

LICENCIATURA EM BIOLOGIA

DISCIPLINA
BIOQUÍMICA

Ano Lectivo de 2013/2014

Aula nº 12

28 MAR

Ricardo Boavida Ferreira

Laboratório 46

Cinética enzimática

Reações enzimáticas com um substrato e com mais de um substrato. Equação de Michaelis-Menten. Equações cinéticas e definição de parâmetros cinéticos. Métodos de cálculo dos parâmetros cinéticos.

Regulação da atividade enzimática. Inibição reversível e irreversível; mecanismos cinéticos de inibição.

Efeitos cooperativos e alostéricos. Enzimas (proteínas) alostéricas, características estruturais e conformação das enzimas alostéricas. Regulação alostérica.

Problemas sobre cinética enzimática.

Material de estudo: diapositivos das aulas, bibliografia recomendada e textos de apoio.

Principais factores que afectam a velocidade das reacções catalisadas por enzimas:

- Concentração de enzima
- Concentração do substrato
- Temperatura
- pH

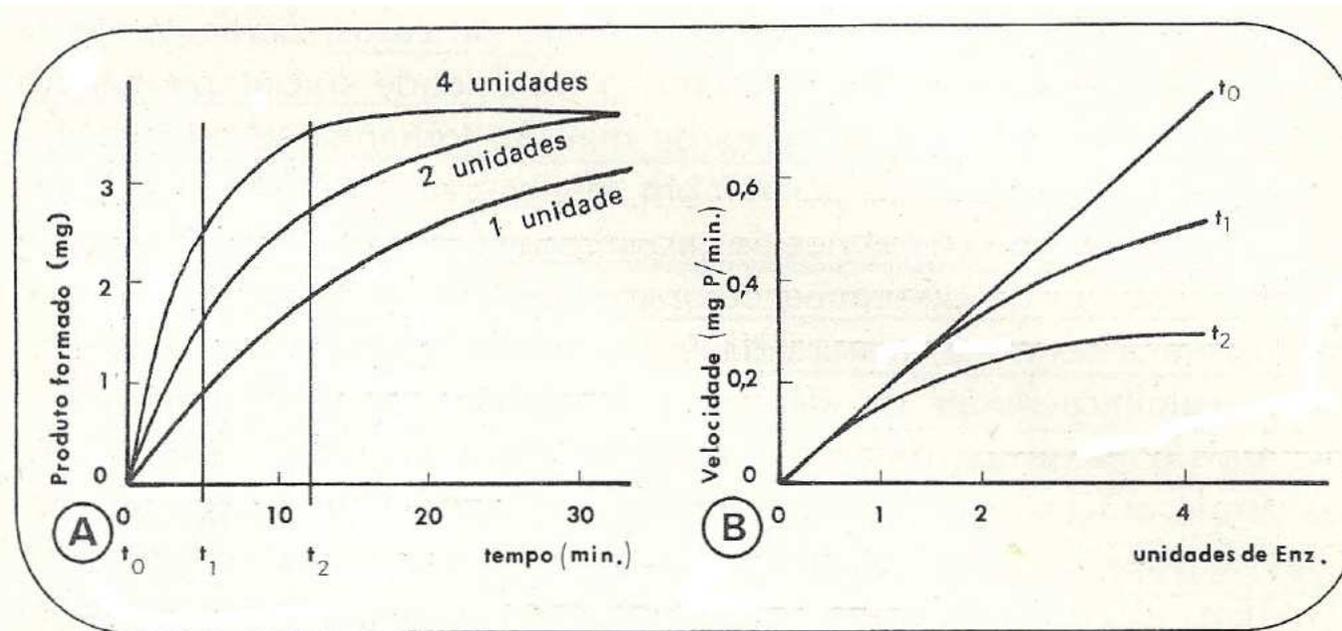
O melhor método de investigar o efeito de cada um destes factores será fazer variar cada um *de per si* (mantendo os outros constantes) e determinar a alteração produzida na velocidade da reacção enzimática como consequência dessa variação.

Velocidade de catálise: influência da concentração de enzima

Existe proporcionalidade entre as velocidades iniciais (no tempo zero, t_0) e as quantidades de enzima, isto é,

$$v = k [E]$$

Portanto, dentro de condições adequadas e idênticas, duas moléculas de enzima actuando independentemente, transformarão uma quantidade de substrato dupla da que é transformada por uma única molécula, no mesmo intervalo de tempo.



Curvas de actividade em função do tempo para uma mesma enzima quando a três concentrações múltiplas (uma, duas e quatro unidades); B — Velocidades aparentes da catálise (obtidas, a partir de A, em três tempos diferentes), representadas em função da quantidade de enzima. Note-se que só para as velocidades iniciais se observa proporcionalidade entre a velocidade e a quantidade de enzima.

Velocidade de catálise: influência da concentração do substrato

Determinadas as velocidades iniciais (v) de uma reacção enzimática para uma série de concentrações do substrato (S), a representação gráfica de v em função de $[S]$ fornece uma secção de uma hipérbole rectangular de equação

$$v = \frac{a [S]}{[S] + b}$$

em que a e b são duas constantes, sendo a o máximo valor de v (ponto de tangência à assíntota) e b o valor de $[S]$ para o qual $v = 1/2 a$. A a dá-se normalmente a designação de **velocidade máxima**, representando-se por V_{\max} ou V , e a b (uma importante constante das reacções enzimáticas) foi dado o nome de **constante de Michaelis**, representando-se por K_m . Portanto, a equação anterior toma, para as reacções enzimáticas, a forma usual

$$v = \frac{V [S]}{K_m + [S]}$$

a qual é designada por **equação de Michaelis-Menten**.

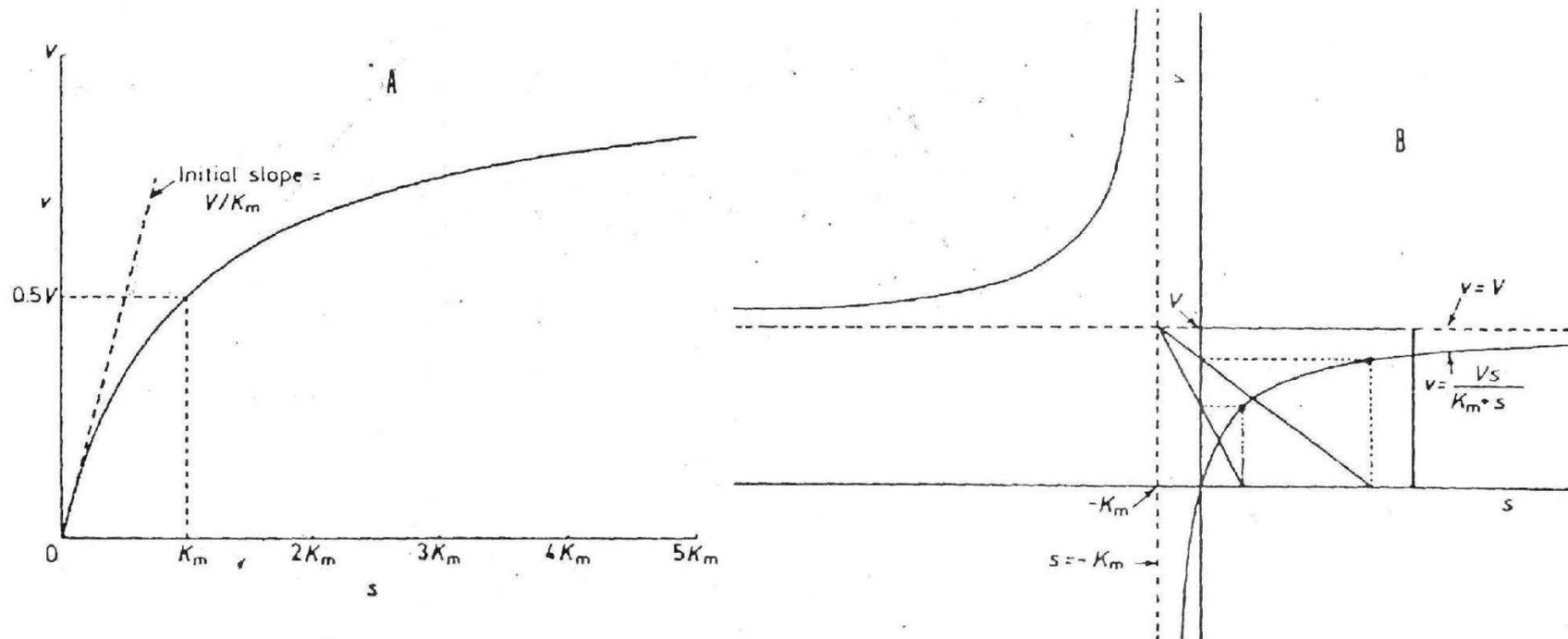
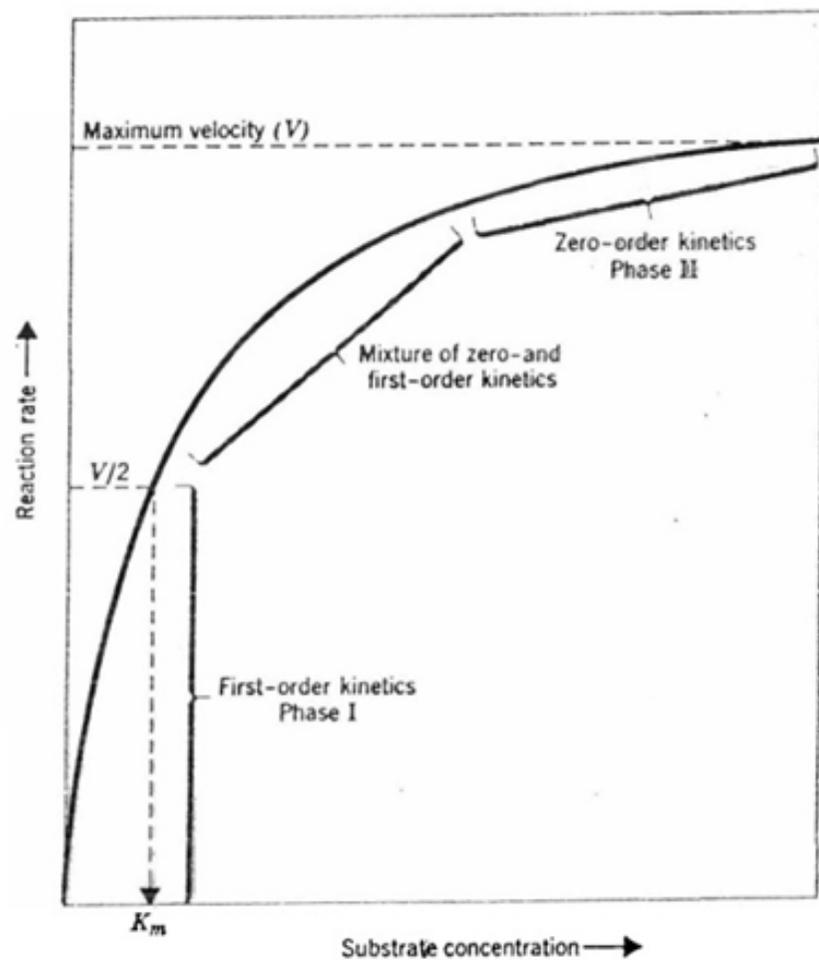
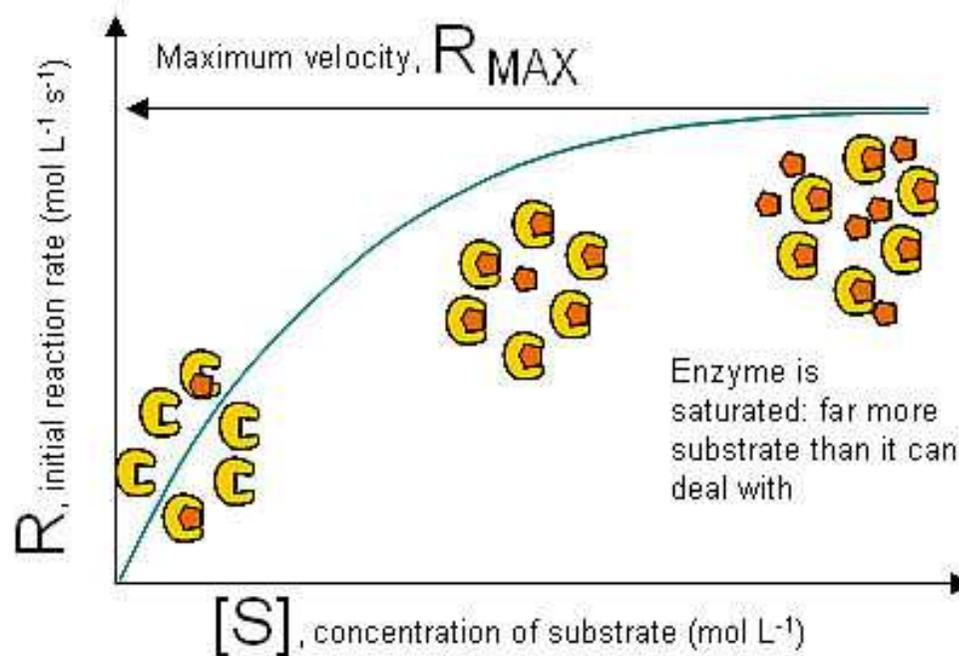


Fig. 6.1 - Representação gráfica da velocidade inicial de uma reacção enzimática que obedece à equação de Michaelis-Menten, em função da concentração do substrato. Em A está representada a parte da curva correspondente a $0 < S < 5 K_m$. Em B está representada a mesma curva para um intervalo mais amplo de valores de S , incluindo valores fisicamente impossíveis, de modo a ilustrar a relação da curva com as duas asimptotas, $S = -K_m$ e $v = V_{m\acute{a}x}$ (Cornish-Bowden, 1979).



Effect of substrate concentration on reaction rate, assuming that enzyme concentration is constant.



Significado das constantes K_m e V_{max}

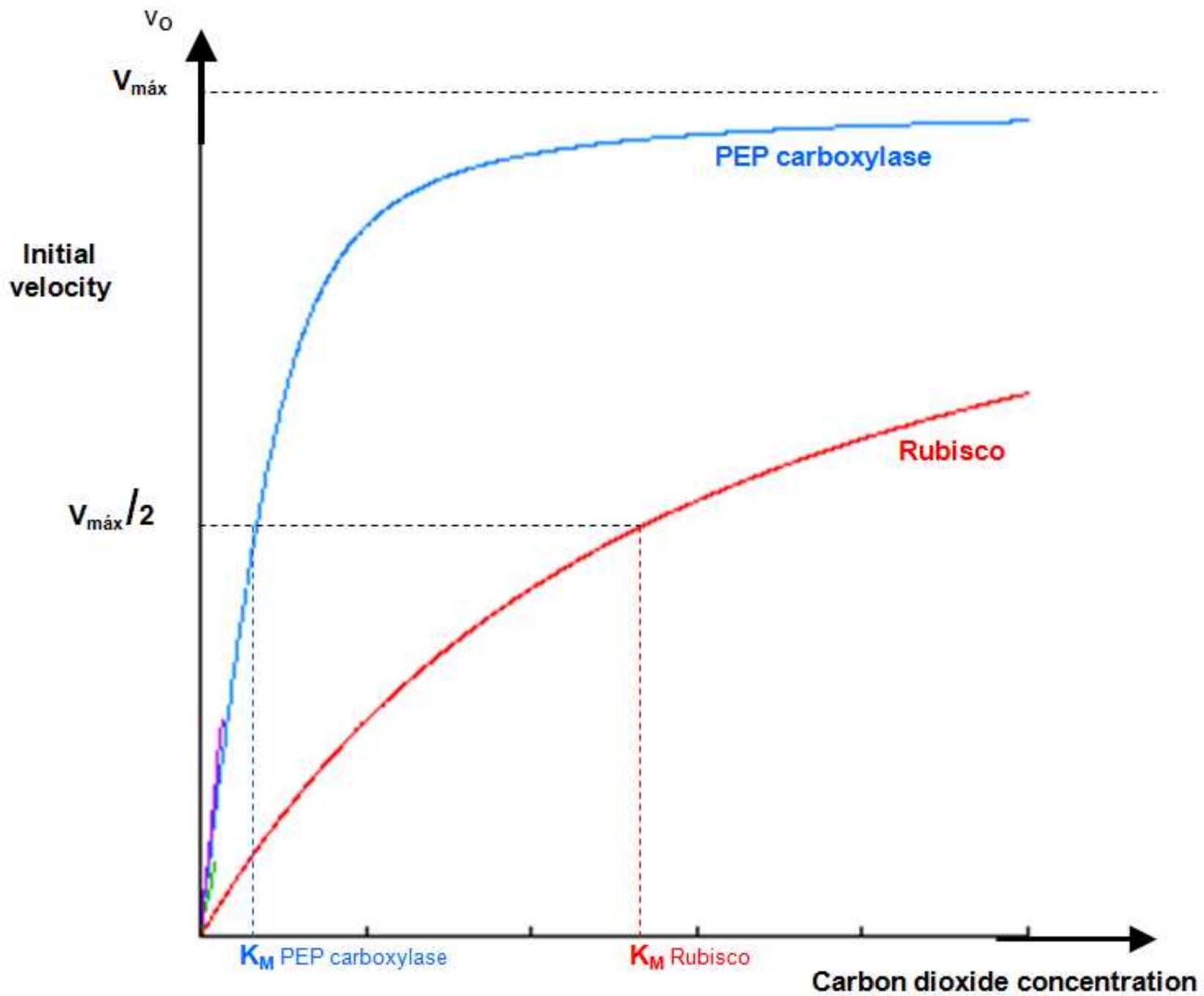
A constante de Michaelis, K_m , representa o valor da concentração do substrato para o qual essa reacção se processa a uma velocidade igual a metade de V_{max} . A constante exprime-se pois em unidades de concentração (por exemplo, em mol/L), sendo obviamente independente das unidades em que se exprime a velocidade da reacção.

Do ponto de vista prático, K_m fornece indicações sobre a eficiência com que a enzima 'trabalha' com dado substrato. Um K_m pequeno indica que (para igual concentração de S) a enzima é capaz de catalisar a transformação desse substrato a maior velocidade do que quando o K_m é grande.

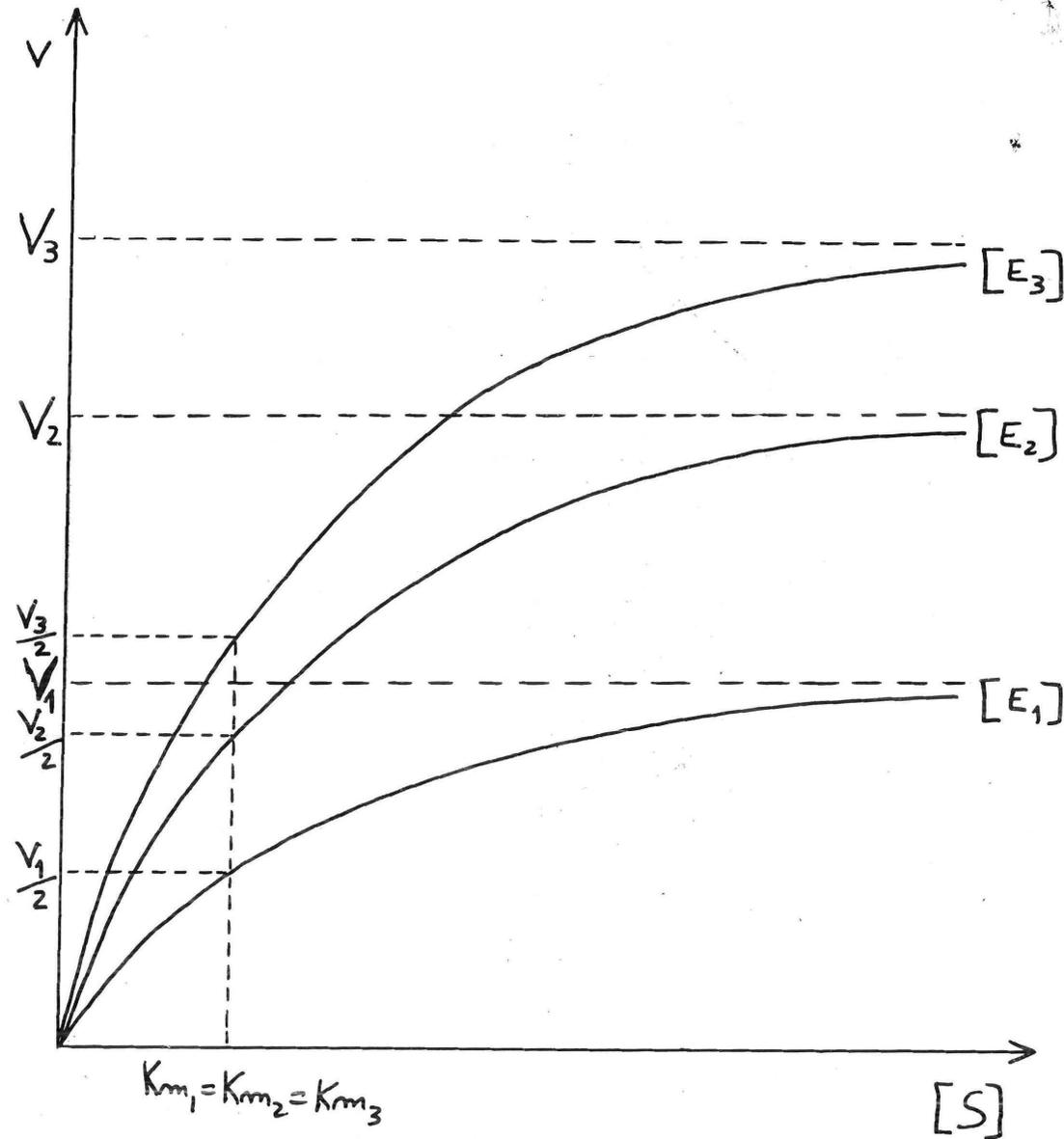
K_m só é uma medida da afinidade da enzima para o seu substrato quando a teoria de Michaelis-Menten for verificada, sendo então K_m uma constante de dissociação. Nestes casos (porventura os mais correntes) é em geral o inverso de K_m que é tomado como medida da afinidade. Baixos valores de K_m corresponderão a elevadas afinidades e altos valores a baixas afinidades.

V_{max} é uma velocidade enzimática e portanto terá as dimensões dessa velocidade, exprimindo-se usualmente em mol de produto formado por s. A constante K_m é independente da quantidade de enzima presente na reacção, enquanto que V_{max} depende dessa quantidade pois que quanto mais enzima estiver presente maior será a velocidade da reacção, tendo-se por definição (quando a enzima está saturada),

$$V_{max} = k [E]$$

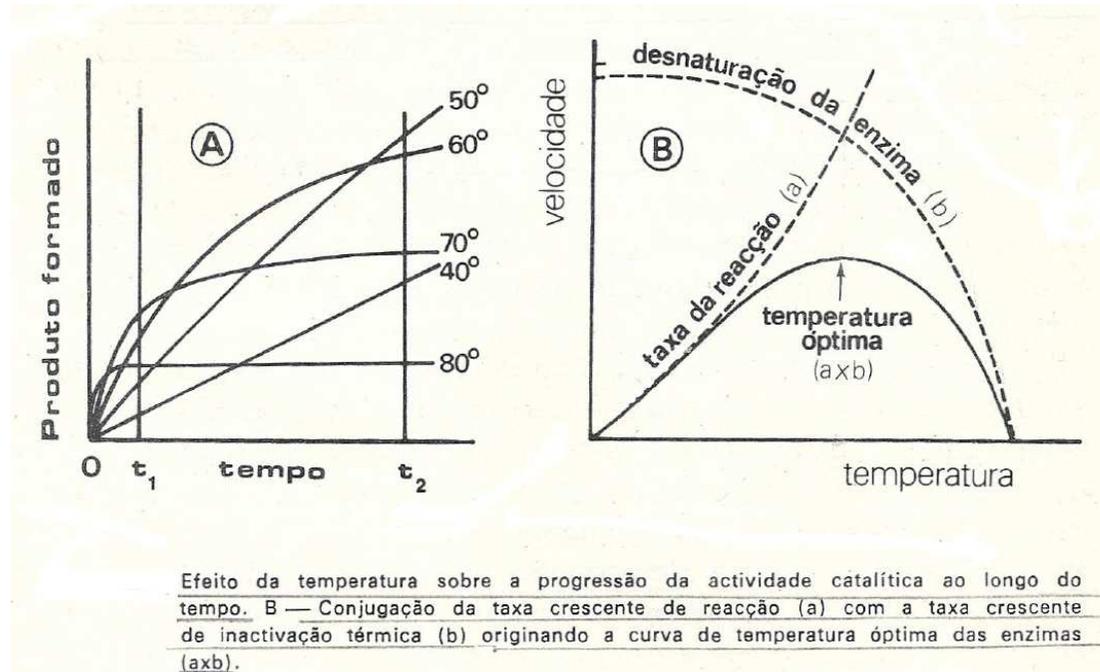


DEPENDÊNCIA DE K_m E V_{max} DE $[E]$



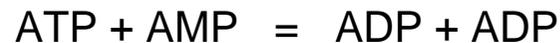
Velocidade de catálise: influência da temperatura

Ao estudar a actividade catalítica de uma enzima ao longo do tempo, para uma série de temperaturas, obtem-se um conjunto de curvas. Como daí se depreende, a velocidade inicial da reacção enzimática aumenta regularmente com o acréscimo da temperatura. No entanto, a quantidade de substrato transformado em intervalos de tempo sucessivos vai decrescendo, para temperaturas superiores a um certo valor.



a temperatura exerce dois efeitos antagónicos sobre o sistema enzimático. Por um lado aumenta a velocidade inicial (ou verdadeira actividade catalítica) da enzima, por outro conduz a uma progressiva inactivação das moléculas da enzima. A conjugação dos dois efeitos conduz à definição de uma **temperatura óptima**.

A taxa de inativação das enzimas em solução aumenta rapidamente com a temperatura. Na maioria dos casos essa inativação é virtualmente instantânea a temperaturas próximas de 70 °C. O número de enzimas que pode suportar temperaturas de 100 °C sem sofrerem inativação é extremamente reduzido. Um exemplo já clássico é o da enzima adenilato cinase que catalisa a reação:



Esta enzima pode suportar um aquecimento prolongado a 100 °C e a pH 1,0.

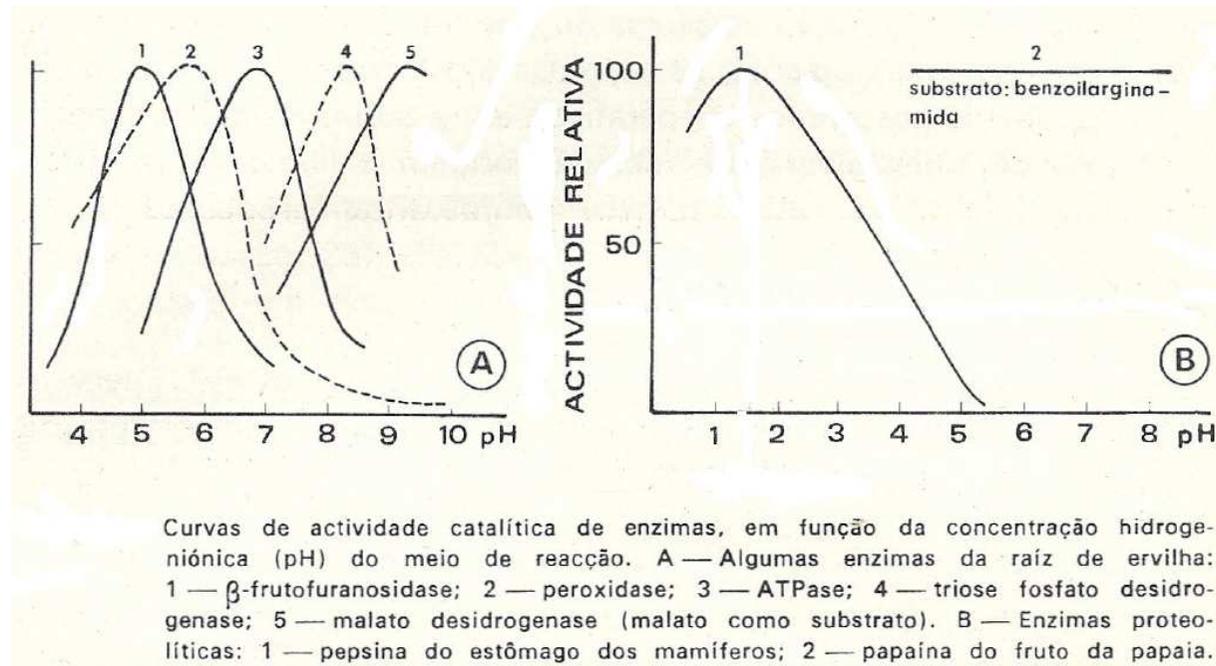
A inativação das enzimas pelo calor é devida à desnaturação da proteína enzimática, a qual é grandemente influenciada pelo pH.

O efeito da temperatura nas reações enzimáticas (e em outros processos celulares) é geralmente expresso em termos do **coeficiente de temperatura Q_{10}** . O Q_{10} representa o fator pelo qual a velocidade das reações enzimáticas (ou de outro processo biológico) vem multiplicada em consequência de um acréscimo de temperatura de 10 °C. O Q_{10} das reações enzimáticas situa-se geralmente entre 1 e 2. É uma característica geral dos processos de catálise o facto de o Q_{10} das reações catalisadas ser mais baixo do que o das reações não catalisadas, e o das reações catalisadas por enzimas ser mais baixo que o das reações catalisadas por catalisadores inorgânicos.

Velocidade de catálise: influência do pH

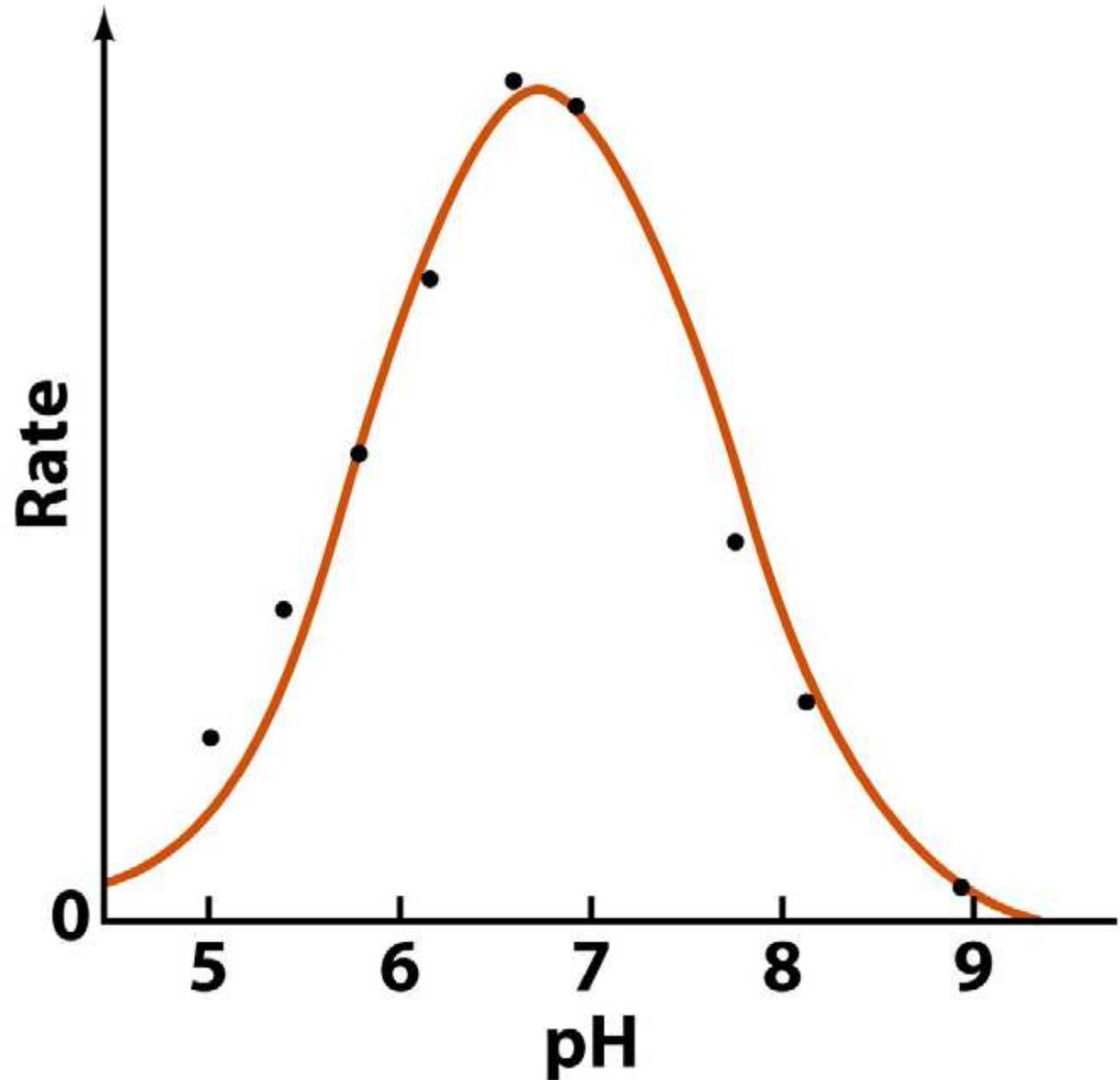
As enzimas são usualmente activas apenas numa gama restrita da escala do pH. Além disso, verifica-se que existe normalmente um valor bem definido de pH para o qual a actividade catalítica de cada enzima é máxima - **pH óptimo da enzima**; em certos casos, contudo, observa-se antes uma banda bastante larga de máxima actividade (patamar de valores óptimos de pH) que no caso extremo da papaína (quando tem a benzoilarginamida como substrato) se estende por várias unidades de pH. Para grande número de enzimas, o pH óptimo, além de ser bem definido, situa-se próximo da neutralidade, ou quando muito entre os limites de pH 5 e 9. Todavia, há algumas excepções, de que é exemplo a pepsina, que com certos substratos apresenta um óptimo de pH a 1,5.

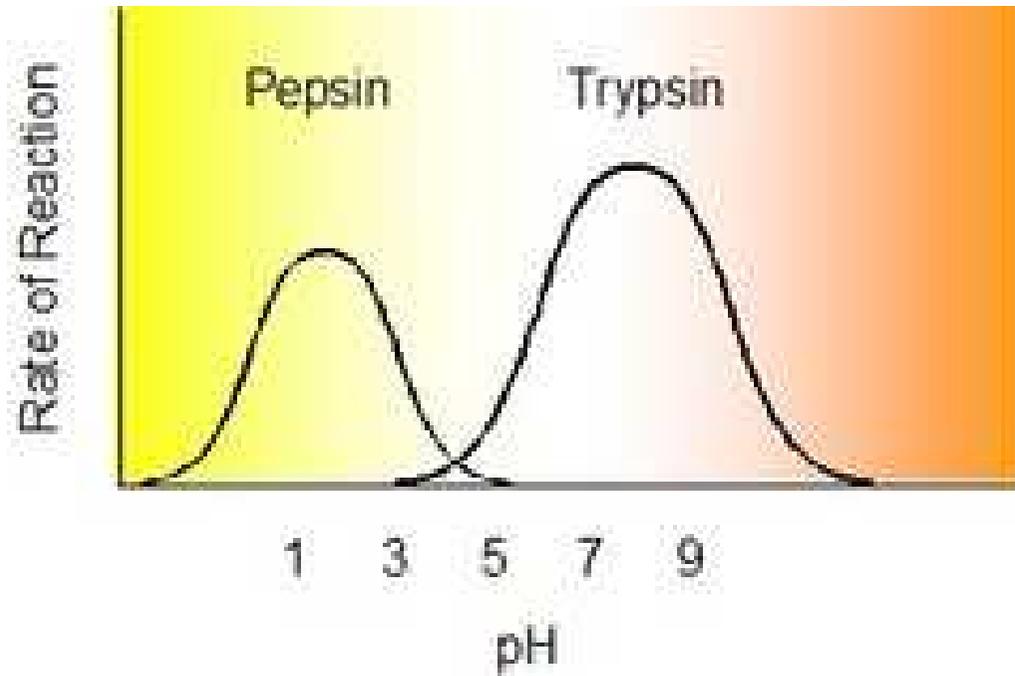
O efeito do pH sobre a catálise enzimática, como todos os efeitos de pH, é devido a alterações no estado de ionização dos componente do sistema, em consequência da variação da concentração em H^+ .



Effects of pH on enzyme activity

- Binding of substrate to enzyme
- The ionization states of the amino acid residues involved in the catalytic activity of the enzyme
- The ionization of the substrate
- The variation of protein structure (significant at extremes of pH)





Pepsin is an enzyme that works best at pH = 2 in the highly acidic conditions of the stomach

Teoria de Michaelis-Menten

Para uma reacção enzimática que segue a cinética de Michaelis-Menten, o gráfico da velocidade inicial da reacção (v) em função da concentração de substrato (S) é uma hipérbole rectangular da forma

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

Os parâmetros que caracterizam esta equação e que são em geral estimados a partir dos resultados observados são V_{\max} (a velocidade inicial máxima, que é teoricamente atingida quando a enzima estiver saturada por uma concentração infinita de substrato) e K_m (a constante de Michaelis, numericamente igual à concentração de substrato que corresponde a metade da velocidade inicial máxima).

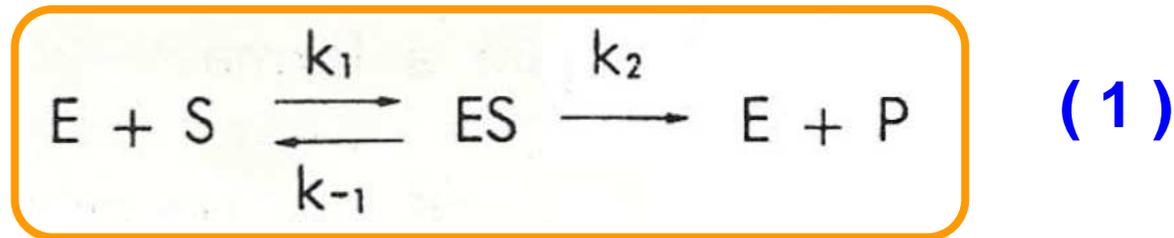


Leonor Michaelis
1875–1949



Maud Menten
1879–1960

De acordo com a teoria de Michaelis e Menten, para uma reacção enzimática com um único substrato, a enzima livre (E) e o substrato (S) estão permanentemente em equilíbrio com o complexo ES durante a reacção:



De acordo com esta teoria, a primeira equação traduz uma simples dissociação e a transformação de ES (segunda equação) será um processo muito mais lento do que aquela dissociação. Por outras palavras, **a constante k_2 será muito mais baixa do que k_1 . Portanto, a velocidade de formação do produto (velocidade da reacção enzimática, v) não estará dependente da velocidade de formação do complexo ES, mas apenas da taxa de decomposição deste complexo**, isto é,

$$v = k_2 [ES] \quad (2)$$

A constante de dissociação de ES, K_s , pode facilmente ser determinada a partir de cima, pois corresponde ao inverso da constante de equilíbrio desta equação e viria a receber a designação de constante de Michaelis (K_m). Portanto será:

$$K_s = K_m = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{[E][S]}{[ES]} \quad (3)$$

A conjugação das equações (2) e (3) permite obter a equação de Michaelis-Menten do seguinte modo:

Dada a dificuldade prática de determinar as concentrações da enzima livre e do complexo ES e a possibilidade de quantificar a quantidade total de enzima, E_T ,

$$[E_T] = [E] + [ES] \quad (4)$$

Substituindo [E] na equação (3) fica

$$K_m = \frac{([E_T] - [ES]) [S]}{[ES]} \quad (5)$$

Resolvendo em ordem a [ES] fica

$$[ES] = \frac{[E_T] [S]}{K_m + [S]} \quad (6)$$

Substituindo agora o valor de [ES] na equação (2) virá

$$v = \frac{k_2 [E_T] [S]}{K_m + [S]} \quad (7)$$

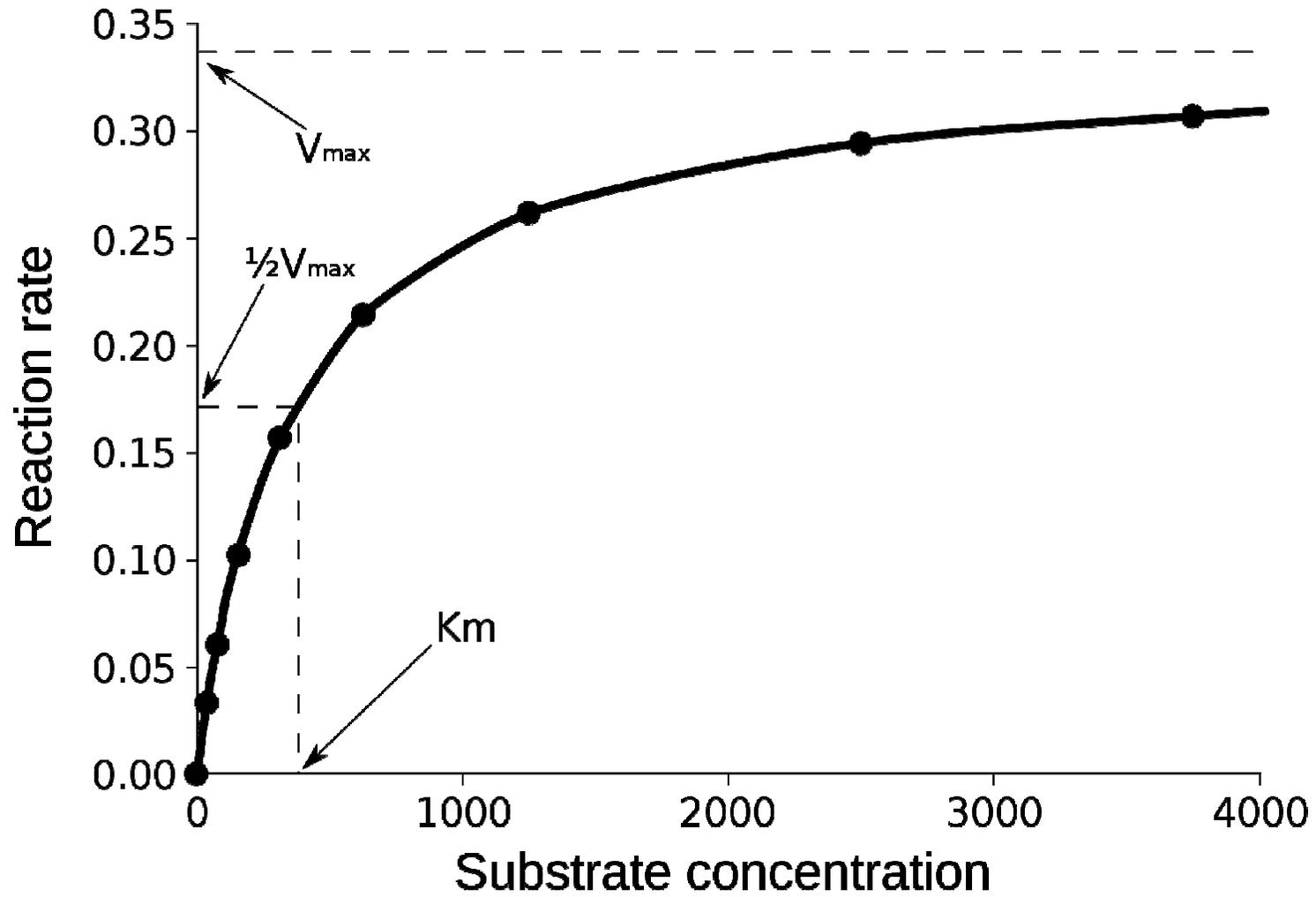
Repare-se no significado de $k_2 [E_T]$ nesta equação. Quando a concentração do substrato for muito elevada, todas as moléculas da enzima estarão ligadas a moléculas do substrato ($[E_T] = [ES]$, enzima saturada) e a enzima estará funcionando ao máximo da sua velocidade; portanto, do ponto de vista teórico, poderá escrever-se nessas condições - ver equação (2):

$$k_2 [E_T] = k_2 [ES] = V_{max} \quad (8)$$

A substituição deste valor na equação (7) fornecerá finalmente a equação de Michaelis-Menten:

$$v = \frac{V [S]}{K_m + [S]} \quad (9)$$

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



Uma vez que a relação entre a variável independente S e a variável dependente v é não-linear, Michaelis e Menten (1913) reconheceram desde logo que não era prática a determinação de $V_{\text{máx}}$ e K_m a partir da equação da hipérbole. Para tal, contribuía o facto de haverem restrições de natureza física, as quais tornam apenas possível a medição de v para valores positivos e finitos de S . Não era assim fácil determinar com rigor aqueles parâmetros, já que as assíntotas não podem ser localizadas com precisão; além disso, era difícil traçar com rigor uma hipérbole rectangular.

A equação de Michaelis-Menten pode hoje ser representada de maneira diferente para a determinação de $V_{\text{máx}}$ e K_m , a partir de uma série de medições da velocidade inicial a diferentes concentrações de substrato: uns métodos são simples, rápidos e expeditos, mas de menor precisão; outros são mais precisos e complexos, complexidade esta apenas aparente dada a possibilidade de utilização de computadores cada vez mais exactos e rápidos. De todos eles, apenas faremos referência a cinco, por serem talvez os de utilização mais corrente. Dentro destes, os três mais conhecidos resultam de transformações lineares da equação de Michaelis-Menten.

A teoria/equação de Michaelis-Menten aplica-se apenas a reacções químicas catalisadas por enzimas com um só substrato.

Contudo, a maioria das reacções enzimáticas do metabolismo celular são reacções com mais de um substrato. A cinética enzimática destas reacções é consideravelmente mais complexa. Por este motivo, e apenas no caso das enzimas que seguem a cinética de Michaelis-Menten, utiliza-se comumente um truque: satura-se a enzima relativamente a todos os seus substratos com excepção daquele que se pretende estudar, ficando assim a velocidade da reacção a depender da concentração de um único substrato.

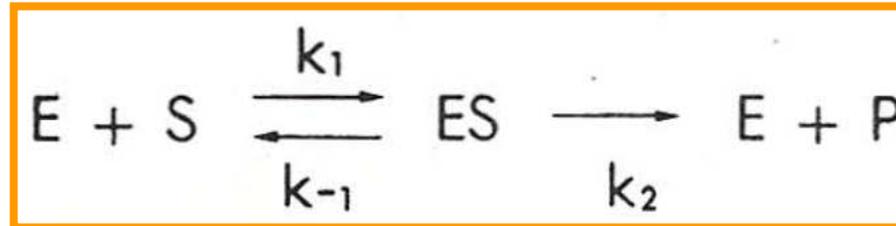
Teoria do *steady-state* de Briggs-Haldane

A teoria de Michaelis-Menten considera que a formação do produto (P) a partir do complexo ES é a fase lenta do processo enzimático e portanto que ES se mantém sempre em equilíbrio com E e S (equação 1).

Contudo, dadas as elevadíssimas capacidades catalíticas de muitas enzimas, tornou-se evidente que a formação de P poderia ocorrer tão rapidamente que o equilíbrio



poderá nunca chegar a verificar-se na prática. Briggs e Haldane, em 1925, consideraram não ser necessário admitir a existência de um equilíbrio de dissociação entre ES e E + S, mas aceitar antes o princípio de que as concentrações dos intermediários do processo enzimático (ES nas reacções de um só substrato) permaneciam constante durante a reacção. Portanto, era sugerido que durante a reacção enzimática



A formação do complexo ES e a sua transformação para originar 'E + P' ou 'E + S' ocorriam (na ausência de outros factores) a velocidades aproximadamente iguais, pelo que a concentração de ES se mantinha constante

devido a esse estado de equilíbrio dinâmico (*steady-state*) dos reagentes; isto é, a taxa de desintegração de ES igualava a taxa da sua formação.

Usando o postulado acabado de referir, Briggs e Haldane desenvolveram uma teoria em que relacionaram a velocidade da reacção enzimática com a concentração do substrato, obtendo uma equação idêntica à de Michaelis-Menten. A diferença fundamental entre as duas equações refere-se ao significado da constante K_m . Enquanto que segundo a teoria de Michaelis-Menten K_m é uma constante de dissociação igual a k_{-1}/k_1 , segundo a teoria de Briggs-Haldane a nova constante, K_m^1 , tem o valor:

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

ou

$$K_m^1 = K_m + \frac{k_2}{k_1}$$

Vindo K_m^1 a igualar K_m quando k_2 for muito mais pequeno do que k_1 . Relembre-se que esta foi a premissa admitida por Michaelis e Menten, o que mostra ser a sua teoria um caso particular da teoria do *steady-state*.

Sendo a equação 9 a expressão matemática de ambas as teorias, e não se fazendo normalmente distinção gráfica entre as constantes K_m^1 e K_m , deve-se pois ter cuidado em exprimir correctamente o valor de K_m quando tal for necessário.

Métodos de cálculo de $V_{\text{máx}}$ e K_m

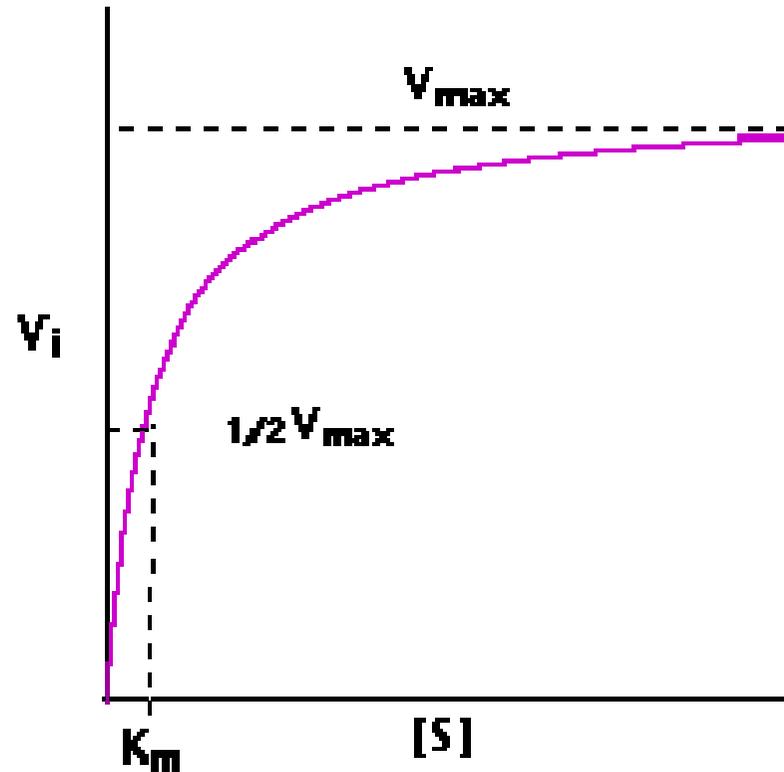
Michaelis-Menten theory



Maud Menten



Leonor Michaelis



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

V_i = initial velocity (moles/time)

$[S]$ = substrate concentration (molar)

V_{max} = maximum velocity

K_m = substrate concentration when

V_i is one-half V_{max}

(Michaelis-Menton constant)

1 - Método de Lineweaver-Burk ou "*double reciprocal plot*"

Invertendo ambos os membros da equação de Michaelis-Menten obtém--se a seguinte equação:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\text{máx}}} + \frac{K_m}{V_{\text{máx}}} \cdot \frac{1}{S}$$

Esta equação mostra que a representação gráfica de $1/v$ em função de $1/S$ é uma recta, com derivada igual a $K_m/V_{\text{máx}}$, ordenada na origem igual a $1/V_{\text{máx}}$ e abcissa na origem igual a $-1/K_m$

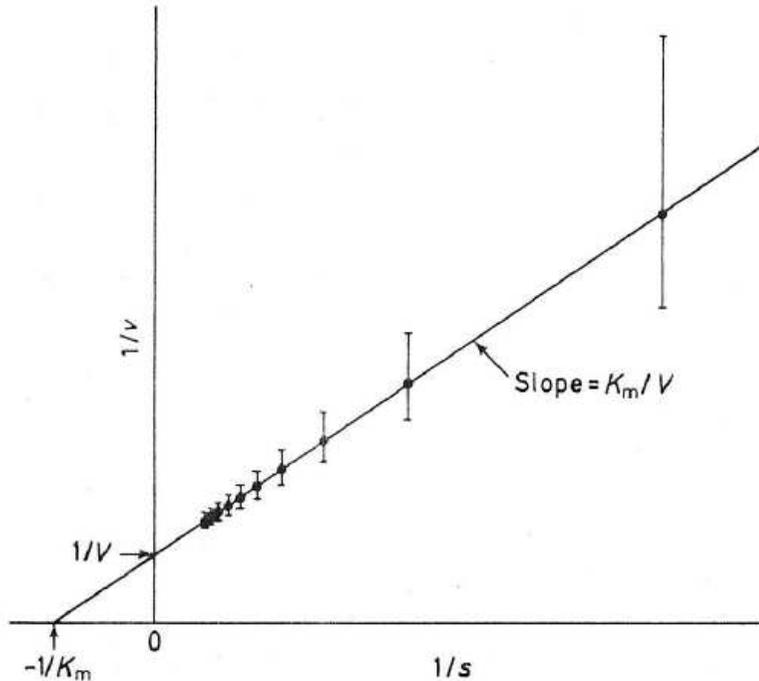


Gráfico de Lineweaver-Burk ou "*double reciprocal plot*". As barras verticais correspondem a um erro de $\pm 0,05 \cdot V_{\text{máx}}$ em v .

Comentários

- Grande popularidade.
- Não deve ser utilizado. É imperfeito do ponto de vista estatístico. É o pior de todos os métodos.
- Principal defeito: tomando o inverso de v , os menores valores de v (que são precisamente aqueles valores que têm maior percentagem de erro) desempenham um papel exageradamente importante na determinação da posição da recta ajustada – ilustrado pelas barras verticais da figura, as quais correspondem todas à mesma amplitude de erro em v .
- Principais vantagens: as variáveis v e S estão separadas; maus dados experimentais originam frequentemente bons ajustamentos.

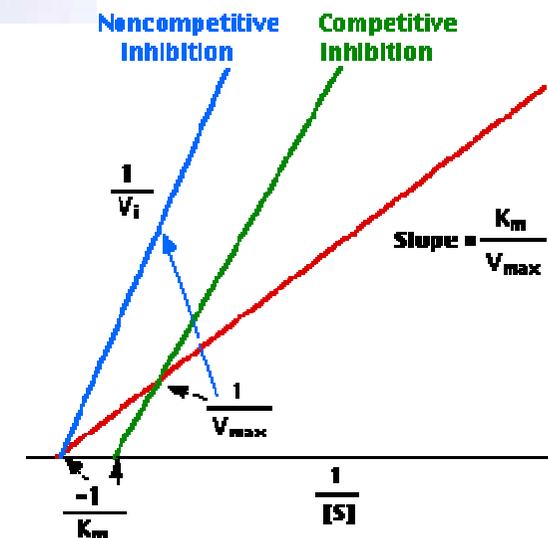
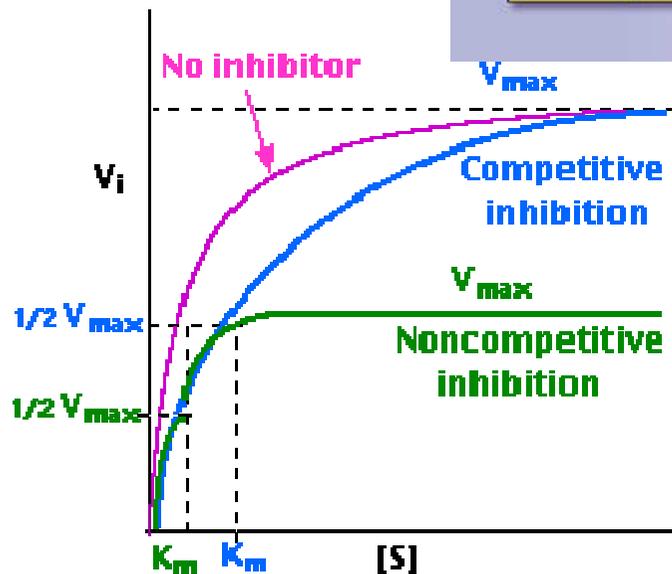
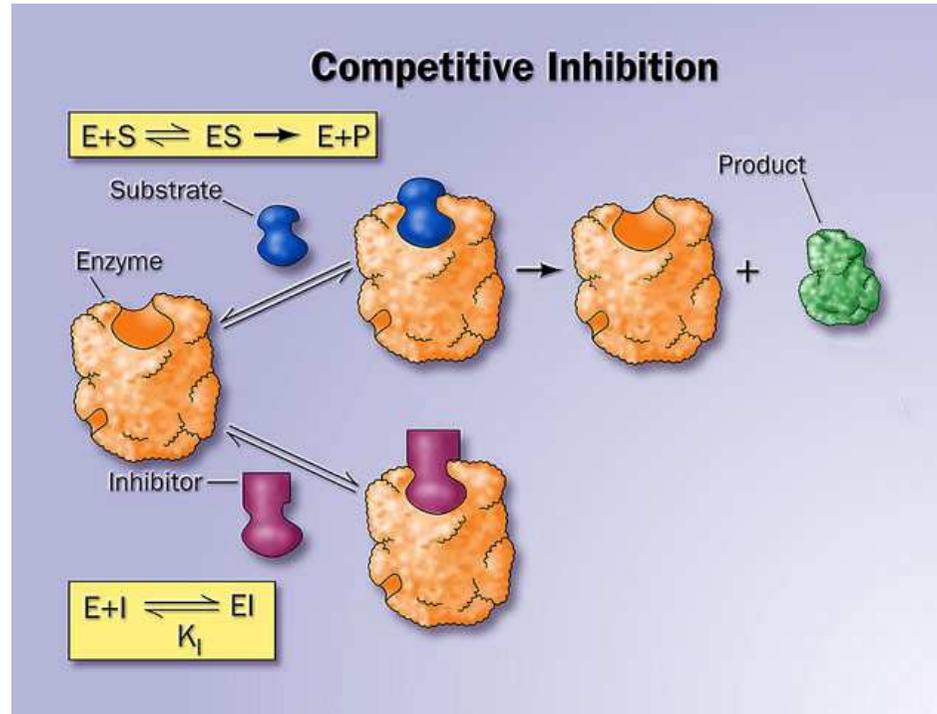
The Effects of Enzyme Inhibitors

Enzymes can be inhibited **competitively**, when the substrate and inhibitor compete for binding to the same active site or **noncompetitively**, when the inhibitor binds somewhere else on the enzyme molecule reducing its efficiency.

The distinction can be determined by plotting enzyme activity with and without the inhibitor present.

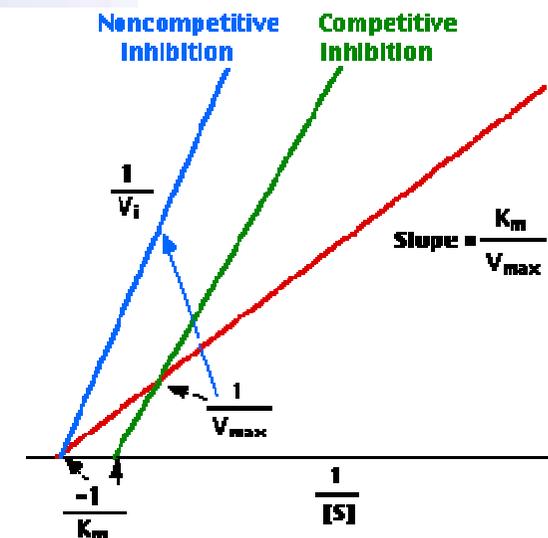
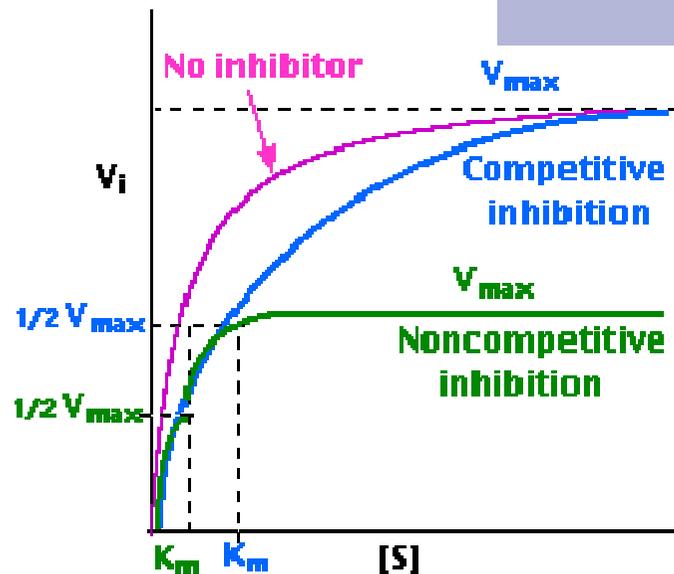
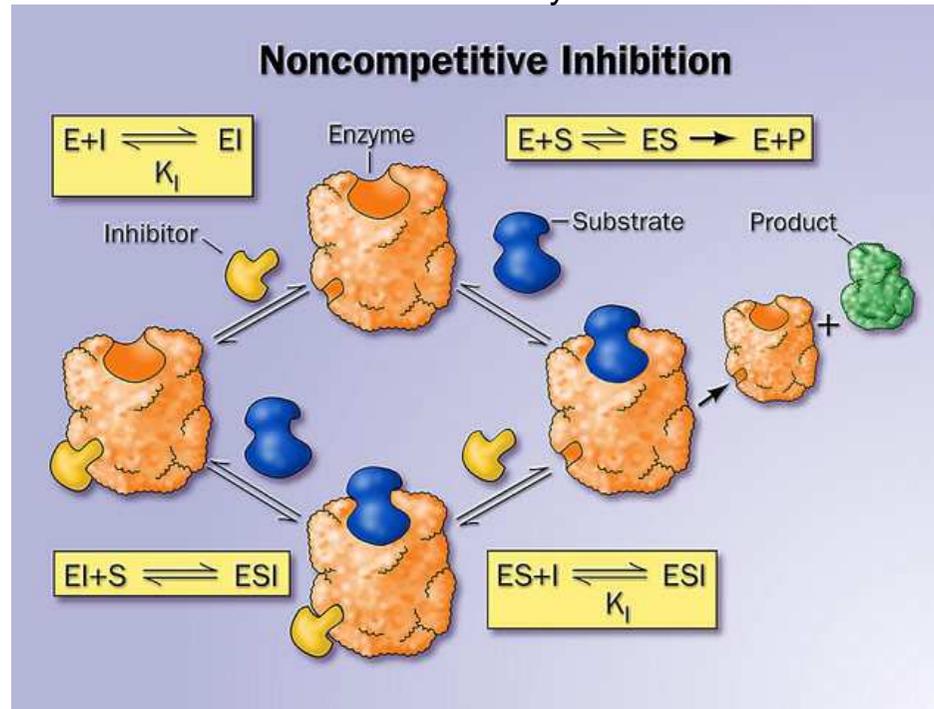
Competitive Inhibition

In the presence of a competitive inhibitor, it takes a higher substrate concentration to achieve the same velocities that were reached in its absence. So while V_{max} can still be reached if sufficient substrate is available, one-half V_{max} requires a higher $[S]$ than before and thus K_m is larger.



Noncompetitive Inhibition

With noncompetitive inhibition, enzyme molecules that have been bound by the inhibitor are taken out of the game, so enzyme rate (velocity) is reduced for all values of $[S]$, including V_{max} and one-half V_{max} but K_m remains unchanged because the active site of those enzyme molecules that have not been inhibited is unchanged.



2 - Método de Hanes

Multiplicando ambos os membros da equação de Lineweaver-Burk por S obtém-se a equação de Hanes:

$$\frac{S}{v} = \frac{K_m}{V_{\text{máx}}} + \frac{1}{V_{\text{máx}}} \cdot S$$

Esta equação mostra que a representação gráfica de S/v em função de S é uma recta, com derivada igual a $1/V_{\text{máx}}$, ordenada na origem igual a $-K_m/V_{\text{máx}}$ e abcissa na origem igual a $-K_m$.

Comentários

- É imperfeito do ponto de vista estatístico. Melhor que o método de Lineweaver-Burk porque os erros em v reflectem-se mais homogeneamente em S/v do que em $1/v$.

- Tal como no método anterior, tomando o inverso de V , dá-se ênfase exagerado aos valores mais baixos de v , que são precisamente os valores que têm maior percentagem de erro.

- A variável independente, S , aparece em ambos os membros da equação, de tal modo que um gráfico de S/v em função de S mostra um certo grau de correlação inevitável - inevitável no sentido em que, mesmo se v e S fossem variáveis aleatórias independentes, as variáveis S/v e S estariam correlacionadas entre si. Esta correlação inevitável, sendo positiva, tende a fortalecer a correlação observada entre as duas variáveis porque a relação teórica contida na equação de Hanes é também positiva.

- Este método tem o inconveniente de não separar as variáveis S e v .

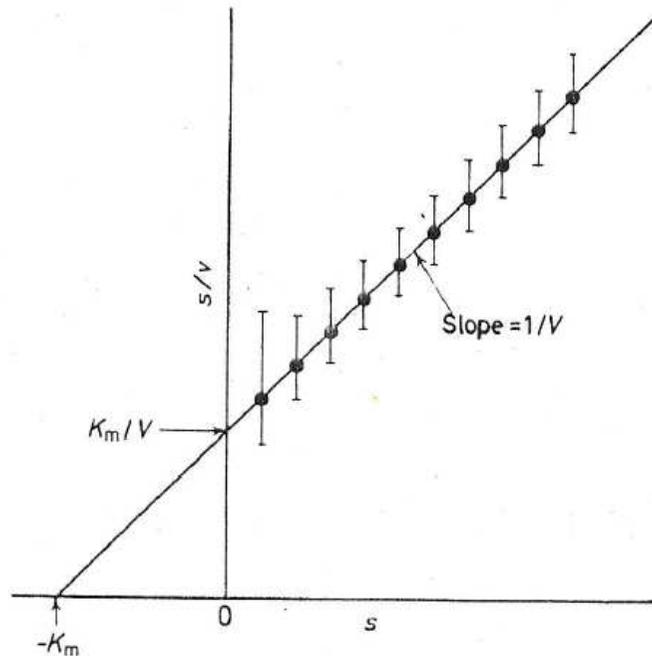


Gráfico de Hanes. As barras verticais correspondem a um erro de $\pm 0,05 \cdot V_{\text{máx}}$ em v .

3 - Método de Eadie-Hofstee

Multiplicando ambos os membros da equação de Lineweaver-Burk por $v \cdot V_{\text{máx}}$ e rearranjando a equação, obtém-se a 3ª transformação linear da equação de Michaelis-Menten: a equação de Eadie-Hofstee:

$$v = V_{\text{máx}} - K_m \cdot \frac{v}{S}$$

Esta equação mostra que a representação gráfica de v em função de v/S é uma recta, com derivada igual a $-K_m$, ordenada na origem igual a $V_{\text{máx}}$ e abcissa na origem igual a $V_{\text{máx}}/K_m$.

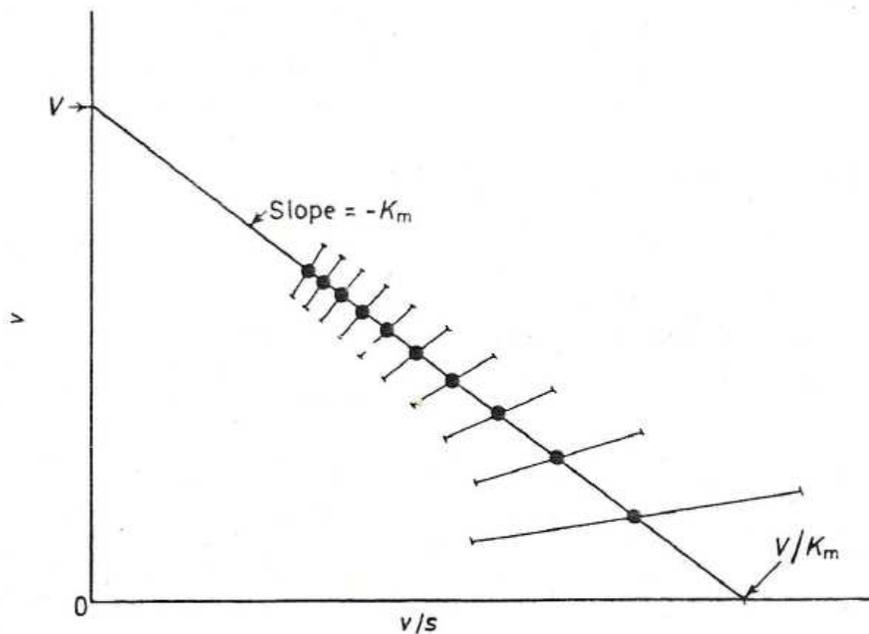


Gráfico de Eadie-Hofstee. As barras oblíquas correspondem a um erro de $\pm 0,05 \cdot V_{\text{máx}}$ em v .

Comentários

- É imperfeito do ponto de vista estatístico.
- Sofre, em menor extensão, do mesmo inconveniente estatístico que o método de Lineweaver-Burk, com a complicação adicional de que ambas as variáveis são afectadas pela variabilidade experimental em v .
- O facto de v aparecer em ambos os membros da equação provoca um certo grau de correlação inevitável entre as variáveis v e v/S de tal modo que, mesmo quando S e v são duas variáveis aleatórias independentes, as variáveis v e v/S estão relacionadas entre si. Esta correlação, sendo positiva, tende a enfraquecer a correlação observada entre as variáveis no gráfico, já que a relação teórica dada pela equação entre v e v/S é negativa.
- Como ambas as variáveis estão sujeitas a erro, o método geral do ajustamento de uma recta a pontos pelo método dos mínimos quadrados não é, teoricamente, aplicável.

4- Representação gráfica linear directa (*direct linear plot*)

Trata-se de um método estatístico não-paramétrico, gráfico, introduzido por Eisenthal e Cornish-Bowden (1974).

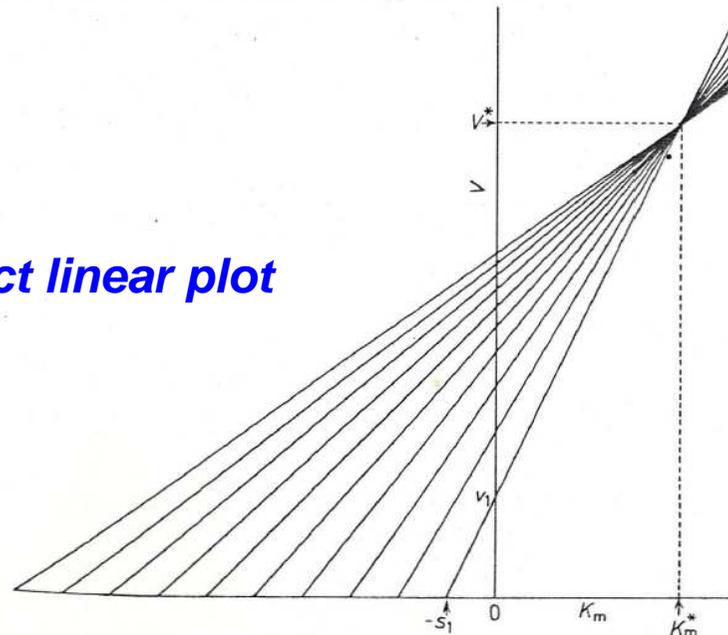
Rearranjando a equação de Michaelis-Menten de modo a obter $V_{\text{máx}}$ em função de K_m , chega-se à seguinte equação:

$$V_{\text{máx}} = v + \frac{v}{S} K_m$$

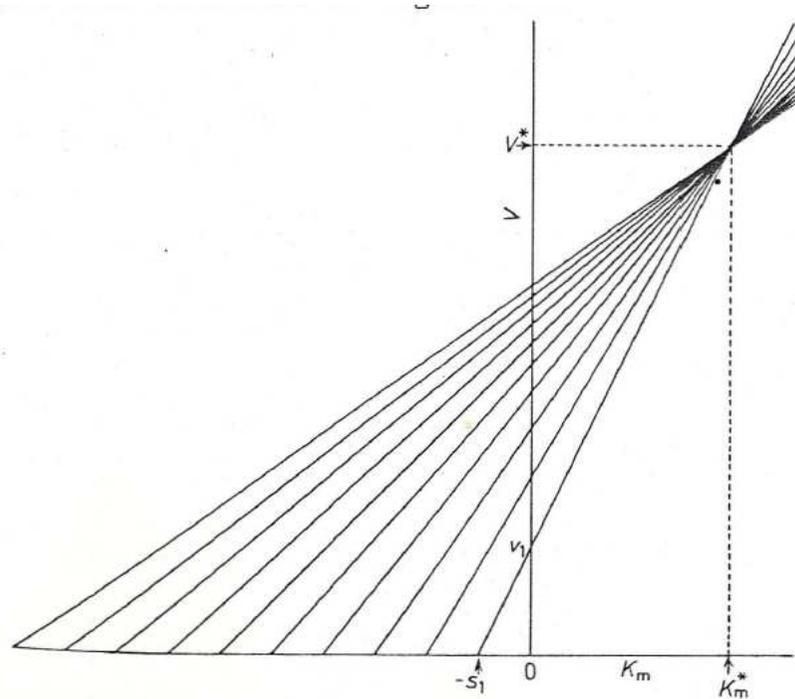
Então, se tratarmos $V_{\text{máx}}$ e K_m como sendo variáveis e v e S como constantes, esta equação define uma linha reta, com derivada v/S , ordenada na origem v e abcissa na origem $-S$. Cornish-Bowden (1979) refere que isto não é tão estranho como pode parecer à primeira vista - com efeito, uma vez S e v medidos experimentalmente, eles passam a ser constantes já que qualquer análise dos resultados os mantém inalterados; em relação a $V_{\text{máx}}$ e K_m , eles podem ser tratados como variáveis enquanto não forem estimados os seus valores.

Assim, neste método, cada par de valores experimentais (S_i, v_i) origina uma recta num gráfico que representa $V_{\text{máx}}$ em função de K_m .

direct linear plot



Modelo teórico



“Direct linear plot” - Cada linha representa uma observação e é traçada a partir da abcisa na origem, $K_m = -S_i$ e da ordenada na origem $V_{máx} = v_i$. As coordenadas do ponto de intersecção dão os valores de K_m e $V_{máx}$ que satisfazem às observações.

Exemplifiquemos o método para um primeiro caso de $n = 2$ observações.

Uma vez construídos os eixos coordenados ($V_{máx}$ em função de K_m) e obtidas as duas observações experimentais, ficamos com 2 pares de valores (S_i, v_i) , com $i = 1, 2$. Para o primeiro par de valores (S_1, v_1) marcam-se os pontos $K_m = -S_1$ no eixo dos K_m e $V_{máx} = v_1$ no eixo dos $V_{máx}$; em seguida, traça-se uma recta que passa por estes dois pontos, a qual é prolongada para o 1º quadrante.

Para este par de valores (S_1, v_1) há, portanto, uma infinidade de pares de valores $V_{máx}$ e K_m que satisfazem a equação:

$$V_{máx} = v_1 + v_1/S_1 \cdot K_m$$

É conveniente notar que esta recta não é um gráfico, no mesmo sentido dos que se obtêm pelo 3 métodos anteriores; no “direct linear plot” cada recta corresponde a um só ponto experimental.

Traçando do mesmo modo a recta que corresponde a uma segunda observação (com diferentes valores de S e v , isto é, com $S_2 \neq S_1$ e $v_2 \neq v_1$), verifica-se igualmente que há uma infinidade de valores de $V_{máx}$ e K_m que satisfazem a nova equação:

$$V_{máx} = v_2 + v_2/S_2 \cdot K_m$$

Para o caso em que $S_2 \neq S_1$ e $v_2 \neq v_1$, estas duas rectas não definem os mesmos pares de valores de K_m e $V_{máx}$, excepto no ponto de intersecção - este ponto define o único par de valores K_m e $V_{máx}$ que satisfaz ambas as observações (exceptuam-se os casos em que $v_1/S_1 = v_2/S_2$, isto é, casos em que as duas rectas são paralelas, por não haver ponto de intersecção entre elas) .

Modelo real

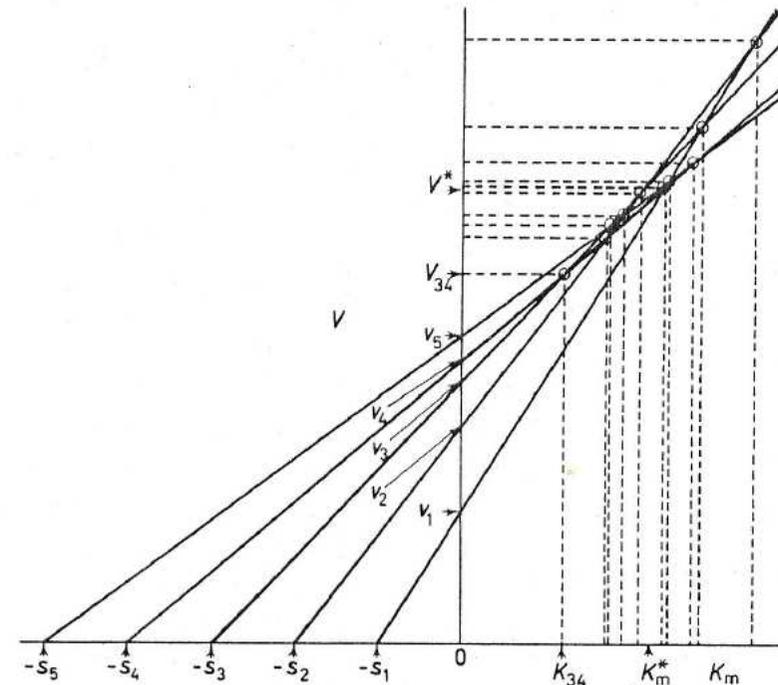
Na prática, como as observações estão sujeitas a erro, não há um único ponto, comum à intersecção de todas as rectas. O gráfico que normalmente se obtém está representado na figura. Neste caso, cada intersecção fornece uma estimativa inicial de K_m e de $V_{m\acute{a}x}$. Estas estimativas são marcadas em ambos os eixos coordenados. As melhores estimativas a tomar para K_m e $V_{m\acute{a}x}$ serão as medianas das respectivas estimativas iniciais.

As melhores estimativas dos parâmetros K_m e $V_{m\acute{a}x}$ são dadas por:

$K_m^* = \text{mediana dos valores de } K_{m\ i,j}$

$V_{m\acute{a}x}^* = \text{mediana dos valores de } V_{m\acute{a}x\ i,j}$

Este método foi intitulado de "*direct linear plot*" porque representa cada observação por uma recta e porque fornece directamente os valores de $V_{m\acute{a}x}$ e K_m , isto é, a representação gráfica é linear e a sua leitura directa.



"*Direct linear plot*". As linhas são traçadas como indicado na figura anterior e cada intersecção (círculos) fornece uma estimativa $K_{i,j}$ do K_m e uma estimativa $V_{m\acute{a}x\ i,j}$ de $V_{m\acute{a}x}$. Estas estimativas estão marcadas nos eixos coordenados. A melhor estimativa de K_m (K_m^*) obtém-se tomando a mediana dos $K_{m\ i,j}$ e a de $V_{m\acute{a}x}$ ($V_{m\acute{a}x}^*$) obtém-se tomando a mediana dos $V_{m\acute{a}x\ i,j}$.

Vantagens e inconvenientes do "direct linear plot"

Vantagens:

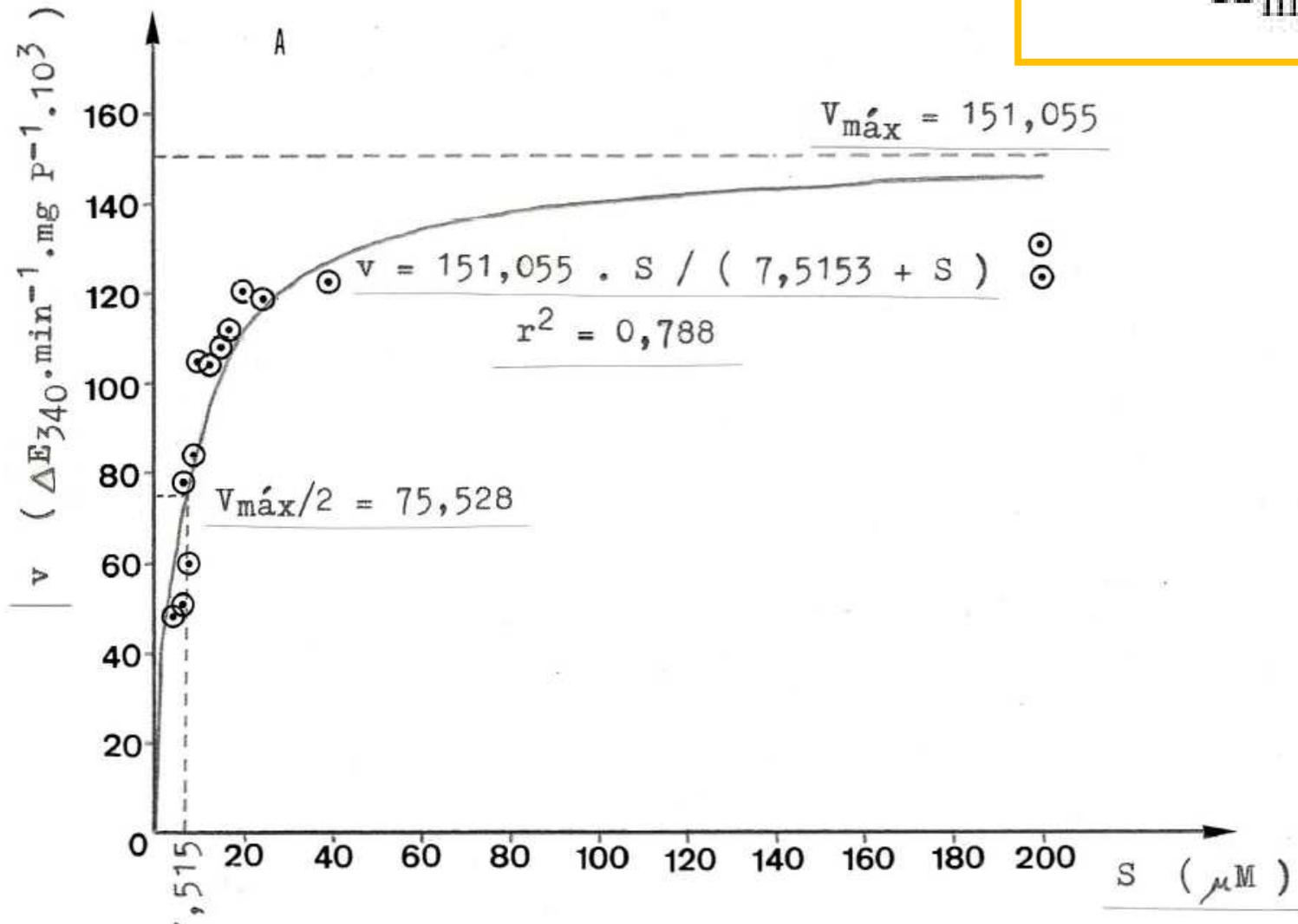
- a intersecção das retas dá diretamente o valor dos parâmetros K_m e $V_{m\acute{a}x}$, os quais são lidos diretamente no gráfico, sem necessidade de cálculo;
- é muito simples de construir, porque consiste apenas de linhas retas;
- não são necessárias transformações;
- fornece indicações claras e precisas acerca da qualidade das observações, identificando observações aberrantes;
- fornece indicação visual da precisão das constantes estimadas;
- é muito insensível a valores aberrantes;
- requer poucos pressupostos acerca da natureza do erro experimental;
- é, estatisticamente, mais preciso do que os três métodos anteriormente referidos;
- permite um fácil diagnóstico do tipo de inibição.

Desvantagens:

- permite apenas a representação de um número reduzido de observações em cada gráfico; como o número de intersecções obtidas a partir de n observações (S_i, v_i) é dado por $1/2.n.(n-1)$, é fácil de ver que o método gráfico se complica muitíssimo quando o número de observações vai aumentando; com efeito, para 10 observações, é necessário traçar 10 retas e determinar as coordenadas dos seus 45 pontos de intersecção [para 16 observações serão 120). Isto torna limitativa a utilização do método porque além de o tornar muito trabalhoso, é praticamente impossível, para as dimensões normais do papel correntemente utilizado, a determinação gráfica das coordenadas de centenas de pontos de intersecção. Além disso, o ponto de intersecção de duas retas define-se mais facilmente se elas se intersectarem com ângulos próximos de 90° , criando-se situações ambíguas quando os ângulos de intersecção são muito agudos. Com um número grande de retas, por mais bem espaçadas que estejam os valores de S_i e v_i , as retas intersectar-se-ão com ângulos muito agudos, o que torna pouco precisa a estimativa dos parâmetros; este inconveniente pode ser ultrapassado pela utilização de um computador;
- em determinadas condições é menos preciso que o ajustamento direto da hipérbole retangular aos pontos experimentais, pelo método dos mínimos quadrados;
- não é adequado para a utilização de repetições (várias medições de v para um dado valor de S), o que é frequente acontecer na prática;
- não fornece informação analítica simples acerca da precisão das estimativas dos parâmetros K_m e $V_{m\acute{a}x}$.

5 - Ajustamento directo de uma hipérbole rectangular aos pontos experimentais, pelo método dos mínimos quadrados

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



A equação de Michaelis-Menten tal como usualmente escrita está incompleta, já que ignora o efeito do erro experimental. Por isso, é mais correcto escrevê-la sob a forma:

$$v_i = \frac{V_{m\acute{a}x} \cdot S_i}{K_m + S_i} (1 + e_i)$$

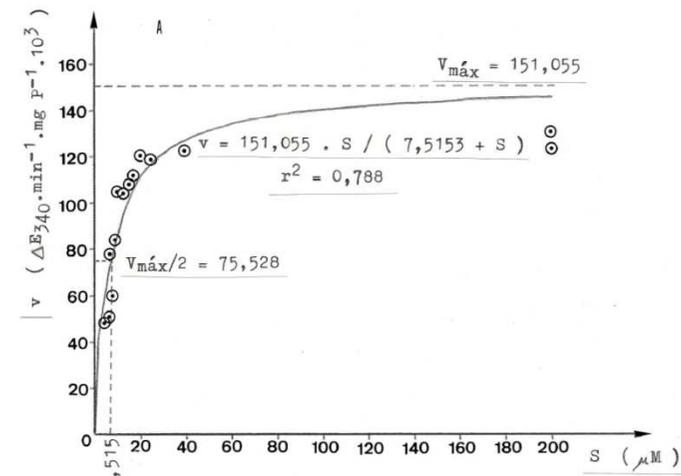
com $i = 1, 2, \dots, n$, em que e_i mede o desvio relativo do valor observado v_i do valor calculado $V_{m\acute{a}x} \cdot S_i / (K_m + S_i)$. O erro $(1+e_i)$ aparece na equação como um factor e não como um erro aditivo, pois tal parece corresponder a uma situação mais exacta.

Quando a equação de Michaelis-Menten é expressa sob esta forma, é fácil concluir porque é que as transformações lineares atrás referidas originam resultados pouco precisos.

Pondo a expressão de cima em função de e_i virá:

$$e_i = \frac{K_m \cdot v_i}{V_{m\acute{a}x} \cdot S_i} + \frac{v_i}{V_{m\acute{a}x}} - 1$$

Interessa-nos pois obter a equação da hipérbole rectangular que faça e_i o mínimo possível - basta para isso aplicar o método dos mínimos quadrados.



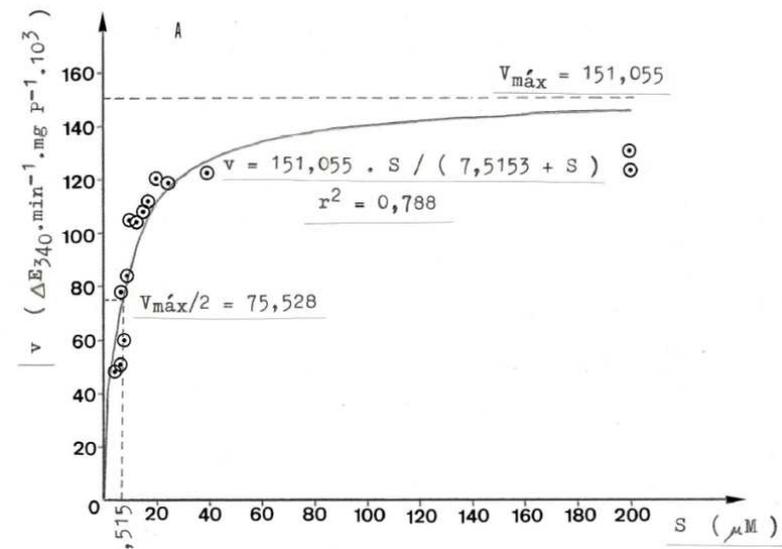
Principais vantagens e inconvenientes deste método

Vantagens:

- é simples;
- separa as variáveis v e S ;
- as estimativas dos parâmetros são, em geral, mais precisas que nos métodos lineares;
- não são necessárias transformações de variáveis e, conseqüentemente, transformações das suas variâncias.

Desvantagens:

- gráfico não linear;
- dificuldade no traçado preciso das assíntotas;
- todos estes cálculos estatísticos são relativamente trabalhosos e tanto mais quanto maior o valor de n ; para maior rigor e rapidez requer utilização de computador;
- efeitos não tomados em conta no modelo e que originam maus ajustamentos não são tão facilmente detectáveis como nos métodos lineares - por exemplo, os diferentes tipos de inibição podem ser mais facilmente reconhecidos com os métodos lineares.



Problemas de Enzimologia

1) A actividade da enzima que catalisa a reacção



foi determinada a diferentes concentrações de substrato e nos tempos abaixo indicados:

Concentração inicial de sacarose (mM)	Glucose formada (μg) em:					
	30 seg	1 min	2 min	5 min	10 min	15 min
10	180,2	360,3	600,0	1079,9	1410,2	1501,1
20	270,3	540,5	959,8	2039,8	3000,4	3481,5
40	360,3	720,6	1351,2	3240,1	6181,7	8520,9
60	405,4	810,7	1440,3	3451,5	6699,6	9600,1
80	432,4	864,8	1591,1	3749,8	7300,0	10801,2
100	450,4	900,8	1801,7	4504,1	9008,2	13512,0

Determine as velocidades iniciais v_0 , para cada uma das concentrações de sacarose.

Utilizando estas velocidades faça a representação gráfica de v_0 em função da concentração de substrato.

2) As velocidades iniciais de uma reacção enzimática do tipo



foram determinadas para diferentes concentrações de substrato, tendo sido obtidos os resultados indicados na tabela seguinte:

Concentração de S (M)	Velocidade inicial (μ moles/min.)
$1,00 \times 10^{-2}$	75,00
$1,00 \times 10^{-3}$	75,00
$1,00 \times 10^{-4}$	60,00
$7,50 \times 10^{-5}$	56,25
$6,25 \times 10^{-6}$	15,00

- Determine o K_m e a velocidade máxima que pode ser obtida com a quantidade de enzima utilizada.
- Qual será a velocidade inicial para uma concentração de substrato igual a $2,5 \times 10^{-5} \text{ M}$?
- Qual será a velocidade inicial quando $[S] = 10^{-4}$ e se for duplicada a concentração de enzima ?
- Se $[S] = 0,04 \text{ M}$ qual será a concentração do produto ao fim de 3 minutos ?

- 3) A partir da equação de Michaelis-Menten calcule as concentrações de substrato (expressas em múltiplos de K_m) necessárias para obter as seguintes velocidades iniciais: $0,5 V_{max}$, $0,9 V_{max}$, $0,95 V_{max}$ e $1 V_{max}$.

- 4) Determine a actividade molecular (taxa absoluta de catálise ou "turnover number") da enzima catalase, que catalisa a reacção:



sabendo que um extracto da enzima, com o grau de pureza de 85%, forneceu os seguintes dados experimentais:

- 2,95 mg de proteína por litro;
- produção, na presença de um excesso de água oxigenada, durante um período de 10 minutos, de 340 μl de oxigénio (a 20°C e a uma atmosfera de pressão) por cada 0,1 ml de extracto;
- peso molecular da enzima próximo de 225.000.

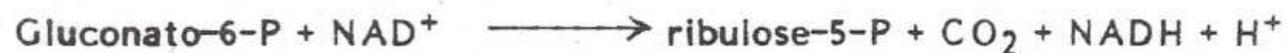
Nota: In enzymology, turnover number (also termed k_{cat}) is defined as the maximum number of molecules of substrate that an enzyme can convert to product per catalytic site per unit of time.

- 5) As velocidades iniciais de uma dada reacção enzimática ($S \longrightarrow P$) foram determinadas a várias concentrações de substrato, tendo sido obtidos os resultados seguintes:

[S] (M)	v (μ moles/min.)
$8,35 \times 10^{-6}$	13,8
$1,00 \times 10^{-5}$	16,0
$1,25 \times 10^{-5}$	19,1
$1,67 \times 10^{-5}$	23,8
$2,00 \times 10^{-5}$	26,7
$2,50 \times 10^{-5}$	30,8
$3,30 \times 10^{-5}$	36,2
$5,00 \times 10^{-5}$	44,5
$1,00 \times 10^{-4}$	57,2
$2,00 \times 10^{-4}$	66,7

Determine K_m e V_{max} pelo método gráfico do LINEWEAVER-BURK

6) A actividade da 6-fosfogluconato desidrogenase (descarboxilante), que catalisa a reacção:



foi estudada a pH 7,6 e 9,0, tendo-se obtido os seguintes resultados:

Concentração de gluconato-6-P (10^{-4} M)	Acréscimo de absorvância a 340 nm durante os cinco minutos iniciais	
	pH 7,6	pH 9,0
0,174	0,074	0,034
0,267	0,085	0,047
0,526	0,098	0,075
1,666	0,114	0,128
4,000	—	0,167

Determine a que valor de pH é maior a afinidade da enzima para o gluconato-6-P.

- 7) Estudou-se a taxa de hidrólise do L-carbobenzoxi-glicil-D-fenilalanina sob a acção da enzima carboxipeptidase (na presença e na ausência de inibidores) para o que se recorreu à reacção colorimétrica da ninidrina. A partir dos resultados expressos no quadro (em unidades arbitrárias de actividade) determine o tipo de cada um dos inibidores.

Concentração inicial do substrato (mM)	Inibidor			
	0	Hidrocinaurato 2 mM	Fenilbutirato 2 mM	Benzoato 50 mM
100,0	—	16,0	—	40,8
71,3	166,0	—	—	—
58,1	142,6	—	—	—
55,0	—	—	90,9	—
50,0	—	11,1	—	38,4
40,0	—	7,6	57,1	—
38,4	111,8	—	—	—
28,5	111,0	—	—	—
25,0	—	5,6	50,0	33,3
17,5	—	—	—	30,3
12,5	66,0	—	28,5	—

Soluções

- ① 360,3 540,5 720,6 810,7 864,8
900,8 μg glicose formada / min
- ② a) $K_m = 2,5 \times 10^{-5} \text{ M}$ $V_{\text{max}} = 75 \mu\text{mol} / \text{min}$
b) $v_0 = V_{\text{max}} / 2 = 37,5 \mu\text{mol} / \text{min}$
c) $v_0 = 60 \mu\text{mol} / \text{min}$ e $v_0 = 120 \mu\text{mol} / \text{min}$
d) $3 \times 75 \mu\text{mol} / \text{min} = 225 \mu\text{mol} / \text{min}$
- ③ $S = 1 \text{ Km}, 9 \text{ Km}, 19 \text{ Km}, \infty (*)$
(*) escreva-se 1: a equação de M.-M. na forma
 $S = v_0 K_m / (V_{\text{max}} - v_0)$, depois substitua-se v_0 por V_{max}
- ④ 2.725.000 moléculas de H_2O_2 consumidas por molécula,
de enzima por minuto
- ⑤ $K_m = 4 \times 10^{-5} \text{ M}$ $V_{\text{max}} = 8,3 \times 10^{-5} \text{ mol} / \text{min}$
- ⑥ faça 1: $v = f[S]$
Podem depois fazer-se a representação gráfica de
 V_{max}/Km - Bink e calcular o valor da K_m para
cada valor de pH
mas a observação direta do gráfico de $v = f[S]$ mostra
que a afinidade de E para S é maior a pH 7,6
do que a pH 9,0.
- ⑦ Hidroxiacetato : I competitivo ($K_m \uparrow, V_{\text{max}} =$)
Fenilbutirato : I não-competitivo ($K_m = V_{\text{max}} \downarrow$)
Benzato : I incompetivo ($K_m \downarrow, V_{\text{max}} \downarrow$).

FIM