

ENZIMAS

CÂNDIDO PINTO RICARDO
ARTUR TEIXEIRA

Didáctica Editora



5 NOÇÕES DE
CINÉTICA
ENZIMÁTICA

Como se tem vindo a referir, a característica fundamental que permite distinguir uma enzima de outra é a reacção química que cada uma especificamente catalisa. Qualquer estudo fundamental das propriedades catalíticas de uma enzima tem de ser baseado em medições quantitativas da taxa de catálise. Além disso, é da maior importância para a compreensão dos mecanismos da acção enzimática estudar o efeito produzido pela variação de diversos factores (temperatura, concentração do substrato e de outros compostos, pH, etc.) na taxa de catálise. Tais estudos recebem a designação genérica de estudos cinéticos (do grego *kineein* — mover-se).

A análise cinética dos processos enzimáticos exige a formulação de termos matemáticos simples que permitam a derivação de equações que definam a taxa de catálise. A validade de tais equações pode ser posta à prova pela comparação dos valores por elas fornecidos com os resultados obtidos experimentalmente. Em certos casos, contudo, as expressões matemáticas que foram derivadas podem ser tão complexas que tornam difícil (se não impossível) qualquer comparação analítica entre a teoria e a experimentação. A complexidade de tais equações pode em geral ser reduzida através de certas simplificações, que possivelmente serão apenas válidas para determinadas situações experimentais.

Excluídos estes casos extremos de complexidade, os quais devem ser deixados para os especialistas na matéria, a cinética enzimática tem-se mostrado um campo da enzimologia de grande importância, não só para a compreensão dos mecanismos da acção enzimática, mas também em todos os aspectos práticos da utilização das enzimas.

A VELOCIDADE DA CATÁLISE ENZIMÁTICA

A actividade catalítica de uma enzima por unidade de tempo, ou seja a quantidade de produto formado na unidade de tempo, costuma designar-se por **velocidade de catálise** ou **velocidade enzimática**.

IMPORTÂNCIA DA DETERMINAÇÃO DA VELOCIDADE ENZIMÁTICA NO TEMPO-ZERO: A VELOCIDADE INICIAL

Quando se faz a representação gráfica da actividade catalítica de uma enzima em função do tempo, obtem-se em geral uma curva

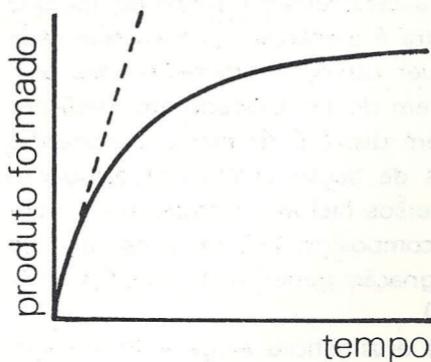


Fig. 12 — Curva da actividade catalítica de uma enzima em função do tempo (velocidade de catálise). A velocidade inicial de catálise é expressa pela tangente à curva no tempo zero.

do tipo da representada na Fig. 12, em que a actividade decresce com o tempo. Portanto, a velocidade enzimática decresce igualmente com o tempo. Vários factores poderão contribuir para tal decréscimo, como por exemplo: a) os produtos da reacção podem inibir a enzima; b) o grau de saturação da enzima com o substrato pode decrescer devido ao desaparecimento do substrato sob o efeito da catálise; c) a reacção inversa pode tornar-se mais significativa devido aos princípios da lei da acção das massas (aumento da concentração dos produtos); d) a enzima (ou coenzimas) pode sofrer um processo de inactivação em consequência da temperatura ou do pH a que a reacção está a decorrer. As causas apontadas (e outras) quando actuam (isoladamente ou em conjunto) sobre o sistema em estudo fazem com que as condições experimentais inicialmente estabelecidas não se mantenham ao longo do tempo. Com efeito, é só no momento de início da reacção (tempo-zero) que as várias causas referidas não tiveram ainda oportunidade de actuar, *sendo apenas então que as condições experimentais são conhecidas com exactidão.*

É pois fácil concluir que só será representativa das condições inicialmente estabelecidas a velocidade enzimática determinada num curto intervalo de tempo após $t = 0$, ou, mais correctamente, **o valor limite da velocidade enzimática quando o tempo tende para zero.** A esta velocidade dá-se o nome de **velocidade inicial**, costumando, simplifadamente considerá-la como a velocidade no tempo zero. A velocidade inicial (v_0), é o coeficiente angular da tangente à curva de velocidades, no ponto zero (Fig. 12). Em estudos de cinética enzimática só faz sentido utilizar velocidades iniciais.

ASPECTOS PRÁTICOS DA DETERMINAÇÃO DA VELOCIDADE INICIAL

Algumas enzimas, quando saturadas com o substrato, mantêm velocidades de catálise iguais à velocidade inicial durante um período de tempo relativamente longo, o qual pode mesmo ser superior a uma hora. Nestes casos, a determinação da velocidade inicial é muito fácil pois que para a obter bastará dividir a quantidade de produto formado, pelo tempo, isto é, determinar o valor médio da velocidade nesse período de tempo. Para proceder deste modo haverá que assegurar-se que a velocidade se manteve de facto constante durante esse intervalo; de contrário, erros graves poderão ser cometidos (ver por exemplo Fig. 13). Infelizmente, num grande número de casos, particularmente a baixas concentrações de substrato, a velocidade inicial permanece constante apenas durante fracções de minuto, tornando-se difícil a sua determinação e sendo de esperar um menor grau de rigor. A forma mais correcta de proceder nestes casos consistirá em efectuar o maior número possível de determinações num período de tempo curto imediatamente a seguir à mistura da enzima com o substrato. Se a actividade catalítica puder ser determinada por um processo contínuo, o seu registo mecânico na forma de um gráfico permitirá atingir esse desiderato. O recurso a métodos de amostragem levará forçosamente a menor rigor, dependendo grandemente da prática do experimentador.

Em estudos particularmente rigorosos é em geral importante conhecer a grandeza do erro associado com as determinações da velocidade. Se a reacção enzimática não for muito complexa poderá deduzir-se uma equação que permitirá saber em que porção da reacção, após o tempo-zero, a velocidade média tem um erro inferior a $x\%$ da velocidade inicial «verdadeira».

FACTORES QUE AFECTAM A VELOCIDADE ENZIMÁTICA

Numerosos e variados factores influenciam a velocidade inicial das reacções enzimáticas, sendo os principais: a) a concentração da enzima; b) a concentração do substrato; c) o pH; d) a temperatura; e) a presença de activadores ou de inibidores. O melhor método de investigar o efeito de cada um destes factores será fazer variar cada um *de per si* (mantendo os outros constantes) e determinar a alteração produzida na velocidade inicial da reacção enzimática como con-

sequência dessa variação. Analisa-se a seguir o efeito que cada um dos referidos factores exerce.

CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA

Na Fig. 13 A representam-se curvas de actividade enzimática ao longo do tempo, para uma mesma enzima quando esta está presente em 3 concentrações crescentes (uma, duas e quatro unidades de enzima), mas em que todos os outros factores são mantidos constantes.

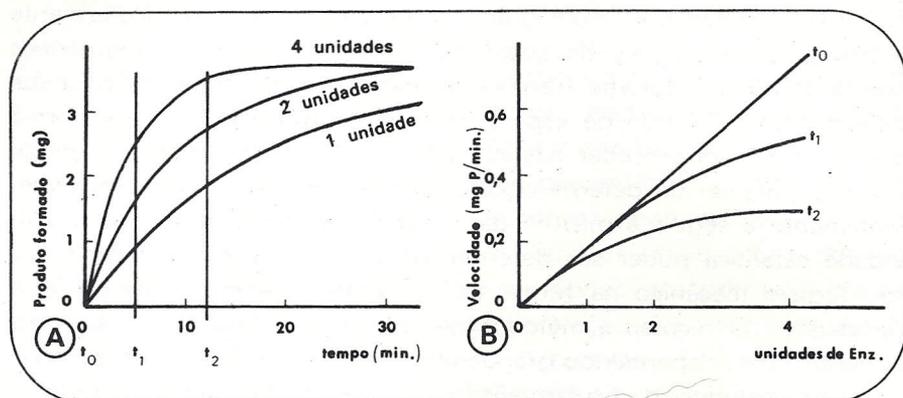


Fig. 13.A — Curvas de actividade em função do tempo para uma mesma enzima quando a três concentrações múltiplas (uma, duas e quatro unidades); B — Velocidades aparentes da catálise (obtidas, a partir de A, em três tempos diferentes), representadas em função da quantidade de enzima. Note-se que só para as velocidades iniciais se observa proporcionalidade entre a velocidade e a quantidade de enzima.

As velocidades de catálise obtidas a partir destas curvas estão representadas em função das quantidades de enzima na Fig. 13B. Como se vê, existe proporcionalidade entre as velocidades iniciais (no tempo zero, t_0) e as quantidades de enzima, isto é,

$$v = k [E] \quad (\text{Eq. 26})$$

Portanto, dentro de condições adequadas e idênticas, duas moléculas de enzima actuando independentemente, transformarão uma quantidade de substrato dupla da que é transformada por uma única molécula, no mesmo intervalo de tempo. Volta-se a insistir sobre o facto

de que só as velocidades iniciais poderão traduzir a verdadeira actividade catalítica das enzimas. Com efeito, da observação da Fig. 13B ressalta a ausência de proporcionalidade entre as velocidades medidas nos tempos t_1 e t_2 e as quantidades de enzima. A proporcionalidade expressa pela Eq. 26 só se aplica pois sob certas condições rigidamente definidas: constância de pH e temperatura, não inactivação da enzima, etc.. É só no tempo zero que poderá haver maior garantia de essas condições serem ainda rigidamente respeitadas. Como se verá na secção seguinte a velocidade de catálise é dependente da concentração do substrato e esta diminui necessariamente com o tempo de actuação da enzima. Em geral, para evitar grandes alterações na velocidade da reacção ao longo do tempo, como consequência do desaparecimento do substrato, as concentrações da enzima e do substrato são ajustadas por forma que menos de 1% do substrato seja transformado durante a experiência de medição da velocidade de catálise.

Por vezes, mesmo utilizando velocidades iniciais, a Eq. 26 parece não ser respeitada. Várias destas «excepções aparentes» têm sido descritas na literatura da especialidade. Em todos esses casos se veio a demonstrar que o desvio da proporcionalidade era devido a factores colaterais às enzimas, como por exemplo: deficiente difusão dos produtos (particularmente quando são gasosos), deficiente quantidade de coenzimas, presença de compostos tóxicos nos reagentes, presença de inibidores ou activadores na solução da enzima, etc.. Portanto, excluídas excepções do tipo referido, *existe uma proporcionalidade exacta entre a concentração da enzima e as velocidades iniciais*. Aliás, a maioria dos trabalhos de cinética enzimática assentam nesta premissa básica.

CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO

A concentração do substrato é, de entre os factores que influenciam a velocidade das reacções enzimáticas, um dos mais importantes. Determinadas as velocidades iniciais (v) de uma reacção enzimática para uma série de concentrações do substrato (S), a representação gráfica de v em função de $[S]$ fornece a curva típica representada na Fig. 14, a qual é uma secção de uma hipérbole rectangular de equação

$$v = \frac{a [S]}{[S] + b} \quad (\text{Eq. 27}),$$

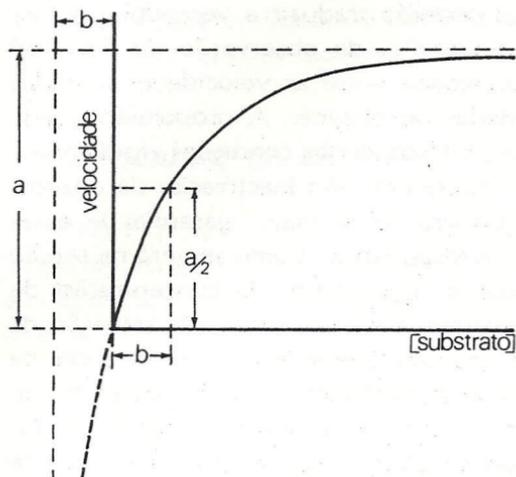


Fig. 14 — Curva hiperbólica característica da variação da velocidade inicial de uma reacção enzimática em função da concentração do substrato.

em que a e b são duas constantes, sendo a o máximo valor de v (ponto de tangência à assíntota) e b o valor de $[S]$ para o qual $v = 1/2 a$. A a dá-se normalmente a designação de **velocidade máxima**, representando-se por V_{max} ou V , e a b (uma importante constante das reacções enzimáticas) foi dado o nome de **constante de Michaelis**, representando-se por K_m . Portanto, a Eq. 27 toma, para as reacções enzimáticas, a forma usual

$$v = \frac{V [S]}{K_m + [S]} \quad (\text{Eq. 28}),$$

a qual é designada por **equação de Michaelis-Menten**.

Teoria de Michaelis-Menten

Embora a equação de Michaelis-Menten possa ser obtida através dos resultados experimentais, como acima se mostrou, ela pode ser igualmente deduzida a partir de considerações puramente teóricas, tal como aqueles dois cientistas demonstraram em 1913. Os estudos de Michaelis e Menten e os conceitos daí resultantes têm constituído as bases de grande parte da cinética enzimática.

Repare-se no significado da forma da curva da Fig. 14: para baixas concentrações do substrato existe proporcionalidade entre essas

concentrações e a velocidade da reacção; para altas concentrações do substrato a velocidade da reacção não aumenta proporcionalmente ao substrato. Este aparente desvio da lei da acção das massas, para elevadas concentrações do substrato (ver Fig. 3), levou Brown (em 1902) a sugerir que a enzima e o substrato formavam um complexo, ES, o qual era o «substrato efectivo» que determinava a velocidade da reacção enzimática (veja-se capítulo 1). Henri (em 1902), por seu turno, sugeriu que a reacção enzimática dependia de simples dissociações, processando-se segundo as equações:



em que: E-enzima livre, S-substrato, P-produto, ES-complexo enzima-substrato e k_1 , k_{-1} e k_2 são constantes de velocidade.

Michaelis e Menten, retomando os conceitos de Henri (que foram de importância capital para a compreensão dos processos enzimáticos) sugeriram que a **enzima livre (E) e o substrato (S) estavam permanentemente em equilíbrio com o complexo ES durante a reacção enzimática**. Assim sendo, a Eq. 29 traduziria uma simples dissociação e a transformação de ES (Eq. 30) seria um processo muito mais lento do que aquela dissociação. Por outras palavras, a constante k_2 seria muito mais baixa do que k_1 . Portanto, a velocidade de formação do produto (velocidade da reacção enzimática, v) não estaria dependente da velocidade de formação do complexo ES mas apenas da taxa de decomposição deste complexo, isto é,

$$v = k_2 [ES] \quad (\text{Eq. 31})$$

A constante de dissociação de ES, K_s , pode facilmente ser determinada a partir da Eq. 29, pois corresponde ao inverso da constante de equilíbrio desta equação e viria a receber a designação de constante de Michaelis (K_m). Portanto será:

$$K_s = K_m = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{[E] [S]}{[ES]} \quad (\text{Eq. 32})$$

A conjugação das equações 31 e 32 permitirá obter a equação de Michaelis-Menten (Eq. 28). No entanto convirá, antes, fazer uma transformação à Eq. 32 por forma a poder eliminar as concentrações da enzima livre e do complexo ES que são difíceis de determinar na prática. O que na prática se pode determinar é a quantidade total de enzima, E_T , sendo:

$$[E_T] = [E] + [ES] \quad (\text{Eq. 33})$$

Portanto a equação 32 tomará a forma:

$$K_m = \frac{([E_T] - [ES]) [S]}{[ES]} \quad (\text{Eq. 34})$$

Tirando o valor de $[ES]$ desta equação ter-se-á:

$$[ES] = \frac{[E_T] [S]}{K_m + [S]} \quad (\text{Eq. 35})$$

Substituindo agora este valor de $[ES]$ na Eq. 31 obtem-se:

$$v = \frac{k_2 [E_T] [S]}{K_m + [S]} \quad (\text{Eq. 36})$$

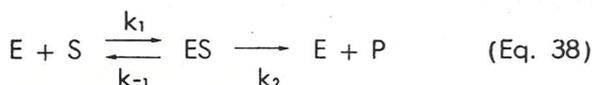
Repare-se no significado de $k_2 [E_T]$ nesta equação. Quando a concentração do substrato for muito elevada todas as moléculas da enzima estarão ligadas a moléculas do substrato ($[E_T] = [ES]$, enzima saturada) e a enzima estará funcionando ao máximo da sua velocidade, portanto, do ponto de vista teórico, poderá escrever-se nessas condições (ver Eq. 31):

$$k_2 [E_T] = k_2 [ES] = V_{\max} \quad (\text{Eq. 37})$$

A substituição deste valor na Eq. 36 fornecerá finalmente a equação de Michaelis-Menten (Eq. 28).

Teoria do «Steady-State» de Briggs-Haldane

Como se tem vindo a referir, a teoria de Michaelis-Menten considera que a formação do produto (P) a partir do complexo ES (Eq. 30) é a fase lenta do processo enzimático e portanto que ES se mantém sempre em equilíbrio com E e S (Eq. 29). Todavia, dadas as elevadíssimas capacidades catalíticas de muitas enzimas, tornou-se evidente que a formação de P poderia ocorrer tão rapidamente que o equilíbrio $E + S \rightleftharpoons ES$ nunca chegaria a verificar-se na prática. Briggs e Haldane, em 1925, consideraram não ser necessário admitir a existência de um equilíbrio de dissociação entre ES e $E + S$, mas aceitar antes o princípio de que as concentrações dos intermediários do processo enzimático (ES nas reacções de um só substrato) permaneciam constantes durante a reacção. Portanto, era sugerido que durante a reacção enzimática



a formação do complexo ES e a sua transformação para originar $E + P$ ocorriam (na ausência de outros factores) a velocidades aproximadamente iguais, pelo que a concentração de ES se mantinha constante devido a esse estado de equilíbrio dinâmico («steady-state») dos reagentes; isto é, a taxa de desintegração de ES igualava a taxa da sua formação.

Usando o postulado acabado de referir, Briggs e Haldane desenvolveram uma teoria em que relacionaram a velocidade da reacção enzimática com a concentração do substrato, obtendo uma equação idêntica à de Michaelis-Menten (Eq. 28). A diferença fundamental entre as duas equações refere-se ao significado da constante K_m . Enquanto que segundo a teoria de Michaelis-Menten K_m é uma constante de dissociação igual a k_{-1}/k_1 (ver Eq. 32), segundo a teoria de Briggs-Haldane a nova constante, K_m^1 , tem o valor:

$$K_m^1 = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (\text{Eq. 39})$$

Portanto será:

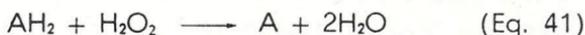
$$K_m^1 = K_m + \frac{k_2}{k_1} \quad (\text{Eq. 40})$$

vindo K_m^1 a igualar K_m quando k_2 for muito mais pequeno do que k_1 . Relembre-se que esta foi a premissa admitida por Michaelis e Menten o que mostra ser a sua teoria um caso particular da teoria do «steady-state».

Sendo a Eq. 28 a expressão matemática de ambas as teorias, e não se fazendo normalmente distinção gráfica entre as constante K_m^1 e K_m , deve-se pois ter cuidado em exprimir correctamente o valor de K_m quando tal for necessário.

Verificação experimental da teoria de Briggs-Haldane

Durante cerca de 20 anos a teoria de Briggs-Haldane foi considerada uma mera curiosidade académica dado que, embora possível determinar a constante global K_m , não havia no entanto métodos que permitissem determinar separadamente as diversas constantes de velocidade (k_1 , k_{-1} , k_2). Este estado de coisas viria a ser alterado quando se tornou viável, para certas enzimas, determinar directamente a concentração do complexo ES (geralmente através de métodos espectrofotométricos). Este campo de investigação foi inicialmente desenvolvido pelo bioquímico americano B. Chance que em 1943, aplicou pela primeira vez tal técnica à enzima peroxidase, a qual catalisa a reacção:



A peroxidase contém ferro hematóinico na sua molécula, apresentando alteração no seu espectro de absorção ao combinar-se com a água oxigenada (portanto o complexo ES pode ser assim detectado). Esta enzima apresenta outras vantagens para o estudo em questão: a) o complexo $E-H_2O_2$ pode formar-se na ausência do dador de hidrogénio, não progredindo porém a reacção além desse estágio; b) sendo o dador de hidrogénio o corante verde de malaquite (na sua forma reduzida, incolor), a reacção pode ser completamente seguida no espectrofotómetro através de detecção da forma oxidada (verde) do corante. Recorrendo a equipamento apropriado Chance conseguiu determinar as quantidades do complexo ES e do produto, ao fim de períodos de tempo inferiores a 2 segundos, após o início da reacção. Embora a reacção catalisada pela peroxidase envolva dois substratos (Eq. 41), ao manter a enzima saturada com AH_2 a reacção pode considerar-se como envolvendo apenas um único substrato — a água oxigenada (veja-se neste capítulo a cinética de reacções com mais de

um substrato). A determinação das constantes de velocidade nestas condições veio confirmar a validade da teoria de Briggs-Haldane, não só para a peroxidase, mas para outras enzimas que podem também ser estudadas por esta técnica.

No caso específico da peroxidase foi interessante verificar que o seu comportamento catalítico não podia, na verdade, ser adequadamente explicado pela teoria de Michaelis-Menten uma vez que K_m , longe de ser uma constante de dissociação (k_{-1}/k_1), era antes próxima de K_2/K_1 (isto é, representava a razão entre os dois passos sucessivos da reacção, ver Eq. 38). Deve todavia referir-se que, embora das duas teorias de cinética enzimática a de Briggs-Haldane seja a mais geral, acontece todavia que para um grande número de enzimas a teoria de Michaelis-Menten fornece valores suficientemente próximos da realidade para ser aceitável recorrer a ela. Enzimas como a peroxidase devem antes considerar-se como casos extremos de afastamento da teoria de Michaelis-Menten, relativamente raros.

Significado das constantes K_m e V_{max}

Independentemente de se aplicar a dada reacção enzimática, uma ou outra das duas teorias acabadas de apresentar, a constante de Michaelis, K_m , representa sempre o valor da concentração do substrato para o qual essa reacção se processa a uma velocidade igual a metade de V_{max} (ver Eq. 28). A constante exprime-se pois em unidades de concentração (por exemplo em *moles/litro*), sendo obviamente independente das unidades em que se exprime a velocidade da reacção. Alguns valores de K_m são indicados na Tabela 4.

Do ponto de vista prático, K_m fornece indicações sobre a eficiência com que a enzima «trabalha» com dado substrato. Um K_m pequeno indica que (para igual concentração de S) a enzima é capaz de catalisar a transformação desse substrato a maior velocidade do que quando o K_m é grande. Note-se que na célula certos substratos existem usualmente em elevada concentração enquanto que outros, pelo contrário, existem em baixa concentração. Uma vez que a concentração do substrato influencia igualmente a velocidade enzimática (veja-se a Eq. 28), compreende-se que seja de interesse celular que reacções-chave do metabolismo, e que envolvem substratos naturalmente existentes em baixa concentração, sejam catalisadas por enzimas com baixos valores

Tabela 4

Valores da constante de Michaelis (K_m) para algumas enzimas

Enzima	Reacção catalisada	Substrato	K_m (M)
α -Glucosidade, de grãos de cevada	Maltose + H ₂ O \longrightarrow 2 Glucose	Maltose	$1,8 \times 10^{-3}$
β -Fructofuranosidade ácida, da raiz da cenoura	Sacarose + H ₂ O \longrightarrow Glucose + Frutose	Sacarose	$5,6 \times 10^{-2}$
Hexocinase, de levedura	ATP + D-hexose \longrightarrow ADP + D-hexose-6-P	D-Glucose	$1,0 \times 10^{-4}$
		D-Frutose	$7,0 \times 10^{-4}$
		D-Manose	$5,0 \times 10^{-5}$
		D-Galactose	$> 5,0 \times 10^{-2}$
		ATP	$2,0 \times 10^{-4}$
Hexocinase, de cérebro de vitela	Mesma da anterior	D-Glucose	$8,0 \times 10^{-6}$
		D-Frutose	$1,6 \times 10^{-3}$
		D-Manose	$5,0 \times 10^{-6}$
		D-Galactose	$1,0 \times 10^{-1}$
Fosfoglucomutase, da glândula mamária bovina	α -D-Glucose 1,6-diP + α -D-Glucose 1-P \rightleftharpoons α -D-Glucose-6-P + α -D-Glucose 1,6-diP	α -D-Glucose 1-P	$8,5 \times 10^{-6}$
		α -D-Glucose 6-P	$5,0 \times 10^{-5}$
		α -D-Glucose 1,6-diP: (reacção directa)	$6,2 \times 10^{-8}$
		(reacção inversa)	$1,1 \times 10^{-8}$
Desidrogenase láctica, de coração de bovinos	Ac. L-láctico + NAD ⁺ \rightleftharpoons Ac. pirúvico + NADH + H ⁺	Ac. L-láctico	$1,7 \times 10^{-2}$
		NAD ⁺	$1,0 \times 10^{-4}$
		Ac. pirúvico	$1,4 \times 10^{-4}$
		NADH	$2,4 \times 10^{-5}$

de K_m para esses substratos. Na Tabela 4 referem-se alguns valores de K_m , desde bastante pequenos, como 10^{-8} M, até bastante elevados como 10^{-1} M. Para as enzimas que actuam numa série de substratos diferentes (caso das hexocinases da Tabela 4), aquele que fornece o menor K_m é em geral considerado como o substrato natural da enzima. Os K_m de enzimas isoladas de diferentes origens ao serem comparados podem dar informações sobre a possível identidade dessas enzimas. Repare-se por exemplo (Tabela 4) como as hexocinases de dois seres evolutivamente bastante afastados (como a levedura e a

vitela) apresentam valores de K_m significativamente diferentes para as diversas hexoses.

Note-se, por outro lado, que o K_m só será uma medida da afinidade da enzima para o seu substrato quando a teoria de Michaelis-Menten for verificada, sendo então K_m uma constante de dissociação (Eq. 32). Nestes casos (porventura os mais correntes) é em geral o inverso de K_m que é tomado como medida da afinidade. Baixos valores de K_m corresponderão a elevadas afinidades e altos valores a baixas afinidades.

V_{max} é uma velocidade enzimática e portanto terá as dimensões dessa velocidade, exprimindo-se usualmente em *moles de produto formado por segundo*. Chama-se desde já a atenção para o facto de a constante K_m ser independente da quantidade de enzima presente na reacção, enquanto que V_{max} depende dessa quantidade pois que quanto mais enzima estiver presente maior será a velocidade da reacção (Eq. 26), tendo-se por definição (quando a enzima está saturada), $V_{max} = k_2 [E_T]$ (Eq. 37). Para iguais quantidades de enzima, V_{max} e k_2 são importantes constantes pois que fornecem indicação sobre a velocidade de formação do produto, isto é, da transformação $ES \rightarrow E + P$ (Eq. 30). A constante k_2 que tem as dimensões

$$\frac{V_{max}}{[E_T]} = \frac{\text{mole/s}}{\text{moles}} = \frac{1}{s} \quad (\text{Eq. 42})$$

não se pode em geral determinar na prática por se desconhecer a concentração molar da enzima, a não ser quando se usem enzimas puras. Por isso é a V_{max} que se recorre para ajuizar da velocidade de transformação de ES. Tal forma de proceder será válida quando a equação 30 puder considerar-se irreversível.

Em estudos de Fisiologia recorre-se frequentemente à determinação de V_{max} , que se toma como uma medida da quantidade de dada enzima presente nos tecidos (veja-se capítulo 4). Todavia, isso não significa que na célula a velocidade de catálise de cada enzima iguale V_{max} , já que condições específicas de pH, concentração de substratos, activadores e inibidores, são algumas das formas através das quais a célula afecta a velocidade da catálise enzimática; estes são, na verdade, mecanismos de controlo metabólico a que a célula recorre (veja-se capítulo 7).

Formas práticas de determinar Km e Vmax

A determinação de Vmax e de Km a partir da curva hiperbólica que relaciona v com $[S]$ (Fig. 14) além de ser trabalhosa não fornece valores exactos pois que a assíntota à curva é difícil de estabelecer. A questão tem sido torneada, na prática, pela transformação da equação de Michaelis-Menten (Eq. 28) numa equação de forma linear. Esta técnica parece ter sido primeiramente adoptada por Woolf (anteriormente a 1932) mas só veio a ser largamente usada a partir de 1934 com a publicação dum trabalho de Lineweaver e Burk.

Na Fig. 15 apresentam-se as rectas resultantes da representação gráfica das três equações mais frequentemente utilizadas na prática

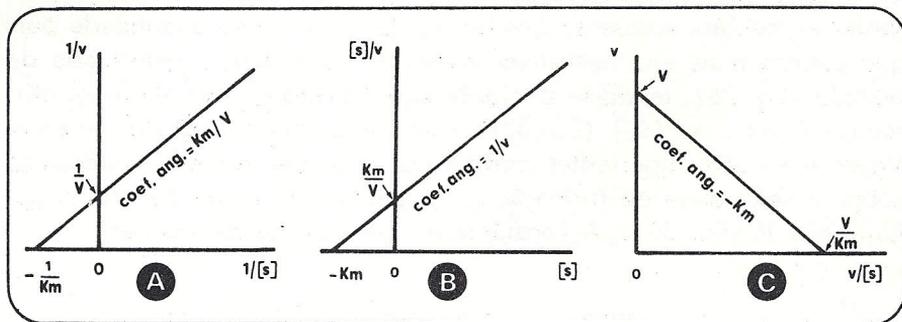


Fig. 15 — Relações lineares entre velocidade das reacções enzimáticas e concentração do substrato, segundo as equações de: A) Lineweaver-Burk; B) Eadie; C) Woolf (ou Hofstee).

para cálculo de Vmax e Km. Para obter a equação de Lineweaver-Burk, a equação de Michaelis-Menten foi transformada de modo a tomar a forma:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (\text{Eq. 43})$$

A equação de Eadie é a equação anterior multiplicada por $[S]$, logo:

$$\frac{[S]}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}} + \frac{[S]}{V_{\max}} \quad (\text{Eq. 44})$$

A equação de Woolf (ou de Hofstee) é da forma

$$v = V_{\max} - \frac{v}{[S]} K_m \quad (\text{Eq. 45})$$

As representações gráficas de $1/v$ em função de $1/[S]$, $[S]/v$ em função $[S]$ e v em função $v/[S]$, respectivamente para as equações 43, 44 e 45 fornecem as rectas indicadas na Fig. 15.

Na prática, a determinação de K_m e V_{max} é usualmente feita recorrendo a um dos três métodos gráficos representados na Fig. 15. Os valores daquelas duas constantes são obtidos a partir do coeficiente angular e das intercepções das rectas com os eixos coordenados, como se mostra na figura. Portanto, haverá que fazer incubações da enzima com diversas concentrações do substrato (S) e determinar as correspondentes velocidades iniciais (v). Conforme o método gráfico escolhido, assim haverá que transformar S e v por forma a fazer-se a respectiva representação gráfica. Apresenta-se a seguir um exemplo. Suponha-se que se pretende determinar V_{max} e K_m da enzima β -frutofuranosidase existente num extracto de raízes. Esta enzima catalisa a reacção:



podendo a velocidade de catálise ser determinada a partir da quantidade de açúcares redutores (glucose e frutose), produzidos na unidade de tempo. Fizeram-se incubações, durante 15 minutos e a 30°C , de porções de 1 ml do extracto de raízes com 4 ml de uma solução tampão de pH igual ao óptimo de actividade da enzima; cada incubado continha uma concentração diferente de sacarose (Tabela 5). Um ensaio preliminar havia mostrado que, nas condições do ensaio, a velocidade de catálise se mantinha constante ao longo dos 15 minutos; portanto, as velocidades médias de catálise durante esse período puderam ser tomadas como velocidades iniciais. Na Tabela 5 indicam-se os teores de açúcares redutores produzidos pela enzima na presença das diferentes concentrações de sacarose e as correspondentes velocidades iniciais. Tendo-se escolhido o método gráfico de Lineweaver-Burk para determinação das constantes K_m e V_{max} , houve que fazer os cálculos dos valores $1/[S]$ e $1/v$ (inversos da concentração do substrato e da velocidade inicial), que se apresentam nas duas últimas colunas da Tabela 5. Por último, fez-se a representação de Lineweaver-Burk (Fig. 16). A recta obtida corta os eixos de $1/[S]$ e $1/v$ respectivamente em $-1/K_m$ e $1/V_{max}$ (ver Fig. 15), sendo os correspondentes valores $-20 \text{ litros} \times \text{moles}^{-1}$ e $0,82 \times 10^6 \text{ min.} \times \text{ml} \times \text{moles}^{-1}$. Portanto os valores das constantes procuradas são: $K_m = 5 \times 10^{-2} \text{ moles de sacarose por litro}$; $V_{max} = 1,22 \mu \text{ moles de sacarose hidrolisada por minuto por mililitro de extracto}$.

Tabela 5

Resultados de um ensaio visando determinar os valores de K_m e V_{max} da enzima β -frutofuranosidase

Concentração do substrato (Sacarose) no tempo zero (mM)	Produto formado durante 15 min., por 1 ml de extracto (μ g açúcares redutores)	Velocidade inicial (v) (μ moles sacarose hidrolisada por min. por ml extracto)	$1/[S]$ (litrosxmoles ⁻¹)	$1/v$ ($10^6 \times \text{min.} \times \text{ml} \times \text{moles}^{-1}$)
25,0	2 216,0	0,41	40	2,44
33,3	2 540,3	0,47	30	2,13
50,0	3 242,9	0,60	20	1,66
100,0	4 431,9	0,82	10	1,22

Um método distinto dos acabados de descrever e a que é possível recorrer, particularmente quando houver um grande número de determinações a efectuar, faz uso do computador. Após programação adequada, ao fornecer ao computador a equação da hipérbole rectangular, as concentrações de S e os valores de v obtidos experimentalmente, o instrumento fornecerá rapidamente o valor da assíntota à curva (V_{max}) e a partir desta também o valor de K_m .

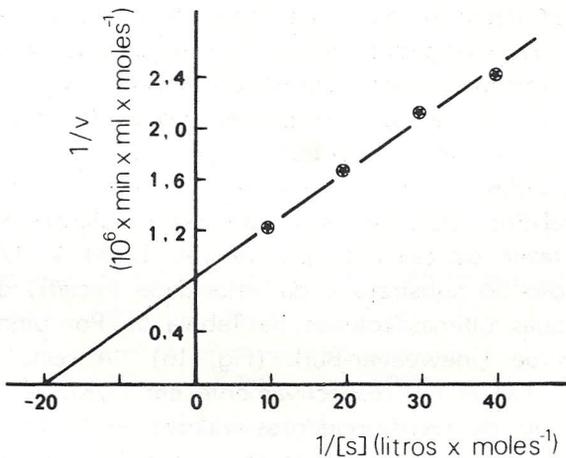


Fig. 16 — Representação gráfica de Lineweaver-Burk para determinação de K_m e V_{max} da enzima β -frutofuranosidase, segundo os dados experimentais indicados na Tabela 5.

Ordem de reacção durante a catálise enzimática

Nas reacções químicas, entende-se por *ordem da reacção o número de tipos de moléculas cujas concentrações determinam a taxa da reacção*. Convém analisar esta questão em relação às reacções catalisadas por enzimas. Considere-se uma reacção química que envolva apenas um reagente. Já se referiu que, ao representar a velocidade da reacção em função da concentração do reagente, se obtém uma recta (Fig. 3) quando a reacção é não catalisada. A recta representa pois as **reacções químicas de ordem um** (ou de **primeira ordem**). Para uma reacção de um só substrato, catalisada por uma enzima, a velocidade varia segundo um hipérbolo recta em função do substrato (Figs. 3, 14 e 17), o que indica que a ordem da reacção enzimática não permanece constante mas sim que depende da concentração do substrato. Uma vez que a equação desta hipérbolo é a equação de Michaelis-Menten (Eq. 28), considerem-se os dois casos extremos:

A) A concentração do substrato é muito menor do que K_m , próxima de zero; então a equação de Michaelis-Menten tomará a forma simplificada

$$v = \frac{V_{\max}}{K_m} [S] \quad (\text{Eq. 47})$$

e' uma vez que V_{\max}/K_m é uma constante, a velocidade v será directamente proporcional à concentração de S , o que quer dizer que para baixas concentrações do substrato a reacção enzimática é de ordem um (Fig. 17);

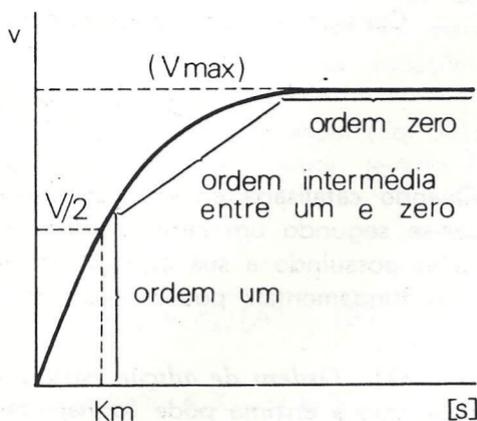


Fig. 17 — Variação da ordem da reacção enzimática em função da concentração do substrato.

B) A concentração do substrato é muito maior do que K_m e portanto ter-se-á

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{[S]} = V_{\max} \quad (\text{Eq. 48})$$

o que significa que a velocidade da reacção é independente da concentração do substrato, sendo por isso de ordem zero (Fig. 17). Para concentrações do substrato intermédias entre os dois extremos referidos, a ordem da reacção será intermédia entre um e zero.

Considerações análogas às acabadas de fazer, poderiam ser aplicadas a reacções envolvendo mais do que um substrato. Do ponto de vista dos estudos de cinética enzimática interessa que a ordem da reacção seja o mais baixo possível. Quando a reacção tiver vários substratos, a ordem da reacção poderá ser decrescida saturando a enzima com um ou mais substratos; a ordem decrescerá de um número igual ao número de substratos saturantes.

Reacções com mais de um substrato

Em todas as noções de cinética até aqui apresentadas considerou-se que a reacção enzimática envolvia apenas um substrato, todavia a maioria das reacções enzimáticas é bimolecular e outras envolvem mesmo um maior número de substratos. Portanto convirá alargar os conceitos anteriormente definidos, a reacções mais complexas.

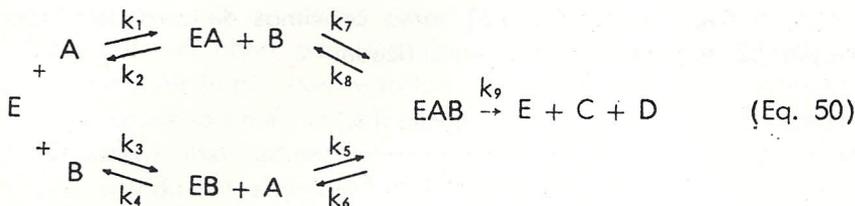
Considere-se uma reacção bimolecular



Quando catalisada enzimaticamente uma tal reacção poderá processar-se segundo um certo número de possíveis percursos, cada um deles possuindo a sua equação de velocidade. Assim, dois mecanismos fundamentais podem ocorrer:

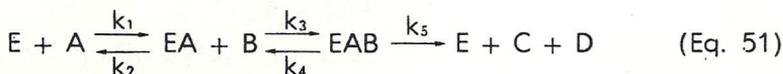
A) *Ordem de adição casual* — segundo este mecanismo admite-se que a enzima pode formar complexos binários com A e B (EA

e EB) simultaneamente, sem que haja interferência de um substrato sobre o outro. O esquema geral deste mecanismo é o seguinte:



Portanto, o complexo ternário está em equilíbrio com os dois complexos binários e com os substratos livres.

B) *Ordem de adição obrigatória ou sequencial* — neste mecanismo apenas um dos substratos (A ou B) forma o complexo binário com a enzima e só depois o outro substrato se liga à enzima para formar o complexo ternário. Assim, será:



Neste exemplo admitiu-se que seria apenas o substrato A que tinha a capacidade de formar o complexo binário.

Tal como descrito para a reacção unimolecular também nas reacções mais complexas a dedução da equação de velocidade pode basear-se quer nos princípios do equilíbrio de dissociação de Michaelis-Menten, quer nos princípios mais genéricos do «steady-state» de Briggs-Haldane. Neste segundo caso, o tratamento matemático é mais complexo pois envolve a resolução de um certo número de equações simultâneas, o que se pode tornar bastante trabalhoso.

Para a reacção bimolecular de ordem de adição casual (Eq. 50), a aplicação dos princípios da teoria de Michaelis-Menten levaria à obtenção da equação de velocidade:

$$v = \frac{k_9 [E_T]}{1 + K_{AB}/[B] + K_{BA}/[A] + K_{AB} \times K_A/[A] \times [B]} \quad (\text{Eq. 52})$$

em que: $K_A = k_2/k_1$; $K_B = k_4/k_3$; $K_{BA} = k_6/k_5$ e $K_{AB} = k_8/k_7$.

Note-se porém que $k_2 [E_T] = V_{max}$. Por outro lado, quando se mantiver um dos substratos, por exemplo B, a uma concentração muito elevada (enzima saturada com esse substrato), então ter-se-á que $K_{AB}/[B]$ e $K_{AB} \times K_A/[A] \times [B]$ serão próximos de zero pelo que a equação 52 tomará a forma simplificada:

$$v = \frac{V_{max} [A]}{[A] + K_{BA}} \quad (\text{Eq. 53})$$

a qual é análoga à equação de Michaelis-Menten para reacções de um só substrato (Eq. 28). Se for aceitável considerar que a afinidade da enzima para um dos substratos não é afectada pela presença do segundo substrato (o que é frequente nas reacções de ordem de adição casual), então ter-se-á $K_A = K_{BA}$ e $K_B = K_{AB}$, pelo que a equação 53 se poderá escrever

$$v = \frac{V_{max} [A]}{[A] + K_A} \quad (\text{Eq. 54})$$

A aplicação da teoria do «steady-state» à reacção bimolecular de ordem de adição casual levaria à obtenção de equações de velocidade análogas às equações 52, 53 e 54, em que o significado das constantes seria no entanto diferente (identicamente ao descrito atrás para um substrato).

Do ponto de vista prático interessa referir que um grande número de reacções bimoleculares têm equações de velocidade da forma da equação 52. Portanto essas reacções podem ser tratadas como reacções de um único substrato desde que um dos dois substratos seja mantido constante, a uma concentração suficientemente elevada para que a enzima permaneça saturada em relação a ele. Com efeito, a saturação da enzima com um substrato faz decrescer de uma unidade a ordem da reacção enzimática (veja-se Fig. 17) pelo que a reacção, que de outro modo seria de ordem dois, passará a ser de ordem um. Pode então fazer-se o estudo das propriedades catalíticas da enzima em relação ao substrato cuja concentração se não fixou, para o qual se obterão gráficos lineares ao efectuar as representações gráficas do tipo Lineweaver-Burk, ou afins. A partir de tais gráficos obter-se-ão V_{max} e as restantes constantes cinéticas K_A , K_B , ..., devendo no entanto

notar-se que: ao fixar o substrato A se obterão as constantes referentes a B e ao fixar B se terão as constantes referentes a A.

Uma segunda classe de reacções bimoleculares tem equações de velocidade que não se podem exprimir pela equação 52, não sendo também possível obter para tais reacções representações lineares do tipo Lineweaver-Burk. Isso significa que os mecanismos enzimáticos dessas reacções são mais complexos do que aqueles até aqui referidos. Como se verá mais adiante, as enzimas alostéricas são um exemplo em que, devido aos efeitos cooperativos entre sub-unidades, as representações de Lineweaver-Burk não dão origem a linhas rectas.

CONCENTRAÇÃO HIDROGENIÓNICA

Algumas enzimas catalisam reacções nas quais os H^+ intervêm directamente como substrato (ou produto). Um grupo importante de enzimas deste tipo são as desidrogenases:



O estado de equilíbrio destas reacções é influenciado pelo pH dado os H^+ nelas participarem. Portanto, o pH baixo favorece a reacção no sentido da redução de A e um pH alto tem o efeito oposto. Este facto tem de ser tomado em conta ao estudar estas enzimas.

Independentemente do efeito particular acabado de referir, o pH exerce uma acção geral sobre todas as enzimas. Com efeito, as enzimas são usualmente activas apenas numa gama restricta da escala do pH. Além disso, verifica-se que existe normalmente um valor bem definido de pH para o qual a actividade catalítica de cada enzima é máxima — **pH óptimo da enzima** (Fig. 18); em certos casos, contudo, observa-se antes uma banda bastante larga de máxima actividade (patamar de valores óptimos de pH) que no caso extremo da papaína (quando tem a benzoilarginamida como substrato) se estende por várias unidades de pH (Fig. 18B). Para grande número de enzimas, o pH óptimo, além de ser bem definido, situa-se próximo da neutralidade, ou quando muito entre os limites de pH 5 e 9. Todavia, há algumas excepções, pois certas enzimas podem ter o seu pH óptimo de actividade a valores extremos de pH, como é o caso da enzima proteolítica do estômago dos mamíferos, a pepsina, que com certos substratos apresenta um óptimo de pH a 1,5 (Fig. 18B). Acrescen-

te-se pois que, frequentemente, o pH óptimo das enzimas varia com o tipo de substância que está sendo utilizada como substrato.

O efeito do pH sobre a catálise enzimática, como todos os efeitos de pH, é devido a alterações no estado de ionização dos componentes

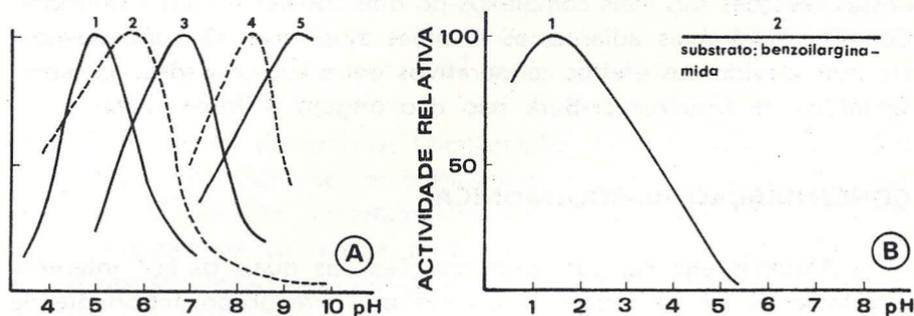


Fig. 18 — Curvas de actividade catalítica de enzimas, em função da concentração hidrogeniônica (pH) do meio de reacção. A — Algumas enzimas da raiz de ervilha: 1 — β -frutofuranosidase; 2 — peroxidase; 3 — ATPase; 4 — triose fosfato desidrogenase; 5 — malato desidrogenase (malato como substrato). B — Enzimas proteolíticas: 1 — pepsina do estômago dos mamíferos; 2 — papaína do fruto da papaia.

do sistema, em consequência da variação da concentração em H^+ . Tanto a enzima no estado livre, como o complexo enzima-substrato, como o próprio substrato, poderão ser a sede de tais alterações de ionização. Sendo as enzimas proteínas, as quais contêm numerosos grupos ionizáveis, compreende-se facilmente que uma mesma enzima possa existir numa longa série de diferentes estados de ionização, conforme o pH do meio. A ionização de grupos da proteína bastante afastados do centro activo da enzima poderão ter pouco ou nenhum efeito sobre a actividade catalítica, a não ser que originem processos de desnaturação da proteína. Alterações iónicas de grupos próximos ou pertencentes ao centro activo terão sempre grande efeito sobre a actividade catalítica.

Portanto, o efeito do pH sobre a actividade catalítica das enzimas pode resultar das seguintes influências: a) sobre a estabilidade da enzima (a qual pode ser irreversivelmente desnaturada a valores superiores ou inferiores ao pH óptimo); b) sobre a afinidade da enzima para o substrato, daí resultando deficiente saturação da enzima; c) sobre a transformação catalítica em si, isto é, V_{max} . Estes três

efeitos poderão frequentemente actuar em combinação, assim, por exemplo, para um lado do pH óptimo o decréscimo de actividade poderá resultar de diminuição de afinidade da enzima para o substrato, enquanto que para o outro lado o decréscimo de actividade poderá ser devido à instabilidade da enzima.

Em geral, é possível distinguir na prática os efeitos do pH devidos a cada uma das três causas acabadas de referir. No que se refere aos efeitos do pH sobre V_{max} e sobre K_m é mesmo possível identificar, a partir deles, os grupos da enzima que foram afectados pela concentração hidrogeniónica. Estudos desta natureza são de grande importância pois que permitem não só identificar grupos catalíticos do centro activo das enzimas, como avançar teorias sobre os mecanismos da catálise enzimática.

TEMPERATURA

O efeito da temperatura na velocidade das reacções enzimáticas pode ser muito complexo, uma vez que a temperatura pode afectar vários dos parâmetros da reacção, como por exemplo: a) a estabilidade da enzima; b) a velocidade de transformação do complexo ES; c) a afinidade entre o substrato e a enzima; d) a ionização de grupos importantes na catálise; e) a afinidade de activadores e inibidores para a enzima; etc. Todavia, estes diferentes efeitos podem ser experimentalmente estudados, cada um de per si, desde que o efeito dos restantes factores possa ser eliminado ou mantido constante. Assim, a instabilidade da enzima, devido à temperatura, pode ser estudada expondo a enzima a várias temperaturas durante um período de tempo fixo, que preceda a determinação da actividade catalítica, medindo-se esta em seguida, em condições em que a enzima seja estável. Os efeitos sobre a afinidade, do substrato ou de activadores, serão eliminados ao saturar a enzima com essa respectiva substância, podendo então determinar-se a acção da temperatura sobre V_{max} . O efeito da temperatura sobre a constante de Michaelis pode também ser determinada, usando métodos análogos aos utilizados para estudar o efeito do pH sobre a mesma constante. Importantes informações sobre a natureza de grupos catalíticos do centro activo das enzimas podem ser obtidas através destes estudos da acção da temperatura.

Temperatura óptima das enzimas

Ao estudar a actividade catalítica de uma enzima ao longo do tempo, para uma série de temperaturas, obtem-se um conjunto de curvas, as quais são geralmente análogas às representadas na Fig. 19A. Como daí se depreende, a velocidade inicial da reacção enzimática aumenta regularmente com o acréscimo da temperatura. No entanto, a quantidade de substrato transformado em intervalos de tempo sucessivos vai decrescendo, para temperaturas superiores a um certo valor. Portanto, ao considerar intervalos de tempo finitos, parece haver um valor óptimo de temperatura o qual é no entanto variável com o intervalo considerado (comparem-se os tempos t_1 e t_2 da Fig. 19A). Pode-se assim compreender que a temperatura exerce dois efeitos antagónicos sobre o sistema enzimático. Por um lado aumenta a velocidade inicial (ou verdadeira actividade catalítica) da enzima, mas por outro conduz a uma progressiva inactivação das moléculas da enzima (Fig. 19B). A conjugação dos dois efeitos conduz à definição de uma temperatura óptima.

A taxa de inactivação das enzimas em solução aumenta rapidamente com a temperatura. Na maioria dos casos essa inactivação é virtualmente instantânea já a temperaturas próximas de 70°C. O número

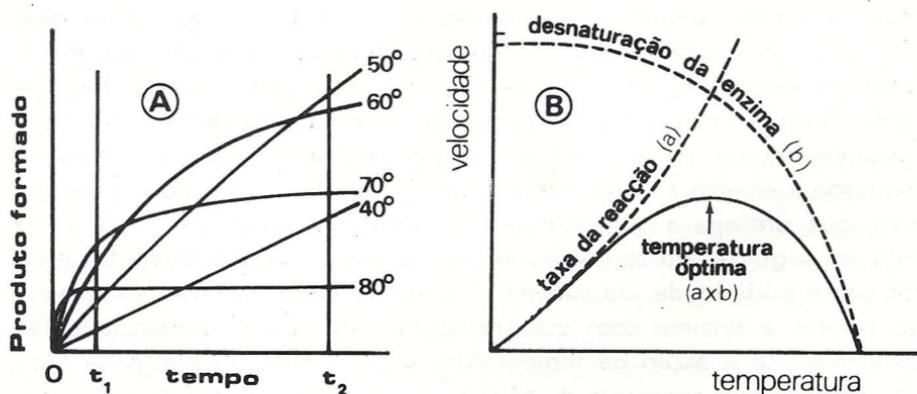
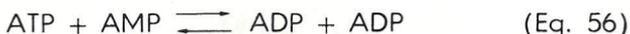


Fig. 19.A — Efeito da temperatura sobre a progressão da actividade catalítica ao longo do tempo. B — Conjugação da taxa crescente de reacção (a) com a taxa crescente de inactivação térmica (b) originando a curva de temperatura óptima das enzimas (axb).

de enzimas que pode suportar temperaturas de 100°C sem sofrerem inactivação é extremamente reduzido. Um exemplo já clássico é o da enzima adenilato cinase que catalisa a reacção:



Esta enzima pode suportar um aquecimento prolongado a 100°C e a pH 1,0.

Tem-se verificado, como já se referiu no capítulo 2, que a inactivação das enzimas pelo calor é devida à desnaturação da proteína enzimática, a qual é grandemente influenciada pelo pH. Embora cada enzima tenha o seu comportamento bastante particular, muitas enzimas são frequentemente inactivadas, mesmo à temperatura ambiente, quando o pH do meio é inferior a 5,0 ou superior a 8,0.

Q₁₀ e energia de activação das reacções enzimáticas

O efeito da temperatura nas reacções enzimáticas (e em outros processos celulares) é geralmente expresso em termos do **coeficiente de temperatura Q₁₀**. O Q₁₀ representa o factor pelo qual a velocidade das reacções enzimáticas (ou de outro processo biológico) vem multiplicada em consequência de um acréscimo de temperatura de 10°C. O Q₁₀ das reacções enzimáticas situa-se geralmente entre 1 e 2. É uma característica geral dos processos de catálise o facto de o Q₁₀ das reacções catalisadas ser mais baixo do que o das reacções não catalisadas. Por outro lado, quando se comparam enzimas com catalisadores inorgânicos, por exemplo hidrogeniões nos processos de hidrólise, verifica-se que a mesma reacção quando catalisada por enzimas tem um Q₁₀ mais baixo do que quando catalisada por um catalisador inorgânico.

Outra grandeza importante das reacções catalisadas é a **energia de activação** de Arrhenius, **E** (expressa em calorías/mole). O conceito de energia de activação é idêntico ao de variação de entalpia de activação (ΔH^*). Contudo, o cálculo de E segundo a teoria original de Arrhenius dá uma diferença de RT calorías em relação ao cálculo de ΔH^* segundo a teoria das taxas absolutas de reacção, portanto:

$$E = \Delta H^* + RT \quad (\text{Eq. 57})$$

em que ΔH^* representa a variação de conteúdo calórico (entalpia) entre o complexo activado e as moléculas não activadas, R é a constante dos gases perfeitos e T a temperatura absoluta. Resultados empíricos mostram ser, aproximadamente,

$$E = \frac{RT^2 \times \ln Q_{10}}{10} \quad (\text{Eq. 58})$$

Quando duas ou mais enzimas catalisam a mesma reacção, obtem-se uma diferente energia de activação para cada enzima, mas quando a mesma enzima actua sobre diferentes substratos, então obtem-se a mesma energia de activação para todos os substratos. Verifica-se de facto que a energia de activação parece ser mais característica de uma dada enzima do que o seu próprio substrato. Este facto é ilustrado pelos valores expressos na Tabela 6.

Tabela 6

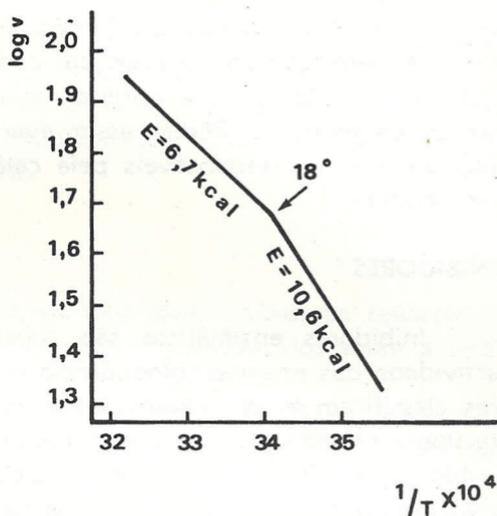
Energia de activação de reacções de hidrólise, catalisadas por H^+ e por enzimas

Reacção	Catalisador	E(cal/mole)
Hidrólise da sacarose	H^+	26 000
» » »	β -frutofuranosidade de cevada	13 000
» » »	β -frutofuranosidase de levedura	11 000
» » rafinose	β -frutofuranosidase de levedura	11 000

Representação gráfica de Arrhenius

A representação gráfica do logaritmo da velocidade inicial da reacção enzimática em função de $1/T$ (representação de Arrhenius) nem sempre origina uma recta; em certos casos o gráfico tem uma descontinuidade sendo formado por duas semi-rectas (Fig. 20). Tal descontinuidade sugere haver uma variação na energia de activação, de um valor a outro ao atingir-se a temperatura de transição. Várias têm sido as causas sugeridas como possíveis responsáveis deste fenómeno: a) existência de duas reacções enzimáticas paralelas (por exem-

Fig. 20 — Representação gráfica de Arrhenius para a reacção da fumarato hidratase (Ac. fumárico + H₂O ⇌ Ac. L-málico) a pH 6,35.



plo diferentes centros activos) com diferentes Q_{10} ; b) reacção enzimática consistindo de duas reacções sucessivas com diferentes Q_{10} ; c) existência da enzima em duas formas, com diferente energia de activação, havendo mudança na proporção relativa dessas formas (por exemplo desagregação em sub-unidades); d) inactivação reversível da enzima, que passa a existir em duas formas (activa e inactiva) em equilíbrio.

Nos últimos anos, interessantes resultados têm sido obtidos em estudos de enzimas associadas a membranas biológicas. Os pontos de descontinuidade das representações de Arrhenius feitas para as reacções catalisadas por tais enzimas aproximam-se bastante dos valores de temperatura nos quais os fosfolípidos da respectiva membrana passam de um estado ordenado (cristalino) a um estado mais desordenado. Admite-se que esta alteração da estrutura da membrana leve a uma modificação da configuração das enzimas, o que alterará alguma(s) constante(s) das reacções catalisadas por essas enzimas, e portanto os ΔH^* .

Efeito sobre o estado de ionização da enzima

Já se referiu, ao tratar do efeito do pH, a influência exercida por grupos ionizáveis da enzima na velocidade de reacção enzimática. Variações de temperatura originarão alterações no estado de ionização de cada um desses grupos. Assim, fazendo a representação gráfica

de pK_m e de $\log V_{max}$ em função do pH, para diferentes temperaturas, as alterações produzidas em cada pK podem ser medidas através das variações da sua posição nas curvas correspondentes às diferentes temperaturas. Podem assim eventualmente identificar-se os grupos da enzima, responsáveis pela catálise e que são afectados pela temperatura.

INIBIDORES

Inibidores enzimáticos são substâncias que interferem com a actividade das enzimas, bloqueando o processo catalítico. Os inibidores classificam-se em **reversíveis** e **irreversíveis**, conforme a enzima recupera ou não as suas propriedades catalíticas após a remoção do inibidor. A inibição devida aos inibidores irreversíveis é progressiva, acabando por afectar todas as moléculas da enzima, desde que a quantidade de inibidor seja suficiente. A inibição devida aos inibidores reversíveis não é progressiva, atingindo antes, um valor de equilíbrio que depende da concentração do inibidor. Portanto, o grau de inibição ao fim de um certo tempo é determinado, no caso dos inibidores irreversíveis, pela constante de velocidade da reacção entre o inibidor e a enzima, e no caso dos inibidores reversíveis pela constante de equilíbrio (K_i) da reacção:



A eficiência do inibidor é normalmente expressa por esta constante K_i , que é o recíproco da afinidade da enzima para o inibidor.

Exemplos de inibidores irreversíveis são os gases tóxicos desenvolvidos pelos alemães durante a 1.^a Guerra Mundial. Tais compostos (conhecidos por «gases dos nervos») são derivados dos ácidos fluorofosfóricos (HPO_2F_2 , H_2PO_3F , etc.), altamente voláteis e tóxicos (alguns deles dezenas de vezes mais tóxicos do que o ácido cianídrico), sendo inibidores da enzima colinesterase, catalisadora da reacção:



A acetilcolina é um dos mediadores do sistema nervoso, participando portanto no controlo do funcionamento de todos os processos vitais dos animais superiores. Regulando a colinesterase o nível de acetilcolina no organismo, compreende-se como a sua inibição irreversível afectará gravemente o organismo.

São numerosos os inibidores reversíveis podendo citar-se como exemplos: um outro inibidor da colinesterase, a eserina ($C_{15}H_{21}N_3O_2$), alcalóide extraído da planta africana feijão de Calabar, utilizado em medicina, e o ácido cianídrico, inibidor da citocromo oxidase, enzima terminal do processo respiratório.

Inibidores reversíveis

Vamos concentrar a nossa atenção sobre inibidores reversíveis, referindo resumidamente os efeitos por eles produzidos sobre a cinética enzimática.

Tal como acontece com outros factores que afectam a velocidade das reacções enzimáticas, os inibidores reversíveis podem actuar quer sobre a constante de Michaelis, quer sobre a velocidade máxima da reacção. Existem portanto dois tipos distintos de inibidores reversíveis. Os que aumentam o valor de K_m são designados por **inibidores competitivos**, uma vez que as moléculas do inibidor e as do substrato competem entre si durante a complexação com a enzima. Portanto, será



isto é, a enzima pode complexar ou o substrato ou o inibidor mas não ambos simultaneamente. Os inibidores competitivos são geralmente substâncias com estrutura análoga à dos substratos das enzimas, combinando-se com estas no mesmo local em que o substrato se liga, isto é, no centro activo. A acção dos inibidores competitivos é abolida a concentrações elevadas do substrato, não afectando portanto o valor de V_{max} .

Os inibidores reversíveis que não afectam o valor de K_m , mas que simplesmente originam um decréscimo de V_{max} são designados por **inibidores não-competitivos**. Neste tipo de inibição a enzima pode combinar-se simultaneamente com o substrato e o inibidor, isto é:



o que sugere que o inibidor se liga à enzima num local diferente do centro activo. Portanto, embora não competindo com o substrato para o centro activo das enzimas, os inibidores não-competitivos ao ligarem-se à enzima afectam a sua configuração mais apropriada à catálise, levando à diminuição da velocidade a que a reacção se processa.

A₁ — Inibição competitiva

A aplicação da teoria de Michaelis-Menten à inibição competitiva leva à obtenção da seguinte fórmula para a velocidade da reacção enzimática:

$$v = \frac{V_{\max} \times [S]}{K_m (1 + i/K_i) + [S]} \quad (\text{Eq. 63})$$

Esta fórmula difere da fórmula usual de Michaelis-Menten (Eq. 28) pelo facto de K_m vir multiplicado pelo factor $(1 + i/K_i)$, em que i representa a concentração do inibidor e K_i a constante de dissociação do complexo EI (Eq. 59). O efeito do inibidor competitivo é pois afectar K_m de um factor $(1 + i/K_i)$, designando-se por K_m aparente, a nova constante:

$$K_p = K_m (1 + i/K_i) \quad (\text{Eq. 64})$$

Note-se assim que ao aumentar i , K_p aumentará proporcionalmente.

Dando à equação 63 a forma de Lineweaver-Burk, ter-se-á:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_m (1 + i/K_i)}{V_{\max} [S]} \quad (\text{Eq. 65})$$

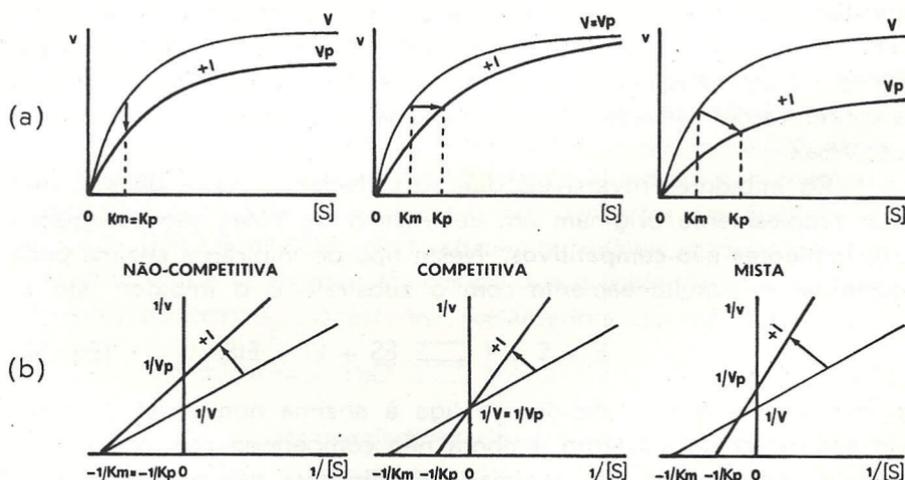


Fig. 21 — Representação gráfica do efeito de três tipos de inibidores reversíveis, nos parâmetros da reacção enzimática. a) Representação de v em função de $[S]$; b) representação de $1/v$ em função de $1/[S]$ (ou de Lineweaver-Burk). As setas indicam o sentido das transformações produzidas pela presença dos inibidores; $K_p = K_m$ aparente; $V_p = V$ aparente.

Se S estiver em elevada concentração, então pela equação anterior será $1/v = 1/V_{\max}$ o que indica que V_{\max} não é afectada pela presença do inibidor.

Na Fig. 21 estão representados graficamente os efeitos produzidos pelo inibidor nos parâmetros da reacção enzimática.

A₂ — Inibição não-competitiva

Quando a reacção enzimática ocorre na presença de um inibidor não-competitivo, então a equação de Michaelis-Menten toma a forma

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{1 + i/K_i \cdot (K_m + [S])} \quad (\text{Eq. 66})$$

Portanto, na presença do inibidor a velocidade máxima vem dividida pelo factor $(1 + i/K_i)$, designando-se por velocidade máxima aparente a grandeza

$$V_p = \frac{V_{\max}}{1 + i/K_i} \quad (\text{Eq. 67})$$

É fácil de verificar pela Eq. 66 que o valor de $[S]$ para o qual $v = V_p/2$ é $[S] = K_m$. Logo, o inibidor não-competitivo decresce o valor de V_{\max} de um factor proporcional à concentração do inibidor, mas não afecta o valor de K_m da reacção enzimática. Estas mesmas conclusões ressaltam da observação das representações gráficas da Fig. 21.

A₃ — Outros tipos de inibição reversível

As duas formas de inibição acabadas de referir são casos especiais, extremos, sendo frequente que os resultados obtidos na prática não se ajustem a nenhum deles, sendo antes formas parciais de inibição ou mesmo formas mistas. Têm-se assim descrito casos de inibição **parcialmente competitiva**, **parcialmente não-competitiva** e **mista**, entre outras. Enquanto que as duas primeiras se aproximam de um ou outro dos tipos extremos referidos, a inibição mista, como o nome sugere, é um misto das inibições competitiva e não-competitiva, acontecendo

Fazendo a representação gráfica de $1/v$ contra $1/[S]$ para diferentes concentrações de I obtém-se uma série de linhas paralelas (Fig. 22).

A₄ — Métodos de determinação de K_i

A constante de inibição, K_i , é, como já se referiu, a constante de dissociação do complexo formado entre a enzima e o inibidor ou, por outras palavras, o inverso da afinidade da enzima para o inibidor.

Existem vários métodos que permitem determinar K_i . Um, bastante corrente, consiste em determinar os valores de K_m e V_{max} na ausência de inibidor e os valores aparentes destas grandezas (K_p e V_p) quando o inibidor está presente, recorrendo a métodos gráficos do tipo Lineweaver-Burk (Fig. 21). Para os inibidores competitivos ter-se-á, a partir da Eq. 64, que:

$$K_i = \frac{i}{(K_p/K_m) - 1} \quad (\text{Eq. 71})$$

e, para os inibidores não-competitivos, através da Eq. 67, ter-se-á:

$$K_i = \frac{i}{(V_{max}/V_p) - 1} \quad (\text{Eq. 72})$$

Portanto, a partir destas duas equações e dos valores obtidos a partir dos gráficos de Lineweaver-Burk (K_p e K_m para os inibidores competitivos e V_{max} e V_p para os inibidores não-competitivos) é possível determinar os respectivos valores de K_i .

Este método tem a vantagem de ser aplicável mesmo quando a inibição for parcialmente competitiva ou não-competitiva, ou mesmo mista. Nestes casos, todavia, as expressões que fornecem o valor de K_i não são as Eq. 71 e 72, mas outras relações. Este assunto pode ser aprofundado no livro de Dixon e Webb: «Enzymes».

A constante K_i exprime-se em unidades de concentração (moles/l). Uma vez representar K_i o inverso da afinidade da enzima para o inibidor, este será tanto «mais potente» quanto menor for K_i . Na Tabela 7 indicam-se os valores de K_i para inibidores de algumas enzimas.

Tabela 7

Exemplos de inibidores enzimáticos e valores das respectivas constantes K_i

Enzima	Reacção catalisada	Inibidor	K_i (M)
Lactato desidrogenase do músculo de coelho	$L\text{-Lactato} + \text{NAD}^+ \rightarrow \text{Piruvato} + \text{NADH} + \text{H}^+$	Piruvato Lactato	$1,8 \times 10^{-4}$ $2,6 \times 10^{-2}$
Glucose-6-P desidrogenase de levedura	$Gl-6\text{-P} + \text{NADP}^+ \rightarrow \text{Ác. 6-P-Glucónico} + \text{NADPH} + \text{H}^+$	NADPH Fosfato	$2,7 \times 10^{-5}$ 10^{-1}
Hexocinase de levedura	$Glucose + \text{ATP} \rightarrow Gl-6\text{-P} + \text{ADP}$	Glucose-6-P	$9,1 \times 10^{-3}$
Álcool desidrogenase de levedura	$\text{Álcool} + \text{NAD}^+ \rightarrow \text{Aldeído (ou cetona)} + \text{NADH} + \text{H}^+$	Acetaldeído NADH Etanol NAD ⁺	$6,7 \times 10^{-4}$ $1,8 \times 10^{-5}$ $4,3 \times 10^{-2}$ $6,1 \times 10^{-4}$
Alanina racemase de <i>Pseudomonas sp.</i>	$L\text{-Alanina} \rightarrow D\text{-Alanina}$	Amino-oxiacetato Hidroxilamina	$4,0 \times 10^{-7}$ 10^{-5}
Citrato liase de <i>Streptococcus diacetilactis</i>	$\text{Citrato} \rightarrow \text{Acetato} + \text{Oxaloacetato}$	Mg ⁺⁺ Ca ⁺⁺	$2,5 \times 10^{-2}$ $1,7 \times 10^{-4}$
Adenosina deaminase de <i>Aspergillus oryzae</i>	$\text{Adenosina} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Inosina} + \text{NH}_3$	Adenina Inosina Hipoxantina	$6,7 \times 10^{-4}$ $7,0 \times 10^{-4}$ $7,9 \times 10^{-3}$
α -Glucosidase de levedura	$\text{Maltose} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2 \text{ Glucose}$	Maltose Sacarose	$3,5 \times 10^{-2}$ $3,7 \times 10^{-2}$
β -Amilase de batata doce	Hidrólise do amido	Ciclo-hexa-amilose	$1,7 \times 10^{-4}$

PECULIARIDADES CINÉTICAS DAS ENZIMAS ALOSTÉRICAS

CURVA SIGMÓIDE DO EFEITO DO SUBSTRATO NA VELOCIDADE INICIAL

Ao fazer a representação gráfica da velocidade inicial em função da concentração do substrato, verifica-se não se obter, para as enzimas alostéricas, a habitual curva hiperbólica (Fig. 14), mas antes uma curva de configuração sigmóide (Fig. 23), mais ou menos pronunciada conforme as condições do ensaio e a escala da representação. Demonstrou-se que, nas enzimas alostéricas *, este tipo de curva é consequên-

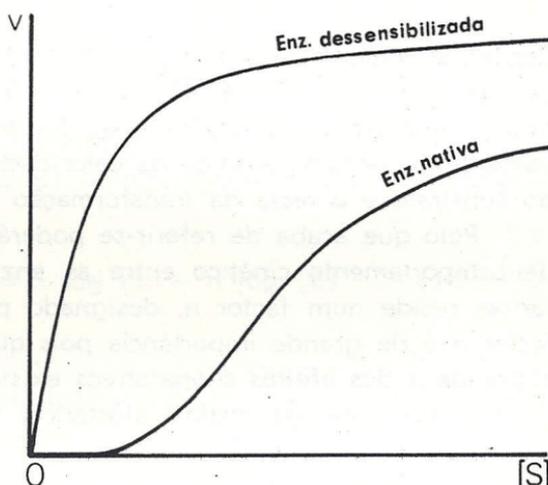


Fig. 23 — Representação gráfica de v em função de $[S]$ para uma enzima alostérica. A) Curva sigmóide obtida com a enzima no estado nativo; B) curva hiperbólica obtida com a mesma enzima após dessensibilização pelo calor.

cia das interações cooperativas (ver Fig. 9 e 10) que ocorrem entre os vários centros receptores para o substrato, existentes na molécula da enzima. A sujeição da enzima a vários tratamentos químicos e físicos (por exemplo a acção do calor) leva à sua dessensibilização alostérica, o que tem como consequência passar ela a comportar-se, do ponto de vista cinético, como as enzimas não alostéricas (Fig. 23). Portanto a dessensibilização leva à perda do comportamento alostérico sem todavia originar perda de actividade catalítica.

(*) — Reacções catalisadas por enzimas não alostéricas podem fornecer representações do tipo sigmóide quando possuindo ordem elevada.

DETERMINAÇÃO DA GRANDEZA DOS EFEITOS COOPERATIVOS

A partir da curva sigmóide (v em função de $[S]$) das enzimas alostéricas não é possível obter uma representação linear do tipo Lineweaver-Burk ($1/v$ em função de $1/[S]$). É no entanto possível fazer uma transformação empírica que leve a curva sigmóide a tomar uma forma hiperbólica, de maneira análoga ao que fora já proposto por Hill ao estudar a saturação da hemoglobina com oxigénio. A **equação de Hill**, também utilizada para as enzimas alostéricas, é:

$$v = \frac{V_{\max} [S]^n}{K_m + [S]^n} \quad (\text{Eq. 73})$$

Consequentemente, ao fazer as representações gráficas de v em função de $[S]^n$ e de $1/v$ em função de $1/[S]^n$ (Fig. 24) obter-se-ão as típicas representações gráficas das enzimas não alostéricas, respectivamente, a curva hiperbólica da velocidade em função da concentração do substrato e a recta da transformação de Lineweaver-Burk.

Pelo que acaba de referir-se poderá concluir-se que a diferença de comportamento cinético entre as enzimas alostéricas e não alostéricas reside num factor n , designado por **coeficiente de Hill**. Este factor n é de grande importância pois que se demonstra traduzir ele a grandeza dos efeitos cooperativos existentes entre o substrato e os centros receptores da enzima alostérica.

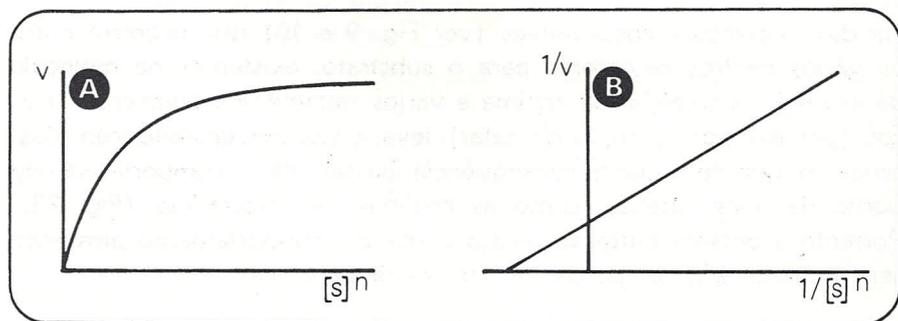


Fig. 24 — Representações gráficas da equação de Hill: A) v em função de $[S]^n$ e B) $1/v$ em função de $1/[S]^n$.

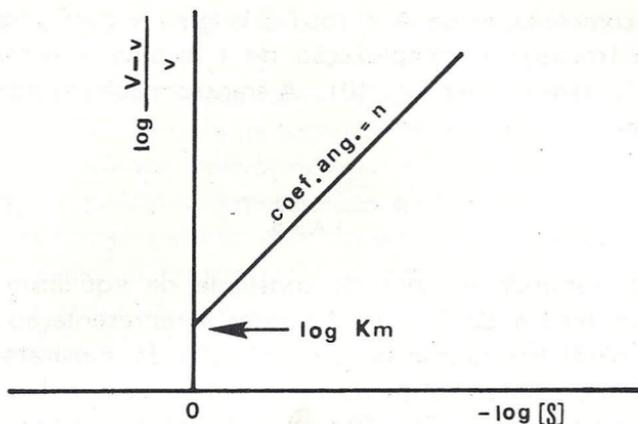


Fig. 25 — Método gráfico da determinação do coeficiente de Hill (n) para enzimas alostéricas

Para obtenção do valor do coeficiente de Hill, haverá que encontrar métodos apropriados. Pode por exemplo recorrer-se ao computador. Um método menos sofisticado, e de uso bastante corrente, baseia-se na equação 73 após rearranjo apropriado, que leva à expressão:

$$\log \frac{V_{\max} - v}{v} = \log K_m - n \log [S] \quad (\text{Eq. 74})$$

Ao fazer a representação gráfica de $\log \frac{V_{\max} - v}{v}$ em função de $-\log [S]$, obtém-se uma recta (Fig. 25) cujo coeficiente angular é igual ao coeficiente de Hill.

ACÇÃO DOS ACTIVADORES E INIBIDORES ALOSTÉRICOS

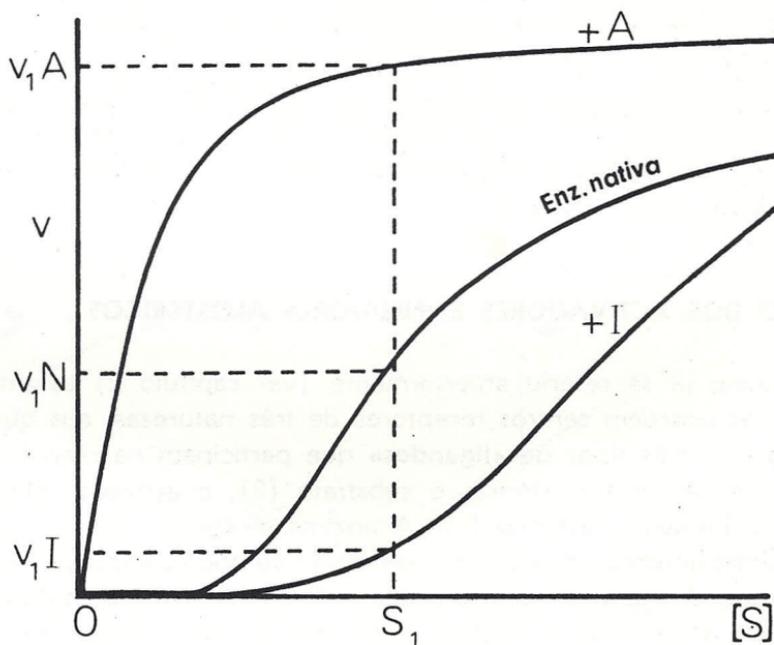
Como já se referiu anteriormente (ver capítulo 2) as enzimas alostéricas possuem centros receptores de três naturezas, aos quais se vão ligar os três tipos de «ligandos» que participam na reacção enzimática de natureza alostérica: o substrato (S), o **activador alostérico** (A) e o **inibidor alostérico** (I). A enzima alostérica pode complexar A e S simultaneamente, mas pelo contrário não pode complexar nenhum destes ligandos ao mesmo tempo que I. Por outro lado, a configuração molecular da enzima é afectada pelo tipo de ligando que tem com-

plexado: a complexação de A e (ou) S origina a configuração R (de «relaxed» = frouxa); a complexação de I origina a configuração T (de «tight» = tensa) (ver Fig. 10). A transformação entre estas duas configurações,



é reversível, variando o valor da constante de equilíbrio L com as concentrações de I e de $S + A$. Ao fazer a representação gráfica da velocidade inicial em função da concentração do substrato para uma enzima alostérica, na presença ou na ausência de A e I, obtêm-se as curvas indicadas na Fig. 26. Portanto, o inibidor alostérico leva a acentuar a forma sigmóide da curva da velocidade, enquanto que o activador alostérico faz com que a curva tome a forma hiperbólica. Pode pois concluir-se que os efeitos cooperativos devidos ao substrato são máximos quando a enzima se encontra no estado tenso, e mínimos quando ela está no estado frouxo (que possui já máxima afinidade para o substrato).

Fig. 26 — Efeito da presença do activador ou do inibidor alostérico, na forma da curva da velocidade inicial em função de [substrato] de uma enzima alostérica.



INTERACÇÕES ENTRE «LIGANDOS»

É costume definir duas classes de efeitos alostéricos: 1) **Efeitos homotrópicos**, que são as interacções entre moléculas de um só tipo de ligando; 2) **Efeitos heterotrópicos**, que são as interacções entre moléculas de ligandos diferentes. As interacções homotrópicas são sempre cooperativas (isto é, intensificam-se), enquanto que as interacções heterotrópicas podem ser cooperativas ou antagónicas (isto é, intensificarem-se ou anularem-se). Nas células, as enzimas alostéricas estão geralmente sempre sujeitas a interacções homotrópicas, devidas pelo menos a um tipo de ligando, podendo ainda estar sujeitas a efeitos heterotrópicos. Esta questão está relacionada com a regulação do metabolismo celular. Como se verá no capítulo 7, muitas das enzimas que têm papel-chave em tal regulação são de natureza alostérica.

DESSENSIBILIZAÇÃO E ALTERAÇÃO MOLECULAR

Quando a enzima alostérica é dessensibilizada, todas as categorias de interacções alostéricas deixam simultaneamente de ser observáveis. Por outro lado, como se referiu acima, a enzima passa a fornecer uma curva de velocidade do tipo hipérbole (Fig. 23). A comparação das Figs. 23 e 26 mostra então que a enzima dessensibilizada fica permanentemente numa configuração semelhante ao estado frouxo. Admite-se que a dessensibilização origina alterações estruturais que, não afectando os centros activos da enzima, afectam todavia a sua estrutura quaternária, quer levando à dissociação da enzima em monómeros, quer modificando a relação estrutural existente entre as sub-unidades. Possivelmente, a configuração frouxa é a menos «constrangida», por natureza mais estável do que a configuração tensa, ou aquela que o substrato estabiliza naturalmente.

O metabolismo dos seres vivos é consequência de um complexo e elaborado conjunto de reacções químicas mais ou menos interdependentes, estando todos os processos celulares intimamente dependentes da acção de catalisadores biológicos — as enzimas.

Conhecem-se mais de 1000 enzimas, cada uma delas catalisando, salvo raras excepções, uma reacção específica e indispensável ao harmonioso funcionamento da célula.

Apresentam-se neste livro noções sobre o processo de catálise enzimática e sobre os mecanismos da sua regulação na célula.



COLECCÃO FORMAÇÃO UNIVERSITÁRIA

