

# ***Cinética Enzimática***

## ***Parte 2***

Variável independente:  
**concentração do substrato.**

Constante\*:  
**velocidade  
máxima**

Variável dependente:  
**velocidade de reação,**  
função de [S].

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

Constante de Michaelis:  
 **$K_D$  aparente de ES.**

\* “Constante”:  $V_{\max}$  é função de  $[E]_{\text{total}}$

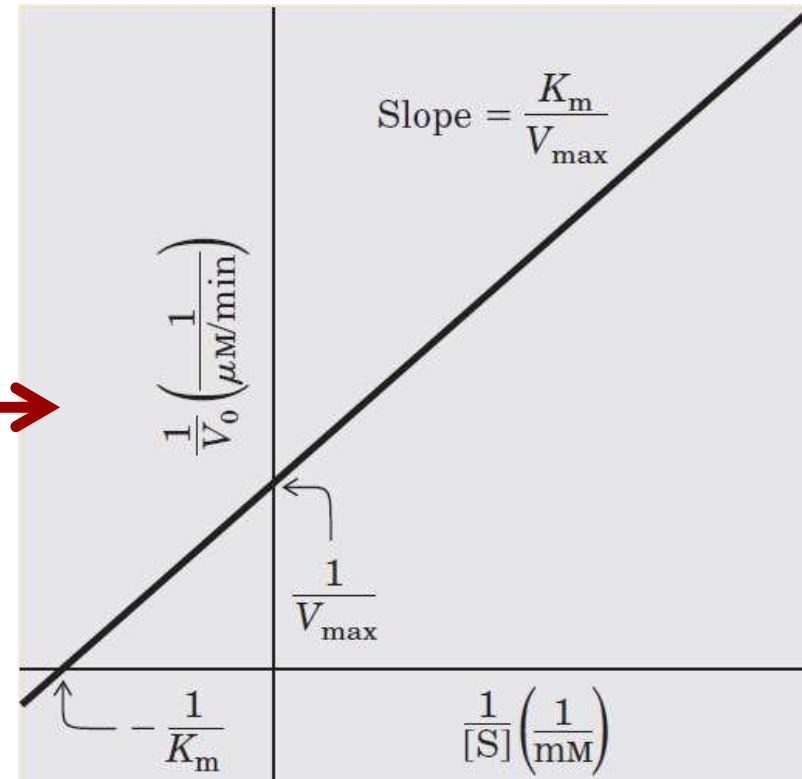
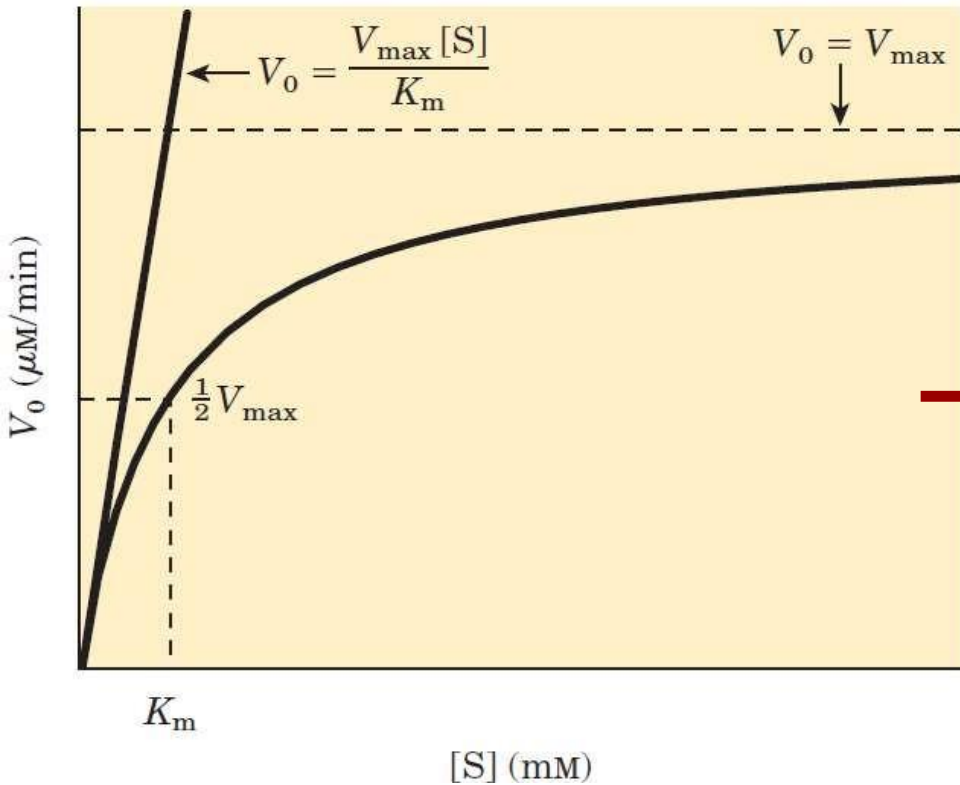
## Determinando $V_{\max}$ e $K_M$

Gráfico do duplo recíproco ou Lineweaver-Burk

$$\frac{1}{V} \text{ versus } \frac{1}{[S]}$$

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M + [S]}{V_{\max} [S]} = \frac{K_M}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

$$y = ax + b$$



## 1º Significado do $K_M$

→ Importante parâmetro da reação enzimática e da função biológica

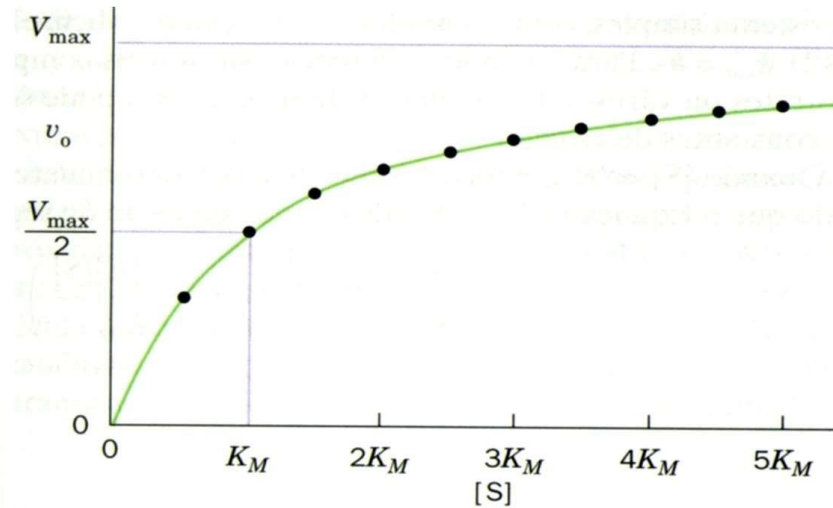
→ Fornece uma medida da  $[S]$  para que ocorra uma catálise significativa Enzimas diferem muito no  $K_M$  □

Depende do substrato e das condições experimentais:

Temperatura, sais, pH, etc

Se  $K_M = [S]$  □

$$V = \frac{V_{\max} [S]}{2[S]} = \frac{V_{\max}}{2}$$



Se  $K_M$  é conhecido, a fração de sítios ativos ocupados em uma dada  $[S]$  pode ser definida

$$f_{ES} = \frac{V}{V_{\max}} = \frac{[S]}{[S] + K_M}$$

Então  $K_M$  é a  $[S]$  na qual a  $V$  é a metade da  $V_{\max}$ , é a  $[S]$  na qual 50% dos sítios ativos estão ocupados

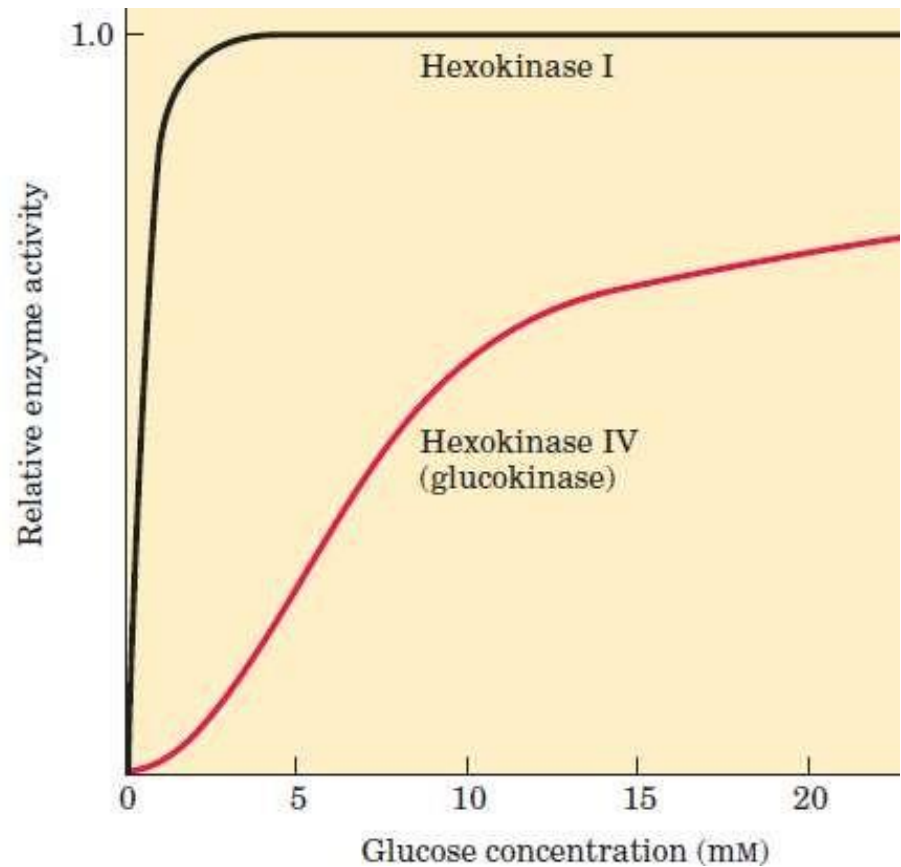
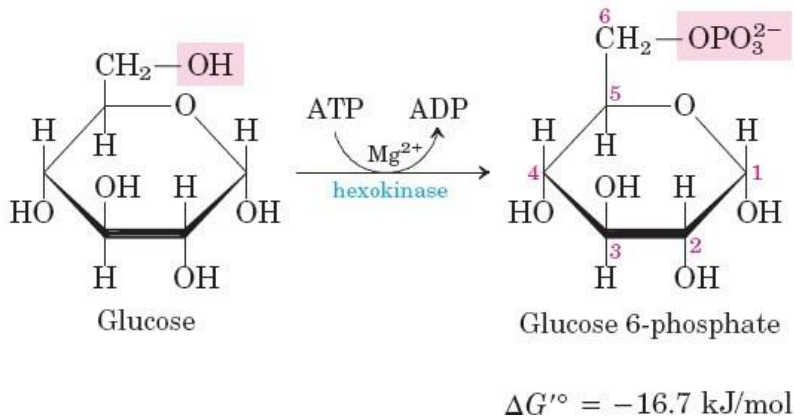
**QUADRO 8.5** Valores de  $K_M$  de Algumas Enzimas

Enzima	Substrato	$K_M$ ( $\mu\text{M}$ )
Quimotripsina	Acetil-L-triptofanamida	5.000
Lisozima	Hexa-N-acetilglicosamina	6
$\beta$ -Galactosidase	Lactose	4.000
Treonina desaminase	Treonina	5.000
Anidrase carbônica	$\text{CO}_2$	8.000
Penicilinase	Benzilpenicilina	50
Piruvato carboxilase	Piruvato	400
	$\text{HCO}_3^-$	1.000
	ATP	60
Arginina-tRNA sintetase	Arginina	3
	tRNA	0,4
	ATP	300

## 2º Significado do $K_M$

$K_M$  está relacionado às constantes de velocidade de cada etapa da reação

**Ex: Hexoquinase (Músculo) versus Glicoquinase (Fígado) □ Fosforilação da Glicose**



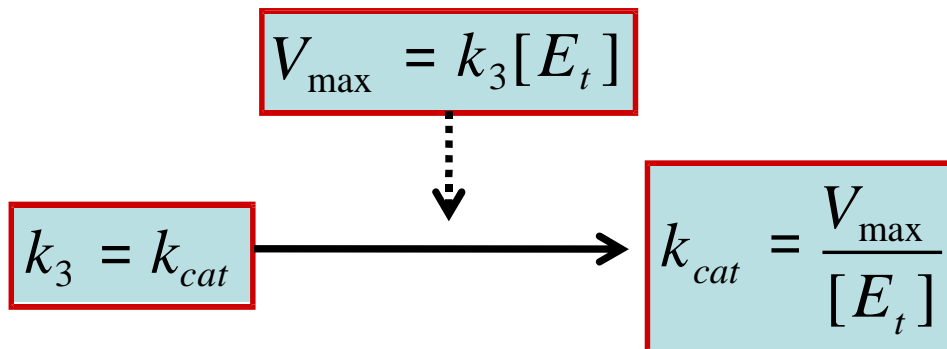
## Significado do Vmax

Se a  $[S] \gg [E_t]$ , a E está saturada com o S e a  $[ES] = [E_t]$  Nestas condições □ **Velocidade máxima de formação de P = Vmax**

Vmax está relacionado ao número de renovação da E (*turnover number* =  $k_3 = k_{cat}$ )

→ Número de moléculas de S transformadas em P, por uma molécula de E, na unidade de tempo, quando a E está saturada com S

→ Representa a eficiência catalítica da E Número de reações enzimáticas por unidade de tempo



$1/k_{cat} =$  tempo gasto pela E para realizar 1 ciclo catalítico

### Maximum turnover numbers of some enzymes

Enzyme	Turnover number (per second)
Carbonic anhydrase	600,000
3-Ketosteroid isomerase	280,000
Acetylcholinesterase	25,000
Penicillinase	2,000
Lactate dehydrogenase	1,000
Chymotrypsin	100
DNA polymerase I	15
Tryptophan synthetase	2
Lysozyme	0.5

## Significado do $k_{cat}/K_M$ : A Eficiência Catalítica

Em condições fisiológicas as Enzimas não estão saturadas com o S  $\rightarrow [S]/K_M = 0,01-10$

$$\text{Se } [S] \ll K_M \rightarrow V \propto [E][S]$$

$$[E] = [E_t]$$



$$V_0 = k_{cat} [E_t] \frac{[S]}{K_M + [S]} = \frac{k_{cat}}{K_M} [E_t][S]$$

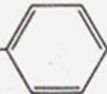
Então, a velocidade da reação depende de  $k_{cat}/K_M$ ,  $[S]$  e  $[E_t]$

$\rightarrow k_{cat}/K_M$  é a Constante de Velocidade nestas condições

$k_{cat}/K_M$

- É uma medida de eficiência da Enzima
- Permite comparar a preferência de uma Enzima para diferentes Substratos
  - Constante de especificidade

### Preferências de Substrato da Quimotripsina

Amino acid in ester	Amino acid side chain	$k_{cat}/K_M$ ( $s^{-1} M^{-1}$ )
Glycine	—H	$1.3 \times 10^{-1}$
Valine	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \text{—CH} \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$	2.0
Norvaline	—CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	$3.6 \times 10^2$
Norleucine	—CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	$3.0 \times 10^3$
Phenylalanine	—CH <sub>2</sub> — 	$1.0 \times 10^5$

## **As enzimas podem ser Inibidas**

**Moléculas específicas podem interagir com a enzima inibindo-a**

### **Inibidores Irreversíveis**

**→ Dissociação muito lenta do Inibidor da Enzima**

- ligação covalente ou não covalente estável ou destroem grupo funcional da enzima**
- Podem “marcar” os aminoácidos catalíticos**

**□ Ferramenta útil para estudar mecanismo de reação.**

**1) Reagentes específicos □ reagem com o sítio ativo**

**2) Análogos do estado de transição**

**3) Inibidores suicidas ou com base no mecanismo**



# As enzimas podem ser Inibidas

## Inibidores Reversíveis

□ Dissociação rápida do Inibidor da Enzima

- Ligam-se à Enzima por múltiplas ligações não-covalentes

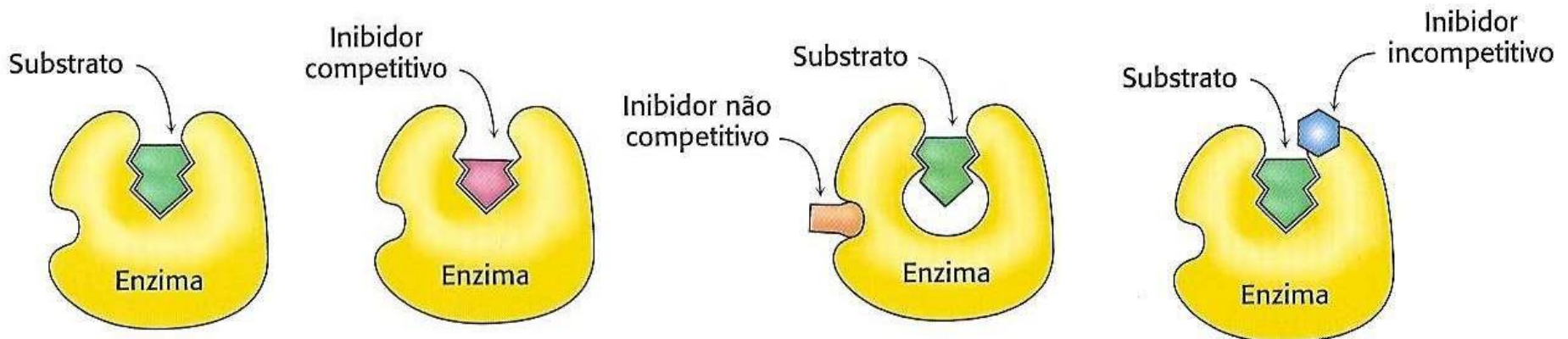
- **Importante mecanismo de regulação da atividade de Enzimas Alostéricas** Inibidores competitivos:

São similares aos substratos

Interagem no sítio ativo □ sem formação do complexo ESI Inibidores não-competitivos: São diferentes aos substratos

Interagem numa região diferente do sítio ativo □ com a formação do complexo ESI Inibidores Incompetitivos □ Interage somente com o complexo ES

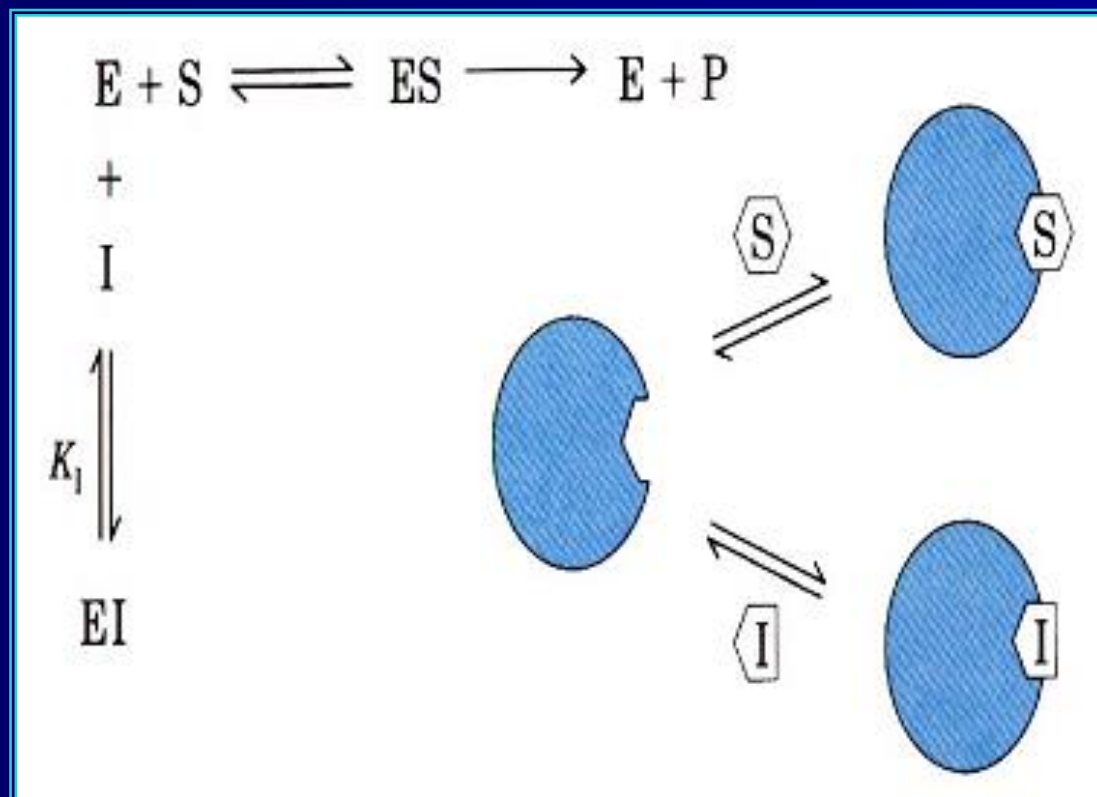
Inibidores mistos □ Interage tanto com o complexo ES como com a E



# *Inibidores Competitivos*

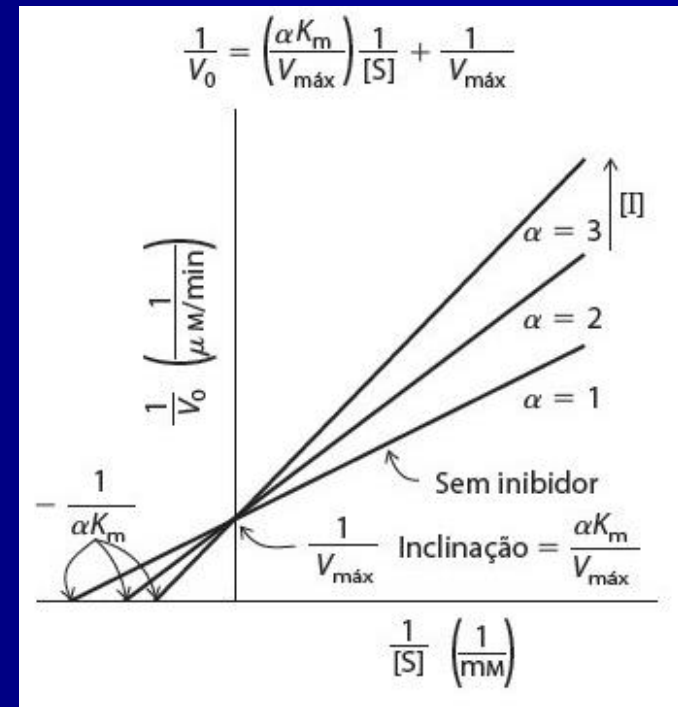
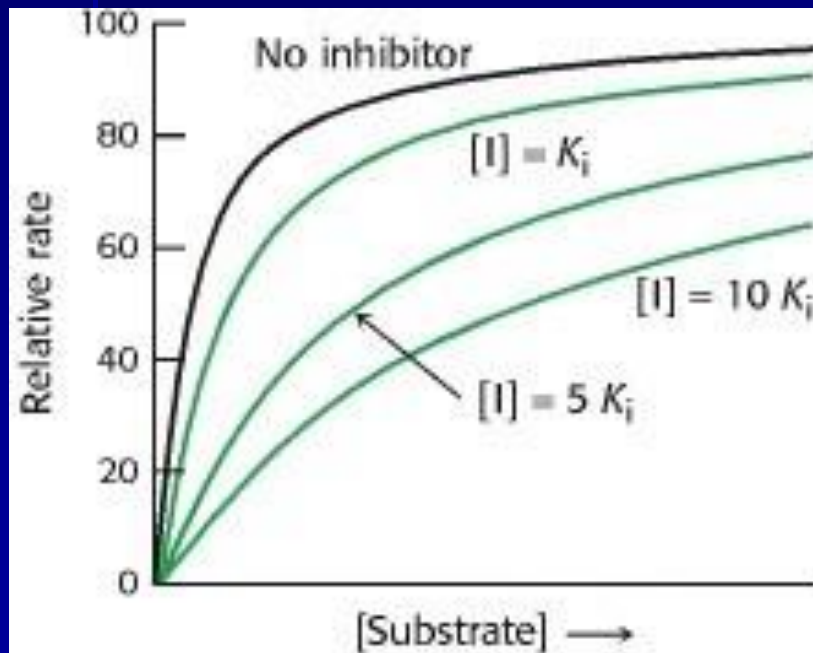
Reduzem a  $V$  da Reação por reduzir a proporção de E ligadas ao S

- Modificam a  $K_M$  por um fator  $\alpha$
- Não Modificam a  $V_{max}$
- Competem com o S pelo sítio ativo da E
- Pode ser deslocado pelo aumento da [S]



# Inibidores Competitivos

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

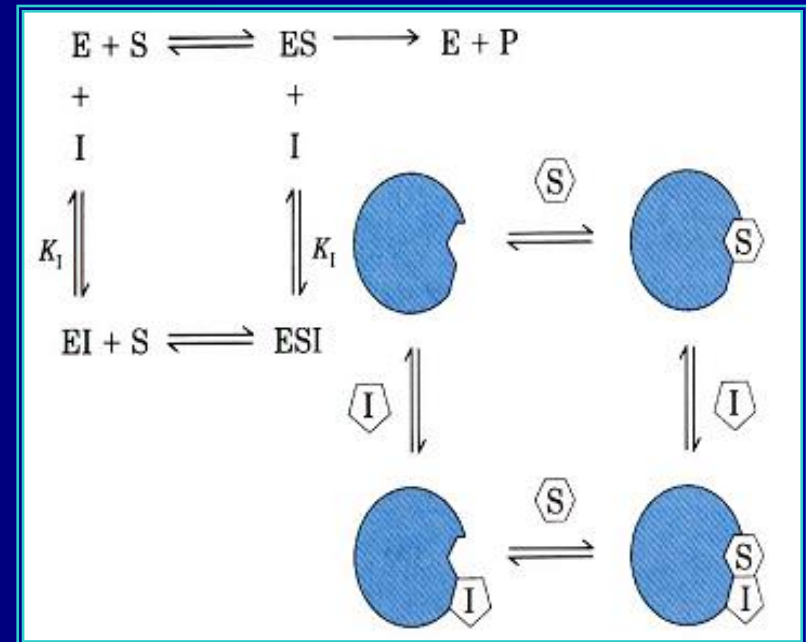


# Inibidores Não-Competitivos

↪ Ocupa outro sítio →  
**ES, EI e EIS;**

↪  $[S] \uparrow =$  não leva  
todas as **E** →  
produtiva;

↪  $V_{m\acute{a}x} \downarrow$  e  $K_m$  normal.

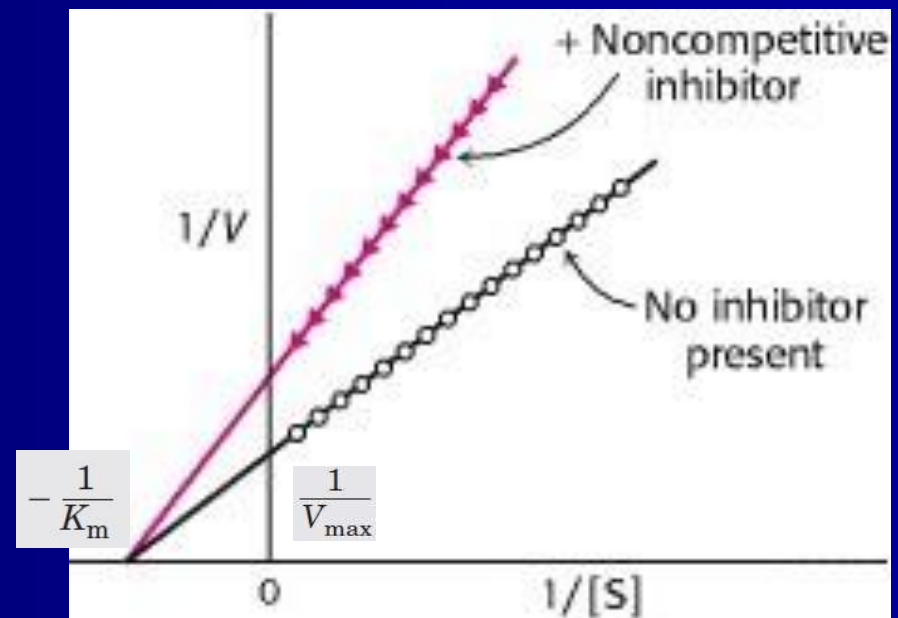
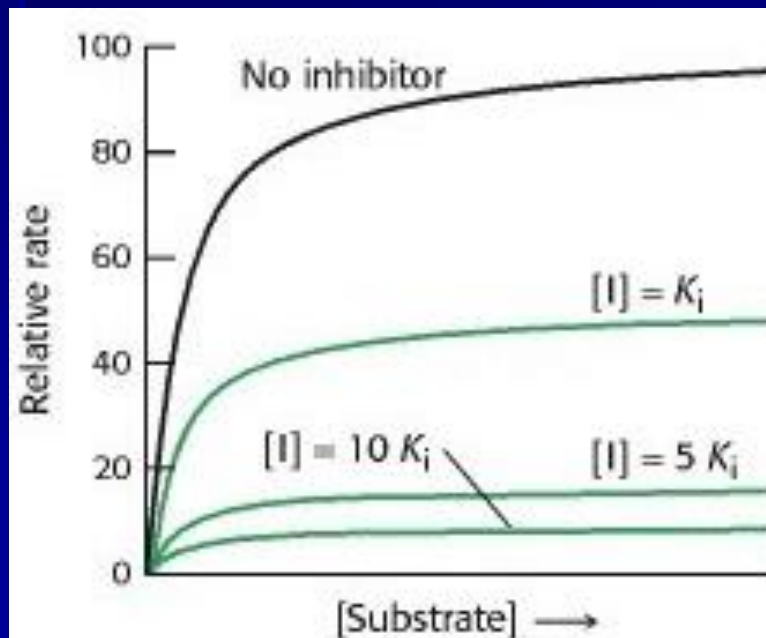


# Inibidores Não-Competitivos

Inibidor liga num sítio distinto do Sítio ativo tanto na E como no complexo ES pré-formado

- Não Modificam a  $K_M$
- Modificam a  $V$  por fator de  $\alpha$
- Reduzem o número de renovação da E
- Não pode ser deslocado pelo aumento da  $[S]$

$$V_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_M \alpha + [S] \alpha'}$$



# Inibidores mistos

Inibidor liga num sítio distinto do Sítio ativo tanto na E como no complexo ES pré-formado

□ Modificam ambos  $K_M$  e a  $V_{\max}$  por fator dependente de  $\alpha$  e  $\alpha'$

- Reduzem o número de renovação da E
- Não pode ser deslocado pelo aumento da [S]

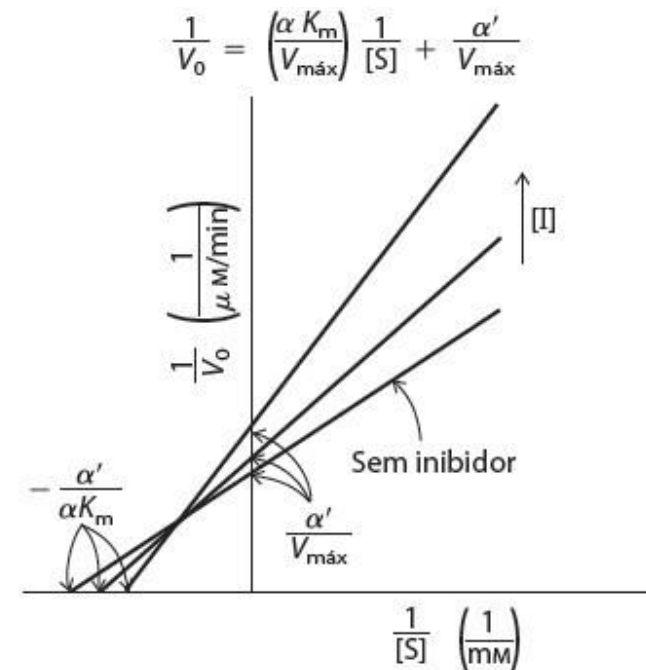
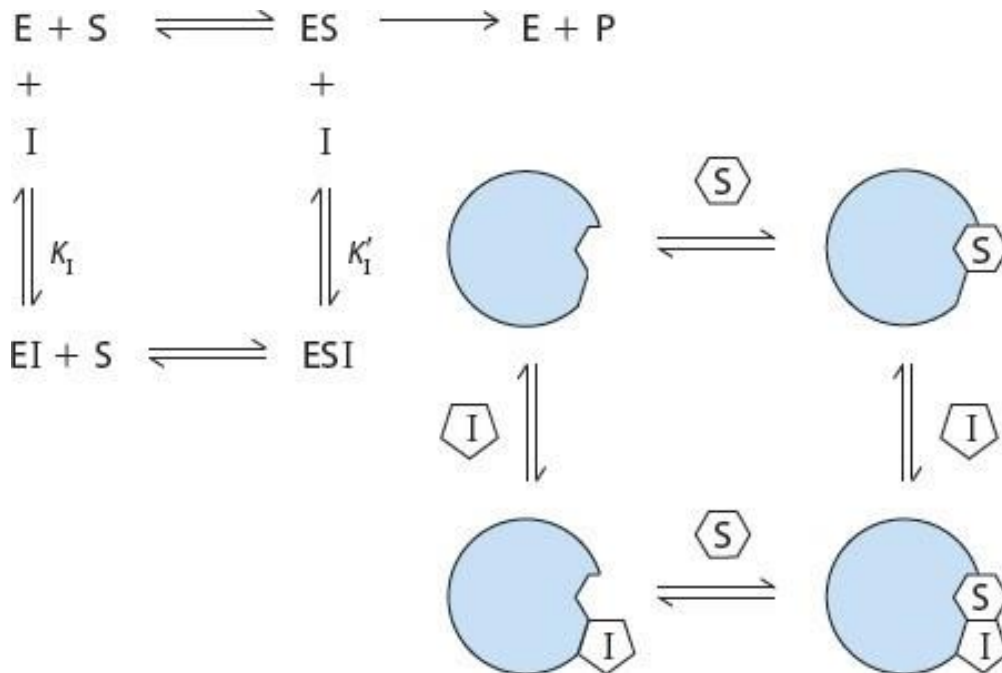
$$V_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_M \alpha + [S] \alpha'}$$

$$\alpha = \frac{1 + [I]}{K'_i}$$

$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

$$\alpha' = \frac{1 + [I]}{K'_i}$$

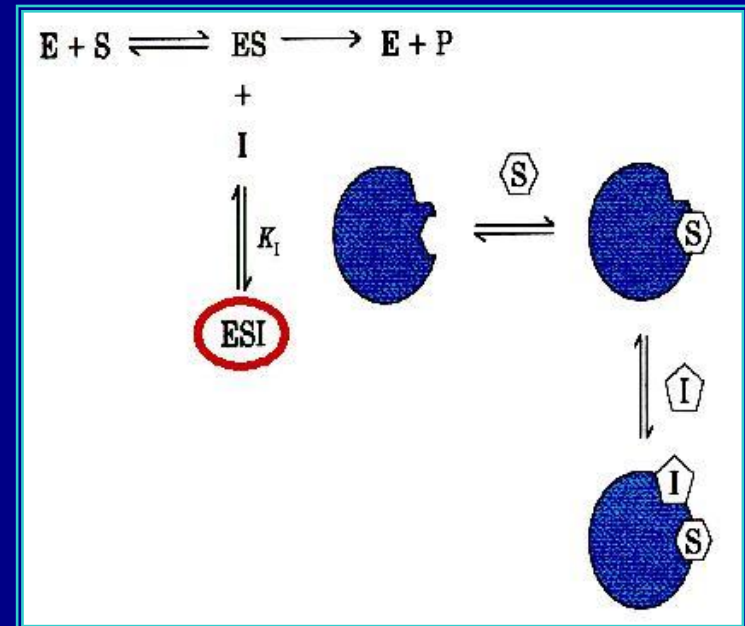
$$K'_i = \frac{[ES][I]}{[ESI]}$$



# *Inibidores Incompetitivos*

**Inibidor liga somente no Complexo ES pré-formado**

- **Modificam a  $K_M$  e a  $V_{max}$  por  $\alpha'$**
- **Reduzem o número de renovação da **E****
- **Não pode ser deslocado pelo aumento da  $[S]$**

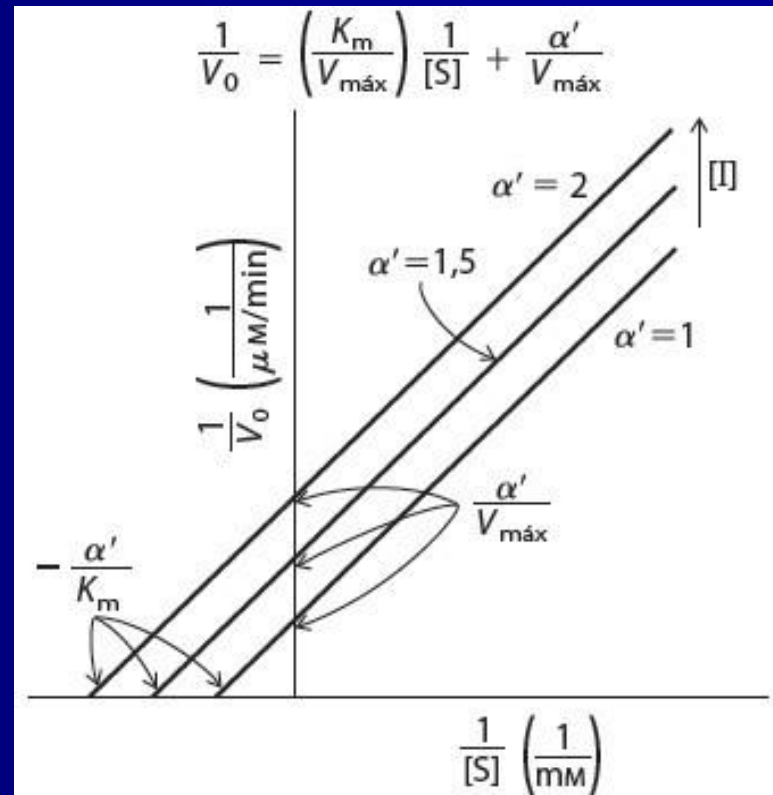
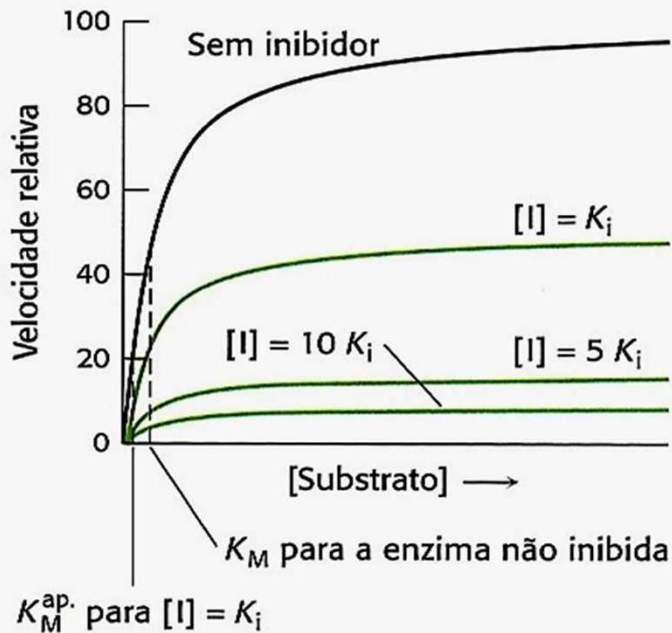
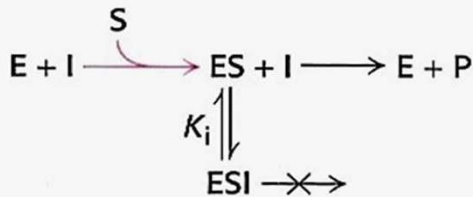


# Inibidores Incompetitivos

$$V_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + [S] \cdot \alpha'}$$

Em alta [S]

$$V_0 = \frac{V_{\max}}{\alpha'}$$



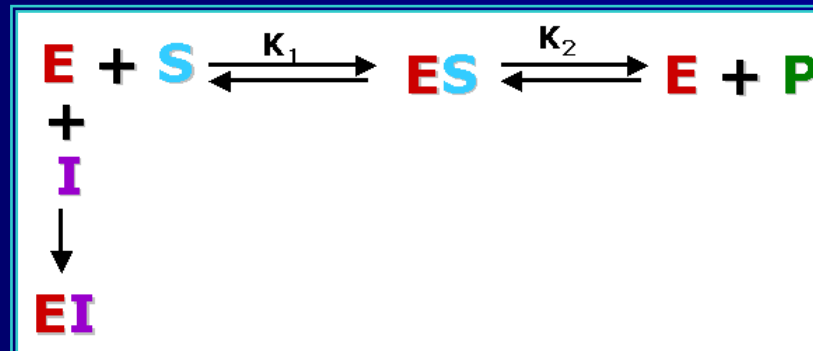


# *Inibidores Irreversíveis*

↪ Combinam-se com um grupo funcional → destruição;

↪ União covalente → inibidor e enzima.

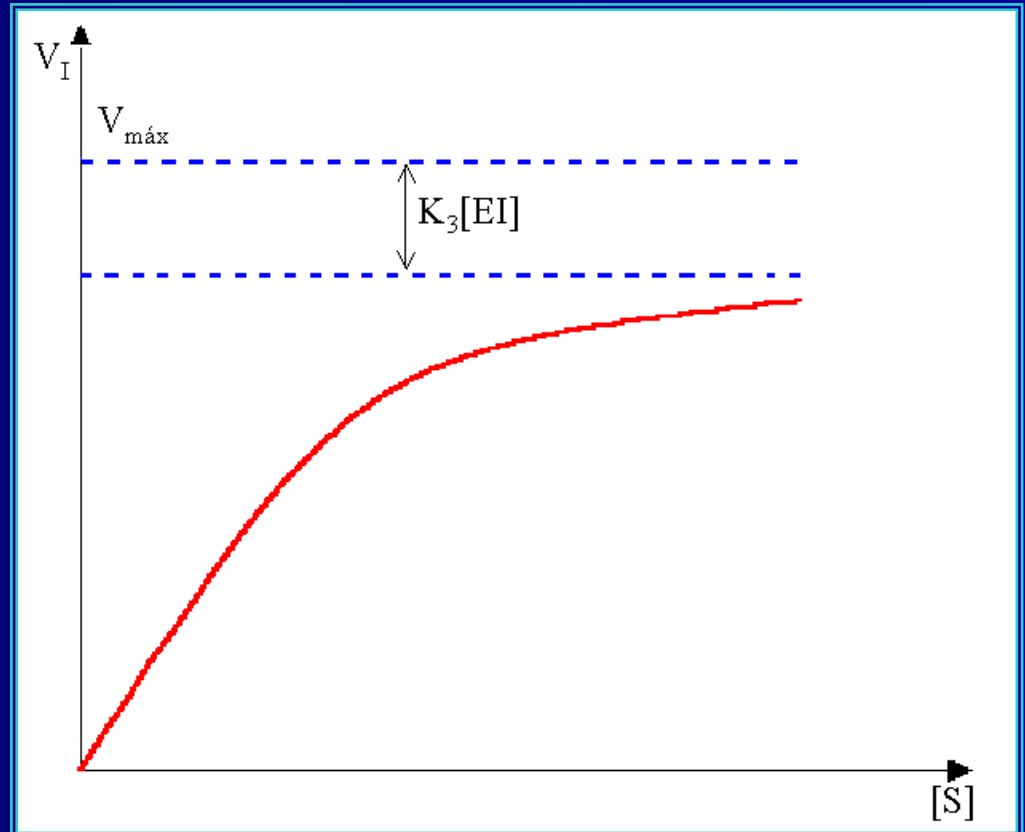
↪  $V_{m\acute{a}x} \downarrow$  e  $K_m =$



# *Inibidores Irreversíveis*

↪ Equação de Michaelis e Menten:

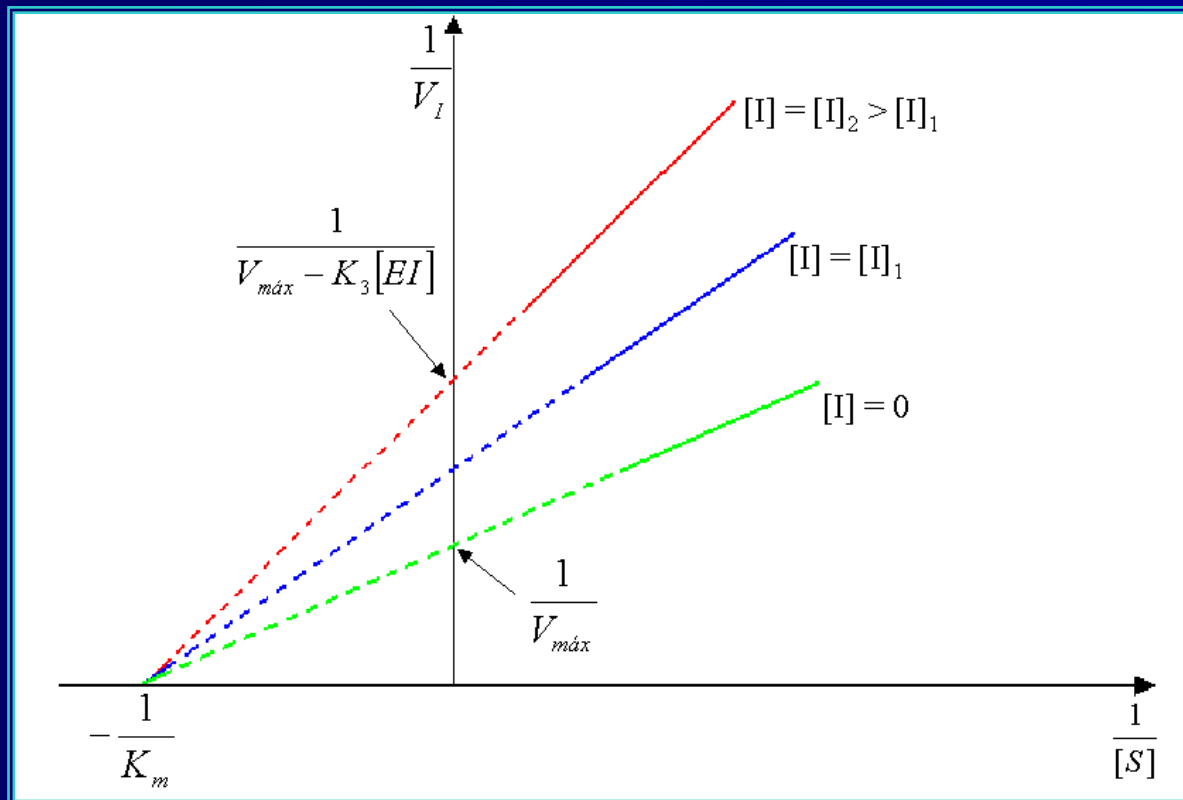
$$V_I = (V_{m\acute{a}x} - k_3 \cdot [EI]) \frac{[S]}{K_m + [S]}$$



# Inibidores Irreversíveis

↪ Lineweaver-Burk:

$$\frac{1}{V_I} = \frac{1}{V_{m\acute{a}x} - K_3[EI]} + \frac{K_m}{V_{m\acute{a}x} - K_3[EI]} \cdot \frac{1}{[S]}$$



# *Influência do pH*

- ↪ Valor de pH ótimo = atividade máxima;
- ↪ Velocidade da reação: ↓ pH afasta do ótimo;
- ↪ Influência do pH: análise dos grupos dissociáveis;
- ↪ Ácidos (Brønsted): compostos capazes de dissociar-se, liberando  $H^+$ .

# Influência do pH

⇒ Aminoácidos:



⇒ pH ↓ →  $-COO^-$  captam prótons =  $-COOH$ ;

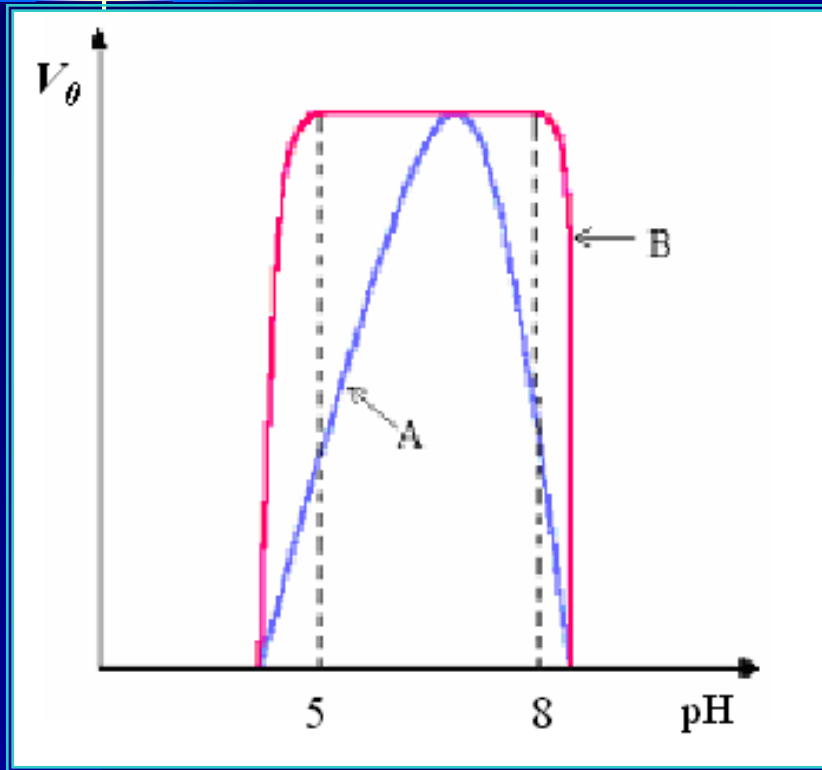
⇒ pH ↑ →  $-NH_3^+$  são dissociados =  $NH_2$ ;

⇒ Ligação eletrostática =  $-COO^- \cdots NH_3^+$ .

# *Influência do pH*

- ↪ pH ótimo depende do número e tipo de grupos ionizáveis  $\Rightarrow$  estrutura primária;
- ↪ Variações do pH  $\Rightarrow$  afeta substrato com grupos ionizáveis;
- ↪ Estabilidade da enzima: temperatura, força iônica, concentração de substratos ou cofatores da enzima e concentração da enzima, entre outros.

# *Influência do pH*



↪ pH 5 e 8 = não afeta a atividade;

↪ Declínio entre pH 6,8-8 e 6,8-5 = forma iônica não adequada;

↪  $5 > \text{pH} > 8$  = inativação irreversível.

# *Influência da Temperatura*

↪  $\uparrow T \rightarrow \uparrow$  velocidade de reação =  $\uparrow$  energia cinética;

↪  $T$  muito elevadas = desnaturação da enzima

- Rompidas as pontes de hidrogênio  $\rightarrow$  alterações estruturas = nova conformação;
- $T$  desnaturação  $\rightarrow$  pouco acima da  $T$  ótima.



# *Influência da Temperatura*

- ↳ Enzimas ↓ PM  $\Rightarrow$  1 cadeia polipeptídica e pontes dissulfeto = estáveis ao calor;
- ↳ Efeito da  $T$  = pH, força iônica e a presença ou ausência de ligantes;
- ↳ Substratos protegem a enzima da desnaturação.

# *Regulação da Atividade*

- ↪ Sistema enzimático: produto da reação da 1ª enzima → substrato da enzima subsequente;
- ↪ Enzimas reguladoras → determina a velocidade da seqüência;
  - Atividade catalítica ↑ ou ↓ → sinais;
- ↪ Moléculas sinalizadoras → pequenos metabólitos ou cofatores.

# *Enzimas Alostéricas*

- ↳ Ligação não-covalente e reversível  $\Rightarrow$  modulador;
- ↳ Inibição por retroalimentação
  - Enzima reguladora  $\Rightarrow$  inibida pelo *P* final da via  $\Rightarrow$  reequilibra as necessidades celulares;
- ↳ Moduladores: inibidores ou estimuladores.

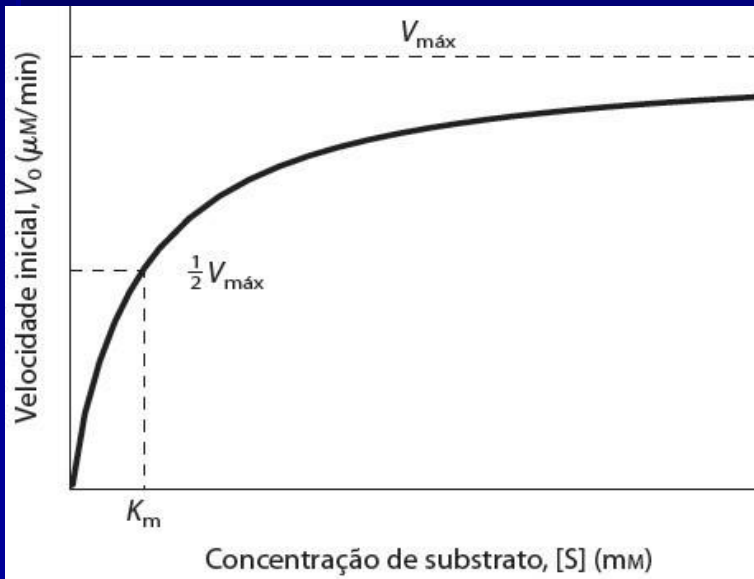
# *Enzimas Alostéricas*

- ↪ Modulador = substrato → homotrópicas;
- ↪ Modulador  $\neq$  substrato → heterotrópicas;
- ↪ Sítio alostérico → específico para o modulador;
- ↪ Curva de saturação sigmóide → subunidades múltiplas.

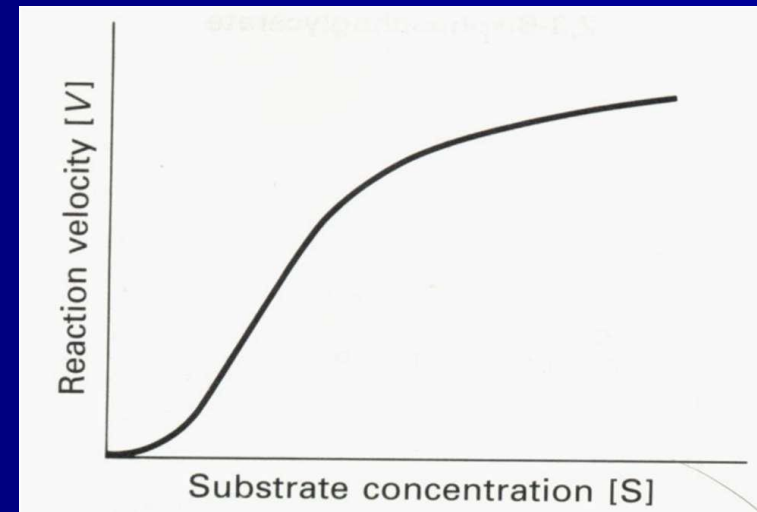
# *Enzimas Alostéricas*

↪ ≠ curvas de variação de atividade →  
moduladores inibidores, ativadores ou os  
dois tipos.

*Michaelis –Menten*



*Enzima alostérica*

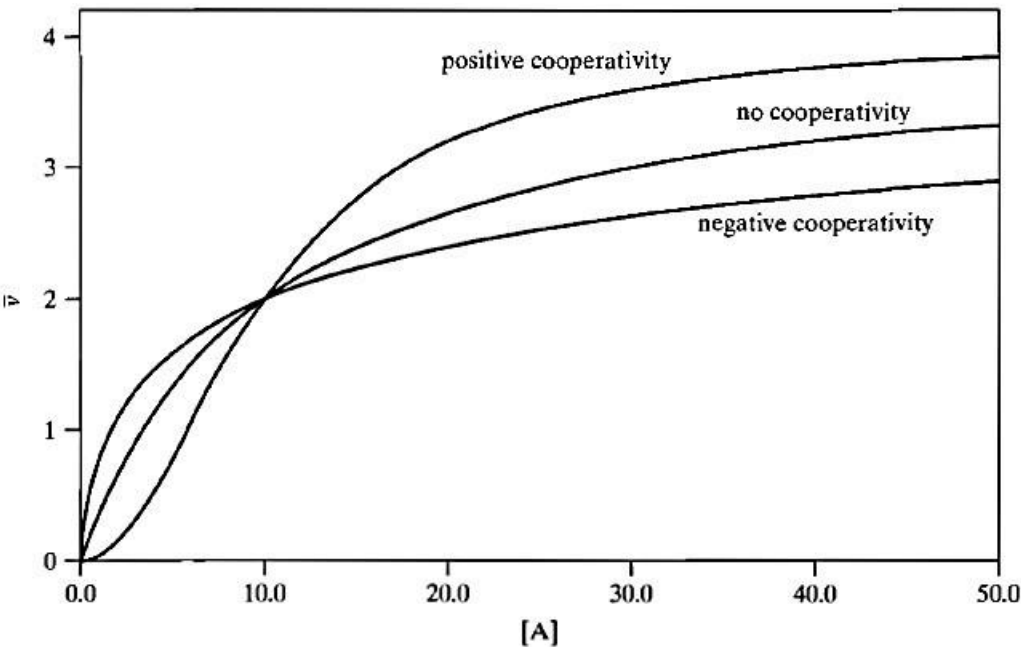


# Enzimas Alostéricas

O grau de cooperatividade pode ser avaliada pelo

Coefficiente de Hill =  $n_H$

- $n_H = 1$  □ interação não cooperativa
- $n_H > 1$  □ cooperatividade positiva
- $n_H < 1$  □ cooperatividade negativa



Relação entre o coeficiente de Hill e o efeito da concentração do substrato sobre a velocidade da reação de enzimas alostéricas

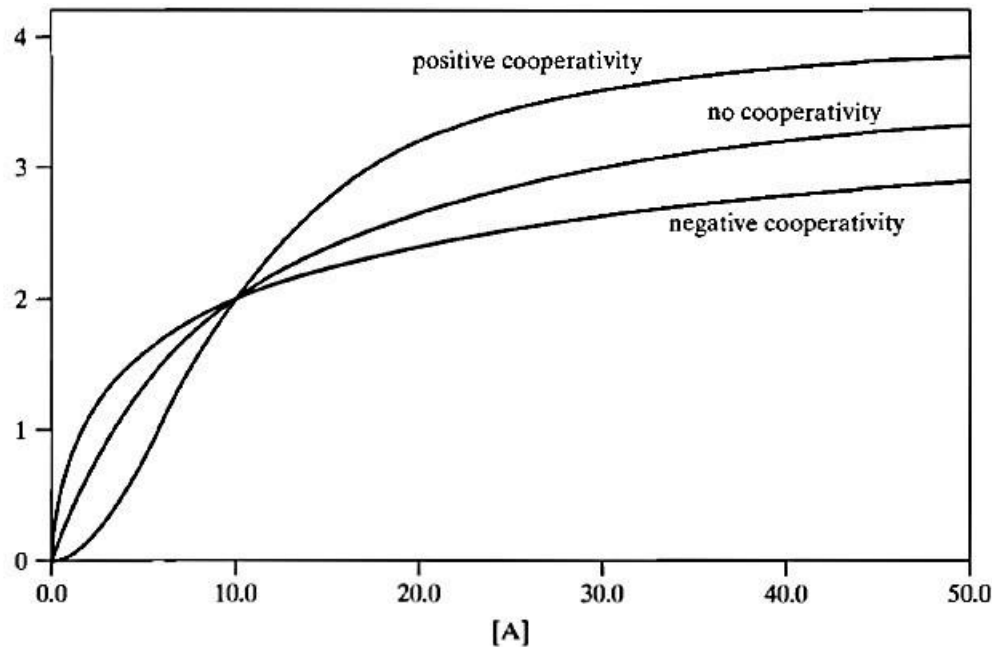
Coefficiente de Hill ( $n_H$ )	Mudança requerida na $[S]$ para aumentar a $V_0$ de 10% para 99% da $V_{máx}$
0,5	× 6.600
1,0	× 81
2,0	× 9
3,0	× 4,3
4,0	× 3

# Enzimas Alostéricas

O grau de cooperatividade pode ser avaliada pelo

Coefficiente de Hill =  $n_H$

- $n_H = 1$  □ interação não cooperativa
- $n_H > 1$  □ cooperatividade positiva
- $n_H < 1$  □ cooperatividade negativa

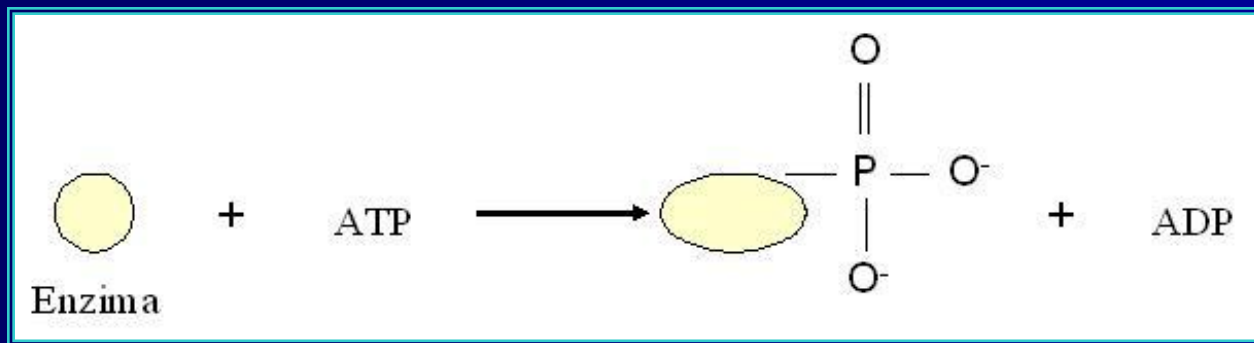


Relação entre o coeficiente de Hill e o efeito da concentração do substrato sobre a velocidade da reação de enzimas alostéricas

Coefficiente de Hill ( $n_H$ )	Mudança requerida na $[S]$ para aumentar a $V_0$ de 10% para 99% da $V_{\max}$
0,5	× 6.600
1,0	× 81
2,0	× 9
3,0	× 4,3
4,0	× 3

# Modificação Covalente

↳ Ligação covalente de um grupo químico à sua estrutura;



↳ Metabolismo alterado → aciona vias inativas e inibem vias ativas.