

Bioquímica Experimental

Licenciatura e Bacharelado em Química

CINÉTICA ENZIMÁTICA

Material de Apoio Discussão Enzimas

2023

É a parte da Enzimologia que estuda os fatores que afetam a velocidade das reações catalisadas pelas enzimas.

- concentração de substrato**
- pH**
- temperatura**
- presença de inibidores ou ativadores**

[E], [S], [I], [P], [Ativadores], pH, temperatura

Atividade de Enzima: medida em unidades de enzima

Unidade de Enzima: quantidade de enzima que catalisa a transformação de $1\mu\text{mol}$ de S em P por minuto ($\mu\text{mol} / \text{min}$)

Atividade Específica: Unidades por miligrama de proteína (U /mg)

Requisitos para determinar a atividade enzimática

- características da reação catalisada
- método de dosagem

- reagente

- produto

- Contínuo

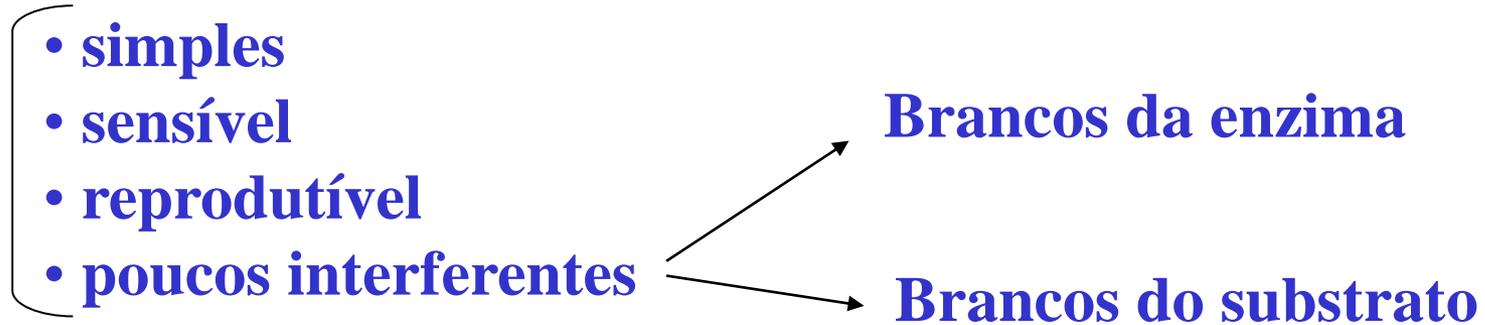
- Descontínuo



Inativar a enzima

- NaOH
- TCA
- Aquecimento
- Reagente específico

- método de dosagem

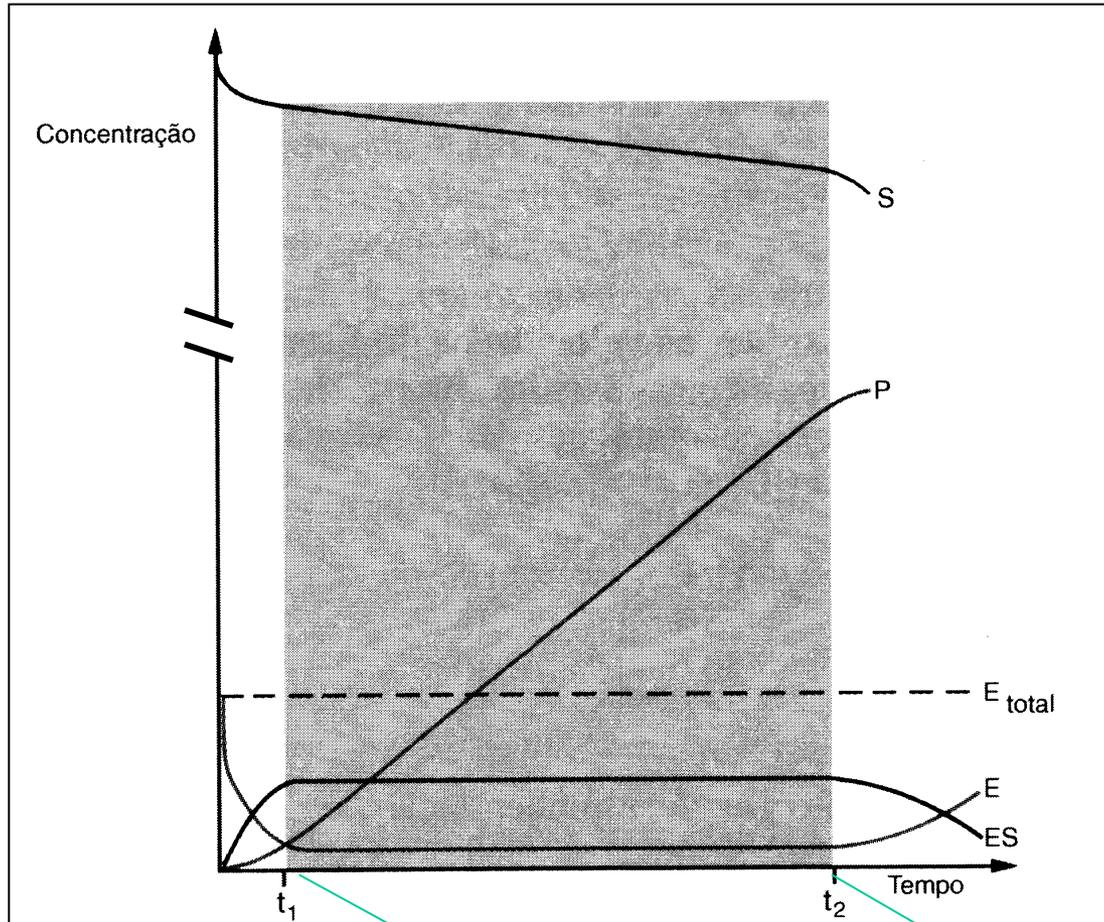


Unidade de atividade enzimática

Unidade de Enzima: quantidade de enzima que catalisa a transformação de $1\mu\text{mol}$ de S em P por minuto ($\mu\text{mol} / \text{min}$)

Atividade Específica: Unidades por miligrama de proteína (U / mg)

1925 – Briggs & Haldane: Estado Estacionário

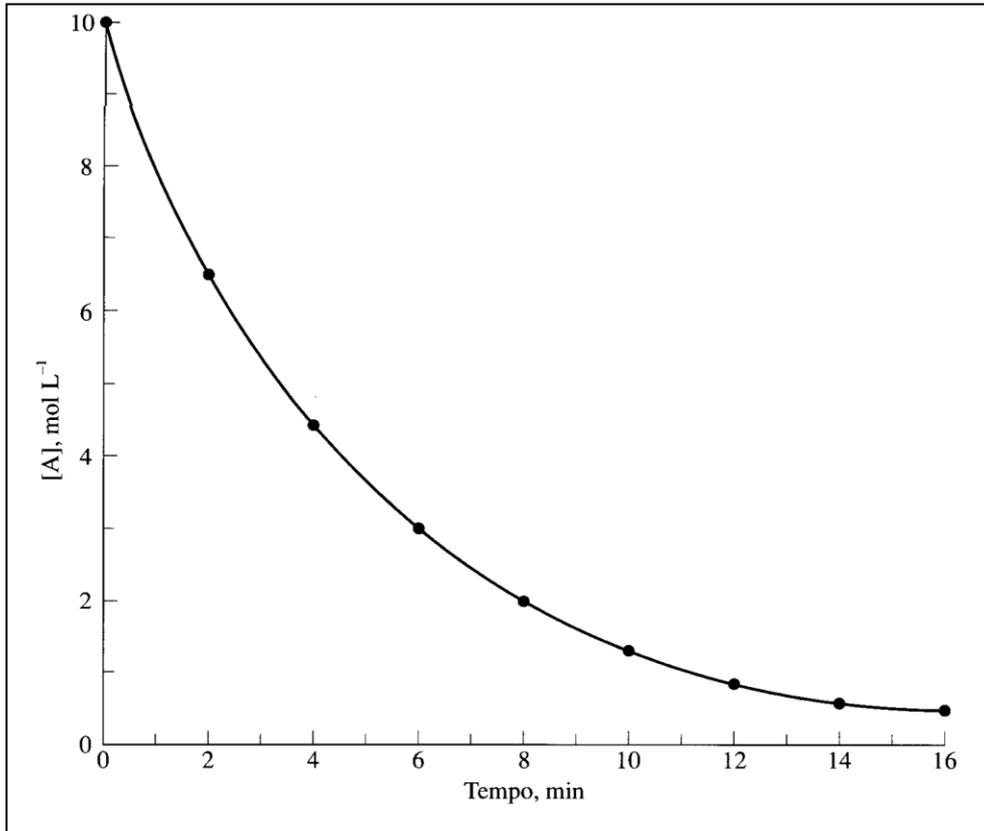


$$[S] \gg \gg [E]$$

$$[ES] \approx ctte$$

“Cinética do estado estacionário”

Efeito da concentração do substrato



- velocidade inicial (v_0)

Tempos curtos

$[E] \llll [S]$

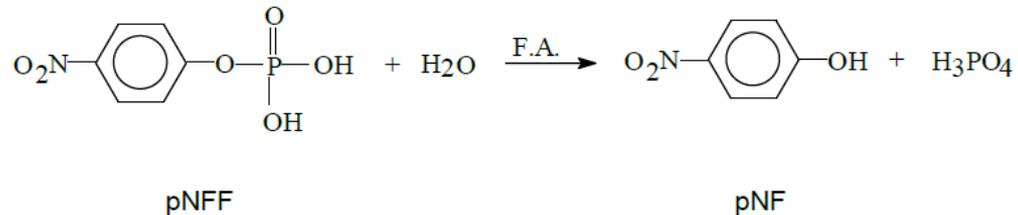


$[S]$ constante

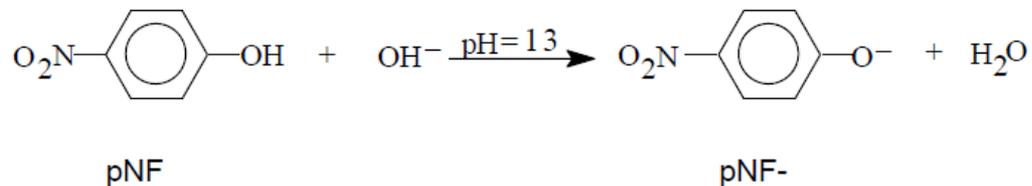
Mede-se consumo até 5% da $[S]$

Enzima: Fosfatase Ácida da Batata

Reação Catalisada



Método de detecção (dosagem)



Método Descontínuo

Interrupção da reação NaOH

Prática 4

Efeito da do tempo e concentração da enzima

Cinética Enzimática

Cálculo de Velocidade

Calcular a quantidade de p-nitrofenolato formado (em $\mu\text{moles/min}$) em cada tubo e fazer um gráfico destes valores em função da massa de enzima (ng) no tubo.

Ex: Abs
tubo 10ng

Calculo: $Abs = \epsilon \cdot c \cdot l \rightarrow c = \frac{Abs}{\epsilon \cdot l}$ Ex: $\frac{0,15}{17600 (\text{mol/L})^{-1} \cdot \text{cm}} = 2,84 \times 10^{-5} \text{ mol cm}^{-1}$

Pl/Tubo: $2,84 \times 10^{-5} \text{ mol/L} \times 1000 \text{ mL} \times 2 \text{ mL} = 5,68 \times 10^{-8} \text{ mol/tubo}$ / 70 min

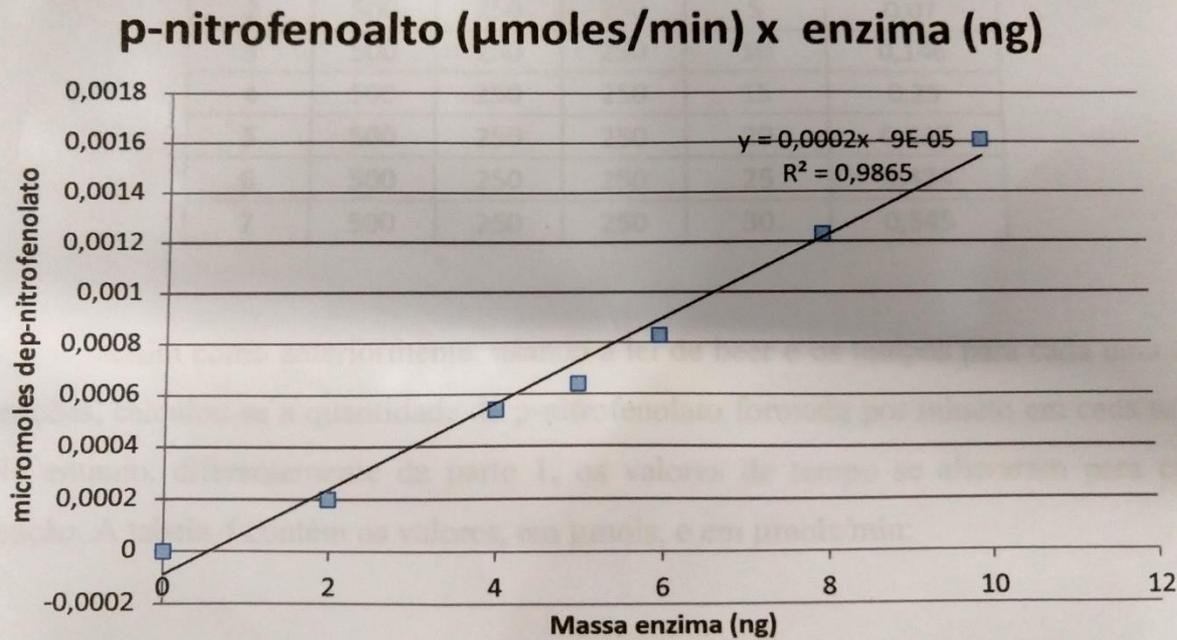
$\times \rightarrow 2 \text{ mL}$ Volume final da amostra

Vel: $1,89 \times 10^{-9} \text{ mol/min} \Rightarrow 1,89 \times 10^{-3} \text{ } \underline{\underline{\mu\text{mol/min}}}$

Cinética Enzimática

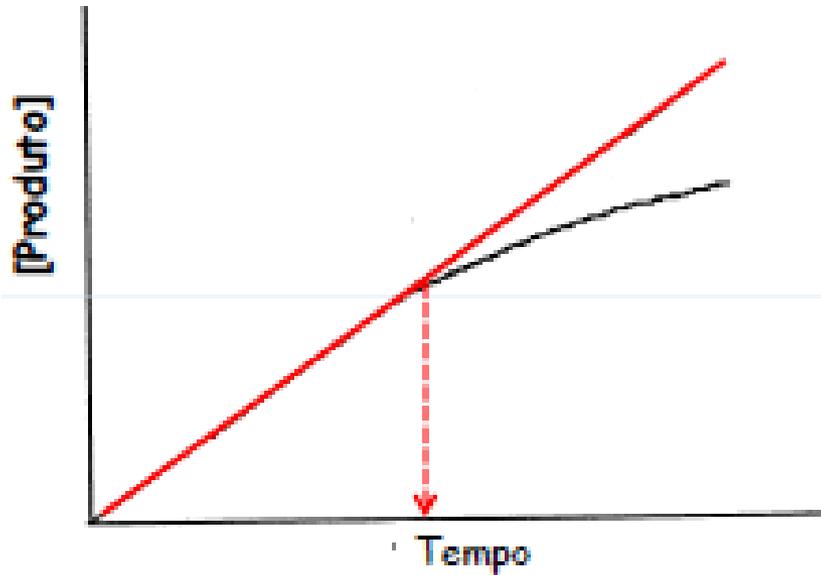
(feito na aula em anos anteriores)

Figura 1 – quantidade de p-nitrofenolato ($\mu\text{moles}/\text{min}$) x massa de enzima (ng)

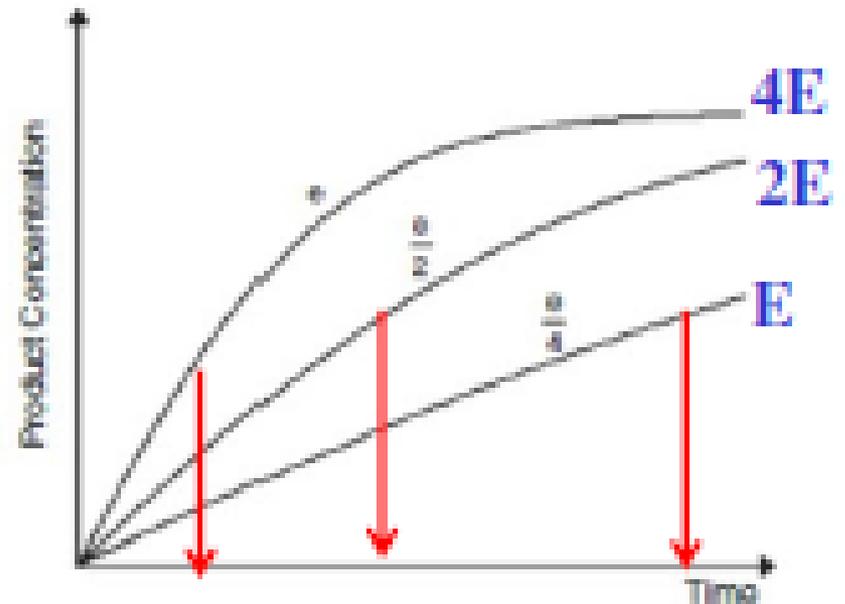


Efeito do Tempo na Velocidade

Curva de progressão da reação

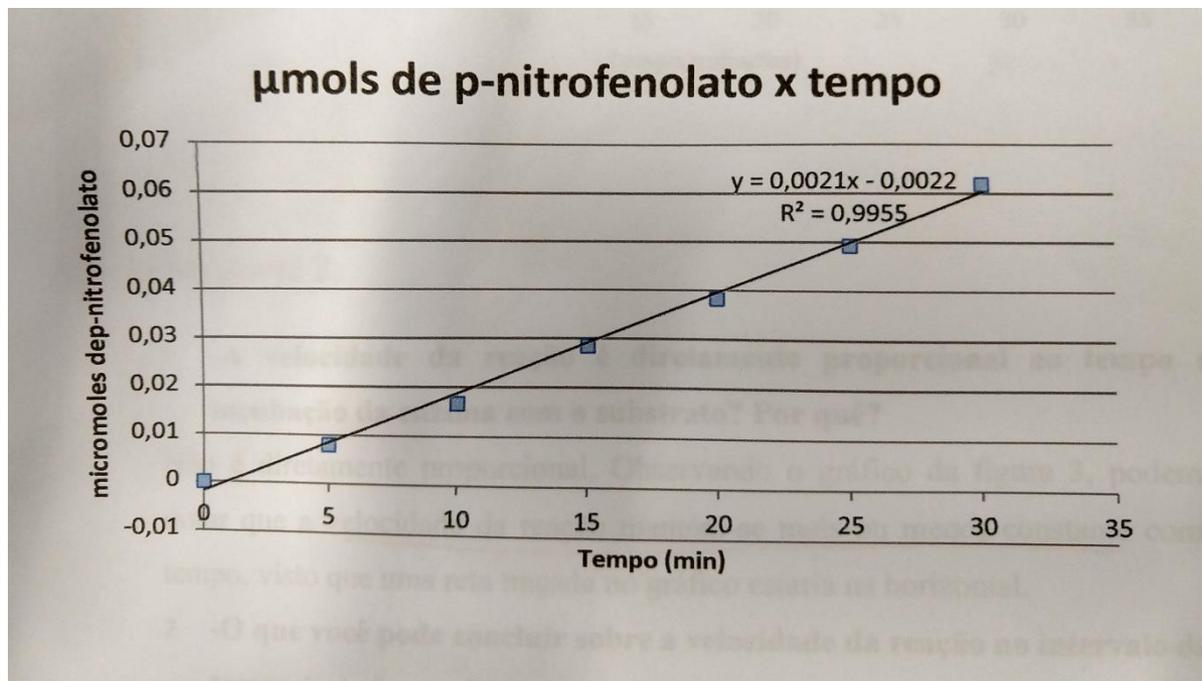


[E] e [S] fixas



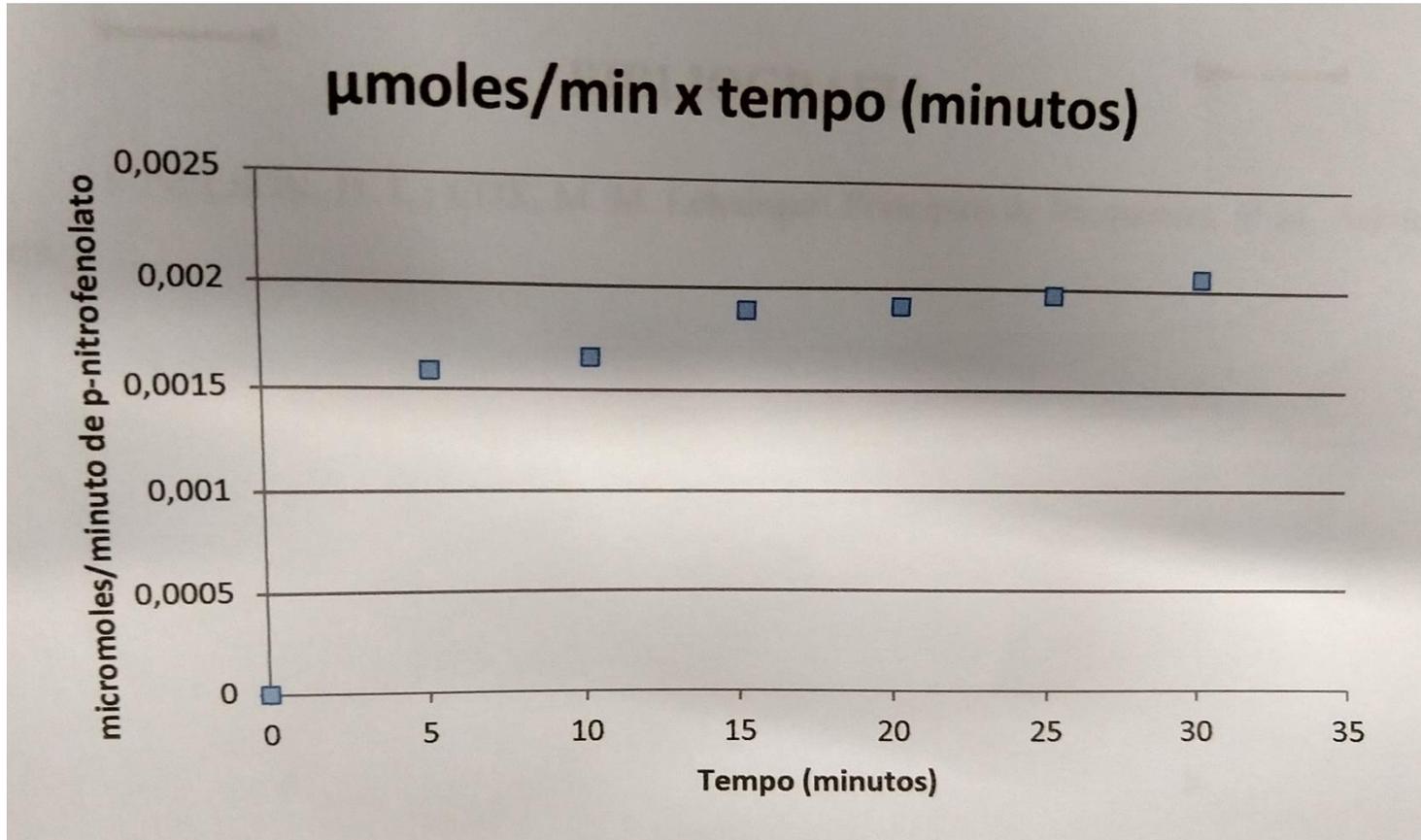
Cinética Enzimática

(feito na aula em anos anteriores)



Cinética Enzimática

(feito na aula em anos anteriores)



Verificação de Velocidade Inicial (V_0)

Cálculo de Consumo de Substrato

2. As velocidades de reação determinadas são realmente velocidades iniciais?

V_{INICIAL} = ATÉ 5% DO SUBSTRATO. 1 mL - 2 μ mols — 100%

$0,4 \times 10^{-6}$ mols — 5%

Se, no tubo, o consumo for menor:

É velocidade inicial

Cinética Enzimática

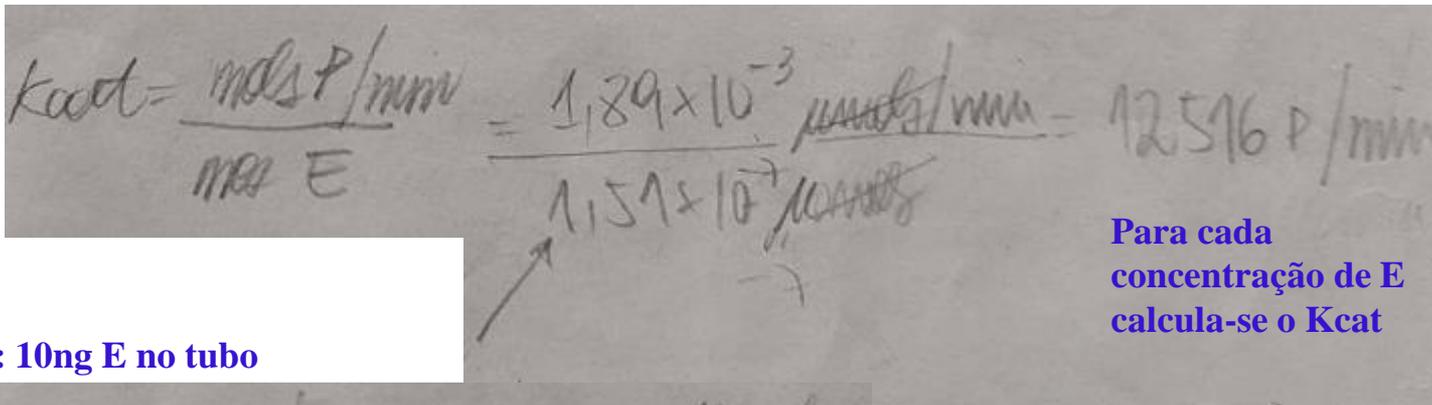
3. Sabendo que a massa molecular aparente da enzima é 66.000, determinar o “número de renovação” da enzima em relação ao pNFF.

Número de Renovação

Constante catalítica ou “turnover” (k_{cat})

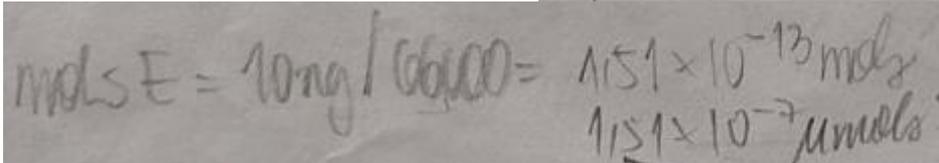
Nº de S (mols) convertido em P por uma molécula de enzima (mol) em uma unidade de tempo

$$k_{\text{cat}} = V_{\text{max}} / [E_t]$$



Handwritten calculation showing the determination of k_{cat} . The formula is $k_{\text{cat}} = \frac{\text{mols P/min}}{\text{mol E}}$. The calculation is $k_{\text{cat}} = \frac{1,89 \times 10^{-3} \text{ } \mu\text{mols/min}}{1,51 \times 10^{-7} \text{ } \mu\text{mols}} = 12516 \text{ P/min}$. An arrow points from the $1,51 \times 10^{-7} \text{ } \mu\text{mols}$ term to the text "Ex: 10ng E no tubo".

Para cada
concentração de E
calcula-se o Kcat



Handwritten calculation showing the conversion of 10ng of enzyme to moles: $\text{mols E} = 10\text{ng} / 66000 = 1,51 \times 10^{-13} \text{ mols} = 1,51 \times 10^{-7} \text{ } \mu\text{mols}$.

Constante Catalítica

Turnover Numbers (k_{cat}) of Some Enzymes

Enzyme	Substrate	k_{cat} (s^{-1})
Catalase	H_2O_2	40,000,000
Carbonic anhydrase	HCO_3^-	400,000
Acetylcholinesterase	Acetylcholine	140,000
β -Lactamase	Benzylpenicillin	2,000
Fumarase	Fumarate	800
RecA protein (an ATPase)	ATP	0.4

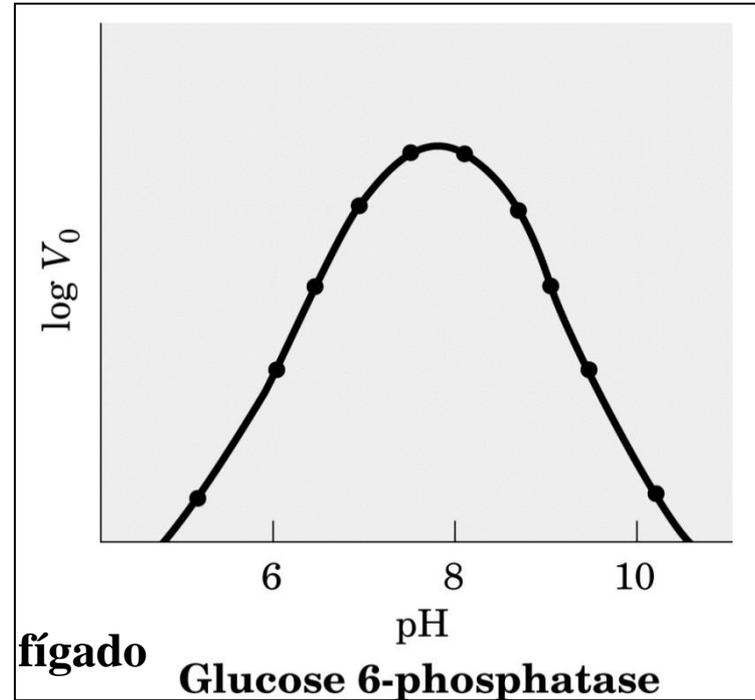
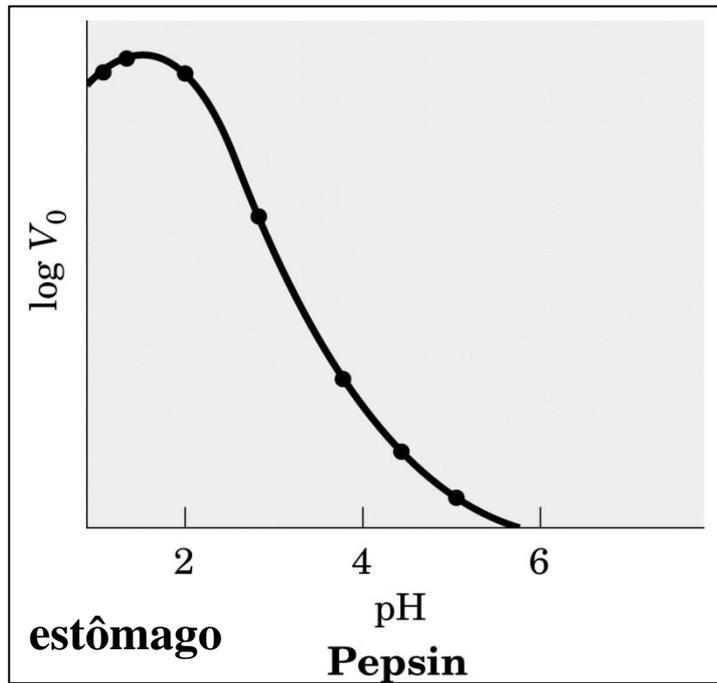
compara

- 2 enzimas
- 2 S da mesma enzima

Prática 5

Efeito do pH e concentração de Substrato sobre a atividade da enzima

Efeito do pH na atividade enzimática



- cadeias laterais de aa
- no Sítio ativo
- fora do sítio ativo
- mudança na carga do substrato

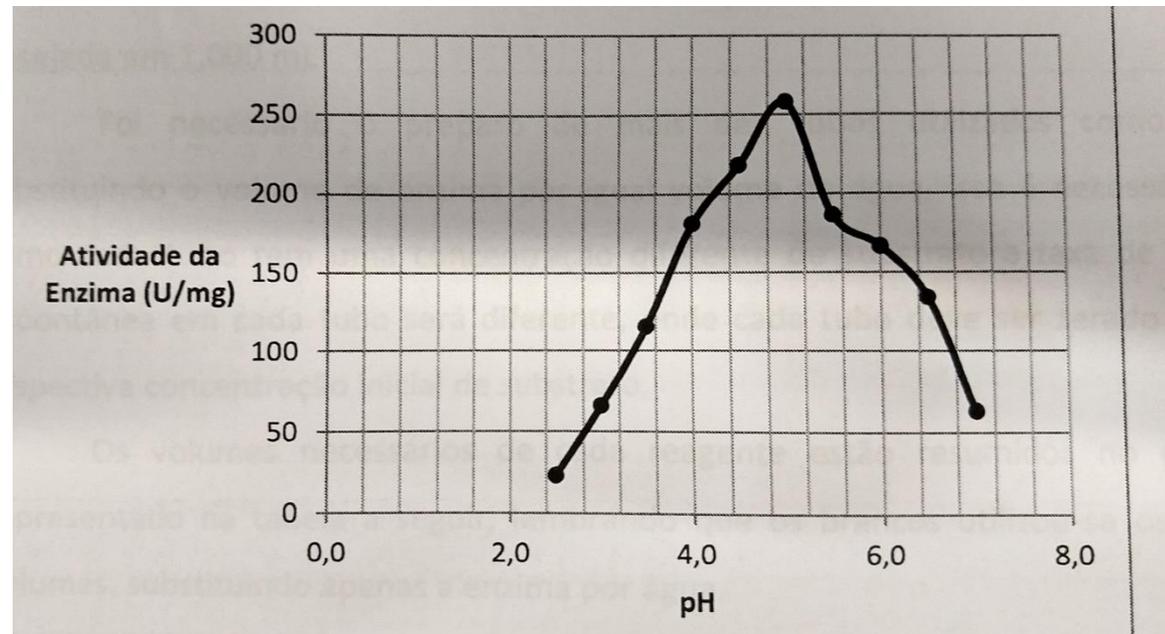
Efeito do ambiente químico sobre pKa dos grupos R

EFEITO DO PH SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA

- procedimento experimental

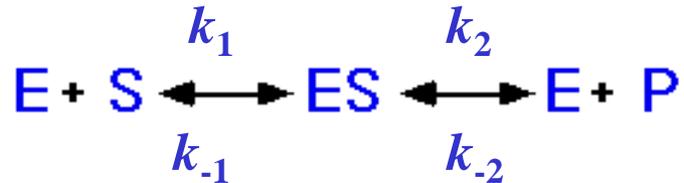
- brancos

(feito na aula em anos anteriores)



DETERMINAÇÃO DE K_m

Equação de Michaelis-Menten



Premissas:

1. Passo limitante da velocidade (quebra do ES)

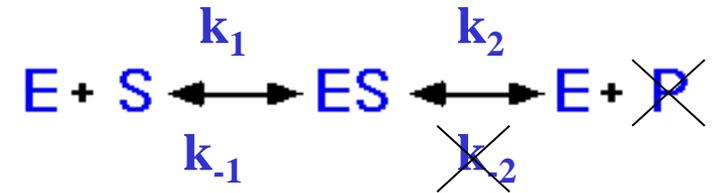
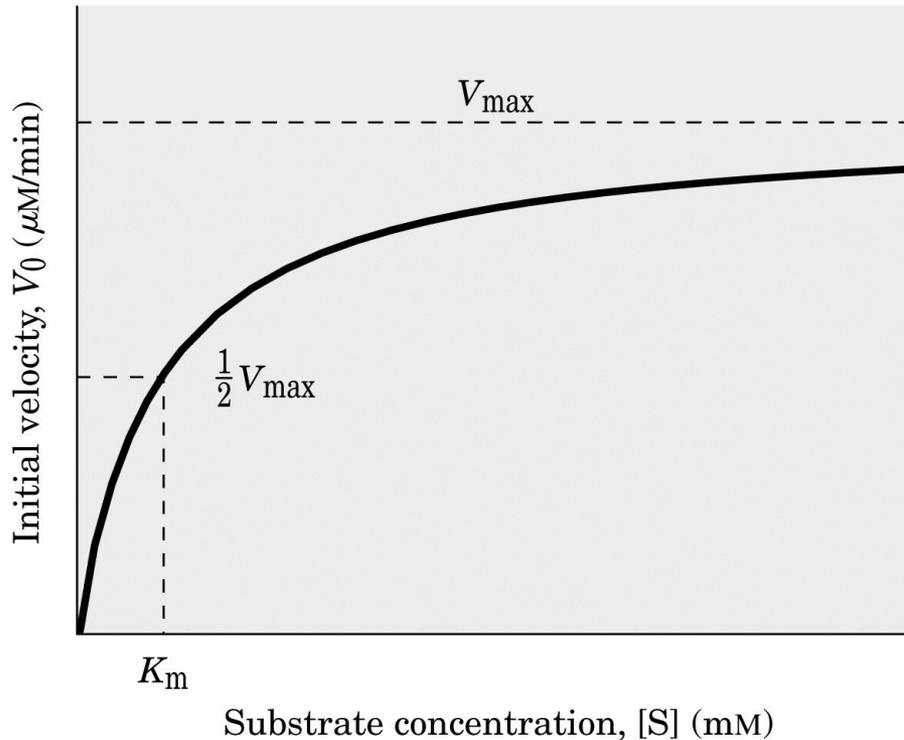
2. $[E]_T \ll [S]$, tempos curtos

3. $[ES] = \text{constante}$

Estado
estacionário

Cinética Enzimática

Efeito da [S] sobre V_0



Equação de Michaelis-Menten

$$v_0 = \frac{V_M [S]}{K_M + [S]}$$

$$v_0 = V_{\text{max}} / 2 \quad \longrightarrow \quad K_m = [S]$$

Cinética Enzimática

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

K_m indica uma medida de afinidade da E para S ($k_2 \ll k_{-1}$)

K_m for Some Enzymes and Substrates		
Enzyme	Substrate	K_m (mM)
Hexokinase (brain)	ATP	0.4
	D-Glucose	0.05
	D-Fructose	1.5



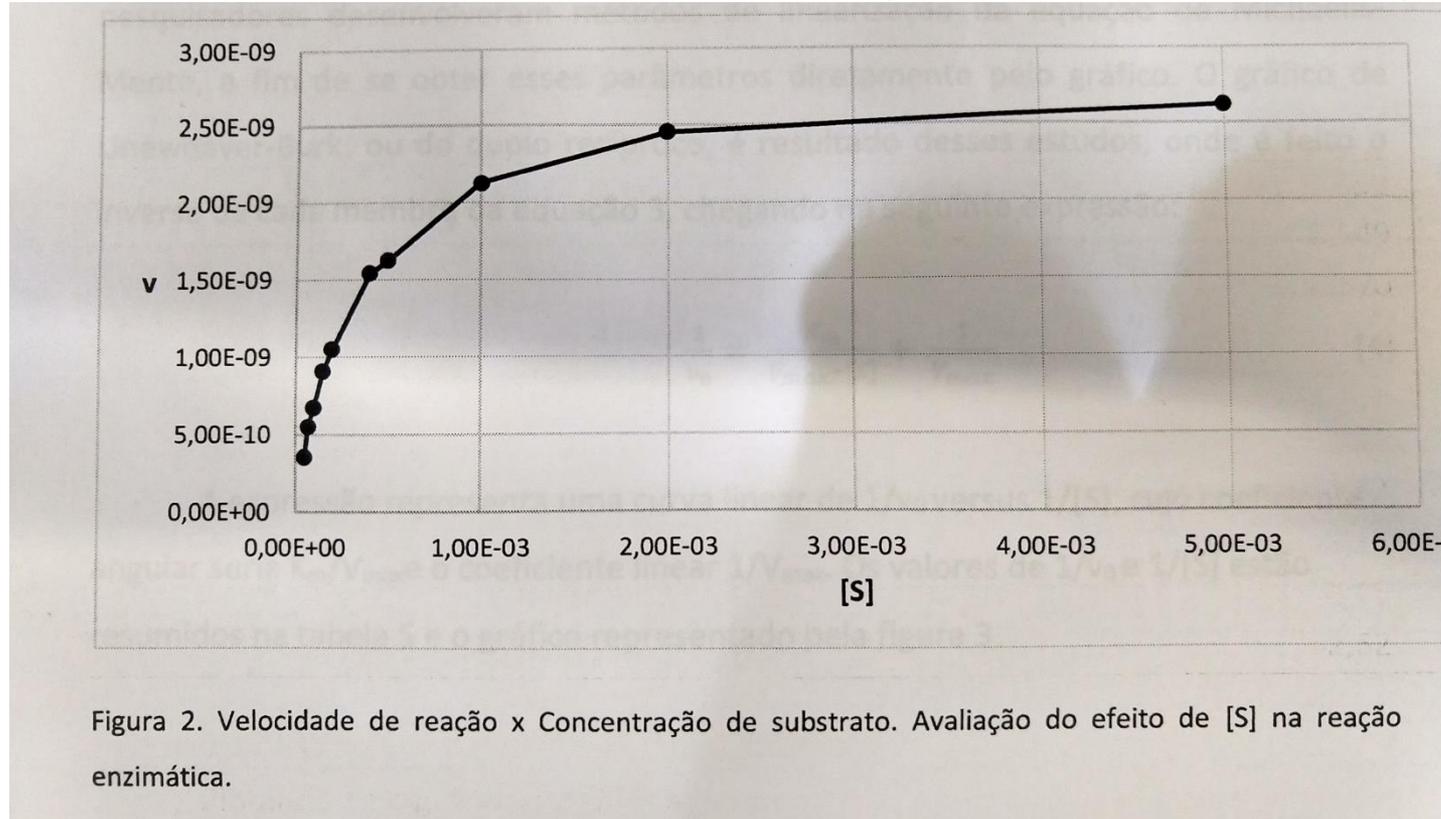
Porque determinar K_M ?

- ✓ Pelo valor do K_M pode-se comparar enzimas de diferentes fontes, tecidos, estágios de desenvolvimento, etc.
- ✓ Conhecendo-se o valor do K_M pode-se trabalhar em condições onde $[S] \gg K_M$ e com isso pode-se medir a atividade da enzima.
- ✓ O K_M dá uma ideia da preferência da enzima pelo substrato.
- ✓ A mudança do valor do K_M em função da presença de um ligante, fornece uma ideia de regulação da atividade da enzima.

Cinética Enzimática

- procedimento experimental
- tratamento dos dados

(feito na aula em anos anteriores)



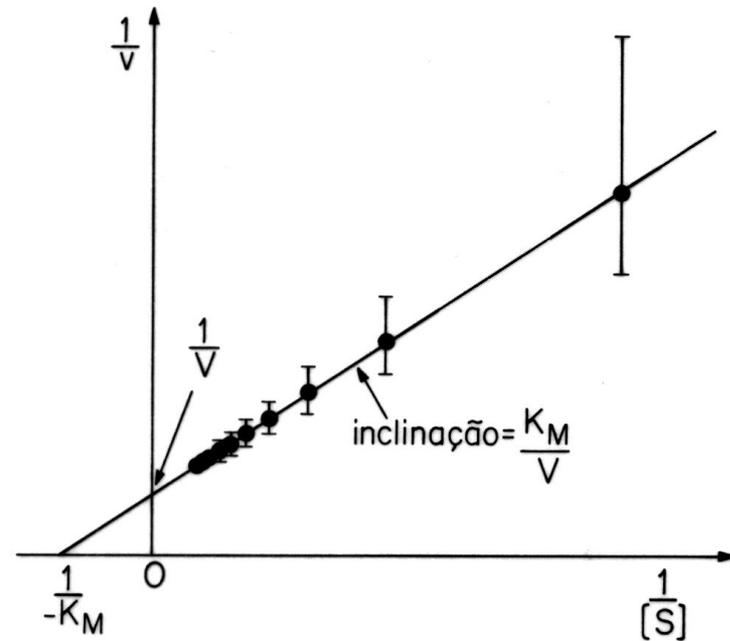
OBS: É difícil desenhar uma hipérbole retangular.

Duplo recíproco (inverso) ou Lineweaver-Burk

Transformações algébricas da equação de Michaelis-Menten

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M}{V_{\max} [S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

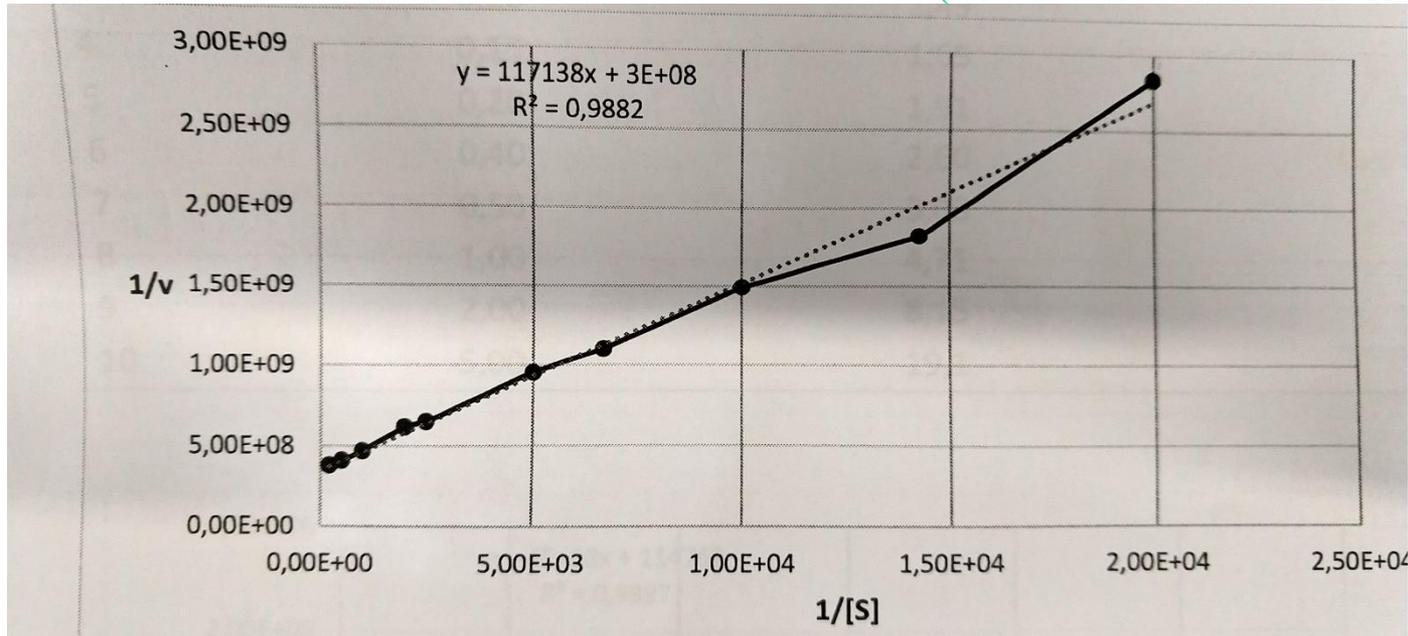
Fornece K_M e V_{\max}
mais precisos que
gráfico $V_0 \times [S]$



OBS: É a representação mais usada!

Duplo recíproco ou Lineweaver-Burk

(feito na aula em anos anteriores)



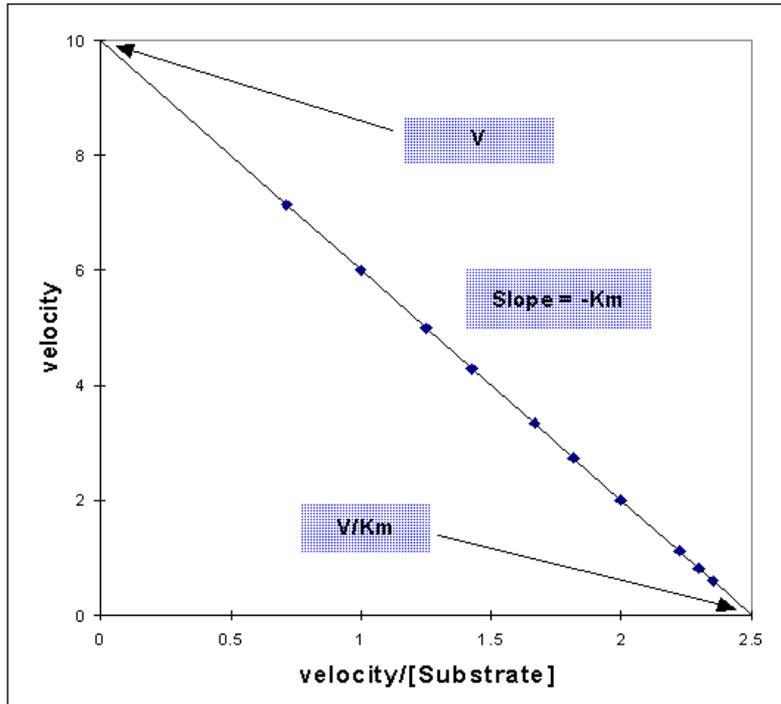
$$K_m = 0,39 \text{ mmol/L}$$

$$V_{max} = 0,0033 \text{ } \mu\text{mol/min}$$

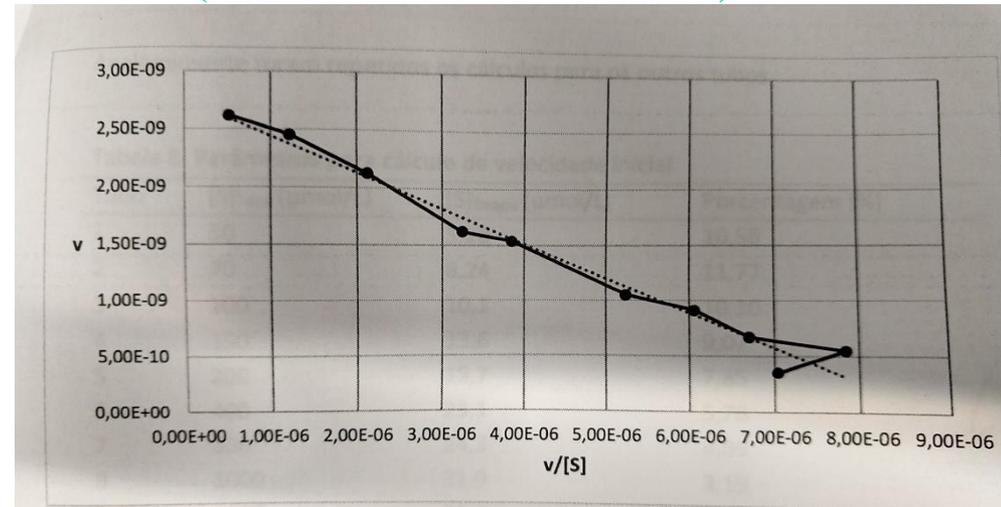
OBS: vantagem dessa representação é que as variáveis $1/v$ e $1/[S]$ estão em eixos diferentes

Cinética Enzimática

Representação de Edie-Hofstee



(feito na aula em anos anteriores)



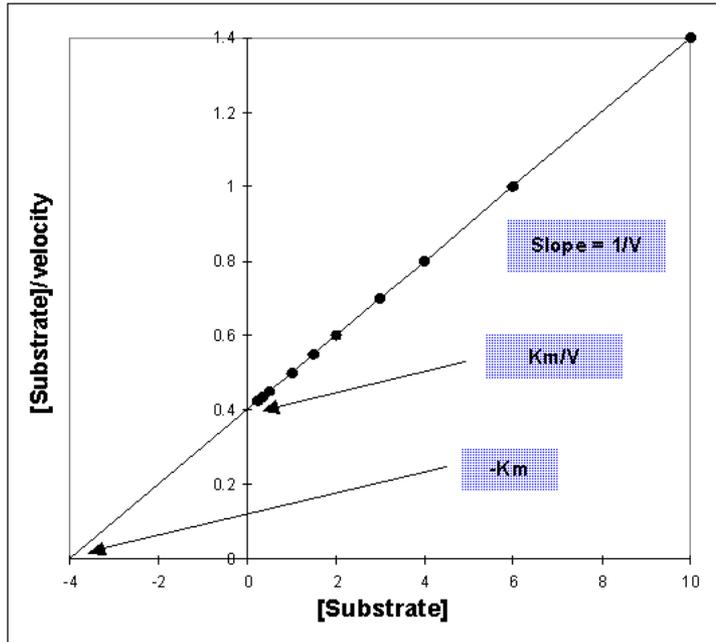
$$K_m = 0,30 \text{ mmol/L}$$

$$V_{\max} = 0,0030 \text{ } \mu\text{mol/min}$$

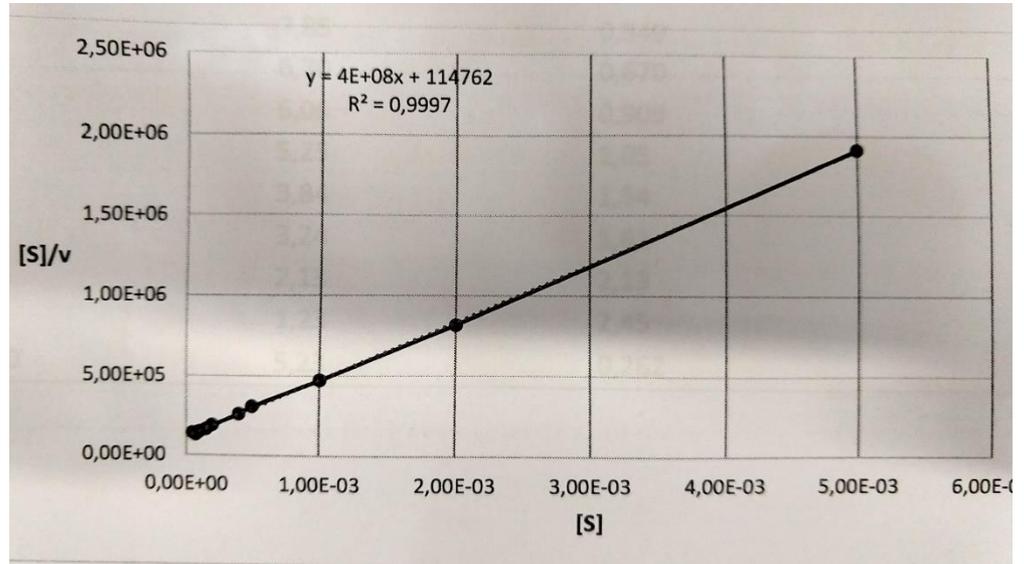
$$v = V_{\max} - K_m \frac{v}{[S]}$$

OBS: A variável dependente V_0 ocorre em ambos os eixos.

Representação de Hanes-Woolf



(feito na aula em anos anteriores)



$$\frac{[S]}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}} + \frac{1}{V_{\max}} [S]$$

$$K_m = 0,29 \text{ mmol/L}$$

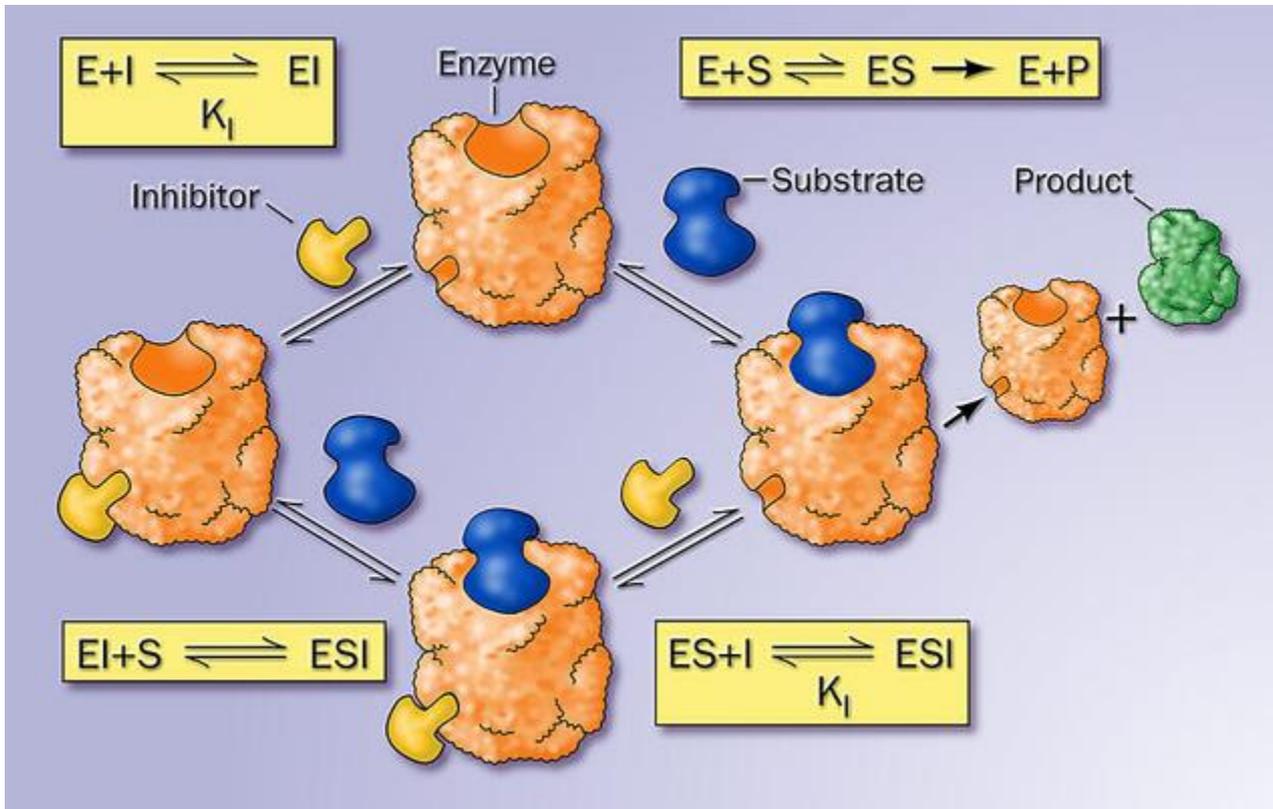
$$V_{\max} = 0,0025 \text{ } \mu\text{mol/min}$$

OBS: a distorção das barras de erros é a menor dentre todas elas.

Prática 6

Efeito de Inibidores sobre a Velocidade da Reação

INIBIÇÃO NÃO-COMPETITIVA

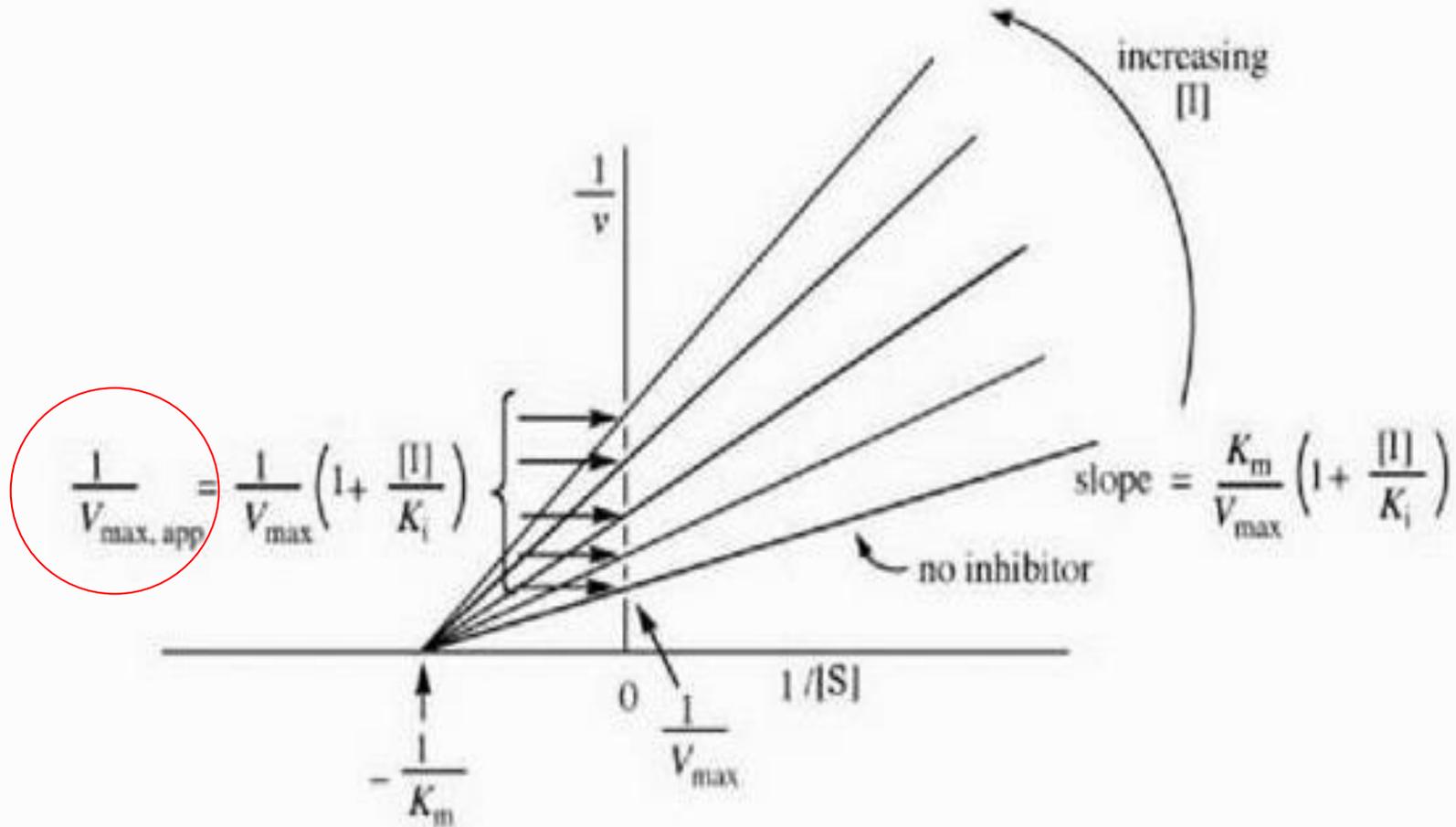


I liga fora do sítio ativo (na E ou no ES)

- E e S se combinam rápida e reversivelmente
- I se combina rápida e reversivelmente com E e ES
- EI e ESI não se quebram em E + P

Cinética Enzimática

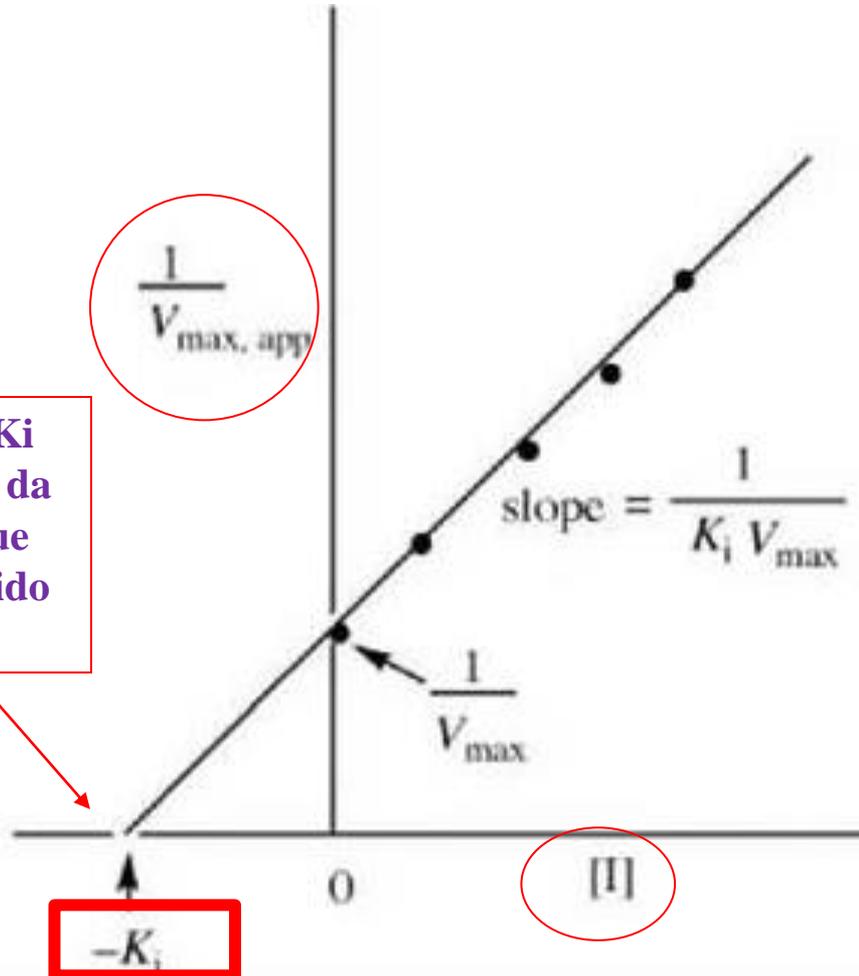
INIBIÇÃO NÃO-COMPETITIVA



Cinética Enzimática

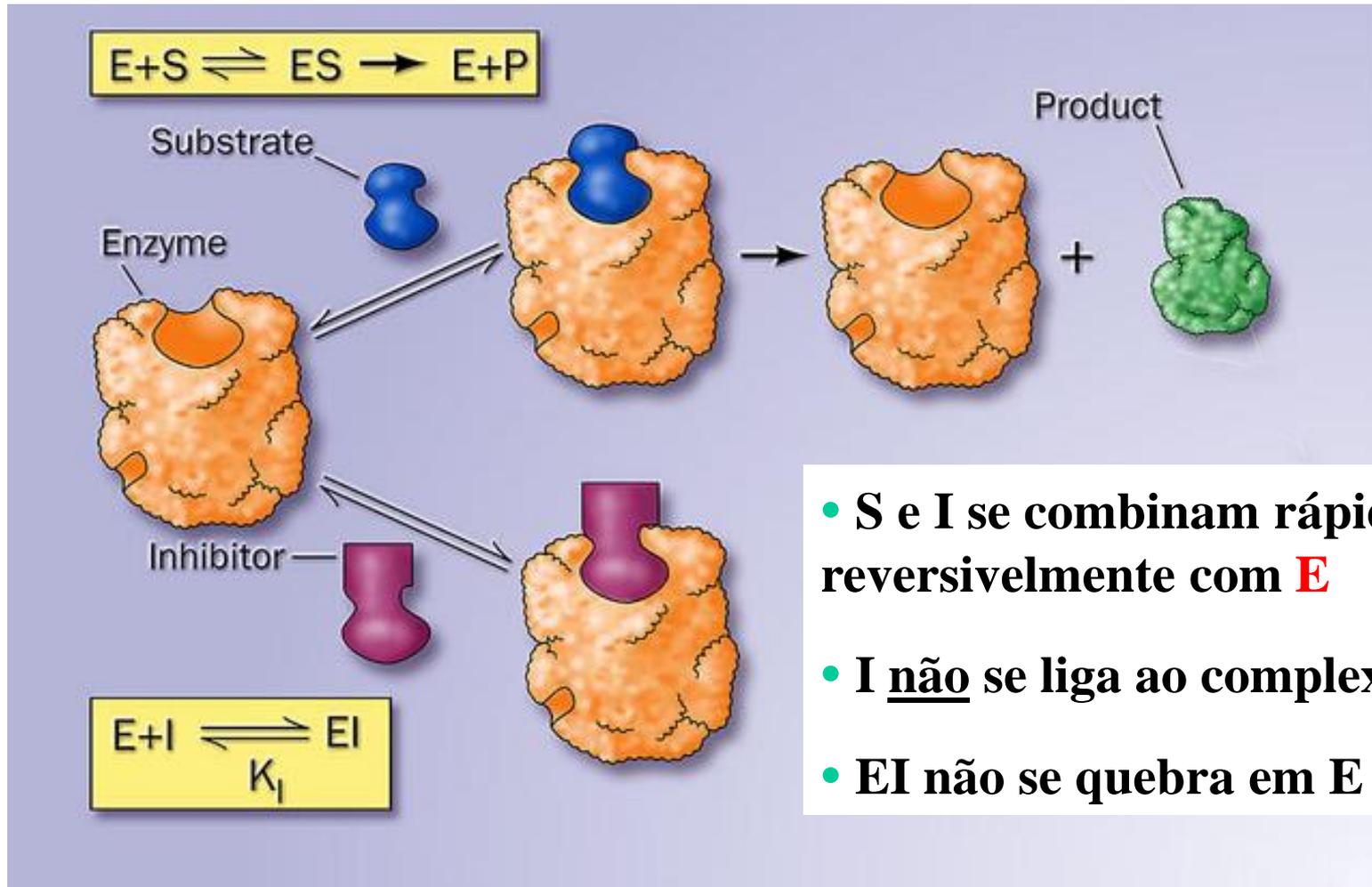
INIBIÇÃO NÃO-COMPETITIVA

Gráfico para Determinação de K_i

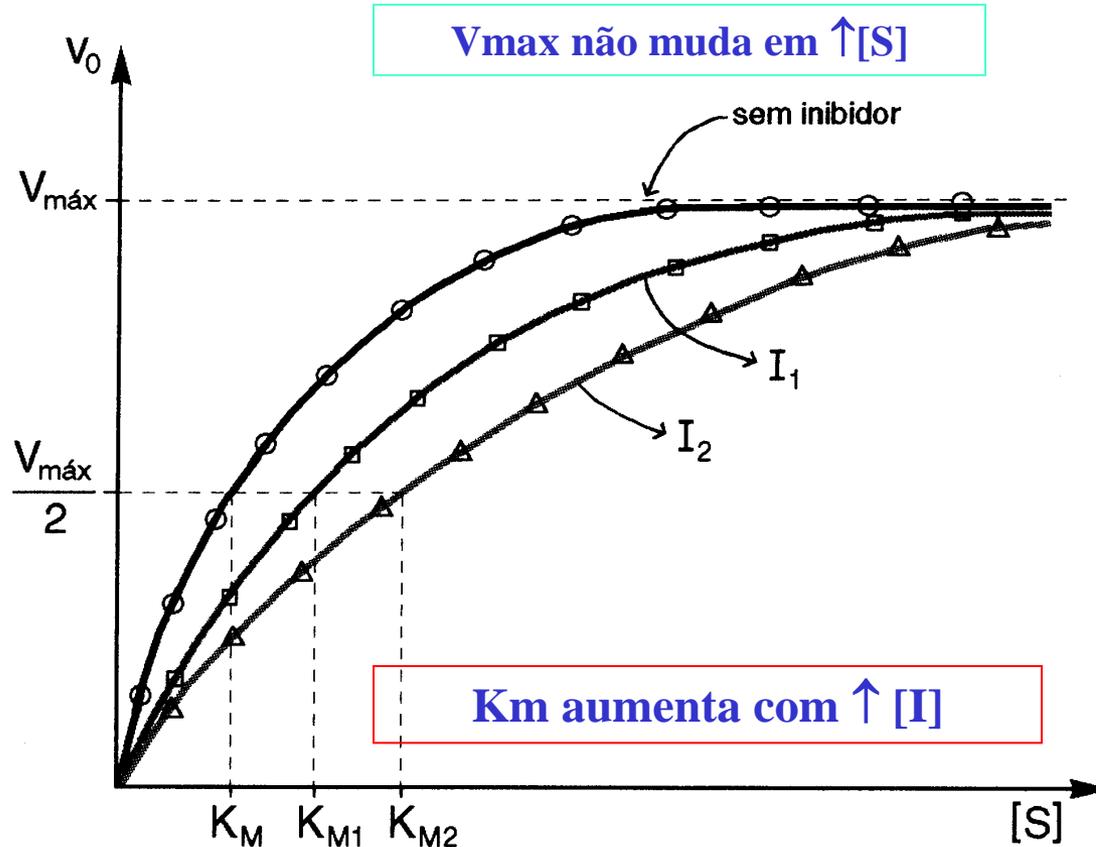
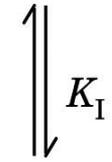
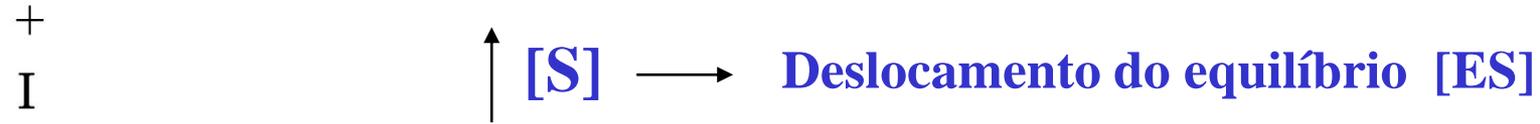


Mais fácil obter K_i pela extrapolação da reta no eixo x, que será o mesmo obtido pela equação

INIBIÇÃO COMPETITIVA



Cinética Enzimática



$$v_0 = \frac{V_M \cdot [S]}{\alpha K_M + [S]}$$

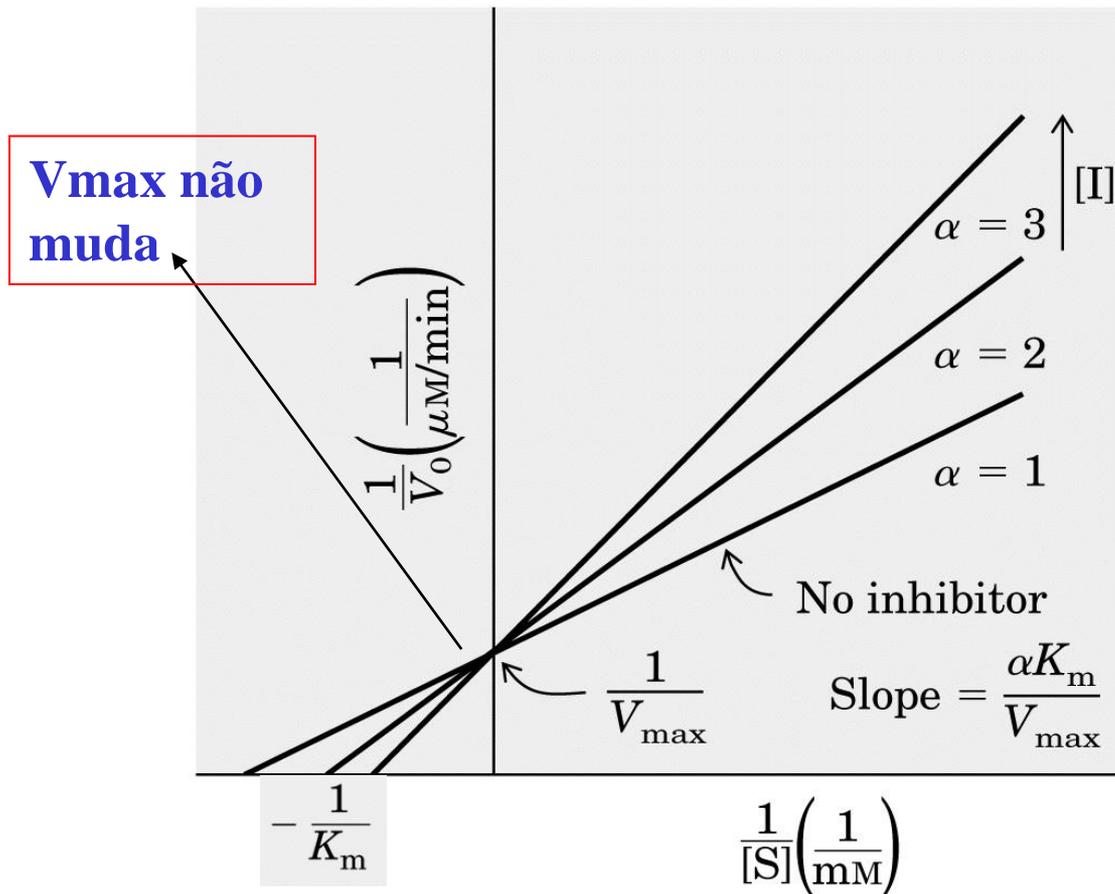
Km
"aparente"

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

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

Inibição competitiva: representação de Lineweaver-Burk

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



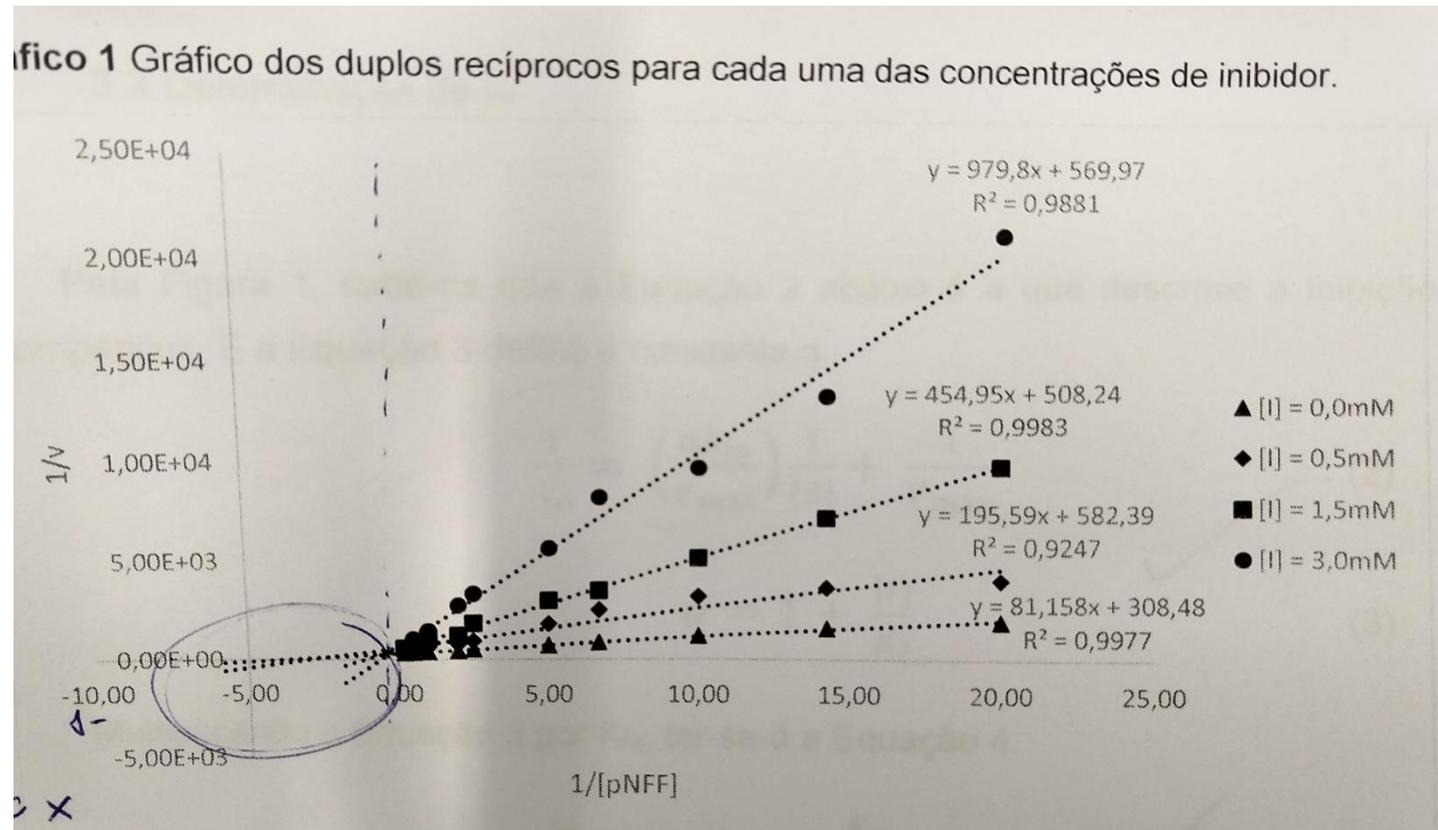
Inibição competitiva

Km aumenta com I

Cinética Enzimática

Gráfico Duplo recíproco da Fosfatase Ácida da Batata (feito na aula em anos anteriores)

Gráfico Duplo recíproco: determinação de K_m e K_m aparentes

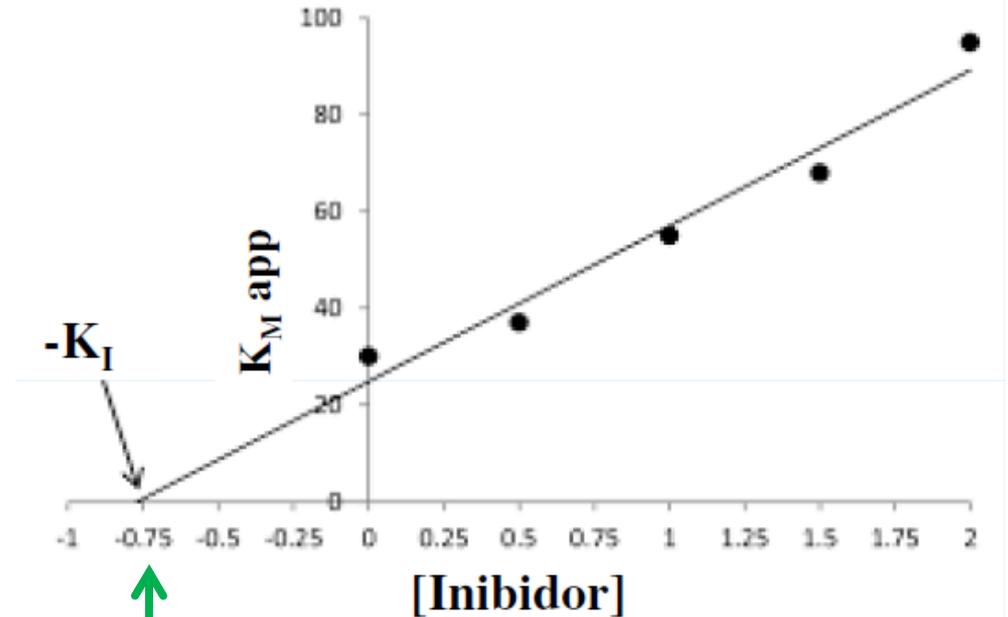


Cinética Enzimática

Gráfico para Determinação de K_I INIBIÇÃO COMPETITIVA

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

$$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_I} \quad K_i = \frac{[E][I]}{[EI]}$$



$$\alpha K_m = K_m + \frac{K_m [I]}{K_I}$$

$$0 = \cancel{K_m} + \frac{\cancel{K_m} [I]}{K_I} \rightarrow$$

$$K_I = -[I]$$

Cinética Enzimática

Gráfico De t determinação do K_i (feito na aula em anos anteriores)

Mais fácil obter K_i
pela extrapolação da
reta no eixo x, que
será o mesmo obtido
pela equação

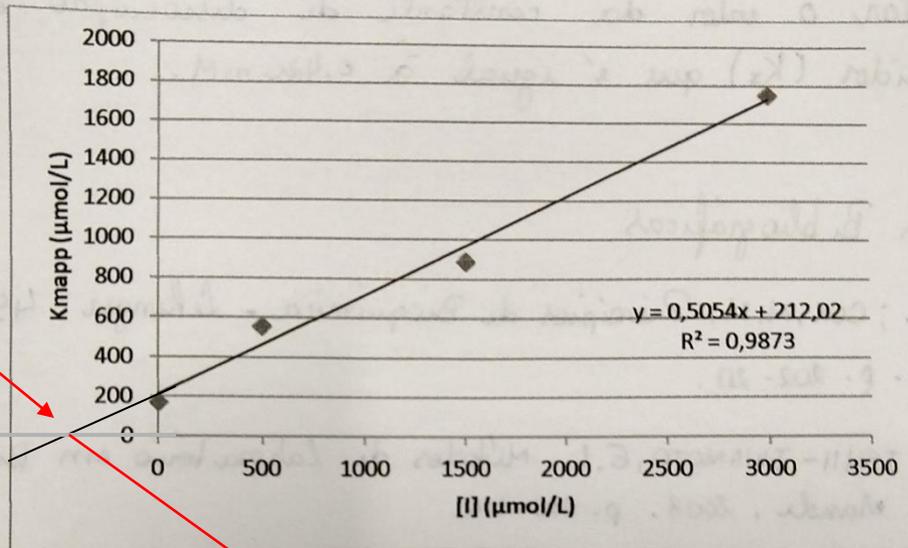


gráfico 3: K_{mapp} versus $[I]$

A partir do gráfico 3 pode-se determinar o valor da constante de dissociação do complexo enzima-inibidor (K_i):

Sendo a intersecção no eixo x igual a $-K_i$, tem-se que:

$$y = a + bx \rightarrow 0 = a + bx \rightarrow bx = -a \rightarrow x = -\frac{a}{b}$$

$$x = -K_i = -\frac{a}{b} \rightarrow K_i = \frac{a}{b} = \frac{212}{0,505} = 420 \mu\text{mol/L} = 0,420 \text{ mM.}$$