



Bioquímica Avançada

QBQ5751

Docentes ministrantes

Guilherme Menegon Arantes

Iolanda Midea Cuccovia

Maria Teresa Machini

Roberto Kopke Salinas

Sandro Roberto Marana

Sayuri Miyamoto

Shaker Chuck Farah

Walter Colli

Coordenação

Deborah Schechtman

Eduardo Moraes Rego Reis

Graziella Eliza Ronsein

Colaboração

Bayardo Baptista Torres

Departamento de Bioquímica

IQ - USP

2023

Calendário e Programa

Aulas: Quarta e Sextas-feiras das 14 às 17h

Local: sala A5 Queijinho

Março	8		Apresentação da disciplina	* sala 604, bloco 6	
	17	ED	Aminoácidos e Peptídeos	Maria. Teresa Machini	
	22	AE	Aminoácidos e Peptídeos	Maria. Teresa Machini	
	24	ED	Termodinâmica e Forças Intermoleculares	Guilherme Menegon Arantes	
	29	AE	Termodinâmica	Guilherme Menegon Arantes	
	31	AE	Forças Intermoleculares	Guilherme Menegon Arantes	
Abril	12	ED	Estrutura e Função de Proteínas	Shaker Chuck Farah	
	14	AE	Estrutura e Função de Proteínas	Shaker Chuck Farah	
	19	ED	<i>Folding</i> e Dinâmica de Proteínas	Roberto Kopke Salinas	
	26	E			
	28	Prova 1			
Maio	3	AE	<i>Folding</i> e Dinâmica de Proteínas	Roberto Kopke Salinas	
	5	ED	Enzimas e Cinética Enzimática	Sandro Roberto Marana	
	10	AE	Enzimas e Cinética Enzimática	Sandro Roberto Marana	
	12	E			
	17	Prova 2			
	19	AE	Lipídios	Sayuri Miyamoto	
	24	AE	Membranas	Iolanda Midea Cuccovia	
	26	AE	Carboidratos	Walter Colli	
	31	E			
Junho	2	Prova 3			

ED: Estudo Dirigido

AE: Aula Expositiva

E = Discussão de Exercícios

Aminoácidos e Peptídeos

Estudo Dirigido

Objetivos das aulas: Rever os fundamentos básicos de estrutura, propriedades, química e funções dos aminoácidos e peptídeos. Ampliar e aprofundar o conhecimento sobre estes grupos de biomoléculas. Introduzir noções sobre a pesquisa, a manufatura e as aplicações deles em diferentes áreas da saúde, alimentação e atividades humanas.

1. Escreva e observe a estrutura química geral de um α -aminoácido. A partir dela você consegue prever propriedades/características exibidas por este tipo de composto orgânico e apontar nela que elementos estruturais as determinam?
2. Reveja a nomenclatura/abreviações usadas para tais biomoléculas, aceita pela IUPAC e encontrada nos livros indicados para estudo (é essencial que através delas você reconheça os α -aminoácidos e os associe à classificação vigente). Aproveite e também reveja a classificação dos α -aminoácidos e cite aqui o critério usado para estabelecê-la.
3. Além dos α -aminoácidos, existem outros tipos de aminoácidos naturais? Cite exemplos e escreva suas estruturas químicas.
4. É sabido que os α -aminoácidos são os blocos construtivos de pelo menos dois tipos de biomoléculas com funções biológicas essenciais à vida. Quais? Tente se lembrar ou busque informações sobre outras “funções” atribuídas aos aminoácidos.
5. Existem α -aminoácidos denominados usuais e não usuais. Justifique e exemplifique.
6. Se você dispuser da estrutura química de um aminoácido ou da sua curva de titulação conseguirá prever o seu pI? Comente.
7. Que propriedade está sendo explorada quando se usa aminoácidos para fins de preparar soluções com capacidade de tamponamento? Explique.
8. Que propriedade está sendo explorada quando se consegue separar os aminoácidos Phe, Lys e Asp por eletroforese?
9. Que propriedade está sendo explorada quando se separa os aminoácidos Tyr de Trp por cromatografia em coluna de sílica, fazendo a detecção em 280 nm?
10. Os aminoácidos exibem grupos químicos que os possibilitam formar ligações peptídicas. Escreva as estruturas químicas de dois α -aminoácidos, indique em cada uma que grupos reagem entre si, indique a ligação peptídica e cite os produtos da reação.
11. Sob o ponto de vista estrutural defina octapeptídeo (1), oligopeptídeo (2) e polipeptídeo (3); comente sobre o grau de impacto que cada resíduo de aminoácido pode ter em funções exercidas por 1, 2 e 3.

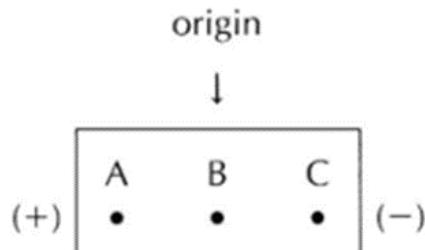
12. Apesar da maioria dos peptídeos bioativos apresentar peso moleculares muito superiores aos dos aminoácidos, essas biomoléculas têm em comum diversas propriedades. Liste-as e comente.
13. Indique alguns peptídeos citados em livros de Bioquímica e Biologia Molecular básicas, bem como as funções biológicas que eles exercem.
14. Que tipos de estrutura (níveis de organização estrutural) peptídeos contendo 15-23 resíduos de aminoácidos podem apresentar em solução aquosa? E se ele tiver na sequência um resíduo de Cys (C)? E se tiver várias Cys?
15. Assim como os aminoácidos, peptídeos podem ser separados de outras biomoléculas e de outros peptídeos por eletroforese? Justifique.
16. A insulina teve a sua estrutura determinada em pesquisa que deu a F. Sanger o Prêmio Nobel de Química de 1958. Um dos pontos-chave do trabalho foi ele ter incubado o peptídeo com 1-fluoro-2,4-dinitrobenzeno reativo para grupos α -amina terminais (ou N-terminais) e ter observado a formação de dois produtos coloridos posteriormente identificados como dinitrofenil-Gly e dinitrofenil-Phe. O que de ele concluiu a partir destes resultados?
17. Neste estudo dirigido se faz importante lembrar diferentes tipos de eletroforese, cromatografias em camada delgada e em coluna, métodos de preparação e modificação em laboratório, diferentes métodos espectroscópicos e espectrométricos, diferentes tipos de microscopia, simulações computacionais, modelagem e dinâmica molecular tem viabilizado o o estudo e a aplicação de aminoácidos, peptídeos e seus derivados.

Bibliografia:

- Amino acids, Cap. 4, Biochemistry, Voet & Voet, 3rd. Edition (2004) e capítulo correspondente em edições mais recentes.
- Covalent Structures of Proteins and Nucleic Acids, Cap. 7- item 7.1, Voet & Voet, 3rd. Edition (2004) e capítulo/item correspondente em edições mais recentes.
- Amino acids, Peptides and Proteins, Nelson & Cox, Cap. 3, Lehinger – Principles of Biochemistry, 4th. Edition (2005) e capítulo correspondente em edições mais recentes.
- D.J. Dietzen, Amino Acids, Peptides, and Proteins. In: Principles and Applications of Molecular Diagnostics, 2018, pp. 345-380. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816061-9.00013-8>

Exercícios

- Desenhe a curva de titulação com solução de KOH esperada da Arg ou R, indicando nela as diferentes regiões e estados de protonação dos grupos ionizáveis.
- Agora desenhe a estrutura química deste α -aminoácido em pH 8, indicando o estado de protonação dos grupos químicos ionizáveis.
- Em que faixas de pH uma solução de Ala ou A poderia ter ação tamponante? Em que valores de pH os tampões deste α -aminoácido teriam capacidade de resistir à adição de ácido e base? Justifique.
- Em quais dos seguintes valores de pH, a) pH 2; (b) pH 7; (c) pH 12, a Pro (P), o Asp (D) e a Lys (K) seriam separáveis por eletroforese?
- Considere os aminoácidos Cys (R=-CH₂-SH), Ile [R=-CH(CH₃)-CH₂-CH₃], Glu [R=-(CH₂)₂-COOH], Lys [R=-(CH₂)₄-NH₃⁺] e Thr [R=-CH-(CH₃)-OH], bem como os pKCOOH alfa=2,4, pKNH₃⁺= 9,2, pKRAsp= 3,6, pKRLys= 10,5; pKRArg= 12,5 e pKRCys = 8,7. Responda justificando:
 - quais deles apresentam grupos quimicamente reativos nas suas cadeias laterais e porque isso é importante?
 - qual(is) deles apresenta(m) mais de um estereoisômero e, portanto, é(são) opticamente ativo(s)? Por quê?
 - quando indicadas, o que as letras *l* e *d* e *D* e *L* informam sobre as características dos aminoácidos?
 - qual o valor e como se calcula o pI do ácido aspártico? Mostre todas as formas ionizáveis.
- Com base nas estruturas dos aminoácidos fornecidas, pede-se:
 - quais você conseguiria separar por diferença de polaridade? Explique.
 - indicar o seu comportamento eletroforético em pH 7;
 - se ele fosse acetilado no seu grupo amina α ele reagiria com ninidrina ou fenilisotiocianato?
- Os dipeptídeos Asp-Phe, Gly-Cys e Tyr-Lys são separados por eletroforese em pH 6,0, resultando no padrão mostrado abaixo. Identifique cada uma das manchas.



- Desenhe o gráfico de solubilidade em função do pH do meio para dois peptídeos hipotéticos A e B, sendo que A contém 8 resíduos de Glu (E), 2 Gly (G), 2 Lys (K); B contém

2 Glu (E), 2 Ala (A), 8 Lys (K). Com base no gráfico obtido, sugira um método para separar A de B.

9. Escreva a estrutura química do peptídeo Arg-Ile-Gly-Val, reconhecendo as ligações peptídicas nele presentes;

- b) calcule o seu pI, demonstrando os cálculos e estruturas ionizáveis, para prever o seu comportamento eletroforético em pH 7,4;
- c) se ele fosse esterificado na Val4, ele reagiria com ninidrina ou fenilisotiocianato para dosagem e sequenciamento?
- d) como seria o seu espectro de absorção de luz? Desenhe.
- e) como você interpretaria em termos de relação estrutura-atividade biológica o fato de seu análogo sintético Arg-Ile-Gly-Phe não ser ativo?

10. Qual é a sequência de um dipeptídeo para o qual foram feitas as seguintes afirmações:

- (a) Contém um aminoácido não hidroxilado que interrompe estrutura helicoidal
- (b) Produz um dinitrofenil-aminoácido óticamente inativo quando tratado com o reagente de Sanger (*aparece na pergunta 16 do estudo dirigido*).
- (c) Produz aminoácido considerado básico ao ser tratado rapidamente com carboxipeptidase.
- (d) Contém um grupo imidazol, mas não um tiol.
- (e) Pode ser clivado para produzir dois dipeptídeos, os quais em pH 4 migram para o catodo em eletroforese.

Interações Moleculares e Termodinâmica Bioquímica

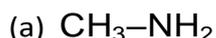
Estudo Dirigido

- Qual significado dos seguintes termos físicos e como eles estão relacionados?
(a) Calor (b) Temperatura (c) Energia (d) Entalpia (e) Entropia (f) Energia livre (g) Trabalho
- Qual objeto de estudo e qual a utilidade em processos bioquímicos dos seguintes termos? Descreva alguns exemplos.
(a) Termodinâmica (b) Cinética (c) Estrutura molecular
- E importante termos noções básicas de escalas de tamanho, energia e tempo relevantes em Bioquímica. Responda abaixo com um valor e unidade apropriada. Não é necessário saber um valor exato, apenas a ordem de grandeza.
 - Qual o tamanho de:
 - Uma molécula de água?
 - Uma proteína de ~100 aminoácidos globular enovelada?
 - Uma bicamada lipídica (sua grossura)?
 - Um ribossomo?
 - Uma bactéria *E. coli*?
 - Qual a energia livre necessária para:
 - Romper uma ligação de hidrogênio entre duas moléculas de água?
 - Desenovelar uma proteína de ~100 aminoácidos globular enovelada?
 - Sintetizar (estrutura primária) um peptídeo de 10 aminoácidos?
 - Romper uma ligação carbono-carbono (C-C) na molécula de etano CH₃-CH₃?
 - Quanto tempo leva para:
 - Vibrar uma ligação C-C?
 - Romper uma ligação de hidrogênio entre duas moléculas de água?
 - Formar uma α -hélice com ~20 aminoácidos?
 - Desenovelar uma proteína de ~100 aminoácidos globular enovelada?
 - Romper uma ligação C-C?
- Sobre um equilíbrio químico genérico $A \rightleftharpoons B$, responda:
 - O que este equilíbrio representa?
 - Qual sua relação com o mecanismo de uma transformação microscópica?
 - Como podemos calcular uma constante de equilíbrio? O que ela significa?

- (d) Como podemos medir uma constante de equilíbrio?
- (e) Como podemos calcular a velocidade da transformação do reagente A?
- (f) Como podemos medir a velocidade da transformação do reagente A?

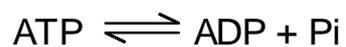
Exercícios

1. Esquematize uma possível geometria e sua curva de interação (energia x distância, R) para um dímero entre uma molécula de água e outra molécula de:



Indique qual(is) força(s) intermolecular(es) contribue(m) principalmente nas regiões em que $R < R_{eq}$, $R \sim R_{eq}$ e $R > R_{eq}$, onde R_{eq} é a distância de equilíbrio do dímero.

2. Desenhe a estrutura do NaCl no estado sólido e também no estado aquoso. Neste último, destaque suas interações com a água. Explique em termos energéticos ou termodinâmicos por que a rede cristalina do NaCl(s) é desfeita em água.
3. O que é efeito hidrofóbico? Qual o seu papel na manutenção da estrutura das proteínas ou de membranas biológicas? Explique termodinamicamente sua resposta.
4. ΔG° é característico de cada reação (desde que a temperatura seja constante) e não varia com as concentrações de reagentes e produtos. ΔG , por outro lado, pode assumir qualquer valor em função das concentrações iniciais de reagentes e produtos. Mostre por que estas afirmações são verdadeiras discutindo a expressão que relaciona ΔG° e ΔG .
5. Para a reação genérica $A \rightleftharpoons B$, $K_{eq} = 10^3$, responda:
- (a) Qual o valor de ΔG° ? No equilíbrio, as concentrações molares de A e B podem variar? Qual é o ΔG se, antes do equilíbrio ser atingido, as concentrações iniciais $[A]_{ini} \gg [B]_{ini}$?
- (b) Proponha uma condição na qual a reação inversa ($B \rightarrow A$) seja espontânea, sem alterar a temperatura ou pressão do meio. Mostre que a sua proposta é possível calculando o respectivo ΔG .
- (c) Se a constante de velocidade de primeira ordem, $k_1 = 10 \text{ s}^{-1}$, qual deve ser o valor da constante k_{-1} para a reação inversa? Calcule os valores de $\Delta G^\ddagger_{A \rightarrow B}$ e de $\Delta G^\ddagger_{B \rightarrow A}$.
6. Proponha uma condição em que a reação de formação de UDP-glicose a partir de UMP + glicose 1-fosfato dentro de uma célula seja espontânea através do acoplamento à reação



Utilize a tabela de energias livres de reações mostrada nos slides de aula.

7. Usando novamente a tabela de ΔG° mostrada nos slides de aula, calcule a energia livre de hidrólise de ADP, a partir apenas das energias de hidrólise de ATP e pirofosfato (PPi).

Estrutura e Função de Proteínas

Estudo Dirigido

1. Instalar um dos seguintes programas de gráfica molecular no seu computador: Pymol, Chimera ou ChimeraX. Assistir vídeos para aprender como utilizar os programas (ver o final deste arquivo para instruções e alguns links)
2. Baixar os arquivos de coordenados das estruturas de mioglobina humana (3RGK.pdb), desoxi-hemoglobina (2HHB.pdb) e oxi-hemoglobina (1HHO.pdb) providenciados na e-disciplinas ou diretamente do PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>)
3. Abrir os arquivos .pdb em Chimera ou Pymol. Aprender como colorir átomos, resíduos de aminoácidos, trechos de sequência específicos, cadeias, medir distâncias e representar estruturas secundárias (na forma de fitas *ribbons/cartoons*) e superfícies (ver o final deste arquivo para instruções e alguns links).
4. Analisar as estruturas de mioglobina, oxi-hemoglobina e desoxi-hemoglobina para identificar:
 - a) as alfa-hélices A-H das subunidades. Em uma destas hélices, identificar todas as pontes de hidrogênio entre os resíduos nas posições i e $i+4$.
 - b) os grupos heme e as histidinas proximais e distais
 - c) contatos que mantêm a estrutura quaternária na oxi-hemoglobina e desoxi-hemoglobina com referência às interações importantes mencionadas no capítulo sobre hemoglobina no livro texto BIOQUÍMICA (de Voet e Voet) ou FUNDAMENTOS DE BIOQUÍMICA (de Voet, Voet e Pratt).
 - d) os aminoácidos com carga positiva que compõem o sítio de ligação do 2,3-BPG. Você pode encontrar o arquivo pdb no Protein Data Bank da hemoglobina em complexo com 2,3-BPG.
 - e) Escolher uma outra proteína de seu interesse com estrutura depositada no Protein Data Bank, para fazer uma análise similar.
5. Delimitar todos os efetores alostéricos da hemoglobina e seus sítios de ligação
6. Ler o artigo de Goodey e Benkovic (doi:10.1038/nchembio.98) sobre a relação entre a dinâmica proteica e alosteria (até o primeiro parágrafo da página 479).
7. Ler os artigos de Changeaux (10.1146/annurev-biophys-050511-102222) e de Cornish-Bowden (doi:10.1111/febs.12469), prestando atenção aos sucessos e fracassos dos modelos MWC e KNF em explicar cooperatividade e alosteria em diferentes proteínas.

8. Definir alosteria e cooperatividade e descrever a relação entre os dois conceitos/fenômenos.

9. Comparar as semelhanças e diferenças entre os conceitos de "*induced fit*" e "*conformational selection*".

Para obterem o programa PYMOL, por favor, sigam o procedimento descrito abaixo:

- 1) acesse <https://pymol.org/edu/?q=educational/>
- 2) adicionar dados para uso não comercial
- 3) você receberá login e senha para fazer o download

Para obterem o programa Chimera e/ou ChimeraX, por favor, sigam as instruções nos seguintes sites:

<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/download.html>

<https://www.cgl.ucsf.edu/chimerax/>

Bibliografia

Tutorial sobre uso de Pymol (interface gráfica molecular)

<https://www.youtube.com/watch?v=lhiQGLGfbG4>

Mais um tutorial sobre Pymol

<https://www.youtube.com/watch?v=jISFbpywbw>

Página de tutoriais do site do Pymol (mais avançado)

<https://pymolwiki.org/index.php/Category:Tutorials>

Páginas de tutoriais de UCSF Chimera ou ChimeraX (mais avançado)

<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/docs/UsersGuide/frameut.html>

<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/videodoc/videodoc.html>

ou <https://www.cgl.ucsf.edu/chimerax/tutorials.html>

<https://www.cgl.ucsf.edu/chimerax/docs/videos/>

Outros vídeos uteis sobre Chimera:

<https://www.youtube.com/watch?v=eLxhKc7Ljjk>

<https://www.youtube.com/watch?v=ZICQW3LBdpw>

“Folding” e dinâmica de proteínas

Estudo Dirigido

- 1) O que é entalpia?
- 2) O que é entropia?
- 3) O que diz a lei de distribuição de Boltzmann?
- 4) O que significa o termo “random coil” aplicado a proteínas?
- 5) Qual é a hipótese termodinâmica de Anfinsen?
- 6) Qual é o paradoxo de Levinthal?
- 7) O que é o mecanismo de nucleação-condensação?
- 8) O que é o funil de enovelamento?
- 9) Como chaperonas auxiliam o enovelamento de proteínas *in vivo*?
- 10) Predição de estruturas de proteínas a partir da sequência de amino ácidos
- 11) Quais são os graus de liberdade de um polipeptídeo?
- 12) Primeiras evidências de que proteínas são flexíveis
- 13) Tipos de movimento e técnicas experimentais para estudá-los
- 14) A dinâmica é importante para a função biológica de uma proteína?
- 15) Boa parte do genoma codifica para proteínas intrinsecamente desordenadas (IDPs)
- 16) Como descrever a estrutura de proteínas que não possuem estrutura definida?
- 17) Como proteínas interagem umas com as outras: modelo de seleção de confôrmeros vs. “induced-fit”
- 18) O que são transições de fase líquido-líquido?
- 19) O que são condensados ou organelas sem membrana?

Exercícios

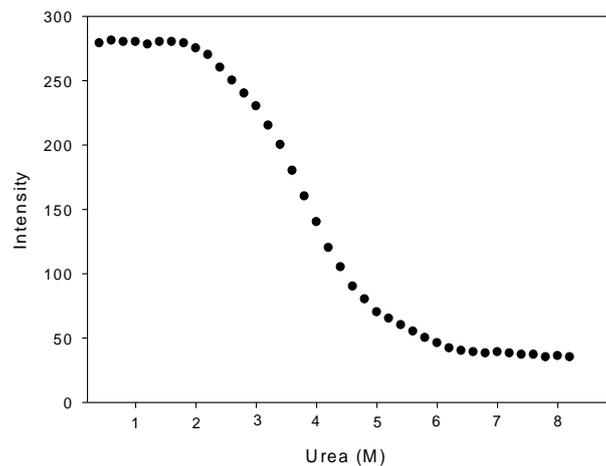
- 1) Use o Google ColabFold (Mirdita et al. 2022 “ColabFold: Making protein folding accessible to all”. Nat. Methods 19: 679-682. Doi: 10.1038/s41592-022-01488-1) para fazer um modelo para a estrutura tridimensional da proteína VirB9 cuja sequência de amino ácidos é:

```
MKLFNRYSVALLSALPLALCALSAQAQVQVEYAYAPDRIYQVRTGLGITTQVELSPNEKILDYSTGFTGG
WELTRRENVFYLPKPNVDVTNMMIRTATHSYILELKVVDWQRLQAKQAGVQYKVVFTYPKDTSFNN
VADADTSKNGPLLNAKILKDRRYDYDYATRTRKKSRLIPSRVYDDGKFTYINMDLTRFPTGNFPVAFAR
EKEHAEDFLVNTTVEGNTLIVHGTYPFLVVRHGDNVVGLRRNKQK
```

Responda:

- a) Quantos domínios foram preditos?
- b) Qual é o *folding* de cada domínio?
- c) O que é possível dizer sobre a orientação relativa entre os domínios?
- d) A predição é consistente com estruturas experimentais (PDB 2N01 e 6GYB)?

- 2) Estudos de desnaturação de proteínas são úteis na elucidação da estrutura e das interações que a estabilizam. O gráfico abaixo registra o desenovelamento de uma proteína pela adição de concentrações crescentes de ureia.



A estabilidade da proteína calculada a partir deste experimento é $\Delta G = 0.58$ kcal/mol.

Responda:

- Por que é importante que o processo de desenovelamento que seja reversível?
 - Como você poderia utilizar medidas de fluorescência do triptofano para acompanhar o processo de desnaturação de uma proteína pela adição de ureia? Explique como você calcularia as populações do estado enovelado e desenovelado em função da concentração de ureia.
 - Suponha que foi introduzida uma mutação pontual que aumente a estabilidade da proteína. Desenhe na figura acima, o gráfico de desnaturação da proteína mutante.
- 3) Utilizando um programa de visualização (USCF Chimera, Pymol, VMD, Rasmol, etc) inspecione as estruturas PDB ID 1RCP e 1TNF. Analise a topologia, e procure identificar o “folding” de cada estrutura.
- 4) O processo de enovelamento de proteínas pode ser descrito considerando-se que a superfície de energia livre da molécula assemelha-se a um funil em que o estado nativo corresponde ao poço de menor energia. Se fizermos um gráfico da seção transversal do funil, a coordenada horizontal representará um ângulo diedral caracterizando a conformação da cadeia polipeptídica, enquanto que a coordenada vertical representará a energia livre interna da cadeia. Responda:
- Por que o funil é mais largo na parte de cima, do que na parte de baixo?
 - Esquematize em um mesmo gráfico a seção transversal do funil para uma proteína bem enovelada, e para uma proteína intrinsecamente desordenada.
- 5) Assuma que uma cadeia polipeptídica possui apenas uma conformação em alfa-hélice enquanto no estado desordenado (“random coil”) cada aminoácido pode assumir três possíveis conformações. Calcule a variação de entropia (ΔS) da reação de desenovelamento:

hélice → *coil*

de um polipeptídeo de 100 resíduos. Qual é o valor do ΔH por resíduo que seria necessário para tornar a temperatura de desnaturação (a temperatura na qual $K_{eq} = 1$) igual a 50 °C? Compare este valor com a energia envolvida na formação de uma ligação de hidrogênio, estimada em 0 a 12 kJ/mol.

Bibliografia

- a) O capítulo 6 do livro Branden C. And Tooze J. (1999) *Introduction to Protein Structure*, 2ª edição, Garland Science;
- b) Pace e Scholtz (2006) "Measuring the conformational stability of a protein". Chapter 12 pp. 299 – 321. *Cold Spring Harb Protoc*; Doi:10.1101/pdb.prot4244
- c) Radford S.E. (2000) Protein folding: progress made and promises ahead. *Trends Biochem. Sci.* 25: 611-618. Doi: 10.1016/S0968-0004(00)01707-2;
- d) Dobson (2003) "Protein folding and misfolding" *Nature* 426: 884 – 890. Doi: 10.1038/nature02261;
- e) Wolynes, Onuchic e Thirumalai (1995) *Navigating the folding routes*. *Science* 267: 1619-1620. Doi: 10.1126/science.7886447
- f) Henzler-Wildman e Kern (2007) *Dynamic personalities of proteins*. *Nature* 450: 964 – 972. Doi: 10.1038/nature06522

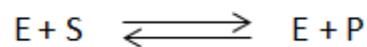
Enzimas e Cinética Enzimática

Objetivos para Estudo

Este guia de estudos busca estabelecer uma trilha para entendimento dos modelos do Equilíbrio Rápido e Estado Estacionário que embasam a dedução da equação de Michaelis-Menten que relaciona a velocidade inicial de reações catalisadas por enzimas com a concentração do substrato. Este guia deve ser acompanhado pela leitura dos capítulos sobre este tema nos livros Bioquímica Básica (Marzzoco & Torres, 2007 e/ou Enzyme Kinetics (I.H. Segel, 1993).

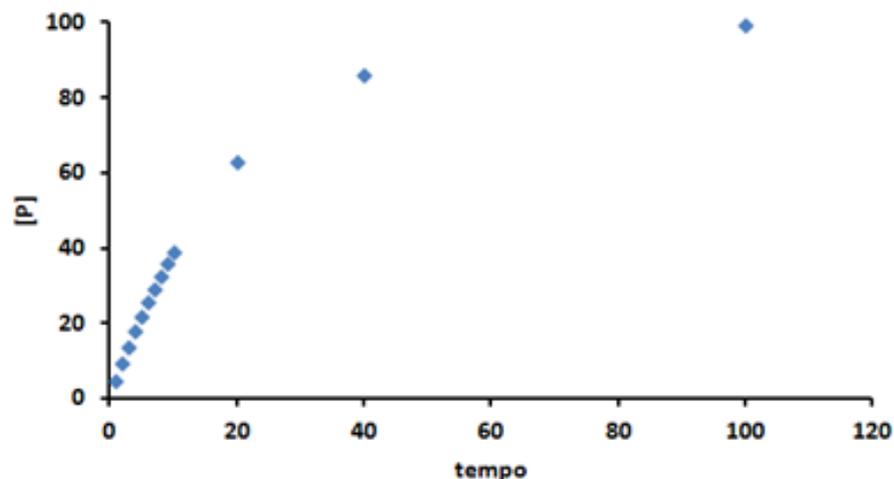
Modelos para reação catalisada por enzimas

Considere o modelo simplificado para reação catalisada por uma enzima (E):



Entenda que a velocidade observada (v) para a formação de produto (P) ao longo do tempo, expressa como $\Delta[P]/\Delta t$, depende da concentração de enzima [E] e de substrato [S] totais. Reconheça esta proposta na expressão $v \propto [E][S]$. O símbolo \propto indica “é proporcional”.

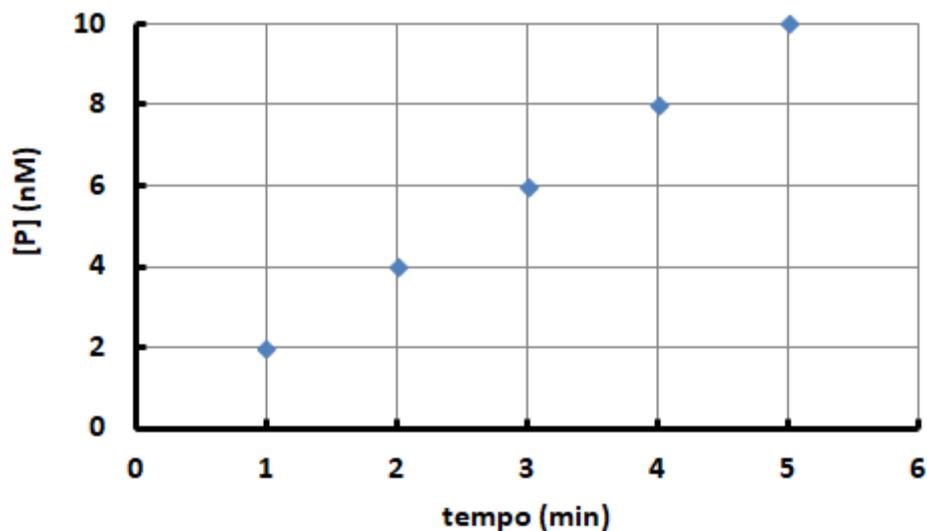
Considerando esta proposta, entenda que a velocidade de formação de P irá diminuir ao longo do tempo de reação devido à própria transformação de S em P, ou seja, a [S] diminui ao longo do tempo. Reconheça que o expresso acima está representado no gráfico abaixo.



Entenda que neste gráfico a velocidade de formação de P pode ser aproximada pela inclinação (tangente) em cada ponto da curva acima. Visualize que a inclinação, ou seja, a velocidade diminui ao longo do tempo, como mencionado acima.

Focando nos tempos do início da reação (tempos iniciais), entenda que existe uma janela de tempo em que a $[S]$ variou relativamente pouco (5-10%), ou seja, pouco substrato foi transformado em P. Enfim, dentro desta janela de tempos iniciais a $[S]$ em qualquer tempo é aproximadamente igual àquela inicialmente adicionada na reação. Reconheça que esta proposta pode ser expressa como $[S]_t \approx [S]_0$ dentro dos tempos iniciais.

Lembrando-se da expressão $v \propto [E] \cdot [S]$, entenda que o gráfico abaixo representa a formação de produto nos tempos iniciais desta reação.



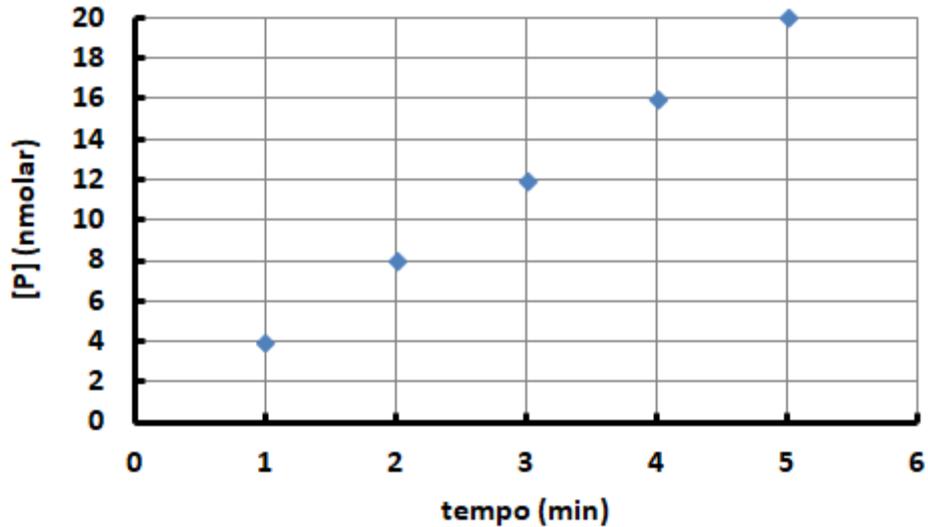
Explícite o motivo pelo qual a relação $[P] \times t$ é linear no gráfico acima.

Entenda que no gráfico acima a velocidade de formação de P é constante ao longo do tempo, que $[S]_t \approx [S]_0$ e que a $[E]_{\text{total}}$ ativa segue também inalterada. Lembre-se que nestas condições a velocidade da reação catalisada pela enzima é chamada de velocidade inicial (v_0).

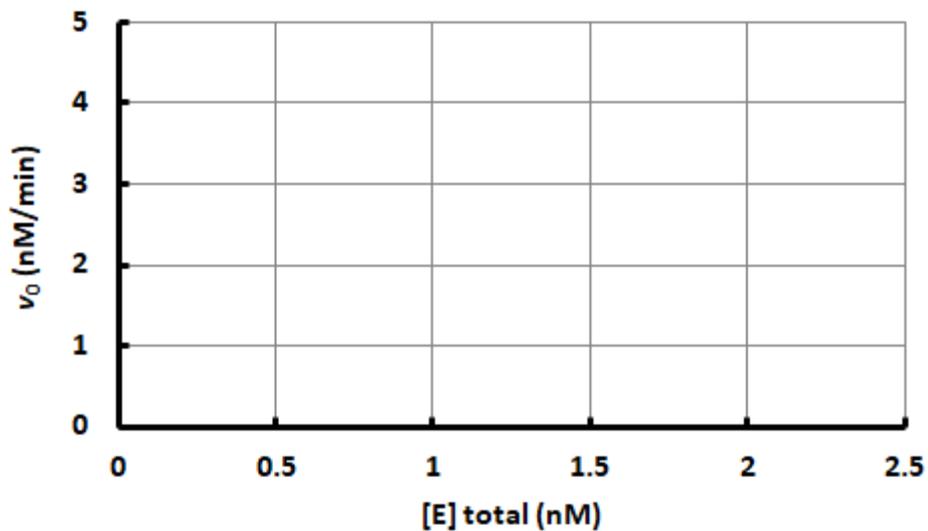
Reconheça que neste tipo de gráfico (acima) a velocidade inicial (v_0) corresponde à inclinação da reta. Calcule a v_0 .

Assuma agora que o gráfico abaixo representa uma reação catalisada por uma enzima em condições de “velocidade inicial”. Considere que os dados foram coletados em um experimento realizado com $[E]_{\text{total}} = 2 \text{ nM}$ (nanoMolar).

Lembrando-se da expressão $v \propto [E] \cdot [S]$, represente, nos mesmos eixos, os resultados esperados para experimentos feitos nas concentrações 1 e 0,5 nM.

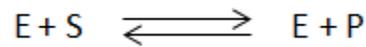


Entenda que o resultado do experimento acima pode ser expresso em um gráfico que correlaciona v_0 com $[E]_{\text{total}}$. Desenhe este gráfico.

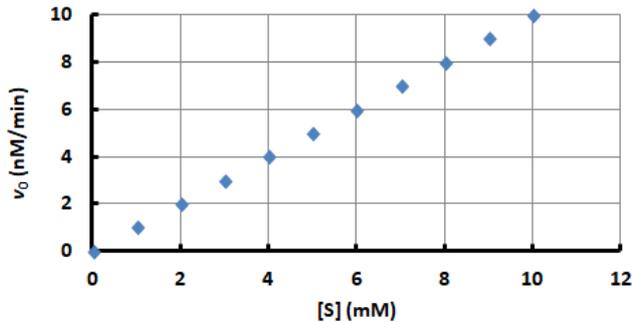


Entenda que o gráfico acima indica que a velocidade inicial (v_0) da reação é diretamente proporcional à concentração de enzima total ativa ($[E]_{\text{total}}$) na amostra usada. Com base nesta observação, reconheça que a velocidade inicial (v_0) da reação é uma expressão da atividade enzimática.

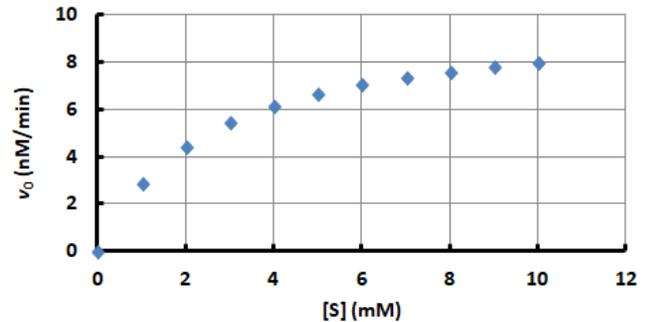
Retornando ao modelo simplificado da reação catalisada pela enzima:



note que estabelecemos uma relação entre a velocidade inicial (v_0) da reação e um dos participantes do processo, a enzima ($[E]_{total}$). Reconheça que considerando as condições de “velocidade inicial” e baseando-se na expressão $v \propto [E].[S]$, o mesmo raciocínio desenvolvido acima para E se aplicaria ao substrato S, assim seria esperado hipoteticamente o gráfico da esquerda para relação $v_0 \times [S]$. Porém, de fato, é obtido experimentalmente o gráfico da direita.



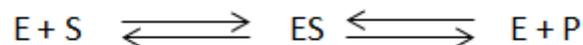
Hipotético



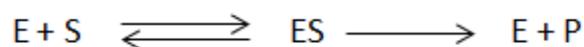
Experimental

Entenda que frente ao conflito “teoria x experimento” mencionado acima, o modelo simplificado para reação catalisada pela enzima (abaixo) precisa ser reelaborado, pois não é suficiente para explicar a relação $v_0 \times [S]$.

Considere então o modelo abaixo para reação catalisada por uma enzima (E). Leia neste modelo que as formas livres da enzima (E) e do substrato (S) se associam formando um complexo enzima-substrato (ES), o qual pode se dissociar ou originar o produto. Note que o produto se forma apenas a partir do complexo ES.



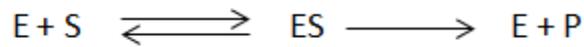
Recorde que em cinética química as velocidades são proporcionais a concentrações. Lembre-se que este modelo busca descrever a reação catalisada pela enzima em condições de “velocidade inicial”. Deste modo, se há baixo consumo de S ($[S]_t \approx [S]_0$), haverá baixa [P] formado. Logo a etapa $P \rightarrow [ES]$ terá velocidade insignificante, sendo então descartada do modelo.



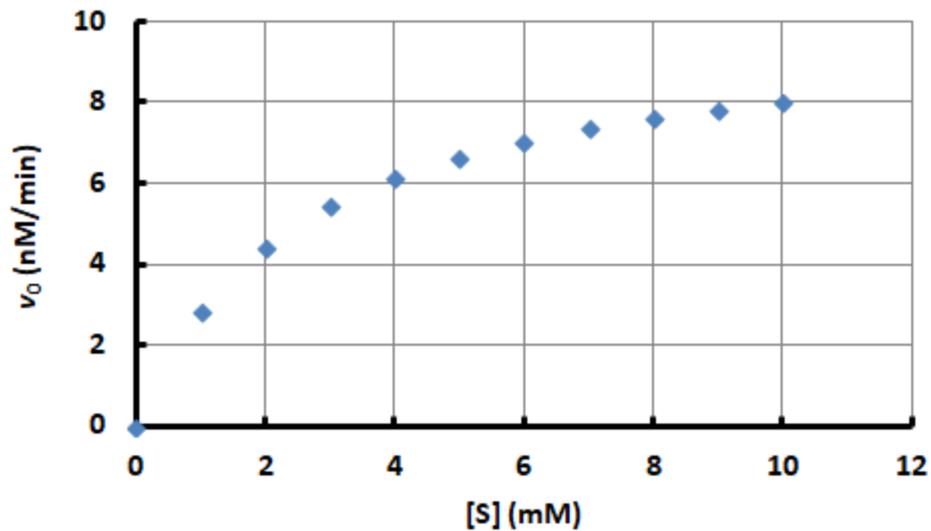
Reconheça que no modelo acima para reação catalisada por uma enzima, a velocidade inicial (v_0) será proporcional à concentração do complexo enzima-substrato ($[ES]$). Assim, $v_0 \propto [ES]$.

Perceba que ao passo que aumenta a $[S]$, este se combina com cada vez mais enzimas, levando a crescentes $[ES]$. Mas, a $[ES]$ aumentará até certo ponto, ou seja, haverá um limite máximo (um teto) para a $[ES]$. Este limite máximo é determinado pela própria $[E]_{\text{total}}$ no meio de reação.

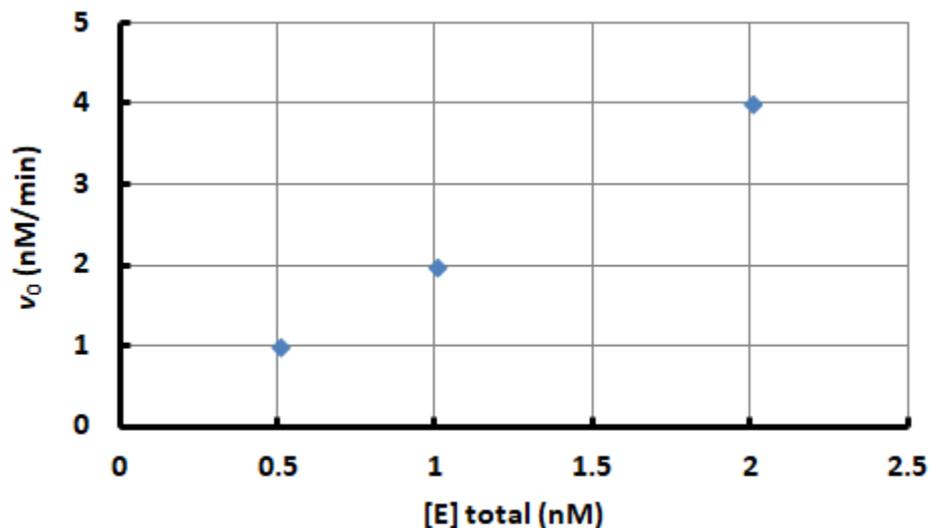
Frente ao exposto acima, entenda que o gráfico da relação $v_0 \times [S]$ é coerente com o modelo usado para reação catalisada pela enzima.



Há um limite máximo para a velocidade inicial (v_0), chamado de Velocidade Máxima (V_{max}).



Considerando que $[ES]$ está ligada à $[E]_{\text{total}}$ disponível, note que o modelo usado acima para descrever a reação catalisada pela enzima também é coerente com a relação $v_0 \times [E]_{\text{total}}$ já abordada anteriormente.



A seguir este modelo será usado para deduzir uma equação que conecte v_0 à $[S]$ em certa $[E]_{\text{total}}$.

Cinética para Enzimas Michaelianas

Equilíbrio Rápido

Recorde o modelo abaixo adotado para descrever a reação catalisada pela enzima em condições de velocidade inicial (v_0). Note a numeração incluída para identificar as etapas discretas.

Recorde que “ k ” minúsculo indica uma constante de velocidade e “ K ” maiúsculo indica uma constante de equilíbrio.



Recorde que uma constante de velocidade* pode ser interpretada como a fração da concentração de dado reagente A que se transforma em B por unidade de tempo. Alternativamente pode ser interpretada como a fração dos encontros dos reagentes A e B geram o produto C* (**respectivamente uma constante de velocidade de primeira e de segunda ordem*).

Note que, aplicando-se as condições de velocidade inicial, temos que $[S]_t \approx [S]_0$. Assim podemos escrever apenas $[S]$, pois não há mudança na concentração ao longo do tempo da reação.

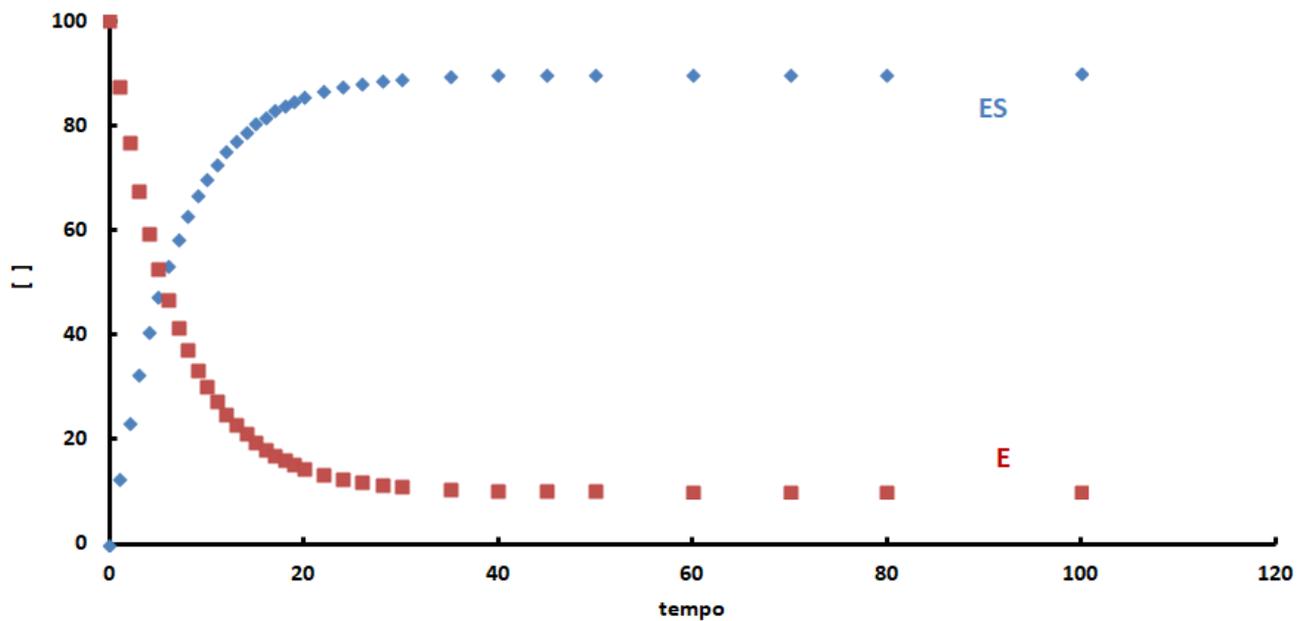
Entenda que, no modelo, a enzima total ($[E]_{\text{total}}$) ocorre em duas populações, forma livre ($[E]$) e complexo enzima-substrato ($[ES]$). Assim, $[E]_{\text{total}} = [E] + [ES]$

Pense no esquema da reação catalisada pela enzima (acima) em uma condição particular em que k_3 é muito menor do que k_2 e k_1 .

Responda: Nesta condição qual evento será mais provável em uma dada unidade de tempo: ES gerar P ou ES se dissociar em E e S?? Assim, $v_3 \ll v_2$ ou $v_3 \gg v_2$??

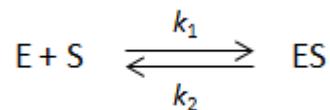
Reconheça que por conta de $k_3 \ll k_2$, uma vez que certa $[S]$ está presente com o passar do tempo então E e S entram em equilíbrio com ES. Entenda que “estar em equilíbrio” significa que $v_1 = v_2$, ou seja, a velocidade com que ES se forma se equipara à velocidade com que ES se dissocia. Entenda que no equilíbrio $[E]$ e $[ES]$ não se alteram ao longo do tempo, embora estejam se interconvertendo constantemente. Deste modo, esta condição aplicada ao modelo acima é chamada de Equilíbrio Rápido.

Reconheça no gráfico abaixo o exposto acima.



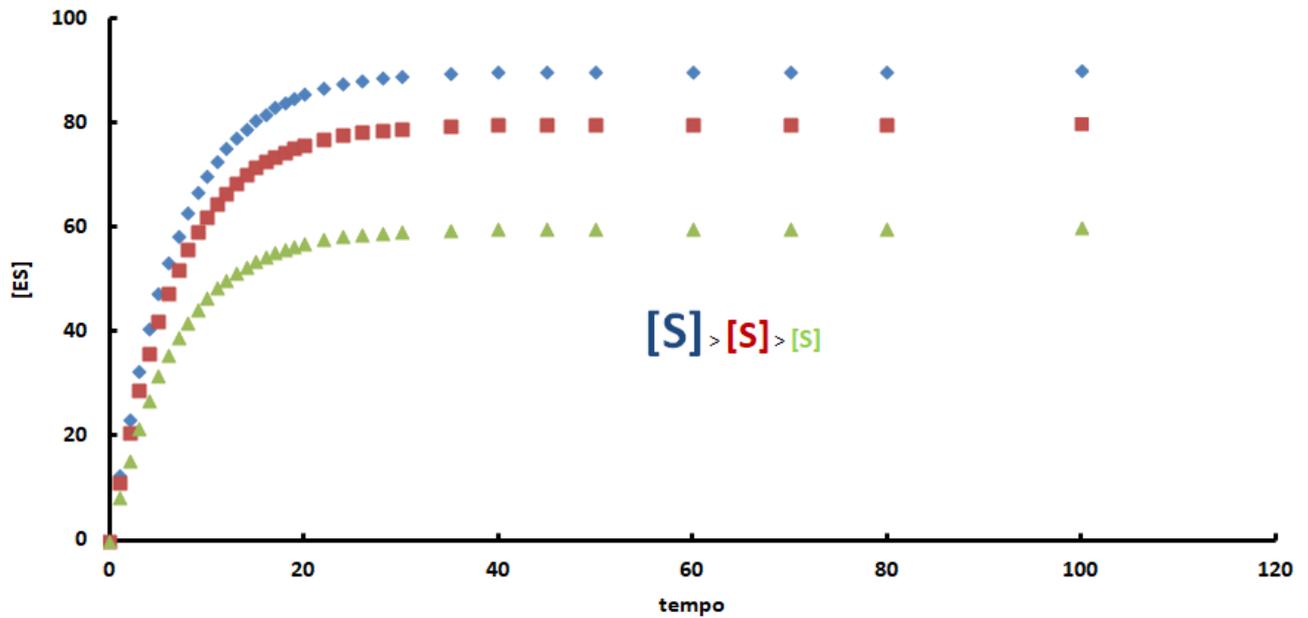
Perceba que a manutenção da condição de “velocidade inicial”, ou seja, baixo consumo de S ($[S]_t \approx [S]_0$), é essencial para manutenção deste equilíbrio.

Entenda que a proporção $[E] [S] / [ES]$ seguirá inalterada enquanto o sistema seguir no equilíbrio. Esta proporção é a constante de equilíbrio (K_S) que se aplica à combinação de etapas de formação e dissociação de ES



Considerando a constante de equilíbrio K_S , entenda que diferentes $[S]$ levarão à formação de diferentes $[ES]$. Mas, será mantida a proporção $[E] [S] / [ES]$. Enfim, $[S]/K_S = [ES]/[E]$

Reconheça o exposto acima no gráfico abaixo.



Entenda que se [ES] é constante ao longo do tempo e que uma fração (k_3) desta população se converte em produto por unidade de tempo, então a velocidade inicial (v_0) é constante para dada [S].

Com base no exposto nos pontos acima, note que existe uma relação entre [S] e [ES] e também uma relação entre [ES] e v_0 . Logo, deve existir uma “relação composta” que conecta [S] a v_0 . Esta “relação composta” é a Equação de Michaelis - Menten.

A relação entre [S] e [ES] deve envolver K_S . Já a relação entre [ES] e v_0 deve conter k_3 . Deste modo, a Equação de Michaelis – Menten deve conter estes dois termos.

A Equação de Michaelis – Menten deve indicar que aumentos de [S] resultam em aumentos de [ES] e conseqüentemente incrementos de v_0 . Porém, até um limite, determinado por $[E]_{total}$ (ver acima), onde se atinge a maior v_0 possível naquela condição experimental, ou seja, atinge V_{max} .

Acompanhe em anexo uma das possíveis deduções da Equação de Michaelis-Menten para reações catalisadas por enzimas em condições de Equilíbrio Rápido.

Observe o formato da equação de Michaelis-Menten.

$$v_0 = \frac{V_{max} [S]}{K_S + [S]}$$

Note que a equação pode ser igualmente escrita como

$$v_0 = V_{max} \frac{[S]}{K_S + [S]}$$

Assim, esta equação pode ser lida: a velocidade inicial (v_0) corresponderá a uma fração (percentual) da Velocidade Máxima (V_{max}), a qual será determinada pela relação entre $[S]$ e K_S . Esta fração tenderá a 1 (100%), ou seja, v_0 tenderá à V_{max} , somente em $[S] \gg K_S$.

Recorde que a relação $[S]/K_S$ determina $[ES]/[E]$ (ver acima). Visualize que a velocidade inicial (v_0) em relação à Velocidade Máxima (V_{max}) observada em certo $[S]$ é um reflexo da abundância do $[ES]$. Deste modo, a v_0 é determinada pela relação entre $[S]$ e K_S .

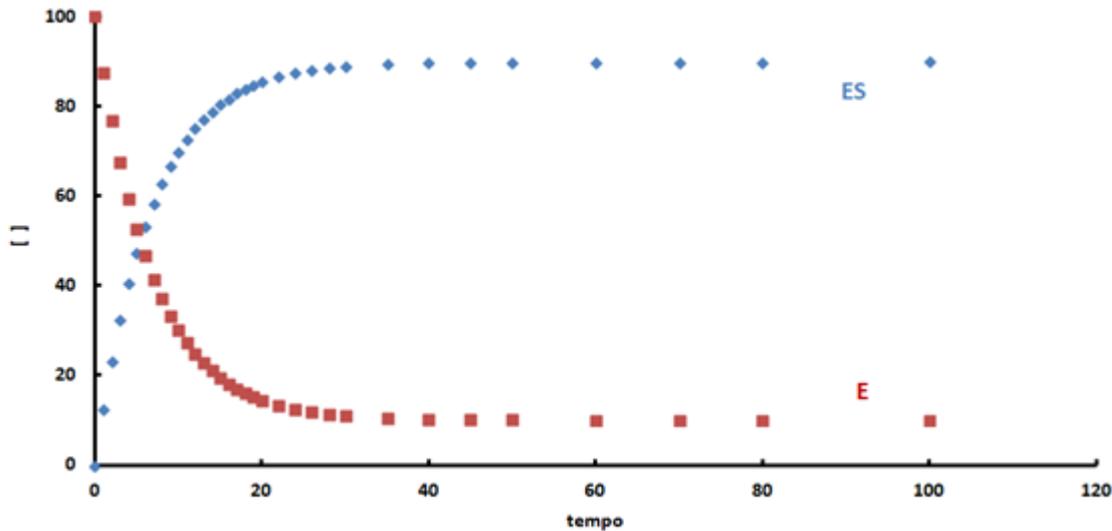
Entenda que quando $[S] \gg K_S$ então $[ES] \gg [E]$, ou seja, virtualmente toda a enzima presente na reação ($[E]_{total}$) encontra-se no complexo ES.

Note que a Velocidade Máxima (V_{max}) é atingida quando virtualmente toda a enzima presente na reação ($[E]_{total}$) encontra-se no complexo ES ($[ES] = [E]_{total}$). Deste modo,

$$V_{max} = k_3[E]_{total}$$

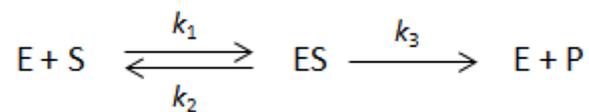
Cinética para Enzimas Michaelianas Estado Estacionário

Recorde que no modelo do Equilíbrio Rápido por conta de $k_3 \ll k_2$, então E e S estão em equilíbrio com ES. Relembre que “estar em equilíbrio” significa que $v_1 = v_2$ e que $[E]$ e $[ES]$ não se alteram ao longo do tempo, embora estejam se interconvertendo constantemente. Relembre que este modelo é válido para condição de “velocidade inicial” (baixo consumo de S ($[S]_t \approx [S]_0$)), a qual é essencial para manutenção deste equilíbrio. Reconheça esta situação no gráfico abaixo.



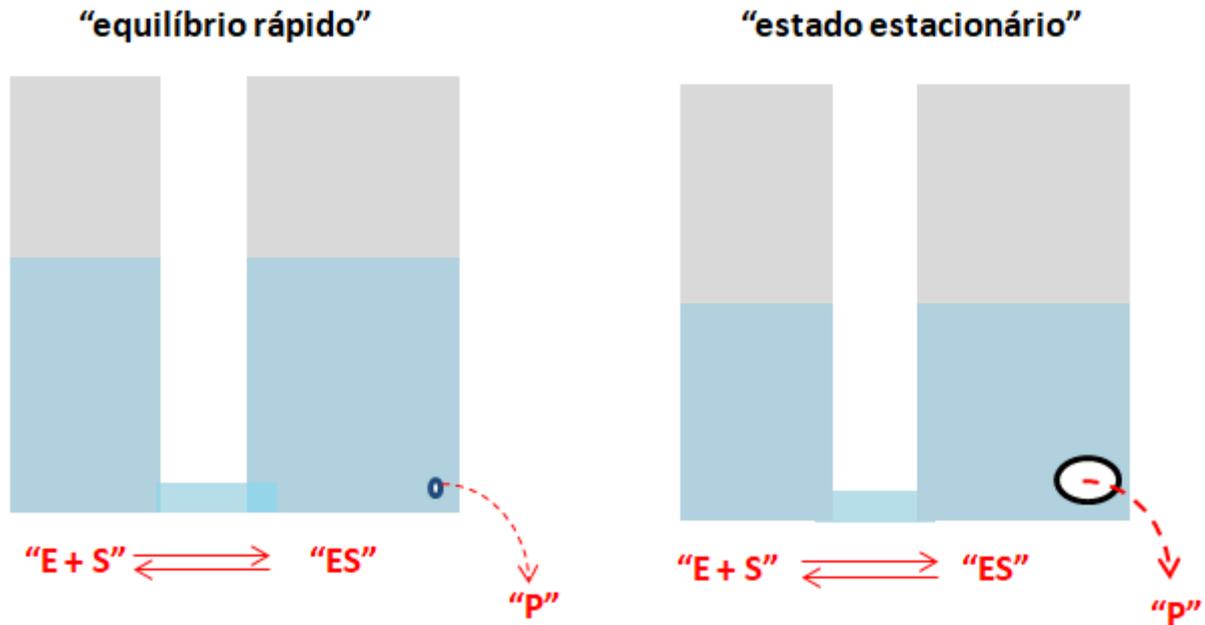
Entenda que o balanço nas velocidades de formação e desaparecimento de ES é fundamental para manutenção de sua constante concentração ao longo do tempo.

Reconheça que no esquema abaixo, a velocidade de formação de ES equivale a v_1 , enquanto a velocidade de desaparecimento é v_2+v_3 .



No modelo de Equilíbrio Rápido, considera-se v_3 desprezível frente à v_2 . Porém, mesmo que não o seja, ainda assim a [ES] pode se manter estável ao longo do tempo, desde que $v_1 = v_2+v_3$. Esta é a condição assumida pelo modelo do Estado Estacionário.

Pense sobre a analogia a seguir para comparar os modelos do Equilíbrio Rápido e do Estado Estacionário. Considere dois compartimentos (em cinza) preenchidos com água (azul) conectados por um tubo (horizontal) que permite à água circular entre eles. Mesmo que haja um “furo” em um dos compartimentos a altura das colunas de água irá se equiparar entre os compartimentos. Esta “equiparação” ocorrerá independentemente do tamanho do “furo”.



Note a analogia dos compartimentos com as populações "E + S" e "ES", da tubulação horizontal com a interconversão entre estas populações, do "furo" com a etapa 3 de formação do P, da dimensão do "furo" com a relação k_3 versus k_2 e k_1 e da "equiparação das colunas" com a estabilidade de [ES] e [E] ao longo do tempo.

Perceba que a condição de "velocidade inicial" (baixo consumo de S; $[S]_t \approx [S]_0$) é essencial para manutenção deste estado estacionário da [ES].

Entenda que no Estado Estacionário será mantida a proporção $[E] / [ES]$ para dada [S].

Reconheça que o modelo do Equilíbrio Rápido é um caso particular do modelo do Estado Estacionário. Para isso, imagine que k_3 pode adotar qualquer valor, para os quais sempre haverá uma situação em que $v_1 = v_2 + v_3$. Mas, apenas alguns destes valores de k_3 são insignificantes frente à k_2 .

Entenda que sendo [ES] estável ao longo do tempo e uma fração (dada por k_3) desta população se convertendo em produto por unidade de tempo, então a velocidade inicial é constante para certa [S].

Com base no exposto nos pontos acima, note que existe uma relação entre [S] e [ES] e também uma relação entre [ES] e v_0 . Logo, também no modelo do Estado Estacionário deve existir uma "relação composta" que conecta [S] a v_0 . Esta "relação composta" é a Equação de Michaelis - Menten. Acompanhe uma das possíveis deduções da Equação de Michaelis-Menten para condições de Estado Estacionário.

Atente para definição de K_m pelas seguintes expressões deduzidas no modelo do Estado Estacionário

$$K_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1}$$

$$K_m = \frac{[E][S]}{[ES]}$$

Compare K_m com a definição de K_s para o modelo de Equilíbrio Rápido. Note que K_m converte-se em K_s quando $k_3 \ll k_2$, ou seja, no modelo de Equilíbrio Rápido.

$$K_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1} \qquad K_s = \frac{k_2}{k_1}$$

Com base nas definições abaixo, note que quanto menor K_m ou K_s , maior a abundância de ES em relação à E para uma dada [S]. Enfim, quanto menor K_m ou K_s , maior a afinidade entre a enzima e o substrato.

$$K_m = \frac{[E][S]}{[ES]} \qquad K_s = \frac{[E][S]}{[ES]}$$

Observe o formato da equação de Michaelis-Menten para o modelo do Estado Estacionário.

$$v_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

Note que a equação pode ser igualmente lida como

$$v_0 = V_{max} \frac{[S]}{K_m + [S]}$$

Assim, a equação pode ser interpretada como: A velocidade inicial (v_0) atingirá uma fração (percentual) da Velocidade Máxima (V_{max}), a qual será determinada pela relação entre [S] e K_m . Esta fração tenderá a 1 (100%), portanto v_0 tenderá a V_{max} , somente em $[S] \gg K_m$.

Recorde que a relação $[S]/K_m$ determina $[ES]/[E]$ (ver acima). Visualize que a velocidade inicial (v_0) em relação à Velocidade Máxima (V_{max}) observada em certo $[S]$ é um reflexo da abundância do $[ES]$. Enfim, v_0 é determinada pela relação entre $[S]$ e K_m .

Entenda que quando $[S] \gg K_m$ então $[ES] \gg [E]$, ou seja, virtualmente toda a enzima presente na reação ($[E]_{total}$) encontra-se no complexo ES.

Note que a Velocidade Máxima (V_{max}) é atingida quando virtualmente toda a enzima presente na reação ($[E]_{total}$) encontra-se no complexo ES. Deste modo,

$$V_{max} = k_3[E]_{total}$$

A equação de Lineweaver-Burk para Enzimas Michaelianas

Os parâmetros de cinética enzimática do estado estacionário, K_m e V_{max} , são determinados por meio de ajuste da equação de Michaelis-Menten em dados de v_0 e $[S]$. A transformação de Lineweaver-Burk é particularmente útil para estudo de mecanismos de inibição e ativação de enzimas.

Recorde a equação de Michaelis-Menten para o modelo do Estado Estacionário para reações catalisadas por enzimas.

$$v_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

Recorde que esta equação descreve uma curva (hipérbole). Esquematize o gráfico $v_0 \times [S]$ para uma reação catalisada por uma enzima michaeliana.

Note que o ponto de partida para transformação da equação de Michaelis-Menten na equação de Lineweaver-Burk consiste na inversão de ambos os lados da igualdade.

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m + [S]}{V_{max}[S]}$$

Acompanhe uma dedução da equação de Lineweaver-Burk em anexo.

Perceba que a equação de Lineweaver-Burk descreve uma reta ($y = ax + b$), onde $y = 1/v_0$, $x = 1/[S]$, a inclinação (a) = K_m/V_{max} e o intercepto no eixo y (b) = $1/V_{max}$

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

Perceba que o ponto em que $y = 0$, ou seja, a reta corta o eixo x , é $-b/a$. Deste modo, na equação de Lineweaver-Burk este ponto corresponde à $-1/K_m$. Faça esta demonstração.

Note que a transformação (inversão vista acima) proposta por Lineweaver-Burk converte a curva vista no gráfico $v_0 \times [S]$ em uma reta no gráfico $1/v_0 \times 1/[S]$. Esta operação é chamada linearização.

Dedução da Equação de Michaelis-Menten Modelo do Equilíbrio Rápido



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

$$v_0 = k_3[ES]$$

$$V_{max} = k_3[E]_{total}$$

$$[E]_{total} = [E] + [ES]$$

$$\frac{v_0}{V_{max}} = \frac{[ES]}{[E]_{total}} = \frac{[ES]}{[E] + [ES]}$$

$$\frac{v_0}{V_{max}} = \frac{\frac{[E][S]}{K_S}}{[E] + \frac{[E][S]}{K_S}}$$

$$\frac{v_0}{V_{max}} = \frac{\frac{[S]}{K_S}}{1 + \frac{[S]}{K_S}}$$

$$\frac{v_0}{V_{max}} = \frac{[S]}{K_S + [S]}$$

$$v_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_S + [S]}$$

Dedução da Equação de Michaelis-Menten
Modelo do Estado Estacionário



$$v_1 = v_2 + v_3$$

$$k_1[E][S] = k_2[ES] + k_3[ES]$$

$$k_1[E][S] = (k_2 + k_3)[ES]$$

$$\frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{(k_2 + k_3)}{k_1} = K_m$$

$$\frac{v_0}{V_{max}} = \frac{[ES]}{[E]_{total}} = \frac{[ES]}{[E] + [ES]}$$

$$\frac{v_0}{V_{max}} = \frac{\frac{[E][S]}{K_m}}{[E] + \frac{[E][S]}{K_m}}$$

$$\frac{v_0}{V_{max}} = \frac{\frac{[S]}{K_m}}{1 + \frac{[S]}{K_m}}$$

$$\frac{v_0}{V_{max}} = \frac{[S]}{K_m + [S]}$$

$$v_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

Dedução da equação de Lineweaver-Burk para enzimas michaelianas

$$v_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m + [S]}{V_{max}[S]}$$

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{V_{max}[S]} + \frac{[S]}{V_{max}[S]}$$

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

Lipídios

Estudo Dirigido

1. Defina o que são lipídeos. Cite três principais funções de lipídeos dando exemplos.
2. Desenhe a estrutura e explique a diferença da temperatura de fusão entre o ácido *trans*-oleico, mais conhecido como ácido eláidico (44,5°C) e o ácido *cis*-oleico (13,4°C). Comente sobre os ângulos de ligação e o efeito sobre as forças intermoleculares.
3. Desenhe a estrutura dos ácidos graxos essenciais ômega-3 linolênico e ômega-6 linoleico. O que vem a ser a denominação ômega? Por que estes ácidos graxos são considerados essenciais?
4. Desenhe a estrutura química geral das principais classes lipídicas encontradas em membranas biológicas. Explique por que fosfolipídeos predominam em membranas biológicas, e não ácidos graxos livres ou triacilgliceróis.
5. Os esteróis possuem múltiplas estruturas e funções. Estão presentes em membranas, gotículas lipídicas intracelulares, e na circulação sanguínea.
 - 5a. Desenhe a estrutura de um esterol com função estrutural, sinalizador e de armazenamento. Compare as estruturas em termos de polaridade e localização celular.
 - 5b. Por que uma determinada “fração” de colesterol é chamada "colesterol ruim" e outra de “colesterol bom”?
6. Desenhe a estrutura geral das partículas lipoproteicas responsáveis pelo transporte de lipídeos na circulação sanguínea. Como sua estrutura difere de uma membrana celular ou de uma gotícula lipídica (*lipid droplets*)? Explique por que os triacilgliceróis e ésteres de colesterol precisam ser empacotados nessas partículas para serem transportados na circulação sanguínea?
7. A distribuição de lipídeos entre os diferentes lados (face interna e externa) das membranas biológicas foi estabelecida através da utilização de enzimas hidrolisadoras de fosfolípidos conhecidas como fosfolipases e esfingomielinases.
 - 7a. Leia a metodologia do artigo de Lorent et al 2020 e explique como foi feita a determinação da composição de lipídeos nas duas faces da membrana. Faça um desenho esquemático mostrando o substrato e os produtos formados pelas enzimas utilizadas nos experimentos.
 - 7b. Compare os trabalhos de Lorent et al 2020 e Verkleij et al 1973. Discuta as diferenças e semelhanças quanto a estratégias experimentais e resultados obtidos.

Bibliografia

1. Fahy et al (2009). Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids¹. *Journal of Lipid Research*, 50, S9-S14.
2. Lorent et al (2020). Plasma membranes are asymmetric in lipid unsaturation, packing and protein shape. *Nature Chemical Biology*, 16(6), 644-652.

3. Verkleij et al (1973). The asymmetric distribution of phospholipids in the human red cell membrane. A combined study using phospholipases and freeze-etch electron microscopy. *Biochim Biophys Acta*, 323(2), 178-193.

Links úteis:

Lipid Maps - <https://www.lipidmaps.org>

Lipidomics Standard - <https://lipidomicstandards.org>

Membranas

Estudo Dirigido

1. O que é a temperatura de transição de membranas?
2. Qual o efeito do comprimento da cadeia hidrocarbônica dos fosfolipídios na temperatura de transição de uma membrana?
3. A presença de ácidos graxos insaturados provoca quais alterações na estrutura da membrana?
4. Qual o efeito de colesterol na fluidez de membranas?
5. O que são *Lipid Rafts*?
6. Qual a estrutura, na membrana, de proteínas ligadas a âncoras lipídicas?
7. Qual a diferença entre as estruturas de uma micela e de um lipossomo?
8. Como se prepara uma micela? E um lipossomo?
9. O que são vesículas gigantes (GUVs)? Como são preparadas?

Bibliografia

Ler os trabalhos citados abaixo e comparar os modelos de membrana de Singer e Nicolson (Fluid Mosaic) com o modelo proposto por Frederick R. Maxfield (Mosaic Domain Model)

1. S.J. Singer, G.L. Nicolson, The Fluid Mosaic Model of the structure of cell membrane, *Science* 175 (1972) 720-731.
2. Garth L. Nicolson- *Biochim. Biophys. Acta*, 1838, 2014, 1451-1466
3. Frederick R. Maxfield, *Current Opinion in Cell Biology*, 2002, 14, 483-487

Carboidratos

Estudo Dirigido

Açúcares e polissacarídeos

1. Rever o conceito de aldeídos e cetonas
2. Rever conceito de centro de assimetria; carbono quiral; entender porque um carbono assimétrico pode determinar um isômero óptico e um isômero espacial
3. Séries de aldoses e cetoses; numeração dos carbonos da molécula;
4. Rever o conceito de capacidade redutora da função aldeído
5. Mutarrotação; introdução de novo centro de assimetria; formação de hemiacetais; ciclização intramolecular; configurações α e β dos açúcares; conceito de anomeria
6. Notação de (1) Haworth; (2) Barco e Cadeira
7. Equilíbrio químico entre as diversas formas da glicose em solução
8. Fixar conceitos de Configuração e Conformação de moléculas de açúcar
9. Dissacarídeos
10. Quais são os polímeros principais de glicose? Tipos de ligação.
11. Formação de polímeros de açúcar: amilose, amilopectina
12. Polímeros em ligação β entre açúcares: celulose, quitina

Glicolipídeos, Glicoproteínas, Glicosaminoglicanas e Proteoglicanas

13. Ligação (-N-) e ligação (-O-) nas glicoproteínas; estruturas de oligossacarídeos ligados a Asparagina
14. Antígenos dos grupos sanguíneos ABO
15. Glucosaminadases, N-glicanases e O-glicanases
16. Mucinas
17. Glicolipídeos: esfingosina, ceramida, esfingomielina, cerebrosídeo, gangliosídeo
18. Estrutura química de GIPL-1 de *Trypanosoma cruzi* e estrutura de Âncoras de Proteínas (GPI ou GIPLs)
19. Glicosaminoglicanas: unidades de repetição; sulfatação; estrutura da Heparina
20. Ligação das glicosaminoglicanas com a proteína