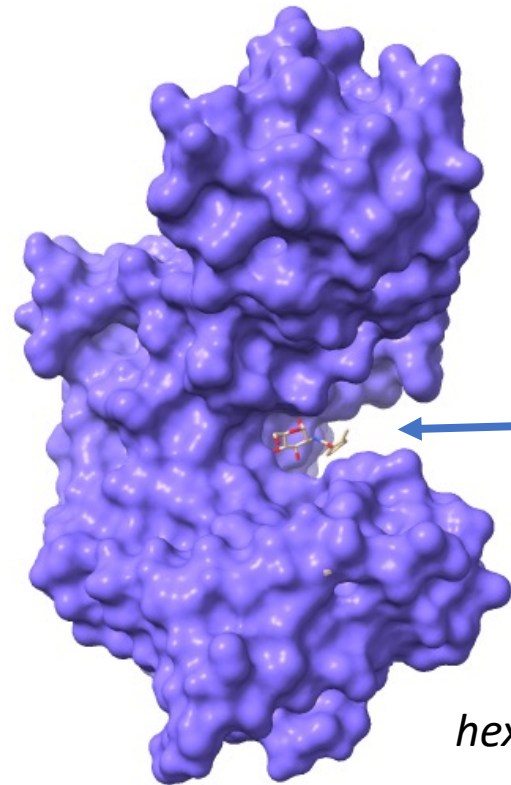


Cinética enzimática (QBQ1453)

Prof. Roberto Kopke Salinas
Departamento de Bioquímica
IQ - USP

Enzimas são proteínas que atuam como catalisadores biológicos



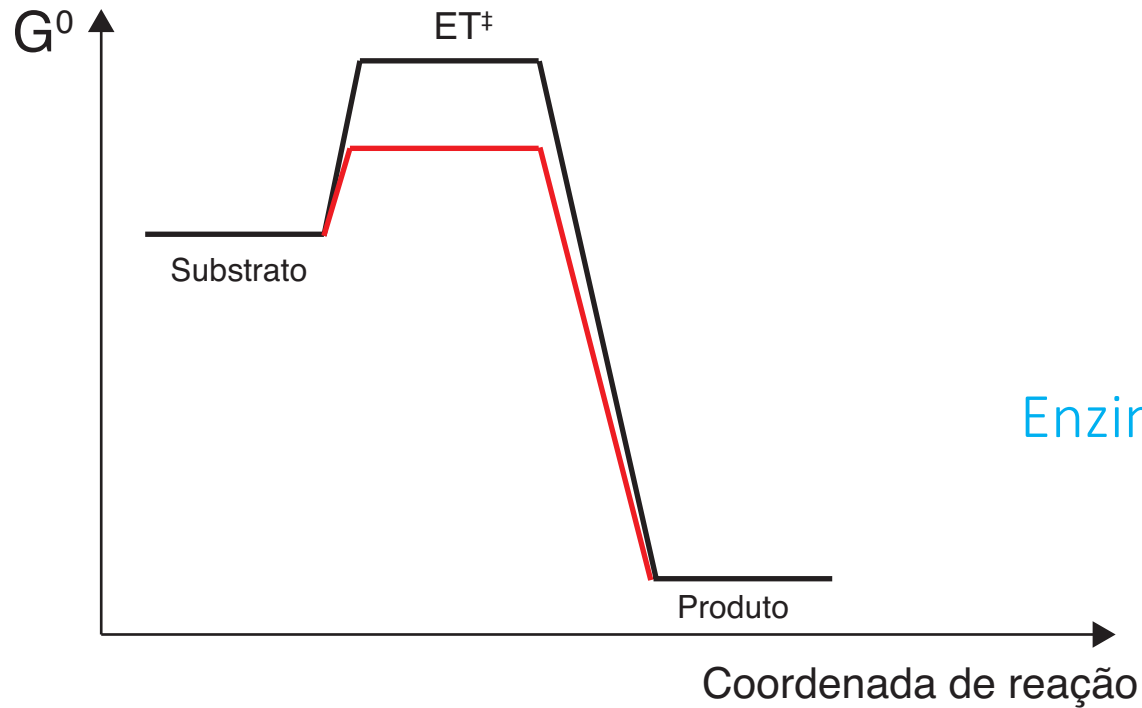
hexoquinase

$$\frac{v_{catalisada}}{v_{n\tilde{a}o-catalisada}} = 10^6$$

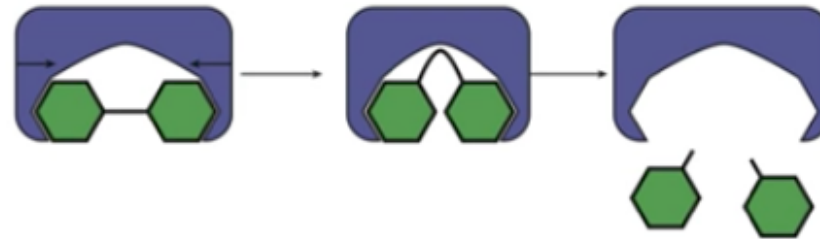
Sítio ativo

Enzimas catalisam todas as reações do metabolismo

Por que enzimas são bons catalisadores?

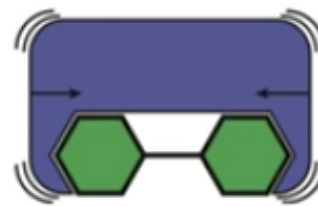


Enzyme complimentary to transition state



Enzimas estabilizam o estado de transição

Enzyme complementary to substrate



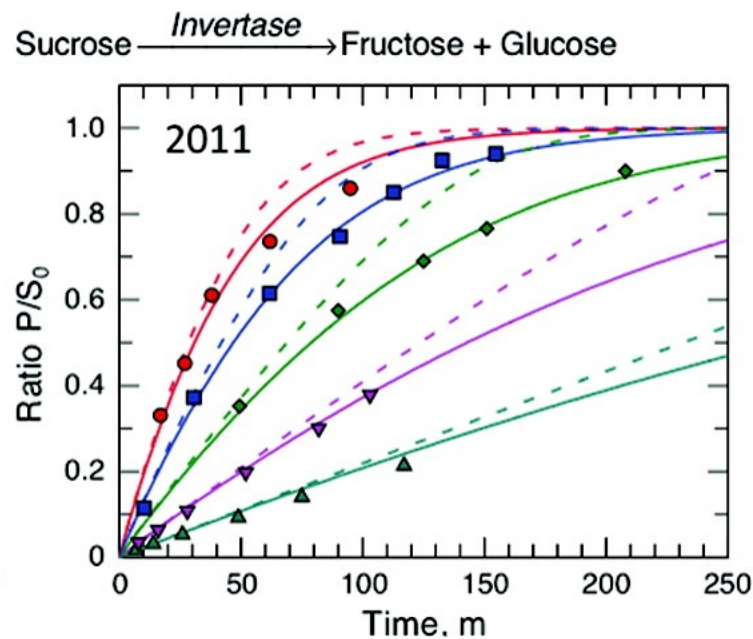
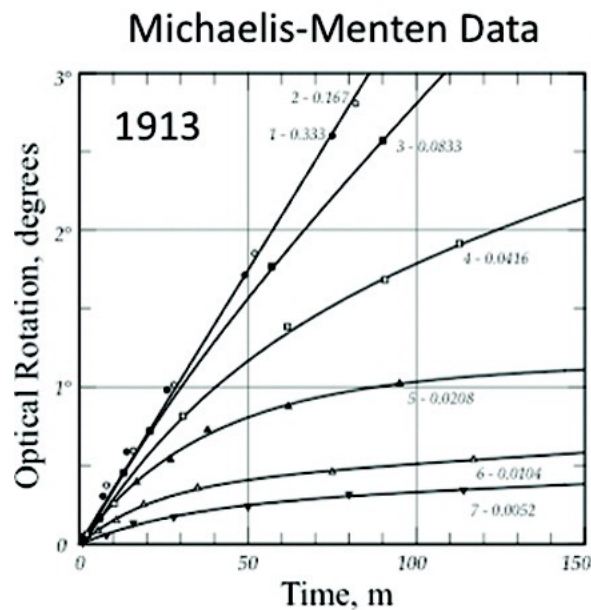
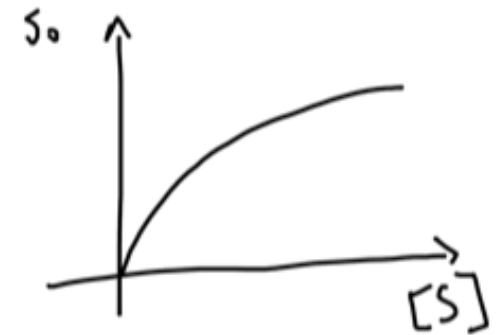
Doesn't enhance catalysis

A velocidade de uma reação enzimática depende da concentração do complexo enzima-substrato, e pode ser predita pela equação de Michaelis-Menten

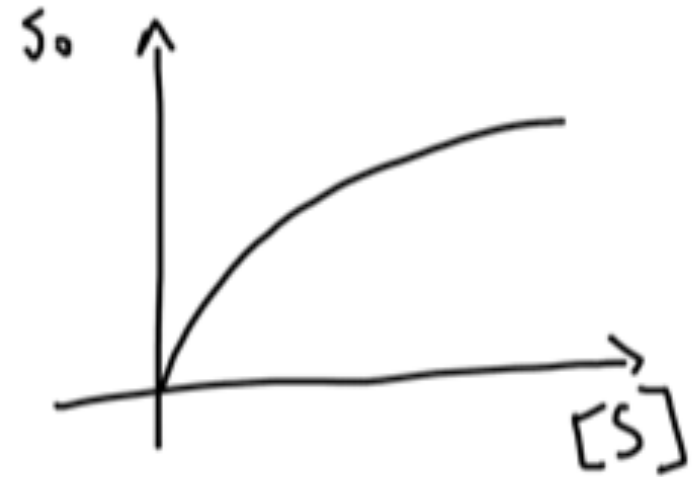
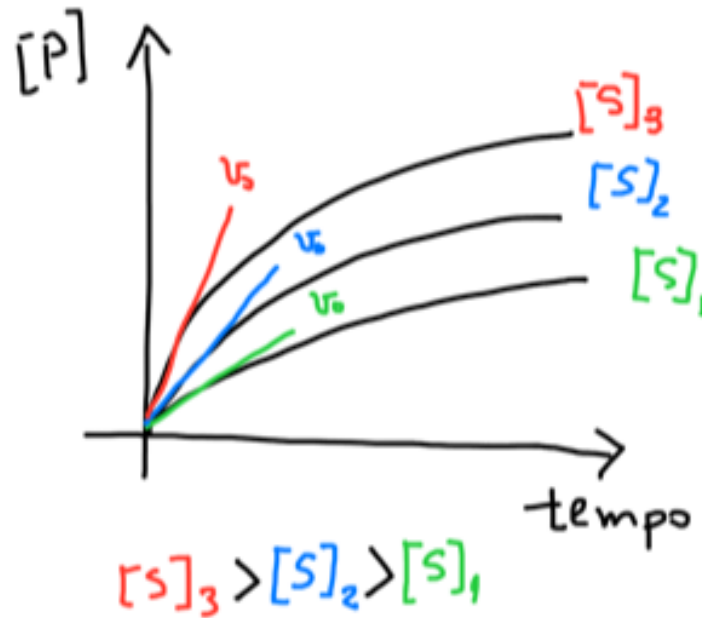
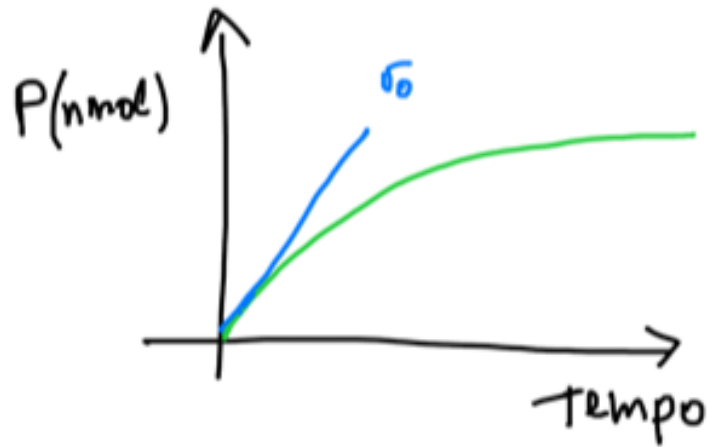


$$V_{max} = k_{cat} [E]_{total}$$

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

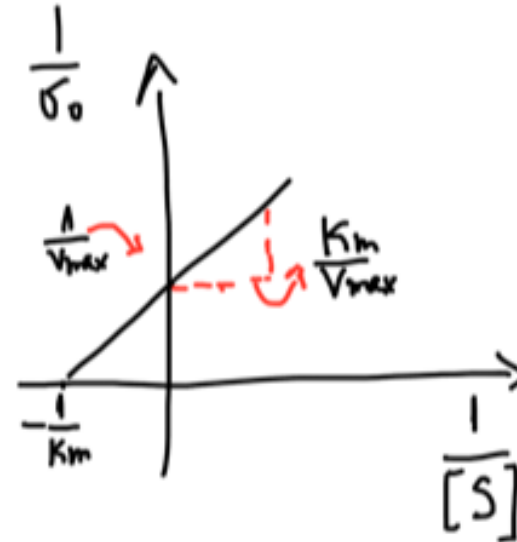
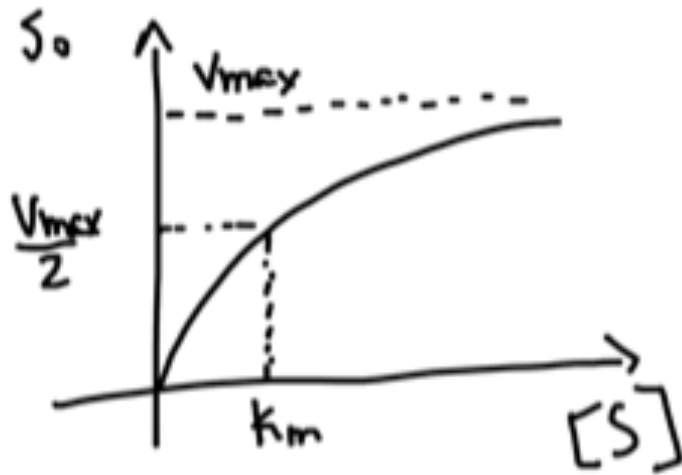


Como podemos determinar as características cinéticas de uma enzima?



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

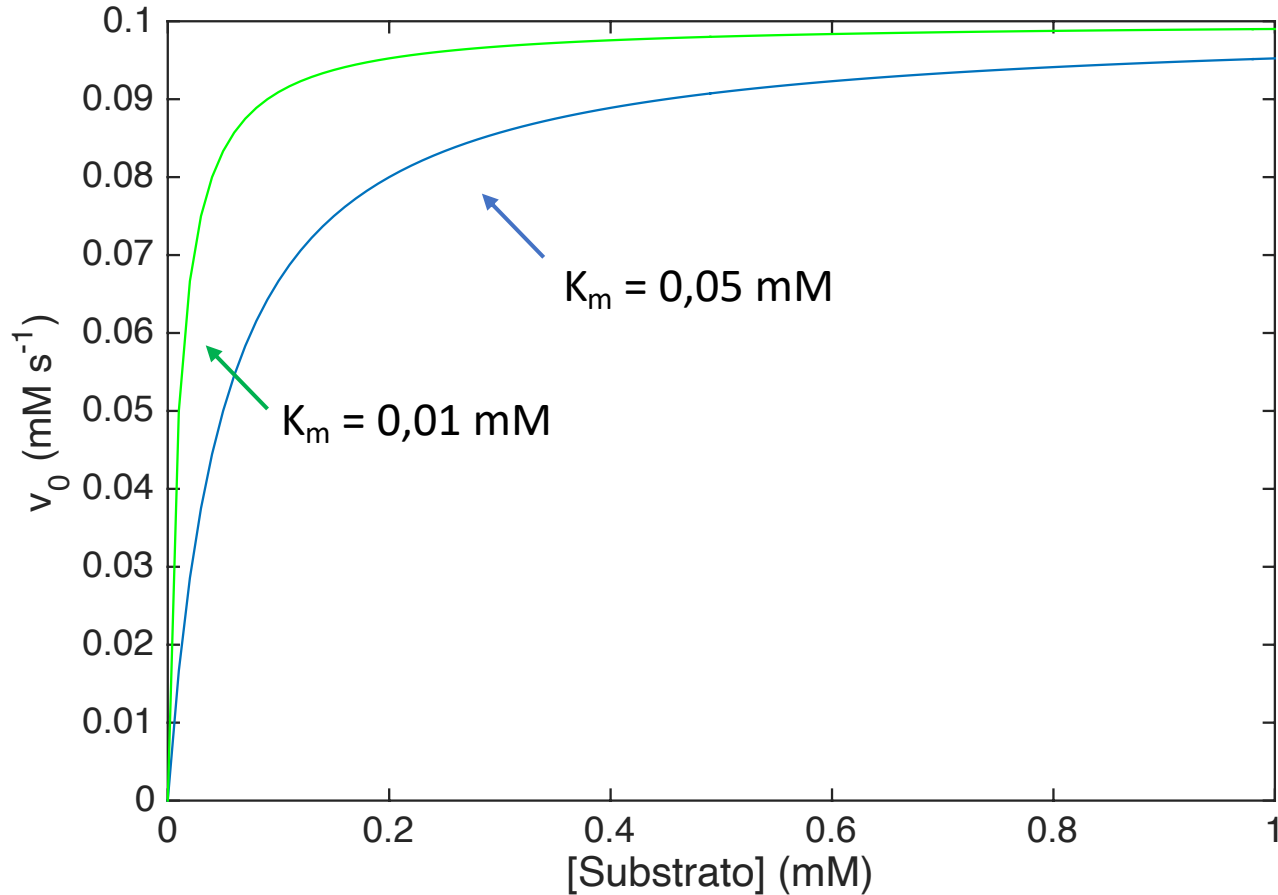
Como podemos determinar as características cinéticas de uma enzima?



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

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

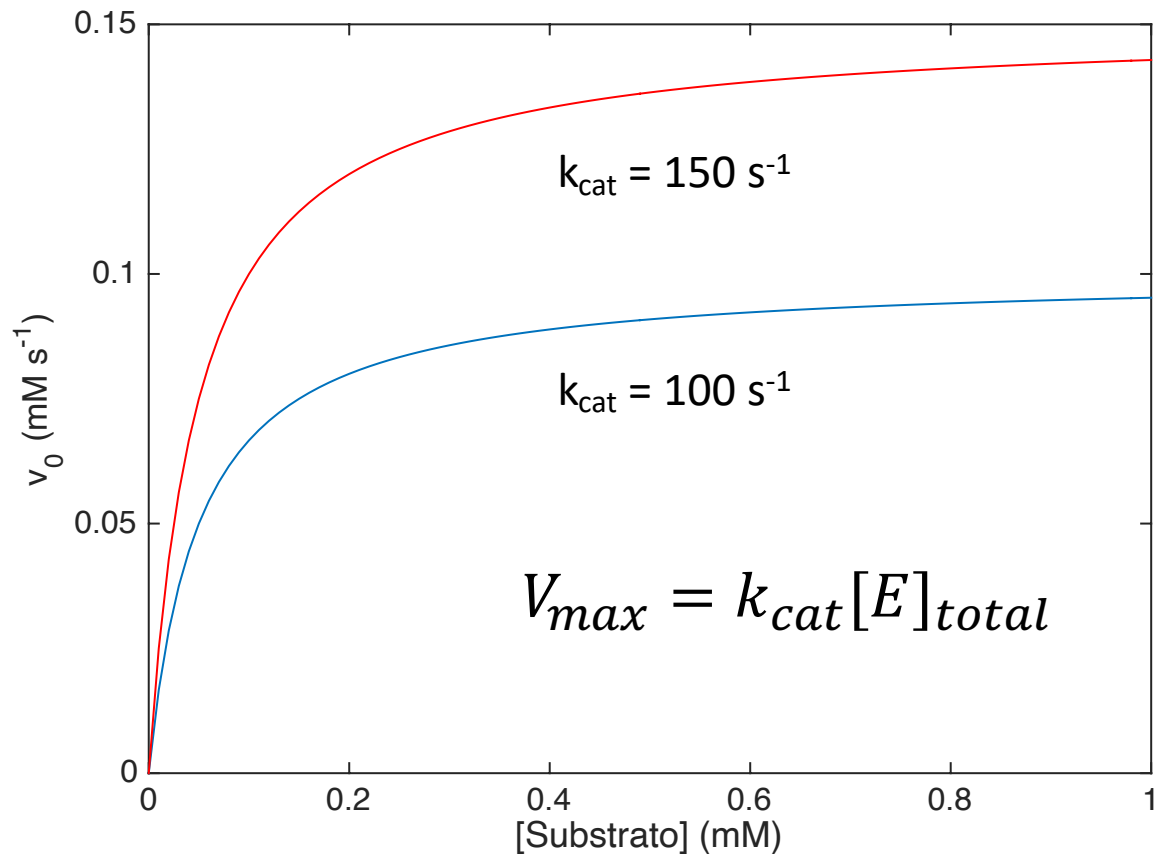
Qual é o significado do K_m ?



| Enzima | Substrato | K_M (mM) |
|--------------------------|---------------|------------|
| Glicerol desidrogenase | glicerol | 39 |
| Anidrase carbônica | CO_2 | 7,5 |
| Álcool desidrogenase | etanol | 0,5 |
| Isocitrato desidrogenase | isocitrato | 0,45 |
| Hexoquinase | glicose | 0,15 |
| Hexoquinase | frutose | 1,5 |

Fonte: Bayardo e Marzocco, Bioquímica Básica, 3a ed., Guanabara Koogan, 2007

A velocidade máxima reflete a atividade da enzima em excesso de substrato



| Enzima | k_{cat} (s^{-1}) | K_M (mM) | k_{cat}/K_M ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) |
|--------------------------------|-------------------------------|----------------------|--|
| Superóxido dismutase | 1×10^6 | 3.5×10^{-4} | 2.8×10^9 |
| Catalase | 1×10^7 | 2.5×10^{-2} | 4.0×10^8 |
| Acetilcolinesterase | 1×10^4 | 9.0×10^{-5} | 1.6×10^8 |
| Anidrase carbônica | 1×10^6 | 1.2×10^{-2} | 8.3×10^7 |
| Pepsina (hidrólise de Phe-Gly) | 5×10^{-1} | 3.0×10^{-4} | 1.7×10^3 |

Por que conhecer K_m ?

- comparar enzimas de diferentes fontes (tecidos, organismos, fase do ciclo de vida, etc...)
- comparar diferentes substratos de uma mesma enzima (relação com afinidade)

Por que conhecer V_{max} ?

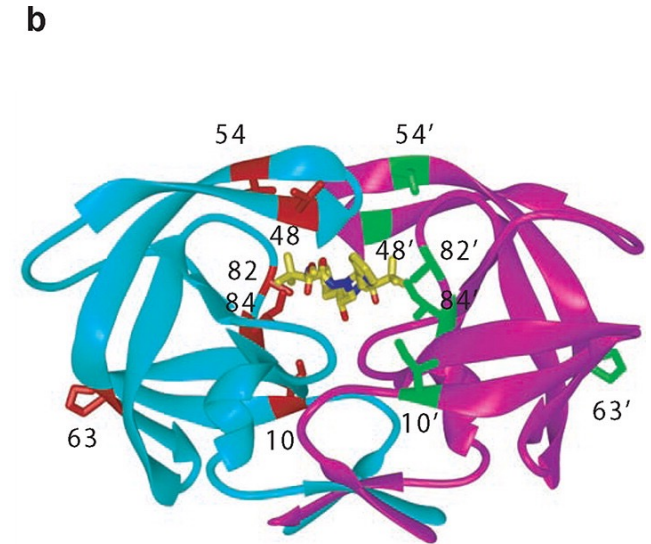
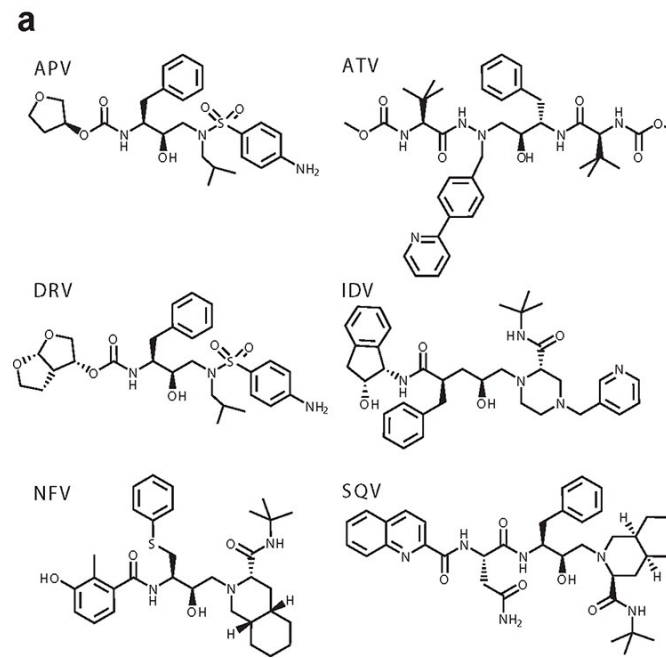
Para uma mesma preparação enzimática é possível comparar a velocidade de catálise para diferentes tipos de substrato ($V_{max} \rightarrow k_{cat}$)

Por que conhecer k_{cat}/K_m ?

Eficiência de catálise frente a diferentes substratos (comparação real)

Inibidores

- Moléculas que se ligam reversivelmente ou irreversivelmente às enzimas, reduzindo a atividade enzimática ou inativando a enzima
- Antivirais: inibidores da RNA polimerase, da protease do HIV e do HCV
- Anti-hipertensivo: captopril inibe a ECA1

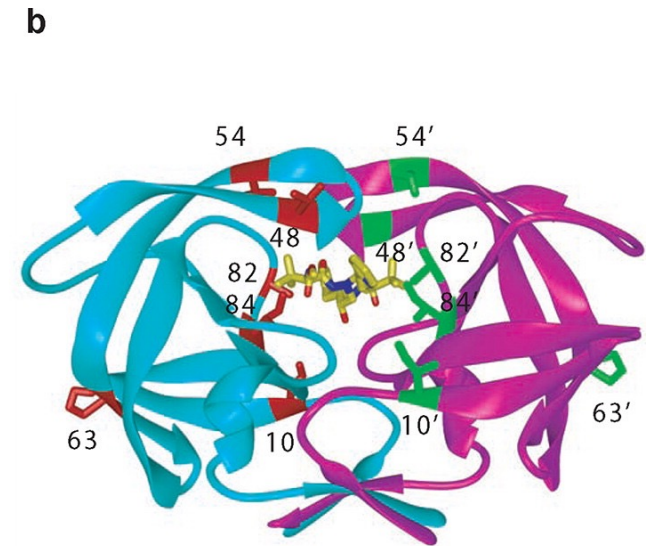
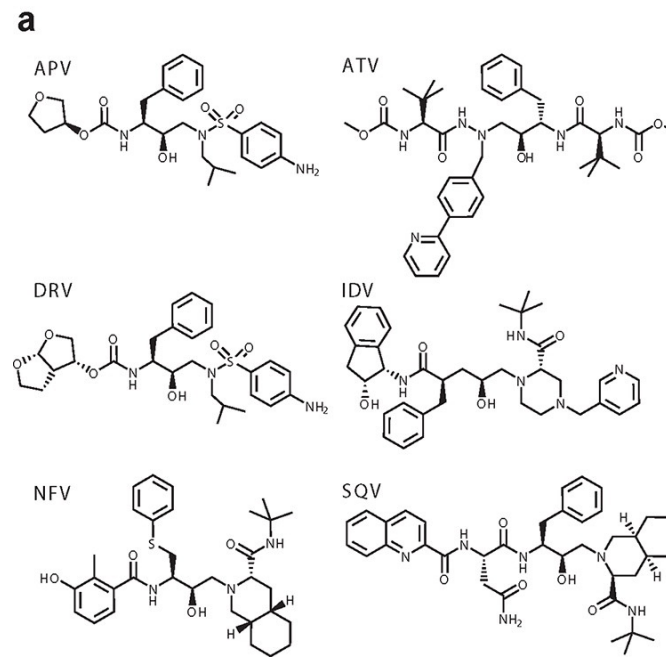


King et al., 2012 DOI: (10.1021/cb300191k)

| Protease type | K_m (μM) | k_{cat} (s^{-1}) | k_{cat}/K_m ($\text{s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$) |
|---------------|-------------------------|--------------------------------------|---|
| WT | 12.9 ± 0.9 | 10.8 ± 0.3 | 0.84 |
| I50V | 29 ± 2 | 1.90 ± 0.04 | 0.07 |
| V82F/I84V | 13 ± 2 | 3.0 ± 0.1 | 0.23 |
| MDR-HM | 32 ± 3 | 1.5 ± 0.1 | 0.05 |
| TRM | 31 ± 1 | 7.0 ± 0.1 | 0.23 |

Inibidores

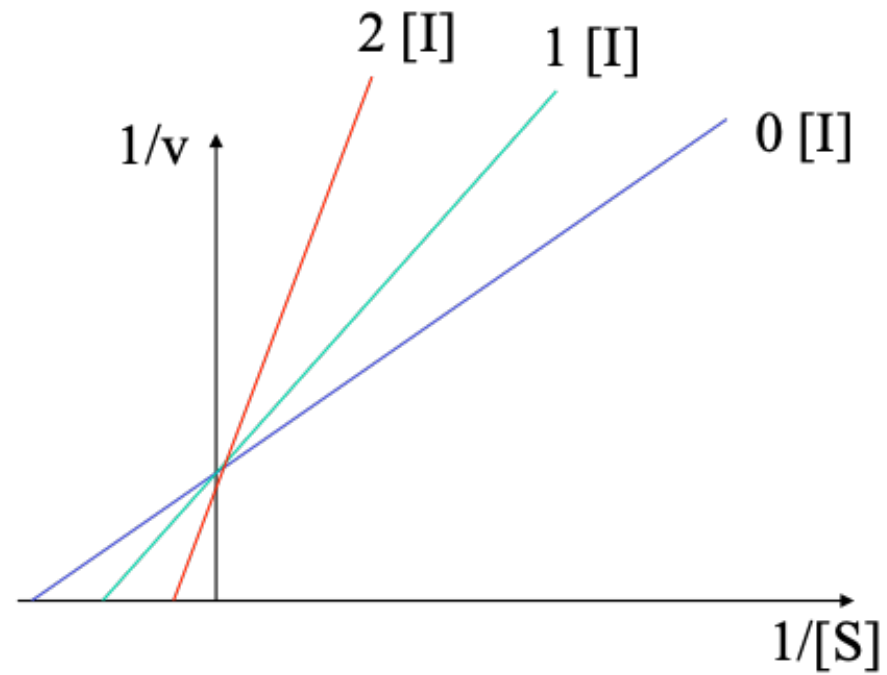
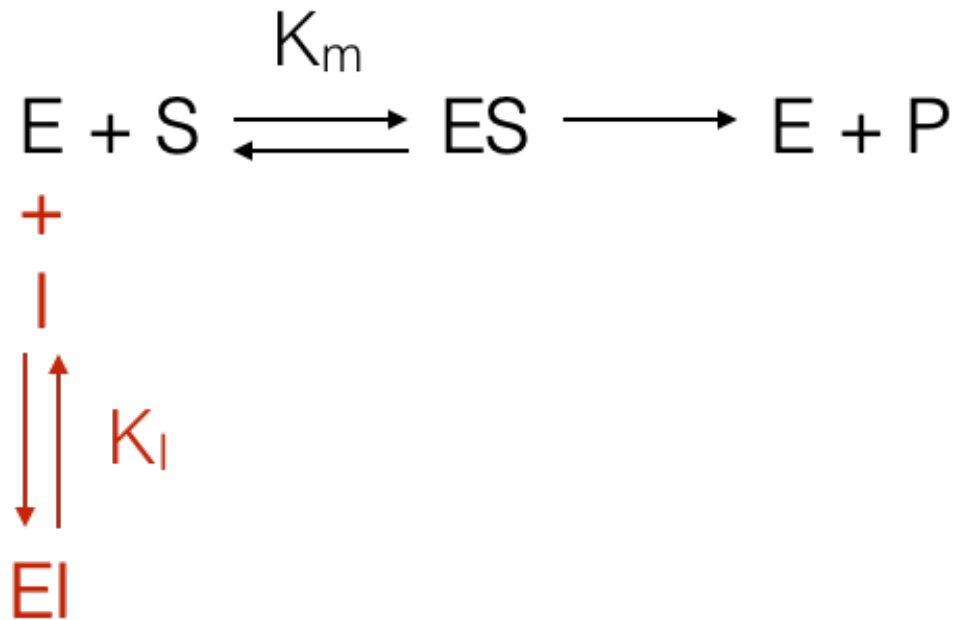
- Moléculas que se ligam reversivelmente ou irreversivelmente às enzimas, reduzindo a atividade enzimática ou inativando a enzima
- Antivirais: inibidores da RNA polimerase, da protease do HIV e do HCV
- Anti-hipertensivo: captopril inibe a ECA1



King et al., 2012 DOI: (10.1021/cb300191k)

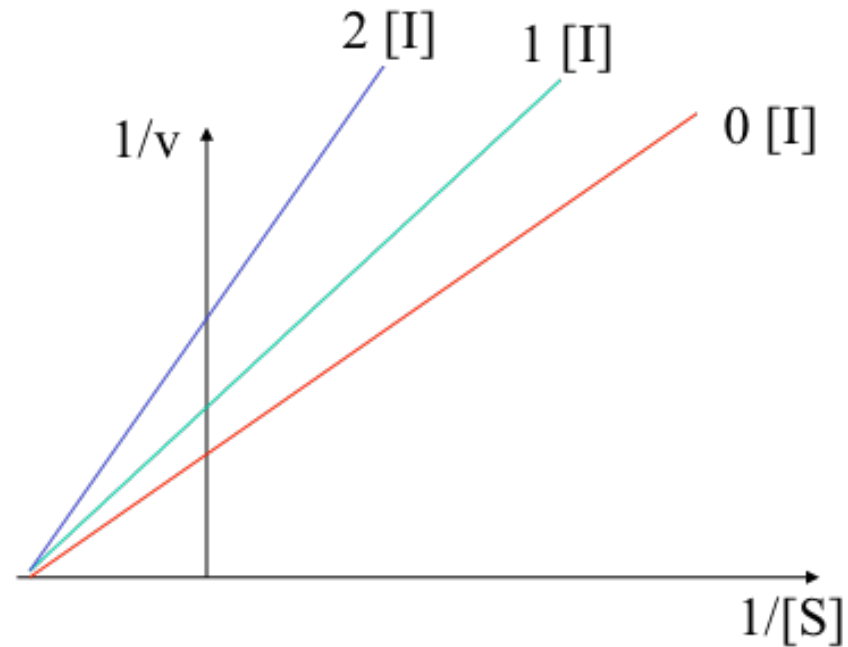
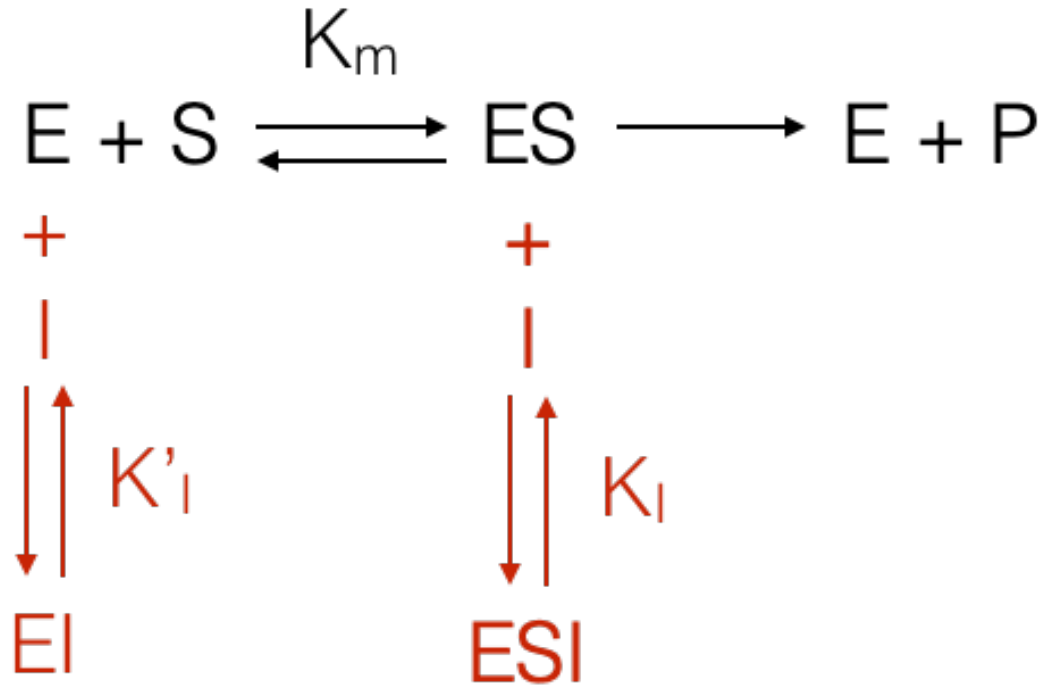
| Inhibitor | K_i (pM) |
|-----------|------------|
| APV | 170 |
| ATV | 35 |
| DRV | 10 |
| IDV | 250 |

Inibidores competitivos



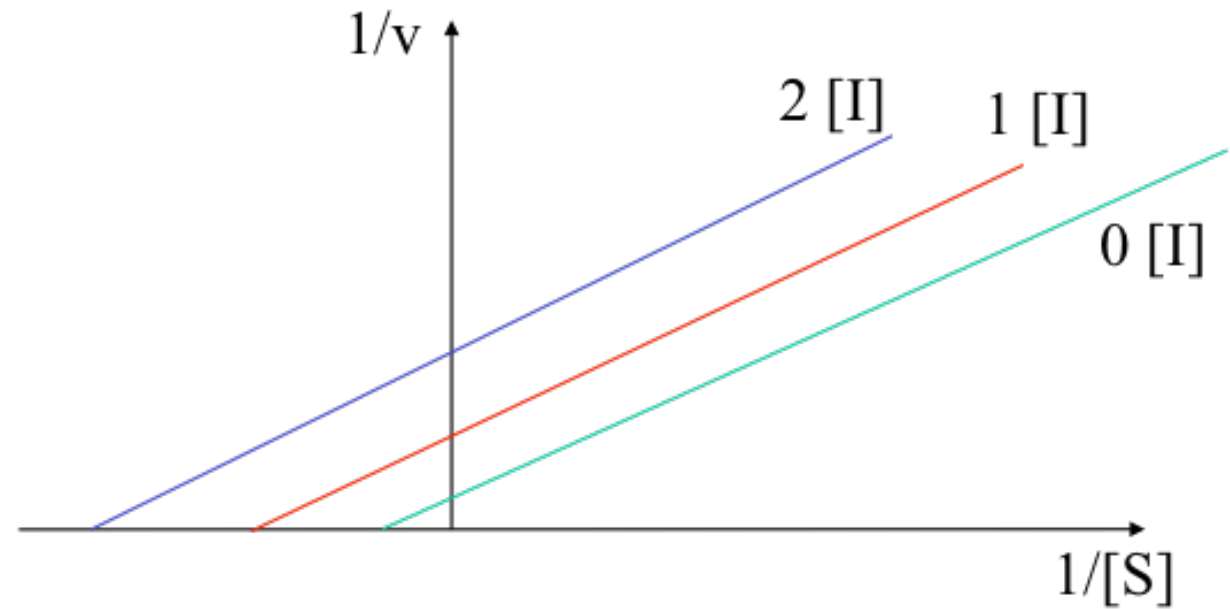
- Interação reversivelmente com a enzima
- São estruturalmente parecidos ao substrato
- Diminuem a afinidade da enzima pelo substrato
- K_I é a constante de dissociação do complexo EI

Inibidores não competitivos



- Interação reversivelmente ou não com a enzima
- Interação em um sítio diferente do sítio ativo
- Diminuem V_{max} (a quantidade de enzima disponível)
- Neste caso particular as constantes de dissociação dos complexos EI e ESI, são iguais: $K'_i = K_i$

Inibidores acompetitivos (“uncompetitive”)



- Interagem apenas com o complexo ES
- Diminuem V_{max} e K_m

Caracterização da alfa-glicosidase: K_m e V_{max}

Objetivos

Caracterizar a α -glicosidase de *Saccharomyces cerevisiae* através das determinações da afinidade (K_m) da enzima pelo substrato (*p*-nitrofenil- α -glicosídeo) e da velocidade máxima (V_{max}) de hidrólise do substrato.

