

Problemas de Enzimologia

Série 4

1. Adicionou-se uma quantidade constante de enzima a uma série de meios de 10 mL com diferentes concentrações de substrato. As velocidades iniciais, representadas na tabela abaixo, são determinadas medindo o número de moles, ou micromoles, de substrato consumido (ou produto produzido) por minuto. Responda às seguintes perguntas sem recorrer a métodos de representação gráfica:

- Qual o valor de V_{\max} para esta concentração de enzima ?
- Estime o valor de K_m para este enzima.
- Mostre se a reacção segue ou não uma cinética Michaeliana.
- Qual a concentração de enzima livre para $[A]=5.0 \times 10^{-3}$?
- Quais as velocidades iniciais para valores de $[A]$ iguais a 1.0×10^{-6} e 1.0×10^{-1} M ?
- Calcule a quantidade total de produto produzida durante os primeiros 5 min de reacção para $[A]=2.0 \times 10^{-3}$ M. Poderia fazer-se o mesmo cálculo para $[A]=2.0 \times 10^{-6}$ M ?
- Suponha que a concentração de enzima em cada mistura era aumentada 4 vezes, qual seria o valor de K_m ? E o de V_{\max} ? Qual seria o valor de v para $[A] = 2.0 \times 10^{-6}$ M ?

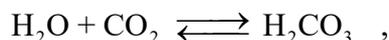
$[A]$ (M)	v ($\mu\text{mol}/\text{min}$)
5.0×10^{-2}	0.25
5.0×10^{-3}	0.25
5.0×10^{-4}	0.25
5.0×10^{-5}	0.20
5.0×10^{-6}	0.071
5.0×10^{-7}	0.0096

2. O K_m de um certo enzima é 1.0×10^{-5} M, sendo o comportamento do sistema Michaeliano. Para uma concentração de substrato de 0.10 M, a velocidade inicial de reacção é de $37 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$ para uma determinada concentração de enzima. No entanto, a mesma velocidade de reacção de $37 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$ é observada quando a concentração de substrato é de 0.010 M.

- Usando a equação de Michaelis-Menten, mostre porque é que a velocidade de reacção não é afectada por uma redução de uma ordem de grandeza na concentração de substrato.
- Calcule v como fracção de V_{\max} para concentrações de substrato de $0.20 K_m$, $0.50 K_m$, $1.0 K_m$, $2.0 K_m$, $4.0 K_m$, $10.0 K_m$
- A partir dos resultados da alínea anterior, esboce um gráfico de v/V_{\max} em função de $[A]/K_m$. Qual será o melhor intervalo de valores de $[A]$ para estudar a dependência de v com $[A]$ ou determinar o valor de K_m ?

3. Pretende-se desenhar um ensaio enzimático de forma a ser pouco sensível a pequenas variações na concentração de substrato. Qual deverá ser o valor de $[A]/K_m$ para que uma variação de 10% na concentração de substrato resulte numa variação de v inferior a 1% ?

4. A anidrase carbónica do eritrócito (M.M. 30000) tem um dos mais altos valores de “turnover” (k_{cat}) que se conhece. A reacção que cataliza é a hidratação reversível do CO_2 :



que é um passo muito importante no transporte do CO_2 dos tecidos para o pulmão. Se 10.0 μg de anidrase carbónica pura catalisarem a hidratação de 0.30 g de CO_2 em 1 minuto a 37 °C e à velocidade máxima V_{max} , qual será o k_{cat} da anidrase carbónica (em unidades de min^{-1}) ?

5. Um enzima michaeliano apresenta os seguintes parâmetros cinéticos: $k_1=5.0 \times 10^7 M^{-1}s^{-1}$, $k_{-1}=2.0 \times 10^4 s^{-1}$, $k_2=4.0 \times 10^2 s^{-1}$. Calcule o K_m (segundo o modelo de Briggs-Haldane) e o K_s para esta reacção. Pode considerar-se que há manutenção de um estado de pré-equilíbrio entre enzima, substrato e complexo enzima-substrato ?

6. Para um determinado conjunto de condições experimentais (pH, temperatura, solução tampão, etc..), verificou-se que uma determinada enzima apresenta um K_m de igual $6.0 \times 10^{-4} M$. Num estudo posterior, dissolveram-se 0.5 μmol de substrato na mesma solução tampão, adicionou-se enzima, e o volume foi preenchido até aos 25 mL:

a) Qual a ordem da reacção ?

b) Se a quantidade de substrato adicionada fosse 0.5 mmol, qual seria a ordem da reacção ?

7. Fez-se um ensaio cinético de uma enzima para uma concentração de substrato igual a $2 \times 10^{-5} M$. Em 6 min, metade do substrato tinha sido consumido. O K_m para este substrato é $5.0 \times 10^{-3} M$. Calcule o valor de V_{max}

8. Num estudo cinético da enzima fumarase de coração de porco, determinaram-se parâmetros para a reacção directa $K_m = 1.7 mM$ e $V_{max} = 0.25 mM s^{-1}$. Para a reacção inversa determinaram-se os parâmetros $K_m = 3.8 mM$ e $V_{max} = 0.11 mM s^{-1}$. Numa amostra de fumarase de proveniência diferente, os parâmetros determinados foram $K_m = 1.6 mM$ e $V_{max} = 0.024 mM s^{-1}$ para a reacção directa e $K_m = 1.2 mM$ e $V_{max} = 0.012 mM s^{-1}$ para a reacção inversa. Comente estes resultados.

9. Um estudo de velocidades iniciais de catálise de uma esterase para uma mistura racémica de substratos mostraram que o enantiómero L era o substrato verdadeiro, consumido totalmente para dar produto, enquanto o enantiómero D podia ser recuperado intacto no final da reacção. Com base nestes resultados, a cinética da reacção foi analisada, assumindo que o enantiómero D não tinha qualquer efeito sobre o enzima, e estimou-se um K_m de 2 mM para o enantiómero L. Estudos posteriores mostraram que o enantiómero D tem efeito sobre a reacção, actuando como inibidor competitivo, com um K_{ic} igual ao K_m . Em face desta última conclusão, qual deveria ser o valor correcto para o K_m inicialmente estimado ?

10. Para uma reacção sujeita a inibição pelo produto, a equação da curva de progressão é dada por

$$k_{cat} [E]_0 t = (1 - K_{mA} / K_{mP}) ([A]_0 - [A]) + K_{mA} (1 + [A]_0 / K_{mP}) \ln ([A]_0 / [A])$$

- a) Verifique que a forma diferenciada desta equação corresponde à equação da inibição pelo produto.
- b) Escreva as expressões para K_m^{app} e V_{max}^{app} e verifique em que condições podem estes valores ser negativos.