

O SENTIDO DAS REAÇÕES E AS ENZIMAS

27-ABRIL-2023

QBQ-0313

Bioquímica: Estrutura e Função de Macromoléculas

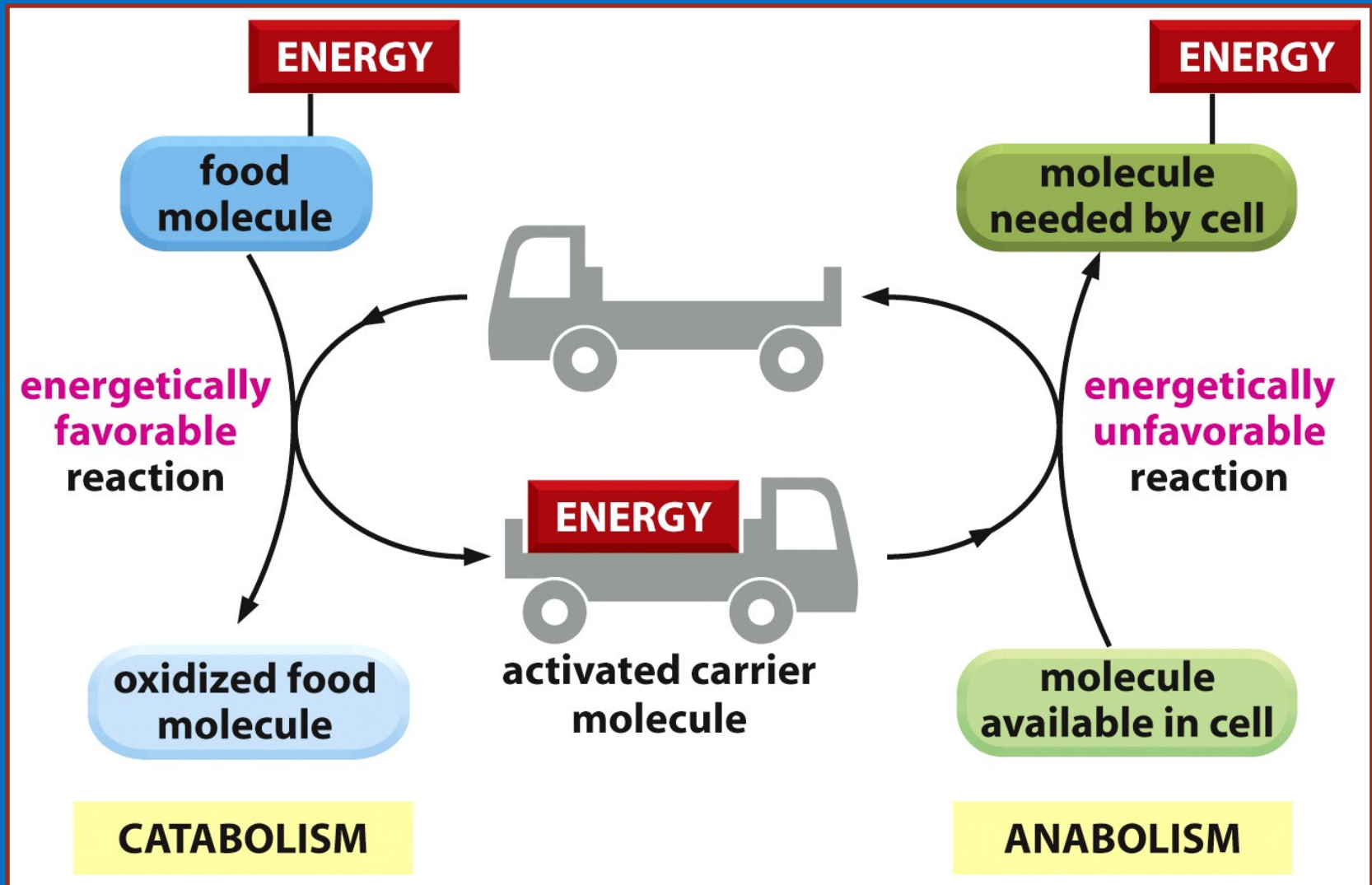
Nutrição USP

A catálise na vida

- Um dos princípios da vida é que os organismos sejam capazes de extrair, transformar e utilizar a energia do ambiente.
- Para tal, sistemas biológicos são dotados de catalisadores (enzimas), que são, por sua vez, essenciais para que esta transformação ocorra de maneira eficiente.



As reações metabólicas: catabolismo e anabolismo



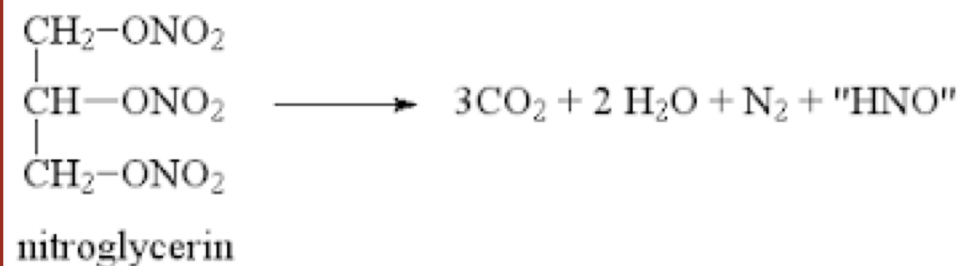
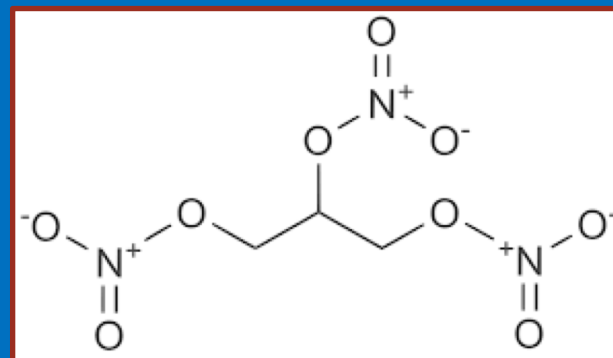
A catálise na vida

- Tomemos um simples exemplo: o aproveitamento da energia da molécula do açúcar.
- A transformação de sacarose (açúcar comum) em CO_2 e H_2O é uma reação altamente exergônica (libera energia).
- Porém, o açúcar que compramos, pode permanecer num pacote nas prateleiras dos supermercados por anos, sem nenhuma conversão aparente.
- Apesar de termodinamicamente favorável, esta reação demora anos para acontecer.
- Nos organismos vivos, o açúcar é prontamente convertido em CO_2 e H_2O , liberando sua energia, em questão de minutos ou segundos.
- Isto se deve a presença de catalisadores biológicos, as enzimas.



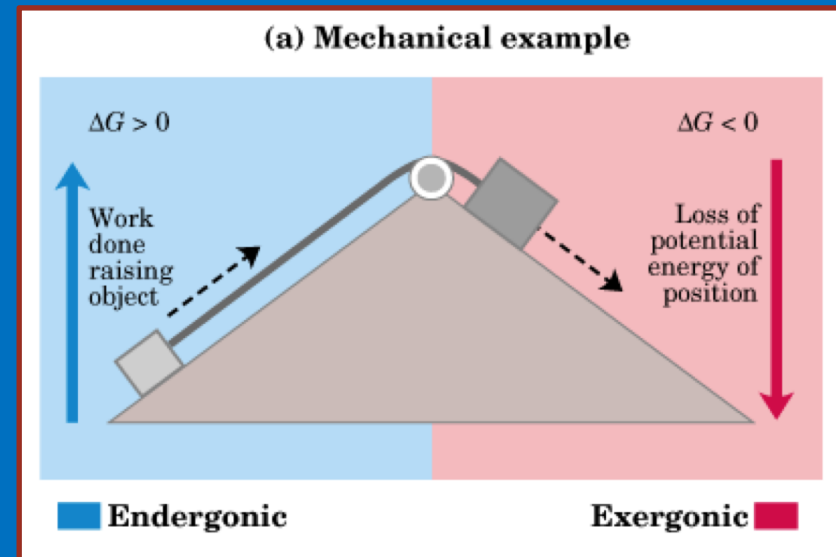
A energia das ligações químicas

- Tomemos, agora, outro exemplo: a nitroglicerina
- Diferentemente do açúcar, é uma molécula tão instável, que basta um choque mecânico para que ela libere a energia contida nas suas ligações
- A temperatura chega a 5.000 °C e o seu volume expande mais de 1.200 vezes
- Esta é uma reação espontânea
- Porém, a maioria das substâncias não explode e para liberar a energia contida nas suas ligações, precisamos de enzimas
- Por quê?



Termodinâmica e as reações biológicas

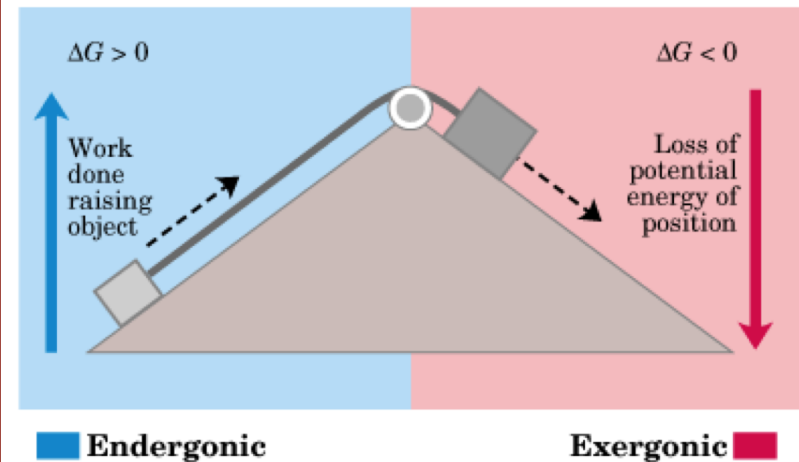
- As reações biológicas obedecem as leis da termodinâmica e dependem da energia livre de Gibbs (G) disponível para que a reação ocorra a uma temperatura e pressão constantes.
- Em termodinâmica, a energia de Gibbs (G) se refere a quantidade máxima de energia que pode ser extraída de um sistema fechado.
- Assim, quando uma reação química ocorre (transformação), há uma mudança nos níveis de energia de Gibbs entre o sistema inicial e final.
- Esta diferença é conhecida como $\Delta G = G_{\text{final}} - G_{\text{inicial}}$.



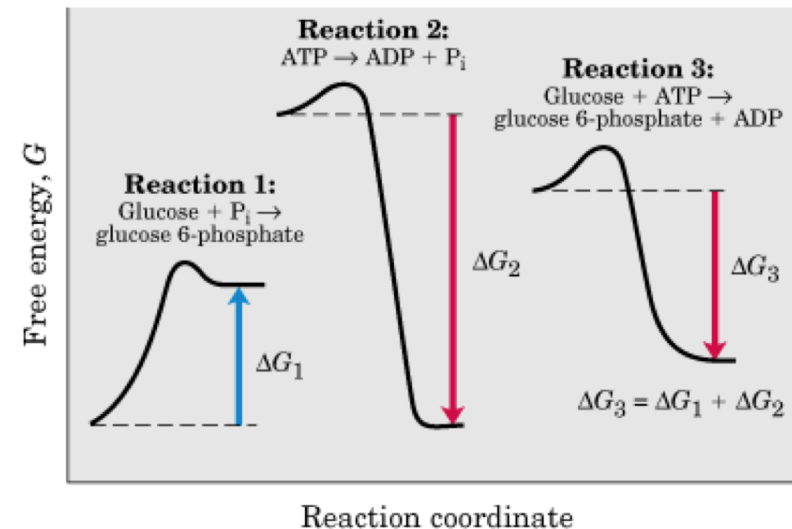
Reações exergônicas e endergônicas

- Uma reação que libera energia livre ($\Delta G < \text{zero}$), é chamada de reação exergônica.
- Reações exergônicas são favoráveis e muitas vezes espontâneas.
- Já reações com aumento de energia livre ($\Delta G > \text{zero}$), são chamadas de reações endergônicas.
- As reações endergônicas são desfavoráveis termodinamicamente e não espontâneas.
- Ou seja, é necessária a adição de energia para que a reação ocorra.
- Reações endergônicas podem ocorrer, se acopladas a reação exergônica, de tal forma, que ao final, a soma da energia livre do sistema seja menor que zero ($\Delta G < \text{zero}$).

(a) Mechanical example



(b) Chemical example



Energia livre (G), Entalpia (H) e entropia (S)

- É a energia térmica de uma molécula.

$$H = U + PV$$

U = energia interna (J)

P = pressão (pascal)

V = volume (m³)

- Toda reação química tem uma diferença de entalpia (ΔH) que pode ser expressa como:

$$\Delta H = H_{\text{produto}} - H_{\text{reagentes}}$$

Se $\Delta H < \text{zero}$ a reação é exotérmica (libera calor)

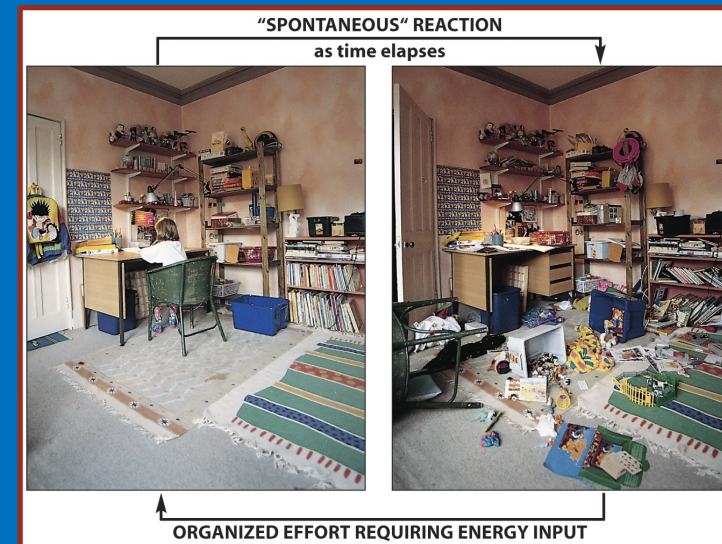
Se $\Delta H > \text{zero}$ a reação é endotérmica (absorve calor)

- A entropia indica o estado de organização de um sistema
- A relação entre todas estas variáveis é:

$$G = H - TS$$

TABLE 1-1 Strengths of Bonds Common in Biomolecules

Type of bond	Bond dissociation energy* (kJ/mol)	Type of bond	Bond dissociation energy (kJ/mol)
Single bonds		Double bonds	
O—H	470	C=O	712
H—H	435	C=N	615
P—O	419	C=C	611
C—H	414	P=O	502
N—H	389		
C—O	352	Triple bonds	
C—C	348	C≡C	816
S—H	339	N≡N	930
C—N	293		
C—S	260		
N—O	222		
S—S	214		



ΔG , ΔG° e $\Delta G^{\circ'}$

- Numa reação, a variação da energia livre é dada pela equação:

$$G(p,T) = U + pV - T.S \quad \text{ou} \quad \Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

- Como a energia livre depende da concentração dos reagentes, temperatura e outras variáveis do sistema, utiliza-se a energia livre padrão, que é a energia livre quando a concentração dos reagentes e produtos é 1M, temperatura 25°C e pH = 0 (ΔG°).
- Isto porque, a energia contida em 1 mol de reagentes é o dobro da energia contida em 0,5 mol dos mesmos reagentes.
- Da mesma forma, a concentração altera a velocidade e o equilíbrio de uma reação, modificando a quantidade de energia liberada.

ΔG e o sentido das reações

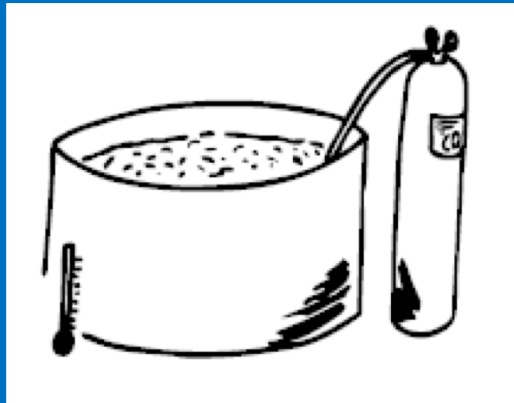
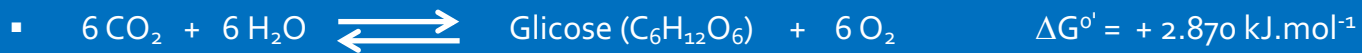
- Assim, para reações biológicas, as medidas são efetuadas em pH = 7 (ao invés de pH = 0), e por isso, denominamos a energia livre padrão' ΔG° .



- O sinal do ΔG° indica em que sentido a reação ocorre de forma favorável.
- Porém, ela precisa de energia de ativação para ocorrer (colocar a panela no fogo para fazer caramelo....)

ΔG e o sentido das reações

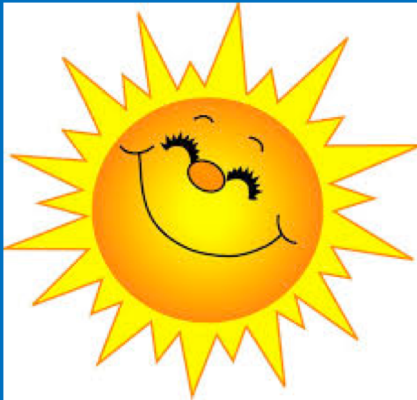
- Já a reação posta, não é favorável porque o ΔG° é (muito) positivo:



- Por exemplo, seria possível produzir glicose borbulhando CO_2 em H_2O ?

ΔG e o sentido das reações

- Porém, isto é exatamente o que as plantas fazem!



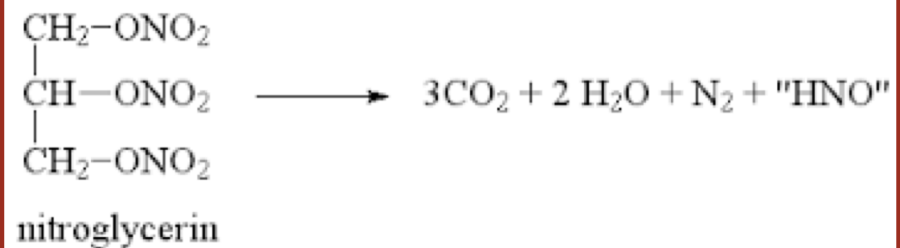
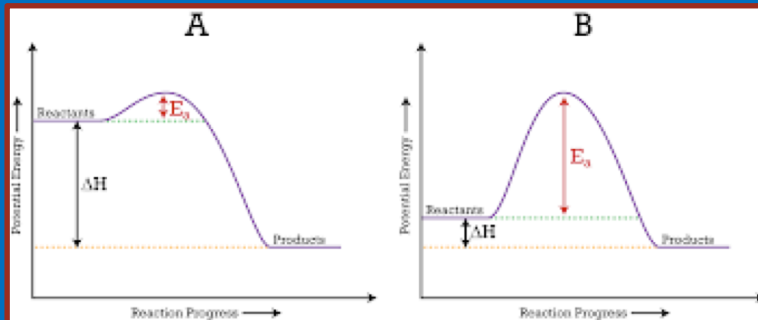
energia sol
(fotossíntese)



- Mas, para isto, são necessárias várias etapas, para vencer as barreiras de ativação.
- É preciso adicionar energia no sistema (no caso das plantas, a energia do sol)

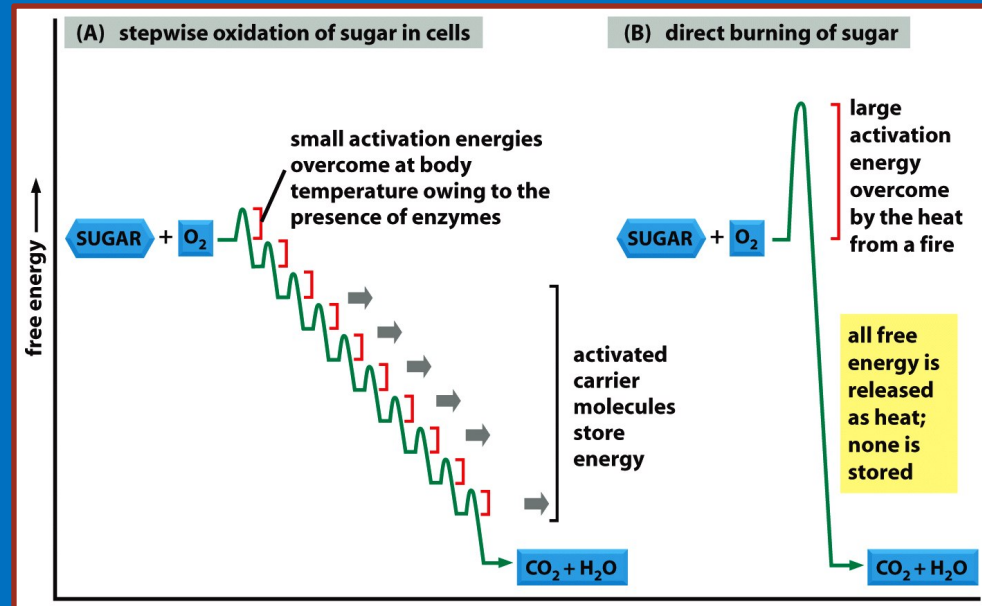
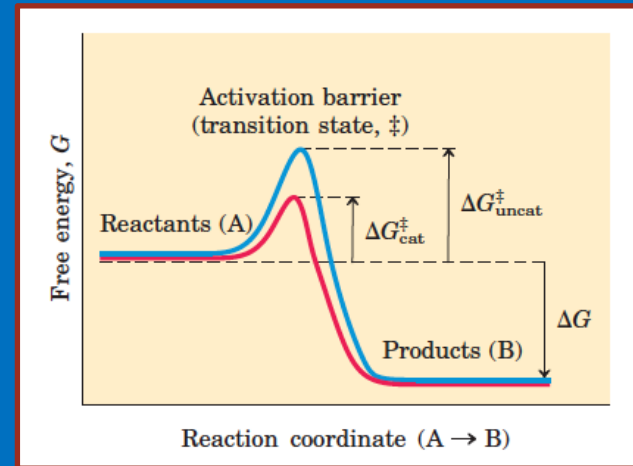
A energia de ativação

- A energia de ativação é uma barreira energética que precisa ser rompida para que uma reação ocorra
- Por exemplo, se você deixar um pacote de açúcar cair no chão, o máximo que pode acontecer é sujar o chão e atrair formigas!
- Porém, se você deixar cair um frasco do explosivo nitroglicerina... Cabum!
- Isto porque o açúcar é uma molécula estável, que pare se decompor, precisa de uma alta energia de ativação
- Já a nitroglicerina tem uma baixa energia de ativação e um simples chacoalhar pode induzir a sua degradação, liberando, rapidamente, toda a energia contida nas suas moléculas



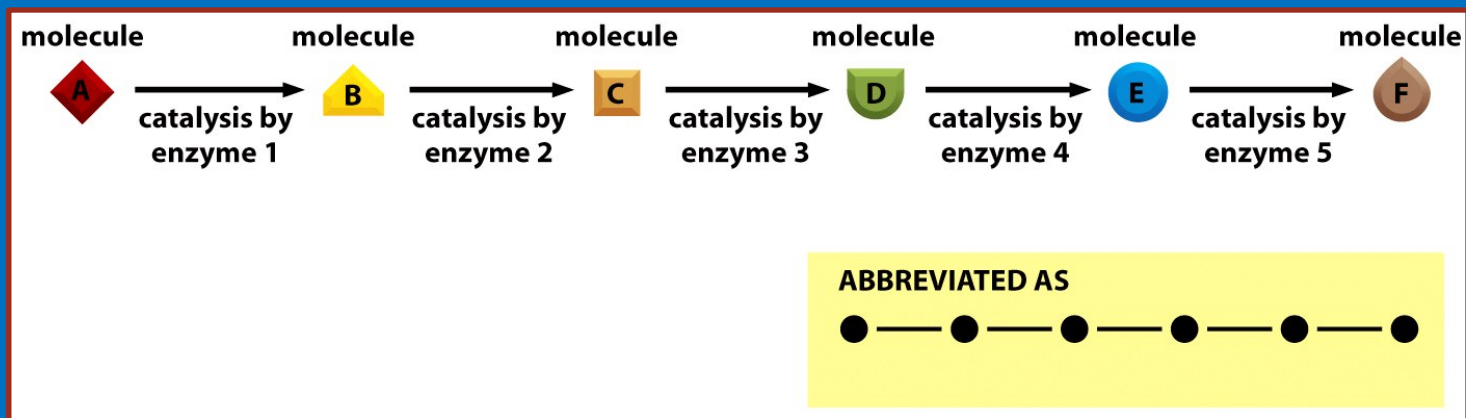
As enzimas e energia de ativação

- O valor de ΔG° não diz com que velocidade uma reação irá ocorrer.
- Por isso, enzimas são importantes, diminuindo a barreira energética para que uma reação ocorra.
- Organismos vivos utilizam várias reações individuais, em etapas, para se chegar ao resultado final.
- Por exemplo, para se oxidar a glicose diretamente a CO_2 e H_2O , é preciso vencer a alta energia de ativação.
- Ou, utilizando-se várias reações individuais, cada uma com energia de ativação baixa, podemos obter o mesmo resultado.



As enzimas e o metabolismo

- O metabolismo é, portanto, o conjunto de reações que as células usam para degradar ou sintetizar biomoléculas
- O metabolismo pode ser dividido em vias metabólicas, como veremos ao longo deste curso
- Por exemplo, a via glicolítica, é o conjunto de enzimas e reações usadas para metabolizar a glicose
- Existem vias para o metabolismo de (quase) todos os biomoléculas importantes para a célula: açúcares, aminoácidos, ácidos nucleicos, etc

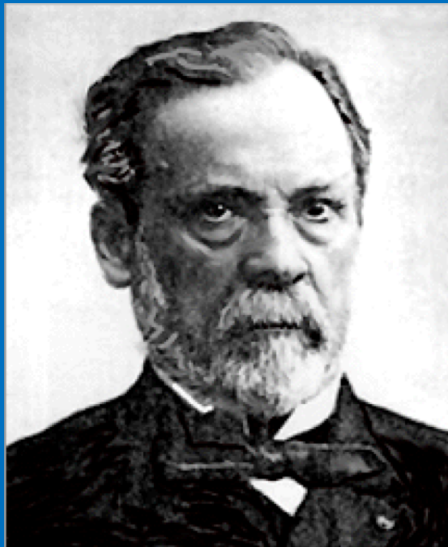


As enzimas

- O estudo das enzimas é muito importante para entender os processos biológicos.
- As enzimas são elementos centrais em todos os processos bioquímicos, trabalhando em conjunto, elas transformam as moléculas constituintes da vida, tais como CO_2 , compostos nitrogenados, açúcares (carboidratos), gordura e proteínas (aminoácidos) em todas as demais substâncias que compõem sistemas biológicos.
- O estudo das enzimas é portanto essencial para entendermos como a vida funciona.
- A falta (ou excesso) de uma atividade enzimática, frequentemente, resulta em doenças genéticas.
- O estudo das enzimas é também fundamental para processos biotecnológicos, tais como a conversão do suco da cana-de-açúcar em etanol para consumo pelos carros, ou outros processos industriais.

O começo: Louis Pasteur e a fermentação

- As enzimas foram primeiramente reconhecidas no final dos anos de 1700 como componente da degradação da carne pelos sucos gastrointestinais, ou pela conversão do amido a açúcar pela saliva.
- Nos anos de 1850, Louis Pasteur propôs que a conversão do açúcar em álcool pelas leveduras era catalisado por “fermentos”, inseparáveis das células das leveduras.



Louis Pasteur



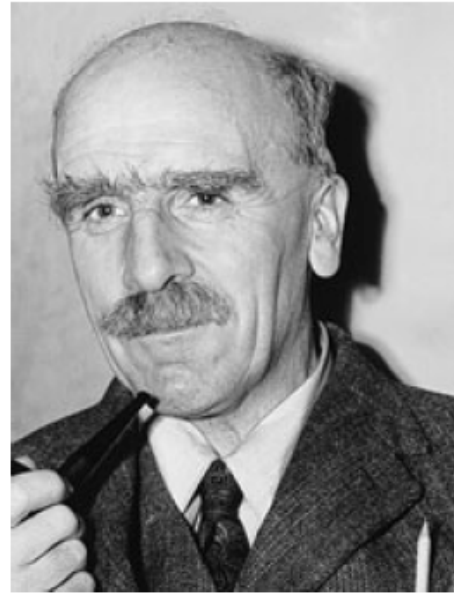
Levedura (*Saccharomyces cerevisiae*)

O começo

- Em 1897, Eduard Buchner demonstrou que moléculas presentes em extratos de levedura eram capazes de fermentar o açúcar em etanol.
- Wilhelm Kühn sugeriu, pela primeira vez, o nome enzimas para essas moléculas (do grego ἔνζυμον, levedar).



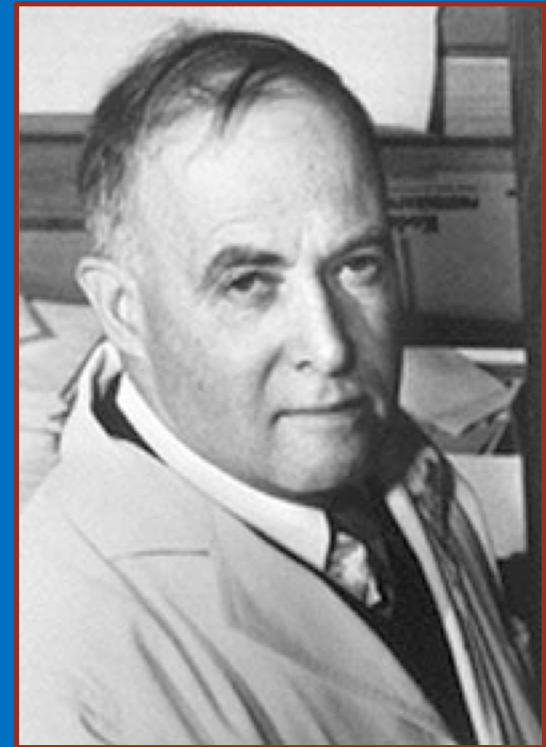
Eduard Buchner, 1860–1917



J. B. S. Haldane, 1892–1964

O começo: enzimas são proteínas

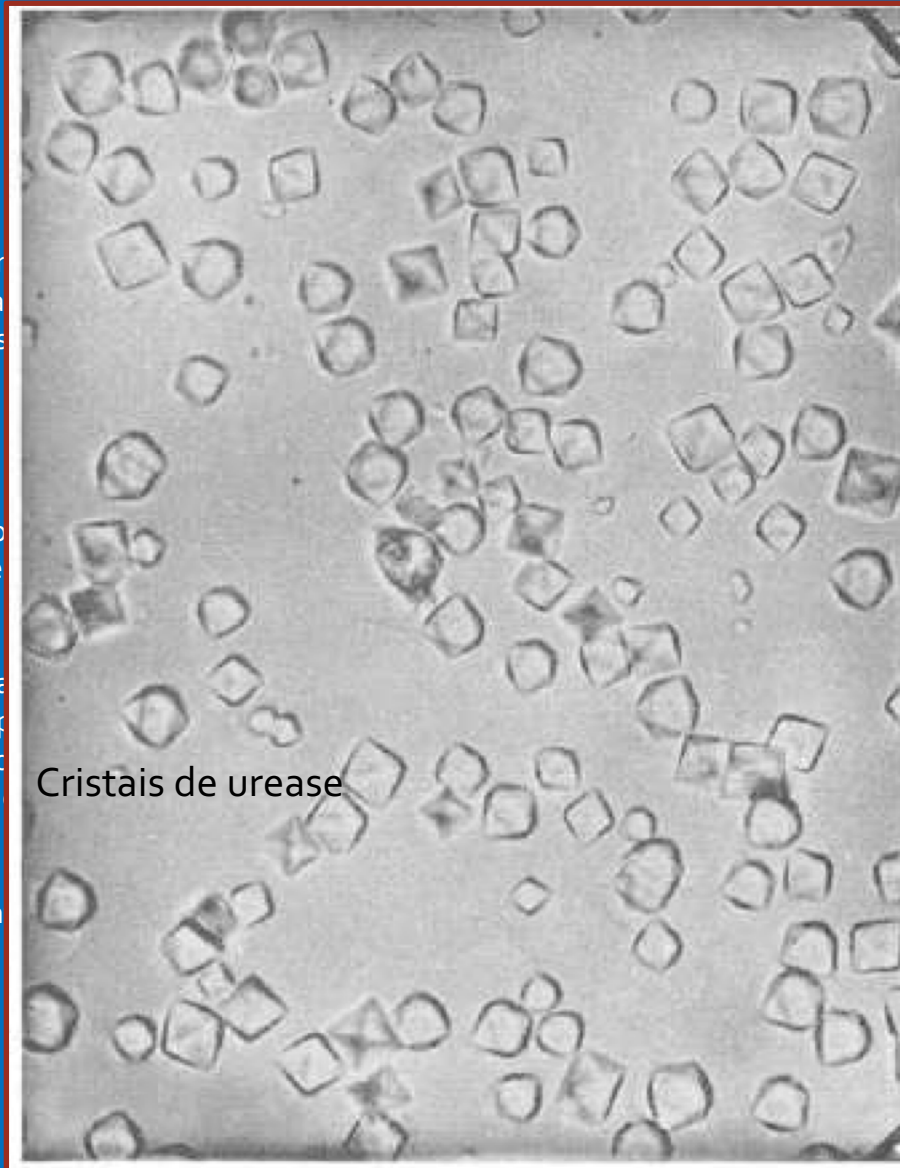
- Em 1926, James Sumner cristalizou a enzima urease e mostrou que ela era composta exclusivamente por proteína. Ele propôs que todas as enzimas fossem proteínas.
- Esse conceito só foi aceito anos mais tarde, quando John Northrop e Moses Kunitz cristalizaram a tripsina, a pepsina e outras enzimas digestiva.
- Nesta mesma época, J. B. S. Haldane escreveu um tratado (*Enzymes*), propondo que interações fracas entre as enzimas e os substratos fossem utilizados para catalisar as reações biológicas.
- Esses princípios continuam válidos até hoje.



James Sumner (Nobel em química, 1946)

O começo: enzimas são proteínas

- Em 1926, James Sumner mostrou que ela era proteína. Ele propôs que as enzimas são proteínas.
- Esse conceito só foi consolidado por John Northrop e Mooney Williams, que isolaram a pepsina e outras enzimas.
- Nesta mesma época, o livro *Enzymes*, publicado por Sumner, tratava das enzimas e de suas propriedades, entre as enzimas e de suas propriedades, para catalisar as reações químicas.
- Esses princípios começaram a ser aplicados em 1946, quando Sumner recebeu o Prêmio Nobel em Química.



Cristais de urease



Sumner (Nobel em Química, 1946)

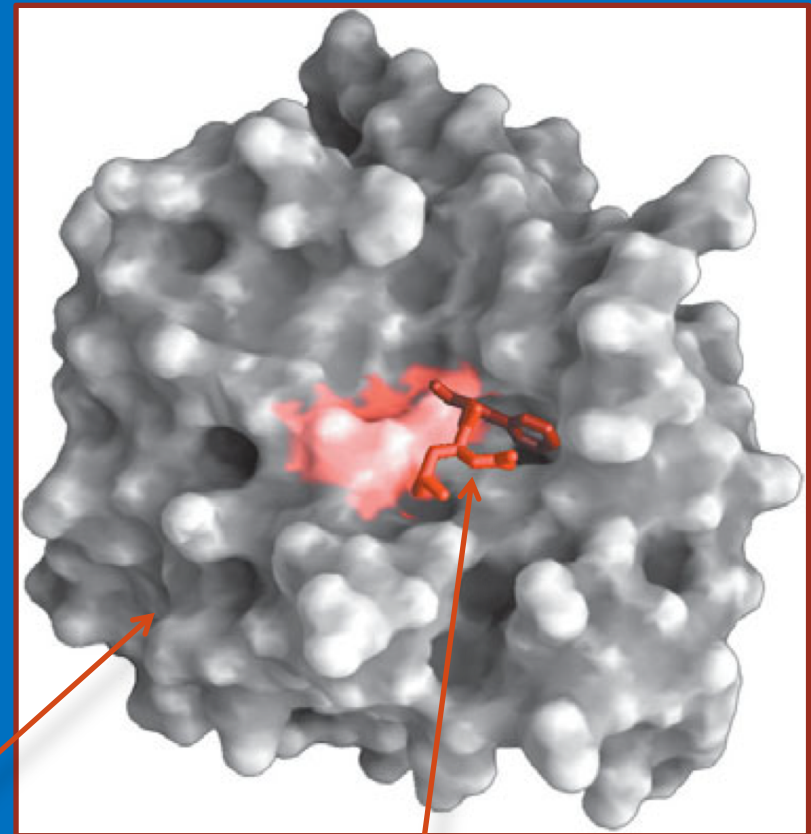
As enzimas

- Com exceção de alguns RNAs catalíticos, todas as enzimas são proteínas.
- A atividade catalítica depende da integridade e da estrutura da proteínas.
- Se uma proteína for denaturada, dissociada das suas subunidades, ou decomposta em seus aminoácidos constituintes, ela sempre perderá a atividade.
- As enzimas podem variar de peso molecular, de 12.000 a mais de 1 milhão de Da (Daltons).
- A molécula que se liga à enzima é chamada de SUBSTRATO.



As enzimas

- Com exceção de alguns RNAs catalíticos, todas as enzimas são proteínas.
- A atividade catalítica depende da integridade e da estrutura da proteínas.
- Se uma proteína for denaturada, dissociada das suas subunidades, ou decomposta em seus aminoácidos constituintes, ela sempre perderá a atividade.
- As enzimas podem variar de peso molecular, de 12.000 a mais de 1 milhão de Da (Daltons).
- A molécula que se liga à enzima é chamada de SUBSTRATO.

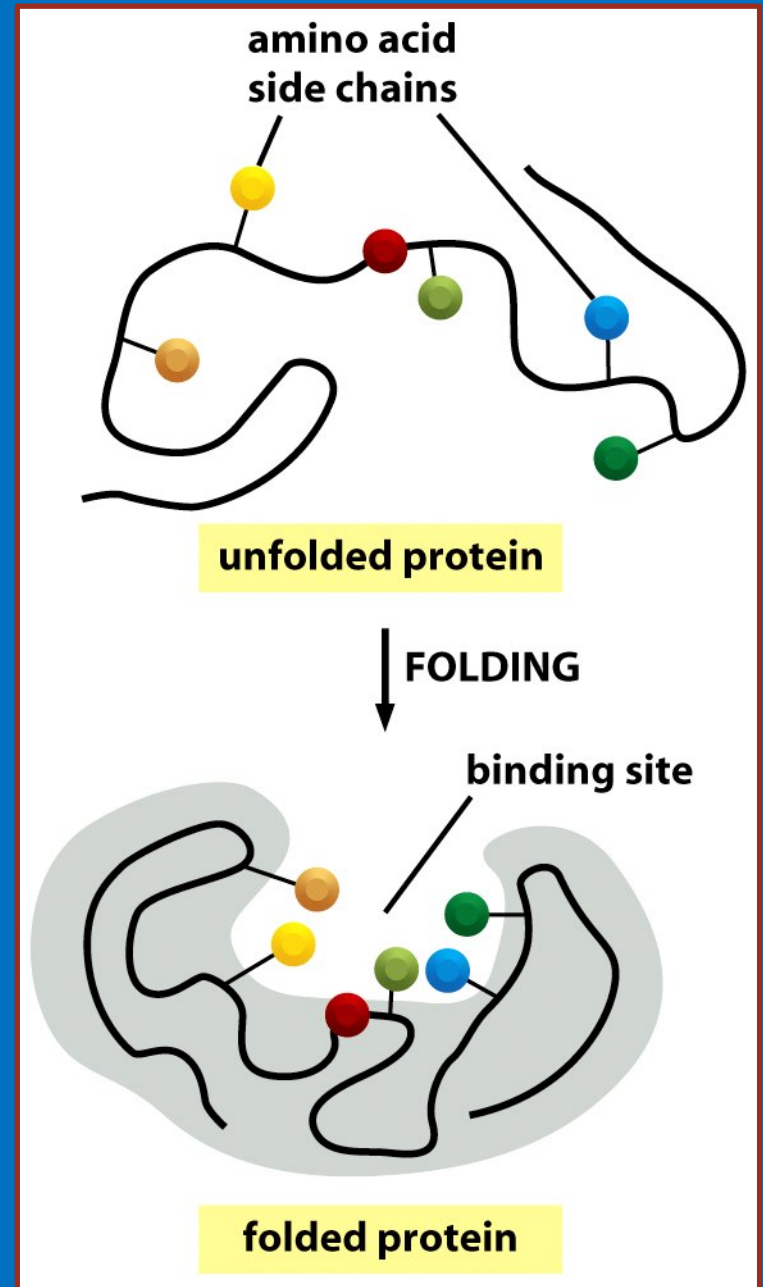


Enzima

Substrato

As enzimas

- A estrutura terciária da proteína determina os resíduos que compõem o sítio catalítico
- São estes amino ácidos que interagem com o substrato e catalisam as reações biológicas



As enzimas e os cofatores

- As enzimas podem conter apenas a cadeia polipeptídica, ou podem conter ainda cofatores (tais como íons inorgânicos) ou coenzimas (moléculas mais complexas).

TABLE 6-1 Some Inorganic Elements That Serve as Cofactors for Enzymes

Cu^{2+}	Cytochrome oxidase
Fe^{2+} or Fe^{3+}	Cytochrome oxidase, catalase, peroxidase
K^{+}	Pyruvate kinase
Mg^{2+}	Hexokinase, glucose 6-phosphatase, pyruvate kinase
Mn^{2+}	Arginase, ribonucleotide reductase
Mo	Dinitrogenase
Ni^{2+}	Urease
Se	Glutathione peroxidase
Zn^{2+}	Carbonic anhydrase, alcohol dehydrogenase, carboxypeptidases A and B

Muitas vitaminas são cofatores de enzimas

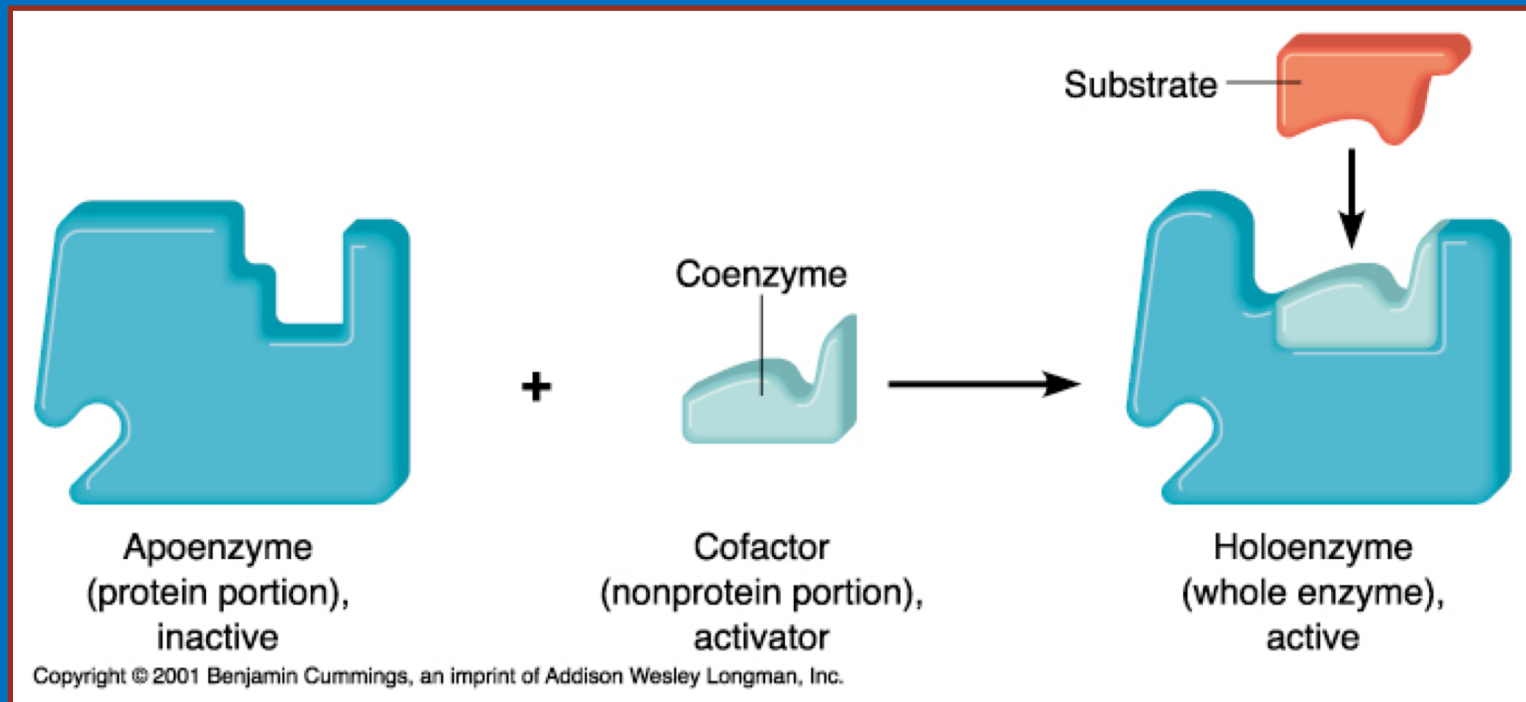
- Cofatores e coenzimas são também chamados de grupos prostéticos.
- Enzimas que contêm grupos prostéticos são também chamadas de holoenzimas (do Grego, holo = todo), enquanto que a cadeia peptídica é denominada de apoproteína (apo = afastado).

TABLE 6-2 Some Coenzymes That Serve as Transient Carriers of Specific Atoms or Functional Groups

<i>Coenzyme</i>	<i>Examples of chemical groups transferred</i>	<i>Dietary precursor in mammals</i>
Biotin	CO ₂	Biotin
Coenzyme A	Acyl groups	Pantothenic acid and other compounds
5'-Deoxyadenosylcobalamin (coenzyme B ₁₂)	H atoms and alkyl groups	Vitamin B ₁₂
Flavin adenine dinucleotide	Electrons	Riboflavin (vitamin B ₂)
Lipoate	Electrons and acyl groups	Not required in diet
Nicotinamide adenine dinucleotide	Hydride ion (:H ⁻)	Nicotinic acid (niacin)
Pyridoxal phosphate	Amino groups	Pyridoxine (vitamin B ₆)
Tetrahydrofolate	One-carbon groups	Folate
Thiamine pyrophosphate	Aldehydes	Thiamine (vitamin B ₁)

Muitas vitaminas são cofatores de enzimas

- Os cofatores participam da reação. Ou seja, sem o cofator, a reação não ocorre.
- Muitos dos cofatores não são sintetizados pelas células humanas e precisam ser adquiridos na dieta.
- Por isso, estes cofatores são conhecidos como vitaminas.



As enzimas são classificadas de acordo com a reação catalisada

- As enzimas geralmente recebem o sufixo –ase junto ao nome do substrato ou da reação que catalisam.
- Assim, urease catalisa a hidrólise da uréia.
- Outras enzimas receberam nomes associados à sua função: pepsina (do Grego, pepsis = digestão) e lisozima pela sua capacidade de lisar (romper) a parede bacteriana.
- As vezes, enzimas podem ter mais de um nome. Por isso, foi criada uma classificação em função de sua atividade. Por exemplo, a enzima ATP glicose fosfotransferase pode ser chamada de EC 2.7.1.1 (Enzyme comission number).

TABLE 6–3 International Classification of Enzymes

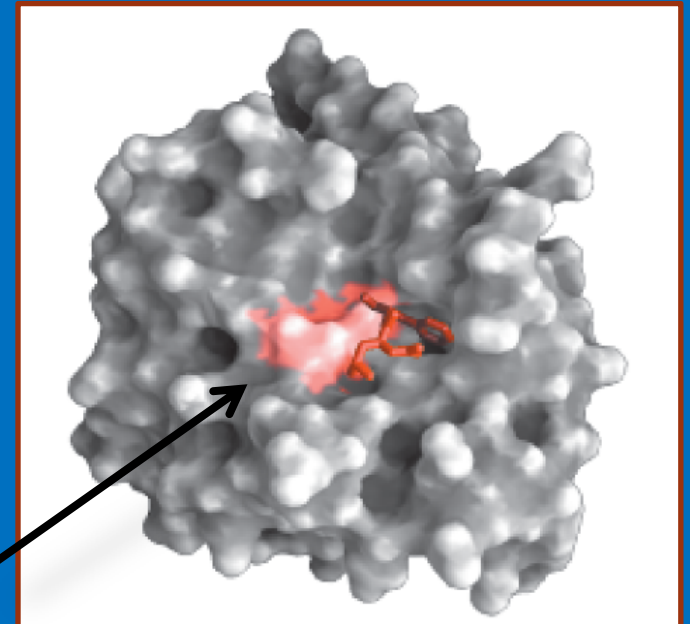
No.	Class	Type of reaction catalyzed
1	Oxidoreductases	Transfer of electrons (hydride ions or H atoms)
2	Transferases	Group transfer reactions
3	Hydrolases	Hydrolysis reactions (transfer of functional groups to water)
4	Lyases	Addition of groups to double bonds, or formation of double bonds by removal of groups
5	Isomerases	Transfer of groups within molecules to yield isomeric forms
6	Ligases	Formation of C—C, C—S, C—O, and C—N bonds by condensation reactions coupled to ATP cleavage

Como as enzimas funcionam

- As reações catalisadas pelas enzimas ocorrem no SÍTIO ATIVO da proteína.
- A molécula que se liga ao sítio ativo e sofre a reação enzimática é denominada de SUBSTRATO.
- Uma reação enzimática simples pode ser representada como :

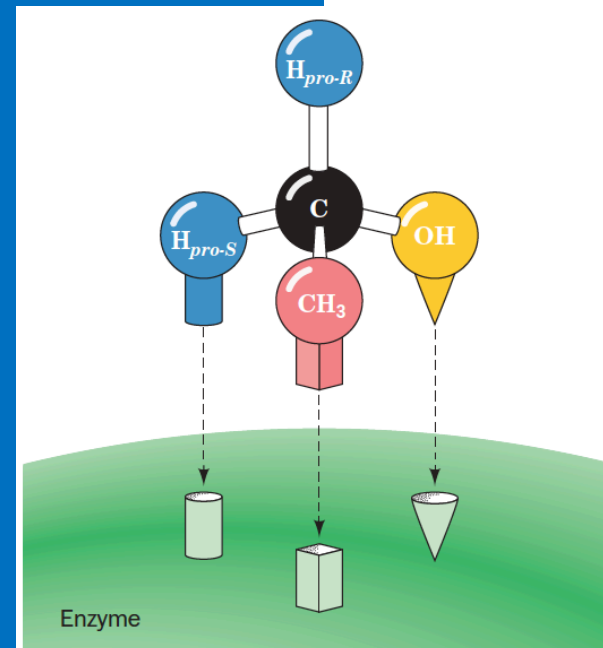
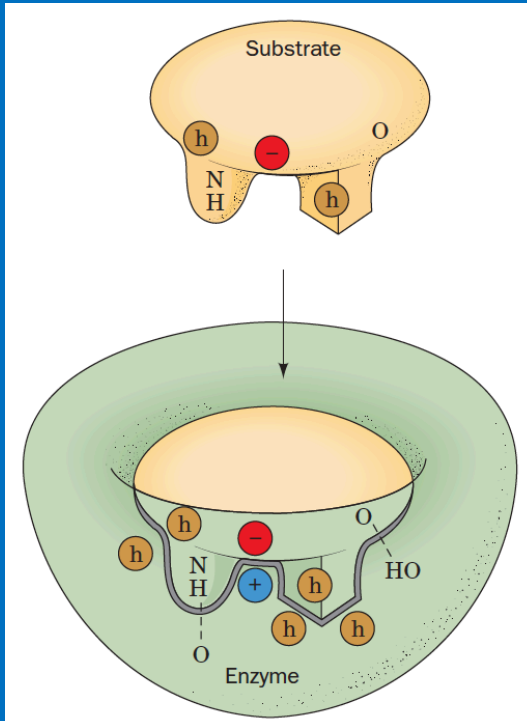


Sítio ativo

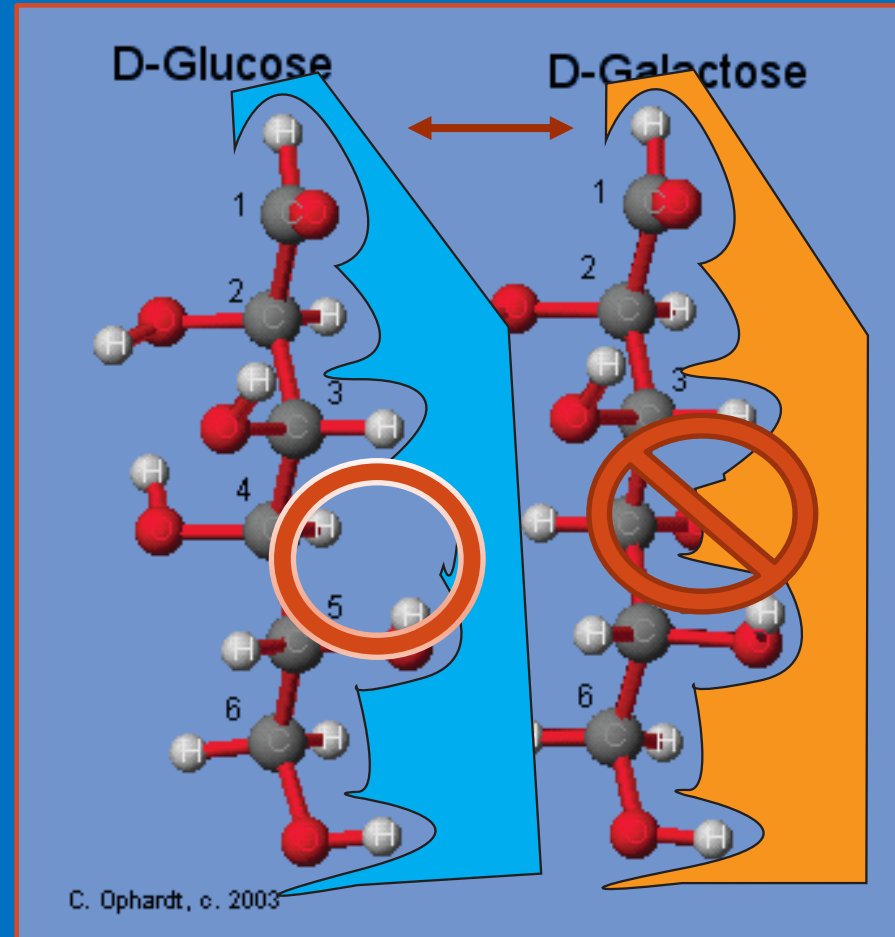
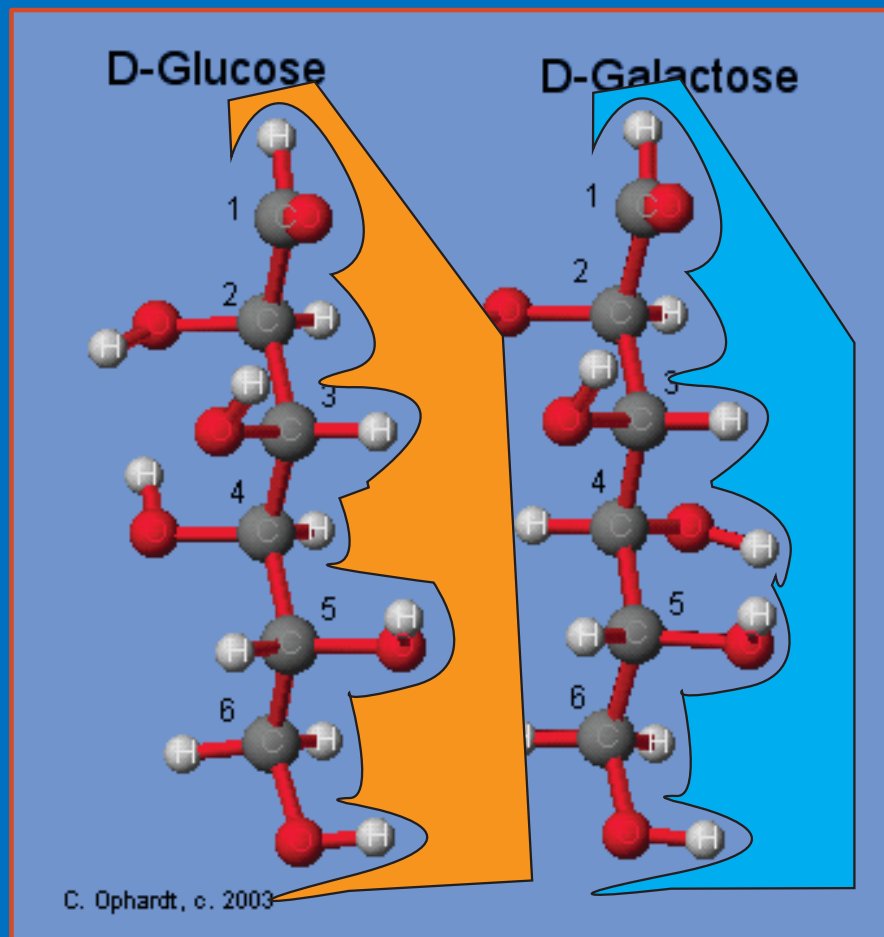


Os sítios ativos são estereoespecíficos

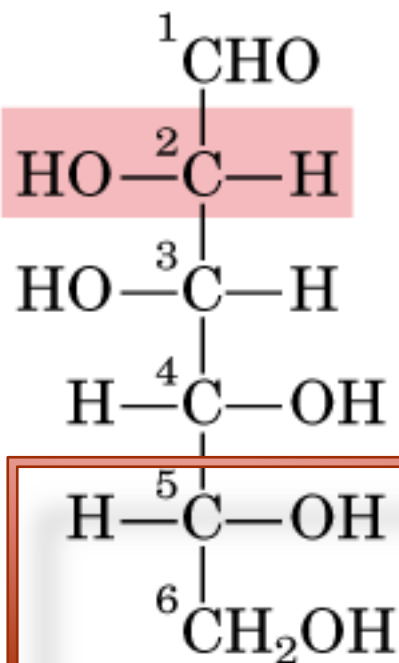
- O reconhecimento do substrato envolve a interação com diferentes grupos na enzima.
- Estes grupos estão organizados no espaço.
- Por isso, o reconhecimento pela enzima depende do enantiômero do substrato.
- Por exemplo, a grande maioria das enzimas é capaz de distinguir L-aminoácidos de D-aminoácidos.



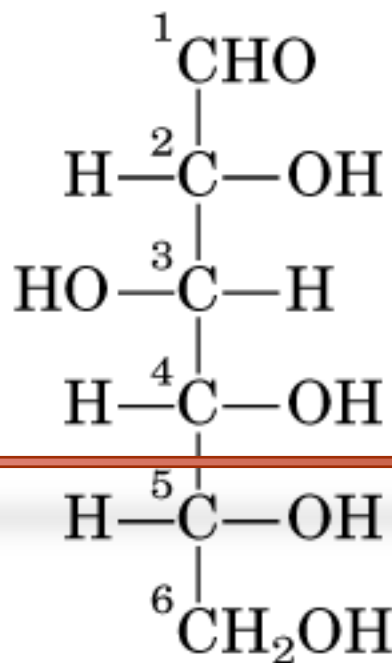
O sítio ativo das enzimas conseguem diferenciar moléculas muito parecidas, como os epímeros das hexoaldoses



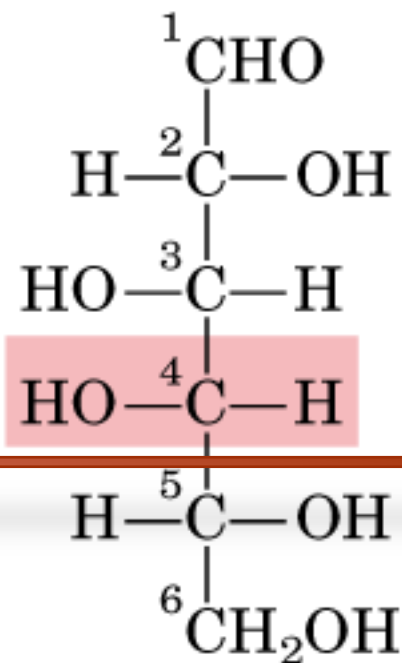
O sítio ativo das enzimas conseguem diferenciar moléculas muito parecidas, como os epímeros das hexoaldoses



D-Mannose
(epimer at C-2)



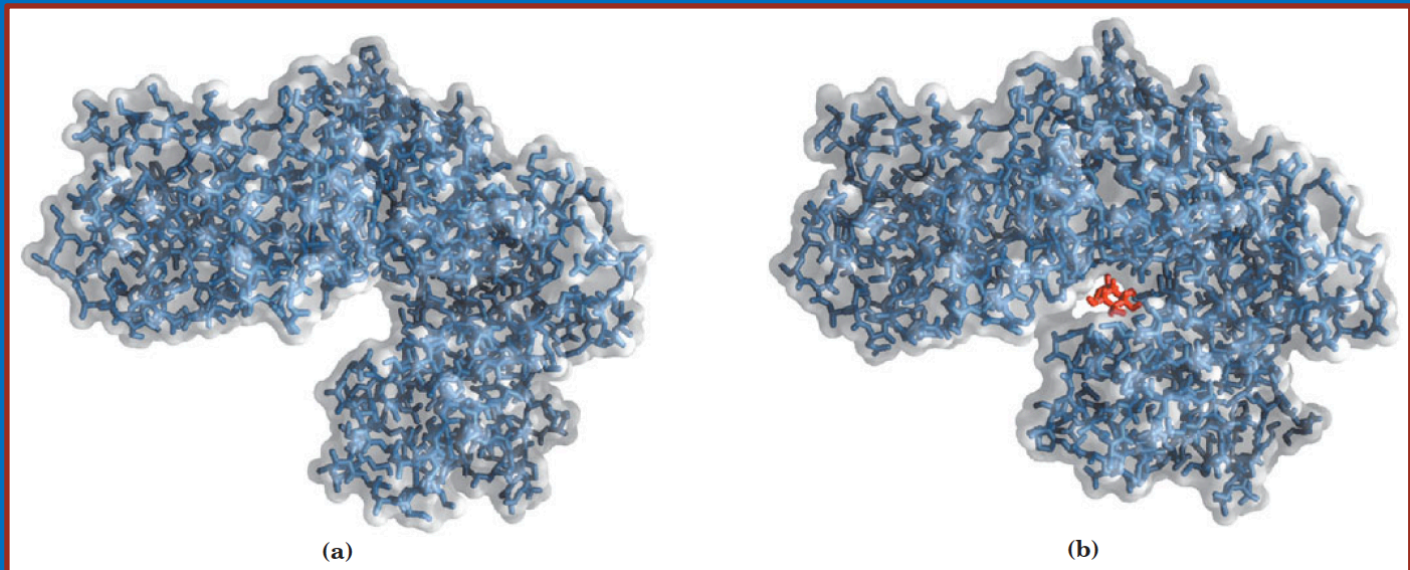
D-Glucose



D-Galactose
(epimer at C-4)

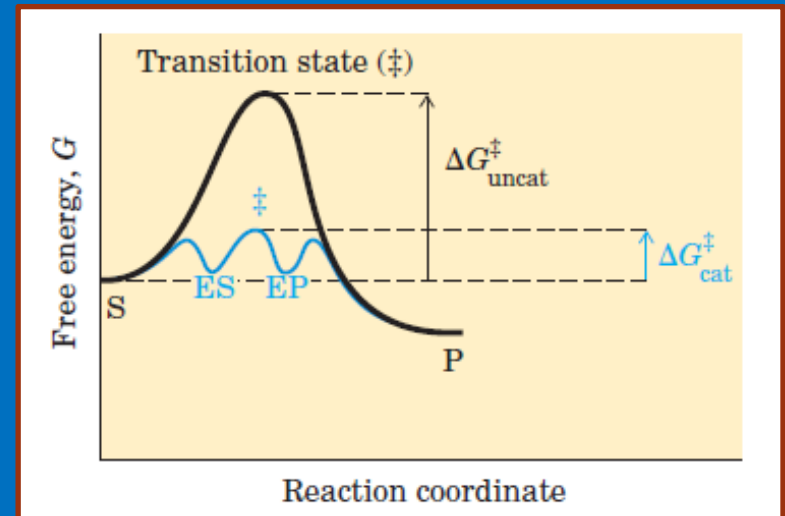
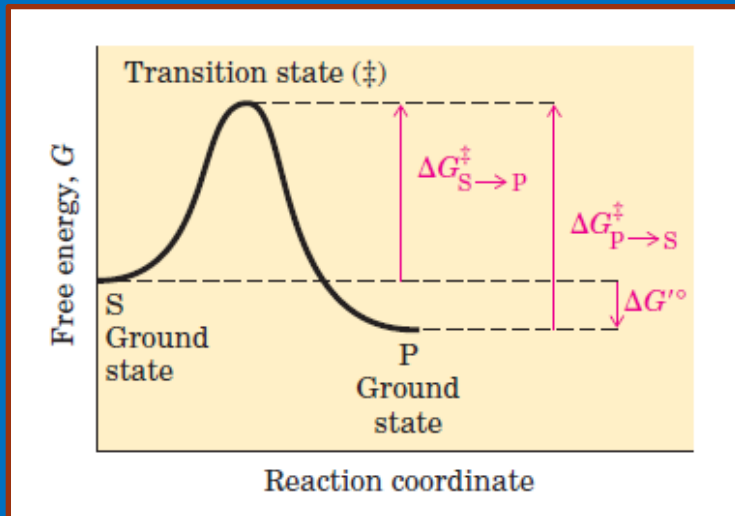
A ligação do substrato altera a estrutura da enzima

- Nós vimos que a ligação do oxigênio à hemoglobina altera sua conformação (do estado T para o R).
- Enzimas agem da mesma forma.
- A ligação do substrato altera a conformação da enzima.



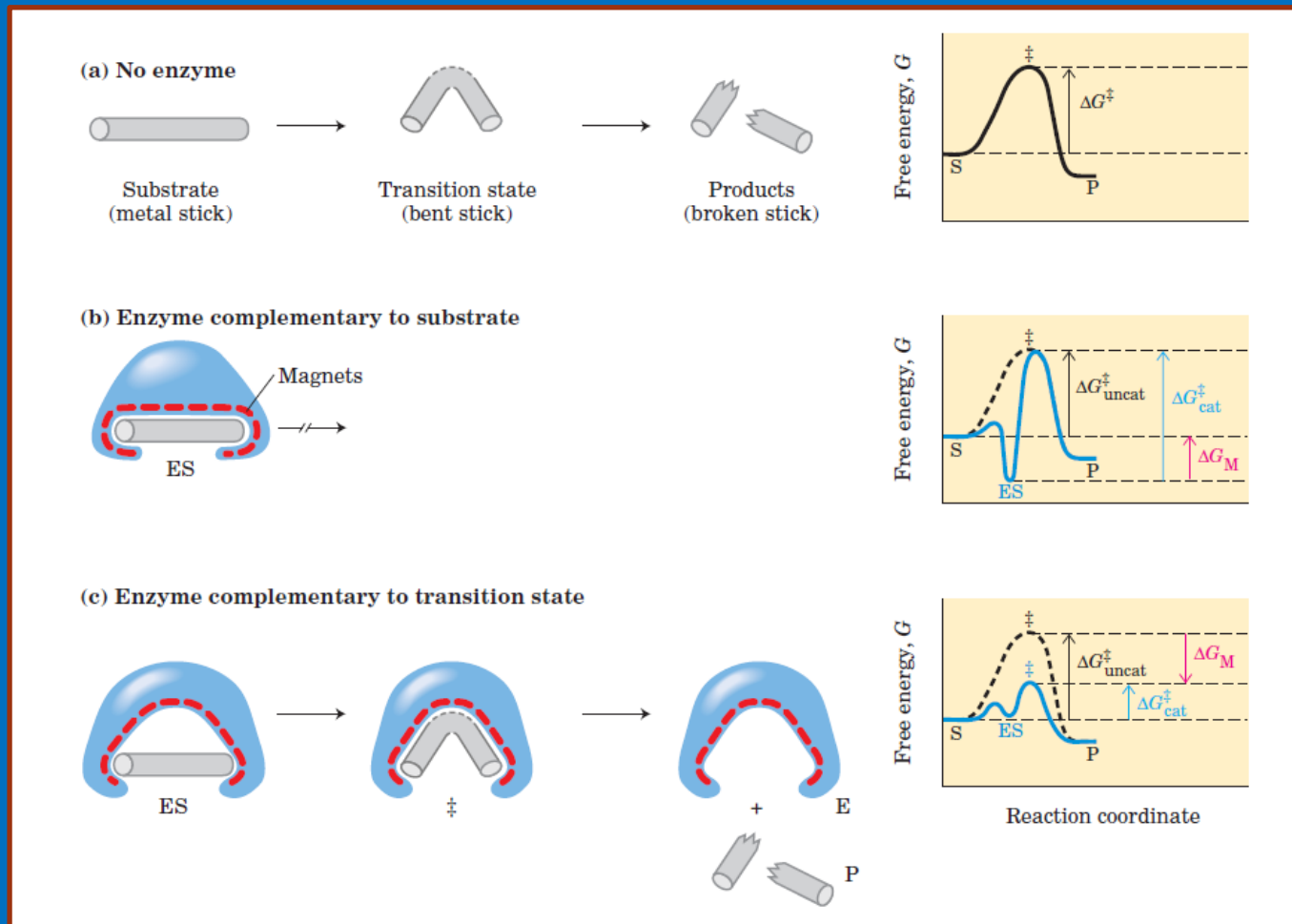
Energia livre de Gibbs (ΔG)

- Para entendermos as reações bioquímicas, precisamos primeiro apreciar a importância do equilíbrio químico e da energia de ativação de uma reação química.
- A energia de ativação de uma reação química é como uma barreira energética que precisa ser vencida para que uma reação ocorra.
- Se não existissem barreiras energéticas, compostos complexos reverteriam espontaneamente em moléculas mais simples e nunca existiriam.
- As enzimas são capazes de diminuir esta barreira energética de forma seletiva para determinadas reação.



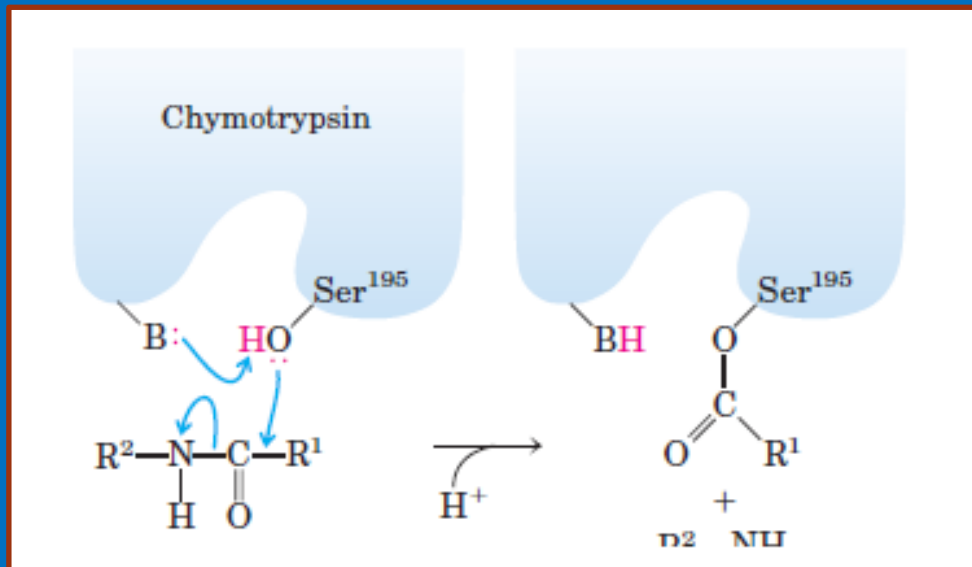
Enzima e os estados de transição

- Enzimas mimetizam estados de transição de uma reação.
- Intermediários de uma reação são moléculas formadas durante o processo que tenham um tempo de vida superior ao tempo de vibração de uma ligação química (10^{-13} s)



Grupos catalíticos

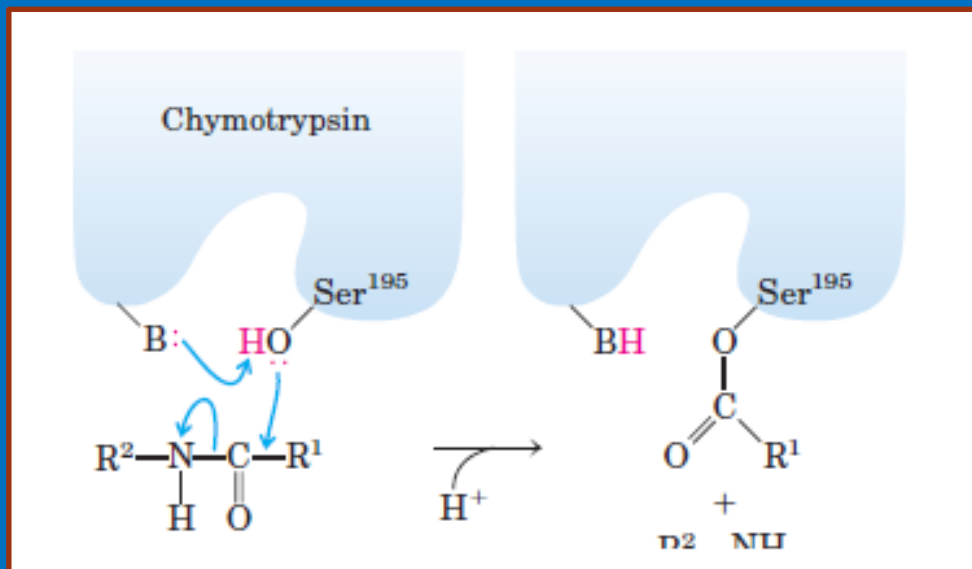
- As reações enzimáticas podem ser classificadas de acordo com o mecanismo utilizado.
- Uma vez ligado à enzima, o substrato pode sofrer ataques por grupos reativos de cadeias laterais de aminoácidos estrategicamente posicionados no sítio ativo.
- Catálises do tipo ácido-base, catálise covalente, ou catálise por íons metálicos, são alguns exemplos de possíveis reações.



Amino acid residues	General acid form (proton donor)	General base form (proton acceptor)
Glu, Asp	R-COOH	R-COO ⁻
Lys, Arg	R- $\overset{\text{H}}{\underset{\text{H}}{\text{N}}}$	R- $\ddot{\text{N}}\text{H}_2$
Cys	R-SH	R-S ⁻
His	R-C=CH HN-C-NH	R-C=CH HN-C-N:
Ser	R-OH	R-O ⁻
Tyr	R-C ₆ H ₄ -OH	R-C ₆ H ₄ -O ⁻

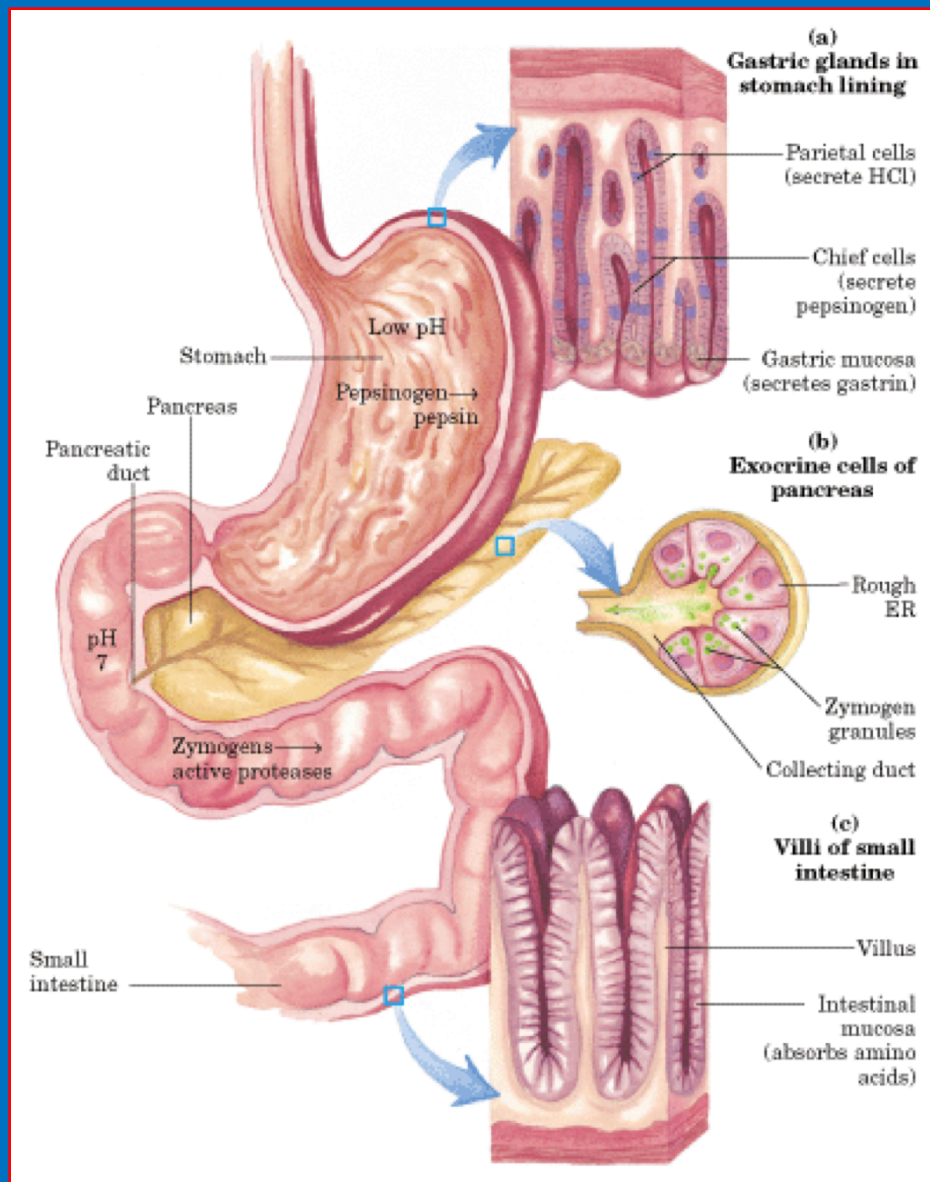
Grupos catalíticos

- Catálises do tipo ácido-base, catálise covalente, ou catálise por íons metálicos, são alguns exemplos de possíveis reações.
- As reações do tipo ácido-base são, de fato, as reações enzimáticas mais comuns.
- As catálises covalentes ocorrem quando há a formação de uma ligação covalente do substrato (ou intermediário) à enzima.



Amino acid residues	General acid form (proton donor)	General base form (proton acceptor)
Glu, Asp	R-COOH	R-COO ⁻
Lys, Arg	R- $\overset{\text{H}}{\underset{\text{H}}{\text{N}}}$	R- $\ddot{\text{N}}\text{H}_2$
Cys	R-SH	R-S ⁻
His	R-C=CH HN-C-NH	R-C=CH HN-C-N:
Ser	R-OH	R-O ⁻
Tyr	R-C ₆ H ₄ -OH	R-C ₆ H ₄ -O ⁻

A absorção dos aminoácidos é feita no intestino



Proteases:

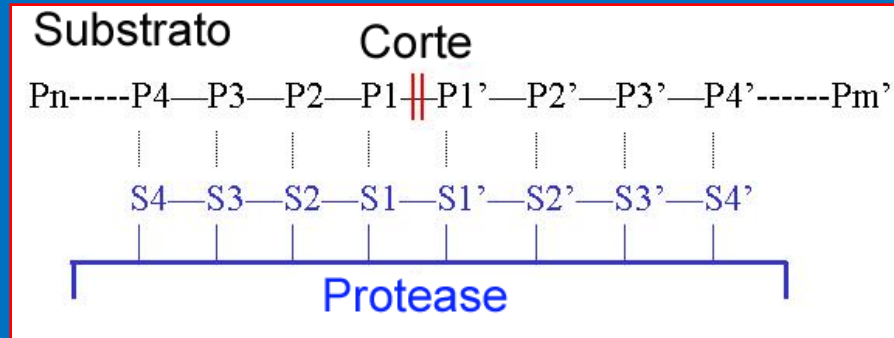
- Serine proteases
- Threonine proteases
- Cysteine proteases
- Aspartate proteases
- Metalloproteases
- Glutamic acid proteases

Endopeptidases, clivam polipeptídios no meio da cadeia.

Aminopeptidases, removem aminoácido partindo da extremidade amino-terminal.

Carboxipeptidases, removem aminoácidos a partir da extremidade carboxi-terminal.

Proteases



Pepsina, encontrada no suco gástrico, cliva, preferencialmente, polipeptídios onde P₁ ou P₁' são Phe, Tyr, Trp e Leu. Os aminoácidos Arg, Lys e His nas posições P₃ e Arg em P₁ inibem a enzima. A enzima é mais específica em pH 1.3 e perde a especificidade em pH >2.

Tripsina, produzida pelo pâncreas, e secretada no intestino, cliva cadeias polipeptídicas onde P₁ é Arg ou Lys. P₁' não pode ser Pro.

Proteases

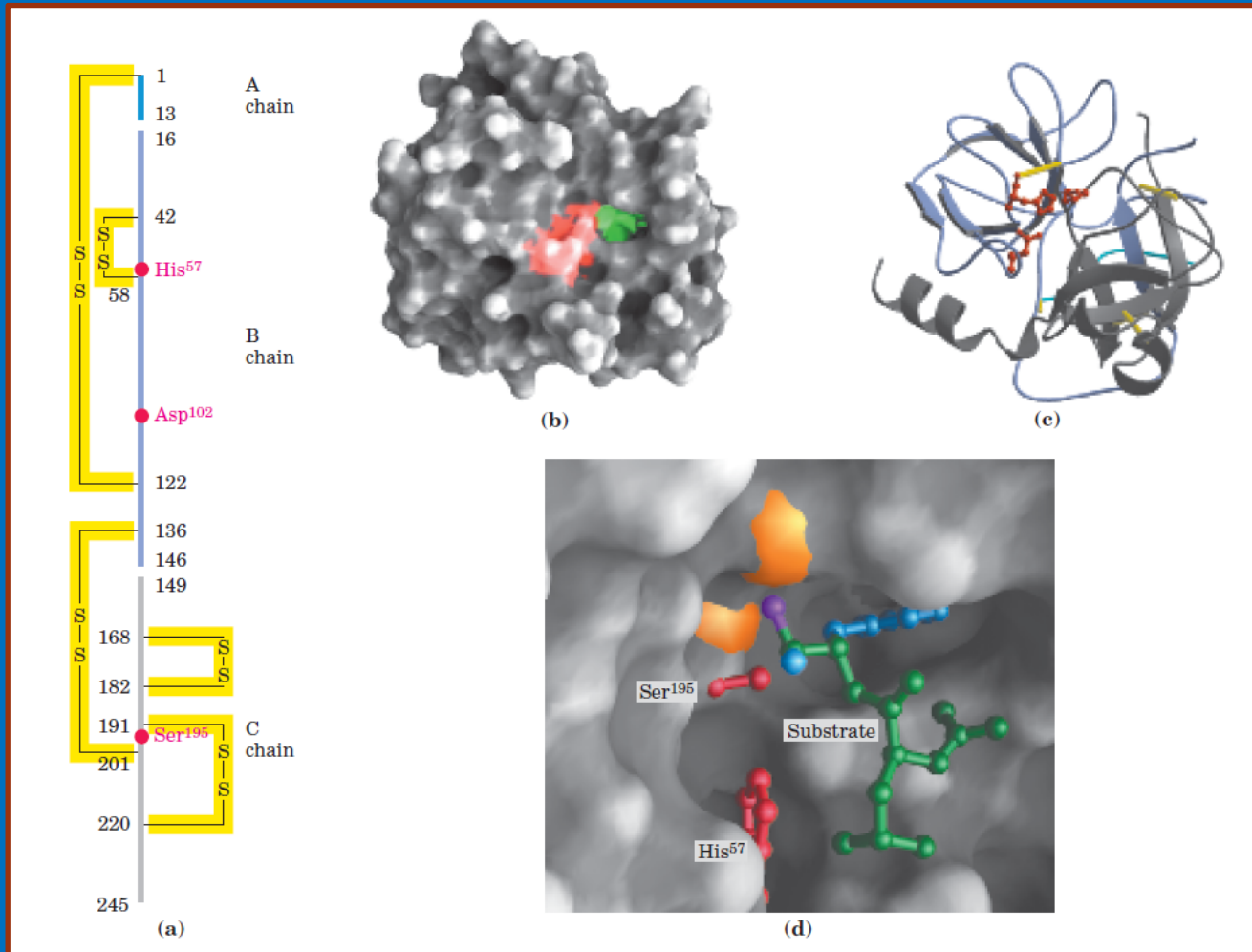
Cleavage sites

The following enzymes potentially cleave when the respective compositions of the cleavage sites are found. However, there also are some **exceptions**.

Enzyme name	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'
Arg-C proteinase	-	-	-	R	-	-
Asp-N endopeptidase	-	-	-	-	D	-
BNPS-Skatole	-	-	-	W	-	-
Caspase 1	F, W, Y, or L	-	H, A or T	D	not P, E, D, Q, K or R	-
Caspase 2	D	V	A	D	not P, E, D, Q, K or R	-
Caspase 3	D	M	Q	D	not P, E, D, Q, K or R	-
Caspase 4	L	E	V	D	not P, E, D, Q, K or R	-
Caspase 5	L or W	E	H	D	-	-
Caspase 6	V	E	H or I	D	not P, E, D, Q, K or R	-
Caspase 7	D	E	V	D	not P, E, D, Q, K or R	-
Caspase 8	I or L	E	T	D	not P, E, D, Q, K or R	-
Caspase 9	L	E	H	D	-	-
Caspase 10	I	E	A	D	-	-
Chymotrypsin-high specificity (C-term to [FYW], not before P)	-	-	-	F or Y	not P	-
	-	-	-	W	not M or P	-
	-	-	-	F, L or Y	not P	-
Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P)	-	-	-	W	not M or P	-
	-	-	-	M	not P or Y	-
	-	-	-	H	not D, M, P or W	-
Clostripain (Clostridiopeptidase B)	-	-	-	R	-	-
CNBr	-	-	-	M	-	-
Enterokinase	D or N	D or N	D or N	K	-	-
Factor Xa	A, F, G, I, L, T, V or M D or E		G	R	-	-
Formic acid	-	-	-	D	-	-
Glutamyl endopeptidase	-	-	-	E	-	-
GranzymeB	I	E	P	D	-	-
Hydroxylamine	-	-	-	N	G	-
Iodosobenzoic acid	-	-	-	W	-	-
LysC	-	-	-	K	-	-
NTCB (2-nitro-5-thiocyanobenzoic acid)	-	-	-	-	C	-
Pepsin (pH1.3)	-	not H, K, or R	not P	not R	F, L, W or Y	not P
	-	not H, K, or R	not P	F, L, W or Y	-	not P
Pepsin (pH>2)	-	not H, K or R	not P	not R	F or L	not P
	-	not H, K or R	not P	F or L	-	not P
Proline-endopeptidase	-	-	H, K or R	P	not P	-
Proteinase K	-	-	-	A, E, F, I, L, T, V, W or Y	-	-
Staphylococcal peptidase I	-	-	not E	E	-	-
Thermolysin	-	-	-	not D or E	A, F, I, L, M or V	-
	-	-	G	R	G	-
Thrombin	A, F, G, I, L, T, V or M A, F, G, J, L, T, V, W or A P		R	R	not D or E	not DE
	-	-	-	K or R	not P	-
Trypsin (please note the exceptions!)	-	-	W	K	P	-
	-	-	M	R	P	-
Enzyme name	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'

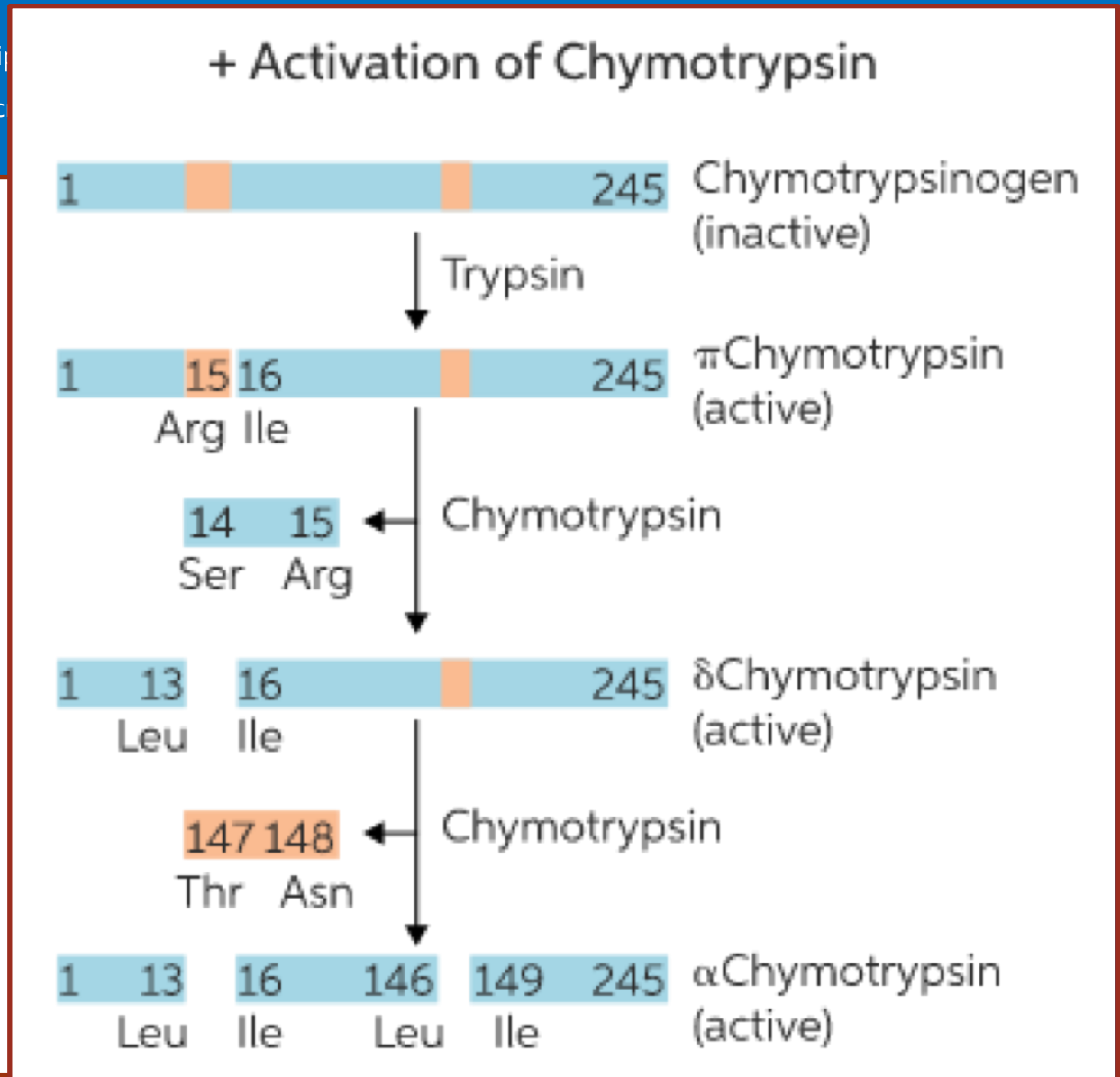
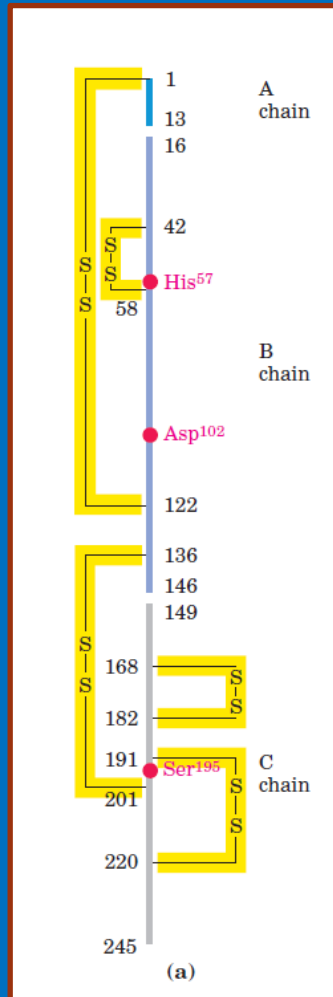
As serinas proteases: a quimiotripsina

- A quimiotripsina é uma das principais enzimas digestivas.
- Ela é produzida no pâncreas e secretada no intestino.



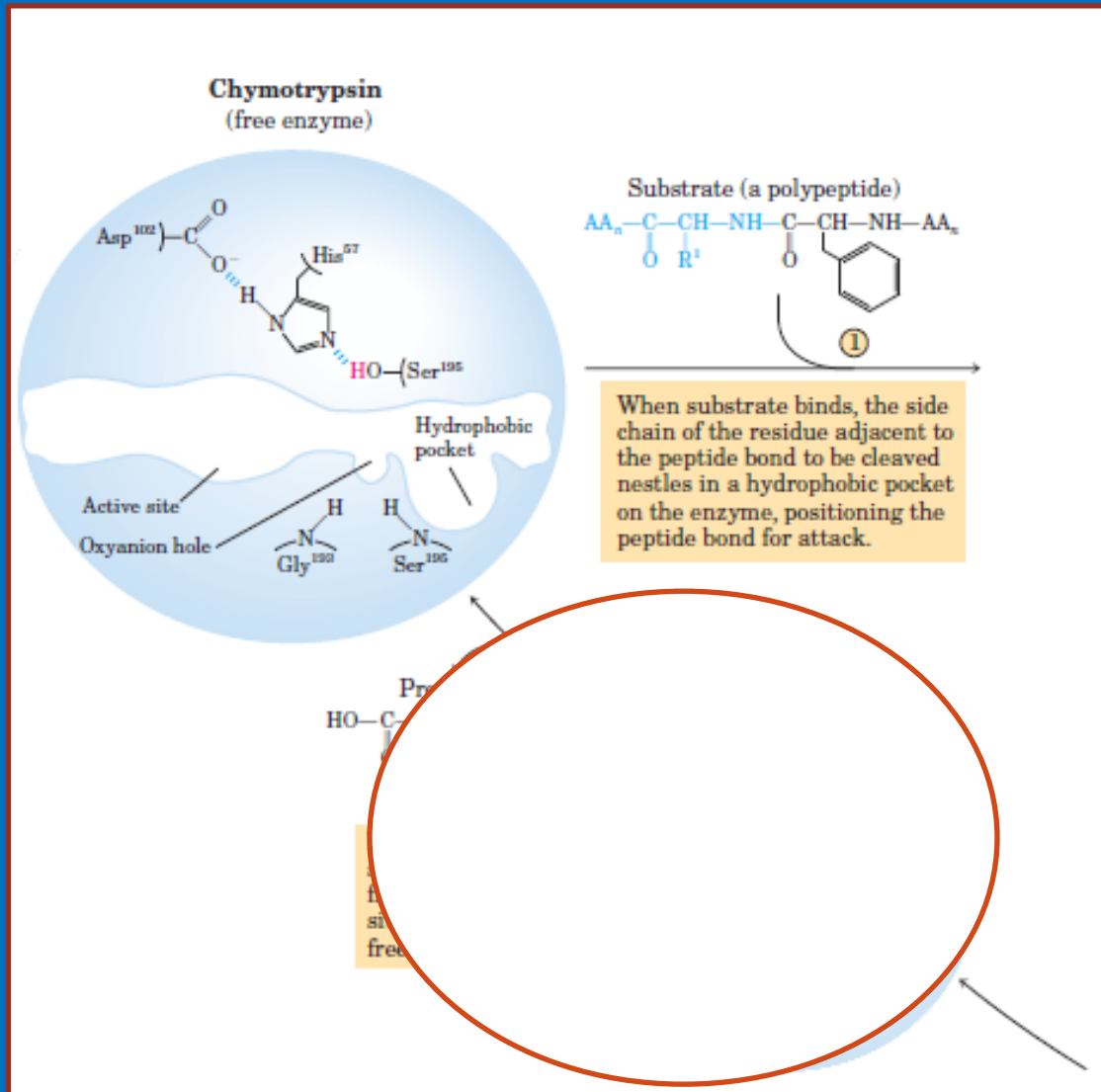
As serinas proteases: a quimiotripsina

- A quimiotripsina é uma das principais serinas proteases.
- Ela é produzida no pâncreas e secreta no sangue.



Quimiotripsina

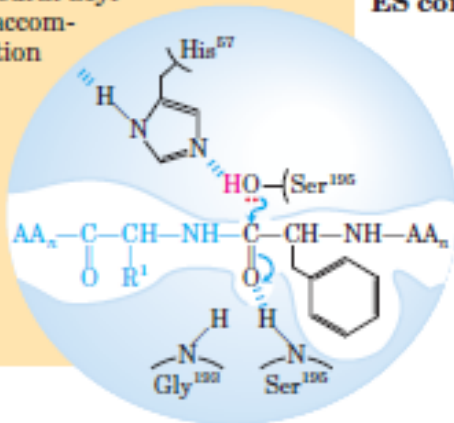
- A hidrolise de peptídios pela quimiotripsina é um exemplo de uma reação ácido-base.



Quimiotripsina

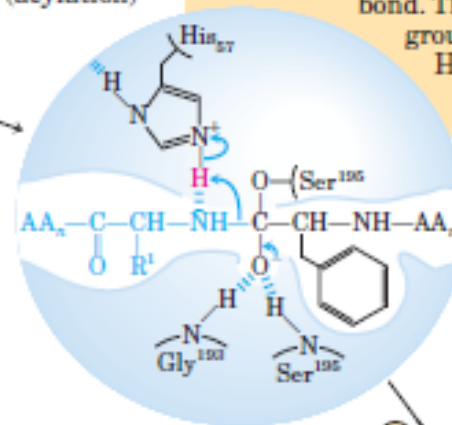
Interaction of Ser¹⁹⁶ and His⁵⁷ generates a strongly nucleophilic alkoxide ion on Ser¹⁹⁶; the ion attacks the peptide carbonyl group, forming a tetrahedral acyl-enzyme. This is accompanied by formation of a short-lived negative charge on the carbonyl oxygen of the substrate, which is stabilized by hydrogen bonding in the oxyanion hole.

ES complex

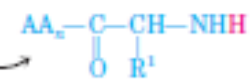


Instability of the negative charge on the substrate carbonyl oxygen leads to collapse of the tetrahedral intermediate; re-formation of a double bond with carbon displaces the bond between carbon and the amino group of the peptide linkage, breaking the peptide bond. The amino leaving group is protonated by His⁵⁷, facilitating its displacement.

Short-lived intermediate (acylation)




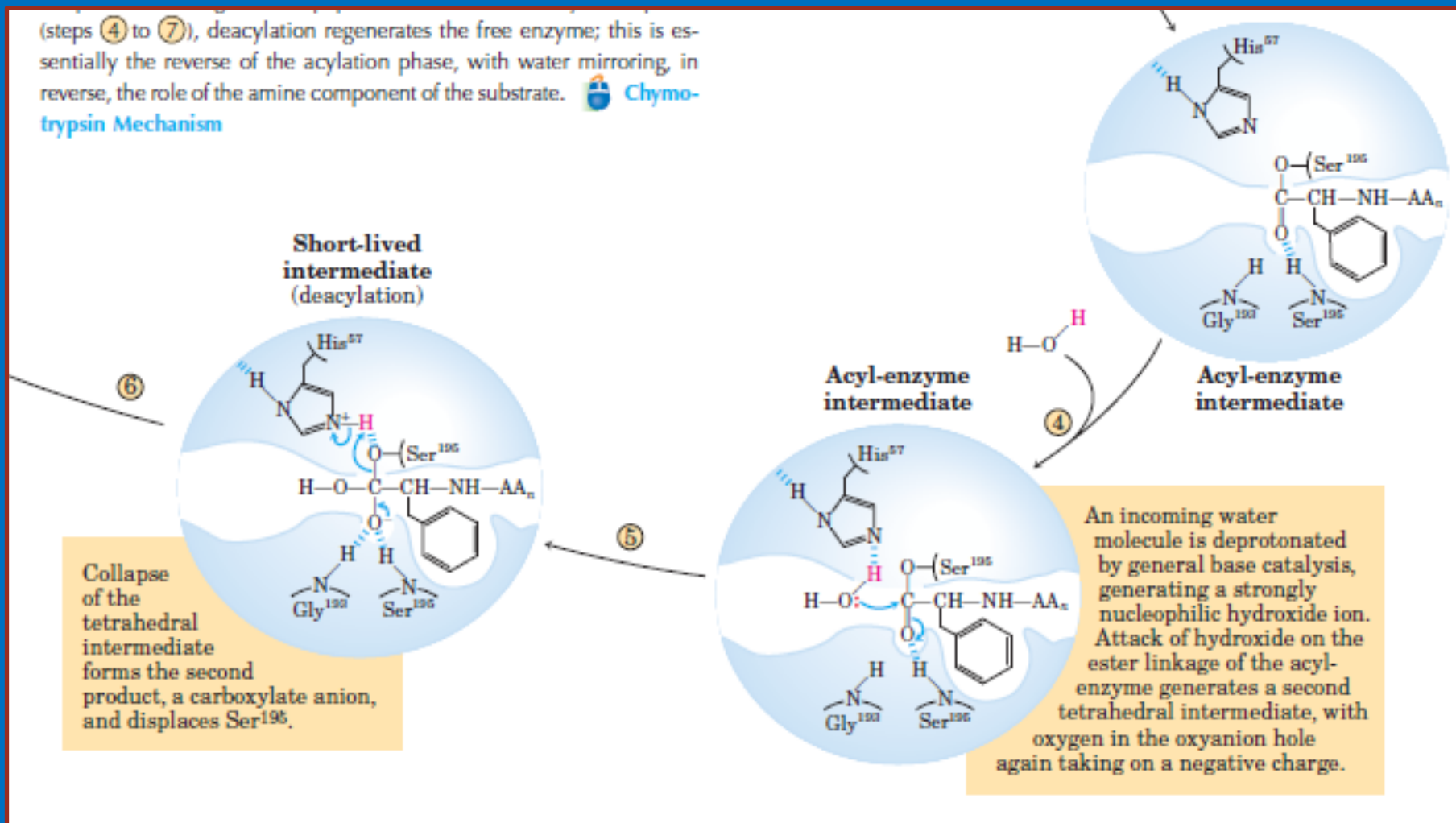
Product 1



MECHANISM FIGURE 6-21 Hydrolytic cleavage of a peptide bond by chymotrypsin. The reaction has two phases. In the acylation phase (steps ① to ③), formation of a covalent acyl-enzyme intermediate is coupled to cleavage of the peptide bond. In the deacylation phase

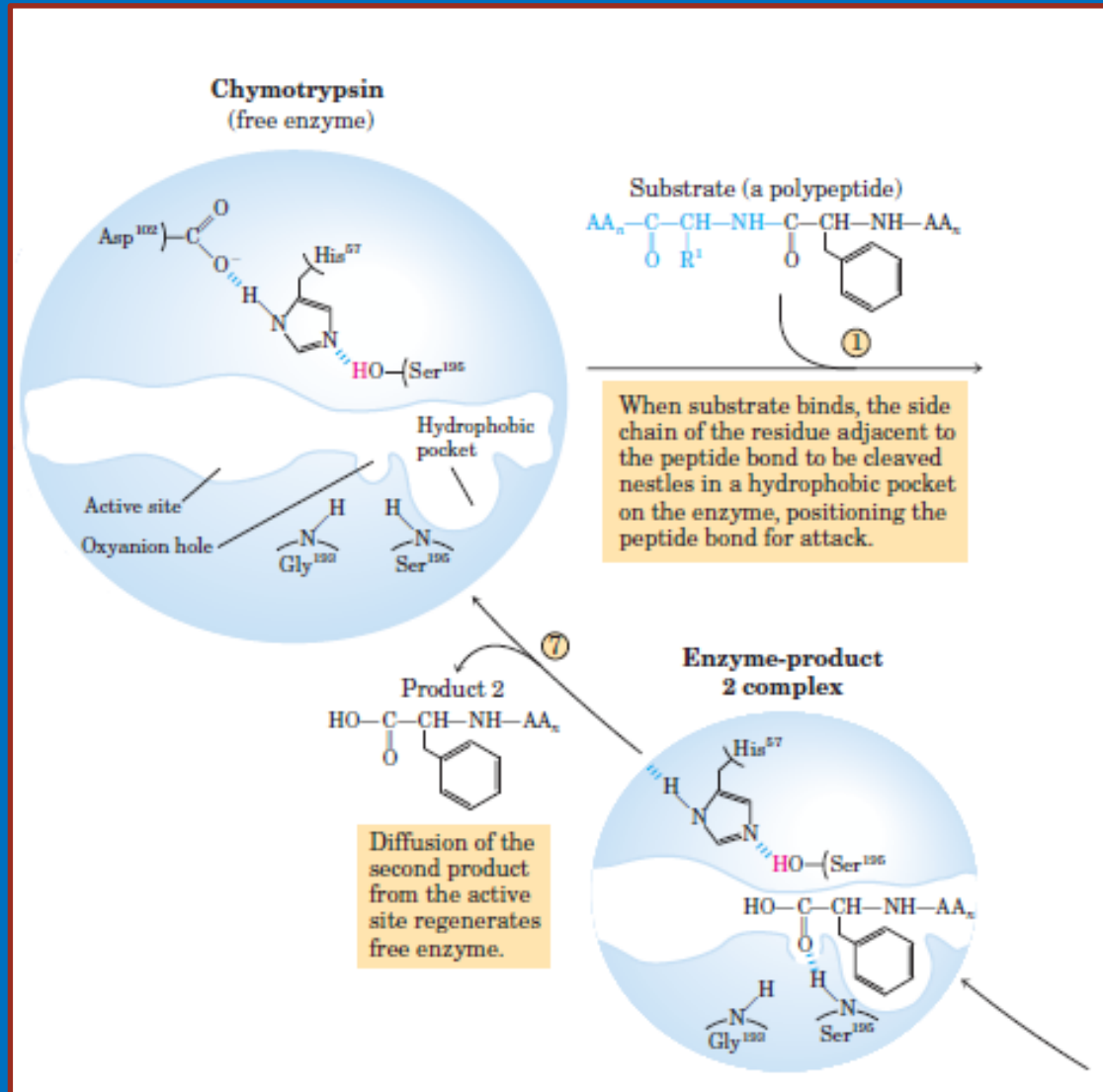
Quimiotripsina

(steps ④ to ⑦), deacylation regenerates the free enzyme; this is essentially the reverse of the acylation phase, with water mirroring, in reverse, the role of the amine component of the substrate.  **Chymotrypsin Mechanism**



Quimiotripsina

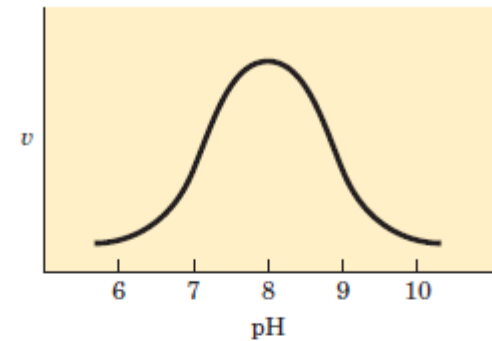
- A hidrolise de peptídios pela quimiotripsina é um exemplo de uma reação ácido-base.



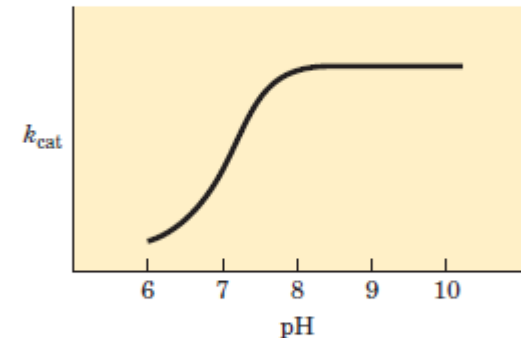
pH

- O pH tem um efeito muito importante sobre as enzimas.
- Tomemos como exemplo, a quimiotripsina, que acabamos de analisar.
- Mudanças de pH abaixo de 7-8, alteram a carga da His⁵⁷, impedindo que o primeiro ataque nucleofílico (Ser¹⁹⁵) ocorra.
- Já pH acima de 8 a 9, altera a carga da Ile16 (amino-terminal da cadeia A), alterando a conformação, e destruindo o sítio de ligação do substrato.
- Portanto, mudanças de pH podem alterar de diversas formas a atividade enzimática.
- De uma forma geral, enzimas têm um pH ótimo numa faixa relativamente estreita, e próximas do pH do meio onde são encontradas.

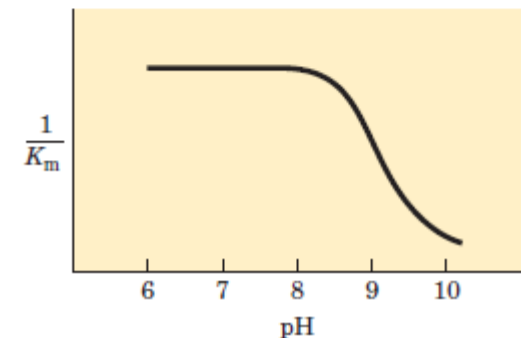
(a)



(b)



(c)





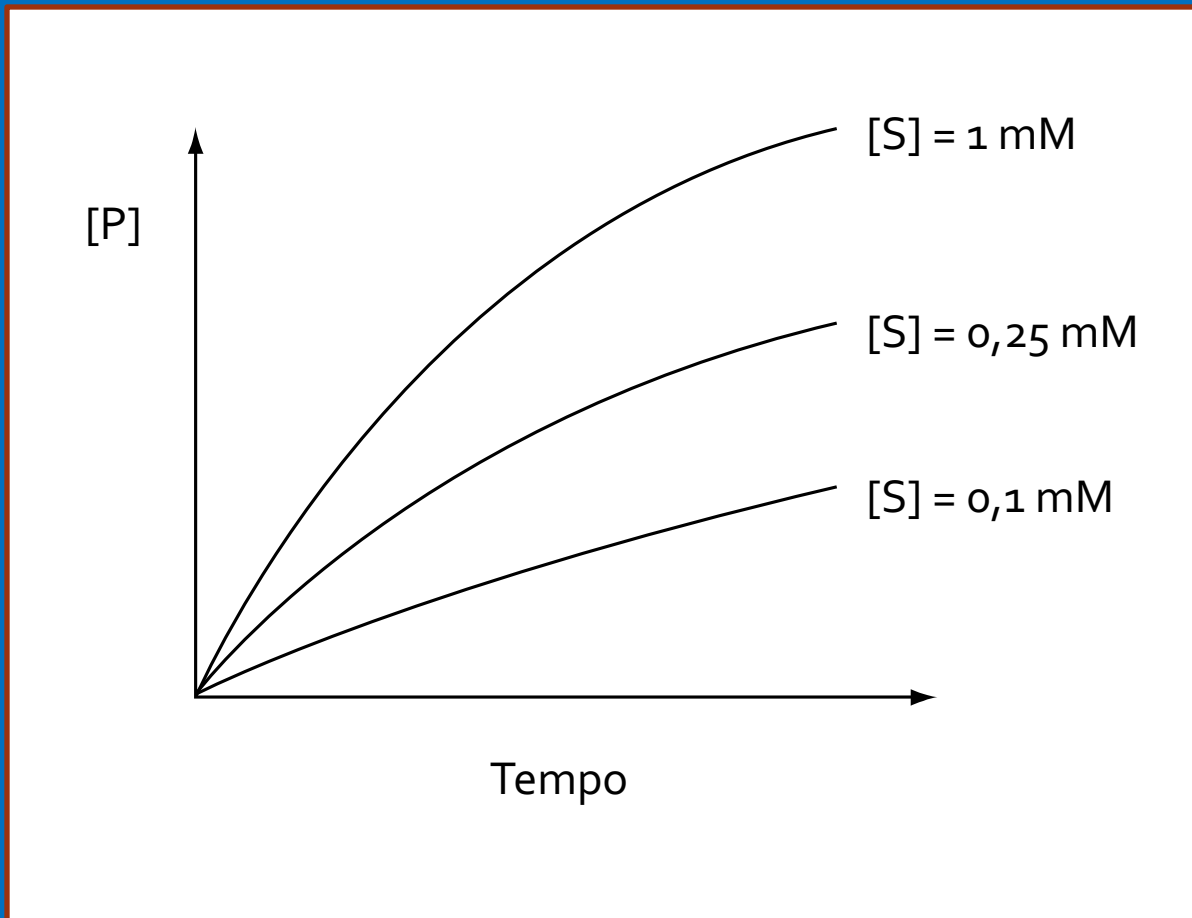
Qual é a diferença entre uma enzima ativa e uma enzima denaturada?



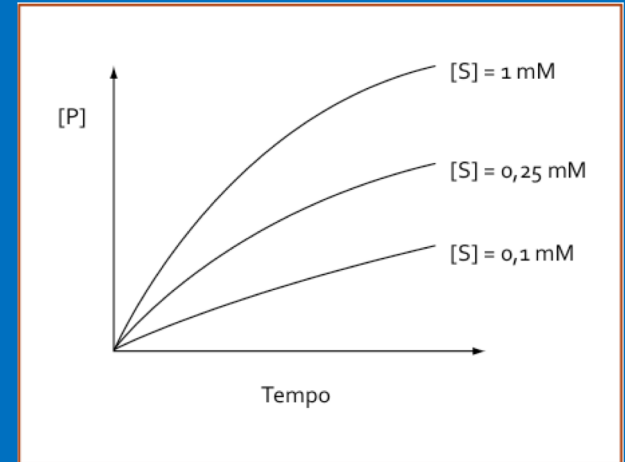
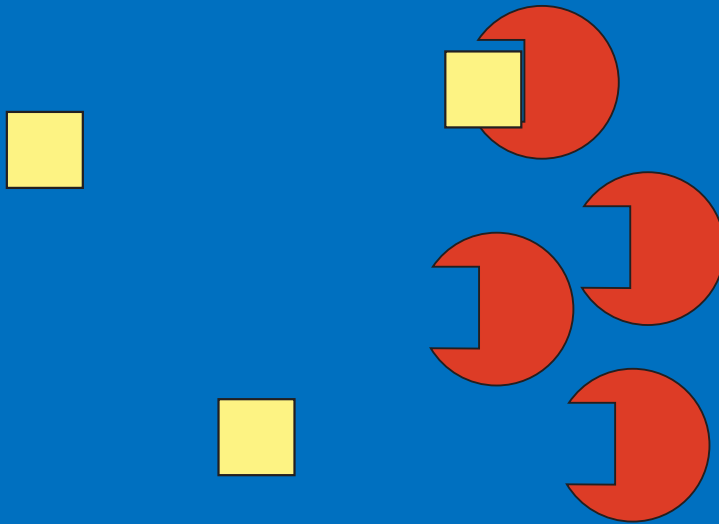
Cinética enzimática

- Estudos sobre a estrutura e função de proteínas são importantes para que pesquisadores compreendam como um enzima funciona.
- Porém, um dos aspectos fundamentais para entender o funcionamento de uma enzima é a sua velocidade de reação e com esta é afetada pelas condições do meio.
- Esses estudos são definidos com cinética enzimática.
- Um dos principais fatores quando estudando uma reação enzimática é a sua VELOCIDADE INICIAL (V_0).
- A V_0 de uma reação é o momento inicial da catálise, quando a concentração de substrato é muito maior do que a de enzima.
- De forma geral, a concentração de uma enzima numa reação enzimática é na ordem de nanomolar, enquanto a do substrato é várias ordens de magnitude maior (micro a milimolar).
- Se analisarmos uma reação enzimática apenas nos seus momentos iniciais (1 ou 2 minutos, ou menos), a variação na concentração de substrato é mínima e pode ser considerada constante.

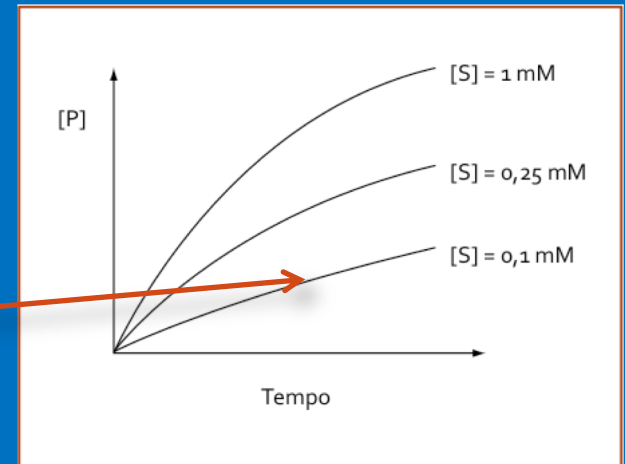
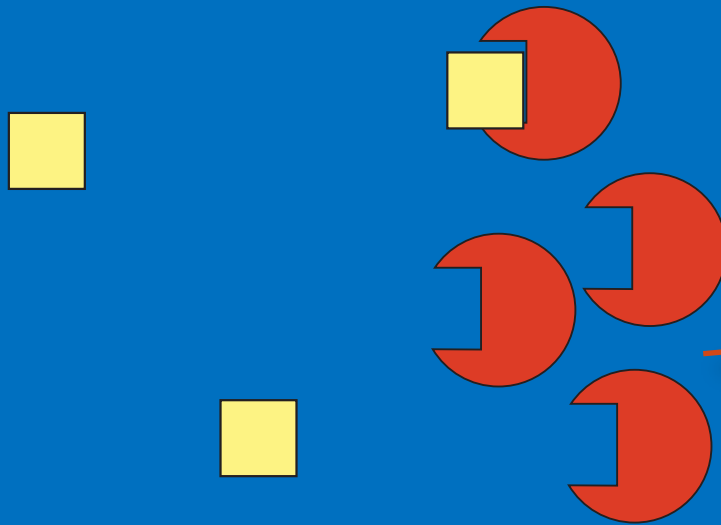
O principal fator que afeta a velocidade de uma reação é a concentração do substrato



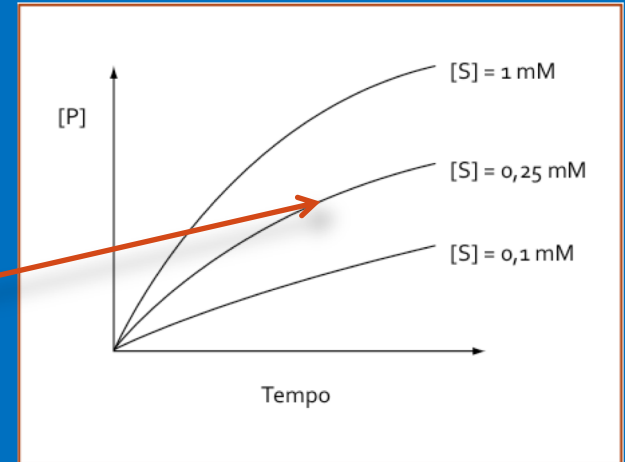
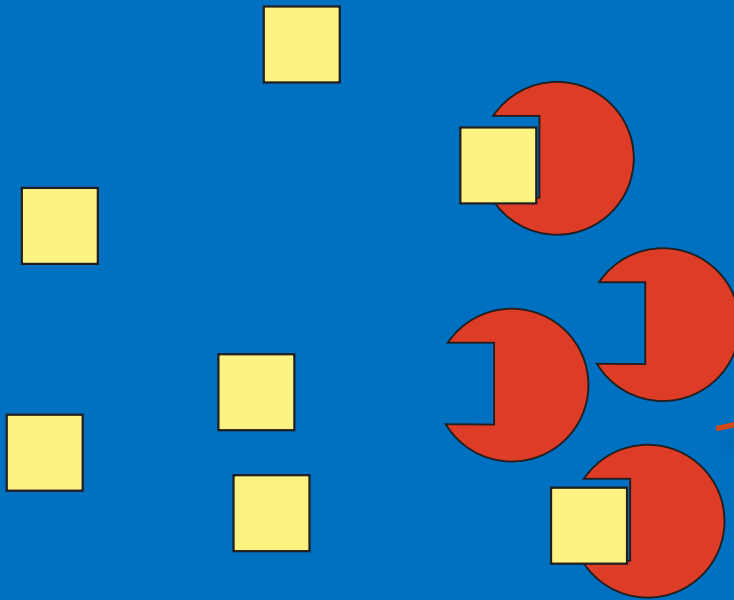
O principal fator que afeta a velocidade de uma reação é a concentração do substrato



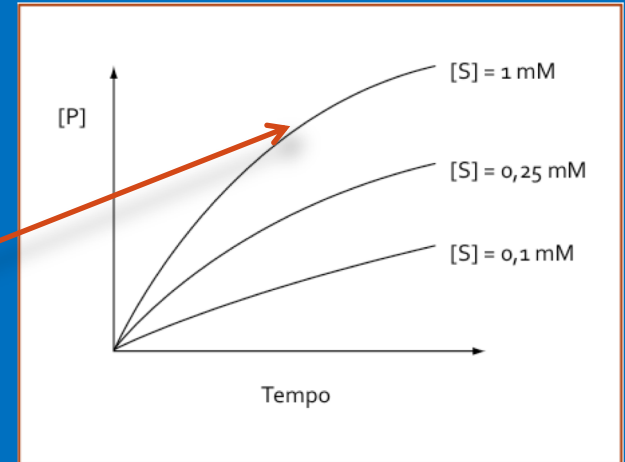
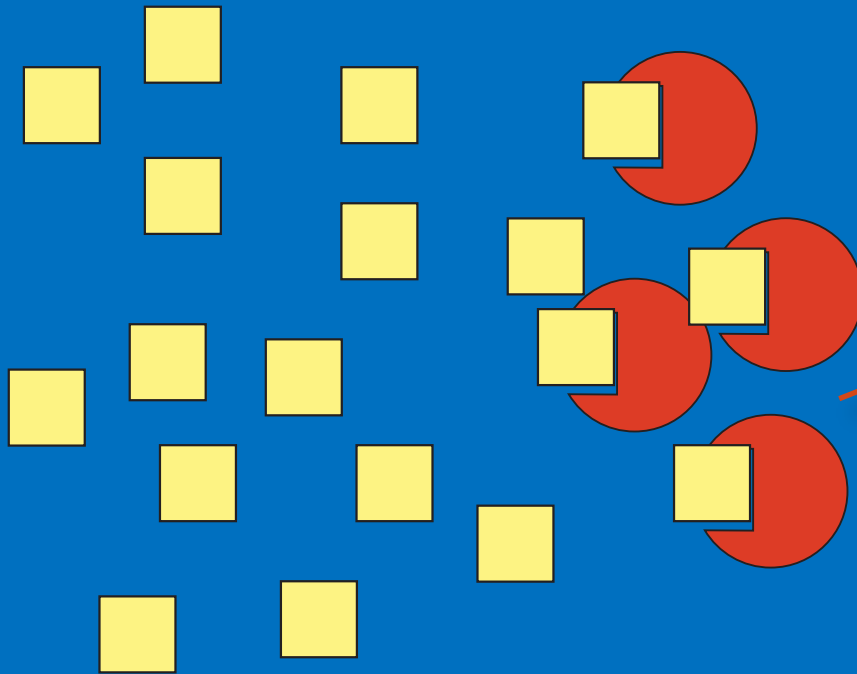
O principal fator que afeta a velocidade de uma reação é a concentração do substrato



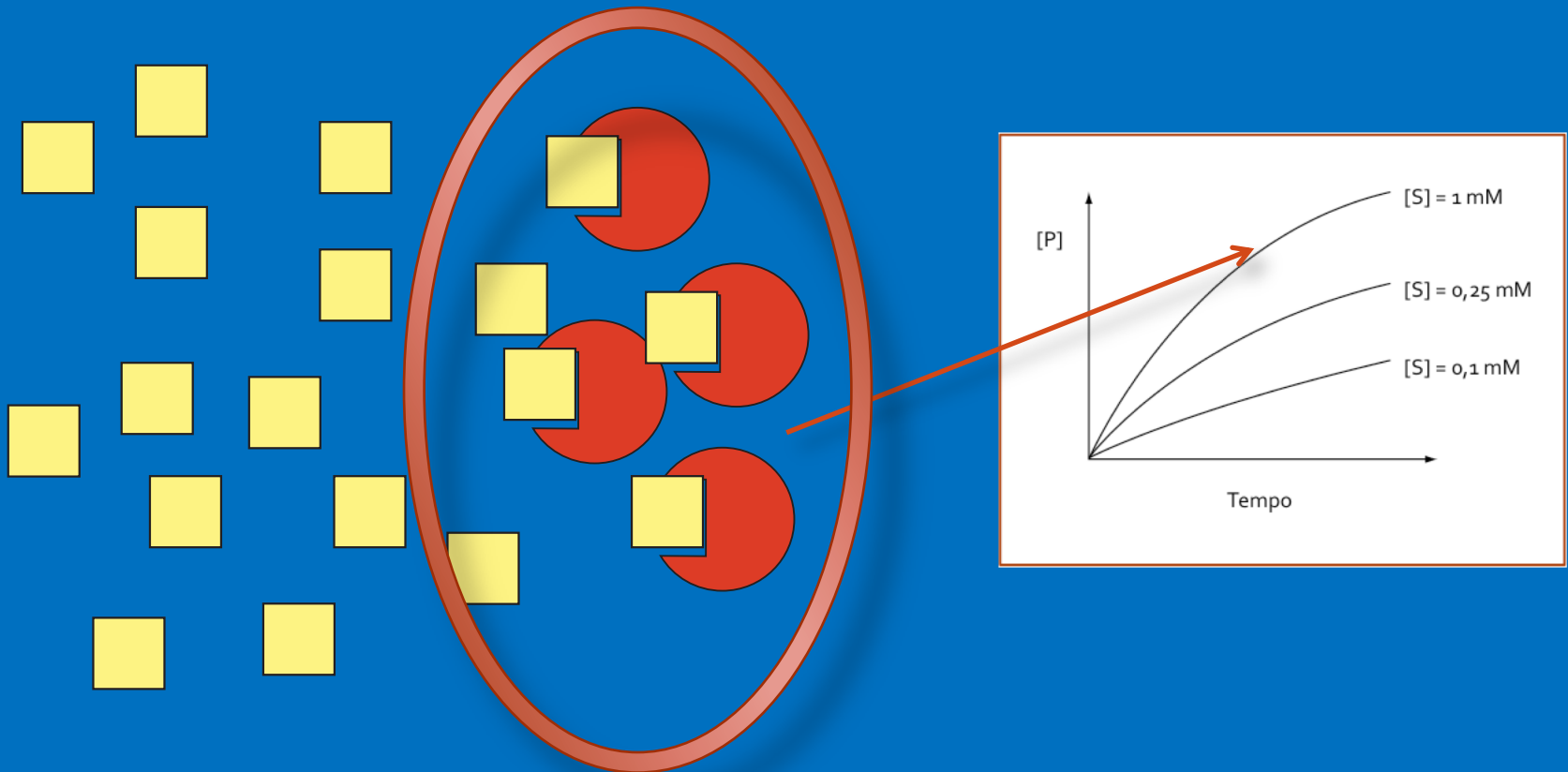
O principal fator que afeta a velocidade de uma reação é a concentração do substrato



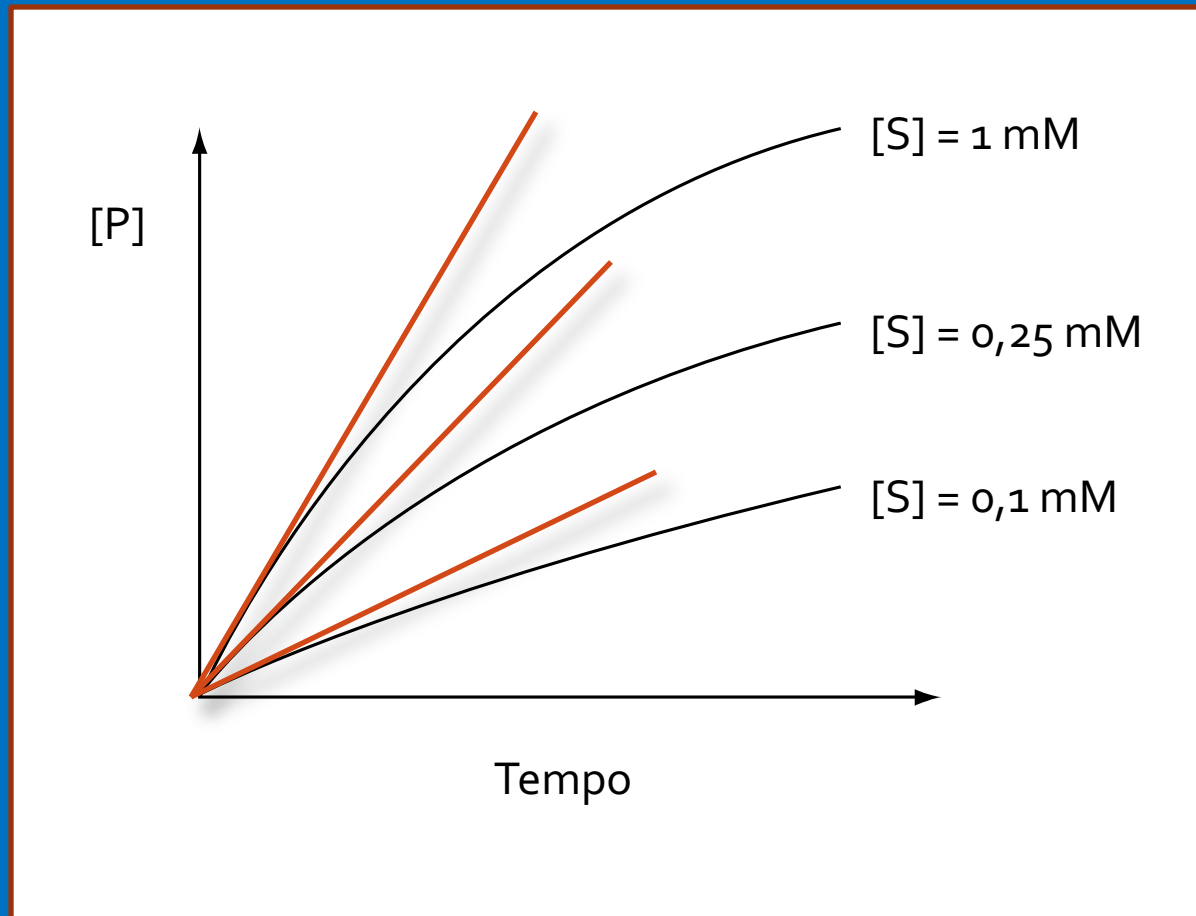
O principal fator que afeta a velocidade de uma reação é a concentração do substrato



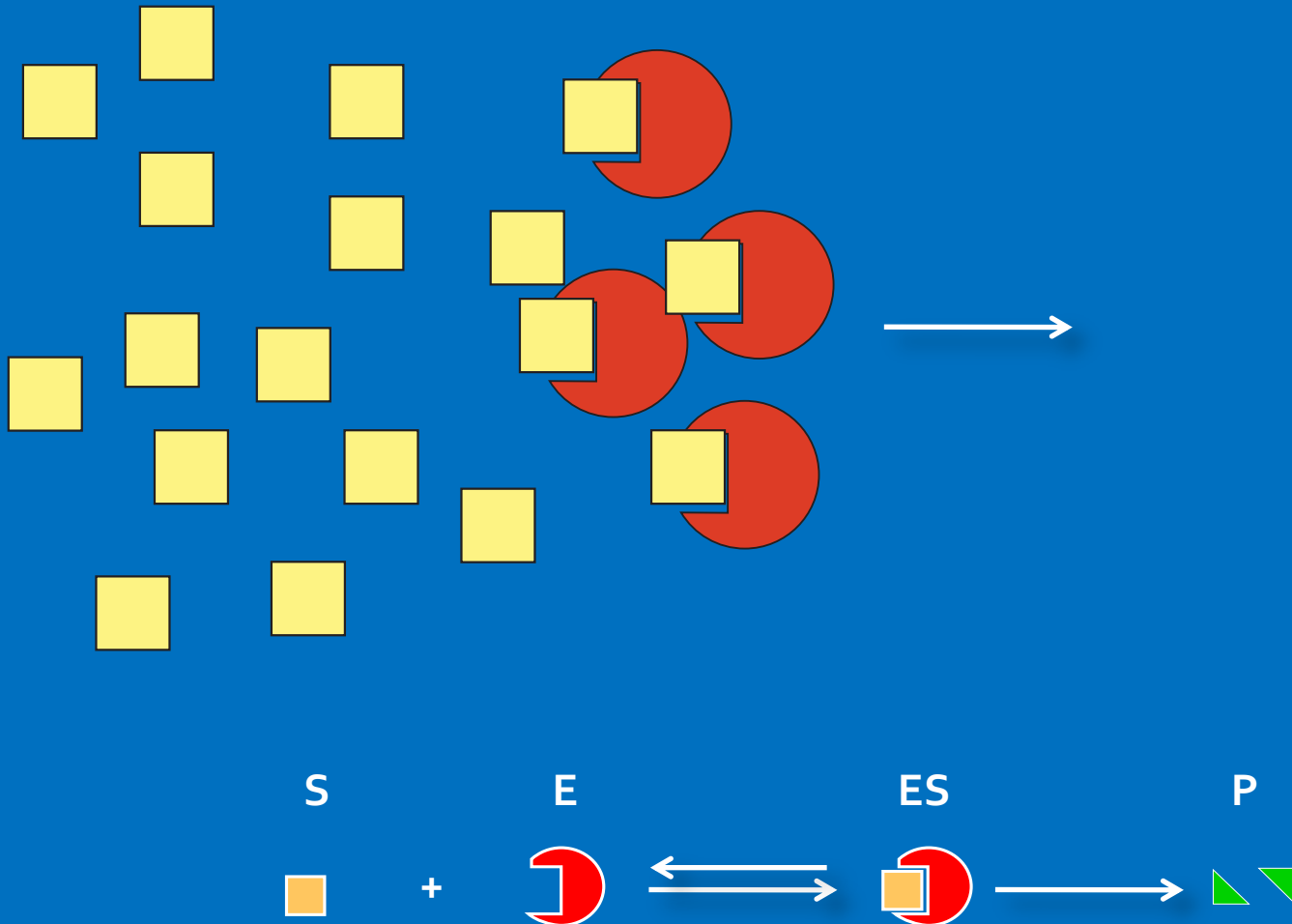
O principal fator que afeta a velocidade de uma reação é a concentração do substrato



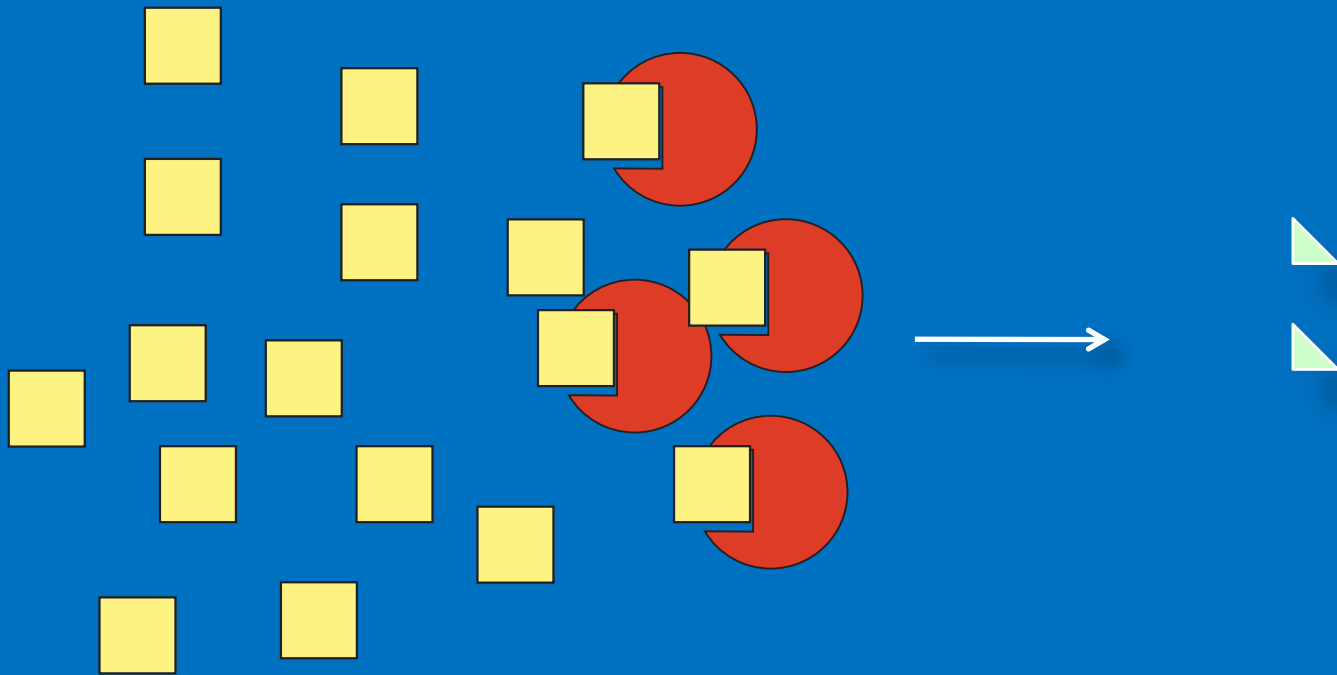
Em cinética enzimática, um parâmetro importante é a velocidade inicial da reação (V_0)



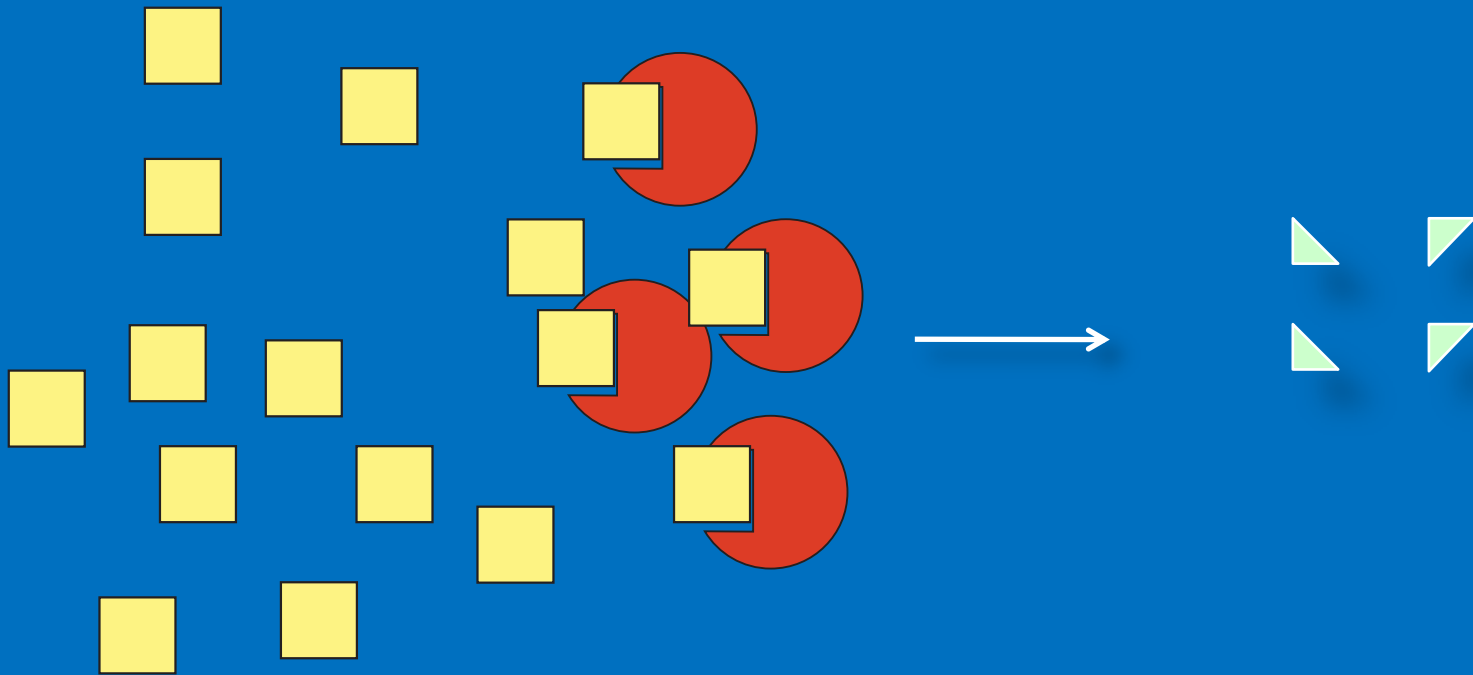
O principal fator que afeta a velocidade de uma reação é a concentração do substrato



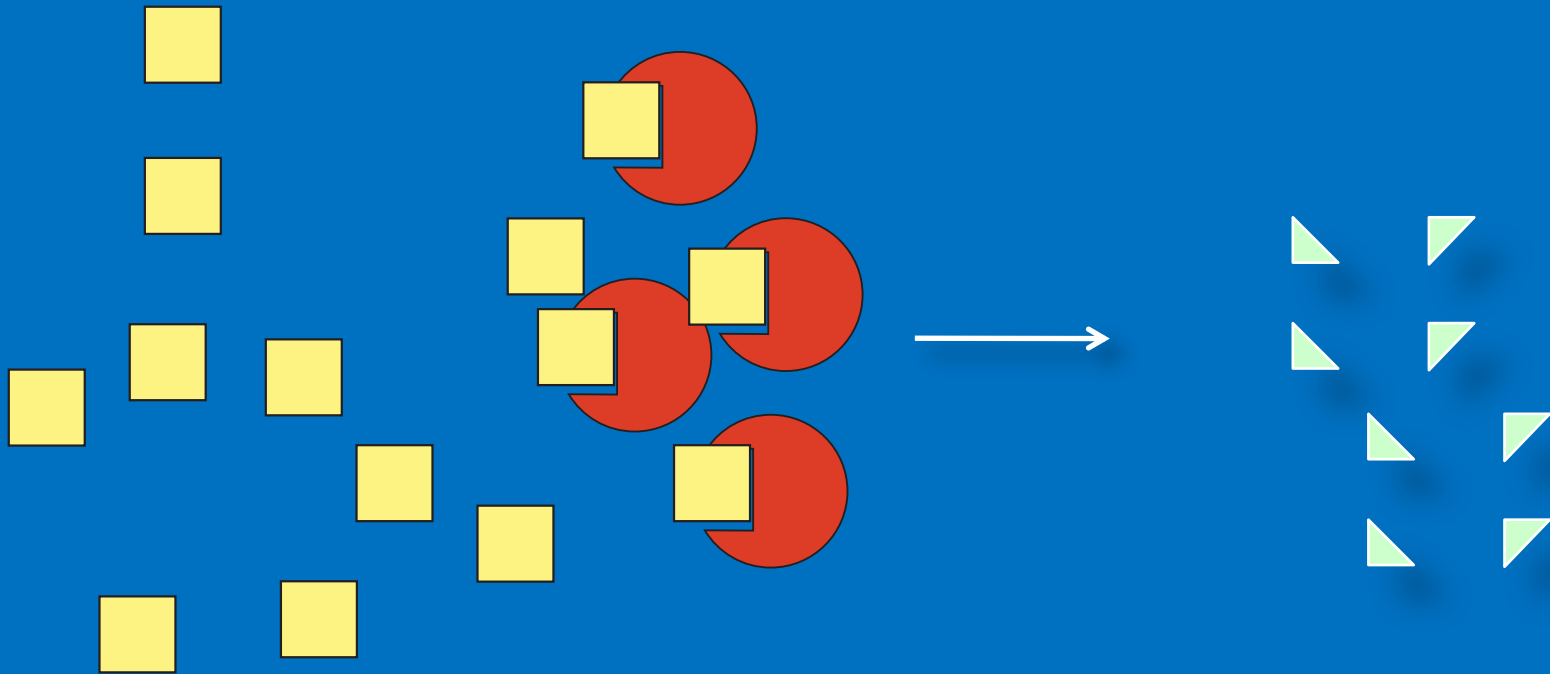
O principal fator que afeta a velocidade de uma reação é a concentração do substrato



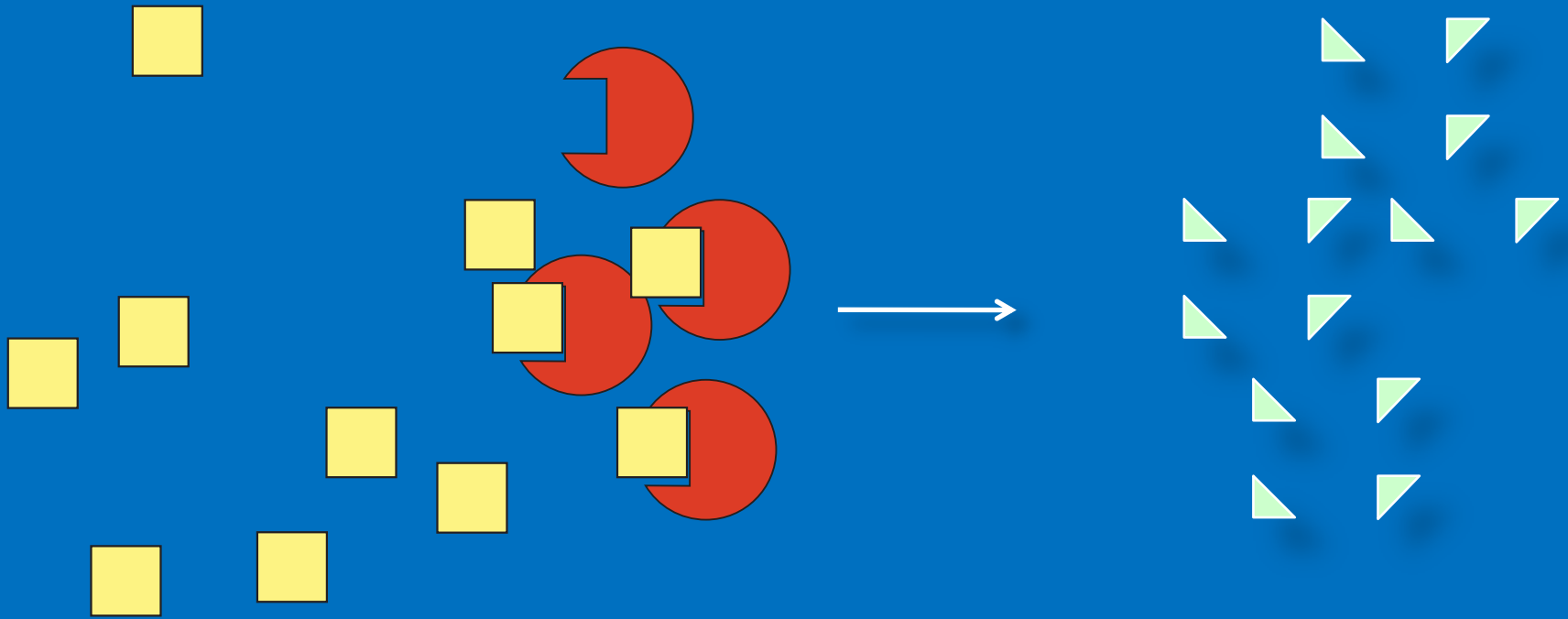
O principal fator que afeta a velocidade de uma reação é a concentração do substrato



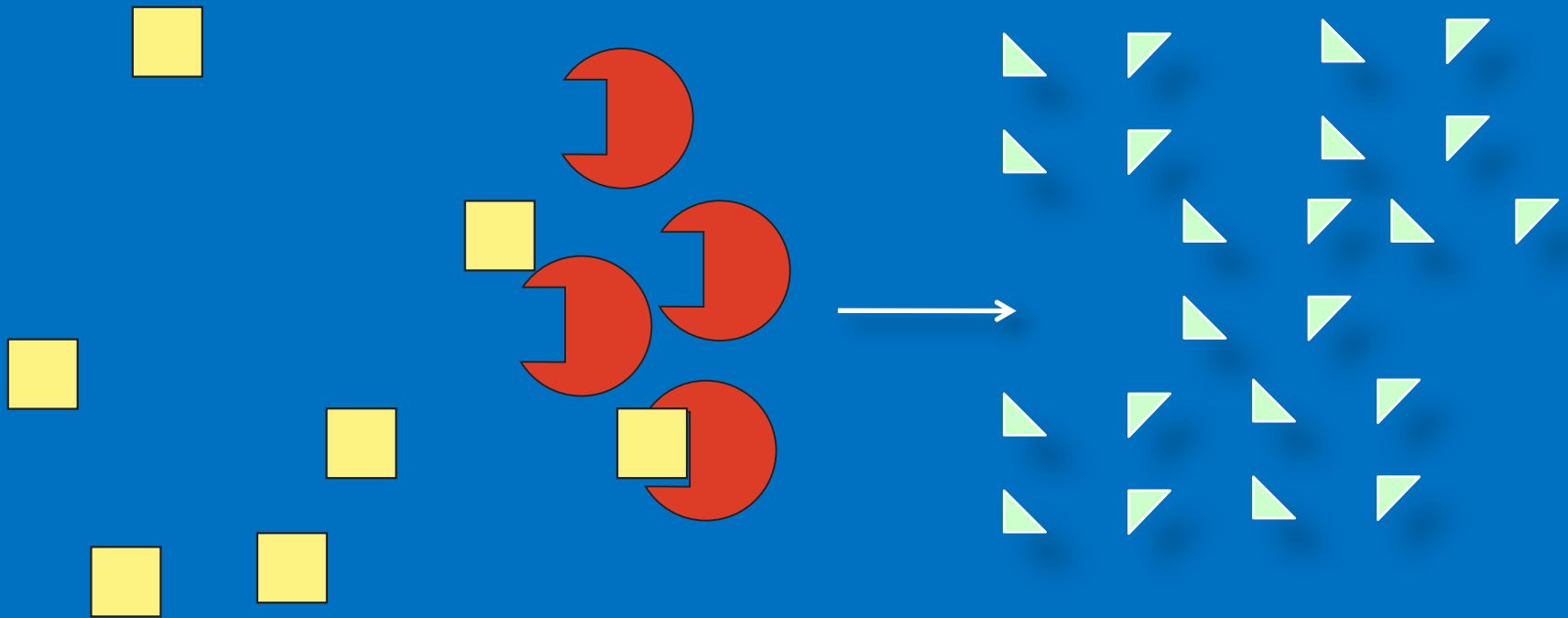
O principal fator que afeta a velocidade de uma reação é a concentração do substrato



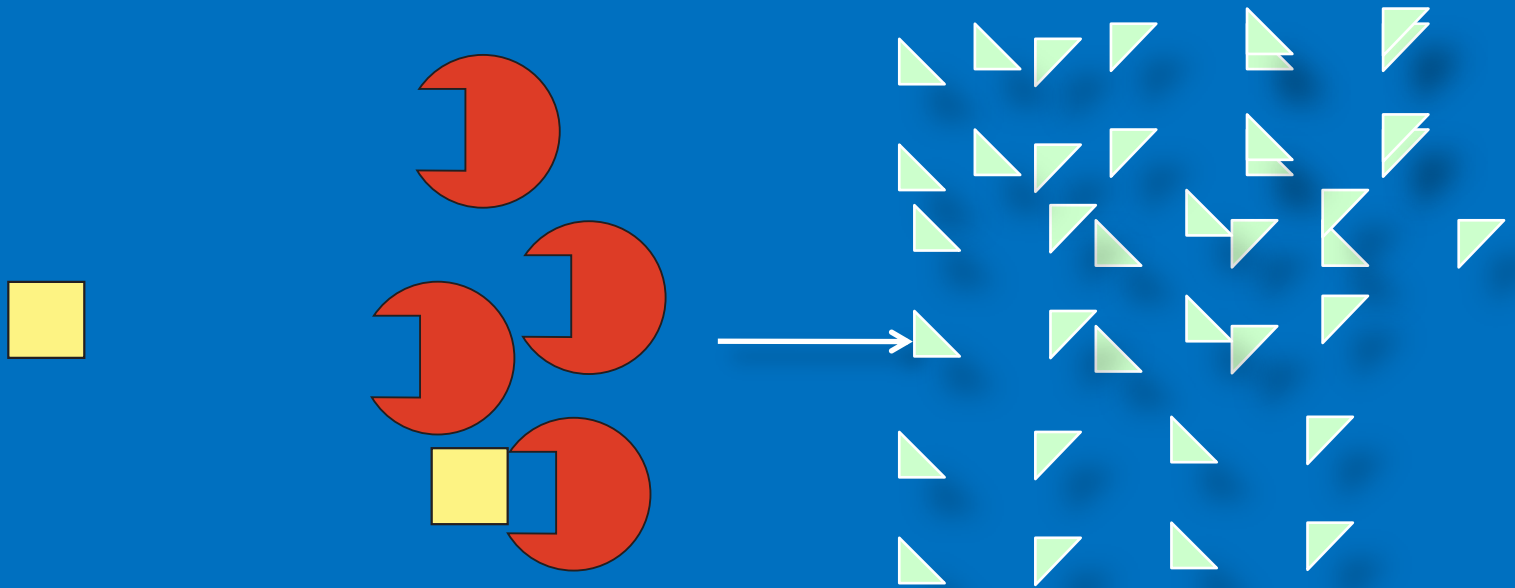
O principal fator que afeta a velocidade de uma reação é a concentração do substrato



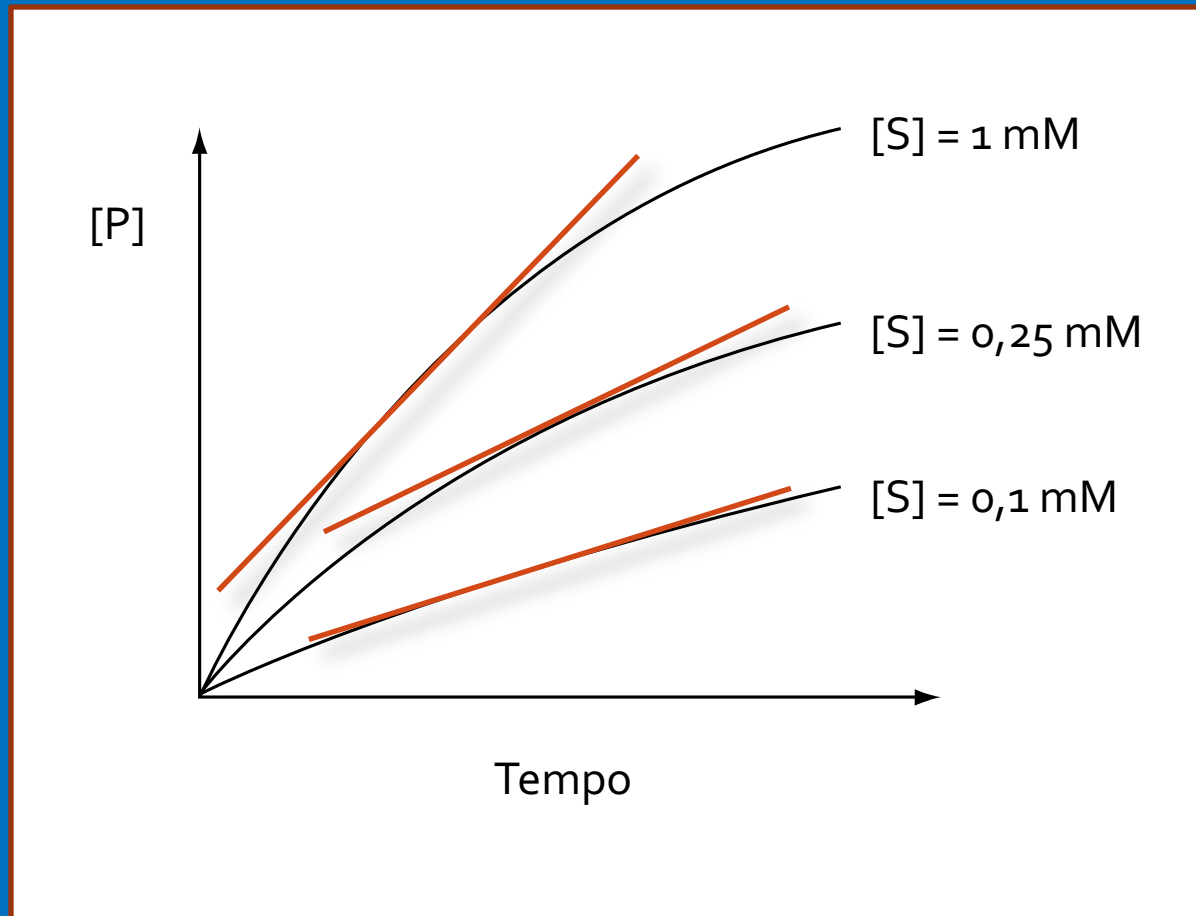
O principal fator que afeta a velocidade de uma reação é a concentração do substrato



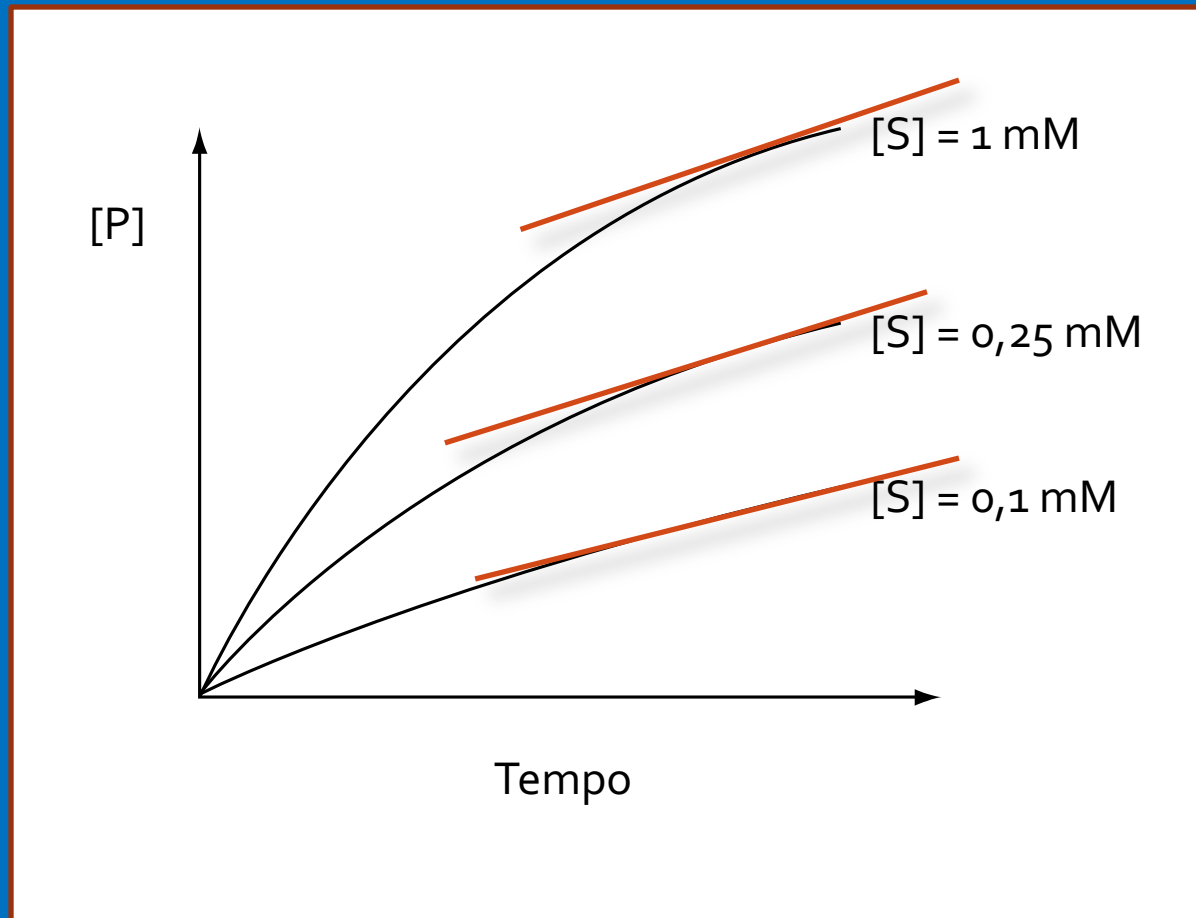
O principal fator que afeta a velocidade de uma reação é a concentração do substrato



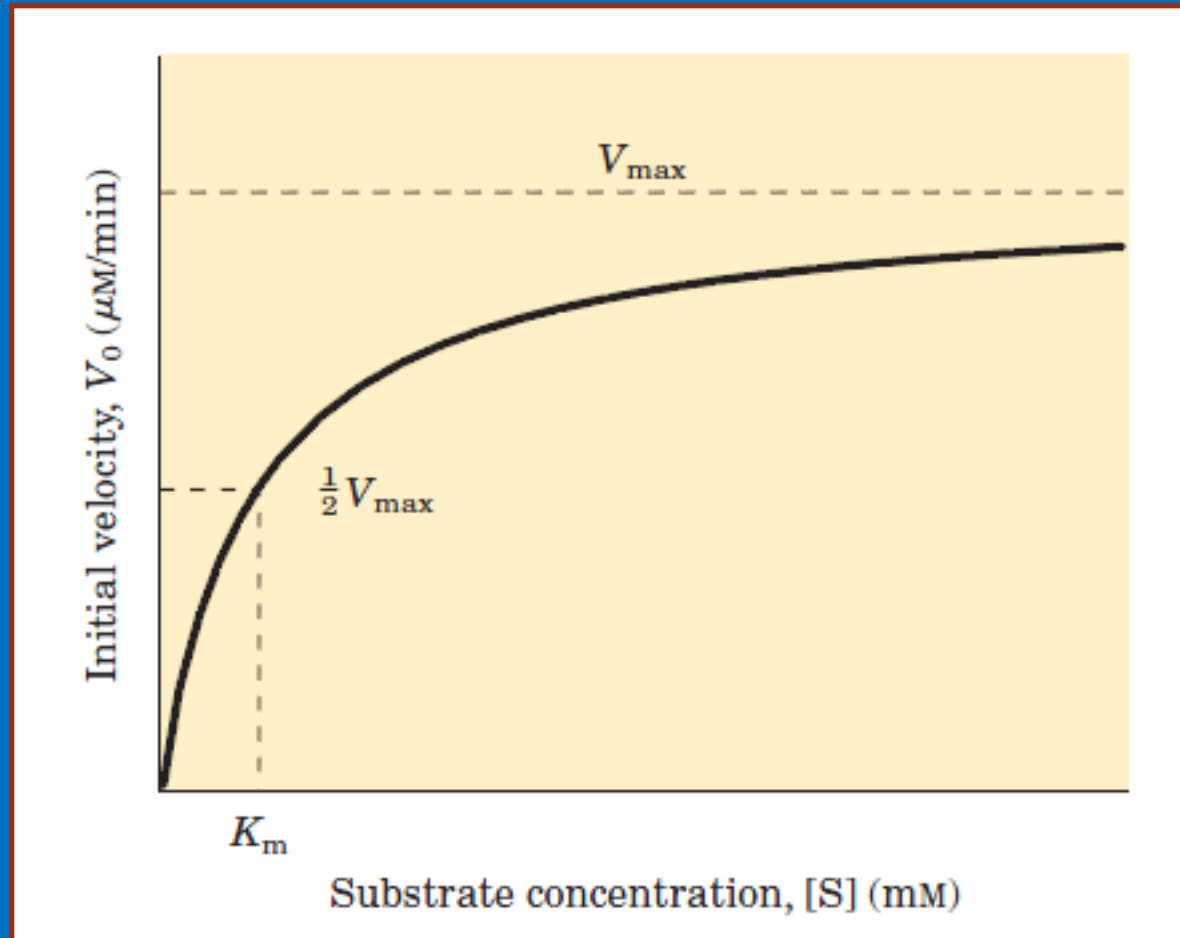
Em cinética enzimática, um parâmetro importante é a velocidade inicial da reação (V_0)



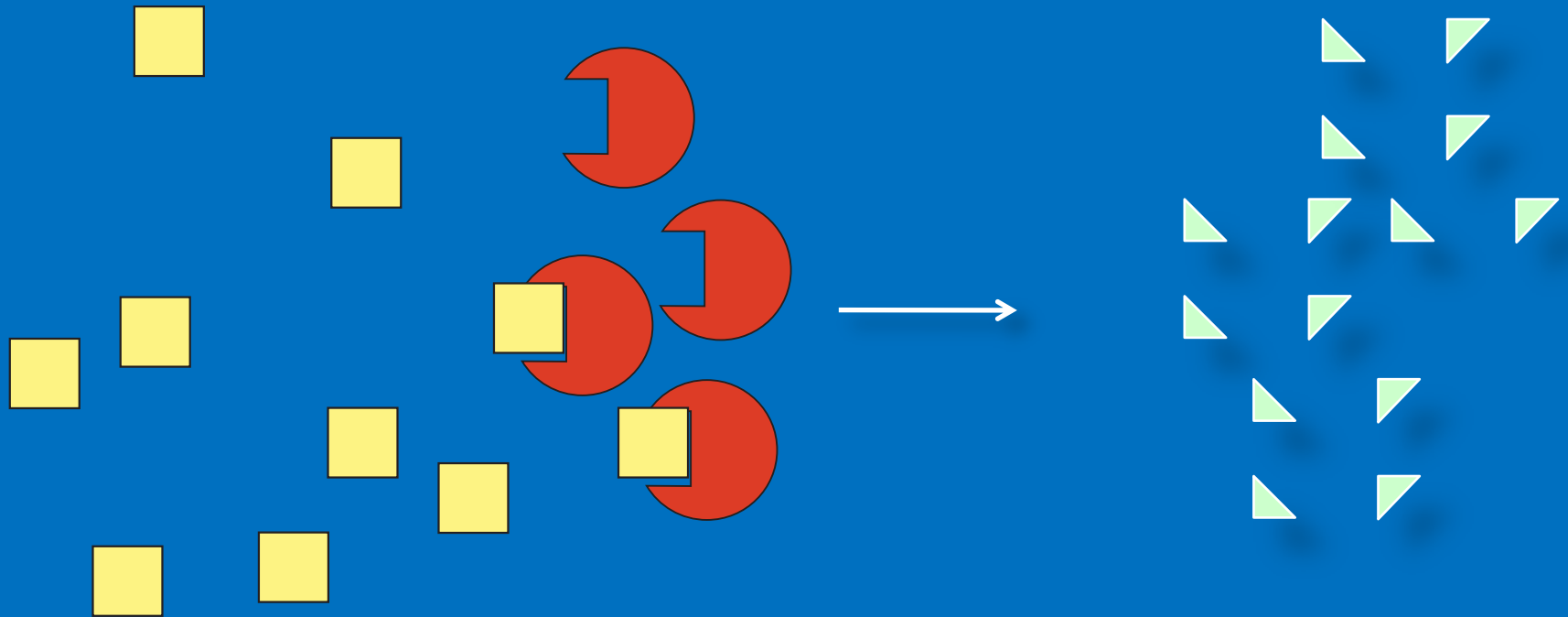
Em cinética enzimática, um parâmetro importante é a velocidade inicial da reação (V_0)



Velocidade máxima de uma reação



No K_m , metade das enzimas estarão ligadas ao substrato



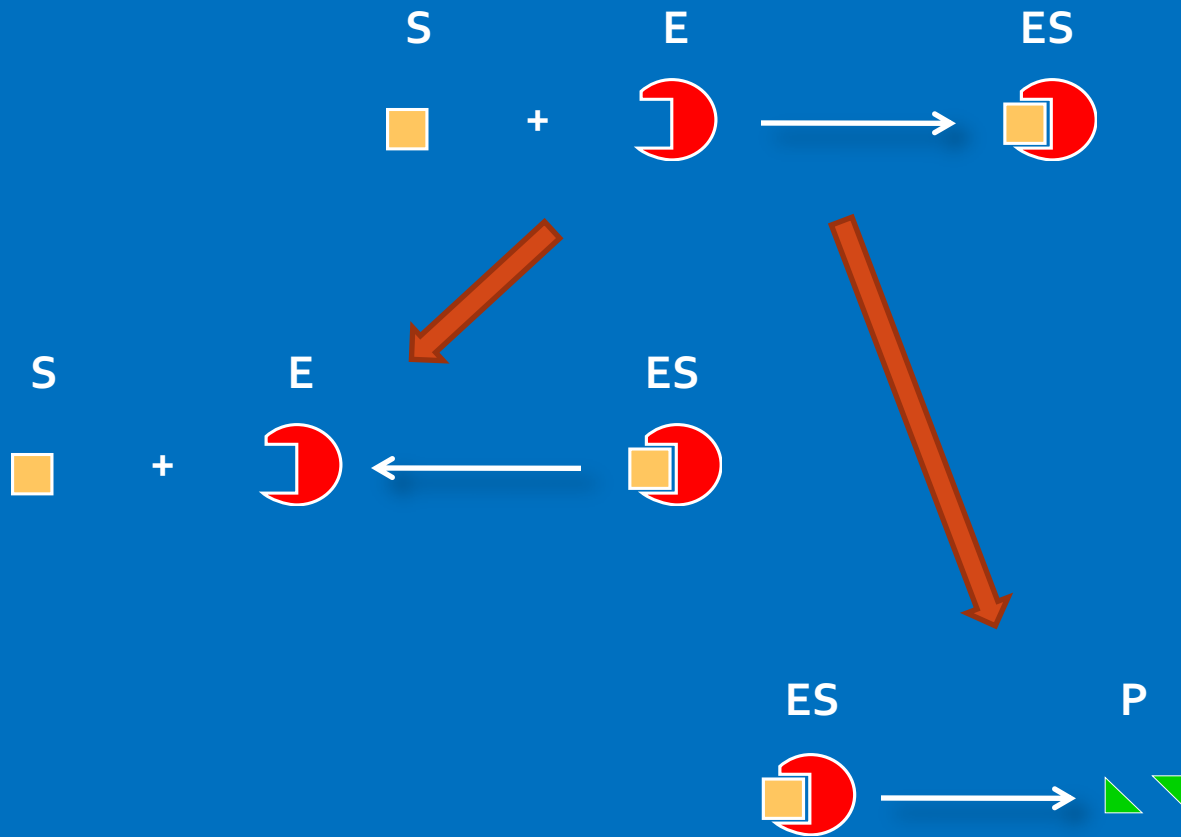
Cinética enzimática:

1. O substrato liga-se à enzima



Cinética enzimática:

1. Duas coisas podem acontecer, então...



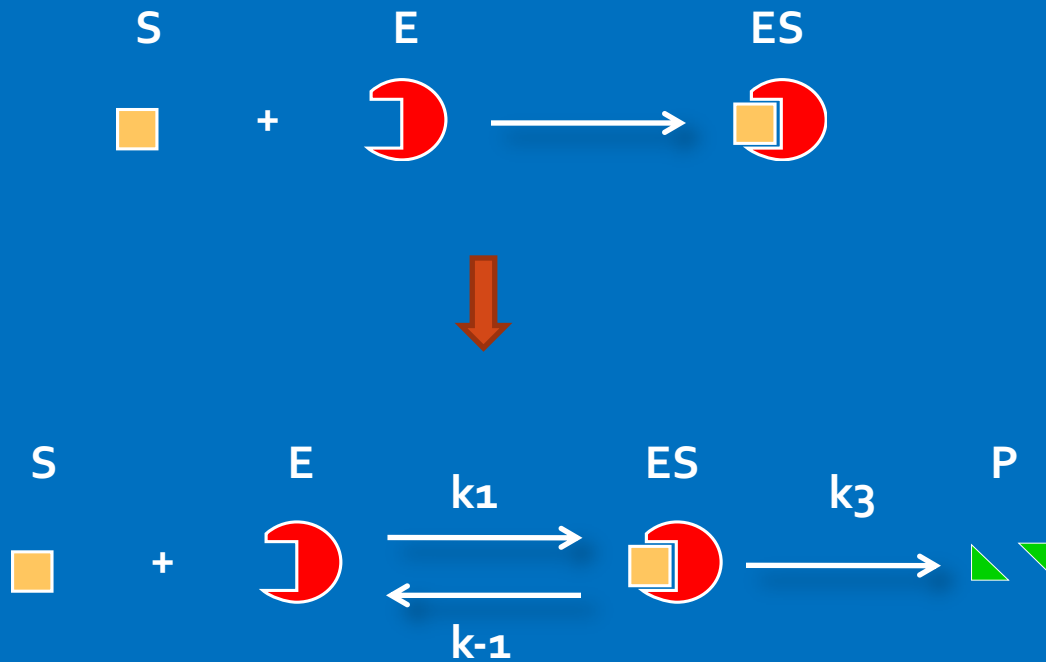
Cinética enzimática:

2. Em resumo:



Cinética enzimática:

2. Em resumo:



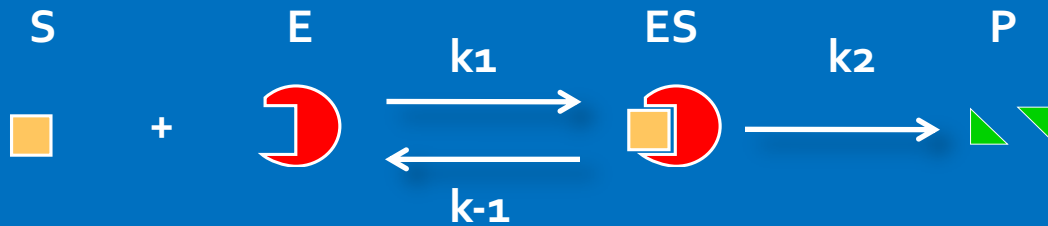
Leonor Michaelis (1875-1949)



Maud Menten (1879-1960)



Cinética enzimática



Como $V_o = k_2 \cdot [ES]$ e com ES não é um parâmetro fácil de ser determinado:

$[Et]$ = enzima total e enzima livre, então $[E] = [Et] - [ES]$

Formação de ES $\longrightarrow [ES] = k_1 \cdot [S] \cdot [E]$

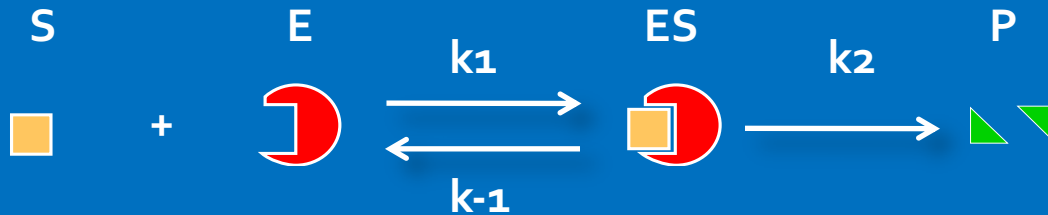
Dissociação de ES $\longrightarrow [ES] = k_{-1} \cdot [ES]$

No equilíbrio, a velocidade de formação é igual a de dissociação, ou seja:

$k_1 \cdot [E] \cdot [S] = k_{-1} \cdot [ES]$ Como $[E] = [Et] - [ES]$ então:

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

Cinética enzimática



Agora, nos resolvemos a equação para [ES]:

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

$$k_1 \cdot [E_t][S] - k_1 \cdot [S] \cdot [ES] = (k_{-1} + k_2) \cdot [ES] \quad \text{Adicionando-se } k_1 \cdot [S] \cdot [ES] \text{ aos dois lados:}$$

$$k_1 \cdot [E_t] \cdot [S] = (k_1 \cdot [S] + k_{-1} + k_2) \cdot [ES] \quad \text{e agora nós resolvemos para [ES]:}$$

$$[ES] = \frac{k_1 \cdot [E_t] \cdot [S]}{k_1 \cdot [S] + k_{-1} + k_2} \quad \text{dividindo ambos os lados por } k_1:$$

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

Cinética enzimática

$$[ES] = \frac{[Et].[S]}{[S] + (k_{-1} + k_2)/k_1}$$

O termo $(k_{-1} + k_2)/k_1$ é definido com constante de Michaelis (K_m)

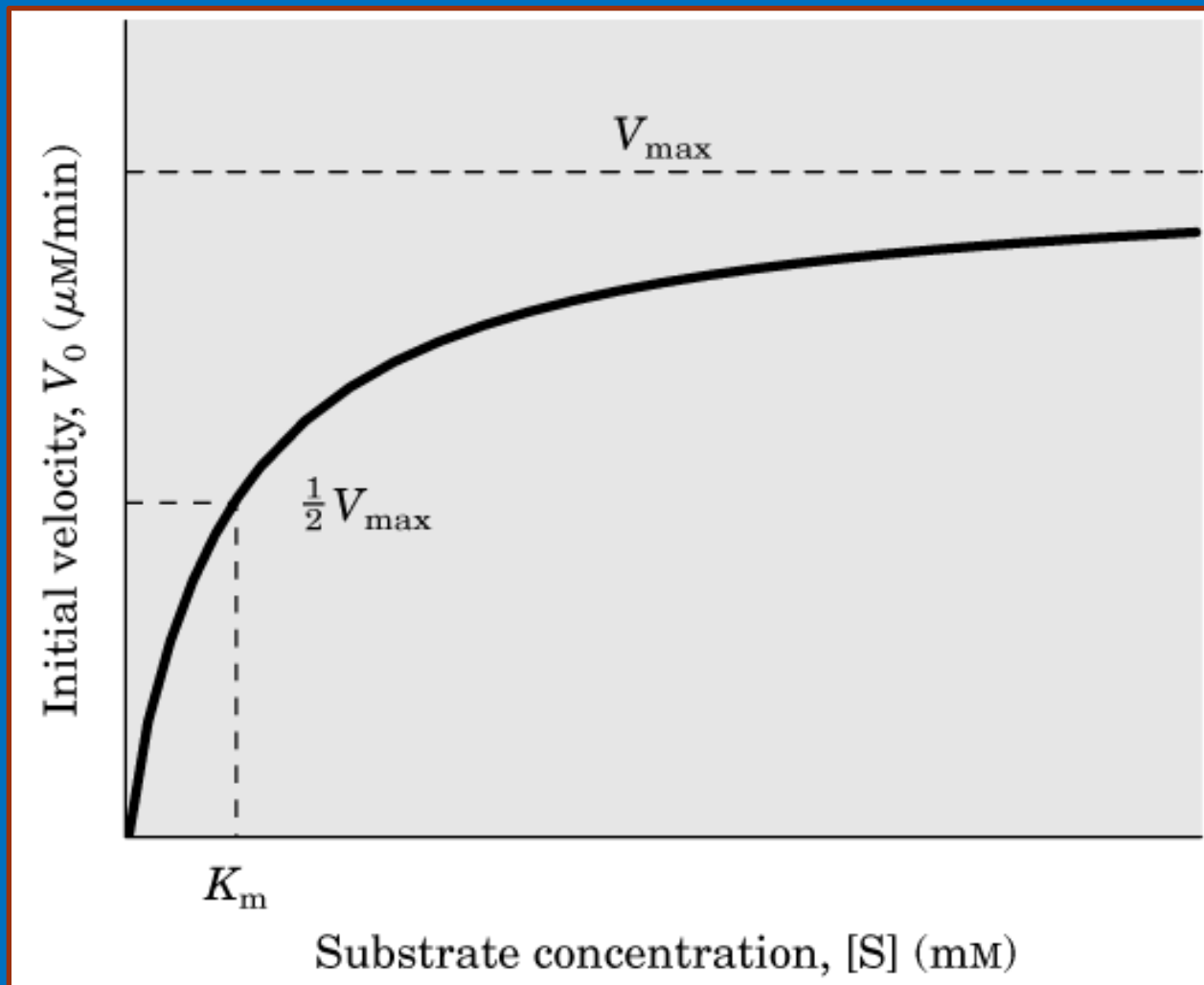
$$[ES] = \frac{[Et].[S]}{[S] + K_m} \quad \text{como } V_o = k_2.[ES]$$

$$V_o = \frac{k_2.[Et].[S]}{[S] + K_m}$$

Esta equação pode ser simplificada assumindo que na velocidade máxima, a enzima está saturada, portanto, $[Et] = [ES]$. Então:

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

Efeito do substrato na velocidade inicial de uma reação



Cinética enzimática

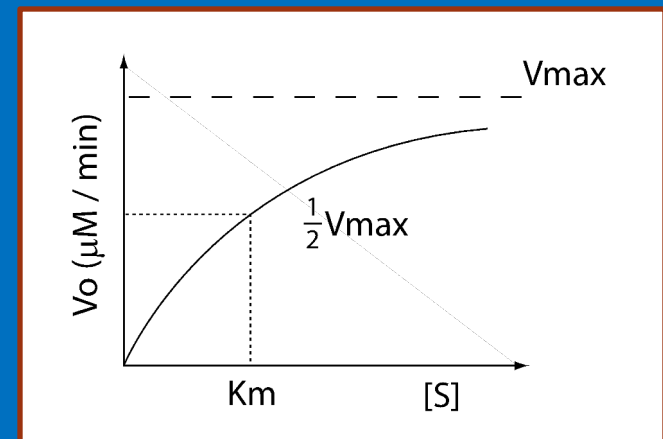
$$V_o = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{[S] + K_m}$$

Uma relação importante surge dessa equação quando V_o é a metade de V_{\max} :

$$\frac{V_{\max}}{2} = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{[S] + K_m} \iff \frac{1}{2} = \frac{[S]}{[S] + K_m}$$

Ou seja:

$K_m = [S]$ quando V_o é a metade de V_{\max}



Cinética enzimática: A equação de Lineweaver-Burk:

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

Invertendo-se os termos, teremos:

$$\frac{1}{V_o} = \frac{K_m + [S]}{V_{\max} \cdot [S]}$$

Separando-se os componentes do lado direito da equação:

$$\frac{1}{V_o} = \frac{K_m}{V_{\max} \cdot [S]} + \frac{[S]}{V_{\max} \cdot [S]}$$

Ou seja...

Cinética enzimática: A equação de Lineweaver-Burk:

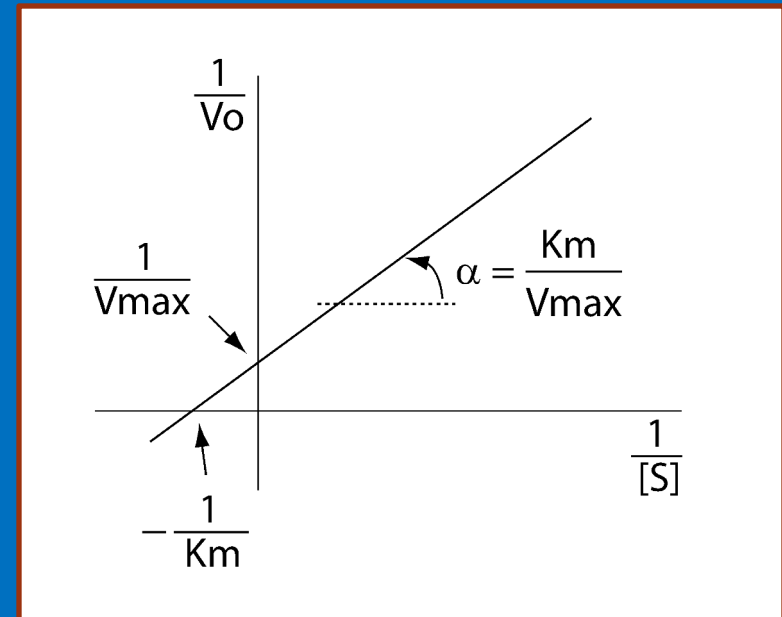
$$\frac{1}{V_o} = \frac{K_m}{V_{max} \cdot [S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

uma equação do tipo $y = ax+b$!

$$\frac{1}{V_o} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

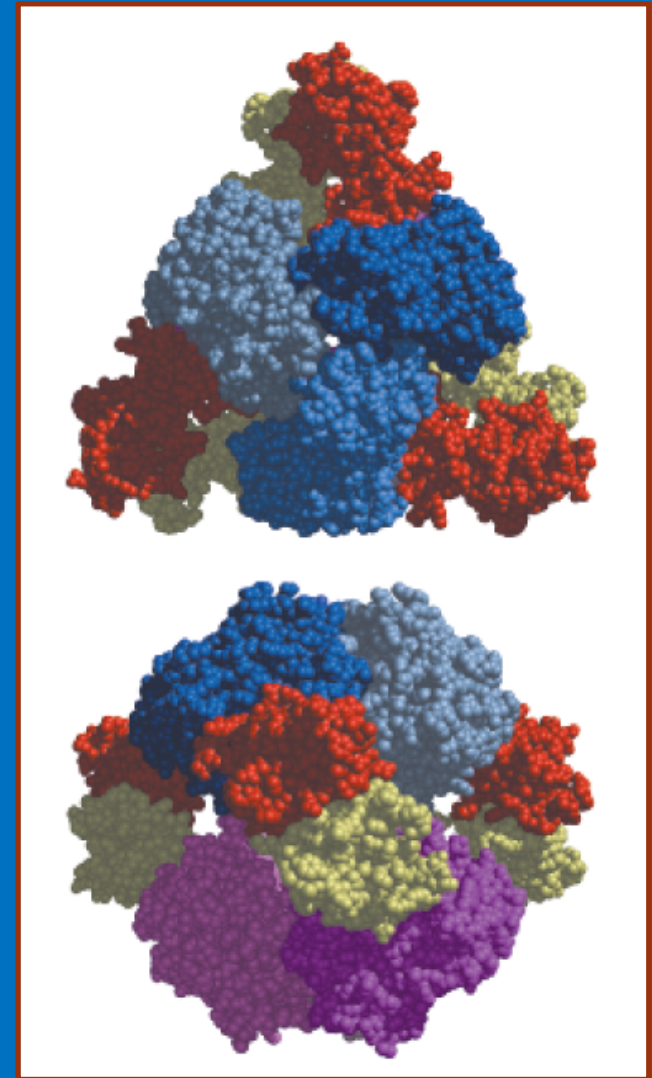
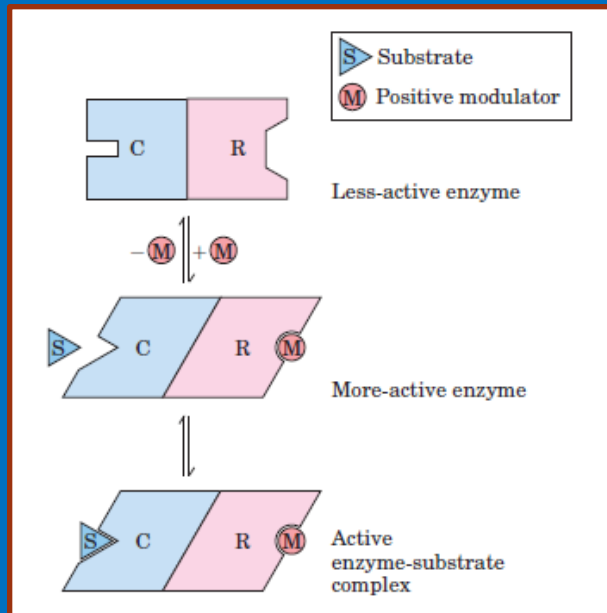
uma equação do tipo $y = ax+b$!

Portanto, num gráfico de $1/[S] \times 1/[V_o]$ teremos:



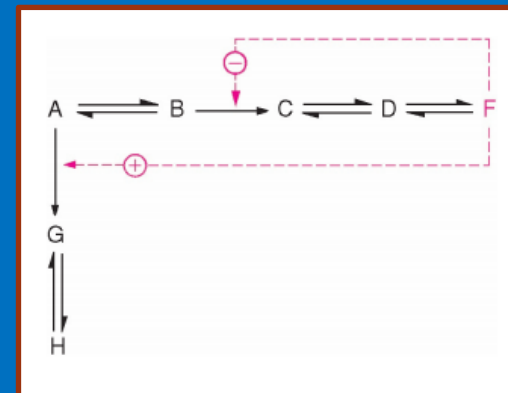
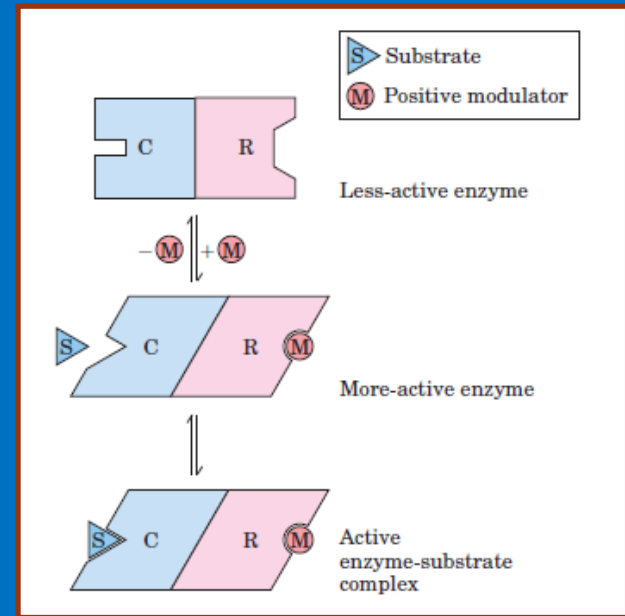
Enzimas alostéricas

- Muitas enzimas podem ser reguladas.
- Este é um importante mecanismo metabólico.
- A ligação de uma molécula “ativadora” ou “inibidora” pode aumentar ou inibir a atividade de uma enzima.
- Isto pode ocorrer por um efeito cooperativo entre as diferentes subunidades de uma proteína (unidade regulatória).



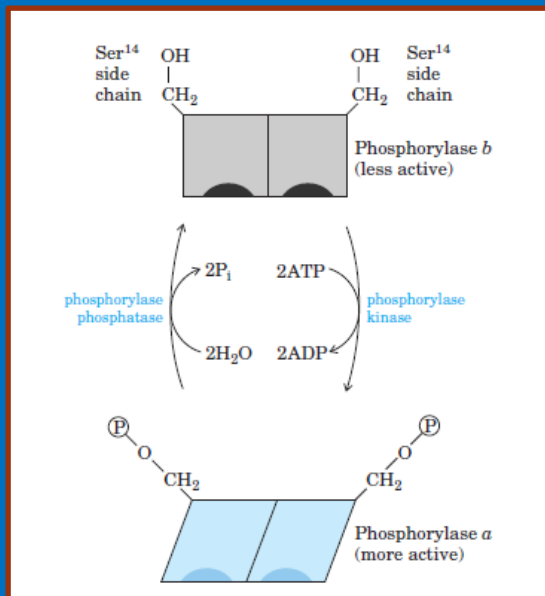
Enzimas alostéricas

- Por exemplo, a conversão do aminoácido treonina em isoleucina pode ser feito através de uma série de reações enzimáticas.
- Para impedir que toda a treonina da célula seja convertida em isoleucina, a primeira enzima da cadeia de reações é controlada alostericamente pela concentração de isoleucina.
- Se não houver isoleucina, a reação pode ocorrer.
- Quando a concentração de isoleucina aumentar, a enzima é inibida alostericamente, interrompendo a cadeia.



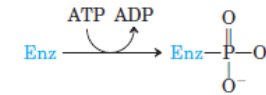
Regulação por modificação covalente

- As enzimas podem ser reguladas por modificações covalentes.
- Uma modificação muito importante é a fosforilação.
- Enzimas podem ser ativadas ou inibidas se fosforiladas em resíduos de serina, treonina ou tirosina específicos.
- Outras modificações (tabela ao lado) também podem modular a atividade de enzimas.

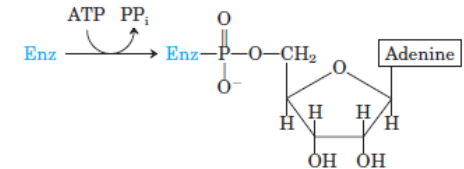


Covalent modification (target residues)

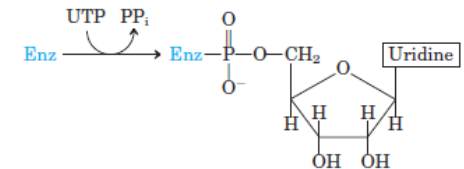
Phosphorylation (Tyr, Ser, Thr, His)



Adenylylation (Tyr)

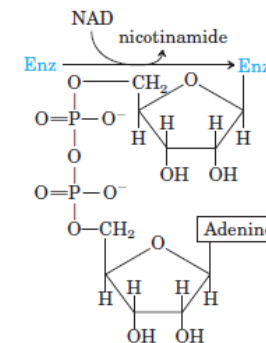


Uridylylation (Tyr)

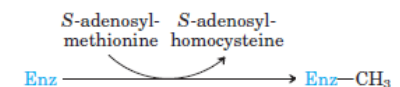


ADP-ribosylation

(Arg, Gln, Cys, diphthamide—a modified His)



Methylation (Glu)





Bibliografia

- Leiam o capítulo 6 (Enzimas) do Lehninger – Princípios de Bioquímica

Ou

- Capítulo 5 (Enzimas) do livro Bioquímica Básica (Marzzoco e Torres).
- 