

## **QBQ0204 Bioquímica: Estrutura de Biomoléculas e Metabolismo**

### **Guia de estudos**

#### ***Aula 5: Enzimas 1***

A aula de enzimas será dividida em duas partes. Nesta aula serão introduzidos conceitos gerais sobre enzimas. Preste atenção pois a leitura básica está fragmentada, e há partes de leitura básica as quais são referentes somente a aula 2 sobre enzimas. Também está sendo anexado um texto extra sobre escorbuto que acredito ser interessante para a área de vocês. Dentre outras regiões do corpo, o escorbuto acomete as gengivas devido à insuficiência de vitamina C no organismo. Este assunto se relaciona com temas já abordados sobre estrutura de proteínas e o conceito de vitaminas introduzido hoje.

# 5 Enzimas

A manutenção da vida celular depende da contínua ocorrência de um conjunto de reações químicas, que devem atender duas exigências fundamentais: (1) devem ocorrer em *velocidades adequadas* à fisiologia celular — a insuficiência na produção ou na remoção de metabólitos pode levar a condições patológicas, e (2) precisam ser altamente *específicas*, de modo a gerar produtos definidos.

Quando se examina a composição química de uma célula simples como a de *Escherichia coli* (Tabela 5.1), uma bactéria presente no trato intestinal humano, pode parecer improvável obter a exatidão das reações necessárias para a manutenção e reprodução desta bactéria frente à grande variedade de compostos ali presentes. Em células de eucariotos, o número de compostos químicos é ainda maior e, mesmo considerando a separação em diferentes compartimentos celulares, cada organela contém uma formidável diversidade de compostos, potencialmente capazes de reagir uns com os outros. Por outro lado, nas temperaturas relativamente baixas em que vivem as células, as velocidades destas reações são desprezíveis, e as moléculas presentes, praticamente inertes. De fato, uma reação química pode ser termodinamicamente viável ou espontânea (Seção 4.1), mas ter velocidade igual a zero ou muito próxima de zero. Por exemplo, glicose cristalizada ou em solução pode ser mantida em contato com oxigênio, sem que ocorra oxidação do açúcar, apesar da oxidação de glicose liberar grande quantidade de energia. A velocidade com que esta transformação ocorre, em tempo mensurável, é igual a zero.

A presença de proteínas com função catalítica, as *enzimas*, dirigindo todas as reações celulares permite atender as duas exigências inicialmente apresentadas.

Como *catalisadores*, as enzimas aumentam de várias ordens de grandeza a velocidade das reações que catalisam (Tabela 5.2) — a oxidação de glicose por oxigênio por meio de uma sequência de reações catalisadas por enzimas pode ser feita nas células em minutos. Para ter uma ideia do papel indispensável das enzimas, basta lembrar que mesmo reações que têm água como reagente (e a concentração da água é 55,5 M) são catalisadas por enzimas. Ademais, por serem altamente específicas, as enzimas “selecionam”, entre todas as reações potencialmente possíveis, aquelas que efetivamente irão ocorrer.

Durante muito tempo, admitiu-se que todos os catalisadores biológicos fossem proteínas. No início da década de 1980, entretanto, verificou-se que moléculas de RNA catalisavam reações químicas celulares. A descoberta foi surpreendente e este tipo particular de catalisador recebeu o nome de *ribozima*. Comporta-se de forma semelhante às proteínas enzimáticas, obedecendo também à cinética de Michaelis-Menten (Seção 5.6). Sua atuação nas reações metabólicas está restrita a alguns casos especiais, conquanto importantes. Cerca de 10 anos depois da identificação das ribozimas, foram selecionados, *in vitro*, pequenos segmentos de DNA com atividade catalítica, as *desoxirribozimas*, que, todavia, não são encontradas na natureza.

**Tabela 5.1** Composição química aproximada de uma célula de *E. coli*.

Substâncias	% do peso celular	Número de tipos diferentes
Água	70	1
Íons inorgânicos (Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , Ca <sup>2+</sup> , Cl <sup>-</sup> , SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> )	1	20
Proteínas	15	2.500
Aminoácidos e seus precursores	0,5	100
Carboidratos e seus precursores	3	200
Lipídios e seus precursores	2	50
DNA	1	1
RNA	6	1.000

Nucleotídeos e seus precursores	0,5	200
Outras moléculas	0,2	200

**Tabela 5.2 Aumento da velocidade da reação por catálise enzimática.**

Reação	Enzima	$V_c/V^{(1)}$
$\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$	Anidrase carbônica	$10^7$
Di-hidroxiacetona fosfato $\rightleftharpoons$ Gliceraldeído 3 -fosfato	Triose fosfato isomerase	$10^9$
Glicose + ATP $\rightleftharpoons$ Glicose 6 -fosfato + ADP + $\text{H}^+$	Hexoquinase	$10^{10}$
Glicose 6-fosfato $\rightleftharpoons$ Glicose 1-fosfato	Fosfoglicomutase	$10^{12}$
Ureia + $\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{NH}_3 + \text{CO}_2$	Urease	$10^{14}$
Orotidina monofosfato $\rightleftharpoons$ Uridina monofosfato + $\text{CO}_2$	Orotidina monofosfato descarboxilase	$10^{17}$

<sup>(1)</sup> $V_c$  = velocidade da reação catalisada;  $V$  = velocidade da reação não catalisada.

As considerações que serão feitas daqui para diante referem-se exclusivamente às enzimas “proteicas”.

## 5.1 Atuação das enzimas na cinética das reações

### As enzimas aceleram a velocidade da reação por diminuírem sua energia de ativação

Tomando o exemplo simples da conversão irreversível de uma substância A em B ( $A \rightarrow B$ ), a *velocidade da reação* ( $v$ ) será:

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

[B] e [A] representam as concentrações molares de B e de A, e a unidade da velocidade ( $v$ ) é mols por litro por segundo. A velocidade da reação é proporcional à concentração de A:

$$v = k[A]$$

A constante  $k$  é chamada *constante de velocidade* da reação, com unidade de  $\text{seg}^{-1}$ . Esta é uma reação de *primeira ordem*, já que sua velocidade depende da concentração do reagente com expoente igual a 1.

A maior parte das reações químicas processadas nos organismos são mais complexas, por envolverem, pelo menos, três moléculas diferentes e por serem, geralmente, reversíveis. São reações de *segunda ordem*, representadas por



para as quais, pode-se demonstrar, as velocidades de reação serão, respectivamente

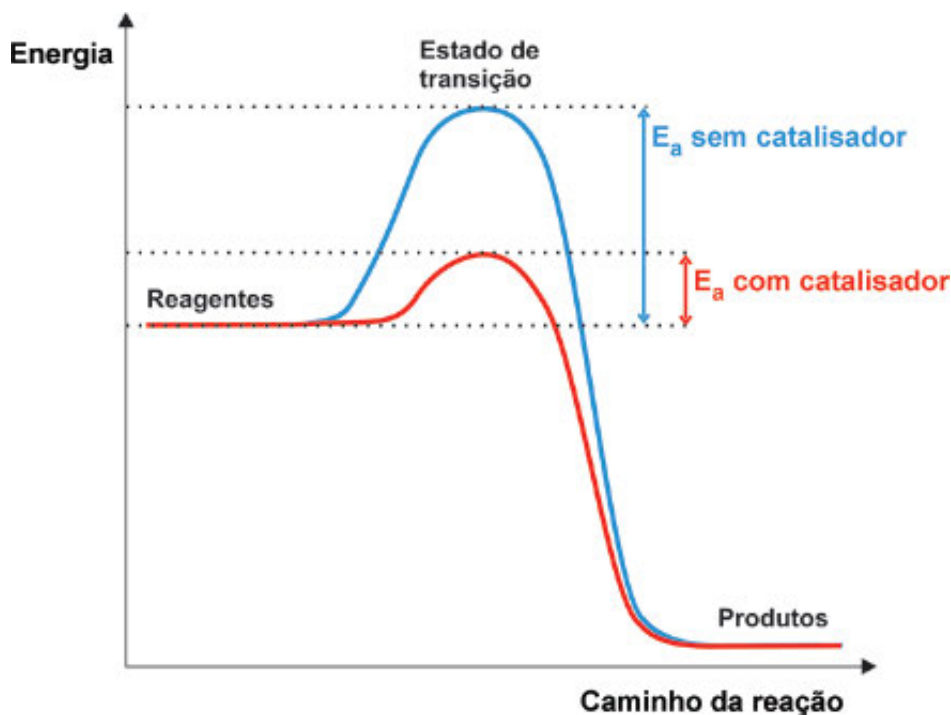
$$v = k[A]^2 \quad \text{e} \quad v = k[A][B]$$

Para um melhor entendimento dos fatores que interferem na velocidade de reação, é importante analisar como ocorre a transição entre reagente e produto (ou entre reagentes e produtos). Considere-se o diagrama de uma reação espontânea (Figura 5.1) que mostra a variação de energia livre do sistema em função de um parâmetro genérico da reação que mede a sua progressão, o seu *caminho*. Na reação espontânea, a energia dos produtos é menor do que a dos reagentes. Nota-se, ainda, que para se transformar no produto, o reagente deve passar por um estado intermediário, de maior energia. Assim, para reagir, as moléculas devem ter uma quantidade de energia que lhes permita atingir o estado reativo, chamado *estado de transição*.

Uma reação de primeira ordem envolve, muitas vezes, alterações da molécula do reagente (único), que requerem energia e que a fazem alcançar o estado de transição. Esta condição, para cada molécula, ocorre ocasionalmente, de modo que somente uma fração das moléculas de um sistema está apta a sofrer a reação. Uma reação de segunda ordem só ocorre quando duas moléculas diferentes colidem — ao se chocarem, as moléculas devem estar com orientação apropriada uma em relação à outra e a colisão deve levá-las a adquirir uma quantidade mínima de energia que lhes permita atingir o estado

de transição. Muitos choques são improdutivos ou porque ocorrem entre moléculas direcionadas de modo inadequado ou porque as colisões não são suficientemente energéticas.

Para levar todas as moléculas de um mol de uma substância até o estado de transição, necessita-se de uma quantidade de energia definida como *energia livre de ativação* ou *energia de ativação* ( $E_a$ ). Esta energia é, portanto, a “barreira” que separa os reagentes dos produtos (Figura 5.1) e equivale ao adicional à energia média das moléculas de reagente, necessária para atingir o estado de transição. A velocidade de uma reação será diretamente proporcional ao número de moléculas com energia igual ou maior do que a energia do estado de transição.



**Figura 5.1** Diagrama mostrando a variação de energia livre em função do caminho de uma reação espontânea hipotética. Na presença do catalisador, a reação ocorre por um caminho alternativo com energia de ativação ( $E_a$ ) menor.

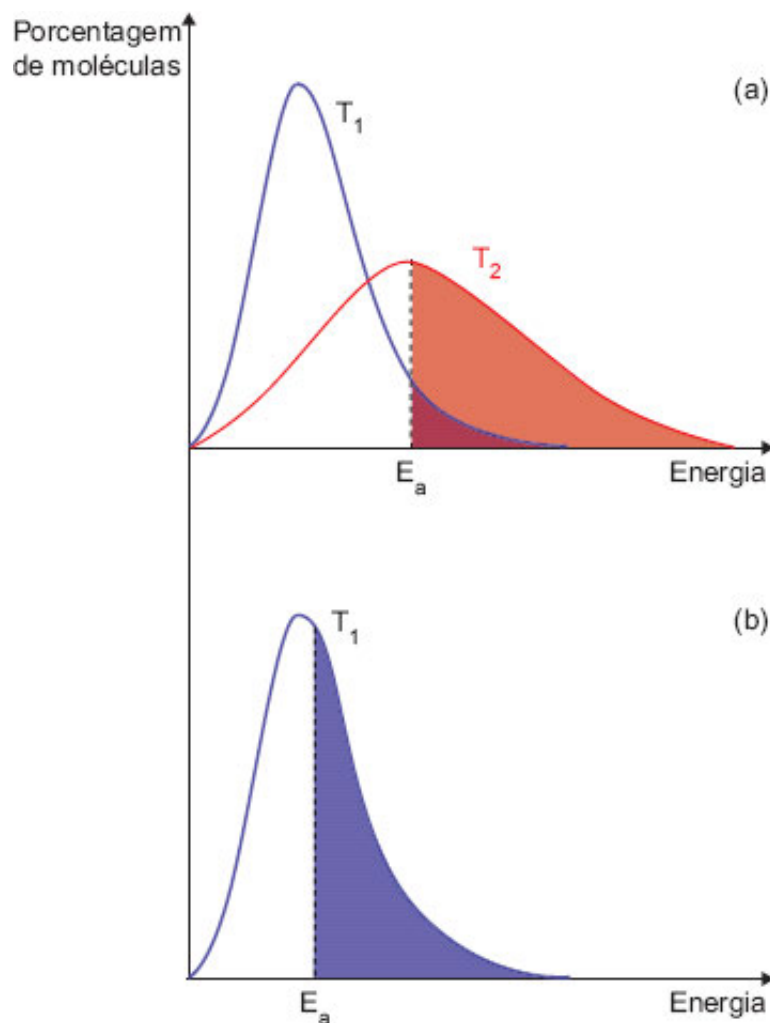
Em uma população de moléculas, nem todas têm o mesmo conteúdo energético. Algumas têm conteúdo muito pequeno, outras, muito grande, e a maioria apresenta um conteúdo médio, característico da temperatura na qual a população se encontra. Quando se eleva a temperatura de um sistema, as moléculas, no seu conjunto, adquirem um conteúdo energético maior, respeitando o mesmo padrão de distribuição de energia.

A decorrência das considerações expostas é que a velocidade de reação pode ser aumentada de três maneiras diferentes:

1. *aumentando a concentração do reagente*, como estabelecido pela equação da velocidade;
2. *elevando a temperatura*, pois um número maior de moléculas atinge a energia de ativação (Figura 5.2 a);
3. *diminuindo a energia de ativação*, por permitir que, mesmo mantida a temperatura, um número maior de moléculas atinja a energia necessária para reagir (Figura 5.2 b).

A redução do valor da energia de ativação pode ser obtida pela presença de catalisadores, e é o processo empregado pelos seres vivos para acelerar suas reações químicas. Os *catalisadores* aceleram a velocidade da reação, sem alterar a proporção entre reagentes e produtos encontrada no final da reação e sem serem consumidos no processo. Como sua concentração permanece constante, podem atuar em quantidades mínimas, ditas *catalíticas*, várias ordens de grandeza menores do que as concentrações dos reagentes. O catalisador participa efetivamente da reação, sofrendo alterações de sua estrutura química durante o processo; invariavelmente, porém, retorna à sua forma original quando a reação termina.

As *enzimas* catalisam praticamente todas as reações químicas que se processam nos seres vivos. Nas reações enzimáticas, os reagentes são chamados *substratos*.



**Figura 5.2** 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) pela presença de um catalisador. A área colorida representa a fração da população com energia igual ou maior do que a energia de transição ( $E_a$ ).

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

Geralmente há uma grande diferença de tamanho entre as moléculas de enzimas e as de seus substratos. As enzimas são macromoléculas proteicas — mesmo as menores são formadas de mais de uma centena de aminoácidos — e suas massas molares variam de 10.000 a alguns milhões, enquanto a massa molar dos substratos é muitas ordens de grandeza inferior (Tabela 5.3).

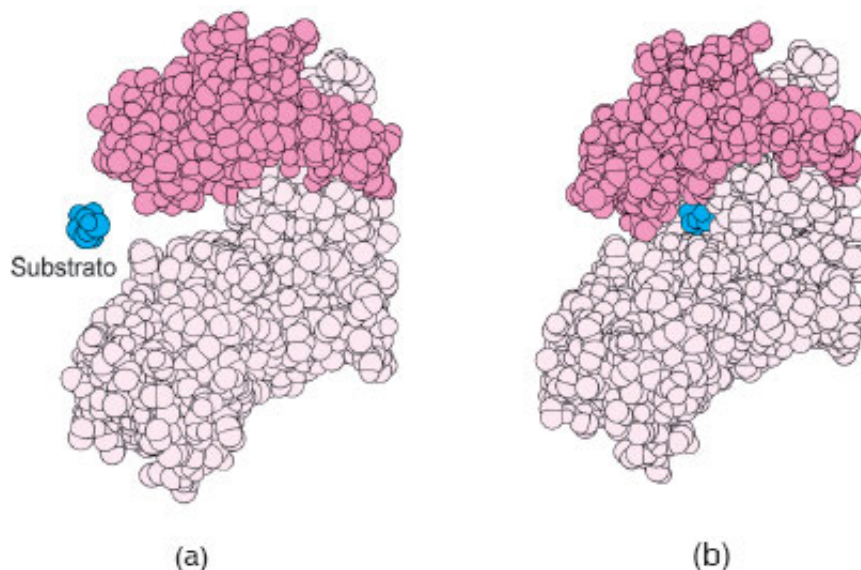
**Tabela 5.3** Massas molares aproximadas de enzimas e de seus substratos.

Enzima	Substrato	Massa molar aproximada
Catalase	$H_2O_2$	200.000
		34
Urease	Ureia	500.000
		60
Fosfofrutoquinase	Frutose 6-fosfato	380.000
		300
Glutamina sintetase	Glutamato	600.000
		150

Embora, em geral, o total da molécula enzimática seja necessário para a catálise, a ligação com o substrato dá-se apenas em uma região pequena e bem definida da enzima, chamada *sítio ativo*. O sítio ativo constitui uma cavidade com forma definida, revestida por cadeias laterais de aminoácidos, algumas das quais ajudam a ligar o substrato enquanto outras participam diretamente da catálise. A estrutura do sítio ativo é responsável pela grande especificidade das enzimas, pois permite à enzima “reconhecer” seu substrato. Uma molécula, para ser aceita como substrato, deve ter uma forma

complementar à do sítio ativo e conter grupos químicos capazes de estabelecer ligações precisas com cadeias laterais de aminoácidos do sítio ativo.

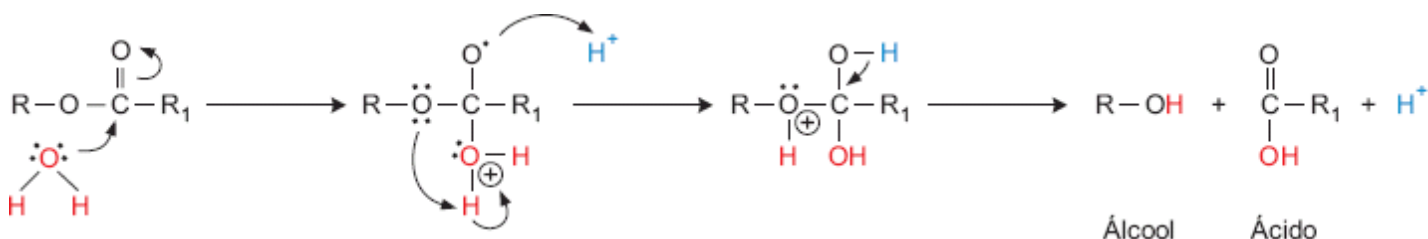
A relação substrato-enzima não deve ser entendida como um modelo rígido de chave-fechadura. A ligação do substrato induz uma mudança na conformação da enzima (Figura 5.3), amoldando sua forma à do substrato e fazendo-a adquirir uma nova configuração, ideal para a catálise. É o que se chama *ajuste induzido*.



**Figura 5.3** 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.

A ligação à enzima modifica também a molécula do substrato, que é submetida a tensão e distorção, assumindo uma conformação aproximada à que tem no estado de transição, mas com menor conteúdo energético. Ainda mais, a ligação das moléculas dos substratos ao sítio ativo propicia sua correta orientação e sua aproximação, favorecendo a reação, que passa a depender muito menos dos choques casuais entre moléculas. Na verdade, as enzimas reproduzem os mecanismos da catálise não enzimática de reações orgânicas. Nestes processos, cadeias laterais de aminoácidos do sítio ativo adicionam ou removem prótons do substrato, ou formam ligações covalentes transitórias com o substrato. As enzimas, como todos os catalisadores, criam um novo *caminho* para a reação, com um novo estado de transição, que requer menor energia de ativação (Figura 5.1).

Um exemplo simples deste novo caminho é a hidrólise de um éster catalisada por ácido (Figura 5.4). A reação de hidrólise consiste no ataque do oxigênio (que tem carga residual negativa) da molécula de água ao carbono presente no éster (que tem carga residual positiva, em virtude de sua dupla ligação com o oxigênio). A energia de ativação requerida para atingir o estado de transição é alta. Os íons  $H^+$  originados da dissociação do ácido criam um caminho alternativo para a reação: o íon  $H^+$  liga-se ao oxigênio presente no éster, aumentando a carga positiva do carbono e tornando-o mais suscetível ao ataque do oxigênio da água. Este novo caminho, na presença de  $H^+$ , tem energia de ativação menor e, em uma mesma temperatura, mais moléculas poderão reagir e a velocidade da reação será maior. Se a mesma reação fosse catalisada por uma enzima, a atuação catalítica do íon  $H^+$  poderia ser exercida por um grupo  $NH_3^+$  pertencente à cadeia lateral de um resíduo de lisina do sítio ativo.



**Figura 5.4** Mecanismo da hidrólise de um éster catalisada por um ácido. A presença dos íons  $H^+$  altera a distribuição de cargas elétricas do éster, criando um caminho de reação.

### As enzimas são mais eficientes que os catalisadores não enzimáticos

As enzimas aceleram a velocidade das reações em várias ordens de grandeza maiores do que os catalisadores não

enzimáticos; tomam possível a ocorrência, a velocidades apreciáveis, de reações cujas velocidades seriam desprezíveis na sua ausência (Tabela 5.2). Como as enzimas apresentam alto grau de *especificidade*, ocorrerão em uma célula, dentre todas as reações potencialmente possíveis entre as numerosas substâncias presentes, apenas aquelas reações para as quais a célula possua enzimas específicas. Ainda mais: como são sintetizadas pelas próprias células, *sua concentração e sua atividade podem ser reguladas*, permitindo um ajuste fino do metabolismo às condições fisiológicas.

O conjunto destes aspectos favoráveis possibilita a manutenção da vida, justificando o alto investimento energético para a síntese de enzimas.

### 5.1.1 Graus de especificidade das enzimas

O sítio ativo de uma enzima permite a ligação apenas do seu substrato, trazendo grande especificidade para a catálise. O grau de especificidade varia com a enzima considerada. Há enzimas que aceitam como substratos vários aminoácidos, enquanto outras exigem um aminoácido determinado. Entretanto, qualquer que seja o grau de especificidade apresentado pelas enzimas, é sempre maior do que o apresentado pelos catalisadores não enzimáticos. Os íons  $H^+$ , por exemplo, agem como catalisadores em um grande número de reações, incluindo a hidrólise de ésteres, proteínas e polissacarídeos. As *enzimas proteolíticas*, ao contrário, são específicas para a hidrólise de proteínas, não atuando sobre carboidratos ou lipídios, para cujas hidrólises são requeridas enzimas próprias. Entre as enzimas proteolíticas aparecem diferentes graus de especificidade: a *pepsina* hidrolisa ligações peptídicas das quais participem grupos carboxílicos de aminoácidos aromáticos (triptofano, fenilalanina e tirosina) e a *tripsina* reconhece apenas ligações peptídicas formadas por arginina ou lisina. Graus extremos de especificidade são encontrados entre as *L-aminoxidases*, por exemplo. São enzimas capazes de reconhecer aminoácidos na configuração L, sendo inativas com isômeros na forma D.

## 5.2 Classificação e nomenclatura das enzimas

As enzimas são classificadas em seis grupos de acordo com o tipo de reação que catalisam (Tabela 5.4) e cada grupo é subdividido em classes e subclasses. Cada enzima recebe um nome que descreve a reação que catalisa e um código numérico, de tal forma que possa ser identificada sem ambiguidade.

Por exemplo, a enzima que catalisa a oxidação do etanol por  $NAD^+$  é designada *álcool:NAD<sup>+</sup>: oxirredutase* e tem o número de classificação EC 1.1.1.1. (EC de *Enzyme Commission*), que significa:

EC 1 = oxirredutases

EC 1.1 = oxirredutases que atuam sobre doadores de elétrons com grupo HC-OH

EC 1.1.1 = oxirredutases que atuam sobre doadores com grupo HC-OH e catalisam uma reação que tem  $NAD^+$  ou  $NADP^+$  como aceptores de elétrons

EC 1.1.1.1 = enzima que catalisa a oxidação do etanol.

A nomenclatura oficial é, na prática, substituída por nomes mais simples ou que se tornaram clássicos. A *álcool:NAD<sup>+</sup>: oxirredutase* é comumente referida como *álcool desidrogenase*; a enzima que catalisa a síntese de glicogênio, oficialmente designada *UDPglicose:glicogênio 4- $\alpha$ -D-glicosiltransferase* (EC 2.4.1.11), é chamada *glicogênio sintase*. Na terminologia usual, o nome é dado indicando o substrato, seguido de outra palavra terminada em *ase* que especifica o tipo de reação que a enzima catalisa. Sendo assim, com um pouco de prática, é possível prever o nome da enzima conhecendo-se a reação que ela catalisa e vice-versa. Mesmo esta forma simplificada de nomenclatura apresenta exceções, como é o caso das enzimas digestivas: *pepsina*, *tripsina* etc., cujos nomes triviais tornaram-se clássicos.

### 5.3 Fatores que interferem na atividade enzimática: pH e temperatura

A estrutura e a forma do sítio ativo são uma decorrência da estrutura tridimensional da enzima e podem ser afetadas por quaisquer agentes capazes de provocar mudanças na conformação da proteína. Isto torna a atividade enzimática dependente das características do meio, notadamente do pH e da temperatura (Seção 2.8).

**Tabela 5.4 As seis classes de enzimas e as reações que catalisam.**

Classe	Tipo de reação	Exemplo
	Oxidação-redução $AH_2 + B \rightleftharpoons A + BH_2$	

1. Oxirredu-tases		$\text{H}_3\text{C}-\underset{\text{H}}{\overset{\text{H}}{\text{C}}}-\text{OH} + \text{NAD}^+ \xrightleftharpoons[\text{desidrogenase}]{\text{álcool}} \text{H}_3\text{C}-\underset{\text{H}}{\overset{\text{H}}{\text{C}}}=\text{O} + \text{NADH} + \text{H}^+$
		Etanol <span style="margin-left: 200px;">Acetaldeído</span>
2. Transferases	Transferência de grupos $A-X + B \rightleftharpoons A + B-X$	$\text{Glicose} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{glicoquinase}} \text{Glicose 6-fosfato} + \text{ADP}$
3. Hidrolases	Hidrólise $A-B + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons A-H + B-OH$	$\text{Sacarose} + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{sacarase}} \text{Glicose} + \text{Frutose}$
4. Liases	Adição de grupos a duplas ligações ou remoção de grupos, deixando dupla ligação $A = B + X - Y \rightleftharpoons A - B$	$\text{Fumarato} + \text{H}_2\text{O} \xrightleftharpoons{\text{fumarase}} \text{Malato}$
5. Isomerases	Rearranjos intramoleculares $A - B \rightleftharpoons A - B$	$\text{Glicose 6-fosfato} \xrightleftharpoons[\text{isomerase}]{\text{fosfoglico}} \text{Frutose 6-fosfato}$
6. Ligases	Condensação de duas moléculas, associada ao consumo de ATP $A + B \rightleftharpoons A - B$	$\text{Piruvato} + \text{HCO}_3^- + \text{ATP} \xrightarrow[\text{carboxilase}]{\text{piruvato}} \text{Oxaloacetato} + \text{ATP} + \text{P}_i$

Ⓟ =  $\text{PO}_3^{2-}$ .

Tabela 5.5 pH ótimo de enzimas.

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

Para a maioria das enzimas existe um valor de pH no qual a sua atividade é máxima — a velocidade da reação diminui à medida que o pH se afasta desse valor ótimo. Ele é característico para cada enzima (Tabela 5.5), mas, com frequência, está próximo do pH neutro. A influência do pH sobre a catálise enzimática pode ser melhor compreendida lembrando que as enzimas apresentam grupos ionizáveis nos resíduos de aminoácidos. Alguns destes grupos podem fazer parte do sítio ativo ou serem importantes na manutenção da estrutura espacial da molécula. Existe uma concentração hidrogeniônica que propicia um determinado arranjo de grupos protonados e desprotonados que leva a molécula de enzima à conformação ideal para exercer seu papel catalítico. Este *pH ótimo* decorre do número e tipo de grupos ionizáveis que uma enzima apresenta e da sequência em que estão organizados, ou seja, depende de sua estrutura primária. Por outro lado, quando o substrato contém grupos ionizáveis, as variações de pH também poderão afetar suas cargas. A eficiência da catálise dependerá, então, de encontrarem-se, enzima e substrato, com conformação e carga adequadas para permitir a interação.

A velocidade da reação enzimática, a 0°C, apresenta valores próximos de zero. A elevação da temperatura aumenta a velocidade somente enquanto a enzima conservar sua estrutura nativa. Acima de 50-55°C, a maioria das enzimas são desnaturadas, acarretando a perda do poder de catálise. Entre 0°C e 50°C vive a grande maioria dos seres vivos; há,



entretanto, exceções, entre as quais a mais notável é representada por bactérias que vivem em águas termais, com temperaturas ao redor de 100°C.

As considerações referentes a amplas variações de pH são pertinentes ao estudo da atividade enzimática *in vitro*. Os seres vivos têm suas reações ocorrendo em ambiente tamponado, já que todas as células dispõem de mecanismos para manutenção do pH. Mesmo assim, microambientes celulares podem apresentar pequenas variações de pH que afetam a atividade das enzimas e que servem para o controle de sua ação. A temperatura tem influência decisiva sobre a distribuição geográfica dos seres vivos. Microrganismos, vegetais e animais ectotérmicos têm suas atividades vitais inteiramente dependentes da temperatura ambiente; aves e mamíferos, endotérmicos, são menos afetados.

Término leitura básica, enzimas parte 1

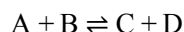
## 5.4 Cinética da reação enzimática

Início leitura básica, enzimas parte 2

### Enzima e substrato formam um complexo transitório

O estudo das reações enzimáticas e de uma série de propriedades das enzimas baseia-se em medidas da *velocidade* da reação, que é diretamente proporcional à concentração do reagente (Seção 5.1). À medida que a reação se processa, a concentração do reagente diminui e a velocidade da reação também, ou seja, a velocidade da reação varia ao longo do tempo. A velocidade da reação determinada após um intervalo de tempo é a *velocidade média* da reação durante esse tempo. Para determinar a velocidade de reação efetivamente proporcional à concentração inicial de reagente, é necessário medir a *velocidade inicial* ( $v_0$ ). Esta medida é conseguida utilizando-se um tempo de reação muito pequeno, durante o qual a conversão de reagente em produto tenha sido tão reduzida que a concentração de reagente possa ser considerada constante — é o chamado *tempo inicial*. Como o tempo inicial difere para cada reação considerada, podendo variar de frações de segundos até várias horas, convencionou-se ser o tempo em que menos de 10% do reagente (substrato) tenham sido transformados em produto.

Grande parte das reações catalisadas enzimaticamente obedece ao padrão



Para o tratamento da cinética enzimática, entretanto, será adotado um modelo mais simples, em que há apenas um substrato e um produto, representado por:



É o caso, por exemplo, de algumas reações de isomerização, em que um isômero é transformado em outro.

A velocidade de reação é medida em tempos iniciais, quando a concentração de P é desprezível (e, portanto a velocidade  $v = k[P]$  é praticamente igual a zero), sendo possível fazer a aproximação:



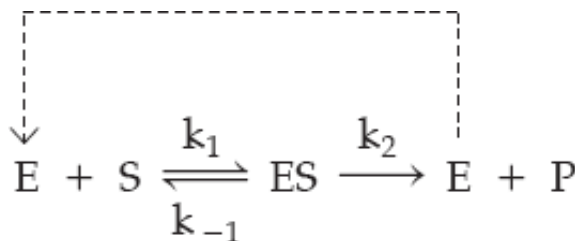
A reação catalisada enzimaticamente processa-se em duas etapas: na primeira, a enzima (E) liga-se reversivelmente ao substrato (S), formando um *complexo enzima-substrato* (ES):



Na segunda fase, são liberados o produto (P) e a enzima:



Uma vez na forma livre, a enzima pode, então, ligar-se a outra molécula de substrato (seta tracejada no esquema seguinte). A representação conjunta das etapas (1) e (2) é:



As equações de velocidade para as reações componentes do processo são:

$$v_1 = k_1 [E] [S]$$

$$v_{-1} = k_{-1} [ES]$$

$$v_2 = k_2 [ES]$$

O tratamento matemático dos dados experimentais, obtidos com preparações não purificadas de enzimas, foi feito no início do século XX por Leonor Michaelis e Maud L. Menten. Estes pesquisadores procuravam explicar, sobretudo, porque a função que relaciona a velocidade da reação com a concentração do reagente (substrato, S) era uma hipérbole equilátera e não uma reta, como previsto pela equação  $v = k [\text{reagente}]$ .

Michaelis e Menten partiram de dois pressupostos: (1) a concentração de substrato é muito maior do que a concentração de enzima e (2)  $k_1 > k_{-1} > k_2$ . São duas as decorrências desta diferença de grandeza entre as constantes de velocidade  $k_{-1}$  e  $k_2$ :

1. a primeira reação estabelece um equilíbrio, o que não seria possível se  $k_2$  fosse maior do que  $k_{-1}$
2. a velocidade da reação global, ou seja, a velocidade da formação do produto,  $v_2$ , é determinada pelo valor de  $k_2$ , já que esta é a etapa mais lenta e limitante do processo.

Estes pressupostos revelaram-se verdadeiros para um grande número de enzimas, chamadas *enzimas michaelianas*, e serão admitidos para as considerações feitas a seguir. Para muitas enzimas, entretanto, as premissas consideradas por aqueles autores não são verdadeiras e a cinética de suas reações é diferente da que será tratada aqui.

Nas reações enzimáticas, a concentração de enzima é, via de regra, muito menor que a de substrato. Realmente, em virtude da diferença de massa molar entre eles (Tabela 5.3), soluções equimolares de enzima e substrato não são usadas na prática e, muitas vezes, nem sequer poderiam ser obtidas. Um exemplo ilustrativo é a reação de síntese de glutamina a partir de glutamato e  $\text{NH}_4^+$ , catalisada pela glutamina sintetase:



Uma solução 10 mM de glutamato ( $\text{mol} = 150$ ) contém 1,5 g/L; para conter o mesmo número de moléculas, uma solução de glutamina sintetase ( $\text{mol} = 600.000$ ) deveria ser também 10 mM, ou seja, conter 6 kg de enzima por litro! Na prática, portanto, as soluções de enzimas são muito mais diluídas do que as de seus substratos e, nas reações enzimáticas, o número de moléculas de enzima é muito inferior ao número de moléculas do substrato. Esta situação é semelhante à celular, onde a concentração de substrato chega a ser  $10^6$  vezes superior à da enzima.

Apesar dessa disparidade numérica, quando se adiciona enzima a uma solução de substrato, nem todas as moléculas de enzima combinam-se com o substrato. Como  $k_2$  é muito menor do que  $k_{-1}$ , a conversão  $\text{ES} \rightarrow \text{E} + \text{P}$  é comparativamente muito lenta e estabelece-se um equilíbrio entre E, S e ES. Este equilíbrio é atingido em frações de segundo depois de serem postos em contato enzima e substrato, e tem concentrações definidas e constantes de cada espécie, havendo sempre uma porcentagem de enzima livre (E). Na Figura 5.5, esta fase ocorre até o tempo  $t_1$ . Como a enzima é um composto químico, a reação  $\text{E} + \text{S} \rightleftharpoons \text{ES}$  em nada difere de uma reação genérica  $\text{A} + \text{B} \rightleftharpoons \text{C}$ , em cujo equilíbrio existem, concomitantemente, as espécies A, B e C. As concentrações de cada espécie dependerão do valor da constante de equilíbrio da reação e, portanto, dos valores das constantes de velocidade  $k_1$  e  $k_{-1}$ :

$$\text{E} + \text{S} \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} \text{ES} \qquad K_{\text{eq}} = \frac{[\text{ES}]}{[\text{E}] [\text{S}]} = \frac{k_1}{k_{-1}}$$

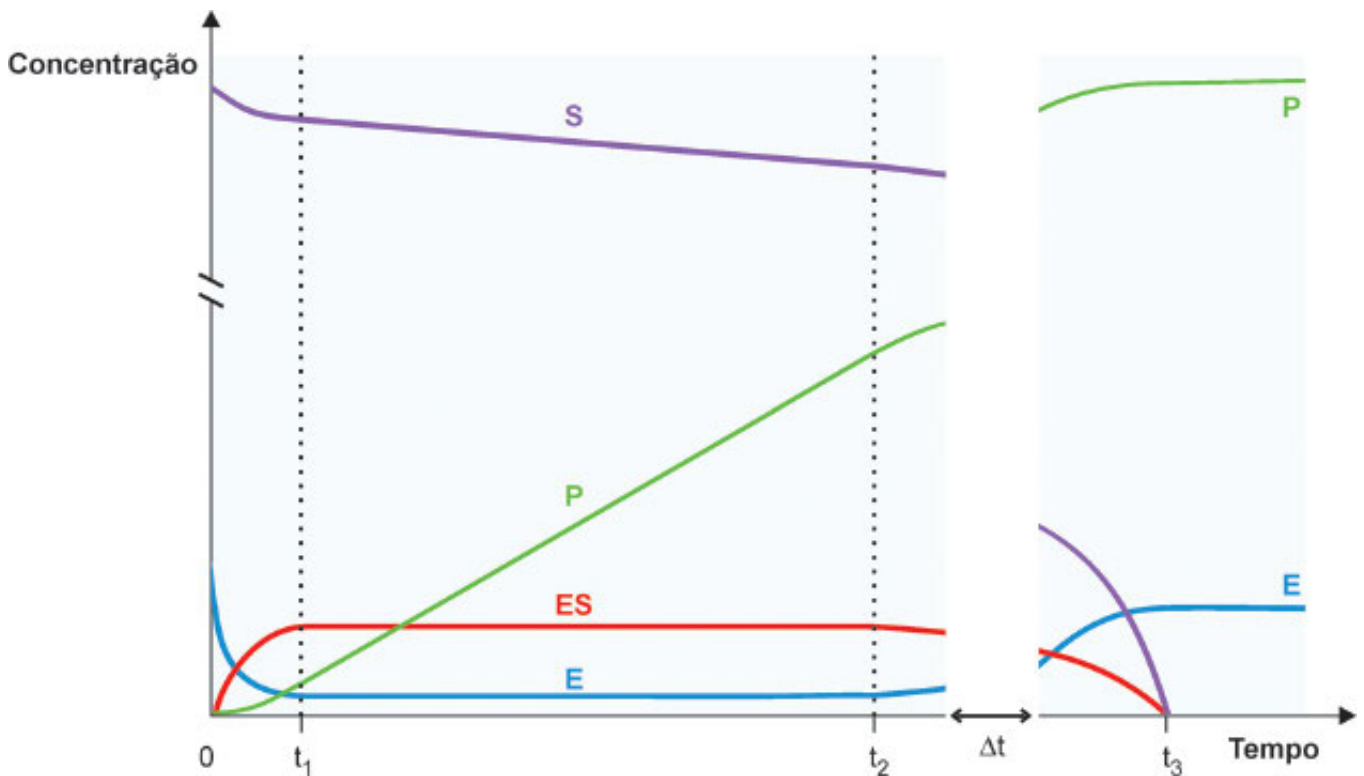
Tendo havido formação de ES, inicia-se a segunda parte da reação enzimática, aquela que efetivamente gera o produto, com *velocidade diretamente proporcional à concentração de ES*:



Durante o tempo em que é medida a *velocidade inicial* (o *tempo inicial*), mantém-se a seguinte situação: contínua formação do produto e concentrações estáveis de ES, E e S. O fato de ES estar sendo consumido na formação do produto não provoca diminuição significativa da sua concentração, pois há sempre substrato excedente para combinar-se com a enzima que é liberada quando se forma o produto; a pequena e contínua diminuição da concentração de S não é significativa, face ao seu grande excesso. Na Figura 5.5, este período corresponde ao intervalo  $t_1$ – $t_2$ . Naturalmente, em tempos maiores do que os tempos iniciais (tempos maiores do que  $t_2$ , na Figura 5.5) a diminuição da concentração de substrato passa a ser significativa: a reação prosseguirá com velocidades cada vez menores (ao longo do intervalo de tempo  $\Delta t$ , na Figura 5.5), até que todo o substrato seja transformado em produto (tempo  $t_3$ , na Figura 5.5).

As considerações que serão feitas daqui para diante referem-se a velocidades iniciais ( $v_0$ ), medidas em tempos iniciais.

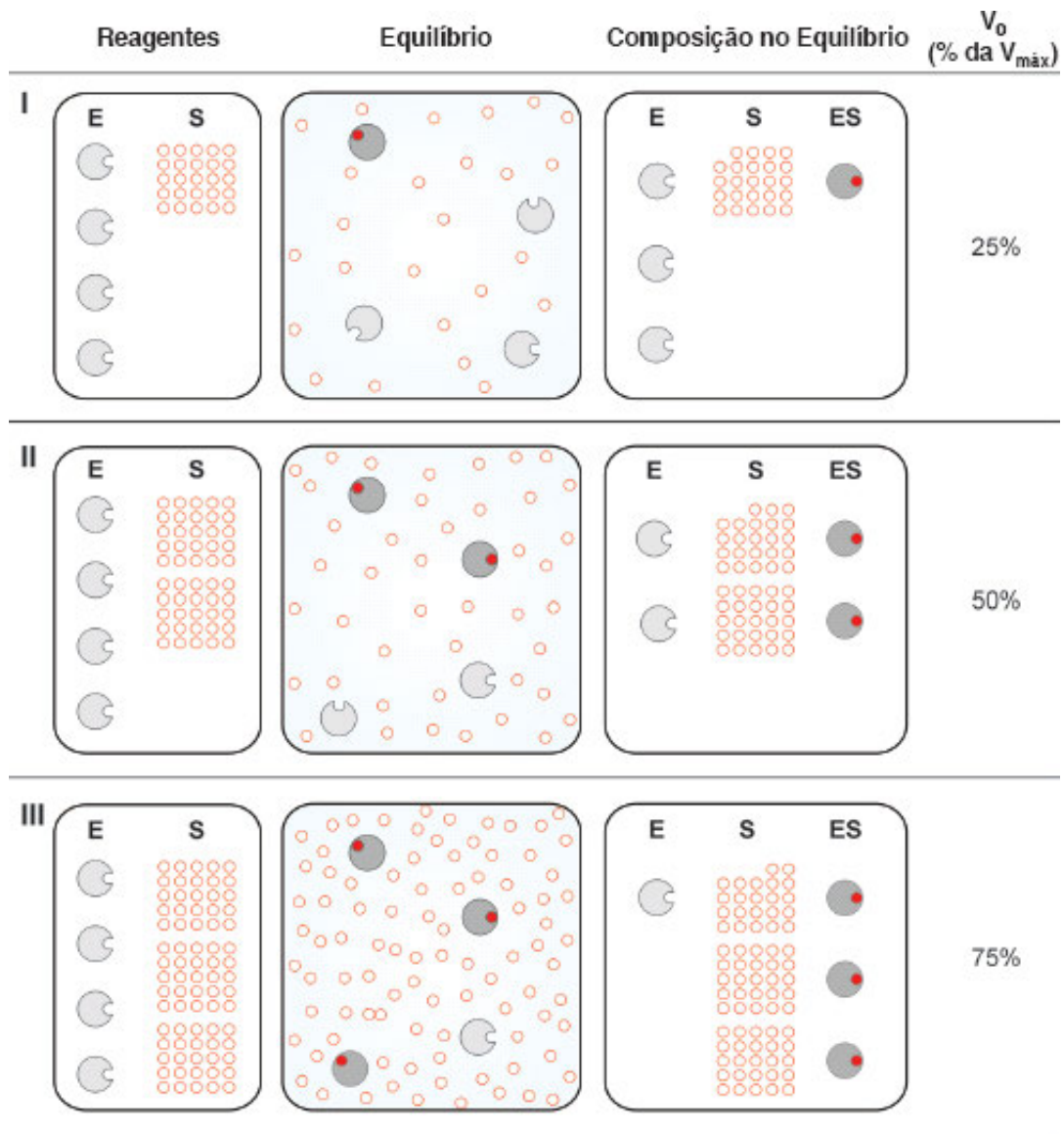
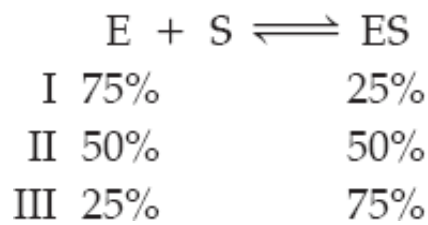
A influência da concentração do substrato na velocidade da reação pode ser esclarecida pela análise de três situações de concentrações diferentes de substrato (situações I, II e III da Figura 5.6), com uma *mesma* concentração de enzima. É importante ressaltar que as velocidades consideradas são velocidades iniciais,  $v_0$  (incluindo a  $V_{\text{máx}}$ ), medidas após um *mesmo* tempo inicial — a influência do tempo na velocidade da reação não está sendo analisada na Figura 5.6.



**Figura 5.5** Variação das concentrações dos componentes da reação enzimática em função do tempo. O intervalo  $0 - t_1$  é muito pequeno. Após o tempo  $t_1$  estabelece-se o equilíbrio entre E, S e ES, cujas concentrações permanecem aproximadamente constantes até o tempo  $t_2$ . A concentração do produto cresce sempre; a concentração do substrato, a rigor, diminui, mas pode ser considerada constante face à sua enorme concentração em comparação à da enzima, do complexo ES e do produto. Entre  $t_1$  e  $t_2$  está o tempo inicial, durante o qual a velocidade inicial ( $v_0$ ) deve ser medida. Durante o intervalo de tempo  $\Delta t$ , a concentração do substrato diminui efetivamente e a reação chega ao final (tempo  $t_3$ ).

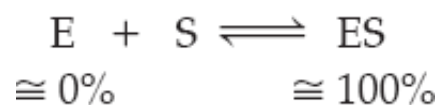
A situação I da Figura 5.6 supõe uma pequena concentração de substrato (pequena, porém muito maior do que a concentração de enzima) e que o equilíbrio da primeira etapa da reação seja tal que apenas 25% das moléculas de enzimas presentes estejam ligadas ao substrato, formando o complexo ES; os 75% restantes estarão livres, na forma E. Na situação II, há uma maior concentração de substrato e o equilíbrio é obtido com 50% das moléculas de enzimas na forma de complexo ES e os outros 50% como enzimas livres (E). Na situação III, o aumento da concentração de substrato foi tal que levou 75% das moléculas de enzimas a estar complexadas com o substrato.

Em resumo, nas situações I, II e III da Figura 5.6, as concentrações de E (enzima livre) e de complexo ES, expressas como porcentagem da concentração total de enzima ( $[E] + [ES]$ ), são:



**Figura 5.6** 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  $V_{m\acute{a}x}$ . Na prática, a proporção  $[S]/[E]$  é muito maior do que a representada no esquema.

Se a quantidade de substrato for muito maior do que a prevista na situação III, a concentração de E será praticamente nula, encontrando-se toda a enzima disponível sob a forma de ES. Trata-se da maior concentração possível de ES, praticamente igual à concentração de enzima utilizada:



A concentração de ES é refletida na velocidade de formação do produto, já que

$$v_2 = k_2 [ES]$$

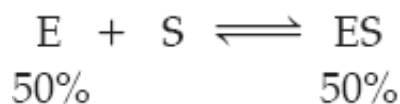
e a reação ocorre na maior velocidade possível. Essa concentração de substrato é dita *saturante* e, a partir dela, novos aumentos da concentração de substrato não terão efeito perceptível sobre a velocidade da reação, que atingiu o seu valor máximo, a *velocidade máxima* ( $V_{m\acute{a}x}$ ) da reação. Com as concentrações de substrato das situações I e II serão obtidas velocidades respectivamente iguais a 25 e 50% da  $V_{m\acute{a}x}$ . A velocidade da reação é sempre proporcional à concentração de

ES, como exemplificado na Figura 5.6.

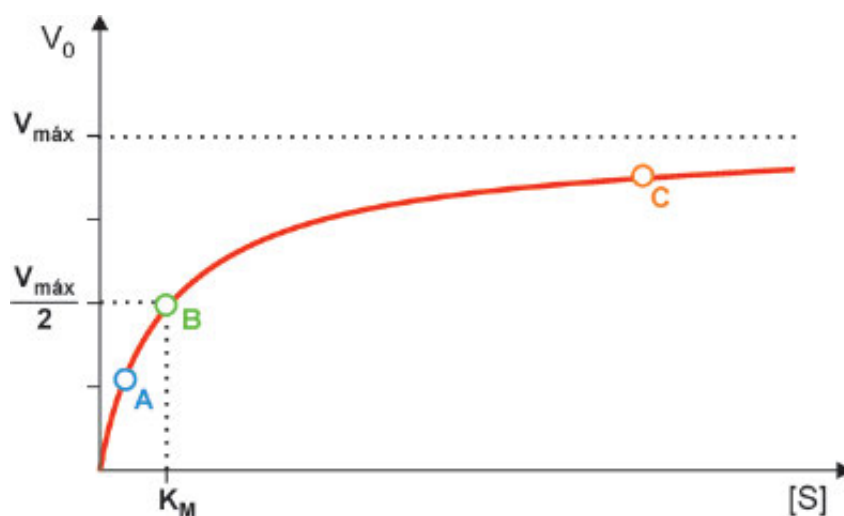
Os dados experimentais para construir um gráfico que relaciona velocidade inicial e concentração de substrato (Figura 5.7) podem ser conseguidos pelo procedimento seguinte. Prepara-se uma série de tubos contendo a *mesma* concentração de enzima e concentrações crescentes de substrato. Espera-se o tempo adequado para que se forme uma quantidade mensurável de produto; este tempo, entretanto, deve ser suficientemente pequeno para que menos de 10% do substrato tenham sido transformados em produto, para garantir que serão medidas velocidades iniciais. Dosa-se o produto e calcula-se a velocidade (quantidade de produto formado dividido pelo tempo). Na curva obtida (Figura 5.7), podem-se identificar duas regiões:

1. a região que contém os pontos A e B, em que a velocidade aumenta com o aumento da concentração de S, indicando que durante a reação havia moléculas de enzima livres — nesta parte, a concentração de S é o fator limitante da velocidade da reação;
2. a região do ponto C, em que a velocidade permanece essencialmente constante, apesar do aumento da concentração de S, e se aproxima de  $V_{\text{máx}}$ , indicando que a maioria das moléculas de enzima estiveram ligadas ao substrato durante o tempo em que a velocidade da reação foi medida (sobre a dificuldade de determinar o valor de  $V_{\text{máx}}$  a partir do gráfico da Figura 5.7, ver Seção 5.5).

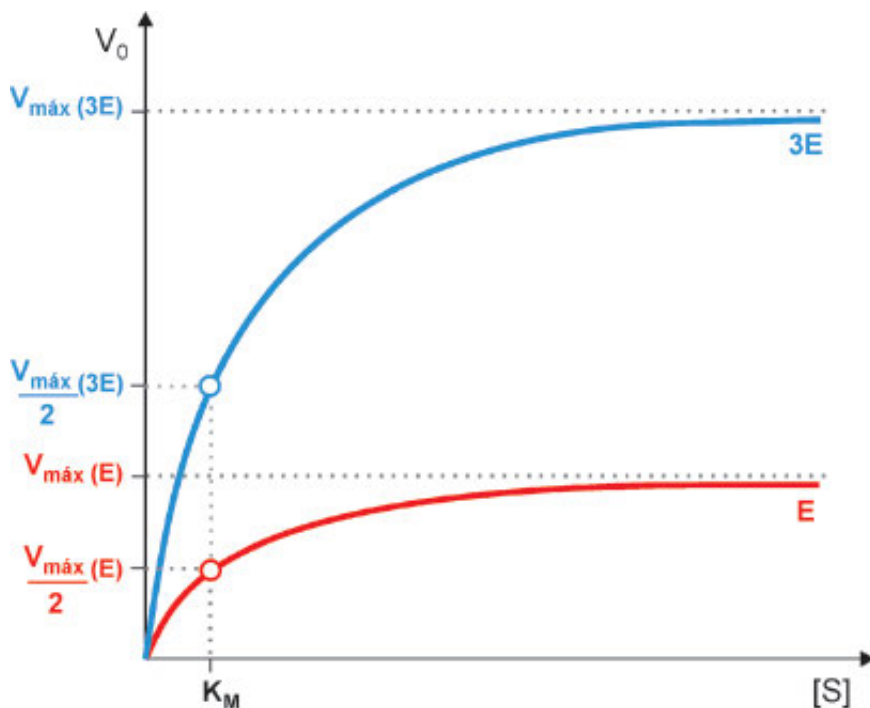
Entre todas as concentrações de substrato, existe uma que provoca a formação de uma concentração de ES igual à metade da máxima possível — o equilíbrio da primeira etapa é estabelecido com 50% das enzimas sob a forma livre e 50% das enzimas na forma ES (situação II da Figura 5.6):



Nestas condições, a velocidade é igual à metade da  $V_{\text{máx}}$ . Esta específica concentração de substrato corresponde à *constante de Michaelis-Menten*,  $K_M$  (Seção 5.6), e apresenta interesse particular, pois seu valor indica a *afinidade* que uma enzima apresenta pelo substrato. Esta correlação pode ser exemplificada com a *hexoquinase*, que aceita como substratos açúcares de seis carbonos (hexoses), como a glicose e a frutose. Para saber por qual das duas hexoses a hexoquinase apresenta maior afinidade, são feitos dois experimentos, do tipo mostrado na Figura 5.8, um utilizando glicose como substrato e o outro, frutose. Em cada experiência, obtêm-se a velocidade máxima aproximada da reação e a metade dessa velocidade. No caso em que o substrato é a glicose, a metade da  $V_{\text{máx}}$  é obtida com concentração do açúcar igual a 0,15 mM. Dito de outra forma, é necessária uma concentração 0,15 mM de glicose para que metade da enzima disponível encontre-se ligada à glicose, fazendo o complexo Enzima-Glicose. Para conseguir situação análoga com frutose, é necessária uma concentração de frutose 10 vezes maior, isto é, 1,5 mM. A hexoquinase tem, portanto, uma afinidade muito maior pela glicose do que pela frutose.



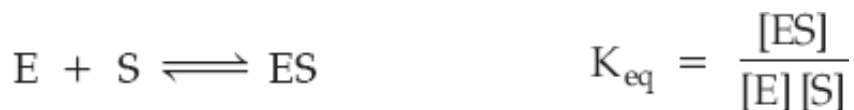
**Figura 5.7** Variação da velocidade da reação enzimática ( $v_0$ ) em função da concentração do substrato (S).



**Figura 5.8** Variação da velocidade da reação enzimática ( $v_0$ ) em função da concentração do substrato (S) para duas concentrações de enzima (E, 3E).

### A velocidade da reação é diretamente proporcional à concentração da enzima

Em todas as considerações feitas sobre a variação da velocidade de reação em relação à concentração de substrato, admitiu-se sempre uma concentração *fixa* de enzima. Variando a concentração de enzima, a velocidade *sempre* irá variar qualquer que seja a concentração do substrato, pois se, para uma concentração E de enzima obtém-se:



Para uma concentração de enzima igual a 2E, deve-se ter:

$$K_{eq} = \frac{[2ES]}{[2E][S]}$$

O substrato está sempre em tal excesso que a quantidade que se liga à enzima é desprezível, de modo que:

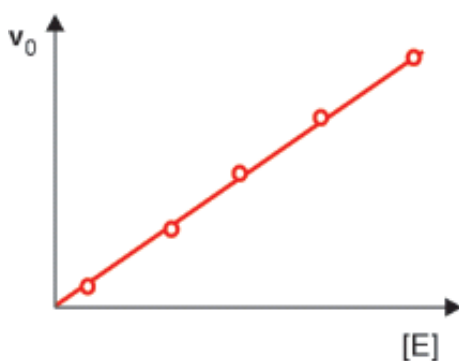
$$[S] - [ES] \cong [S] \qquad \text{e} \qquad [S] - [2ES] \cong [S]$$

Entretanto, a concentração de ES em um caso é o dobro da outra e, como

$$v_2 = k_2 [ES]$$

a velocidade em um caso também será o dobro da outra (Figura 5.8).

Generalizando, a velocidade da reação é diretamente proporcional à concentração da enzima (Figura 5.9). Esta proporcionalidade facilita a determinação da concentração (atividade) de uma enzima.



**Figura 5.9** Velocidade da reação enzimática ( $v_0$ ) em função da concentração da enzima (E).

### A dosagem de uma enzima é obtida pela medida de sua atividade

As concentrações das soluções são habitualmente expressas em unidades de massa do soluto por unidades de volume da solução. As soluções de enzimas constituem um caso especial, por duas razões. A primeira é que muitas vezes há necessidade de aferir a quantidade de uma enzima na presença de outras proteínas — é o caso de dosagem de enzimas no plasma sanguíneo e em outros fluidos corpóreos ou extratos celulares. A segunda razão é que o importante não é a massa total da enzima, mas a quantidade de enzimas ativas. Ou seja, interessa aferir a atividade enzimática e não a concentração. Em uma solução de enzima desnaturada, sua massa é conservada, mas a propriedade catalítica está perdida.

Em virtude do exposto, a dosagem de uma enzima é feita pela medida de sua *atividade*, que é avaliada pela velocidade da reação que ela catalisa. Dada a especificidade das enzimas, esta medida é possível, mesmo na presença de outras proteínas. Uma amostra da solução contendo a enzima é incubada com concentração alta de substrato, para garantir a velocidade máxima e impedir que pequenas variações na concentração do substrato possam afetar as medidas. A velocidade da reação é determinada e a atividade enzimática é expressa em Unidades Internacionais. Uma *Unidade Internacional (U)* é a quantidade de enzima capaz de formar 1  $\mu\text{mol}$  de produto por minuto em condições de medida especificadas para cada caso (pH, temperatura etc.). As dosagens de enzimas são geralmente expressas em U/mL ou U/L (Tabela 5.6).

A concentração de enzimas intracelulares no plasma é centenas de vezes menor do que no interior das células. Quando as células são lesadas, suas concentrações plasmáticas tornam-se anormalmente elevadas, revelando a instalação da moléstia. Ainda mais, a enzima cuja concentração plasmática aumenta pode indicar o tecido ou órgão que sofreu a injúria. Por isto, a dosagem de enzimas no plasma é prática corrente para a elucidação e o acompanhamento de muitas doenças (Tabelas 5.6 e 5.7) — os valores obtidos no indivíduo afetado são comparados com os valores médios encontrados em indivíduos sadios.

A medida da atividade enzimática é também imprescindível para monitorar a purificação de uma enzima. O processo de isolamento de uma enzima é iniciado a partir de um macerado de órgão ou tecido, o *extrato celular*. Tomando uma amostra deste extrato, deve-se determinar a atividade da enzima em questão (em U/mL, geralmente) e a quantidade total de Unidades presentes no volume do extrato. Para adotar um parâmetro que permita a comparação com outras preparações e com etapas posteriores do processo de purificação, é necessário usar um referencial; a referência habitualmente utilizada é a concentração total de proteína presente na preparação. Define-se, assim, a *atividade específica*, que é o número de Unidades de enzima por miligrama de proteína presente na preparação. A cada etapa processada em direção à purificação da enzima, são feitas novas medidas de atividade e de concentração de proteína, e calculada a nova atividade específica. Se a etapa de purificação foi bem-sucedida, a atividade específica medida deve aumentar (Tabela 5.8). Este aumento significa, naturalmente, que o procedimento adotado eliminou proteínas indesejáveis. Novos procedimentos de purificação são efetuados até que, no caso ideal, a atividade específica da preparação toma-se máxima e constante, indicando que a enzima está pura.

**Tabela 5.6** Resultados de exames laboratoriais de dosagens de enzimas plasmáticas em dois indivíduos (A e B).

Enzimas	Atividade enzimática no soro (U/L)		
	Indivíduo A	Indivíduo B	Valores de referência
Aldolase	2	2,1	Até 3
Amilase	120	125	60-160
Colinesterase	2.700	3.200	1.900-3.800
Creatina quinase	62	50	10-80
Lactato desidrogenase	398	220	120-240
Fosfatase ácida prostática	2,8	7,7	Até 3,7
Fosfatase alcalina	295	80	50-250
Aspartato transaminase	560	12	Até 18
Alanina transaminase	1.095	18	Até 21
$\gamma$ -Glutamil transferase	61	11	6-28

Os resultados dos exames do indivíduo A são compatíveis com um quadro de hepatite viral aguda e os dos exames do indivíduo B, com carcinoma de próstata.

**Tabela 5.7 Enzimas cujas concentrações plasmáticas são alteradas em determinadas doenças.**

Enzimas	Moléstias
Transaminases, $\gamma$ -glutamil transferase	Hepatite, enfarte do miocárdio
Creatina quinase, lactato desidrogenase	Enfarte do miocárdio
Amilase, lipase	Pancreatite
Fosfatase alcalina, $\gamma$ -glutamil transferase	Hepatite, cirrose, câncer, processos obstrutivos de vias biliares
Fosfatase ácida	Neoplasia de próstata
Amilase	Parotidite (caxumba)

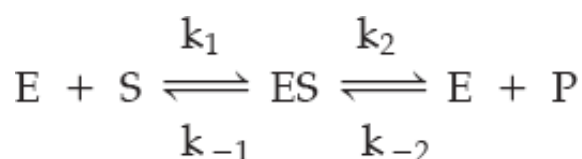
**Tabela 5.8 Purificação hipotética de uma enzima.**

Etapas da purificação	Volume (mL)	Proteína (mg/mL)	Proteína total (mg)	U <sup>(1)</sup> /mL	U totais	U/mg <sup>(2)</sup>	Índice de purificação <sup>(3)</sup>
1. Extrato celular	10	80	800	2.000	20.000	25	1
2. Fracionamento por (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2	120	240	9.000	18.000	75	3
3. Filtração em gel	10	2,2	22	1.620	16.200	750	30
4. Cromatografia de troca iônica	5	2,8	14	2.268	11.340	800	32
5. Cromatografia de afinidade	2	1,1	2,2	5.500	11.000	5.000	200

<sup>(1)</sup> U: unidade internacional de atividade enzimática. <sup>(2)</sup> Atividade específica: número de unidades de enzima por miligrama de proteína. Pelos dados apresentados na tabela, observa-se que a etapa 4 não é um método conveniente para a purificação da enzima em questão; esta etapa deveria ser suprimida em tentativas subsequentes. <sup>(3)</sup> Índice de purificação: razão entre a atividade específica da etapa considerada e a atividade específica do extrato celular.

## 5.5 A equação de Michaelis-Menten

A descrição matemática dos fenômenos cinéticos da catálise enzimática é dada pela *equação de Michaelis-Menten*. Para deduzi-la, será considerada a reação reversível:



Considerando os tempos iniciais de reação, a velocidade de formação de ES a partir de E + P

$$v_{-2} = k_{-2} [E] [P]$$

pode ser desprezada, pois, como a concentração inicial de P é insignificante em relação a S, o produto não conseguirá ligar-se à enzima, já que a probabilidade de ligação do substrato é muito maior. A própria equação desta velocidade mostra que, quando a concentração de P é próxima de zero, a velocidade  $v_{-2}$  também tende a zero.

A velocidade de formação de ES é apenas:

$$v_1 = k_1 [E] [S]$$

[E] é a concentração de enzima livre, isto é, a diferença entre a concentração adicionada de enzima (ou seja, sua concentração total = E<sub>0</sub>) e a concentração de ES (ou seja, a quantidade de enzima ligada ao substrato). Substituindo este valor de [E] na equação de  $v_1$ :

$$v_1 = k_1 ([E_0] - [ES]) [S]$$



A velocidade de desaparecimento de ES será a soma de duas velocidades: aquela que dissocia ES em E + S ( $v_{-1}$ ) e aquela que transforma ES em E + P ( $v_2$ ):

$$v_{-1} = k_{-1}[ES]$$

$$v_2 = k_2[ES]$$

Assim, a velocidade de desaparecimento de ES será:

$$v_{-1} + v_2 = k_{-1}[ES] + k_2[ES]$$

$$v_{-1} + v_2 = (k_{-1} + k_2)[ES]$$

Durante os tempos iniciais de reação, a concentração de ES mantém-se constante, com o estabelecimento de um equilíbrio estacionário (*steady-state*). As velocidades de formação ( $v_1$ ) e de desaparecimento ( $v_{-1} + v_2$ ) de ES são, então, iguais.

$$v_1 = v_{-1} + v_2$$

$$k_1([E_t] - [ES]) \cdot [S] = (k_{-1} + k_2)[ES]$$

$$([E_t] - [ES]) \cdot [S] = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \cdot [ES]$$

$$[E_t] \cdot [S] - [ES] \cdot [S] = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \cdot [ES]$$

$$[E_t] \cdot [S] = [ES] \cdot \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [ES] \cdot [S]$$

$$[E_t] \cdot [S] = [ES] \left( \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S] \right)$$

$$[ES] = \frac{[E_t][S]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S]}$$

Equação (A)

A velocidade inicial da reação total é a velocidade do aparecimento do produto:

$$v_0 = k_2[ES]$$

Substituindo, nesta equação, o valor de [ES] da equação (A):

$$v_0 = k_2 \frac{[E_t][S]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S]}$$

Como a velocidade máxima ( $V_{\text{máx}}$ ) é obtida quando toda a enzima ( $E_t$ ) se encontra sob a forma de ES, o produto  $k_2[E_t]$  é a velocidade máxima e

$$v_0 = \frac{V_{\text{máx}}[S]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S]}$$

A relação  $(k_{-1} + k_2)/k_1$  foi definida por Michaelis e Menten como uma nova constante,  $K_M$ . Chega-se assim à expressão final da equação de Michaelis-Menten:

$$v_0 = \frac{V_{\text{máx}} [S]}{K_M + [S]}$$

Quando a concentração de substrato é tal que a velocidade de reação é metade da velocidade máxima (ponto B da Figura 5.7), resulta:

$$\frac{V_{\text{máx}}}{2} = \frac{V_{\text{máx}} [S]}{K_M + [S]}$$

$$\frac{1}{2} = \frac{[S]}{K_M + [S]}$$

$$K_M + [S] = 2 [S]$$

$$K_M = [S]$$

A última igualdade indica que a *constante de Michaelis-Menten é numericamente igual à concentração de substrato que determina a metade da velocidade máxima*, o que permite a determinação experimental desta constante (Figura 5.7). O valor do  $K_M$  indica o grau de afinidade da enzima pelo substrato, como exemplificado pela hexoquinase (Tabela 5.9).

**Tabela 5.9** Constante de Michaelis-Menten de enzimas.

Enzima	Substrato	$K_M$ (mM)
Glicerol desidrogenase	Glicerol	39
Anidrase carbônica	CO <sub>2</sub>	7,5
Álcool desidrogenase	Etanol	0,5
Isocitrato desidrogenase	Isocitrato	0,45
Hexoquinase	Glicose	0,15
Hexoquinase	Frutose	1,5

### A velocidade da reação só é diretamente proporcional a baixas concentrações de substrato

Quando a concentração do substrato é muito inferior ao  $K_M$ ,  $K_M + [S]$  é praticamente igual a  $K_M$ , e a equação de Michaelis-Menten se reduz a:

$$v_0 = \frac{V_{\text{máx}}}{K_M} [S]$$

Como  $\frac{V_{\text{máx}}}{K_M}$  é uma constante, é possível escrever

$$v_0 = K [S]$$

uma equação de reta do tipo  $y = ax$ . Esta equação mostra que, com concentrações pequenas de substrato, a velocidade de reação é diretamente proporcional à concentração do substrato (região do ponto A no gráfico da Figura 5.7).

Por outro lado, quando a concentração de S é muito maior do que  $K_M$  (região do ponto C da Figura 5.7),  $K_M + [S]$  é praticamente igual a  $[S]$  e a equação de Michaelis-Menten fica igual a

$$v_0 = V_{\text{máx}}$$

indicando que, quando a concentração de substrato é muito alta (saturante), a velocidade é constante e máxima, independentemente da concentração de substrato. Na prática, é muito difícil atingir a  $V_{\text{máx}}$ ; ainda assim, há recursos matemáticos que permitem determinar seu valor.

### Um gráfico com os valores inversos de $v_0$ e $[S]$ possibilita a determinação de $V_{\text{máx}}$ e $K_M$

A equação de Michaelis-Menten é a equação de uma hipérbole retangular; portanto, os valores exatos de  $V_{\text{máx}}$  nunca são atingidos, pois a curva tem assíntota no valor  $V_{\text{máx}}$  do eixo  $v_0$ . Mesmo aproximações de  $V_{\text{máx}}$  seriam obtidas com concentrações tão altas de substrato, que são difíceis de conseguir experimentalmente. Como consequência, a determinação de  $K_M$  **também é impossibilitada**.

O problema da determinação de  $V_{\text{máx}}$  e  $K_M$  pode ser resolvido a partir da transformação algébrica da equação de Michaelis-Menten. Esta transformação, formulada por Lineweaver e Burk, é obtida tomando o inverso daquela equação:

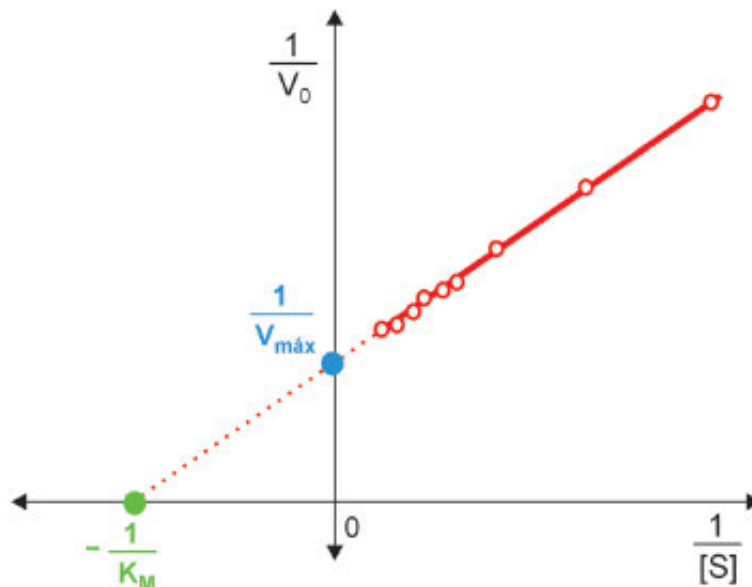
$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M + [S]}{V_{\text{máx}} [S]}$$

ou

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M}{V_{\text{máx}}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\text{máx}}}$$

que é uma equação de reta do tipo  $y = ax + b$ .

Um gráfico com os valores de  $\frac{1}{v_0}$  contra valores de  $\frac{1}{[S]}$  é uma reta cujo intersepto nas ordenadas é  $\frac{1}{V_{\text{máx}}}$  e, nas abscissas,  $-\frac{1}{K_M}$  (Figura 5.10).



**Figura 5.10** 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), permite a determinação dos valores de  $K_M$  e de  $V_{\text{máx}}$ .

Este gráfico permite aferir  $V_{\text{máx}}$  sem que seja atingido, na prática, o ponto que equivaleria a esta velocidade, já que a reta pode ser traçada a partir de pontos experimentais conseguidos com concentrações não saturantes de substrato. Prolongando-se a reta, encontra-se o valor do inverso de  $V_{\text{máx}}$  no intersepto com o eixo das ordenadas e o valor negativo do inverso de  $K_M$ , na intersecção com o eixo das abscissas.

### Algumas enzimas estão próximas da perfeição catalítica

Para estudar a eficiência da catálise enzimática, define-se a constante catalítica,  $k_{\text{cat}}$ :

$$k_{\text{cat}} = \frac{V_{\text{máx}}}{[E_t]}$$

A constante catalítica mede, para uma dada concentração de enzima, a eficiência máxima, obtida em condições de  $V_{\text{máx}}$ , quando todas as enzimas estão complexadas com o substrato. Como  $V_{\text{máx}}$  é igual ao produto  $k_2 [E_t]$ ,  $k_{\text{cat}}$  é igual a  $k_2$ :

$$k_2 = \frac{V_{\text{máx}}}{[E_t]}$$

$k_{\text{cat}}$  é também conhecida como *número de renovação (turnover number)* da enzima, porque equivale ao número máximo de moléculas de substrato que um centro ativo converte em produto, por segundo. O valor de  $k_{\text{cat}}$  indica a rapidez com que uma enzima pode operar, quando todos os centros ativos estão ocupados, ou seja, evidencia com que eficiência o complexo enzima substrato origina produto (Tabela 5.10). A eficiência é espantosa: pelo valor de  $k_{\text{cat}}$  para a catalase, verifica-se que uma molécula desta enzima é capaz de originar 10.000.000 de moléculas de produto por segundo!

Se ao valor de  $k_{\text{cat}}$  for associado o valor de  $K_M$ , pode-se definir uma nova constante  $k_{\text{cat}}/K_M$ , que relaciona a eficiência catalítica da enzima com a sua afinidade pelo substrato. Um baixo valor de  $k_{\text{cat}}/K_M$  ocorrerá ou porque a enzima tem pouca afinidade pelo substrato ( $K_M$  grande), ou porque a eficiência de gerar produto a partir de ES é pequena ( $k_{\text{cat}}$  pequeno), ou pelas duas razões somadas. Por outro lado, os maiores valores desta relação serão obtidos satisfazendo simultaneamente duas condições: alta afinidade da enzima pelo substrato ( $K_M$ pequeno) e alta eficiência na transformação de ES em produto ( $k_{\text{cat}}$  grande). Na Tabela 5.10 aparecem os valores da razão  $k_{\text{cat}}/K_M$  para várias enzimas. Esta razão para as enzimas mais eficientes aproxima-se muito dos valores do coeficiente de difusão, ou seja, da frequência de colisão entre enzima e substrato por difusão simples ( $10^8$ - $10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ). Isto significa que estas enzimas catalisam a reação com uma eficiência próxima da perfeição: geram produto cada vez que colidem com o substrato. São enzimas que catalisam reações de grande importância para a fisiologia celular, seja na transmissão do impulso nervoso (acetilcolinesterase), na remoção de  $\text{CO}_2$  dos tecidos (anidrase carbônica) ou na eliminação de radicais livres de oxigênio (catalase e superóxido dismutase); comparativamente, a pepsina, uma enzima digestiva, é muito poucoeficiente.

**Tabela 5.10 Algumas enzimas de alta eficiência.**

Enzima	$k_{\text{cat}} (\text{s}^{-1})$	$K_M (\text{M})$	$k_{\text{cat}}/K_M (\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$
Superóxido dismutase	$1 \times 10^6$	$3,5 \times 10^{-4}$	$2,8 \times 10^9$
Catalase	$1 \times 10^7$	$2,5 \times 10^{-2}$	$4,0 \times 10^8$
Acetilcolinesterase	$1 \times 10^4$	$9,0 \times 10^{-5}$	$1,6 \times 10^8$
Anidrase carbônica	$1 \times 10^6$	$1,2 \times 10^{-2}$	$8,3 \times 10^7$
Pepsina (hidrólise de Phe-Gly)	$5 \times 10^{-1}$	$3,0 \times 10^{-4}$	$1,7 \times 10^3$

## 5.6 Inibidores enzimáticos

A atividade enzimática pode ser diminuída pela ação de substâncias, genericamente chamadas de *inibidores*. Algumas destas substâncias são constituintes normais das células, outras são estranhas aos organismos. Os inibidores enzimáticos encontrados nas células que cumprem um papel regulador importante são designados *alostéricos*. Como estes inibidores são produzidos pelas próprias células, a variação de sua concentração é um recurso por elas largamente empregado no controle da velocidade das reações (Seção 19.2.1).

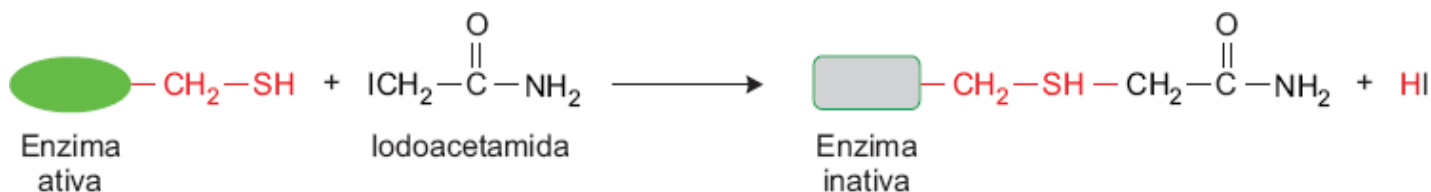
Adicionalmente, o uso *in vitro* de inibidores tem trazido um enorme volume de conhecimento sobre a estrutura das enzimas, a organização do centro ativo, o mecanismo de catálise etc., além de contribuir para a elucidação da sequência de reações que compõem uma via metabólica.

A possibilidade de inibir reações enzimáticas é também um campo aberto para aplicações farmacológicas. Muitos medicamentos de uso corrente na prática terapêutica baseiam suas propriedades na inibição específica de certas enzimas. Alguns exemplos serão analisados nesta seção.

Conquanto exista grande variação quanto aos mecanismos de inibição, pode-se agrupar os inibidores em duas grandes categorias, irreversíveis e reversíveis, segundo a estabilidade de sua ligação com a molécula de enzima.

Os *inibidores irreversíveis* reagem com as enzimas, levando a uma inativação praticamente definitiva. Alguns exemplos são os *compostos organofosforados*, que constituem o princípio ativo de muitos inseticidas; eles formam

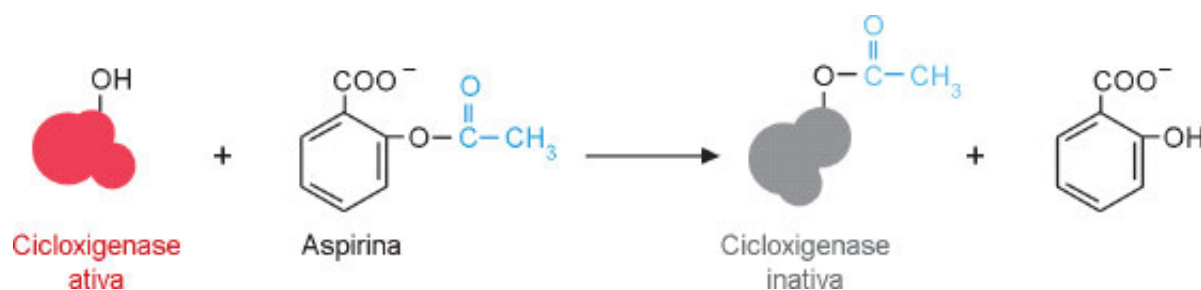
ligações covalentes com o grupo OH de resíduos de serina. Outros exemplos são a *iodoacetamida* e o *iodoacetato*, que reagem com o grupo SH de resíduos de cisteína:



Este tipo de inibidor é muito tóxico para os organismos, devido não só à irreversibilidade da sua ligação às enzimas, mas também em virtude de sua inespecificidade. É nesta toxicidade que reside o perigo potencial dos detritos industriais, cujo conteúdo em inibidores enzimáticos inespecíficos é capaz de afetar praticamente qualquer ser vivo. Ligando-se a serina ou cisteína, aminoácidos frequentes nas proteínas, esses inibidores podem inativar qualquer enzima.

Outros inibidores irreversíveis têm propriedades terapêuticas. A *aspirina* (*ácido acetilsalicílico*) é empregada como agente anti-inflamatório, antipirético e analgésico. Ela transfere seu grupo acetila para o grupo OH de um resíduo de serina da molécula de *cicloxigenase*, inativando-a (Figura 5.11); esta enzima participa da via de síntese de *prostaglandinas* (Seção 16.6). A *penicilina* liga-se covalentemente ao sítio ativo de uma enzima da via de síntese da parede bacteriana, inibindo-a; desprovidas de parede, as células ficam sujeitas à lise; este antibiótico é o agente terapêutico ideal, que atua sobre uma enzima que o parasita apresenta e o indivíduo parasitado não.

Os *inibidores reversíveis* são classicamente divididos em dois grupos: os competitivos e os não competitivos.



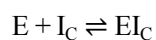
**Figura 5.11** Reação de inativação da cicloxigenase por reação irreversível com aspirina (ácido acetilsalicílico).

## 5.6.1 Inibidores competitivos

### Os inibidores competitivos competem com o substrato pelo centro ativo da enzima

Os *inibidores competitivos* ( $I_C$ ), por apresentarem configuração espacial semelhante à do substrato, são capazes de ligarem-se ao centro ativo da enzima, produzindo um complexo enzima-inibidor ( $EI_C$ ).

A constante de equilíbrio da reação

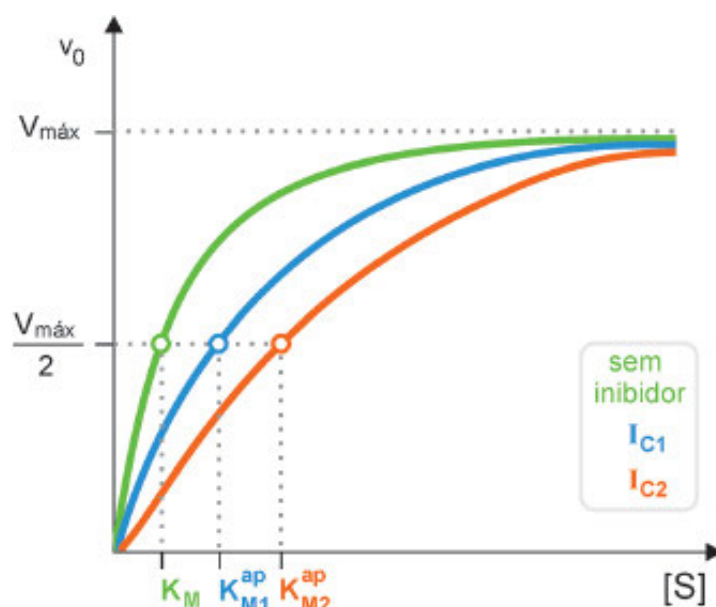


é chamada constante do inibidor ( $K_{I_c}$ ), e mede a afinidade da enzima pelo inibidor, como o  $K_M$  mede a afinidade da enzima pelo substrato:

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

O complexo  $EI_C$  *jamaiz* gera produto e a atividade enzimática ficará diminuída proporcionalmente à fração de enzima que estiver ligada ao inibidor. Uma vez que este tipo de inibidor se liga ao mesmo sítio onde se liga o substrato, a ligação do inibidor e a ligação do substrato a uma dada molécula de enzima são eventos mutuamente exclusivos. Quando a molécula da enzima é liberada — ou por dissociação do complexo  $EI_C$  ou por decomposição do complexo  $ES$  em  $E + P$  —, irá associar-se a novas moléculas de substrato ou de inibidor, com uma probabilidade que dependerá de suas concentrações e das afinidades entre a enzima e o substrato e entre a enzima e o inibidor. Em concentrações baixas de substrato, encontrar-se-á uma fração das enzimas associada ao substrato (gerando produto) e uma fração ligada ao inibidor e a velocidade da reação ficará reduzida. Se a concentração do substrato for muito grande em relação à concentração do inibidor competitivo, a probabilidade de formação do complexo  $ES$  é praticamente 100%, e tudo se passa como se não houvesse inibidor presente no meio de reação. A velocidade máxima da reação será idêntica à velocidade máxima da reação na ausência do inibidor, mas só será obtida com concentrações de substrato maiores do que as da reação não inibida

(Figura 5.12). Se a concentração do inibidor competitivo for exageradamente alta em relação à concentração do substrato, a probabilidade da enzima livre ligar-se ao substrato será, praticamente, nula e a velocidade da reação será zero.



**Figura 5.12** Efeito de duas concentrações de inibidor competitivo ( $I_{C1} < I_{C2}$ ) sobre a velocidade da reação enzimática.  $K_{M1}^{ap}$  e  $K_{M2}^{ap}$  são valores do  $K_M$  aparente para as concentrações  $I_{C1}$  e  $I_{C2}$  de inibidor, respectivamente.

Visto que mesmo na presença de inibidor competitivo a velocidade máxima pode ser atingida, são as velocidades obtidas com concentrações menores de substrato que revelam a inibição. Há, neste caso, uma *aparente* alteração do valor do  $K_M$ , que parece maior do que o da reação sem inibidor. É claro, entretanto, que este valor não pode ser usado como uma medida de  $K_M$ , cuja determinação deve ser feita na ausência de inibidores. A nova constante, medida em presença de inibidores, é chamada  $K_M$  aparente ( $K_M^{ap}$ ).

O valor de  $K_M^{ap}$  depende de duas variáveis: a afinidade da enzima pelo inibidor, expressa pela constante do inibidor ( $K_{Ic}$ ), e a própria concentração de inibidor,  $[I_c]$ . A equação da velocidade da reação torna-se igual a

$$v_0 = \frac{V_{m\acute{a}x} [S]}{K_M \left(1 + \frac{[I_c]}{K_{Ic}}\right) + [S]}$$

onde  $K_M \left(1 + \frac{[I_c]}{K_{Ic}}\right) = K_M^{ap}$ . Substituindo-se este valor na equação anterior, obtém-se

$$v_0 = \frac{V_{m\acute{a}x} [S]}{K_M^{ap} + [S]}$$

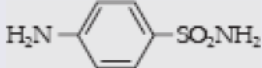

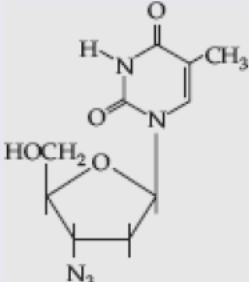
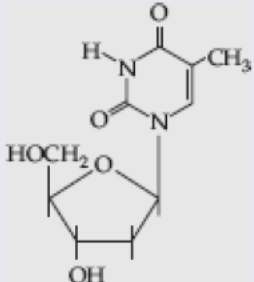
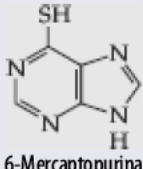
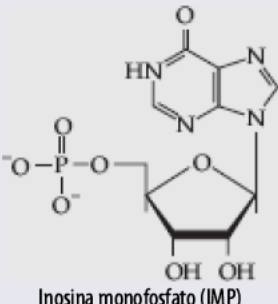
que é uma variante da equação de Michaelis-Menten, na qual o  $K_M$  está trocado pelo  $K_M^{ap}$ . Fica evidente que as variáveis mencionadas afetam o valor de  $K_M$  e não de  $V_{m\acute{a}x}$ , e que quanto maior a concentração do inibidor competitivo, maior o  $K_M^{ap}$  (Figura 5.12).

A transformação de Lineweaver-Burk aplicada à última equação está apresentada na Figura 5.14. A comparação do valor de  $K_M^{ap}$  com o valor do  $K_M$  tem muita utilidade na determinação do tipo de inibidor — competitivo ou não competitivo.

Um exemplo clássico de inibição competitiva é a ação de *malonato* sobre a reação catalisada pela *succinato desidrogenase* (Tabela 5.11). O malonato e outros compostos com estrutura semelhante ao succinato inibem competitivamente a enzima.

**Tabela 5.11** Inibidores competitivos de algumas enzimas, seus substratos naturais e as moléstias em cujo tratamento são empregados.

Inibidor	Substrato	Enzima

$  \begin{array}{c}  \text{COO}^- \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{COO}^- \\  \text{Malonato} \\    \\  \text{COO}^- \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{COO}^- \\  \text{Glutarato}  \end{array}  $	$  \begin{array}{c}  \text{COO}^- \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{COO}^- \\  \text{Succinato}  \end{array}  $	Succinato desidrogenase
 <p>Sulfanilamida</p>	 <p><i>p</i>-Aminobenzoato (PABA)</p>	Di-hidropteroato sintase
 <p>AZT (3'-azido-2'-desoxitimidina)</p>	 <p>Desoxitimidina</p>	Transcriptase reversa
 <p>6-Mercaptopurina</p>	 <p>Inosina monofosfato (IMP)</p>	Adenilossuccinato sintetase

Os inibidores competitivos têm largo emprego terapêutico, porque inibem reações que ocorrem específica ou preferencialmente no microrganismo parasita (bactérias ou vírus) e não existem no organismo hospedeiro. Este é o caso da *sulfanilamida* (Tabela 5.11), um quimioterápico do grupo das *sulfonamidas*, utilizadas no combate a infecções bacterianas. Muitas bactérias patogênicas sintetizam *ácido fólico* (Seção 17.2.2) e o substrato de uma das etapas da via de síntese é o *p-aminobenzoato* (PABA). A sulfanilamida atua como inibidor competitivo da enzima que catalisa essa etapa, bloqueando a síntese de ácido fólico. A deficiência desse composto torna a bactéria incapaz de reproduzir-se. Essa via não ocorre no organismo humano, para o qual o ácido fólico é uma vitamina, a vitamina B<sub>9</sub> (Tabela 5.13).

Outro exemplo é o AZT (*3'-azido-2'-desoxitimidina*), um análogo estrutural da desoxitimidina que inibe a DNA polimerase-RNA dependente (*transcriptase reversa*), necessária para a replicação do vírus HIV (de *Human Immunodeficiency Virus*), causador da AIDS (de *Acquired Immune Deficiency Syndrome*). O tratamento atual da AIDS emprega uma combinação de agentes antivirais (*coquetel*) que inclui inibidores da transcriptase reversa e da protease do HIV, outra proteína-chave para a construção das partículas virais.

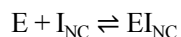
Os inibidores competitivos são ainda utilizados na quimioterapia de diversos tipos de câncer. Neste caso, a célula neoplásica comporta-se como o agressor do organismo; seu metabolismo é diferente do da célula normal sob vários aspectos, incluindo uma velocidade de multiplicação muito maior, o que implica síntese de ácidos nucleicos intensa. Por isto, análogos estruturais de intermediários das vias de síntese de nucleotídeos são os fármacos de escolha; um exemplo é a *6-mercaptopurina*, que impede a síntese de nucleotídeos purínicos. Os quimioterápicos atuarão mais intensamente sobre as células cancerosas, mas também serão atingidos tecidos normais que se dividem rapidamente, como a medula óssea (que produz as células sanguíneas), a mucosa intestinal, os folículos capilares, as células germinativas masculinas etc.

## 5.6.2 Inibidores não competitivos

Os inibidores pertencentes a esta classe não guardam qualquer semelhança estrutural com o substrato da reação que

inibem. Seu efeito é provocado por ligação a grupamentos que não pertencem ao centro ativo; esta ligação altera a estrutura enzimática a tal ponto que inviabiliza a catálise. O ponto de ligação do inibidor não competitivo ( $I_{NC}$ ) é a cadeia lateral de um aminoácido — o grupo OH de serina, ou o grupo SH de cisteína, por exemplo. Como estes grupos são frequentes nas enzimas, a ação de inibidores não competitivos é bastante inespecífica, o mesmo inibidor podendo atuar sobre um grande número de enzimas (ao contrário do que ocorre com os inibidores competitivos).

A reação do inibidor não competitivo com a enzima pode ser representada por:



Vê-se, pelo equilíbrio, que há sempre uma fração de enzimas ligadas ao inibidor e inativas. O que diferencia este tipo de inibidor dos inibidores irreversíveis é que, no caso destes últimos, uma molécula enzimática ligada ao inibidor está *definitivamente* inativada, enquanto, no caso dos inibidores reversíveis não competitivos, uma molécula de enzima, que em um instante está ligada ao inibidor (inativa), pode encontrar-se livre (ativa) em um momento seguinte. Sendo assim, o fato da ligação do inibidor não competitivo à molécula de enzima ser reversível não diminui seu poder de ação. Como o sítio de ligação do inibidor não competitivo é diferente do sítio ativo, em alguns casos é possível a ligação concomitante de inibidor e substrato à enzima, formando um complexo ternário  $EI_{NC}S$ , incapaz de gerar produto.

Na presença de um inibidor não competitivo, tudo se passa como se efetivamente houvesse uma concentração menor de enzimas. Uma vez que a velocidade da reação enzimática é diretamente proporcional à concentração de enzimas ativas, a velocidade de reação será menor do que na ausência do inibidor para *qualquer* concentração de substrato; é claro que a velocidade máxima da reação também será reduzida. Ainda mais, já que o substrato e o inibidor não competitivo não competem pelo mesmo sítio de ligação na enzima, aumentos na concentração do substrato *não* podem anular ou mesmo atenuar o efeito do inibidor.

As características descritas permitem prever, para o inibidor não competitivo (Figura 5.13), uma cinética diferente da do inibidor competitivo. Além disso, com inibidores não competitivos, o valor do  $K_M$  aparente coincide com o valor do  $K_M$ . Isto porque as velocidades medidas resultam da ação de enzimas que não estão ligadas ao inibidor e que conservam a mesma afinidade pelo seu substrato.

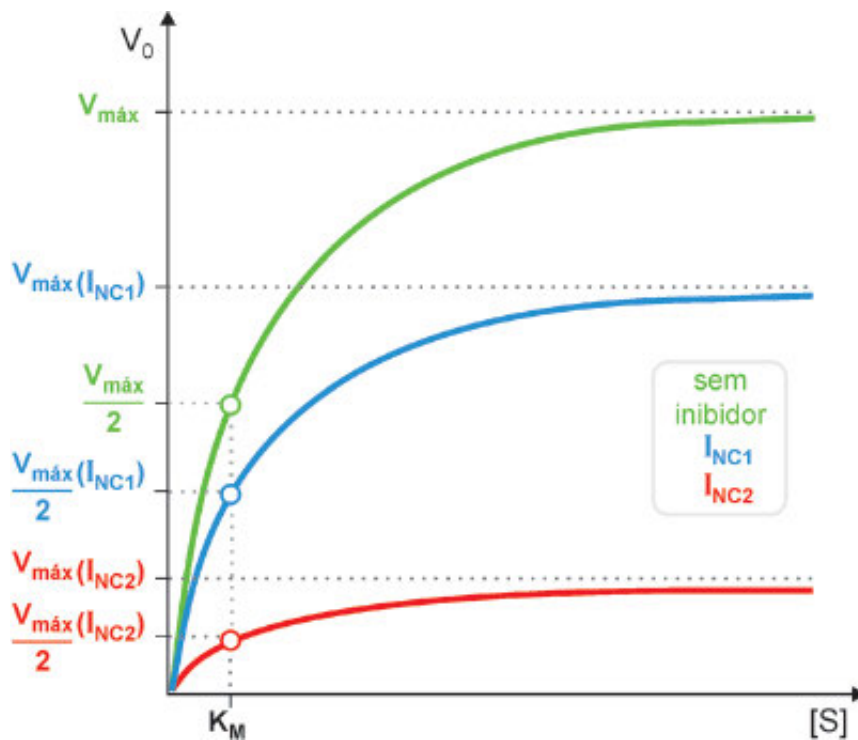
No caso da inibição não competitiva, a constante de dissociação do complexo  $EI_{NC}$  e a própria concentração do inibidor interferem no valor de  $V_{m\acute{a}x}$ , e não no de  $K_M$ , ao contrário do que ocorre com o inibidor competitivo. A equação de Michaelis-Menten passa a ser:

$$v_0 = \frac{\frac{V_{m\acute{a}x}}{1 + \frac{[I_{NC}]}{K_{I_{NC}}}} [S]}{K_M + [S]}$$

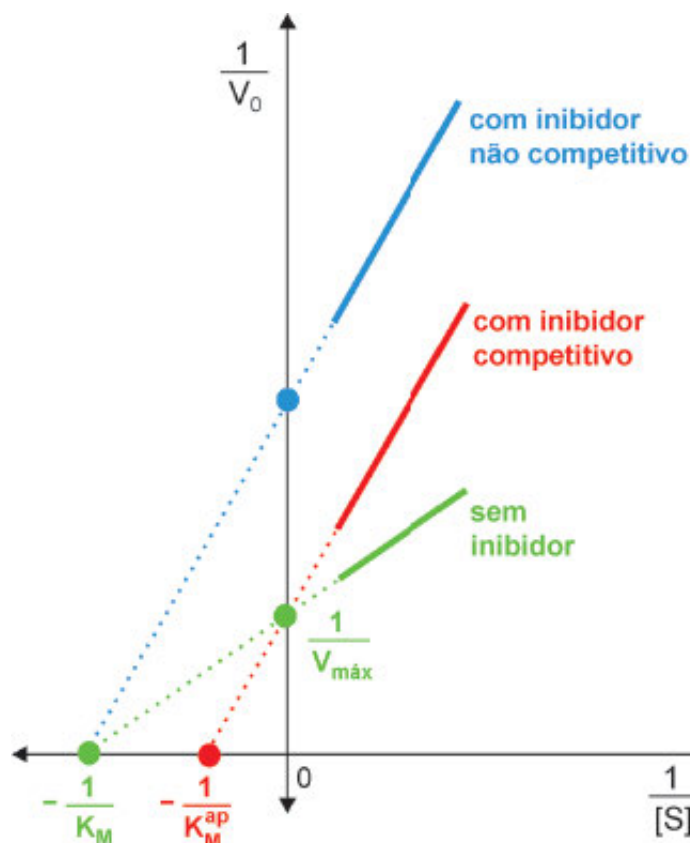
A Figura 5.14 apresenta a transformação de Lineweaver-Burk aplicada a esta equação, em comparação com as transformações para a cinética da reação na presença de inibidor competitivo e na ausência de inibidores.

São exemplos de inibidores não competitivos os íons de metais pesados como  $Hg^{+}$ ,  $Pb^{+}$  e  $Ag^{+}$ , que reagem com grupos SH das proteínas. Os inibidores não competitivos têm amplo espectro de ação o que torna sua ingestão, direta ou indireta (por alimentos contaminados), extremamente tóxica. Muitos casos de intoxicação por  $Hg^{+}$  ocorrem em mineração de ouro, onde o mercúrio é usado na extração do metal. O despejo de resíduos deste processo em rios é uma fonte considerável de poluição ambiental.





**Figura 5.13** 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.



**Figura 5.14** Transformação de Lineweaver-Burk para a reação enzimática sem inibidor e em presença de inibidores competitivo e não competitivo.

### 5.6.3 Antimetabólitos

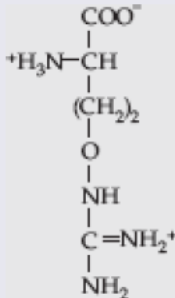
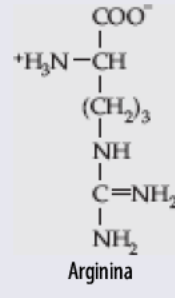
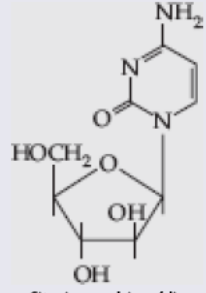
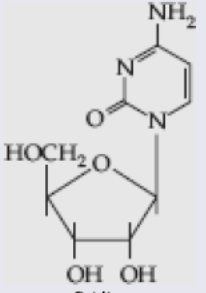
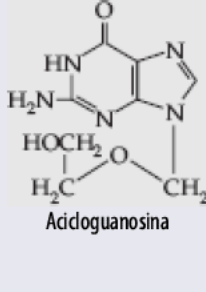
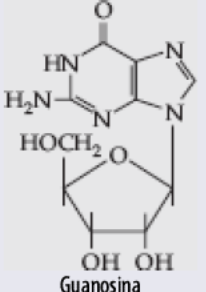
#### Análogos de substratos são “venenos” naturais ou medicamentos

Uma classe importante e extremamente variada de compostos tem sua ação relacionada com a atividade enzimática. São os *antimetabólitos* ou *análogos de substratos*, que, como o nome indica, têm fórmula estrutural semelhante à de substratos naturais, ligam-se ao centro ativo e, ao contrário dos inibidores competitivos, geram produtos. Estes produtos são diferentes do produto gerado pelo substrato e, por não serem aceitos como substrato pela enzima seguinte, ou por serem instáveis ou por qualquer outro motivo, a via metabólica sobre a qual interferem fica interrompida.

Muitos antimetabólitos constituem um mecanismo de defesa de plantas contra a ingestão de suas folhas e sementes por insetos, pássaros e mamíferos. Entre esses compostos tóxicos, estão os análogos de aminoácidos, sendo conhecidos mais de 300. Estes análogos, nos organismos herbívoros, são incorporados no lugar dos aminoácidos “certos” e as proteínas resultantes são inativas. Um exemplo é a *canavanina*, um análogo de arginina (Tabela 5.12). Outras plantas venenosas sintetizam *fluoroacetato*, um composto extremamente tóxico, que acarreta o bloqueio do ciclo de Krebs (Seção 10.1). O fluoroacetato, análogo de acetato, é transformado em fluoroacetil-coenzima A e substitui a acetil-coenzima A na condensação com oxaloacetato (primeira reação do ciclo de Krebs) originando fluorocitrato. A enzima seguinte do ciclo, a aconitase, não reconhece fluorocitrato como substrato e o ciclo é interrompido. Em 2004, foram constatados muitos casos letais de envenenamento de animais no Zoológico de São Paulo por fluoroacetato, componente de venenos contra ratos, atualmente de comercialização proibida.

Diversos quimioterápicos são constituídos por análogos de nucleosídeos, que interrompem a replicação do DNA. É o caso de *citosina arabinosídeo*, inserida no DNA em lugar de citosina, particularmente utilizada no tratamento de leucemias e linfomas; *acicloguanosina (aciclovir)*, empregada no combate ao vírus herpes, é introduzida pela DNA polimerase do vírus no seu DNA, no lugar de guanosina, mas não é reconhecida pela DNA polimerase da célula hospedeira, residindo nesta diferença a sua eficácia.

**Tabela 5.12 Antimetabólitos e os substratos que substituem.**

Antimetabólitos	Substratos
 <p>Canavanina</p>	 <p>Arginina</p>
 <p>Citosina arabinosídeo</p>	 <p>Citidina</p>
 <p>Acicloguanosina</p>	 <p>Guanosina</p>

## 5.7 Regulação da atividade enzimática

A coordenação das numerosas vias metabólicas presentes nas células, a capacidade de responder adequadamente a mudanças no meio ambiente, o crescimento e a diferenciação harmônicos do organismo são resultantes da possibilidade de regular a ação enzimática. Basicamente, existem dois mecanismos para a modulação da atividade enzimática:

1. Controle da disponibilidade de enzimas, exercido sobre as velocidades de síntese e de degradação das enzimas, que determinam sua concentração celular
2. Controle da atividade da enzima, efetuado por mudanças estruturais da molécula enzimática e que redundam em alterações da velocidade de catálise.

Outros dois processos de regulação enzimática, de ocorrência mais restrita, estão descritos a seguir.

### Zimogênios são formas inativas de enzimas

Certas enzimas, cujo local de ação é extracelular (plasma, trato digestório), são sintetizadas na forma de precursores inativos, chamados *zimogênios*. Para que um zimogênio adquira propriedades de enzima, é necessária a hidrólise de determinadas ligações peptídicas, com a consequente remoção de um segmento da cadeia de aminoácidos. A cadeia polipeptídica remanescente adquire nova estrutura espacial, onde é organizado um centro ativo funcional.

Várias enzimas proteolíticas, como *pepsina* e *quimotripsina*, são sintetizadas como zimogênios e assim mantidas enquanto estão armazenadas em suas células de origem, sem risco de haver digestão das proteínas celulares. A transformação zimogênio → enzima processa-se fora destas células, no local onde a atividade digestiva deve ser exercida. Este é o caso de *pepsinogênio*, que origina pepsina na cavidade gástrica, por remoção de 42 resíduos de aminoácidos, sob a ação de íons  $H^+$ . A própria pepsina formada catalisa a conversão de novas cadeias de pepsinogênio em pepsina. Analogamente, *tripsinogênio* e *quimotripsinogênio*, de origem pancreática, são transformados em tripsina e quimotripsina no intestino delgado, sob a ação de enzimas hidrolíticas específicas.

### Isoenzimas e isoformas são versões diferentes de uma mesma enzima

Existem enzimas que catalisam a mesma reação, mas que apresentam estruturas diversas, dependendo do tecido ou organela em que ocorrem em um organismo — são as isoenzimas e as isoformas. *Isoenzimas* resultam de vários *loci* gênicos ou de genes alelos de um mesmo *locus*: cada uma tem seu *locus* gênico próprio. *Isoformas* resultam de modificações pós-transcricionais (clivagem proteolítica, modificação covalente de aminoácidos etc.) de uma estrutura proteica comum.

Frequentemente, as isoenzimas resultam de combinações diferentes de subunidades comuns. A *lactato desidrogenase* (*LDH*, de *lactate dehydrogenase*), por exemplo, é constituída por quatro subunidades de dois tipos: subunidade H (de *Heart*, coração em inglês) e M (de *Músculo*), que podem associar-se de maneiras variadas. As formas HHHH e HHHM são abundantes no coração, enquanto a forma MMMM predomina em músculos esqueléticos e fígado. Outros tecidos apresentam diferentes composições de subunidades.

Diversas enzimas têm isoenzimas que se apresentam em diferentes isoformas, como a hexoquinase, a creatina quinase e a fosfatase alcalina. Os transportadores de glicose (GLUT — Seção 19.6.3) e as cadeias pesadas da miosina (Seção 22.5) também ocorrem em várias isoformas.

Diante de uma determinada situação fisiológica, as isoenzimas ou isoformas de órgãos distintos podem tornar-se ativas ou inativas, permitindo a resposta adequada do particular órgão onde se localizam (Seção 20.2). Adicionalmente, o padrão característico de isoenzimas nos tecidos tem grande utilidade na prática médica: a detecção de um tipo de isoenzima no plasma e, conseqüentemente, a identificação do seu tecido de origem, é um procedimento largamente empregado no diagnóstico e acompanhamento de diversas doenças.

Término da leitura básica, parte 2 enzimas

## 5.8 Cofatores enzimáticos

Início leitura básica,  
parte 1 enzimas

### Cofatores são imprescindíveis para a atividade de inúmeras enzimas

A maioria das enzimas necessita da associação com outras moléculas ou íons para exercer seu papel catalítico. Esses componentes da reação enzimática são genericamente chamados *cofatores*. Os cofatores podem ser *íons metálicos* ou moléculas orgânicas, não proteicas, de complexidade variada, que recebem o nome de *coenzimas*.

Íons metálicos como  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  e  $Co^{2+}$  costumam fazer parte da estrutura da enzima ou por ligarem-se a cadeias laterais de aminoácidos, frequentemente pertencentes ao sítio ativo da enzima, ou por estarem presentes em grupos prostéticos como, por exemplo, o heme (Seção 3.2). Outros íons metálicos como  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Mg^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$  e  $Ca^{+2}$  associam-se fracamente e reversivelmente à enzima, ao substrato ou à coenzima. É o caso de reações catalisadas por quinases, que utilizam como coenzima o complexo ATP- $Mg^{+2}$ : na ausência de  $Mg^{+2}$ , o ATP não se liga à enzima.

As coenzimas atuam como aceptores de átomos ou grupos funcionais do substrato em uma dada reação e como doadores destes mesmos grupos ao participarem de outra reação e, por isto, diz-se que as coenzimas são *transportadoras* de determinados grupos (Tabela 5.13). Durante a catálise, coenzima e substrato acham-se alojados no centro ativo da enzima, consistindo a reação na remoção de um grupo químico do substrato e sua transferência para a coenzima, ou vice-versa. Fica evidente que as coenzimas não apenas sofrem modificações em sua estrutura ao participar de uma reação enzimática, mas são *necessárias em quantidades estequiométricas em relação ao substrato*. Todavia, o fato de as coenzimas serem constantemente recicladas, oscilando entre duas formas, permite que suas concentrações celulares possam ser bastante

reduzidas, muito menores do que as concentrações de substrato.

Nem sempre é imediata a distinção entre substrato e coenzima. Um critério diferencial é o fato de, em reações metabólicas subsequentes, o substrato sofrer novas alterações, enquanto a coenzima volta à sua forma original. A coenzima pode encontrar-se covalentemente ligada à molécula enzimática, constituindo um *grupo prostético*, como a flavina adenina dinucleotídeo (FAD), uma coenzima transportadora de hidrogênio. Ou a coenzima pode ser uma molécula “livre”, reunindo-se à enzima apenas no momento da catálise, como acontece com a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD<sup>+</sup>).

Algumas coenzimas, como o ATP e o GTP, são integralmente sintetizadas pelas células. Outras apresentam em sua molécula um componente orgânico que não pode ser sintetizado pelos animais superiores. Este componente, ou um seu precursor, deve então ser obtido da dieta, constituindo uma *vitamina*. As vitaminas são compostos orgânicos sintetizados por plantas ou microrganismos, indispensáveis ao crescimento e às funções normais dos animais superiores. Ao contrário de carboidratos, proteínas e lipídios, são requeridos na dieta em pequenas quantidades (microgramas ou miligramas diários), já que são precursores de coenzimas, cujas concentrações celulares são muito pequenas, por serem constantemente recicladas.

As necessidades vitamínicas diferem segundo as espécies. A *vitamina C (ácido ascórbico)*, por exemplo, é necessária aos primatas; a maioria dos mamíferos é dotada de vias de síntese de ácido ascórbico, que, assim, não é uma vitamina para estes animais. Os seres humanos precisam de várias outras vitaminas. No extremo oposto, *Escherichia coli*, uma bactéria comum no trato intestinal humano, é capaz de multiplicar-se em uma solução contendo apenas uma fonte de carbono (glicose), uma fonte de nitrogênio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) e sais minerais. A partir destas substâncias, é capaz de sintetizar todos os compostos necessários à sua manutenção e reprodução, inclusive aqueles que, para os animais superiores, constituem-se em vitaminas.

As vitaminas são classicamente divididas em *hidrossolúveis*, que incluem as vitaminas do complexo B (Tabela 5.13) — tiamina (vitamina B<sub>1</sub>), riboflavina (B<sub>2</sub>), nicotinamida (B<sub>3</sub>), ácido pantotênico (B<sub>5</sub>), piridoxina (B<sub>6</sub>), biotina (B<sub>7</sub>), ácido fólico (B<sub>9</sub>), cobalamina (B<sub>12</sub>) e o ácido ascórbico (C), e *lipossolúveis* — as vitaminas A, D, E e K. São as vitaminas hidrossolúveis as que têm função de coenzimas ou fazem parte de moléculas de coenzimas. A participação das vitaminas lipossolúveis nas reações metabólicas é menos conhecida.

As estruturas das vitaminas e coenzimas serão apresentadas ao longo do estudo do metabolismo, à medida que forem sendo descritas as reações das quais participam.

**Tabela 5.13 Grupos transportados por coenzimas e vitaminas presentes em suas moléculas.**

Coenzima	Grupo transportado	Vitamina
Adenosina trifosfato (ATP)	Fosfato	—
Tiamina pirofosfato (TPP)	Aldeído	Tiamina (B <sub>1</sub> )
Flavina adenina dinucleotídeo (FAD)	Hidrogênio	Riboflavina (B <sub>2</sub> )
Nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD <sup>±</sup> )	Hidreto	Nicotinamida (B <sub>3</sub> )
Coenzima A	Acila	Ácido pantotênico (B <sub>5</sub> )
Piridoxal-fosfato	Amino	Piridoxina (B <sub>6</sub> )
Biotina	CO <sub>2</sub>	Biotina (B <sub>7</sub> )
Tetraidrofolato	Carbono	Ácido fólico (B <sub>9</sub> )
Metilcobalamina	Metil	Cobalamina (B <sub>12</sub> )

## Bibliografia

### Término leitura básica, parte 1 enzimas

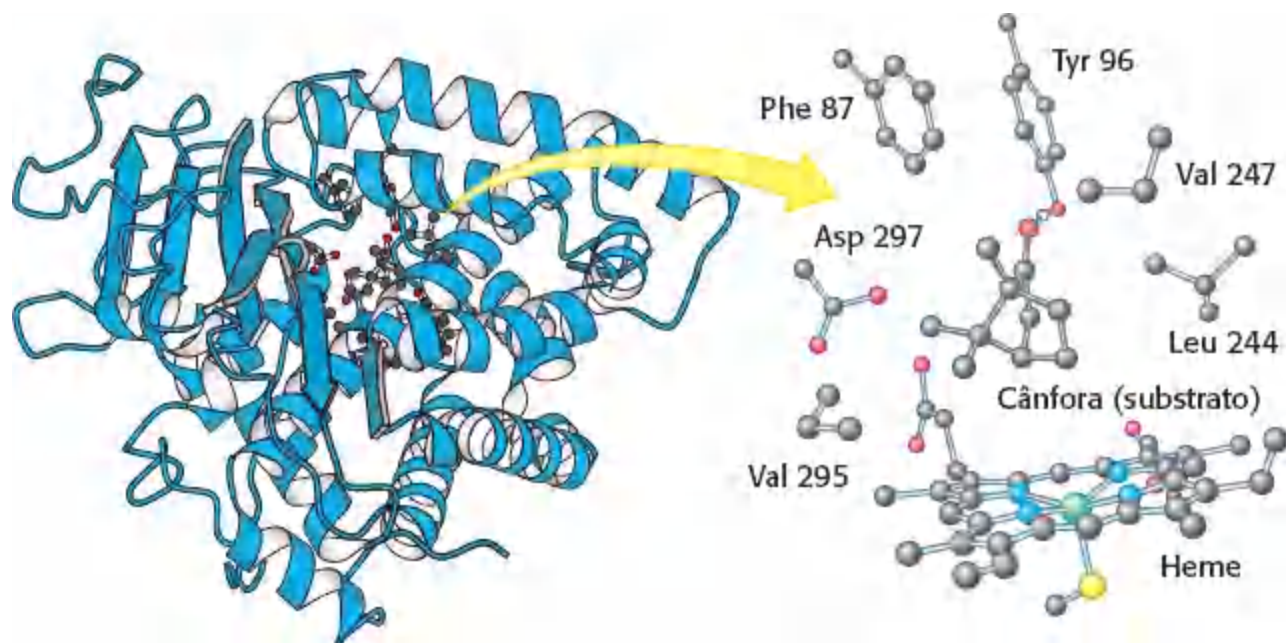
- Bruice TC, Benkovic SJ: Chemical basis for enzyme catalysis. *Biochemistry* **39**: 6267-6274, 2000.
- Burtis CA, Ashwood ER (editors): *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*, 5th ed. W.B. Saunders Company, 2001.
- Chandrasekar J, Silverman SK: Catalytic DNA with phosphatase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110** (14): 5315-5320, 2013.
- Cornish-Bowden A: *Fundamentals of Enzyme Kinetics*, 3rd ed. Portland Press, 2004.
- Cornish-Bowden A, Cardenas ML: Metabolic analysis in drug design. *C R Biol* **326** (5): 509-515, 2003.
- Deichmann U, Schuster S, Mazat JP, Chornish-Bowden A: Commemorating the 1913 Michaelis-Menten paper Die Kinetik der Invertinwirkung: three perspectives. *FEBSJ* **281** (2):435-463, 2014.
- DeRose VJ: Two decades of RNA catalysis. *Chem Biol* **9** (9): 961-969, 2002.
- Eisenthal R, Danson M (editors): *Enzyme Assays: A Practical Approach*, 2nd ed. Oxford University Press, 2002.

- Eisenthal R *et al.*: Catalytic efficiency and  $k_{cat}/K_M$ : a useful comparator? *Trends Biotechnol* **25** (6): 247-249, 2007.
- Frauenfelder H: What determines the speed limit on enzyme catalysis? *Nat Chem Biol* **4** (1): 21-22, 2008.
- Harman JG *et al.* (editors): *Goodman & Gilman's The Pharmacologic Basis of Therapeutics*, 9th ed. McGraw-Hill, 2000.
- Marangoni AG: *Enzyme Kinetics. A Modern Approach*. Wiley-Interscience, 2002.
- Michaelis L, Menten ML: Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochem Z (Biochemische Zeitschrift)* **49**: 333-369, 1913.
- Michaelis L, Menten ML, Johnson KA, Goody RS: The original Michaelis constant: translation of the 1913 Michaelis-Menten paper. *Biochemistry* **50** (39):8264-8269, 2011.

especificidade de ligação.

Quais são as evidências para a existência de um complexo enzima-substrato?

1. A primeira pista foi a observação de que, em uma concentração constante de enzima, a velocidade da reação aumenta com a concentração crescente de substrato até alcançar uma velocidade máxima (Figura 8.4). Em contrapartida, as reações não catalisadas não exibem esse efeito de saturação. *O fato de que uma reação catalisada por enzima tenha uma velocidade máxima sugere a formação de um complexo ES distinto.* Em uma concentração de substrato suficientemente alta, todos os sítios catalíticos são ocupados ou saturados, de modo que a velocidade da reação não pode aumentar. Apesar de indireta, a capacidade de saturar uma enzima com substrato constitui a evidência mais geral da existência de complexos ES.



**Figura 8.5 Estrutura de um complexo enzima-substrato.** À esquerda, a enzima citocromo P450 é ilustrada ligada a seu substrato, a cânfora. À direita, observe que, no sítio ativo, o substrato é circundado por resíduos da enzima. Observe também a presença de um cofator heme. [Desenhada a partir de 2CPP. pdb.]

2. A *cristalografia de raios X* tem fornecido imagens de alta resolução de substratos e análogos de substratos ligados aos sítios ativos de muitas enzimas (Figura 8.5). No Capítulo 9, iremos analisar mais detalhadamente vários desses complexos.

3. As *características espectroscópicas* de muitas enzimas e substratos mudam com a formação de um complexo ES. Essas mudanças são particularmente notáveis quando a enzima contém um grupo prostético colorido (ver Questão 31).

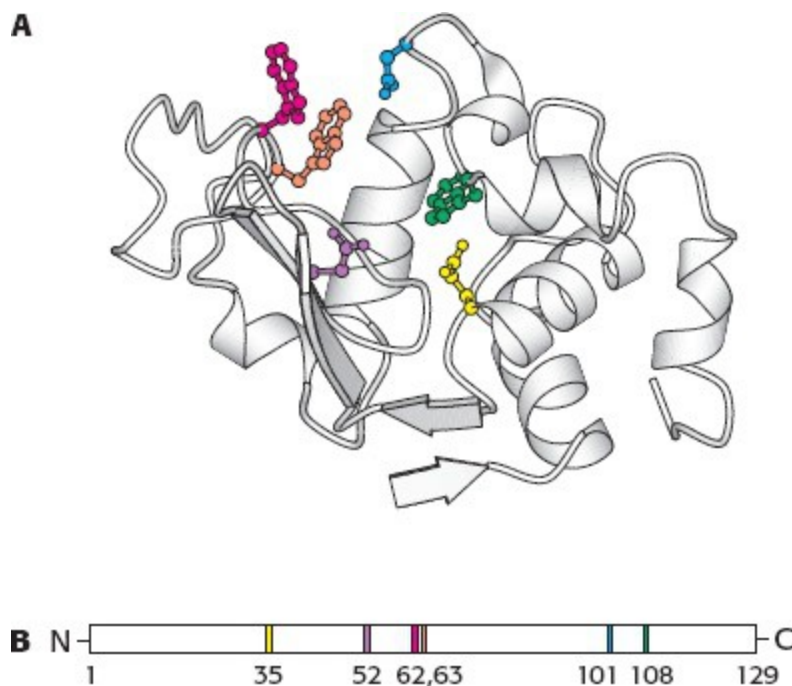
Início leitura básica, parte 1 enzimas

## Os sítios ativos das enzimas apresentam algumas características em comum

O *sítio ativo* de uma enzima é a região que se liga aos substratos (e ao cofator, se houver algum). Além disso, contém os resíduos que participam diretamente na produção e na quebra de ligações. Esses resíduos são denominados *grupos catalíticos*. Em essência, *a interação da enzima com o substrato no sítio ativo promove a formação do estado de transição*. O sítio ativo é a região da enzima que diminui mais diretamente  $\Delta G^\ddagger$  da reação, proporcionando, assim, o aumento de

velocidade característico da ação da enzima. Apesar de as enzimas diferirem amplamente na sua estrutura, especificidade e modo de catálise, podem ser feitas várias generalizações no que concerne a seus sítios ativos:

1. *O sítio ativo é uma fenda ou cavidade tridimensional* formada por grupos que provêm de diferentes partes da sequência de aminoácidos: na verdade, resíduos bem distantes na sequência de aminoácidos podem interagir mais fortemente do que os resíduos adjacentes na sequência, que podem ser estericamente impedidos de interagir uns com os outros. Na lisozima, uma enzima que degrada as paredes celulares de algumas bactérias, os grupos importantes no sítio ativo são proporcionados pelos resíduos 35, 52, 62, 63, 101 e 108 da sequência de 129 aminoácidos (Figura 8.6).

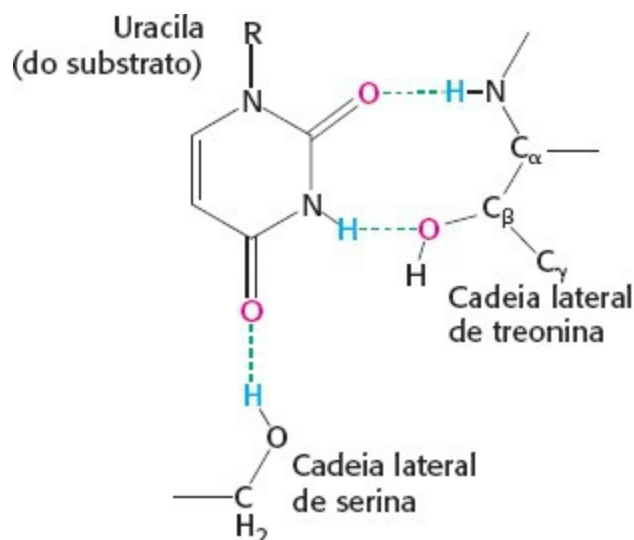


**Figura 8.6 Os sítios ativos podem incluir resíduos distantes.** **A.** Diagrama em fitas da enzima lisozima, com vários componentes do sítio ativo mostrados em cores. **B.** Representação esquemática da estrutura primária da lisozima, mostrando que o sítio ativo é composto de resíduos que provêm de diferentes partes da cadeia polipeptídica. [Desenhada a partir de 6LYZ.pdb.]

2. *O sítio ativo ocupa uma pequena parte do volume total de uma enzima.* A maioria dos resíduos de aminoácidos de uma enzima não está em contato com o substrato, o que levanta a questão desafiadora de porque as enzimas são tão grandes. Quase todas as enzimas são constituídas de mais de 100 resíduos de aminoácidos, o que lhes confere uma massa acima de 10 kDa e um diâmetro de mais de 25 Å. Os aminoácidos “extras” servem de andaime para criar o sítio ativo tridimensional. Em muitas proteínas, os aminoácidos remanescentes também constituem sítios regulatórios, sítios de interação com outras proteínas ou canais para trazer os substratos até os sítios ativos.

3. *Os sítios ativos são microambientes singulares.* Em todas as enzimas de estrutura conhecida, os sítios ativos têm uma forma semelhante a uma fenda ou cavidade, à qual os substratos se ligam. A água é habitualmente excluída, a não ser que ela seja um reagente. O microambiente apolar da fenda aumenta a ligação dos substratos, bem como a catálise. Todavia, a fenda também pode conter resíduos polares. No microambiente apolar do sítio ativo, alguns desses resíduos polares adquirem propriedades especiais, que são essenciais para a ligação do substrato ou a catálise. As posições

internas desses resíduos polares constituem exceções biologicamente cruciais à regra geral de que os resíduos polares são expostos à água.

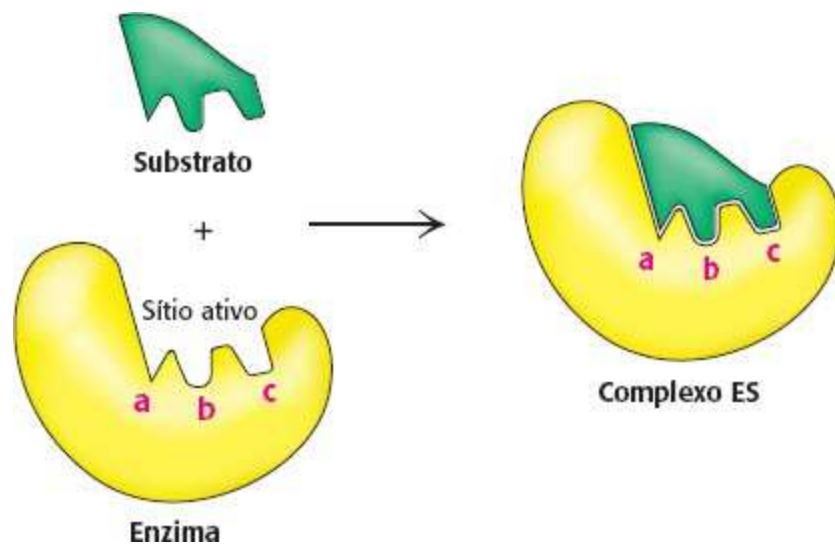


**Figura 8.7 Pontes de hidrogênio entre uma enzima e o seu substrato.** A enzima ribonuclease forma pontes de hidrogênio com o componente uridina do substrato. [Segundo F. M. Richards, H. W. Wyckoff and N. Allewell. In: *The Neurosciences: Second Study Programa*, F. O. Schmidt, Ed. (Rockefeller University Press, 1970), p. 970.]

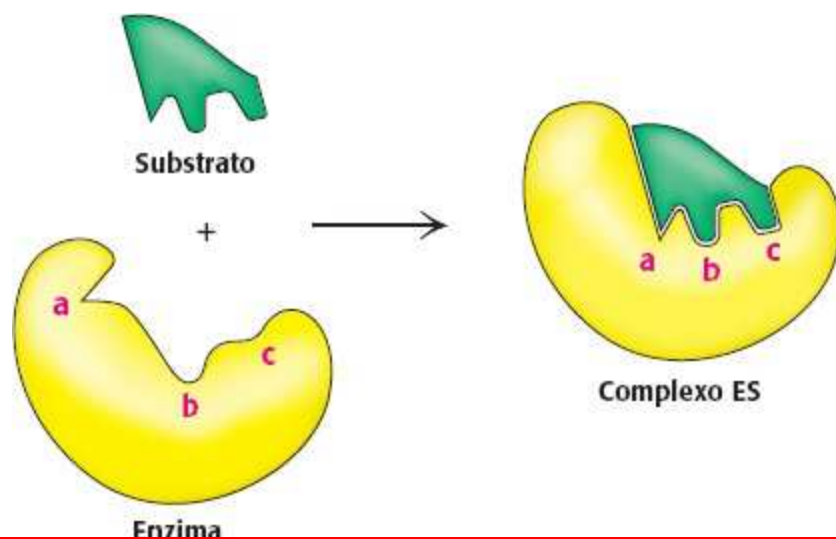
4. *Os substratos estão ligados às enzimas por múltiplas atrações fracas.* As interações não covalentes nos complexos ES são muito mais fracas do que as ligações covalentes, que apresentam energias entre  $-210$  e  $-460$   $\text{kJ mol}^{-1}$  (entre  $-50$  e  $-110$   $\text{kcal mol}^{-1}$ ). Em contrapartida, os complexos ES têm habitualmente constantes de equilíbrio que variam de  $10^{-2}$  a  $10^{-8}$  M, correspondendo a energias livres de interação, que variam de cerca de  $-13$  a  $-50$   $\text{kJ mol}^{-1}$  (de  $-3$  a  $-12$   $\text{kcal mol}^{-1}$ ). Conforme discutido na Seção 1.3, essas interações reversíveis fracas são mediadas por interações eletrostáticas, pontes de hidrogênio e forças de van der Waals. As forças de van der Waals só se tornam significativas na ligação quando numerosos átomos do substrato aproximam-se simultaneamente de muitos átomos da enzima através do efeito hidrofóbico. Por conseguinte, a enzima e o substrato devem ter formas complementares. O caráter direcional das pontes de hidrogênio entre a enzima e o substrato frequentemente reforça um alto grau de especificidade, conforme observado na ribonuclease, a enzima que degrada o RNA (Figura 8.7).

5. *A especificidade de ligação depende do arranjo precisamente definido de átomos no sítio ativo.* Como a enzima e o substrato interagem por meio de forças de curta amplitude, que necessitam de um contato estreito, é necessário que o substrato tenha um formato correspondente à enzima para se adaptar ao local de interação com a enzima. Emil Fischer propôs a analogia da chave e fechadura em 1890 (Figura 8.8), que constituiu o modelo para a interação enzima-substrato durante várias décadas. Todavia, hoje em dia, sabemos que as enzimas são flexíveis, e que as formas dos sítios ativos podem ser acentuadamente modificadas pela ligação do substrato, como foi postulado por Daniel E. Koshland, Jr., em 1958. O sítio ativo de algumas enzimas assume um formato que é complementar ao do substrato apenas *após* a ligação do substrato. Esse processo de reconhecimento dinâmico é denominado *encaixe induzido* (Figura 8.9).





**Figura 8.8 Modelo de chave e fechadura da ligação enzima-substrato.** Neste modelo, o sítio ativo da enzima não ligada tem um formato complementar ao do substrato.



**Figura 8.9 Modelo de encaixe induzido da ligação enzima-substrato.** Neste modelo, a enzima muda de formato com a ligação do substrato. O sítio ativo apresenta um formato complementar ao do substrato somente após a ligação do substrato.

Término leitura básica, parte 1 enzimas

**A energia de ligação entre a enzima e o substrato é importante para a catálise**

As enzimas reduzem a energia de ativação, porém de onde provém a energia para reduzir a energia de ativação? A energia livre é liberada pela formação de um grande número de interações fracas entre uma enzima complementar e seu substrato. A energia livre liberada na ligação é denominada *energia de ligação*. Somente o substrato correto pode participar na maioria das interações com a enzima ou em todas elas e, assim, tornar a energia de ligação máxima, explicando a notável especificidade de substrato exibida por muitas enzimas. Além disso, *o complemento completo dessas interações só é formado quando o substrato é convertido no estado de transição*. Por conseguinte, a energia de ligação máxima é liberada quando a enzima facilita a formação do estado de transição. A energia liberada pelas interações entre a enzima e o substrato pode ser considerada como uma redução da energia de ativação. Paradoxalmente, a interação mais estável (energia de ligação máxima) ocorre entre a enzima e o estado de transição, o intermediário menos estável da reação. Todavia, o estado de transição é demasiado instável para existir por muito tempo. Ele

# A DEFICIÊNCIA DA VITAMINA C E A MOLÉCULA DO COLÁGENO NO ESCORBUTO

Texto extra

## Caso clínico

Homem de 47 anos de idade foi levado ao hospital de emergências apresentando o início de um quadro de confusão mental, letargia, fraqueza e anorexia. Tinha ainda sinais de hemorragias subcutâneas nas pernas e nas gengivas. Ultimamente (6 meses) perdera 5kg de peso corporal. Um exame de sangue revelou grau acentuado de anemia (concentração de hemoglobina de 6g/dL, valores normais entre 14 e 16). Ao microscópio, as hemácias estavam de tamanho e cor normais. Os demais componentes sanguíneos, como eletrólitos, cálcio, magnésio, amônia, ácido fólico, vitamina B<sub>12</sub>, glicose, plaquetas e enzimas usualmente afetadas nos distúrbios das funções hepáticas e renais, estavam todos com valores dentro da normalidade. Não havia sangue oculto nas fezes. Começou então o tratamento da anemia com transfusão de hemácias, enquanto se investigava a causa da doença.

Uma nutricionista foi chamada para avaliar os hábitos alimentares do paciente que eram regulares e até monótonos: café da manhã, almoço (sanduíche de presunto, queijo, salada, ovo e um copo de leite) e jantar (alimentos congelados, geralmente lasanha e um pedaço de carne). Não ingeria suplementos vitamínicos e sua alimentação foi considerada pobre em frutas e vegetais frescos. Bebia ainda grande quantidade de cerveja (cerca de 8 a 10 latas por dia). Foi-lhe prescrita complementação de vitaminas e colhida biópsia de pele da perna que revelou um quadro compatível com o da deficiência de vitamina C. A dosagem dessa vitamina no sangue confirmou o diagnóstico ao detectar uma concentração de 10µmol/L; valores normais entre 45 e 90. Caso clínico adaptado de Leger, 2008.

## Fundamentação bioquímica

Atualmente, casos clínicos de deficiências vitamínicas, como o acima descrito, são muito raros. Eles deixaram de ser uma questão de saúde pública a partir da década de 1950 quando os bioquímicos terminaram por esclarecer as funções metabólicas das vitaminas e elas foram de uma forma ou outra incorporadas na alimentação. Recentemente, entretanto, estão surgindo relatos de casos de escorbuto pontuais entre os sem-tetos de Paris (Khonsari et al., 2005) na população de jovens universitários americanos (Johnston et al., 1998) e, nesse caso clínico, descrito por um médico de família canadense (Leger, 2008). Todos eles demonstrando que essas doenças não desapareceram e basta um descuido para que elas surjam com toda sua exuberância clínica.

## Aspectos históricos

Embora conhecida já antes de Cristo, o escorbuto teve seu pico de incidência nos séculos XVI e XVII, durante a realização das grandes expedições marítimas, quando os marinheiros ficavam expostos durante muito tempo a uma dieta artificial. É conhecido o relato de Vasco da Gama que perdeu dois terços da sua tripulação durante sua primeira viagem à Índia. Acredita-se que nesses dois séculos a doença tenha matado mais de 2 milhões de marinheiros. A causa – uma deficiência nutricional – apenas foi estabelecida em 1747, quando James Lind, médico da marinha inglesa, realizou o primeiro ensaio clínico que se tem notícia na história da Medicina. Em uma das suas viagens, dividiu 12 dos seus marinheiros acometidos com escorbuto em 6 grupos de 2. Todos receberam a mesma ração básica dos demais tripulantes, mas cada um dos grupos ganhava uma complementação nutricional especial contendo uma das carências então acreditadas como causadora da doença. Apenas o grupo que recebeu uma cota de lima e limões frescos se curou. Essa conclusão terapêutica foi publicada em forma de livro em 1753, mas só foi aceita oficialmente 40 anos mais tarde pela marinha inglesa (Baron, 2009).

## Isolamento e caracterização do ácido ascórbico

Em 1928, o bioquímico húngaro Szent-Gyorgi isolou da adrenal um composto que mais tarde seria conhecido como ácido ascórbico. Ele existia em quantidades muito pequenas nesse órgão e só posteriormente, quando se descobriu que a páprica (uma espécie de pimenta, de origem húngara) tinha grandes quantidades

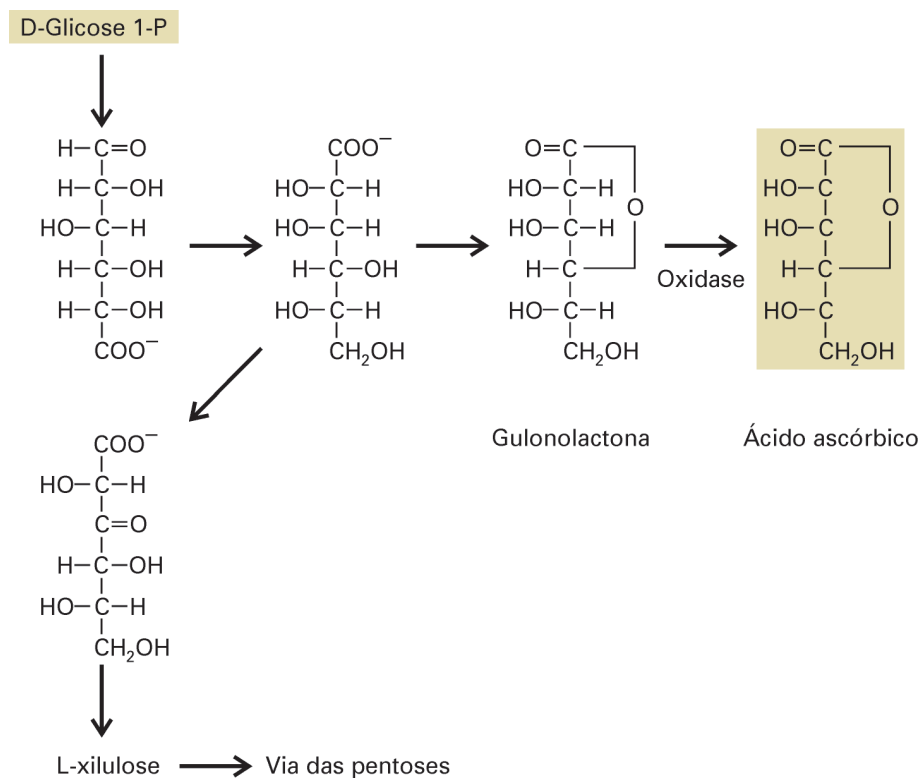
## ESCORBUTO

do composto (Svirbelg e Szent-Gyorgi, 1932), é que foi possível determinar sua estrutura química (Haworth, 1937). Szent-Gyorgi e Haworth receberam (em 1937) por esses trabalhos pioneiros na identificação do ácido ascórbico os Prêmios Nobel de Medicina e Química, respectivamente.

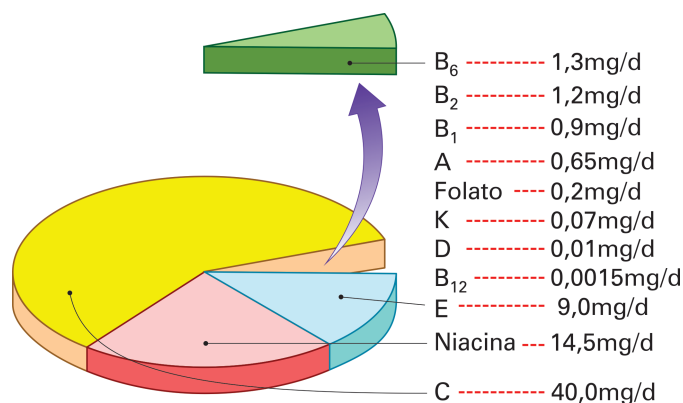
Na grande maioria dos animais e vegetais, o **ácido ascórbico** é produzido a partir da glicose, durante a via de oxidação do **ácido glicurônico** (Fig. 3.1).

Nos primatas (o homem entre eles) e na cobaia houve uma mutação na enzima *gulonolactona oxidase* que, ao ser inativada, deixa de sintetizar o ácido ascórbico. Nesses organismos, essa substância passa a ser considerada uma vitamina (a **vitamina C**) que, necessariamente, tem de ser ingerida diariamente com a dieta (Linster e Schaftingen, 2007).

Ao contrário de outras vitaminas, que são necessárias em pequenas quantidades, a vitamina C é requerida em quantidades uma ou duas ordens de grandeza superior às demais (Fig. 3.2, retirada de Gaw et al., 2008).



**Figura 3.1.** Via da biossíntese da vitamina C.



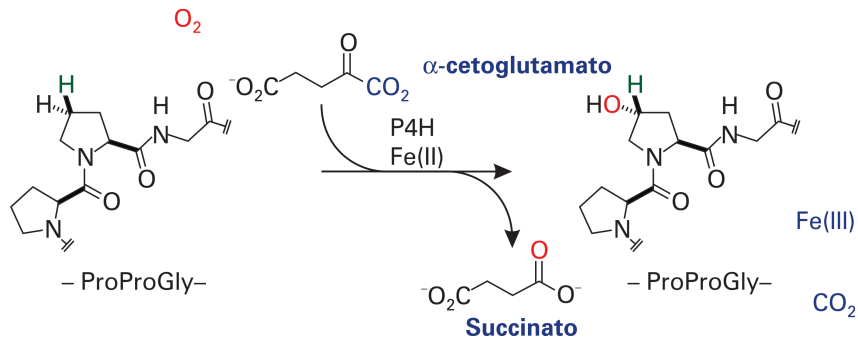
**Figura 3.2.** Requerimento diário médio de vitaminas para um adulto.

A principal reação onde a vitamina C participa é a catalisada pela *prolina hidroxilase* que oxida a prolina em **5'-hidroxiprolina** (Fig. 3.3) (Shoulders e Raines, 2009).

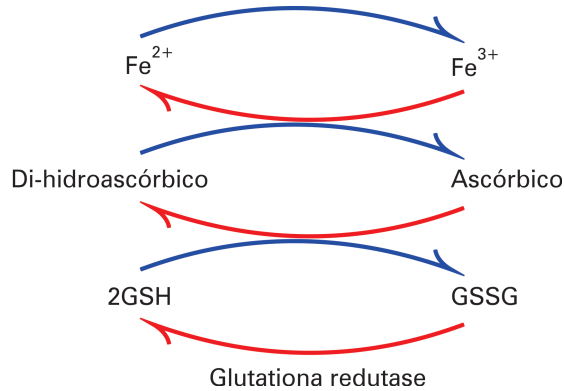
Nessa reação, as prolinas presentes nas moléculas precursoras dos colágenos são oxidadas pelo O<sub>2</sub>, ao mesmo tempo que uma molécula de **α-cetoglutarato** é oxidada a **succinato**. Nesse processo, o Fe<sup>2+</sup> da enzima é oxidado a Fe<sup>3+</sup>, que inibe fortemente a enzima e tem de ser removido pela oxidação do **ácido ascórbico** em **di-hidroascórbico** (Fig. 3.4). Finalmente, esse é regenerado através da *glutathiona redutase*.

Outras hidroxilases catalisam a transformação de algumas prolinas em **3'-hidroxiprolinas** e lisinas em **hidroxilisinias**. Em todas essas reações, a vitamina C é necessária para se evitar o escorbuto (ver estrutura do colágeno a seguir).

Existem ainda outras hidroxilases (não relacionadas com o escorbuto e que não serão aqui mencionadas) que também utilizam a vitamina C como agente antioxidante. Além disso, ela (como o selênio, a vitamina E e a glutathiona) retira elétrons adicionais das espécies reativas do oxigênio (superóxido, hidroxila, peridroxila e água oxigenada), protegendo o organismo dos seus efeitos deletérios, que poderão levar a várias doenças crônicas, entre elas a **aterosclerose**, vários tipos de **cânceres** e **doenças autoimunes** (Mandl et al., 2009). Talvez essa seja a razão para explicar as altas concentrações de ácido ascórbico encontradas nos vegetais e outros animais e também para justificar a recomendação da ingestão de grandes quantidades de vitamina C no homem. Se fosse apenas para desinibir a *prolina hidroxilase* pela ação colateral do Fe<sup>3+</sup>, quantidades menores da vitamina já seriam suficientes.



**Figura 3.3.** Reação catalisada pela *prolina hidroxilase*.



**Figura 3.4.** Regeneração do ácido ascórbico.

## O colágeno é a proteína mais abundante do reino animal

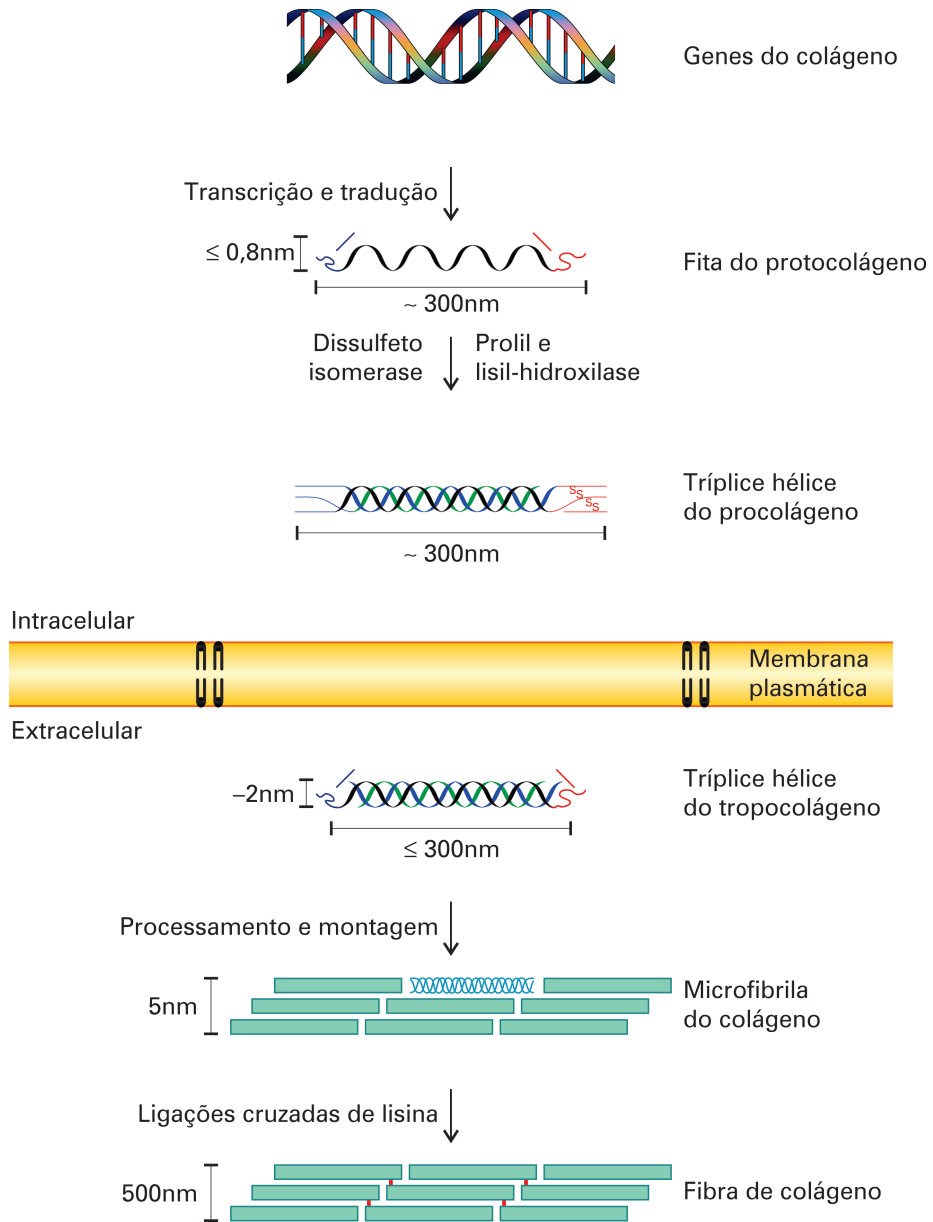
A maior parte das células do nosso organismo é banhada por uma **matriz extracelular** que tem importância capital na formação dos órgãos e seu funcionamento adequado. Além dos componentes específicos dos diversos órgãos (fibronectinas, lamininas e proteoglicanas), a matriz extracelular (também conhecida como tecido conjuntivo) é formada basicamente por três proteínas estruturais: o **colágeno**, a **elastina** e a **fibrilina**, em proporções distintas em cada tecido. Delas, a mais importante do ponto de vista médico é o colágeno (Shoulders e Raines, 2009).

Quase 30% de todas as proteínas do reino animal são constituídas por um dos 29 tipos de colágenos encontrados nos vertebrados (no total são cerca de pelo menos 30 cadeias polipeptídicas diferentes, cada uma delas codificada por um gene específico). Deles os mais importantes para a estrutura da pele, osso e cartilagens são os colágenos dos tipos I e II, respectivamente. Eles são proteínas fibrosas, constituídas por uma cadeia polipeptídica com cerca de 1.000 aminoácidos (na molécula madura). Três destas cadeias formam uma estrutura de hélice tripla, enoveladas entre si. Esta estrutura apresenta em cada uma das suas cadeias polipeptídicas um motivo especial contendo a sequência de aminoácidos GLY–X–Y, que se repete cerca de 300 vezes na molécula. Ou seja, o primeiro aminoácido de cada três é sempre constituído pela glicina; X e Y poderão ser outros aminoácidos. Entretanto, cerca de 100 dos aminoácidos encontrados em X são prolinas, e 100 dos Y, hidroxiprolinas. Essa estrutura determina a formação de um bastão molecular com 1,4nm de diâmetro e 300nm de comprimento. Esse bastão é considerado mais resistente à tração do que um fio de aço de mesmo diâmetro. Mas isso apenas se as prolinas forem finalmente oxidadas em hidroxiprolinas na posição Y do motivo molecular, o que permitirá a formação de pontes de hidrogênio adicionais e mais estáveis entre as três cadeias polipeptídicas (Kivirikko e Prockop, 1995; Beyers, 2001).

Dentro da célula, a molécula do colágeno é inicialmente sintetizada nos ribossomos numa forma precursora de peso molecular maior, o **protocolágeno**. Esse é encaminhado ao retículo endoplasmático, onde sua sequência sinalizadora é clivada e o restante da molécula adentra a organela. Nessa forma, de **procolágeno**, ela continua seu processamento pós-tradução com a hidroxilação das prolinas e hidroxilisinas, sendo depois secretada para o espaço extracelular, onde receberá o processamento proteolítico final nas suas extremidades (amino e carboxila terminais) para formar o **tropocolágeno** (Fig. 3.5).

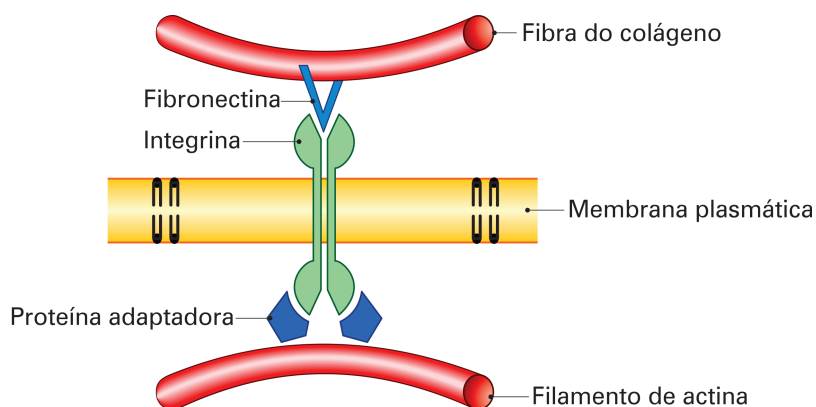
No espaço extracelular, o tropocolágeno sofre uma montagem molecular contendo inúmeras hélices triplas escalonadas (uma **microfibrila**). Finalmente, através de ligações cruzadas entre a lisina com a hidroxilisina de microfibrilas diferentes formam as desmosinas e isodesmosinas, que aumentam em muito a resistência à tração da nova fibra, as **fibras do colágeno**.

As fibras de colágeno exercem seu papel de sustentação do tecido conjuntivo ligando-se à superfície celular através da mediação da **fibronectina**. Essa molécula, por um lado, associa-se com o colágeno e, por outro, com as **integrinas** da membrana plasmática e, em consequência, com o sistema do citoesqueleto de actina (Fig. 3.6).



**Figura 3.5.** Síntese das fibras de colágeno.





**Figura 3.6.** A ligação da matriz extracelular (colágeno e fibronectina) com o citoesqueleto das células animais.

## Patogenia das lesões

A maior parte dos sintomas e sinais apresentados no escorbuto pode ser totalmente explicada pela inadequada formação da molécula do colágeno na ausência da vitamina C. Sem a formação da hidroxiprolina e da hidroxilisina tanto a hélice tripla quanto as ligações cruzadas ficam prejudicadas, tornando a fibra do colágeno muito instável para a perfeita sustentabilidade dos tecidos. Dessa forma, os vasos sanguíneos são facilmente rompidos provocando hemorragias (tanto nas extremidades dos membros quanto nas gengivas), surgem edemas nos ossos e articulações que levam à dor e à baixa cicatrização de feridas. Essas hemorragias podem levar ao aparecimento da anemia, eventualmente agravada pela deficiência de outras vitaminas (ácido fólico) geralmente associadas com a deficiência da vitamina C. Uma associação frequentemente mencionada na literatura entre o alcoolismo e o escorbuto continua desafiando uma explicação em nível molecular. O que se sabe com certeza é que o álcool aumenta a excreção renal de vitamina C, o que deve acelerar o aparecimento da doença.

Finalmente, deve-se esclarecer que as lesões do colágeno descritas neste capítulo diferem daquelas de natureza genética descritas no **Quadro 3.1**, em que o defeito molecular está localizado em mutações puntiformes nos genes das cadeias polipeptídicas dos vários tipos de colágeno.

**Quadro 3.1. Doenças causadas por mutações em genes do colágeno.**

Gene	Doença
Colágeno tipo I	Osteogênese imperfeita
Colágeno tipo II	Condrodisplasias
Colágeno tipo II	Síndrome Ehlers-Danlos IV
Colágeno tipo VII	Epidermólise bolhosa
Colágeno tipo X	Condrodisplasia de Schmid

## Tratamento

O tratamento básico do escorbuto é a **suplementação vitamínica**. Recomenda-se a ingestão de 1-2g de vitamina C nos primeiros dias do tratamento, diminuindo-se essa quantidade para 500mg/dia durante a primeira semana e depois para 100mg durante alguns meses. Os principais sintomas começam a melhorar nas primeiras 24 horas, as lesões hemorrágicas na pele e gengiva cedem em duas semanas e o quadro clínico volta à normalidade em 3 meses.

Para a prevenção da doença, recomenda-se a ingestão de frutas e vegetais frescos em vez do uso da vitamina sintética (Halliwell, 1999). Isso porque esses alimentos, além da vitamina C e de outras, possuem vários outros compostos antioxidantes e antineoplásicos que certamente cobrirão mais adequadamente eventuais deficiências nutricionais.

## Questões

- 1 Quais são as principais diferenças entre o ácido ascórbico e as demais vitaminas?
- 2 Como a molécula do colágeno garante a sustentabilidade do tecido conjuntivo?
- 3 Do ponto de vista médico no que diferem as doenças hereditárias do colágeno e o escorbuto?
- 4 Quais são as razões alegadas para se recomendar a ingestão diária de altas concentrações de vitamina C?

## Bibliografia

- Baron JH. Sailor's scurvy before and after James Lind – a reassessment. *Nutr Rev* 2009;67(6):315-332.
- Beyers PH. Disorders of collagen biosynthesis and structure. In Scriver CR, Beaudet A, Sly W (eds). *The metabolic and molecular basis of inherited diseases*. 8th ed. New York: McGraw-Hill; 2001. p. 5241.
- Gaw A, Murphy MJ, Cowan RA, O'Reilly DStJ, Stewart MJ, Shepherd J. *Clinical biochemistry*. 4th ed. Churchill-Livingstone-Elsevier; 2008. p. 102-103.
- Halliwell B. Vitamin C: poison, prophylactic or panacea? *Trends Bioch Sci* 1999;24:255-259.
- Haworth WN. The structure of carbohydrates and of vitamin C. Nobel Lecture; 1937.
- Johnston CS, Solomon E, Corte C. Vitamin C status of a campus population: college students get a C minus. *J Am College Health* 1998;46(5):209-213.
- Khonsari H, Grandiere-Perez L, Caumes E. Le scorbut n'a pas disparu: histoire d'une maladie réémergente. *Rev Med Int* 2005;26(11):885-890.
- Kivirikko KI, Prockop DJ. Collagens: molecular biology, diseases and potentials for therapy. *Annu Rev Biochem* 1995;64:403-443.
- Leger D. Scurvy: reemergence of nutritional deficiencies. *Can Fam Physician* 2008;54:1403-1406.
- Linster CL, Schaftingen EV. Vitamin C: biosynthesis, recycling and degradation in mammals. *FEBS J* 2007;274:1-22.
- Mandl J, Szarka A, Bánhegyi G. Vitamin C: update on physiology and pharmacology. *Br J Pharmacol* 2009;157:1097-1100.
- MedlinePlus scurvy. Disponível em <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/000355.htm>
- Shoulders MD, Raines RT. Collagen structure and stability. *Annu Rev Biochem* 2009;78:929-958.
- Svirbelg JL, Szent-Gyorgi A. The chemical nature of vitamin C. *Biochem J* 1932;26(3):865-870.