

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA
NUTRIÇÃO E METABOLISMO – 2021

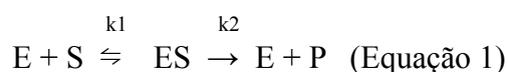
Prática on-line 3 – Cinética enzimática

Nesta prática, iremos A) determinar os valores de velocidade máxima e K_m para a reação de hidrólise enzimática do BAPNA, B) verificar os efeitos do pH e da C) concentração da enzima na velocidade da reação.

Cinética Enzimática

Cinética enzimática consiste na medida da velocidade de uma reação na presença de uma enzima. Já temos conhecimento que as enzimas são catalisadores biológicos extremamente eficientes, mas precisamos entender agora como calcular os parâmetros cinéticos de uma determinada reação.

Vamos pensar numa reação enzimática hipotética qualquer (Equação 1):



Através desta equação temos que lembrar de fatores extremamente importantes: Δ

1. **A massa de enzima ou concentração de enzima ([E])** é um dado extremamente importante e geralmente se tem como unidade **mg/mL**. Vale ressaltar que, para se obter um valor de **0,98 mg/mL** ou **0,98 µg/mL**, por exemplo, é realizado o procedimento de **Dosagem de Proteínas**, o mesmo realizado na primeira prática;
2. **A concentração do substrato ([S])** é um dado importante com unidades geralmente em **mM**. Devemos sempre lembrar que, um excesso de S é adicionado ao meio reacional para garantir que todas as moléculas de proteína/enzima estejam com seu centro catalítico ocupado e produzindo o produto durante todo o tempo de reação;
3. **Saber as condições ótimas (temperatura e pH)** em que a enzima de interesse trabalha é algo essencial.

4. A formação do complexo ES é a etapa **RÁPIDA (k_1) e reversível** da reação, enquanto que a etapa na qual o **complexo ES dá origem ao produto é LENTA (k_2) e irreversível**;
5. A enzima é capaz de se regenerar no fim da reação.

Tendo em vista estes conceitos iniciais, podemos agora entender melhor como calcular os parâmetros cinéticos. Porém, primeiramente temos que definir conceitualmente os parâmetros através do gráfico abaixo (Figura 1):

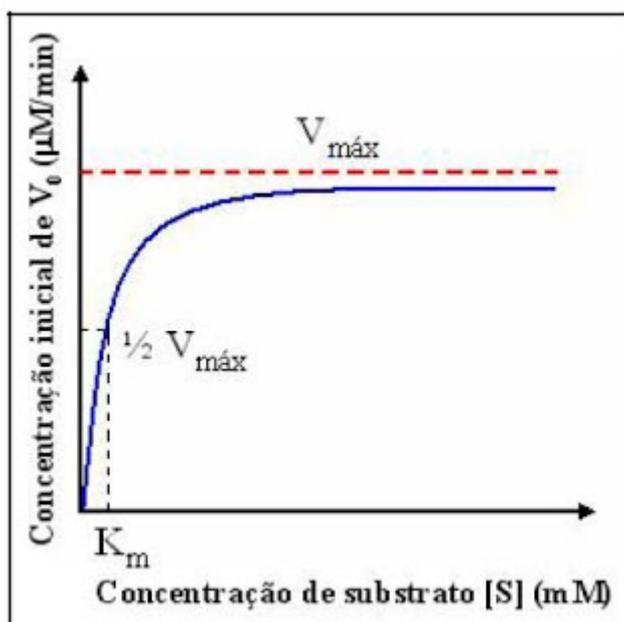


Figura 1: Representação gráfica de uma reação catalisada por uma enzima hipotética que segue os parâmetros introduzidos por Michaelis-Menten.

a) Velocidade Inicial (V_0): é definida como a velocidade em que até 5% do substrato é transformado em produto.

Unidade: U/mg ou U/mL

Definição de U: mmol/nmol/µmol de produto por minuto de reação.

b) Velocidade Máxima ($V_{máx}$): é definida como a velocidade na qual todas as moléculas de enzima estão com seus centros catalíticos ocupados com uma molécula de substrato (ES) e

que, devido a concentração de S ser muito alta, a velocidade não se altera, atinge um platô e é denominada máxima.

Unidade: U/mg ou U/mL

c) Afinidade (K_M): é definido como a concentração de substrato necessária para atingir metade da velocidade máxima. É denominado K_M para enzimas que seguem uma cinética Michaeliana e $K_{0,5}$ para enzimas que seguem cinética cooperativa. Quanto maior o K_M , menor a afinidade que a enzima tem por aquele substrato e vice-versa.

Unidade: mM/nM/ μ M

d) Número de turnover (k_{cat}): é definido como a eficiência catalítica, ou seja, o número de moléculas (enzimas) que são regeneradas por segundo.

Nesta prática iremos utilizar **N α -Benzoil-DL-arginina 4-nitroanilida (BAPNA)** como substrato da enzima **Batroxobina**, ambas apresentadas na Figura 2. Observe que na estrutura do BAPNA existem dois anéis, o que confere a este composto certa coloração quando submetido a determinadas condições. O caso mais comum é a hidrólise, que pode ser efetivamente realizada em meio aquoso e na presença de uma enzima. A Batroxobina é uma serinoprotease extremamente eficiente na catálise deste substrato. Trata-se de uma enzima encontrada em veneno de serpentes, mais especificamente as do gênero *Barthrops*. É uma enzima coagulante, similar à Trombina, com baixo peso molecular (aproximadamente 60 kDa) e possui em sua estrutura uma pequena porção de carboidratos, sendo caracterizada como um glicopeptídeo.

A Figura 3 traz algumas propriedades deste composto que podem ser encontradas no site da Sigma Aldrich, uma plataforma extremamente útil para se realizar compras de reagentes em geral.

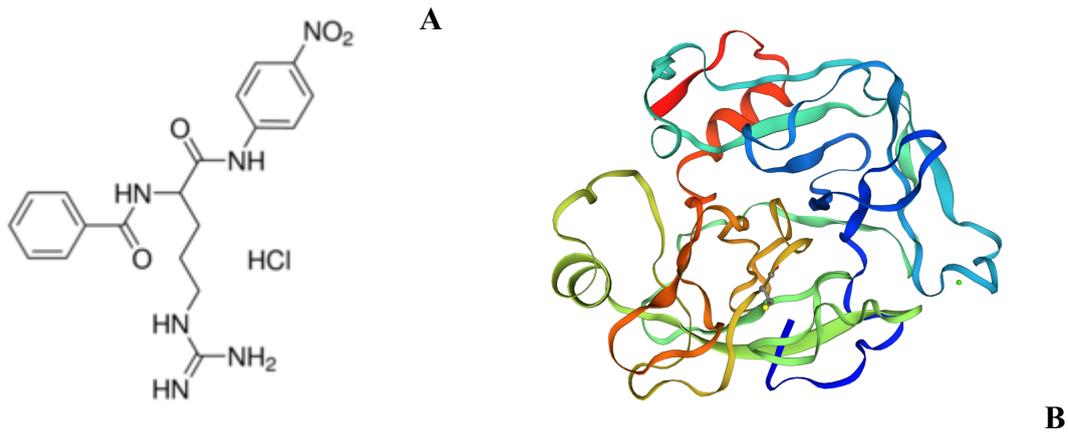


Figura 2: **A)** $N\alpha$ -Benzoyl-DL-arginina 4-nitroanilida (BAPNA) e **B)** Estrutura da enzima Batroxobina.

Propriedades

Related Categories	Amidase, Biochemicals and Reagents, Cell Biology, Cell Signaling and Neuroscience, Enzyme Substrates, Enzymes, Inhibitors, and Substrates, Peptides and Proteins, Peptides for Cell Biology, Protease Substrates, Substrates by Enzyme, Trypsin, Trypsin Substrates Less...
Quality Level	200
assay	≥98%
form	powder
solubility	DMSO: 50 mg/mL, clear, colorless to deep brown-yellow
storage temp.	-20°C
SMILES string	<chem>Cl[H].NC(=N)NCCCC(NC(=O)c1ccccc1)C(=O)Nc2ccc(cc2)[N+][O-]</chem>
InChI	1S/C19H22N6O4.ClH/c20-19(21)22-12-4-7-16(24-17(26)13-5-2-1-3-6-13)18(27)23-14-8-10-15(11-9-14)25(28)29;/h1-3,5-6,8-11,16H,4,7,12H2,(H,23,27)(H,24,26)(H4,20,21,22);1H
InChI key	DEOKFPFLXFNAON-UHFFFAOYSA-N

Descrição

Application	$N\alpha$ -Benzoyl-DL-arginine 4-nitroanilide hydrochloride has been used as a substrate for trypsin ^[2] and elastase in enzyme analysis. ^[1]
Packaging	Bottomless glass bottle. Contents are inside inserted fused cone.
Substrates	A chromogenic trypsin substrate.

Figura 3: Características gerais da BAPNA extraídas da Sigma Aldrich ($N\alpha$ -Benzoyl-DL-arginine 4-nitroanilide ≥ 98 % | 911-77-3 | Sigma-Aldrich (sigmaaldrich.com))