

## Problemas de Enzimologia

### Série 4

1. Adicionou-se uma quantidade constante de enzima a uma série de meios de 10 mL com diferentes concentrações de substrato. As velocidades iniciais, representadas na tabela abaixo, são determinadas medindo o número de moles, ou micromoles, de substrato consumido (ou produto produzido) por minuto. Responda às seguintes perguntas sem recorrer a métodos de representação gráfica:

- Qual o valor de  $V_{\max}$  para esta concentração de enzima ?
- Qual o valor de  $K_m$  para este enzima ?
- Mostre se a reacção segue ou não uma cinética Michaeliana.
- Qual a concentração de enzima livre para  $[A]=5.0 \times 10^{-3}$  ?
- Quais as velocidades iniciais para valores de  $[A]$  iguais a  $1.0 \times 10^{-6}$  e  $1.0 \times 10^{-1}$  M ?
- Calcule a quantidade total de produto produzida durante os primeiros 5 min de reacção para  $[A]=2.0 \times 10^{-3}$  M. Poderia fazer-se o mesmo cálculo para  $[A]=2.0 \times 10^{-6}$  M ?
- Suponha que a concentração de enzima em cada mistura era aumentada 4 vezes, qual seria o valor de  $K_m$  ? E o de  $V_{\max}$  ? Qual seria o valor de  $v$  para  $[A] = 2.0 \times 10^{-6}$  M ?

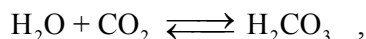
$[A]$ (M)	$v$ ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ )
$5.0 \times 10^{-2}$	0.25
$5.0 \times 10^{-3}$	0.25
$5.0 \times 10^{-4}$	0.25
$5.0 \times 10^{-5}$	0.20
$5.0 \times 10^{-6}$	0.071
$5.0 \times 10^{-7}$	0.0096

2. O  $K_m$  de um certo enzima é  $1.0 \times 10^{-5}$  M, sendo o comportamento do sistema Michaeliano. Para uma concentração de substrato de 0.10 M, a velocidade inicial de reacção é de  $37 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$  para uma determinada concentração de enzima. No entanto, a mesma velocidade de reacção de  $37 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$  é observada quando a concentração de substrato é de 0.010 M.

- Usando a equação de Michaelis-Menten, mostre porque é que a velocidade de reacção não é afectada por uma redução de uma ordem de grandeza na concentração de substrato.
- Calcule  $v$  como fracção de  $V_{\max}$  para concentrações de substrato de  $0.20 K_m$ ,  $0.50 K_m$ ,  $1.0 K_m$ ,  $2.0 K_m$ ,  $4.0 K_m$ ,  $10.0 K_m$
- A partir dos resultados da alínea anterior, esboce um gráfico de  $v/V_{\max}$  em função de  $[A]/K_m$ . Qual será o melhor intervalo de valores de  $[A]$  para estudar a dependência de  $v$  com  $[A]$  ou determinar o valor de  $K_m$

3. Pretende-se desenhar um ensaio enzimático de forma a ser pouco sensível a pequenas variações na concentração de substrato. Qual deverá ser o valor de  $[A]/K_m$  para que uma variação de 10% na concentração de substrato resulte numa variação de  $v$  inferior a 1% ?

4. A anidrase carbónica do eritrócito (M.M. 30000) tem um dos mais altos “turnovers” ( $k_{cat}$ ) que se conhece. A reacção que cataliza é a hidratação reversível do  $CO_2$ :



que é um passo muito importante no transporte do  $CO_2$  dos tecidos para o pulmão. Se 10.0  $\mu g$  de anidrase carbónica pura catalisarem a hidratação de 0.30 g de  $CO_2$  em 1 minuto a 37 °C e à velocidade máxima  $V_{max}$ , qual será o  $k_{cat}$  da anidrase carbónica (em unidades de  $min^{-1}$ ) ?

5. Um enzima michaeliano apresenta os seguintes parâmetros cinéticos:  $k_1=5.0 \times 10^7 M^{-1}s^{-1}$ ,  $k_{-1}=2.0 \times 10^4 s^{-1}$ ,  $k_2=4.0 \times 10^2 s^{-1}$ . Calcule o  $K_m$  (segundo o modelo de Briggs-Haldane) e o  $K_s$  para esta reacção. Pode considerar-se que há manutenção de um estado de pré-equilíbrio entre enzima, substrato e complexo enzima-substrato ?

6. Num estudo cinético da enzima fumarase de coração de porco, determinaram-se parâmetros para a reacção directa  $K_m = 1.7 \text{ mM}$  e  $V_{max} = 0.25 \text{ mM s}^{-1}$ . Para a reacção inversa determinaram-se os parâmetros  $K_m = 3.8 \text{ mM}$  e  $V_{max} = 0.11 \text{ mM s}^{-1}$ . Numa amostra de fumarase de proveniência diferente, os parâmetros determinados foram  $K_m = 1.6 \text{ mM}$  e  $V_{max} = 0.024 \text{ mM s}^{-1}$  para a reacção directa e  $K_m = 1.2 \text{ mM}$  e  $V_{max} = 0.012 \text{ mM s}^{-1}$  para a reacção inversa. Comente estes resultados.

7. Um estudo de velocidades iniciais de catálise de uma esterase para uma mistura racémica de substratos mostraram que o enantiómero L era o substrato verdadeiro, consumido totalmente para dar produto, enquanto o enantiómero D podia ser recuperado intacto no final da reacção. Com base nestes resultados, a cinética da reacção foi analisada, assumindo que o enantiómero D não tinha qualquer efeito sobre o enzima, e estimou-se um  $K_m$  de 2 mM para o enantiómero L. Estudos posteriores mostraram que o enantiómero D tem efeito sobre a reacção, actuando como inibidor competitivo, com um  $K_{ic}$  igual ao  $K_m$ . Em face desta última conclusão, qual deveria ser o valor correcto para o  $K_m$  inicialmente estimado ?

8. Para uma reacção sujeita a inibição pelo produto, a equação da curva de progressão é dada por

$$k_{cat}[E]_0 t = (1 - K_{mA}/K_{mP})([A]_0 - [A]) + K_{mA}(1 + [A]_0/K_{mP}) \ln([A]_0/[A])$$

- Verifique que a forma diferenciada desta equação corresponde à equação da inibição pelo produto.
- Escreva as expressões para  $K_m^{app}$  e  $V_{max}^{app}$  e verifique em que condições podem estes valores ser negativos.