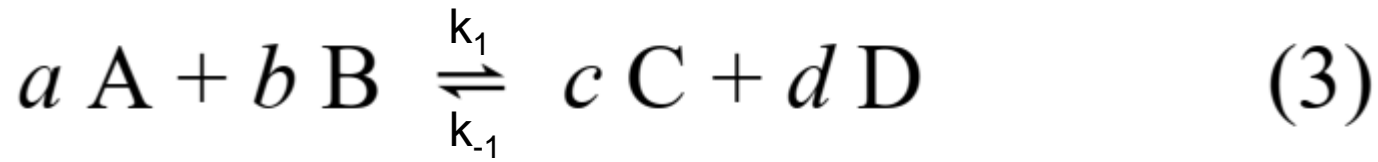
The background features a series of concentric, broken circles in shades of gray and yellow on a black field. A solid red circle is positioned on the right side, overlapping the white central area.

QBQ0204

Bioquímica

Enzimas parte 2



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,

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

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

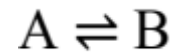
$$v_1 = +d[D]/dt \quad (5b)$$

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

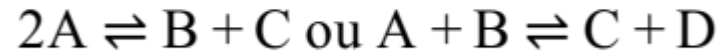
$$v_{-1} = k_{-1} [C]^c [D]^d$$

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

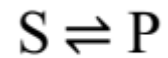
No equilíbrio, $v_1 = v_{-1}$



$v = k[A]$ Reação de primeira ordem, portanto a unidade de k é s^{-1}



$v = k[A]^2$ e $v = k[A][B]$ Reação de segunda ordem, portanto a unidade de k é $M^{-1}s^{-1}$

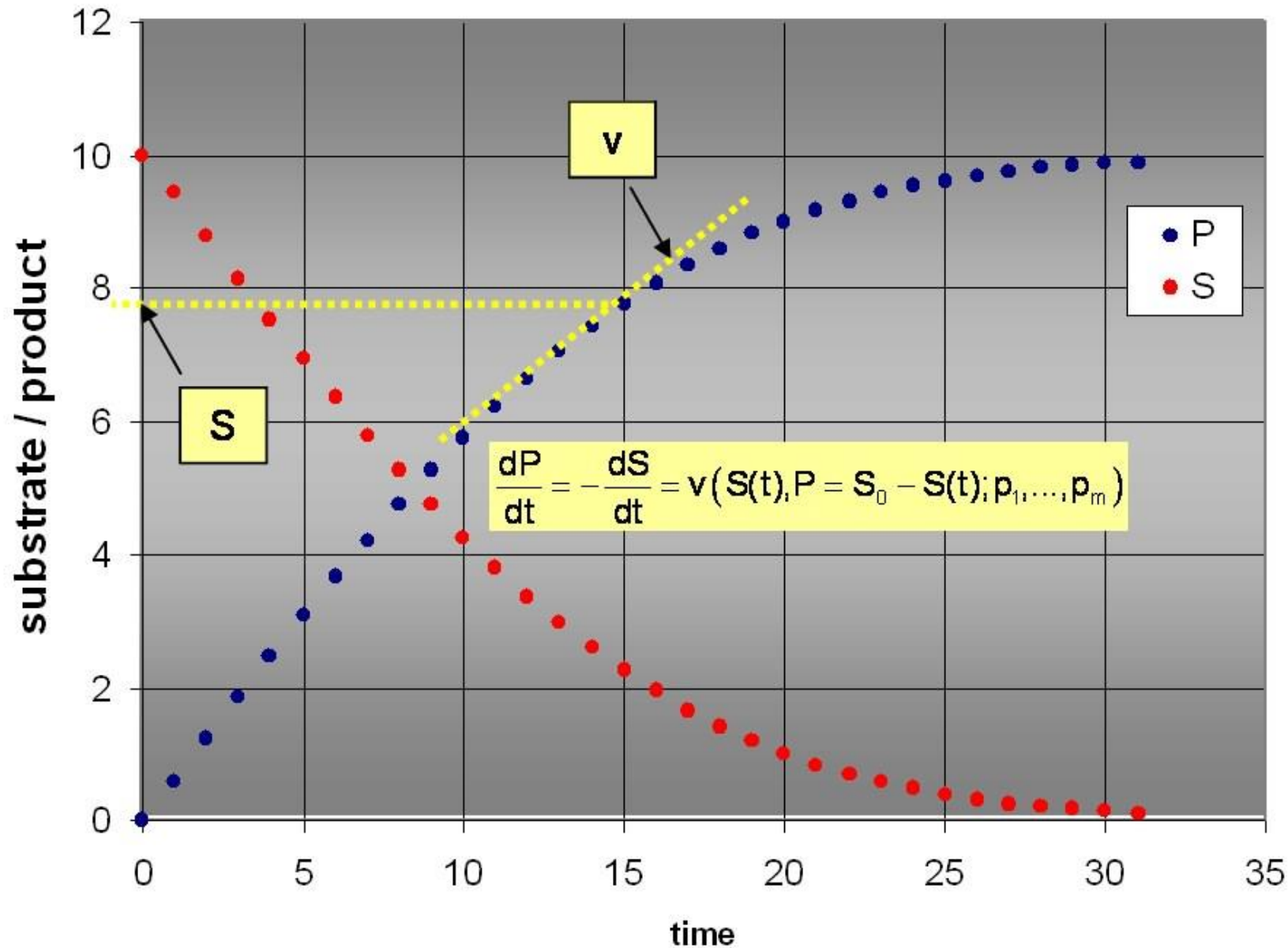


$$V = k[S] \quad V = \frac{d[P]}{dt}$$

Reação de primeira ordem, portanto a unidade da **velocidade** é **$M \cdot s^{-1}$** , ou **$mol \cdot L^{-1} s^{-1}$**

$$V = k[S]$$

A velocidade é proporcional à concentração de substrato, portanto ela varia ao longo da reação. Logo, a taxa de formação de produto também varia.



*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.

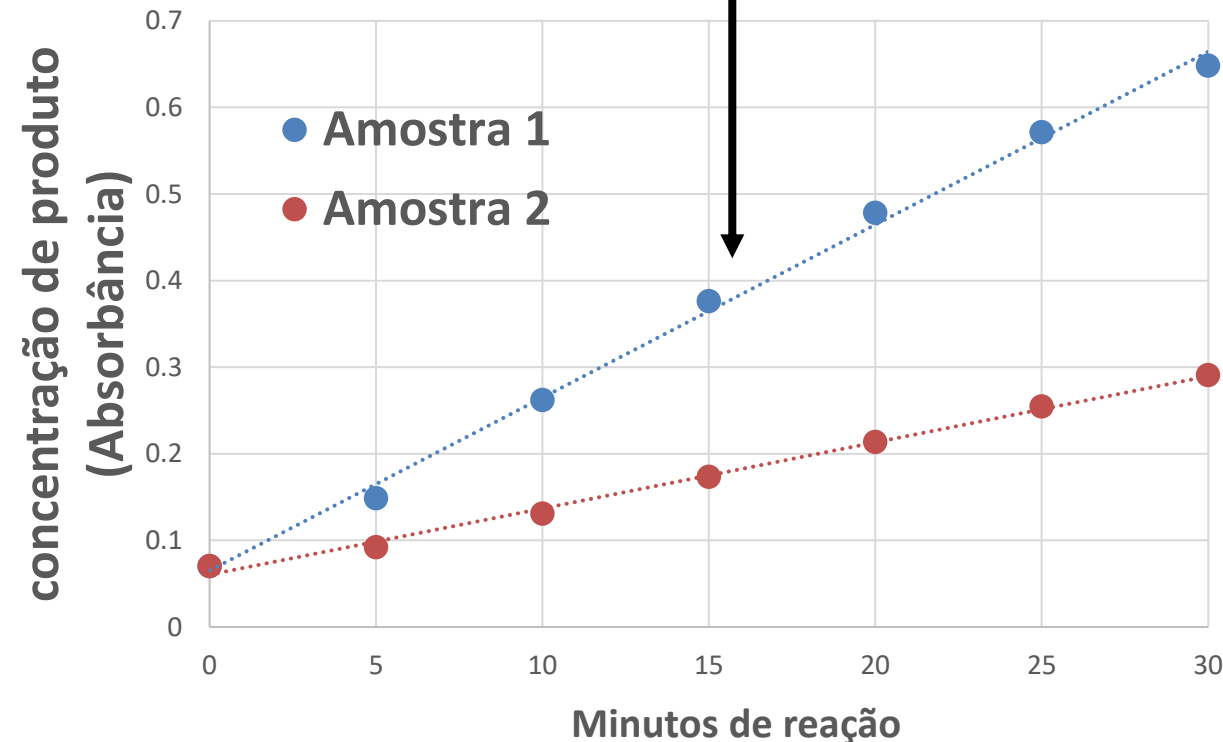
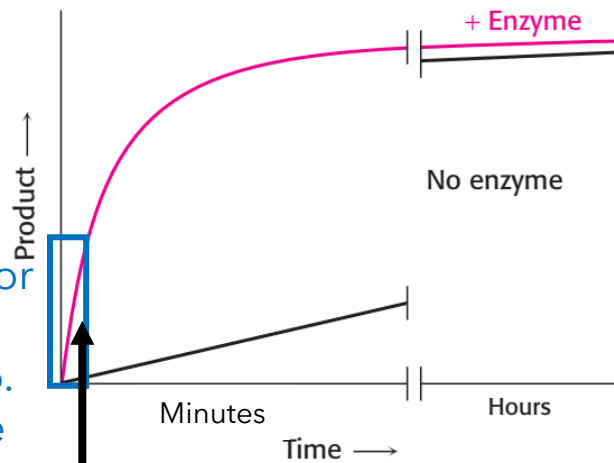
*A unidade utilizada se chama **U** (unidade de atividade enzimática).

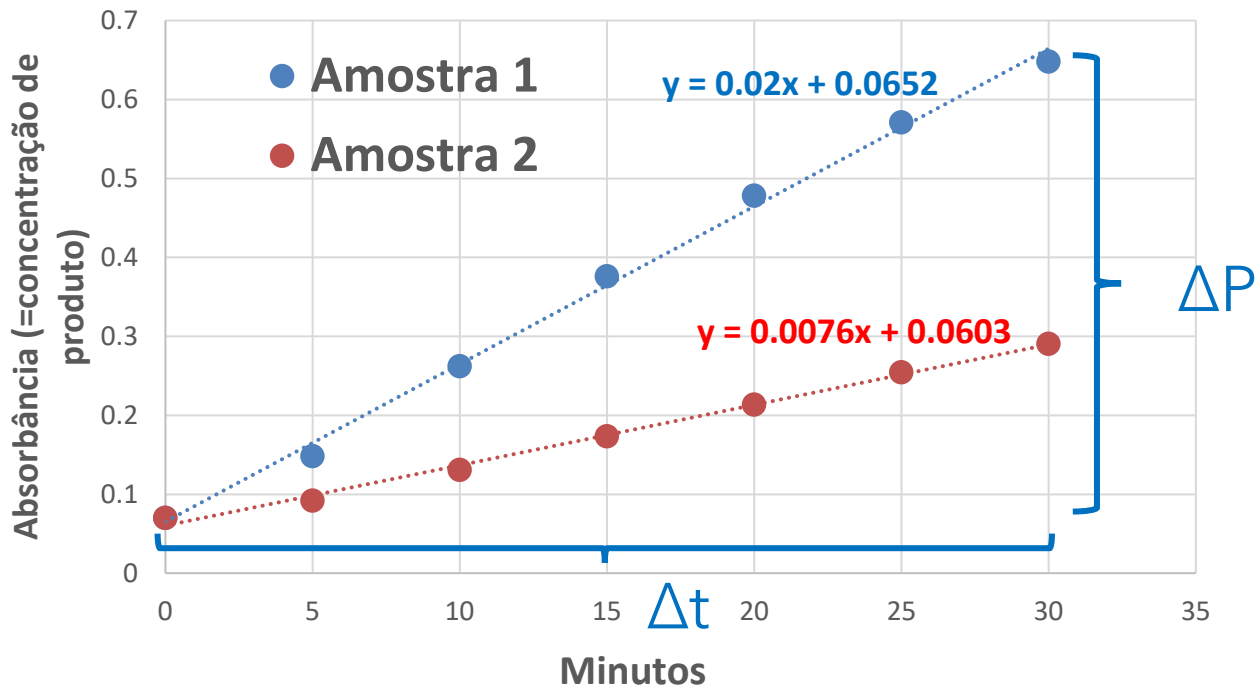
*1 U = 1 μmol de formação de produto por minuto. Pode ser dividido pelo volume da amostra (U/L)

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

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

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





$$v_0 = \frac{\Delta P}{\Delta t}$$

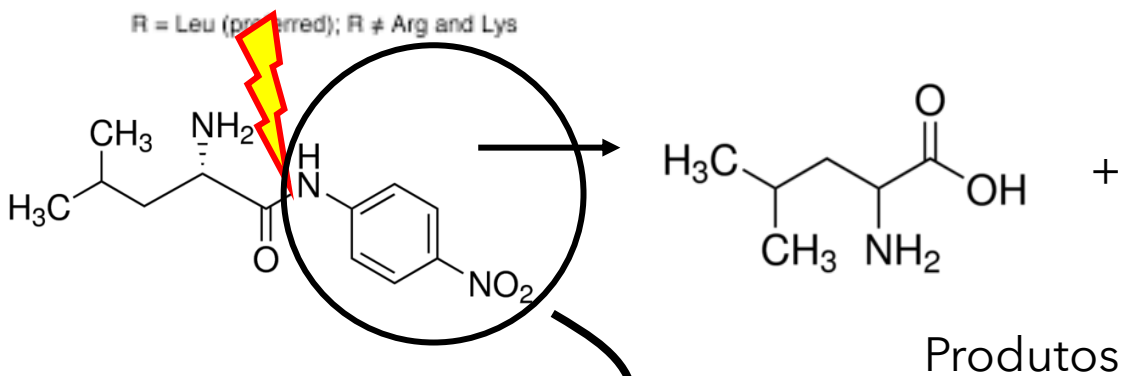
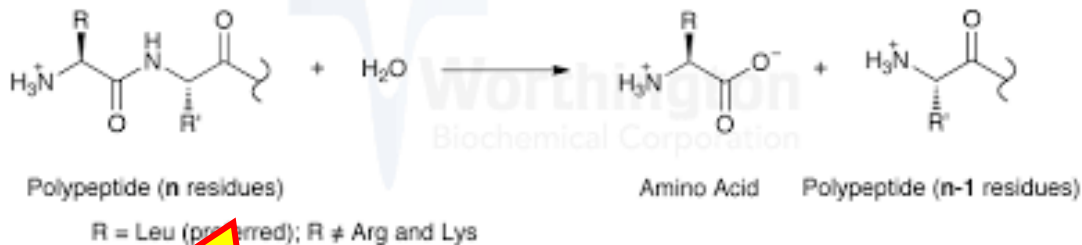
	Absorbância (410 nm) = <u>concentração</u> de produto	
Tempo (min)	Amostra 1	Amostra 2
0	0.0699	0.07
5	0.1483	0.0919
10	0.262	0.1307
15	0.3762	0.1733
20	0.4781	0.2135
25	0.571	0.2545
30	0.648	0.2906

$$v_0 = \frac{0,648 - 0,0699}{30 - 0}$$

$$v_0 = 0,02 \text{ abs/min}$$

Observar que a unidade ainda não está correta!

Leucine Aminopeptidase

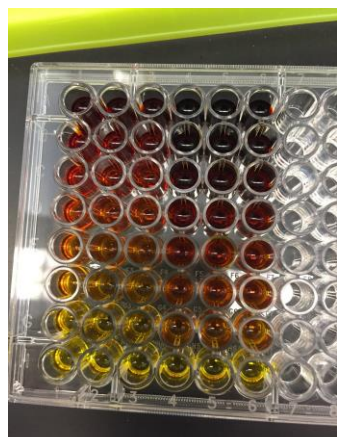
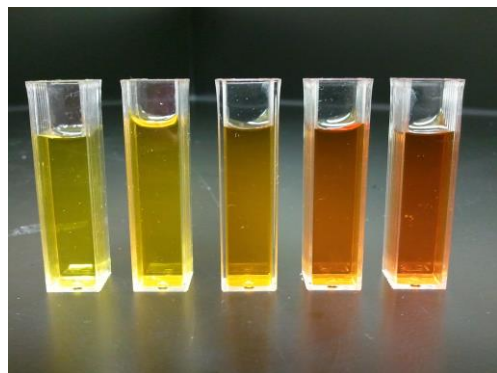


Substrato sintético (simula uma molécula natural, mas é menor e possui um **cromóforo**)

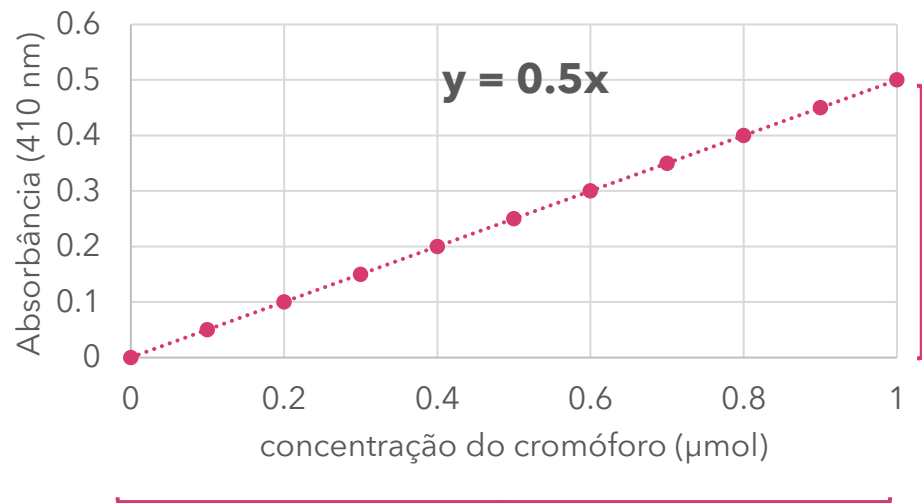
Ao ser clivado, o substrato gera dois produtos, sendo um deles com cor. Portanto, a sua concentração pode ser determinada ao se medir a absorbância.

Ao determinar a concentração do produto, é possível medir sua **variação no tempo**, determinando a **velocidade inicial (v_0)** da reação.

Na prática, é mais fácil medir a formação de produto no tempo, do que o consumo de substrato.



Curva Padrão do cromóforo



$$0,5 = \frac{\Delta abs}{\Delta \mu mol}$$

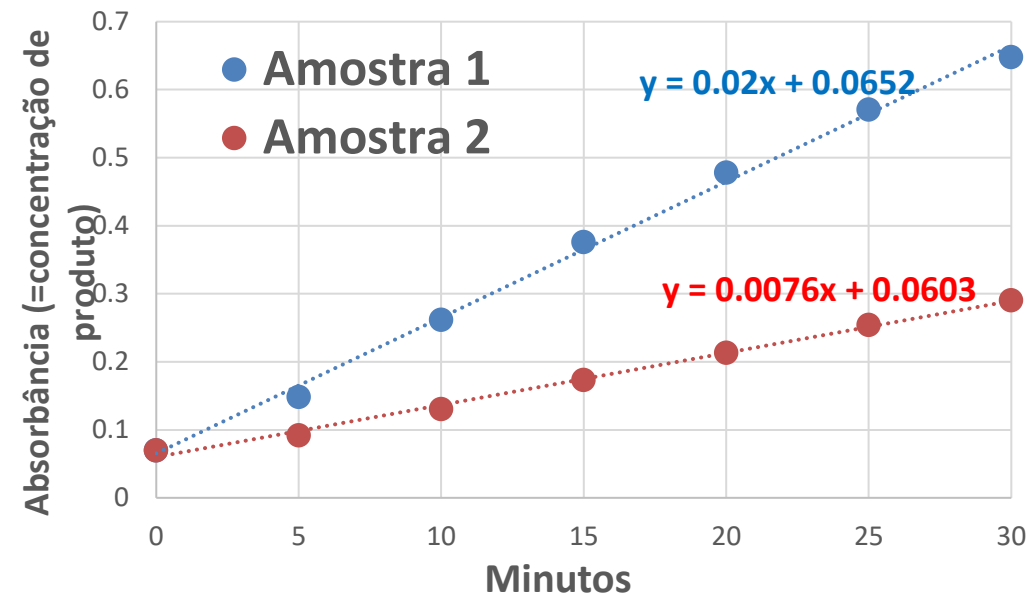
Inverso

$$2 = \frac{\Delta \mu mol}{\Delta abs}$$

2 é o **Fator de transformação** de absorbância em concentração de produto

$$0,02 \frac{abs}{min} \cdot 2 \frac{\mu mol}{abs} = 0,04 \frac{\mu mol}{min} = 0,04 U$$

$$0,0076 \frac{abs}{min} \cdot 2 \frac{\mu mol}{abs} = 0,015 \frac{\mu mol}{min} = 0,015 U$$



$$v_0 = \frac{0,648 - 0,0699}{30 - 0}$$

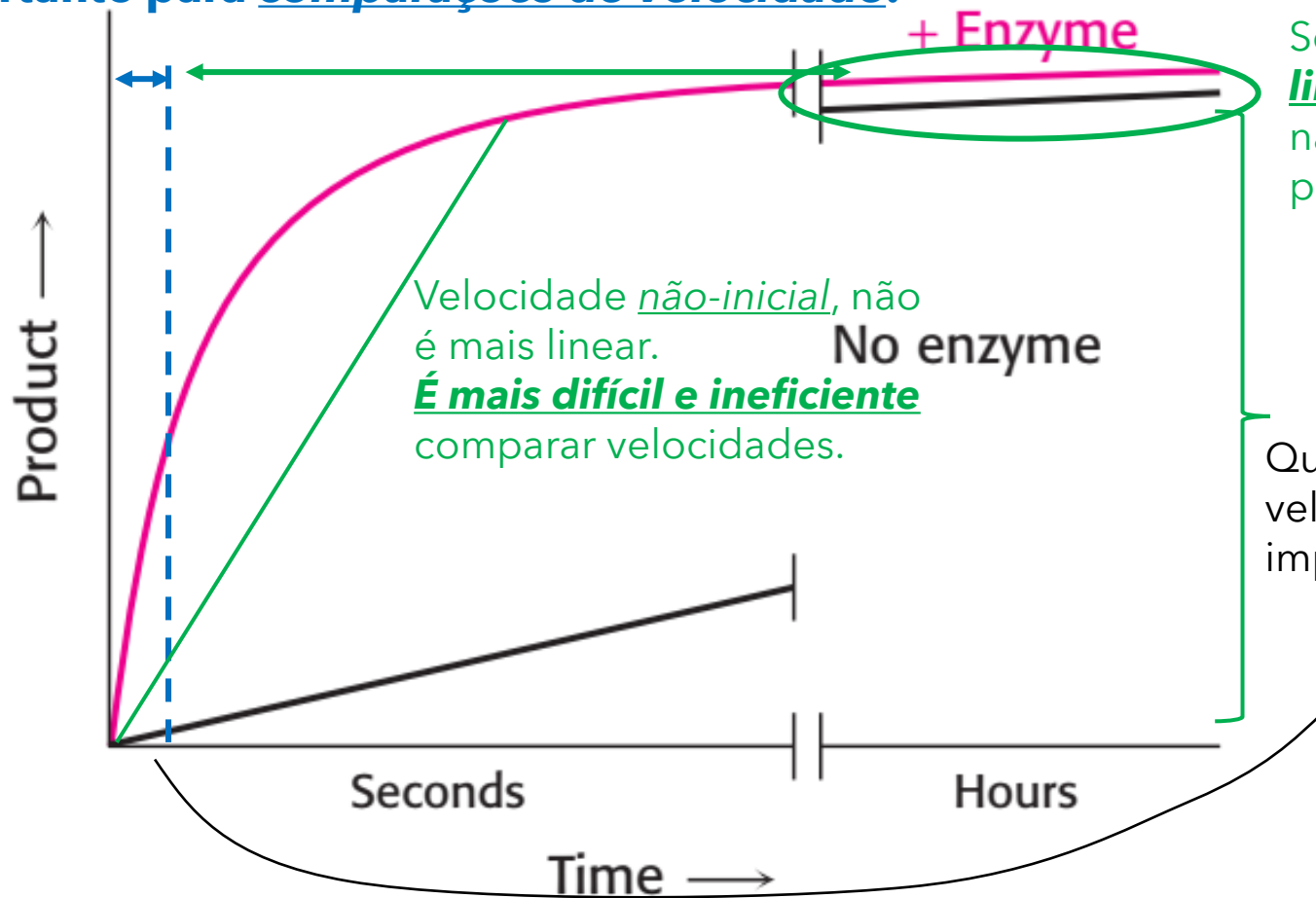
Amostra 1 $v_0 = 0,02 \text{ abs/min}$

Amostra 2 $v_0 = 0,0076 \text{ abs/min}$

1 U = 1 μmol de produto formado por minuto.

$$v_{01} > v_{02}$$

Velocidade inicial V_0 , linear. Importante para comparações de velocidade.



Se fizéssemos a comparação **fora da região linear**, a reação catalisada enzimaticamente e não-catalisada, em determinado momento, poderiam aparentar ter a **mesma velocidade!**

Quando na verdade, a diferença é muito grande na velocidade, por isso o conceito de velocidade inicial é importante.

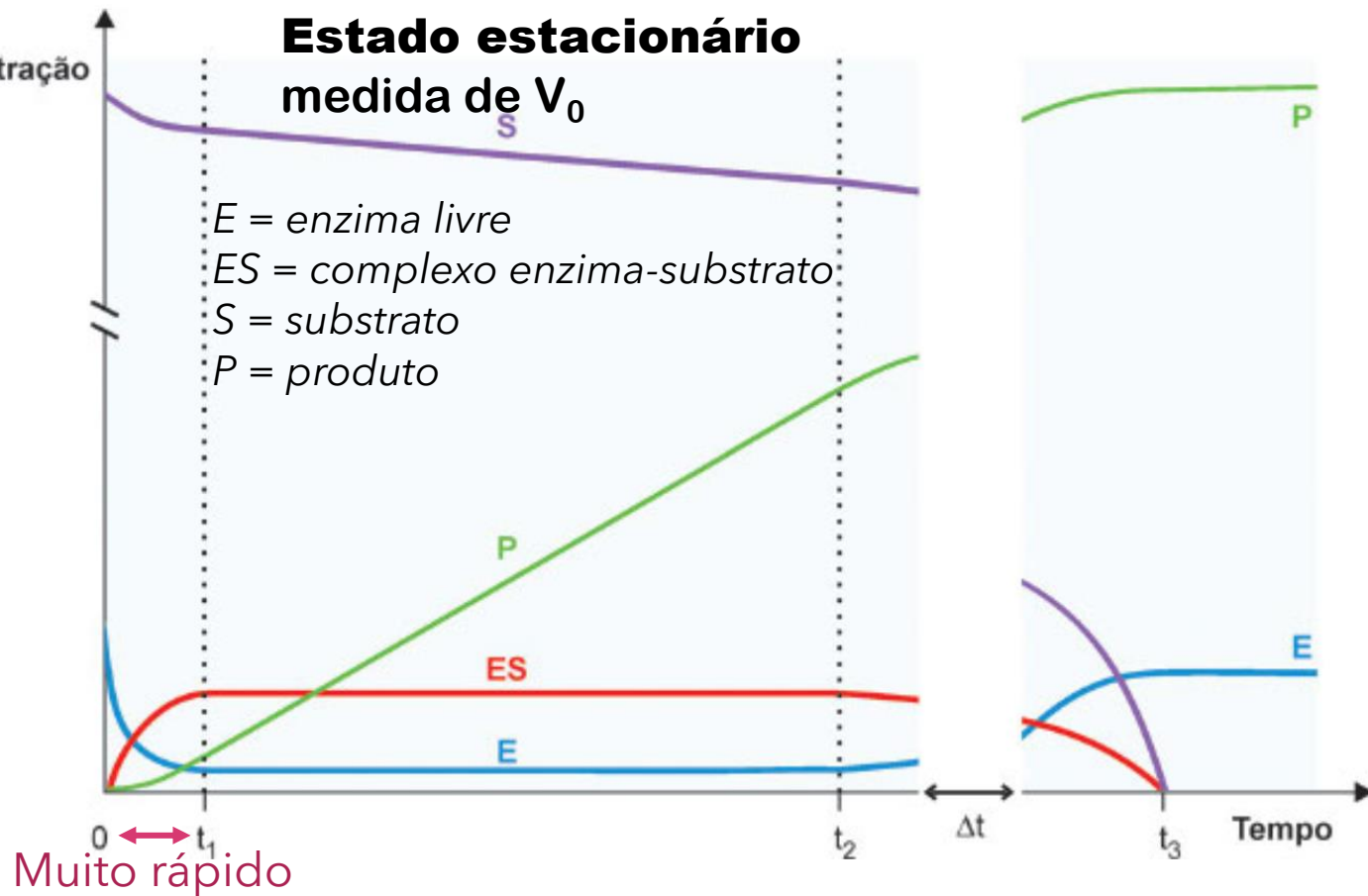
$$V = k[S]$$

A velocidade é proporcional à concentração de substrato, portanto ela varia ao longo da reação.

Estado estacionário

medida de V_0

E = enzima livre
 ES = complexo enzima-substrato
 S = substrato
 P = produto



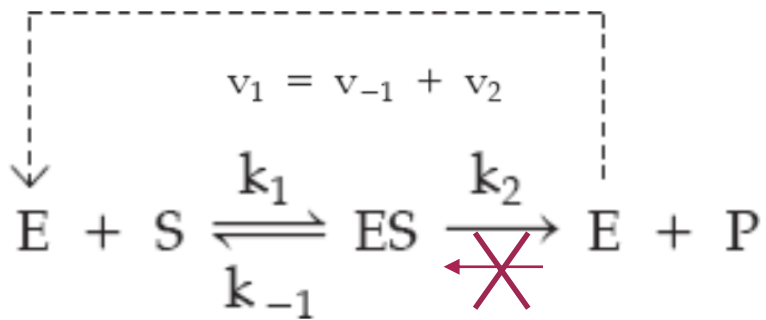
[S] - assume-se que é constante frente a sua pequena variação e alta concentração.
[S] >>> [E].

[ES] e logo **[E]** são constantes, $v_1 = v_{-1} + v_2$

$k_1 > k_{-1} >>> k_2$, portanto, a etapa limitante do processo é determinada por k_2 .

$$v_0 = v_2 = k_2[ES]$$

Baixa **[P]** ao longo do estado estacionário faz com que a reação reversa não ocorra.



$$v_1 = k_1[E][S]$$

$$v_{-1} = k_{-1}[ES]$$

$$v_2 = k_2[ES]$$

$$v_1 = v_{-1} + v_2$$



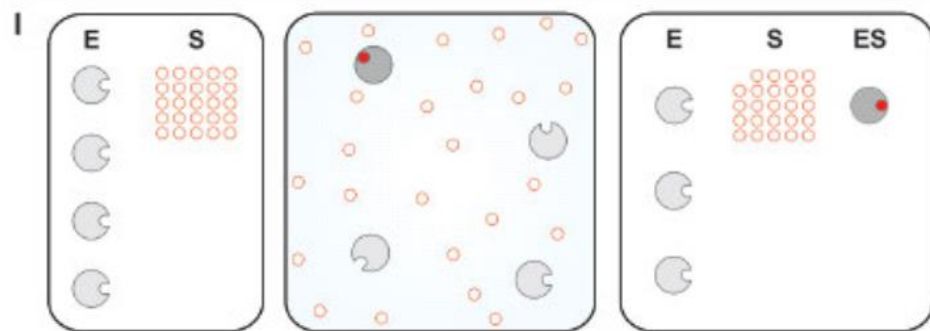
I	75%	25%
II	50%	50%
III	25%	75%

Estado estacionário

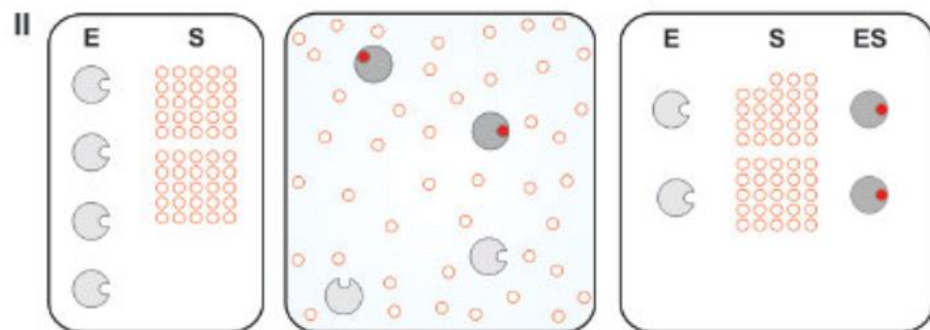
Estado estacionário

Reagentes

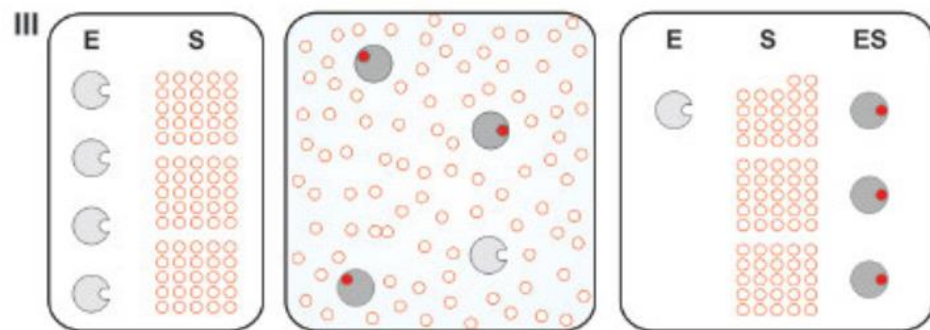
V_0
(% da $V_{m\acute{a}x}$)



25%



50%



75%

Efeito da concentração de substrato na formação do complexo ES.

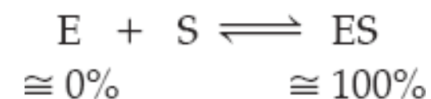
Lembrando que **a velocidade da reação** vai ser **proporcional** à **quantidade de complexo ES** formado. $v_0 = k_2[ES]$

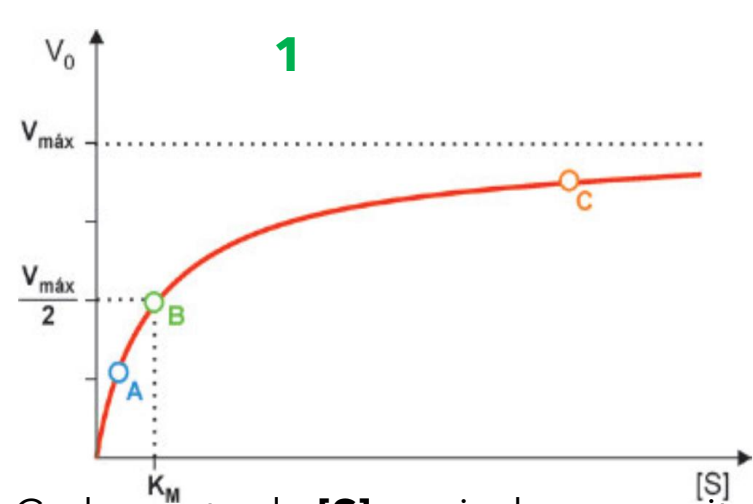
$$V_0I < V_0II < V_0III$$

*Portanto, v_0 pode variar de acordo com a concentração do substrato **[S]**.

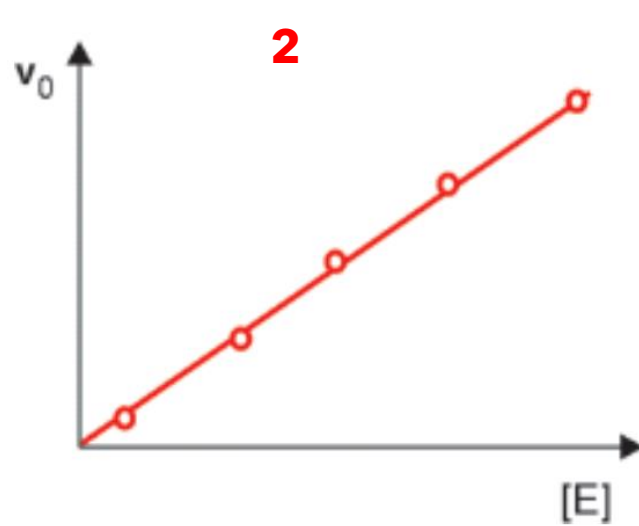
*É maior conforme **[S]** aumenta, pois mais complexo **ES** se forma (mesmo com **[E]** constante).

*Logo, haverá uma v_0 maior que todas as outras a partir de uma determinada **[S]**, chamada de **velocidade máxima (v_{max})**, na qual toda **[E]** está na forma **[ES]**.





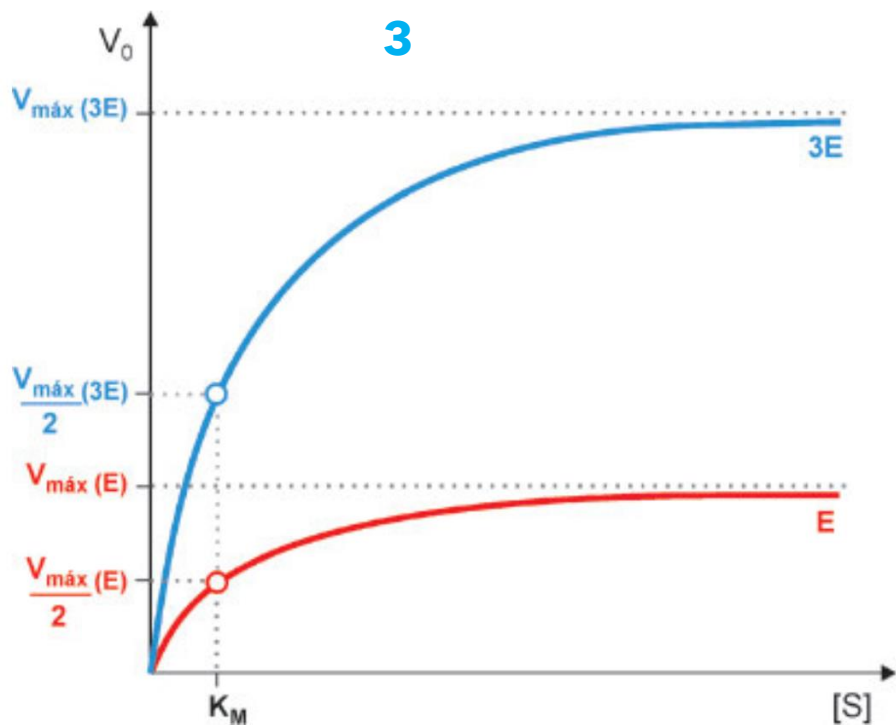
Cada ponto de **[S]** equivale a uma situação c saturação da enzima, e formação de **ES** mostrada no slide anterior, no qual foi feita uma medida de **velocidade inicial** da reação.

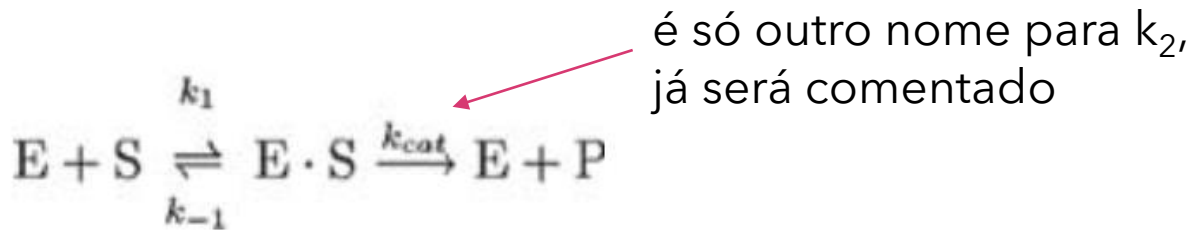
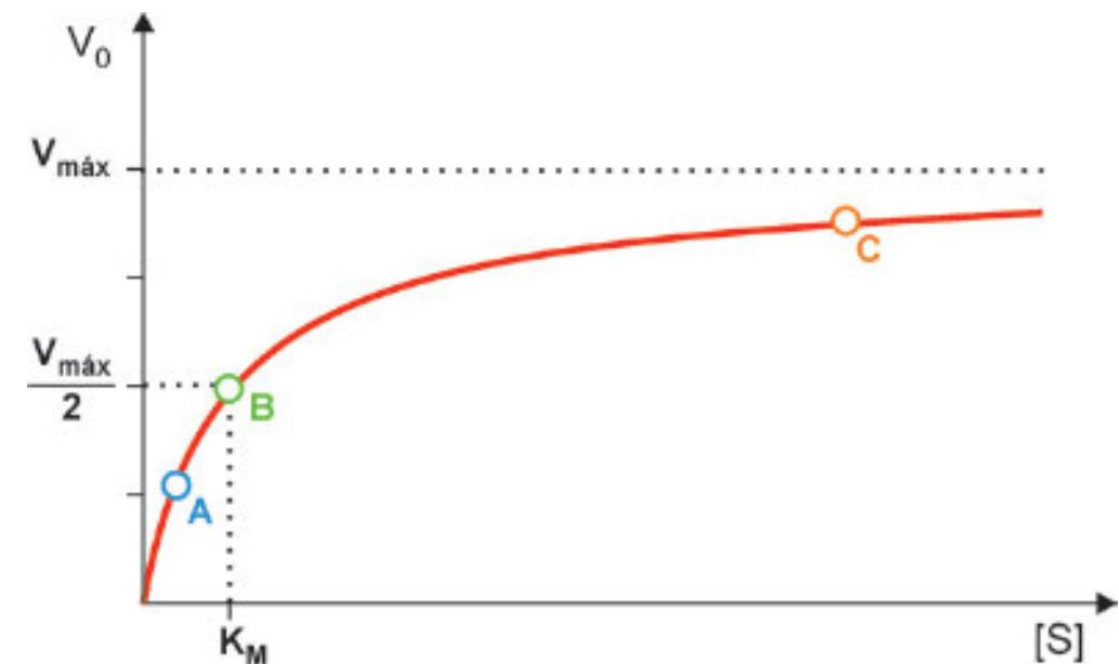


1. Ao se aumentar **[S]**, para uma **[E]** constante, v_0 aumenta até atingir $v_{\text{máx}}$.

2. v_0 é diretamente proporcional à concentração de enzima **[E]**.

3. Em diferentes **[E]**, o $v_{\text{máx}}$ será relativo.





$$K_S = \frac{[E][S]}{[E \cdot S]} = \frac{k_{-1}}{k_1}$$

$k_{-1} \gg k_{cat}$, portanto, $K_S \approx K_M$.

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_{cat}}{k_1}$$

$$K_M = \frac{\text{"separação de ES"}}{\text{"formação de ES"}}$$

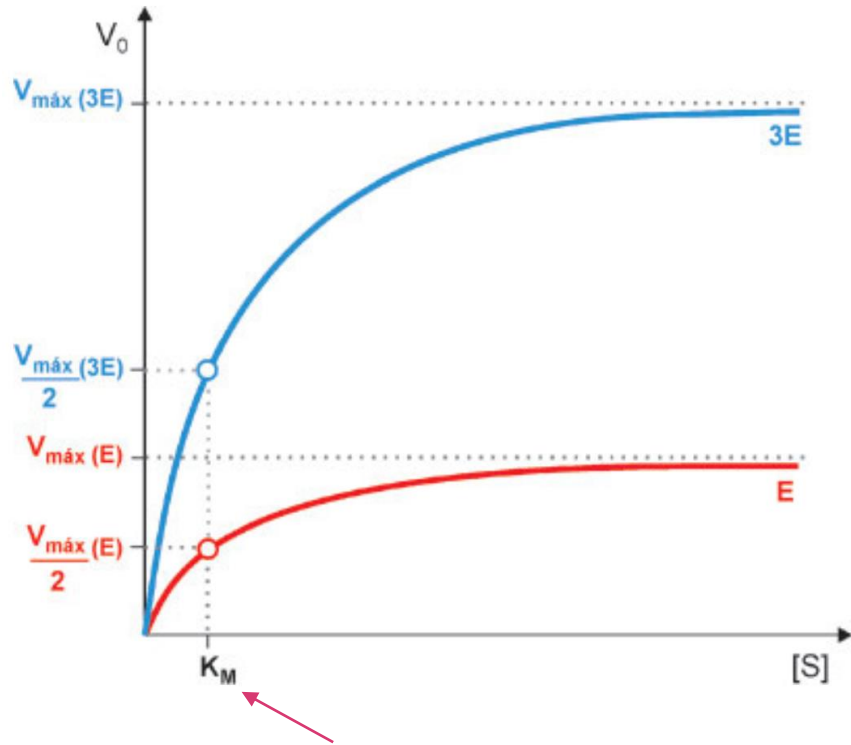
K_M não muda para a mesma enzima, pois é a relação entre constantes!

Um alto **K_M** indica que relativamente "desfaz mais **ES**" do que se forma, ou "forma pouco **ES**".

Um baixo **K_M** indica que relativamente "desfaz menos **ES**" do que se forma, ou quer dizer que "forma mais **ES**".

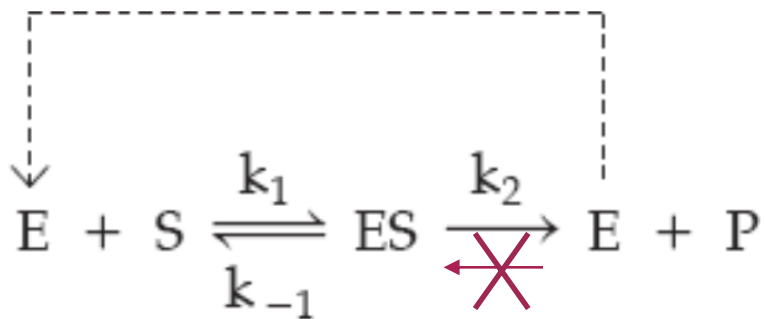
Portanto, ao se comparar o **K_M** para diferentes enzimas que catalisam a mesma reação, pode-se correlacionar que **baixo** K_M indica **maior "afinidade"** da enzima pelo **substrato**. Indica que a enzima tem mais propensão a formar **ES**.

K_M não muda para a mesma enzima, pois é a relação entre constantes!



Não importa $[E]$, K_M não muda, diferentemente de $V_{\text{máx}}$ que aumenta conforme se aumenta a concentração de enzima $[E]$.

K_M igual para diferentes $[E]$.



$$v_1 = k_1 [E] [S]$$

$$v_{-1} = k_{-1} [ES]$$

$$v_2 = k_2 [ES]$$

$$k_2 = k_{cat}$$

$$v_2 = k_{cat} [ES]$$

$$\textit{turnover number} (s^{-1}) = k_{cat}$$

é a mesma relação com o valor de k explicado no início da aula para reação de primeira ordem.

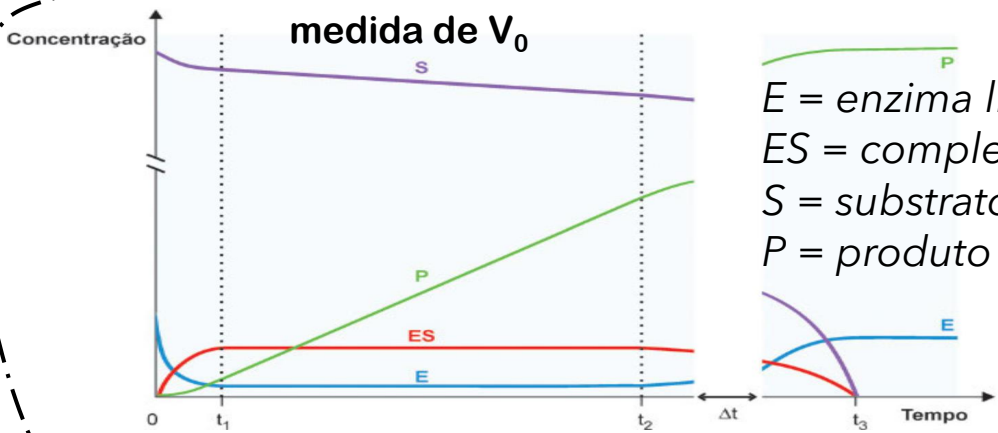
Quanto maior, maior será o número de ciclos por segundo que a enzima realiza.

Tabela 5.10 Algumas enzimas de alta eficiência.

Enzima	$k_{cat} (s^{-1})$	$K_M (M)$	$k_{cat}/K_M (M^{-1} \cdot s^{-1})$
Superóxido dismutase	1×10^6	$3,5 \times 10^{-4}$	$2,8 \times 10^9$
Catalase	1×10^7	$2,5 \times 10^{-2}$	$4,0 \times 10^8$
Acetilcolinesterase	1×10^4	$9,0 \times 10^{-5}$	$1,6 \times 10^8$
Anidrase carbônica	1×10^6	$1,2 \times 10^{-2}$	$8,3 \times 10^7$
Pepsina (hidrólise de Phe-Gly)	5×10^{-1}	$3,0 \times 10^{-4}$	$1,7 \times 10^3$

Para se comparar a eficiência catalítica de duas enzimas, faz-se uma razão entre k_{cat} / K_M

**Estado estacionário
medida de V_0**



A equação de Michaelis-Menten

$$v_1 = v_{-1} + v_2$$

$$k_1 ([E_t] - [ES]) \cdot [S] = (k_{-1} + k_2) [ES]$$

$$([E_t] - [ES]) \cdot [S] = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \cdot [ES]$$

$$[E_t] \cdot [S] - [ES] \cdot [S] = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \cdot [ES]$$

$$[E_t] \cdot [S] = [ES] \cdot \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [ES] \cdot [S]$$

$$[E_t] \cdot [S] = [ES] \left(\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S] \right)$$

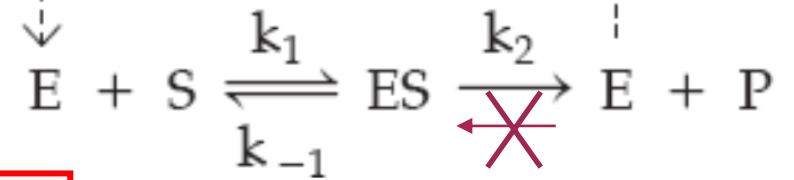
$$[ES] = \frac{[E_t][S]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S]}$$

$$[E] = [E_{total}] - [ES]$$

$$v_1 = k_1 ([E_t] - [ES]) [S]$$

$$v_{-1} = k_{-1} [ES]$$

$$v_2 = k_2 [ES]$$



$$v_{-1} + v_2 = k_{-1} [ES] + k_2 [ES]$$

$$v_{-1} + v_2 = (k_{-1} + k_2) [ES]$$

A equação de Michaelis-Menten

$$[ES] = \frac{[E_t][S]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S]}$$

$$v_0 = k_2 [ES]$$

$$v_0 = k_2 \frac{[E_t][S]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S]}$$

$$v_0 = \frac{V_{\text{máx}} [S]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S]}$$

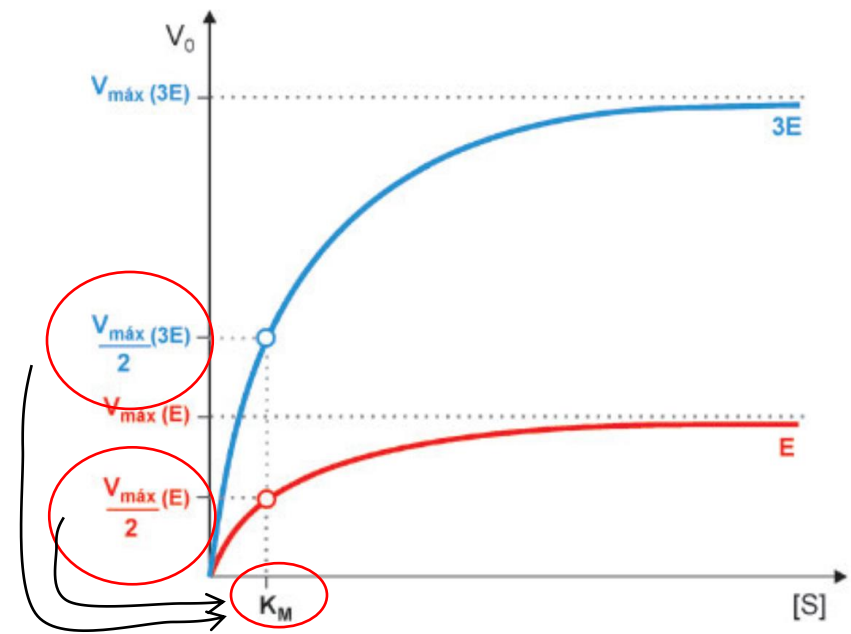
$$v_0 = \frac{V_{\text{máx}} [S]}{K_M + [S]}$$

$$\frac{V_{\text{máx}}}{2} = \frac{V_{\text{máx}} [S]}{K_M + [S]}$$

$$\frac{1}{2} = \frac{[S]}{K_M + [S]}$$

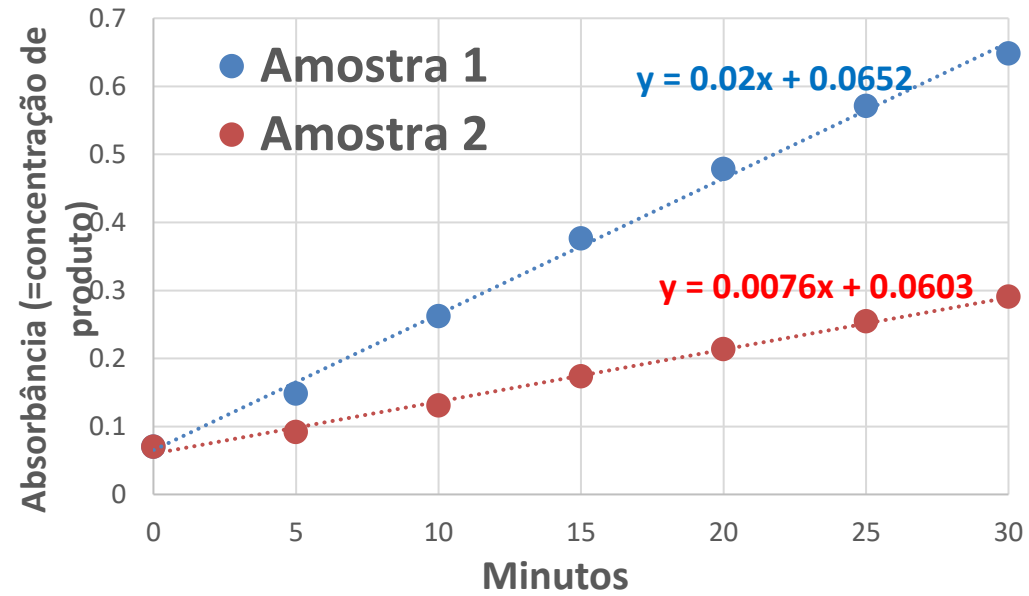
$$K_M + [S] = 2 [S]$$

$$K_M = [S]$$



Numericamente, a **[S]** na qual **v₀** é metade de **v_{max}** é igual ao valor de **K_M**

Agora que entendemos melhor, o que podemos dizer sobre as amostras 1 e 2?



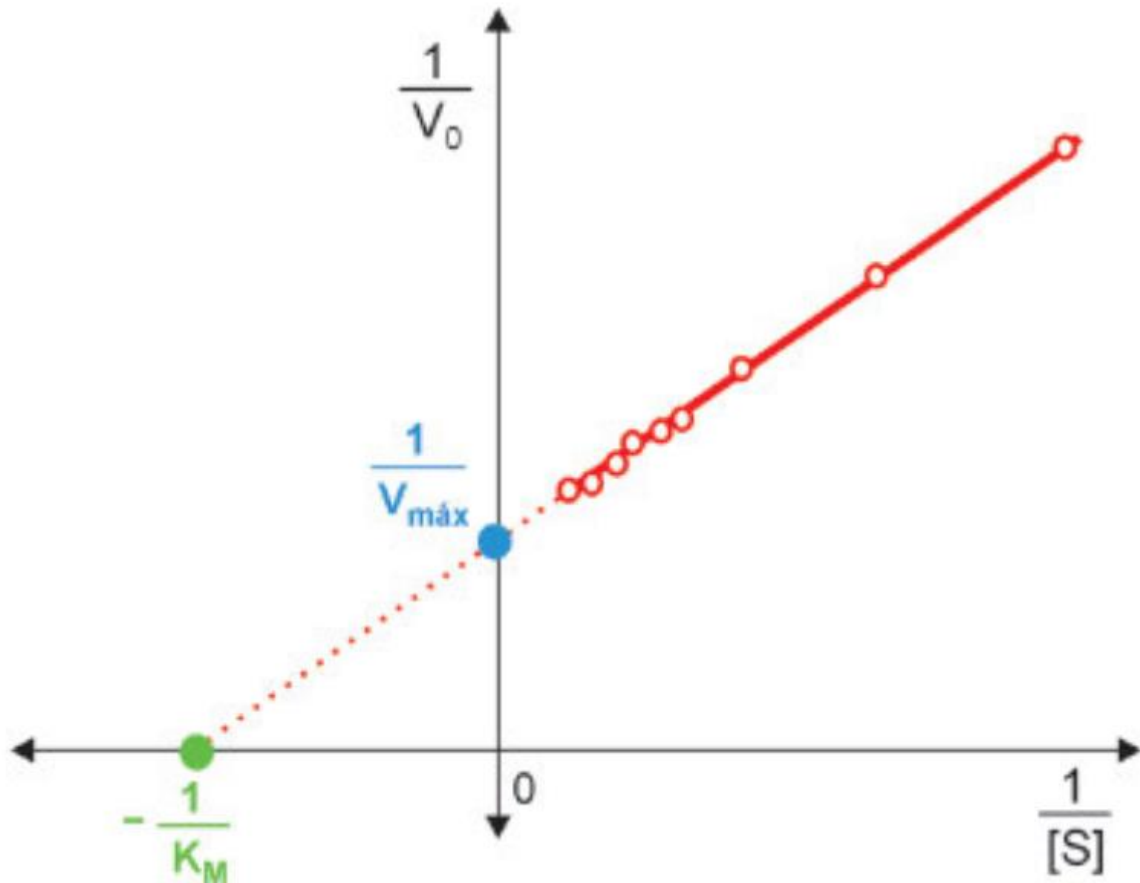
Ou **[S]** amostra 1 > amostra 2, para mesmo **[E]**.

Ou **[E]** amostra 1 > amostra 2, para mesma **[S]**.

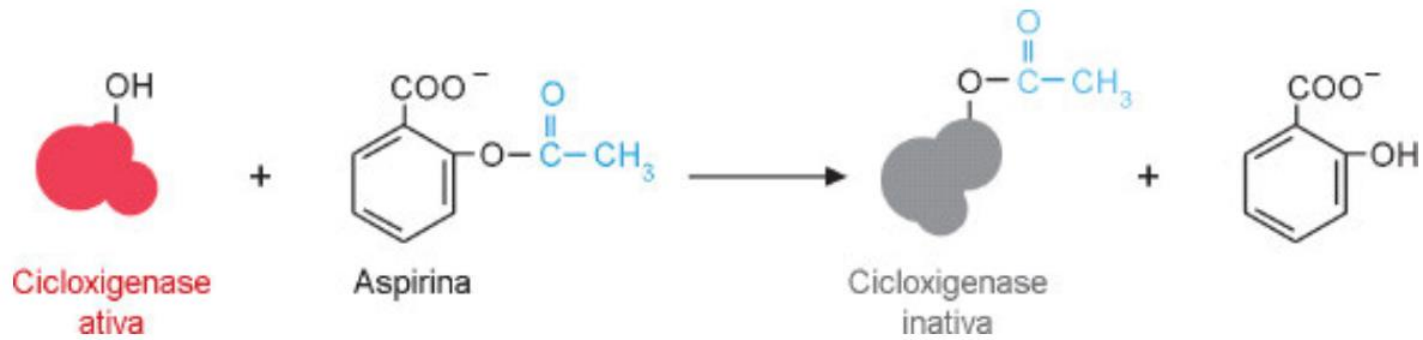
$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M}{V_{\text{máx}}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\text{máx}}}$$

Plote de Lineweaver-Burk

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



Inibidores Irreversíveis



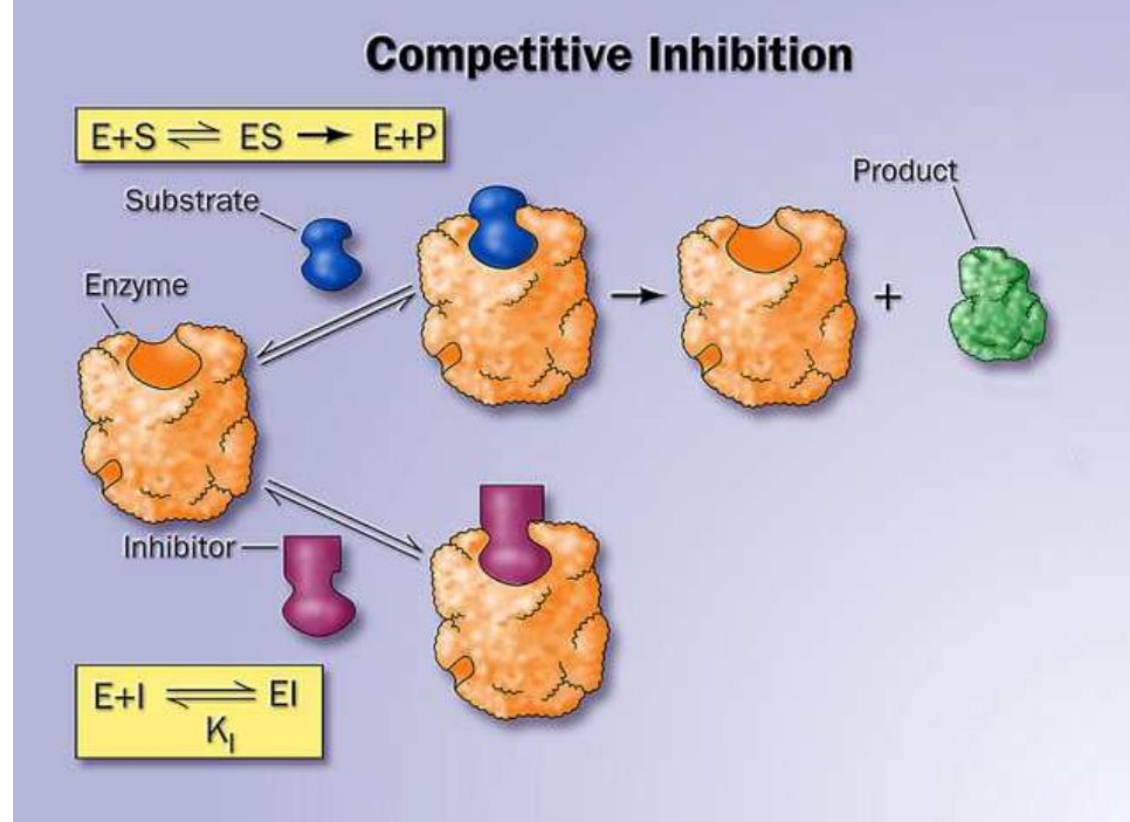
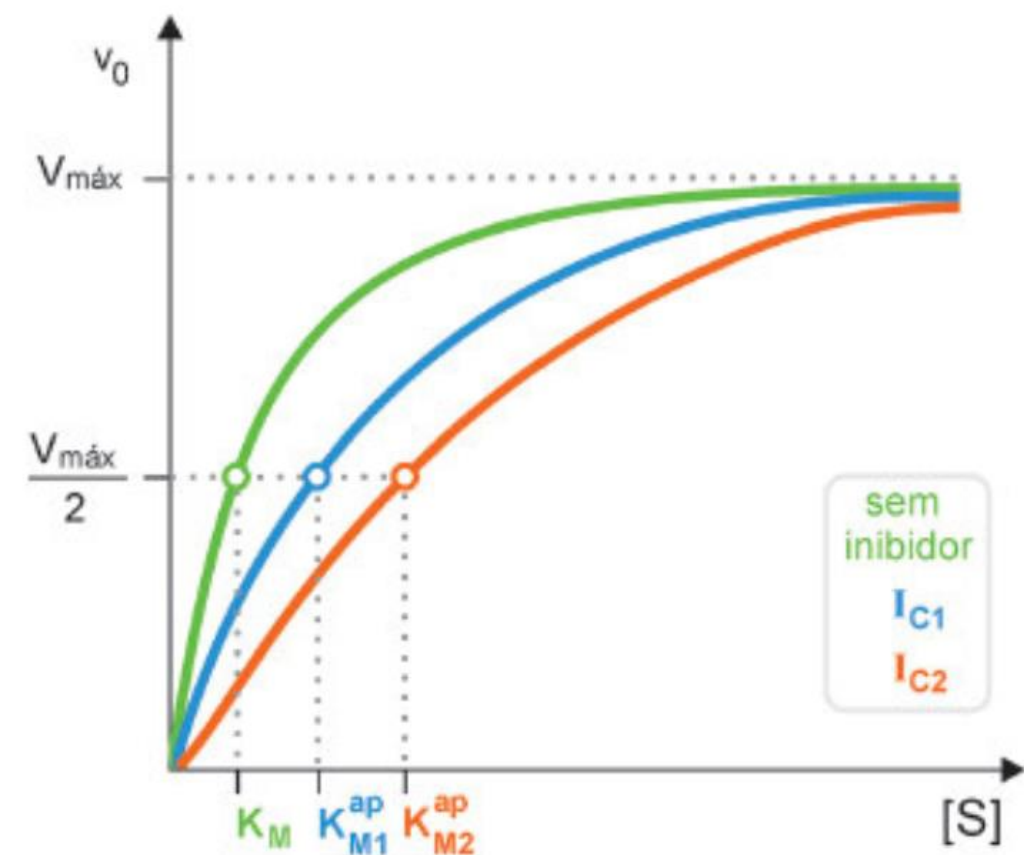
Inibidores Reversíveis

Competitivo

Não-competitivo

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

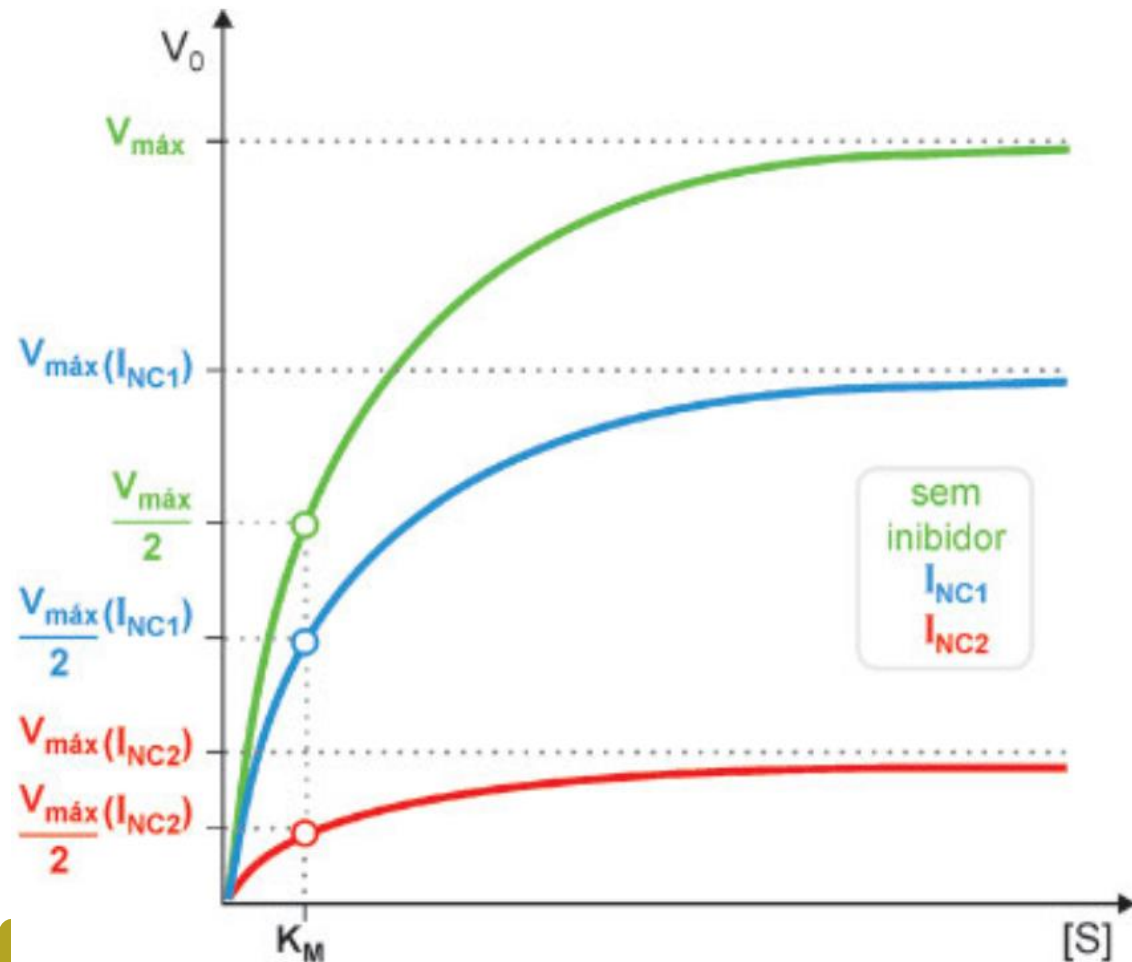
Atinge-se o mesmo v_{\max} , mas K_M *muda*.



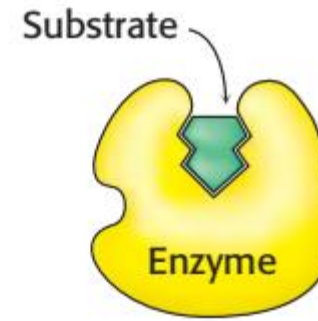
Inibidores Reversíveis

Competitivo

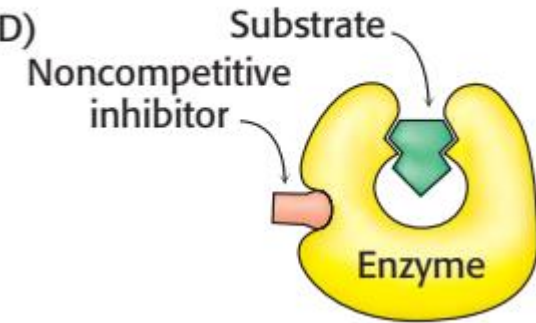
Não-competitivo



(A)



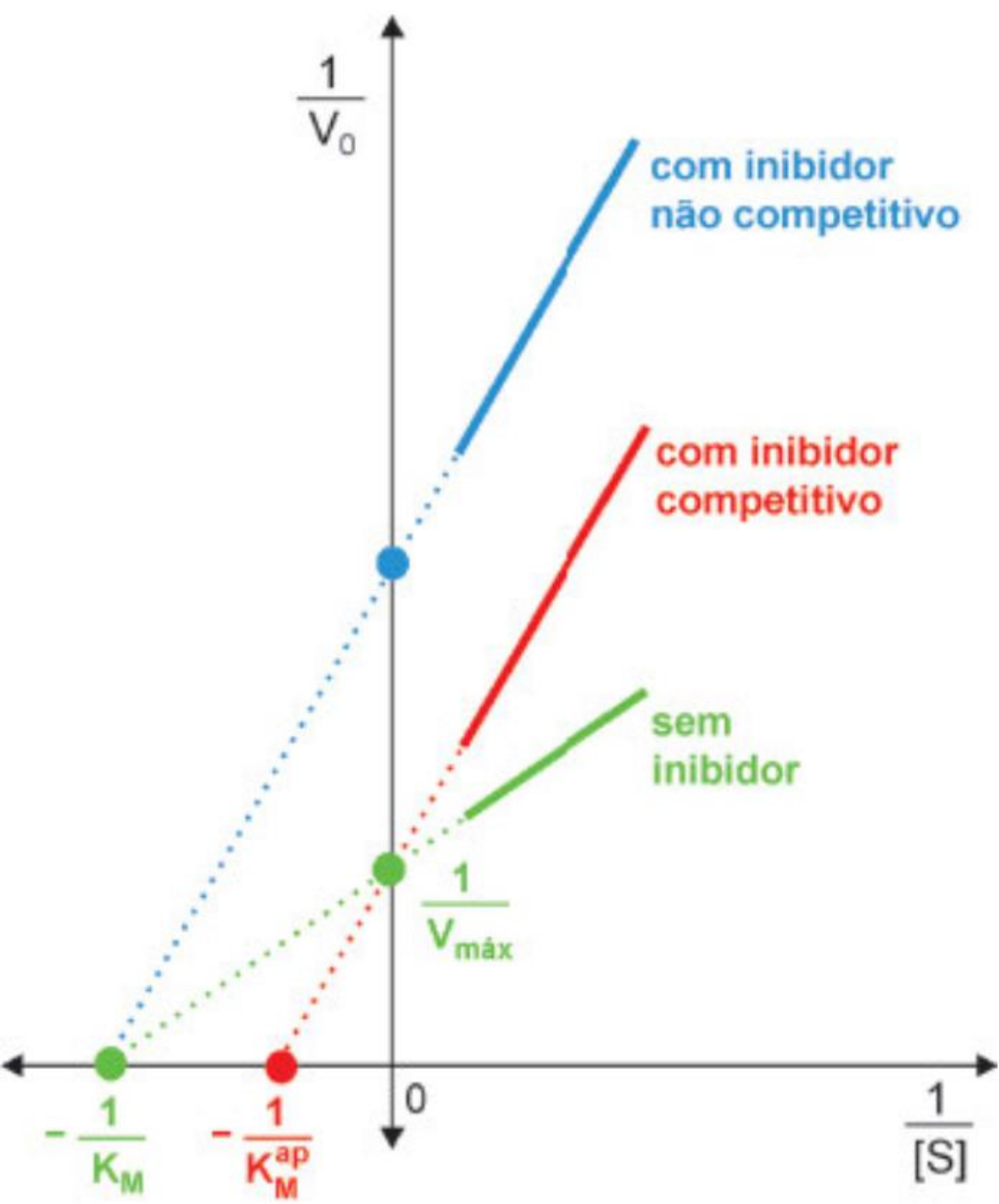
(D)



K_M não muda, mas não se atinge o mesmo $V_{\text{máx}}$

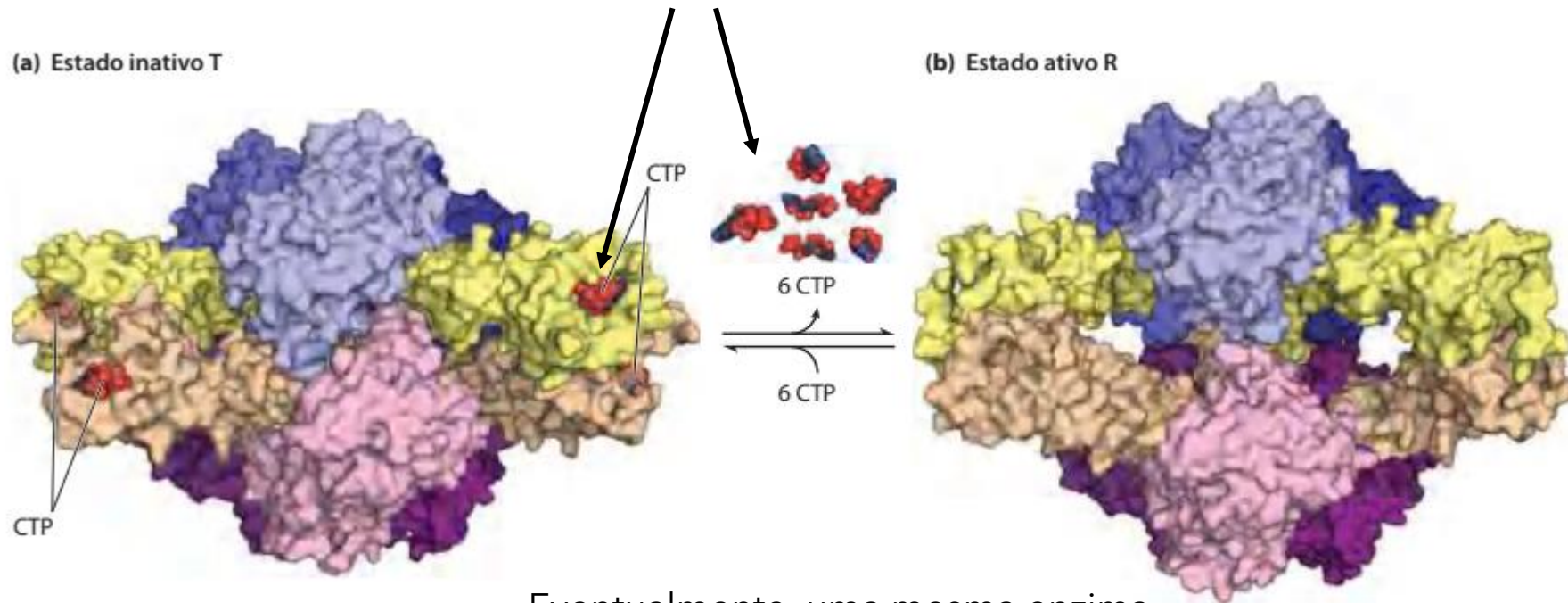
Na prática é como se $[E]$ fosse menor, pois o inibidor inativa a enzima temporariamente, mas não se liga no **sítio ativo**.

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



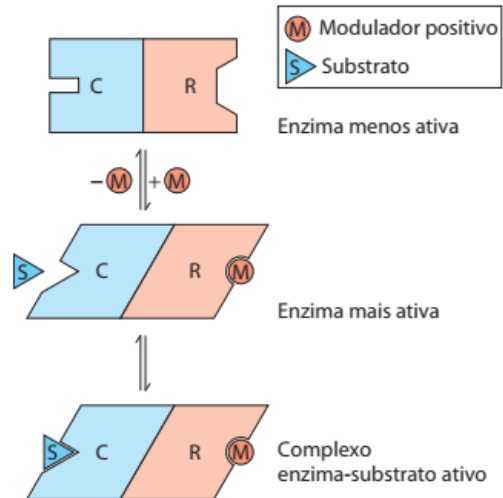
Enzimas **alostéricas** apresentam estrutura quaternária no geral.

Os **efetadores alostéricos** se ligam em região fora do sítio ativo (**sítio alostérico**). Mudanças conformacionais facilitam (**efetador positivo**) ou dificultam (**efetador negativo**) a catálise.



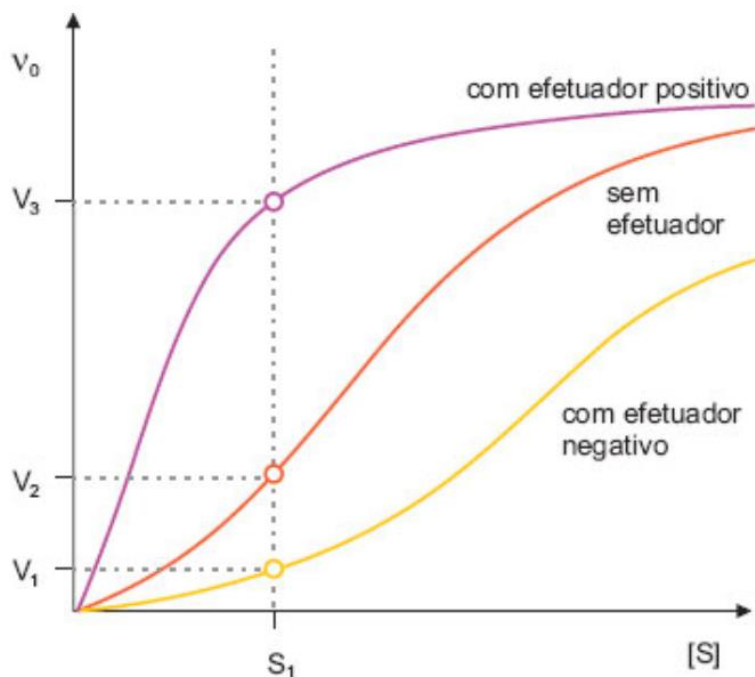
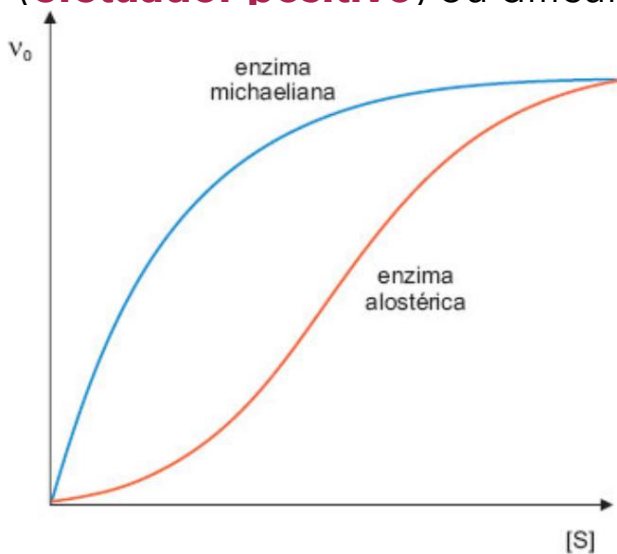
Ao se **desligar** o **efetador alostérico negativo** a proteína fica **mais ativa**. É comum o efetador ser um produto final de uma via metabólica, portanto, regulando por **retroalimentação negativa** a via.

Eventualmente, uma mesma enzima pode ter tanto efetadores positivos como negativos.



Enzimas **alostéricas** apresentam estrutura quaternária no geral.

Os **efetadores alostéricos** se ligam em região fora do sítio ativo (**sítio alostérico**). Mudanças conformacionais facilitam (**efetador positivo**) ou dificultam (**efetador negativo**) a catálise.



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

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

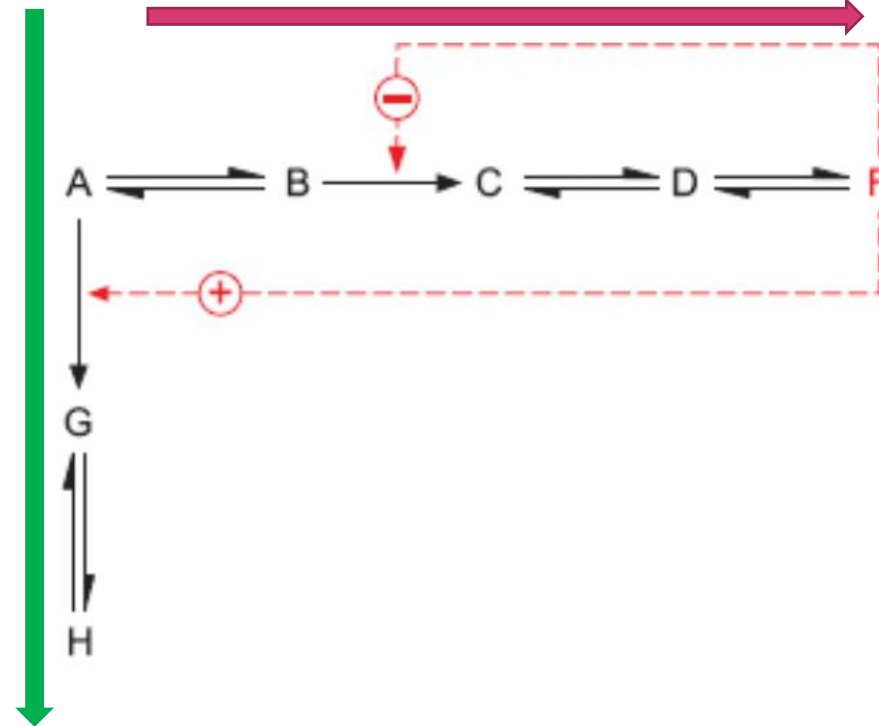
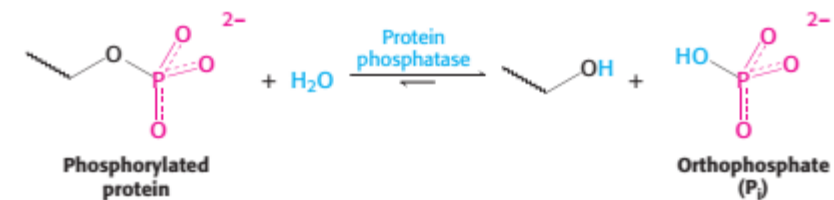


Tabela 19.1 Enzimas alostéricas e seus efetadores.

Enzima	Efetadores alostéricos	
	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	
Acetil-CoA carboxilase	Acil-CoA	Citrato

Tabela 19.2 Modificação da atividade enzimática por fosforilação.

Via metabólica	Enzima fosforilada	Forma
Glicogenólise	Glicogênio fosforilase quinase	Ativa
	Glicogênio fosforilase	Ativa
Glicogênese	Glicogênio sintase	Inativa
Glicólise e gliconeogênese	6-Fosfofruto-2-quinase	Inativa
	Frutose 2,6-bisfosfatase	Ativa
	Piruvato quinase	Inativa
Piruvato → Acetil-CoA	Piruvato desidrogenase	Inativa
Lipólise	Lipase	Ativa
Lipogênese	Citrato liase	Inativa
	Acetil-CoA carboxilase	Inativa
	3-Hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase	Inativa



Quinase (ou cinase) é uma enzima que *adiciona* um **fosfato** a uma outra proteína.

Fosfatase é uma enzima que *remove* um grupo **fosfato** de uma outra proteína.

Um grupo **fosfato** adicionado pode *ativar* a enzima "A", ou *inativar* a enzima "B". Ou seja, ***varia para cada enzima.***

