

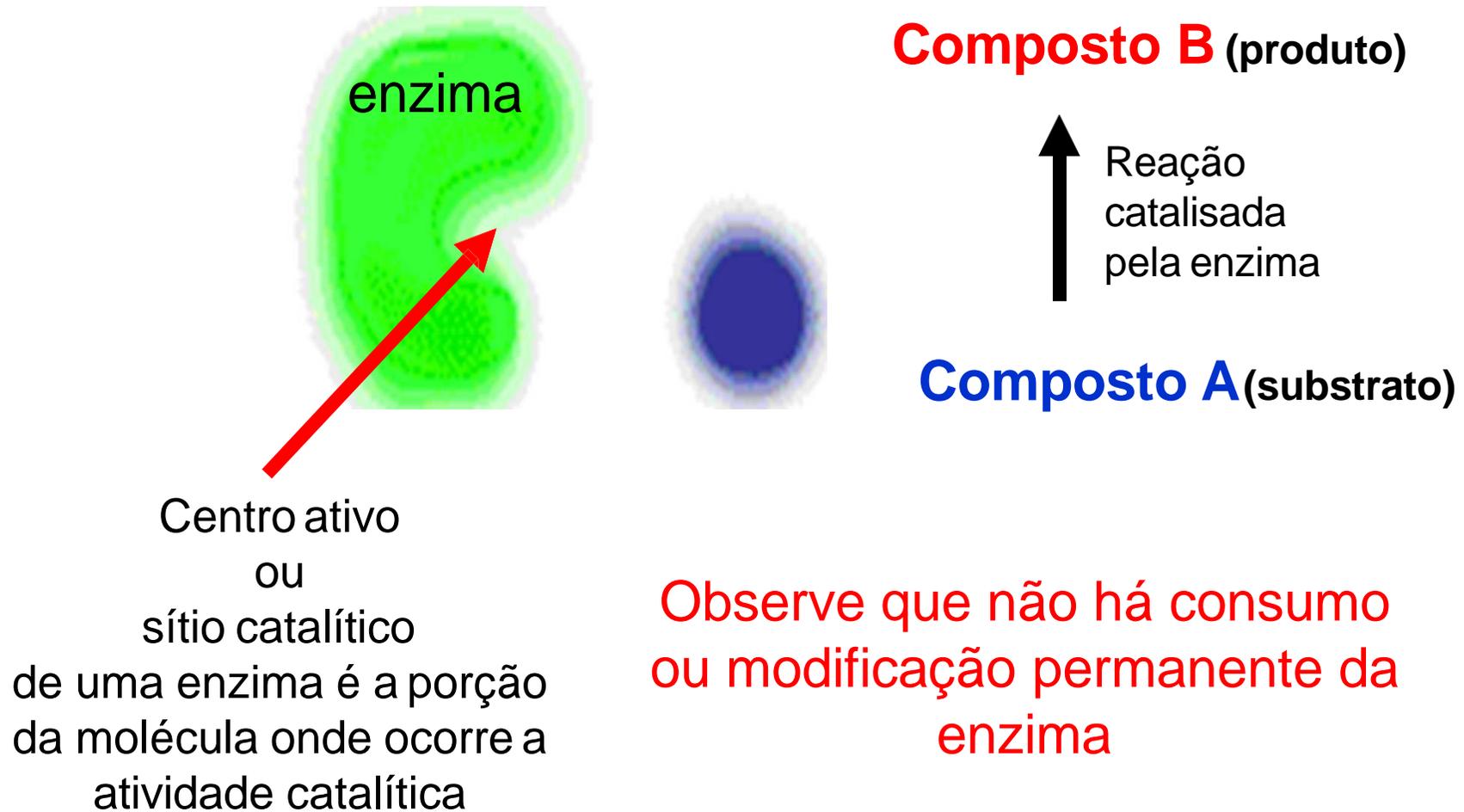
# **Catalise enzimática**

**Prof. Henning Ulrich**

## Enzimas: como atuam ?

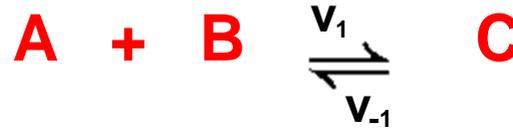
- catalisadores
- classificação
- especificidade e mecanismos de ação
- regulação enzimática
- inibidores e aplicações

**Enzimas** são proteínas que agem como catalizadores biológicos:



## Teoria da catálise

Considere as reações:



No **equilíbrio** da reação, as velocidades das reações se igualam:  $v_1 = v_{-1}$



- concentrações de todos os reagentes não se alteram mais
- pode se dizer que a reação *terminou*

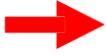
Catalisador **acelera** as velocidades de **ambos os lados da reação**



- o ponto do equilíbrio é atingido mais rápido
- o ponto do **equilíbrio não se altera**, ou seja [reagentes] e de [produtos] no “final” da reação” são as mesmas da reação não catalisada



- termodinâmica da reação não se altera

Catalisador **não** é consumido na reação  pode atuar em [ ] baixas

# Equilíbrio químico

- As enzimas realizam, muitas vezes, as reações nos dois sentidos  $E + S \rightleftharpoons ES \rightleftharpoons EP \rightleftharpoons E + P$
- A concentração de substratos e produtos é o que define a velocidade das reações  $K_{eq} = \frac{[P]}{[S]}$
- Poder catalítico das enzimas vem da **energia livre liberada** na formação de ligações fracas quando da interação enzima-substrato
  - Interações fracas entre ES são otimizadas no estado de transição

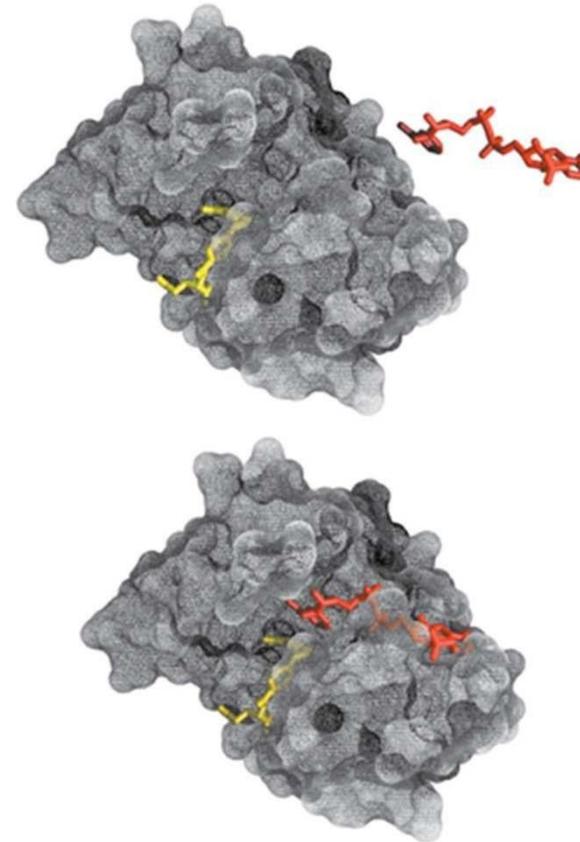


FIGURA 6-4 Complementaridade de formas entre o substrato e o seu sítio de ligação na enzima.

## Enzimas são catalisadores biológicos:

Equação geral  
de uma reação  
enzimática



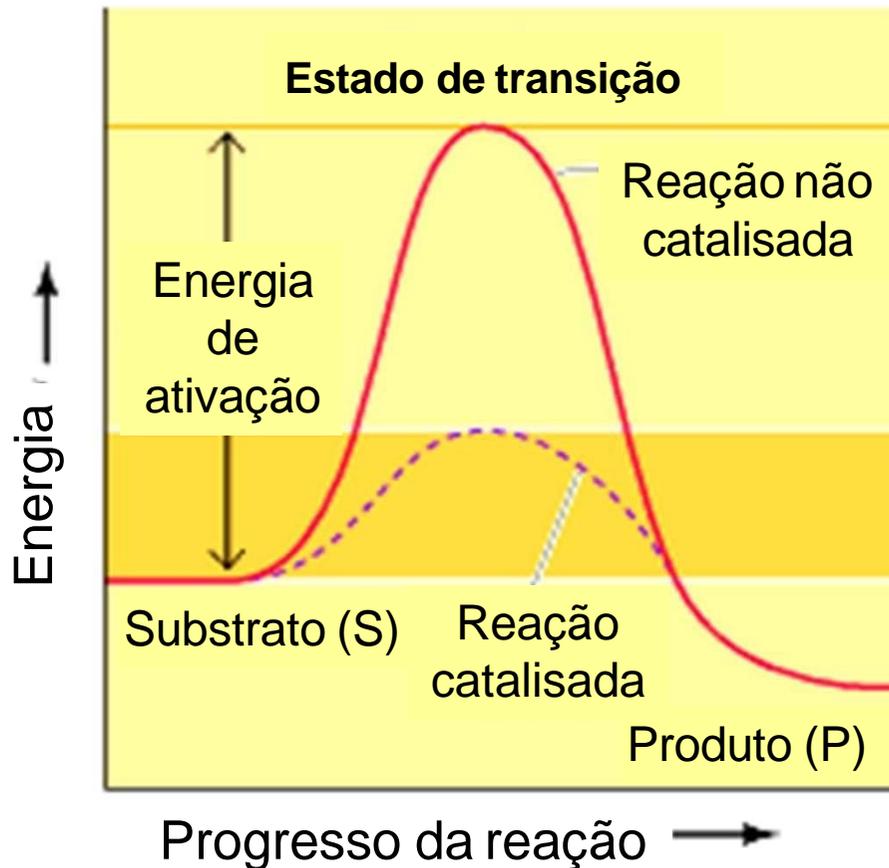
representa o  
estado de  
transição

### Que diferenças existem entre catalisadores inorgânicos, como íons metálicos, e as enzimas ?

- enzimas são **mais eficientes**: podem acelerar reações até  $10^{14}$  vezes contra  $10^2 - 10^3$  vezes dos catalisadores inorgânicos;
- enzimas **são específicas**: catalisam reações envolvendo às vezes apenas um único tipo de reagente;
- enzimas são **estereo-específicas** e não produzem sub-produtos reacionais;
- enzimas operam em **condições amenas** de temperatura, pressão e pH;
- enzimas podem ser **altamente reguladas** através de fatores extrínsecos à reação, tanto por ativadores como por inibidores.

# Teoria da catálise

O gráfico mostra a variação de energia ao longo de uma reação.



**Energia de ativação ou barreira energética:**

↪ quantidade de energia que é preciso fornecer aos reagentes para a reação ocorrer

**Estado de transição ou complexo ativado:**

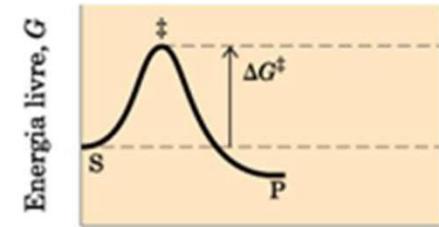
↪ forma molecular intermediária entre o reagente e o produto, existe somente no alto da barreira energética.

É altamente instável.

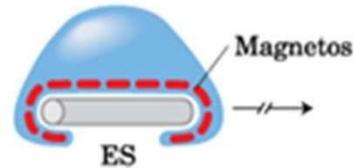
Um **Catalisador diminui a barreira energética** criando percursos alternativos da reação para formação do estado de transição.

# Bastonase

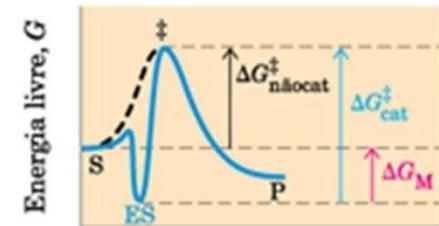
- Pauling (1946): Enzima deve ser complementar ao **Estado de transição (ET)**, não ao substrato
- ET não é forma estável
- Interações fracas entre a enzima e o substrato propulsionam a catálise enzimática
- Necessidade de múltiplas interações fracas explica pq alguns prots são tão grandes



(b) Enzima complementar ao substrato



Estabiliza  
o  
substrato



(c) Enzima complementar ao estado de transição

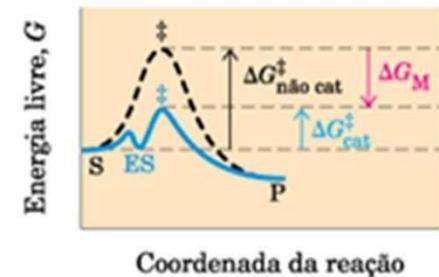
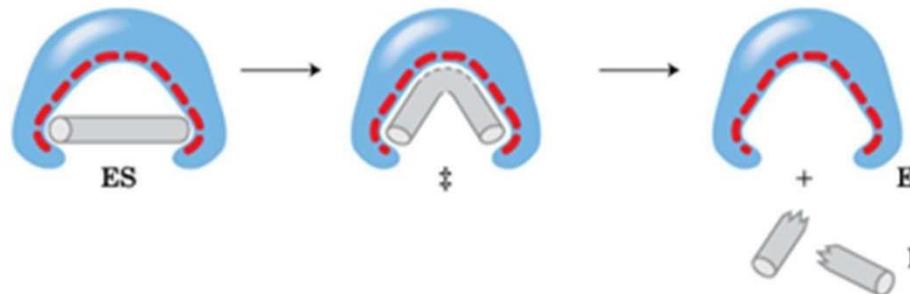


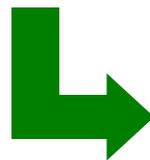
FIGURA 6-5 Uma enzima imaginária (bastonase) que catalisa a quebra de um bastão metálico.

## Enzimas aceleram reações várias ordens de grandeza

Compare esses números !

Enzima	Velocidade na ausência de enzima "Reações/segundo"	Velocidade da reação catalisada "Reações/segundo"	Poder catalítico
Anidrase carbônica	$1.3 \times 10^{-1}$	$1.0 \times 10^6$	$7.7 \times 10^6$
Triosefosfato isomerase	$4.3 \times 10^{-6}$	4.300	$1.0 \times 10^9$
Carboxipeptidase A	$3.0 \times 10^{-9}$	578	$1.9 \times 10^{11}$
AMP nucleosidase	$1.0 \times 10^{-11}$	60	$6.0 \times 10^{12}$
Nuclease de estafilococos	$1.7 \times 10^{-13}$	95	$5.6 \times 10^{14}$

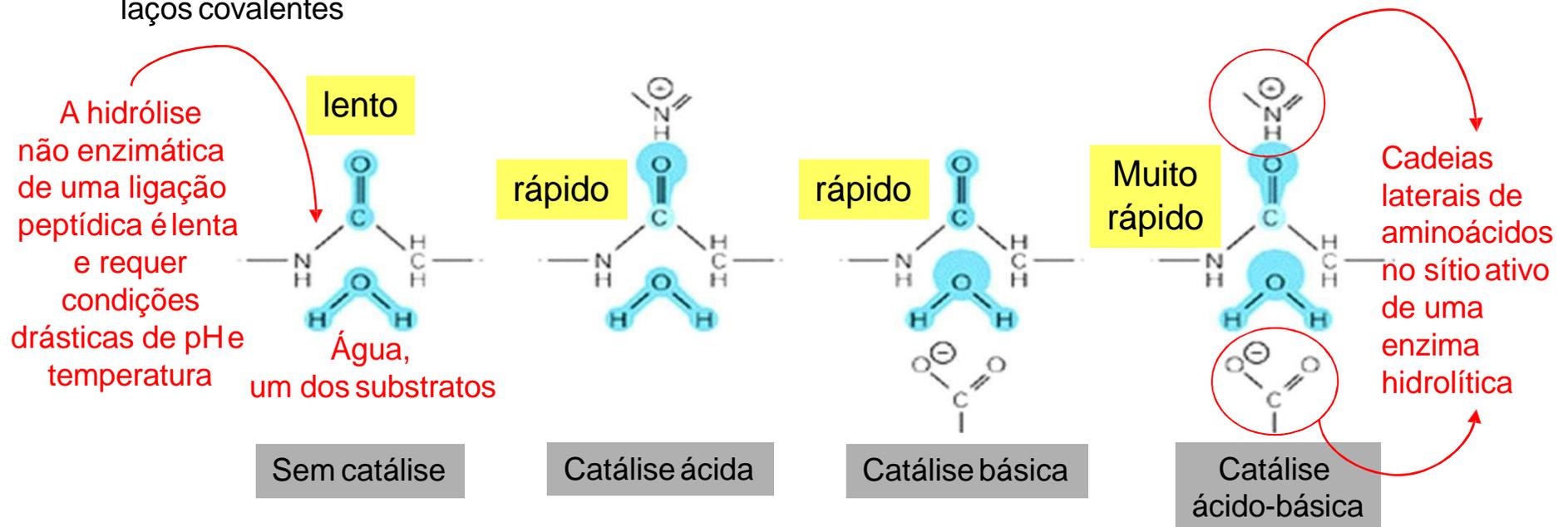
Número de "turnover" ou de renovação: quantas vezes a enzima completa o ciclo da reação em um segundo



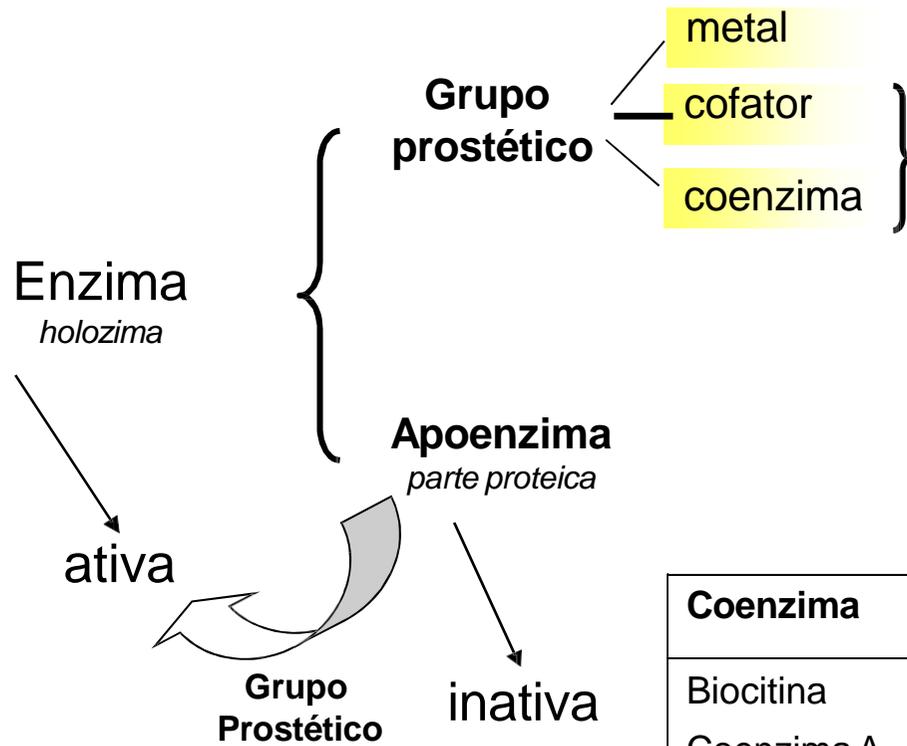
$$\text{Número de turnover} = \frac{\text{moles de S catalisado por segundo}}{\text{moles de enzima}}$$

# Por que a catálise por enzimas é mais eficiente ?

- 1) **Aumento da concentração dos reagentes na superfície da enzima:** “atração” dos reagentes para interação com a enzima).
- 2) **Orientação correta dos reagentes (substratos):** parte da energia de ativação representa o posicionamento adequado dos reagentes para que haja contacto entre os átomos corretos. O sitio ativo da enzima favorece o posicionamento correto dos reagentes.
- 3) **Aumento da reatividade dos reagentes:** as cadeias laterais (R) dos aminoácidos da enzima ou cofatores e coenzimas podem interagir diretamente com os substratos, dando-lhes carga elétrica ou polarizando-os, tornando-os quimicamente mais reativos, ou ainda cedendo ou transferindo certas funções químicas.
- 4) **Indução de deformação física no substrato,** por contacto com as cadeias laterais (R) dos aminoácidos das enzimas, que desestabilizam a molécula do substrato e facilitam o rompimento de laços covalentes



Algumas proteínas, enzimas em especial, contêm em sua molécula uma porção não proteica, que é essencial para atividade biológica.



Distinção entre cofator e coenzima depende da força de ligação com a apoproteína. Ex: o NAD<sup>+</sup> pode ser cofator de uma enzima (ligação fraca) e ser coenzima de outra (ligação forte). O mesmo ocorre com os metais.

**Coenzimas participam do ciclo catalítico das enzimas recebendo ou fornecendo grupos químicos para a reação**

Coenzima	Reação com	Vitamina
Biocitina	CO <sub>2</sub>	Biotina
Coenzima A	Grupos acil	Ác. Pantotênico
Coenzima B12	H e grupos alquil	Vitamina B12
FAD, FMN	óxido-redução	Riboflavina
NAD, NADP	óxido-redução	Niacina
Fosfato de piridoxal	Grupos aminos	Piridoxina
Pirofosfato Tiamina	Grupos aldeídos	Tiamina
Tetrahydrofolato	unidades C	Ácido fólico

# Classificação das Enzimas:

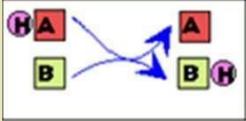
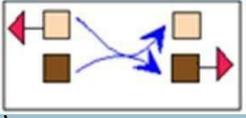
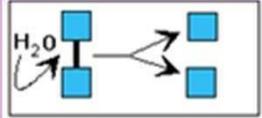
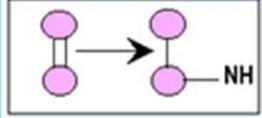
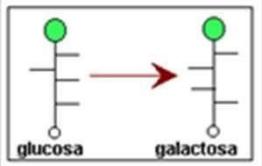
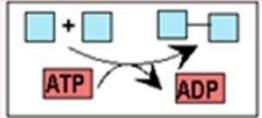


considera tipo de reação e substratos

Nomenclatura oficial das enzimas é dada pela *Enzyme Commission* da International Union for Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) :

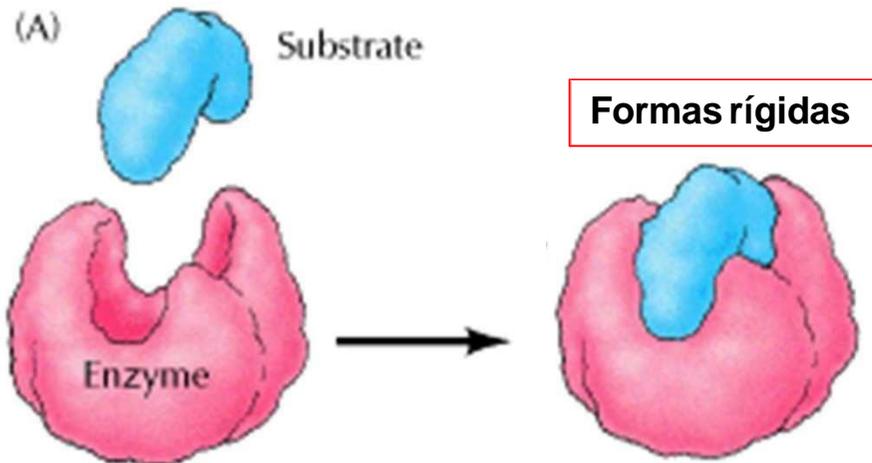
ATPase (Adenosinatrifosfatase): EC 3.6.1.3  
 - é uma hidrolase 3  
 - atua num anidrido 3.6  
 - o anidrido contém fosfato 3.6.1  
 - esse anidrido é ATP 3.6.1.3

Números identificam o tipo de reação e o tipo de substrato alvo

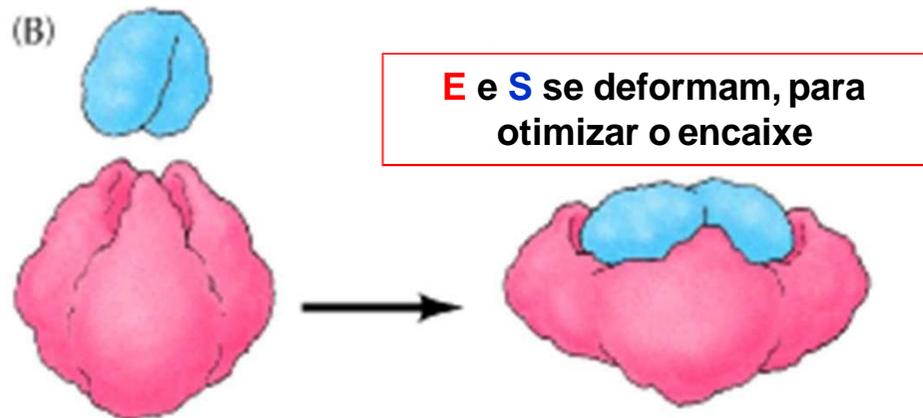
<p>1. <b>Óxido-redutases</b> ( Reações de óxido-redução).</p>	<p>Transferência de elétrons Se uma molécula se reduz, há outra que se oxida.</p> 
<p>2. <b>Transferases</b> (Transferência de grupos funcionais)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• grupos aldeído</li> <li>• grupos acila</li> <li>• grupos glucosil</li> <li>• grupos fosfatos (quinases)</li> </ul> 
<p>3. <b>Hidrolases</b> (Reações de hidrólise)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Transformam polímeros em monômeros.</li> <li>Atuam sobre:                             <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ligações éster</li> <li>• Ligações glicosídicas</li> <li>• Ligações peptídicas</li> <li>• Ligações C-N</li> </ul> </li> </ul> 
<p>4. <b>Liases</b> (Adição a ligações duplas)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Entre C e C</li> <li>• Entre C e O</li> <li>• Entre C e N</li> </ul> 
<p>5. <b>Isomerases</b> (Reações de isomerização)</p>	
<p>6. <b>Ligases</b> (Formação de laços covalentes com gasto de ATP)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Entre C e O</li> <li>• Entre C e S</li> <li>• Entre C e N</li> <li>• Entre C e C</li> </ul> 

## Enzimas são específicas para o reconhecimento de seus substratos.

Modelo Chave-Fechadura



Modelo Chave-Fechadura



Emil Fisher, na década de 1950, propôs o **modelo chave-fechadura** para explicar o reconhecimento (especificidade) do substrato pela enzima. Nesse modelo, o sítio ativo da enzima é pre-formado e tem a forma complementar à molécula do Substrato, de modo que outras moléculas não teriam acesso a ela.

No entanto, o modelo chave-fechadura não explica a interação das enzimas com inibidores e análogos dos substratos.

Na década de 1970, Daniel Kosland propôs o **modelo de encaixe induzido**, no qual o contacto com a molécula do substrato induz mudanças conformacionais na enzima, que otimizam as interações com os resíduos do sítio ativo. Esse é o modelo aceito hoje em dia.

# Grupos catalíticos

- **Catálise geral ácido-base**
  - Transferência de prótons
- **Catálise covalente**
  - Formação de lig. covalente transitória entre E e S
    - Ativação do substrato
- **Catálise por íons metálicos**
  - Estabilizam estados de transição
  - 1/3 das enzimas conhecidas usam íons metálicos nas reações catalíticas
- Enzimas muitas vezes usam as três estratégias de catálise em conjunto -- quimiotripsina

Resíduo de aminoácido	Forma geral ácida (doador de próton)	Forma geral básica (aceptor de próton)
Glu, Asp	$R-COOH$	$R-COO^-$
Lys, Arg	$R-\overset{+}{N}H_2$	$R-\ddot{N}H_2$
Cys	$R-SH$	$R-S^-$
His	$R-C(=NH^+)N$	$R-C(=N)N:$
Ser	$R-OH$	$R-O^-$
Tyr	$R-C_6H_4-OH$	$R-C_6H_4-O^-$

FIGURA 6-9 Aminoácidos na catálise geral ácido-básica.

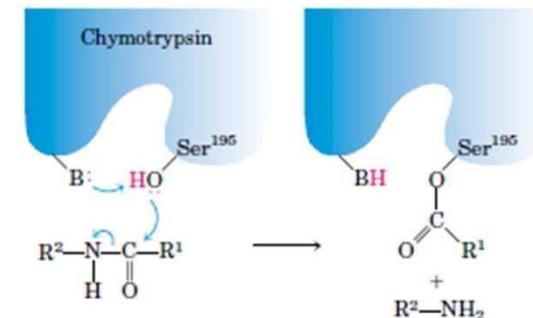
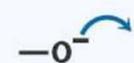
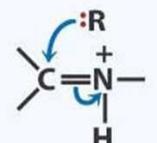
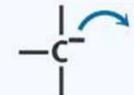
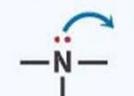
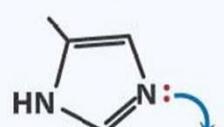
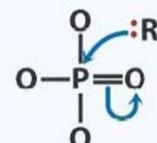
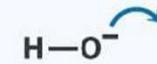
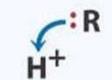
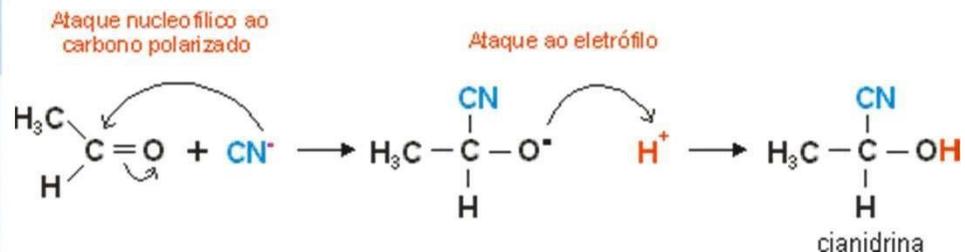


figure 8-10

**Covalent and general acid-base catalysis.** The first step in the reaction catalyzed by chymotrypsin is the acylation step. The hydroxyl group of Ser<sup>195</sup> is the nucleophile in a reaction aided by general base catalysis (the base is the side chain of His<sup>57</sup>). This provides a new pathway for the hydrolytic cleavage of a peptide bond. Catalysis occurs only if each step in the new pathway is faster than the uncatalyzed reaction. The chymotrypsin reaction is described in more detail in Figure 8-19.

# Ataques nucleofílicos e eletrofílicos

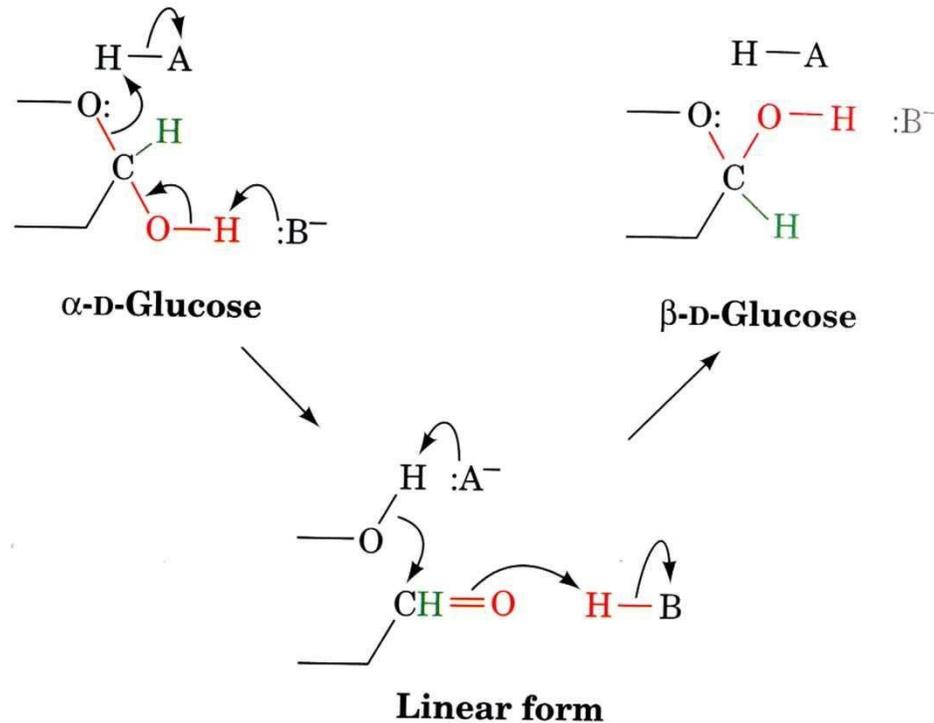
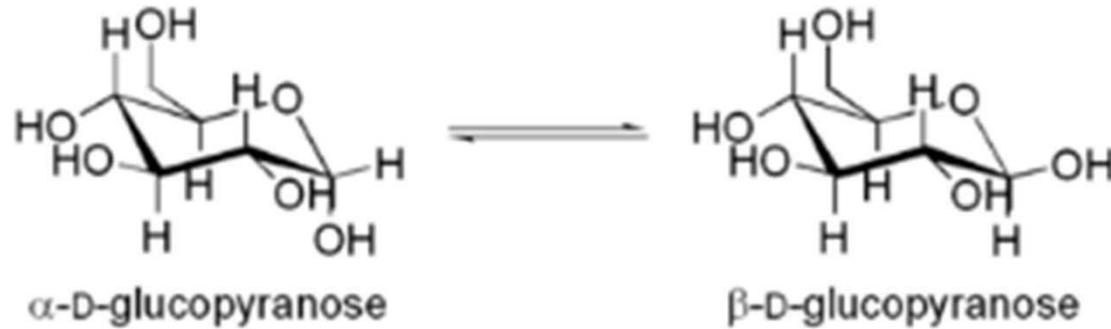
Nucleophiles	Electrophiles
 <p>Negatively charged oxygen (as in an unprotonated hydroxyl group or an ionized carboxylic acid)</p>	 <p>Carbon atom of a carbonyl group (the more electronegative oxygen of the carbonyl group pulls electrons away from the carbon)</p>
 <p>Negatively charged sulfhydryl</p>	 <p>Pronated imine group (activated for nucleophilic attack at the carbon by protonation of the imine)</p>
 <p>Carbanion</p>	 <p>Uncharged amine group</p>
 <p>Imidazole</p>	 <p>Phosphorus of a phosphate group</p>
 <p>Hydroxide ion</p>	 <p>Proton</p>



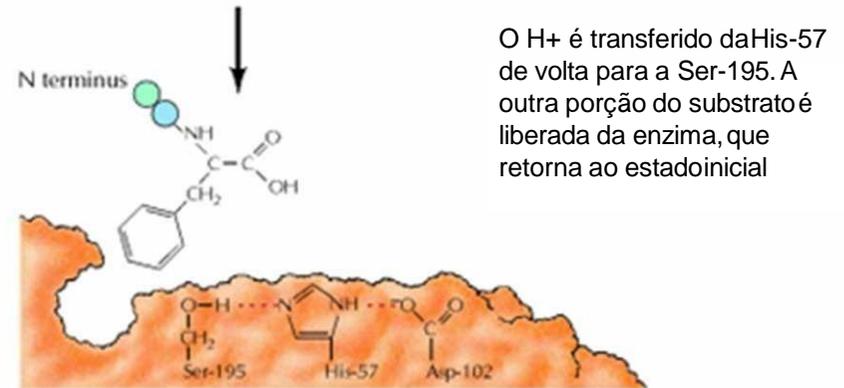
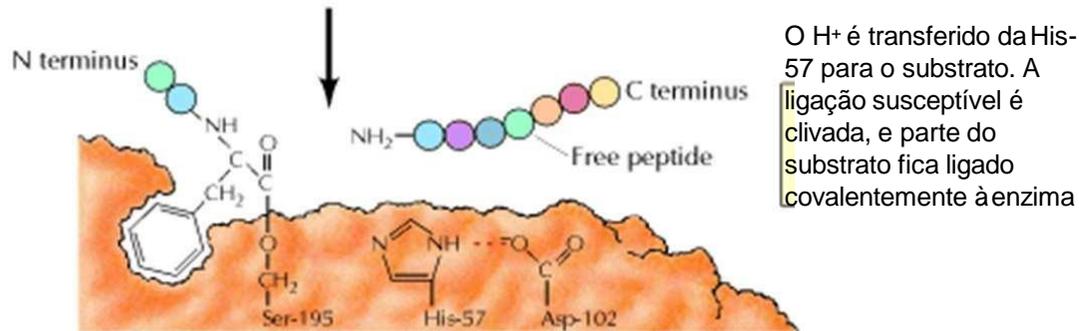
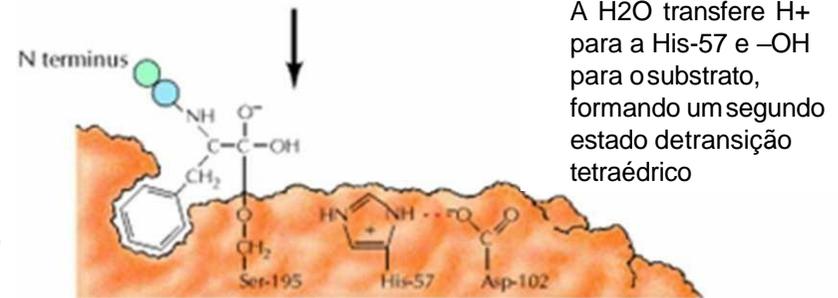
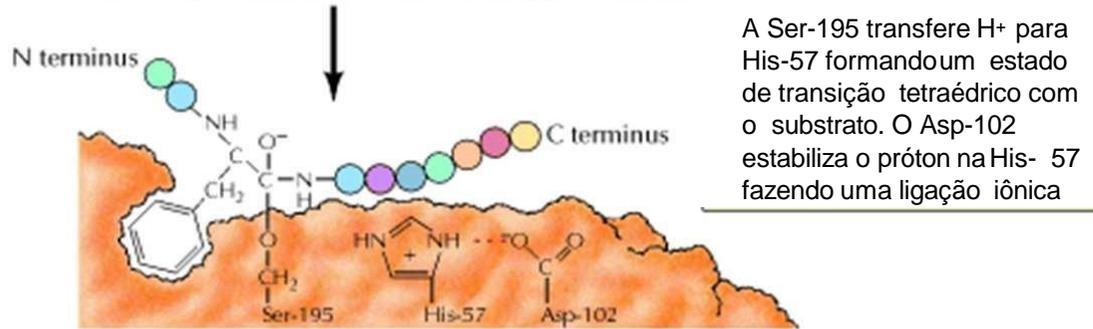
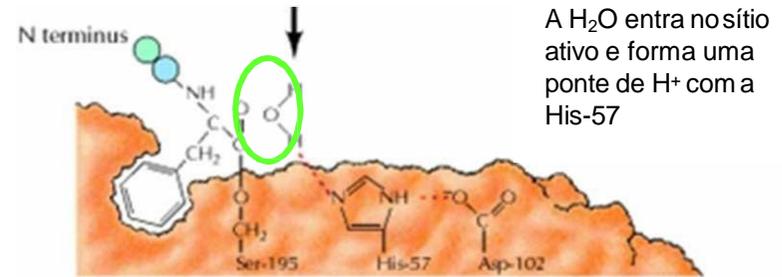
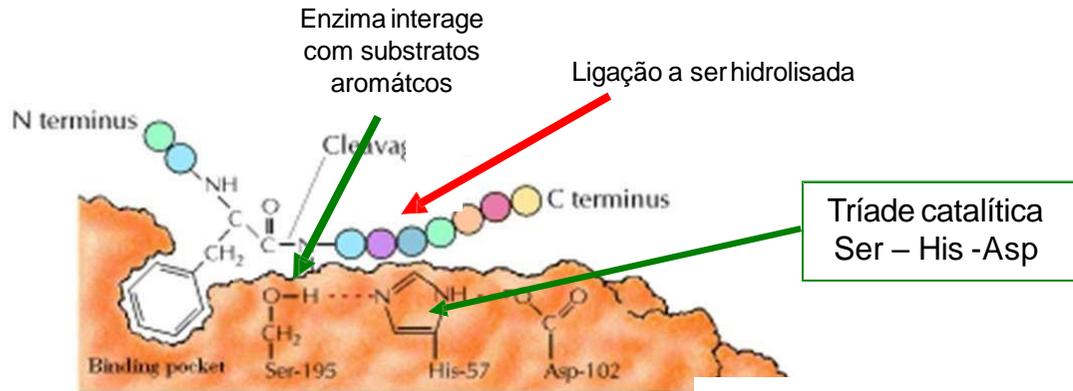
**Catalise nucleofílica: (Nucleófilo: átomo ou grupo rico em elétrons. O substrato está sujeito ao ataque nucleofílico do catalisador. Catalisador = nucleófilo.**

**Catalise eletrofílica: (Eletrófilo: átomo ou grupo deficiente em elétrons. O catalisador está sujeito ao ataque nucleofílico do substrato, levando à formação de um intermediário mais ativo. Catalisador = eletrófilo.**

# Mutarrotação de glicose catalisada pela mutarotase



# Mecanismo de ação da **quimotripsina**, um exemplo típico de uma serino proteinase



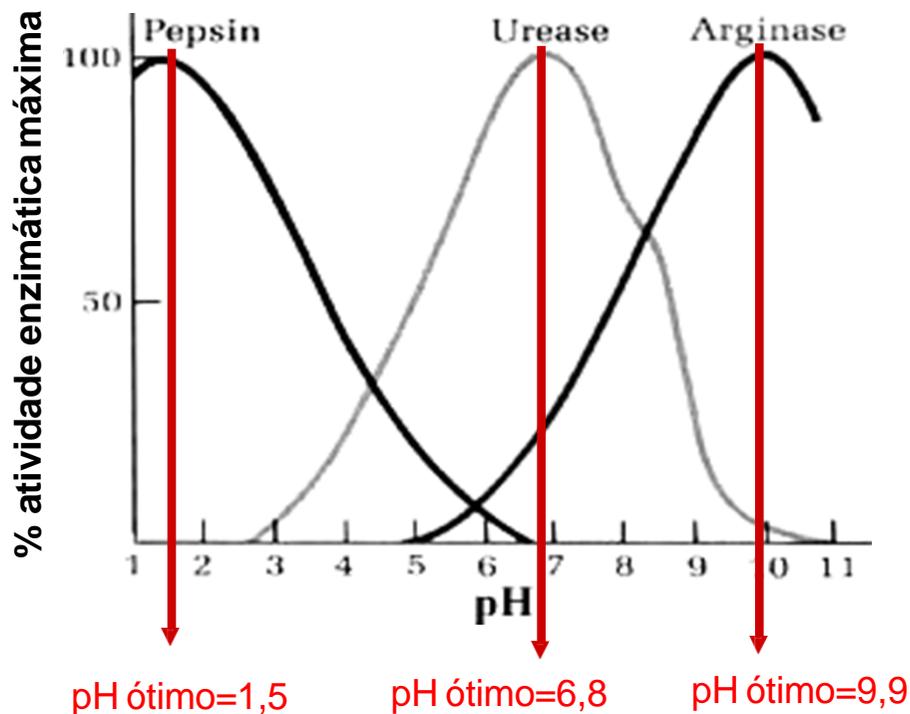
# Fatores que afetam a atividade enzimática:

1. Condições do meio que afetam estabilidade protéica
  - { pH
  - { temperatura
2. Tempo da reação
3. Concentração dos reagentes
  - { a enzima
  - { o substrato
  - { co-fator(s)

Vários são os fatores que afetam o funcionamento das enzimas como catalisadores. Alguns desses fatores são decorrentes da natureza proteica das enzimas, como o efeito do pH e da temperatura. Para se estudar o efeito isolado de um dos fatores acima, é necessário que todos os outros fatores sejam mantidos fixos.

## Fatores que controlam a atividade enzimática:

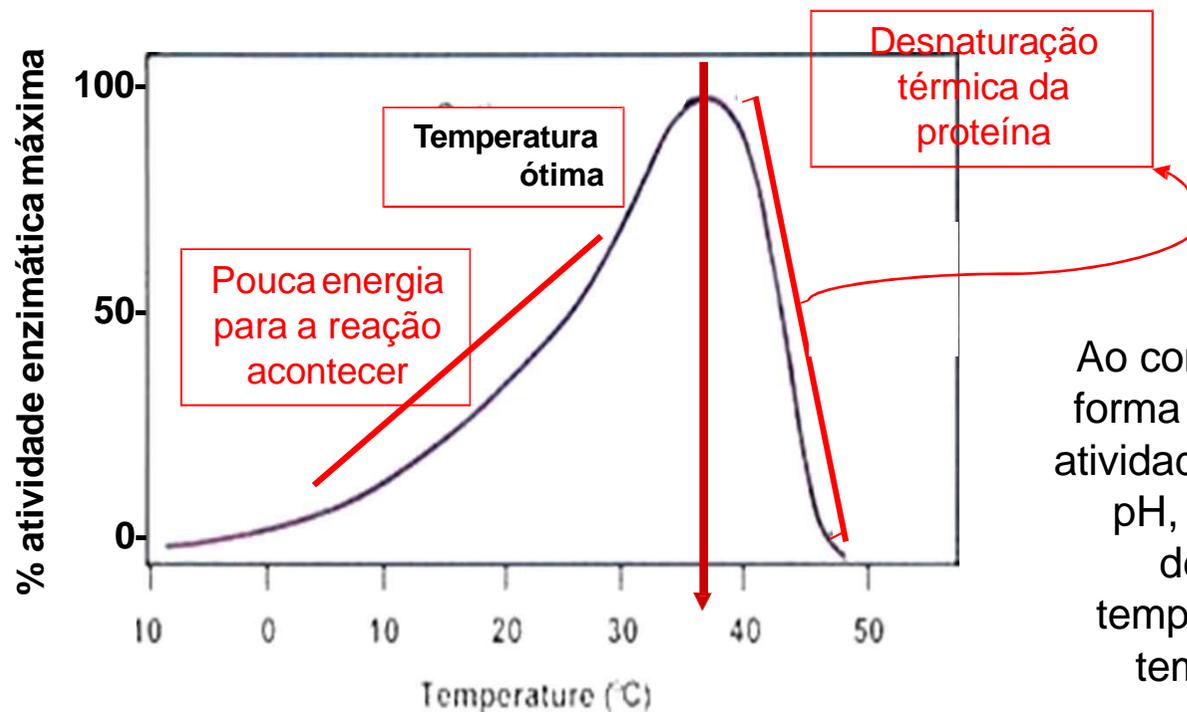
1. Fatores que afetam a estabilidade proteica das enzimas
  - Variações de pH: pH ótimo



O pH ótimo de uma enzima reflete variações no estado de ionização de resíduos de aminoácidos do sítio ativo. A enzima está pelo menos parcialmente desnaturada em pHs afastados do pH ótimo. Quando o substrato é uma molécula ionizável, o pH ótimo da enzima também reflete o seu estado de ionização .

## Fatores que controlam a atividade enzimática:

1. Fatores que afetam a estabilidade proteica das enzimas
  - Variações de pH: pH ótimo
  - Variações de temperatura: temperatura ótima



Ao contrário da curva em forma de sino no caso da atividade enzimática *versus* pH, a enzima só está desnaturada em temperaturas acima da temperatura ótima.

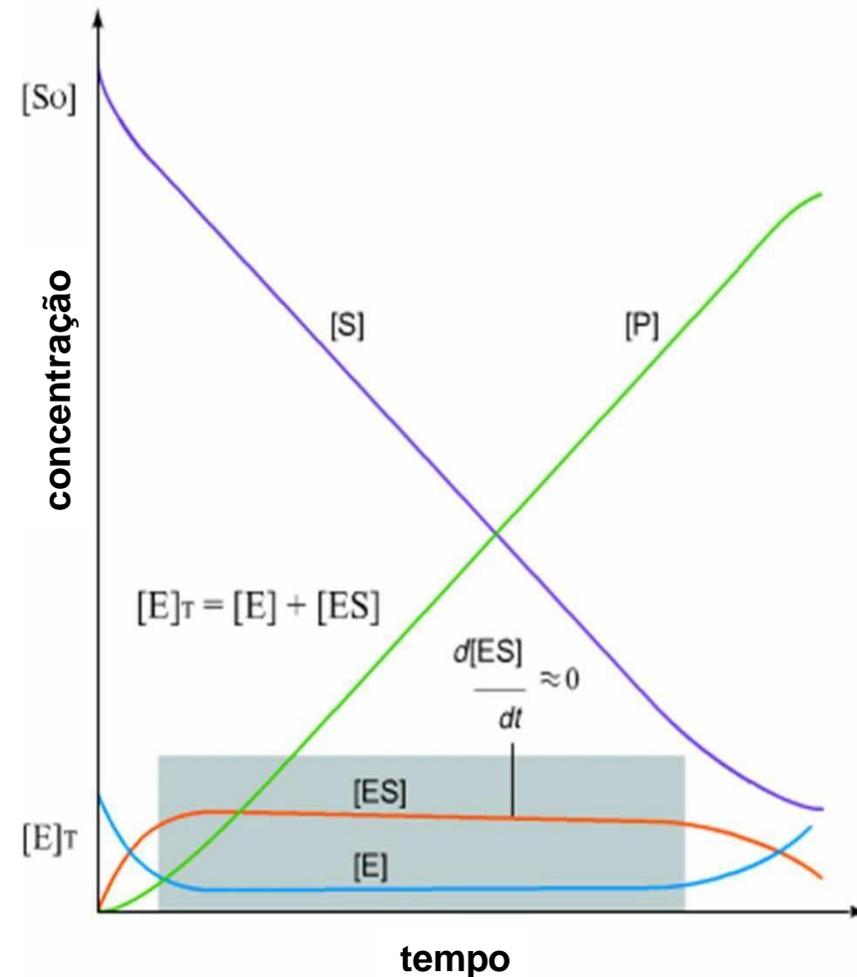
## Fatores que controlam a atividade enzimática:

2. Tempo da reação
3. Concentração:
  - da enzima
  - do substrato
  - de co-fatore(s)

A [substrato] cai na mesma razão em que a [produto] aumenta em função do tempo.

A enzima existe sob duas formas: enzima livre E e complexo enzima-substrato ES. No início da reação, a [E] livre cai e a do complexo [ES] aumenta e atinge um máximo, em que não há mais [E] livre no meio. Nessa situação (indicada no retângulo cinza), diz-se que a enzima está saturada (só existe no complexo ES). A velocidade da reação é a máxima.

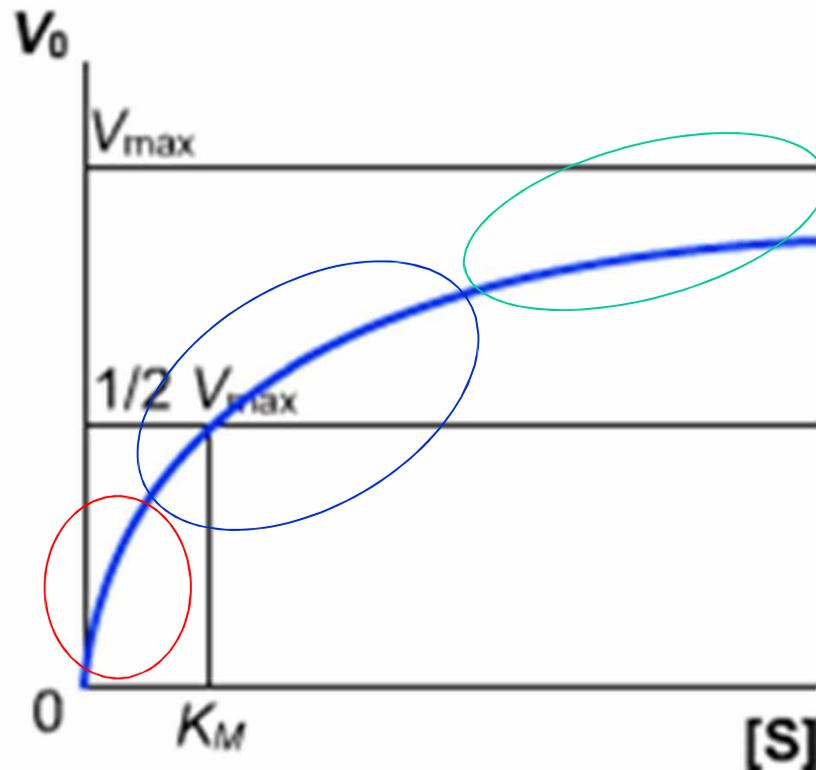
O gráfico abaixo ilustra como as concentrações de E, S e P variam ao longo do tempo da reação.



## Michaelis-Menten

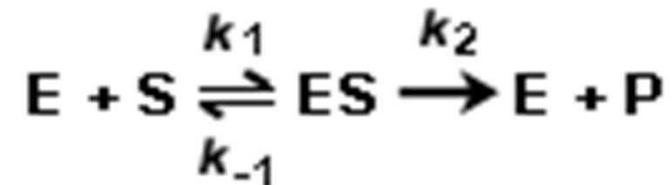
Michaelis e Menten formularam as bases da cinética enzimática, para explicar como a concentração do substrato [S] afeta a velocidade da reação  $v$ , conforme se observa no gráfico abaixo.

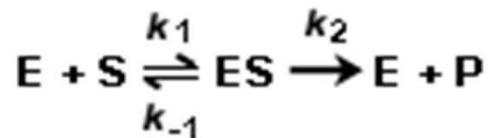
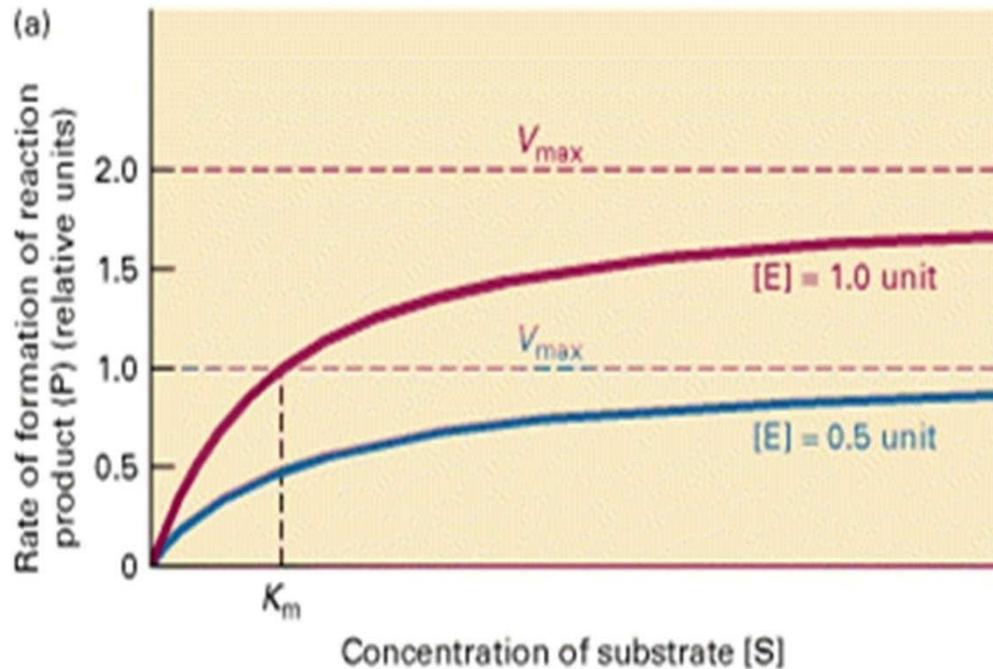
A velocidade da reação apresenta três regiões de comportamento diferente, a medida que se aumenta a concentração do substrato:



- parte a**:  $v$  aumenta proporcionalmente com aumentos de  $S$ .
- parte b**:  $v$  aumenta não proporcionalmente com aumentos de  $S$ .
- parte c**:  $v$  não aumenta mais, tendendo a um valor máximo ( $V_{max}$ ), sendo independente da  $[S]$

O gráfico mostra **um conjunto de reações** que estão acontecendo simultaneamente, conforme as equações abaixo:





-  $k_2$  ou  $k_{cat}$  (constante catalítica) mede o “poder catalítico” da enzima

$$v = k_2 \frac{E_{total} + [P]}{[ES]} \quad k_2 = \frac{V_{max}(s^{-1})}{[E_{total}]}$$

Para calcular  $k_{cat}$  considera-se que toda a E existe como ES, e que  $v=V_{max}$

A **velocidade** da reação somente é **proporcional** à **[E]**

quando a enzima está **saturada**, ou seja, reação é de ordem zero (independe) em relação a [S]

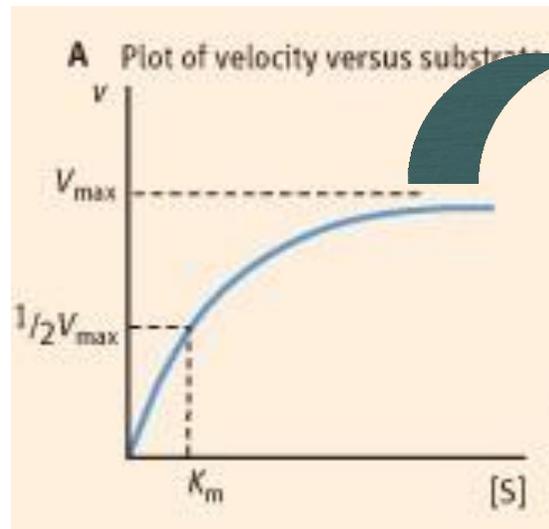
**Eficiência catalítica**

$K_{cat}/K_m$

Parâmetro mais adequado para comparações cinéticas

# VELOCIDADE DA ENZIMA

Unidade de enzima (U) - quantidade de enzima que catalisa a transformação de 1  $\mu\text{mol}$  de substrato por min



[ES]

SÍTIOS DE LIGAÇÃO  
OCUPADOS