



Enzimas

Carla Bittar
Bioquímica e Metabolismo Animal

Enzimas



- ▶ Proteínas altamente especializadas
- ▶ Alto poder catalítico
 - Especificidade por substratos
 - Condições de temperatura e pH
- ▶ Sequência organizada de reações de catálise
 - Degradação de moléculas
 - Conservação e transporte de energia
 - Síntese de macromoléculas
- ▶ Não alteram equilíbrio da reação
- ▶ Atividade regulada geneticamente ou por condições metabólicas



Velocidade de reações catalisadas e não-catalisadas

Enzima	Não-catalisada (s ⁻¹)	Catalisada (s ⁻¹)	Aumento da velocidade
Anidrase carbônica	$1,3 \times 10^{-1}$	1.000.000	$7,7 \times 10^6$
Adenosina-deaminase	$1,8 \times 10^{-10}$	370	$2,1 \times 10^{12}$
Nuclease estafilocócica	$1,7 \times 10^{-13}$	95	$5,6 \times 10^{14}$
Triose-fosfato-isomerase	$4,3 \times 10^{-6}$	4.300	$1,0 \times 10^9$
Quimiotripsina	$1,0 \times 10^{-9}$	190	$1,7 \times 10^{11}$
Orotidina-descarboxilase	$2,8 \times 10^{-16}$	39	$1,4 \times 10^{17}$



Enzimas são proteínas

- ▶ Peso molecular de 12.000 a milhões
- ▶ Atividade catalítica depende da integridade de sua conformação
- ▶ Reação catalizada ocorre numa fenda: **sítio ativo**
- ▶ **Sítio alostérico**
 - afastado do sítio ativo
 - alterações de conformação que afetam o sítio ativo



Cofatores

- ▶ metais de transição, metais alcalinos e alcalinos terrosos
Se ligam a enzima, orientam o substrato

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



Coenzimas

▶ Coenzimas: moléculas orgânicas

Coenzima	Reação	Fonte vitamínica
Biocitina	Carboxilação	Biotina
Coenzima A	Transferência de grupos acila	Ácido pantotênico
Cobalamina	Alquilação	Cobalamina (B ₁₂)
Flavina	Oxidação-redução	Riboflavina (B ₂)
Ácido lipóico	Transferência de grupo acila	-
Nicotinamida	Oxidação -redução	Nicotinamida (niacina)
Fosfato de piridoxal	Transferência de grupo amino	Piridoxina (B ₆)
Tetraidrofolato	Transferência de grupos de 1-carbono	Ácido fólico
Pirofosfato de tiamina	Transferência de grupo aldeído	Tiamina (B ₁)
Retinal	Visão, crescimento e reprodução	Vitamina A
1, 25-diidroxicolecalciferol	Metabolismo do cálcio e fósforo	Vitamina D



Coenzimas e co-fatores	Enzima
Coenzima	
Pirofosfato de tiamina (TTP)	Piruvato-desidrogenase
Flavina adenina dinucleotídeo (FAD)	Monoaminooxidase
Nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD)	Lactato-desidrogenase
Piridoxal fosfato	Glicogênio-fosforilase
Coenzima A (CoA)	Acetil-CoA-carboxilase
Biotina	Piruvato-carboxilase
Tetraidrofolato	Timidilate-sintase
Co-fator metálico	
Zn ²⁺	Anidrase-carbônica
Zn ²⁺	Carboxipeptidase
Ni ²⁺	Urease
Mo	Nitrato-redutase
Se	Glutationa-peroxidase
Mn ²⁺	Superóxido-dismutase
K ⁺	Propionil-CoA-carboxilase

- ▶ Fortemente ligado a enzima: **grupo prostético**



Zimogênio ou proenzima

- ▶ Enzimas sintetizadas como precursores inativos

Clivagem

Ligação de peptídeos específicos

“ogênio”

Local de síntese	Zimogênio	Enzima ativa
Estômago	Pepsinogênio	Pepsina
Pâncreas	Quimiotripsinogênio	Quiniotripsina
Pâncreas	Tripsinogênio	Tripsina
Pâncreas	Pró-carboxipeptidase	Carboxipeptidase
Pâncreas	Proelastase	Elastase



Classificação

- ▶ Sufixo “ase”
 - Urease: hidrólise de uréia
 - DNA polimerase: polimerização de nucleotídeos
- ▶ Pepsina, tripsina: não denotam atividade
- ▶ De acordo com as reações catalizadas
 - 6 classes, com subclasses, sub-subclasses



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



Classificação

- ▶ No. de classificação:
Enzyme commission number: E.C. number
- ▶ Nome sistemático



ATP:glucose fosfotransferase

Hexokinase

E.C.number: 2.7.1.1

2: classe: transferase

7: subclasse: fosfotransferase

1: fosfotranferase com grupo hidroxil como acceptor

1: D-glucose como acceptor de grupo fosforil



Problemas

- ▶ Reações não catalisadas ocorrem lentamente
- ▶ Moléculas estáveis em condições comuns de temperatura, pH e umidade
- ▶ Eventos desfavoráveis

Colisão de 2 moléculas em orientação favorável

Formação transiente de intermediários de carga instável

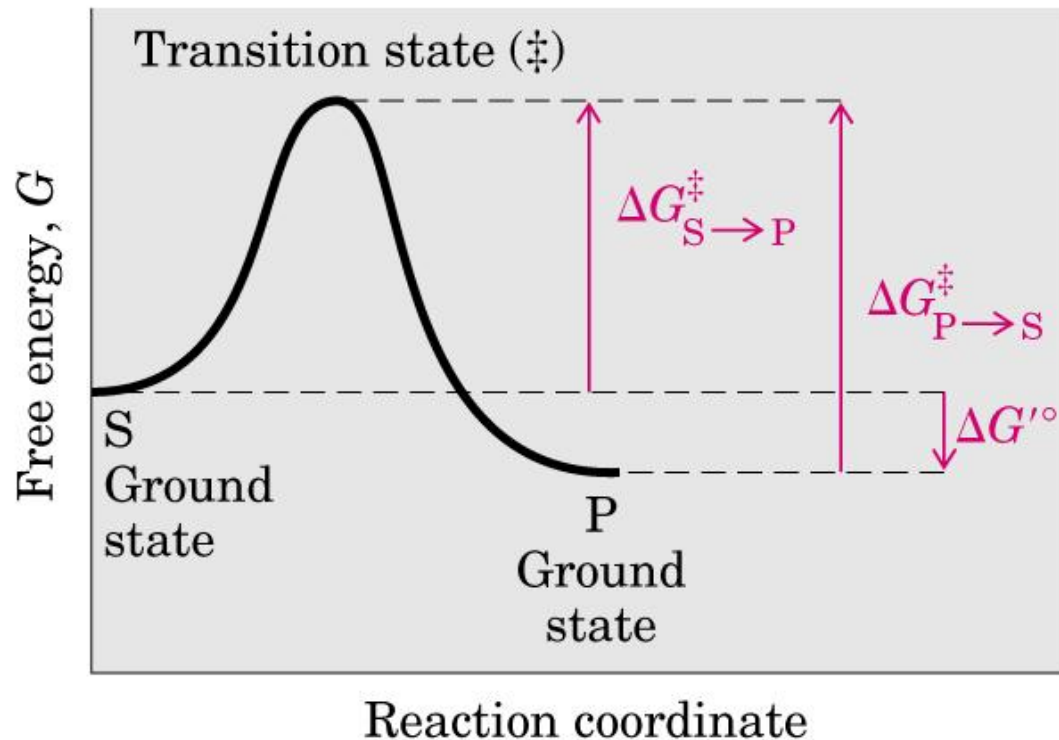
Solução

Enzima faz com que ambiente no qual a reação ocorre seja energeticamente mais favorável



Enzimas alteram taxa da reação

- ▶ $E + S \rightleftharpoons ES \rightleftharpoons EP \rightleftharpoons E + P$
- ▶ Equilíbrio da reação vs Taxa da reação



Mudança na energia-livre padrão

Equilíbrio S/P reflete a diferença de energia entre seus estados iniciais

Diferença é negativa: favorece P

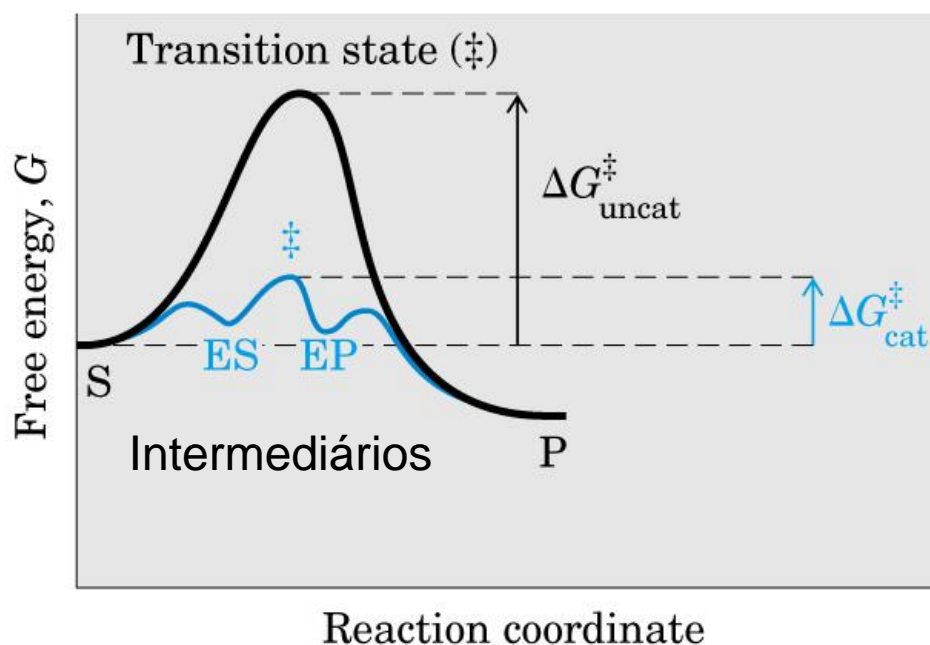
Diferença é positiva: favorece S



▶ Taxa de reação depende de outros parâmetros:

Barreira de energia

- Alinhamento dos grupos reagentes
- Formação de cargas transientes instáveis
- Rearranjos de ligações



Diferença de energia livre entre ponto inicial e estado de transição:

ENERGIA DE ATIVAÇÃO

Taxa da reação reflete a energia de ativação para que a mesma ocorra

Taxa é determinada pela maior energia de ativação do passo intermediário

Passo-limitante



- ▶ Enzimas tem alto poder catalítico e são extremamente específicas

Cyclophilin	10^5
Carbonic anhydrase	10^7
Triose phosphate isomerase	10^9
Carboxypeptidase A	10^{11}
Phosphoglucomutase	10^{12}
Succinyl-CoA transferase	10^{13}
Urease	10^{14}
Orotidine monophosphate decarboxylase	10^{17}

- ▶ Como estes aumentos, altos e seletivos, nas taxas podem ser explicados?
- ▶ De onde vem a energia para a redução na energia de ativação para reações específicas?



Poder catalítico

- ▶ Rearranjo de ligações covalentes durante a reação

Resíduos de aa, cofatores, coenzimas

Ligações ocorrem no sítio ativo

- ▶ Interações não-covalentes entre enzimas e substrato (ES)

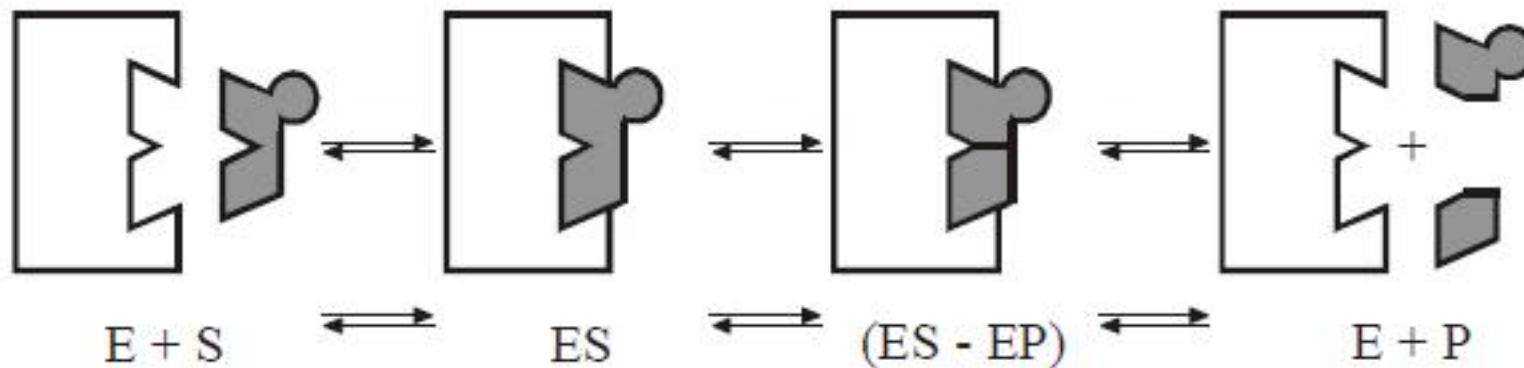
Liberação de energia que fornece estabilidade a interação

Energia de ligação (ΔG_B): principal fonte de energia

Especificidade: complementaridade

▶ Modelo chave-fechadura

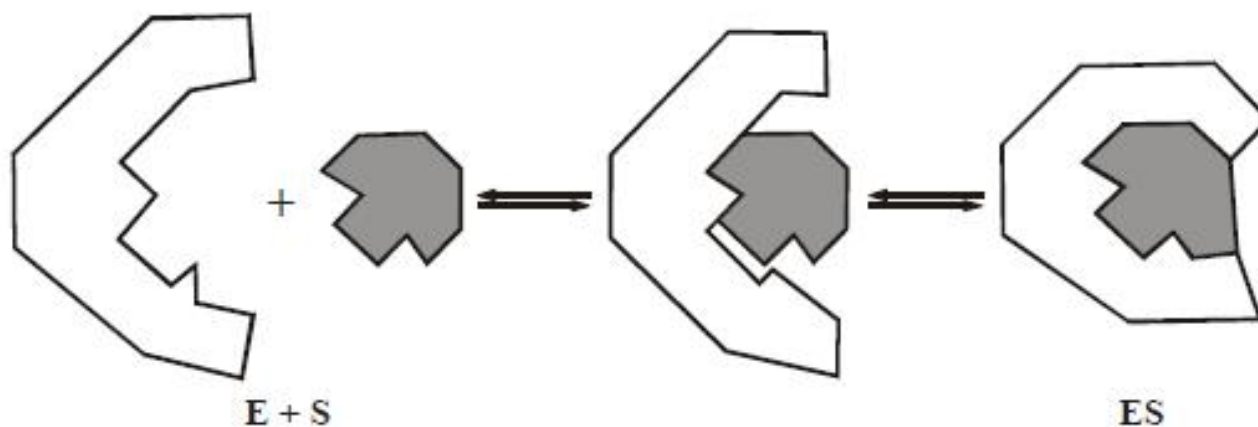
- Interação específica (exclusiva) é mediada pela superfície de moléculas com formas e propriedades iônicas complementares



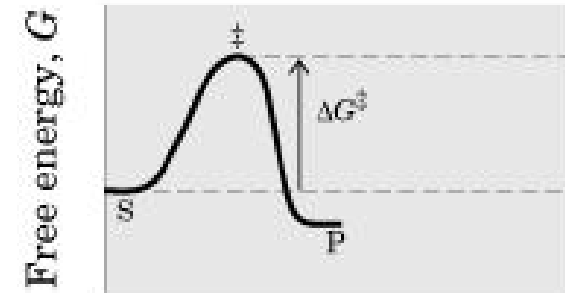
▶ Modelo encaixe induzido:

Complementaridade raramente é perfeita

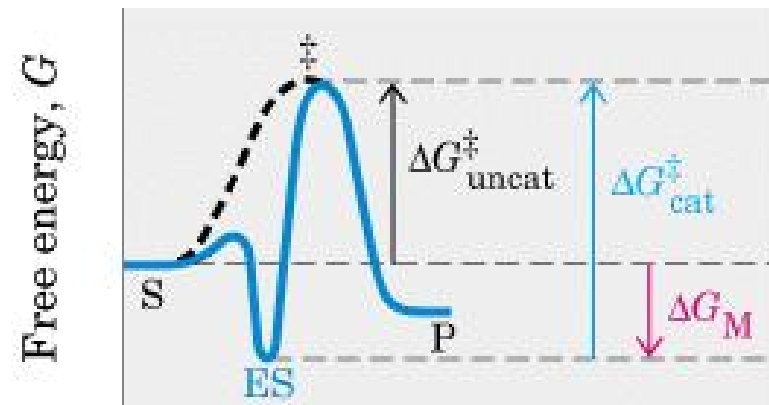
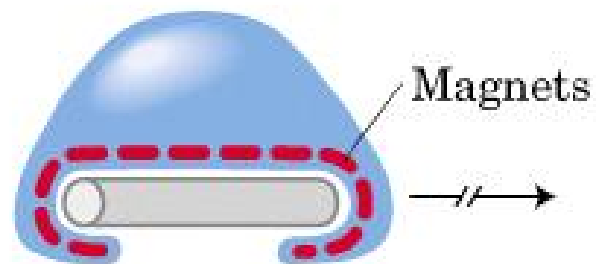
Alterações de conformação de uma ou das duas moléculas



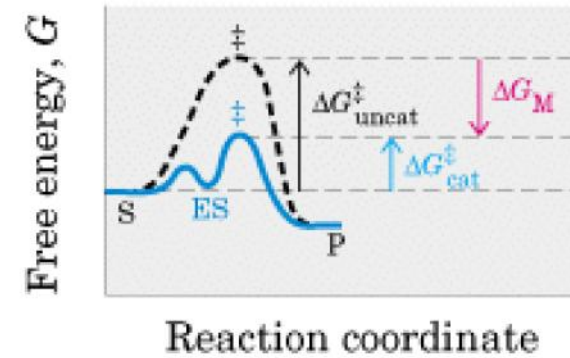
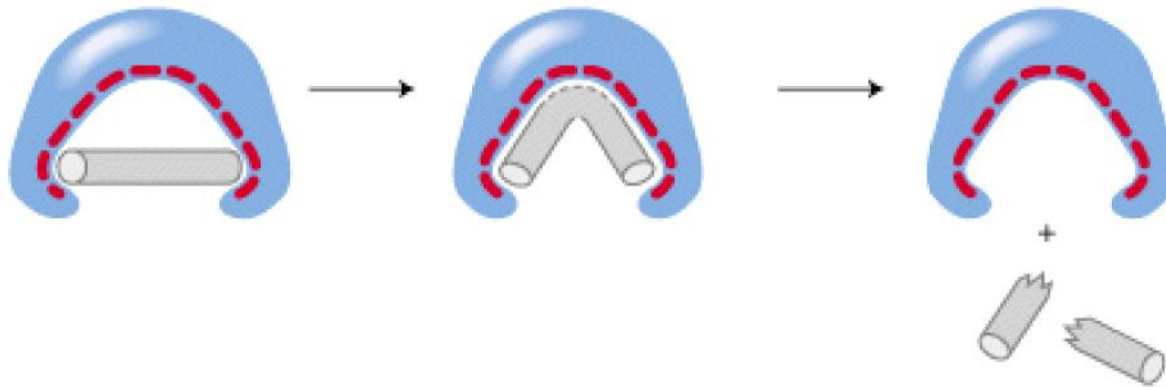
(a) No enzyme



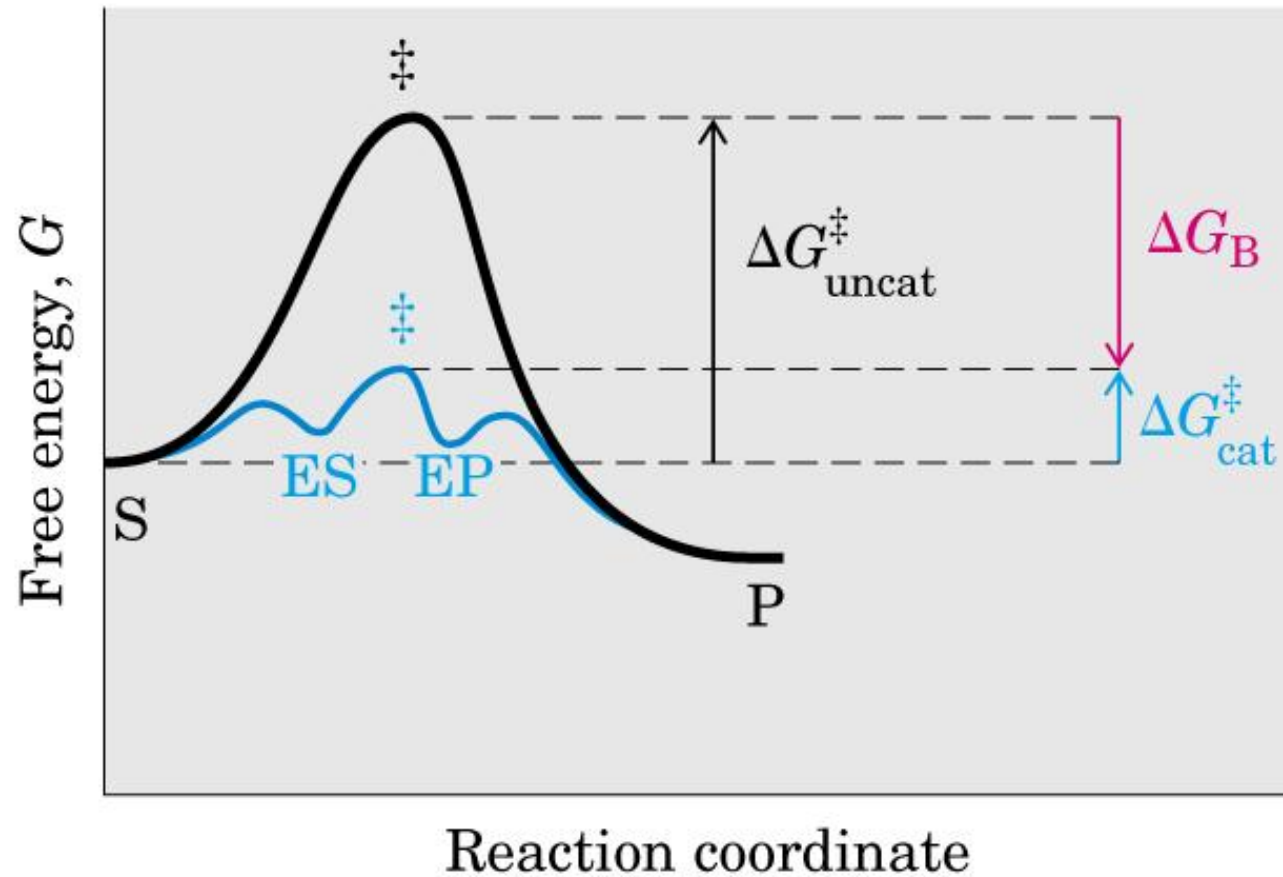
(b) Enzyme complementary to substrate



(c) Enzyme complementary to transition state



Enzima deve ser complementar ao estado de transição da reação



Interações fracas entre enzima e substrato fornecem a principal força motora para catálise enzimática



Mecanismos catalíticos

- ▶ Efeitos de proximidade e orientação

Substrato e grupos funcionais em orientação adequada

Após posicionamento, alteração na conformação: ES



Mecanismos catalíticos

- ▶ Catálise ácido-base

Grupos químicos mais reativos com adição ou remoção de íons: H^+ ou OH^-

Sítios ativos contém aa que podem doar ou receber prótons



Mecanismos catalíticos

- ▶ Catálise covalente

Ligação covalente transiente: E-S

Altera a rota da reação e resulta em catálise quando esta rota tem energia de ativação menor que a rota não catalizada



Mecanismos catalíticos

▶ Catálise íons metais

Metais fortemente ligados as enzimas ou dispersos em solução

Interação entre enzima ligada a metal e substrato

- Orientação do substrato para a reação
- Estabilização de estados de transição carregados



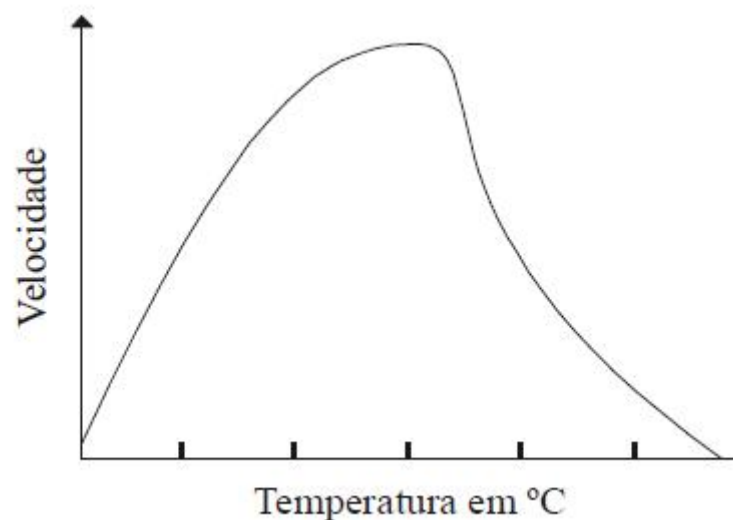
Atividade enzimática

▶ Temperatura

Quanto maior a temperatura, maior a velocidade da reação...até temperatura ótima

- 40–45°C

Energia para atingir estado de transição



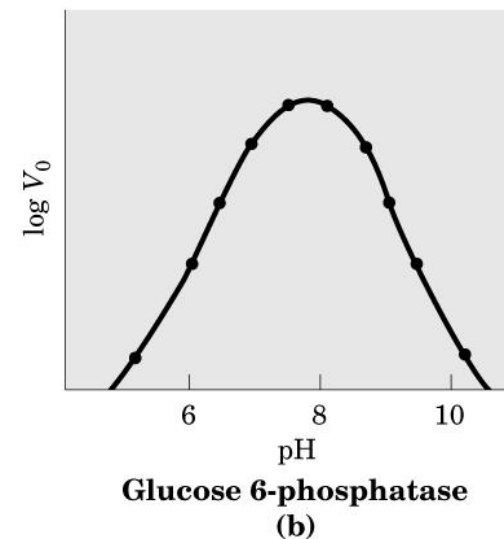
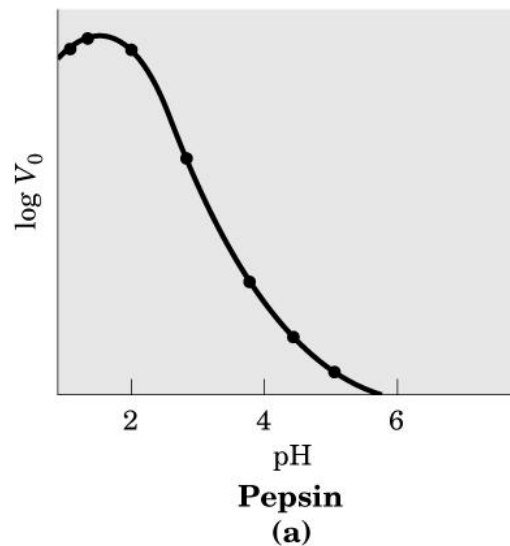
Atividade enzimática

▶ pH

Atividade catalítica está relacionada à ionização de aminoácidos no sítio ativo

Alterações nos grupos ionizáveis podem alterar conformação da enzima

Toleram grandes faixas de pH, mas são ativas em faixa estreita: pH ótimo





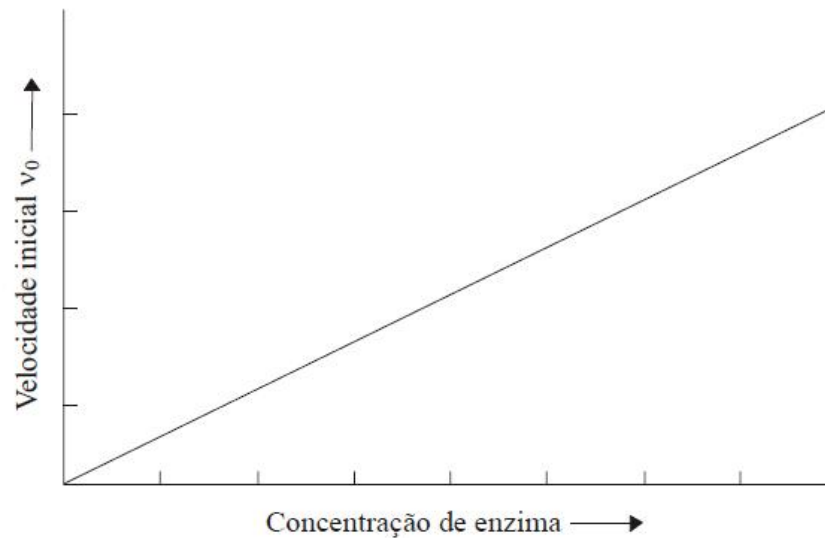
Enzima	pH ótimo
B-amilase	4-5
Tripsina	5,1
Urease	6,4-6,9
Quimotripsina	7-9
Pepsina	1,5-2,0
Lipase	7,0
Fosfatase ácida	4,5-5,0
Fosfatase alcalina	8,4-9,5
Hexoquinase	4,6



Atividade enzimática

- ▶ Concentração da enzima

Velocidade da reação é diretamente proporcional a concentração de enzima





Atividade enzimática

▶ Concentração do substrato

Velocidade

- Formação de produto (consumo de substrato)
- Consumo do reagente

$$V = - \frac{[S]}{t} = k [S]$$

[S] = concentração substrato

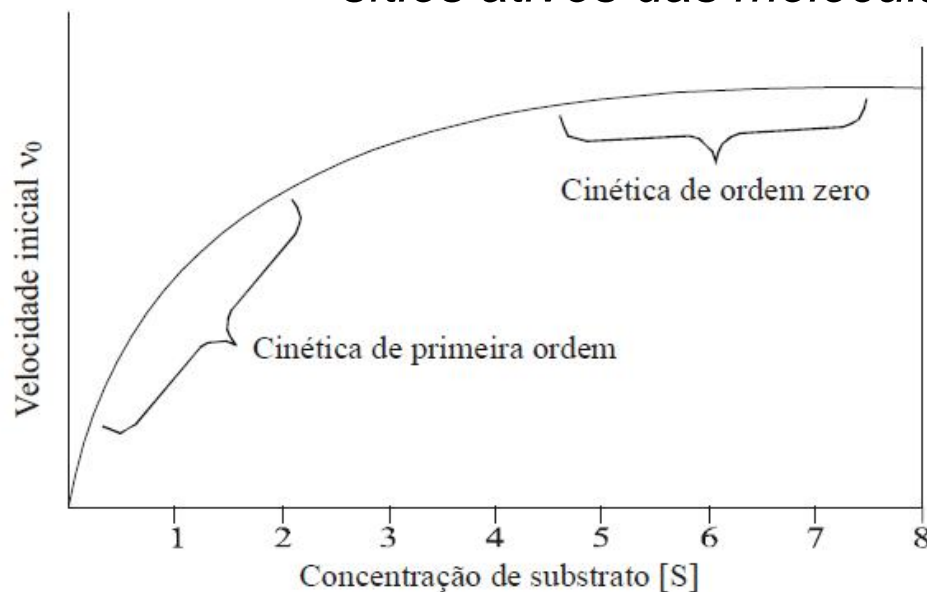
t = tempo

k = constante de velocidade

Cinética enzimática

- ▶ Velocidade é diretamente proporcional a concentração de substrato: cinética de 1^a. Ordem
- ▶ Velocidade não é aumentada com acréscimo de substrato: cinética de ordem zero

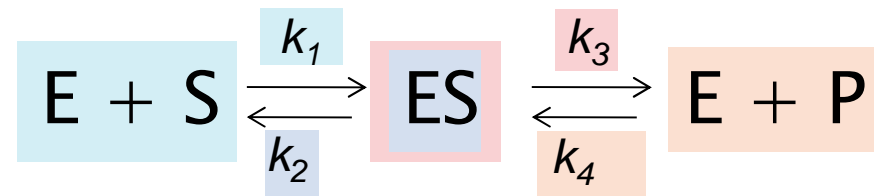
Quantidade de substrato saturou todos os sítios ativos das moléculas enzimáticas



Cinética enzimática



▶ Steady-state



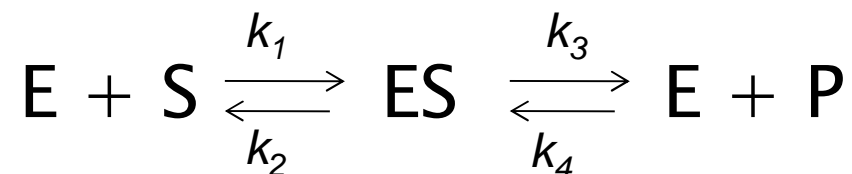
Velocidade de formação ES = velocidade de degradação ES

$$(k_1 \times [E] \times [S]) + (k_4 \times [E] \times [P]) = (k_2 \times [ES]) + (k_3 \times [ES])$$



Cinética enzimática

▶ Steady-state



Velocidade de formação ES = velocidade de degradação ES

$$k_1 \times E \times S + K_4 \times E \times P = k_2 \times ES + k_3 \times ES$$

$$\frac{E}{ES} = \frac{k_2 + K_3}{K_1} \times \frac{1}{S}$$

$K_m =$ Constante de Michaelis-Menten



Como $E = E_{\text{total}} - ES$

$$\frac{E_{\text{total}}}{ES} = \frac{k_m}{S} + 1$$

Velocidade máxima é de fácil determinação quando toda enzima está ligada ao substrato

$$V_{\text{max}} = k \times E_{\text{total}} \quad k = V_{\text{max}} / E_{\text{total}}$$

$$V = k \times ES \quad k = V / ES$$

$$\frac{V_{\text{max}}}{v} = \frac{E_{\text{total}}}{ES}$$



$$\frac{V_{\max}}{v} = \frac{k_m}{S} + 1$$

$$V = \frac{V_{\max} \times S}{k_m + S}$$

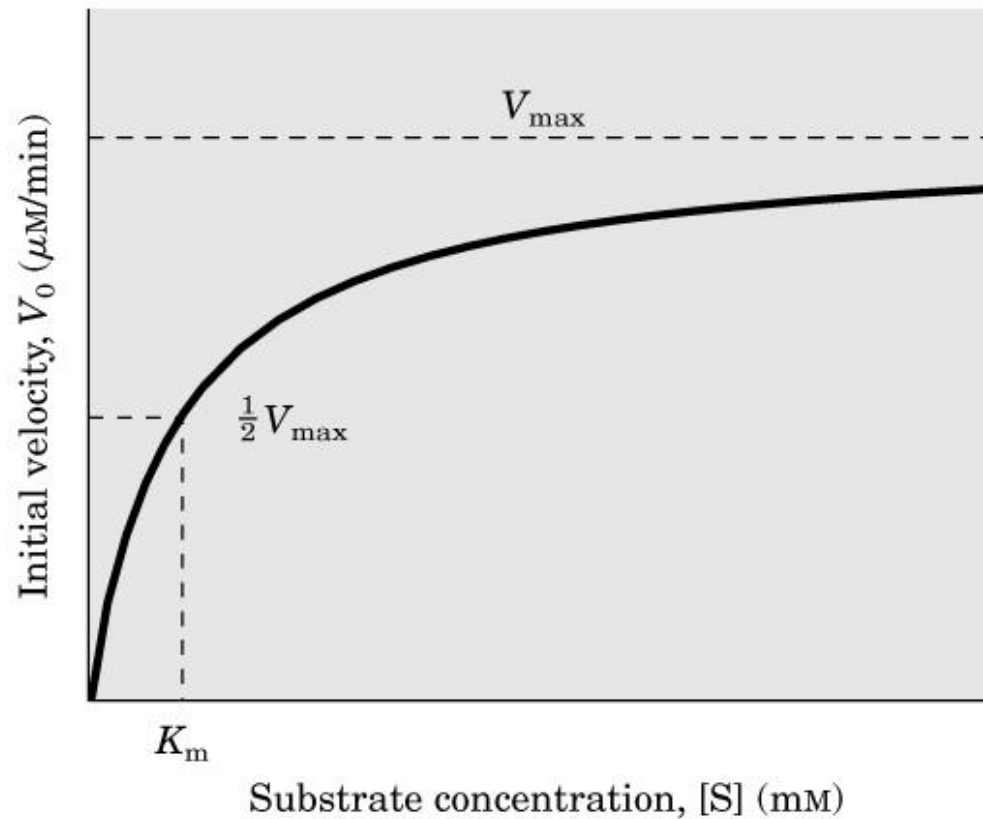
Quando $V = V_{\max}/2$, então $k_m = S$

Km = concentração de substrato que produz metade da velocidade máxima

Cinética enzimática



- ▶ Baixos valores de k_m refletem alta afinidade



K_m de enzimas



Enzima	Substrato	K_m (μM)
Anidrase-carbônica	CO_2	8.000
Arginina-tRNA-sintetase	Arginina	3
	tRNA	0,4
	ATP	300
β -Galactotidase	Lactose	4.000
Lisozima	Hexa- <i>N</i> -acetilglicosamina	6
Penicilase	Benzilpenicilina	50
Piruvato-carboxilase	Piruvato	400
	HCO_3^-	1.000
	ATP	60
Quimiotripsina	Acetil-1-triptofanamida	5.000
Treonina-desaminase	Treonina	5.000



Constante catalítica (K_{cat})

- ▶ Enzimas não atuam em condições saturadas de substrato
- ▶ Número de reciclagem (*turnover number*)
No. de moléculas de substrato convertidos em produto por segundo por molécula de enzima (por sítio ativo)

Enzima	K_{cat} (s^{-1})
Nuclease estafilocócica	95
Citidina-deaminase	299
Triose-fosfato-isomerase	4.300
Ciclofilina	13.000
Cetoesteróide-isomerase	66.000
Anidrase-carbônica	1.000.000

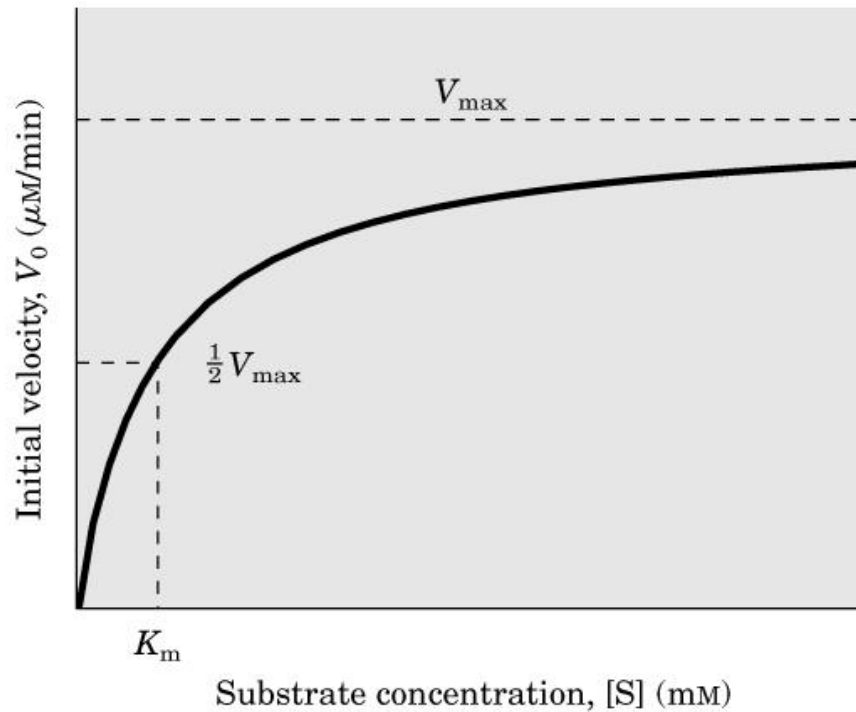
Constante de especificidade (k_{cat}/k_m)



- ▶ Relaciona eficiência catalítica com afinidade
Velocidade de degradação de ES em P não pode ser maior que encontro de E e S
- ▶ Valores baixos indicam pouca afinidade pelo substrato

Enzima	k_{cat}/K_M ($\text{s}^{-1}\text{M}^{-1}$)
Acetilcolinesterase	1.6×10^8
Anidrase-carbônica	8.3×10^7
Catalase	4×10^7
Crotonase	2.8×10^8
Fumarase	1.6×10^8
Triose-phosphate-isomerase	2.4×10^8
β -Lactamase	1×10^8
Superoxide-dismutase	7×10^9

Gráfico Lineweaver–Burk

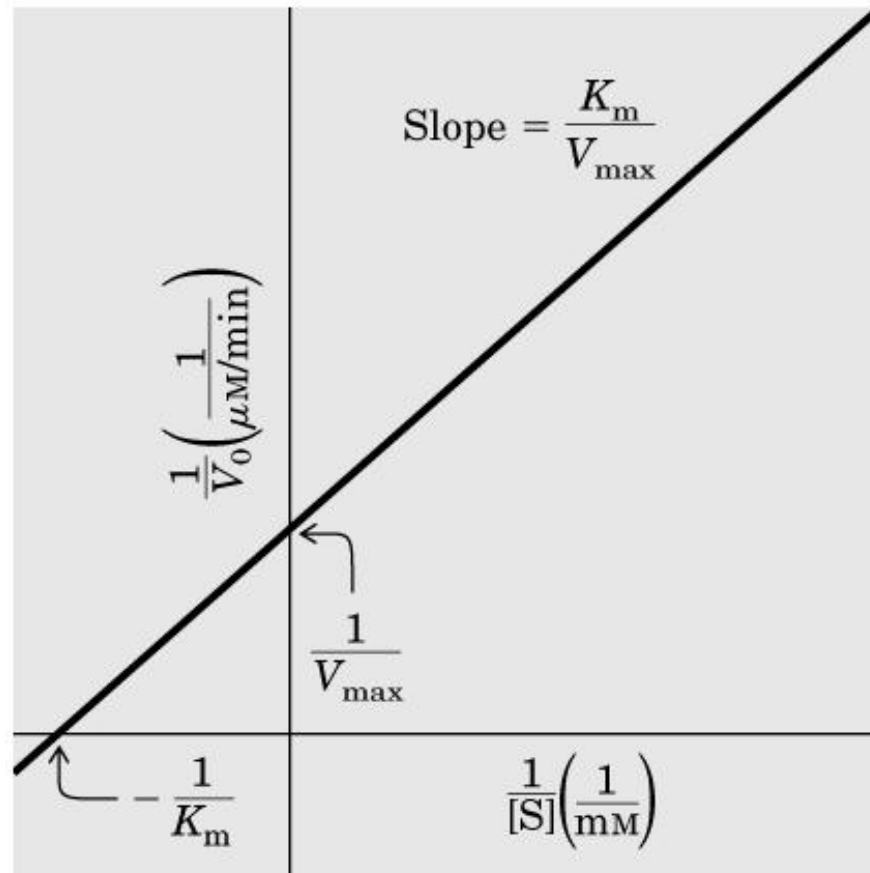


$$V_0 = \frac{V_{\text{max}}[S]}{K_m + [S]}$$

Fazendo o inverso da equação,

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{\text{max}}[S]} + \frac{1}{V_{\text{max}}}$$

Gráfico Lineweaver–Burk



Cálculo preciso de V_{max} e K_m

Reações com vários substratos



- ▶ Mecanismo ordenado

S1 e S2 devem se ligar a enzima em ordem obrigatória
Ligação de S1 necessária para formação de sítio de ligação de S2



Desidrogenase alcóolica

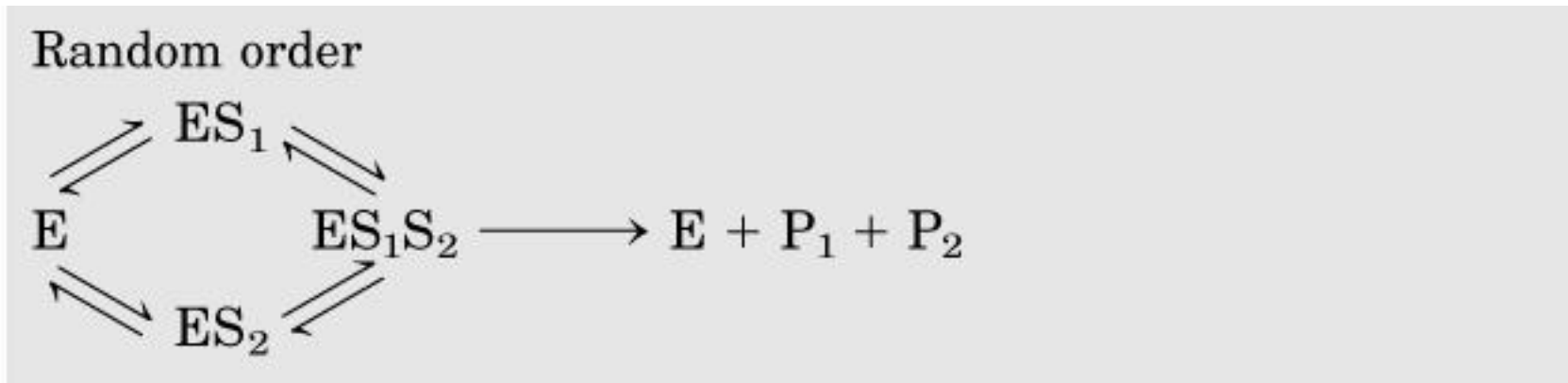


Reações com vários substratos



- ▶ Mecanismo aleatório

S1 e S2 podem se ligar em qualquer ordem



Reações com vários substratos



- ▶ Reação de dupla troca (pingue-pongue)
Um ou mais produtos são liberados antes que outro substrato se ligue a enzima

(b) Enzyme reaction in which no ternary complex is formed





Inibição enzimática

▶ Inibidores: reduzem atividade

Fármacos, antibióticos, conservantes, venenos

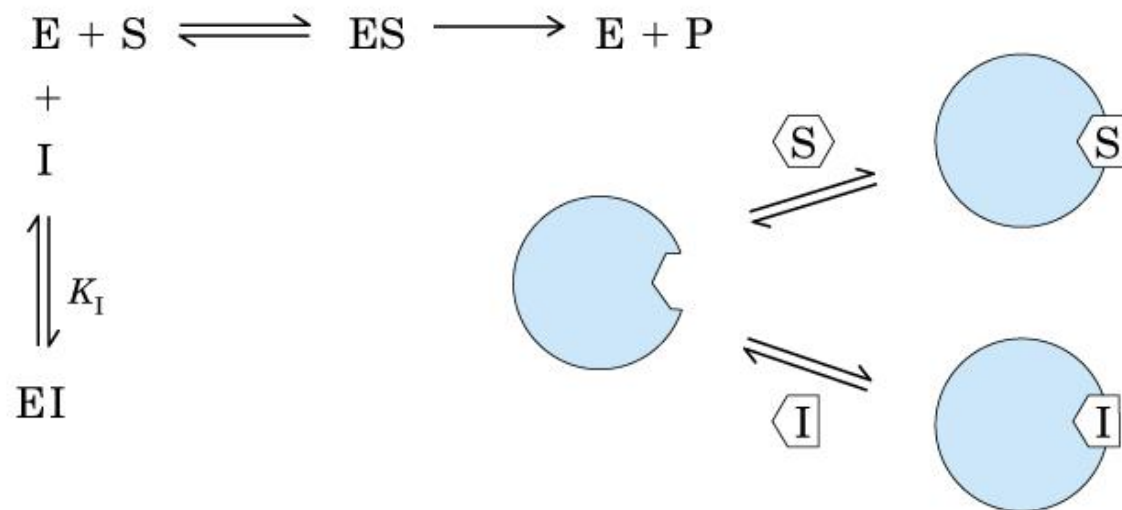
Irreversível: inativação definitiva

Reversível: interações não covalentes

- Competitiva
- Não-competitiva
- Mista

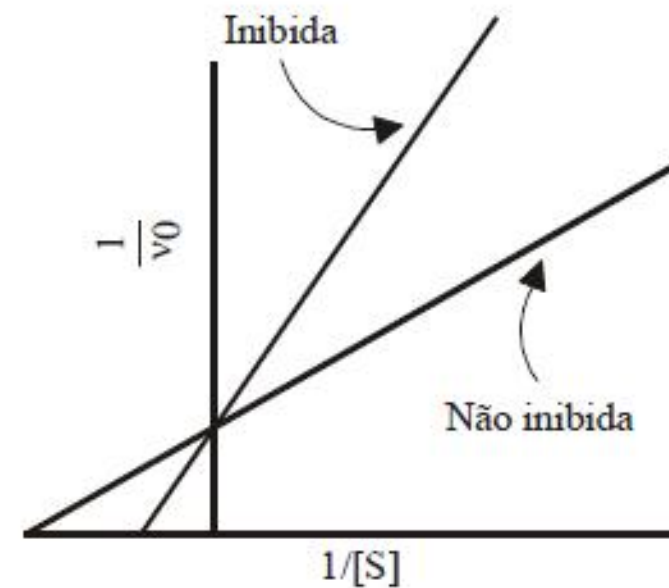
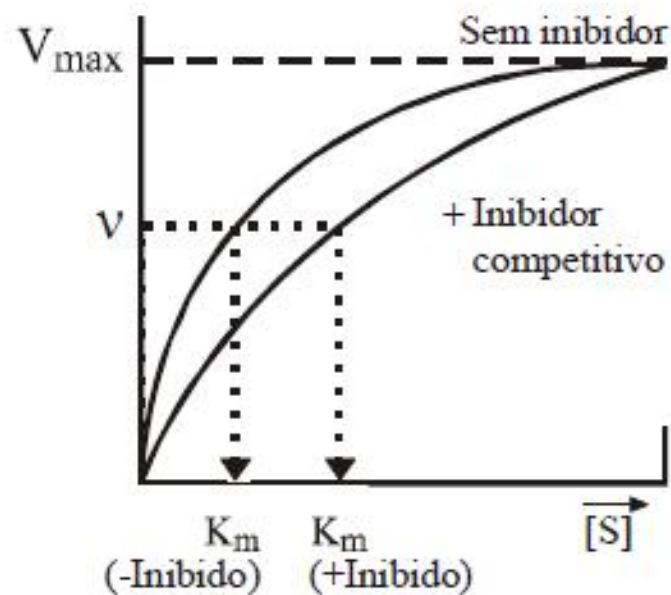
Inibição competitiva

- ▶ Competem pelo sítio ativo
- ▶ Pode ser revertida pelo aumento na [S]



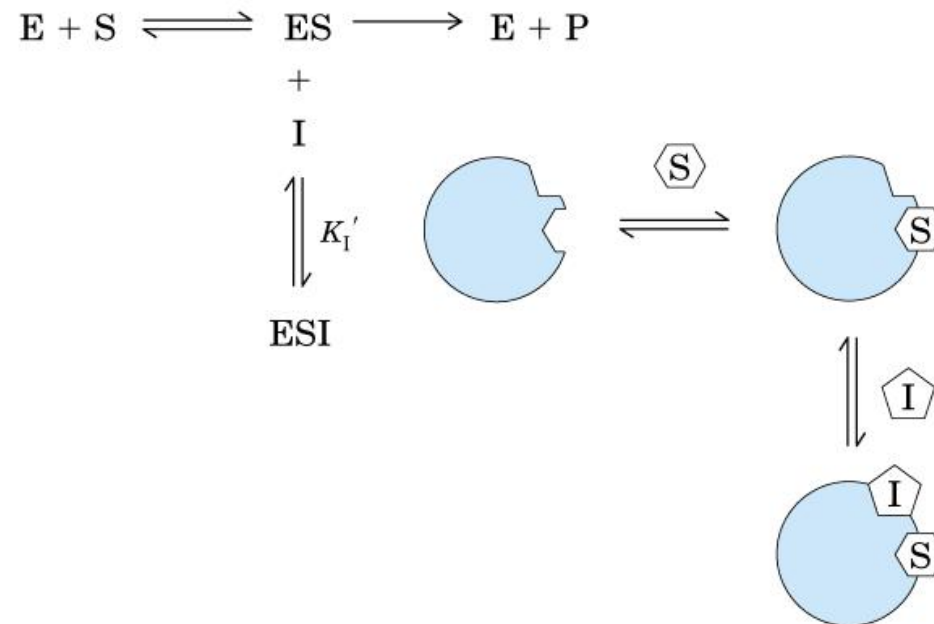
(a) Competitive inhibition

- ▶ K_m é aumentado: mais substrato é necessário para $V_{max}/2$
- ▶ Não há alteração em V_{max} se $[S]$ é elevada



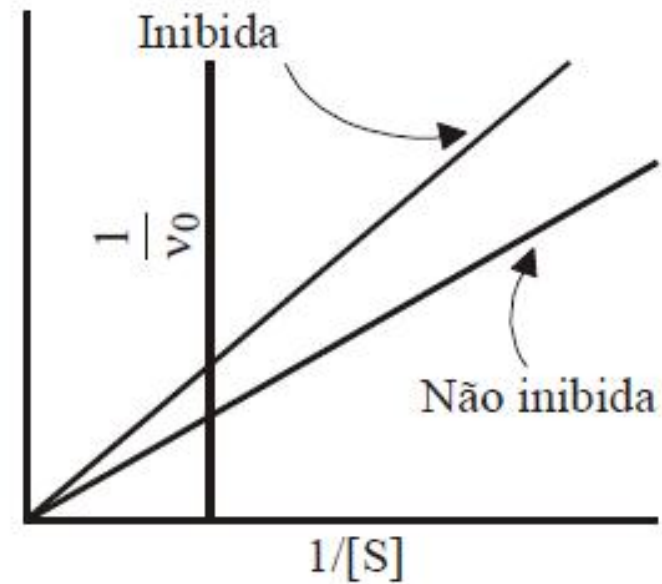
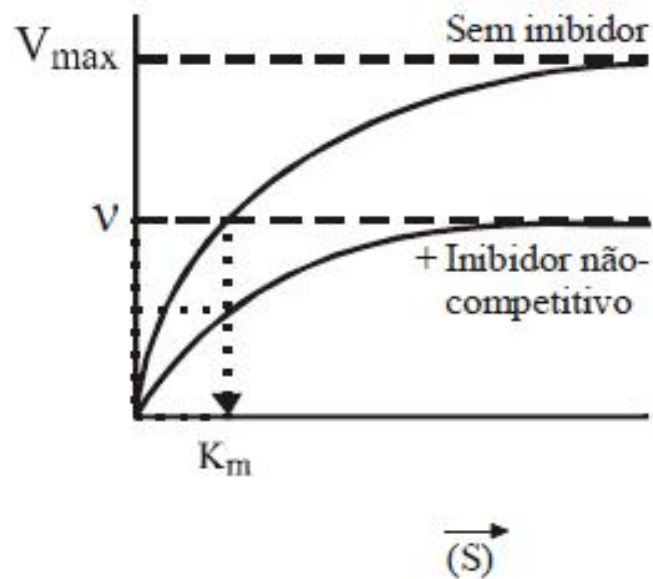
Inibição não-competitiva

- ▶ Inibidor se liga ao complexo ES em sítio diferente do sítio de ativação
- ▶ Metais pesados Hg, Pb, Ag inibem enzimas com grupo SH ou COOH

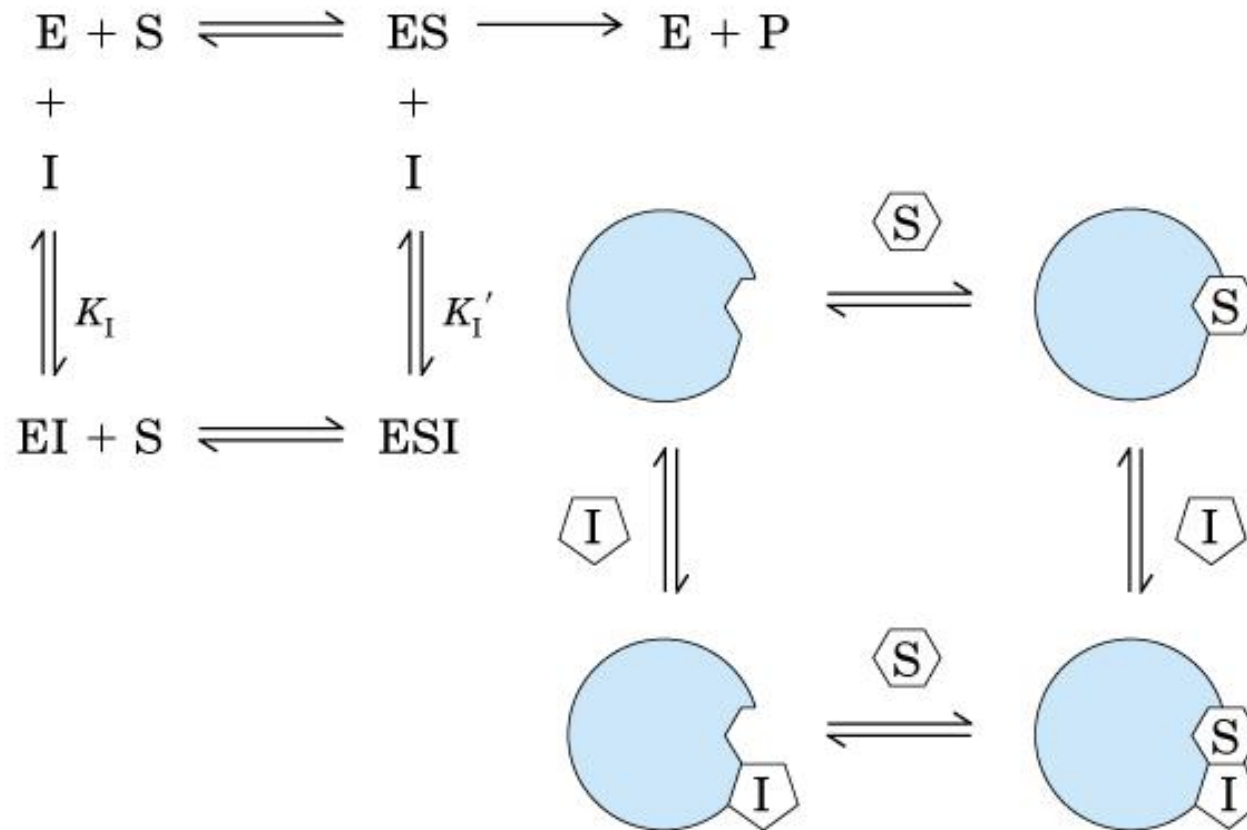


(b) Uncompetitive inhibition

- ▶ Inibição não é revertida pelo aumento na $[S]$
- ▶ Inibidor reduz concentração de enzima ativa, diminui $V_{\text{máx}}$
- ▶ Não afeta k_m



Inibição Mista



(c) Mixed inhibition



Enzimas regulatórias

- ▶ Atuam no metabolismo

Relação dos produtos de uma via e a atividade de outras vias

Regulação: modulação de uma ou mais enzimas-chave

Etapa de comprometimento (committed step)

Ajuste de concentração de enzimas



Enzimas regulatórias

▶ Controle genético

Síntese em resposta a mudanças metabólicas ou alterações fisiológicas

- Indução enzimática

Inibição de síntese em resposta a concentração de produto final



Enzimas regulatórias

▶ Regulação por modificação covalente

Atividade de enzimas que regulam o fluxo metabólico regulada por modificações covalentes reversíveis

- Ativação ou inibição da enzima

Fosforilação e defosforilação

Acetilação e desacetilação

Adenilação e desadenilação

Enzimas regulatórias



▶ Enzimas alostéricas

Reguladas por moduladores ligados a sítios adicionais e que sofrem alteração de conformação

Efector ou modulador alostérico altera a afinidade de ligação enzima–substrato

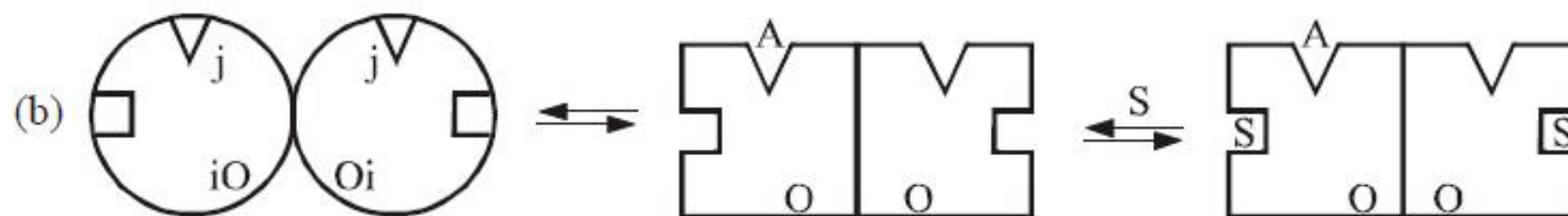
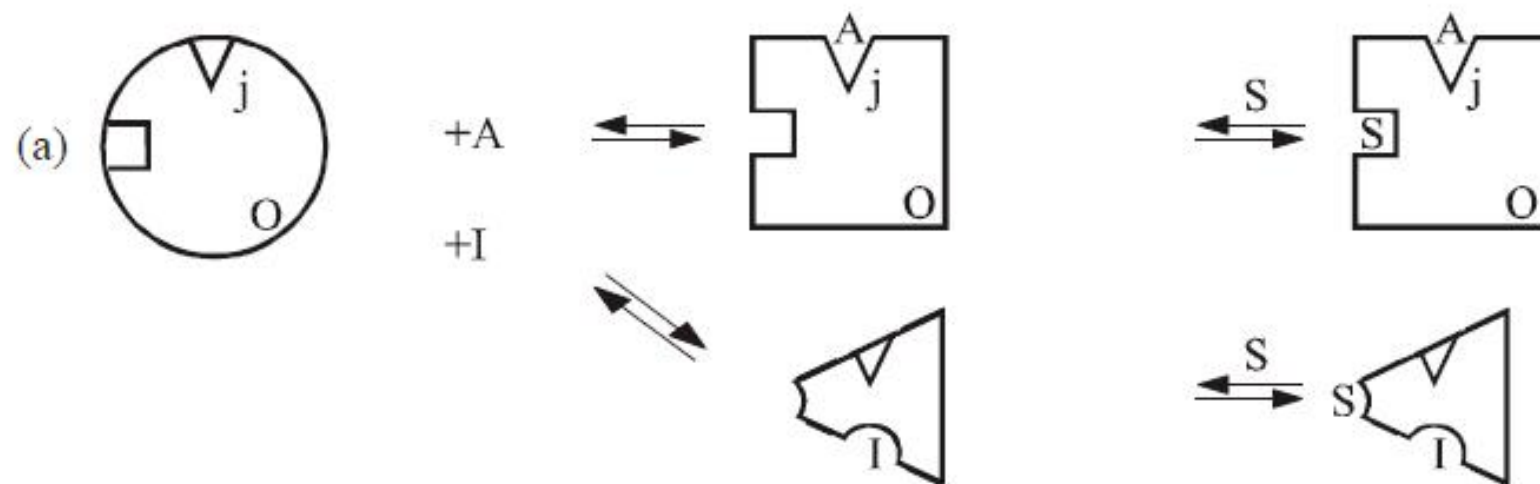
- Ligação em sítios alostéricos
- ATP, proteínas de baixo PM, substratos/produtos de reação

- Efector +: aumenta afinidade, eleva velocidade da reação
- Efector -: diminui afinidade, reduz velocidade da reação

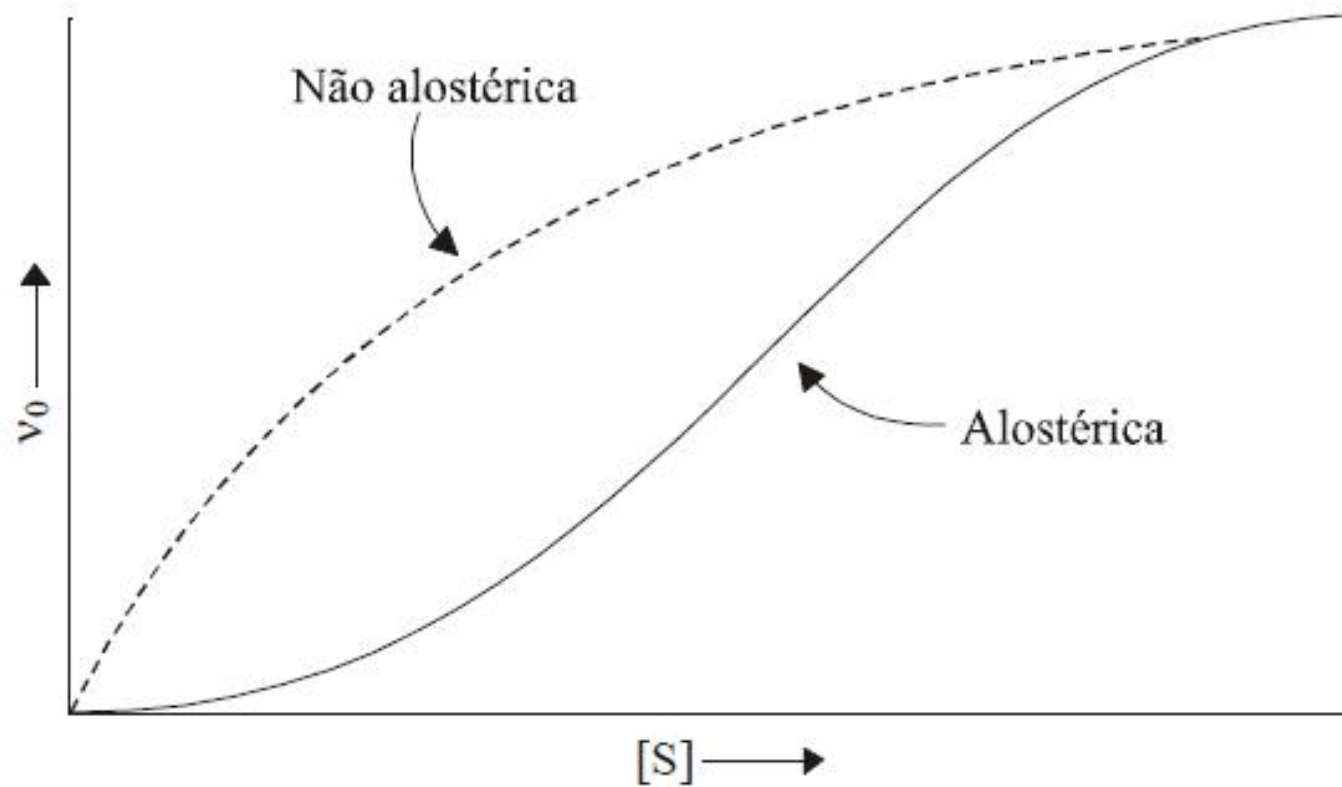


Enzimas regulatórias

- ▶ Enzimas alostéricas são oligoméricas
 - ▶ Várias unidades cada uma com um sítio ativo
 - ▶ Sítio ativo e alostérico na mesma unidade ou unidade diferente
 - ▶ Ligação do substrato em uma subunidade pode afetar a ligação do substrato ao sítio ativo de outra subunidade
 - ▶ Cooperatividade positiva: ligação do primeiro substrato aumenta a afinidade de substratos adicionais a outros sítios
 - ▶ Cooperatividade negativa: ligação do primeiro reduz a afinidade de outros substratos

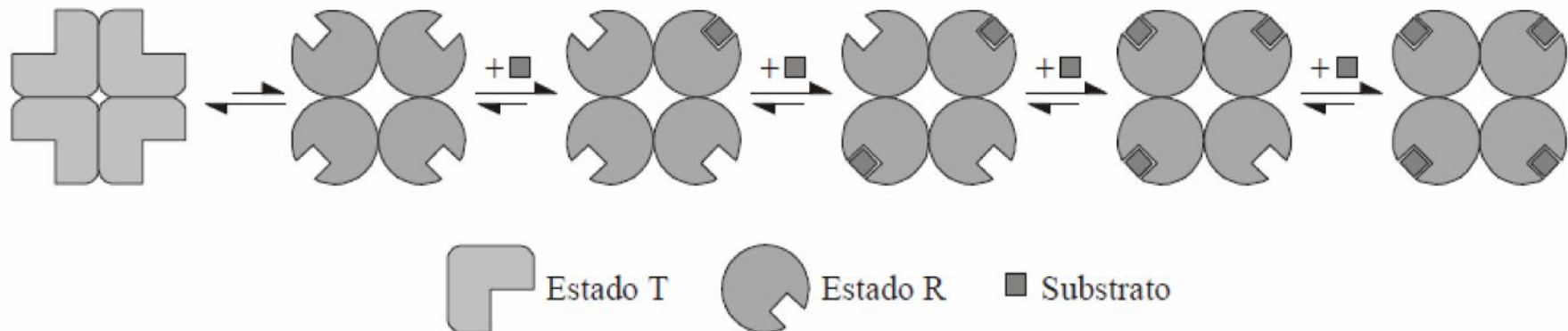


- ▶ Interações entre sítios é evidenciada pela cinética



- ▶ Modelos explicam curva sigmóide
- ▶ Modelo concertado ou de simetria
 - Subunidades na forma inativa (tensa) ou ativa (relaxada) em equilíbrio
 - Alteração de conformação de 1 subunidade leva a alteração das outras

Modelo concertado

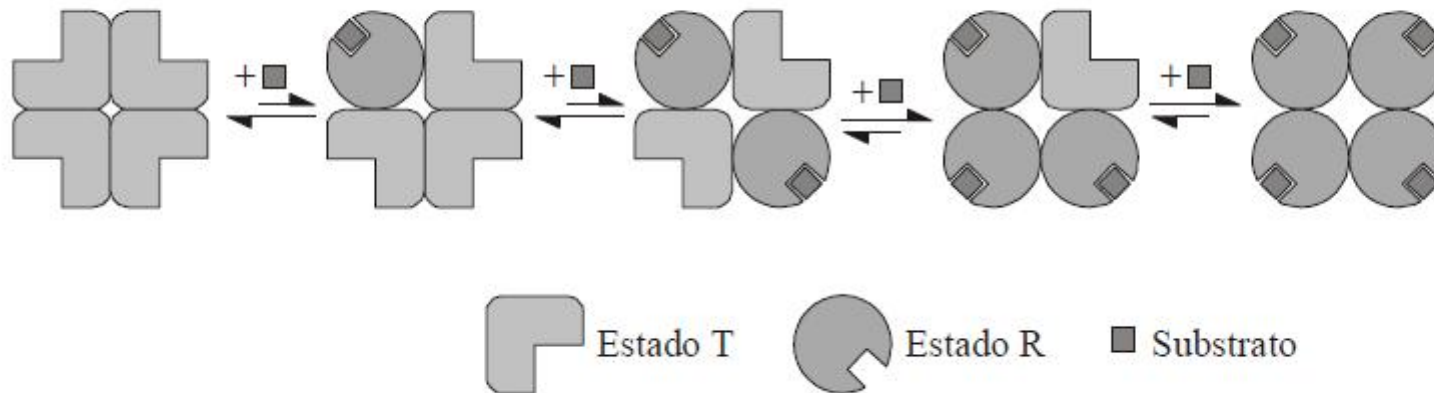


▶ Modelo seqüencial

Mudanças conformacionais são independentes

Ligação de um substrato torna a alteração de conformação mais provável na subunidade adjacente

Modelo seqüencial



Literatura sugerida



- ▶ LEHNINGER, A.L. Princípios de Bioquímica. São Paulo: Sarvier, 2002. 975 p.

Influence of dietary zinc and copper on digestive enzyme activity and intestinal morphology in weaned pigs¹

M. S. Hedemann,² B. B. Jensen, and H. D. Poulsen

Department of Animal Health, Welfare and Nutrition, Danish Institute of Agricultural Sciences,
Research Centre Foulum, 8830 Tjele, Denmark

A rationale for the development of feed enzyme products for ruminants

K. A. Beauchemin, D. Colombatto¹, and D. P. Morgavi²

*Agriculture and Agri-Food Canada, Lethbridge, Alberta, Canada T1J 4B1. Contribution no. (387) 02102,
received 14 November 2002, accepted 21 October 2003.*