proteínas

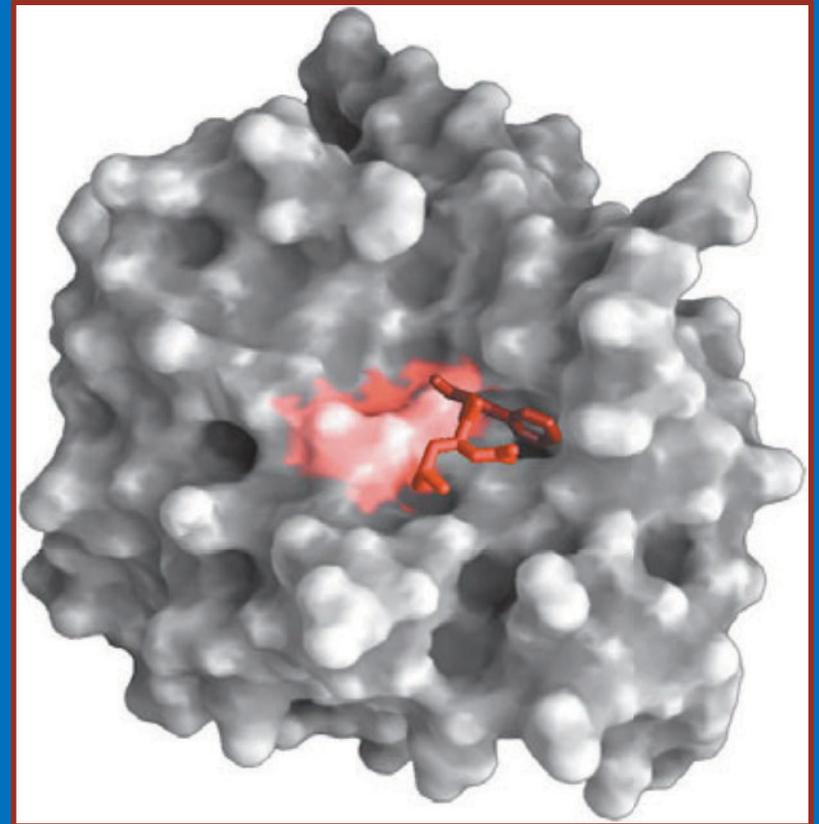
- Em 1926, James Sumner mostrou que ela era proteína. Ele propôs que as enzimas são proteínas.
- Esse conceito só foi aceito quando John Northrop e Moellor demonstraram que a pepsina e outras enzimas são proteínas.
- Nesta mesma época, Sumner publicou o tratado (*Enzymes*), que estabeleceu a distinção entre as enzimas e os catalisadores inorgânicos para catalisar as reações químicas.
- Esses princípios com



Sumner (Nobel em Química, 1946)

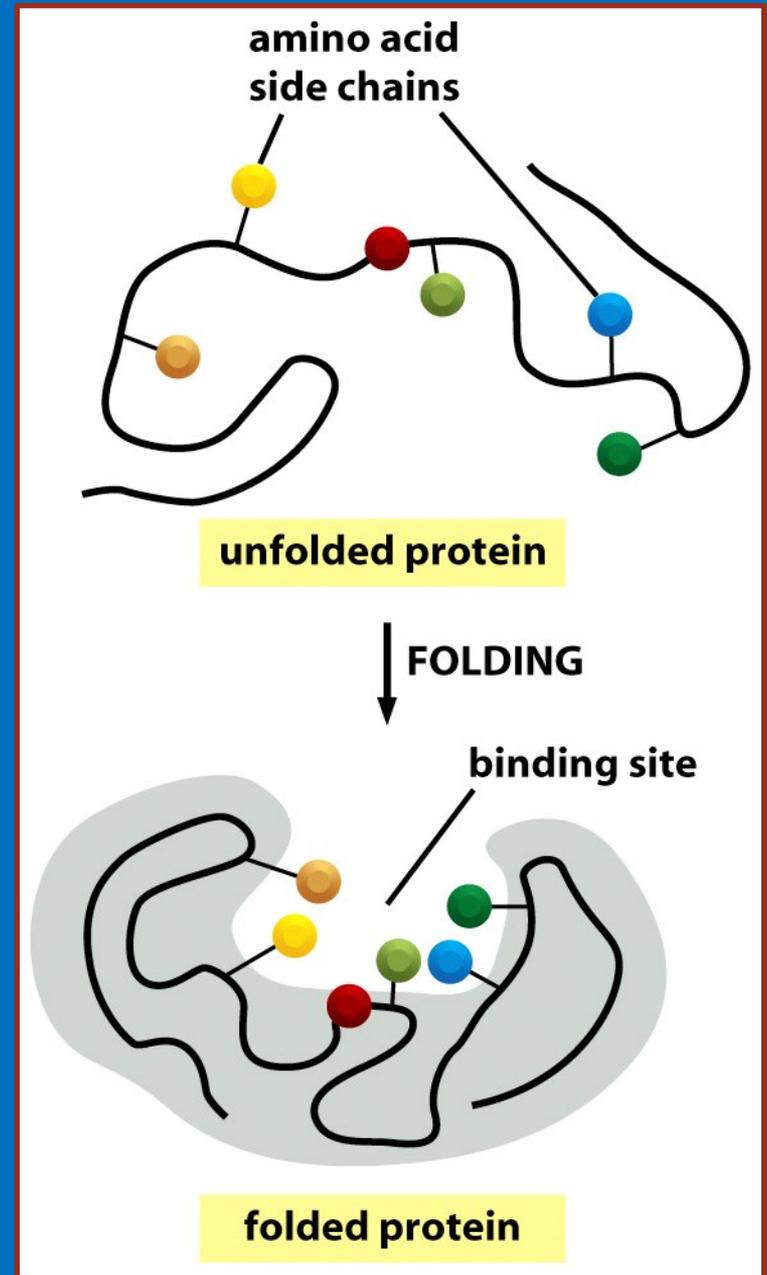
As enzimas

- Com exceção de alguns RNAs catalíticos, todas as enzimas são proteínas.
- A atividade catalítica depende da integridade e da estrutura da proteínas.
- Se uma proteína for denaturada, dissociada das suas subunidades, ou decomposta em seus aminoácidos constituintes, ela sempre perderá a atividade.
- As enzimas podem variar de peso molecular, de 12.000 a mais de 1 milhão de Da (Daltons).
- A molécula que se liga à enzima é chamada de SUBSTRATO.



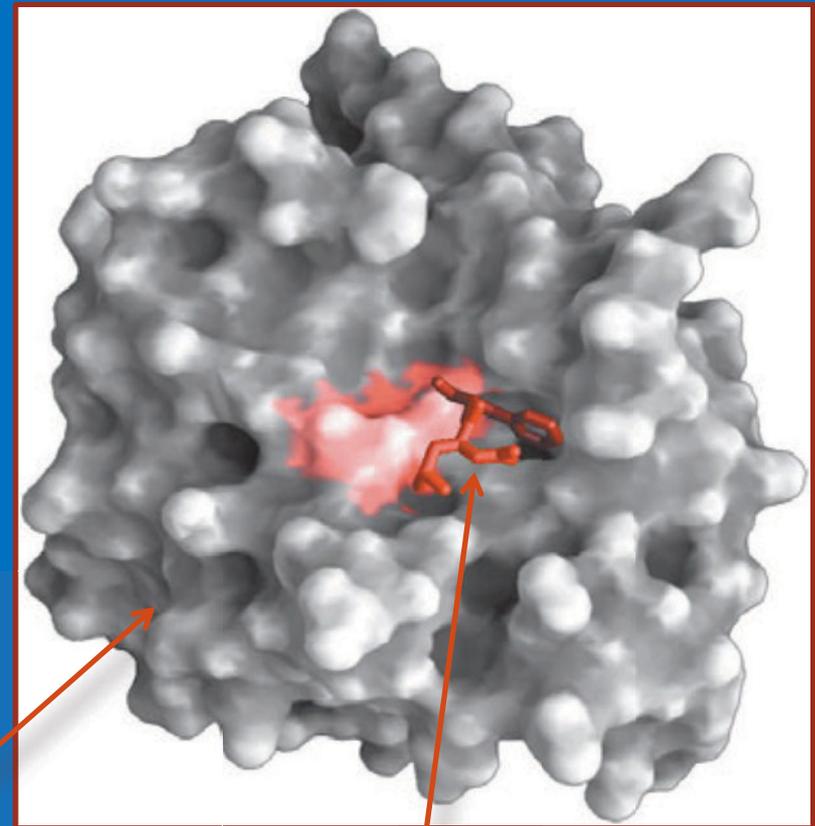
Sítio ativo de uma proteína

- Os aminoácidos que formam o sítio catalítico podem estar próximos ou distantes na sequência primária.



As enzimas

- Com exceção de alguns RNAs catalíticos, todas as enzimas são proteínas.
- A atividade catalítica depende da integridade e da estrutura da proteínas.
- Se uma proteína for denaturada, dissociada das suas subunidades, ou decomposta em seus aminoácidos constituintes, ela sempre perderá a atividade.
- As enzimas podem variar de peso molecular, de 12.000 a mais de 1 milhão de Da (Daltons).
- A molécula que se liga à enzima é chamada de SUBSTRATO.



Enzima

Substrato

As enzimas e os cofatores

- As enzimas podem conter apenas a cadeia polipeptídica, ou podem conter ainda cofatores (tais como íons inorgânicos) ou coenzimas (moléculas mais complexas).

TABLE 6-1 Some Inorganic Elements That Serve as Cofactors for Enzymes

Cu^{2+}	Cytochrome oxidase
Fe^{2+} or Fe^{3+}	Cytochrome oxidase, catalase, peroxidase
K^{+}	Pyruvate kinase
Mg^{2+}	Hexokinase, glucose 6-phosphatase, pyruvate kinase
Mn^{2+}	Arginase, ribonucleotide reductase
Mo	Dinitrogenase
Ni^{2+}	Urease
Se	Glutathione peroxidase
Zn^{2+}	Carbonic anhydrase, alcohol dehydrogenase, carboxypeptidases A and B

Muitas vitaminas são cofatores de enzimas

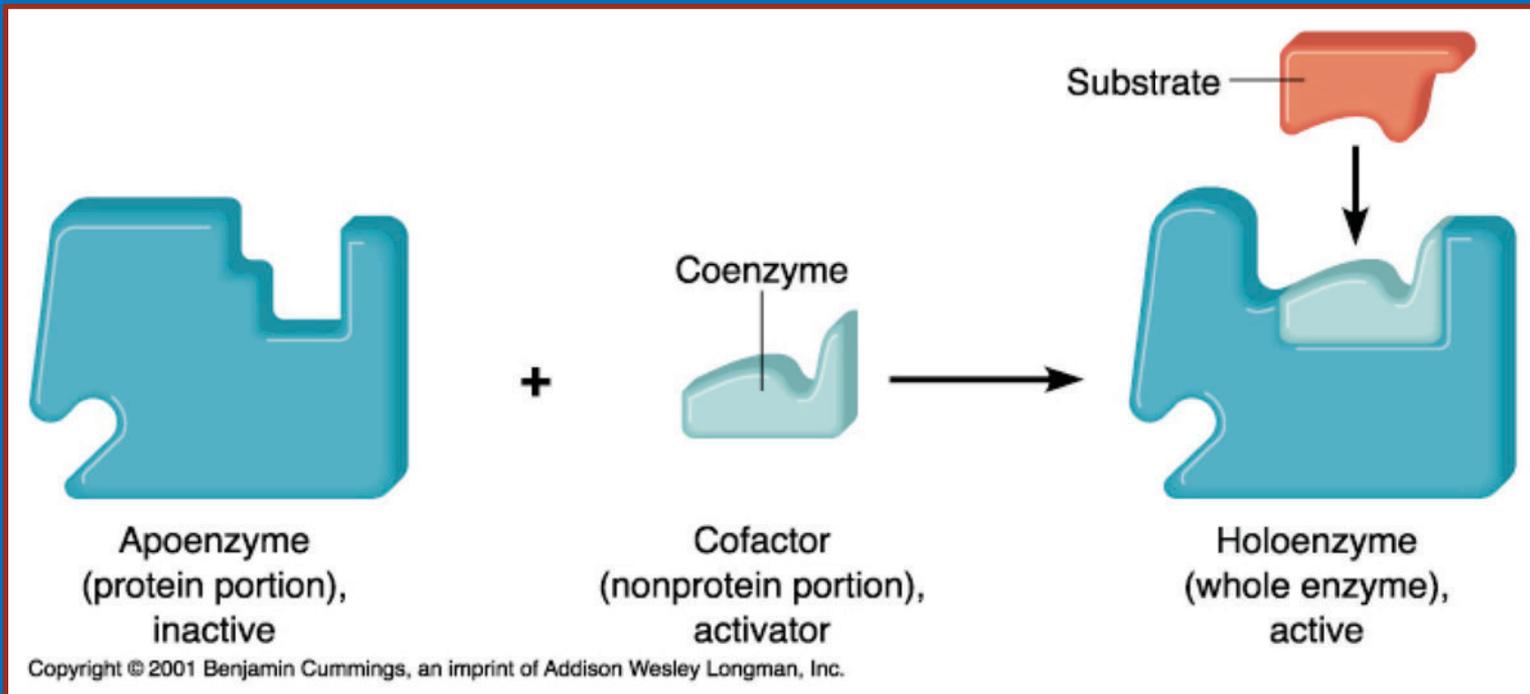
- Cofatores e coenzimas são também chamados de grupos prostéticos.
- Enzimas que contêm grupos prostéticos são também chamadas de holoenzimas (do Grego, holo = todo), enquanto que a cadeia peptídica é denominada de apoproteína (apo = afastado).

TABLE 6-2 Some Coenzymes That Serve as Transient Carriers of Specific Atoms or Functional Groups

<i>Coenzyme</i>	<i>Examples of chemical groups transferred</i>	<i>Dietary precursor in mammals</i>
Biotin	CO ₂	Biotin
Coenzyme A	Acyl groups	Pantothenic acid and other compounds
5'-Deoxyadenosylcobalamin (coenzyme B ₁₂)	H atoms and alkyl groups	Vitamin B ₁₂
Flavin adenine dinucleotide	Electrons	Riboflavin (vitamin B ₂)
Lipoate	Electrons and acyl groups	Not required in diet
Nicotinamide adenine dinucleotide	Hydride ion (:H ⁻)	Nicotinic acid (niacin)
Pyridoxal phosphate	Amino groups	Pyridoxine (vitamin B ₆)
Tetrahydrofolate	One-carbon groups	Folate
Thiamine pyrophosphate	Aldehydes	Thiamine (vitamin B ₁)

Muitas vitaminas são cofatores de enzimas

- Os cofatores participam da reação. Ou seja, sem o cofator, a reação não ocorre.
- Muitos dos cofatores não são sintetizados pelas células humanas e precisam ser adquiridos na dieta.
- Por isso, estes cofatores são conhecidos como vitaminas.



As enzimas são classificadas de acordo com a reação catalisada

- As enzimas geralmente recebem o sufixo –ase junto ao nome do substrato ou da reação que catalisam.
- Assim, urease catalisa a hidrólise da uréia.
- Outras enzimas receberam nomes associados à sua função: pepsina (do Grego, pepsis = digestão) e lisozima pela sua capacidade de lisar (romper) a parede bacteriana.
- As vezes, enzimas podem ter mais de um nome. Por isso, foi criada uma classificação em função de sua atividade. Por exemplo, a enzima ATP glicose fosfotransferase pode ser chamada de EC 2.7.1.1 (Enzyme comission number).

TABLE 6–3 International Classification of Enzymes

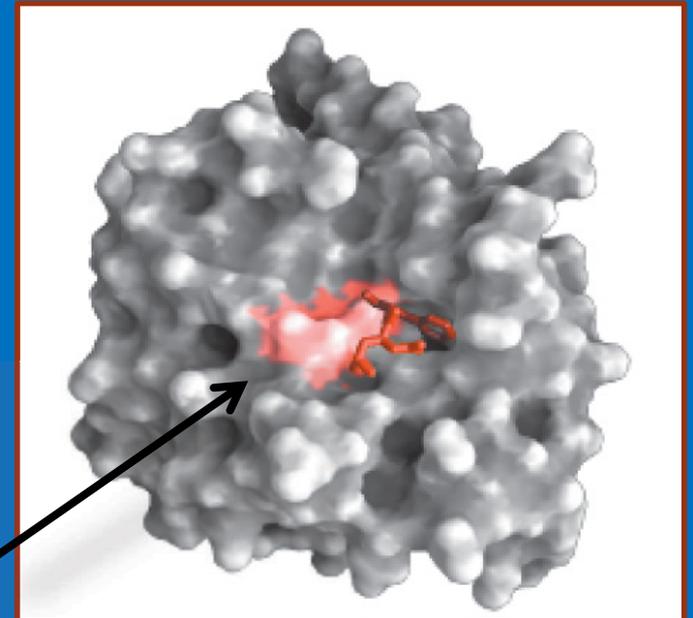
No.	Class	Type of reaction catalyzed
1	Oxidoreductases	Transfer of electrons (hydride ions or H atoms)
2	Transferases	Group transfer reactions
3	Hydrolases	Hydrolysis reactions (transfer of functional groups to water)
4	Lyases	Addition of groups to double bonds, or formation of double bonds by removal of groups
5	Isomerases	Transfer of groups within molecules to yield isomeric forms
6	Ligases	Formation of C—C, C—S, C—O, and C—N bonds by condensation reactions coupled to ATP cleavage

Como as enzimas funcionam

- As reações catalisadas pelas enzimas ocorrem no SÍTIO ATIVO da proteína.
- A molécula que se liga ao sítio ativo e sofre a reação enzimática é denominada de SUBSTRATO.
- Uma reação enzimática simples pode ser representada como :

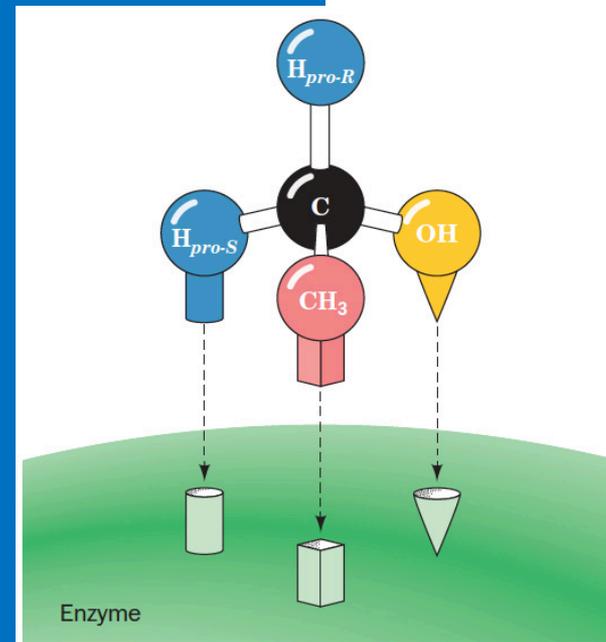
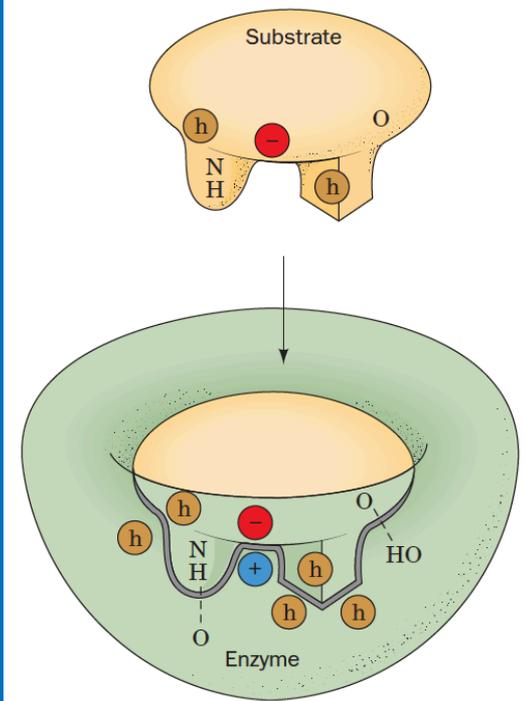


Sítio ativo

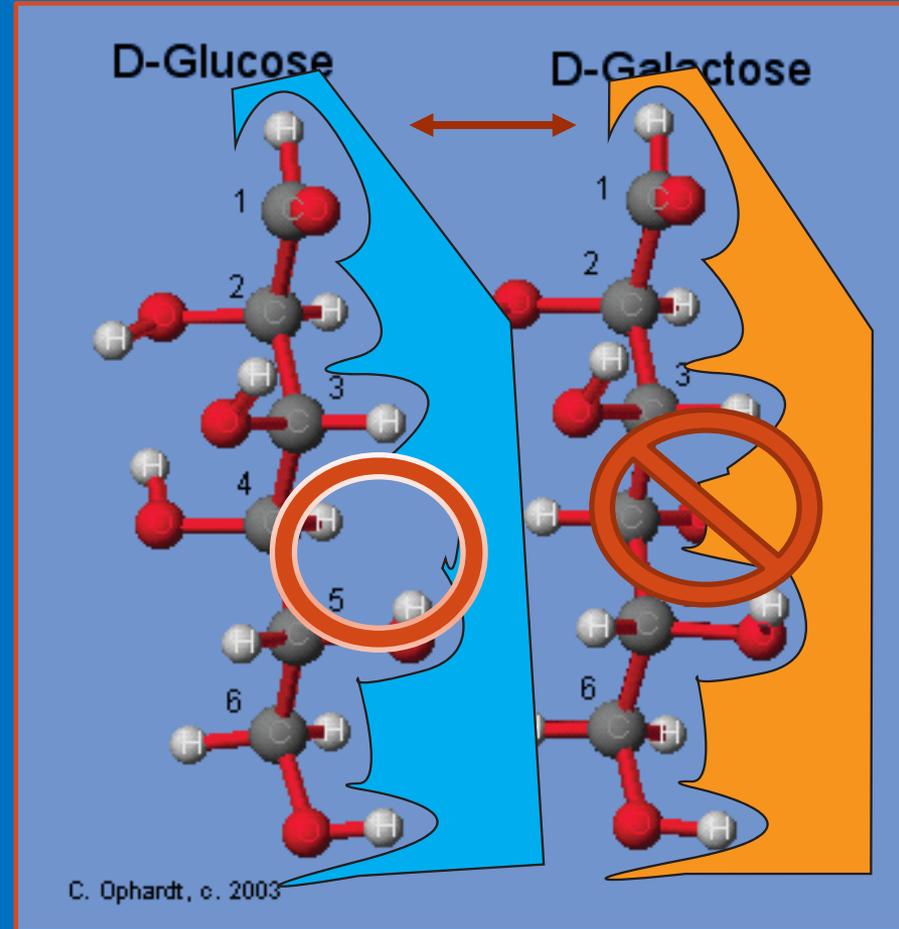
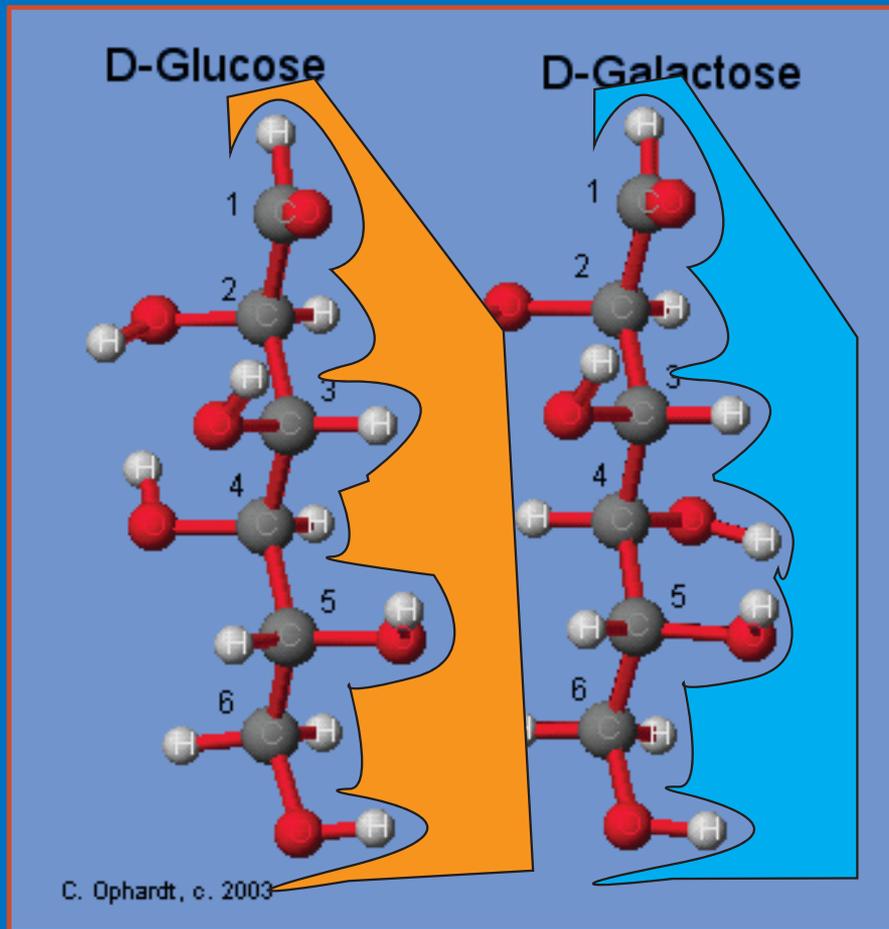


Os sítios ativos são estereoespecíficos

- O reconhecimento do substrato envolve a interação com diferentes grupos na enzima.
- Estes grupos estão organizados no espaço.
- Por isso, o reconhecimento pela enzima depende do enantiômero do substrato.
- Por exemplo, a grande maioria das enzimas é capaz de distinguir L-aminoácidos de D-aminoácidos.



Enzimas conseguem diferenciar os diferentes epimeros



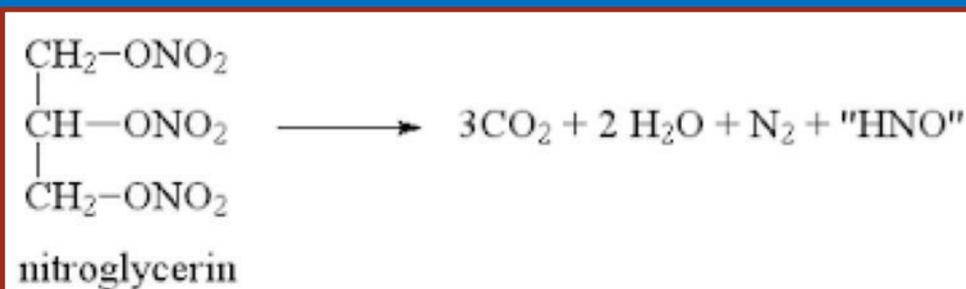
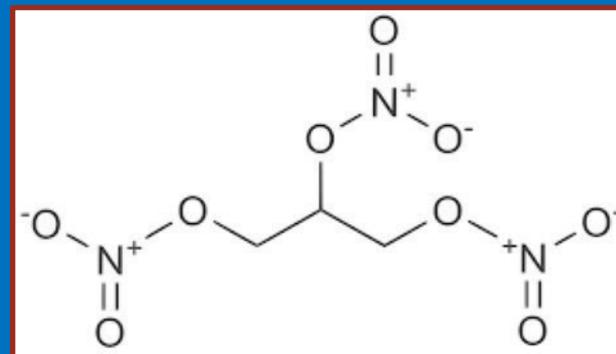
A catálise na vida

- Isto talvez surpreenda os iniciantes na bioquímica, mas tomemos um simples exemplo: o aproveitamento da energia da molécula do açúcar.
- A transformação de sacarose (açúcar comum) em CO_2 e H_2O é uma reação altamente exergônica (libera energia).
- Porém, o açúcar que compramos, pode permanecer num pacote nas prateleiras dos supermercados por anos, sem nenhuma conversão aparente.
- Apesar de termodinamicamente favorável, esta reação demora anos para acontecer.
- Nos organismos vivos, o açúcar é prontamente convertido em CO_2 e H_2O , liberando sua energia, em questão de minutos ou segundos.
- Isto se deve a presença de catalisadores biológicos, as enzimas.



A energia das ligações químicas

- Tomemos a nitroglicerina ou o TNT (dinamite) como exemplo
- São moléculas instáveis, e basta um choque mecânico ou um pouco de calor (pavio) para que ela libere a energia contida nas suas ligações
- No caso da nitroglicerina, a temperatura chega a 5.000 °C e o seu volume expande mais de 1.200 vezes
- Esta é uma reação espontânea
- Porém, a maioria das substâncias não explode e para liberar a energia contida nas suas ligações, precisamos de enzimas



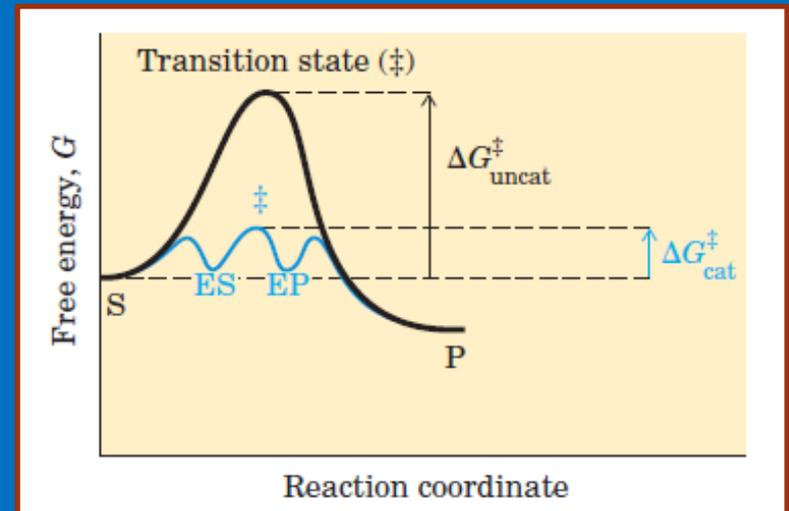
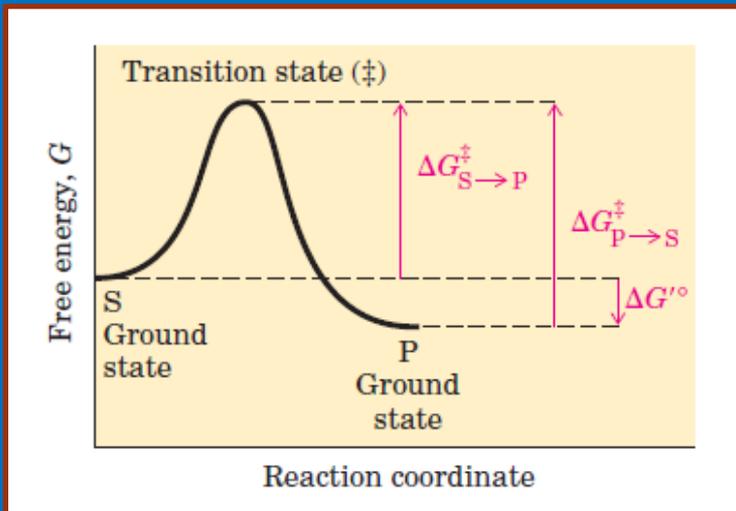
A energia das ligações químicas

- O açúcar, farinha (carboidratos) não liberam sua energia facilmente
- Mesmo colocando a farinha no forno a lenha ela não explode!
- Para converter os carboidratos em energia, precisamos vencer uma barreira energética
- Isto pode ser feito quando preparamos caramelo
- O calor converte o açúcar em CO_2 e H_2O



Energia livre de Gibbs (ΔG)

- Para entendermos as reações bioquímicas, precisamos primeiro apreciar a importância do equilíbrio químico e da energia de ativação de uma reação química.
- A energia de ativação de uma reação química é como uma barreira energética que precisa ser vencida para que uma reação ocorra.
- Se não existissem barreiras energéticas, compostos complexos reverteriam espontaneamente em moléculas mais simples e nunca existiriam (p.ex., os explosivos).
- As enzimas são capazes de diminuir esta barreira energética de forma seletiva para determinadas reação.



ΔG e ΔG°

- Numa reação, a variação da energia livre é dada pela equação:

$$G(p,T) = U + pV - T.S \quad \text{ou} \quad \Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

- Como a energia livre depende da concentração dos reagentes, temperatura e outras variáveis do sistema, utiliza-se a energia livre padrão, que é a energia livre quando a concentração dos reagentes e produtos é 1M, temperatura 25°C e pH = 0 (ΔG°).
- Isto porque, a energia contida em 1 mol de reagentes é o dobro da energia contida em 0,5 mol dos mesmos reagentes.
- Da mesma forma, a concentração altera a velocidade e o equilíbrio de uma reação, modificando a quantidade de energia liberada.

Entalpia (H)

- É a energia térmica de uma molécula.

$$H = U + PV$$

U = energia interna (J)

P = pressão (pascal)

V = volume (m³)

- Toda reação química tem uma diferença de entalpia (ΔH) que pode ser expressa como:

$$\Delta H = H_{\text{produto}} - H_{\text{reagentes}}$$

Se $\Delta H < \text{zero}$ a reação é exotérmica (libera calor)

Se $\Delta H > \text{zero}$ a reação é endotérmica (absorve calor)

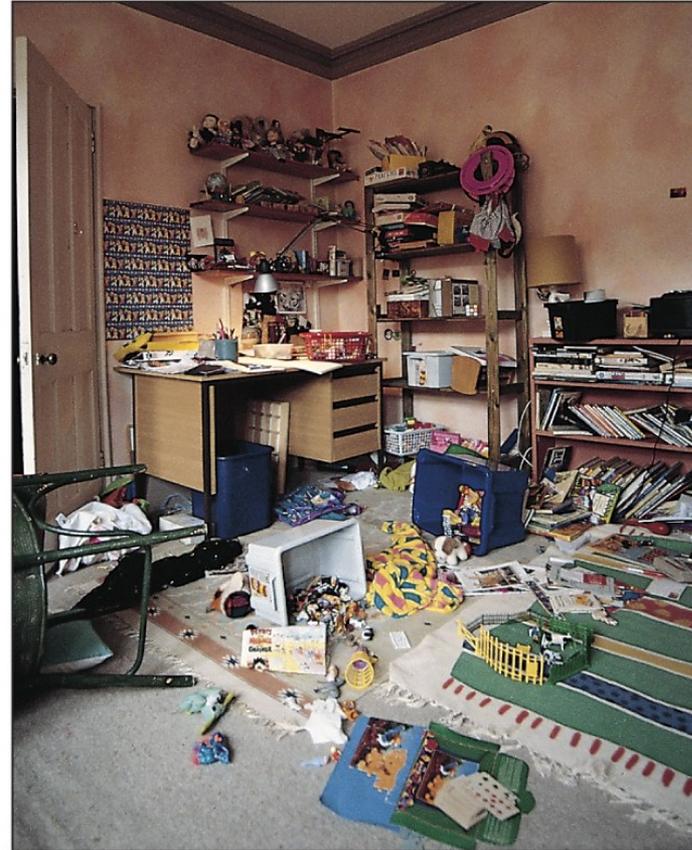
TABLE 1-1 Strengths of Bonds Common in Biomolecules

Type of bond	Bond dissociation energy* (kJ/mol)	Type of bond	Bond dissociation energy (kJ/mol)
Single bonds		Double bonds	
O—H	470	C=O	712
H—H	435	C=N	615
P—O	419	C=C	611
C—H	414	P=O	502
N—H	389	Triple bonds	
C—O	352	C≡C	816
C—C	348	N≡N	930
S—H	339		
C—N	293		
C—S	260		
N—O	222		
S—S	214		

Entropia: o que é??

"SPONTANEOUS" REACTION

as time elapses



ORGANIZED EFFORT REQUIRING ENERGY INPUT

Mas o que é ΔG° ?

- Considere a reação:



- Como a energia livre depende da concentração dos reagentes, Gibbs demonstrou que:

$$\Delta G = \Delta G^{\circ} + RT \ln [C].[D] / [A].[B]$$

R = constante dos gases

T = temperatura (K)

- No equilíbrio, $[C].[D] / [A].[B] = K_{eq}$ e $\Delta G = \text{zero}$, assim:

$$\Delta G^{\circ} = -RT \ln K_{eq}$$

- Desta forma, temos uma maneira fácil de determinar o valor de ΔG° .
- ΔG° é, portanto, uma constante que indica qual o sentido de uma reação e até que ponto esta reação irá ocorrer.

Mas o que é ΔG° ?

- Considere a reação:



- Onde o valor de $K_{eq} = 10^3$

$$\Delta G^{\circ} = -RT \ln K_{eq} = - (0,082) \times 298 \text{ K} \ln (10^3) = -112 \text{ kJ/mol}$$

- Desta forma, temos uma maneira fácil de determinar o valor de ΔG° .
- ΔG° é, portanto, uma constante que indica qual o sentido de uma reação e até que ponto esta reação irá ocorrer
- Isto indica também, a direção da reação depende da concentração dos reagentes

Mas o que é ΔG° ?

- Considere a reação:



- Onde o valor de $K_{eq} = 10^2$

$$\Delta G^{\circ} = -RT \ln K_{eq} = -(0,082) \times 298 \text{ K} \ln (10^2) = -112 \text{ kJ/mol}$$

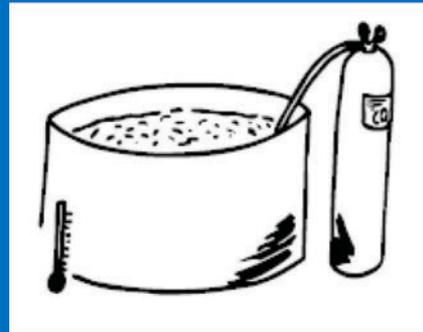
- Por exemplo, se a concentração inicial de A é zero ($[A] = 0$), então a reação irá, inicialmente, ocorrer no sentido oposto



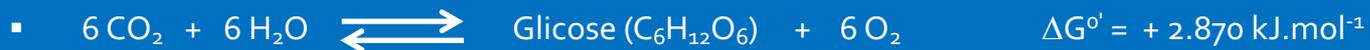
- Isto até o equilíbrio ser atingido

ΔG , ΔG° e $\Delta G^{\circ'}$

- Assim, para reações biológicas, as medidas são efetuadas em $\text{pH} = 7$ (ao invés de $\text{pH} = 0$), e por isso, denominamos a energia livre padrão' $\Delta G^{\circ'}$.

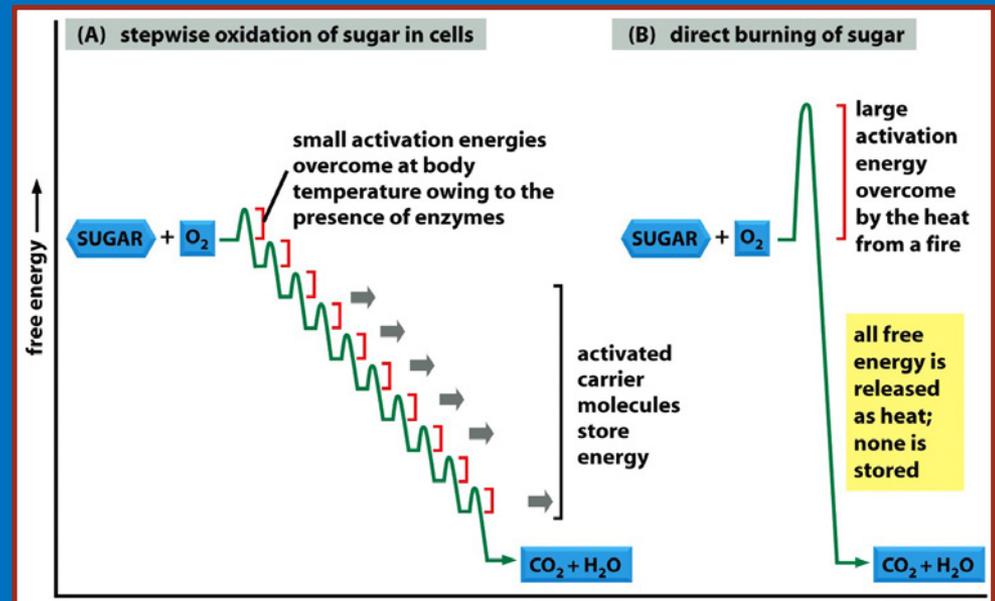
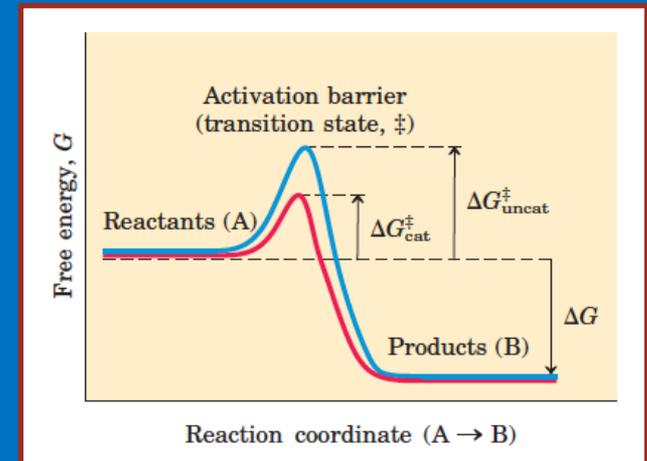


- O sinal do $\Delta G^{\circ'}$ indica em que sentido a reação ocorre.



Energia de ativação

- O valor de ΔG° não diz com que velocidade uma reação irá ocorrer.
- Por isso, enzimas são importantes, diminuindo a barreira energética para que uma reação ocorra.
- Organismos vivos utilizam várias reações individuais, em etapas, para se chegar ao resultado final.
- Por exemplo, para se oxidar a glicose diretamente a CO_2 e H_2O , é preciso vencer a alta energia de ativação.
- Ou, utilizando-se várias reações individuais, cada uma com energia de ativação baixa, podemos obter o mesmo resultado.



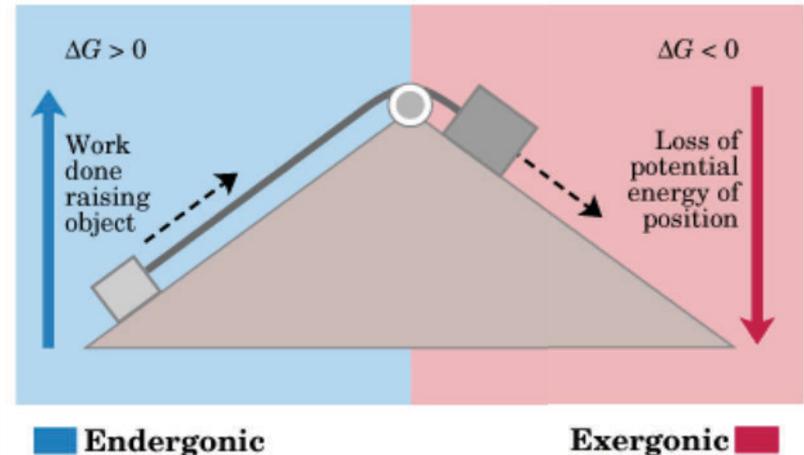
ΔG de reações acopladas

- Porém, como os organismos podem sintetizar glicose se o ΔG é maior que zero?
- Tomemos a seguinte reação da etapa inicial da via glicolítica:

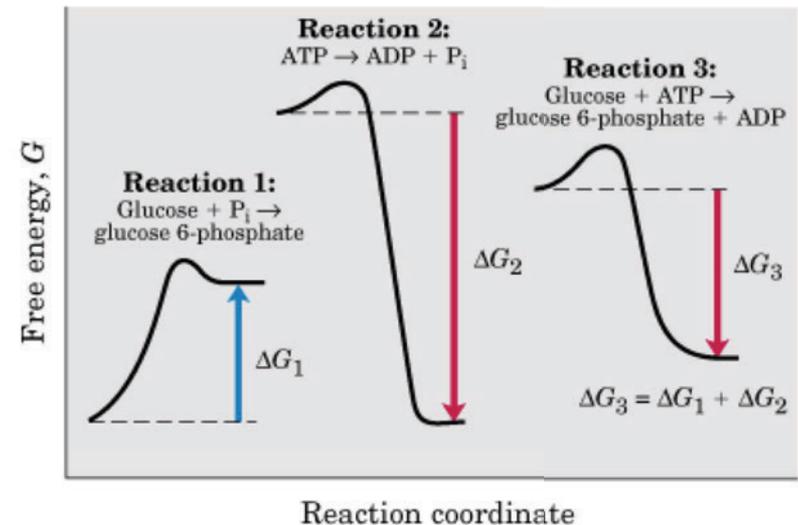


- Acoplando-se a hidrólise da molécula de ATP ($\text{ATP} \rightleftharpoons \text{ADP} + \text{P}_i$) à reação acima, temos um $\Delta G^{\circ} < \text{zero}$.

(a) Mechanical example

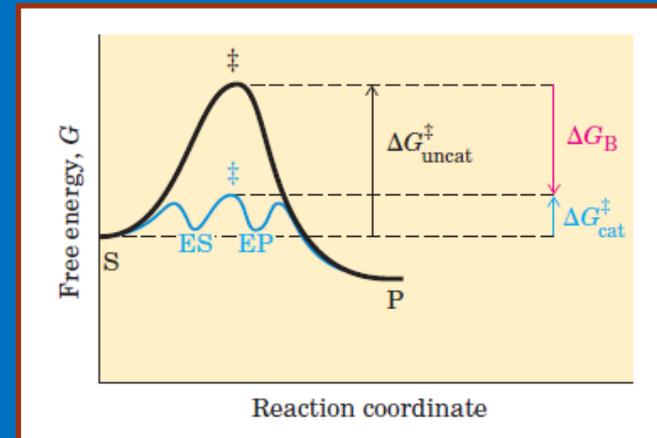


(b) Chemical example



Enzima e os estados de transição

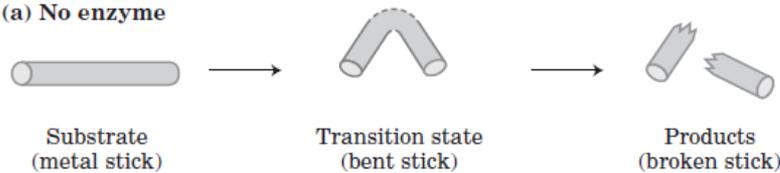
- A energia de formação de uma única ligação fraca (hidrogênio, Van de Waals) é de 4 a 30 kJ/mol. Quando um substrato liga-se a uma enzima, várias ligações são formadas.
- Isto é importante para compensar a diminuição da entropia e da desolvatação do substrato.
- A ligação do substrato à enzima é ainda uma das principais fontes de energia livre utilizada para baixar o ΔG de uma reação.
- Esta energia é chamada de ΔG_B .
- A ligação do substrato à enzima dá a enzima a especificidade necessária para distinguir entre as diferentes moléculas biológicas de uma célula.
- Por exemplo, se o substrato tem uma hidroxila que forma uma ligação de hidrogênio com um ácido glutâmico no sítio ativo, qualquer molécula que não tenha esta hidroxila terá uma energia de ligação mais baixa com a enzima e será um substrato ruim.



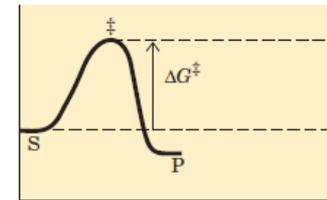
Enzima e os estados de transição

- Enzimas mimetizam estados de transição de uma reação.
- Intermediários de uma reação são moléculas formadas durante o processo que tenham um tempo de vida superior ao tempo de vibração de uma ligação química (10^{-13} s)

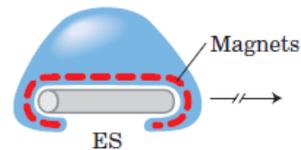
(a) No enzyme



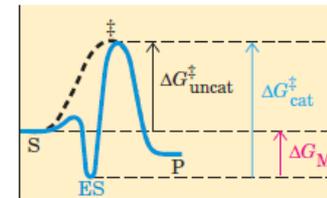
Free energy, G



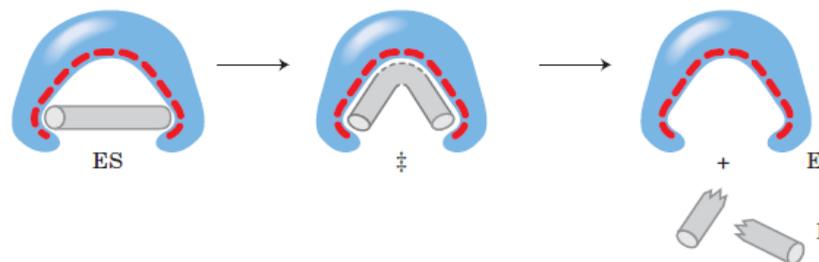
(b) Enzyme complementary to substrate



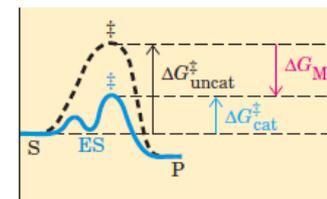
Free energy, G



(c) Enzyme complementary to transition state



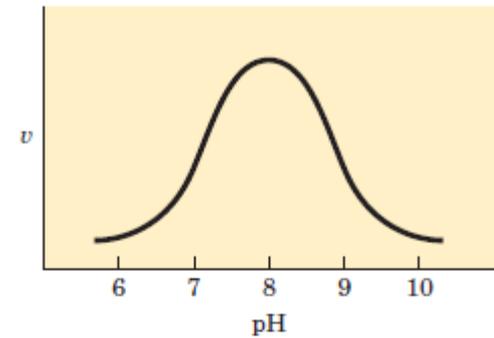
Free energy, G



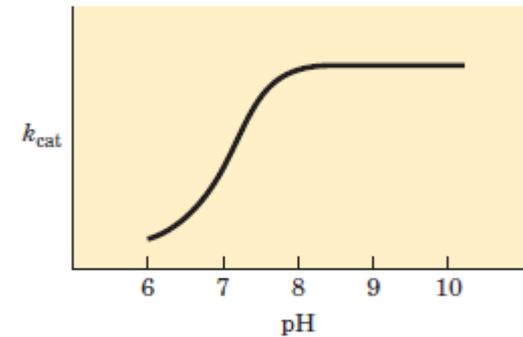
pH

- O pH tem um efeito muito importante sobre as enzimas.
- Tomemos como exemplo, a quimiotripsina, que acabamos de analisar.
- Mudanças de pH abaixo de 7-8, alteram a carga da His⁵⁷, impedindo que o primeiro ataque nucleofílico (Ser¹⁹⁵) ocorra.
- Já pH acima de 8 a 9, altera a carga da Ile16 (amino-terminal da cadeia A), alterando a conformação, e destruindo o sítio de ligação do substrato.
- Portanto, mudanças de pH podem alterar de diversas formas a atividade enzimática.
- De uma forma geral, enzimas têm um pH ótimo numa faixa relativamente estreita, e próximas do pH do meio onde são encontradas.

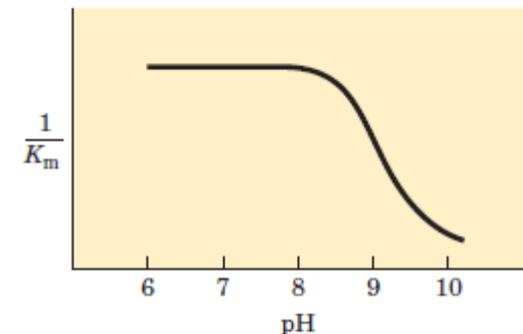
(a)



(b)

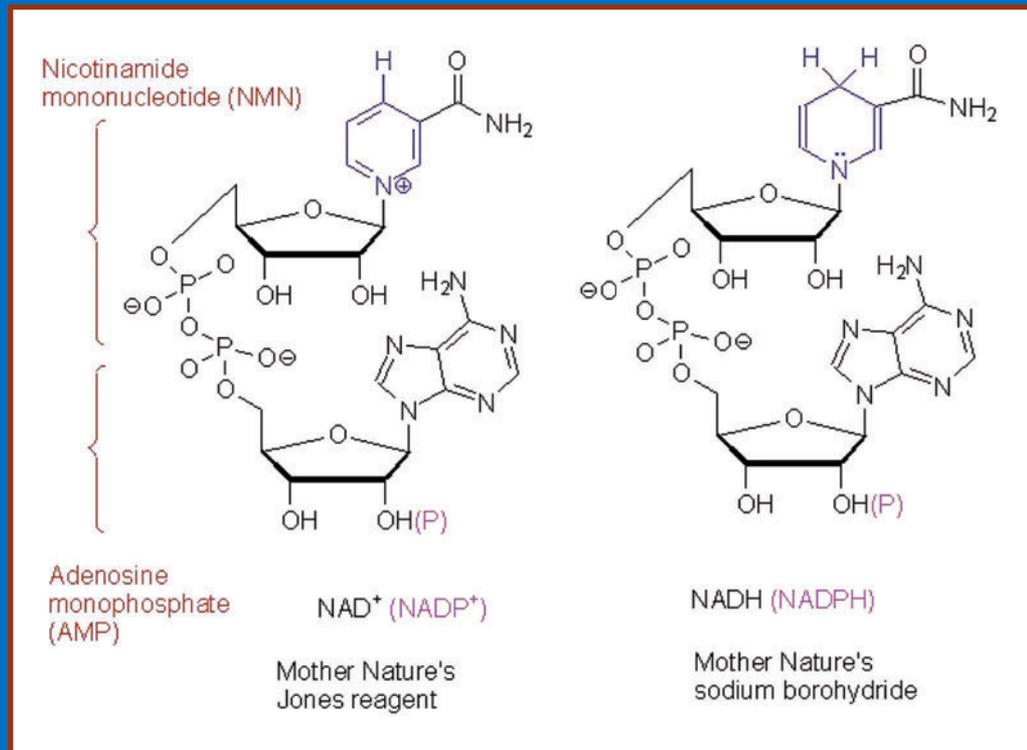


(c)



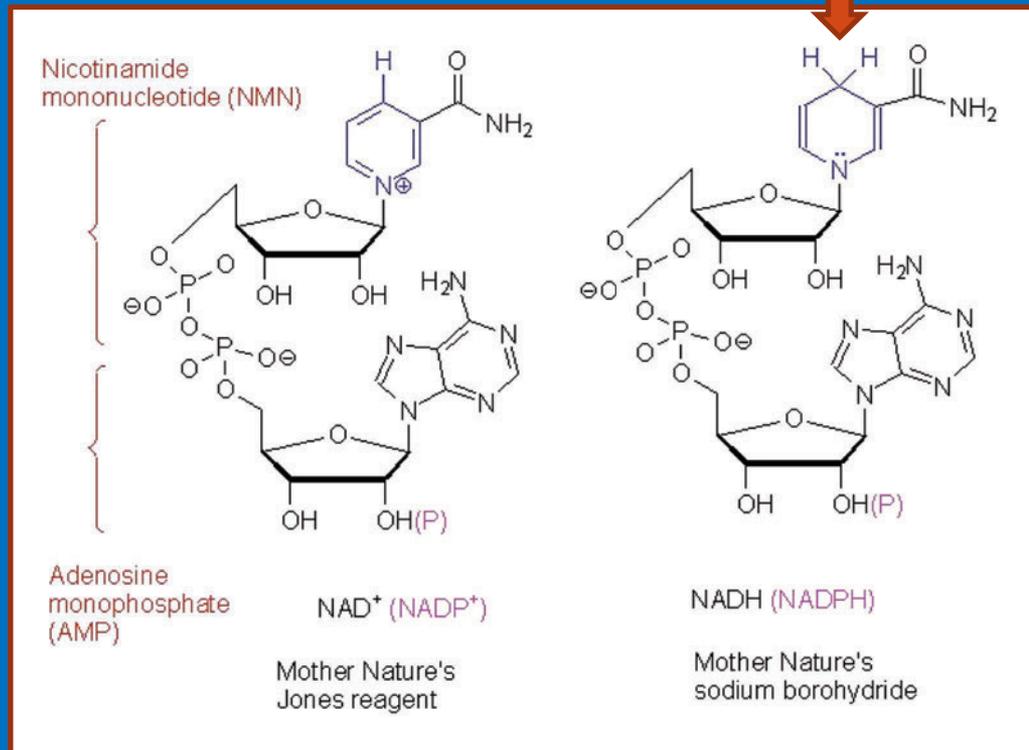
Coenzimas são importantes para diversas reações

- Muitas enzimas utilizam co-fatores (íons metálicos ou divalentes, Ca e Mg) para a catálise.
- Outras enzimas utilizam co-fatores, moléculas que participam das reações como aceptoras ou doadoras de prótons, grupos metila, etc.
- Por exemplo, a nicotinamida mononucleotídeo (NAD) e a nicotinamida mononucleotídeo fosfato (NADPH) são co-fatores aceptores (ou doadores) de prótons, essenciais para diversas enzimas



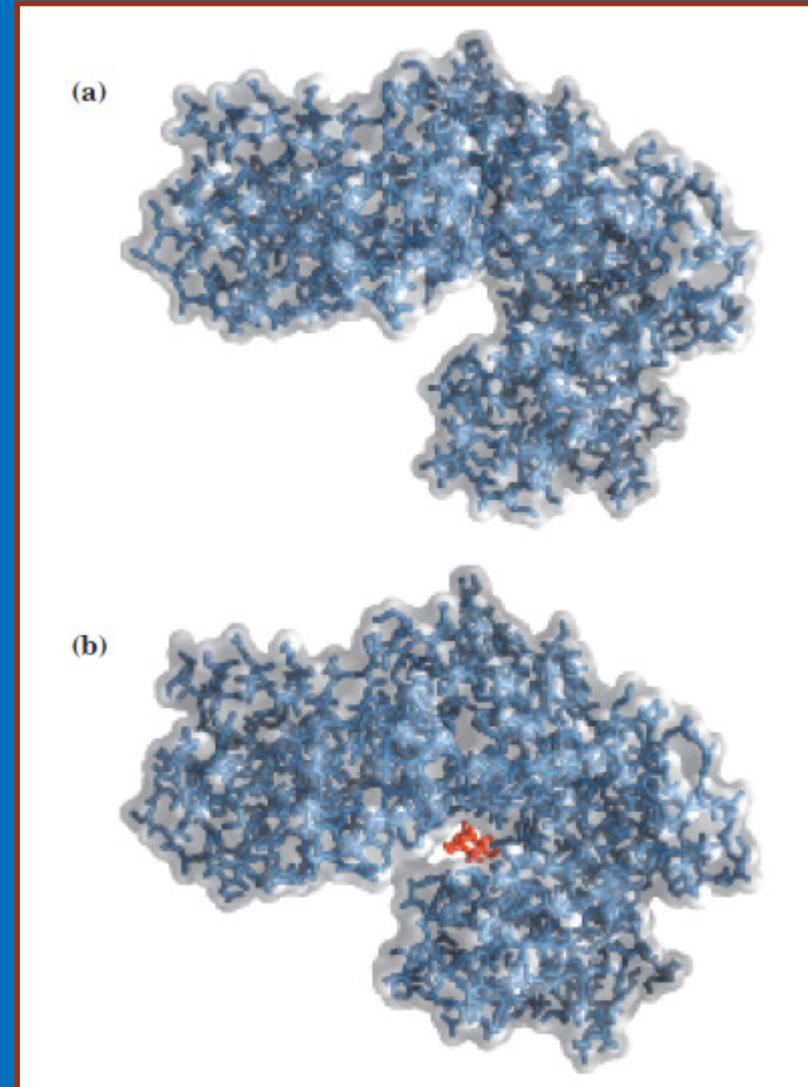
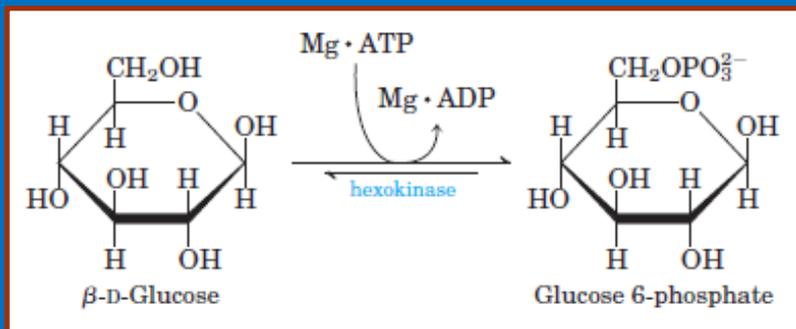
Coenzimas são importantes para diversas reações

- Muitas enzimas utilizam co-fatores (íons metálicos ou divalentes, Ca e Mg) para a catálise.
- Outras enzimas utilizam co-fatores, moléculas que participam das reações como aceptoras ou doadoras de prótons, grupos metila, etc.
- Por exemplo, a nicotinamida mononucleotídeo (NAD) e a nicotinamida mononucleotídeo fosfato (NADPH) são co-fatores aceptores (ou doadores) de prótons, essenciais para diversas enzimas



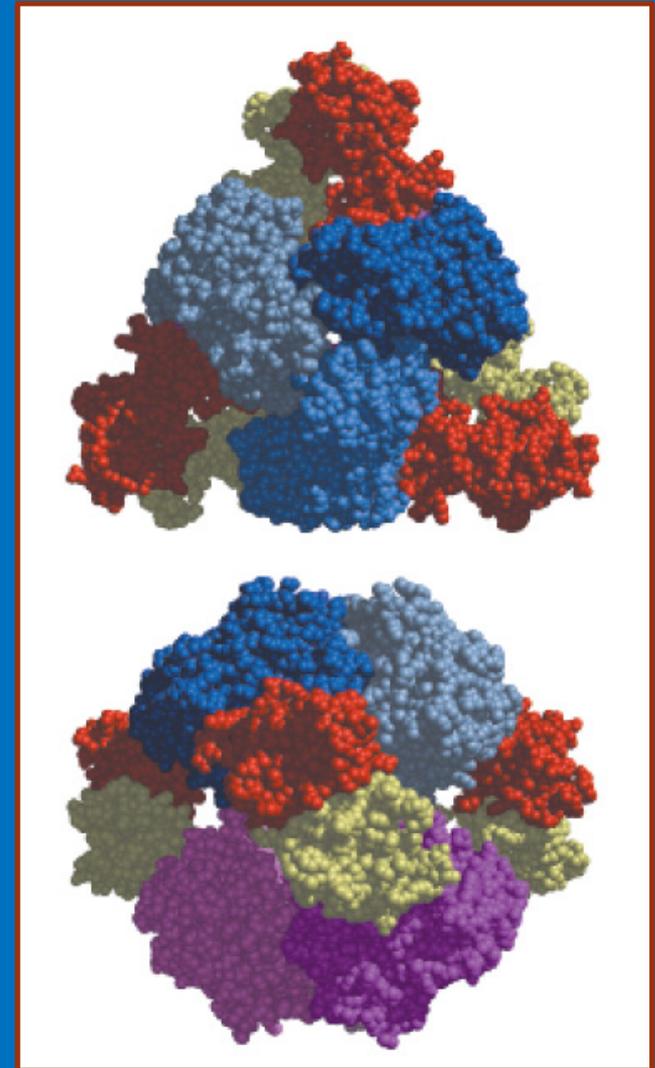
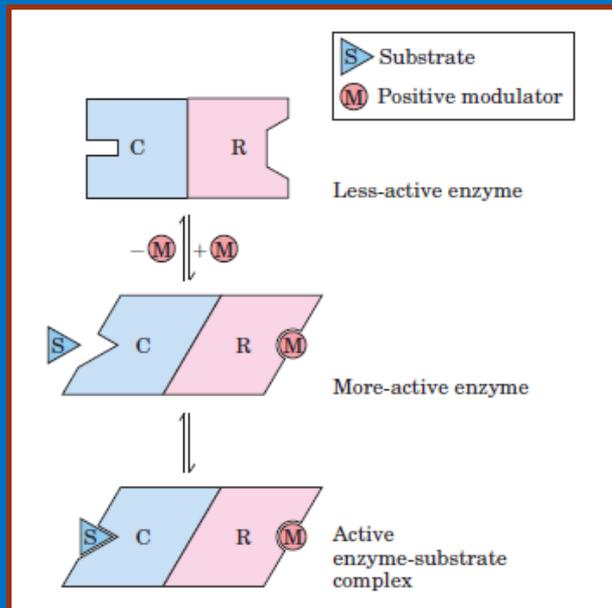
Ativação por mudança de conformação: a hexoquinase

- A via de degradação da glicose (via glicolítica) se inicia com conversão de glicose em glicose-6-fosfato.
- Esta reação é catalisada pela enzima hexoquinase, e utiliza a adenosina trifosfato (ATP) como cofator e doador de um grupo fosfato.
- Quando glicose (mas não H₂O) liga-se à enzima hexoquinase (a), há uma mudança de conformação que ativa a enzima, aproximando os grupos reativos.
- Isto faz com que o fosfato seja transferido para a molécula de glicose.



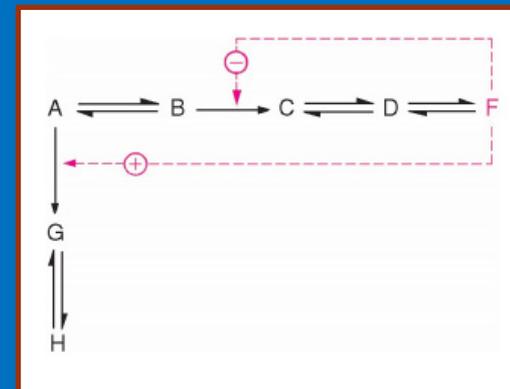
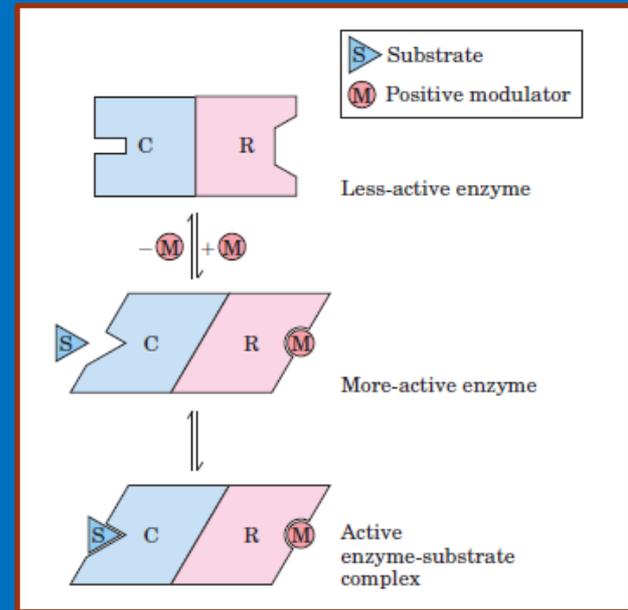
Enzimas alostéricas

- Muitas enzimas podem ser reguladas.
- Este é um importante mecanismo metabólico.
- A ligação de uma molécula “ativadora” ou “inibidora” pode aumentar ou inibir a atividade de uma enzima.
- Isto pode ocorrer por um efeito cooperativo entre as diferentes subunidades de uma proteína (unidade regulatória).



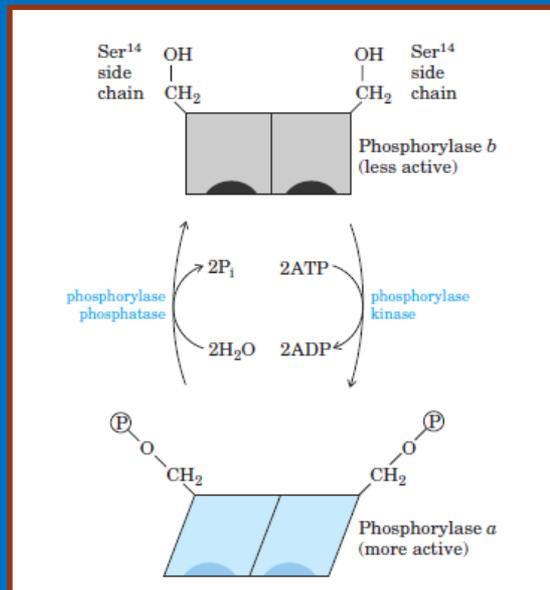
Enzimas alostéricas

- Por exemplo, a conversão do aminoácido treonina em isoleucina pode ser feito através de uma série de reações enzimáticas.
- Para impedir que toda a treonina da célula seja convertida em isoleucina, a primeira enzima da cadeia de reações é controlada alostericamente pela concentração de isoleucina.
- Se não houver isoleucina, a reação pode ocorrer.
- Quando a concentração de isoleucina aumentar, a enzima é inibida alostericamente, interrompendo a cadeia.



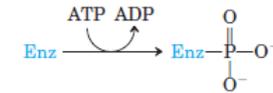
Regulação por modificação covalente

- As enzimas podem ser reguladas por modificações covalentes.
- Uma modificação muito importante é a fosforilação.
- Enzimas podem ser ativadas ou inibidas se fosforiladas em resíduos de serina, treonina ou tirosina específicos.
- Outras modificações (tabela ao lado) também podem modular a atividade de enzimas.

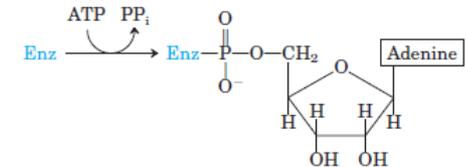


Covalent modification (target residues)

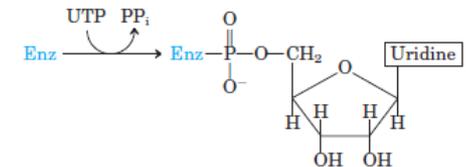
Phosphorylation (Tyr, Ser, Thr, His)



Adenylylation (Tyr)

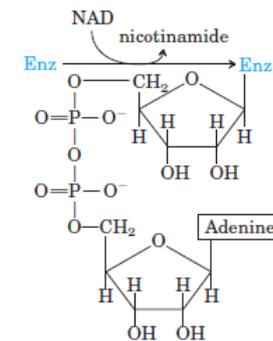


Uridylylation (Tyr)

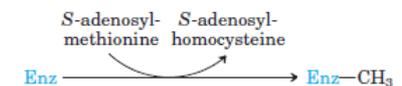


ADP-ribosylation

(Arg, Gln, Cys, diphthamide—a modified His)



Methylation (Glu)



Bibliografia

- Leiam o capítulo 6 (Enzimas) do Lehninger – Princípios de Bioquímica

Ou

- Capítulo 4 (sentido das reações) e 5 (Enzimas) do livro Bioquímica Básica (Marzzoco e Torres).