

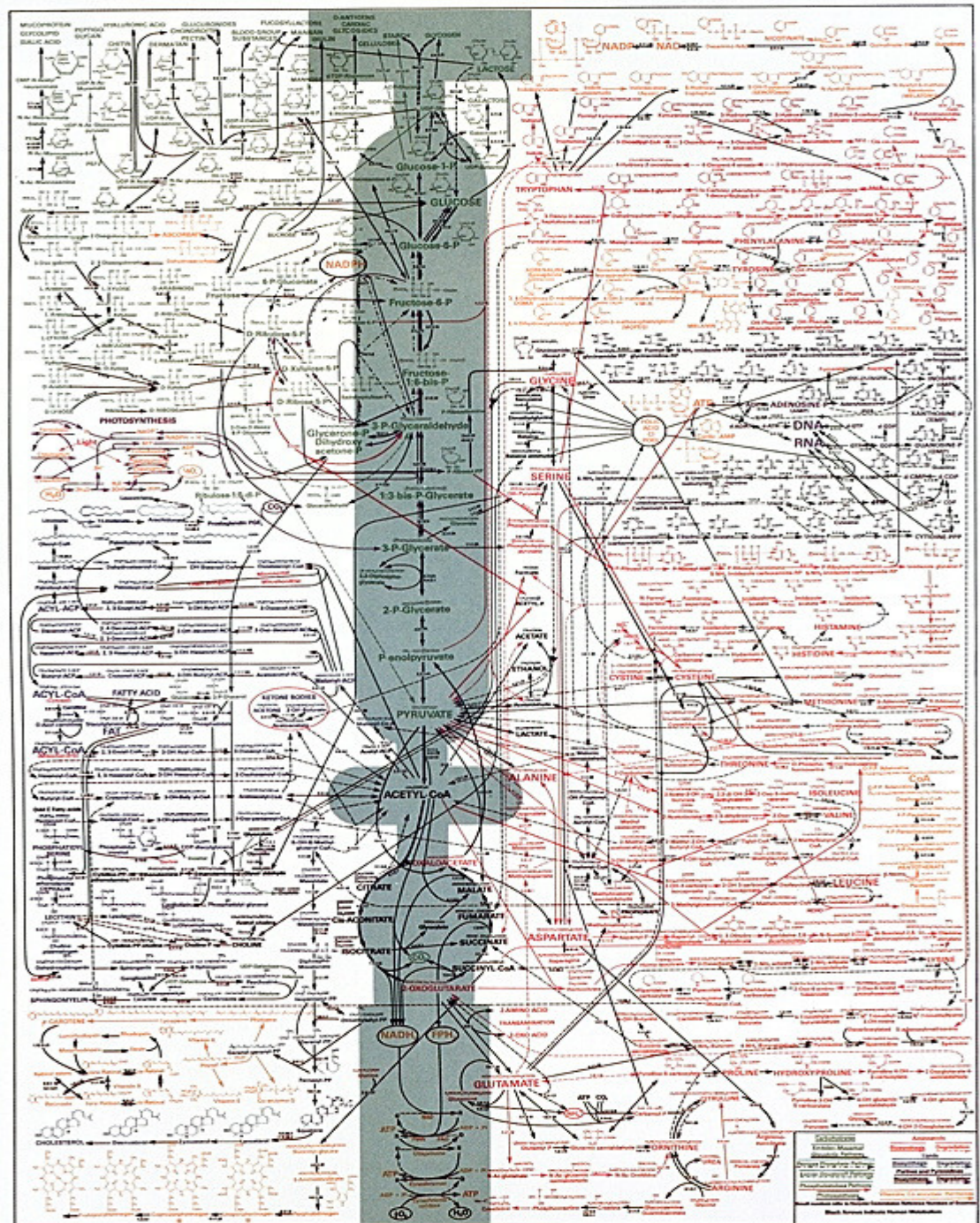
# Bioquímica Geral B

## Sumário

### ENZIMAS: Conceitos básicos

- Conceitos e propriedades gerais das enzimas
- Cofactores e coenzimas
- Nomenclatura e classificação das enzimas
- O centro activo
- Teoria do estado de transição
- Efeito da temperatura e do pH na actividade enzimática
- Mecanismos catalíticos

As reacções químicas  
nas células são  
mediadas por enzimas



# As enzimas são catalisadores biológicos

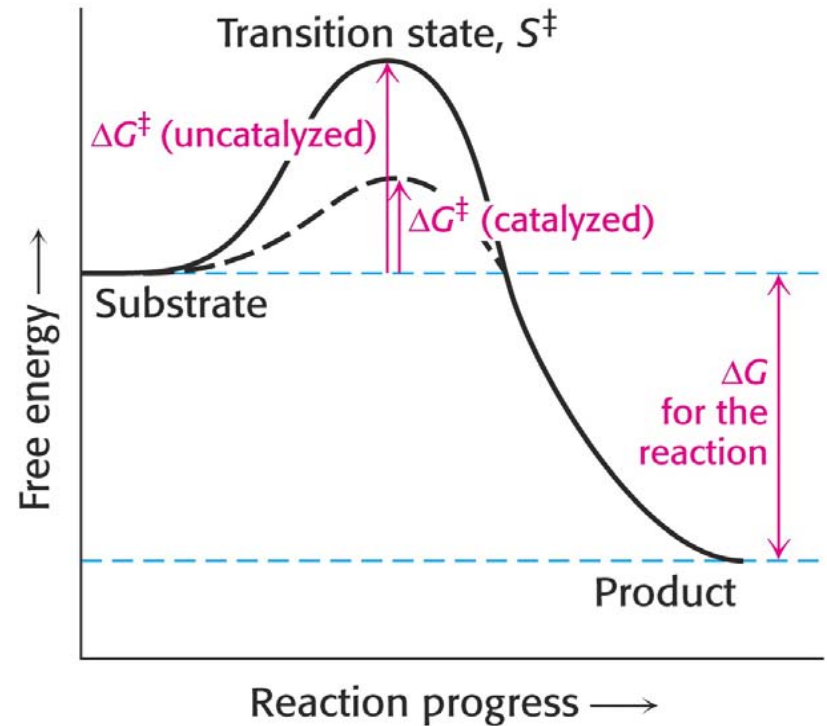
## Actuam baixando a energia do estado de transição

A **energia de activação** requerida para iniciar um processo químico pode ser fornecida através do aumento da temperatura que irá aumentar a agitação molecular

Em bioquímica, a temperatura dos sistemas biológicos não pode ultrapassar os valores compatíveis com a vida dos organismos (aquecimento vs desnaturação)



Intervenção de **catalisadores bioquímicos, enzimas, cuja função é baixar a energia de activação** necessária à reacção e permitir que esta decorra a velocidade muito mais elevada.



$$k = \frac{k_B T}{h} e^{\frac{-\Delta G^\ddagger}{RT}}$$

A lei de Arrhenius relaciona a constante de velocidade da reacção com a energia de activação.



**Enzimas** são proteínas globulares especializadas (com a excepção de um pequeno grupo de RNAs) que têm como função acelerar reacções químicas (até  $10^{20}x$  ), sem alterar a constante de equilíbrio da reacção

**Table 11-1 Catalytic Power of Some Enzymes**

Enzyme	Nonenzymatic Reaction Rate ( $s^{-1}$ )	Enzymatic Reaction Rate ( $s^{-1}$ )	Rate Enhancement
Carbonic anhydrase	$1.3 \times 10^{-1}$	$1 \times 10^6$	$7.7 \times 10^6$
Chorismate mutase	$2.6 \times 10^{-5}$	50	$1.9 \times 10^6$
Triose phosphate isomerase	$4.3 \times 10^{-6}$	4300	$1.0 \times 10^9$
Carboxypeptidase A	$3.0 \times 10^{-9}$	578	$1.9 \times 10^{11}$
AMP nucleosidase	$1.0 \times 10^{-11}$	60	$6.0 \times 10^{12}$
Staphylococcal nuclease	$1.7 \times 10^{-13}$	95	$5.6 \times 10^{14}$

Source: Radzicka, A. and Wolfenden, R., *Science* **267**, 91 (1995).

As enzimas actuam em **condições suaves** (pH, T, pressão)

E são **altamente específicas** relativamente a substratos e produtos

A sua eficiência e especificidade deriva do **arranjo 3D dos grupos catalíticos**.

# Propriedades gerais das enzimas

**As enzimas diferem dos catalisadores químicos em vários aspectos:**

- **Velocidades de reacção mais elevadas.**  
Normalmente  $10^6$  a  $10^{12}$  vezes superiores às reacções não catalisadas e superiores em várias ordens de grandeza às reacções catalisadas quimicamente.
- **Condições de reacção mais suaves.**  
 $T < 100^\circ\text{C}$ , pressão atmosférica,  $\text{pH} \cong 7,0$ . Contrariamente, a catálise química ocorre muitas vezes a temperaturas e pressões elevadas e pH extremos.
- **Especificidade reaccional elevada.**  
Elevado grau de especificidade em relação ao(s) substrato(s) e ao(s) produto(s)  $\Rightarrow$  uma reacção enzimática raramente tem produtos secundários!
- **Regulação da reacção.**  
A actividade enzimática é controlada não só pelo(s) substrato(s) e/ou produto(s), bem como por outras substâncias. Os mecanismos de regulação enzimática incluem o controlo alostérico, modificação covalente da enzima e controlo da quantidade de enzima sintetizada.

# Definições / Revisões

- **Catalisador.** Substância que aumenta a velocidade de uma reacção química sem sofrer qualquer alteração durante o processo. Não afecta a constante de equilíbrio; diminui a energia de activação
- **Cofactor.** Molécula pequena, orgânica ou inorgânica, requerida para que uma apoenzima adquira actividade/função (Fe, Zn, Mg)
  - **Coenzima.** Pequenas moléculas que actuam como substrato; ligam-se ao sítio activo, participam na reacção (são quimicamente modificados), após a reacção podem separar-se da proteína para participar noutras reacções (derivados de vitaminas: NAD, FAD, FMN)
  - **Grupos prostético.** São cofactores covalentemente ligados à cadeia polipeptídica (hemo, centros Fe-S)
- **Isoenzimas.** Enzimas que catalisam a mesma reacção
- **Substrato.** Molécula sobre a qual actua a enzima

# Cofactores e Coenzimas

Algumas enzimas necessitam de um cofactor não proteico para ter actividade catalítica:



**Cofactores** {

- Iões metálicos
- Grupos prostéticos (ex. hemo, centros Fe-S)
- Coenzimas (derivados de vitaminas)

## ALGUNS EXEMPLOS DE ELEMENTOS INORGÂNICOS USADOS COMO COFACTORES

$\text{Cu}^{2+}$	Citocromo <i>c</i> oxidase
$\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$	Citocromo <i>c</i> oxidase, catalase, peroxidase
$\text{K}^{+}$	Piruvato cinase
$\text{Mg}^{2+}$	Hexocinase, glucose 6-fosfatase, piruvato cinase
$\text{Mn}^{2+}$	Arginase, reductase de ribonucleótidos
Mo	Dinitrogenase
$\text{Ni}^{2+}$	Urease
Se	Glutational peroxidase
$\text{Zn}^{2+}$	Anidrase carbónica, álcool desidrogenase, carboxipeptidases A e B

# Cofactores e Coenzimas

---

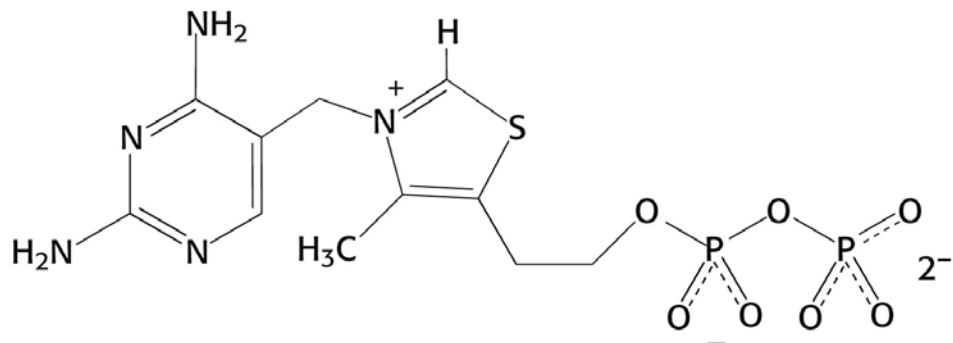
## ALGUNS EXEMPLOS DE COENZIMAS/VITAMINAS<sup>(\*)</sup>

---

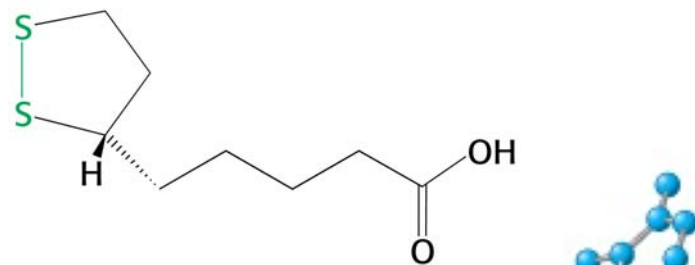
Coenzima	Função principal	Precursor nos mamíferos
Flavina-adenina-dinucleótido (FAD)	Oxidação-redução (desidrogenases, cadeia respiratória)	Riboflavina (vitamina B <sub>2</sub> )
Nicotidamida-adenina-dinucleótido (NAD)	Oxidação-redução (desidrogenases, cadeia respiratória)	Vitamina PP (ác. nicotínico)
Ácido lipóico	Descarboxilação oxidativa	Ácido lipóico
Coenzima A	Transferência de grupos acilo (R-CO-)	Ácido pantoténico
Coenzimas de cobamida	Transferência de grupos metilo	Vitamina B <sub>12</sub>
Piridoxal fosfato	Metabolismo dos aminoácidos	Vitamina B <sub>6</sub>

---

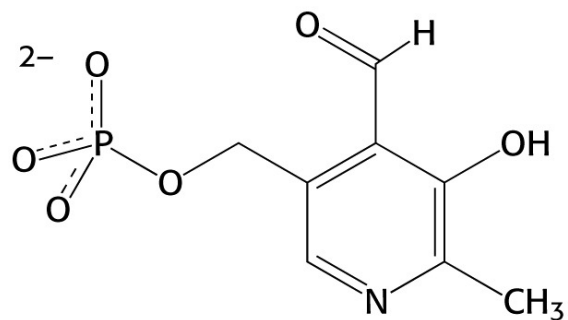




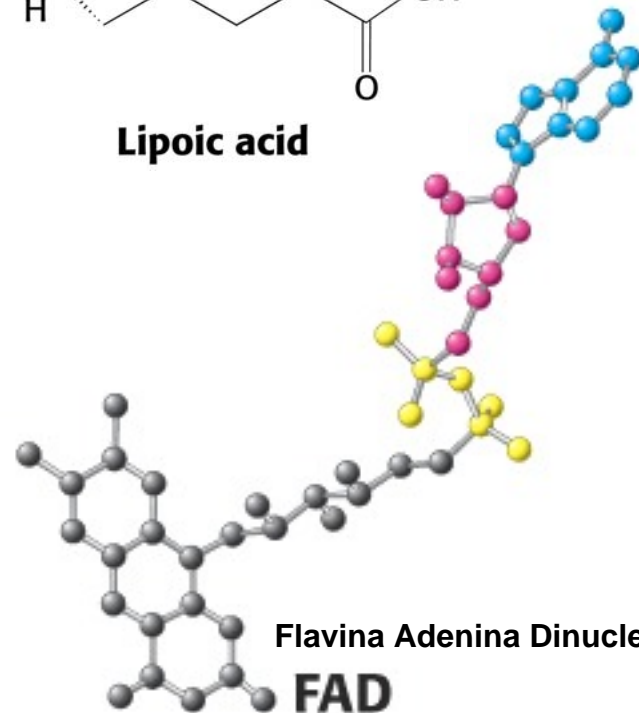
**Thiamine pyrophosphate (TPP)**



**Lipoic acid**

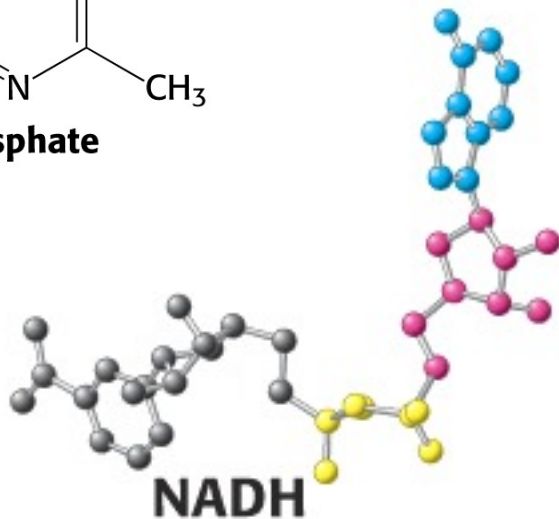


**Pyridoxal phosphate (PLP)**



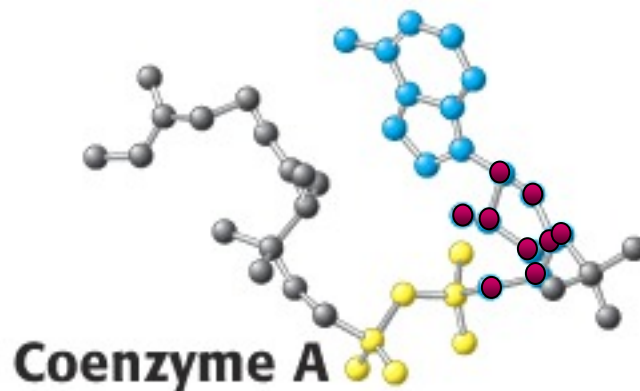
**Flavina Adenina Dinucleotídeo**

**FAD**



**NADH**

**Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo**



**Coenzyme A**

# Nomenclatura das enzimas

**As enzimas são classificadas com base nas reacções que catalisam:**

- **Nome sistemático**, formado de acordo com regras definitivas, revela a acção de uma enzima, identificando-a com precisão
- **Nome trivial (ou recomendado)**, deverá ser suficientemente curto para uso comum  $\equiv$  Nome do substrato + sufixo **ase**

*Ex:* Ure**ase**  $\equiv$  hidrólise da ureia

Hexocin**ase**  $\equiv$  ATP + D-glucose  $\rightarrow$  ADP + D-glucose 6-fosfato

**Recomendação da comissão de nomenclatura em vigor:**

ATP + D-glucose  $\rightarrow$  ADP + D-glucose 6-fosfato

E.C. 2.7.1.1. (classificação internacional)

“Enzyme Classification” - Os n<sup>os</sup> representam a classe, subclasse, sub-subclasse, e um n<sup>o</sup> arbitrário (n<sup>o</sup> de série) dentro da sub-subclasse.

# Nomenclatura / Classificação das enzimas

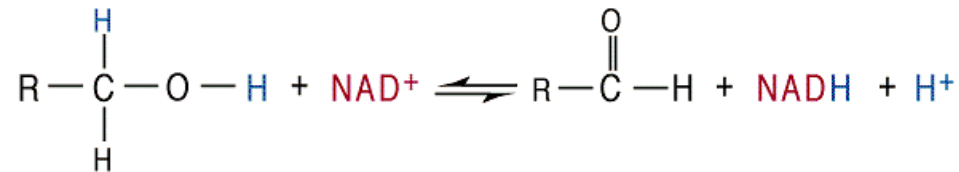
## CLASSIFICAÇÃO INTERNACIONAL DAS ENZIMAS

Classe	Reacção catalisada
1. Oxidoredutases	Transferência de electrões (iões hidreto ou átomos de H)
2. Transferases	Reacções de transferência de grupos
3. Hidrolases	Reacções de hidrólise (transferência de grupos funcionais para a água)
4. Liases	Adição de grupos em ligações duplas, ou formação de ligações duplas por remoção de grupos
5. Isomerasas	Transferência de grupos dentro de uma mesma molécula produzindo formas isoméricas
6. Ligases	Formação de ligações C—C, C—S, C—O e C—N através de reacções de condensação acopladas à hidrólise de ATP

# Nomenclatura / Classificação das enzimas

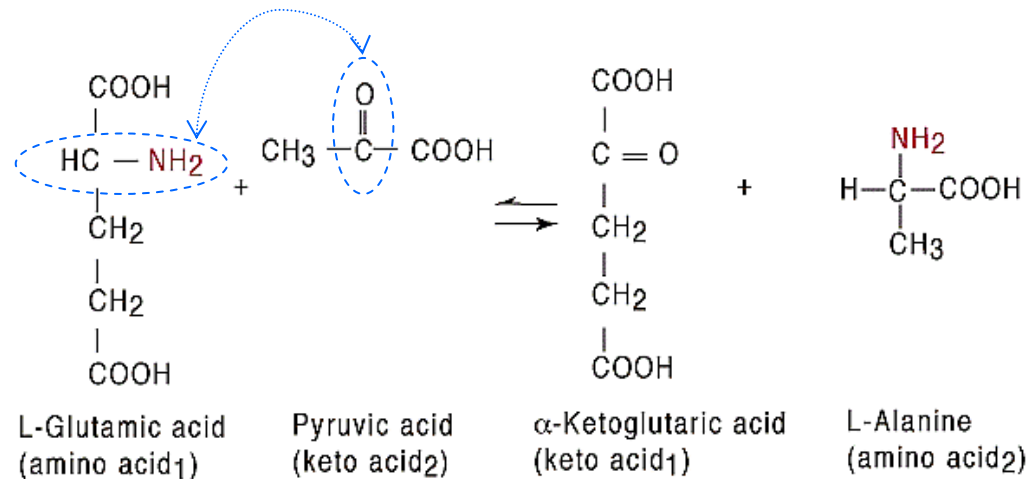
## 1. Oxidoreductases – enzimas que catalisam reacções de oxidação-redução.

Ex: Oxidação do etanol a aldeído pela *álcool desidrogenase*:



## 2. Transferases – enzimas que transferem grupos funcionais entre dadores e aceptadores.

Ex: Reacção catalisada por uma transferase do grupo amino (aminotransferase):



# Nomenclatura / Classificação das enzimas

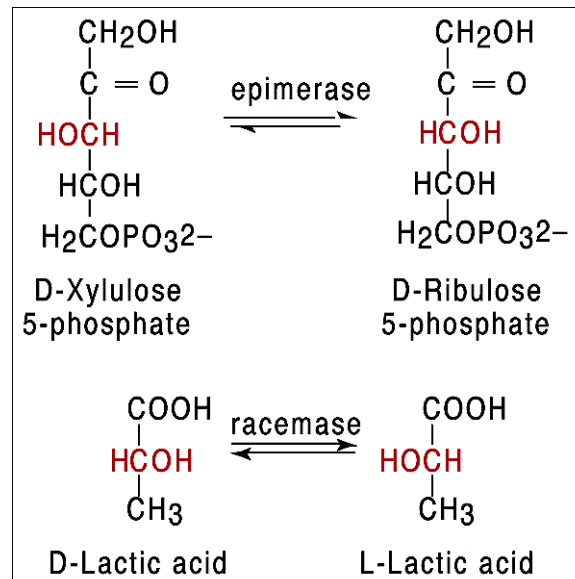
## 3. Hidrolases – enzimas que transferem grupos funcionais para a água.

Ex: Quebra de uma ligação peptídica:



## 4. Isomerases – enzimas que catalisam reacções de isomerização. Grupo muito heterogéneo.

Ex: conversão da xilulose-5-fosfato em ribulose-5-fosfato ou interconversão dos isómeros D em L do ácido láctico:

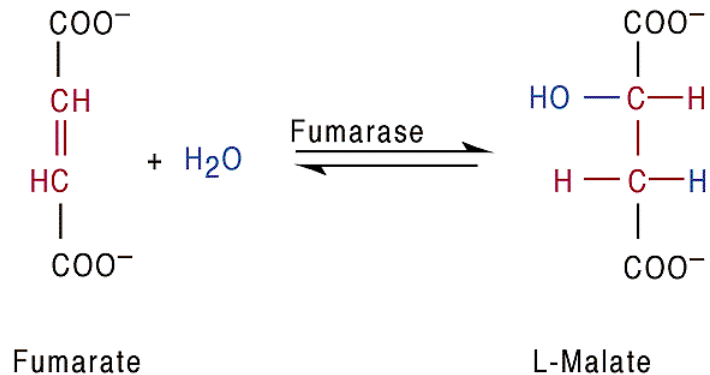




# Nomenclatura / Classificação das enzimas

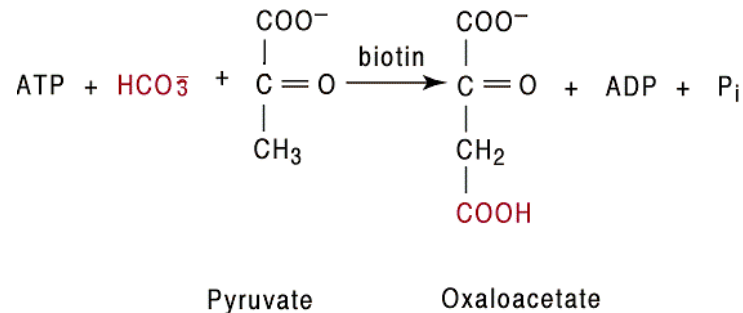
## 5. **Liases** – Adicionam ou removem elementos ( $\text{H}_2\text{O}$ , amónia, ou $\text{CO}_2$ ) a ligações duplas.

Exs: Reacção catalisada por uma *descarboxilase* que remove  $\text{CO}_2$  do  $\alpha$ - ou  $\beta$ -cetoácido ou reacção catalisada pela *fumarase* em que a adição de água à ligação dupla do fumarato resulta na conversão em malato:



## 6. **Ligases** – enzimas que “ligam” moléculas à custa da hidrólise de ATP.

Ex: Reacção catalisada pela *piruvato carboxilase* :

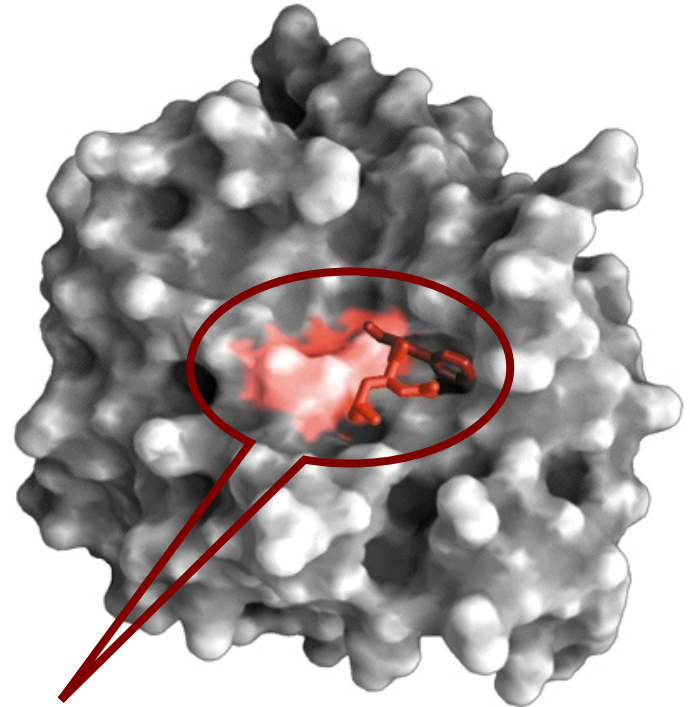


# A reacção enzimática: o centro activo

- **A reacção ocorre no centro activo:**

- contém os resíduos de aminoácidos directamente envolvidos na reacção;
- ocupa uma parte relativamente pequena do volume total da enzima;
- trata-se de uma entidade tridimensional;
- corresponde, geralmente, a uma cavidade na molécula de enzima, com um ambiente químico muito próprio.
- o substrato entra no sítio activo e liga-se à enzima através de interacções fracas.
- por vezes há formação de ligações covalentes entre a enzima e o substrato

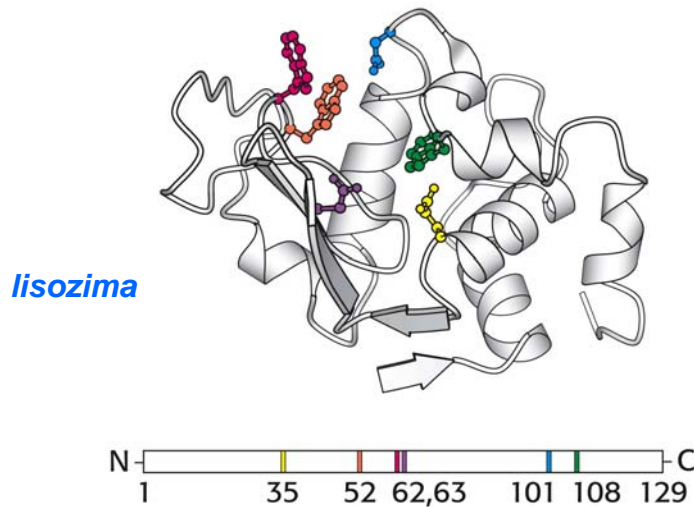
**complexo quimotripsina-substrato**



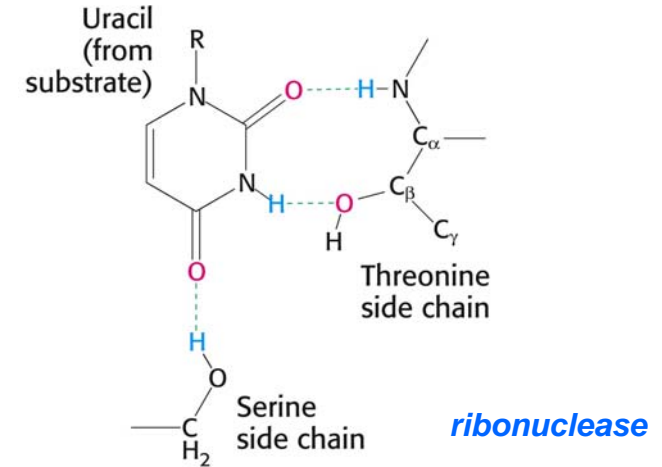
Ligação do substrato  
ao **centro activo**

# Os centros activos são “desenhados” para ligar o substrato e estabilizar o estado de transição.

- o centro activo pode incluir resíduos distantes na sequência de a.a.

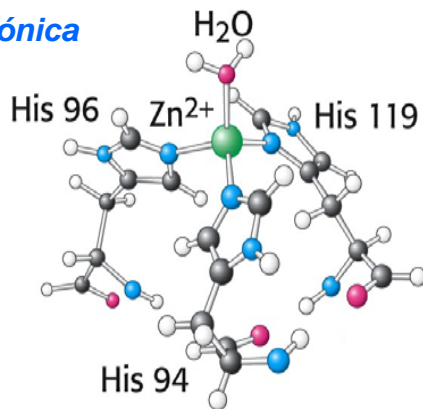


- formam-se pontes de Hidrogénio entre a enzima e o substrato (ligações fracas).

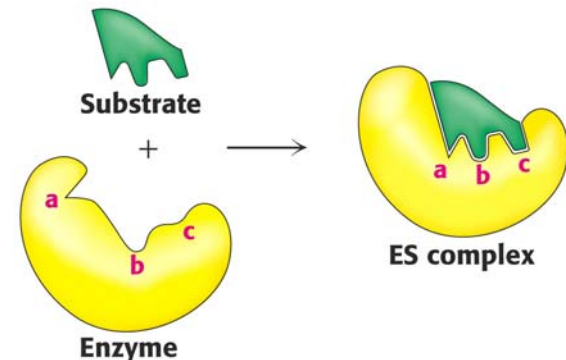


- Cavidades hidrofóbicas excluem a água (excepto quando H<sub>2</sub>O é reagente).

*anidrase carbónica*



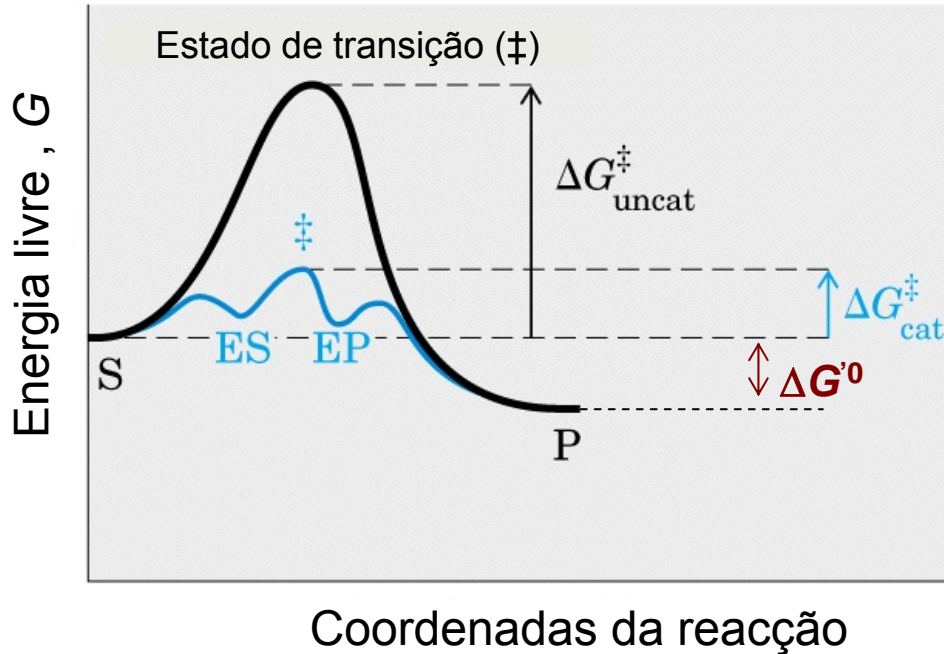
- Modelo do encaixe induzido: a enzima sofre uma alteração conformacional após ligação do substrato.



# Teoria do estado de transição

As enzimas não alteram o equilíbrio das reacções que catalisam.

Diminuem a energia de activação ( $\Delta G^\ddagger$  : energia livre necessária para atingir o estado de transição).



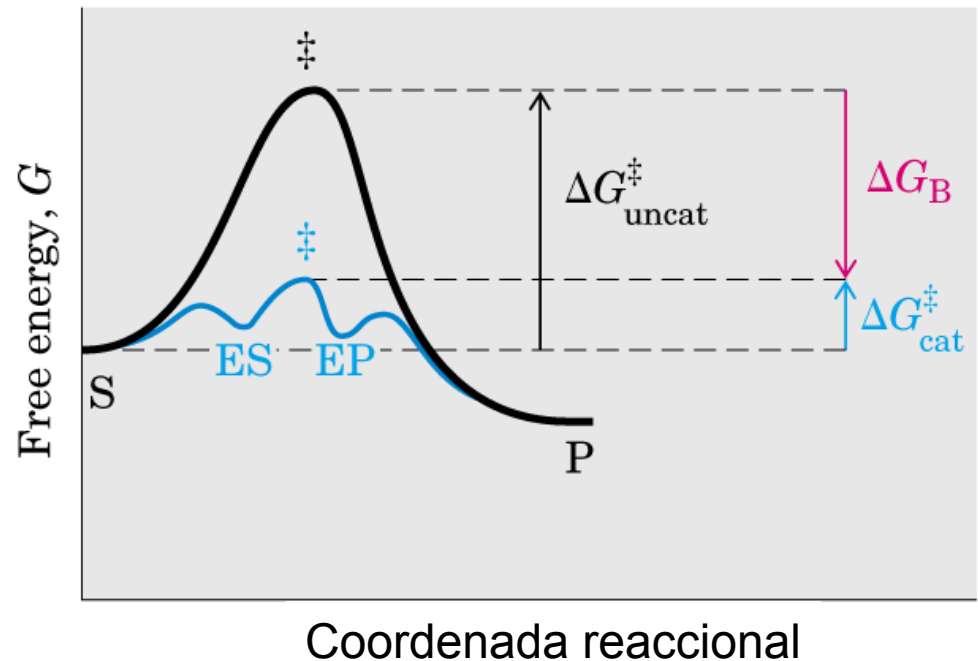
- Os intermediários  $ES$  e  $EP$  encontram-se em mínimos de energia
- A energia de activação da reacção catalisada ( $\Delta G^\ddagger_{\text{cat}}$ ) é menor que a da reacção não catalisada ( $\Delta G^\ddagger_{\text{uncat}}$ ) → aumento da velocidade da reacção)

# Ligação preferencial do estado de transição

$$\frac{k_{cat}}{k_{uncat}} = \exp\left[\left(\Delta G_{uncat}^{\ddagger} - \Delta G_{cat}^{\ddagger}\right) / RT\right]$$

Um  $\Delta G_B$  de 34.2 kJmol<sup>-1</sup> resulta num aumento da velocidade de 10<sup>6</sup> (a 25°C).

Esta energia é equivalente à energia de 2 pontes de hidrogénio!

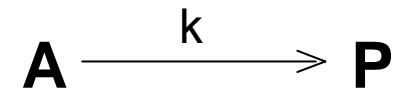
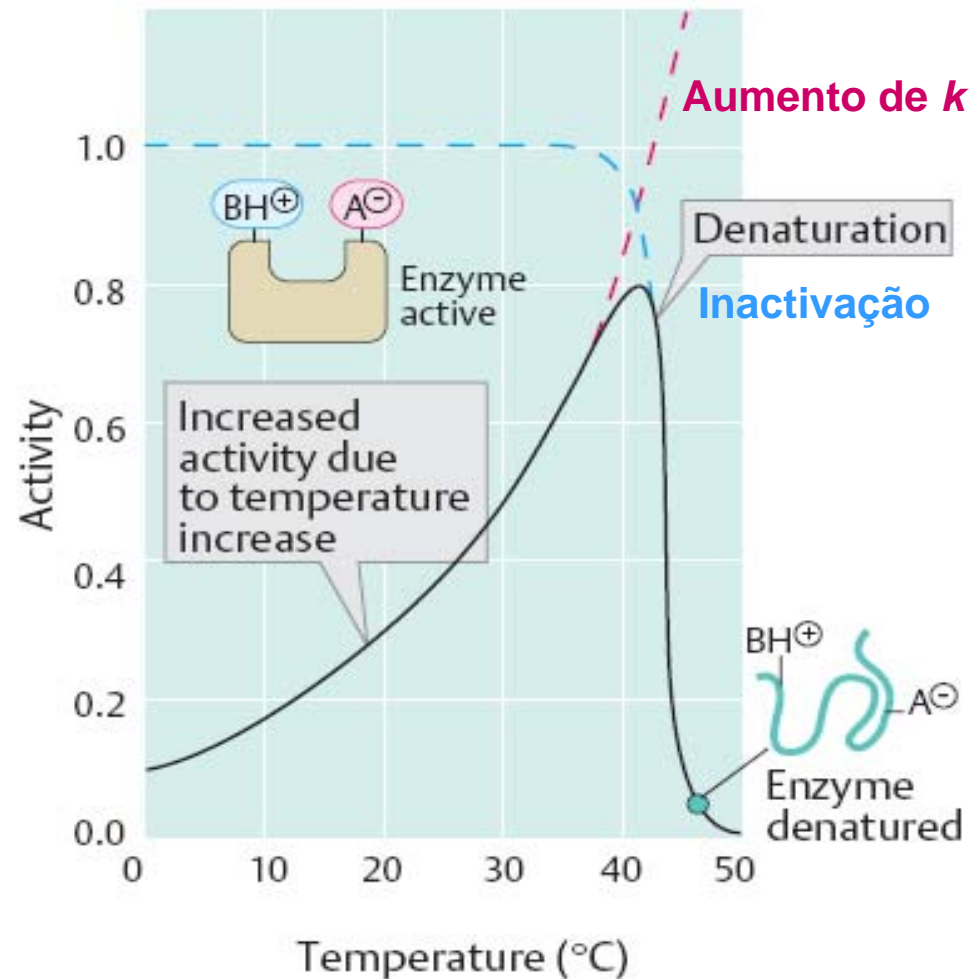


Compostos análogos ao estado de transição são inibidores competitivos. Isto pode ser utilizado como base para 'drug design'.



# Efeito da temperatura na actividade enzimática

A curva da actividade enzimática em função da temperatura apresenta um máximo que corresponde à temperatura óptima da enzima. A temperatura óptima varia de enzima para enzima.



$$k = \frac{k_B T}{h} e^{-\frac{\Delta G^\ddagger}{RT}}$$

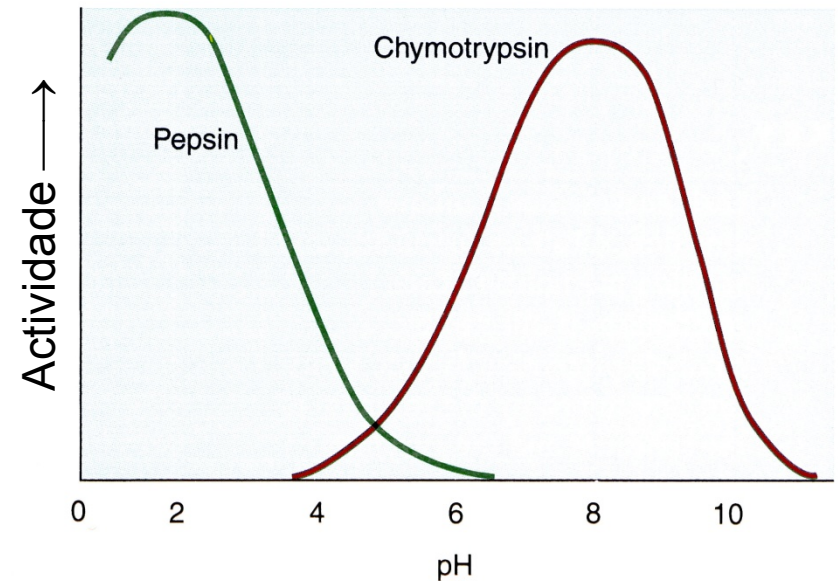
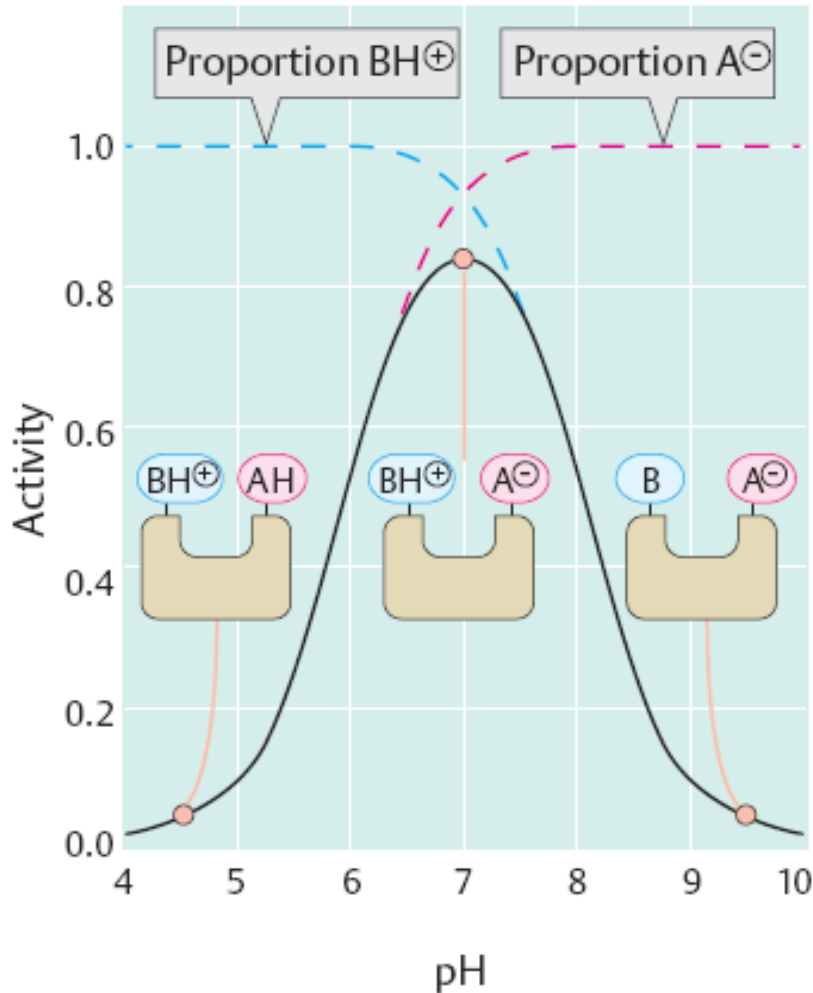
**Na região de temperaturas baixas a actividade aumenta exponencialmente de acordo com a lei de Arrhenius.**

$\Delta G^\ddagger$  é a energia livre de Gibbs de activação,  $k_B$  é a constante de Boltzmann e  $h$  a constante de Planck

**A temperaturas elevadas a actividade cai abruptamente devido à desnaturação da enzima.**

# Efeito do pH na actividade enzimática

As proteínas são sensíveis ao pH. A maior parte das enzimas apenas está activa numa gama relativamente estreita de valores de pH.



## Efeitos do pH na actividade enzimática:

- Ligação do substrato à enzima
- actividade catalítica
- Ionização do substrato
- Estrutura da proteína (desnaturação a pH extremos)

O estudo da dependência da actividade com o pH pode dar informação acerca dos valores de  $pK_a$  dos aminoácidos do centro activo

# Mecanismos catalíticos

As enzimas são “máquinas moleculares” complexas que actuam através de uma grande diversidade de mecanismos.

**Os mecanismos das reacções enzimáticas são idênticos aos das reacções com catalisadores químicos, mas as enzimas são melhores!!**

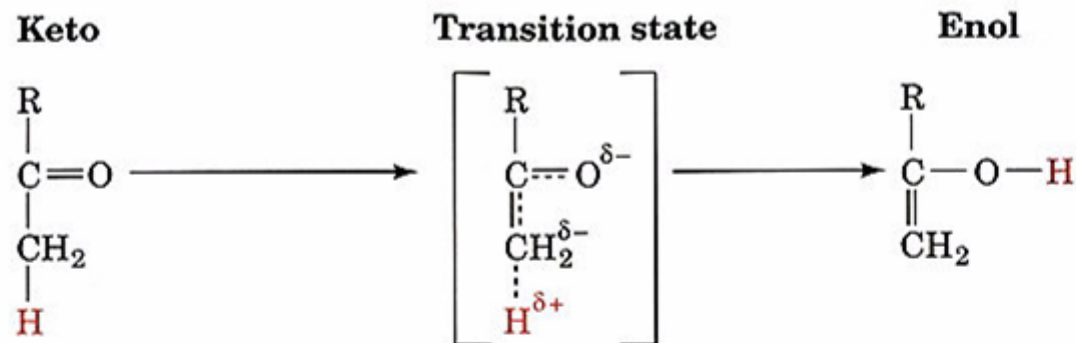
## Tipos de reacções de catálise

- ácido / base
- covalente
- iões metálicos
- electrostática
- proximidade e orientação
- ligação preferencial do estado de transição

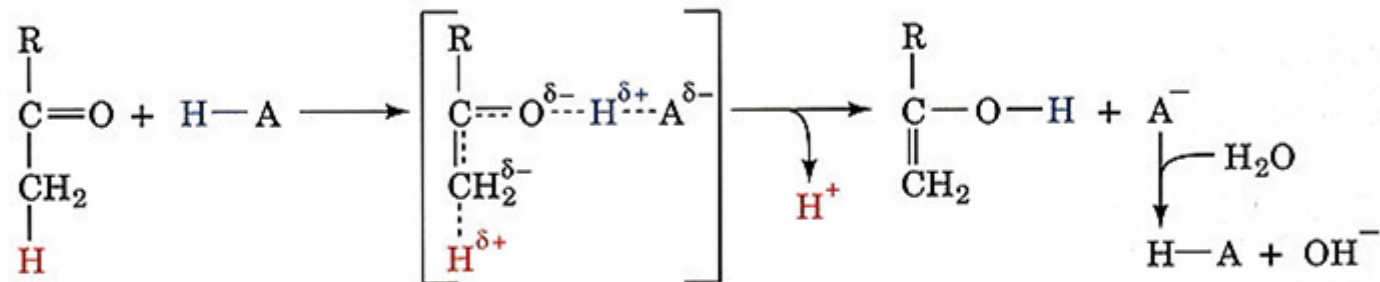
# Catálise ácido / base

Transferência parcial de próton (catálise ácida) ou captura de próton (catálise básica) baixam a energia livre do estado de transição.

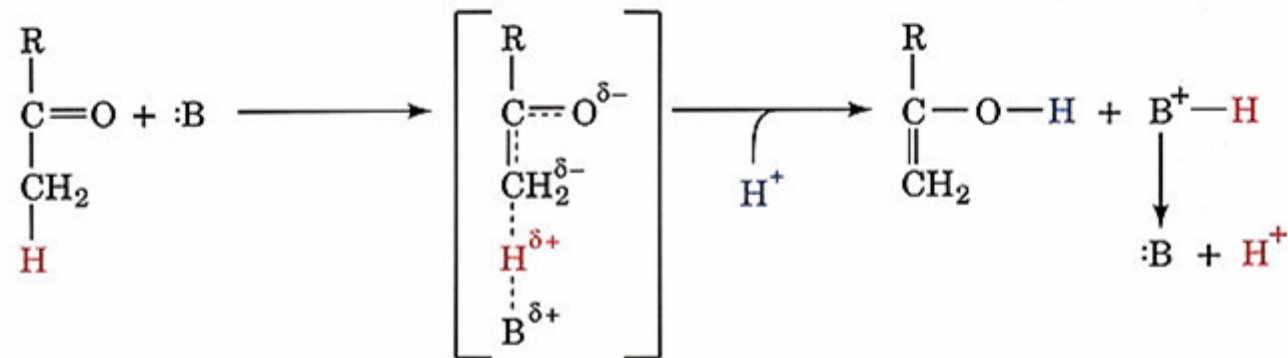
Não catalisada



Catálise **ácida**  
geral



Catálise **básica**  
geral



**Aminoácidos com cadeias laterais ionizáveis podem participar em mecanismos de catálise ácido / base**

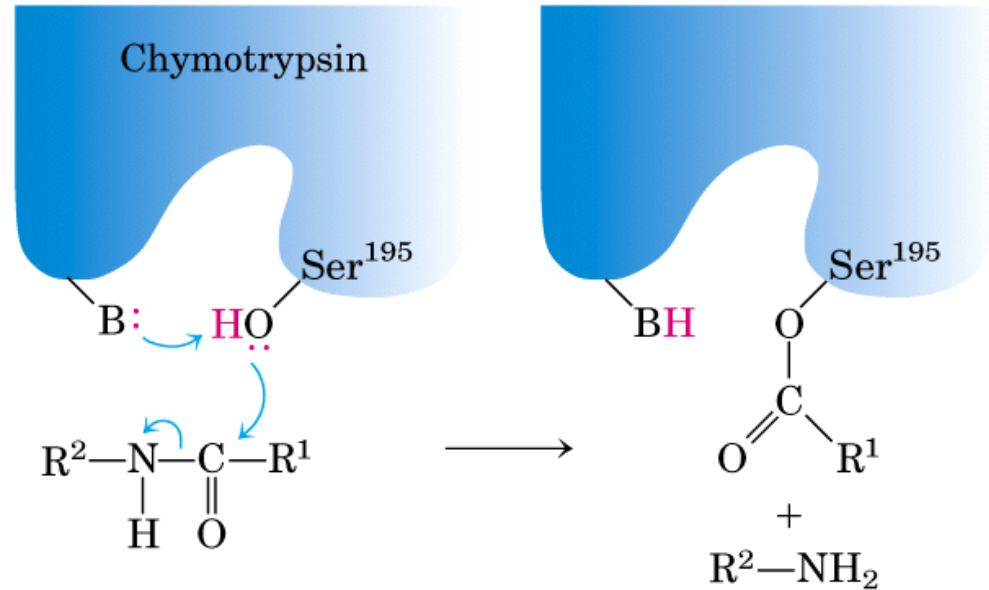
Amino acid residues	General acid form (proton donor)	General base form (proton acceptor)
<b>Glu, Asp</b>	$\text{R}-\text{COOH}$	$\text{R}-\text{COO}^-$
<b>Lys, Arg</b>	$\text{R}-\overset{\text{H}}{\underset{\text{H}}{\text{N}^+}}\text{H}$	$\text{R}-\ddot{\text{N}}\text{H}_2$
<b>Cys</b>	$\text{R}-\text{SH}$	$\text{R}-\text{S}^-$
<b>His</b>	$\begin{array}{c} \text{R}-\text{C}=\text{CH} \\ \text{HN} \quad \text{N}^+\text{H} \\ \text{C} \\ \text{H} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{R}-\text{C}=\text{CH} \\ \text{HN} \quad \text{N}: \\ \text{C} \\ \text{H} \end{array}$
<b>Ser</b>	$\text{R}-\text{OH}$	$\text{R}-\text{O}^-$
<b>Tyr</b>	$\text{R}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OH}$	$\text{R}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{O}^-$



# Catálise covalente

Formação de uma ligação covalente transiente entre o catalisador e o substrato

Um catalisador covalente eficiente deve ser simultaneamente um bom nucleófilo e um bom grupo de saída.



Grupos com elevada polarizabilidade como o imidazole (**His**) e o tiol (**Cis**) têm estas propriedades

O grupo carboxílico de **Asp**, o grupo hidroxilo de **Ser** e o grupo amino de **Lis** também participam em catálise covalente.

Coenzimas como a tiamina pirofosfato e o piridoxal fosfato funcionam principalmente como catalisadores covalentes em associação com as apoenzimas.

# Catálise com iões metálicos

Quase 1/3 de todas as enzimas conhecidas necessita da presença de iões metálicos para a sua actividade catalítica.

## Os iões metálicos participam na catálise de 3 formas:

- Ligando o substrato e orientando-o correctamente
- Mediando reacções de oxidação-redução
- Estabilizando electrostaticamente cargas negativas

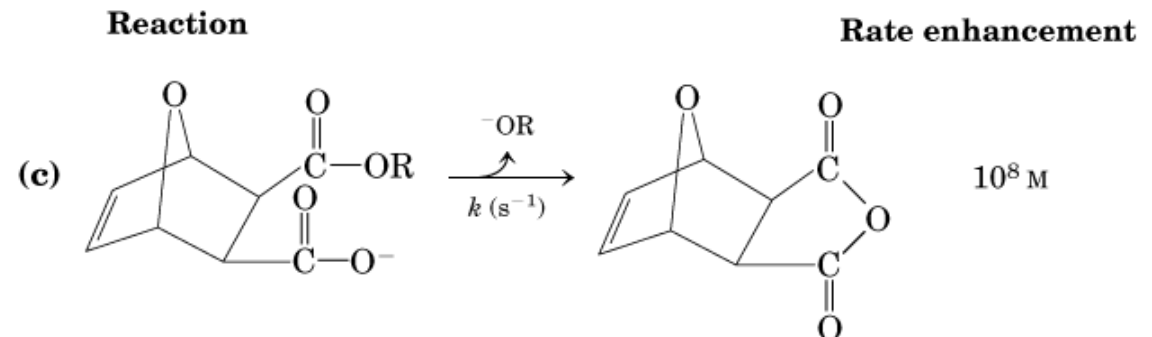
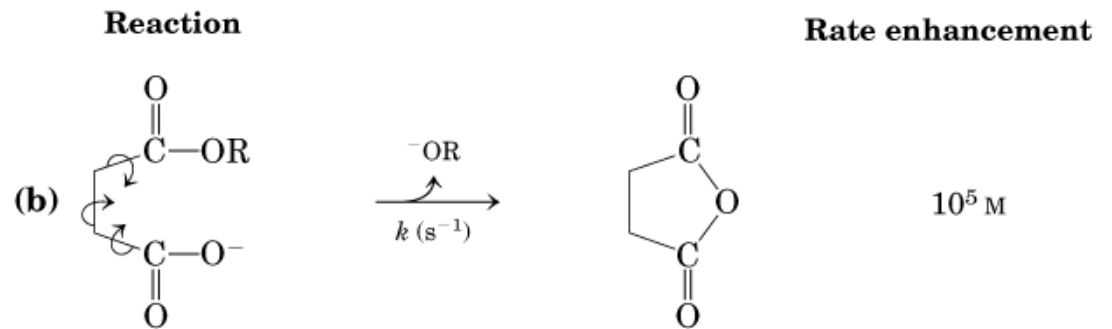
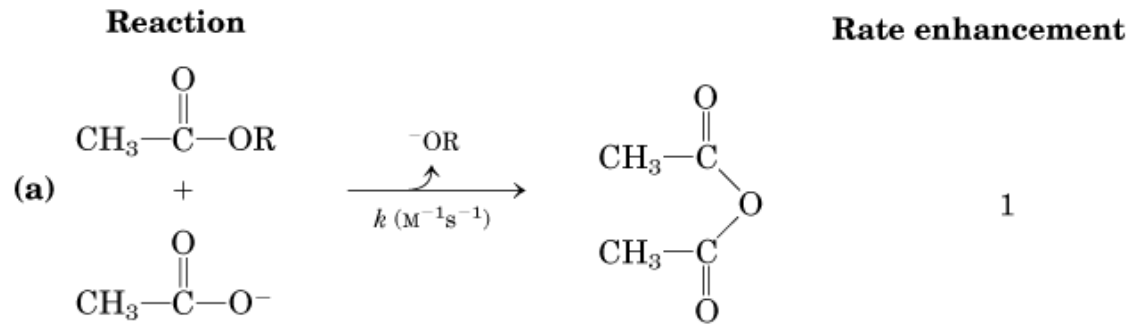
**Metaloenzimas** contêm iões metálicos fortemente ligados:  
 $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{3+}$

**Enzimas activados por metais** ligam fracamente iões metálicos que estão na solução :  
 $\text{Na}^{+}$ ,  $\text{K}^{+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$

# Proximidade e orientação

A ligação dos substratos às enzimas obriga à sua **imobilização** e **alinhamento**, otimizando a reactividade.

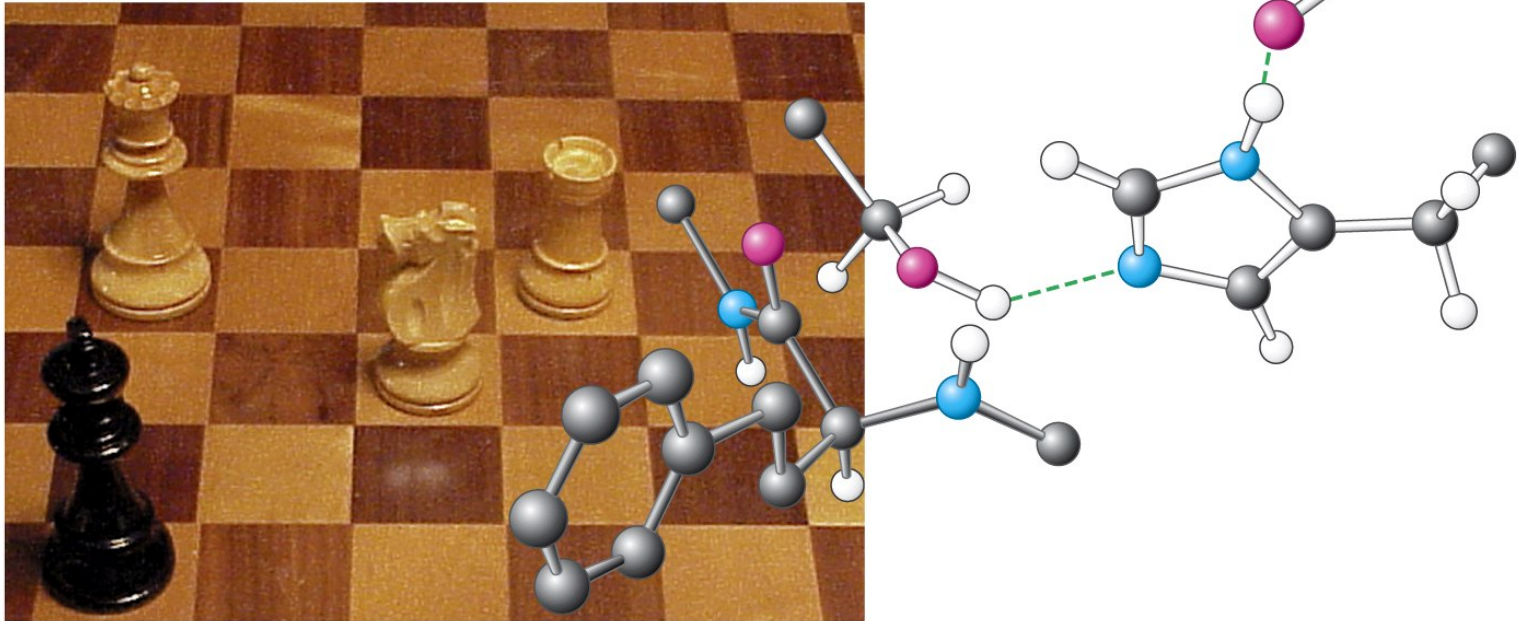
(A energia necessária para este processo vem da ligação do substrato à enzima)



**EXEMPLO**

# Estratégias catalíticas

## Mecanismo catalítico das proteases de serina



No centro activo das proteases de serina encontram-se 3 aminoácidos (tríade catalítica) que actuam em conjunto na hidrólise da ligação peptídica.



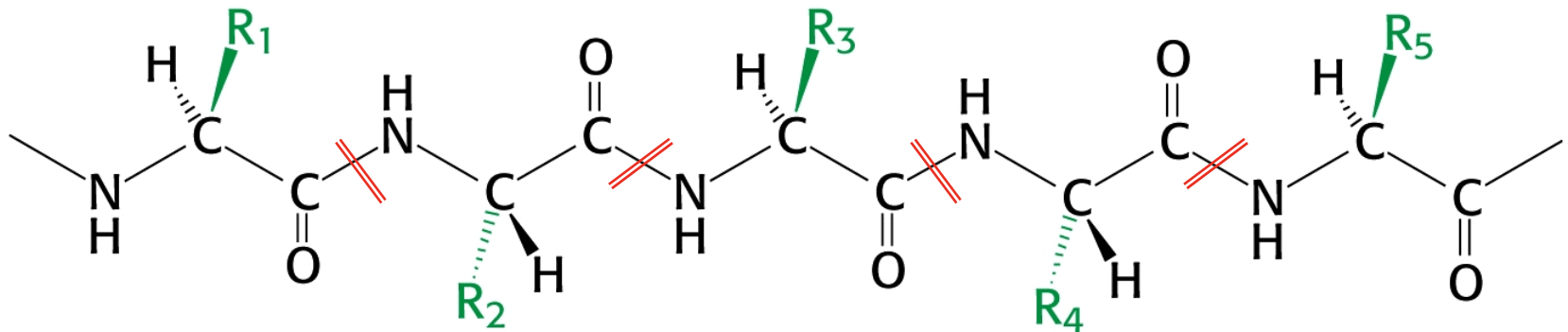
# Proteases

O '*turnover*' das proteínas é um processo importante nos seres vivos. As proteínas que já fizeram a sua função têm que ser degradadas para se aproveitarem os aminoácidos na síntese de novas proteínas.

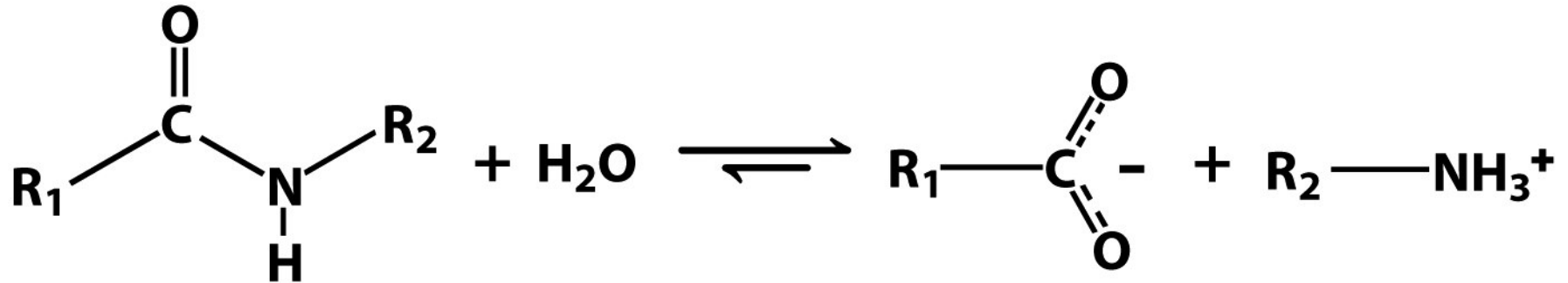
As proteínas ingeridas na dieta têm que ser degradadas.

A regulação da actividade de algumas proteínas e enzimas é feita através de reacções proteolíticas.

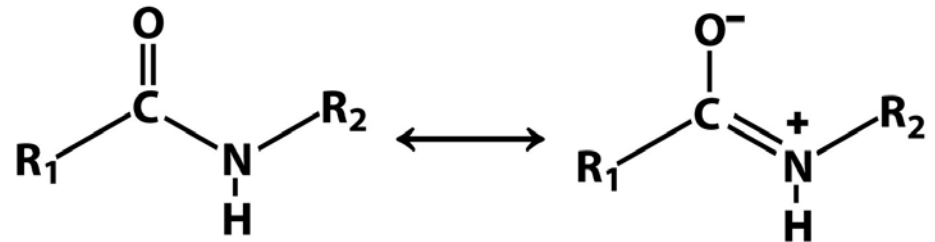
As proteases hidrolisam ligações peptídicas por adição de água. A especificidade das diferentes proteases é conferida pela cadeia lateral (**R**) dos aminoácidos próximos da ligação a quebrar.



A hidrólise da ligação peptídica é termodinamicamente favorável mas é muito lenta nas condições fisiológicas.



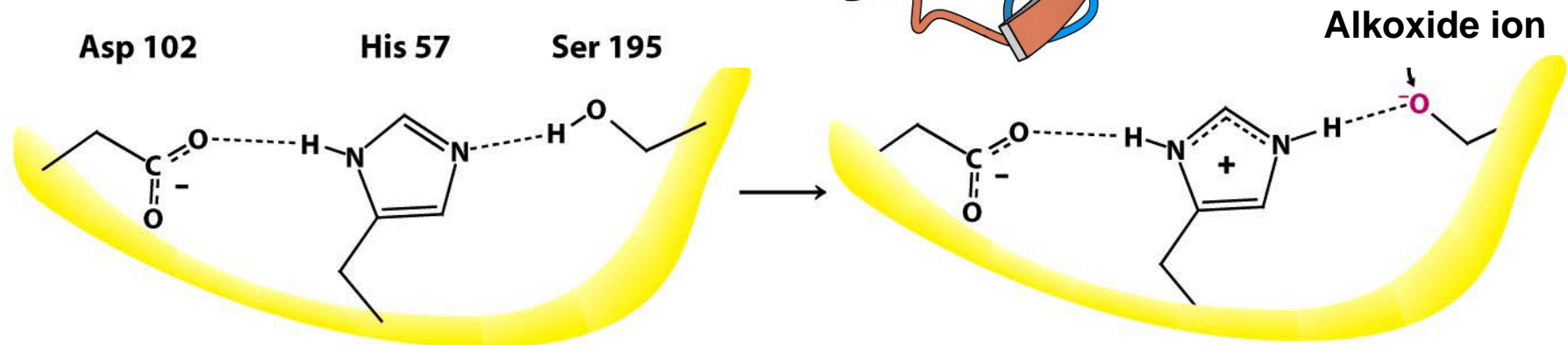
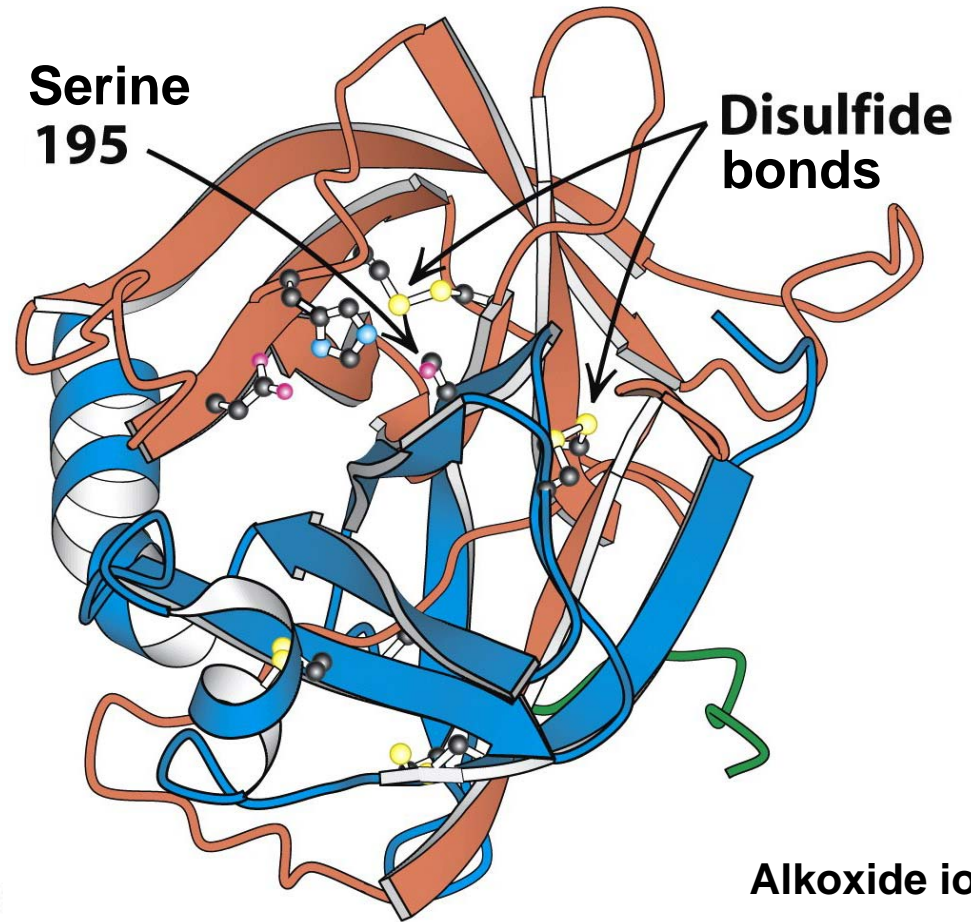
- carácter parcial de dupla ligação
- o carbono do C=O é menos electrofílico e menos susceptível a um ataque nucleofílico



A enzima vai facilitar o ataque nucleofílico ao grupo carbonilo para promover a cisão da ligação peptídica. As proteases de serina têm uma Ser muito reactiva que vai fazer o ataque nucleofílico. Forma-se um intermediário covalente durante a catálise.

# Tríade catalítica

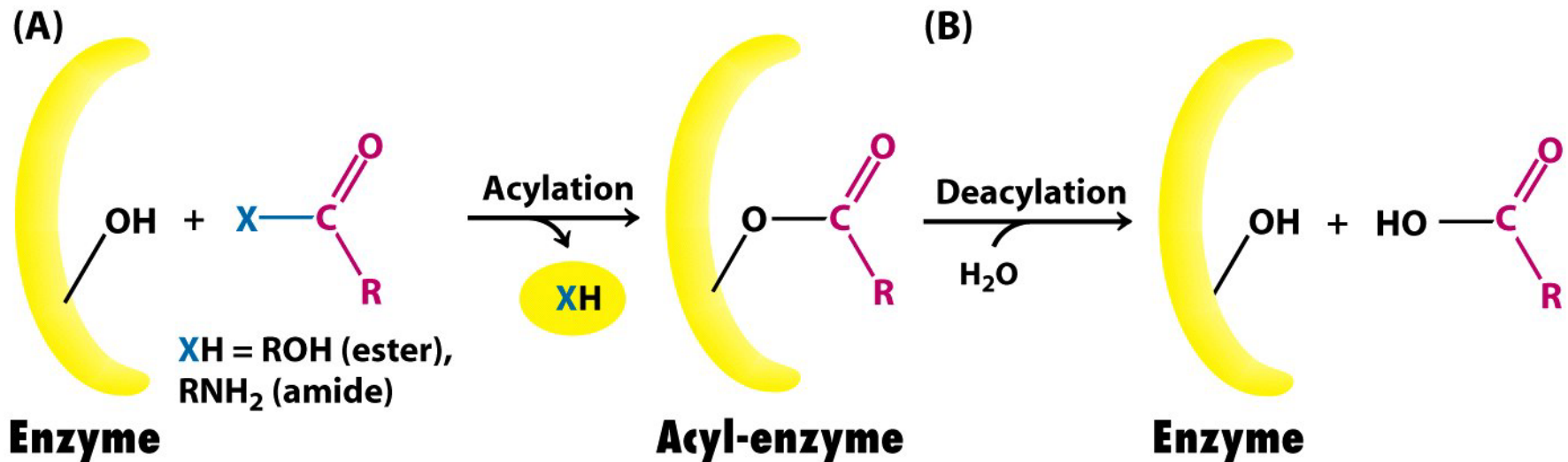
Os aminoácidos catalíticos **His 57** e **Ser 195** estão localizados numa bolsa inacessível ao solvente junto ao local de ligação do substrato e perto de um **Asp 102** conservado.



A triade catalítica converte a serina 195 num nucleófilo muito potente

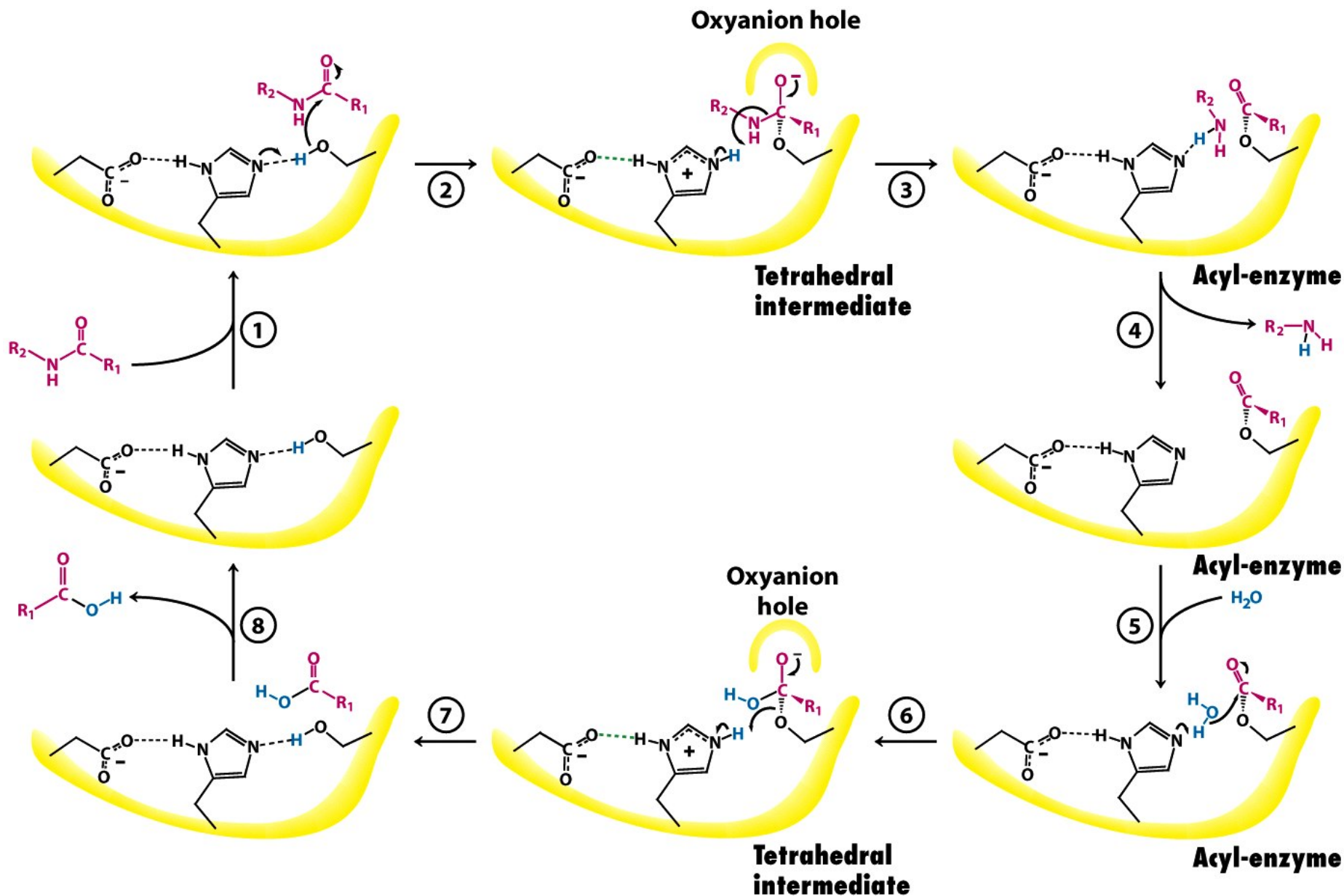
# A catálise da quimotripsina envolve 2 passos e um intermediário covalente

Os resultados cinéticos foram interpretados em termos de um mecanismo reaccional Ping Pong com dois passos, havendo formação de um intermediário covalentemente ligado à enzima. É um exemplo de catálise covalente.



- (A) No primeiro passo entra o primeiro substrato (péptido) e dá-se uma acilação, com formação do intermediário acilado da enzima. Liberta-se o primeiro produto (péptido do lado C).
- (B) No segundo passo entra o segundo substrato (água) e dá-se a desacilação da enzima. Liberta-se o segundo produto (péptido do lado N) e a enzima livre é regenerada.

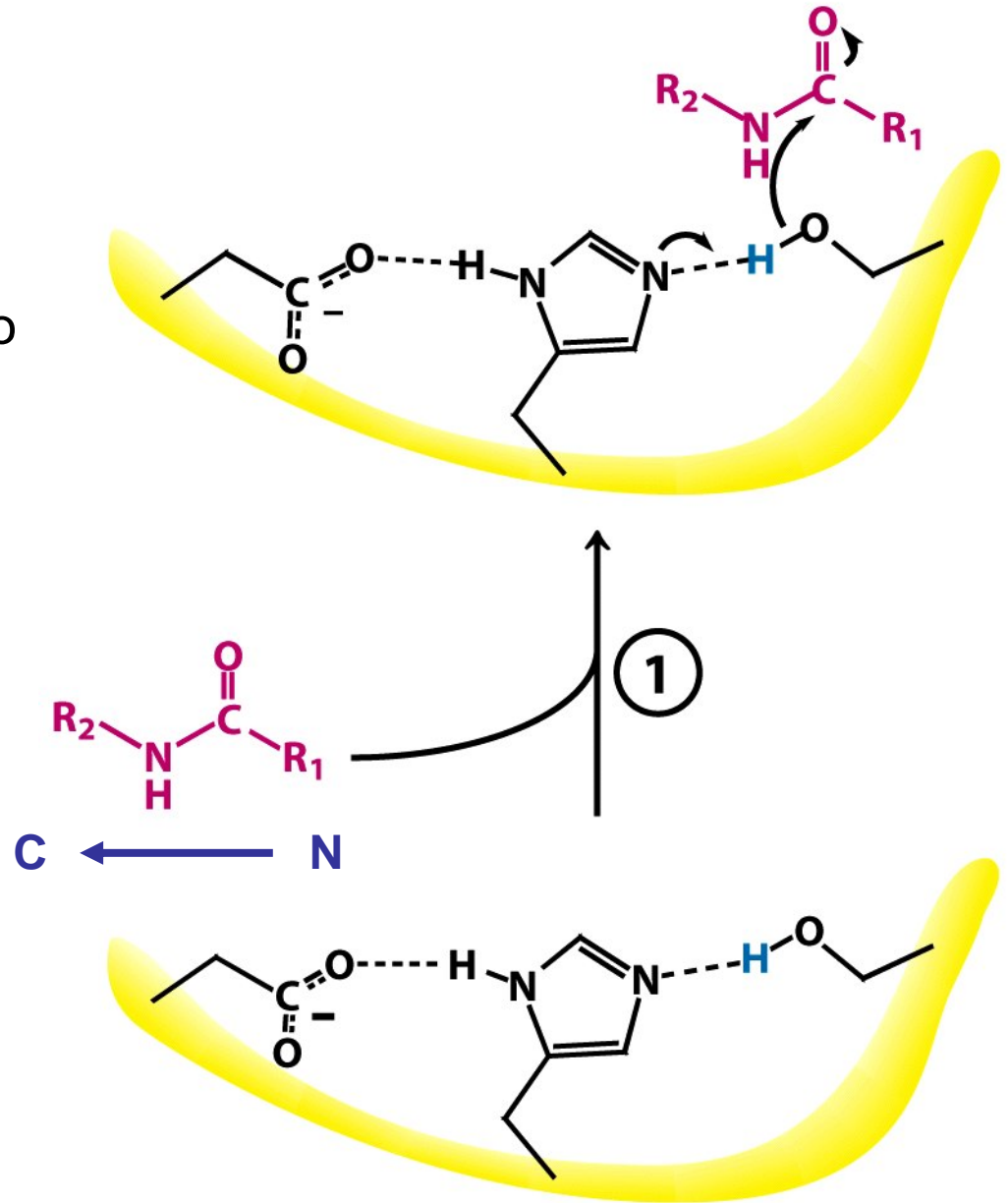
# Mecanismo catalítico



## Passo 1

Ligação do substrato ao centro activo da enzima:

A cadeia lateral do aminoácido R1 'encaixa' na bolsa hidrofóbica, posicionando o grupo carbonilo da ligação peptídica que vai ser cortada na proximidade da ser 195.





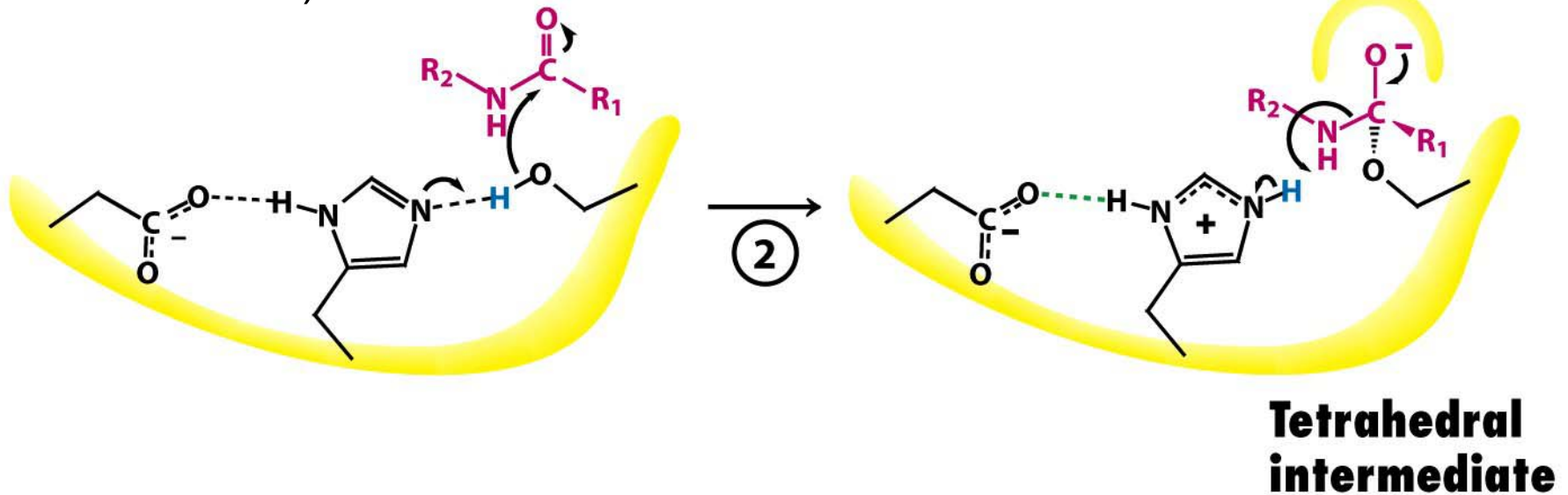
## Passo 2: Ataque nucleofílico da Ser ao grupo carbonilo

**Ser 195** faz um ataque nucleofílico ao carbonilo da ligação peptídica formando um **intermediário tetraédrico** (catálise covalente)

**His 57** captura o próton (catálise básica) e o ião imidazólio é estabilizado pelo **Asp 102** (catálise electrostática)

O oxianião forma duas ligações de hidrogénio com grupos NH da cadeia polipeptídica (ligação preferencial do estado de transição)

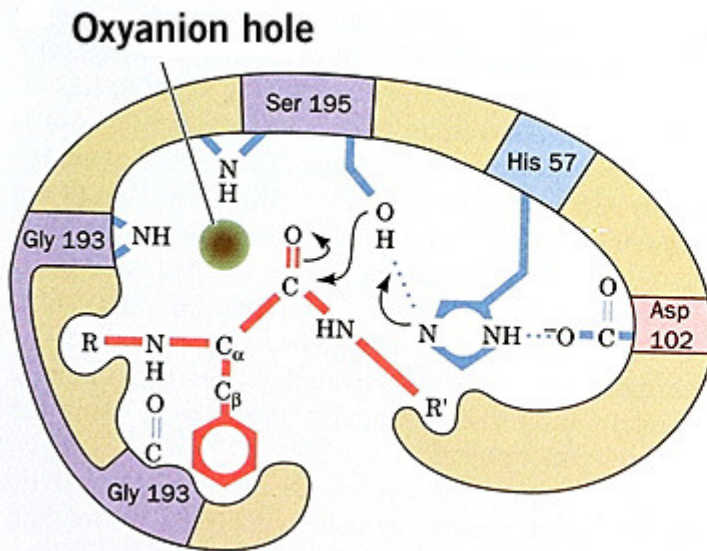
**Oxanion hole**



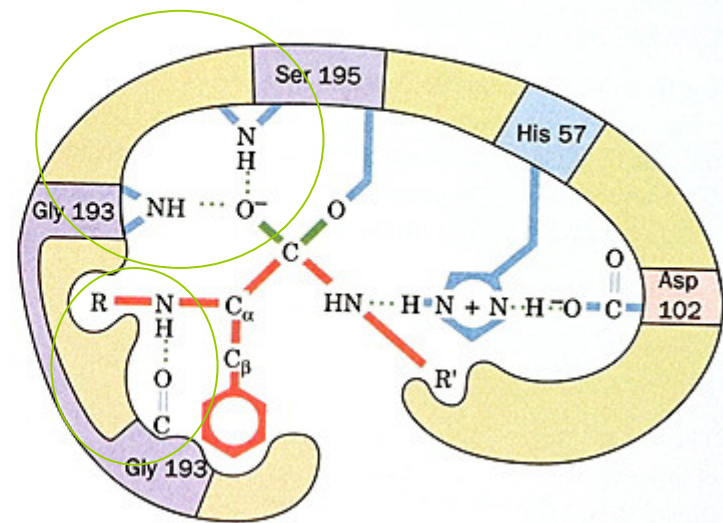


A distorção de conformação que ocorre quando o intermediário tetraédrico se forma permite a formação de duas ligações de hidrogénio adicionais entre grupos NH da cadeia polipeptídica e o oxianião. Forma-se ainda mais uma ligação de hidrogénio entre um grupo NH do péptido e um C=O da enzima.

A maior parte do poder catalítico da quimotripsina deriva da ligação preferencial do estado de transição.

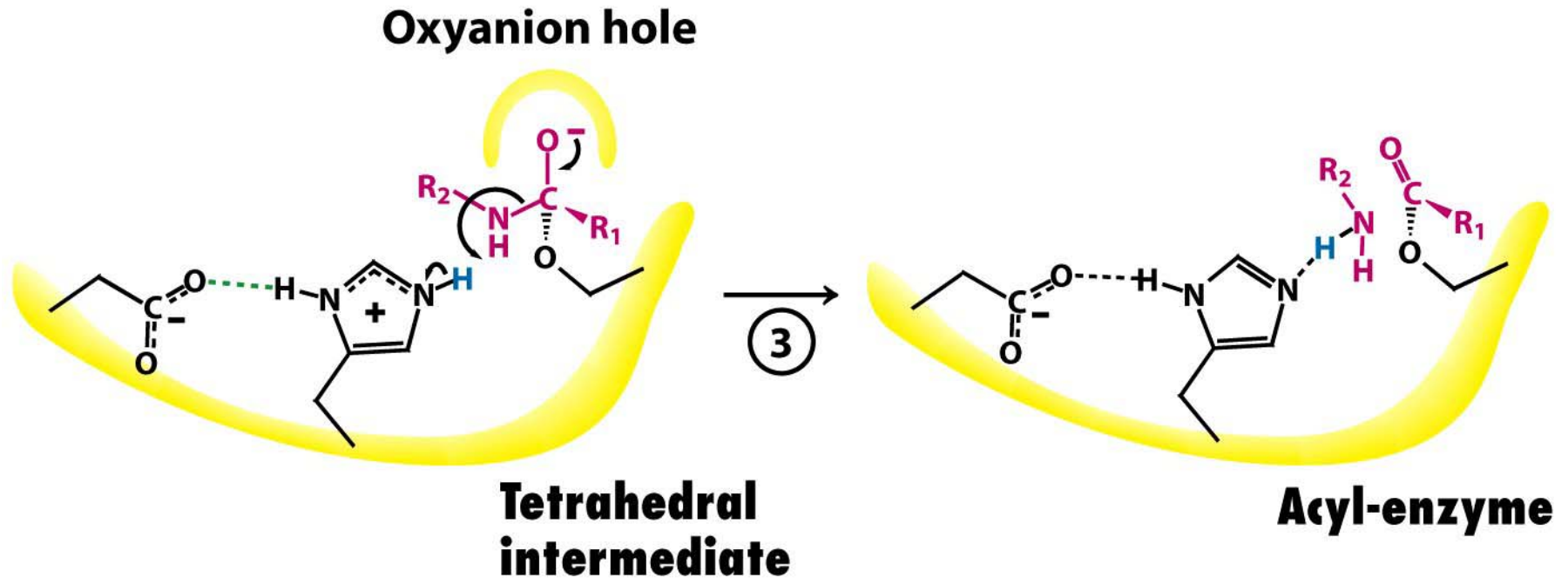


## Substrato ligado



## Intermediário tetraédrico

### Passo 3: Colapso do intermediário tetraédrico

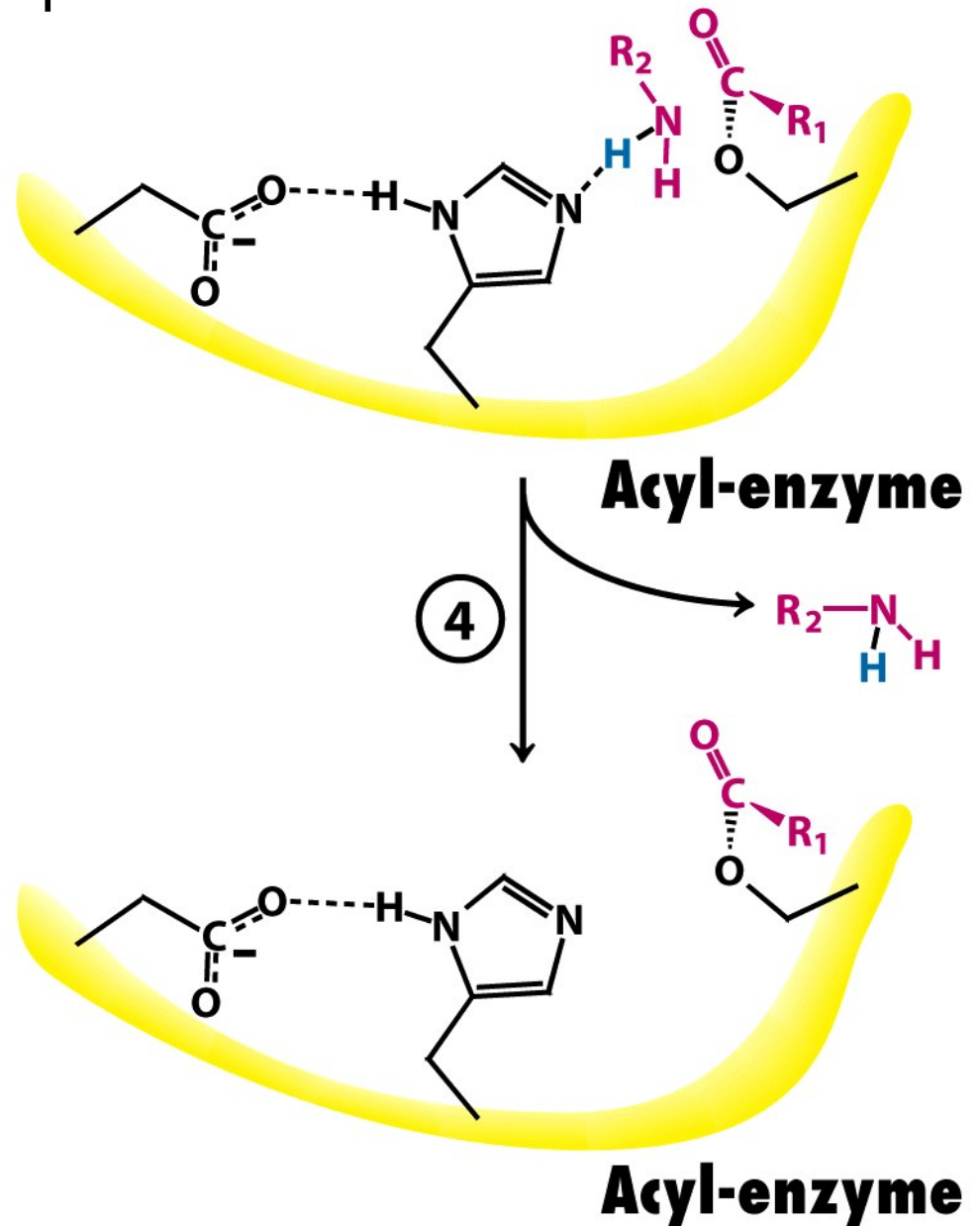


O intermediário tetraédrico decompõe-se dando origem a um intermediário enzima-acilo, devido à força motriz da doação do próton pela **His 57** (catálise ácida)

## Passo 4: Libertação do componente amina

O primeiro péptido liberta-se da enzima. Este péptido contém o grupo amina que estava envolvido na ligação peptídica que foi cortada.

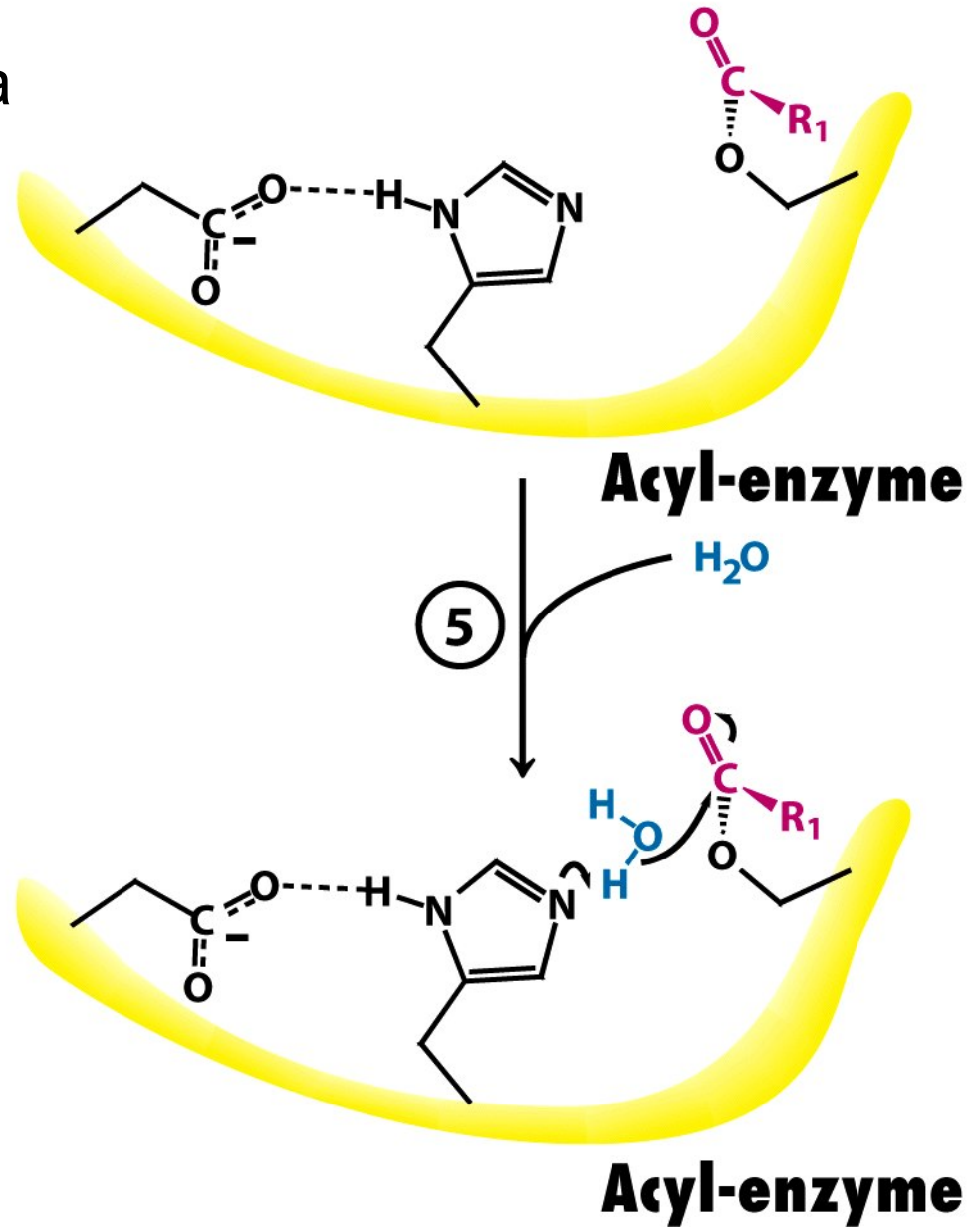
(Notar que corresponde à extremidade C do péptido original.)



## Passo 5: Entrada de água

O intermediário enzima-acilo é instável relativamente à reacção de hidrólise.

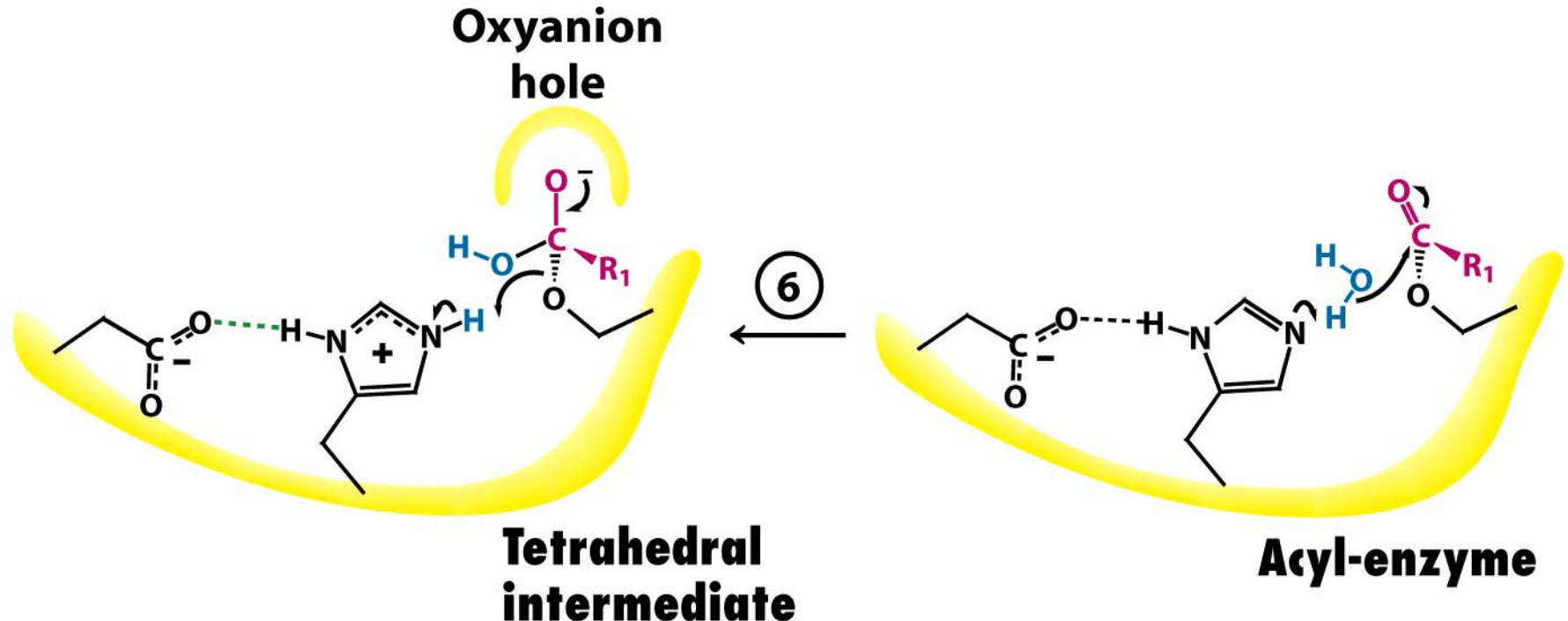
Dá-se a entrada de uma molécula de água para o centro activo da enzima.



O intermediário enzima-acilo é desacilado por reacções que são o inverso dos passos anteriores...

### Passo 6: Ataque nucleofílico da água à enzima acilada

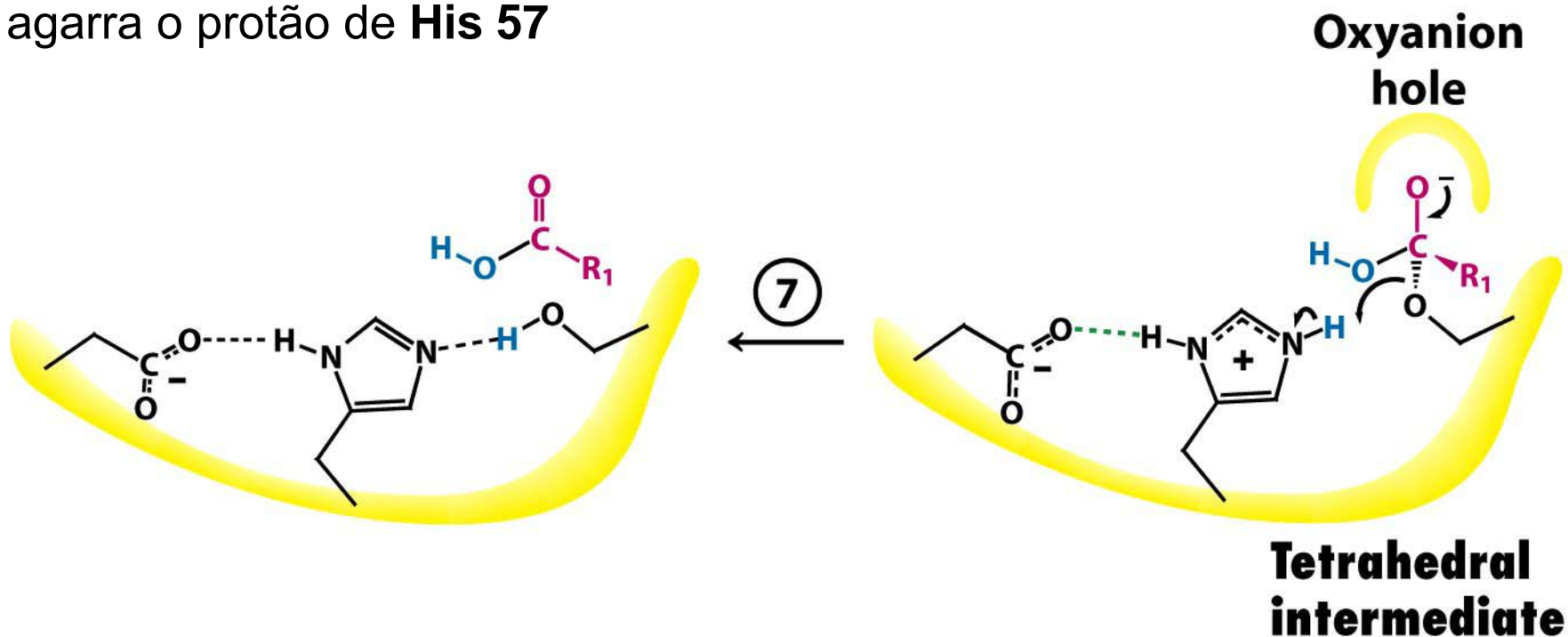
Dá-se um ataque nucleofílico da água ao grupo carbonilo com formação de novo intermediário tetraédrico. **His 57** agarra o protão da água e o ião imidazólio é estabilizado por **Asp 102**. O oxianião é estabilizado por duas ligações de hidrogénio com grupos NH da cadeia polipeptídica.



## Passo 7: Colapso do intermediário tetraédrico

O intermediário decompõem-se:

**Ser 195** é o grupo de saída e agarra o próton de **His 57**

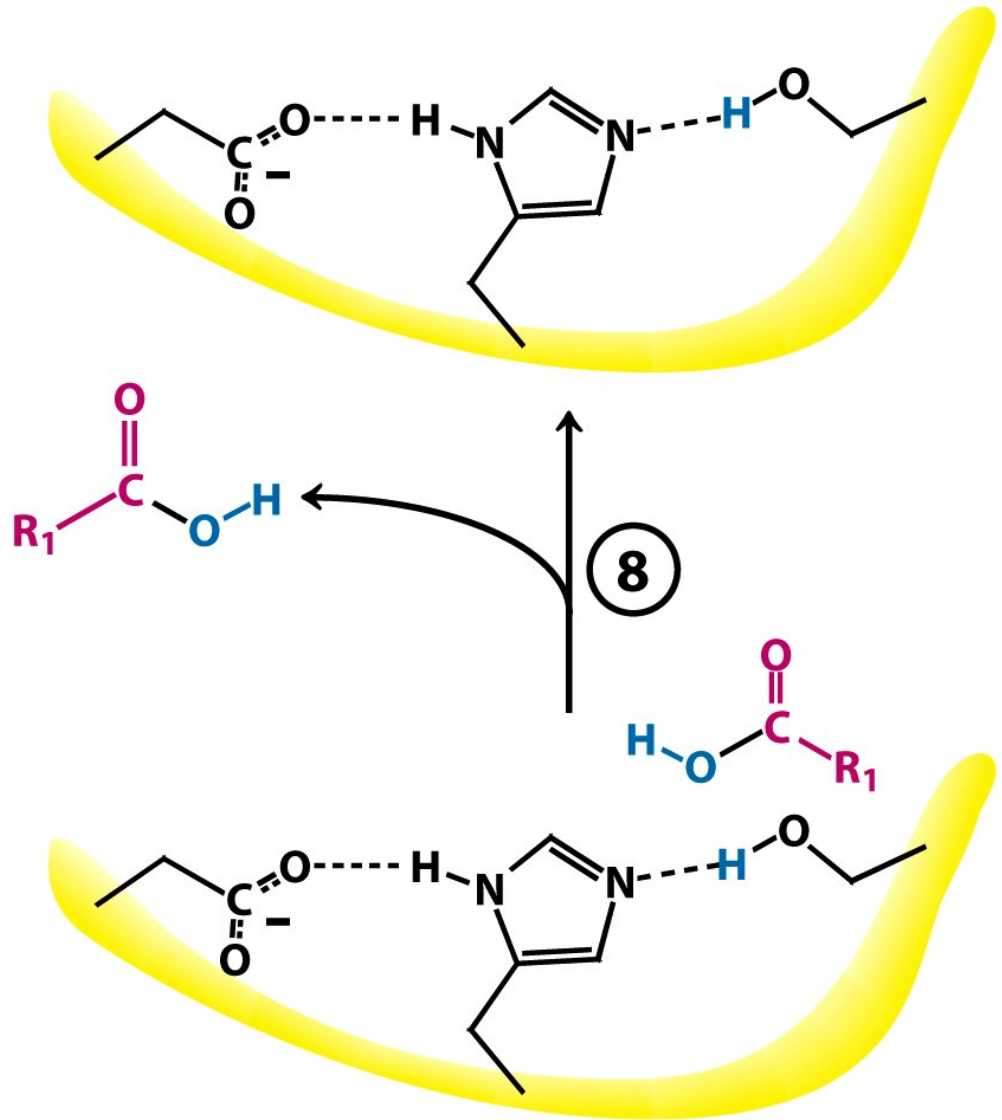




## Passo 8: Libertação do componente ácido carboxílico

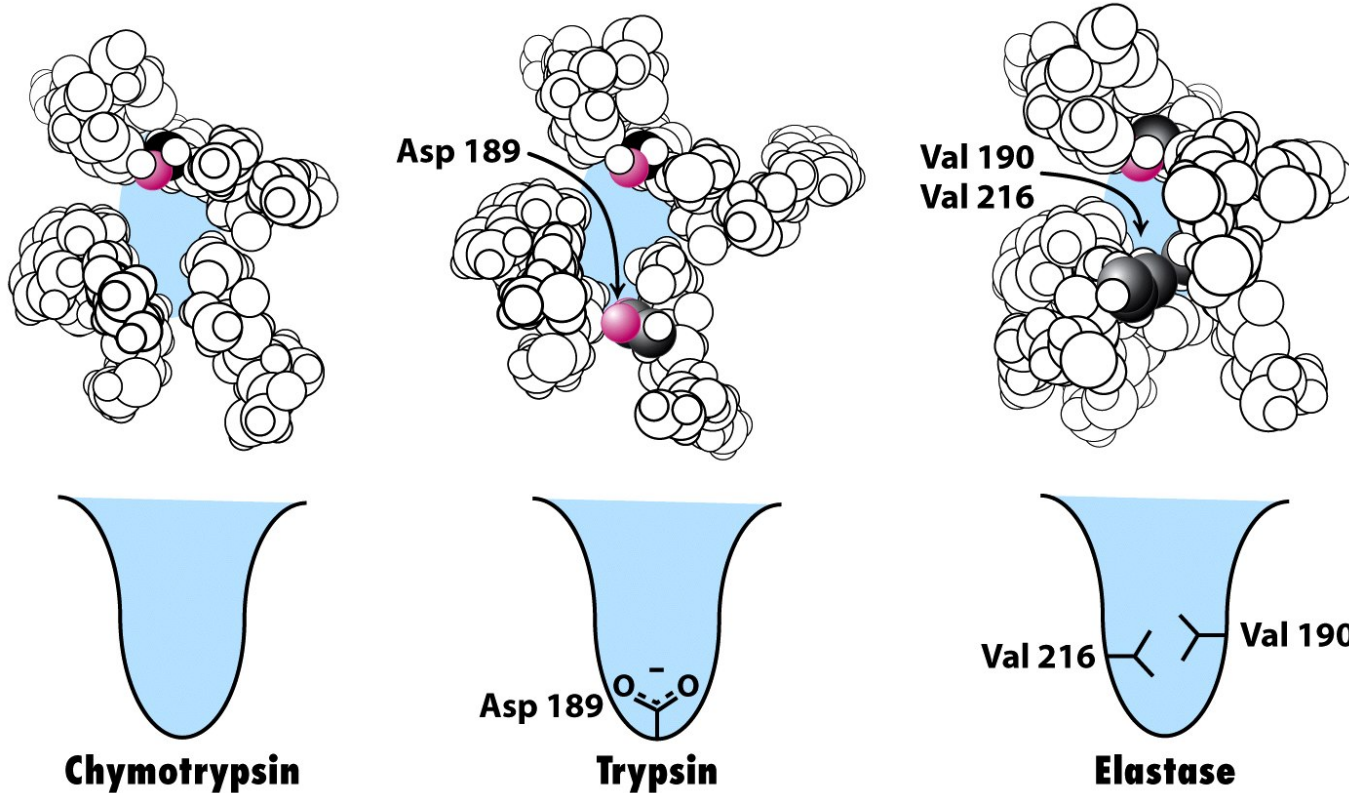
O segundo péptido liberta-se da enzima. Este péptido contém o grupo carboxilo que estava envolvido na ligação peptídica que foi cortada. (Notar que corresponde à extremidade N do péptido original.)

A enzima livre é regenerada





# Especificidade para o substrato



**Quimotripsina:** bolsa hidrofóbica localizada perto dos grupos catalíticos.

**Corta do lado C de resíduos hidrofóbicos volumosos (Fen, Trp, Tir, Leu)**

**Tripsina:** Existe um Asp (Asp 189) no fundo da bolsa de ligação do substrato que pode formar um par iônico com resíduos de carga positiva do substrato.

**Corta do lado C de resíduos carregados positivamente (Lis, Arg)**

**Elastase:** A bolsa de ligação do substrato está obstruída por dois resíduos volumosos (Val e Tir substituem duas Gli).

**Corta do lado C de resíduos pequenos neutros (Ala, Gli, Val)**