


unesp  UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Jaboticabal
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias 

Enzimas

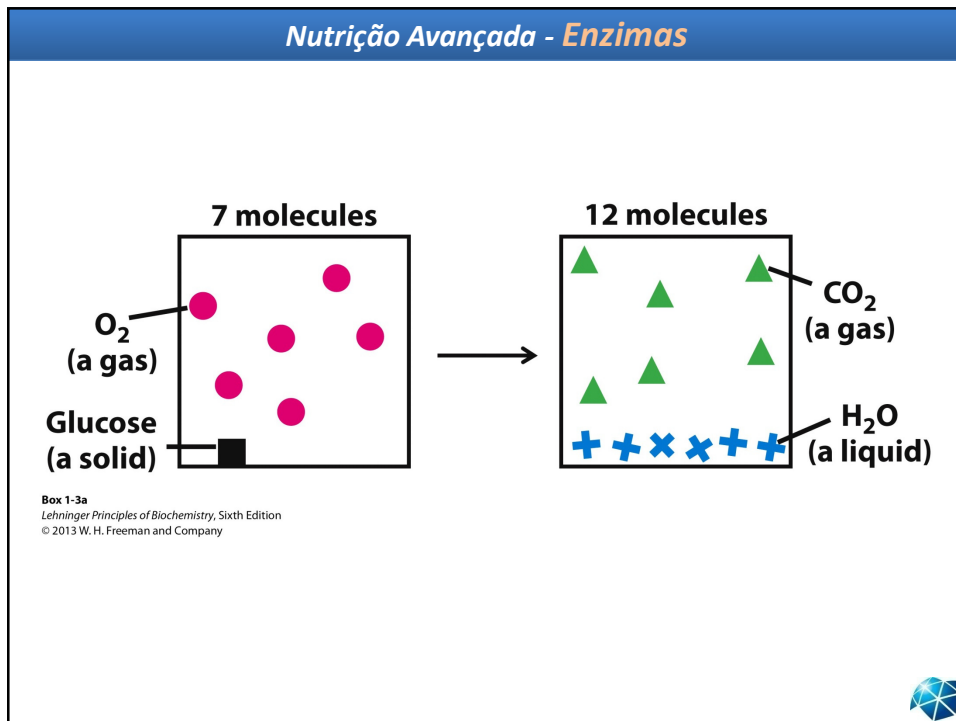
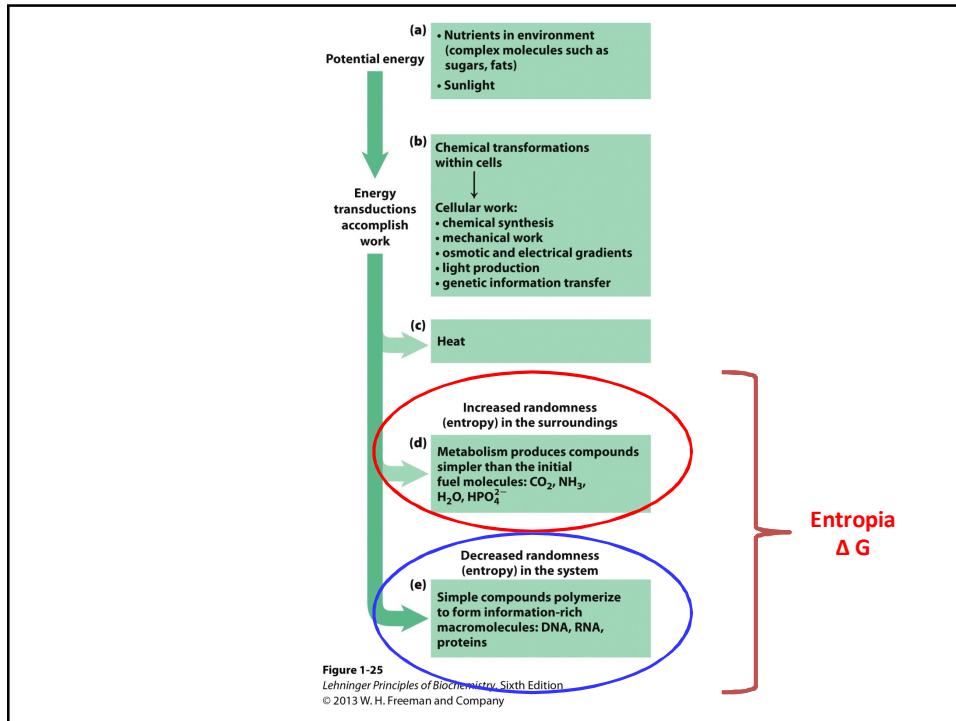
Prof. Luciano Hauschild

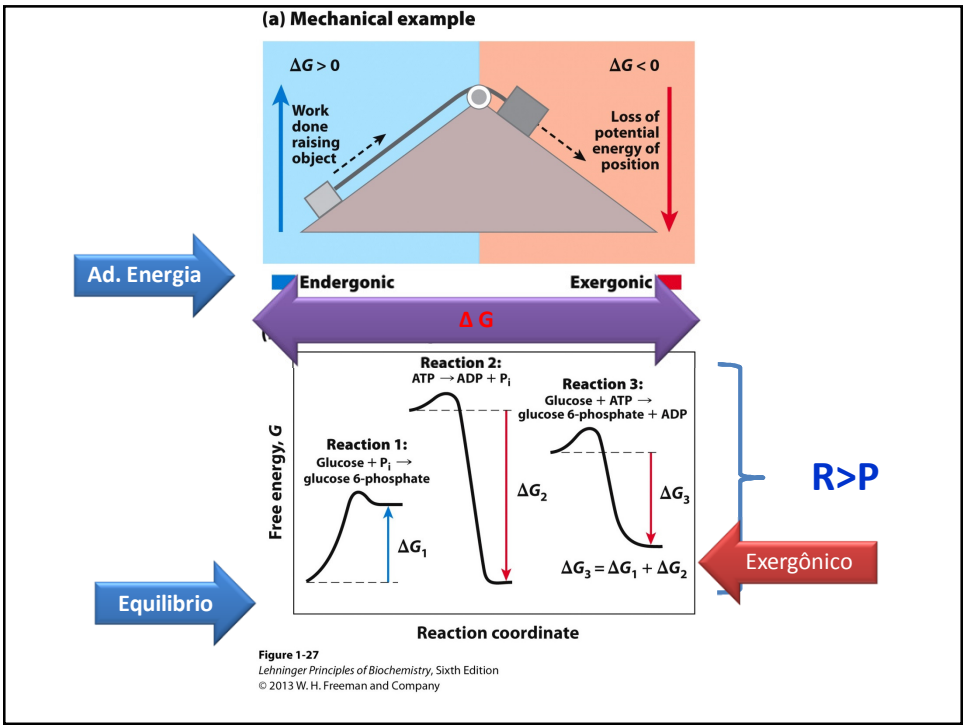
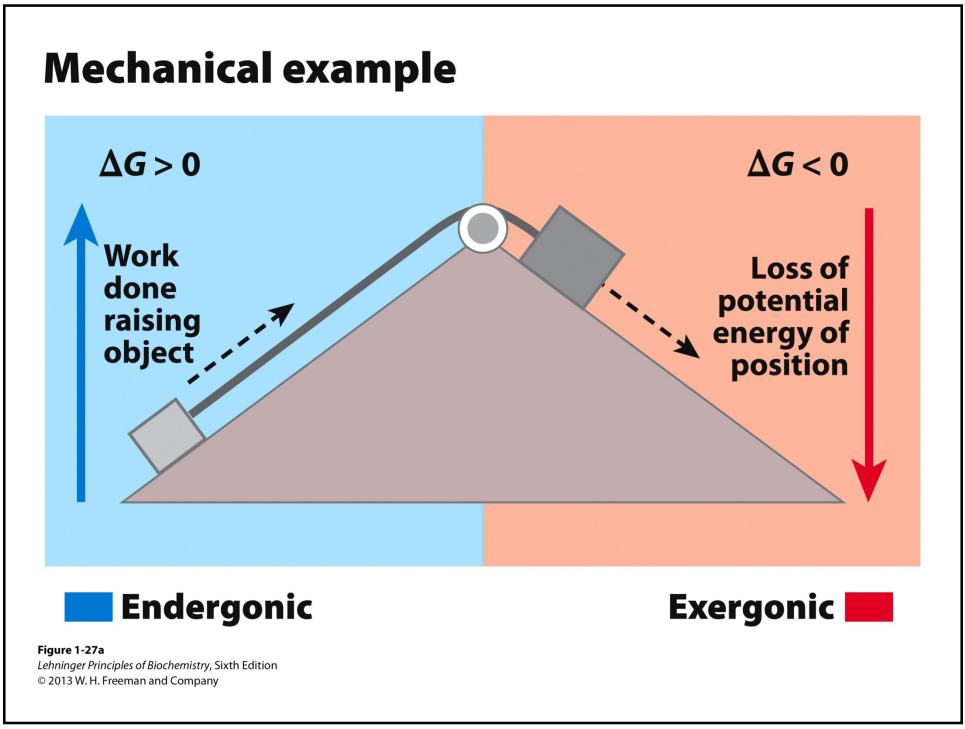


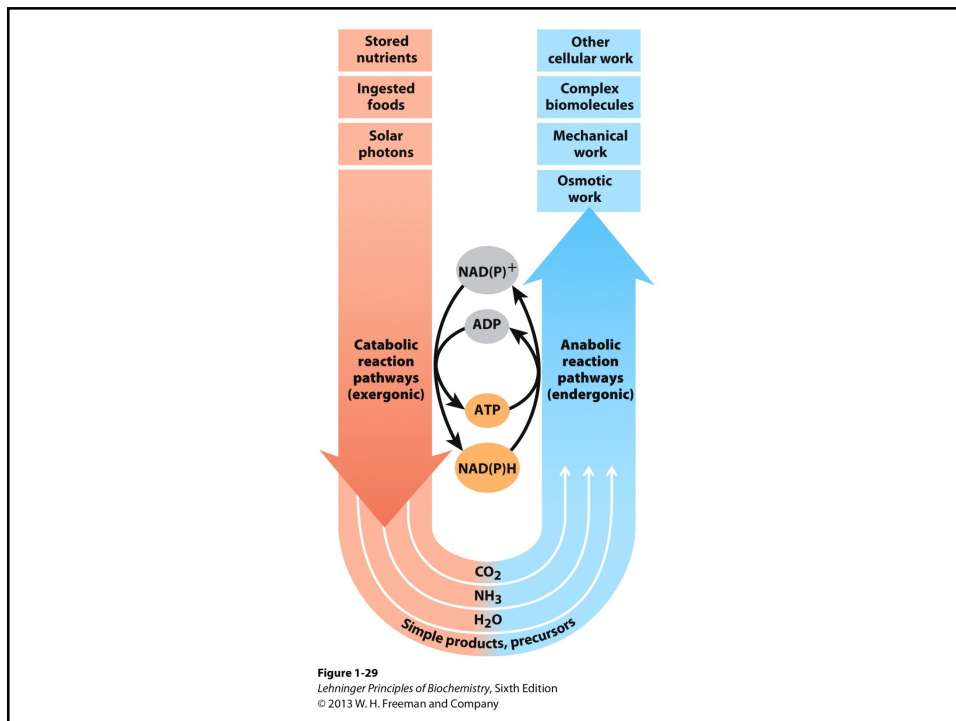
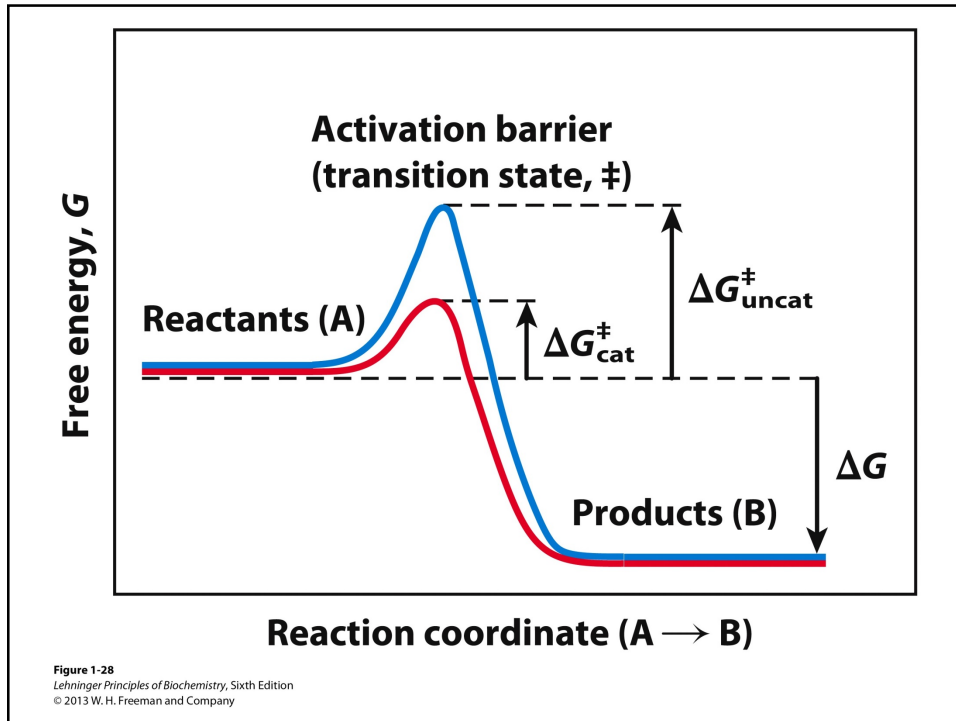
Plano de aula

- 1) Atuação das enzimas na cinética de reação
- 2) Classificação e nomenclatura
- 3) Fatores que interferem na atividade enzimática
- 4) Cinética de reação enzimática
- 5) Inibidores enzimáticos
- 6) Reguladores enzimáticos
- 7) Cofatores enzimáticos
- 8) Importância das enzimas no metabolismo animal



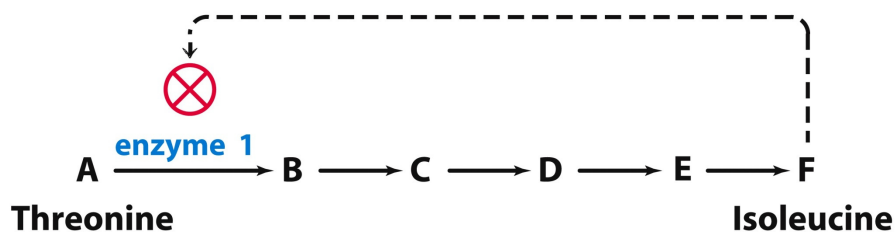






Nutrição Avançada - Enzimas

O metabolismo é regulado para alcançar o balanço



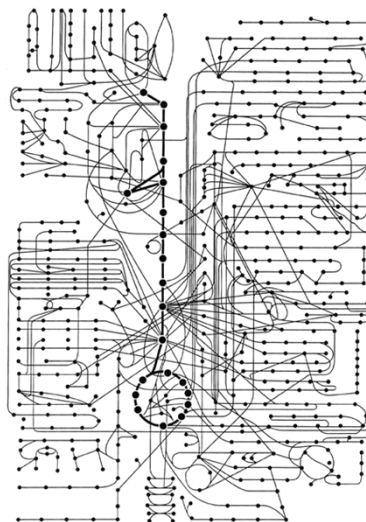
Unnumbered 1 p28
Lehninger Principles of Biochemistry, Sixth Edition
© 2013 W. H. Freeman and Company



Nutrição Avançada - Enzimas

Catalizadores biológicos:

- Vias metabólicas;
- Adaptação do metabolismo a mudanças;
- Acido ribonucleico (ribozimas).



Nutrição Avançada - *Enzimas*

- **Mantuação da vida celular – reações químicas:**

1- velocidades adequadas à fisiologia celular

2 – Precisam ser altamente específicas



Nutrição Avançada - *Enzimas*



Nutrição Avançada - Enzimas

- Enzimas são catalizadores muito eficientes
- Podem aumentar a velocidade de uma reação em até 10^{17} vezes ($10^{17} = 100.000.000.000.000.000$)

Cyclophilin	10^5
Carbonic anhydrase	10^7
Triose phosphate isomerase	10^9
Carboxypeptidase A	10^{11}
Phosphoglucomutase	10^{12}
Succinyl-CoA transferase	10^{13}
Urease	10^{14}
Orotidine monophosphate decarboxylase	10^{17}

Exemplos de algumas enzimas e o aumento na velocidade de reação causado por cada uma delas



Nutrição Avançada - Enzimas

Atuação das enzimas

Conversão irreversível:

$$v = \frac{d[B]}{dt} \text{ ou } v = -\frac{d[A]}{dt}$$

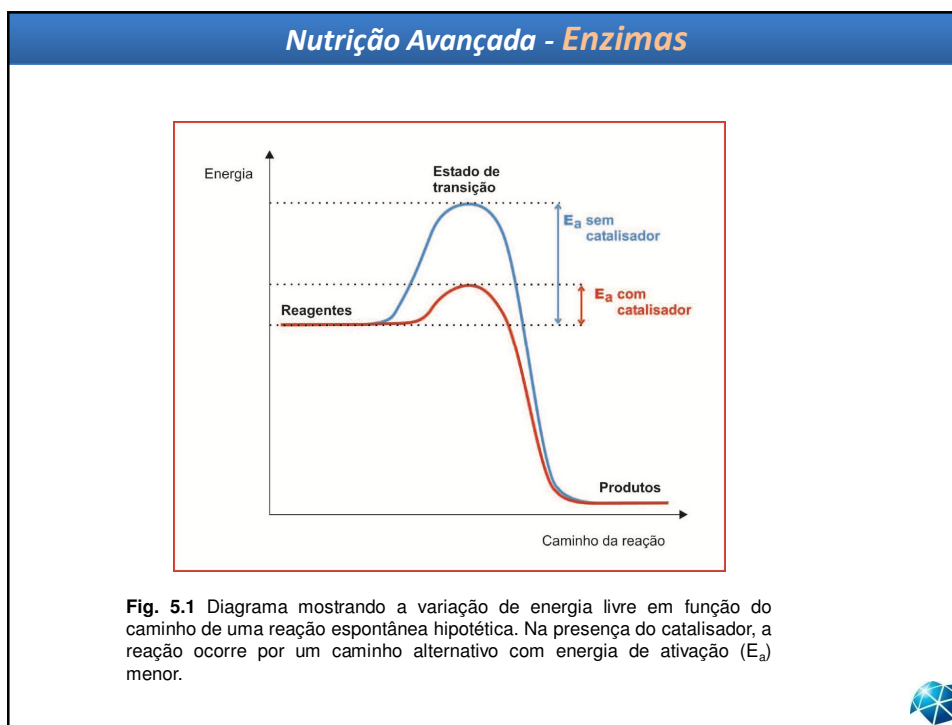
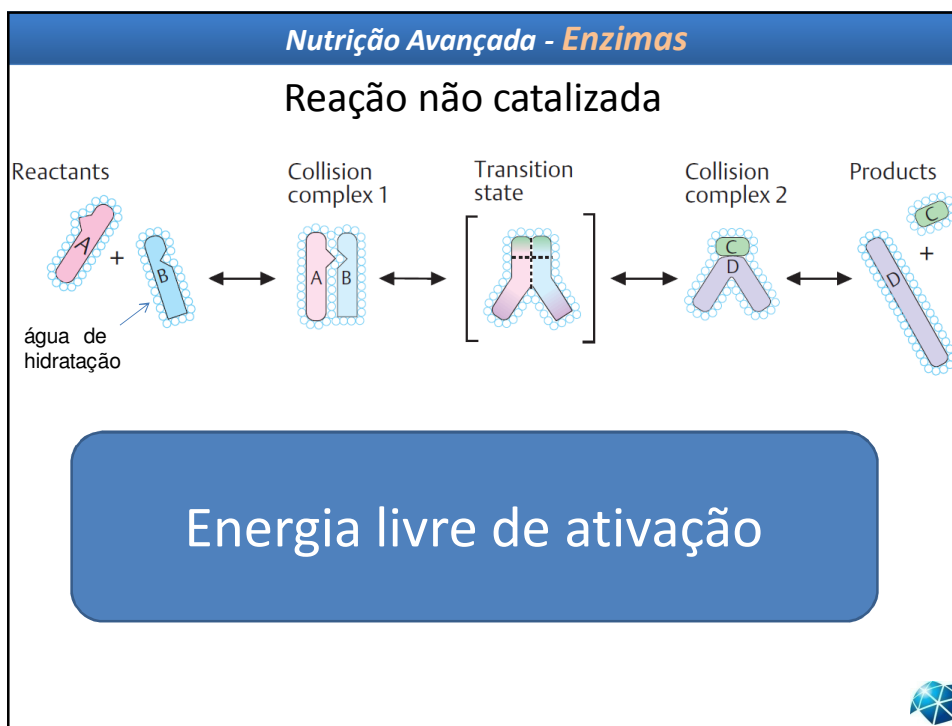
A veloc. é proporcional a concentração de A

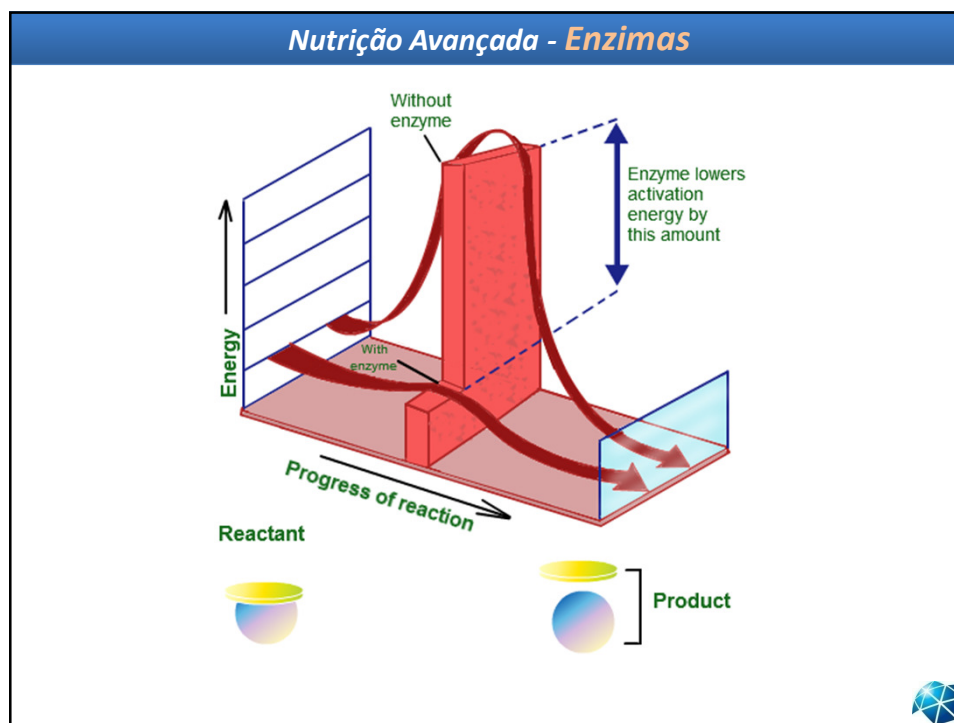
$$v = k [A]$$

Reações complexas



$$V = k(A) (B)$$





Nutrição Avançada - Enzimas

Atuação das enzimas

Aumento da veloc. reação:

1. Aumentando a concentração do reagente
2. Elevando temperatura
3. Diminuindo a energia ativação

Nutrição Avançada - Enzimas

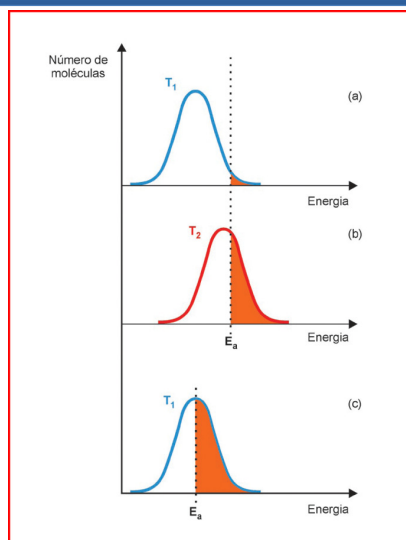


Fig. 5.3 Alteração da distribuição de energia entre as moléculas de uma população que se encontram em uma temperatura T_1 (a) por aumento da temperatura ($T_2 > T_1$) (b) e pela presença de um catalisador (c). A área colorida representa a fração da população com energia igual ou maior do que a energia de transição (E_a).



Nutrição Avançada - Enzimas



Nutrição Avançada - Enzimas

A eficiência da catálise enzimática deriva da ligação do substrato à enzima

- Sítio ativo
- AA
- Modelo rígido chave –fechadura??
- Substrato induz mudança enzima



Nutrição Avançada - Enzimas

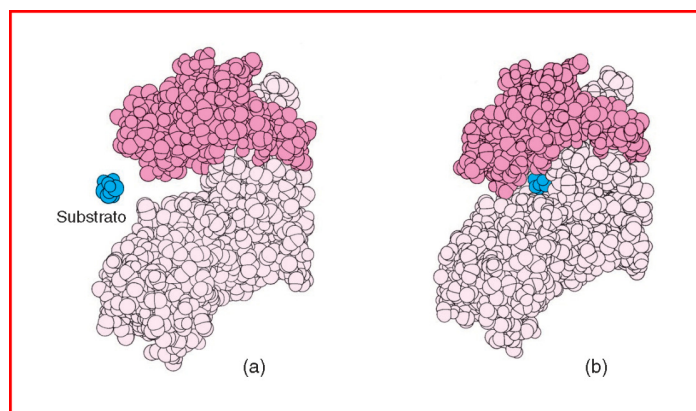
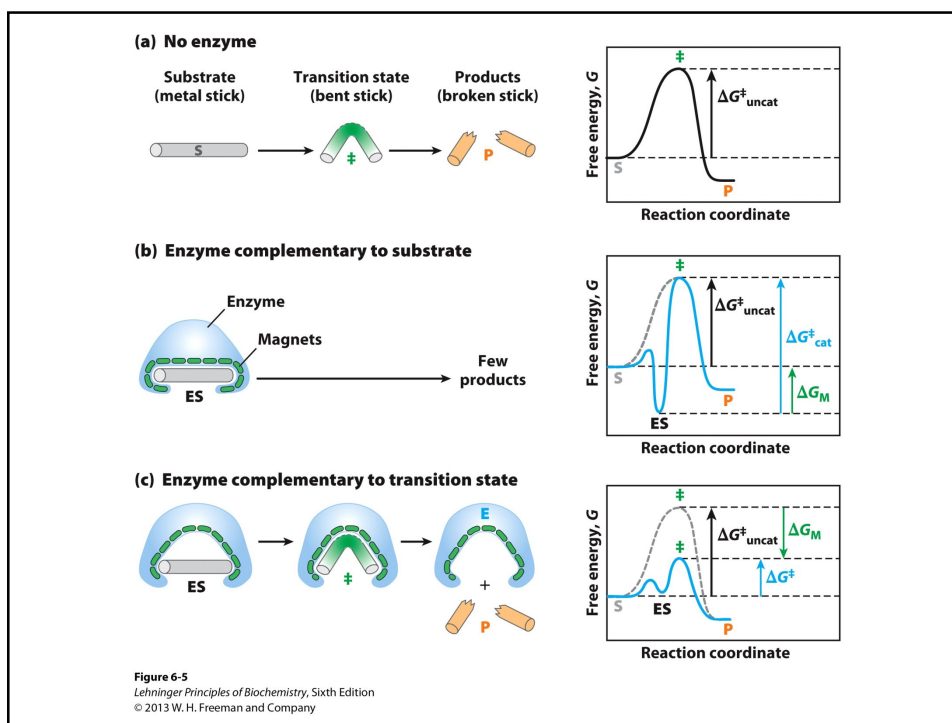


Fig. 5.4 Mudança da conformação da enzima induzida pela ligação com o substrato. O exemplo mostra a hexoquinase antes **(a)** e depois **(b)** de se ligar ao substrato, a glicose. A molécula da enzima consta de dois domínios, que se aproximam, encaixando o substrato.





Nutrição Avançada - Enzimas

As enzimas apresentam outras grandes vantagens e relação aos catalizadores não-enzimáticos

- Sintetizadas pela própria célula
- A atividade pode ser regulada
- Diminuem a energia ativação
- São específicas



Nutrição Avançada - Enzimas

Classes de enzimas

- 2000 enzimas
- Com base nas especificidades de reação de substrato
- Todas enzimas estão catalogadas num cadastro (EC- de “enzyme comission”. Ex.:**1.13.11.11**).
- O primeiro indica a qual das seis grandes classes de proteínas ela pertence
- Os dois seguintes indicam sub-classe
- O último indica qual é a enzima propriamente dita



Nutrição Avançada - Enzimas

Classe	Tipo de reação	Sub-classes
1 Oxidoreductases	<p>○ = Reduction equivalent</p>	Dehydrogenases Oxidases, peroxidases Reductases Monooxygenases Dioxygenases
2 Transferases		C ₁ -Transferases Glycosyltransferases Aminotransferases Phosphotransferases
3 Hydrolases		Esterases Glycosidases Peptidases Amidases
4 Lyases ("synthases")		C-C-Lyases C-O-Lyases C-N-Lyases C-S-Lyases
5 Isomerases		Epimerases cis trans Isomerases Intramolecular transferases
6 Ligases ("synthases")		C-C-Ligases C-O-Ligases C-N-Ligases C-S-Ligases



Nutrição Avançada - Enzimas

Grau de especificidade

Massas molares de enzimas e de seus substratos

Enzima	Substrato	Massa molar aproximada
Catalase		200.000
	H ₂ O ₂	34
Urease		500.000
	Uréia	60
Fosfotquinase		380.000
	Frutose-6-fosfato	300
Glutamina sintase		600.000
	Glutamato	150



Nutrição Avançada - Enzimas

Fatores que interferem na atividade enzimática

pH ótimo de enzimas

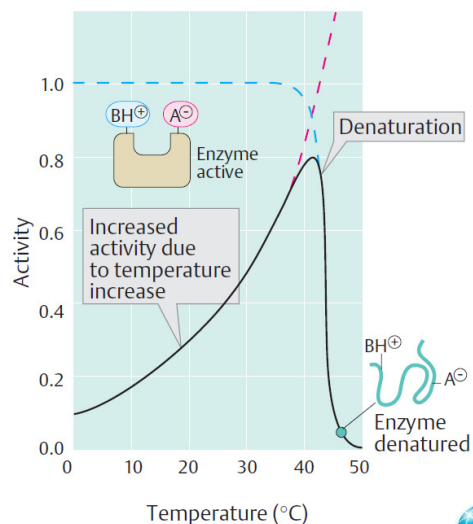
Enzima	pH ótimo
Pepsina	1,5
Fosfatase ácida	4,5
Urease	6,5
Tripsina	7,8
Arginase	9,7



Nutrição Avançada - Enzimas

Efeito da temperatura na atividade enzimática

- O aumento de temperatura geralmente acarreta um aumento na atividade enzimática
- Até um valor de temperatura em que começa a haver desnaturação e consequente perda de atividade



Nutrição Avançada - Enzimas

Cinética Enzimática

- Enzima e substrato formam um complexo transitório



$$v = k [A]$$

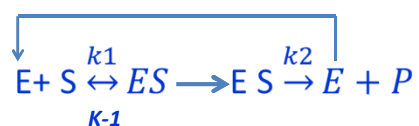
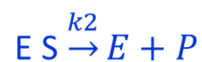
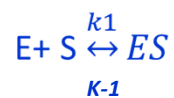
- Δt

- Veloc inicial (v_0) = -10% A convertido em B



Nutrição Avançada - *Enzimas*

Cinética Enzimática



Nutrição Avançada - *Enzimas*

Cinética Enzimática

$$V_1 = K_1 [E] [S]$$

$$V_{-1} = K_{-1} [ES]$$

$$V_2 = K_2 [ES]$$

$$K_{-1} \gg K_2$$



Nutrição Avançada - Enzimas

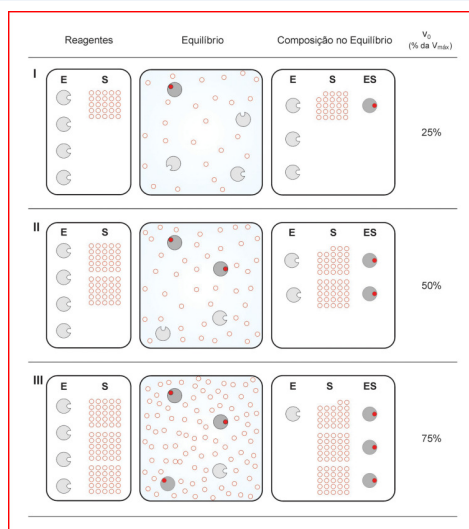


Fig. 5.7 Esquema ilustrativo do equilíbrio $E + S \rightleftharpoons ES$, em três situações (I, II, III) de concentrações diferentes de substrato e mesma concentração de enzima, analisadas após um mesmo tempo inicial. As velocidades de reação (v_0) são indicadas em porcentagens da $v_{máx}$. Na prática, a proporção $[S]/[E]$ é muito maior do que a representada no esquema.



Nutrição Avançada - Enzimas

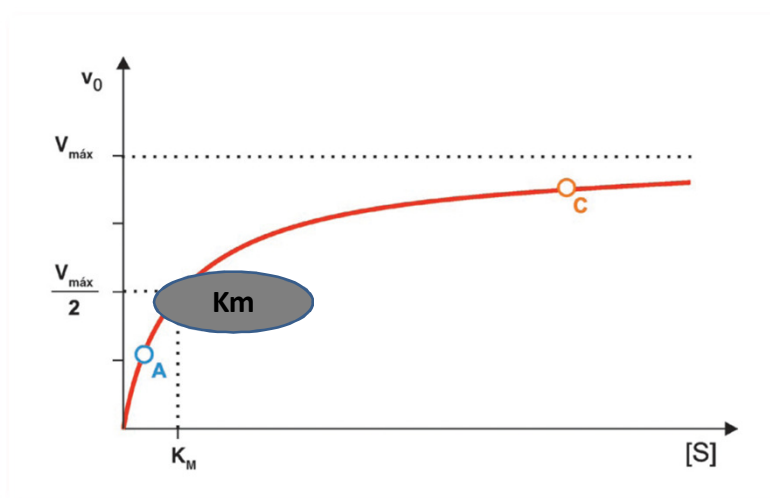


Fig. 5.9 Variação da velocidade da reação enzimática (v_0) em função da concentração do substrato (S).



Nutrição Avançada - Enzimas

A dosagem da enzima é obtida pela medida de sua atividade

- ✓ Dosagem em massa por volume
- ✓ Purificar enzimas
- ✓ Dosagem colorimétrica
- ✓ Ativ. Enzimática
 - ✓ Plasma



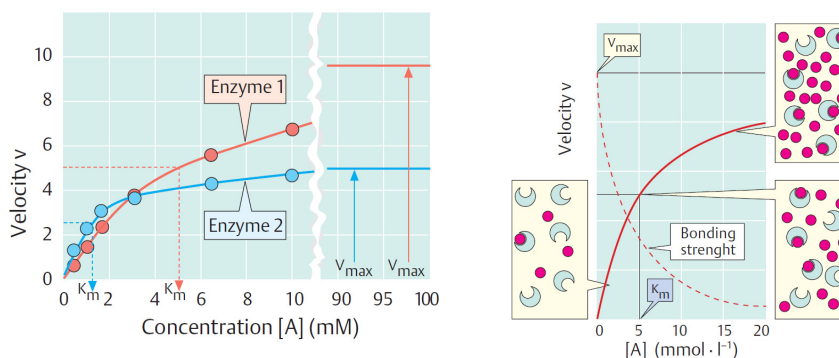
Nutrição Avançada - Enzimas

Resultados de exames laboratoriais de dosagens de enzimas plasmáticas em dois indivíduos (A e B)

Enzimas	Atividade enzimática no soro (U/L)		
	Individuo A	Individuo B	Valores referência
Aldolase	2	2,1	Até 3
Amilase	120	125	60-160
Colinesterase	2.700	3200	1900-3800
Creatina quinase	62	50	10-80
Lactato desidrogenase	398	220	120-240
Fosfatase ácida total	7,3	15,6	4,8-13,5
Fosfatase ácido protática	2,8	7,7	Até 3,7
Fosfatase alcalina	295	80	50-250
Aspartato transaminase	560	12	Até 18
Alanina transaminase	1095	18	Até 21



Cinética de Michaelis–Menten



- Velocidade x concentração de substrato
- V_{max} : velocidade máxima
- K_m : concentração de substrato na qual a reação acontece na metade da velocidade máxima
- Na V_{max} virtualmente todas as moléculas de enzima estão com seus sítios ativos ocupados
- No K_m (constante de Michaelis) metade das moléculas de enzima presentes no meio de reação estão com seus sítios ocupados.
- K_m é uma medida da afinidade da enzima pelo substrato, quanto menor o K_m maior a afinidade
- A curva se aproxima de V_{max} , mas nunca alcança esse valor isso caracteriza uma **assíntota**.

Nutrição Avançada - Enzimas

Importância da cinética enzimática

- ✓ Explica como as enzimas trabalham;
- ✓ Permite prever o comportamento das enzimas em organismos vivos.



Nutrição Avançada - Enzimas

Valores inversos de V_0 e $[S]$

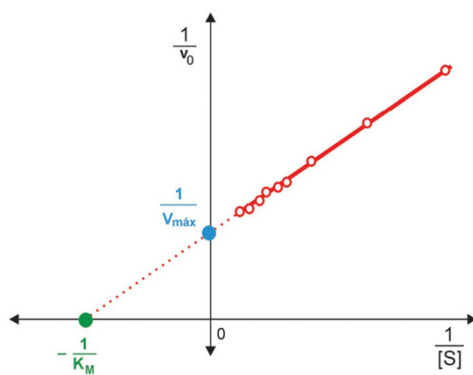


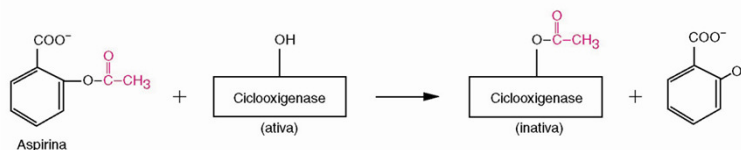
Fig. 5.12 Transformação de Lineweaver-Burk para os resultados de um experimento onde foram preparados tubos contendo diversas concentrações de substrato e a mesma concentração de enzima; após a incubação, mediu-se V_0 . Os inversos dos valores das concentrações de substrato utilizadas e os inversos dos valores de v_0 compõem uma reta (linha contínua), que, extrapolada (linha pontilhada), permitem a determinação dos valores de K_M e de $V_{máx}$.



Nutrição Avançada - Enzimas

Inibidores não competitivos

- ✓ Produzidos pelas próprias células: utilizados controle reações
- ✓ Aplicações farmacológicas (Sulfonamida)
- ✓ Tipos:
 - ✓ Irreversíveis
 - ✓ Reversível



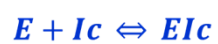
Reação de inativação da ciclooxigenase por reação irreversível com ácido acetilsalicílico (aspirina).



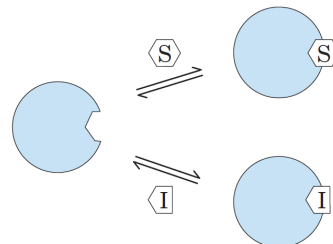
Nutrição Avançada - Enzimas

Inibidores competitivos

- Competem com o substrato



$$K_{Ic} = \frac{[E I_c]}{[E] [I_c]}$$



Nutrição Avançada - Enzimas

Inibidores competitivos

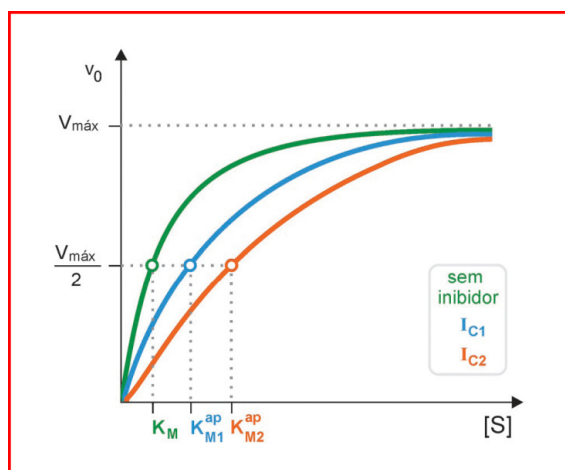
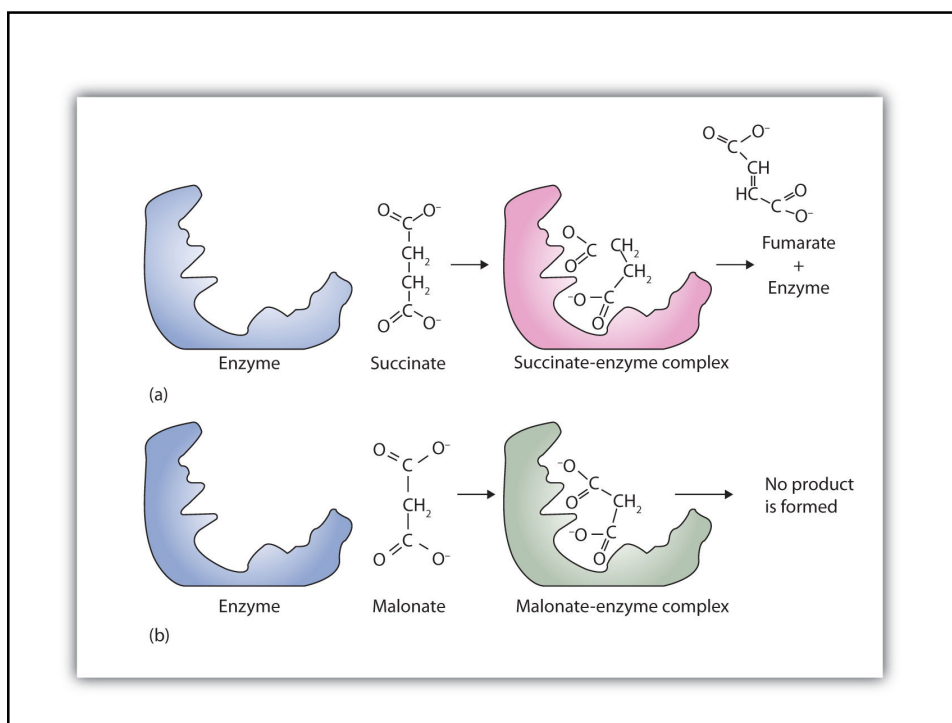


Fig. 5.14 Efeito de duas concentrações de inibidor competitivo ($I_{c1} < I_{c2}$) sobre a velocidade da reação enzimática. K_{M1} e K_{M2} são valores do K_M aparente para as concentrações I_{c1} e I_{c2} de inibidor, respectivamente.

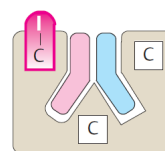




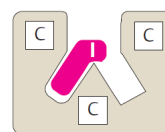
Nutrição Avançada - Enzimas

Inibição não-competitiva

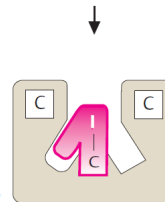
- Quando o inibidor interage com um grupamento importante para a atividade da enzima mas não pode ser deslocado pelo substrato a inibição é chamada não-competitiva
- “Substratos suicidas” possuem um grupamento reativo que forma uma ligação covalente estável com o sítio ativo da enzima



4. Modifying reagent



a



b

5. “Suicide substrate”

Nutrição Avançada - Enzimas

Inibidores não competitivos

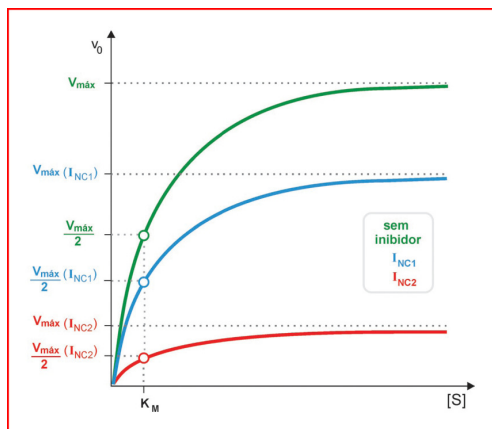


Fig. 5.15 Efeito de duas concentrações de inibidor não-competitivo ($I_{NC1} < I_{NC2}$) sobre a velocidade da reação enzimática. O valor do K_M permanece inalterado, mas as velocidades máximas decrescem com o aumento da concentração do inibidor.



Nutrição Avançada - Enzimas

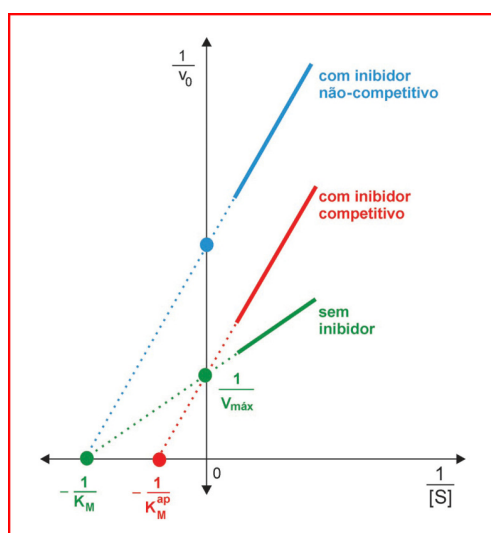
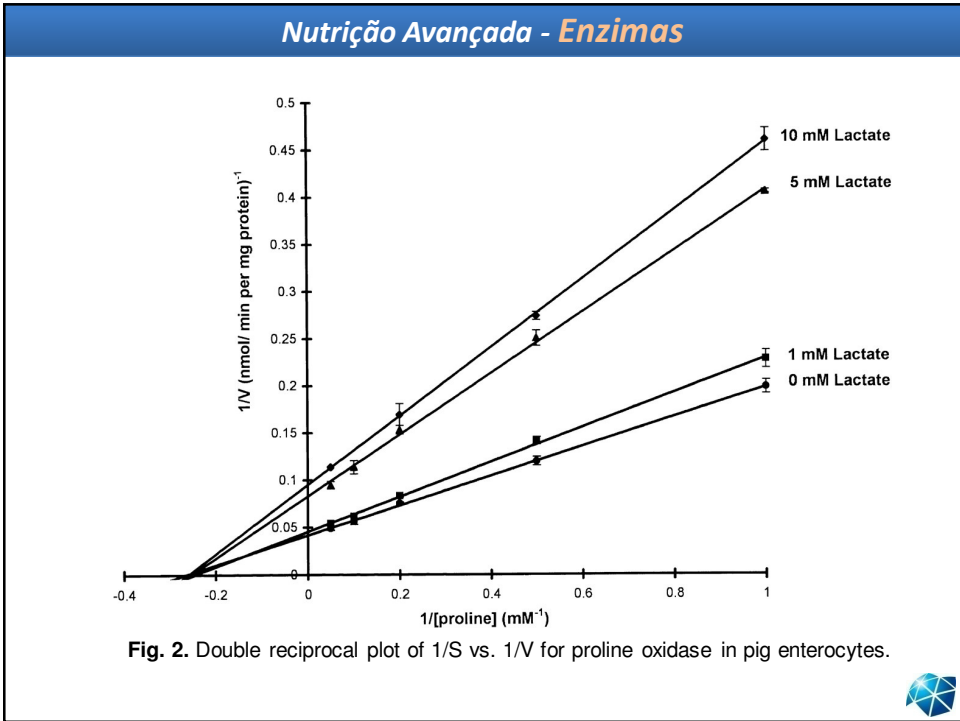
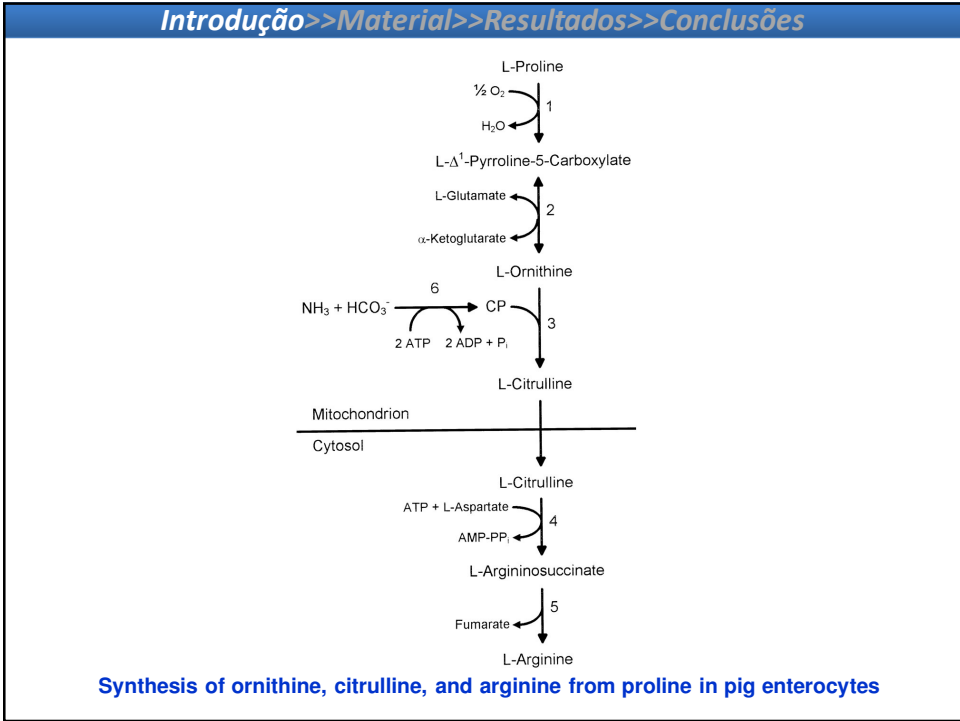


Fig. 5.16 Transformação de Lineweaver-Burk para a reação enzimática sem inibidor e em presença de inibidores competitivo e não-competitivo.





Nutrição Avançada - Enzimas

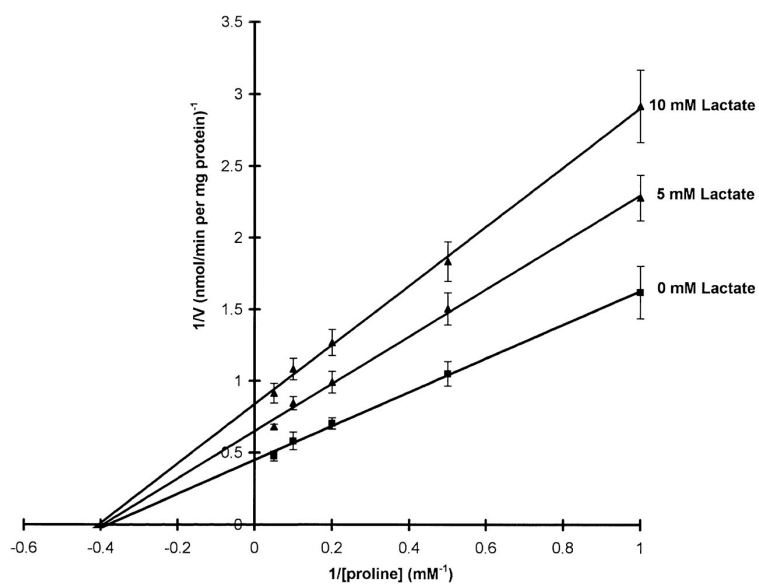


Fig.3. Double reciprocal plot of $1/S$ vs. $1/V$ for proline oxidase in pig liver.



Nutrição Avançada - Enzimas

Cofatores enzimáticos



Nutrição Avançada - Enzimas

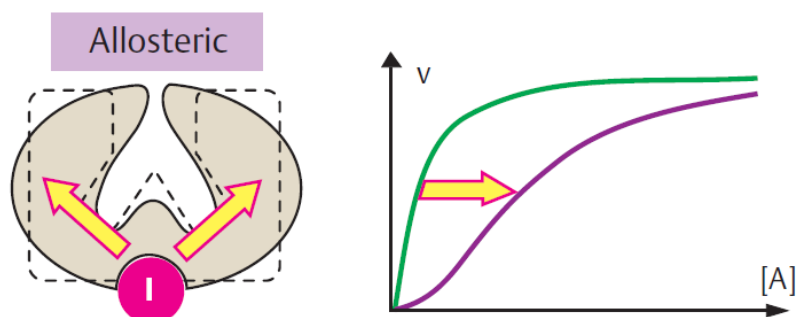
Importância da cinética enzimática

- ✓ Alteração da concentração das enzimas
- ✓ Alteração da atividade das enzimas
 - ✓ Regulação alostérica



Nutrição Avançada - Enzimas

Inibição alostérica



- Inibidores alostéricos se ligam a um sítio afastado do centro ativo
- Provocam uma mudança conformacional na enzima que indiretamente reduz sua atividade
- Não pode ser descrito pelo modelo de Michaelis–Menten (resulta em uma **sigmóide** em vez de uma **hipérbole**)

Nutrição Avançada - Enzimas

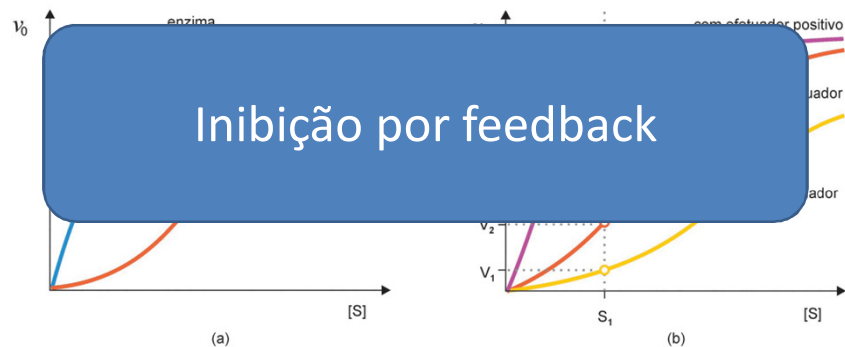


Fig. 19.1 a) Gráfico da velocidade de reação em função da concentração de substrato para uma enzima alostérica e para uma enzima michaeliana. A curva sigmoideal exibida pela enzima alostérica é o reflexo da cooperatividade apresentada pelas suas subunidades; as enzimas monoméricas, michaelianas, têm cinética hiperbólica. b) Cinética da reação catalisada por uma enzima alostérica na presença e na ausência de efetadores alostéricos. Com igual concentração de substratos (S_1), a velocidade da reação varia dependendo da presença de efetadores.



Nutrição Avançada - Enzimas

Importância da cinética enzimática

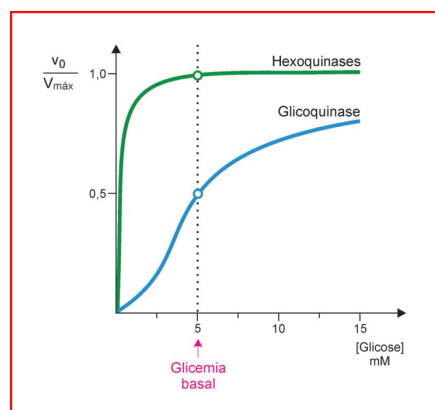


Fig. 20.6 Curvas de saturação com glicose para as hexoquinases I a III e para a glicocinase. Em valores próximos da concentração basal de glicose plasmática (5 mM),



Nutrição Avançada - Enzimas

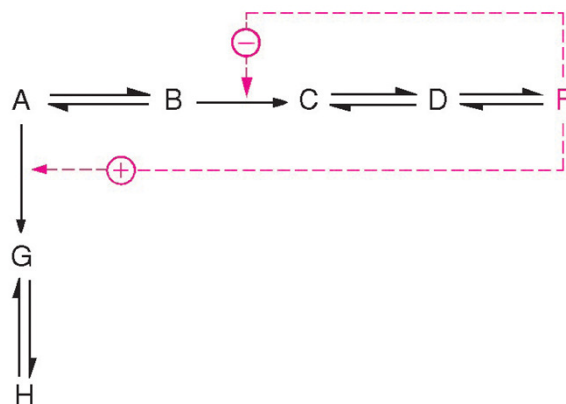


Fig. 19.2 Regulação alostérica de duas vias metabólicas hipotéticas. O composto F é efetador alostérico negativo da enzima que catalisa a conversão de B em C e efetador alostérico positivo da enzima que converte A em G — a oferta de A resulta em síntese aumentada de H.

