



Cinética Enzimática

Prof Bernardo Dias



Cinética Química ou Bioquímica

A Cinética química ou Bioquímica procura caracterizar e analisar os fatores que influenciam a velocidade de uma reação, química ou Bioquímica, respectivamente.

**Cinética
Enzimática**



Análise quantitativa do efeito de cada um dos fatores na expressão da atividade enzimática: $[E]$, $[S]$, $[P]$, inibidores e ativadores, T , pH e imobilização (heterogênea)

Aplicações:

- Determinar as constantes de afinidade do S e dos inibidores (K_m e K_i);
- Conhecer as condições ótimas da catálise (T , pH, $[S]$ etc);
- Ajudar a elucidar os mecanismos de reação (estudo ordem reação e tipo cinética);
- Determinar a função de uma determinada enzima em uma rota metabólica (para um dado S).



A VELOCIDADE DA REAÇÃO NÃO ESTÁ RELACIONADA COM A ENERGIA DE REAGENTES E PRODUTOS.

CINÉTICA

CINÉTICA

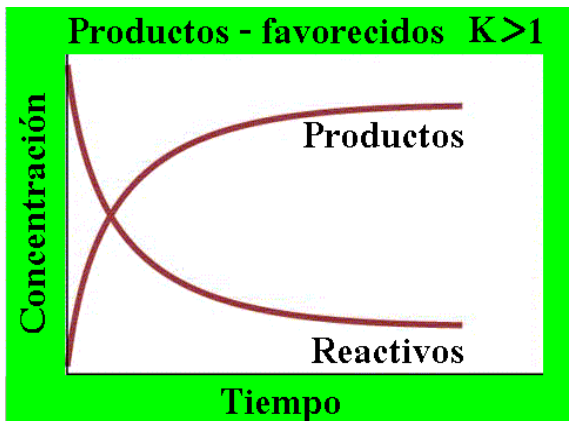
(velocidade)

TERMODINÂMICA

é diferente de

TERMODINÂMICA

(energia $\Delta G = - RT \ln K$ (K cte equilíbrio))



Estudo de uma reação química ou bioquímica específica a uma temperatura determinada .

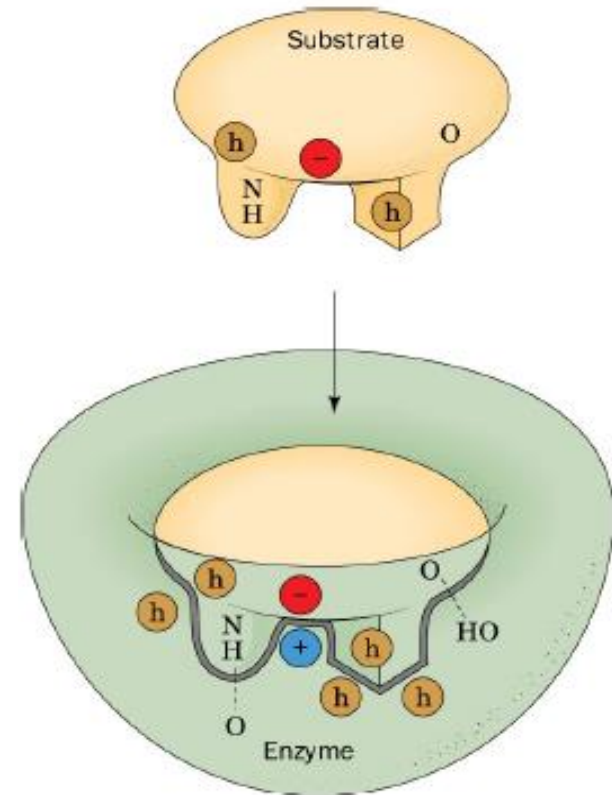
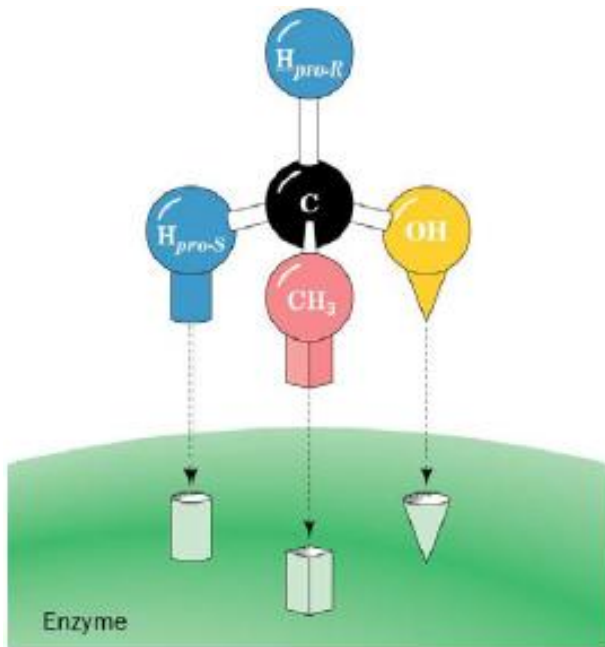
Estuda-se a **Velocidade da reação** medindo-se as mudanças de concentração que ocorrem em um dado intervalo de tempo.



Introdução

Hipótese Chave-Fechadura

Emil Fischer (1894): alto grau de especificidade das enzimas originou
→ **Chave-Fechadura**, que considera que a enzima possui sitio ativo complementar ao substrato, em tamanho, forma e natureza química
→ Cavidade geometricamente rígida

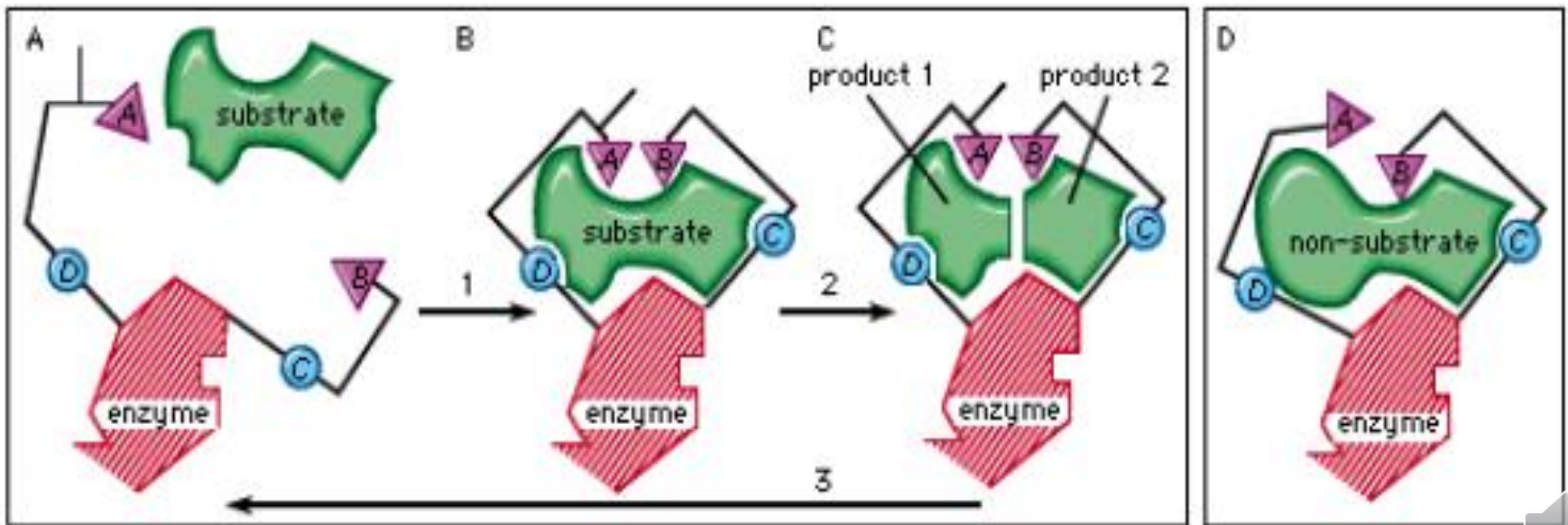


Introdução

Hipótese Encaixe Induzido

Substrato induz mudanças conformacionais na enzima → Alinhamento preciso dos grupos catalíticos e suas ligações com o substrato

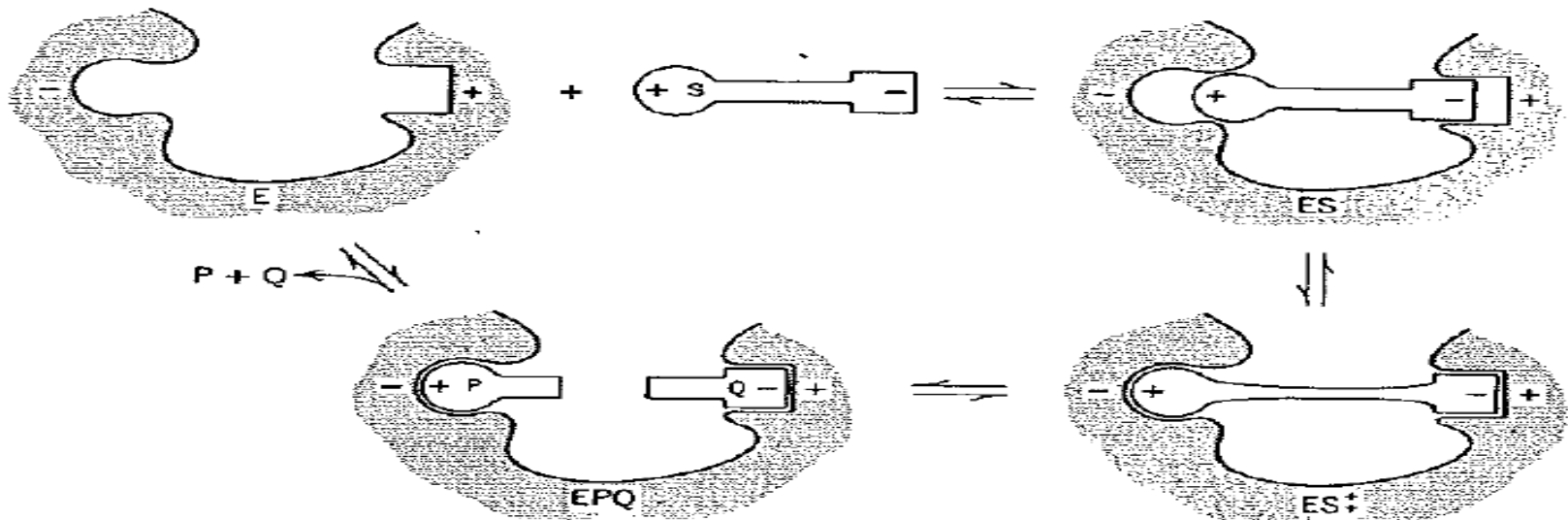
Substratos análogos podem se ligar a enzima → Não induzem apropriadamente o alinhamento dos grupos catalíticos.



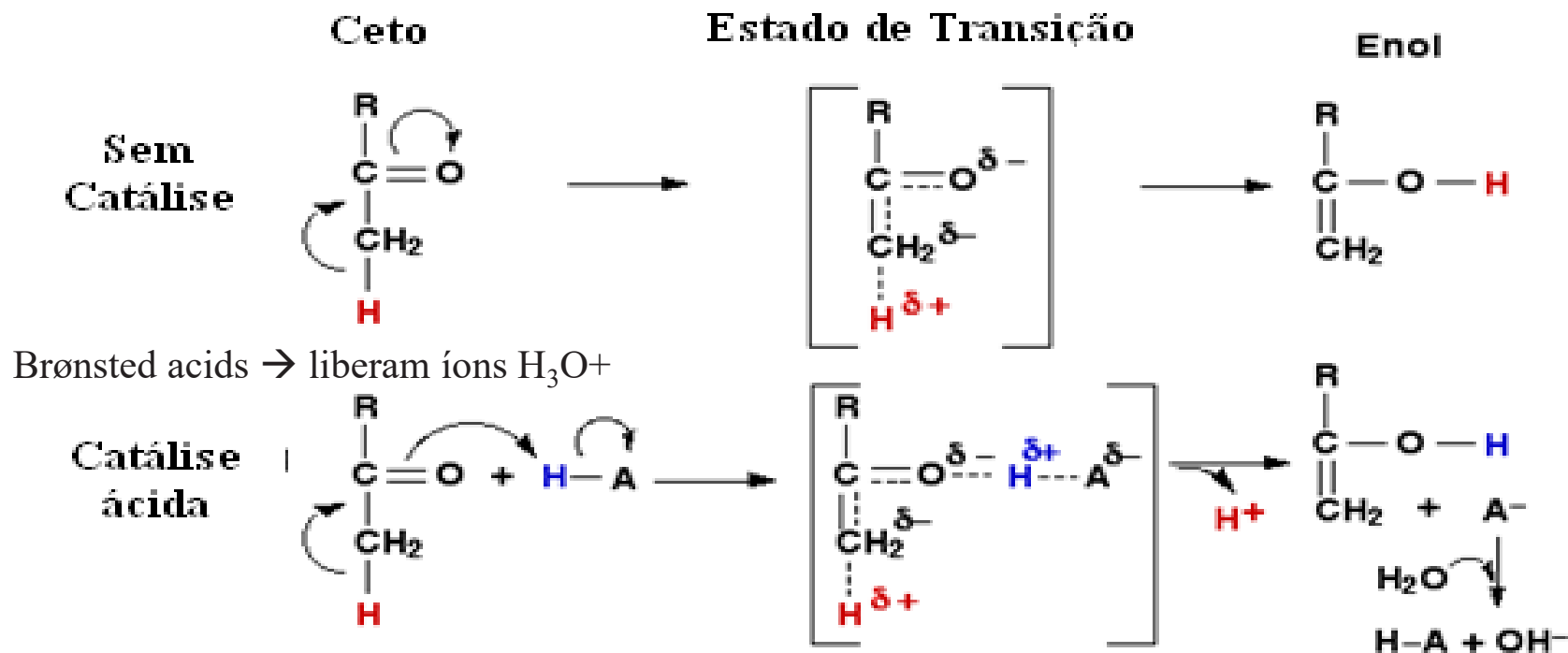
Introdução

Eficiência Catalítica → ↓ **Energia de Ativação** →
Estabilizar o Estado de Transição

- **Orbital steering** → Alinhamento ótimo dos orbitais do substrato e dos grupos catalíticos
- **Stereopopulation control** → Restrição da liberdade rotacional do substrato (“congelamento”)
- **Distorção do Substrato (Rack)** → Ligações formadas entre o substrato e a enzima são tão fortes que levam a uma alteração na molécula de substrato



Estratégias de Catálise



Catálise ácida $\rightarrow$ Transferência parcial de prótons de um ácido para o estado de transição diminuir a energia livre do estado de transição de uma reação



Estratégias de Catálise

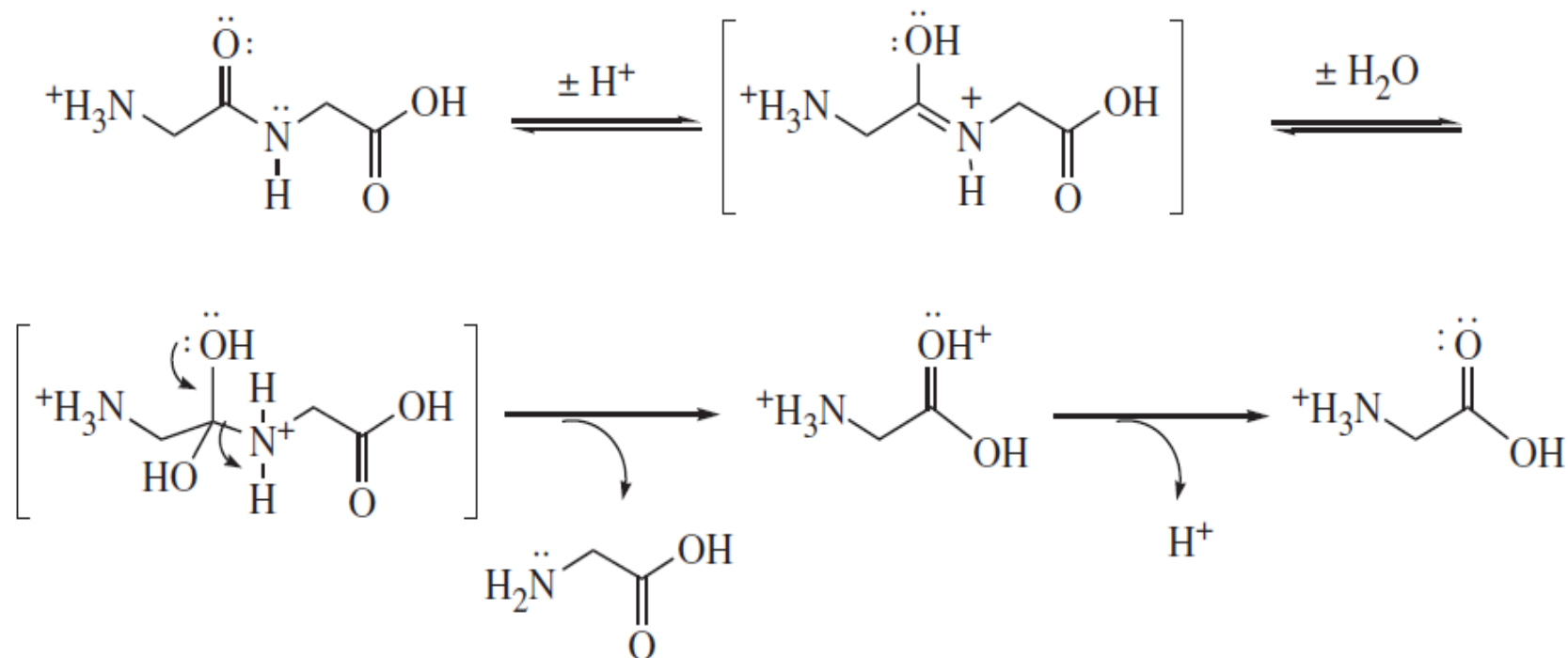
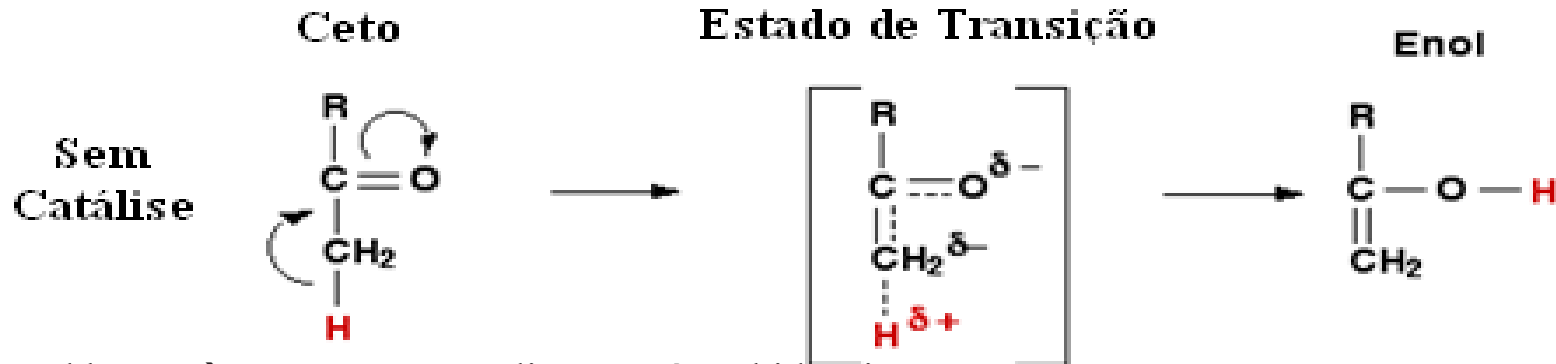


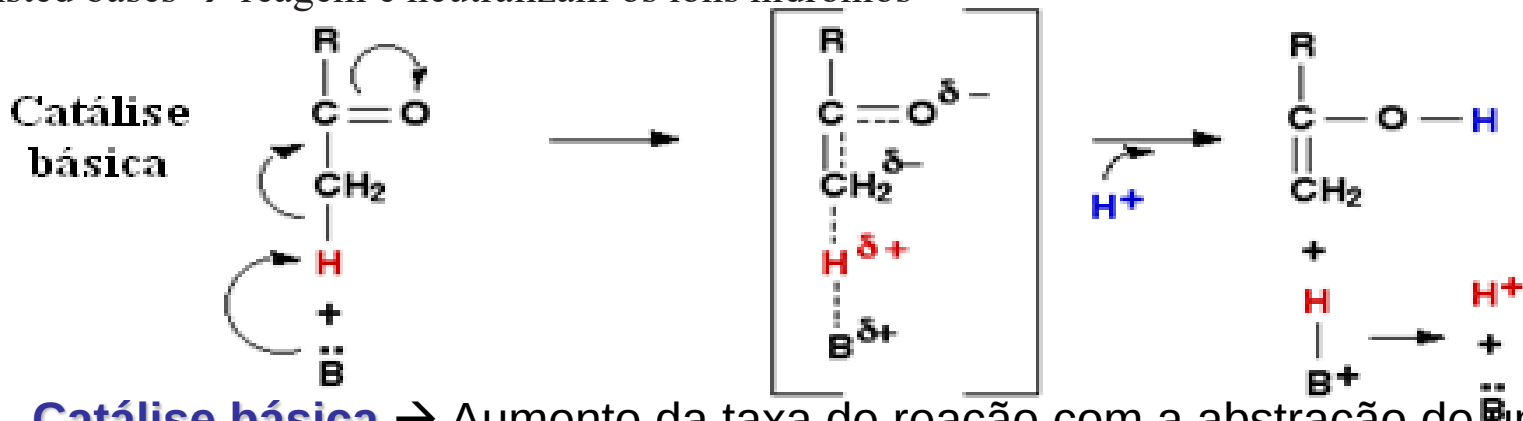
Fig. 1-5. Hydrogen ion catalysis in the hydrolysis of a peptide. Peptide hydrolysis catalyzed by strong acids takes place by specific acid catalysis in which the peptide is first protonated in an equilibrium process. The protonated peptide is highly reactive with water because of the disruption of electron delocalization within the amide linkage and the presence of the positive charge. The addition of water as a nucleophile forms the tetrahedral intermediate, which collapses by cleavage to the two amino acids.



Estratégias de Catálise



Brønsted bases $\rightarrow$ reagem e neutralizam os íons hidrônios



Catálise básica $\rightarrow$ Aumento da taxa de reação com a abstração de um próton por uma base.

Resíduos laterais de Asp, Glu, His, Cys, Thr e Lys podem estar envolvidos.

Ex. Hidrólise de glicosídeos, ésteres e amidas, reações de transferência de grupo fosfato, acila e glicosídeos; desidratação de compostos β -hidroxicarbonílicos; formação e hidrólise de aldíminas (base de Schiff) e cetíminas



Estratégias de Catálise

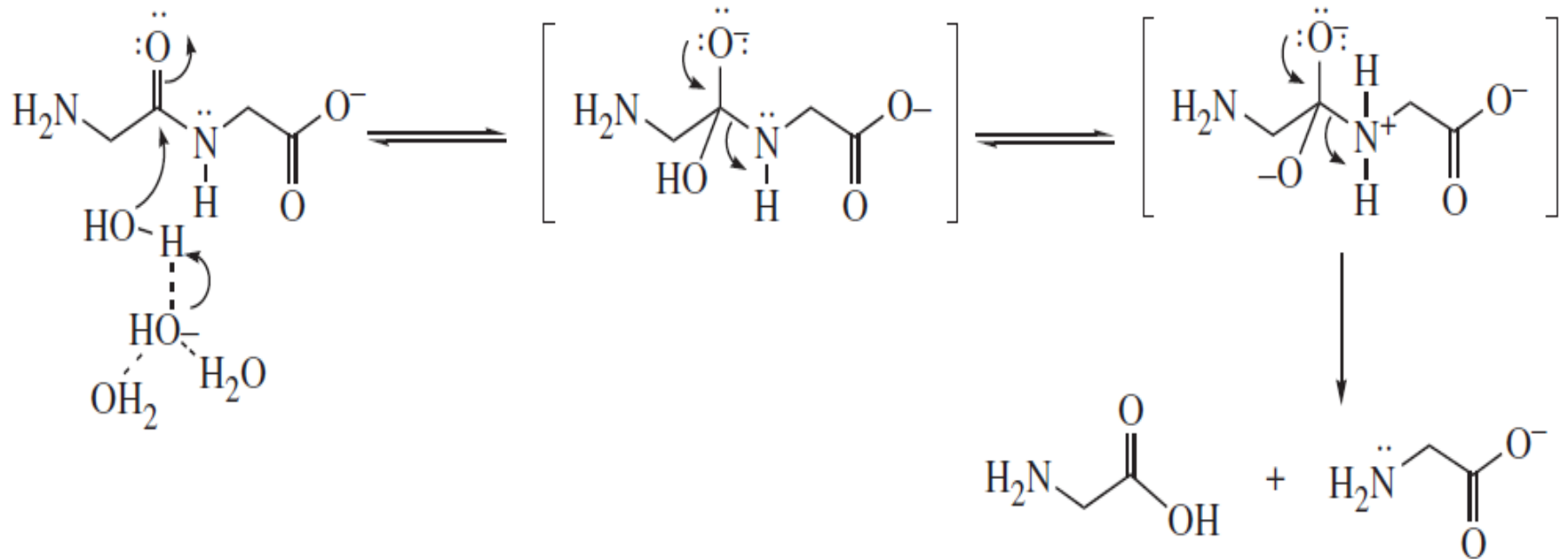


Fig. 1-6. Hydroxide ion catalysis in the hydrolysis of a peptide. The mechanism is written to represent catalysis by hydroxide ion, which initially reacts as a nucleophile adding to the carbonyl group of the peptide. Hydroxide is regenerated in the last step. In a practical reaction, a mole of hydroxide ion is consumed by reaction with the free carboxylic acid produced in the next-to-last step. Hydroxide reacts through intervening molecules of water that hydrate the ion.



Estratégias de Catálise

Nucleófilo → espécie que doa um par de elétrons a um eletrófilo para formar uma ligação química
→ Base de Lewis

Catálise Covalente ou Nucleofílica → Formação transiente de uma ligação covalente substrato-enzima através das cadeias laterais dos aminoácidos His, Cis, Asp, Lis e Ser (agentes nucleofílicos)

- 1) Ataque nucleofílico da enzima sobre o substrato com a formação de uma ligação covalente,
- 2) Perda de elétrons no sítio ativo da enzima e separação da enzima do produto formado.

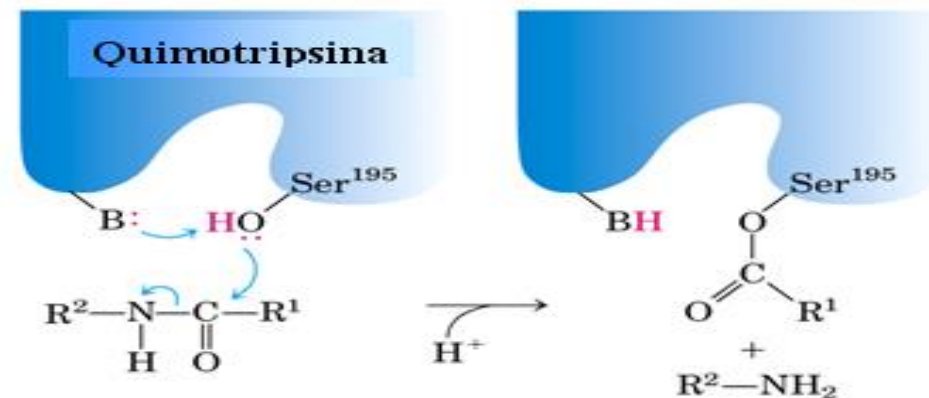


Table 1-3. Enzymes that Employ Nucleophilic Catalysis.

Nucleophilic Side Chain	Enzymes
Serine (β-OH)	Serine proteases Esterases Alkaline phosphatases
Cysteine (β-SH)	Cysteine proteases Acyl transferases
Histidine (β-imidazole)	Phosphotyrosine phosphatases Nucleoside diphosphate kinase Galactose-1-P uridylyltransferase Histidine triad (HIT) proteins
Lysine	Acid phosphatases DNA ligase RNA ligase RNA capping enzyme
Glutamate and aspartate (COOH)	Retaining glycosidases Coenzyme A transferases



Estratégias de Catálise

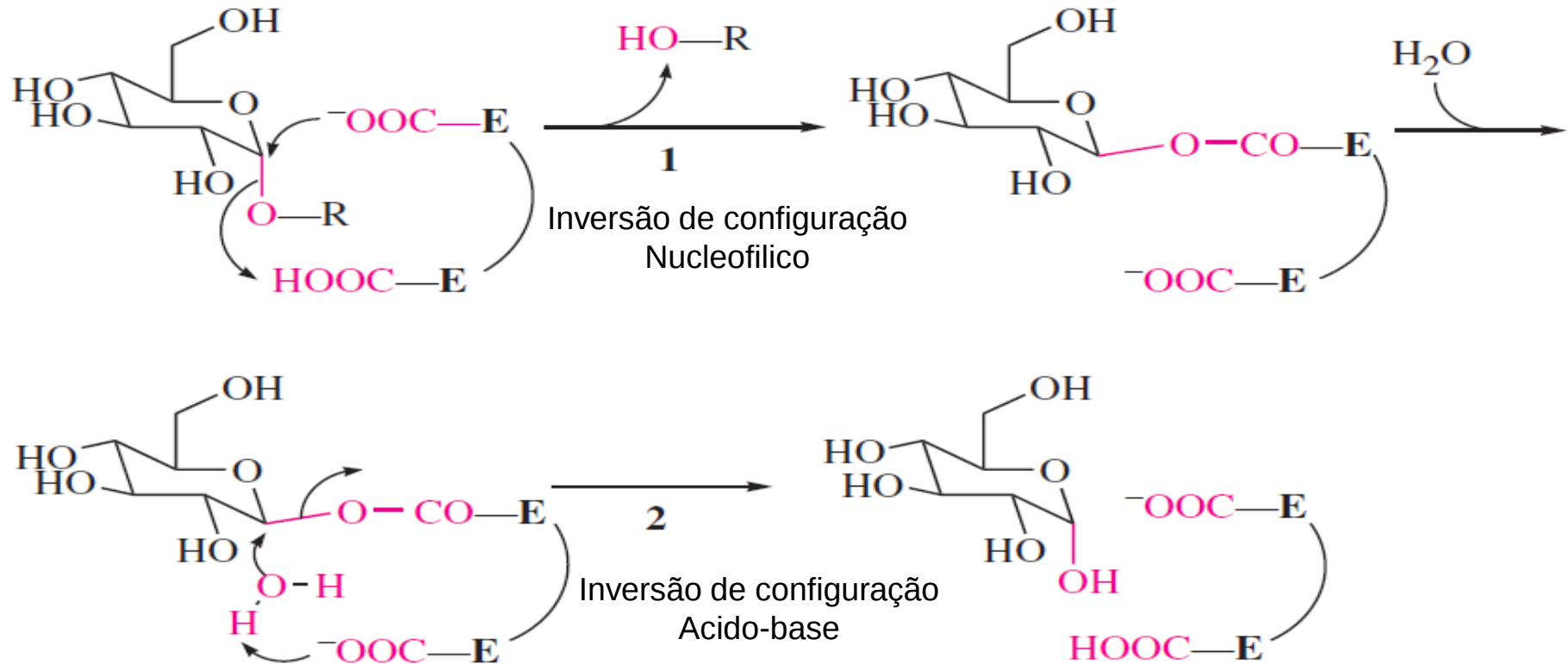


Fig. 1-9. Nucleophilic and general acid-base catalysis in the enzymatic hydrolysis of a glycoside by a “retaining” glycosidase. In a retaining glycosidase, one carboxylate group in the active site reacts as a nucleophile to displace the aglycone and form a covalent glycosyl-enzyme intermediate. The process proceeds with inversion of configuration at $\text{C}1$ of the glycosyl substrate, so that an α -glycoside substrate becomes a β -glycoside intermediate. Hydrolysis of the enzyme-glycoside intermediate also proceeds with inversion of configuration at $\text{C}1$, and the overall hydrolysis proceeds with retention of configuration.

Estratégias de Catálise

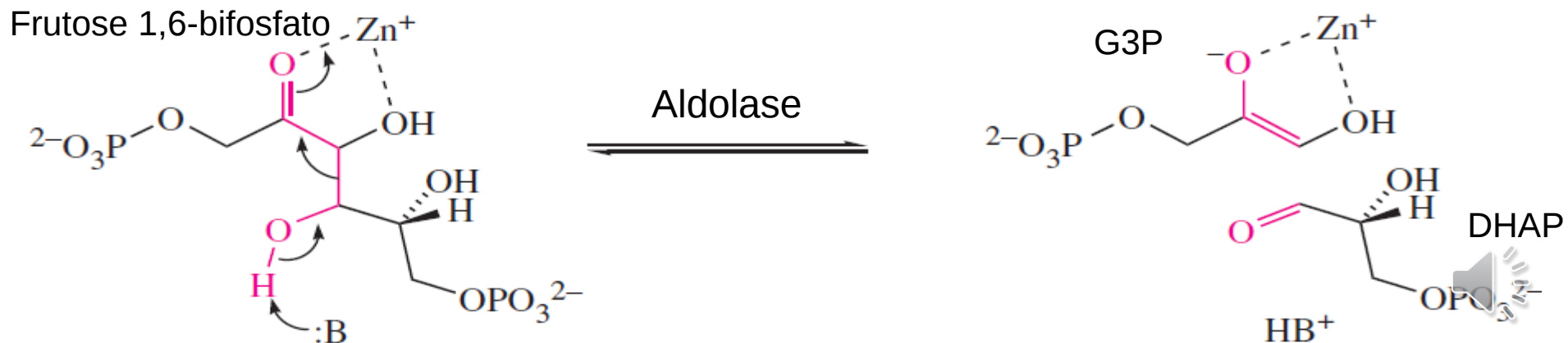
Catálise por Íons metálicos

- Catalisador eletrofílico, estabilizando uma carga negativa em um intermediário de reação. Ex. metais divalentes;
- Catalisador nucleofílico, aumentando a acidez de uma molécula próxima, como a água na hidratação do CO₂ pela anidrase carbônica;
- Ligando-se ao substrato, aumentando o número de interações com a enzima, tendo como exemplo das NMP quinases.

Metalo-enzimas → Ligações fortes com Fe²⁺, Fe³⁺, Cu²⁺, Zn²⁺ e Mn²⁺,

Enzimas ativadas por metais → Ligações fracas com Na⁺, K⁺, Mg²⁺ e Ca²⁺.

Metal ions act as Lewis acids in biological reactions that take place in aqueous solutions. Examples include phosphotransfer and the facilitation of enolization by enolase, racemizations and dehydration by aconitase.



Estratégias de Catálise

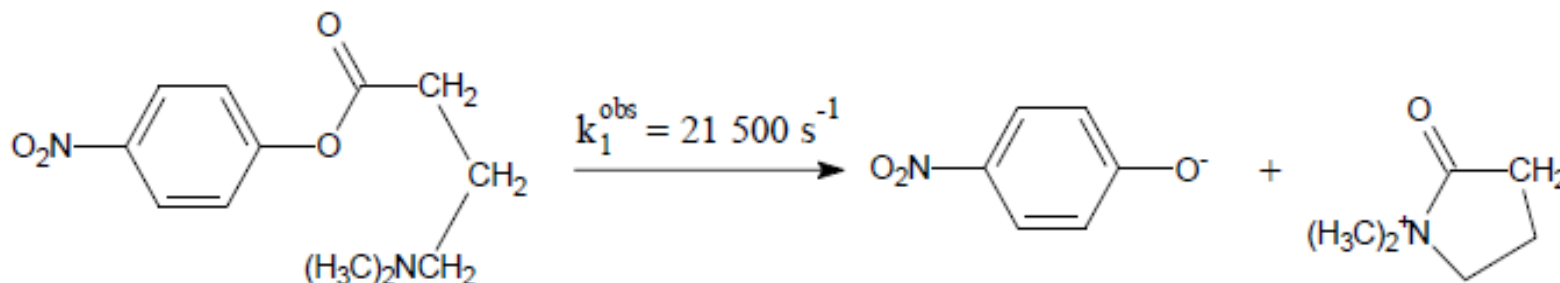
Catálise por Aproximação e Orientação

Muitas reações incluem dois substratos distintos, onde a velocidade de reação é aumentada pela aproximação destes a uma superfície de ligação em uma enzima. A estrutura tridimensional da enzima pode trazer várias cadeias laterais reativas a uma grande proximidade no sítio ativo. Ao se ligar ao substrato no sítio ativo, a enzima orienta o substrato para a interação mais eficiente com estas cadeias laterais.

Ex. Reações intramoleculares, facilitando ciclização de moléculas, e fosforilação

near attack conformations (NACs)

- structure in which reacting groups are in close proximity and in orientations that allow the reaction to proceed.
- pretransition-state structure that faces a small barrier to reaction. In this regard, the energetic relationship with the transition state may be similar to that of a metastable intermediate.



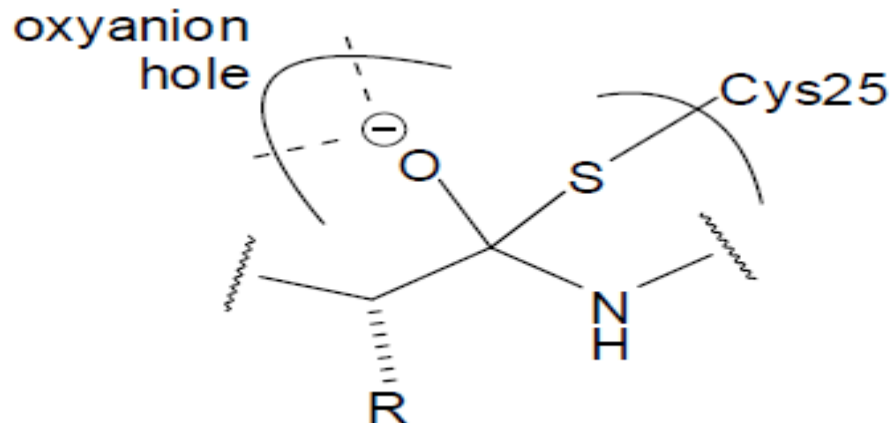
Estratégias de Catálise

Catálise Eletrostática

→ Quando um substrato se liga a enzima, a água é excluída do sítio ativo (dessolvatação), causando uma diminuição da constante dielétrica local, o que aumenta as interações eletrostáticas no sítio ativo, e também resulta na proteção dos grupos reativos da água, evitando a formação de produtos indesejáveis.

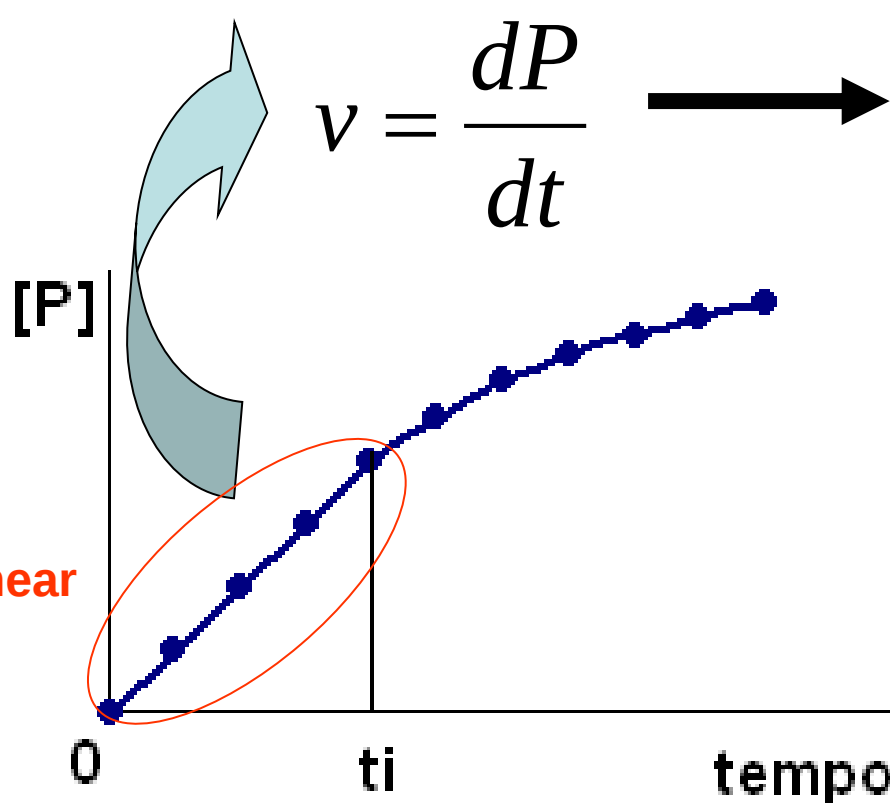
→ O envolvimento de grupos funcionais carregados da enzima na estabilização de intermediários instáveis no mecanismo químico

- stabilisation of charge developed at TS Thermodynamic State
- for example, serine and cysteine proteases favour the formation of a tetrahedral intermediate by stabilising the negative charge developed on oxygen, in an *oxyanion hole*
 - e.g.: consider papain, a Cys protease



Modelos Cinéticos

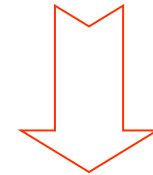
$v \rightarrow$ Atividade Enzimática



$$v = \frac{dP}{dt} \longrightarrow v = -\frac{dS}{dt}$$

Velocidade de reação:

“diminuição na concentração de um dos reagentes ou formação de produto na unidade de tempo”



Concentrações são geralmente dadas em mol.L^{-1} e o tempo em minutos



ESTEQUIOMETRIA E VELOCIDADE DE REAÇÃO

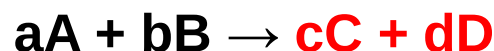
Consideremos a seguinte reação:



Consumem-se duas moles de A por cada mole de B que se forma, ou seja, a velocidade com que A se consome é o dobro da velocidade de formação de B. Escrevemos a **velocidade da reação** como:

$$velocidade = -\frac{1}{2} \frac{\Delta[A]}{\Delta t} \quad \text{ou} \quad velocidade = \frac{\Delta[B]}{\Delta t}$$

No caso geral, para a reação:



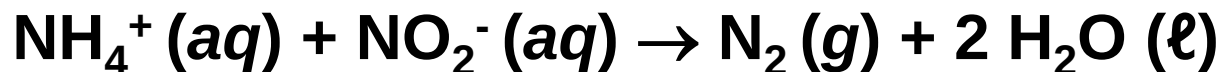
A velocidade é dada por:

$$velocidade = -\frac{1}{a} \frac{\Delta[A]}{\Delta t} = -\frac{1}{b} \frac{\Delta[B]}{\Delta t} = \frac{1}{c} \frac{\Delta[C]}{\Delta t} = \frac{1}{d} \frac{\Delta[D]}{\Delta t}$$



EQUAÇÃO DE VELOCIDADE OU LEI CINÉTICA DE UMA REAÇÃO

Consideremos a reação



para a qual

TABLE 14.2 Rate Data for the Reaction of Ammonium and Nitrite Ions in Water at 25°C

Experiment Number	Initial NH_4^+ Concentration (M)	Initial NO_2^- Concentration (M)	Observed Initial Rate (M/s)
1	0.0100	0.200	5.4×10^{-7}
2	0.0200	0.200	10.8×10^{-7}
3	0.0400	0.200	21.5×10^{-7}
4	0.0600	0.200	32.3×10^{-7}
5	0.200	0.0202	10.8×10^{-7}
6	0.200	0.0404	21.6×10^{-7}
7	0.200	0.0606	32.4×10^{-7}
8	0.200	0.0808	43.3×10^{-7}

Verifica-se que

- quando a $[\text{NH}_4^+]$ duplica, mantendo a $[\text{NO}_2^-]$ constante, a velocidade duplica;
- quando a $[\text{NO}_2^-]$ duplica mantendo a $[\text{NH}_4^+]$ constante, a velocidade também duplica;



EQUAÇÃO DE VELOCIDADE OU LEI CINÉTICA DE UMA REAÇÃO

Logo, $v \propto [\text{NH}_4^+][\text{NO}_2^-]$

Equação de velocidade ou Lei cinética da reação:

$$v = k[\text{NH}_4^+][\text{NO}_2^-]$$

onde k é a **constante de velocidade da reação**.

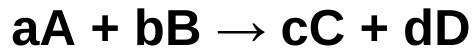
Relacionada a variação da concentração de reagente ou produto na unidade de tempo, em uma reação na qual todos os reagentes encontram-se em concentração unitária. Por esse motivo, k também é chamada de velocidade específica de reação, K está relacionada com a concentração dos reagentes e com a temperatura

Para uma dada temperatura, a relação de k com as concentrações dos reagentes é dada por uma equação que se chama LEI DE VELOCIDADE ou EQUAÇÃO DE VELOCIDADE



Ordem de reação

Consideremos a reação geral:



A equação da velocidade assume a forma:

$$\text{Velocidade} = k[A]^x[B]^y$$

x, y, k – determinados experimentalmente

x e y – ordem de uma reação; x é a ordem de A e y é a ordem de B .

A reação tem ordem global ($x + y$)

Chama-se ordem de uma reação (ordem global) à soma dos valores das potências a que as concentrações de reagentes se encontram elevadas na equação cinética da reação

Uma reação pode ser de ordem zero, 1 (1.^a ordem), 2 (2.^a ordem), etc.

Tanto a ordem de uma reação química como a constante de velocidade devem ser determinadas experimentalmente.



As Leis de Velocidade mais simples podem ser dadas tanto na forma diferencial (como visto anteriormente) ou na forma integrada

Lei de Velocidade	Ordem
$V = k (a)^0 = k$	0
$V = k (a)$	1
$V = k (a)^2$	2
$V = k (a) (b)$	2
$V = k (a) (b)^2$	3

Ordem de reação: é a soma dos expoentes dos termos de concentração que aparecem na forma diferencial da Lei de Velocidade



Reações de ordem zero

❖ **Reações de ordem zero são raras.** As reações de primeira e de segunda ordem são os tipos mais comuns de reações.

❖ **A equação cinética é:** **velocidade = $k[A]^0=k$**

A equação concentração tempo é:

$$-\frac{d[A]}{dt} = k$$

$$[A] = [A]_0 - k t$$

❖ A velocidade de uma reação de ordem zero é constante e independente das concentrações de reagentes.



Reações de ordem zero

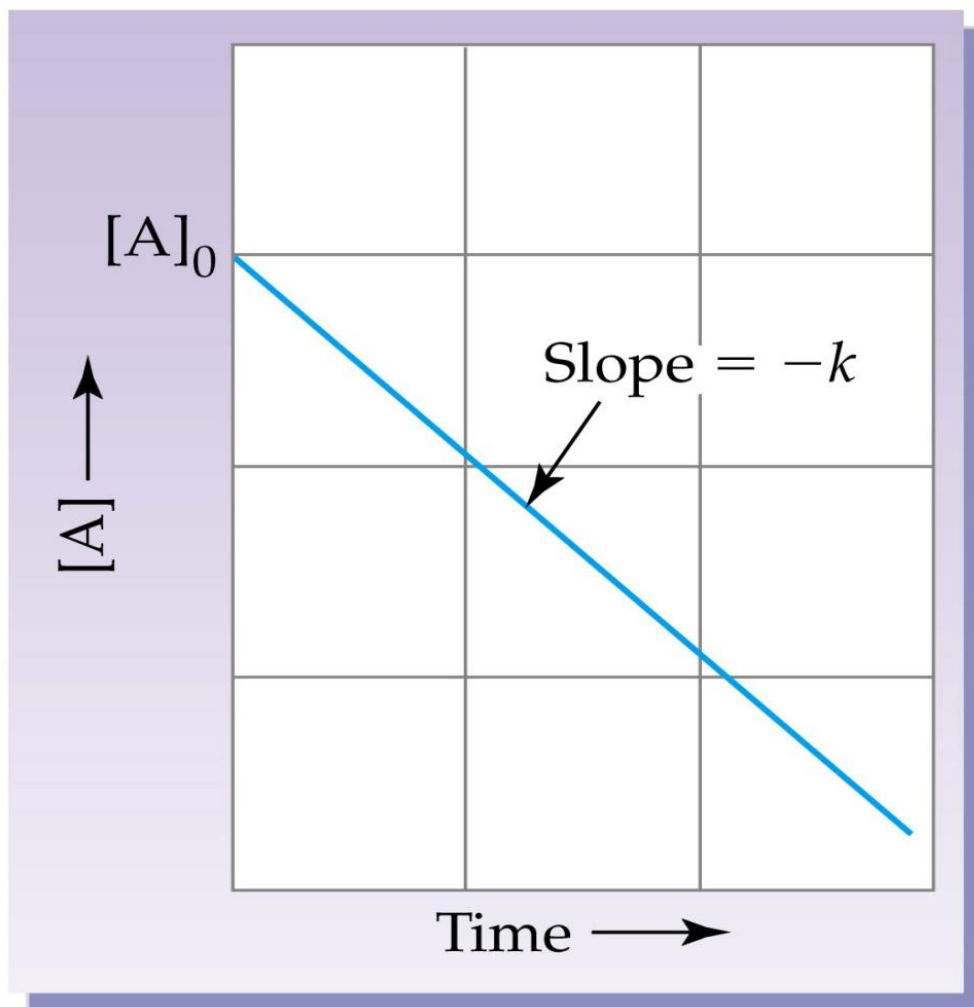


Gráfico da concentração $[A]$ em função do tempo para uma reação de ordem zero

Tempo de de meia-vida

$(t_{1/2})$: é o tempo necessário para que a concentração de uma reagente diminua para metade do seu valor inicial.

$$t_{1/2} = \frac{[A]_0}{2k}$$



Reações de 1ª ordem

Uma **reação de primeira ordem** é uma reação cuja velocidade depende da concentração de reagente elevada à potência unitária.



$$velocidade = - \frac{\Delta[A]}{\Delta t}$$

$$velocidade = k[A]$$

$$- \frac{\Delta[A]}{\Delta t} = k[A] \Leftrightarrow k = - \frac{\Delta[A]}{[A]} \times \frac{1}{\Delta t} (s^{-1})$$

$$\Leftrightarrow \ln \frac{[A]_0}{[A]} = kt \Leftrightarrow \ln[A]_0 - \ln[A] = kt$$

$$\Leftrightarrow \ln[A] = -kt + \ln[A]_0$$

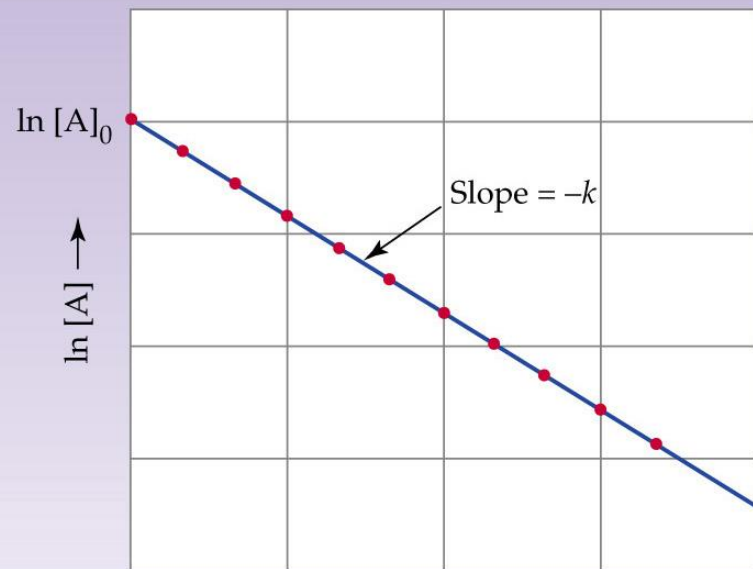


Comportamentos característicos de uma reação de primeira ordem



(a)

a) Diminuição da concentração do reagente com o tempo.



(b)

b) Utilização da representação gráfica da relação linear de $\ln[A]$ em função do tempo para calcular a constante de velocidade.



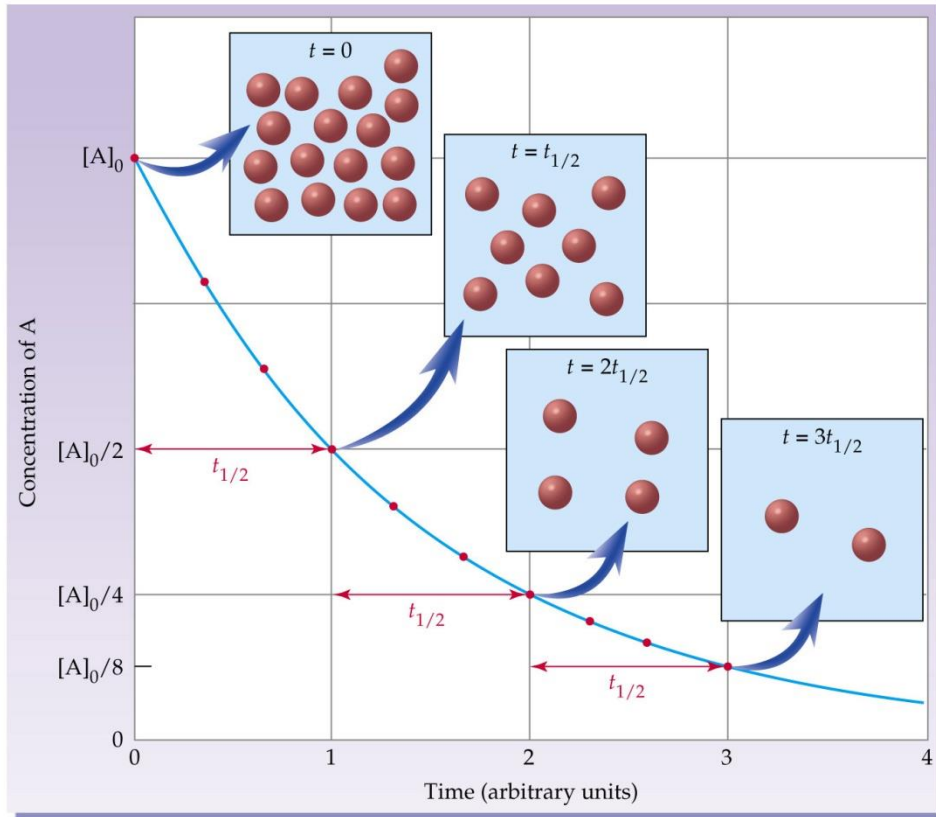
TEMPO DE MEIA-VIDA

Tempo de meia-vida ($t_{1/2}$):

$$t = \frac{1}{k} \ln \frac{[A]_0}{[A]}$$

Por definição de tempo de meia-vida, quando $t = t_{1/2}$,

$$[A] = [A]_0/2$$



Variação da concentração de um reagente com o número de tempos de semi-transformação para uma reação de primeira ordem

$$t_{1/2} = \frac{1}{k} \ln \frac{[A]_0}{[A]_0/2} \Leftrightarrow t_{1/2} = \frac{1}{k} \ln 2 \Leftrightarrow t_{1/2} = \frac{0,693}{k}$$



REAÇÕES DE 2ª ORDEM

“Reações de segunda ordem são aquelas nas quais a velocidade da reação química é proporcional ao produto das concentrações de dois reagentes”

É a reação cuja velocidade depende da concentração de reagente elevada ao quadrado ou de concentrações de dois reagentes diferentes, cada um deles elevada à unidade.

1º Caso: $A \rightarrow \text{produto}$

2º Caso: $A + B \rightarrow \text{produto}$



REAÇÕES DE 2ª ORDEM

1º Caso: $A \rightarrow \text{produto}$

$$\text{velocidade} = -\frac{\Delta[A]}{\Delta t}$$

$$\text{velocidade} = k[A]^2$$

$$-\frac{\Delta[A]}{\Delta t} = k[A]^2$$

$$k = -\frac{\Delta[A]}{[A]^2} \times \frac{1}{\Delta t} \left(\frac{1}{Ms} \right)$$

$$d[M]/[M]^2 = -kdt$$

$$1/[M] = kt + (1/[M]_0)$$



Reações de 2ª ordem

2º Caso: $A + B \rightarrow \text{produto}$

$$\text{velocidade} = - \frac{\Delta[A]}{\Delta t} = - \frac{\Delta[B]}{\Delta t}$$

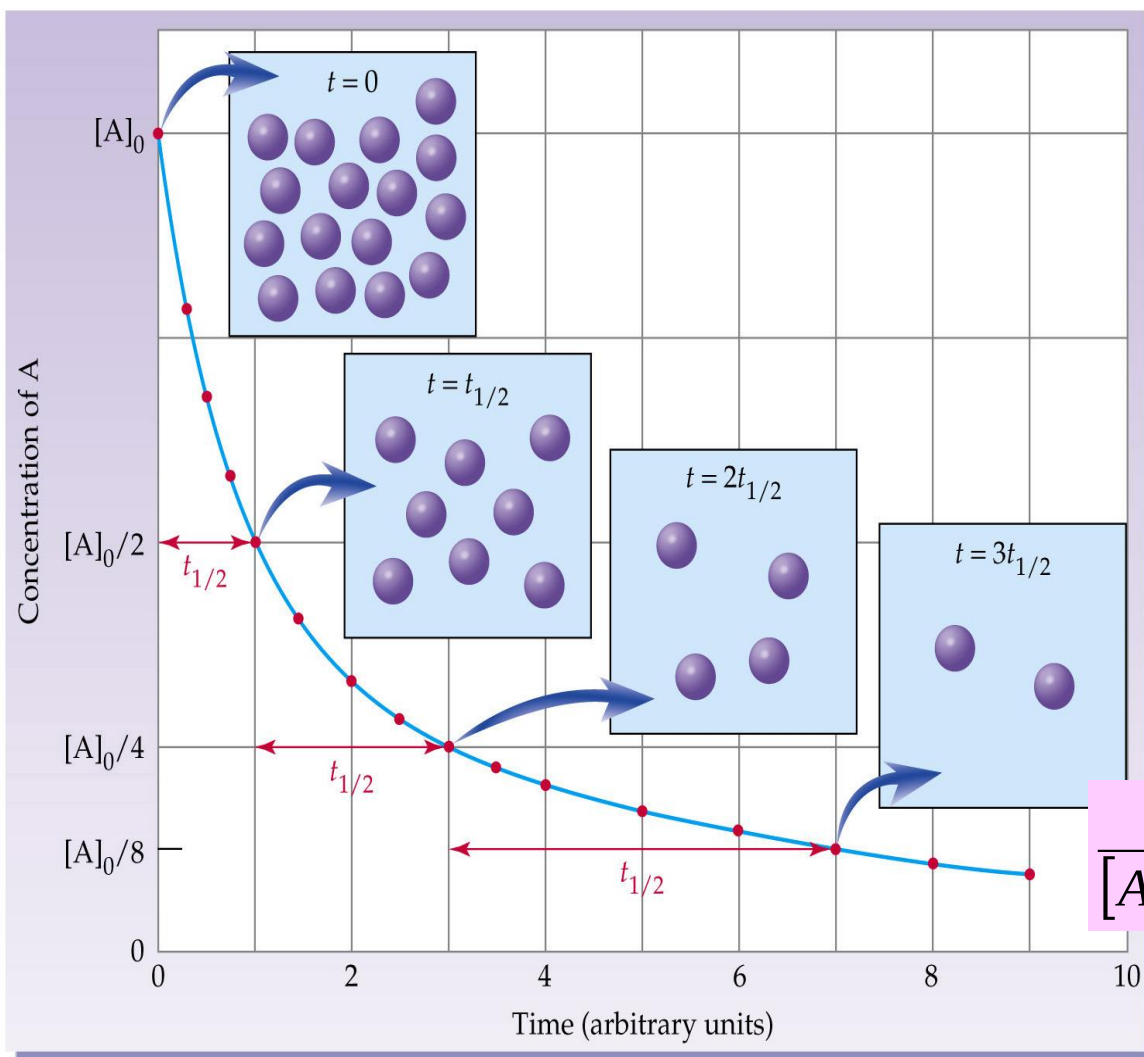
$$\text{velocidade} = k[A][B]$$

$$- \frac{\Delta[A]}{\Delta t} = - \frac{\Delta[B]}{\Delta t} = k[A][B]$$

$$\frac{1}{[A]} = \frac{1}{[A_0]} + kt$$



Tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) na reação de 2ª ordem



Podemos obter uma equação para o tempo de meia-vida da reação de 2ª ordem, se fizermos $[A] = [A]_0/2$ na equação:

$$\frac{1}{[A]} = \frac{1}{[A]_0} + kt$$

Obtém-se

$$\frac{1}{[A]_0/2} = \frac{1}{[A]_0} + kt_{1/2} \Leftrightarrow t_{1/2} = \frac{1}{k[A]_0}$$



Resumo da cinética de reações de ordem zero, 1ª ordem e 2ª ordem

Ordem	Equação		Tempo de meia-vida
	Equação cinética	concentração-tempo	
0	Velocidade = k	$[A] = [A]_0 - kt$	$t_{1/2} = \frac{[A]_0}{2k}$
1	Velocidade = $k [A]$	$\ln[A] = \ln[A]_0 - kt$	$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}$
2	Velocidade = $k [A]^2$	$\frac{1}{[A]} = \frac{1}{[A]_0} + kt$	$t_{1/2} = \frac{1}{k[A]_0}$



Modelos Cinéticos

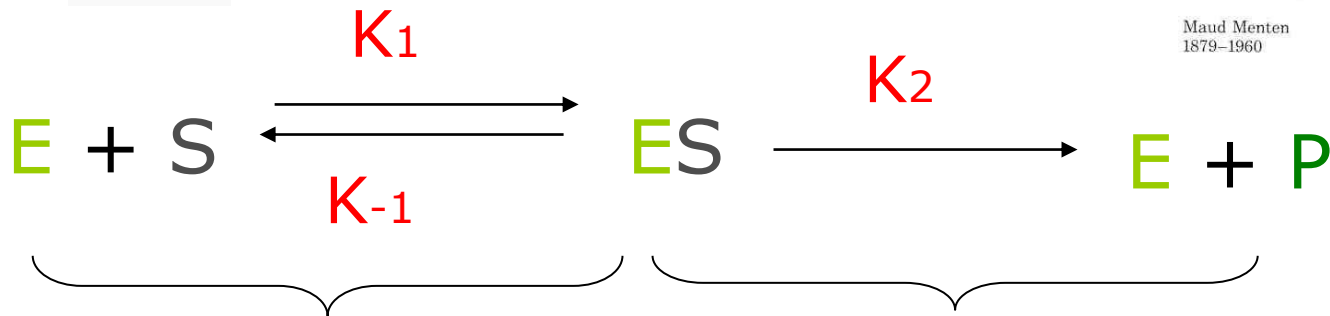
Michaelis-Menten → equilíbrio rápido



1913

Leonor Michaelis -Enzimologista

Maud Menten - Pediatra



Etapa rápida

Etapa lenta

Hidrolases (Água em excesso), isomerasas e liases → comportamento cinético

$$v_0 = k[E_0]$$

$$[E_0] = [E] + [ES]$$

$$[S_0] = [S] + [ES]$$

$$[E] \ll [S]$$

$$[S_0] \cong [S]$$

$$\longrightarrow v_0 = k_2[ES]$$



Modelos Cinéticos

Hipótese do Equilíbrio Termodinamico ou de Henri

$$K = \frac{[E] \cdot [S]}{[ES]} = \frac{([E_0] - [ES]) \cdot [S]}{[ES]} \longrightarrow [ES] = \frac{[E_0] \cdot [S]}{K + [S]} \xrightarrow{k_2} v_0 = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K + [S]}$$

$k_2 \ll k_{-1}$

Hipótese do Estado Estacionário ou de Briggs-Haldane

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[S]([E_0] - [ES]) - (k_{-1} + k_2)[ES] = 0$$

$$[ES] = \frac{[E_0] \cdot [S]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S]} \xrightarrow{k_2} v_0 = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

k_{cat} $\longrightarrow$ Numero máximo de moléculas de substrato convertidas a moléculas de produto por sítio ativo por unidade de tempo

$k_{cat} = k_2$ Cinética de um substrato, e um sítio ativo

Modelos Cinéticos

Dúvidas: QUANDO $K_S = K_M$?

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

$$K_S = \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_{-1}}{k_1}$$

$$\rightarrow K_M = K_S + \frac{k_2}{k_1}$$

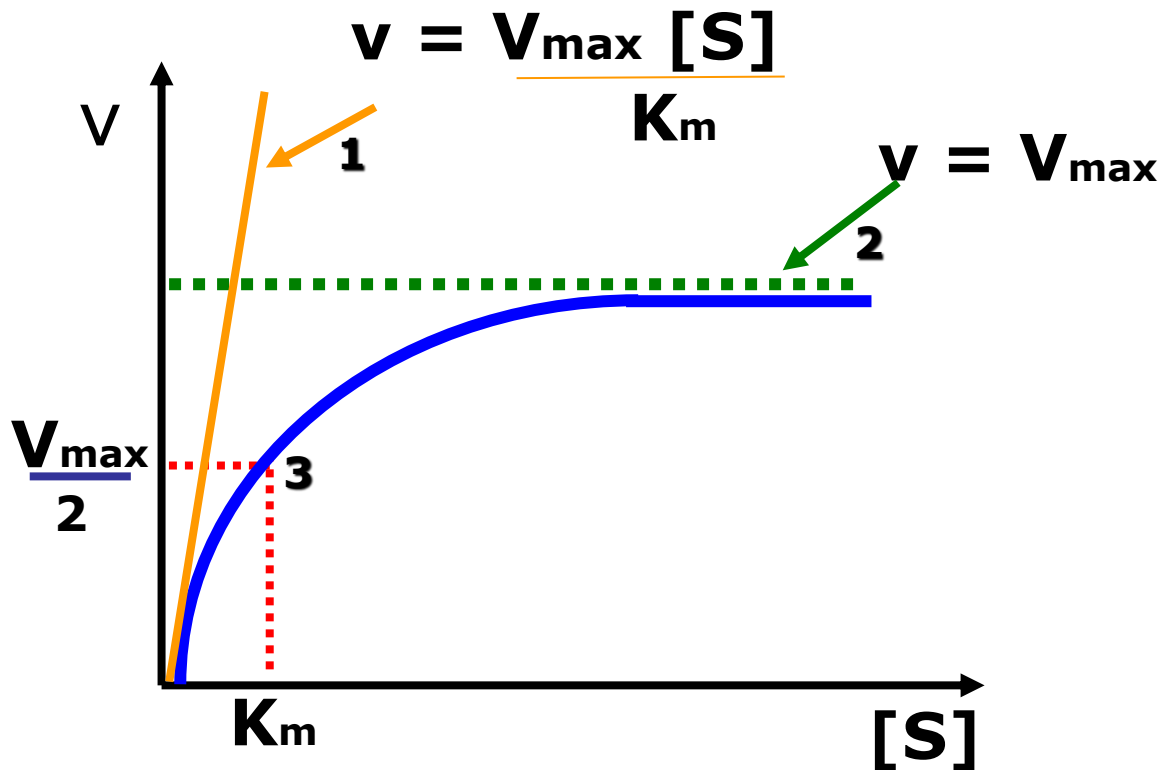
$$k_2 \ll k_{-1} \Rightarrow K_M \cong K_S$$

Dúvidas: O que é eficiência catalítica ou constante de especificidade?

$$\frac{k_{cat}}{K_M} = \frac{k_2}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1}} \longrightarrow k_2 \ll k_{-1} \Rightarrow \frac{k_{cat}}{K_M} = k_1$$

Enzimas – ordem da reação

$$V = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$



Quando a formação de P for proporcional à [S] a velocidade da reação é de **1ª ORDEM**

1- $[S] \downarrow \rightarrow K_m \gg [S]$

Quando a velocidade da reação independe da [S] a reação é de **ORDEM ZERO**

2- $[S] \uparrow \rightarrow [S] \gg K_m$

$\downarrow$
 $v = V_{\max}$



Modelos Cinéticos

K_m depende:

- aspectos específicos do mecanismo de reação;
- n° de passos da reação;
- velocidades relativas dos passos individuais.

ENZIMA	SUBSTRATO	K _m (mM)
Catalase	H ₂ O ₂	25
Hexoquinase	ATP	0,4
	D-Glicose	0,05
	D-Fructose	1,5
Quimotripsina	Gliciltirosinilglicina	108
	N-benzoiltirosinamida	2,5

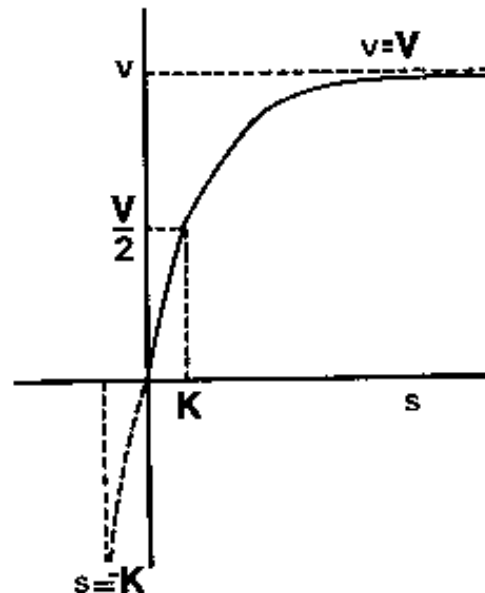
Se em um experimento usarmos $[S] = K_s$ o máximo que poderemos alcançar para v é um valor de $v = V_{\text{máx}}/2$, sendo este independente da concentração da enzima.



Determinação Experimental dos Parâmetros Cinéticos

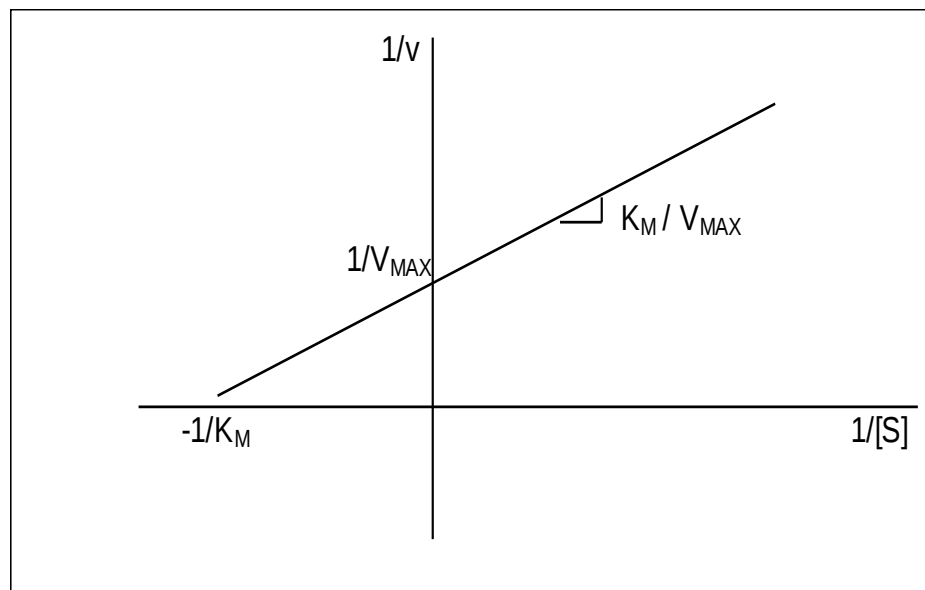
Representação hiperbólica de assintotas:

$$S = -K_M \quad v = V_{MAX}$$



Métodos de Linearização

Método dos inversos de *Lineweaver-Burke*



Método	Eixo y	Eixo x	Intercessão eixo y	Intercessão eixo x	Tangente
Lineweaver-Burke	$1/v$	$1/S$	$1/V_{MAX}$	$-1/K_M$	K_S/V_{MAX}
Hanes	S/v	S	K_M/V_{MAX}	$-K_M$	$1/V_{MAX}$
Eadie-Hofstee	v	v/S	V_{MAX}	V_{MAX}/K_M	$-K_M$
Integrado	$1/t \ln(S_i/S)$	$(S_i-S)/t$	V_{MAX}/K_M	V_{MAX}	$-1/K_M$

métodos integrados são importantes para determinar ***mecanismos de inibição***

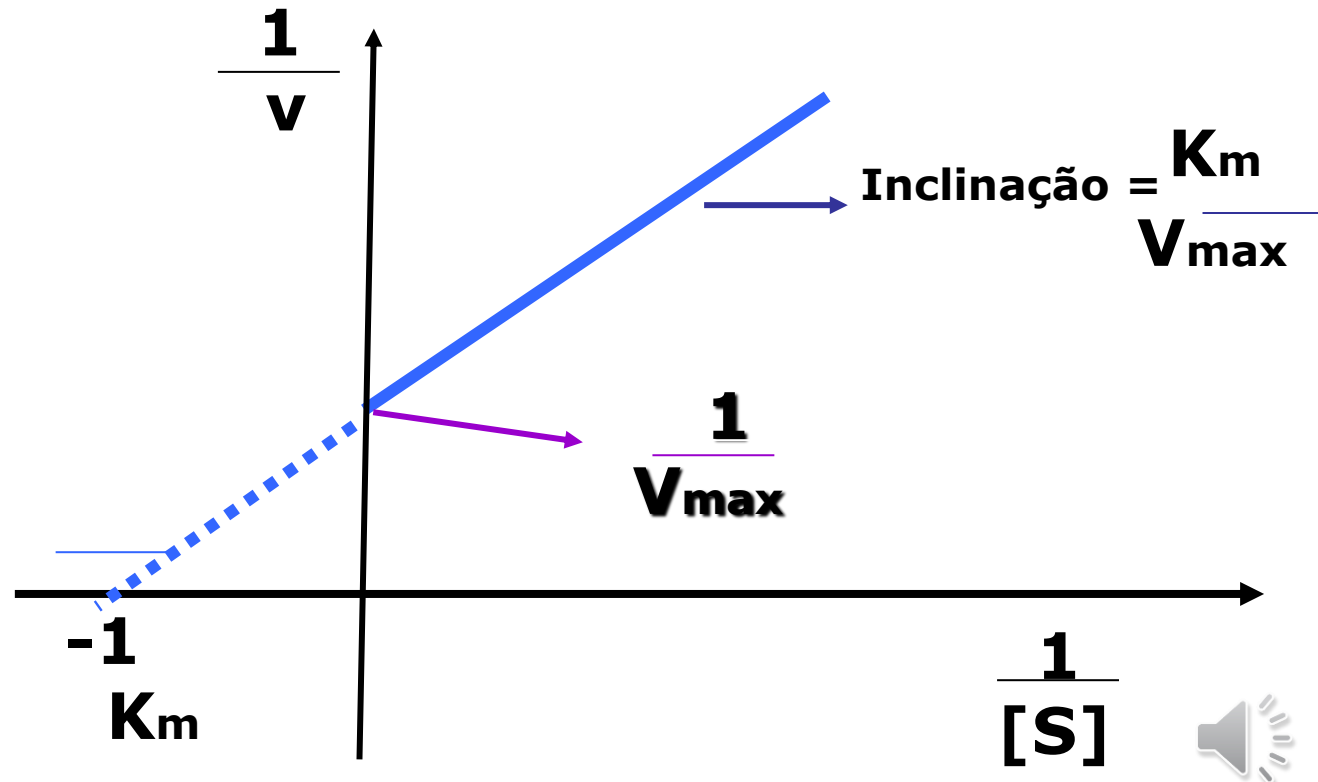


ENZIMAS – MÉTODOS GRÁFICOS

Permitem obter os parâmetros cinéticos (K_m e V_{max})

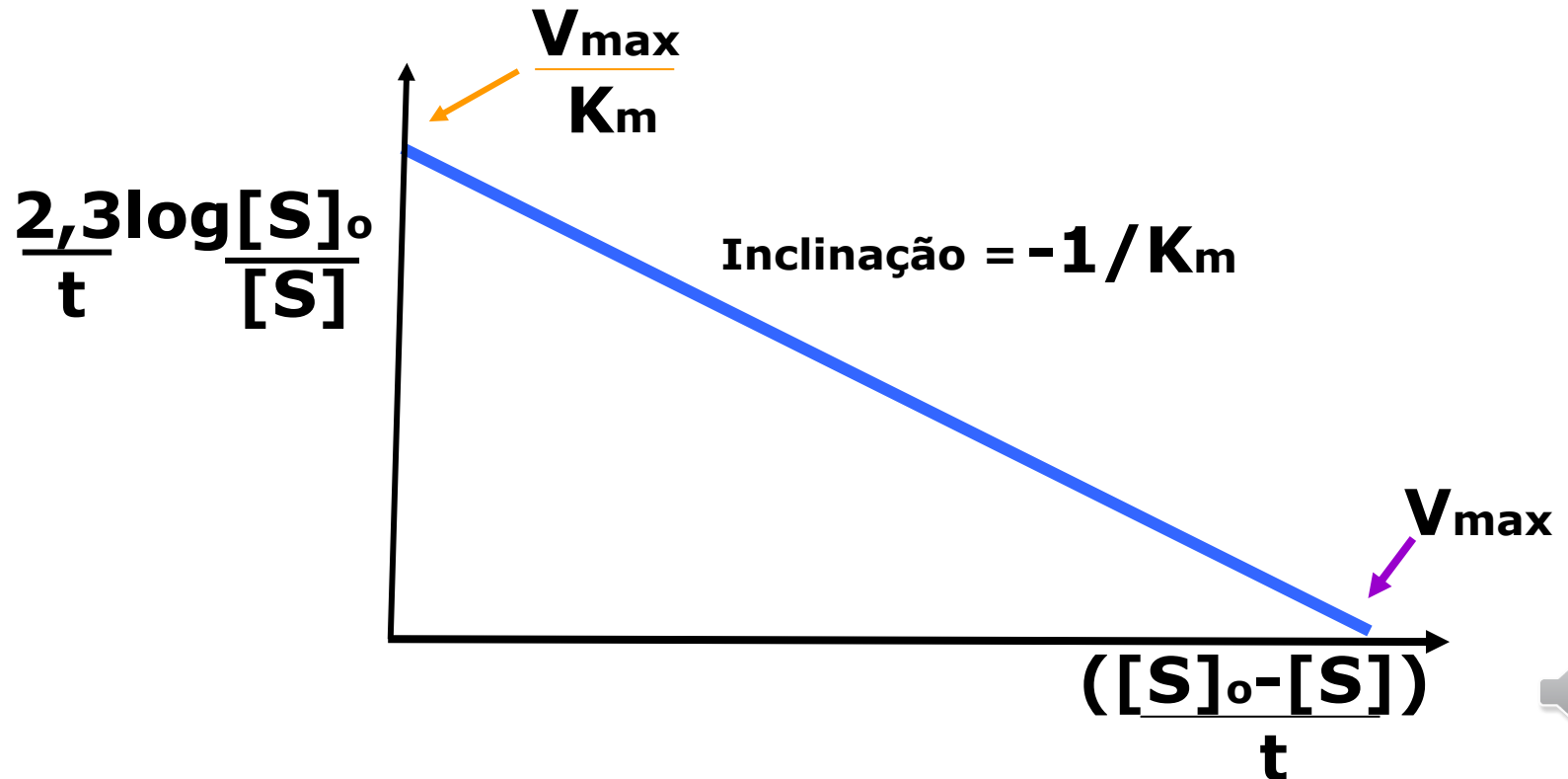
× Gráfico dos Recíprocos de *Lineweaver-Burk*

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$



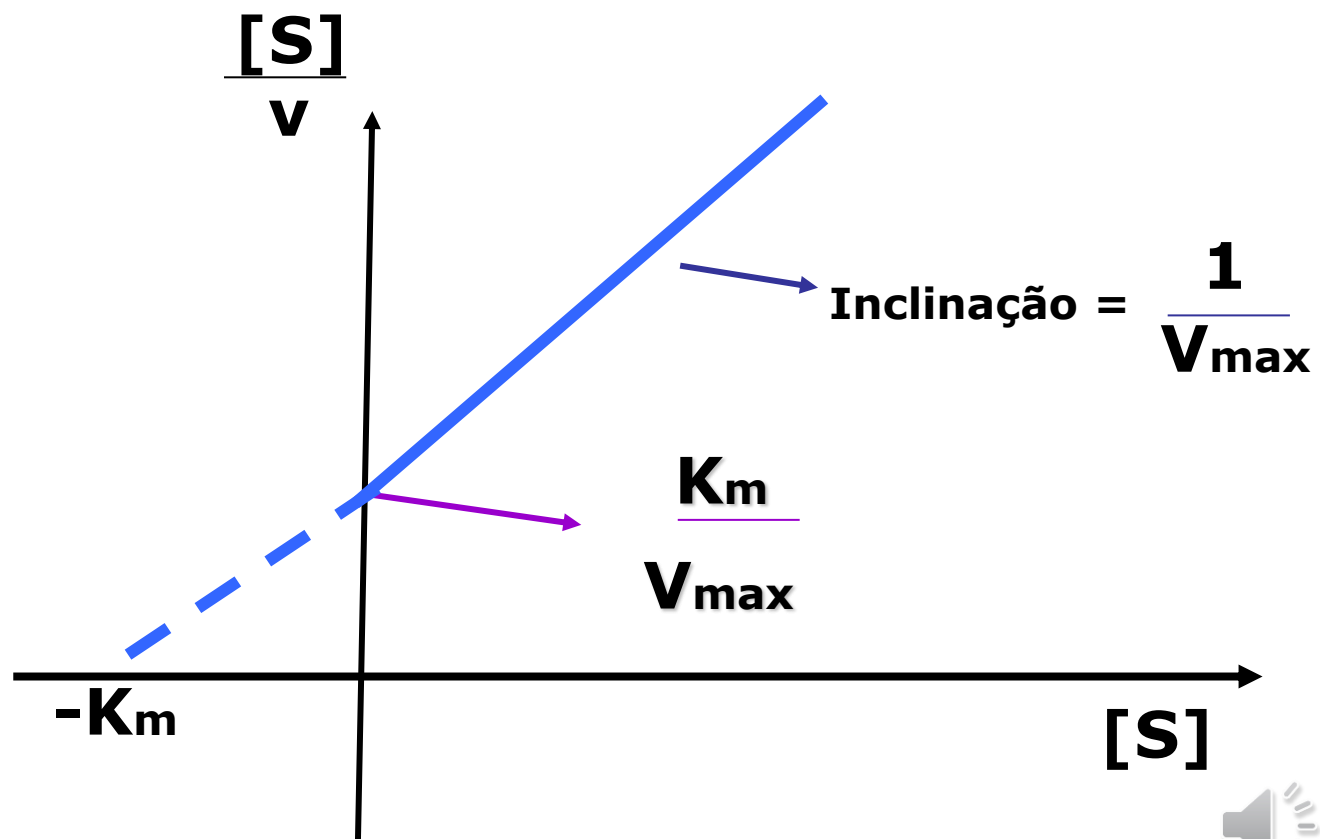
✖ Gráfico da equação integrada de Michaelis-Menten

$$\frac{2,3}{t} \log \frac{[S]_o}{[S]} = \frac{V_{\max}}{K_m} - \frac{1}{K_m} \frac{([S]_o - [S])}{t}$$



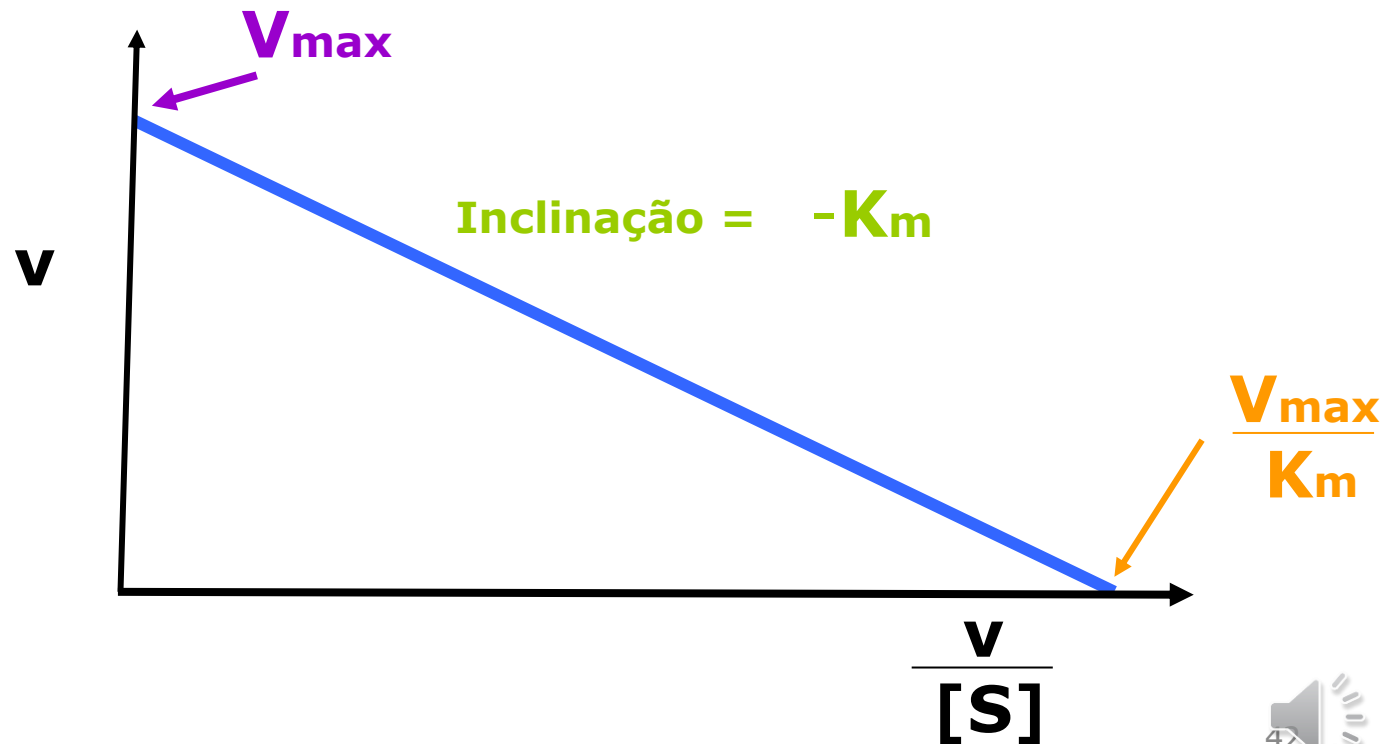
× Gráfico de *Hanes-Woolf*

$$\frac{[S]}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}} + \frac{1}{V_{\max}} [S]$$



× Gráfico de Eadie-Hofstee

$$v = V_{\max} - K_m \frac{v}{[S]}$$



Aula 3 - Inibição Enzimática

× Qualquer substância que reduz a velocidade de uma reação enzimática.

Reguladores – ativadores – aceleram v

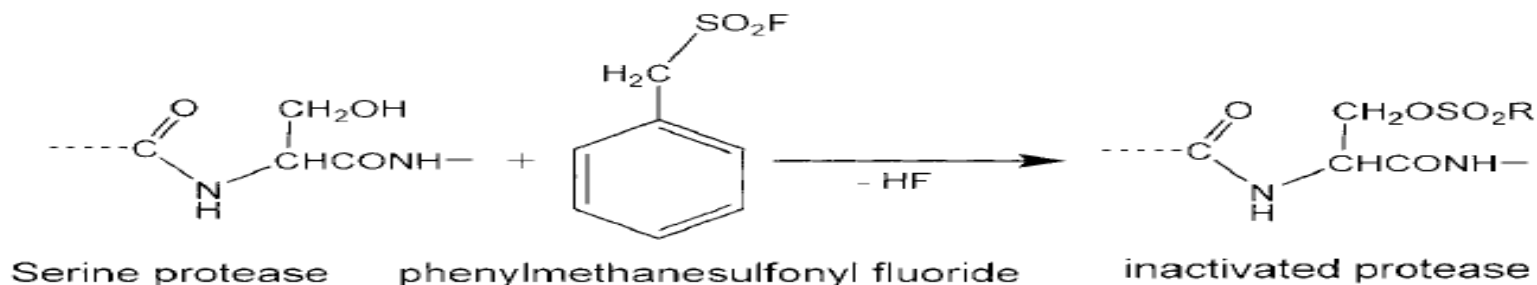
Inibidores – reduzem reversivelmente v

Inativadores – reduzem irreversivelmente v



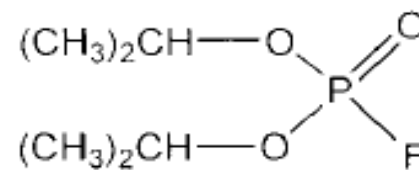
Reações Irreversíveis

Substratos suicidas → substratos analógicos que formam uma ligação covalente no sítio ativo, bloqueando irreversivelmente a enzima



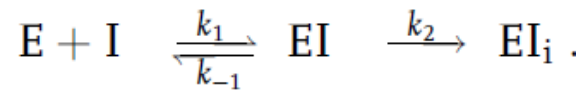
Acetilcolina esterase é inibida por diisopropilfluorofosfato (DPFP) → precursor de gases organofosforados, como o Sarin → neurotoxina

Falha na hidrólise de acetilcolina leva a insuficiência respiratória, dose letal de 100 mg
Outros sintomas: vômitos, salivação, suor excessivo, cólicas abdominais, coma



Diisopropyl phosphorofluoridate

Reações Irreversíveis



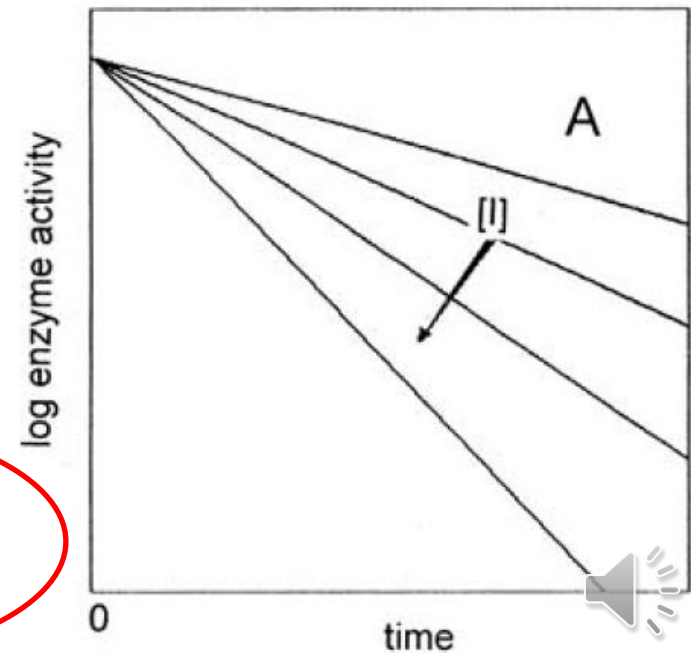
$$[E]_0 = [E] + [EI] + [EI]_i = [E]_a + [EI]_i .$$

$$\frac{d[EI]_i}{dt} = \frac{d([E]_0 - [E]_a)}{dt} = k_2[EI] .$$

$$d[E]_0/dt=0 \longrightarrow -\frac{d[E]_a}{dt} = k_2[EI] \quad [E]_a = [EI] + [E] = [EI] + \frac{[EI]K_i}{[I]}$$

$$\frac{d[E]_a}{dt} = \frac{k_2[E]_a}{1 + \frac{K_i}{[I]}} \longrightarrow -\int_{[E]_0}^{[E]_a} \frac{d[E]_a}{[E]_a} = \int_{t=0}^t \frac{k_2 dt}{1 + \frac{K_i}{[I]}}$$

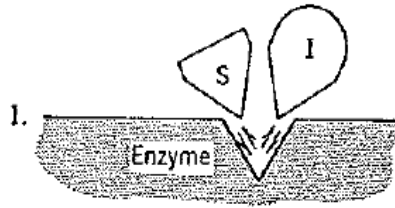
$$\ln \frac{[E]_a}{[E]_0} = -\frac{k_2 t}{1 + \frac{K_i}{[I]}}$$



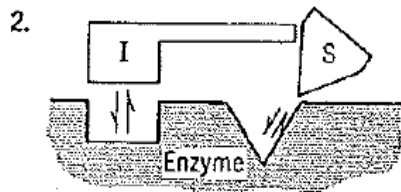
Inibição Enzimática

Inibição Competitiva

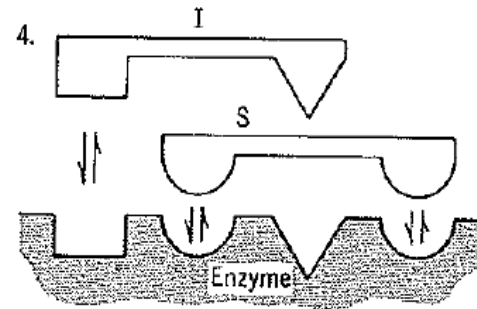
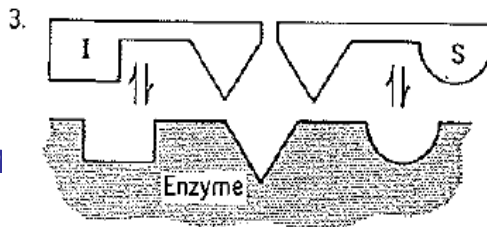
1. Modelo clássico, S e I competem pelo mesmo sítio de ligação



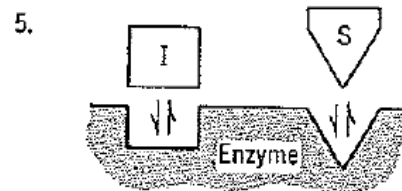
2. I e S são mutuamente excludentes por causa de impedimento estéreo



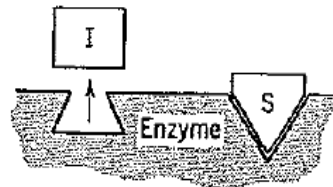
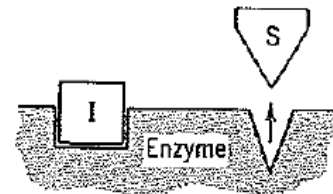
3. I e S possuem um sítio comum de ligação

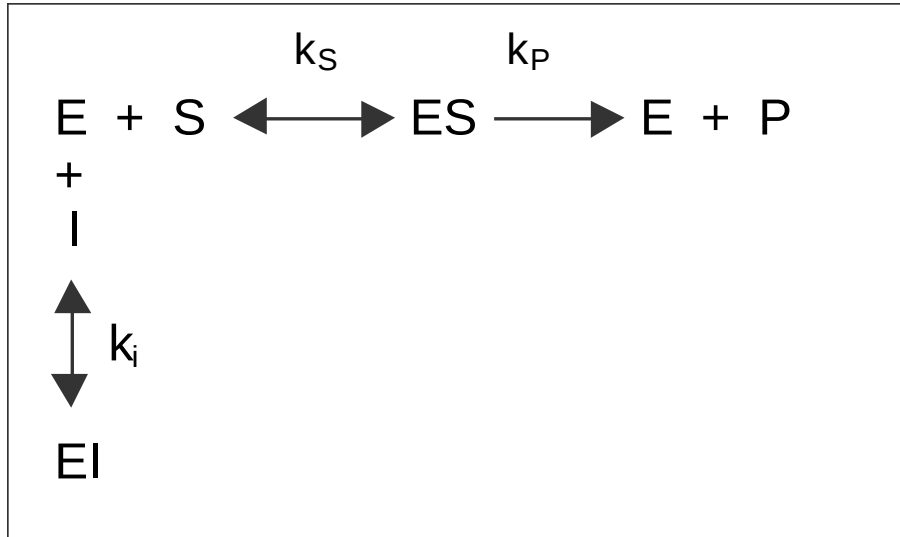


4. Os sítios de ligação para I e S são distintos, mas se sobrepõem



5. A ligação de I em um sítio inibidor distinto causa uma mudança conformacional na enzima que não permite a ligação do substrato (vice-versa)



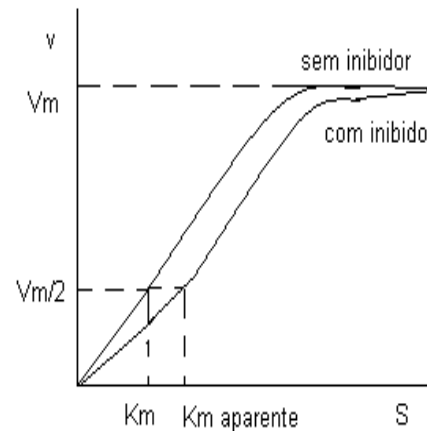
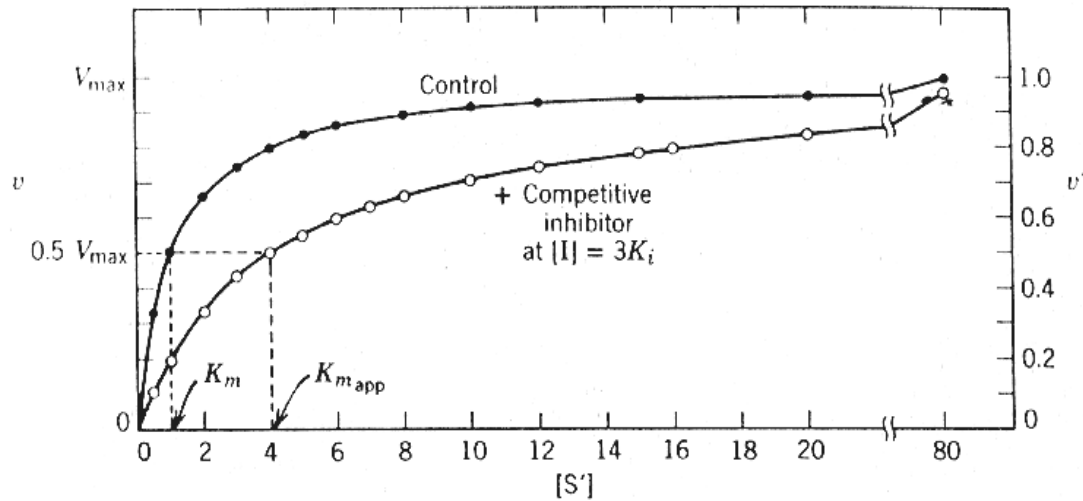


Afeta a ***afinidade*** da enzima pelo seu substrato (K_S), sem afetar a ***reatividade*** do complexo ativo enzima-substrato ($V_{\max}$) minimizada em elevadas [S]

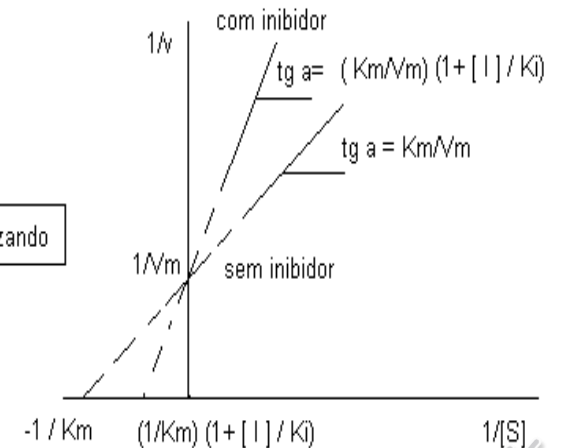
$$\frac{v}{V_{\max}} = \frac{[S]}{k_S \left(1 + \frac{[I]}{k_i} \right) + [S]}$$



Plot de v versus $[S]$ na presença e na ausência de uma concentração fixa do **inibidor competitivo**



Linearizando



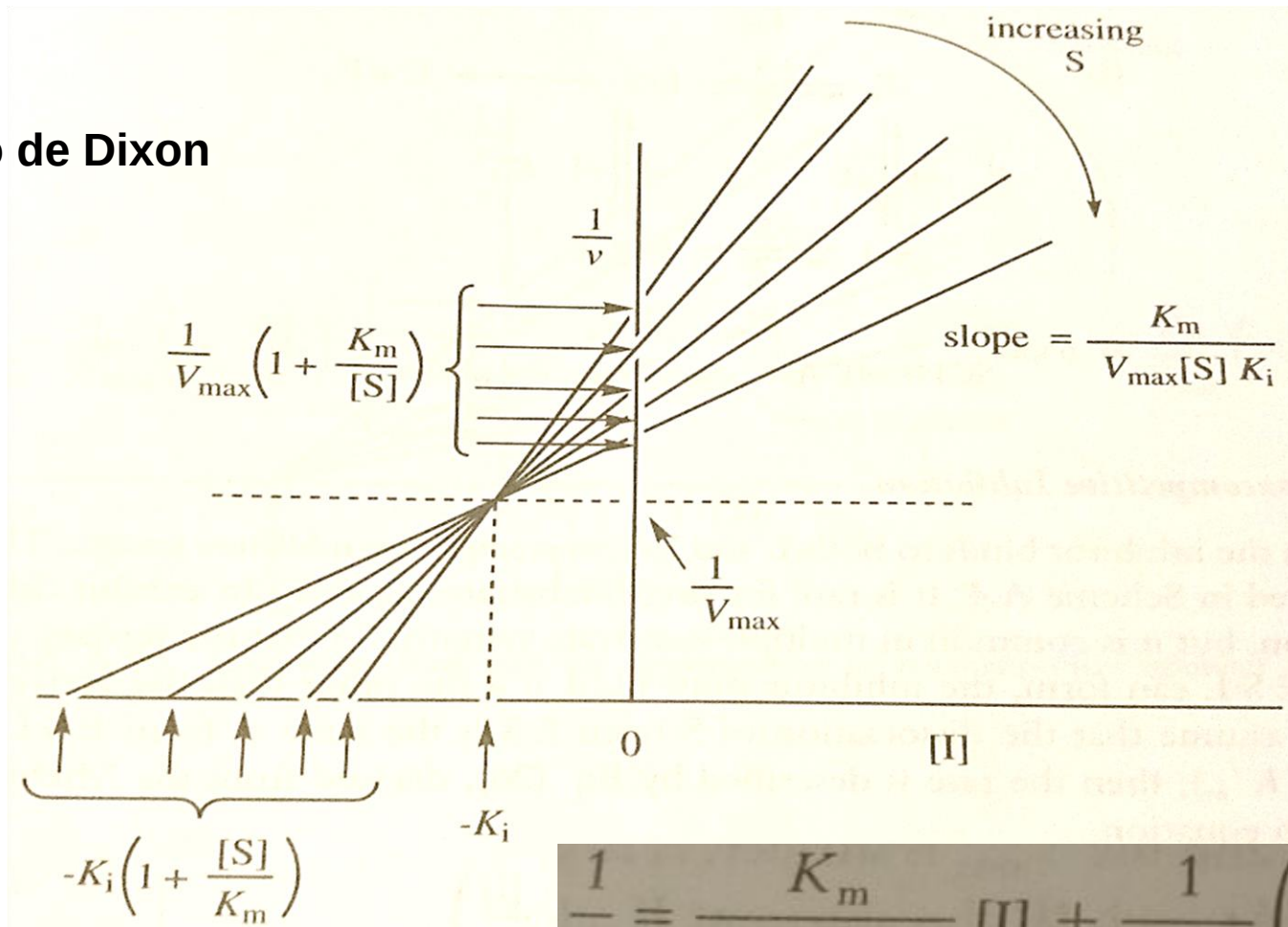
$$K_m \text{ aparente} = K_m (1 + [I]/K_i)$$



Inibição Enzimática

Inibição Competitiva

Gráfico de Dixon

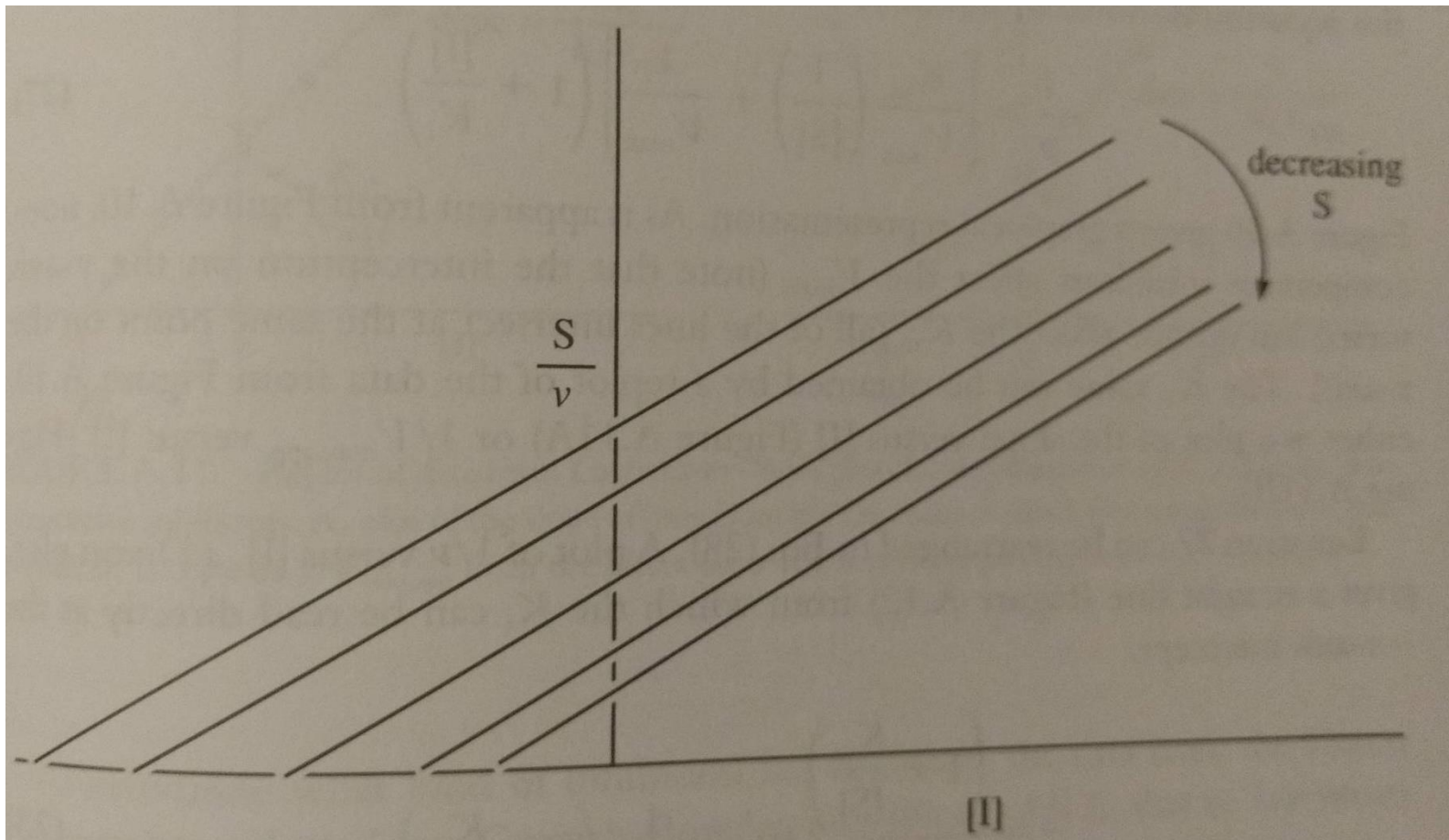


$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}[S]K_i} [I] + \frac{1}{V_{\max}} \left(1 + \frac{K_m}{[S]} \right)$$

Inibição Enzimática

Inibição Competitiva

Gráfico de Cornish-Bowden



Inibição Enzimática

Inibição Competitiva - Exemplo

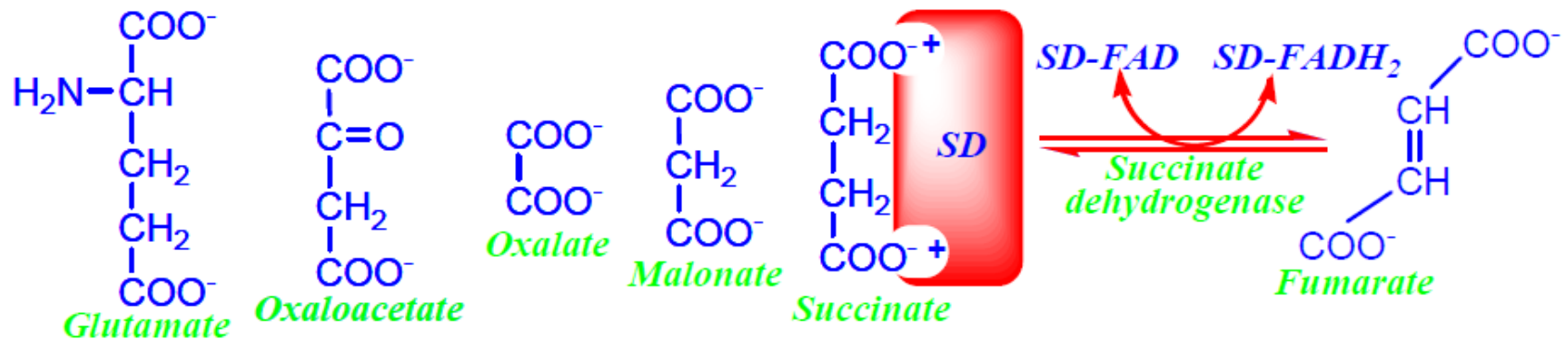


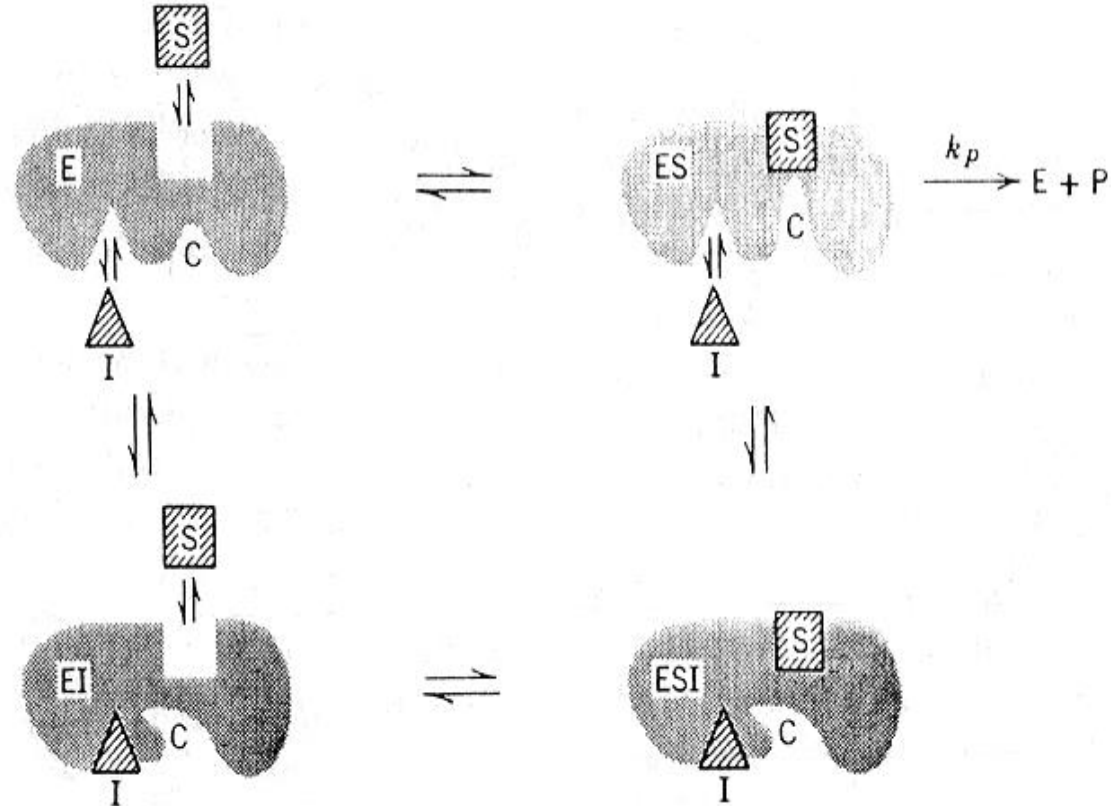
Fig. 8. The substrate and different competitive inhibitors of succinate dehydrogenase (SD).

Efeito do ácido malônico na succinate desidrogenase, pertencente ao Ciclo de Krebs.
Outros inibidores menos competitivos: oxalate, glutamate and oxaloacetate.

Característica comum: presença de 2 grupos $-\text{COOH}$ groups, sugerindo que o sitio ativo da flavoenzima SD possui 2 grupos de ligação carregados positivamente

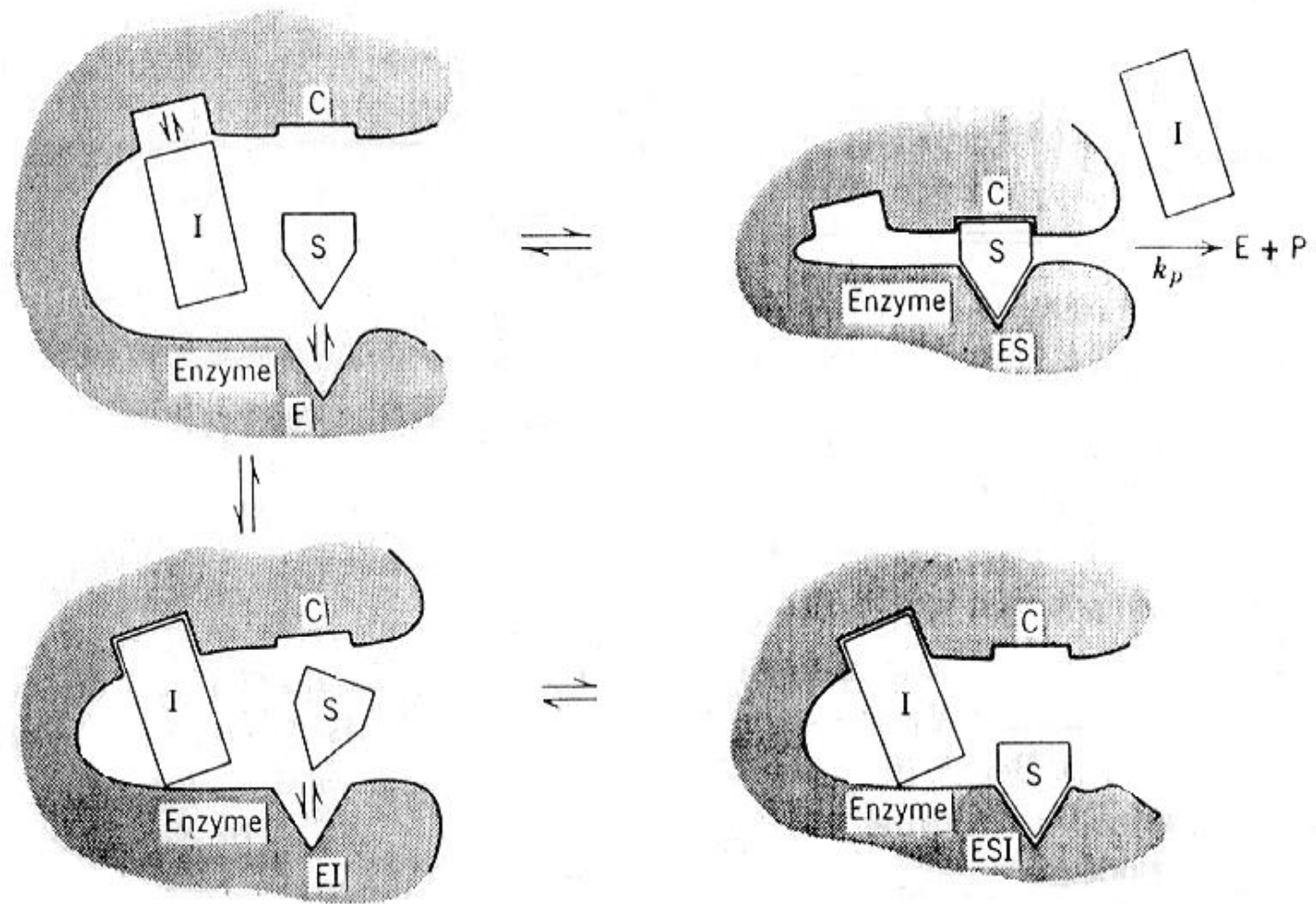


Modelos de Inibição Não-Competitiva



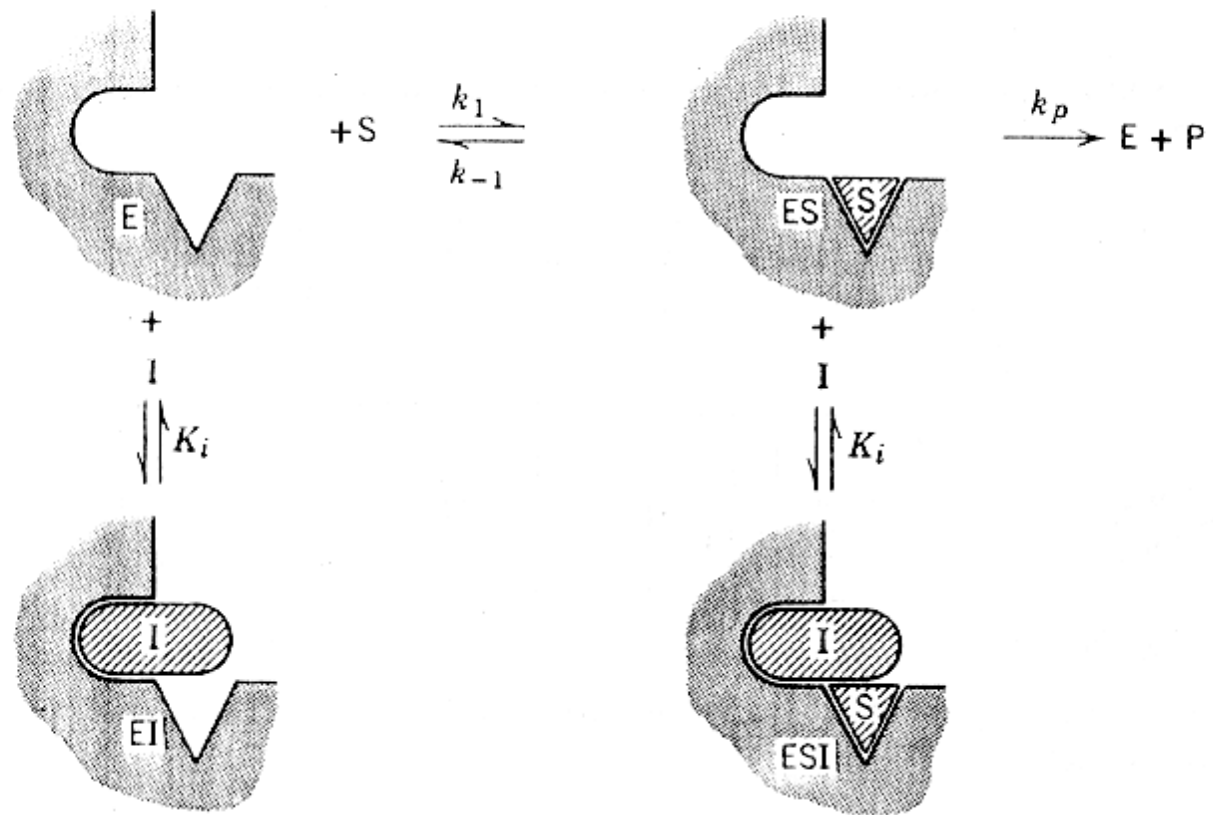
1. S e I não são mutuamente excludentes, mas ESI é cataliticamente inativo (não competitiva)





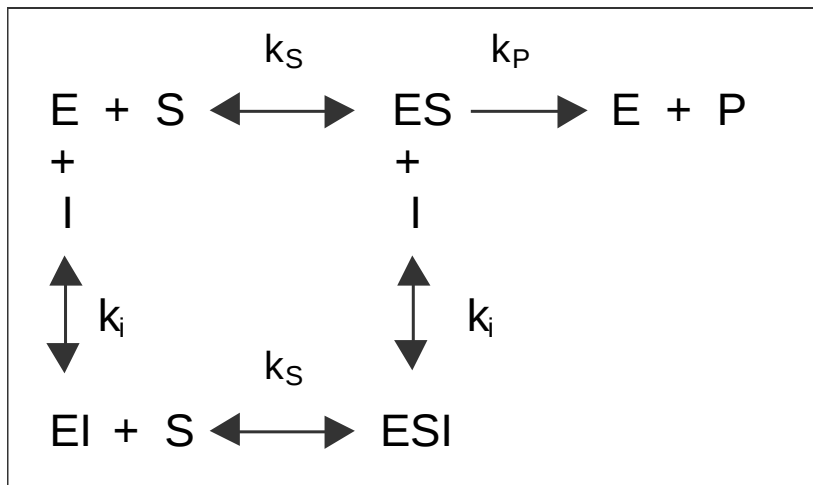
2. *I não pode se ligar ao complexo ES já formado, mas também forma complexos terciários enzima-inibidor-substrato cataliticamente inativos*





3. *I e S são mutuamente excludentes por causa de impedimento estérico*

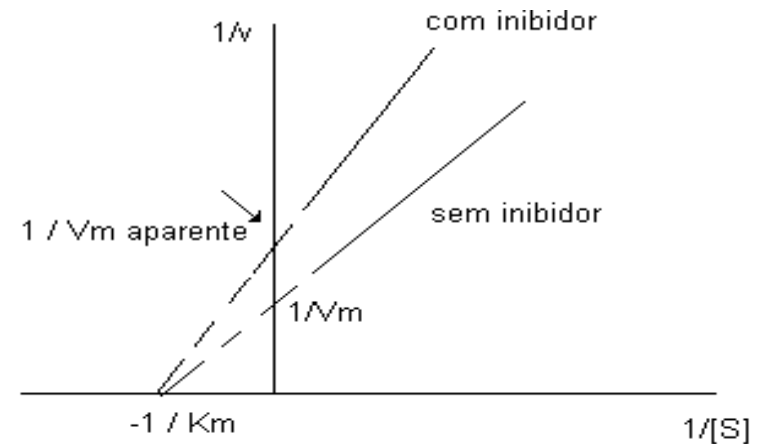
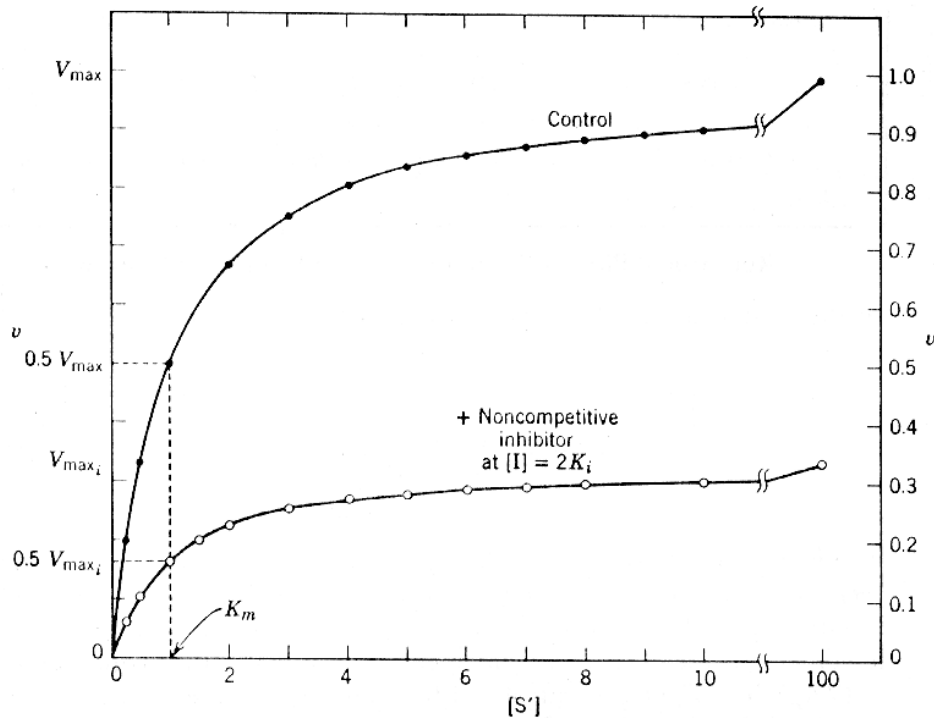




$$\frac{v}{\frac{V_{\max}}{\left(1 + \frac{[I]}{k_i}\right)}} = \frac{[S]}{k_S + [S]}$$

Afeta a **reatividade** da enzima pelo seu substrato ($V_{\max}$), sem afetar a **afinidade** do complexo ativo enzima-substrato (K_S)

*Plot de v versus $[S]$ na presença e na ausência de uma concentração fixa do **inibidor não-competitivo***



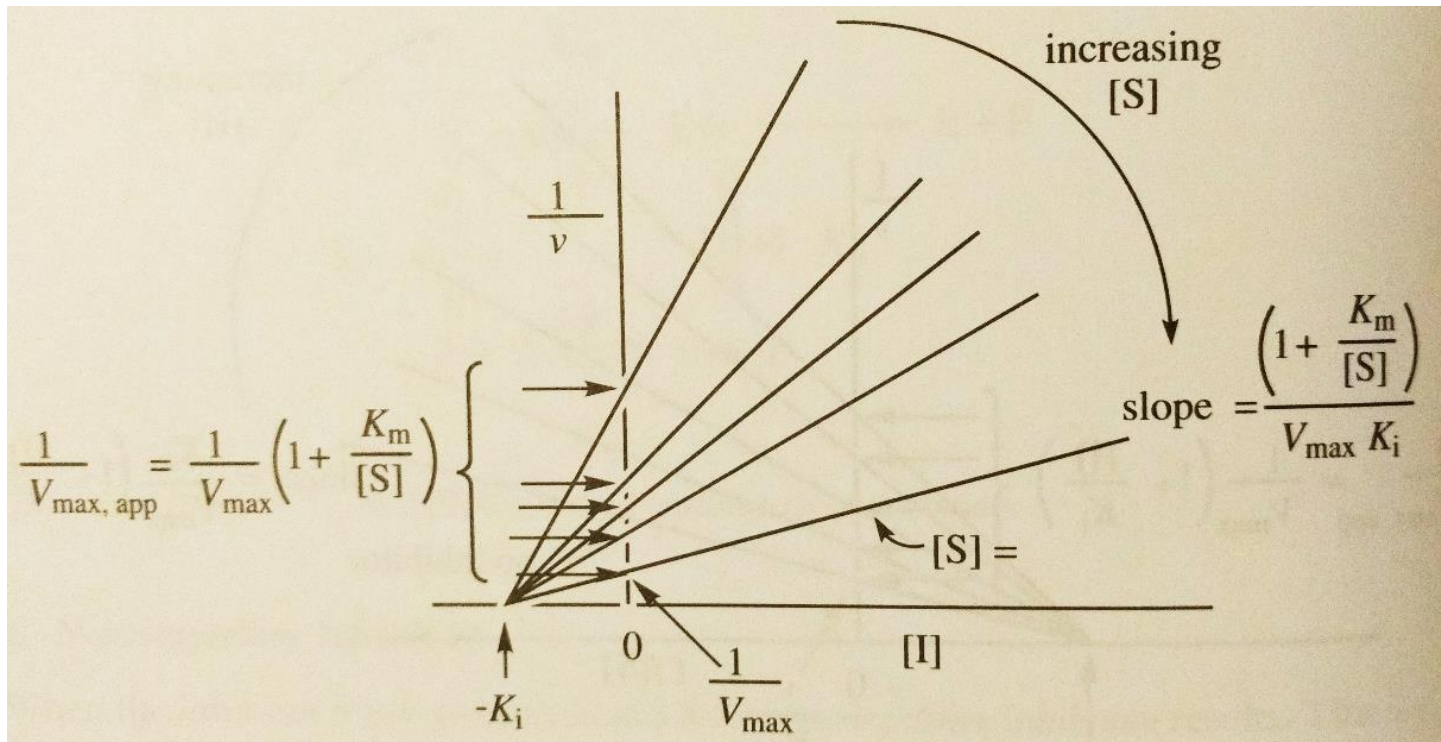
$$V_m \text{ aparente} = V_m (1 + [I] / K_i)$$

Inibição Enzimática

Inibição Não-Competitiva

Gráfico de Dixon

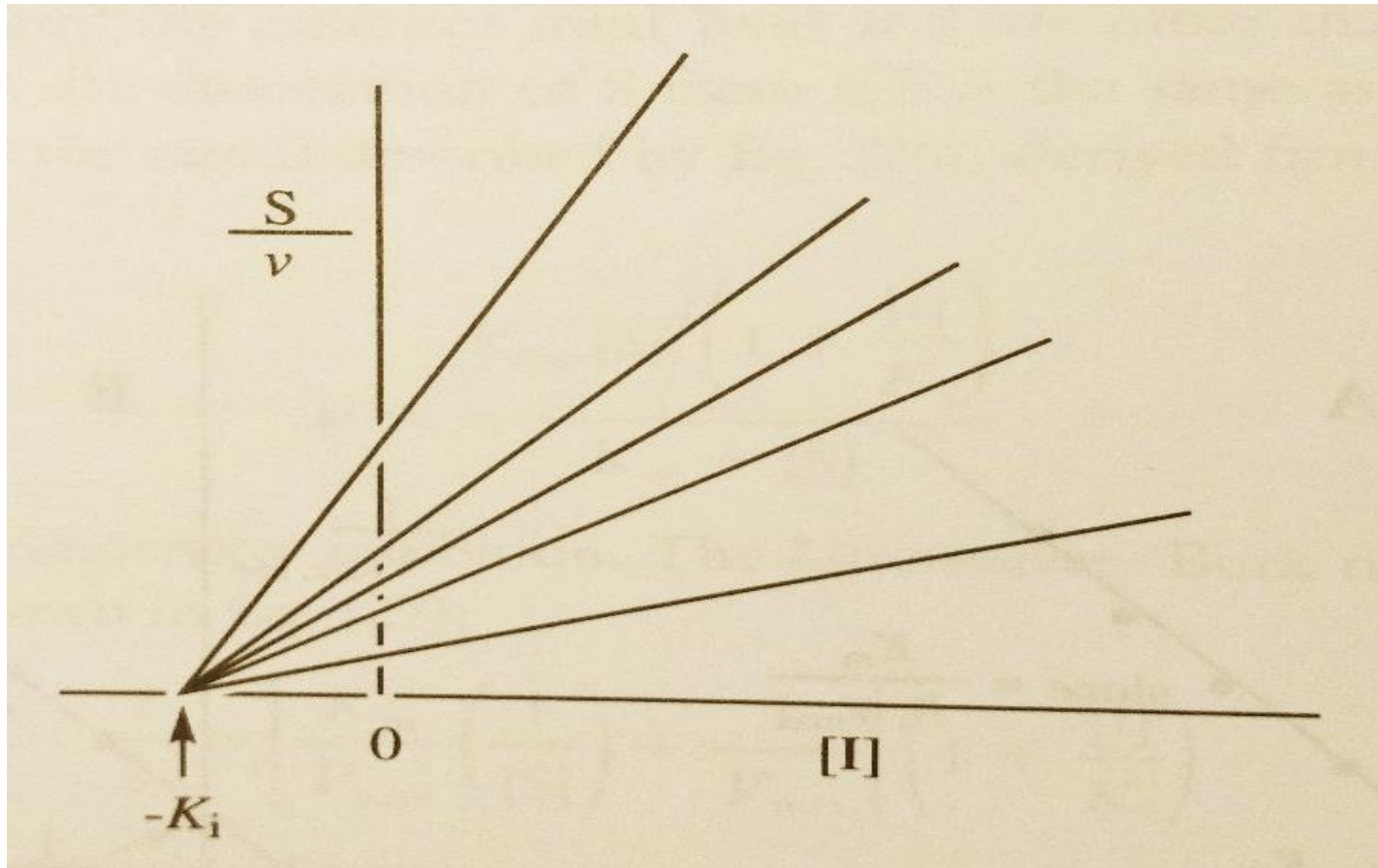
$$\frac{1}{v} = \frac{\left(1 + \frac{K_m}{[S]}\right)}{V_{\max} K_i} [I] + \frac{1}{V_{\max}} \left(1 + \frac{K_m}{[S]}\right)$$



Inibição Enzimática

Inibição Não-Competitiva

Gráfico de Cornish-Bowden



Inibição Enzimática

Inibição Não-Competitiva

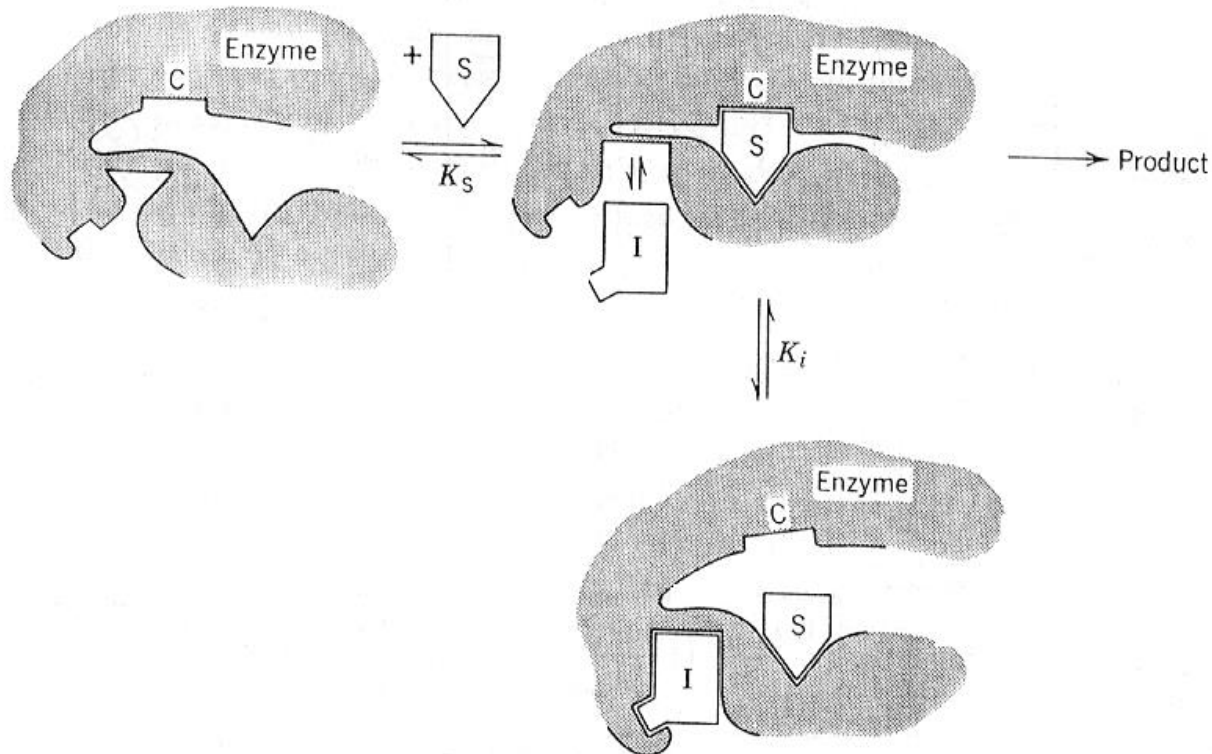
Maioria dos venenos: cianeto e azidas inibem enzimas que possuem ferro ou cobre como componente do sítio ativo ou grupo prostético, como a citocromo c oxidase.

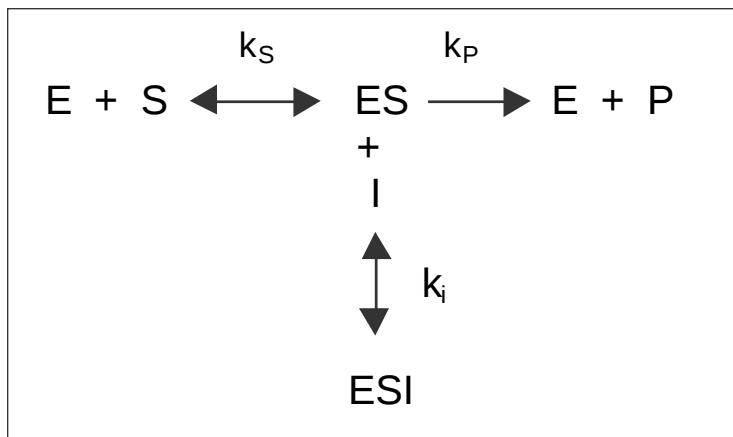
Estes também incluem a inibição enzimática por H^+ pelo lado ácido, ou por OH^- pelo lado alcalino na faixa ótima de pH, como acetazolamida (inibição da anidrase carbônica); aspirina (ciclooxigenase); e AMP (frutose-1,6-difosfatase)



Modelos de Inibição Acompetitiva

Ocorre a altas $[s]$ e ocorre bloqueio de ES. Na enzima pode haver 2 sítios de ligação, um para S e outra para I, sendo que este último só se torna ativo quando o complexo ES esta formado. O complexo ESI formado não gera produtos.



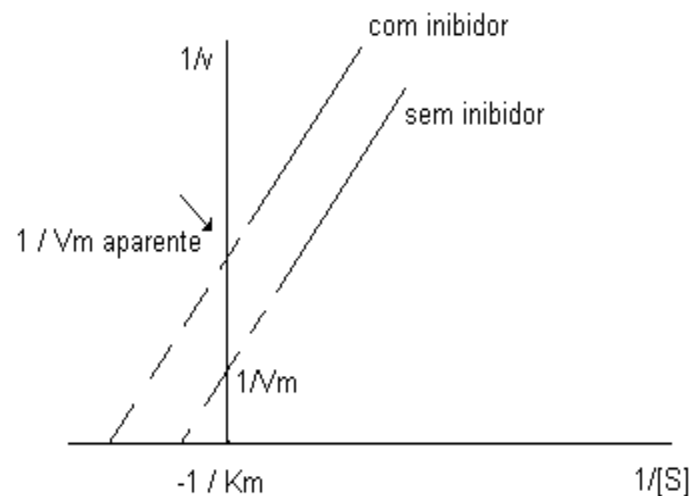
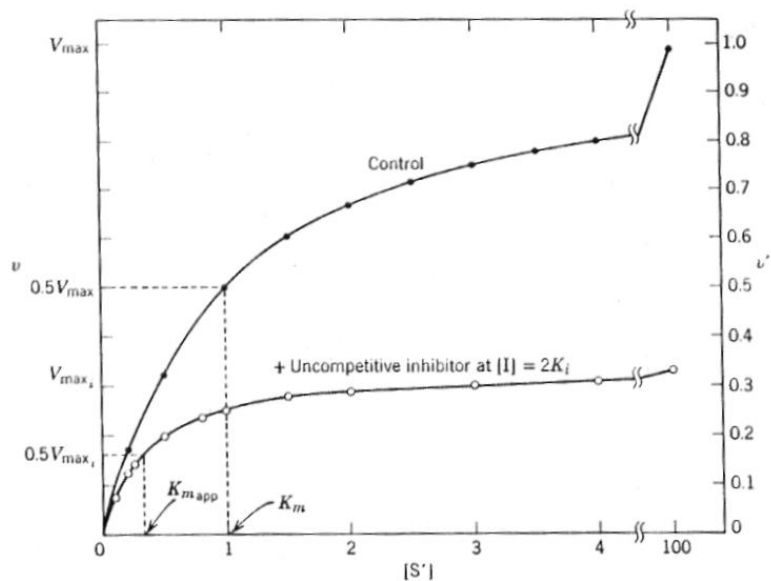


$$\frac{v}{V_{\max}} = \frac{[S]}{k_S + \left(1 + \frac{[I]}{k_i}\right)[S]}$$

Inibição Mista:
 afeta tanto a **afinidade** de
 E por S (k_S) como a
reatividade de ES ($V_{\max}$)



Plot de v versus $[S]$ na presença e na ausência de uma concentração fixa do **inibidor acompetitivo**



$$V_m \text{ aparente} = V_m / (1 + [I] / K_i)$$

$$K_m \text{ aparente} = K_m / (1 + [I] / K_i)$$

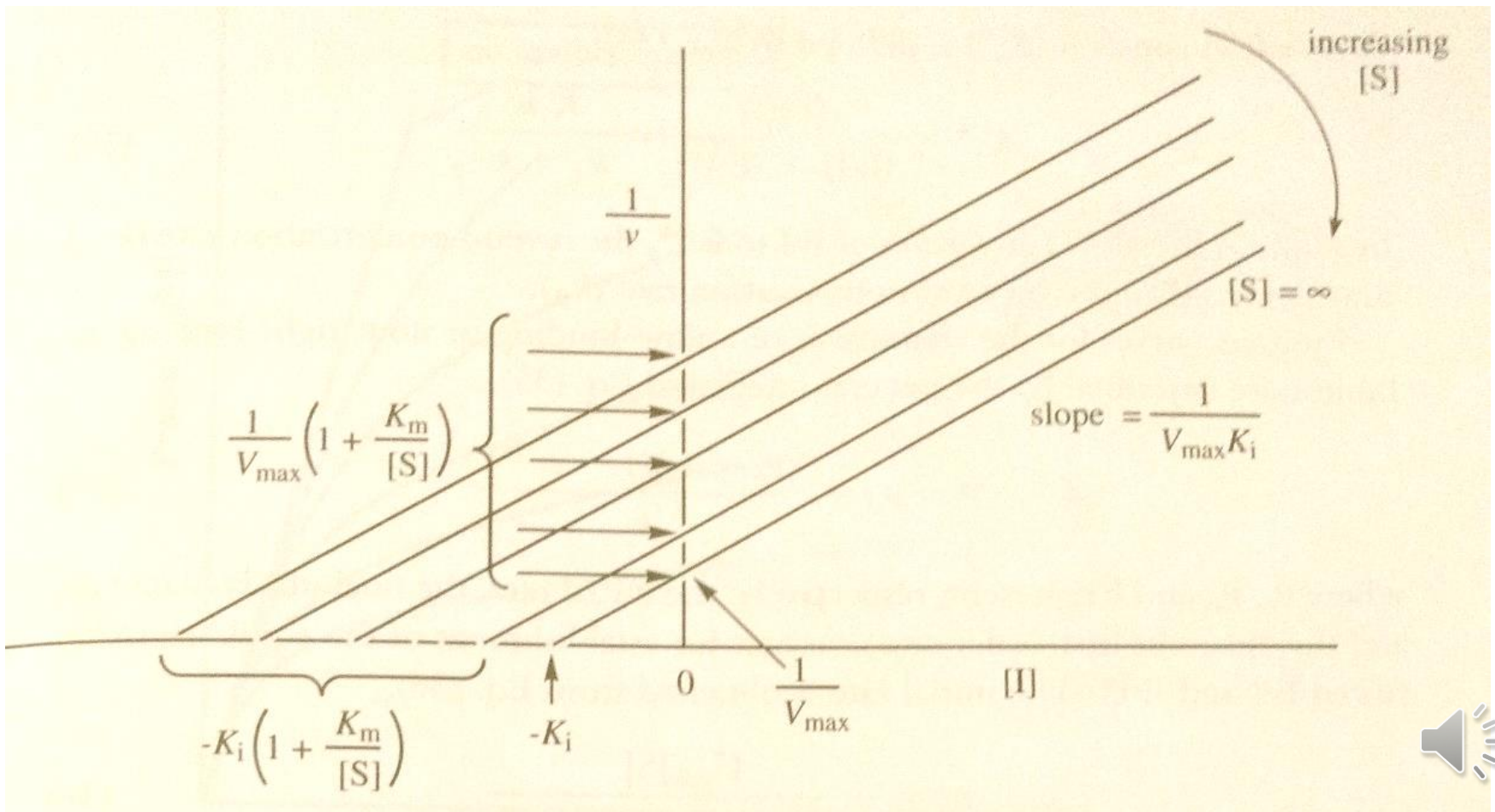


Inibição Enzimática

Inibição Acompetitiva

Gráfico de Dixon

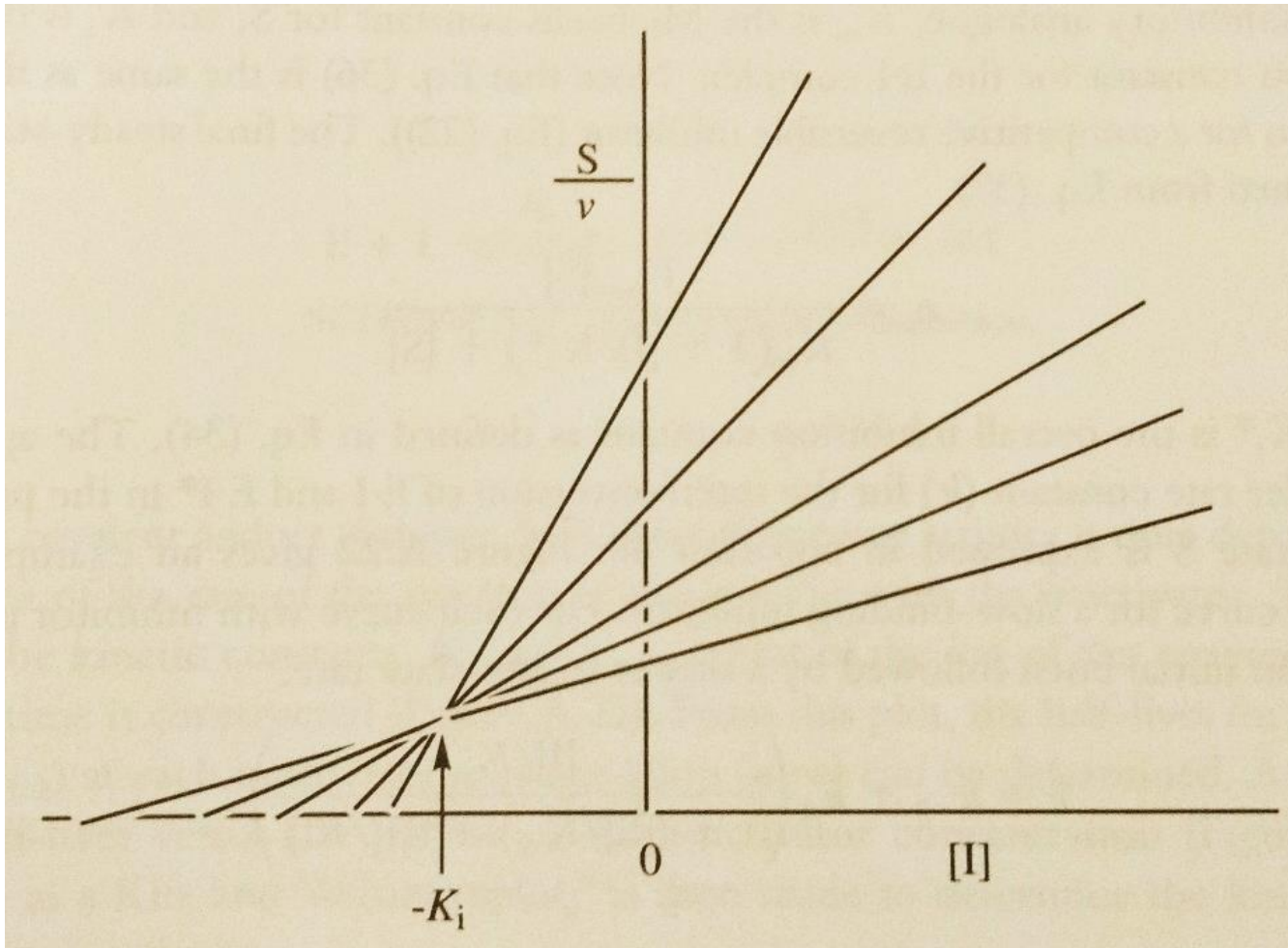
$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\max} K_i} [I] + \frac{1}{V_{\max}} \left(1 + \frac{K_m}{[S]} \right)$$



Inibição Enzimática

Inibição Acompetitiva

Gráfico de Cornish-Bowden



Inibição Enzimática

Inibição Acompetitiva

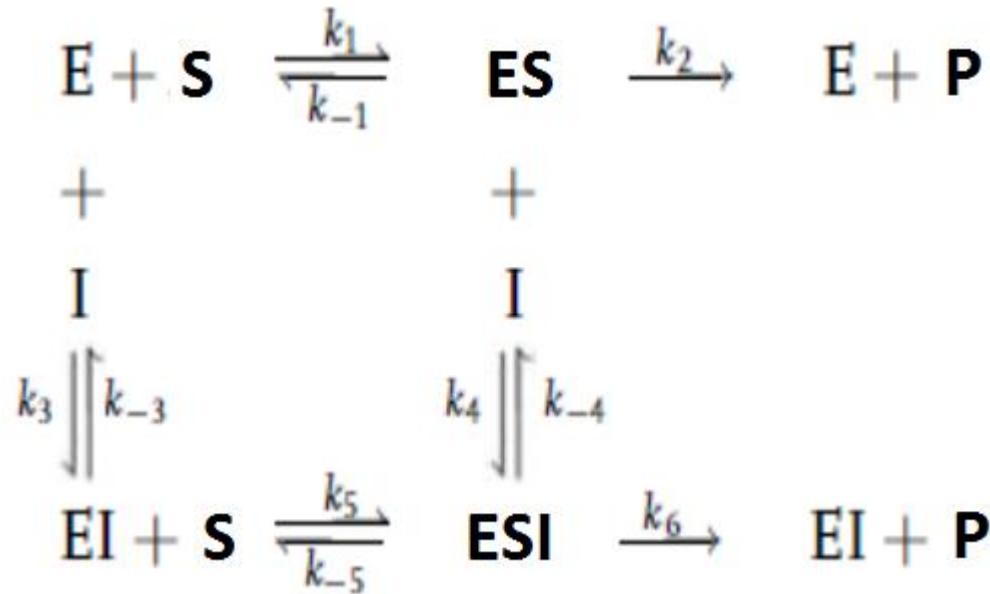
Mais difícil de ocorrer, mas frequente em enzimas multiméricas.

- Inibição da lactato desidrogenase por oxalato
- Inibição da fosfatase alcalina por L-fenilalanina
- Inibição das enzimas que regulam a forma do grupo heme por chumbo, que atuam interferindo na formação de pontes dissulfeto. Pode ser revertido pela ação de agentes redutores e dialise



Inibição Enzimática

Inibições Parciais



$$K_{ic} = \frac{k_{-3}}{k_3} = \frac{[\text{E}][\text{I}]}{[\text{EI}]} ;$$

$$K_{iu} = \frac{k_{-4}}{k_4} = \frac{[\text{ES}][\text{I}]}{[\text{ESI}]}$$

$$V_1 = k_2[\text{E}]_0, \quad V_2 = k_6[\text{E}]_0$$

$$v = \frac{\left(V_1 + \frac{V_2[\text{I}]}{K_{iu}} \right) [\text{S}]}{K_m \left(1 + \frac{[\text{I}]}{K_{ic}} \right) + \left(1 + \frac{[\text{I}]}{K_{iu}} \right) [\text{S}]}$$

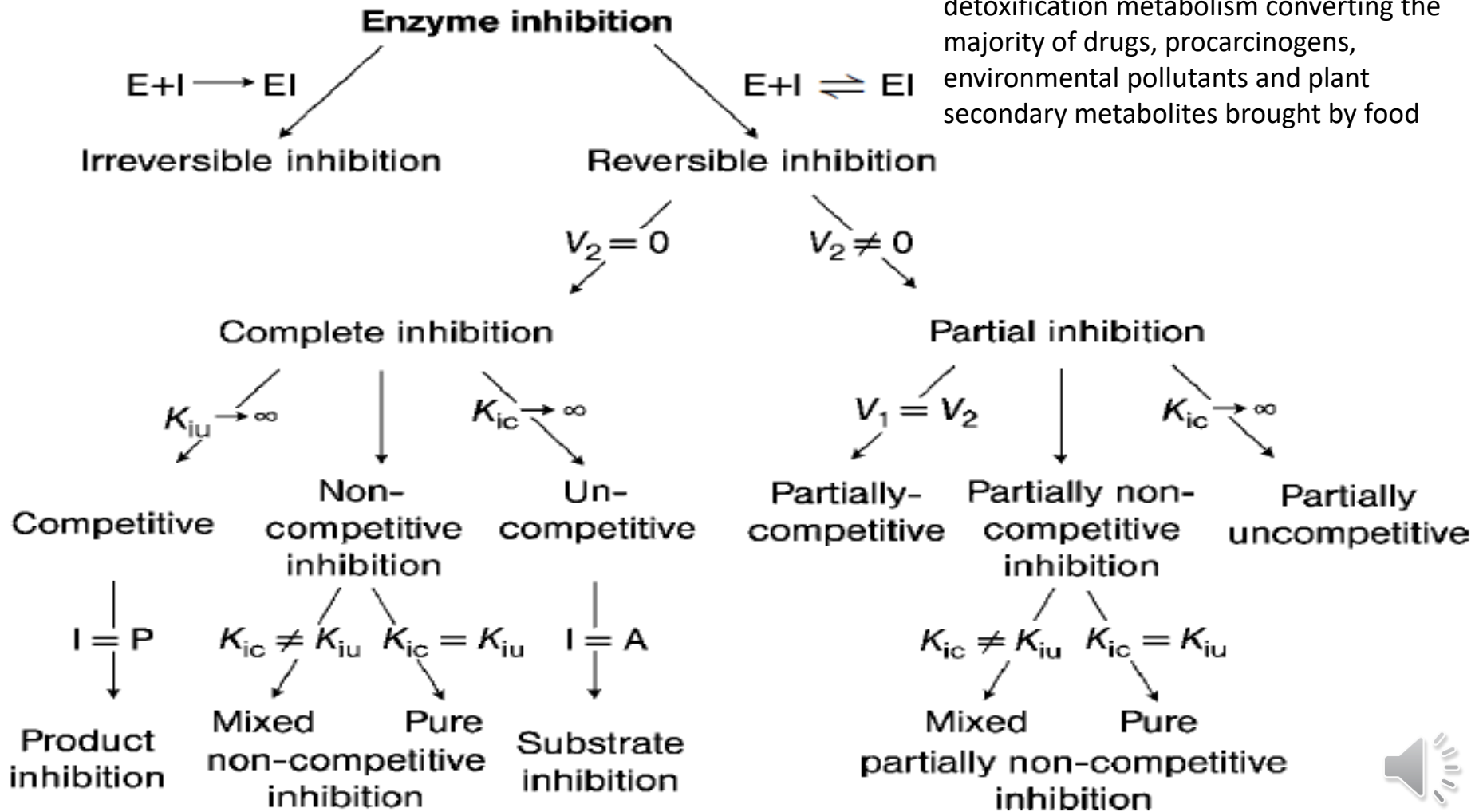


Inibição Enzimática

Inibições Parciais

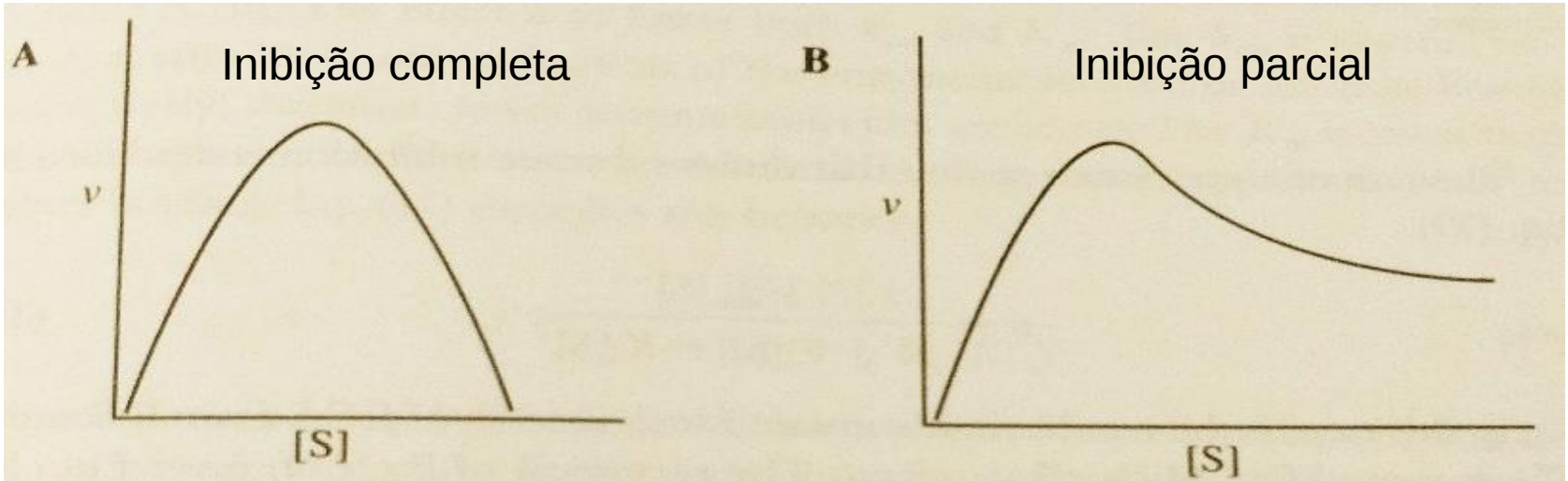
Ex.: Cytochromes P450

heme b-thiolate enzymes, that catalyze mono-oxygenation reactions by the insertion of one oxygen atom from dioxygen into a hydrophobic substrate, the other atom being reduced to water. In animals, play a key role in the oxidative phase of the detoxification metabolism converting the majority of drugs, procarcinogens, environmental pollutants and plant secondary metabolites brought by food

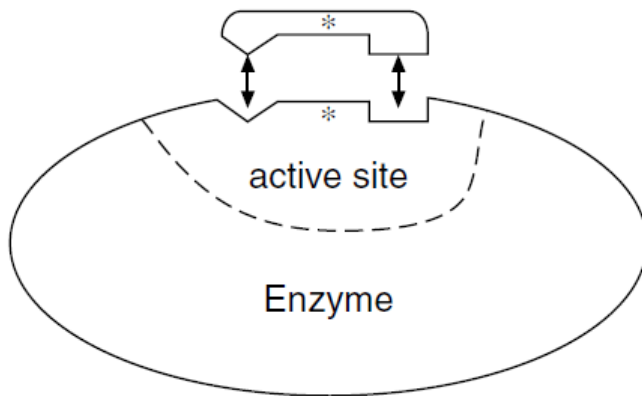


Inibição Enzimática

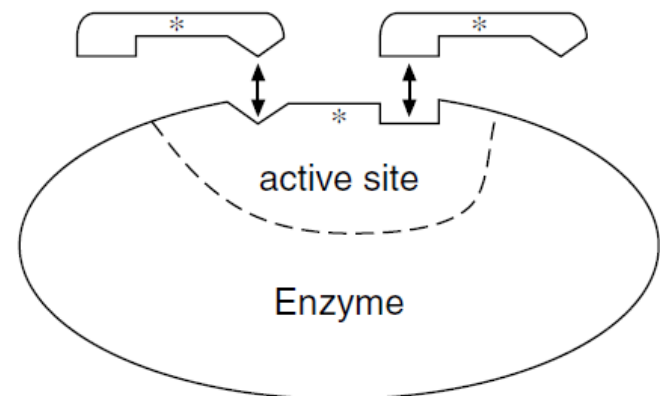
Inibição por Substrato



Low $[S]$ favors formation of ES and alignment of reactive groups (*) of E and S

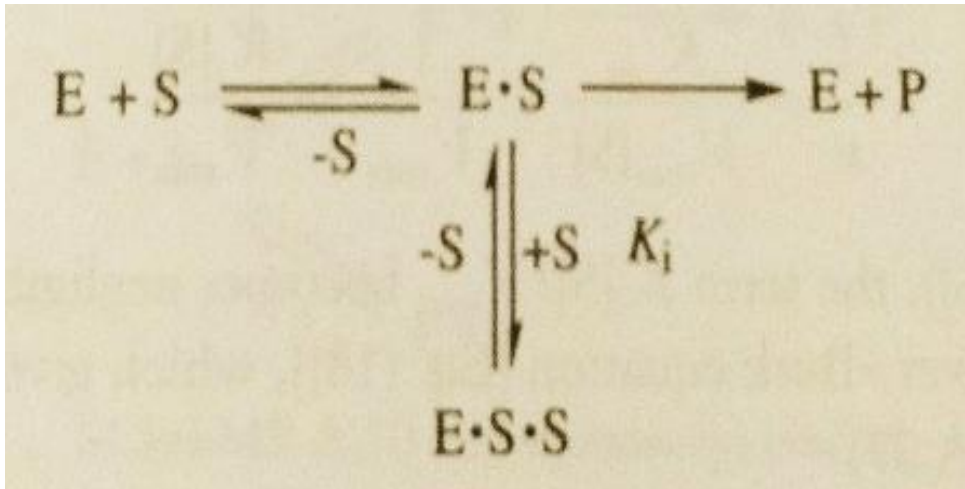


High $[S]$ favors formation of ESS and nonproductive binding



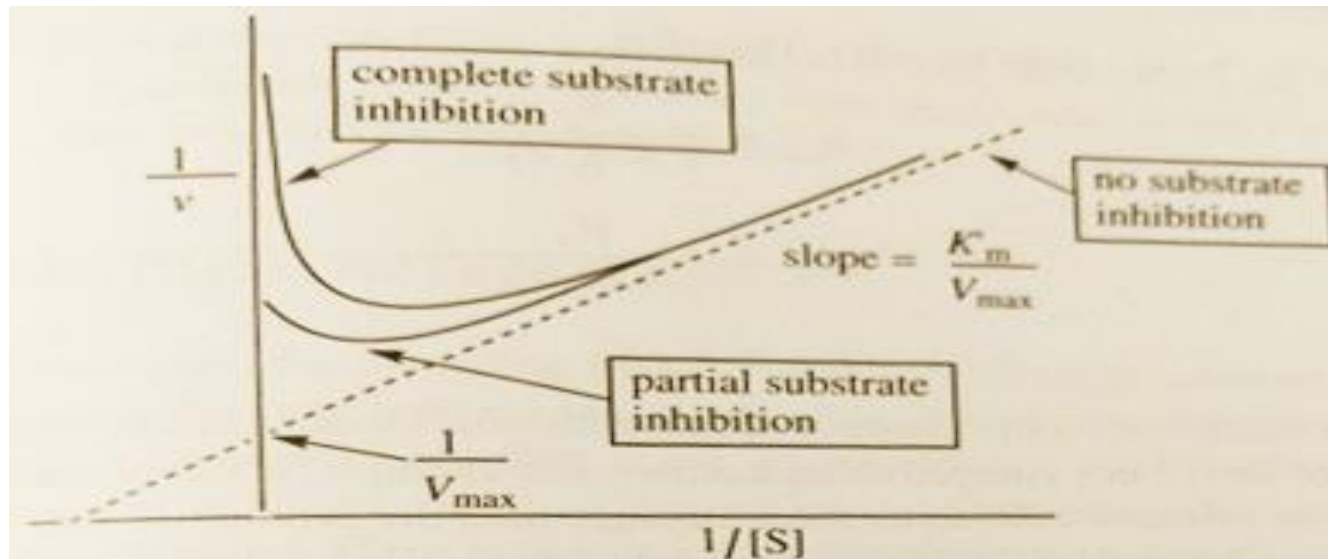
Inibição Enzimática

Inibição por Substrato



Exemplos:
Invertase; $\uparrow$ [sacarose]
Beta-glicosidase; $\uparrow$ [celobiose]

$$v = \frac{V_m S}{K_M + S + \frac{S^2}{K_i}}$$



Inibição Enzimática

Exemplos:

Beta-galactosidase; $\uparrow$ [galactose]

Beta-glicosidase; $\uparrow$ [glicose]

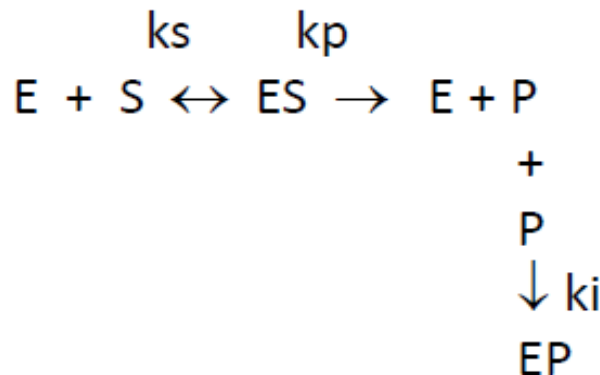
Inibição por Produto

Para inibição pelo Produto, este deve ter estrutura semelhante a do substrato para competir com ele.

Sendo neste caso, inibição do tipo competitiva.

Este tipo de inibição conduz a eventos extrudentes, quando o produto se liga a enzima o substrato não se liga, devido a modificações estruturais.

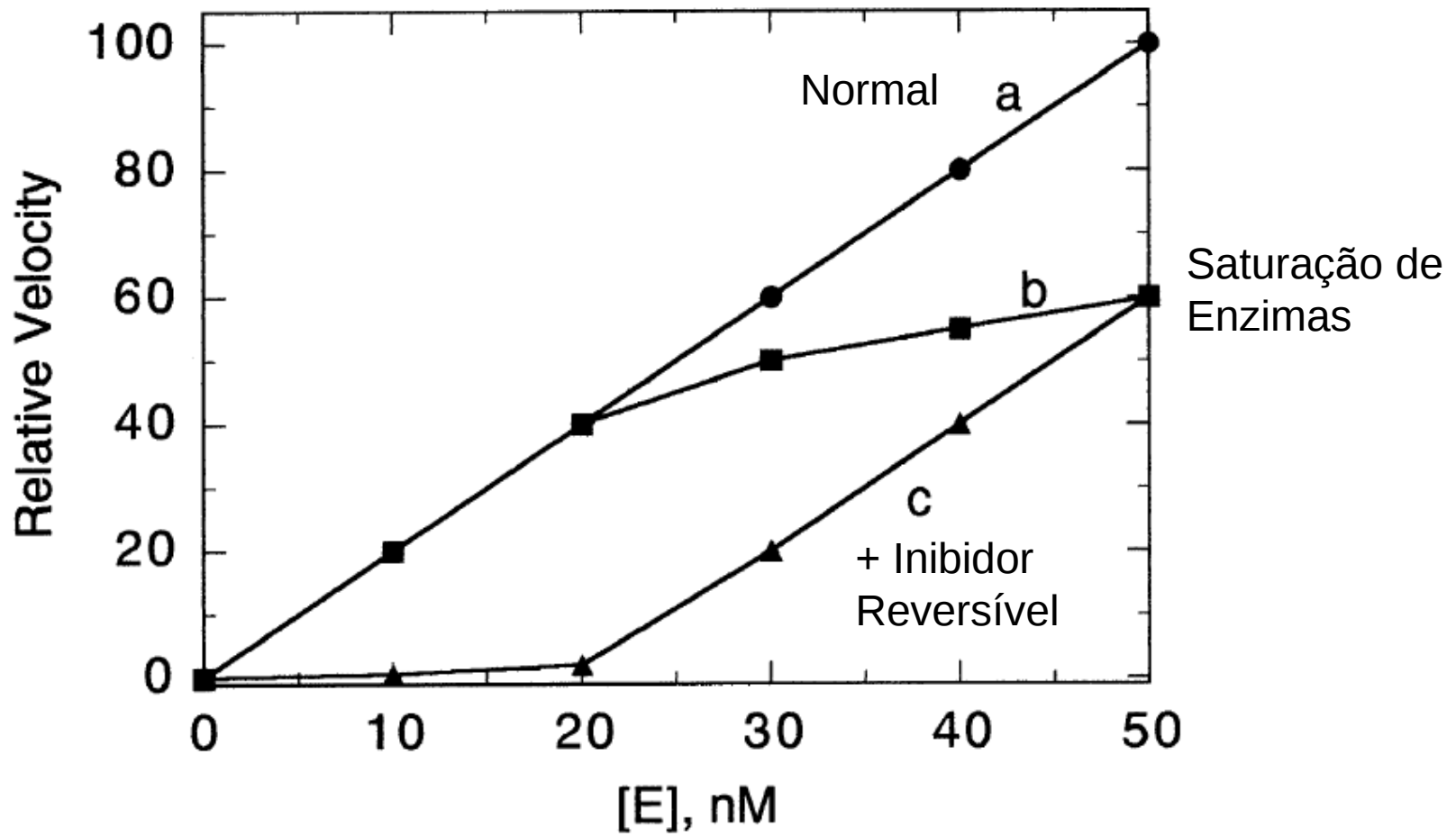
Inibidor pode se ligar somente após a entrada do substrato



$$v = \frac{V_m S}{K_M \left(1 + \frac{P}{K_i} \right) + S}$$



Influencia da [E]



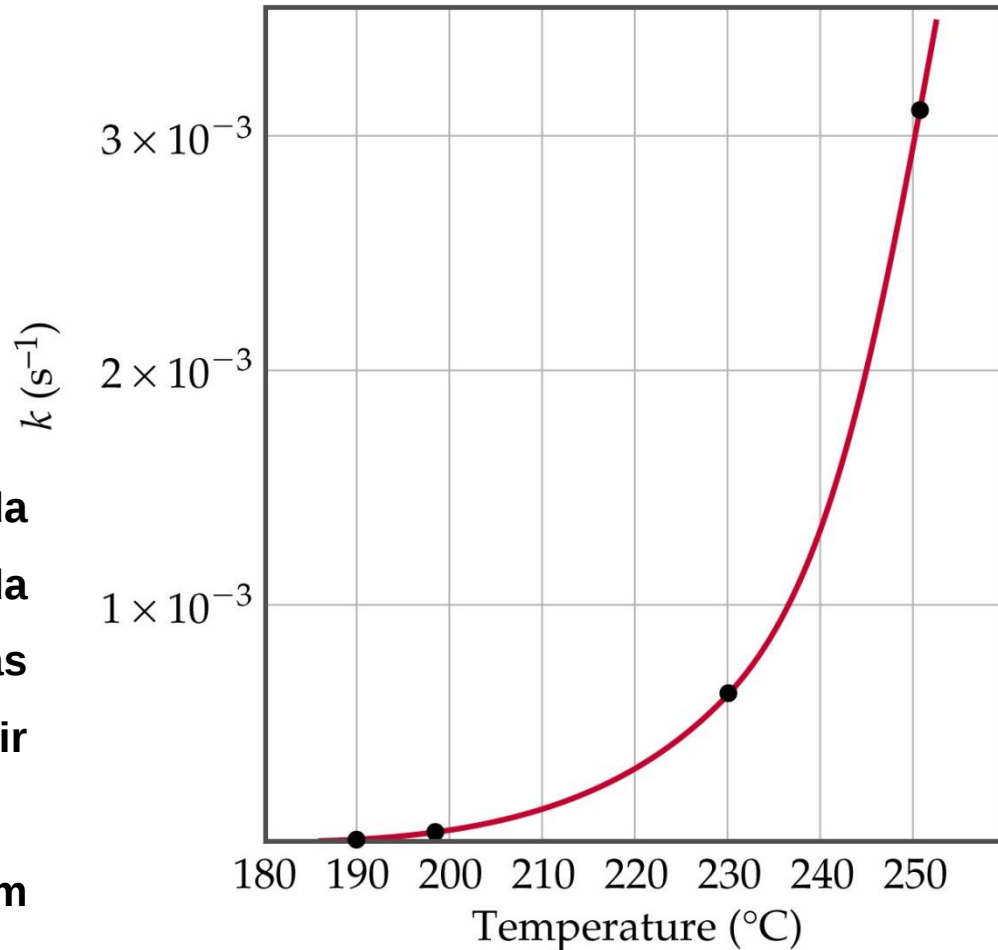
Influencia da Temperatura

Para a maioria das reações, a velocidade aumenta com um aumento da temperatura.

Teoria das Colisões de Arrhenius

Modelo que explica o aumento da velocidade das reações com o aumento da temperatura, considerando que as moléculas, para reagirem, têm que colidir umas com as outras.

Contudo, nem todas as colisões resultam na formação de produtos; só uma pequena parte delas vai resultar na ocorrência de reação, dependendo de dois fatores:

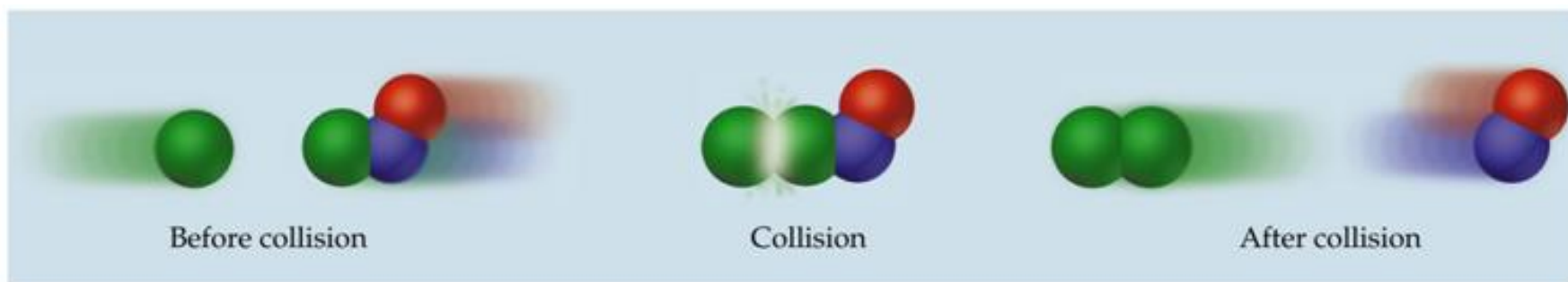


1. Fator de orientação
2. Energia cinética

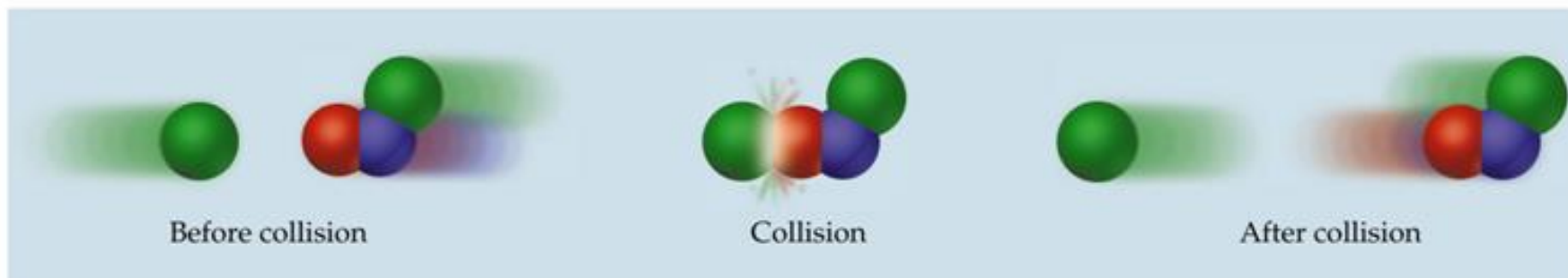


Fator de orientação

Para que uma reação aconteça, é necessário que as moléculas dos reagentes colidam com a orientação correta.



Colisão Eficaz



Colisão Ineficaz



Energia de ativação

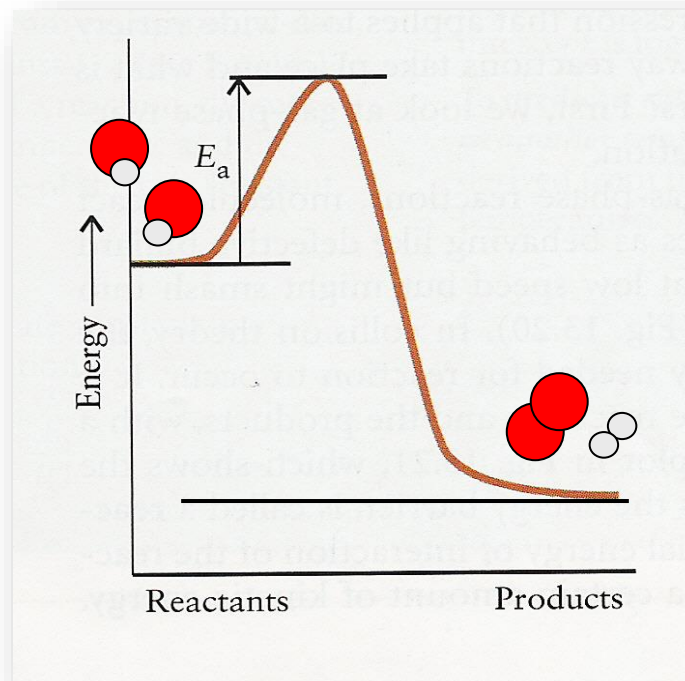
Energia de ativação:

Tal como uma bola não consegue alcançar o topo de uma colina se não rolar com energia suficiente até à colina, uma reação não ocorre se as moléculas não possuírem energia suficiente para ultrapassar a barreira de energia de ativação.



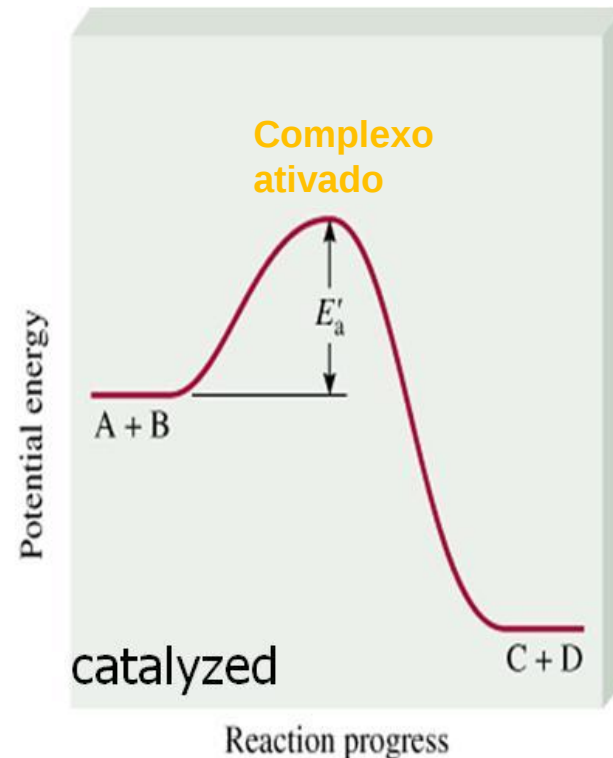
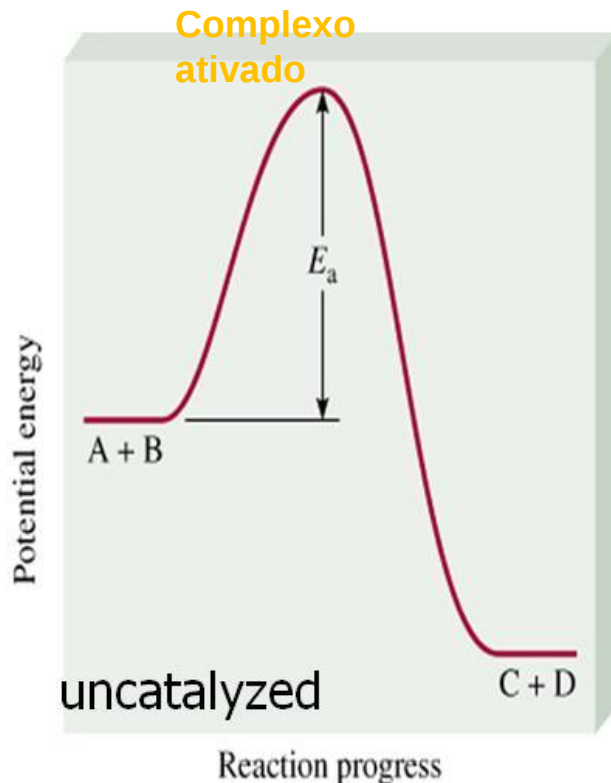
Energia de ativação

Energia de ativação: segundo a teoria das colisões postula-se que, para que possam reagir, as moléculas que colidem têm de possuir uma energia cinética total maior ou igual do que a **energia de ativação** (E_a). É a energia necessária para que se inicie uma dada reação.



Complexo ativado

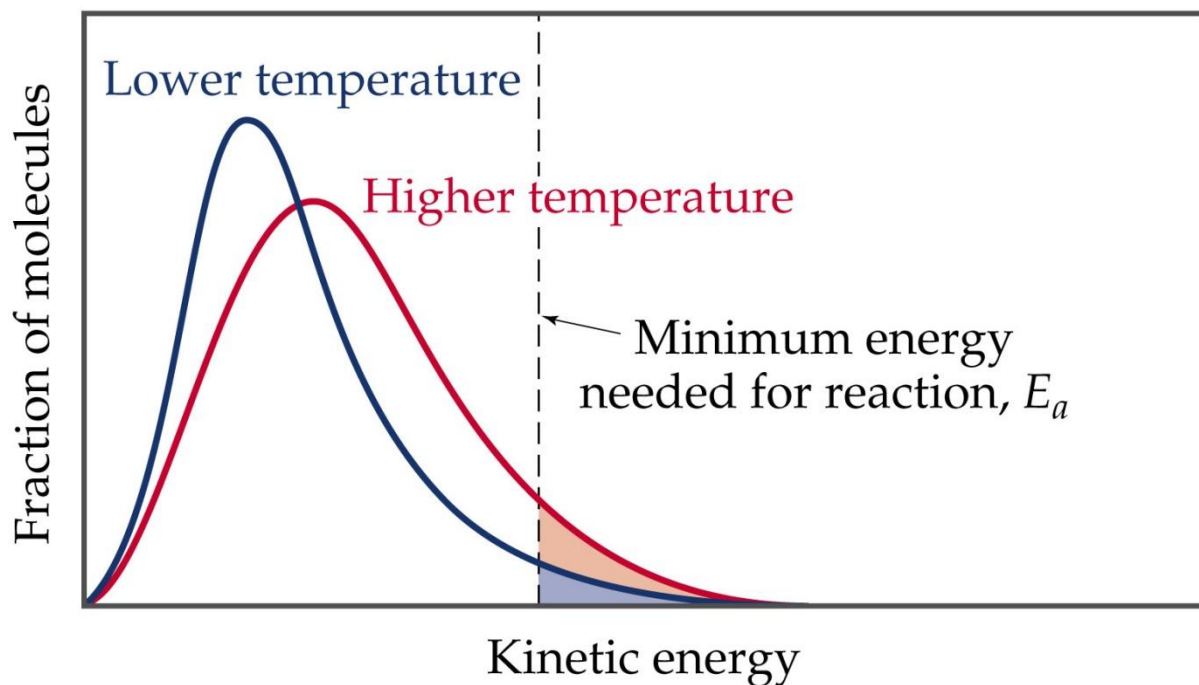
- Complexo ativado:** é a espécie formada transitoriamente pelas moléculas de reagentes, como resultado da colisão, antes da formação do (s) produto (s)



Fracção de Moléculas com E_a

A fracção de moléculas, f , com energia igual ou superior E_a é:

$$f = e^{-E_a/RT}$$



EQUAÇÃO DE ARRHENIUS

- A maior parte dos dados da velocidade das reações obedece à seguinte relação

$$k = Ae^{-E_a/RT}$$

Em que:

k - constante de velocidade

A – fator de frequência (medida da probabilidade de uma colisão eficaz)

E_a – energia de ativação (kJ/ mol)

R – constante dos gases ideais (em unidades S.I. 8,314 J/K . mol)

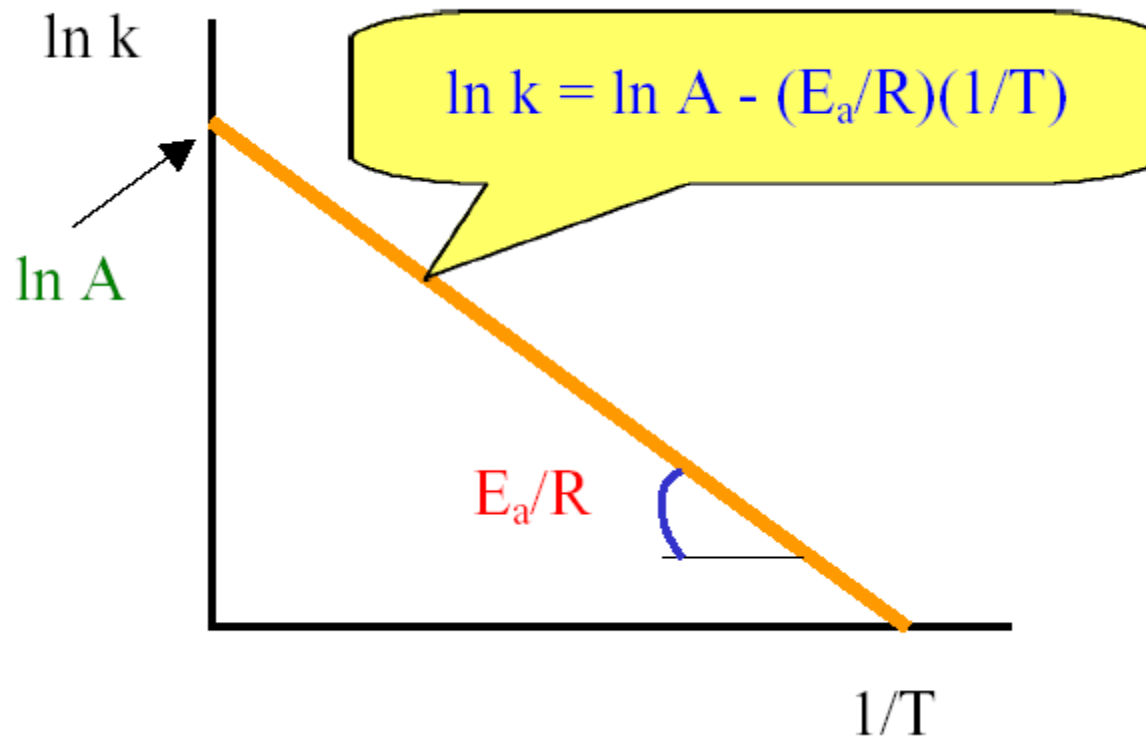
T – temperatura absoluta

Quanto menor E_a e maior T , maior k .



$$\ln k = \ln A - (E_a/R) (1/T)$$

Uma relação de $\ln k$ em função de $1/T$ resulta em uma reta cuja inclinação é o valor de E_a/R e o intercepto é $\ln A$, como na figura abaixo:



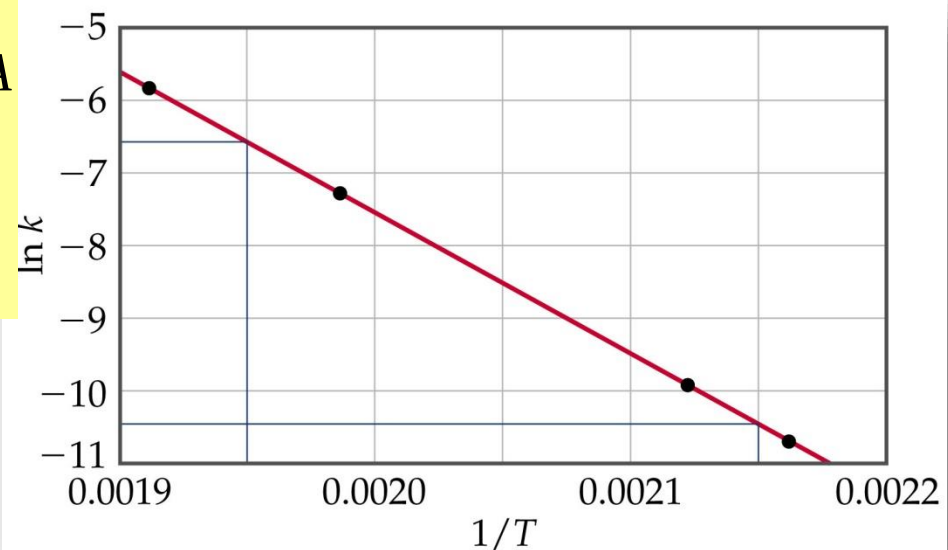
DETERMINAÇÃO DA ENERGIA DE ATIVAÇÃO

Rearranjando a Equação de Arrhenius, obtém-se:

$$k = Ae^{-E_a/RT} \Leftrightarrow \ln k = \left(-\frac{E_a}{R}\right)\left(\frac{1}{T}\right) + \ln A$$

E_a (kJ/mol)

$R = 8,314 \text{ J/K.mol}$



Para duas temperaturas, a relação entre as constantes de velocidade é:

$$\ln k_1 - \ln k_2 = \frac{E_a}{R} \left(\frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_1} \right) \quad \ln (k_2/k_1) = E_a/R(1/T_1 - 1/T_2)$$

$$\ln x = 2,303 \log x$$

$$\log (k_2/k_1) = E_a/2,303R(1/T_1 - 1/T_2)$$

Para verificar quanto a variação da temperatura afeta a velocidade de uma reação química, vamos considerar que a energia de ativação para a reação seja de 50 KJ mol^{-1} e que a variação de temperatura seja de 27 para 37 graus Celsius.

1. Converter as duas temperaturas para graus Kelvin:

$$T_1 = 27 + 273 = 300 \text{ K}$$

$$T_2 = 37 + 273 = 310 \text{ K}$$

2. Adicionar a energia de ativação, T_1 , T_2 , e $R = 8,31 \times 10^{-3} \text{ KJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ na equação de Arrhenius

$$\log (k_2/k_1) = 50 \text{ KJ mol}^{-1} / 2,303 (8,31 \times 10^{-3} \text{ KJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}) (1/300 \text{ K} - 1/310 \text{ K})$$

3. Avalie o lado direito da equação: $\log (k_2/k_1) = 0,2808$

4. Aplicar antilog nos dois lados da equação:

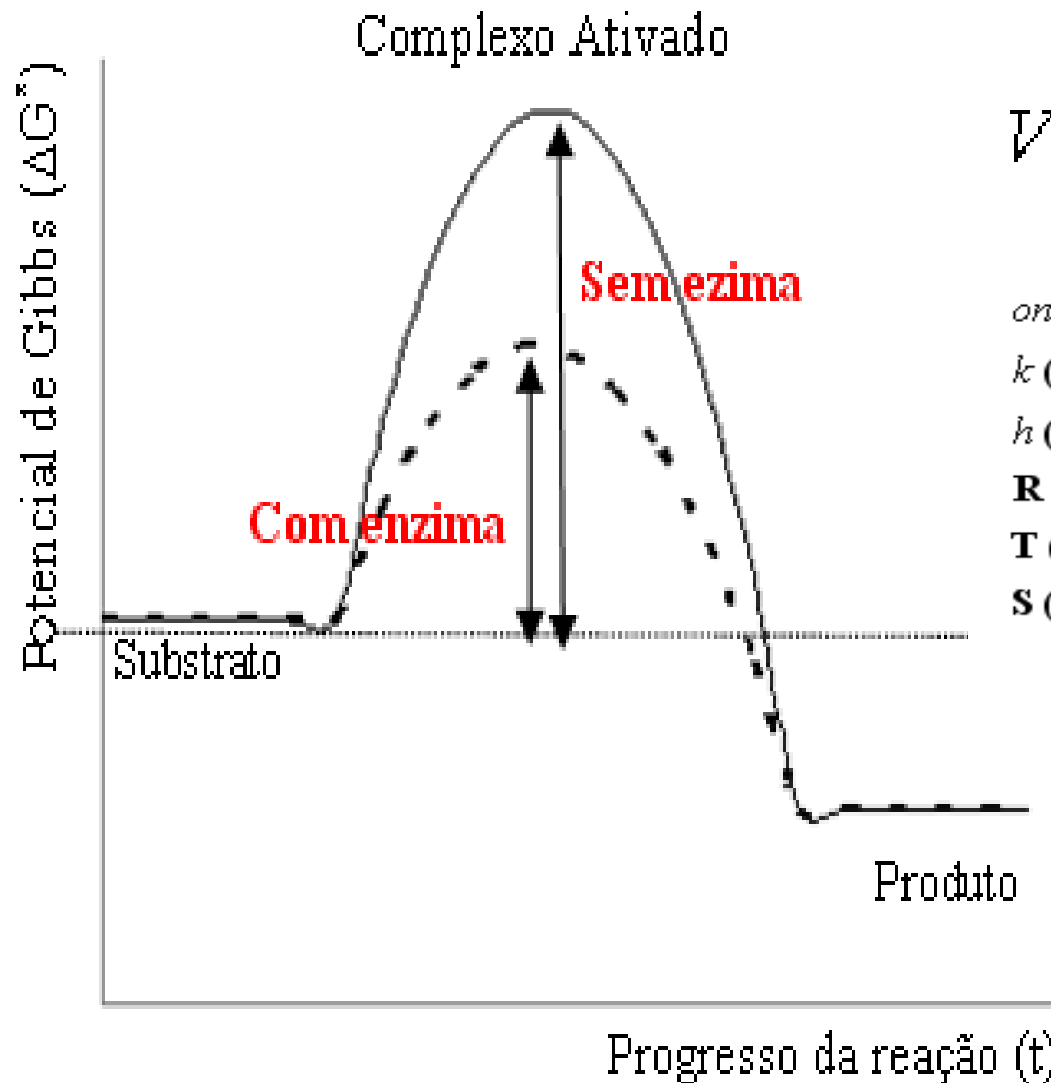
$$\text{antilog} [\log (k_2/k_1)] = \text{antilog } 0,2808$$

$$k_2/k_1 = 1,91 \rightarrow k_2 = 1,91 k_1$$

Em outras palavras, aumentando a temperatura da reação química em 10 graus, a velocidade aproximadamente dobrou, devida ter dobrado a constante da velocidade.



Ação Enzimática



$$V = \frac{kT}{h} [S] e^{-\Delta G^\circ / RT}$$

onde:

k (constante de Boltzmann) = $1,38 * 10^{-23}$ J/K

h (constante de Planck) = $6,63 * 10^{-34}$ J.s

R (constante universal dos gases) = $8,31$ J/mol.K

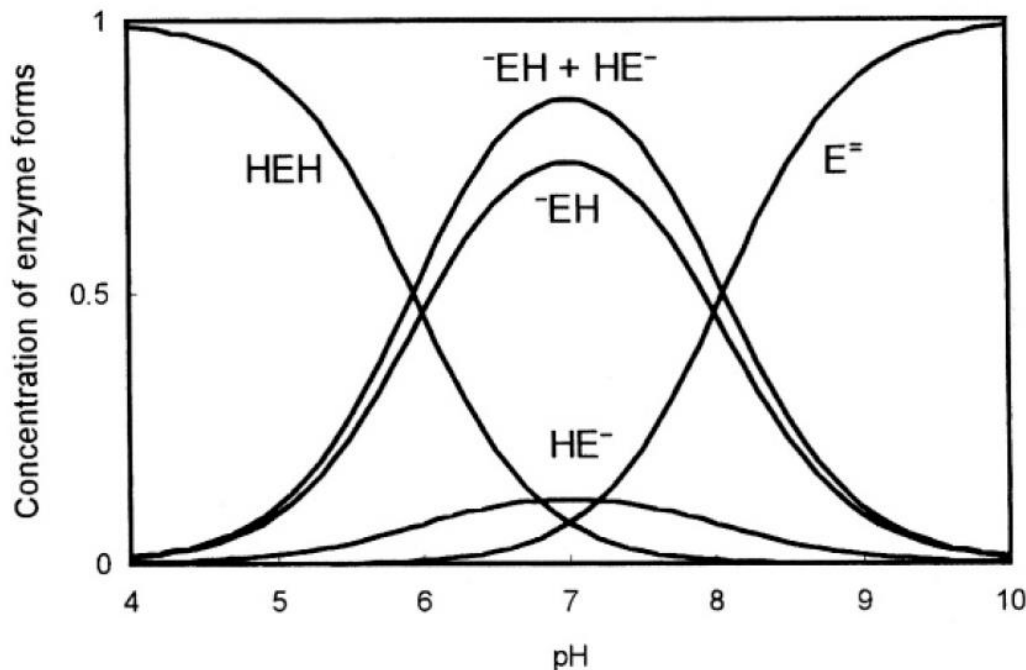
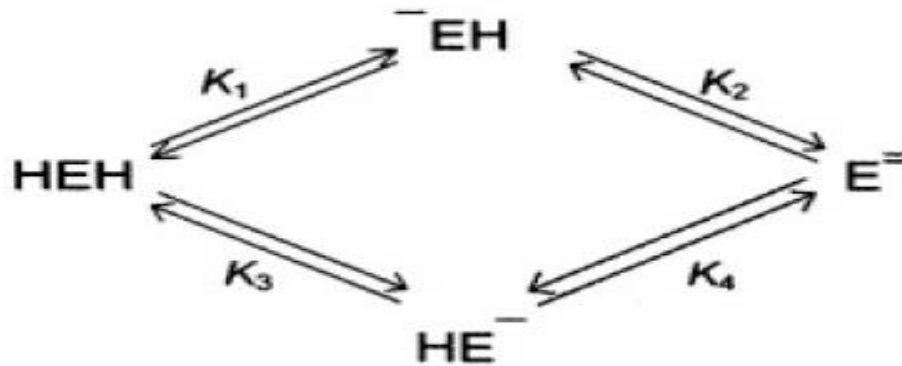
T (temperatura, K)

S (concentração de substrato, mol/L)

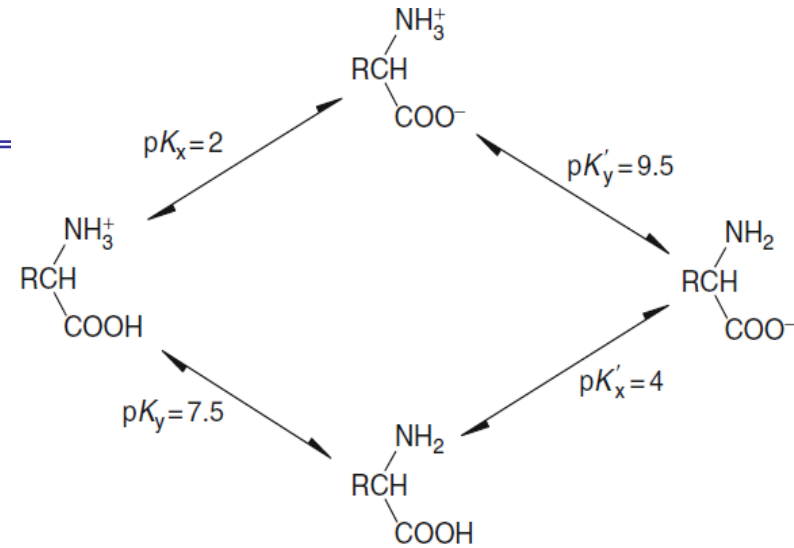


Influencia do pH

Sítio ativo dibásico



$$pK_a = -\log K_a$$



$$E_0 = [\text{HEH}] + [\text{^-EH}] + [\text{HE}^-] + [\text{E}^=]$$

$$[\text{^-EH}] = \frac{[\text{HEH}]K_1}{[\text{H}^+]}$$

$$[\text{HE}^-] = \frac{[\text{HEH}]K_3}{[\text{H}^+]}$$

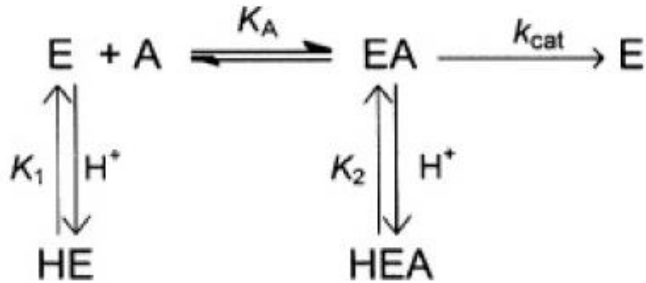
$$[\text{E}^=] = \frac{[\text{HEH}]K_1K_2}{[\text{H}^+]^2} = \frac{[\text{HEH}]K_3K_4}{[\text{H}^+]^2}$$



Influencia do pH

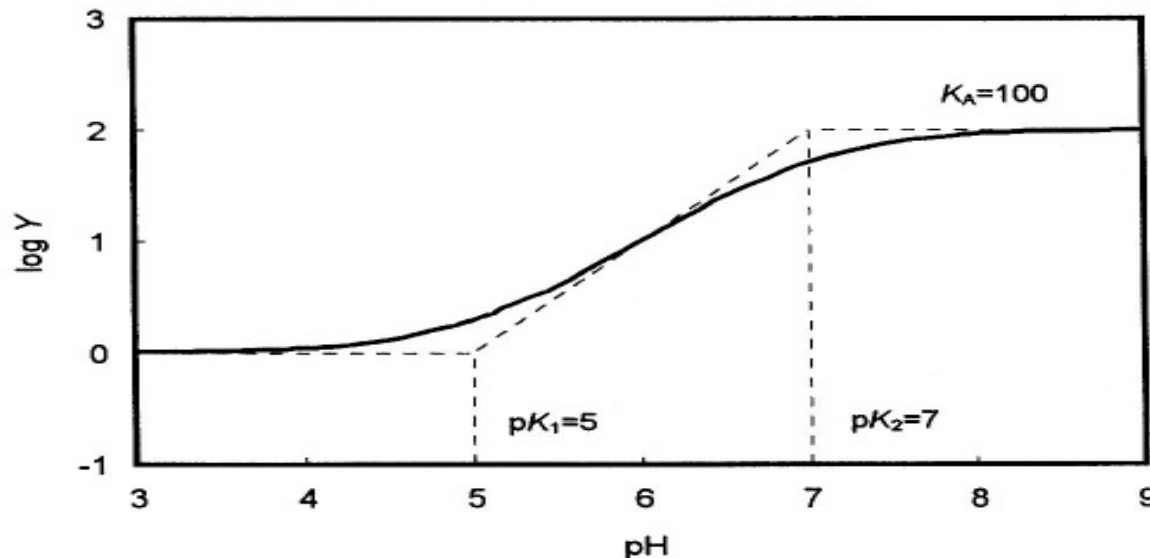
$$pH = -\log[H^+]$$

$$V_1 = k_{cat}E_0$$



$$v_o = \frac{\left(\frac{V_1}{1 + \frac{H}{K_2}} \right) A}{K_A \left(\frac{1 + \frac{H}{K_1}}{1 + \frac{H}{K_2}} \right) + A}$$

Gráfico de Dixon-Webb

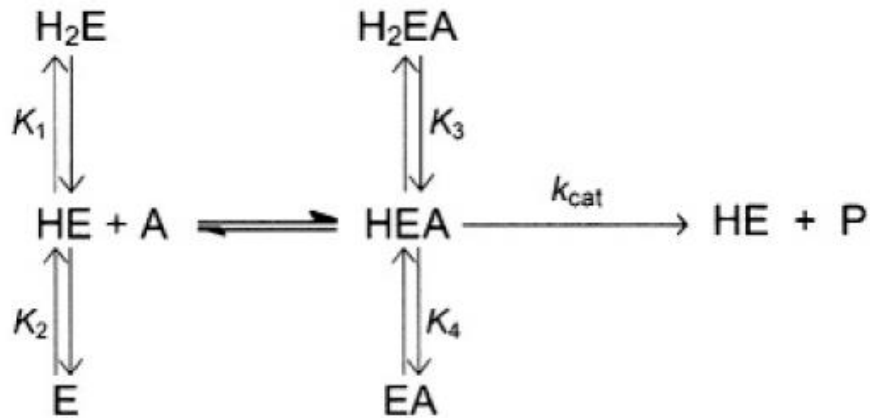


Y → variável trabalhada

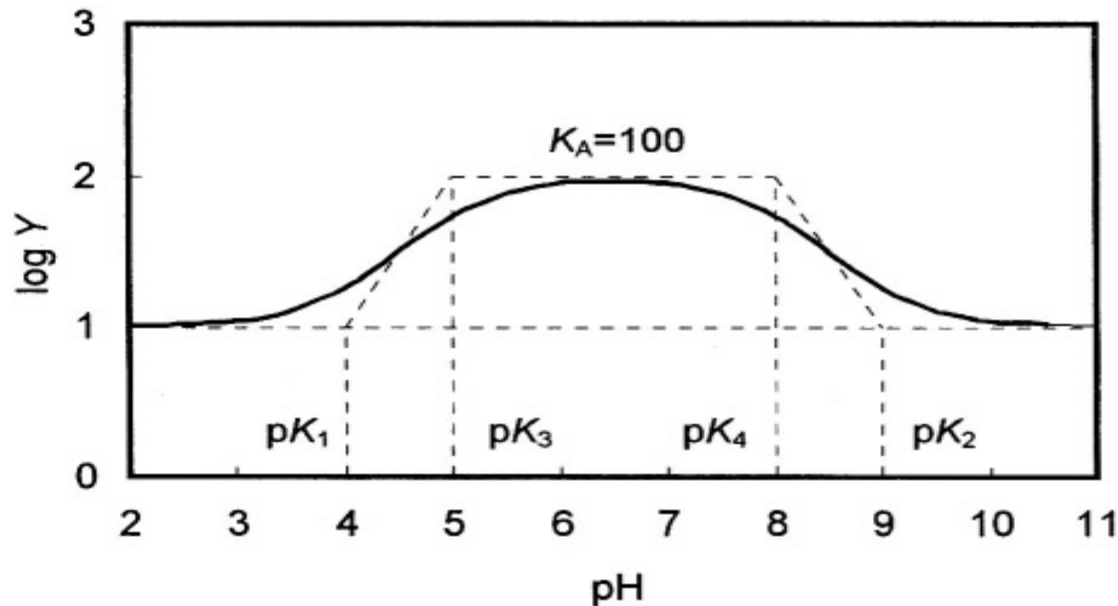
$$K_A^{APP} = K_A \left(\frac{1 + \frac{H}{K_1}}{1 + \frac{H}{K_2}} \right)$$



Influencia do pH



$$v_0 = \frac{\left(\frac{V_1}{1 + \frac{H}{K_3} + \frac{K_4}{H}} \right) A}{K_A \left(\frac{1 + \frac{H}{K_1} + \frac{K_2}{H}}{1 + \frac{H}{K_3} + \frac{K_4}{H}} \right) + A}$$



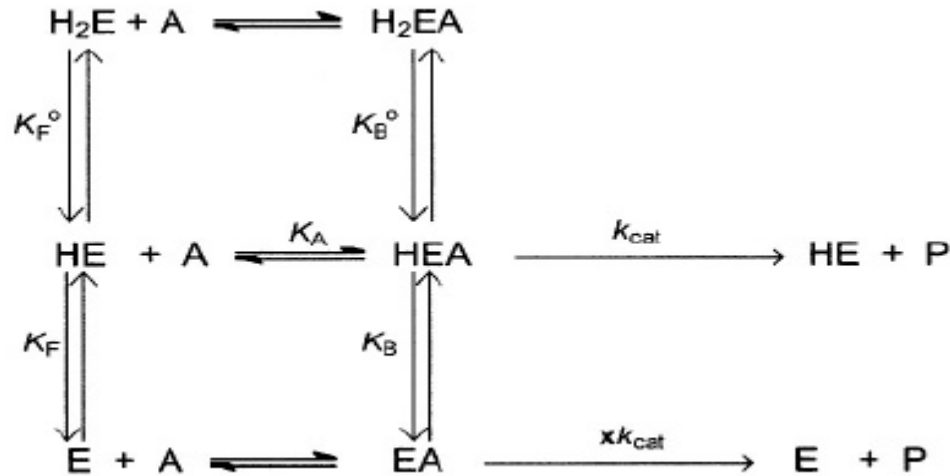
$$K_A^{\text{APP}} = K_A \frac{\left(1 + \frac{H}{K_1} + \frac{K_2}{H} \right)}{\left(1 + \frac{H}{K_3} + \frac{K_4}{H} \right)}$$



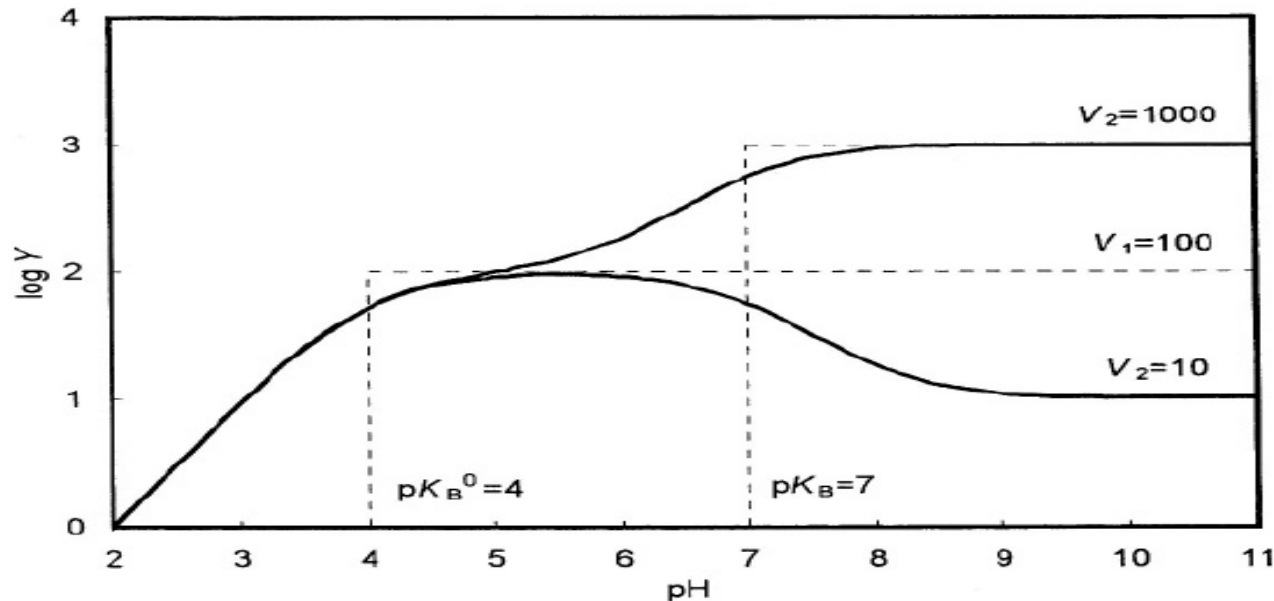
Influencia do pH

$$V_1 = k_{\text{cat}} E_0$$

$$V_2 = x k_{\text{cat}} E_0$$



$$v_0 = \frac{\left[V_1 + V_2 \left(\frac{K_B}{H} \right) \right] A}{K_A \left(\frac{1 + \frac{H}{K_F^0} + \frac{K_F}{H}}{1 + \frac{H}{K_B^0} + \frac{K_B}{H}} \right) + A}$$

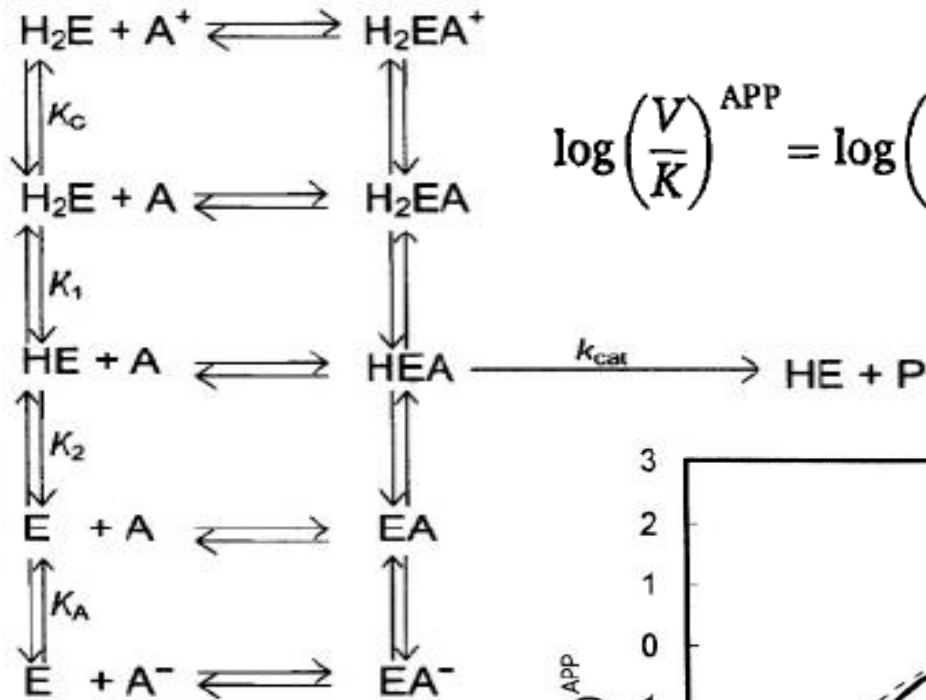


$$V_{\text{APP}} = \frac{V_1 + V_2 \left(\frac{K_B}{H} \right)}{1 + \frac{H}{K_B^0} + \frac{K_B}{H}}$$

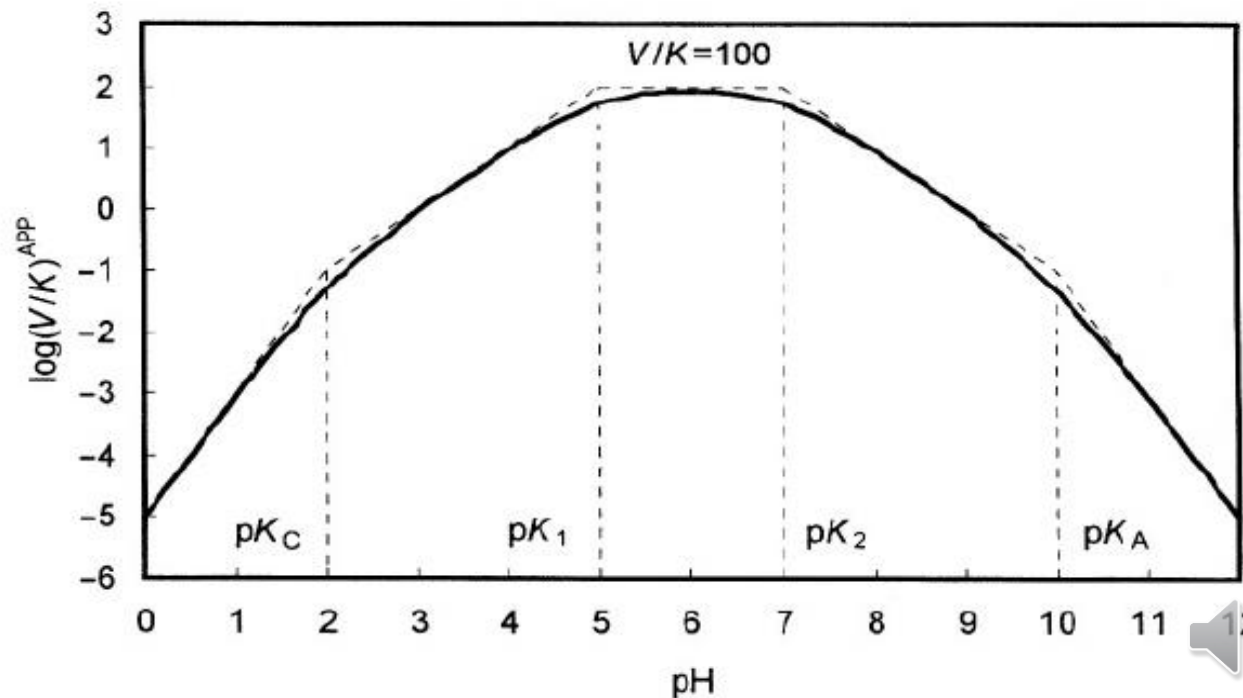


Influencia do pH

Ionização de Substrato



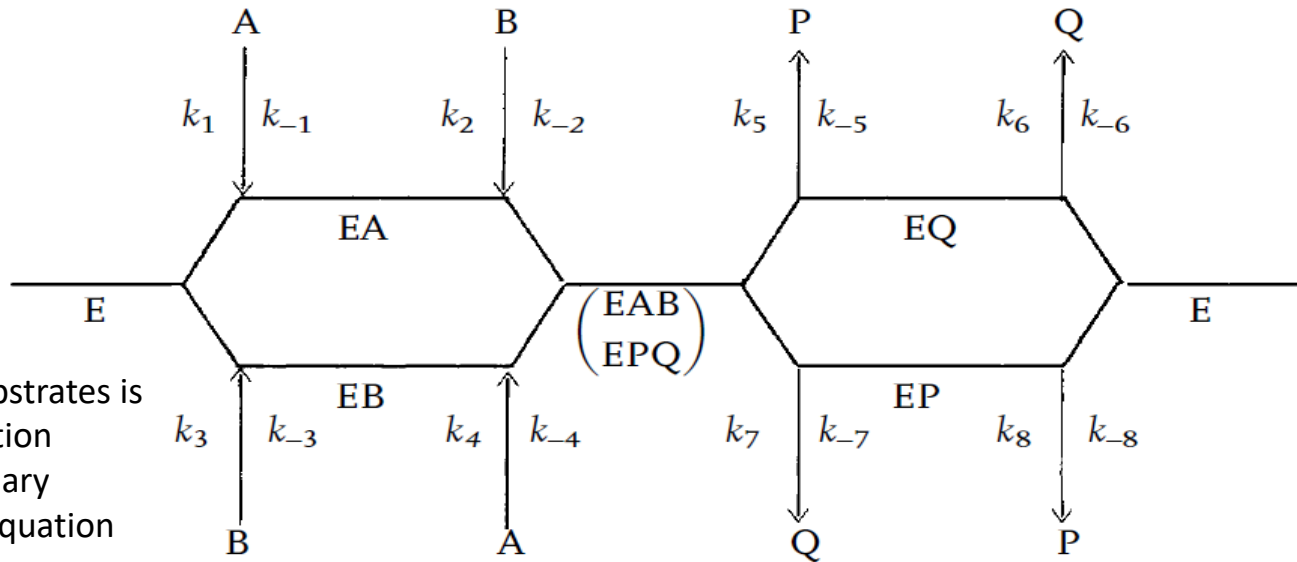
$$\log \left(\frac{V}{K} \right)^{\text{APP}} = \log \left(\frac{V}{K} \right) - \log \left(1 + \frac{H}{K_1} + \frac{K_2}{H} \right) - \log \left(1 + \frac{H}{K_c} + \frac{K_A}{H} \right)$$



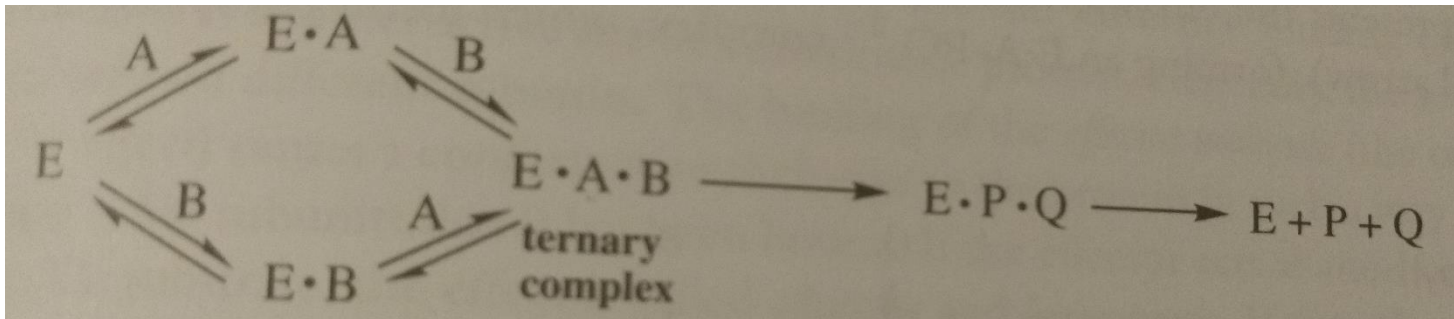
Modelos com mais de um substrato

Mecanismos Sequenciais

Aleatório



If one of the two substrates is kept constant, Equation reduces to the ordinary Michaelis-Menten equation



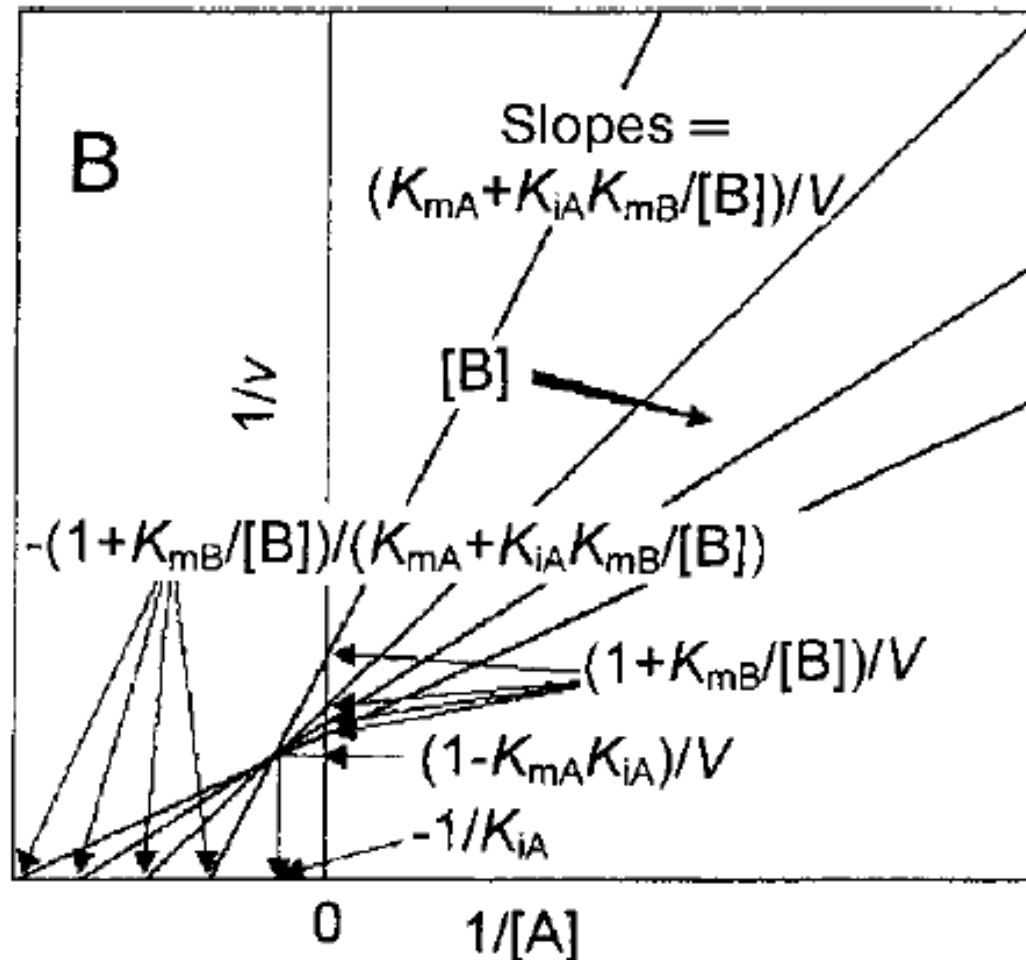
$$v = \frac{V_1[A][B]}{K_{iA}K_{mB} + K_{mB}[A] + K_{mA}[B] + [A][B]}$$



Modelos com mais de um substrato

Mecanismos Sequenciais

Aleatório

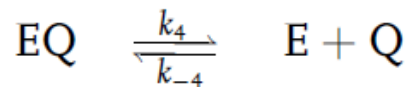
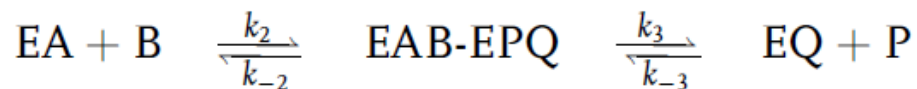
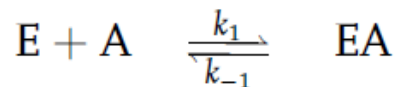


Modelos com mais de um substrato

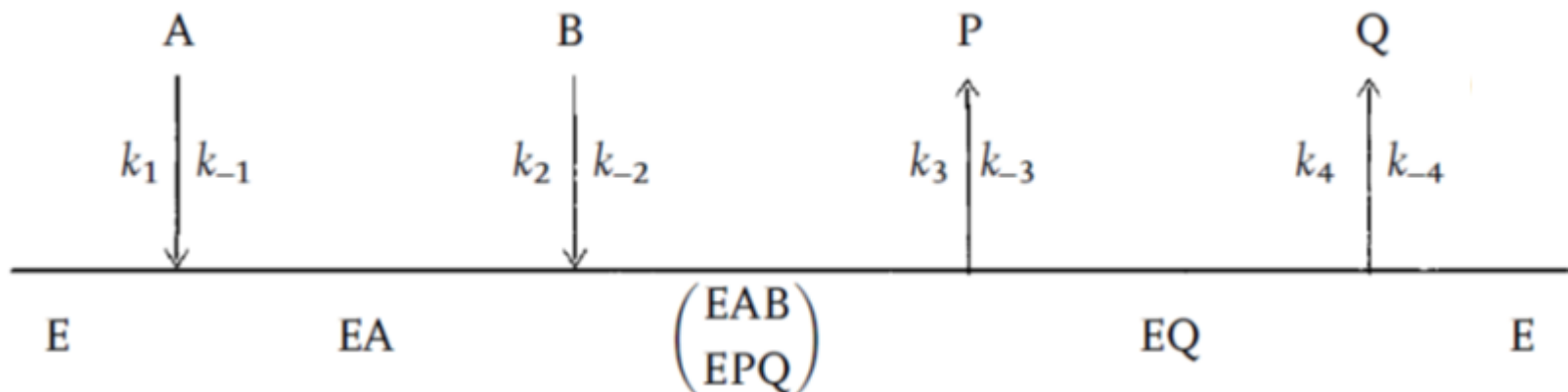
Mecanismos Sequenciais

Ordenado

Exemplos:
Desidrogenases



$$v = \frac{V_1[A][B]}{K_{iA}K_{mB} + K_{mB}[A] + K_{mA}[B] + [A][B]}$$

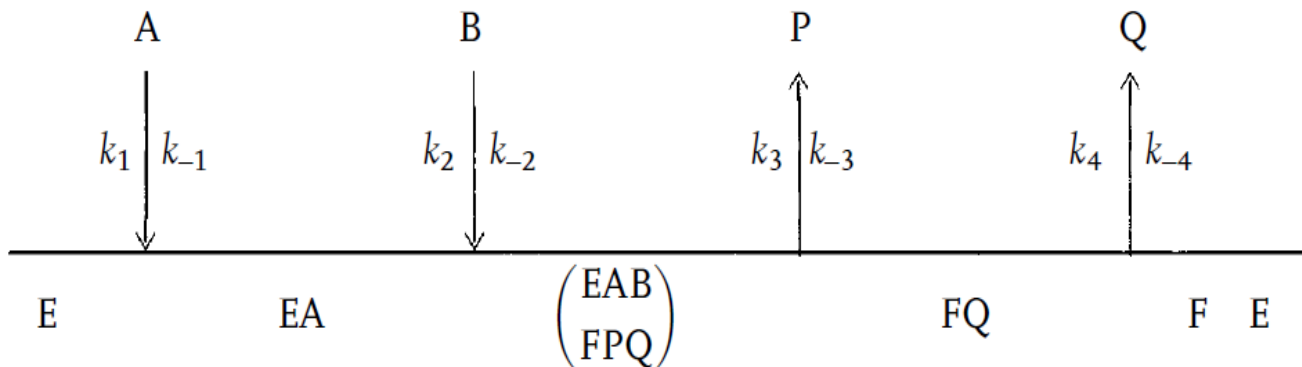
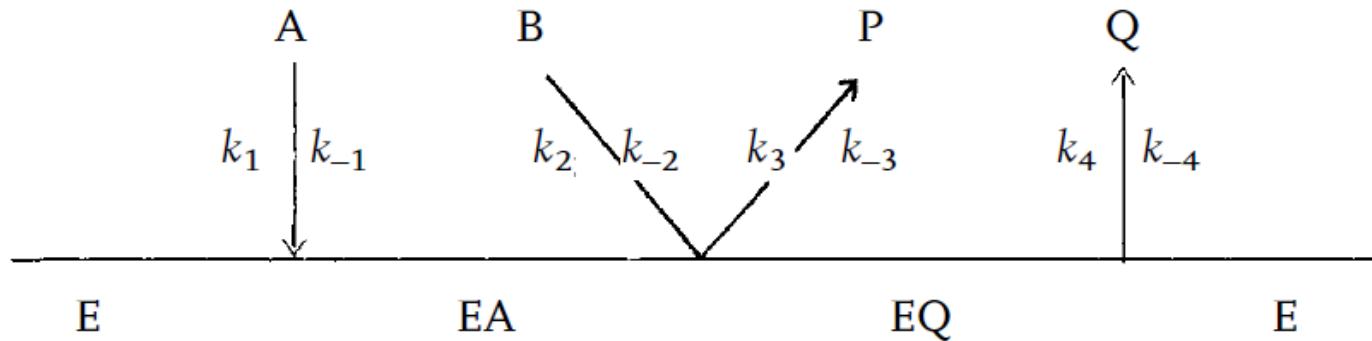


Modelos com mais de um substrato

Mecanismo Theorell-Chance

$$v = \frac{V_1[A][B]}{K_{iA}K_{mB} + K_{mB}[A] + K_{mA}[B] + [A][B]}$$

Exemplos:
Alcool Desidrogenase



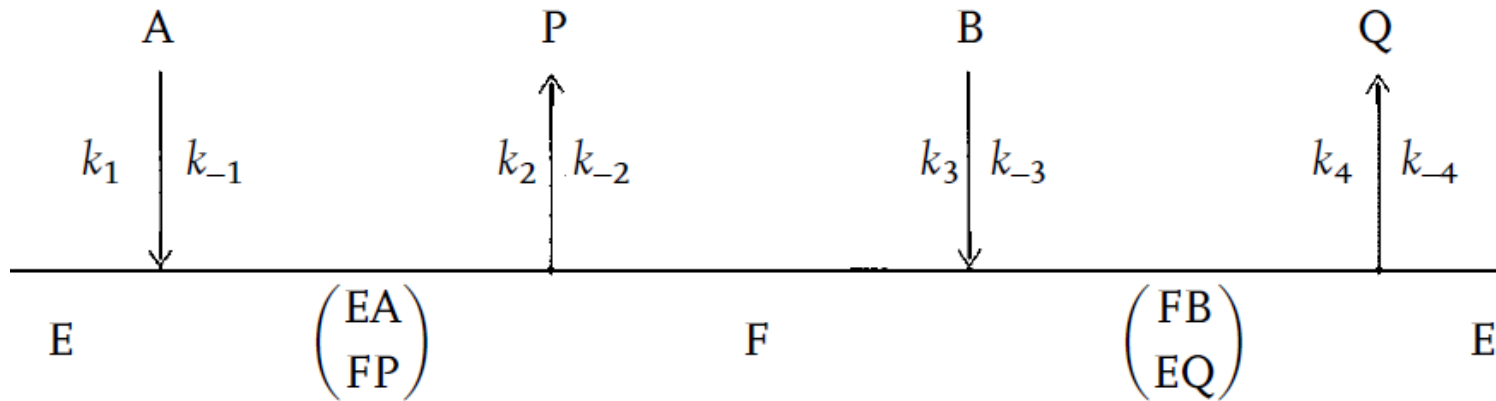
An *iso-ordered mechanism* exists when the enzyme isomerizes in the central complex from EAB to FPQ



Modelos com mais de um substrato

Mecanismo Ping Pong

Exemplos:
Transaminases
Fatty acid synthase



$$v = \frac{V_1 [A][B]}{K_{mB} [A] + K_{mA} [B] + [A][B]}$$

binding constants of substrate or products to the free enzyme are designated as K_{iA} , K_{iB} , K_{iC} . . . , K_{iP} , K_{iQ} , K_{iR} , where 'i' means 'inhibition'.



Modelos com mais de um substrato

Mecanismo Ping Pong

