Aula 3:
Enzimas - Biocatalizadores

Enzimas - Histórico

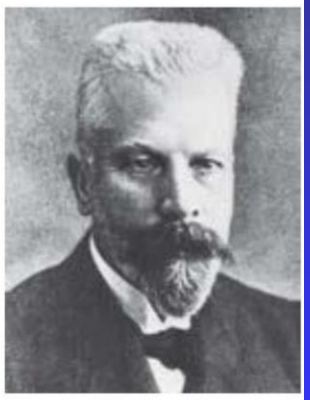
Catálise biológica → início séc. XIX

digestão da carne: estômago

digestão do amido: saliva

1850

Louis Pasteur - concluiu que a fermentação do açúcar em álcool pela levedura era catalisada por "fermentos" os quais seriam inseparáveis das células vivas.



Eduard Buchner, 1860-1917

Eduard Buchner (1897)

extratos de levedo podiam fermentar o açúcar até álcool;

enzimas funcionavam mesmo quando removidas da célula viva.

James Sumner (1926)

Isolou e cristalizou a urease;

Cristais eram de proteínas;

Postulou que "todas as enzimas são proteínas".

James Sumner, 1887-1955

John Northrop (década 30)

Cristalizou a pepsina e a tripsina bovinas;

Década de 50 – séc. XX

75 enzimas → isoladas e cristalizadas;

Ficou evidenciado caráter proteico .

Atualmente - Mais de 2000 enzimas são conhecidas.

Características Gerais:

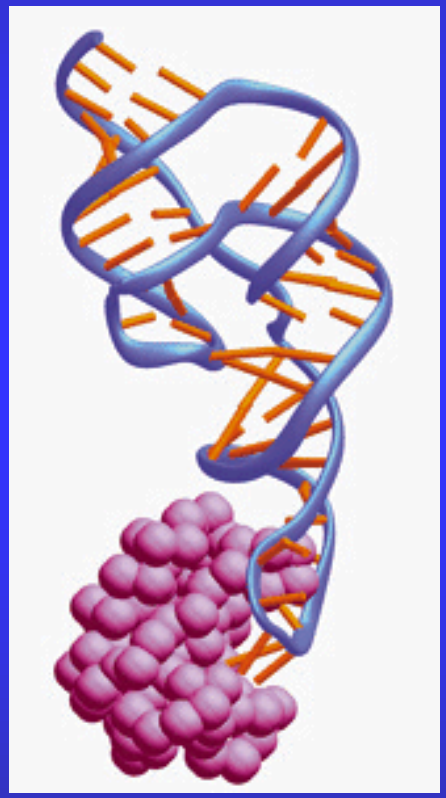
- Proteínas (maioria) ou RNAs (ribozimas) - naturais
- Catalisadores de reações nos sistemas biológicos
  - Alta eficiência catalítica
  - Alto grau de especificidade por seus substratos
  - Reações baratas e seguras, com baixa energia de ativação
  - Não tóxicas
- Funcionam
  - em soluções aquosas
  - em pH e temperaturas fisiológicas

Tabela 5.2 Aumento da velocidade da reação por catálise enzimática.

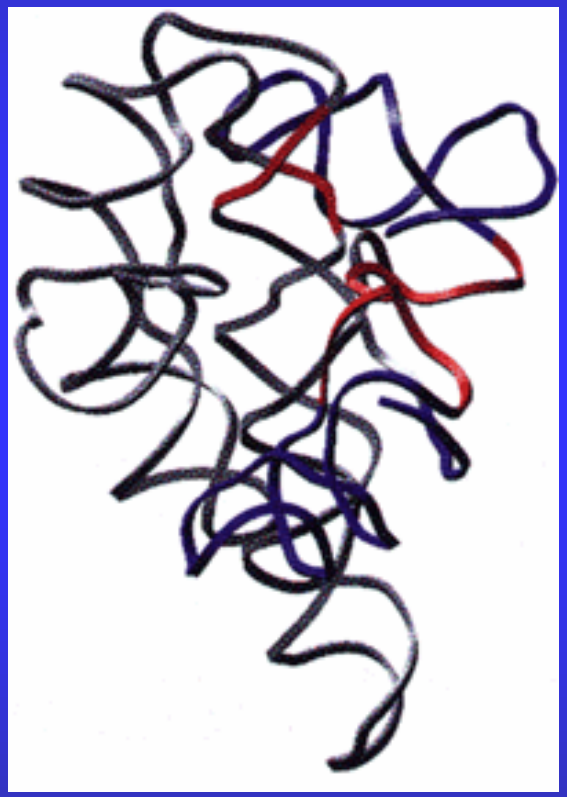
Reação	Enzima	Vc/V[1]
$CO_2 + H_2O \rightleftharpoons HCO_3^- + H^+$	Anidrase carbônica	10^7
Di-hidroxiacetona fosfato ⇌ Gliceraldeído 3 -fosfato	Triose fosfato isomerase	10^9
Glicose + ATP ⇌ Glicose 6 -fosfato + ADP + H^+	Hexoquinase	10^{10}
Glicose 6-fosfato ⇌ Glicose 1-fosfato	Fosfoglicomutase	10^{12}
Ureia + $H_2O \rightleftharpoons NH_3 + CO_2$	Urease	10^{14}
Orotidina monofosfato ⇌ Uridina monofosfato + CO_2	Orotidina monofosfato descarboxilase	10^{17}

[1] Vc = velocidade da reação catalisada; V = velocidade da reação não catalisada.

RNA pode ser uma enzima

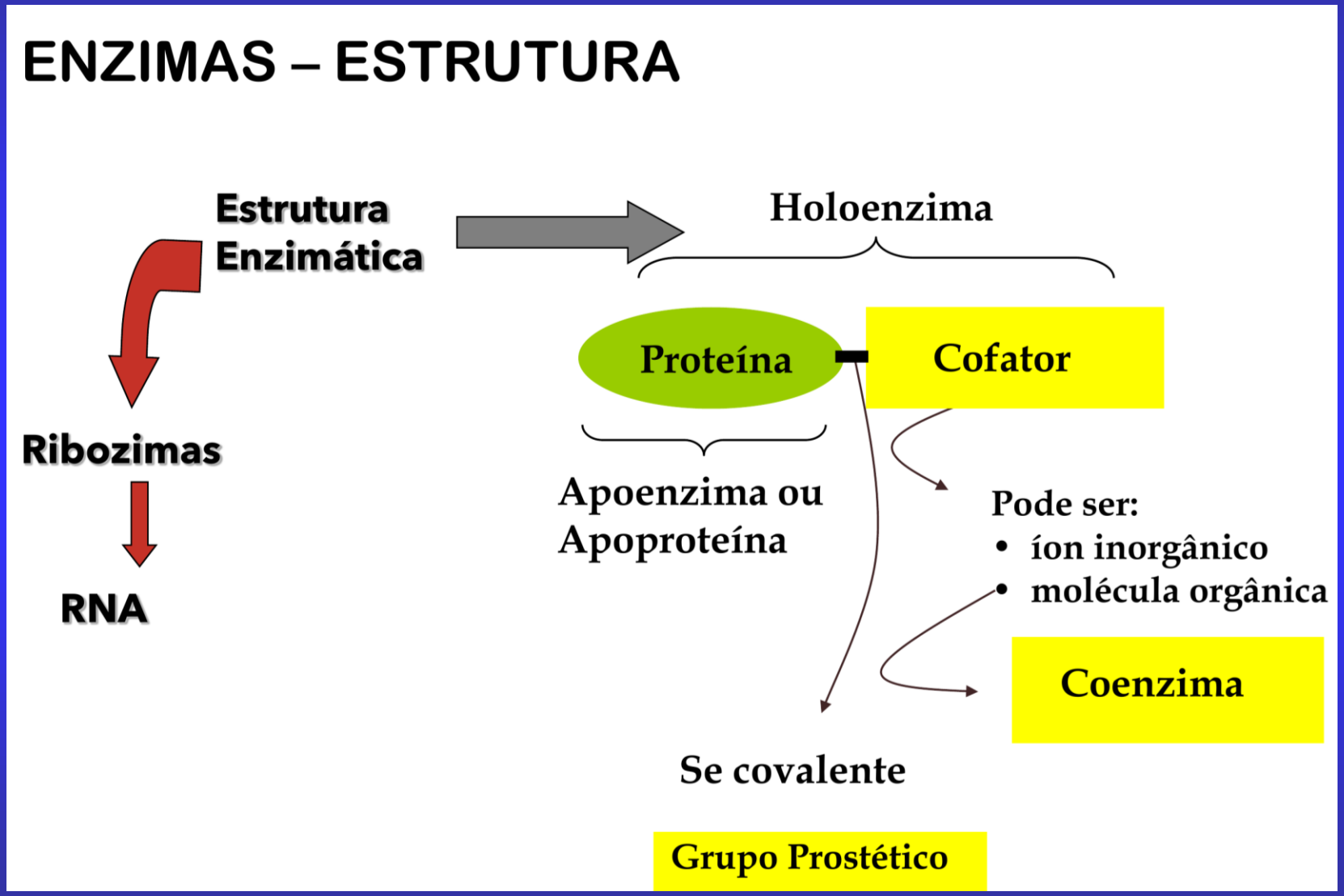


O modelo estrutural do laboratório da J. A. Doudna ilustra a estrutura da ribozima do patógeno humano *hepatitis delta virus*.



Os *twists* and *turns* da ribozima de *Tetrahymena* são visualizados através da estrutura de cristal determinada pelo Thomas R. Cech e colegas.

A maioria das enzimas são proteínas...



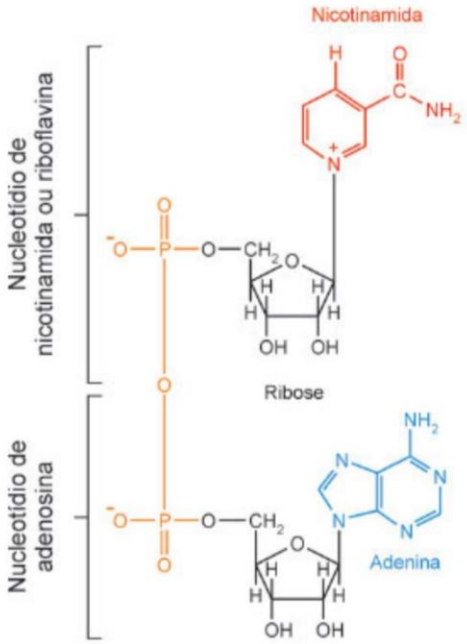
…que não atuam sozinhas...

Table 8.2 Enzyme cofactors

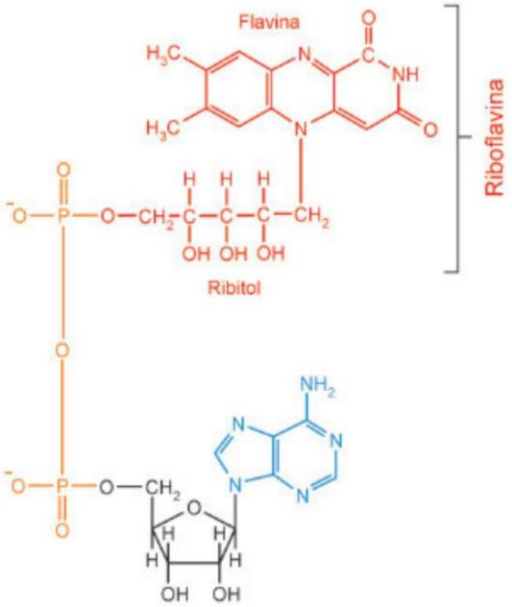
Cofactor	Enzyme
Coenzyme	
Thiamine pyrophosphate	Pyruvate dehydrogenase
Flavin adenine nucleotide	Monoamine oxidase
Nicotinamide adenine dinucleotide	Lactate dehydrogenase
Pyridoxal phosphate	Glycogen phosphorylase
Coenzyme A (CoA)	Acetyl CoA carboxylase
Biotin	Pyruvate carboxylase
5′-Deoxyadenosyl cobalamin	Methylmalonyl mutase
Tetrahydrofolate	Thymidylate synthase
Metal	
Zn^{2+}	Carbonic anhydrase
Zn^{2+}	Carboxypeptidase
Mg^{2+}	*Eco*RV
Mg^{2+}	Hexokinase
Ni^{2+}	Urease
Mo	Nitrate reductase
Se	Glutathione peroxidase
Mn	Superoxide dismutase
K^{+}	Propionyl CoA carboxylase

Tabela 5.13 Grupos transportados por coenzimas e vitaminas presentes em suas moléculas.

Coenzima	Grupo transportado	Vitamina
Adenosina trifosfato (ATP)	Fosfato	—
Tiamina pirofosfato (TPP)	Aldeído	Tiamina (B_1)
Flavina adenina dinucleotídio (FAD)	Hidrogênio	Riboflavina (B_2)
Nicotinamida adenina dinucleotídio ($NAD^{\gtrless}$)	Hidreto	Nicotinamida (B_3)
Coenzima A	Acila	Ácido pantotênico (B_5)
Piridoxal-fosfato	Amino	Piridoxina (B_6)
Biotina	CO_2	Biotina (B_7)
Tetraidrofolato	Carbono	Ácido fólico (B_9)
Metilcobalamina	Metil	Cobalamina (B_{12})

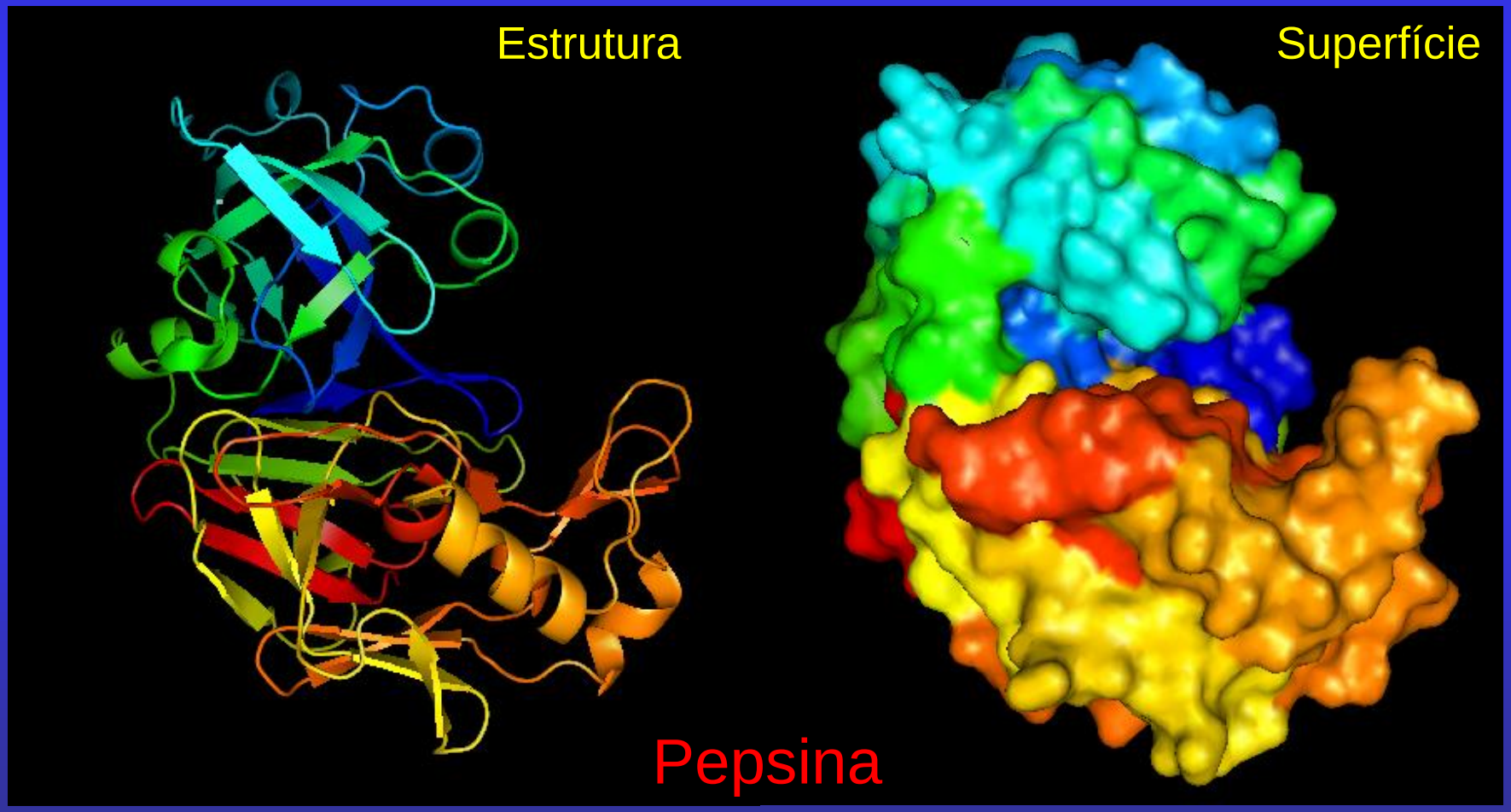


NAD^+

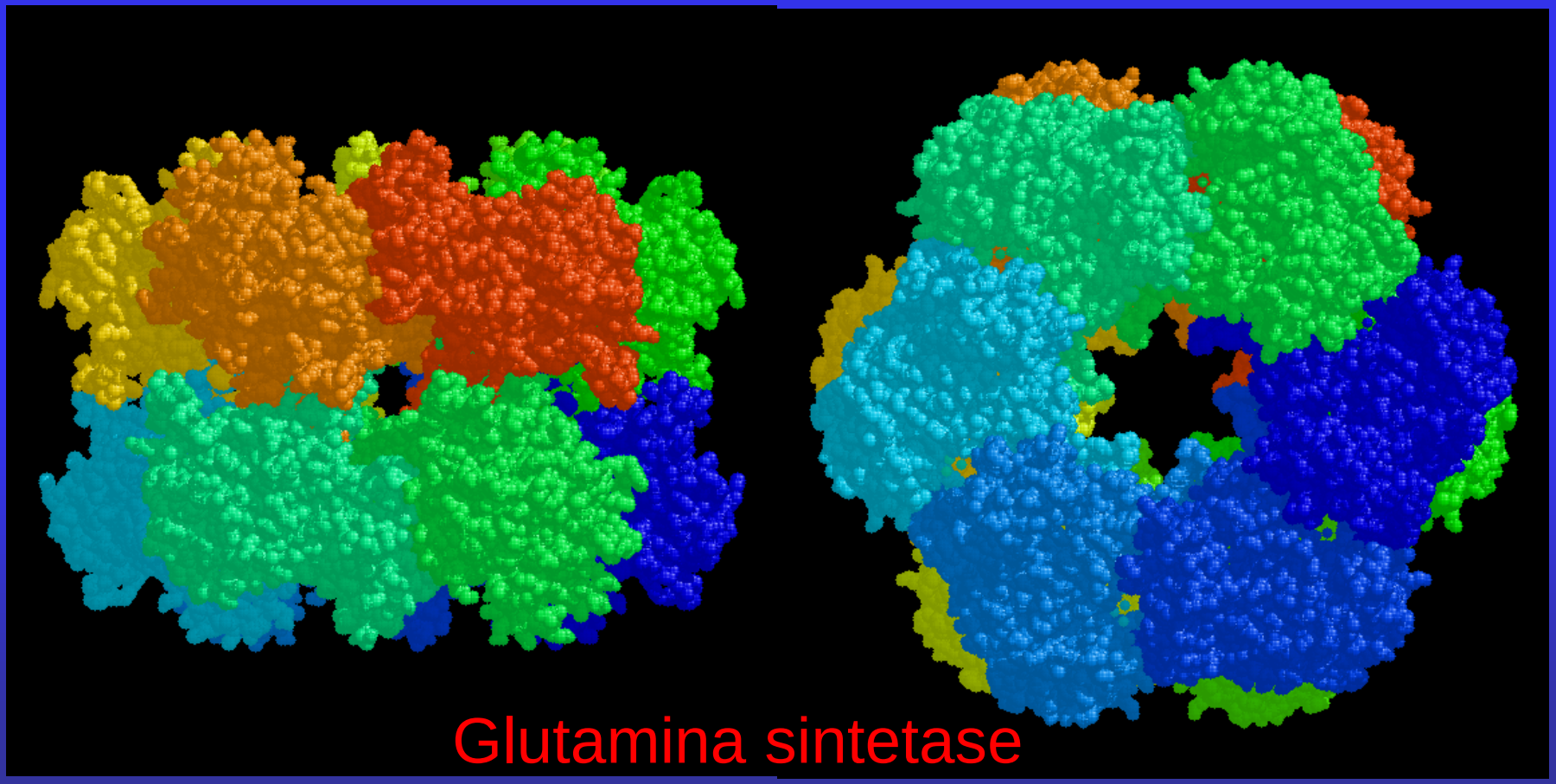


FAD

Enzimas monoméricas



Enzimas multiméricas



Glutamina sintetase

Enzimas – nomenclatura

Existem 3 métodos para nomenclatura enzimática:

- Nome Recomendado: Mais curto e utilizado no dia a dia de quem trabalha com enzimas. Usa o sufixo "ase" para caracterizar a enzima. Ex: Urease, Hexoquinase, Peptidase, etc.

- Nome Sistemático: Mais complexo, dá informações precisas sobre a função metabólica da enzima. Ex: ATP-Glicose-Fosfo-Transferase

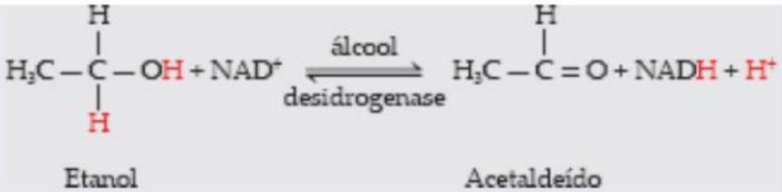
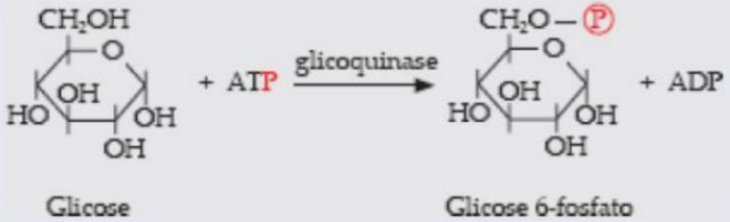
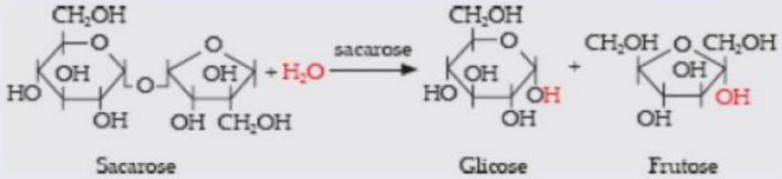
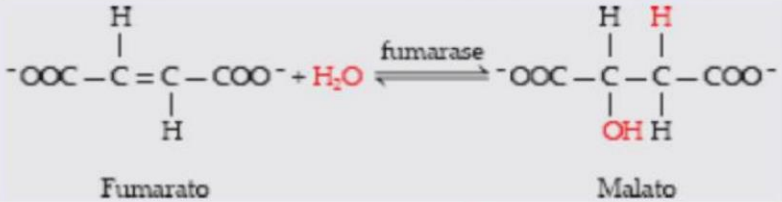
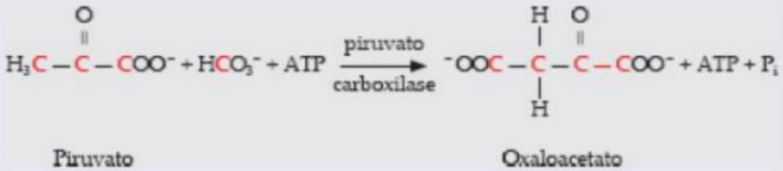
- Nome Usual : Consagrado pelo uso. Ex: Tripsina, Pepsina, Ptialina.

Classificação de enzimas

Classes de *International Union of Biochemistry (IUB)*

1. Oxidoredutases
    1. Desidrogenases
    2. Oxidases
    3. Redutases
    4. Peroxidases
    5. Catalase
    6. Oxigenases
    7. Hidroxilases
2. Transferases
    1. Transaldo(ceto)lases
    2. Acil-, Metil-, glucosil- e fosforil-transferases
    3. Cinases
    4. Fosfomutases
3. Hidrolases
    1. Esterases
    2. Glicosidases
    3. Peptidases
    4. Fosfatases
    5. Tiolases
    6. Fosfolipases
    7. Amidases
    8. Deaminases
    9. Ribonucleases
1. Liases
    1. Decarboxilases
    2. Aldolases
    3. Hidratases
    4. Dehidratases
    5. Sintases
    6. Liases
2. Isomerases
    1. Racemases
    2. Epimerases
    3. Isomerases
    4. Mutases (não todas)
3. Ligases
    1. Sintetases
    2. carboxilases

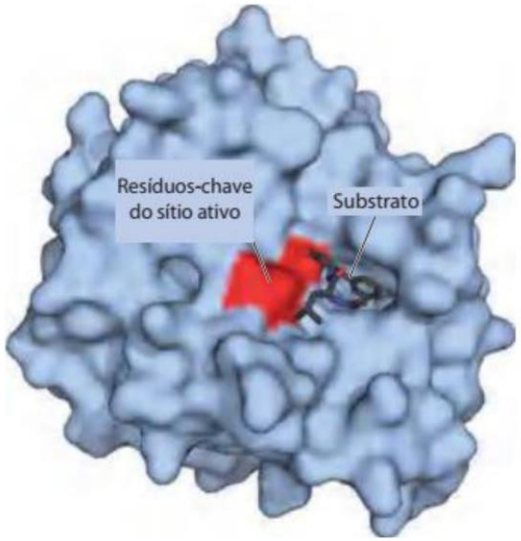
Tabela 5.4 As seis classes de enzimas e as reações que catalisam.

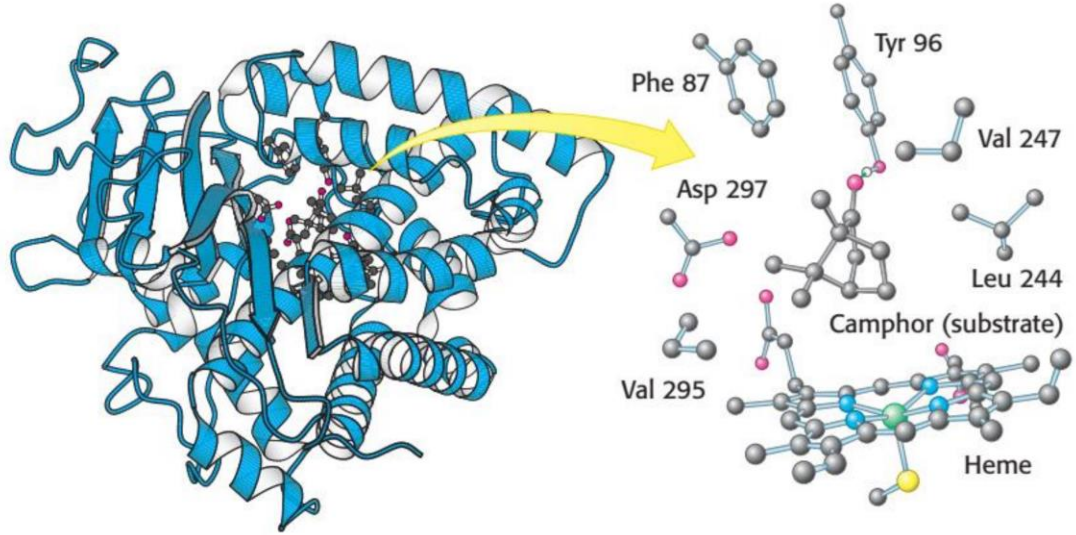
Classe	Tipo de reação	Exemplo
1. Oxirredu-tases	Oxidação-redução $AH_2 + B \rightleftharpoons A + BH_2$	
2. Transferases	Transferência de grupos $A-X + B \rightleftharpoons A + B-X$	
3. Hidrolases	Hidrólise $A-B + H_2O \rightleftharpoons A-H + B-OH$	
4. Liases	Adição de grupos a duplas ligações ou remoção de grupos, deixando dupla ligação $A=B + X-Y \rightleftharpoons A(X)-B(Y)$	
5. Isomerases	Rearranjos intramoleculares $A-B \rightleftharpoons A-B$ (X Y → Y X)	
6. Ligases	Condensação de duas moléculas, associada ao consumo de ATP $A + B \rightleftharpoons A-B$	

Enzimas - biocatalisadores:

- Aumentam a velocidade das reações
  - Diminuindo a energia de ativação
  - Diminuindo a entropia dos reactantes
- Não alteram o equilíbrio das reações
- Não são consumidas na reação
- Atuam em pequenas concentrações
- Atividade pode ser regulada

Sitio ativo ou catalítico e encaixe do substrato (reagente)





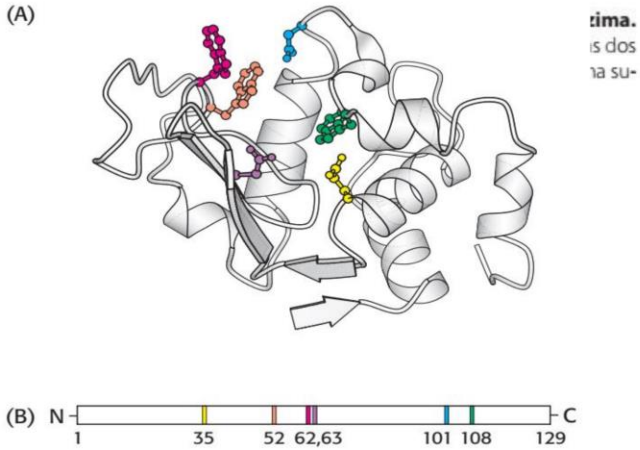


Figure 8.6 Active sites may include distant residues.

Modos de Ligação dos Substratos as Enzimas

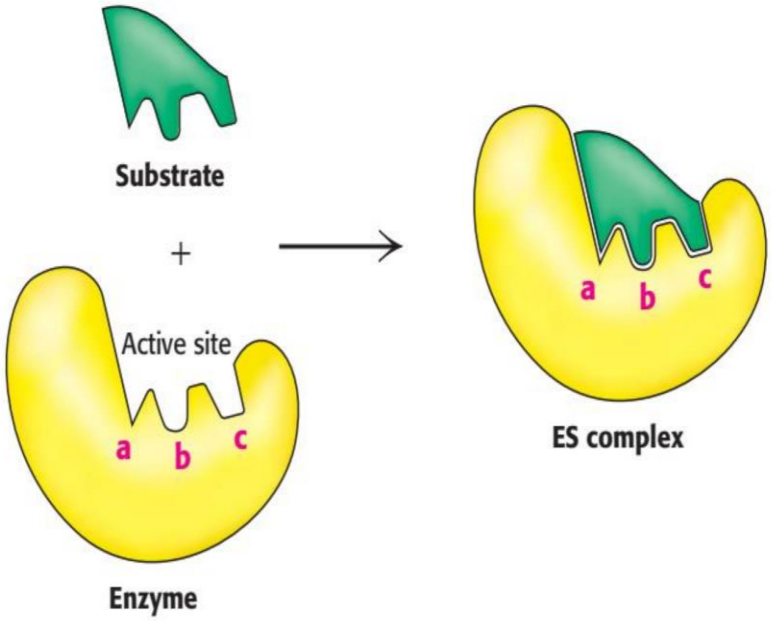


Figure 8.8 Lock-and-key model of enzyme–substrate binding. In this model, the active site of the unbound enzyme is complementary in shape to the substrate.

Emil Fischer (1894): alto grau de especificidade das enzimas originou → **Chave-Fechadura** 🗝, que considera que a enzima possui sitio ativo complementar ao substrato.

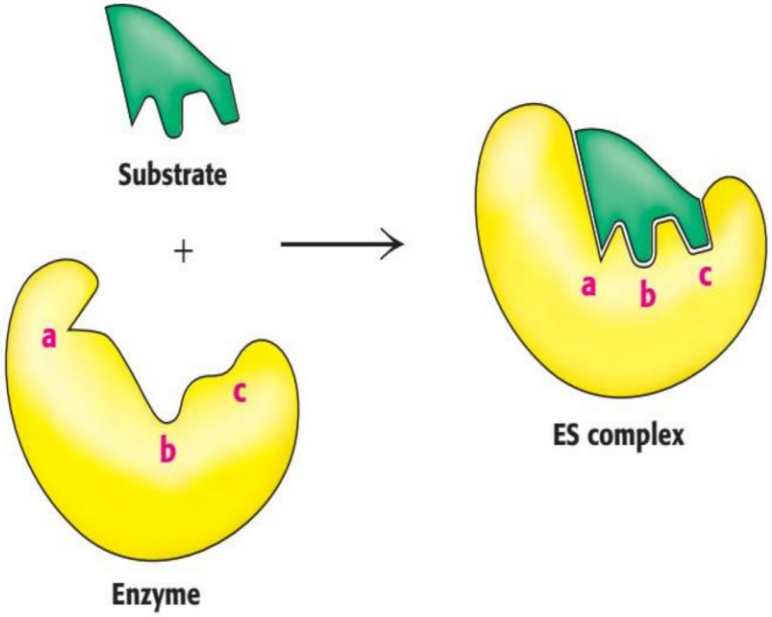
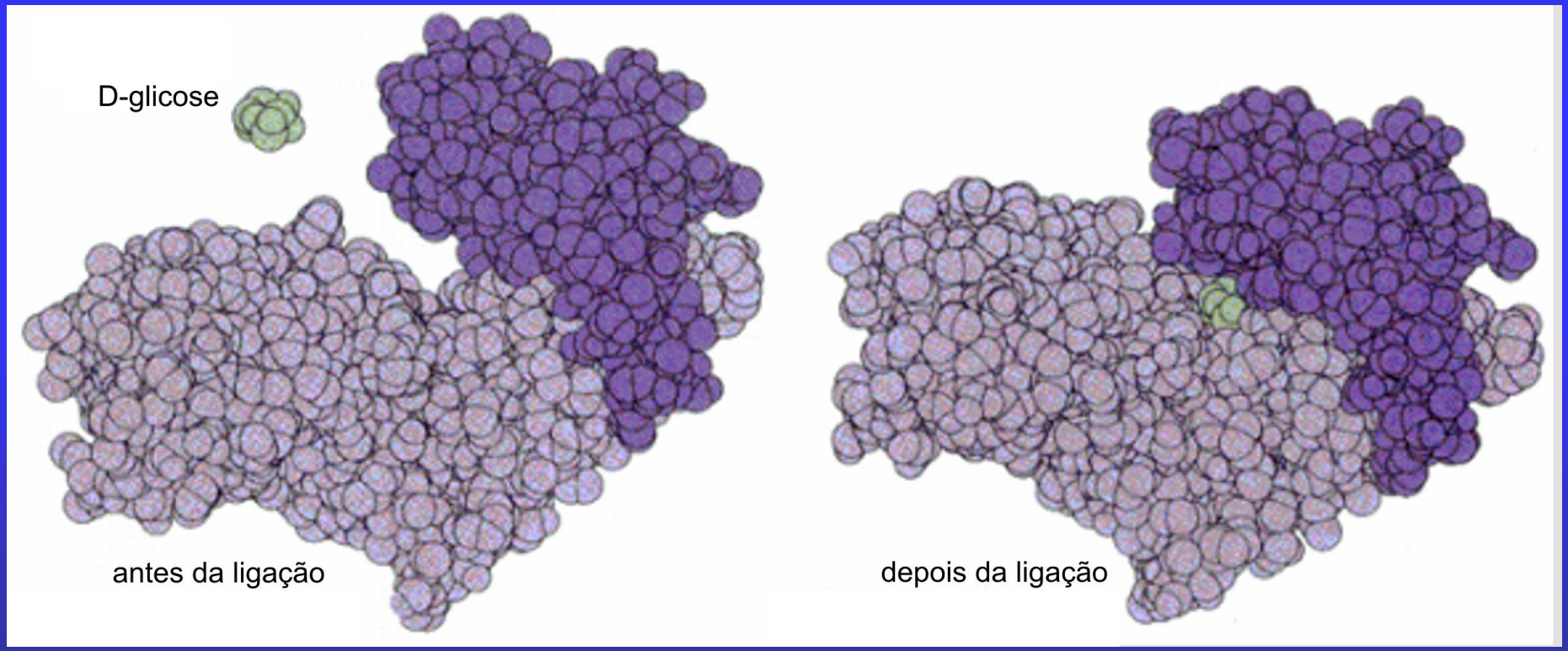


Figure 8.9 Induced-fit model of enzyme–substrate binding. In this model, the enzyme changes shape on substrate binding. The active site forms a shape complementary to the substrate only after the substrate has been bound.

Koshland (1958): **Encaixe Induzido**, enzima e o o substrato sofrem conformação para o encaixe. O substrato é distorcido para conformação exata do estado de transição.

Catálise enzimática – Encaixe induzido

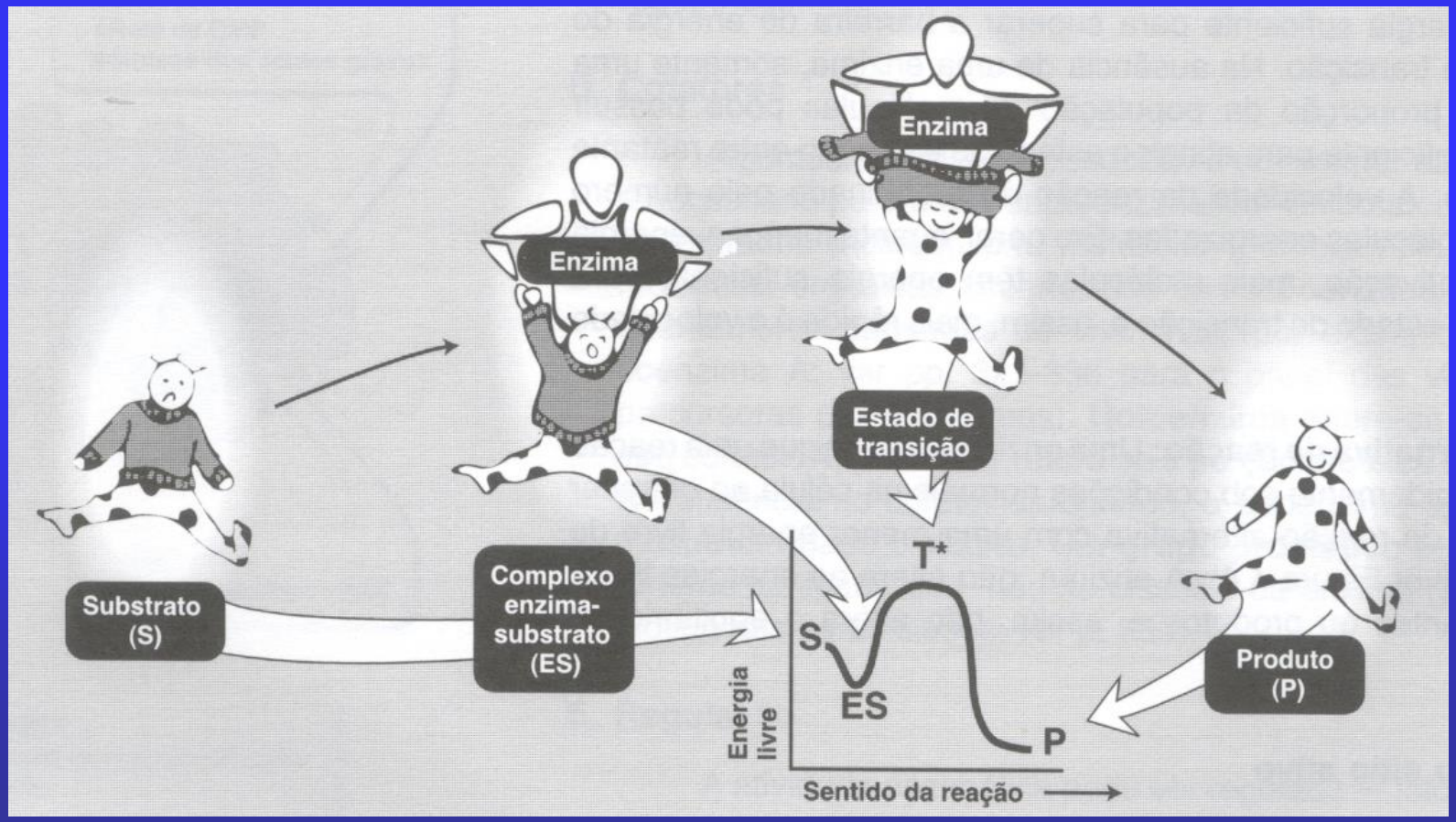
Ligação da glicose à hexoquinase (hexocinase)



Catálise enzimática – enzima inalterada por reação

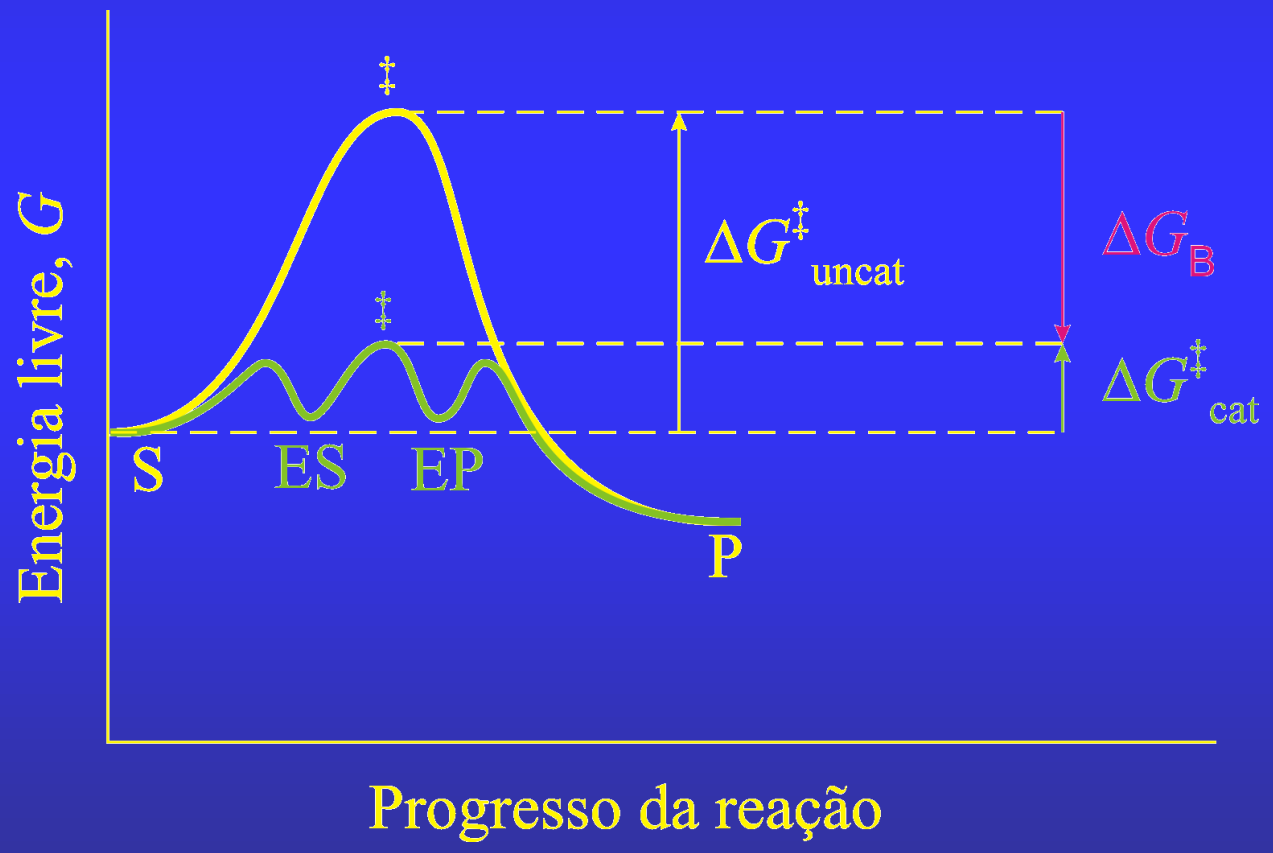
$$S + E \leftrightarrow ES \rightarrow P + E$$

Representação das alterações de energia que acompanham a formação do complexo ES, do estado de transição e a subseqüente liberação do produto



Catálise enzimática – energia de ativação

S + E ↔ ES ↔ EP → P + E

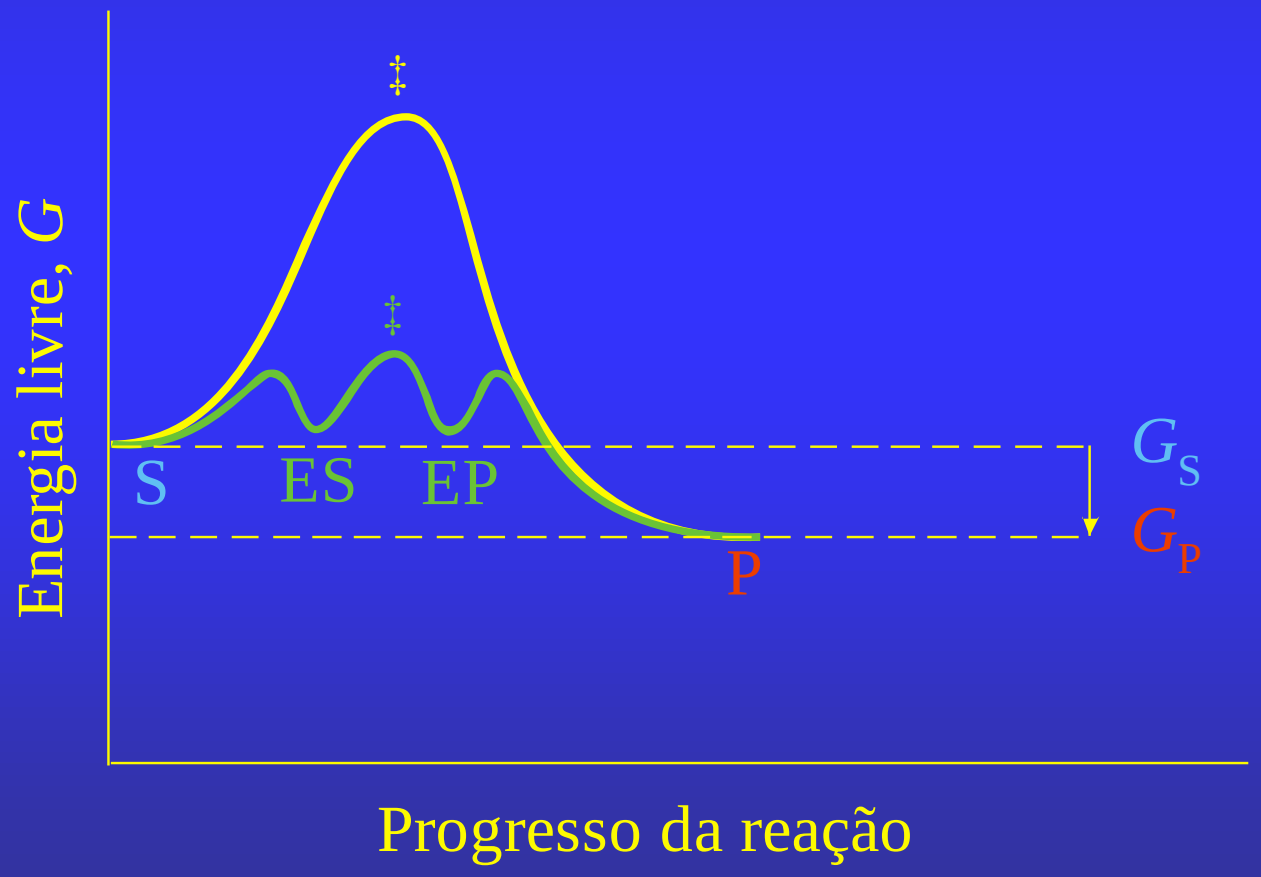


As enzimas facilitam a reação substrato-produto por diminuir energia de ativação através de complexos intermediários

ES e EP

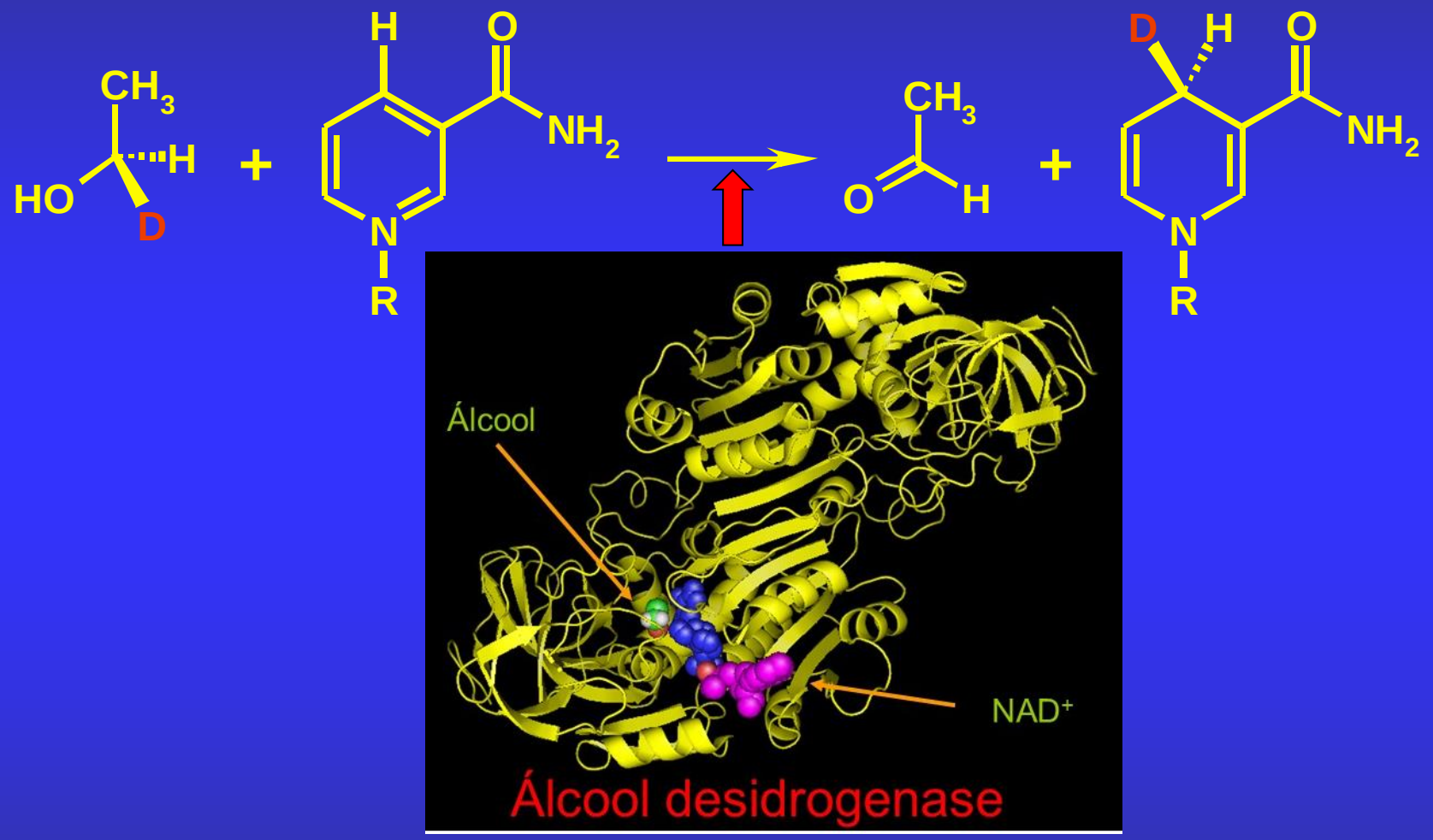
Catálise enzimática – equilíbrio da reação

S + E ↔ ES ↔ EP → P + E



As enzimas não alteram o equilíbrio das reações – energia livre dos substratos e produtos e igual na reação catalisada ou não catalisada

Catálise enzimática – estereoespecifidade

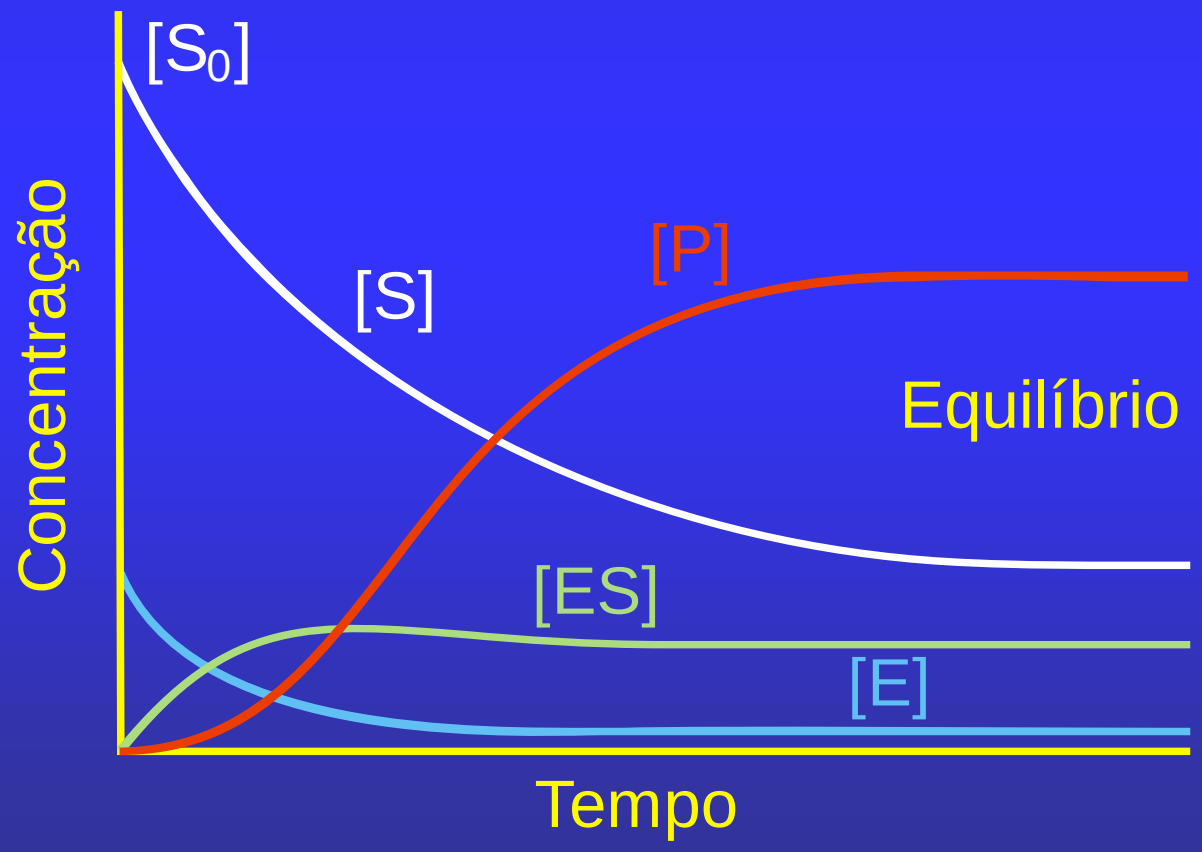


Somente um hidrogênio (D) específico é transferido do álcool para NAD^+ na reação catalisada pela álcool desidrogenase

Atividade da enzima

Mudanças nas concentrações de participantes da reação catalisada por enzima

$$S + E \leftrightarrow ES \rightarrow P + E$$



Efeito de pH na atividade das enzimas

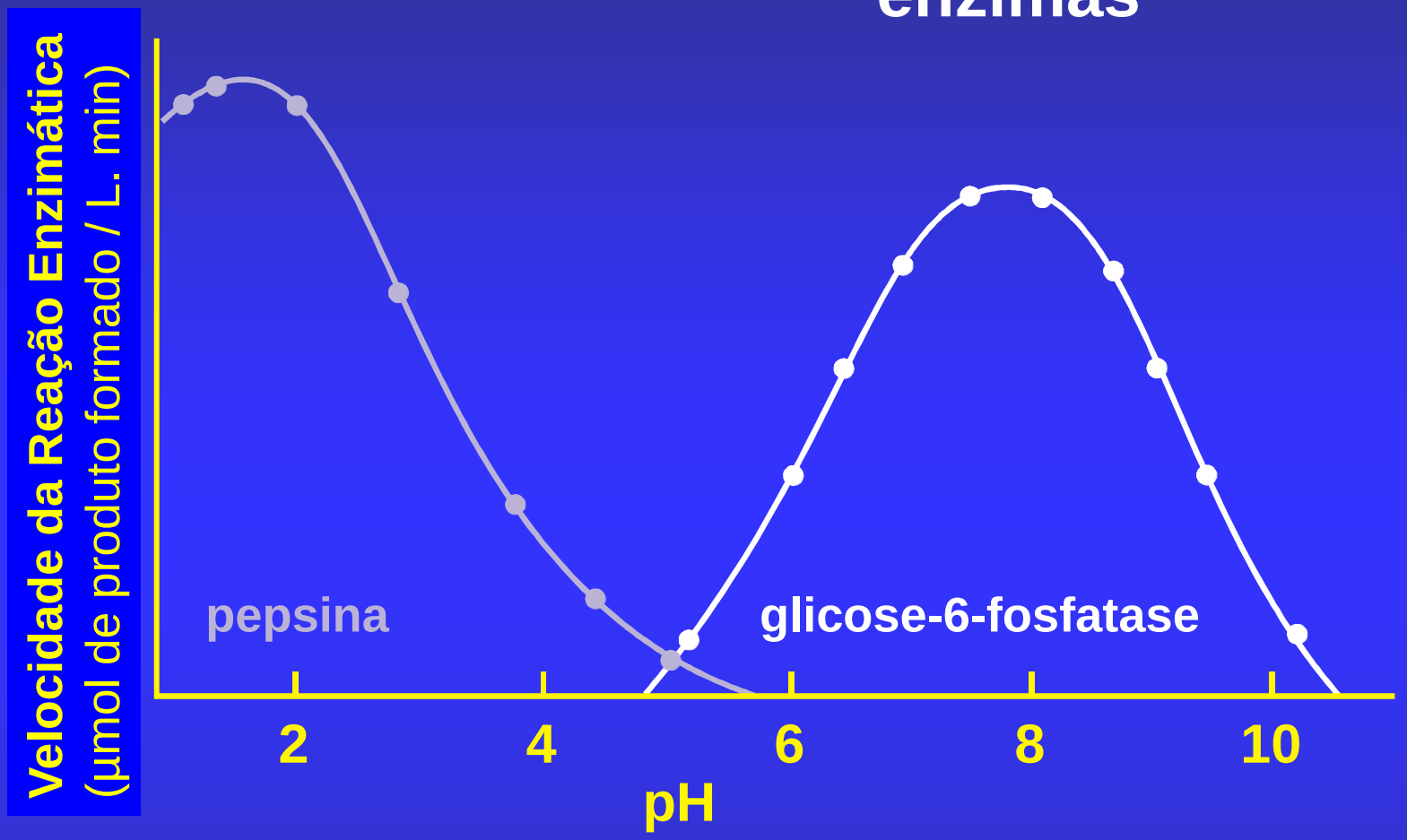
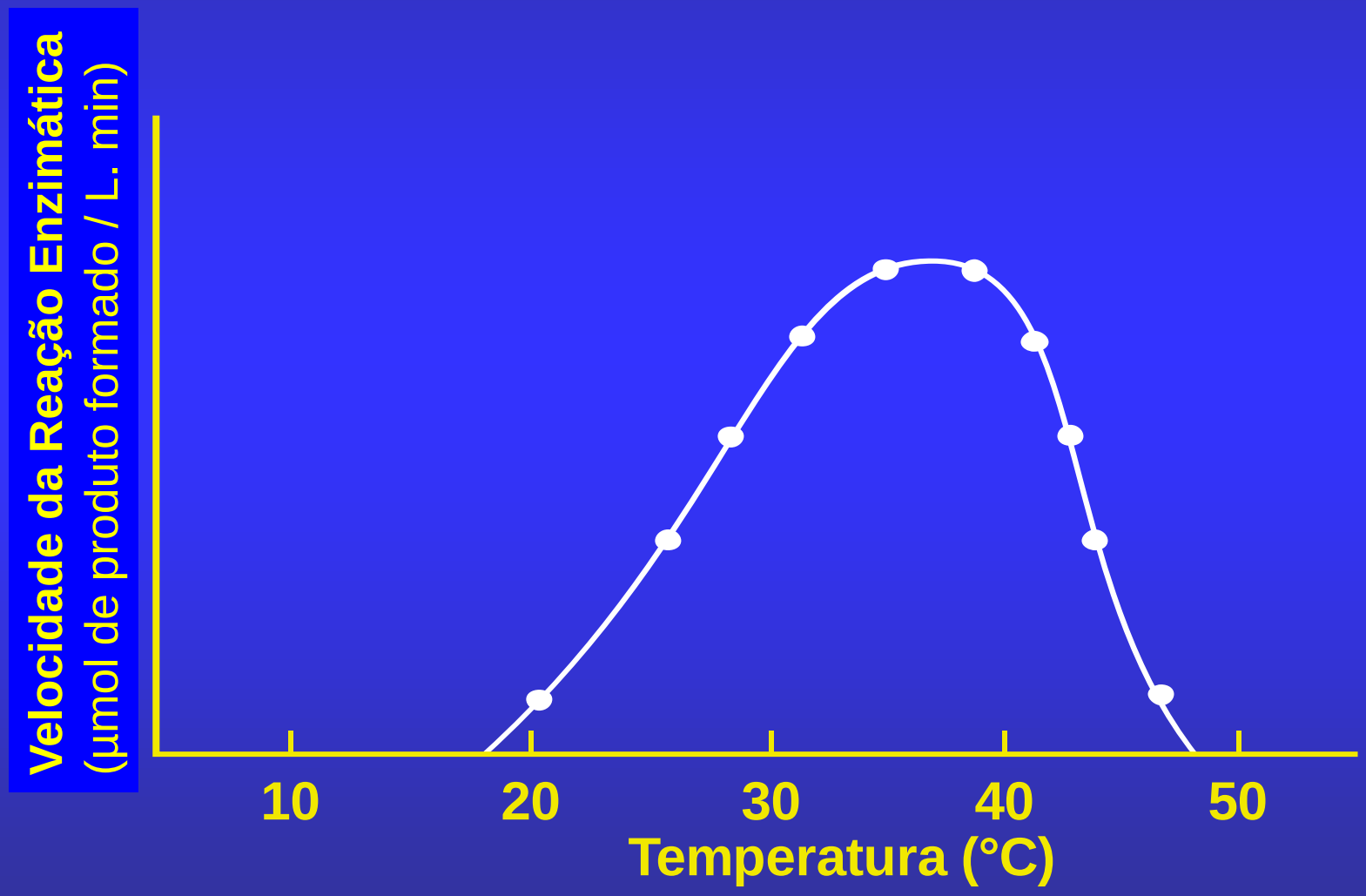


Tabela 5.5 pH ótimo de enzimas.

Enzimas	pH ótimo
Pepsina	1,5
Fosfatase ácida	4,5
Urease	6,5
Tripsina	7,8
Arginase	9,7

Efeito de temperatura na atividade das enzimas

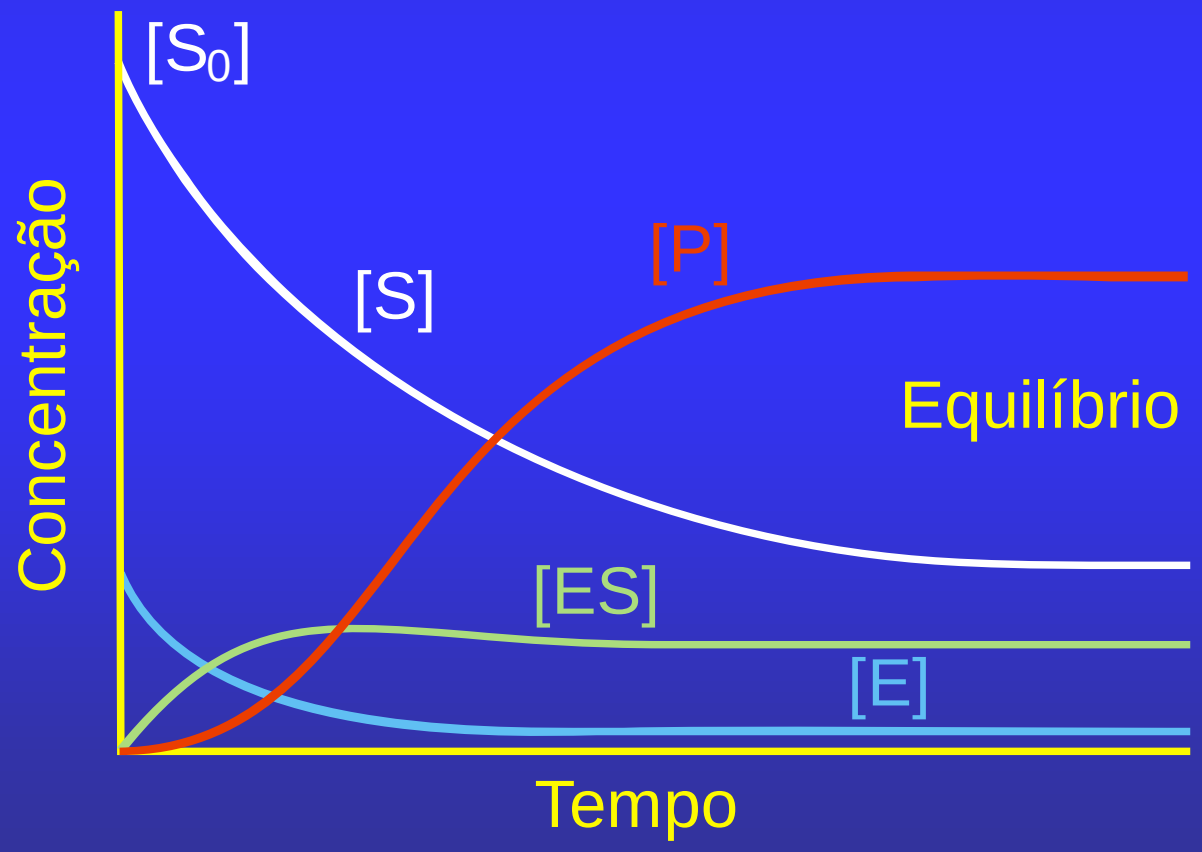


Aula 3
Cinética Enzimática: Caracterização da atividade enzimática

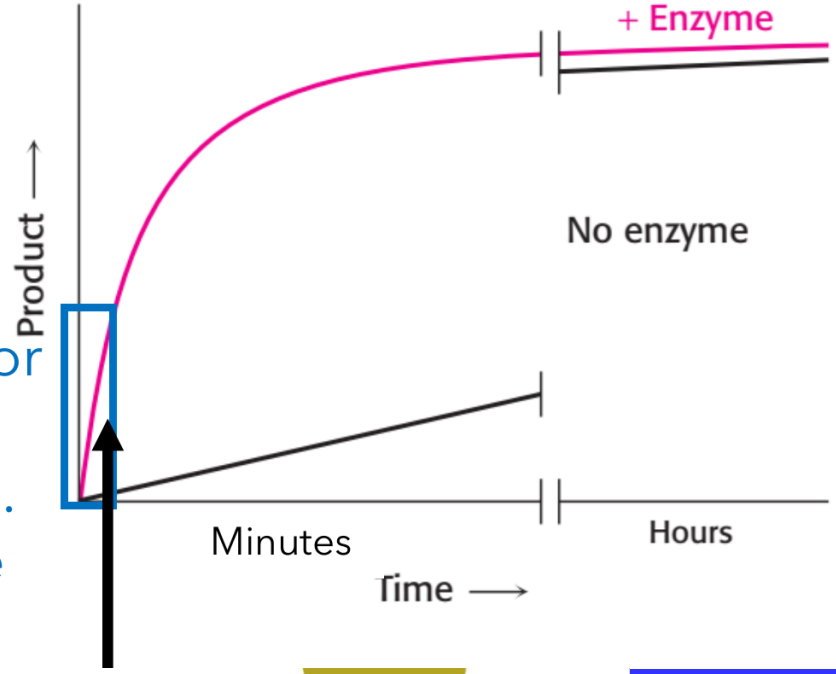
Atividade da enzima

Mudanças nas concentrações de participantes da reação catalisada por enzima

$$S + E \leftrightarrow ES \rightarrow P + E$$



Parte linear da curva catalisada por enzima está relacionada a ***velocidade inicial (v_0)*** da reação. Isso se converte no parâmetro de ***atividade enzimática***.



*A atividade enzimática é a *taxa de formação* de **produto** no **tempo**. Ela deve se basear em medida de ***velocidade inicial*** **(v_0)** da reação.

*A unidade utilizada se chama **U** (unidade de atividade enzimática).

*1 U = 1 µmol de formação de produto por minuto. Pode ser dividido pelo volume da amostra (U/L)

*Portanto, é somente uma variação da unidade para medida de velocidade da reação ($mol.L^{-1}s^{-1}$).

*A medida de **v_0** ***NÃO*** é feita no equilíbrio.

$$E + S \leftrightarrow ES \rightarrow E + P$$

$$A \leftrightarrow B$$

$$v = \frac{d[B]}{dt} \quad \text{ou} \quad v = -\frac{d[A]}{dt}$$

$$v = k\,[A]$$

$$a\,A + b\,B \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} c\,C + d\,D \qquad (3)$$

$$v_1 = k_1 [A]^a [B]^b$$

$$v_{-1} = k_{-1} [C]^c [D]^d$$

$$K_{eq} = \frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{[C]^c [D]^d}{[A]^a [B]^b}$$

No equilíbrio, $V_1 = V_{-1}$

A velocidade de uma reação química mede a taxa de variação $d[E]/dt$ da quantidade de alguma espécie E participante do processo reativo com o tempo. Desta forma, a velocidade de uma reação pode ser expressa de várias maneiras. Por exemplo, considerando a equação (3), podemos escrever a velocidade da reação direta em termos da quantidade do componente A consumida com o tempo,

$$v_1 = -d[A]/dt \qquad (5a)$$

ou em termos da quantidade do componente D, formado a partir de A e B:

$$v_1 = +d[D]/dt \qquad (5b)$$

Cinética enzimática – equação de Michaelis-Menten

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \qquad ES \xrightarrow{k_2} E + P$$

Leonor Michaelis and

Maud. L. Menten.

Die Kinetik der Invertinwerkung. Biochem. Z., 49, 333 (1913).

velocidade da reação é limitada por passo ES → E + P

$v = k_2[ES]$

Se [S] >> [E] e o sistema é em equilíbrio dinâmico a [ES] = const.

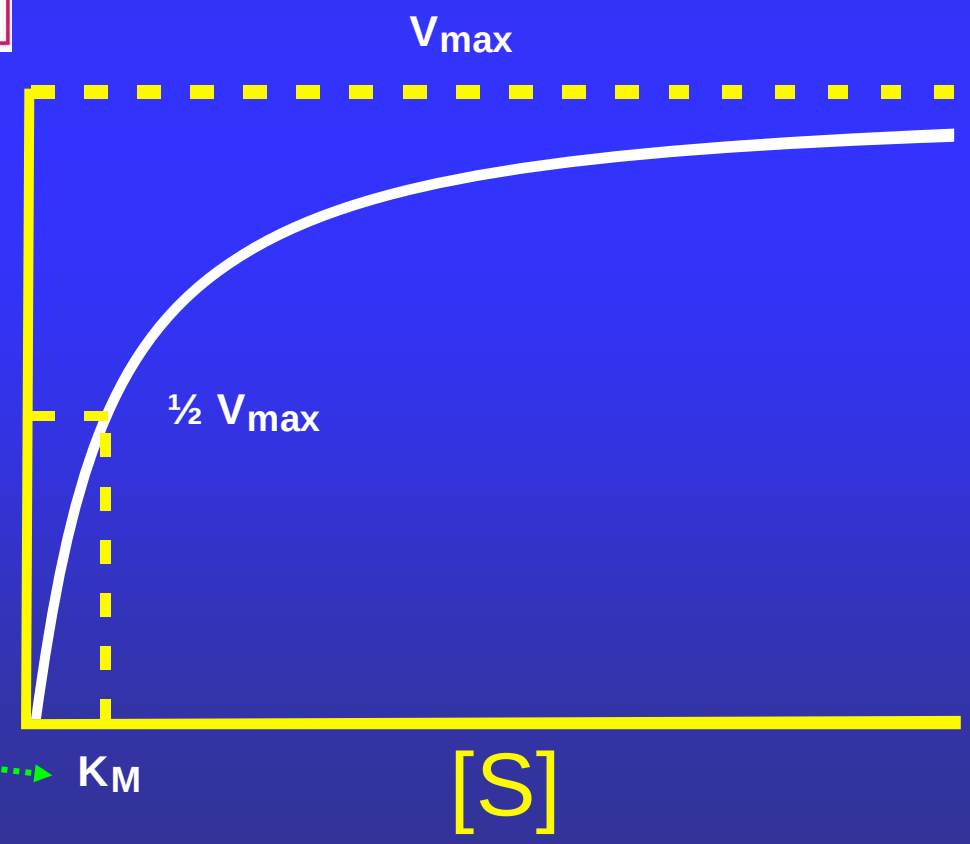
$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_2} E + P$$

Gráfico de Michaelis-Menten

Equação de Michaelis-Menten

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

Constante de Michaelis



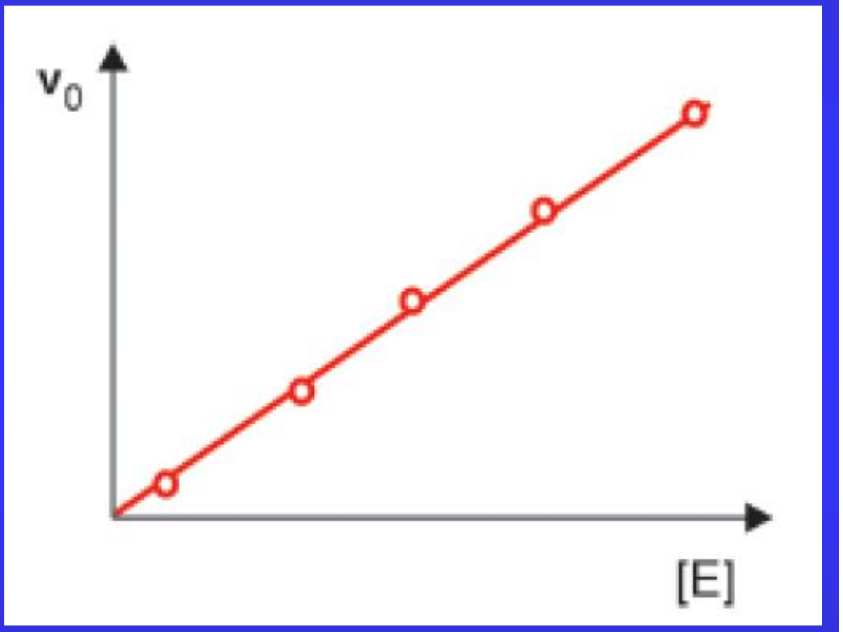
Entre estas [S], uma representa um equilíbrio estabelecido com 50% de E e ES. Nesta condição a velocidade é igual a metade da Vmáx, ou seja, representa uma [S] que foi chamada de constante de Michaelis-Menten, ou Km, que é específica da enzima.

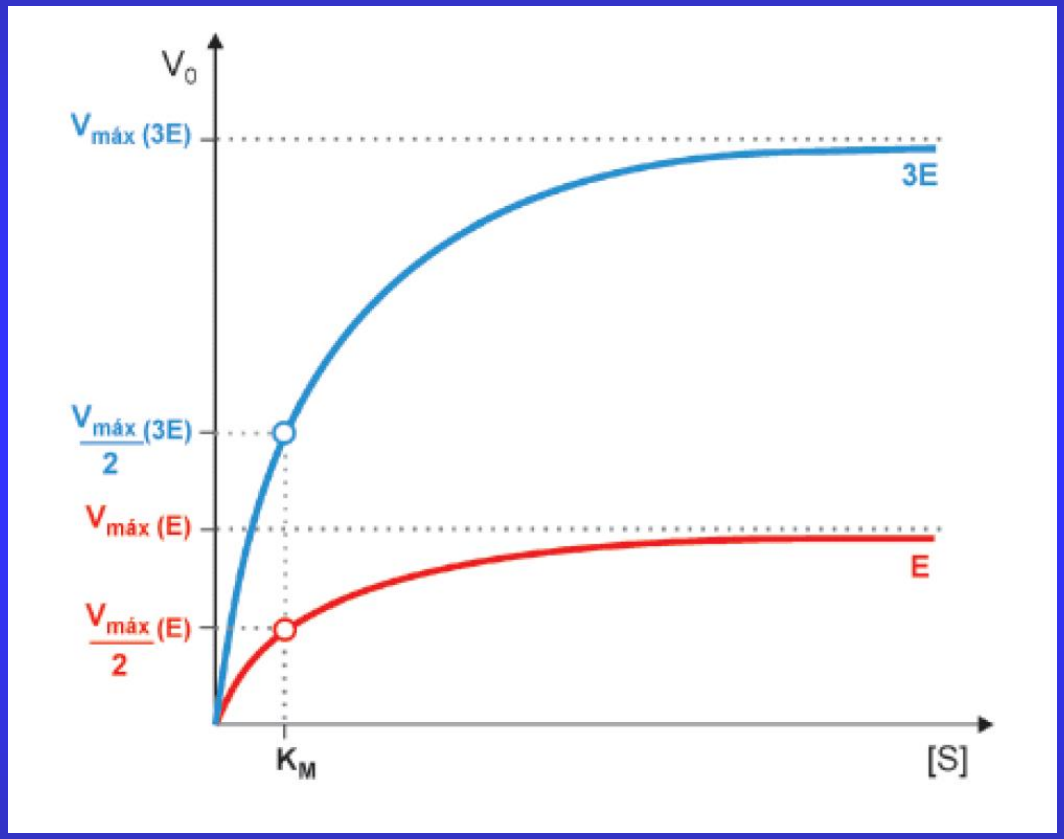
Km representa a afinidade de uma Enzima por um Substrato!

Tabela 5.9 Constante de Michaelis-Menten de enzimas.

Enzima	Substrato	K_M (mM)
Glicerol desidrogenase	Glicerol	39
Anidrase carbônica	CO_2	7,5
Álcool desidrogenase	Etanol	0,5
Isocitrato desidrogenase	Isocitrato	0,45
Hexoquinase	Glicose	0,15
Hexoquinase	Frutose	1,5

A velocidade da reação é diretamente proporcional à concentração da enzima





Equação de Lineweaver-Burk

Equação de Michaelis-Menten

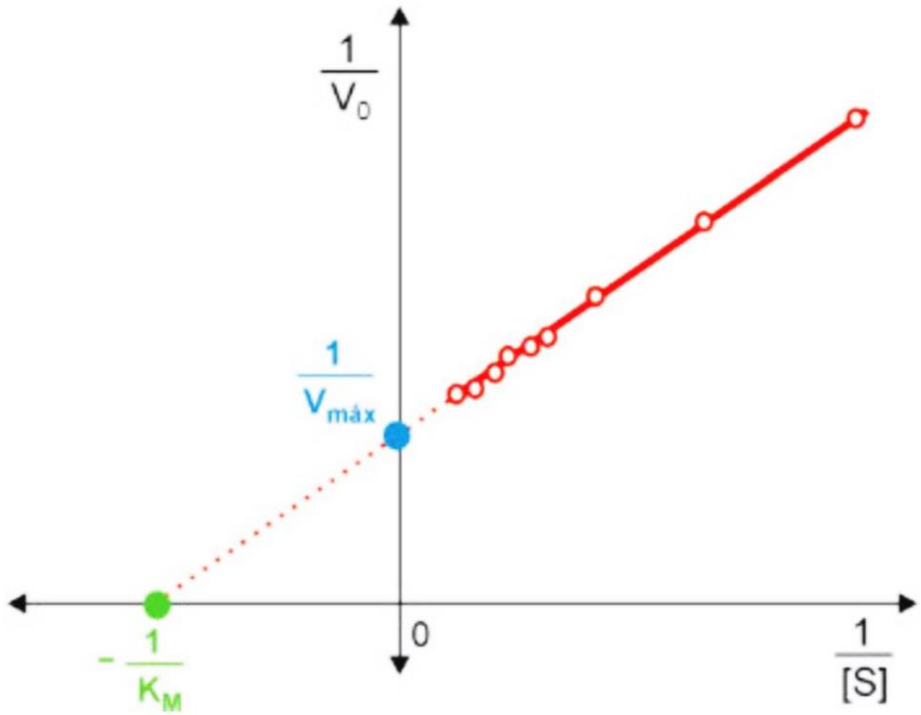
$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

Constante de Michaelis

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M}{V_{máx}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{máx}}$$

Plote de Lineweaver-Burk

Usa-se os inversos de $\mathbf{v_0}$ e **[S]** para que a curva adquira aspecto linear. Assim, é possível se obter uma valor aproximado de $\mathbf{v_{max}}$ e $\mathbf{K_M}$.

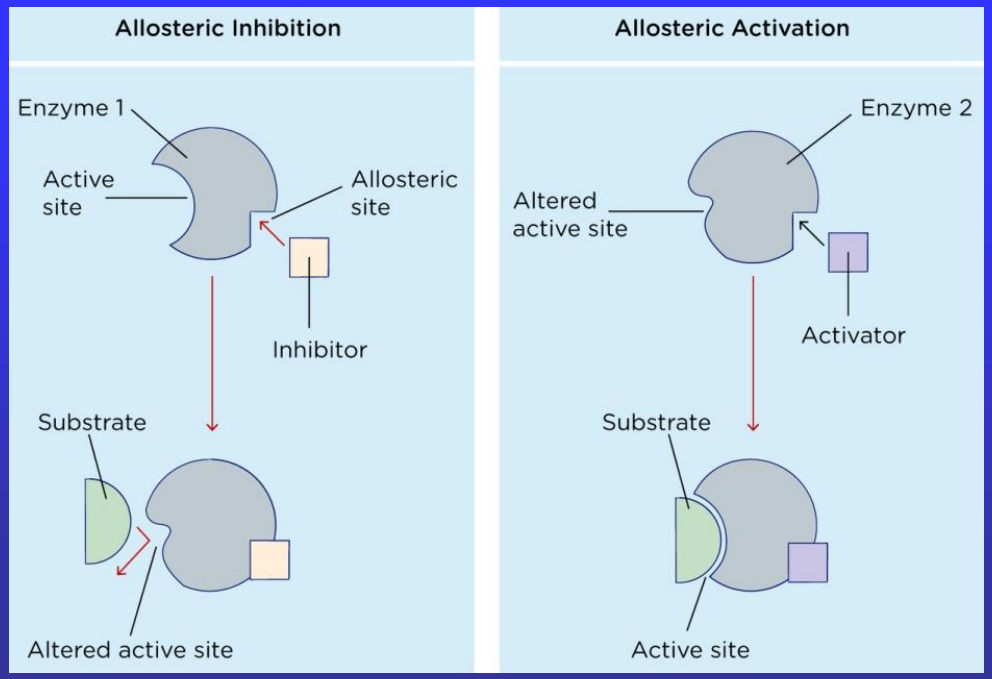


Lineweaver, H; and Burk, D. (1934).

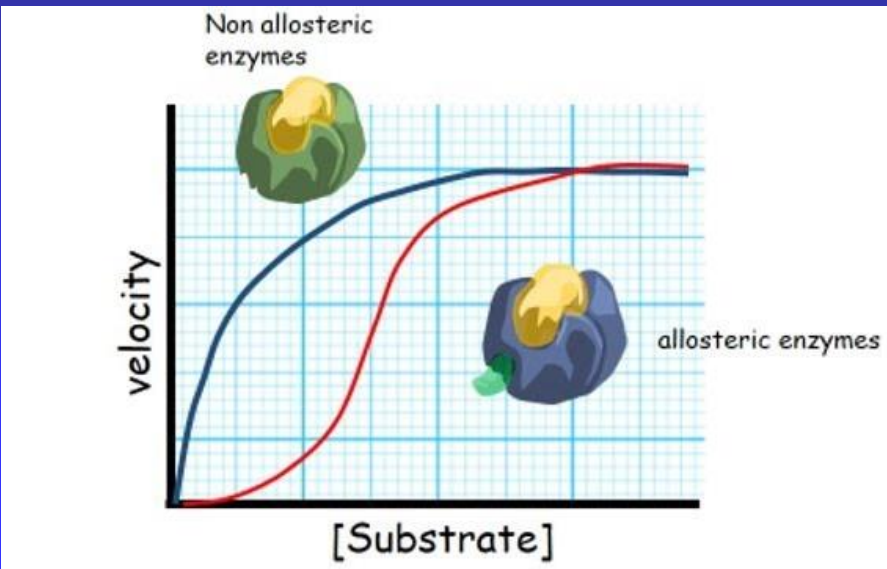
The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *J. Am. Chem. Soc.* **56**: 658-66.

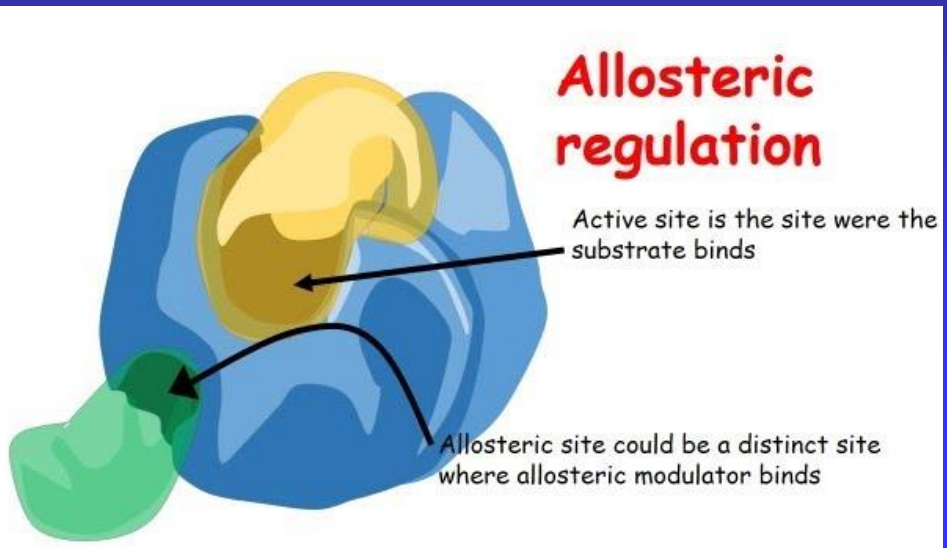
Enzimas alostéricas

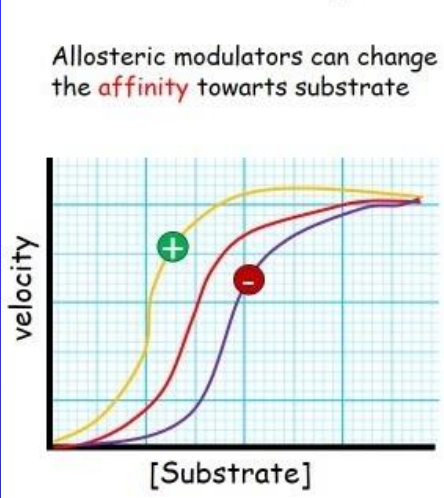
- Alostérico: Grego *allo* = outro + *stereo* = forma
- Enzima alostérica: um oligômero cuja atividade biológica é afetada por outras substâncias ligadas a ela
  - estas substâncias modificam a atividade da enzima por alteração na conformação de sua estrutura 4ária
- Efetor alostérico: uma substância que modifica o comportamento de uma enzima alostérica; pode pode ser
  - inibidor alostérico
  - ativador alostérico

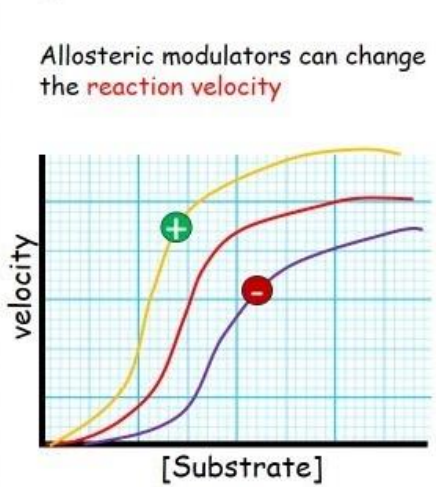


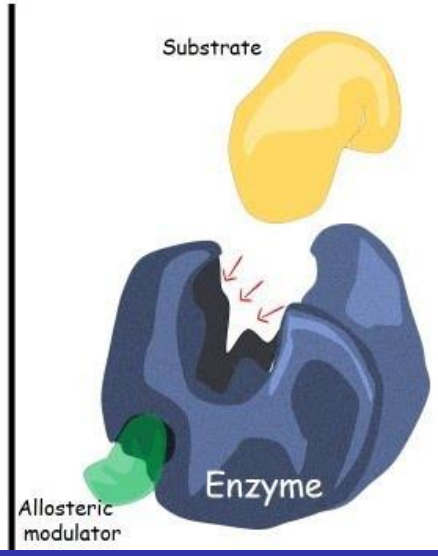
Enzimas alostéricas



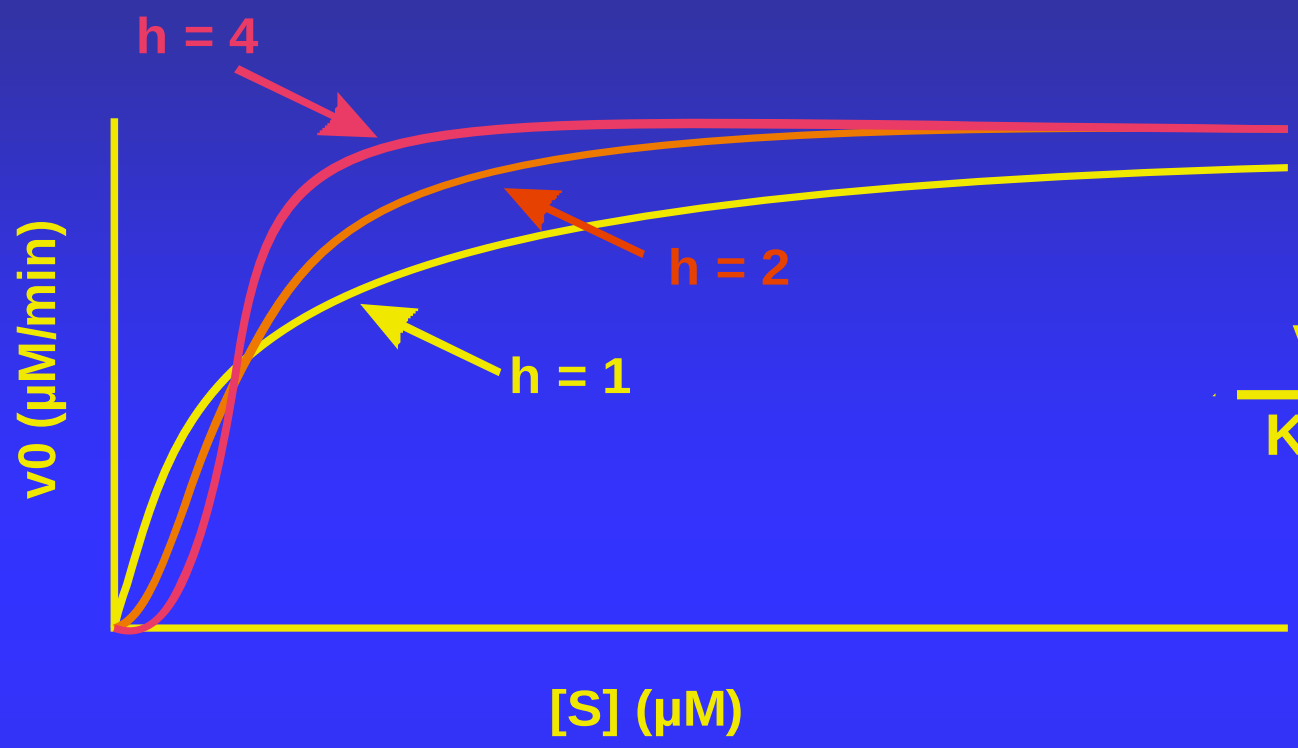




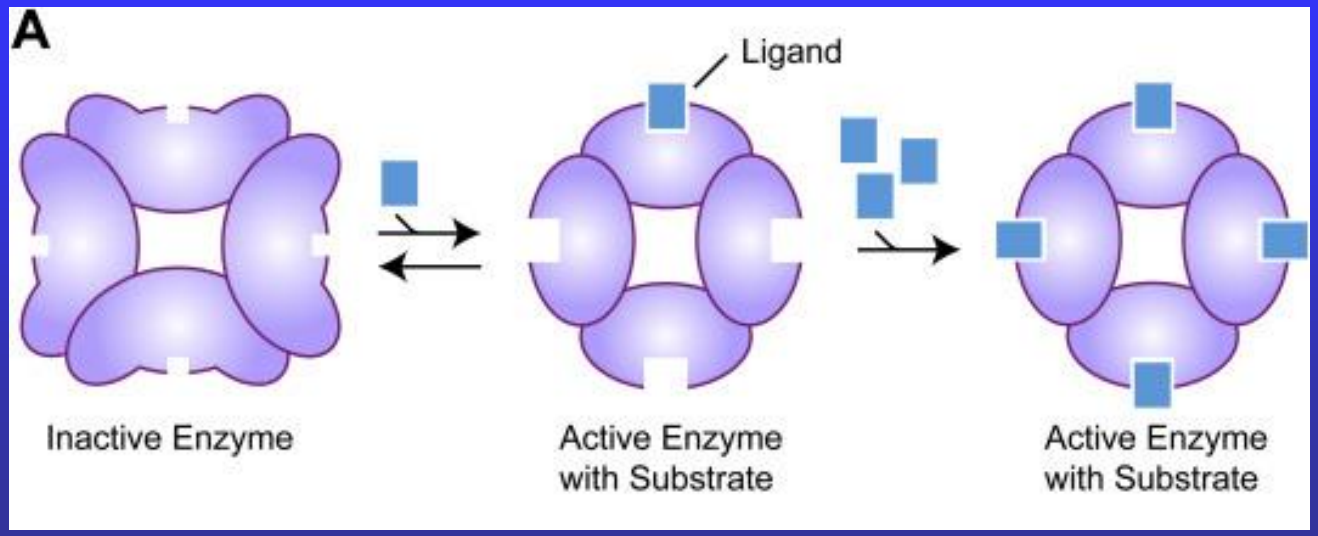




Enzimas alostéricas - cooperatividade: equação de Hill



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



Substância F: **retroalimentação negativa (*efetuador alostérico negativo*)** na reação catalisada por B **na via 1**

Substância F: **retroalimentação positiva (*efetuador alostérico positivo*)** na reação catalisada por A na **via 2**.

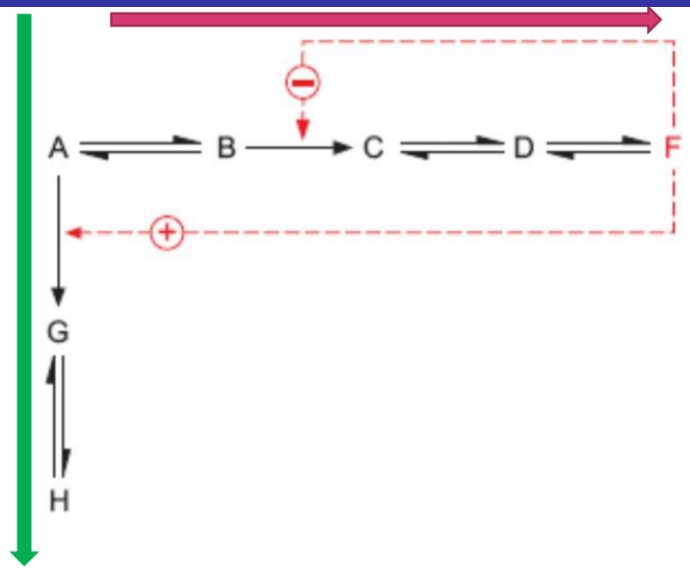


Tabela 19.1 Enzimas alostéricas e seus efetuadores.

	Efetuadores alostéricos	
Enzima	**Negativos**	**Positivos**
Fosfofrutoquinase 1	ATP, Citrato	AMP, Frutose 2,6-bisfosfato
Frutose 1,6-bisfosfatase	Frutose 2,6-bisfosfato	
6-Fosfofruto-2-quinase	Fosfoenolpiruvato	
Frutose 2,6-bisfosfatase	Frutose 6-fosfato	Fosfoenolpiruvato
Piruvato quinase	Alanina	Frutose 1,6-bisfosfato
Piruvato carboxilase		Acetil-CoA
Piruvato desidrogenase	Acetil-CoA, NADH	Piruvato
Isocitrato desidrogenase	NADH	ADP
α-Cetoglutarato desidrogenase	Succinil-CoA, NADH, ATP	
Carnitina acil transferase I	Malonil-CoA	
Citrato liase	Acil-CoA	

Tabela 5.7 Enzimas cujas concentrações plasmáticas são alteradas em determinadas doenças.

Enzimas	Moléstias
Transaminases, γ-glutamil transferase	Hepatite, enfarte do miocárdio
Creatina quinase, lactato desidrogenase	Enfarte do miocárdio
Amilase, lipase	Pancreatite
Fosfatase alcalina, γ-glutamil transferase	Hepatite, cirrose, câncer, processos obstrutivos de vias biliares
Fosfatase ácida	Neoplasia de próstata
Amilase	Parotidite (caxumba)

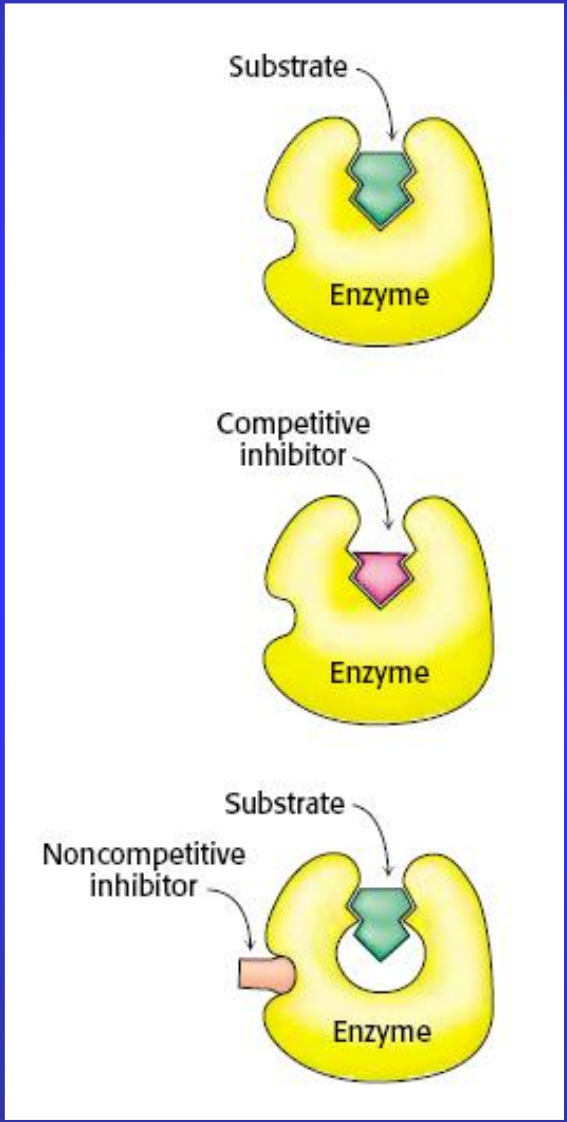
Tabela 5.6 Resultados de exames laboratoriais de dosagens de enzimas plasmáticas em dois indivíduos (A e B).

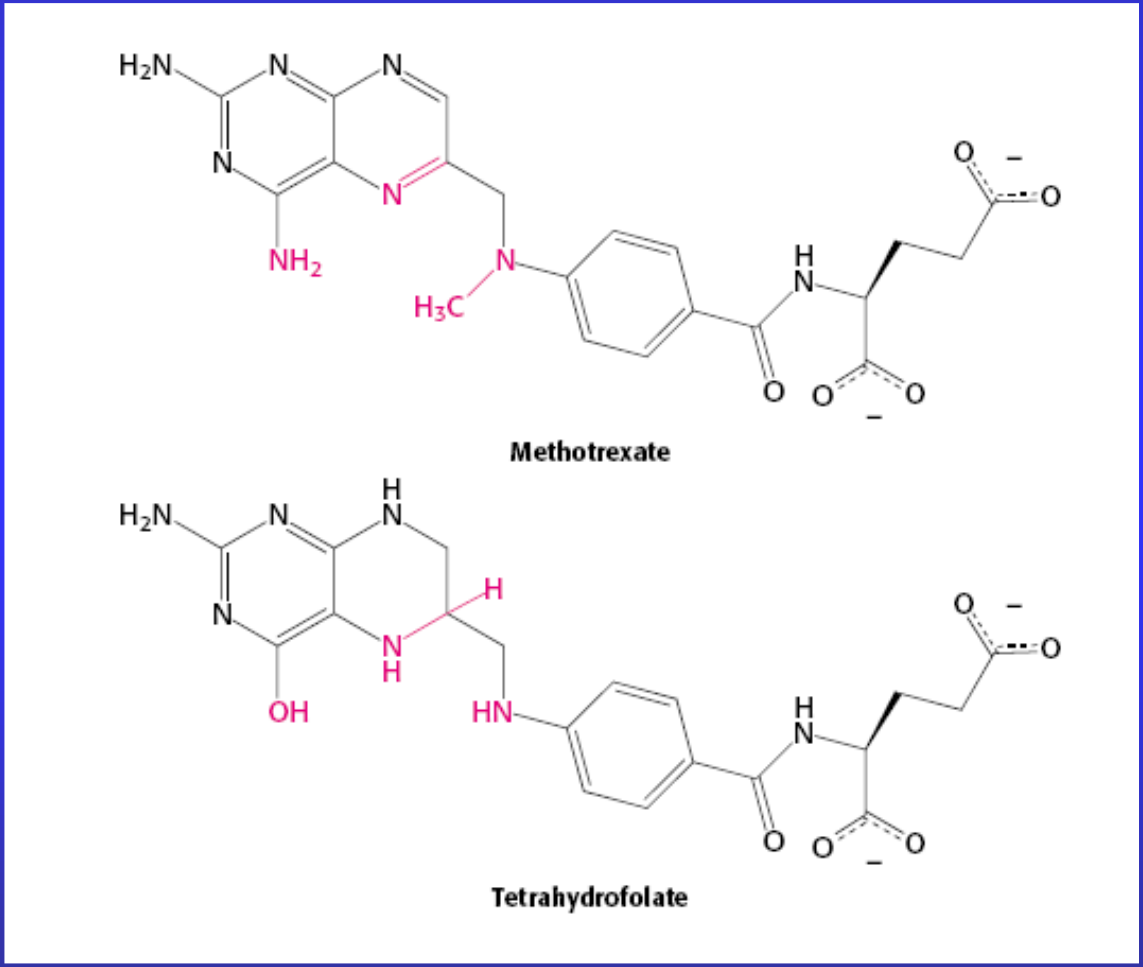
	Atividade enzimática no soro (U/L)		
Enzimas	Indivíduo A	Indivíduo B	Valores de referência
Aldolase	2	2,1	Até 3
Amilase	120	125	60-160
Colinesterase	2.700	3.200	1.900-3.800
Creatina quinase	62	50	10-80
Lactato desidrogenase	398	220	120-240
Fosfatase ácida prostática	2,8	7,7	Até 3,7
Fosfatase alcalina	295	80	50-250
Aspartato transaminase	560	12	Até 18
Alanina transaminase	1.095	18	Até 21
γ-Glutamil transferase	61	11	6-28

Os resultados dos exames do indivíduo A são compatíveis com um quadro de hepatite viral aguda e os dos exames do indivíduo B, com carcinoma de próstata.

Aula 3:
Regulação da atividade enzimática

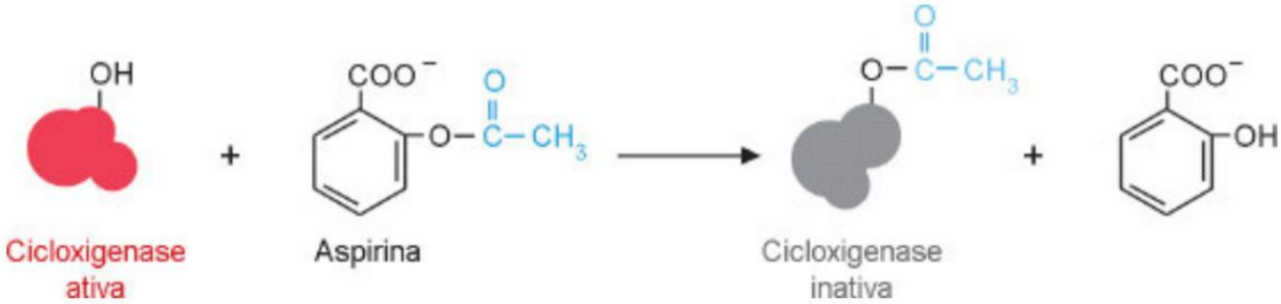
Regulação da atividade enzimática – inibição





Regulação da atividade enzimática – inibidores

Inibidores Irreversíveis



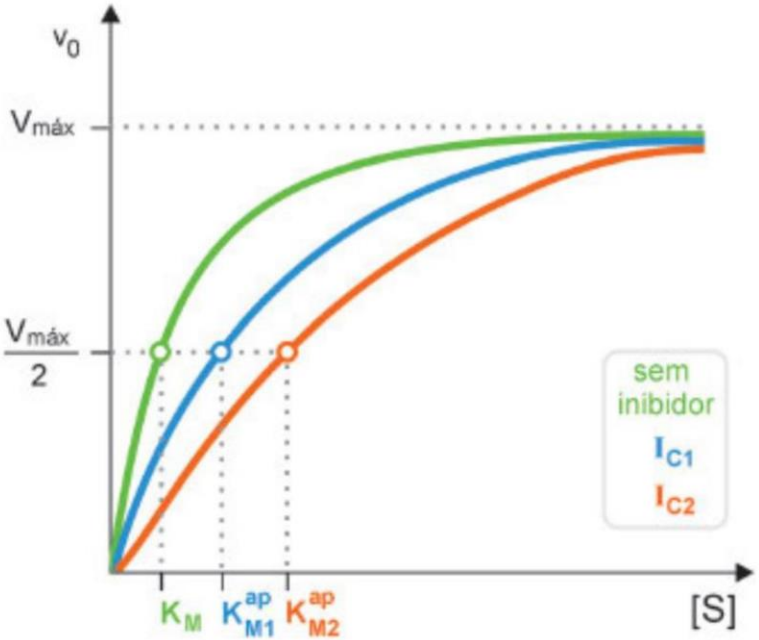
Inibidores Reversíveis

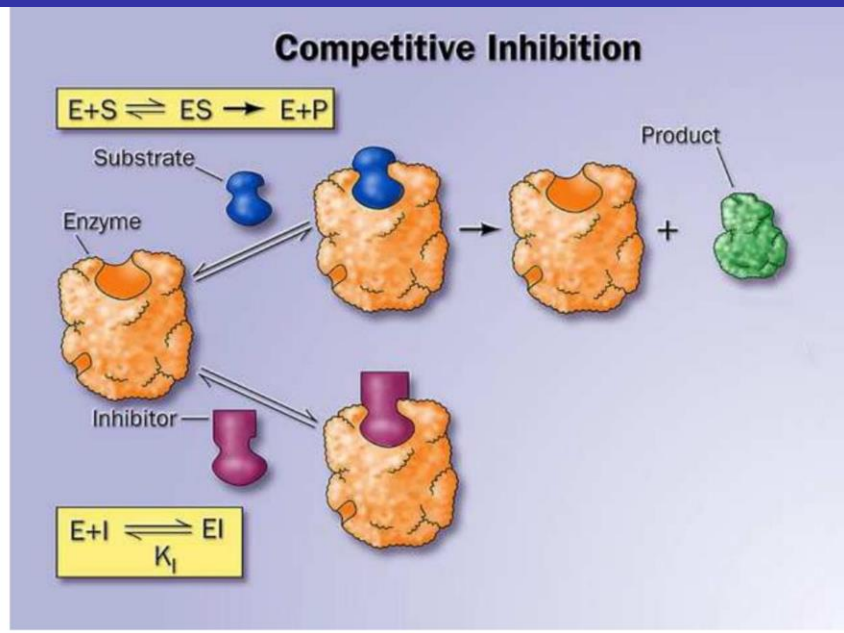
Competitivo

Não-competitivo

Como compete pelo sítio ativo, é necessário maior **[S]** para se atingir $\mathbf{v_{max}/2}$, assim como $\mathbf{v_{max}}$.

Atinge-se o mesmo $\mathbf{v_{max}}$, mas $\mathbf{K_M}$ *muda*.

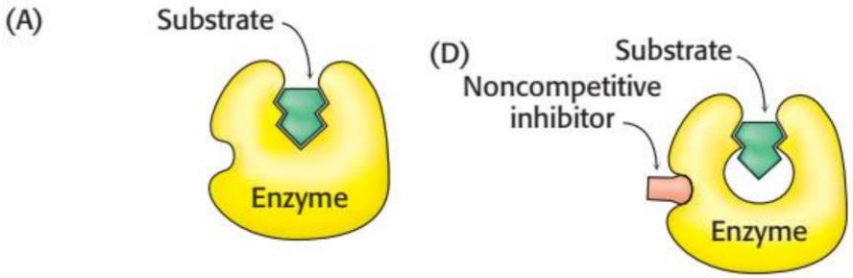


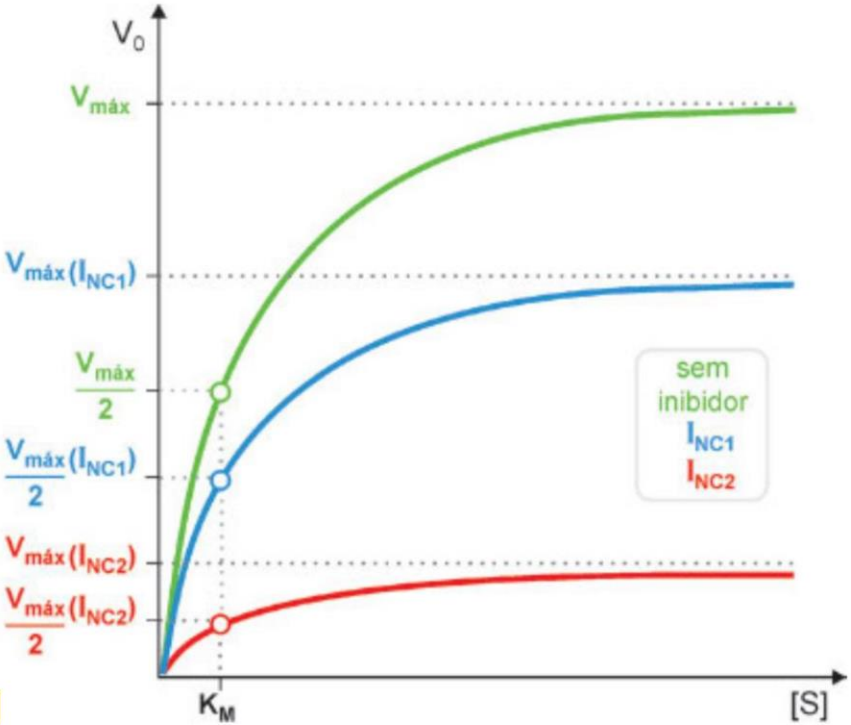


Inibidores Reversíveis

Competitivo

Não-competitivo



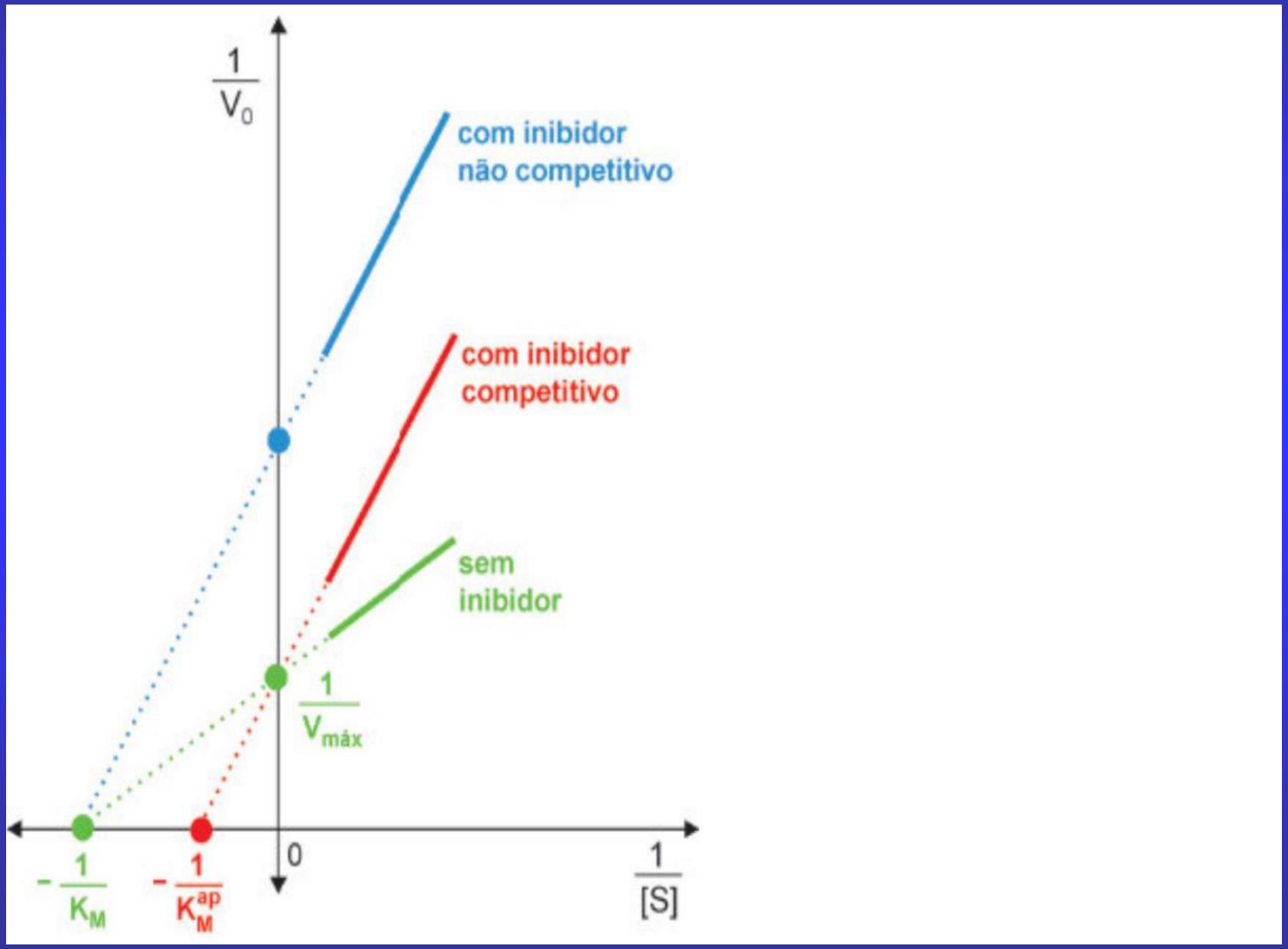


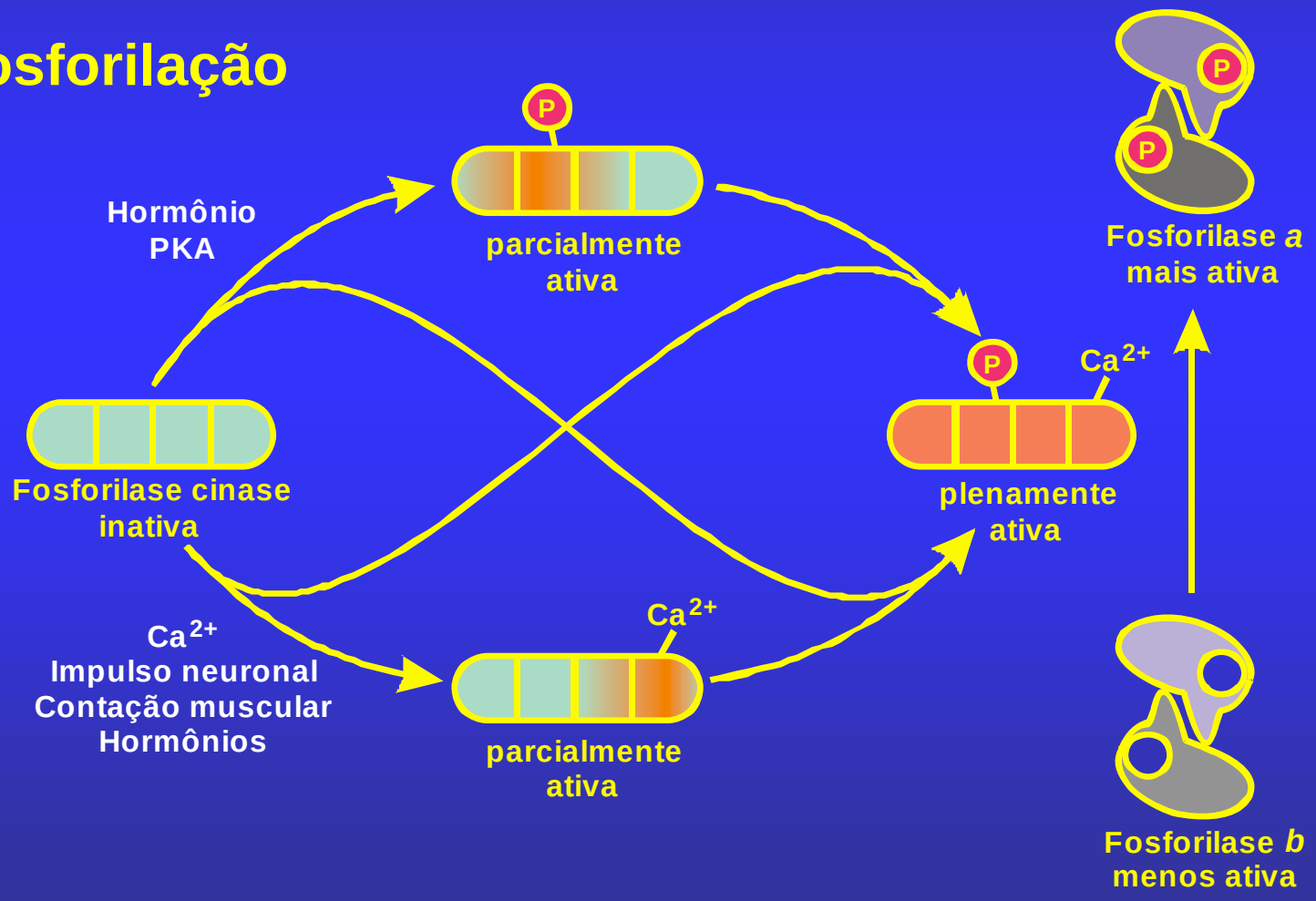
K_M *não muda*, mas não se atinge o mesmo **v_{max}**

Na prática é como se **[E]** fosse menor, pois o inibidor inativa a enzima temporariamente, mas *não* se liga no **sítio ativo**.

Inibidores podem ser usados como medicamentos, defesa, regulação, etc.

Plote de Duplo-Recíproco: reações enzimáticas com e sem inibidor reversível!



Regulação da atividade enzimática – modificação covalente da enzima

- **Fosforilação**