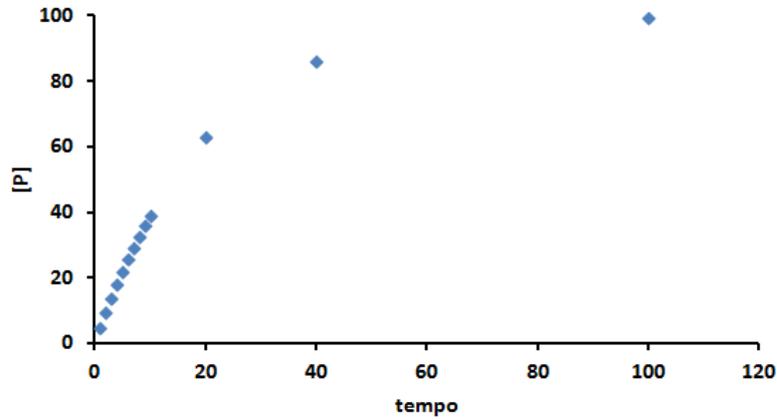
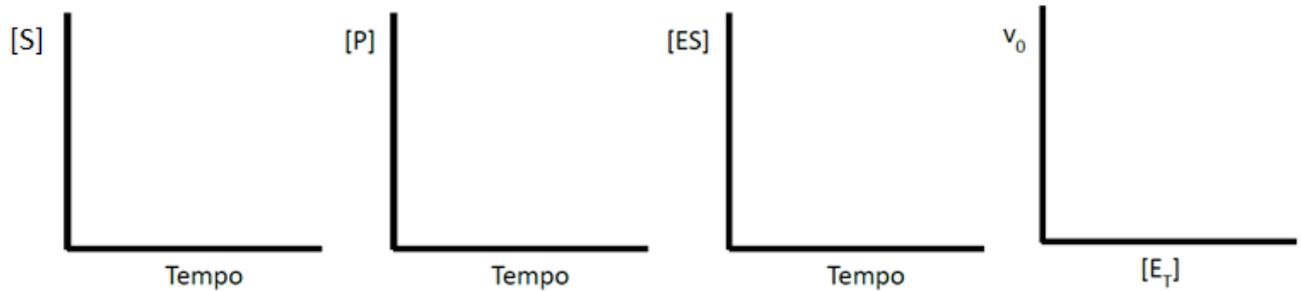


Enzimas e Cinética Enzimática

1 - Formule hipóteses para o resultado descrito no gráfico abaixo

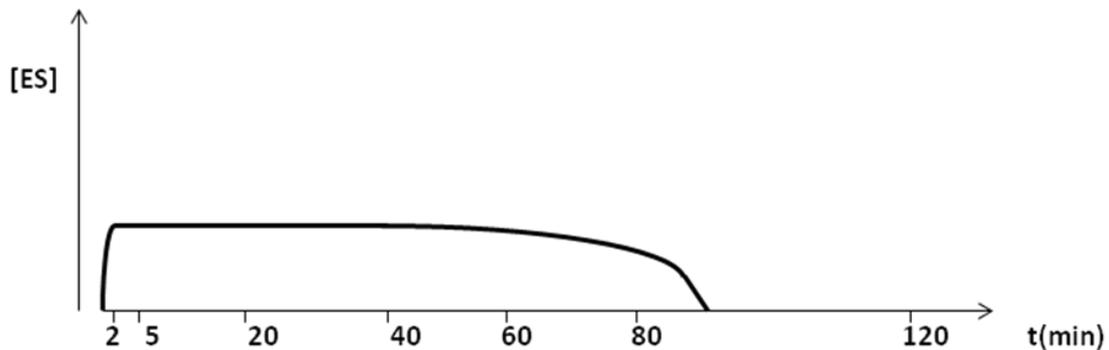


2 - Para uma reação enzimática que está ocorrendo em condições de velocidade inicial, esquematize as curvas que representem a relação entre as variáveis de cada gráfico a seguir.



3 - Com base na figura abaixo obtida para uma reação catalisada enzimaticamente

a) indique qual a faixa de tempo em que podemos assumir que a reação catalisada enzimaticamente encontra-se em condição de estado estacionário. Justifique a resposta.

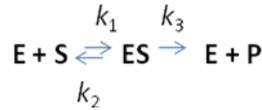


b) Considerando que foram feitas quatro medidas de concentração de produto nos tempos 5, 10, 15 e 20 min, esquematize com seria o gráfico de $[P]$ versus tempo (min). Explique.

c) Esquematize como seria o gráfico de velocidade da reação versus tempo dentro desta mesma janela de tempo (5 a 20 min). Explique.

4 - Descreva e compare (salientando semelhanças e diferenças) os modelos de “equilíbrio rápido” e “estado estacionário” para reações catalisadas enzimaticamente.

5 - Com base no esquema e na tabela abaixo indique qual(is) destas enzimas provavelmente catalisaria(m) a reação em condições de equilíbrio rápido e estado estacionário. Justifique sua resposta.

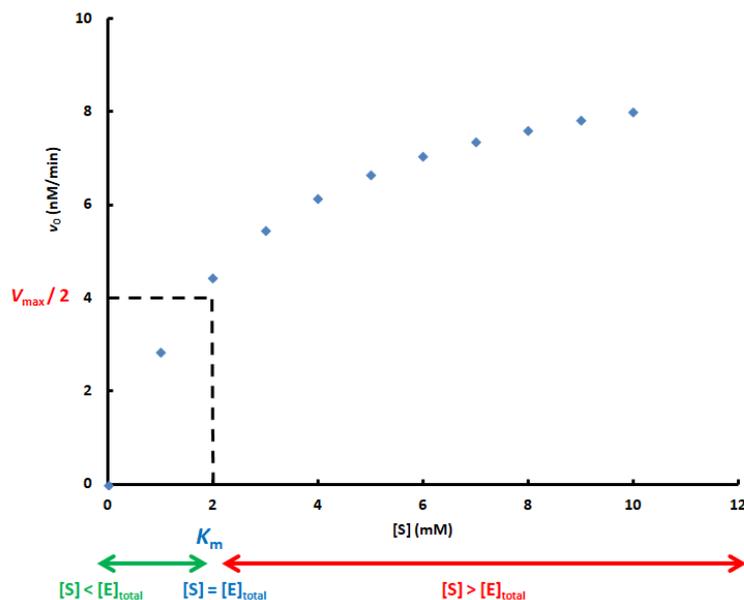


Enzima	k_1 ($M^{-1}.s^{-1}$)	k_2 (s^{-1})	k_3 (s^{-1})
1	1	0,1	0,1
2	1	0,1	10
3	10	0,1	0,0001

6 – Considerando que enzimas são caracterizadas *in vitro* pela análise de medidas de velocidade inicial seguindo modelo de Estado Estacionário e/ou Equilíbrio Rápido, pondere sobre a adequação e consequência da realização destes experimentos em situações em que $[S] \approx [E]_{total}$.

7 - Demonstrar que nas condições usualmente empregadas em ensaios *in vitro* ($[S] \gg [E]_{total}$ e velocidade inicial) a razão de saturação de uma enzima pelo substrato ($[ES]/[E]_{total}$) depende apenas do K_m e da concentração do substrato.

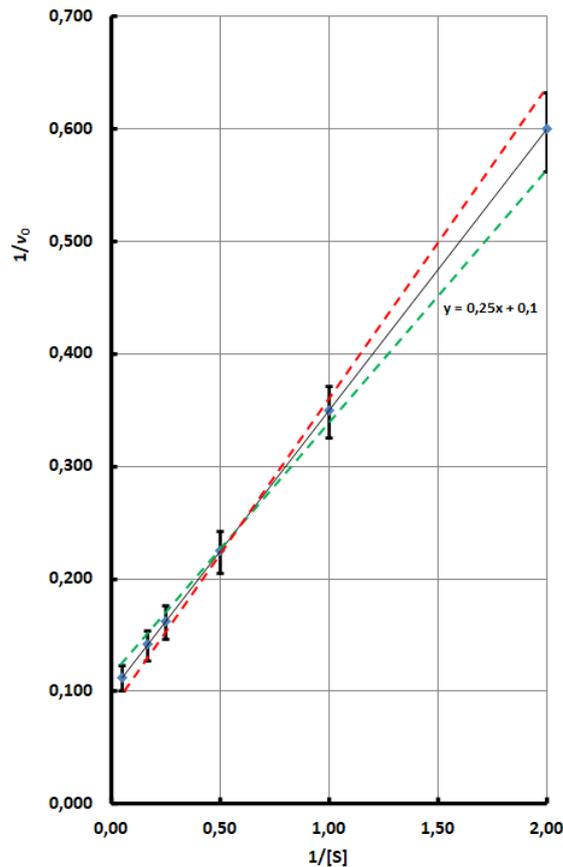
8 - A figura abaixo representa um **conceito equivocado** frequentemente invocado para explicar a curva de $v_0 \times [S]$ em reações catalisadas por enzimas. Segundo esta **interpretação equivocada** da curva, a concentração de substrato numericamente igual ao K_m seria onde $[S]$ equivale à $[E]_{total}$ na reação. Abaixo deste ponto, a concentração de substrato seria menor do que a concentração de enzima, enquanto acima deste ponto a concentração de substrato excederia aquela de enzima. Inclusive até o ponto que $[S] \gg [E]_{total}$ que se atingiria a Velocidade Máxima. Baseando-se nos exercícios anteriores, explique porque este conceito representado na figura está equivocado.



9 - O gráfico de Lineweaver-Burk (gráfico de $1/v_0$ versus $1/[S]$) é especialmente útil para análise de mecanismos de inibição, sendo muitas vezes usado para uma estimativa inicial de K_m e V_{max} . Partindo dos dados de $[S]$ e velocidade inicial (v_0) fornecidos, use a linearização de Lineweaver-Burk para estimar o K_m e o V_{max} desta enzima. A preparação do gráfico é parte obrigatória da resposta.

[S] (mM)	v_0 ($\mu\text{mol}/\text{min}$)
1,00	83,3
0,50	71,4
0,33	62,5
0,25	55,6
0,20	50,0
0,17	45,5
0,14	41,7
0,13	38,5
0,11	35,7
0,10	33,3

10 – Uma limitação e dificuldade para o uso do gráfico de Lineweaver-Burk (gráfico de $1/v_0$ versus $1/[S]$) para estimativa de K_m e V_{max} de enzimas é o efeito de erros sistemáticos sobre a inclinação da reta, o que acaba introduzindo imprecisão nos parâmetros cinéticos. Para ilustrar este efeito, o gráfico abaixo foi construído com base em dados de v_0 calculados empregando a equação de Michaelis-Menten sobre os quais foi aplicado um erro sistemático de 10%. A equação de reta apresentada no gráfico foi determinada com base nos dados calculados.



Os pontos extremos desta reta, consideradas as barras de erro, são marcados pelos valores $1/[S] = 2$ e $1/v_0 = 0,6 + 0,055$ e $0,6 - 0,067$ e $1/[S] = 0,05$ e $1/v_0 = 0,11 + 0,01$ e $0,11 - 0,013$. Empregando estes valores extremos estime os limites superior (linha laranja) e inferior (linha verde) de flutuação da inclinação e seu efeito em termos de erro relativo sobre o K_m .

11 - Em um experimento empregando-se uma preparação que continha 1 η M da enzima succinato desidrogenase e uma faixa de 0,5 a 50 μ M de substrato succinato foram determinados um K_m de 5 μ M e um V_{max} de 1 η M/s. Em um segundo experimento feito separadamente, mas com a mesma preparação enzimática, foi possível avaliar que para associação entre a succinato desidrogenase e o inibidor competitivo malonato observa-se um K_i igual a 20 μ M.

Caso estes dois experimentos sejam repetidos com uma nova preparação contendo 0,5 η M de succinato desidrogenase, mas mantendo a mesma faixa de concentração do substrato e de inibidor competitivo, quais os valores esperados para K_m , V_{max} e K_i ? Justifique a resposta.

12 - Uma **definição informal** frequentemente usada no estudo de enzimas é que “ K_m é a metade da Velocidade Máxima”. Considerando então que um experimento seja repetido com o dobro da concentração de enzima (por exemplo 0,5 e 1 nM) e obtenha-se conseqüentemente um V_{max} duas vezes maior. Com base na **definição informal** acima então o K_m também dobraria?? E a afinidade entre a enzima e o substrato? Seria alterada? Discuta como o uso desta **definição informal** pode levar à conceitos equivocados.

13 - Qual a unidade de K_m ? Demonstre que K_m é expresso em M (Molar)?

14 - Com base na tabela abaixo (BBActa 1545, 41-52; 2001) que apresenta os parâmetros cinéticos para hidrólise de uma série de substratos catalisada por uma mesma beta-glicosidase, indique qual a ordem de preferência pelo substrato (especificidade) desta enzima. Justifique sua resposta.

Obs. Apresente a ordem de preferência (especificidade) em seqüência decrescente.

Substrate	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($s^{-1} mM^{-1}$)
MU β glc	2.3 ± 0.1	1.73 ± 0.09	0.75 ± 0.06
NP β glc	0.47 ± 0.01	0.56 ± 0.01	1.2 ± 0.03
NP β gal	2.1 ± 0.2	0.17 ± 0.01	0.08 ± 0.006
NP β xyl	0.52 ± 0.04	0.0140 ± 0.0001	0.028 ± 0.002
NP β fuc	0.8 ± 0.1	2.4 ± 0.5	2.8 ± 0.9