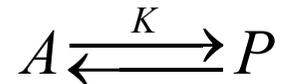


Efeito da Temperatura sobre as reações enzimáticas

Equação de van't Hoff

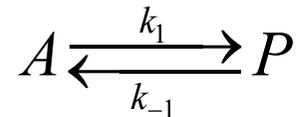
- A variação das constantes de equilíbrio K para uma reação:



É dada pela **equação de van't Hoff**:

$$\frac{d \ln K}{dT} = \frac{\Delta H^0}{RT^2}$$

em que R é a constante dos gases perfeitos e ΔH_0 a variação entalpia padrão da reação. A reação pode ser escrita como:



sendo a constante de equilíbrio K relacionada com as constantes cinéticas por:

$$K = \frac{k_1}{k_{-1}}$$

A equação de Arrhenius

- Substituindo esta expressão na equação de van't Hoff, obtemos o par de equações:

$$\frac{d \ln k_1}{dT} = \frac{\Delta H_1^0}{RT^2} + \lambda$$

$$\frac{d \ln k_{-1}}{dT} = \frac{\Delta H_{-1}^0}{RT^2} + \lambda$$

em que lambda λ é uma constante desconhecida idêntica nas duas equações. Arrhenius assumiu $\lambda = 0$, escrevendo a equação na forma:

$$\frac{d \ln k}{dT} = \frac{E_a}{RT^2}$$

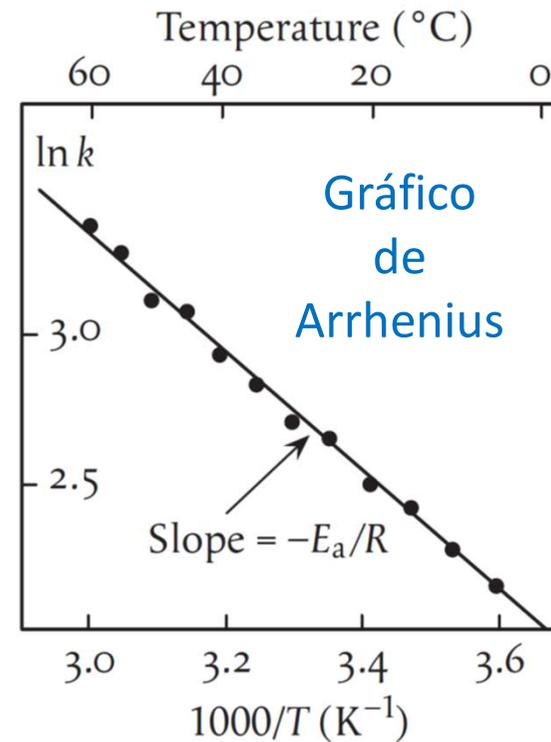
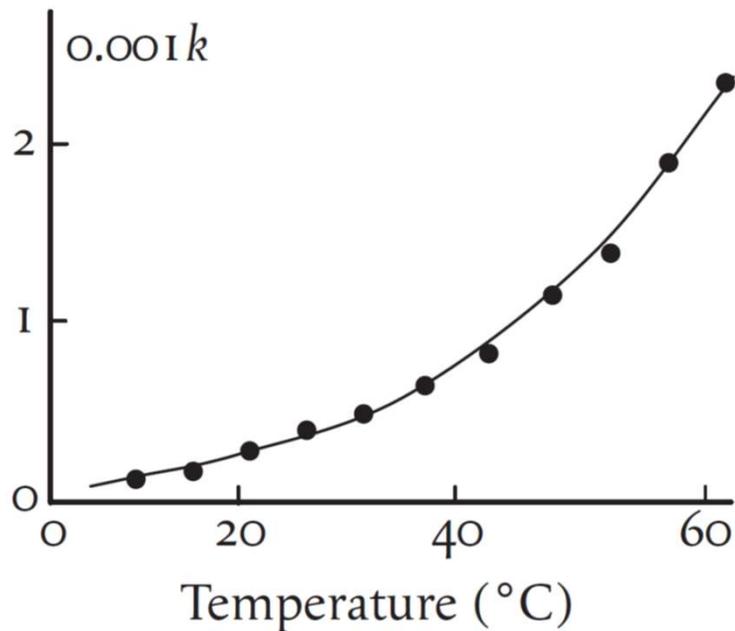
a forma integrada:

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{RT}$$

A equação de Arrhenius

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{RT}$$

$$k = Ae^{-\frac{E_a}{RT}}$$



Teoria de colisões

- De acordo com a distribuição de Maxwell-Boltzmann, a fração de moléculas num sistema com energia superior a E_a é proporcional a:

$$e^{-\frac{E_a}{RT}}$$

A equação de Arrhenius pode assim ser interpretada como indicando que só podem participar na reação moléculas com energia superior a E_a , a *energia de ativação*.

Na prática, podemos escrever o seguinte resultado:

$$k = PZ e^{-\frac{E_a}{RT}}$$

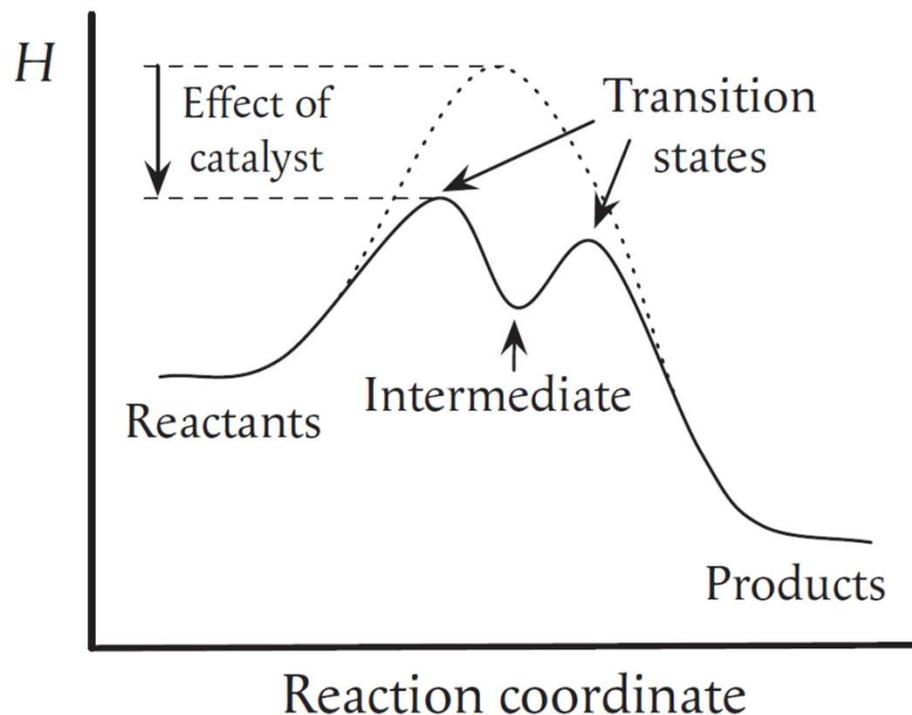
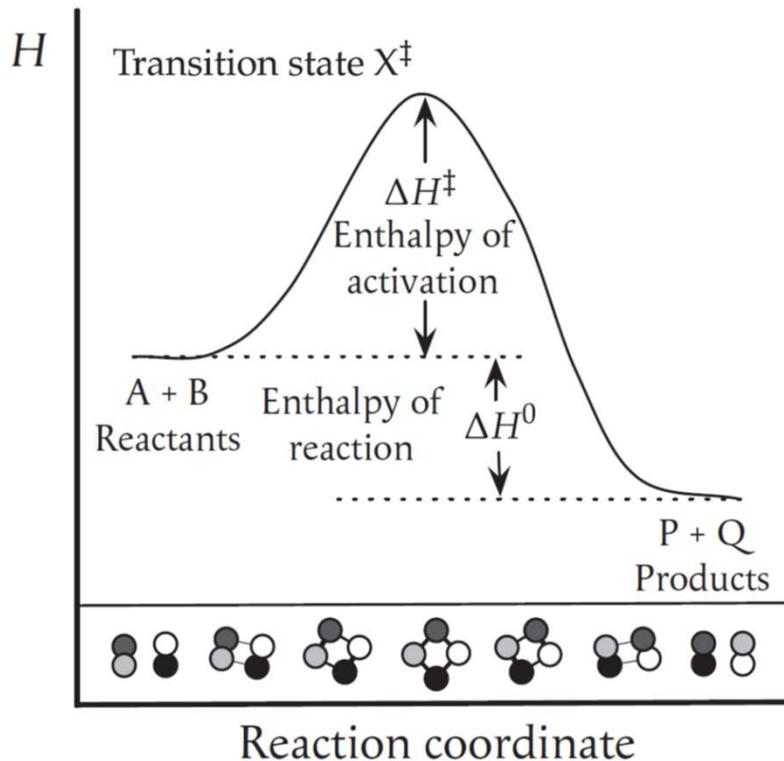
em Z é a frequência das colisões, e P a probabilidade de uma colisão produzir reação (colisão eficaz).

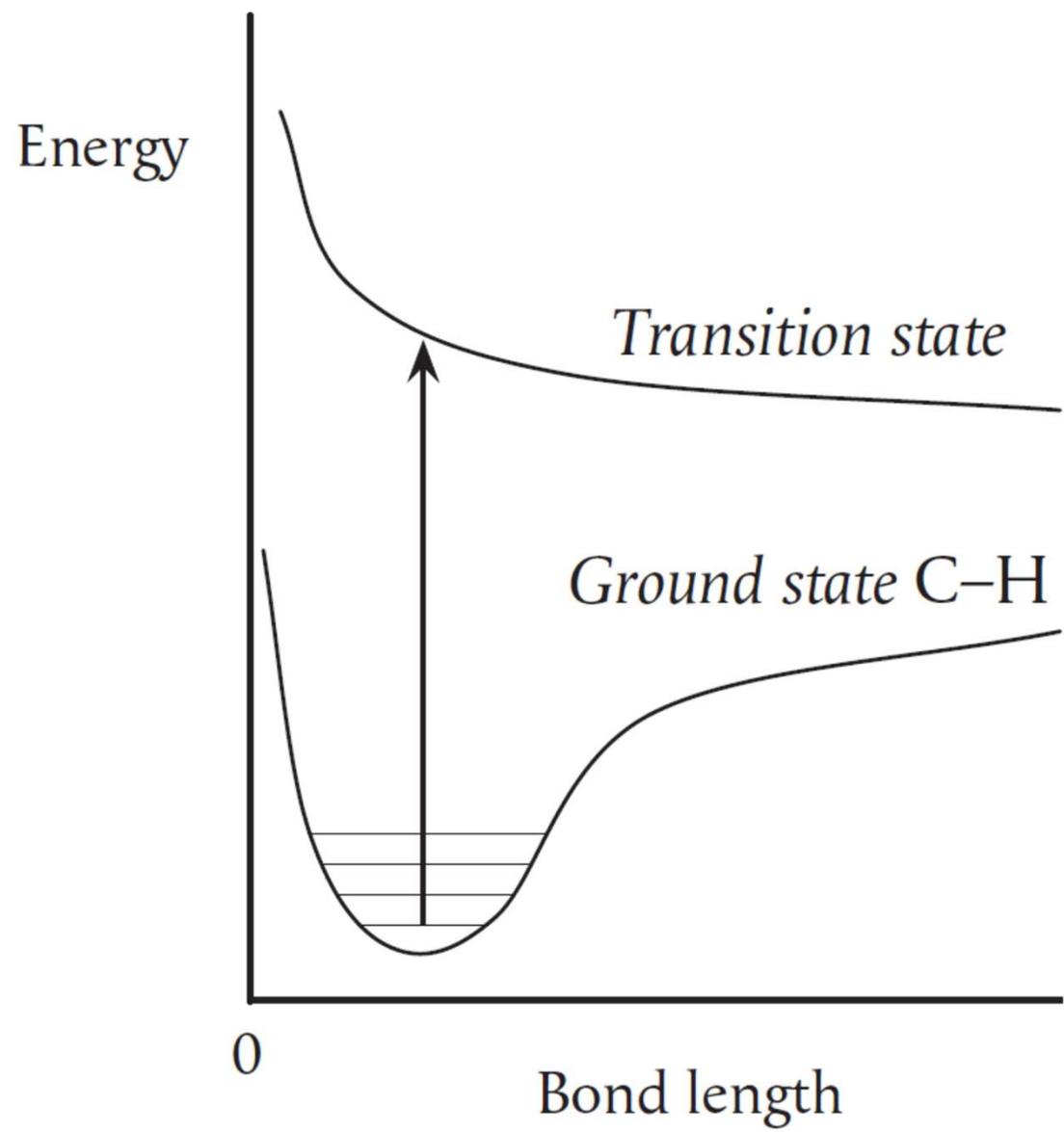
Esta equação descreve bastante bem o comportamento das reações em fase gasosa, no entanto as reações enzimáticas dão-se geralmente em meio *aquoso*.

Teoria do Estado de Transição

Teoria que relaciona as velocidades das reações químicas com as propriedades de uma espécie hipotética denominada *estado de transição*. Desenvolvida por Eyring (1935) e Glasstone (1940).

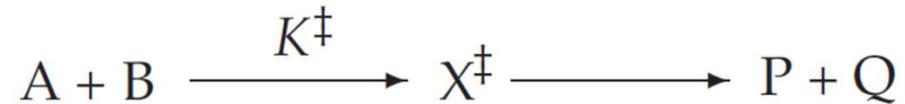
O sistema reacional passa através de um conjunto de estados, desde os reagentes até aos produtos, indexados por uma “coordenada reacional”. Ao longo deste percurso existe um ponto de energia máxima. Este ponto é o *estado de transição* e não deve ser confundido com um composto intermediário, o qual é uma espécie química detetável.





Teoria do Estado de Transição

Uma reação bimolecular pode ser representada como:



em que X^\ddagger é o estado de transição. Este é um estado hipotético que é considerado como estando em equilíbrio com A e B,

$$[X^\ddagger] = K^\ddagger [A][B]$$

em que K^\ddagger é dado por:

$$\Delta G^\ddagger = -RT \ln K^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger$$

sendo G^\ddagger , H^\ddagger e S^\ddagger são respetivamente a energia livre, entalpia e entropia de formação do estado de transição a partir dos reagentes. A concentração de X^\ddagger vem dada por:

$$[X^\ddagger] = [A][B]e^{\Delta S^\ddagger/R}e^{-\Delta H^\ddagger/RT}$$

Teoria do Estado de Transição

A expressão anterior permite calcular a concentração do estado de transição, e a ligação que se quebra no estado de transição tem frequência de vibração RT/Nh , em que h é a constante de Planck. A constante de segunda ordem para a reação vem assim dada por

$$k = \frac{RT}{Nh} e^{\Delta S^\ddagger/R} e^{-\Delta H^\ddagger/RT}$$

Tomando logaritmos e diferenciando, fica

$$\frac{d \ln k}{dT} = \frac{\Delta H^\ddagger + RT}{RT^2}$$

A comparação desta expressão com a equação de Arrhenius mostra que a energia de ativação E_a não é igual a ΔH^\ddagger , mas sim a $\Delta H^\ddagger + RT$. Esta dependência implica uma ligeira curvatura no gráfico de Arrhenius, insignificante na prática face a outros fatores.

Sendo que o gráfico de Arrhenius permite facilmente determinar A e E_a , ΔH^\ddagger e ΔS^\ddagger podem ser calculados a partir de:

$$\Delta H^\ddagger = E_a - RT$$

$$\Delta S^\ddagger = R \ln \left(\frac{ANh}{RT} \right) - R$$

Teoria do Estado de Transição

Embora não sejam grandezas termodinâmicas verdadeiras, a entalpia e entropia de ativação podem fornecer informação valiosa sobre a natureza do estado de transição e mecanismo de uma reação:

- **Entalpia de ativação:** um valor alto desta grandeza significa necessidade de distensão, distorção ou mesmo quebra de ligações para a formação do estado de transição
- **Entropia de ativação:** um ΔS^\ddagger grande e negativo implica que a formação do estado de transição requer a adoção de orientações precisas por parte dos reagentes, a aproximação ao longo de vetores bem definidos. Sendo que as moléculas envolvidas em processos bioquímicos são geralmente grande e flexíveis, são expectáveis valores de ΔS^\ddagger grandes e negativos.

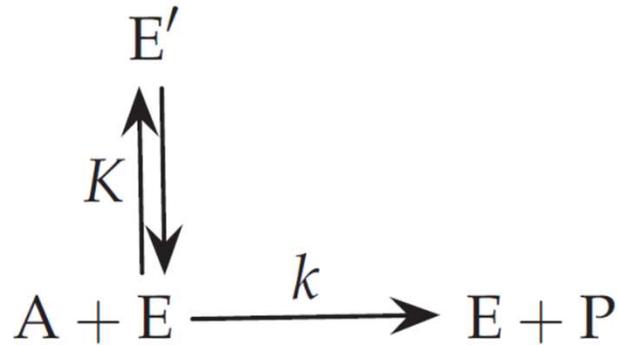
Um catalisador pode acelerar a velocidade de uma reação quer aumentando ΔS^\ddagger , quer diminuindo ΔH^\ddagger , ou ambos. É expectável que ambos os fatores sejam importantes na catálise enzimática.

Efeito da temperatura na catálise enzimática

O tratamento teórico da dependência da temperatura deveria aplicar-se à catálise enzimática, mas na prática existem alguns fatores adicionais a considerar.

- Todos os enzimas sofrem desnaturação para temperaturas acima da temperatura fisiológica, sendo a conformação do enzima alterada (muitas vezes irreversivelmente) com perda atividade catalítica. A desnaturação enzimática está associada a uma entalpia positiva muito grande (da ordem de $200-500 \text{ kJ/mol}$), a qual é compensada pela variação positiva de entropia associada a um maior número de conformações permitidas no estado desnaturado.

Desnaturação reversível



K – cte. de equilíbrio
para a desnaturação

E' – forma desnaturada
do enzima, inactiva

A variação da constante de desnaturação K com a temperatura pode ser dada por:

$$-RT \ln K = \Delta G^{0'} = \Delta H^{0'} - T\Delta S^{0'}$$

ou

$$K = \exp \left(\frac{\Delta S^{0'}}{R} - \frac{\Delta H^{0'}}{RT} \right)$$

Por outro lado a constante de segunda ordem k para a reacção enzimática pode ser dada pela equação de Arrhenius:

$$k = A \exp \left(\frac{-E_a}{RT} \right)$$

Desnaturação reversível

A velocidade da reação catalisada enzimaticamente é dada por $v = k [E][A]$, mas a concentração de enzima ativa tem que ser expressa em termos da concentração total e da forma desnaturada:

$$[E] = [E]_0 - [E']$$

sendo então que

$$v = \frac{k[E]_0[A]}{1 + k}$$

ou

$$v = k_{obs} [E]_0 [A]$$

com

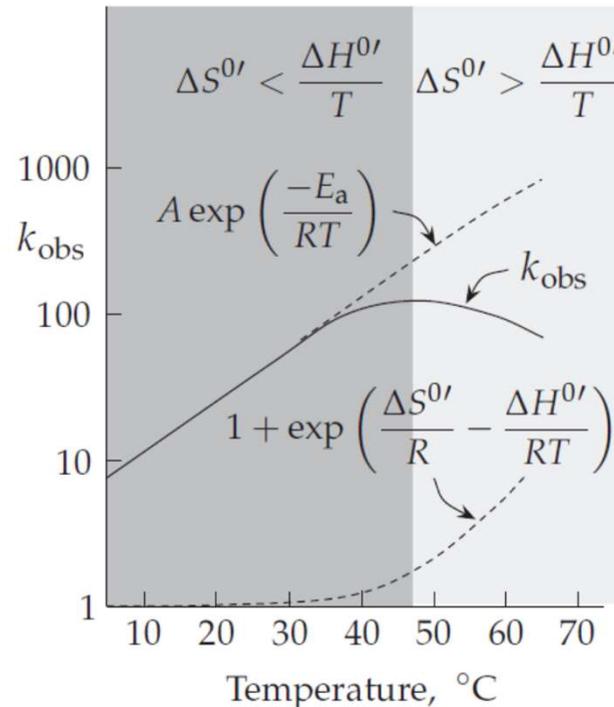
$$k_{obs} = \frac{k}{1 + K}$$

Desnaturação reversível

Combinando as expressões anteriores, obtém-se a seguinte expressão para $k_{\text{obs}} =$

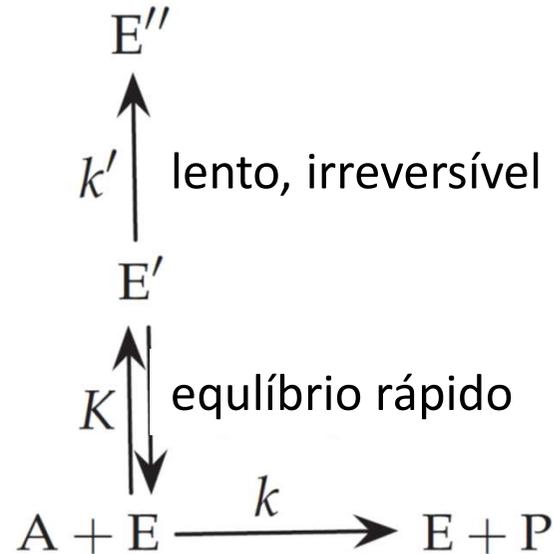
$$k_{\text{obs}} = \frac{A \exp\left(\frac{-E_a}{RT}\right)}{1 + \exp\left(\frac{\Delta S^{0'}}{R} - \frac{\Delta H^{0'}}{RT}\right)}$$

a baixas temperaturas, quando $\Delta S^{0'}/R$ é pequeno comparado com $\Delta H^{0'}/RT$, o termo exponencial no denominador é insignificante, e k_{obs} varia de acordo com a equação de Arrhenius. Para temperaturas acima de $\Delta H^{0'}/\Delta S^{0'}$, o denominador aumenta rapidamente e a velocidade de reação diminui.



Desnaturação irreversível

Um modelo mais realista deverá incluir a desnaturação térmica irreversível que geralmente ocorre sob acção da temperatura:



A forma ativa E do enzima converte-se rapidamente numa forma inativa E' estabelecendo-se um estado de pré-equilíbrio. A forma E' converte-se *irreversivelmente* numa segunda forma inativa E'', sendo o efeito deste processo cumulativo com o tempo do ensaio.

- 1) Para períodos de tempo suficientemente curtos, o model reversível pode aplicar-se
- 2) O efeito da irreversibilidade é cumulativo, com uma perda de actividade maior para tempos maiores

Temperatura óptima ?

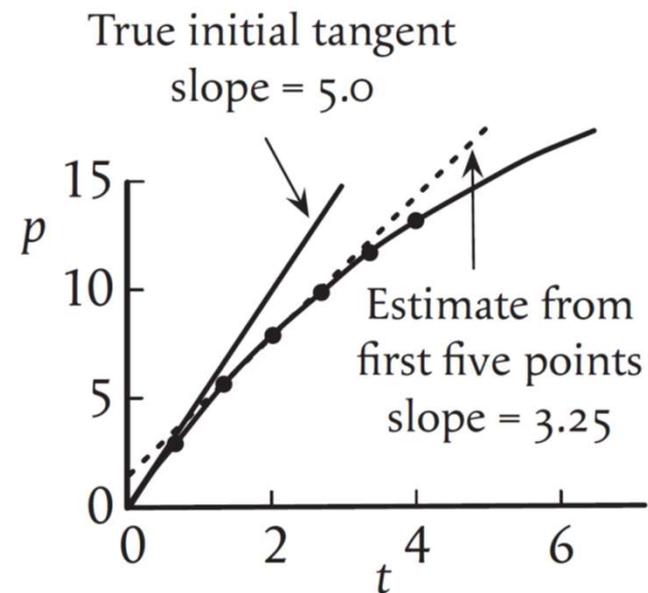
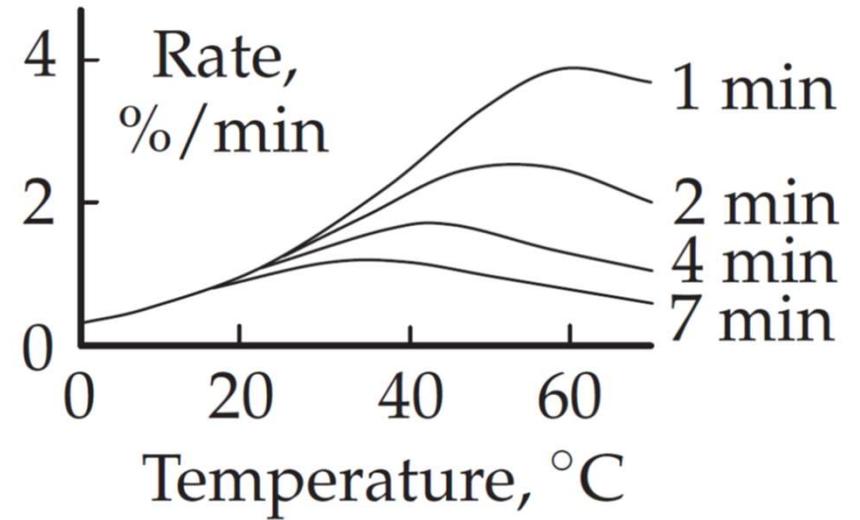
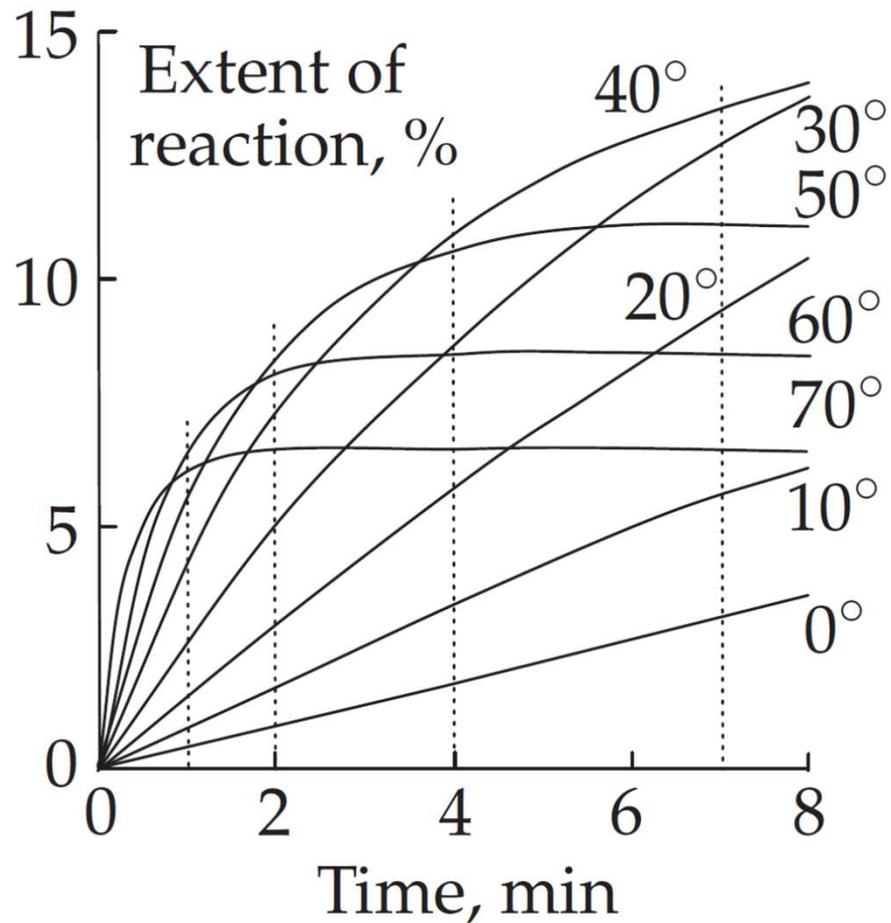
O modelo simples com reversibilidade permite entender porque a equação de Arrhenius parece falhar para temperaturas mais altas. A temperatura para a qual k_{obs} é máximo poder ser definida como “temperatura óptima”, mas o seu valor tem pouco significado, pois a dependência da temperatura é frequentemente variável com as condições do ensaio experimental.

Quanto maior tempo de incubação pré-análise, mais baixa será a temperatura óptima observada, devido ao efeito cumulativo da desnaturação.

A baixas temperaturas a reacção pode aproximar o equilíbrio, mas para altas temperaturas a reacção para muito antes de este ser atingido.

O valor de temperatura óptima observada vai depender do intervalo usado para estimar as velocidades iniciais!

Temperatura óptima ?



Gráficos de Arrhenius em enzimologia

Devido à desnaturação, os estudos de dependência da temperatura só podem geralmente ser feitas num intervalo estreito de temperaturas, ex. 0-50 °C

Os gráficos são geralmente curvos, implicando que pouca informação pode ser extraída.

Necessário medir várias velocidades a cada temperatura, para poder estimar a dependência dos parâmetros V_{\max} , K_m e V_{\max}/K_m . Estas dependências apresentam geralmente curvatura, que pode ter múltiplas causas: alteração de conformação do enzima, mistura de isozimas, efeito da temperatura sobre o substrato, etc.

Quais quer efeitos sobre o gráfico de Arrhenius deverão ser correlacionados com medidas independentes

É necessário que haja conhecimento *mecânico* sobre os parâmetros de Michaelis-Menten do sistema para que se possa obter informação útil das variações com a temperatura.

A maior parte das “energias de activação” para reações enzimas que se podem encontrar na literatura têm muito pouco valor.

Compensação Entalpia-Entropia

Estimativas dos parâmetros ΔH^\ddagger e ΔS^\ddagger para diferentes sistemas produzem por vezes a impressão de existência de variações compensatórias de entalpia e entropia de activação, conduzindo a uma manutenção de ΔG^\ddagger e respectivas contantes cinéticas.

