

Forma integrada da equação de Michaelis-Menten

Integração da equação de Michaelis-Menten

Existem situações experimentais em que a estimativa das velocidades iniciais é pouco fiável, sendo necessário recorrer à forma integrada da equação de Michaelis-Menten para poder extrair parâmetros cinéticos de uma curva de progressão de produto.

$$\left\{ \begin{array}{l} v = \frac{d[P]}{dt} \\ [A] = [A]_0 - [P] \\ v = \frac{V_{\max} [A]}{K_m + [A]} \end{array} \right. \Rightarrow \frac{d[P]}{dt} = \frac{V_{\max} ([A]_0 - [P])}{K_m + ([A]_0 - [P])}$$

Integração da equação de Michaelis-Menten

Esta equação pode ser integrada por separação das variáveis:

$$\int \frac{K_m + [A]_0 - [P]}{[A]_0 - [P]} d[P] = \int V_{\max} dt$$

$$-K_m \ln([A]_0 - [P]) + [P] = V_{\max} t + \alpha$$

Usando a condição inicial $[P]=0$ quando $t=0$, fica $\alpha = -K_m$, e rearranjando vem:

$$V_{\max} t = [P] + K_m \ln \left(\frac{[A]_0}{[A]_0 - [P]} \right)$$

Integração da equação de Michaelis-Menten

A forma integrada da equação de Michaelis-Menten é muitas vezes escrita:

$$V_{\max}^{\text{app}} t = [P] + K_m^{\text{app}} \ln \left(\frac{[A]_0}{[A]_0 - [P]} \right)$$

O uso das grandezas aparentes realça o facto de que esta equação é muito mais geral do que o caso a partir do qual foi deduzida.

$V_{\max}(\text{app})$ e $K_m(\text{app})$ podem diferir muito de K_m e V_{\max} , podendo até ser negativos!

No entanto, a seguinte relação é sempre válida:

$$v_0 = \frac{V_{\max}^{\text{app}} [A]_0}{K_m^{\text{app}} + [A]_0}$$

e permite estimar v_0 se os valores de $V_{\max}(\text{app})$ e $K_m(\text{app})$ forem conhecidos.

Integração da equação de Michaelis-Menten

A equação integrada,

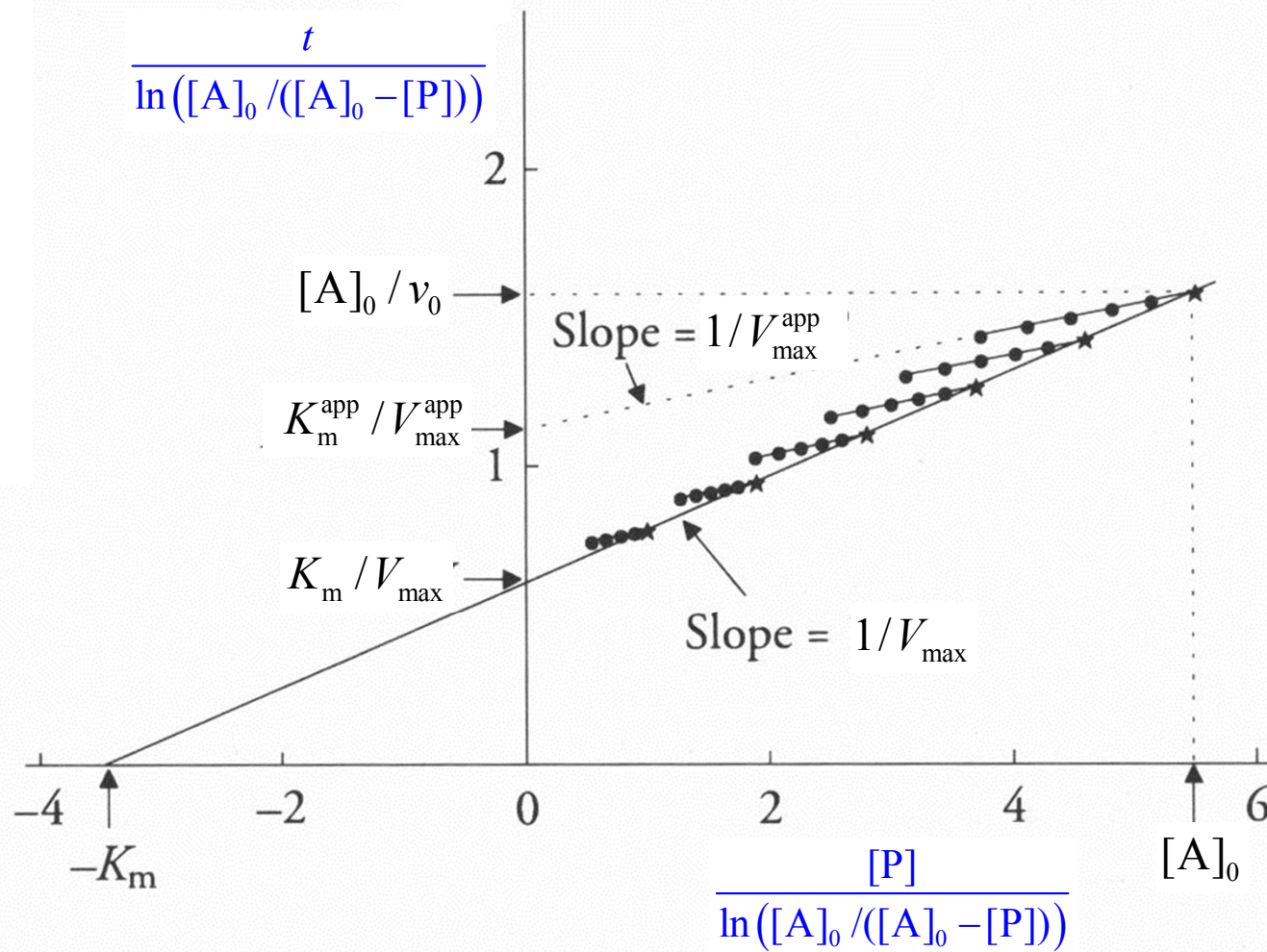
$$V_{\max}^{\text{app}} t = [P] + K_m^{\text{app}} \ln \left(\frac{[A]_0}{[A]_0 - [P]} \right)$$

pode ser rearranjada para a seguinte forma:

$$\frac{t}{\ln([A]_0 / ([A]_0 - [P]))} = \frac{1}{V_{\max}^{\text{app}}} \left\{ \frac{[P]}{\ln([A]_0 / ([A]_0 - [P]))} \right\} + \frac{K_m^{\text{app}}}{V_{\max}^{\text{app}}}$$

Portanto um gráfico de $\frac{t}{\ln([A]_0 / ([A]_0 - [P]))}$ em função de $\frac{[P]}{\ln([A]_0 / ([A]_0 - [P]))}$

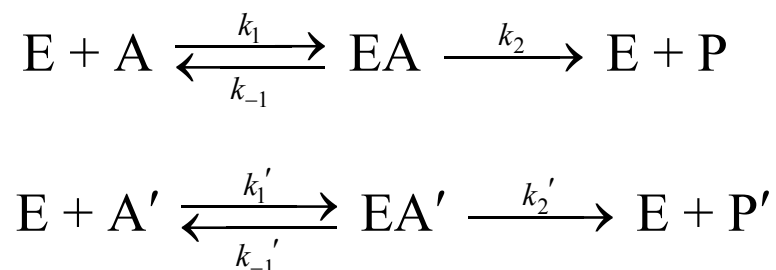
produz uma recta de declive $1 / V_{\max}^{\text{app}}$ e ordenada na origem $K_m^{\text{app}} / V_{\max}^{\text{app}}$



Competição de substratos e especificidade enzimática

Competição de substratos e especificidade enzimática

A eficiência catalítica $k_A = k_{\text{cat}}/K_m$ também se designa por *constante de especificidade*. A razão torna-se clara se considerarmos uma situação de *competição* entre dois substratos A e A', pelo centro activo de um mesmo enzima E:



A partir deste esquema podem deduzir-se o seguinte par de equações de velocidade:

$$\begin{aligned} v &= \frac{d[\text{P}]}{dt} = \frac{k_2[\text{E}]_0[\text{A}]}{K_m(1 + [\text{A}']/K_m') + [\text{A}]} \\ v' &= \frac{d[\text{P}']}{dt} = \frac{k_2'[\text{E}]_0[\text{A}']}{K_m'(1 + [\text{A}]/K_m) + [\text{A}']} \end{aligned}$$

Cada um dos substratos se comporta como um *inibidor competitivo* relativamente ao outro, sendo a constante de inibição igual ao K_m do substrato em competição.

Competição de substratos e especificidade enzimática

O verdadeiro significado da constante k_A emerge se considerarmos o quociente v/v' :

$$\frac{v}{v'} = \frac{\frac{k_2[E]_0[A]}{K_m(1+[A']/K_m')+[A]}}{\frac{k_2'[E]_0[A']}{K_m'(1+[A]/K_m)+[A']}} = \frac{\frac{(k_2/K_m)[E]_0[A]}{1+[A']/K_m'+[A]/K_m}}{\frac{(k_2'/K_m')[E]_0[A']}{1+[A]/K_m+[A']/K_m'}} = \frac{(k_2/K_m)[E]_0[A]}{(k_2'/K_m')[E]_0[A']}$$

Tendo em conta que $k_A = k_2/K_m$ e $k_A' = k_2'/K_m'$:

$$\frac{v}{v'} = \frac{(k_2/K_m)\cancel{[E]_0}[A]}{(k_2'/K_m')\cancel{[E]_0}[A']} = \frac{k_A[A]}{k_A'[A']} \quad \text{e quando } [A]=[A'] \quad \boxed{\frac{v}{v'} = \frac{k_A}{k_A'}}$$

Numa mistura *equimolar* de substratos competindo para o *mesmo centro activo* de um enzima E, a razão entre as velocidades de catálise de dois substratos é igual à razão entre as constantes de especificidade do enzima para cada substrato.

Competição de substratos e especificidade enzimática

Parâmetros cinéticos para diferentes substratos da fumarase:

Substrate	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (mM)	" K_i " (mM)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ mM ⁻¹)
Fluorofumarato	2700	0.027	-	100000
Fumarato	800	0.005	-	160000
Clorofumarato	20	0.11	0.10	180
Bromofumarato	2.8	0.11	0.15	25
Iodofumarato	0.043	0.12	0.10	0.36
Mesaconato	0.023	0.51	0.49	0.047
L-tartarato	0.93	1.3	1.0	0.72

Exemplo: numa mistura equimolar dos substratos *fumarato* e *fluorofumarato* o enzima fumarase catalisa a decomposição do fumarato 60% mais rápido:

$$\frac{v}{v'} = \frac{k_A}{k_A'} = \frac{160000}{100000} = 1.60$$

O fumarato é o substrato mais **específico**

Teste de competição de substratos

Quando se verifica a transformação de dois substratos na presença de um extracto enzimático, podem verificar-se duas situações:

- a) Os dois substratos competem para o centro activo de um mesmo enzima
- b) Os dois substratos são catalizados por enzimas distintos presentes no extracto

Para distinguir entre estas duas situações podemos recorrer a um *teste de competição*.

A soma das velocidades v e v' para dois substratos em competição é:

$$v_{\text{tot}} = v + v' = \frac{(V_{\text{max}} / K_m)[A] + (V_{\text{max}}' / K_m')[A']}{1 + [A'] / K_m' + [A] / K_m}$$

Determinando experimentalmente duas concentrações de referência $[A]=[A]_0$ e $[A']=[A']_0$ tais que:

$$\frac{V_{\text{max}}[A]_0}{K_m + [A]_0} = \frac{V_{\text{max}}[A']_0}{K_m + [A']_0} = v_0$$

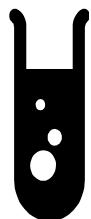
Estas são assim concentrações de $[A]$ e $[A']$ que conduzem a uma mesma velocidade de catálise observada para cada substrato.

Teste de competição de substratos

Preparando uma série de soluções contendo uma mistura dos dois substratos tais que as suas concentrações são interpoladas entre zero e $[A]_0$ e $[A']_0$:

$$\left. \begin{array}{l} [A] = (1 - r)[A]_0 \\ [A'] = r[A']_0 \end{array} \right\} r \in [0, 1]$$

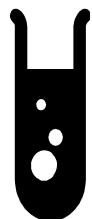
Exemplo com 5 soluções:



$$[A] = [A]_0$$

$$[A'] = 0$$

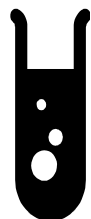
$$r = 0$$



$$[A] = 0.75[A]_0$$

$$[A'] = 0.25[A']_0$$

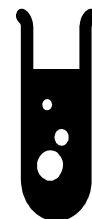
$$r = 0.25$$



$$[A] = 0.5[A]_0$$

$$[A'] = 0.5[A']_0$$

$$r = 0.5$$



$$[A] = 0.25[A]_0$$

$$[A'] = 0.75[A']_0$$

$$r = 0.75$$



$$[A] = 0$$

$$[A'] = [A']_0$$

$$r = 1$$

Para cada uma destas soluções, v_{tot} será a soma das velocidades observadas para a catálise de A e A' .

Teste de competição de substratos

A expressão de v_{tot} assume a seguinte forma:

$$v_{\text{tot}} = \frac{(V_{\text{max}} / K_m)(1-r)[A]_0 + (V'_{\text{max}} / K'_m)r[A']_0}{1 + (1-r)[A]_0 / K_m + r[A']_0 / K'_m}$$

$$= \frac{v_0[(1-r)(1 + [A]_0 / K_m) + r(1 + [A']_0 / K'_m)]}{(1-r)(1 + [A]_0 / K_m) + r(1 + [A']_0 / K'_m)} = v_0$$

Conclusão: se os dois substratos competirem para o mesmo centro activo, a velocidade total observada *será a mesma* em todas as misturas (v_0).

