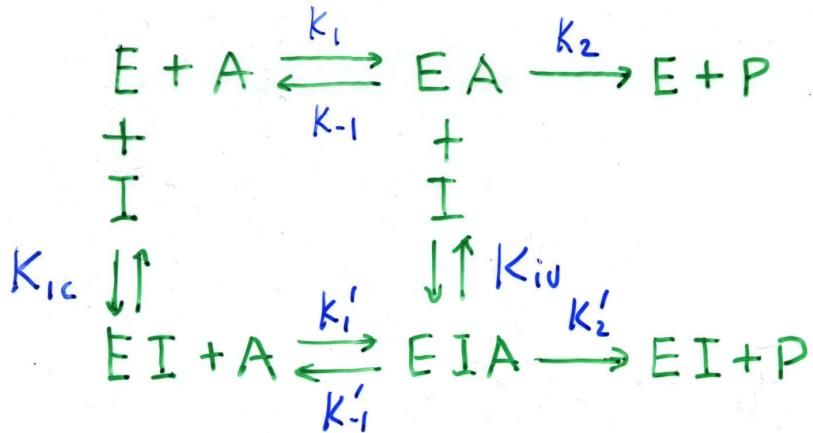


INIBIÇÃO HÍPERBÓLICA (PARCIAL)



$$V = \frac{[E]_0 [A] (K_2 + K'_2 [I]/K_{iu}) / (1 + [I]/K_{iu})}{K_m \left(\frac{1 + [I]/K_{ic}}{1 + [I]/K_{iu}} \right) + [A]}$$

$$K^{app} = \frac{K_m (1 + [I]/K_{ic})}{(1 + [I]/K_{iu})} \quad V_{max}^{app} = [E]_0 \left(K_2 + K'_2 [I]/K_{iu} \right) / \left(1 + \frac{[I]}{K_{iu}} \right)$$

$$\frac{1}{V_{max}^{app}} = (1 + [I]/K_{iu}) / [E]_0 (K_2 + K'_2 [I]/K_{iu})$$

$$K_m^{app} / V_{max}^{app} = K_m (1 + [I]/K_{ic}) / [E]_0 (K_2 + K'_2 [I]/K_{iu})$$

→ SÃO FUNÇÕES HÍPERBÓLICAS DE [I]

$$K_2 = K'_2 \Rightarrow V = \frac{K [E]_0 [A]}{K_m \left(\frac{1 + [I]/K_{ic}}{1 + [I]/K_{iu}} \right) + [A]}$$

$K_{iu} > K_{ic} \Rightarrow$ INIBIÇÃO COMPETITIVA PARCIAL

$K_{iu} < K_{ic} \Rightarrow$ ACTIVAÇÃO COMPETITIVA

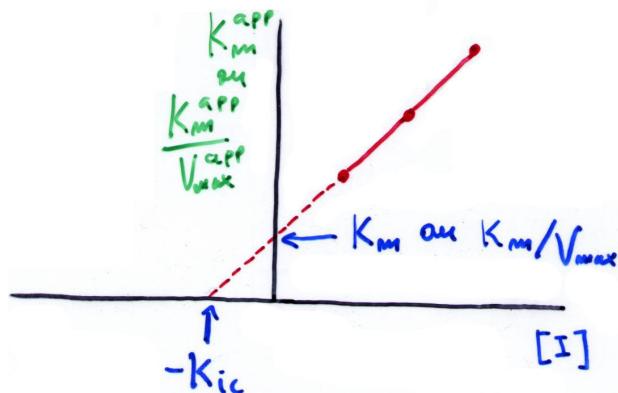
Determinação de constantes de inibição: gráficos primários

Representação dos parâmetros *aparentes* em função da concentração de inibidor.

Inibição competitiva:

$$K_m^{\text{app}} = K_m + \frac{K_m}{K_{ic}}[I]$$

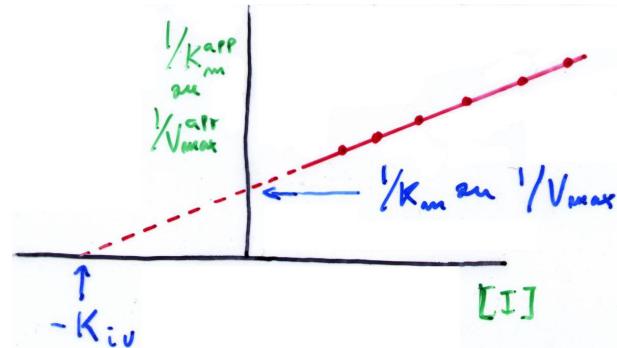
$$\frac{K_m^{\text{app}}}{V_{\max}^{\text{app}}} = \frac{K_m}{V_{\max}} + \frac{K_m^{\text{app}}}{V_{\max}^{\text{app}} K_{ic}}[I]$$



Inibição anti-competitiva:

$$\frac{1}{V_{\max}^{\text{app}}} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{[I]}{V_{\max} K_{iu}}$$

$$\frac{1}{K_m^{\text{app}}} = \frac{1}{K_m} + \frac{[I]}{K_m K_{iu}}$$



Inibição mista:

$$\frac{1}{V_{\max}^{\text{app}}} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{[I]}{V_{\max} K_{iu}}$$

$$\frac{K_m^{\text{app}}}{V_{\max}^{\text{app}}} = \frac{K_m}{V_{\max}} + \frac{K_m^{\text{app}}}{V_{\max}^{\text{app}} K_{ic}}[I]$$

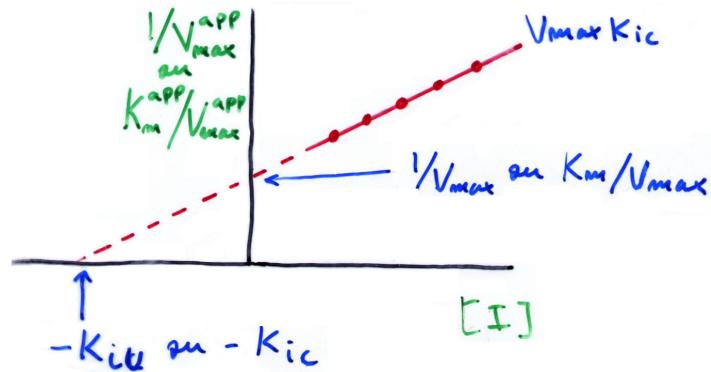


GRÁFICO DE DIXON

$$V = \frac{V_{\max} [A]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_{ic}} \right) + [A] \left(1 + \frac{[I]}{K_{iu}} \right)}$$

TOMANDO O INVERSO, E CONSIDERANDO DUAS CONCENTRAÇÕES DISTINTAS DE SUBSTRATO, $[A]_1$ E $[A]_2$, VEM

$$\frac{1}{V_1} = \frac{K_m + [A]_1}{V_{\max} [A]_1} + \frac{[I] \left(\frac{K_m}{K_{ic}} + \frac{[A]_1}{K_{iu}} \right)}{V_{\max} [A]_1}$$

$$\frac{1}{V_2} = \frac{K_m + [A]_2}{V_{\max} [A]_2} + \frac{[I] \left(\frac{K_m}{K_{ic}} + \frac{[A]_2}{K_{iu}} \right)}{V_{\max} [A]_2}$$

POR TANTO, UM GRÁFICO DE $\frac{1}{V}$ EM FUNÇÃO DE $[I]$ PARA $[A]$ CTE PRODUZ UMA RETA. PARA DOIS VALORES DE $[A]$, A INTERSEÇÃO CALCULA-SE FAZENDO $\frac{1}{V_1} = \frac{1}{V_2}$,

$$\frac{K_m + [A]_1}{V_{\max} [A]_1} + \frac{[I] \left(\frac{K_m}{K_{ic}} + \frac{[A]_1}{K_{iu}} \right)}{V_{\max} [A]_1} = \frac{K_m + [A]_2}{V_{\max} [A]_2} + \frac{[I] \left(\frac{K_m}{K_{ic}} + \frac{[A]_2}{K_{iu}} \right)}{V_{\max} [A]_2}$$

$$\frac{K_m}{V_{\max}} \left(\frac{1}{[A]_1} - \frac{1}{[A]_2} \right) \left(1 + \frac{[I]}{K_{ic}} \right) = 0$$

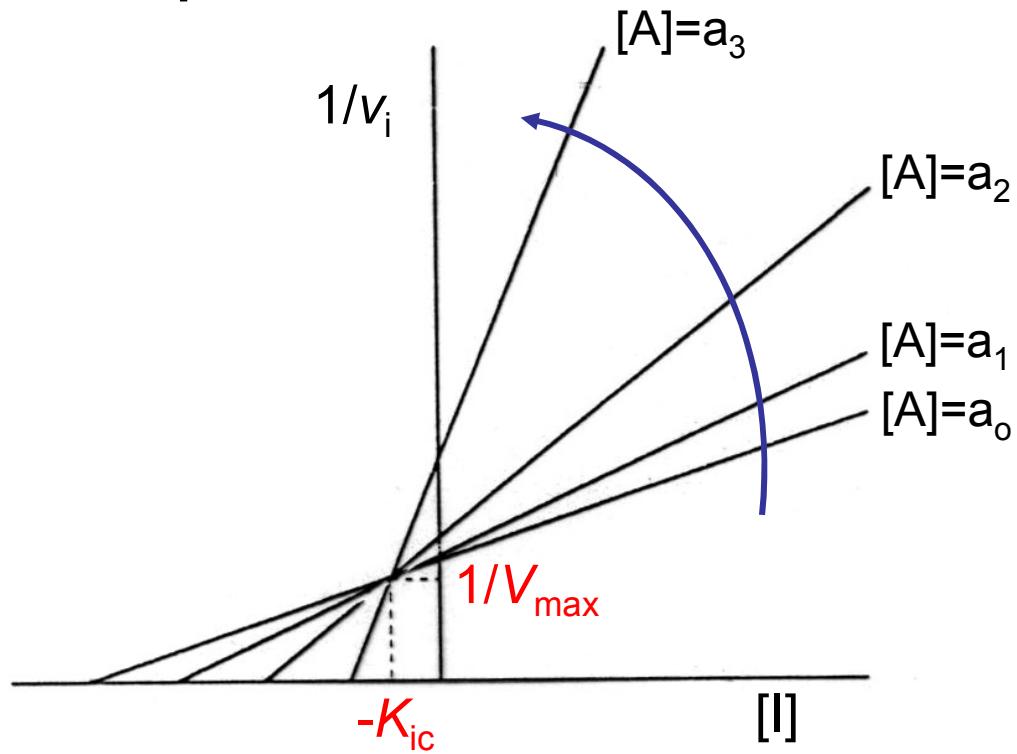
QUE IMPLICA

$[I] = -K_{ic}$ e $\frac{1}{V} = \left(1 - \frac{K_{ic}}{K_{iu}} \right) / V_{\max}$

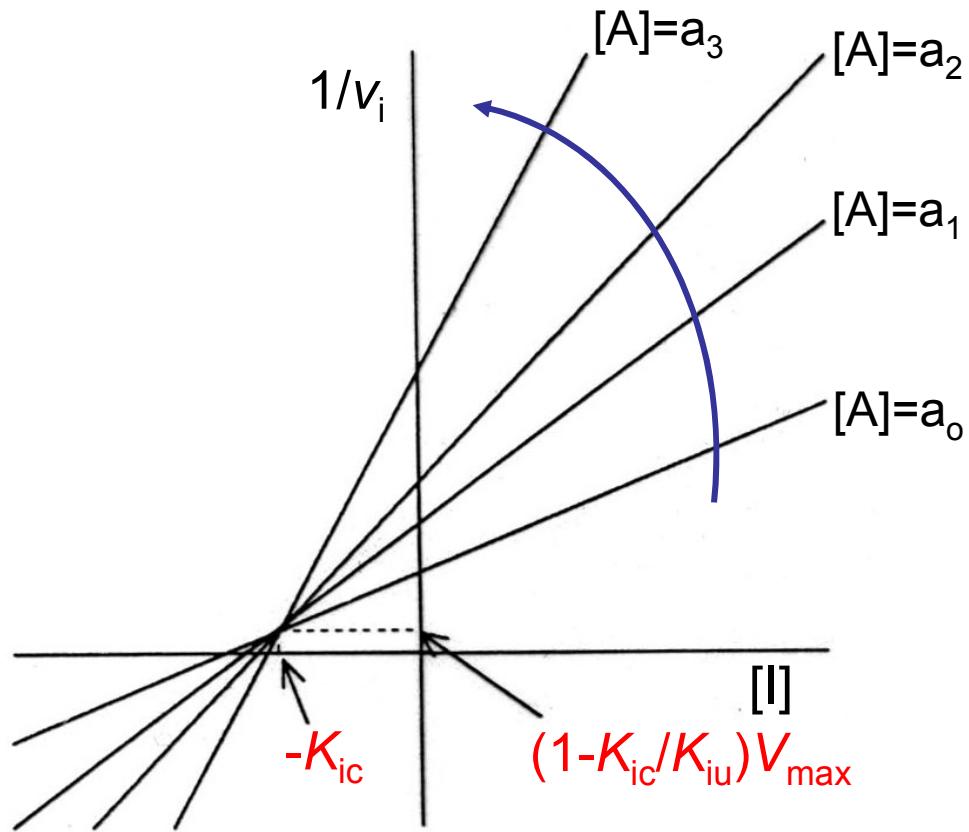
RETAS DE $\frac{1}{V}$ EM FUNÇÃO DE $[I]$ PARA DIFERENTES VALORES DE $[A]$ INTERSECTAM-SE EM $\left(-K_{ic}, \left(1 - \frac{K_{ic}}{K_{iu}} \right) / V_{\max} \right)$

Gráficos de Dixon

Inibição competitiva:

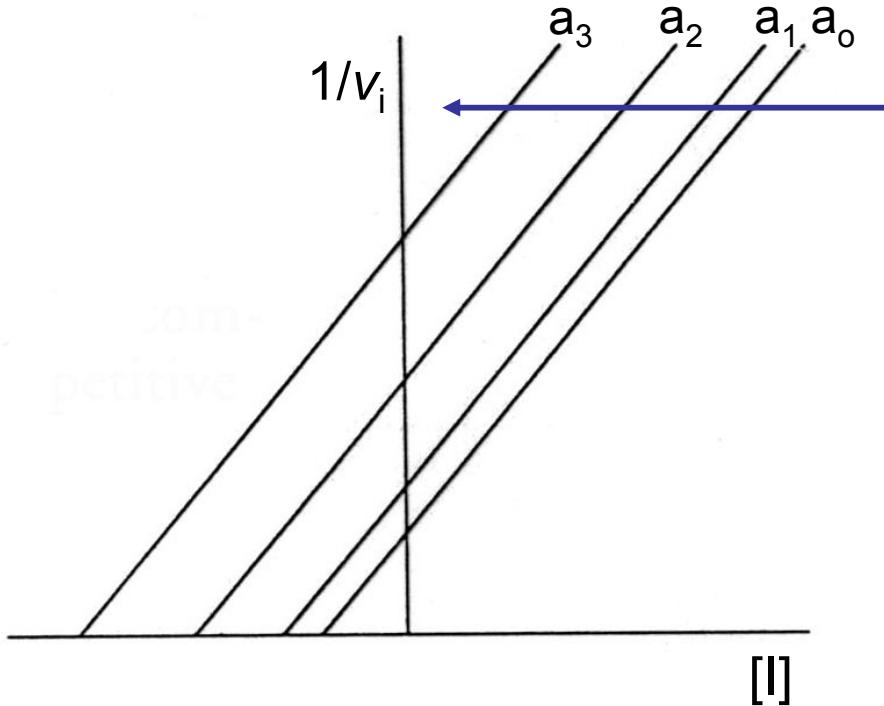


Inibição mista:



Gráficos de Dixon

Inibição anti-competitiva:

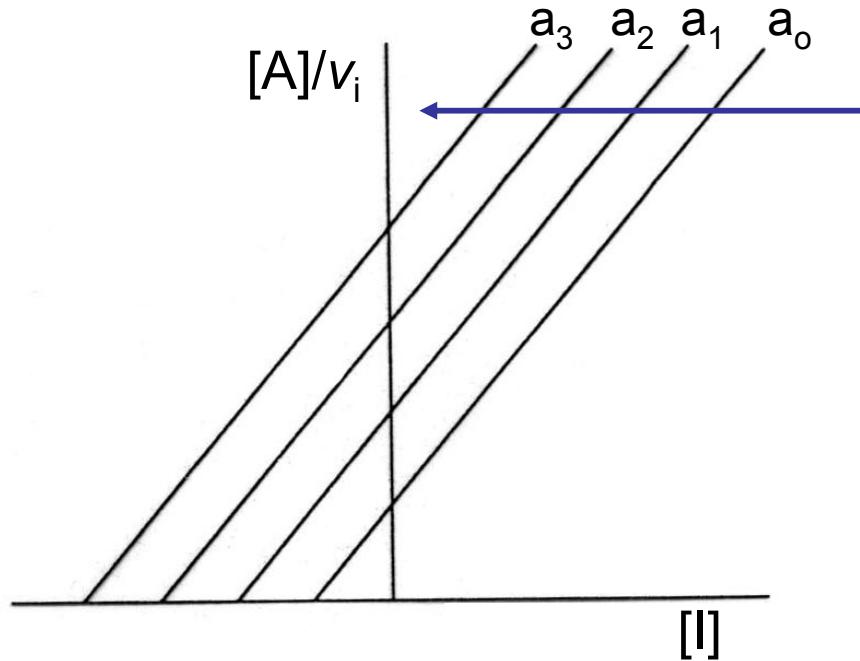


O gráfico de Dixon não pode ser usado para estimar constantes de inibição competitiva pura, pois as rectas para diferentes concentrações de substrato intersectam-se no *infinito*.

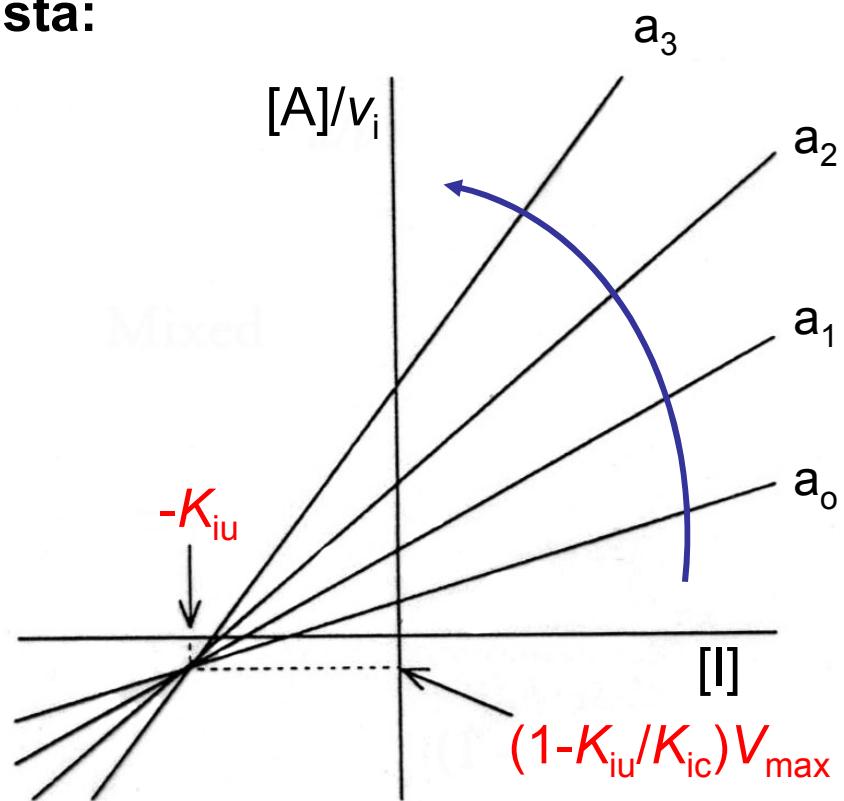
Para obviar esta situação é possível complementar a representação de Dixon com o gráfico de Cornish-Bowden, em que se representa $[A]/v$ em função de $[I]$.

Gráficos de Cornish-Bowden

Inibição competitiva:

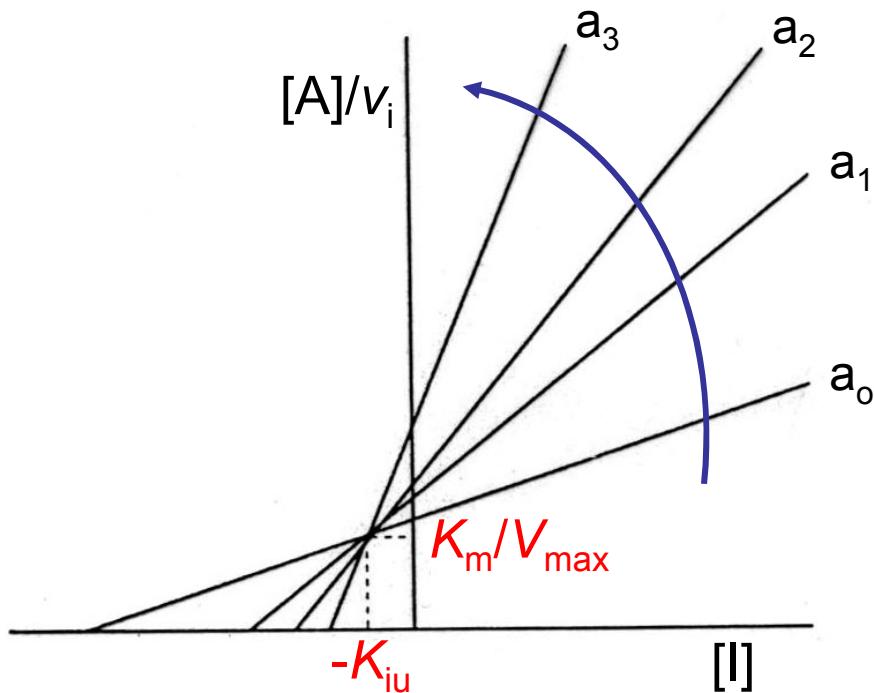


Inibição mista:



Gráficos de Cornish-Bowden

Inibição anti-competitiva:



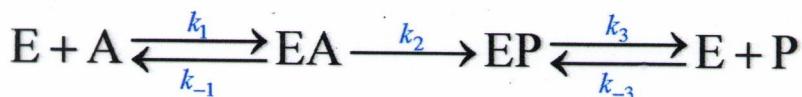
Através do uso combinado dos gráficos de Dixon e Cornish-Bowden, é possível estimar as constantes K_{ic} e K_{iu} , e cobrir todas as situações, desde a inibição competitiva pura à inibição anti-competitiva pura.

Inibição pelo produto

A inibição pelo produto pode ser uma consequência natural da reversibilidade de uma reacção, cuja velocidade diminui à medida que o equilíbrio se aproxima. No entanto, algumas reacções *praticamente irreversíveis* exibem inibição pelo produto quando catalisadas enzimáticamente. No mecanismo de Michaelis-Menten de dois passos teríamos que ter



Ou seja, o primeiro passo teria de ser irreversível e o segundo reversível. Um mecanismo muito mais plausível é o do modelo de 3 passos com o segundo passo irreversível,



Sendo $k_{-2} = 0$, temos

$$K_{mP} = \frac{k_{-1}k_3 + k_2k_3}{k_{-3}(k_{-1} + k_2)} = \frac{k_3}{k_{-3}} = K_{sP} \quad , \quad k_{-0} = 0 \quad , \quad k_P = \frac{k_{-0}}{K_{mP}} = 0$$

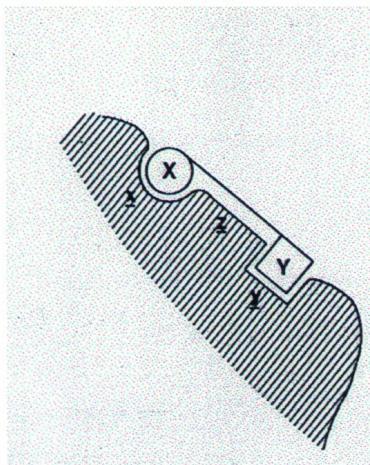
E a equação de Michaelis-Menten reversível reduz-se a

$$v = \frac{k_A [E]_0 [A]}{1 + \frac{[A]}{K_{mA}} + \frac{[P]}{K_{sP}}}$$

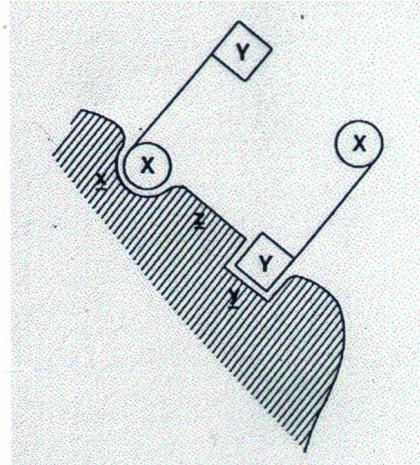
A expressão acima descreve uma *inibição competitiva*, com o produto P a actuar como inibidor, e sendo a constante de inibição igual a K_{sP} .

Inibição pelo substrato

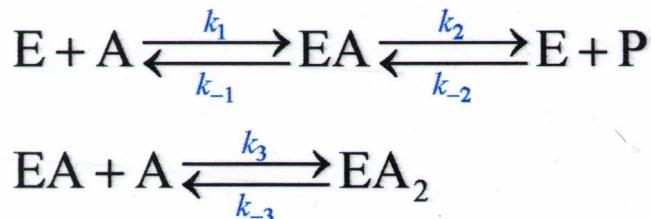
O substrato pode provocar inibição da sua própria catálise através de um modo de ligação não-produtivo. O caso mais simples é o de um ligando multidentado:



Ligaçāo produtiva
do substrato



Ligaçāo nāo-produtiva
do substrato



$$K_m = \frac{[E][A]}{[EA]} \quad K' = \frac{[EA][A]}{[EA_2]} \quad [E]_0 = [E] + [EA] + [EA_2]$$

$$v = \frac{V_{\max}[A]}{K_m + [A] + \frac{[A]^2}{K'}}$$

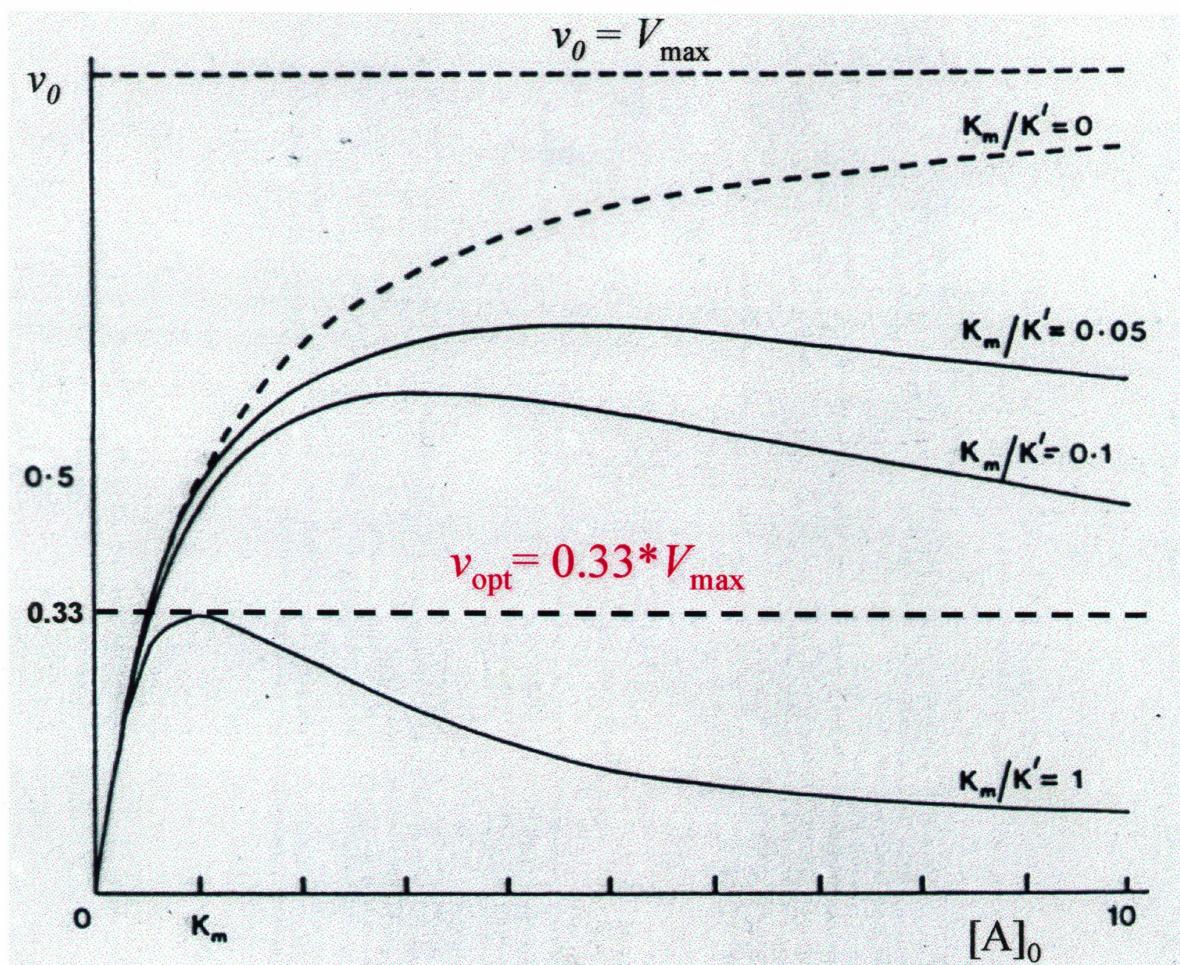
Inibição pelo substrato

O máximo valor de v obtém-se para

$$[A] = \sqrt{K_m K'}$$

Se designarmos este valor de velocidade como v_{OPT} , temos

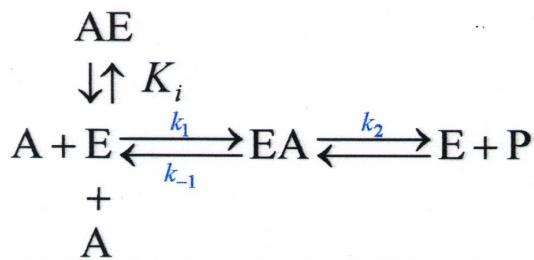
$$\frac{K_m}{K'} = 1 \Rightarrow v_{opt} = 33\% \text{ de } V_{max}$$



Note-se que a designação de V_{max} no contexto deste inibição é meramente formal: corresponde à velocidade máxima que seria observada caso *não* ocorresse inibição pelo substrato.
Ocorrendo este tipo de inibição, a velocidade atingirá um máximo para um valor de velocidade igual a $\sqrt{K_m K'}$

Ligaçāo nāo-produtiva do substrato

Quando o enzima é pouco específico para o substrato (*p.e.* quimotripsina) pode ocorrer a formação de um complexo enzima substrato (AE) para o qual não é possível haver formação de produto:



Este esquema é semelhante ao da inibição competitiva, pelo que a velocidade inicial observada será dada por

$$v = \frac{V_{\max} [A]}{K_m \left(1 + \frac{[A]}{K_i} \right) + [A]}$$

Esta expressão pode ser rearranjada na forma da equação de Michaelis-Menten

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

com

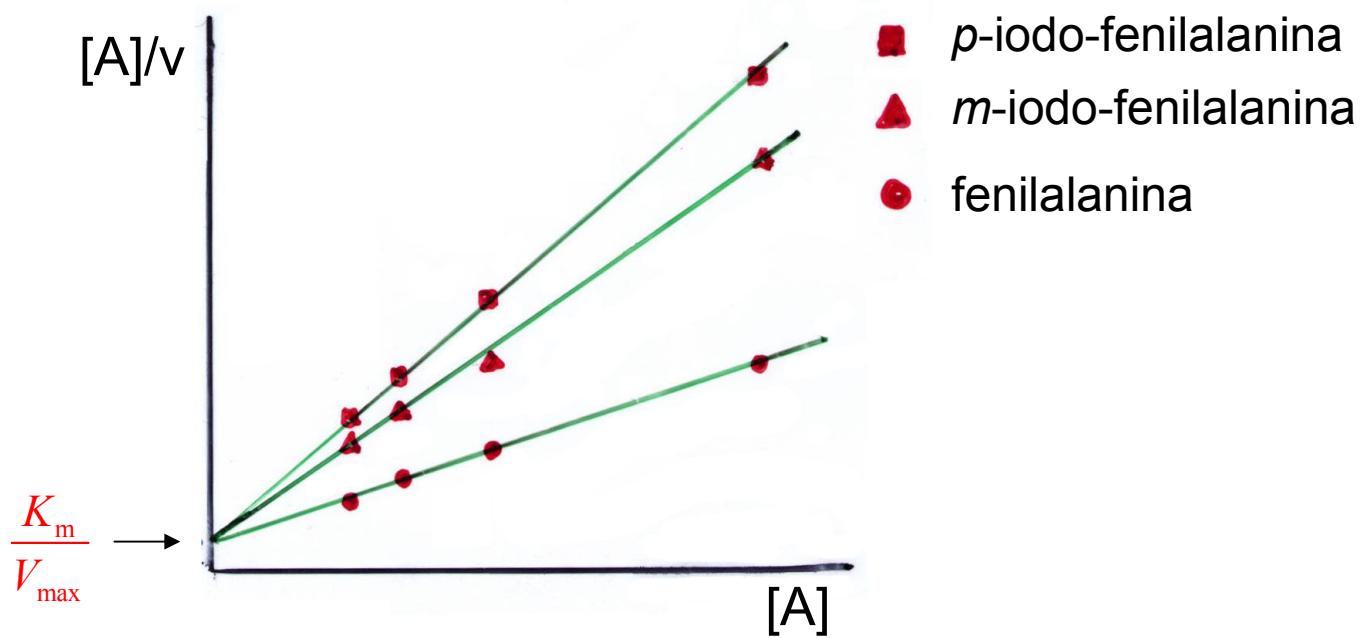
$$V_{\max}^{\text{app}} = \frac{V_{\max}}{\left(1 + \frac{K_m}{K_i} \right)} \quad K_m^{\text{app}} = \frac{K_m}{\left(1 + \frac{K_m}{K_i} \right)} \quad \frac{V_{\max}^{\text{app}}}{K_m^{\text{app}}} = \frac{V_{\max}}{K_m}$$

Portanto a cinética observada será Michaeliana, mas as constantes “verdadeiras” do enzima aparecem divididas por uma quantidade desconhecida.

Evidência para a ligação não-produtiva

A presença de ligação não-produtiva pode ser evidenciada pela comparação dos parâmetros cinéticos de um dado enzima relativamente a uma família de substratos.

Oxidação da fenilalanina pela L-amino-oxidase)



O gráfico de Hanes-Woolf indica um K_m/V_{max} para os 3 substratos, o que sugere ligação não produtiva em diferentes graus para os substituintes da fenilalanina