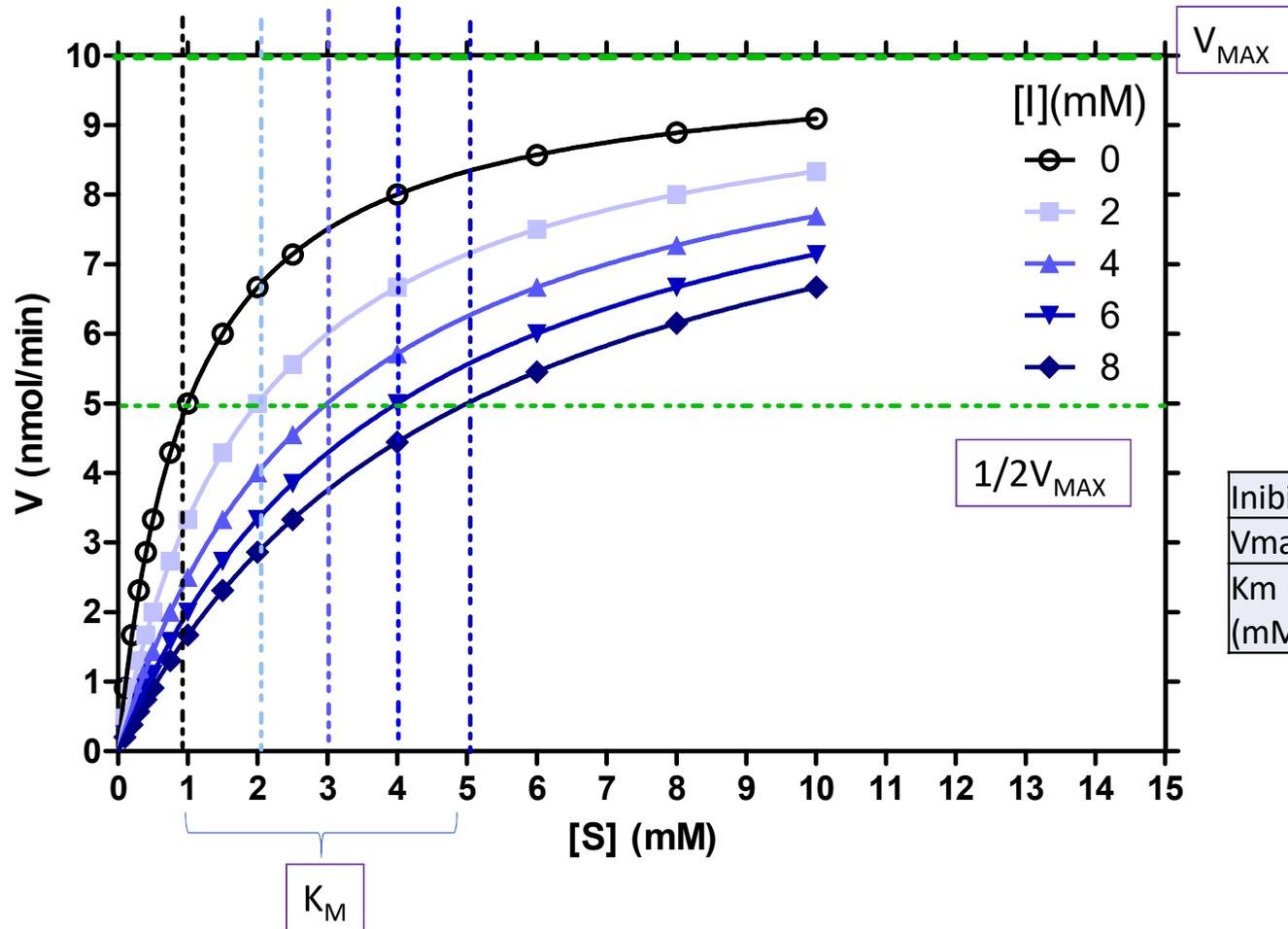


Para uma alfa-glicosidase foram determinadas as velocidades de hidrólise de diferentes concentrações de substrato (NpaGlc) na presença de diferentes concentrações de um inibidor. Estes dados estão apresentados na tabela abaixo. Baseando-se nesta tabela determine o V_{max} e o K_m para a hidrólise do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

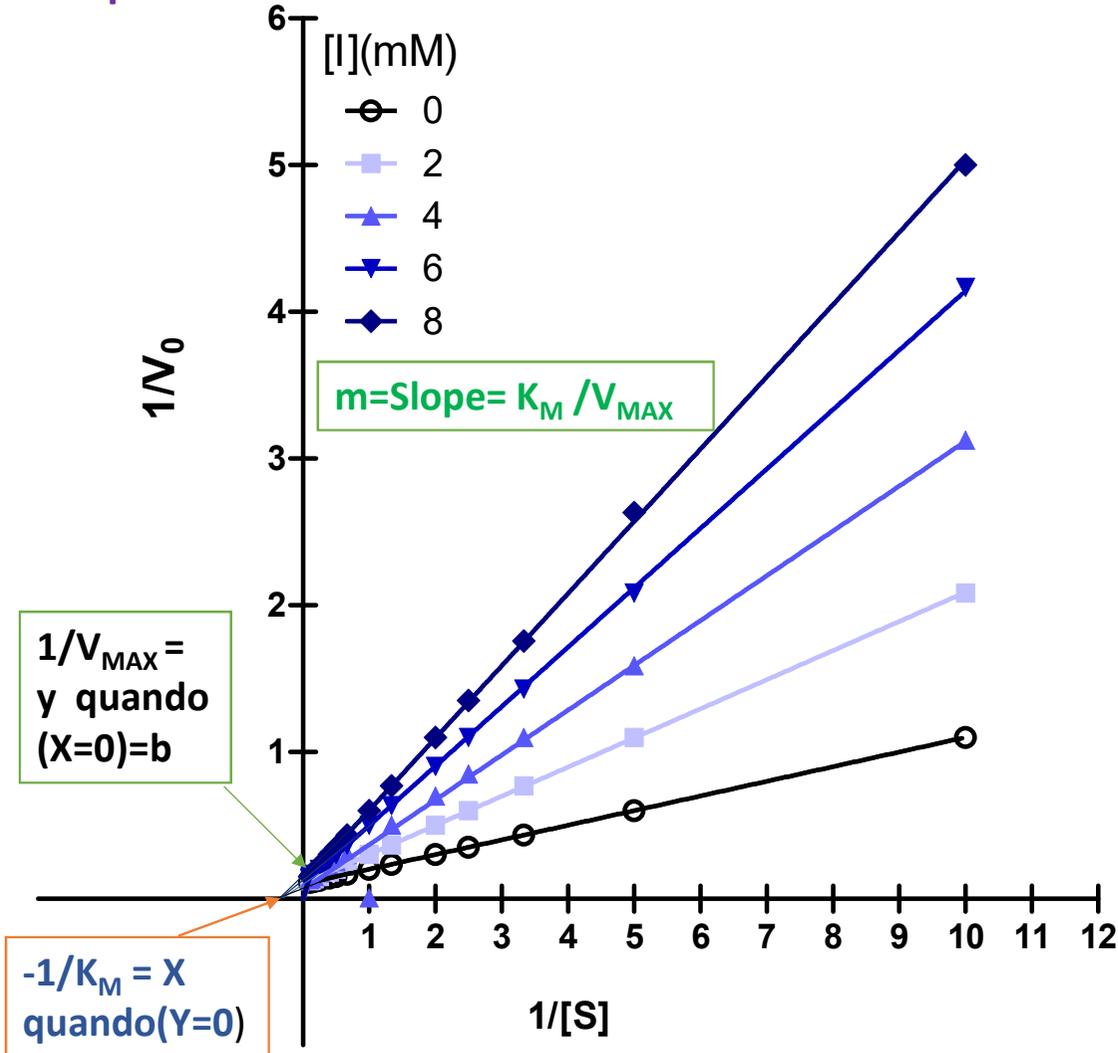
As curvas hiperbólicas obtidas permitem identificar que trata-se de enzima michaeliana e estimar os valores de Km ou Vmax, pois $K_m = [S]$ quando $V_o = V_{m\acute{a}x}/2$.



$$v = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{k_M + [S]}$$

Inibidor	0	2	4	6	8
Vmax	9.998	9.997	9.995	9.997	9.998
Km (mM)	0.9991	1.998	2.997	3.996	5.001

Método da linearização para cálculo de Km e Vmáx: plot do duplo recíproco ou de Lineweaver-Burk



Após calcular $1/V$ e $1/[s]$, é possível ajustar os dados a uma linha reta e obter os valores precisos 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

I	slope		km aparente	vmax	α	Ki
	AX	B				
2	0.1986	0.1015	1.956650246	9.852217	2.0	2.024316
4	0.3016	0.0974	3.09650924	10.26694	3.0	1.98116
6	0.405	0.0935	4.331550802	10.69519	4.1	1.964602
8	0.4925	0.109	4.518348624	9.174312	4.9	2.03566

É possível obter V_{max} usando o valor do intercepto no y quando $x=0$. E o K_M pode ser obtido de duas formas: a partir da inclinação e o valor do V_{max} previamente obtido ou usando o valor de intercepto no x quando $y=0$...

$$v_{max} = (b)^{-1} = \left(\frac{1}{v_{max}}\right)^{-1} = (0.1001)^{-1} = 9.99 \text{ nmol/min}$$

1

$$m = \frac{k_M}{v_{max}}$$

$$K_M = (m) \cdot V_{max}$$

$$K_M = \left(0.09986 \frac{\text{mM}}{\text{nmol/min}}\right) * 9.99 \text{ nmol/min} = 0.997 \text{ mM}$$

2

$$\text{Intercepto no x} = \frac{-1}{K_M} = -1.002 = K_M$$

$$\left(\frac{-1}{k_M}\right)^{-1} = (-1.002)^{-1} = -0.998 * -1 = 0.998 \text{ mM}$$

Inibidor	0	2	4	6	8
vmax	9.99001	9.852217	10.27116	10.69976	9.174312
Km jeito 1	0.997602	1.95665	3.138866	4.333405	4.518349
Km jeito 2	0.998004	1.956564	3.097893	4.332756	4.516712

Como Podemos observar nos dados obtidos, a V_{max} permanece constante (aprox. 10 nmol/min) e os (K_M') aparentes obtidos na presença do inibidor são maiores ao K_M sem inibidor, isso descreve um tipo de inibição

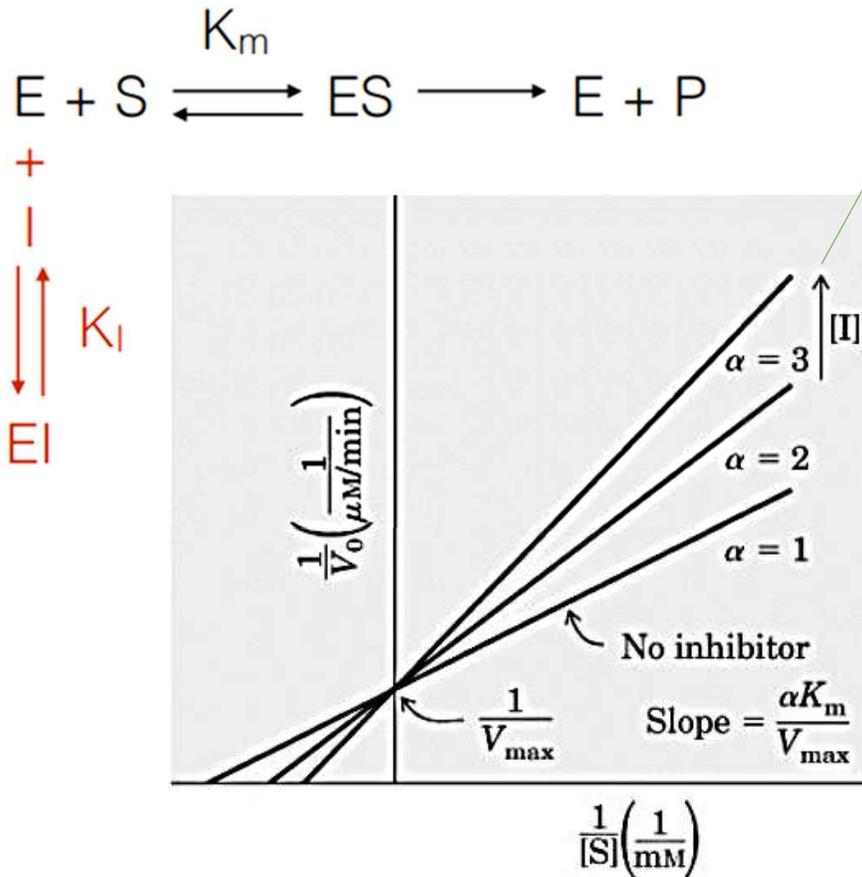
COMPETITIVA.

$$K_M' > K_M$$

Entende-se então que o (K_M') será igual ao K_M sem inibidor, multiplicado por um fator que descreve o grau de inibição chamado α

$$K_M' = \alpha \cdot K_M$$

Inibidores competitivos



Quanto maior a concentração do inibidor, maior será o grau de inibição α , neste tipo de inibição competitiva. Sendo assim, α depende da concentração do inibidor e da **constante de inibição K_i** que apresente esse inibidor com essa enzima:

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

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

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

$$K_i = 2.048$$

Alternativamente podemos obter o K_i a partir da seguinte equação:

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

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

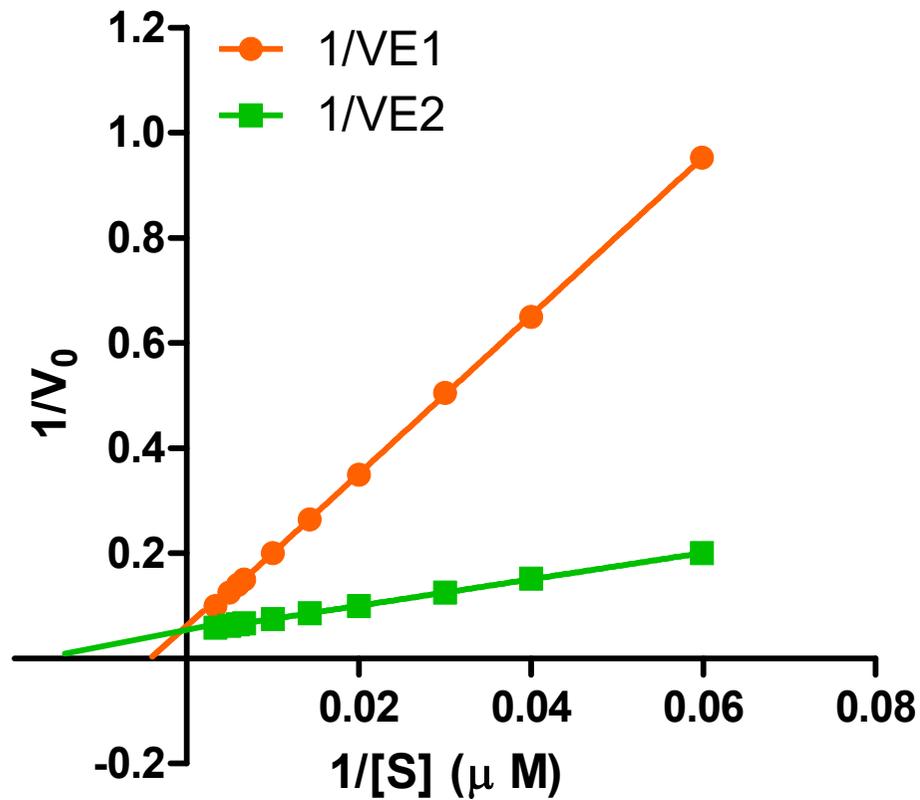
$$\frac{1}{V_0} = \left(\left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) * K_M * \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \right)$$

$$\frac{1}{0.32} = \left(\frac{\left(1 + \frac{[4 \text{ mM}]}{K_i} \right) * 0.99}{10} * \frac{1}{[0.1]} + \frac{1}{10} \right)$$

$$K_i = 2$$

a) Tecido embrionário de fígado contém uma enzima que catalisa a reação $S \longrightarrow P$. Tecido de fígado adulto também apresenta a atividade $S \longrightarrow P$. Alguns dados cinéticos obtidos com extratos dos dois tecidos são apresentados abaixo. Que conclusões você pode tirar com relação a identidade das duas enzimas?

[S] [M]	<i>Velocidade Inicial Observada</i> ($\mu\text{-moles} \times \text{mg de proteína}^{-1} \times \text{min}^{-1}$)	
	Extrato de Fígado Adulto (E1)	Extrato de Fígado Embrionário (E2)
$1,67 \times 10^{-5}$	1,05	5,00
$2,5 \times 10^{-5}$	1,54	6,66
$3,33 \times 10^{-5}$	1,98	8,00
$5,0 \times 10^{-5}$	2,86	10,00
$7,0 \times 10^{-5}$	3,78	11,67
$1,0 \times 10^{-4}$	5,00	13,33
$1,5 \times 10^{-4}$	6,67	15,0
$1,67 \times 10^{-4}$	7,15	15,4
$2,0 \times 10^{-4}$	8,00	16,0
$3,0 \times 10^{-4}$	10,00	17,1

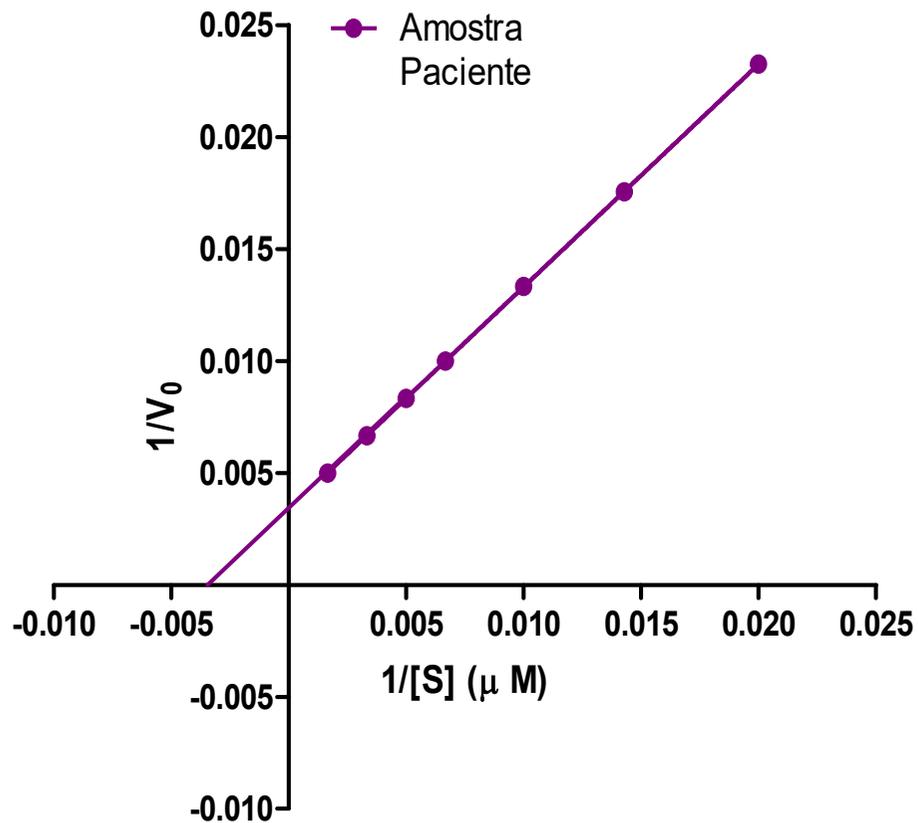


	VE1	VE2
Slope	15.07	2.513
Y-intercept when X=0.0	0.04952	0.04993
X-intercept when Y=0.0	-0.003287	-0.01987
Vmax $\mu\text{mol. mg}$ proteina por min	20.19386	20.02804
K_M (μM)	304.3215	50.33046

As duas enzimas possuem a mesma Vmax e a E1, apresenta uma K_M muito maior para este substrato em relação à E2, sugerindo que E2 (A enzima presente no fígado embrionário) precisa de menos substrato para atingir a metade da Vmax ou tem maior afinidade por este substrato.

b) Durante danos consideráveis do fígado, uma enzima (E_1 do Probl. 1) é liberada na corrente sanguínea. Após exercícios intensos, uma enzima de músculo, E_3 , que catalisa a mesma reação, é liberado na corrente sanguínea. E_1 e E_3 podem ser diferenciadas facilmente porque apresentam diferentes valores de K_m (A K_m da enzima de músculo é $2 \times 10^{-5} M$.) Uma determinação com uma amostra de sangue de um paciente apresentou os resultados dados na tabela abaixo. O paciente sofre de uma doença do fígado, ou simplesmente tem se exercitado violentamente? (O paciente chegou inconsciente no hospital, de modo que você não pode fazer a ele nenhuma pergunta).

$[S] (M)$	$v (moles \times ml \text{ de soro}^{-1} \times min^{-1})$
5×10^{-5}	43
7×10^{-5}	57
1×10^{-4}	75
$1,5 \times 10^{-4}$	100
2×10^{-4}	120
3×10^{-4}	150
6×10^{-4}	200



Slope	0.995
Y-intercept when X=0.0	0.003355
X-intercept when Y=0.0	-0.003372

E1	K_M (μM)	304.3215
AMOSTRA PACIENTE	K_M (μM)	296,5
E3	K_M (μM)	20

O K_M obtido a partir das amostras do paciente é muito semelhante ao K_M presente no fígado de um adulto (Aprox. 300 μM), o que significa que este paciente sofre de uma doença no fígado e essa enzima está sendo liberada na corrente sanguínea.