

2. Cinética enzimática

Enzimas são catalisadores em sistemas biológicos. As características mais notáveis das enzimas são o seu poder catalítico e a sua especificidade. Quase a totalidade das enzimas são proteínas, porém algumas moléculas de RNA também são capazes de promover catalise. O exemplo mais conhecido de riboenzima é o RNA ribossomal.

Uma das funções mais importantes desempenhadas pelas proteínas é o reconhecimento específico de ligantes através da formação de interações não covalentes. Enzimas utilizam esta capacidade para interagir com o substrato (ligante) posicionando-o de forma adequada para que reações químicas possam ocorrer. **Enzimas catalisam reações químicas porque estabilizam o estado de transição.** Elas catalisam apenas uma reação química, sendo que a ocorrência de reações colaterais é rara em comparação com reações não catalisadas. A **tabela 1** ilustra o ganho em velocidade de reação promovido por enzimas selecionadas:

Tabela 1: Aumento de velocidade de reação proporcionado por certas enzimas

Enzima	Velocidade da reação não catalisada	Velocidade da reação catalisada
Anidrase carbonica	$1.3 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$	$1 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$
Triose fosfato isomerase	$4.3 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$	$4.3 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$
Carboxipeptidase A	$3.0 \times 10^{-9} \text{ s}^{-1}$	578 s^{-1}

Enzimas são altamente específicas para o substrato. Um exemplo desta especificidade são as proteases, enzimas que catalisam a reação de clivagem da ligação peptídica. A papaína é uma protease que não discrimina o aminoácido adjacente à ligação peptídica, assim ela reconhece diferentes sequências de aminoácidos. A tripsina, por outro lado, cliva somente ligações peptídicas adjacentes a lisinas ou argininas, que são aminoácidos de cadeia lateral longa e carregados positivamente. Outro exemplo é a DNA polimerase, uma enzima que catalisa a formação da ligação fosfodiéster para formar uma nova dupla-fita de DNA. Ela é praticamente insensível a erros incorporando menos de um nucleotídeo errado a cada mil. Dessa forma a DNA polimerase é uma enzima altamente específica para a fita de DNA molde.

Equilíbrio

O sentido de uma reação química depende da variação da energia livre de Gibbs envolvida ($\Delta G = G_{\text{produtos}} - G_{\text{reagentes}}$). Reações com ΔG negativo são espontâneas, enquanto que reações com ΔG positivo não são espontâneas e precisam de energia para ocorrer. Reações com $\Delta G = 0$ estão no equilíbrio. O valor do ΔG depende apenas dos estados inicial e final, independe do caminho.

A magnitude e o sinal do ΔG nada informam sobre a velocidade com que as reações ocorrem. Por exemplo, a reação de oxidação de glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) a CO_2 e H_2O é espontânea, mas não ocorre a taxas perceptíveis na ausência de enzimas. O ΔG de combustão da glicose é o mesmo caso a reação seja catalisada ou não.

O grau de espontaneidade de uma reação química depende do valor do ΔG , o qual depende, por sua vez, das concentrações de reagentes e produtos conforme a equação 3:

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln \frac{[\text{produtos}]}{[\text{reagentes}]}, \quad (3)$$

sendo que

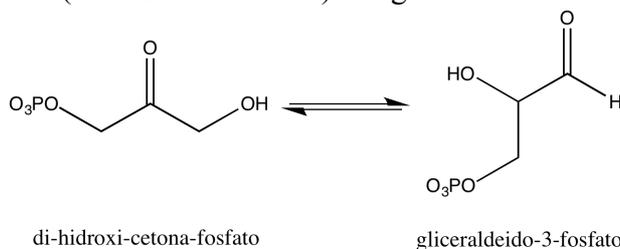
$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_{eq}. \quad (4)$$

A **Tabela 2** mostra a correlação entre constantes de equilíbrio e ΔG . Note como reações com ΔG positivo não ocorrem na direção esperada, ao contrário de reações com ΔG negativo (**Tabela 2**).

Tabela 2. Relação entre K_{eq} e ΔG .

K_{eq}	ΔG (kJ/mol)
10^{-6}	34.2
10^{-3}	17.1
1.00	0.00
10^1	-5.7
10^3	-17.1

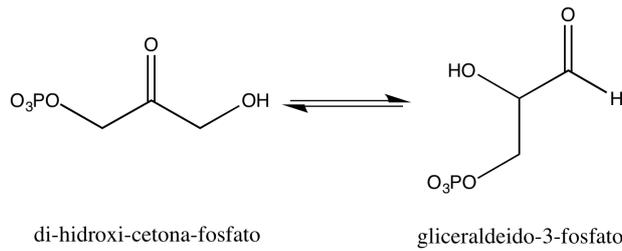
6. Reações químicas que não são espontâneas ($\Delta G^0 > 0$) podem tornar-se espontâneas ajustando-se as concentrações de reagentes e produtos. Este aspecto é determinante em condições celulares. Por exemplo, considere a reação de isomerização de dihidroxicetona-fosfato (DHAP) em gliceraldeído-3-fosfato (GAP) que ocorre durante a via glicolítica. A razão entre as concentrações de DHAP e GAP no equilíbrio é 0.0475 a 298 K e pH 7 ($R = 8315 \text{ JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$). Pergunta-se:



- i) A reação de isomerização de DHAP em GAP nas condições de equilíbrio é espontânea?
- ii) A reação será espontânea quando as concentrações de DHAP e GAP forem $200 \mu\text{M}$ e $3 \mu\text{M}$, respectivamente?

Enzimas aceleram reações químicas mas não alteram o equilíbrio da reação, que é dado apenas em função da diferença de energia livre entre produtos e reagentes (Figura 8).

A velocidade das reações químicas é expressa a partir de uma medida da variação da concentração de produtos ou reagentes em função do tempo. Considere o equilíbrio entre dihidroxicetona-fosfato (DHAP) e gliceraldeído-3-fosfato (GAP) ilustrado abaixo:



Este equilíbrio possui velocidades no sentido da formação de gliceraldeido-3-fosfato ou dihidroxicetona-fosfato. A velocidade da reação direta é expressa como:

$$v = \frac{d[\text{DHAP}]}{dt} = k[\text{DHAP}] \quad (5)$$

onde a constante de velocidade “k” é expressa em s^{-1} . Reações que são diretamente proporcionais à concentração do reagente são chamadas de “reações de primeira ordem”. Reações bimoleculares e cuja velocidade é proporcional à concentração de dois reagentes são chamadas “reações de segunda ordem”, neste caso a constante cinética é expressa em $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

Catálise enzimática

A velocidade de uma reação química é diretamente proporcional à energia de ativação. Enzimas agem como catalisadores biológicos, e atuam para diminuir a barreira de energia de ativação conforme mostrado na **Figura 8**, acelerando a reação.

A forma pela qual enzimas diminuem a barreira de energia é através da estabilização do estado de transição. A primeira etapa de uma reação catalítica é a formação de um complexo específico entre enzima e substrato. Dessa forma, a enzima é capaz de orientar o(s) substrato(s) adequadamente para que a reação química ocorra.

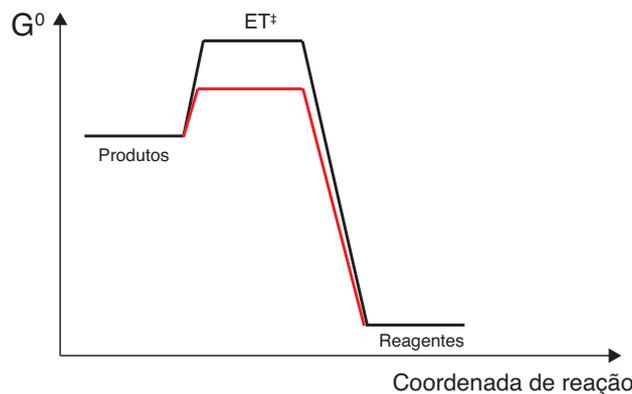


Figura 8. Diagrama de energia livre em função da coordenada de reação para uma reação na ausência (preto) e presença da enzima (vermelho). A enzima estabiliza o estado de transição, diminuindo a barreira de energia de ativação.

A velocidade das reações químicas depende da constante de velocidade e das concentrações dos reagentes. Portanto, não é de estranhar que a velocidade de uma reação enzimática, medida a partir da taxa de formação do produto “P”, aumente com a concentração de enzima:

$$v = k[E]_{total} \cdot (6)$$

A velocidade da reação também aumenta com a concentração de substrato como seria de esperar. O curioso é que a velocidade de reação aumenta linearmente para baixas concentrações de substrato, mas deixa de aumentar em altas concentrações de substrato e atinge um valor máximo (V_{max}) (**Figura 9**). Com certeza, a velocidade de uma reação não catalisada não apresenta este efeito de saturação.

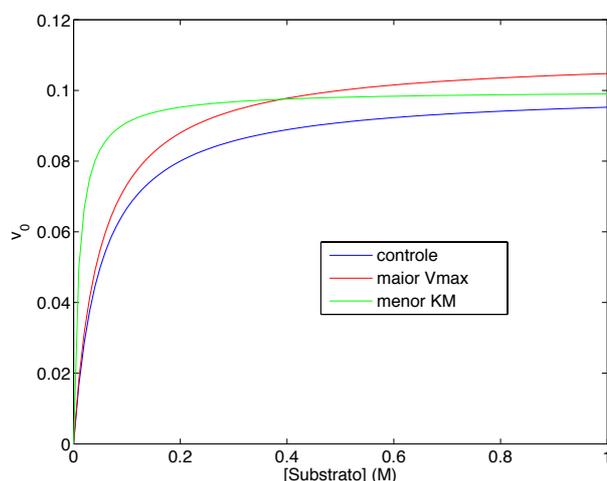
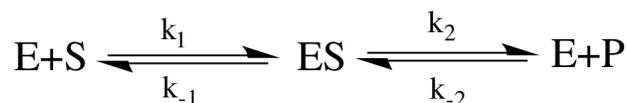


Figura 9. Velocidade inicial (v_0) em função da concentração de substrato (azul). Comparação com enzimas diferentes apresentando menor K_M (verde) ou maior V_{max} (vermelho).

Para compreendermos a origem deste efeito de saturação é preciso considerar as condições em que as medidas foram realizadas. Medidas de velocidades de reações enzimáticas são geralmente realizadas nos intervalos de tempo iniciais da reação, e em condições de baixíssima concentração de enzima e um excesso de substrato. Quando a enzima é misturada com um excesso de substrato, há um período inicial durante o qual as concentrações de intermediários, de complexo enzima-substrato (ES) aumentam até atingir valores estacionários. Uma vez que os intermediários atingiram concentrações estacionárias, as velocidades de reação alteram-se muito pouco com o tempo.

Leonor Michaelis e Maud Menten propuseram em 1913 um modelo simples para explicar as características cinéticas observadas na **Figura 9**. O modelo de Michaelis-Menten pressupõe que o complexo ES é um intermediário da reação catalítica. O complexo enzima-substrato também costuma ser chamado de “complexo de Michaelis”:



A reação catalítica é dividida em duas etapas. Inicialmente ocorre a interação entre uma molécula da enzima e outra do substrato, formando o complexo “ES”. Este primeiro equilíbrio é considerado rápido e reversível, e não envolve alterações das ligações químicas. O complexo ES é mantido por interações não covalentes. As

reações químicas ocorrerão em uma segunda etapa, na qual o complexo ES se decompõe em enzima livre e produto. Esta segunda etapa segue uma cinética de primeira ordem, dependente da constante k_2 ou k_{cat} .

O complexo ES também pode ser formado a partir da reação reversa entre enzima e produto. Mas como as medidas são realizadas nos instantes iniciais em que a concentração de produto é muito pequena, a reação reversa pode ser ignorada. Esta análise também assume que a decomposição de ES em enzima e produto livres é rápida, e portanto pode ser ignorada. O esquema final é:



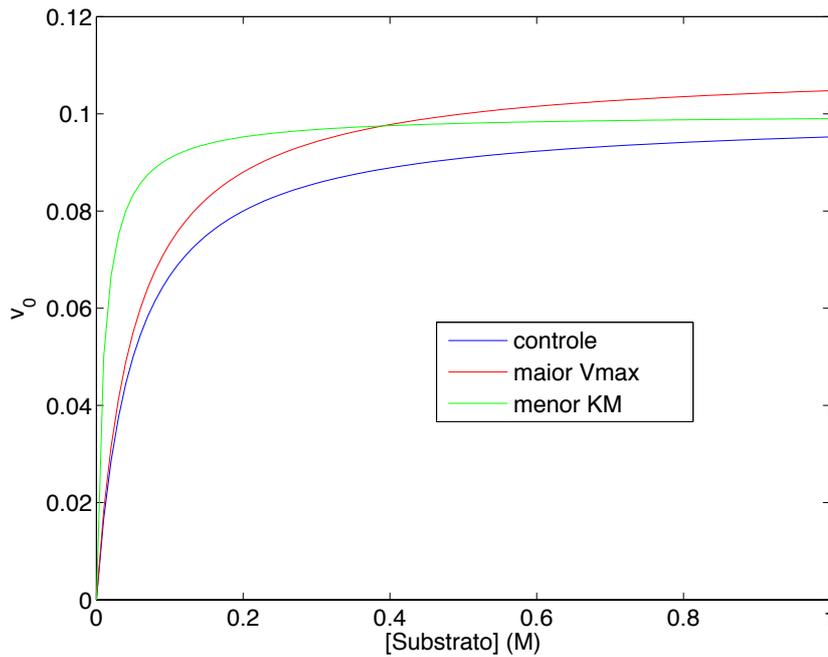
Com um pouquinho de álgebra e assumindo-se a condição de estado estacionário, é possível chegar a uma equação simples para a velocidade inicial de reação em função da concentração de substrato e das constantes cinéticas. Esta é a chamada “equação de Michaelis-Menten”, e reproduz muito bem o comportamento ilustrado na **Figura 9**:

$$v_0 = \frac{k_2[E]_t[S]}{\frac{k_{-1}+k_2}{k_1}+[S]} = \frac{V_{max}[S]}{K_M+[S]} \quad (7)$$

A constante cinética k_2 ou k_{cat} é frequente chamada de “*turnover*”. Ela representa o número máximo de moléculas de substrato convertidas em produto por unidade de tempo. A constante k_{cat} é uma constante de velocidade de primeira ordem. Na presença de excesso de substrato, a velocidade inicial v_0 atinge o valor máximo (V_{max}) que depende apenas da constante catalítica k_{cat} .

$$V_{max} = k_2[E]_{total} \quad (8)$$

K_M é igual à concentração de substrato na qual a metade da velocidade máxima ($v_0 = V_{max}/2$) é atingida. Dessa forma K_M representa a concentração de substrato necessária para se atingir uma taxa razoável de conversão de substratos em produtos. E na situação particular em que $k_2 \ll k_{-1}$, K_M representa a constante de dissociação do complexo ES. As tabelas 3 e 4 apresentam os valores do *turnover* e de K_M para algumas enzimas.



A Figura 9 ilustra o efeito de variações de K_M e V_{max} sobre o comportamento cinético de uma enzima.

Tabela 3. Turnover de algumas enzimas

Enzima	k_{cat} (s^{-1})
Anidrase carbonica	6.0×10^5
Acetilcolinesterase	2.5×10^4
Lactato desidrogenase	1.0×10^3

Tabela 4. K_M de algumas enzimas

Enzima	Substrato (s^{-1})	K_M (μM)
Anidrase carbonica	CO_2	8.0×10^3
β -galactosidase	Lactose	4.0×10^3
Arginina-tRNA-sintetase	Arginina	3

Normalmente, em condições fisiológicas, a velocidade de uma reação enzimática é dada pela razão k_{cat}/K_M , que é uma constante de velocidade de segunda ordem aparente:

$$v_0 = \frac{k_{cat}}{K_M} [E][S]. \quad (9)$$

Em uma condição em que a concentração de substrato for muito menor do que o K_M ,

$$v_0 = \frac{k_{cat}}{K_M} [E]_{total}[S]. \quad (10)$$

A razão k_{cat}/K_M depende tanto da eficiência da reação catalítica k_{cat} , como da afinidade entre enzima e substrato, K_M . Esta razão é uma boa medida da especificidade da interação entre enzima e substrato como mostra a **Tabela 5**. Neste

caso , fica evidente que a quimotripsina possui preferência por substratos volumosos como a fenilalanina.

Tabela 5. Preferências da quimotripsina pelo substrato

Ester de amino ácido	k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)
Glicina	1.3×10^{-1}
Valina	2.0
Fenilalanina	1.0×10^5

É interessante imaginar o quão eficiente uma enzima pode ser. A resposta para essa pergunta depende do limite da razão k_{cat}/K_M . Suponha que a decomposição do complexo ES em enzima e produtos seja muito mais rápida do que a velocidade de dissociação do complexo ($k_2 \gg k_{-1}$), neste caso o limite é dado por k_1 , a constante de velocidade de formação do complexo “ES”. O limite para k_1 é a velocidade de difusão das moléculas em solução, um número da ordem de 10^8 a $10^9 M^{-1}s^{-1}$. Enzimas que possuem valor k_{cat}/K_M nesta faixa são ditas “perfeitas”, pois atingiram a perfeição catalítica (**Tabela 6**).

Tabela 6 Enzimas que atingiram perfeição catalítica

Enzima	k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)
Acetilcolinesterase	1.6×10^8
Anidrase carbônica	8.3×10^7
Catalase	4.0×10^7

Representação gráfica dos dados

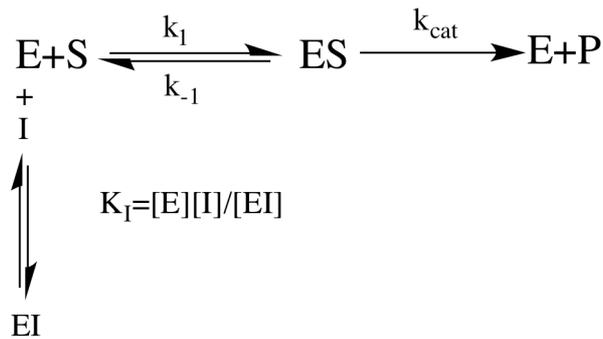
É muito útil linearizar a equação de Michaelis-Menten para determinar os valores de k_{cat} e K_M , e também para examinar desvios da idealidade. Dessa forma, um gráfico de $1/v$ em função de $1/[S]$ obedeceria a uma equação de reta igual a:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (11)$$

A análise dessa equação indica que o ponto em que o gráfico cruza o eixo das ordenadas equivale a $1/V_{max}$ e que o coeficiente angular é dado por K_M/V_{max} .

Inibição

Enzimas podem ser inativadas pelo aumento da temperatura, ou pela interação não covalente com inibidores, pequenas moléculas que competem com o substrato pelo sítio ativo. Estes inibidores são chamados de “competitivos”. No caso de um inibidor competitivo, o mecanismo de Michaelis-Menten teria que ser alterado para:



E não é difícil derivar a equação de Michaelis-Menten levando em conta o equilíbrio entre a enzima e o inibidor competitivo:

$$v = \frac{v_{\text{max}}[S]}{K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) + [S]} \quad 12$$

Observa-se que o K_M aparente aumentou por um fator de $(1 + [I]/K_I)$, ou seja, a afinidade aparente entre enzima e substrato diminuiu. Note que o inibidor competitivo não afeta o V_{max} , apenas K_M .

Mecanismos

De onde vem o poder catalítico e a especificidade das enzimas? Nós já vimos que as enzimas formam um complexo com o substrato através da formação de interações não covalente, e que elas interagem melhor com o estado de transição. Como isto ocorre?

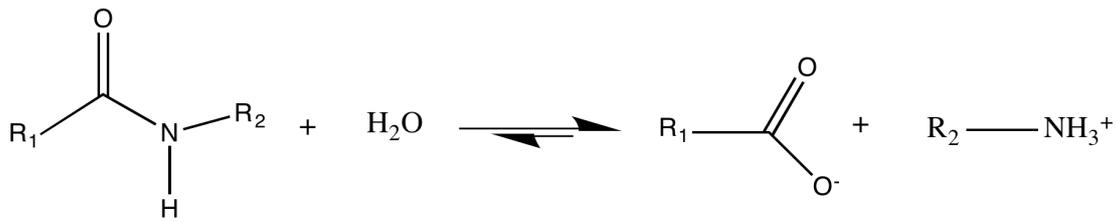
Estruturas cristalográficas e ensaios de mutação sítio-dirigida permitiram obter a resposta em alguns casos.

Os mecanismos descritos abaixo trazem exemplos de um ou mais tipos de catálise:

- a) *catálise covalente*: em que o sítio ativo contém um nucleófilo poderoso que liga-se covalentemente a parte do substrato durante a catálise
- b) *catálise ácido-base*: uma molécula que não seja a água assume o papel de doador/aceptor de prótons
- c) *catálise por aproximação*: enzimas facilitam proximidade entre os substratos trazendo-os para uma mesma superfície de interação
- d) *catálise por íon metálico*: íons metálicos agem cataliticamente, por exemplo ao facilitar a formação de nucleófilos.

Proteases

Enzimas proteolíticas possuem a tarefa de acelerar a reação de hidrólise da ligação peptídica.



Embora esta reação seja termodinamicamente favorável, ela é extremamente lenta na ausência de um catalisador. Para promover a clivagem da ligação peptídica a enzima deve facilitar um ataque nucleofílico no grupo carbonila da ligação peptídica. A quimotripsina emprega um nucleofílico forte capaz de fazer este ataque nucleofílico. Este nucleofílico é o grupo hidroxil da cadeia lateral de uma serina extraordinariamente reativa. A reatividade extraordinária da Ser¹⁹⁵ vem do fato de que o grupo OH da cadeia lateral forma uma ligação de hidrogênio com a His⁵⁷. O grupo NH da His⁵⁷ forma, por sua vez, uma ligação de hidrogênio com a cadeia lateral do Asp¹⁰². Este arranjo, conhecido como “tríade catalítica”, estabiliza uma carga negativa na cadeia lateral da Ser195, que se torna extraordinariamente ácida (**Figura 10**).

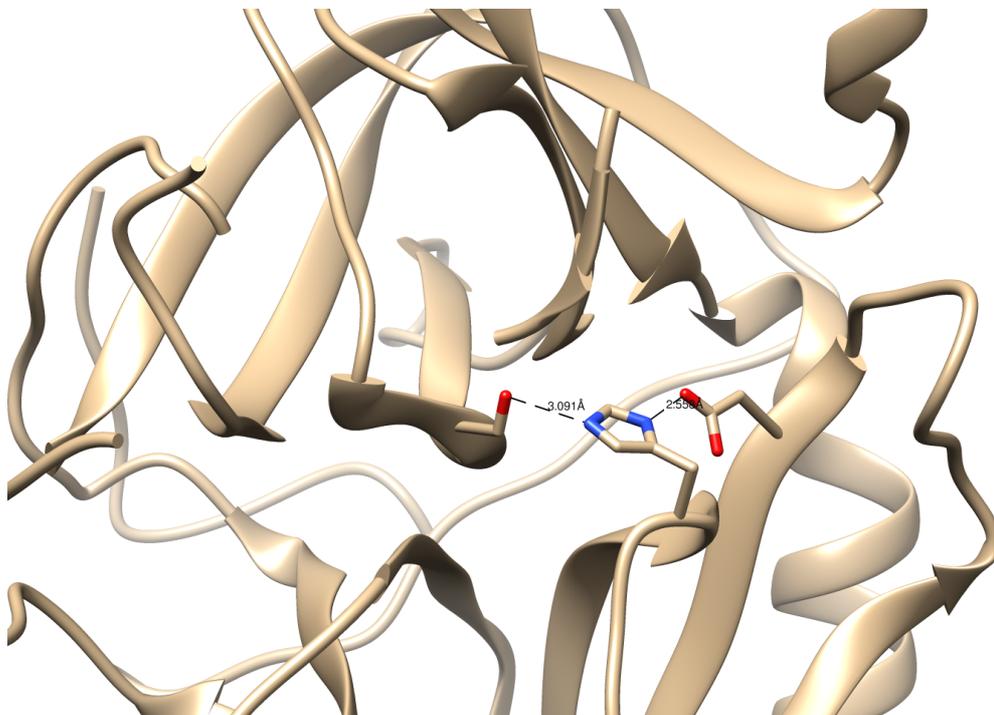


Figura 10. Tríade catalítica da quimotripsina formada pela Ser¹⁹⁵, His⁵⁷ e Asp¹⁰². A rede de ligações de hidrogênio torna o grupo OH da Ser¹⁹⁵ extremamente reativo e estabiliza um oxianion.

O mecanismo proposto para a reação catalítica envolve um ataque nucleofílico do oxigênio da cadeia lateral da Ser¹⁹⁵ sobre a carbonila do substrato, que assume configuração tetraédrica intermediário e uma carga negativa no oxigênio da carbonila. Esta carga negativa será estabilizada por grupos NH da proteína, que formam o chamado “oxyanion hole”. O passo seguinte envolve a clivagem da ligação peptídica ao mesmo tempo em que o próton ligado à His57 é transferido para o grupo amino da cadeia polipeptídica livre. Como resultado, a enzima permanece acilada por parte da cadeia polipeptídica. Portanto, este mecanismo envolve a formação de um **intermediário covalente**, e a próxima etapa deve se a hidrólise desse

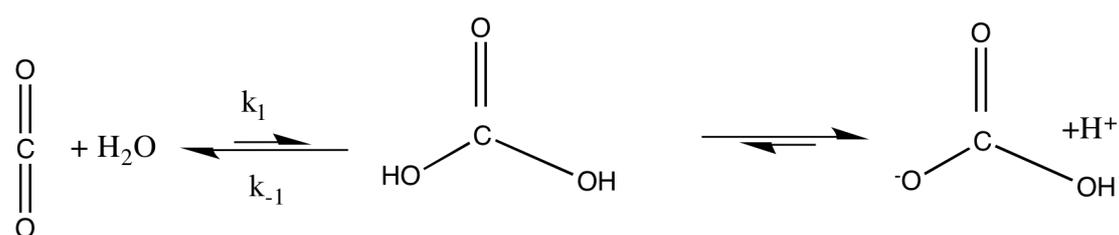
intermediário covalente. Na próxima etapa uma molécula de água ocupa o lugar do grupo amino do substrato. A His57 age como uma base e abstrai um próton da água, enquanto o grupo hidroxila ataca a carbonila do intermediário que colapsa liberando a segunda metade do peptídeo e regenerando a enzima.

Este mecanismo não explica a especificidade da enzima. A quimiotripsina cliva ligações peptídicas adjacentes a cadeias laterais grandes e volumosas, como fenilalanina. O reconhecimento do substrato envolve a interação da cadeia lateral na posição amino-terminal à ligação que será clivada, com um bolsão hidrofóbico. Este bolso hidrofóbico possui, no caso da quimiotripsina, maior afinidade por cadeias laterais aromáticas e volumosas.

A quimiotripsina é uma protease da classe das *serino-proteases*, pois utiliza a cadeia lateral de uma Serina para fazer o ataque nucleofílico na carbonila. Outras classes de proteases utilizam uma estratégia semelhante, as *cisteíno-proteases*, *aspartil-proteases* e as *metalo-proteases*. Nestas três classes de proteases, o mecanismo de catálise segue o mesmo padrão. Primeiro ocorre a ativação de um agente nucleofílico capaz de realizar um ataque sobre a carbonila da ligação peptídica que será clivada. No caso das cisteíno-proteases, esse agente será uma cisteína que assume a função da serina. No caso das metaloproteases ou aspartil-proteases, o ataque nucleofílico é efetuado por uma molécula de água reativa. Frequentemente, o grupo carbonila que sofre o ataque também é polarizado, de forma a assumir menor densidade eletrônica. O terceiro aspecto importante é a estabilização do intermediário tetraédrico através da formação do “oxyanion hole”. No caso das metalo-proteases, um íon metálico, por exemplo Zn^{2+} , interage com uma molécula de água polarizando-a e tornando-a altamente reativa.

Anidrase carbônica

A anidrase carbônica é uma enzima cuja função é acelerar a reação de hidratação de CO_2 formando o ânion bicarbonato:



As constantes k_1 (pseudo-primeira ordem) e k_{-1} (primeira ordem) são 0.15 s^{-1} e 50 s^{-1} , respectivamente, na ausência de catalisador. Portanto o equilíbrio da reação é deslocado no sentido da formação de CO_2 .

Anidrase carbônica acelera a reação de hidratação de CO_2 para velocidades $k_{cat} = 10^6 \text{ s}^{-1}$. A enzima possui um íon Zn^{2+} coordenado por três histidinas, o quarto ponto de coordenação do Zn^{2+} é satisfeito por uma molécula de H_2O .

O turnover da anidrase-carbônica é altamente dependente do pH, e apresenta uma transição de um estado de baixa atividade em pH baixo para um estado de alta atividade em pHs maiores que 9, sendo que o ponto médio dessa transição é o pH 7. O

grupo responsável por essa transição é uma molécula de água que está coordenada pelo Zn^{2+} . A interação com o Zn^{2+} faz com que o pK_a da molécula de água diminua de 15.7 para 7.0. Esta molécula de água é capaz de perder um próton facilmente devido ao pK_a mais baixo, formando um radical hidroxila que é capaz de realizar um ataque nucleofílico no CO_2 gerando um íon bicarbonato.