C E N A

BD - 002

# C I N É T I C A  D E  E N Z I M A S

RUY DE ARAUJO CALDAS

21 junho 1971

BOLETIM DIDÁTICO

CENA
BIBLIOTECA
N.º 1586

CENA/BD-002

CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

USP - CNEN

ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA "LUIZ DE QUEIROZ"

PIRACICABA - SP

- BRASIL -

- DIRETOR DO CENA -

Prof. Admar Cervellini

DIV. ENSINO E EXTENSÃO
Epaminondas S.B.Ferraz

DIVISÃO DE PESQUISAS
Eurípedes Malavolta

- COMISSÃO EDITORIAL -

Admar Cervellini
Almiro Blumenschein
André M. L. Neptune
Aristeu M. Peixoto
Eneas Salati
Epaminondas S.B.Ferraz
Eurípedes Malavolta
Otto J. Crocomo

C E N A

- CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA -

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR

- ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA "LUIZ DE QUEIROZ" -

- PIRACICABA - S.P. - BRASIL -

# A P R E S E N T A Ç Ã O

Mesmo aqueles que não estudam enzimas como tais, mas dedicam-se à elucidação do metabolismo celular, estão se envolvendo com enzimas. Ou seja: quem está penetrando nos intrincados caminhos metabólicos, está estudando o comportamento de complexos sistemas enzimáticos. Quem analisa o desenvolvimento e a diferenciação celular, o está fazendo em têrmos de enzimas: suas variações, seus produtos, sua redistribuição.

Há um modo qualitativo de se interpretar os dados metabólicos encaixando-os na estrutura que já se conhece dos esquemas e ciclos bioquímicos. Mas, quem se interessa pelos "porques" que estão no coração dos problemas, começa por analisar e interpretar os dados quantitativamente, e então uma formulação matemática do comportamento das enzimas se faz necessária. É justamente êsse o objetivo do presente trabalho, cujo conteudo se descortinará diante dos leitores ao virarem estas páginas.

Êste Boletim Didático é endereçado a todos aqueles que trabalham com enzimas e problemas correlatis, como mecanismos de absorção de íons pelas células, e desejam instrumentos para a interpretação quantitativa de seus dados. Ele encerra os resumos de um Curso Intensivo sôbre "Cinética de Enzimas", do qual tive a honra de ser escolhido Coordenador. O Curso é parte integrante das atividades do Setor de Bioquímica de Plantas do Centro de Energia Nuclear na Agricultu

ra, e foi preparado e ministrado cuidadosamente pelo Dr. Ruy de Araujo Caldas, do Departamento de Química da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

O tratamento dado pelo Dr. Caldas aos Tópicos desenvolvidos foi de molde a proporcionar aos interessados uma visão não só global, mas de profundidade sôbre "o que acontece com as enzimas" e "como as enzimas atuam. A matemática está presente, não porém para afugentar os que se dedicam a problemas bioquímicos, e sim para dar-lhe importantes subsídios na conquista de novas aberturas nos caminhos científicos pelos quais enveredaram. Cumprimento pois, o Dr. Caldas, e sinto-me lisonjeado ao associar-me com esta publicação na maneira simples de escrever esta Apresentação.

OTTO J. CROCOMO
Professor Associado de Bioquímica
Responsável pelo Setor de Bioquímica de
Plantas do CENA.

Piracicaba, junho de 1971.

# 1. CINÉTICA QUÍMICA ELEMENTAR

## 1.1. Considerações iniciais

A cinética química se preocupa bàsicamente com o estudo das velocidades das Reações Químicas. O estudo de velocidades em condições experimentais diferentes pode ser utilizado como uma ferramenta importante para estimar mecanismos de reações químicas.

A cinética química nasceu com L.Wilhemy (1850) quando estudava a conversão da sacarose polarimètricamente; determinou que $C = Co \times e^{-K_1 t}$ sendo C a concentração em um tempo t e Co a concentração inicial da sacarose.

## 1.2. Ordem e Molecularidade de uma Reação Química

### 1.2.1. Ordem

A ordem de uma reação química não está correlacionada com a estoquiometria da Reação.

Considere a reação:

$$A + B + \ldots\ldots\ldots + N \rightleftharpoons X + Y + \ldots\ldots\ldots W$$

$$\frac{dc_R}{dt} = f\,(c_A, c_B \ldots\ldots\ldots c_N)$$

ou

$$-\frac{dc_R}{dt} = K' c_A^a \; c_B^b \ldots\ldots\ldots c_N^n$$

Conceito de ordem: a + b + ..... n, soma dos expoentes da expressão de velocidade.

Exemplos:-

(a) $2N_2O_5 \longrightarrow 4NO_2 + O_2$

$$-\frac{d[N_2O_5]}{dt} = K_1[N_2O_5]_1 \quad \text{ordem(1) em } N_2O_5$$

(b) $2NO_2 \longrightarrow 2NO + O_2$

$$-\frac{d[NO_2]}{dt} = K_2[NO_2]^2 \quad \text{ordem(2) em } NO_2$$

(c) $CH_3 - C(=O) - H \xrightarrow{\Delta} CH_4 + O.$

$$-\frac{d[CH_3CHO]}{dt} = K'[CH_3CHO]^{3/2}_1 \quad \text{ordem 3/2 em } CH_3CHO$$

(d) $(C_2H_5)_3N + C_2H_5Br \longrightarrow (C_2H_5)_4NBr$

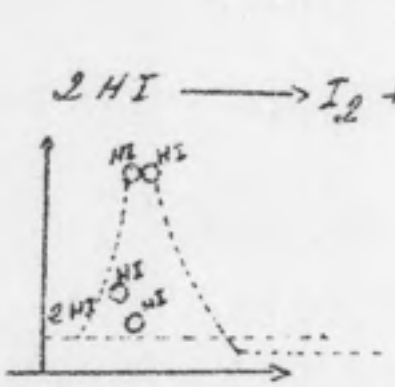
$$-\frac{d[C_2H_5Br]}{dt} = K_2[C_2H_5Br][(C_2H_5)_3N]$$

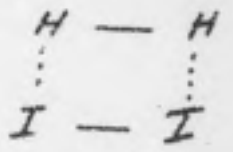
1.2.2. Molecularidade

Molecularidade é o número de moléculas de reagentes que participam do complexo ativado - é aplicável à reações elementares:

Exemplo:

$$2HI \longrightarrow I_2 + H_2$$




E uma reação bimolecular, pois, no mecanismo teórico duas moléculas de HI se unem para formar o complexo ativado (2HI)

Esta reação, por coincidência, é também de 2ª ordem:

$$-\frac{d[HI]}{dt} = K_2[HI]^2$$

Nota:- tôdas as reações bimoleculares são de 2ª ordem, mas o inverso não é verdadeiro.

1.2.3. A constante de proporcionalidade

Exemplo:

$$2N_2O_5 \longrightarrow 4NO_2 + O_2$$

$$-\frac{d[N_2O_5]}{dt} = K_1[N_2O_5]; +\frac{d[NO_2]}{dt} = K_1'[N_2O_5]$$

$$+\frac{d[O_2]}{dt} = K_1''[N_2O_5]$$

Portanto, $\boxed{K_1 = \frac{1}{2} K_1' = 2K_1''}$

Unidades da constante de proporcionalidade:

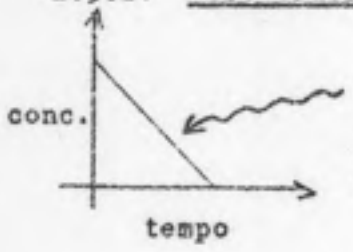
(a) 1ª ordem, $K_1 = (\text{moles/l})^{-1}\ \text{sec}^{-1} \times (\text{moles/l})^{-1} = \text{sec}^{-1}$

(b) 2ª ordem, $K_2 = (\text{moles/l})^{-1}\ \text{sec}^{-1} \times (\text{moles/l})^{2} = \frac{(\text{moles/l})^{-1}}{\text{sec}^{-1}}$

(c) n ordem, $K_n = (\text{tempo})^{-1}\ (\text{conc.})^{1-n}$

## 1.3. Equações das Reações de zero e 1ª ordem

### 1.3.1. Zero ordem

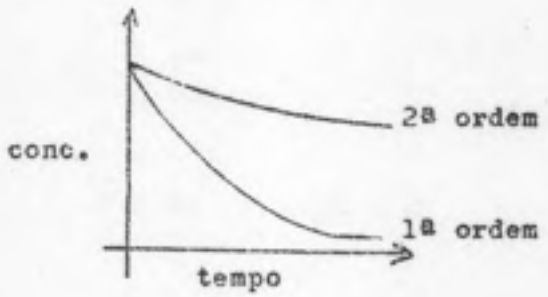



Avaliação da mudança em concentração é independente da própria concentração

Portanto, $\frac{dc_A}{dt} \neq f(c_A), \therefore \frac{dc_A}{dt} = K$

Nota:- K é constante de proporcionalidade da pseudo zero ordem porque na realidade não existe reação de zero ordem.

### 1.3.2. Primeira ordem

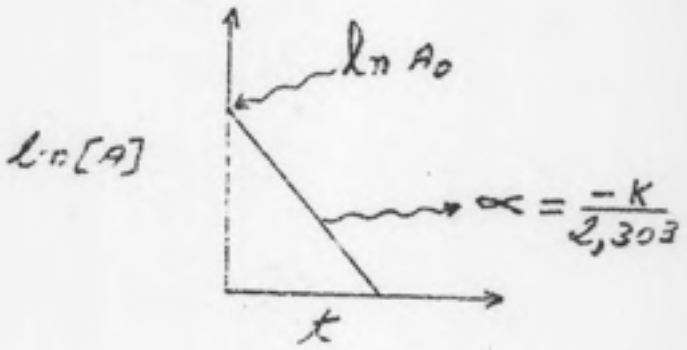


Temos que: $\frac{dC_A}{dt} = K[A]$

$$\therefore \frac{dC_A}{[A]} = K\,dt \;;\quad \int_{A=A_0}^{A=A} \frac{dC_A}{[A]} = \int_{t=0}^{t=t} K\,dt$$

$$\therefore \ln A = \ln A_0 - Kt$$

Num gráfico teremos:




## 1.4. Equações de Segunda Ordem

Nas reações de segunda ordem (comparadas com as de 1ª ordem) a velocidade da reação torna-se mais vagarosa mais ràpidamente.

### 1.4.1. Em um só reagente

$$-\frac{dC_A}{dt} = K[A]^2$$

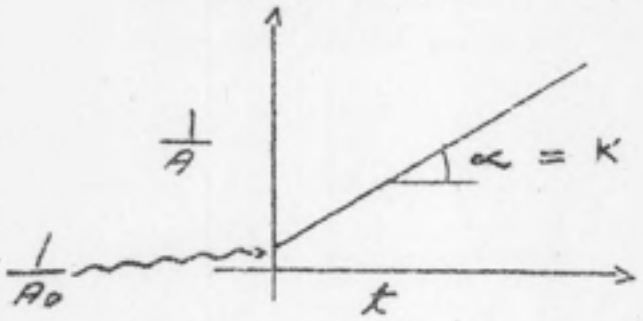
$$\therefore -\int_{A=A_0}^{A=A} \frac{dC_A}{} = \int_{t=0}^{t=t} K\,dt = Kt$$

Sabe-se que $\int_{x_1}^{x_2} x^K \, dx = \frac{x^{K+1}}{K+1}$

Portanto, $\int_{A=A_0}^{A=A} \frac{dc_A}{[A]^2} = -\int_{A=A_0}^{A=A} dc_A [A]^{-2} = \frac{1}{A} - \frac{1}{A_0}$

$$\therefore \quad \frac{1}{A} = \frac{1}{A_0} + Kt$$

Num gráfico teremos:




1.4.2. Em dois reagentes

$$[A] = a - x \; ; \; [B] = b - x$$

$$\therefore \quad \frac{dx}{dt} = K_2 (a-x)(b-x), \text{ ou } \frac{dx}{(a-x)(b-x)} = K_2 t$$

Tomando a expressão:

(I) $$\frac{dx}{(a-x)(b-x)} = \left(\frac{A}{a-x} + \frac{B}{b-x}\right) dx =$$

$$= \left[\frac{A(b-x) + B(a-x)}{(a-x)(b-x)}\right] dx = \left[\frac{Ab + Ba - (A+B)x}{(a-x)(b-x)}\right] dx$$

$A + B = 0$ (porque não tem têrmo em x)

$B = -A$

$Ab + Ba = 1$; $\therefore A(b-a) = 1$ ou $A = \frac{1}{b-a}$

A expressão (I) torna-se:

$$\left[\frac{1}{a-x} - \frac{1}{b-x}\right] A\,dx = \left[\frac{1}{a-x} - \frac{1}{b-x}\right] \frac{1}{b-a}\,dx$$

Teremos que:

$$\frac{dx}{(a-x)(b-x)} = \left[\frac{dx}{a-x} - \frac{dx}{b-x}\right] \frac{1}{b-a} = K_2\,dt$$

ou,

$$\int_{x=0}^{x=x} \frac{1}{b-a}\left[\left(\frac{1}{a-x}\right)dx - \left(\frac{1}{b+x}\right)dx\right] = \int_{t=0}^{t=t} K_2\,dx + C$$

Para t = 0 e x = 0, teremos:

$$C = \frac{1}{b-a}\left[-\ln a + \ln b\right]$$

$$\therefore C = \frac{1}{b-a} \ln \frac{b}{a}$$

ou seja,

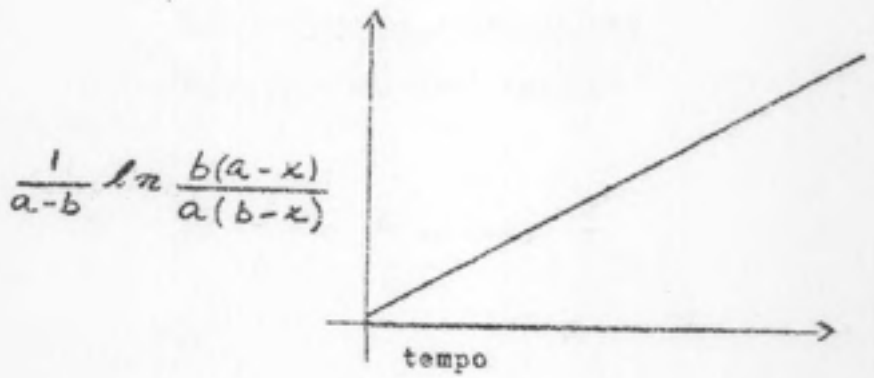
$$\frac{1}{b-a}\left[\ln \frac{(b-x)}{(a-x)}\right] - \frac{1}{b-a} \ln \frac{b}{a} = K_2 \tau$$

$$\therefore \frac{1}{b-a}\left[\ln \frac{(b-x)}{(a-x)}\right] - \frac{1}{b-a} \ln \frac{b}{a} = K_2 \tau$$

ou,

$$\boxed{\frac{1}{a-b} \ln \frac{b(a-x)}{a(b-x)} = K_2 \tau}$$

Num gráfico,

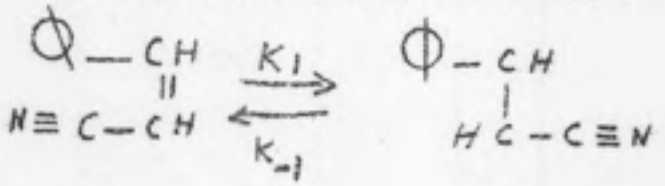


## 1.5. Tipos de reações

### 1.5.1. Reações opostas

$A \underset{K_{-1}}{\overset{K_1}{\rightleftharpoons}} B$, em que $\frac{dx}{d\tau} = K_1(a-x) - K_{-1}(b+x)$

(a) Reação reversível de 1ª ordem - primeiramente estudadas por G.B. Kistiakowsky (JACS, 1932):



a velocidade da reação foi medida pela variação do índice de refração do condensado.

No equilíbrio, $K_2 q = \frac{K_1}{K_{-1}}$

(b) Reações opostas Bimoleculares - (Max Bodenstein):

$$H_2 + I_2 \underset{K_{-2}}{\overset{K_2}{\rightleftharpoons}} 2HI$$
$$(a-\tfrac{x}{2})(b-\tfrac{x}{2}) \qquad (x)$$

$$\therefore \frac{d[HI]}{dt} = \frac{dx}{d\tau} = K_2(a-\tfrac{x}{2})(b-\tfrac{x}{2}) - K_{-2}x^2$$

### 1.5.2. Reações consecutivas

Tomando a seguinte reação:

$$A \underset{K_1}{\longrightarrow} B \underset{K_1'}{\longrightarrow} C$$
$$x \qquad y \qquad z$$

Podemos tirar as seguintes relaçôes:

(a) $$\frac{-dx}{dt} = K_1 x$$

(b) $$-\frac{dy}{dt} = -K_1 x + K_1' y$$

(c) $$\frac{dz}{dx} = K_1' y$$

Relaçôes:

(I) Da equação (a) tira-se que:

$$x = a\, e^{-K_1 t}$$

sendo que a constante de integração é $-\underline{\ln a}$

(II) $$\frac{dy}{dt} = -K_1' y + K_1 a e^{-K_1 t}$$

$$\therefore y = e^{-K_1' t}\left[\frac{K_1 a e^{(K_1' - K_1)t}}{K_1' - K_1} + c\right]$$

para $t = o$ e $y = o$, $c = \frac{-K_1 a}{K_1' - K_1}$

(III) Usando o mesmo procedimento:

$$Z = a\left(1 - \frac{K_1' e^{-K_1 t}}{K_1' - K_1} + \frac{K_1 e^{-K_1' t}}{K_1' - K_1}\right)$$

CENA 1586

Tomando a seguinte reação como exemplo:

$$CH_3-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-CH_3 \xrightarrow{\Delta\ K_1} CH_2=CO + CH_4$$

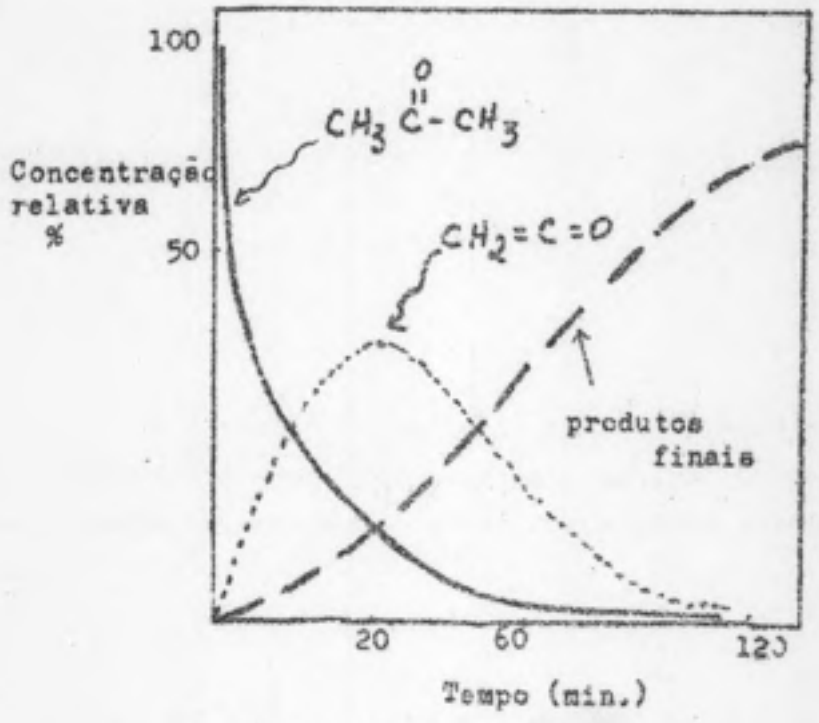
$$\downarrow K_1'$$

$$\tfrac{1}{2}\,C_2H_4 + CO$$

Neste caso $K_1 \lll K_1'$, portanto,

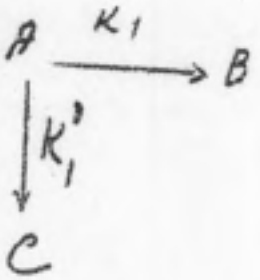
$$Z = a(1 - e^{-K_1 t})$$

Num gráfico teremos:

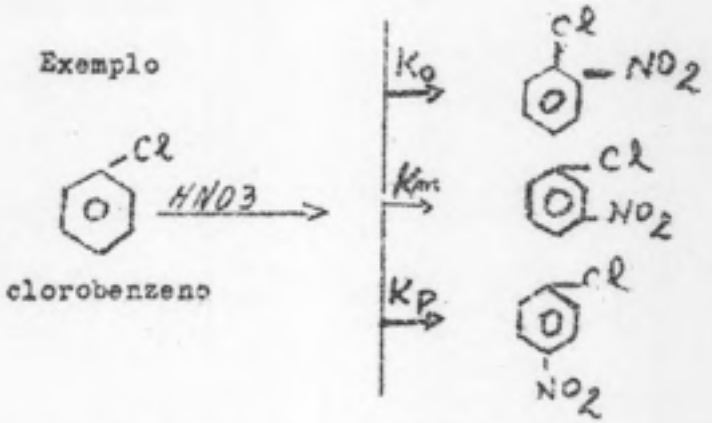



1.5.3. Reações paralelas

Um reagente A pode ao mesmo tempo dar origem aos produtos B e C por vias mecanísticas independentes:




As reações de substituição no núcleo benzênico são exemplos clássicos de paralelismo, em que mais de um isômero é obtido.




A formação de todos os nitroderivados segue a equação de 1ª ordem em clorobenzeno e as concentrações dos mesmos estão relacionadas com as respectivas constantes:

$$[o-NCB]:[m-NCB]=[p-NCB]=Ko:Km:Kp$$

A concentração de um dos produtos pode ser aumentada desde que o meio de reação seja convenientemente alterado

## 1.5.4. Reações em cadeia

Exemplo de reação em cadeia (Christiansen, Henzfeld e Polanyi):

$H_2 + Br_2 \rightleftarrows 2HBr$, a qual

segue a lei, $\frac{d[HBr]}{dt} = \frac{K[H_2][Br_2]^{\frac{1}{2}}}{m + \frac{[HBr]}{[Br_2]}}$

A velocidade da reação é inibida pelo produto $[HBr]$

Passos da reação:

(a) Iniciação da cadeia: $Br_2 \xrightarrow{K_1} 2Br$

(b) Propagação da cadeia

($b_1$) $Br + H_2 \xrightarrow{K_2} HBr + H$

($b_2$) $H + Br_2 \xrightarrow{K_3} HBr + Br$

(c) Inibição da cadeia: $H + HBr \xrightarrow{K_4} H_2 + Br$

(d) Quebra da cadeia: $2Br \xrightarrow{K_5} Br_2$

Usando a aproximação "steady-state" em que

$$\frac{d[Br]}{dt} = 0 \text{ e } \frac{d[H]}{dt} = 0,$$

pode-se encontrar que:

$$\frac{d[HBr]}{dt} = 2\,\frac{K_3 K_2 K_4^{-1} K_1^{\frac{1}{2}} K_5^{-\frac{1}{2}} [H_2][Br_2]^{\frac{1}{2}}}{K_3 K_4^{-1} + [HBr][Br_2]^{-1}}$$

## 1.6. Determinação da ordem de uma reação

Supomos a seguinte reação:

$$aA + bB + cC + \ldots \rightleftharpoons pP + qQ + rR + \ldots$$

A velocidade da mesma pode ser dada por,

$$-\frac{dc_A}{dt} = -\frac{dc_B}{dt} = \ldots \quad = +\frac{dc_P}{dt} = \frac{dc_Q}{dt} \ldots$$

Para determinar ordem da mesma, usualmente emprega-se o método de isolamento de Ostwald, que consiste em usar as concentrações, por exemplo:- de B, C ..... bem maiores do que a de A. Assim procedendo:

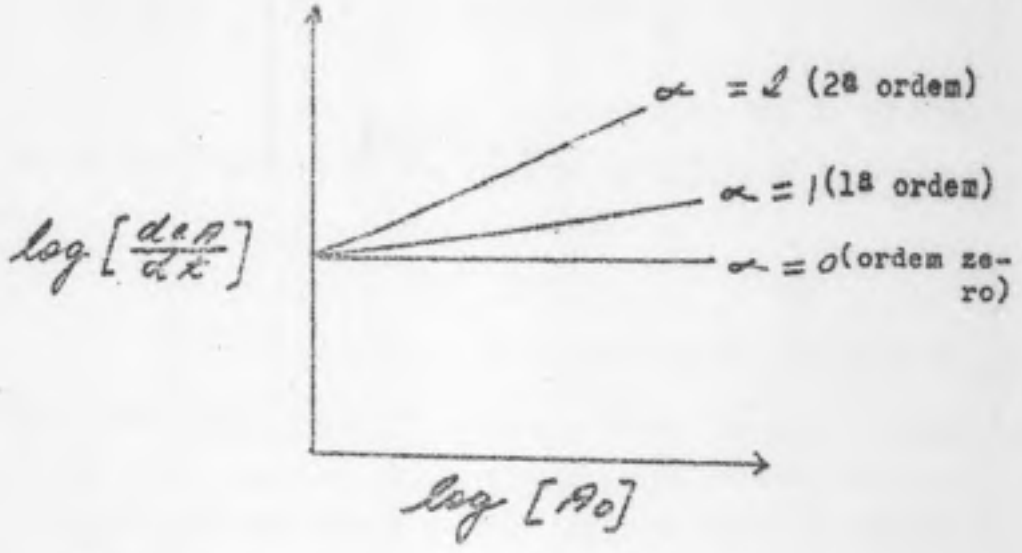
$$\frac{dc_A}{dt} = K[c_{A_0}]^{\alpha}$$

Tomando a expressão log:

$$\log\left(\frac{dc_A}{dt}\right) = \log K + \alpha \log[c_{A_0}]$$

e medindo a chamada $v_0$, em que

$[A_0] - x \approx [A_0]$, tem-se que:




1.7. Catálise:

1.7.1. O que um catalisador faz:

a)- um catalisador influencia na velocidade de reação, no entanto, não altera a posição do equilíbrio(Wilhelm Ostwald);

b)- segue-se, que um catalisador acelera as velocidades nos dois sentidos de uma reação química, desde que

$$Keq = \frac{K_1}{K_2} \left(\text{para } A \underset{K_2}{\overset{K_1}{\rightleftharpoons}} B\right)$$

c)- assim sendo, os catalisadores usados na esterificação de um ácido com um alcool podem também ser utilizados na hidrólise do éster.

1.7.2. Catálise homogênea

Nêste tipo de catálise a velocidade da reação depende da concentração do catalisador.

Exemplo:

a decomposição térmica de éteres é catalisada por vapôres de $I_2$ e a expressão da velocidade é:

$$-\frac{d[\text{éter}]}{dt} = K_2\,[I_2]\,[\text{éter}]$$

A energia de ativação da pirólise do éter cai de 53 Kcal para 34 Kcal (na reação com vapôres de $I_2$).

1.7.3. Catálise Heterogênea

A reação: $Br_2 + H_2C=CH_2 \longrightarrow H-\underset{\underset{Br}{|}}{\overset{\overset{H}{|}}{C}}-\underset{\underset{Br}{|}}{\overset{\overset{H}{|}}{C}}-H$ se processa à velocidade bem mais elevada quando em recipiente de vidro cheio de tubos capilares ou pérolas de vidro. A reação é inibida quando o recipiente de vidro é parafinado interiormente.

A reação numa superfície é usualmente dividida nos seguintes passos elementares:

(a)- difusão dos reagentes até a superfície;
(b)- adsorção dos reagentes à superfície;
(c)- reação química na superfície;
(d)- desorção dos produtos da superfície;
(e)- difusão dos produtos da superfície;

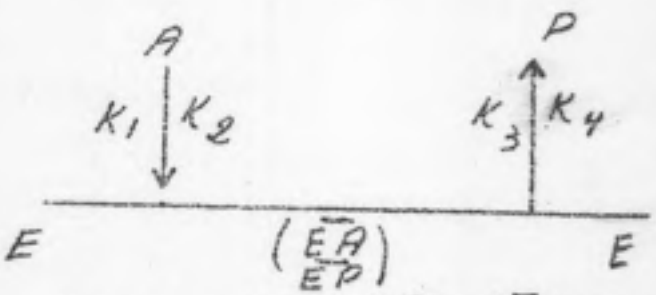
## 2. Cinética de reações catalisadas por enzimas, sem inibição

### 2.1. Equação de Menten-Michaelis

#### 2.1.1. O modêlo

$$E + A \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftarrows}} (E\bar{A}) \rightleftarrows (E\bar{P}) \underset{k_4}{\overset{k_3}{\rightleftarrows}} E + P$$

ou




Nota:- as formas $(E\bar{A})$ e $(E\bar{P})$ não podem ser distinguidas, cinèticamente.

#### 2.1.2. Velocidade inicial ($v_o$)

a) $v \cong v_o$; $[A] \cong [A_o]$; $[P] \cong [P_o]$

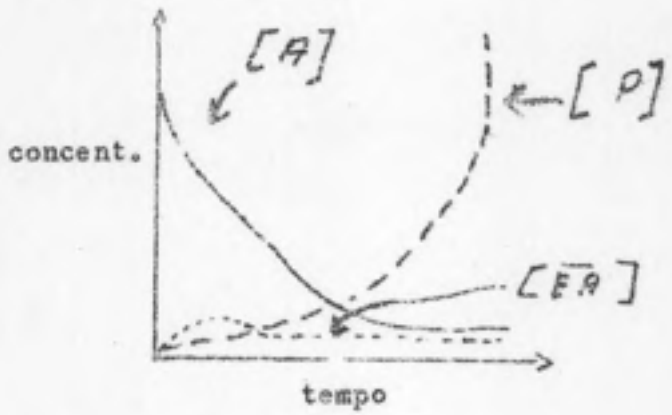
b) $[P] \cong 0$; $v_o = k_3 [E\bar{A}] \gg k_4 (P)(E)$

$$\therefore \frac{dP}{dt} = v_o \cong k_3 [E\bar{A}]$$

#### 2.1.3. "Steady-State"

$$\frac{d_E}{dt} = 0; \quad \frac{d(E\bar{A})}{dt} = 0$$

Num gráfico teremos:




2.1.4. A equação:

$$v_0 = \frac{V[A]}{K_m + [A]} \quad \text{ou} \quad \frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{V} \cdot \frac{1}{A} + \frac{1}{V}$$

(Linewear & Burk)

Na formulação de Dalziel, tem-se que:

$$\frac{E0}{v_0} = \frac{1}{K_3} + \frac{1}{[S]} + \left[ \frac{1}{K_1} + \frac{K_2}{K_1 K_3} \right],$$

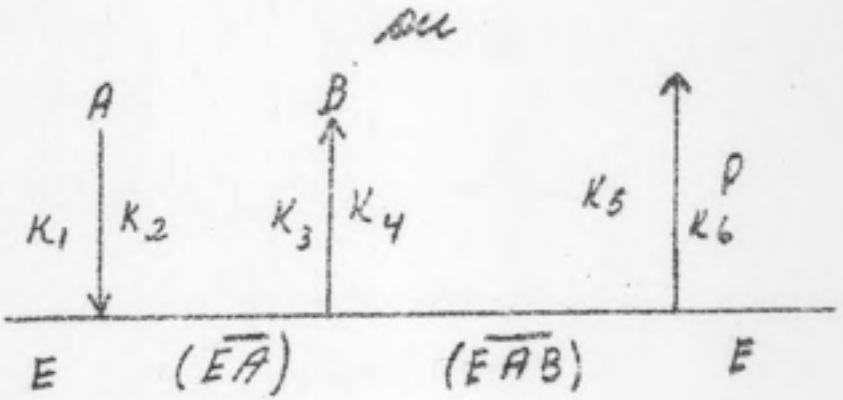
ou

$$\frac{E_0}{v_0} = \Phi_0 + \frac{\Phi_1}{[S]},$$ onde $E_0$ = concentração total de enzima.

2.2. Equações para dois substratos e um produto

Supondo o seguinte sistema binário ordenado:

$$E + A \underset{K_2}{\overset{K_1}{\rightleftarrows}} (\overline{EA}) + B \underset{K_4}{\overset{K_3}{\rightleftarrows}} (\overline{EAB}) \underset{K_6}{\overset{K_5}{\rightleftarrows}} E + P$$




2.2.1. Supondo que:

a) $[P] \cong 0$ portanto, $K_6[P] \cong 0$

b) $[A], [B] >> E_o$

c) $\frac{dP}{dt} = v_o = K_5(\overline{EAB})$

d) Conservação:

$$E_t = E + (\overline{EA}) + (\overline{EAB})$$

2.2.2. <u>Derivação</u>:

a) $\frac{dE}{dt} = 0 = -K_1 E A + K_2(\overline{EA}) + K_5(\overline{EAB})$

b) $\frac{d\overline{EA}}{dt} = 0 = K_1 EA - K_2(\overline{EA}) - K_3(\overline{EA})B + K_4(\overline{EAB})$

c) $\frac{d\overline{EAB}}{dt} = 0 = K_3(\overline{EA})B - K_4(\overline{EAB}) - K_5(\overline{EAB})$

d) $v_0 = K_5 (\overline{E\overline{A}B}) \therefore (E\overline{A}B) = \frac{v_0}{K_5}$

Da equação $(C)$ tem-se que:

$$(\overline{E\overline{A}}) = \frac{v(K_4 + K_5)}{K_3 K_5 B}$$

Da equação $(b)$ tira-se que:

$$E = \frac{v}{K_1 A}\left[\frac{K_2(K_4+K_5)}{K_3 K_5 B} + 1\right]$$

Sabe-se que:

$$E_0 = E + \overline{E\overline{A}} + \overline{\overline{E}AB}$$

$$E_0 = \frac{v}{K_1 A}\left[\frac{K_2(K_4+K_5)}{K_3 K_5 B} + 1\right] + \frac{v(K_4+K_5)}{K_3 K_5 B} + \frac{v}{K_5}$$

Dividindo por $v$:

$$\frac{E_0}{v} = \frac{1}{K_5} + \frac{1}{K_1 A} + \frac{(K_4+K_5)}{K_3 K_5 B} + \frac{K_2(K_4+K_5)}{K_1 K_3 K_5 A B}$$

Usando a nomenclatura de Dalziel:

$$\frac{E_0}{v} = \Phi_0 + \frac{\Phi_1}{A} + \frac{\Phi_2}{B} + \frac{\Phi_{12}}{A.B}$$

ou

$$\frac{1}{v} = \frac{\Phi_0}{E_0} + \frac{\Phi_1}{E_0} \cdot \frac{1}{A} + \frac{\Phi_2}{E_0} \cdot \frac{1}{B} + \frac{\Phi_{12}}{E_0} \cdot \frac{1}{AB}$$

Sendo V = velocidade máxima global,

tem-se que:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V} + \frac{K_A}{V} \cdot \frac{1}{A} + \frac{K_B}{V} \cdot \frac{1}{B} + \frac{K_{AB}}{V} \cdot \frac{1}{AB}$$

O que é V ?

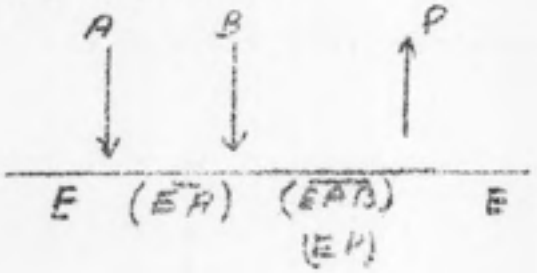
V é o limite da velocidade v quando a(s) concentração(ões) do(s) substrato(s) tornam-se bem grandes:

$$\frac{1}{V} = \lim \left(\frac{1}{v}\right)$$

$[A]$ e $[B]$ = bem grandes

2.3. Nomenclatura de Dalziel

2.3.1. Num sistema binário ordenado com um produto (Bi- Uni ordenado):




Equação:

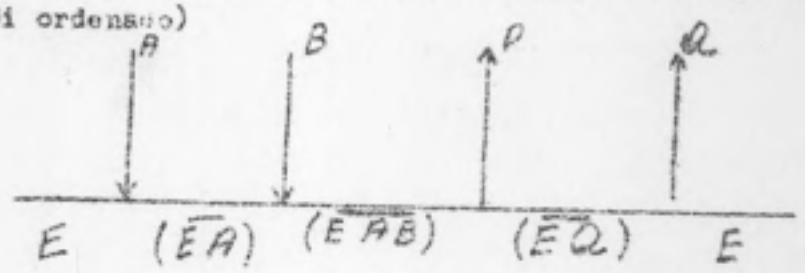
$$\frac{E_0}{v} \Phi_0 + \frac{\Phi_1}{A} + \frac{\Phi_2}{B} + \frac{\Phi_{12}}{AB}$$

Sendo $A$ constante $([A] >> [B])$

$$\frac{E_o}{v} = \left(\Phi_o + \frac{\Phi_1}{A}\right) + \left(\Phi_2 + \frac{\Phi_{12}}{A}\right)\frac{1}{B}$$

constante constante

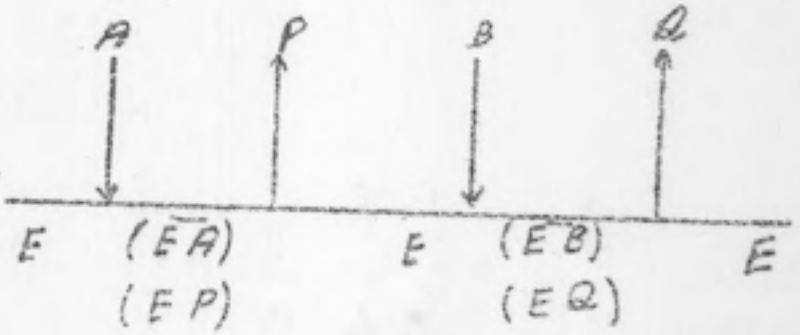
2.3.2. Num sistema binário ordenado com dois produ-
tos(Bi-Bi ordenado)




Equação:

$$\frac{E_o}{v} = \Phi_o + \frac{\Phi_1}{A} + \frac{\Phi_2}{B} + \frac{\Phi_{12}}{AB}$$

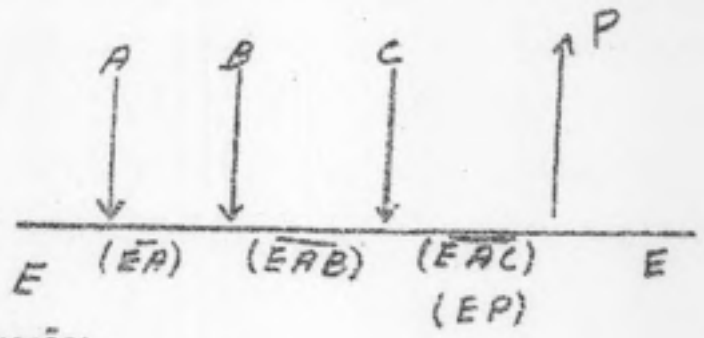
2.3.3. Num sistema binário "ping-pong":



Equação:

$$\frac{E_o}{v} = \Phi_o + \frac{\Phi_1}{A} + \frac{\Phi_2}{B}$$

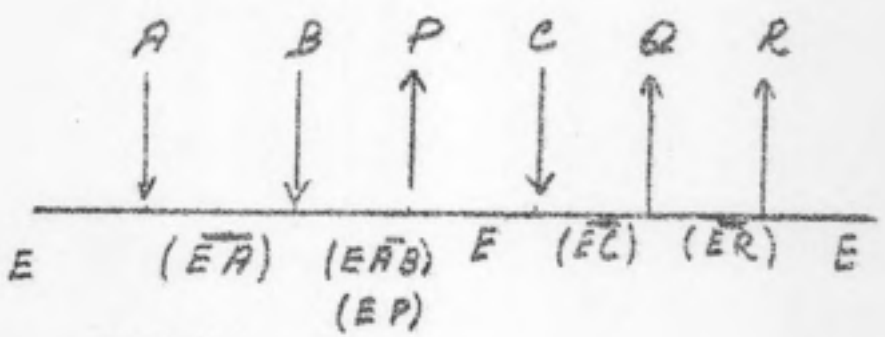
2.3.4. Num sistema terciário(ordenado)-uni:




Equação:

$$\frac{E_o}{v} = \Phi_o + \frac{\Phi_1}{A} + \frac{\Phi_2}{B} + \frac{\Phi_3}{C} + \frac{\Phi_{12}}{AB} + \frac{\Phi_{23}}{BC} + \frac{\Phi_{123}}{ABC}$$

2.3.5. Num sistema "Bi Uni Uni Bi Ping Pong":




Equação:

$$\frac{E_o}{v} = \Phi_o + \frac{\Phi_1}{A} + \frac{\Phi_2}{B} + \frac{\Phi_3}{C} + \frac{\Phi_{12}}{AB}$$

## 2.4. Determinação de Km(app) em Reações com mais de um substrato

Quando se determina parâmetros tais como Vmax e Km o que estamos achando em realidade, são valôres aparentes, pois, a Vmax real, por exemplo, depende da concentração do substrato (A) e de outras inúmeras variáveis.

Em cinética de enzima conceitua-se

Vmax aparente como:

$$\left(\frac{1}{V}\right)_{\text{aparente}} = \lim_{\left(\frac{1}{S}\right)\longrightarrow 0} \left(\frac{1}{v}\right)$$

Para o cálculo de Km(ap.), tomaremos a seguinte equação na formulação de Dalziel:

$$\frac{1}{v} = \frac{\Phi_o}{E_o} + \frac{\Phi_1}{E_o}\cdot\frac{1}{A} + \frac{\Phi_2}{E_o}\cdot\frac{1}{B} + \frac{\Phi_{12}}{E_o}\cdot\frac{1}{AB}$$

ou na forma

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V} + \frac{K_A}{A} + \frac{K_B}{B} + \frac{K_{AB}}{AB}$$

quando $[B]$ for bem elevada tem-se que:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V} + \frac{K_{A(ap.)}}{A},$$ diz-se que:

$$K_A \text{ (aparente)} = \lim_{[B] \longrightarrow \infty} K_A$$

Na prática o que se faz quando temos mais de um substrato é calcular a velocidade inicial da reação nas seguintes condições:

(a)- com concentrações crescentes do substrato em estudo;

(b)- ao mesmo tempo mantendo os demais substratos em saturação;

(c)- portanto, antes de fazermos qualquer trabalho de cinética enzimática devemos ter em mãos tôdas as curvas de saturação de todos os substratos em estudo.

Para o estudo de êrros envolvidos os cálculos de Km (ap) existe um trabalho de G.N. Wilkinson que é considerado clássico:

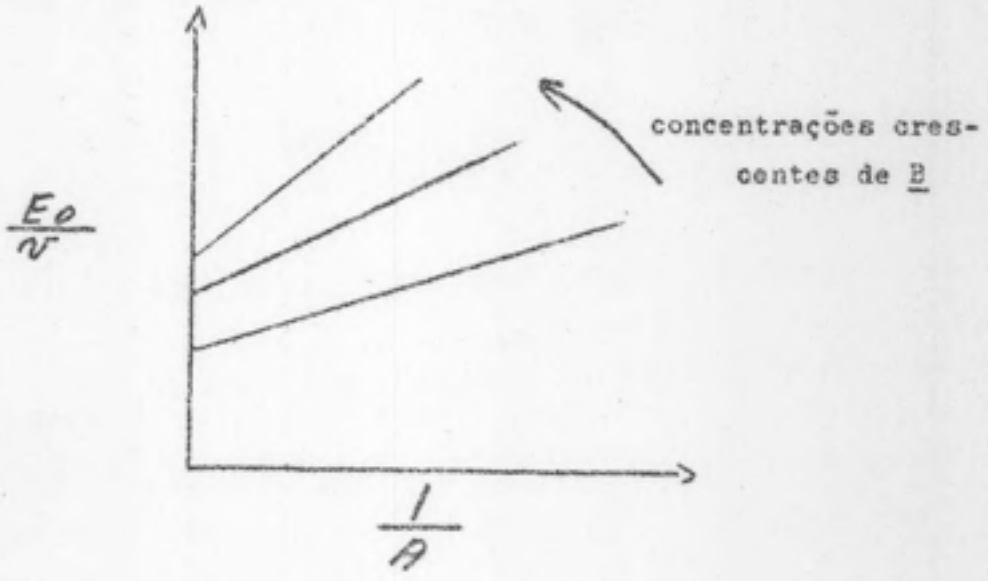
"Statistical Estimations in Enzyme Kinetics"
Biochem. J. (1961), 80, 324 - 333.

## 2.5. Determinação gráfica das constantes $\Phi_0, \Phi_1, \Phi_2, \Phi_{12}$

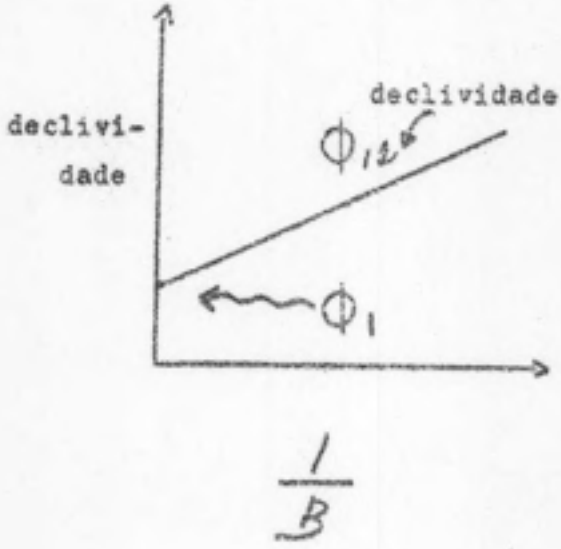
### 2.5.1. Tomando o sistema binário ordenado:

$$\frac{E_0}{v} = \Phi_0 + \frac{\Phi_1}{A} + \frac{\Phi_2}{B} + \frac{\Phi_{12}}{AB}$$

Primeiramente, coloca -se num gráfico:

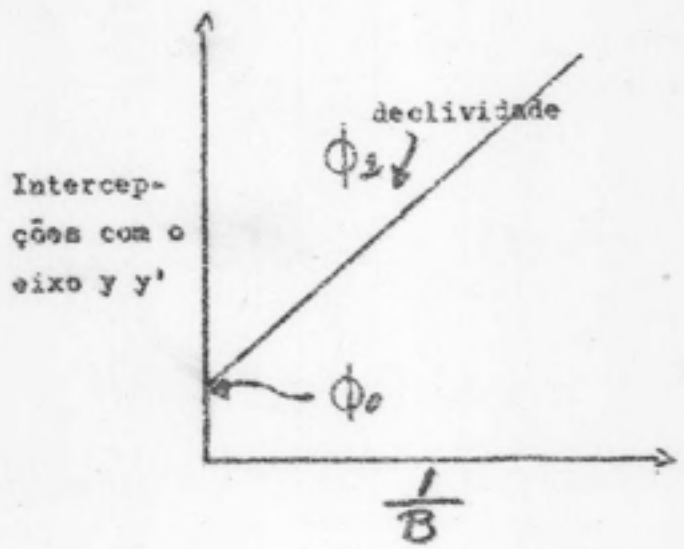



2.5.2. Tomando os dados das declividades do gráfico 2.5.1 vs. $\frac{1}{B}$, temos:



2.5.3. Tomando os valôres das intercepções com o eixo dos y y' do gráfico 2.5.1. vs. $\frac{1}{B}$

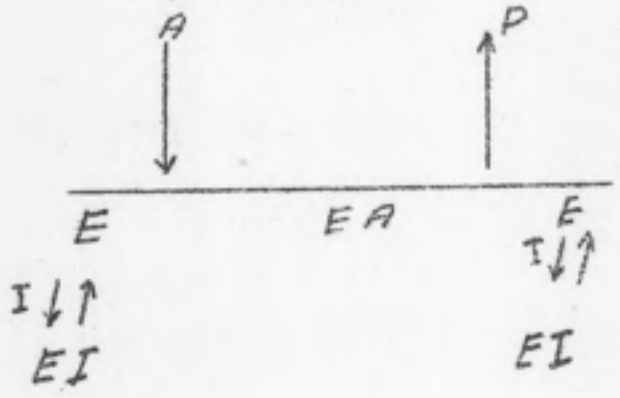
temos:



## 3. Cinética de Reações Catalisadas por enzimas, com inibidor

### 3.1. Inibidor combina com a enzima (E)

#### 3.1.1. Modêlo




com a formação do complexo (EI), reduz-se a concentração total de enzima.

$$E + S \underset{K_2}{\overset{K_1}{\rightleftarrows}} (ES) \xrightarrow{K_3} E + P$$

$$I \downarrow\uparrow$$

$$(EI)$$

#### 3.1.2. Derivação

Tomando a seguinte reação:

$$E + I \rightleftarrows (EI), \text{ em que}$$

$$Ki = \frac{(E)(I)}{(EI)} = \text{constante de dissociação do complexo } (EI),$$

portanto, $(EI) = (E) \cdot \frac{I}{Ki}$

Relações básicas:

(a) $$\frac{d(ES)}{dt} = K_1(E)(S) - (K_2 + K_3)(\overline{ES}) = 0$$

(b) $$(\overline{ES}) = \frac{K_1(E)(S)}{K_2 + K_3} = \frac{(E)(S)}{Km}$$

(c) $$E_t = E + (\overline{ES}) + (\overline{EI}) = E\left(1 + \frac{I}{Ki}\right) + (\overline{ES})$$

(d) $$E = \frac{Et - (\overline{ES})}{1 + \frac{I}{Ki}}$$

(e) $$(\overline{ES}) = \frac{(E)(S)}{Km} = \frac{S}{Km}\left(\frac{Et - \overline{ES}}{1 + I/Ki}\right)$$

$$= \frac{(S)(Et)}{Km(1 + I/Ki} - \frac{(\overline{ES})(S)}{Km(1 + I/Ki)}$$

(f) $$(\overline{ES})\left(1 + \frac{S}{Km(1 + I/Ki)}\right) = \frac{(S)(Et)}{Km(1 + I/Ki)}$$

$$(g)\quad (\bar{ES}) = \frac{\frac{(S)(Et)}{Km(1+I/Ki)}}{1+\frac{(S)}{Km(1+I/Ki)}} = \frac{(S)(Et)}{Km(1+I/Ki)+S}$$

$$(h)\quad v = K_3(\bar{ES}) = \frac{K_3(S)(Et)}{Km(1+I/Ki)+S}$$

sendo $V_{max} = K_3(Et)$

$$(i)\quad v = \frac{V_{max}(S)}{Km(1+I/Ki)+(S)} \quad \text{ou} \quad \frac{1}{v} = \frac{Km(1+I/Ki)}{Vmx}\cdot\frac{1}{S}+\frac{1}{V_{max}}$$

3.1.3. Usando a formulação de Dalziel , tem-se que:

a) sem inibição

$$\frac{E_0}{v} = \frac{1}{K_3}\left(\frac{K_2+k_3}{K_1}\right)\cdot\frac{1}{S}$$

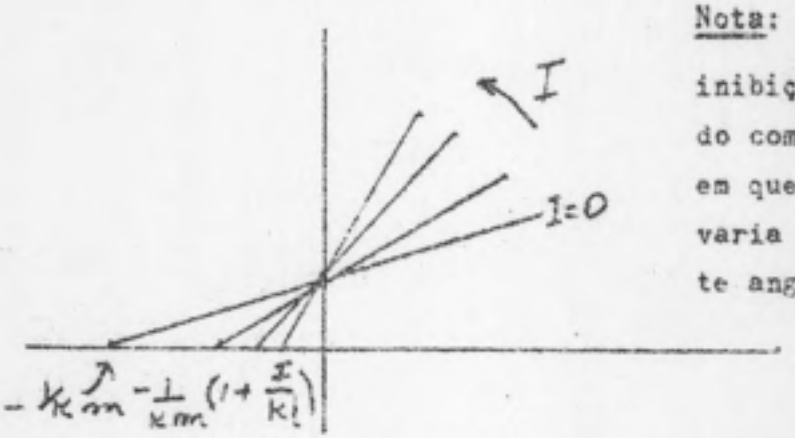
$$\frac{E_0}{v} = \frac{\bar{ES}}{v} + \frac{E}{v}$$

b) com inibição

$$\frac{E_0}{v} = \frac{\bar{ES}}{v} + \frac{E}{v} + \frac{\bar{EI}}{v} \quad \text{ou}$$

$$\frac{E_0}{v} = \Phi_0 + \frac{\Phi_1}{S}\left(1+I/K_I\right)$$

3.4. Num gráfico:




Nota: êste tipo de inibição é conhecido como Competitiva em que o inibidor varia o coeficiente angular $\phi_1$.

3.2. Inibidor combina com o complexo $(\overline{ES})$

3.2.1. Modêlo

$$E + S \rightleftharpoons (\overline{ES}) \longrightarrow E + P$$

$$+$$

$$I$$

$$\downarrow\uparrow$$

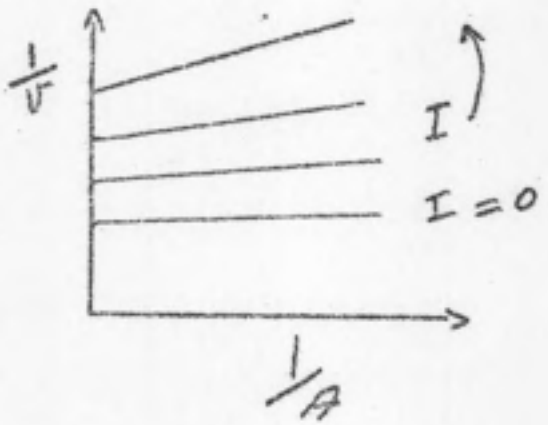
$$(\overline{ESI})$$

3.2.2. Equação

Seguindo os mesmos passos discutidos em (1), chega-se a conclusão que:

$$\frac{E_o}{v} = \Phi_o \left(1 + \frac{I}{K_i}\right) + \frac{\Phi_1}{A}$$

3.2.3. Num gráfico, tem-se que:




Como se vê pela equação acima, o inibidor influencia no valor de $\emptyset_o$, ou seja, modificando os valôres de Vmax.

Nota- Este tipo de inibição é conhecido com o nome de incompetitiva

3.5. Inibidor combina com (S) e com o complexo ($\overline{ES}$)

3.5.1. O modêlo

$$E + S \rightleftharpoons (\overline{ES}) \rightarrow E + P$$

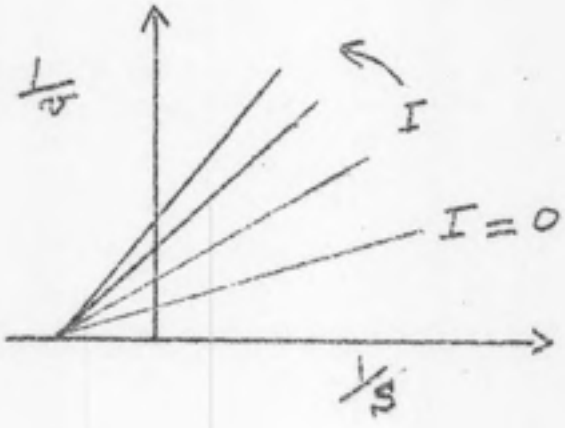
$$\begin{array}{ccc} + & + & + \\ I & I & I \\ \downarrow\uparrow & \downarrow\uparrow & \downarrow\uparrow \\ (\overline{EI}) & (ESI) & (\overline{EI}) \end{array}$$

3.5.2. Equação

Por uma dedução simples chega-se à conclusão que:

$$\frac{E_o}{v} = \Phi_o \left(1 + \frac{I}{K_1}\right) + \frac{\Phi_1}{A}\left(1 + \frac{I}{K_2}\right)$$

3.5.3. Num gráfico:




O inibidor afeta os valôres de $\emptyset_o$ (intercessão com o eixo y y') e $\emptyset_1$ (declividade da reta).

Este tipo de inibição é conhecido com o nome de Não-competitiva.

3.6. Inibição por substratos

Alguns substratos podem em elevada concentração se comportar como inibidores, o que é verificado pelo gráfico 1/v x 1/S.

3.6.1. Modêlo

$$E + S \rightleftarrows (\bar{E}\bar{S}) \longrightarrow E + P$$

$$+ \qquad\qquad + \qquad\qquad +$$

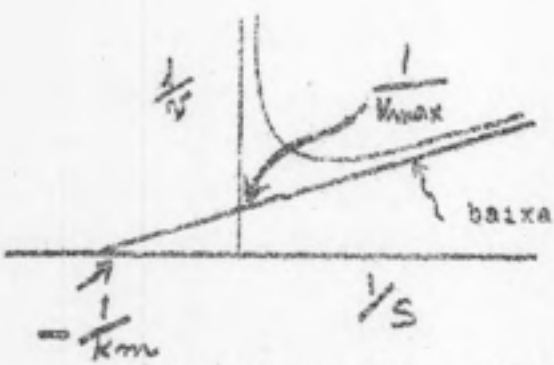
$$S \qquad\qquad S \qquad \text{(alta concentração)}$$

$$\downarrow\uparrow \qquad\qquad \downarrow\uparrow$$

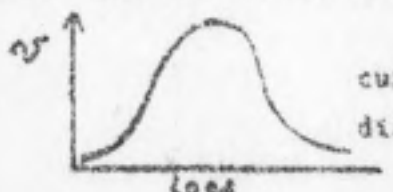
$$(SE) \qquad\qquad (\bar{S}\bar{E}S) \quad \text{(o qual não se transforma em produtos)}$$

ligado a outro centro ≠ do centro ativo

3.6.2. Num gráfico




Enzimas que apresentam êste tipo de comportamento possuem cinética muito complicada e difícil de ser analisada. Para que o experimento tenha maior garantia de que se defronte com o problema de inibição por substrato é sempre bom fazer a seguinte análise gráfica.




curva simétrica semelhante à distribuição normal

## 4. O procedimento de King e Altman para derivação de equações.

### 4.1. Princípios sôbre o sistema

Usando métodos algébricos simples, só é possível derivar equações fazendo aproximações, tais como: $P \cong 0$ ou $Q \cong 0$, sendo P e Q produtos de uma reação.

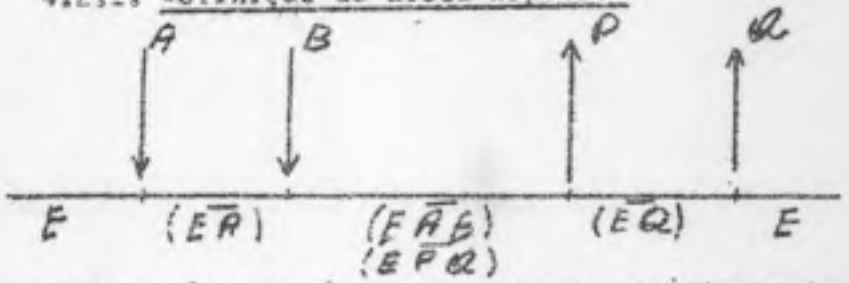
Em equações mais complicadas como no caso das casualizadas (random), é mesmo difícil ou quase impossível chegar à alguma forma para $v_c$ mesmo usando aproximações como as sugeridas acima.

King e Altman em 1956 propuseram um sistema bem simplificado o que provém de uma análise de determinantes de um sistema contendo nEXi formas de enzima.

Básicamente o método foi desenvolvido baseado no método de Cramer para cálculo da concentração relativa de cada espécie particular $EX_i$. O leitor que estiver interessado no método deve-se referir ao trabalho original de King e Altman: J. Phys. Chem. 60 - 1375 - 1378 (1956).

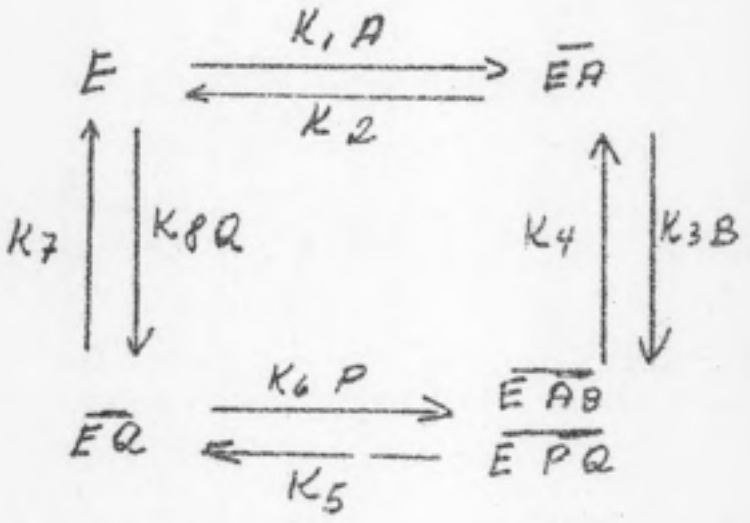
### 4.2. Como usar o metodo

#### 4.2.1. Definição da nossa hipótese




Nota: é impossível distinguir, cinèticamente, as formas $(E\overline{AB})$ e $(E\overline{PQ})$

4.2.2. Dar uma forma geométrica ao mecanismo




4.2.3. Escrever as combinações geométricas

possíveis de linhas que ligam as formas interconversíveis da enzima:

Êste nº(a) pode ser calculado pela forma,

$$a = \frac{m!}{(n-1)!\,(m-n+1)!}\,,$$ onde

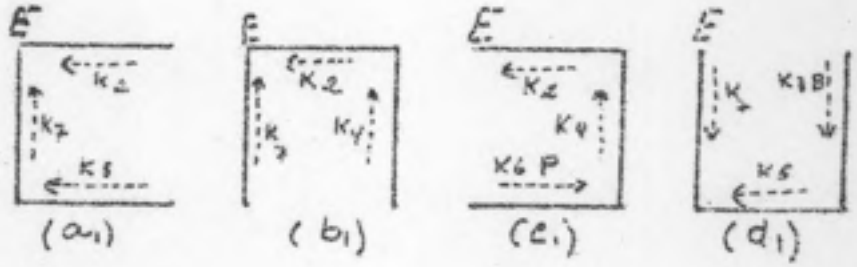
m = nº de linhas básicas na figura

n = nº de formas de enzima

No caso citado em 4.2.2., teremos:

4.2.3. Cálculo das frações $\frac{EX_i}{E_0}$ :

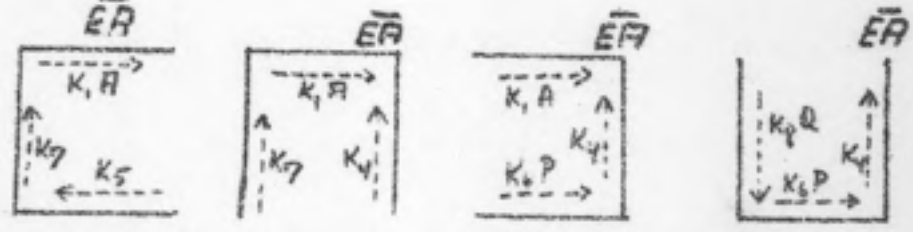
a) $\frac{E}{E_0}$




A fração $\frac{E}{E_0}$ será $= \frac{K_1K_5K_7 + K_2K_4K_7 + K_2K_4K_6P + K_3K_5K_7B}{\sum}$

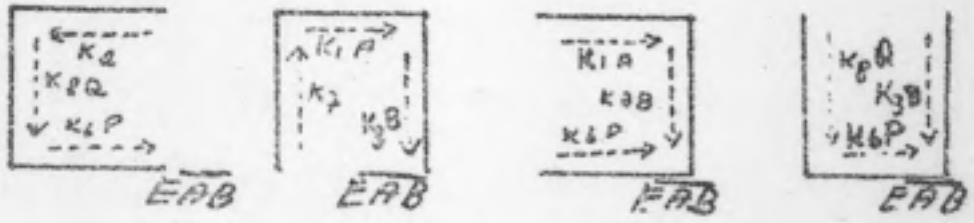
onde $\sum$ = somatória que aparece mais tarde

b) $\frac{\overline{EA}}{E_0}$




A fração $\frac{\overline{EA}}{E_0}$ será $= \frac{K_1K_5K_7A + K_1K_4K_7A + K_1K_4K_6QP + K_4K_6K_8PA}{\sum}$

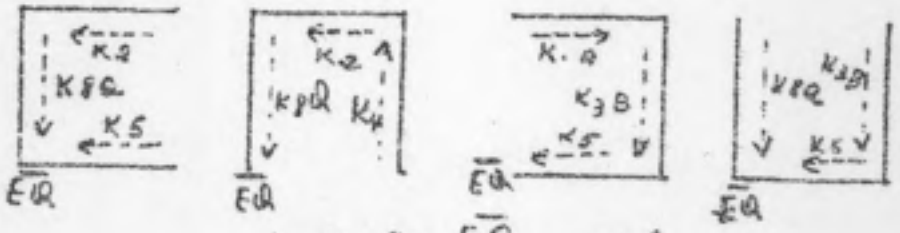
c) $\dfrac{\overline{EAB}}{E_0}$




A fração $\dfrac{\overline{EAB}}{E_0}$ será

$$\frac{K_2K_6K_8PQ + K_1K_3K_7AB + K_1K_3K_4BP + K_3K_4K_8BPQ}{\Sigma}$$

d) $\dfrac{\overline{EQ}}{E_0}$




A fração $\dfrac{\overline{EQ}}{E_0}$ será

$$\frac{K_2K_5K_8Q + K_2K_4K_8Q + K_1K_3K_5AB + K_3K_5K_8BQ}{\Sigma}$$

4.2.4. Expressão para velocidade

$$\frac{dQ}{dt} = v = K_7\,\overline{EQ} - K_8\,[E]\,[Q]$$

Cálculo de $\frac{v}{E_0}$:

$$\frac{v}{E_0} =$$

$$\frac{[K_7(K_2 + K_5K_8Q + K_2K_4K_8Q + K_1K_3K_5AB + K_3K_5K_8BQ) - K_8Q(K_2K_5K_7 + K_3K_4K_7 + K_2K_4K_6P + K_3K_5K_7B)]}{\sum}$$

$$\frac{v}{E_0} = \frac{K_1K_3K_5K_7AB - K_2K_4K_6K_8PQ}{\sum}$$

A $\sum$ (somatória total) = soma dos numeradores das expressões para

$$\frac{EK_i}{E_0}\left(\frac{E}{E_0} + \frac{\overline{EA}}{E_0} + \frac{\overline{EAB}}{E_0} + \frac{\overline{EQ}}{E_0}\right)$$

4.2.5. Cálculo da expressão $\frac{E_0}{v}$:

Fazendo [P] e [Q] = 0, ou seja, sem inibição pelos produtos da reação, tem-se que:

$$\frac{v}{E_0} = \frac{K_1K_3K_5K_7AB}{K_2(K_4+K_5)K_7 + K_1A(K_4+K_5)K_7 + K_3K_5K_7B + K_1K_3AB(K_5+K_7)}$$, portanto,

$$\frac{E_0}{v} = \frac{K_5+K_7}{K_5K_7} + \frac{1}{K_1A} + \frac{K_4+K_5}{(K_3K_5)B} + \frac{K_2(K_4+K_5)}{K_1K_3K_5AB}$$

Usando a representação de Dalziel:

$$\frac{E_o}{v} = \Phi_0 + \frac{\Phi_1}{A} + \frac{\Phi_2}{B} \quad \frac{\Phi_{12}}{AB},$$

onde $\Phi_0 = \frac{K_5 + K_7}{K_5 K_7}$ ; $\Phi_1 = \frac{1}{K_1}$ ; $\Phi_2 \quad \frac{K_4 + K_5}{K_3 K_5}$ ;

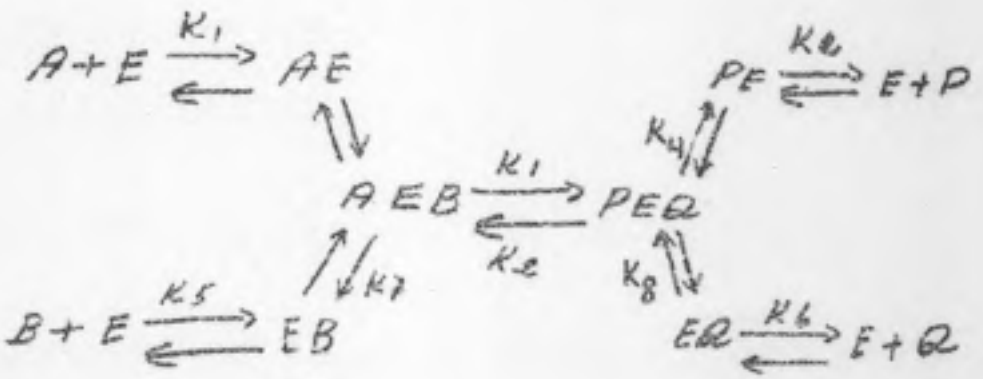
$$\Phi_{12} = \frac{K_2(K_4 + K_5)}{K_1 K_3 K_5}$$

## 4.3. O procedimento de King e Altman em reações complexas

Os mecanismos casualizados ("Random") são um dos tipos mais complexos para serem determinados. Estudos recentes em JBC provam que o procedimento de King e Altman é também útil para este tipo de mecanismo.

Para simplificar a dedução empregam-se constantes de equilíbrio em vêz de constantes de proporcionalidade .

### 4.3.1. Um exemplo de mecanismo casualizado

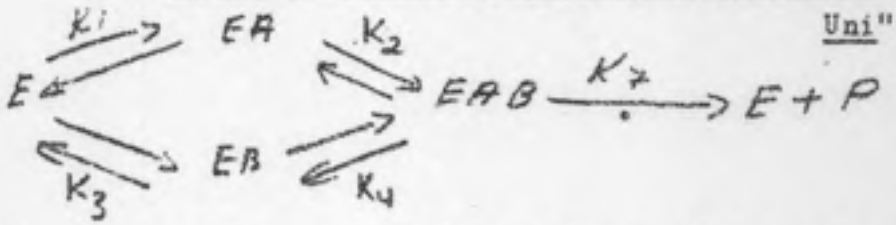


Nêste tipo de mecanismo em que o ligamento e desligamento de A ou B na enzima é completamente ao acaso e não depende do que está prèviamente ligado ao mesmo, pode- se dizer que:

a) $K_1 = K_7$ e $K_5 = K_3$ (na reação para frente)

b) $K_2 = K_8$ e $K_6 = K_4$ (na reação reversa)

4.3.2. Esquema para um mecanismo casualizado "Bi-Uni"




(*) todos os outros passos são bem rápidos e êste pode ser considerado o passo que limita a velocidade da reação. Êste passo é, pràticamente, irreversivel desde que $[P]_o \cong 0$

Dedução

a)- velocidade

$$\frac{\partial P}{\partial t} = \nu K_f \overline{EAB}$$

b)- constante de equilíbrio

$$b_1)\ K_1 = \frac{\overline{EA}}{[E][A]}; \qquad b_2)\ K_2 = \frac{\overline{EAB}}{(\overline{EA})(B)}$$

$$b_3)\ K_3 = \frac{\overline{EB}}{[E][B]}; \qquad b_4)\ K_4 = \frac{\overline{EAB}}{[\overline{EB}][A]}$$

c)- formas de enzimas

$$\overline{EAB} = K_4 A(\overline{EB}) \qquad \overline{EA} = \frac{\overline{EAB}}{K_2 B}$$

$$\overline{EB} = K_3 (E)(B)$$

$$E = \frac{(\overline{EA})}{K_1 A} \qquad \overline{EB} = \frac{\overline{EAB}}{K_f A} = \frac{v}{K_f K_4 A}$$

$$E = \frac{\overline{EB}}{K_3 B} = \frac{v}{K_f K_3 K_4 AB}$$

$$\overline{EA} = K_1(E)(A) = \frac{v_i K_1 \cancel{A}}{K_f K_4 \cancel{A} K_3 B} = \frac{v K_1}{K_f K_3 K_4 B}$$

$$\overline{EAB} = \frac{v}{K_f}$$

Usando a relação $\frac{E_o}{v}$

$$\frac{E_o}{v} = \frac{1}{K_f} + \frac{1}{K_f K_4 A} + \frac{1}{K_2 K_f B} + \frac{1}{K_3 K_4 K_f AB}$$

ou

$$\frac{E_o}{v} = \Phi_o + \frac{\Phi_1}{A} + \frac{\Phi_2}{B} + \frac{\Phi_{12}}{AB}$$

## 5. Determinação do mecanismo de Reações Catalisadas por enzimas

### 5.1. Uso de inibição pelos produtos da reação

Antes de examinar o problema da inibição da reação E + S ou da transformação ES ⟶ E + P, vamos recordar alguma coisa sôbre os tipos de inibição e as relações entre a concentração do inibidor e intersecção com y y' assim como a declividade da reta num gráfico 1/v x 1/S.

#### 5.1.1. Na inibição competitiva

$$\frac{1}{v} = \frac{K}{V}\left(1 + \frac{I}{ki}\right)\frac{1}{S} + \frac{1}{V}; \quad (y = ax + b)$$

$b = \frac{1}{V}$ = intersecção com y y', não varia com a presença do inibidor

$a = \frac{K}{V}\left(1 + \frac{I}{ki}\right)$ = declividade da reta a qual varia positivamente a medida que a concentração do inibidor aumenta.

#### 5.1.2. Na inibição incompetitiva

$$\frac{1}{v} = \frac{K}{V}\left(\frac{1}{S}\right) + \frac{1}{V}\left(1 + \frac{I}{Ki}\right); \quad (y = ax + b)$$

a) declividade, não sofre alteração pela presença do inibidor.

b) intersecção com y y', é alterada pela presença do inibidor.

5.1.3. Na inibição não competitiva

$$\frac{1}{v} = \frac{K}{V}\left(1 + \frac{I}{Ki}\right)\left(\frac{1}{S}\right) + \frac{1}{V}\left(1 + \frac{I}{Ki}\right)$$

declividade — intersecção

Ambos a e b da equação da reta ( $y = a\,x + b$) são variáveis.

Neste caso as retas, para $\neq [I]$, se encontram no ponto definido por $R - \frac{1}{K}\left(\frac{Ki \text{ decliv.}}{Ki \text{ inters.}}\right)$ e $\frac{1}{V}\left(1 - \frac{Ki \text{ decliv.}}{Ki \text{ inters.}}\right)$

Na inibição linear não competitiva as retas se cruzam no eixo XX', portanto, possuem o mesmo valor para Ki.

5.1.4. Inibição por produtos

Considere o seguinte sistema:

$$E + A \rightleftarrows \overline{EA} + B \rightleftarrows E\overline{AB} \rightleftarrows EQ + P$$

$$EQ \updownarrow E + Q$$

Num exame rápido da equação acima vê-se que A reage com a forma livre da enzima E, o mesmo acontecendo com Q. Portanto, já podemos de antemão predizer que mantendo a concentração de B constante e $[P] = 0$, Q será um inibidor competitivo de A.

Fazendo estudos desta natureza pode-se chegar a constatação do provável mecanismo da reação enzimática, ou seja, a ordem de entrada dos substratos no centro ativo e a saída dos produtos.

Para estudos de inibição com produtos de uma reação enzimática, é bom seguir os seguintes passos de trabalho:

1º) propor um mecanismo;

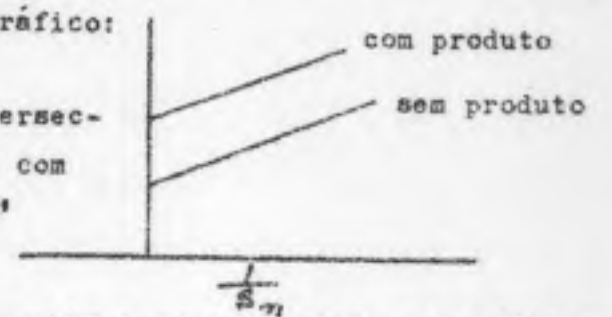
2º) dedução da equação que expressa velocidade em função dos substratos e produtos;

3º) deduzir a expressão matemática para um substrato e um produto com concentrações variáveis, portanto, os demais substratos com concentrações fixas e os demais produtos ausentes;

4º) repetir (3) para todos os substratos e todos os produtos;

5º) verificar como as intersecções com y y', do gráfico 1/v x 1/S, variam com o inverso dos substratos

Num gráfico:




6º) repetir o mesmo descrito para (5) com as declividades das curvas;

7º) relacionam as declividades e as intersecções das várias curvas com as constantes $\phi_0, \phi_1, \phi_2, \phi_{12} \ldots$;

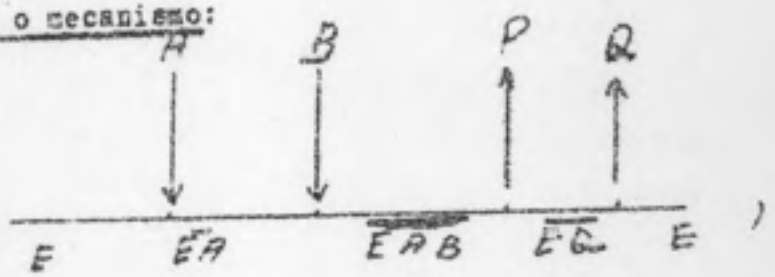
8º) estimar a partir dos gráficos os tipos de inibições causadas pelos diversos produtos;

9º) relacionar as constantes $\phi_0, \phi_1, \phi_2, \phi_{12} \ldots$ com valôres de $(K_m)_{ap}$ e $(K_i)_{ap}$;

10º) comparar os resultados gráficos obtidos com o mecanismo proposto com os de outro mecanismo que poderá fornecer resultados gráficos similares.

Um exemplo:

a) <u>supondo o mecanismo:</u>




b) a seguinte equação para v pode ser encontrada:

$$v = \frac{(k_1 k_3 k_5 k_7 AB - k_2 k_4 k_6 k_8 PQ) E_0}{\begin{aligned} & k_2(k_4+k_5)k_7 + k_2(k_4+k_5)k_8 Q \\ & + k_1(k_4+k_5)k_7 A + k_2 k_4 k_6 P \\ & + k_3 k_5 k_7 B + (k_2+k_4) k_6 k_8 PQ \\ & + k_1 k_3 (k_5+k_7) AB + k_1 k_3 k_6 AB P \\ & + k_1 k_4 k_6 AP + k_3 k_6 k_8 BPQ \\ & + k_3 k_5 k_8 BQ \end{aligned}}$$

c) Para $[P] = 0$ e $[Q] \neq 0$ a seguinte equação pode ser obtida (Dalziel):

$$\frac{E_0}{v} = \Phi_0 + \frac{\Phi_1}{A}\left(1 + \frac{K_9}{K_7} Q\right) + \frac{\Phi_2}{B} + \frac{\Phi_{12}}{AB}\left(1 + \frac{K_9}{K_7} Q\right)$$

Esta é conhecida como a equação da inibição pelo produto Q.

d) Para $[Q]=0$ e $[P]\neq 0$ :

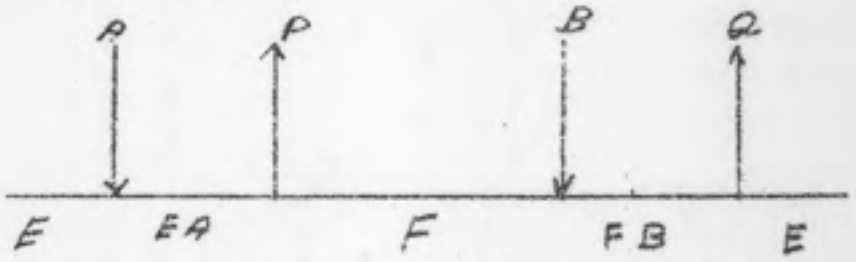
$$\frac{E_0}{v}=\left[\left(Q_0+\frac{K_6 P}{K_5 K_7}\right)+\frac{Q_1}{A}\right]+\left[\left(\frac{Q_2}{B}+\frac{K_4 K_6 P}{K_3 K_5 K_7 B}\right)+\right.$$

$$\left.+\left(\frac{Q_{12}}{AB}+\frac{K_0 K_4 K_6}{K_1 K_3 K_5 K_7}\frac{P}{AB}\right)\right]$$

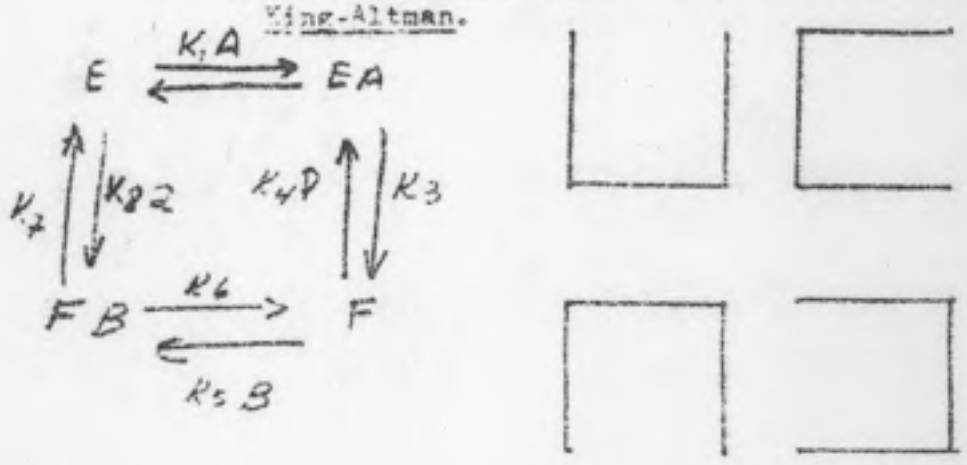
e) Pode-se como nos casos (b) e (d) verificar para A ou B variáveis, qual a influencia de P ou Q na declividade da ou na intersecção da reta obtida pelo gráfico de 1/v x 1/S.

## 5.2. Determinação do mecanismo "Ping-Pong"

### 5.2.1. Modêlo




### 5.2.2. Derivação da expressão para v pelo método de King-Altman.



Para $[P] = 0$, encontra-se que:

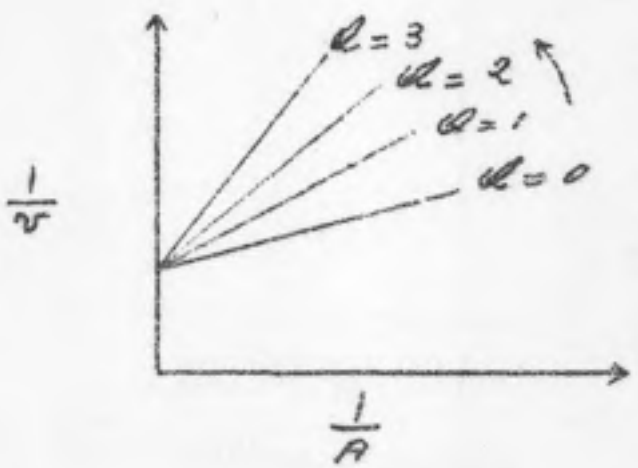
$$\frac{E_o}{v} = \frac{K_3 + K_7}{K_3 K_7} + \frac{K_2 + K_3}{K_1 K_3} \cdot \frac{1}{A} + \frac{(K_2 + K_3) K_8}{K_1 K_3 K_7} \cdot \frac{Q}{A}$$

$$+ \frac{K_5 + K_7}{K_5 K_7} \cdot \frac{1}{B} + \frac{(K_2 + K_3) K_6 K_8 Q}{K_1 K_3 K_5 K_7 A B}$$

5.2.3. Usando outra formulação (Dalziel) para B constante e A variável:

$$\frac{E_o}{v} = \left(Q_o + \frac{Q_2}{B}\right) + \frac{Q_1}{A}\left[\left(1 + \frac{K_8}{K_7} Q\right) + \frac{K_6 K_8 Q}{K_5 K_7 B}\right]$$

Fazendo um gráfico de 1/A x 1/v tem-se que:

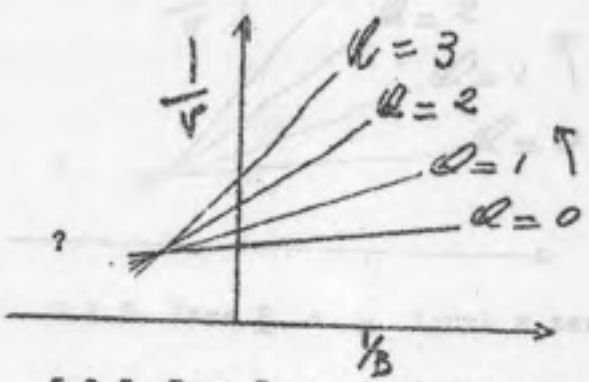



vê-se por êste gráfico que Q está competindo com A pela mesma forma enzimática

5.2.4. Usa outra vez a formulação de Dalziel para A constante e B variável:

$$\frac{E_o}{v} = \left[Q_o + \frac{Q_1}{A}\left(1 + \frac{K_8 Q}{K_7}\right)\right] + \frac{1}{B}\left[Q_2 + \frac{Q_1 K_6 K_8 Q}{K_5 K_7 A}\right]$$

Num gráfico teremos:

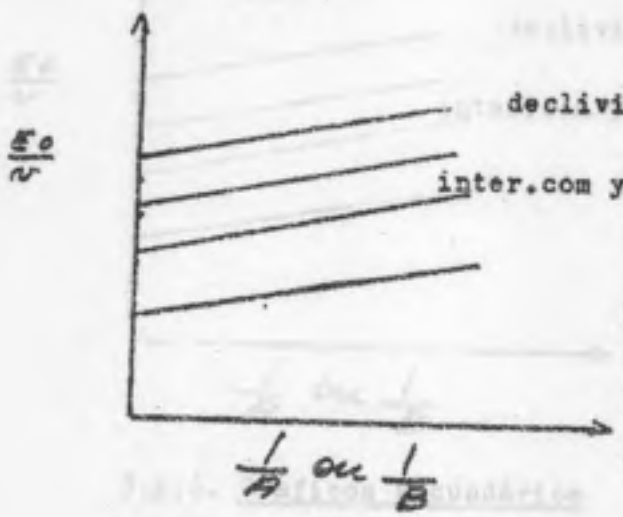



vê-se que Q não compete com B pela mesma forma da enzima.

5.2.5. Para P e Q igual a zero:

$$\frac{E_o}{v} = Q_0 + \frac{Q_1}{A} \qquad \frac{Q_2}{B}$$

Num gráfico




declividade = $Q_1$

inter.com y y' = $y y' = Q_0 + \frac{Q_2}{B}$

Nota: Êstes dois gráficos ($\frac{E_o}{v} \times \frac{1}{A}$ e $\frac{E_o}{v} \times \frac{1}{B}$) são chamados gráficos primários.

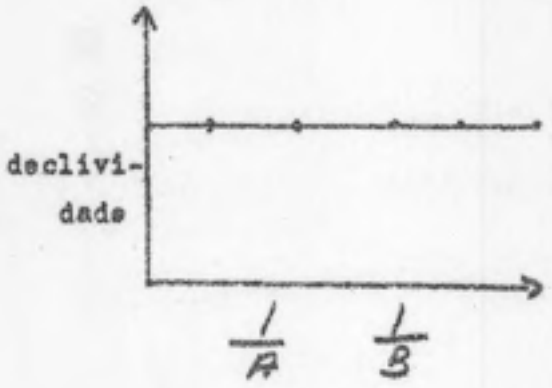
5.2.6. Gráficos secundários

Êstes gráficos feitos a partir dos gráficos primários, usando valôres de declividade x 1/S ou intersecção x 1/S, são indispensáveis para estimar mecanismos enzimáticos.

A êste ponto é bom salientar que nunca se determina um mecanismo de uma reação enzimática cinèticamente.

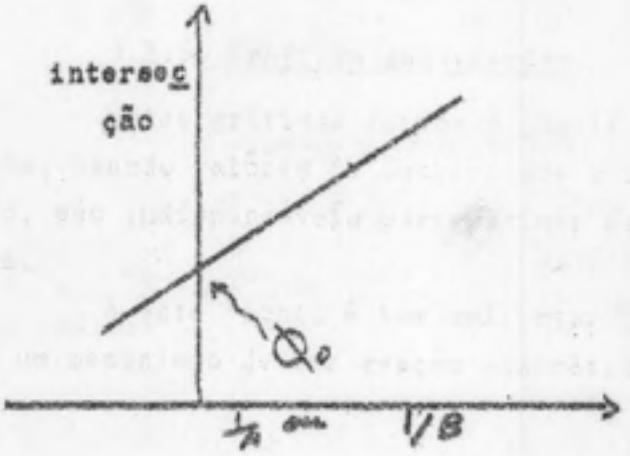
O que se faz com os dados de cinética é eliminar os mecanismos que não se enquadram com os dados experimentais. Para determinação do mecanismo mais provável é feita usando outros processos químicos (marcação com $H_2{}^3O$, $C^{14}$....)

a) declividade x 1/B:




Este resultado é característico do mecanismo "ping-pong".

b) Intersecção $\propto \frac{1}{B}$

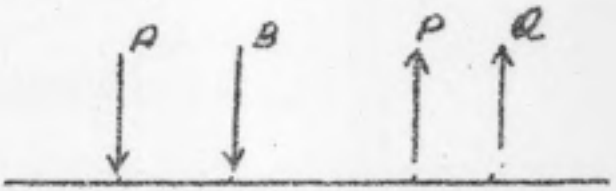


Pela equação da intersecção: Int = $\phi_0 + \frac{\phi_2}{B}, \ell$

$\phi_0$ e $\phi_2$ podem então ser determinados.

5.3. Determinação do mecanismo Bi-Bi ordenado

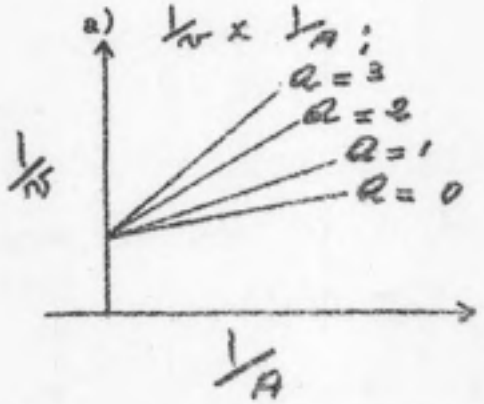
5.3.1. Modêlo




5.3.2. Equação para $[P] = \infty$ e $[Q] \neq 0$:

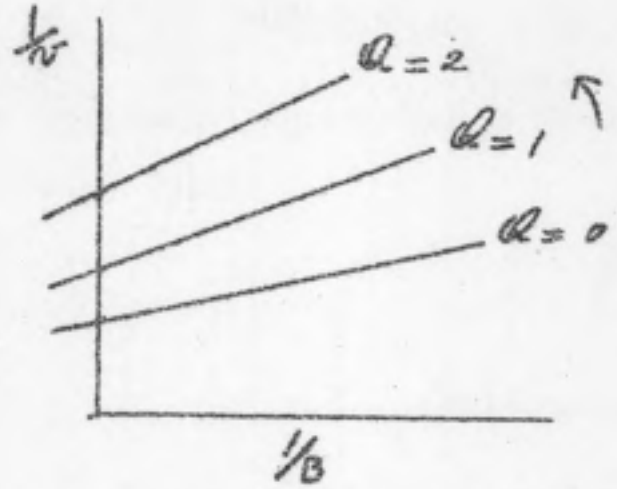
$$\frac{E_o}{v} = \phi_0 + \frac{Q_1}{A}\left(1 + \frac{K_1}{K_7}\ell\right) + \frac{Q_2}{B} + \frac{Q_{12}}{AB}\left(1 + \frac{K_7}{K_8}\ell\right)$$

5.3.3. Gráficos primários da equação 5.3.2.




Vê-se que Q está competindo com A pela mesma forma da enzima.

b) $1/v$ x. $1/B$:




É um tipo de inibição não-competitiva

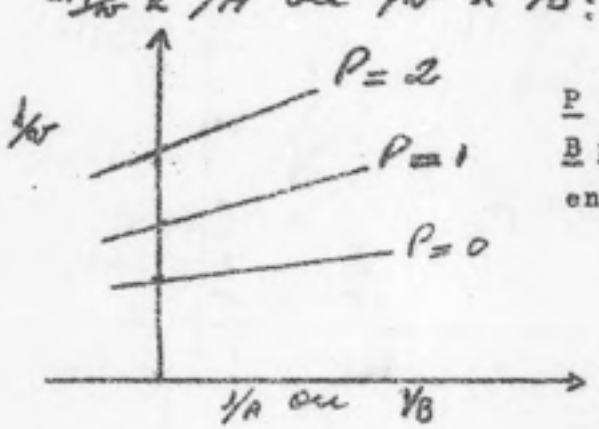
5.3.4. Equação para $[P] \neq 0$ e $[Q] = 0$

$$\frac{E_0}{v} = \left(\Phi_0 + \frac{K_6 P}{K_5 K_7}\right) + \frac{\Phi_1}{A} + \frac{\Phi_2}{B} + \frac{K_4 K_6 P}{K_3 K_5 K_7 B} + \frac{\Phi_{12}}{AB}$$

$$+ \frac{K_2 K_4 K_6 P}{K_1 K_3 K_5 K_7 A B}$$

5.3.5. Gráficos primários da equação 5.3.2.

a) $1/v$ x $1/A$ ou $1/v$ x $1/B$:



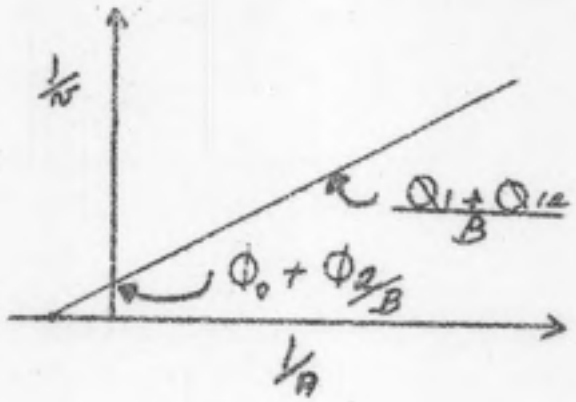

P não compete com A ou B pelas mesmas formas enzimáticas.

5.3.6. Gráficos primários de 1/S x 1/v para P ou Q = 0

a) $1/v \times 1/A$

A equação geral será:

$$\frac{E_0}{v} = \Phi_0 + \frac{\Phi_2}{B} + \frac{1}{A}\left(\Phi_1 + \frac{\Phi_{12}}{B}\right)$$



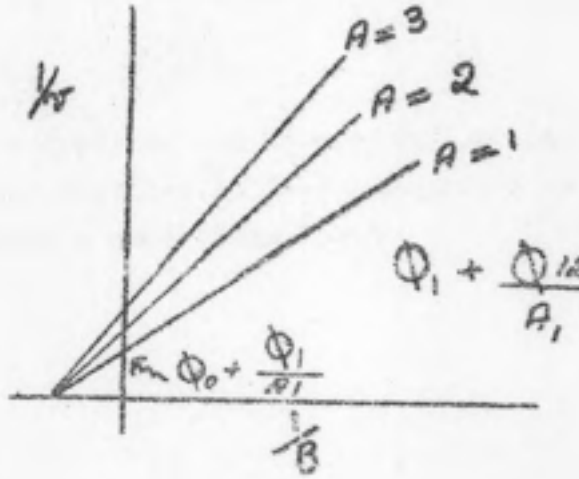

A variável e

B constante

b) $1/v \times 1/B$

A equação será

$$\frac{E_0}{v} = \Phi_0 + \frac{\Phi_1}{A} + \frac{\Phi_2}{B}\left(1 + \frac{\Phi_{12}}{A}\right)$$

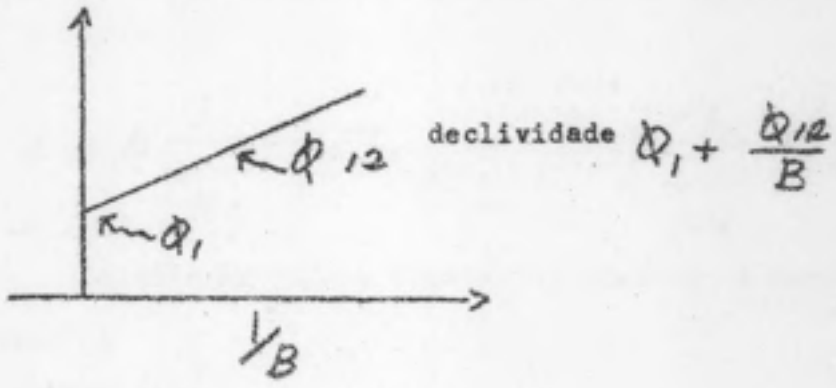



A fixo e

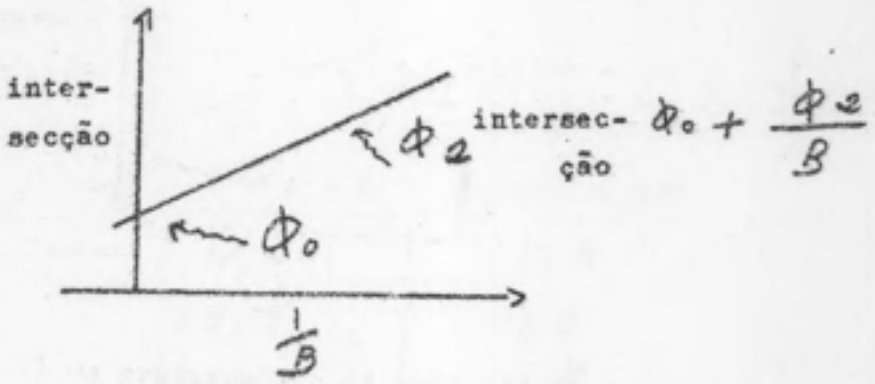
B variável

5.3.6. Gráficos secundários (a partir de 5.3.5.b)

a) declividade X $\frac{1}{B}$ :




b) intersecção x 1/B




c) Os gráficos com os produtos de inibição podem ser fàcilmente feitos seguindo as mesmas normas para o caso "Ping Pong".

## Problemas sôbre Cinética enzimática

1. Mostrar como se deriva a equação para a velocidade inicial ($v_o$) do sistema abaixo, com um substrato:

$$E + A \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftarrows}} (\overline{EA} \rightleftarrows \overline{EP}) \underset{k_4}{\overset{k_3}{\rightleftarrows}} E + P$$

Relacionar também constantes como Km e Vmax com as constantes $\phi_0$ e $\phi_1$

2. Os seguintes dados foram obtidos com uma enzima a $10^{-9}$ M.

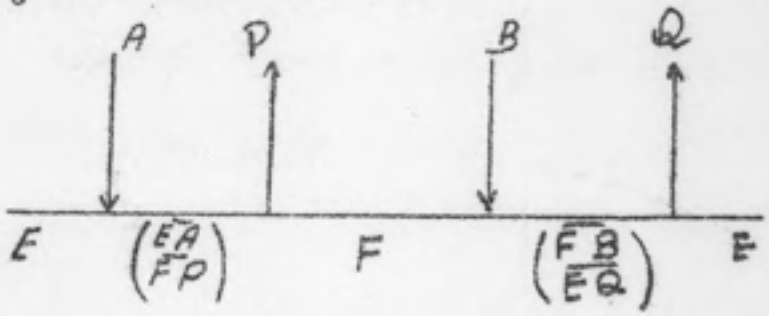
| $\mu l\ CO_2/5 min$ | concentração do substrato $\mu M$ |
|---|---|
| 9,65 | 0,6 |
| 15,2 | 1,0 |
| 22,3 | 1,5 |
| 25,6 | 2,0 |
| 34,5 | 3,0 |
| 40,0 | 4,0 |

Calcular, gràficamente, os parâmetros das seguintes equações:

(a) $\frac{1}{v_0} = \frac{Km}{V}\ \frac{1}{S} + \frac{1}{V}$

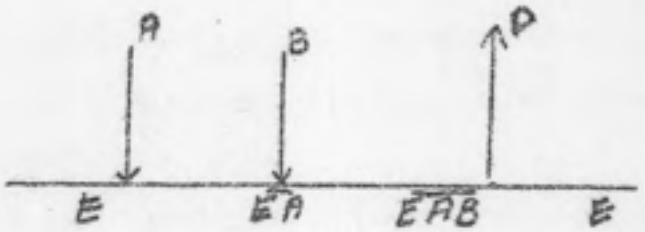
(b) $\frac{F_0}{v_0} = \phi_0 + \frac{\phi_1}{S}$

3. Derivar a equação completa para velocidade inicial ($v_o$) do seguinte mecanismo:




Relacionar os valôres das constantes $\phi_0$, $\phi_1$ e $\phi_2$ com os valôres de $(K_A)ap$ e $(K_B)ap$.

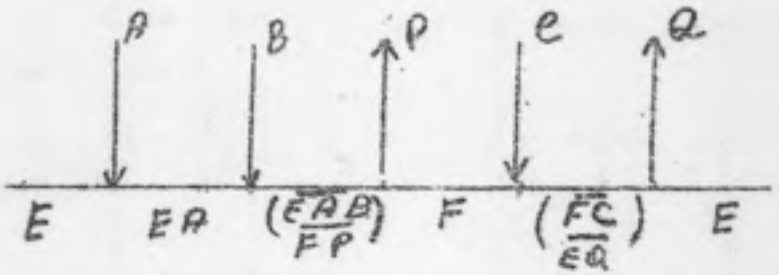
4. Derivar a expressão de $v_o$ em função de $[A]$, $[B]$ e $[P]$ para o mecanismo seguinte.



5. Derivar a equação de $v_o$ para o mecanismo binário ordenado quando:

a) $Q \neq 0$ e $P = 0$ e b) $Q = 0$, $P \neq 0$

6. Dado o mecanismo abaixo:




"Bi Uni Uni Uni Ping-Pong"

Predizer os gráficos resultantes nas seguintes circunstâncias:

a)- $v_o$ para os substratos $\underline{A}$, $\underline{B}$ e $\underline{C}$;

$a_1$)- $1/v_o$ versus 1/A, B sendo o substrato fixo-variável e $\underline{C}$ à concentração de saturação;

$a_2$)- $1/v_o$ versus 1/A, $\underline{C}$ sendo o substrato fixo-variável e $\underline{B}$ à saturação;

$a_3$)- $1/v_o$ versus 1/B, $\underline{C}$ sendo o substrato fixo-variável, $\underline{A}$ à saturação.

b)- Inibição de $\underline{A}$, $\underline{B}$ e $\underline{C}$ pelos produtos da reação:

$b_1$)- $\underline{A}$ variável, $\underline{B}$ fixo e não saturado, $\underline{C}$ saturado, $\underline{Q}$ como inibidor e P=0;

$b_2$)- $\underline{C}$ variável, $\underline{A}$ fixo e não saturado, $\underline{B}$ saturado, $\underline{Q}$ inibidor e P=0

c)- Inibição "dead-end", A, B, C como substratos

$c_1$)- I combina com E: A variável, B e C fixos e não saturados;

$c_2$)- I combina com E: B variável, A e C fixos e não saturados;

$c_3$)- I combina com F: B variável, A e C fixos e não saturados.

Nota: êste mecanismo é encontrado na página 110 e 131-132 do artigo de Cleland.

Respostas de alguns dos problemas formulados

1º problema

a)- $\frac{1}{v} = \frac{Km}{V} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{V}$

b)- $\frac{E_o}{v} = \Phi_o + \frac{\Phi_1}{S}$

c)- $V = \frac{E_o}{\Phi_o}$ e $Km = \Phi_1 \cdot K_3$

2º problema

a)- $Vmax = 2,80 \times 10^{-5}$ µl/seg.

b)- $Km = 2,1 \times 10^{-6}$ M

c)- $\Phi_o = 2,8 \times 10^{-11}$ M µl/seg

d)- $\Phi_1 = 5,6 \times 10^{3}$ $M^2$

4º problema $v = \frac{E_o[K_1 K_3 K_5 AB - K_2 K_4 K_6 P]}{K_2(K_4+K_5) + K_1 A(K_4+K_5+K_3 B) + K_6 P(K_2+K_4) + K_3 K_5 B + K_3 K_6 BP}$

Bibliografia:-

ALBERTY,ROBERT A., 1962 - The Interpretation of Steady State Kinetic Date on Enzymatic Reactions. Brookhaven Symposia in Biology, No. 15, pp. 18-31, June 4-6.

ALBERTY,ROBERT A. 1952. The Relationship between Michaelis Constants, Maximum Velocities and the Equilibrium Constant for an Enzyme-catalyzed Reaction. Amer. Chem. Soc. J., 75 pp. 1928-32.

BERMAN,MONES,SHAHN,EZRA,WEISS,MARJORY F., The Routine Fitting of Kinetic Data to Models: A Mathematical Formalism for Digital Computers. Biophysical Journal, 2,p.275-316, 1962.

BLOOMFIELD,VICTOR,PELLER,LEONARD,ALBERTY,ROBERT A., 1962.Physical and Inorganic Chemistry... Multiple Intermediates in Steady-state Enzyme Kinetics. J. of the Amer.Chem.Soc. 84, pp.4367-4384.

BOCK,ROBERT M., ALBERTY,ROBERT A., 1953. Studies of the Enzyme Fumarase. I. Kinetics and Equilibrium. Amer. Chem. Soc. Journal, 75, pp. 1921-25

CLELAND,W.W., 1963. The Kinetics of Enzyme-Catalyzed Reactions with Two or More Substrates or Products, I. Nomenclature and Rate Equations, pp. 104-137; II. Inhibition: Nomenchature and Theory, pp. 173-187; III. Prediction of Initial Velocity and Inhibition Patterns by Inspection, pp. 188-196. Biochem. Biophys.Acta, 67

DALZIEL,KEITH - 1957. Initial Steady State Velocities in the Evaluation of Enzyme-Coenzyme-Substrate Reaction Mechanisms Acta Chemica Scandinavica, 11, no. 10,pp. 1706-1793.

DOWD,JOHN E., RIGGS,DOUGLAS S. 1965. A comparison of Estimates of Michaelis Menten Kinetic Constants from Various Linear Transformations. J.of Biol. Chem. Vol.240 (2) 863-869.

FRIEDEN,CARL, 1957. The Calculation of an Enzyme-Substrate Dissociation Constant from the Over-all Initial Velocity for Reactions Involving Two Substrates. Amer. Chem. Soc. Journal, 79:1894.

FRIEDEN,CARL, 1964. Treatment of Enzyme Kinetic Data. J. of Biol. Chem. 239, no. 10, pp. 3522-31.

HARADA,KIYOSHI,WOLFE,R.G. 1968. Malic Dehydrogenase. VI.A.Kinetic Study of Hydroxymalonate Inhibition. J.of Biol. Chem. 243, 4123-30.

HARADA,KIYOSHI,WOLFE,R.G., 1968. Malic Dehydrogenase. VI.A Kinetic Study of Hydroxymalonate Inhibition. J.of.Biol. Chem. 243, 4131-37.

KING,E.L., C.ALTMAN, 1956. "A Schematic Method of Deriving the Rate Laws for Enzyme- catalyzed Reactions". J.Phy. Chem. 60: 1375

KING,E.L., 1958. "Unusual Kinetic Consequences of certain Enzyme catalysis Mechanisms". J.Phys. Chem. 60: 1378.

MAHLER, H.R. and E.H.CORDES, 1968. "Biological Chemistry"- Capítulo VI. Harper & Row, Publishers, Inc.

VELICK,SIDNEY F., VAVRA,JOHN. 1962. A kinetic and Equilibrium Analysis of the Glutamic Oxaloacetate Transaminase Mechanism. J.of Biol. Chem. vol. 237 (7), 2109-2122.

W.W.CLELAND. 1964. The Statistical Analysis of Enzyme Kinetic Date. Advances in Enzymology, 29, pp. 1-32.

WILKINSON,G.N. 1961. Statistical Estimations in Enzyme Kinetic Biochem. J., 80 p. 324.

WONG,J. TZE-FEI, HANES,CHARLES S., 1962. Kinetic Formulations for Enzymic Reactions Involving Two Substrates. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology, 48 p. 763-804,