

QBQ0204 Bioquímica: Estrutura de Biomoléculas e Metabolismo

Guia de estudos

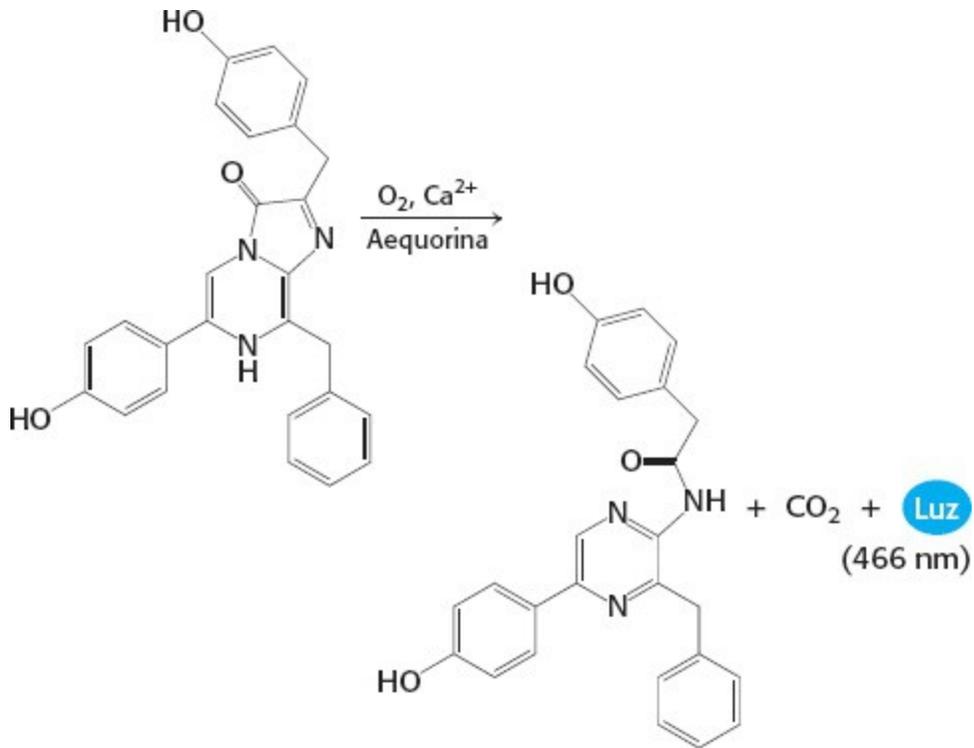
Aula 5: Enzimas, parte 1

Nesta aula serão introduzidos conceitos gerais sobre enzimas e as estratégias usadas para catálise do ponto de vista energético. Neste momento é importante que comece a leitura dos fundamentos físicos que se encontram a partir da página 34 do guia de estudos da **aula 2**. Se conseguir ler o texto inteiro de fundamentos físicos é melhor. Mas caso não consiga, foque-se nos itens abaixo, pois eles ajudam no entendimento da aula de hoje.

K_{eq} e ΔG° são medidas da tendência das reações ocorrerem espontaneamente

As enzimas promovem sequências de reações químicas

Atente-se para o fato de que há duas leituras básicas no guia de estudos da aula de hoje, sendo a segunda uma breve introdução geral às enzimas.



A atividade de uma enzima é responsável pelo brilho da água-viva luminescente, à esquerda. A enzima aequorina catalisa a oxidação de um composto pelo oxigênio na presença de cálcio, liberando CO_2 e luz. [À esquerda, Lesya

- 8.1** As enzimas são catalisadores poderosos e altamente específicos
- 8.2** A energia livre é uma função termodinâmica útil para o entendimento das enzimas
- 8.3** As enzimas aceleram reações, facilitando a formação do estado de transição
- 8.4** A equação de Michaelis-Menten descreve as propriedades cinéticas de muitas enzimas
- 8.5** As enzimas podem ser inibidas por moléculas específicas
- 8.6** As enzimas podem ser estudadas uma molécula de cada vez

As enzimas, que são os catalisadores dos sistemas biológicos, atuam como notáveis dispositivos moleculares, que determinam os padrões das transformações químicas. Elas também medeiam a transformação de uma forma de energia em outra. Cerca de 25% dos genes do genoma humano codificam enzimas, o que testemunha a sua importância para a vida. As características mais notáveis das enzimas consistem em seu *poder catalítico* e sua *especificidade*. A catálise ocorre em determinado local da enzima, denominado *sítio ativo*.

Quase todas as enzimas conhecidas são proteínas. Entretanto, as proteínas não têm o monopólio absoluto da catálise; a descoberta de moléculas de RNA cataliticamente ativas fornece evidências convincentes de que o RNA era um biocatalisador no início da evolução. As proteínas, como classe de macromoléculas, são catalisadores altamente efetivos para uma grande diversidade de reações químicas, em virtude de sua capacidade de *ligar-se especificamente a uma variedade muito ampla de moléculas*. Ao utilizar o repertório completo de forças intermoleculares, as enzimas aproximam os substratos em uma orientação ideal, que constitui o prelúdio para a formação e a quebra de ligações químicas. Elas catalisam reações *ao estabilizar os estados de transição*, as formas químicas de maior nível de energia nas vias das reações. Ao estabilizar seletivamente um estado de transição, uma enzima determina qual das várias reações químicas potenciais deve realmente ocorrer.

Tabela 8.1 Aumento da velocidade por enzimas selecionadas.

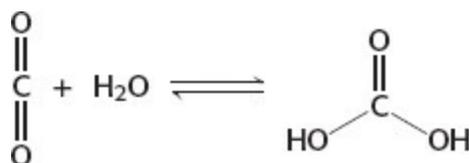
Enzima	Meia-vida não enzimática	Velocidade não catalisada (k_{un} s ⁻¹)	Velocidade catalisada (k_{cat} s ⁻¹)	Aumento da velocidade (k_{cat} s ⁻¹ / k_{un} s ⁻¹)
OMP descarboxilase	78.000.000 anos	$2,8 \times 10^{-16}$	39	$1,4 \times 10^{17}$
Nuclease estafilocócica	130.000 anos	$1,7 \times 10^{-13}$	95	$5,6 \times 10^{14}$
AMP nucleosidase	69.000 anos	$1,0 \times 10^{-11}$	60	$6,0 \times 10^{12}$
Carboxipeptidase A	7,3 anos	$3,0 \times 10^{-9}$	578	$1,9 \times 10^{11}$
Cetosteroide isomerase	7 semanas	$1,7 \times 10^{-7}$	66.000	$3,9 \times 10^{11}$
Triose fosfato isomerase	1,9 dia	$4,3 \times 10^{-6}$	4.300	$1,0 \times 10^9$
Corismato mutase	7,4 h	$2,6 \times 10^{-5}$	50	$1,9 \times 10^6$

Abreviaturas: OMP, orotidina monofosfato; AMP, adenosina monofosfato.

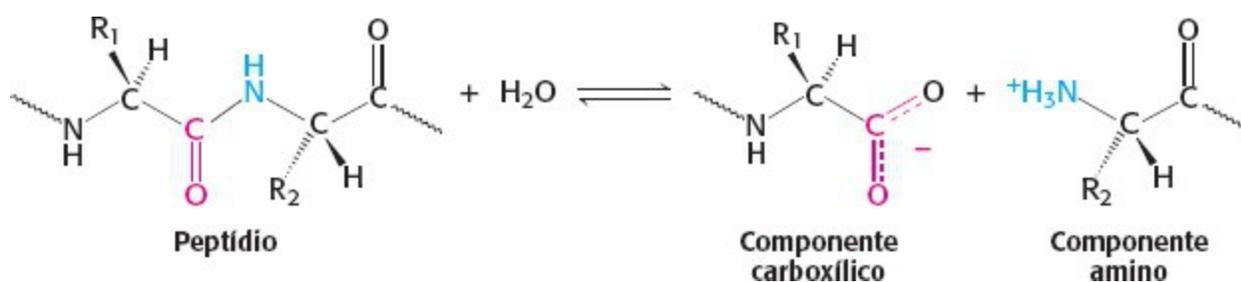
Fonte: A. Radzicka e R. Wolfenden. *Science* 267:90-93, 1995.

8.1 As enzimas são catalisadores poderosos e altamente específicos

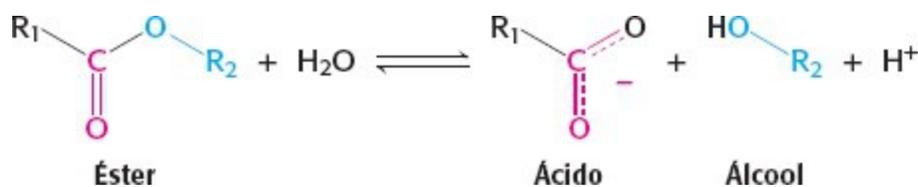
As *enzimas* aceleram as reações por fatores de até um milhão de vezes ou mais (Tabela 8.1). Com efeito, a maioria das reações nos sistemas biológicos não ocorre em velocidades perceptíveis na ausência de enzimas. Mesmo uma reação tão simples quanto a hidratação do dióxido de carbono é catalisada por uma enzima – isto é, a anidrase carbônica (Seção 9.2). A transferência de CO_2 dos tecidos para o sangue e, em seguida, para o ar nos alvéolos dos pulmões seria menos completa na ausência dessa enzima. De fato, a anidrase carbônica é uma das enzimas mais rápidas conhecidas. Cada molécula da enzima pode hidratar 10^6 moléculas de CO_2 *por segundo*. Essa reação catalisada é 10^7 vezes mais rápida do que a não catalisada. O mecanismo de catálise da anidrase carbônica será considerado no Capítulo 9.



As enzimas são altamente específicas tanto nas reações que catalisam quanto na sua escolha dos reagentes, que são denominados *substratos*. Uma enzima catalisa habitualmente uma única reação química ou um conjunto de reações estreitamente relacionadas. Consideraremos as *enzimas proteolíticas* como exemplo. *In vivo*, essas enzimas catalisam a *proteólise*, isto é, a hidrólise de uma ligação peptídica.



A maioria das enzimas proteolíticas também catalisa uma reação diferente, porém relacionada, *in vitro* – a saber, a hidrólise de uma ligação éster. Essas reações são mais facilmente monitoradas do que a proteólise e são úteis na investigação experimental dessas enzimas.



As enzimas proteolíticas diferem acentuadamente no seu grau de especificidade de substrato. A

papaína, que é encontrada no mamão, é pouco discriminativa: ela cliva qualquer ligação peptídica sem considerar praticamente a identidade das cadeias laterais adjacentes. Essa falta de especificidade responde pelo seu uso em molhos para amaciar a carne. Por outro lado, a tripsina, uma enzima digestiva, é muito específica e catalisa a clivagem de ligações peptídicas apenas no lado carboxílico dos resíduos de lisina e arginina (Figura 8.1A). A trombina, uma enzima que participa na coagulação do sangue, é ainda mais específica do que a tripsina. Ela catalisa apenas a hidrólise de ligações Arg-Gly em determinadas sequências peptídicas (Figura 8.1B).

A DNA polimerase I, uma enzima dirigida pelo molde (Seção 28.3), é outro catalisador altamente específico. Na fita de DNA em processo de síntese, a DNA polimerase adiciona nucleotídios em uma sequência determinada pela sequência dos nucleotídios em outra fita de DNA que serve como molde. A DNA polimerase I é notavelmente precisa na execução das instruções fornecidas pelo molde. Ela insere um nucleotídio errado em uma nova fita de DNA menos de uma em mil vezes. *A especificidade de uma enzima deve-se à interação precisa do substrato com a enzima. Essa precisão é o resultado da complexa estrutura tridimensional da proteína enzimática.*

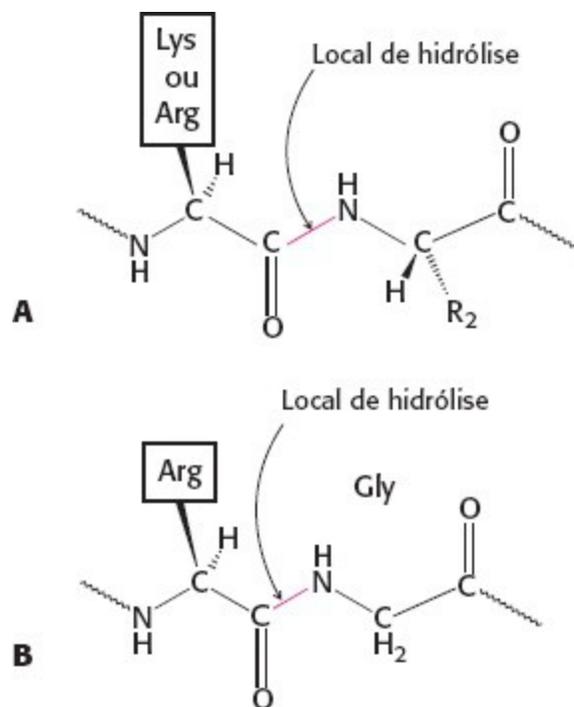


Figura 8.1 Especificidade enzimática. **A** A tripsina efetua a clivagem no lado carboxílico dos resíduos de arginina e lisina, enquanto **(B)** a trombina cliva ligações Arg-Gly somente em determinadas sequências.

Muitas enzimas necessitam de cofatores para a sua atividade

A atividade catalítica de muitas enzimas depende da presença de pequenas moléculas, denominadas *cofatores*, embora o seu papel exato varie com o cofator e a enzima. Em geral, esses cofatores são capazes de executar reações químicas que não podem ocorrer pelo conjunto padrão de vinte aminoácidos. Uma enzima sem o seu cofator é designada como *apoenzima*; a enzima completa e cataliticamente ativa é denominada *holoenzima*.



Os cofatores podem ser subdivididos em dois grupos: (1) metais e (2) pequenas moléculas orgânicas, denominadas *coenzimas* (Tabela 8.2). As coenzimas, que frequentemente derivam de vitaminas,

podem ligar-se à enzima firmemente ou frouxamente. As coenzimas ligadas firmemente são denominadas *grupos prostéticos*. As coenzimas associadas frouxamente são mais semelhantes a cossustratos, visto que, do mesmo modo que os substratos e produtos, elas se ligam à enzima e são liberadas dela. Entretanto, o uso da mesma coenzima por uma variedade de enzimas as diferencia dos substratos normais, assim como a sua origem nas vitaminas (Seção 15.4). As enzimas que utilizam a mesma coenzima efetuam habitualmente a catálise por mecanismos semelhantes. No Capítulo 9, examinaremos a importância dos metais para a atividade enzimática e, em todo o livro, veremos como as coenzimas e seus parceiros, as enzimas, operam em seu contexto bioquímico.

Tabela 8.2 Cofatores de enzimas.

Cofator	Enzima
Coenzima	
Tiamina pirofosfato	Piruvato desidrogenase
Flavina adenina nucleotídio	Monoamina oxidase
Nicotinamida adenina dinucleotídio	Lactato desidrogenase
Piridoxal fosfato	Glicogênio fosforilase
Coenzima A (CoA)	Acetil-CoA carboxilase
Biotina	Piruvato carboxilase
5'-desoxiadenosil cobalamina	Metilmalonil mutase
Tetra-hidrofolato	Timidilato sintase
Metal	
Zn ²⁺	Anidrase carbônica
Zn ²⁺	Carboxipeptidase
Mg ²⁺	<i>EcoRV</i>
Mg ²⁺	Hexoquinase
Ni ²⁺	Urease
Mo	Nitrato redutase
Se	Glutaciona peroxidase
Mn	Superóxido dismutase
K ⁺	Propionil-CoA carboxilase

As enzimas podem transformar a energia de uma forma para outra

Uma atividade essencial observada em todos os sistemas vivos consiste na capacidade de converter uma forma de energia em outra. Por exemplo, na fotossíntese, a energia luminosa é convertida em energia química de ligação. Na respiração celular, que ocorre nas mitocôndrias, a energia livre contida em pequenas moléculas provenientes do alimento é transformada inicialmente na energia livre de um gradiente iônico e, a seguir, em uma moeda corrente diferente – a energia livre do adenosina trifosfato. Em virtude de seu papel central na vida, não é surpreendente que as enzimas desempenhem funções vitais na transformação da energia. Como veremos adiante, as enzimas são fundamentais no processo de fotossíntese e na respiração celular. Outras enzimas podem então utilizar a energia das ligações químicas do ATP de diversas maneiras. Por exemplo, a enzima miosina converte a energia do ATP na energia mecânica da contração muscular (Capítulo 35). As bombas, nas membranas das células e das organelas, que podem ser consideradas enzimas que movem substratos, em lugar de alterá-los quimicamente, utilizam a energia do ATP para transportar moléculas e íons através da membrana (Capítulo 13). Os gradientes químicos e elétricos que resultam da distribuição desigual dessas moléculas e íons são, eles próprios, formas de energia que podem ser usadas com vários propósitos, como a transmissão de impulsos nervosos.

Os mecanismos moleculares dessas enzimas de transdução de energia estão sendo elucidados. Em capítulos posteriores, veremos como ciclos unidirecionais de etapas individuais – ligação, transformação química e liberação – levam à conversão de um tipo de energia em outro.

8.2 A energia livre é uma função termodinâmica útil para o entendimento das enzimas

As enzimas aceleram a velocidade das reações químicas, porém as propriedades da reação – se ela pode ou não ocorrer e o grau com que a enzima acelera a reação – dependem das diferenças de energia entre os reagentes e os produtos. A *energia livre* (G), que foi introduzida no Capítulo 1, é uma propriedade termodinâmica que mede a energia útil ou energia capaz de realizar um trabalho. Para compreender como as enzimas operam, precisamos considerar apenas duas propriedades termodinâmicas da reação: (1) a diferença de energia livre (ΔG) entre os produtos e os reagentes e (2) a energia necessária para iniciar a conversão dos reagentes em produtos. A primeira determina se a reação irá ocorrer de modo espontâneo, enquanto a segunda determina a velocidade da reação. As enzimas afetam apenas esta última propriedade. Iremos rever alguns dos princípios de termodinâmica à medida que se aplicam às enzimas.

A variação de energia livre fornece informações acerca da espontaneidade de uma reação, mas não de sua velocidade

Conforme discutido no Capítulo 1, a variação de energia livre de uma reação (ΔG) nos diz se ela pode ocorrer espontaneamente:

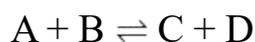
1. *Uma reação só pode ocorrer espontaneamente se G for negativo.* Essas reações são denominadas *exergônicas*.

2. Um sistema está em equilíbrio e não pode ocorrer nenhuma mudança *efetiva* se ΔG for igual a zero.
3. Uma reação não pode ocorrer espontaneamente se ΔG for positivo. É necessária uma entrada de energia livre para acionar esse tipo de reação. Essas reações são denominadas *endergônicas*.
4. ΔG de uma reação depende apenas da energia livre dos produtos (o estado final) menos a energia livre dos reagentes (o estado inicial). ΔG de uma reação é independente da via (ou do mecanismo molecular) da transformação. O mecanismo de uma reação não exerce nenhum efeito sobre ΔG . Por exemplo, ΔG para a oxidação da glicose a CO_2 e H_2O é a mesma, independentemente de ela ocorrer por combustão ou por uma série de etapas catalisadas por enzimas em uma célula.
5. ΔG não fornece nenhuma informação sobre a velocidade de uma reação. Um ΔG negativo indica que a reação *pode* ocorrer de modo espontâneo, mas não significa que ela irá ocorrer em uma velocidade perceptível. Conforme discutido adiante (Seção 8.3), a velocidade de uma reação depende da *energia livre de ativação* (ΔG^\ddagger), que, em grande parte, não está relacionada com ΔG da reação.

A variação padrão de energia livre de uma reação está relacionada com a constante de equilíbrio

Como para qualquer reação, precisamos ser capazes de determinar ΔG para uma reação catalisada enzimaticamente, a fim de saber se a reação é espontânea ou se necessita de uma entrada de energia. Para determinar esse importante parâmetro termodinâmico, precisamos levar em consideração a natureza dos reagentes e dos produtos, bem como as suas concentrações.

Consideremos a seguinte reação



ΔG desta reação é dada por

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln \frac{[\text{C}][\text{D}]}{[\text{A}][\text{B}]} \quad (1)$$

em que ΔG° é a *variação padrão de energia livre*, R é a constante universal dos gases, T é a temperatura absoluta, e $[\text{A}]$, $[\text{B}]$, $[\text{C}]$ e $[\text{D}]$ são as concentrações molares (mais precisamente, as atividades) dos reagentes. ΔG° é a variação de energia livre para esta reação em condições padrões – isto é, quando cada um dos reagentes A, B, C e D está presente em uma concentração de 1,0 M (para um gás, o estado padrão é habitualmente escolhido como uma (1) atmosfera). Por conseguinte, ΔG de uma reação depende da *natureza* dos reagentes (expressa no termo ΔG° da equação 1) e de suas *concentrações* (expressas pelo termo logarítmico da equação 1).

Foi adotada uma convenção para simplificar os cálculos de energia livre para as reações bioquímicas. O estado padrão é definido por ter um pH de 7. Em consequência, quando o H^+ é um reagente, a sua atividade tem o valor 1 (correspondendo a um pH de 7) nas equações 1 e 3 (adiante). A atividade da água também é considerada como 1 nessas equações. A *variação padrão de energia livre em pH 7*, designada pelo símbolo $\Delta G^{\circ'}$, será usada em todo o livro. O *quilojoule* (abreviado *kJ*) e a *quilocaloria* (*kcal*) serão usados como as unidades de energia. Um quilojoule equivale a 0,239

quilocaloria.

Unidades de energia

Um *quilojoule* (kJ) é igual a 1.000 J.

Um *joule* (J) é a quantidade de energia necessária para aplicar uma força de 1 newton pela distância de 1 metro.

Uma *quilocaloria* (kcal) é igual a 1.000 cal.

Uma *caloria* (cal) é equivalente à quantidade de calor necessária para elevar a temperatura de 1 grama de água de 14,5°C para 15,5°C.

1 kJ = 0,239 kcal.

Uma maneira simples de determinar $\Delta G^{\circ'}$ consiste em medir as concentrações dos reagentes e dos produtos quando a reação alcança o equilíbrio. No equilíbrio, não existe nenhuma variação efetiva nos reagentes e produtos; em essência, a reação está interrompida, e $\Delta G = 0$. Em equilíbrio, a equação 1 torna-se então

$$0 = \Delta G^{\circ'} + RT \ln \frac{[C][D]}{[A][B]} \quad (2)$$

e, portanto

$$\Delta G^{\circ'} = -RT \ln \frac{[C][D]}{[A][B]} \quad (3)$$

A constante de equilíbrio em condições padrões, K'_{eq} , é definida como

$$K'_{\text{eq}} = \frac{[C][D]}{[A][B]} \quad (4)$$

Aplicando a equação 4 na equação 3, temos

$$\Delta G^{\circ'} = -RT \ln K'_{\text{eq}} \quad (5)$$

que pode ser reorganizada para dar

$$K'_{\text{eq}} = 10^{-\Delta G^{\circ'}/RT} \quad (6)$$

Substituindo $R = 8,315 \times 10^{-3} \text{ kJ mol}^{-1} \text{ deg}^{-1}$ e $T = 298 \text{ K}$ (que corresponde a 25°C), temos

$$K'_{\text{eq}} = 10^{-\Delta G^{\circ'}/2,47} \quad (7)$$

Em que $\Delta G^{\circ'}$ é aqui expresso em quilojoules por mol, devido à escolha das unidades para R na equação 7. Por conseguinte, a energia livre padrão e a constante de equilíbrio de uma reação estão relacionadas por uma expressão simples. Por exemplo, uma constante de equilíbrio de 10 fornece uma variação padrão de energia livre de $-5,69 \text{ kJ mol}^{-1}$ ($-1,36 \text{ kcal mol}^{-1}$) a 25°C (Tabela 8.3). Observe que, para cada variação de 10 vezes na constante de equilíbrio, $\Delta G^{\circ'}$ varia $5,69 \text{ kJ mol}^{-1}$ ($1,36 \text{ kcal mol}^{-1}$).

Tabela 8.3 Relação entre ΔG° e K'_{eq} (a 25°C).

K'_{eq}	ΔG°	
	kJ mol ⁻¹	kcal mol ⁻¹
10 ⁻⁵	28,53	6,82
10 ⁻⁴	22,84	5,46
10 ⁻³	17,11	4,09
10 ⁻²	11,42	2,73
10 ⁻¹	5,69	1,36
1	0,00	0,00
10	-5,69	-1,36
10 ²	-11,42	-2,73
10 ³	-17,11	-4,09
10 ⁴	-22,84	-5,46
10 ⁵	-28,53	-6,82

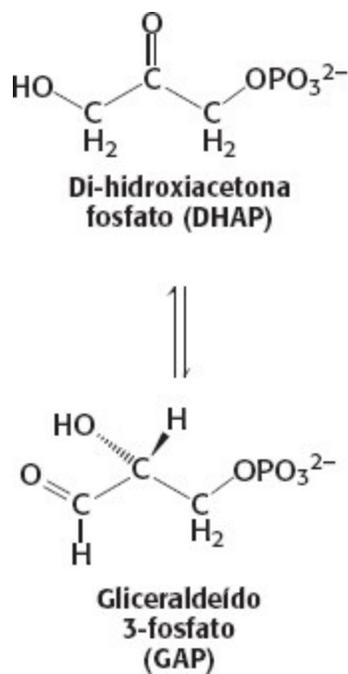
Como exemplo, calculemos ΔG° e ΔG para a isomerização da di-hidroxiacetona fosfato (DHAP) em gliceraldeído 3-fosfato (GAP). Essa reação ocorre na glicólise (Capítulo 16). No equilíbrio, a razão entre GAP e DHAP é de 0,0475 a 25°C (298 K) e pH 7. Por conseguinte, $K'_{eq} = 0,0475$. A variação padrão de energia livre para essa reação é então calculada pela equação 5:

$$\begin{aligned}\Delta G^{\circ} &= -RT \ln K'_{eq} \\ &= -8,315 \times 10^{-3} \times 298 \times \ln (0,0475) \\ &= +7,53 \text{ kJ mol}^{-1} (+1,80 \text{ kcal mol}^{-1})\end{aligned}$$

Nessas condições, a reação é endergônica. O DHAP não é convertido espontaneamente em GAP.

Calculemos agora ΔG para essa reação, quando a concentração inicial de DHAP é de 2×10^{-4} M, e a concentração inicial de GAP é de 3×10^{-6} M. Substituindo esses valores na equação 1, temos

$$\begin{aligned}\Delta G &= 7,53 \text{ kJ mol}^{-1} + RT \ln \frac{3 \times 10^{-6} \text{ M}}{2 \times 10^{-4} \text{ M}} \\ &= 7,53 \text{ kJ mol}^{-1} - 10,42 \text{ kJ mol}^{-1} \\ &= -2,89 \text{ kJ mol}^{-1} (-0,69 \text{ kcal mol}^{-1})\end{aligned}$$



Esse valor negativo para ΔG indica que a isomerização de DHAP a GAP é exergônica e pode ocorrer espontaneamente quando essas espécies estiverem presentes nas concentrações precedentes. Observe que ΔG para essa reação é negativo, embora ΔG° seja positivo. *É importante ressaltar que o fato de ΔG para uma reação ser maior, menor ou igual a ΔG° depende das concentrações dos reagentes e dos produtos.* O critério de espontaneidade para uma reação é ΔG , e não ΔG° . Esse aspecto é importante, visto que as reações que não são espontâneas com base em ΔG° podem tornar-se espontâneas pelo ajuste das concentrações dos reagentes e produtos. Esse princípio constitui a base do acoplamento das reações na formação das vias metabólicas (Capítulo 15).

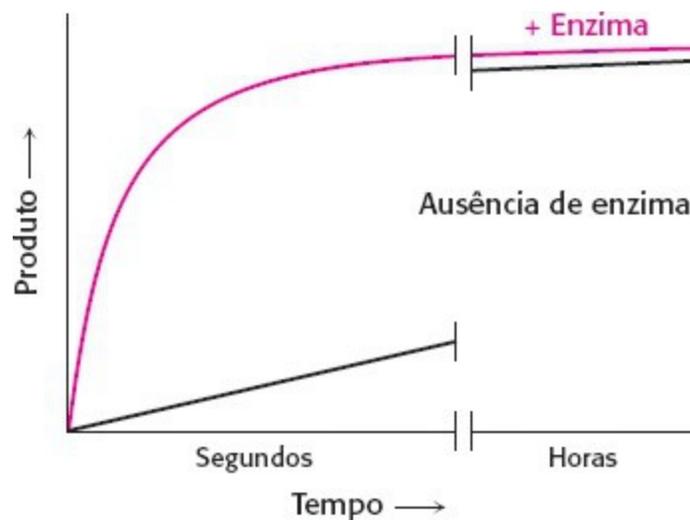


Figura 8.2 As enzimas aceleram a velocidade da reação. O mesmo ponto de equilíbrio é alcançado, porém muito mais rapidamente na presença de uma enzima.

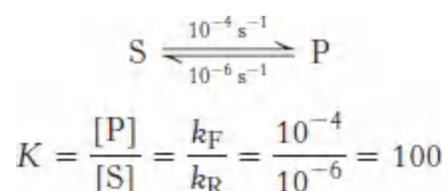
As enzimas só alteram a velocidade da reação, e não o seu equilíbrio

Como as enzimas são catalisadores extraordinários, é tentador atribuir-lhes poderes que elas não têm. Uma enzima não pode alterar as leis da termodinâmica e, *em consequência, não pode alterar o equilíbrio de uma reação química.* Consideremos uma reação catalisada enzimaticamente, a conversão do substrato S em produto P. A Figura 8.2 mostra a velocidade de formação do produto no

tempo, na presença e na ausência de enzima. Observe que a quantidade de produto formado é a mesma, na presença ou na ausência da enzima; todavia, neste exemplo, a quantidade de produto formado em segundos quando a enzima está presente poderia levar horas (ou séculos, veja Tabela 8.1) para se formar se a enzima estivesse ausente.

Por que a velocidade da formação de produto se estabiliza com o passar do tempo? A reação alcançou o equilíbrio. O substrato S ainda está sendo convertido em produto P, porém P está sendo convertido em S em uma velocidade que faz com que a quantidade de P presente permaneça a mesma.

Examinemos o equilíbrio de uma maneira mais quantitativa. Suponhamos que, na ausência de enzima, a constante de velocidade da reação direta (k_F), para a conversão de S em P, seja de 10^{-4} s^{-1} , e a constante de velocidade da reação reversa (k_R), para a conversão de P em S, seja de 10^{-6} s^{-1} . A constante de equilíbrio K é dada pela razão entre essas constantes de velocidade:



A concentração de P no equilíbrio é 100 vezes a de S, esteja ou não presente uma enzima. Todavia, poderia ser necessário um tempo muito longo para alcançar esse equilíbrio na ausência de enzima, ao passo que o equilíbrio seria alcançado rapidamente na presença de uma enzima apropriada (ver Tabela 8.1). *As enzimas aceleram a obtenção do equilíbrio, mas não deslocam a sua posição. A posição de equilíbrio é uma função apenas da diferença e energia livre entre reagentes e produtos.*

8.3 As enzimas aceleram reações, facilitando a formação do estado de transição

A diferença de energia livre entre reagentes e produtos explica o equilíbrio da reação, porém as enzimas aceleram a velocidade com que esse equilíbrio é alcançado. Como podemos explicar o aumento de velocidade em termos termodinâmicos? Para fazê-lo, precisamos considerar não os pontos finais da reação, mas a via química entre os pontos finais.

Uma reação química do substrato S para formar o produto P passa por um *estado de transição* X^\ddagger que apresenta uma energia livre mais alta do que S ou P.



A dupla cruz denota o estado de transição. Esse estado é uma estrutura molecular transitória, que não é mais o substrato, mas que ainda não é o produto. O estado de transição é a forma menos estável e mais raramente ocupada ao longo da via da reação, visto que é a que apresenta a energia livre mais alta. A diferença de energia livre entre o estado de transição e o substrato é denominada *energia livre de ativação de Gibbs* ou, simplesmente, *energia de ativação*, simbolizada por ΔG^\ddagger (Figura 8.3).

$$\Delta G^\ddagger = G_{X^\ddagger} - G_S$$

Observe que a energia de ativação ou ΔG^\ddagger não entra no cálculo final de ΔG para a reação, visto que a energia necessária para gerar o estado de transição é liberada quando o estado de transição forma o produto. A barreira de energia de ativação sugere imediatamente como uma enzima aumenta a velocidade da reação sem alterar ΔG da reação: as enzimas atuam para diminuir a energia de ativação ou, em outras palavras, *as enzimas facilitam a formação do estado de transição*.

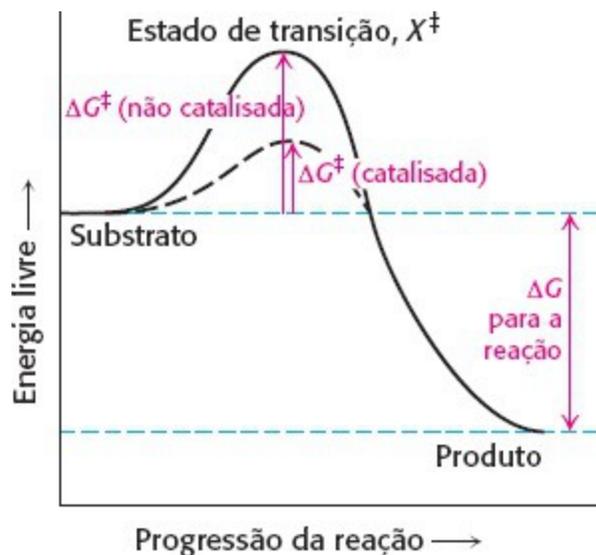
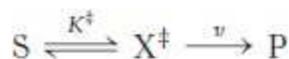


Figura 8.3 As enzimas diminuem a energia de ativação. As enzimas aceleram as reações ao diminuírem ΔG^\ddagger , a energia livre de ativação.

Uma abordagem para compreender o aumento da velocidade de reação obtido pelas enzimas consiste em supor que o estado de transição (X^\ddagger) e o substrato (S) estejam em equilíbrio.



em que K^\ddagger é a constante de equilíbrio para a formação de X^\ddagger , e v é a velocidade de formação do produto a partir do X^\ddagger . A velocidade da reação v é proporcional à concentração de X^\ddagger ,

$$v \propto [X^\ddagger],$$

visto que apenas o X^\ddagger pode ser convertido em produto. Por sua vez, a concentração de X^\ddagger em equilíbrio está relacionada com a diferença de energia livre, ΔG^\ddagger , entre X^\ddagger e S; quanto maior a diferença de energia livre entre esses dois estados, menor a quantidade de X^\ddagger . Por conseguinte, a velocidade global da reação V depende da ΔG^\ddagger . Especificamente,

$$V = v[X^\ddagger] = \frac{kT}{h} [S] e^{-\Delta G^\ddagger/RT}$$

Nesta equação, k é a constante de Boltzmann, e h é a constante de Planck. O valor de kT/h a 25°C é de $6,6 \times 10^{12} \text{ s}^{-1}$. Suponhamos que a energia livre de ativação seja de $28,53 \text{ kJ mol}^{-1}$ ($6,82 \text{ kcal mol}^{-1}$). Se formos aplicar esse valor de ΔG na equação 7 (como mostra a Tabela 8.3), essa diferença de energia livre irá ocorrer quando a razão $[X^\ddagger]/[S]$ for 10^{-5} . Se supusermos, para maior simplicidade, que $[S] = 1 \text{ M}$, então a velocidade da reação V é de $6,2 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$. Se ΔG^\ddagger fosse reduzida em $5,69 \text{ kJ}$

mol^{-1} ($1,36 \text{ kcal mol}^{-1}$), a razão $[\text{X}^\ddagger]/[\text{S}]$ seria então de 10^{-4} , e a velocidade da reação seria de $6,2 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$. Uma diminuição de $5,69 \text{ kJ mol}^{-1}$ em ΔG^\ddagger resulta em uma V 10 vezes maior. Uma diminuição relativamente pequena de ΔG^\ddagger (20% nesta reação em particular) resulta em um aumento muito maior de V .

Por conseguinte, vemos o mecanismo pelo qual as enzimas operam: *as enzimas aceleram as reações ao diminuir ΔG^\ddagger , a energia de ativação*. A combinação do substrato com a enzima cria uma via de reação, em que a energia do estado de transição é mais baixa que a da reação na ausência da enzima (Figura 8.3). Como a energia de ativação é menor, um maior número de moléculas apresenta a energia necessária para alcançar o estado de transição. A diminuição da barreira de ativação é análoga ao abaixamento de uma barra de salto em altura; mais atletas serão capazes de passar por cima dela. *A essência da catálise é a estabilização do estado de transição*.

“Penso que as enzimas são moléculas cuja estrutura é complementar aos complexos ativados das reações que elas catalisam, isto é, à configuração molecular intermediária entre as substâncias reagentes e os produtos da reação para esses processos catalisados. A atração da molécula de enzima pelo complexo ativado levaria, assim, a uma redução de sua energia e, portanto, a uma diminuição da energia de ativação da reação e a um aumento de sua velocidade.”

—Linus Pauling

Nature 161:707, 1948

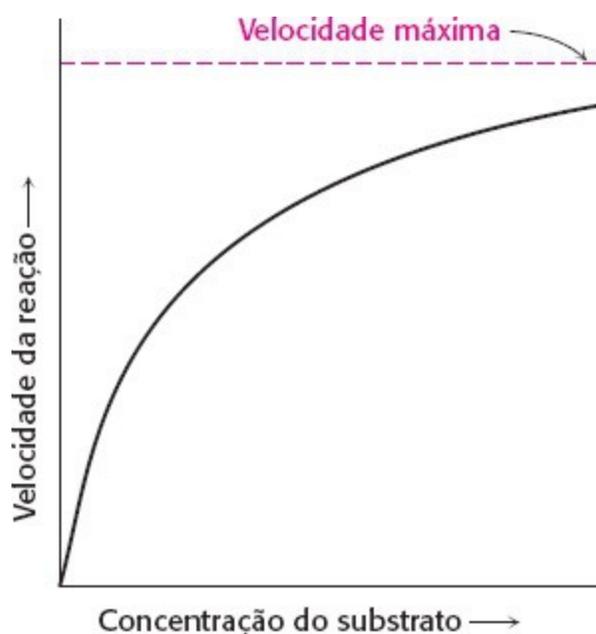


Figura 8.4 Velocidade de reação versus concentração de substrato em uma reação catalisada por enzima. Uma reação catalisada por enzima aproxima-se de uma velocidade máxima.

A formação de um complexo enzima-substrato constitui a primeira etapa na catálise enzimática

Grande parte do poder catalítico das enzimas provém de sua capacidade de organizar os substratos em orientações favoráveis para promover a formação dos estados de transição. As enzimas reúnem os substratos em complexos de *enzima-substrato* (ES). Os substratos ligam-se a uma região específica da enzima, denominada *sítio ativo*. As enzimas são, em sua maioria, altamente seletivas na sua ligação aos substratos. Com efeito, a especificidade catalítica das enzimas depende, em parte, da

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.

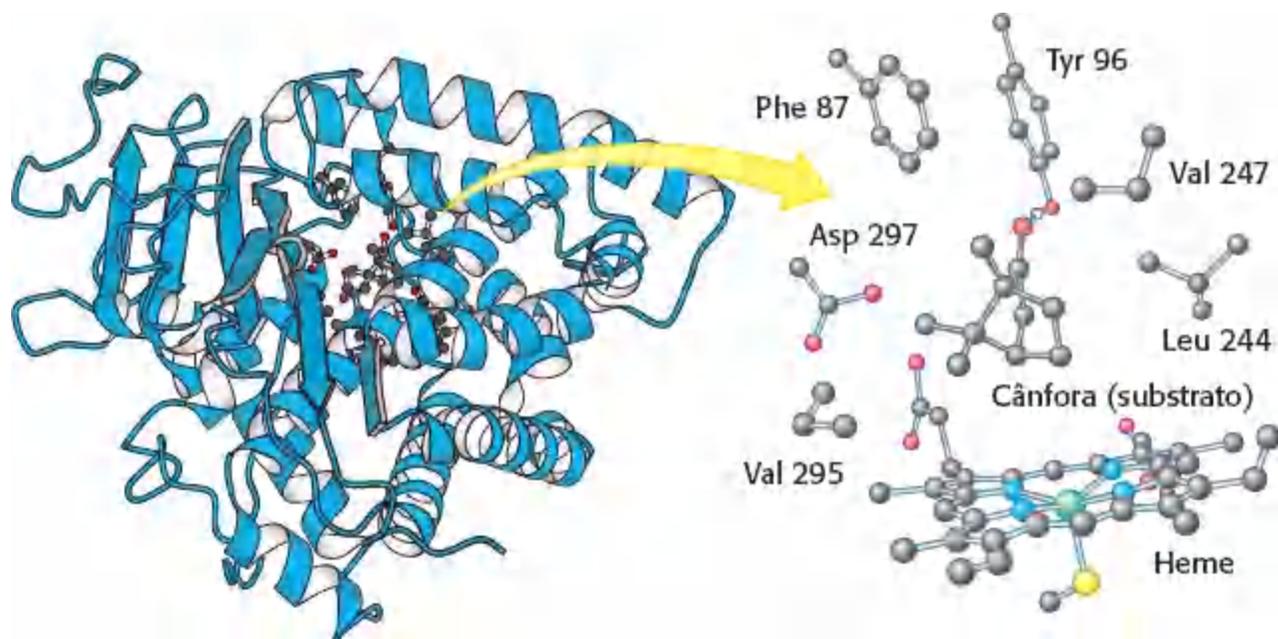


Figura 8.5 Estrutura de um complexo enzima-substrato. À esquerda, a enzima citocromo P450 é ilustrada ligada a seu substrato, a cânfora. À direita, observe que, no sítio ativo, o substrato é circundado por resíduos da enzima. Observe também a presença de um cofator heme. [Desenhada a partir de 2CPP.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

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 ΔG^\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).

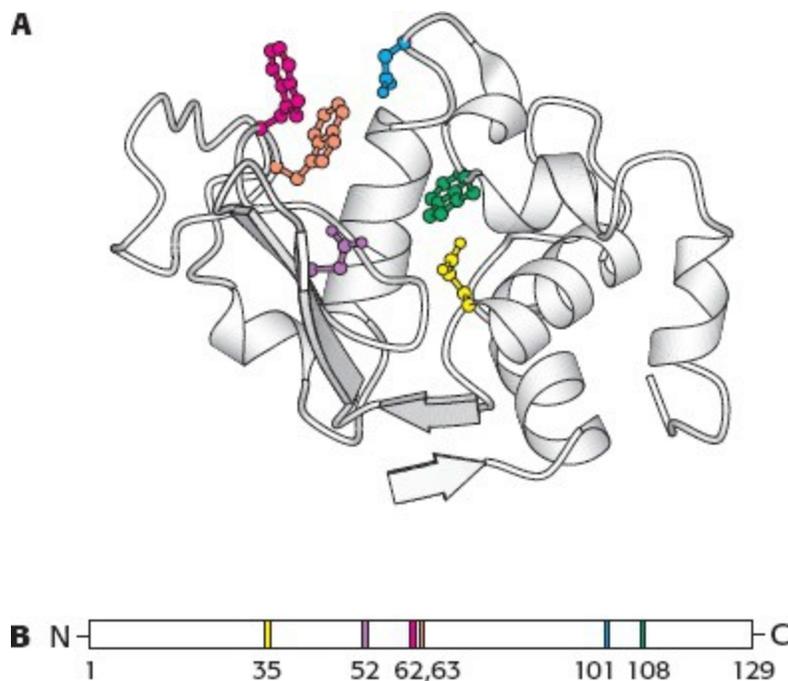


Figura 8.6 Os sítios ativos podem incluir resíduos distantes. **A.** Diagrama em fitas da enzima lisozima, com vários componentes do sítio ativo mostrados em cores. **B.** Representação esquemática da estrutura primária da lisozima, mostrando que o sítio ativo é composto de resíduos que provêm de diferentes 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.

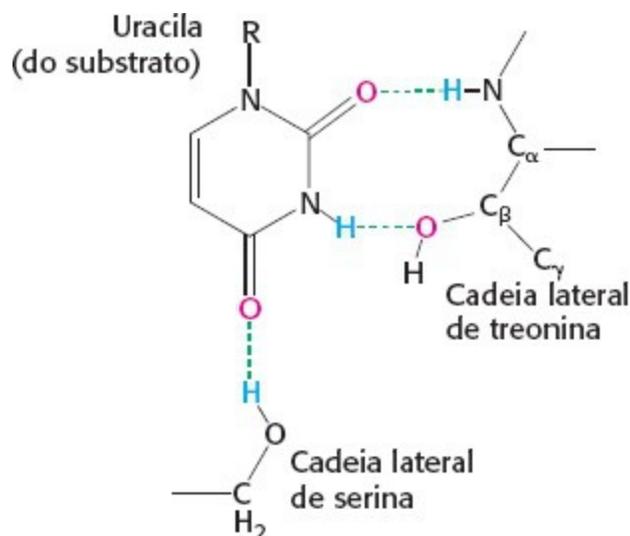


Figura 8.7 Pontes de hidrogênio entre uma enzima e o seu substrato. A enzima ribonuclease forma pontes de hidrogênio com o componente uridina do substrato. [Segundo F. M. Richards, H. W. Wyckoff and N. Allewell. In: *The Neurosciences: Second Study Programa*, F. O. Schmidt, Ed. (Rockefeller University 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 kJ mol⁻¹ (entre -50 e -110 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 kJ mol⁻¹ (de -3 a -12 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).

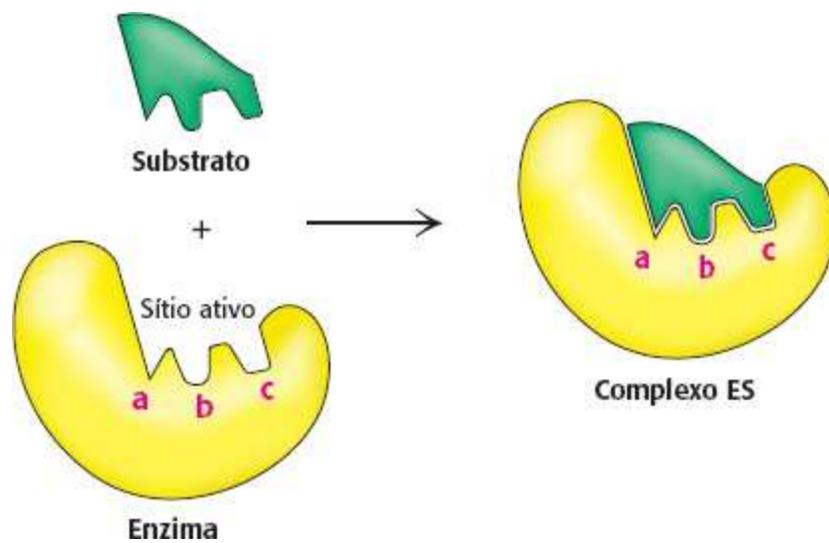


Figura 8.8 Modelo de chave e fechadura da ligação enzima-substrato. Neste modelo, o sítio ativo da enzima não ligada tem um formato complementar ao do substrato.

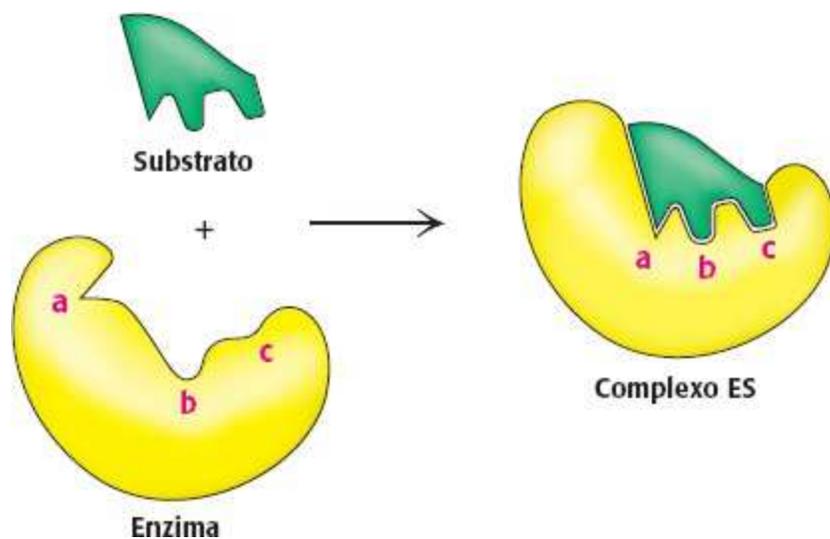


Figura 8.9 Modelo de encaixe induzido da ligação enzima-substrato. Neste modelo, a enzima muda de formato com a ligação do substrato. O sítio ativo apresenta um formato complementar ao do substrato somente após a ligação do substrato.

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

colapsa para o substrato ou para o produto, porém qual dos dois irá se acumular é determinado apenas pela diferença de energia entre o substrato e o produto – isto é pelo ΔG da reação.

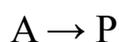
Término leitura básica

8.4 A equação de Michaelis-Menten descreve as propriedades cinéticas de muitas enzimas

O estudo das velocidades das reações químicas é denominado *cinética*, enquanto o estudo das velocidades das reações catalisadas por enzimas é denominado *cinética enzimática*. Uma descrição cinética da atividade enzimática irá nos ajudar a entender como as enzimas funcionam. Começaremos com um breve exame de alguns dos princípios básicos de cinética das reações.

A cinética é o estudo das velocidades das reações

O que queremos dizer quando falamos da “velocidade” de uma reação química? Consideremos uma reação simples:



A velocidade V é a quantidade de A que desaparece em uma unidade específica de tempo. É igual à velocidade de aparecimento de P ou à quantidade de P que aparece em uma unidade específica de tempo.

$$V = -\Delta A/\Delta T = \Delta P/\Delta T \quad (8)$$

Se A for amarelo e P incolor, podemos acompanhar a diminuição da concentração de A, medindo a diminuição da intensidade da cor amarela ao longo do tempo. Consideremos por enquanto apenas a mudança na concentração de A. A velocidade da reação está diretamente relacionada com a concentração de A por uma constante de proporcionalidade, k , denominada *constante de velocidade*.

$$V = k[A] \quad (9)$$

As reações que são diretamente proporcionais à concentração dos reagentes são denominadas *reações de primeira ordem*. As constantes de velocidade de primeira ordem apresentam as unidades de s^{-1} .

Muitas reações bioquímicas importantes incluem dois reagentes. Por exemplo,



ou



Elas são denominadas *reações bimoleculares*, e as equações de velocidade correspondentes frequentemente assumem a forma

$$V = k[A]^2 \quad (10)$$

e

Enzimas

Início leitura básica

- 6.1 Introdução às enzimas 189
- 6.2 Como as enzimas funcionam 191
- 6.3 A cinética enzimática como abordagem à compreensão do mecanismo 200
- 6.4 Exemplos de reações enzimáticas 214
- 6.5 Enzimas regulatórias 226

São duas as condições fundamentais para haver vida. Primeiro, o organismo deve ser capaz de se autorreplicar (tópico considerado na Parte III); segundo, ele deve ser capaz de catalisar reações químicas com eficiência e seletividade. A importância central da catálise pode parecer surpreendente, mas é fácil de demonstrar. Como foi descrito no Capítulo 1, os sistemas vivos fazem uso da energia do ambiente. Muitos humanos, por exemplo, consomem quantidades substanciais de sacarose (o açúcar comum) como combustível, geralmente na forma de comidas e bebidas doces. A conversão de sacarose em CO_2 e H_2O , em presença de oxigênio, é um processo altamente exergônico, liberando energia livre que pode ser usada para pensar, mover-se, sentir gostos e enxergar. Entretanto, um saco de açúcar pode permanecer na prateleira por anos a fio sem qualquer conversão evidente em CO_2 e H_2O . Embora esse processo químico seja termodinamicamente favorável, ele é muito lento. Mesmo assim, quando a sacarose é consumida por seres humanos (ou por qualquer outro organismo), ela libera sua energia química em segundos. A diferença é a catálise. Sem catálise, as reações químicas como aquelas da oxidação da sacarose poderão não ocorrer na escala de tempo adequada e então não podem sustentar a vida.

Neste capítulo, o foco se voltará para os catalisadores das reações dos sistemas biológicos: as enzimas, as proteínas mais notáveis e mais altamente especializadas. As enzimas têm um poder catalítico extraordinário, geralmente muito maior do que os catalisadores sintéticos ou inorgânicos. Elas têm um alto grau de especificidade para os seus respectivos substratos, aceleram as reações químicas e atuam em soluções aquosas sob condições suaves de temperatura e pH. Poucos catalisadores não biológicos têm esse conjunto de propriedades.

As enzimas estão no centro de cada um dos processos bioquímicos. Atuando em sequências organizadas, elas ca-

talisam cada uma das reações das centenas de etapas que degradam as moléculas dos nutrientes, que conservam e transformam energia química e que constroem as macromoléculas biológicas a partir de precursores elementares.

O estudo das enzimas tem imensa importância prática. Em algumas doenças, especialmente nas doenças genéticas hereditárias, pode haver uma deficiência ou mesmo ausência total de uma ou mais enzimas. Outras doenças podem ser causadas pela atividade excessiva de determinada enzima. A determinação das atividades de enzimas no plasma sanguíneo, nas hemácias ou em amostras de tecidos é importante no diagnóstico de certas enfermidades. Muitos medicamentos agem por interação com enzimas. As enzimas também são ferramentas importantes na engenharia química, tecnologia de alimentos e agricultura.

O capítulo inicia com descrições das propriedades das enzimas e os princípios que embasam seu poder catalítico, depois aborda a cinética enzimática, disciplina que fornece muito do arcabouço para qualquer discussão a respeito de enzimas. Serão dados exemplos específicos de mecanismos de ação de algumas enzimas de modo a ilustrar os princípios apresentados no início do capítulo. Por fim, o capítulo discute como a atividade das enzimas é regulada.

6.1 Introdução às enzimas

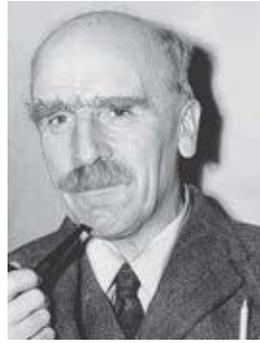
Boa parte da história da bioquímica é a história da pesquisa sobre enzimas. A catálise biológica foi reconhecida e descrita nos final dos anos de 1700 em estudos da digestão de carne por secreções do estômago. A pesquisa continuou no século seguinte examinando a conversão do amido em açúcar pela saliva e por vários extratos de plantas. Por volta de 1850, Louis Pasteur concluiu que a fermentação de açúcar em álcool por leveduras é catalisada por “fermentos”. Ele postulou que esses fermentos eram inseparáveis da estrutura das células de levedura vivas. Esse ponto de vista, chamado de vitalismo, prevaleceu por décadas. Então, em 1897, Eduard Buchner descreveu que extratos de levedura podiam fermentar açúcar em álcool, provando que a fermentação era feita por moléculas que continuavam ativas mesmo após serem removidas das células. Os experimentos de Buchner, ao mesmo tempo, marcaram o final da visão vitalista e o alvorecer da ciência bioquímica. Posteriormente, Frederick W. Kühne deu o nome de **enzimas** para as moléculas detectadas por Buchner.



Eduard Buchner, 1860-1917



James Sumner, 1887-1955



J. B. S. Haldane, 1892-1964

O isolamento e a cristalização da urease por James Sumner em 1926 foi uma quebra de paradigma nos estudos iniciais sobre enzimas. Sumner descobriu que os cristais de urease constituíam-se totalmente de proteína e postulou que toda enzima é uma proteína. Na ausência de outros exemplos, essa ideia permaneceu controversa por algum tempo. Somente na década de 1930 é que a conclusão de Sumner foi amplamente aceita, isso depois que John Northrop e Moses Kunitz cristalizaram a pepsina, a tripsina e outras enzimas digestivas e descobriram que todas elas são proteínas. Durante esse período, J. B. S. Haldane escreveu um tratado intitulado *Enzymes*. Embora a natureza molecular das enzimas não estivesse totalmente reconhecida, Haldane fez a notável suposição de que ligações fracas entre a enzima e seu substrato poderiam ser usadas para catalisar a reação. Essa ideia ainda permanece essencial no conhecimento da catálise enzimática.

A partir da última parte do século XX, milhares de enzimas foram purificadas, suas estruturas elucidadas e seus mecanismos explicados.

A maioria das enzimas é proteína

Exceto por um pequeno grupo de moléculas de RNA catalíticas (Capítulo 26), todas as enzimas são proteínas. A atividade catalítica depende da integridade das suas conformações nativas. Se uma enzima for desnaturada ou dissociada nas suas subunidades, geralmente a atividade catalítica é perdida. Se uma enzima for degradada até os aminoácidos que a compõem, a atividade catalítica é sempre destruída. Então, as estruturas proteicas primária, secundária, terciária e quaternária das enzimas são essenciais para a atividade catalítica.

As enzimas, assim como as outras proteínas, têm pesos moleculares variando de cerca de 12.000 a mais de um milhão. Algumas enzimas não necessitam de outros grupos químicos além dos seus próprios resíduos de aminoácidos. Outras necessitam de um componente químico adicional denominado **cofator**, que pode ser um ou mais íons inorgânicos como Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} ou Zn^{2+} (Tabela 6-1) ou uma molécula orgânica ou metalorgânica complexa, denominada **coenzima**. As coenzimas agem como carreadores transitórios de grupos funcionais específicos (Tabela 6-2). A maioria deles é derivada das vitaminas, nutrientes orgânicos cuja presença na dieta é necessária em pequenas

quantidades. As coenzimas serão estudadas com mais detalhe à medida que forem abordadas as vias metabólicas na Parte II. Algumas enzimas necessitam *tanto* de uma coenzima *quanto* de um ou mais íons metálicos para terem atividade. Uma coenzima ou um íon metálico que se ligue muito firmemente, ou mesmo covalentemente, a uma enzima é denominado **grupo prostético**. Uma enzima completa, cataliticamente ativa junto com a sua coenzima e/ou íons metálicos, é denominada **holoenzima**. A parte proteica de uma dessas enzimas é denominada **apoenzima** ou **apoproteína**.

Finalmente, algumas enzimas são modificadas covalentemente por fosforilação, glicosilação e outros processos. Muitas dessas modificações estão envolvidas na regulação da atividade enzimática.

As enzimas são classificadas segundo as reações que catalisam

Muitas enzimas receberam seus nomes pela adição do sufixo “ase” ao nome dos seus substratos ou a uma palavra que descreve sua atividade. Assim, a urease catalisa a hidrólise da ureia e a DNA-polimerase catalisa a polimerização de nucleotídeos para formar DNA. Outras enzimas foram batizadas pelos seus descobridores em razão de uma função ampla, antes que fosse conhecida a reação específica catalisada por elas. Por exemplo, uma enzima conhecida por atuar na digestão de alimentos foi denominada pepsina, do grego *pepsis* (digestão), e a lisozima foi denominada pela sua capacidade de lisar (degradar) a parede de bactérias. Outras foram ainda denominadas a partir de sua fonte: a tripsina, denominada em parte do grego *tryein* (desgastar), foi obtida esfregando tecido pancreático com glicerina. Às vezes, a mesma enzima tem dois ou mais nomes, ou duas enzimas têm o mesmo nome. Devido a essa ambiguidade e também ao número cada vez maior de enzimas que são

TABELA 6-1 Alguns íons inorgânicos que servem de cofatores para enzimas

Íons	Enzimas
Cu^{2+}	Citocromo-oxidase
Fe^{2+} ou Fe^{3+}	Citocromo-oxidase, catalase, peroxidase
K^{+}	Piruvato-cinase
Mg^{2+}	Hexocinase, glicose-6-fosfatase, piruvato-cinase
Mn^{2+}	Arginase, ribonucleotídeo-redutase
Mo	Dinitrogenase
Ni^{2+}	Urease
Zn^{2+}	Anidrase carbônica, álcool-desidrogenase, carboxipeptidases A e B

TABELA 6-2 Algumas coenzimas que servem como carreadores transitórios de átomos ou grupos funcionais específicos

Coenzima	Exemplo de grupo químico transferido	Precursor presente na dieta de mamíferos
Biocina	CO ₂	Biotina
Coenzima A	Grupos acil	Ácido pantotênico e outros compostos
5'-Desoxiadenosilcobalamina (coenzima B ₁₂)	Átomos de H e grupos alquil	Vitamina B ₁₂
Flavina-adenina-dinucleotídeo	Elétrons	Riboflavina (vitamina B ₂)
Lipoato	Elétrons e grupos acil	Não é necessário na dieta
Nicotinamida-adeninad nucleotídeo	Íon hidrido (:H ⁻)	Ácido nicotínico (niacina)
Piridoxal-fosfato	Grupos amino	Piridoxina (vitamina B ₆)
Tetra-hidrofolato	Grupos de um carbono	Folato
Tiamina-pirofosfato	Aldeídos	Tiamina (vitamina B ₁)

Nota: As estruturas e os modos de ação destas coenzimas estão descritos na Parte II.

descobertas, os bioquímicos, por meio de um acordo internacional, adotaram um sistema de nomenclatura e classificação de enzimas. Esse sistema divide as enzimas em seis classes, cada uma com subclasses, com base nos tipos de reações que catalisam (Tabela 6-3). Um número de classificação de quatro partes e um nome sistemático, que identifica a reação catalisada, são especificados para cada enzima. Como exemplo, o nome sistemático da enzima que catalisa a reação



é ATP: glicose-fosfotransferase, indicando que ela catalisa a transferência de um grupo fosforribosil do ATP para a glicose. Seu número da Comissão de Enzimas (número E. C., do inglês *Enzyme Commission*) é 2.7.1.1. O primeiro número (2) indica o nome da classe (transferase); o segundo número (7), a subclasse (fosfotransferase); o terceiro número (1), uma fosfotransferase que tem um grupo hidroxila como aceptor, e o quarto número (1), D-glicose como o aceptor do grupo fosforil. Para muitas enzimas, é usado um nome comum com mais frequência, hexocinase, nesse caso específico. Uma lista completa com a descrição dos milhares de enzimas conhecidas é mantida pelo Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme). Este capítulo

dedica-se principalmente aos princípios e às propriedades comuns a todas as enzimas.

RESUMO 6.1 Introdução às enzimas

- ▶ A vida depende de catalisadores poderosos e específicos: as enzimas. Praticamente todas as reações bioquímicas são catalisadas por enzimas.
- ▶ Com a exceção de poucos RNA catalíticos, todas as enzimas conhecidas são proteínas. Muitas necessitam de coenzimas ou cofatores não proteicos para exercerem a atividade catalítica.
- ▶ As enzimas são classificadas segundo o tipo de reação que catalisam. Todas as enzimas têm número E. C. e nome formais. Muitas têm nomes comuns.

Término leitura básica

6.2 Como as enzimas funcionam

Início leitura complementar

A catálise enzimática das reações é essencial para os sistemas vivos. Nas condições biológicas relevantes, as reações não catalisadas tendem a ser lentas – a maioria das moléculas biológicas é muito estável nas condições internas das células com pH neutro, temperaturas amenas e ambiente aquoso. Além disso, muitos processos químicos corriqueiros, como a formação transitória de intermediários instáveis

TABELA 6-3 Classificação internacional das enzimas

Classe n ^o	Nome da classe	Tipo de reação catalisada
1	Oxidoredutases	Transferência de elétrons (íons hidrido ou átomos de H)
2	Transferases	Reações de transferência de grupos
3	Hidrolases	Reações de hidrólise (transferência de grupos funcionais para a água)
4	Liases	Clivagem de C—C, C—O, C—N ou outras ligações por eliminação, rompimento de ligações duplas ou anéis, ou adição de grupos a ligações duplas.
5	Isomerases	Transferência de grupos dentro de uma mesma molécula produzindo formas isoméricas
6	Ligases	Formação de ligações C—C, C—S, C—O e C—N por reações de condensação acopladas à hidrólise de ATP ou cofatores similares

carregados ou a colisão de duas ou mais moléculas exatamente na orientação exata necessária para que as reações ocorram, são desfavoráveis ou improváveis no ambiente celular. As reações necessárias para digerir os alimentos, enviar sinais nervosos ou contrair os músculos simplesmente não ocorrem em velocidades adequadas sem catálise.

As enzimas contornam esses problemas ao proporcionarem um ambiente específico adequado para que uma dada reação possa ocorrer mais rapidamente. A propriedade característica das reações catalisadas por enzimas é que a reação ocorre confinada em um bolsão da enzima denominado **sítio ativo** (Figura 6-1). A molécula que liga no sítio ativo e sobre a qual a enzima age é denominada **substrato**. O contorno da superfície do sítio ativo é delimitado por resíduos de aminoácidos com grupos nas cadeias laterais que ligam o substrato e que catalisam a sua transformação química. Frequentemente, o sítio ativo engloba o substrato, sequestrando-o completamente da solução. O complexo enzima-substrato, cuja existência foi primeiramente proposta por Charles-Adolphe Wurtz em 1880, é fundamental para a ação enzimática. Também é o ponto de partida para o tratamento matemático que define o comportamento cinético das reações catalisadas por enzimas e para a descrição teórica dos mecanismos das enzimas.

As enzimas alteram a velocidade da reação, não o equilíbrio

Uma reação enzimática simples pode ser escrita como



onde E, S e P representam enzima, substrato e produto; ES e EP são complexos transitórios da enzima com o substrato e com o produto.

Para entender a catálise, deve-se primeiro avaliar a importância de distinguir entre o equilíbrio e a velocidade de

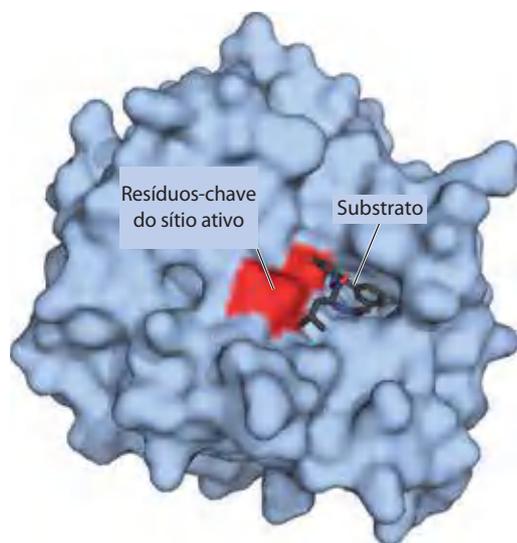


FIGURA 6-1 Ligação de um substrato no sítio ativo de uma enzima. A enzima quimotripsina, com o substrato ligado (PBD ID 7GCH). Alguns dos resíduos-chave do sítio ativo aparecem como uma mancha vermelha na superfície da enzima.

uma reação. A função do catalisador é aumentar a *velocidade* da reação. A catálise não afeta o *equilíbrio* da reação. Qualquer reação, como $S \rightleftharpoons P$, pode ser descrita por um diagrama de coordenadas da reação (Figura 6-2), que representa a variação de energia durante a reação. A energia é descrita nos sistemas biológicos, como foi discutido no Capítulo 1, em termos de energia livre, G . No diagrama de coordenadas da reação, a energia livre do sistema é colocada no gráfico em função do progresso da reação (a coordenada da reação). O ponto de partida tanto da reação direta quanto da reação reversa é denominado **estado fundamental**, a contribuição que uma molécula média (S ou P) fornece para a energia livre do sistema, sob dadas condições do sistema.

CONVENÇÃO-CHAVE: Para descrever a variação de energia livre das reações, químicos definiram um conjunto de condições padrão (temperatura de 298 K; pressão parcial de cada gás de 1 atm [ou 101,3 kPa]; concentração de cada soluto de 1 M) e expressam as mudanças de energia livre de um sistema reagindo sob essas condições como ΔG° , a **variação de energia livre padrão**. Uma vez que os sistemas bioquímicos geralmente envolvem concentrações de H^+ muito abaixo de 1 M, bioquímicos definiram uma **variação de energia livre padrão bioquímica**, $\Delta G'^\circ$, a variação de energia livre padrão *em pH 7,0*. Essa definição será usada neste livro. Uma definição mais completa de $\Delta G'^\circ$ é fornecida no Capítulo 13. ■

O equilíbrio entre S e P reflete a diferença entre as energias livres dos seus estados fundamentais. No exemplo mostrado na Figura 6-2, a energia livre do estado fundamental de P é menor do que a de S, e então $\Delta G'^\circ$ para a reação é negativa (reação exergônica) e o equilíbrio favorece mais P que S. A posição e a direção do equilíbrio *não* são afetadas pelos catalisadores.

Um equilíbrio favorável não significa que a conversão $S \rightarrow P$ ocorra em uma velocidade detectável. A *velocidade* da reação depende de um parâmetro totalmente diferente. Há uma barreira energética entre S e P: a energia necessária para alinhar os grupos reagentes, para a

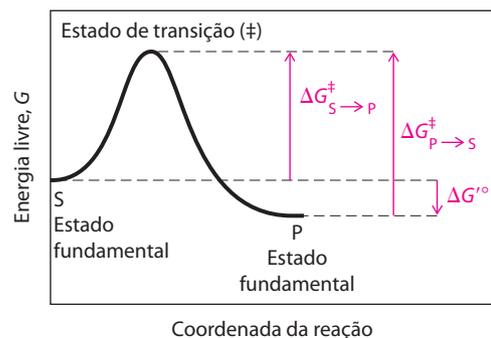


FIGURA 6-2 Diagrama da coordenada da reação. A energia livre do sistema está colocada no gráfico *versus* o progresso da reação $S \rightarrow P$. Diagramas deste tipo descrevem as mudanças de energia durante a reação. O eixo horizontal (coordenada da reação) reflete as mudanças químicas progressivas (p. ex., quebra ou formação da ligação) à medida que S é convertido em P. As energias de ativação, ΔG^\ddagger , para as reações $S \rightarrow P$ e $P \rightarrow S$ estão indicadas. ΔG° é a variação total da energia livre padrão na direção $S \rightarrow P$.

formação de cargas instáveis transitórias, rearranjos de ligações e ainda outras transformações necessárias para que a reação ocorra em qualquer direção. Isso é ilustrado pela curva de energia nas Figuras 6-2 e 6-3. Para que a reação ocorra, as moléculas devem suplantam essa barreira e atingir um nível de energia mais alto. O topo da curva de energia é um ponto a partir do qual o decaimento para o estado S ou para o estado P tem a mesma probabilidade de ocorrer (nos dois casos a curva é descendente). Isso é denominado **estado de transição**. O estado de transição não é uma forma química com alguma estabilidade significativa e não deve ser confundido com os intermediários da reação (como ES ou EP). O estado de transição é um momento molecular transitório em que eventos como a quebra de ligação, a formação de ligação ou o desenvolvimento de carga ocorrem com a mesma probabilidade de seguirem tanto para formar novamente o substrato como para formar o produto. A diferença entre os níveis energéticos do estado basal e do estado de transição é a **energia de ativação**, ΔG^\ddagger . A velocidade da reação reflete essa energia de ativação: uma energia de ativação maior corresponde a uma reação mais lenta. A velocidade da reação pode aumentar pela elevação da temperatura e/ou da pressão, o que aumenta o número de moléculas com energia suficiente para suplantam a barreira energética. Alternativamente, a energia de ativação pode ser diminuída pela adição de um catalisador (**Figura 6-3**). *Os catalisadores aumentam a velocidade das reações por diminuir as energias de ativação.*

As enzimas não são exceções à regra de que os catalisadores não afetam o equilíbrio da reação. As flechas bidirecionais na Equação 6-1 indicam isso: qualquer enzima que catalise a reação $S \rightarrow P$ também catalisa a reação $P \rightarrow S$. O papel da enzima é *acelerar* a interconversão entre S e P. A enzima não é gasta no processo e o ponto de equilíbrio não é afetado. Entretanto, a reação atinge o equilíbrio muito mais rapidamente quando a enzima apropriada estiver presente, pois a velocidade da reação é aumentada.

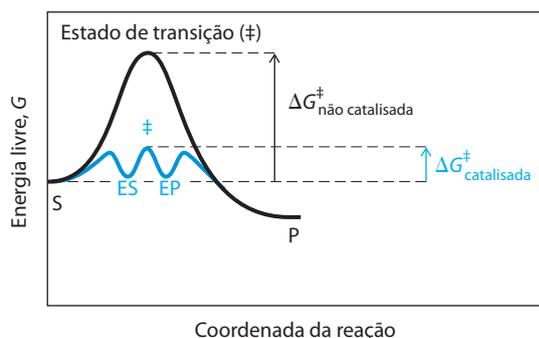
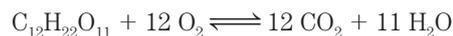


FIGURA 6-3 Diagrama da coordenada da reação comparando uma reação catalisada por enzima com uma não catalisada. Na reação $S \rightarrow P$, os intermediários ES e EP ocupam o nível mínimo na curva da progressão da energia de uma reação catalisada por uma enzima. Os termos $\Delta G^\ddagger_{\text{não catalisada}}$ e $\Delta G^\ddagger_{\text{catalisada}}$ correspondem, respectivamente, à energia de ativação da reação não catalisada e à energia de ativação total da reação catalisada. A energia de ativação é menor quando a reação é catalisada por uma enzima.

Esse princípio geral é ilustrado pela conversão de sacarose e oxigênio em dióxido de carbono e água:



Essa conversão, que ocorre por meio de uma série de reações separadas, tem $\Delta G'^\circ$ muito grande e negativo, e, no equilíbrio, a quantidade de sacarose presente é desprezível. Ainda assim, a sacarose é um composto estável, porque a barreira da energia de ativação que deve ser suplantada antes que reaja com oxigênio é bastante alta. A sacarose pode ser armazenada em um recipiente com oxigênio quase que indefinidamente sem reagir com ele. Nas células, entretanto, a sacarose é prontamente degradada em CO_2 e H_2O em uma série de reações catalisadas por enzimas. Essas enzimas não apenas aceleram as reações, mas também as organizam e as controlam de modo que boa parte da energia liberada é recuperada em outras formas químicas, sendo disponibilizada para as células realizarem outras tarefas. A via de reações na qual a sacarose (e outros açúcares) é degradada constitui a via primária de produção de energia das células. As enzimas dessa via permitem que a sequência de reações ocorra em uma escala de tempo biologicamente útil.

As reações podem ter várias etapas, incluindo a formação e o consumo de espécies químicas transitórias denominadas **intermediários da reação**.¹ Qualquer espécie da rota da reação que tenha uma vida química finita (maior do que a vibração molecular, $\sim 10^{-13}$ segundos) é um intermediário da reação. Quando a reação $S \rightleftharpoons P$ é catalisada por uma enzima, os complexos ES e EP podem ser considerados intermediários, mesmo que S e P sejam espécies químicas estáveis (Equação 6-1); os complexos ES e EP ocupam vales no diagrama das coordenadas da reação (Figura 6-3). Além disso, no curso de uma reação catalisada por enzima geralmente existem intermediários químicos menos estáveis. A interconversão entre dois intermediários da reação que ocorrem em sequência constitui uma etapa da reação. Quando uma reação tem várias etapas, a velocidade final é determinada pela etapa (ou etapas) com a maior energia de ativação. Essa etapa é denominada **etapa limitante da velocidade**. Em um caso simples, a etapa limitante da velocidade é o ponto de maior energia no diagrama da interconversão entre S e P. Na prática, a etapa limitante da reação pode variar segundo as condições de reação, sendo que muitas enzimas podem ter várias etapas com energias de ativação similares, significando que todas essas etapas são parcialmente limitantes da velocidade.

A energia de ativação é uma barreira energética para as reações químicas. Essas barreiras são cruciais para a própria vida. A velocidade na qual uma molécula sofre uma determinada reação diminui à medida que a barreira da reação aumenta. Sem essas barreiras energéticas, as macro-

¹Neste capítulo, *etapa* e *intermediário* referem-se às espécies químicas na via de uma única reação catalisada por uma enzima. No contexto de vias metabólicas envolvendo muitas enzimas (discutido na Parte II), esses termos são usados de maneira diferente. Uma reação enzimática inteira geralmente é tomada como uma “etapa” da via, e o produto de uma reação enzimática (que é o substrato para a próxima enzima da via) é referido como “intermediário”.

moléculas complexas poderiam reverter espontaneamente para formas moleculares mais simples, e as estruturas complexas e altamente ordenadas e os processos metabólicos das células não poderiam existir. Durante o curso da evolução, as enzimas desenvolveram-se para diminuir *seletivamente* as energias de ativação das reações necessárias para a sobrevivência celular.

A velocidade e o equilíbrio da reação têm definições termodinâmicas precisas

O *equilíbrio* da reação está inextricavelmente ligado à variação da energia livre padrão da reação, $\Delta G'^{\circ}$ e a *velocidade* da reação está ligada à energia de ativação, ΔG^{\ddagger} . Uma introdução básica sobre essas relações termodinâmicas é a próxima etapa para compreender como as enzimas agem.

Um equilíbrio como $S \rightleftharpoons P$ é descrito por uma **constante de equilíbrio**, K'_{eq} , ou simplesmente K (p. 25). Nas condições padrão usadas para comparar os processos bioquímicos, a constante de equilíbrio é designada K'_{eq} (ou K'):

$$K'_{eq} = \frac{[P]}{[S]} \quad (6-2)$$

Segundo a termodinâmica, a relação entre K'_{eq} e $\Delta G'^{\circ}$ pode ser descrita pela expressão

$$\Delta G'^{\circ} = -RT \ln K'_{eq} \quad (6-3)$$

onde R é a constante dos gases, 8,315 J/mol · K, e T é a temperatura absoluta, 298 K (25°C). A Equação 6-3 é desenvolvida e discutida com mais detalhes no Capítulo 13. Aqui, o ponto importante é que a constante de equilíbrio é diretamente relacionada com o total da energia livre padrão da reação (Tabela 6-4). Um grande valor negativo de $\Delta G'^{\circ}$ reflete um equilíbrio de reação favorável, mas, como foi observado, isso não significa que a reação ocorrerá com velocidade alta.

A velocidade de uma reação é determinada pela concentração do reagente (ou reagentes) e por uma **constante de velocidade**, normalmente designada por k . Para uma reação unimolecular $S \rightarrow P$, a velocidade da

reação, V (representando a quantidade de S que reage por unidade de tempo), é expressa por uma **equação de velocidade**:

$$V = k[S] \quad (6-4)$$

Nessa reação, a velocidade depende apenas da concentração de S, sendo uma reação de primeira ordem. O fator k é uma constante de proporcionalidade que reflete a probabilidade de que a reação ocorra em determinado conjunto de condições (pH, temperatura, etc.). Aqui, k é a constante de velocidade de primeira ordem e tem como unidade a recíproca do tempo, como s^{-1} . Se uma reação de primeira ordem tiver uma constante de velocidade k de $0,03 s^{-1}$, isso pode ser interpretado (quantitativamente) como que 3% do S disponível serão convertidos em P em 1 s. Uma reação com uma constante de velocidade de $2.000 s^{-1}$ ocorrerá em uma pequena fração de segundo. Se a velocidade de reação depender da concentração de dois compostos diferentes, ou se a reação for entre duas moléculas de um mesmo composto, a reação será de segunda ordem, e k é a constante de velocidade de segunda ordem, com unidade de $M^{-1}s^{-1}$. A equação da velocidade passa a ser

$$V = k[S_1][S_2] \quad (6-5)$$

A partir da teoria do estado de transição pode-se derivar uma expressão relacionando a magnitude da constante de velocidade com a energia de ativação:

$$k = \frac{kT}{h} e^{-\Delta G^{\ddagger}/RT} \quad (6-6)$$

onde k é a constante de Boltzmann e h é a constante de Planck. Nesse momento, o ponto importante é que a relação entre a constante de velocidade k e a energia de ativação ΔG^{\ddagger} é inversa e exponencial. De maneira simples, essa é a base para afirmar que energia de ativação mais baixa significa velocidade de reação mais rápida.

Depois de analisar *o que* as enzimas fazem, é possível focalizar *como* elas o fazem.

Poucos princípios são suficientes para explicar o poder catalítico e a especificidade das enzimas

As enzimas são catalisadores extraordinários. O aumento de velocidade conferido pelas enzimas situa-se na faixa de 5 a 17 ordens de magnitude (Tabela 6-5). As enzimas também são muito específicas, distinguindo facilmente substratos com estruturas muito semelhantes. Como é que esse enorme e altamente seletivo aumento de velocidade pode ser explicado? Qual é a fonte de energia para essa grande diminuição nas energias de ativação de reações específicas?

A resposta para essas questões tem duas partes distintas, embora interligadas. A primeira parte baseia-se no rearranjo de ligações covalentes durante a reação catalisada pela enzima. Muitos tipos de reações químicas ocorrem entre substratos e grupos funcionais da enzima (cadeias específicas de aminoácidos, íons metálicos e coenzimas). Grupos funcionais catalíticos na enzima podem formar ligações covalentes transitórias com um substrato e ativá-lo para a reação, ou um grupo pode ser transitoriamente transferido do substrato para a enzima. Geralmente, essas reações

TABELA 6-4 Relações entre K'_{eq} e $\Delta G'^{\circ}$

K'_{eq}	$\Delta G'^{\circ}$ (kJ/mol)
10^{-6}	34,2
10^{-5}	28,5
10^{-4}	22,8
10^{-3}	17,1
10^{-2}	11,4
10^{-1}	5,7
1	0
10^1	-5,7
10^2	-11,4
10^3	-17,1

Nota: Esta relação é calculada a partir de $\Delta G'^{\circ} = -RT \ln K'_{eq}$ (Equação 6-3).

TABELA 6-5 Alguns aumentos de velocidade proporcionados por enzimas

Ciclofilina	10^5
Anidrase carbônica	10^7
Triose-fosfato-isomerase	10^9
Carboxipeptidase A	10^{11}
Fosfoglicomutase	10^{12}
Succinil-CoA-transferase	10^{13}
Urease	10^{14}
Orotidina-monofosfato-descarboxilase	10^{17}

ocorrem apenas no sítio ativo da enzima. Interações covalentes entre enzimas e substratos diminuem a energia de ativação, acelerando a reação, por fornecerem condições para que a reação ocorra por uma via alternativa de baixa energia. Os tipos específicos de rearranjos que ocorrem estão descritos na Seção 6.4.

A segunda parte da explicação fundamenta-se em interações *não covalentes* entre enzima e substrato. É importante lembrar (Capítulo 4) que interações fracas não covalentes ajudam a estabilizar a estrutura das proteínas e as interações proteína-proteína. Essas mesmas interações são cruciais para a formação de complexos entre proteínas e moléculas pequenas, incluindo os substratos de enzimas. Muito da energia necessária para diminuir a energia de ativação provém de interações fracas não covalentes entre substrato e enzima. O que realmente distingue as enzimas de outros catalisadores é a formação de um complexo ES específico. A interação entre substrato e enzima nesse complexo é mediada pelas mesmas forças que estabilizam a estrutura das proteínas, incluindo ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas e iônicas (Capítulo 4). A formação de cada interação fraca no complexo ES é acompanhada pela liberação de uma pequena quantidade de energia livre que estabiliza a interação. A energia proveniente da interação enzima-substrato é denominada **energia de ligação**, ΔG_B . O seu significado abrange mais que uma simples interação enzima-substrato. *A energia de ligação é a principal fonte de energia livre utilizada pelas enzimas para a diminuição da energia de ativação das reações.*

Dois princípios fundamentais inter-relacionados possibilitam uma explicação geral de como as enzimas utilizam a energia de ligação não covalente.

1. Muito do poder catalítico das enzimas provém basicamente da energia livre liberada na formação de muitas ligações fracas e interações entre a enzima e seu substrato. Essa energia de ligação contribui tanto para a especificidade como também para a catálise.
2. Interações fracas são otimizadas no estado de transição da reação. Os sítios ativos das enzimas são complementares não aos substratos por si mesmos, mas aos estados de transição pelos quais os substratos passam ao serem convertidos em produtos durante a reação enzimática.

Esses termos são essenciais para o entendimento das enzimas e constituem importante foco deste capítulo.

As interações fracas entre enzima e substrato são otimizadas no estado de transição

Como é que as enzimas utilizam a energia de ligação para diminuir a energia de ativação de uma reação? A formação do complexo ES não é, por si só, uma explicação, embora algumas das primeiras considerações sobre os mecanismos de ação das enzimas tenham começado com essa ideia. Estudos sobre a especificidade das enzimas, realizados por Emil Fischer, o levaram a propor, em 1894, que as enzimas seriam estruturalmente complementares aos seus substratos de modo a se encaixarem como uma chave em uma fechadura (**Figura 6-4**). Essa ideia elegante, de que uma interação específica (portanto, exclusiva) entre duas moléculas biológicas seria mediada por superfícies moleculares com formas complementares, influenciou muito o desenvolvimento da bioquímica; efetivamente, essas interações são centrais para muitos processos bioquímicos. Entretanto, a hipótese da “chave e fechadura” pode ser enganadora quan-

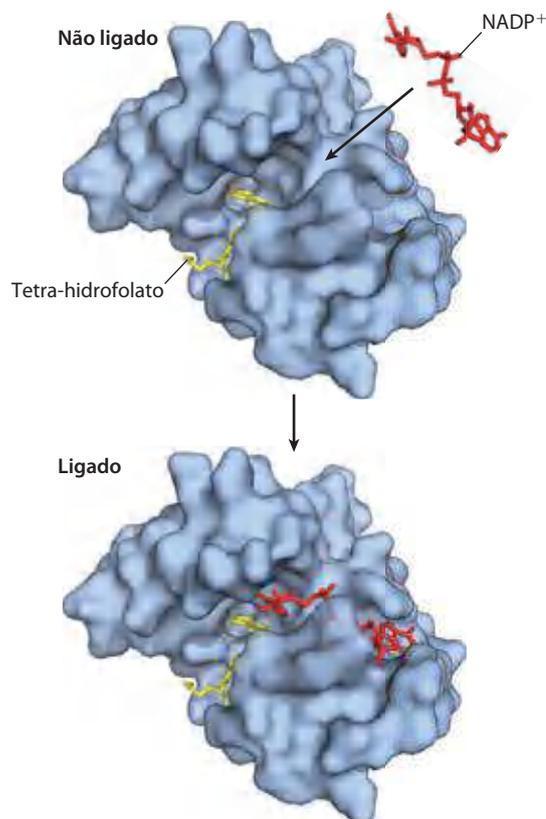


FIGURA 6-4 Complementaridade de formas entre o substrato e o seu sítio de ligação na enzima. A enzima di-hidrofolato-reductase com o seu substrato NADP^+ (em vermelho) não ligado (acima) e ligado (abaixo). O tetra-hidrofolato (em amarelo) também é visível (PDB 1D 1RA2). Neste modelo, o NADP^+ liga-se a um bolsão complementar à sua forma e às suas propriedades iônicas, ilustração da hipótese de “chave e fechadura” proposta por Emil Fischer para a ação enzimática. Na realidade, a complementaridade entre proteína e ligante (neste caso, o substrato) raramente é perfeita, como visto no Capítulo 5.

do aplicada à catálise enzimática. Uma enzima totalmente complementar ao seu substrato seria uma enzima muito pobre, como se pode demonstrar.

Por exemplo, considere uma reação imaginária, a quebra de um bastão de metal magnetizado; a reação não catalisada está mostrada na **Figura 6-5a**. Duas enzimas imaginárias – duas “bastonases” – poderiam catalisar essa reação. Ambas utilizam forças magnéticas como paradigma para a energia de ligação utilizada por enzimas reais. Primeiro, será desenhada uma enzima perfeitamente complementar ao substrato (Figura 6-5b). O sítio ativo dessa bastonase é um bolsão delimitado por ímãs. Para reagir (quebrar), o bastão deve atingir o estado de transição da reação, mas o bastão se encaixa tão perfeitamente ao sítio ativo que não consegue se dobrar, pois ao se dobrar haveria a eliminação de algumas das interações mag-

néticas entre o bastão e a enzima. Uma enzima desse tipo *impede* a reação, porque estabiliza o substrato em vez de desestabilizá-lo. No diagrama de coordenadas da reação (Figura 6-5b), esse tipo de complexo ES corresponderia a uma energia da qual o substrato teria dificuldade de escapar. Uma enzima dessas seria inútil.

A noção moderna da catálise enzimática, primeiramente proposta por Michael Polanyi (1921) e Haldane (1930), foi elaborada por Linus Pauling em 1946 e por William P. Jencks na década de 1970. Para poder catalisar reações, as enzimas devem ser complementares ao *estado de transição da reação*. Isso significa que interações ótimas entre substratos e enzimas só ocorrem no estado de transição. A Figura 6-5c demonstra como uma enzima dessas pode funcionar. O bastão de metal liga-se à bastonase, mas apenas um subconjunto das interações mag-

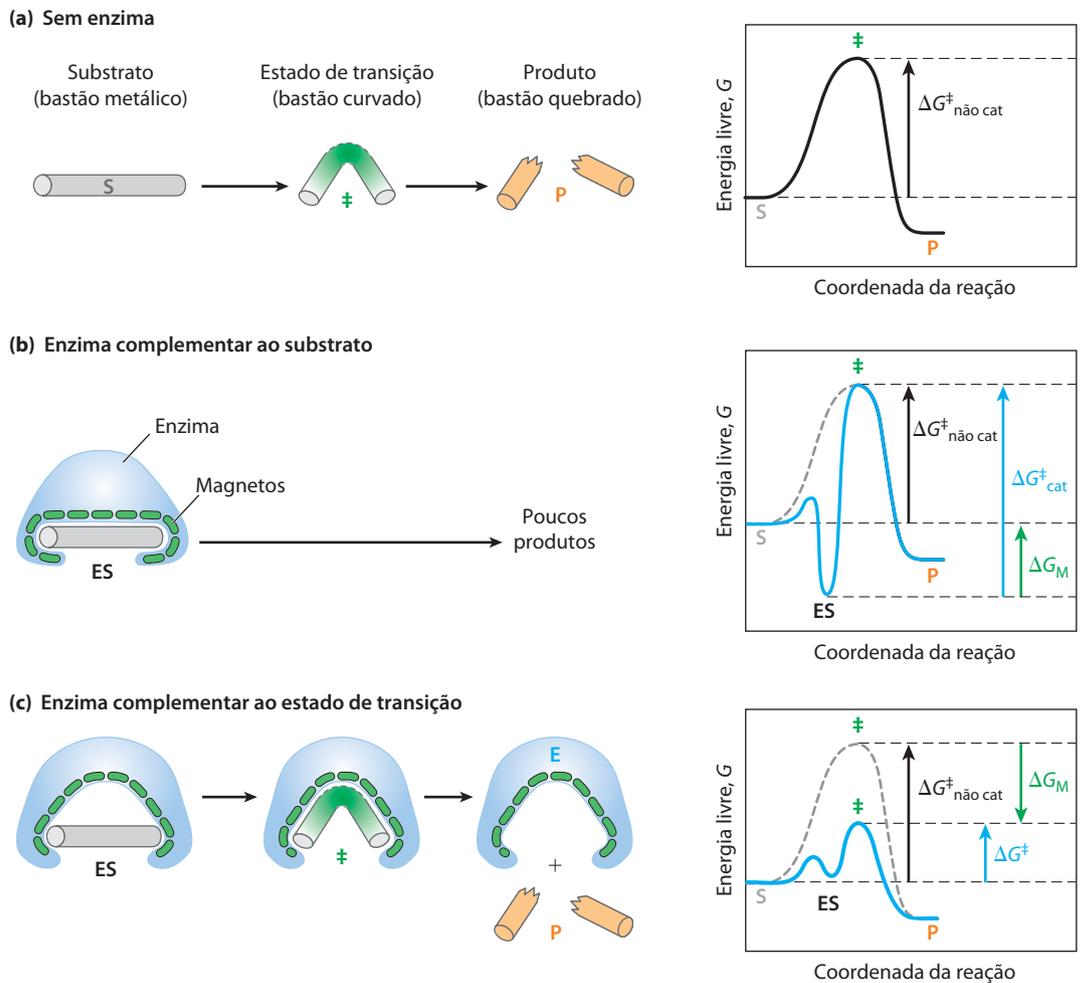


FIGURA 6-5 Proposta de uma enzima imaginária (bastonase) que catalise a quebra de um bastão metálico. (a) Antes da quebra, o bastão primeiro deve ser curvado (o estado de transição). Nos dois exemplos de bastonase, interações magnéticas representam as ligações fracas entre a enzima e o substrato. (b) A bastonase com um bolsão magnético de estrutura complementar a do bastão (o substrato) estabiliza o substrato. O curvamento é impedido pelas atrações magnéticas entre o bastão e a bastonase. (c) Uma enzima com bolsão complementar ao estado de transição da reação ajuda a desestabilizar o bastão, contribuindo para a catálise da reação. A energia de ligação das interações magnéticas compensa o aumento da

energia livre necessária para curvar o bastão. Os diagramas das coordenadas das reações (à direita) mostram as consequências energéticas da complementaridade ao substrato *versus* a complementaridade ao estado de transição (os complexos EP estão omitidos). ΔG_M , a diferença entre as energias dos estados de transição da reação catalisada e da não catalisada, reflete a contribuição das interações magnéticas entre o bastão e a bastonase. Quando a enzima for complementar ao substrato (b), o complexo ES é mais estável e tem menos energia livre no estado basal que o substrato isoladamente. O resultado é um *aumento* na energia de ativação.

néticas possíveis é usado para formar o complexo ES. O substrato ligado ainda deve ter aumento na energia livre para atingir o estado de transição. Agora, entretanto, o aumento de energia livre necessário para tensionar o bastão em uma curvatura e quebrar parcialmente a conformação é compensado (“pago”) pelas interações (energia de ligação) que se formam entre a enzima e o substrato no estado de transição. Muitas dessas interações envolvem partes do bastão distantes do ponto de quebra. Assim, as interações entre a bastonase e as regiões não reagentes do bastão fornecem parte da energia necessária para catalisar a quebra do bastão. Esse “pagamento de energia” traduz-se em diminuição efetiva na energia de ativação e aumento na velocidade da reação.

As enzimas reais agem segundo um princípio análogo. No complexo ES há a formação de interações fracas, mas a completa complementaridade entre o substrato e a enzima ocorre apenas quando o substrato estiver no estado de transição. A energia livre (energia de ligação) liberada durante a formação dessas interações compensa parcialmente a energia necessária para atingir o topo da curva de energia. A soma da energia de ativação ΔG^\ddagger desfavorável (positiva) e a energia de ligação favorável ΔG_B (negativa) resulta em uma redução líquida da energia de ativação (Figura 6-6). Mesmo quando ligado à enzima, o estado de transição não é uma forma estável, mas sim o curto período de tempo em que o substrato permanece no topo da curva de energia. Reações catalisadas por enzimas são muito mais rápidas que os processos não catalisados, pois a barreira energética a ser vencida é muito menor. O princípio importante é que *interações com ligações fracas entre a enzima e o substrato fornecem uma substancial força propulsora para a catálise enzimática*. Os grupos presentes no substrato e envolvidos nessas ligações fracas podem atuar a alguma distância das ligações rompidas ou modificadas. As interações fracas formadas apenas no estado de transição são as que fazem a principal contribuição para a catálise.

A necessidade de múltiplas interações fracas para impedir a catálise ajuda a explicar por que as enzimas (e algumas coenzimas) são tão grandes. A enzima deve fornecer grupos funcionais para as interações iônicas, ligações de hidrogênio e outras interações importantes e também deve posicio-

nar precisamente esses grupos de modo que a energia de ligação seja otimizada no estado de transição. A formação de uma ligação adequada é atingida mais facilmente pelo posicionamento do substrato em uma cavidade (o sítio ativo) onde é efetivamente removido da água. O tamanho das proteínas reflete a necessidade de uma superestrutura para manter os grupos interativos posicionados adequadamente e para evitar o colapso da cavidade.

A energia de ligação contribui para a especificidade da reação e a catálise

É possível demonstrar quantitativamente que a energia de ligação é responsável pela enorme aceleração na velocidade proporcionada pelas enzimas? A resposta é sim. Como ponto de referência, a Equação 6-6 permite calcular que, nas condições normais das células, ΔG^\ddagger deve ser diminuído em cerca de 5,7 kJ/mol para acelerar uma reação de primeira ordem por um fator de 10. A energia que é disponibilizada pela formação de uma única interação fraca geralmente é estimada em 4 a 30 kJ/mol. A energia total disponibilizada por um certo número dessas interações é, portanto, suficiente para uma diminuição da energia de ativação entre os 60 e os 100 kJ/mol necessários para explicar o grande aumento na velocidade das reações observado em muitas enzimas.

A mesma energia de ligação que fornece energia para a catálise também dá às enzimas sua **especificidade**, isto é, a capacidade de distinguir entre substratos e moléculas competidoras. Conceitualmente, especificidade é fácil de distinguir de catálise, contudo, essa diferenciação é muito mais difícil de demonstrar experimentalmente, pois a catálise e a especificidade provêm do mesmo fenômeno. Se o sítio ativo de uma enzima tiver grupos funcionais organizados otimamente de modo que se forme uma grande variedade de interações fracas com determinado substrato no correspondente estado de transição, a enzima não será capaz de interagir com a mesma intensidade com alguma outra molécula. Por exemplo, se o substrato tiver um grupo hidroxila que forme uma ligação de hidrogênio com um resíduo específico de Glu de uma enzima, qualquer molécula que não tiver um grupo hidroxila naquela determinada posição será um substrato pobre para essa enzima. Ainda, qualquer molécula que tiver um grupo funcional extra para o qual a enzima não tenha um bolsão ou um sítio de ligação provavelmente será excluída da enzima. De maneira geral, a *especificidade* deriva da formação de muitas interações fracas entre a enzima e a molécula específica do substrato.

A importância da energia de ligação para a catálise pode ser facilmente demonstrada. Por exemplo, a enzima glicolítica triose-fosfato-isomerase catalisa a interconversão entre gliceraldeído-3-fosfato e di-hidroxiacetona-fosfato:

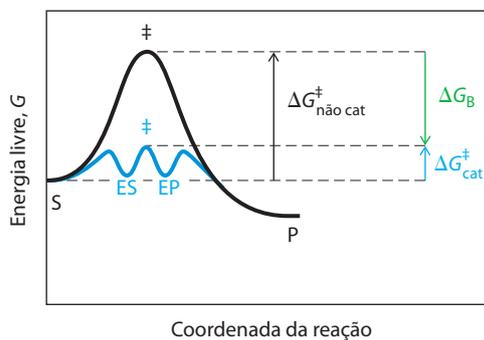
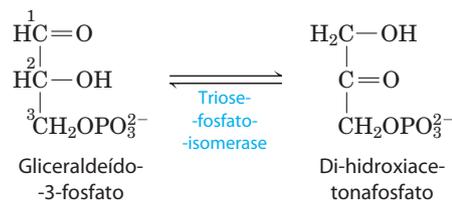


FIGURA 6-6 Papel da energia de ligação na catálise. Para diminuir a energia de ativação da reação, o sistema deve adquirir uma quantidade de energia equivalente ao valor da diminuição de ΔG^\ddagger . Boa parte dessa energia vem da energia de ligação (ΔG_B) proporcionada pela formação de interações fracas não covalentes entre substrato e enzima que ocorrem no estado de transição. O papel de ΔG_B é análogo ao de ΔG_M da Figura 6-5.



Esta reação rearranja os grupos carbonila e hidroxila dos carbonos 1 e 2. Entretanto, mais de 80% da aceleração da velocidade da reação catalisada pela enzima foi relacionado com as interações enzima-substrato envolvendo o grupo fosfato do carbono 3 do substrato. Isso foi determinado comparando as reações catalisadas pela enzima usando como substratos gliceraldeído-3-fosfato e gliceraldeído (sem grupo fosfato na posição 3).

O princípio geral apresentado anteriormente pode ser ilustrado por vários mecanismos catalíticos bem conhecidos. Esses mecanismos não são mutuamente excluídos, de modo que uma mesma enzima pode incorporar vários tipos de mecanismos no seu mecanismo total de ação.

Considerando o que é necessário para a reação acontecer, verifica-se que fatores físicos e termodinâmicos preponderantes contribuem para ΔG^\ddagger , a barreira para a reação. Entre esses mecanismos, é possível incluir (1) a entropia (liberdade de movimento) das moléculas em solução, que reduz a possibilidade de que elas reajam entre si; (2) a camada de solvatação das moléculas de água ligadas por ligações de hidrogênio e que rodeiam e ajudam a estabilizar a maioria das moléculas biológicas em solução aquosa; (3) a distorção dos substratos que ocorre em muitas reações; (4) a necessidade de um alinhamento apropriado dos grupos funcionais catalíticos da enzima. A energia de ligação pode ser usada para superar todas essas barreiras.

Primeiro, uma grande restrição à mobilidade relativa de dois substratos prestes a reagir, ou **redução da entropia**, é um benefício óbvio proporcionado pela ligação deles à enzima. A energia de ligação mantém o substrato na orientação apropriada para reagir, uma contribuição substancial para a catálise, porque colisões produtivas entre as moléculas da solução podem ser muito raras. Os substratos podem ser alinhados precisamente com a enzima com muitas interações fracas entre cada substrato e grupos estrategicamente posicionados na enzima fixando as moléculas de substrato na posição apropriada. Estudos mostraram que restrições à mobilidade de dois reagentes podem produzir um aumento de várias ordens de grandeza na velocidade (**Figura 6-7**).

Segundo, a formação de ligações fracas entre substrato e enzima resulta na **dessolvatação** do substrato. Interações enzima-substrato substituem a maioria das ligações de hidrogênio entre o substrato e as moléculas de água que são um impedimento para a reação. Terceiro, a energia de ligação envolvendo interações fracas, que se formam apenas no estado de transição da reação, ajudam a compensar termodinamicamente qualquer distorção, principalmente a redistribuição de elétrons, de modo que então o substrato pode sofrer a reação.

Finalmente, em geral a enzima também sofre uma mudança de conformação quando o substrato se liga a ela, induzindo múltiplas interações fracas com o substrato. Isso é chamado de **ajuste induzido**, mecanismo postulado por Daniel Koshland em 1958. Esses movimentos podem afetar apenas uma pequena parte da enzima nas proximidades do sítio ativo ou podem envolver mudanças no posicionamento de domínios inteiros da enzima. Em geral, uma rede de movimentos acoplados ocorre por toda a enzima, que finalmente leva às mudanças necessárias no sítio ativo. O ajuste

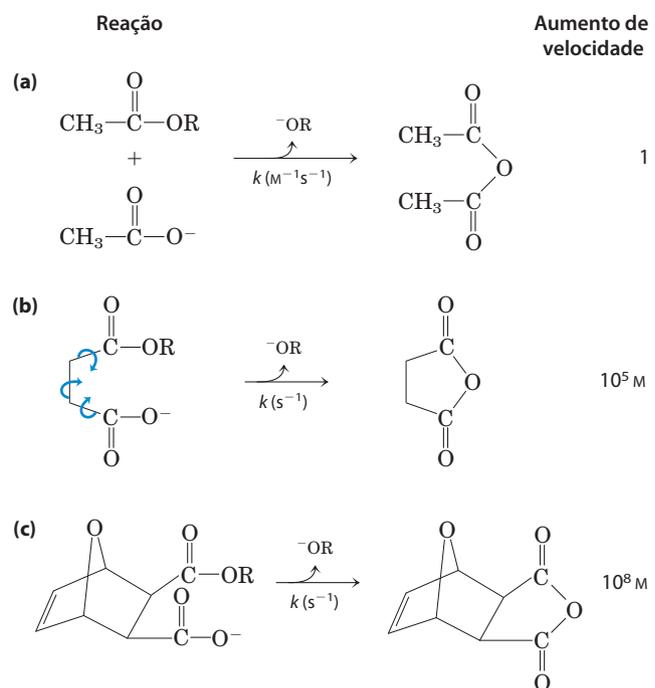


FIGURA 6-7 Aumento da velocidade por redução da entropia. A figura mostra reações de ésteres com grupos carboxilatos formando anidridos. Em todos os casos, o grupo R é o mesmo. **(a)** Nesta reação bimolecular, a constante k é de segunda ordem, com unidades de $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$. **(b)** Quando os dois grupos reagentes estão em uma mesma molécula, e então têm menor liberdade de movimento, a reação é muito mais rápida. Nesta reação unimolecular, k tem unidade de s^{-1} . Dividindo a constante de velocidade de (b) pela constante de velocidade de (a) obtém-se um fator de aumento de velocidade de 10^5 M . (O aumento de velocidade tem como unidade a molaridade, pois neste caso uma reação unimolecular foi comparada com uma reação bimolecular.) Colocando de outra maneira, se o reagente em (b) estiver em uma concentração de 1 M , o comportamento dos grupos reativos será o mesmo que teria caso estivesse em uma concentração de 10^5 M . Observe que a reação em (b) tem liberdade de rotação em três de suas ligações (mostradas por meio de setas curvas), mas, mesmo assim, isso representa uma redução substancial de entropia em relação a (a). Se as rotações das ligações que giram em (b) forem tolhidas como em (c), a entropia é reduzida ainda mais e a reação apresenta um aumento de velocidade de 10^8 M em relação a (a).

induzido serve para levar grupos funcionais específicos da enzima para uma posição apropriada para catalisar a reação. As mudanças conformacionais também permitem a formação de ligações fracas adicionais no estado de transição. Em ambos os casos, a nova conformação da enzima apresenta propriedades catalíticas aumentadas. Como foi visto, o ajuste induzido é uma característica comum da interação reversível de ligantes com proteínas (Capítulo 5). O ajuste induzido também é importante para a interação de praticamente todas as enzimas com seus substratos.

Grupos catalíticos específicos contribuem para a catálise

Em muitas enzimas, a energia de ligação utilizada para formar o complexo ES é apenas um dos vários contribuintes para o mecanismo total de catálise. Uma vez que o substrato esteja ligado a uma enzima, grupos funcionais catalíticos posicionados de modo apropriado ajudam no rompimento e na formação de ligações por vários mecanismos,

incluindo catálise geral acidobásica, catálise covalente e catálise por íons metálicos. Esses mecanismos são diferentes dos mecanismos com base na energia de ligação, pois geralmente envolvem uma interação transitória *covalente* com o substrato ou a transferência de um grupo do substrato ou para ele.

Catálise geral acidobásica. A transferência de prótons é a reação mais comum em bioquímica. No curso da maioria das reações que ocorrem nas células há transferência de um ou, geralmente, de muitos prótons. Muitas reações bioquímicas envolvem a formação de intermediários carregados instáveis que tendem a quebrarem-se rapidamente nas espécies reagentes que os constituem, impossibilitando assim a reação (**Figura 6-8**). Intermediários carregados, geralmente, podem ser estabilizados pela transferência de prótons para os substratos (ou dos substratos) ou intermediários formando uma espécie que se transforma mais rapidamente em produtos. O efeito da catálise por ácidos ou bases é geralmente estudado usando reações não enzimáticas

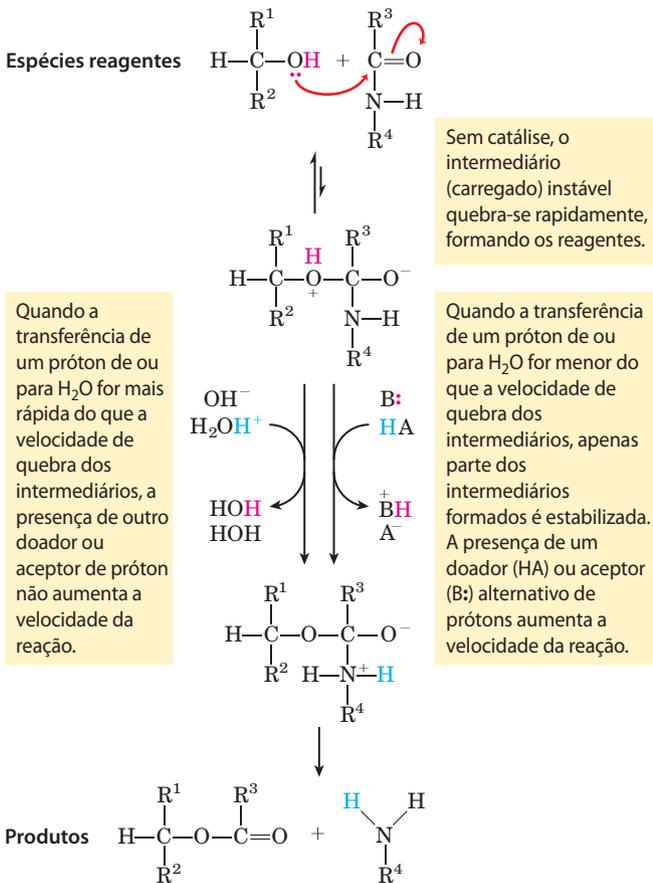


FIGURA 6-8 Como o catalisador contorna o incremento de cargas desfavoráveis durante a hidrólise de uma amida. A hidrólise da ligação amida, mostrada aqui, é a mesma reação catalisada pela quimotripsina e outras proteases. O incremento de cargas é desfavorável e pode ser contornado pela doação de um próton por parte de H_3O^+ (catálise ácida específica) ou HA (catálise ácida geral), sendo que HA representa qualquer ácido. De maneira semelhante, a carga pode ser neutralizada pela subtração de um OH^- (catálise básica específica) ou de B: (catálise básica geral), na qual B: representa uma base qualquer.

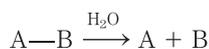
como modelo. Nessas reações não enzimáticas, a transferência de prótons pode envolver apenas constituintes da água ou então de outros doadores ou aceptores fracos de próton. Catalisadores que utilizam apenas íons H^+ (H_3O^+) ou OH^- presentes na água são chamados de **catalisadores acidobásicos**. Se prótons forem transferidos entre o intermediário e a água mais rapidamente do que a quebra do intermediário em reagentes, o intermediário é estabilizado cada vez que se formar e nenhuma catálise adicional mediada por outros aceptores ou doadores de prótons ocorrerá. Em muitos casos, entretanto, apenas água é insuficiente. O termo **catálise geral acidobásica** refere-se à transferência de prótons mediada por alguma outra molécula que não água. Nas reações não catalisadas por enzimas que ocorrem em soluções aquosas, a adição de ácidos ou bases fortes proporciona uma aceleração da velocidade observável somente se o intermediário instável da reação quebrar-se em reagentes com mais rapidez do que a transferência de prótons apenas da água (ou transferência de prótons para formar água). Nessa situação, muitos ácidos orgânicos fracos podem suplementar a água como doadores de prótons, ou então bases orgânicas fracas podem servir como aceptores de prótons.

No sítio ativo das enzimas, onde moléculas de água talvez não estejam disponíveis como doadoras ou aceptoras de prótons, a catálise acidobásica geral torna-se crucial. Algumas cadeias laterais de aminoácidos podem assumir o papel de agentes doadores e aceptores de prótons (**Figura 6-9**). Esses grupos podem estar posicionados precisamente no sítio ativo da enzima de modo a possibilitar a transferência de prótons, proporcionando um aumento de velocidade da ordem de 10^2 a 10^5 . Esse tipo de catálise ocorre na grande maioria das enzimas.

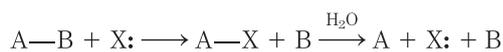
Resíduo de aminoácido	Forma geral ácida (doador de próton)	Forma geral básica (aceptor de próton)
Glu, Asp	$\text{R}-\text{COOH}$	$\text{R}-\text{COO}^-$
Lys, Arg	$\text{R}-\overset{\text{H}}{\underset{\text{H}}{\text{N}^+}}-\text{H}$	$\text{R}-\overset{\cdot\cdot}{\text{N}}\text{H}_2$
Cys	$\text{R}-\text{SH}$	$\text{R}-\text{S}^-$
His	$\text{R}-\text{C}(\text{NH})=\text{CH}-\text{N}^+\text{H}$	$\text{R}-\text{C}(\text{NH})=\text{CH}-\text{N}:$
Ser	$\text{R}-\text{OH}$	$\text{R}-\text{O}^-$
Tyr	$\text{R}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OH}$	$\text{R}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{O}^-$

FIGURA 6-9 Aminoácidos na catálise geral acidobásica. Muitas reações orgânicas são favorecidas por doadores (ácidos gerais) ou aceptores (bases gerais) de prótons. Os sítios ativos de algumas enzimas têm grupos funcionais de aminoácidos, como os mostrados aqui, que podem participar dos processos catalíticos como doadores ou aceptores de prótons.

Catálise covalente. Na catálise covalente há a formação de uma ligação covalente transitória entre a enzima e o substrato. Considere a hidrólise de uma ligação entre os grupos A e B:



Na presença de um catalisador covalente (enzima com grupo nucleofílico X:), a reação torna-se



Isso modifica o caminho da reação e resulta em catálise *apenas* quando o novo caminho tiver uma energia de ativação menor do que a da reação não catalisada. Ambas as novas etapas devem ser mais rápidas do que a reação não catalisada. Várias cadeias laterais de aminoácidos, incluindo as mostradas na Figura 6-9, e grupos funcionais de alguns cofatores de enzimas servem como agentes nucleofílicos na formação de ligações covalentes com substratos. Esses complexos covalentes sempre passam por uma reação adicional para regenerar a enzima livre. A ligação covalente entre enzima e substrato pode ativar o substrato para uma reação posterior de um modo geralmente específico para um grupo ou uma coenzima.

Catálise por íons metálicos. Metais, tanto ligados firmemente à enzima quanto tomados da solução juntamente com o substrato, podem participar na catálise de várias maneiras. Interações iônicas entre metais ligados a enzimas e substratos podem ajudar a orientar o substrato para a reação ou estabilizar estados de transição carregados. Esse tipo de uso de interações fracas entre metais e substratos é similar a alguns dos usos da energia de ligação enzima-substrato descritos anteriormente. Os metais também podem ser mediadores de reações de oxidorredução por mudanças reversíveis no estado de oxidação do íon metálico. Aproximadamente um terço de todas as enzimas conhecidas necessita de um ou mais íons metálicos para a atividade catalítica.

A maioria das enzimas combina várias estratégias de catálise para proporcionar um aumento na velocidade das reações. Um bom exemplo é o uso de catálise covalente, catálise geral acidobásica e estabilização do estado de transição na reação catalisada pela quimotripsina, apresentada em detalhes na Seção 6.4.

RESUMO 6.2 Como as enzimas funcionam

- ▶ As enzimas são catalisadores altamente eficazes, geralmente aumentando as velocidades de reação por um fator de 10^5 a 10^{17} .
- ▶ As reações catalisadas por enzimas são caracterizadas pela formação de um complexo entre o substrato e a enzima (complexo ES). A ligação ao substrato ocorre em um bolsão da enzima denominado sítio ativo.
- ▶ A função das enzimas e dos outros catalisadores é diminuir a energia de ativação, ΔG^\ddagger , da reação, aumentando, assim, a velocidade das reações. O equilíbrio da reação não é afetado pela enzima.
- ▶ Uma parte significativa da energia utilizada no aumento da velocidade das reações proporcionada por enzimas

provém de interações fracas (ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas e iônicas) entre substrato e enzima. O sítio ativo das enzimas é estruturado de modo tal que algumas dessas ligações fracas ocorrem preferencialmente no estado de transição, estabilizando esse estado. A necessidade de interações múltiplas é uma das razões para o grande tamanho das enzimas. A energia de ligação, ΔG_B , é usada de diversas maneiras para diminuir a energia necessária para a ativação, ΔG^\ddagger . Ela pode ser usada, por exemplo, para diminuir a entropia, para a dessolvatação do substrato ou para provocar uma mudança conformacional na enzima (ajuste induzido). A energia de ligação também é responsável pela extraordinária especificidade das enzimas por seus substratos.

- ▶ Mecanismos catalíticos adicionais utilizados pelas enzimas incluem a catálise geral acidobásica, a catálise covalente e a catálise por íons metálicos. A catálise geralmente envolve interações covalentes transitórias entre o substrato e a enzima, ou a transferência de grupo da enzima ou para a enzima, de modo a proporcionar um caminho novo e com menor energia de ativação para as reações. Em qualquer dos casos, as enzimas retornam ao estado não ligado uma vez que a reação tenha se completado.

Término leitura complementar

6.3 A cinética enzimática como abordagem à compreensão do mecanismo

Normalmente os bioquímicos utilizam várias abordagens para estudar o mecanismo de ação de enzimas purificadas. A estrutura tridimensional das proteínas fornece informações importantes, que são incrementadas pela química de proteínas e por modernos métodos de mutagênese sítio-dirigida (mudança na sequência de aminoácidos de uma proteína por engenharia genética; ver Figura 9-10). Essas tecnologias permitem que os enzimologistas examinem o papel de aminoácidos individualmente na estrutura e na atividade de uma enzima. Entretanto, a abordagem mais antiga para entender o mecanismo das enzimas, e que permanece ainda entre as mais importantes, é determinar a *velocidade* da reação e como ela se modifica em resposta a mudanças nos parâmetros experimentais, disciplina conhecida como **cinética enzimática**. A seguir, será apresentada uma breve introdução à cinética das reações catalisadas por enzimas. Visões mais avançadas estão disponíveis nas fontes citadas ao final deste capítulo.

A concentração do substrato influi na velocidade das reações catalisadas por enzimas

Um fator-chave que afeta a velocidade das reações catalisadas por enzimas é a concentração do substrato, [S]. Entretanto, o estudo dos efeitos da concentração do substrato é complicado pelo fato de [S] modificar-se durante o curso de uma reação *in vitro* à medida que o substrato é convertido em produto. Uma abordagem que simplifica os experimentos de cinética enzimática é medir a **velocidade inicial**, designada como V_0 (Figura 6-10). Em uma