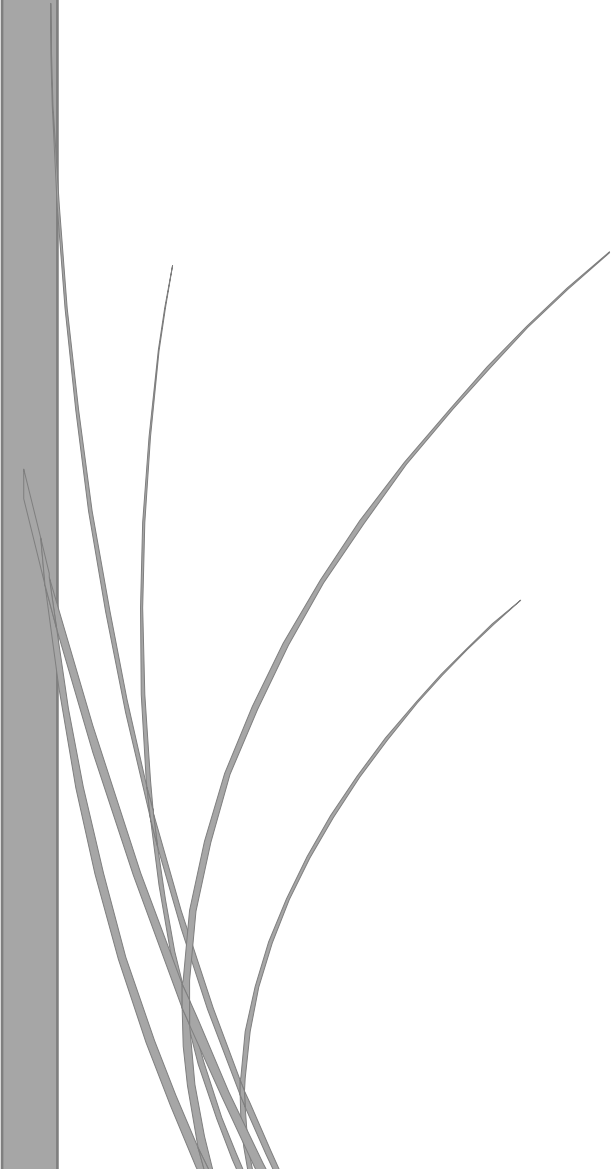




Apontamentos Aula nº8

Química-Física



BETTER MINDS
De estudantes para estudantes

AULA Nº 8

Sumário

- IV - Equilíbrio Químico (cont.)
- Ligação de ligandos e íons metálicos a macromoléculas (um e n sítios de ligação por macromolécula, estudos experimentais de equilíbrio de ligação)
 - Bioenergética (estado padrão em bioquímica, algumas limitações na biologia)

Ref (1), Cap. 8, pp. 334 - 312, 338 - 339.

Prof. Ana Carolina Dias-Cibral

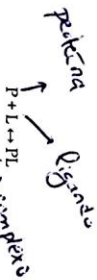
Gêneros de ligação

Um sítio de ligação por molécula

n sítios de ligação equivalentes e independentes por molécula

Um sítio de ligação por molécula

A reação:



Tem como constante de equilíbrio:

$$K_d = \frac{[P][L]}{[PL]}$$

constante de dissociação
 (trata-se de um ligando e um complexo)

4) Ligação de ligandos e íons metálicos a macromoléculas

Um dos fenômenos bioquímicos mais estudados é a interação de pequenas moléculas (ligandos) com receptores específicos nas superfícies das membranas e com proteínas.

Exemplos de interações reversíveis são:

- Ligação e liberação de prótons por grupos ácidos e básicos das proteínas;
- Associação de íons como o Mg^{2+} e o Ca^{2+} com proteínas e ácidos nucleicos;
- Reações antígeno-anticorpo;
- Ligação Reversível do oxigênio à hemoglobina, mioglobina.
- Cinética enzimática

$pH = 7$ $\rightarrow$ ponto isotétrico
 (cargas negativas = cargas positivas)

Como utilizamos frequentemente a dissociação:



é mais conveniente:

$$K_d = \frac{[P][L]}{[PL]}$$

constante de dissociação

Quanto menor o valor de K_d maior a concentração do complexo PL.
 As constantes deste equilíbrio estão relacionadas por:

Determinação do valor de K_d

$$K_d K_s = 1$$

Definimos primeiro a quantidade Y (saturação fracional dos sítios)

$$Y = \frac{[PL]}{[P] + [PL]}$$

3 não há nenhuma macromolécula livre; grau de saturação = 1
 $Y = 1$ $\hookrightarrow$ [P] = 0 proteínas livres
 não há macromoléculas livres

$$Y = \frac{[PL]}{[P] + [PL]} = \frac{P L}{P + P L K_d}$$

Y = razão entre a concentração de L ligado a 1 P (PL) e a concentração total de todas as formas de P e PL.

$\rightarrow$ todos os locais possíveis de ligação

Exemplo:

$Y \rightarrow 0$ quando $[P]_0 = 0$ $\rightarrow$ nenhum ligante
 $Y \rightarrow 1$ quando $[P]_0 = \infty$ $\rightarrow$ saturação

metade das moléculas P estão complexadas com L

metade das moléculas P estão livres.

Por isso $[P] = [P]_0 - [PL] = K_d$

Determinar o valor de K_d :

$$[P]_0 = \frac{[P][L]}{K_d}$$

é mais fácil analisar a quantidade de proteína no meio de que no complexo, daí substituímos o $[P]$ por

Substituindo na expressão de Y o $[P]$, obtemos:

$$Y = \frac{[P][L]}{[P] + [L]} = \frac{K_d[L]}{K_d + [L]}$$

$[L] =$ concentração de ligandos livres no equilíbrio.

Obtenção de Y:

Início

1. Uma concentração conhecida de L, $[L]_0$, é adicionada a uma concentração conhecida de P, $[P]_0$.

Equilíbrio

2. Pode-se medir o valor de $[P]$, ou de $[L]$, porque a $[L]_0$ é conhecida no início e, o balanço de massa requer que a $[L] + [PL]$ é igual a $[L]_0$.

O valor de P não necessita de ser medido porque $[P] + [PL] = [P]_0$, por isso $[P] = [P]_0 - [PL]$.

Fazendo o inverso da equação:

$$Y = \frac{[L]}{[L] + K_d}$$

Relação direta

$$Y = b + mX$$

(gráfico de $1/Y$ vs $1/[L]$ linha recta com declive K_d)

inversamente

Se os dados de Y são conhecidos, podemos obter a curva de ligação, ficando saturada.

Rearranjando a equação obtemos ainda:

$$1 = Y + \frac{K_d}{[L]} Y$$

Representando graficamente:

$$\frac{Y}{[L]} = \frac{1}{K_d} - \frac{Y}{[L]}$$

Relação de Scatchard

ao usarmos esta equação, podemos tirar o valor de K_d da 2ª forma.

$$1 - Y = \frac{K_d}{[L]} Y \quad \text{ou} \quad \frac{1}{K_d} - \frac{Y}{[L]} = \frac{Y}{[L]}$$

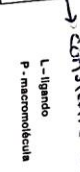
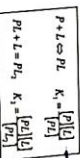
ex: K_d é a concentração de ligando necessária para ocupar 50% dos sítios de ligação.

* n sítios de ligação equivalentes por molécula

Uma macromolécula tem n sítios equivalentes $\rightarrow$ cada sítio de ligação tem o mesmo valor de K_d , independentemente de os outros sítios da mesma molécula estarem ou não ocupados.

n = 2

Se uma macromolécula tem dois sítios de ligação equivalentes, ela terá dois equilíbrios obrigatórios:



2 lugares de ligação



L-ligando

P-macromolécula

Onde K_1 e K_2 são as constantes de dissociação. Agora, definimos Y (saturação fraccionada dos locais) como:

2 formas de se ligar a forma de se ligar

$$2K_1 = K$$

$$Y = \frac{[P] + 2[PL_2]}{[P] + [PL] + [PL_2]}$$

PL_2 tem duas moléculas de L ligadas a uma molécula de P logo a sua concentração deve ser multiplicada por 2.

Substituindo as relações:

$$[P] = \frac{[P][L]}{K_1} \cdot [P] = \frac{[P][L]}{K_1}$$

na equação anterior, escrevemos:

$$(1) \quad Y = \frac{[P][L]}{[P] + [P][L]/K_1 + [P][L]^2/K_1 K_2} = \frac{[L]}{1 + [L]/K_1 + [L]^2/K_1 K_2}$$

K_1 pode parecer ser igual a K_2 , porque ambos os sítios são independentes e têm a mesma constante de dissociação.

Contudo, não é o caso, devido a factores estatísticos.

Seja K a constante de dissociação de um dado sítio (chamada de *constante intrínseca de dissociação*).

Então $2K_1 = K$ porque existem duas maneiras para que L se unido ao P e uma maneira para que se separe de P . K_1 pode ser igual a K se houver apenas um sítio de ligação.

A equação (1) pode agora ser escrita como:

$$Y = \frac{2[L]/K + 2[L]^2/K^2}{1 + 2[L]/K + [L]^2/K^2} = \frac{2[L]/K + 2[L]^2/K^2}{(1 + [L]/K)^2} = \frac{2[L]}{[L] + K}$$

n de locais de ligação

Esta equação é o resultado obtido por dois sítios equivalentes.

Na generalidade, para n sítios equivalentes, temos:

$$Y = \frac{n[L]}{[L] + K} \quad (6)$$

$n \rightarrow$ locais de ligação

Esta equação pode ser reestruturada em diversas formas apropriadas e representadas graficamente.

Os procedimentos mais comuns são:

- Relação directa
- Relação dupla recíproca
- Relação de Scatchard

11

Depois de um L estar ligado, existe um único caminho para que L se unido a PL e dois caminhos para que se separe de PL .
 $\log(K_2 = 2K_1)$
A relação geral entre a constante de dissociação K_i e K é dado por:

$$K_i = \frac{1}{(i-1)!} \left(\frac{K}{K_1} \right)^i$$

Por exemplo, se $i=1, 2$ e $n=2$, então a expressão anterior é dada por:

$$K_1 = \frac{K}{1} \quad K_2 = 2K$$

Deste modo, com base na análise estatística, verificamos que a segunda constante de dissociação é quanto vezes maior que a primeira constante de dissociação ($K_2 = 2K_1$).

K é igual à raíz quadrada do produto das constantes de dissociação individuais:

$$K = \sqrt{K_1 K_2}$$

Quando os locais de ligação são todos equivalentes

$\rightarrow$ Apesar do Gauss serem iguais, vi muita influência onde se podem ou não ligar

1) Relação directa.

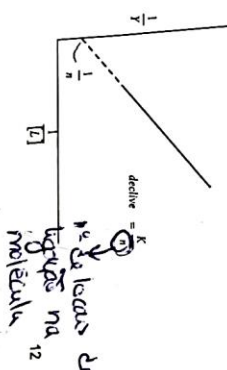
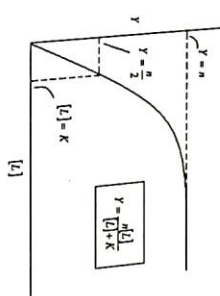
Curva hipérbolica característica da ligação simples (isto é, os sítios de ligação são todos equivalentes e não interagem).

Quando $[L] = K$, nós temos $Y = n/2$ e quando temos uma concentração de ligandos muito elevada podemos assumir que $[L] \gg K$, então, $Y = n$.

A relação directa geralmente não é usada para determinar os valores de n e K , porque a determinação de n a concentrações muito elevadas de ligando é muitas vezes difícil e é necessário saber o valor do n para determinar o K .

2) Relação dupla recíproca.

$$\frac{1}{Y} = \frac{1}{n} + \frac{K}{n[L]}$$



10

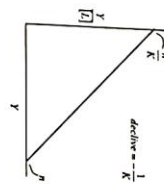
3) Relação de Scatchard
Começando com a equação (6), temos:

$$\frac{y[l] + r^2 - n(l)}{K} + r = \frac{n(l)}{K}$$

$$y = \frac{n(l)}{K} - \frac{r^2}{K}$$

ou

$$y = \frac{n}{K} - \frac{r^2}{K}$$



Permite-me saber
quais lugares de
ligação tem

Esta equação é conhecida como a equação de Scatchard.
Portanto, traçamos y/l versus y que nos dá uma linha recta de declive $-1/K$ e uma intercepção na abscissa de n .

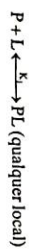
A concentração total de PL é dada por:

$$[PL] = [PL^{(1)}] + [PL^{(2)}]$$

$$= \frac{[P][L]}{K} + \frac{[P][L]}{K}$$

$$= \frac{2[P][L]}{K} \quad (2)$$

Também podemos expressar o equilíbrio de ligação por:



Onde K_1 :

$$K_1 = \frac{[P][L]}{[PL]} \quad (3)$$

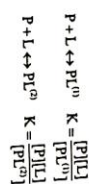
Substituindo a equação (2) em (3) obtemos:

$$K_1 = \frac{[P][L]}{2[P][L]} = \frac{K}{2}$$

15

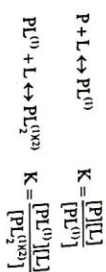
Relação entre K_1 e K_2 e a Constante de Dissociação Intrínseca (K)

Consideremos uma Macromolécula (P) com dois locais de ligação equivalentes e independentes. Suponhamos que os dois locais são distintos e por isso chamemos-lhe (1) e (2).
Uma vez que os locais de ligação são equivalentes, a constante de equilíbrio para a dissociação dos ligandos, designada por constante de dissociação intrínseca, é a mesma para os dois casos a seguir apresentados:

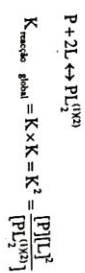


14

Assumindo que os ligandos se ligam sequencialmente podemos escrever:

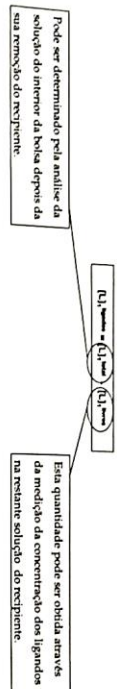


Somando as equações anteriores temos que



Podemos por isso escrever:

$$[PL^{(1)(2)}] = \frac{[P][L]^2}{K^2} \quad (4)$$



Agora podemos ver como o constante de equilíbrio real (K) e o número de sítios de ligação (n) podem ser obtidos usando a técnica da dialise de equilíbrio:

Supondo que começamos com uma solução proteica com concentração conhecida na fase 1 e uma solução de ligandos com concentração conhecida na fase 2. No equilíbrio, a quantidade Y é dada por:

$$Y = \frac{[L]_{\text{ligado}}}{[P]_{\text{total}}}$$

$[P]_{\text{total}}$ - concentração da solução proteica original

21

A experiência pode ser repetida usando diferentes concentrações das soluções dos ligandos e da proteína, e os valores de K e n podem ser determinados pelo gráfico de Hughes-Klotz ou pelo de Scatchard.

$$\frac{1}{Y} = \frac{1}{n} + \frac{K}{n} \left(\frac{1}{[L]} \right)$$

$$\frac{Y}{[L]} = \frac{n}{K} - \frac{Y}{K}$$

Neste caso $[L] = [L]_{\text{total}}$

A técnica da dialise de equilíbrio tem sido empregue com sucesso na ligação de drogas, hormonas e outras moléculas pequenas a proteínas e ácidos nucleicos.

De notar que neste caso assumimos que os ligandos não eram eletrólitos pelo que, a concentração de ligandos livres é igual nas duas fases, em equilíbrio. Se o ligando for um eletrólito teremos de aplicar a equação de Debye-Hückel.

22

5) Bioenergética

* O estado padrão em bioquímica

Bioenergética é o estudo das transformações de energia nos sistemas vivos

Os Químicos-Físicos e os Bioquímicos têm definições diferentes de estado padrão

Estado padrão para uma solução ideal é aquele no qual todos os reagentes e produtos se encontram numa concentração unitária molal com molal

é definido de acordo com a concentração presente na atmosfera

Exemplo
Concentração do H^+ definida para o estado padrão como sendo 10^{-7}
M, uma vez que o pH fisiológico é cerca de 7

check lot n° 8

check lot n° 8
pH 7.0

O potencial vai a derivação com os métodos

A variação de energia de Gibbs padrão de acordo com estas duas convenções é diferente para reações que envolvam a libertação ou consumo de iões hidrogénio, dependendo da convenção usada

$\Delta G < 0 \rightarrow$ reação espontânea

Processos físico-químicos

$$\Delta G^\circ_f$$

Processos bioquímicos

$$\Delta G^\circ_p$$

Consideremos a reação:



A variação de energia de Gibbs (ΔG) para o processo é dada por:

$$\Delta_r G = \Delta_r G^\circ + RT \ln \frac{([C]/1 \text{ M}) ([\text{H}^+]/1 \text{ M})^n}{([A]/1 \text{ M}) ([B]/1 \text{ M})}$$

Segundo a convenção bioquímica a variação de energia de Gibbs para o processo é dada por:

$$\Delta_r G = \Delta_r G^\circ + RT \ln \frac{([C]/1 \text{ M}) ([\text{H}^+]/1 \times 10^{-7} \text{ M})^n}{([A]/1 \text{ M}) ([B]/1 \text{ M})}$$

bioquímica
" ΔG°_p "

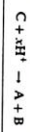
Das duas equações anteriores obtém-se:

$$\Delta_r G^\circ = \Delta_r G^\circ + xRT \ln \frac{1}{1 \times 10^{-7}}$$

Se $x = 1$ e $T = 298$ K então:

$$\Delta_r G^\circ = \Delta_r G^\circ + 39.93 \text{ kJ mol}^{-1}$$

Considerando o caso em que H^+ aparece como reagente:



Então:

$$\Delta_r G^\circ = \Delta_r G^\circ - xRT \ln \frac{1}{1 \times 10^{-7}}$$

Repare que apesar de serem usadas diferentes convenções para o estado padrão, $\Delta_r G^\circ$ não varia.

Isto significa que para reações que produzam iões H^+ o valor de $\Delta_r G^\circ$ é superior ao de $\Delta_r G^\circ$ em 39.93 kJ por mol de iões H^+ libertados. Logo sob condições padrão a reação é mais espontânea a pH 7 do que a pH 0

check ok na 8

Ou para $x = 1$:

$$\Delta_r G^\circ = \Delta_r G^\circ - 39.93 \text{ kJ mol}^{-1}$$

Esta reação será mais espontânea a pH 0 do que a pH 7. Para uma reação que não envolva iões H^+ , $\Delta_r G^\circ = \Delta_r G^\circ$

$$\Delta_r G^\circ < \Delta_r G^\circ$$

* Algumas limitações da termodinâmica em biologia

A energia de Gibbs padrão é apenas válida para reações nos quais os reagentes no seu estado padrão são convertidos em produtos no seu estado padrão

O que nunca se verifica para processos biológicos "in vivo"

Termodinâmica aplica-se normalmente a sistemas fechados em equilíbrio

Sistemas vivos são sistemas abertos, que são mantidos num estado estacionário em vez do equilíbrio