

Enzimas: a Catálise das Reações Biológicas. Parte I

Prof. Dr. Tiago R. Figueira
Disc. Bioquímica e Biofísica
EEFERP/USP

Objetivos

- Compreender a importância das enzimas para a vida
- Compreender as propriedades das enzimas
- Compreender como as enzimas funcionam

Sumário

- 1. Introdução**
2. Propriedade das enzimas
3. Como as enzimas funcionam
4. Cinética enzimática
5. Regulação das atividades das enzimas

A catálise biológica

Enzimas

- São estruturas* altamente especializadas em catalisar reações (aceleram até 10^{11} vezes a velocidade das reações)
- Possuem alto grau de especificidade em relação ao substrato
- A função pode ser sensível ao pH, a temperatura e pode ser regulada

•A maioria é proteína, mas algumas são RNAs

Aspectos históricos

- Séc **XVIII**: foi reconhecida a catálise biológica (secreção do estômago promovia a degradação de carne)
- Séc **XIX**:
 - **Início**: a saliva degradava amido em moléculas menores
 - 1850**: açúcar → álcool (por fungos vivos; ação catalisada por “fermentos”, segundo Louis Pasteur)
 - 1897**: açúcar → álcool (por extratos de fungos). As “entidades” responsáveis por tal catálise foram chamadas de enzimas
 - Purificação de enzimas
- 1926**: isolamento e imageamento da urease (J . Summer); postulou-se que toda enzima é proteína

A catálise possibilita a vida

Sem catálise enzimática, os processos de transformação de biomoléculas e nutrientes não aconteceriam em tempo compatível com a vida.



Importância geral

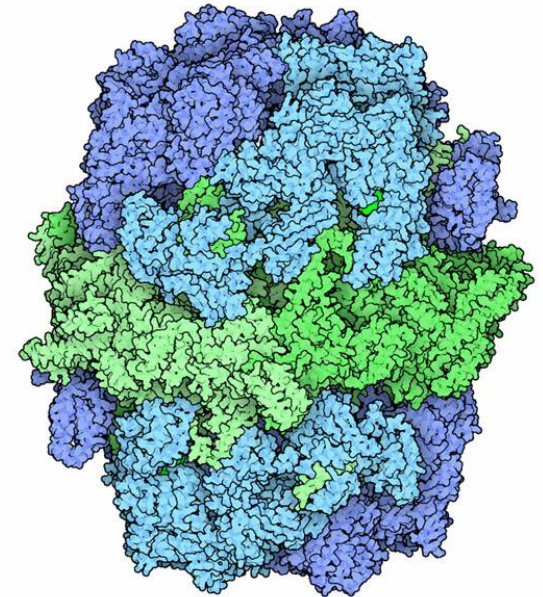
- A **catálise eficiente e seletiva** de reações bioquímicas é fundamental para os processos necessários à vida
 - Enzimas atuam em sequência para degradar completamente as moléculas dos nutrientes
 - Atuam nas reações de síntese de biomoléculas a partir de precursores mais simples
- A regulação da atividade de enzimas específicas modula a velocidade de vários processos no organismo vivo

Sumário

1. Introdução
- 2. Propriedade das enzimas**
3. Como as enzimas funcionam
4. Cinética enzimática
5. Regulação das atividades das enzimas

Propriedades das Enzimas

- Maioria é proteína
 - Proteína globular (ou domínio globular de proteína fibrosa)
 - Conjugada a grupo prostético
- Pode estar em solução ou em membranas



Cinco propriedades essenciais das enzimas

1. Acelera a velocidade das reações, por diminuir a energia de ativação da reação
2. Tem alta seletividade pelos seus substratos
3. A atividade pode ser regulada por mecanismos reversíveis e irreversíveis
4. Não altera o equilíbrio da reação
5. Não é consumida nem produzida pela reação bioquímica

A função das enzimas (i.e. atividade) pode depender de:

- **Cofatores** (um ou mais íons inorgânicos)
- **Coenzimas** (moléculas orgânicas, geralmente derivadas de vitaminas – auxiliam na transferência de grupos químicos e elétrons)
- **pH**
- **Temperatura**
- Concentração de substrato da reação
- Ocorrência/presença de moduladores da enzima

Exemplo de cofatores de enzimas

TABELA 6-1

Alguns íons inorgânicos que servem de cofatores para enzimas

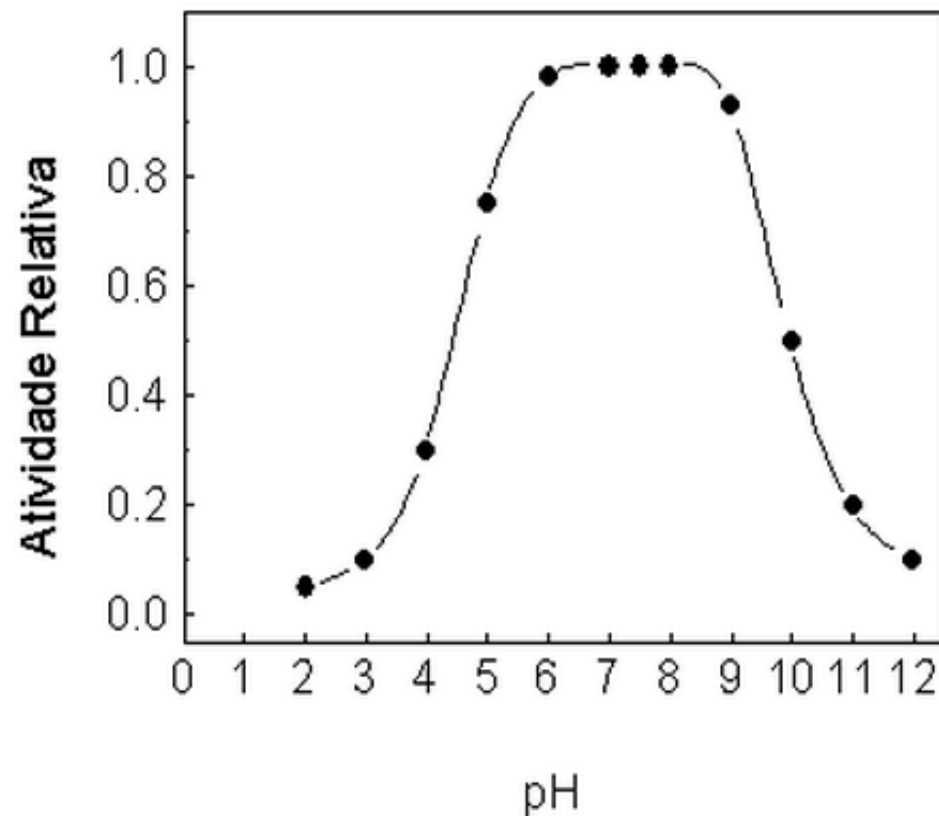
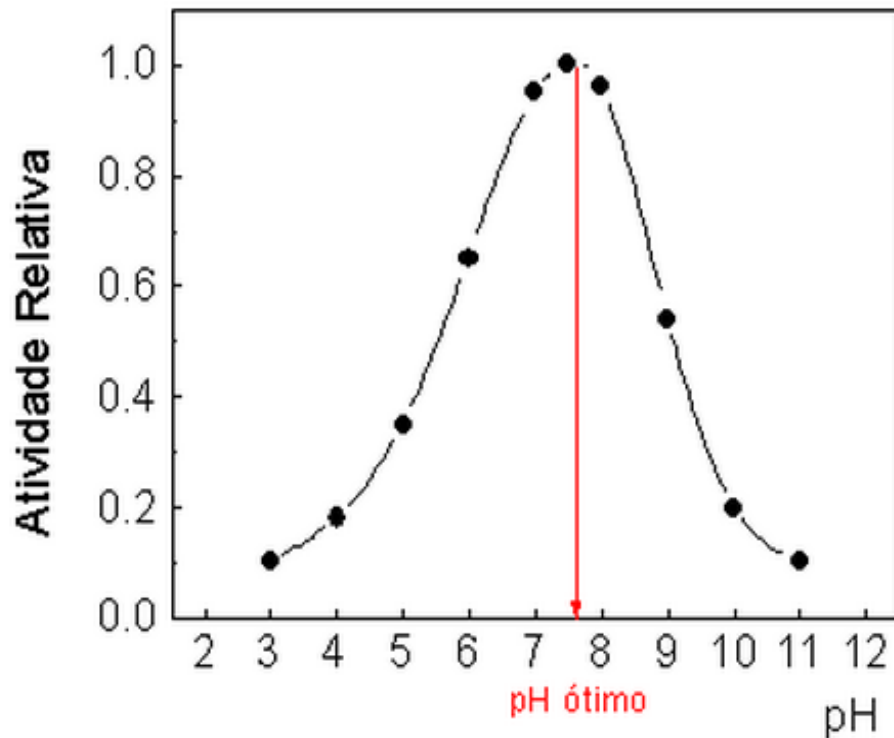
Íons	Enzimas
Cu^{2+}	Citocromo-oxidase
Fe^{2+} ou Fe^{3+}	Citocromo-oxidase, catalase, peroxidase
K^{+}	Piruvato-cinase
Mg^{2+}	Hexocinase, glicose-6-fosfatase, piruvato-cinase
Mn^{2+}	Arginase, ribonucleotídeo-redutase
Mo	Dinitrogenase
Ni^{2+}	Urease
Zn^{2+}	Anidrase carbônica, álcool-desidrogenase, carboxipeptidases A e B

Exemplo de **coenzimas**:
elas atuam na **transferência de elétrons ou de grupos químicos** entre substratos e produtos

Coenzima	Precursor presente na dieta de mamíferos
Biocina	Biotina
Coenzima A	Ácido pantotênico e outros compostos
5'-Desoxiadenosilcobalamina (coenzima B ₁₂)	Vitamina B ₁₂
Flavina-adenina-dinucleotídeo	Riboflavina (vitamina B ₂)
Lipoato	Não é necessário na dieta
Nicotinamida-adeninadinucleotídeo	Ácido nicotínico (niacina)
Piridoxal-fosfato	Piridoxina (vitamina B ₆)
Tetra-hidrofolato	Folato
Tiamina-pirofosfato	Tiamina (vitamina B ₁)

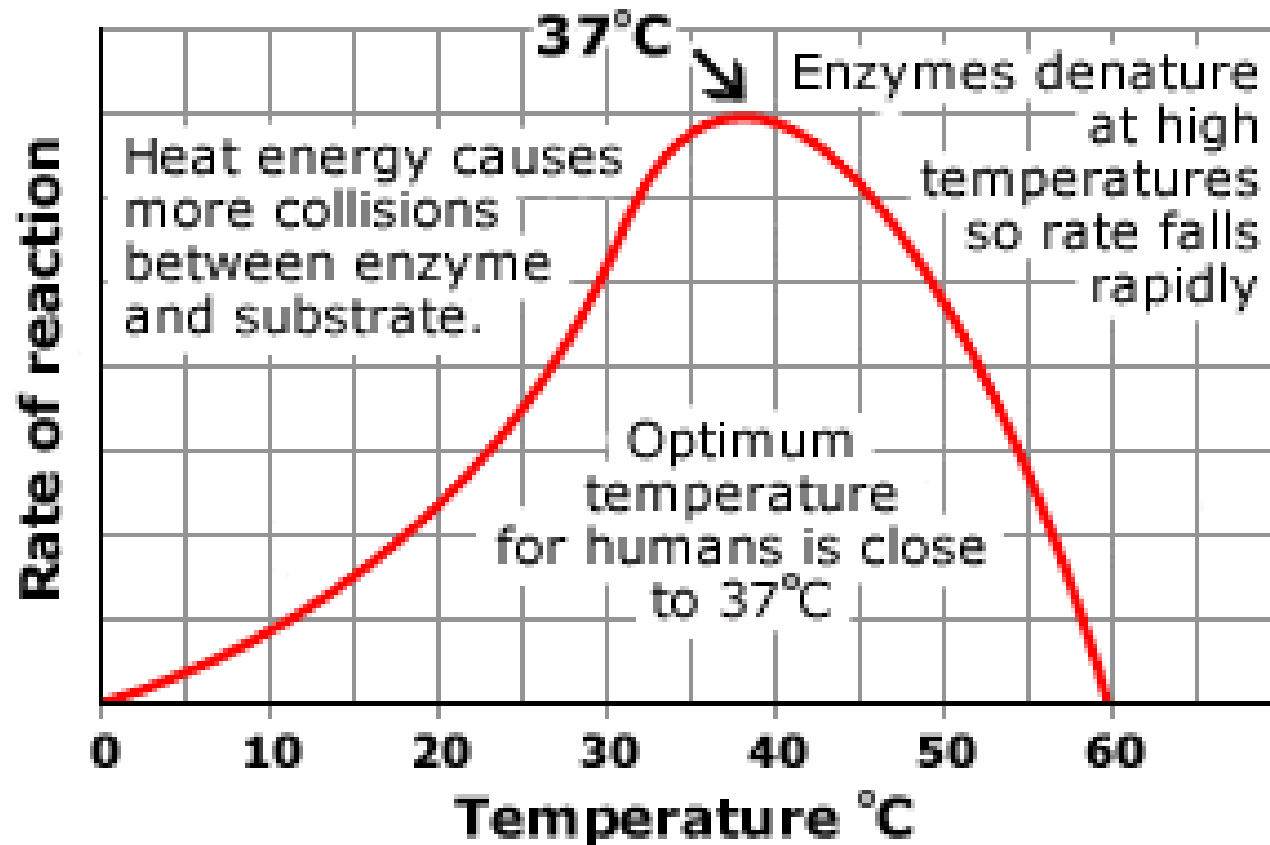
Efeito do pH na atividade da enzima

O que é “atividade enzimática”?



O pH ótimo ou a faixa de pH ótimo é individual de cada enzima

Efeito da temperatura na atividade da enzima



A temperatura ótima é individual de cada enzima e pode variar significativamente entre espécies

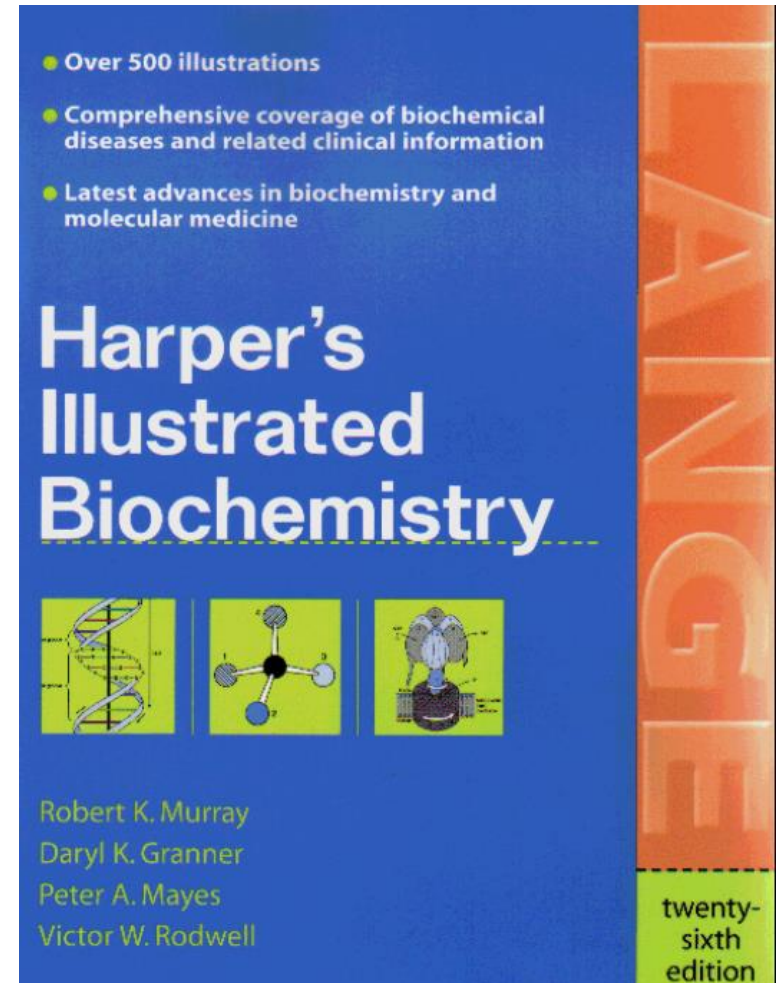
Enzimas são nomeadas e classificadas de acordo com a reação que ela catalisa

- Terminam com “**ase**”
- Tem nomes comuns e há também nomenclatura e codificação sistemáticos (ex: **E.C. 2.7.1.1**)
 - Ex: hexoquinase = ATP-glicose fosfotransferase

TABELA 6-3 Classificação internacional das enzimas

Classe nº	Nome da classe	Tipo de reação catalisada
1	Oxidoredutases	Transferência de elétrons (íons hidrido ou átomos de H)
2	Transferases	Reações de transferência de grupos
3	Hidrolases	Reações de hidrólise (transferência de grupos funcionais para a água)
4	Liasas	Clivagem de C—C, C—O, C—N ou outras ligações por eliminação, rompimento de ligações duplas ou anéis, ou adição de grupos a ligações duplas.
5	Isomerases	Transferência de grupos dentro de uma mesma molécula produzindo formas isoméricas
6	Ligases	Formação de ligações C—C, C—S, C—O e C—N por reações de condensação acopladas à hidrólise de ATP ou cofatores similares
7	translocases	

Referências Utilizadas



Enzimas: a Catálise das Reações Biológicas. Parte II

Prof. Dr. Tiago R. Figueira
Disc. Bioquímica e Biofísica
EEFERP/USP

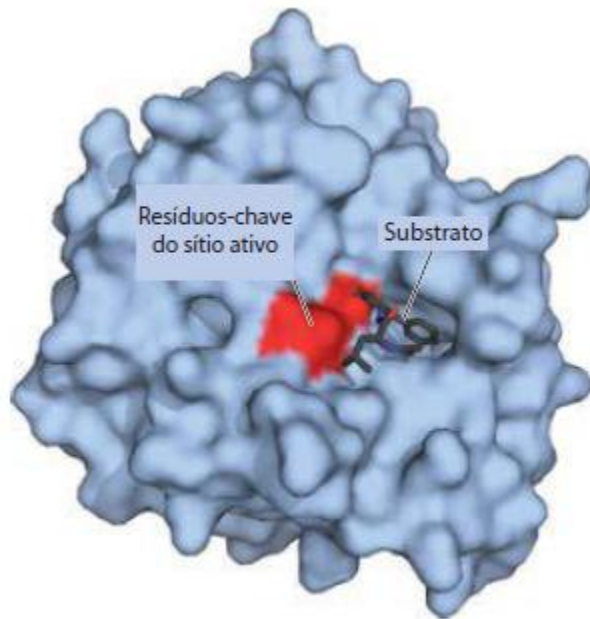
Sumário

1. Introdução
2. Propriedade das enzimas
- 3. Como as enzimas funcionam**
4. Cinética enzimática
5. Regulação das atividades das enzimas

Princípios básicos sobre o funcionamento das enzimas

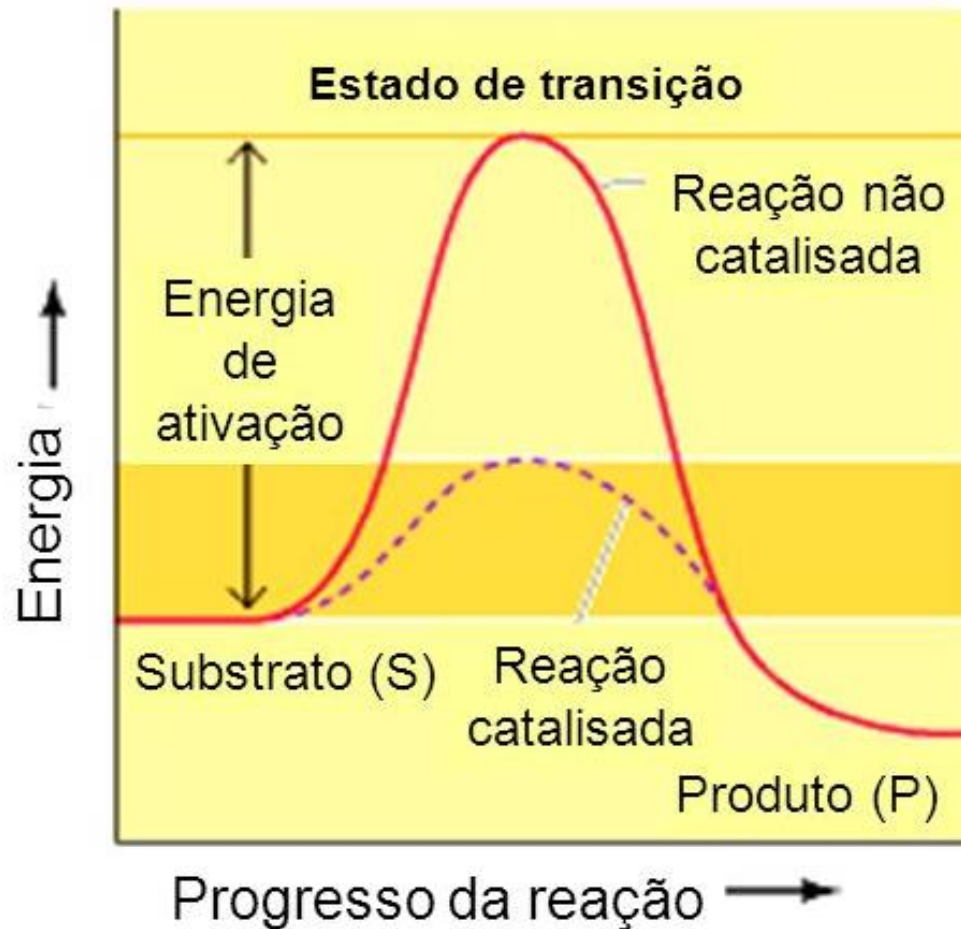
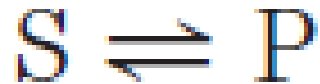
Pensemos na reação de transformação de **S** em **P**: $S \rightleftharpoons P$

Primeiramente, a enzima liga o substrato, “sequestrando-o” da solução



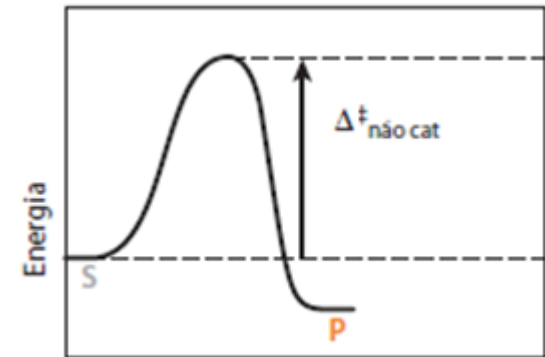
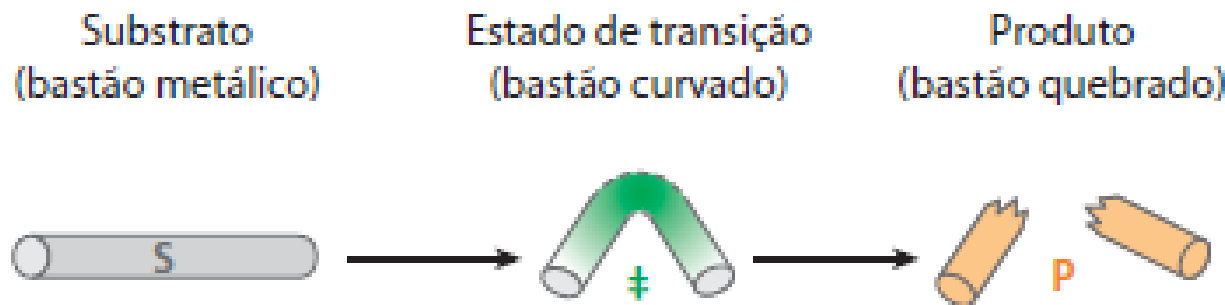
Substrato ligado ao sítio
ativo da enzima

A catalise ocorre porque a enzima
reduz a energia de ativação



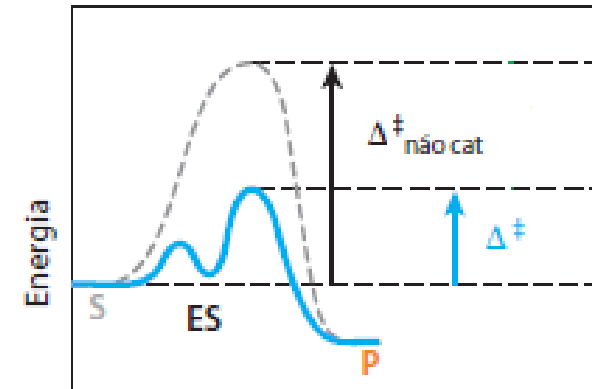
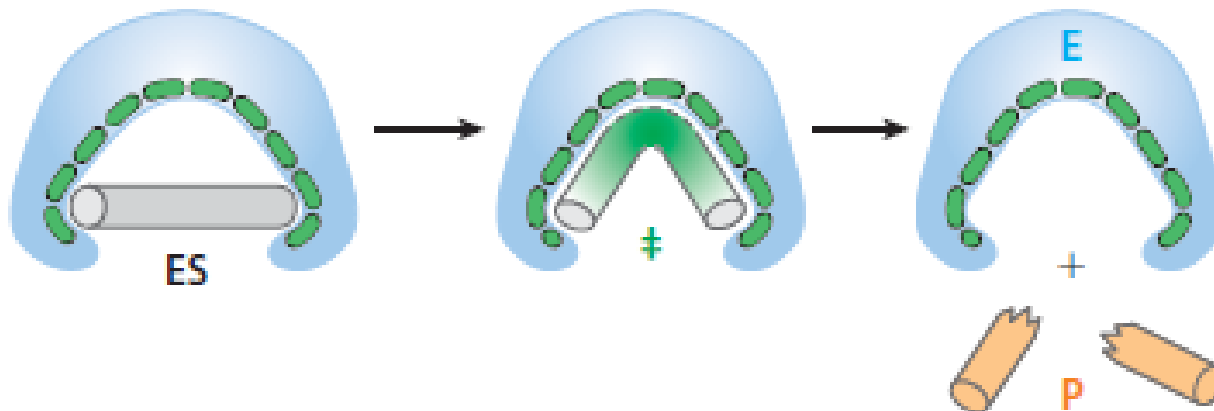
A enzima é complementar ao substrato no estado de transição

(a) Sem enzima



Enzima não pode ser geometricamente complementar ao substrato

(c) Enzima complementar ao estado de transição



Devido a redução da energia de ativação, a velocidade da reação é acelerada inúmeras vezes

TABELA 6-5

Alguns aumentos de velocidade proporcionados por enzimas

Ciclofilina	10^5
Anidrase carbônica	10^7
Triose-fosfato-isomerase	10^9
Carboxipeptidase A	10^{11}
Fosfoglicomutase	10^{12}
Succinil-CoA-transferase	10^{13}
Urease	10^{14}
Orotidina-monofosfato-descarboxilase	10^{17}

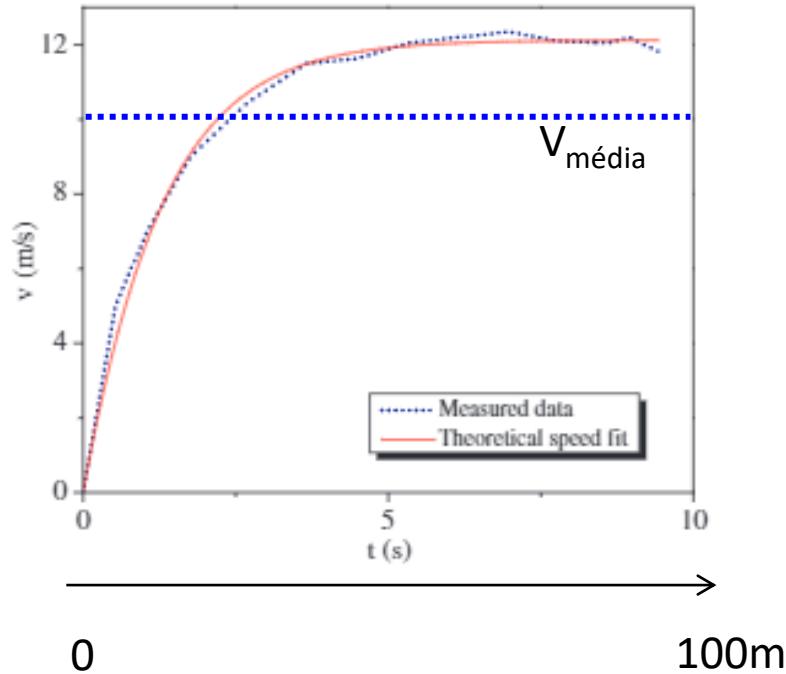
Sumário

- ~~1. Introdução~~
- ~~2. Propriedade das enzimas~~
- ~~3. Como as enzimas funcionam~~
- 4. Cinética enzimática**
5. Regulação das atividades das enzimas

Qual é a velocidade de Usain Bolt em um sprint de 100 m ?

Cinética

Eur. J. Phys.34(2013) 1227–1233



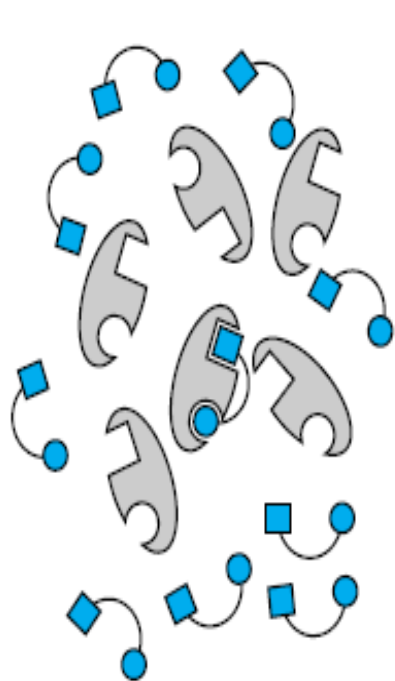
Qual é a velocidade do circular USP entre o ponto da EEFERP e a próxima parada?

Cinética Enzimática

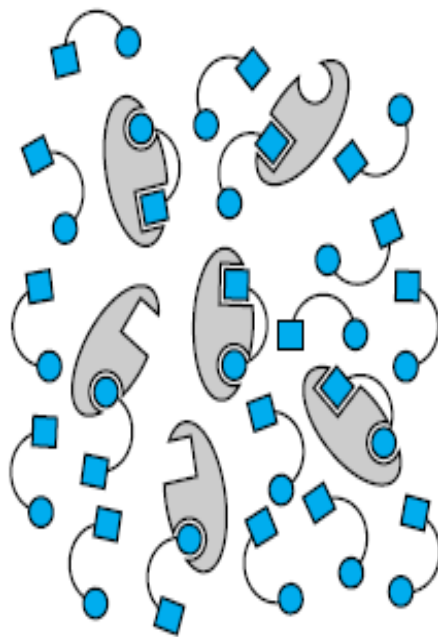
É a descrição (gráfica/matemática) das alterações da velocidade da reação que ocorrem em resposta a alterações na concentração dos substratos

Cinética Enzimática

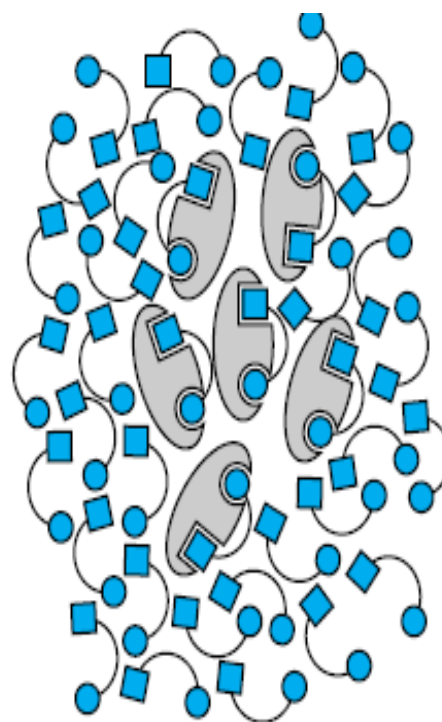
Interação entre concentração de **Substrato** e concentração de **Enzima**



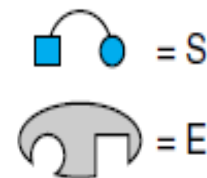
A



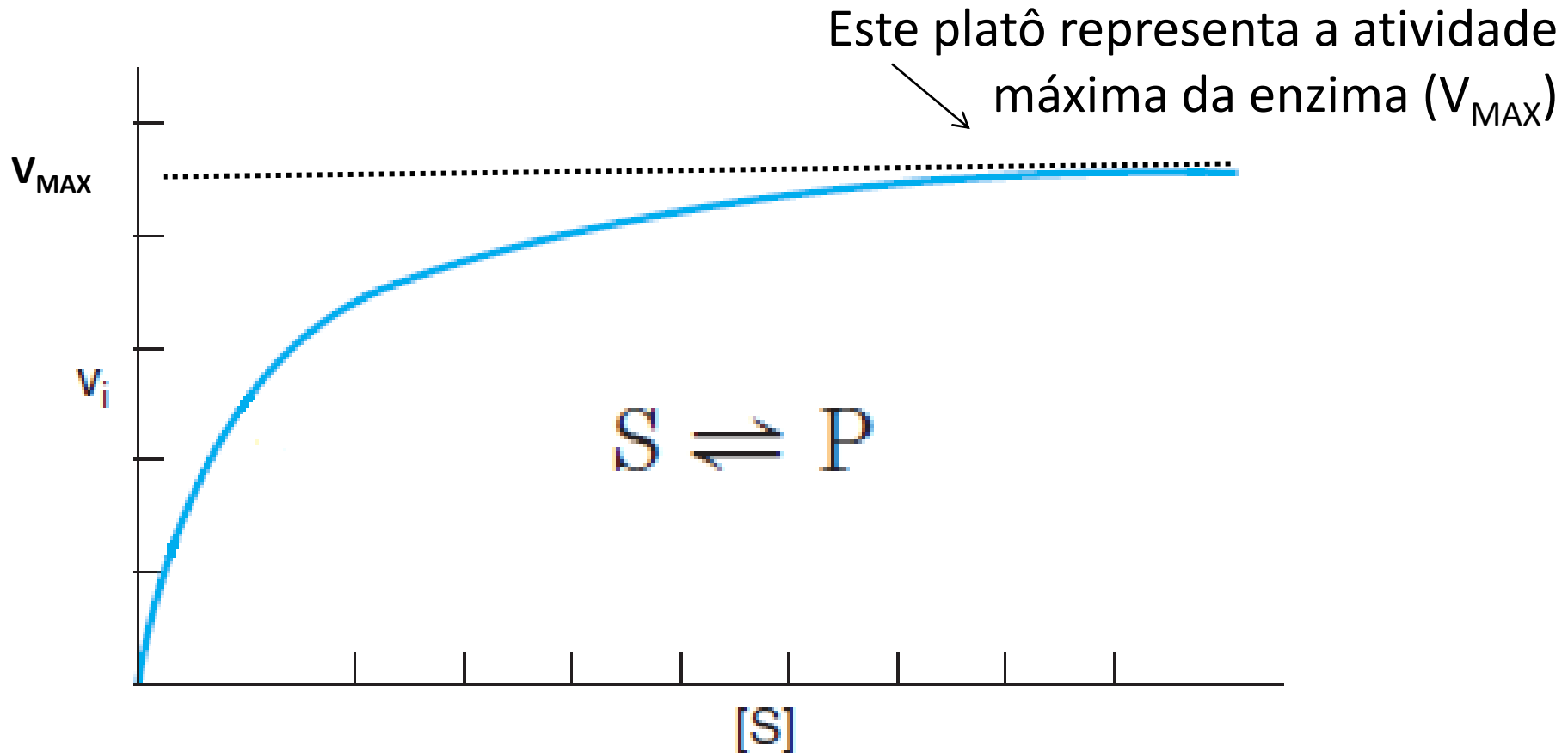
B



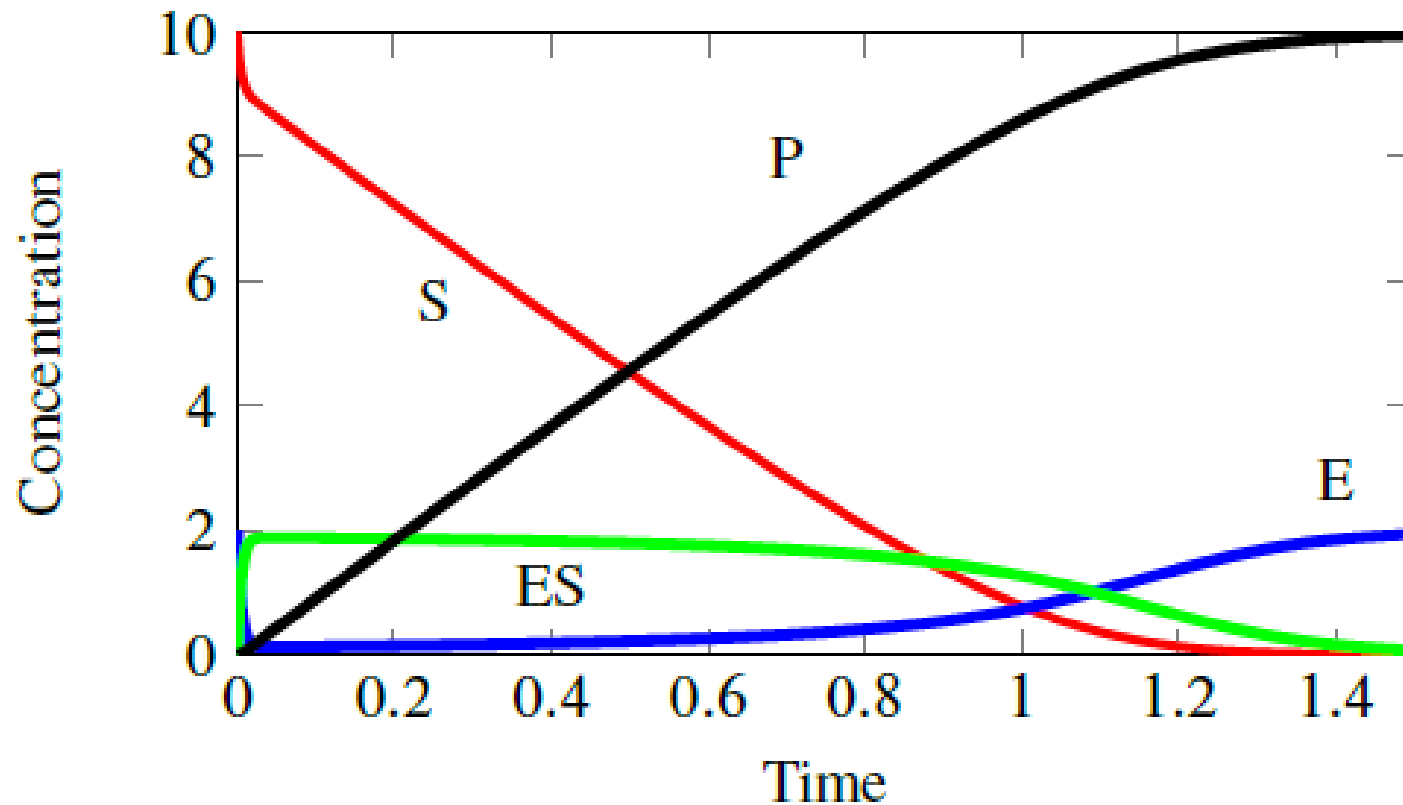
C



Cinética Enzimática: a velocidade da reação é dependente da [substrato], até certo ponto!



Exemplo das concentrações dos participantes da reação enzimática até o atendimento do equilíbrio



A definição de atividade enzimática é simples e direta

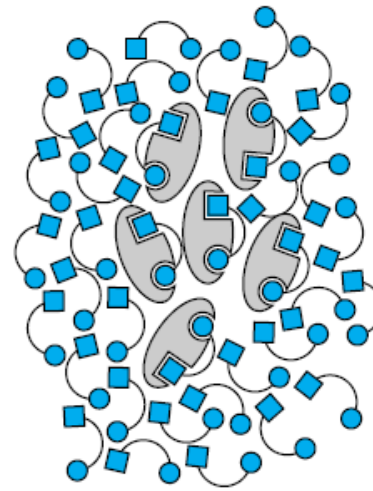
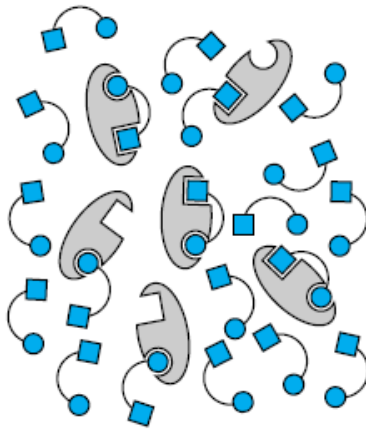


- Número de mol de Substrato transformado em Produto a cada minuto
- Convenção: **1 μ mol/min = 1U**

Exemplo de reação: **Piruvato + NADH $\leftrightarrow$ Lactato + NAD⁺**

Un

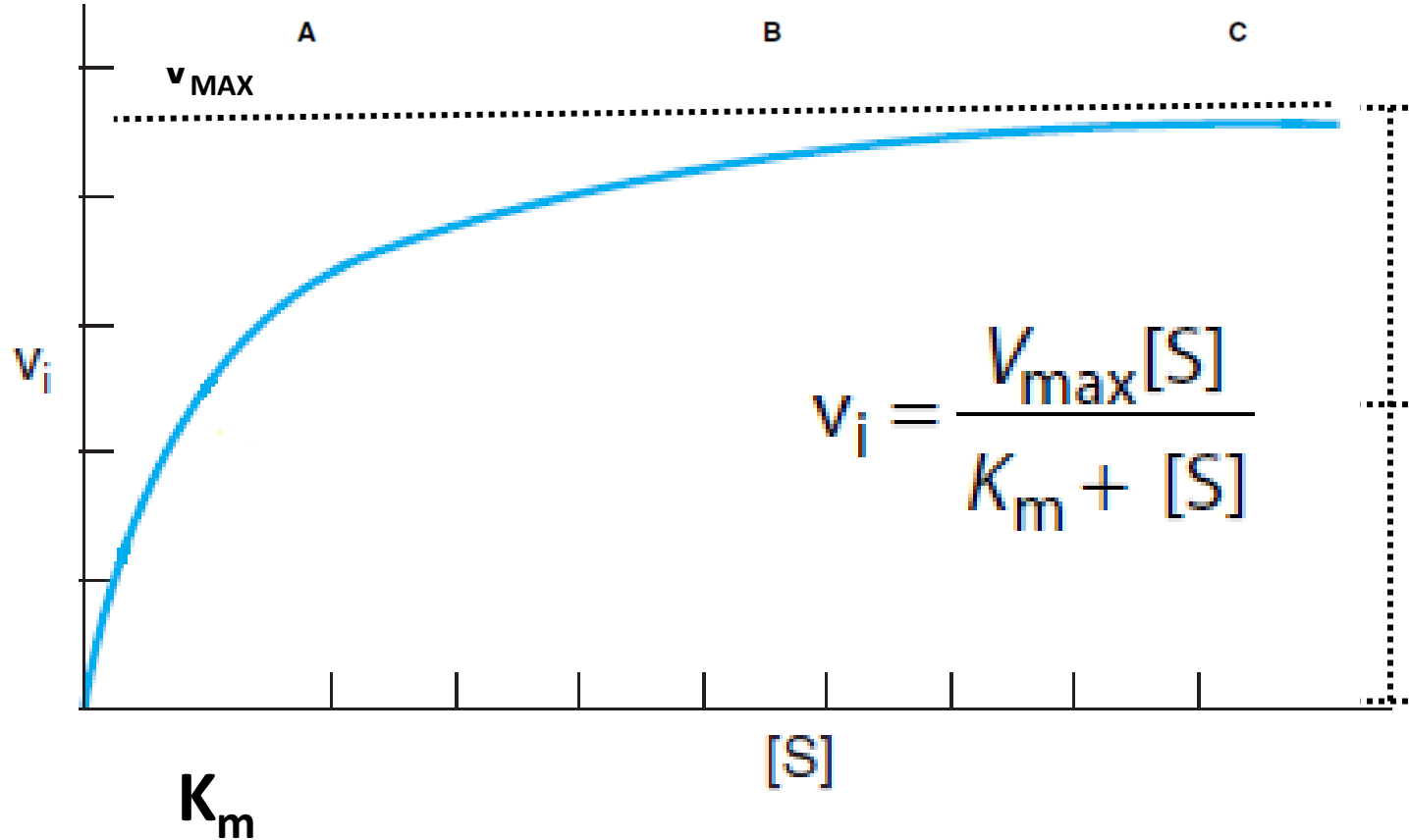
ive a
a



A

B

C



Constante de Michaelis-Menten

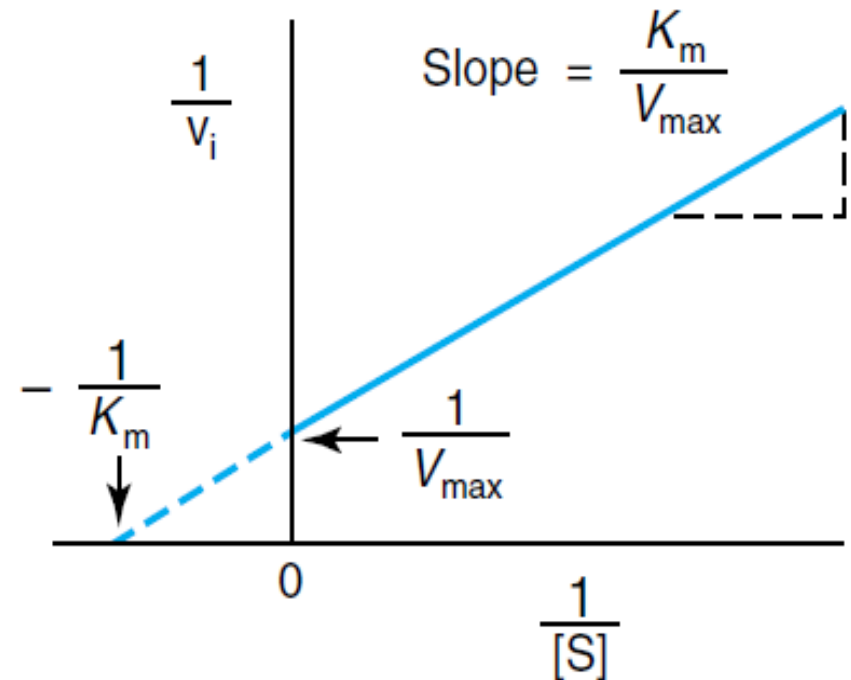
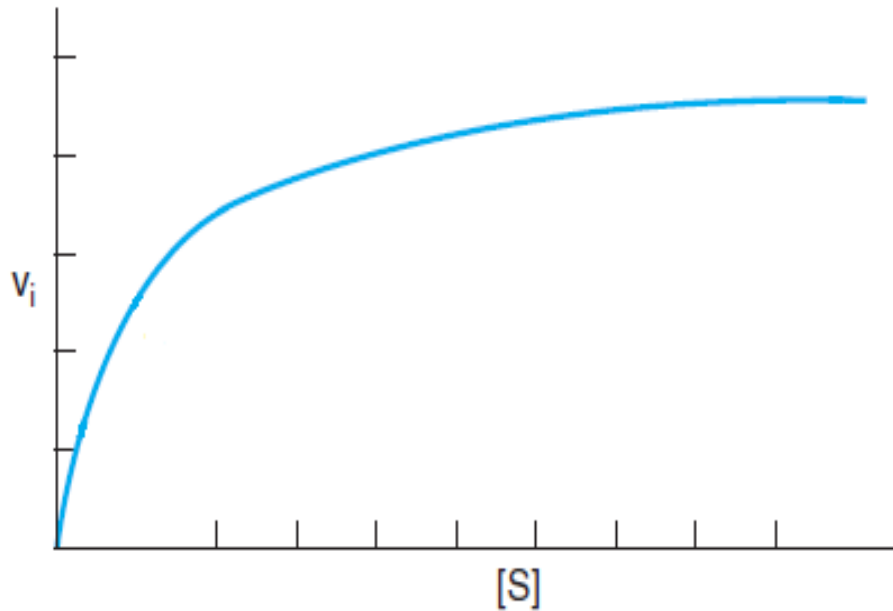
O K_m da enzima é geralmente um valor próximo da concentração *in vivo* do seu substrato

TABELA 6-6 K_m de algumas enzimas e seus substratos

Enzima	Substrato	K_m (mM)
Hexocinase (cérebro)	ATP	0,4
	D-Glicose	0,05
	D-Fructose	1,5
Anidrase carbônica	HCO_3^-	26
Quimotripsina	Gliciltirosilglicina	108
	N-benzoiltirosinamida	2,5
β -Galactosidade	D-Lactose	4,0
Treonina-desidratase	L-Treonina	5,0

A curva hiperbólica pode ser linearizada para facilitar a análise da cinética enzimática

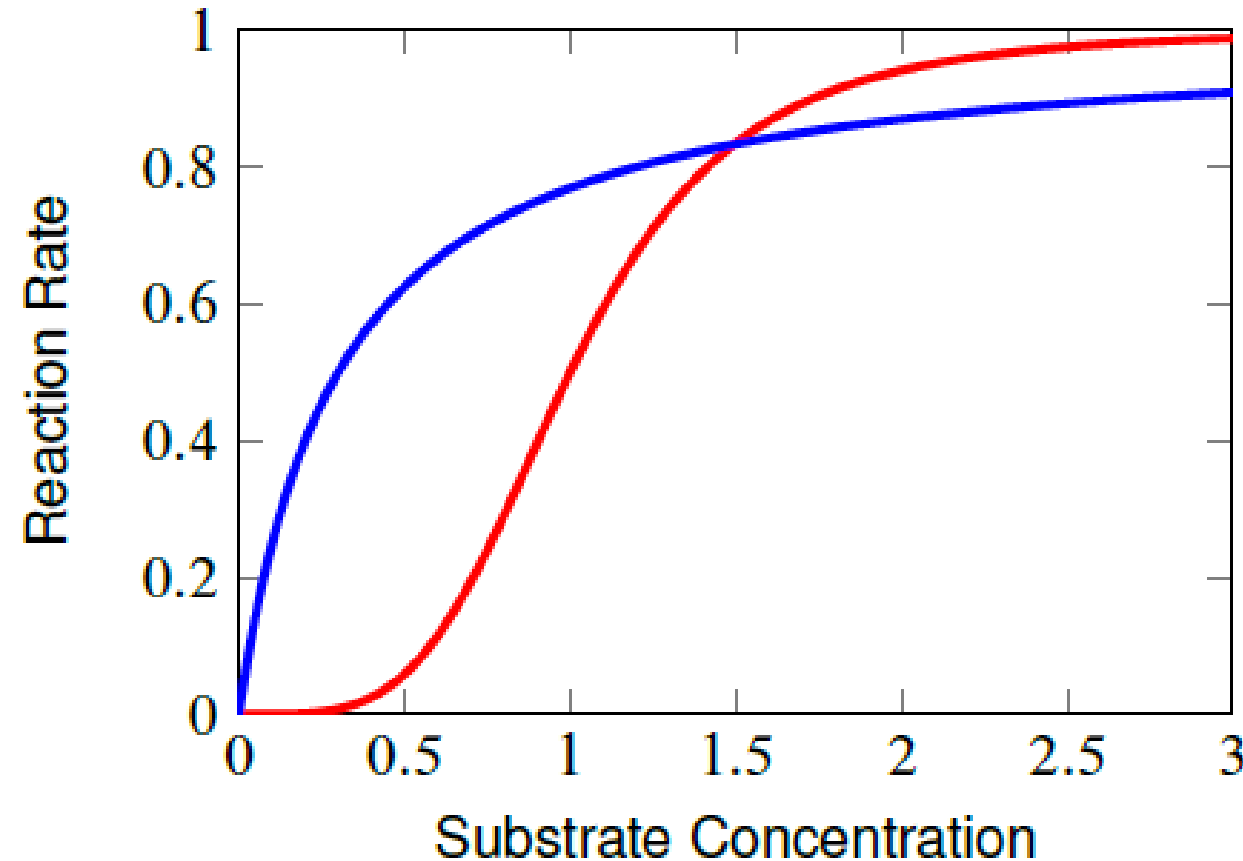
Gráfico do duplo recíproco (ou Lineweaver-Burk)



Cinética de reações enzimáticas mais complexas:

- quando há mais de um substrato
- enzimas que sofrem modulação de sua atividade

Comportamento Hiperbólico vs. Sigmoidal



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

$$V_i = \frac{V_{\text{MAX}} * [S]^n}{K_{50\%}^n + [S]^n}$$

Equação de Hill
n = grau de
cooperação

A constante catalítica (K_{cat}) é a medida da velocidade “intrínseca” da enzima

$$K_{\text{cat}} = V_{\text{max}} / \text{Quantidade total de enzima}$$

$$\text{nmol/s/nmol} = 1/\text{s}$$

TABELA 6-7 Número de renovação (*turnover*), k_{cat} , de algumas enzimas

Enzima	Substrato	k_{cat} (s^{-1})
Catalase	H_2O_2	40.000.000
Anidrase carbônica	HCO_3^-	400.000
Acetilcolinesterase	Acetilcolina	14.000
β -Lactamase	Benzilpenicilina	2.000
Fumarase	Fumarato	800
Proteína RecA (uma ATPase)	ATP	0,5

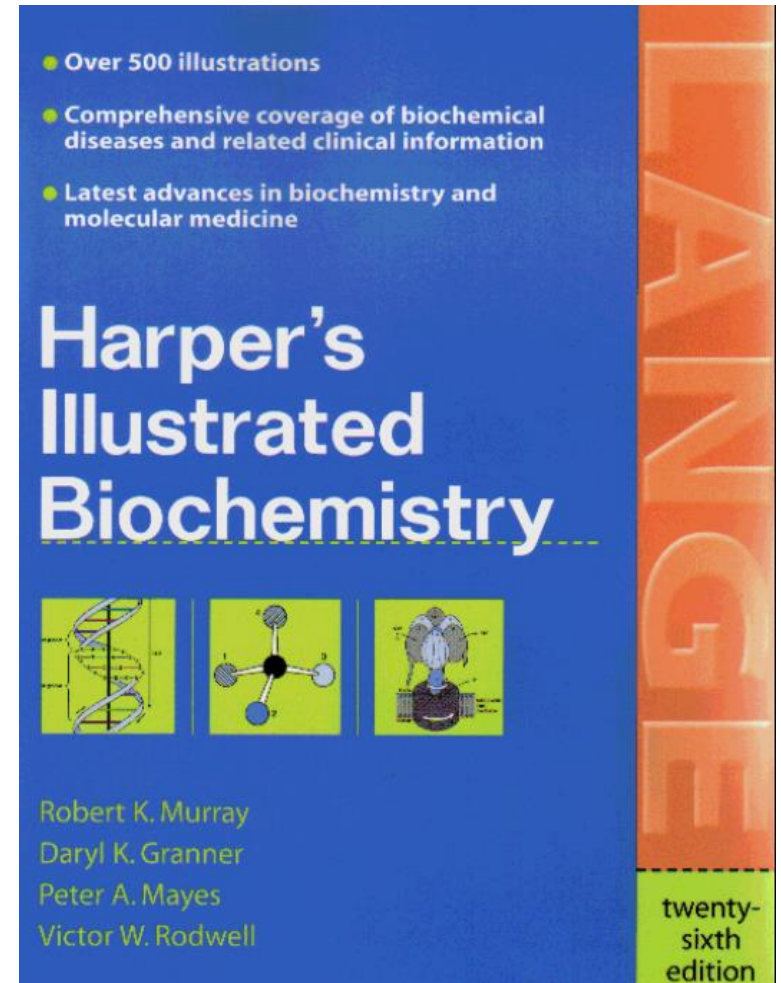
A comparação de eficiência entre enzimas exige examinarmos:

- K_{cat}
- K_{m} (ou $K_{50\%}$)

Sumário

1. Introdução
2. Propriedade das enzimas
3. Como as enzimas funcionam
4. Cinética enzimática
5. **Regulação das atividades das enzimas**

Referências Utilizadas



Informações para a Prova 3 e Recuperação

Prova 3: 28/06/24, com duas turmas:

- Turma 1: 8:03 – 8h58; nomes com iniciais de L a Z e alunos da REF0003
- Turma 2: 9:03-9:55; nomes com iniciais de A a K

Tópicos do módulo 3 + interação proteína ligante e estrutura de proteínas

Recuperação no dia 05 de julho às 8h

Enzimas: a Catálise das Reações Biológicas. Parte III

Prof. Dr. Tiago R. Figueira
Disc. Bioquímica e Biofísica
EEFERP/USP

Sumário

1. Introdução
2. Propriedade das enzimas
3. Como as enzimas funcionam
4. Cinética enzimática
5. **Regulação das atividades das enzimas**

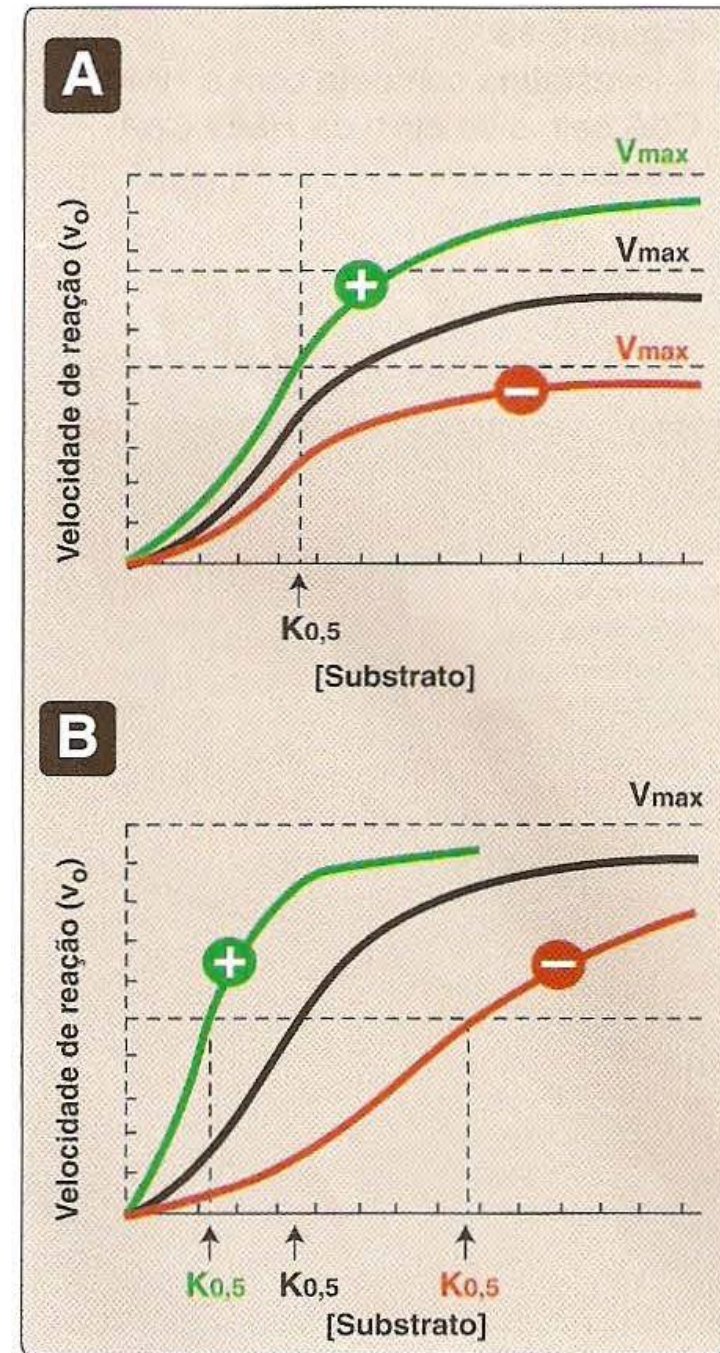
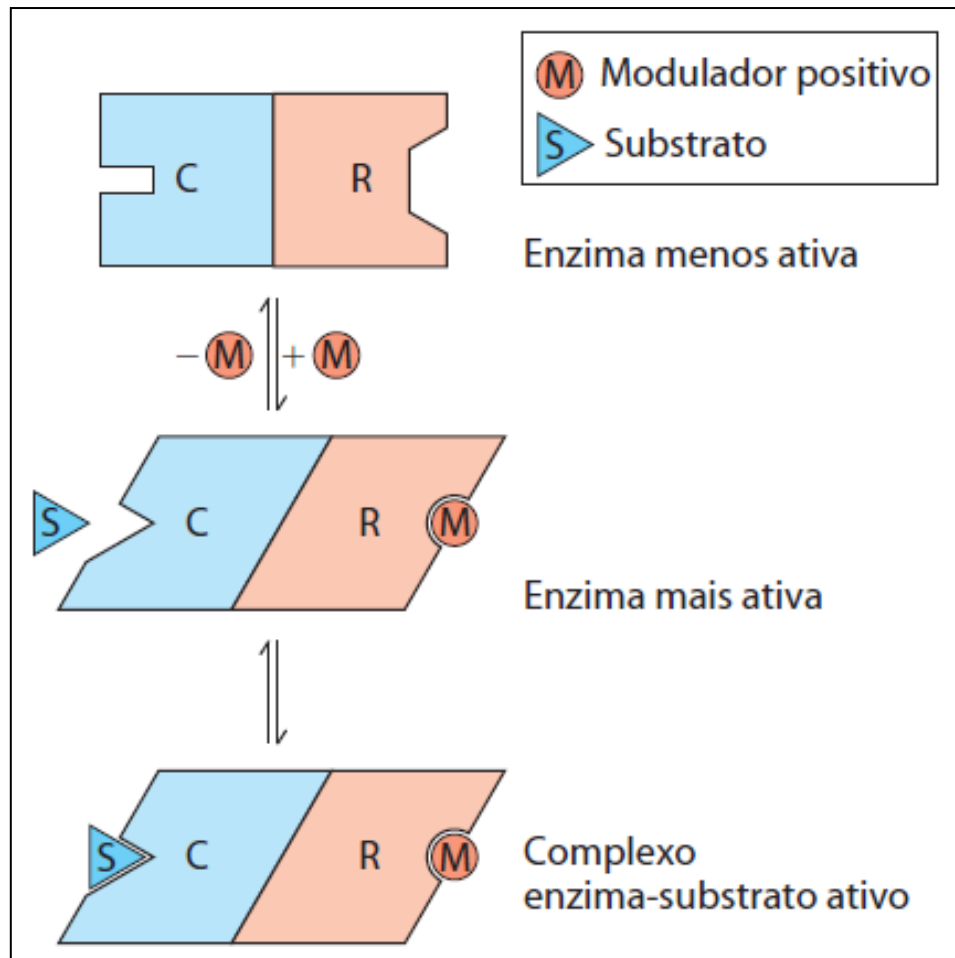
Regulação das atividades das enzimas

Subtópicos

- Regulação das enzimas
 - Modulação alostérica
 - Modulação por modificação covalente
- Inibição das enzimas (alvo de muitos fármacos)

Modulação Alostérica

Substância se liga reversivelmente a sítio regulatório da enzima e causa mudança conformacional – Estimulo (+) ou Inibição (-)

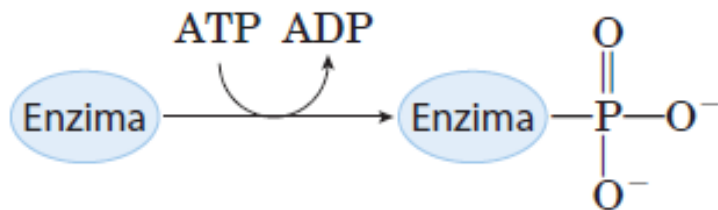


Modulação por Modificação Covalente

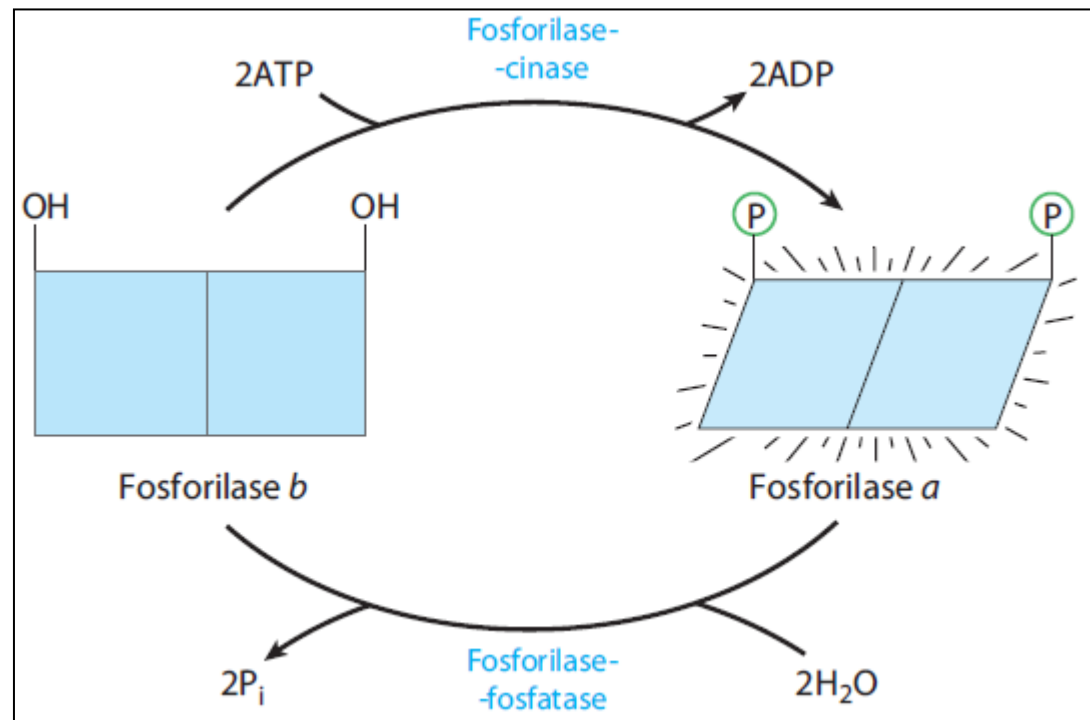
- Ligação covalente de grupos químicos a um ou mais resíduos de aminoácidos da enzima (é reversível)

Fosforilação

(Tyr, Ser, Thr, His)

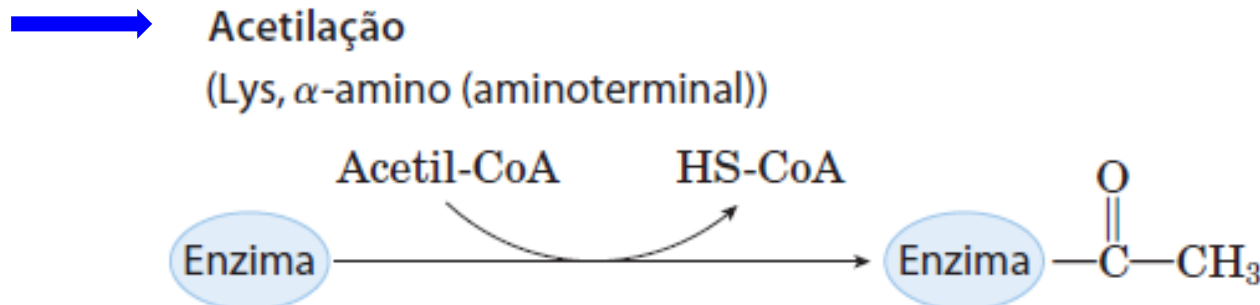
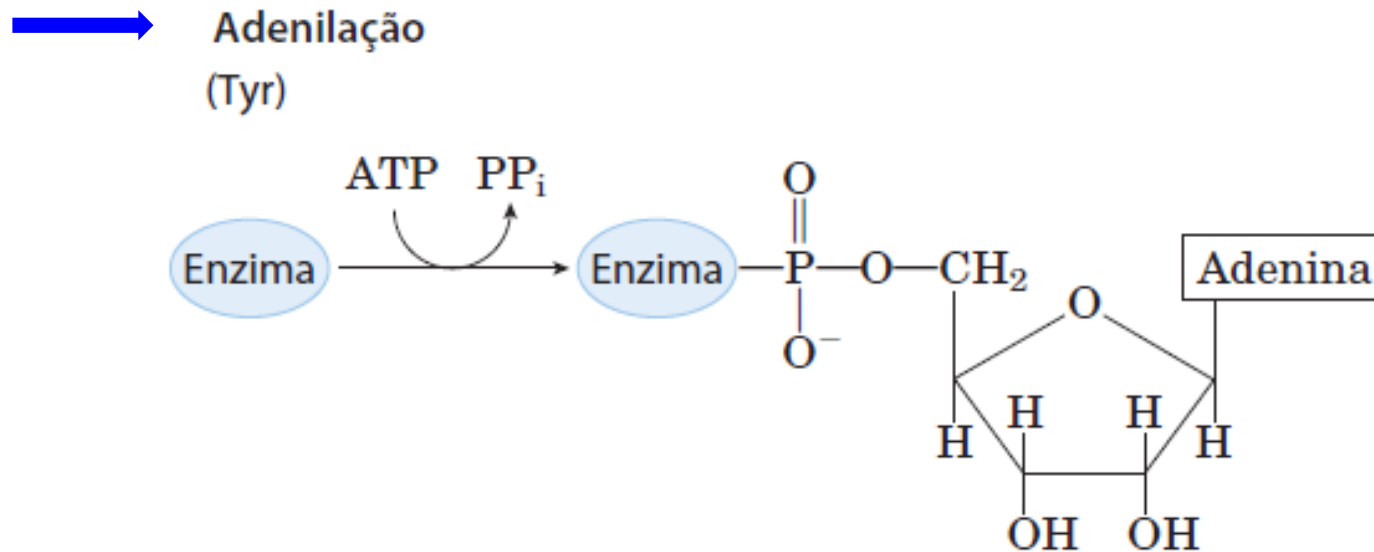


Exemplo de regulação por fosforilação : glicogênio fosforilase



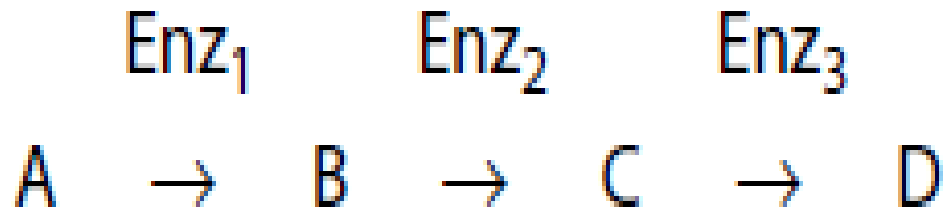
Há inúmeras outras formas de modulação covalente das enzimas

Outros exemplos

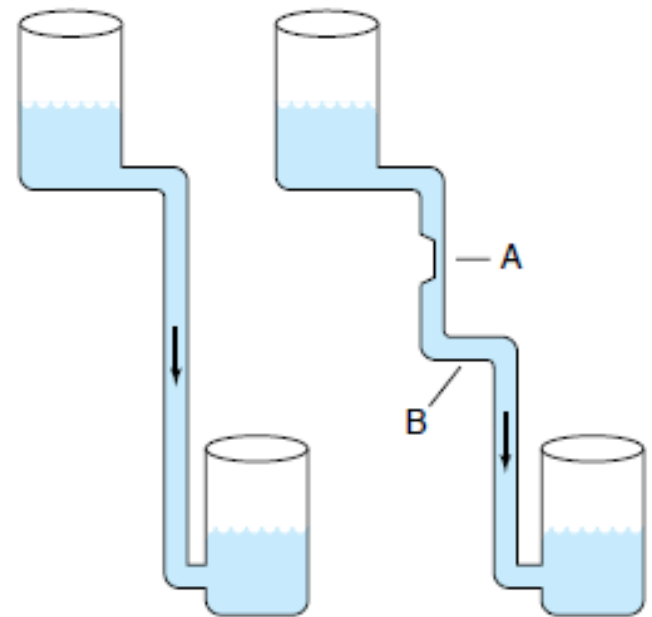


Enzimas “moduláveis” regulam o metabolismo

Conceito de via metabólica



Uma enzima pode limitar o fluxo através da via toda
(*rate limiting step*)



O fluxo através de uma via metabólica depende da:

- Quantidade das enzimas regulatórias (aquelas que catalisam os “passos limitantes” da via)
- Atividade destas enzimas (sujeita a ação de moduladores)

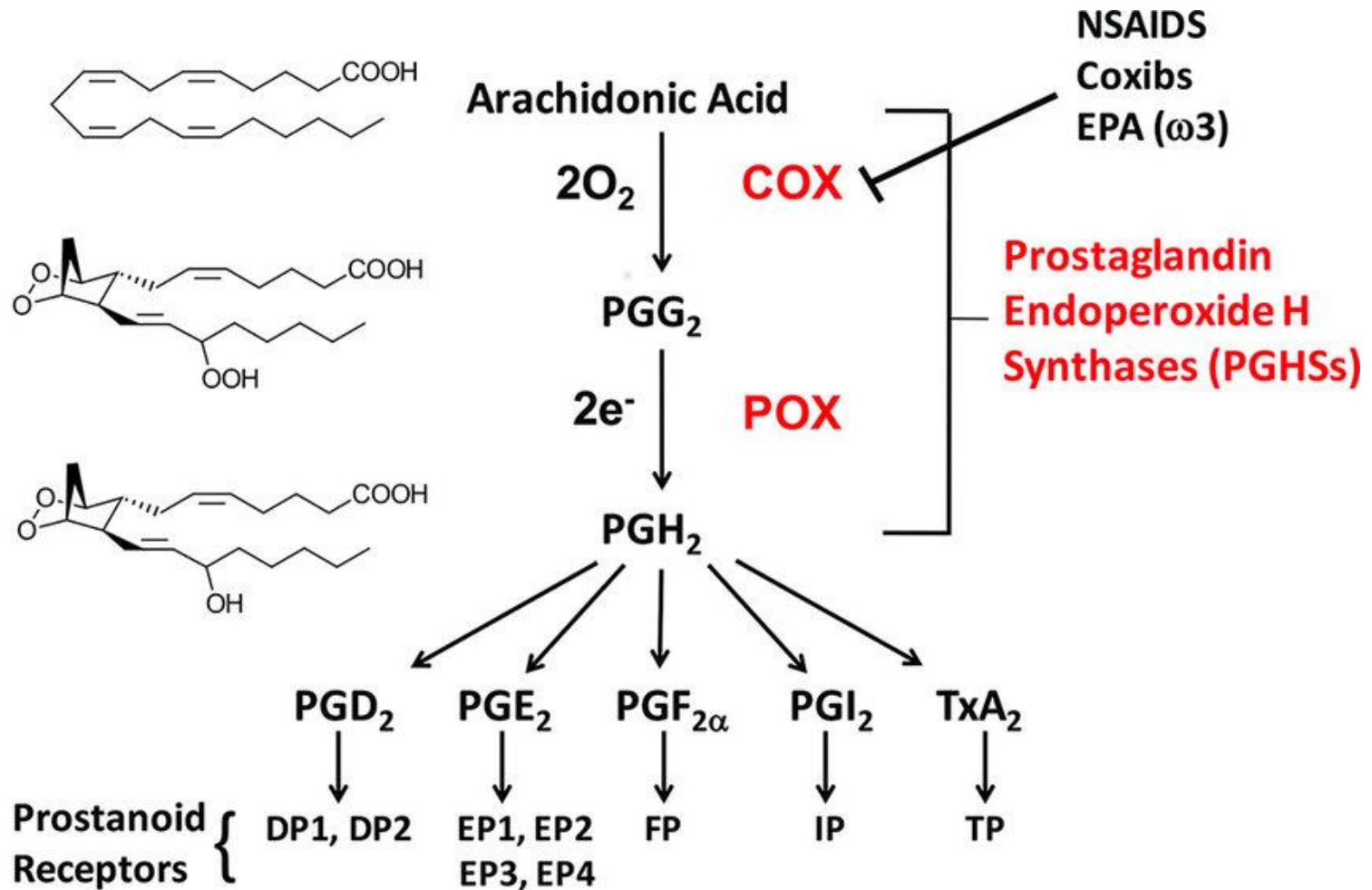
Importância do organismo ter mecanismos de modulação das atividades de enzimas

- O fluxo através das vias metabólicas, seja ela anabólica ou catabólica, deve ser adequado às necessidades momentâneas da célula;
 - tais necessidade variam!

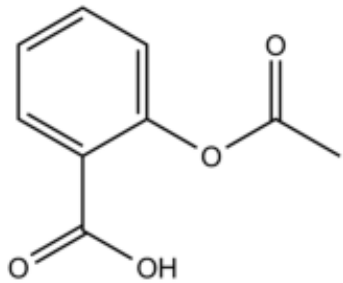
- O maior contingente de fármacos agrupa inibidores de enzimas

Seus efeitos terapêuticos dependem da inibição de enzimas!

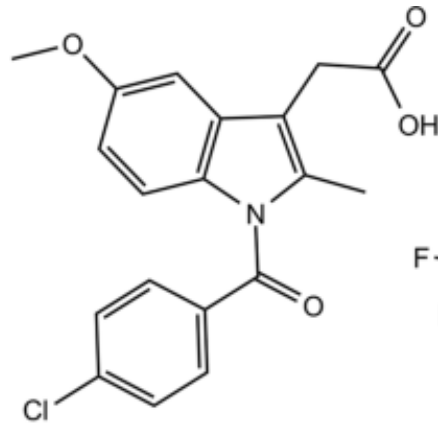
Os medicamentos mais vendidos exercem seus efeitos por inibir enzimas



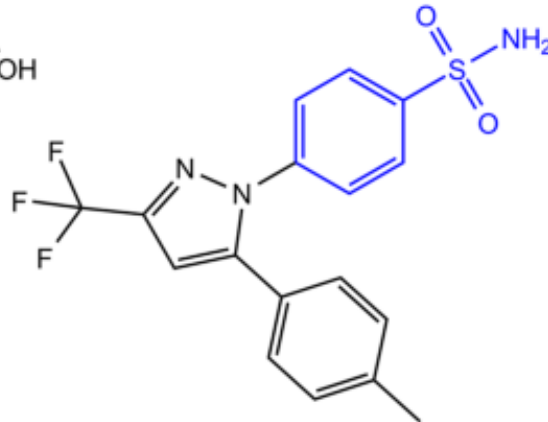
Inibidores de COX são os anti-inflamatórios não esteroidais (AINS; *NSAID*)



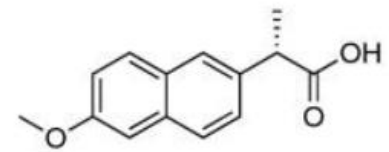
Acetyl salicylic acid (1)



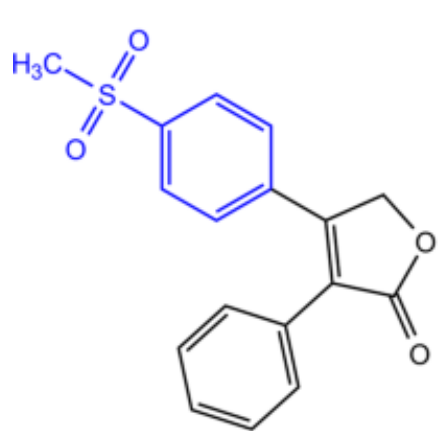
Indomethacin (2)



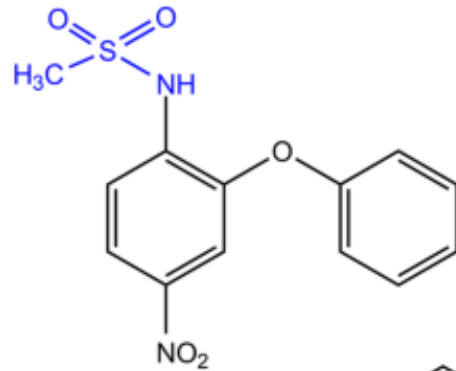
Celecoxib (3)



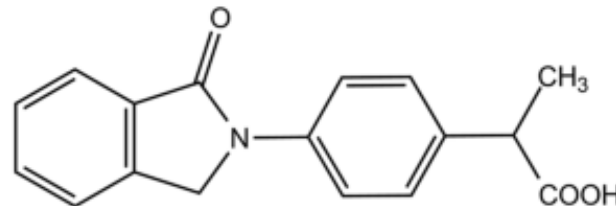
Naproxen



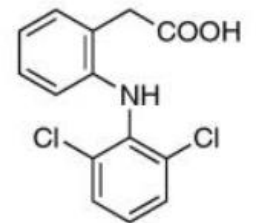
Rofecoxib (4)



Nimesulide (5)



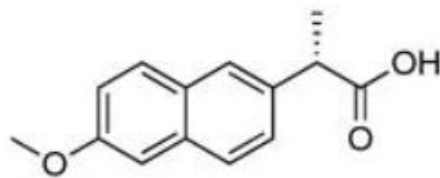
Indoprofen (6)



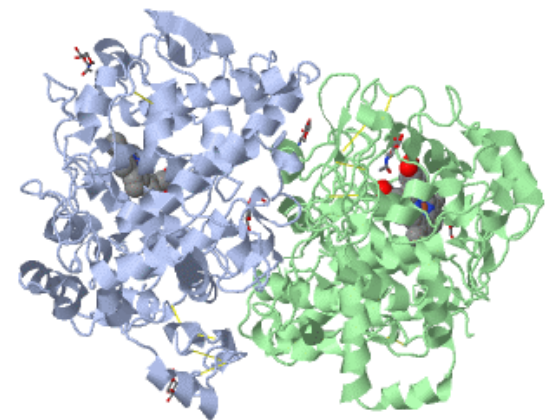
Diclofenac

Mecanismo de inibição da cicloxigenase por AINS

AINS (e.g. naproxeno): Inibição reversível mista de cicloxigenase (doi: 10.1074/jbc.M110.162982)



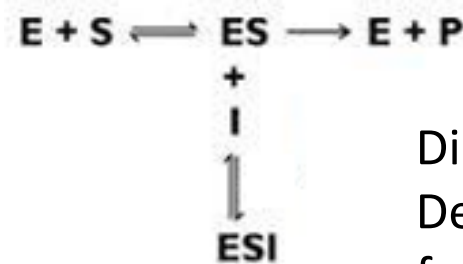
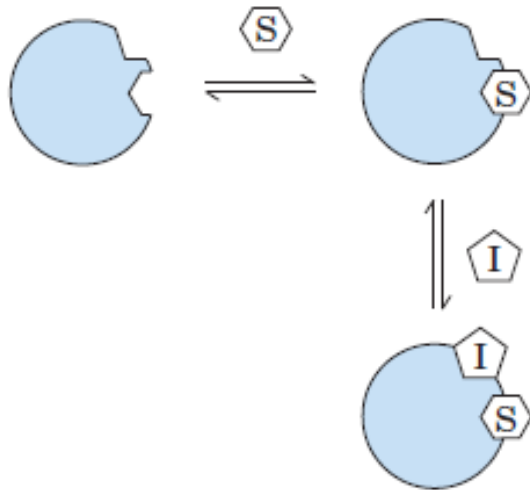
Naproxen



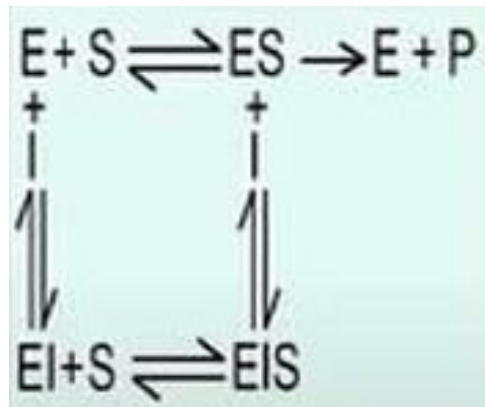
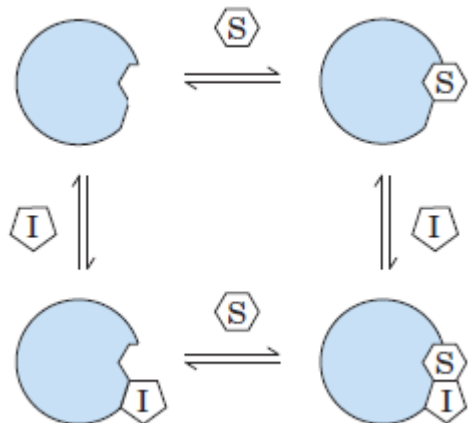
Estrutura da COX-2

Mecanismos de Inibição Reversível das Enzimas

Acompetitiva: inibidor (I) se liga a um sítio separado do complexo ES

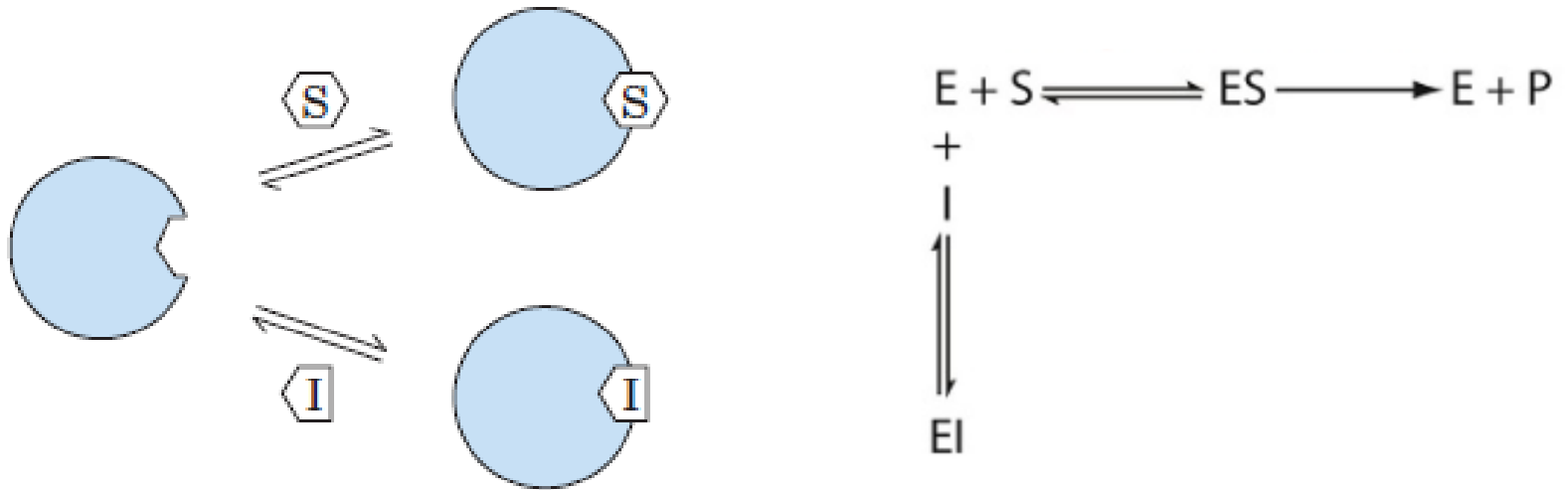


Diminui [ES]
Desloca o equilíbrio para formar ES (i.e. $\uparrow$ afinidade)



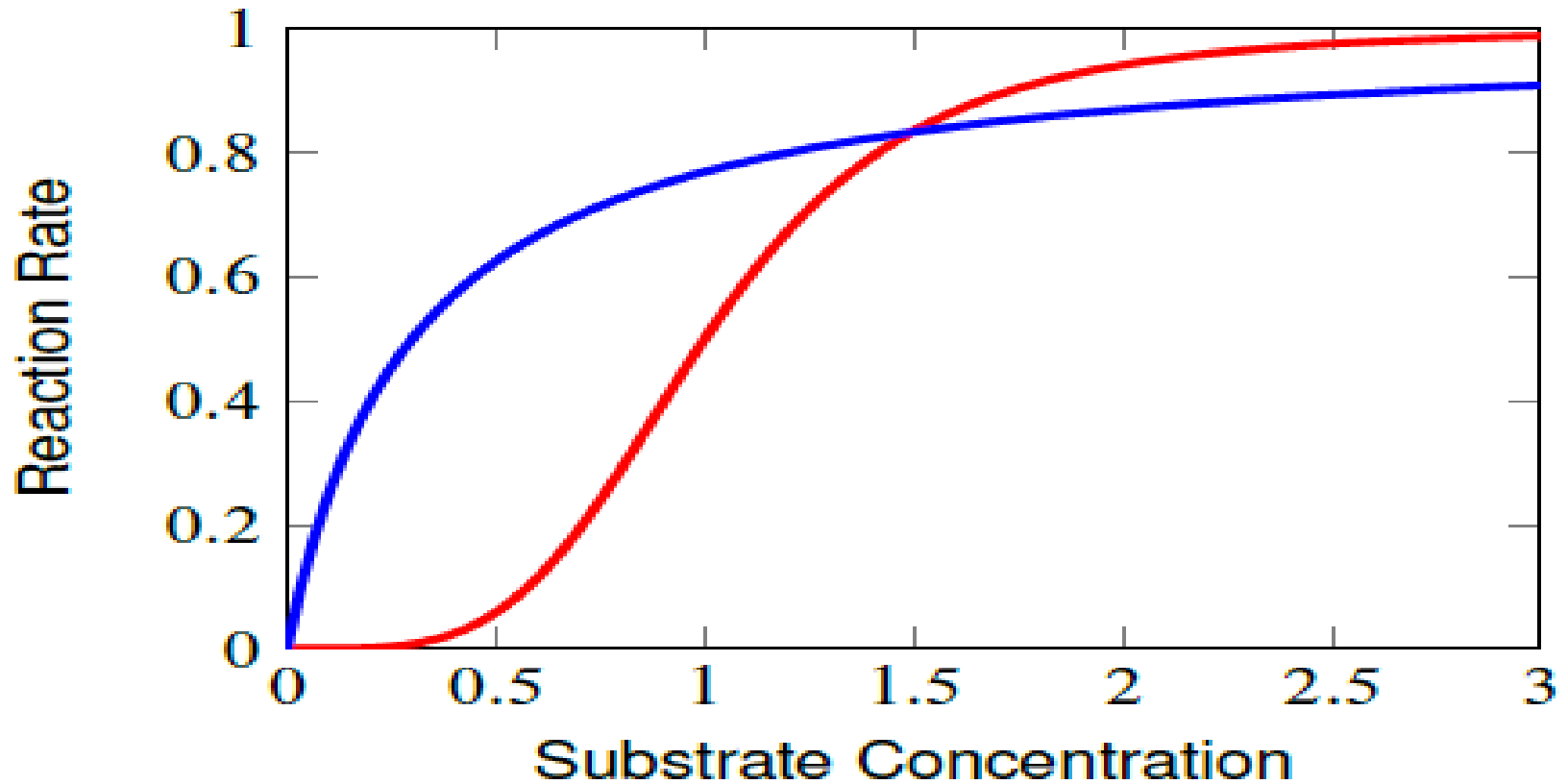
Não-competitiva mista: inibidor (I) se ligar a um sítio separado do complexo ES ou da E livre

Mecanismos de Inibição Reversível das Enzimas

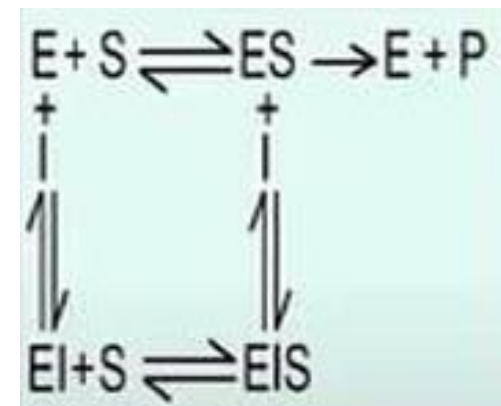


Competitiva: inibidor (I) se liga no sítio ativo da enzima

Proporção entre concentrações do substrato e do inibidor influencia a efetiva inibição da enzima



Tipo de inibição	$V_{MÁX}$	$K_{50\%}$
Competitiva	$\leftrightarrow$	$\uparrow$
Acompetitiva	$\downarrow$	$\downarrow$
Não-competitiva	$\downarrow$	Mista: $\uparrow$ ou $\downarrow$
		Pura: $\leftrightarrow$

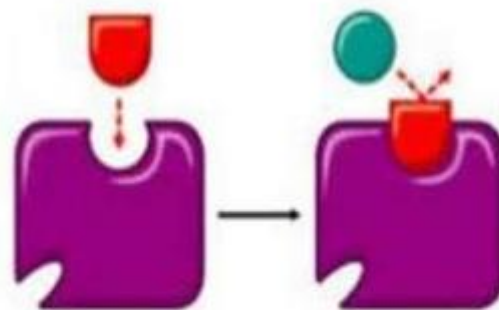


Inibição irreversível de enzima

Inibidor:

- Liga-se covalentemente à enzima
- Destrói ou ocupa o sítio ativo da enzima

Há grande potencial de uso terapêutico



Inseticidas fosforados

Sumário

1. Introdução
2. Propriedade das enzimas
3. Como as enzimas funcionam
4. Cinética enzimática
5. Regulação das atividades das enzimas

Referências Utilizadas

