

# **Dosagem da atividade enzimática**

**Concentração de Atividade Enzimática (U/mL)**

**Atividade específica (U/mg)**

# Teoria geral das reações enzimáticas - 1913

Die Kinetik der Invertinwirkung.

Von

L. Michaelis und Miß Maud L. Menten.

*(Eingegangen am 4. Februar 1913.)*



**Leonor Michaelis**  
1875–1949



**Maud Menten**  
1879–1960

Unnumbered 6 p203  
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition  
© 2008 W.H. Freeman and Company

$$V_0 = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]}$$

$V_0$ : velocidade no tempo inicial quando a  $[S] \gg [E]$

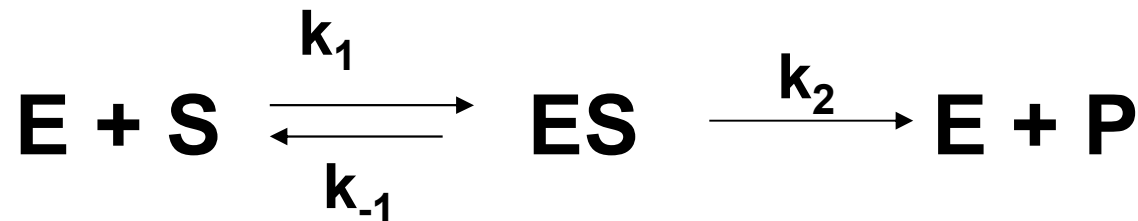
$V_{\max}$ : V máximo

$[S]$ : concentração do substrato

$K_m$ : constante de Michaelis

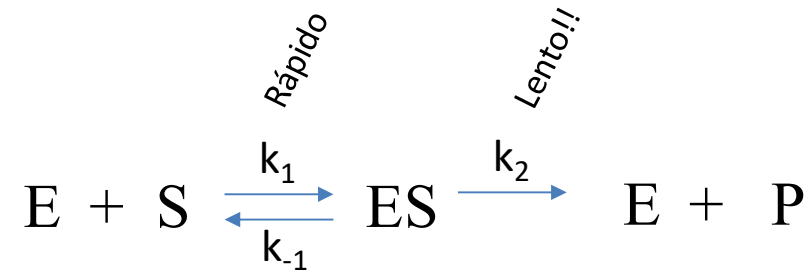
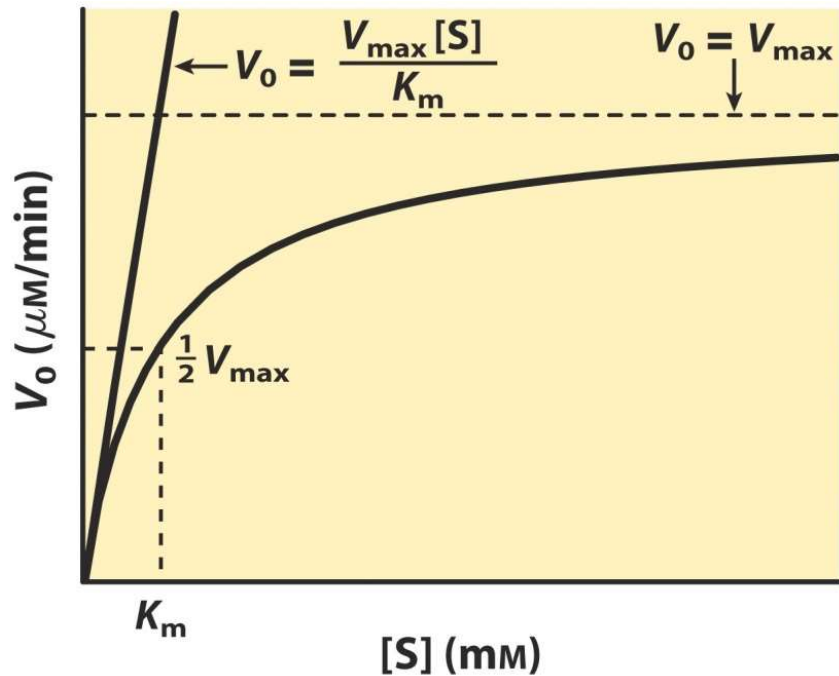
# Equação de Michaelis-Menten

- Relaciona velocidade ( $V_0$ ) com a concentração de substrato  $[S]$
- Parte do pressuposto que o passo de conversão do complexo ES para P é o passo limitante
- $[ES]$  constante – estado estacionário
- No início da reação,  $[P]$  é desprezível e a conversão  $P \rightarrow S$  (descrita por  $K_{-2}$ ) pode ser ignorada



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

## Constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ )



Graficamente, é a concentração de  $S$  onde  $V_0$  é metade de  $V_{\text{max}}$

$$V_0 = \frac{V_{\text{max}}}{2} \Rightarrow \boxed{K_m = [S]}$$

Por definição :

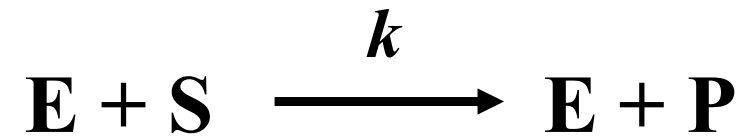
$$\boxed{K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}}$$

Enzimas são catalisadores biológicos.

Apresentam especificidade em relação aos produtos e reagentes

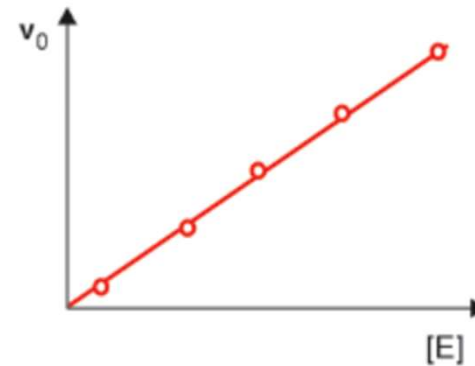


**A presença de uma enzima específica pode ser detectada através da ocorrência da reação**  
*(formação do produto a partir de substrato específico)*



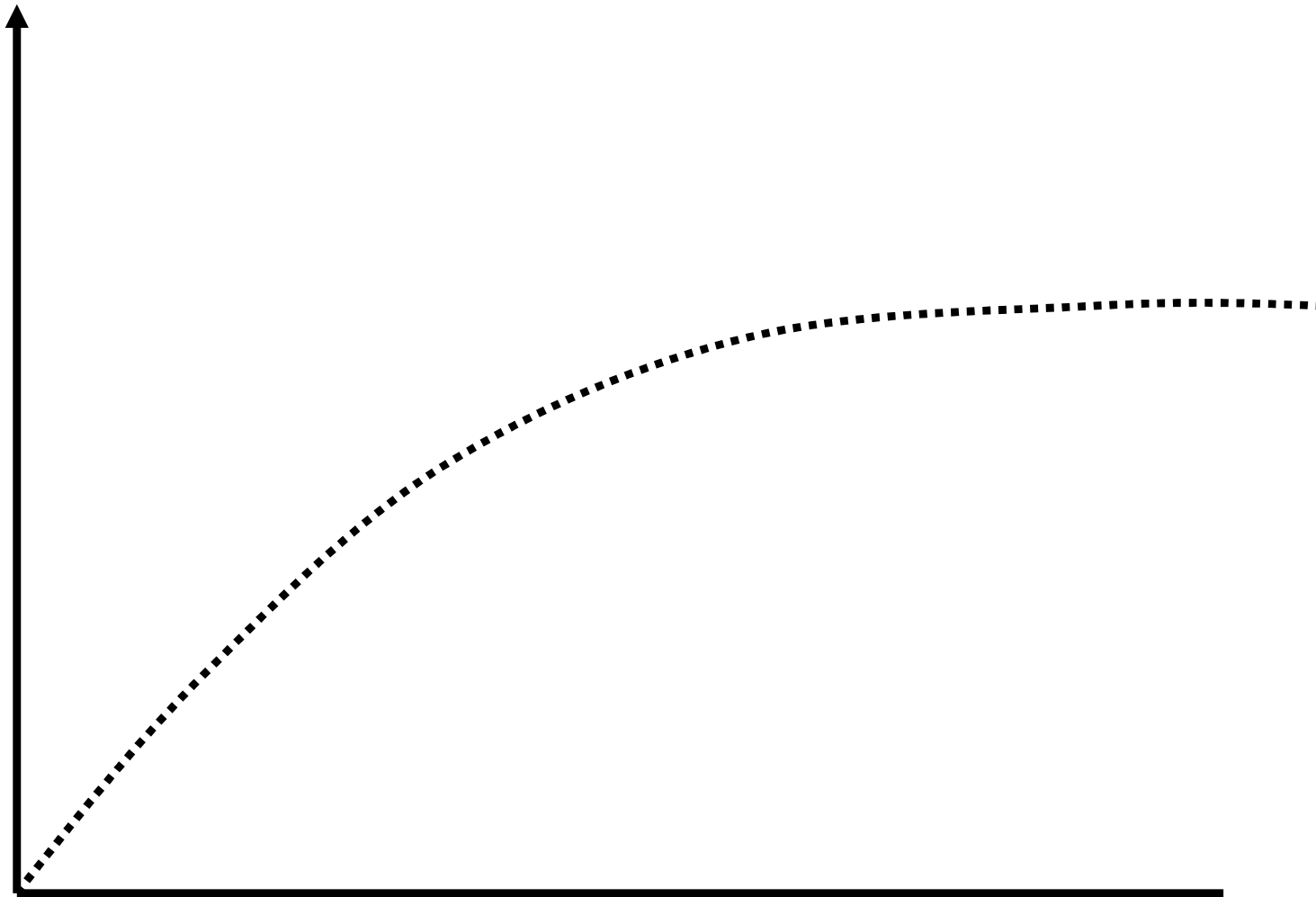
**Como quantificar a enzima?**

$$v = k [E] [S]$$



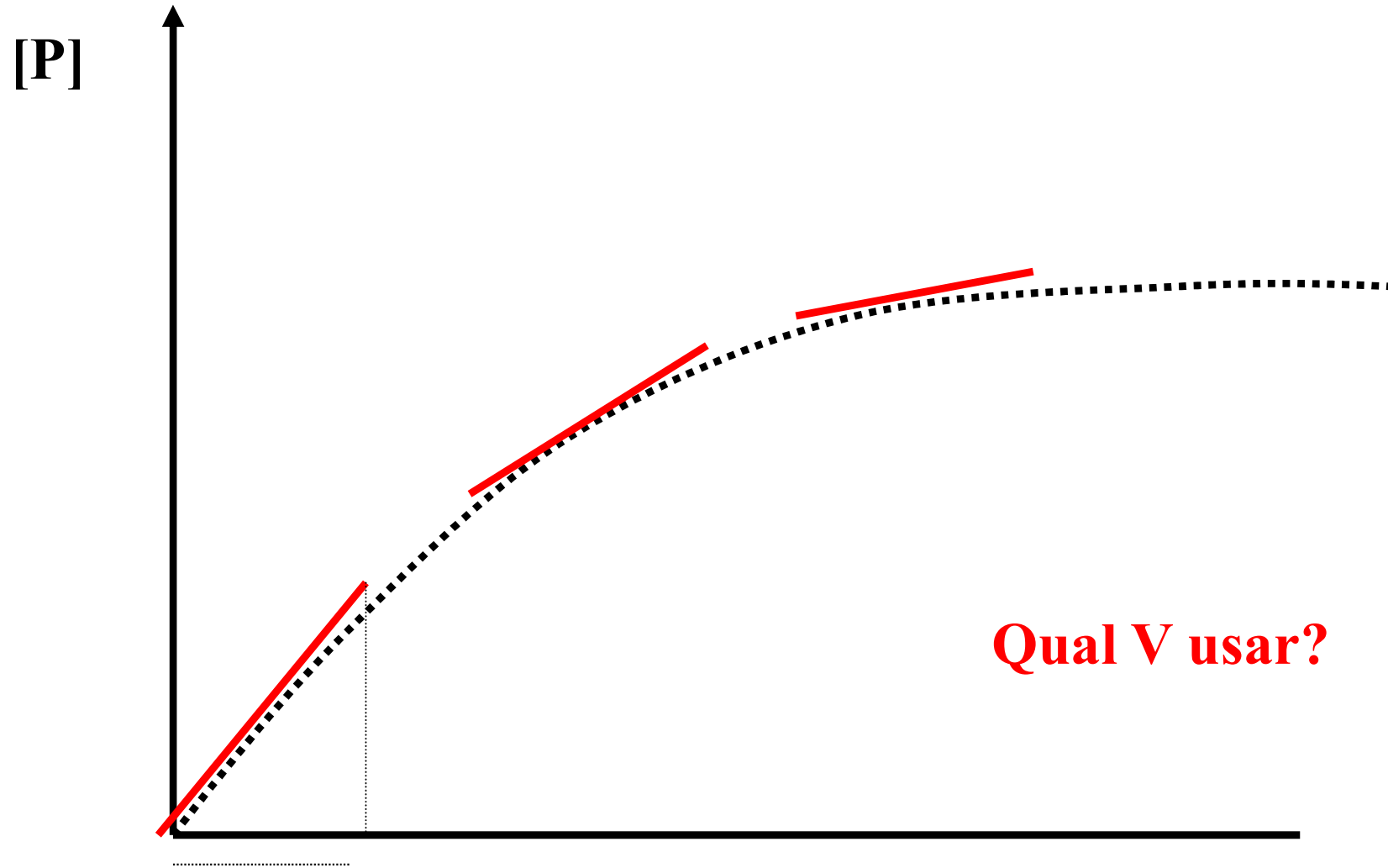
Assim, se  $[S] \sim \text{constante}$ , a velocidade é diretamente proporcional a concentração de enzima

**[P]**



**tempo**

$$V = \Delta[P]/\Delta t$$



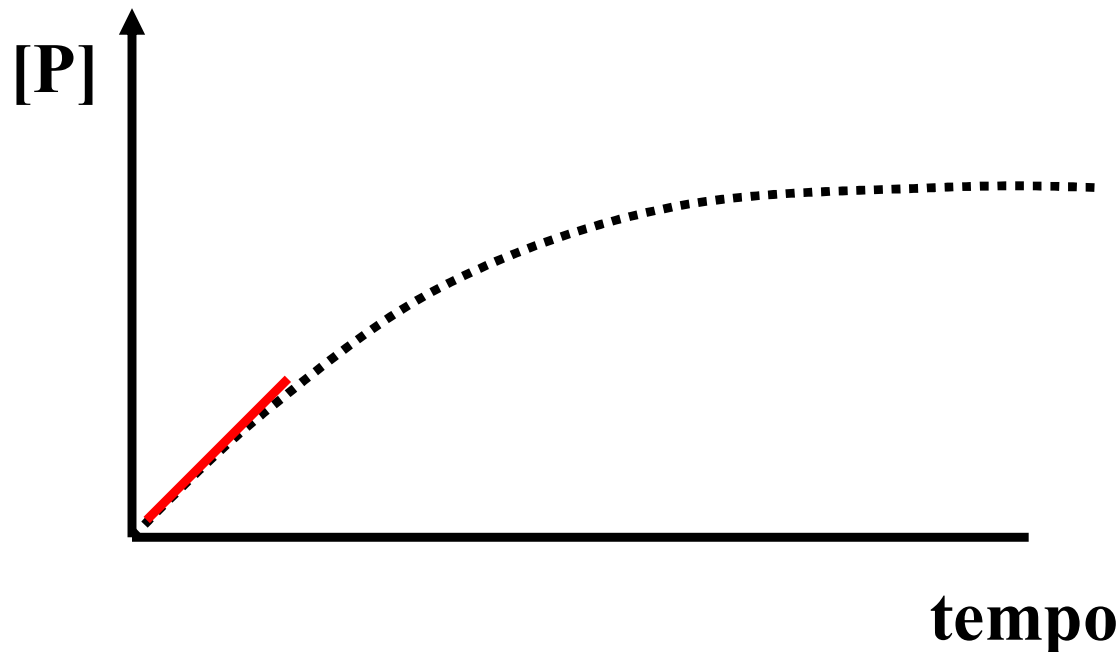
$$\textit{inclinação} = \Delta y / \Delta x$$

**tempo**



$$v = k [E] [S]$$

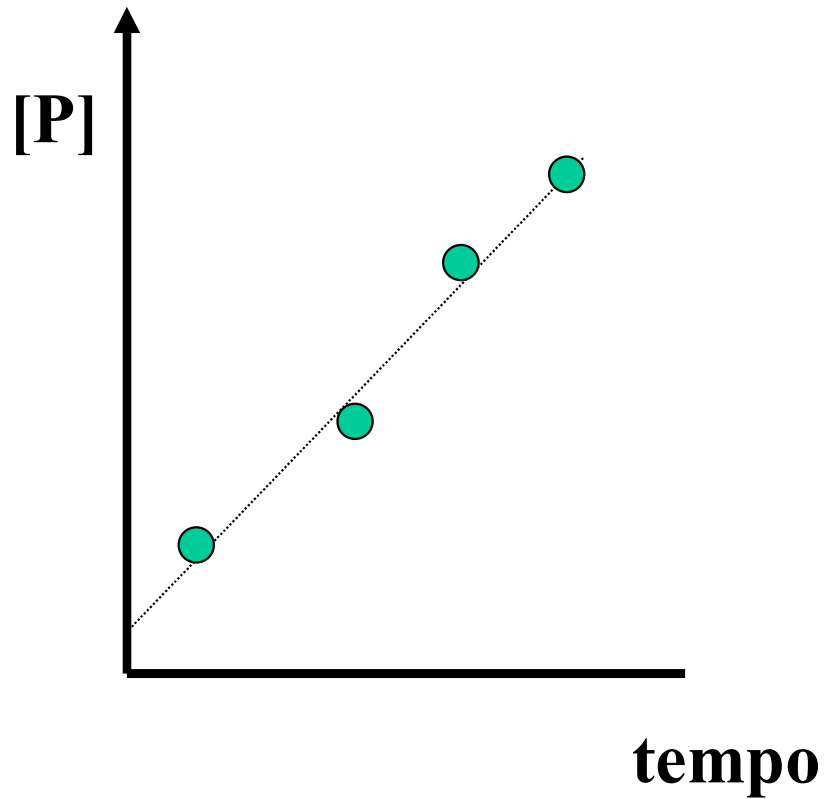
Assim, se  $[S] \sim$  constante (igual à inicial; muito S e pouco E saturado), a velocidade é diretamente proporcional a concentração de enzima



Se menos de 5% de S for consumido, podemos assumir  $v \sim$  constante ( $v_0$ )

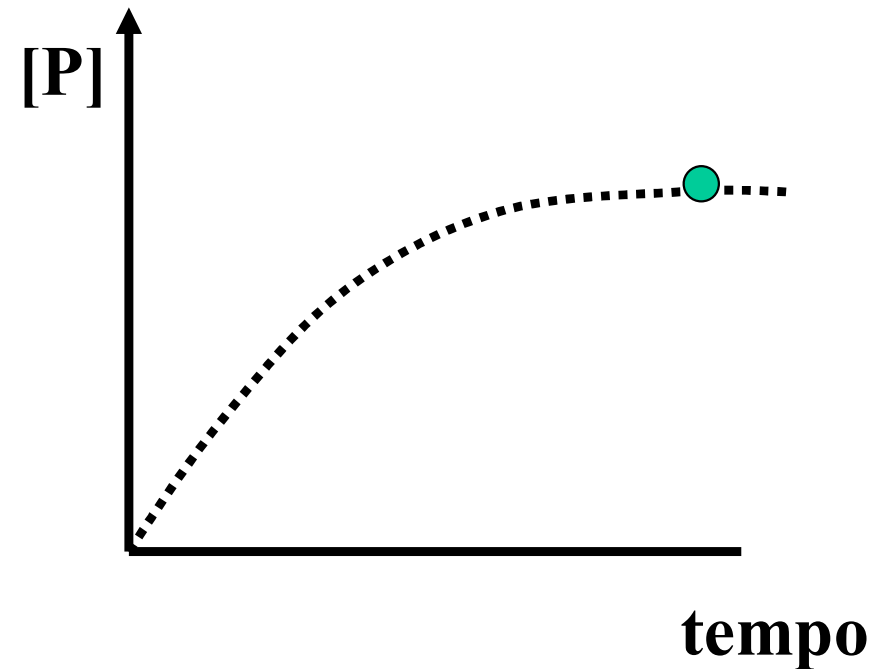
## Medida de velocidade inicial

Construir uma curva de [P] x tempo e verificar se é linear.



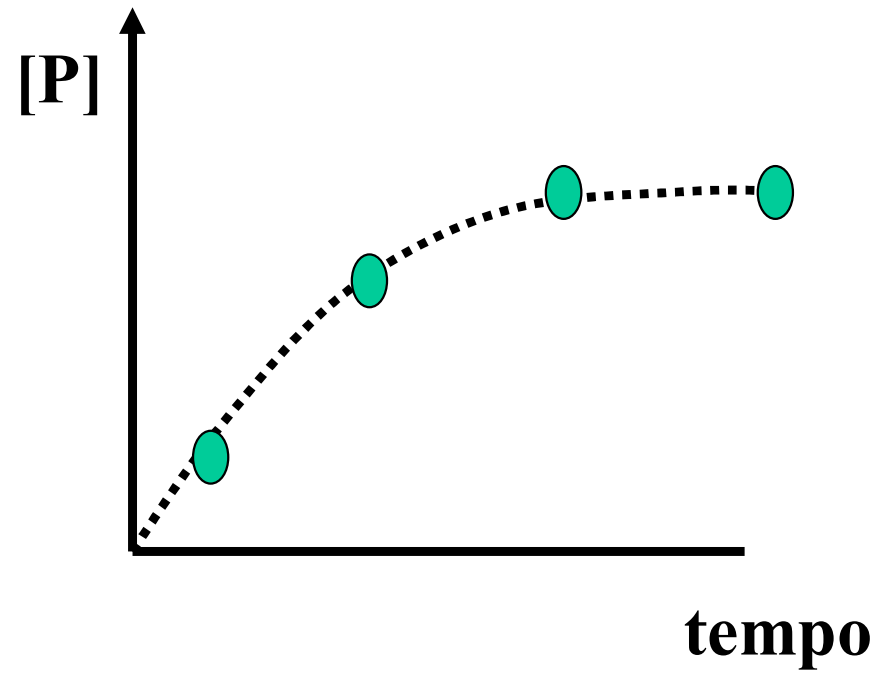
vários tempos

$x$

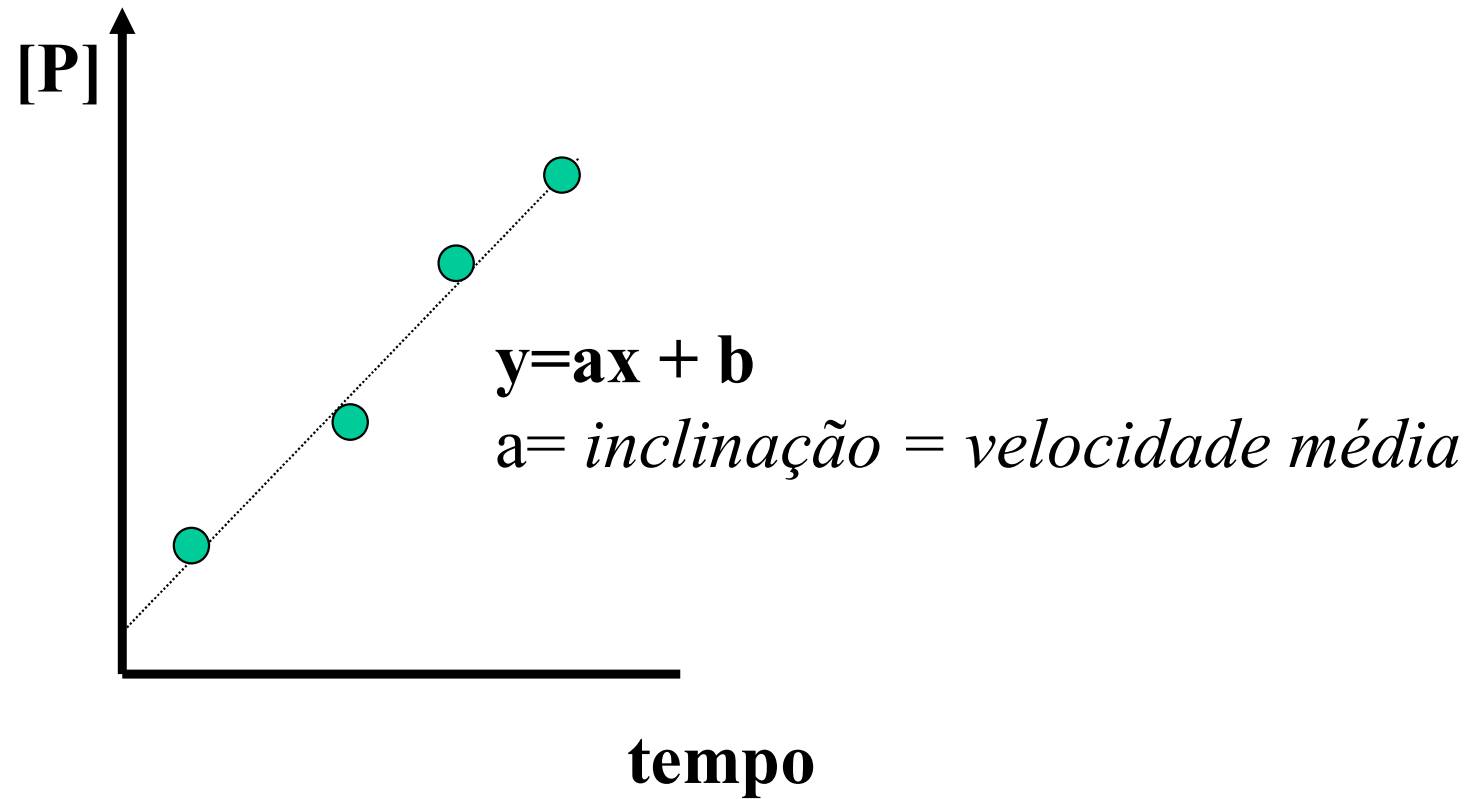


1 único tempo

$$v = k [E] [S]$$



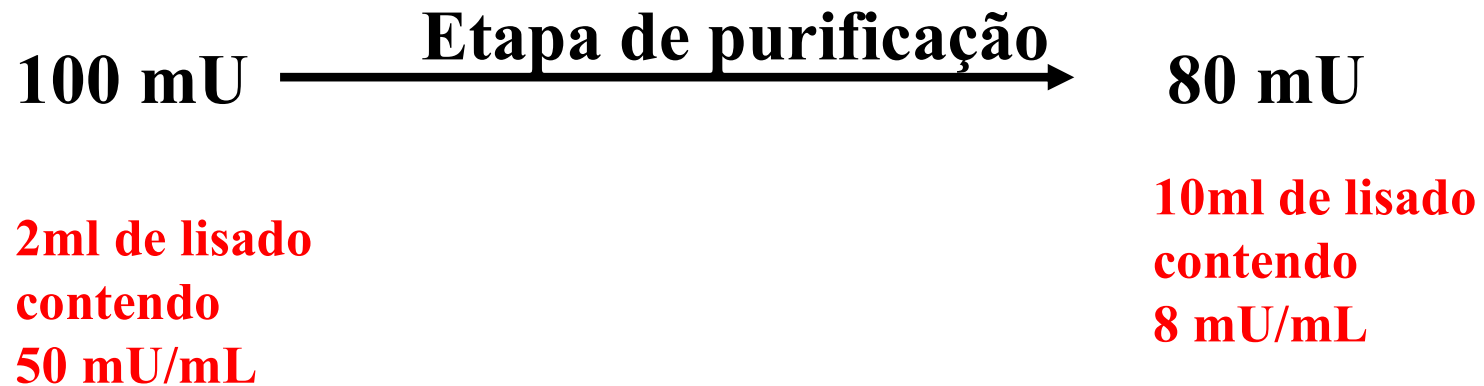
- consumo do substrato
- inativação da enzima



**1 U de atividade = quantidade de E em uma  
reação com velocidade de 1  $\mu\text{mol P/min}$**

$$\mathbf{1\ U = 1\ \mu\text{mol P} / \text{min}}$$

## Recuperação da atividade enzimática



$$\text{Recuperação} = 80\% = 80 \text{ mU}/100 \text{ mU}$$

### **Recuperação:**

**porcentagem de atividade enzimática recuperada após o procedimento de purificação**

# Enriquecimento

100 mU/mg  $\xrightarrow{\text{Etapa de purificação}}$  200 mU/mg

$$\text{Enriquecimento} = 2 = 200/100$$

**Enriquecimento:** indica o aumento da atividade específica após o procedimento de purificação.

# Exemplo prático

**A Purification Table for a Hypothetical Enzyme\***

Procedure or step	Fraction volume (ml)	Total protein (mg)	Activity (units)	Specific activity (units/mg)
1. Crude cellular extract	1,400	10,000	100,000	10
2. Precipitation with ammonium sulfate	280	3,000	96,000	32
3. Ion-exchange chromatography	90	400	80,000	200
4. Size-exclusion chromatography	80	100	60,000	600
5. Affinity chromatography	6	3	45,000	15,000

## **Métodos empregados:**

**Filtração/centrifugação, cromatografia em coluna**

**Monitoramento via eletroforese ou ensaio enzimático**

# Determinação da Atividade Enzimática do lisado

## Quanto de $\alpha$ -glicosidase?

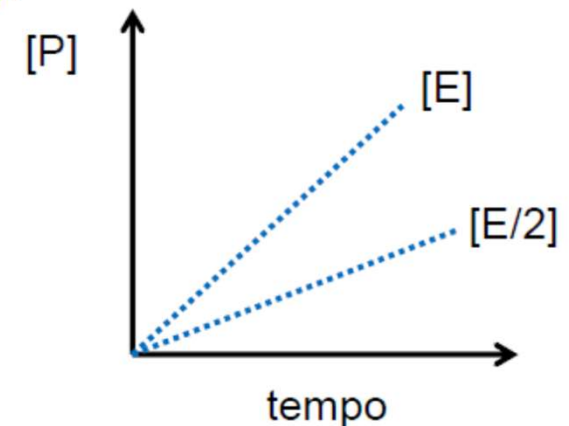
### Objetivo

**Determinar a atividade da  $\alpha$ -glicosidase no lisado de *Saccharomyces cerevisiae***

-Presença de uma enzima específica num lisado celular pode ser detectada através da ocorrência da reação que catalisa (formação de produto ou desaparecimento de substrato).

$$v = k [E] [S]$$

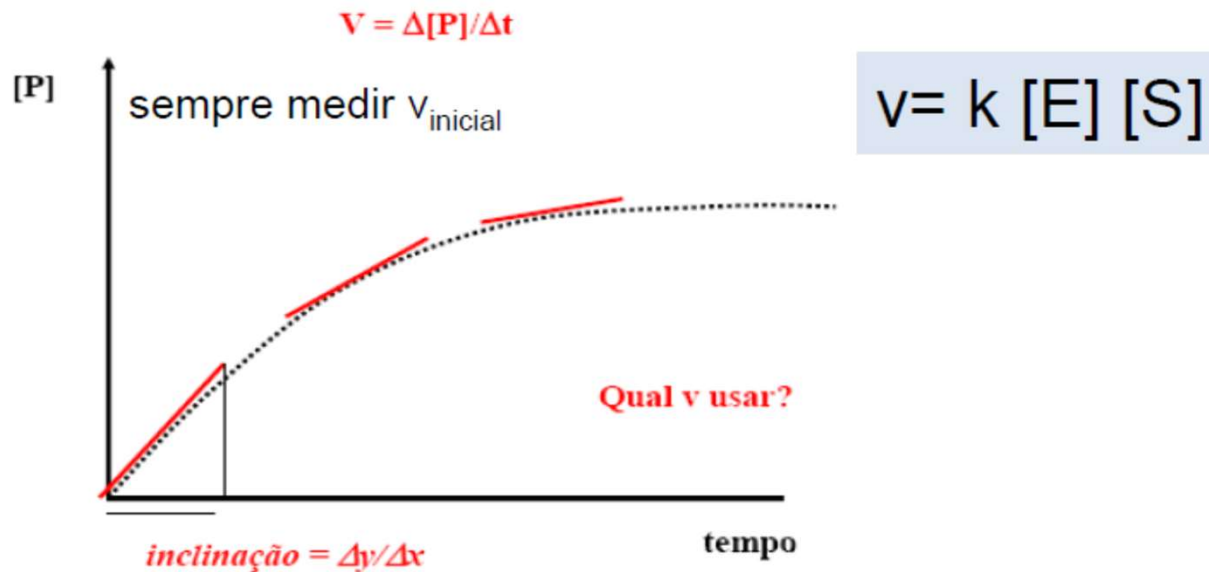
-Se  $[S] \sim$  constante ( $\sim$  inicial), a velocidade da reação é diretamente proporcional à concentração de enzima





# Determinação da Atividade Enzimática do lisado

## COMO MEDIR VELOCIDADE DE UMA REAÇÃO?

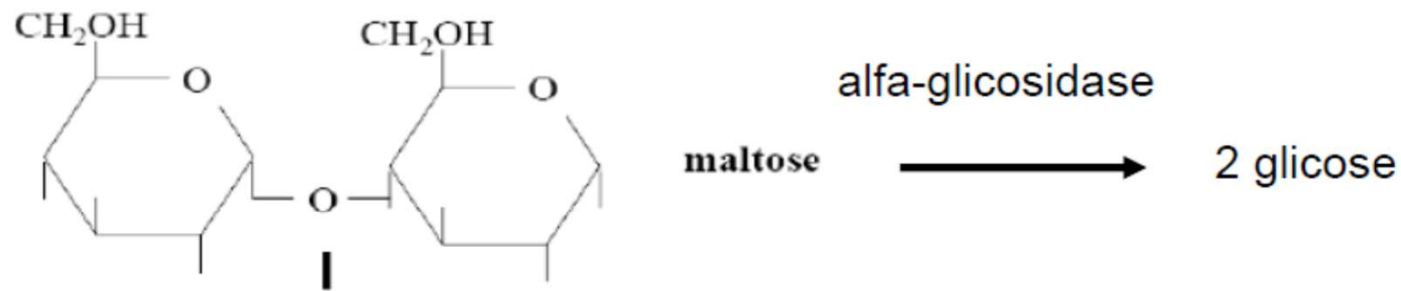


-Se menos de 5% do substrato for consumido, pode-se assumir que  $v \sim \text{constante} = v_{\text{inicial}}$  que é diretamente proporcional à concentração de enzima. Portanto  $v_i$  é uma medida da quantidade de enzima.

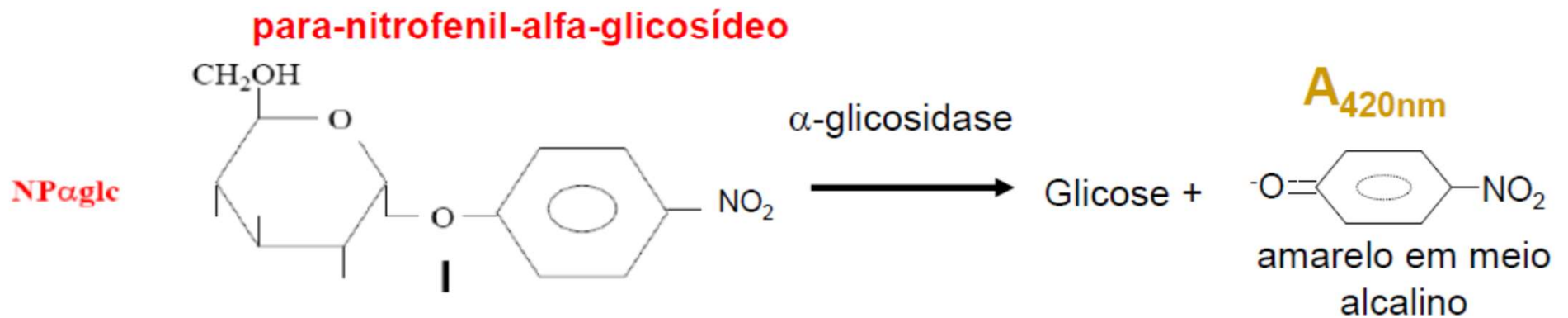
-Definição- 1 unidade de enzima ( 1U) é a quantidade de enzima que produz 1  $\mu\text{mol}$  de produto/min (consome 1  $\mu\text{mol}$  de substrato/min).

# Planejamento Prática 3 –Curva de p-nitrofenolato

-Reação catalisada: hidrólise da ligação  $\alpha$ -glicosídica



-Substrato artificial para facilitar a medida de atividade (produto colorido)- (colorimetria= absorvância de luz visível)



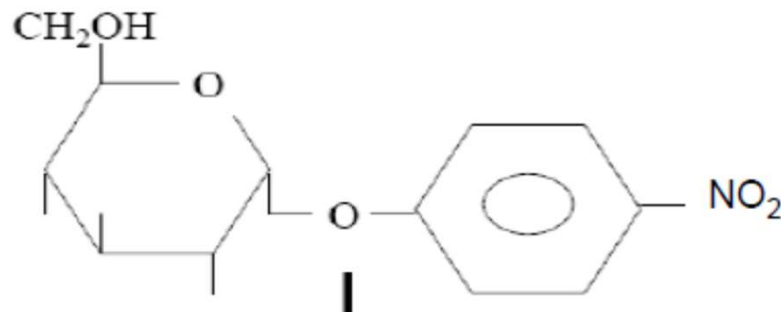
Procedimento A – Construção da curva de calibração de *p*-nitrofenolato  
 Em uma série de tubos, pipete conforme o indicado na Tabela abaixo:  
 Após pipetar a curva, homogeneizar cada tubo suavemente  
 e reserve em um local seguro

tubos	p-nitrofenol 2 mM (μL)	H <sub>2</sub> O (μL)	Tampão Bicarbonato (ml)	ABS (405nm)
<b>Bco</b>	0	200	2	
<b>1</b>	5	195	2	
<b>2</b>	10	190	2	
<b>3</b>	20	180	2	
<b>4</b>	30	170	2	
<b>5</b>	50	150	2	
<b>6</b>	75	125	2	
<b>7</b>	100	100	2	
<b>8</b>	125	75	2	
<b>9</b>	150	50	2	
<b>10</b>	175	25	2	
<b>11</b>	200	0	2	

# Planejamento Prática 3 –Curva de p-nitrofenolato

## Reação

para-nitrofenil- $\alpha$ -glicosídeo (NP $\alpha$ glc)

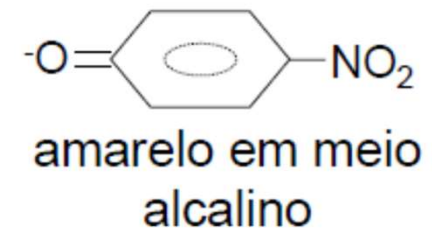


$\alpha$ -glicosidase

Glicose +

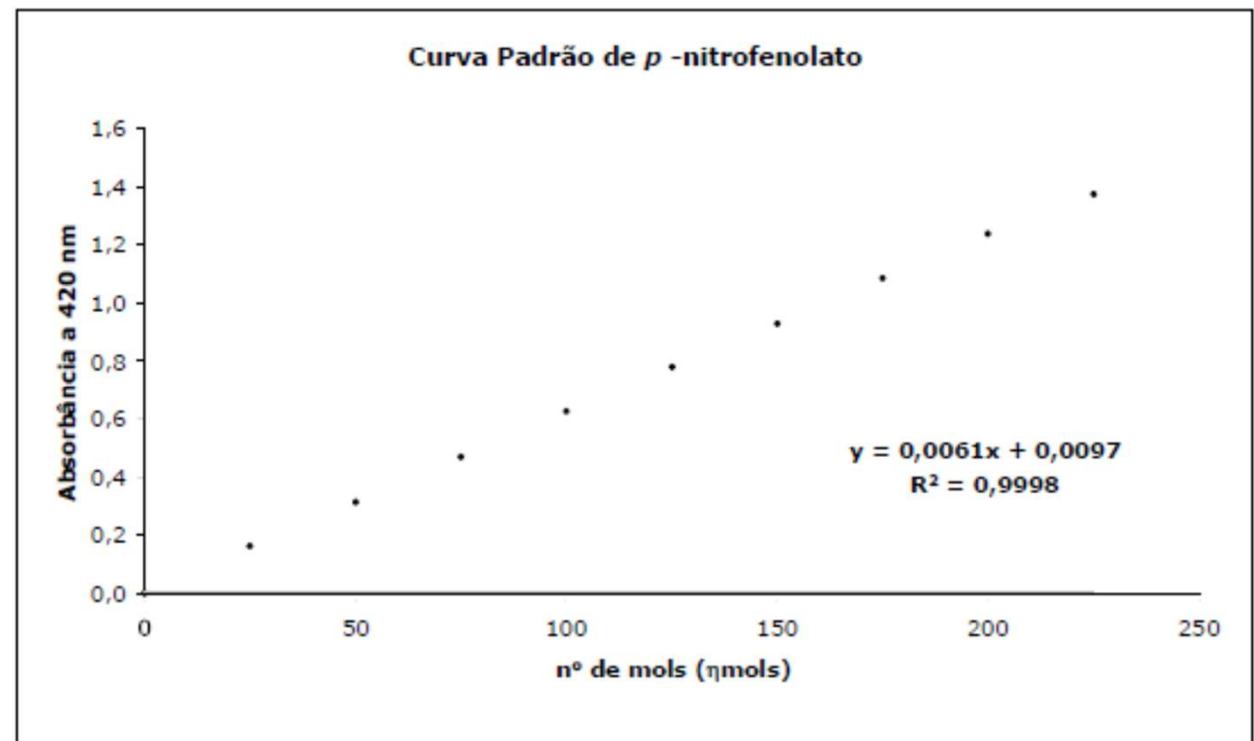
Para-nitrofenolato

$A_{420\text{nm}}$



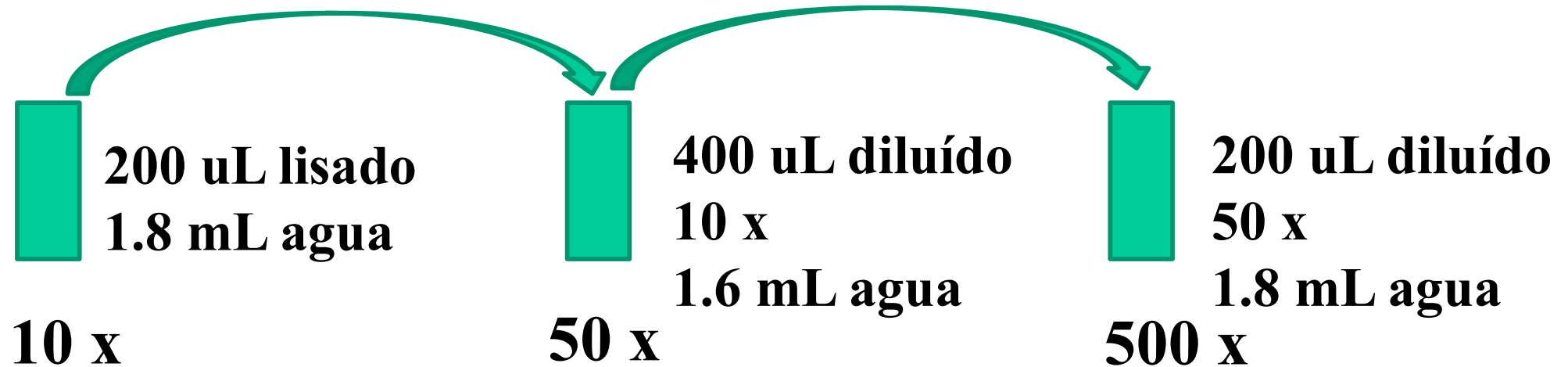
Curva de calibração:

quantidades  
conhecidas de  
p-nitrofenolato



# Planejamento Prática 3 –Determinação da Atividade Enzimática do lisado

## Procedimento A – Diluição do lisado de *Saccharomyces cerevisiae*



**TUDO NO GELO!!!**

# Planejamento Prática 3 –Determinação da Atividade Enzimática do lisado

1. Preparar os tubos **em banho de gelo** (13 tubos ao total, considerando as 3 diluições do lisado, 10 x, 50 x e 500 x e o branco de enzima).
2. Adicionar **primeiro** o substrato
3. Adicionar cada concentração de lisado diluído ainda em **banho de gelo**
4. Transferir **todos os tubos ao mesmo tempo** para o banho a 30°C
5. Ao remover cada tubo, interromper a reação enzimática adicionando 2 mL de tampão carbonato- bicarbonato pH 11,0.
6. Agitar manualmente
7. Deixar os tubos em temperatura ambiente.
8. Após retirar **todos** os tubos, transferir 200 uL para uma placa e ler as absorbâncias a 420 nm

<b>Para cada diluição tubos</b>	NP $\alpha$ Glc 4 mM (mL)	lisado diluído (mL)	Tempo de incubação a 30°C (min)
1	0,2	0,2	5
2	0,2	0,2	10
3	0,2	0,2	15
4	0,2	0,2	20
Branco de Enzima	---	0,2	20

# Planejamento Prática 3 –Determinação da Atividade Enzimática do lisado

**Absorbância de 1 ou mais diluições precisam cair na curva de p-nitrofenolato**

	L10x	L50X	L500x
tubos	$A_{420}$	$A_{420}$	$A_{420}$
1			
2			
3			
4			
Branco de Enzima			
Branco de Substrato			

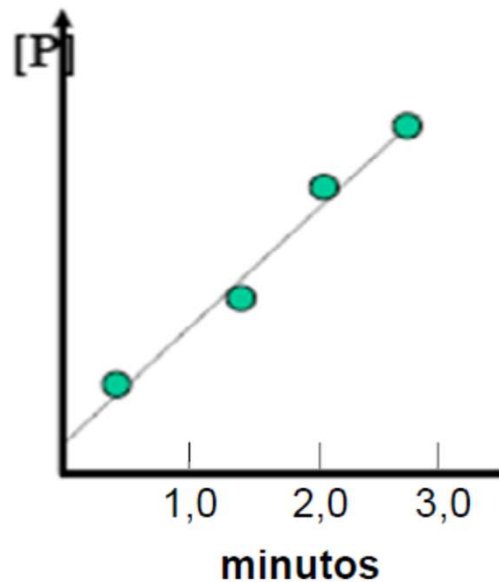
Resultados: absorbância obtida na curva padrão de p-nitrofenolato

Construir gráfico de nmols de produto por tempo para cada diluição do lisado

# Planejamento Prática 3 –Determinação da Atividade Enzimática do lisado

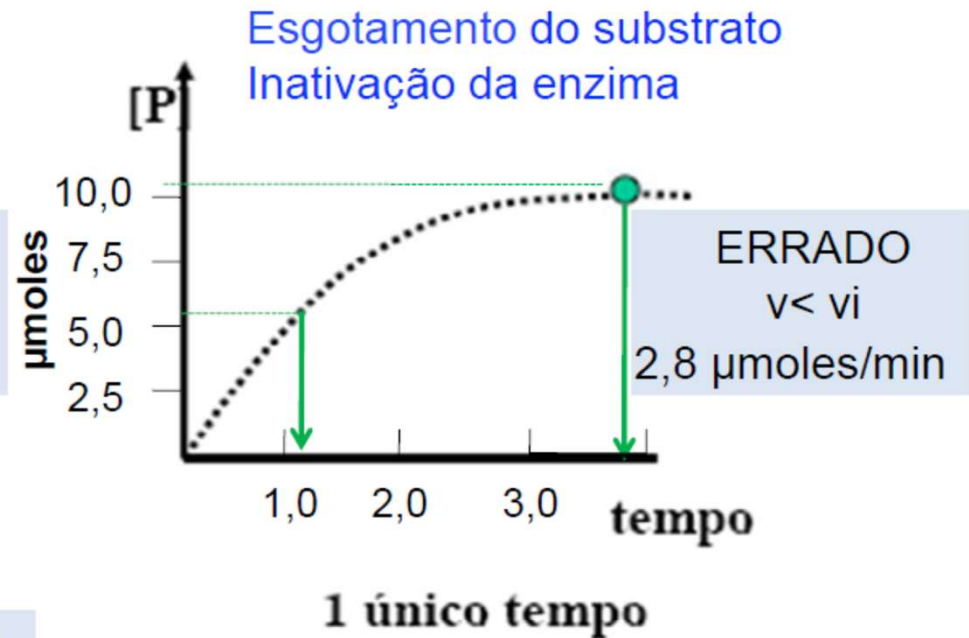
## MEDIDA DE VELOCIDADE INICIAL

-Construir uma curva de [P] x tempo e ver se está linear



CORRETO  
 $v=v_i$   
4,7  $\mu\text{moles/min}$

4,7 U de enzima



-Concentração de atividade enzimática= número de unidades de enzima por ml (U/ml)

-Atividade específica- número de unidades de enzima/mg proteína (U/mg)