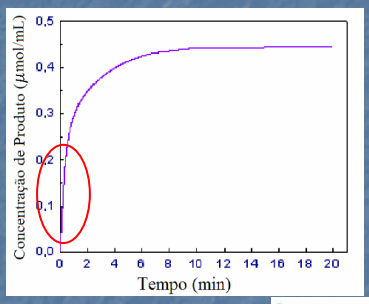
ESTABILIDADE DE ENZIMAS

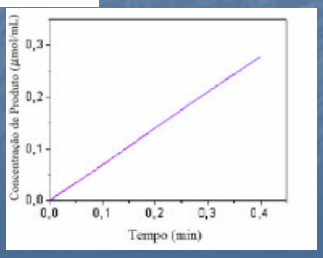
Estabilidade Enzimática X Atividade Enzimática

- **Atividade Enzimática**: É dada pela medição da velocidade inicial da reação sob uma faixa de condições determinadas.
- **Estabilidade Enzimática**: Capacidade das enzimas de reter sua capacidade catalítica sob diferentes condições de reação ao longo do tempo – função biológica das enzimas esta intimamente associada à sua estrutura tridimensional.

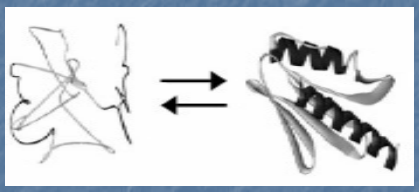
Atividade Enzimática



Velocidade inicial da reação é determinada pela faixa linear da formação de produto.



Estabilidade das Enzimas



Desnaturado **Nativo**

Estado termodinamicamente mais estável em condições fisiológicas

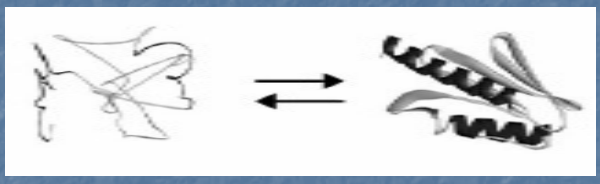
Os estados de equilíbrio da desnaturação das proteínas consistem na alteração das propriedades físico químicas da solução de modo a deslocar o equilíbrio – valor da constante de equilíbrio.

Fatores que Influenciam a Estabilidade

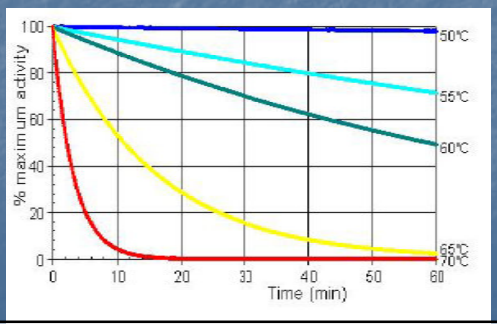
- **Temperatura**
- **pH**
- Força iônica
- Presença de agentes desnaturantes
- Atividade da água
- **Pressão**

Efeito da Temperatura

Desnaturação por desdobramento da Molécula- liberdade conformacional aumenta a elevadas temperaturas – reversível na zona de transição



Desnaturado **Nativo**



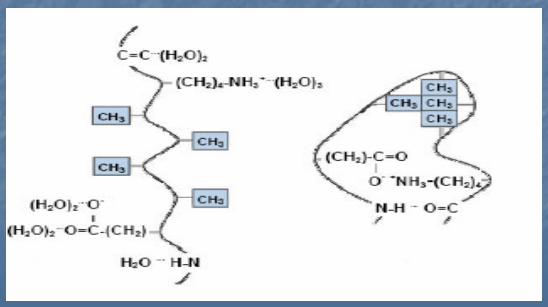
Efeito do pH

- Normalmente valores extremos de pH induzem a desnaturação (muito ↑ ou muito ↓).
- Alteração da carga dos aminoácidos da molécula (anula interações eletrostáticas- promove repulsões)- 7 dos 20 aas das proteínas alteram sua carga com variação do pH
- Afeta a estrutura da molécula.

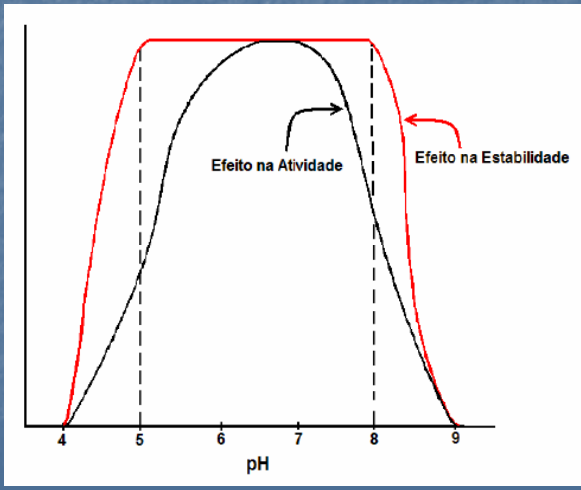
Efeito do pH

- Desnaturação ácida (pH ↓) desaparecimento das cargas negativas (grupos COOH das Asp e Glu).
- Desnaturação alcalina (pH ↑): desaparecimento das carga positivas- acúmulo negativas grupos COOH e nas tirosinas e cisteínas.

Estrutura interna de uma proteína- irreversível aumenta reatividade



Efeito do pH



Agentes Desnaturantes

- Substâncias que causam a desnaturação das enzimas- aumentam solubilidade cadeias laterais da proteína (hidrófobas e polipeptídica)
- Na maioria das vezes é reversível (100%).
- Utilizados p/ caracterização termodinâmica da desnaturação.

Ex: cloreto de guanidina e uréia

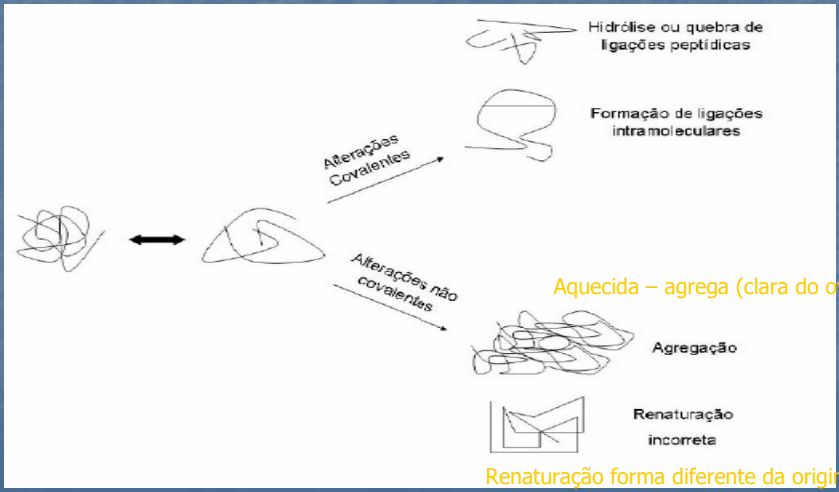
Atividade da Água

- O nível e distribuição de água residual afeta a eficiência catalítica.
- Falta de água torna a molécula mais rígida e excesso de água diminuí estabilidade enzimática (aw<1- causa rigidez)

Desnaturação Irreversível

Modo de quantificar inativação irreversível – medir a atividade enzimática

inversamente proporcional ao número de moléculas irreversívelmente desnaturadas



Aquecida – agrega (clara do ovo)

Renaturação forma diferente da original

Desnaturação Irreversível

Alterações Covalentes

- Quebra das ligações peptídicas: contaminação c/ proteases,pH ácido ou alcalino
- Desamidação dos resíduos de asparagina e glutamina (introduz cargas negativas no interior da molécula conduzindo a perda da atividade)

Alterações Não Covalentes

- Agregação (interações hidrófobas minimiza contato com a água externa -pelos aas hidrófobos expostos na superfície, que se agregam)

Desnaturação Irreversível

- Inativação pode seguir cinética de 1a ordem, exceto enzimas imobilizadas.

$$E \xrightarrow{k} Ed$$

$$-\frac{dE}{dt} = k_d E$$

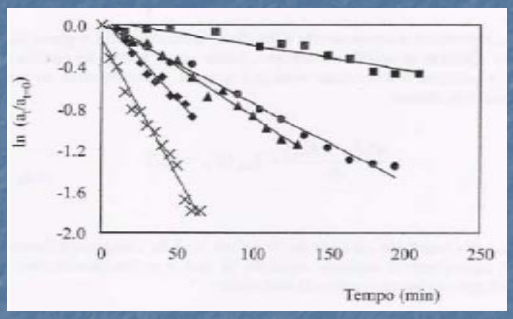
Taxa de perda de atividade
E= atividade enzima , t= tempo,
Kd = constante de desativação

Integrando

$$\frac{E}{Eo} = e^{-kd\,t}$$

Eo= atividade no tempo zero
E= atividade no tempo t
k= constante de desativação

Efeito da Temperatura - Desnaturação



Ex. Decaimento da cutinase a pH 9,2 em diferentes Temperaturas – pode-se calcular Kd para cada Temperatura
Kd maior com aumento de T

Meia-vida

$$t1/2 = \frac{\ln 0{,}5}{-Kd}$$

E/Eo= 0,5

Tempo de meia vida – tempo ao fim do qual a enzima perde 50% da atividade

Efeito da Temperatura - Desnaturação

IMOBILIZAÇÃO:

- Tende a aumentar a estabilidade das enzimas.

Enzimas Termoestáveis

- Resistentes a desnaturação térmica
- Demanda industrial (mercado ~US$ 250 milhões)
- Processos mais drásticos
- Organismos termofílicos

Efeito da Pressão

- O efeito da pressão em um processo físico-químico em equilíbrio é governado por uma mudança de volume no processo (ΔV).

- A aplicação de pressão faz com que o equilíbrio se desloque em favor do lado da reação com menor volume.

$$\left(\frac{d \ln K}{dP}\right)_T = -\left(\frac{\Delta V}{RT}\right)$$

Efeito da Pressão

Interações Intramoleculares

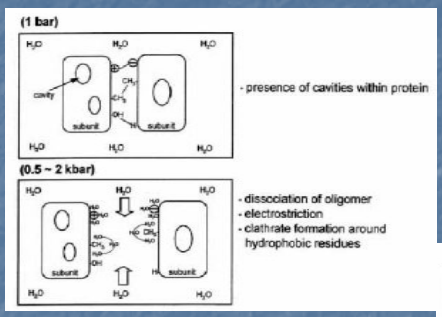
- Interações iônicas: Proteínas formam pares iônicos que estabilizam sua estrutura terciária e quaternária. A pressão leva ao seu rompimento.
- Hidratação: Deformação da proteína pela entrada de água dentro da molécula.
- Ligações de hidrogênio: Promove as ligações de H, acarretando em conformações flutuantes. Diminui o tamanho das ligações comprimindo a molécula.

Efeito da Pressão

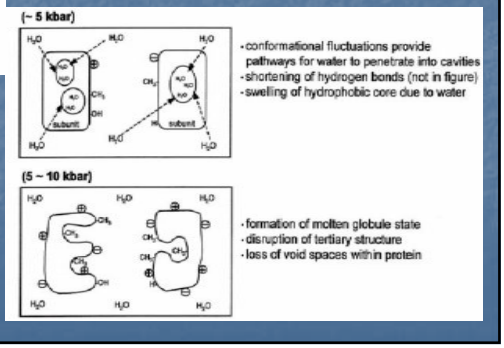
- Interações Intermoleculares

- Proteína-Proteína: Dissociação de proteínas oligoméricas,fragmentação da molécula.
- Enzima-Substrato: A ocorrência de eletrostrição pode romper o par iônico entre substrato e enzima.

Efeito da Pressão



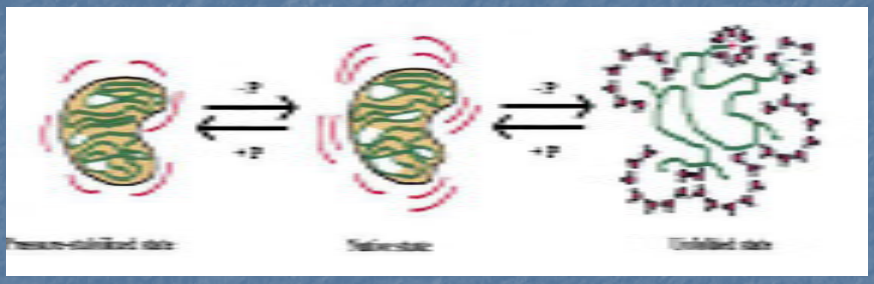
Interações moleculares



Termoestabilização Induzida por Pressão

- Pressão e Temperatura são forças opostas em termos de entropia.

Aumentando a temperatura leva a desordem enquanto que aumentando a pressão leva a ordem.

Porém, isso não é verdadeiro para todas as proteínas.

Termoestabilização Induzida por Pressão