



Tutorial Sisma - Cinética Enzimática

5 de junho de 2018

José Maurício Schneedorf FS

Nesse tutorial você aprenderá a analisar curvas cinéticas de 1a. e 2a. ordem, bem como avaliar equações e parâmetros de cinética enzimática.

1 Constante de Velocidade e Ordem de Reações

1. O Sisma permite visualizar e avaliar a **ordem de uma reação** bem como sua **constante de velocidade**. Assim, para uma **reação de primeira ordem**, a função inserida (*Write a new function*) deverá obedecer a equação 1 abaixo, descrita pela lei das velocidades integradas, e na qual a velocidade é diretamente proporcional à concentração do reagente:

$$v = -\frac{dR}{dt} = k * R \quad (1)$$

,onde k representa a constante de velocidade da reação.

2. Para tanto, elabore o que está representado na Figura 1.

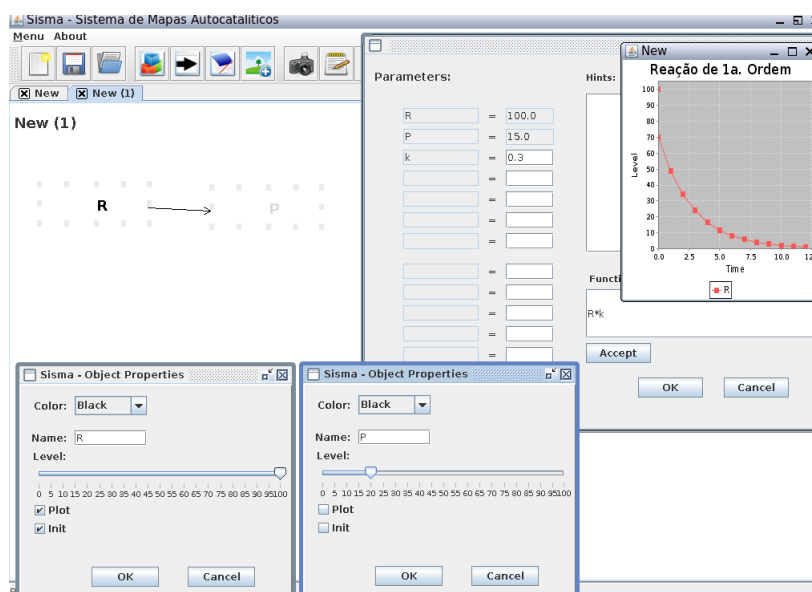


Figura 1: Janelas indicativas da configuração de objetos e caminhos para uma reação de 1a. ordem. Observe os níveis e caixas selecionadas, bem como a curva resultante.

3. Uma reação de primeira ordem exibe linearidade num gráfico de tempo *versus* $\ln R$, com valor da inclinação dada pela constante de velocidade. Para testar isso, exporte os dados (ícone **Export**) sem salvar, copiando-os da tabela gerada e colando-os numa planilha. Nomeie as colunas (tempo, R, P) e atribua $\ln(R)$ à próxima coluna. Plote o gráfico de tempo *versus* " $\ln R$ " resultante, observe sua linearidade e calcule a inclinação.
4. A inclinação do gráfico resultante pode ser calculada dividindo-se uma faixa em " $\ln R$ " pela correspondente em "tempo". O cálculo é mais preciso, contudo, se conduzido por ajuste linear dos dados, tal como representado na Figura 2 com auxílio da planilha de distribuição livre Gnumeric.

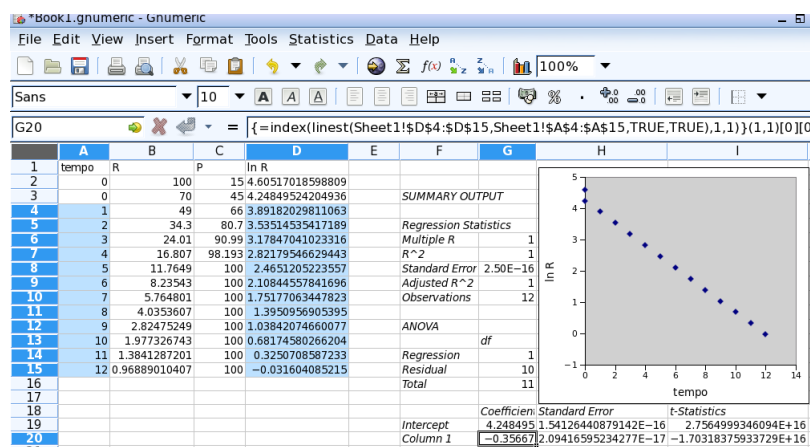


Figura 2: Resultado gráfico e de ajuste linear para uma reação de 1a. ordem (Equação 1). Veja que o valor da inclinação calculada aproxima-se do valor teórico proposto para a constante de velocidade. Obs: o ajuste foi realizado descontando-se os dois primeiros valores, como representado pela seleção das colunas "tempo" e " $\ln R$ ".

5. Da mesma forma, uma **reação de segunda ordem** pode ser simulada no Sisma, seguindo-se a equação 2, e na qual a velocidade da reação depende do quadrado da concentração do reagente:

$$v = -\frac{dR}{dt} = k * R^2 \quad (2)$$

6. Elabore uma nova reação (menu de ícones, "New") como representado na Figura 3, a qual também mostra o resultado da curva de progresso resultante. É necessário construir uma nova reação quando se altera a natureza da equação no Sisma, pois o programa retém a informação da função matemática anterior, o que pode levar a erros na simulação quando utilizada a mesma reação.

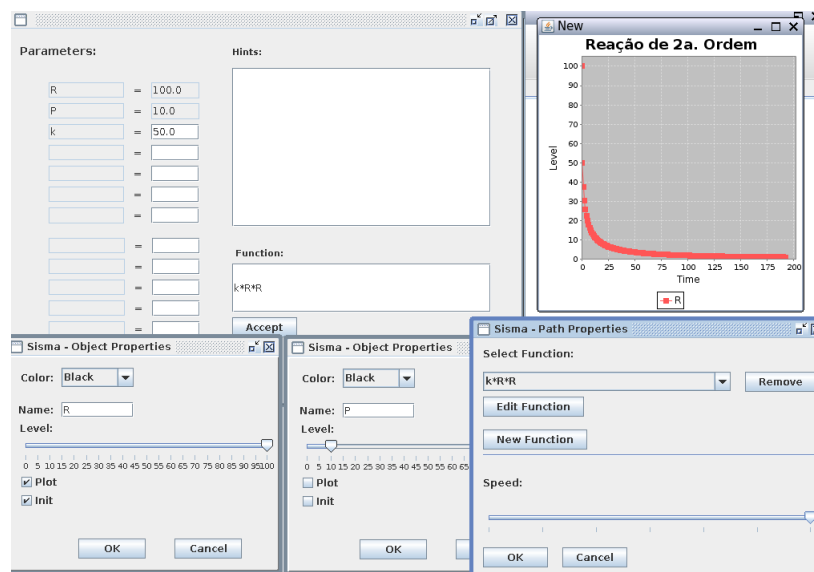


Figura 3: Janelas indicativas da configuração de objetos e caminhos para uma reação de 2a. ordem. Observe os níveis e caixas selecionadas, bem como a curva resultante. A reação pode ser acelerada como indicado pela barra de rolagem da janela de propriedades de caminho.

7. Uma reação de 2a. ordem também pode ser linearizada para obtenção de sua constante de velocidade. Nesse caso, o "tempo" é plotado contra o recíproco de "R", como representado na Figura 4 resultante.

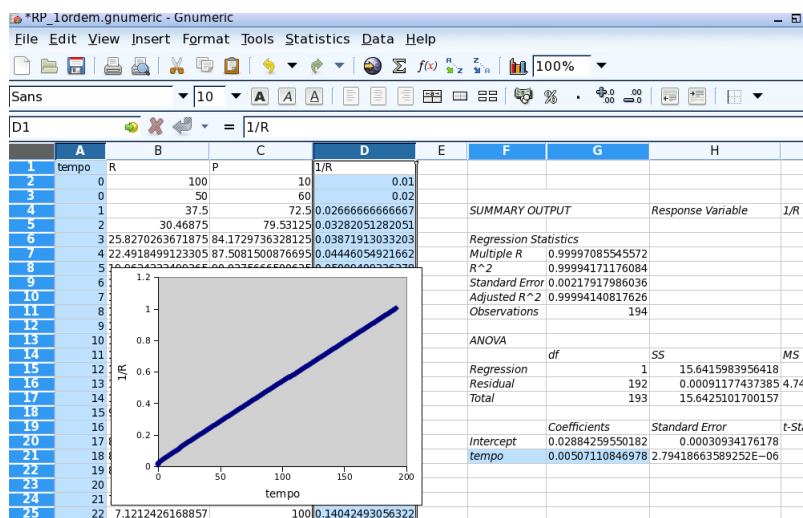


Figura 4: Resultado gráfico e de ajuste linear para uma reação de 2a. ordem (Equação 2). Note como o valor calculado pela inclinação aproxima-se do valor teórico proposto para a constante de velocidade.

8. Seguindo o mesmo princípio, uma **reação de ordem zero**, onde a velocidade independe da concentração do reagente, pode ser avaliada como representado na Figura 5, e com valor calculado de k como consta na Figura 6.

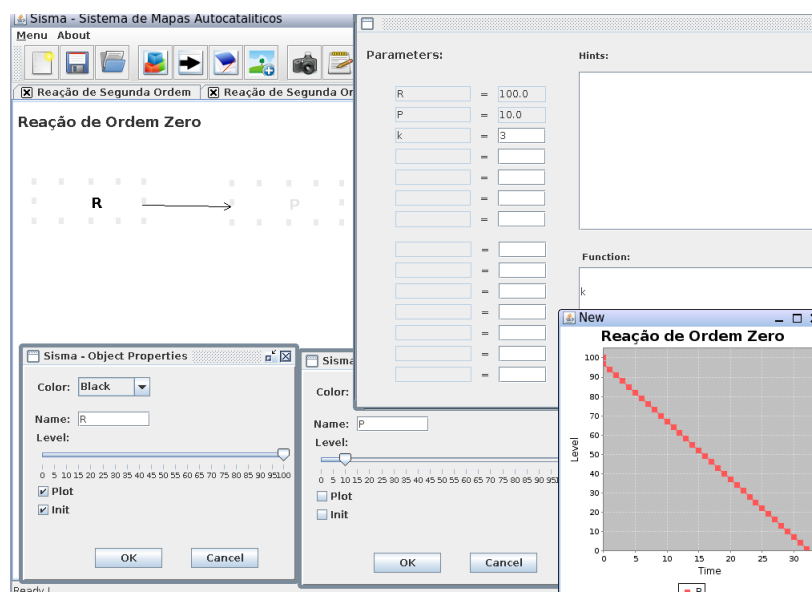


Figura 5: Janelas indicativas da configuração de objetos e caminhos para uma reação de ordem zero. Observe os níveis e caixas selecionadas, bem como linearidade resultante do decréscimo constante de R.

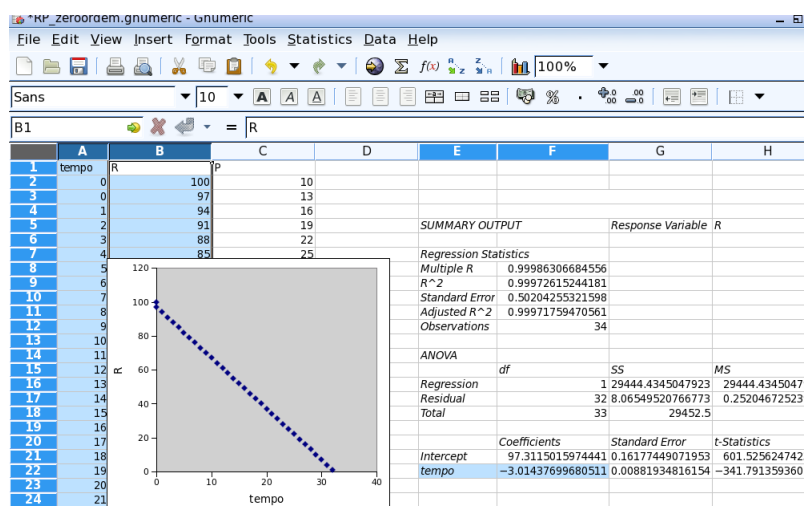


Figura 6: Resultado gráfico e de ajuste linear para uma reação de ordem zero. Note como o valor calculado pela inclinação aproxima-se do valor teórico proposto para a constante de velocidade.

2 Enzimas

- O metabolismo é composto por uma diversidade ampla de enzimas que catalizam reações específicas e são da mesma forma moduladas em sua atividade. Num modelo generalizado, contudo, qualquer operação enzimática pode ser resumida como na Figura 7:

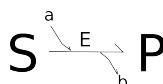


Figura 7: Esquema geral para ação de uma enzima. S-substrato, P-produto, E-enzima, a-cofatores, efetores, coenzimas, b-efetores, coenzimas.

10. Dessa forma, é possível simular conversões enzimáticas no Sisma utilizando-se sequências autocatalíticas variadas, como as exemplificadas na Figura 8

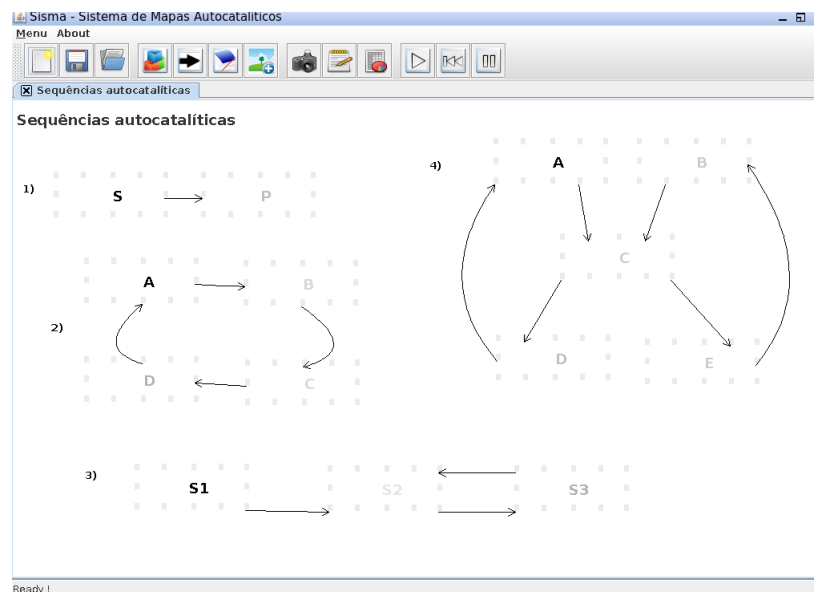


Figura 8: Alguns exemplos de sequências autocatalíticas entre substratos e produtos.

3 Equação de Michaelis-Menten

11. O comportamento cinético de uma reação na presença de uma enzima envolve etapas que a torna distinta de uma reação de primeira, segunda ou de zero ordem, embora seus componentes estejam presentes em função da concentração de um substrato ou de substratos múltiplos. Embora a enzima como catalizador não seja modificada, ela participa da reação como segue, e na qual cada taxa de reação pode ser representada por uma constante de velocidade de 1a. ordem:



12. O formalismo para dedução da cinética de reações enzimáticas leva em conta certas premissas, como o baixo consumo de "S" e a constância do complexo "ES" (**estado quase estacionário**). A aproximação do estado estacionário de Briggs-Haldane prevê que a taxa de formação do complexo ES seja igual a sua desconstrução, o que faz com que ES permaneça constante ao longo da reação.
13. É possível simular essa condição no Sisma até um determinado limite, como pode ser ilustrado pela Figura 9. A simulação foi executada em *speed* máximo para as três reações, e com valores das constantes de velocidade de: $k_1=0.1$, $k_2=0.05$ e $k_3=0.05$. Os teores das espécies foi ajustado para: $S=100$, $ES=70$ e $P=0$, e todos clicados para inicialização simultânea (*Init*).

Estado Estacionário Para ES

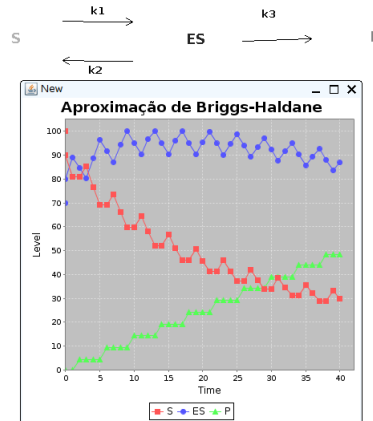


Figura 9: Simulação de aproximação do estado estacionário de Briggs-Haldane. Parâmetros: $k_1=0.1$, $k_2=0.05$, $k_3=0.05$. Todos os objetos foram ajustados para inicialização simultânea.

14. Observe que o teor de ES mantém-se estável por determinado período, enquanto ocorre a formação de ES balanceada com sua decomposição (conversão de ES para P e reversão de ES para S). Essa situação não se mantém ao longo de toda a simulação pois, diferentemente do que ocorre experimentalmente, o desenho envolve um alto consumo de substrato ($k_1=0.1$) cuja taxa se equilibra com uma formação branda de produto ($k_3=0.05$) e a dissociação do complexo ES ($k_2=0.05$), para melhor visualização.
15. Numa situação real, a quantidade de ES inicia-se nula, diferente da proposta para o simulador. Isso ocorre porque a reação que forma ES é instantânea, o que no simulador inviabilizaria sua observação. Perceba que os valores somados de k_2 e k_3 propostos igualam-se ao de k_1 . Isso foi intencional, pois dessa forma obtém-se o estado estacionário por determinado período, uma vez que a taxa de formação de ES iguala-se a taxa de decomposição de ES. Exercite essa simulação atribuindo outros valores para as constantes de velocidade e perceba que as curvas mudam drasticamente.
16. Dentro dessa aproximação do estado estacionário para ES, o valor de k_3 e k_2 também serão menores do que k_1 . Isso decorre da barreira energética maior para uma reação química à formação do produto, do que a de ligações fracas diretoras da adsorção de substrato à enzima.
17. Mas por que o teor de ES não se mantém estável por mais tempo? Observe que na Figura 9 não se faz menção à enzima na formação do complexo ES. Dessa forma, para aproximar a simulação do esquema da Equação 3, deve-se incluir a enzima livre, como na Figura 10):

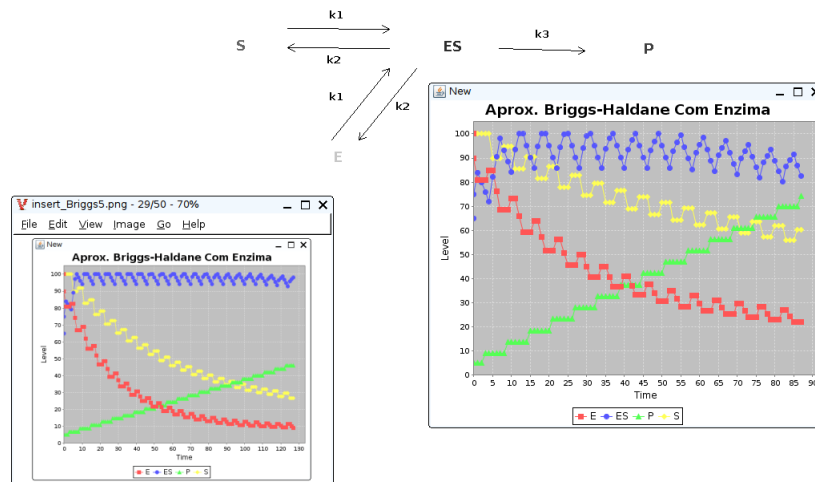


Figura 10: Simulação de aproximação do estado estacionário de Briggs-Haldane, com inclusão da enzima livre. Parâmetros: $k_1=0.1$, $k_2=0.05$, $k_3=0.05$. A imagem menor à esquerda representa o mesmo esquema, mas com valores de $k_2=k_3=0.02$. Todos os objetos foram ajustados para inicialização simultânea.

18. Observe agora pelo gráfico maior da Figura 10, que a permanência do teor de ES (estado estacionário) perdurou por duas vezes mais em relação ao esquema da Figura 9. E veja também que reduzindo-se o valor de k_2 e k_3 para 0.02 obtém-se maior estabilização ainda para ES (canto inferior da Figura 10). Em ambas as situações a enzima livre E sofre decaimento decorrente da diferença entre as constantes de velocidade k_1 e k_2 .

4 Curva de Michaelis-Menten e obtenção dos parâmetros cinéticos.

19. As constantes k_1 , k_2 e k_3 podem ser reunidas numa constante única para as taxas de reação, a **constante de Michaelis-Menten**, **K_m** , de forma que:

$$K_m = \frac{k_1 + k_3}{k_2} \quad (4)$$

20. Dessa forma, a função que melhor define o comportamento padrão de uma enzima, e que é deduzida a partir da aproximação do estado estacionário para " ES ", é a **equação de Michaelis-Menten** (Equação 5). Por tal razão, essa é a opção padrão (*default*) do Sisma quando se insere um novo caminho (*path*).

$$v = \frac{V_m * S}{K_m + S} \quad (5)$$

21. A equação de Michaelis-Menten descreve uma cinética hiperbólica no tempo, como pode ser representado na Figura 11, e que também fornece os parâmetros para seu desenho, a **velocidade máxima (limite) da reação** ou **V_m** , e a **constante de Michaelis-Menten**, **K_m** . Perceba que a opção de zerar o valor de " P " faz com que este não apareça na tela principal ao início da simulação.

22. Experimente reduzir o teor de S e verifique como fica a simulação é abreviada, simulando o efeito cinético devido a menor concentração de substrato disponível à enzima.

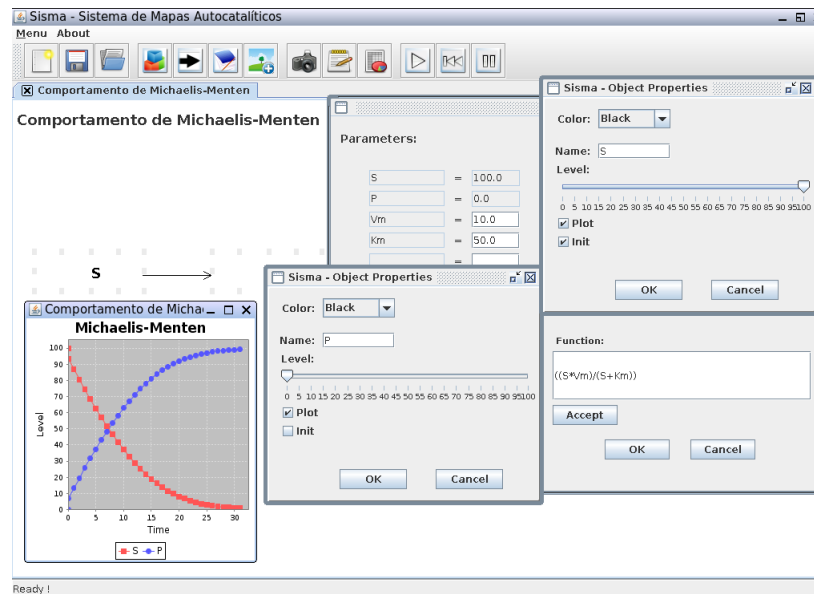


Figura 11: Exemplo de uma reação enzimática pela equação de Michaelis-Menten.

23. A equação supra possui uma forma direta de representação, o gráfico de " S " *versus* " v ", **velocidade inicial** da reação, ou simplesmente gráfico de Michaelis-Menten.
24. O método padrão para se obter uma curva de tal natureza é um tanto trabalhoso, pois faz-se necessário simular a formação de " P " no tempo em vários níveis de " S " (concentrações de substrato). Obtidas essas curvas, provê-se o valor de " v " a partir da inclinação inicial de cada simulação e só aí plota-se os pontos de " S " inicial *versus* " v " obtido. A partir dessa representação, obtém-se os parâmetros de Michaelis-Menten, " V_m " e " K_m ".

5 Tratamento de dados.

5.1 Pela determinação de substrato e velocidade instantâneos.

25. Uma forma alternativa e simplificada para se obter a curva direta de Michaelis-Menten consiste basicamente em se calcular os valores instantâneos de substrato consumido e velocidade em cada intervalo de tempo.
26. Para o Sisma essa técnica torna-se bastante útil pois transforma os dados cinéticos de S no tempo para S *instantâneo* e v *instantâneo*. Dessa forma, é possível analisar curvas convencionais de cinética enzimática, como o gráfico de Michaelis-Menten apresentado a seguir, bem como suas linearizações e funções não lineares decorrentes.

27. Para obter os dados de S e v instantâneos a partir de S somente, você deve obter inicialmente os dados de decaimento de "S" no tempo (**curva progressiva**), tal como representado na Figura 12:

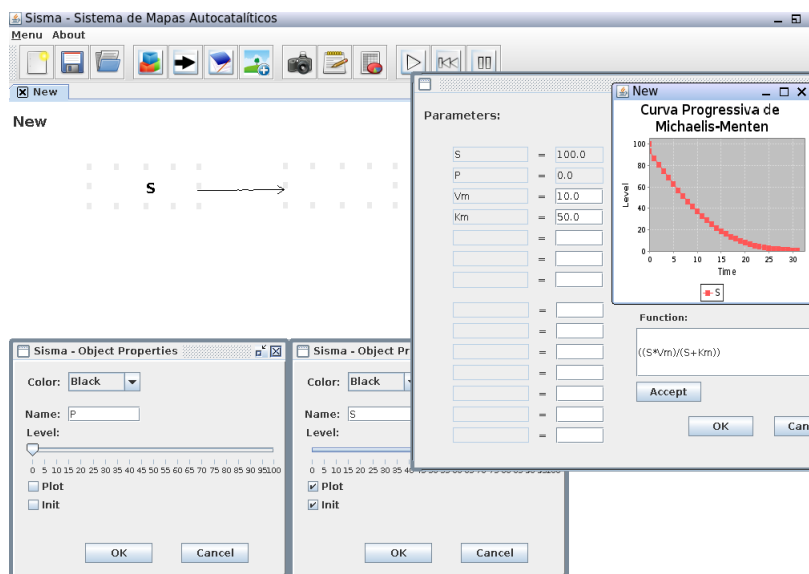


Figura 12: Decaimento de substrato pela equação de Michaelis-Menten. Observe os valores dos parâmetro cinéticos.

28. Exporte os dados, copiando-os e colando-os para uma planilha e proceda os cálculos de S instantâneo e v instantâneo como segue:
29. Ao lado da coluna de "S" da planilha, copie a mesma coluna de "S", só que descontada sua 1a. linha (Figura 13). Atribua às colunas as etiquetas "Si" e "Sj". Considere S_m como a concentração de S no intervalo de tempo em que cada ponto da curva é gerada no Sisma (S instantâneo). Dessa forma, S_m equivalerá à média entre Si e Sj, ou seja, $(Si+Sj)/2$. Para a v instantânea, nomeie uma coluna como "v", e calcule a velocidade como dS/dt . Isso é bem simples pois, como o intervalo de tempo entre dois pontos (Si e Sj) no Sisma é de 1 s, basta calcular v pela diferença entre Si e Sj ((Figura 13).

A	B	C	D	E
t	Si	Sj	Veloc. instantânea $v = (Si - Sj) / dt = dS/dt$	Substr. instantâneo $S_m = (Si + Sj) / 2$
0	100	93.3333333333333	6.66666666666667	96.6666666666667
1	86.8217054263566	80.4760963612008	6.51162790697674	90.077519379845
2	80.4760963612008	74.3082159137036	6.16788044749718	77.3921561374522
3	74.3082159137036	68.3304761989538	5.97773971474977	71.3193460563287
4	68.3304761989538	62.5559303343646	5.77454586458919	65.4432032666592
5	62.5559303343646	56.9981662833251	5.55776405103957	59.7770483088448
6	56.9981662833251	51.6711435629172	5.32702272040786	54.3346549231211
7	51.6711435629172	46.588959793543	5.0821837693742	49.1300516782301
8	46.588959793543	41.7655348500374	4.82342494350555	44.1772473217902
9	41.7655348500374	37.2142035775406	4.55133127249685	39.489869213709
10	37.2142035775406	32.9472147097865	4.26698886775411	35.0807091436635
11	32.9472147097865	28.9751446619782	3.97207004780828	30.961179685824
12	28.9751446619782	25.306250507242	3.66889415473626	27.1406975846101
13	25.306250507242	21.9458056123247	3.36044489491723	23.6260280597833
14	21.9458056123247	18.8954810763013	3.05032453602344	20.420643344313

Figura 13: Colunas exportadas do Sisma (t, Si), bem como as processadas para a determinação de "S" e "v" instantâneos.

30. Agora basta montar o gráfico de " S_m versus "v" para a representação direta de Michaelis-Mentem (Figura 14).

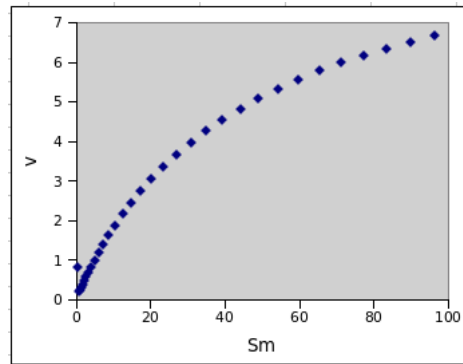


Figura 14: Gráfico direto de Michaelis-Menten referente aos dados obtidos pela simulação da Figura 11 após obtenção de S e v instantâneos (Yun & Suelter, Biochim. Biophys Acta, 480 (1), 1977).

31. Observe que o gráfico é hiperbólico, embora não se tenha sua assíntota plenamente atingida. Isso é bastante comum nos ensaios cinéticos com enzimas e, por essa razão, a determinação de " V_m " (extrapolação assintótica da curva), e por conseguinte, de " K_m " (valor de " S " projetado à metade de " V_m "), torna-se dificultada.
32. Embora os parâmetros cinéticos possam ser determinados com auxílio de algoritmos de ajuste não linear, é comum na literatura os procedimentos de linearização para tal fim, dada a simplicidade do ajuste linear. Dentre as linearizações mais prementes em livros didáticos e mesmo publicações científicas, encontra-se o **gráfico duplo-recíproco (Lineweaver-Burk)**.
33. Para elaborar um gráfico duplo-recíproco e obter os parâmetros cinéticos, basta criar as colunas " $1/S_m$ " e " $1/v$ " na planilha e plotar o resultado (Figura 15.)

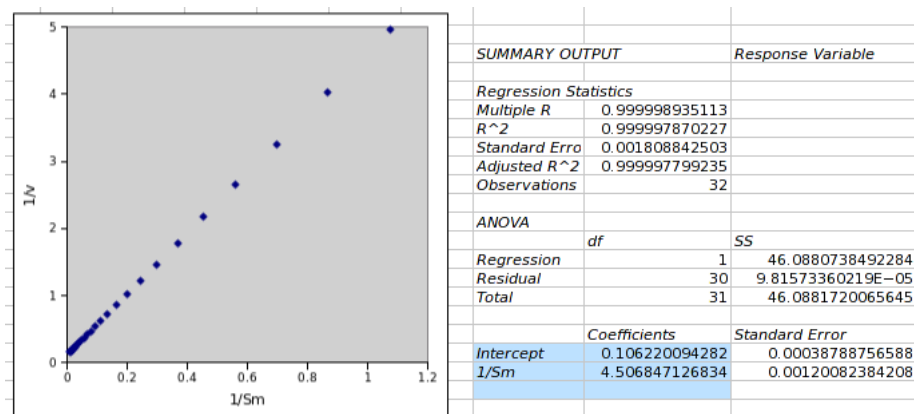


Figura 15: Gráfico duplo-recíproco (Lineweaver-Burk) referente aos dados da curva de Michaelis-Menten (Figura 14). As células marcadas representam o o valor do intercepto (" $1/V_m$ ", *intercept*) e a inclinação (" K_m/V_m ", $1/S_m$) do gráfico.

34. Obtido o ajuste, determinam-se os parâmetros cinéticos a partir do intercepto ($1/V_m$) e da inclinação (K_m/V_m) do gráfico. No exemplo dado os parâmetros resultam em $V_m=9,4$ e $K_m=42,4$, valores bem próximos do simulado ($V_m=10$, $K_m=50$, Figura 12).

35. Se desejável, uma **correção de erro** para possíveis **desvios da linearidade** no duplo-recíproco, pode ser efetuada convertendo-se o valor de Sm para Sm_{corr} , como segue:

$$Sm_{corr} = \frac{Sm}{\ln\left(\frac{S_i}{S_j}\right)} \quad (6)$$

5.2 Pela equação integrada de Michaelis-Menten

36. Uma forma alternativa para a obtenção dos parâmetros cinéticos a partir do valor do substrato consumido no tempo é dada pela forma integrada da equação de Michaelis-Menten. Essa ser definida como:

$$P = Vm * t - Km * \ln \frac{S_0}{S} \quad (7)$$

, Onde S_0 é o teor inicial de substrato

37. Linerizando-se a Equação 7 acima obtém-se:

$$\frac{P}{t} = Vm * \frac{\ln \frac{S_0}{S}}{t} * Km \quad (8)$$

38. Dessa forma, um gráfico de $\ln S/S_0 * 1/t$ versus P/t deverá fornecer o valor de Km como inclinação e Vm como intercepto.
39. Esse tratamento pode ser simulado no Sisma, montando-se uma reação $S \rightarrow P$ como acima, e atribuindo $Vm=10$ e $Km=50$. Após a simulação, coleta-se os dados, elabora-se o gráfico acima e calcula-se Vm e Km por ajuste linear, como representado na Figura 16.

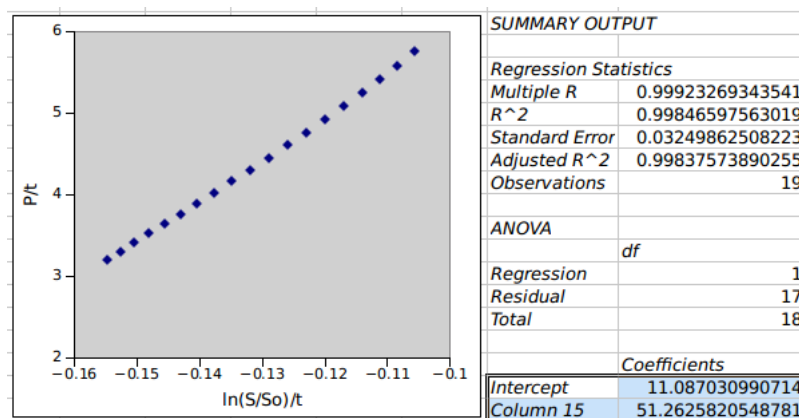


Figura 16: Resultado do ajuste linear para os dados de simulação ($Vm=10$, $Km=50$) pela equação integrada de Michaelis-Menten. Obs: o ajuste foi realizado com um subconjunto da faixa linear de pontos ($n=19$) da simulação.

40. Percebe-se pela Figura 16 a estreita proximidade entre o valor teórico e o encontrado no ajuste para Vm e Km . Não obstante, a regressão foi conduzida com

um subconjunto de pontos da faixa linear (19 pontos). Se tomados todos os pontos da simulação ($n=31$), sua distribuição se encaixaria melhor na curvatura representada na Figura 17

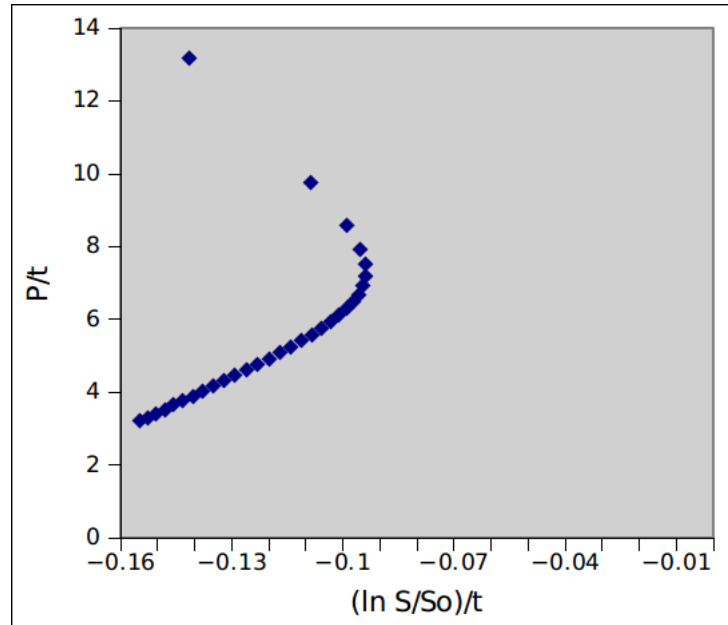
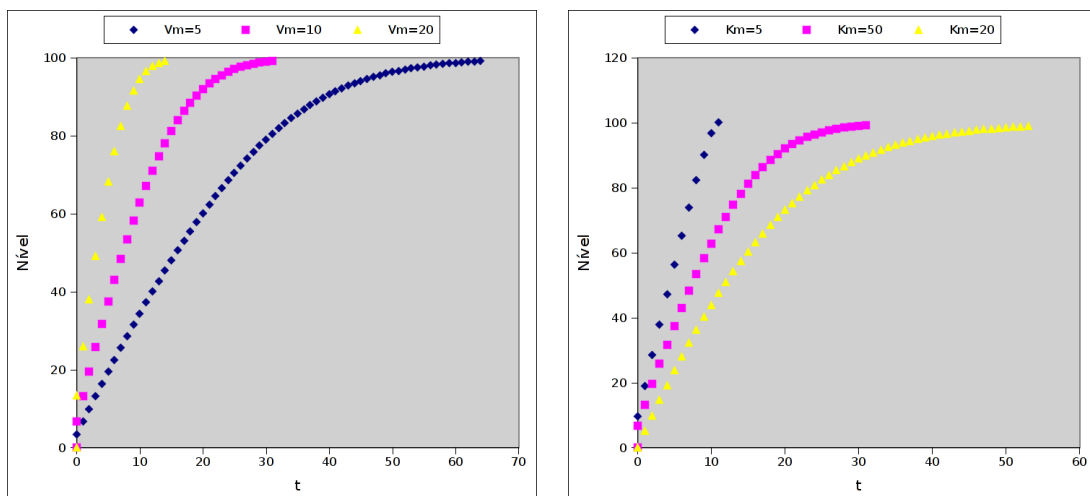


Figura 17: Distribuição de todos os pontos referentes à simulação da Figura 17 ($n=31$).

6 Os parâmetros cinéticos Km e Vm

41. Variando-se os valores de Km e Vm para a equação de conversão de S em P na simulação, é possível compreender com mais clareza o seu significado. Para isso, monte uma reação simples $S \rightarrow P$, e varie os valores dos parâmetros (ex: $V_m=5, 10$ e 20 ; $K_m=5, 50$, e 100) e observe o resultado das simulações (Figura 18).



(a) Variação em V_m (5, 10, 20) com $K_m=50$ (b) Variação em K_m (5, 50, 100) com $V_m=10$

Figura 18: Curvas progressivas obtidas com variação nos parâmetros cinéticos (a) V_m , and (b) K_m .

42. Como visto pela Figura 18, a atividade de uma enzima depende de ambos os parâmetros, K_m e V_m . Nesse sentido, uma enzima de excelência deverá possuir um baixo valor para K_m e alto para V_m . Isso define a **eficiência catalítica** de uma enzima, ou seja a razão V_m/K_m , ou **constante de especificidade**.
43. Veja que essa razão V_m/K_m também constitui o recíproco da inclinação de um gráfico linear de Lineweaver-Burk (Figura 15). Dessa forma, é possível utilizar essa representação gráfica na comparação da eficiência catalítica de enzimas.
44. É importante mencionar que o parâmetro adequado nessas medições é **kcat**, **constante catalítica**, a qual é obtida pela razão de V_m pela concentração da enzima. Por uma questão prática, pode-se equalizar nesses estudos V_m a k_{cat} presumindo uma concentração unitária para a enzima.
45. No entanto, também é possível verificar o efeito da concentração de enzima pelo simulador bastando alterar-se a Equação 5:

$$v = \frac{k_{cat} * E_o * S}{S + K_m} \quad (9)$$

46. Assim, variando-se E_o pode-se visualizar curvas de progresso mais rápidas ou mais lentas (Figura 19)

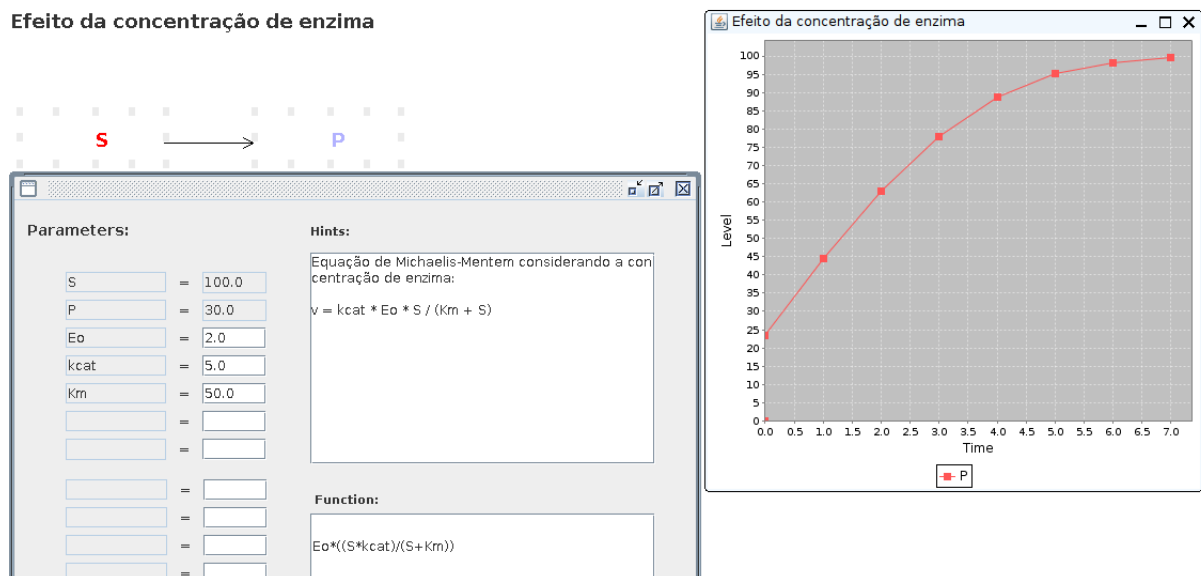


Figura 19: Exemplo de curva de progresso sob variação da concentração de enzima.

47. Uma enzima que exiba **proficiência catalítica** deverá possuir uma razão k_{cat}/K_m (no caso, V_m/K_m) numa faixa de 10^8 - 10^9 s^{-1} . Isso indica uma enzima que atinge sua capacidade máxima instantaneamente, com a catálise dependente apenas do encontro difusional entre substrato e enzima. Essa perfeição catalítica pode ser simulada no Sisma, selecionando-se para a mesma reação $S \rightarrow P$ acima, mas atribuindo valores extremos para V_m e K_m , por exemplo 1×10^7 e 0.1, respectivamente (Figura 20), e considerando $E_o=1$.

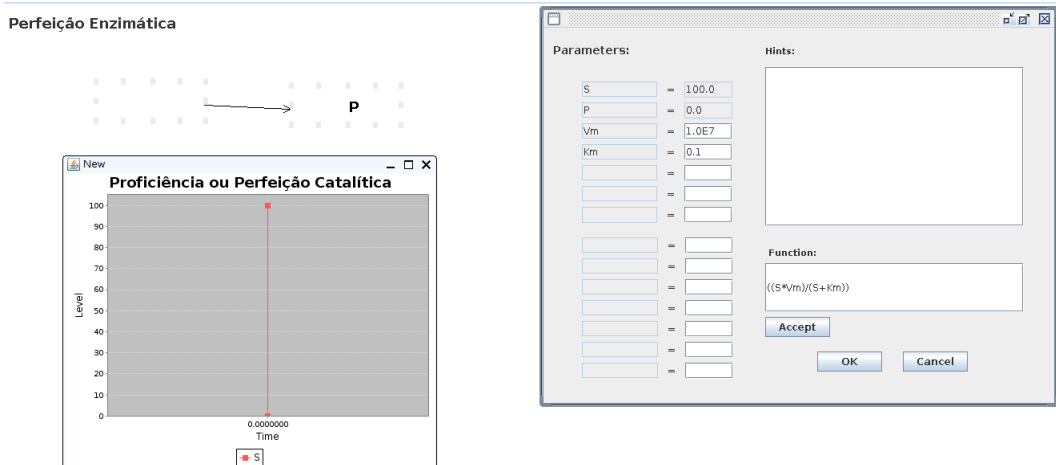
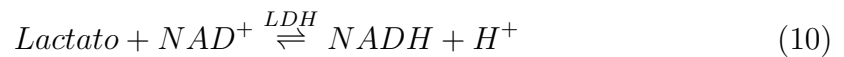


Figura 20: Exemplo de proficiência catalítica. Observe os valores de Vm e Km que resultaram na conversão instantânea de substrato.

7 Cofatores

48. Enzimas atuam comumente na presença de **íons**, geralmente metálicos, e/ou **coenzimas**, compostos orgânicos inseridos fortemente na estrutura proteica (**grupos prostéticos**) ou adsorvidos a essa (**cosubstratos**), como no exemplo abaixo:



, onde LDH representa a enzima *lactato desidrogenase* e NAD^+ o cosubstrato (coenzima).

49. O Sisma pode simular a ação de coenzimas sobre uma enzima alvo. Para tanto, é necessário montar um esquema um pouco mais complexo, como o representado na Figura 21.



Figura 21: Esquema reacional para o efeito de uma coenzima. Todos os compostos devem ser inicializados para a simulação, embora só interesse a visualização gráfica do produto. ES, ESco e P devem ser ajustados para nível zero antes da simulação.

50. A Figura 22 explicita as equações bem como os parâmetros necessários à simulação. Observando-se a sequência desses parâmetros, pode concluir-se que há uma rápida formação do complexo *ES* ($k1=50$) embora não se tenha sua

conversão para produto a uma taxa significativa ($k_2=1e-5$), permanecendo em alto teor até o final da reação. No entanto, a participação da coenzima na reação permite que sua interação com a enzima ($k_3=5$) forneça a energia necessária para a conversão do substrato a produto (K_m e V_m), completando a reação.

Figura 22: Equações e parâmetros para a simulação de reação enzimática dependente de uma coenzima (Figura 21).

51. Comparando-se a simulação para teores distintos da coenzima, a Figura 23 apresenta o gráfico de progresso resultante para a reação na presença de um alto teor de coenzima (A), e sob um teor baixo dessa (B).

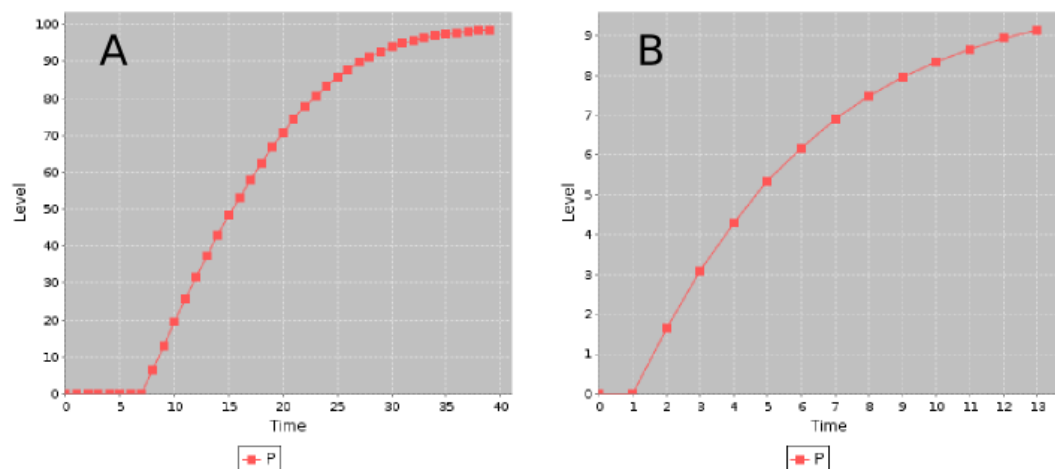


Figura 23: Resultado da simulação para uma enzima dependente de coenzima, tal como representado no esquema da Figura 21. Para demonstrar a necessidade do cosubstrato na reação, a coenzima está representada com nível 100 (A) e 15 (B).

52. Na prática, o formalismo de Michaelis-Menten só pode ser aplicado numa reação

$S \rightarrow P$ e, dessa, forma, não se pode utilizá-lo para esquemas complexos como os representados pela dependência de um cosubstrato.

53. É possível também observar uma fase *lag* entre o início da reação e o aparecimento do produto. Isso deve-se pelo baixo valor da constante k_2 na conversão de 1a. ordem de $Co \rightarrow ESc$. Elevando-se esse valor reduz-se a fase *lag* da curva (início).

8 Vitaminas

54. Da mesma forma que para coenzimas apresentado na seção anterior, é possível utilizar o Sisma para a visualização da dependência de uma vitamina que converte-se a uma coenzima, essa necessária à reação. A Figura 24 exemplifica essa reação.

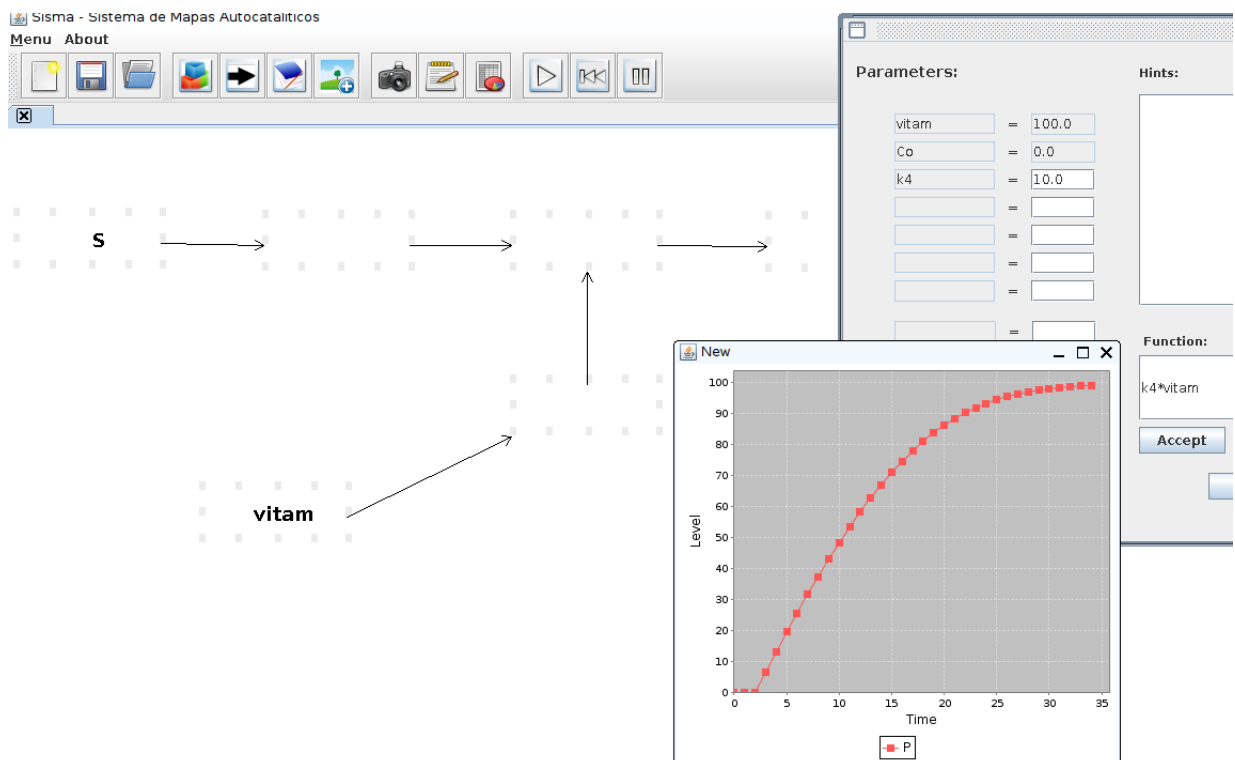
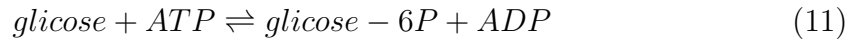


Figura 24: Representação da dependência de uma vitamina numa reação enzimática. O esquema apenas introduz a vitamina, a partir da reação apresentada na Figura 21.

9 Ajuste induzido

55. A cinética de Michaelis-Mentem sugere dois modelos principais para a ligação do substrato e sua conversão a produto: o **modelo chave-fechadura**, exemplificado nos itens anteriores, e o **modelo de ajuste induzido**. Nesse, a ligação do substrato à enzima promove uma mudança conformacional que resulta na forma ativa da enzima. Isso pode ser exemplificado na conversão da forma fechada (inativa) da hexoquinase para a forma aberta (ativa), induzida pelo substrato:



56. Uma ilustração da simulação acima pode ser observada na Figura 25. O esquema foi elaborado com as equações e parâmetros *default* do programa. Veja que a reação procede com a ligação inicial de substrato à forma fechada da enzima (HKclose), sucedendo-se sua conversão para a forma aberta (HKopen), e consequente liberação do produto.

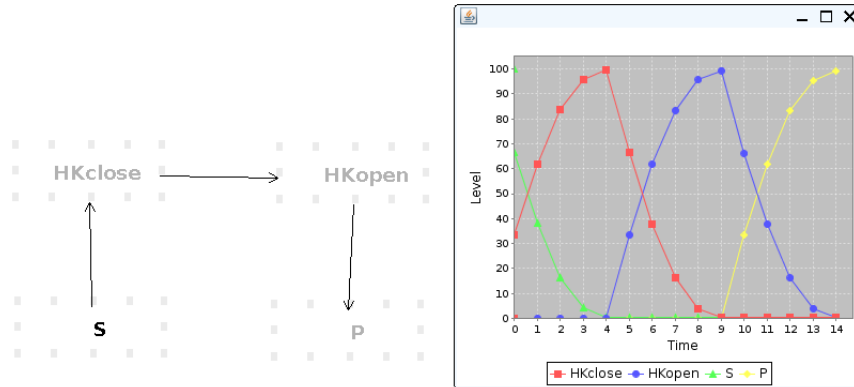


Figura 25: Ilustração de ajuste induzido. O produto é liberado somente após a conversão para a forma aberta da enzima, induzida pelo substrato. Para a simulação foram utilizadas as equações *default* do programa, $V_m=10$ e $K_m=50$.

10 Enzimas multiméricas

57. Para **enzimas multiméricas** o ajuste induzido pelo substrato e por outros ligantes também atua de modo regulatório, convertendo subunidades inativas em ativas. Nesse caso, o esquema reacional pressupõe um equilíbrio entre as formas tensa (T) e relaxada (R) de subunidades de uma enzima multimérica. Dessa forma, o aumento de S tende a converter a forma T inativa da enzima para a forma R capaz de formar o produto. Isso pode ocorrer de **forma sequencial**, modelo KNF (Koshland, Némethy e Filmer) ou de **forma simultânea** (em concerto), modelo MWC (Monod, Wyman e Changeaux). A Figura 26 exemplifica um equilíbrio $T \rightleftharpoons R$ em concerto (MWC).

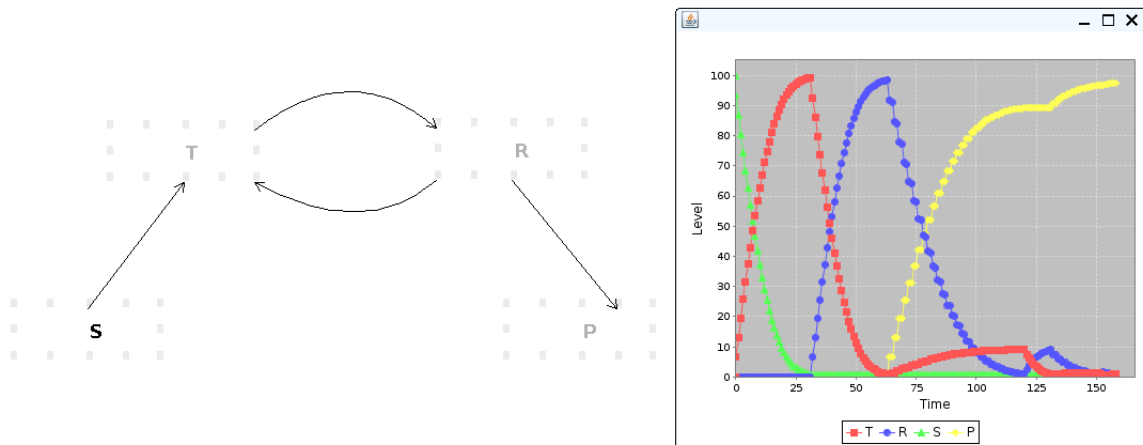


Figura 26: Ilustração para o equilíbrio $T \rightleftharpoons R$ em concerto (MWC) para uma enzima multimérica. Presupõe-se que todas as subunidades da enzima exibem ou forma T ou a forma R. Simulação elaborada com a equação padrão do programa, e os parâmetros $V_m=10$ e $K_m=50$, exceto para o *path* $R \rightarrow T$, onde $V_m=1$, o que resulta no perfil secundário de ascensão do produto.

58. Observe que o substrato liga-se à forma T das subunidade da enzima induzindo-as à forma ativa R simultaneamente (em concerto), com consequente formação do produto. Veja também que o escoamento da forma T não é total, consequência dos valores para as constantes de velocidade para o equilíbrio $T \rightleftharpoons R$, com $V_m=10$ para a reação direta e $V_m=1$ para a inversa. Dessa forma, uma pequena quantidade de T ainda converte-se a R ao final, resultando no segundo ombro da liberação de produto.
59. Uma simulação mais elaborada desses modelos pode ser exemplificada na Figura 27, que ilustra o modelo sequencial de KNF com o ajuste para as formas ativas das subunidades induzido pelo substrato. Nesse caso, perceba que os "dímeros" exibem as formas R e T de forma aleatória em suas cadeias (TR ou RT). Quando as subunidades interagem com o substrato, a enzima assume a forma ativa em ambas as subunidades RR.

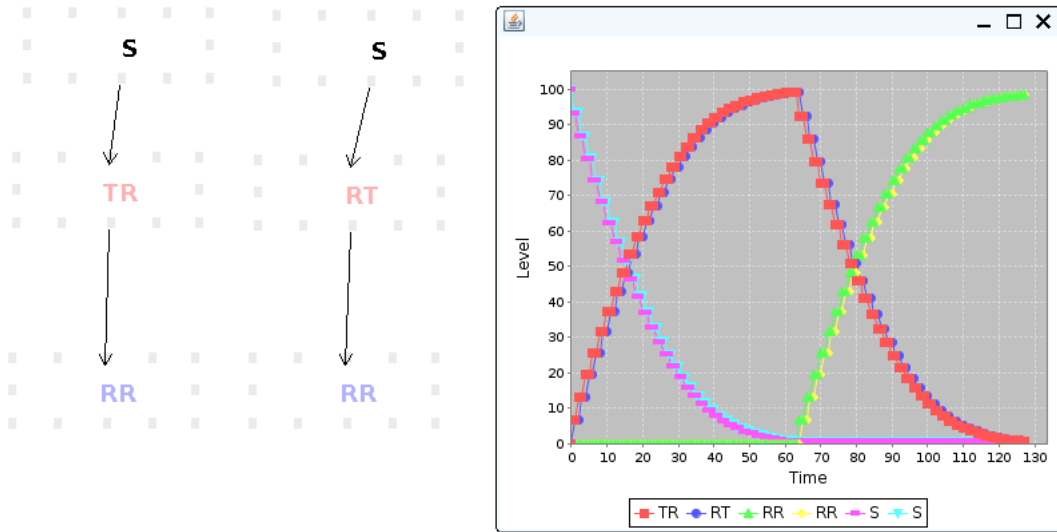


Figura 27: Simulação de um dímero enzimático para o modelo sequencial (KNF). A simulação foi elaborada com a equação padrão do programa, os parâmetros $V_m=10$ e $K_m=50$, e *Init* para ambos os substratos. Por praticidade, o equilíbrio $T \rightleftharpoons R$ foi omitido em cada subunidade.

60. Note que na simulação o substrato converte ambas as formas diméricas da enzima (TR e RT) para seu estado ativo (RR). Nesse caso, o gráfico de progresso mostra a ascensão das formas ativas acompanhada pela redução das inativas, e em decorrência da ativação pelo substrato.

11 Modificação covalente.

61. Outra forma similar de regulação enzimática para a transição $T \rightleftharpoons R$ consiste na **modificação por ligação covalente**, geralmente por fosforilação ou defosforilação, embora não haja preferência de uma ação ou outra por qualquer das formas. A Figura 28 ilustra um diagrama simples para a inativação de piruvato desidrogenase por fosforilação mediada por ATP. Observe que a forma ativa da enzima (PyrDH) reduz-se progressivamente com a fosforilação por ATP, sucedendo-se a conversão à forma inativa da enzima (PyrDHP) e liberação de ADP. Como mencionado, esse esquema constitui apenas uma ilustração da reação proposta, uma vez que não há conversão autocatalítica de ATP para PyrDH, e tampouco de PyrDHP para ADP.

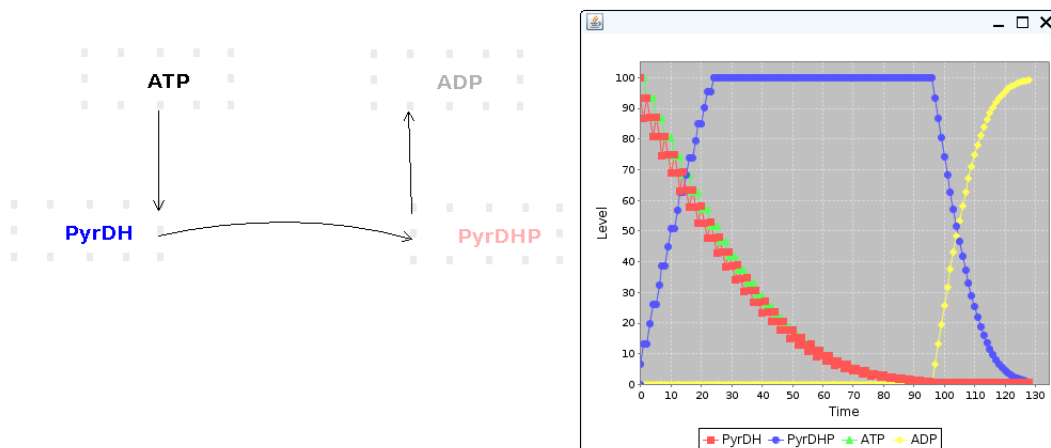


Figura 28: Simulação para a inativação de piruvato desidrogenase por fosforilação. Para todos os *path*, equação padrão com $V_m=10$, $K_m=50$.

12 Enzima alostérica

62. Compostos podem ligar-se a enzimas em **sítios alostéricos ou regulatórios** distintos do sítio ativo, levando a transições conformacionais que resultam na mudança da atividade enzimática. Isso pode ocorrer tanto para o substrato, como explicado acima, como para moléculas variadas. Dessa forma, **efetores alostéricos** podem ser considerados ativadores ou inibidores de uma enzima, participando de sua regulação.
63. A ação de um **ativador alostérico** pode ser simulada no Sisma como representado no gráfico de progresso da Figura 29, que também compara a cinética do produto formado na ausência do efetor (dados exportados para planilha).
64. É importante que se tenha em mente que, embora o simulador apresente uma conversão do efetor Ef para o produto P como num mapa autocatalítico, tal como proposto para o Sisma, esse fenômeno não ocorre de fato.
65. Outra observação importante é que a conversão dos dados no tempo para o *tratamento de velocidade instantânea* descrito ao item 28 para S e v não deve resultar em qualquer diferença entre a enzima controle e aquela sob efeito do efetor alostérico, portanto não incidindo sobre os valores de V_m ou K_m . Isto ocorre porque a equação que define a cinética entre o substrato e o produto não é modificada pelo efetor. Apenas ocorre uma aceleração (ativador) ou retardo (inibidor) na formação do produto, como representado na Figura 29.

Efetor Alostérico Positivo

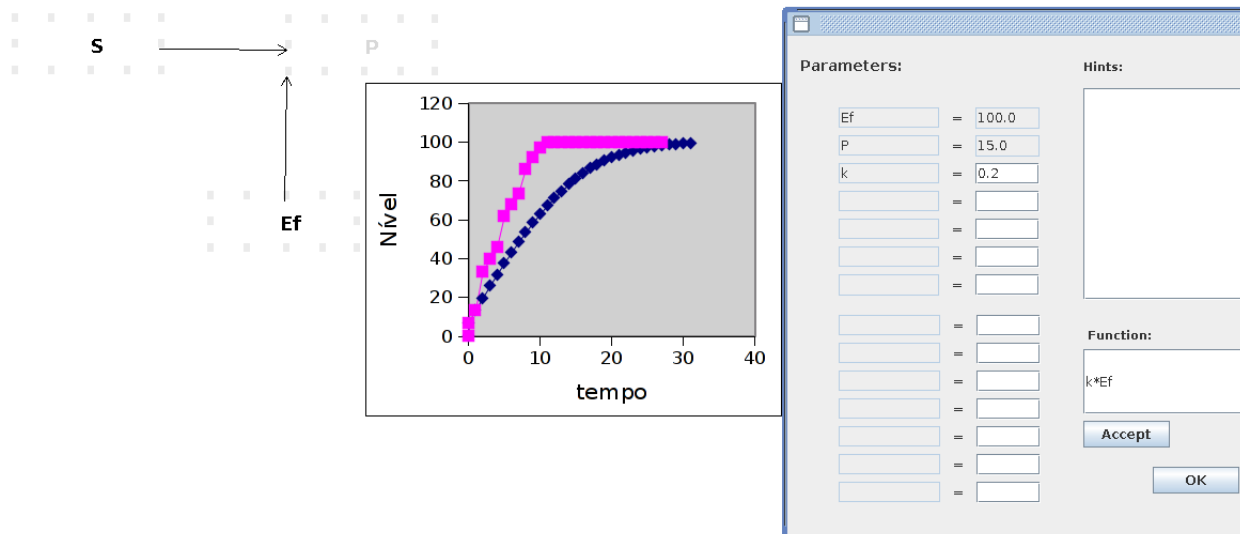


Figura 29: Efeito de um ativador alostérico (rosa) no tempo. A equação de 1a. ordem sobre o efetor é apenas figurativa, uma vez que não há processo cinético real de conversão do efetor para o produto da reação, mas sua influência sobre a geração desse. A curva controle foi produzida utilizando-se a equação de Michaelis-Menten com $V_m = 10$ e $K_m = 50$.

66. Isso pode ser comprovado se tentarmos aplicar o *método das velocidades instantâneas* descrito acima para obter a curva de Michaelis-Menten. Veja pela Figura 30 que as curvas obtidas na ausência e presença do ativador se sobrepõem.

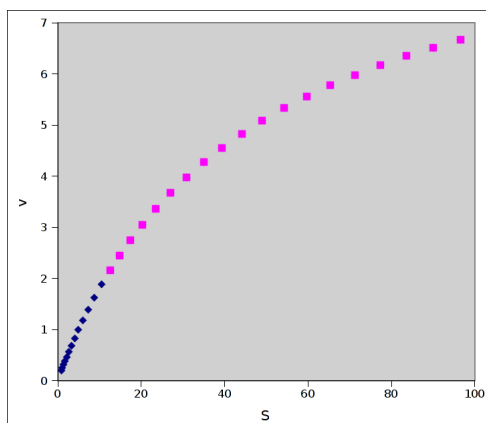


Figura 30: Curva de Michaelis-Menten para enzima controle (azul e sobreposta) e enzima na presença de um ativador alostérico (rosa). Essa sobreposição decorre dos valores de K_m e V_m que permanecem inalterados na presença do efetor.

67. Um **inibidor alostérico** também pode ser simulado, bastando-se alterar o valor da constante na equação do efetor, como representado na Figura 31 abaixo.

Efator Alostérico Negativo

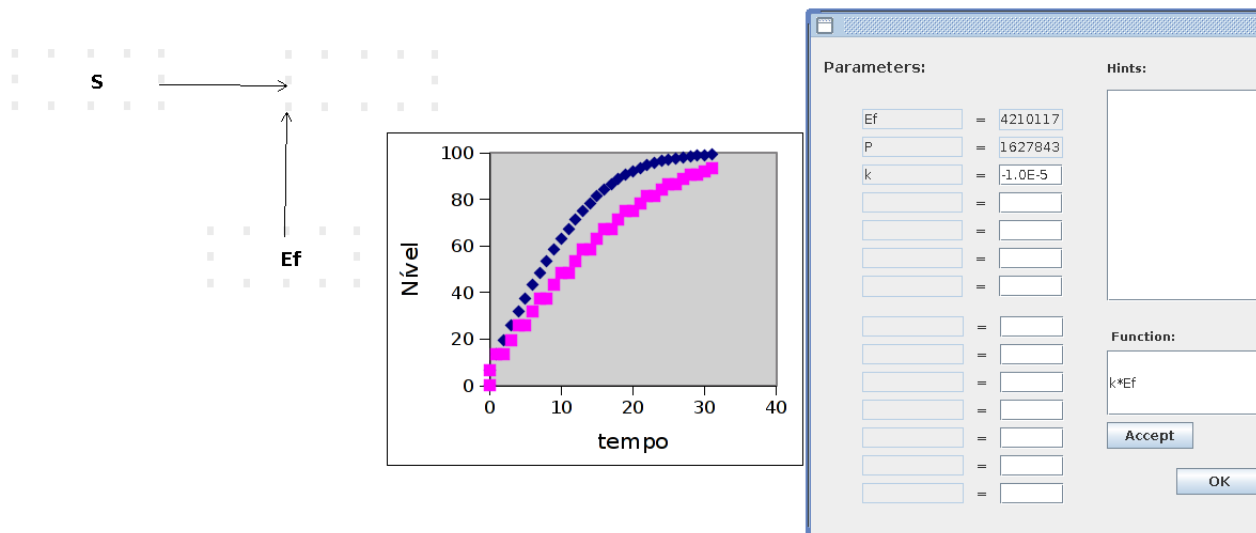


Figura 31: Efeito de um inibidor alostérico (rosa) no tempo. A equação de 1a. ordem sobre o efator é apenas figurativa, uma vez que não há processo cinético real de conversão do efator para produto. Observe o valor negativo da constante para o efeito de redução da atividade enzimática. A curva controle foi produzida utilizando-se a equação de Michaelis-Menten com $V_m = 10$ e $K_m = 50$.

68. Como forma alternativa, e mais simples, para a simulação de um efator alostérico, pode-se também aplicar a equação de Michaelis-Menten somente, porém com um fator multiplicador ao final. Assim, para um *ativador*, o fator deverá ser maior que a unidade, e para um *inibidor*, menor que essa.
69. Um efator alostérico bastante comum no metabolismo é o próprio substrato da enzima, levando à **inibição por excesso de substrato**. A função que define esse efeito é dada por:

$$v = \frac{V_m}{1 + \frac{K_m}{S} + \frac{S}{K_i}} \quad (12)$$

70. A inibição pelo substrato pode ser simulada no Sisma pela introdução da Equação 19, tal como exemplificado na Figura 32:

Efeito da concentração de enzima

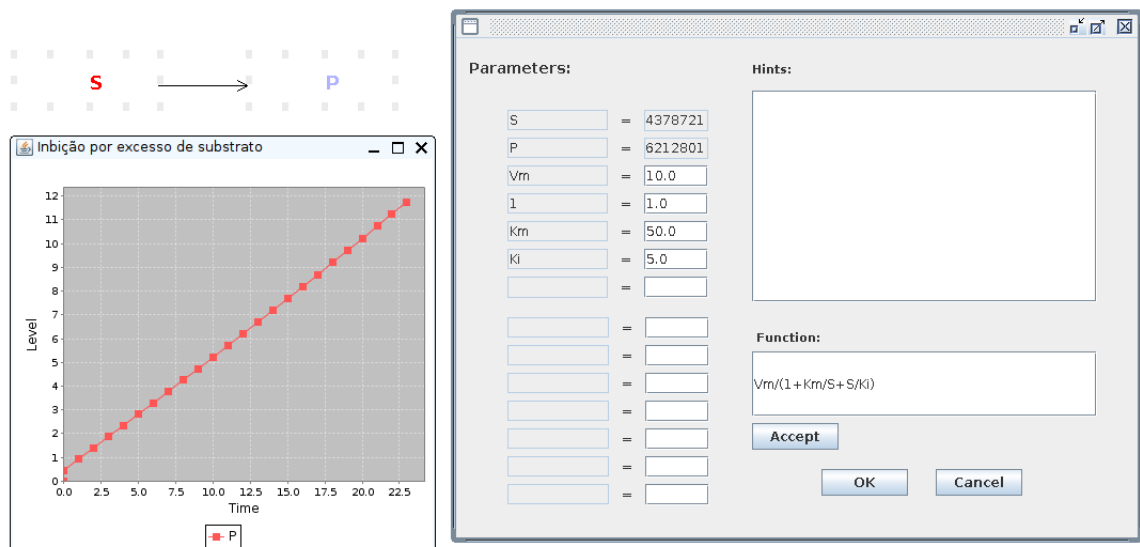


Figura 32: Exemplo de Inibição por excesso de substrato.

13 Cooperatividade

71. Enzimas alostéricas podem exibir atividades distintas em função de sua interação cooperativa com moléculas de substrato ou outros ligantes. Assim, a enzima apresenta-se na forma T na ausência de substrato, mas converte-se progressivamente à forma R com a ligação sucessiva de moléculas desse em suas subunidades. A função geral que define o comportamento de cooperatividade na atividade enzimática, *equação de Hill*, é dada por:

$$v = \frac{V_m * S^{n_H}}{K_s^{n_H} + S^{n_H}} \quad (13)$$

, onde n^H representa um índice de cooperatividade (Hill) e K_s a constante de dissociação do complexo ES. Conceitualmente, o parâmetro K_s pode ser considerado como K_m quando n_H for igual à unidade, ou uma aproximação desse, para valores de n_H distantes dessa.

72. O Sisma também pode simular o efeito de cooperatividade. Na introdução de uma função com uma ativação por cooperatividade, basta introduzir a Equação 13 convertendo o expoente como produto da quantidade desejada. Exemplificando, para S^n deve-se fazer $S * S$ n vezes.
73. Ilustrando o efeito de cooperatividade, monte e execute o diagrama reacional da Figura 33. Perceba que a curva de progresso resultante atinge a assíntota mais rapidamente do que na ausência do efeito cooperativo (curva de uma enzima não alostérica). Ressalta-se, portanto, que a função de Michaelis-Menten, por si, não é capaz de explicar o comportamento alostérico e, por consequência, cooperativo de uma enzima.

Cooperatividade

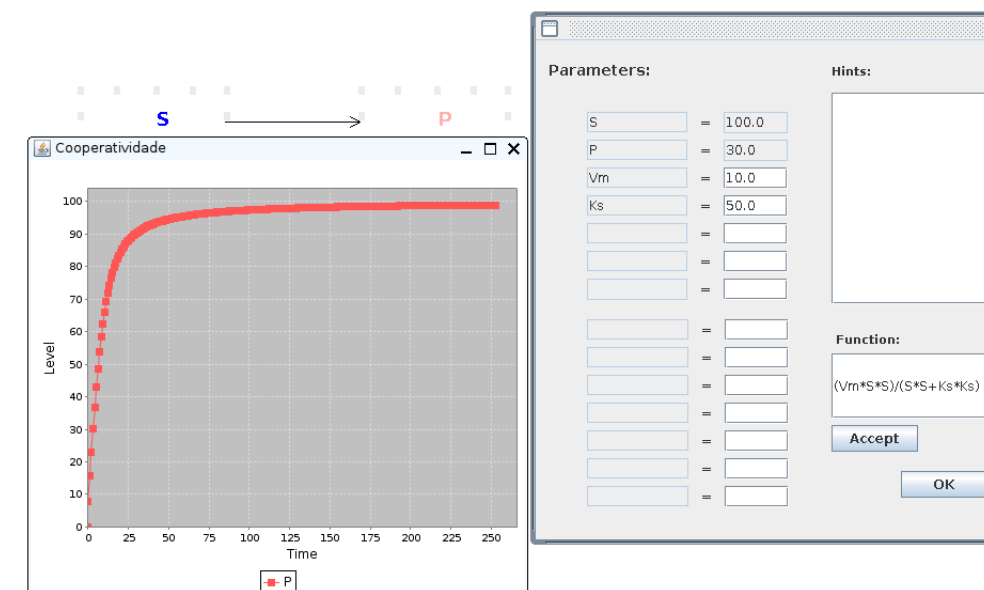


Figura 33: Simulação para o efeito de cooperatividade positiva para uma enzima alostérica ($n_H=2$). Perceba que a equação representa uma função de Michaelis-Menten com S e K_s elevados ao segundo expoente, de acordo com a Equação 13.

74. Convertendo-se os valores da curva de progresso para velocidade instantânea, como já explorado, pode-se visualizar o efeito da cooperatividade positiva. Nesse caso, para uma ilustração mais robusta, a Figura 34 apresenta os resultados dessa transformação a partir de simulações com distintos valores para K_s (50 e 100), e em duas representações diferentes: gráfico direto de Michaelis-Menten gráfico e duplo-recíproco.
75. Observe que no gráfico direto (Figura 34A) um teor crescente de substrato é necessário para converter a enzima em sua forma ativa (equilíbrio $T \rightleftharpoons R$), elevando por consequência sua taxa de reação. A Figura 34B representa o gráfico duplo-recíproco curvilíneo resultante. Pode-se verificar também que o valor crescente de K_s impacta fortemente no duplo-recíproco.

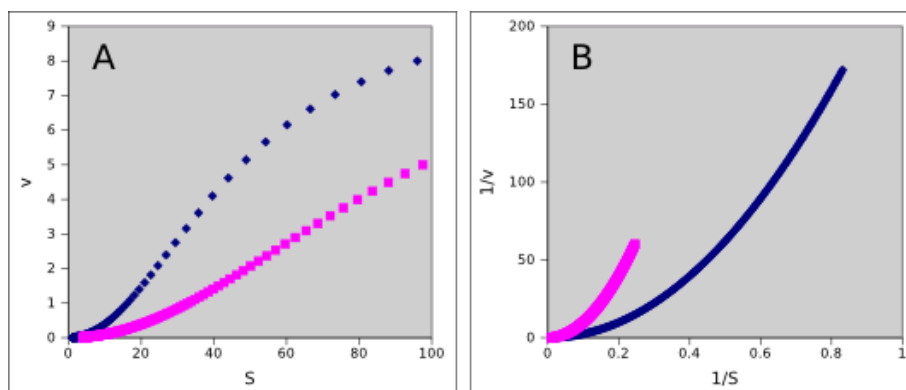


Figura 34: Cooperatividade apresentada por uma enzima alostérica com valor de $n_H=2$, tal como obtido a partir da transformação para velocidade instantânea dos dados exportados da Figura 33. A - gráfico direto. B - gráfico de Lineweaver-Burk.

76. Uma representação quantitativa da cooperatividade reside na **linearização da Equação 13 de Hill** acima, e subsequente determinação do valor de seu índice, n_H :

$$\ln\left(\frac{v}{V_m - v}\right) = n_H * \ln S - n_H * \ln K_s \quad (14)$$

, Onde K_s representa uma constante de dissociação, originalmente deduzida a partir de estudos de ligação de oxigênio a hemoglobina.

77. Para um modelo cooperativo puro a inclinação do gráfico resultante representa o índice de cooperatividade de Hill (n_H). Assim, tomando-se como exemplo os dados de cooperatividade para $K_s=100$ e $V_m=10$ do exemplo acima (Figura 34, perfil rosa), a linearização de Hill para a Equação 13 resulta na Figura 35 abaixo.

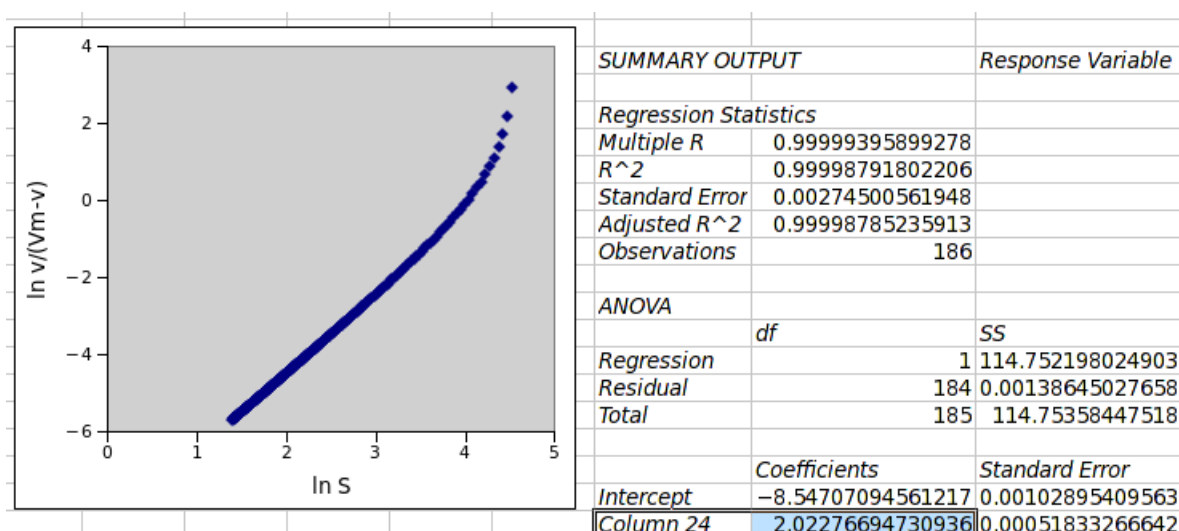
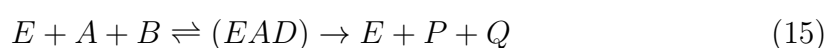


Figura 35: Gráfico de Hill e determinação do índice de cooperatividade homônimo para o exemplo da Figura 34, com $V_m=10$ e $K_s=100$ (dados da curva de progresso convertidos pelo método de velocidades instantâneas).

78. Para se determinar o parâmetro de cooperatividade de Hill, n_H , basta obter-se a inclinação da curva resultante na faixa linear. No caso, esse valor foi de 2,02 ($n=186$, Figura 35), muito próximo portanto do esperado a partir da equação de velocidade inserida com expoente quadrático para S (Equação 13, Figura 33). Complementarmente, pelo intercepto da curva extrai-se o valor da constante dissociação do modelo. Para o exemplo (Figura 35), $K_s=68,8$, relativamente próximo do valor teórico ($K_s=50$) oferecido à simulação.

14 Substratos múltiplos

79. Algumas reações enzimáticas dependem de mais de um substrato para realizar-se. Exemplificando, a reação 15 abaixo envolve a conversão de dois substratos, A e B, nos produtos, P e Q.



80. Essa reação de bisubstrato pode ocorrer num **modelo sequencial** (ordenado ou aleatório), ou num **modelo ping-pong**. Esses modelos também podem ser representados no Sisma. Para tanto, pode-se utilizar as equações *default* de Michaelis-Menten, sem qualquer alteração, uma vez que se busca sua observação dinâmica, mais do que seu formalismo cinético.
81. Dessa forma, ilustrando para o *modelo sequencial*, monte o esquema da Figura 36 abaixo, zerando o nível dos compostos, exceto para E, A e B. E aloque uma inicialização simultânea para esses (E, A e B). Se quiser representar a reação mais rapidamente, aloque a barra de rolagem de todos os *path* para a velocidade mais alta.

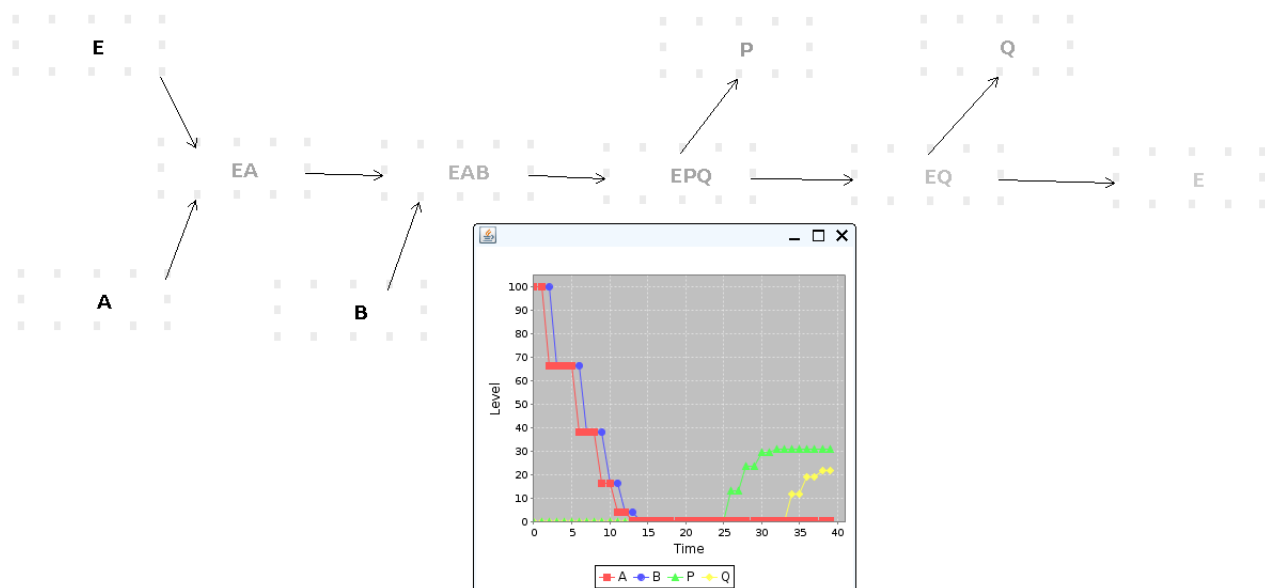


Figura 36: Reação de bisubstrato para um modelo sequencial ordenado. Todos os substratos (A e B) são ligados à enzima antes da liberação dos produtos (P e Q). Para reproduzir o gráfico de progresso, selecione para *Plot* apenas A, B, P e Q, mantenha as equações e parâmetros padrão do programa, mas altere o valor de V_m para 20 em $EPQ \rightarrow P$ e $EQ \rightarrow Q$.

82. Uma ilustração curiosa para o modelo sequencial pode ser pensada de modo iterativo, com conversão dos produtos a substratos, tornando a via cíclica. Isso é comum no metabolismo, e pode ser exemplificado para o Sisma bastando-se unir cada produto a seu substrato, concomitante à recuperação da enzima. A Figura ?? ilustra o esquema reacional, enquanto que a Figura ?? apresenta o resultado para uma simulação de 30 minutos.

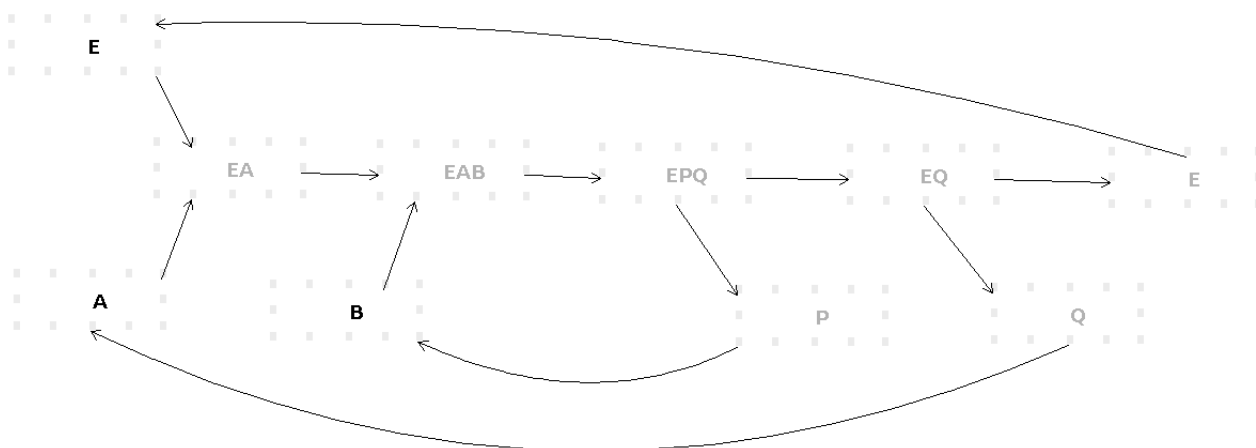


Figura 37: Diagrama reacional para ciclização do esquema sequencial apresentado na Figura ??.

83. Perceba que ocorre uma estabilização dos níveis dos produtos após um período de tempo, simulando o que ocorre em reações mais complexas na célula.

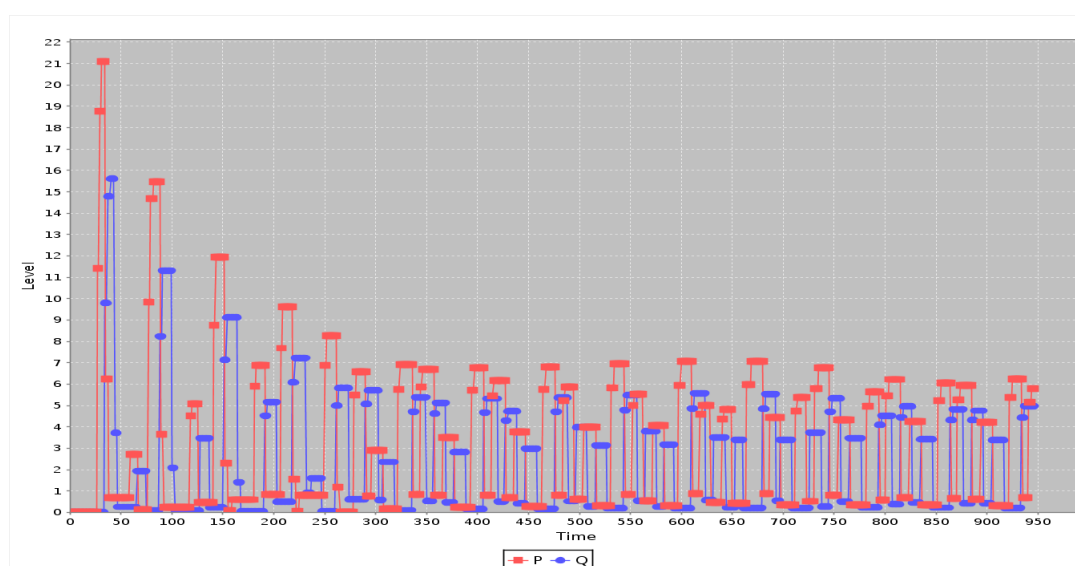


Figura 38: Curva de progresso da simulação apresentada na Figura 37. Observe a tendência ao equilíbrio dos teores de produtos após um período.

84. Também é possível simular o *modelo ping-pong*, no qual a liberação de um segundo produto depende da de um primeiro. Para isso, monte e rode o esquema da Figura 39, permitindo a visualização gráfica apenas de A (1o. substrato), F (forma intermediária da enzima), P (primeiro produto), e Q (segundo substrato). Anule os níveis das espécies enzimáticas e dos produtos para uma melhor percepção do fluxo de reagentes, e atribua $V_m=30$ para a liberação de Q ($EQ \rightarrow P$). Perceba que o segundo produto (Q) só é liberado após a transição da enzima (E) para uma forma substituída (F) induzida pelo primeiro substrato (A). Isso permite a liberação do 2o. produto (Q) após a ligação ao 2o. substrato (B). Não é possível a visualização do consumo do 2o. substrato nessa simulação, pois a opção *Init* nesse faz com que seja consumido ao início da reação, contrariando o modelo proposto.

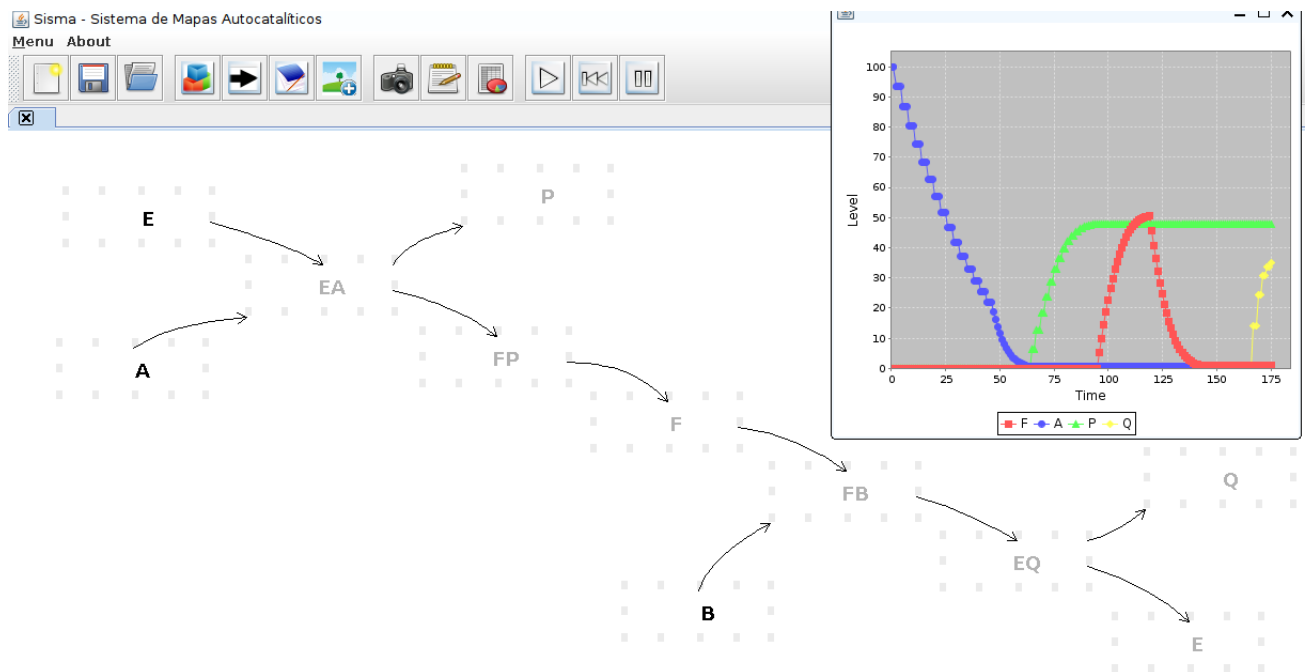


Figura 39: Reação de bisubstrato para um modelo ping-pong. Um produto (P) é liberado após a ligação com um substrato (A), sucedendo-se a liberação de um segundo produto (Q) após a ligação do segundo substrato (B) à enzima modificada pela primeira ligação (F). Observe que o aumento do período entre a liberação dos produtos é devido à conversão da forma substituída F da enzima. Para reproduzir o gráfico de progresso, selecione para *Plot* apenas A, B, P e Q, mantenha as equações e parâmetros padrão do programa, mas altere o valor de V_m para 30 em $EQ \rightarrow Q$.

15 Inibição Enzimática

85. A inibição sobre enzimas pode dar-se de modo irreversível (ligações covalentes, por exemplo, alquilação ou acilação no sítio ativo) ou reversível (adsorção de compostos no sítio ativo ou não). Existem diversos arranjos para uma inibição reversível dos quais os principais estão ilustrados na Figura 40.

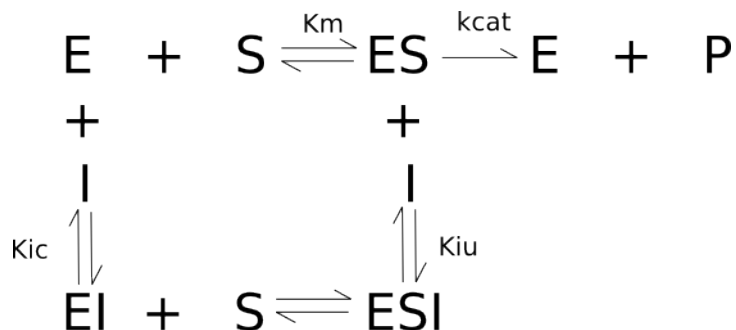


Figura 40: Diagrama de reações de inibição enzimática. K_m - constante de Michaelis-Menten para valores desprezíveis de k_{cat} ; k_{cat} - constante catalítica; K_{ic} - constante de inibição competitiva; K_{iu} - constante de inibição incompetitiva.

86. Os modelos de inibição podem ser distinguidos, na prática, pelos valores de V_m e K_m aparentes encontrados na presença do inibidor. A Tabela 1 abaixo explicita

como identificá-los:

Tabela 1: Variação dos parâmetros cinéticos em função do tipo de inibição enzimática.

Parâmetro	Compet.	Incompet.	Não Comp. Puro	Não Comp. Misto
Vm	-	↓	↓	↓
Km	↑	↓	-	↑

87. Para se avaliar uma inibição enzimática pelo Sisma, portanto, basta comparar simulações obtidas com variação dos parâmetros cinéticos. Exemplificando, para uma *inibição competitiva*, *Vm permanece constante e Km eleva-se*, como representado na Figura 41.

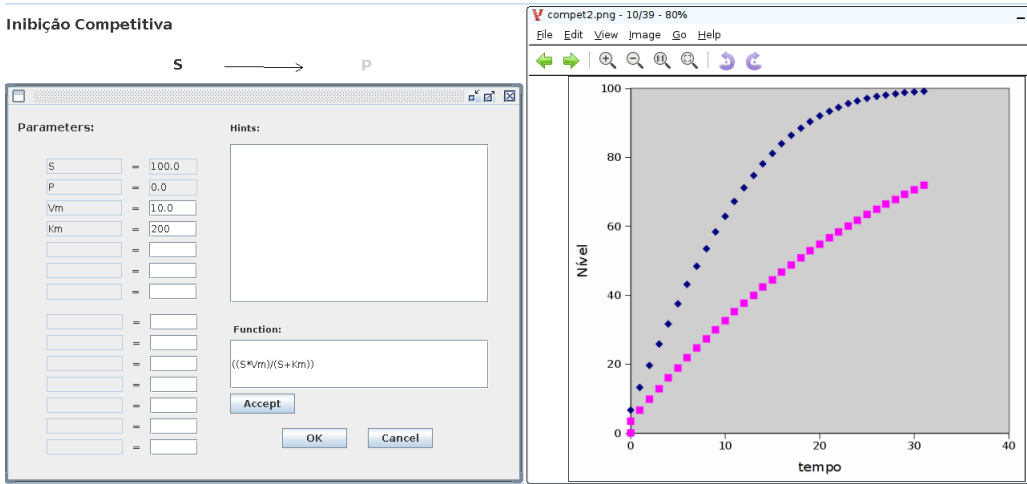


Figura 41: Inibição competitiva. Observe o perfil da curva na presença do inibidor (rosa) e os parâmetros cinéticos utilizados. Para a curva controle (azul) foi utilizado $V_m=10$ e $K_m=50$. As curvas foram feitas em planilha após colagem dos dados exportados do Sisma.

88. A partir do mesmo raciocínio, para uma *inibição incompetitiva*, V_m e K_m *decrecem proporcionalmente*, de tal modo que a razão K_m/V_m aparentes iguala-se à K_m/V_m na ausência do inibidor (enzima controle). Em termos práticos, fazendo $K_m=50$ e $V_m=10$ para a curva controle, um inibidor competitivo poderá ter, por exemplo, $K_m=10$ e $V_m=2$ (Figura 42), já que ambas as razões, com e sem inibidor, resultam no mesmo valor.

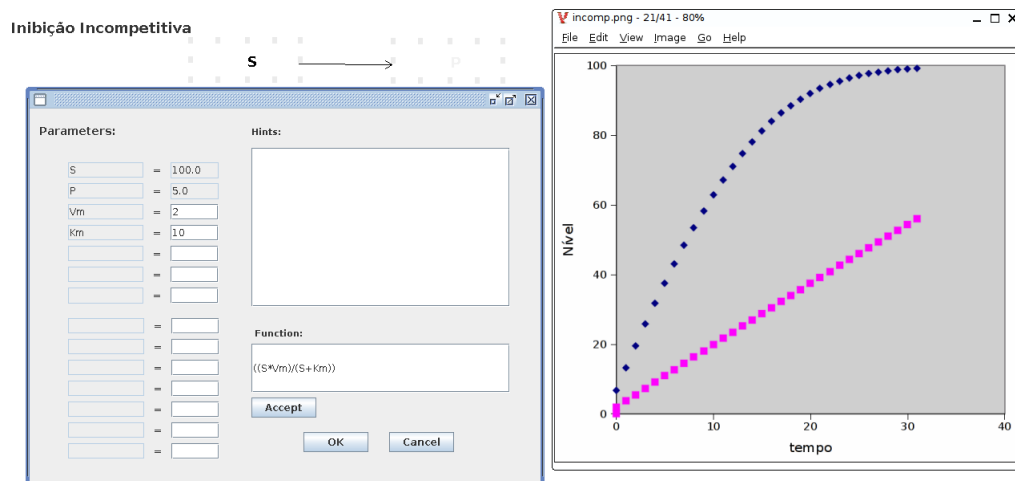


Figura 42: Inibição incompetitiva. Observe o perfil da curva na presença do inibidor (rosa) e os parâmetros cinéticos utilizados. Para a curva controle (azul) foi utilizado $V_m=10$ e $K_m=50$. As curvas foram feitas em planilha após colagem dos dados exportados do Sisma.

89. Por sua vez, *uma inibição não competitiva pura apresenta um valor de K_m inalterado mas de V_m reduzido*, em relação à enzima controle, como exemplificado na Figura 43.

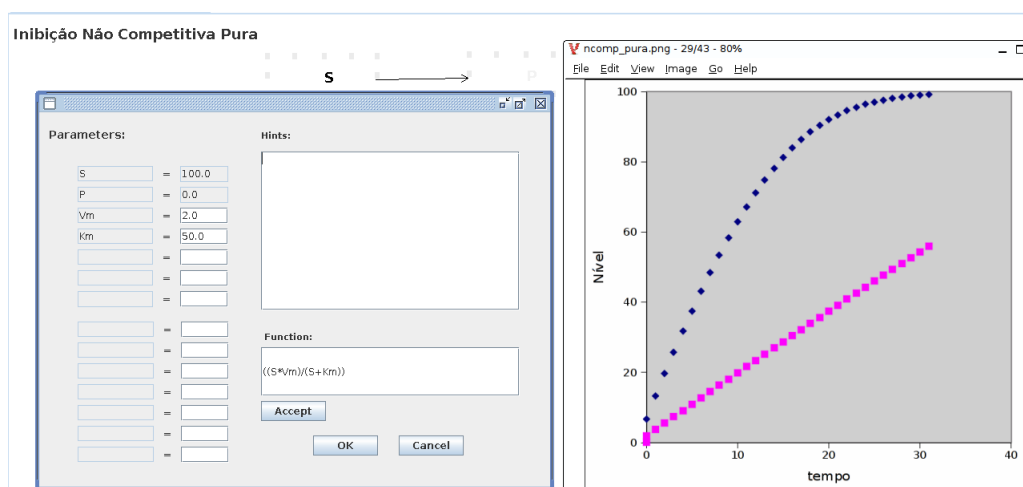


Figura 43: Inibição não competitiva pura. Observe o perfil da curva na presença do inibidor (rosa) e os parâmetros cinéticos utilizados. Para a curva controle (azul) foi utilizado $V_m=10$ e $K_m=50$. As curvas foram feitas em planilha após colagem dos dados exportados do Sisma.

90. Por fim, *uma inibição não competitiva mista apresenta uma redução no valor de V_m e aumento no de K_m* (Figura 44).

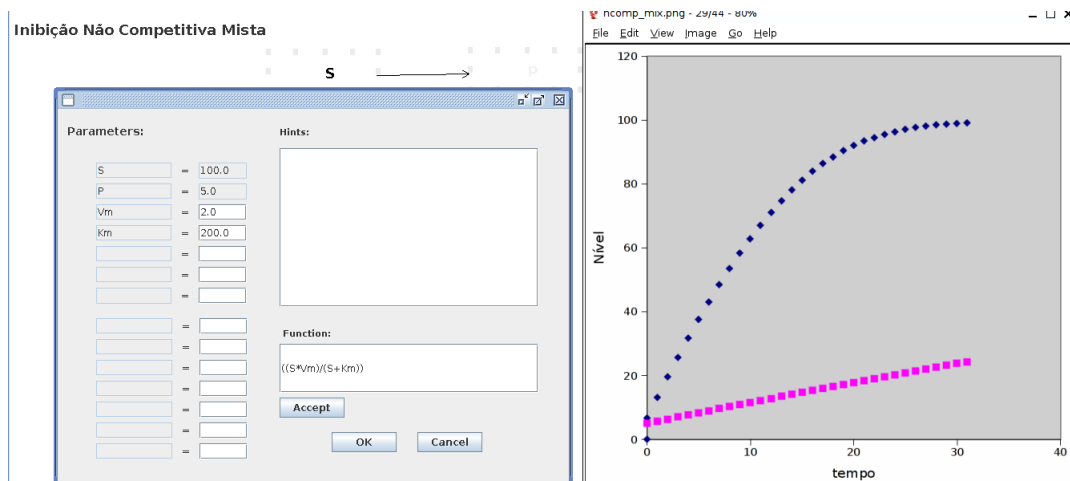


Figura 44: Inibição não competitiva mista. Observe o perfil da curva na presença do inibidor (rosa) e os parâmetros cinéticos utilizados. Para a curva controle (azul) foi utilizado $V_m=10$ e $K_m=50$. As curvas foram feitas em planilha após colagem dos dados exportados do Sisma.

16 Diagnóstico do Tipo de Inibição

91. A literatura reporta um grande espectro de técnicas experimentais, de modelagem computacional e mesmo procedimentos gráficos para o discernimento dos modos de inibição enzimática. A identificação desses modos (competitivo, incompetitivo, não competitivo) é fundamental para o desenvolvimento de compostos para alvos enzimáticos drogáveis. Dentre as diversas técnicas, a observação do perfil de um gráfico duplo-recíproco (Figura 15) é frequentemente reportada.
92. Para o diagnóstico do tipo de inibição pelo gráfico duplo-recíproco, faz-se necessária sua construção para a enzima controle e para a inibida, num mesma representação. Assim, tomando-se os resultados obtidos para inibição competitiva, incompetitiva, não competitiva pura e não competitiva mista, respectivamente às Figuras 41, 42, 43, e 44, e aplicando-se o *método das velocidades instantâneas* explicado ao item 28 desse texto, pode-se obter os valores instantâneos de v e S , e cujos gráficos duplos-recíprocos são representados à Figura 45.

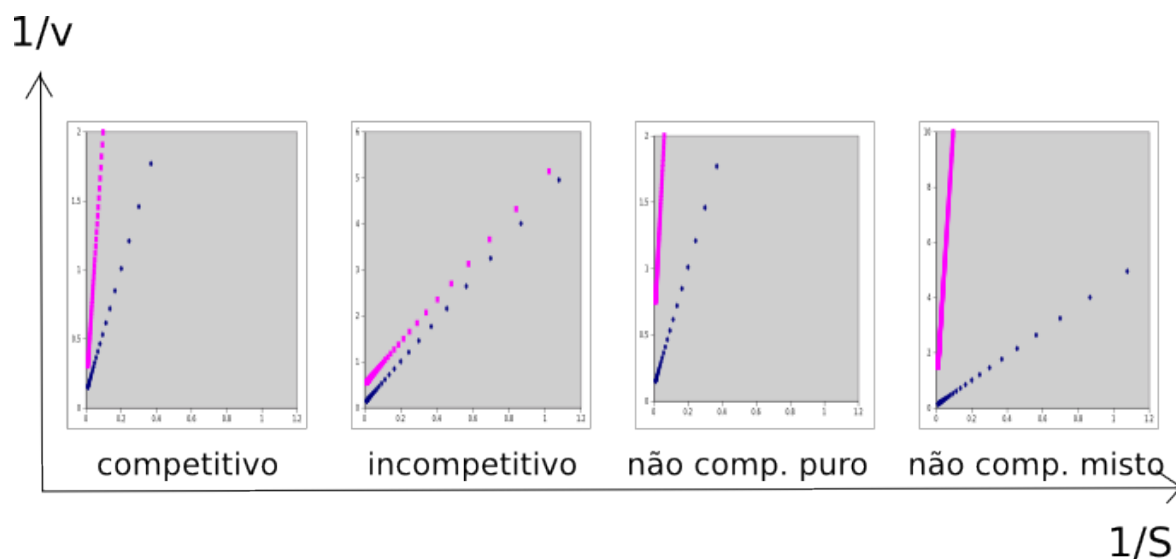


Figura 45: Diagnóstico de modelos de inibição enzimática. Os pontos representam a enzima controle (azul) e inibida (rosa). Os dados foram calculados a partir de simulações no Sisma variando-se os parâmetros cinéticos (vide texto).

17 Constantes de Inibição

93. As alterações nos valores de V_m e K_m na presença de um inibidor retratados na Tabela 1 acima originam, por consequência, uma alteração na própria equação de Michaelis-Menten (Equação 5). Dessa forma, a equação geral para os modelos de inibição retratados na Figura 40 transforma-se em:

$$v = \frac{V_m * S}{\alpha * K_m + \alpha' * S} \quad (16)$$

Onde,

$$\alpha = 1 + \frac{I}{K_{ic}} \quad e \quad \alpha' = 1 + \frac{I}{K_{iu}} \quad (17)$$

Com K_{ic} como a constante de *inibição competitiva* e K_{iu} como a constante de *inibição incompetitiva*. Para a *inibição não competitiva* são atribuídos valores a ambas. Deve-se ter em mente que, à excessão de k_{cat} , as constantes de inibição presentes na Figura 40 reportam constantes de dissociação de seus complexos.

94. Por esse procedimento é possível determinar-se as constantes de inibição de cada modelo, tendo em vista sua magnitude, tal como representado na Tabela 2:

Tabela 2: Tipos de inibição enzimática e magnitude das constantes de inibição correlatas.

Tipo	Constantes
Sem inibidor	K_{ic} e $K_{iu} = \infty$
Competitivo	$K_{iu} = \infty$
Incompetitivo	$K_{ic} = \infty$
Não Compet. Puro	$K_{iu} = K_{ic} \neq \infty$
Não Compet. Misto	$K_{iu} \neq K_{ic} \neq \infty$

As constantes de inibição referem-se a constantes de dissociação. Assim, se uma constante tende ao infinito (∞), isso indica que não há ligação do composto.

95. Por outro lado, também é possível **simular uma inibição específica** fornecendo a equação apropriada. Exemplificando no Sisma para uma inibição competitiva: monte um esquema simples ($S \rightarrow P$), forneça nível 100 para S (só *Init*) e zero para P (só *Plot*), e utilize a seguinte *equação para inibição competitiva*:

$$v = \frac{V_m * S}{(\alpha * K_m + S)} \quad (18)$$

96. Considere $\alpha=5$, $V_m=10$ e $K_m=50$, insira a equação como representado na Figura 46 e "rode" a simulação. Faça o mesmo para e enzima controle, como dantes, ou compare com um dos gráficos já representados dessa.

Equação Para Inibição Competitiva

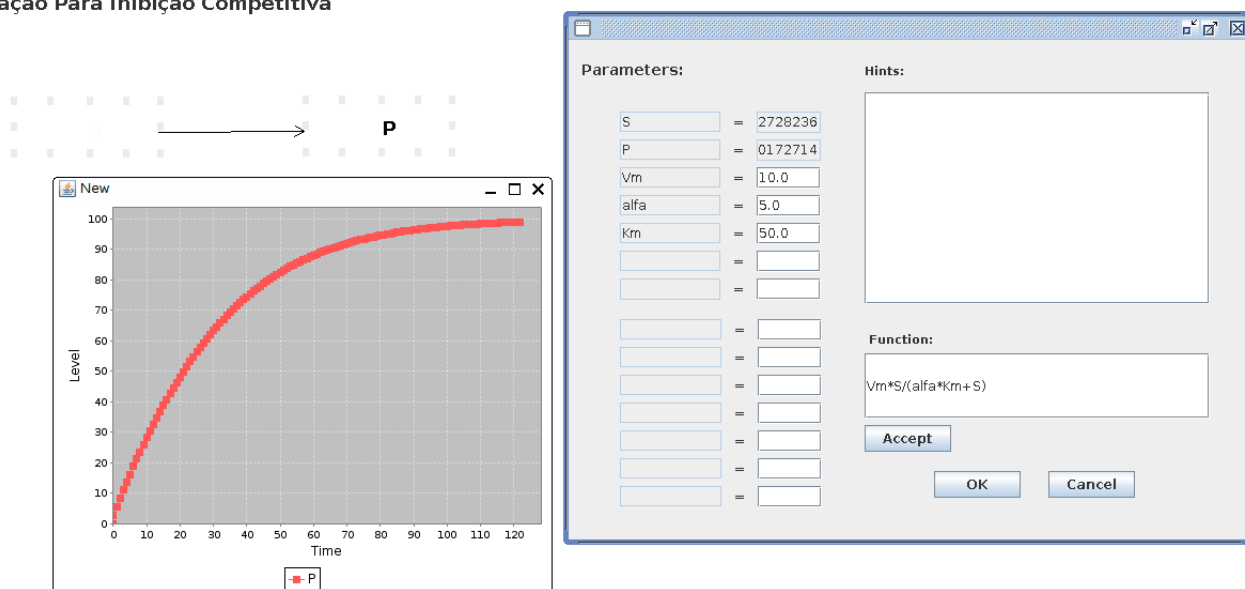


Figura 46: Simulação de cinética enzimática na presença de um inibidor competitivo.

97. Convertendo-se os dados pelo tratamento de velocidade instantânea, os resultados do gráfico de Michaelis-Menten resultante e duplo-recíproco para a enzima controle e inibida estão ilustrados na Figura 47.

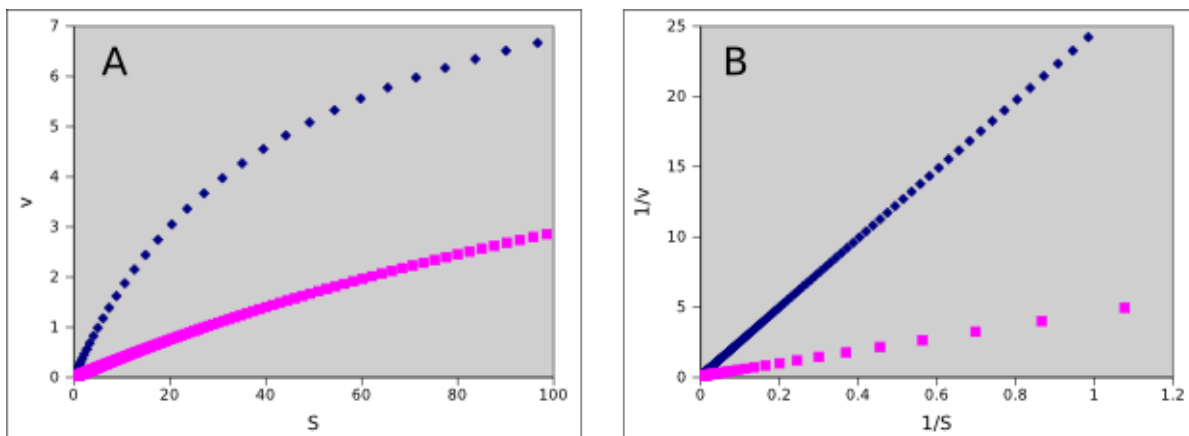


Figura 47: Gráfico de Michaelis-Menten (A) e Lineweaver-Burk (B) dos dados de inibição competitiva, tal como calculados a partir do emprego da Equação 18 (vide texto). A enzima controle está representada em azul e a inibida, em rosa.

98. Agora, para se comparar o valor teórico da constante de inibição inserida na equação, com o obtido pela simulação e tratamento subsequente dos dados, calcula-se o valor de K_m da enzima controle pelo duplo-recíproco ($V_m=9,4$ e $K_m=42,4$; ítem 34), e compara-se com o K_m obtido na presença do inibidor, ou K_m aparente, ou $\alpha \cdot K_m$. Isso resulta em α que, pela equação 17, fornece o valor da constante de inibição para o modelo competitivo, K_{ic} .
99. OK, vamos lá: a inclinação do duplo-recíproco com inibidor ($K_m \cdot \alpha / V_m$) resulta em $\alpha=24,5$. Tomando-se o valor de V_m e K_m da enzima controle obtém-se $\alpha=5,43$. Veja que esse valor é bem próximo do proposto na simulação para α (5,0).
100. Se desejar calcular a *constante de inibição para o modelo competitivo*, basta reportar-se à Equação 17 para determinado valor de I , concentração do inibidor. Essa estratégia pode ser igualmente empregada para os outros modelos de inibição reversível.

18 Inibição por substrato

101. Além da retroinibição pelo produto, a enzima pode também ser inibida por excesso de substrato. Nessa situação, vale a Equação 19 que segue:

$$v = \frac{V_m}{1 + \frac{K_m}{S} + \frac{S}{K_i}} \quad (19)$$

102. O Sisma pode simular essa situação, como na Figura 49 que segue:

Inibição por substrato

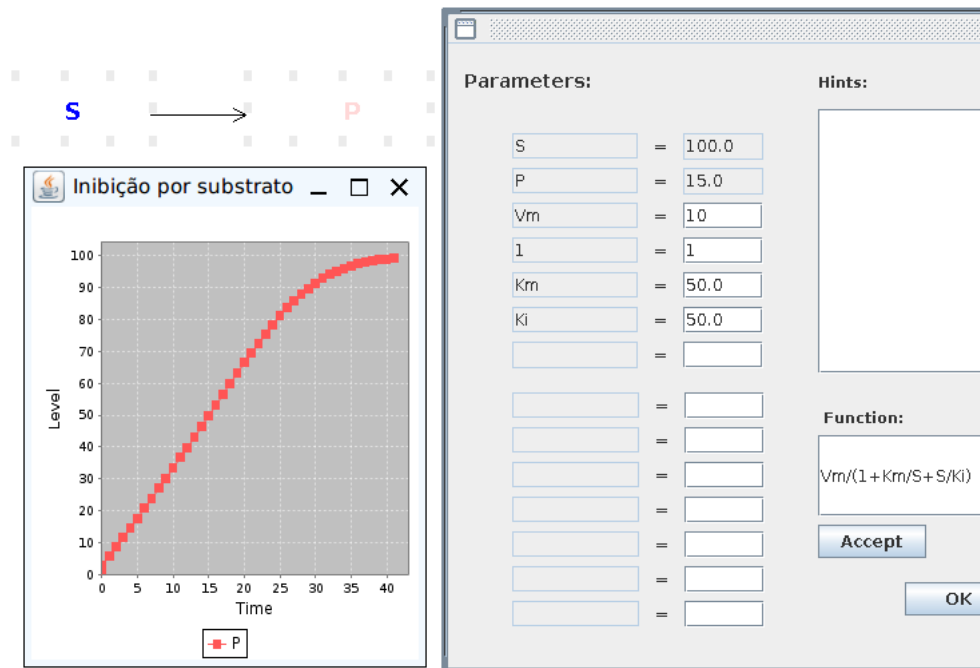


Figura 48: Parâmetros e curva de progresso para simulação de inibição por substrato.

103. Aplicando-se o método de velocidades instantâneas para os dados gerados, obtém-se a curva direta e o duplo-recíproco, tal como representado na Figura ??.

Inibição por substrato

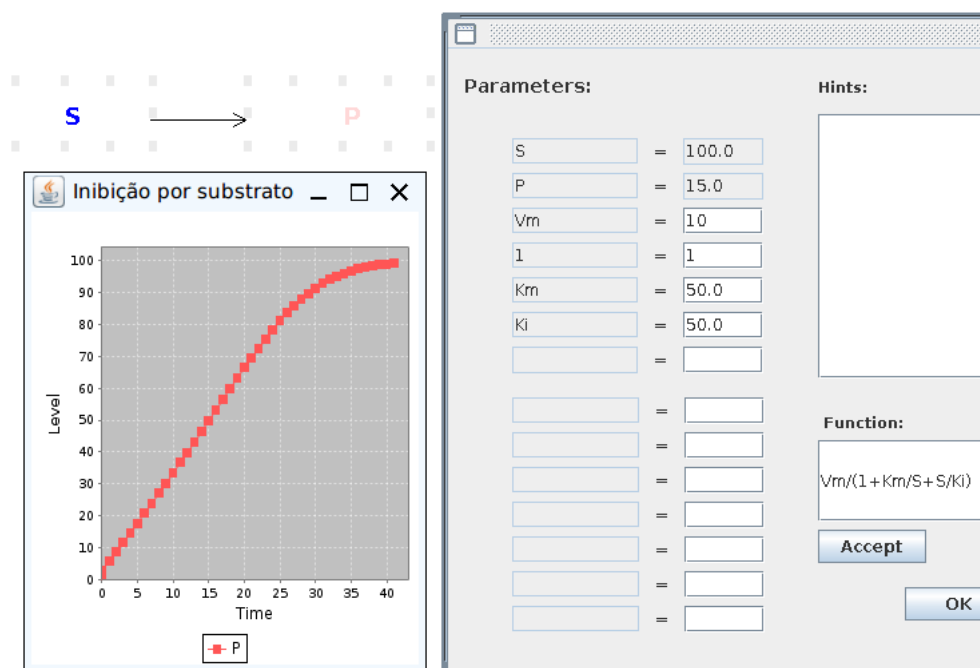


Figura 49: Curva direta de Michaelis-Menten (A) e linearização de Lineweaver-Burk (B) para os dados de simulação da Figura ??.