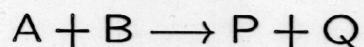


## Reacções multi-substrato

- Com excepção de algumas reacções de isomerização, não existem praticamente reacções com apenas um substrato.
- Reacções de mais de um substrato podem ser analisadas como mono-substrato quando os substratos adicionais estão em largo excesso (p.ex. hidrolases), e também porque quando se varia apenas a concentração de um substrato o comportamento é aproximadamente mono-substrato.
- As reacções bi-substrato bi-produto:



constituem cerca de 60% de todas as reacções enzimáticas conhecidas, incluindo as hidrolases, transferases e oxi-redutases.

- As reacções com três ou mais substratos também são frequentes, mas os métodos usados para o seu tratamento são essencialmente semelhantes aos usados para as reacções bi-substrato.

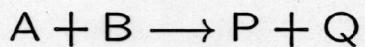
## **Classificação de mecanismos de reacção**

- **Sequencial:** Os substratos têm de ligar-se todos, antes de haver libertação de produtos.
  - **Aleatório:** A ordem de entrada dos substratos é variável.  
Exemplos: Algumas desidrogenases, kinases
  - **Ordenado:** A ordem de entrada dos substratos é fixa.  
Exemplos: NAD-desidrogenases
- **Ping-pong:** Ocorre libertação de produtos antes de todos os substratos de se terem ligado.  
Exemplos: Proteases de serina, transaminases, flavoenzimas.

## Nomenclatura de Cleland

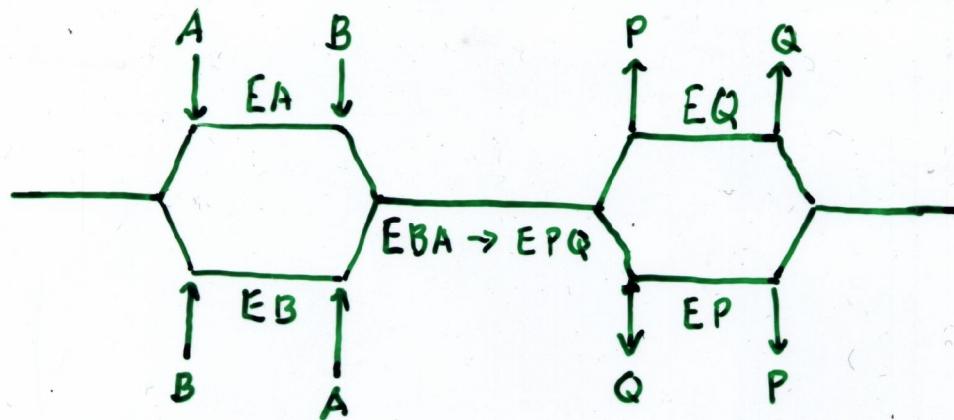
1. Os substratos designam-se pelas letras A, B, C, D pela ordem em que se ligam ao enzima.
2. Os produtos designam-se pelas letras P, Q, R, S pela ordem em que se libertam do enzima.
3. As formas estáveis do enzima designam-se pelas letras E, F, G, sendo a forma E o enzima livre. Entendem-se por forma estáveis as formas que são incapazes, por si só, de conversão noutras formas estáveis.
4. O número de reagentes e produtos numa dada reacção é especificado, por ordem, usando os termos *Uni*(um), *Bi*(dois), *Ter*(três) e *Quad*(quatro).

Exemplo: a reacção



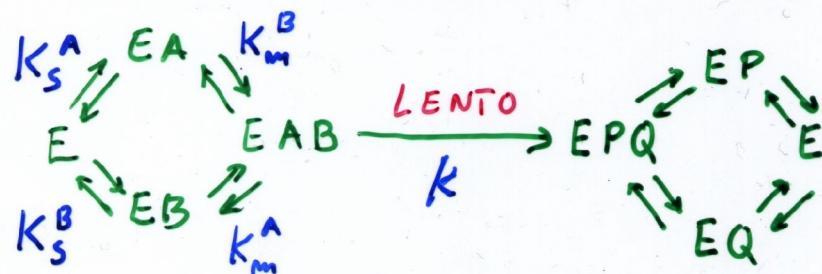
é uma reacção *Bi-Bi*

# Bi-Bi SEQUENCIAL ALEATÓRIO



NESTE MECANISMO QUALQUER DOS SUBSTRATOS SE PODE LIGAR AO ENZIMA ORIGINANDO COMPLEXOS BINÁRIOS EA E EB QUE PODEM DE SEGUIDA LIGAR-SE AO SEGUNDO SUBSTRATO FORMANDO UM COMPLEXO TERNÁRIO.

SE ASSUMIRMOS QUE O PASSO  $EBA \rightarrow EPQ$  É LENTO E DETERMINANTE DA REAÇÃO, OS COMPLEXOS EA E EB PODEM CONSIDERAR-SE EM EQUILÍBRIO RÁPIDO:



NESTAS CONDIÇÕES O MECANISMO É REGIDO PELA SEGUINTE EQUAÇÃO DE VELOCIDADE:

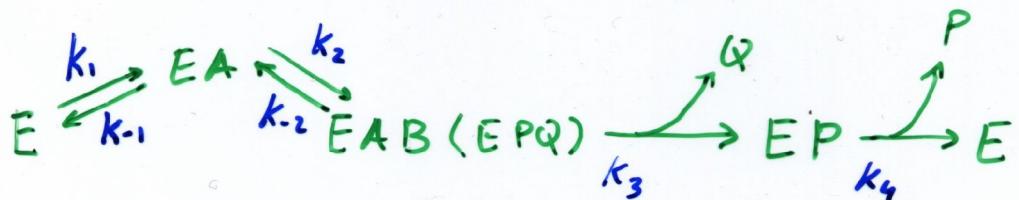
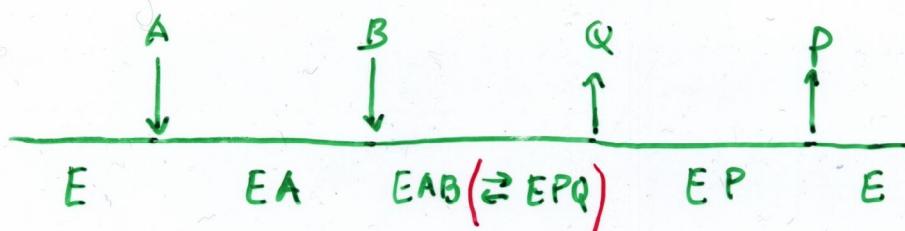
$$V = \frac{V_{max}}{1 + \frac{K_m^A}{[A]} + \frac{K_m^B}{[B]} + \frac{K_s^A K_m^B}{[A][B]}}$$

$$V_{max}^{app} = \frac{V_{max}[B]}{[B] + K_m^B}$$

$$K_m^{app} = \frac{K_m^A[B] + K_s^A K_m^B}{[B] + K_m^B}$$

$$\frac{V_{max}^{app}}{K_m^{app}} = \frac{(V_{max}/K_m^A)[B]}{[B] + K_s^A K_m^B / K_m^A}$$

## Bi-Bi SEQUENCIAL ORDENADO



ESTE MECANISMO ORIGA A QUE A E B INTERAGAM POR ESTA ORDEM COM O ENZIMA. NÃO HÁ LIBERTAÇÃO PE PRODUTO SEM QUE SE FORME O COMPLEXO TERNÁRIO EAB. OS PRODUTOS SÃO TAMBÉM LIBERTADOS POR UMA ORDEM ESPECÍFICA.

$$V = \frac{V_{max}}{1 + \frac{K_m^A}{[A]} + \frac{K_m^B}{[B]} + \frac{K_s^A K_m^B}{[A][B]}}$$

A EXPRESSÃO É FORMALMENTE IDÊNTICA À DO MECANISMO SEQUENCIAL ALEATÓRIO, MAS O SIGNIFICADO DAS CONSTANTES É DIFERENTE. ASSIM:

$$K_m^A = \frac{K_3 K_4}{k_1 (k_3 + k_4)} \quad K_m^B = \frac{(k_2 + k_3) K_4}{k_2 (k_3 + k_4)} \quad K_{CAT} = \frac{k_3 K_4}{k_3 + k_4}$$

SE  $k_{-1} \gg K_{CAT}$  OU  $K_{sA} \gg K_{mA}$  TEMOS (MECANISMO SEQUENCIAL ORDENADO DE EQUILÍBRIO)

$$V = \frac{V_{max}}{1 + \frac{K_m^B}{[B]} + \frac{K_s^A K_m^B}{[A][B]}}$$

$\text{Fixo } K_{-1}$

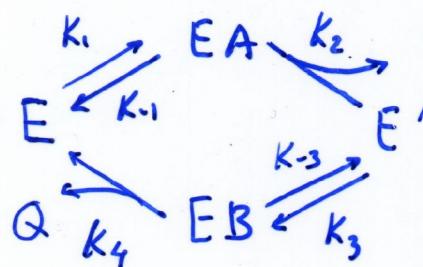
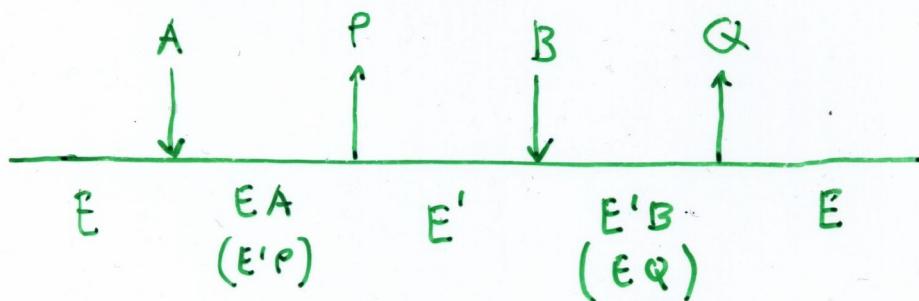
$$\begin{cases} V_{app} = V_{max} \left( 1 + \frac{K_m^B}{[B]} \right) \\ K_m = \frac{K_s^A K_m^B}{[B]} \end{cases}$$

$\text{Fixo } K_{sA}$

$$\begin{cases} V_{app} = V_{max} \\ K_m = K_m^B \left( 1 + \frac{K_s^A}{[A]} \right) \end{cases}$$

## PING - PONG

NO MECANISMO DE PING-PONG, A LIGAÇÃO DE A E B É MUTUAMENTE EXCLUSIVA, NÃO SE FORMANDO COMPLEXO TERNÁRIO EAB. O PRODUTO CORRESPONDENTE AO 1º SUBSTRATO LIBERARÉ LIBERTA-SE ANTES DA LIGAÇÃO DO SEGUNDO SUBSTRATO.



$$V = \frac{V_{max}}{1 + \frac{K_m^A}{[A]} + \frac{K_m^B}{[B]}}$$

FIXANDO B:

$$V = \frac{V_{max} [A] / (1 + K_m^B / [B])}{[A] + K_m^A / (1 + K_m^B / [B])}$$

$$\bar{V}_{max}^{app} = V_{max} / (1 + K_m^B / [B])$$

$$\bar{V}_{max}^{app} / K_m^B = V_{max} / K_m^A$$

FIXANDO A:

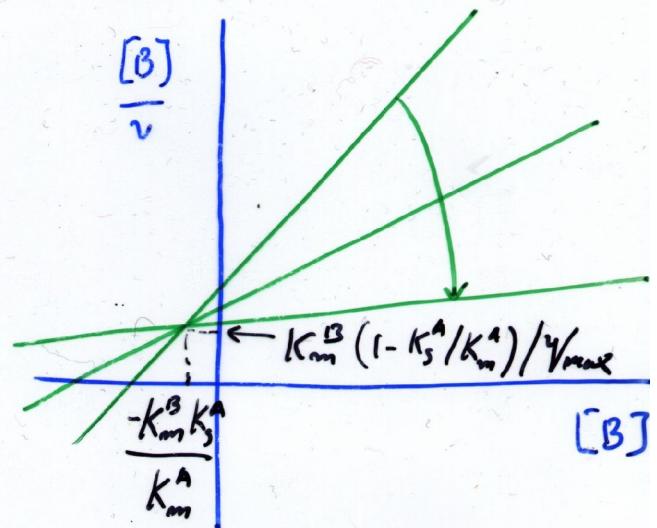
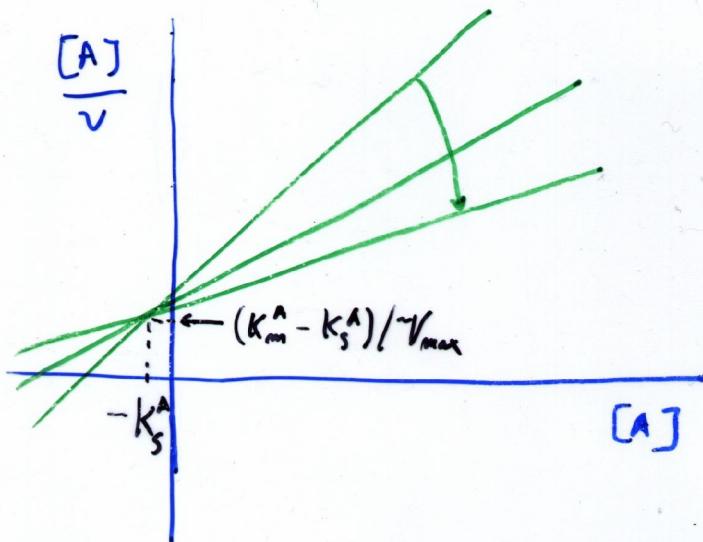
$$V = \frac{V_{max} [B] / (1 + K_m^A / [A])}{[B] + K_m^B / (1 + K_m^A / [A])}$$

$$\bar{V}_{max}^{app} = V_{max} / (1 + K_m^A / [A])$$

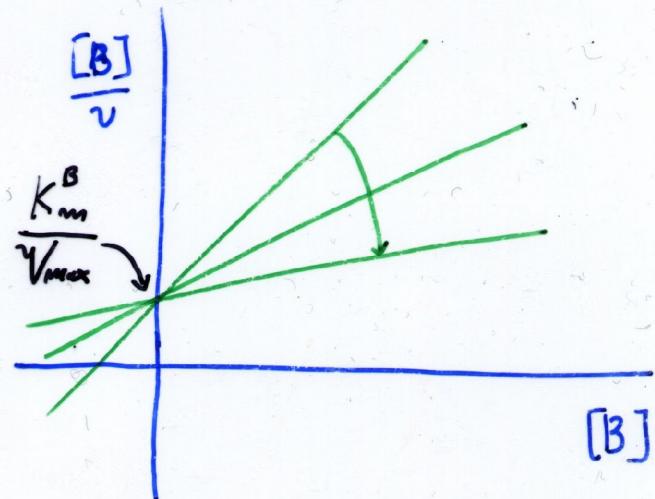
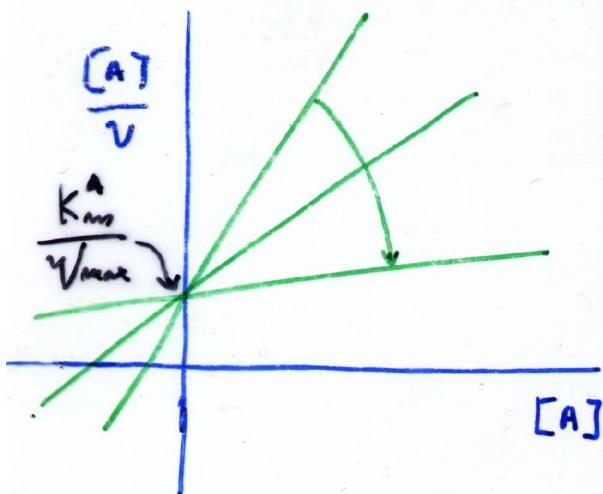
$$\bar{V}_{max}^{app} / K_m^A = V_{max} / K_m^B$$

# REPRESENTAÇÃO GRÁFICA

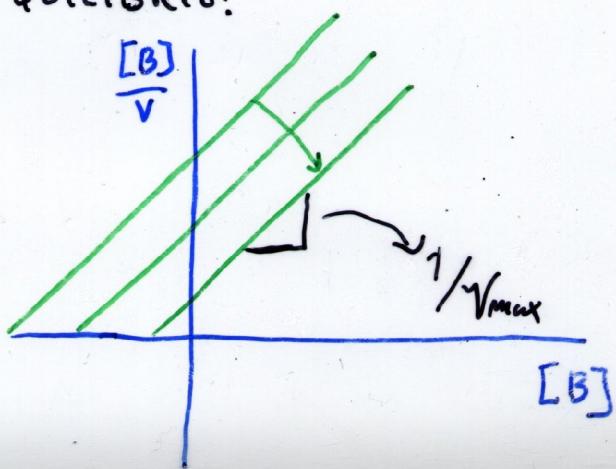
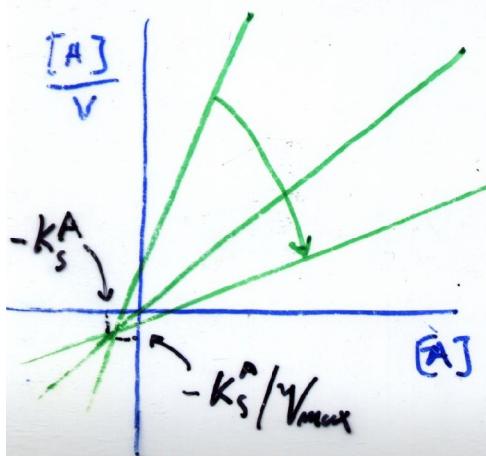
SEQUENCIAL ORDENADO + SEQUENCIAL ALEATÓRIO:



PING - PONG:



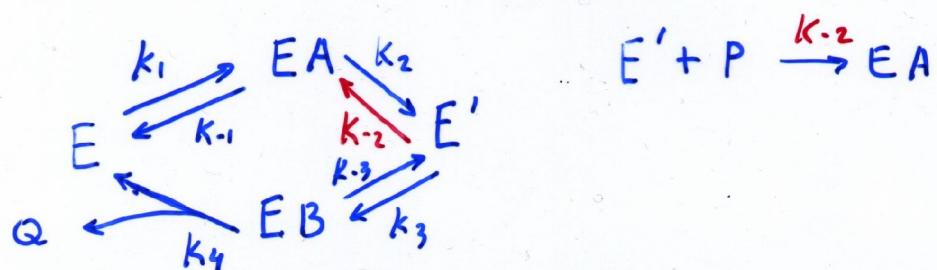
SEQUENCIAL ORDENADO DE EQUILÍBRIO:



# PADRÕES DE INIBIÇÃO PELO PRODUTO

O EFEITO INIBITÓRIO DE UM OU OUTRO DOS PRODUTOS NUMA REAÇÃO BI-SUBSTRATO PODE SERVIR DE DIAGNÓSTICO PARA O TIPO DE MECANISMO PRESENTE:

EXEMPLO (MECANISMO DE PING-PONG):



$$V = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{K_m^A}{[A]} + \frac{K_m^B}{[B]} \left( 1 + \frac{[P]}{K_i} \right) + \frac{K_s^A K_m^B [P]}{K_i [A][B]}}$$

TOMANDO [A] COMO O SUBSTRATO VARIÁVEL:

$$V = \frac{V_{\max} [A] / (1 + K_m^B / [B]) (1 + [P] / K_i)}{[A] + \frac{K_m^A + K_s^A K_m^B [P] / K_i [B]}{1 + (K_m^B / [B]) (1 + [P] / K_i)}} \quad \text{INIBIÇÃO MISTA}$$

PARA [B] SATURANTE VEM  $\rightarrow V = \frac{V_{\max} [A]}{K_m^A + [A]}$  NÃO HÁ INIBIÇÃO

TOMANDO [B] COMO SUBSTRATO VARIÁVEL:

$$V = \frac{V_{\max} [B] / (1 + K_m^A / [A])}{[B] + \frac{K_m^B (1 + [P] / K_i) + K_s^A K_m^B [P] / K_i [A]}{1 + K_m^A / [A]}}$$

INIBIÇÃO COMPETITIVA

PARA [A] SATURANTE FICA

$$V = \frac{V_{\max} [B]}{[B] + K_m^B \left( 1 + \frac{[P]}{K_i} \right)}$$

A INIBIÇÃO MANTEM-SE

INIBIÇÃO  
PELO PRODUTO

MECANISMO	SUBSTRATO VARIÁVEL	SUBSTRATO FÍXO	P		Q	
			A	B	A	B
ALEATÓRIO EQUIL.	A	B	COMPETITIVA	COMPETITIVA	—	—
	A	B SATURADO	—	—	—	—
	B	A	COMPETITIVA	COMPETITIVA	—	—
	B	A SATURADO	—	—	—	—
ORDENADO	A	B	COMPETITIVA	MISTA	—	—
	A	B SATURADO	COMPETITIVA	ANTI-CONE.	—	—
	B	A	MISTA	MISTA	—	—
	B	A SATURADO	—	—	—	—
PING-PONG	A	B	MISTA	COMPETITIVA	—	—
	A	B SATURADO	—	COMPETITIVA	—	—
	B	A	COMPETITIVA	MISTA	—	—
	B	A SATURADO	COMPETITIVA	COMPETITIVA	—	—