

Bioquímica



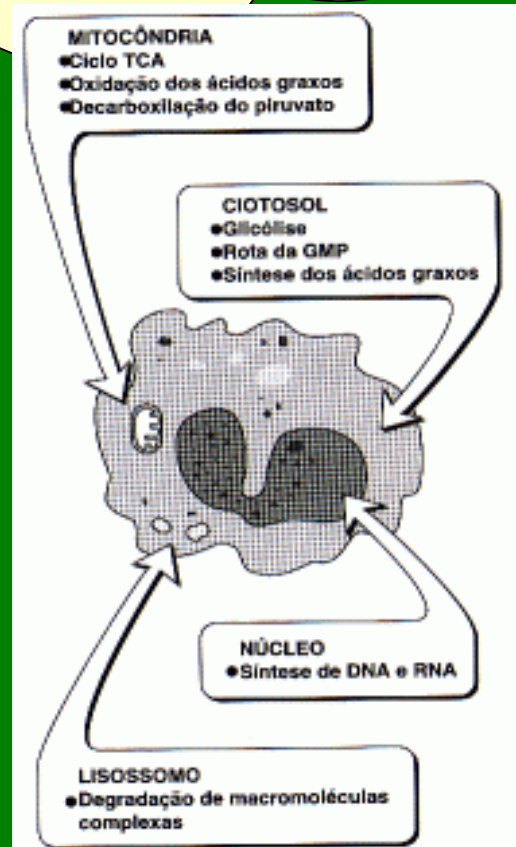
Dra. Kátia R. P. de Araújo Sgrillo

katiasgrillo@uesc.br

O que são Enzimas

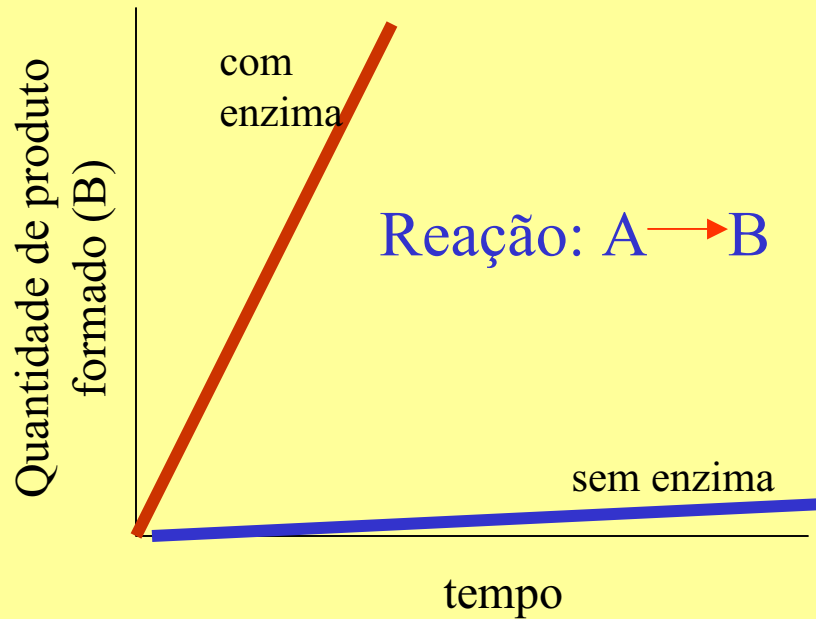
As **enzimas** são **altamente específicas**, interagindo com um ou alguns substratos e catalizando somente um tipo de reação química.

São **proteínas** sintetizadas nas células vivas que **catalizam ou aceleram uma reação** termodinamicamente possível, de modo que seja compatível com o processo bioquímico essencial para a própria célula.



Localização intracelular de algumas vias bioquímicas importantes

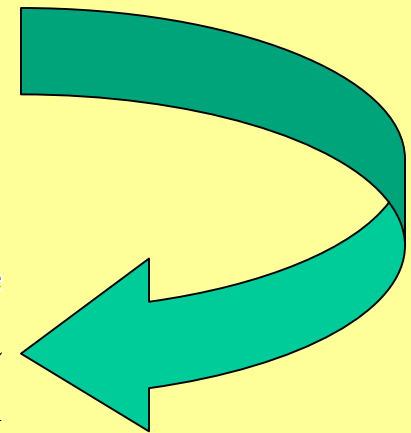
enzima



Em geral as enzimas aumentam de **1 milhão até mais de 1 trilhão de vezes a velocidade da reação**, em relação a reação correspondente sem a presença da enzima.

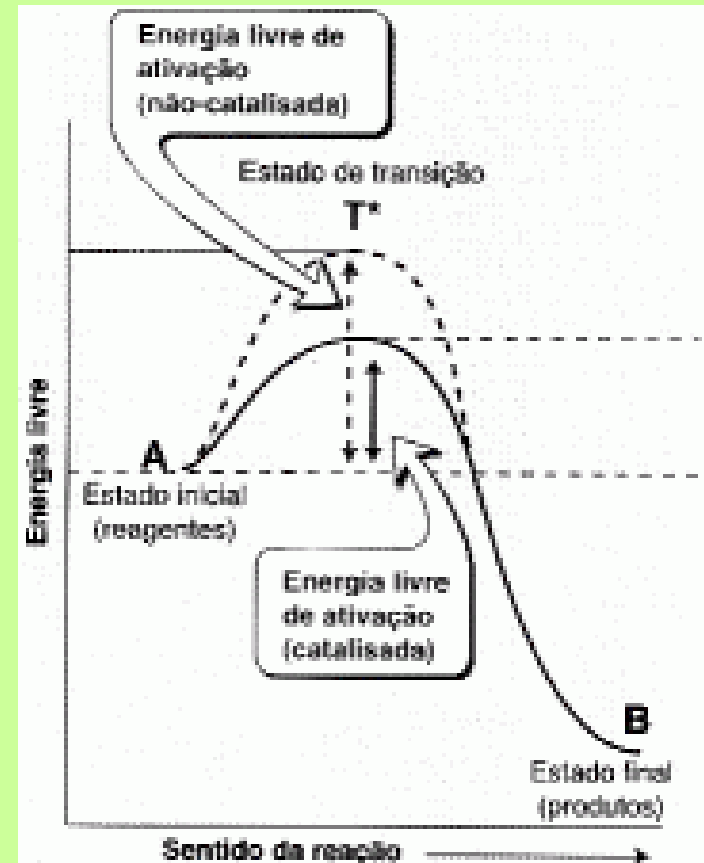
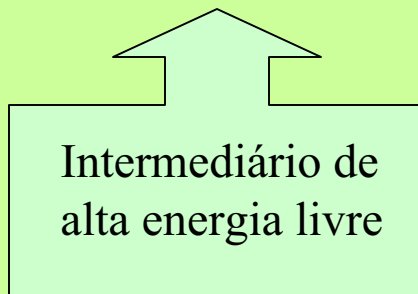
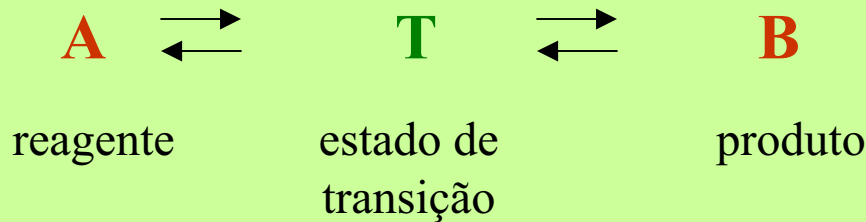
A enzima não é consumida no processo.

Uma mesma molécula de **enzima** pode **agir repetidamente** na conversão de muitas moléculas de A em B. Não modifica a constante de equilíbrio de uma reação. Trabalha em **concentrações extremamente baixas**.



Como funcionam as enzimas

Praticamente todas as reações químicas têm uma **barreira de energia separando os reagentes e produtos**. Esta barreira é denominada de **energia livre de ativação**.





As moléculas de enzimas contêm um bolsão ou fendas especial denominado

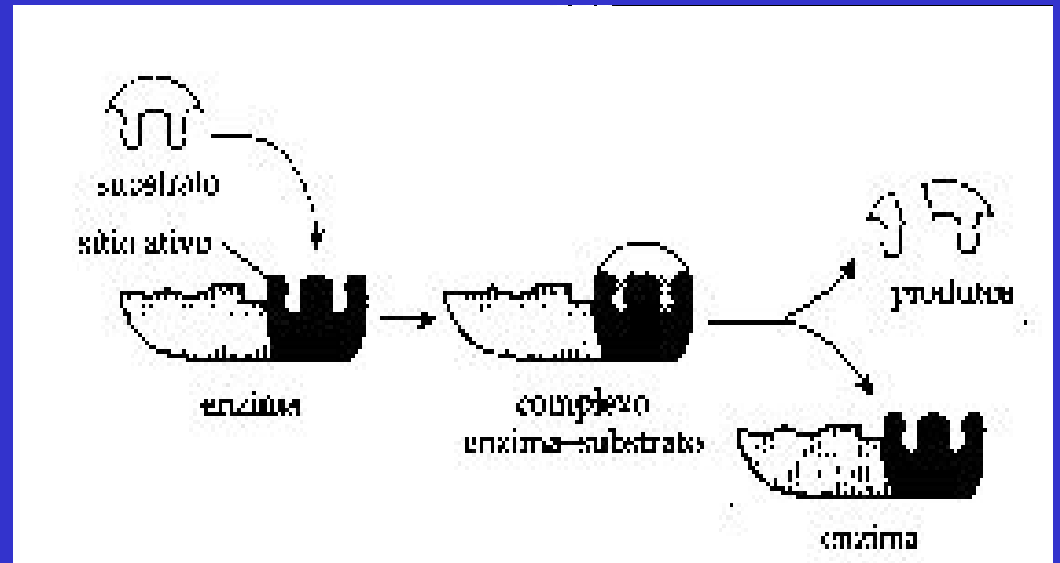
Sítio ativo

Os sítios ativos contêm aminoácidos cujas cadeias laterais criam uma superfície tridimensional complementar ao substrato.

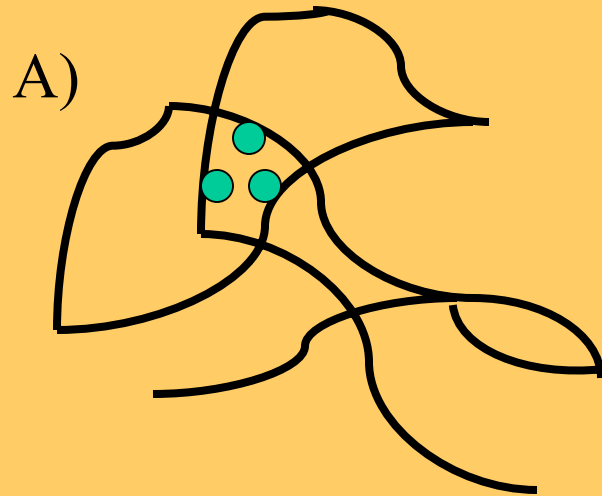


Representação - reação enzimática

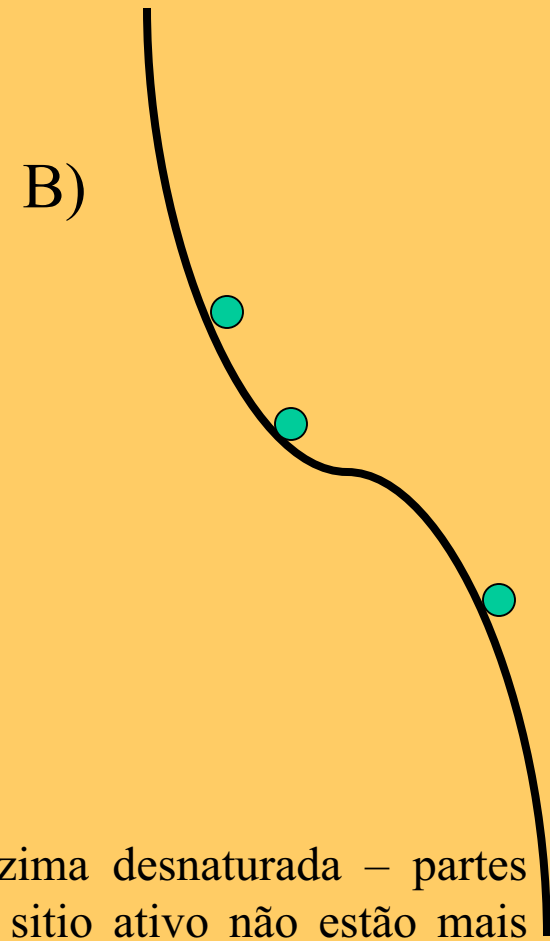
Toda enzima possui um **SITIO ATIVO**. O *sítio ativo* da enzima e o substrato apresentam estruturas complementares e desse modo ajustam-se como uma chave-fechadura. Enquanto eles estão unidos no complexo enzima-substrato, a reação catalítica ocorre. Os produtos da reação deixam a superfície da enzima, liberando-a para que combine com uma outra molécula.



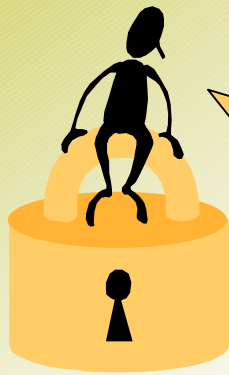
O sítio ativo consiste em diferentes partes da cadeia protéica (a enzima). Estas partes são colocadas juntas através do dobramento e da flexão da cadeia protéica (estruturas secundárias e terciárias), e assim o sítio ativo ocupa uma área relativamente pequena.



A) Representação esquemática de um sítio ativo em uma enzima.



B) Enzima desnaturada – partes do sítio ativo não estão mais em proximidade.



De fato uma molécula, para ser aceita como **substrato**, deve ter a **forma espacial adequada** para alojar-se no no centro ativo da enzima e os grupos químicos capazes de estabelecer reações precisas com os radicais do centro ativo.



Como cada enzima possui uma organização estrutural específica, o seu **centro ativo permite a ligação apenas do seu substrato**, trazendo grande especificidade para a catalise.



Com grau de especificidade variável, algumas enzimas apresentam :

✓ **especificidade absoluta** – atuam unicamente sobre um único substrato. **Por exemplo:** *succinato desidrogenase* que catalisa a conversão de ác. succínico para ác. fumárico, produz apenas o isômero *trans* e nunca o isômero *cis*.

✓ **ligação específica** – rompe ligações apenas entre grupos específicos. **Por exemplo** : a enzima *trombina* romperá as ligações entre aminoácidos arginina e glicina e não afetará as ligações entre os outros aminoácidos.

✓ **especificidade por grupos** - catalisam somente certos grupos específicos. **Por exemplo** : a *quimiotripsina* catalisa a hidrólise somente de proteínas contendo fenilalanina, triptofano ou tirisina.

✓ **estereoespecificidade** – tais enzimas podem detectar a diferença entre isômeros ópticos e selecionar apenas um desses isômeros. **Por exemplo** : a enzima *arginase* catalisa a hidrólise da L-arginina, mas não tem qualquer efeito na hidrólise da D-arginina.



As enzimas



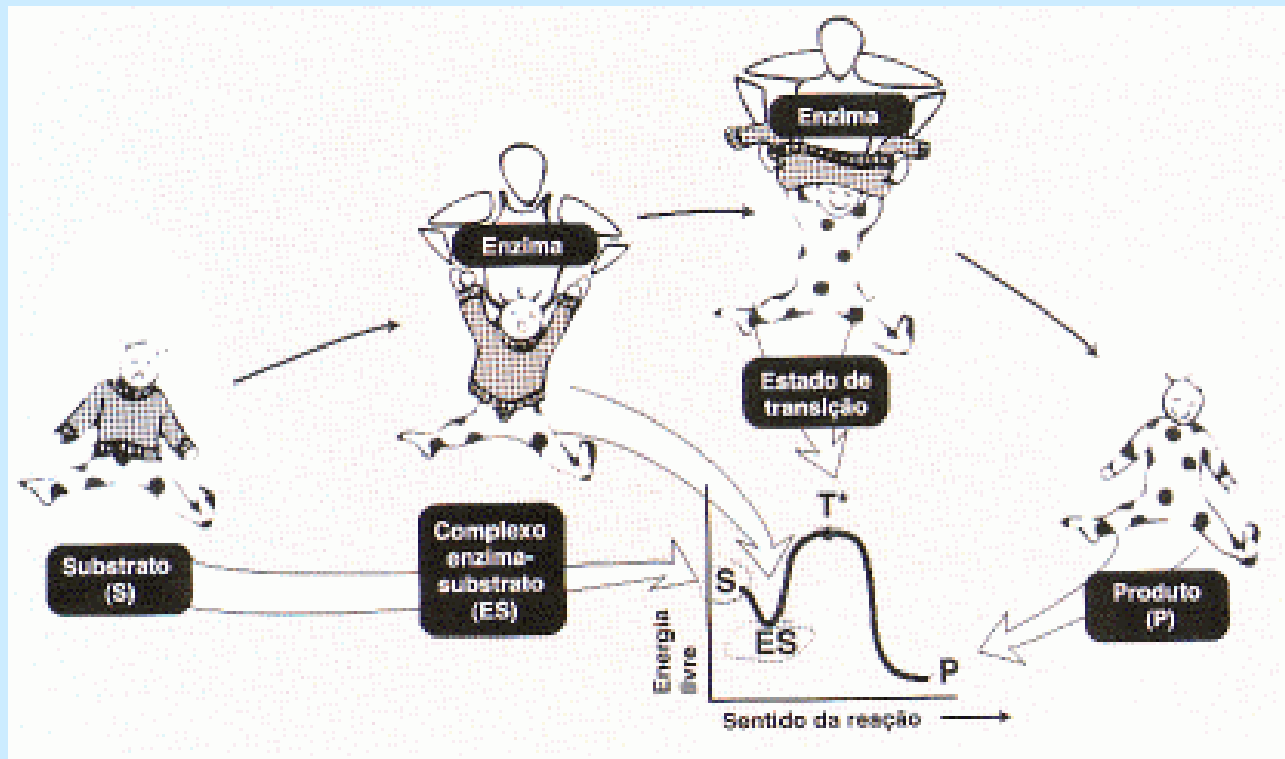
são específicas



✓ **especificidade de reação** – catalisam certos tipos de reações. **Por exemplo** : a *esterases* catalisam a hidrólise de ésteres em geral, e as *carboidrases*, a hidrólise de carboidratos.

Estado de Transição

Substrato + Enzima se transformam em um complexo ES que dissocia-se em enzima e produto.

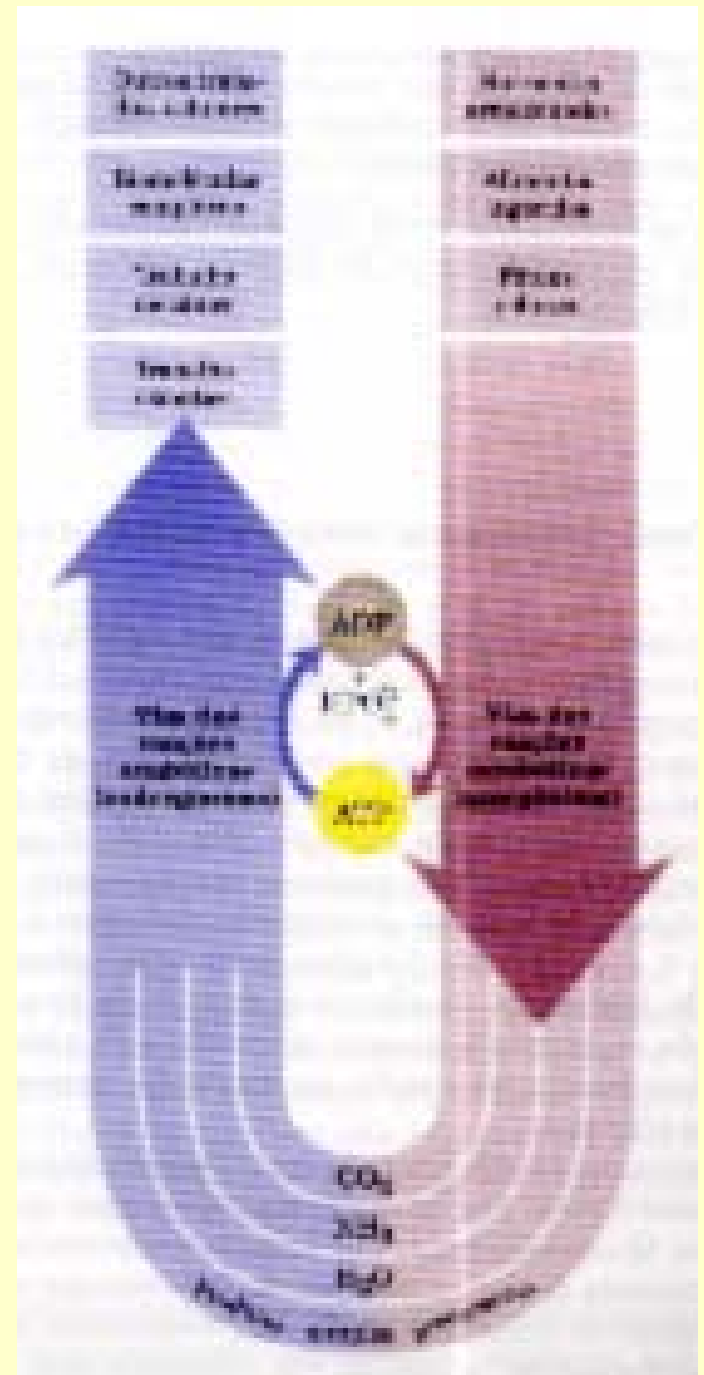


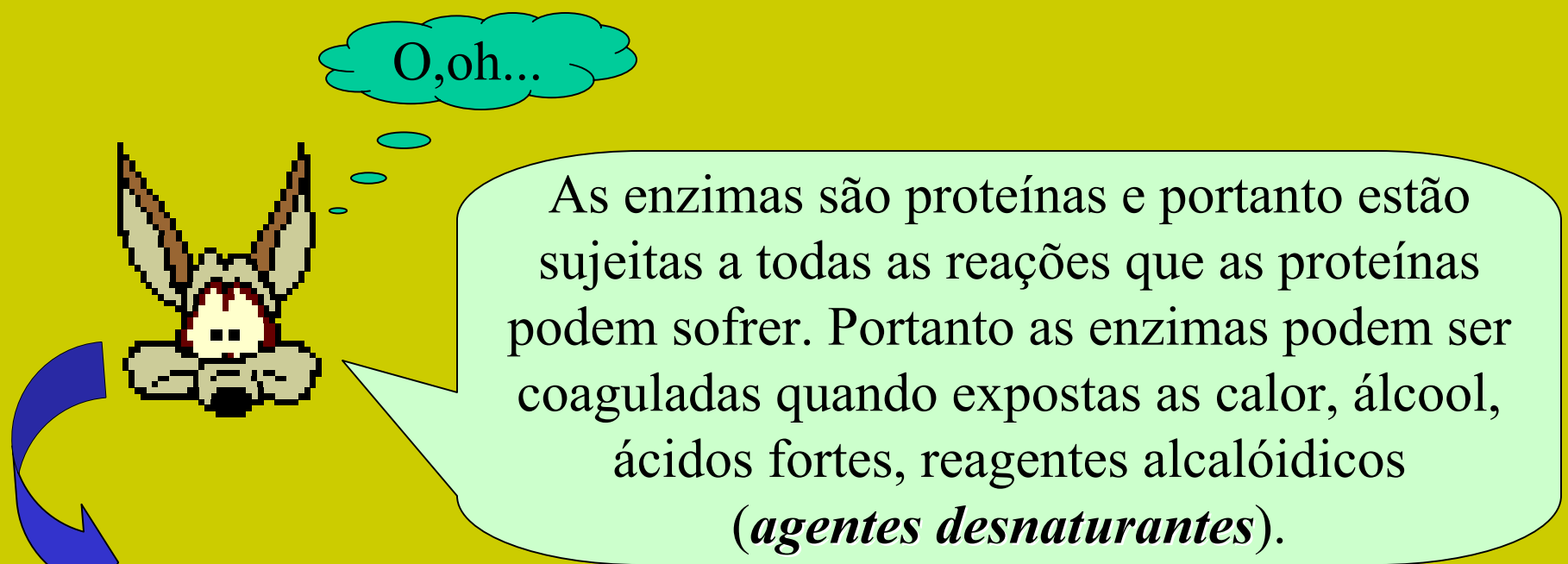
O número de moléculas de substrato convertidas em produto por molécula de enzima por segundo é denominado ***número de turnover***.

Milhares de reações químicas enzimaticamente catalisadas nas células são funcionalmente organizadas em muitas seqüências diferentes de reações consecutivas, chamadas

VIAS

O ATP é o intermediário químico que une os processos celulares liberadores de energia com aqueles que a consomem. Na célula, seu papel é análogo àquele do dinheiro na economia: ele é “produzido/ganho” nas reações exergônicas e “gasto/consumido” naquelas endergônicas.





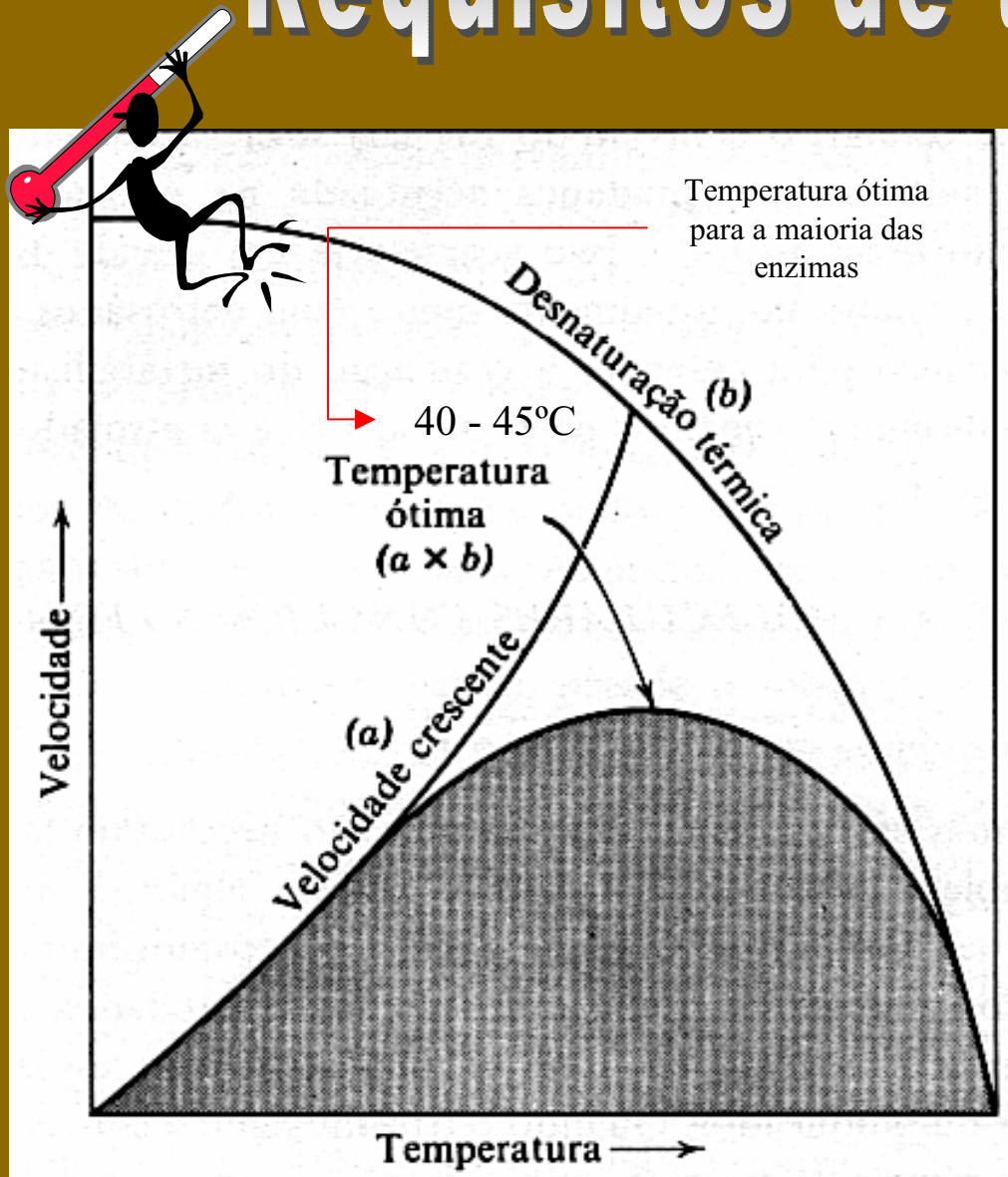
O,oh...

As enzimas são proteínas e portanto estão sujeitas a todas as reações que as proteínas podem sofrer. Portanto as enzimas podem ser coaguladas quando expostas as calor, álcool, ácidos fortes, reagentes alcalóidicos (*agentes desnaturantes*).

As **enzimas** sofrem **influência** de inúmeros fatores, tendo sua melhor atuação em condições ideais de **temperatura, pH, concentração da enzima e do substrato.**

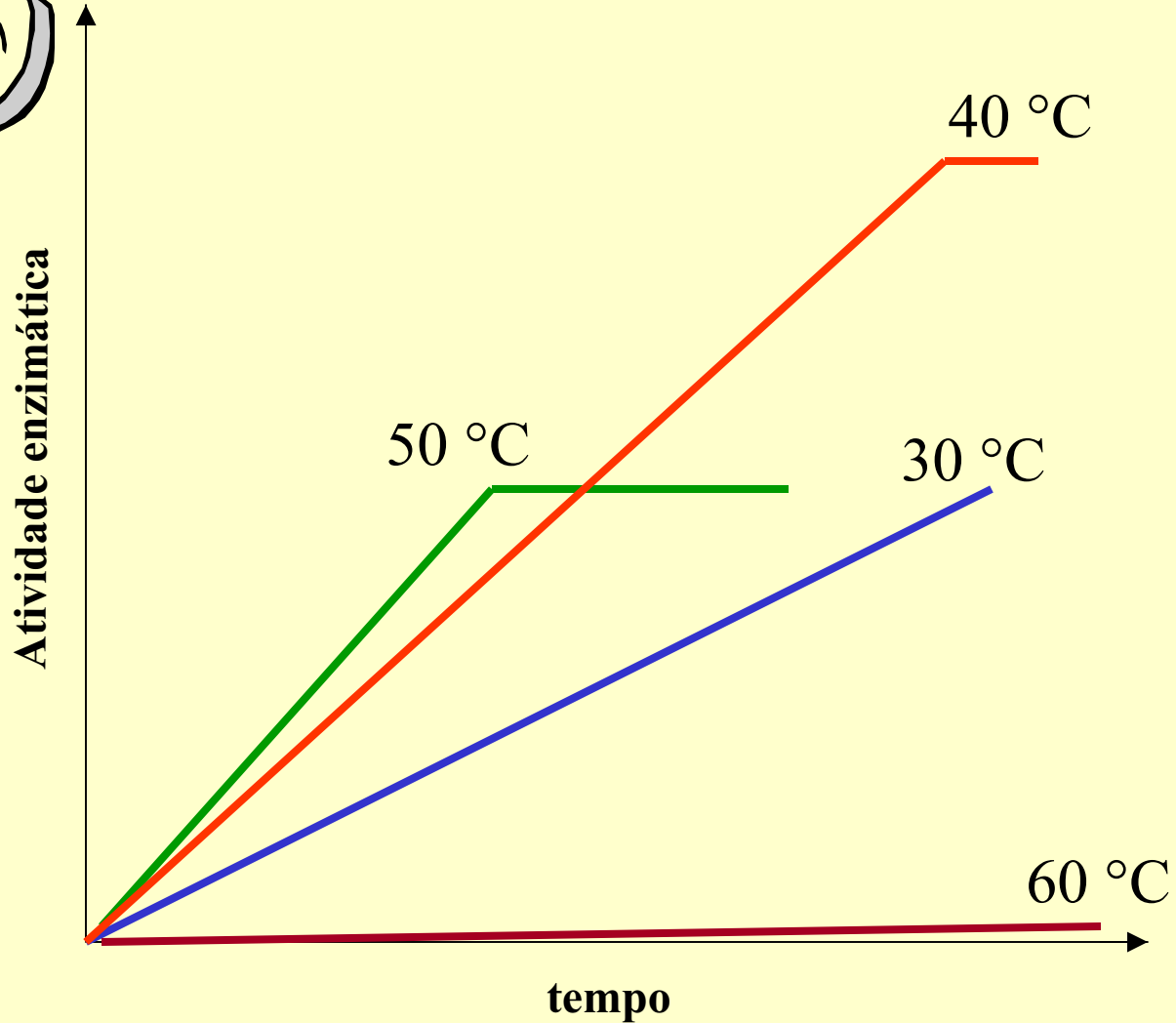
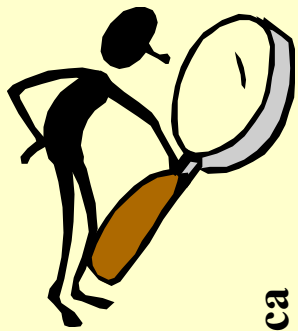
Muitas enzimas tem sido atualmente preparadas na forma cristalina.

Requisitos de temperatura



A velocidade de todas as reações químicas é afetada pela temperatura: quanto maior a temperatura, mais rápida é a reação. Isto também é verdadeiro nas reações envolvendo enzimas. Contudo, se a temperatura for exageradamente elevada, a enzima (proteína) será desativada por desnaturação e perderá sua função biológica.

Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática

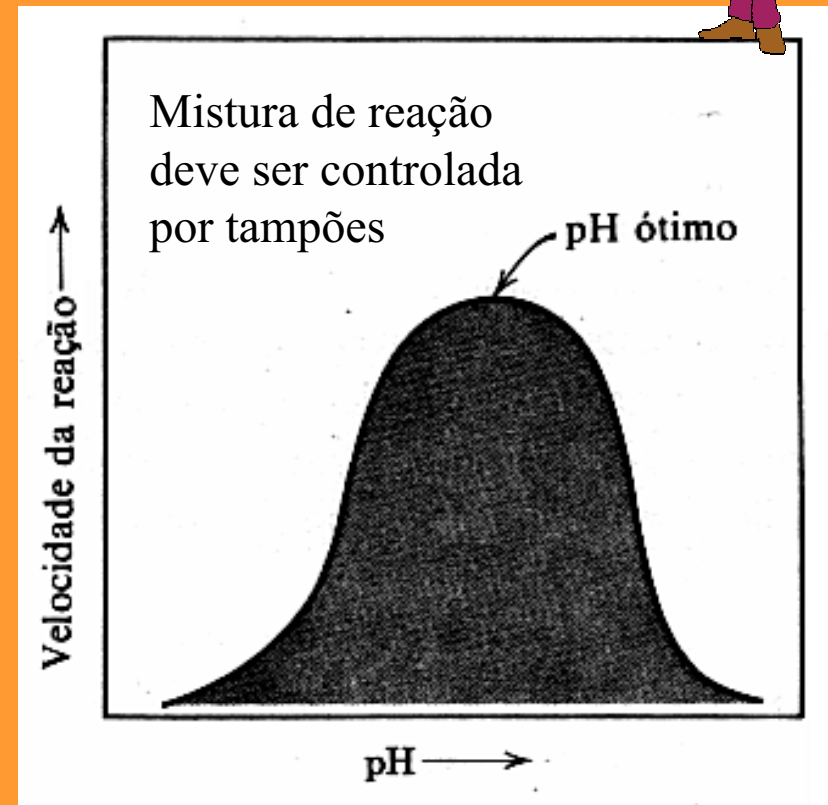


Importância do pH

pH



Cada enzima apresenta uma faixa de pH na qual o seu funcionamento é melhor. Essa é chamada de **faixa ótima de pH**, para aquela enzima em particular. Como os fluidos corporais são tamponados, o pH geralmente não varia muito além dos valores ótimos.



Afeta o caráter iônico dos grupos carboxílicos e aminos

Efeito das concentrações



Do mesmo modo que nas reações químicas, a velocidade da reação é aumentada com o aumento nas concentrações dos reagentes. Com uma maior concentração de substrato, a velocidade de reação aumentará até que a enzima disponível torne-se saturada com o substrato. Além disso, com o aumento da quantidade de enzima, a velocidade de reação aumentará supondo um suprimento ilimitado de substrato.



ativação



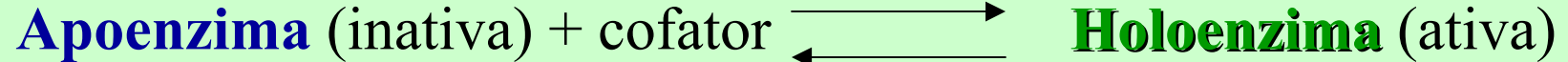
Algumas enzimas necessitam ser ativadas para atuarem como catalisadores.

Exemplo: a *papaína*, uma enzima proteolítica fica inerte quando exposta ao oxigênio; quando se adiciona um redutor adequado para converter -S-S- em -SH, a papaína se torna completamente ativada (desde que seja protegida do O).

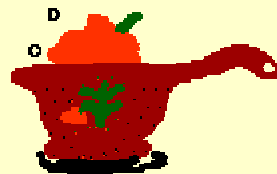
cofator
“ajudante”

- **Grupos prostéticos** - cofator firmemente preso à proteína enzimática
- **Coenzimas** - molécula orgânica pequena, estável ao calor, que se dissocia facilmente da enzima.
- **Ativadores metálicos** - grande número de enzimas exigem cátions (K^+ , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} ou Zn^{2+}) como ativadores

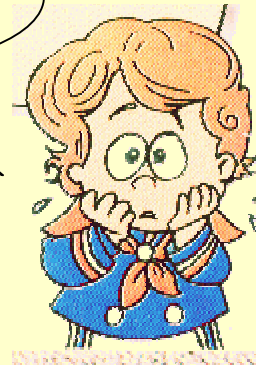
Um complexo enzima cofator cataliticamente **ativo** é chamado de holoenzima. A proteína enzimaticamente inativa resultante da remoção do co-fator da holoenzima é chamado de apoenzima, isto é:



As **coenzimas** são quimicamente **modificadas** pelas reações enzimáticas em que participam. Portanto devem ser **regeneradas**.

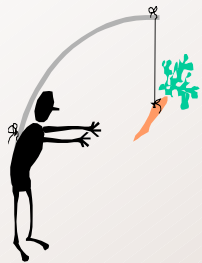


As **vitaminas** são **coenzimas** que **não** podem ser **sintetizadas** pelo organismo e que portanto devem estar presentes na dieta.

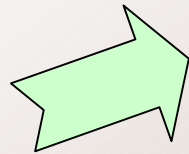


exemplos de

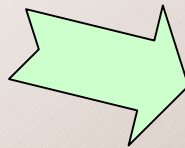
Coenzimas



pelagra



Fatores de crescimento para microrganismos



Substâncias que curam doenças causadas por deficiências nutricionais

Por exemplo a **nicotinamida**, que é uma porção que compõe o **NAD⁺** ou seu ácido carboxílico análogo. O ácido nicotínico, alivia a doença, que pode ser fatal, causada pela deficiência nutricional da nicotinamida em seres humanos, conhecida por **pelagra** (sintomas: diarreia, dermatite e demência).

Exemplo

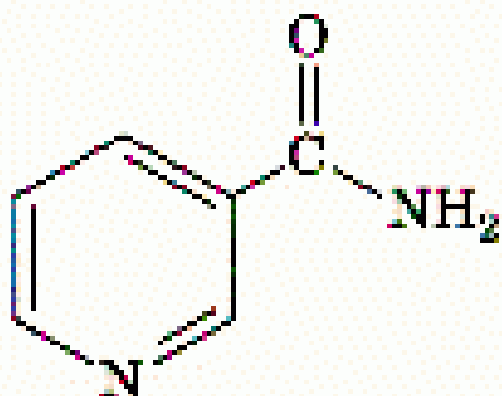
O termo *niacina* é o nome oficial para a vitamina representada pelo ácido nicotínico ou nicotinamida.



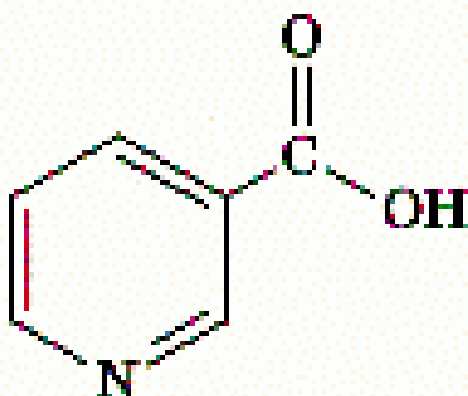
Função
bioquímica:



Os nucleotídeos de piridina são coenzimas para enzimas conhecidas como desidrogenases que catalizam reações de óxido-redução.

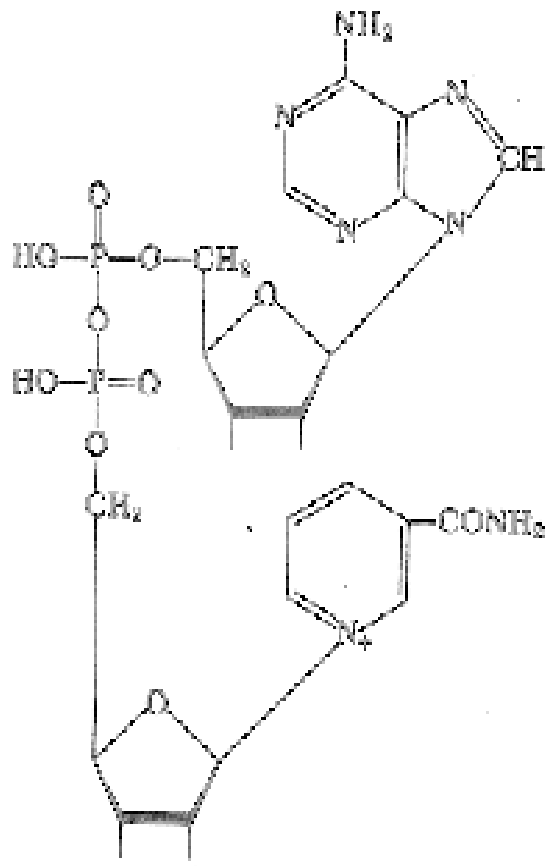
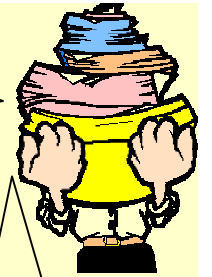


Nicotinamida
(niacinamida)

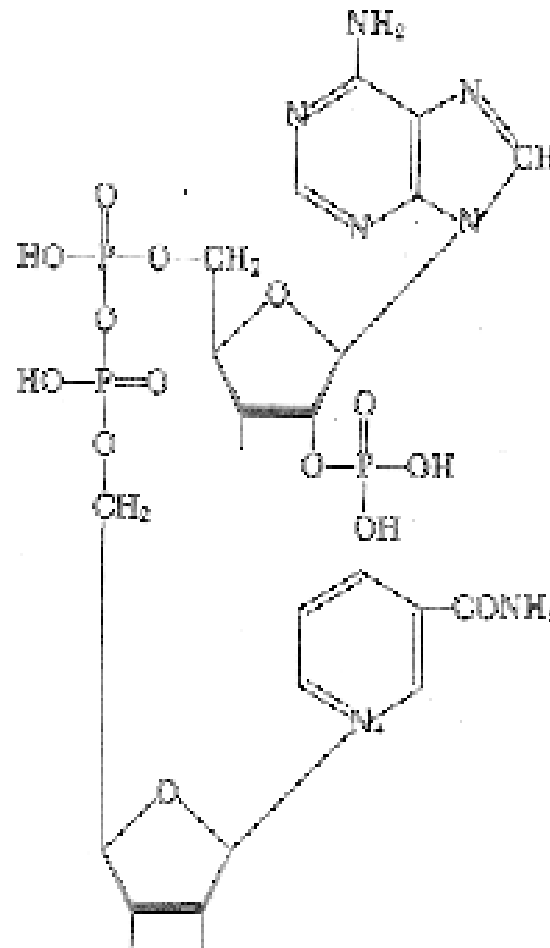


Ácido nicotínico
(niacina)

As formas coenzimáticas da vitamina são os nucleotídeos de piridina



NAD⁺
coenzima I



NADP⁺
coenzima II

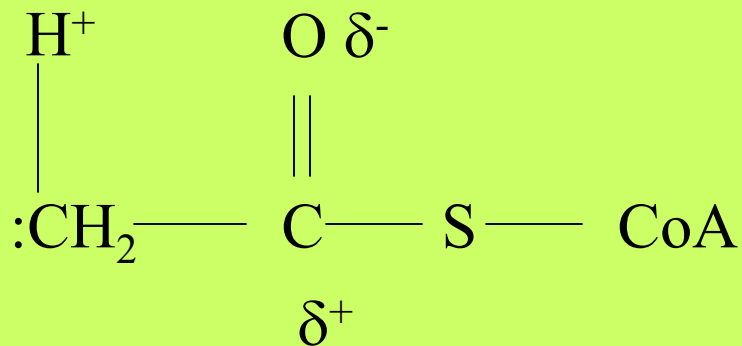
denominados
nicotinamida-
adenina
dinucleotídeo
(**NAD⁺**) ou
coenzima I e
fosfato de
nicotinamida-
adenina
dinucleotídeo
(**NADP⁺**) ou
coenzima II.

exemplos

reações catalisadas por

NADP⁺
e **NAD⁺**

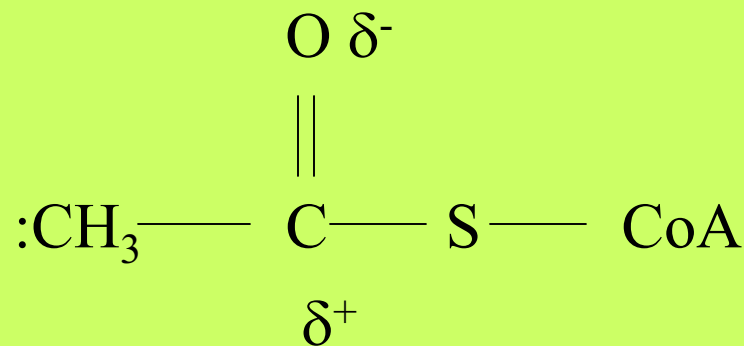
enzimas	substrato	produto	coenzima
Desidrogenase alcoólica	etanol	acetaldeído	NADP⁺
Desidrogenase isocítrica	isocitrato	α -cetogluturato + CO ₂	
Desidrogenase láctica	lactato	piruvato	
<i>apoenzima</i>			<i>cofator</i>
Málica	L-malato	piruvato + CO ₂	NAD⁺
Desidrogenase de glicose-6-fosfato	Glicose-6-fosfato	ác. 6-fosfoglicônico	
Desidrogenase glutâmica	ác. L-glutâmico	α -cetogluturato + NH ₃	



As fórmulas do acetilCoA tem uma típica estrutura em que um nucleófilo tal como H₂O, R-S:- ou o α-carbono do acetilCoA pode atacar o local com carga positiva.

Acetil-CoA como um nucleófilo

Acetil-CoA metabólito central. Participa do metabolismo de lipídeos, carboidratos e proteínas.



Acetil-CoA como um eletrófilo

Nomenclatura

Segundo a propriedade específica da enzima

6. Ligases -

enzimas que catalizam unindo duas moléculas conjuntamente com a ruptura de uma ligação pirofosfórica

5. Isomerases -

enzimas que catalizam diferentes tipos de isomeração (racemases, epimerases, cis-trans isomerase, cetol isomerases intramoleculares, mutases)

4. Liases - enzimas que catalizam reversivelmente a remoção não hidrolítica de grupos (furase, descarboxilase).

1. Óxidorredutases -

enzimas que catalizam reações de oxi-redução (desidrogenases, oxidases, oxigenases).

2. Transferases -

enzimas que catalizam reações de transferência de grupos (transaminases, quinases, transacetilases).

3. Hidrolases -

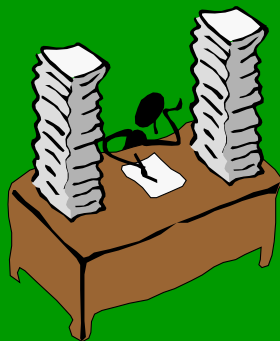
enzimas que catalizam reações de hidrólise de vários compostos (hidrolases do substrato - hidrolase de éster do glicerol)

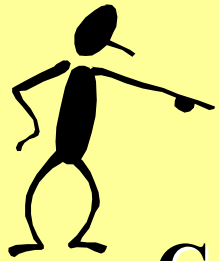


Termos para não esquecer...



Enzima: uma biomolécula, proteína, que catalisa uma reação química específica. Ela não afeta o equilíbrio da reação catalisada; ela aumenta a velocidade da reação através do fornecimento de uma via de reação com menor energia de ativação.





Termos para não esquecer...

Cofator: íon inorgânico ou uma coenzima necessária para atividade de uma enzima.

Coenzima: cofator orgânico necessário para a ação de certas enzimas; freqüentemente utiliza uma vitamina como um dos componentes.

Grupo prostético: íon metálico ou composto orgânico (diferente de um aminoácido), que se liga covalentemente a uma proteína e é essencial para sua atividade.

Holoenzima: a molécula cataliticamente ativa de uma enzima, incluindo todas as subunidades necessárias, grupos protéticos e cofatores.

Bioquímica

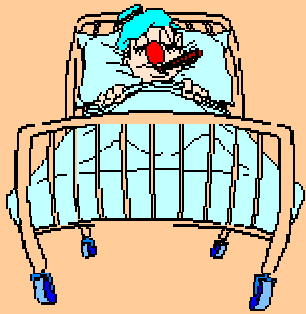


Dra. Kátia R. P. de Araújo Sgrillo

katiasgrillo@uesc.br

Atividade enzimática

A **concentração de enzimas intracelulares no plasma** e **centenas de vezes menor** que no interior das células, onde elas são sintetizadas.



Em **condições patológicas**, quando as células são lesadas, suas concentrações plasmáticas tornam-se anormalmente elevadas, revelando a instalação da moléstia. Ainda mais o tipo de enzima cuja concentração plasmática aumenta pode indicar o tecido ou órgão que sofreu a injúria. Por isso a dosagem de enzimas no plasma é prática corrente para a elucidação e o acompanhamento de muitos casos patológicos.

Exemplos

Enzimas cujas concentrações plasmáticas são alteradas em determinadas condições patológicas

Enzimas

Transaminases

Creatinina quinase, lactato desidrogenase

Amilase, lipase

Fosfatase alcalina, γ -glutamil transferase

Fosfatase ácida

Creatinina quinase

Lactato desidrogenase

Amilase

Moléstias

Hepatite

Enfarte do miocárdio

Pancreatite

Processos obstrutivos biliares

Neoplasia de próstata

Lesão cerebral grave

Anemia hemolítica

Parotidite (caxumba)

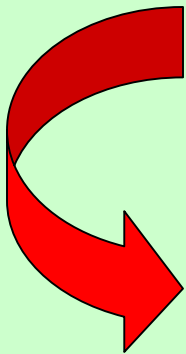
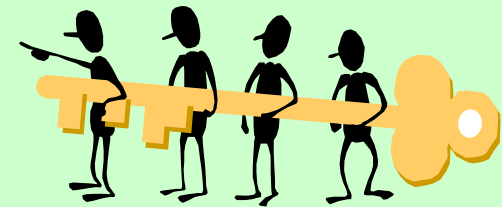




Regulação da atividade enzimática

A regulação da velocidade de reação das enzimas é essencial para o organismo coordenar seus inúmeros processos metabólicos.

Algumas enzimas com funções reguladoras especializadas respondem a *efetores alostéricos*.



Enzima Reguladora: enzima que possui uma função reguladora graças a sua **capacidade de apresentar alterações na sua atividade catalítica por mecanismos alostérico** ou por modificações covalentes.

O que são

efetores

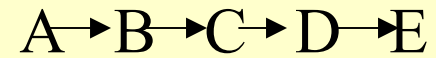


e enzimas alostéricas ?

Efetores - são moléculas que se ligam de modo **não-covalente** a um sítio **diferente do sítio ativo**. Podem ser: o próprio **substrato** (**homotrófico**) ou algum **produto da via metabólica** (**heterotrófico**).

Enzimas alostéricas
são reguladas por moléculas denominadas **efetores** que se ligam de modo **não-covalente** a um sítio **diferente do sítio ativo**.

Efetores



Homotróficos: quando o próprio substrato serve como efetor. Normalmente funciona como efetor positivo.

A presença de uma molécula em um sítio na enzima aumenta as propriedades catalíticas dos outros sítios de ligação ao substrato. Sítios exibem *cooperatividade*.

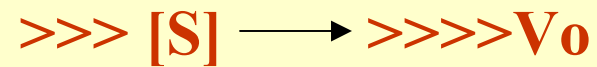
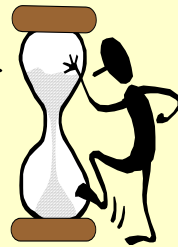
Quanto + substrato tem, mas a enzima funciona



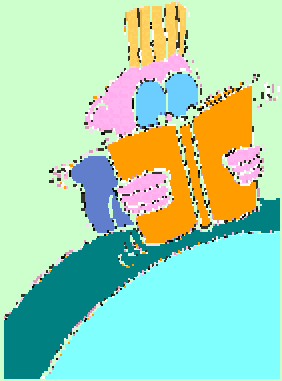
Heterotróficos: efetor diferente do substrato. Exemplo: A enzima que converte A em B possui um sítio alostérico, que se liga ao produto final E. Se a [E] aumenta a enzima inicial na rota é inibida. Inibição por feedback serve para coordenar o fluxo de moléculas de substrato nas reações de acordo com a necessidade da célula (rota específica).

Velocidade de reação

A velocidade da maioria das enzimas é sensível a alterações na concentração de substrato [S]

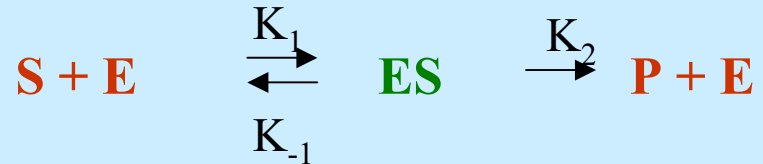


A velocidade de uma reação (v) catalisada por uma enzima aumenta conforme a concentração do substrato até atingir uma **velocidade máxima (V_{max})**. A obtenção de um platô na velocidade de reação em altas concentrações de substrato reflete a saturação pelo substrato de todos os sítios ativos de ligação disponíveis na enzima.



Equação de Michaelis-Menten

Descreve como a velocidade de reação varia com a [S]



Onde:

S - substrato

E - enzima

ES - complexo transitório enzima-substrato

P - produto

K_1 , K_{-1} e K_2 - constantes de velocidade

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

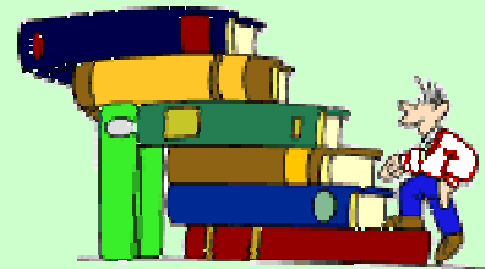
Onde:

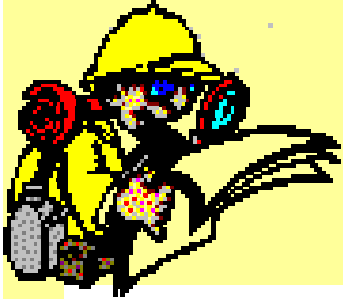
V_o - velocidade inicial de reação

V_{\max} velocidade máxima

K_m - constante de Michaelis-Menten = $(K_1 + K_2) / K_1$

[S] - concentração do substrato

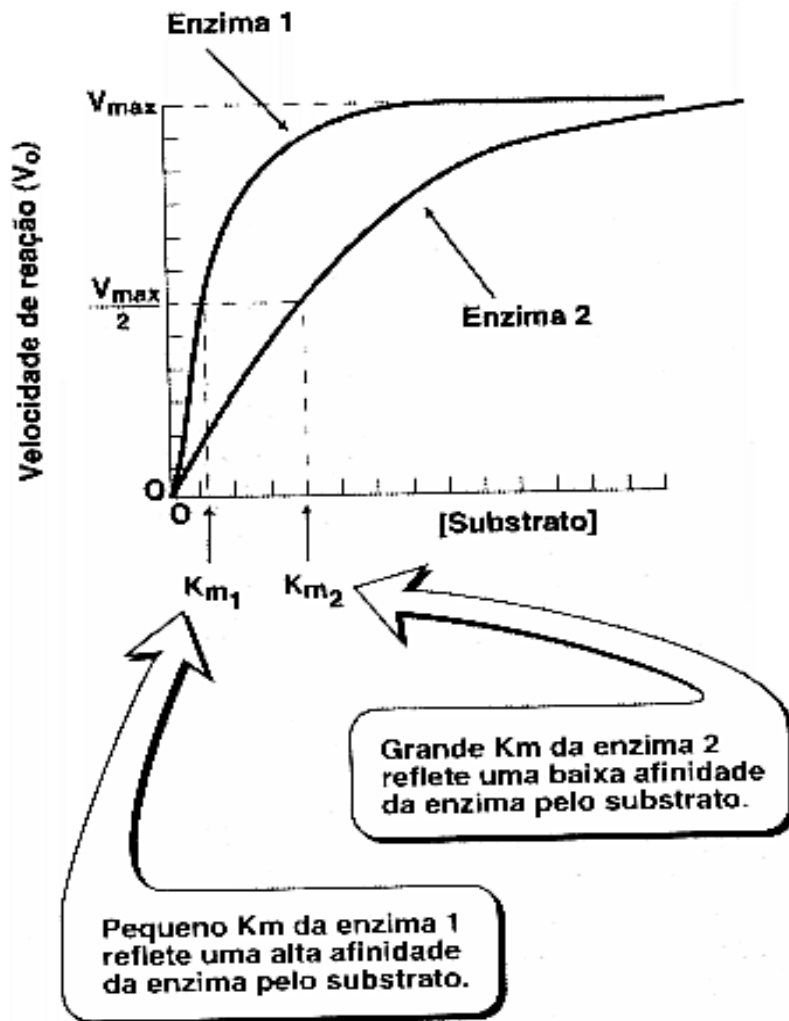




Conclusões importantes

Constante de Michaelis-Menten

$$K_m = (K_1 + K_2) / K_1$$

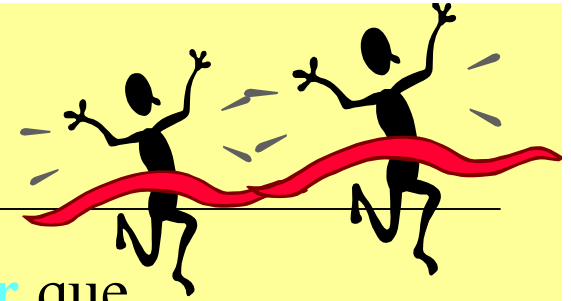


✓ K_m - é característico da enzima e do substrato. Não varia com a concentração da enzima.

✓ K_m pequeno - numericamente pequeno (baixo) reflete alta afinidade da enzima com o substrato.

✓ K_m grande - numericamente grande (alto) reflete baixa afinidade da enzima com o substrato.

Ordem da reação



✓ **Primeira ordem:** quando a $[S]$ é muito menor que o K_m , a velocidade de reação é proporcional à concentração do substrato.

✓ **Ordem zero:** quando a $[S]$ é muito maior que o K_m , a velocidade de reação é constante e igual a V_{max} .

Efeito da concentração do substrato na velocidade de reação para uma reação catalisada por enzimas →

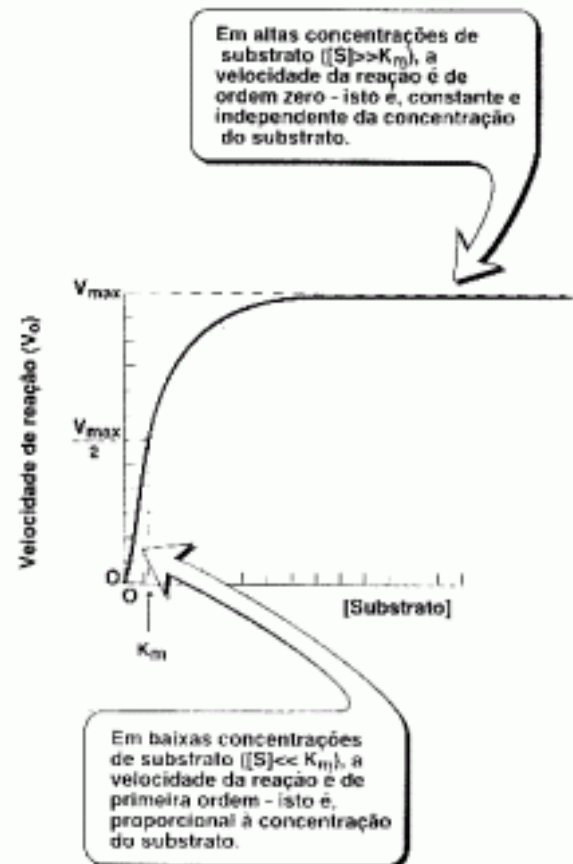
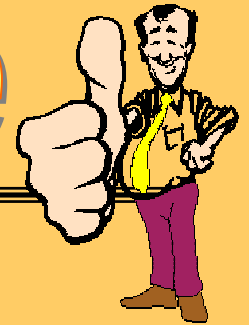
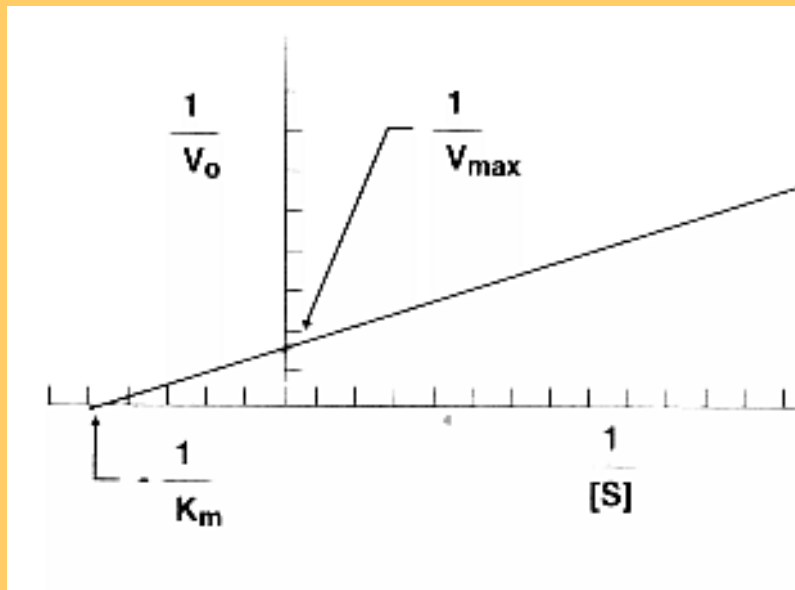


Gráfico de Lineweaver-Burke



Nem sempre é possível determinar quando V_{max} foi atingida. (ver gráfico anterior).

Quando se traça o gráfico $1/V_o$ versus $1/[S]$, uma linha reta é obtida. Esta curva é denominada de **Lineweaver-Burke** ou **curva duplo-recíproca**, e pode ser usada para **calcular o K_m e V_{max}** , bem como para determinar o **mecanismos de ação dos inibidores enzimáticos**.



Equação descrevendo a curva de **Lineweaver-Burke**

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

Obs.: $1/V_{max}$ é onde a curva corta o eixo Y e $1/K_m$ é onde a curva corta o eixo X.

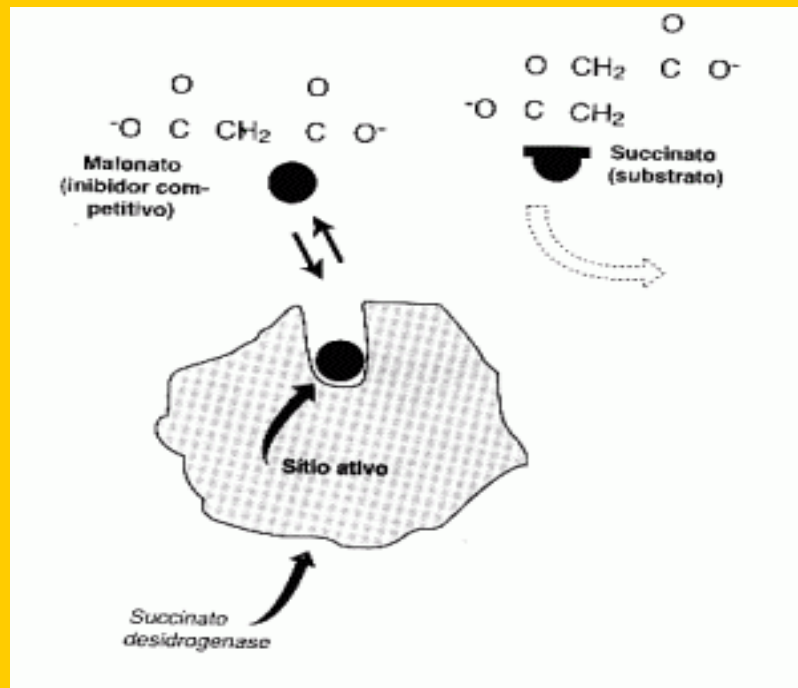
Compostos que tem a capacidade de se combinar com certas enzima e bloqueiam a sua capacidade catalítica.

inibidores



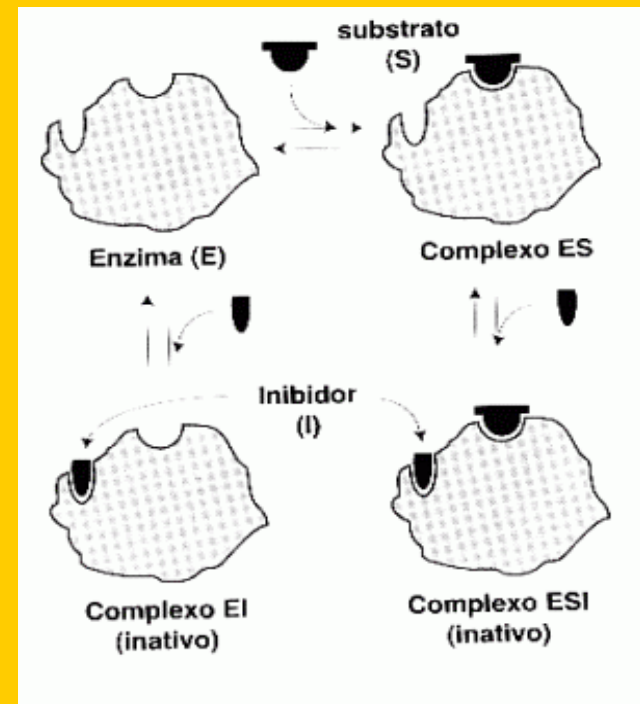
competitivos

Quando um composto compete com o substrato ou com uma coenzima pelo sítio ativo na proteína enzimática

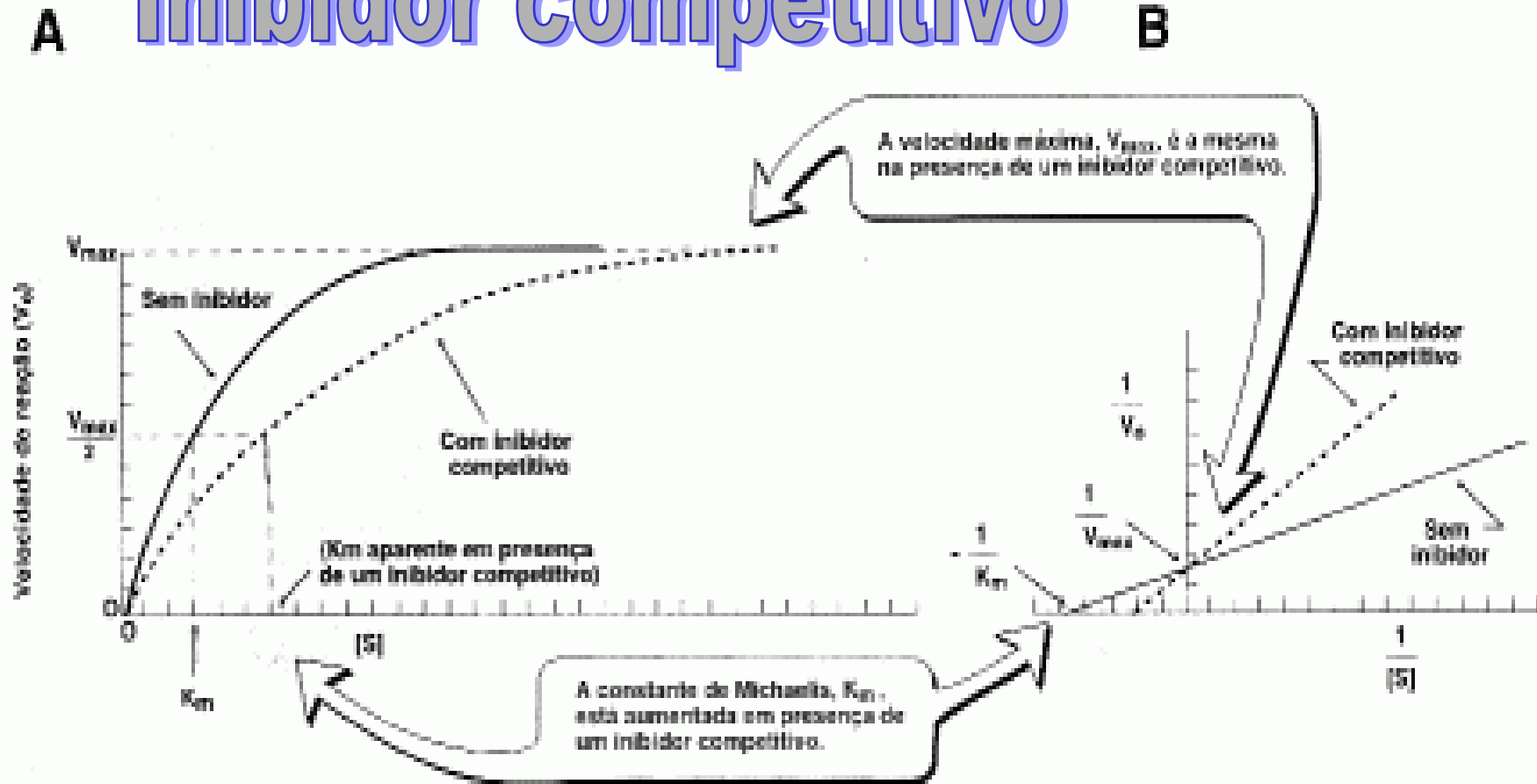


Não competitivos

O tipo de inibição que não pode ser anulado com o aumento da concentração do substrato.

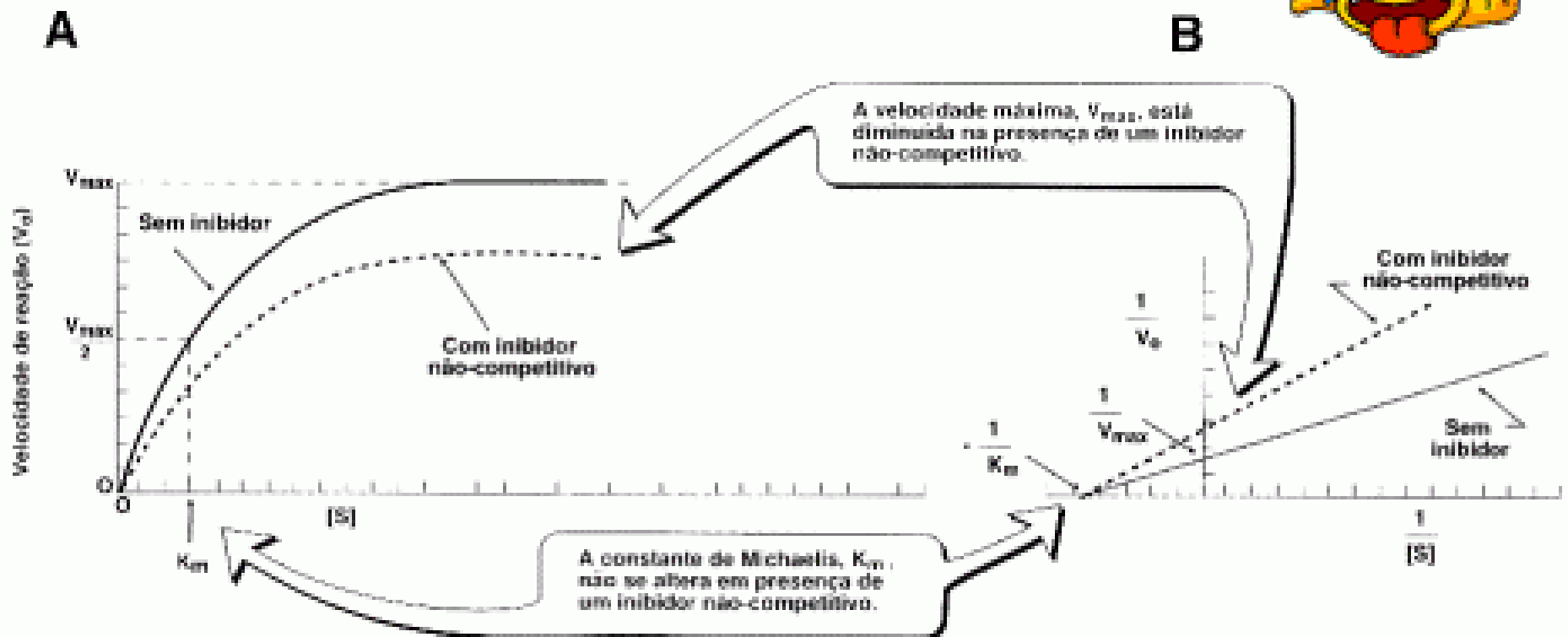


Inibidor competitivo



- Efeito do inibidor competitivo na curva de velocidade de reação (V_o) versus substrato.
- Gráfico de Lineweaver-Burke da inibição competitiva de uma enzima

Inibidor não competitivo



- Efeito do inibidor não-competitivo na curva de velocidade de reação (V_o) versus substrato.
- Gráfico de Lineweaver-Burke da inibição não-competitiva de uma enzima.



Termos para não esquecer...

Enzima Alostérica: uma enzima reguladora com atividade catalítica modulada pela ligação não covalente de um metabólito específico em um sítio diferente do sítio ativo.

Enzima Homotrópica: enzima alostérica que utiliza seu substrato como modulador.

Enzima Heterotrópica: enzima alostérica que requer um outro modulador diferente do seu substrato.

Enzima Reguladora: enzima que possui uma função reguladora graças a sua capacidade de apresentar alterações na sua atividade catalítica por mecanismos alostérico ou por modificações covalentes.

Termos para não esquecer...



Enzima repressível: ocorre normalmente nas bactérias, enzima cuja síntese é inibida quando o seu produto de reação estiver facilmente disponível.

Enzimas Constitutivas: enzimas necessárias à células durante todo o tempo e presentes em nível quase constante; por exemplo, muitas enzimas das vias metabólicas centrais. Algumas vezes são chamadas de “*enzimas da administração interna*”.

Exercício

