Resumo Tema 6: Cinética e mecanismos de catálise enzimática

As enzimas são responsáveis pela catálise das reações dos sistemas biológicos. Elas aceleram as reações químicas, têm um alto grau de especificidade para os seus respectivos substratos, atuam em soluções aquosas sob diferentes condições de temperatura e pH. Com exceção de um pequeno grupo de RNAs catalíticos, as enzimas são em sua maioria proteínas, e sua atividade catalítica depende da integridade das suas conformações nativas.

As enzimas são classificadas de acordo com o tipo de reação catalisada em seis classes: oxidorredutase, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases. Adicionalmente, um código de 4 números (E.C number) é dado para identificar cada enzima.

A forma em que as enzimas aumentam a velocidade de uma reação é via diminuição da energia de ativação necessária para que um substrato seja convertido em produto. A ligação ao substrato ocorre em um bolsão da enzima denominado sítio ativo, dando origem a um complexo ES. De um modo geral, uma reação enzimática simples pode ser descrita da seguinte forma:

k1 k2

E+S <--> ES <--> EP <--> E+P

k-1

Em que E é a enzima, S é o substrato, P é o produto, ES e EP são complexos transitórios da enzima com o substrato e com o produto, k1: constante de velocidade de formação do complexo; k‐1: constante de velocidade de dissociação do complexo ES; k2: constante de velocidade de decomposição do complexo ES, formando o produto.

Por sua vez, a análise quantitativa dos fatores que influenciam a velocidade de uma reação bioquímica é o objetivo da cinética enzimática. Assim a cinética enzimática permite:

-Determinar as constantes de afinidade do S e dos inibidores (Km e Ki);

-Conhecer as condições ótimas da catálise (T, pH, [S] etc);

-Ajudar a elucidar os mecanismos de reação (estudo ordem reação e tipo cinética);

-Determinar a função de uma determinada enzima em uma rota metabólica (para um dado S)

A efetividade de ação de uma enzima é dada pela medida da velocidade da reação que a enzima catalisa, a qual é determinada pela quantidade de produto gerado, ou de substrato consumido, por unidade de tempo, como representado na equação abaixo:

(1)

Para determinação da velocidade da reação catalisada por uma enzima, e calcular a atividade enzimática, a técnica experimental mais usual da cinética enzimática é o método das velocidades iniciais, que assume a cinética de estado estacionário.

Dessa forma, a taxa medida de consumo do substrato, ou formação de produto, deve ser constante em toda faixa de tempo do ensaio para se medir a verdadeira taxa inicial. Para isto, é preciso garantir que a formação de produto em função do tempo e a velocidade da reação em função da concentração de enzima sejam lineares. Medidas de velocidade inicial de uma reação enzimática são primordiais para o entendimento do mecanismo de ação da enzima.

Por definição da International Union of Biochemistry (IUPAC), uma unidade de atividade enzimática (1 U) é a quantidade de enzima que catalisa a conversão de um μmol do substrato por minuto, nas condições do ensaio. Então, para se determinar a atividade da enzima, deve‐se normalizar a velocidade da reação catalisada (em μmol/min) pela quantidade de enzima utilizada na reação catalítica (por exemplo, mg, mL, mol).

A cinética da reação enzimática é afetada por mudanças nas condições da reação, como, por exemplo, concentração de substrato, pH, temperatura, presença de inibidores ou ativadores, entre outras. Em resumo, para a determinação da velocidade de reação, alguns aspectos devem ser observados:

• O ensaio deve ser feito em altas concentrações de substrato. Na prática, são recomendadas conversões de aproximadamente 5% do substrato durante o tempo de realização do ensaio. Assim, a concentração de substrato permanece em excesso no meio reacional durante todo o

tempo de reação.

• A concentração de produto formada, ao término do ensaio, deve ser baixa o suficiente para não ter influência sobre a velocidade.

• As condições de pH e temperatura devem ser favoráveis à reação.

• Os ensaios devem ser reprodutíveis.

O conjunto de dados mais importante e informativo é obtido ao estudar a velocidade da reação em função da concentração de substrato. Para muitas enzimas, a velocidade inicial varia hiperbólicamente com a concentração de substrato, para uma mesma concentração de enzima. O modelo cinético proposto por Michaelis e Menten (1913) é um dos mais utilizados para descrever esse efeito. Se os ensaios realizados se diferem apenas pela concentração inicial do substrato, a velocidade da reação será função crescente da concentração de substrato até um determinado valor, quando a enzima se torna saturada pelo substrato e a velocidade se mantém aproximadamente constante quando maiores concentrações de substrato estão disponíveis

Vm é a máxima velocidade inicial, teoricamente atingida quando a enzima está saturada pela alta concentração de substrato, e representa o valor do eixo y no qual a curva atinge o platô. km, denominada constante de Michaelis,-Menten é a concentração de substrato na qual é atingida uma velocidade igual à metade da máxima e indica a afinidade (tendência de se ligar) de uma enzima com seu substrato. Quando uma enzima atuar sobre mais de um substrato, km permite identificar o substrato pelo qual a enzima tem maior afinidade. Quanto menor for o valor de km, maior será a afinidade da enzima pelo substrato. Se uma enzima tem um baixo valor de km, ela atinge sua velocidade máxima inicial (Vm) em baixas concentrações de substrato.

Para a maioria das enzimas, km varia entre 10‐1 e 10‐7 M.

Observando o gráfico da Figura 2 e a Equação 2, pode‐se perceber que, se a concentração de substrato for muito menor que km, ou seja, km+S≈km,então v=(Vm/km).S, e a velocidade de reação se comporta como de primeira ordem em função da concentração de substrato, ou seja, a velocidade é linearmente proporcional ao aumento da concentração de substrato. Mas, se a concentração de substrato for muito maior que km, então km+S≈S e v=Vm, a velocidade de reação se comporta como de ordem zero, ou seja, a velocidade não é modificada com o aumento da concentração de substrato.

A determinação dos parâmetros km e Vm a partir de valores experimentais de velocidade inicial em função de diferentes concentrações de substrato pode ser feita por regressão não linear, ajustando os dados experimentais à equação de Michaelis-Menten. É também possível aplicar transformações para linearizar a equação de Michaelis‐Menten e ajustar os dados experimentais a uma reta. Entre as opções de linearização, Lineweaver‐Burk, também conhecida como duplo recíproco, é a mais popular. Uma questão importante, diz a respeito do tipo de enzima com que estamos trabalhado, pois apesar da ampla aplicabilidade do modelo de Michaelis‐Menten, ele não é capaz de descrever as propriedades cinéticas de todas as enzimas. Enzimas alostéricas, que apresentam múltiplas subunidades e múltiplos sítios ativos, por exemplo, não obedecem à cinética de Michaelis‐Menten.