



Capítulo

3

VALTER T. MOTTA

---

BIOQUÍMICA BÁSICA

# Enzimas

# 3

---

## Enzimas

### Objetivos

1. Compreender a sistematização da nomenclatura enzimática.
2. Descrever as classes enzimáticas: hidrolase, transferase, isomerase, liase, ligase e oxirredutase.
3. Descrever a função de coenzimas e co-fatores na biocatálise.
4. Conceituar energia livre de ativação e correlacionar com a atividade enzimática.
5. Conceituar sítio ativo de uma enzima e correlacionar com atividade enzimática.
6. Conceituar número de renovação (turnover) e reconhecer sua significação biológica.
7. Conceituar especificidade enzimática e reconhecer sua significação biológica.
8. Descrever o efeito da temperatura e pH sobre a velocidade da reação enzimática.
9. Descrever o efeito da variação da concentração do substrato na velocidade da reação enzimática e indicar o significado do Km.
10. Descrever as semelhanças e diferenças entre inibição enzimática competitiva, não-competitiva e incompetitiva ao nível de sítio ativo.
11. Descrever a regulação alostérica e seus efeitos.
12. Reconhecer que o caráter sigmoidal da curva de substrato de uma proteína alostérica, depende da interação entre as subunidades e é modificado pela interação da proteína com o efetor.

A vida depende de uma bem orquestrada série de reações químicas. Muitas delas, entretanto, ocorrem muito lentamente para manter os processos vitais. Para resolver esse problema, a natureza planejou um modo de acelerar a velocidade das reações químicas por meio da catálise. As ações catalíticas são executadas por enzimas que facilitam os processos vitais em todas as suas formas, desde os vírus até os mamíferos superiores.

### Quadro 3.1 Natureza química das enzimas

A palavra *enzima* foi introduzida por Kuhne em 1878 para designar a ocorrência no levedo de algo responsável pela sua atividade fermentativa. Berzelius, 50 anos antes, tinha reconhecido a presença de fermentos de ocorrência natural que promoviam reações químicas e antecipou o conceito de catalisadores biológicos. Berzelius classificou os fermentos em “organizados” e “não-organizados” com base na presença ou ausência de microorganismos intactos. Kuhne aplicou a palavra enzima aos fermentos derivados de extratos de levedos, i.e. “fermentos não-organizados”.

Em 1897, Büchner preparou um filtrado de extratos de levedo que foi o primeiro extrato enzimático removido de células vivas que pode catalisar a fermentação.

A natureza química das enzimas permaneceu controversa. Em 1926, Sumner cristalizou a *urease* a partir de extratos de feijão, no entanto, a preparação tinha pequena atividade catalítica e outros investigadores atribuíram o efeito catalítico a contaminantes e não à proteína. Willstätter, por outro lado, purificou a *peroxidase* com elevada capacidade catalítica e ausência de outras proteínas. No início dos anos 30, Northrop e cols. cristalizaram a pepsina e a tripsina demonstrando definitivamente que as enzimas eram proteínas.

As *enzimas* são proteínas com a função específica de acelerar reações químicas que ocorrem sob condições termodinâmicas não-favoráveis. Elas aceleram consideravelmente a velocidade das reações químicas em sistemas biológicos quando comparadas com as reações correspondentes não-catalisadas. Para ser classificada como enzima, uma proteína deve:

- Apresentar extraordinária eficiência catalítica.
- Demonstrar alto grau de especificidade em relação a seus substratos (reagentes) e aos seus produtos.
- Acelerar a velocidade das reações em  $10^6$  a  $10^{12}$  vezes mais do que as reações correspondentes não-catalisadas.
- Não ser consumida ou alterada ao participar da catálise.
- Não alterar o equilíbrio químico das reações.
- Ter sua atividade regulada geneticamente ou pelas condições metabólicas.

**Tabela 3.1** – Velocidade de reações não-catalisadas e catalisadas por enzimas

Enzima	Não-catalisada (s <sup>-1</sup> )	Catalisada (s <sup>-1</sup> )	Aumento da velocidade
Anidrase carbônica	$1,3 \times 10^{-1}$	1.000.000	$7,7 \times 10^6$
Adenosina-deaminase	$1,8 \times 10^{-10}$	370	$2,1 \times 10^{12}$
Nuclease estafilocócica	$1,7 \times 10^{-13}$	95	$5,6 \times 10^{14}$
Triose-fosfato-isomerase	$4,3 \times 10^{-6}$	4.300	$1,0 \times 10^9$
Quimiotripsina	$1,0 \times 10^{-9}$	190	$1,7 \times 10^{11}$
Orotidina-descarboxilase	$2,8 \times 10^{-16}$	39	$1,4 \times 10^{17}$

$s^{-1}$  = unidade da constante de velocidade de reação de primeira ordem

### Quadro 3.2 Uso industrial das enzimas

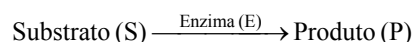
A indústria biotecnológica produz várias enzimas para diferentes usos.

O uso de *proteases* em detergentes melhora a remoção de manchas de origem biológica, como o sangue e molhos. O termo “biológico” empregado nas embalagens de sabão em pó reflete a presença de proteases. As proteases são também utilizadas em restaurantes para amaciar a carne, por cervejeiros para eliminar a turvação nas cervejas, por padeiros para melhorar a textura do pão e em indústrias de lúvas para amaciar o couro.

Outras enzimas também apresentam uso industrial. Por exemplo, a *lipase* é adicionada a líquidos detergentes para degradar graxas (lipídeos) e em alguns queijos para desenvolver aroma. A *pectinase* é usada na indústria de geléias para promover a máxima extração de líquido das frutas. As *amilases* são empregadas para degradar o amido em certos removedores de papel de parede para facilitar a sua retirada. definitivamente que as enzimas eram proteínas.

As proteínas não são únicas substâncias com propriedades catalíticas nos sistemas biológicos. Alguns RNA, denominados *ribozimas*, também executam essa função.

A reação catalisada por enzima pode ser esquematizada como segue:



A molécula sobre a qual a enzima atua é o *substrato* (S) que se transforma em *produto* (P) da reação. Na ausência de enzima pouco produto (ou nenhum) é formado, mas em presença da mesma, a reação se processa em alta velocidade. Como a maioria das reações é reversível, os produtos da reação numa direção tornam-se substratos para a reação inversa.

As enzimas são os catalisadores mais específicos que se conhece, tanto para o substrato como para o tipo de reação efetuada sobre o substrato. A especificidade inerente da enzima, reside em uma cavidade ou fenda de ligação do substrato, que está situada na superfície da proteína enzimática. A cavidade, denominada *sítio ativo*, é um arranjo de grupos presentes em cadeias laterais de certos aminoácidos que ligam o substrato por ligações não-covalentes. Muitas vezes, os resíduos de aminoácidos que formam o sítio ativo ficam em regiões distantes, na seqüência primária, mas próximos no sítio ativo, pelo enovelamento de cadeia polipeptídica (estrutura terciária).

Algumas enzimas têm outra região na molécula, o *sítio alostérico*, afastada do sítio ativo. No sítio alostérico moléculas pequenas específicas se ligam e causam alterações na conformação protéica que afetam o sítio ativo, aumentando ou reduzindo a atividade enzimática.

A maioria das enzimas necessitam de moléculas orgânicas ou inorgânicas pequenas, essenciais à sua atividade e denominadas *coenzimas* e *co-fatores*.

### 3.1 Classificação das enzimas

Com a descoberta de grande número de enzimas, houve a necessidade de sistematização da nomenclatura. A *União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular* (IUBMB) adotou um sistema racional e prático de nomenclatura identificando as enzimas em seis classes, de acordo com a natureza da reação química que catalisam. Para cada enzima, são atribuídos dois nomes e um número de classificação de quatro dígitos que identificam as classes, as subclasses e as sub-subclasses.

Na classificação internacional sistemática, as enzimas são divididas em seis grupos de acordo com o tipo de reação catalisada (Tabela 3.1).

**Tabela 3.1** – Classificação das enzimas

Classe da enzima	Tipo de reação catalisada
Oxidorrredutases	Reações de oxidação–redução
Transferases	Transferência de grupos funcionais
Hidrolases	Reações de hidrólise
Liases	Remoção de grupos para formar ligações duplas
Isomerases	Isomerização
Ligases	Formação de ligações entre duas moléculas

Por exemplo, a enzima glicose–6–fosfatase (nome trivial), tem como nome sistemático *D-Glicose–6–fosfato fosfohidrolase* e número de classificação EC 3.1.3.9. Os números representam a classe (3, hidrolase), subclasse (1, atua sobre ligações éster), sub–subclasse (3, fosforil monoéster hidrolase) e seu número de série dentro da sub–subclasse (9). A sigla “EC” é a abreviatura de *Enzyme Commission*.

Muitas enzimas de uso rotineiro são designadas pelo nome alternativo ou trivial. Por exemplo, algumas são denominadas pela incorporação do sufixo *–ase* ao nome do substrato sobre os quais elas atuam; por exemplo, a enzima que hidrolisa a *uréia* é denominada *urease*; o amido, a *amilase*; ésteres do fosfato, as *fosfatases*. Outras são designadas pelo tipo de ação catalítica que realizam, tais como, *anidrase* carbônica; D–amino *oxidase*; lactato *desidrogenase*. Algumas levam nomes vulgares como a tripsina, pepsina, emulsina, etc.

### Quadro 3.3 Enzimas usadas como agentes terapêuticos

Algumas enzimas são empregadas como agentes terapêuticos no tratamento de diferentes doenças. As *proteases*, *amilases* e *lipases* são usadas para auxiliar a digestão.

A *asparaginase* é usada no tratamento da *leucemia linfocítica aguda*. As células normais são capazes de sintetizar asparagina enquanto certas células tumorais, inclusive as leucêmicas, não produzem o derivado do aminoácido. A administração intravenosa de asparaginase reduz o nível plasmático de asparagina e, assim, diminui o desenvolvimento de células leucêmicas.

A *desoxiribonuclease* (DNase) é útil no tratamento da *fibrose cística*. A principal característica da fibrose cística são as infecções respiratórias recorrentes, particularmente devido a *Pseudomonas aeruginosa*, o que resulta em grandes quantidades de DNA proveniente das bactérias destruídas e morte das células fagocíticas do sistema imune. O DNA contribui para a viscosidade do muco que provoca sintomas aflitivos. A DNase é usada para degradar o DNA e diluir o muco.

A *estreptocinase* é empregada na remoção de coágulos sanguíneos no infarto do miocárdio e nas extremidades dos membros inferiores. Ativa a transformação da proenzima fibrinolítica *plasminogênio* à *plasmina*, uma enzima que quebra a fibrina insolúvel do coágulo sanguíneo.

## 3.2 Co-fatores metálicos e coenzimas

Algumas enzimas são proteínas simples consistindo inteiramente de cadeias polipeptídicas, como as enzimas hidrolíticas pepsina, tripsina, lisozima e ribonuclease. Entretanto, a maioria das enzimas somente exercem sua atividade catalítica em associação com *co-fatores metálicos e coenzimas*.

**1. Co-fatores metálicos.** Os metais importantes nos organismos vivos são classificados em dois grupos: *metais de transição* (exemplo,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$ ) e *metais alcalinos e alcalinos terrosos* (exemplo,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Ca}^{2+}$ ). Devido a sua estrutura eletrônica, os metais de transição estão freqüentemente envolvidos na catálise.

Várias propriedades dos metais de transição os tornam essenciais para a catálise. Os íons metálicos apresentam um grande número de cargas positivas especialmente úteis na ligação de pequenas moléculas. Os metais de transição atuam como ácidos de Lewis (aceptores de pares eletrônicos), e são eletrófilos efetivos. Como suas valências permitem interagirem com dois ou mais ligantes, os íons metálicos participam na orientação apropriada do substrato para a reação. Como consequência, o complexo substrato-íon metálico polariza o substrato e promove a catálise. Exemplo, quando o  $\text{Zn}^{2+}$ , co-fator da anidrase carbônica, polariza uma molécula de água, forma-se um grupo OH ligado ao  $\text{Zn}^{2+}$  (função de ácido de Lewis do zinco). O grupo OH ataca nucleofilicamente o  $\text{CO}_2$ , convertendo-o em  $\text{HCO}_3^-$ .

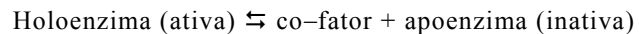
Finalmente, como os metais de transição têm dois ou mais estados de oxidação, eles podem mediar reações de oxidação-redução. Por exemplo, a oxidação reversível do  $\text{Fe}^{2+}$  para formar  $\text{Fe}^{3+}$  é importante na função do citocromo  $\text{P}_{450}$ , uma enzima microsomal que processa substâncias tóxicas.

**Quadro 3.1** – Algumas coenzimas, as reações que promovem e as vitaminas precursoras

Coenzima	Reação	Fonte vitamínica
Biotina	Carboxilação	Biotina
Coenzima A	Transferência de grupos acila	Ácido pantotênico
Cobalamina	Alquilação	Cobalamina (B <sub>12</sub> )
Flavina	Oxidação–redução	Riboflavina (B <sub>2</sub> )
Ácido lipóico	Transferência de grupo acila	-
Nicotinamida	Oxidação –redução	Nicotinamida (niacina)
Fosfato de piridoxal	Transferência de grupo amino	Piridoxina (B <sub>6</sub> )
Tetraidrofolato	Transferência de grupos de 1-carbono	Ácido fólico
Pirofosfato de tiamina	Transferência de grupo aldeído	Tiamina (B <sub>1</sub> )
Retinal	Visão, crescimento e reprodução	Vitamina A
1, 25-diidroxicolecalciferol	Metabolismo do cálcio e fósforo	Vitamina D

**2. Coenzimas.** São moléculas orgânicas pequenas, frequentemente derivadas de vitaminas. Existem também certos nutrientes análogos às vitaminas (exemplo, ácido lipóico e ácido *p*-aminobenzóico) que são sintetizados em pequenas quantidades e que facilitam os processos catalisados por enzimas. Na Tabela 3.1 são listadas as coenzimas, as reações que elas participam e as fontes vitamínicas que dão origem as coenzimas.

A enzima é cataliticamente ativa quando forma um complexo denominado *holoenzima*. O componente protéico do complexo é designado de *apoenzima*.

**Quadro 3.2** – Coenzimas/co-fatores metálicos e enzimas

Coenzimas e co-fatores	Enzima
<b>Coenzima</b>	
Pirofosfato de tiamina (TTP)	Piruvato–desidrogenase
Flavina adenina dinucleotídeo (FAD)	Monoaminoxidase
Nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD)	Lactato–desidrogenase
Piridoxal fosfato	Glicogênio–fosforilase
Coenzima A (CoA)	Acetil–CoA–carboxilase
Biotina	Piruvato–carboxilase
Tetraidrofolato	Timidilate–sintase
<b>Co-fator metálico</b>	
Zn <sup>2+</sup>	Anidrase–carbônica
Zn <sup>2+</sup>	Carboxipeptidase
Mg <sup>2+</sup>	Hexocinase

---

Ni <sup>2+</sup>	Uréase
Mo	Nitrato-reductase
Se	Glutationa-peroxidase
Mn <sup>2+</sup>	Superóxido-dismutase
K <sup>+</sup>	Propionil-CoA-carboxilase

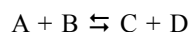
---

### 3.3 Reações catalisadas por enzimas

---

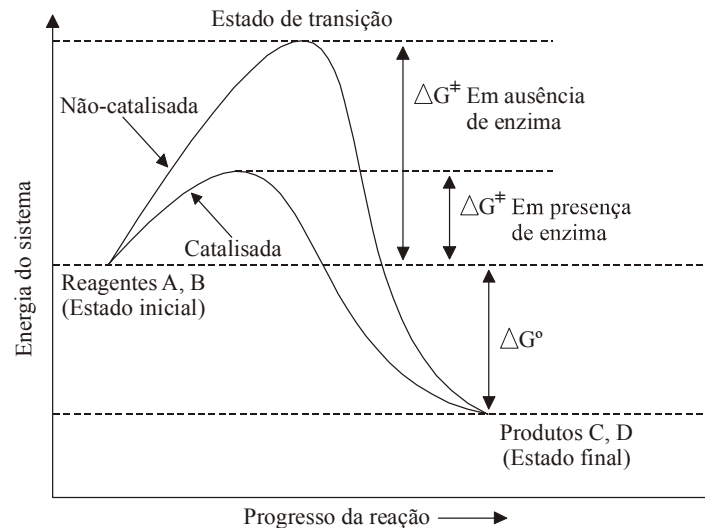
Para reagir, as moléculas presentes em uma solução devem colidir com orientação apropriada e com a quantidade de energia que lhes permitam formar o complexo ativado, denominado *estado de transição* que representa os reagentes em seu estado ativado. Para atingir o estado de transição, necessita-se de uma quantidade de energia definida como *energia livre de ativação* ( $E_a$ ) ou mais comum em bioquímica *energia livre de ativação*,  $\Delta G^\ddagger$  (o símbolo ( $\ddagger$ ) indica o processo de ativação). Sob condições fisiológicas, a velocidade das reações pode ser aumentada pela *redução da energia livre de ativação* conseguida pela ação de *enzimas*.

A comparação do perfil energético das reações catalisadas e não-catalisadas é mostrada na Figura 3.1 para a reação:



No gráfico, o estado de transição corresponde ao ponto de mais alta energia da reação não-catalisada e é a medida da *energia livre de ativação*,  $\Delta G^\ddagger$ . Ou ainda,  $\Delta G^\ddagger$  é a energia livre do estado de transição subtraída da energia livre dos reagentes. No complexo ativado (estado de transição do sistema), os reagentes estão em forma intermediária de alta energia e não podem ser identificados nem como reagentes nem como produtos. O complexo do estado de transição pode ser decomposto em produtos ou voltar aos reagentes.





**Figura 3.1**

**Diagrama energético de reação catalisada e de reação não-catalisada.**  $\Delta G^\ddagger$  = energia livre de ativação,  $\Delta G^\circ$  = variação de energia livre. A diferença entre os valores da energia de ativação de uma reação catalisada e de uma reação não-catalisada, indica a eficiência do catalisador.

A velocidade de uma reação é inversamente proporcional ao valor de sua energia livre de ativação. Quanto maior o valor de  $\Delta G^\ddagger$ , menor será a velocidade da reação. *Os catalisadores aumentam a velocidade da reação reduzindo a energia livre de ativação.* A velocidade de uma reação pode aumentar na ordem de  $10^6$  a  $10^{12}$  vezes mais do que a reação correspondente não-catalisada.

Três propriedades distintas das enzimas permitem que elas exerçam papel central na promoção e regulação dos processos celulares, caracterizando-as como componentes vitais aos sistemas vivos:

- *Elevada especificidade da reação.* Como regra geral, cada reação sob condições apropriadas é catalisada por uma enzima específica. Diante de várias rotas potencialmente possíveis, a enzima escolhe a com menor energia livre de ativação.
- *Condições reacionais mais brandas.* A atividade de cada enzima é dependente do pH, da temperatura, da presença de vários co-fatores e das concentrações de substratos e produtos.
- *Capacidade de regulação da concentração e da atividade.* Permite o ajuste fino do metabolismo em diferentes condições fisiológicas.

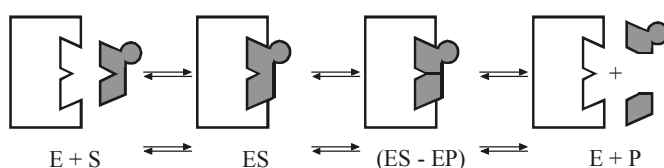
### 3.4 Sítio ativo catalítico

Sítio ativo é a região na superfície da enzima onde ocorre a catálise. O substrato liga-se ao sítio ativo por ligações não-covalentes (interações eletrostáticas, pontes de hidrogênio, interações de van der Waals e interações hidrofóbicas). Os grupos que participam das ligações são: a carboxila do ácido glutâmico ou do ácido aspártico, o grupo  $\epsilon$ -amino da lisina, o imidazol da histidina, a hidroxila da serina, etc.

Somente uma pequena porção do substrato onde ocorre transformação está ligada à enzima. Isso não implica, entretanto, que os aminoácidos no sítio ativo estejam um ao lado do outro na estrutura primária da proteína. Em consequência das dobras e enovelamento da enzima (estrutura secundária e terciária), certos resíduos de aminoácidos podem estar distantes um do outro na seqüência primária, ainda que juntos no sítio ativo da proteína completa.

A especificidade da ligação enzima-substrato depende do arranjo precisamente definido de átomos no sítio ativo. Uma das explicações para a elevada especificidade das enzimas é que suas estruturas tridimensionais permitem um perfeito encaixe com o substrato. Dois modelos foram propostos para explicar a especificidade enzimática, o modelo chave-fechadura e o modelo do encaixe induzido.

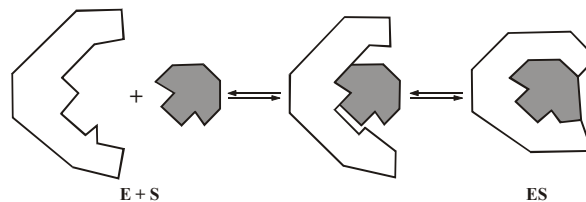
**1. Modelo chave-fechadura.** Muitas enzimas contêm fendas com dimensões fixas que permitem a inserção somente de compostos com uma dada configuração. O substrato se ajusta a esse sítio de ligação como uma chave se ajusta à sua fechadura. Substâncias que não se encaixam na fenda para formar o complexo enzima-substrato (ES), não reagem, mesmo possuindo grupos funcionais idênticos ao do substrato verdadeiro. Esse conceito é chamado *modelo chave-fechadura* proposto por Fisher em 1890.



**Figura 3.2**  
**Modelo chave-fechadura.** A interação entre a enzima (com estrutura rígida) e seu substrato.

**2. Modelo do encaixe induzido.** Um modelo mais flexível de interação enzima-substrato é o *encaixe induzido* (induced-fit) proposto por Koshland em 1958. Os sítios ativos dessas enzimas não estão completamente pré-formados e a interação inicial do substrato com a enzima induz uma alteração conformacional na enzima. Isso promove o reposicionamento dos aminoácidos catalíticos para formar

o sítio ativo e a estrutura correta para interagir com os grupos funcionais do substrato (Figura 3.3).



**Figura 3.3**  
**Modelo do encaixe induzido.** A ligação inicial do substrato à enzima induz uma mudança conformacional na enzima produzindo um melhor encaixe.

### 3.5 Mecanismos catalíticos

As reações químicas envolvidas na transformação dos substratos variam com os mecanismos de ação das enzimas. Os principais tipos de mecanismos catalíticos que as enzimas utilizam são: (1) efeitos de proximidade e orientação, (2) catálise eletrostática, (3) catálise ácido-básica e (4) catálise covalente.

**1. Efeitos de proximidade e orientação.** Os substratos se aproximam dos grupos funcionais catalíticos da enzima em uma orientação espacial apropriada para que a reação possa ocorrer. Após o correto posicionamento do substrato, uma modificação na conformação da enzima resulta em um complexo enzima-substrato orientado. Essa orientação leva o complexo enzima-substrato ao estado de transição.

**2. Catálise por íons metálicos.** A força das interações eletrostáticas está relacionada com a capacidade das moléculas solventes vizinhas em reduzir os efeitos de atração entre os grupos químicos. Como a água é excluída do sítio ativo quando o substrato se liga, a constante dielétrica local é muitas vezes baixa. A distribuição de cargas nos sítios ativos das enzimas pode influenciar a reatividade química do substrato. Uma ligação mais eficiente do substrato reduz a energia livre do estado de transição, que acelera a reação.

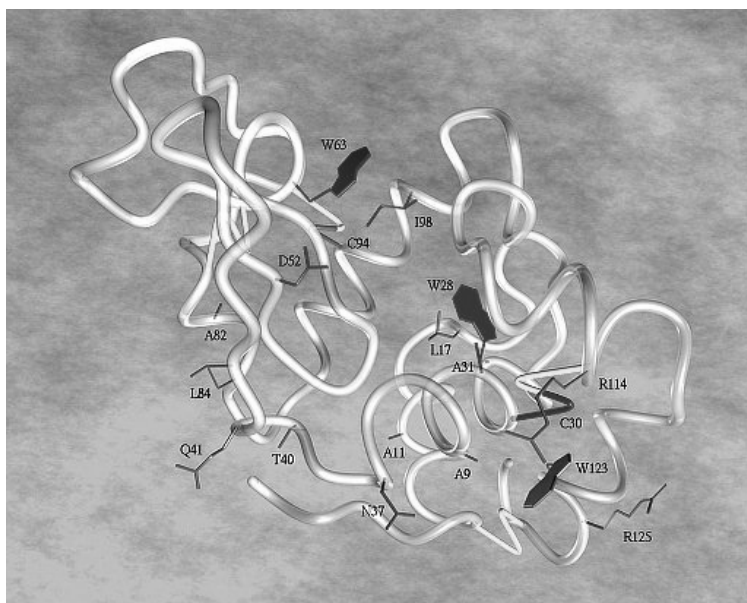
**3. Catálise ácido-básica geral.** Os grupos químicos podem se tornar mais reativos pela adição ou remoção de prótons. Os sítios ativos das enzimas contêm cadeias laterais que podem atuar como doadores ou receptores de prótons. Esses grupos são denominados ácidos gerais ou bases gerais. Por exemplo, a cadeia lateral da histidina (grupo imidazol) muitas vezes atua como catalisador ácido e/ou básico em concerto porque tem  $pK_a$  na faixa de pH fisiológico.

**4. Catálise covalente.** Acelera a velocidade da reação pela formação de uma ligação covalente transitória entre a enzima e o substrato. Um grupo nucleofílico da cadeia lateral do catalisador

forma uma ligação covalente instável com um grupo eletrofílico do substrato. O complexo enzima–substrato então forma o produto.

### A. Mecanismo de ação da lisozima

O mecanismo de ação da lisozima emprega tanto a distorção da cadeia polissacarídica como a catálise ácido-básica geral. A lisozima é uma enzima com cadeia polipeptídica única com 129 resíduos de aminoácidos. A lisozima, uma glicosidase, destrói as paredes das células bacterianas ao hidrolisar a ligação glicosídica entre o *N*-acetilmuramato e *N*-acetilglicosamina. A molécula da lisozima tem uma fenda, à qual os substratos se ligam por ligações pontes de hidrogênio e forças de van der Waals. O mecanismo catalítico da lisozima envolve o ácido glutâmico 35, na sua forma não-carregada, que atua como catalisador ácido para clivar o substrato polissacarídico pela doação de um  $H^+$  ao oxigênio da ponte entre os anéis D e E. O  $C_1$  do anel D fica, então, com carga positiva. O íon axônio resultante carregado positivamente e planar, é eletrostaticamente estabilizado pelo aspartato 52 na sua forma de carboxilato. A reação é facilitada pela distorção do resíduo D na conformação planar de meia-cadeira, o que permite que a carga positiva seja compartilhada entre o C-1 e o átomo de oxigênio do anel.



**Figura 3.4**  
Estrutura da lisozima.

## B. Mecanismo de ação das serino–proteases

As enzimas serino–proteases empregam a catálise ácido–básica geral e a catálise covalente para a sua ação. As serino–proteases são um grupo de enzimas proteolíticas que incluem a *quimotripsina*, *tripsina*, *elastase*, *trombina*, *plasmina*, e são assim chamadas por utilizar um único resíduo serina ativada no sítio ativo. As serino–proteases utilizam o grupo  $-\text{CH}_2-\text{OH}$  da serina como um nucleofílico para hidrolisar cataliticamente ligações peptídicas. Formam um intermediário covalente acil–enzima, no qual o grupo carboxila do substrato é esterificado com a hidroxila da serina 195 (catálise covalente). O caráter nucleófilo da  $-\text{OH}$  é bastante acentuado pela histidina 57, que recebe um próton da serina (catálise ácido–básica geral). A histidina resultante com carga positiva é estabilizada pela interação eletrostática com a carga negativa do aspartato 102. A segunda etapa, o intermediário acil–enzima é deacilado pelo reverso das etapas anteriores.

Outras serino–proteases existem na forma precursora inativa, denominadas *zimogênios*, que são ativadas por clivagem catalítica de uma ligação polipeptídica específica por outras serino–proteases.

A atividade das proteases é limitada por inibidores sintetizados pelo pâncreas e fígado. Por exemplo, se enzimas pancreáticas forem prematuramente ativadas ou liberadas do pâncreas após um trauma, elas são rapidamente inativadas por inibidores da protease. Os inibidores passam por substratos da protease, mas não são completamente hidrolizados. O desequilíbrio entre a atividade das proteases e a atividade de inibidores da protease pode provocar doenças, por exemplo, enfisema.

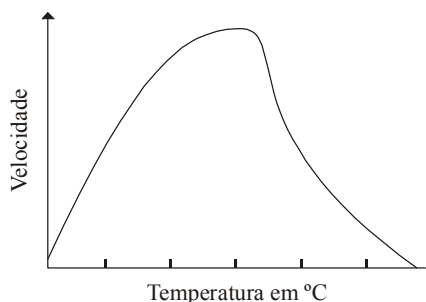
## 3.6 Fatores que influenciam a atividade enzimática

---

Vários fatores influenciam a atividade enzimática, incluindo a temperatura, pH, concentração do substrato, tempo e produto da reação.

### A. Temperatura

As reações químicas são afetadas pela temperatura. Quanto maior a temperatura, maior a velocidade da reação. A velocidade aumenta porque mais moléculas adquirem energia suficiente para atingir o estado de transição. Em reações catalisadas por enzimas, a velocidade é acelerada pelo aumento da temperatura até atingir uma temperatura ótima na qual a enzima opera com a máxima eficiência. Como as enzimas são proteínas, os valores de temperatura ótima situam-se entre 40 e 45 °C e dependem do pH e da força iônica. Acima dessa temperatura, a atividade das enzimas declina abruptamente por desnaturação protéica. Sob condições de hipotermia, a atividade enzimática é deprimida. As relações acima descritas são mostradas na Figura 3.5.

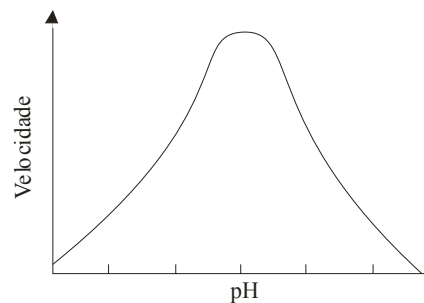
**Figura 3.5**

Efeito da temperatura sobre a velocidade de uma reação catalisada por enzima.

### B. pH

A concentração de íons hidrogênio afeta as enzimas de vários modos. Primeiro, a atividade catalítica das enzimas está relacionada à ionização de aminoácidos no do sítio ativo.. Por exemplo, a atividade catalítica de certas enzimas necessita a forma protonada da cadeia lateral do grupo amino. Se o pH torna-se suficientemente alcalino de tal modo que o grupo perde seu próton, a atividade da enzima pode ser reduzida. Além disso, os substratos podem também serem afetados. Se um substrato contém um grupo ionizável, as mudanças no pH afetam a capacidade de ligação ao sítio ativo. Segundo, alterações nos grupos ionizáveis podem modificar a estrutura terciária das enzimas. Mudanças drásticas no pH promovem a desnaturação de muitas enzimas.

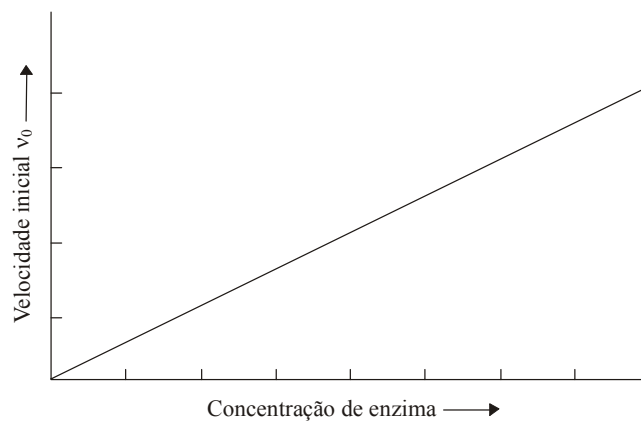
Apesar de algumas enzimas tolerar grandes mudanças no pH, a maioria delas são ativas somente em intervalos muito estreitos. Por essa razão, os organismos vivos empregam tampões que regulam o pH. O valor do pH no qual a atividade da enzima é máxima é chamado *pH ótimo*. O pH ótimo das enzimas varia consideravelmente. Por exemplo, o pH ótimo da pepsina, enzima proteolítica produzida no estômago é, aproximadamente, 2. Para a quimotripsina, que digere as proteínas no intestino delgado, o pH ótimo é, aproximadamente, 8. O efeito do pH sobre a atividade das enzimas é esquematizado na Figura 3.6.

**Figura 3.6**

Atividade enzimática versus pH (considerando-se os outros fatores constantes)

### C. Concentração da enzima

A velocidade máxima da reação é uma função da quantidade de enzima disponível, aquela aumenta proporcionalmente pela introdução de mais enzima ao sistema. Assim, a velocidade inicial da reação enzimática é diretamente proporcional à concentração de enzima (existindo substrato em excesso) (Figura 3.7).

**Figura 3.7**

Efeito da concentração da enzima sobre a velocidade inicial ( $v_0$ ). A concentração do substrato está acima da necessária para atingir a velocidade máxima.

### D. Concentração do substrato

Para atender as necessidades do organismo, as reações bioquímicas devem ocorrer em velocidade compatível. A *velocidade* de uma reação bioquímica é expressa em termos de formação de produto ou pelo consumo do reagente por unidade de tempo. Ao considerar uma *reação unimolecular* (que envolve um único reagente):



O progresso da reação é descrita pela *equação da velocidade* na qual a velocidade é expressa em termos da constante de velocidade ( $k$ ) e a concentração do reagente  $[A]$ :

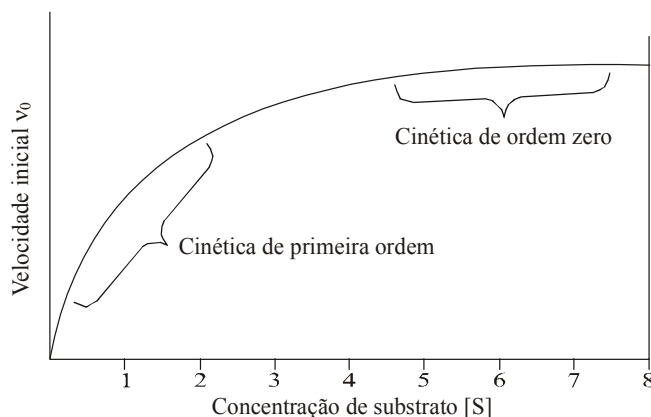
$$\text{Velocidade} = v = \frac{-\Delta[A]}{\Delta t} = k[A]$$

onde  $[A]$  = concentração do substrato,  $t$  = tempo e  $k$  = constante de proporcionalidade designada *constante de velocidade* (sua unidade é o recíproco do tempo,  $s^{-1}$ ) que depende das condições da reação (temperatura, pH e força iônica). O sinal negativo para as variações da  $[A]$  indica que  $A$  está sendo consumido na reação. A equação mostra que a velocidade da reação é diretamente proporcional a concentração do reagente  $A$ . O processo exibe *cinética de primeira ordem* (Figura 3.8).

Quando a adição de mais reagente não aumenta a velocidade, a reação exibe *cinética de ordem zero* (Figura 3.8). A expressão da velocidade para a reação  $A \rightarrow P$  é

$$\text{Velocidade} = k[A]^0 = k$$

A velocidade é constante porque não depende da concentração dos reagentes, mas de outros fatores. A quantidade de reagente é o suficiente grande para saturar todos os sítios catalíticos das moléculas enzimáticas. Assim, o reagente só existe na forma de complexos enzima-substrato (ES). Como a curva velocidade-substrato é hiperbólica, a fase de ordem zero atinge uma velocidade máxima,  $V_{\max}$ .



**Figura 3.8**

Efeito da concentração do substrato sobre a velocidade inicial ( $v_0$ ) em reações catalisadas por enzimas.

Uma reação *bimolecular* ou de *segunda ordem* pode ser escrita:



Sua equação de velocidade é



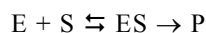
$$\text{Velocidade} = -\frac{\Delta[A]}{\Delta t} = -\frac{\Delta[B]}{\Delta t} = k[A][B]$$

O  $k$  é a constante de velocidade de segunda ordem e tem como unidade  $M^{-1}\cdot s^{-1}$ . A velocidade de uma reação de segunda ordem é proporcional ao produto da concentração dos dois reagentes ( $[A][B]$ ).

### 3.7 Cinética enzimática

O estudo da velocidade das reações enzimáticas ou cinética enzimática, envolve informações indiretas sobre o mecanismo de ação catalítica, especificidade das enzimas, alguns fatores que afetam a velocidade das reações e a determinação quantitativa de seus efeitos. Apesar de catalisarem uma grande variedade de reações por diferentes mecanismos, as enzimas podem ser analisadas quanto as suas velocidades para quantificar as suas eficiências.

Quando o substrato  $S$  liga o sítio ativo de uma enzima  $E$ , um *complexo enzima-substrato* ( $ES$ ) é formado em processo rápido e reversível antes da formação do produto. Após um breve tempo, o produto se dissocia da enzima conforme a equação:



onde

$k_1$  = constante de velocidade para a formação do complexo  $ES$

$k_2$  = constante de velocidade para a dissociação de  $ES$  em  $P$

$k_3$  = constante de velocidade para a formação de produto e liberação do sítio ativo.

A relação quantitativa entre a velocidade de reação enzimática e a concentração do substrato é definida pela equação de *Michaelis-Menten* (Leonor Michaelis e Maud Menten em 1913). No desenvolvimento da equação deve-se supor que (1) o  $k_2$  é negligenciável quando comparado com  $k_1$  e (2) a velocidade de formação de  $ES$  é igual a velocidade de sua degradação não sofrendo alterações durante a medida da velocidade (*postulado do estado estacionário*):

$$\text{Velocidade} = \frac{\Delta P}{\Delta t} = k_3[ES]$$

Para ter utilidade, a velocidade de uma reação deve ser definida em termos de  $[S]$  e  $[E]$ . A velocidade de formação de  $ES$  é igual a  $k_1[E][S]$ , enquanto a velocidade de dissociação de  $ES$  é igual a  $(k_2 + k_3)[ES]$ . O postulado do estado estacionário iguala as duas velocidades:

$$K_1[E][S] = (k_2 + k_3)[ES]$$

$$[ES] = \frac{[E][S]}{(k_2 + k_3)/k_1}$$

Michaelis e Menten introduziram uma nova constante,  $K_m$

$$K_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1}$$

assim, a expressão de velocidade pode ser obtida após manipulação algébrica adequada:

$$v_o = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

Essa é a *equação de Michaelis–Menten* que relaciona a *velocidade inicial* ( $v_o$ , mudança na concentração de reagente ou produto durante os primeiros poucos segundos da reação) de uma reação catalisada por enzima com a concentração do substrato. As duas constantes nessa equação, a *velocidade máxima* ( $V_{\max}$ , velocidade atingida sob condições de saturação da enzima em condições específicas de temperatura, pH e força iônica) e  $K_m$  são específicas para cada enzima sob condições especificadas de pH e temperatura. Para aquelas, onde  $k_3 \ll k_2$ , a  $K_m$  torna-se a recíproca da constante de ligação enzima-substrato:

$$K_m = \frac{1}{K_a}$$

e a  $V_{\max}$  reflete a fase catalítica do mecanismo enzimático conforme sugere a equação 3.1. Em outras palavras, nesse modelo simples da atividade da enzima distingue-se duas fases: inicialmente a ligação do substrato seguida pela modificação química do mesmo.

Se for permitido à velocidade inicial de reação,  $v_o$ , ser igual a metade da velocidade máxima ( $v_o = \frac{1}{2} V_{\max}$ ) na equação 3.3, o  $K_m$  será igual a  $[S]$ :

$$\frac{1}{2} V_{\max} = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

Dividindo por  $V_{\max}$ , obtém-se

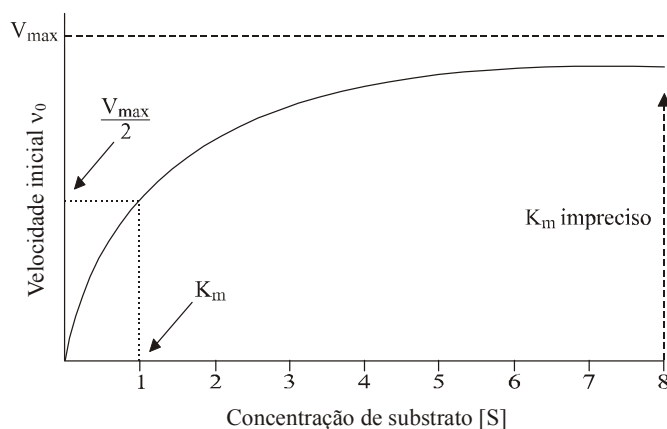
$$\frac{1}{2} = \frac{[S]}{K_m + [S]}$$

Reorganizando a equação:

$$K_m + [S] = 2[S]$$

$$K_m = [S]$$

O valor do  $K_m$  (constante de Michaelis) é numericamente igual à concentração do substrato (mol/L) na qual a velocidade inicial da reação corresponde à metade da velocidade máxima. Ou seja, na concentração de substrato em que  $[S] = K_m$ , a equação de Michaelis–Menten torna-se  $v_o = V_{\max}/2$ . A concentração da enzima não afeta o  $K_m$ .



**Figura 3.9**  
**Determinação do  $K_m$  pelo gráfico de velocidade inicial ( $v_0$ ) versus concentração do substrato, [S].** O  $K_m$  é a concentração do substrato (mol por litro) na qual a velocidade inicial da reação é metade da velocidade máxima.

Valores pequenos de  $K_m$  refletem *afinidade elevada* da enzima pelo substrato e, portanto, atingirá a máxima eficiência catalítica em baixas concentrações de substrato. Valores grandes de  $K_m$  refletem *baixa afinidade* da enzima pelo substrato.

**Tabela 3.2** – Valores do  $K_m$  para algumas enzimas

Enzima	Substrato	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )
Anidrase-carbônica	$\text{CO}_2$	8.000
Arginina-tRNA-sintetase	Arginina	3
	tRNA	0,4
	ATP	300
$\beta$ -Galactotidase	Lactose	4.000
Lisozima	Hexa-N-acetilglicosamina	6
Penicilase	Benzilpenicilina	50
Piruvato-carboxilase	Piruvato	400
	$\text{HCO}_3^-$	1.000
	ATP	60
Quimiotripsina	Acetil-1-triptofanida	5.000
Treonina-desaminase	Treonina	5.000

### A. Constante catalítica ( $k_{\text{cat}}$ )

As enzimas nas células e fluidos do corpo normalmente não atuam em concentrações saturadas de substrato. Para avaliar a eficiência catalítica de uma enzima, define-se a *constante catalítica*,  $k_{\text{cat}}$  também conhecida como *número de reciclagem* (turnover number):

$$k_{\text{cat}} = \frac{V_{\text{max}}}{[E]_{\text{total}}}$$

$k_{\text{cat}}$  representa o número de moléculas de substrato convertidos em produto por segundo por molécula de enzima (ou por mol de sítio ativo nas enzimas oligoméricas) sob condições de saturação. Em outras palavras, o  $K_{\text{cat}}$  indica o número máximo de moléculas convertidas em produto por segundo por cada sítio ativo.  $[E]_{\text{total}}$  = concentração total da enzima.

**Tabela 3.3** – Constantes catalíticas de algumas enzimas

Enzima	$K_{\text{cat}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )
Nuclease estafilicócica	95
Citidina–deaminase	299
Triose–fosfato–isomerase	4.300
Ciclofilina	13.000
Cetoesteróide–isomerase	66.000
Anidrase–carbônica	1.000.000

### B. Constante de especificidade ( $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ )

A relação  $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$  é chamada *constante de especificidade* e relaciona a eficiência catalítica da enzima com a sua afinidade pelo substrato. A velocidade da reação varia diretamente com a frequência de colisões entre as moléculas de enzima e as de substrato na solução. A decomposição do complexo ES em E + P não pode ocorrer mais velozmente que o encontro de E e S para formar ES.

A relação  $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$  é, em geral, o melhor parâmetro cinético para comparações de eficiência catalítica entre diferentes enzimas. Valores baixos da relação indicam pouca afinidade da enzima pelo substrato. Por exemplo, a *acetilcolinoestrase* tem valor de  $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$  de  $1,5 \times 10^8 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$  mostrando alta eficiência, enquanto a *urease* o valor é  $4 \times 10^5 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$  descreve uma menor eficiência.

**Tabela 3.4** – Constante de especificidade,  $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ , de algumas enzimas

Enzima	$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ ( $\text{s}^{-1}\text{M}^{-1}$ )
Acetilcolinesterase	$1.6 \times 10^8$
Anidrase–carbônica	$8.3 \times 10^7$
Catalase	$4 \times 10^7$
Crotonase	$2.8 \times 10^8$
Fumarase	$1.6 \times 10^8$
Triose–phosphate–isomerase	$2.4 \times 10^8$
$\beta$ –Lactamase	$1 \times 10^8$
Superoxide–dismutase	$7 \times 10^9$

### C. Gráfico de Lineweaver-Burk

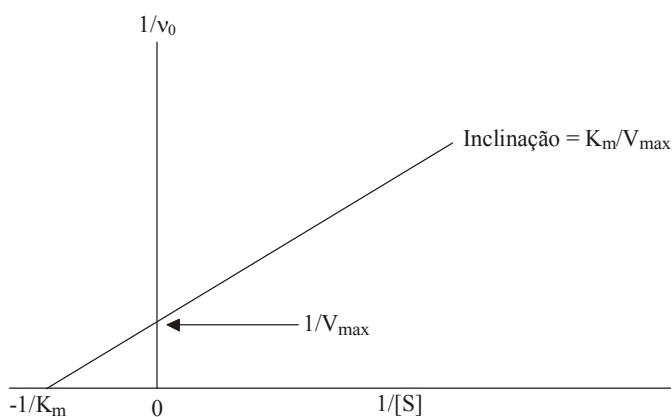
Os valores do  $K_m$  e da  $V_{max}$  de uma enzima são determinados pela medida das velocidades iniciais para várias concentrações de substrato. Pela construção do gráfico mostrado na Figura 3.6 só é possível calcular valores aproximados de  $K_m$  e da  $V_{max}$ . A determinação mais acurada desses valores é possível pela modificação algébrica da equação de Michaelis–Menten:

$$v_0 = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

utilizando o inverso da equação:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{V_{max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

A representação gráfica da recíproca de velocidade inicial,  $1/v_0$ , versus a recíproca da concentração do substrato,  $1/[S]$ , fornece uma linha reta com inclinação  $K_m/V_{max}$  em um gráfico *duplo-recíproco* ou *Lineweaver–Burk*. O ponto onde essa linha intercepta a ordenada é igual a  $1/V_{max}$ , e o ponto de intersecção na abscissa é igual a  $-1/K_m$  (Figura 3.10). A utilização do gráfico permite calcular com precisão  $V_{max}$  e  $K_m$  pela medida da inclinação e do intercepto.



**Figura 3.10**  
**Determinação da  $V_{max}$  e  $K_m$  a partir do gráfico duplo-recíproco de Lineweaver–Burk.** O gráfico  $1/v_0$  versus  $1/[S]$  derivado de medidas das velocidades iniciais em várias concentrações diferentes de substratos. A linha reta obtida pela ligação de pontos individuais é ampliada para interceptar a ordenada e abscissa. Os valores de  $K_m$  e  $V_{max}$  são determinados pela medida das inclinações e intersecções.

### D. Reações com multissubstratos

Mais da metade das reações bioquímicas envolvem dois substratos, em lugar de reações simples com um único substrato e que

obedecem o modelo de Michaelis-Menten. As reações com multissubstratos podem proceder por diferentes mecanismos:

1. *Mecanismo ordenado*. Os substratos,  $S_1$  e  $S_2$ , devem associar-se à enzima com uma ordem obrigatória antes que a reação possa ocorrer. A ligação do primeiro substrato é necessária para que a enzima forme o sítio de ligação para o segundo substrato. Muitas desidrogenases nas quais o segundo substrato é uma coenzima ( $NAD^+$ , FAD etc.) são exemplos desse mecanismo.
2. *Mecanismo aleatório*. Os dois substratos,  $S_1$  e  $S_2$ , podem se ligar à enzima em qualquer ordem. A hexocinase transfere um grupo fosfato do ATP para a glicose por esse mecanismo, apesar da glicose tender ligar inicialmente a molécula de ATP.
3. *Reações de dupla-troca (pingue-pongue)*. Um ou mais produtos são liberados antes que os outros substratos se liguem à enzima modificada. As reações catalisadas pela UDP-glicose-1-fosfato uridiltransferase, piruvato-carboxilase e acetil-CoA-carboxilase são exemplos desse mecanismo.

### 3.8 Inibição enzimática

Inibidores são substâncias que reduzem a atividade das enzimas e incluem fármacos, antibióticos, preservativos de alimentos e venenos. São importantes por várias razões: (1) Os inibidores enzimáticos atuam como reguladores das vias metabólicas. (2) Muitas terapias por fármacos são baseadas na inibição enzimática. Por exemplo, muitos antibióticos e fármacos reduzem ou eliminam as atividades de certas enzimas. O tratamento da AIDS inclui inibidores das proteases, moléculas que inativam a enzima necessária para produzir novos vírus. (3) Desenvolvimento de técnicas para demonstrar a estrutura física e química, e as propriedades funcionais das enzimas.

Distinguem-se dois tipos de inibição: *reversível* e *irreversível*, segundo a estabilidade da ligação entre o inibidor e a molécula de enzima. Na inibição reversível ocorre interações não-covalentes entre o inibidor e a enzima, enquanto na inibição irreversível envolve modificações químicas da molécula enzimática, levando a uma inativação definitiva. Na inibição reversível, a enzima retoma sua atividade após dissociação do inibidor. Três classes de inibidores reversíveis são descritos: *competitivo*, *não-competitivo* e *incompetitivo*.

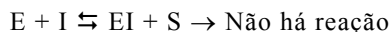
**Quadro 3.4 Inibidores de enzimas do HIV**

O vírus da imunodeficiência humana (HIV) leva à síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) infectando as células do sistema imune. Nas primeiras etapas da infecção, o HIV fixa-se à célula-alvo e injeta o seu material genético (RNA em vez de DNA) na célula hospedeira. O RNA viral é transcrito em DNA por uma enzima viral conhecida como *transcriptase reversa*. A seguir, o DNA é integrado no genoma do hospedeiro, e a célula pode produzir mais RNA viral e proteínas para empacotá-los em novas partículas virais.

Vários inibidores da transcriptase reversa foram desenvolvidos. O arquétipo é o AZT (3'-azido-3'-desoxitimidina; Zidovudina), o qual é absorvido pelas células, fosforilado e incorporado nas cadeias de DNA sintetizadas pela transcriptase reversa a partir do molde do HIV. Uma vez que o AZT não possui o grupo 3'-OH, ele funciona como um terminador de cadeia, da mesma maneira que os didesoxinucleotídeos utilizados no sequenciamento do DNA. A maioria das DNA-polimerases celulares tem baixa afinidade pela AZT fosforilado, mas a transcriptase reversa tem uma alta afinidade por essa droga, o que torna o AZT efetivo contra a replicação.

**A. Inibição competitiva**

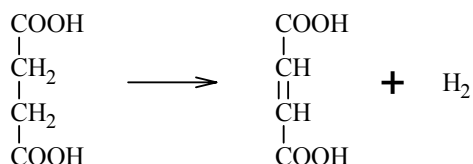
Inibidores competitivos são substâncias que competem diretamente com o substrato normal pelo sítio ativo das enzimas. São moléculas estruturalmente semelhantes ao substrato. O inibidor (I) competitivo reage reversivelmente com a enzima para formar um complexo enzima-inibidor (EI) análogo ao complexo enzima-substrato, mas cataliticamente inativo:



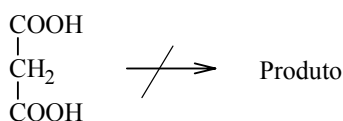
A atividade da enzima declina por não ocorrer a formação do complexo enzima-substrato durante a existência do complexo EI. A ação do inibidor pode ser revertida aumentando-se a quantidade de substrato. Em altas [S], todos os sítios ativos estão preenchidos com substrato e a velocidade da reação atinge o mesmo valor que o observado sem o inibidor.

Como o substrato e o inibidor competem pelo mesmo sítio de ligação na enzima, o  $K_m$  para o substrato mostra um *aumento* aparente em presença do inibidor. Ou seja, mais substrato é necessário para atingir a metade da  $V_{max}$ . Não há alteração na  $V_{max}$  quando a concentração do substrato é suficientemente elevada.

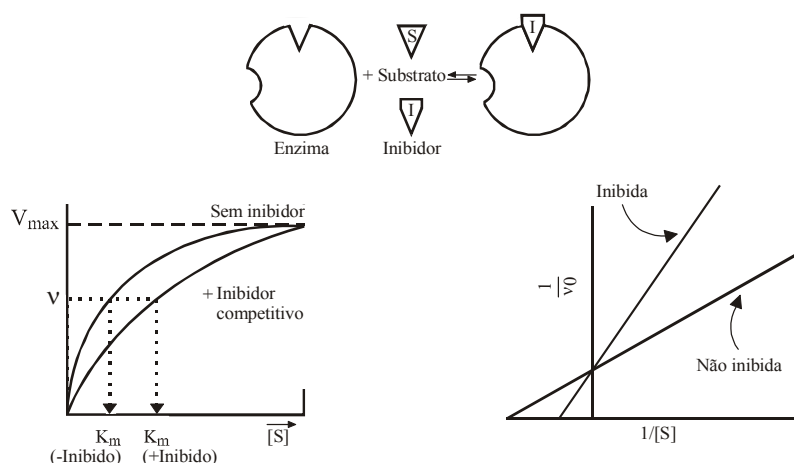
Um exemplo clássico de inibição competitiva envolve a enzima *succinato-desidrogenase* uma enzima do ciclo do ácido cítrico que converte o *succinato* a *fumarato* pela remoção de dois átomos de hidrogênio:



O *malonato* é análogo em sua estrutura ao succinato e liga-se ao sítio ativo da enzima mas não é convertido a produto.



O mecanismo da inibição competitiva é mostrado na Figura 3.11.



**Figura 3.11**

Inibição competitiva. Gráficos de  $v_0$  versus concentração de substrato para uma reação de Michaelis–Menten na presença de um inibidor competitivo. A segunda figura mostra o mesmo tipo de inibição em um gráfico de Lineweaver–Burk.

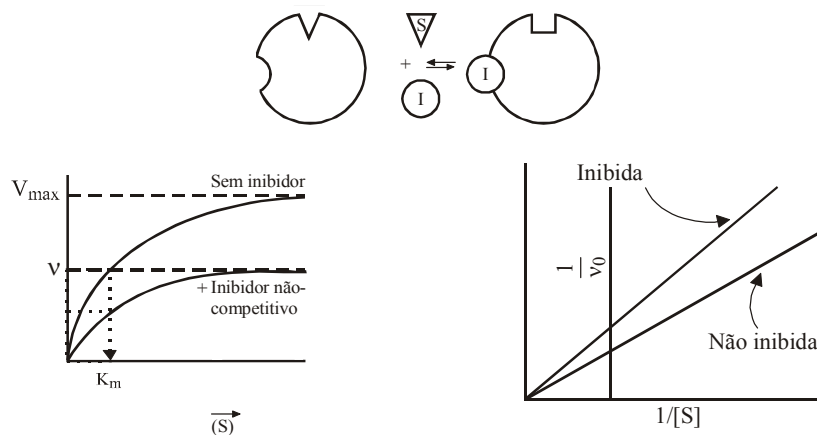
## B. Inibição não-competitiva

O inibidor não-competitivo se liga tanto à enzima como ao complexo ES em um sítio diferente do sítio de ligação do substrato. A ligação do inibidor não bloqueia a ligação do substrato, mas provoca uma modificação da conformação da enzima que evita a formação de produto:



A inibição não reverte pelo aumento na concentração do substrato. O inibidor reduz a concentração da enzima ativa e, assim, diminui a  $V_{\max}$  aparente. Nesses casos, o inibidor não afeta o  $K_m$  para o substrato. O inibidor não-competitivo não apresenta semelhança estrutural com o substrato. Os metais pesados,  $\text{Hg}^{2+}$  e  $\text{Pb}^{2+}$ , que ligam-se aos grupos sulfidrílicos e modulam a conformação da enzima, são exemplos de inibidores não-competitivos





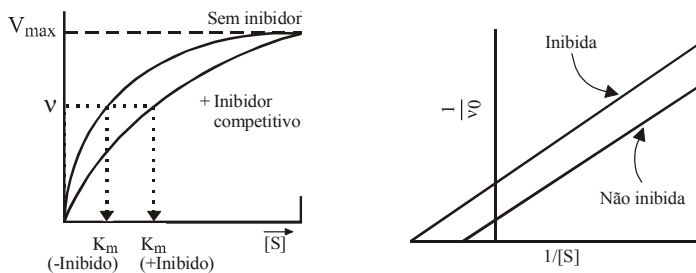
**Figura 3.12**  
**Inibição não-competitiva.** A. Efeito da concentração do substrato sobre a velocidade inicial na presença de um inibidor não-competitivo. B. Gráfico de Lineweaver-Burk para a reação mostrada em A.

### C. Inibição incompetitiva

O inibidor incompetitivo liga-se apenas ao complexo ES da enzima originando um complexo inativo, ESI. O inibidor não se combina com a enzima livre.



A inibição não é revertida pelo aumento na concentração do substrato. O resultado é a modificação aparente do  $K_m$  e  $V_{max}$ . (Figura 3.14).



**Figura 3.13**  
 Gráfico de Lineweaver-Burk para um inibidor incompetitivo.

### D. Inibição irreversível

A inibição irreversível envolve modificação covalente e permanente do grupo funcional necessário para a catálise, tornando a enzima inativa. É classificado como um *inativador*. Alguns pesticidas inibem o sítio ativo da acetilcolina-esterase, o que impede a hidrólise

da acetilcolina na sinapse, resultando, no homem, paralisia dos músculos respiratórios e edema pulmonar.

### E. Fármacos que atuam como inibidores enzimáticos

Muitos fármacos modernos atuam como inibidores da atividade enzimática. Esse mecanismo é encontrado com antivirais, antitumorais e antibacterianos. Os compostos com diferentes estruturas em relação ao substrato natural que atuam como inibidores são conhecidos como *antimetabólitos*. Entre os quais citam-se, as *sulfas* (a sulfanilamida compete com o ácido *p*-aminobenzóico necessário para o crescimento bacteriano), o *metotrexato* (compete com o diidrofolato e é usado no tratamento da leucemia infantil), *substratos suicidas* (geram uma espécie altamente reativa que reage de forma irreversível com o sítio ativo, exemplo, o Omeprazol usado no tratamento de excessiva acidez estomacal), *fluorouracil* (inibidor irreversível da timidilato-sintetase) e *6-mercaptopurina* (compete com a adenina e guanina e é efetiva no tratamento de leucemias infantis).

## 3.9 Regulação da atividade enzimática

---

Além da influência exercida sobre a atividade enzimática de diversos fatores, tais como: concentração do substrato e enzima, pH, temperatura e presença de co-fatores, tem-se também, a integração das enzimas nas vias metabólicas e a interrelação dos produtos de uma via com a atividade de outras vias. As vias metabólicas não operam em capacidade máxima o tempo todo. De fato, muitos processos podem ser interrompidos, inibidos ou ativados, durante certas fases no ciclo de vida da célula. Se assim não fosse, a célula teria um crescimento descontrolado e antieconômico.

A regulação das vias metabólicas ocorre por meio da modulação da atividade de uma ou mais enzimas-chave do processo. A etapa de maior energia de ativação é denominada *etapa de comprometimento* (geralmente uma reação irreversível). Comumente, enzima-chave que catalisa a etapa comprometida serve como válvula de controle do fluxo de moléculas no percurso metabólico.

**Quadro 3.5 Inibidores irreversíveis**

*Inibidores enzimáticos irreversíveis* são geralmente substâncias tóxicas. Podem ser substâncias naturais ou sintéticas.

Os compostos *organofosforados* como o diisopropilfosforidato (DIFP), formam ligações covalentes com o grupo OH de resíduos de serina 195 da acetilcolinesterase (enzima que catalisa a hidrólise da acetilcolina), inativando-a. A *iodoacetamida*, reage com o grupo SH de resíduos de cisteína. Esses inibidores são bastante tóxicos para os organismos, não só pela irreversibilidade de sua ligação às enzimas, mas também devido à sua inespecificidade.

Outro exemplo de inibidor irreversível é a *aspirina* (*ácido acetil-salicílico*), porém com propriedades farmacológicas (antiinflamatório, antipirético e analgésico). A aspirina transfere irreversivelmente seu grupo acetyl para o grupo OH de um resíduo de serina da molécula de ciclooxigenase, inativando-a. Essa enzima é responsável pela catálise da primeira reação da síntese de *prostaglandinas* (substâncias reguladoras de muitos processos fisiológicos).

A *penicilina* liga-se especificamente às enzimas da via de síntese da parede bacteriana, inibindo-as irreversivelmente.

A regulação das vias bioquímicas envolve mecanismos sofisticados e complexos. É conseguida principalmente pelo ajuste das concentrações e atividades de certas enzimas. O controle é atingido por: (1) controle genético, (2) modificação covalente, (3) regulação alostérica e (4) compartimentalização.

**A. Controle genético**

A quantidade das enzimas disponíveis nas células depende da velocidade de sua síntese e da velocidade de sua degradação. A síntese de enzimas em resposta às mudanças das necessidades metabólicas é um processo conhecido como *indução enzimática*, que permite a resposta celular de maneira ordenada às alterações no meio.

A síntese de certas enzimas pode ser especificamente inibida por *repressão*. O produto final de uma via bioquímica pode inibir a síntese de uma enzima-chave da mesma via.

**B. Regulação por modificação covalente**

A atividade de algumas enzimas que modulam o fluxo das vias metabólicas, é regulada por modificações covalentes reversíveis, em reações catalisadas por outras enzimas. Isso resulta na ativação ou inibição da atividade enzimática. Frequentemente, a modificação envolve a *fosforilação* e *defosforilação* da enzima por adição ou remoção de grupos fosfato ou, por modificações covalentes de outro tipo. As fosforilação e defosforilação são catalisadas por *proteínas-cinases* e *proteínas-fosfatases*, respectivamente. Como exemplo do processo regulador, tem-se a enzima glicogênio fosforilase que catalisa o desdobramento do glicogênio. A enzima se apresenta na forma fosforilada (ativa) e defosforilada (inativa) em processo de interconversão cíclica entre as duas formas. O mecanismo geral de regulação por modificação covalente está intimamente associado à ação hormonal.

Outros exemplos de modificações covalentes reversíveis incluem acetilação–desacetilação, adenilação–desadenilação, uridinilação–desuridililação e metilação–desmetilação.

### C. Regulação alostérica

As enzimas reguladas por moduladores ligados a sítio(s) adicional(is) e que sofrem mudanças conformacionais não-covalentes são denominadas *alostéricas*. A afinidade da ligação enzima-substrato das enzimas alostéricas é modificada por ligantes denominados *efetores* ou *moduladores alostéricos*, unidos reversível e não-covalentemente a locais específicos da estrutura tridimensional protéica e nominados *sítios alostéricos*, que são diferentes e distantes dos sítios ativos específicos para os substratos. Os efetores são pequenas moléculas orgânicas, por exemplo, o ATP (trifosfato de adenosina), proteínas de baixo peso molecular, substratos ou produtos da reação. A maioria das enzimas sujeitas a esses efeitos são decisivas na regulação do metabolismo intermediário.

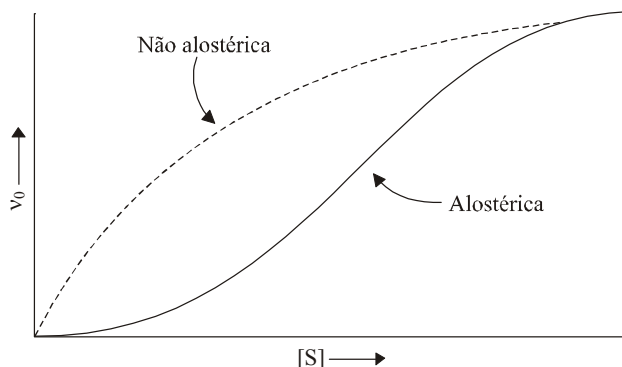
Os efetores podem ser:

- *Efetor alostérico positivo* – aumenta a afinidade da enzima pelo substrato e, assim, eleva a velocidade da reação.
- *Efetor alostérico negativo* – reduz a afinidade da enzima pelo substrato e, assim, diminui a velocidade da reação.

A maioria das enzimas alostéricas é *oligomérica*; ou seja, são compostas de várias subunidades polipeptídicas, cada uma com um sítio ativo. Em algumas enzimas, o sítio alostérico e o sítio ativo estão localizados na mesma subunidade (ex.: piruvato-carboxilase); em outras, estão localizados em subunidades diferentes (ex.: aspartato-carbamoiltransferase). Em consequência da natureza oligomérica das enzimas alostéricas, a ligação do substrato a uma subunidade pode afetar a ligação de outras moléculas de substrato aos outros sítios ativos. *Cooperatividade* é a influência que a união de um ligante a uma protômero tem sobre a união de ligante a outro protômero numa proteína oligomérica. A interação estabelecida entre os sítios ativos é evidenciada pela cinética da catálise: o gráfico de  $v_0$  versus a concentração de substrato [S] é uma *curva sigmóide*, em lugar da *curva hiperbólica* de Michaelis–Menten (Figura 3.14).

Quanto a cooperatividade as reações podem ser:

- *Positivamente cooperativa* onde a ligação do primeiro substrato aumenta a afinidade de substratos adicionais por outros sítios ativos.
- *Negativamente cooperativa* em que a ligação do primeiro substrato reduz a afinidade por substratos adicionais.

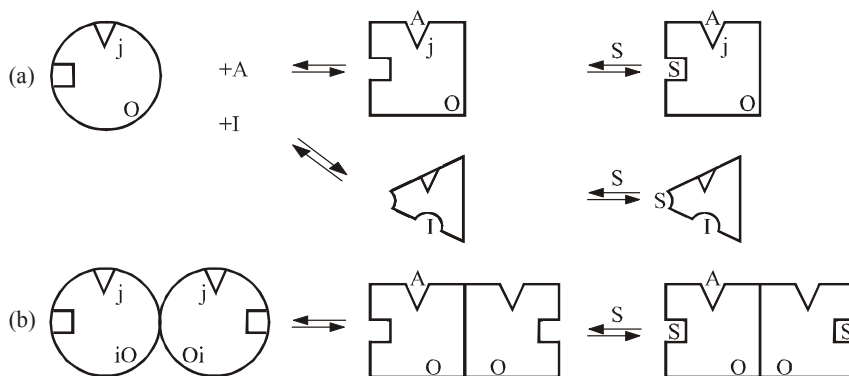


**Figura 3.14**  
 Velocidade inicial da reação versus a concentração de substrato (S) para enzimas alostéricas comparadas com enzimas não-alostéricas.

As enzimas alostéricas podem exercer diferentes efeitos:

- *Interações homotrópicas.* A união do ligante a um protômero pode afetar a união de ligantes aos outros protômeros do oligômero.
- *Interações heterotrópicas.* É o efeito de um ligante sobre a ligação de um ligante diferente; o efeito pode ser tanto positivo como negativo.

Algumas enzimas alostéricas têm dois ou mais efetores e podem ser reguladas por efetores positivos e negativos que poderão estar presentes em diferentes concentrações.



**Figura 3.15**  
**Modelos de sistemas de enzimas alostéricas.** (a) *Modelo de uma enzima monomérica.* A ligação de um efector alostérico positivo (A) ao sítio ativador, j, induz a uma nova conformação da enzima, com maior afinidade pelo substrato. A ligação de um efector alostérico negativo ao sítio inibidor, i, resulta numa conformação da enzima com afinidade diminuída pelo substrato (S). (b) *Modelo de uma enzima alostérica polimérica.* A ligação de um efector alostérico positivo (A) no sítio j, causa uma mudança alostérica na conformação do protômero ao qual o efector se liga que é transmitida a um segundo protômero por meio de interações cooperativas protômero-protômero. A afinidade pelo substrato

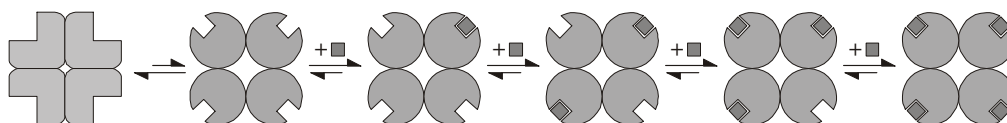
aumenta nos dois protômeros. Um efetor negativo diminui a afinidade pelo substrato nos dois protômeros.

Dois modelos explicam o comportamento de enzimas alostéricas com curvas sigmoidais  $v_0$  versus  $[S]$  que refletem as interações cooperativas entre as subunidades oligoméricas:

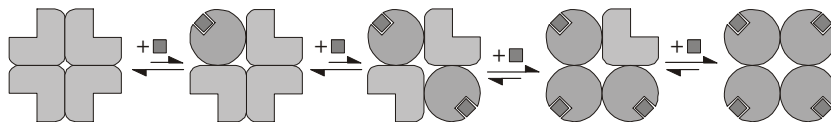
**1. Modelo concertado (ou de simetria).** Proposto por Monod, Wyman e Changeux, onde as subunidades estão todas na forma inativa (T, tenso) ou todas na forma ativa (R, relaxado). Os estados T e R estão em equilíbrio. Ativadores e substratos favorecem o estado R. Inibidores favorecem o estado T. Uma mudança conformacional num protômero causa uma mudança correspondente em todos os protômeros.

**2. Modelo seqüencial.** Proposto por Koshland, Némethy e Filmer as subunidades podem sofrer a mudança conformacional individualmente. A ligação do substrato aumenta a probabilidade da mudança conformacional. A mudança em uma subunidade faz ocorrer uma mudança similar na subunidade adjacente, vizinho do protômero contendo o ligante unido, assim como torna mais provável a ligação de uma segunda molécula de substrato.

Modelo concertado



Modelo seqüencial



**Figura 3.16**

**Comportamento das enzimas alostéricas.** No modelo concertado, todas as unidades são convertidas do estado T (baixa afinidade) para o estado R (alta afinidade) simultaneamente. No modelo seqüencial, as subunidades sofrem mudanças conformacionais progressivamente com as ligações do substrato.

## D. Zimogênios

Muitas enzimas são sintetizadas como precursores inativos e, subsequentemente, ativadas pela clivagem de uma ou mais ligações peptídicas específicas. O precursor inativo é chamado *zimogênio* (ou *proenzima*). Não é necessária uma fonte de energia (ATP) para a clivagem.

As formas zimogênios são geralmente designadas pelo sufixo *-ogênio* depois do nome da enzima; a forma zimogênio da quimotripsina é denominada quimotripsinogênio. Algumas vezes, a forma zimogênio é referida pró-enzima; a forma zimogênio do colágeno é o pro-colágeno.

A proteólise específica é um meio comum de ativação de enzimas e outras proteínas nos sistemas biológicos. Exemplos:

- As enzimas digestivas que hidrolisam proteínas são sintetizadas como zimogênios no estômago e pâncreas (Quadro 3.3).
- A coagulação sangüínea é mediada por uma cascata de ativadores proteolíticos que asseguram uma rápida e amplificada resposta a lesão celular. Os zimogênios são sintetizados nas células do fígado e são secretados no sangue para subsequente ativação por serino-proteases.
- Alguns hormônios protéicos são sintetizados como precursores inativos. Por exemplo: a *insulina* é derivada da *pró-insulina* pela remoção proteolítica de um peptídeo.
- A proteína fibrosa *colágeno*, o maior constituinte da pele e ossos, é derivado do *pro-colágeno*, um precursor solúvel.
- Muitos processos de desenvolvimento são controlados pela ativação de zimogênios. Por exemplo, parte do colágeno é desdobrado no útero dos mamíferos após o parto. A conversão da *pró-colagenases* em *colagenases*, a protease ativa, é realizado no momento apropriado dentro do processo.
- A *apoptose* ou a *morte celular programada* é mediada por enzimas proteolíticas denominadas *captases* e sintetizadas na forma de precursor *pró-caspases*. Quando ativadas por vários sinais, as caspases atuam na morte celular. A apoptose promove um meio de esculpir as formas de parte do corpo no curso do desenvolvimento e um meio de eliminar células produtoras de auto-anticorpos ou infectadas com patógenos também como, células contendo uma grande quantidade de DNA lesado.

**Quadro 3.3 – Zimogênios gástricos e pancreáticos**

Local de síntese	Zimogênio	Enzima ativa
Estômago	Pepsinogênio	Pepsina
Pâncreas	Quimiotripsinogênio	Quiniotripsina
Pâncreas	Tripsinogênio	Tripsina
Pâncreas	Pró-carboxipeptidase	Carboxipeptidase
Pâncreas	Proelastase	Elastase

## E. Isoenzimas

Outro fenômeno de regulação metabólica e que depende da estrutura quaternária das proteínas enzimáticas são as isoenzimas. As *isoenzimas* ou *isozimas* são formas moleculares múltiplas de uma

enzima, que realizam a mesma ação catalítica e ocorrem na mesma espécie animal. O exemplo clássico é a *lactato-desidrogenase* (LDH) um tetrâmero formado por duas espécies diferentes de cadeias polipeptídicas, denominadas M (músculo) e H (coração). Essas subunidades são codificadas por genes diferentes. A combinação das duas cadeias produz cinco isoenzimas que podem ser separadas eletroforéticamente (Quadro 3.4).

**Quadro 3.4** – Composição das subunidades da lactato-desidrogenase e suas principais localizações

Tipo	Composição	Localização
LDH-1	HHHH	Miocárdio e eritrócitos
LDH-2	HHHM	Miocárdio e eritrócitos
LDH-3	HHMM	Cérebro e fígado
LDH-4	HMMM	-
LDH-5	MMMM	Músculo esquelético e fígado

A lactato desidrogenase catalisa a redução reversível do piruvato a lactato. Desse modo, no músculo esquelético a isoenzima LDH-5 apresenta  $V_{\max}$  elevada para o piruvato e, portanto, converte rapidamente o piruvato a lactato. No caso da LDH-1, encontrada no coração a  $V_{\max}$  é relativamente baixa para o piruvato, não favorecendo a formação do lactato. O excesso de piruvato inibe a isoenzima LDH-1. O músculo cardíaco, um tecido essencialmente aeróbico, metaboliza a glicose a piruvato e, a seguir, a  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$ , produzindo pouco lactato. Entretanto, em situações de déficit de oxigênio, o piruvato pode ser convertido a lactato como medida de emergência. Assim, as características cinéticas distintas das duas enzimas determinam o tipo de metabolismo em cada tecido.

Foram estudadas isoenzimas de várias enzimas diferentes, sendo as mais importantes, do ponto de vista clínico, além da lactato desidrogenase, a creatina cinase e a fosfatase alcalina.

### 3.10 Aplicações clínicas das enzimas

Muitas das enzimas presentes no plasma, líquido cefalorraquidiano, urina e exudatos, são provenientes, principalmente, do processo normal de destruição e reposição celular. Entretanto, certas enzimas se apresentam, nesses líquidos, em teores elevados após lesão tecidual provocadas por processos patológicos com o aumento na permeabilidade celular ou morte prematura da célula. Nos casos de alteração da permeabilidade, as enzimas de menor massa molecular aparecem no plasma. Quanto maior o gradiente de concentração entre os níveis intra e extracelular, mais rapidamente a enzima difunde para fora. As enzimas citoplasmáticas surgem no plasma antes daquelas presentes nas organelas sub-celulares. Quanto maior a extensão do tecido lesado, maior o aumento no nível plasmático. As enzimas não específicas do plasma



são clarificadas em várias velocidades, que dependem da estabilidade da enzima e sua susceptibilidade ao sistema reticuloendotelial.

Algumas enzimas tem sua atividade no próprio plasma; por exemplo, as enzimas associadas a coagulação sangüínea (trombina), dissolução de fibrina (plasmina) e clareamento de quilomicrons (lipase lipoprotéica). As enzimas mais ensaiadas no laboratório clínico são mostradas na Quadro 3.5.

**Quadro 3.5** – Enzimas rotineiramente ensaiadas no laboratório clínico

Enzimas	Órgão ou tecido afetado
Aldolase	Músculo, coração
Amilase	Pâncreas
Creatina-cinase (CK ou CPK)	Coração, músculo, cérebro
Fosfatase ácida	Próstata (carcinoma)
Fosfatase alcalina	Fígados, ossos
Lactato-desidrogenase (DHL)	Fígado, coração, eritrócitos
Lipase	Pâncreas
$\gamma$ -Glutamyl-transpeptidase	Fígado
Glicose 6-P-desidrogenase	Eritrócitos (doença genética)
Transaminase-oxalacética (OT)	Fígado, coração
Transaminase-pirúvica (PT)	Fígado, coração

## Resumo

1. As enzimas são catalisadores biológicos. Elas aumentam a velocidade da reação pois seguem uma via alternativa que necessita menos energia que a reação não-catalisada. As enzimas são específicas para o tipo de reação que catalisam. Cada tipo de enzima possui um local específico em sua superfície denominado sítio ativo, que é uma pequena fenda onde se liga o substrato. No modelo chave-e-fechadura, a fenda do sítio ativo e o substrato são complementares. No modelo do encaixe-induzido a proteína é mais flexível e se adapta ao substrato.
2. Cada enzima é classificada de acordo com o tipo de reação que catalisa. Existem seis tipos de categorias enzimáticas: oxidoredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases.
3. A cinética enzimática é o estudo quantitativo da catálise por enzimas. De acordo com o modelo de Michaelis-Menten, quando o substrato S liga-se ao sítio ativo de uma enzima E, um complexo de estado de transição é formado. Durante o estado de transição, o substrato é convertido em produto. Após algum tempo, o produto se dissocia da enzima.
4. O número de renovação ( $K_{cat}$ ) é a medida do número de moléculas de substrato convertidos em produto por unidade por uma enzima quando ela está saturada de substrato. O termo  $K_{cat}/K_m$  descreve a eficiência da enzima.
5. A inibição enzimática pode ser reversível ou irreversível. Os inibidores irreversíveis geralmente ligam-se covalentemente às enzimas. Na inibição reversível, o inibidor pode dissociar-se da enzima. Os tipos mais

comuns de inibição reversível são a competitiva, não-competitiva e a incompetitiva.

6. As propriedades cinéticas das enzimas alostéricas não são explicadas pelo modelo de Michaelis–Menten. A maioria das enzimas alostéricas são proteínas multi-subunidades. A ligação do substrato ou efetor a uma subunidade afeta as propriedades de ligação dos outros protômeros.
7. As enzimas empregam os mesmos mecanismos dos catalizadores não-enzimáticos. Vários fatores contribuem para a catálise enzimática: efeitos de proximidade e orientação, efeitos eletrostáticos, catálise ácido-base e catálise covalente. A combinação desses fatores afetam os mecanismos enzimáticos.
8. As cadeias laterais de aminoácidos presentes nos sítios ativos são os principais responsáveis pela transferência de prótons e substituições nucleófilas. Co-fatores não-protéicos (metais e coenzimas) são usados pelas enzimas para catalisar vários tipos de reações.
9. As enzimas são sensíveis aos fatores ambientais como a temperatura e pH. Cada enzima tem uma temperatura ótima e um pH ótimo.
10. As reações químicas nas células vivas são organizadas em uma série de vias bioquímicas. As vias são controladas principalmente pelo ajuste das concentrações e atividades das enzimas por meio do controle genético, modificação covalente, regulação alostérica e compartimentalização.