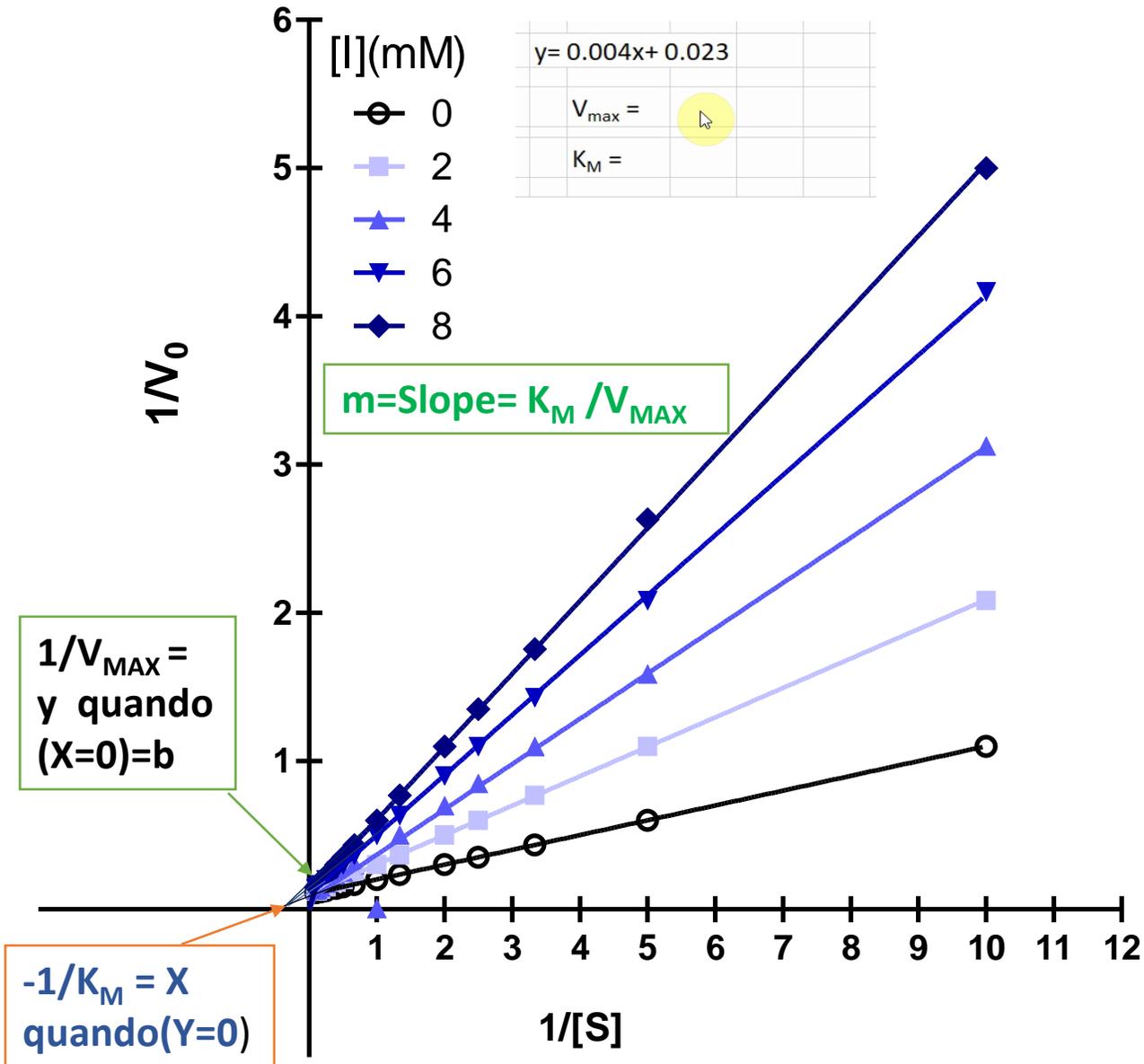


9. Para uma alfa-glicosidase foram determinadas as velocidades de hidrólise de diferentes concentrações de substrato (NpaGlc) na presença de diferentes concentrações de um inibidor. Estes dados estão apresentados na tabela abaixo. Baseando-se nesta tabela determine o V_{max} e o K_m para a hidrólise do substrato e o K_i para este inibidor.

[S] (mM)	V (nmol/min)				
[I] (mM)	0	2	4	6	8
0.1	0.91	0.48	0.32	0.24	0.20
0.2	1.67	0.91	0.63	0.48	0.38
0.3	2.31	1.30	0.91	0.70	0.57
0.4	2.86	1.67	1.18	0.91	0.74
0.5	3.33	2.00	1.43	1.11	0.91
0.75	4.29	2.73	2.00	1.58	1.30
1	5.00	3.33	2.50	2.00	1.67
1.5	6.00	4.29	3.33	2.73	2.31
2	6.67	5.00	4.00	3.33	2.86
2.5	7.14	5.56	4.55	3.85	3.33
4	8.00	6.67	5.71	5.00	4.44
6	8.57	7.50	6.67	6.00	5.45
8	8.89	8.00	7.27	6.67	6.15
10	9.09	8.33	7.69	7.14	6.67

Método ajuste a uma linha reta : Lineweaver-Burk



Levando em conta a equação Lineweaver-Burk, após calcular $1/V$ 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...

$$y = mx + b$$

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

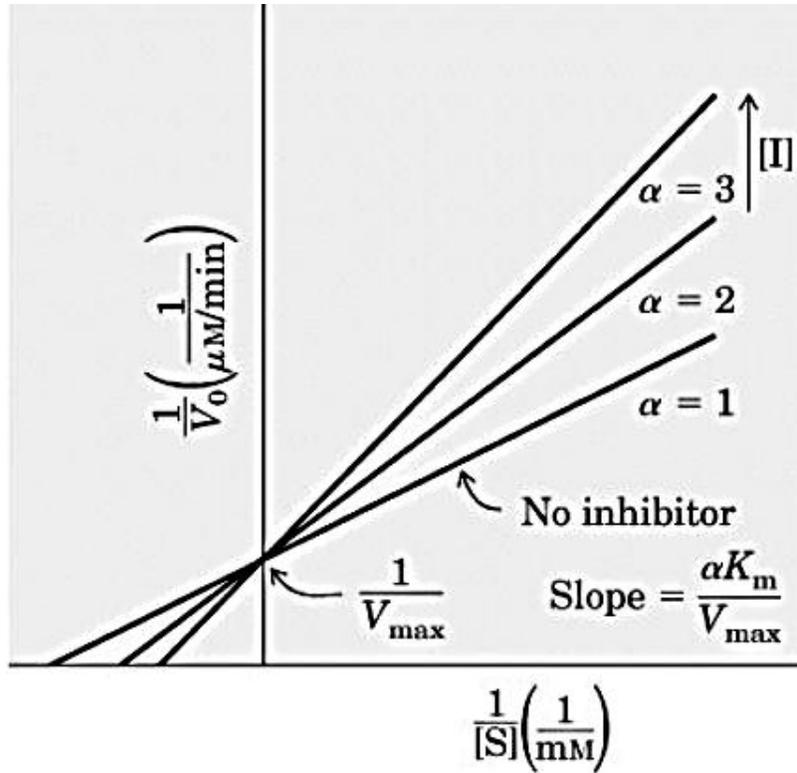
Inibidor (mM)	0	2	4	6	8
m=Slope Inclinação	0.09986	0.1986	0.3056	0.4050	0.4925
Y-intercept quando X=0.0 $1/V_{max} = b$	0.1001	0.1015	0.09736	0.09346	0.1090
X-intercept quando Y=0.0 $-1/K_M$	-1.002	-0.5111	-0.3228	-0.2308	-0.2214

Inibidores competitivos



+
|
↑
↓
EI

K_i



$$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_i}$$

$$K_M' = \alpha * K_M$$

$$K_M' = 1 + \frac{[I]}{K_i} \cdot K_M$$

$$1.956564 \text{ mM} = \left(1 + \frac{2 \text{ mM}}{k_i} \right) * 0.99 \text{ mM}$$

$$K_i = 2.048$$

Alternativamente podemos obter o K_i a partir da seguinte equação:

$$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_i}$$

$$\frac{1}{V_0} = \left(\frac{\alpha K_m}{V_{max}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

$$m = \text{Slope} = \alpha K_m / V_{MAX}$$

$$\frac{1}{V_0} = \left(\left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) * K_M \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

$$\frac{1}{0.48} = \left(\left(1 + \frac{[2 \text{ mM}]}{K_i} \right) * 1 \text{ mM} \right) \frac{1}{[0.1]} + \frac{1}{10}$$

$$K_i = 2$$

$$\text{Slope quando } [I] = 2 \text{ mM} = \frac{\left(1 + \frac{[2]}{K_i} \right) \cdot K_M}{V_{max}}$$

$$0.1986 = \frac{\left(1 + \frac{[2 \text{ mM}]}{K_i} \right) \cdot 0.99}{10}$$

$$K_i = 2$$

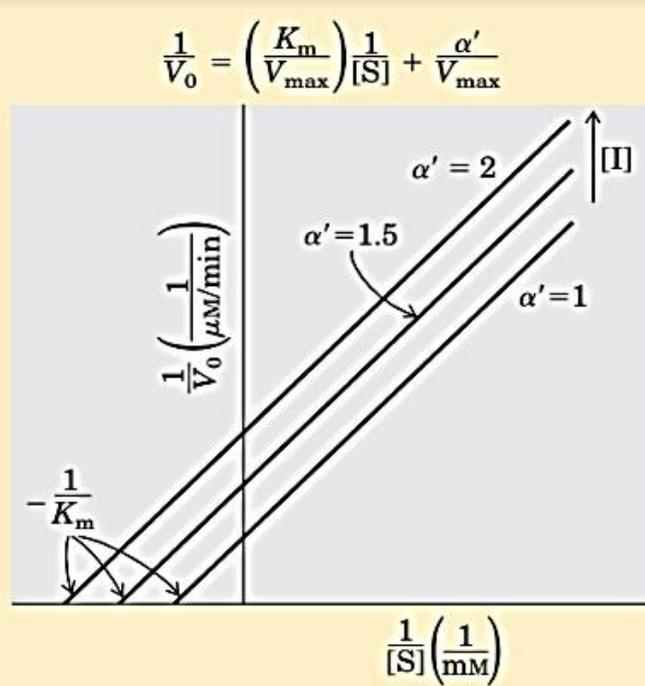


FIGURE 2 Uncompetitive inhibition.

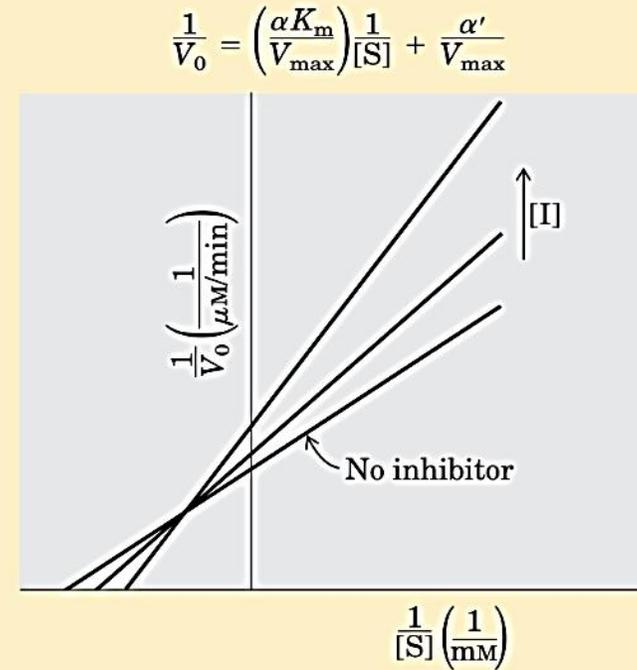
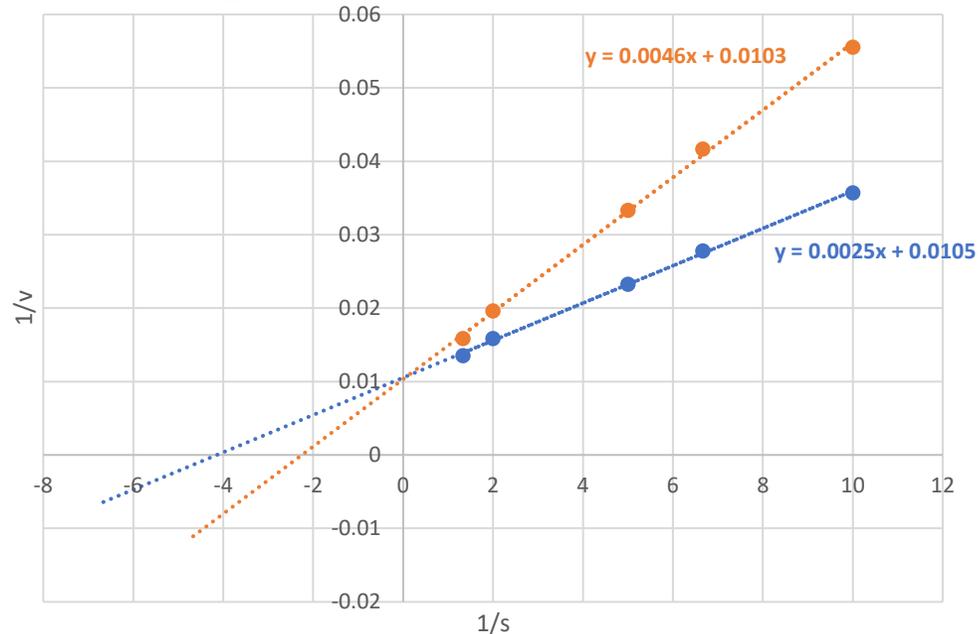


FIGURE 3 Mixed inhibition.

TABLE 6-9 Effects of Reversible Inhibitors on Apparent V_{\max} and Apparent K_m

<i>Inhibitor type</i>	<i>Apparent V_{\max}</i>	<i>Apparent K_m</i>
None	V_{\max}	K_m
Competitive	V_{\max}	αK_m
Uncompetitive	V_{\max}/α'	K_m/α'
Mixed	V_{\max}/α'	$\alpha K_m/\alpha'$

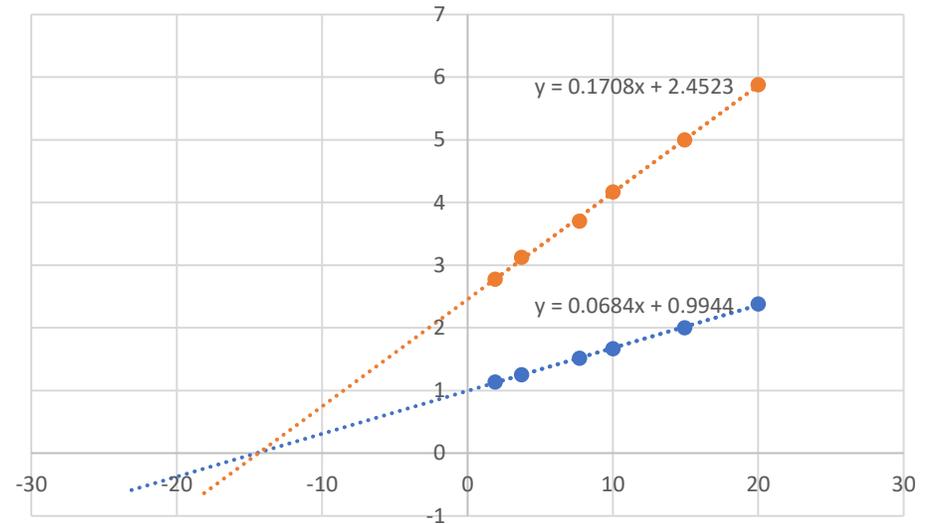
Levando em conta os dados presentes na tabela, determine os parâmetros Cinéticos de K_M e V_{Max} para a sua atividade na presença e na ausência do inibidor (Concentração do $[I] = 2.2 \times 10^{-4} \text{ M}$. Que tipo de inibição está sendo produzida (Justifique)? Determine a K_i .



$V_{Max} = 100 \text{ } \mu\text{moles/min}$ e $K_M = 0.25 \text{ mM}$
 $V_{max}' = 100 \text{ } \mu\text{moles/min}$ e $K_M' = 0.46 \text{ mM}$

$K_i = 0.26 \text{ mM}$ Competitivo

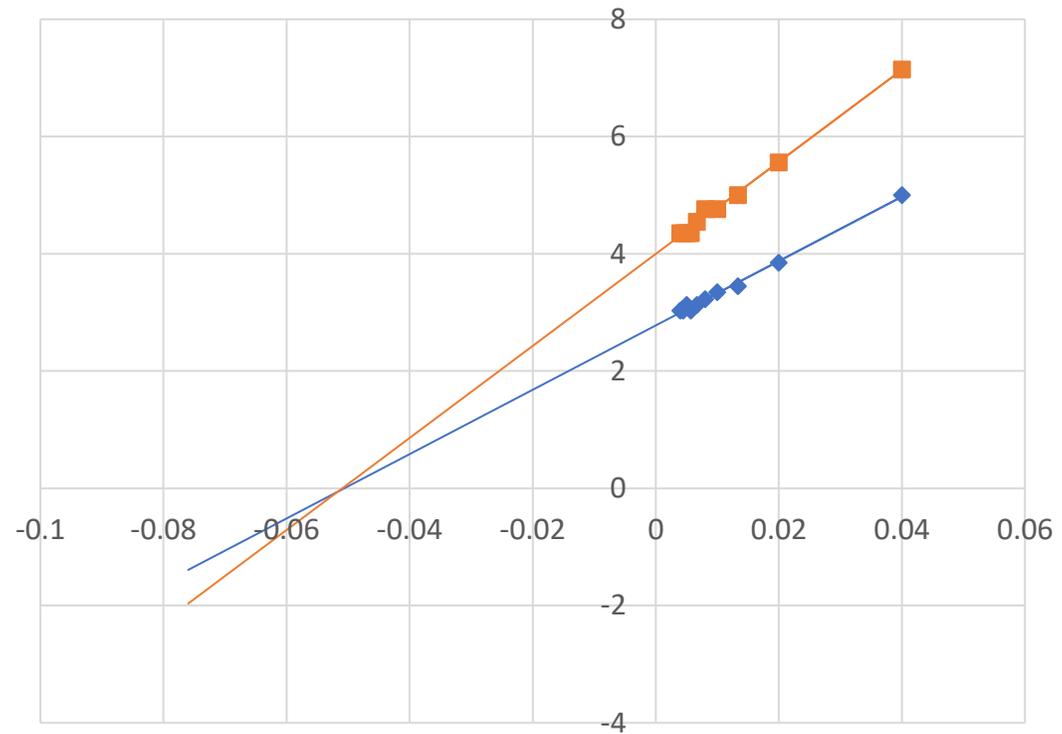
Levando em conta os dados presentes na tabela, determine parâmetros Cinéticos de K_M e V_{Max} para a sua atividade na presença e na ausência do inibidor. Que tipo de inibição está sendo produzida (Justifique)?, Qual informação adicional seria necessária para a determinação do K_i ?



$V_{Max} = 1 \text{ } \mu\text{moles/min}$ e $K_M = 0.068 \text{ mM}$
 $V_{max}' = 0.41 \text{ } \mu\text{moles/min}$ e $K_M' = 0.068 \text{ mM}$

$K_i = \text{ falta a concentração do inibidor}$

Não-Competitivo (Puro)



$$\text{Slope} = \frac{K_M}{V_{\max}} \left[1 + \frac{[I]}{K_I} \right]$$

(noncompetitive inhibitor)

não competitiva pura	V _{max} app > V _{max}
	K _m = K _m app