

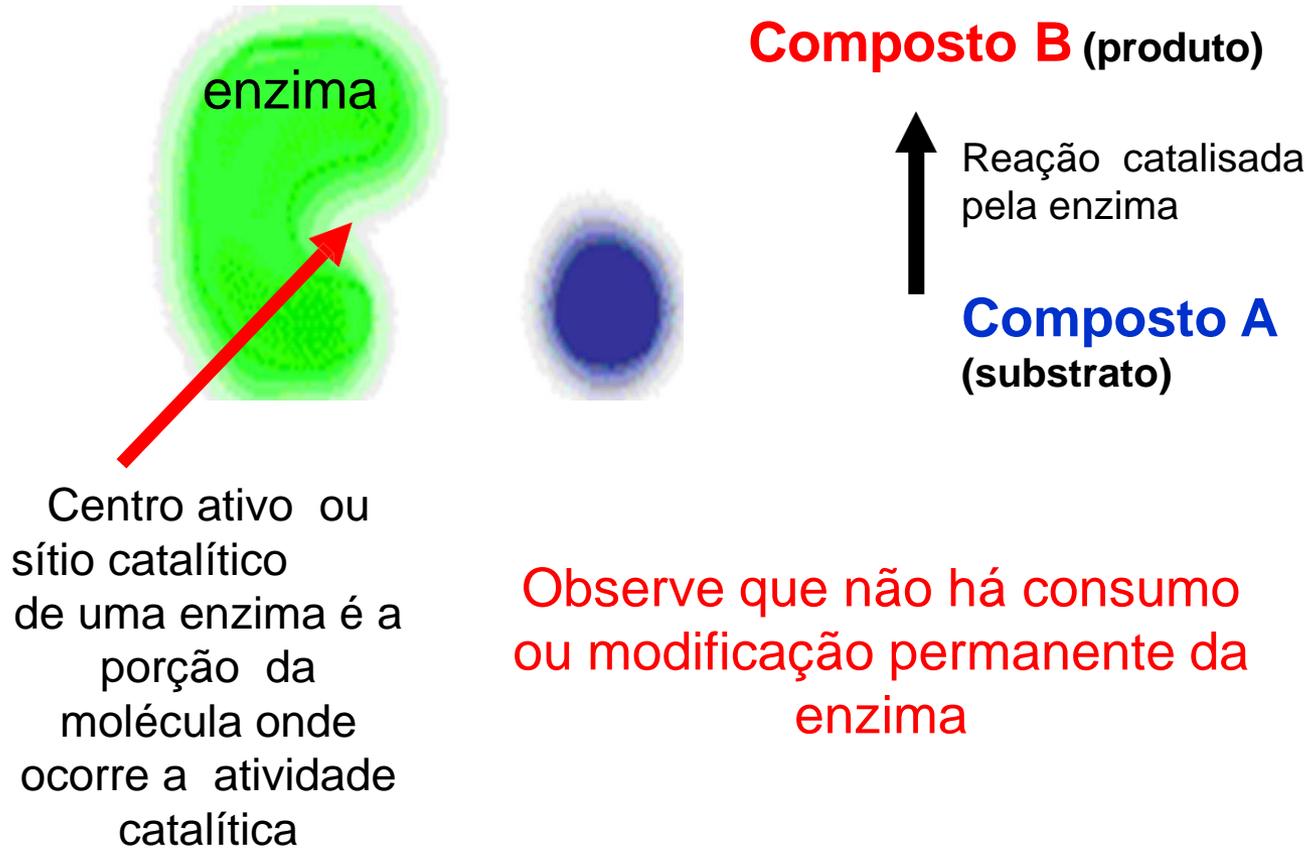
Cinética Enzimática

Prof. Dr. Henning Ulrich

Enzimas: como atuam ?

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

Enzimas são proteínas que agem como catalizadores biológicos:



Teoria da catálise

Considere as reações:



No **equilíbrio** da reação, as velocidades das reações se igualam: $V_1 = V_{-1}$

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

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

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

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

Equilíbrio químico

- As enzimas realizam, muitas vezes, as reações nos dois sentidos $E + S \rightleftharpoons ES \rightleftharpoons EP \rightleftharpoons E + P$

- A concentração de substratos e produtos é o que define a velocidade das reações

$$K_{eq} = \frac{[P]}{[S]}$$

- Poder catalítico das enzimas vem da **energia livre liberada** na formação de ligações fracas quando da interação enzima-substrato
- Interações fracas entre ES são otimizadas no estado de transição

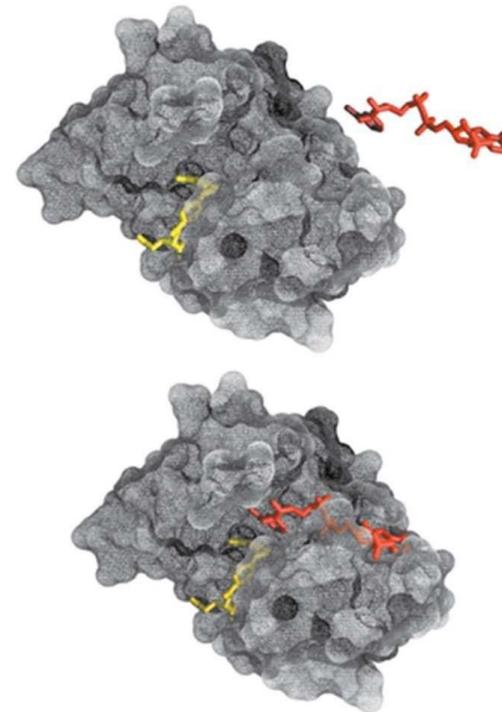


FIGURA 6-4 Complementaridade de formas entre o substrato e o seu sítio de ligação na enzima.

Enzimas são catalisadores biológicos:

Equação geral
de uma reação
enzimática



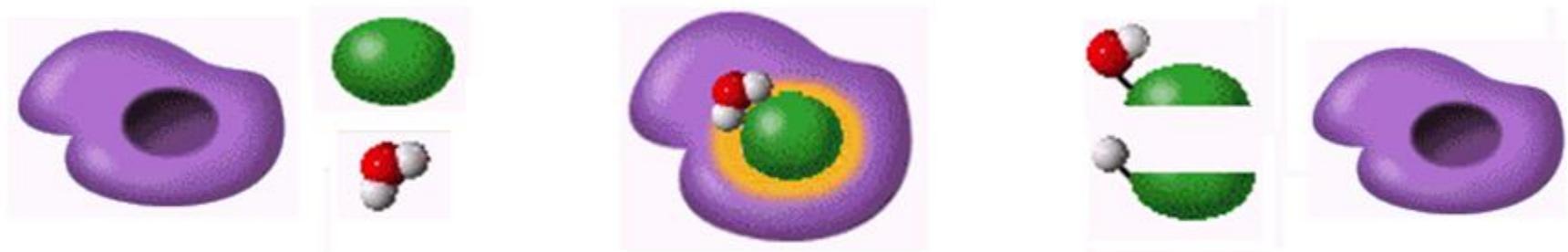
representa o
estado de
transição

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

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

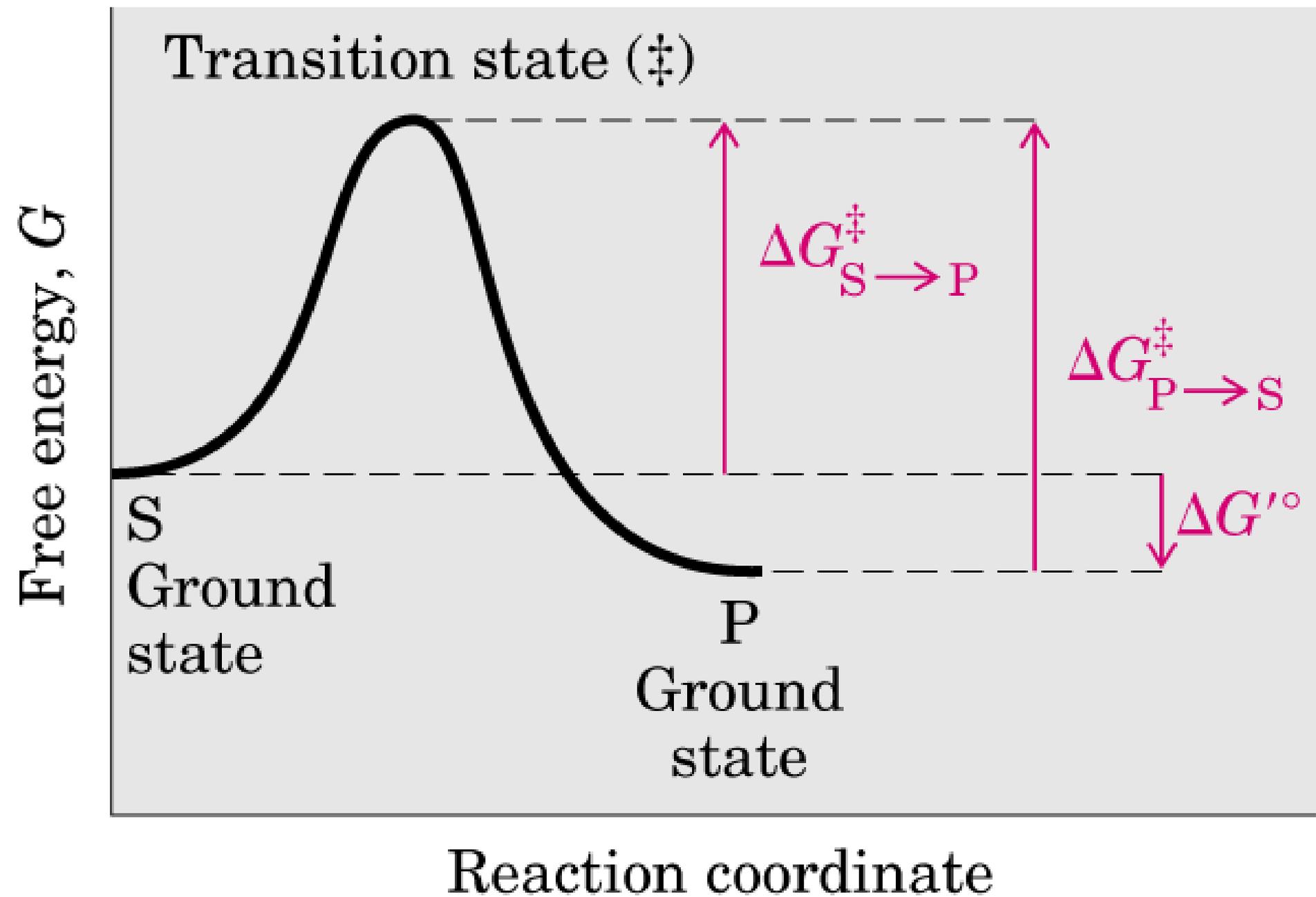
Como as enzimas trabalham?

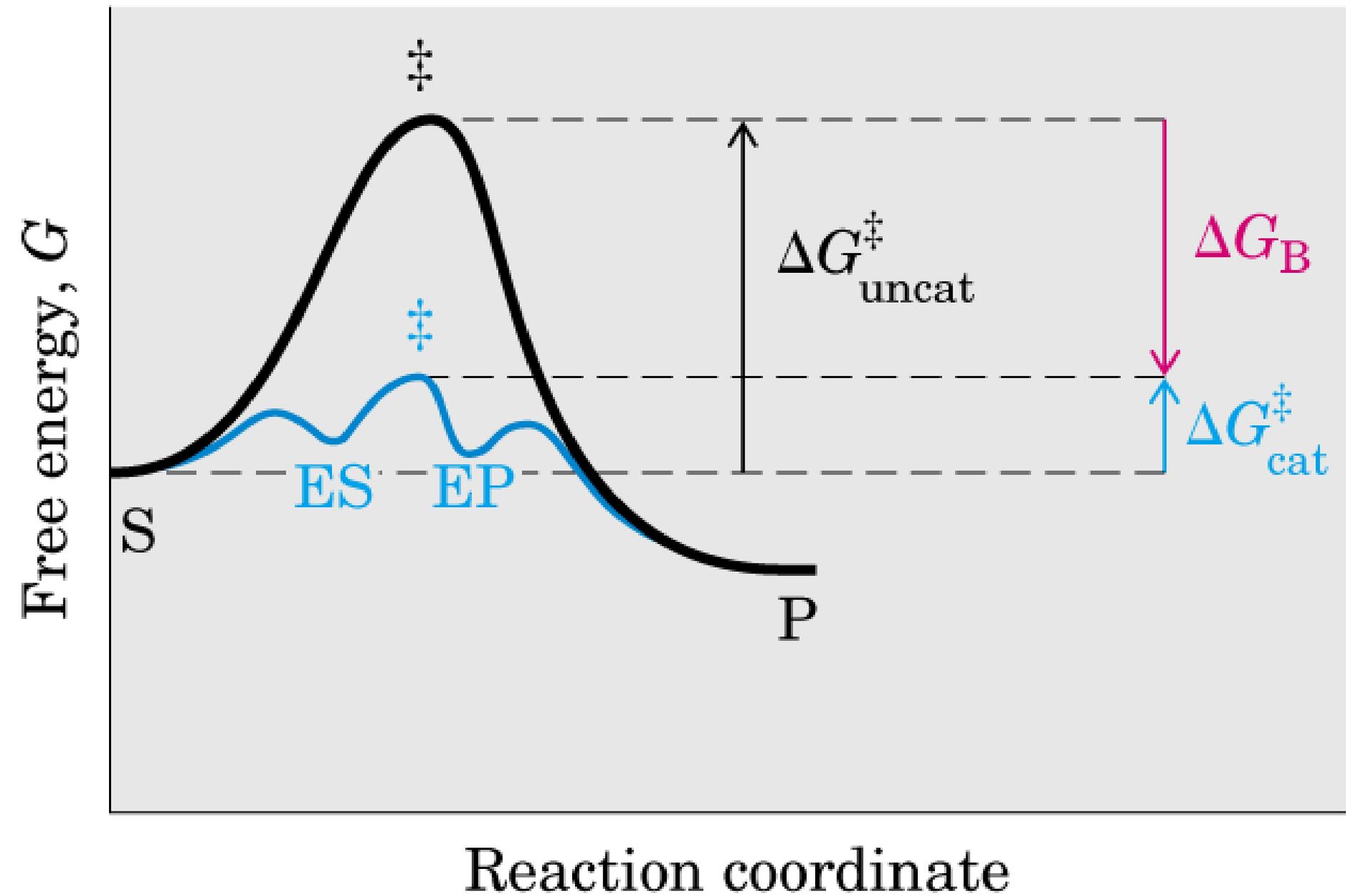
Componentes da reação enzimática



Substrato se liga ao
SÍTIO ATIVO
da enzima

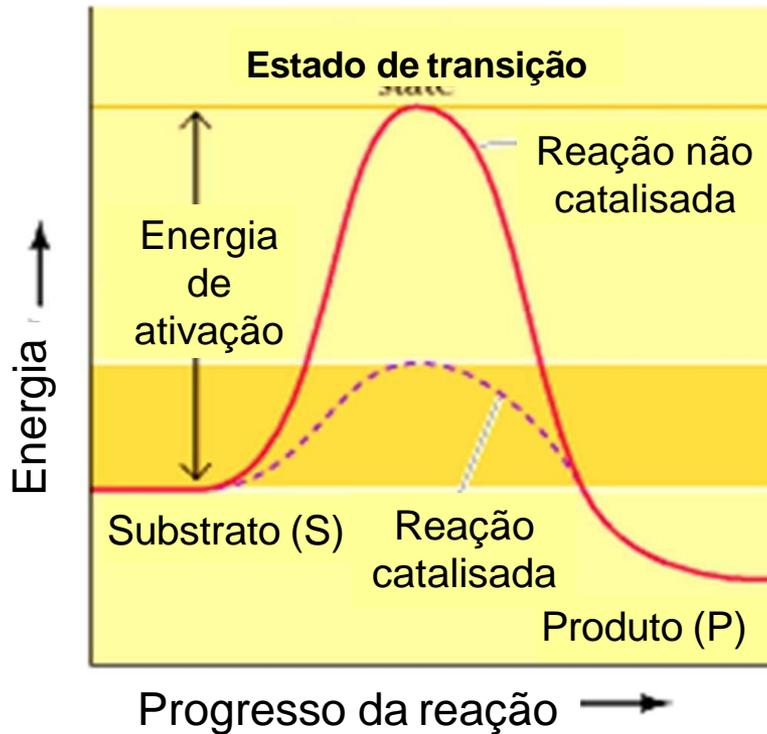
Princípio de catálise: o catalisador (enzima) não é consumido na reação





Teoria da catálise

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



Energia de ativação ou barreira energética:

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

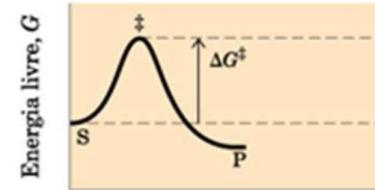
Estado de transição ou complexo ativado:

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

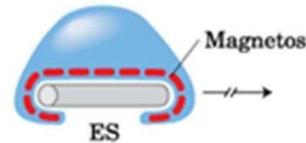
Um Catalisador diminui a barreira energética criando percursos alternativos da reação para formação do estado de transição.

Bastonase

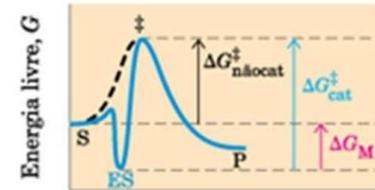
- Pauling (1946): Enzima deve ser complementar ao **Estado de transição (ET)**, não ao substrato
- ET não é forma estável
- Interações fracas entre a enzima e o substrato propulsionam a catálise enzimática
- Necessidade de múltiplas interações fracas explica pq alguns prots são tão grandes



(b) Enzima complementar ao substrato



Estabiliza
o
substrato



(c) Enzima complementar ao estado de transição

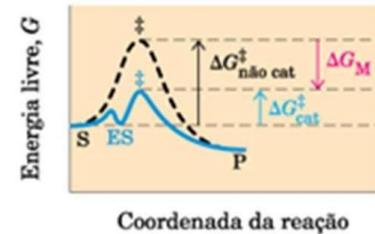
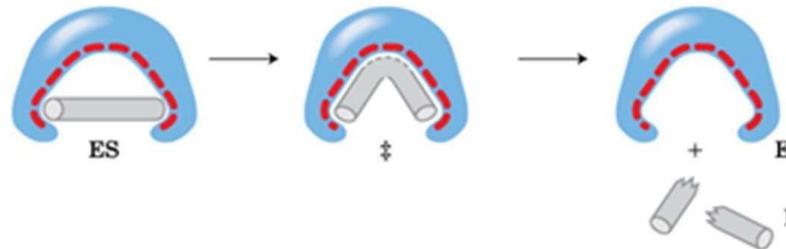


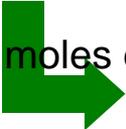
FIGURA 6-5 Uma enzima imaginária (bastonase) que catalisa a quebra de um bastão metálico.

Enzimas aceleram reações várias ordens de grandeza

Compare esses números !

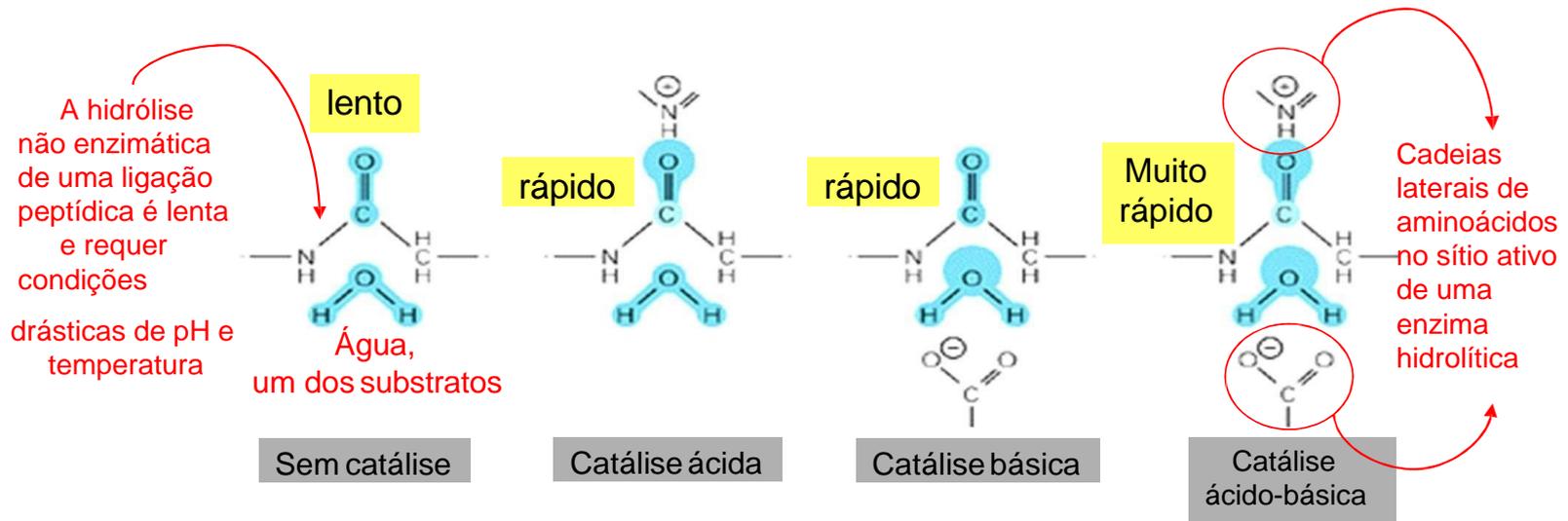
Enzima	Velocidade na ausência de enzima "Reações/segundo"	Velocidade da reação catalisada "Reações/segundo"	Poder catalítico
Anidrase carbônica $\text{H}_2\text{O}_2 \rightleftharpoons \text{H}_2\text{O} + \frac{1}{2} \text{O}_2$	1.3×10^{-1}	1.0×10^6	7.7×10^6
Triosefosfato isomerase	4.3×10^{-6}	4.300	1.0×10^9
Carboxipeptidase A	3.0×10^{-9}	578	1.9×10^{11}
AMP nucleosidase	1.0×10^{-11}	60	6.0×10^{12}
Nuclease de estafilococos	1.7×10^{-13}	95	5.6×10^{14}

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

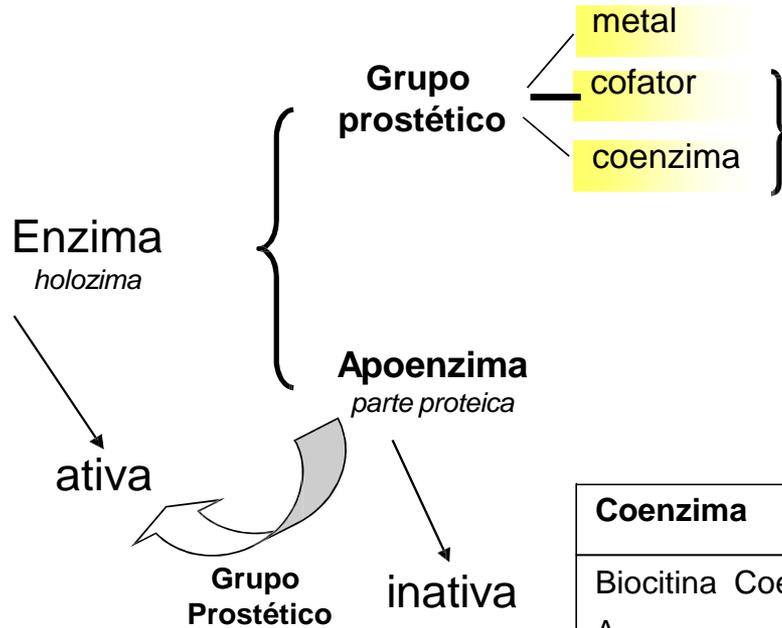
Número =  moles de S catalisado por segundo
de turnover moles de enzima

Por que a catálise por enzimas é mais eficiente ?

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



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



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

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

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

Classificação das Enzimas:

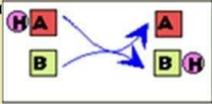
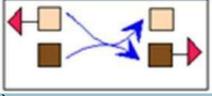
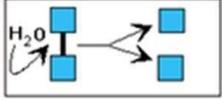
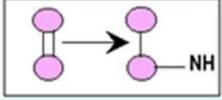
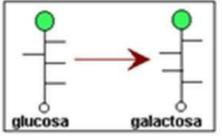
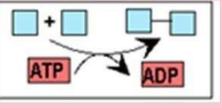


considera tipo de reação e substratos

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

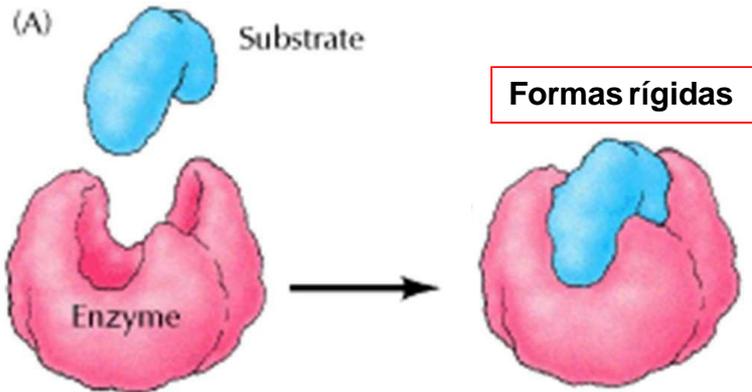
- é uma hidrolase 3
 - atua num anidrido 3.6
 - o anidrido contém fosfato 3.6.1
 - esse anidrido é ATP 3.6.1.3
- ATPase (Adenosinatrifosfatase); EC 3.6.1.3

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

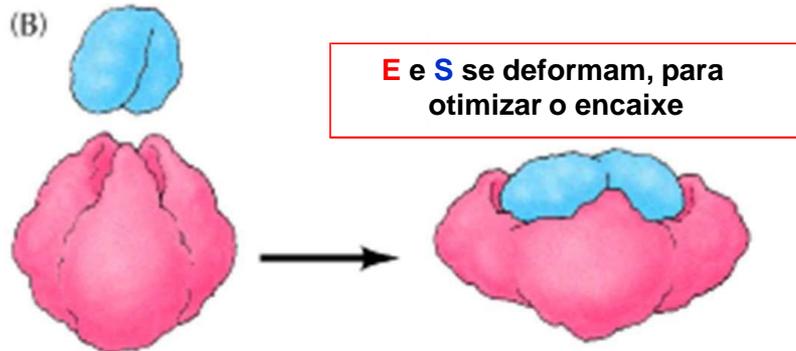
<p>1. Óxido-redutases (Reações de oxido- redução).</p>	<p>Transferência de elétrons. Se uma molécula se reduz, há outra que se oxida.</p> 
<p>2. Transferases (Transferência de grupos funcionais)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • grupos aldeído • grupos acila • grupos glucosil • grupos fosfatos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

Enzimas são específicas para o reconhecimento de seus substratos.

Modelo Chave-Fechadura



Modelo Chave-Fechadura



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

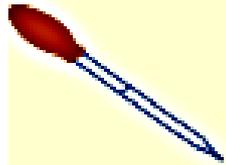
No entanto, o modelo chave-fechadura não explica a interação das enzimas com inibidores e análogos dos substratos.

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

Cinética Enzimática

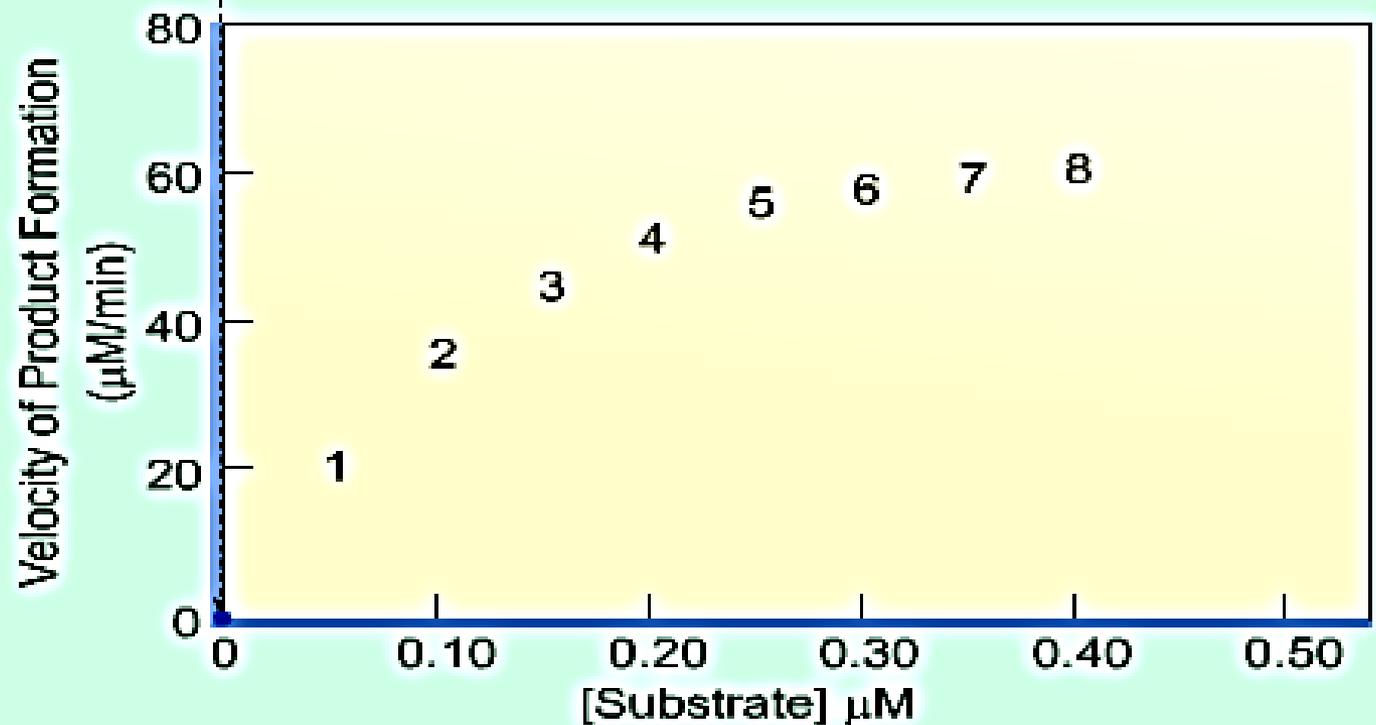
Estudo da velocidade da reação enzimática e como ela se altera em função de diferentes parâmetros

A concentração do substrato afeta a velocidade das reações catalisadas por enzimas

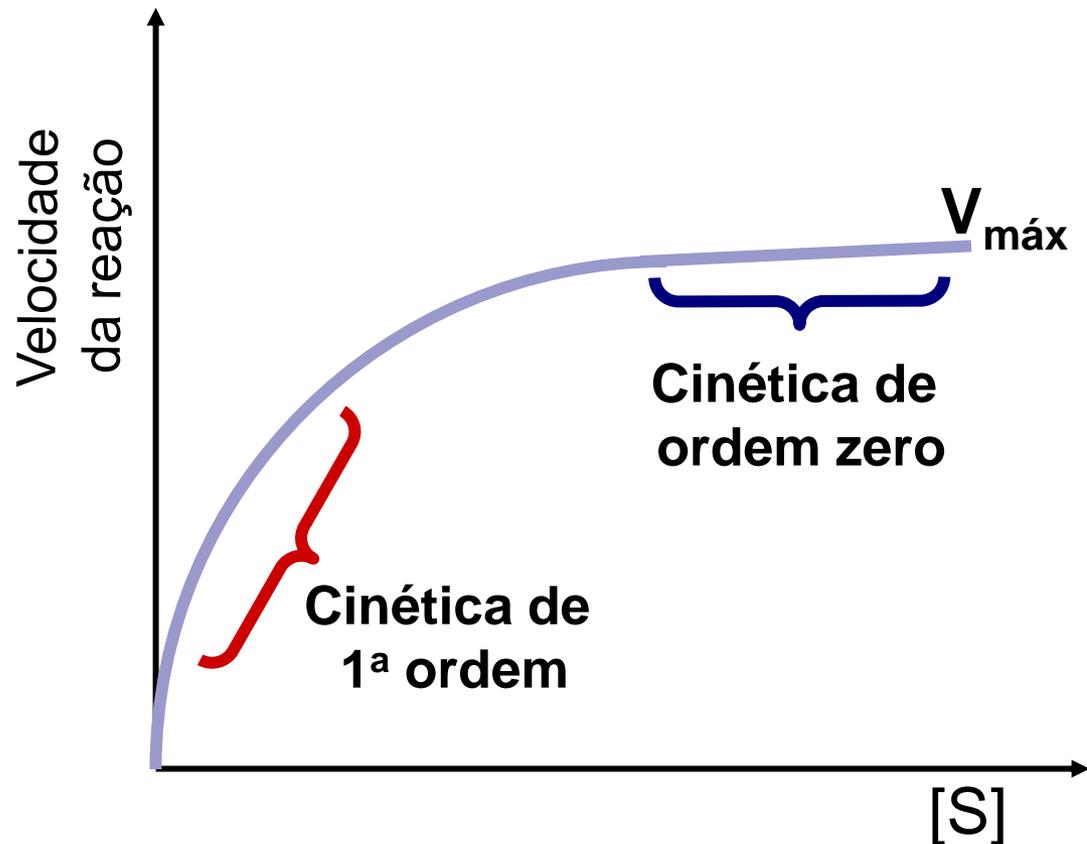


[enzima] constante

Tube number	0	1	2	3	4	5	6	7	8
[Substrate] = μM	0	.05	.10	.15	.20	.25	.30	.35	.40
$v = \mu\text{M}/\text{min}$	0								



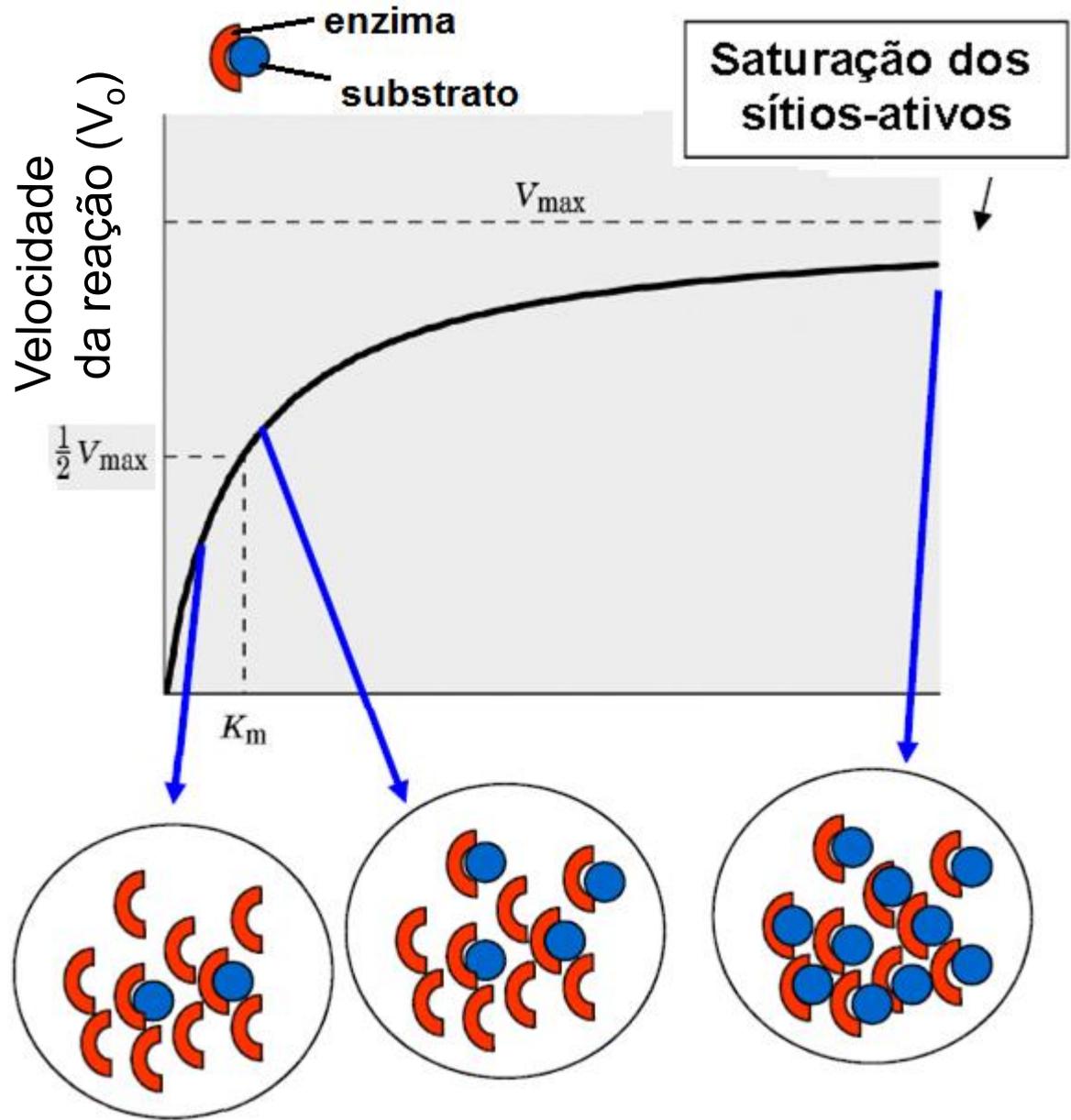
Influência da concentração de substrato sobre a atividade enzimática



Por que a curva da velocidade da reação é hiperbólica?

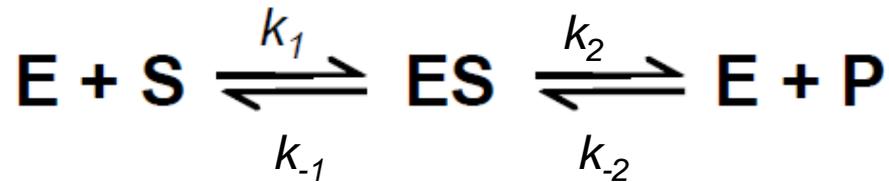
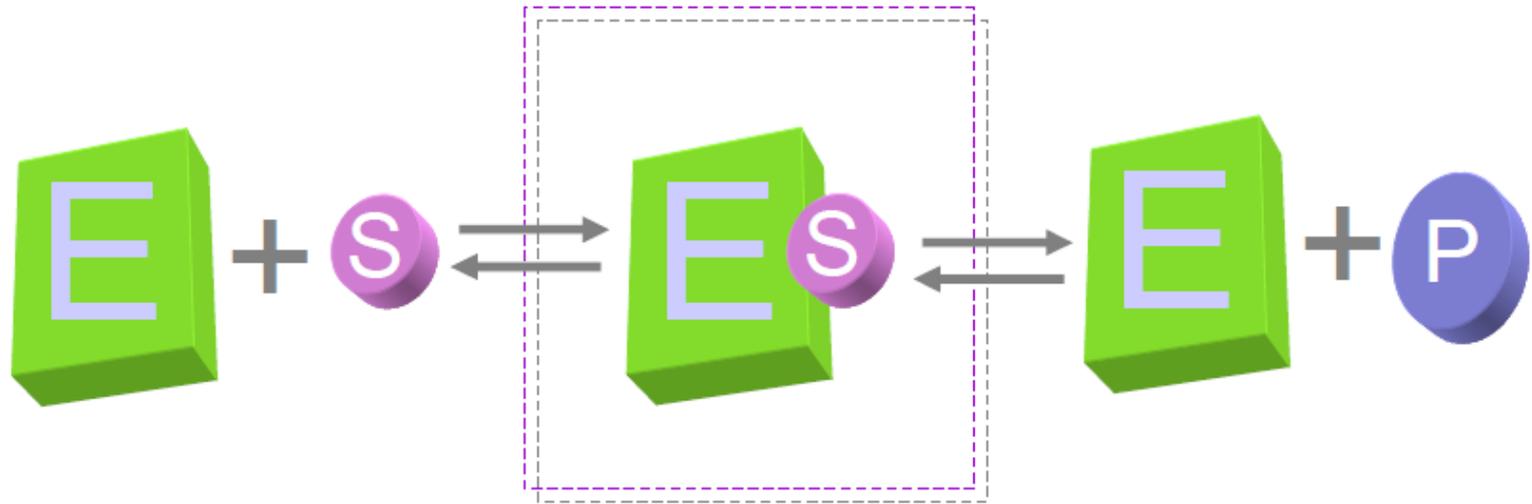
Concentrações baixas de substrato ocorre aumento linear entre Velocidade (V_0) e o Substrato [S]

$\uparrow\uparrow [S] \rightarrow V_0$ aumenta cada vez menos até atingir um patamar (V_{max})



Curva relacionando [S] e V_0 pode ser expressa algebricamente

Equação de Michaelis-Menten



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

velocidade inicial - V_0
velocidade máxima - V_{\max}
constante de Michaelis - K_M

Equação Michaelis-Menten

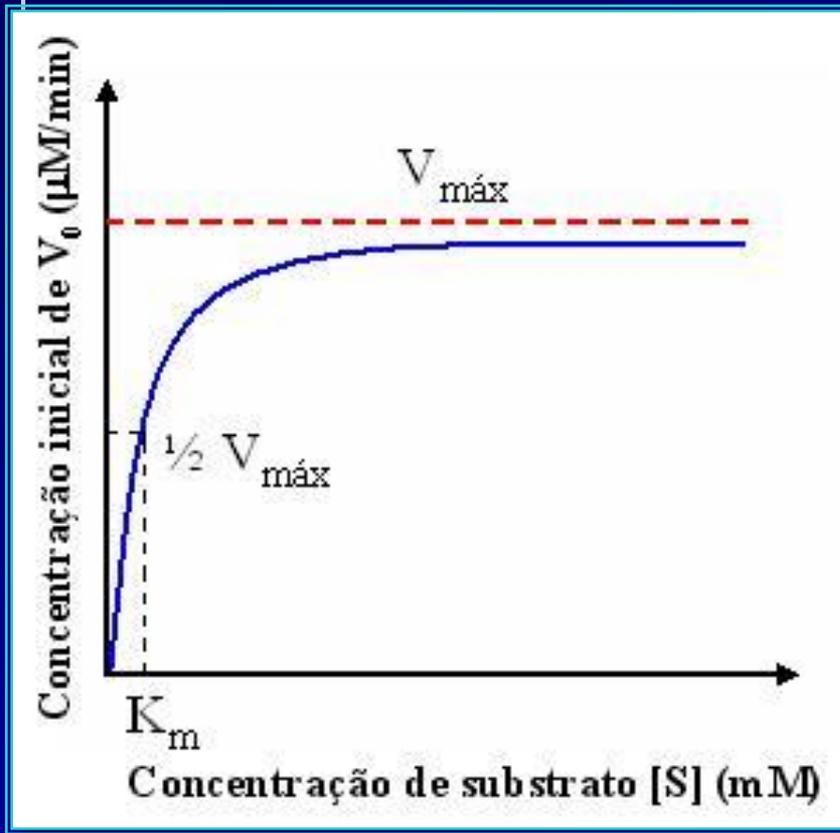
- ↪ Equação da velocidade para uma reação catalisada enzimaticamente e com um único substrato;
- ↪ Relação quantitativa entre a V_0 , a $V_{máx}$ e a $[S]$ inicial relacionadas através de K_m .

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

Influência do Substrato

- ↳ Concentração de substrato $[S]$: afeta a velocidade da reação;
- ↳ Efeito de $[S]$: varia durante o curso de uma reação $\Rightarrow \mathbf{S} \rightarrow \mathbf{P}$;
- ↳ Velocidade inicial (V_0): $[S] \gg [E] \rightarrow$ tempo muito curto $\rightarrow [S] = \text{constante}$.

Influência do Substrato



↔ $[E] = \text{cte}$

↔ $\downarrow [S] = V_0 \uparrow$ linear

↔ $\uparrow [S] = V_0 \uparrow$

↔ $V_0 = V_{\text{máx}}$

Influência do Substrato

↪ Alguns casos a V_0 não pode ser medida

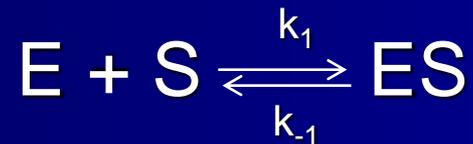
- Não existe técnica experimental;
- Equação química não representa a transformação;

↪ Velocidade da reação:

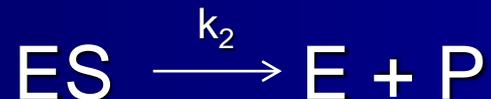
- Velocidade média de consumo ou produção;
- Variação de uma propriedade no sistema.

Influência do Substrato

- ↳ Vitor Henri (1903): **E** liga-se ao **S** para formar **ES** → passo obrigatório;
- ↳ Leonor Michaelis e Maud Menten (1913)
 - **E** combina-se reversivelmente com **S** → **ES**



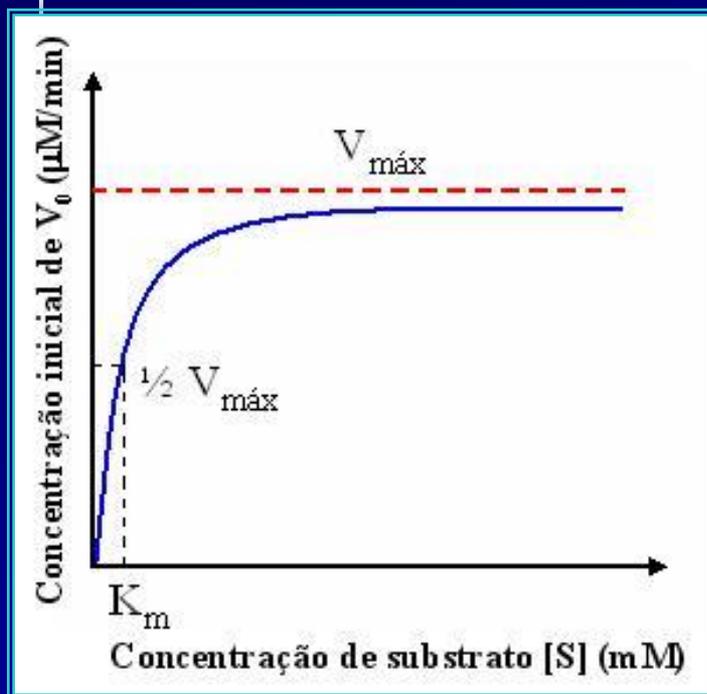
- **ES** se rompe → **E** e **P**



Influência do Substrato

- ↪ Qualquer instante da reação: ***E*** e ***ES***;
- ↪ $[S] \downarrow = \text{velocidade da reação} \Rightarrow [S]$;
- ↪ $V_{m\acute{a}x}$ = todas as moléculas de ***E*** estiverem na forma ***ES*** → enzima “saturada”;
- ↪ $\uparrow [S]$: estado pré-estacionário → \uparrow ***ES***;
 - Estado estacionário → $[ES] = \text{cte}$;
 - $V_0 \rightarrow$ estado estacionário.

Equação Michaelis-Menten



↪ Curva: possui a mesma forma para a maioria das enzimas;

↪ Expressa pela Equação de Michaelis e Menten;

↪ Hipótese: limitante \rightarrow quebra de $ES \rightarrow E + P$.

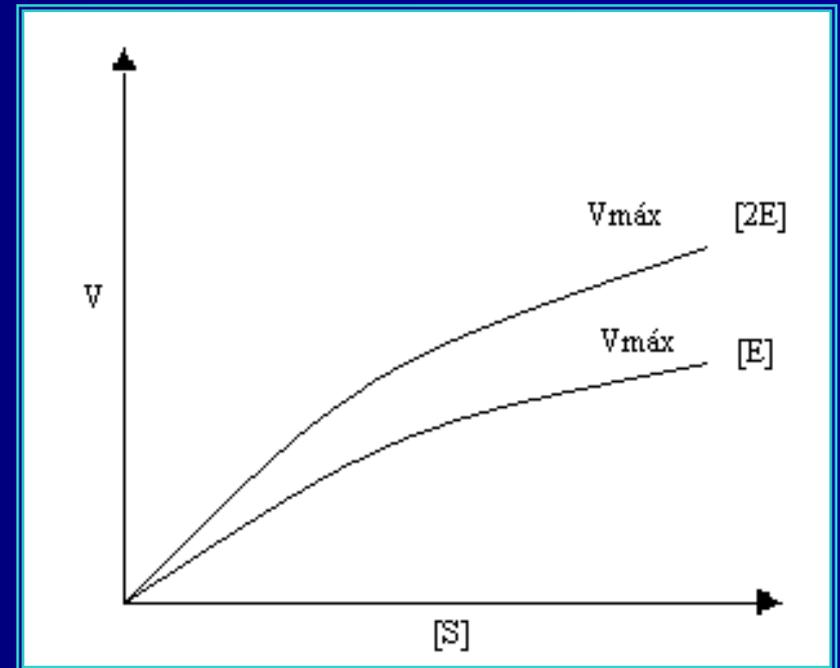
Equação Michaelis-Menten

↳ Relação numérica:
 V_0 é metade de
 $V_{máx}$:

$$V_0 = \frac{1}{2} \cdot V_{máx}$$

↳ k_m = “afinidade”
pelo substrato;
↓ K_m ↑ afinidade

↳ $V_{máx}$ é proporcional à [E].



Significado de K_m e $V_{m\acute{a}x}$

- ↪ Equação Michaelis e Menten = dependência hiperbólica;
- ↪ Mecanismos de reação diferentes → catalisam reações com 6 ou 8 passos;
- ↪ Significado e magnitude de $V_{m\acute{a}x}$ e K_m varia;
- ↪ K_m : depende de aspectos específicos do mecanismo de reação.

Significado de K_m e $V_{m\acute{a}x}$

$$K_m = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1}$$

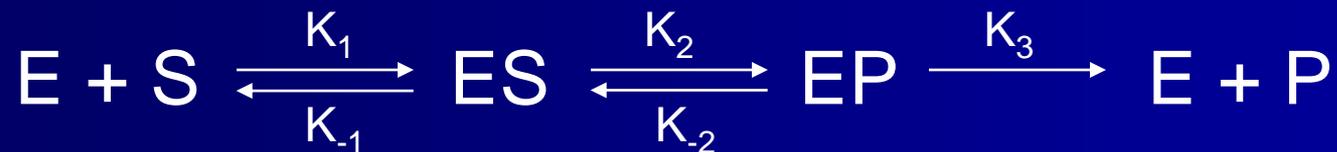
↪ $K_2 \ll K_{-1} \Rightarrow$ afinidade da enzima;

↪ $K_2 \gg K_{-1}$;

↪ K_2 e K_{-1} são comparáveis a $K_m \Rightarrow$ função complexa;

↪ $V_{m\acute{a}x}$: número de passos da reação e identidade dos passos limitantes.

Significado de K_m e $V_{m\acute{a}x}$



↪ Enzima na saturação: **EP** e $V_{m\acute{a}x} = k_3 \cdot [Et]$;

↪ K_{cat} = velocidade limitante de qualquer reação → enzimas saturadas;

↪ K_{cat} e K_m = ambiente celular, concentração do substrato e química da reação.

Complexo enzima-substrato: ES

$$v \text{ (formação)} = k_1 [S] [E] \quad \{ \quad v \text{ ("degradação")} = k_{-1}[ES] + k_2 [ES] = (k_{-1} + k_2) [ES]$$

Estado estacionário ("steady state"): [ES] = constante

$$v \text{ de formação} = v \text{ de "degradação"} \text{ ou: } k_1 [S] [E] = (k_{-1} + k_2) [ES]$$

$$[S] [E] / [ES] = (k_{-1} + k_2) / k_1 \quad \{ \quad (k_{-1} + k_2) / k_1 = K_m$$

Constante de Michaelis

$$[ES] = [S] [E] / K_m \quad \{ \quad [E] = [E_T] - [ES] \quad \{ \quad [ES] = ([E_T] - [ES]) [S] / K_m$$

$$[ES] = [E_T] [S] / K_m - [ES] [S] / K_m \quad \{ \quad [ES] + [ES] [S] / K_m = [E_T] [S] / K_m$$

$$([ES] K_m + [ES] [S]) / K_m = [E_T] [S] / K_m \quad \{ \quad [ES] (K_m + [S]) / K_m = [E_T] [S] / K_m$$

$$[ES] = [E_T] [S] / K_m + [S]$$

$$[ES] = [E_T] \left(\frac{[S]}{K_m} + [S] \right)$$

$$[ES] = v / k_2$$

$$[E_T] = V_{\max} / k_2$$

$$v / k_2 = V_{\max} / k_2 \left(\frac{[S]}{K_m} + [S] \right)$$

Variável independente:
concentração do substrato.

Constante*:
**velocidade
máxima**

Variável dependente:
velocidade de reação,
função de [S].

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

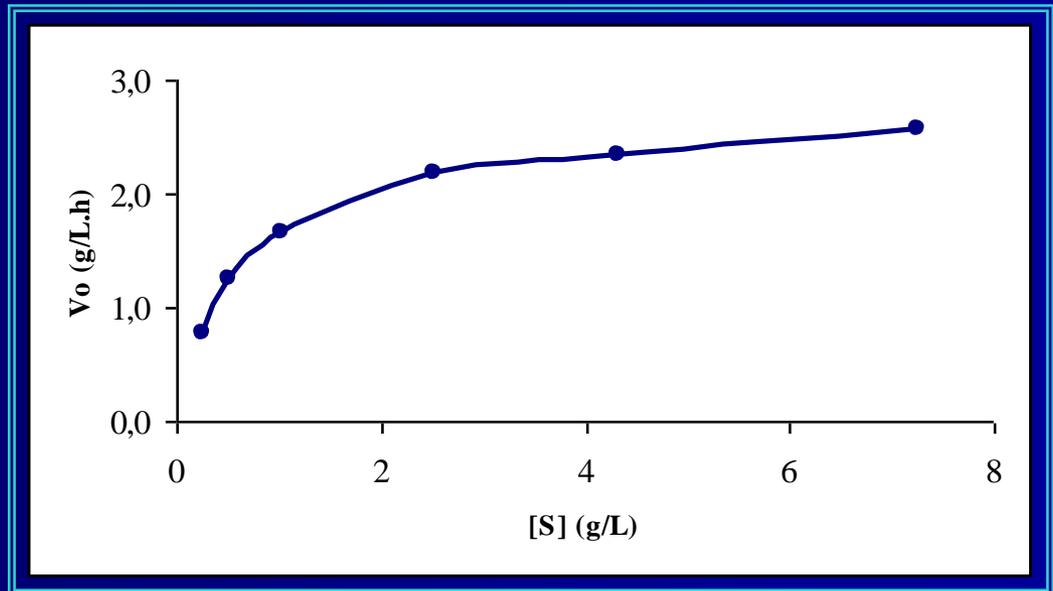
Constante de Michaelis:
 K_D aparente de ES.

* “Constante”: V_{\max} é função de $[E]_{\text{total}}$

Parâmetros Cinéticos

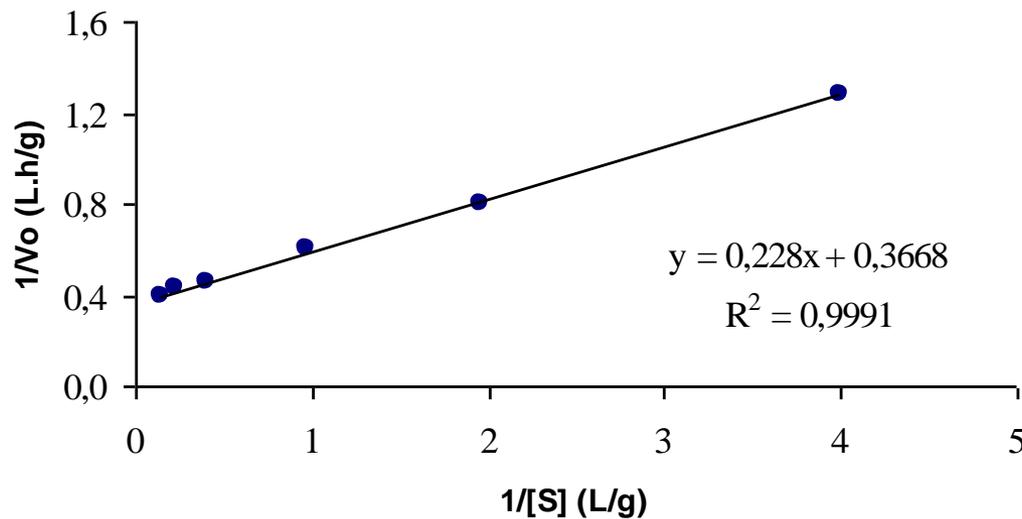
↳ Exemplo:

[S] (g/L)	V_o (g/L.h)
0,25	0,78
0,51	1,25
1,03	1,66
2,52	2,19
4,33	2,35
7,25	2,57



Parâmetros Cinéticos

↳ Exemplo: Lineweaver-Burk



$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{m\acute{a}x}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}}$$

$$\frac{1}{V_0} = 0,228 \cdot \frac{1}{[S]} + 0,3668$$

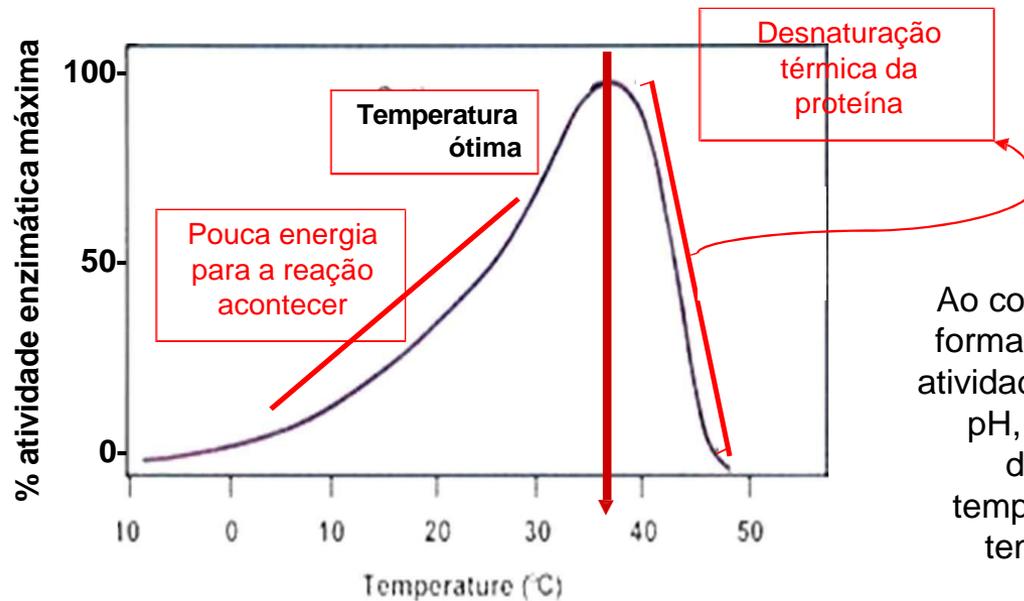
Portanto,

$$\frac{1}{V_{m\acute{a}x}} = 0,3668 \Rightarrow V_{m\acute{a}x} = 2,73 \frac{g}{L \cdot h}$$

$$\frac{K_m}{V_{m\acute{a}x}} = 0,228 \Rightarrow K_m = 0,622 \frac{g}{L}$$

Fatores que controlam a atividade enzimática:

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



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

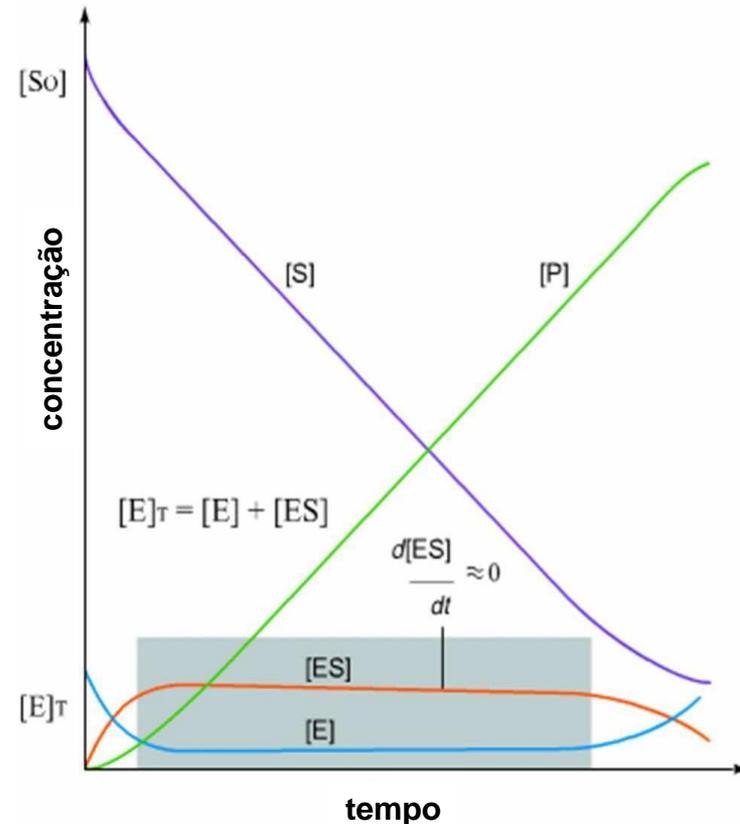
Fatores que controlam a atividade enzimática:

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

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

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

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



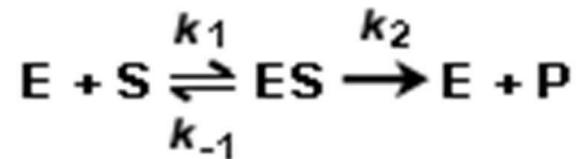
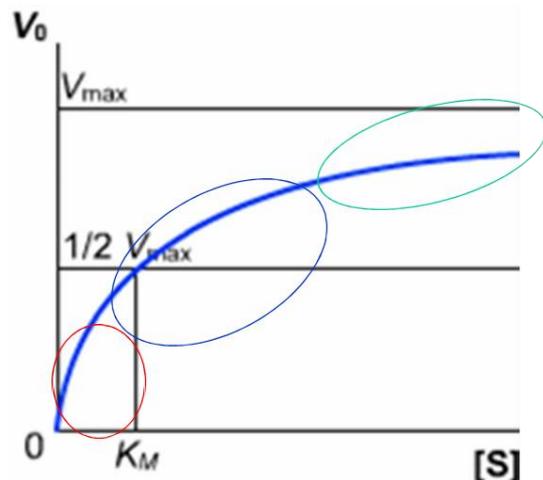
Michaelis-Menten

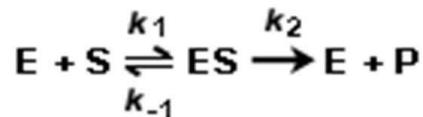
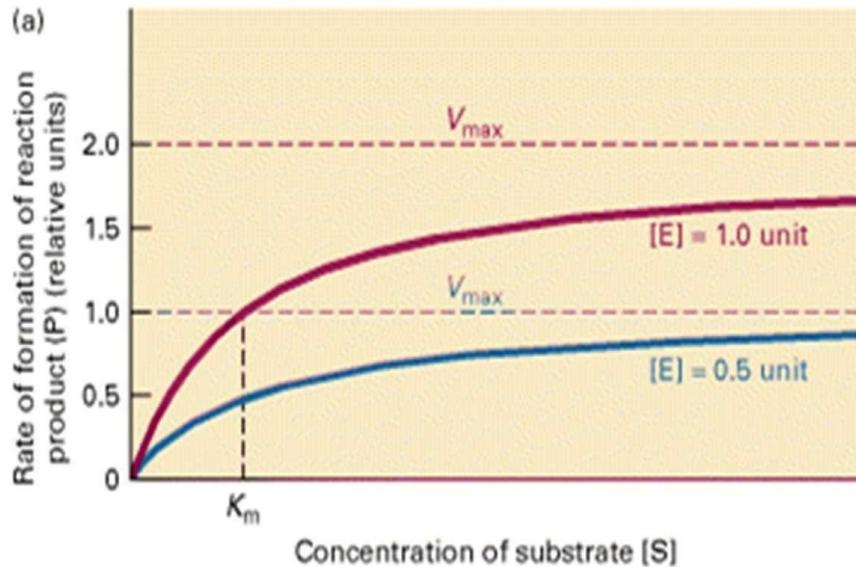
Michaelis e Menten formularam as bases da cinética enzimática, para explicar como a concentração do substrato [S] afeta a velocidade da reação v , conforme se observa no gráfico abaixo.

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

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

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





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

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

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

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

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

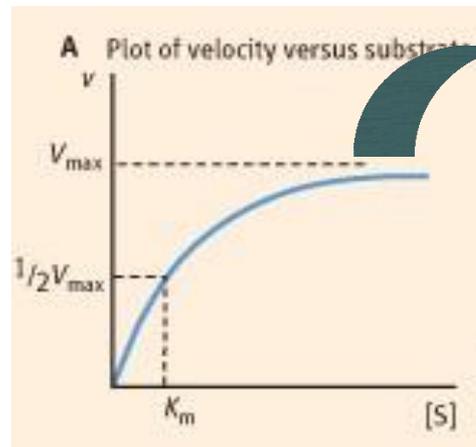
Eficiência catalítica

K_{cat}/K_m

Parâmetro mais adequado para comparações cinéticas

VELOCIDADE DA ENZIMA

Unidade de enzima (U) - quantidade de enzima que catalisa a transformação de 1 μmol de substrato por min



[ES]

SÍTIOS DE LIGAÇÃO
OCUPADOS