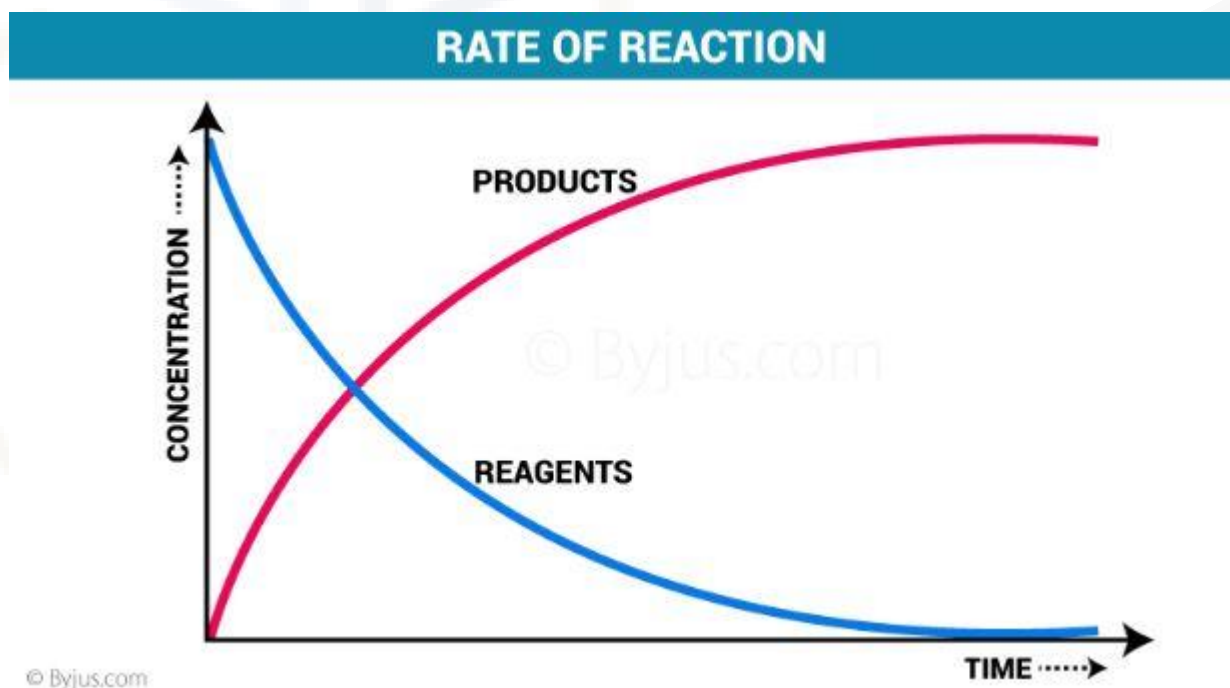


1- Fazer o Gráfico de [Produto] x Tempo para a Reação

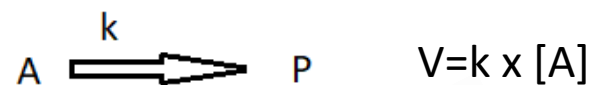
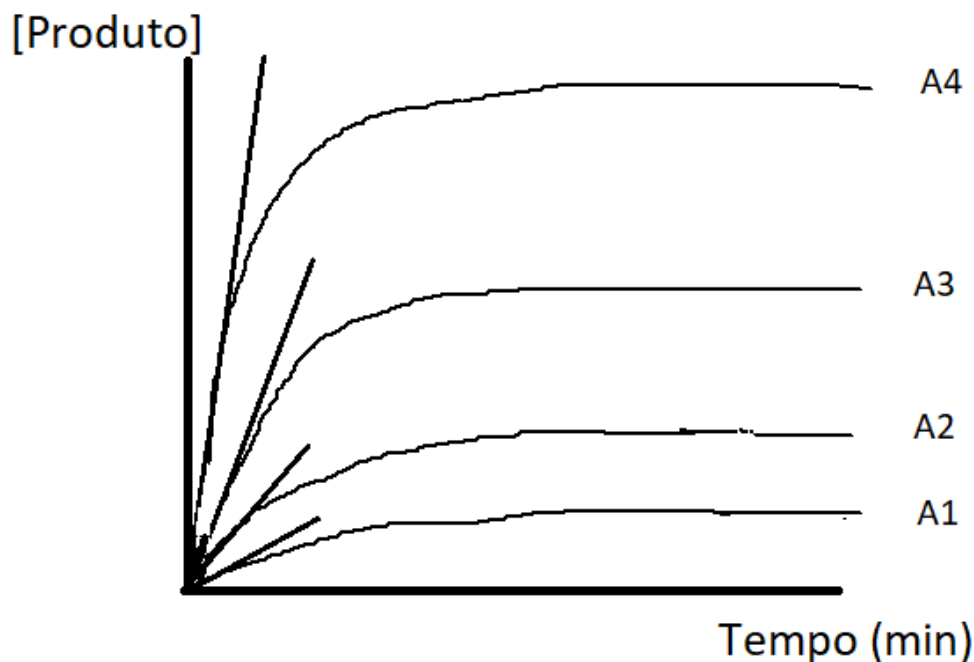
A \longrightarrow B. Definir velocidade da reação

$$v = -\Delta A / \Delta t$$

$$v = \Delta B / \Delta t$$



2-Escriver a equação de velocidade da reação $A \xrightarrow{k} B$ em função da concentração de A. Como proceder para medir esta velocidade? Que tempos (iniciais ou finais) devem ser escolhidos para que as medidas de velocidade sejam de fato relacionadas à concentração inicial de A?



$$V_0 = -\Delta[A]/\Delta t$$

$$V_0 = \Delta[P]/\Delta t$$

$$V_0 = k \times [A]$$

3- Definir velocidade inicial de reação



$$V_0 = -\Delta[A]/\Delta t$$

$$V_0 = \Delta[P]/\Delta t$$

$$V_0 = k \times [A]$$

- 3- Definir velocidade inicial de reação



$$V_0 = -\Delta[A]/\Delta t$$

$$V_0 = \Delta[P]/\Delta t$$

$$V_0 = k \times [A]$$

- 4- Estudar o software Cinética Enzimática e responder as questões 5, 6 e 7.**

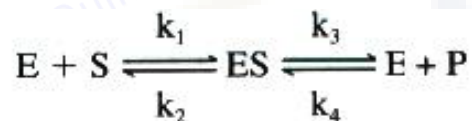
- 5. Classificar as afirmações abaixo como verdadeiras ou falsas.
- 5a. Sempre que o número de moléculas de substrato é maior que o número de moléculas de enzimas, todas as moléculas de enzimas estão ligadas a moléculas de substrato.
 - 5b. A velocidade da reação é proporcional ao tempo da reação.
 - 5c. A velocidade da reação é proporcional à concentração de substrato.
 - 5d. A velocidade da reação é proporcional concentração de enzima, desde que a concentração de substrato não seja limitante.
 - 5e. A velocidade da reação é proporcional à concentração do complexo enzima-substrato.
 - 5f. A quantidade de produto formado depende do tempo da reação.
 - 5g. Ao final de cada experimento (do software) todo substrato foi convertido em produto.

- 6. Em um experimento com concentração constante de enzima e substrato obteve-se 0,001 mmols de produto em 20 minutos de reação. A massa de produto formada em 10 minutos de incubação será
 - 6a. 0,0005 mmols
 - 6b. 0,0010 mmols
 - 6c. 0,002 mmols

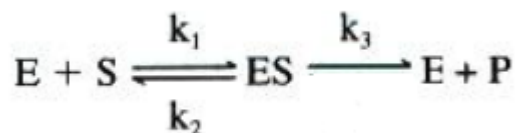
- 7. Em um experimento com concentração constante de enzima e substrato obteve-se 0,001 mmols de produto, formados a cada minuto durante 20 minutos de reação. Se o tempo de incubação fosse 10 minutos, a velocidade da reação seria
 - 7a. 0,0005 mmols/minuto
 - 7b. 0,0010 mmols/minuto
 - 7c. 0,0020 mmols/minuto

8. Definir *sítio ativo*. Podem pertencer ao sítio ativo de uma enzima cadeias laterais de aminoácidos distantes uns dos outros na estrutura primária?
9. A ligação de uma enzima ao seu substrato é uma reação irreversível?

10. Escrever a equação de velocidade da formação do complexo ES.



k_4 é desprezada porque
Em v_0 a $[P]$ é muito baixa



$$V_0 = k_1[E][S]$$

Escrever a equação da velocidade da formação de P a partir de ES.

$$v_0 = k_3 [ES] \quad \rightarrow \quad [ES] = \frac{[E_t][S]}{\frac{k_2 + k_3}{k_1} + [S]} \quad \rightarrow \quad v_0 = k_3 \frac{[E_t][S]}{\frac{k_2 + k_3}{k_1} + [S]}$$

$$V_{\text{Max}} = k_3 [E_t]$$

$$k_3 = k_{\text{cat}}$$

E_t = Enzima total

Turnover number = k_{cat}/K_M

$$v_0 = \frac{V_{\text{máx}} [S]}{K_M + [S]}$$

11. Verificar as concentrações relativas de enzima e substrato em uma reação enzimática e estabelecer a relação entre as ordens de grandeza das constantes de velocidade k_1 , k_2 e k_3 .

$$k_1 > k_2$$

$$k_3 \ll k_1, k_2$$

Michaelis Menten:

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

$$[P] \ll [S]$$

k_4 é desprezado



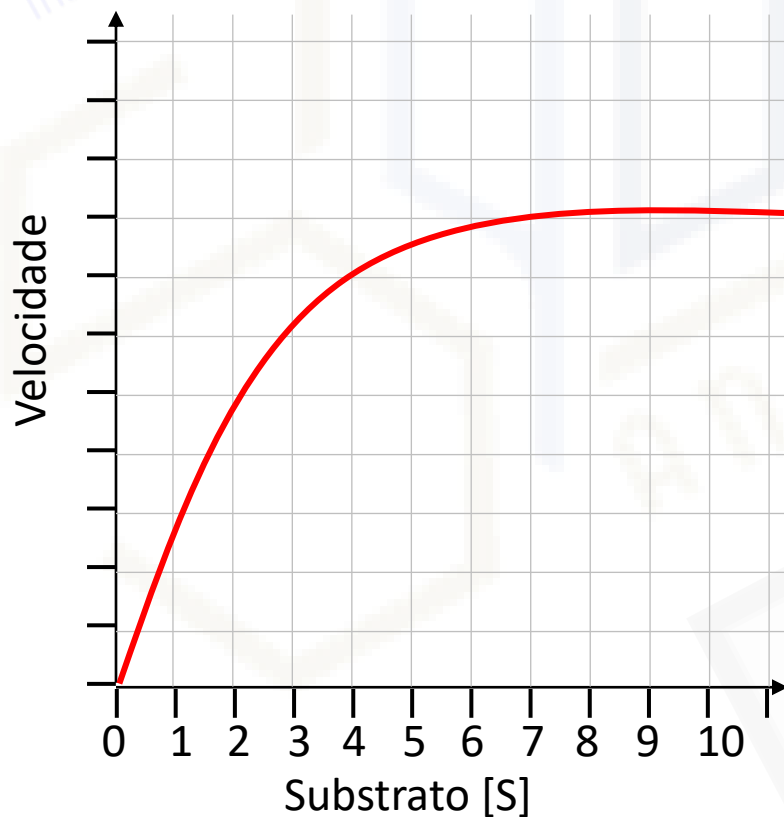
Qual é a etapa limitante da velocidade de transformação de S em P?

$$V_o = k_3 [ES]$$

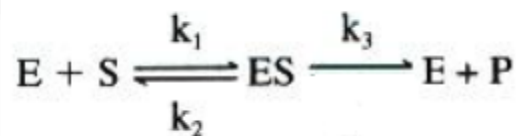
Quadro 5.8 Algumas enzimas de alta eficiência

Enzima	k_{cat} (s^{-1})	K_M (M)	k_{cat}/K_M ($\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)
Superóxido dismutase	1×10^6	$3,5 \times 10^{-3}$	$0,3 \times 10^9$
Catalase	1×10^7	$2,5 \times 10^{-2}$	$4,0 \times 10^8$
Acetilcolinesterase	1×10^4	$9,0 \times 10^{-5}$	$1,6 \times 10^8$
Anidrase carbônica	1×10^6	$1,2 \times 10^{-2}$	$8,3 \times 10^7$
Pepsina (hidrólise de Phe-Gly)	5×10^{-1}	$3,0 \times 10^{-4}$	$1,7 \times 10^3$

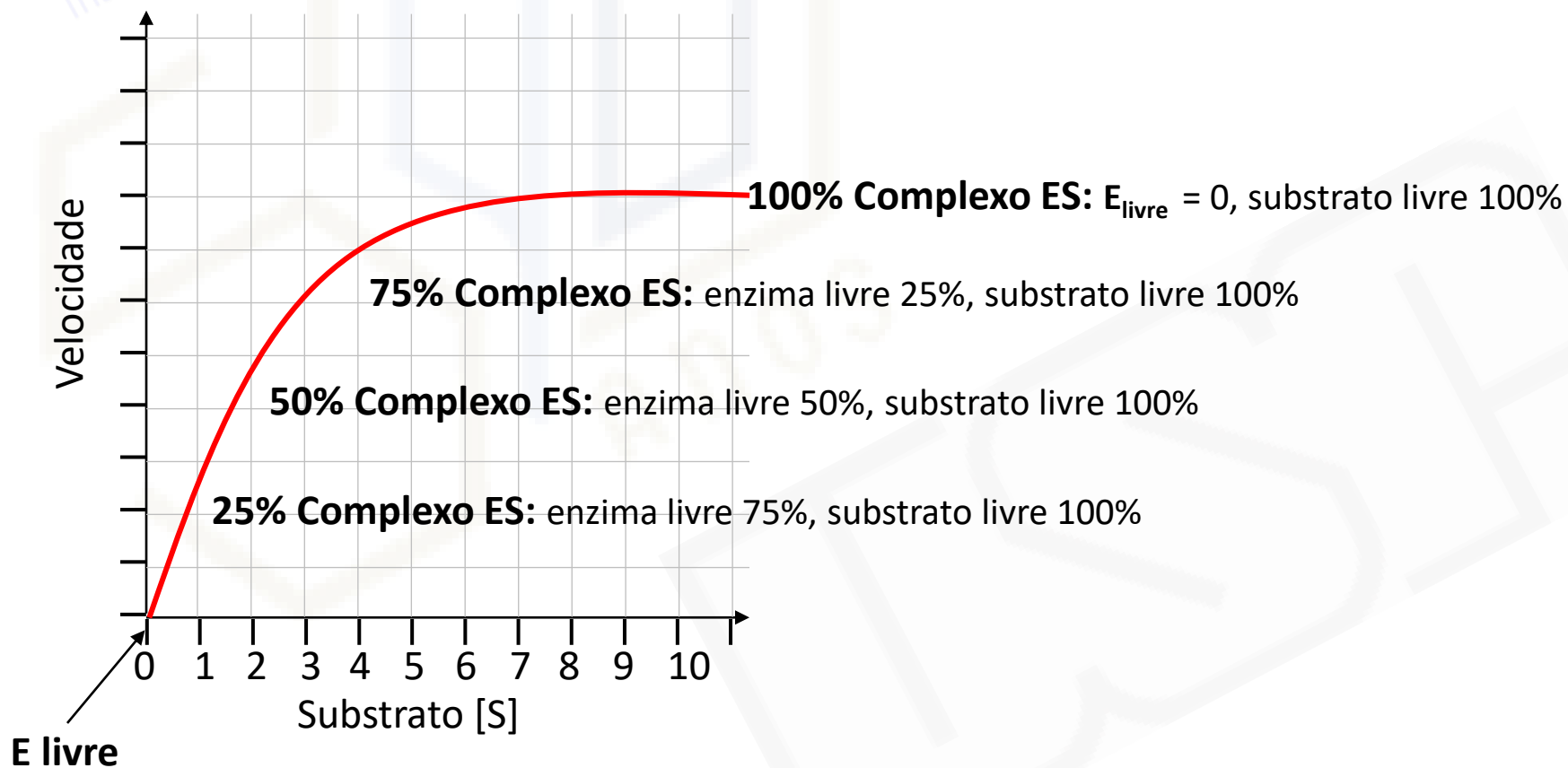
12. Fazer o gráfico da velocidade da reação $S \rightarrow P$, catalisada enzimaticamente, em função da concentração de S. Descrever os procedimentos experimentais que levariam à obtenção dos dados para a construção do gráfico.



- ✓ Concentração variada de substrato
- ✓ Concentração fixa de enzima
- ✓ Experimento realizado num tempo determinado



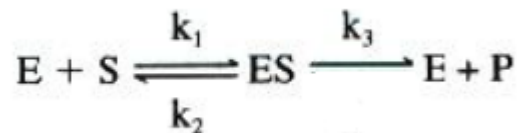
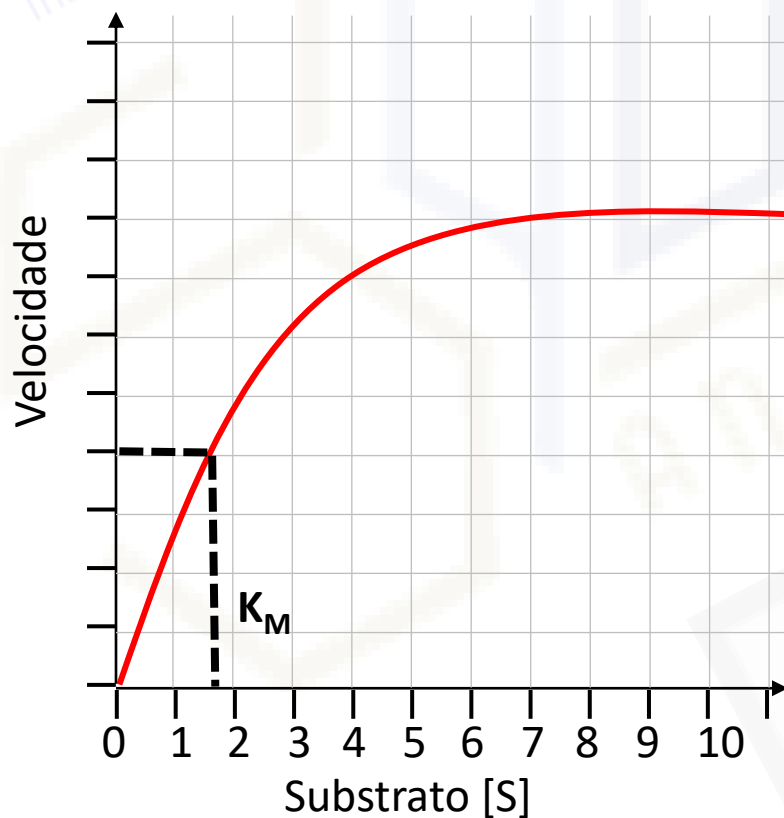
13. Analisando o gráfico do item 12, verificar, em cada trecho da curva, as concentrações de enzima livre, substrato e complexo ES.



14. A constante de Michaelis-Menten (K_M) deve ser expressa em unidades de tempo, de velocidade ou de concentração? Como é feita sua determinação experimental?

K_M – Indica a afinidade entre o substrato e a enzima.

K_m = concentração do substrato quando a reação atinge a metade da velocidade máxima. Expressa em concentração.



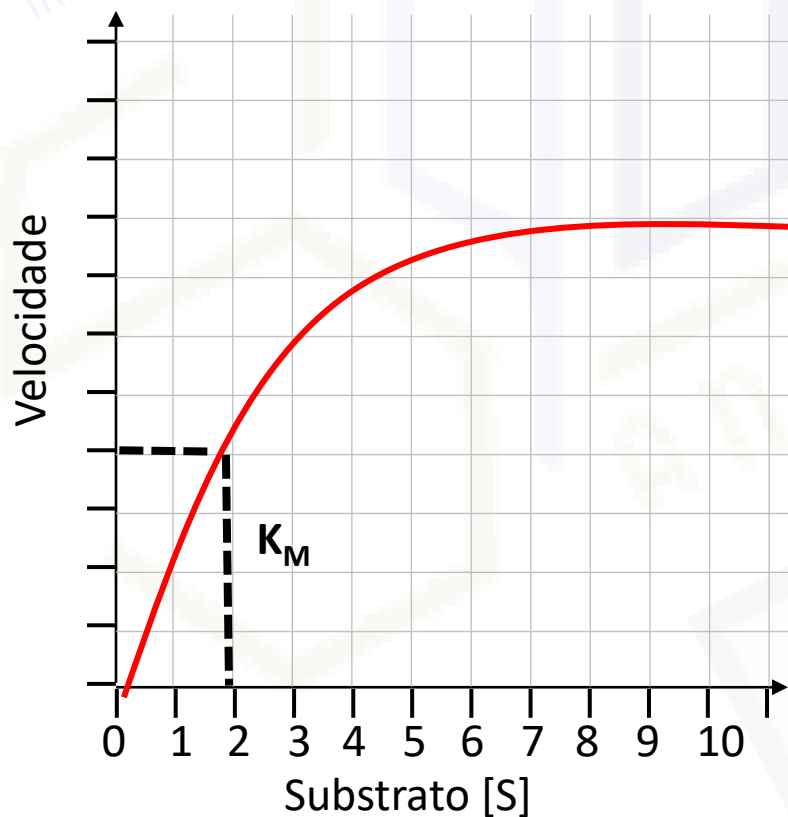
$$V_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + [S]}$$

$$K_m = \frac{(k_2 + k_3)}{k_1} \rightarrow K_m = \frac{k_2}{k_1}$$

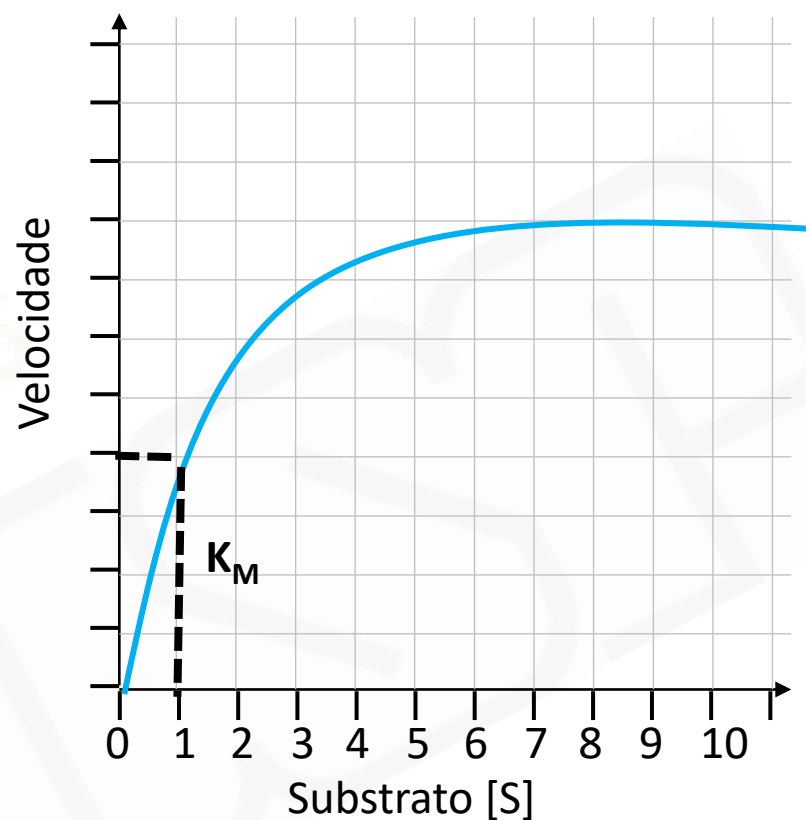
$$k_3 \ll k_2 \text{ e } k_3$$

15. Pode-se afirmar que, se o valor de K_M para o substrato A é maior do que para o substrato B, a enzima tem maior afinidade por A?

Substrato A



Substrato B



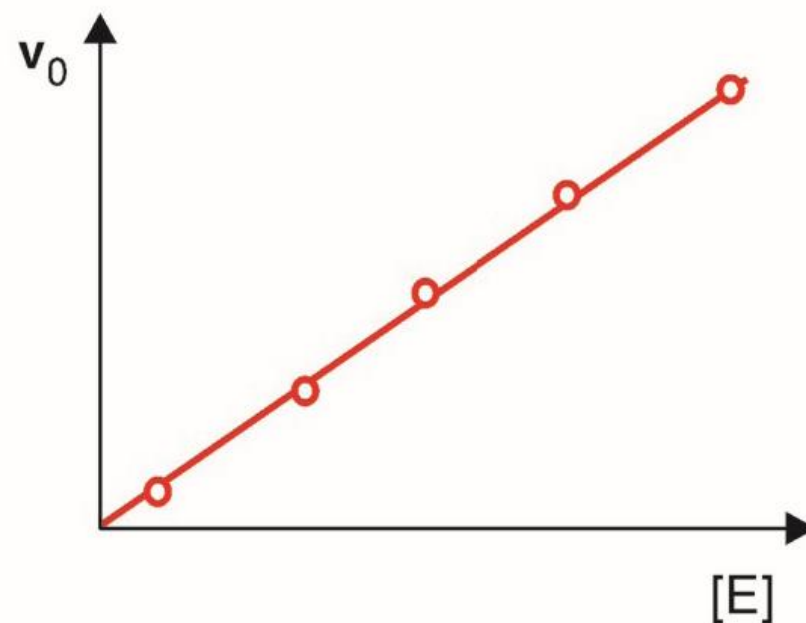
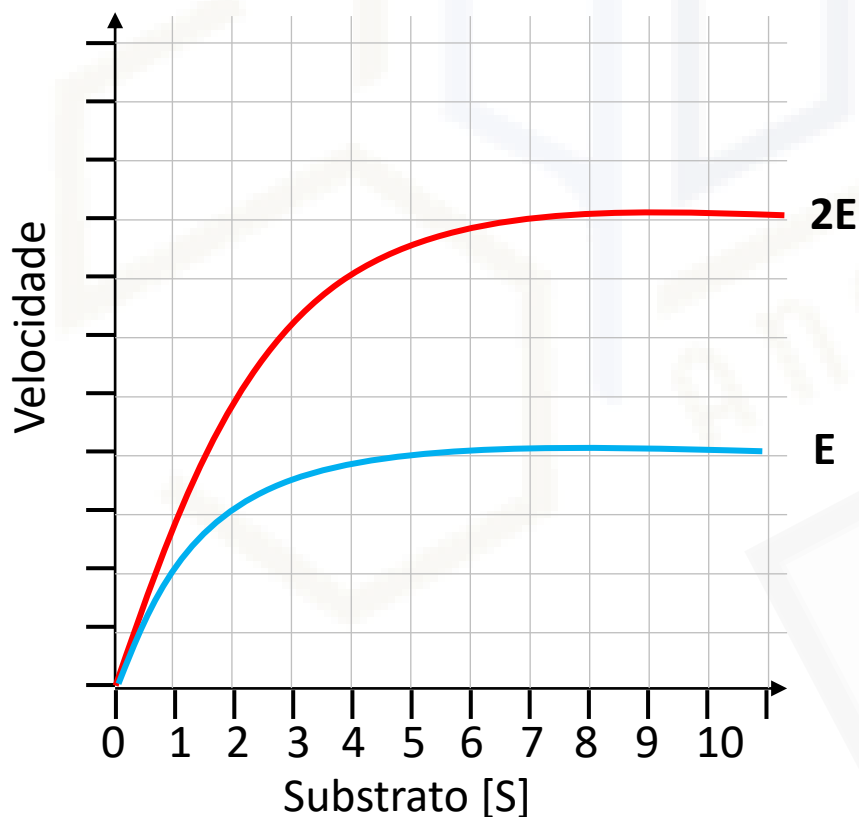
Quadro 5.8 Algumas enzimas de alta eficiência

Enzima	k_{cat} (s^{-1})	K_M (M)	k_{cat}/K_M ($\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)
Superóxido dismutase	1×10^6	$3,5 \times 10^{-3}$	$0,3 \times 10^9$
Catalase	1×10^7	$2,5 \times 10^{-2}$	$4,0 \times 10^8$
Acetilcolinesterase	1×10^4	$9,0 \times 10^{-3}$	$1,6 \times 10^8$
Anidrase carbônica	1×10^6	$1,2 \times 10^{-2}$	$8,3 \times 10^7$
Pepsina (hidrólise de Phe-Gly)	5×10^{-1}	$3,0 \times 10^{-4}$	$1,7 \times 10^3$

16. Fazer o gráfico da velocidade de uma reação enzimática em função:

- da concentração de enzima;
- da temperatura;
- do pH.

Descrever os procedimentos experimentais que levariam à obtenção dos dados para a construção destes gráficos. Justificar a forma dos gráficos.

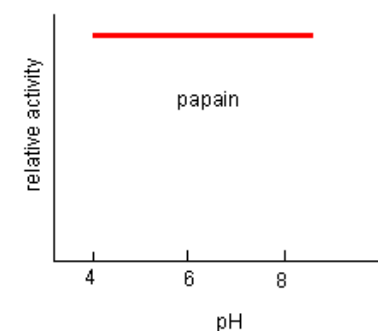
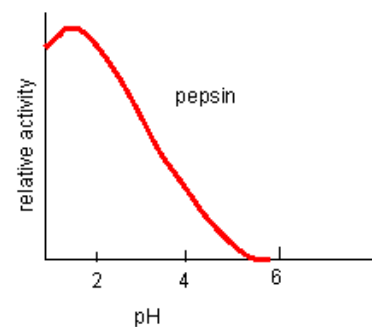
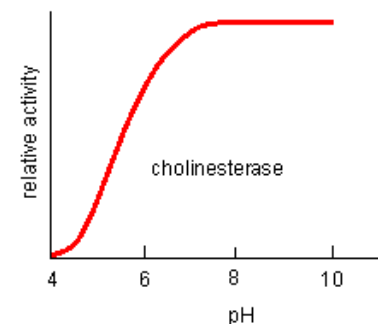
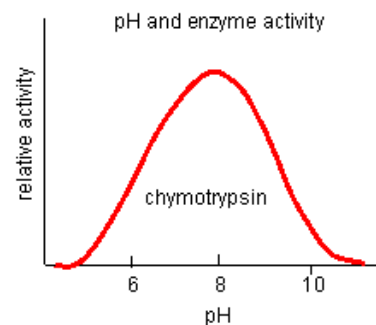
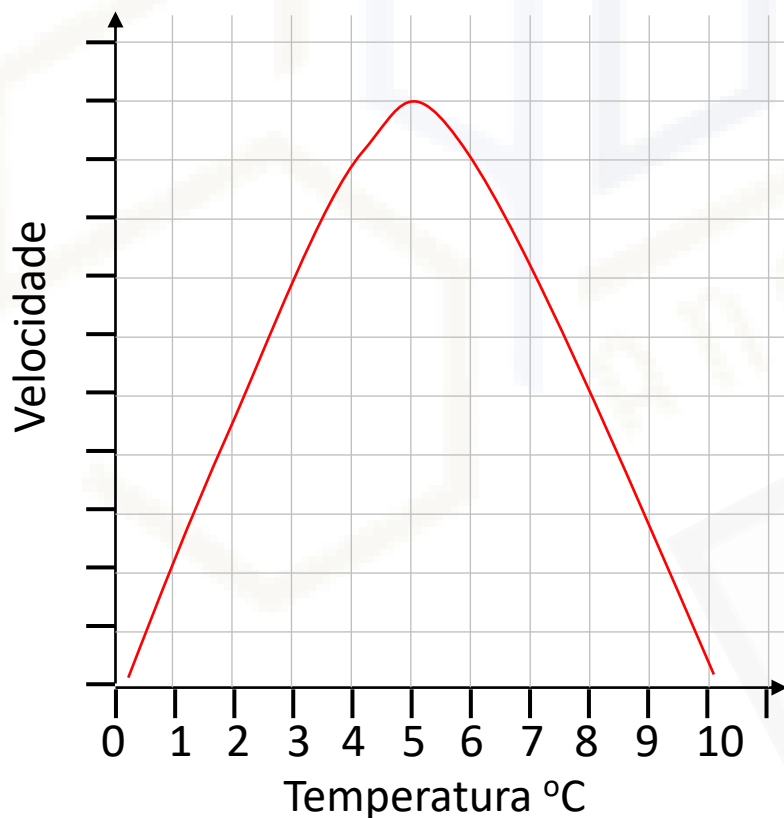


16. Fazer o gráfico da velocidade de uma reação enzimática em função:

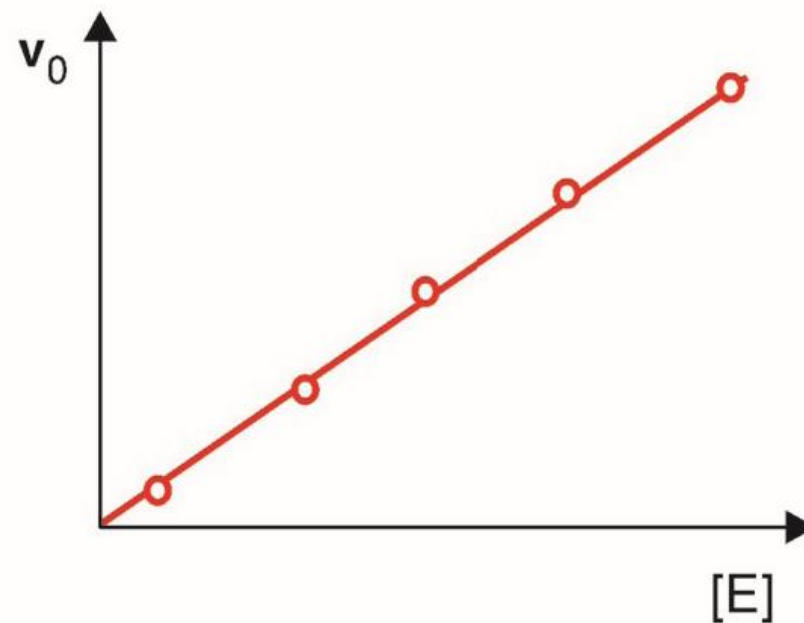
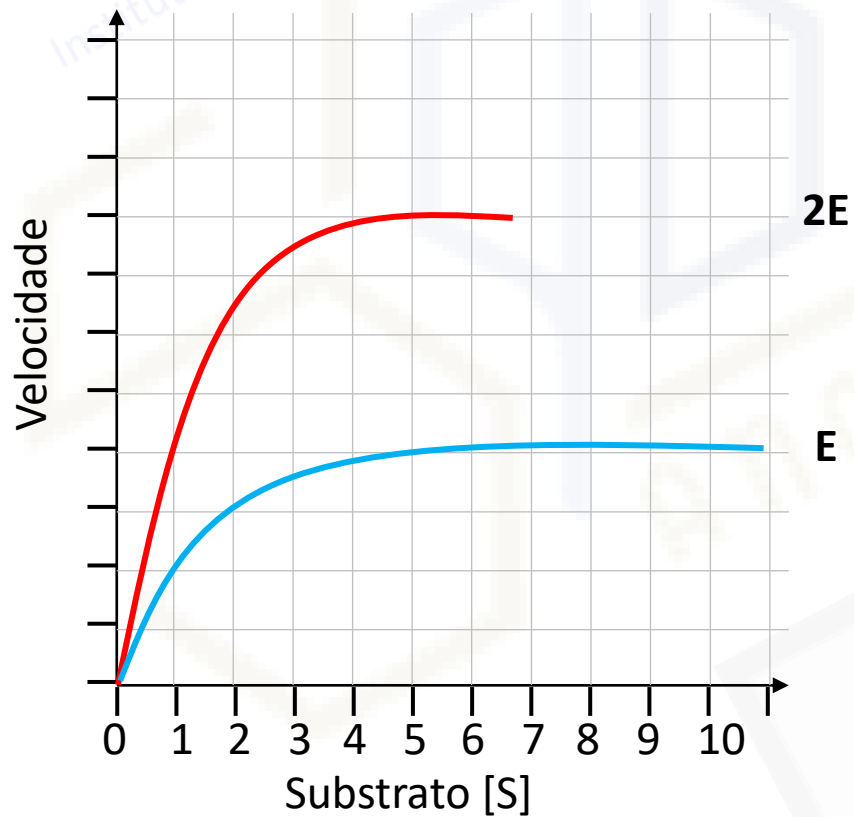
a) da concentração de enzima;

b) da temperatura;

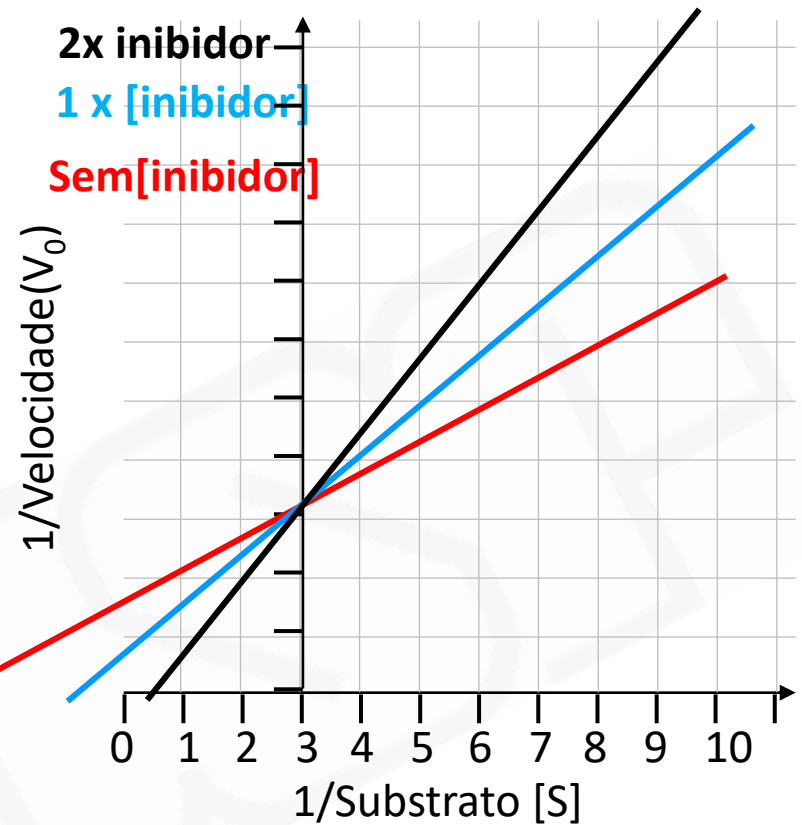
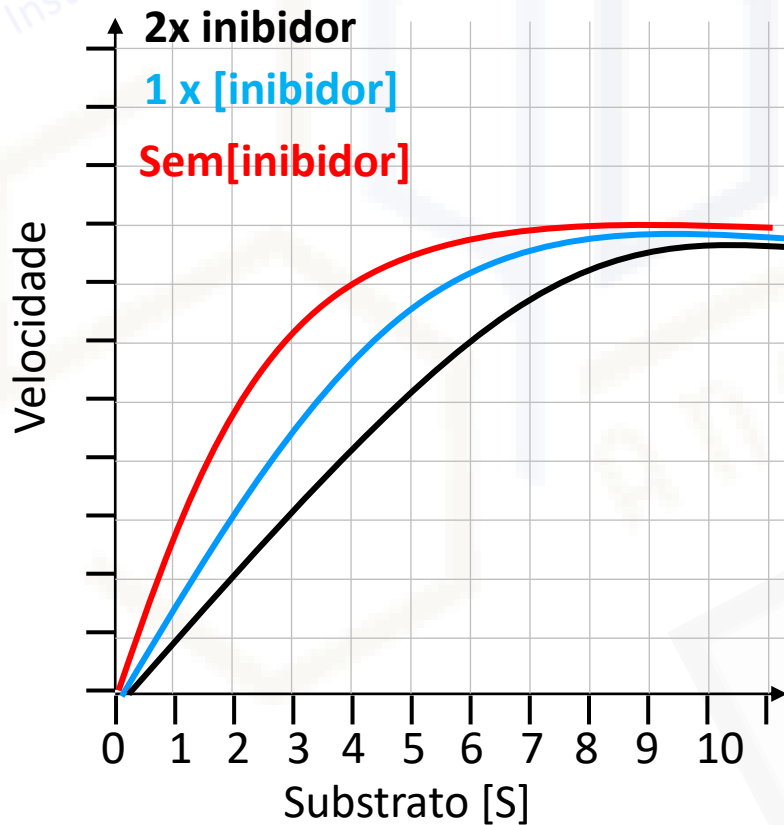
c) do pH. Descrever os procedimentos experimentais que levariam à obtenção dos dados para a construção destes gráficos. Justificar a forma dos gráficos.



17. Fazer o gráfico $v_0 \times [S]$ para concentrações E e 2E de enzima.

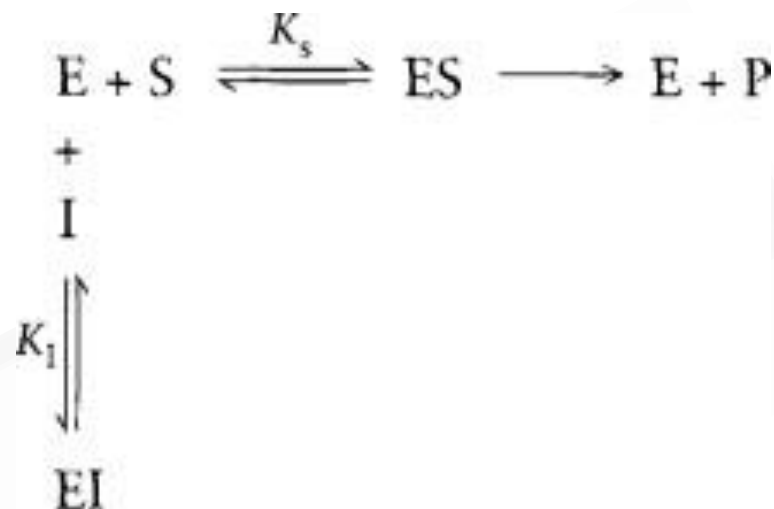
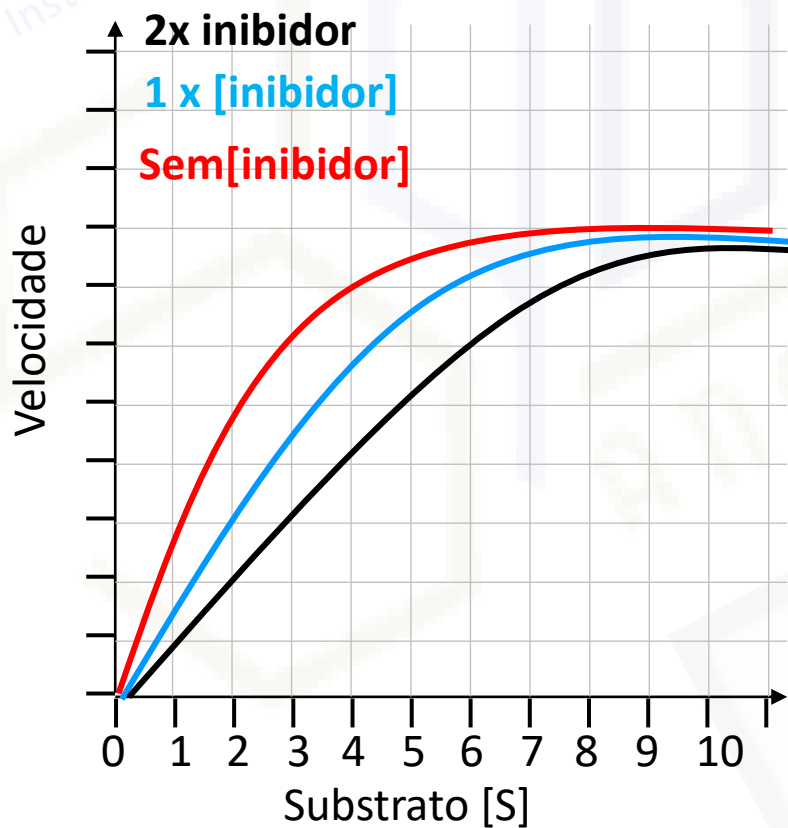


18. Fazer o gráfico $v_0 \times [S]$ na ausência de inibidor, na presença de duas concentrações de **inibidor competitivo** e na presença de duas concentrações de inibidor não competitivo.

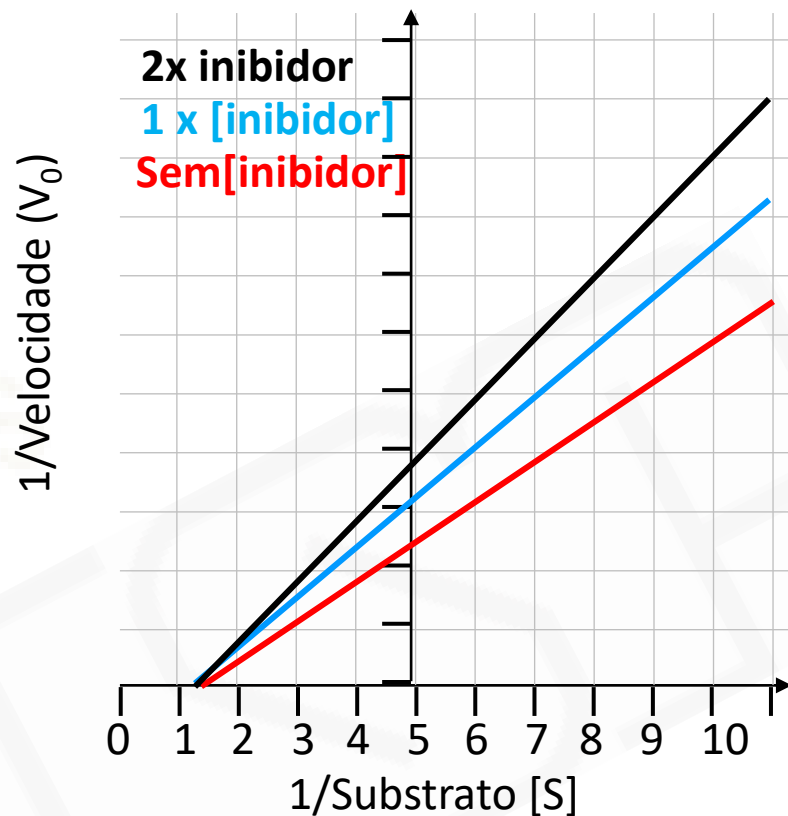
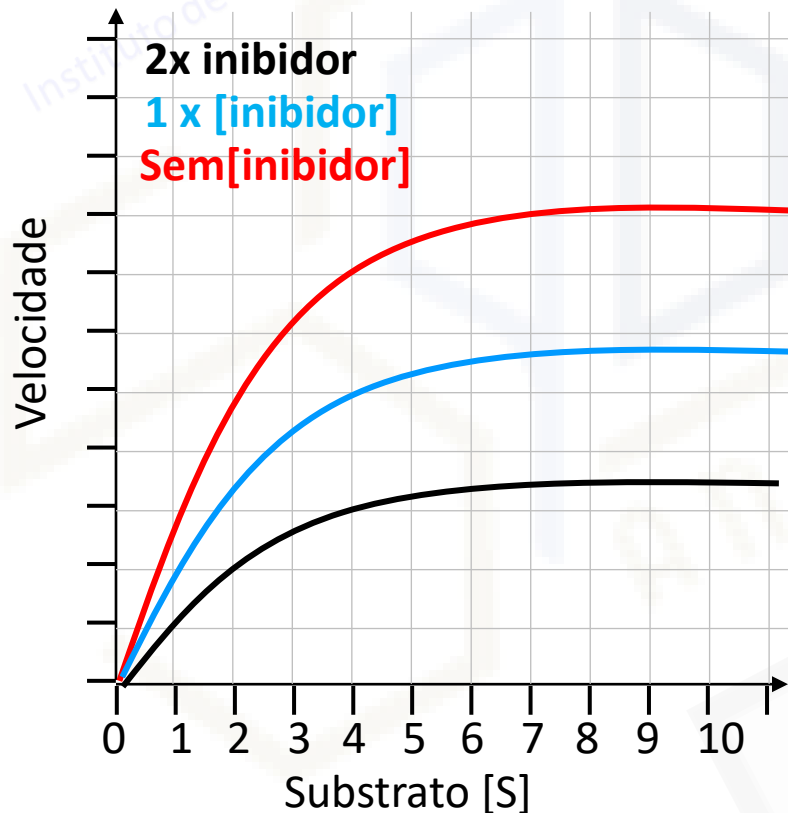


V_{max} = sem mudanças
 K_m = aumenta

Inibidor Competitivo

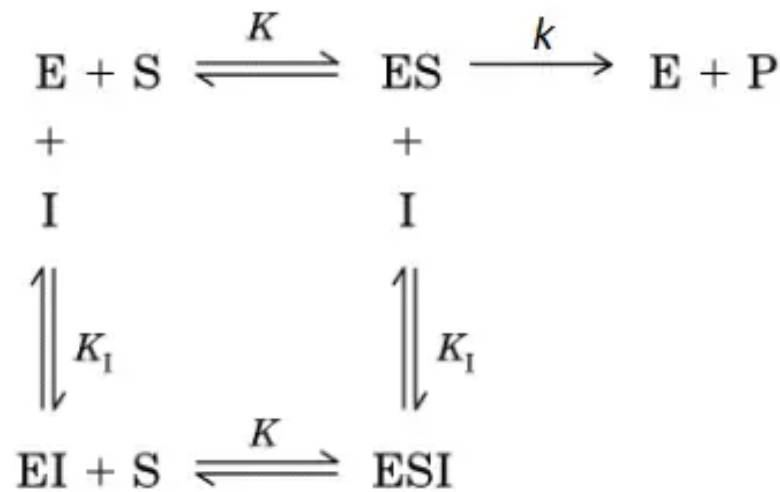
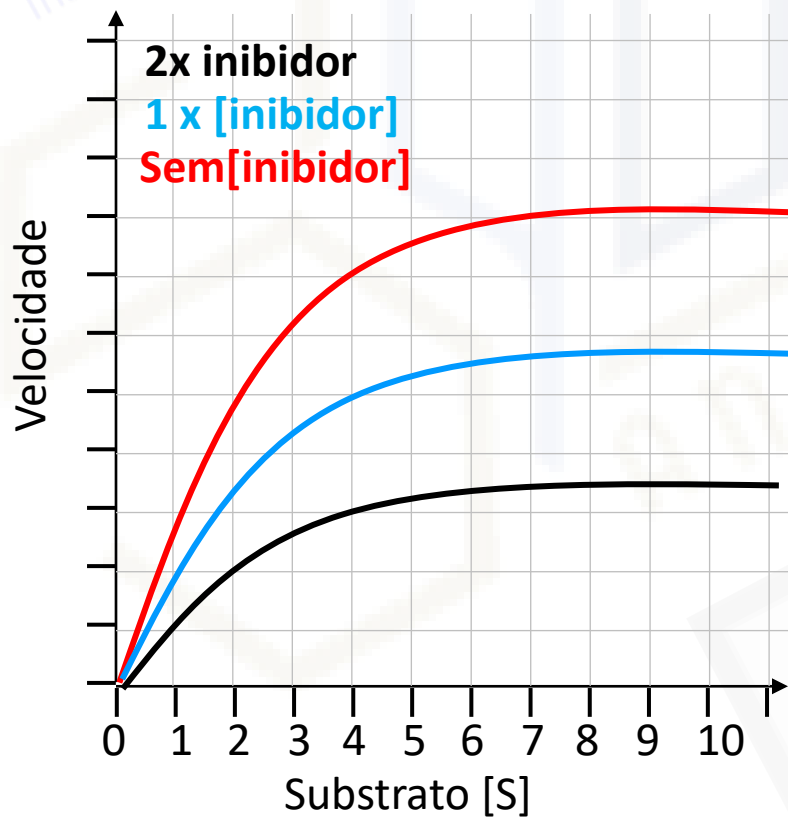


18. Fazer o gráfico $v_0 \times [S]$ na ausência de inibidor, na presença de duas concentrações de inibidor competitivo e na presença de duas concentrações de **inibidor não competitivo**.



V_{max} = muda
 K_m = sem mudanças

18. Fazer o gráfico $v_0 \times [S]$ na ausência de inibidor, na presença de duas concentrações de inibidor competitivo e na presença de duas concentrações de **inibidor não competitivo**.



Uma vez que inibidores não-competitivos tenham sido identificados, o valor de K_i é melhor determinado através de um segundo gráfico obtido plotando-se os diferentes valores de inclinação ou de $1/V_{\max}$ aparente (intercepto no eixo $1/V_0$) versus concentração de inibidor ($[I]$). Em ambos os gráficos o intercepto no eixo de $[I]$ dá o valor de $-K_i$.

No caso de Inibidor competitivo fazer o gráfico de $1/V_{\max}$ aparente vs [Inibidor]

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{V_{\max}} \times \frac{1}{[S]} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) + \frac{1}{V_{\max}}$$

$$v_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_M \left(1 + \frac{[I_c]}{K_{I_c}} \right) + [S]}$$

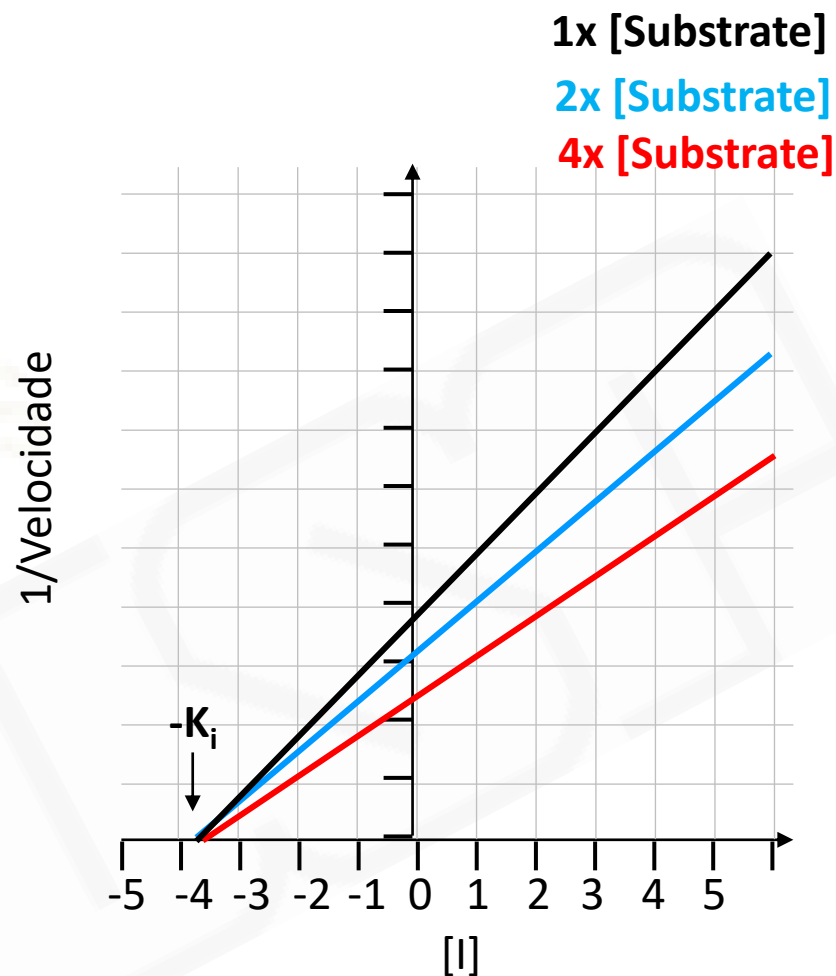
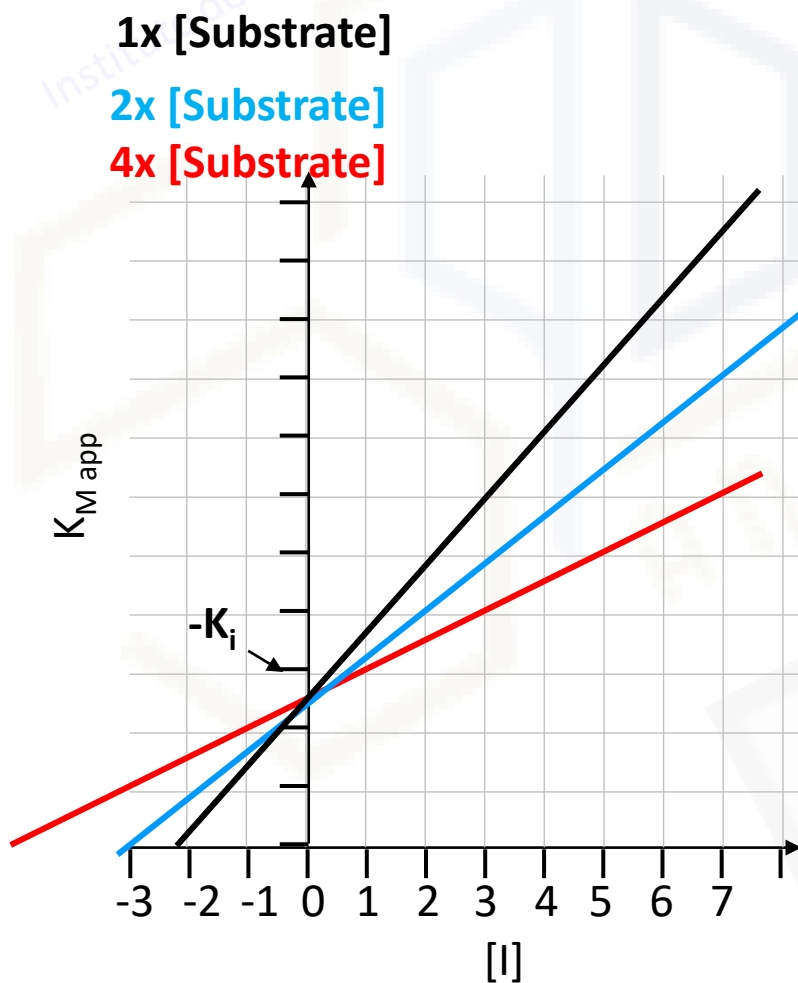
Para calcular K_i de um inibidor não competitivo fazer o gráfico de K_m aparente vs [Inibidor]

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{V_{\max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)$$

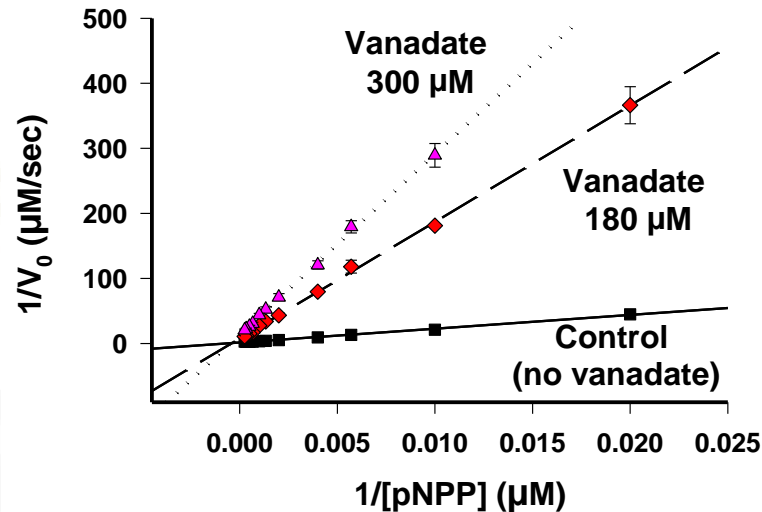
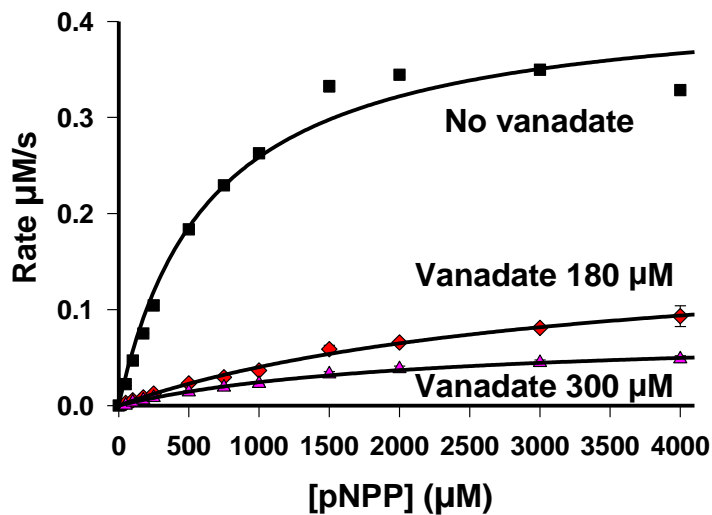
$$v_0 = \frac{\frac{V_{\max}}{1 + \frac{[I_{NC}]}{K_{I_{NC}}}} [S]}{K_M + [S]}$$

19. Definir *constante de inibição* (K_i). O que esta constante mede?

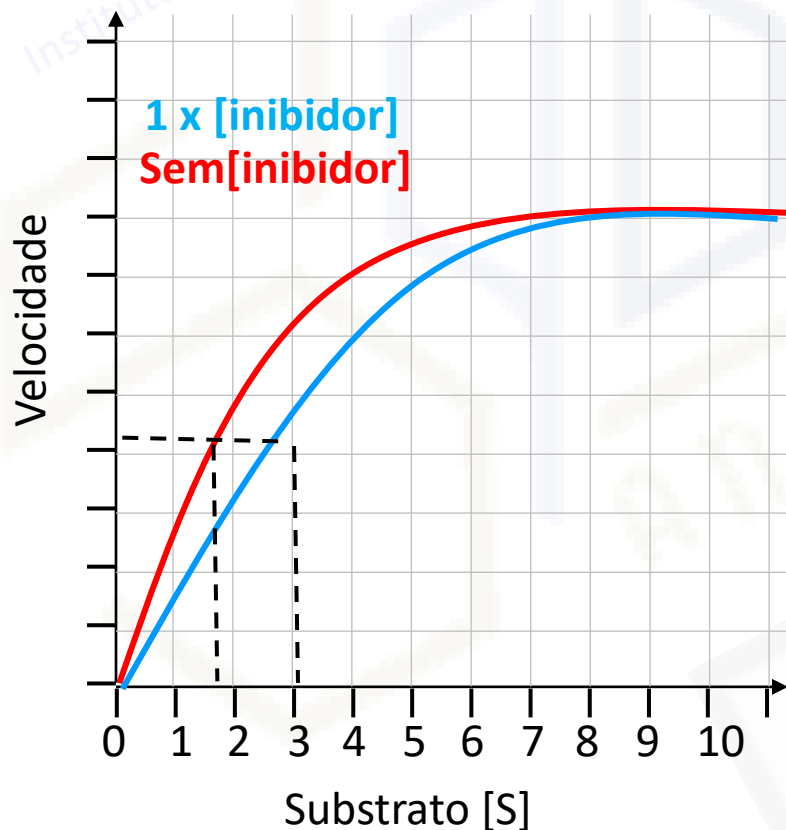
K_i – É a constante de afinidade da Enzima e o Inibidor



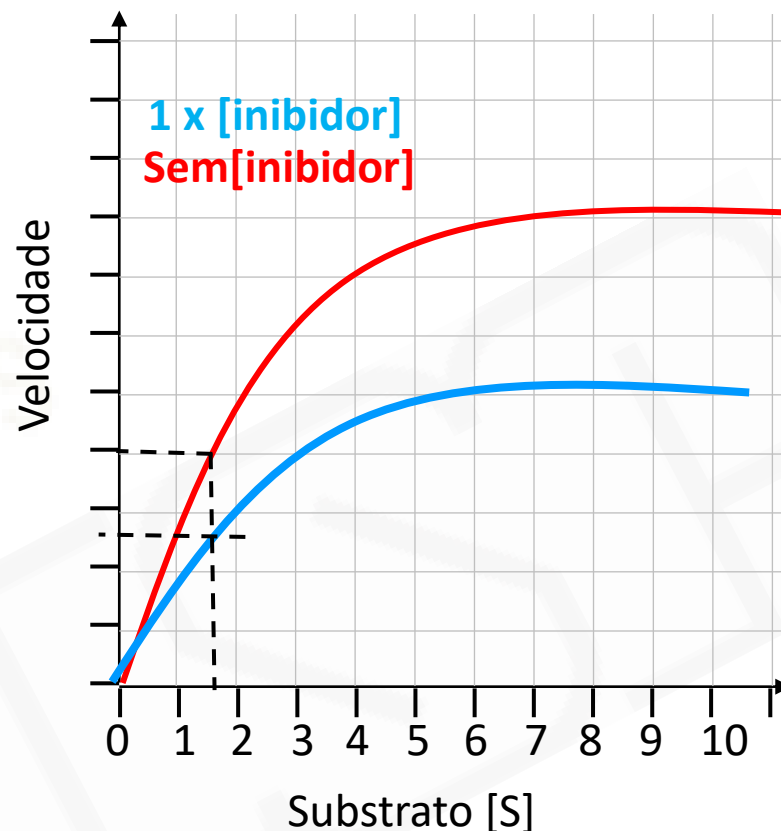
Inibição competitiva



20. Quais seriam os valores de K_M e V_{max} se fosse adicionado inibidor competitivo na concentração de $1 K_i$ à reação? E se fosse adicionado inibidor não competitivo, também na concentração equivalente a $1 K_i$? Considere duas reações separadas para cada inibidor.

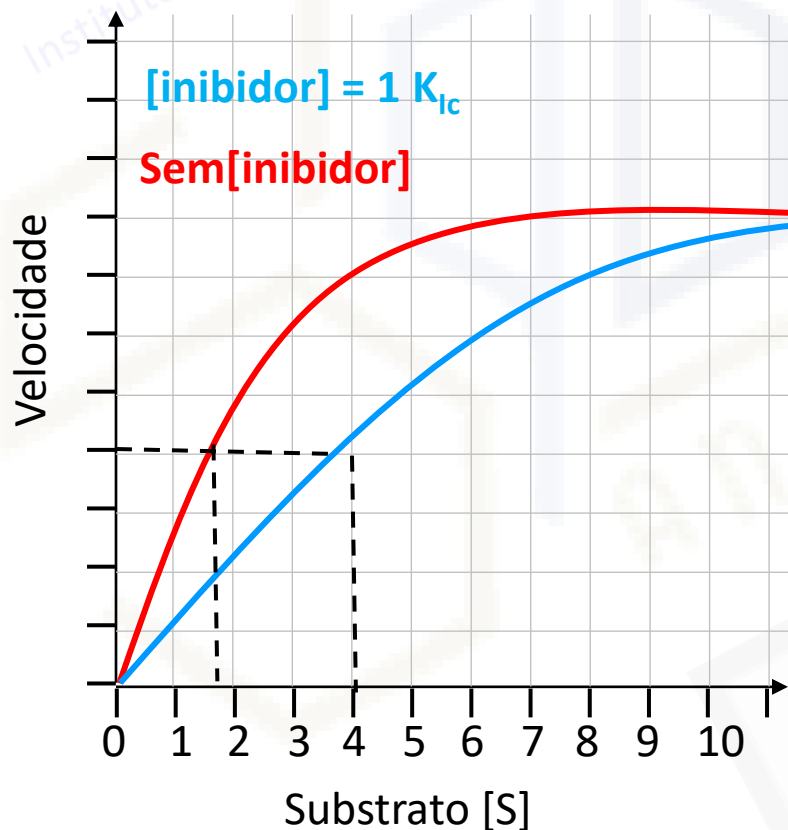


K_M – aumenta
 V_{max} – se mantém



K_M – se mantém
 V_{max} – reduz

20. Quais seriam os valores de K_M e V_{\max} se fosse adicionado inibidor competitivo na concentração de $1 K_i$ à reação? E se fosse adicionado inibidor não competitivo, também na concentração equivalente a $1 K_i$? Considere duas reações separadas para cada inibidor.



K_M – aumenta
 V_{\max} – se mantém

$$V_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_M \left(1 + \frac{[I_c]}{K_{Ic}} \right) + [S]}$$



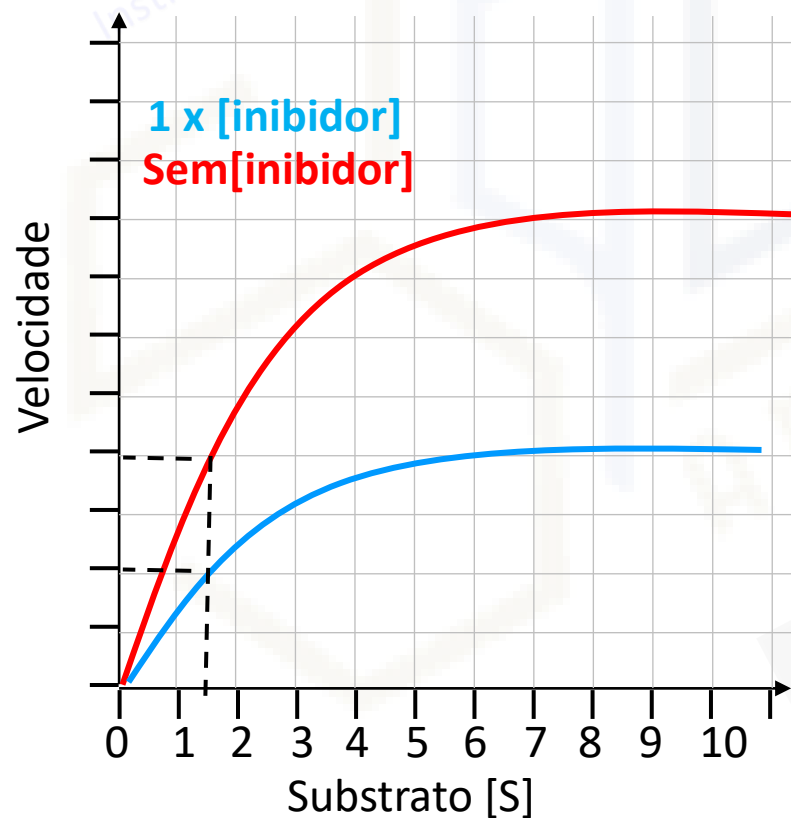
$$V_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_M \left(1 + \frac{[K_{Ic}]}{K_{Ic}} \right) + [S]}$$



$$V_0 = \frac{V_{\max} [S]}{2 K_M + [S]}$$

Portanto o K_M dobraria
 V_{\max} ficaria igual

20. Quais seriam os valores de K_M e V_{max} se fosse adicionado inibidor competitivo na concentração de $1 K_i$ à reação? E se fosse adicionado inibidor não competitivo, também na concentração equivalente a $1 K_i$? Considere duas reações separadas para cada inibidor.



K_m – se mantém
 V_{max} – reduz

$$V_0 = \frac{\frac{V_{máx}}{1 + \frac{[I_{NC}]}{K_{INC}}} [S]}{K_M + [S]} \quad \rightarrow \quad V_0 = \frac{\frac{V_{máx}}{1 + \frac{[K_{INC}]}{K_{INC}}} [S]}{K_M + [S]}$$

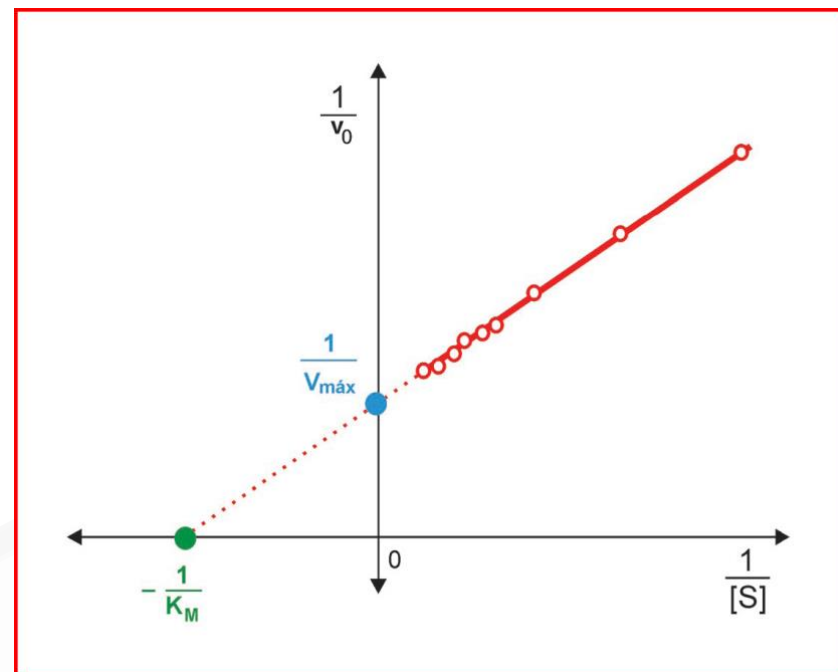
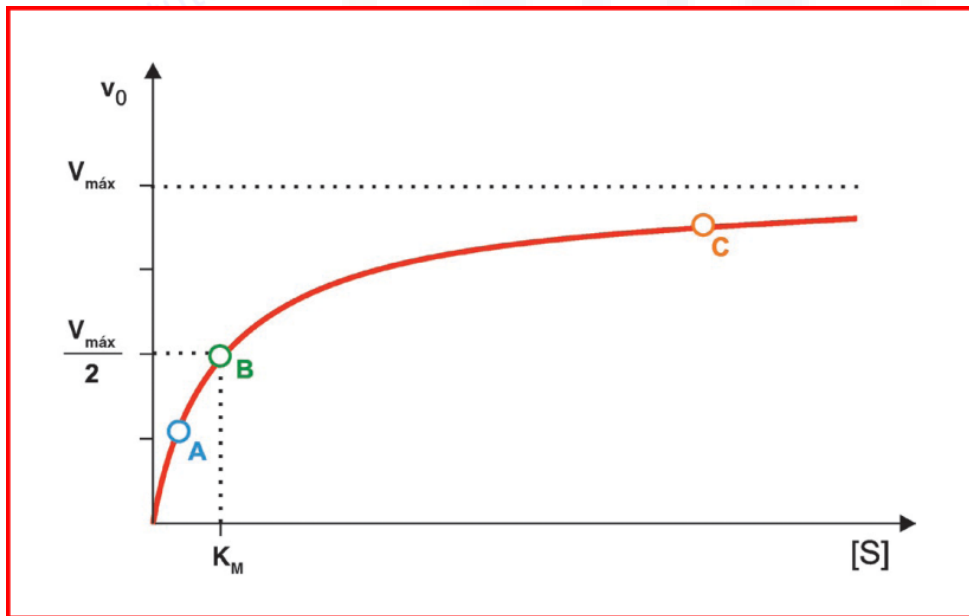
$$\downarrow$$

$$V_0 = \frac{\frac{V_{máx}}{2} [S]}{K_M + [S]}$$

V_{Max} na presença de $[I_{NC}] = 1 K_{INC}$

A velocidade seria a metade da V_{Max} sem inibidor

21. Mostrar as vantagens da transformação de Lineweaver-Burk para a determinação do K_M de uma enzima. Fazer o gráfico de Lineweaver-Burk na ausência de inibidor, na presença de duas concentrações de inibidor competitivo e na presença de duas concentrações de inibidor não competitivo.



$$y = ax + b$$

$$y = \text{slope} \cdot x + \text{intercepto}$$

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{\max} [S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

22. Por que a cinética de algumas enzimas alostéricas tem aspecto sigmoidal enquanto as enzimas michaelianas têm cinéticas hiperbólicas?

Ler Regulação alostérica, pag. 258 a 261).

- ✓ **Cooperatividade**
- ✓ **Ativação alostérica**

23. Fazer o gráfico $v_0 \times [S]$ para uma reação catalisada por uma enzima alostérica, na ausência de efetadores e na presença de efetadores positivo e negativo, que afetam seu K_M .

