

bulares — enzimas inclusive — são desnaturadas. A desnaturação provoca drásticas alterações conformacionais na molécula, acarretando a perda do poder de catálise. No intervalo de temperatura mencionado vive a grande maioria dos seres vivos; há, entretanto, exceções, entre as quais a mais notável é representada por bactérias que vivem em águas termais, com temperaturas ao redor de 100°C. A estabilidade térmica das proteínas destes microrganismos constitui um caso excepcional (p. 30).

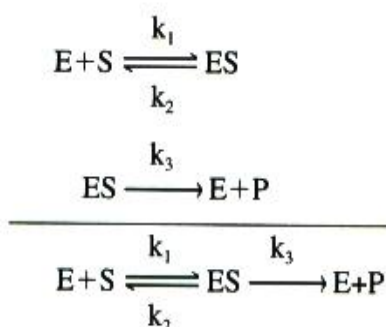
As considerações anteriores, referentes a amplas variações de pH e temperatura, são pertinentes ao estudo da atividade enzimática *in vitro*. Os seres vivos, entretanto, têm suas reações ocorrendo em ambiente tampoadado, já que todas as células dispõem de mecanismos para manutenção do pH. Mesmo assim,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

5.5 CINÉTICA DA REAÇÃO ENZIMÁTICA

Enzima e substrato formam um complexo transitório

O estudo das reações enzimáticas e de uma série de propriedades das enzimas baseia-se em medidas da *velocidade* da reação, que é diretamente proporcional à concentração do reagente. Assim, a velocidade da reação $A \rightarrow B$ (p. 60) é: $v = k[A]$. À medida que a reação se processa, ou seja, A transforma-se em B, a concentração de reagente diminui e, portanto, a velocidade da reação também diminui, passando a ser proporcional às novas concentrações de A. Para que se possa ter um valor único para a velocidade de uma reação, efetivamente proporcional à concentração inicial de A, é conveniente adotar a medida de *velocidade inicial* (v_0). Esta velocidade é obtida medindo-se a quantidade de produto formado em tempos suficientemente curtos para que, no máximo, 5% do reagente (substrato) tenham sido transformados em produto e, portanto, a concentração do reagente possa ser considerada aproximadamente constante durante o tempo da medida. Naturalmente o tempo utilizado para esta medida depende da reação considerada, podendo variar de frações de segundos até várias horas.

A reação catalisada enzimaticamente processa-se em duas etapas: na primeira, a enzima (E) liga-se reversivelmente ao substrato (ou substratos) (S), formando um *complexo enzima-substrato* (ES); na segunda fase é liberado o produto (ou produtos) (P) e a enzima volta à forma livre, podendo, então, ligar-se a outra molécula de substrato. Na maioria dos casos em que a reação catalisada é do tipo $A + B \rightarrow C + D$, os substratos A e B devem ligar-se simultaneamente ao centro ativo, onde ocorre a reação, com liberação dos produtos C e D (Fig. 5.6). Para o tratamento da cinética enzimática, será adotado um modelo mais simples ($S \rightarrow P$), em que há apenas um substrato e um produto. É o caso, por exemplo, de algumas reações de isomerização, em que um isômero é transformado em outro.



Em uma reação enzimática típica, a primeira fase da reação (formação do complexo ES) ocorre a velocidades muito maiores do que a segunda (decomposição do complexo ES em E + P); as equações de velocidade para estas fases são

$$\begin{array}{l}
 v_1 = k_1 [E] [S] \\
 v_3 = k_3 [ES]
 \end{array}$$

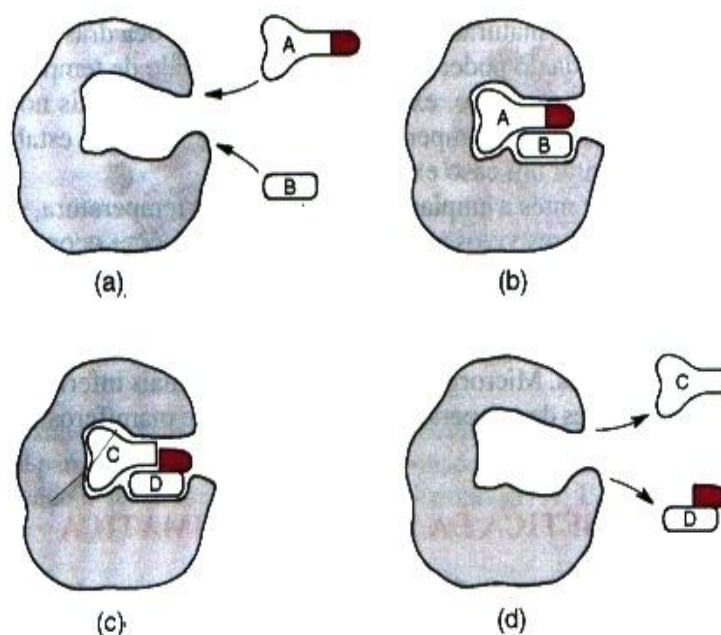


Fig. 5.6 Esquema de uma reação enzimática que consiste na transferência de um grupo químico (assinalado em vermelho), do composto A para o composto B. Em (a) as setas indicam o sítio ativo da enzima. Ambos os substratos alojam-se no centro ativo (b), onde a reação tem lugar (c); do centro ativo são liberados os produtos C e D (d).

onde k_1 , a constante de velocidade da formação do complexo ES, é maior do que k_3 , a constante de velocidade da formação do produto. Ainda mais, k_2 , a constante de velocidade de dissociação de ES em E + S, é menor do que k_1 e maior do que k_3 , isto é, $k_1 > k_2 > k_3$. A velocidade da reação global, ou seja, a velocidade da formação do produto, é, portanto, igual a v_3 , já que esta é a etapa mais lenta e limitante do processo. Estes pressupostos foram estabelecidos por Michaelis e Menten, que desvendaram, com seu tratamento matemático, a cinética da reação catalisada enzimaticamente. Estas suposições revelaram-se verdadeiras para um grande número de enzimas, atualmente chamadas *enzimas michaelianas*, e serão admitidas para as considerações feitas a seguir. Para muitas enzimas, entretanto, as premissas consideradas por aqueles autores não são verdadeiras e a cinética de suas reações é diferente da que será tratada aqui.

Nas reações enzimáticas, a concentração de enzima é, via de regra, muito menor que a de substrato. De fato, em virtude da diferença de peso molecular entre eles (Quadro 5.3), soluções equimolares de enzima e substrato não são usadas na prática e, muitas vezes, nem sequer poderiam ser obtidas. Um exemplo ilustrativo é a reação de síntese de glutamina a partir de glutamato, catalisada pela glutamina sintetase. Uma solução 10 mM de glutamato (mol = 150) contém 1,5 g/L; para conter o mesmo número de moléculas, uma solução de glutamina sintetase (mol = 600.000) deveria ser também 10 mM, ou seja, conter 6 kg de enzima por litro! Na prática, portanto, as soluções de enzimas são muito mais diluídas do que as de seus substratos e, nas reações enzimáticas, o número de moléculas de enzima é muito inferior ao número de moléculas do substrato. Esta situação é semelhante à celular, onde a concentração de substrato chega a ser 10^6 vezes superior à da enzima.

Apesar dessa disparidade numérica, quando se adiciona enzima a uma solução de substrato, nem todas as moléculas de enzima combinam-se com o substrato (Fig. 5.7, situação A). Como k_3 tem valor muito menor do que k_1 e k_2 , estabelece-se um equilíbrio entre E, S e ES, já que a conversão de ES a E + P é comparativamente muito lenta. Este equilíbrio entre E, S e ES tem concentrações definidas e constantes de cada espécie, restando sempre uma porcentagem de enzima livre (E). Na Fig. 5.8, esta fase ocorre até o tempo t_1 . Sob este aspecto, a reação $E + S \rightleftharpoons ES$ em nada difere de uma reação química genérica $A + B \rightleftharpoons C$, em cujo equilíbrio existem, concomitantemente, as espécies A, B e C. As concentrações de cada espécie dependerão do valor da constante de equilíbrio da reação e, portanto, dos valores das constantes de velocidade k_1 e k_2 :



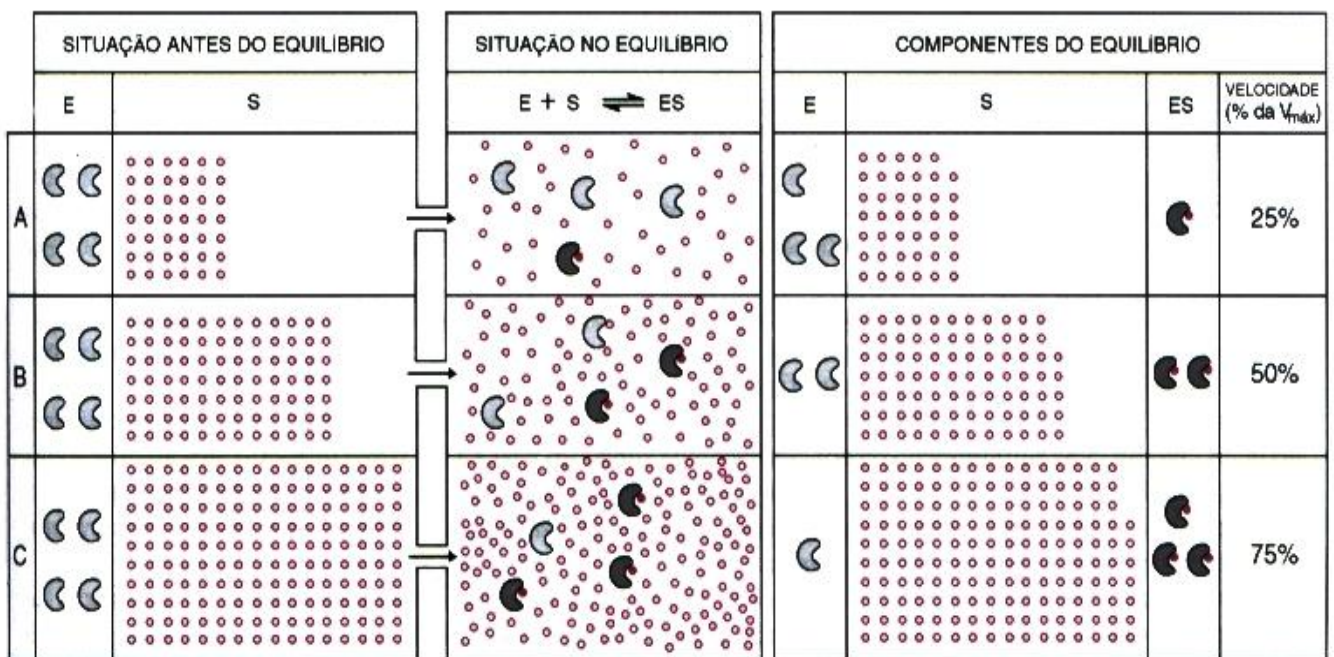


Fig. 5.7 Esquema ilustrativo do equilíbrio $E + S \rightleftharpoons ES$, em três situações (A, B, C) de concentrações diferentes de substrato e mesma concentração de enzima ($[E_{total}] = [E] + [ES]$). Na prática, a relação $[S]/[E]$ é muito maior do que a representada no esquema.

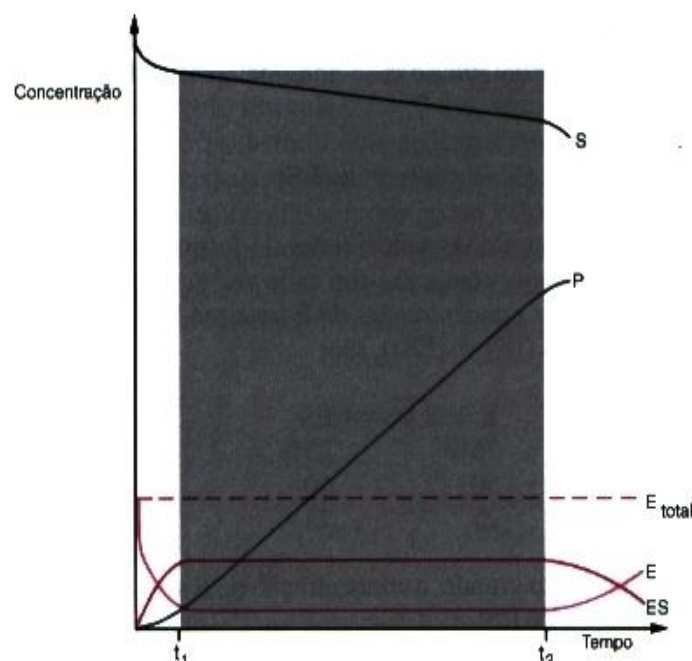
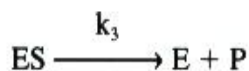


Fig. 5.8 Variação das concentrações dos componentes da reação enzimática em função do tempo. O intervalo $0 - t_1$ é muito pequeno. Após o tempo t_1 , estabelece-se o equilíbrio entre E, S e ES, cujas concentrações permanecem aproximadamente constantes até o tempo t_2 . A concentração do produto cresce sempre; a concentração do substrato, a rigor, diminui mas pode ser considerada constante face à sua enorme concentração em comparação à da enzima, do complexo ES e do produto. Entre t_1 e t_2 está o tempo inicial, durante o qual a velocidade inicial deve ser medida. Após o tempo t_2 , a concentração do substrato começa a diminuir efetivamente e a reação aproxima-se do final.

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



Note-se que o fato de ES estar sendo consumido na formação do produto não provoca diminuição da sua concentração, pois há sempre excesso de substrato (em relação à quantidade de enzima) para combinar-se com a enzima liberada quando se forma o produto.

Esta situação mantém-se durante algum tempo, chamado *tempo inicial*, durante o qual é medida a *velocidade inicial*: contínua formação do produto e concentrações estáveis de ES e E; a pequena e contínua diminuição da concentração de S não é significativa, face ao seu grande excesso. Na Fig. 5.8, este período corresponde ao intervalo $t_1 - t_2$. Naturalmente, em tempos maiores do que os tempos iniciais (tempos maiores do que t_2 , na Fig. 5.8) a diminuição da concentração de substrato passa a ser significativa: a reação prosseguirá com velocidades cada vez menores até que todo o substrato seja transformado em produto. *As considerações que serão feitas daqui para diante restringem-se exclusivamente aos tempos iniciais, e são, portanto, referentes a medidas de velocidades iniciais.*

A análise de três situações de concentrações diferentes de substrato, com uma mesma concentração de enzima, esclarece a influência da concentração do substrato na velocidade da reação. A primeira situação (situação A da Fig. 5.7) supõe uma pequena concentração de substrato (pequena, porém muito maior do que a concentração de enzima) e que o equilíbrio estabelecido por estas concentrações seja tal que apenas 25% das moléculas de enzimas presentes estejam ligadas ao substrato, formando o complexo ES. Os 75% restantes estarão livres, na forma E. No segundo caso (situação B, Fig. 5.7), admita-se igual quantidade de enzima, mas concentração de substrato maior do que a anterior. Novamente se estabelecerá o equilíbrio imediato da primeira etapa da reação. A constante de equilíbrio será, naturalmente, a mesma. Como, neste caso, a concentração de S é maior do que no caso anterior, o equilíbrio será obtido com uma concentração de ES maior e uma concentração de E menor. O aumento da concentração de substrato foi tal que levou 50% das moléculas de enzimas presentes a estar complexadas com o substrato, formando ES, deixando os outros 50% como enzimas livres, E. A concentração de ES, maior do que no caso anterior, é refletida imediatamente na velocidade de formação do produto, já que

$$v_3 = k_3[ES]$$

Com concentrações maiores de substrato, as velocidades de formação do produto tornar-se-ão cada vez maiores, porque, no equilíbrio da primeira etapa, existirá cada vez mais complexo ES (situação C, Fig. 5.7).

Nas situações A, B e C da Fig. 5.7, as concentrações de E (enzima livre) e de ES, expressas como porcentagem da concentração total de enzima ($[E] + [ES]$), são:

	$E + S \rightleftharpoons ES$	
A	75%	25%
B	50	50
C	25	75

Se a quantidade de substrato for muito grande, a concentração de E será praticamente nula, encontrando-se toda a enzima disponível sob a forma de ES:



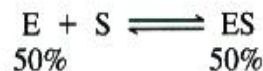
Nestas condições haverá a maior concentração possível de ES e a reação será processada na maior velocidade possível. Esta concentração de substrato é dita *saturante* e, a partir dela, novos aumentos da concentração de substrato não terão efeito perceptível sobre a velocidade da reação, que atingiu o seu valor

máximo, a *velocidade máxima* ($V_{m\acute{a}x}$) da reação. Assim, a velocidade da reação é sempre proporcional à concentração de ES, como exemplificado na Fig. 5.7, onde a velocidade é expressa em porcentagem da $V_{m\acute{a}x}$.

Os dados experimentais para a obtenção de um gráfico que relaciona velocidade inicial e concentrações de substrato (Fig. 5.9) podem ser conseguidos através do procedimento seguinte. Monta-se uma série de tubos, todos contendo a *mesma* concentração de enzima mas com concentrações crescentes de substrato. Espera-se o tempo adequado para que se forme uma quantidade dosável de produto; este tempo, entretanto, deve ser suficientemente pequeno para que no máximo 5% do substrato tenham sido transformados em produto (isto garante que a medida de velocidade corresponderá à *velocidade inicial*). Dosado o produto, a velocidade será calculada dividindo-se a quantidade de produto formado pelo tempo. Na curva obtida (Fig. 5.9), podem-se identificar duas regiões:

1. uma região em que a velocidade aumenta linearmente com o aumento da concentração de S, indicando que durante a reação havia moléculas de enzima livres; nesta parte, portanto, a concentração de S é o fator limitante da velocidade da reação.
2. uma região em que a velocidade permanece constante, igual a $V_{m\acute{a}x}$, apesar do aumento da concentração de S, indicando que todas as moléculas de enzima estiveram ligadas ao substrato durante o tempo em que a velocidade da reação foi medida.

Entre todas as concentrações de substrato, existirá uma determinada concentração que provocará a formação de uma concentração de ES igual à metade da máxima possível. Ou seja, quando se usa esta concentração inicial de substrato, o equilíbrio da primeira etapa está estabelecido com 50% das enzimas sob a forma livre e 50% das enzimas na forma ES (como na situação B da Fig. 5.7).



Nestas condições, a velocidade será, certamente, a metade da $V_{m\acute{a}x}$. Esta concentração definida de substrato é igual à *constante de Michaelis-Menten*, K_M , e apresenta interesse particular, pois seu valor indica a *afinidade* que uma enzima apresenta pelo seu substrato. Por exemplo, a *hexoquinase*, uma enzima do metabolismo de carboidratos, aceita como substrato dois açúcares simples: a glicose e a frutose. Para saber por qual das duas hexoses a hexoquinase apresenta maior afinidade, pode-se medir a $V_{m\acute{a}x}$ da reação (e calcular a metade desta velocidade), utilizando glicose como substrato, e compará-la com a $V_{m\acute{a}x}$ obtida usando frutose como substrato. No caso em que o substrato é a glicose, a metade da $V_{m\acute{a}x}$ é obtida com concentração do açúcar igual a 0,15 mM. Dito de outra forma, é necessária uma concentração de 0,15 mM de glicose para que metade da enzima disponível encontre-se ligada à glicose, fazendo o complexo Enzi-

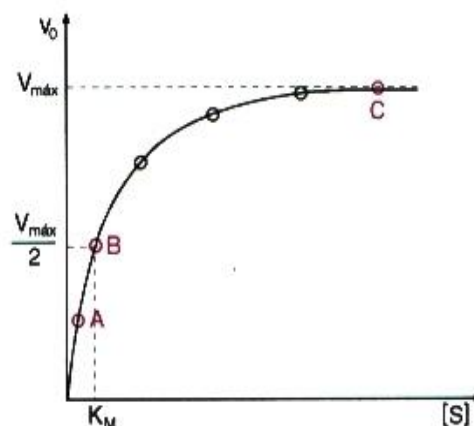


Fig. 5.9 Variação da velocidade da reação enzimática em função da concentração de substrato.

ma-Glicose. Para conseguir-se situação análoga com frutose, é necessária uma concentração de frutose 10 vezes maior, ou seja, 1,5 mM. A hexoquinase tem, portanto, uma afinidade muito maior pela glicose do que pela frutose.

A velocidade da reação é diretamente proporcional à concentração da enzima

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



para uma concentração de enzima igual a 2E deve-se ter

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

É importante lembrar que o substrato está sempre em tal excesso que a quantidade dele que se liga à enzima é desprezível e, portanto,

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

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

$$v_3 = k_3[ES]$$

a velocidade em um caso também será o dobro da outra (Fig. 5.10).

Generalizando, podemos então afirmar que a velocidade da reação é diretamente proporcional à concentração da enzima (Fig. 5.11). Esta proporcionalidade facilita a determinação da concentração (atividade) de uma enzima; há casos freqüentes em que esta dosagem é útil ou necessária.

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

As concentrações das soluções são habitualmente expressas em unidades de massa por unidades de volume; para a aferição da massa do soluto presente em soluções de uso corrente na Bioquímica, empregam-se vários métodos, sendo a determinação colorimétrica um dos mais freqüentes. As soluções de enzimas constituem um caso especial. Muitas vezes há necessidade de aferir a quantidade de uma enzi-

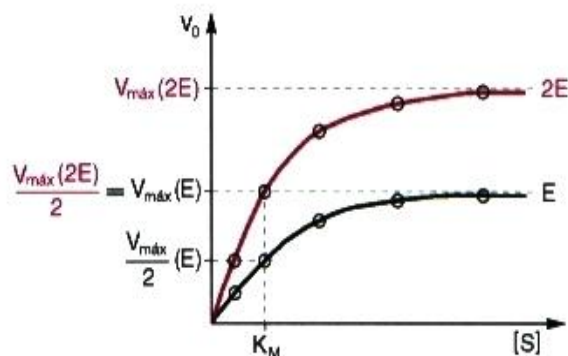


Fig. 5.10 Variação da velocidade da reação enzimática em função da concentração de substrato para duas concentrações de enzima (E, 2E).

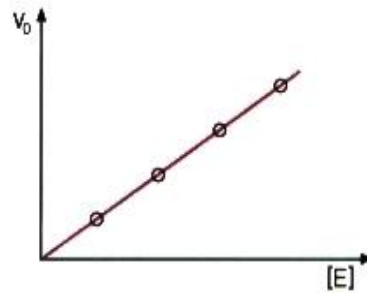


Fig. 5.11 Velocidade da reação enzimática em função da concentração de enzima.

ma presente em soluções que contêm também outras proteínas — é o caso de dosagem de enzimas em plasma sanguíneo e outros fluidos corpóreos ou em extratos celulares. Uma alternativa para esta dosagem seria purificar a enzima, um processo demorado, trabalhoso e, como será visto a seguir, desnecessário. A possibilidade de dosagem colorimétrica de uma dada enzima presente em uma solução contendo outras proteínas está descartada, pela inexistência de um reagente específico para uma dada proteína, porque os reagentes para proteínas atuam sobre todas, já que todas as proteínas têm os mesmos grupos químicos. No caso das enzimas, entretanto, esta limitação não é relevante porque o que verdadeiramente importa é aferir a quantidade de enzimas ativas, ou seja, a atividade enzimática e não a concentração. Em uma solução de proteínas desnaturadas, a massa da enzima de interesse seria conservada mas a propriedade catalítica estaria perdida.

Em virtude do exposto, a dosagem de enzimas é sempre feita através da medida de sua *atividade*, que é avaliada pela velocidade da reação que a enzima catalisa. Dada a especificidade das enzimas, esta medida é possível, mesmo na presença de outras proteínas. Para efetuar essas dosagens, uma amostra da solução contendo a enzima é incubada com concentrações altas de substratos, para garantir a velocidade máxima e impedir que pequenas variações na concentração do substrato possam afetar as medidas. A velocidade da reação é medida e expressa em Unidades Internacionais. Uma *Unidade Internacional (U)* é a quantidade de enzima capaz de formar 1 μmol de produto por minuto em condições ótimas de medida (pH, temperatura etc.), especificadas para cada caso. As dosagens clínicas de enzimas no plasma e em outros fluidos são geralmente expressas em U/mL ou U/L (Fig. 5.12).³

A concentração de enzimas intracelulares no plasma é centenas de vezes menor do que no interior das células, onde elas são sintetizadas. Em condições patológicas, quando as células são lesadas, suas concentrações plasmáticas tornam-se anormalmente elevadas, revelando a instalação da moléstia. Ainda mais, o tipo de enzima cuja concentração plasmática aumenta pode indicar o tecido ou órgão que sofreu a injúria. Por isto, a dosagem de enzimas no plasma é prática corrente para a elucidação e o acompanhamento de muitos casos patológicos (Quadro 5.5). A atividade da enzima de interesse no plasma é aferida e comparada com os valores médios encontrados em indivíduos sadios.

A medida da atividade enzimática é também imprescindível para monitorar a purificação de uma enzima. O processo de isolamento de uma enzima é iniciado a partir de um macerado de órgão ou tecido, o extrato celular. Tomando uma amostra deste extrato, deve-se determinar a atividade da enzima em questão (em U/mL, geralmente) e a quantidade total de Unidades presentes no volume total do extrato. Para adotar um parâmetro que permita a comparação com outras preparações e com etapas posteriores do processo de purificação, é necessário usar um referencial; a referência habitualmente utilizada é a concentração total de proteína presente na preparação. Define-se, assim, a *atividade específica*, ou seja, o número de Unidades de enzima por miligrama de proteína. A cada etapa processada em direção à purificação da enzima, são feitas novas medidas de atividade e de concentração de proteína, e calculada a nova atividade específica. Se a etapa de purificação foi bem-sucedida, a atividade específica encontrada deve aumentar. Este aumento significa, naturalmente, que o procedimento adotado eliminou proteínas indesejáveis. Novos procedimentos de purificação são efetuados até que, no caso ideal, a atividade específica da preparação torna-se máxima e constante, indicando que a enzima está pura (Quadro 5.6).