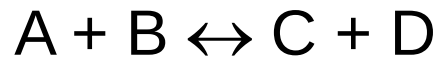


O quê são enzimas?

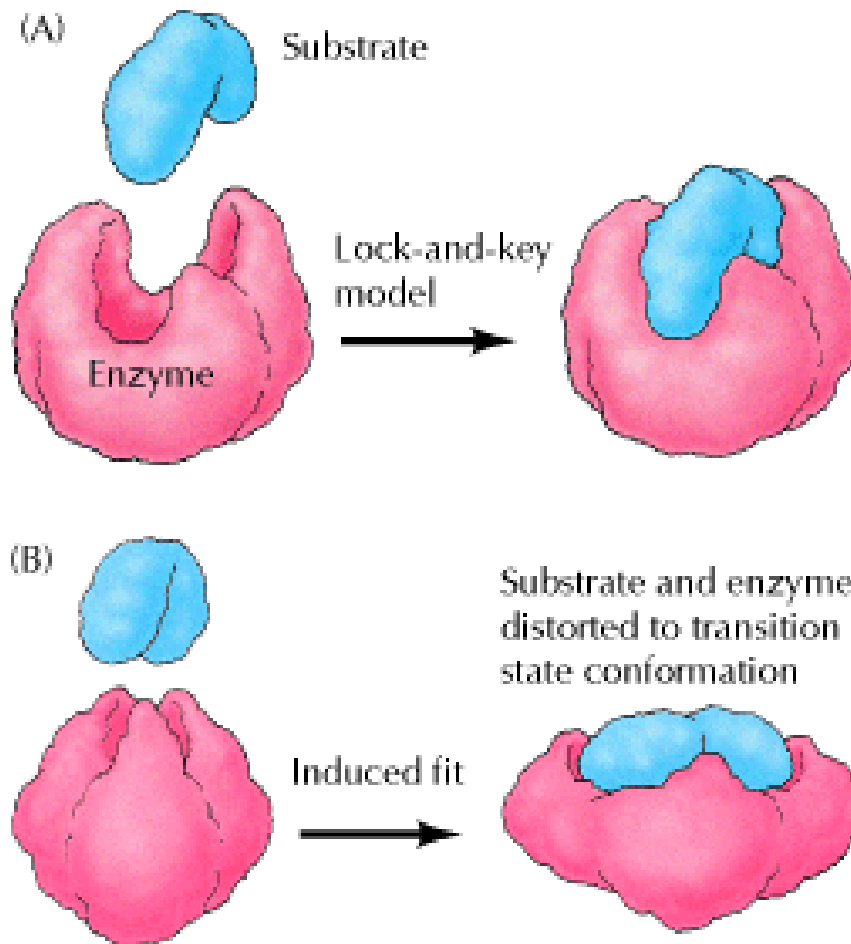
São proteínas globulares que apresentam ação catalítica (aumentam a velocidade de reações químicas).



As enzimas:

- São sintetizadas pelas próprias células onde atuam;
- Apresentam elevada especificidade de ação;
- Podem ser expressas em maior ou menor quantidade, de acordo com as condições fisiológicas;
- Apresentam atividade modulável, permitindo um ajuste fino do metabolismo às necessidades celulares.

Sítio catalítico



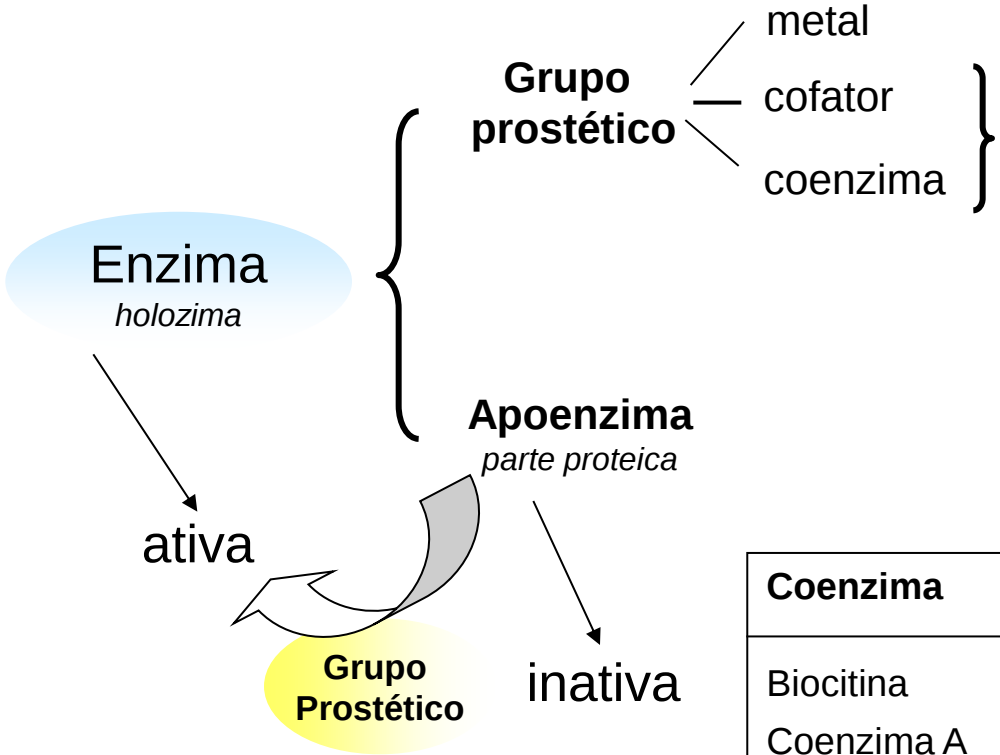
Enzimas aceleram reações várias ordens de grandeza



Compare esses números !

Enzima	Velocidade na ausência de enzima "Reações/segundo"	Velocidade da reação catalisada "Reações/segundo"	Poder catalítico
Peroxidase $\text{H}_2\text{O}_2 \rightleftharpoons \text{H}_2\text{O} + \frac{1}{2} \text{O}_2$	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}

Significado de cofator , grupo prostético e coenzima



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 as metais.

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

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

NOMENCLATURA

Classificação das enzimas em relação à reação catalisada (ENZYME COMMISSION)

Classes de enzimas	Numero de subclasses	Tipo de reação
1. Oxidorredutases	22	Envolve o movimento de elétrons de uma molécula a outra. Em sistemas biológicos nós vemos a remoção de hidrogênio do substrato e as enzimas são chamadas desidrogenases.
2. Transferases	9	Envolve a transferência de grupos de átomos de uma molécula a outra
3. Hidrolases	13	Catalisa reações entre um substrato e a água. Moléculas grandes são quebradas em pequenas unidades.
4. Liases	7	Catalisam a adição de grupos a duplas ligações ou a formação de duplas ligações através da remoção de grupos.
5. Isomerases	6	Catalisam a transferência de grupos de uma posição a outra na mesma molécula.
6. Ligases	6	Ligam moléculas através de ligações covalentes.
7. Translocases	6	Catalisam o movimento de ions ou moleculas através das membranas

Entrar no site :

Enzyme Database - BRENDA

www.brenda-enzymes.org

Procurar por uma enzima:

Ex: invertase

Information on EC 3.2.1.26 - beta-fructofuranosidase

for references in articles please use BRENDA:EC3.2.1.26

EC Tree

3 Hydrolases

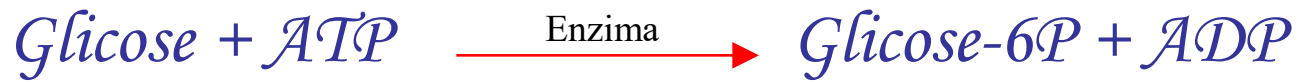
3.2 Glycosylases

3.2.1 Glycosidases,

3.2.1.26 beta-fructofuranosidase

O que significam os números do tipo “EC 2.7.1.1”?

Utilizando-se uma classificação proposta pela Comissão de Enzimas da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular.



Nome trivial: Hexoquinase

Nome Sistemático: ATP:glicose fosfotransferase (EC 2.7.1.1)

2: Transferase

7: Fosfotransferase

1: Fosfotransferase com grupo OH como acceptor

1: Fosfotransferase com grupo OH da glicose como acceptor

Os nomes das enzimas descrevem as suas atividades catalíticas

Quando a uma mesma atividade enzimática correspondem várias proteínas que são produtos de genes distintos que coexistem numa mesma espécie diz-se que estas proteínas são **isoenzimas** e são denominadas com o mesmo nome.

Cinética versus termodinâmica



Propriedade termodinâmica

Variação de energia livre padrão – diferença entre a energia dos reagentes e dos produtos

As enzimas não podem alterar a variação de energia livre

Energia de Ativação – fornecimento de energia para iniciar a reação

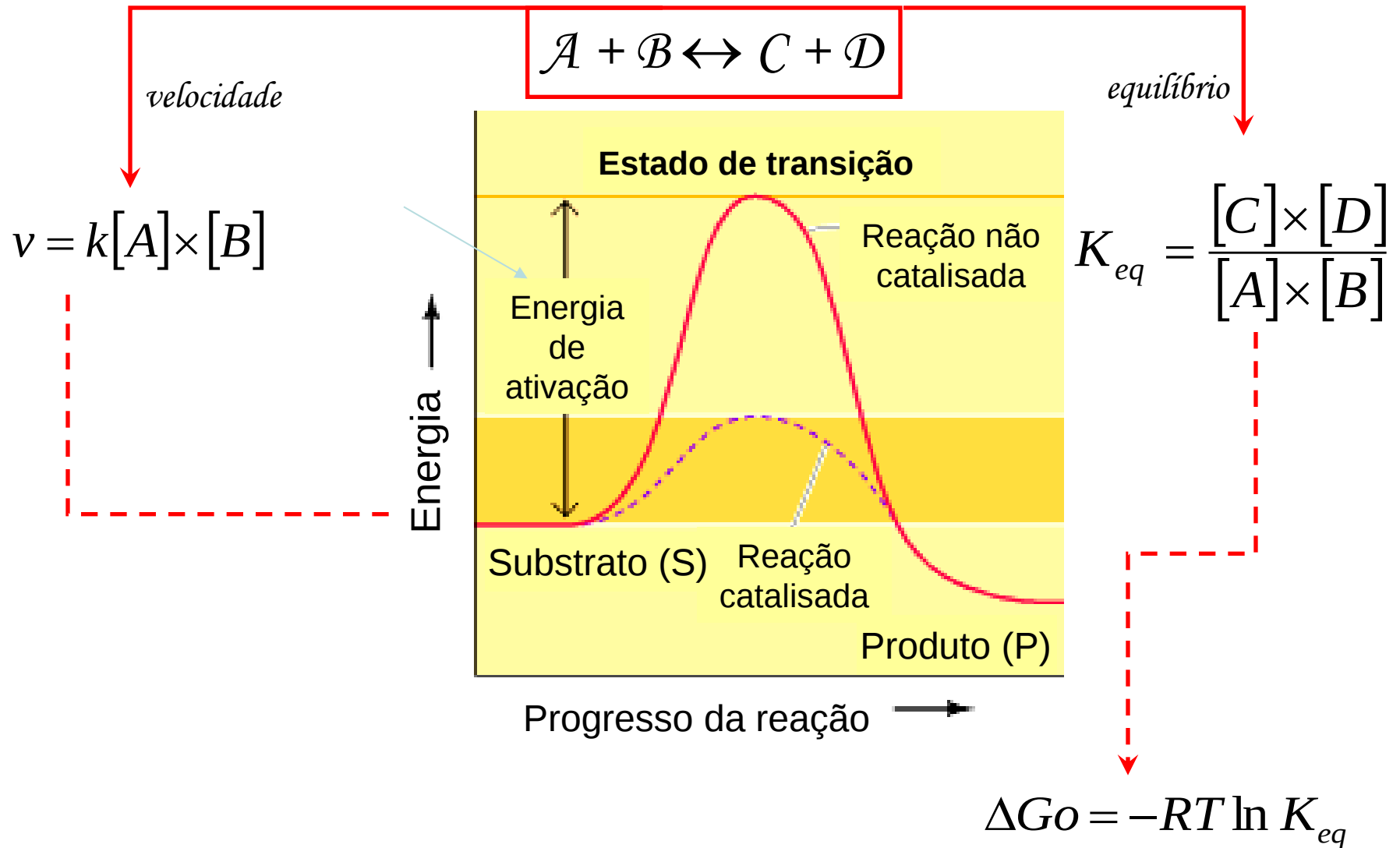
Se uma reação é espontânea significa que ela é rápida?

Glicose + O₂

- Glicose é estável
- Termodinamicamente favorável
- Espontanea
- Energia livre - -686 kcal/mol



Natureza das enzimas



K_{eq} relaciona-se com ΔG

K (constante de proporcionalidade)

Reação de Ordem zero $V = k[S]^0$

Reação de 1ª Ordem $V = k_1 [S]$ $S \rightarrow P$

Reação de 2ª Ordem $V = k_2 [A] [B]$ $A + B \leftrightarrow C + D$

$$K = M/s$$

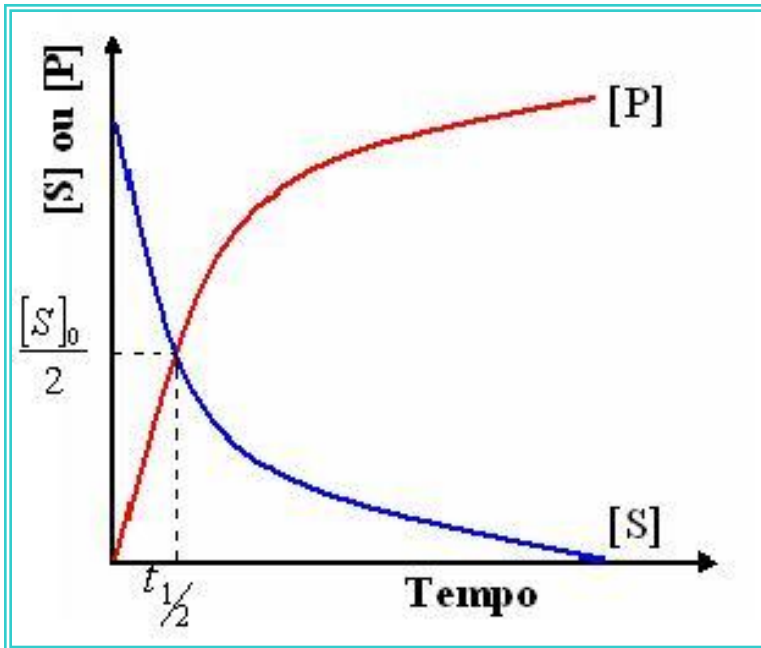
$$K_1 = (M/s)/M, \text{ ou seja, } k_1 = s^{-1}$$

$$K_2 = (M/s) / M.M \quad K_2 = M^{-1}s^{-1}$$

Equações cinéticas de enzimas



$$V = k_1 [S]$$

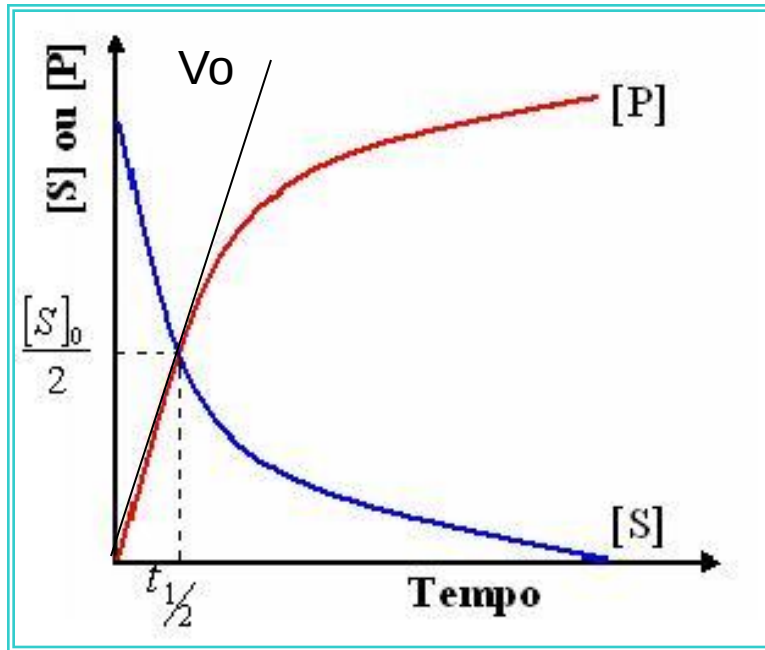


$$V = \frac{-dS}{dt}$$

$$V = \frac{dP}{dt}$$

Por que o **aparecimento** de P e o **desaparecimento** de S não são lineares com o tempo?

V constante apenas no início da reação



$$V = k_1 [S]$$

$$\frac{-dS}{dt} = kS$$

$$k = -\frac{d[S]}{[S]} \cdot \frac{1}{dt}$$

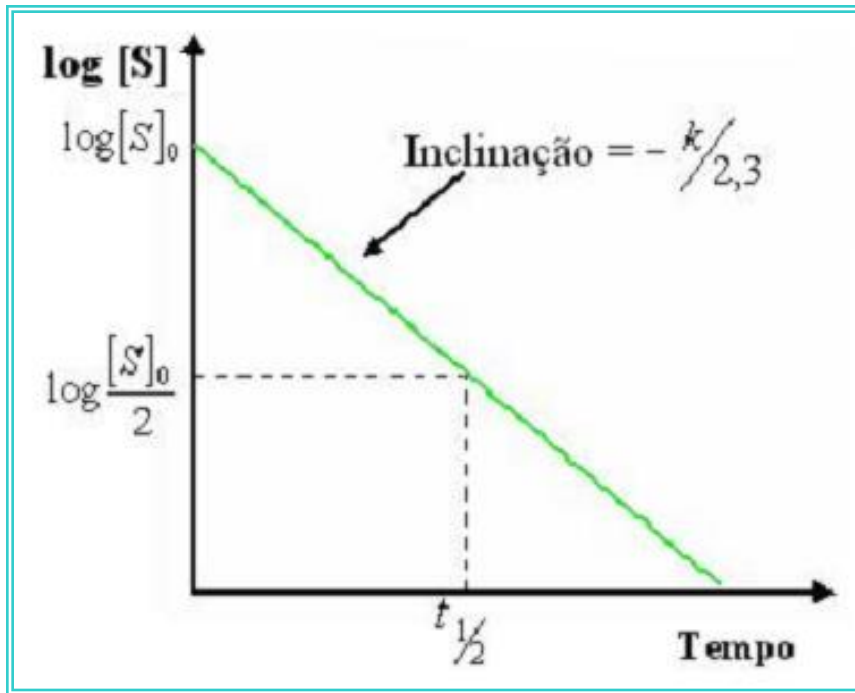
$$2,3 \cdot \log \frac{[S]_0}{[S]} = k(t - t_0)$$

O que significa o $t_{1/2}$?

$$2,3 \log \frac{S_0}{(S_0/2)} = k \cdot t_{1/2}$$

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{k}$$

Reação de 1ª Ordem



↪ $t_{1/2}$ = tempo de “meia vida”
→ tempo necessário para converter em **P** metade do **S** presente.

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{k}$$

Ex. Se o tempo médio de uma reação de primeira ordem é 0,3s, qual será sua constante de velocidade k ? Quanto tempo levará para 95% do substrato desaparecer?

$$t_{1/2} = 0,693/k$$

$$K = 0,693/0,3$$

$$K = 2,31 \text{ s}^{-1}$$

$$2,3 \log S_0 / (0,05S_0) = 2,31 t$$

$$t = 1,3 \text{ s}$$

Ex. Seja a reação $A \rightarrow P$. Sabendo-se que os $t_{1/2}$ para a reação efetuada em pH 5 e 6 são respectivamente 0,099 min e 0,347 min. Calcular o valor de K em cada um dos pH. Você acha que a reação seria mais rápida para pHs altos? Por que?

$$\text{Em pH 5 } k = 7 \text{ min}^{-1}$$

$$\text{Em pH 6 } k = 1,99 \text{ min}^{-1}$$

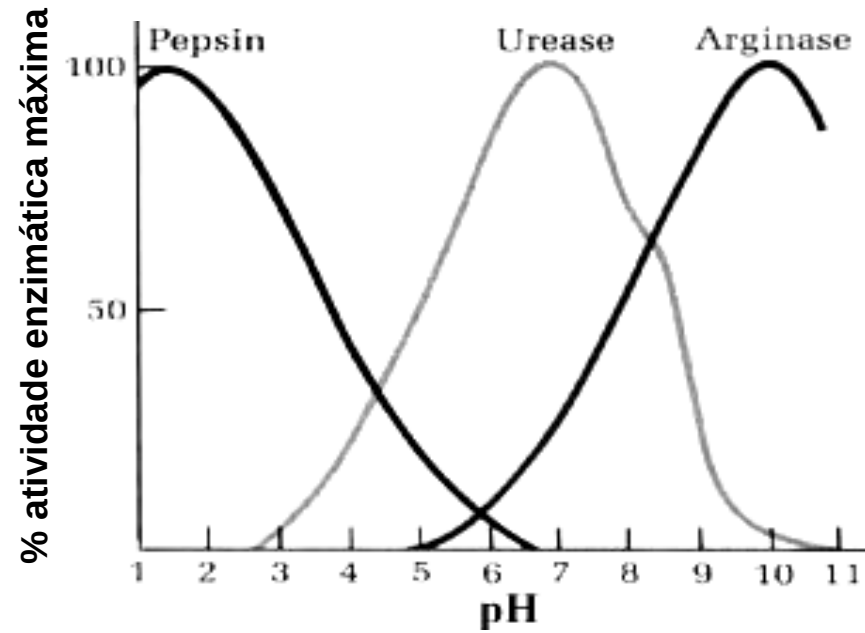
Unidade de Atividade Enzimática

- Segundo a ***Enzyme Comission***, uma Unidade de Atividade (U) corresponde à transformação de um micromol de substrato, ou a formação de um micromol de produto por minuto pela enzima, nas estabelecidas condições do ensaio(temperatura, pH, concentração de substrato).
- A atividade específica é expressa em termos de atividade por mg de proteína (U/mg)

Fatores que afetam a atividade enzimática:

1. Condições do meio que afetam estabilidade protéica
 - { pH
 - { temperatura
2. Tempo da reação
3. Concentração dos reagentes
 - { a enzima
 - { o substrato
 - { co-fator(s)

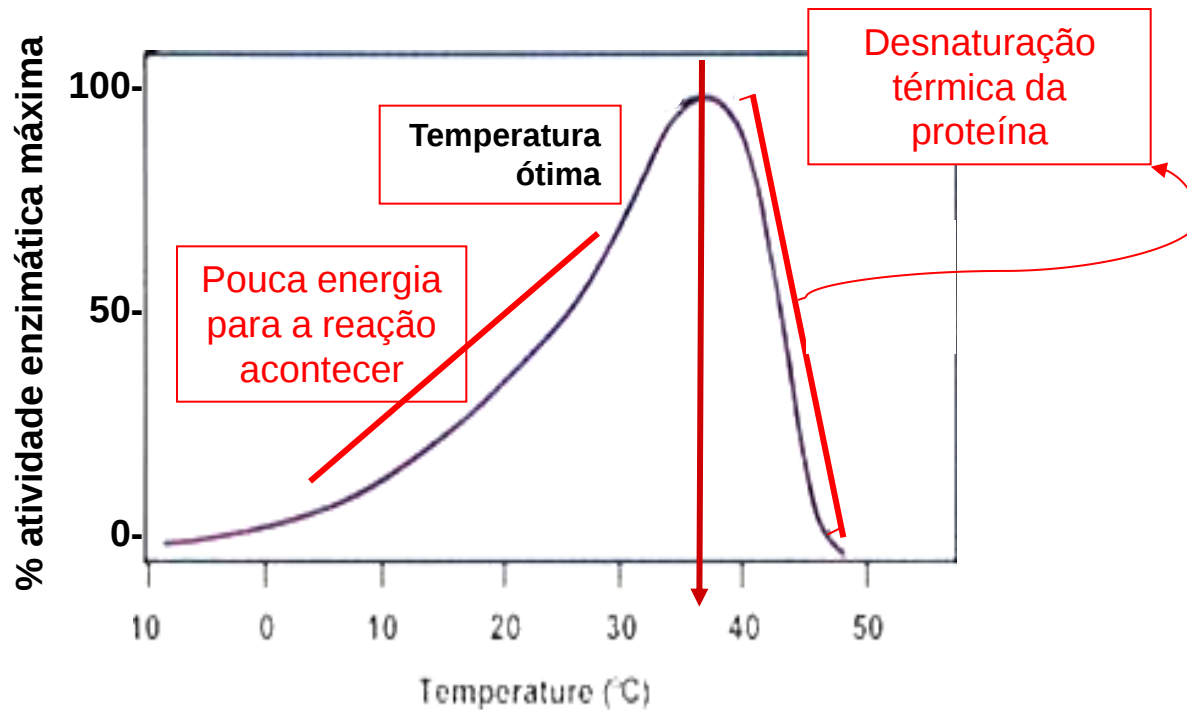
Efeito do pH na atividade enzimática



Efeito da temperatura na atividade enzimática

↑ temperatura dois efeitos ocorrem:

- (a) a taxa de reação aumenta, como se observa na maioria das reações químicas;
- (b) a estabilidade da proteína decresce devido a desativação térmica.



temperatura ótima - é a temperatura máxima na qual a enzima possui uma atividade constante por um período de tempo.

$$v = k[A] \times [B]$$

$$k = \frac{K \times T}{h} e^{\left(\frac{-E_{act}}{RT}\right)}$$

K – cte Boltzman

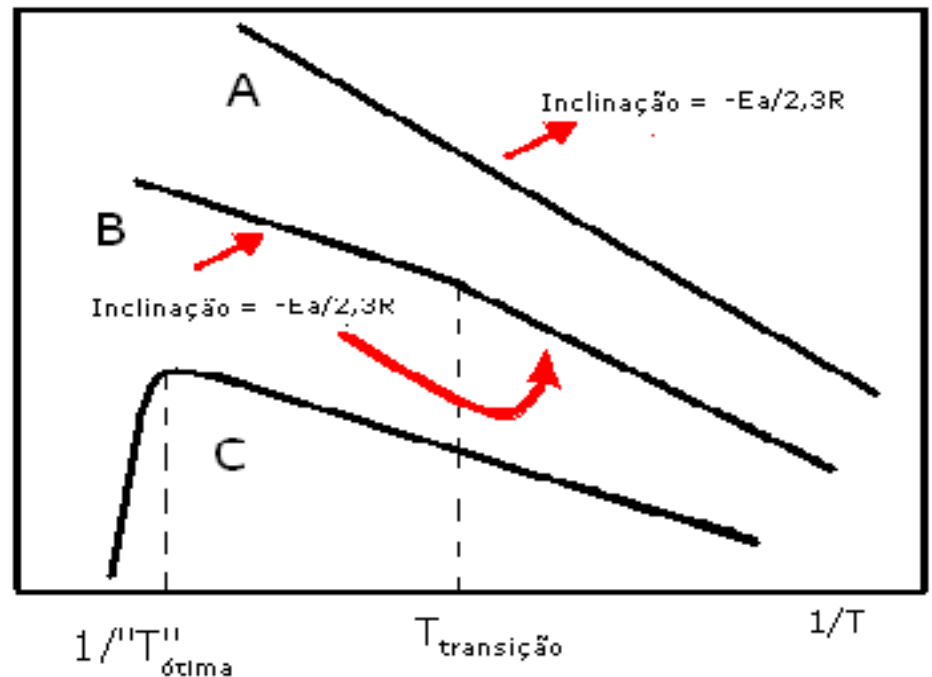
h – cte Planck

$$k = Ae^{-Ea/RT}$$

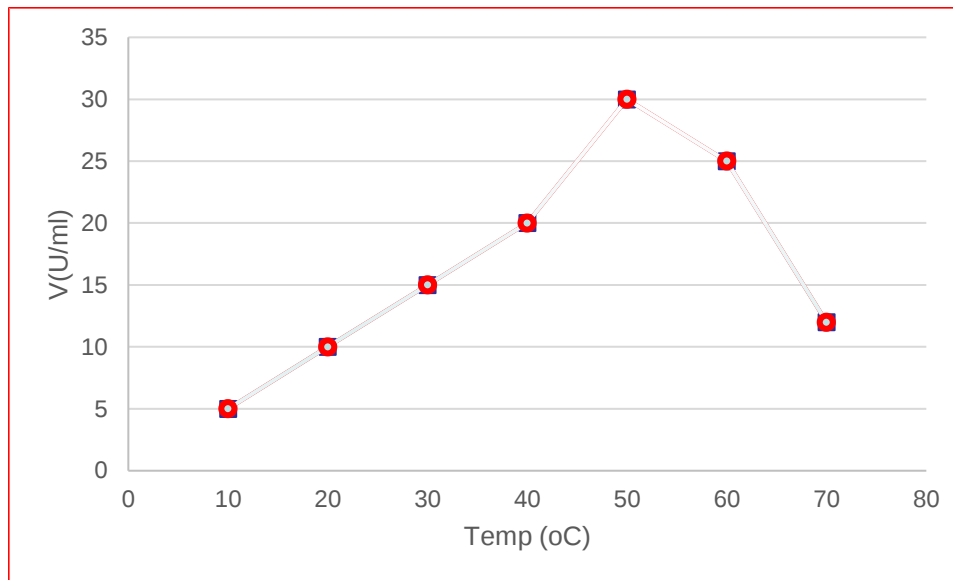
$$\log k = -\frac{Ea}{2,3R} \frac{1}{T} + \log A$$

Log K

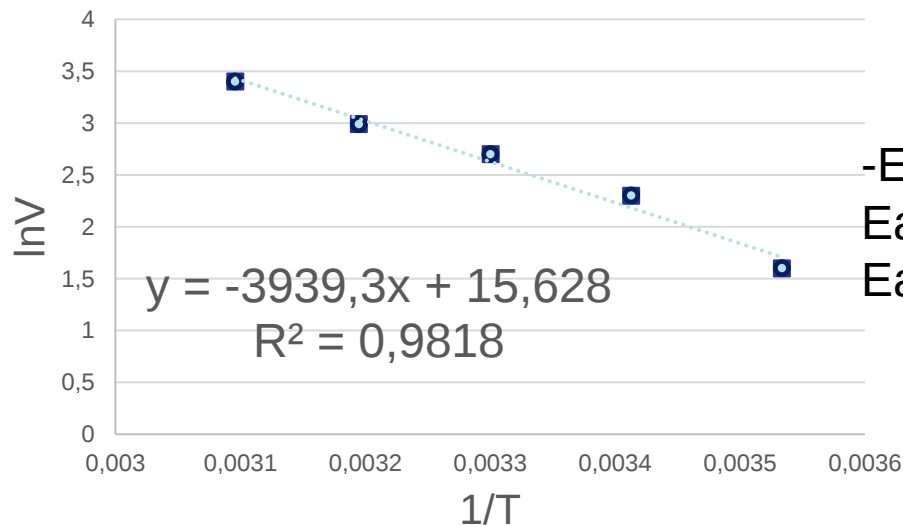
✖ $Ea \rightarrow$ Lei de Arrhenius



ToC	V (U/ml)
10	5
20	10
30	15
40	20
50	30
60	25
70	12



1/T	lnV
0,003534	1,6
0,003413	2,3
0,0033	2,7
0,003195	2,99
0,003096	3,4

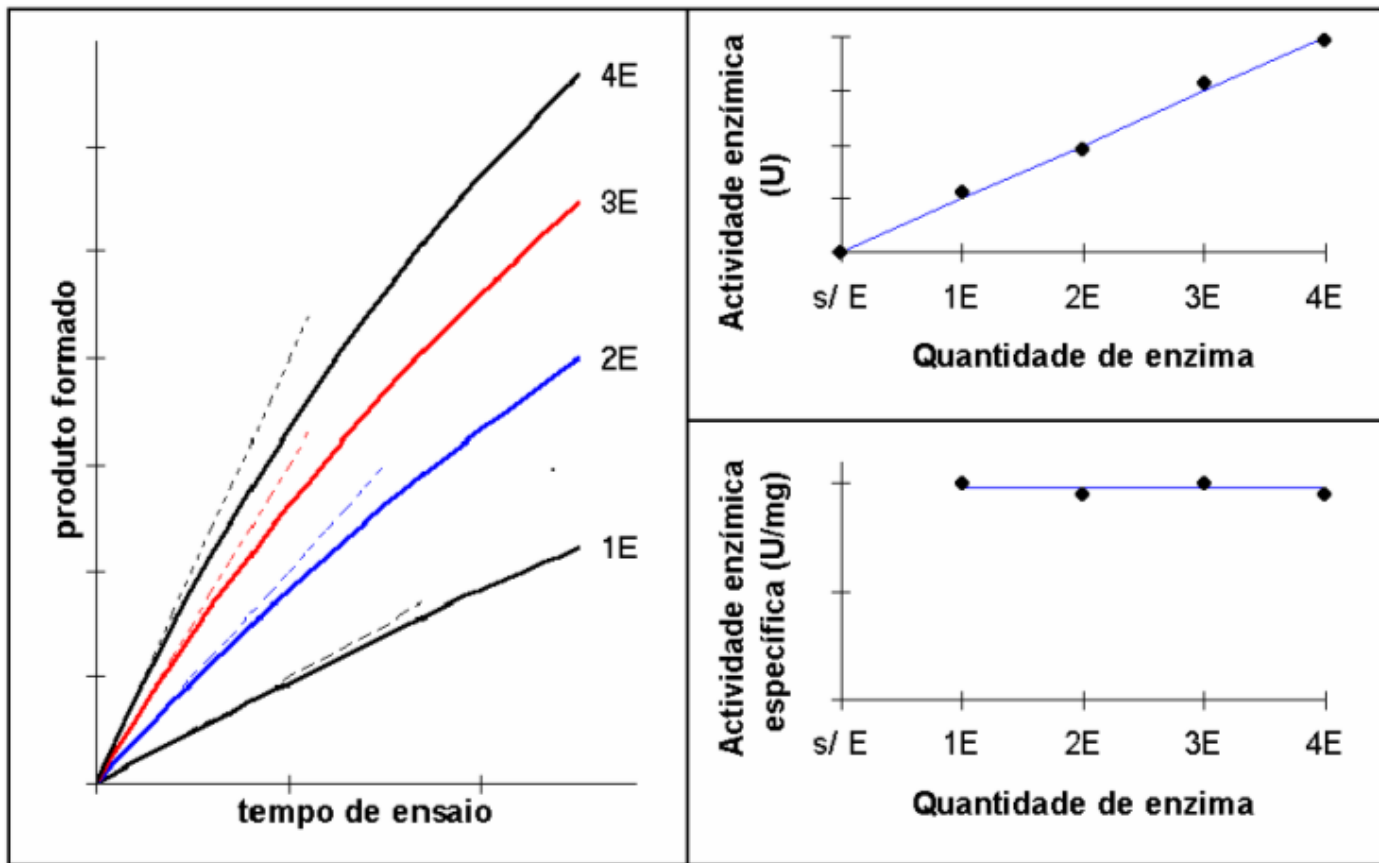


$$-E_a/R = -3939,3$$

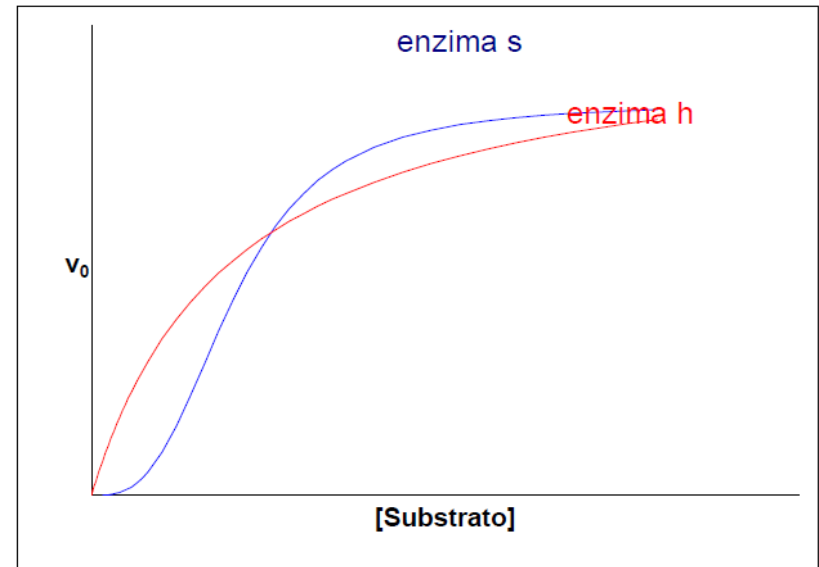
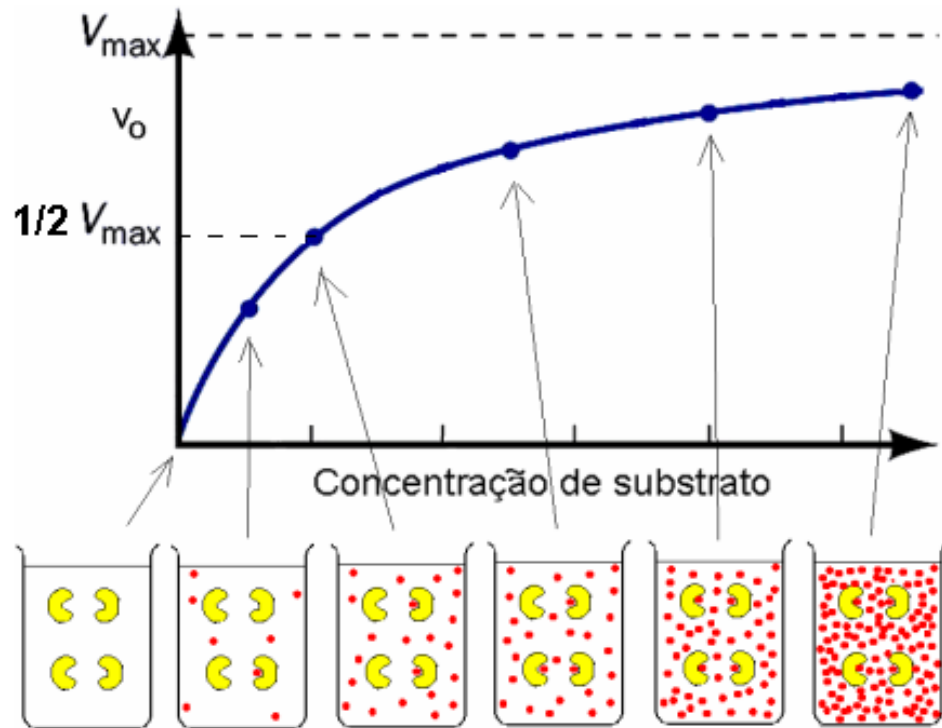
$$E_a = 3939,3 \times 8,31 \text{ J/mol.K}$$

$$E_a = 32,7 \text{ kJ/mol K}$$

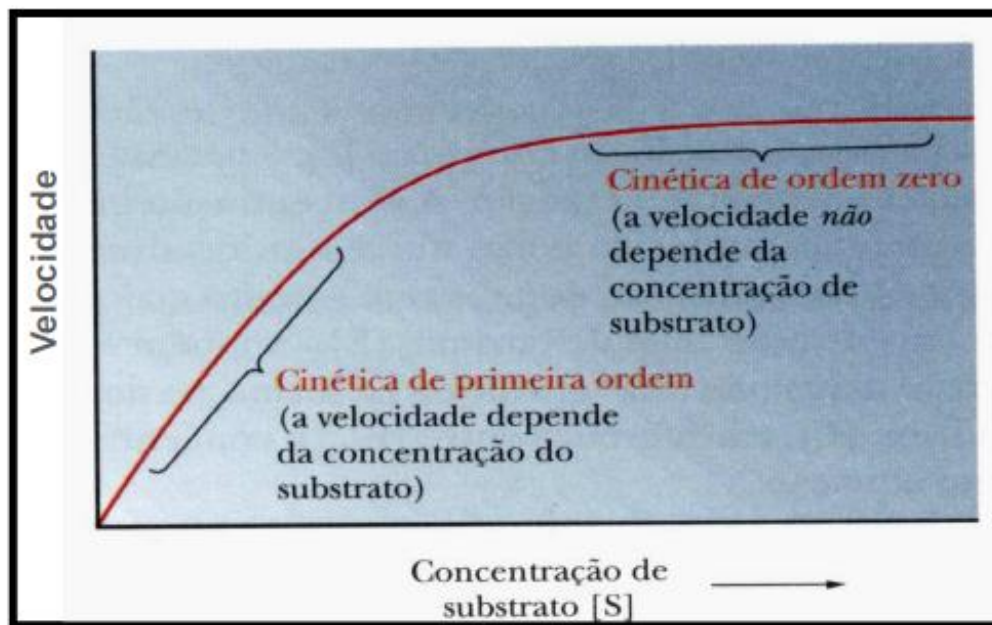
Efeito da concentração de enzima na velocidade da reação



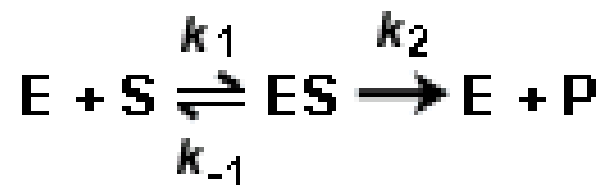
Efeito da concentração de substrato na velocidade da reação



Qual a porcentagem dos sítios ativos estão ocupados?



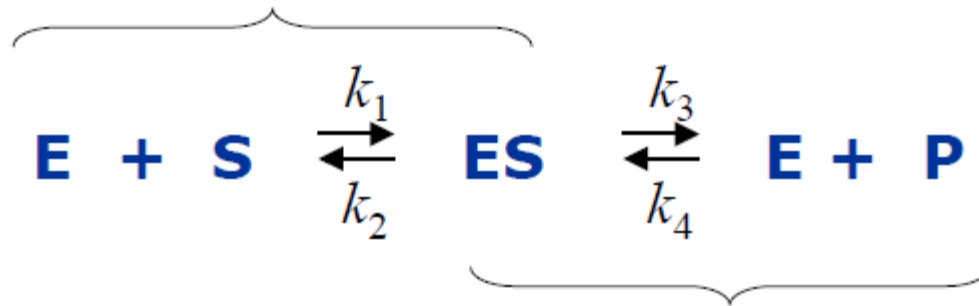
O gráfico mostra **um conjunto de reações** que estão acontecendo simultaneamente, conforme as equações abaixo:



Influência da concentração do substrato

O modelo de **Michaelis-Menten** considera o Equilíbrio Rápido: $K_2 \gg K_3$

Etapa 1



Etapa 2

$$V_1 = V_2$$

$$K_1 [E] [S] = K_2 [ES]$$

$$\frac{K_2}{K_1} = \frac{[E] [S]}{[ES]}$$

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

$$V = k_3 [ES] - k_4 [E] [P]$$

$$V_0 = k_3 [ES]$$



1) $V = k_3 [ES]$

2) $[E_t] = [E] + [ES]$

$$\frac{V}{[E_t]} = \frac{k_3 [ES]}{[E] + [ES]}$$

$$V = \frac{K_3 \frac{[E][S]}{K_1}}{[E] + \frac{[E][S]}{K_1}}$$

$$V = \frac{V_{max} [S]}{K_s + [S]}$$

$$\frac{K_2}{K_1} = K_s = \frac{[E][S]}{[ES]}$$

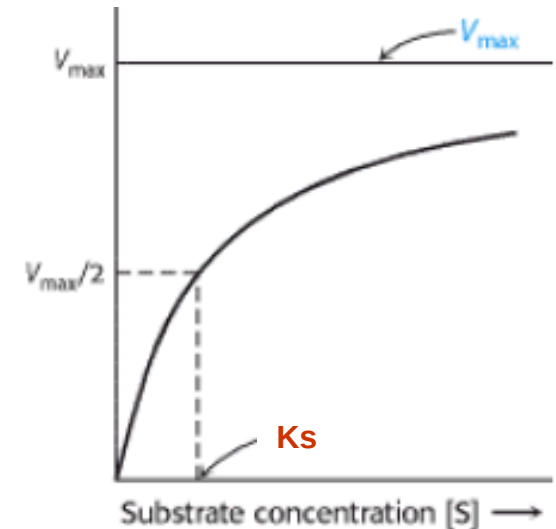
$$[ES] = \frac{[E][S]}{K_s}$$

Quando $V = V_{max}/2$

$$\frac{V_{max}}{2} = \frac{V_{max} [S]}{K_s + [S]}$$

$$K_s + [S] = 2 [S]$$

$$K_s = [S]$$



Ou seja, K_s corresponde à concentração de S necessária para se atingir a metade da velocidade máxima



No numerador, temos duas constantes de velocidade de reações de DECOMPOSIÇÃO de ES
no denominador, a constante de velocidade da FORMAÇÃO de ES.

Dessa forma, **Km** é uma medida da **AFINIDADE** da enzima pelo substrato.

Km ALTO = Baixa afinidade

Km BAIXO = Alta afinidade

Determinação experimental dos parâmetros cinéticos

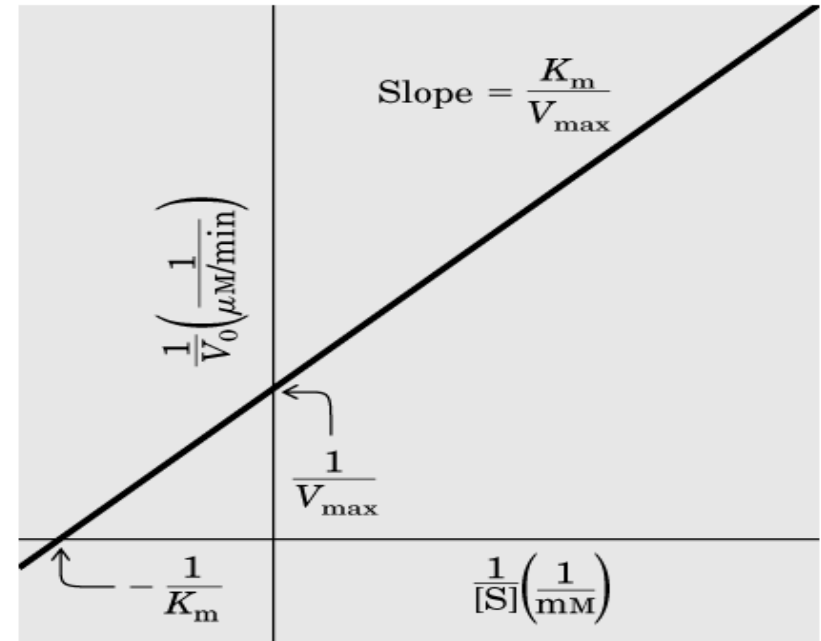
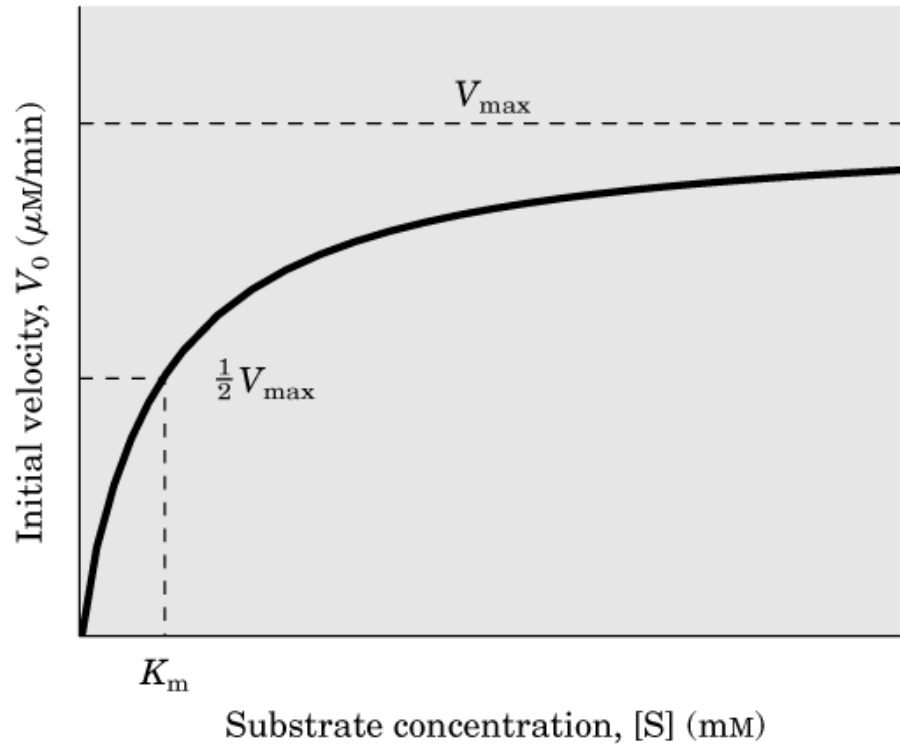


Diagrama Lineweaver-Burk
(Duplo-Recíproco)

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M + [S]}{V_{\max} [S]} = \frac{K_M}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

$$y = ax + b$$

•Determine os valores de Km e Vmax para a descarboxilação de um Beta-cetoacido fornecida nos dados a seguir:

[S] mol/L	V (mmol/L/min)
2,5	0,588
1,0	0,5
0,71	0,417
0,53	0,37
0,25	0,256

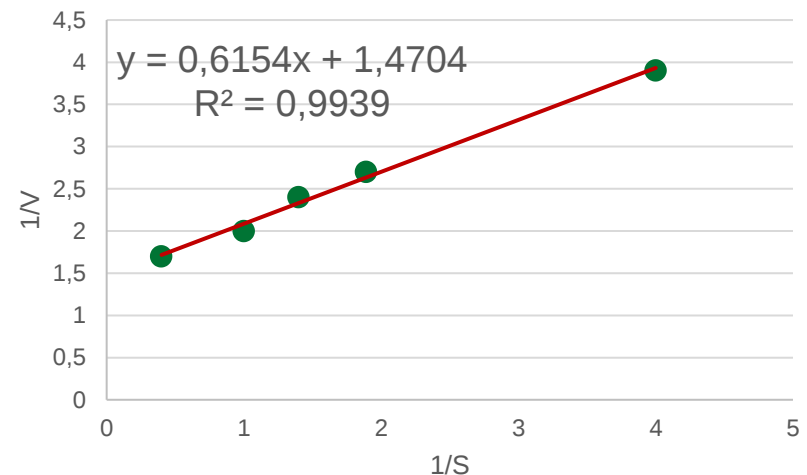
1/S	1/V
0,4	1,7
1	2
1,4	2,4
1,89	2,7
4	3,9

Exercicio 5:

Análise rápida, se: Vmax – 0,588 então Vmax/2 = 0,294

Km estaria entre 0,25 M e 0,53 mol/L

Uma análise correta, precisa de linearização:



$$\frac{1}{V} = \frac{K_M + [S]}{V_{\max} [S]} = \frac{K_M}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

$$1/V_{\max} = 1,4704$$

$$V_{\max} = 0,68 \text{ mol/L/min}$$

$$\text{Inclinação} = k_M/V_{\max}$$

$$0,6154 = k_M/0,68$$

$$K_M = 0,418 \text{ mol/L}$$

Significado de K_m

- Importante parâmetro da reação enzimática e da função biológica
- Fornece uma medida da [S] para que ocorra uma catálise significativa
- K_m está relacionado às constantes de velocidade de cada etapa da reação

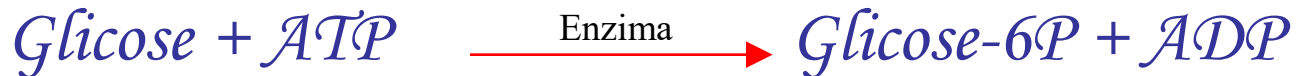


table 8-6

K_m for Some Enzymes and Substrates		
Enzyme	Substrate	K_m (mM)
Catalase	H ₂ O ₂	25
Hexokinase (brain)	ATP	0.4
	D-Glucose	0.05
	D-Fructose	1.5
Carbonic anhydrase	HCO ₃ ⁻	26
Chymotrypsin	Glycyltyrosinylglycine	108
	N-Benzoyltyrosinamide	2.5
β-Galactosidase	D-Lactose	4.0
Threonine dehydratase	L-Threonine	5.0

Significado do $V_{\text{máx}}$

$$V_{\text{max}} = K_3 [E_t]$$

$$K_{\text{cat}} = k_3$$

table 8-7

Turnover Numbers (k_{cat}) of Some Enzymes

Enzyme	Substrate	k_{cat} (s^{-1})
Catalase	H_2O_2	40,000,000
Carbonic anhydrase	HCO_3^-	400,000
Acetylcholinesterase	Acetylcholine	14,000
β -Lactamase	Benzylpenicillin	2,000
Fumarase	Fumarate	800
RecA protein (an ATPase)	ATP	0.4

K_{cat} = Numero de moléculas de S transformadas em P, por uma molecula de E, na unidade de tempo, quando a E esta saturada com S

Significado do k_{cat}/K_M :

- É uma medida de eficiência da Enzima
- Permite comparar a preferência de uma Enzima para diferentes Substratos

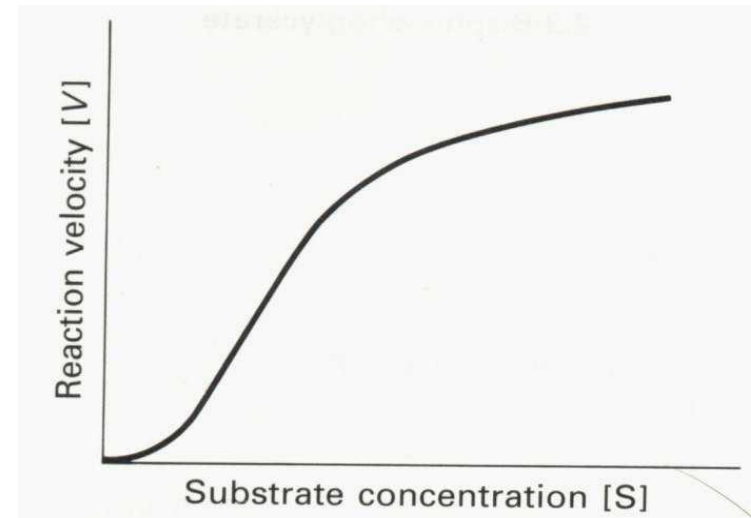
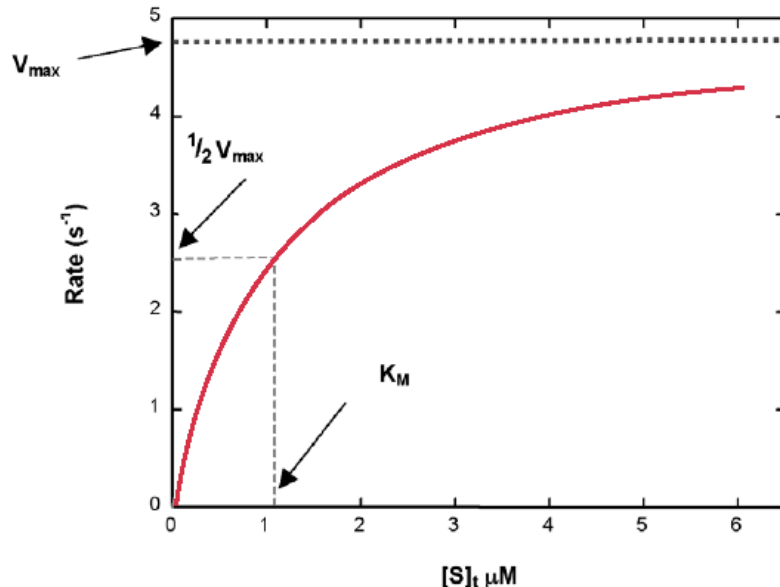
Preferências de Substrato da Quimotripsina

Amino acid in ester	Amino acid side chain	k_{cat}/K_M ($\text{s}^{-1} \text{M}^{-1}$)
Glycine	—H	1.3×10^{-1}
Valine	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{—CH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	2.0
Norvaline	— $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	3.6×10^2
Norleucine	— $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	3.0×10^3
Phenylalanine	— CH_2 — 	1.0×10^5

Influência da concentração de substrato em enzimas

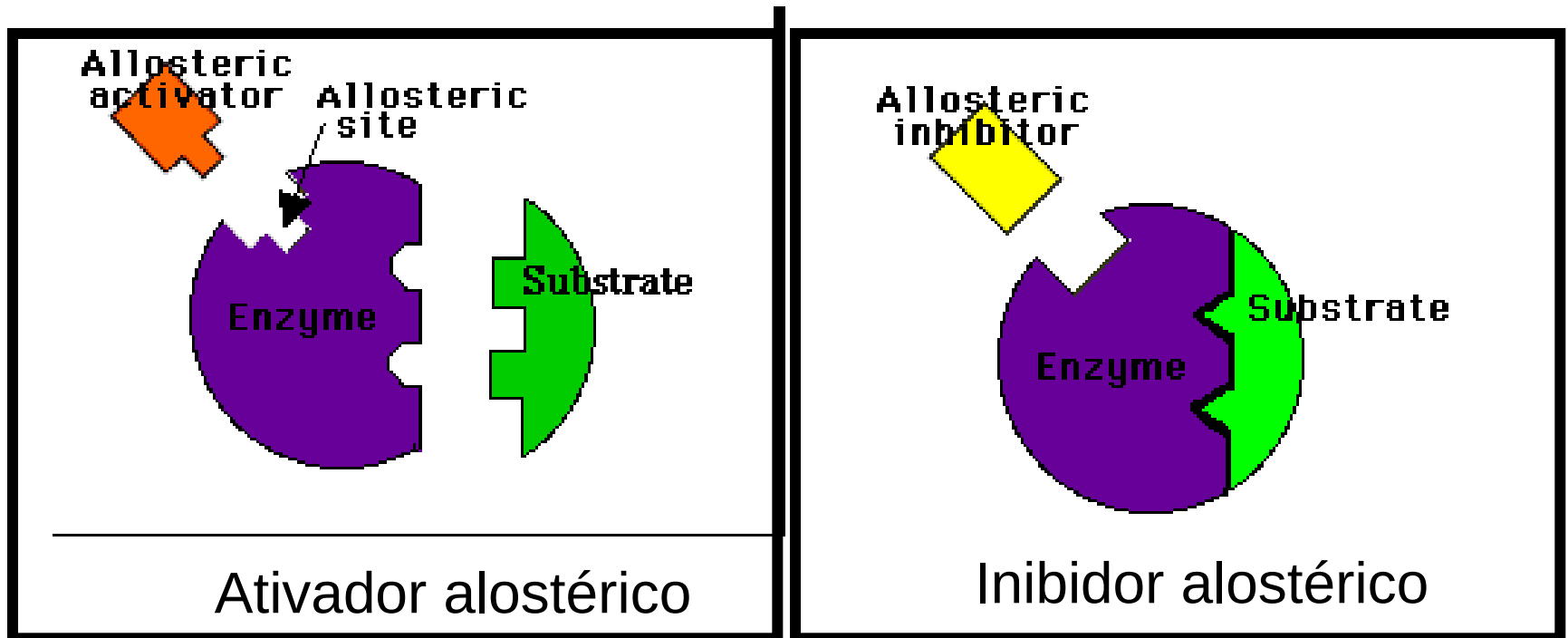
“com cinética de tipo cooperativo ou sigmoide”

- Não obedecem a Cinética de Michaelis-Menten
- Quanto maior a $[S]$ maior será a atividade da E até esta alcançar V_{max}
- Segue modelo da curva de saturação da Hemoglobina com O_2
- Sistema cooperativo



Enzimas alostéricas

possuem uma região diferente do sítio ativo e se liga um efector ou modulador alostérico. A mudança conformacional decorrente da ligação do efector alostérico se propaga pela molécula e afeta o sítio ativo, ativando-o ou inibindo-o.



Enzima regulatória

Equações de $V \times [S]$

$$V_0 = \frac{V_{\max} [S]^h}{(S_{50})^h + [S]^h}$$

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

$[S]$ é a concentração de substrato

S_{50} é a concentração de substrato para a qual a enzima está hemisaturada e em que a velocidade é metade de $V_{\max}$.

h é o coeficiente de Hill e é uma medida do grau de cooperatividade (ou sigmoidicidade): quando $h=1$ a equação acima simplifica e é igual à equação de Michaelis-Menten (ausência de cooperatividade).