

2. Como as enzimas trabalham?

A função termodinâmica denominada de **energia livre (G)** é importante para compreender como as enzimas trabalham.

Parâmetros termodinâmicos que deve-se considerar:

- 1) A variação de energia livre (ΔG) entre produtos e reagentes
- 2) A energia necessária (energia de ativação) para iniciar a conversão dos reagentes em produtos

ΔG : indica a espontaneidade da reação

Energia de ativação: determina a velocidade da reação

As enzimas afeta apenas a energia de ativação!

Sob condições de temperatura e pressão constantes...

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

ΔH - que reflete os tipos e o número de ligações químicas e interações não-covalentes quebrados e formados

ΔS – que reflete a variação da desordem do sistema

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

$\Delta G < 0$ (negativo) : Reações espontâneas > produtos têm menos energia livre que os reagentes, a qual pode ser utilizada para realizar trabalho – são reações exergônicas.

$\Delta G > 0$ (positivo): Precisam que seja fornecida energia – são reações endergônicas.

$\Delta G'^{\circ}$ negativo $\rightarrow$ G reagentes $>$ G produtos

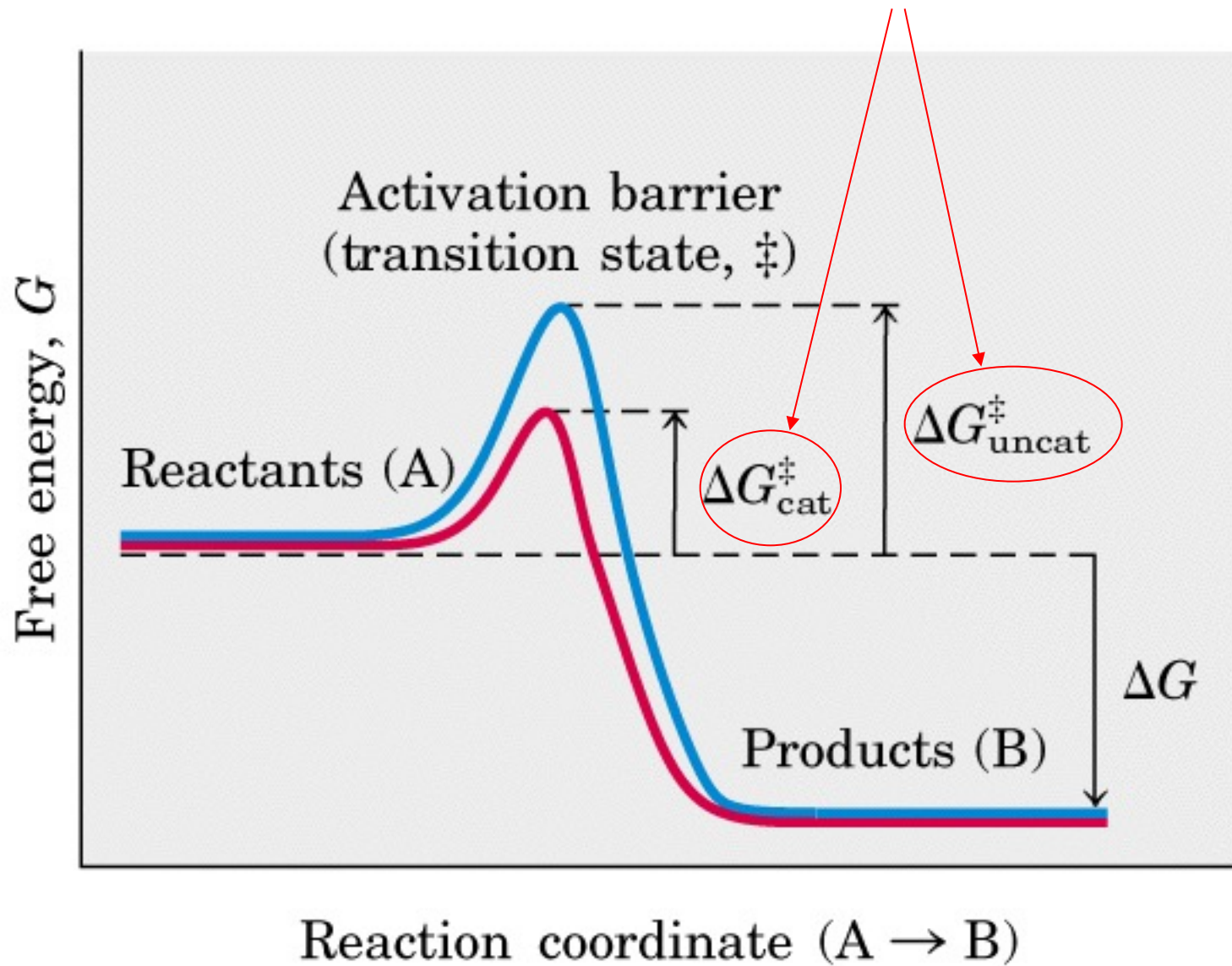
Reação ocorre espontaneamente sob condições padrão.

$\Delta G'^{\circ}$ positivo $\rightarrow$ G reagentes $<$ G produtos

Reação ocorre no sentido reverso, caso seja iniciada com a concentração 1 M (condições padrão)

Lembrem-se todas as reações químicas tendem a ocorrer no sentido que resulta na diminuição de energia livre do sistema.

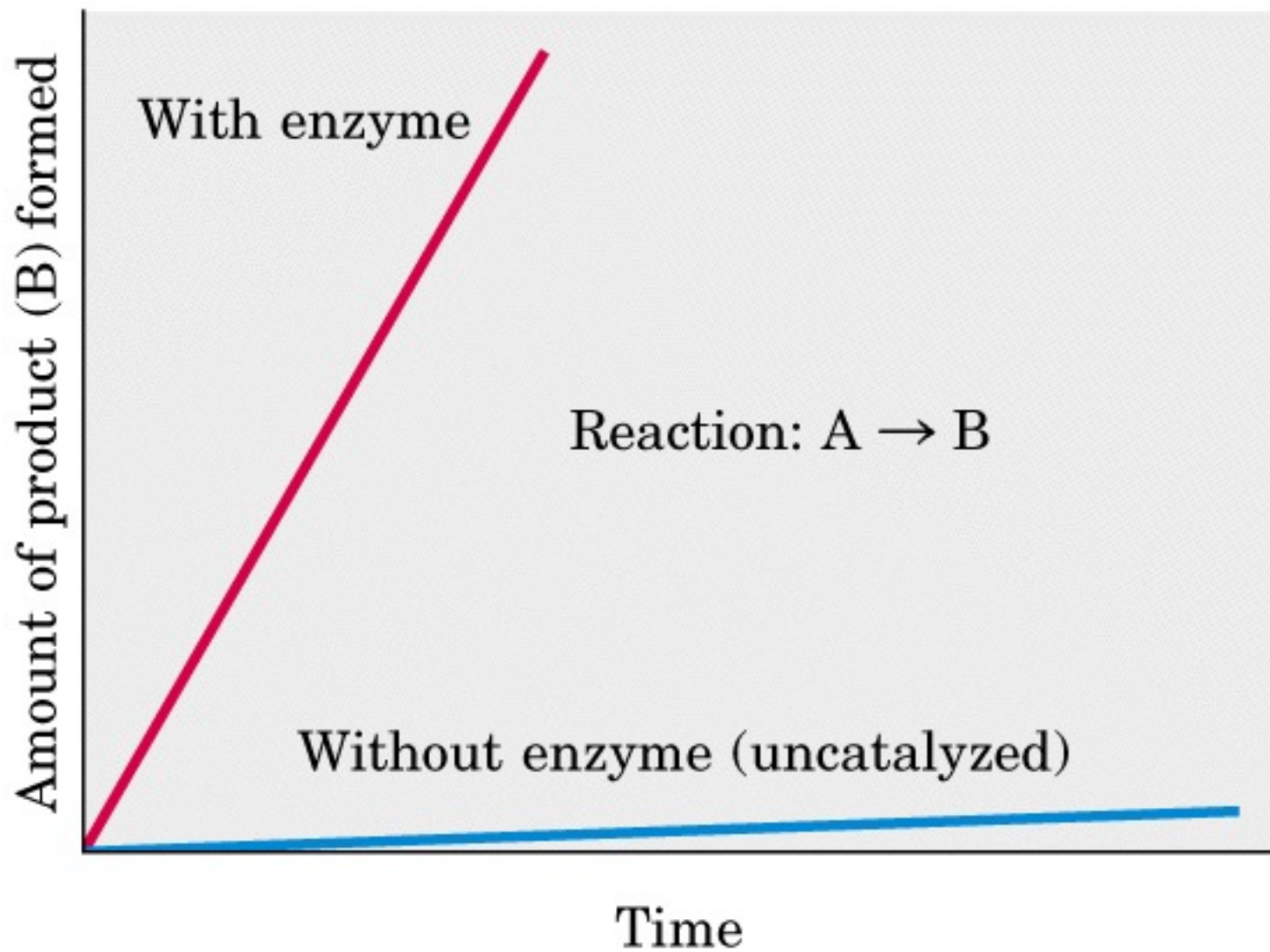
Energia Livre de Ativação



No interior das células as reações químicas ocorrem devido à presença de enzimas

Enzimas: catalisadores capazes de aumentar enormemente a velocidade de reações químicas específicas sem serem consumidos no processo. Elas diminuem a energia de ativação.

Energia de ativação (ΔG^*): energia extra necessária para que a reação ocorra.



Enzimas afetam a velocidade mas não o equilíbrio químico



1. Catalisador não afeta a posição e nem a direção do equilíbrio
2. Um equilíbrio favorável não significa que a conversão de $S \rightarrow P$ ocorra em uma velocidade mensurável

3. A **velocidade** depende da **Energia de Ativação**:

“energia necessária para o alinhamento dos grupos químicos reagentes, formação de cargas transientes, rearranjos de ligações e outras transformações necessária para que a reação ocorra em uma das direções”

O equilíbrio da reação está relacionado à variação de energia livre padrão

TABLE 6-4 Relationship between K'_{eq} and $\Delta G'^{\circ}$

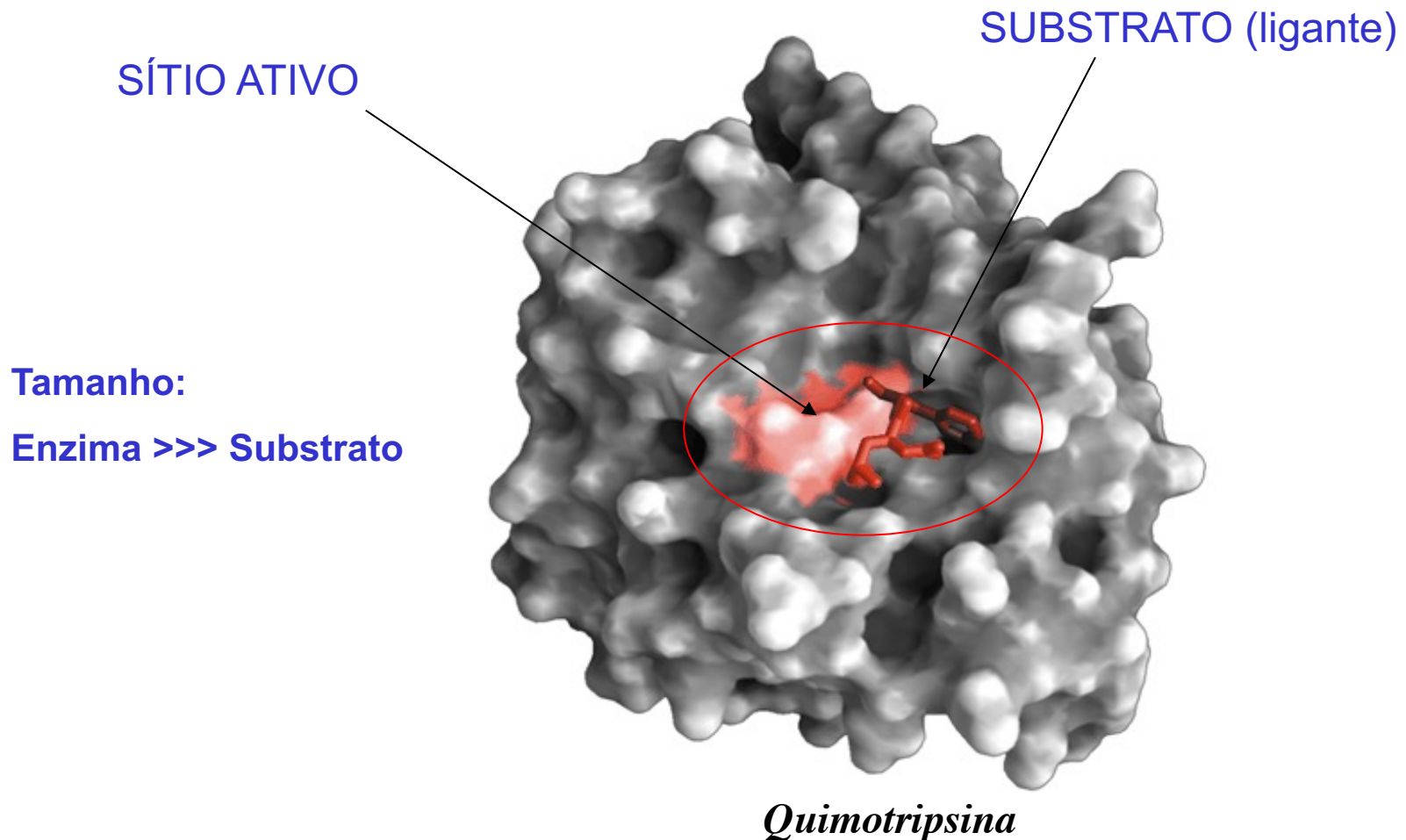
K'_{eq}	$\Delta G'^{\circ}$ (kJ/mol)
10^{-6}	34.2
10^{-5}	28.5
10^{-4}	22.8
10^{-3}	17.1
10^{-2}	11.4
10^{-1}	5.7
1	0.0
10^1	-5.7
10^2	-11.4
10^3	-17.1

Um grande valor negativo de $\Delta G'^{\circ}$ indica um equilíbrio de reação favorável à formação dos produtos, mas não significa que ela ocorra a uma velocidade considerável.

Note: The relationship is calculated from $\Delta G'^{\circ} = -RT \ln K'_{\text{eq}}$ (Eqn 6-3).

2. Como as enzimas trabalham?

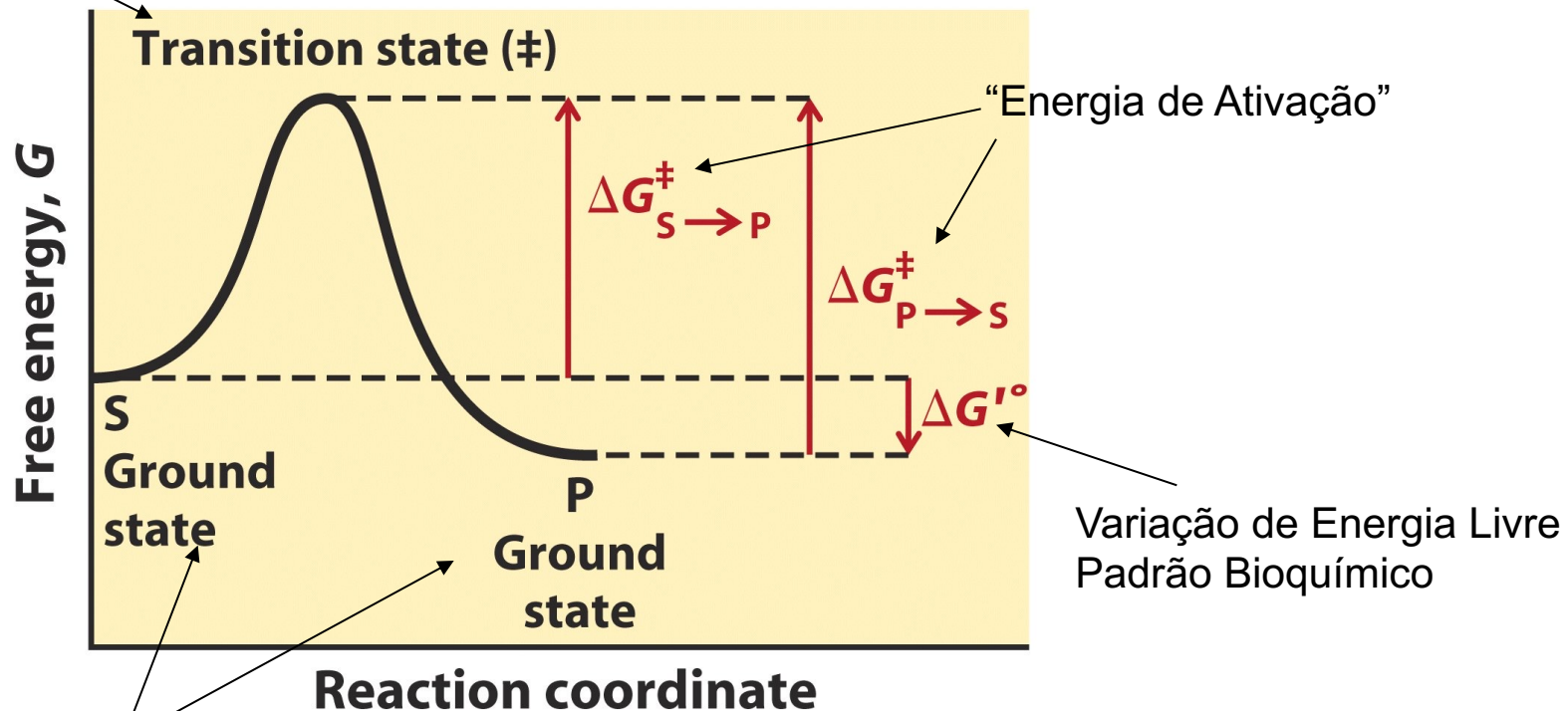
As enzimas fornecem um ambiente específico (**SÍTIO ATIVO**) onde uma dada reação é energeticamente mais favorável.



Enzimas afetam a velocidade mas não o equilíbrio químico



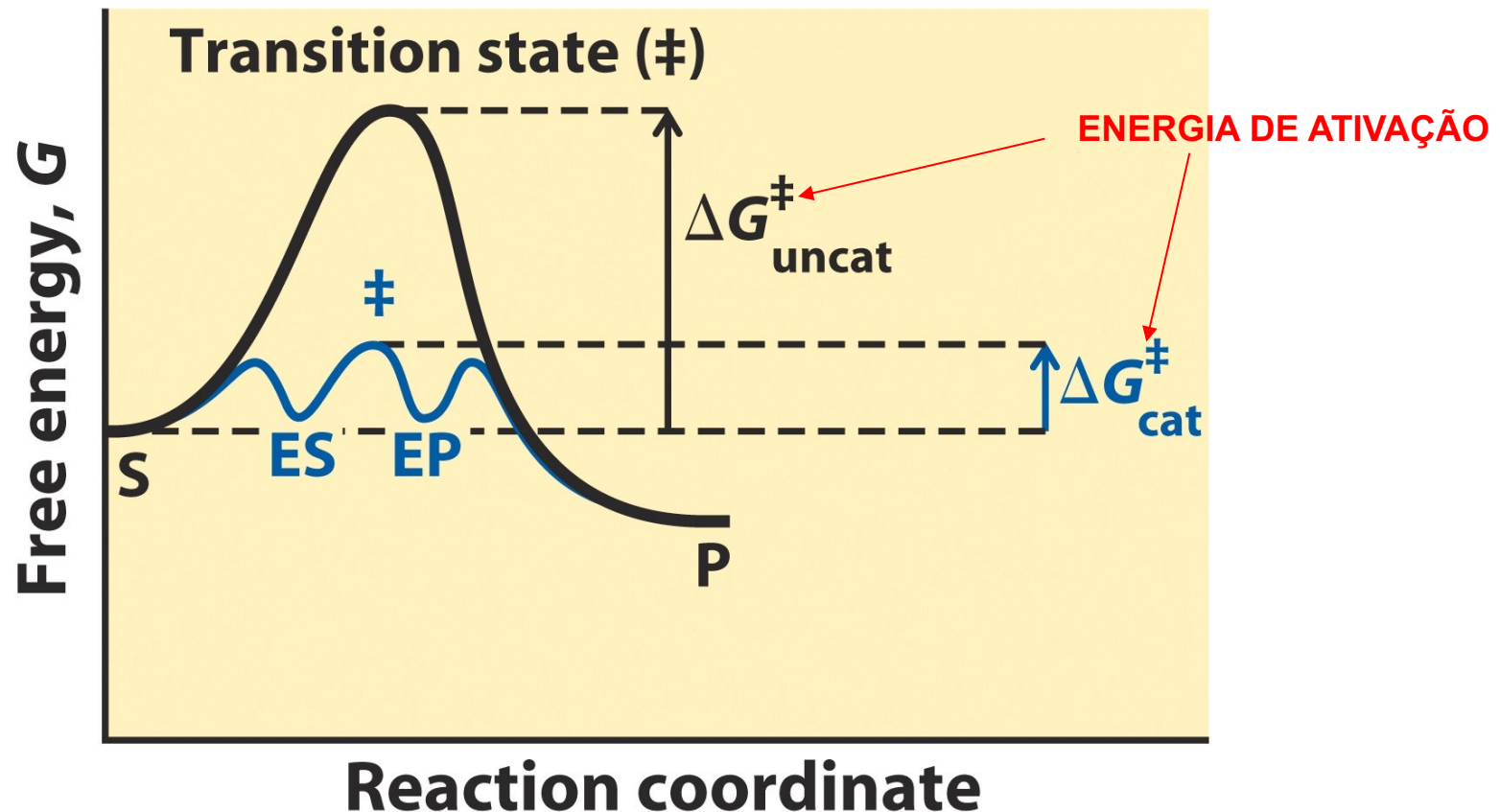
“Estado de transição”



“Estado Fundamental”
Ponto de Partida para a
reação de ida ou de volta.

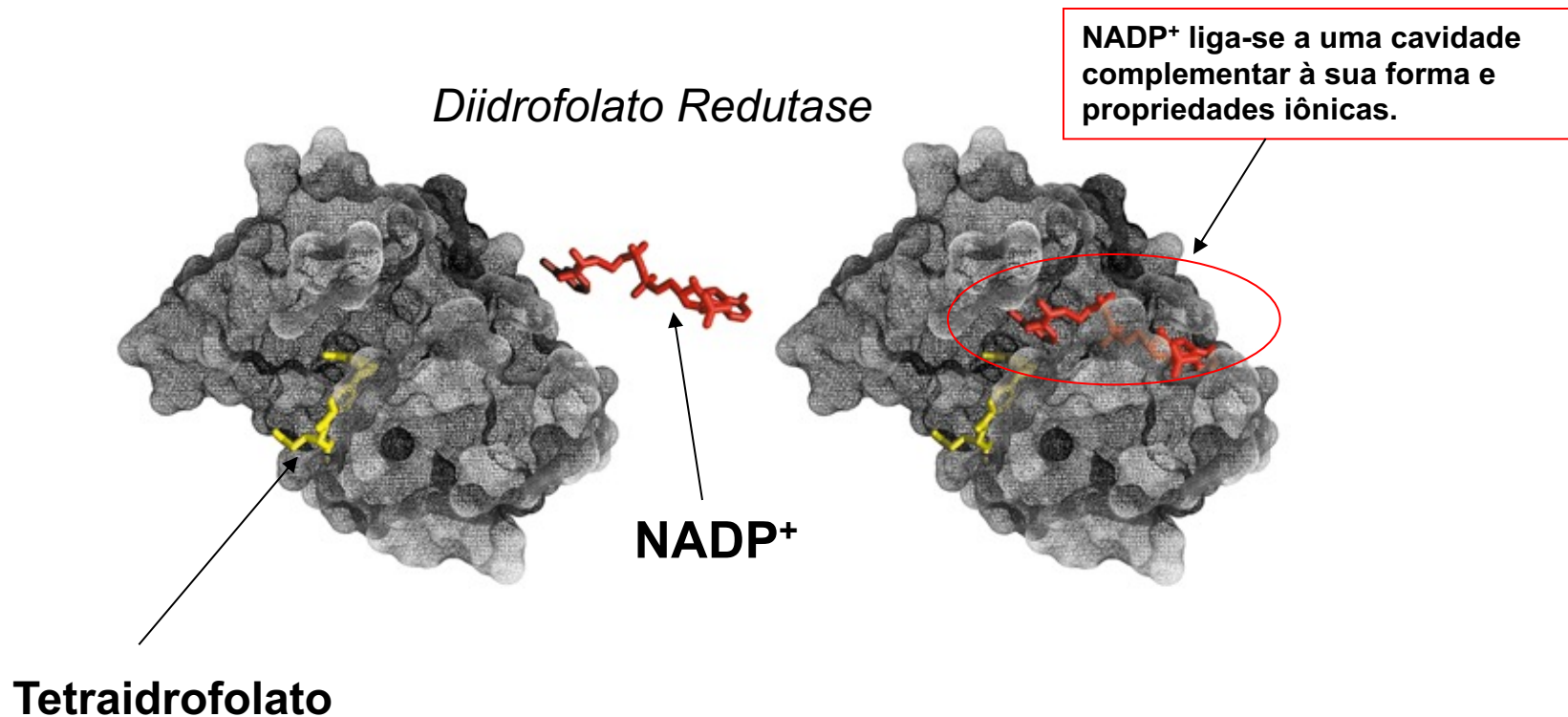
Enzimas aceleram a velocidade da reação diminuindo a energia de ativação

(A enzima não é gasta no processo e não afeta o ponto de equilíbrio)



“Complexo Enzima Substrato”

Formas complementares de um Substrato e seu Sítio Ativo (Chave-Fechadura, Emil Fischer)



Conceito chave-fechadura sugere um encaixe perfeito entre E e S.
O que resultaria numa enzima pouco eficiente!!

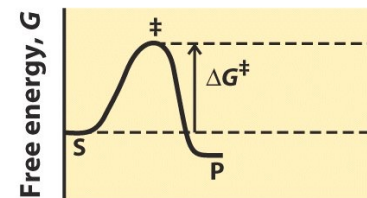
Enzima imaginária (“bastonase”) projetada para catalisar a quebra de um bastão de metal

Modelo Chave-Fechadura
A cavidade complementar ao substrato estabiliza-o mas não o quebra.

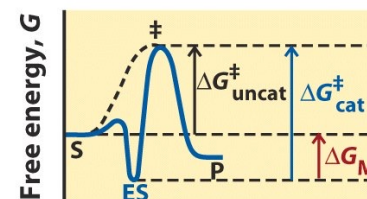
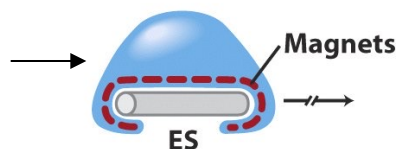
O substrato estabiliza o estado de transição do complexo ES, diminuindo a energia de ativação.

Algumas interações fracas são formadas no complexo ES, mas a totalidade das interações fracas é estabelecida apenas no estado de transição.

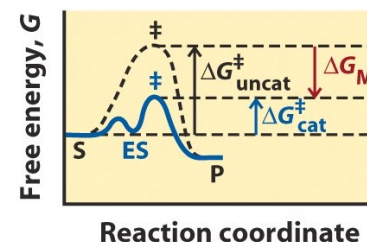
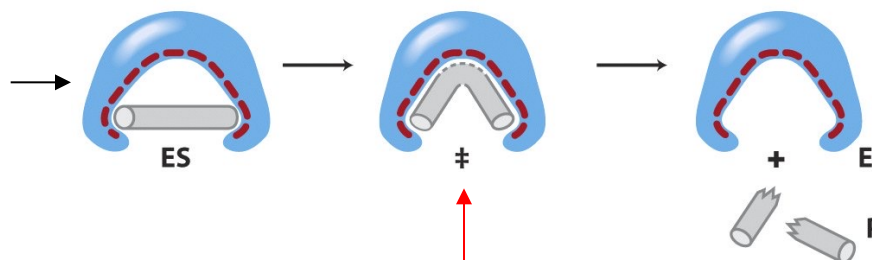
(a) No enzyme



(b) Enzyme complementary to substrate

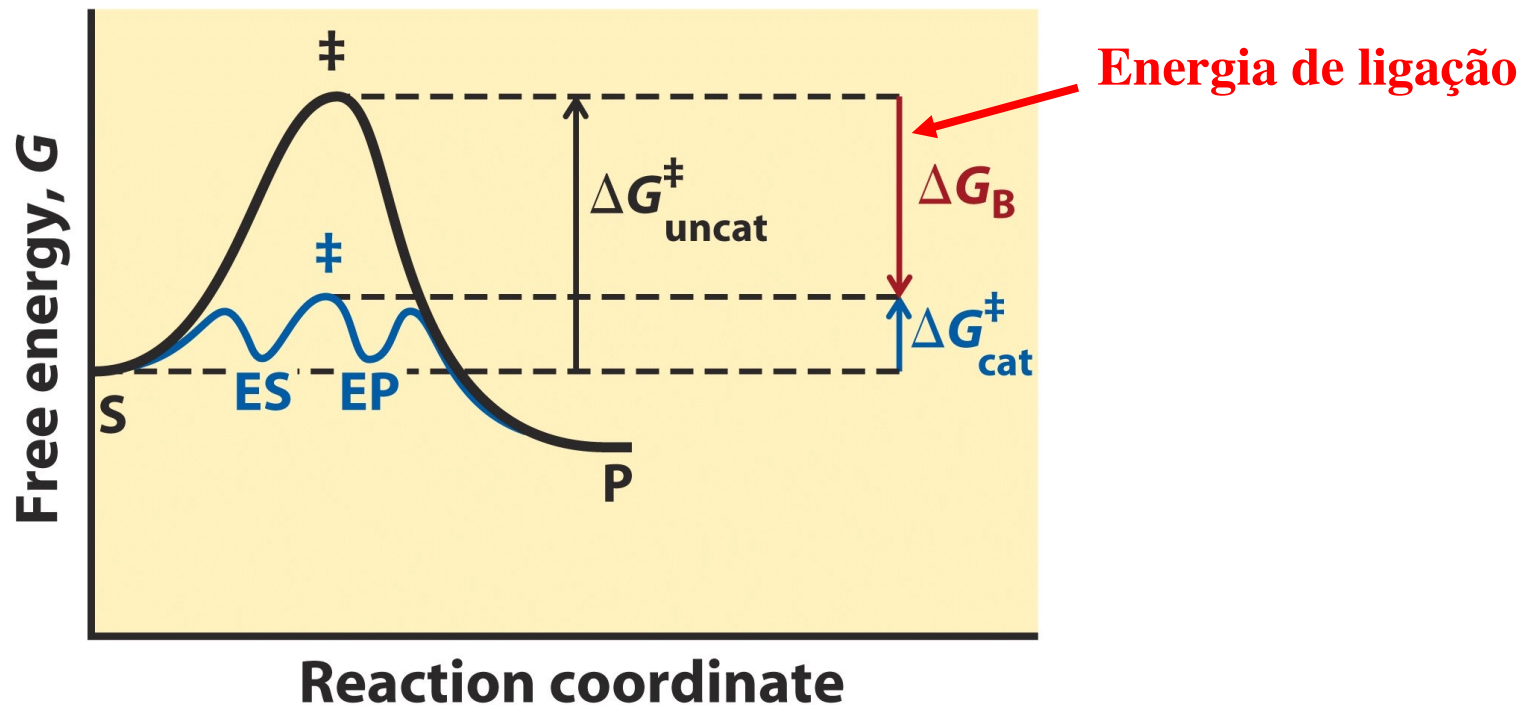


(c) Enzyme complementary to transition state



O papel da **energia de ligação** para a catálise

1. A energia de ligação confere especificidade e catálise.
2. $E + S \rightarrow ES$: As interações fracas formadas entre E e S fornecem a maior parte da energia necessária para a catálise.



3. Cinética Enzimática

“Estuda o mecanismo de reações catalisadas enzimaticamente através do estudo da **velocidade da reação enzimática** e como ela se altera em função de mudanças nos parâmetros experimentais”

1913: Teoria geral da ação das enzimas



Leonor Michaelis
1875–1949



Maud Menten
1879–1960

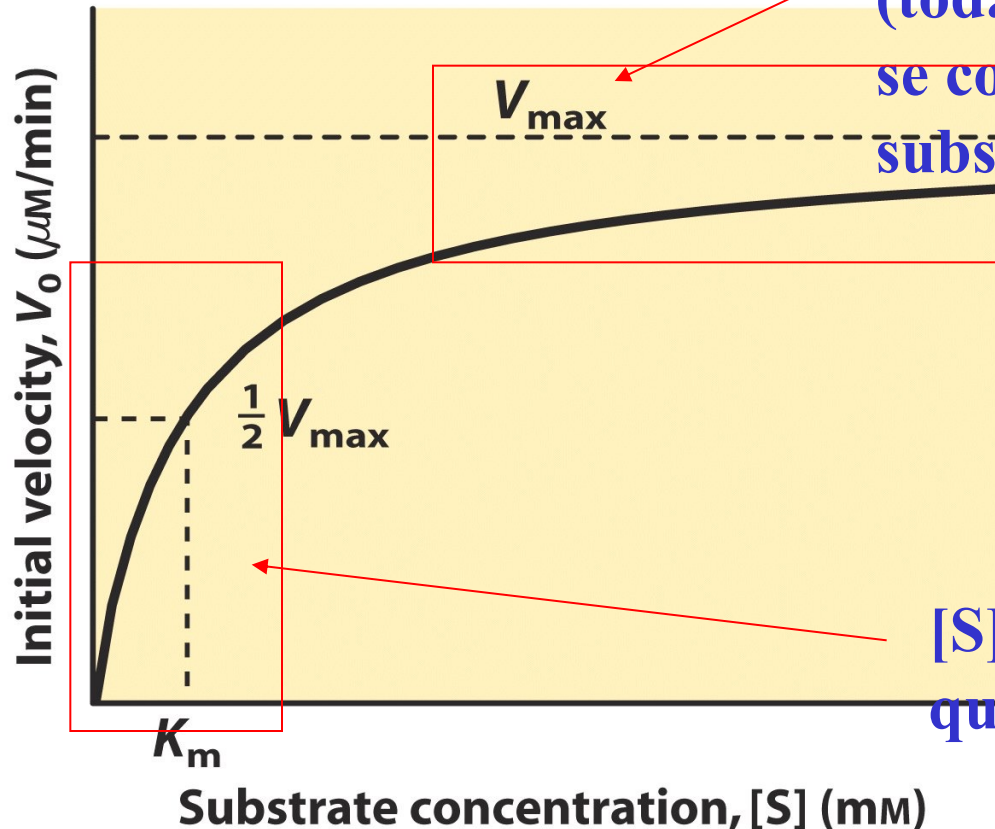


1. Inicialmente a enzima se combina reversivelmente com o substrato para formar o complexo ES, um passo relativamente **rápido**;
2. A seguir, o complexo ES se rompe liberando a enzima (E) e o produto (P) - uma etapa **lenta**. ETAPA LIMITANTE DA REAÇÃO!

A concentração do substrato afeta a velocidade das reações catalisadas enzimaticamente



Enzima está saturada com S
(todas as enzimas encontram-se complexadas com o substrato)



1. Velocidade Inicial (V_0) : velocidade no tempo inicial quando a $[S] \gg [E]$
2. Velocidade máxima (V_{max}) : ponto em que não ocorre variações em V_0 com o aumento da $[S]$.

$[S] \ll [E]$: Grande quantidade de enzimas livres.

Equação de Michaelis-Menten

Equação que relaciona [S] e a Vmax de forma quantitativa.

Michaelis-Menten derivaram a reação partindo da hipótese de que o passo limitante da reação é a quebra do complexo ES.



1. $E + S \rightleftharpoons ES$ reversível e relativamente rápida
2. $ES \rightleftharpoons E + P$, Quebra do complexo ES é LENTA!
3. Velocidade total é dependente da [ES]
4. Quando [S] ↓ a maioria de E está na forma livre
mas quando [S] ↑↑, a maioria de E está complexada
“Enzima está saturada”

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

Onde:

V_0 : velocidade no tempo inicial quando a $[S] \gg [E]$

$V_{\max}$: V máximo

[S]: concentração do substrato

K_m : constante de Michaelis

Significado do K_m

- $K_M = [S]$ quando $v_o = 1/2 V_{max}$.
- Em geral, quanto menor o K_M , mais forte é ligação do substrato pela enzima.
- K_M é usado como uma medida da afinidade da enzima pelo substrato

TABLE 6–6 K_m for Some Enzymes and Substrates

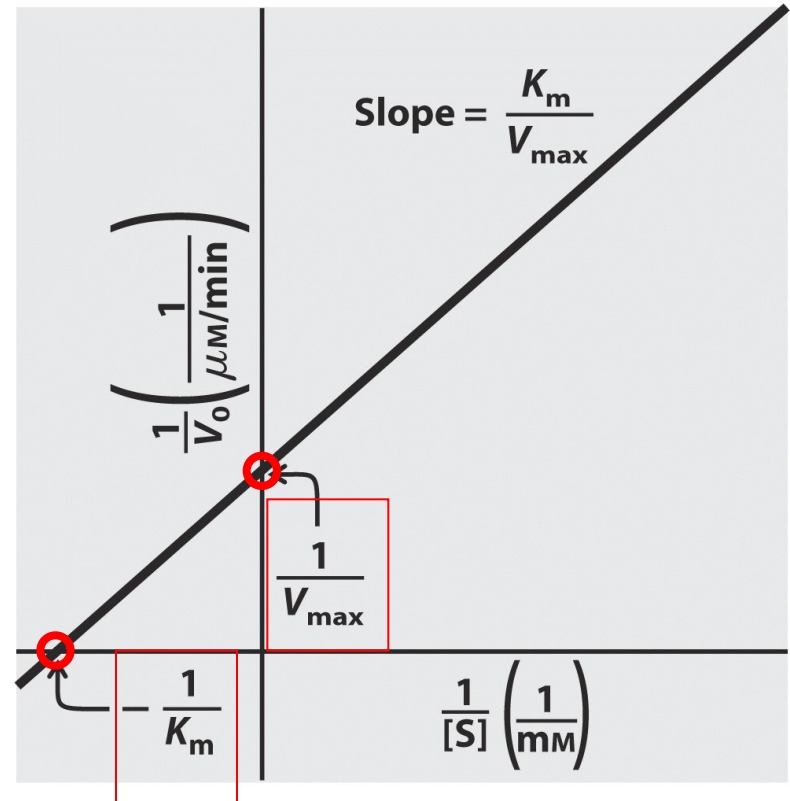
<i>Enzyme</i>	<i>Substrate</i>	K_m (mM)
Hexokinase (brain)	ATP	0.4
	D-Glucose	0.05
	D-Fructose	1.5
Carbonic anhydrase	HCO_3^-	26
Chymotrypsin	Glycyltyrosinylglycine	108
	N-Benzoyltyrosinamide	2.5
β -Galactosidase	D-Lactose	4.0
Threonine dehydratase	L-Threonine	5.0

Transformação da equação de Michaelis e Mentem

Gráfico do Duplo-Recíproco (Equação de Lineweaver- Burk)

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

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



Enzimas estão sujeitas à inibição

1. Importância Farmacêutica do estudo da inibição enzimática

Inibidores enzimáticos são agentes moleculares que interferem na catálise, diminuindo ou acelerando a velocidade da reação... esse é o mecanismo de ação da grande maioria de agentes farmacêuticos.

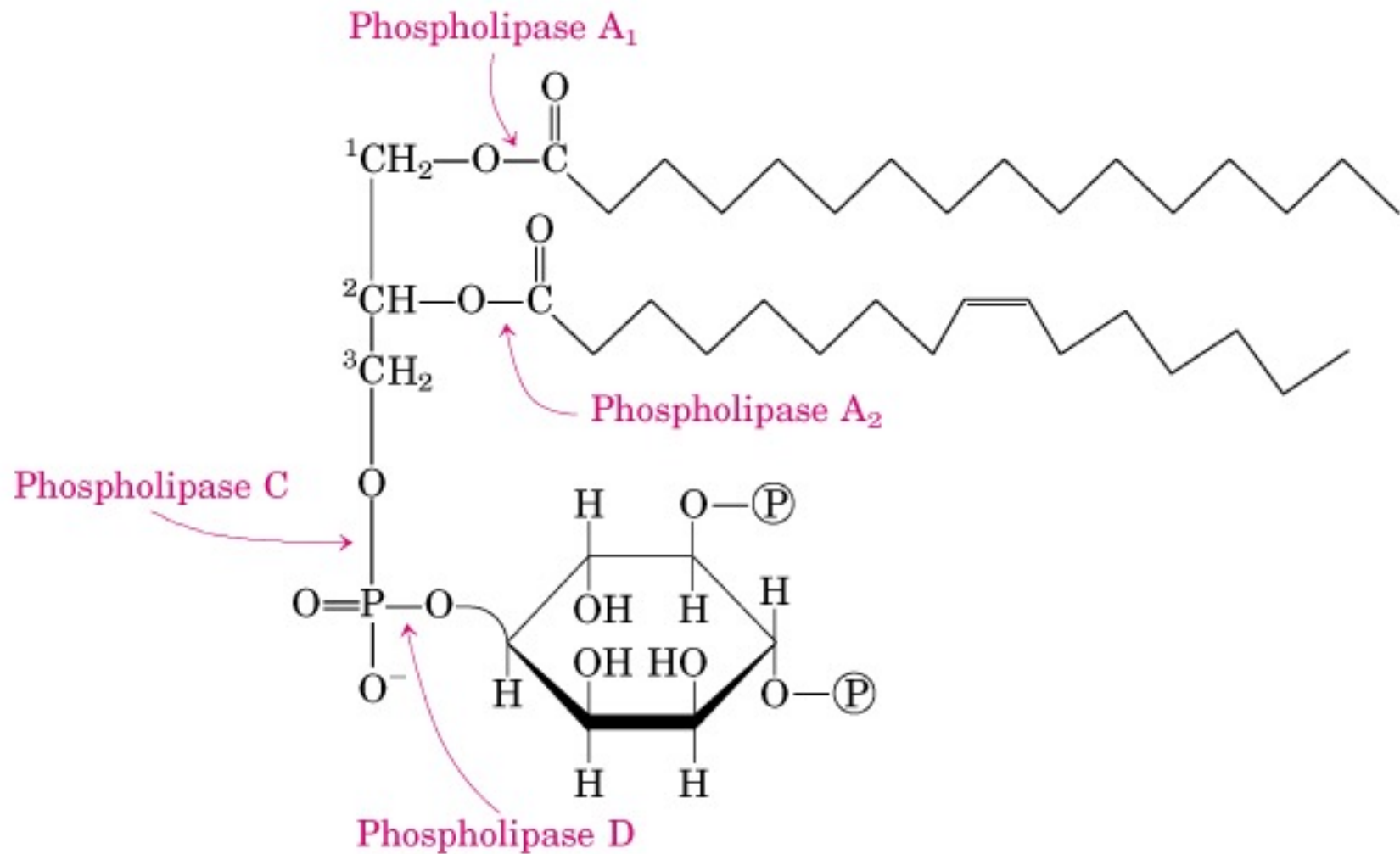
Ex. : Aspirina → Inibidor da síntese de Prostaglandinas → Antiinflamatório

2. Classificação:

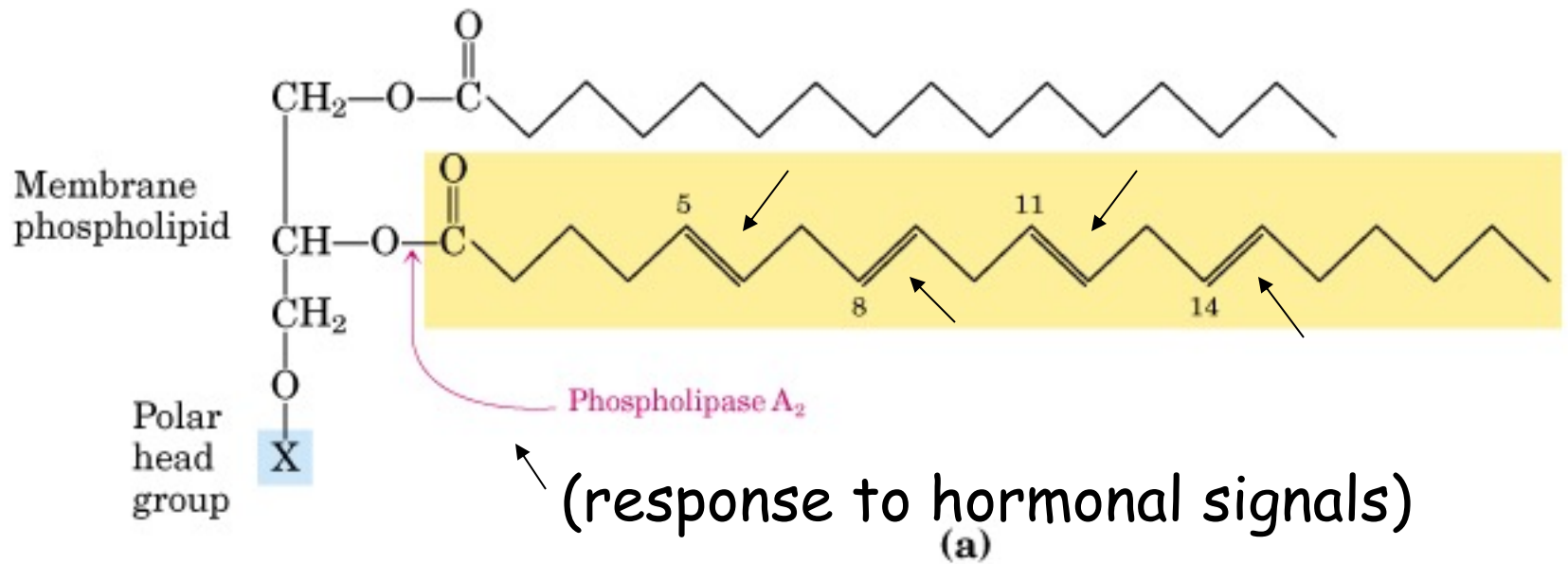
1) Inibição Reversível: { Inibição **Competitiva**
Inibição **Não-Competitiva**
Inibição Inconpetitiva
Inibição Mista

2) Inibição Irreversível

As especificidades das fosfolipases

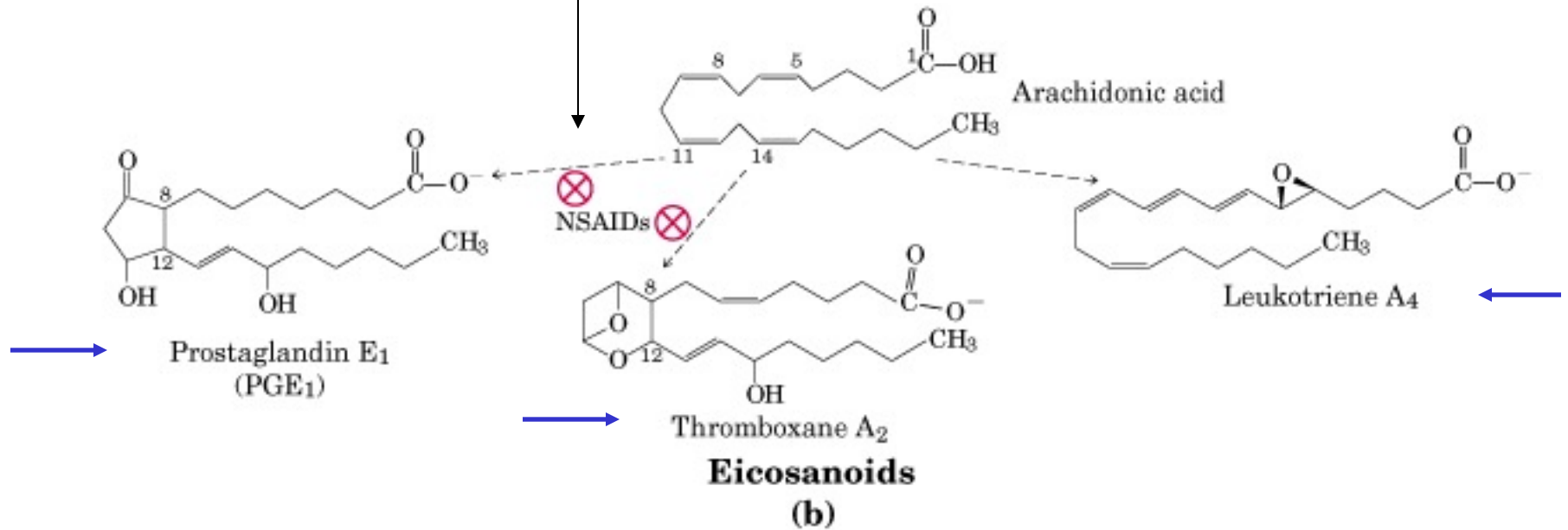


Arachidonic acid and some eicosanoid derivatives



Aspirin, acetaminophen,

Inhibiting the enzyme cyclooxygenase



Inibição competitiva

Substrate

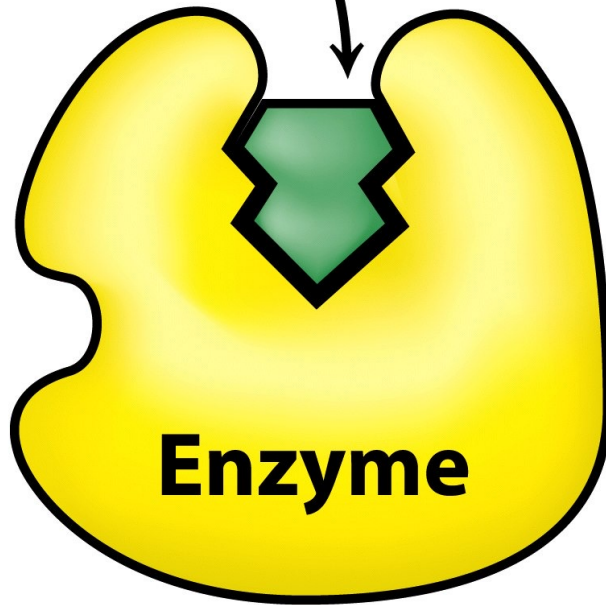


Figure 8-15a
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W.H. Freeman and Company

Competitive inhibitor

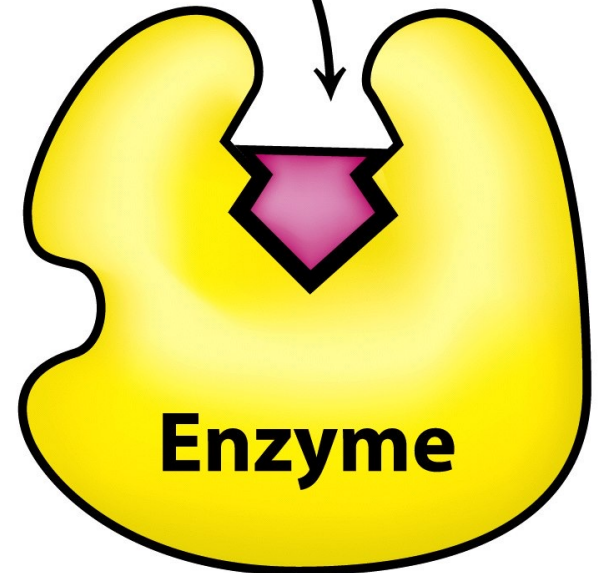
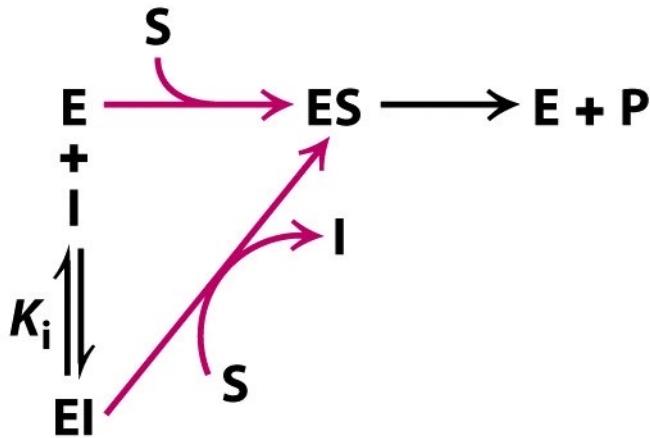


Figure 8-15b
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W.H. Freeman and Company

Inibição competitiva

(I liga-se somente a E)



K_i : constante de dissociação do inibidor

$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

Qto $< K_i$, mais potente é a inibição.

Cinética na presença de [I] cresce

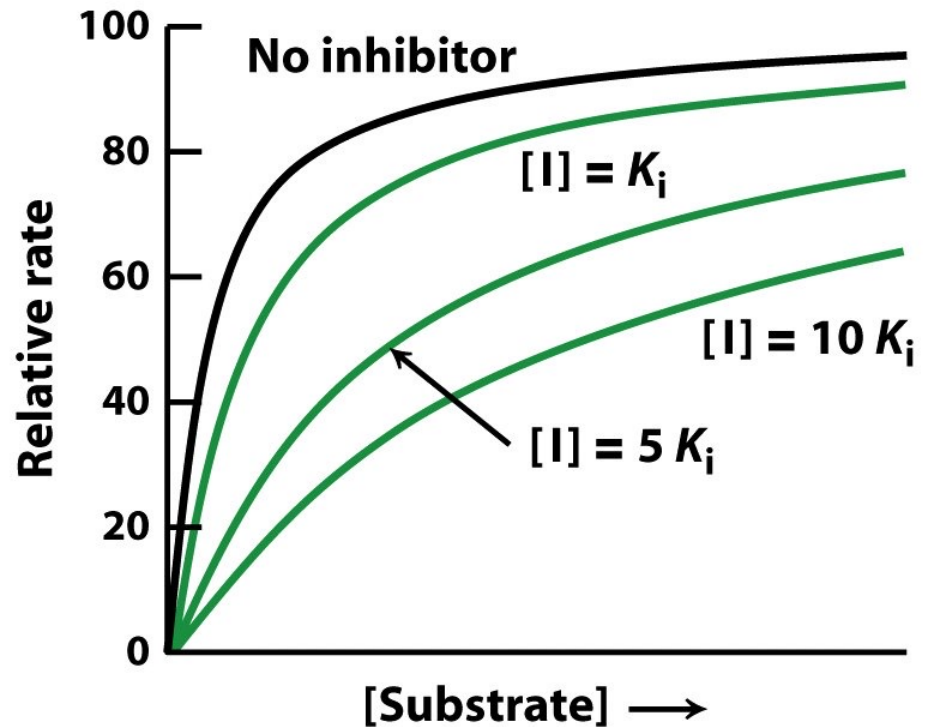


Figure 8-17
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

1. V_{max} → não se altera
2. K_m → aumenta

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M (1 + I/K_i)}{V_M} \times \frac{1}{S} + \frac{1}{V_M}$$

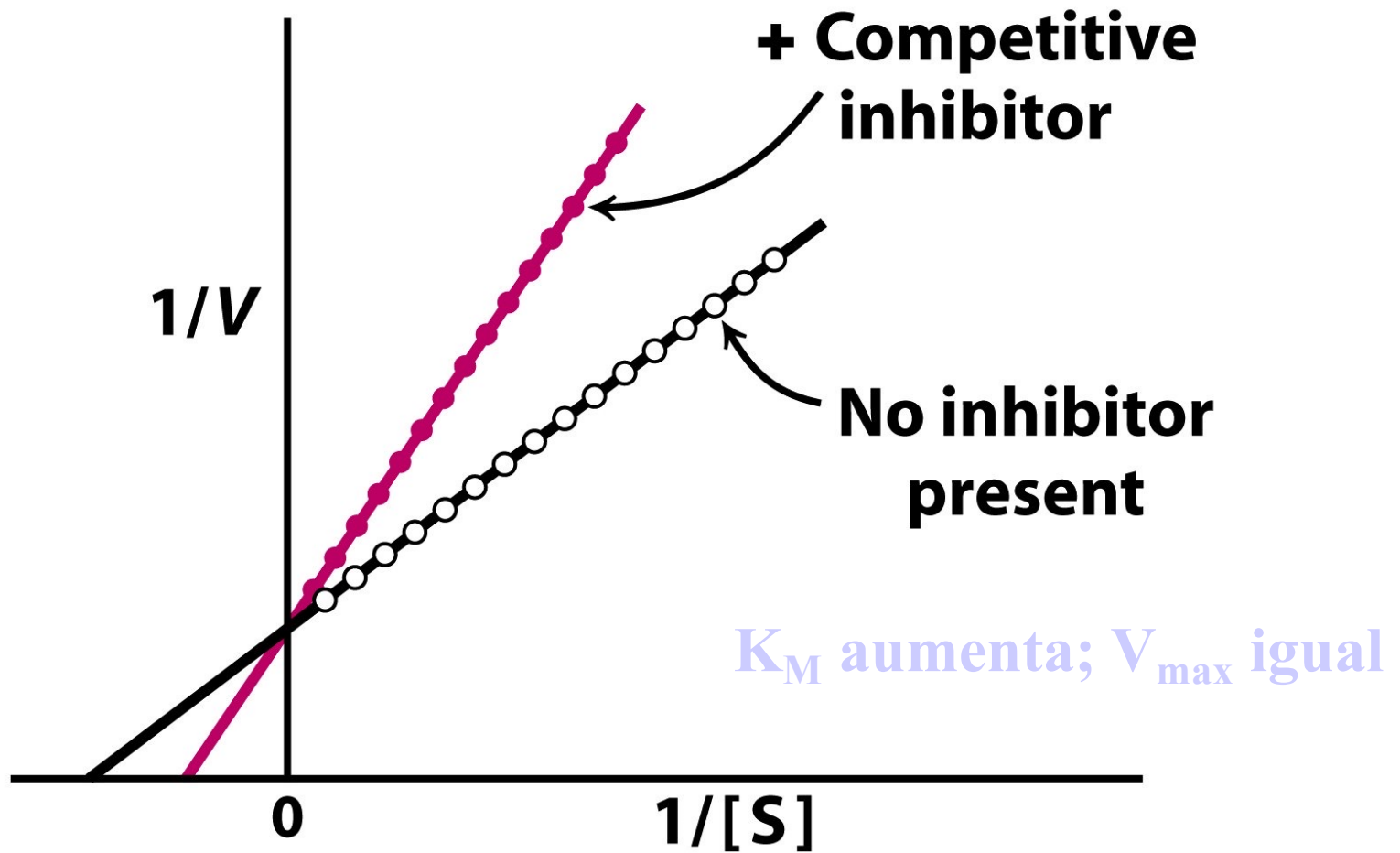
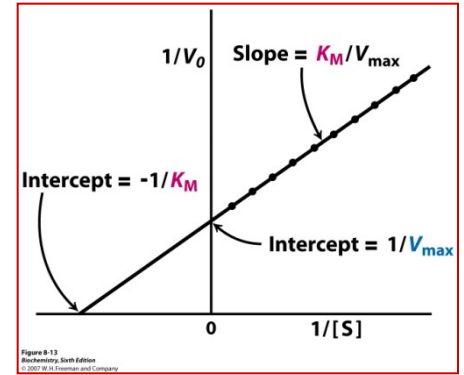


Figure 8-20
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

Inibição competitiva

Exemplo: Intoxicação por Metanol

Desidrogenase alcoólica converte metanol em formaldeído (tóxico!) que pode resultar em cegueira.

Tratamento: ETANOL

O etanol compete com o metanol pelo sítio ativo da enzima

Inibição Não-Competitiva

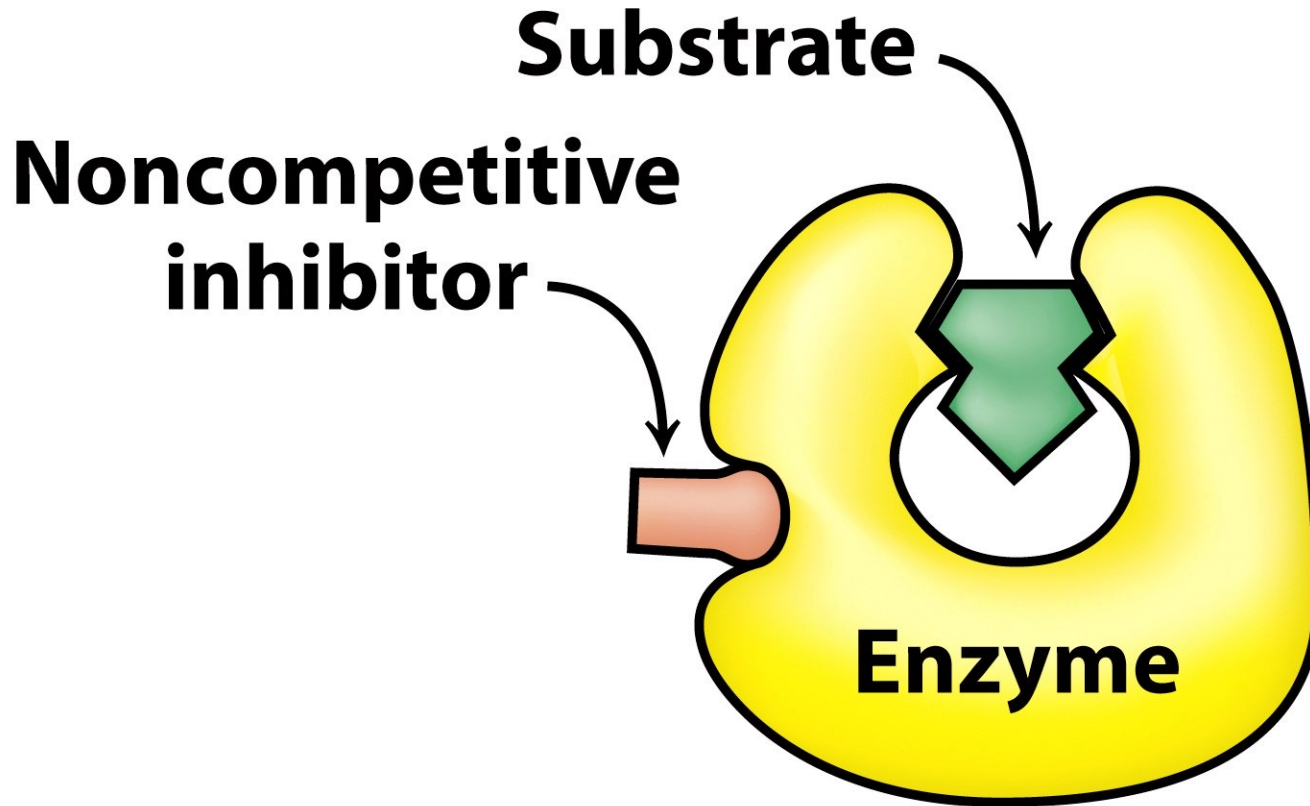
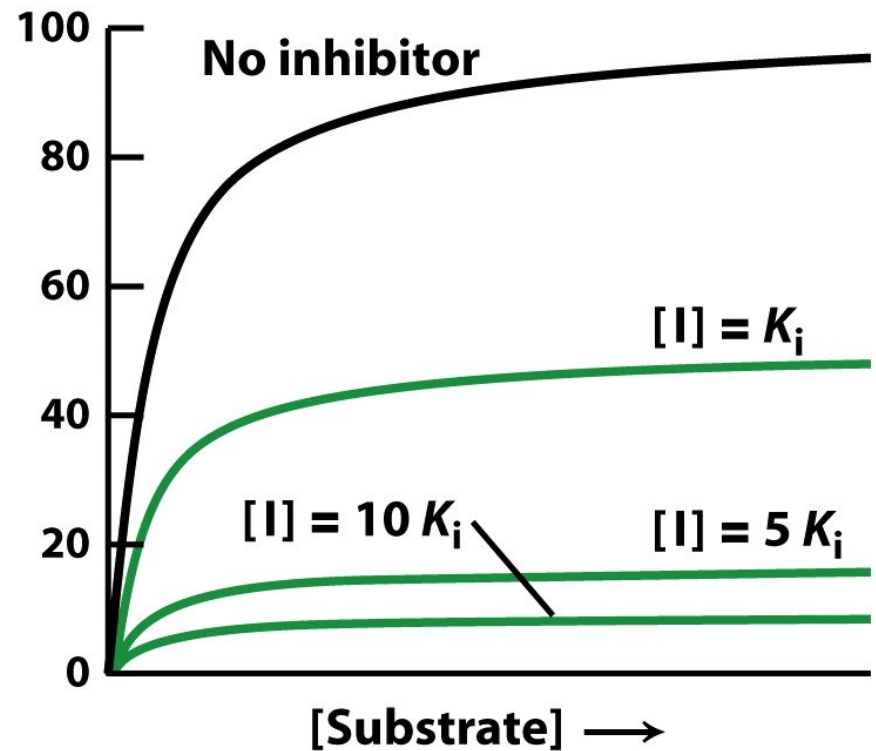
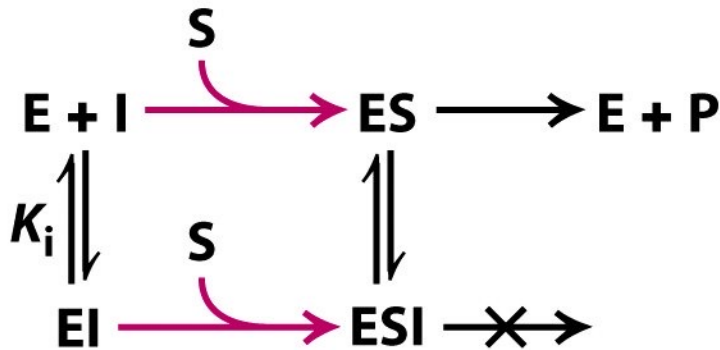


Figure 8-15d
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

Inibidor liga-se a enzima em um sítio diferente a do sítio ativo do substrato.

Inibição Não-Competitiva

(I liga-se a E ou ES)



8-19
nistry, Sixth Edition
W. H. Freeman and Company

1. $V_{max} \rightarrow$ diminui
2. $K_m \rightarrow$ não se altera

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_M / (1 + I/K_i)} \times \frac{1}{S} + \frac{1}{V_M / (1 + I/K_i)}$$

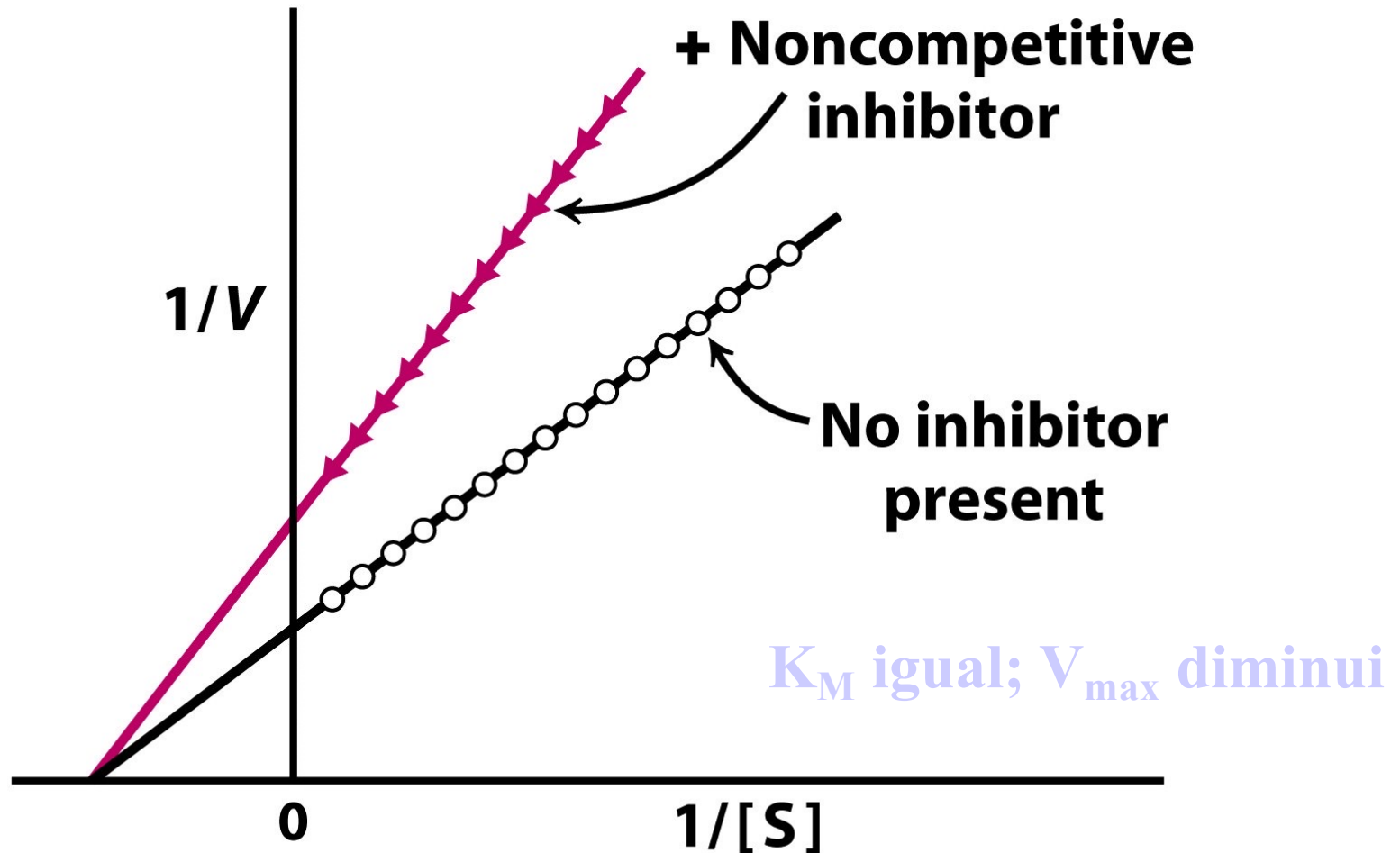
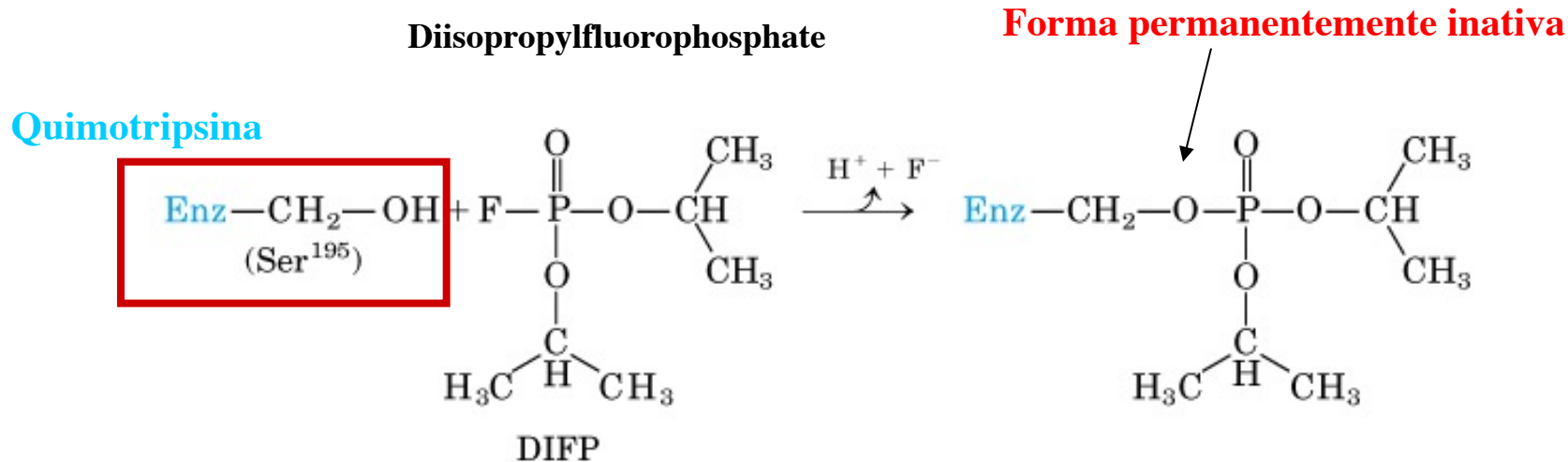


Figure 8-22
Biochemistry, Sixth Edition
 © 2007 W.H. Freeman and Company

Inibição Irreversível

Inibidores irreversíveis combinam-se com um grupo funcional na molécula da enzima ou o destroem ou ainda formam uma **associação covalente** bastante estável.

São úteis como ferramentas no estudo de mecanismo de reação, principalmente para a identificação de aminoácidos importantes para a catálise no sítio ativo.

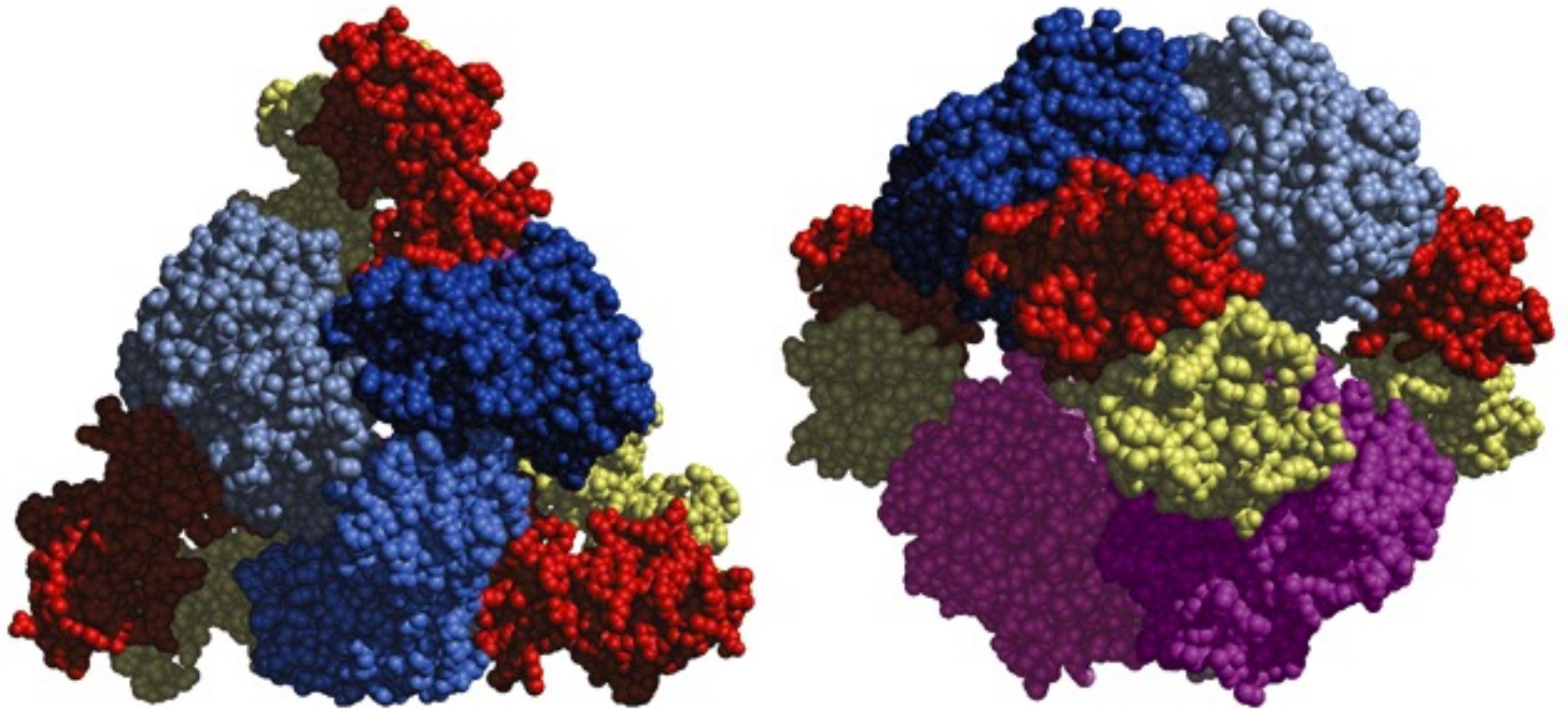


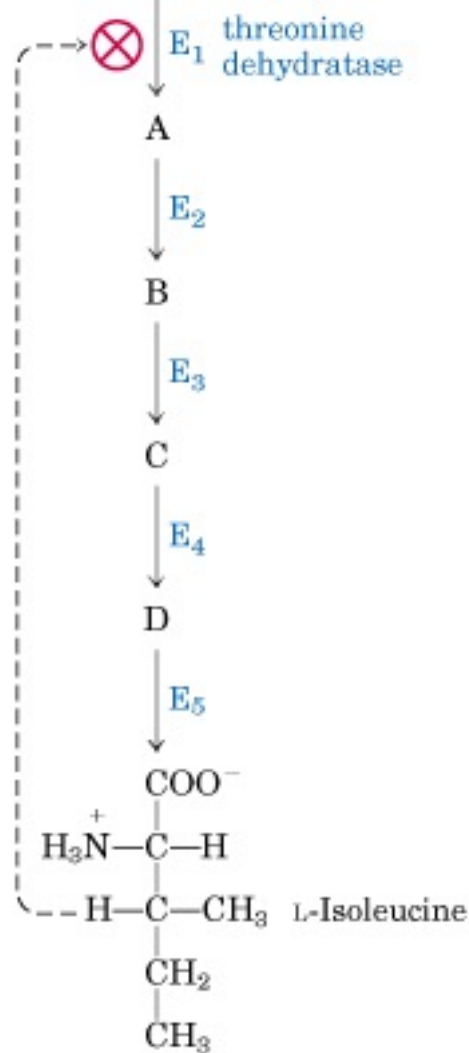
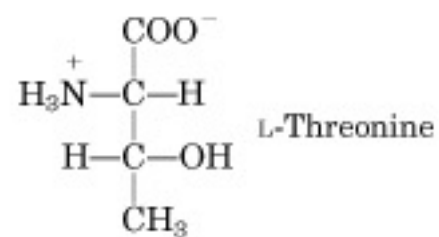
5. Enzimas Alostéricas

Enzimas reguladas pela ligação não-covalente de compostos reguladores chamados, moduladores alostéricos.

A regulação enzimática envolve alterações conformacionais similares a da Hemoglobina

Enzimas Regulatórias





5. Enzimas Alostéricas

São proteínas compostas de subunidades (Estrutura Quaternária) e exibe cooperatividade

Possuem sítios distintos de ligação:

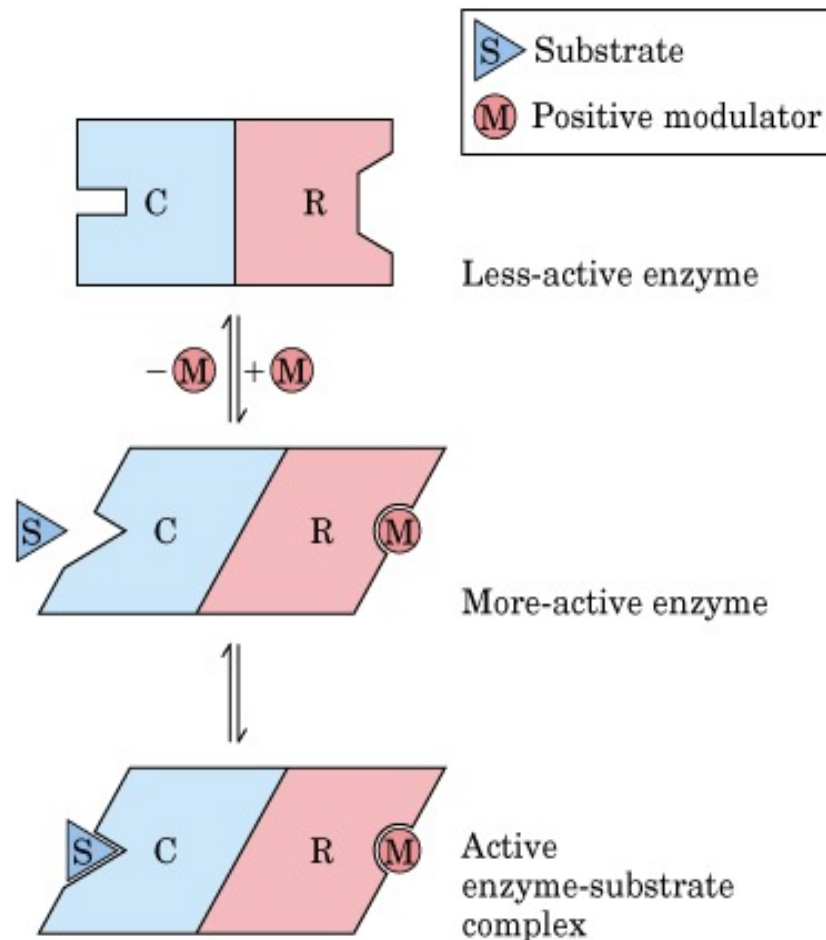
Sítio regulatório e sítio catalítico (ativo).

Sítio regulatório localiza-se em um sítio distinto do sítio ativo.

Esses sítios podem estar localizados em uma mesma subunidade ou em subunidades distintas.

5. Enzimas Alostéricas

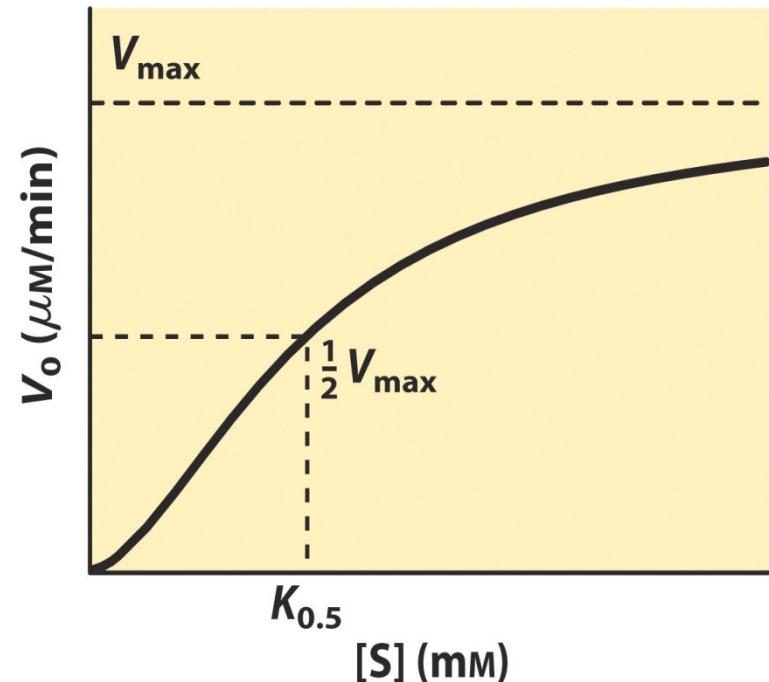
- Em muitas enzimas alostéricas o sítio de ligação do substrato e o(s) sítio(s) de ligação do substrato estão em subunidades diferentes.
- **O modulador pode ser Estimulatório ou Inibitório**
- Ligação do modulador causa **MUDANÇAS na CONFORMAÇÃO**.



5. Enzimas Alostéricas

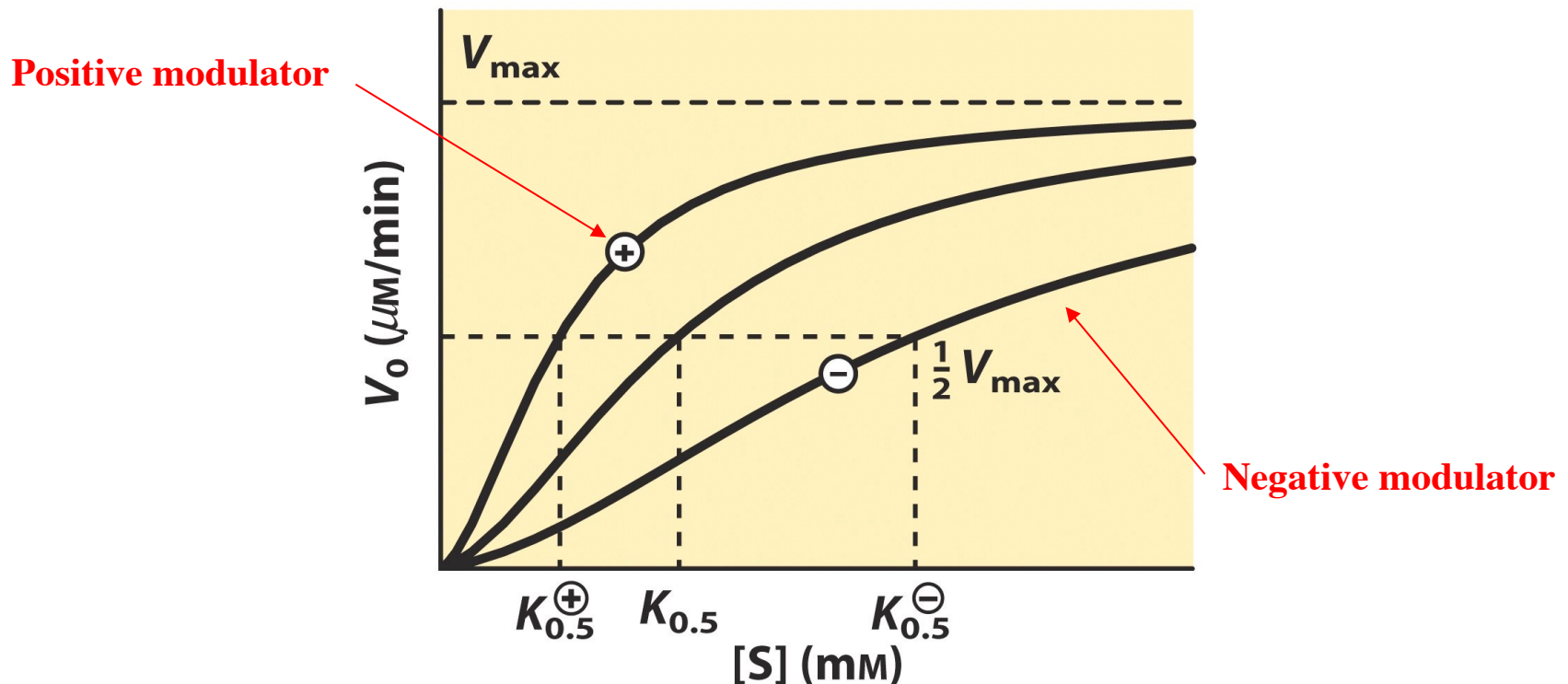
As propriedades cinéticas das enzimas alostéricas divergem do comportamento de Michaelis-Menten

1. As enzimas alostéricas apresentam relações entre V_o e S que diferem da cinética de Michaelis-Menten.
2. Curva sigmoidal em vez de hiperbólica.
3. Ao invés de K_m tem-se um $K_{0,5}$

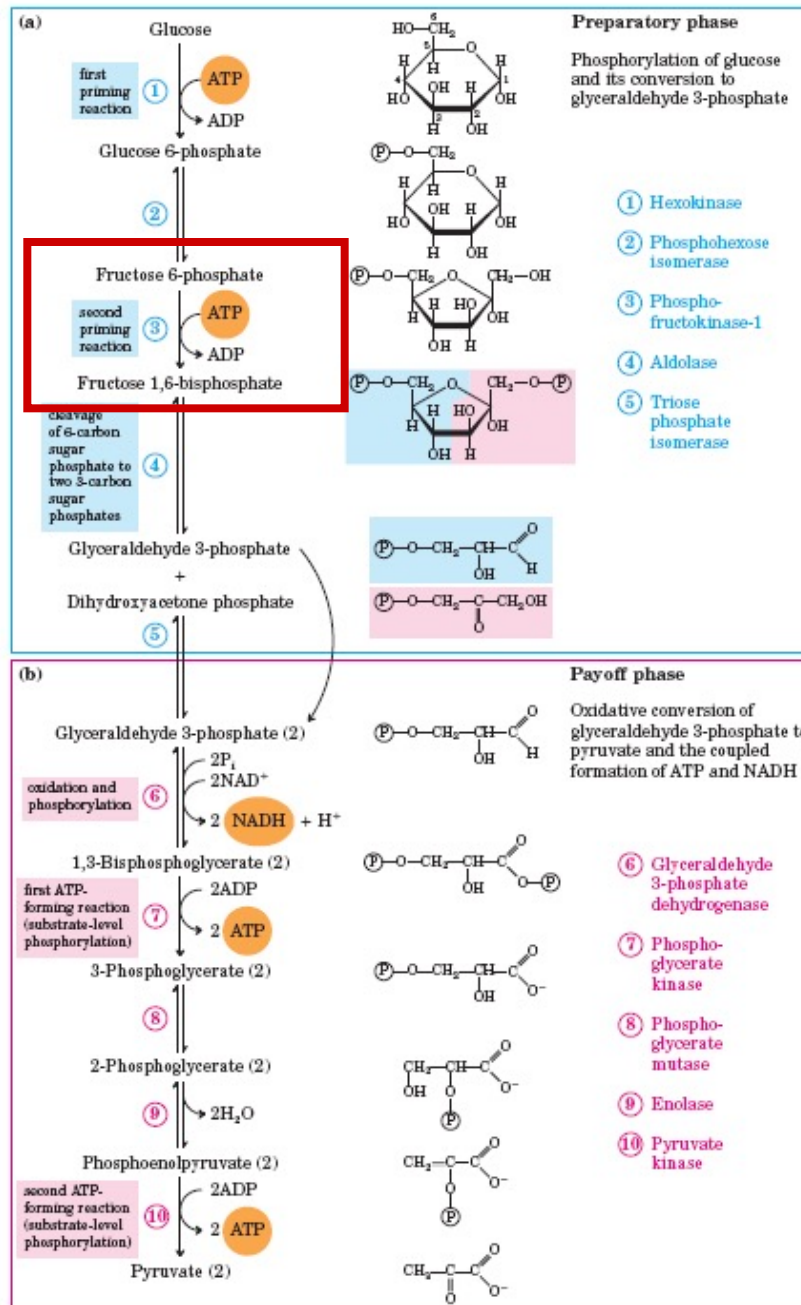


5. Enzimas Alostéricas

Efeitos de um modulador positivo e negativo sobre a enzima alostérica



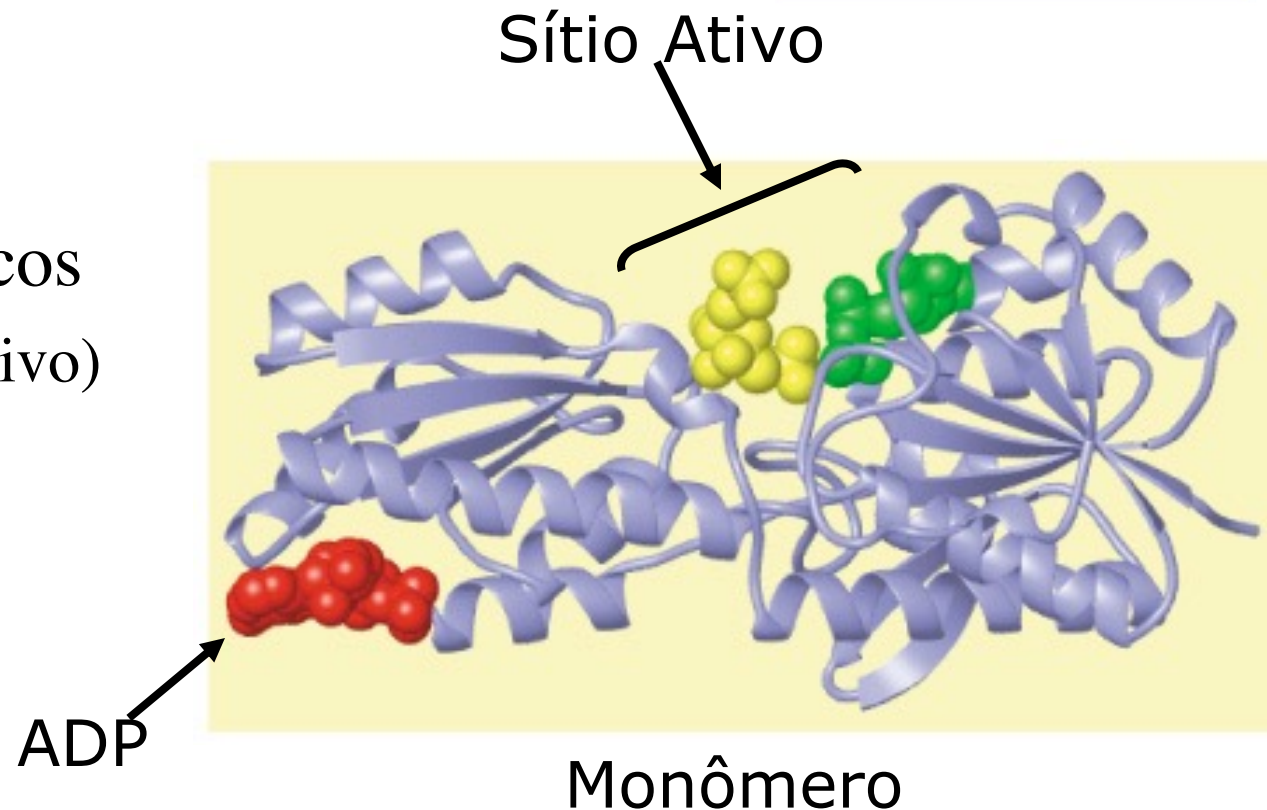
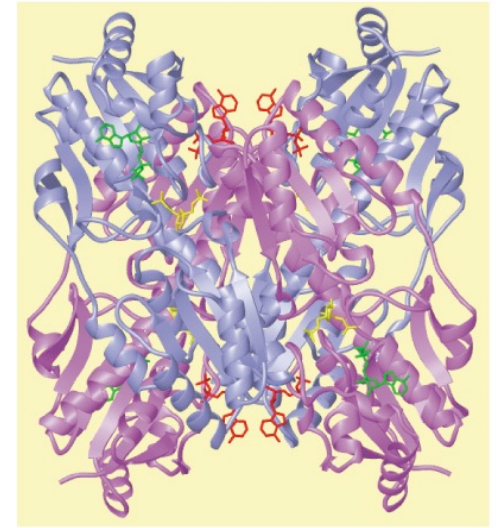
Glicólise



Exemplo de enzima alostérica

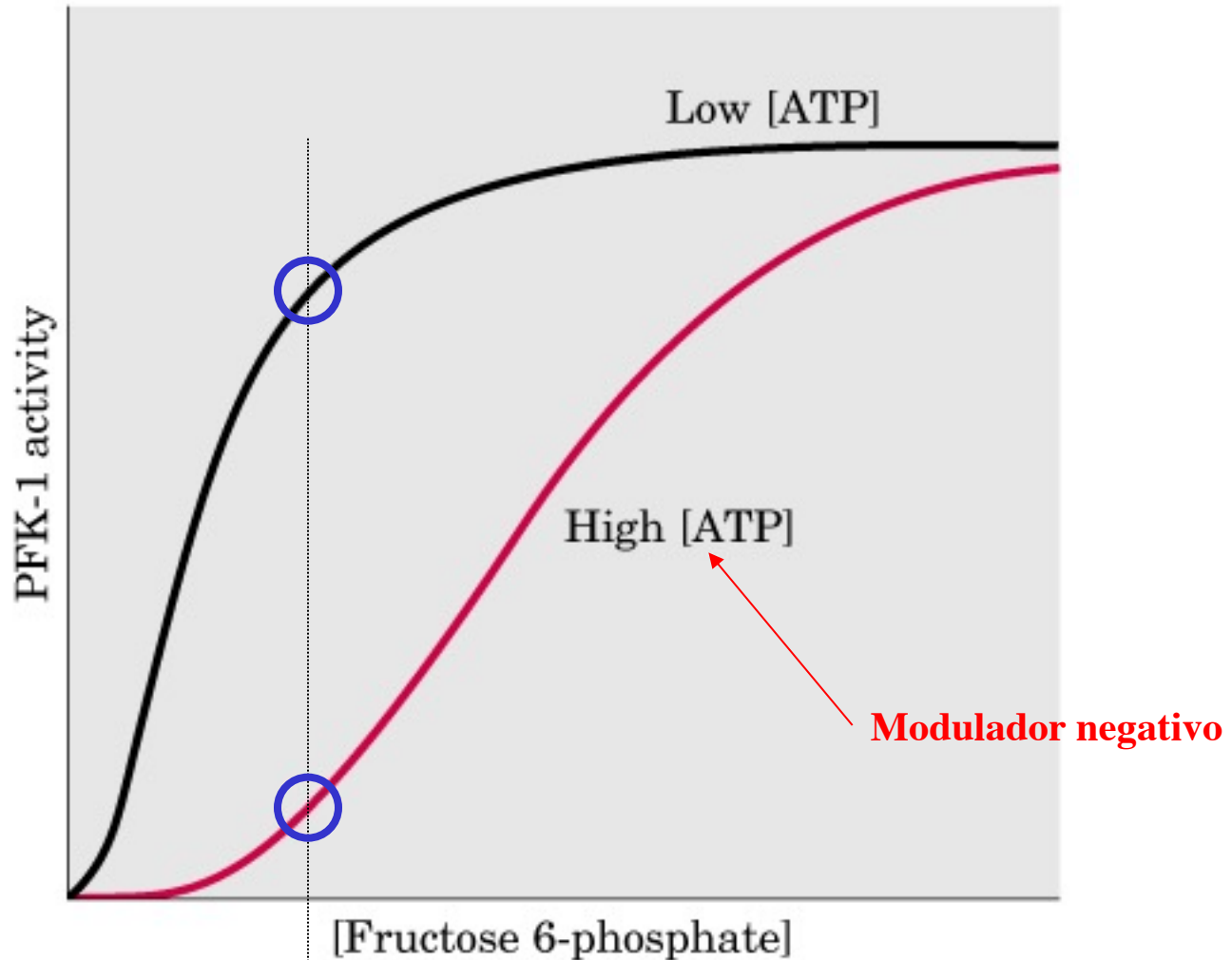
Fosfofrutoquinase

- Tetrâmero
- Substratos
 - F6P
 - ATP
- Efetores Alostéricos
 - PEP, ATP (negativo)
 - ADP (positivo)



5. Enzimas Alostéricas

Fosfofrutoquinase é regulada alostericamente por ATP

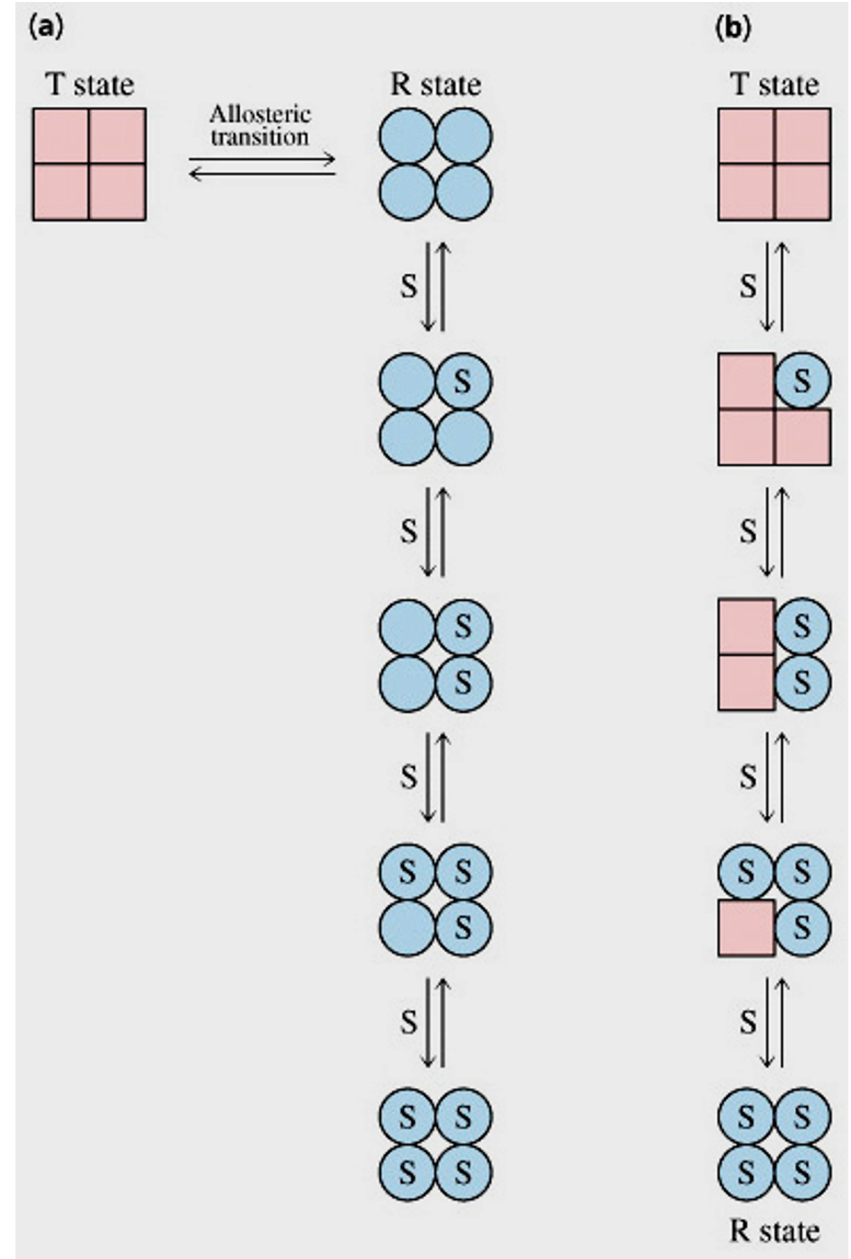


Regulação Alostérica

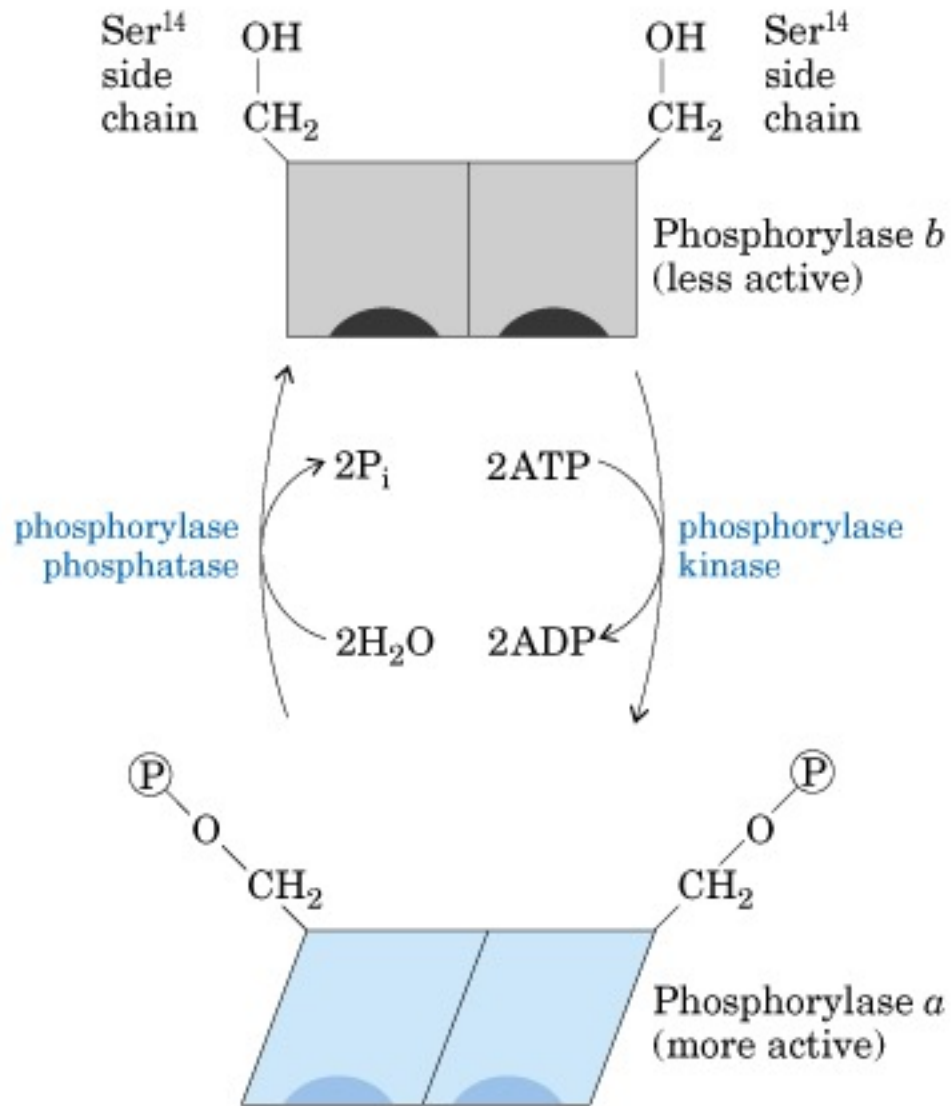
- Lembrar dos estados T e R da Hemoglobina
- Inibidores alostéricos favorecem o estado T (menor afinidade)
- Ativadores alostéricos favorecem o estado R (maior afinidade)

2 modelos de Cooperatividade

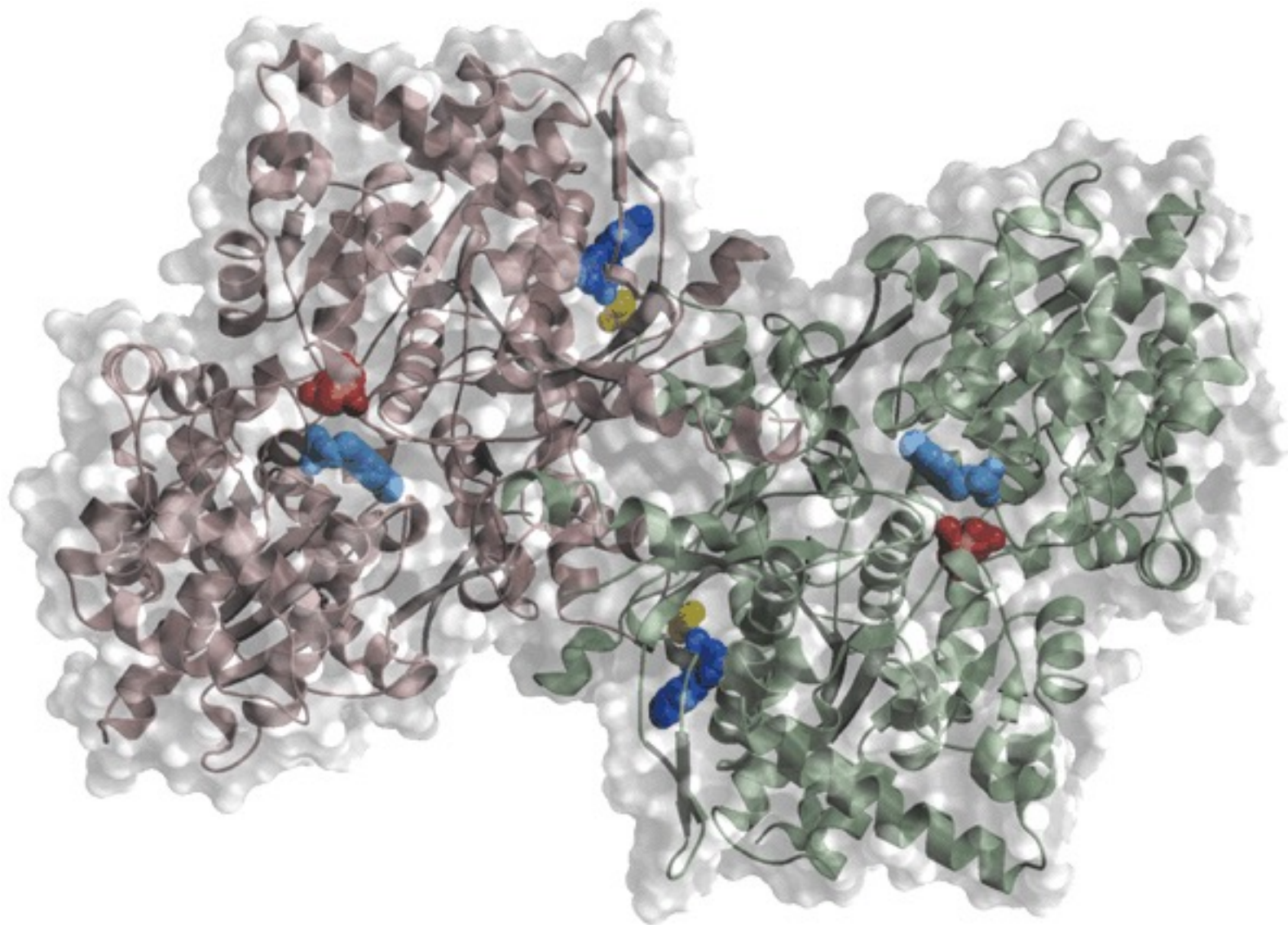
- Concerted
 - Symmetry driven- all R or All T. Substrate stabilizes R.
- Sequential
 - Ligand induced – neighboring unoccupied subunits are variably affected



Modificação Covalente



Glicogênio fosforilase



Atividade de uma enzima

Habilidade catalítica em converter S em P.

Medida: **Unidades de Atividade.**

$1U = 1 \mu\text{mole produto/min.}$

(em condições ótimas)

Atividade específica:
$$\frac{\text{atividade enzimática}}{\text{quantidade de enzimas}}$$

Expresso em: *unidades/mg proteína*