

# Aspectos práticos do estudo da cinética enzimática

## Tipos de ensaios de cinéticos

- **Ensaio contínuo:** o progresso da reacção é monitorizado continuamente, de forma automatizada
- **Ensaio descontínuo:** são retiradas amostras da solução, a intervalos de tempo predeterminados, e o progresso da reacção é analisado na amostra

# Técnicas de medição da velocidade inicial

A medição da velocidade inicial requer a monitorização de um sinal que descreve a formação de produto ou consumo de substrato ao longo do tempo.

A maioria dos ensaios enzimáticos baseia-se na monitorização através de uma ou mais das seguintes técnicas:

- Espectroscopia
- Polarimetria
- Decaimento radioactivo
- Separação electroforética
- Cromatografia de separação
- Reactividade imunológica

## Ensaaios directos, indirectos e acoplados

- **Ensaaios directos:** medição directa da quantidade de substrato ou produto como função do tempo.

(*Exemplo:* oxidação do citocromo c pela citocromo c oxidase. A variação do estado de oxidação do ferro hémico é monitorizada pela sua absorção a 550 nm)

- **Ensaaios indirectos:** quando o substrato ou o produto não produzem um sinal adequado à medição das suas concentrações, mas a produção de produto pode ser acoplada a uma segunda reacção, não-enzimática, produzindo um sinal conveniente

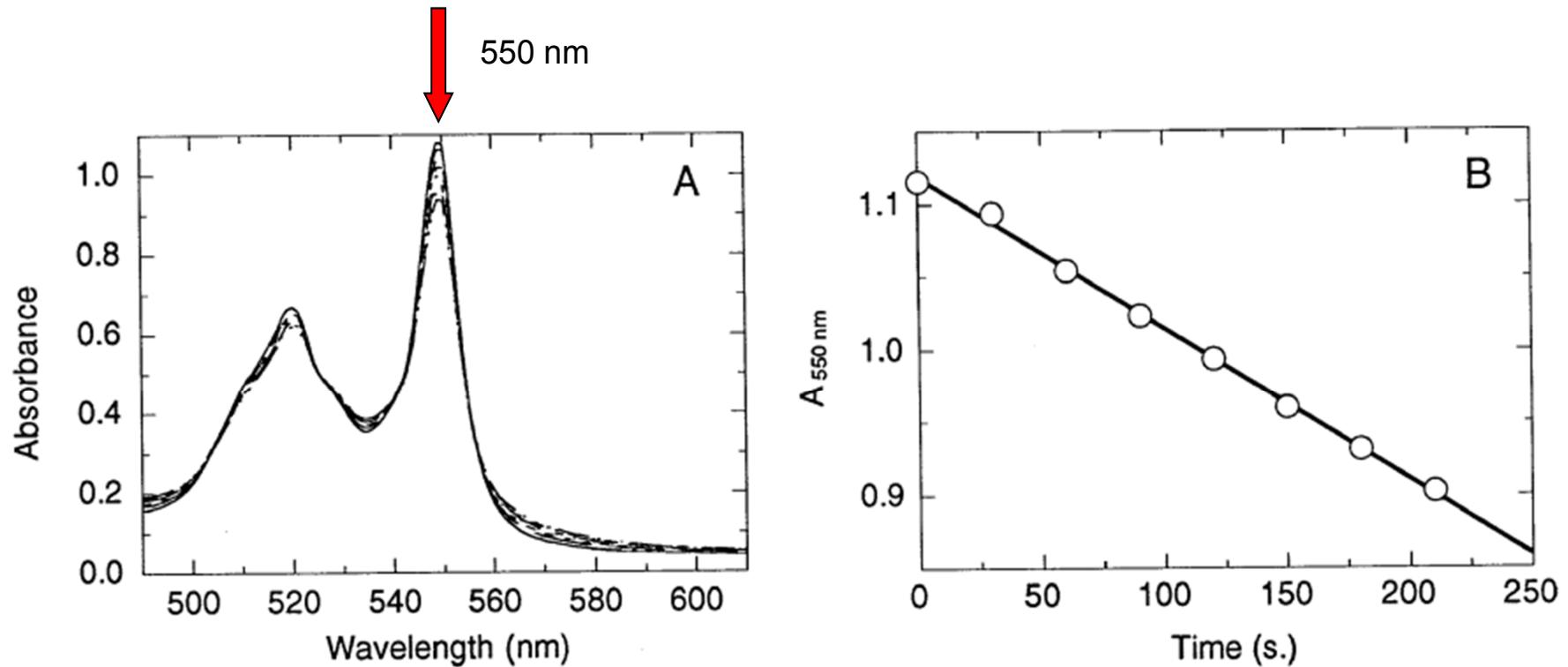
(*Exemplo:* conversão do diidroorotato a ácido orótico pela DHODase na presença de ubiquinona. Os electrões produzidos na reacção convertem a ubiquinona a ubiquinol, e esta última transformação é monitorizada)

- **Ensaaios acoplados:** a reacção de interesse é acoplada a uma segunda reacção enzimática, a qual pode ser convenientemente medida:



(*Exemplo:* medição da actividade da enzima hexocinase, que cataliza a formação de glucose-6-P a partir de glucose e ATP. A G-6-P é o substrato de uma segunda reacção, catalizada pela G-6-P-desidrogenase, em que o NADP<sup>+</sup> é reduzido a NADPH, e a redução deste cofactor pode ser monitorizada espectrofotometricamente a 340 nm)

## Ensaio directo da actividade da citocromo c oxidase



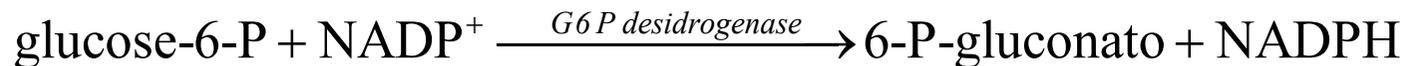
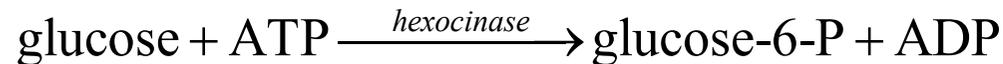
Note-se a relação linear entre absorvência e tempo, resultante do facto de a reacção estar no início (menos de 10% da quantidade inicial de substrato consumido)

## Ensaio acoplados

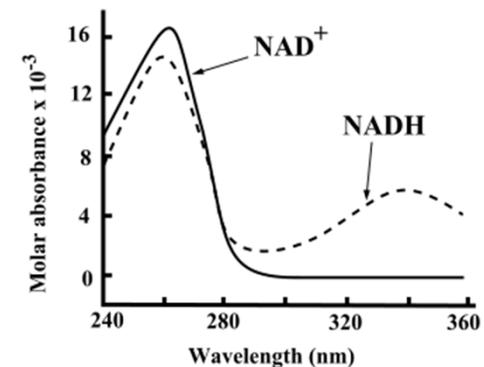


Pretendemos medir a velocidade  $v_1$  de formação do substrato B, mas é a velocidade  $v_2$  de formação de C que conseguimos medir. Assim, precisamos de alcançar uma situação em que  $v_2 = v_1$  ou seja, em que B tenha atingido uma concentração de estado estacionário.

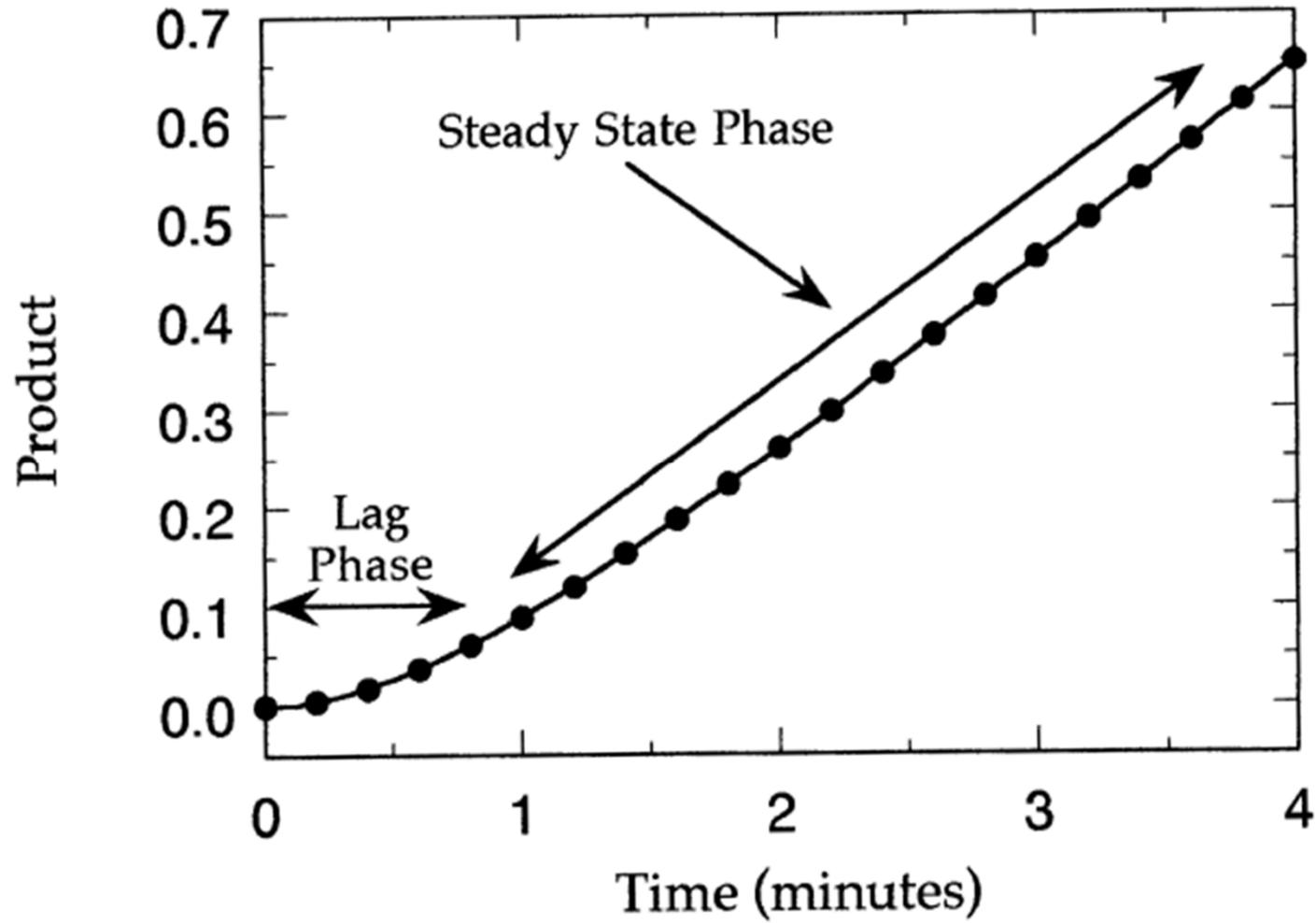
Exemplo:



O estado estacionário de [B] não é alcançado de imediato - existe uma fase *lag* durante a qual o ensaio acoplado conduzirá a estimativas incorrectas da velocidade de reacção.



## Ensaio acoplados: fase *lag* e estado estacionário



## Ensaio acoplados



Se assumirmos  $[B]=cte.$  e que o segundo enzima segue uma cinética Michaeliana, a variação de  $[B]$  com o tempo é dada por:

$$\frac{d[B]}{dt} = v_1 - v_2 = v_1 - \frac{V_{\max}'[B]}{K_m' + [B]}$$

A integração desta equação permite obter uma expressão para o tempo necessário para atingir um determinado valor de  $v_2/v_1$ . Para  $v_2/v_1=0.99$ , tem-se

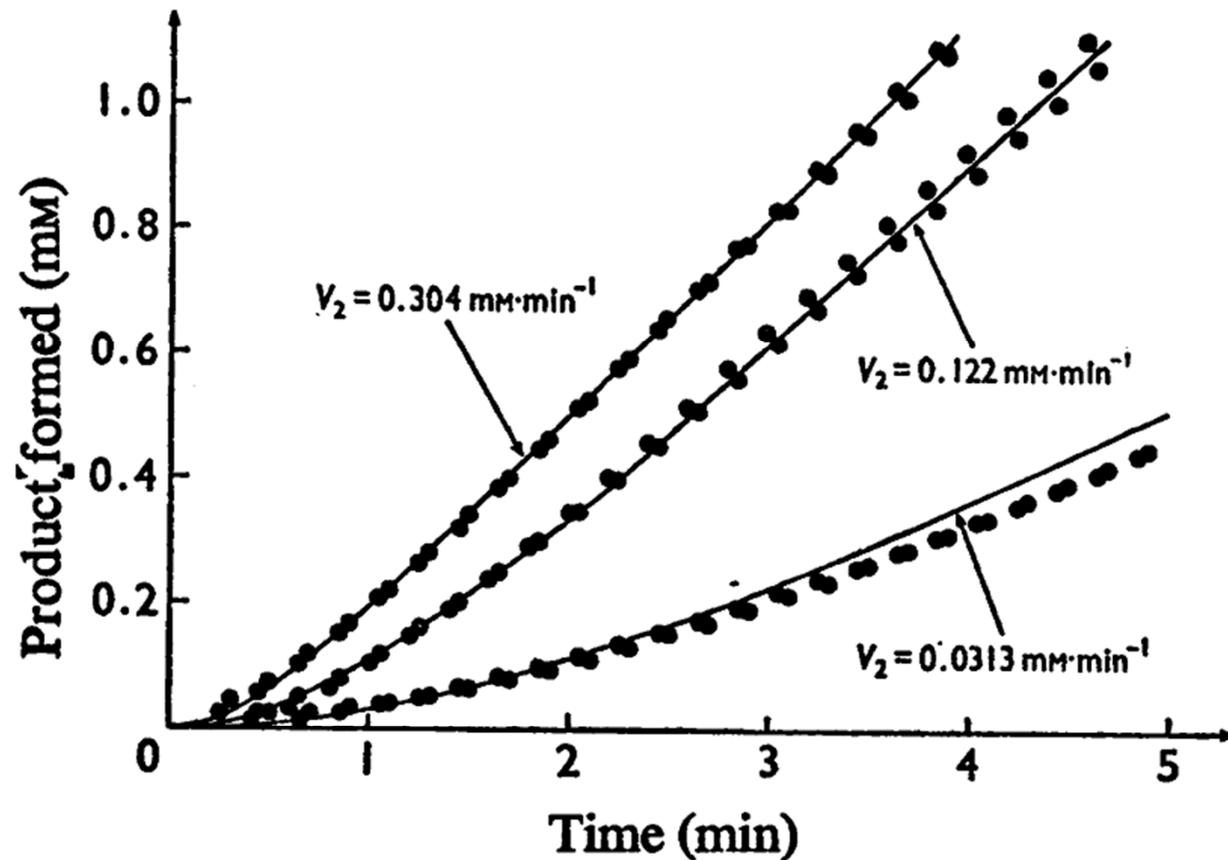
$$t_{99\%} = \frac{\phi K_m'}{v_1}$$

$t_{99\%}$  - tempo para se atingir  $v_2 = 0.99 \cdot v_1$

$K_m'$  -  $K_m$  do segundo enzima

$\phi$  - constante que depende de  $v_1/V_{\max}'$

$v_1/V_2$	$\phi$
0.1	0.54
0.2	1.31
0.3	2.42
0.4	4.12
0.5	6.86
0.6	11.70
0.7	21.40
0.8	45.50
0.9	141.00

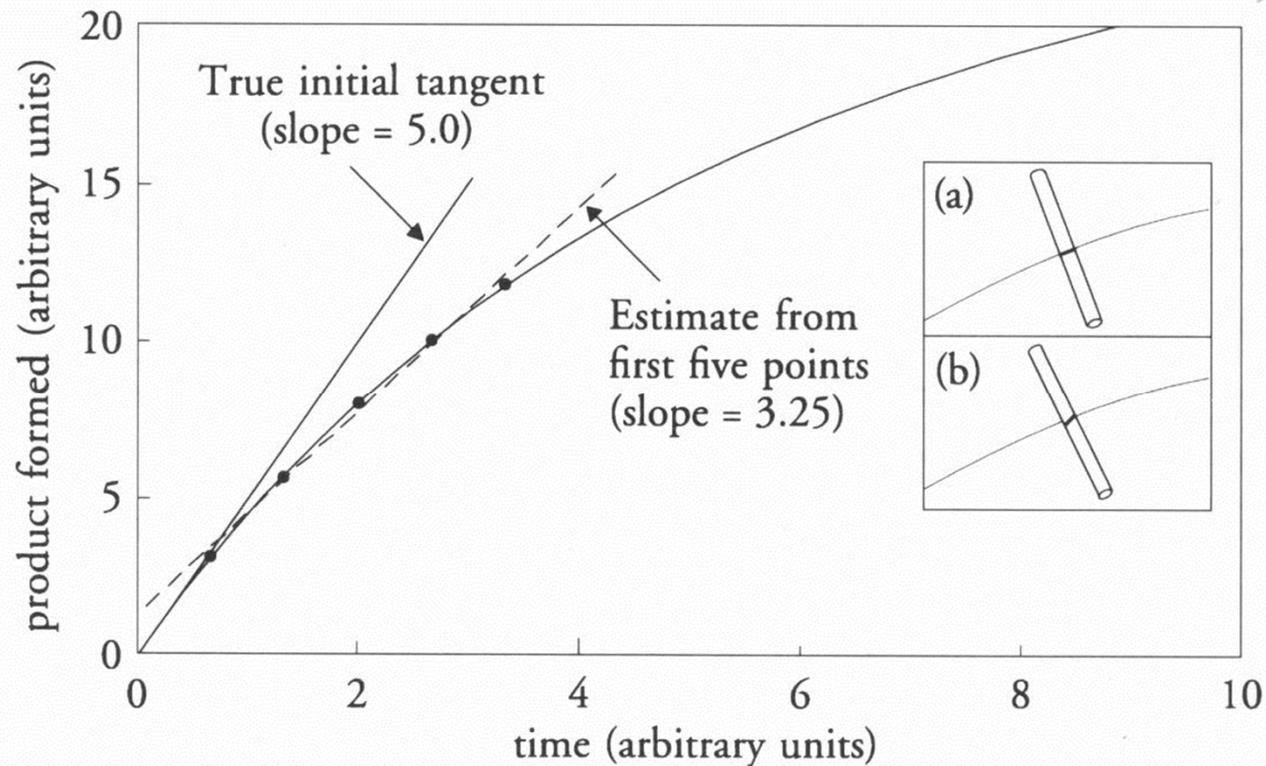


**Fig. 1. Comparison of theory with experimental results for the assay of glucokinase with glucose 6-phosphate dehydrogenase as coupling enzyme**

## Estimativa da velocidade inicial de reacção

Quando o ensaio é feito de maneira a que se complete menos de 1% reacção total é aceitável assumir a linearidade da curva de progresso do produto. No entanto esta situação é mais rara experimentalmente do que se poderia pensar.

Em muitos casos a velocidade inicial pode ser subestimada por assumir erradamente a linearidade na zona inicial da curva.



# Linearidade das curvas de progresso

Os desvios à linearidade ao longo da curva de progresso da reacção são inevitáveis, seja por depleção do substrato, inibição pelo produto, variação das condições do meio, inactivação do enzima, etc...

Uma forma de aumentar o período de linearidade da curva de progresso é aumentar a concentração de substrato.

Por exemplo:

$[A]=5 K_m$  implica que o tempo para consumir 1% de substrato é  $0.34 K_m/V_{max}$

$[A]=10 K_m$  implica que o tempo para consumir 1% de substrato é  $1.11 K_m/V_{max}$

(quase **quatro vezes** superior)

Outra vantagem de trabalhar com concentrações elevadas de substrato é a minimização do erro das velocidades medidas.

Por exemplo:

$[A]=0.1 K_m$  implica que 10% de erro em  $[A]$  produz cerca de **10%** de erro em  $v_i$

$[A]=10 K_m$  implica que 10% de erro em  $[A]$  produz cerca de **1%** de erro em  $v_i$

## Escolha do intervalo de concentrações para o substrato

Assumindo estarmos na presença de um enzima Michaeliano, é necessário encontrar uma gama de valores de concentração de substrato que possam definir  $K_m$  e  $V_{max}$  com precisão aceitável.

- Para definir  $V_{max}$  correctamente será desejável incluir valores de  $[A]$  bastante elevados. No entanto é necessário ter em conta o possível efeito de inibição pelo substrato, e também o custo dos reagentes.

**Na prática:** raramente é justificável o uso de valores de  $[A]$  superiores a  $10 K_m$

- Para a correcta determinação do valor de  $K_m$  necessitamos de valores de  $[A]$  inferiores a  $K_m$ , já que para concentrações baixas a velocidade é proporcional a  $V_{max} / K_m$ . É necessário ter em conta o maior erro associada às medições a baixas concentrações, e o facto de que a hipérbole tem que passar pelo ponto (0,0).

**Na prática:** é costume usar valores mínimos de concentração de cerca de  $0.2 K_m$

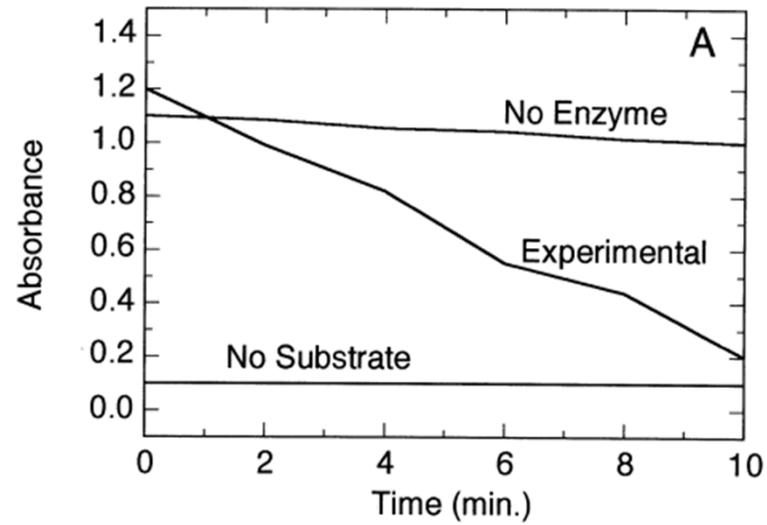
## Uso de controles em ensaios enzimáticos

A actividade medida num ensaio enzimático deve ser sempre comparada com controles em que o substrato e o enzima estão ausentes, para descontar a possível produção de sinal por parte do enzima livre e o efeito da reacção não catalisada.

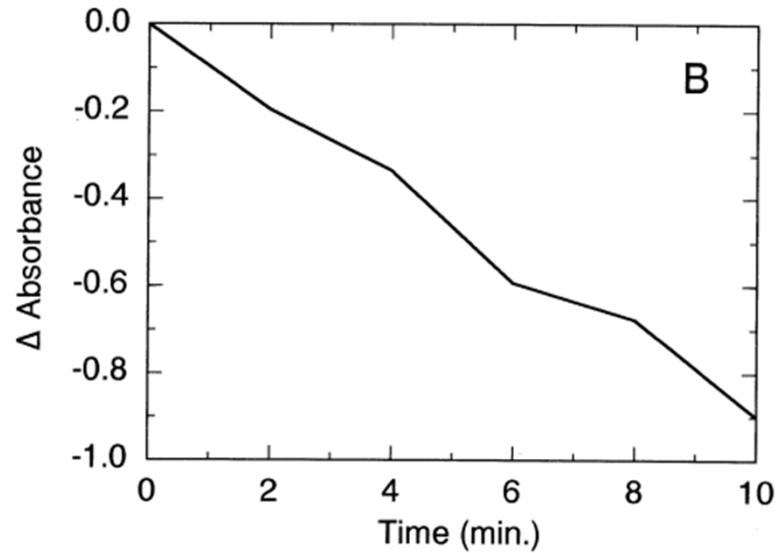
Exemplo de preparação de um ensaio com controles:

Stock Solutions	Volumes Added ( $\mu\text{L}$ )		
	Experimental	No Substrate Control	No Enzyme Control
10 $\times$ Substrate	100	0	100
10 $\times$ Buffer	100	100	100
Distilled water	790	890	800
Enzyme	10	10	0
Total volume	1.0 mL	1.0 mL	1.0 mL

## Resultados de um ensaio com controles



**Medição para as 3 soluções**



**Sinal após subtração dos controles**

# Uso de replicados em ensaios enzimáticos

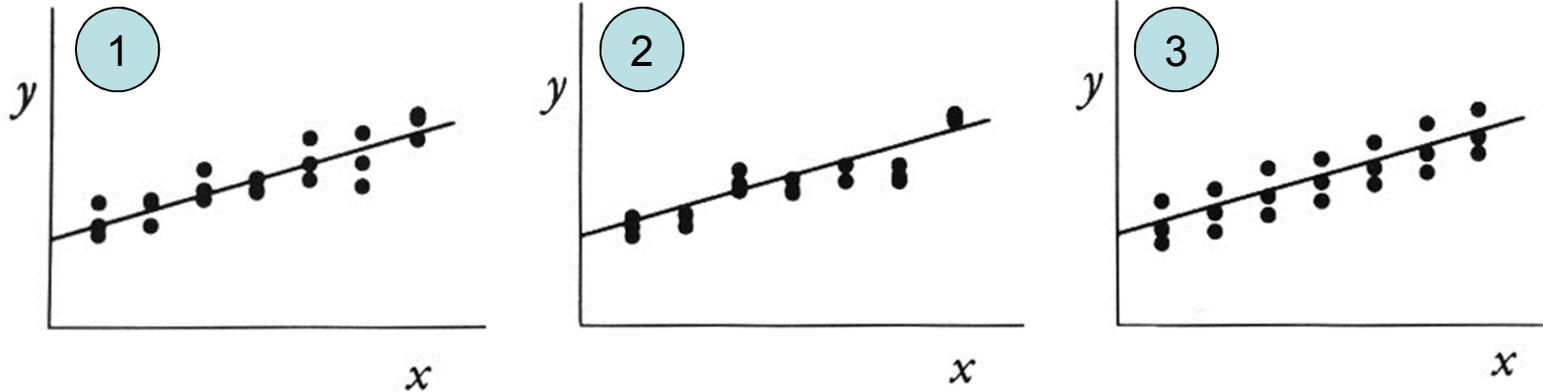
Em qualquer ensaio experimental é observada alguma discrepância entre o modelo que se pretende ajustar e os valores medidos. Esta discrepância pode ter duas origens distintas:

- a) Incapacidade do modelo de descrever o comportamento do sistema
- b) Erros (aleatórios ou sistemáticos) no processo experimental

O uso de *replicados* permite distinguir entre estes 2 tipos de erro. A dispersão dos valores obtidos para os replicados dá uma dimensão do erro intrínseco das observações, o qual não depende do modelo que se pretende ajustar.

A escolha do número de replicados depende essencialmente do número de ensaios que é materialmente possível realizar, do intervalo de concentrações que se pretende cobrir e da complexidade do modelo cinético em estudo.

## Padrões de erro em replicados



- 1 A distribuição do erro dentro de cada grupo de replicados é comparável à distribuição do erro em torno da recta. Este situação é a desejada.
- 2 A dispersão dentro do grupo de replicados é inferior à dispersão em torno da recta. Neste caso os replicados poderão não evidenciar a verdadeira variabilidade e erro associada ao processo experimental.
- 3 A dispersão de erro dentro do grupo é demasiado regular e superior à dispersão em torno da recta. Esta situação faz suspeitar de erro sistemático nas medições e correlação das condições experimentais de cada replicado (replicados tirados em dias diferentes ?).

## Detecção da inactivação do enzima – o teste de Selwin

Sendo muitos enzimas mais estáveis a concentrações elevadas do que a baixas, é frequente observar-se perda de actividade do enzima quando da preparação de soluções mais diluídas a partir de uma solução “stock” inicial.

Este tipo de problema pode conduzir não só a erros no nível total de actividade observada, mas mesmo no seu comportamento, pois os enzimas são frequentemente estabilizados pelos seus substratos, numa extensão proporcional à concentração do substrato – a inactivação do enzima pode produzir comportamento *aparente* não-Michaeliano.

Selwin inventou em 1965 um teste simples para detectar a inactivação do enzima numa amostra.

Se assumirmos que as velocidades medidas são proporcionais à quantidade de enzima, verifica-se a seguinte equação

$$\frac{d[P]}{dt} = [E]_0 f([P])$$

Se integrarmos a equação acima vamos obter

$$[E]_0 t = F([P])$$

# Detecção da inactivação do enzima – o teste de Selwin

$$[E]_0 t = F([P])$$

Note-se que o valor  $[E]_0 t$  após formação de uma quantidade de produto  $[P]$  é simples função de  $[P]$  e *independente de*  $[E]_0$  !

Gráficos de  $[E]_0 t$  em função de  $[P]$  devem ser sobreponíveis para diferentes valores de  $[E]_0$  . Caso não sejam, não pode ser verdadeira a proporcionalidade entre quantidade de enzima presente no meio e velocidade de reacção.

