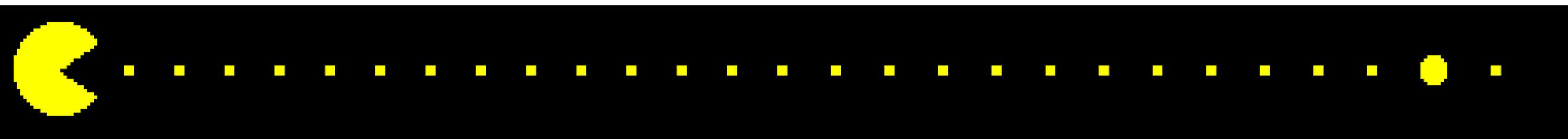
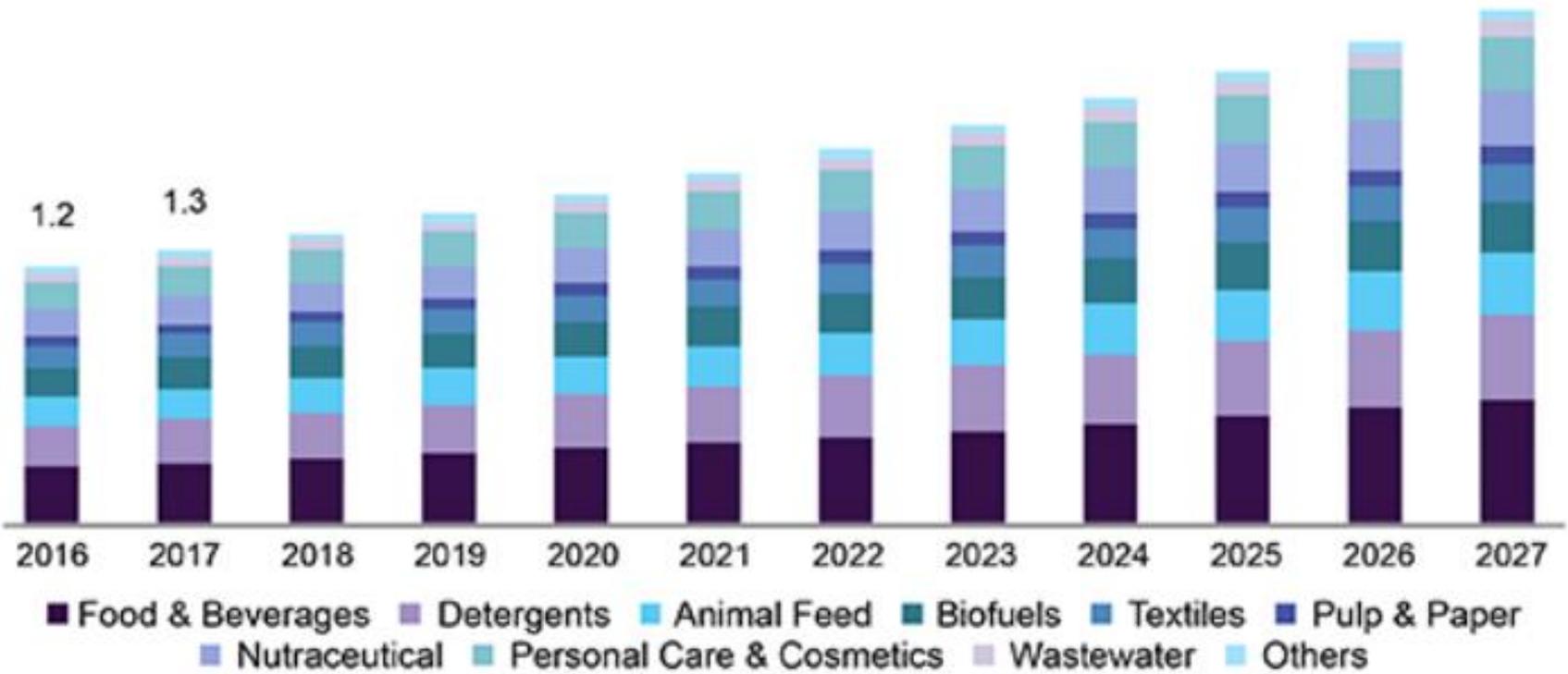


CINETICA ENZIMÁTICA

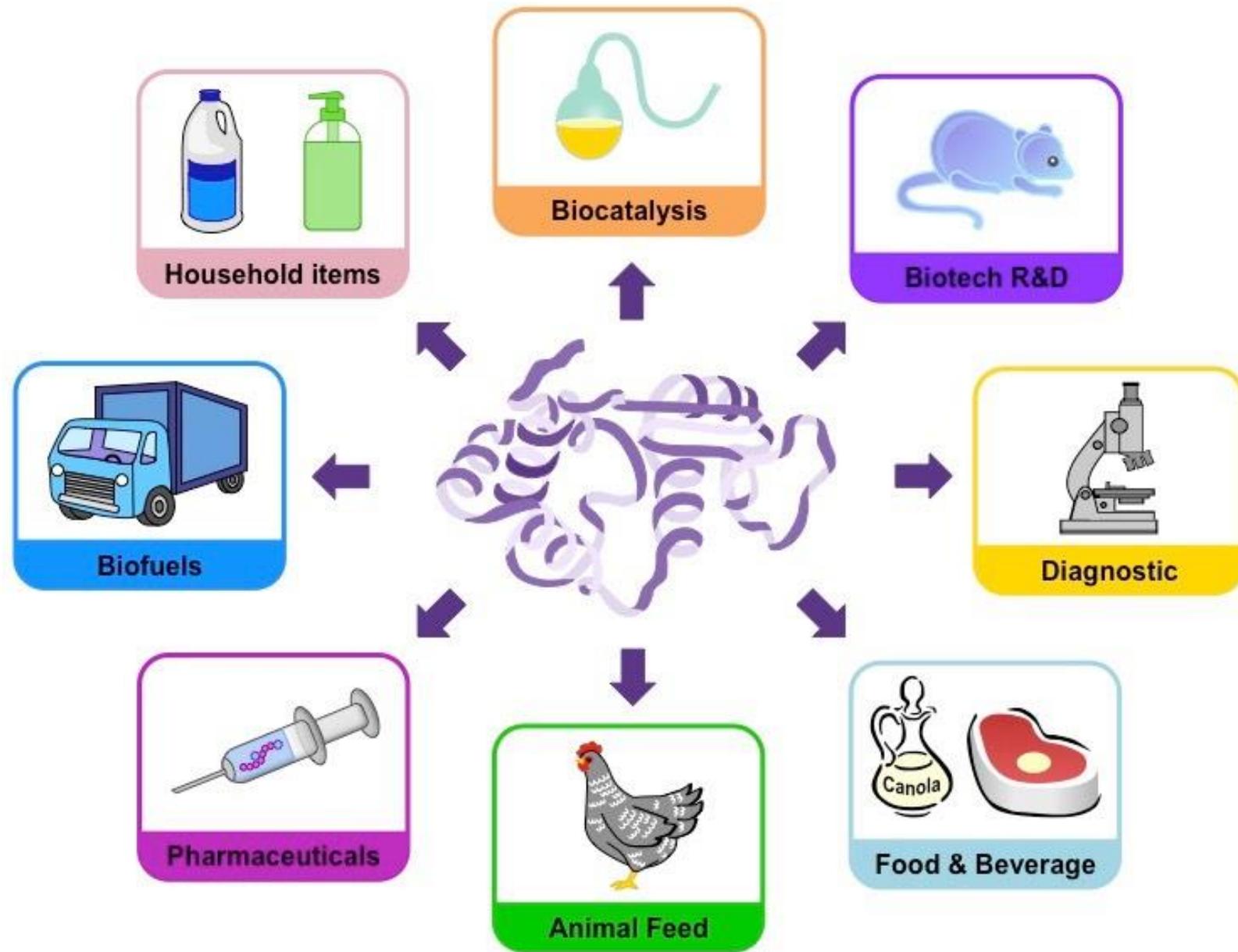
Carolina Manchola



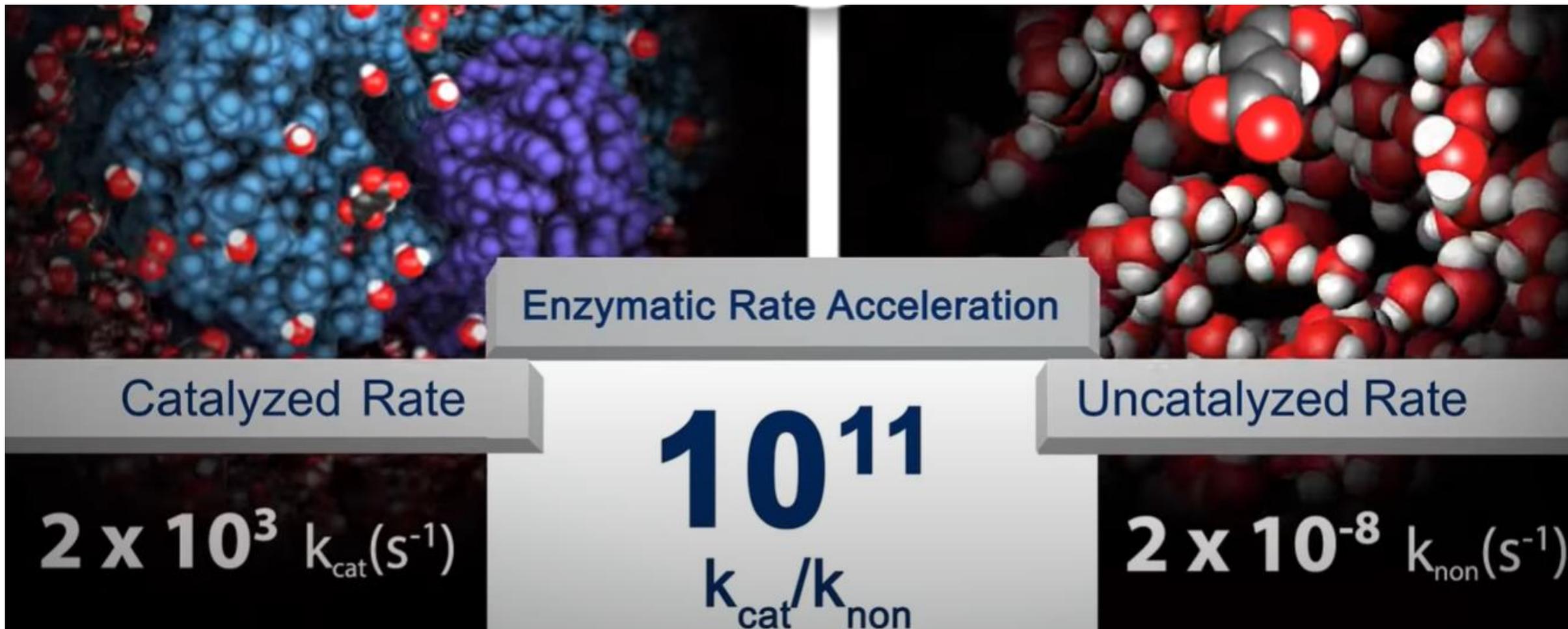
O mercado global de produção de enzimas está avaliado em **USD 9.9 billion** in 2019 e esperado que aumente em 7.1% até 2027.



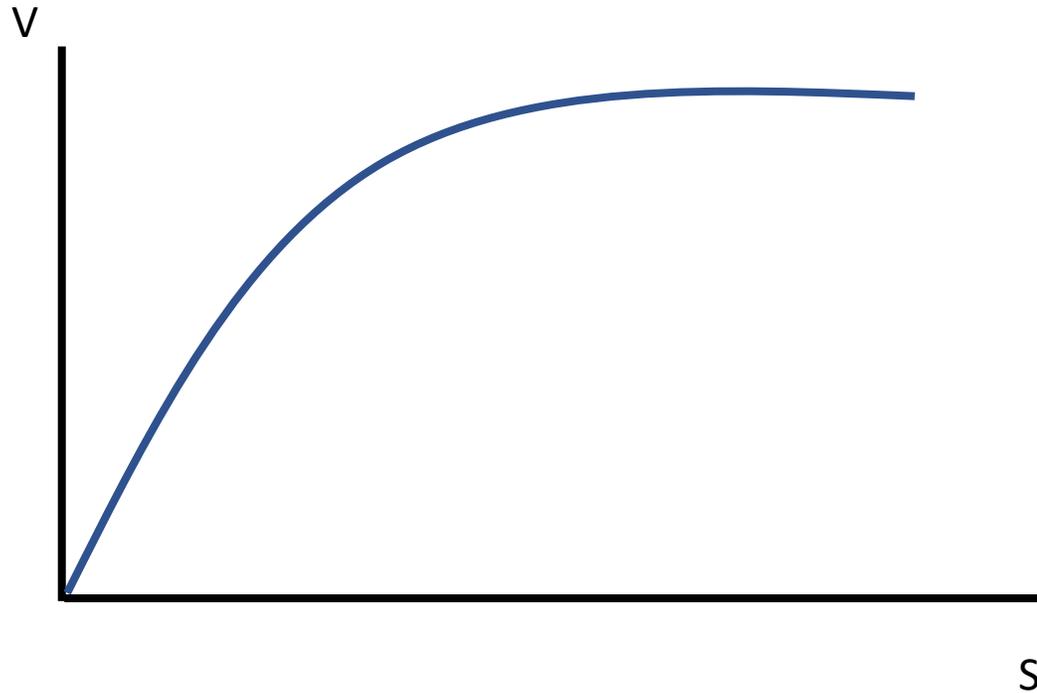
Source: www.grandviewresearch.com



O QUE FAZ DAS ENZIMAS TÃO INTERESSANTES ?

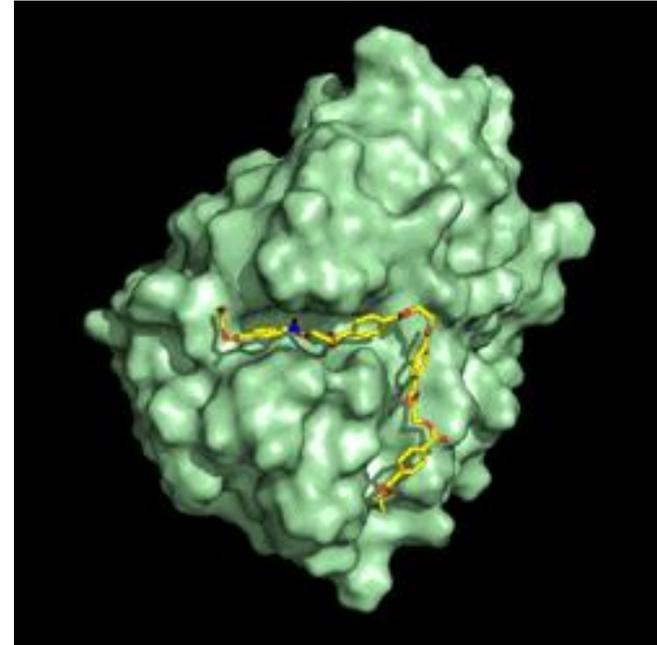


CINÉTICA



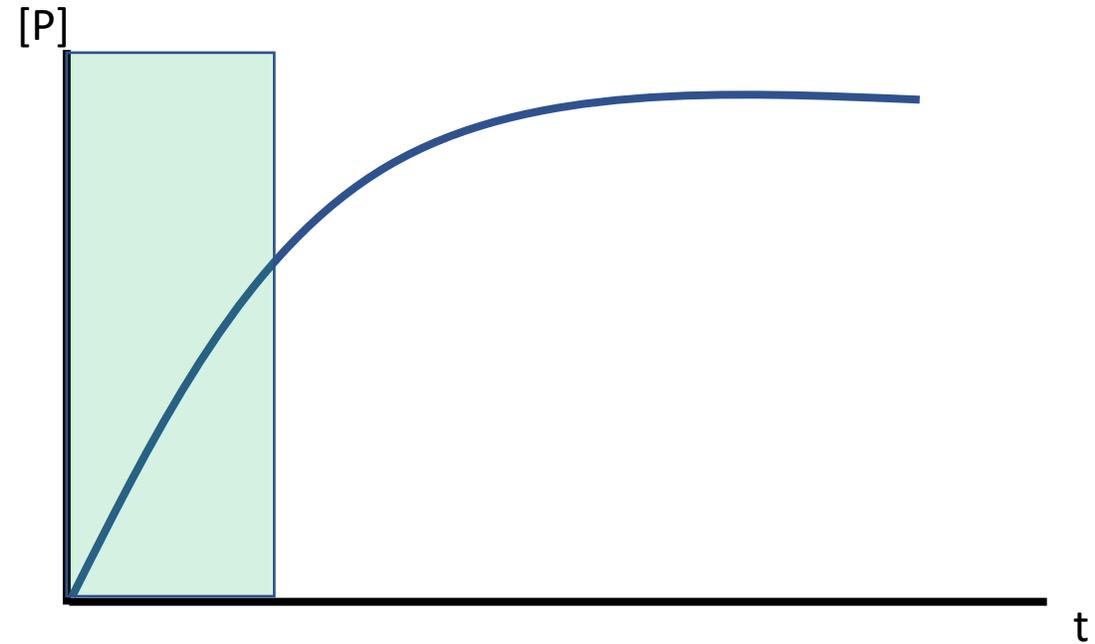
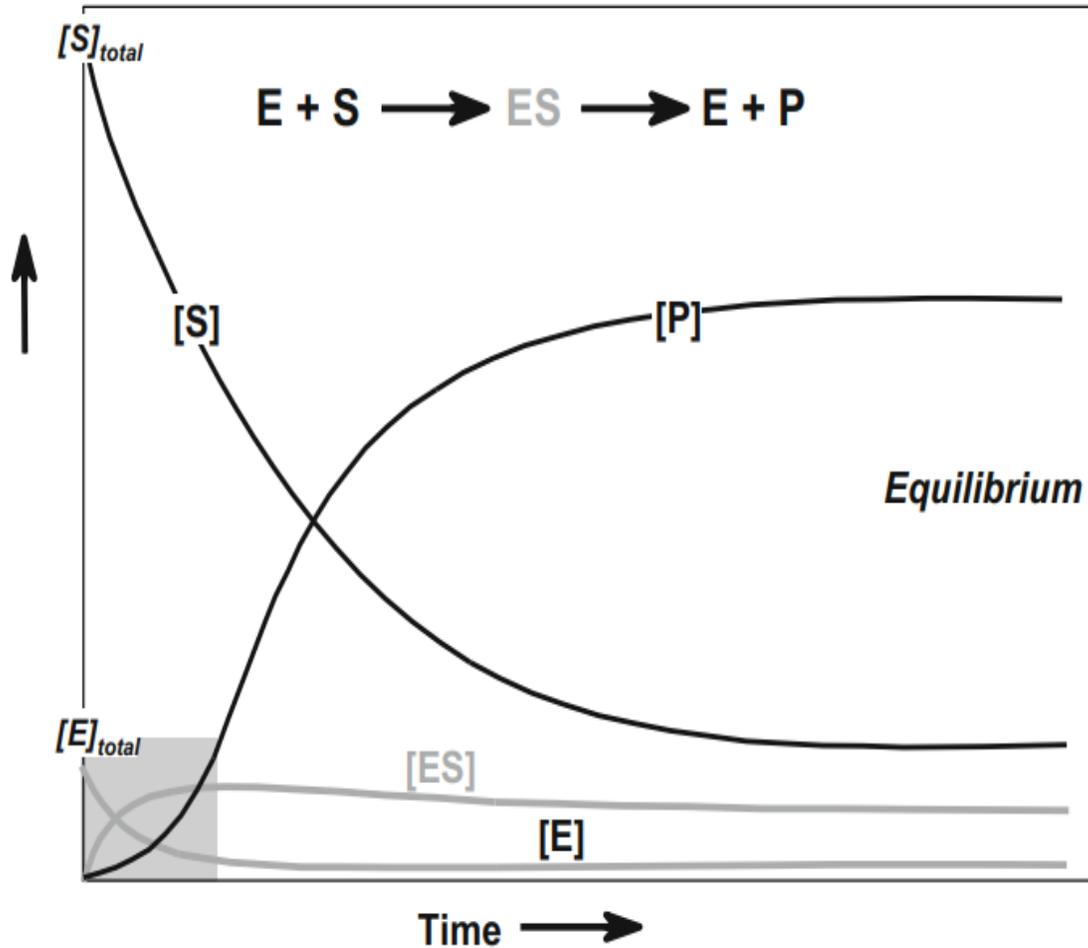
Caracterização **quantitativa** da velocidade da reação. Desde o ponto de vista da sua atividade.

ESTRUTURA



Caracterização ao nível **individual** do funcionamento desde o ponto de vista da sua estrutura.

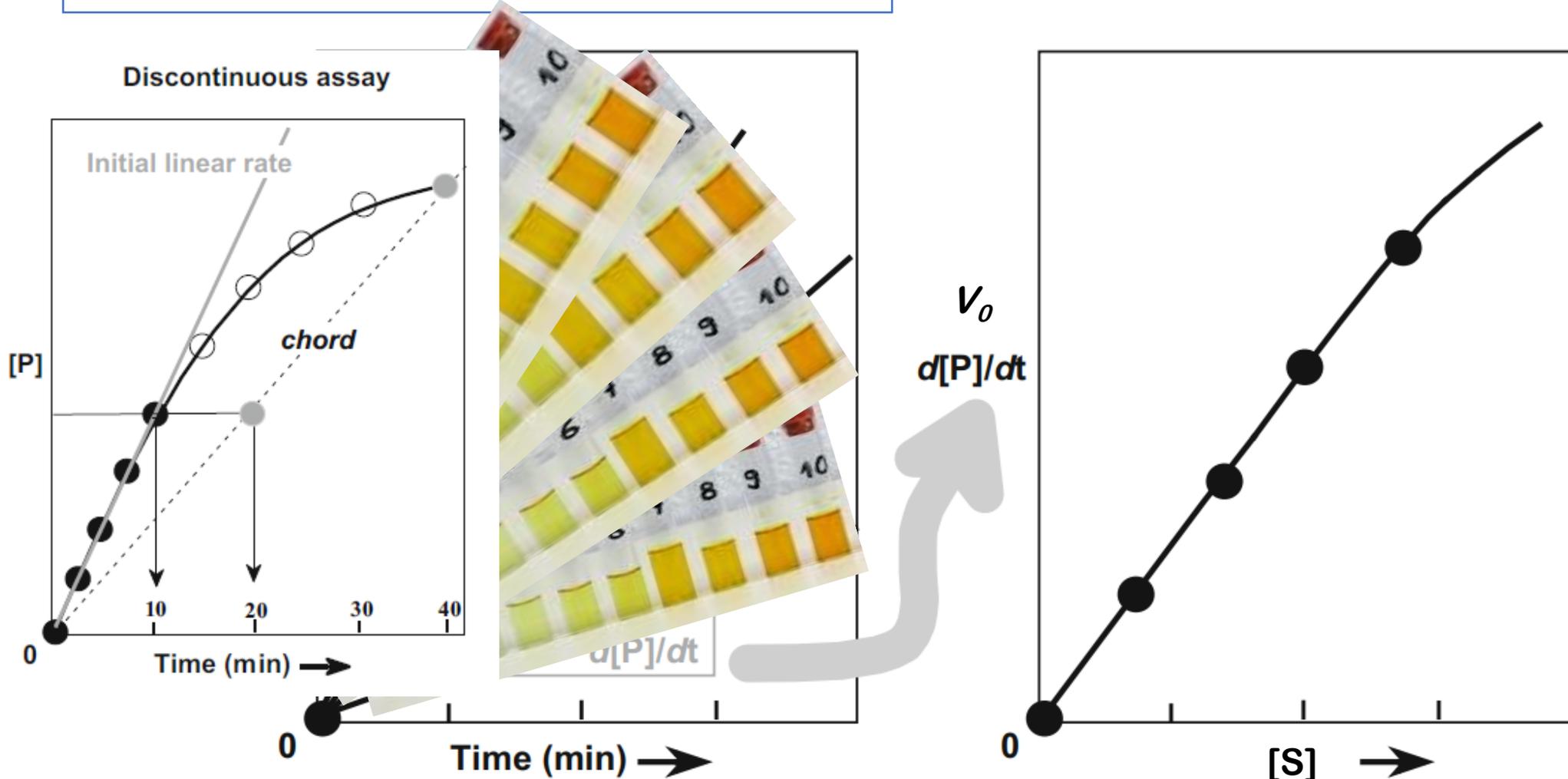
Mudanças que ocorrem ao longo da reação

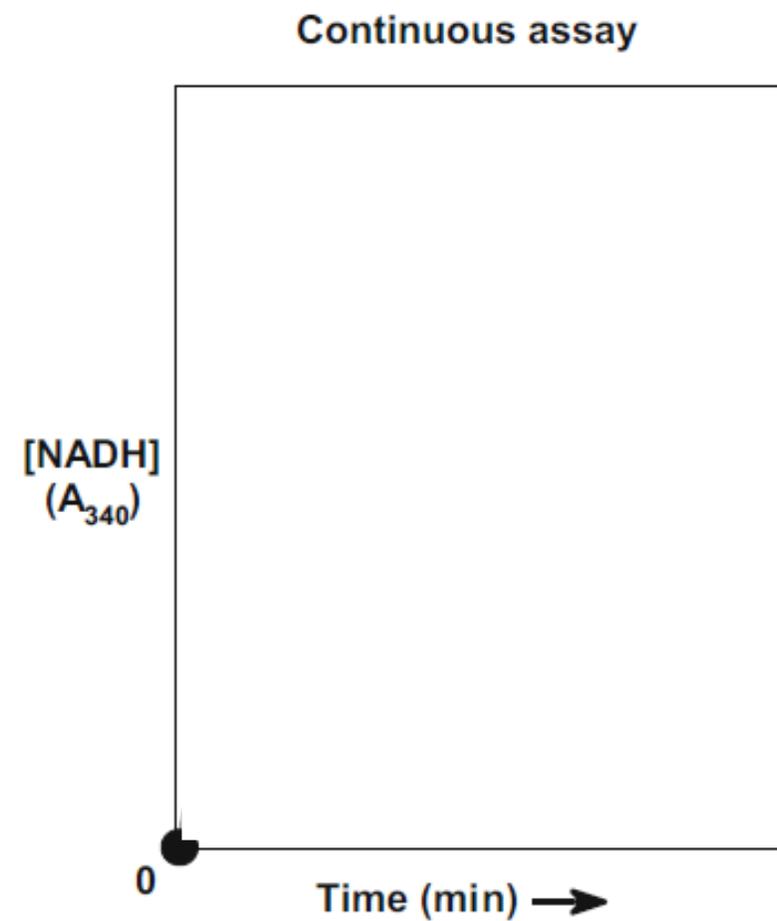
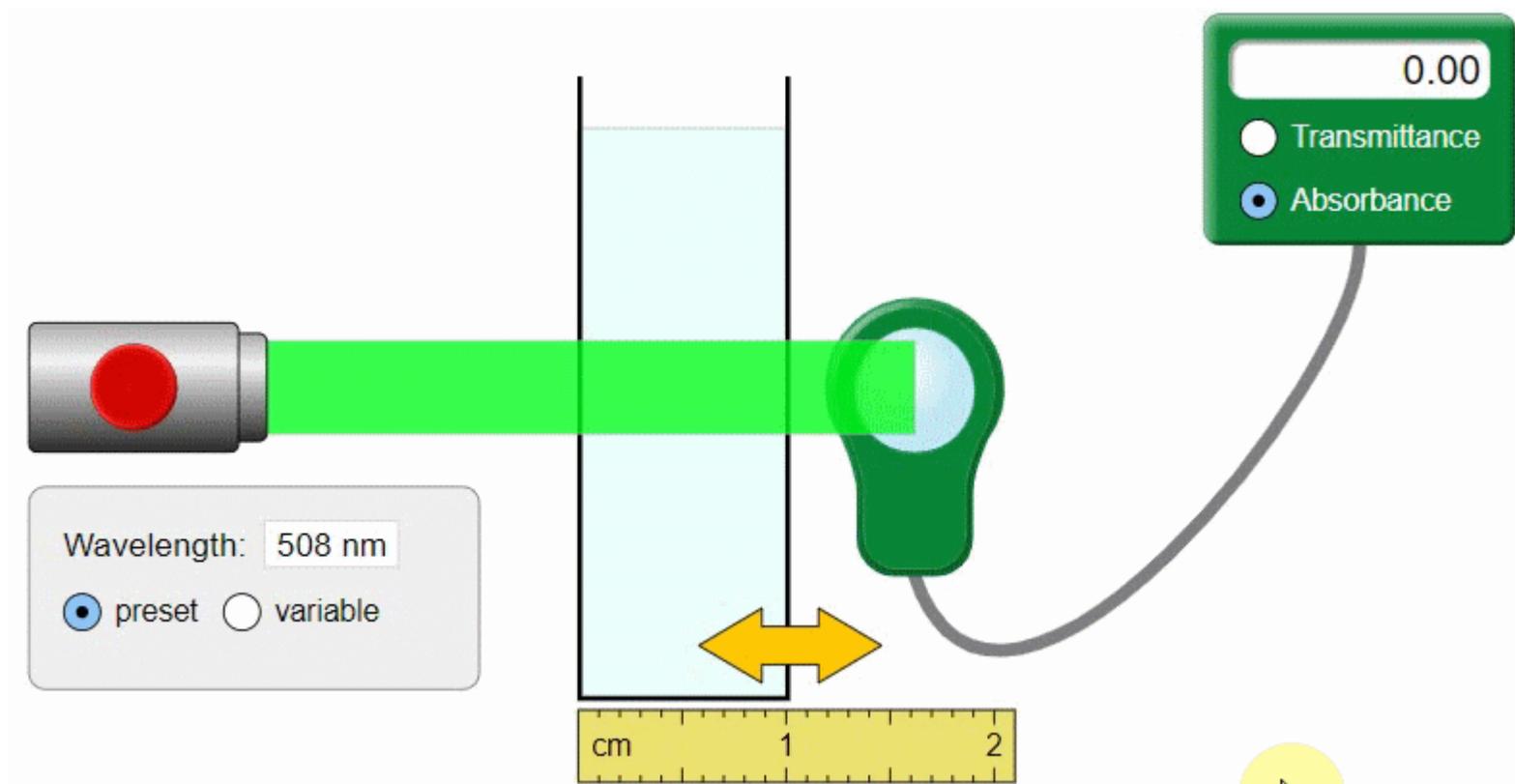


1. Sempre devemos considerar a medida no momento inicial da reação em que a formação de produto é proporcional ao tempo. Nestas condições estaremos medindo a velocidade inicial V_0 ,

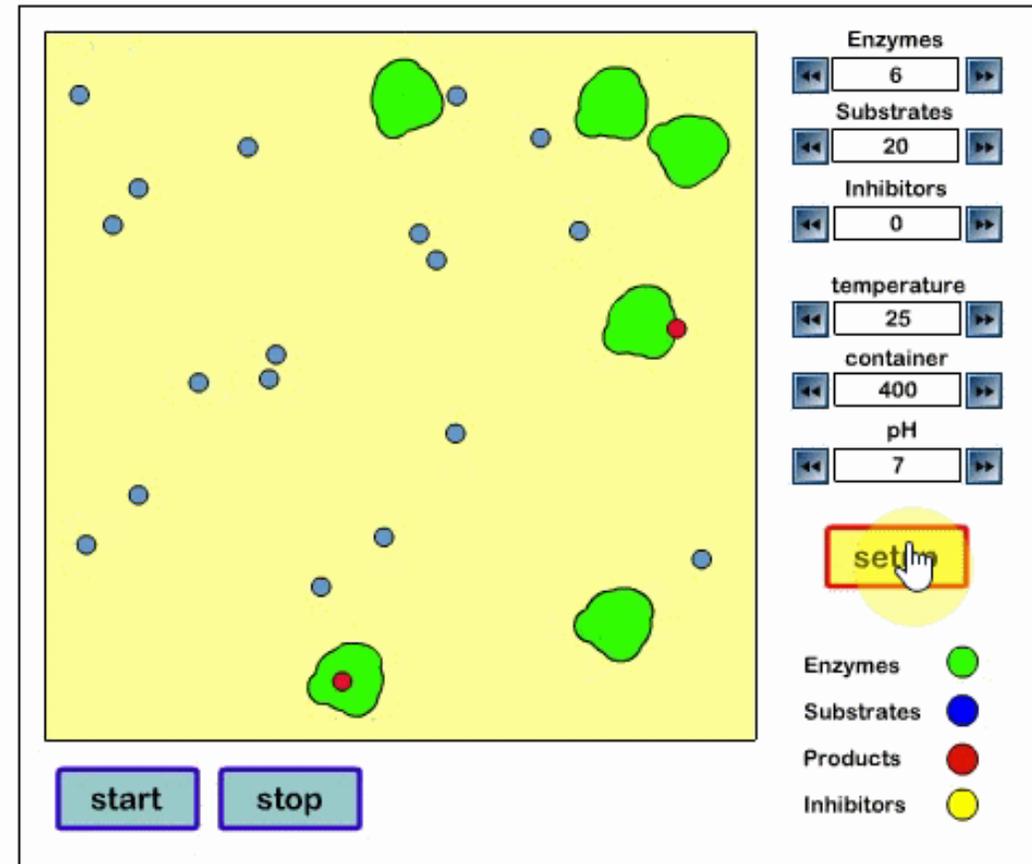
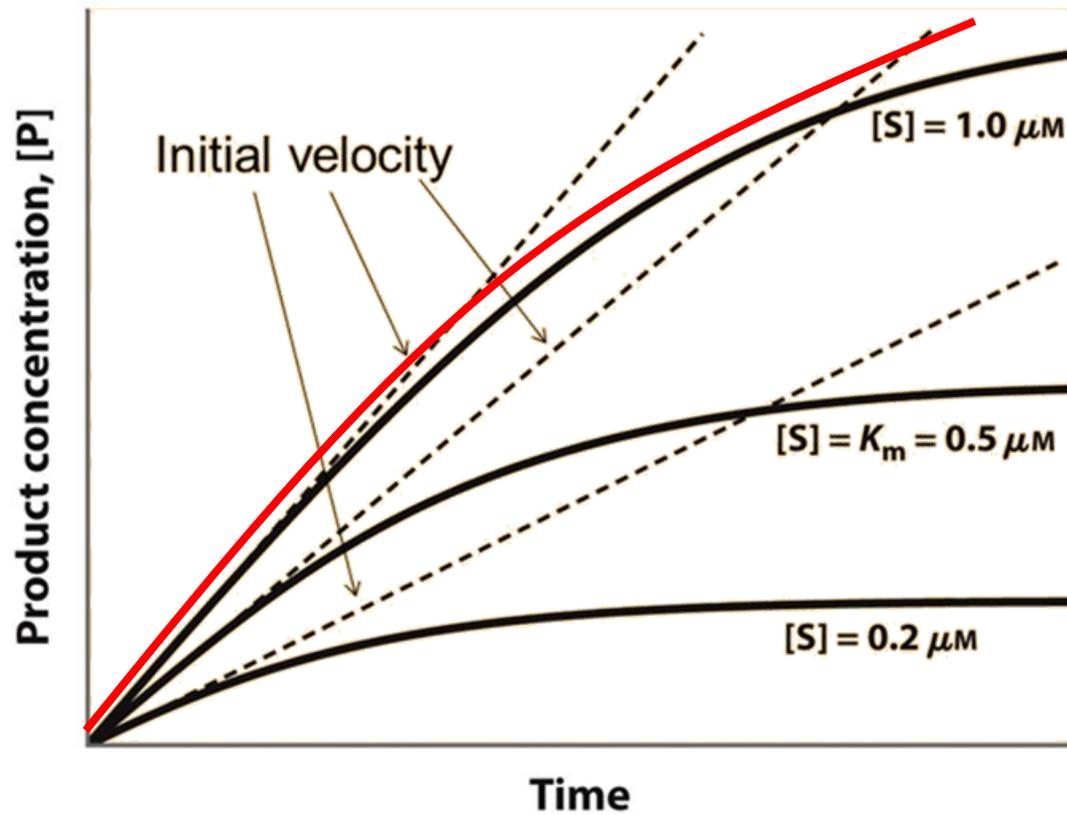
2. Verificar as condições de medida, dependência de temperatura, pH, presença de ativadores ou inativadores na amostra e ajustar as condições de concentração dos reagentes.

3. Uma vez fixos todos esses parâmetros, é possível caracterizar a mudança da velocidade inicial em relação à concentração de Substrato.





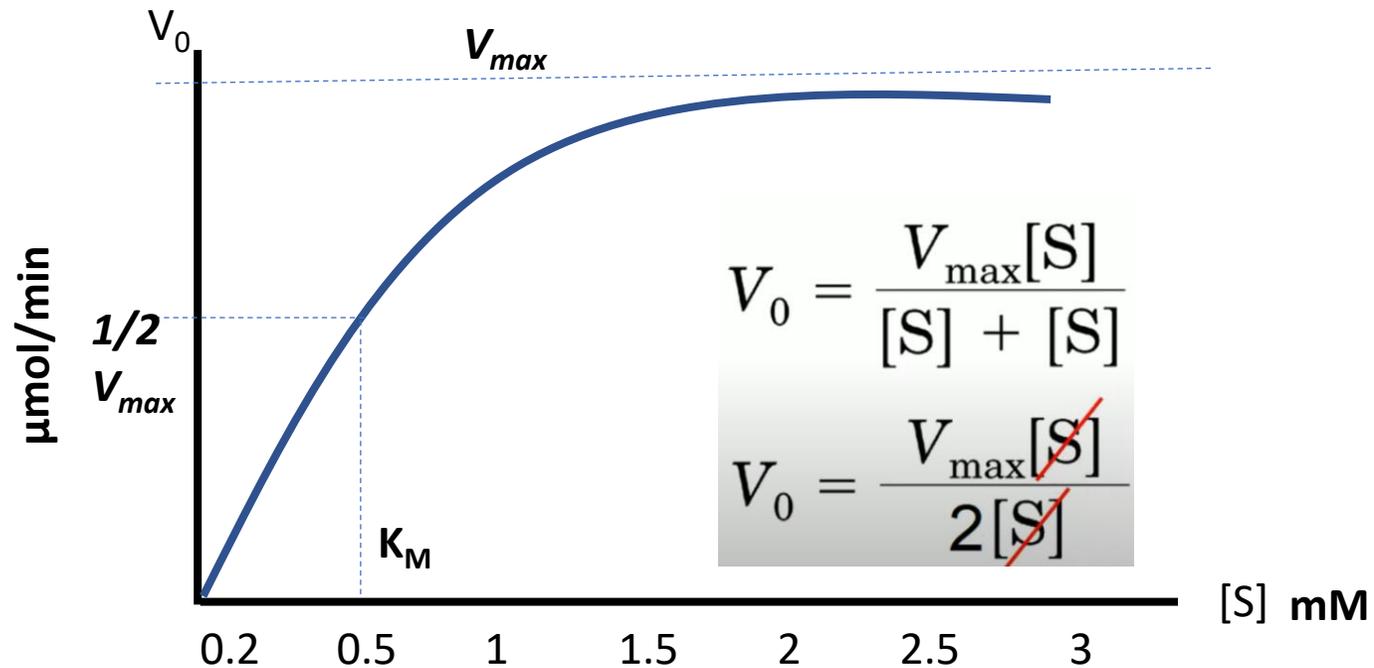
4. Existe um momento na reação em que a velocidade inicial não muda, mesmo aumentando a concentração $[S]$, este efeito é chamado de **SATURAÇÃO (V_{max})**.



5. Henri, e posteriormente Michaelis – Menten, observaram esse efeito de saturação e elucidaram uma equação que relaciona a V_0 com a V_{max} e $[S]$, obtendo uma constante conhecida como K_M .

$$v = \frac{V_{max} [S]}{K_M + [S]}$$

Michaelis – Mentenequation

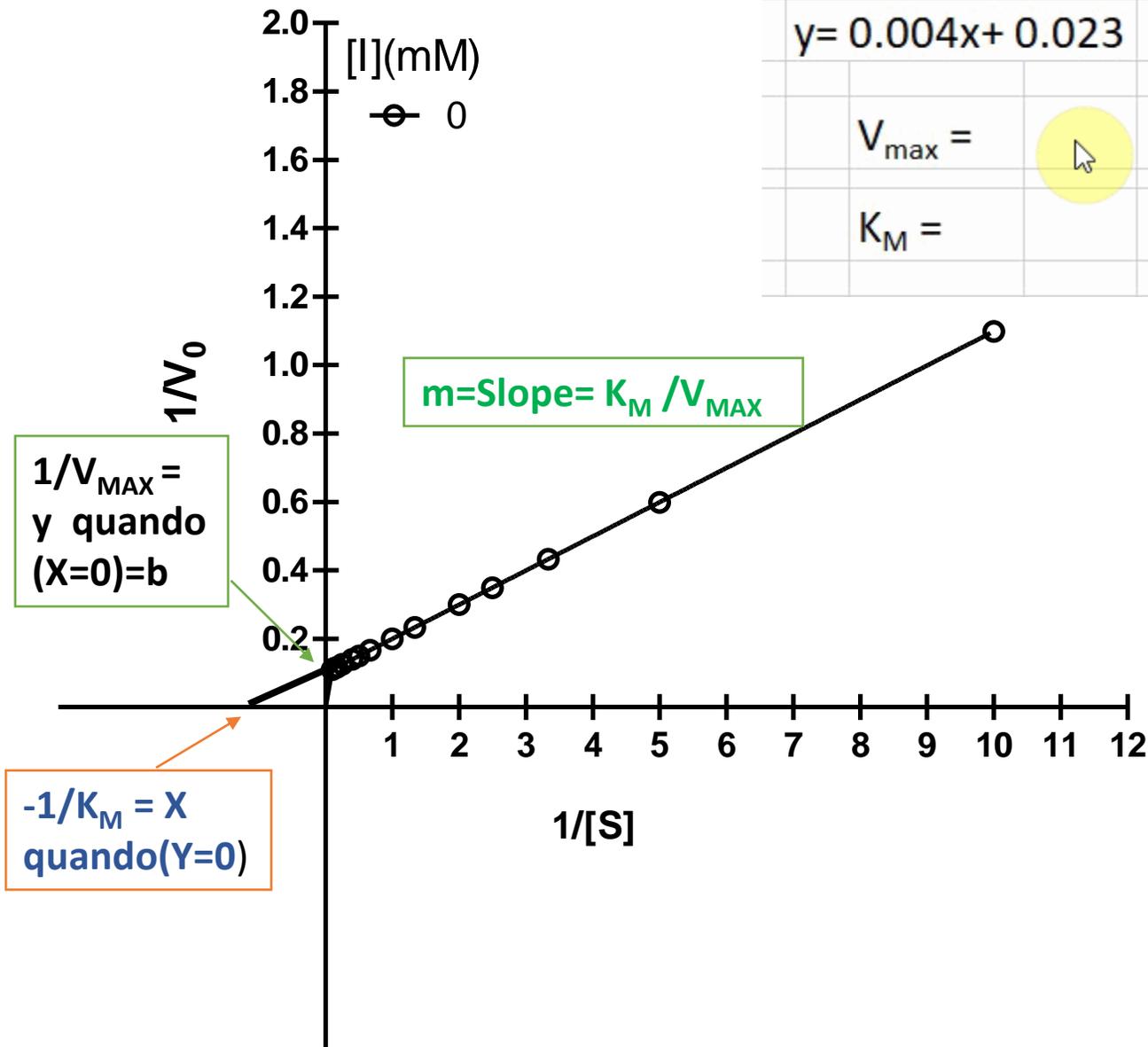


Método duplo recíproco : Lineweaver-Burk

$y = 0.004x + 0.023$	
$V_{\max} =$	
$K_M =$	

$$Y = m x + b$$

$$\frac{1}{v} = \frac{k_M}{v_{\max}} x \frac{1}{[S]} \times \frac{1}{v_{\max}}$$



Levando em conta a equação Lineweaver-Burk, após calcular $1/v_0$ e $1/[s]$, é possível ajustar os dados a uma linha reta e obter os valores para a inclinação e os interceptos nos eixos y e x

- Por que conhecer K_m ? Para comparar enzimas de fontes diferentes (tecidos, organismos, etc), comparar a afinidade da enzima a diferentes substratos
- Por que conhecer V_{max} ? Comparar a velocidade da reação (*turnover*) frente a diferentes substratos
- Por que conhecer V_{max}/K_m ? Comparar a especificidade da enzima frente a diferentes substratos

K_m (unidade: Molar, mM, μ M, etc.)

- $K_M = [S]$ quando $v_o = 1/2 V_{max}$.
- Em geral, quanto menor o K_M , mais forte é ligação do substrato pela enzima.
- K_M é usado como uma medida da **“afinidade”** da enzima pelo substrato

6. Quanto menor o K_M maior é a afinidade pelo substrato

TABLE 6-6 K_m for Some Enzymes and Substrates

<i>Enzyme</i>	<i>Substrate</i>	K_m (mM)
Hexokinase (brain)	ATP	0.4
	D-Glucose	0.05
	D-Fructose	1.5
Carbonic anhydrase	HCO_3^-	26
Chymotrypsin	Glycyltyrosinylglycine	108
	<i>N</i> -Benzoyltyrosinamide	2.5
β -Galactosidase	D-Lactose	4.0
Threonine dehydratase	L-Threonine	5.0

$$k_{cat} \quad (S^{-1})$$

Turnover Number
(número de renovação)

$$7. K_{cat} = V_{Max} / [E_{total}]$$

Moles de Substrato convertidos em produto x segundo
Moles de enzima

TABLE 6-7 Turnover Numbers, k_{cat} , of Some Enzymes

<i>Enzyme</i>	<i>Substrate</i>	k_{cat} (s^{-1})
Catalase	H_2O_2	40,000,000
Carbonic anhydrase	HCO_3^-	400,000
Acetylcholinesterase	Acetylcholine	14,000
β -Lactamase	Benzylpenicillin	2,000
Fumarase	Fumarate	800
RecA protein (an ATPase)	ATP	0.4

k_{cat} = k da etapa limitante

k_{cat} = k quando a enzima está saturada com substrato

k_{cat} = velocidade máxima de conversão de substrato

$$k_{\text{cat}}/K_m \quad (\text{M}^{-1}\text{S}^{-1})$$

(Constante de Especificidade)

Medida da Eficiência Catalítica (“Perfeição Catalítica”)

Quanto maior o valor melhor é a eficiência catalítica da enzima

TABLE 6-8 Enzymes for Which k_{cat}/K_m Is Close to the Diffusion-Controlled Limit (10^8 to $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)

Enzyme	Substrate	k_{cat} (s^{-1})	K_m (M)	k_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
Acetylcholinesterase	Acetylcholine	1.4×10^4	9×10^{-5}	1.6×10^8
Carbonic anhydrase	CO_2	1.1×10^6	1.2×10^{-2}	8.3×10^7
	HCO_3^-	1.4×10^5	2.6×10^{-2}	1.5×10^7
Catalase	H_2O_2	1.4×10^7	1.1×10^0	4×10^7
Crotonase	Crotonyl-CoA	5.7×10^3	2×10^{-5}	2.8×10^8
Fumarase	Fumarate	1.8×10^2	5×10^{-6}	1.6×10^8
	Malate	1.9×10^2	2.5×10^{-5}	3.6×10^7
β -Lactamase	Benzylpenicillin	2.0×10^3	2×10^{-5}	1×10^8

Source: Fersht, A. (1999) *Structure and Mechanism in Protein Science*, p. 166, W. H. Freeman and Company, New York.

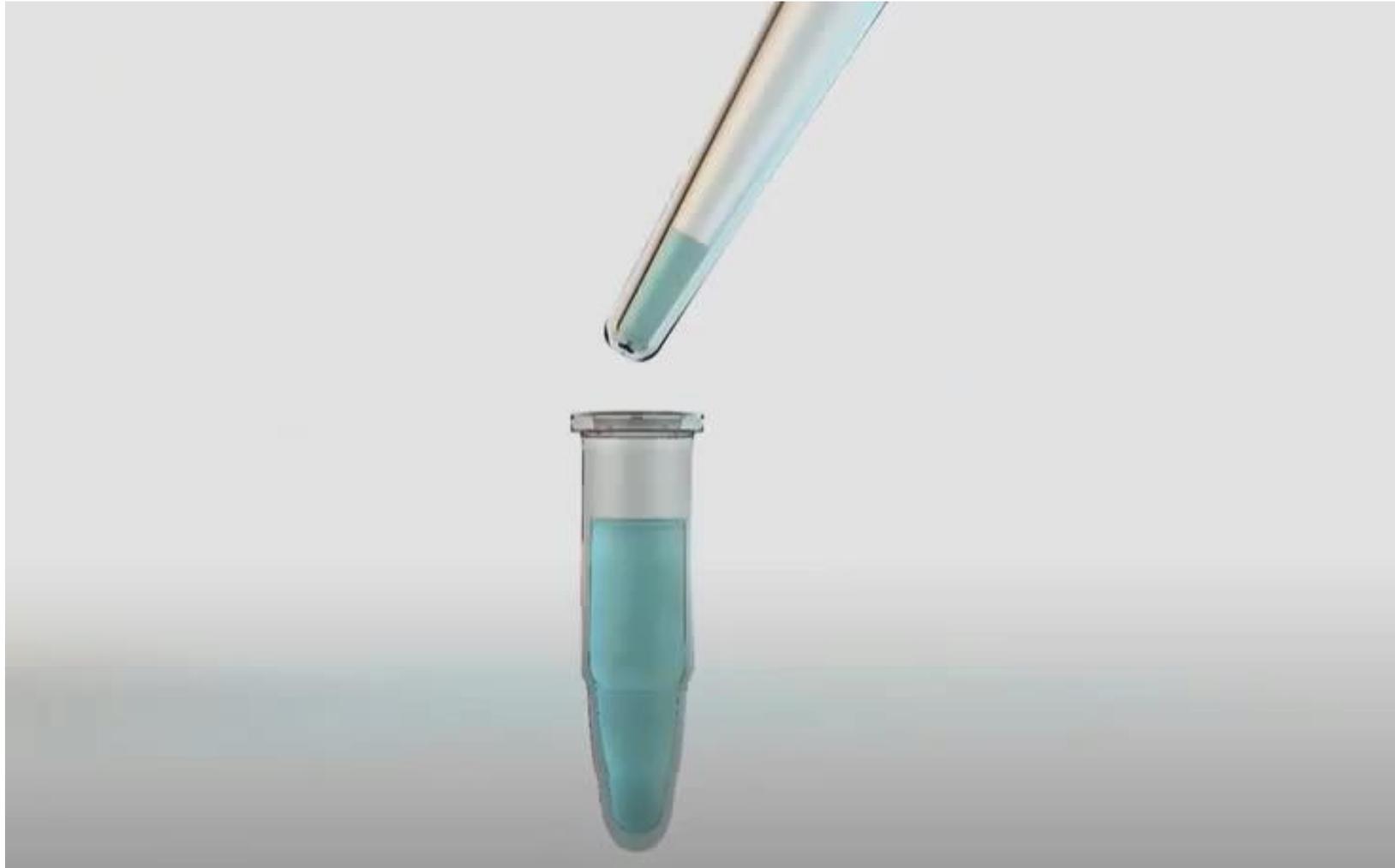
k_{cat}/K_m : É uma medida do quão rápido 2 moléculas (E + S) podem reagir.

Principais técnicas para estudar a estrutura

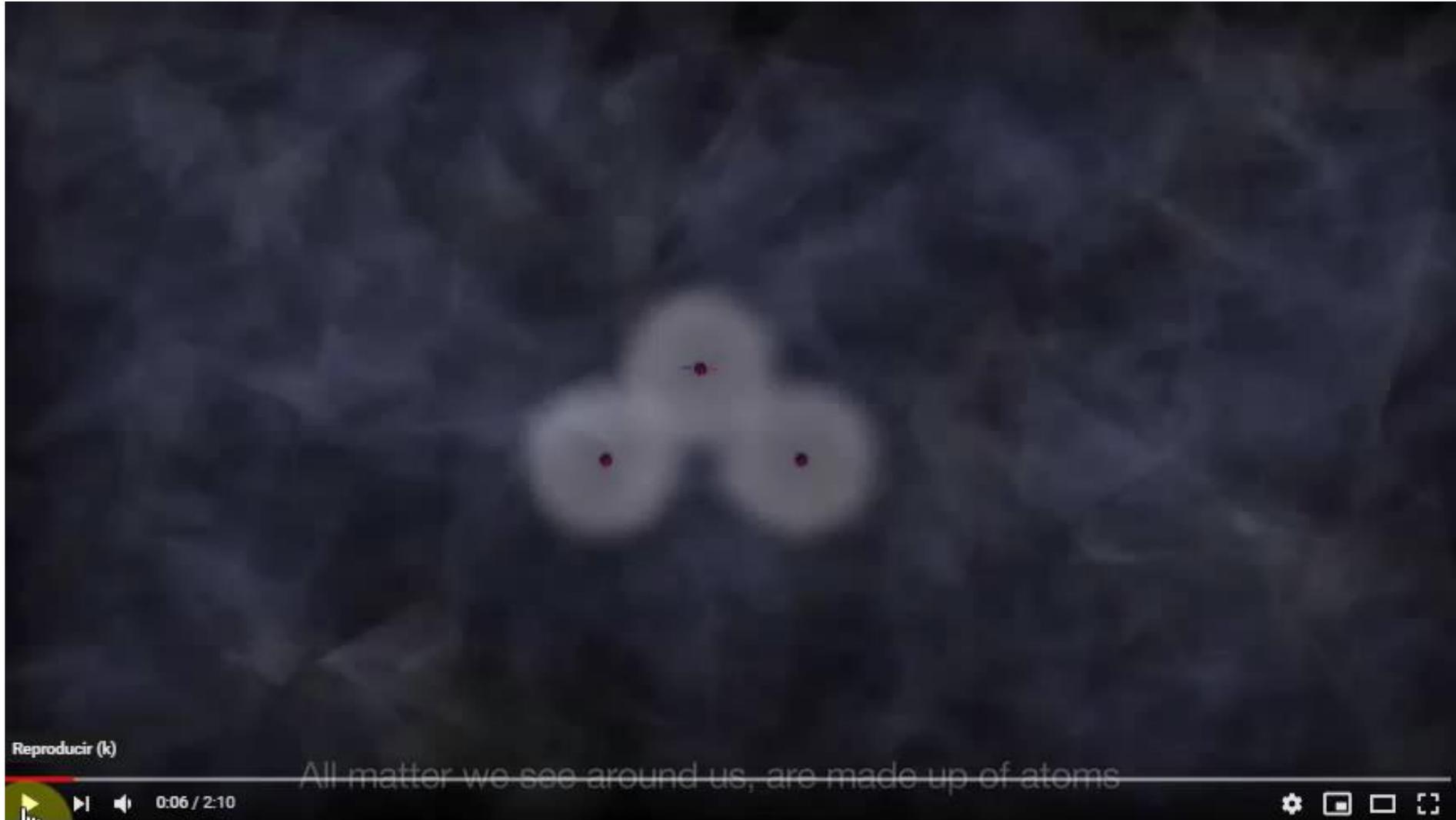
TECNICA	Vantagens	Desvantagens
Cristalografia de Raio X	Completa estrutura em 3D numa resolução atômica	A maioria das proteínas não formam cristais
Cryo EM	Completa estrutura em 3D e não precisa da formação de cristais	A resolução de estruturas muito pequenas precisa de análises posteriores
RMN	Completa estrutura em 3D e noção da dinâmica com ligantes	Precisa de muita amostra e é limitado para proteínas pequenas
Predição computacional	É rápido	Precisa de muita base previa feita com uma das técnicas anteriores
Dinâmica molecular	Simulação de interações	Idem anterior e computadores potentes
Mutação sitio dirigida	Pode melhorar/piorar a atividade da proteína	Necessário ter evidências da localização dos sítios proteicos a serem mutados com uma das técnicas anteriores

X-RAY CRYSTALLOGRAPHY

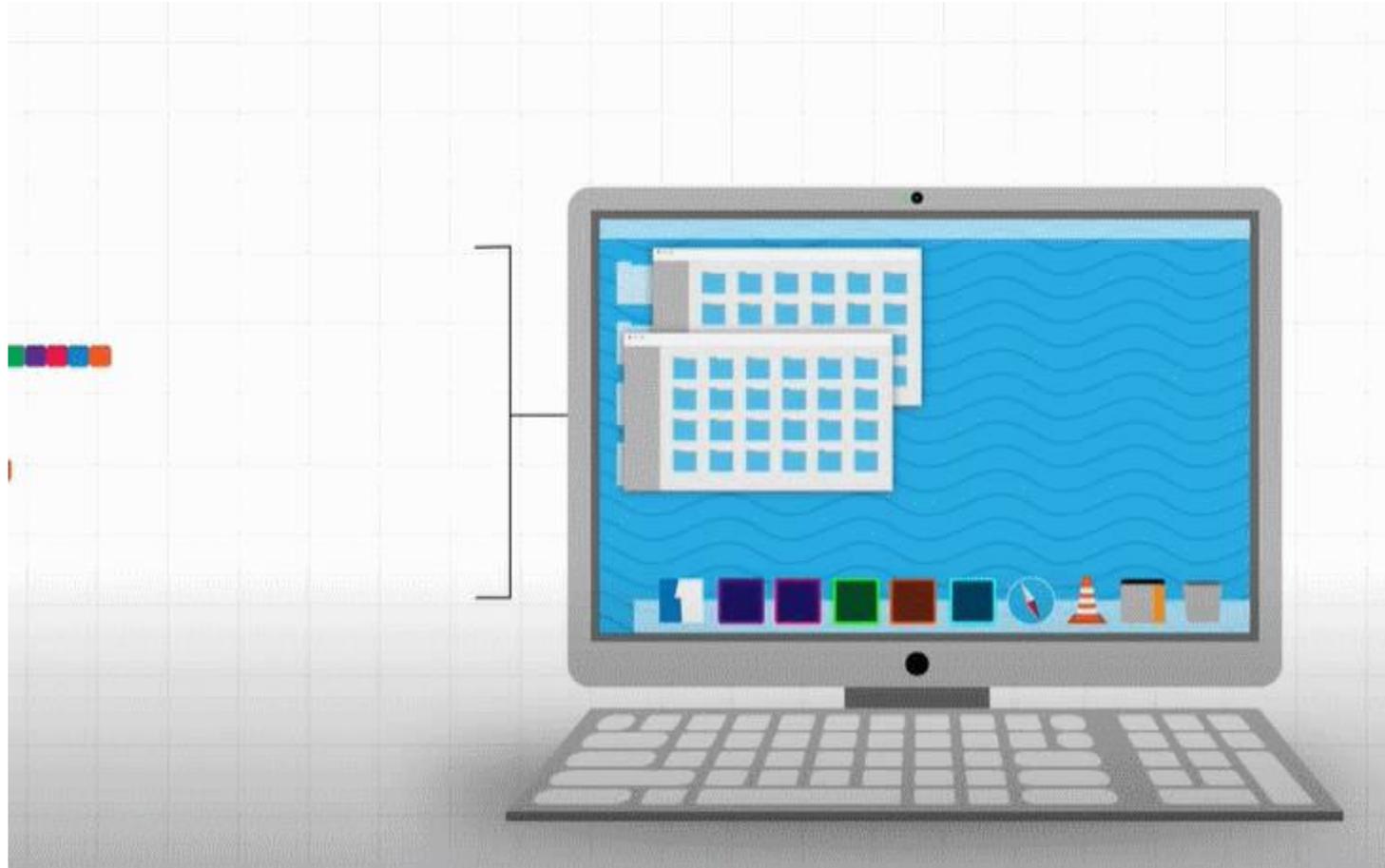
Cryo EM : Cryogenic Electro Microscopy



Ressonância magnética nuclear



Predição computacional da estrutura



Dinâmica Molecular



Mutação sitio-dirigida

