

Bioquímica Geral

Sumário

ENZIMAS: Cinética enzimática

- **As reacções catalisadas por enzimas exibem uma cinética de saturação** (Curvas de saturação hiperbólicas e sigmoidais)
- **Esquema cinético simples para uma reacção enzimática.**
- **Modelo de Michaelis-Menten**
 - Hipóteses restritivas (condição de velocidade inicial, estado estacionário, rápido equilíbrio)
 - Expressão matemática do modelo
 - Significado físico dos parâmetros do modelo (V_M e K_M)
 - Determinação experimental dos parâmetros V_M e K_M
- **Enzimas cataliticamente perfeitas**

Sumário (continuação)

Cinética enzimática

- **Inibição reversível e irreversível**

Modelos cinéticos para inibição reversível: inibição competitiva, incompetitiva e não-competitiva. Referência ao Modelo geral de Webb. Determinação dos parâmetros cinéticos dos modelos.

- **Efeito do pH na actividade enzimática**

Como escolher um modelo de pH adequado aos resultados experimentais?

Modelos cinéticos para enzimas com 1 e 2 graus de protonação.

Gráficos das fracções molares das várias formas em função do pH. Estimativa dos valores de pK_a do modelo.

- **Cinética enzimática a dois substratos**

Notação de Cleland. Mecanismo sequencial ordenado e sequencial ao acaso.

Mecanismo não sequencial (Ping Pong)

Bibliografia suplementar:

Teresa Moura, 'Cinética Enzimática', FCT/UNL 2001

Cinética Enzimática

Estuda a velocidade das reacções catalisadas por enzimas e a forma como esta varia com a concentração do substrato, condições do meio (T, pH...) e na presença de inibidores ou activadores.

Aspecto prático:

No laboratório vamos medir velocidades da reacção em diferentes condições.

Aspecto teórico:

Vamos construir modelos matemáticos que se ajustam aos resultados experimentais. Estes modelos caracterizam-se por depender de parâmetros que têm um significado físico definido.

A informação obtida pode:

- ser útil do ponto de vista experimental (aplicações práticas das enzimas).
- fornecer pistas acerca dos mecanismos e dos aminoácidos envolvidos na catálise.

Como vou obter velocidades no laboratório?

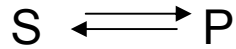
- Medindo o aparecimento do produto em função do tempo

$$v = \frac{d[P]}{dt}$$

- Medindo o desaparecimento do substrato em função do tempo

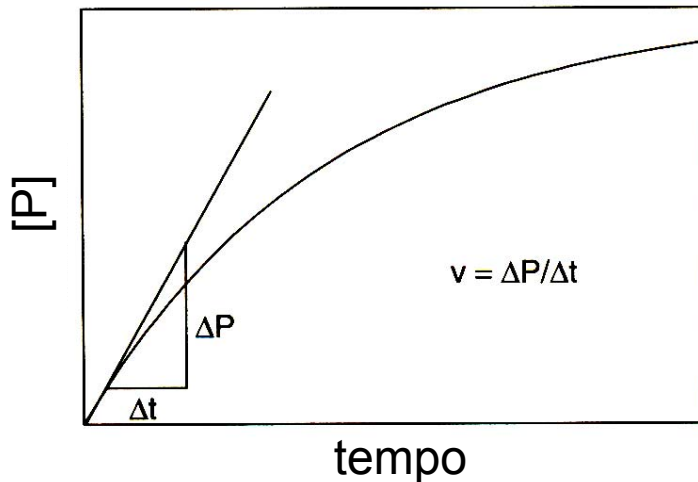
$$v = -\frac{d[S]}{dt}$$

Curvas de evolução temporal : concentração P vs tempo



velocidade instantânea:

$$v = \frac{d[P]}{dt}$$



As curvas de evolução são, normalmente lineares até $\approx 20\%$ de conversão de substrato em produto.

A velocidade da reacção (declive das curvas de evolução) diminui com o tempo até se atingir o equilíbrio:

i) A reacção inversa torna-se cada vez mais importante com a acumulação do produto.

No equilíbrio a velocidade de conversão de S em P iguala a velocidade de conversão de P em S e $v=0$.

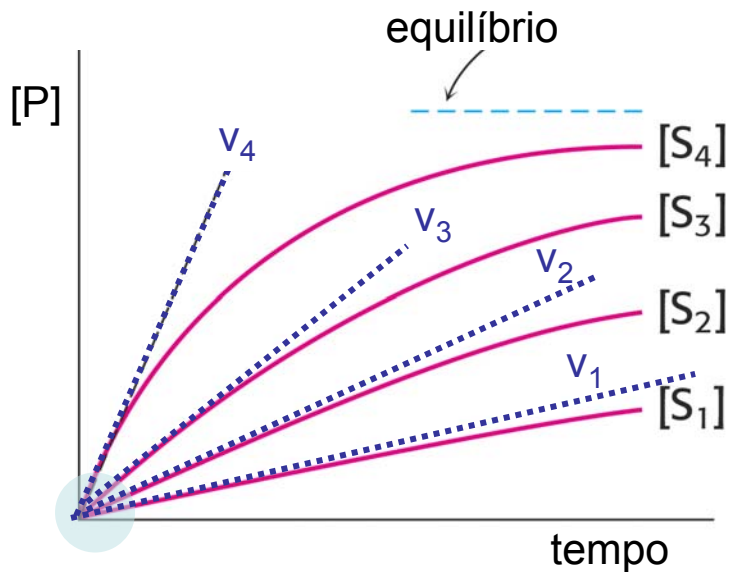
- i) A enzima torna-se instável no decurso da reacção;
- ii) O grau de saturação da enzima pelo substrato diminui à medida que o substrato é consumido;
- iii) Os produtos da reacção inibem a enzima;
- iv) Qualquer combinação dos factores anteriores.



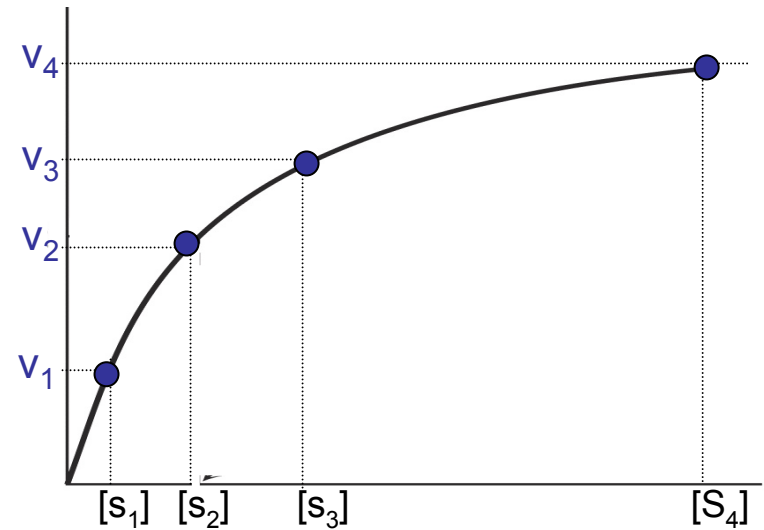
velocidades iniciais, v_0

Determinação experimental da velocidade inicial

**[P] em função do tempo
(exponencial)**



**v_o em função de [substrato]
(Hipérbole)**

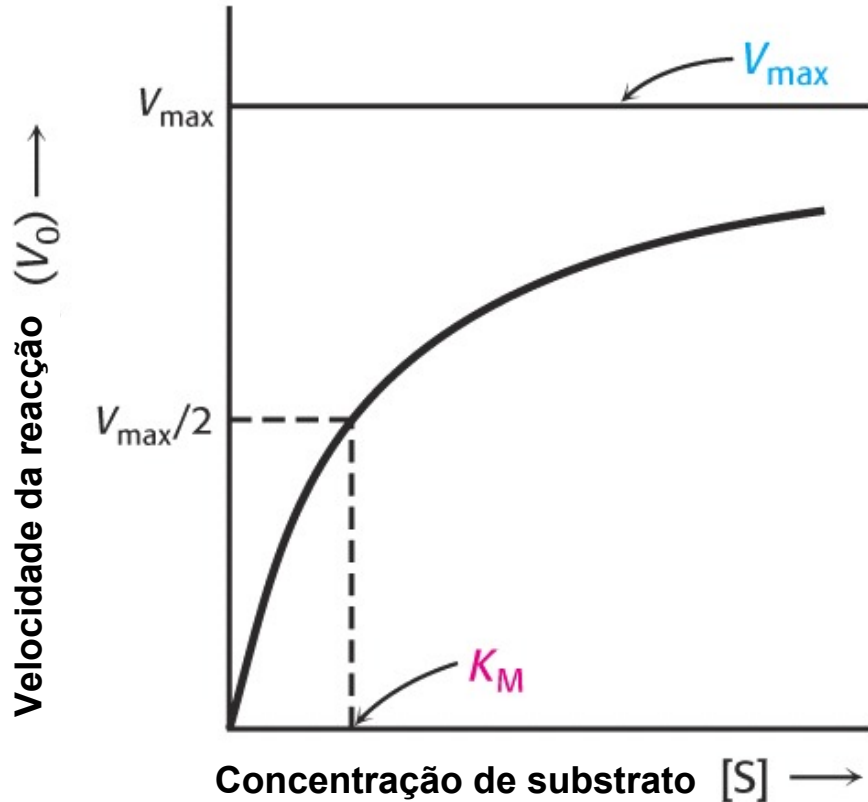


**Determinação experimental da
velocidade inicial: $v_o = (d[P]/dt)_o$**

Determinam-se as tangentes na origem das curvas [P] vs tempo, para diferentes valores de concentração de substrato. A concentração total de enzima (E_T) tem que ser constante.

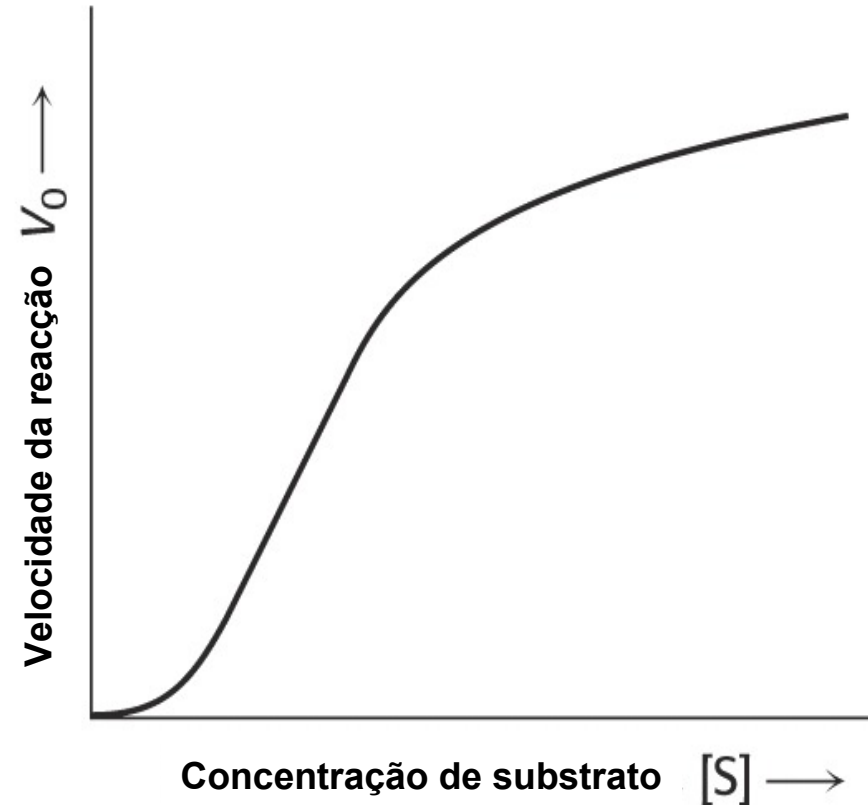
$v_o = f([S]_o)$ exibe saturação

As reacções catalisadas por enzimas exibem uma cinética de saturação



$V_0=f([S])$ curva Hiperbólica

Enzima Michaeliana
(obedece à cinética de Michaelis-Menten)



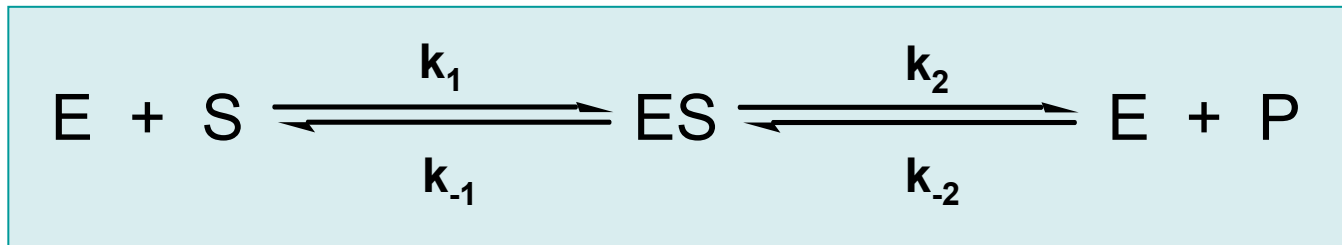
$V_0=f([S])$ curva Sigmoidal

Enzima Alostérica

Nesta disciplina só vamos estudar a cinética de enzimas Michaelianas !

Uma cinética de saturação implica a existência de um complexo enzima-substrato

Esquema cinético simples para uma reacção enzimática



- **4 variáveis:** 4 concentrações: [S], [P], [E] e [ES] (unidades M)
- **4 parâmetros:** 4 constantes de velocidade:
2 constantes de primeira ordem (k_{-1} , e k_2) (unidades: s^{-1})
2 constantes de segunda ordem (k_1 e k_{-2}) (unidades: $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)
Nota: Só se podem comparar constantes com as mesmas unidades (para comparar as constantes é necessário transformar as constantes de segunda ordem em constantes de pseudo-primeira ordem: $k_1 [\text{S}]$ e $k_{-2} [\text{P}]$)
- **4 equações diferenciais** descrevem a variação temporal das 4 espécies
(Rever noções de cinética química!)
- **2 equações de balanço de massa:**
substrato: $[\text{S}_0] = [\text{S}] + [\text{ES}] + [\text{P}]$
enzima: $\text{ET} = [\text{E}] + [\text{ES}]$

Para simplificar a análise vamos considerar duas hipóteses restritivas:

1 – condição de velocidade inicial (v_o)

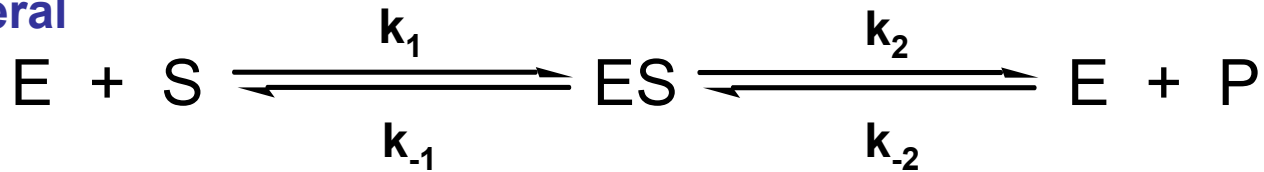
as velocidades são determinadas a partir da tangente na origem da curva $[P]$ vs. tempo. Nestas condições pode-se desprezar a reacção de conversão de produto em ES porque a concentração de produto é muito baixa.

2 – Hipótese de estado estacionário ($[S_o] \gg \gg ET$)

Se a concentração de substrato for muito superior à concentração de enzima, a concentração do intermediário ES é sempre muito baixa e pode considerar-se constante ao longo do tempo ($d[ES]/dt = 0$).

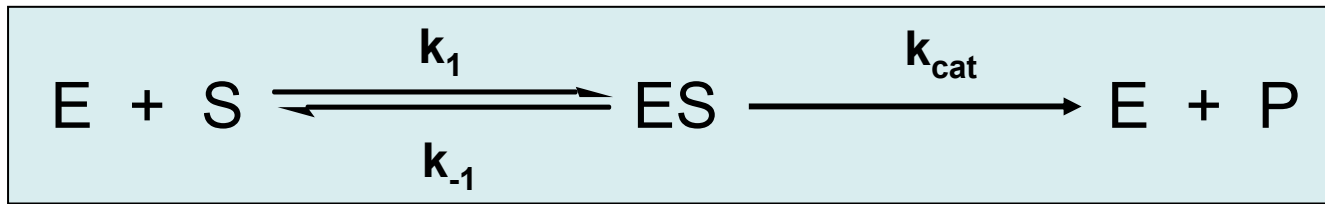
No laboratório é necessário garantir que as experiências são feitas nestas condições!

Modelo geral



Hipóteses restritivas: Condição de velocidade inicial ($[P] \approx 0$)
e hipótese de estado estacionário ($d[ES]/dt=0$)

Modelo cinético de Michaelis-Menten

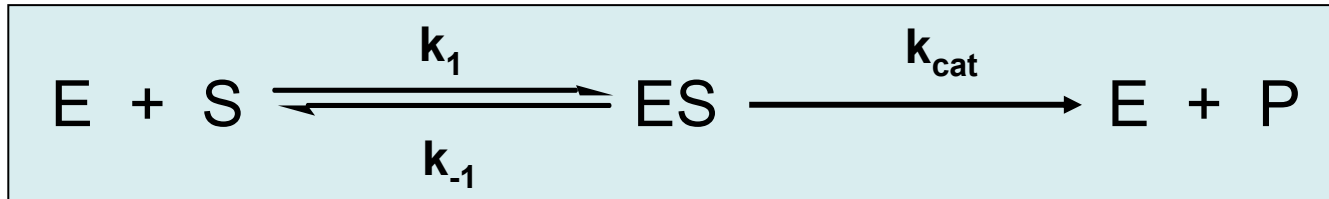


Equações simplificadas:

Equações diferenciais: $\left\{ \begin{array}{l} \frac{d[P]}{dt} = k_{\text{cat}} [ES] \quad \text{velocidade inicial} \\ \frac{d[ES]}{dt} = k_1 [E] [S] - (k_{-1} [ES] + k_{\text{cat}} [ES]) = 0 \end{array} \right.$

Balanço de massas: $\left\{ \begin{array}{l} [S]_0 = [S] \quad (\text{porque } [S] \gg E_T \text{ e } [P] \approx 0) \\ E_T = [E] + [ES] \end{array} \right.$

Dedução da equação de velocidade do modelo de Michaelis-Menten



Objectivo:

Expressar v_0 em função dos parâmetros do modelo (k_1, k_{-1}, k_{cat}) e de quantidades conhecidas ($[S_0]$ e E_T).

Vamos utilizar a expressão da velocidade inicial, a hipótese do estado estacionário e as equações de balanço de massa da enzima e do substrato.

$$\left\{ \begin{array}{l} v_0 = \left(\frac{d[P]}{dt} \right)_0 = k_{cat}[ES] \\ \frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - (k_{-1} + k_{cat})[ES] = 0 \\ ET = [E] + [ES] \\ [S_0] = [S] \end{array} \right.$$

Dedução da equação de velocidade do modelo de Michaelis-Menten

$$v_0 = \left(\frac{d[P]}{dt} \right)_0 = k_{cat} [ES]$$



$$\begin{cases} k_1[E][S] = (k_{-1} + k_{cat})[ES] \\ [S] = [S]_0 \\ E_T = [E] + [ES] \end{cases} \longrightarrow \begin{cases} [E] = [ES] \frac{k_{-1} + k_{cat}}{k_1} \frac{1}{[S]_0} \\ E_T = [ES] \frac{K_M}{[S]_0} + [ES] \end{cases} \longrightarrow [ES] = \frac{E_T}{1 + \frac{K_M}{[S]_0}} \longrightarrow [ES] = \frac{E_T [S]_0}{K_M + [S]_0}$$

definindo

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_{cat}}{k_1}$$

$$V_M = k_{cat} E_T$$

Substituindo na expressão de v_0

$$v_0 = \frac{V_M [S]_0}{K_M + [S]_0}$$

Equação de Michaelis-Menten

K_M constante de Michaelis-Menten

V_M velocidade máxima

$$v_0 = \frac{V_M [S]_0}{K_M + [S]_0}$$

Representação gráfica da equação de Michaelis-Menten: hipérbole rectangular

$$V_0 = \frac{V_M [S]_o}{K_M + [S]_o}$$

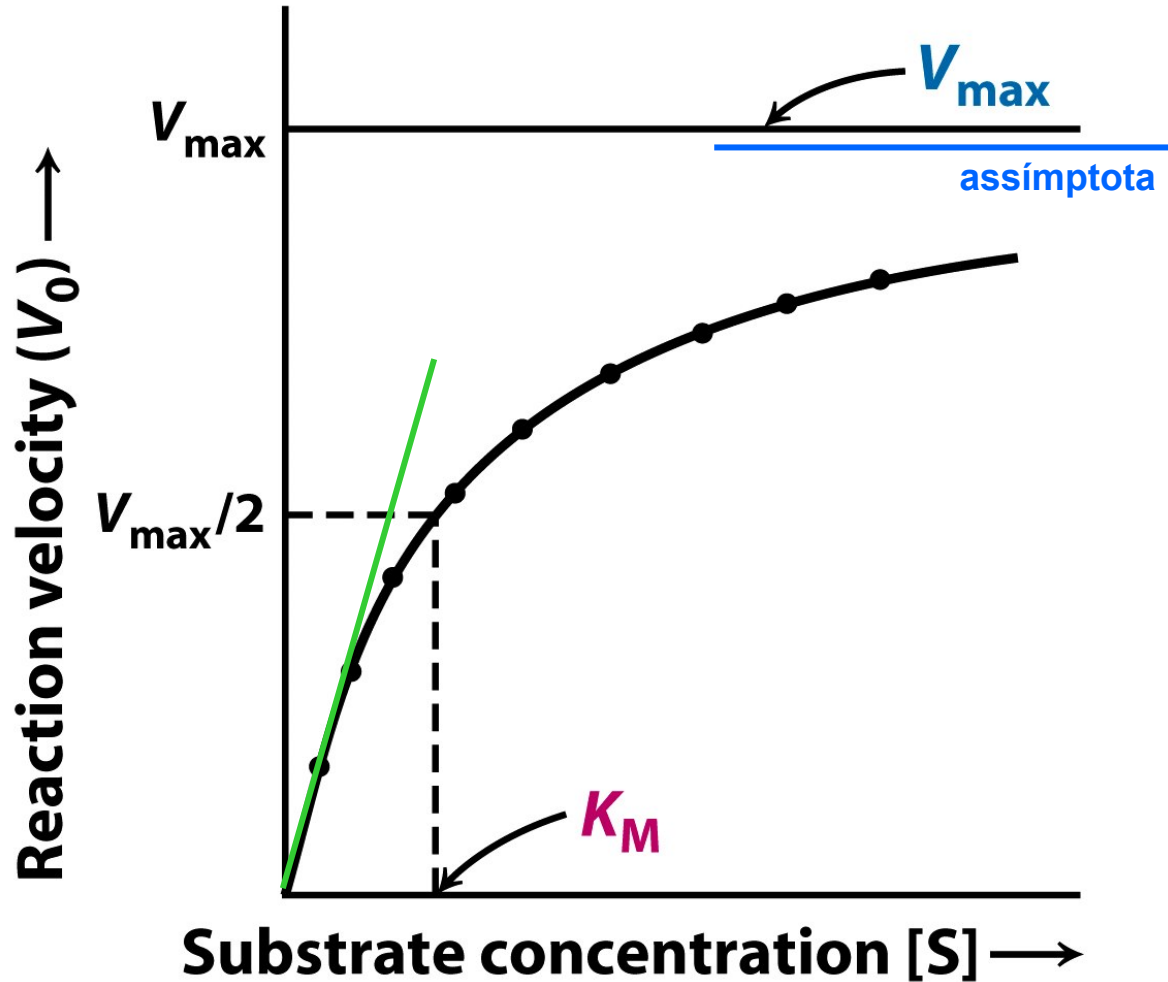
K_M unidades de concentração
 V_M unidades de velocidade

Reacção de 1ª ordem

$$[S]_o \ll K_M \quad v_o = (V_M/K_M) [S]_o$$

Reacção de ordem zero

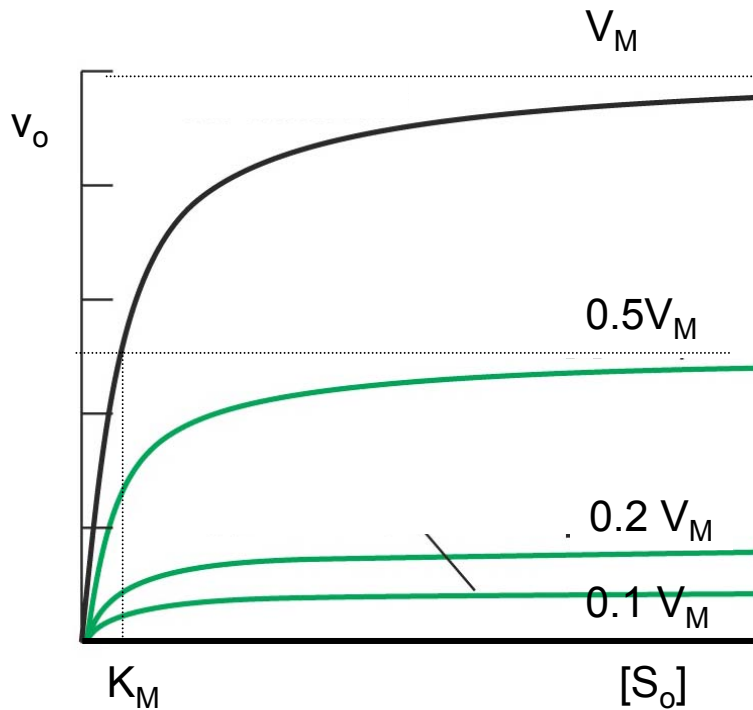
$$[S]_o \gg K_M \quad v_o = V_M$$



Significado físico dos parâmetros V_M e K_M

$$V_M = k_{cat} E_T$$

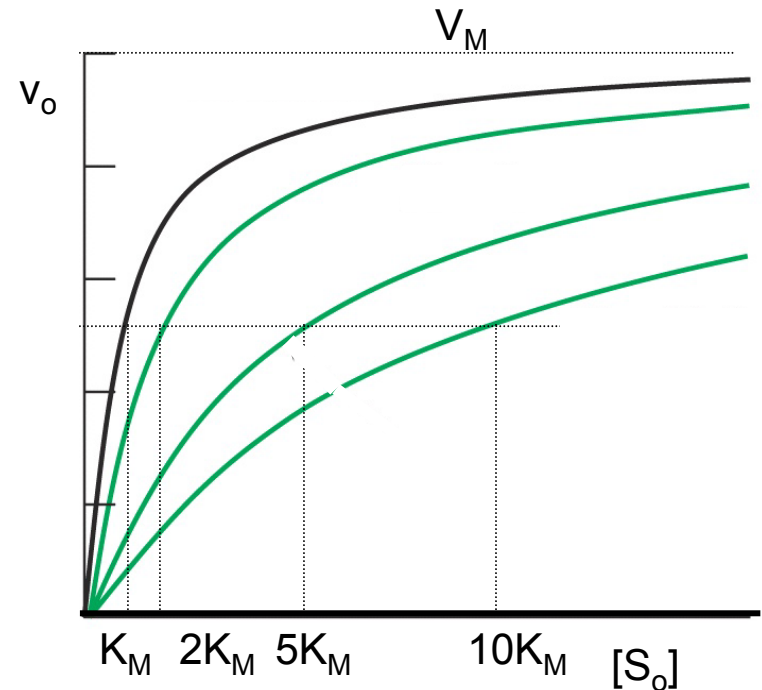
Variação de V_M



V_M depende da concentração da enzima. Corresponde a v_o quando toda a enzima está saturada com substrato, i.e. quando $[S] \gg K_M$.

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_{cat}}{k_1}$$

Variação de K_M



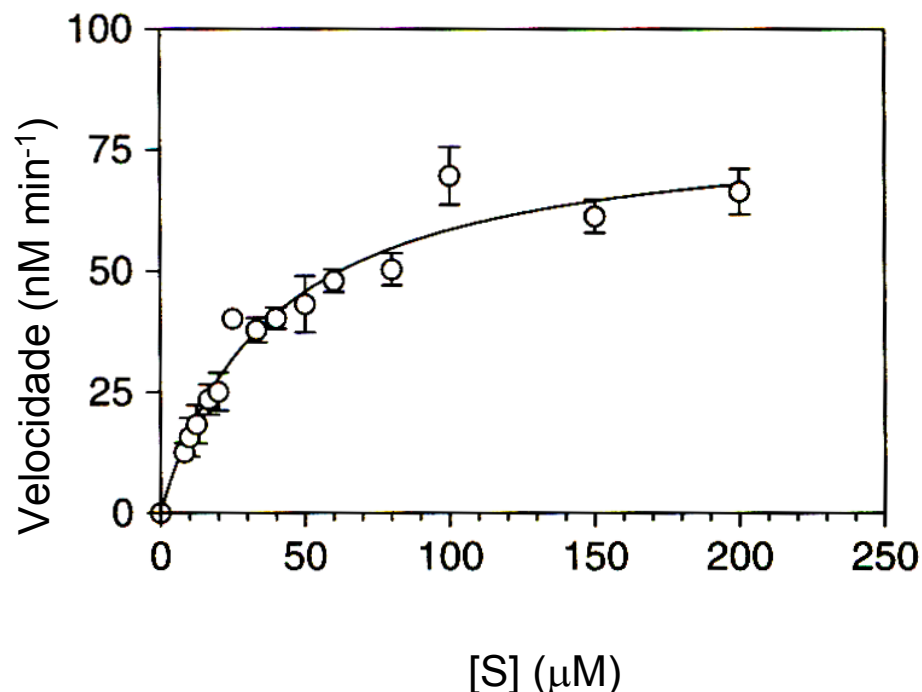
K_M é uma *medida* da afinidade entre a enzima e o substrato. Quanto maior K_M menor afinidade.

Determinação experimental de V_M e K_M

1. Ajuste directo do modelo de Michaelis-Menten recorrendo a regressões não-lineares:

TABLE 3.3 Results for the Nonlinear Least-Squares Fit of Experimental Data to the Michaelis-Menten Model

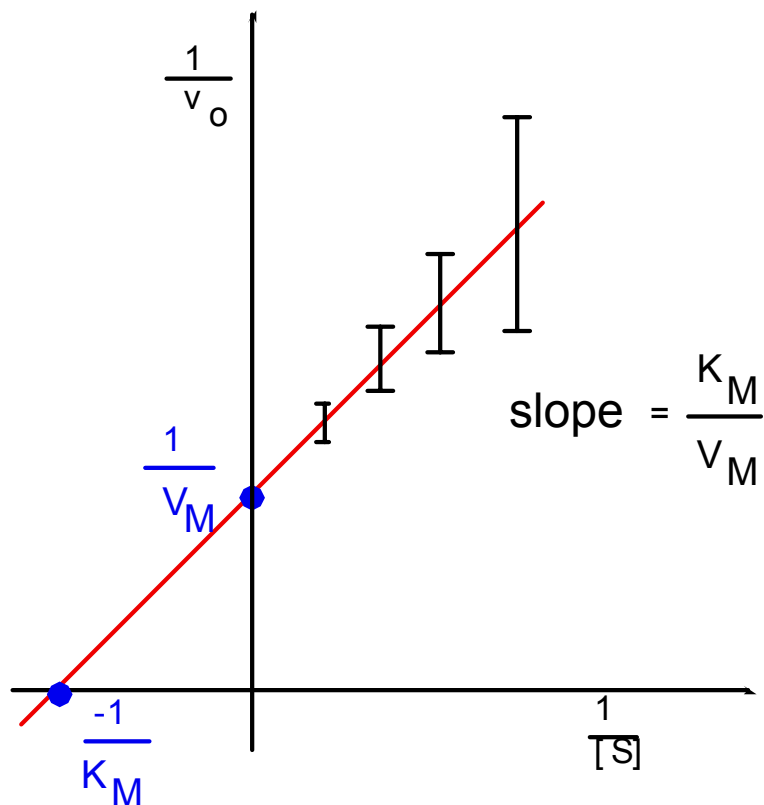
Best-fit values	
V	81.1
K	38.62
Std. error	
V	2.727
K	3.315
95% Confidence intervals	
V	75.66–86.54
K	32.00–45.23
Goodness of fit	
Degrees of freedom	73
r^2	0.934
Absolute sum of squares	2022
SD x	5.263
Runs test	
Points above curve	29
Points below curve	41
Number of runs	40
p Value (runs test)	0.915
Deviation from model	Not significant
Data	
Number of x values	15
Number of y replicates	5
Total number of values	75
Number of missing values	0



Determinação experimental de V_M e K_M

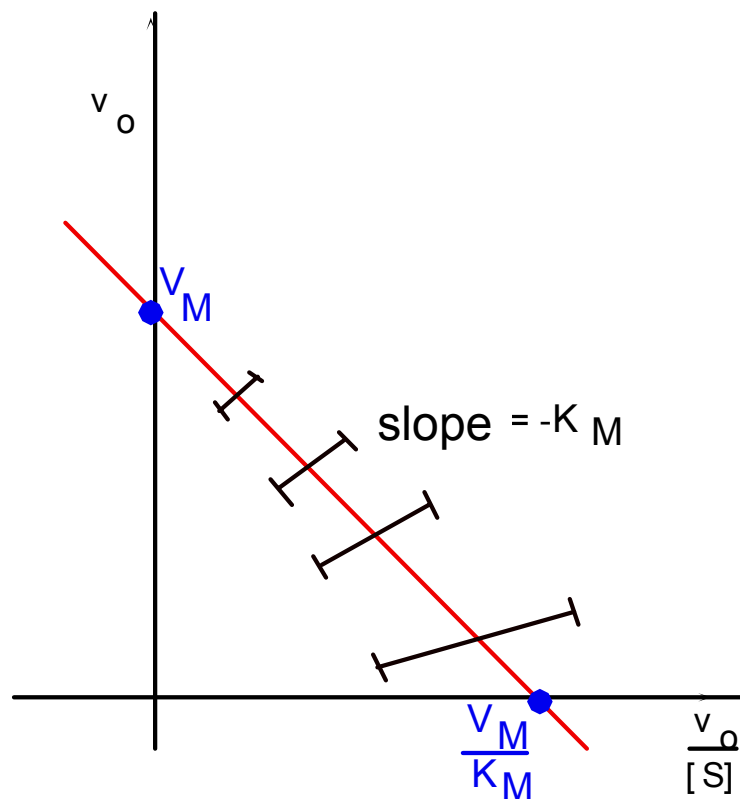
Linearizações da equação de Michaelis-Menten

A - LineweaverBurk



$$\frac{1}{v_o} = \frac{K_M}{V_M} \frac{1}{[S]_o} + \frac{1}{V_M}$$

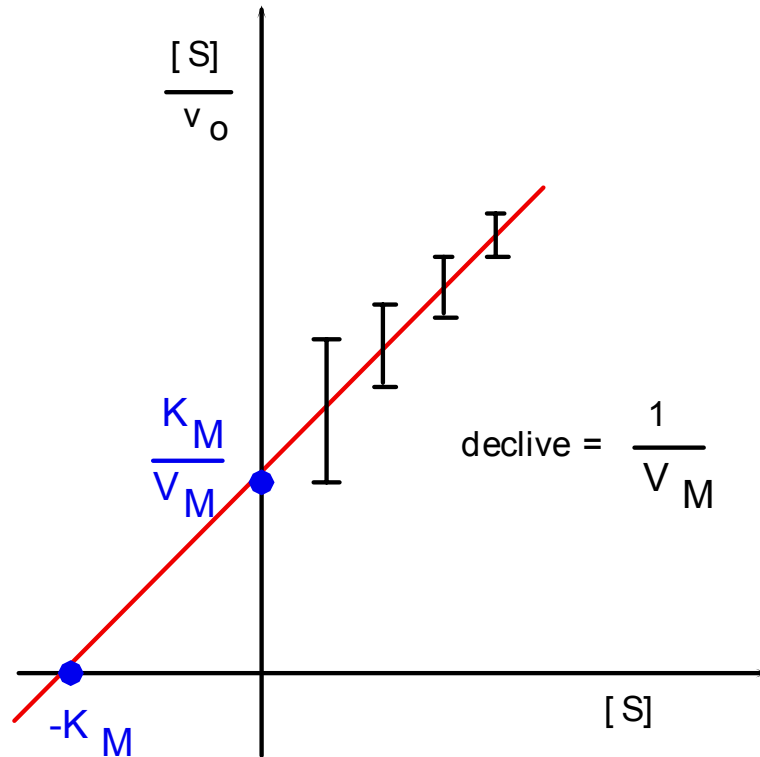
B - Eadie Hofstee



$$v_o = -K_M \frac{v_o}{[S]_o} + V_M$$

Linearização de

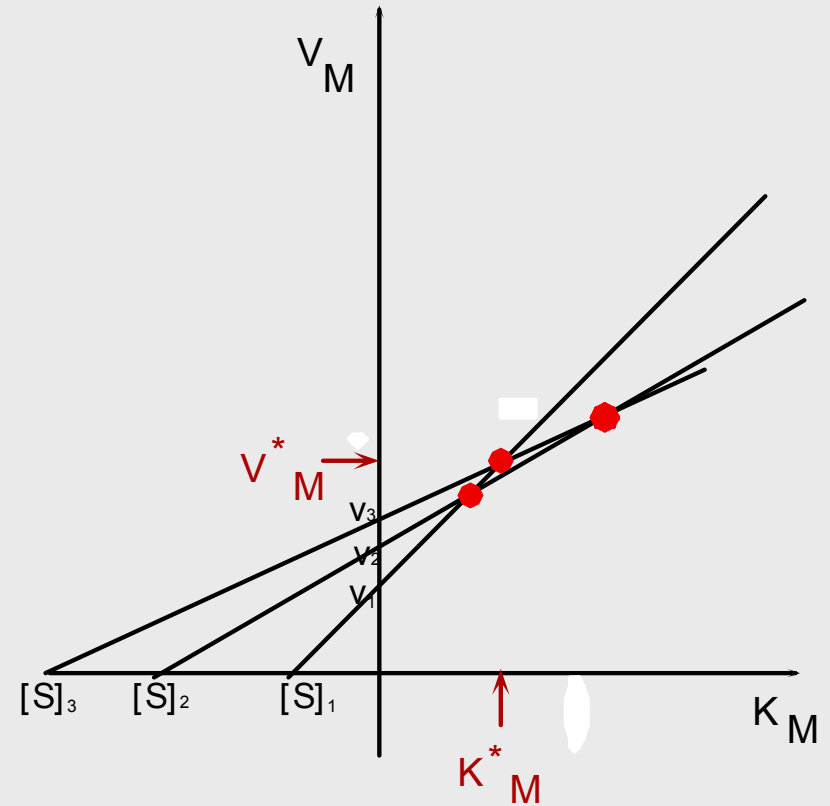
C - Hanes Woolf



$$\frac{[S]_o}{v_o} = \frac{K_M}{V_M} + \frac{1}{V_M} [S]_o$$

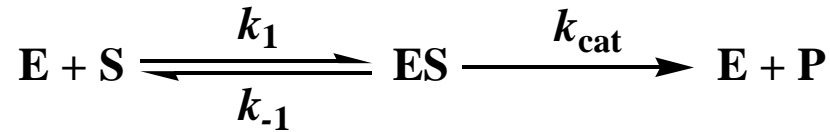
Método directo

D - Cornish Bowden



$$V_M = v_o + \frac{v_o}{[S]_o} K_M$$

Valores de K_M e k_{cat} para várias enzimas



enzima	substrato	$K_M \mu M$
Chymotrypsin	Acetyl-L-tryptophanamide	5000
Lysozyme	Hexa-N-acetylglucosamine	6
β -Galactosidase	Lactose	4000
Threonine deaminase	Threonine	5000
Carbonic anhydrase	CO_2	8000
Penicillinase	Benzylpenicillin	50
Pyruvate carboxylase	Pyruvate	400
	HCO_3^-	1000
	ATP	60
	Arginine	3
	tRNA	0.4
Arginine-tRNA synthetase	ATP	300

Enzima	k_{cat}	Turnover number (per second)
Carbonic anhydrase		600,000
3-Ketosteroid isomerase		280,000
Acetylcholinesterase		25,000
Penicillinase		2,000
Lactate dehydrogenase		1,000
Chymotrypsin		100
DNA polymerase I		15
Tryptophan synthetase		2
Lysozyme		0.5

K_M está relacionado com a formação de ES, K_M elevado \rightarrow fraca afinidade entre E e S
 k_{cat} está relacionado com a velocidade de catálise, k_{cat} elevado \rightarrow reacção mais rápida

Enzimas cataliticamente perfeitas:

k_{cat}/K_M aproxima-se do *limite da difusão*: $10^8 - 10^9 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$

$$\frac{k_{\text{cat}}}{K_M} = \frac{k_{\text{cat}}}{\frac{k_{-1} + k_{\text{cat}}}{k_1}} = \frac{k_{\text{cat}}}{k_{-1} + k_{\text{cat}}} k_1 < k_1$$

O limite de k_{cat}/K_M é o valor de k_1 .

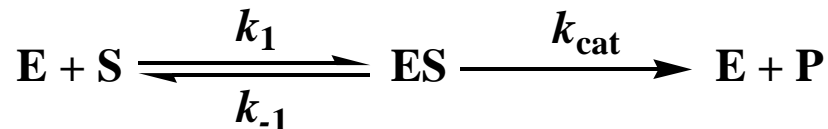
Este valor não pode ser superior ao da constante de velocidade do encontro da enzima com o substrato que é controlado pela difusão.

Enzyme	$k_{\text{cat}}/K_M \text{ (s}^{-1}\text{M}^{-1}\text{)}$
Acetylcholinesterase	1.6×10^8
Carbonic anhydrase	8.3×10^7
Catalase	4×10^7
Crotonase	2.8×10^8
Fumarase	1.6×10^8
Triose phosphate isomerase	2.4×10^8
β -Lactamase	1×10^8
Superoxide dismutase	7×10^9

Estado estacionário vs. Rápido equilíbrio

Estado estacionário

$$d[ES]/dt = 0$$



Se $k_{-1} \gg k_{cat}$ considera-se que a adição de substrato está em rápido equilíbrio e o modelo pode ser simplificado. Nestas condições $[ES]$ está relacionada com as concentrações de enzima livre e substrato pela constante de dissociação K_S .

Rápido equilíbrio



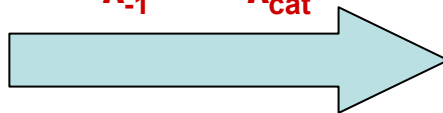
$$K_S = \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_{-1}}{k_1}$$

A hipótese de rápido equilíbrio é mais restritiva do que a hipótese de estado estacionário. → Modelo com menos parâmetros.
A hipótese de rápido equilíbrio **não** pode ser garantida na prática.

Estado estacionário

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_{cat}}{k_1}$$

$k_{-1} \gg k_{cat}$



Rápido equilíbrio

$$K_M = \frac{k_{-1}}{k_1} = K_S$$

Nota:

A hipótese restritiva de rápido equilíbrio corresponde a um caso particular de estado estacionário, em que a concentração do intermediário não só é constante ($d[ES]/dt = 0$), como é igual ao valor definido pela constante de equilíbrio de dissociação ($[ES]=[E][S]/K_S$).

Esta hipótese é mais restritiva do que apenas estado estacionário, e permite maiores simplificações nos modelos cinéticos (substituem-se duas constantes de velocidade (k_1, k_{-1}) por uma constante de equilíbrio, K_S). Nos modelos de inibição e pH vamos utilizar sempre a hipótese restritiva de rápido equilíbrio.

Como se trata de um caso particular de estado estacionário, é sempre necessário garantir no laboratório a condição de estado estacionário ($[S] \gg E_T$). No entanto, é impossível garantir que $k_{-1} \gg k_{cat}$ o que faz com que não seja possível garantir na prática a validade da hipótese restritiva de equilíbrio rápido.

TPC

Deduzir a equação de Michaelis-Menten utilizando a hipótese restritiva de rápido equilíbrio. Chegar às expressões de V_M e K_M para o modelo:



em que $K_S = [E][S]/[ES]$ é a constante de dissociação do complexo ES e k_{cat} é a constante de velocidade de formação do produto.

Cinética enzimática: Inibição

- A inibição da actividade enzimática constitui um importante mecanismo de regulação nos sistemas biológicos.
- Muitas drogas e agentes tóxicos actuam inibindo a actividade de enzimas.
- Inibidores específicos podem ser utilizados para ajudar a elucidar mecanismos catalíticos.

Inibição irreversível

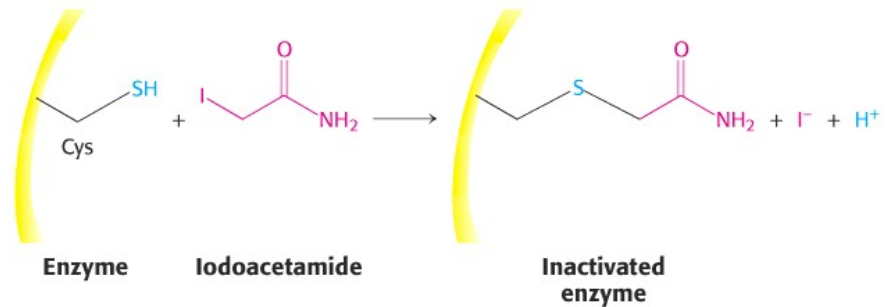
O inibidor liga-se fortemente à enzima e dissocia-se muito lentamente.

Alguns inibidores irreversíveis são drogas potentes.

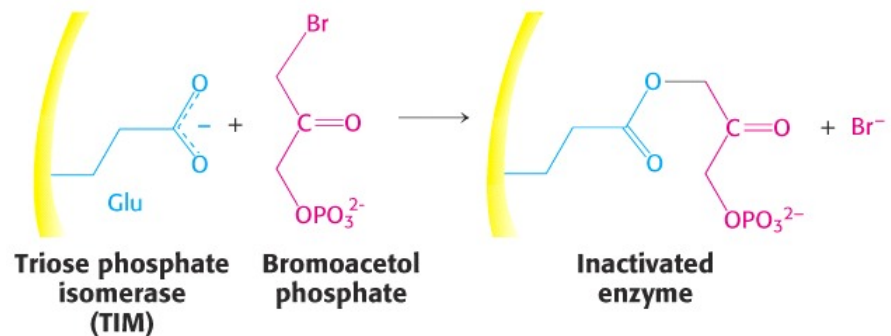
Ex. penicilina (modifica covalentemente a enzima transpeptidase), aspirina (inibe a enzima ciclooxygenase).

Podem utilizar-se inibidores irreversíveis para determinar quais são os aminoácidos do centro activo importantes para a catálise:

Reagentes específicos para certos grupos funcionais que podem estar no centro activo (Cis-SH, Ser-OH, ...)(ex. iodoacetamida, DIPF)



Marcadores de afinidade semelhantes ao substrato mas ligam-se irreversivelmente (ex. bromoacetol fosfato, TPCK).



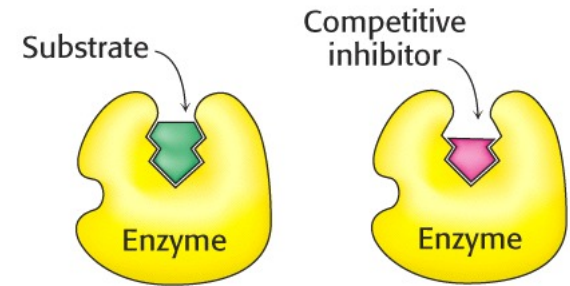
Inibidores suicidas substratos modificados que ao reagir dão origem a um intermediário que inactiva irreversivelmente a enzima.

Inibição reversível

Caracteriza-se por uma rápida dissociação do complexo enzima-inibidor.

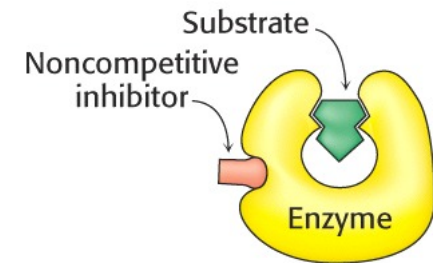
Inibição competitiva: o inibidor é estruturalmente semelhante ao substrato e liga-se no centro activo impedindo a ligação do substrato.

Um inibidor competitivo diminui a velocidade de catálise porque reduz a proporção de moléculas de enzima ligadas ao substrato. É possível reverter este tipo de inibição aumentando a concentração do substrato.



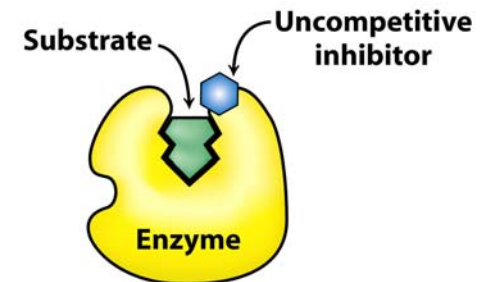
Inibição não-competitiva: inibidor e substrato podem estar simultaneamente ligados à enzima porque se ligam a sítios diferentes.

Um inibidor não competitivo diminui a velocidade de catálise porque diminui o número de *turnover* (k_{cat}).



Inibição incompetitiva: o inibidor incompetitivo só se liga a uma molécula de enzima que tem substrato ligado.

Um inibidor incompetitivo afecta simultaneamente a velocidade de catálise e a afinidade da enzima para o substrato.



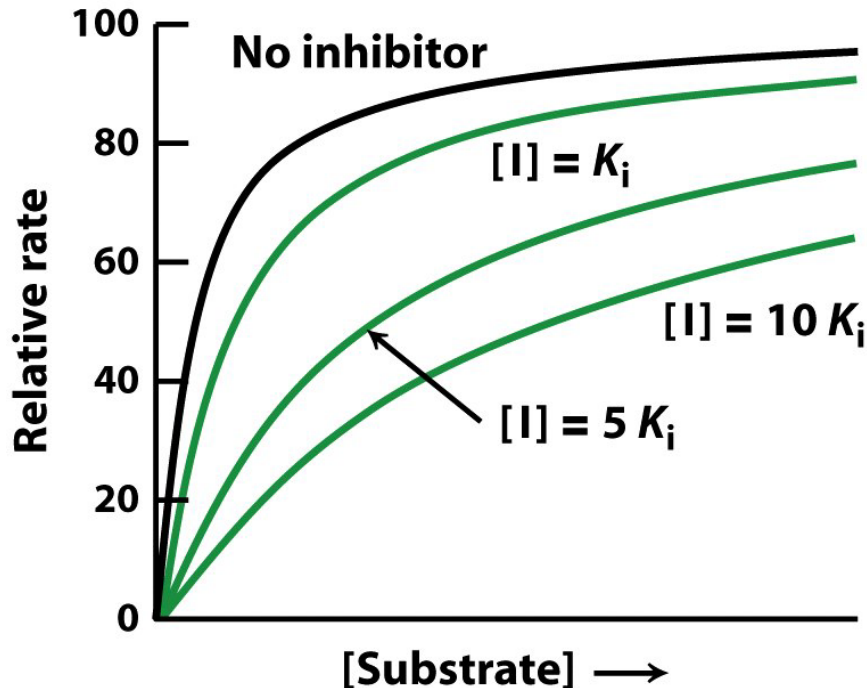
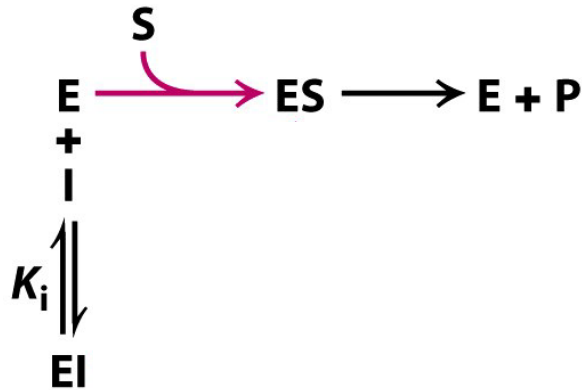
Inibição mista: Situações em que há combinações dos mecanismos anteriores.

Modelação matemática da cinética enzimática na presença de inibidores reversíveis:

- **Inibição competitiva**
- **inibição não-competitiva**
- **inibição incompetitiva**

Referência ao modelo geral de Webb, que é válido para todos os tipos de inibição reversível, incluindo diferentes tipos de inibição mista.

Inibição competitiva



$$v = \frac{V'_M [S]}{K'_M + [S]}$$

$$V'_M = V_M$$

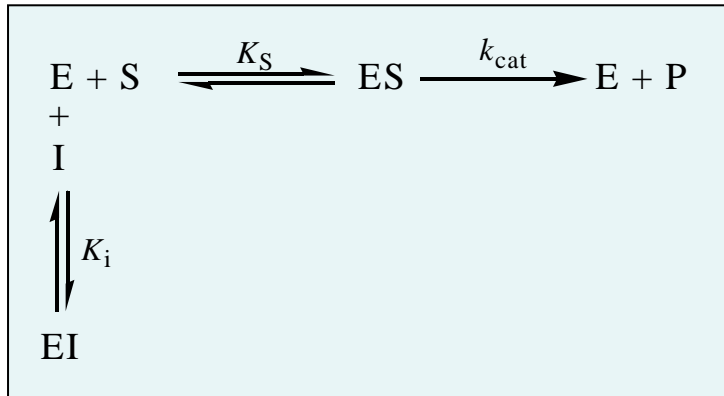
$$K'_M = K_S \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)$$

Na presença do inibidor apenas um dos parâmetros é afectado:

- A velocidade máxima não se altera.
($V'_M = V_M$)
- A afinidade da enzima para o substrato é menor.

$$(K'_M > K_M)$$

Inibição competitiva



Hipóteses restritivas:

- Velocidades iniciais
- Rápido equilíbrio (definem-se constantes de dissociação para S e I)

Equações de partida:

$$v = k_{\text{cat}} [\text{ES}]$$

$$K_S = \frac{[\text{E}][\text{S}]}{[\text{ES}]}$$

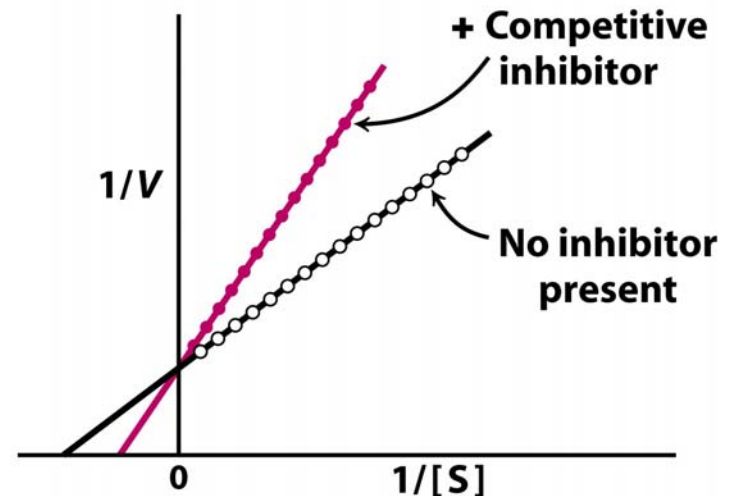
$$K_I = \frac{[\text{E}][\text{I}]}{[\text{EI}]}$$

$$E_T = [\text{E}] + [\text{EI}] + [\text{ES}]$$

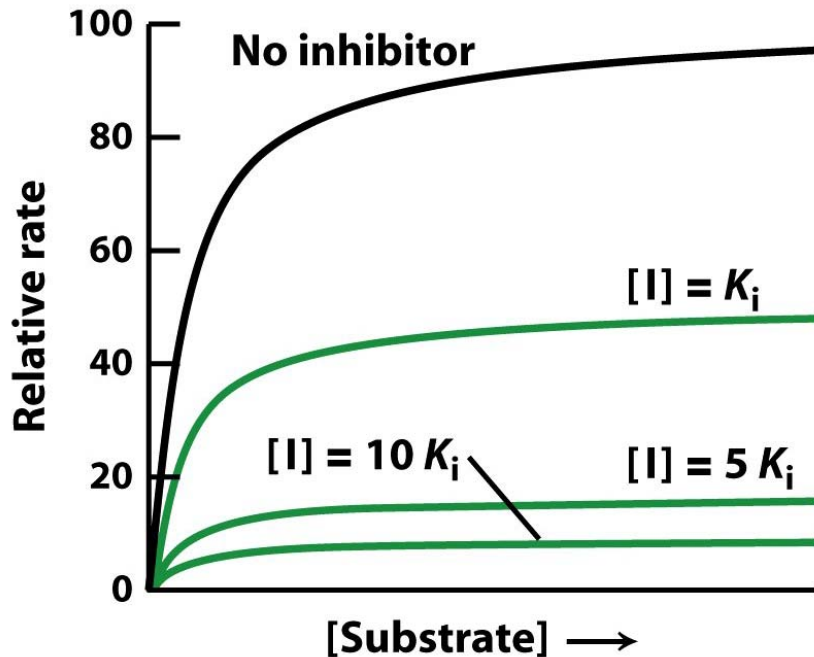
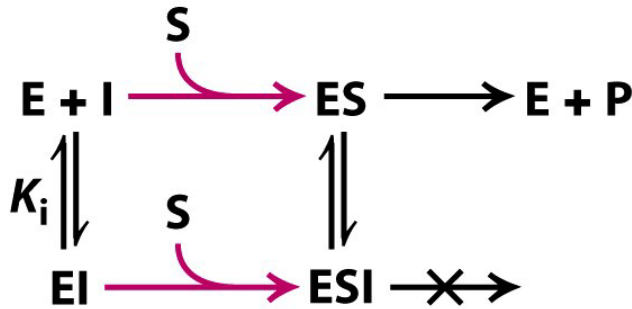
$$E_T = [\text{E}] \left(1 + \frac{[\text{I}]}{K_I} + \frac{[\text{S}]}{K_S} \right) \longrightarrow [\text{E}] = \frac{E_T}{\left(1 + \frac{[\text{I}]}{K_I} + \frac{[\text{S}]}{K_S} \right)}$$

$$v = k_{\text{cat}} \frac{[\text{S}]}{K_S} [\text{E}] = \frac{k_{\text{cat}} E_T \frac{[\text{S}]}{K_S}}{1 + \frac{[\text{I}]}{K_I} + \frac{[\text{S}]}{K_S}} = \frac{k_{\text{cat}} E_T [\text{S}]}{K_S \left(1 + \frac{[\text{I}]}{K_I} \right) + [\text{S}]}$$

$$\begin{aligned}
 V_M' &= k_{\text{cat}} E_T = V_M \\
 v &= \frac{V_M' [\text{S}]}{K_M' + [\text{S}]} \\
 K_M' &= K_S \left(1 + \frac{[\text{I}]}{K_I} \right)
 \end{aligned}$$



Inibição não-competitiva



$$v = \frac{V'_M [S]}{K'_M + [S]}$$

$$V'_M = \frac{V_M}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}$$

$$K'_M = K_S$$

Na presença do inibidor apenas um dos parâmetros é afectado:

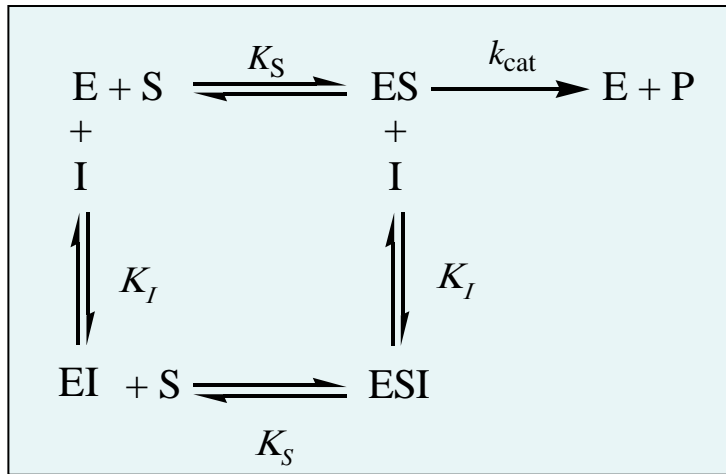
- A velocidade máxima é menor.

$$(V'_M < V_M)$$

- A afinidade da enzima para o substrato não se altera.

$$(K'_M = K_M)$$

Inibição não-competitiva



Hipóteses restritivas:

- Velocidades iniciais
- Rápido equilíbrio (definem-se constantes de dissociação para S e I)

Equações de partida:

$$v = k_{\text{cat}} [\text{ES}]$$

$$K_S = \frac{[\text{E}][\text{S}]}{[\text{ES}]} = \frac{[\text{EI}][\text{S}]}{[\text{ESI}]}$$

$$K_I = \frac{[\text{E}][\text{I}]}{[\text{EI}]} = \frac{[\text{ES}][\text{I}]}{[\text{ESI}]}$$

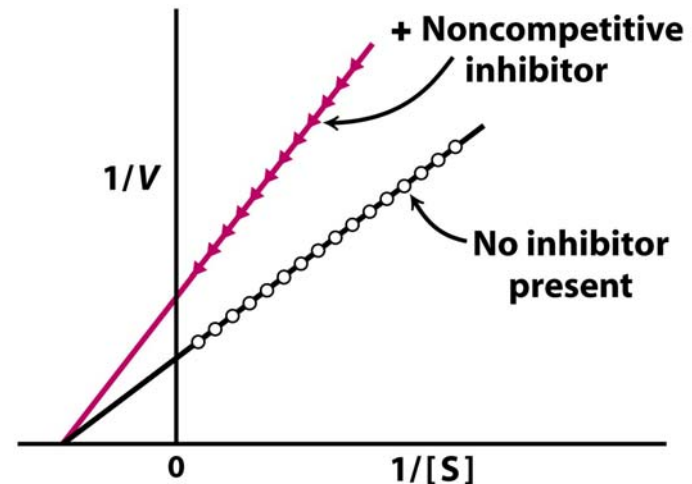
$$E_T = [\text{E}] + [\text{EI}] + [\text{ES}] + [\text{ESI}]$$

$$E_T = [\text{E}] \left(1 + \frac{[\text{I}]}{K_I} + \frac{[\text{S}]}{K_S} + \frac{[\text{I}][\text{S}]}{K_I K_S} \right) \quad [\text{E}] = \frac{E_T}{\left(1 + \frac{[\text{I}]}{K_I} + \frac{[\text{S}]}{K_S} + \frac{[\text{I}][\text{S}]}{K_I K_S} \right)}$$

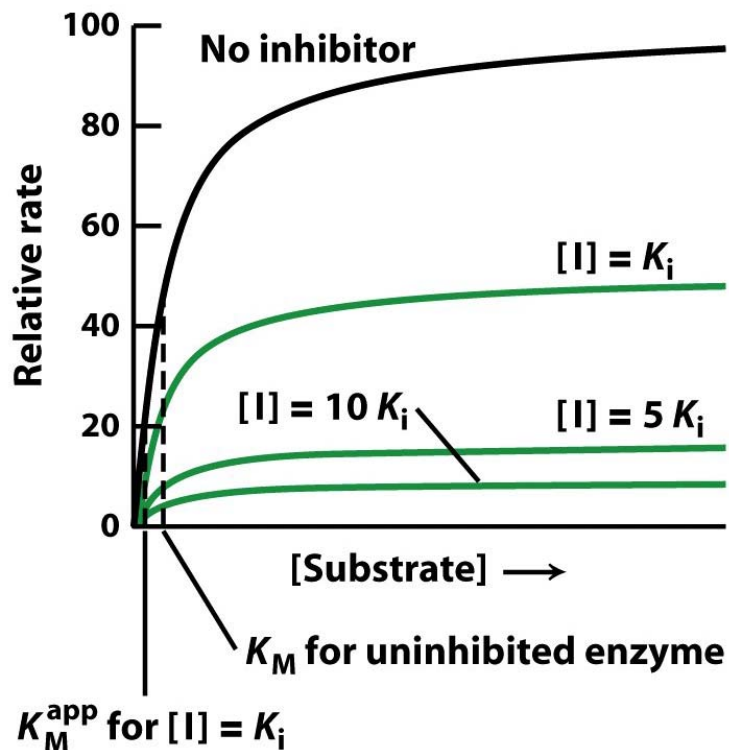
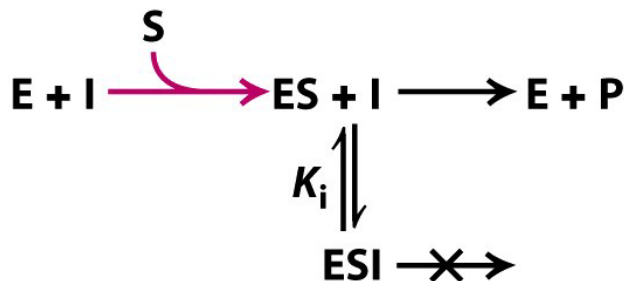
$$v = k_{\text{cat}} \frac{[\text{S}]}{K_S} [\text{E}] = \frac{k_{\text{cat}} E_T \frac{[\text{S}]}{K_S}}{1 + \frac{[\text{I}]}{K_I} + \frac{[\text{S}]}{K_S} + \frac{[\text{I}][\text{S}]}{K_I K_S}} = \frac{k_{\text{cat}} E_T [\text{S}]}{K_S \left(1 + \frac{[\text{I}]}{K_I} \right) + [\text{S}] \left(1 + \frac{[\text{I}]}{K_I} \right)}$$

$$v = \frac{\left(\frac{k_{\text{cat}} E_T}{1 + \frac{[\text{I}]}{K_I}} \right) [\text{S}]}{K_S + [\text{S}]}$$

$$v = \frac{V'_M [\text{S}]}{K'_M + [\text{S}]} \quad V'_M = \frac{V_M}{\left(1 + \frac{[\text{I}]}{K_I} \right)} \quad K'_M = K_S$$



Inibição incompetitiva



$$v = \frac{V'_M [S]}{K'_M + [S]}$$

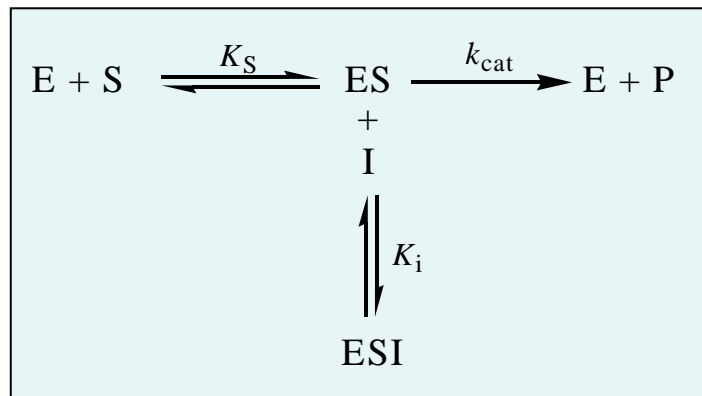
$$V'_M = \frac{V_M}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}$$

$$K'_M = \frac{K_S}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}$$

Na presença do inibidor ambos os parâmetros são afectados :

- A velocidade máxima é menor.
($V'_M < V_M$)
- Há uma aumento aparente da afinidade da enzima para o substrato
($K'_M < K_M$)

Inibição incompetitiva



Hipóteses restritivas:

- Velocidades iniciais
- Rápido equilíbrio (definem-se constantes de dissociação para S e I)

Equações de partida:

$$v = k_{\text{cat}} [\text{ES}]$$

$$K_S = \frac{[\text{E}][\text{S}]}{[\text{ES}]}$$

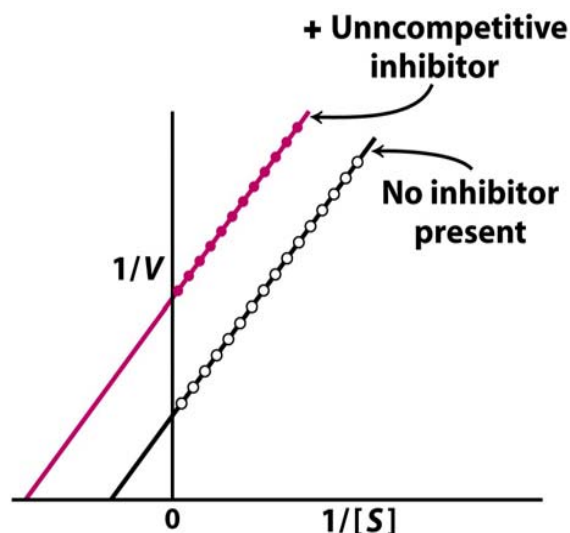
$$K_I = \frac{[\text{ES}][\text{I}]}{[\text{ESI}]}$$

$$E_T = [\text{E}] + [\text{ES}] + [\text{ESI}]$$

$$E_T = [\text{E}] \left(1 + \frac{[\text{S}]}{K_S} + \frac{[\text{I}][\text{S}]}{K_I K_S} \right) \longrightarrow [\text{E}] = \frac{E_T}{\left(1 + \frac{[\text{S}]}{K_S} + \frac{[\text{I}][\text{S}]}{K_I K_S} \right)}$$

$$v = k_{\text{cat}} \frac{[\text{S}]}{K_S} [\text{E}] = \frac{k_{\text{cat}} E_T \frac{[\text{S}]}{K_S}}{1 + \frac{[\text{S}]}{K_S} + \frac{[\text{I}][\text{S}]}{K_I K_S}} = \frac{k_{\text{cat}} E_T [\text{S}]}{K_S + [\text{S}] \left(1 + \frac{[\text{I}]}{K_I} \right)}$$

$$v = \frac{\frac{k_{\text{cat}} E_T}{\left(1 + \frac{[\text{I}]}{K_I} \right)} [\text{S}]}{\frac{K_S}{\left(1 + \frac{[\text{I}]}{K_I} \right)} + [\text{S}]}$$



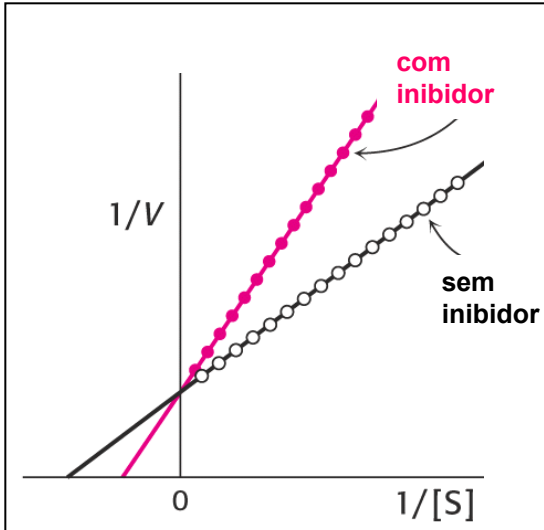
$$v = \frac{V'_M [\text{S}]}{K'_M + [\text{S}]}$$

$$V'_M = \frac{V_M}{\left(1 + \frac{[\text{I}]}{K_I} \right)}$$

$$K'_M = \frac{K_S}{\left(1 + \frac{[\text{I}]}{K_I} \right)}$$

Representação de Lineweaver-Burk para os 3 tipos de inibição reversível

Inibição competitiva

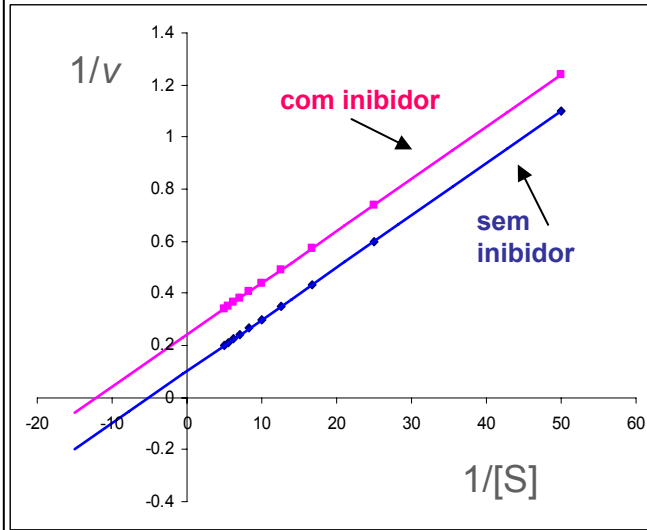


Rectas cruzam no eixo dos YY

$$V'_M = V_M$$

$$K'_M = K_S \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right)$$

Inibição incompetitiva

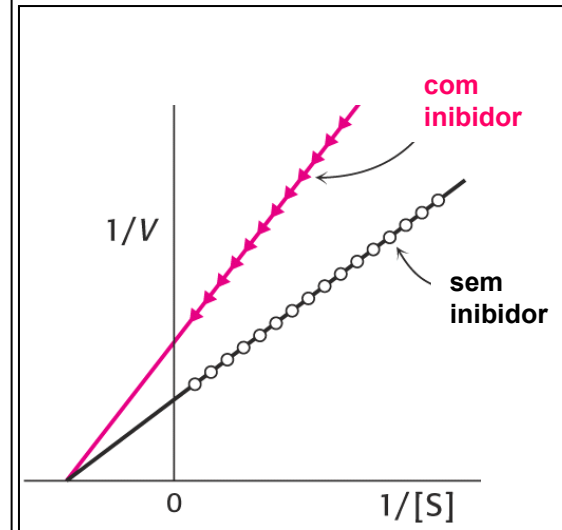


Rectas paralelas

$$V'_M = \frac{V_M}{\left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right)}$$

$$K'_M = \frac{K_S}{\left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right)}$$

Inibição não competitiva



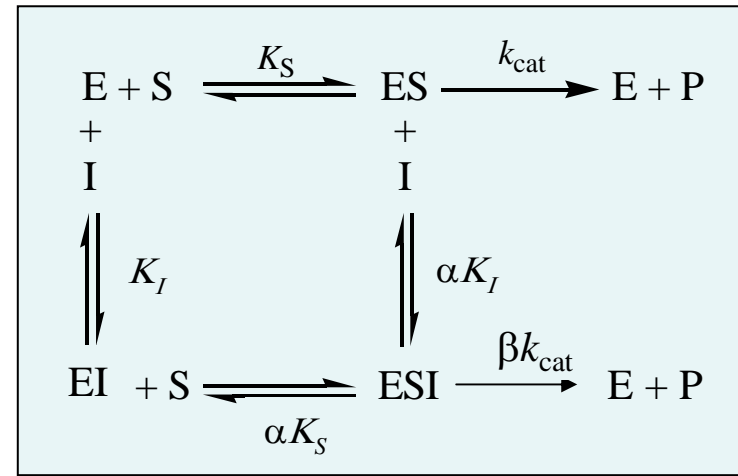
Rectas cruzam no eixo dos XX

$$V'_M = \frac{V_M}{\left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right)}$$

$$K'_M = K_S$$

Modelo Geral de Webb

Definem-se 11 tipos de inibição reversível, dependendo dos valores de α e β .

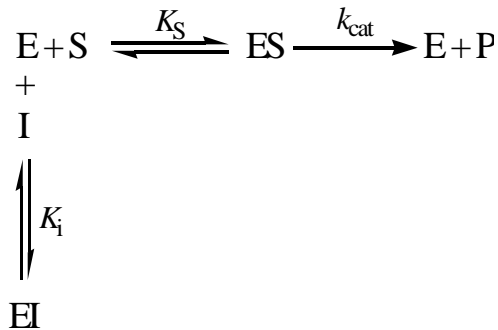


Os 3 casos de inibição simples descritos no início correspondem a casos particulares do modelo geral de Webb:

Inibição competitiva pura:

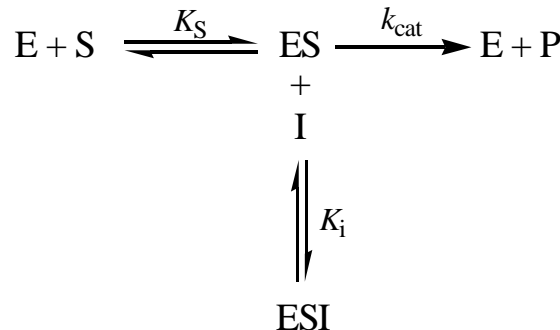
$$\alpha \rightarrow \infty$$

(β indeterminado porque o complexo ESI nunca se forma)



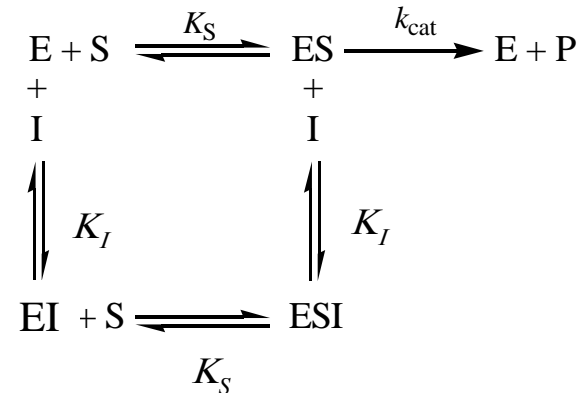
Inibição incompetitiva pura:

$$\beta = 0; \alpha \rightarrow 0; K_I \rightarrow \infty$$

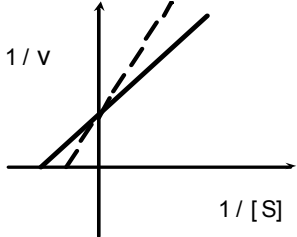
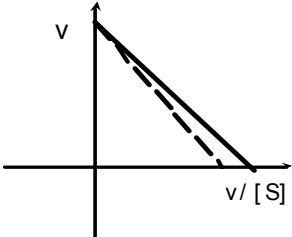
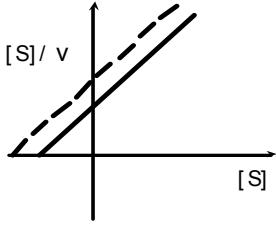
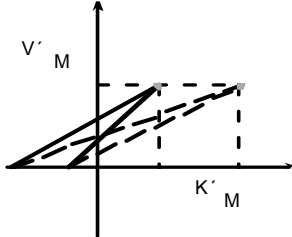
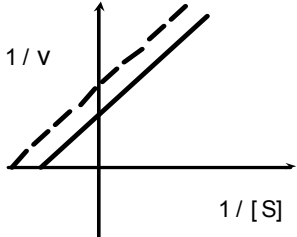
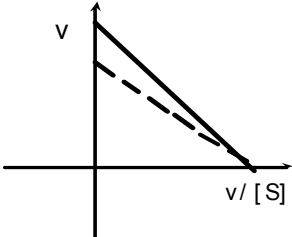
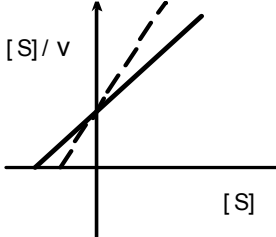
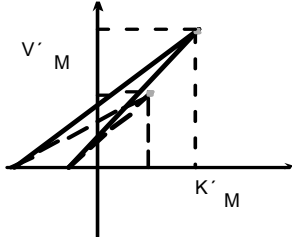
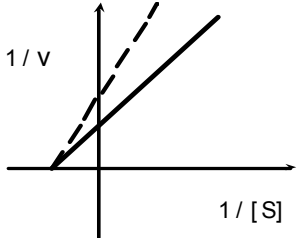
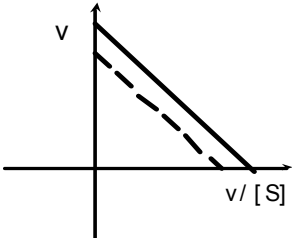
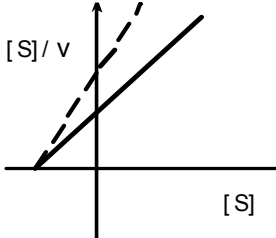
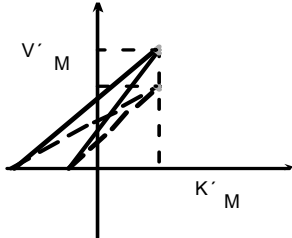


Inibição não competitiva pura:

$$\beta = 0; \alpha = 1$$

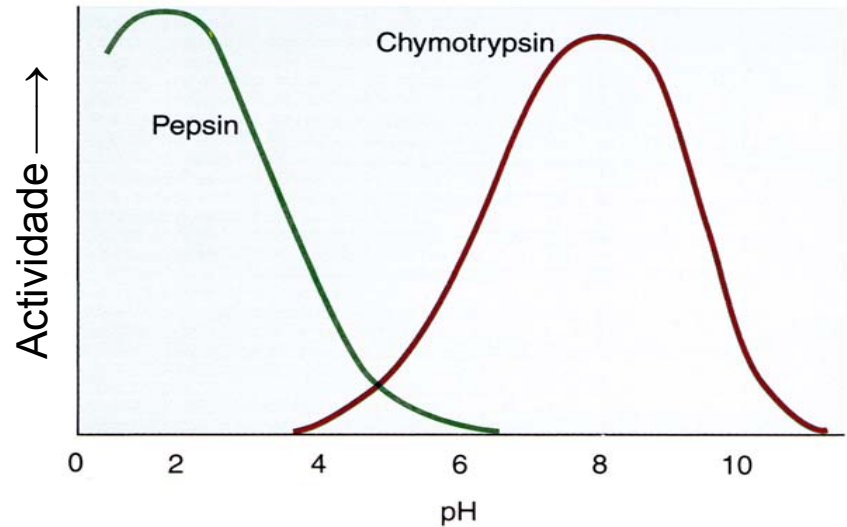


Linearizações e método directo CB para os 3 tipos de inibição

Tipo de inibição	Lineweaver Burk	Eadie Hofstee	Hanes-Woolf	Cornish-Bowden
$V_M' = V_M \frac{1}{1 + \frac{[I]_0}{\alpha K_I}}$ $K_M' = K_M \frac{1 + \frac{[I]_0}{\alpha K_I}}{1 + \frac{[I]_0}{\alpha K_I}}$ <p>competitiva $\alpha \rightarrow \infty$ $V_M' = V_M$ $K_M' > K_M$</p>	$\frac{1}{v_o} = \frac{K_M'}{V_M'} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_M'}$ 	$v_o = -K_M' \frac{v_o}{[S]} + V_M'$ 	$\frac{[S]}{v_o} = \frac{K_M'}{V_M'} + \frac{1}{V_M'} [S]$ 	$V_M' = v_o + \frac{v_o}{[S]} K_M'$ 
<p>incompetitiva $\alpha \rightarrow 0, K_I \rightarrow \infty$ $\alpha K_I = \text{constante}$ $V_M' < V_M$ $K_M' < K_M$</p>				
<p>Não-competitiva $\alpha = 1$ $V_M' < V_M$ $K_M' = K_M$</p>				

Efeito do pH na actividade enzimática

As proteínas são sensíveis ao pH.
A maior parte das enzimas apenas está activa numa gama relativamente estreita de valores de pH.



Efeitos do pH na actividade enzimática:

- Ligação do substrato à enzima
- Actividade catalítica
- Ionização do substrato
- Estrutura da proteína (desnaturação a pH extremos)

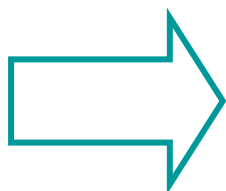
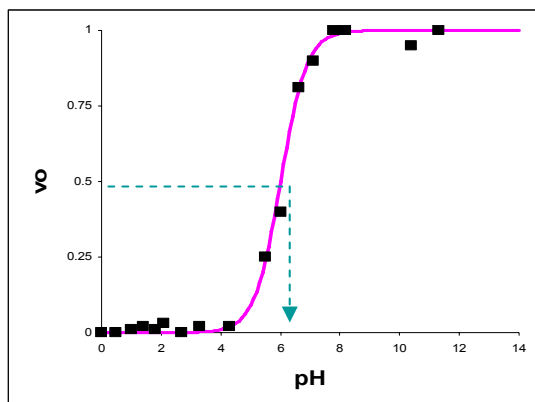
O estudo da dependência da actividade com o pH pode dar informação acerca dos valores de pKa dos aminoácidos do centro activo.

Modelação matemática do efeito do pH na cinética enzimática

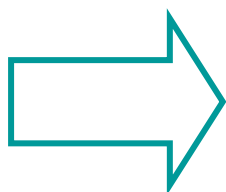
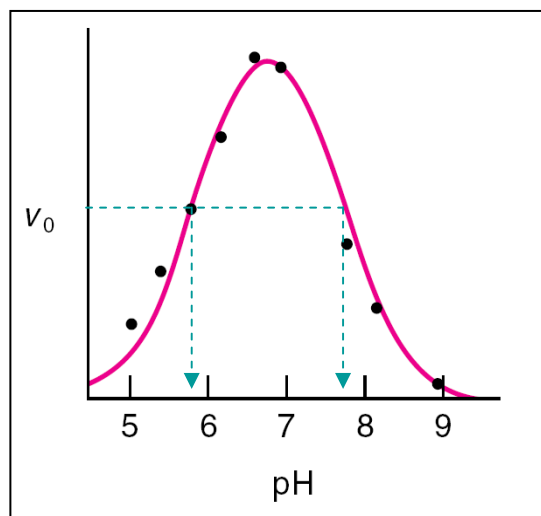
- **modelos com 1 grau de protonação**
- **modelos com 2 graus de protonação**

Como escolher um modelo de pH ?

O número de parâmetros de um modelo nunca deve ser superior ao necessário para explicar os resultados experimentais.



Curvas de actividade deste tipo necessitam apenas de um grupo ionizável: **modelo com 1 grau de protonação** (dois pK_a : um para a enzima livre e outro para a enzima ligada a S). Se a actividade for elevada a pH baixo a forma da enzima activa é a forma protonada (EHS), se a actividade for elevada a pH básico a forma activa da enzima é a forma desprotonada (ES).



Curvas de actividade deste tipo necessitam de dois grupos ionizáveis: **modelo com 2 graus de protonação** (4 pK_a : dois para a enzima livre e dois para a enzima ligada a S). Neste caso apenas a forma com um grau de protonação intermédio dá origem a produto.

EH_2S

EHS

ES

As curvas de actividade com o pH reflectem as populações das espécies que dão origem a produto

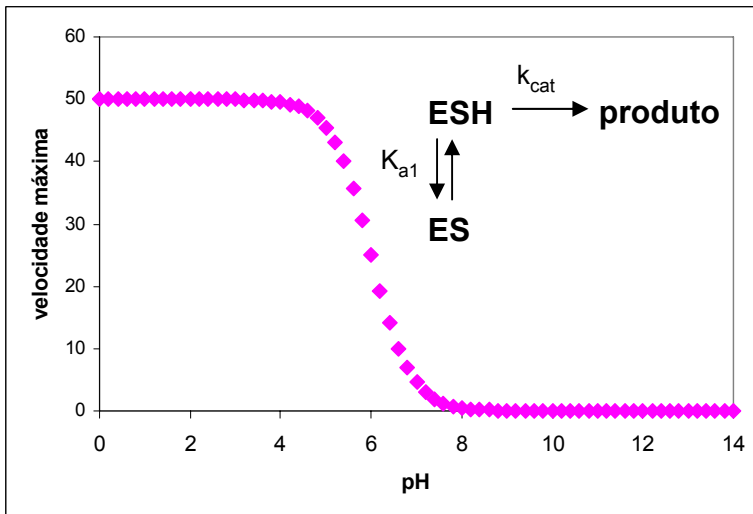
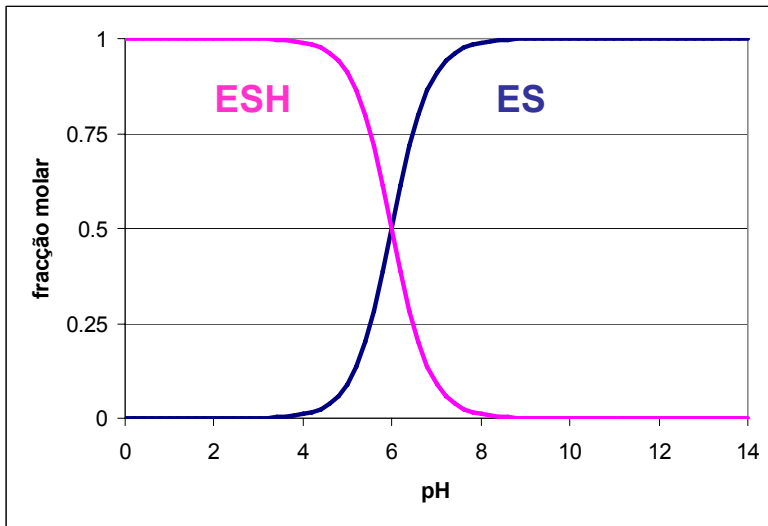
Modelos com 1 grau de protonação

em situação de substrato saturante $[S] \gg K_S$

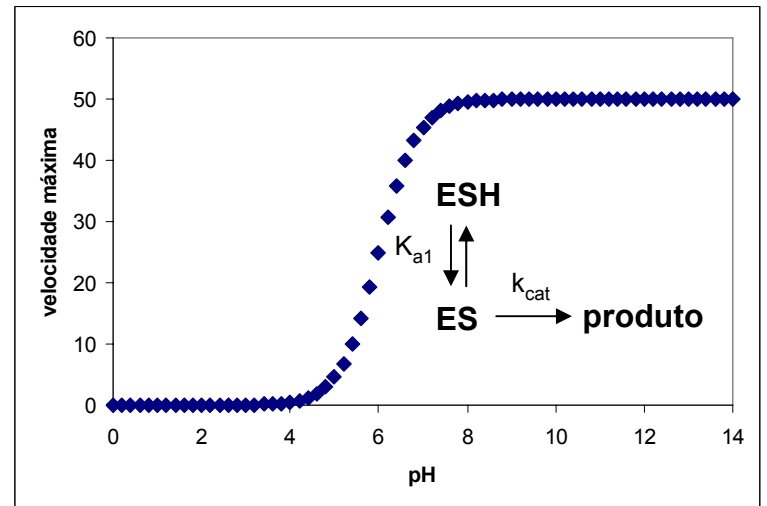
Parâmetros do modelo:

K_{a1} (constante de equilíbrio), nesta simulacao $pK_{a1}=6$

k_{cat} (constante de velocidade)



Apenas a espécie protonada dá produto



Apenas a espécie desprotonada dá produto

Cálculo das populações

Modelo com 1 grau de protonação

Condições de substrato saturante

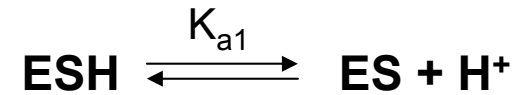
$$E_T = [ES] + [ESH]$$

$$E_T = [ES] + [ES] \frac{[H^+]}{K_{a1}}$$

$$E_T = [ES] \left(1 + \frac{[H^+]}{K_{a1}} \right)$$

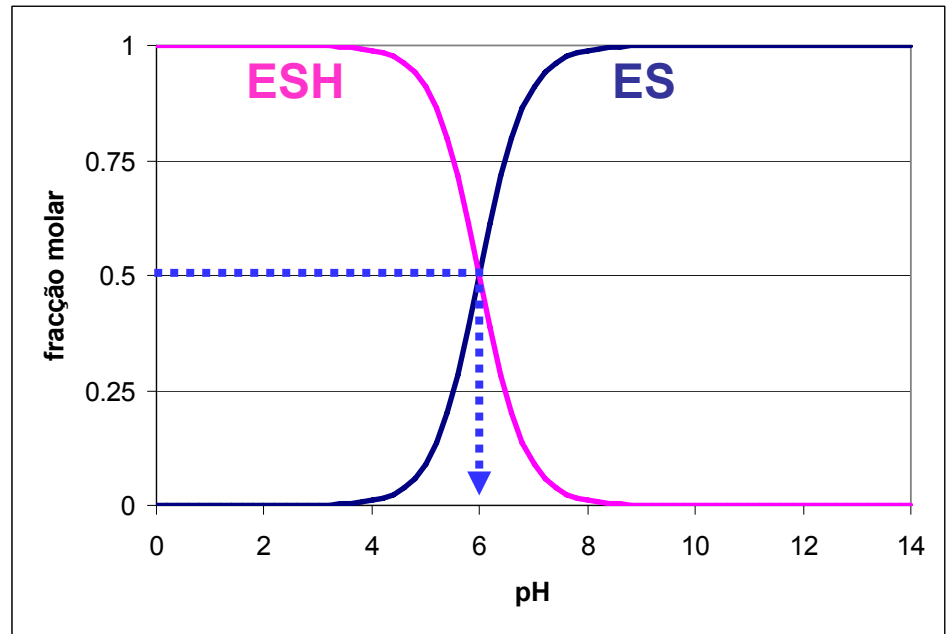
$$\chi_{ES} = \frac{[ES]}{E_T} = \frac{[ES]}{[ES] \left(1 + \frac{[H^+]}{K_{a1}} \right)} = \frac{1}{\left(1 + \frac{[H^+]}{K_{a1}} \right)}$$

$$\chi_{ES} = \frac{[ESH]}{E_T} = \frac{[ES] \frac{[H^+]}{K_{a1}}}{[ES] \left(1 + \frac{[H^+]}{K_{a1}} \right)} = \frac{\frac{[H^+]}{K_{a1}}}{\left(1 + \frac{[H^+]}{K_{a1}} \right)}$$



$$K_{a1} = \frac{[ES][H^+]}{[ESH]}$$

A constante de acidez
é uma constante de
dissociação

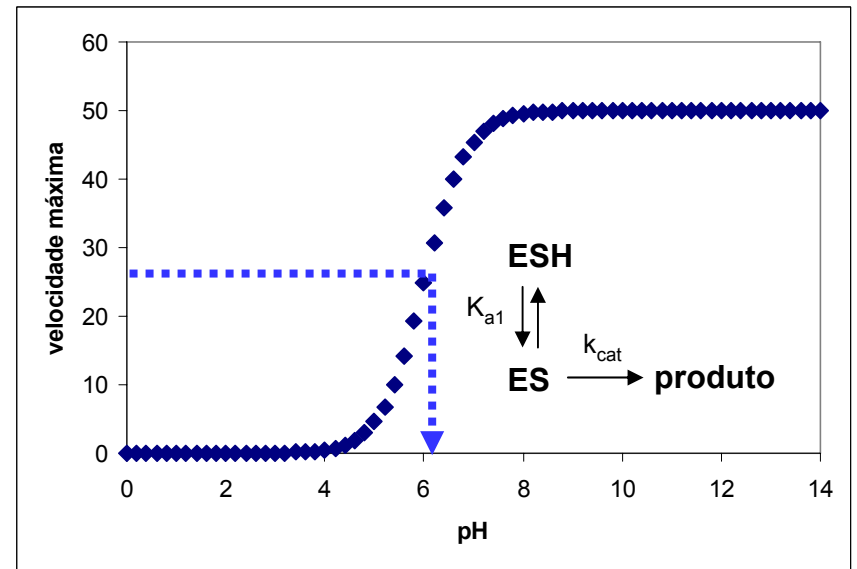
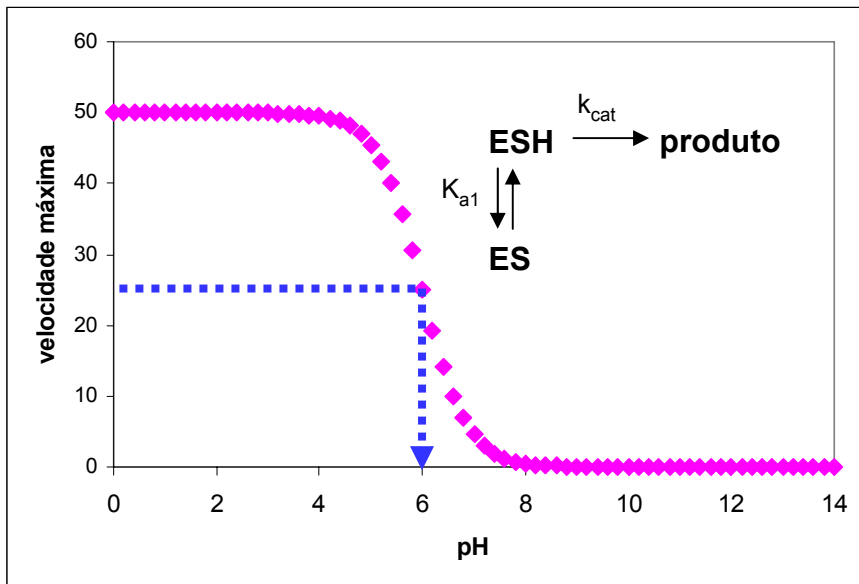


Quando $[ESH]=[ES]$ o valor $pH=pK_{a1}$

Determinação do valor de pK_{a1} a partir das curvas de V_M' em função do pH

Modelos com 1 grau de protonação

em situação de substrato saturante $[S] \gg K_S$



Quando $[ESH] = [ES]$ o valor de V_M' é igual a metade do seu valor máximo, porque apenas uma destas espécies dá origem a produto. Nesse ponto $pH = pK_{a1}$

As curvas de actividade com o pH reflectem as populações das espécies que dão origem a produto

Modelos com 2 graus de protonação

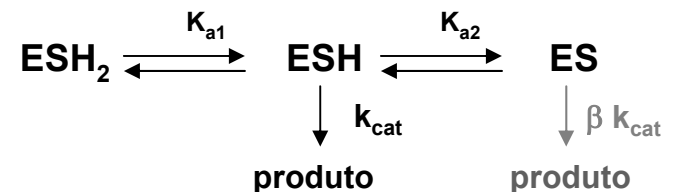
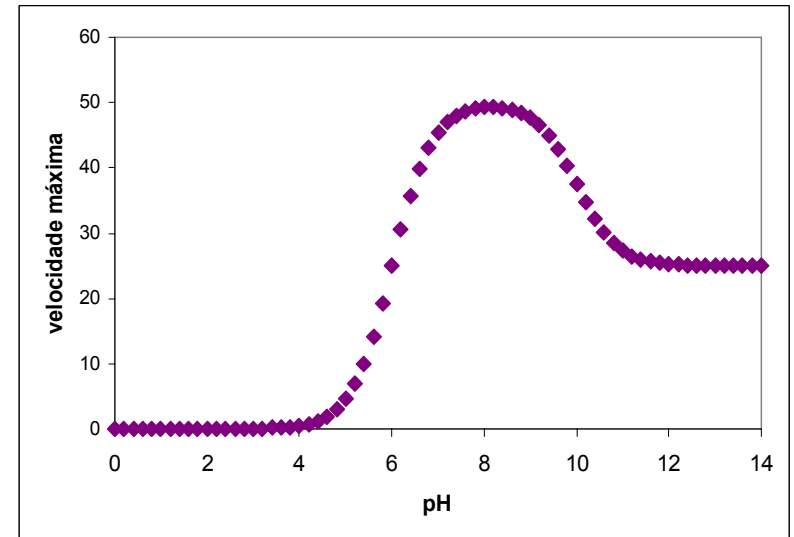
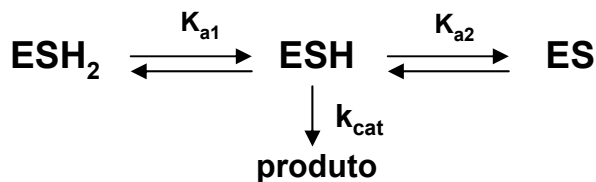
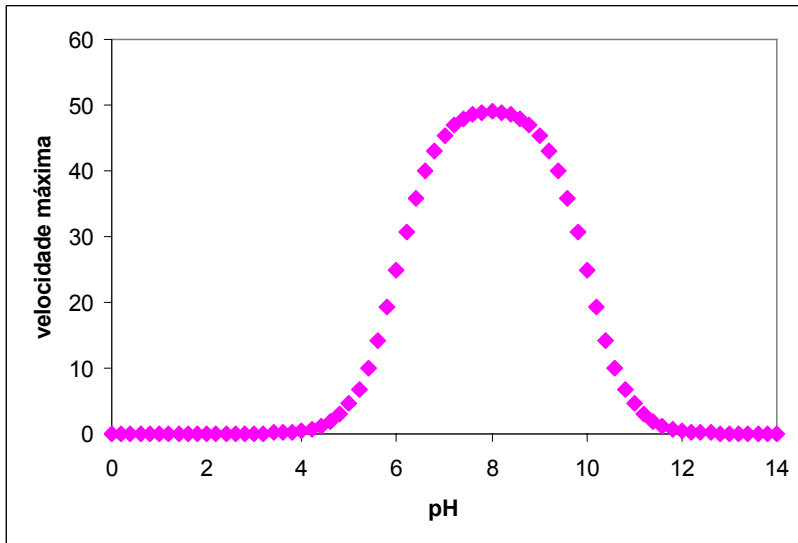
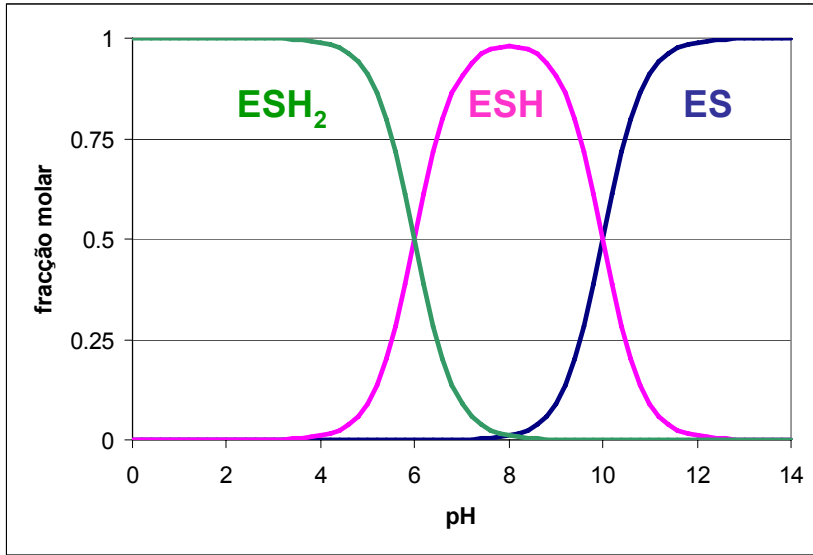
em situação de substrato saturante $[S] \gg K_S$

Parâmetros do modelo:

K_{a1} ; K_{a2} (constantes de equilíbrio), nesta simulação
 $pK_{a1}=6$ e $pK_{a2}=10$

k_{cat} (constante de velocidade)

β (coeficiente adimensional)



Cálculo das populações

Modelo com 2 graus de protonação

Condições de substrato saturante

$$E_T = [ES] + [ESH] + [ESH_2]$$

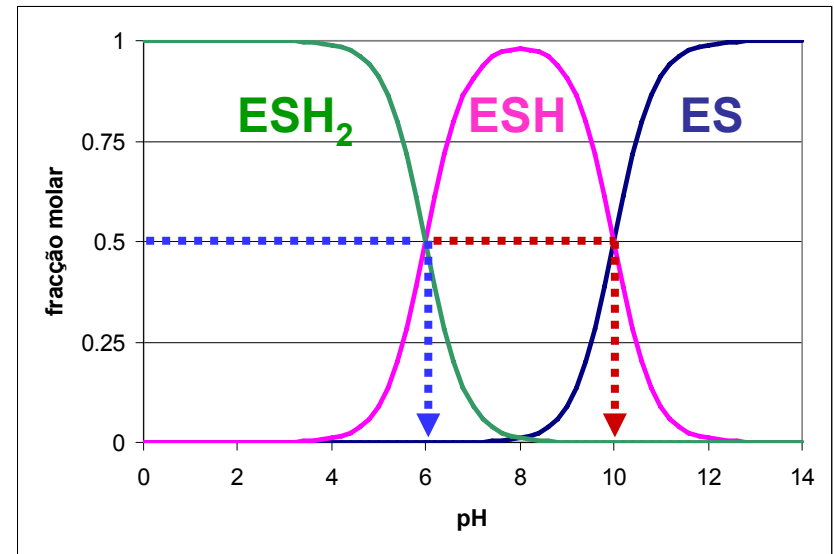
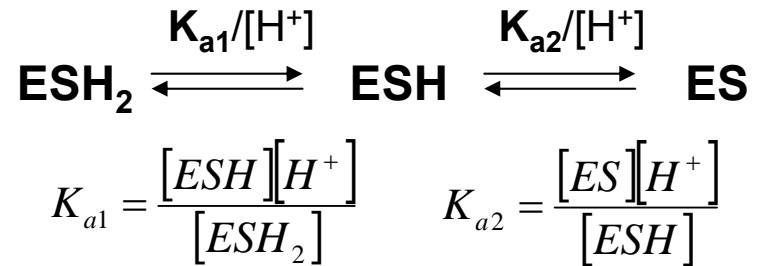
$$E_T = [ES] + [ES] \frac{[H^+]}{K_{a2}} + [ES] \frac{[H^+]}{K_{a2}} \frac{[H^+]}{K_{a1}}$$

$$E_T = [ES] \left(1 + \frac{[H^+]}{K_{a2}} + \frac{[H^+]^2}{K_{a1}K_{a2}} \right)$$

$$\chi_{ES} = \frac{[ES]}{E_T} = \frac{[ES]}{[ES] \left(1 + \frac{[H^+]}{K_{a2}} + \frac{[H^+]^2}{K_{a1}K_{a2}} \right)} = \frac{1}{\left(1 + \frac{[H^+]}{K_{a2}} + \frac{[H^+]^2}{K_{a1}K_{a2}} \right)}$$

$$\chi_{ESH} = \frac{[ESH]}{E_T} = \frac{[ES] \frac{[H^+]}{K_{a2}}}{[ES] \left(1 + \frac{[H^+]}{K_{a2}} + \frac{[H^+]^2}{K_{a1}K_{a2}} \right)} = \frac{\frac{[H^+]}{K_{a2}}}{\left(1 + \frac{[H^+]}{K_{a2}} + \frac{[H^+]^2}{K_{a1}K_{a2}} \right)}$$

$$\chi_{ESH_2} = \frac{[ESH_2]}{E_T} = \frac{[ESH_2]}{[ES] \left(1 + \frac{[H^+]}{K_{a2}} + \frac{[H^+]^2}{K_{a1}K_{a2}} \right)} = \frac{\frac{[H^+]^2}{K_{a1}K_{a2}}}{\left(1 + \frac{[H^+]}{K_{a2}} + \frac{[H^+]^2}{K_{a1}K_{a2}} \right)}$$



Quando

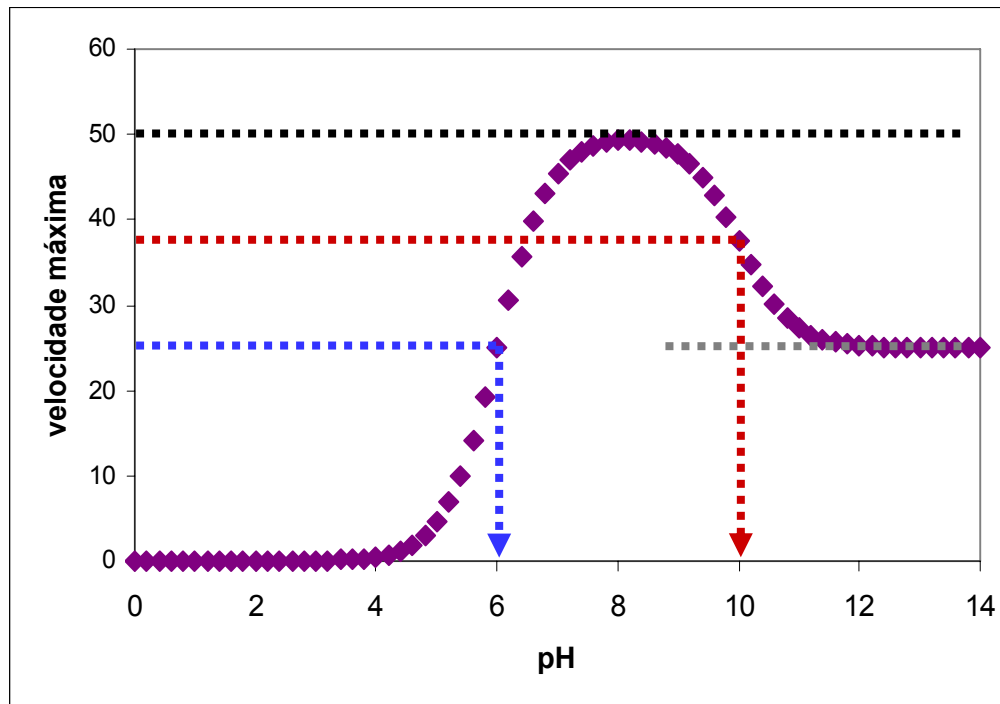
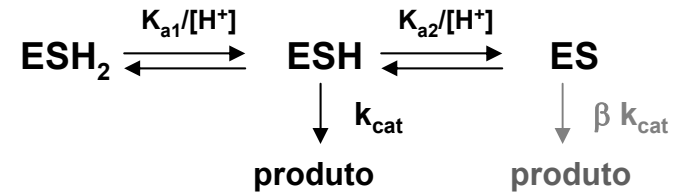
[ESH₂] = [ESH] o valor pH = pK_{a1}

[ESH] = [ES] o valor pH = pK_{a2}

Determinação dos valores de pK_a e de β a partir das curvas de V_M' em função do pH

Modelos com 2 graus de protonação

em situação de substrato saturante $[S] \gg K_s$



Para $\text{pH} \gg \text{p}K_{a2}$
 $[\text{ES}] = 1$ e por isso
 $V_M' = \beta V_M$
 Neste exemplo
 $\beta = 0.5$

Quando $[\text{ESH}_2] = [\text{ESH}]$ o valor de V_M' é igual a metade do seu valor máximo, porque apenas a espécie ESH dá origem a produto. Nesse ponto $\text{pH} = \text{p}K_{a1}$

Quando $[\text{ESH}] = [\text{ES}]$ o valor de V_M' é igual $0.5 V_M + 0.5 \beta V_M$, porque a espécie ESH dá origem a produto com k_{cat} e ES dá produto com βk_{cat} . Nesse ponto $\text{pH} = \text{p}K_{a2}$

Cinética enzimática a dois substratos

Nos sistemas biológicos a maior parte das reacções envolve 2 substratos e 2 produtos:



Os mecanismos que envolvem 2 substratos dividem-se em dois grupos:

- 1. mecanismo sequencial**, quando a adição de todos os substratos se dá antes da libertação de qualquer produto
 - i) ordenado**, dá-se a interacção do substrato com a enzima seguida da libertação de produto de uma forma ordenada;
 - ii) ao acaso (*random*)**, a interacção dos substratos com a enzima e libertação de produto não tem qualquer ordem estabelecida
- 2. mecanismo não-sequencial ou Ping Pong**, quando há libertação de produtos antes da interacção de todos os substratos com a enzima.



estes mecanismos podem ainda ser subclassificados de acordo com a molecularidade dos passos cataliticamente importantes:

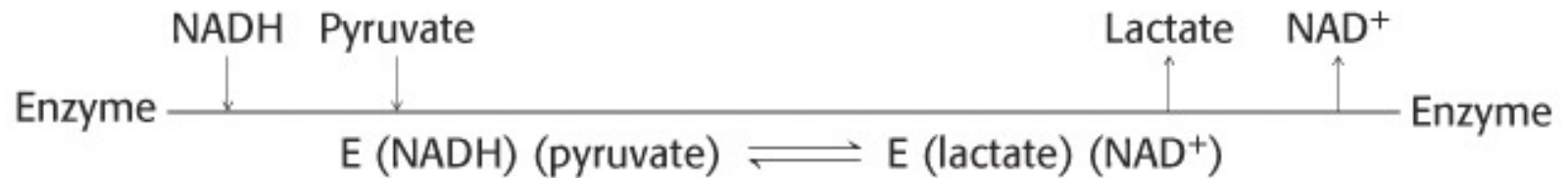
uni (unimolecular), bi (bimolecular), ter (termolecular), e quat (tetramolecular) \Leftrightarrow adição/libertação de substrato ou produto

Cinética enzimática a dois substratos

Notação de Cleland

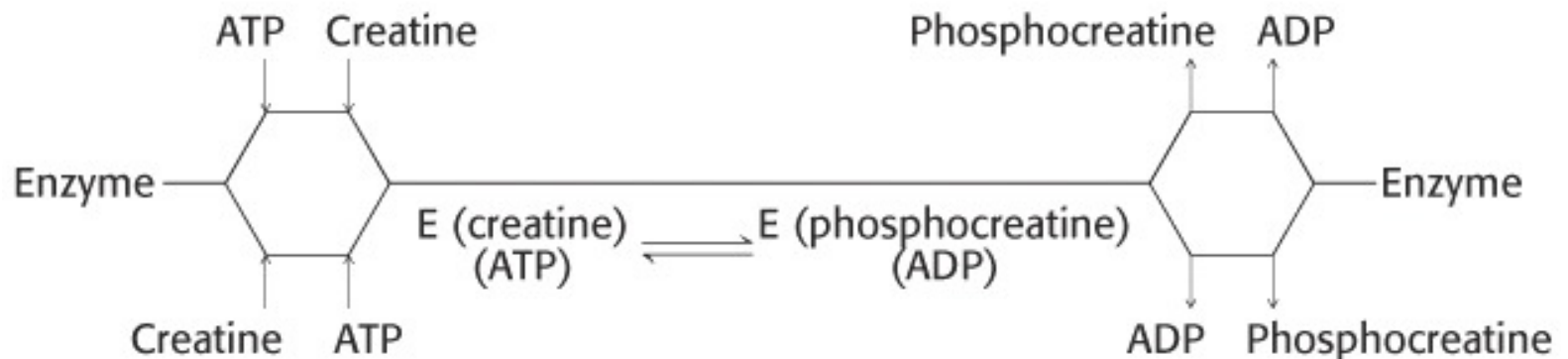
Mecanismo Sequencial ordenado:

A ordem pela qual os 2 substratos se ligam é fixa. Forma-se um complexo ternário entre a enzima e os dois substratos que é convertido na enzima e nos dois produtos. A ordem pela qual os produtos são libertados também é fixa. Ex. *lactato desidrogenase*



Mecanismo Sequencial ao acaso:

A ordem pela qual os 2 substratos se ligam é aleatória. Forma-se um complexo ternário entre a enzima e os dois substratos que é convertido na enzima e nos dois produtos. A ordem pela qual os produtos se libertam é também aleatória. Ex. *cinase da creatina*



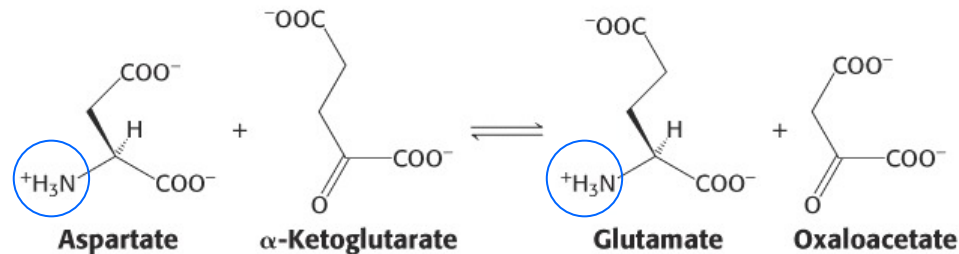
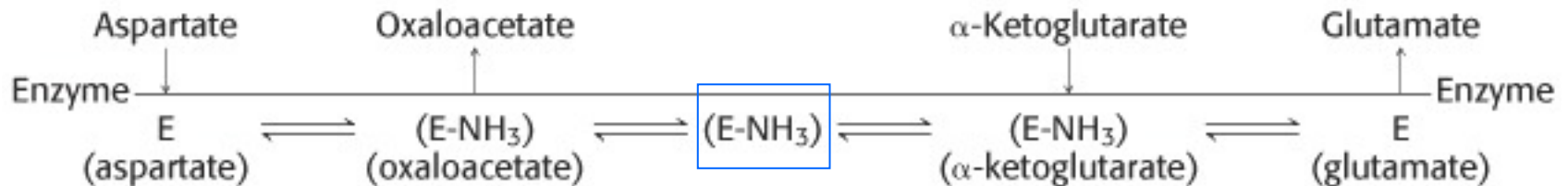
Cinética enzimática a dois substratos

Notação de Cleland

Mecanismo Não-Sequencial (Ping Pong):

Neste tipo de mecanismo dá-se a libertação de um ou mais produtos antes da ligação de todos os substratos à enzima. A **enzima aparece temporariamente numa forma modificada**, entre a ligação do primeiro substrato e a libertação do primeiro produto e a ligação do segundo substrato.

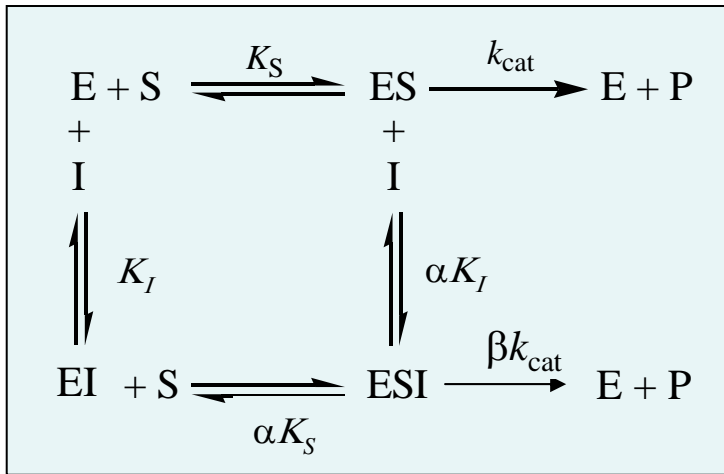
Ex. *aminotransferase*



ANEXOS

i) inibição

Inibição: Modelo de Webb



Hipóteses restritivas:

- Velocidades iniciais
- Rápido equilíbrio (definem-se constantes de dissociação para S e I)

Equações de partida:

$$v = k_{\text{cat}}[\text{ES}] + \beta k_{\text{cat}}[\text{ESI}]$$

$$K_S = \frac{[\text{E}][\text{S}]}{[\text{ES}]} \quad K_I = \frac{[\text{E}][\text{I}]}{[\text{EI}]}$$

$$\alpha K_S = \frac{[\text{EI}][\text{S}]}{[\text{ESI}]} \quad \alpha K_I = \frac{[\text{ES}][\text{I}]}{[\text{ESI}]}$$

$$E_T = [\text{E}] + [\text{EI}] + [\text{ES}] + [\text{ESI}]$$

$$E_T = [\text{E}] \left(1 + \frac{[\text{I}]}{K_I} + \frac{[\text{S}]}{K_S} + \frac{[\text{I}][\text{S}]}{K_I \alpha K_S} \right) \quad [\text{E}] = \frac{E_T}{\left(1 + \frac{[\text{I}]}{K_I} + \frac{[\text{S}]}{K_S} + \frac{[\text{I}][\text{S}]}{K_I \alpha K_S} \right)}$$

$$v = k_{\text{cat}} \frac{[\text{S}]}{K_S} [\text{E}] \left(1 + \beta \frac{[\text{I}]}{\alpha K_I} \right) = \frac{k_{\text{cat}} E_T \frac{[\text{S}]}{K_S} \left(1 + \beta \frac{[\text{I}]}{\alpha K_I} \right)}{1 + \frac{[\text{I}]}{K_I} + \frac{[\text{S}]}{K_S} + \frac{[\text{I}][\text{S}]}{\alpha K_I K_S}}$$

$$v = \frac{k_{\text{cat}} E_T \left(1 + \beta \frac{[\text{I}]}{\alpha K_I} \right) [\text{S}]}{K_S \left(1 + \frac{[\text{I}]}{K_I} \right) + [\text{S}] \left(1 + \frac{[\text{I}]}{\alpha K_I} \right)} = \frac{k_{\text{cat}} E_T \left(1 + \beta \frac{[\text{I}]}{\alpha K_I} \right)}{\left(1 + \frac{[\text{I}]}{\alpha K_I} \right)} [\text{S}]$$

Rearranjando na forma de hipérbole

$$v = \frac{V'_M [\text{S}]}{K'_M + [\text{S}]}$$

$$v = \frac{\left(\frac{1 + \frac{[\text{I}]}{K_I}}{\left(1 + \frac{[\text{I}]}{\alpha K_I} \right)} \right)}{K_S \left(\frac{1 + \frac{[\text{I}]}{K_I}}{\left(1 + \frac{[\text{I}]}{\alpha K_I} \right)} \right) + [\text{S}]} [\text{S}]$$

$$V'_M = V_M \frac{\left(1 + \beta \frac{[\text{I}]}{\alpha K_I} \right)}{\left(1 + \frac{[\text{I}]}{\alpha K_I} \right)} \quad K'_M = K_S \frac{\left(1 + \frac{[\text{I}]}{K_I} \right)}{\left(1 + \frac{[\text{I}]}{\alpha K_I} \right)}$$

Parâmetros V_M' e K_M' da equação de Michealis- Menten

$$V_o = \frac{V'_M [S]_o}{K'_M + [S]_o}$$

Tipos de inibição dependente de β

1. $\beta = 0$ – inibição linear

$$\frac{V_M}{V'_M} = 1 + \frac{[I]_o}{\alpha K_I}$$

2. $0 < \beta < 1$ – inibição hiperbólica

$$\frac{V_M}{V'_M} = \frac{1 + \frac{[I]_o}{\alpha K_I}}{1 + \beta \frac{[I]_o}{\alpha K_I}}$$

3. $\beta = 1$ - **I não é inibidor**

$$V'_M = V_M$$

4. $\beta > 1$ - **I é activador** (ou segundo Substrato)

$$V'_M = V_M \frac{1 + \beta \frac{[I]_o}{\alpha K_I}}{1 + \frac{[I]_o}{\alpha K_I}}$$

$$K'_M = K_S \frac{1 + \frac{[I]_o}{K_I}}{1 + \frac{[I]_o}{\alpha K_I}}$$

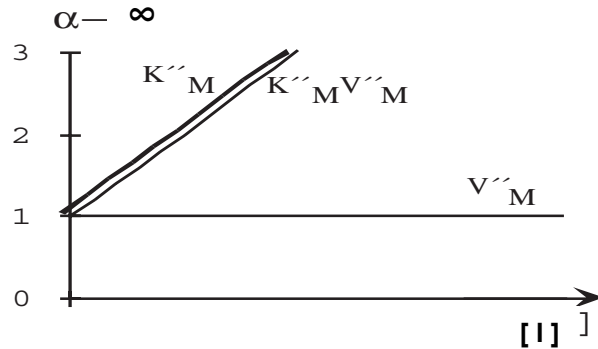
ANEXO IV - Algumas representações gráficas para os vários tipos de inibição derivadas a partir do modelo geral de Webb. $k_3' = k_3 \frac{K_I}{1 + \frac{[I]}{K_I}}$

Tipo de inibição	Representação Lineweaver-Burk ($1/v = f(1/[S])$)	Representação de Eadie-Hofstee ($v = f(v/[S])$)	Representação de Hanes-Woolf ($[S]/v = f([I])$)	$v/v_i = f([I])$	$1/v = f([I])$
Competitiva pura ($\alpha = \infty, \beta = 1$)					
Não competitiva pura ($\alpha = 1, \beta = 0$)					
Incompetitiva pura ($\alpha < 1, \beta = 0, K_I \gg$)					
Competitiva parcial ($1 < \alpha < \infty, \beta = 1$)					
Não competitiva parcial ($\alpha = 1, 0 < \beta < 1$)					

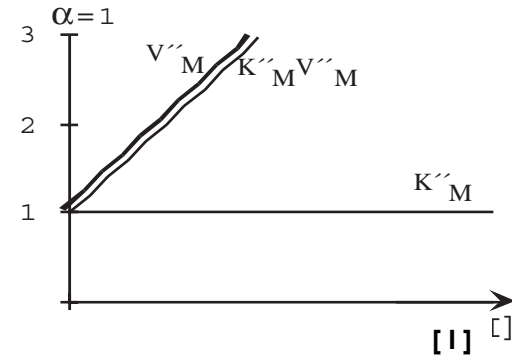
<p>Incompetitiva parcial hiperbólica ($0 < \alpha < 1, 0 < \beta < 1, \alpha = \beta$)</p>					
<p>Não competitiva pura/competitiva parcial ($1 < \alpha < \infty, \beta = 0$)</p>					
<p>Mista não competitiva/incompetitiva ($\alpha < 1, \beta = 0$)</p>					
<p>Mista hiperbólica ($0 < \alpha < 1, 0 < \beta < 1, \alpha < \beta$)</p>					
<p>Mista hiperbólica ($0 < \alpha < 1, 0 < \beta < 1, \alpha > \beta$)</p>					
<p>Mista hiperbólica (parcial) ($1 < \alpha < \infty, 0 < \beta < 1$)</p>					

Inibições lineares $\beta=0$; variação de V_M/V'_M , K'_M/K_M com $[I]$

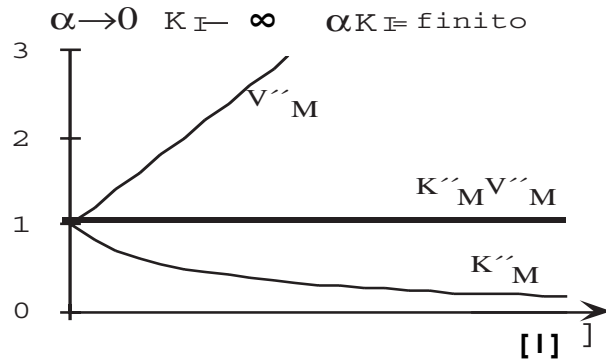
B Competitiva Pura



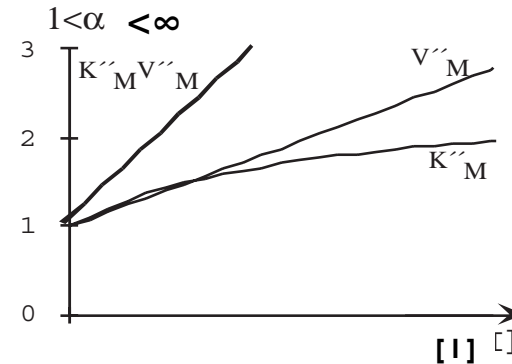
C Não Competitiva Pura



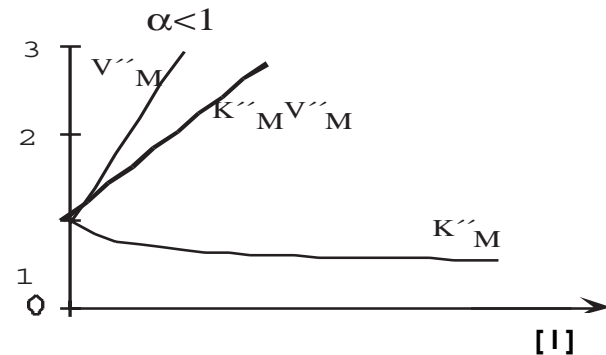
D Incompetitiva Pura



E Não Competitiva /Competitiva Parci



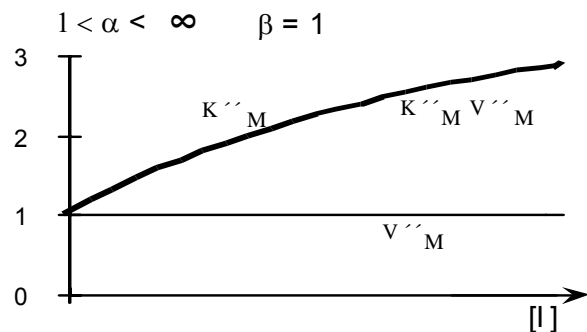
F Não Competitiva /Incompetitiv



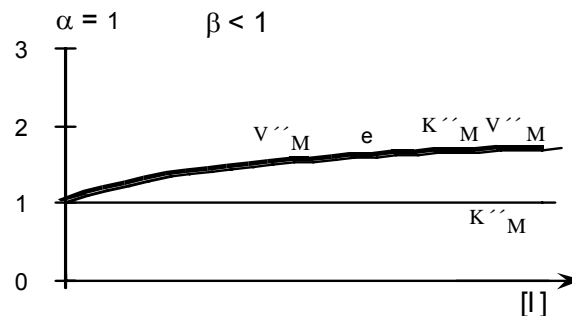
É possível distinguir os 11 tipos de inibição estudando a variação de V_M/V'_M , K'_M/K_M e $V_M K'_M / V'_M K_M$ em função da concentração de inibidor.

Inibições hiperbólicas $\beta \neq 0$; variação de V_M/V'_M , K'_M/K_M com $[I]$

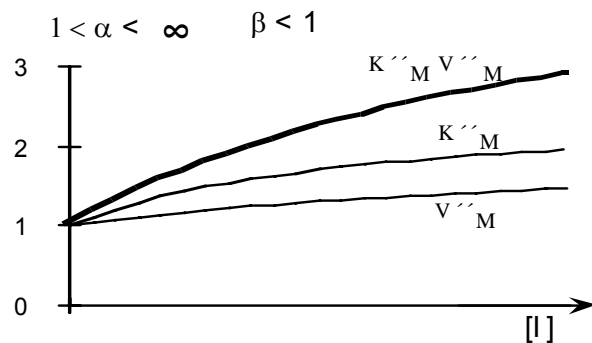
B Competitiva Parcial



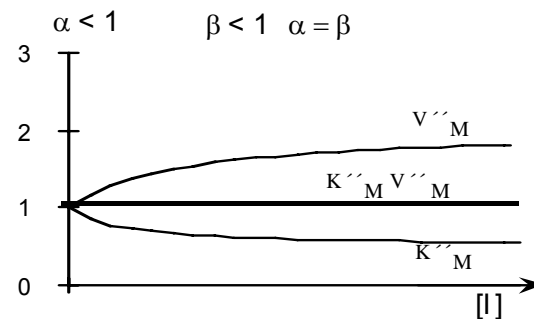
C Não Competitiva Parcial



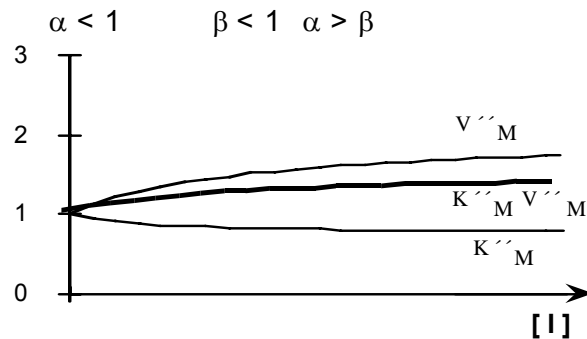
D Mista



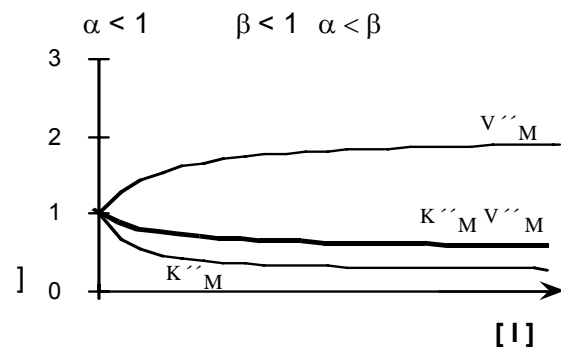
E Incompetitiva Parcial



F Mista



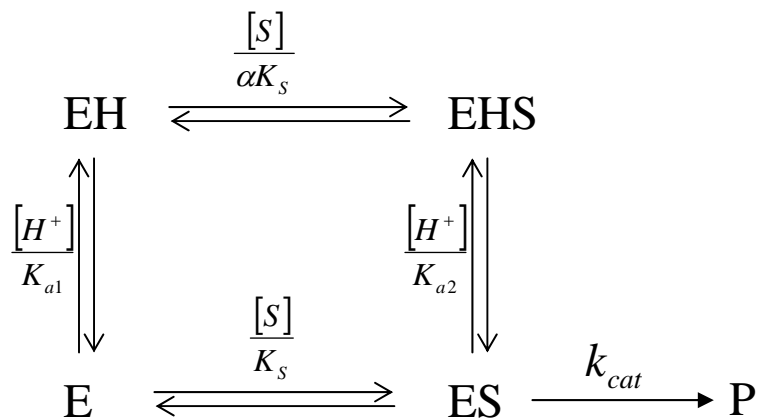
G Mista



ANEXOS

ii) pH

Modelo completo – 1 grau de protonação na enzima



Hipóteses restritivas:

- Velocidades iniciais
- Rápido equilíbrio (definem-se constantes de dissociação para S e H⁺)

Equações de partida:

$$v = k_{cat} [ES]$$

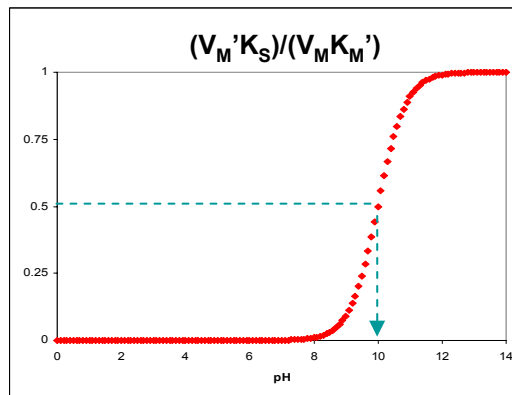
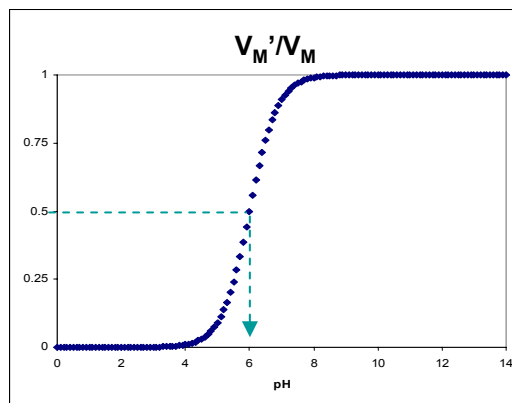
$$K_s = \frac{[E][S]}{[ES]}$$

$$K_{a1} = \frac{[E][H^+]}{[EH]} \quad K_{a2} = \frac{[ES][H^+]}{[EHS]}$$

$$E_T = [E] + [EH] + [ES] + [EHS]$$

Tanto a enzima livre como a enzima ligada ao substrato podem estar protonadas ou desprotonadas. A velocidade depende de dois valores de pK_a: pK_{a1} (enzima livre); pK_{a2} (enzima ligada ao substrato).

$$v = \frac{k_{cat} E_T \frac{[S]}{K_s}}{\left(1 + \frac{[H^+]}{K_{a1}}\right) + \frac{[S]}{K_s} \left(1 + \frac{[H^+]}{K_{a2}}\right)} \xrightarrow{\text{Rearranjando na forma de hipérbole}} v = \frac{V'_M [S]}{K'_M + [S]}$$



$$V'_M = V_M \frac{1}{\left(1 + \frac{[H^+]}{K_{a2}}\right)}$$

$$K'_M = K_s \frac{\left(1 + \frac{[H^+]}{K_{a1}}\right)}{\left(1 + \frac{[H^+]}{K_{a2}}\right)}$$

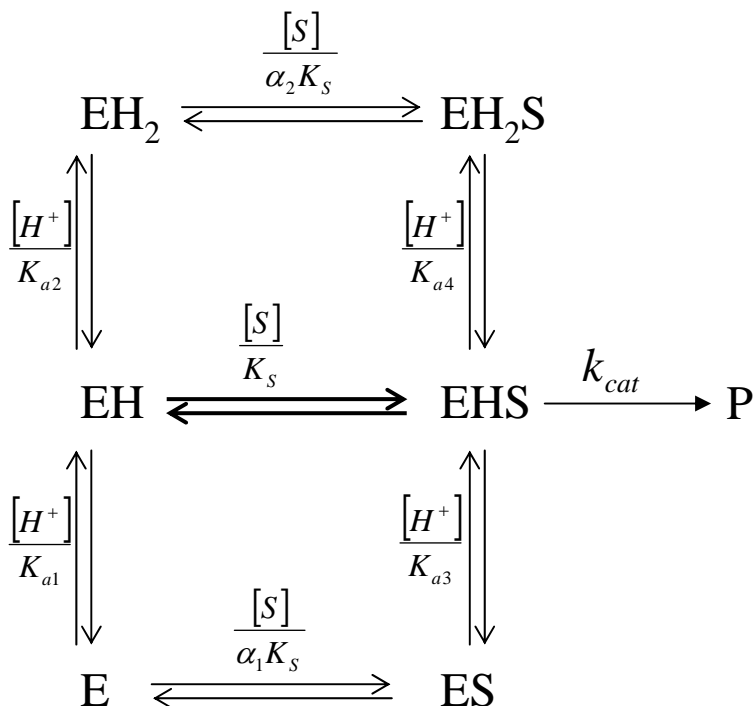
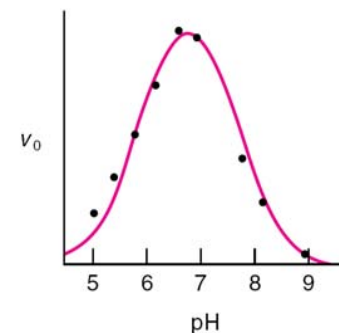
$$\frac{V'_M}{K'_M} = \frac{V_M}{K_s} \frac{1}{\left(1 + \frac{[H^+]}{K_{a1}}\right)}$$

Modelo completo – 2 graus de protonação na enzima

Tanto a enzima livre como a enzima ligada ao substrato podem estar protonadas ou desprotonadas.

A velocidade depende de quatro valores de pK_a :

pK_{a1} e pK_{a2} (enzima livre); pK_{a3} e pK_{a4} (enzima ligada ao substrato).



Equações de partida:

$$v = k_{cat} [EHS]$$

$$K_s = \frac{[EH][S]}{[EHS]} \quad \alpha_1 K_s = \frac{[E][S]}{[ES]} \quad \alpha_2 K_s = \frac{[EH_2][S]}{[EH_2S]}$$

$$K_{a1} = \frac{[E][H^+]}{[EH]} \quad K_{a3} = \frac{[ES][H^+]}{[EHS]}$$

$$K_{a2} = \frac{[EH][H^+]}{[EH_2]} \quad K_{a4} = \frac{[EHS][H^+]}{[EH_2S]}$$

$$E_T = [E] + [EH] + [EH_2] + [ES] + [EHS] + [EH_2S]$$

Hipóteses restritivas:

- Velocidades iniciais
- Rápido equilíbrio (definem-se constantes de dissociação para S e H^+)

microreversibilidade: $\alpha_1 = \frac{K_{a1}}{K_{a3}} \quad \alpha_2 = \frac{K_{a4}}{K_{a2}}$

Determinação experimental dos valores de pKa do centro activo

$$v = \frac{k_{cat} E_T \frac{[S]}{K_S}}{\left(\frac{K_{a1}}{[H^+]} + 1 + \frac{[H^+]}{K_{a2}} \right) + \frac{[S]}{K_S} \left(\frac{K_{a3}}{[H^+]} + 1 + \frac{[H^+]}{K_{a4}} \right)}$$

Rearranjando na forma de hipérbole

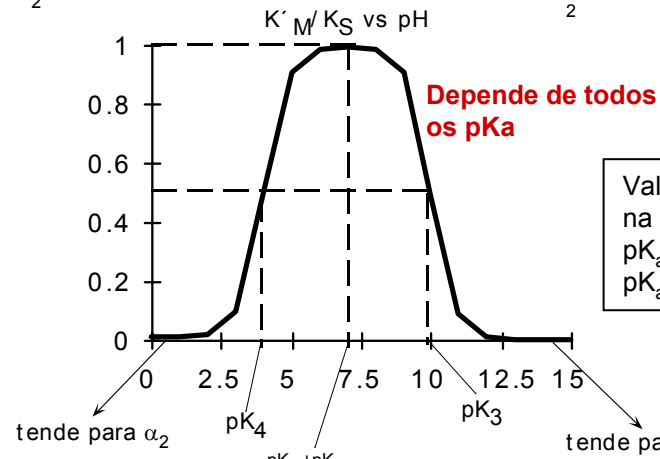
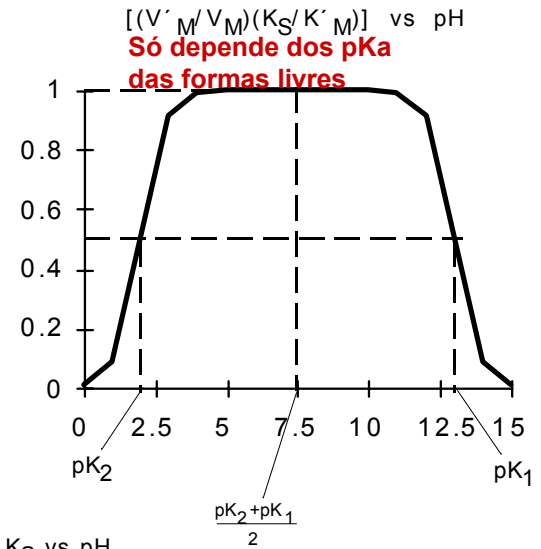
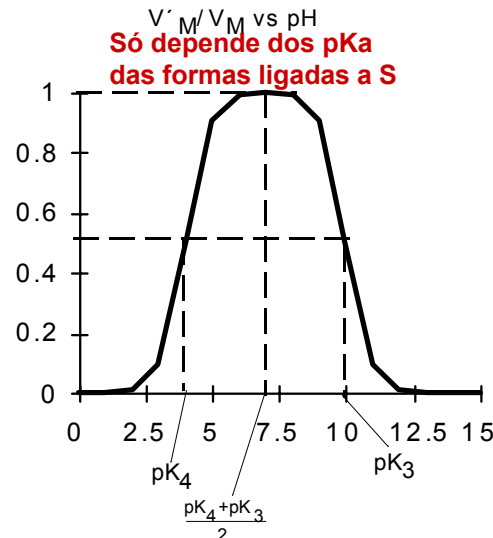
$$v = \frac{V_M' [S]}{K_M' + [S]}$$

$$V_M' = V_M \frac{1}{\left(1 + \frac{K_{a3}}{[H^+]} + \frac{[H^+]}{K_{a4}} \right)}$$

$$K_M' = K_S \frac{\left(1 + \frac{K_{a1}}{[H^+]} + \frac{[H^+]}{K_{a2}} \right)}{\left(1 + \frac{K_{a3}}{[H^+]} + \frac{[H^+]}{K_{a4}} \right)}$$

$$\frac{V_M'}{K_M'} = \frac{V_M}{K_S} \frac{1}{\left(1 + \frac{K_{a1}}{[H^+]} + \frac{[H^+]}{K_{a2}} \right)}$$

Os valores de pKa podem ser determinados a partir de gráficos V_M'/V_M ; K_M'/K_S e $V_M'K_S/V_MK_M'$ em função do pH

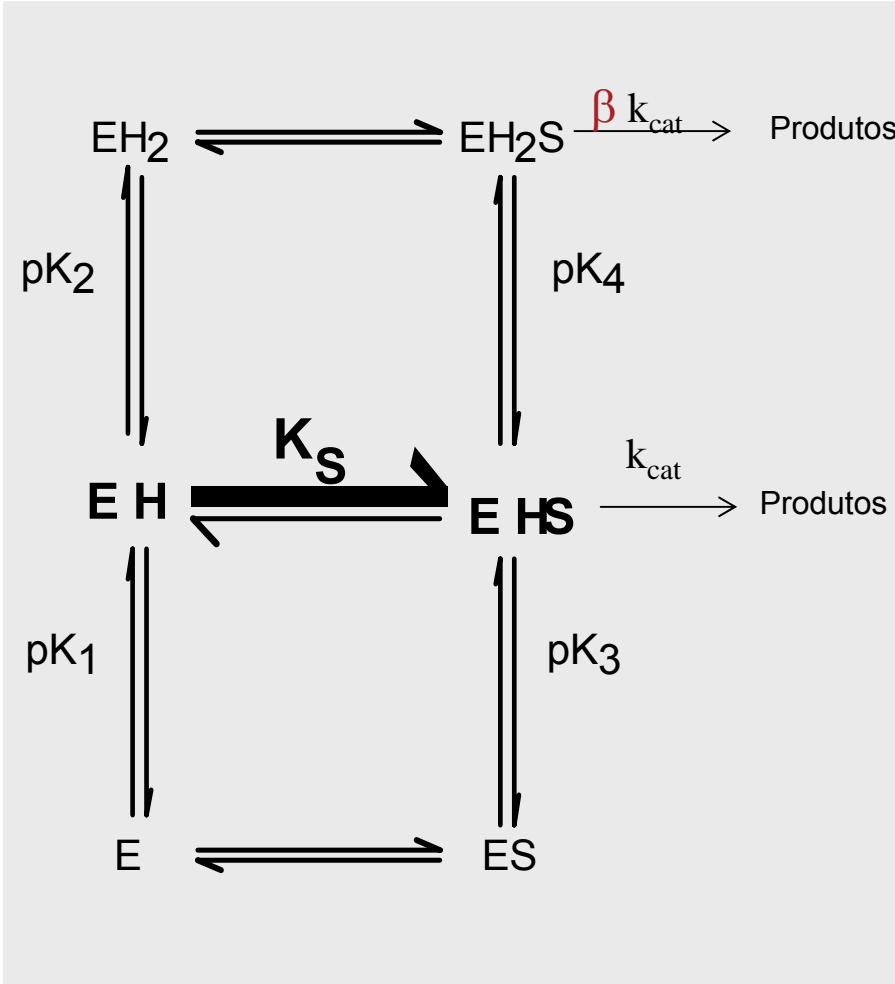


Valores pK_a utilizados na simulação:
 $pK_{a1}=13$, $pK_{a2}=2$,
 $pK_{a3}=10$, $pK_{a4}=4$

$$\alpha_2 = \frac{K_{a4}}{K_{a2}} = 0.01$$

$$\alpha_1 = \frac{K_{a1}}{K_{a3}} = 0.001$$

Modelo completo com 2 graus de protonação e 2 complexos a dar produto



V_M' depende dos pKas das formas ligadas S

$$\frac{V_M'}{V_M} = \left(\frac{1 + \beta \frac{[H^+]}{K_4}}{1 + \frac{K_3}{[H^+]} + \frac{[H^+]}{K_4}} \right)$$

K_M' depende de todos os pKas

$$\frac{K_M'}{K_S} = \left(\frac{1 + \frac{K_1}{[H^+]} + \frac{[H^+]}{K_2}}{1 + \frac{K_3}{[H^+]} + \frac{[H^+]}{K_4}} \right)$$

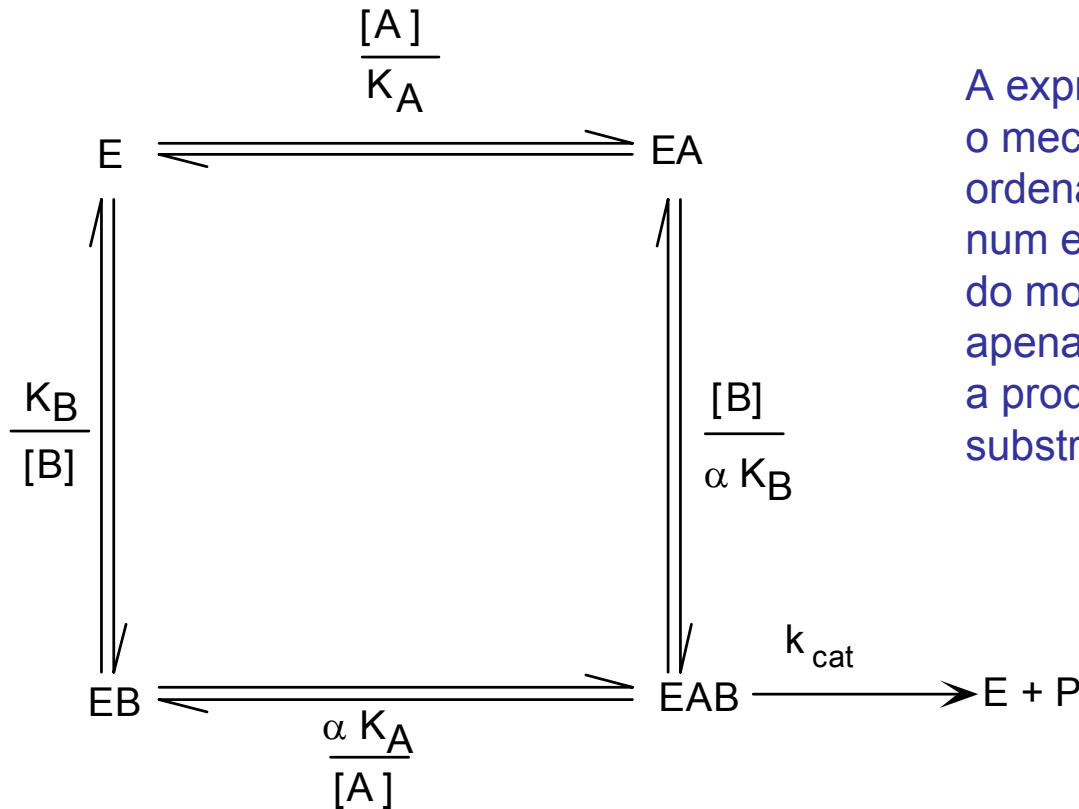
V_M' / K_M' depende dos pKas das formas livres e ligadas

$$\frac{V_M'}{K_M'} = \left(\frac{1 + \beta \frac{[H^+]}{K_4}}{1 + \frac{K_1}{[H^+]} + \frac{[H^+]}{K_2}} \right)$$

ANEXOS

iii) Dois substratos

Mecanismo sequencial



A expressão da velocidade inicial para o mecanismo sequencial (ao acaso ou ordenado) pode deduzir-se com base num esquema cinético semelhante ao do modelo geral de Webb, em que apenas o complexo ternário dá origem a produto. Considera-se a adição dos substratos A e B em rápido equilíbrio.

•Ao acaso

$$\alpha = 1$$

•Ordenado

$$K_B \gg$$

$$\alpha \ll$$

$$\alpha K_B \text{ finito}$$

A determinação experimental dos parâmetros do modelo envolve a realização de ensaios em que se varia a concentração de um dos substratos mantendo a outra constante e vice-versa.

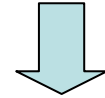
As constantes de dissociação K_A e K_B , α e k_{cat} determinam-se rearranjando a equação ($v=f([A])$ para $[B]=cte.$ e $v=f([B])$ para $[A]=cte.$) e fazendo as representações gráficas adequadas.

$$v_o = \frac{V_M \frac{[A]_o}{K_A} \frac{[B]_o}{\alpha K_B}}{1 + \frac{[A]_o}{K_A} + \frac{[B]_o}{K_B} + \frac{[A]_o[B]_o}{\alpha K_A K_B}}$$

[B] constante



[A] constante



$$v_0 = \frac{V_M^A [A]_o}{K_M^A + [A]_o}$$

$$v_0 = \frac{V_M^B [B]_o}{K_M^B + [B]_o}$$

$$V_M^A = V_M \frac{\frac{[B]_o}{\alpha K_B}}{\left(1 + \frac{[B]_o}{\alpha K_B}\right)}$$

$$V_M^B = V_M \frac{\frac{[A]_o}{\alpha K_A}}{\left(1 + \frac{[A]_o}{\alpha K_A}\right)}$$

$$K_M^A = K_A \frac{\left(1 + \frac{[B]_o}{K_B}\right)}{\left(1 + \frac{[B]_o}{\alpha K_B}\right)}$$

$$K_M^B = K_B \frac{\left(1 + \frac{[A]_o}{K_A}\right)}{\left(1 + \frac{[A]_o}{\alpha K_A}\right)}$$