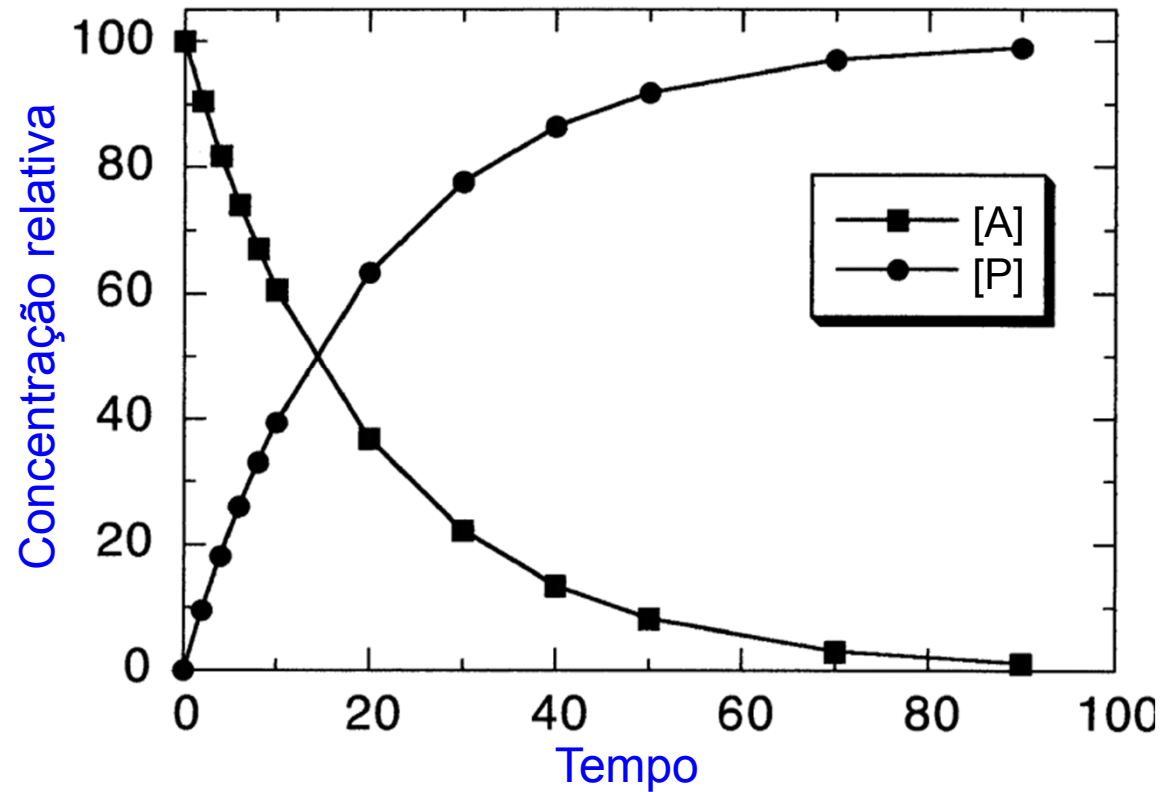


Cinética de reacções enzimáticas mono-substrato

Curva de progresso de reacção enzimática mono-substrato



$$[A] = [A]_0 e^{-kt}$$

$$v = -\frac{d[A]}{dt} = \frac{d[P]}{dt} = k[A]_0 e^{-kt}$$

Atenuação da velocidade de reacção

Um ou mais dos seguintes factores podem contribuir para que a velocidade de reacção vá decaindo ao longo do tempo:

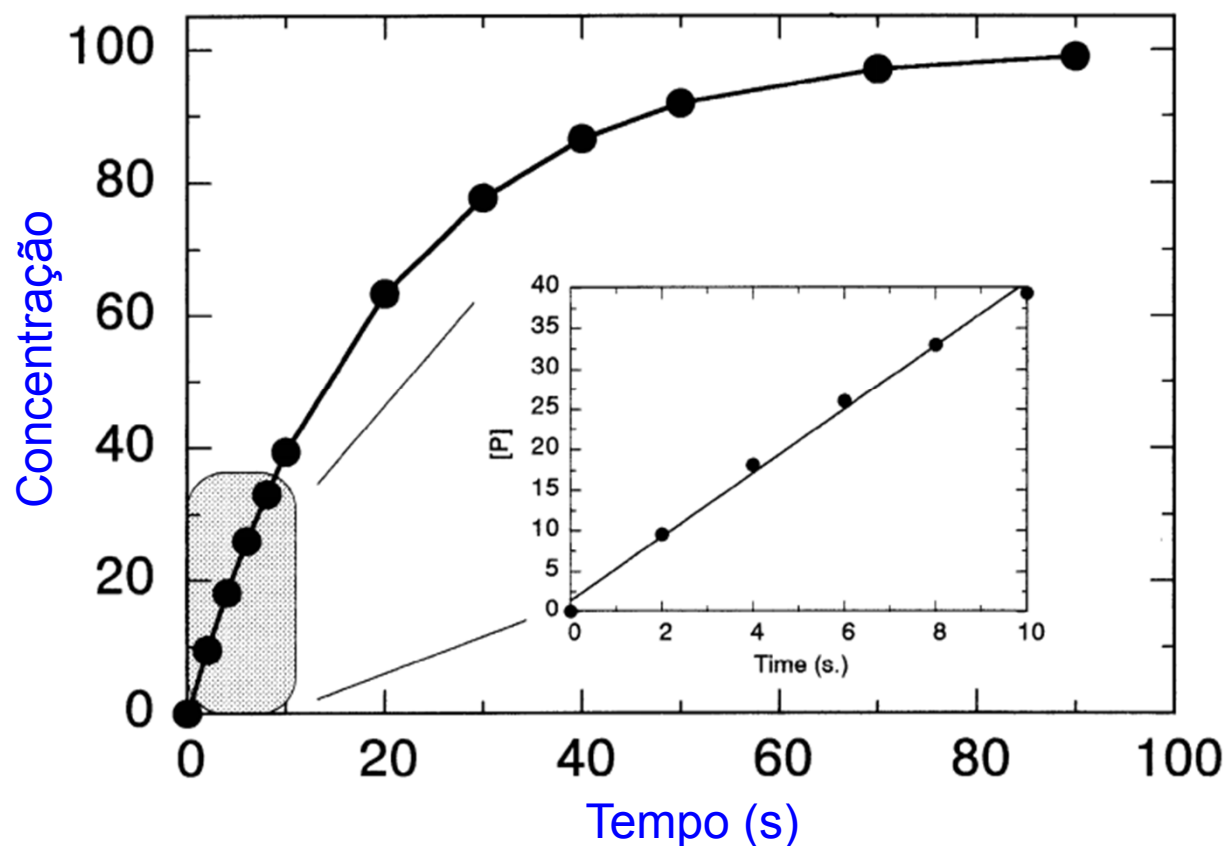
- A reacção inversa predomina à medida que o produto se acumula
- O grau de saturação do enzima diminui à medida que o substrato se gasta
- O enzima torna-se instável durante o decurso de reacção
- O produto (ou produtos) de reacção inibe o enzima

A análise de *velocidades iniciais* de reacção resolve este problema, já que estas se aplicam a um instante de tempo em que os factores acima mencionados ainda não tiveram tempo de afectar a velocidade de reacção. Em condições de velocidade inicial podemos ainda assumir:

$$[A]_T \approx [A]_0 \quad (\text{ainda não se gastou substrato})$$

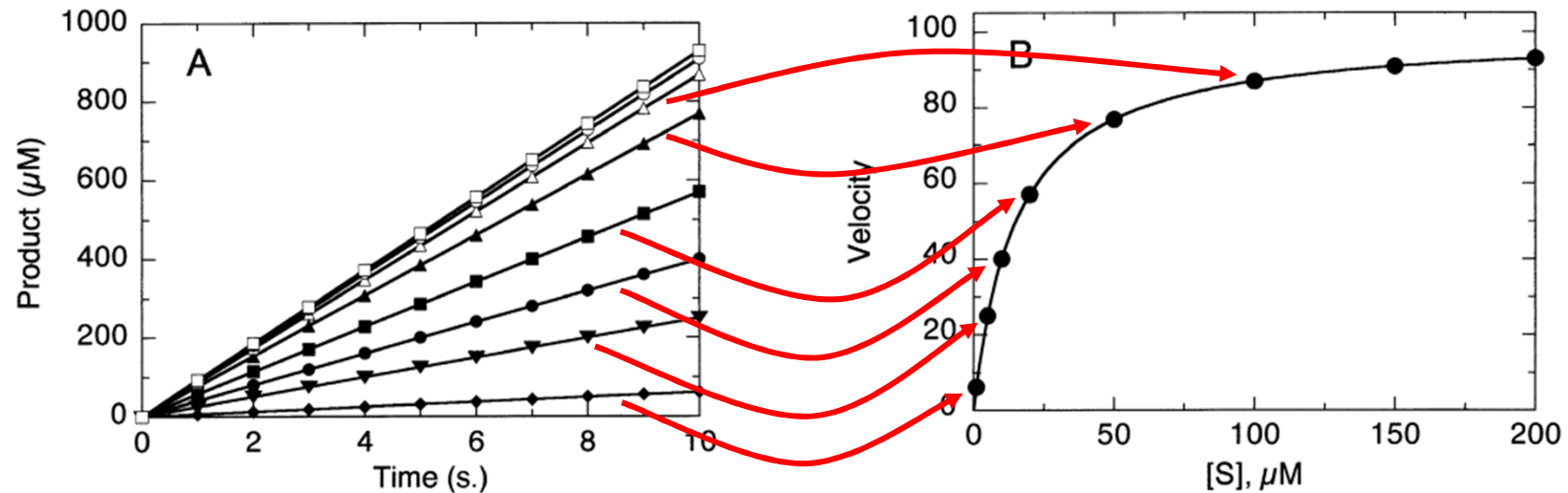
$$[P]_0 \approx 0 \quad (\text{ainda não se formou produto})$$

Velocidades iniciais de reacção



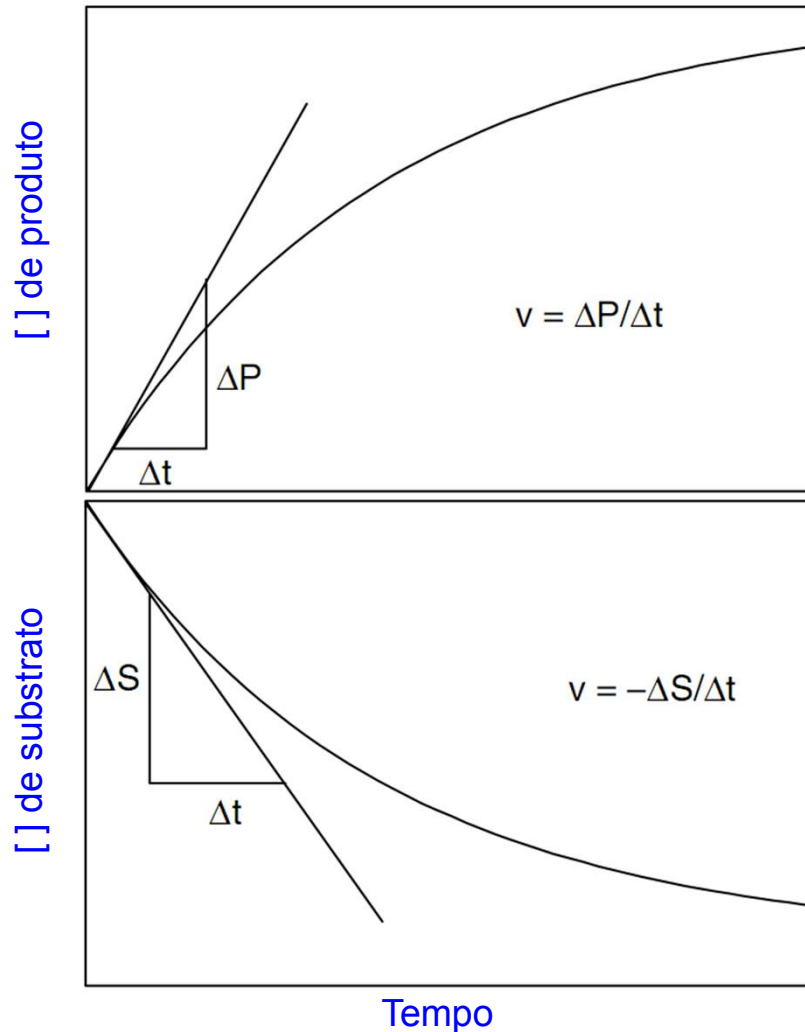
Experimentalmente observa-se uma relação linear entre concentração de produto formado e tempo, desde o início da reacção e até ao consumo de cerca de **10-20%** da quantidade inicial de substrato.

Velocidades iniciais e dependência da concentração



A variação de velocidade com a concentração de substrato não é linear como seria de esperar numa cinética de primeira ordem, $v = k[A]$, mas aparenta antes uma ordem variável (cinética de saturação).

Estimativa de velocidades iniciais



Para assegurar a validade dos dados cinéticos recolhidos, é necessário que se verifiquem as seguintes condições:

- O enzima deverá ser estável durante o intervalo de tempo de recolha de dados para cálculo da velocidade inicial
- As velocidades iniciais são estimadas a partir da curva de progresso de substrato ou produto
- A velocidade de reacção deve ser proporcional à concentração de enzima

$$v_0 = -\frac{\Delta S}{\Delta t} = \frac{\Delta P}{\Delta t}$$

Unidades de actividade enzimática

- *enzyme unit* (e.u.) – quantidade de enzima capaz de catalisar a degradação de **1 μmol** de substrato, ou formação de **1 μmol** de produto em **1 minuto**
- *katal* (kat) – a unidade S.I. de actividade enzimática, corresponde à quantidade de enzima capaz de consumir um **1 mol** de substrato em **1 segundo**

$$1 \text{ e.u.} = 1.7 \times 10^{-7} \text{ kat}$$

A unidade e.u. continua a ser preferida ao katal (apesar de este ser a unidade S.I.), porque as actividades enzimáticas observados experimentalmente estão muito mais próximas em grandeza da primeira unidade (o katal é uma unidade demasiado grande).

A ideia de complexo enzima-substrato

- O'Sullivan and Thompson (1890) verificam que a estabilidade térmica da invertase é muito maior na presença de açúcar
- Wurz (1880) observa a formação de um precipitado de papaína-fibrina
- Buchner (1897) observa estabilização da actividade fermentativa de um extracto de leveduras na presença de sacarose
- Brown (1902) mede velocidades de fermentação da sacarose em leveduras vivas que são *independentes* da concentração de substrato

Trabalhos pioneiros em enzimologia

- **O'Sullivan and Thompson** (1890) estudam a reacção da invertase e chegam às seguintes conclusões:
 - a reacção é dependente do grau de acidez do meio
 - a velocidade é proporcional à concentração de enzima
 - a velocidade aumenta com a concentração de substrato
 - a velocidade parece ser aproximadamente proporcional a $[S]$
 - a velocidade aumenta com a temperatura
 - existe uma temperatura *óptima* acima da qual não há actividade
- **Henri** (1902) propõe um mecanismo baseado na existência de um complexo enzima-substrato, através de uma formulação precisa de um mecanismo cinético
- **Sorensen** (1909) apercebe-se da importância de controlar a concentração hidrogeniónica do meio e inventa a escala de pH
- **Michaelis e Menten** (1913) repetem as experiências de Henri, mas controlam o pH com tampões e medem velocidades iniciais. Os resultados concordam na essência com os anteriores estudos de Henri.

Modelo de Henri

Em 1902 Henri propõe um modelo baseado nas seguintes hipóteses:

- O enzima é um catalisador
- Enzima e substrato reagem rapidamente formando um *complexo enzima-substrato*
- O complexo enzima-substrato decompõe-se em produto num passo único
- Enzima, substrato e complexo enzima-substrato estão em equilíbrio
- A concentração de substrato é muito superior à concentração de enzima
- A velocidade global da reacção é limitada pela decomposição do complexo enzima-substrato em produto
- A medição de velocidades iniciais permite desprezar o efeito da reacção inversa



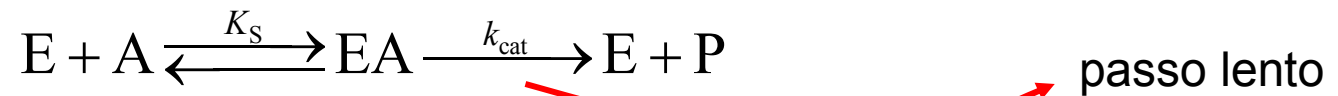
K – constante
característica de cada
preparação de enzima

$$v = \frac{K[A]}{1 + \frac{[A]}{K_s}}$$

$$K_s = \frac{[E][A]}{[EA]}$$

A equação de Henri-Michaelis-Menten

Michaelis e Menten (1913) refinam a abordagem de Henri e propõe um modelo muito semelhante:



considerando o primeiro passo suficientemente rápido para ser considerado em equilíbrio:

$$K_S = \frac{[E]_{eq}[A]_{eq}}{[EA]_{eq}}$$

as concentrações de enzima e substrato livre vêm dadas por:

$$[E] = [E]_0 - [EA]$$

$$[A] = [A]_0 - [EA]$$

se tivermos $[A]_0 \gg [E]_0$ vem $[A] \approx [A]_0$ e $[EA]$ pode ser obtido como :

$$[EA] = \frac{[E]_0}{K_S/[A]_0 + 1}$$

A equação de Henri-Michaelis-Menten

A velocidade de formação do produto depende do segundo passo, que é uma reacção simples de primeira ordem:

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_{\text{cat}}[EA] = \frac{k_{\text{cat}}[E]_0}{K_s/[A] + 1} = \frac{k_{\text{cat}}[E]_0[A]}{K_s + [A]}$$

$$V_{\text{max}} = k_{\text{cat}}[E]_0$$

$$K_m = K_s$$

$$v = \frac{V_{\text{max}}[A]}{K_m + [A]}$$

Equação de
Henri-Michaelis-Menten

V_{max} → velocidade máxima

K_m → cte. de Michaelis