

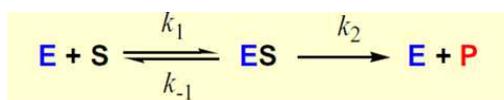
Introdução à cinética enzimática. Cinética da catálise pela invertase.

Termodinâmica MIB (2015)

Todas as enzimas são proteínas e são portanto lábeis, podendo ser inactivadas e desnaturadas. Distinguem-se das outras proteínas pelas propriedades catalisadoras, isto é, pela possibilidade que têm de aumentar milhares de vezes a velocidade de reacções químicas que, na ausência de um catalisador, seriam extremamente lentas.

A velocidade de uma reacção catalisada enzimaticamente depende de muitos factores e o conhecimento da cinética de uma reacção é importante para a caracterização da respectiva enzima porque oferece pistas sobre o seu comportamento “in vivo” e permite prever o seu mecanismo de acção.

A mais simples reacção enzimática pode ser representada da seguinte forma:



em que E é a enzima livre, S é o substrato da reacção, P é o produto e ES é o complexo enzima-substrato. Pode demonstrar-se que, quando $[\text{S}] \gg [\text{P}]$ (início da reacção) e quando $[\text{ES}]$ é constante (estado estacionário), a equação da velocidade inicial da reacção, v_0 , é dada pela expressão conhecida como equação cinética de Michaelis-Menten:

$$v_0 = v_{\max} [\text{S}] / (K_M + [\text{S}]) \quad (1)$$

em que K_M é a constante de Michaelis-Menten,

$$K_M = (k_{-1} + k_2) / k_1 \quad (2)$$

e v_{\max} é a sua velocidade máxima que depende da constante de velocidade k_2 :

$$v_{\max} = k_2 [\text{E}]_{\text{total}} \quad (3)$$

Esta velocidade máxima é atingida quando a proporção $[\text{S}]/[\text{E}]$ atinge valores suficientemente grandes para saturar a enzima, ou seja, para fazer com que todas as moléculas de enzima se encontrem ligadas ao substrato ($[\text{ES}] = [\text{E}]_{\text{total}}$). Os parâmetros K_M e k_2 são característicos de cada reacção enzimática e de cada enzima.

Se representarmos graficamente a velocidade de uma reacção catalisada enzimaticamente

mente em função da concentração do substrato obtém-se um gráfico como o esquematizado na Figura 1.

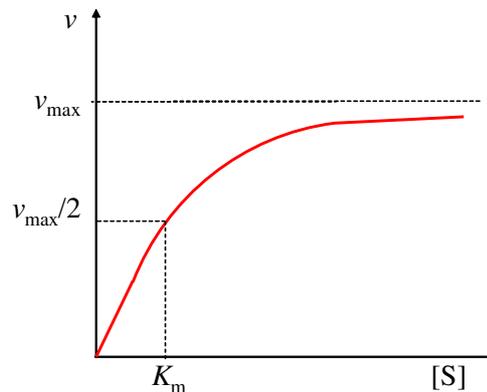


Figura 1- Representação gráfica da velocidade de uma reacção enzimática em função da concentração de substrato (Equação 1). A saturação da enzima com elevadas concentrações de substrato conduz à independência da velocidade da reacção relativamente à concentração de substrato. O valor de K_M coincide com o da concentração de substrato para a qual a velocidade da reacção é exactamente metade da velocidade máxima.

Quando se faz o estudo experimental de uma enzima é difícil averiguar se os dados experimentais obedecem ou não à equação de Michaelis-Menten, isto é, se a relação entre a velocidade da reacção e a concentração é definida ou não pela equação da hipérbole rectangular. Para além disso, para se conhecer o valor de K_M seria necessário conhecer o valor da velocidade máxima, o que nem sempre é fácil. Lineweaver e Burk propuseram que se utilizassem nos gráficos os valores inversos daqueles que aparecem na equação de Michaelis-Menten, ou seja:

$$1/v = 1/v_{\max} + (K_M/v_{\max})(1/[S]) \quad (4)$$

Se se representar graficamente $1/v$ em função de $1/[S]$, e a cinética da enzima for de Michaelis-Menten, então obtém-se uma recta cujo declive é K_M/v_{\max} e cuja ordenada na origem é $1/v_{\max}$, sendo $1/K_M$ a abcissa do ponto da recta cuja ordenada é nula (Figura 2). Esta representação da equação de Michaelis-Menten é de utilização prática porque permite fazer um ajuste da função teórica aos dados experimentais através de uma simples regressão linear.

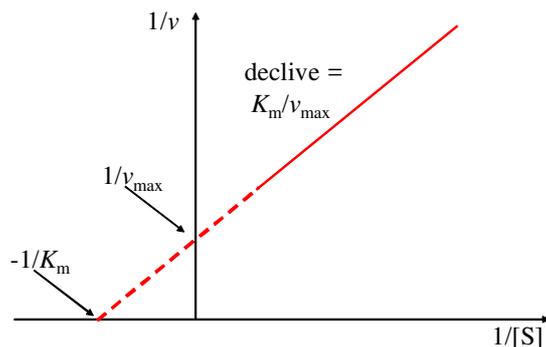


Figura 2 - Representação gráfica de Lineweaver-Burk da equação de Michaelis-Menten (Equação 4).

Medidas de actividade enzimática

A actividade enzimática é definida pelo consumo de uma certa quantidade de substrato, ou a produção de uma certa quantidade de produto, por unidade de tempo:

$$\text{actividade enzimática} = -d[S]/dt = d[P]/dt \quad (5)$$

De acordo com as unidades usadas para a actividade enzimática e para o tempo podem definir-se as seguintes unidades de actividade enzimática:

Unidade Internacional: 1 U.I. = 1 mmol de substrato/minuto a 25 °C

Katal: 1 Kat = 1 mol de substrato/seg a 37°C

Estas unidades podem definir a actividade de uma determinada enzima sem haver necessidade de a isolar, pois nelas não se refere a concentração da própria enzima. Como a purificação de qualquer enzima é, normalmente, difícil, as medidas de actividade enzimática já referidas servem para definir precisamente o grau de purificação da enzima nas várias etapas do processo de isolamento. Ao dividir o valor da actividade enzimática encontrada numa solução pelo número de miligramas de proteína nela existente, define-se um novo conceito: a actividade específica. A medida da actividade específica é máxima quando a enzima se encontra pura.

Cinética da invertase

Reacção

A invertase é uma enzima que catalisa a hidrólise da sacarose segundo a reacção:



Esta é uma reacção praticamente completa, dita “irreversível” em que os produtos da reacção são D-glucose e D-frutose em quantidades equimoleculares. É de notar que a hidrólise da sacarose acontece por mecanismos não catalíticos. Embora a velocidade desses mecanismos seja negligenciável, a temperaturas próximas da ambiente, às quais decorrem as expe-

riências de reacção enzimática, isso já não é verdade a 100 °C. A hidrólise da sacarose a altas temperaturas é por isso relevante para o método de doseamento dos produtos da reacção 1 tal como explicado a seguir.

Doseamento

Para determinar a evolução de uma reacção é necessário medir as quantidades de reagentes gastos, ou de produtos formados, em vários intervalos de tempo. Neste trabalho prático é usado um método espectrofotométrico de doseamento específico para os produtos glucose e frutose que se baseia na sua oxidação quantitativa, a 100 °C, pelo DNS (ácido 3,5 dinitro-salicílico), originando uma solução corada cuja absorvância a 540 nm é proporcional à soma das concentrações de glucose e frutose. A relação entre concentração e absorvância, Equação 6, é determinada previamente por regressão linear, usando um método igual ao deste protocolo, mas com soluções padrão de glucose, ou frutose, com concentrações no intervalo $0 < c < 0,010$ M, para os quais se obtêm absorvâncias no intervalo $0 < \text{Abs}_{540} < 0,8$:

$$A_{540} = \epsilon_{540} ([\text{glucose}] + [\text{frutose}]) L + oo \quad (6)$$

onde A_{540} é a absorvância medida a 540 nm, ϵ_{540} é a absorvidade molar ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) directamente estimada pelo declive da regressão, uma vez que L é 1 cm de espessura da solução, e oo é a ordenada na origem também estimada pela regressão para concentração zero de monossacarídeos. Uma vez que ϵ_{540} e oo dependem da temperatura, é importante anotar a temperatura a que foram determinados estes parâmetros.

É de notar que as soluções para tempo zero usadas como brancos no protocolo cinético contêm sacarose. Isto é necessário devido à presença de grande excesso de sacarose nas amostras cinéticas a dosear, que se poderá hidrolisar quando a solução com DNS for aquecida a 100 °C. Desta forma, a glucose e a frutose que se poderá formar não-enzimaticamente neste passo do trabalho aparecerá tanto nas amostras como nos brancos e é descontada automaticamente nas leituras de absorvância das amostras, sendo doseados apenas os monossacarídeos provenientes da reacção enzimática.

A invertase

A enzima invertase é obtida com eficácia da levedura *Saccharomyces cerevisiae* que produz uma forma intracelular mais leve (~135 kDa) e outra extracelular mais pesada contendo uma porção importante de carboidratos (glicoproteína, 270 kDa). A invertase possui um pH isoelectrónico de cerca de 4 e exibe um máximo de actividade catalítica a pH próximo de 4,5. Por esta razão as soluções de enzima e de sacarose contêm NaH_2PO_4 0,1 M. Em princípio, a espécie anfiprótica H_2PO_4^- estabelece um pH de $(\text{pK}_{a1} + \text{pK}_{a2})/2 = (2.15 + 7.20)/2 = 4.7$ em água pura. No entanto, devido ao ácido carbónico dissolvido em água, e uma vez que a espécie H_2PO_4^- não constitui um tampão, o pH real é normalmente entre 4.4 e 4.5. Como a concentração de enzima é de ordem nanomolar (10^{-9} M) nas soluções reaccionais deste tra-

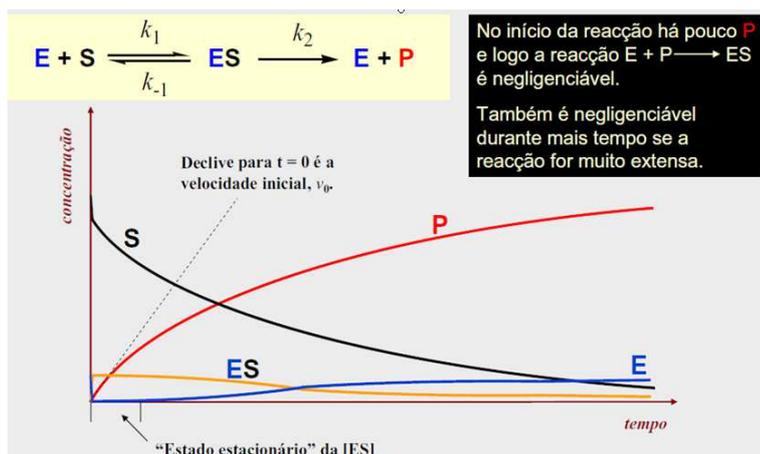


Figura 3 - Evolução com o tempo das concentrações durante uma reacção enzimática com cinética de Michaelis-Menten.

balho, e como os compostos da reacção 1 não possuem propriedades ácido-base e a reacção 1 não envolve H^+ , é esperado que o pH não varie durante a reacção e que portanto a actividade da enzima se mantenha constante.

Determinação das velocidades iniciais, v_0

Para determinar a velocidade inicial (v_0) da reacção de hidrólise é necessário adicionar a uma solução de sacarose uma certa quantidade da enzima invertase, em concentrações tais que não saturam a enzima. Desta solução são então retiradas alíquotas aos tempos 0, 1, 2, 3, 4 e 5 minutos às quais é adicionada solução de DNS. Esta solução pára a reacção, por inactivação da enzima, e permite dosear os produtos formados para cada um desses tempos. O declive da regressão linear aplicada aos dados ($[glucose]$, tempo) é a velocidade média da reacção nos seus primeiros 5 minutos, velocidade essa que se considera constante e uma boa aproximação da velocidade inicial (Figura 3). Para mostrar que assim é considera-se a expressão da cinética de Michaelis-Menten que descreve a variação da concentração de produto com o tempo, isto é, o integral da Equação 1:

$$t v_{\max} = [P] + K_M \ln(1 + [P]/([S]_0 - [P])) \quad (7)$$

onde $[S]_0$ é a concentração de substrato (sacarose) no tempo zero e $[P]$ é a concentração de produto (glucose, por exemplo) no tempo t . A Figura 3 mostra como a variação de $[P]$ não é linear com o tempo. No entanto, no início da reacção, verifica-se que $[S] \gg [P]$ o que, dado que $\ln(1+x) \approx x$, se $x \ll 1$, permite eliminar o logaritmo da equação 7 para obter uma forma válida para os primeiros instantes da reacção:

$$t v_{\max} \approx [P] + K_M [P]/([S]_0 - [P]) \quad (8)$$

Reorganizando os termos em ordem a $[P]$, esta equação pode ser expressa na forma

$$[P] \approx t v_{\max} [S]_0 / (K_M + [S]_0) \quad (9)$$

o que mostra haver, no início da reacção, uma relação linear entre [P] e o tempo, dependendo apenas da constante $v_{\max} [S]_0 / (K_M + [S]_0)$. Não é coincidência que esta constante tenha a forma da Equação 1 pois diferenciando a Equação 9 obtém-se

$$\Delta[P] \approx \Delta t v_{\max} [S]_0 / (K_M + [S]_0) \quad \Leftrightarrow$$

$$\Delta[P]/\Delta t \approx v_{\max} [S]_0 / (K_M + [S]_0) = v_0 \quad (10)$$

A equação 10 mostra que a velocidade instantânea inicial (em rigor quando $t = 0$) é aproximadamente constante durante o intervalo Δt se $[P] \ll [S]$, ou seja, a velocidade média durante os primeiros instantes de uma reacção que se inicia só com sacarose e enzima é uma boa aproximação da velocidade inicial e será tanto melhor quanto menor puder ser Δt .

Determinação de K_M e k_2 da invertase

De posse de valores para v_0 em função de $[S]_0$ é possível por regressão não linear da equação 1, ou regressão linear da equação 4, obter os parâmetros da enzima K_M e v_{\max} . A regressão não linear é de preferir por proporcionar uma estimativa directa das incertezas associadas aos parâmetros.

Sabendo v_{\max} e a concentração de enzima usada é possível calcular a constante k_2 através da equação 3.

Variação de k_2 com a temperatura

Os dados de k_2 em função da temperatura permitem estimar os valores de entalpia e de entropia de activação aparentes do passo $[ES] \rightarrow E + P$ por regressão não linear da equação de Eyring, correspondente à teoria do estado de transição:

$$k_2 = (k_B T/h) \exp(-\Delta G^\ddagger/(RT)) = (k_B T/h) \exp(-\Delta H^\ddagger/(RT)) \exp(\Delta S^\ddagger/R) \quad (11)$$

ou por regressão linear da sua forma logarítmica

$$\ln(k_2/T) = (-\Delta H^\ddagger/(RT)) + (\Delta S^\ddagger/R) + \ln(k_B/h) \quad (12)$$

onde k_B é a constante de Boltzman, h é a constante de Planck, T é a temperatura em Kelvin, R é a constante dos gases ideais e ΔH^\ddagger , ΔS^\ddagger e ΔG^\ddagger são, respectivamente, variação de entalpia, variação de entropia e variação de energia de Gibbs padrão de activação. Tal como referido na sub-secção anterior, também neste caso a regressão não linear é de preferir por proporcionar uma estimativa directa das incertezas associadas aos parâmetros.

Protocolo laboratorial

Material

- Tubos de ensaio
- Pipetas automáticas
- Vortex
- Banho-maria

Cronómetro
Pipeta de 10 cm³
Espectrofotómetro
Agitadores magnéticos
Placa de aquecimento
Gobelés
Gelo
Suportes para tubos de ensaio

Reagentes

Solução de NaH₂PO₄ 0,1 M
Solução de invertase
(Sigma-Aldrich I4504, MM = 270 x 10³ g/mol, 1,00 g dm⁻³ em NaH₂PO₄ 0,1 M)
Reagente de DNS (contendo ácido dinitrosalicílico a 10 g dm⁻³, isto é, 0,044 mol dm⁻³)
Água desionizada
Soluções de sacarose 0,010, 0,025, 0,050 e 0,080 M em NaH₂PO₄ 0,1 M

Técnica

1. Identificar cada um dos gobelés de 50 cm³ das soluções de sacarose com as letras A, B, C e D. Manter os gobelés num banho de água a temperatura constante. Informe-se junto do docente sobre a temperatura a estabilizar (usar gelo e água quente conforme necessário).
2. Para cada solução de sacarose, utilizar seis tubos de ensaio que deve codificar de 0x a 5x, em que x é a letra de código dessa solução de sacarose, A, B, C ou D.
3. Pipetar, com pipeta automática, 1 cm³ do reagente DNS para todos os tubos de ensaio referidos em 2.
- 4 - Retirar, com pipeta automática, 1 cm³ de cada uma das soluções de sacarose para cada um dos tubos zero ("brancos").
- 5 - Pipetar, com pipeta automática, 1 cm³ da solução da enzima e adicioná-la ao gobelé que contém a solução de sacarose 0,010 M, desencadeando simultaneamente o cronómetro e agitando com uma vareta de vidro durante alguns segundos para homogeneizar a mistura.
- 6 - Uns segundos antes do minuto 1, recolher, com pipeta automática, uma amostra de 1 cm³ da solução contida no gobelé. Exactamente ao minuto 1 despejar a amostra directamente para o fundo do tubo de ensaio 1 referente a esta concentração de sacarose. Agitar o tubo de ensaio no vortex e voltar a colocá-lo no suporte.
- 7 - Repetir a operação descrita em 6 para os minutos 2, 3, 4 e 5.
- 8 - Terminados estes ensaios, colocar os tubos de ensaio em banho-maria fervente durante exactamente 8 minutos. É importante que a água esteja em ebulição quando os tubos forem colocados no banho.